

**UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”**

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

TESI DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

**Identificazione e Caratterizzazione di Fattori che
Modulano la Funzionalità Piastrinica: Estrogeni,
Hepatocyte Growth Factor e PKC- θ**

**COORDINATORE DEL CORSO
PROF. UMBERTO DIANZANI**

**SUPERVISORE
PROF.SSA F. SINIGAGLIA**

**DOTTORANDA
DOTT.SSA DANIELA PIETRAPIANA**

**XVI CICLO DEL DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE
ANNI 2000-2005**

INDICE

Influenza degli estrogeni sulla risposta piastrinica alla trombinap.3

Riassunto.....	p. 4
Introduzione.....	p. 5
Metodi.....	p. 7
Risultati.....	p.10
Discussione.....	p.22
Bibliografia.....	p.25

Identificazione del recettore Met in piastrine umane: ruolo del “Hepatocyte Growth Factor” nella modulazione dell’attivazione

piastrinicap.30

Riassunto.....	p.31
Introduzione.....	p.32
Metodi.....	p.35
Risultati.....	p.37
Discussione.....	p.43
Bibliografia.....	p.45

PKC- θ regola il differenziamento megacariocitico ed il cambio di forma piastrinico agendo sui microtubuli p.51

Riassunto.....	p.53
Introduzione.....	p.53
Metodi.....	p.65
Risultati.....	p.70
Risultati 1.....	p.71
Discussione 1.....	p.80
Risultati 2.....	p.84
Discussione 2.....	p.98
Bibliografia.....	p.101

INFLUENZA DEGLI ESTROGENI SULLA RISPOSTA PIASTRINICA ALLA TROMBINA

*Effetti non genomici del 17- β -estradiolo in piastrine
umane: potenziamento dell'aggregazione indotta da
trombina attraverso l'azione del recettore β per gli
estrogeni e della cinasi Src*

RIASSUNTO

L'impatto degli estrogeni sul sistema cardiovascolare e la loro abilità nel regolare la funzione piastrinica è una questione controversa. La recente scoperta della presenza del recettore per gli estrogeni nelle piastrine rende queste cellule degli ottimi modelli per lo studio degli effetti non genomici di questo ormone. Nel presente lavoro, è stato investigato il meccanismo di segnalazione del 17β -estradiolo nelle piastrine umane isolate da donatori maschi sani. Il 17β -estradiolo è in grado di causare una rapida fosforilazione delle tirosina chinasi Src e Pyk2, e la formazione di un complesso di segnalazione che comprende Src, Pyk2 e la fosfatidilinositolo 3-chinasi. Entrambe gli eventi dipendono dall'ingaggio del recettore β per gli estrogeni. Abbiamo scoperto che il recettore β per gli estrogeni nelle piastrine umane si trova associato alla membrana, e, a seguito di trattamento con 17β -estradiolo, si verifica l'attivazione di quelle frazioni di Src e di Pyk2 associate alla membrana, ma non di quella citosolica. Al contrario, non è stata rilevata alcuna attivazione della fosfatidilinositolo 3-chinasi nelle piastrine trattate con estrogeni. 17β -estradiolo da solo non induce direttamente alcuna risposta piastrinica, ma è in grado di potenziare fortemente sia l'attivazione della integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, sia l'aggregazione piastrinica indotte da basse concentrazioni di trombina. Questi effetti si sono dimostrati dipendenti dal reclutamento del recettore β per gli estrogeni e sono associati ad un forte effetto sinergico con la trombina sulla attivazione di Src. In conclusione, questi risultati indicano che il 17β -estradiolo è in grado di modulare la funzionalità piastrinica svolgendo un ruolo proaggregante.

INTRODUZIONE

Gli estrogeni ed il sistema cardiovascolare

Gli ormoni steroidei legano recettori nucleari e regolano una moltitudine di processi biologici che comprendono la morfogenesi, la proliferazione cellulare, il differenziamento e l'apoptosi (Beato et al., Mangelsdorf et al.). Di recente è stato scoperto che, oltre a quest'azione classica, gli ormoni steroidei possono anche indurre effetti rapidi, detti anche non-genomici, in vari tipi cellulari (Falkenstein et al.) Questi effetti includono la regolazione della adenil ciclasi, la stimolazione di p21RAS e della mitogen-activated protein kinases (MAPKs), l'attivazione della fosfatidilinositolo 3-chinasi e la mobilizzazione del Ca²⁺ dai depositi intracellulari (Szego et al., Song et al., Simoncini et al., Morley et al., Migliaccio et al., Valera et al., Honda et al., Russell et al.). E' stato inoltre riportato che gli estrogeni sono in grado di influire sul funzionamento del sistema cardiovascolare. Ad esempio, l'ingaggio del recettore per gli estrogeni associato alla membrana causa una rapida stimolazione della ossido nitrico sintasi endoteliale, favorendo la produzione di NO nelle cellule endoteliali (Chen et al., Haynes et al.). Inoltre si è scoperto che gli estrogeni alterano il metabolismo delle lipoproteine plasmatiche, promuovendo da un lato il decremento delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e dall'altro l'incremento delle lipoproteine ad alta densità (HDL) (Walsh et al.).

Effetti degli estrogeni sulla funzionalità piastrinica

Il ruolo degli ormoni steroidei nella regolazione della funzionalità piastrinica è stato per anni oggetto di investigazioni che hanno riportato risultati contrastanti (Elkes et al., Ross et al., Fuster et al., Bar et al., Bouboulas et al., Miller et al., Anwaar et al.). Molte di queste contraddizioni potrebbero essere dovute ai diversi modelli sperimentali presi in analisi. Infatti, mentre alcuni studi sono stati eseguiti su piastrine lavate esposte ad alte concentrazioni di ormoni, altri hanno analizzato la risposta funzionale di piastrine isolate da donatori in trattamento con estrogeni. Inoltre per molti anni il razionale per questo tipo di indagini è stato messo in discussione per la supposta assenza del recettore in queste cellule. Tuttavia di recente sia il recettore α (ER- α) che (ER- β) il β sono stati identificati nelle piastrine circolanti (Khetawath et al., Jayachandran et al.), suggerendo che gli estrogeni potrebbero avere effetti non-genomici in queste cellule anucleate. Le vie di

trasduzione del segnale e le conseguenze fisiologiche dell'attivazione dei recettori α e β nelle piastrine umane non era mai stato investigato precedentemente.

In una moltitudine di linee cellulari, comprese le Cos-7 e le MCF-7, il 17- β -estradiolo (17 β -E2) induce la attivazione della chinasi Src e la sua associazione allo stesso recettore per gli estrogeni (Migliaccio et al., Di Domenico et al.). E' ormai noto che Src attiva una cascata di trasduzione del segnale intracellulare che coinvolge diversi effettori, compresi le MAPK, Pyk2 e PI3-K. Ad esempio la attivazione di determinati geni è mediata dalla attivazione Src-dipendente delle MAPK (Chao et al., Duong et al., Li et al.). Inoltre Src attivata lega e fosforila la tirosina chinasi Pyk2 (Chao et al., Duong et al., Li et al.). Tutti questi elementi che sono coinvolti nell'attivazione cellulare mediata da estrogeni sono presenti nelle piastrine umane. In particolare, queste cellule esprimono livelli molto alti di diverse tirosina kinasi, compresa Src e Pyk2, le quali vengono rapidamente fosforilate in tirosina durante le fasi precoci della aggregazione piastrinica (Raja et al., Canobbio et al.). Inoltre, PI3-K, un enzima molto versatile che catalizza la produzione dei 3-fosfoinositidi e controlla vari eventi cellulari (Kovacovic et al., Zhang et al., Keely et al., Shaw et al.), è stato visto coimmunoprecipitare con Pyk2 nelle piastrine sia resting, ovvero non attivate, che in quelle attivate (Sayed et al.) ed è necessario per la fosforilazione in tirosina indotta da agonisti (Koziak et al.).

Sebbene le piastrine possiedano elevati livelli di chinasi appartenenti alla famiglia di Src (Varshney et al.), in particolare Src, Fyn, Lyn e Yes, il loro ruolo non è stato ancora completamente chiarito. Diverse evidenze dimostrano che la chinasi Src nelle piastrine potrebbe essere strettamente correlata con la regolazione della funzione adesiva dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Infatti Src associa fisicamente con l'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ed è attivata a seguito dell'adesione piastrinica mediata da $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Oberfell et al.). Inoltre la chinasi Src giocherebbe un ruolo importante nella segnalazione "inside-out" indotta da agonisti, che porta al cambio di conformazione dell'integrina verso quello a più alta affinità di legame per il fibrinogeno (Bauer et al., Hers et al.).

Nel presente lavoro, l'effetto del trattamento con dosi acute di estrogeno sulla funzionalità di piastrine ottenute da donatori maschi sani è stato investigato e sono state caratterizzate le vie di trasduzione attivate da ER β , il recettore per gli estrogeni principalmente espresso in queste cellule.

METODI

Preparazione delle piastrine e studi di aggregazione

Campioni di sangue intero sono stati ottenuti da donatori sani, maschi, adulti di 20-40 anni che non hanno assunto farmaci nelle due settimane precedenti. Il prelievo è stato eseguito utilizzando ACD (130 mM acido citrico; 152 mM citrato di sodio; 112 mM glucosio), come anticoagulante. Le piastrine, ottenute tramite gel-filtrazione su una colonna di CL-2B sefaroso come già descritto in precedenza (Torti et al.), sono state portate alla concentrazione di 3×10^8 cellule/ml in HEPES buffer contenente 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 and 2 mM glucosio. I campioni di piastrine (0.4 ml) sono stati preconditionati a 37°C in un lumiaggregometro prima dell'aggiunta di 100 nM $17\beta\text{-E2}$ o trombina (0.02 e 1 U/ml). Le piastrine sono state preincubate per 30 secondi con 100 nM $17\beta\text{-E2}$ prima della stimolazione con trombina. L'inibitore delle tirosina chinasi PP1 (10 μM) è stato aggiunto 15 minuti prima della stimolazione, mentre l'inibitore competitivo del ER, ICI 182,780 (10 μM) è stato aggiunto contemporaneamente al $17\beta\text{-E2}$. L'aggregazione piastrinica è stata monitorata nel tempo come incremento della trasmittanza.

Localizzazione subcellulare di ER β e delle proteine segnale in piastrine trattate con $17\beta\text{-E2}$

Piastrine gel-filtrate sono state trattate con buffer o con 100 nM $17\beta\text{-E2}$ per tempi crescenti, e membrane e citosol sono stati preparati lisando le cellule con digitonina, essenzialmente come descritto da Barry and Gibbins. Aliquote di citosol e della frazione ricca in membrane, contenenti la stessa quantità di proteine totali, sono state separate mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilamide al 8%, trasferite su membrane di PVDF e marcate con anticorpi anti-ER β o anti-caspasi-9. La frazione delle membrane è stata inoltre marcata con anticorpi specifici contro Src, Src fosfo-Tyr416 (pSrc-Tyr416), Pyk2 e p85/PI3-K. Le bande immunoreattive sono state rilevate mediante reazione di chemiluminescenza.

Analisi della fosforilazione di Src indotta da trombina e da $17\beta\text{-E2}$

Campioni di piastrine gel-filtrate sono state incubate con concentrazioni crescenti di $17\beta\text{-E2}$ (1 nM to 1 μM), con 0.02 U/ml trombina, o con 100 nM $17\beta\text{-E2}$ e 0.02 U/ml trombina per tempi che andavano da 15 a 180 secondi, come indicato nelle figure. In alcuni

esperimenti, 10 μM ICI 182,780 è stato aggiunto alla sospensione piastrinica insieme al $17\beta\text{-E2}$. Aliquote di ciascun campione contenenti la stessa quantità di proteine sono state analizzate assieme mediante immunoblotting utilizzando anticorpi anti-pSrc-Tyr416 e anti-Src.

Immunoprecipitazione

Piastrine gel-filtrate, resting o trattate con 100 nM $17\beta\text{-E2}$ (0.4×10^9 cellule/ml), eventualmente pre-incubate a 37°C con 10 μM PP1 o 50 nM wortmannina per 15 minuti, sono state lisate in tampone da immunoprecipitazione 2X (100 mM Tris/HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 % Nonidet P40, 0.5 % sodio deossicolato, 20 % glicerolo, 20 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 20 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina, 2 mM PMSF, 2 mM Na_3VO_4 , 2 mM NaF). Dopo pre-clearing con Proteina A-Sefaroso, i surnatanti sono stati incubati con anticorpi anti-p85/PI3-K o anti-Pyk2 (1 μg) per 2 ore a 4°C , immunoprecipitati con 50 μl di proteina A-Sefaroso per 45 minuti e lavati tre volte con tampone da immunoprecipitazione 1X. Le proteine immunoprecipitate sono state separate mediante SDS-PAGE, trasferite su membrane di PVDF e marcate con anticorpo anti fosfotirosina. In alcuni esperimenti, le membrane sono state strippate e nuovamente marcate con anticorpi anti-p85/PI3-K o anti-Pyk2. Negli esperimenti di coimmunoprecipitazione, le cellule sono state lisate con tampone di lisi al 1% NP-40 (1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 0.4 mM Na_3VO_4 , 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 4 $\mu\text{g/ml}$ pepstatina e 0.1 U/ml aprotinina). Campioni contenenti la stessa quantità di proteine (solitamente 2 mg) sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti-ER β per 1 ora a 4°C in presenza di 50 μl di biglie di proteina A-Sefaroso. Le proteine immunoprecipitate sono state analizzate mediante immunoblotting con anticorpi specifici come descritto sopra.

Analisi dell'attivazione di PI3-K in piastrine trattate con $17\beta\text{-E2}$

I campioni di piastrine sono stati incubati con tampone o con 100 nM $17\beta\text{-E2}$ per 1 minuto, o stimulate con 1U/ml trombina o con 2 μM U46619 per 3 minuti. Aliquote di ciascun campione contenenti la stessa quantità di proteine, sono stati separati mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilamide al 10 %, trasferite su membrana di PVDF e marcate con anticorpi anti-fosfo-Akt-Ser473 o anti-fosfo-Akt-Thr308. In parallelo, analoghe aliquote dei campioni sono state analizzate tramite immunoblotting con l'anticorpo anti Akt.

Misurazione delle concentrazioni intracellulari di Ca²⁺ e cAMP

Il plasma ricco in piastrine è stato incubato con 3 μ M FURA-2/AM a 37°C per 40 minuti prima della gel-filtrazione su Sefaroso CL-2B. Campioni di piastrine preconditionate a 37°C sono stati stimolati con 100 nM 17 β -E2. Le concentrazioni di Ca²⁺ intracellulare sono state misurate in uno spettrofluorimetro, come descritto in precedenza da Sinigaglia et al. Per la misurazione delle concentrazioni di cAMP, campioni contenenti 1 x 10⁸ cellule/ml sono stati incubati a 37°C con 100 nM 17 β -E2 per 30 secondi. Le piastrine sono state lisate ed il contenuto di cAMP è stato valutato mediante l'utilizzo di un kit commerciale.

Misura del legame di PAC-1 mediante citometria a flusso

Il legame di PAC-1 a piastrine gel-filtrate è stato misurato essenzialmente come descritto da Shattil et al., con alcune modifiche. Aliquote di sospensione piastrinica (3 x 10⁸ cellule/ml) sono state stimolate con tampone, 0.02 U/ml o 1 U/ml trombina, 100 nM 17 β -E2, o 100 nM 17 β -E2 per 30 secondi prima dell'aggiunta di 0.02 U/ml o 1U/ml trombina. La stimolazione è stata portata avanti per 10 minuti a 37°C in presenza dell'anticorpo PAC-1 coniugato-FITC (2.5 μ g/ml), e poi fermata aggiungendo 4 volumi di una soluzione al 0.5% di paraformaldeide. In alcuni esperimenti, le cellule sono state preincubate a 37°C con 10 μ M PP1 per 15 minuti prima della stimolazione, o con 10 μ M ICI 182,780. L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita utilizzando un FACScalibur Beckton-Dickinson, acquisendo i dati di 5000 eventi per campione. La significatività delle differenze tra due serie di dati è stata valutata mediante t test di Student.

RISULTATI

Attivazione della chinasi Src in piastrine trattate con 17 β -E2

E' ormai ben noto dalla letteratura il coinvolgimento della chinasi Src nelle vie di trasduzione del segnale attivato da 17 β -E2 in diversi tipi cellulari (Migliaccio et al. 1996, Migliaccio et al. 1998, Di Domenico et al.). Al fine di comprendere i possibili effetti del 17 β -E2 sulle piastrine, abbiamo preso in considerazione l'ipotesi che l'ormone fosse in grado di promuovere l'attivazione della tirosina chinasi Src. Piastrine gel-filtrate sono state incubate con concentrazioni crescenti di 17 β -E2 per 30 secondi. Aliquote identiche di ciascun campione sono state analizzate mediante immunoblotting con un anticorpo fosfo-specifico in grado di riconoscere la forma attivata di Src che comporta la fosforilazione della tirosina in posizione 416 (pSrc-Tyr416). In parallelo, aliquote identiche di ciascun campione sono state analizzate mediante immunoblotting con un anticorpo anti Src, per verificare che in ogni campione fosse presente la stessa quantità di proteine. Figura 1A mostra che il 17 β -E2 determina la fosforilazione sulla Tyr416 in modo dose-dipendente. Poiché la massima attivazione di Src è stata ottenuta a 100 nM 17 β -E2, tale concentrazione è stata utilizzata in tutti gli esperimenti successivi.

In seguito, è stata analizzata la cinetica della attivazione di Src indotta da 17 β -E2. Figura 1B mostra come la fosforilazione di Src sulla Tyr416 promossa dal 17 β -E2 sia rapida e transiente: è massima a 30 secondi, poi rapidamente decresce. La fosforilazione di Src indotta dal 17 β -E2 è risultata essere completamente abolita dalla preincubazione delle piastrine con l'antagonista del ER ICI 182,780 (Figura 1B) dimostrando così che questo effetto è mediato dall'ingaggio del ER piastrinico.

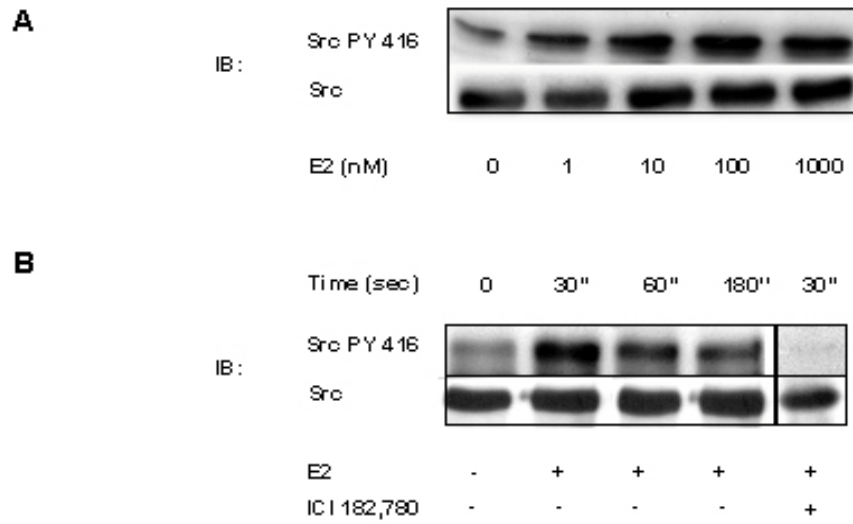


Figura 1

Fig.1. A) Fosforilazione della tirosina 416 di Src indotta dal trattamento con diverse dosi di 17β -E2. B) Cinetica della fosforilazione della tirosina 416 di Src indotta dal trattamento per diversi tempi con 100nM 17β -E2. C) La formazione del complesso è inibita da PP1, l'inibitore di Src, ma non da Wortmannina, l'inibitore di PI3-K.

ER β coordina l'assemblaggio di un complesso di segnalazione dipendente da Src in piastrine trattate con 17 β -E2

Sebbene entrambe i recettori per l'estrogeno, ER α e ER β , siano presenti nelle piastrine umane, ER β sembra essere l'isoforma principalmente espressa in queste cellule (Khetawath et al., Jayachandran et al.). Abbiamo voluto verificare la presenza di una possibile associazione fisica tra ER β e Src in piastrine trattate con 17 β . ER β è stato immunoprecipitato da piastrine resting o trattate con 17 β -E2 e quindi analizzato mediante immunoblotting con anticorpi specifici contro Src o ER β . Figura 2A come effettivamente Src coimmunoprecipiti insieme a ER β solo a seguito di trattamento con estrogeno. Tale associazione infatti non è rilevabile in piastrine resting. La quantità di Src associata a ER β è risultata massima dopo 60 secondi di stimolazione con 17 β -E2 ed in seguito decresce fino quasi ai livelli basali. Il pannello inferiore di Figura 2A dimostra che da ciascun campione sono state immunoprecipitate quantità paragonabili di ER β .

Poiché 17 β -E2 è in grado di indurre l'attivazione di Src, abbiamo quindi cercato di capire se la frazione di Src associata ad ER β in piastrine trattate con 17 β -E2 fosse effettivamente fosforilata sulla Tyr416. Inoltre abbiamo valutato la possibilità che altre proteine di segnalazione, come Syk, Pyk2, FAK, e p85/PI3-K, che notoriamente sono coinvolte sia nella via di segnalazione mediata da estrogeni, sia nell'attivazione piastrinica (Duong et al., Li et al., Kovacsovics et al., Keely et al., Canobbio et al.), potessero essere associate a ER β in piastrine trattate con 17 β -E2. Come illustrato in Figura 2B, non solo pSrc-Tyr416, ma anche Pyk2, e p85/PI3-K coimmunoprecipitano con ER β a seguito di stimolazione delle piastrine con 17 β -E2 per 60 secondi. Al contrario, nè FAK nè Syk sono stati rilevati negli immunoprecipitati di ER β . La formazione di questo complesso di segnalazione è risultato essere rapido e transiente, il complesso è risultato infatti già completamente disassemblato dopo soli 180 secondi dalla stimolazione. La preincubazione delle piastrine con l'inibitore della chinasi Src, PP1, prima della stimolazione con 17 β -E2, inibisce completamente l'associazione di Src, Pyk2 e p85/PI3-K con ER β (Figura 2C), indicando che la formazione di questo complesso di segnalazione richiede l'attivazione di Src. In contrasto, l'associazione di Src, Pyk2 e p85/PI3-K con ER β non viene alterata dal trattamento con wortmannina, l'inibitore della PI3-K (Figura 2C).

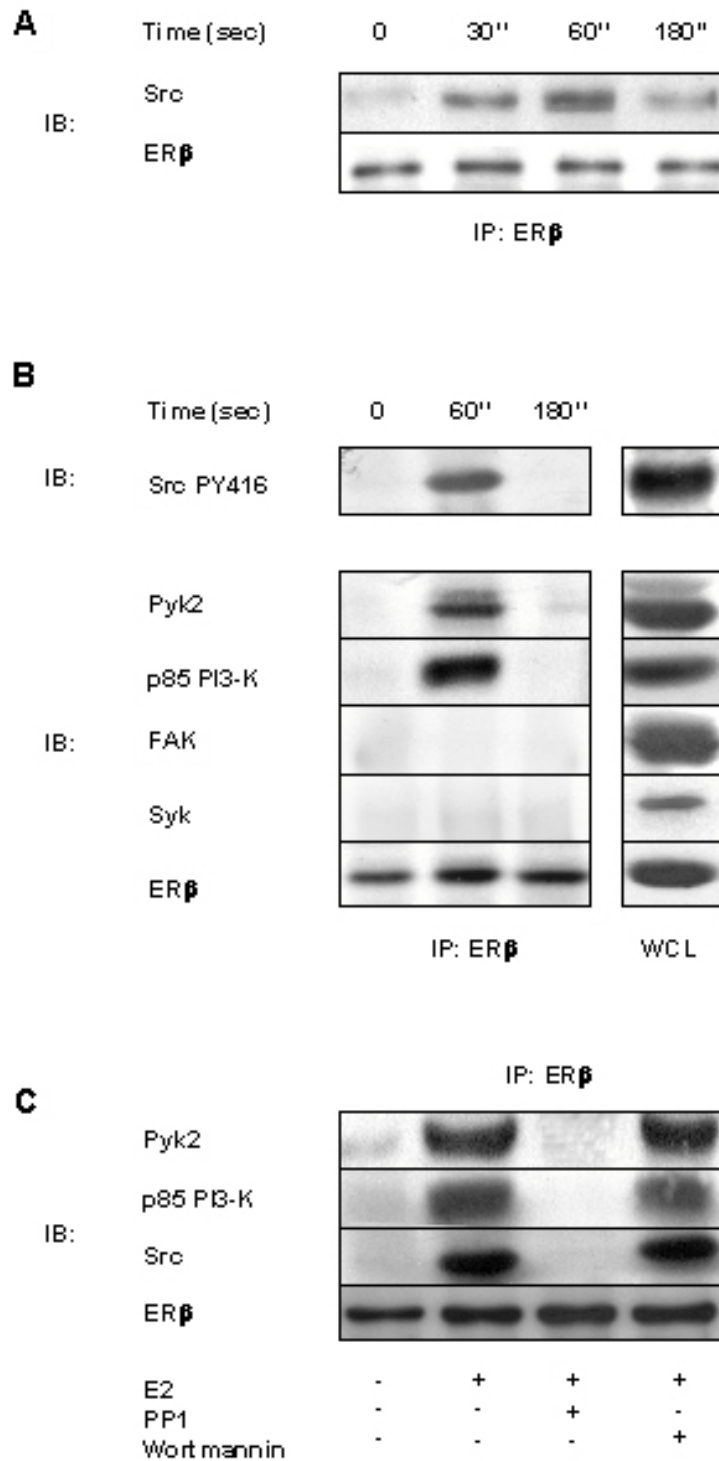


Figura 2

Fig.2. A) Cinetica dell'associazione di Src con ER-β indotta dal 17β-E2. B) Associazione transiente di Pyk2, p85 e Src con ER-β indotta dal 17β-E2; WCL (Whole Cell Lysate) sono i lisati cellulari interi.

Rilocalizzazione subcellulare di ER β , Src, p85/PI3-K e Pyk2 mediata da 17 β -E2

La localizzazione subcellulare di ER β nelle piastrine umane trattate con 17 β -E2 è stata analizzata mediante immunoblotting a seguito del frazionamento delle piastrine in una frazione ricca di membrane (MR) ed una frazione citosolica (CYT). Come osservabile in Figura 3A, ER β è stato rilevato esclusivamente nella frazione ricca di membrane ma non nel citosol, sia in piastrine resting, sia in piastrine trattate con 17 β -E2. Come atteso, la caspasi-9 è stata rilevata esclusivamente nella frazione citosolica. Quindi, ER β nelle piastrine umane è localizzato sulla membrana e non subisce rilocalizzazione a seguito del trattamento con 17 β -E2.

La frazione ricca di membrane è stata ulteriormente analizzata per indagare la localizzazione e/o la possibile rilocalizzazione subcellulare delle proteine segnale reclutate ER β a seguito del trattamento delle piastrine con 17 β -E2. Figura 3B dimostra che nelle membrane di piastrine sia resting che trattate con 17 β -E2 sono presenti identiche quantità di Src. Tuttavia il trattamento con 17 β -E2 era in grado di incrementare rapidamente e transientemente la fosforilazione di Src sulla Tyr416 della frazione associata alla membrana. Inoltre la Figura 3B mostra che il 17 β -E2 determina una traslocazione della chinasi Pyk2 sulla membrana piastrinica, transiente ma significativa. Al contrario, sono state rilevate quantità identiche di p85/PI3-K in tutte le frazioni di membrane analizzate, suggerendo una diversa rilocalizzazione tra p85/PI3-K e Pyk2 nelle piastrine umane trattate con estrogeni.

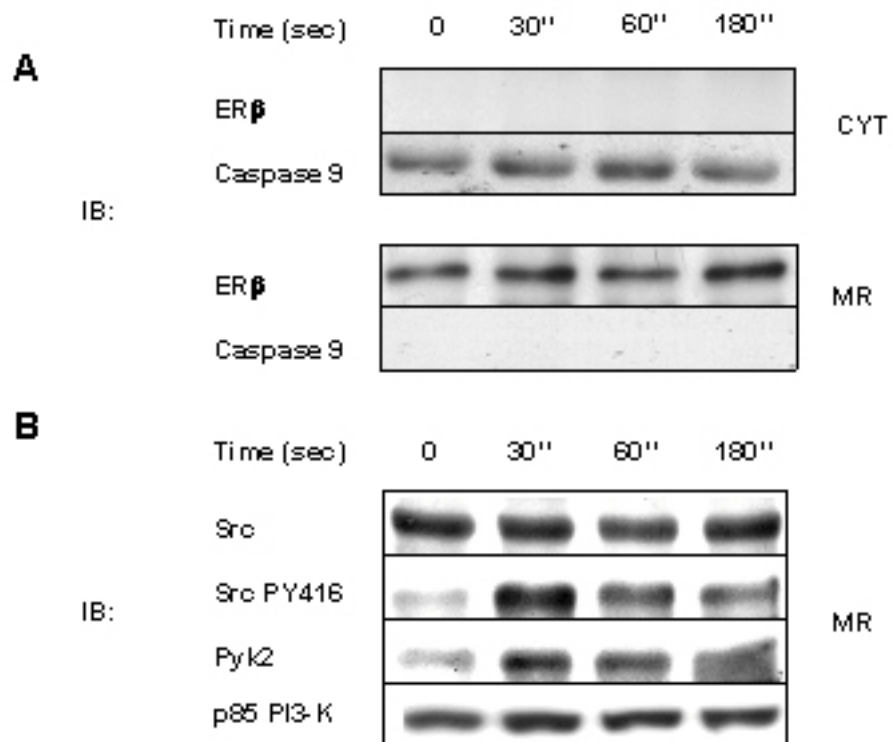


Figura 3

Fig.3. Localizzazione subcellulare di ER- β , Src, Pyk2 e p85 in piastrine trattate per diversi tempi con 17 β -E2. A) ER- β è localizzato nella frazione ricca in membrane (MR) ed è assente in quella citosolica (CYT); l'assenza della Caspasi 9, un enzima citosolico, nella frazione MR indica che non visono state contaminazioni fra le due frazioni subcellulari. B) Cinetica della localizzazione in membrana di Src, Pyk2, p85 e fosforilazione della tirosina 416 della frazione di Src associata alla membrana.

17 β -E2 determina, attraverso Src, la fosforilazione in tirosina di Pyk2 ma non di p85/PI3-K

Allo scopo di meglio caratterizzare il coinvolgimento di Pyk2 e p85/PI3-K nel signalling dipendente da ER β nelle piastrine umane, è stata analizzata la fosforilazione in tirosina di queste proteine in piastrine trattate con 17 β -E2. Entrambe Pyk2 e p85/PI3-K sono state immunoprecipitate da lisati piastrinici, analizzate con immunoblotting, utilizzando prima anticorpi anti fosfo tirosina e successivamente anticorpi anti Pyk2 o anti p85/PI3-K. Figura 4A mostra come 17 β -E2 sia in grado di causare una sostenuta fosforilazione in tirosina di Pyk2, la quale persiste anche a 180 secondi dalla stimolazione. Preincubando le piastrine con l'inibitore della chinasi Src, PP1, si previene completamente la fosforilazione in tirosina di Pyk2 indotta da 17 β -E2. Al contrario, non sono state rilevate bande di fosforilazione in tirosina intorno al peso molecolare di 85 kDa, corrispondente alla subunità regolatoria di p85/PI3-K, negli immunoprecipitati di p85/PI3-K (Figura 4B). Per verificare l'effettivo stato di attivazione di PI3-K in piastrine trattate con 17 β -E2, nonostante la mancata fosforilazione in tirosina della subunità regolatoria p85, è stata indagata la eventuale fosforilazione di Akt, un noto effettore a valle di PI3-K (Vanhaesebroeck et al.), indotta da estrogeno mediante immunoblotting con anticorpi anti fosfospecifici di Akt (fosfo-Ser473 o fosfo-Thr308). Figura 4C mostra che, come atteso, Akt viene fortemente fosforilata in risposta alla trombina o all'analogo del trombossano A₂, U46619. Al contrario, nelle piastrine stimolate con il solo 17 β -E2 è stata rilevata solo una leggera e trascurabile fosforilazione di Akt, indicando che le vie di traduzione innescate dagli estrogeni nelle piastrine umane non passano principalmente attraverso PI3-K.

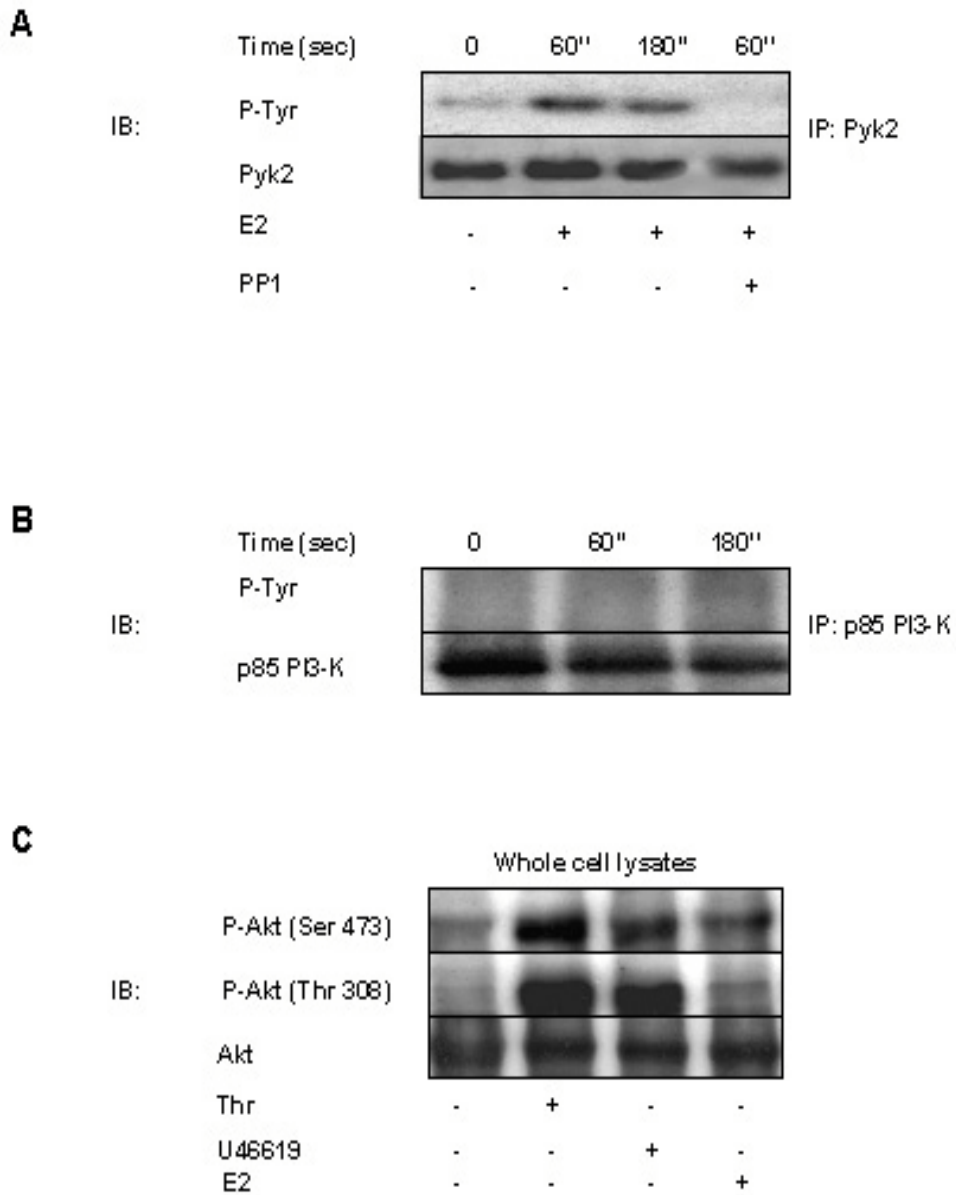


Figura 4

Fig.4. A) La fosforilazione transiente di Pyk2 indotta da 17 β -E2 è inibita da PP1, l'inibitore di Src. B) Il 17 β -E2 non induce la fosforilazione in tirosina della subunità p85 della PI3-K e C) determina solo una lieve fosforilazione di Akt, un effettore a valle di PI3-K

17 β -E2 potenzia l'aggregazione piastrinica indotta da trombina e l'attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$

In seguito abbiamo cercato di capire se l'attivazione di Src indotta dal 17 β -E2 e la formazione del complesso di segnalazione potessero in qualche modo risultare in una risposta funzionale delle piastrine. I primi dati da noi ottenuti indicavano che il trattamento di piastrine gel-filtrate con 17 β -E2 non era in grado di determinare alcuna aggregazione o di alterare i livelli intracellulari di secondi messaggeri il Ca²⁺ o cAMP (dati non riportati). Abbiamo quindi preso in considerazione la possibilità che il 17 β -E2 possa influenzare l'aggregazione piastrinica indotta da agonisti classici come la trombina. Campioni di piastrine gel-filtrate sono stati trattati con 17 β -E2 per 30 secondi e poi stimolati con alte (1 U/ml) o basse (0.02 U/ml) dosi di trombina. Il pretrattamento con 17 β -E2 non ha alcun effetto sull'aggregazione indotta da concentrazioni di trombina sufficientemente alte da determinare una aggregazione massimale (dati non riportati). Al contrario, il pretrattamento delle piastrine con 17 β -E2 risulta in un forte potenziamento dell'aggregazione piastrinica indotta da basse dosi di trombina. Infatti, come riportato nei tracciati di Figura 5A, la stimolazione delle piastrine con la sola trombina (0.02 U/ml) è in grado di indurre il 31.2 \pm 10.8% di aggregazione (n=4). Invece a seguito di pretrattamento con 17 β -E2, l'aggregazione indotta da trombina aumenta fino al 55.3 \pm 10.6% (n=4). Quindi il 17 β -E2 potenzia l'aggregazione indotta da basse dosi di trombina del 73.7% (p=0.008, n=4). Poiché viene bloccato da ICI 182,780, tale potenziamento è mediato dall'azione del ER (Figura 5A). Inoltre la preincubazione con PP1 è in grado di prevenire completamente l'aggregazione indotta da trombina, sia in presenza che in assenza 17 β -E2. Questo dato è indicativo del ruolo essenziale svolto dalla chinasi Src nella risposta piastrinica alla trombina.

L'aggregazione piastrinica è supportata dall'attivazione, indotta da agonisti, dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e dal conseguente legame con il fibrinogeno (Shattil et al.). Per cercare di capire il meccanismo attraverso il quale 17 β -E2 potenzia l'aggregazione indotta da basse dosi di trombina, abbiamo esaminato il processo di segnalazione "inside-out" che porta alla regolazione dell'affinità dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ per il fibrinogeno. L'attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ nelle piastrine stimolate è stata misurata mediante citofluorimetria utilizzando un anticorpo monoclonale mimetico del fibrinogeno, FITC-PAC-1. I risultati di sette diversi esperimenti sono riportati in Figura 5B. In maniera concorde con la sua incapacità di promuovere l'aggregazione piastrinica, il 17 β -E2 da solo non è in grado di indurre

l'attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. La stimolazione delle piastrine con 0.02 U/ml di trombina è in grado di indurre un incremento molto piccolo del legame di PAC-1 rispetto alle piastrine non stimolate, ma tale incremento è in grado di supportare un'aggregazione piastrinica parziale. Tuttavia la preincubazione con 17 β -E2, induce un forte e significativo incremento del legame di PAC-1 alle piastrine stimolate con 0.02 U/ml di trombina. Se paragonato con la risposta determinata dalla sola trombina, il pretrattamento con 17 β -E2 è in grado di causare un incremento di 2.3 volte la fluorescenza legata alle piastrine ($p < 0.005$, $n=7$). L'effetto potenziante del 17 β -E2 sulla segnalazione "inside-out" dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ si è scoperto essere mediato dal reclutamento del ER e coinvolge la attivazione di una Src chinasi, poiché esso reverte completamente incubando le piastrine sia con ICI 182,780 che con PP1.

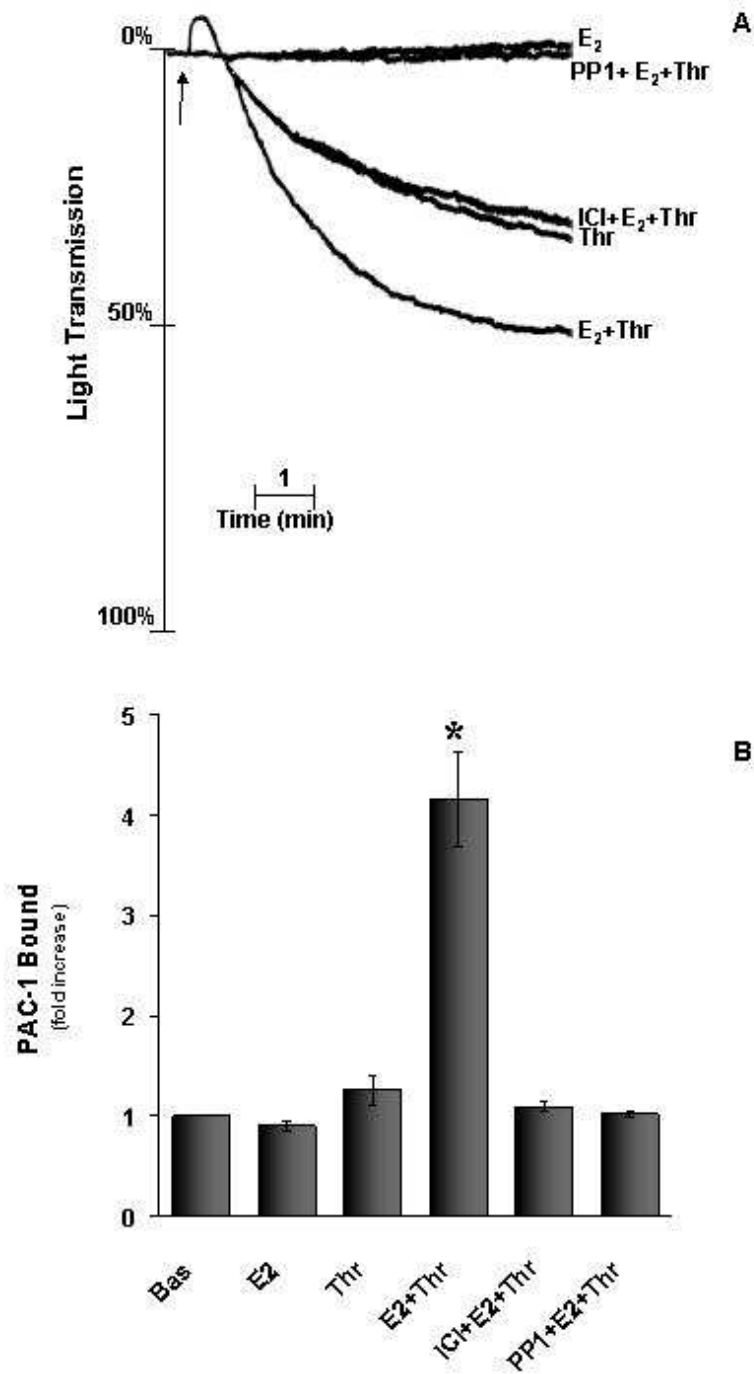


Figura 5

Fig.5. A) Potenziamento dell'aggregazione da basse dosi di trombina (0.2 U/ml) indotta da 17β -E₂; i tracciati di aggregometria riportati sono rappresentativi di altri 4 esperimenti. B) Il potenziamento dell'attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ indotta da basse dosi di trombina è inibito dall'inibitore del recettore per gli estrogeni; gli istogrammi rappresentano le intensità di fluorescenza delle cellule trattate con PAC-1-FITC, l'anticorpo che riconosce la forma attiva dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

17 β -E2 e trombina inducono l'attivazione sinergica di Src

Per correlare ulteriormente la capacità del 17 β -E2 di attivare Src attraverso la sua fosforilazione sulla Tyr416 e di potenziare l'aggregazione indotta da trombina, è stato analizzato l'effetto combinato del trattamento delle piastrine con 17 β -E2 e basse concentrazioni di trombina sulla fosforilazione di Src sulla Tyr416. Figura 6 mette in relazione le cinetiche dell'attivazione di Src indotte da 100 nM 17 β -E2 e 0.02 U/ml trombina. In accordo con i risultati riportati in Figura 1B, il 17 β -E2 induce una rapida e transiente fosforilazione in tirosina di Src, che risulta essere massima dopo 30 secondi. Invece, nelle piastrine stimolate con trombina, la fosforilazione in tirosina di Src dopo 30 secondi è ancora difficilmente rilevabile ma diventa chiaramente visibile a 60 secondi (Figura 6). Quando le piastrine sono trattate con entrambe 17 β -E2 e trombina, si osserva una forte fosforilazione di Src sulla Tyr416 già a 15 secondi che si incrementa fino a 60 secondi. Questa evidenza indica che 17 β -E2 e trombina insieme svolgono un ruolo sinergico sulla fosforilazione di Src, che risulta in un'attivazione di questa chinasi più rapida e più forte.

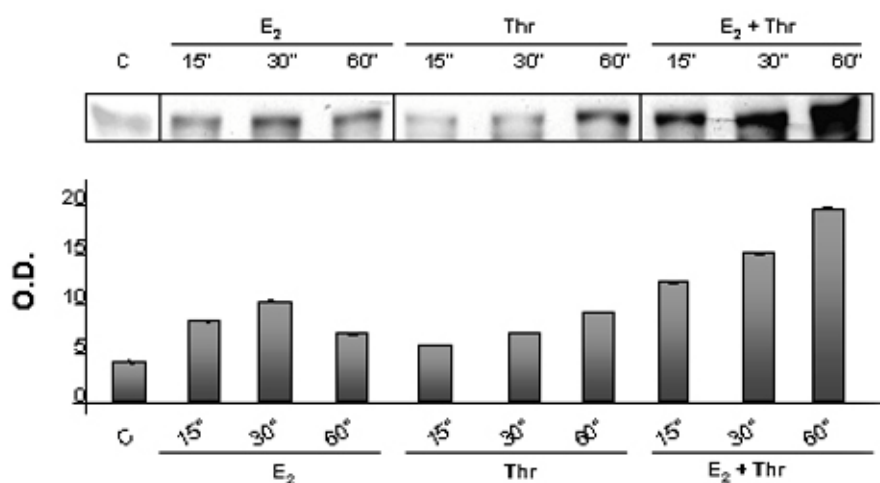


Figura 6

Fig.6. Effetto sinergico di trombina e 17 β -E2 sulla fosforilazione della tirosina 416 di Src. Gli istogrammi sono le medie delle densità ottiche delle bande riportate sopra le quali sono rappresentative di diversi esperimenti eseguiti a queste condizioni.

DISCUSSIONE

Nel presente lavoro abbiamo dimostrato come l'attivazione di Src ed il potenziamento dell'aggregazione indotta da trombina in piastrine trattate con 17β -E2, sia dipendente dall'ingaggio di un recettore per gli estrogeni. Inoltre abbiamo trovato che il ER β associa con Src, Pyk2 e p85/PI3-K in maniera dipendente dal 17β -E2. Inoltre ER β sembra essere il recettore responsabile degli effetti del 17β -E2 nelle piastrine umane. Questa conclusione è supportata dall'evidenza che ER β è effettivamente il principale recettore per gli estrogeni espresso in queste cellule. L'evidenza immunologica dell'espressione di ER α nelle piastrine, recentemente pubblicata da Jayachandran e colleghi, non è stata confermata da altri studi successivi in cui gli autori non sono riusciti a rilevare la presenza né della proteina né del messaggero. Nel presente lavoro, quantità significative di ER β sono state chiaramente rilevate nella frazione delle membrane in piastrine umane, ma non siamo riusciti, alle stesse condizioni, a rilevare la presenza di ER α , sia nella frazione delle membrane che in quella del citosol (dati non riportati). E' ben noto dalla letteratura che ER α e ER β hanno diversi pattern di distribuzione (Gustafsson et al.). Sebbene ER α e ER β medino sia gli effetti genomici che non genomici degli estrogeni, essi manifestano diverse caratteristiche e svolgono funzioni differenti. A questo proposito, sono state documentate delle differenze meccanicistiche nell'attivazione dell'espressione genica mediata da ER α e ER β (Coleman et al.). Inoltre, è stato riportato che ER α , ma non ER β , associa PI3-K in cellule endoteliali (Simoncini e al.) e nello sperma umano (Aquila et al.), come parte della via di segnalazione per l'azione non genomica degli estrogeni. In questo lavoro è stato dimostrato che, in piastrine umane, ER β associa con PI3-K in maniera dipendente dal 17β -E2. Tuttavia questa interazione risulta solo in una modesta attivazione della chinasi, come evidenziato dalla debole fosforilazione di Akt in piastrine trattate con estrogeni. Questo potrebbe suggerire che l'attivazione di PI3-K indotta dagli estrogeni sia promossa in modo più efficiente dal reclutamento di ER α piuttosto che di ER β . In ogni caso, la mancanza di una massiccia attivazione di PI3-K non preclude la possibilità che questa chinasi svolga un ruolo importante nella via di segnalazione iniziata dagli estrogeni; infatti, come noto, questo enzima può funzionare anche come proteina di ancoraggio. A questo proposito è interessante notare che un ruolo simile per la PI3-K è stato già descritto in uno studio su piastrine stimulate con fattore di von Willebrand (Wu et al.), in cui PI3-K funziona come

proteina di ancoraggio nella formazione di un complesso di segnalazione macromolecolare.

Abbiamo anche scoperto che, in aggiunta a Src, il reclutamento di ER β da parte del 17 β -E2 stimola la fosforilazione in tirosina di Pyk2. Mentre la fosforilazione indotta da estrogeni di Src è rapida e transiente, quella di Pyk2 è più sostenuta e persiste oltre i 3 minuti. Sebbene Pyk2 sia attivata durante le prime fasi della stimolazione piastrinica da diversi agonisti, il suo ruolo esatto nella funzionalità piastrinica è ancora sconosciuto (Canobbio et al.). In base agli esperimenti eseguiti con inibitori specifici, Pyk2 si troverebbe a valle di Src nella via di segnalazione mediata da estrogeni che porta al potenziamento della aggregazione piastrinica. Tuttavia in assenza di inibitori specifici per Pyk2 il suo esatto contributo sugli effetti degli estrogeni rimane ancora da stabilire.

Con il nostro studio abbiamo dimostrato che il potenziamento mediato dal 17 β -E2 dell'aggregazione piastrinica indotta da basse concentrazioni di trombina ha come effetto un robusto incremento della affinità dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ per il fibrinogeno. Abbiamo anche visto come l'estrogeno legato all'albumina, che non è in grado di permeare la membrana cellulare, sia capace di potenziare l'aggregazione piastrinica indotta da trombina allo stesso modo del 17 β -E2 (dati non riportati), in accordo con i dati ottenuti sulla presenza del ER β in membrana.

I nostri risultati rappresentano la prima evidenza di una modulazione della funzione di un'integrina da parte degli estrogeni. La regolazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ piastrinica da parte del 17 β -E2 coinvolge un'attivazione della chinasi Src mediata dal recettore per l'estrogeno. Inoltre è stato dimostrato che il trattamento delle piastrine con trombina in presenza di 17 β -E2 ha come risultato l'attivazione sinergica di Src. Perciò i nostri risultati mettono in evidenza un ruolo significativo di Src nella segnalazione "inside-out" che porta all'attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

In questo studio sono stati documentati gli effetti promotori degli estrogeni sull'aggregazione piastrinica, utilizzando piastrine ottenute da donatori maschi. Sebbene le piastrine di maschi e femmine esprimano livelli simili di recettori per gli estrogeni (Khetawath et al), gli estrogeni presenti nel plasma di soggetti di sesso maschile hanno una concentrazione inferiore rispetto al plasma femminile e si suppone che tale concentrazione sia costante. Per questo abbiamo ritenuto che le piastrine di soggetti maschi il miglior modello per lo studio del "signalling" e della funzione mediata dagli estrogeni, in quanto risultano più protette da qualsiasi possibile desensitizzazione causata dalla prolungata

esposizione agli estrogeni. Se la risposta piastrinica agli estrogeni sia o no dipendente dal sesso è ancora oggetto di studio.

L'evidenza di un effetto proaggregante degli estrogeni è di rilevanza fisiologica, poichè potrebbe dare una spiegazione ad evidenze riportate in altri studi e potrebbe avere importanti implicazioni cliniche. Ad esempio, è stato riportato in letteratura che, sebbene non ci siano differenze nel numero totale di molecole di $\alpha_{IIb}\beta_3$ espresse nelle piastrine di maschi e femmine, la stimolazione delle piastrine di soggetti femmina porta alla conversione di una quantità maggiore di recettori disponibili nella loro forma attivata (Faraday et al.). I nostri risultati suggeriscono che questa osservazione può essere motivata dalla presenza di concentrazioni di estrogeni elevate e variabili nel plasma dei soggetti femmina. Di conseguenza l'azione diretta degli estrogeni sulle piastrine circolanti, insieme ad altri fattori, deve essere tenuta in considerazione quando si programma un utilizzo acuto di estrogeni per favorire l'accessibilità dei vasi sanguigni ed anche quando si utilizzano basse dosi di ormone come contraccettivo o in menopausa.

In conclusione, i nostri risultati identificano un nuovo possibile meccanismo attraverso il quale gli estrogeni possono influire sul sistema cardiovascolare. In associazione con gli effetti genomici sulle cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce della parete dei vasi sanguigni, gli estrogeni possono rendere le piastrine più sensibili agli agonisti fisiologici attraverso un effetto diretto ed esclusivamente non genomico sulla regolazione della integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ mediante ER β e la chinasi Src.

BIBLIOGRAFIA

- Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: Many actors in search of a plot. *Cell* 1995;83:851-885.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 1995;83:835-839.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones: a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev.* 2000;52:513-556.
- Szego CM, Davis JS. Adenosina 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1967;58:1711-1718.
- Song RX, McPherson A, Adam L, et al. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER α -Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol.* 2002;16:116-127.
- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil D P, Ley K, Chin W, Liao J K. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* 2000;407:538-541.
- Morley P, Whitfield JF, Vanderhyden BC, Tsang BK, Schwartz JL. A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinol.* 1992;131:1305-1312.
- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, et al. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* 1996;15:1292-1300.
- Valera S, Ballivet M, Bertrand D. Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;99:9949-9953.
- Honda K, Sawada H, Kihara T, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res.* 2000;60:321-327.
- Russell KS, Hynes MP, Sinha D, Cleriarne E, Bender JR. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:5930-5935.

Chen Z, Yuhanna SY, Galchava-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest.* 1999;103:401-406.

Haynes PM, Sinha D, Russell KS, et al. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res.* 2000;37:677-682.

Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnkar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med.* 1991;325:1196-1204.

Elkeles RS, Hampton JR, Mitchell JR. Effect of oestrogens on human platelet behaviour. *Lancet* 1968;2:315-318.

Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis: Part 1. *N Engl J Med.* 1976;295:369-377.

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 1992;326:310-318.

Bar J, Lahav J, Hod M, Ben-Rafael Z, Weinberger I, Brosens J. Regulation of platelet aggregation and adenosine triphosphate release in vitro by 17β -estradiol and medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women. *Throm Haemost.* 2000;84:695-700.

Bouboulas KD, Cooke GE, Roos CM, Bray PF, Goldschmidt-Clermont PJ. The PIA polymorphism of glycoprotein IIIa functions as a modifier for the effect of estrogen on platelet aggregation. *Arch Pathol Lab Med.* 2001;125:112-115.

Miller ME, Thorpe SL, Dores GM. Influence of hormones on platelet intracellular calcium. *Thromb Res.* 1995;77:515-530.

Anwaar I, Rendell M, Gottsater A, Lindgarde F, Hulthen UL, Mattiasson I. Hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women. Effects on intraplatelet cyclic guanosine monophosphate, plasma endothelin-1 and neopterin. *J Intern Med.* 2000;247:463-470.

Khetawath G, Faraday N, Nealen ML, et al. Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor β and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression. *Blood* 2000;95:2289-2296.

Jayachandran M, Miller VM. Human platelets contain estrogen receptor α , caveolin-1 and estrogen receptor associated proteins. *Platelets* 2003;14:75-81.

Di Domenico M, Castoria G, Bilancio A, Migliaccio, Auricchio F. Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res.* 1996;56:4516-4521.

Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, et al. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J.* 1998;17:2008-2018.

Chao TS, Abe M, Hershenson MB, Gomes I, Rosner MR. Src tyrosine kinase mediates stimulation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinase by the tumor promoter thapsigargin. *Cancer Res.* 1997;57:3168-3173.

Duong LT, Lakkakorpi PT, Nakamura I, Machwate M, Nagy RM, Rodan GA. PYK2 in osteoclasts is an adhesion kinase, localized in the sealing zone, activated by ligation of $\alpha(v)\beta3$ integrin, and phosphorylated by src kinase. *J Clin Invest.* 1998;102:881-892.

Li J, Avraham H, Rogers RA, Raja S, Avraham S. Characterization of RAFTK, a novel focal adhesion kinase, and its integrin-dependent phosphorylation and activation in megakaryocytes. *Blood* 1996;88:417-428.

Raja S, Avraham S, Avraham H. Tyrosine phosphorylation of the novel protein-tyrosine kinase RAFTK during an early phase of platelet activation by an integrin glycoprotein IIb-IIIa independent mechanism. *J Biol Chem.* 1997;272:10941-10947.

Canobbio I, Lova P, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M. Proline-rich tyrosine kinase 2 and focal adhesion kinase are involved indifferent phases of platelet activation by vWF. *Thromb Haemost.* 2002;87:509-517.

Sayed MR, Sheid MP, Stevens CM, Duronio V. Thrombin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity in platelets is associated with activation of PYK2 tyrosine kinase: activation of both enzymes is aggregation independent. *J Cell Physiol.* 2000;183:314-320.

Koziak K, Kaczmarek E, Park SY, Fu Y, Avraham S, Avraham H. RAFTK/Pyk2 involvement in platelet activation is mediated by phosphoinositide 3-kinase. *British J Haematol.* 2001;114:134-140.

Kovacsovics TJ, Bachelot C, Toker A, et al. Phosphoinositide 3-kinase inhibition spares actin assembly in activating platelets but reverses platelet aggregation. *J Biol Chem.* 1995;270:11358-11366.

Zhang J, Zhang J, Shattil S J, Cunningham MC, Rittenhouse, SE. Phosphoinositide 3-Kinase and p85/Phosphoinositide 3-Kinase in Platelets. Relative activation by thrombin receptor or phorbol myristate acetate and roles in promoting the ligand-binding function of integrin. *J Biol Chem.* 1996;271:6265-6272.

Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 1997;390:632-636.

Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HH, Toker A, Mercurio AM. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the $\alpha_6\beta_4$ integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 1997;91:949-960.

Varshney GC, Henry J, Kahn A, Phan-Dinh-Tuy F. Tyrosine kinases in normal human blood cells. Platelet but not erythrocyte band 3 tyrosine kinase is p60Src. *FEBS Lett.* 1986;205:97-103.

Obergfell A, Eto K, Mocsai A, et al. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $\alpha_{IIb}\beta_3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 2002;157:265-275.

Bauer M, Maschberger P, Quek L, et al. Genetic and pharmacological analyzes of involvement of Src-family, Syk and Btk tyrosine kinases in platelet shape change. *Thromb Haemost.* 2001;85:331-340.

Hers I, Donath J, Litjens P, Gijsbert van W, Akkerman J. Inhibition of platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ peptides that interfere with protein kinases and the β_3 tail. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1651-1660.

Torti M, Ramaschi G, Sinigaglia F, Lapetina EG, Balduini C. Association of the low molecular weight GTP-binding protein rap2B with the cytoskeleton during platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:7553-7557.

Barry FA and Gibbins JM. Protein Kinase B is regulated in platelets by the collagen receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem.* 2002;277:12874-12878.

Sinigaglia F, Bisio A, Torti M, Balduini CL, Bertolino G, Balduini C. Effect of GPIIb-IIIa complex ligands on calcium ion movement and cytoskeleton organization in activated platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;154:258-264.

Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem.* 1985;260:11107-

11114.

Canobbio I, Bertoni A, Lova P, et al. Platelet activation by von Willebrand Factor requires coordinated signalling through thromboxane A₂ and Fc α IIA receptor. *J Biol Chem.* 2001;276:26022-26029.

Vanhaesebroeck B, Leeyers SJ, Ahmadi K, et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:535-602.

White RE. Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol.* 2002;38:73-80.

Cato ACB, Nestl A, Mink S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Science's STKE.* 2002;RE9.

Gustafsson JA. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:479-485.

Coleman KM, Dutertre M, El-Gharbawy A, Rowan BG, Weigel NL, Smith CL. Mechanistic differences in the activation of estrogen receptor- α (ER α)- and ER β -dependent gene expression by cAMP signaling pathway(s). *J Biol Chem.* 2003;278:12834-12845.

Aquila S, Sisci D, Gentile M, et al. Estrogen receptor (ER) α and ER β are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:1443-1451.

Wu Y, Asazuma N, Satoh K, et al. Interaction between von Willebrand factor and glycoprotein Ib activates Src kinase in human platelets: role of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 2003;101:3469-3476.

Faraday N, Goldschmidt-Clermont PJ, Bray PF. Gender differences in platelet GPIIb-IIIa activation. *Thromb Haemost.* 1997;77:748-754.

**IDENTIFICAZIONE DEL RECETTORE
MET IN PIASTRINE UMANE:
RUOLO DEL “HEPATO CYTE GROWTH
FACTOR” NELLA MODULAZIONE
DELL’ATTIVAZIONE PIASTRINICA**

RIASSUNTO

HGF circolante è significativamente aumentato in molti disordini associati alla formazione di trombi. Poiché le piastrine svolgono un ruolo essenziale nella trombogenesi, nel presente lavoro è stata investigata la capacità di HGF di interagire con le piastrine. I risultati ottenuti mostrano per la prima volta che le piastrine umane esprimono sulla membrana il recettore di HGF Met, la tirosina chinasi codificata dal gene *c-MET*. Abbiamo inoltre verificato che a concentrazioni fisiologiche HGF inibisce sia l'attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, sia l'aggregazione piastrinica indotta dalla trombina, in maniera tempo e dose dipendente. Questi risultati suggeriscono che i livelli circolanti di HGF influiscono sulla trombogenesi attraverso la modulazione negativa della funzionalità piastrinica.

INTRODUZIONE

Hepatocyte growth factor ed il suo recettore Met

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 un 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.

Ruolo di HGF nel sistema cardiovascolare

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 e macrofagi (Beilmann et al., 1997; Birchmeier et al., 2003; 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).

I fattori di crescita e le piastrine

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.

Diversi fattori di crescita sono contenuti nei granuli piastrinici e vengono rilasciati nel plasma a seguito dell'attivazione delle piastrine da parte di agonisti. Per anni si è ritenuto che essi svolgessero essenzialmente degli effetti stimolatori della crescita delle cellule dei vasi, attraverso una segnalazione di tipo paracrino. Tuttavia si è scoperto successivamente che alcuni fattori di crescita, quali PDGF (platelet derived growth factor) e VEGF (vascular endothelial growth factor), sono in grado di influire sulla aggregazione piastrinica attraverso una segnalazione di tipo autocrino. I recettori di VEGF e PDGF sono infatti espressi sulla membrana piastrinica. Si tratta di recettori tirosina chinasi la cui interazione con il ligando determina un'azione modulatrice sull'aggregazione piastrinica indotta da agonisti che può essere di tipo negativo, come nel caso del PDGF, o positivo, come nel caso del VEGF. In ogni caso né il VEGF da solo è in grado di innescare l'attivazione piastrinica, né il PDGF è in grado di bloccare completamente l'aggregazione. La loro azione sembra quindi essere esclusivamente di tipo modulatore. In quest'ottica il rilascio di fattori di crescita dai granuli piastrinici con effetti modulatori opposti sembra svolgere un ruolo contraddittorio sulla funzionalità piastrinica. L'esatta implicazione di questi fattori di crescita sulla aggregazione piastrinica non è stata ancora completamente chiarita, così come non si conoscono ancora i meccanismi di segnalazione che rendono conto dei loro effetti.

E' possibile supporre che siano le diverse concentrazioni plasmatiche di questi fattori a determinare l'aumento o la diminuzione del rischio trombotico.

Sebbene HGF sia stato originariamente identificato in piastrine umane (Nakamura et al.) e nonostante siano sempre più numerose le evidenze riportate in letteratura che suggeriscono il coinvolgimento di HGF nei fenomeni trombotici, l'espressione di Met sulla membrana piastrinica e gli effetti di HGF sulla funzionalità delle piastrine non è mai stata indagata in precedenza. Tutto quanto detto finora ci ha spinto ad investigare il possibile ruolo di HGF e di Met nella funzionalità piastrinica.

MATERIALI E METODI

Materiali

Il Recombinant Human Hepathocyte Growth Factor (HGF) è prodotto da PeproTech EC (London, UK). L'anticorpo monoclonale DO-24 specifico per il dominio extracellulare di Met è stato gentilmente fornito dalla prof.ssa Prat (Università del Piemonte Orientale – Novara) (Prat et al.). Polyclonal L'anticorpo FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibodies è stato acquistato da DAKO (Glostrup, DK). L'anticorpo PAC-1 coniugato FITC è prodotto dalla Becton Dickinson (San Jose, CA). L'anticorpo monoclonale anti c-Myc (9E10) e la trombina da plasma umano sono stati forniti da Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

Preparazione delle piastrine e studi di aggregazione

Il sangue è stato ottenuto da donatori sani che non hanno assunto farmaci nelle due settimane precedenti il prelievo. ACD (130 mM acido citrico, 152 mM citrato di sodio, 112 mM glucosio) è stato usato come anticoagulante. Piastrine ottenute mediante gel-filtrazione su colonna di Sefaroso CL-2B, come precedentemente descritto da Torti et al., sono state utilizzate per tutti gli esperimenti. La concentrazione delle piastrine è stata aggiustata a 3×10^8 cellule/ml in HEPES buffer contenente 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , e 2 mM glucosio. I campioni di piastrine (0.4 ml) sono stati preconditionati a 37°C in un lumiaggregometro e incubate con HGF (10^{-9} – 10^{-12} g/ml) diversi tempi (10 - 180 secondi) prima della stimolazione con 0.2 U/ml trombina, sotto agitazione. L'aggregazione piastrinica è stata monitorata in un Aggregometro Crono-log come incremento della trasmittanza.

Misurazione dell'espressione di Met sulla superficie piastrinica mediante citofluorimetria

Campioni di sospensioni piastriniche (10^9 piastrine/ml) sono state fissate in 0.5% paraformaldeide, lavate 3 volte in PBS ed incubate per 30 minuti sotto costante agitazione con DO-24 o 9E10 (3 µg/ml). Dopo abbondanti lavaggi, I campioni sono stati incubati con anticorpo secondario rabbit anti-mouse IgG coniugato FITC (1:50) per altri 30 minuti al buio. Le piastrine sono state quindi diluite 1:20 con PBS ed analizzate con Becton-Dickinson FACScalibur, acquisendo i dati di 10000 particelle per campione.

Misurazione del legame di PAC-1 mediante citofluorimetria

Il legame di PAC-1 alle piastrine è stato misurato essenzialmente come descritto da Shattil et al., con alcune modifiche. Le piastrine (3×10^8 /ml) sono state incubate con tampone, 0.02 U/ml trombina o 100 pg/ml HGF per 30 secondi prima della stimolazione con 0.02 U/ml trombina, per 10 minuti a 37°C in presenza dell'anticorpo PAC-1 coniugato FITC (2.5 µg/ml) e poi bloccate con 0.5% paraformaldeide. L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita come descritto sopra.

Analisi statistica

I valori sono stati riportati come media \pm S.E.M. La significatività delle differenze è stata determinata con il t-test. $P < 0.05$ è stato considerato significativo.

RISULTATI

Met è espresso nelle piastrine umane.

L'espressione del recettore Met sulla superficie piastrinica è stata investigata su piastrine fissate ed incubate con anticorpo monoclonale DO-24 specifico per il dominio extracellulare di Met (Prat et al.), e poi con anticorpo secondario anti-mouse-IgG coniugato FITC. L'anticorpo monoclonale anti Myc è stato utilizzato come controllo negativo. L'intensità di fluorescenza delle piastrine trattate con DO-24 era 11.3 volte maggiore di quella misurata nei campioni di controllo (Figura 1A). La differenza fra i valori medi di intensità di fluorescenza misurati in cellule trattate con DO-24 e Myc (46.3 ± 10.9 e 5.3 ± 0.2 , rispettivamente) è statisticamente significativa ($P < 0.01$, $n=3$) (Figura 1B). Si può quindi concludere che la proteina Met è espressa sulla superficie piastrinica.

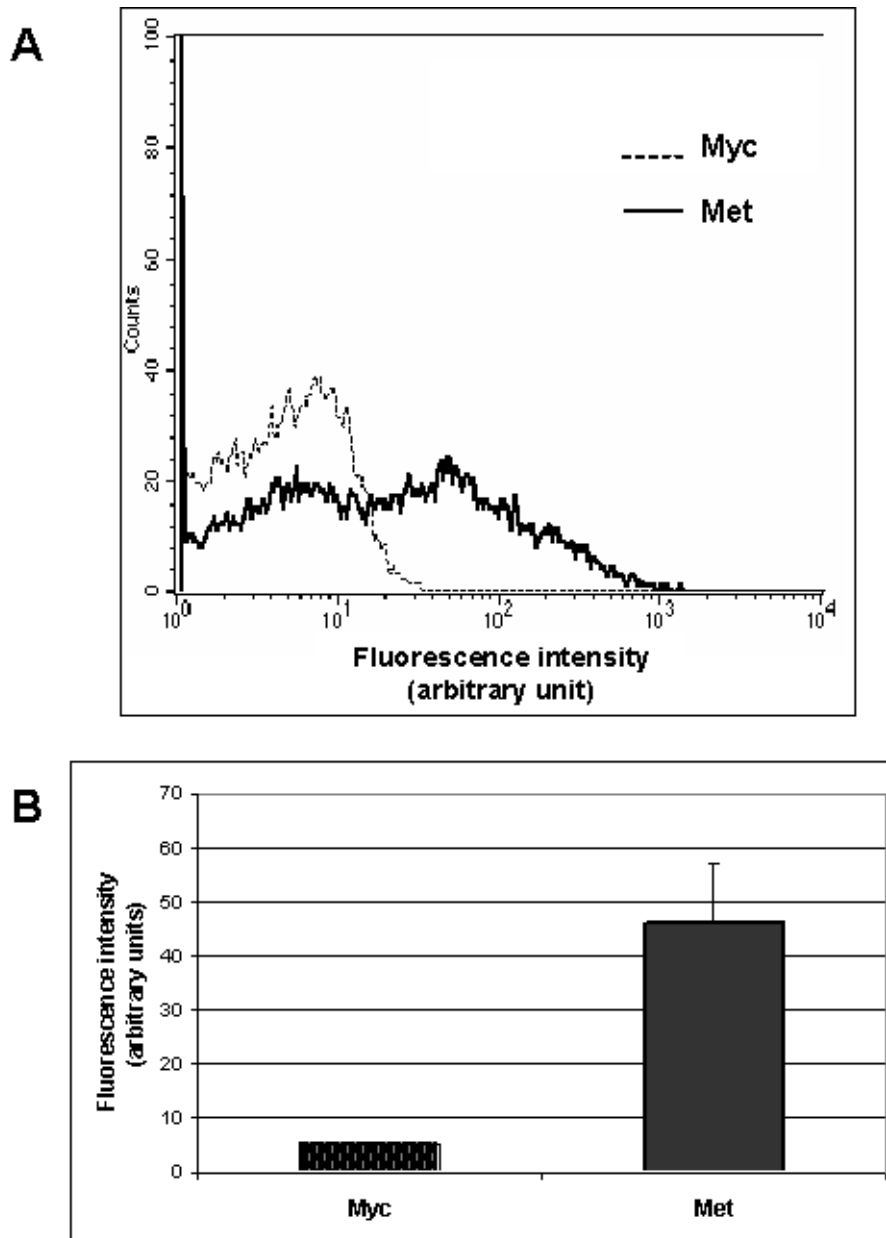


Figura 1

Fig.1. A) Analisi citofluorimetrica dell'espressione di Met sulle piastrine restino: l'anticorpo anti Myc è stato utilizzato come controllo. B) Confronto fra i valori medi delle intensità di fluorescenza ottenute dall'analisi citofluorimetrica in 3 diversi esperimenti dell'anticorpo anti Met e dell'anticorpo di controllo.

HGF inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da trombina e l'attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$

Per valutare la funzionalità e il ruolo del recettore Met in piastrine umane, abbiamo in seguito valutato gli effetti del suo ligando, HGF, sull'aggregazione piastrinica. Il

trattamento con dosi fisiologiche di HGF (10^{-10} g/ml) non promuove alcuna aggregazione piastrinica (Figura 2). Tuttavia abbiamo valutato la possibilità che HGF potesse modulare l'aggregazione piastrinica indotta da agonisti fisiologici come la trombina. Infatti, HGF è in grado di inibire fortemente l'aggregazione se viene aggiunto alla sospensione piastrinica 30 secondi prima della trombina (Figura 2).

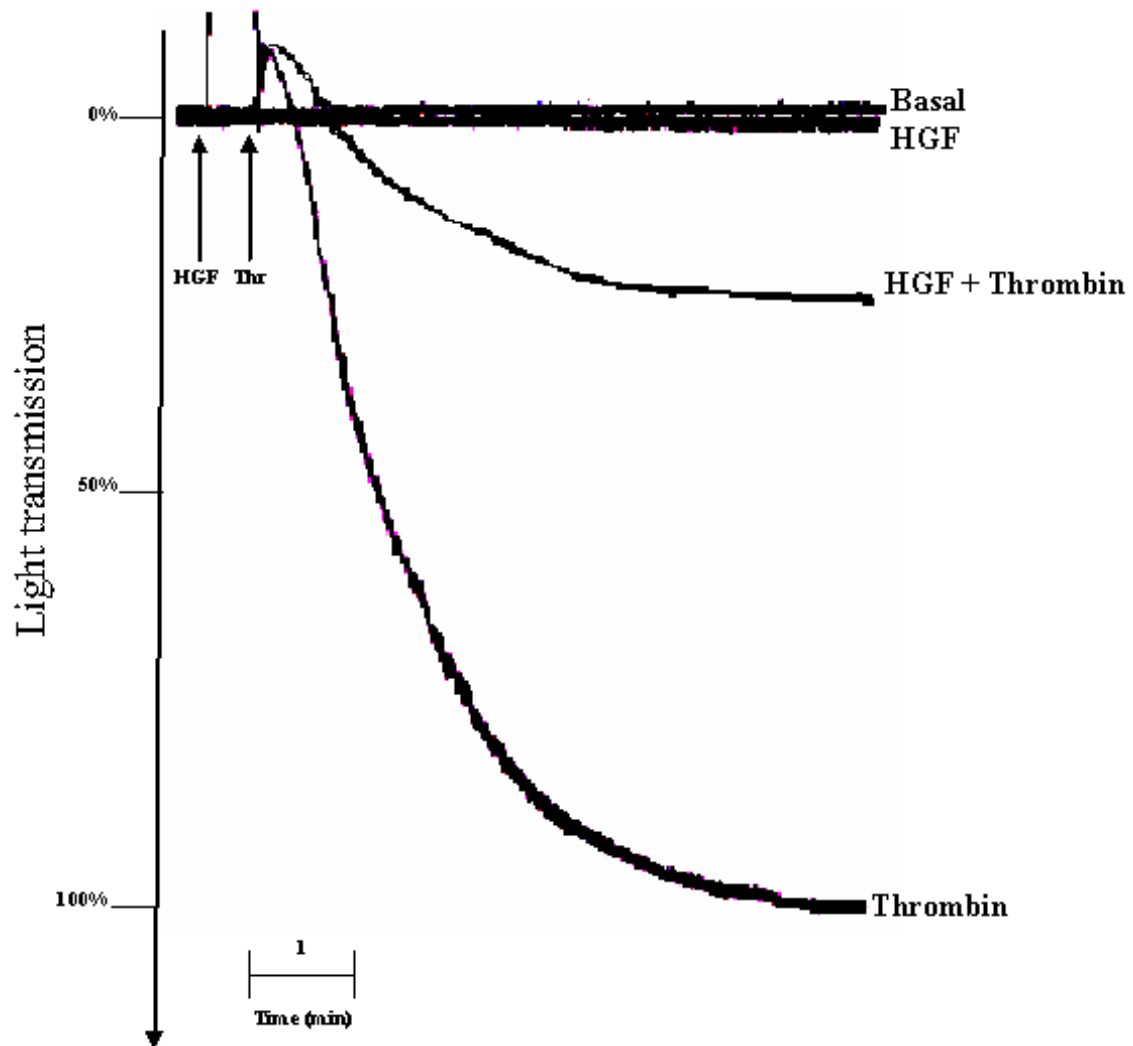


Figura 2

Fig.2. Inibizione dell'aggregazione indotta da trombina da parte di 10^{-10} g/ml HGF. I tracciati di aggregazione sono stati ottenuti con un Lumiaggregometro e sono rappresentativi di diversi esperimenti.

HGF è in grado inoltre di inibire l'aggregazione indotta da trombina in maniera dose dipendente, con il massimo di inibizione (% di inibizione: 80.0 ± 28.8) a partire dalla concentrazione 10^{-10} g/ml (Figura 3A). Concentrazioni inferiori di HGF (10^{-11} - 10^{-12} g/ml) riescono ancora ad inibire (% di inibizione: 18.0 ± 5.1 and 6.1 ± 3.3 , rispettivamente). Questi risultati suggeriscono che HGF influenza l'aggregazione indotta da trombina agendo attraverso un recettore di membrana ad alta affinità.

In seguito abbiamo eseguito degli esperimenti per valutare la cinetica dell'inibizione di HGF, nei quali HGF (10^{-10} g/ml) è stato aggiunto alla sospensione piastrinica per diversi tempi (10-30-180 secondi) prima della stimolazione. L'effetto di HGF sull'aggregazione indotta dalla trombina è risultato essere rapido e transiente, con il picco di inibizione (80%) a 30 secondi (Figura 3B). Il pretrattamento con HGF per 10 secondi causa una leggera diminuzione dell'aggregazione piastrinica (% di inibizione: $14.9 \pm 3.1\%$), mentre non è stato rilevato alcun effetto inibitorio preincubando con HGF per 3 minuti.

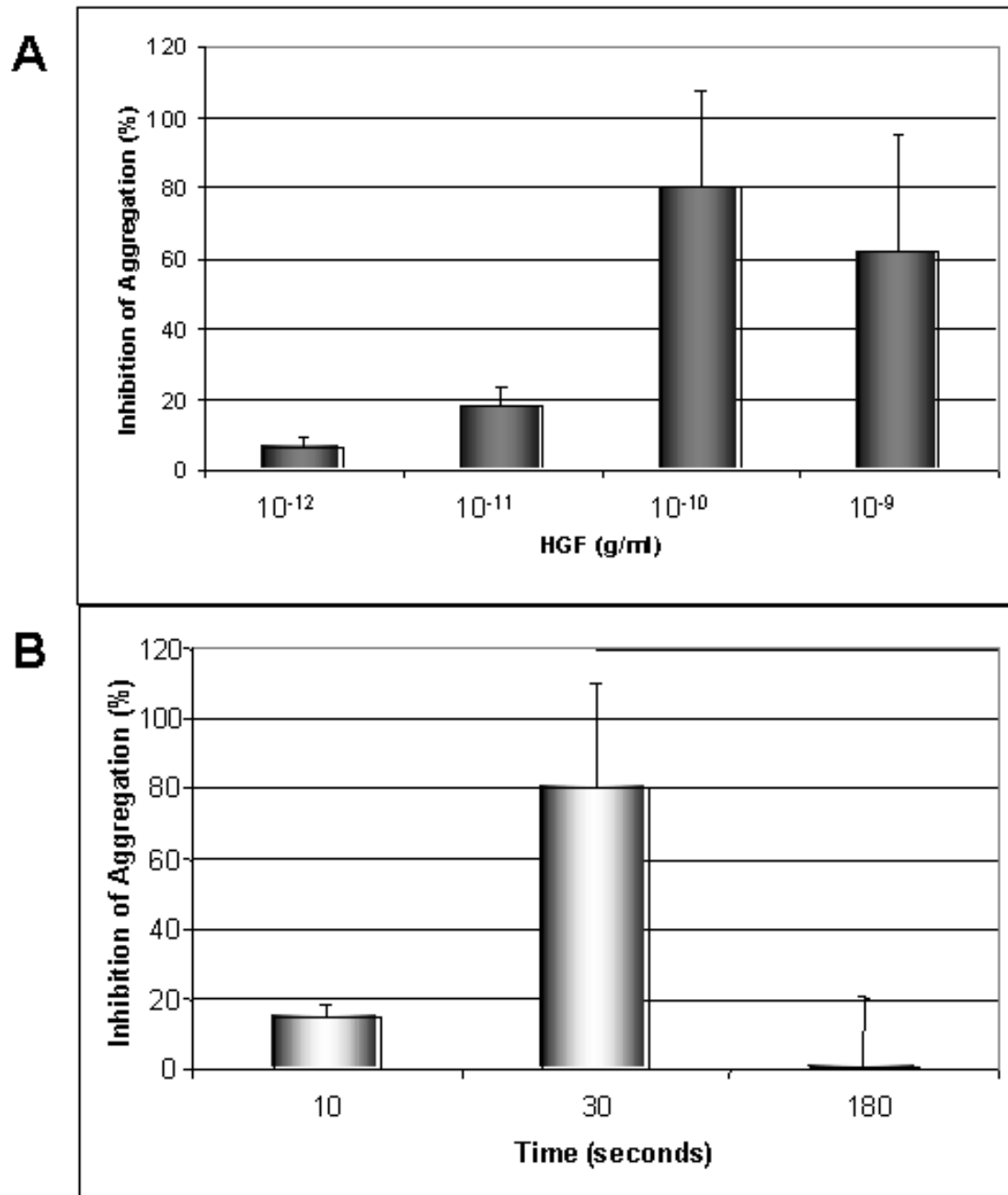


Figura 3

Fig. 3. HGF inibisce l'aggregazione in maniera tempo e dose dipendente. A) Percentuale di inibizione dell'aggregazione indotta da trombina causata dal pretrattamento per 30 secondi con diverse dosi di HGF. B) Percentuale di inibizione dell'aggregazione indotta da trombina causata dal pretrattamento per diversi tempi con 10⁻¹⁰ g/ml HGF.

L'aggregazione piastrinica è dipendente dall'attivazione indotta da agonisti dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, la quale subisce delle variazioni conformazionali, che sono alla base del conseguente legame con il fibrinogeno (Shattil et al.). Per valutare il possibile coinvolgimento di HGF nella via di attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ abbiamo indagato lo

stato di attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ mediante tecnica citofluorimetrica che utilizza un anticorpo monoclonale mimetico del fibrinogeno FITC-PAC-1. I risultati di 7 diversi esperimenti indipendenti sono riportati in Figura 4. In accordo con la sua incapacità di promuovere l'aggregazione piastrinica, HGF da solo no induce l'attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Le piastrine preincubate per 30 secondi con 10^{-10} g/ml HGF prima della stimolazione con trombina mostrano una diminuzione significativa del legame di PAC-1 alle cellule, se paragonato a quello delle piastrine trattate con la sola trombina. I valori medi di intensità di fluorescenza rilevati nelle piastrine stimulate con trombina sono 6.47 ± 1.67 in assenza e 3.13 ± 0.73 in presenza di HGF. Inoltre questi risultati indicano che HGF una riduzione del 50% del PAC-1 legato alle piastrine stimulate con trombina ($P < 0.05$; $n = 7$).

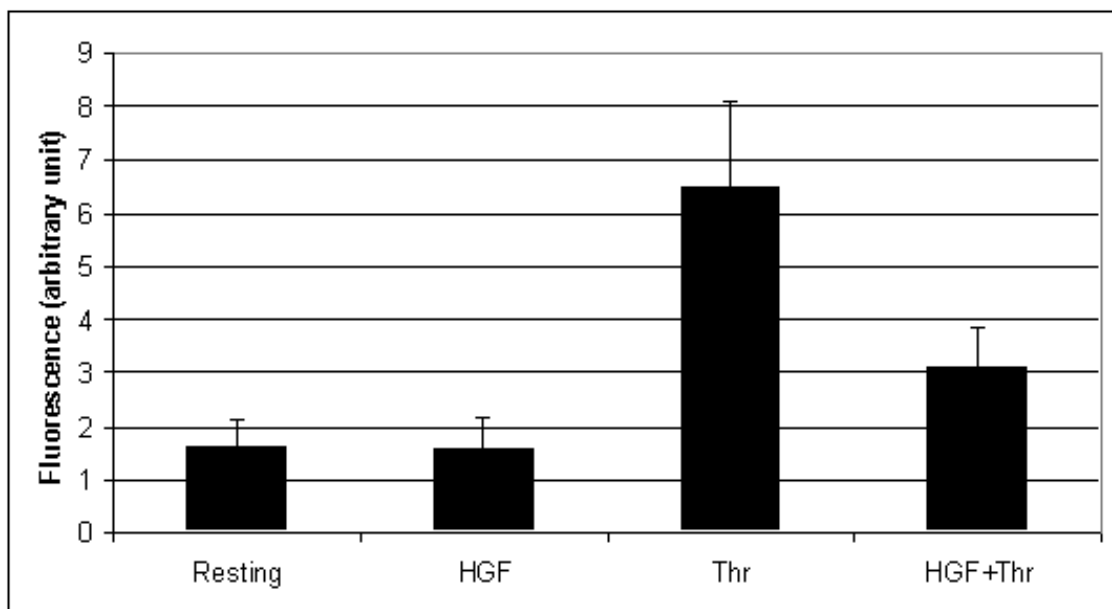


Figura 4

Fig.4. HGF inibisce l'attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ indotta da trombina. Gli istogrammi rappresentano i valori medi dell'intensità di fluorescenza legata alle cellule marcate con PAC-1-FITC, l'anticorpo che riconosce la forma attiva dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo dimostrato per la prima volta che le piastrine umane esprimono il recettore per HGF sulla loro superficie e che HGF svolge un ruolo attivo nel regolare negativamente la funzionalità piastrinica. Infatti, sebbene HGF da solo non sia in grado di dare alcuna risposta funzionale, esso induce una potente inibizione dell'aggregazione indotta da trombina, prevenendo l'attivazione conformazionale dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

La presenza del recettore per HGF è stata chiaramente rilevata sulla superficie delle piastrine resting mediante citofluorimetria, tuttavia è stata rilevata una certa eterogeneità di espressione di Met nelle piastrine. HGF, quando aggiunto 30 secondi prima della stimolazione, inibisce l'aggregazione indotta da trombina in maniera dose dipendente. Una forte inibizione è stata osservata per concentrazioni picomolari (10^{-10} - 10^{-12} g/ml), le quali sono considerate dosi ottimali anche in altri sistemi cellulari, confermando un'elevata affinità per il recettore. Il recettore Met è coinvolto in questo effetto (Naldini et al.). L'effetto di HGF sull'aggregazione piastrinica indotta da agonisti è rapida e transiente, dal momento che le piastrine preincubate con HGF per tempi maggiori di 30 secondi tendono a ritornare ad una aggregazione normale. Questa evidenza potrebbe essere dovuta alla desensitizzazione del recettore delle piastrine. Tuttavia bisogna considerare la possibilità che in presenza delle piastrine, HGF vada incontro a modificazioni strutturali inattivanti.

Sebbene la via di inibizione dipendente da HGF nelle piastrine attivate rimanga ancora da caratterizzare, i nostri risultati indicano che HGF inibisce la segnalazione "inside-out" del recettore per il fibrinogeno $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Shattil et al.). Infatti abbiamo scoperto che l'effetto di HGF sull'aggregazione da trombina è una conseguenza della inibizione da parte di HGF dell'attivazione indotta dalla trombina della integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Nei granuli piastrinici è contenuta una varietà di fattori di crescita e citochine, come VEGF, PDGF, HGF, alcune delle quali (VEGF, PDGF) vengono secrete in seguito a stimolazione (Webb et al., Heldin et al., Nakamura et al.) e sono quindi prontamente disponibili per amplificare o modulare la risposta piastrinica attraverso un meccanismo autocrino-paracrino, in quanto queste cellule possono esprimere i loro recettori (Vassbotn et al., Selheim et al.). E' stato riportato in letteratura che VEGF, così come il ligando per c-Kit CSF, sono in grado di legare le piastrine e di potenziarne l'aggregazione ma solo se le cellule sono preventivamente attivate da agonisti [24, 25]. Questo fatto suggerisce che la conformazione attiva per il legame con il ligando di questi recettori non è esposta sulla

superficie delle piastrine resting, ma richiede di essere indotta da specifici pretrattamenti. Al contrario, le piastrine resting possono legare HGF e PDGF e in questo caso l'interazione recettore-ligando risulta nell'inibizione dell'aggregazione piastrinica indotta da trombina. (dati presentati qui e Vassbotn et al.). Le piastrine vengono facilmente attivate da stimoli sia meccanici che biochimici; tuttavia tutti i fattori di crescita menzionati precedentemente non hanno alcun effetto da soli, ma possono soltanto modulare sia positivamente che negativamente l'aggregazione piastrinica da agonisti. Il fatto che fattori potenziatori come VEGF e CSF possano dare i loro effetti solo in piastrine preattivate, mentre i fattori ad effetto regolatorio negativo come PDGF e HGF possano manifestare i loro effetti sulle cellule resting, è abbastanza interessante e suggerisce che questo possa essere una parte di un meccanismo più generale che ha come scopo il controllo dell'attivazione piastrinica.

Sia HGF che PDGF modulano negativamente l'aggregazione delle piastrine indotta da trombina: In vivo questi fattori di crescita risultano significativamente aumentati nei trombi, dove potrebbero essere coinvolti nel controllo dell'attivazione piastrinica e nella limitazione della formazione del trombo. Le dosi richieste *in loco* di HGF e PDGF sono compatibili con questo ruolo. A livello sistemico le concentrazioni di HGF e PDGF sono simili (Zhu et al., Tahara et al.), ma poiché solo HGF è capace di inibire l'aggregazione piastrinica a queste concentrazioni fisiologiche, richiedendo l'inibizione di PDGF livelli circa 1000 volte più elevati, il feed-back negativo sull'attivazione piastrinica dipenderebbe solamente da HGF

HGF è una citochina pleiotropica, che in generale promuove risposte cellulari positive, come la motilità, la proliferazione, la morfogenesi e la protezione dall'apoptosi (Birchmeier et al.). L'incremento dei suoi livelli plasmatici in seguito a danno ad organi può essere interpretata come una risposta adattativa dell'organismo per contrastare gli stati avversi, cercando di preservare e recuperare l'omeostasi. Infatti questo fattore di crescita risulta aumentato in diverse patologie cardiovascolari, comprese l'ipertensione (Komai et al.), la trombosi arteriosa, l'aterosclerosi (Matsumori et al., Kawamoto et al.) e l'infarto del miocardio (Zhu et al.) dove il suo ruolo cardioprotettivo è stato chiaramente dimostrato. La regolazione negativa dell'attivazione piastrinica qui riportata dovrebbe in ogni caso risultare in una azione protettiva, quindi benefica, di HGF contro gli eventi trombotici.

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. Neoexpression of the c-met/hepatocyte growth factor-scatter factor receptor gene in activated monocytes. *Blood.* 1997;90:4450-8.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:915-25. Review.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4, 915-25.
- 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.
- Bottaro D P, Rubin J S, Faletto D L, Chan A M, Kmiecik T E, Vande Woude G F, Aaronson, S. A. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991; 251, 802-804.
- Brouse SD, Wiesehan VG. Evaluation of Bleeding Complications Associated with Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors (November). *Ann Pharmacother.* 2004 Sep 21 [Epub ahead of print].
- Bussolino F., Di Renzo, M. F., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffey, A., Comoglio, P. M. 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.
- Di Renzo M F, Narsimhan R P, Olivero M, Bretti S, Giordano S, Medico E, Gaglia P, Zara P, and Comoglio P M. Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene* 1991; 6, 1997-2003.

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.

Grabarek J, Groopman JE, Lyles YR, Jiang S, Bennett L, Zsebo K, Avraham H. Human kit ligand (stem cell factor) modulates platelet activation in vitro. *J Biol Chem*. 1994; 269, 21718-24.

Heldin CH, Westermark B. Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul*. 1990; 1, 555-66.

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, 154-159.

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.

Lyon M, Deakin JA, Mizuno K, Nakamura T, Gallagher JT. Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate. Elucidation of the major heparan sulfate structural determinants. *J Biol Chem*. 1994; 269, 11216-23.

Matsumori A, Ono K, Furukawa Y, Okada M, Sasayama S. Circulating hepatocyte growth factor as an early marker of arterial thrombus formation. *Jpn. Circ. J.* 1998; 62(4), 311-313.

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

Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura N. Activation of hepatocyte growth factor in the injured tissues is mediated by hepatocyte growth factor activator. *J Biol Chem.* 1996; 271,3615-8.

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.

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.

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., 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, 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), 1511-1519.

Nakamura T, Teramoto H, and Ichihara A. 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.

Naldini L, Vigna E, Narsimhan R P, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos G K, and Comoglio PM. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 1991b; 6, 501-504.

Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, Dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM. A multifunctional docking site mediates signaling and

transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family, *Cell* 1994; 77, 261-71.

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, 5954-5962.

Prat M, Narsimhan RP, Crepaldi T, Nicotra MR, Natali PG, Comoglio PM. The receptor encoded by the human *c-Met* oncogene is expressed in hepatocytes, in epithelial cells and in solid tumors. *Int. J. Cancer*, 1991; 49, 323-328.

Rappolee D A, 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.

Selheim F, Holmsen H, Vassbotn F. S. Identification of functional VEGF receptors on human platelets. *FEBS Lett.* 2002; 512, 107-10.

Shattil S J, Hoxie J A, Cunningham M, Brass L F. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J. Biol. Chem.* 1985;. 260, 11107-11114.

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.

Tahara A, Yasuda M, Itagane H, Toda I, Teragaki M, Akioka K, Oku H, Takeuchi K, Takeda T, Bannai S, et al. Plasma levels of platelet-derived growth factor in normal subjects and patients with ischemic heart disease. *Am. Heart J.* 1991; 122, 986-92.

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.

Torti M, Ramaschi G, Sinigaglia F, Lapetina E G, Balduini C. Association of the low molecular weight GTP-binding protein rap2B with the cytoskeleton during platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1993; 90, 7553-7557.

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.

Trusolino L, Comoglio PM. Scatter factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth, *Nat Rev Cancer* 2002; 2, 289-300.

Vassbotn F S, Havnen OK, Heldin CH, Holmsen H. Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor. *J. Biol. Chem.* 1994; 269, 13874-13879.

Webb NJ, Bottomley MJ, Watson CJ, Brenchley PE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin. Sci. (Lond).* 1998; 94, 395-404.

Weidner KM, Arakaki N., Hartmann G, Vandekerckhove J, Wengart S, Rieder H, Fonotsch C, Tsubouchi H, Hishida T, Daikuhara Y, and Birchmeier W. 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, Muga S, Rajja R, and Michalopoulos O. Tissue distribution of hepatopoietin A: a heparin binding polypeptide growth factor for hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87:1252-1256.

Zhu Y, Hojo Y, Ikeda U, Shimada K. Production of hepatocyte growth factor during acute myocardial infarction. *Heart*. 2000; 83, 450-5.

**PKC- θ REGOLA IL DIFFERENZIAMENTO
MEGACARIOCITICO ED IL CAMBIO DI
FORMA PIASTRINICO AGENDO SUI
MICROTUBULI**

RIASSUNTO

PKC- θ , una ser/thr chinasi appartenente alla famiglia delle PKC, è particolarmente espressa in linfociti-T e piastrine. Inoltre l'espressione di questa proteina risulta particolarmente aumentata durante il differenziamento da progenitori CD34+ a megacariociti e piastrine. Mentre diversi lavori sono riusciti a spiegarne l'importanza nei processi di attivazione dei linfociti-T, il ruolo di questa isoforma di PKC nelle piastrine e nel differenziamento megacariocitico è ancora del tutto sconosciuto. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la funzione di questo enzima nelle piastrine e nel differenziamento megacariocitico avvalendomi dell'uso di un inibitore. Attraverso studi di coimmunoprecipitazione, aggregometria, microscopia confocale e saggi di attività enzimatica ho trovato che, in piastrine umane, PKC- θ viene attivata e fosforilata il tirosina a seguito di stimolazione con trombina. Inoltre PKC- θ localizza sui microtubuli delle piastrine resting e, solo una volta attivata, associa fisicamente la tubulina favorendo la depolimerizzazione dei microtubuli e contribuendo in questo modo al fenomeno dello "shape change" piastrinico. In seguito abbiamo verificato il ruolo di questo enzima nel differenziamento megacariocitico. Per raggiungere questo scopo, è stato necessario prima mettere a punto un sistema sperimentale di differenziamento, utilizzando le HEL, una linea cellulare eritroleucemica, come modello di progenitore megacariocitico ed il PMA come fattore differenziante. Abbiamo scoperto, attraverso analisi biochimica e citofluorimetrica, che PKC- θ gioca un ruolo fondamentale nel differenziamento, ancora una volta interagendo con i microtubuli. In particolare l'inibizione di questo enzima blocca la poliploidizzazione nelle cellule indotte al differenziamento.

In conclusione i risultati ottenuti in questo studio indicano che PKC- θ svolge un ruolo importante e positivo nel cambio di forma piastrinico e nell'induzione della poliploidia durante il differenziamento megacariocitico, interagendo con i microtubuli e regolandone lo stato di polimerizzazione.

INTRODUZIONE

DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE EMATOPOIETICHE

Il Midollo Osseo é 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 (Rosati).

Nel midollo sono presenti cellule staminali, precursori delle cinque linee ematopoietiche (eritrocitaria, granulocitaria, megacariocitaria, 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.) (Rosati et al., Handing et al.).

Le cellule del sangue si formano e maturano attraverso un processo che prende il nome di emopoiesi o ematopoiesi. Dalle cellule capostipiti discendono due linee principali, la linea mieloide e la linea linfoide. Queste sono cellule che si dividono continuamente e, volend schematizzare, una delle due cellule originate continua a essere capostipite mentre l'altra inizia il differenziamento, 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, solo per fare alcuni esempi.

L'Emopoiesi ha inizio da una cellula staminale: CFU-A (colony forming unit); da questa cellula derivano le due cellule progenitrici delle linee linfoide (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 (Handing et al., Blood, Principles and Practice of Hematology; 2nd Edition. Handin, Lux, Stossel. Lippincot Williams & Wilkins).

HEL: HUMAN ERYTHRO LEUKEMIA

Lo studio dei megacariociti umani e dei processi che portano al loro differenziamento presenta molteplici difficoltà, dovute sia alla raccolta del materiale biologico da cui estrarre i megacariociti o i loro progenitori, sia dalla scarsa resa dei metodi stessi di estrazione, nonché dai problemi per il mantenimento in coltura. Le linee cellulari megacariocitiche, ottenute dal sangue di pazienti leucemici, offrono una opportunità unica per lo studio della proliferazione, del differenziamento e della maturazione dei megacariociti. Esistono diversi tipi di linee cellulari di questo tipo che differiscono per loro proprietà “multifenotipiche” di cellule mieloidi, eritroidi e megacariocitiche, ma tutte esprimono quello che è considerato il marker specifico della linea megacariocitica, l’integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ o glicoproteina IIb-IIIa (Saito H.). Tra queste vi sono le HEL (Human Erythro Leukemia), una linea cellulare, coltivata dal 1985 che deriva dal sangue periferico di un maschio caucasico di 30 anni, affetto da eritroleucemia. Si tratta di cellule leucemiche multipotenti che hanno caratteristiche comuni con le cellule progenitrici CD34+, 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) (Zauli et al.).

Un ruolo chiave nel differenziamento delle HEL è svolto dalla famiglia delle protein chinasi C (PKC). Si è osservato che il differenziamento megacariocitico delle HEL è caratterizzato da un aumento dell’espressione e dell’attività di alcune isoforme di PKC: α , βI , ϵ , θ e ζ . Queste raggiungono il picco di attività catalitica a 30 minuti dalla stimolazione con PMA; a 72 ore dallo stimolo con PMA, 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, Grabarek et al.). 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 o integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e divengono poliploidi (Hong et al., Long et al). 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,

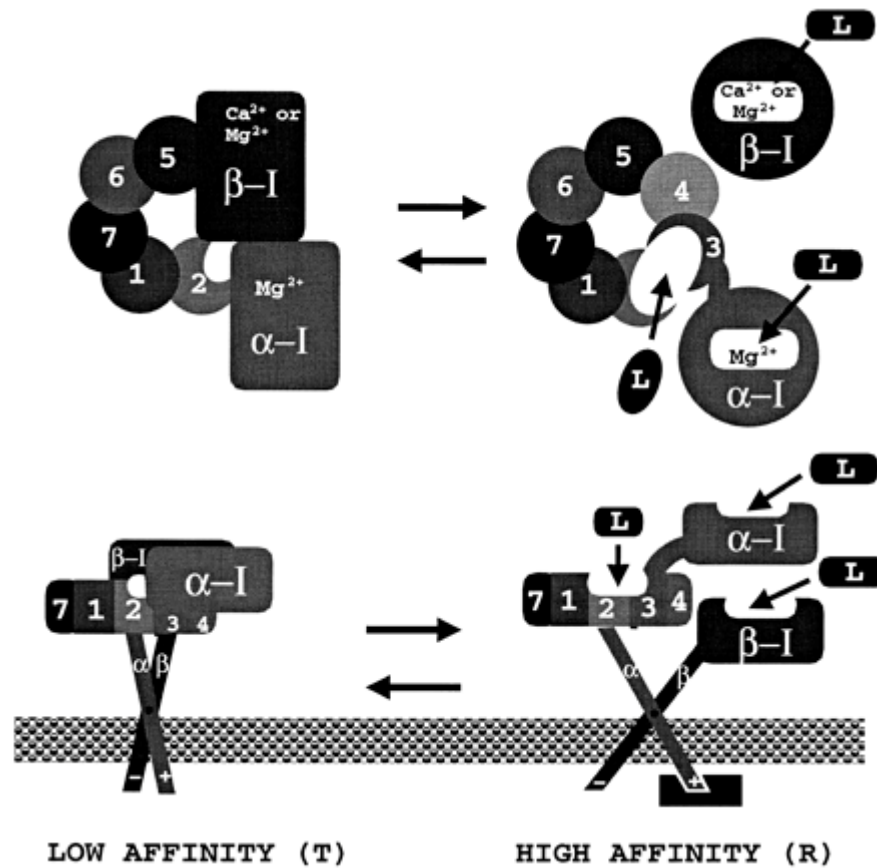
mieloidi e megacariocitiche; la GPIIb-IIIa e il complesso GPIb-IX-V sono dei markers specifici della linea megacariocitica (Nurden, 1997).

Le HEL possiedono anche altri recettori di membrana che sono dei tipici markers piastrinici, come quelli per trombina, ADP, epinefrina, PGE₁. Trombina e PGE₁ provocano l'aumento delle concentrazioni citosoliche del cAMP e del Ca²⁺, 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) (Ylanne et al.), smettono di proliferare ed iniziano cicli di endomitosi che generano cellule poliploidi, ovvero con corredi genetici multipli di 2N (Long et al.).

MARCATORI DI DIFFERENZIAMENTO NELLE HEL

La Glicoproteina IIb-IIIa o integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$

La glicoproteina GPIIb-IIIa, chiamata anche $\alpha_{IIb}\beta_3$, è l'integrina più abbondantemente espressa sulla membrana delle piastrine ed è 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 (figura qui di seguito) (Boudignon, 1996).



Possiede, inoltre, siti di legame con fibronectina, vitronectina, fattore di von Willebrand e trombospondina. La stimolazione delle cellule da parte di agonisti, genera sia una variazione nell'espressione dell'integrina, sia una segnalazione "inside-out" che genera un cambiamento conformazionale nel dominio extracellulare del recettore, portandolo alla sua forma aperta che possiede la maggiore affinità per il fibrinogeno. L'interazione della $\alpha_{IIb}\beta_3$ con il fibrinogeno porta generalmente ad una segnalazione "outside-in" mediata da trasduttori, come PI-3K, Src e Pyk2, che legano il dominio intracellulare dell'integrina. Questo tipo di segnalazione induce una serie di eventi intracellulari che portano allo "spreading", alla riorganizzazione del citoscheletro ed al rilascio di vescicole, attraverso il coinvolgimento di almeno tre vie di segnalazione: quella delle tirosina chinasi, della PI3 chinasi e delle MAP chinasi.

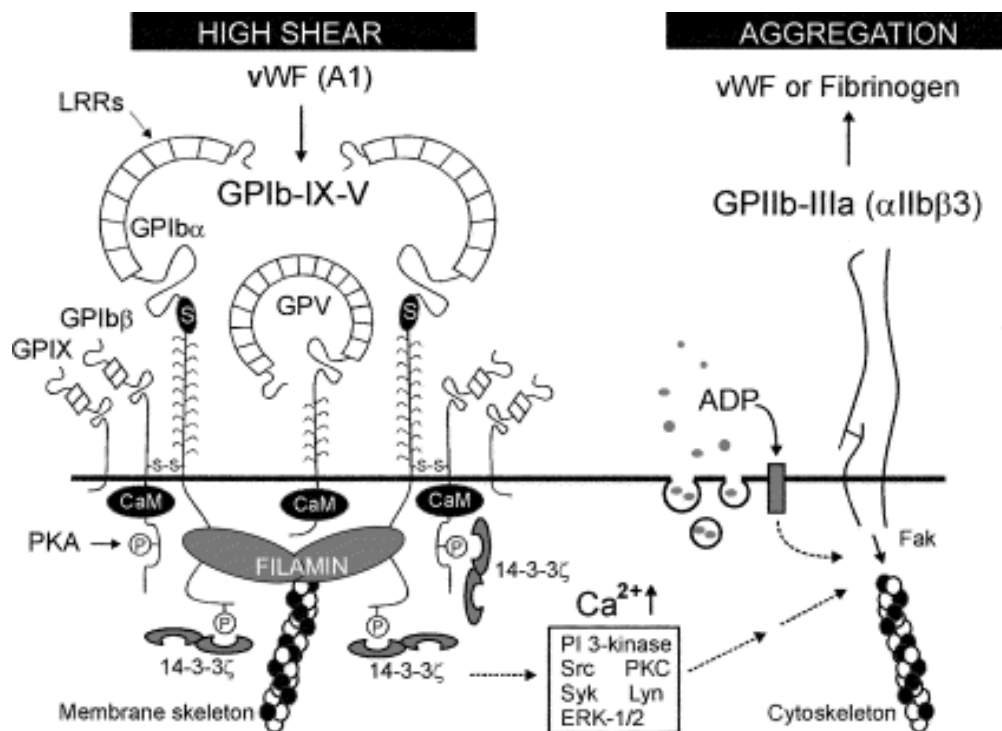
Le HEL esprimono questa integrina sulla propria membrana, ma l'espressione della $\alpha_{IIb}\beta_3$ è fortemente aumentata se le cellule sono indotte, dallo stimolo con esteri del forbolo, a differenziare lungo la linea megacariocitaria (Ylänne et al., Saito, Long et al., Zauli et al.).

Anche nelle HEL la $\alpha_{IIb}\beta_3$ 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-Poudhon et al., Ylänne et al.).

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 (Clemetson et al.).

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 $\alpha_{IIb}\beta_3$, recettore per il fibrinogeno (Berndt et al.). 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. Tutte le subunità del GPIb-IX-V sono richieste per una stabile espressione del recettore funzionale (Andrews et al.).

La più importante subunità del complesso è la GPIIb/IIIa 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 (Dormann et al). La coda citoplasmatica della GPIIb/IIIa 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 GPIIb-IX-V.

Il principale ruolo fisiologico del GPIIb-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 GPIIb-IX-V: questa interazione tra il vWf ed il GPIIb-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.).

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

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

La 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.).

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). 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.); 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 and Schwartz) e in quella uterina; con l'invecchiamento aumentano i tireociti e le cellule del surrene poliploidi (Auer et al.). 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.).

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.).

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. 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.).

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.); la ciclina B1 associata al fuso mitotico permette la condensazione del DNA, durante la poliploidizzazione questa ciclina è degradata da proteosomi (Ravid et al.); 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.).

LA FAMIGLIA DELLE PKC

La Protein Kinase C (PKC) è un enzima appartenente alle serina/treonina kinasi, scoperta nel 1977 da Nishizuka e collaboratori (Takai et al.) ed 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 vie di segnalazione intracellulari che portano alla proliferazione e al differenziamento (Nishizuka et al. 1988, Huang et al.).

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 (Nishizuka et al. 1992, Jerushalmy et al.).

Come tutte le protein chinasi citosoliche, PKC è composta da un dominio regolatorio all'-N terminale e da un dominio catalitico al -C terminale dove si trova anche il sito di legame per l'ATP e la sequenza in grado di legare il substrato. Inoltre PKC, per poter svolgere la sua funzione di fosforilazione in serina o treonina dei substrati, necessita di essere fosforilata a sua volta da altre chinasi. Più di recente si è scoperto che PDK1, una chinasi PI3K dipendente, è l'enzima responsabile della fosforilazione in serina/treonina di PKC. Esistono almeno tre siti in cui la molecola può essere fosforilata: uno sulla treonina 538 nel loop di attivazione all'interno del dominio catalitico ad opera di PDK1 e due sulle ultime due serine al -C terminale le quali subirebbero un'autofosforilazione a significato regolatorio. Tuttavia il significato di queste fosforilazioni rimane ancora oggi discusso (Parek et al., Edwards et al., Hansra et al., Liu et al. 2002).

L'attivazione di PKC ha come conseguenza il trasferimento di un gruppo fosfato dall'ATP agli amminoacidi serina e/o treonina di diversi substrati.

I substrati fosforilati da PKC sono vari e possono cambiare da un tipo cellulare all'altro facendo quindi variare il ruolo funzionale di PKC a seconda dei tessuti in cui è espressa.

Questa molteplicità ed ubiquitarità di funzione è stata spiegata a cavallo tra gli anni '70 e '80 con la scoperta dell'esistenza di diverse isoforme di PKC, ognuna diversamente espressa nei vari tessuti, con diversa regolazione, specificità di substrato e localizzazione sub-cellulare (Huang et al.). Oggi sappiamo che PKC è una famiglia composta da 12 isoenzimi che condividono tutti un dominio catalitico al C-terminale particolarmente conservato. L'esistenza di tre diversi tipi di domini regolatori al N-terminale ha permesso

la divisione della famiglia di PKC in tre sottogruppi: **le PKC convenzionali o cPKC** di cui fanno parte gli isoenzimi α , β I, β II e γ , sono le prime ad essere state scoperte e presentano una regione regolatoria caratterizzata dalla presenza di un dominio C2 capace di legare il Ca^{2+} , da cui sono conseguentemente regolate; inoltre è presente un dominio C1 costituito da due sequenze ricche in cisteina deputate al legame con la membrana e con DAG. **Le PKC non convenzionali o nPKC**, cui appartengono le isoforme δ , ϵ , η e θ , sono prive del dominio C2 o ne possiedono un tronco e comunque non in grado di legare il calcio, perciò sono state chiamate calcio-indipendenti; esse tuttavia mantengono la capacità di legare la membrana ed il DAG essendo fornite del dominio C1 al N-terminale. Le ultime PKC scoperte in ordine di tempo appartengono quasi tutte a quelle PKC Ca^{2+} indipendenti chiamate **atipiche o aPKC**, di cui fanno parte le isoforme ζ , λ , τ e μ . Queste PKC mancano sia del dominio C2 che delle sequenze di legame per il DAG e non si conoscono agonisti in grado di attivarle, conseguentemente poco si conosce circa la loro funzione e regolazione (Nishizuka 1992, Johannes et al., Ron et al., Dorit et al.).

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. Alcune isoforme di PKC come la α e le β sono pressoché ubiquitarie, mentre altre manifestano una maggiore tessuto-specificità (Bell et al., Mochly-Rosen et al.).

L'ISOFORMA θ DI PKC

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 (Chang et al.).

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 (Altman et al.).

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. Questa traslocazione pare mediata sia dalla fosforilazione sulla Thr 538 nel loop di attivazione (Sparatore et al.) da parte di PDK1 che dalla fosforilazione sulla Tyr 90 nel dominio regolatorio dell'enzima dipendente dalla tirosina chinasi Lck (enzima citosolico, appartenente alla famiglia di Src) (Liu et al. 2000). 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, il principale fattore di crescita dei linfociti T (Altman et al.).

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. Il dominio pseudosubstrato è costituito da una sequenza al N-terminale dell'enzima che è analoga a quella del substrato che lega il loop di attivazione del dominio catalitico, ma con la sostituzione di una alanina al posto della ser/thr fosforilabili. 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. Inoltre la fosforilazione in tirosina al N-terminale, proprio nel dominio regolatorio, ne influenzerebbe positivamente l'attività (Altman et al., Ron et al.).

L'isoenzima θ interagirebbe con diverse proteine diverse dal substrato, ma il quadro di queste interazioni rimane ancora confuso (Liu et al. 2000 e 2002).

Meller et al. hanno riportato una interazione specifica di PKC- θ con l'isoforma τ della famiglia delle proteine 14-3-3 nei linfociti-T. 14-3-3 τ è una proteina con funzione di adattatore o di "scaffold" che lega la forma inattiva di PKC- θ e ne impedisce la funzione e la traslocazione. In pratica contribuirebbe alla regolazione di PKC- θ mantenendola nella sua forma inattiva ed ancorata in siti cellulari specifici.

PKC- θ nel differenziamento mieloide

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 (Oshevsky et al., Zauli et al., Grabarek et al.).

Nella linea cellulare da noi usata come modello di progenitore della linea megacariocitica, 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 (Zauli et al.). 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 (Oshevski et al.).

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. L'analisi dei dati presenti in letteratura fa supporre che la PKC- θ sia sempre più espressa nella linea mieloide man mano che si passa da cellule progenitrici a piastrine.

PKC- θ nelle piastrine

Scoperta per la prima volta nelle piastrine da Wang et al. nel 1993, è stata sequenziata e clonata da Chang e colleghi pochi mesi dopo, tuttavia da allora non è stato condotto alcuno studio specifico su questa isoforma che aiutasse a chiarirne la funzione. Notizie aggiuntive ci arrivano da studi condotti su altre due proteine piastriniche che hanno quasi

accidentalmente incappato in PKC- θ . Crosby and Poole nel 2002, studiando una tirosina chinasi citosolica chiamata Bruton's tyrosine kinase (Btk), hanno scoperto una interazione reciproca tra questa proteina e PKC- θ in piastrine umane. In pratica a seguito di stimolazione con Alboaggregina A, PKC- θ fosforila Btk in ser/thr, mentre Btk fosforila a sua volta PKC- θ in tirosina inattivandola.

Moesina, una proteina dei siti d'adesione focale appartenente alla famiglia di ERM (ezrin-radixin-moesin) implicata nel legame tra membrana e citoscheletro è l'unico substrato putativo di PKC- θ finora identificato nelle piastrine. Pietromonaco e colleghi infatti nel 1998, studiando Moesina, hanno scoperto che essa veniva fosforilata *in vitro* proprio dalla isoforma θ di PKC. Purtroppo, nessuno studio successivo è riuscito a dimostrare che l'interazione tra PKC- θ e Moesina avvenga anche in vivo.

Come accennato in precedenza, PKC- θ è risultata essere particolarmente espressa nelle piastrine, tuttavia il ruolo di questa isoforma in queste cellule rimane essenzialmente oscuro.

METODI

Preparazione delle piastrine

Campioni di sangue intero sono stati ottenuti da donatori sani, adulti di 20-40 anni che non hanno assunto farmaci nelle due settimane precedenti il prelievo, il quale è stato eseguito utilizzando ACD (130 mM acido citrico; 152 mM citrato di sodio; 112 mM glucosio), come anticoagulante. Le piastrine ottenute tramite gel-filtrazione su una colonna di CL-2B sefaroso come già descritto in precedenza (Torti et al.), sono state portate alla concentrazione di 3×10^8 cellule/ml in HEPES buffer contenente 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 and 2 mM glucosio.

Coltura cellulare ed induzione del differenziamento

Le HEL sono state coltivate in terreno RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium 1640) al 15% di FBS (siero fetale bovino inattivato al calore), con l'aggiunta di antibiotici ed antimicotici e di 2mM L-glutamina a 37°C al 5% CO_2 . Le cellule sono splittate quando per concentrazioni superiori a 10^6 cellule/ml. Una buona concentrazione per la crescita è di 10^4 - 10^5 cellule/ml. Il differenziamento megacarcinico delle HEL è stato indotto aggiungendo al terreno di coltura 100 nM PMA (forbolo miristato acetato) per 72 ore a 37°C al 5% CO_2 . A questo scopo, le cellule in coltura vengono contaminate con trypan blue, centrifugate e portate in terreno completo ad una concentrazione di 10^6 cell/ml e ad un volume tra i 10 ed i 30 ml.

Per ogni esperimento sono state allestite quattro sottocolture: (1) cellule trattate con 0.0002% DMSO, (2) 100 nM PMA + 0.0001% DMSO, (3) 1 μM θ -PS + 0.0001% DMSO, (4) 1 μM θ -PS + 100 nM PMA. Le cellule così trattate vengono incubate 72 ore a 37°C e al 5% CO_2 . Trascorse le 72 ore le cellule di ciascuna fiasca vengono contaminate separatamente, lavate due volte in PBS e risospese alla concentrazione di 10^6 cellule/ml sempre in PBS. Dopo la marcatura con anticorpi, le cellule sono state analizzate al citofluorimetro o al microscopio confocale, oppure lisate con detergenti per l'analisi biochimica.

Valutazione dell'aggregazione e del cambio di forma

I campioni di piastrine gel-filtrate (0.4 ml) sono stati preconditionati a 37°C in un lumiaggregometro prima dell'aggiunta di 1 o 0.01µM peptide miristoilato pseudo substrato di PKC-θ (θ-PS) e/o trombina (1 U/ml). Le piastrine sono state preincubate per 5 minuti con 1 o 0.01µM θ-PS prima della stimolazione con trombina. L'inibitore di PKC, Ro-318220 (1 µM) è stato aggiunto 15 minuti prima della stimolazione. L'aggregazione piastrinica è stata monitorata nel tempo come incremento della trasmittanza.

Il cambio di forma piastrinico è stato valutato essenzialmente come descritto sopra ma l'aggregazione è stata evitata preincubando i campioni con 10 mM EGTA, essenzialmente come descritto da Negrescu et al., per 5 minuti prima della stimolazione con 1U/ml di trombina.

Localizzazione subcellulare di PKC-θ

Piastrine gel-filtrate sono state trattate con buffer o con 1U/ml trombina per tempi crescenti, e le frazioni subcellulari sono state ottenute mediante due diversi metodi. Membrane e citosol sono stati preparati lisando le cellule con digitonina, essenzialmente come descritto da Barry and Gibbins. Aliquote di citosol e della frazione ricca in membrane, contenenti la stessa quantità di proteine totali, sono state separate mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilamide al 8%, trasferite su membrane di PVDF e marcate con anticorpi PKC-θ anti actina. Le bande immunoreattive sono state rilevate mediante reazione di chemiluminescenza.

Le frazioni contenenti il citoscheletro actinico (CSK) e le frazioni Triton X-100 solubili (TX100S), sono state ottenute lisando le cellule con 1% Triton X-100, essenzialmente come descritto da Torti et al.

Immunoprecipitazione di PKC-θ da piastrine

Piastrine gel-filtrate, resting o stimulate con trombina trattate (0.4×10^9 cellule/ml), eventualmente pre-incubate a 37°C con 1µM θ-PS per 5 minuti, sono state lisate in tampone da immunoprecipitazione 2X (100 mM Tris/HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 % Nonidet P40, 0.5 % sodio deossicolato, 20 % glicerolo, 20 µg/ml leupeptina, 20 µg/ml aprotinina, 2 mM PMSF, 2 mM Na₃VO₄, 2 mM NaF). Dopo preclearing con Proteina A-Sepharoso, i surnatanti sono stati incubati con anticorpi anti PKC-θ o anti α-

tubulina (1 µg) per 2 ore a 4°C, immunoprecipitati con 50 µl di proteina G-Sefaroso per 45 minuti e lavati tre volte con tampone da immunoprecipitazione 1X. Le proteine immunoprecipitate sono state separate mediante SDS-PAGE, trasferite su membrane di PVDF e marcate con anticorpi anti fosfotirosina, anti α-tubulina o anti PKC-θ. In alcuni esperimenti, le membrane marcate con anticorpi anti fosfotirosina sono state strippate e nuovamente marcate con anticorpi anti PKC-θ. Negli esperimenti di coimmunoprecipitazione, le cellule sono state lisate con tampone di lisi al 1% NP-40 (1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, 0.4 mM Na₃VO₄, 10 µg/ml leupeptina, 4 µg/ml pepstatina e 0.1 U/ml aprotinina). Campioni contenenti la stessa quantità di proteine (solitamente 2 mg) sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti PKC-θ per 1 ora a 4°C in presenza di 50 µl di biglie di proteina G-Sefaroso. Le proteine immunoprecipitate sono state analizzate mediante immunoblotting con anticorpi specifici come descritto sopra.

Immunoprecipitazione di PKC-θ nelle HEL

I campioni sono stati lisati 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 sono stati aggiunti gli inibitori delle proteasi (Proteases Inhibitor Cocktail - SIGMA), inibitori delle tirosin-fosfatasi NaF 2mM e Na₃VO₄ 2mM. I lisati sono stati incubati in ghiaccio per 15-20 minuti e poi si centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C. E' stata eseguita la quantificazione delle proteine contenute nei lisati con metodo BCA per immunoprecipitare da un'uguale quantità di proteine in tutti i campioni.

Una volta aggiustati i volumi dei lisati cellulari con IP buffer 1X, ciascun campione è stato addizionato con 1µg di anticorpo anti PKC-θ policlonale ed incubato in camera fredda over-night (su ruota). I campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm a 4°C per eliminare eventuali precipitati. Recuperato il surnatante, è stata aggiunta la proteina G-sefaroso e, dopo incubazione su ruota a 4°C per 45 minuti, gli immunoprecipitati sono stati lavati per 3 volte con IP buffer 1X.

Saggio dell'attività chinasi di PKC-θ

Piastrine gel-filtrate, resting o stimulate con trombina (0.4 x 10⁹ cellule/ml), sono state lisate in tampone di lisi al 1% NP-40 (1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0,

5 mM EDTA, 10 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, 0.4 mM Na₃VO₄, 10 µg/ml leupeptina, 4 µg/ml pepstatina and 0.1 U/ml aprotinina) ed immunoprecipitate con anticorpi anti PKC-θ come descritto sopra. Prima dell'aggiunta della proteina G-Sefaroso ciascun campione è stato separato in due aliquote identiche: una utilizzata per il saggio chinamico e l'altra, di controllo, viene caricata su gel al 8% per elettroforesi e trasferita su membrana per l'immunoblotting con anticorpo anti PKC-θ. Dopo tre lavaggi in tampone di lisi 1% NP-40, gli immunoprecipitati sono stati equilibrati in tampone chinamico (140 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 15 mM MgCl₂ e 2 mM PMSF, 2 mM NaF, 2 µg/ml leupeptina, 2 µg/ml aprotinina, 2 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄). Ciascun campione è stato poi risospeso in 20 µl di soluzione per la reazione chinamica (5mM DTT, e 2µM ATP, in tampone chinamico) contenente 20µCi per reazione di [λ^{32} -P]ATP e 5µg di proteina basica della mielina (MBP), utilizzata come substrato. In alcuni campioni alla soluzione della reazione chinamica sono stati aggiunti 1 µM θ-PS o 3 ng di forbolomiristato-acetato (PMA). La reazione è stata portata avanti per 15 minuti a 37°C. I campioni sono stati separati mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 12%. La quantità di [λ^{32} -P]ATP incorporata nel substrato è stata rilevata mediante autoradiografia.

Microscopia confocale

Campioni di piastrine gel-filtrate, eventualmente preincubate a 37°C per 5 minuti con 1 µM θ-PS, sono state trattate con tampone o con 1U/ml trombina a 37°C per 1 minuto, senza agitazione per evitare la formazione di aggregati. I campioni sono stati fissati in paraformaldeide al 0.5% in PBS. Dopo estensivi lavaggi in PBS per eliminare l'eccesso di paraformaldeide, le piastrine sono state fatte aderire per sedimentazione su vetrino polilisinato. Le piastrine aderenti al vetrino sono state permeabilizzate in ghiaccio con 1% Triton X-100 e poi lavate tre volte in PBS. I vetrini sono stati incubati con 2 µg/ml di anticorpo anti PKC-θ e/o con 2 µg di anticorpo anti α-tubulin in PBS con 1% BSA per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi in PBS i vetrini sono stati incubati per 1 ora con 2.5 µg/ml di anticorpo secondario anti rabbit IgG-FITC e/o 2.5 µg/ml di anti mouse IgG Texas Red. Per marcare il citoscheletro actinico, in alcuni esperimenti, 10 pg di Falloidina-TRITC sono stati aggiunti ai campioni per 10 minuti. I vetrini sono stati ulteriormente lavati in PBS ed è stato montato il coprivetrino aggiungendo FluoroGuard anti-fade reagent per preservare la fluorescenza.

Le immagini sono state raccolte il giorno stesso con un microscopio confocale Bio-Rad MRC1024 (krypton/argon laser) collegato ad un Nikon Diaphot 200, utilizzando un obiettivo ad immersione planapochromat 60X con un'apertura numerica di 1.4. La lunghezza d'onda di eccitazione/emissione era di 488/522 nm per gli anticorpi coniugati con fluoresceina e 567/605 per gli anticorpi marcati con Texas Red.

Analisi citofluorimetrica

L'analisi citofluorimetrica, è stata effettuata per valutare l'espressione dei markers di differenziamento (immunofenotipizzazione) e per valutare il grado di poliploidia raggiunto dalle cellule stimulate. Per l'immunofenotipizzazione, a campioni di 500 μ l di 10^6 cellule/ml sono stati aggiunti 10 μ l di anticorpo anti CD41-FITC o anti CD42-PE o con FITC-conjugated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins, i campioni sono stati incubati per 30 minuti al buio a temperatura ambiente; 1 ml di PBS è stato aggiunto per fermare la reazione. Dopo centrifugazione a 800 rpm per 10 minuti, il pellet è stato risospeso in 500 μ l di PBS.

Per l'analisi della Poliploidia ad 1 ml di 10^6 cellule/ml sono stati aggiunti 3 ml di etanolo ghiacciato, goccia a goccia; i campioni sono stati incubati overnight a -20°C ; il giorno successivo i campioni sono stati lavati in PBS, per eliminare l'etanolo in eccesso, centrifugati a 1400 rpm per 5 minuti, risospesi in PBS con 0.1% di glucosio, nuovamente centrifugati e risospesi in 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). Dopo incubazione a temperatura ambiente per 30 minuti, i campioni sono stati analizzati con un FACSCalibur (Becton-Dickinson), acquisendo 10000 eventi per campione.

RISULTATI

RISULTATI 1:

PKC- θ IN PIASTRINE UMANE

RISULTATI 2:

PKC- θ NEL DIFFERENZIAMENTO MEGACARIOCITICO

RISULTATI 1

PKC- θ in piastrine umane

Localizzazione subcellulare di PKC- θ

Al fine di indagare la localizzazione subcellulare di PKC- θ e la sua eventuale traslocazione al citoscheletro, piastrine gel-filtrate sono state stimolate per 30 e 60 secondi con 1u/ml di trombina. Dopo la lisi con 1% Triton X-100, i campioni sono stati frazionati per separare la frazione solubile al Triton X-100 (TX100) da quella insolubile al Triton X-100, ovvero il citoscheletro actinico (CSK) (Torti et al.). Usando un'altro metodo, le piastrine sono state frazionate usando come detergenti digitonina e poi Triton X-100, come descritto nei materiali e metodi (Barry and Gibbings), per ottenere la frazione citosolica (CYT) e la frazione ricca in membrane (MEM). Aliquote di ciascuna frazione, contenenti la stessa quantità di proteine, sono state analizzate mediante immunoblotting usando anticorpi specifici diretti contro PKC- θ . Figura 1 mostra che PKC- θ non è presente nel citoscheletro di piastrine sia resting che stimolate. Tuttavia PKC- θ localizza prevalentemente nel citosol di piastrine resting ed in seguito a stimolo con trombina si osserva una massiccia diminuzione di PKC- θ nella frazione citosolica ed un deciso incremento della presenza di questa proteina nella frazione ricca in membrane, già massima 30 secondi lo stimolo con trombina.

Per caratterizzare ulteriormente la localizzazione subcellulare di PKC- θ le cellule sono state stimolate per 1 minuto con 1U/ml di trombina, fissate, permeabilizzate ed analizzate al microscopio confocale previa marcatura con anticorpi fluorescenti diretti contro PKC- θ . Le immagini di Figura 2 mostrano come PKC- θ nelle piastrine resting localizzi poco sotto la membrana plasmatica, con una caratteristica distribuzione a forma di anello (Figura 2, pannello a) tipica dei microtubuli piastrinici (Figura 2, pannello b). Dopo stimolazione con trombina, PKC- θ assume una distribuzione più disordinata e diffusa (Figura 2, pannello d), simile a quella della α -tubulina alle stesse condizioni (Figura 2, pannello e). La simultanea marcatura delle piastrine con anticorpi anti PKC- θ coniugati FITC e anti α -tubulina coniugati TRITC è mostrata nei pannelli c e f di Figura 2. L'analisi di colocalizzazione dimostra che PKC- θ colocalizza con α -tubulina (Figura 2, pannello c), nelle piastrine resting e, in misura minore, nelle piastrine stimolate con trombina (Figura 2, pannello f).

Figura 1

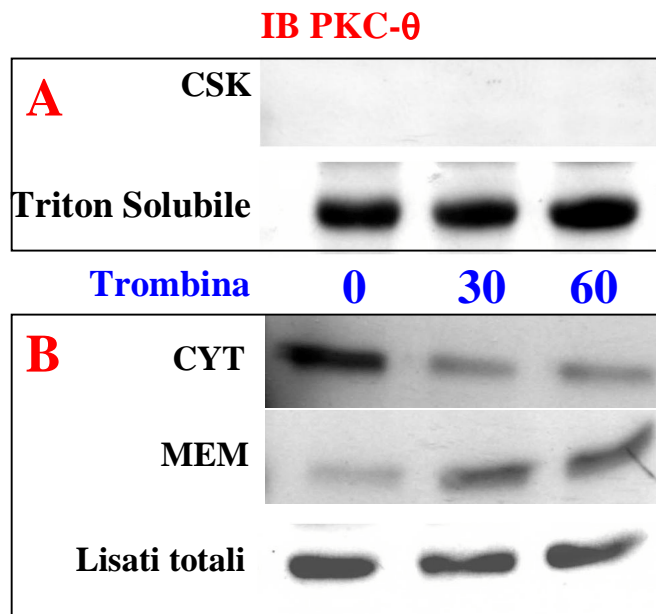


Fig.2. Localizzazione subcellulare di PKC- θ . A) L'enzima è assente nella frazione del citoscheletro actinico (CSK) ma è presente in egual quantità nella frazione solubile al Triton X-100. B) Nelle piastrine non stimulate PKC- θ è presente principalmente nella frazione citosolica (CYT), mentre nelle piastrine stimulate con trombina PKC- θ è rilevabile essenzialmente nella frazione ricca in membrane (MEM):

Figura 2

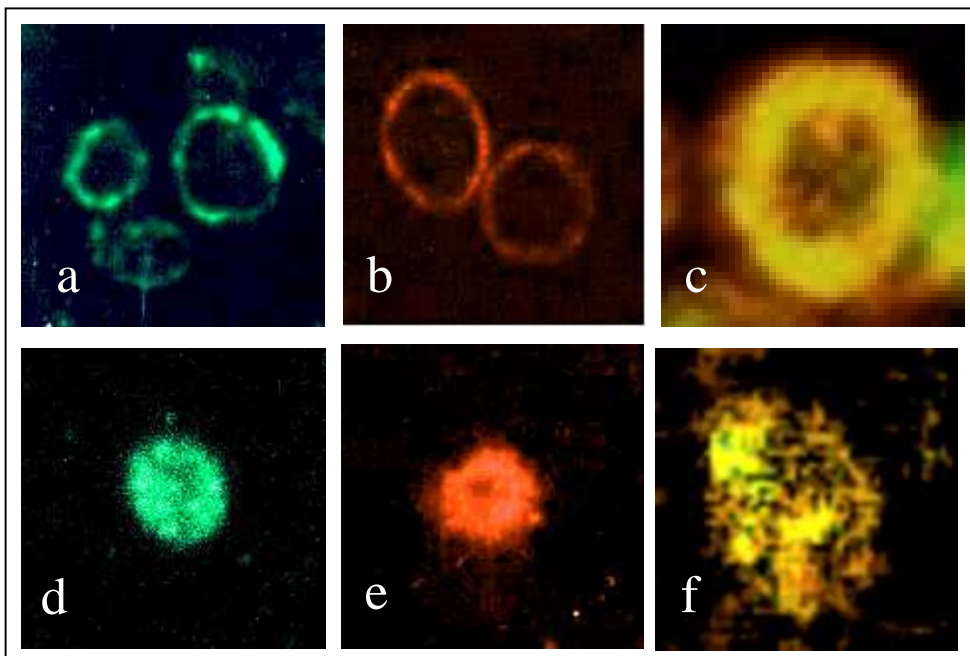


Fig.2. Localizzazione al microscopio confocale di PKC- θ (in verde, a; b), α -tubulina (in rosso, b; e) e di PKC- θ insieme a α -tubulina (c; f), in piastrine resting (a; b; c) e stimulate con trombina (d; e; f).

Fosforilazione in tirosina ed associazione con α -tubulina di PKC- θ

Per caratterizzare ulteriormente l'associazione di PKC- θ con α -tubulina, sono stati eseguiti degli esperimenti di coimmunoprecipitazione. Figura 3 dimostra chiaramente la presenza di una discreta quantità di molecole di α -tubulina negli immunoprecipitati di PKC- θ ottenuti da lisati di piastrine stimulate con trombina. Per contro, l'associazione tra le due proteine nelle piastrine resting è risultata debole e quasi irrilevante. Queste evidenze indicano che la trombina è in grado di indurre l'associazione tra PKC- θ e α -tubulina. Esperimenti simili eseguiti con anticorpi anti PKC- α invece che anti PKC- θ hanno dimostrato che PKC- α non interagisce con α -tubulina in nessuna delle condizioni considerate (dati non riportati). Inoltre la marcatura degli stessi campioni con anticorpi anti fosfotirosina ha evidenziato la presenza di fosforilazione della PKC- θ nelle piastrine stimulate con trombina.

Allo scopo di approfondire lo studio della fosforilazione in tirosina di PKC- θ sono stati eseguiti degli esperimenti in cui gli immunoprecipitati di PKC- θ sono stati separati mediante elettroforesi utilizzando gel di gradiente al 5-15%. In alcuni esperimenti le piastrine sono state trattate con 100 μ M pervanadato con l'intento di inibire l'attività delle tirosina fosfatasi come descritto da Falet et al. Le proteine immunoprecipitate sono state analizzate mediante immunoblotting, prima con anticorpi anti fosfotirosina e poi con anticorpi anti PKC- θ . Nelle piastrine resting, PKC- θ non è fosforilata in tirosina ed il trattamento con pervanadato non è in grado di favorire alcuna fosforilazione (Figura 4) in assenza di stimolazione da trombina. Al contrario, negli immunoprecipitati di PKC- θ ottenuti da piastrine stimulate con trombina, è presente un doppietto riconosciuto dagli anticorpi anti fosfotirosina, probabilmente dovuto ad un diverso grado di fosforilazione in ser/thr, come già documentato da Passalacqua et al. Inoltre, in questo processo dovrebbe essere coinvolta un'attività tirosina chinasi dipendente dalla trombina, poiché il pretrattamento con pervanadato potenzia la fosforilazione in tirosina di PKC- θ solo nelle piastrine stimulate e non nelle resting.

Figura 3

IP PKC- θ

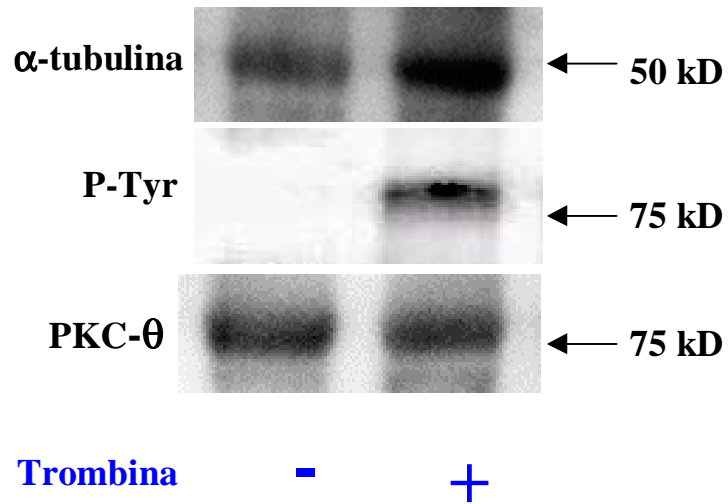


Fig.3. Coimmunoprecipitazione di α -tubulina con PKC- θ . La stimolazione con trombina aumenta l'associazione del α -tubulina e induce la fosforilazione in tirosina di PKC- θ .

Figura 4

IP: PKC- θ

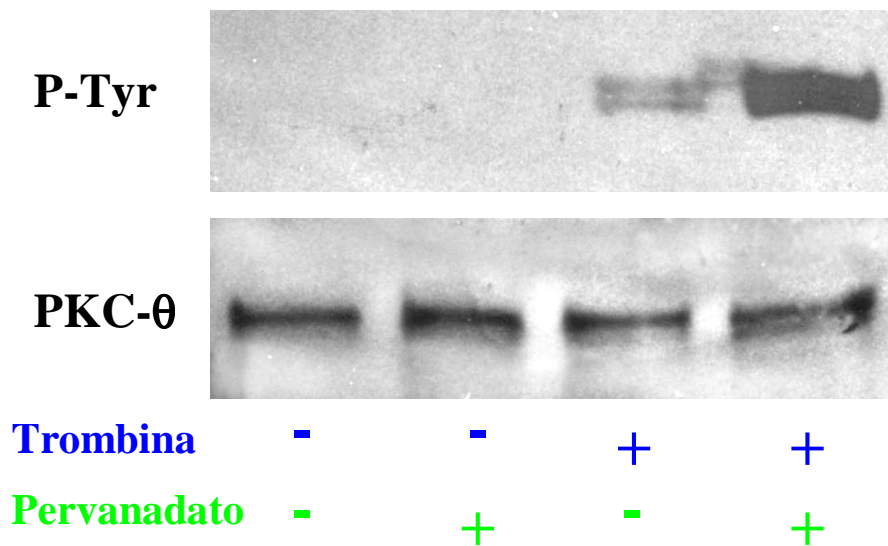


Fig.4. Fosforilazione in tirosina di PKC- θ indotta dalla trombina. L'inibizione delle tirosina fosfatasi con pervanadato aumenta il segnale di fosforilazione solo nelle piastrine stimulate con trombina ma non nelle resting.

Attività di PKC- θ

Abbiamo voluto verificare lo stato di attivazione di PKC- θ nelle piastrine resting ed in quelle attivate mediante un saggio di attività chinasicca su immunoprecipitati di PKC- θ , utilizzando la proteina basica della mielina (MBP) come substrato. L'attività di PKC- θ è stata valutata come quantità di radioattività incorporata nel substrato. Per verificare che ciascun campione contenesse la stessa quantità di proteina, gli immunoprecipitati sono stati divisi in due aliquote identiche: un'aliquota è stata utilizzata per il saggio chinasicco (pannello inferiore di Figura 5), secondo quanto descritto nei metodi, mentre l'altra è stata separata elettroforeticamente su un gel all' 8% di poliacrilammide e sottoposta ad immunoblotting con anticorpi anti PKC- θ (pannello superiore di Figura 5).

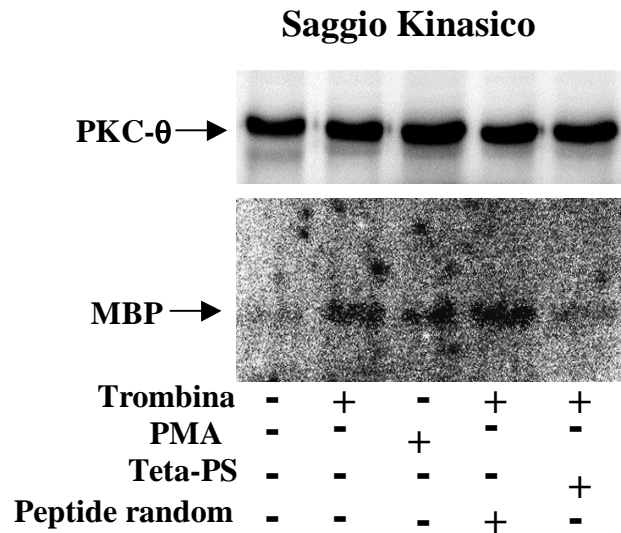
Come si può osservare dal pannello inferiore di Figura 5, PKC- θ è risultata sostanzialmente inattiva nelle cellule resting. Al contrario, PKC- θ purificata da piastrine stimulate con trombina, è attiva ed in grado di fosforilare la MBP, tanto quanto quella isolata da cellule resting e stimolata *in vitro* con PMA.

Inoltre abbiamo valutato la capacità di un peptide miristolato, che mima la sequenza di pseudosubstrato posta al N-terminale della proteina, di inibire l'attività di PKC- θ . I peptidi pseudo substrato miristolati sono considerati altamente selettivi e capaci di permeare le membrane cellulari (Eichholtz et al., Spyridopoulos et al.). Inoltre, Passalacqua et al. hanno recentemente verificato la specificità di θ -PS *in vitro*. Tuttavia la capacità di questo peptide di inibire l'isoforma θ di PKC nelle piastrine umane non era mai stata verificata in precedenza. L'enzima immunoprecipitato da piastrine stimulate con trombina ma fatto reagire con il substrato in presenza di 1 μ M θ -PS non è più in grado di fosforilare MBP, indicando che la presenza del θ -PS inibisce completamente l'attivazione dell'enzima indotta dalla trombina, riportando la fosforilazione del substrato a livelli paragonabili a quelli della PKC- θ immunoprecipitata da cellule resting. Per verificare che l'azione inibitoria di θ -PS sia determinata da un'interazione specifica con il dominio chinasicco dell'enzima, abbiamo utilizzato come controllo, un peptide miristolato con una sequenza random della stessa lunghezza di θ -PS. Come mostrato in Figura 5, il peptide random non interferisce con l'attività chinasicca della PKC- θ ottenuta da immunoprecipitati di piastrine stimulate con trombina, indicando così che l'effetto inibitorio di θ -PS è specifico.

Gli istogrammi del grafico in fondo alla Figura 5 riportano invece i dati relativi alla quantificazione delle bande di fosforilazione della MBP ottenuti da 4 diversi esperimenti eseguiti alle medesime condizioni sperimentali.

Figura 5

A



B

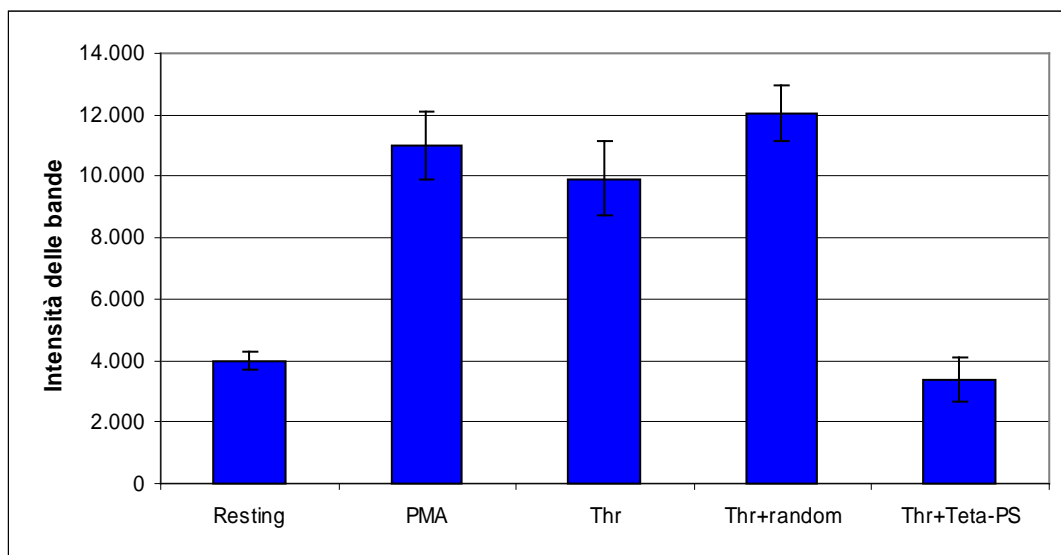


Fig.5. Saggio dell'attività chinasi di PKC- θ . A) Nel pannello superiore è riportato il rilevamento mediante immunoblotting della quantità di enzima immunoprecipitato da ciascun campione. Pannello inferiore: autoradiografia del $[\gamma^{32}\text{-P}]\text{ATP}$ incorporato nel substrato (MBP). B) Quantificazione dell'intensità delle bande delle autoradiografie ottenute da tre diversi saggi di attività chinasi.

Ruolo di PKC- θ nel cambio di forma piastrinico

Ulteriori esperimenti sono stati eseguiti nel tentativo di comprendere il ruolo di PKC- θ sulla funzionalità piastrinica intesa come capacità delle piastrine di cambiare forma e di formare aggregati.

Il cambio di forma piastrinico e l'aggregazione sono stati valutati come descritto nei metodi, utilizzando campioni di piastrine preincubate con 10 μ M Ro 31-8220 o θ -PS (0.01 μ M - 1 μ M) per 5 minuti a 37°C per inibire rispettivamente tutte le isoforme di PKC o il solo isoenzima θ . Né Ro 31-8220 né θ -PS sono in grado di indurre da soli il cambio di forma o l'aggregazione (Figura 6). Tuttavia, mentre Ro 31-8220 inibisce drasticamente l'aggregazione ed il cambio di forma indotti da trombina, θ -PS causa solo una leggera inibizione della aggregazione (Figura 6, pannello B). L'inibizione di PKC- θ con θ -PS provoca però un aumento significativo e dose-dipendente del cambio di forma indotto dalla trombina (Figura 6, pannello A).

Il cambio di forma piastrinico è un fenomeno molto complesso, dovuto a meccanismi sia dipendenti che indipendenti dal Ca^{2+} , responsabili rispettivamente della polimerizzazione dell'actina e della depolimerizzazione dei microtubuli (Paul et al.). Per caratterizzare il tipo di influenza esercitato da PKC- θ sul cambio di forma piastrinico, campioni di piastrine gel-filtrate sono stati preincubati con θ -PS o con Ro 31-8220 per 5 minuti a 37°C, quindi addizionati con tampone o trombina per 1 minuto a 37°C in assenza di agitazione per evitare l'aggregazione ed infine fissati e preparati per la microscopia confocale. Le piastrine sono state trattate contemporaneamente sia con un anticorpo anti α -tubulina e relativo anticorpo secondario coniugato FITC, per marcare i microtubuli, sia con falloidina-TRITC per marcare il citoscheletro actinico. Le immagini di Figura 6 sono rappresentative dei risultati ottenuti in tre diversi esperimenti eseguiti alle medesime condizioni sperimentali.

I pannelli b, f e j di figura 6 indicano che θ -PS da solo non induce variazioni rilevabili della distribuzione sia della α -tubulina e dell'actina nelle cellule resting. Risultati identici sono stati ottenuti trattando le cellule con 10 μ M Ro 31-8220 (dati non riportati). Nelle piastrine stimulate con trombina avviene un'evidente diminuzione del diametro del corpo cellulare e la formazione di filopodi di actina; inoltre si ha depolimerizzazione dei microtubuli con conseguente perdita della distribuzione ad anello a favore di una distribuzione diffusa (Figura 6, pannelli c, g e k). Sorprendentemente nelle piastrine stimulate con trombina in cui l'attività di PKC- θ è inibita dal trattamento con θ -PS,

sebbene siano presenti dei filopodi ad indicare che la normale polimerizzazione dell'actina è avvenuta, i microtubuli mantengono la loro struttura ad anello, così come il diametro del corpo della piastrina rimane simile a quello delle cellule resting (Figura 6, pannelli d, h e l). Questi esperimenti indicano che, in condizioni di inibizione di PKC- θ , si ha il blocco del disassemblaggio dei microtubuli indotto dalla trombina. Questi risultati sono consistenti con quelli ottenuti in aggregometria (Figura 5), i quali indicano che PKC- θ è coinvolta nel cambio di forma piastrinico. Inoltre, poichè θ -PS inibisce la depolimerizzazione dei microtubuli e non i riarrangiamenti actinici, questi dati concordano con l'evidenza di un'interazione tra PKC- θ con i microtubuli ed in particolare con α -tubulina (Figure 2 e 3).

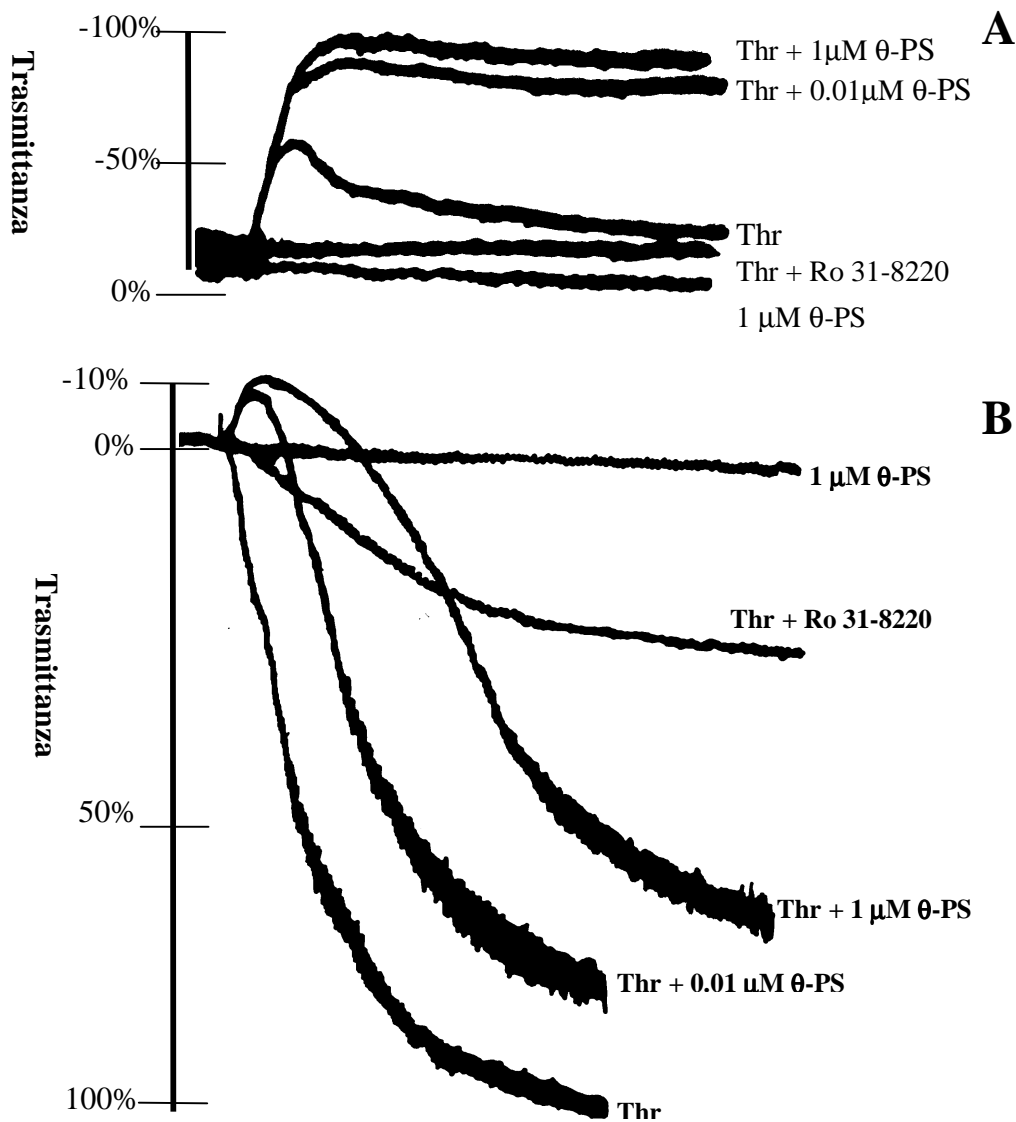


Figura 6

Fig.6. Tracciati di aggregazione ottenuti con un lumiaggregometro. A) Il cambio di forma piastrinico indotto da trombina è potenziato in maniera dose-dipendente dall'inibizione di PKC- θ con θ -PS. B) L'aggregazione indotta da trombina è diminuita fortemente dall'inibizione di tutte le PKC con Ro 31-8220, ma è inibita solo debolmente dalla presenza di θ -PS

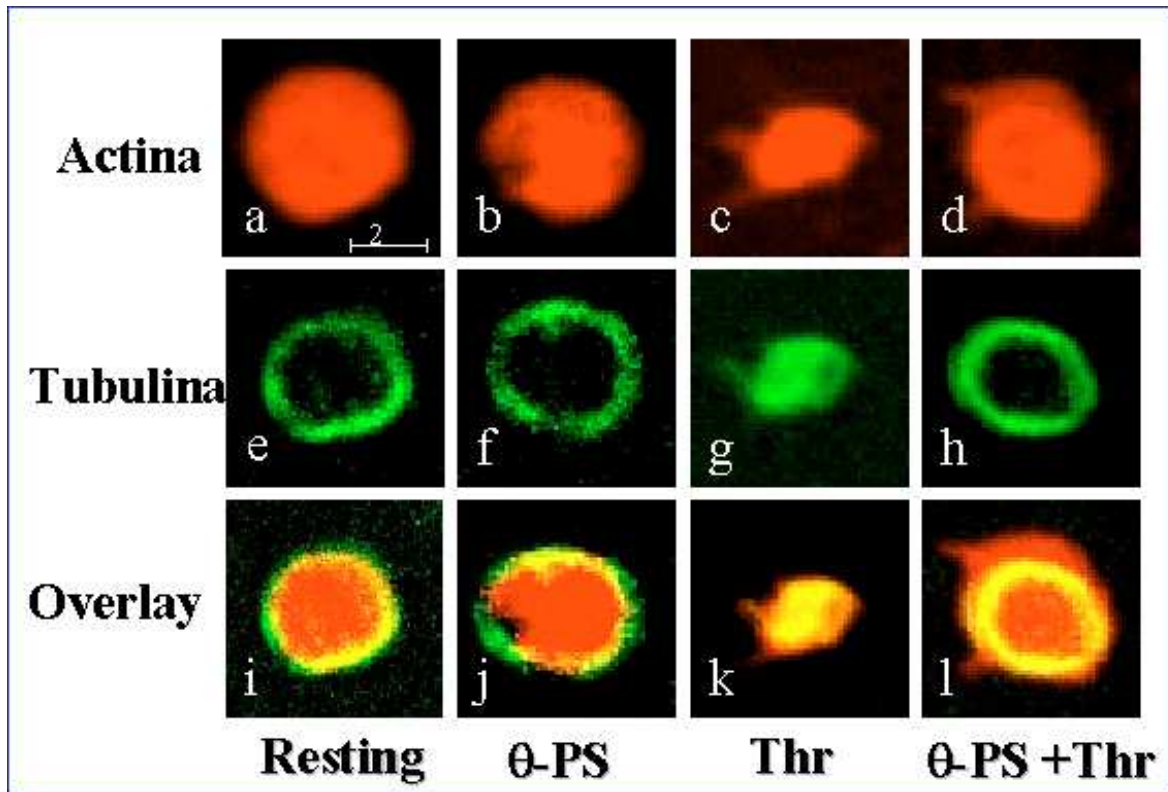


Figura 7

Fig. 7 Citoscheletro piastrinico osservato al microscopio confocale. Inibizione del disassemblaggio dell'anello di microtubuli in piastrine stimulate con trombina in presenza di θ -PS.

DISCUSSIONE 1

In questo lavoro abbiamo dimostrato che nelle piastrine umane la PKC- θ è coinvolta nel cambio di forma piastrinico ed in particolare questo enzima partecipa al processo di depolimerizzazione dei microtubuli indotto dalla trombina.

Il cambio di forma piastrinico è un insieme di processi che avvengono nelle fasi precoci dell'attivazione piastrinica e che coinvolgono principalmente modificazioni dello stato di polimerizzazione della actina e della tubulina (Deranleau et al. Hantgan et al.). E' ben noto ormai che le piastrine, quando vengono stimulate con agonisti, rilasciano il contenuto dei granuli, perdono la loro forma discoidale, il corpo cellulare diminuisce di dimensioni ed emettono protrusioni che conferiscono la caratteristica forma stellata. A livello molecolare queste modificazioni corrispondono ad una massiccia polimerizzazione dell'actina che dà origine a filopodi, alla contrazione e al disassemblaggio dell'anello microtubulare. Sebbene quest'ultimo sia ritenuto responsabile della caratteristica forma discoidale delle piastrine resting, il ruolo dei microtubuli nella funzione piastrinica ed in particolare nel cambio di forma indotto da agonisti è ancora quasi del tutto sconosciuto. In particolare si conosce ancora molto poco riguardo agli eventi responsabili della contrazione e del disassemblaggio dei microtubuli nelle piastrine attivate e tantomeno è stata completamente caratterizzata la cascata di eventi che regola questi processi (White et al.). Si sa soltanto che nelle piastrine il fenomeno è regolato da eventi sia dipendenti che indipendenti dal Ca^{2+} (Paul et al.). Dagli studi in altri tipi cellulari si è scoperto che il processo dinamico di assemblaggio e disassemblaggio della tubulina è finemente regolato dall'attività di ser/thr chinasi, che regolano lo stato di fosforilazione di proteine associate al citoscheletro come MAP-2 e τ nel loro dominio di legame con la tubulina influenzando la stabilità del microtubulo (Jameson et al., Theurkauf et al., Hoshi et al.). Indicazioni in letteratura suggeriscono che proprio le PKC potrebbero essere le chinasi coinvolte in questi processi di fosforilazione. Hoshi e colleghi hanno dimostrato in passato che proprio PKC catalizza la fosforilazione di MAP-2 nel dominio di legame per la tubulina, inibendo così la capacità di MAP-2 di indurre la polimerizzazione dei microtubuli. Nei neuroni si è scoperto che PKC- ϵ , una nPKC che manifesta proprietà di regolazione analoghe a quelle di PKC- θ , è responsabile della fosforilazione di τ . Nelle piastrine la nPKC maggiormente espressa è la PKC- θ , mentre ϵ è assente. Recentemente Banan et al hanno pubblicato un lavoro in cui

dimostrano che l'isoforma θ di PKC lega i microtubuli e ne regola lo stato di polimerizzazione in una linea cellulare intestinale, le Caco-2.

Le informazioni reperibili in letteratura supportano quindi i risultati sperimentali da noi ottenuti su PKC- θ nelle piastrine, i quali indicano un ruolo attivo di questo enzima sui microtubuli nel cambio di forma piastrinico.

L'analisi di microscopia confocale da noi effettuata (Figura 2) dimostra che PKC- θ nelle piastrine resting è localizzata sui microtubuli di cui ne condivide la distribuzione ad anello. Dopo 1 minuto di stimolo con trombina le distribuzioni sia di PKC- θ che della tubulina appaiono disordinate e diffuse. Dagli esperimenti di localizzazione subcellulare, (Figura 1) sappiamo che, a quelle condizioni di stimolo, l'enzima è presente prevalentemente in membrana, contrariamente a ciò che si osserva nelle cellule non stimolate in cui PKC- θ è prevalentemente presente nella frazione citosolica. Inoltre questa traslocazione indotta da trombina è già massima a 30 secondi di stimolazione, suggerendo che la chinasi partecipi agli eventi precoci dell'attivazione piastrinica.

Abbiamo inoltre verificato con esperimenti di coimmunoprecipitazione che l'isoenzima θ associa fisicamente la tubulina. Nelle cellule resting questa associazione appare debole ma è fortemente incrementata dalla stimolazione con trombina (Figura 3). Le condizioni sperimentali ai quali si esegue la immunoprecipitazione (in presenza di detergente e a 0°C), implicano la completa depolimerizzazione dei microtubuli ed escludono perciò la possibilità che questa associazione sia dovuta ad intrappolamento della chinasi nella struttura microtubulare. Per saggiare la specificità dell'associazione sono stati inoltre eseguiti esperimenti analoghi per l'isoforma α di PKC i quali hanno dato esito negativo (dati non riportati).

I risultati ottenuti dai saggi di attività chinasica (Figura 5) hanno dimostrato che PKC- θ è cataliticamente inattiva nelle piastrine resting, mentre il trattamento delle piastrine con trombina è in grado di determinarne l'attivazione *ex vivo*, almeno tanto quanto il PMA *in vitro*. Abbiamo anche verificato che il θ -PS inibisce in maniera specifica l'attività catalitica di PKC- θ nelle piastrine stimolate con trombina, riportandola ai livelli basali. L'utilizzo di questo inibitore è stato fondamentale per le indagini sul ruolo funzionale di PKC- θ . A questo riguardo, le analisi all'aggregometro hanno evidenziato che l'inibizione dell'enzima determina un aumento dose-dipendente del cambio di forma piastrinico indotto da trombina, il quale probabilmente è responsabile del rallentamento del processo di aggregazione osservato (Figura 6 pannello b). L'entità del cambio di forma è correlato

all'aumento di assorbanza della sospensione piastrinica. Le cellule stimulate mutano la loro forma da discoidale, tipica dello stato resting, a "stellata" formata da un corpo cellulare sferico da cui si dipartono numerosi filopodi. Le immagini del citoscheletro ottenute al microscopio confocale hanno aiutato a chiarire il significato di questo aumento di assorbanza osservata negli esperimenti di aggregometria. L'inibizione di PKC- θ con θ -PS determina infatti una inibizione del disassemblaggio dei microtubuli indotto da trombina, senza alterare però la polimerizzazione dell'actina e la conseguente formazione dei filopodi (Figura 7). Conseguentemente non si ha diminuzione del diametro del corpo cellulare ed è plausibile supporre che esso mantenga, almeno in parte, la forma discoidale. Si può ipotizzare che la concomitanza dei due eventi, conservazione delle dimensioni del corpo cellulare e formazione dei filopodi, diano come risultante un maggiore assorbimento ottico delle piastrine in sospensione rispetto quelle attivate normalmente dalla trombina. Sempre dalle immagini ottenute al microscopio confocale è stato possibile osservare che l'inibizione della PKC- θ nelle piastrine resting con θ -PS non induce alcuna modificazione della distribuzione del citoscheletro actinico e dei microtubuli, indicando così che PKC- θ non è coinvolta nel mantenimento della struttura microtubulare delle piastrine resting, confermando così che l'enzima nelle cellule non stimulate si trova in uno stato inattivo.

Nel presente lavoro abbiamo dimostrato per la prima volta che la trombina induce la fosforilazione in tirosina di PKC- θ . Crosby and Poole hanno recentemente riportato una fosforilazione in tirosina di PKC- θ dipendente da Btk. All'attivazione di PKC- θ seguirebbe la fosforilazione in ser/thr di Btk; tale fosforilazione determina l'attivazione di Btk che per contro fosforila PKC- θ in tirosina inattivandola. Gli autori hanno però dimostrato che Btk si fosforila solo in risposta all'attivazione della via di trasduzione della GPVI, ma non di quella dei recettori della trombina (Crosby and Poole). In aggiunta Bauer et al hanno dimostrato che Btk non è coinvolta nel cambio di forma. Conseguentemente dobbiamo pensare che la tirosina chinasi responsabile della fosforilazione in tirosina di PKC- θ indotta dalla trombina sia ancora da identificare.

Nei linfociti T è stato dimostrato da tempo che la fosforilazione in tirosina di PKC- θ da parte della chinasi Lck è importante per l'attività dell'enzima. Se il sito di fosforilazione in tirosina è mutato, l'attività dell'enzima diminuisce drasticamente sia *in vitro* che *in vivo* (Liu et al. 2000). La tirosina chinasi Lck è presente nelle piastrine ed è un'ottima candidata al ruolo di chinasi responsabile della fosforilazione di PKC- θ in queste cellule. Tuttavia questa ipotesi rimane ancora da verificare.

Volendo proporre un modello si può ipotizzare che PKC- θ nelle piastrine resting si trovi nel citosol, subito sotto la membrana piastrinica (White et al.), associata all'anello di microtubuli mediante interazioni deboli non rilevabili dopo trattamento con detergenti. A queste condizioni l'enzima si troverebbe inattivo, nella sua forma chiusa, in cui il dominio chinasi al C-terminale è legato al dominio di pseudosubstrato dell'estremità N-terminale, e forse legato ad una proteina "scaffold" (Wheeler-Jones et al., Ron et al., Altman et al.). In seguito a stimolo con trombina si ha la formazione fosfolipasi-C dipendente di diacilglicerolo, che favorisce la localizzazione in membrana e l'attivazione di PKC- θ . Allo stesso tempo la trombina determina l'attivazione di una tirosina chinasi in grado di fosforilare PKC- θ . In analogia con quanto dimostrato nei linfociti (Liu et al.), la fosforilazione in tirosina potrebbe modulare l'attività dell'enzima. Il diacilglicerolo e la/le fosforilazione/i inducono cambiamenti conformazionali e strutturali nell'isoforma θ di PKC (Parek et al., Altman et al.) che potrebbero promuovere la stabilizzazione del legame con la tubulina, rendendolo resistente al trattamento con detergenti.

In conclusione, in questo lavoro abbiamo dimostrato per la prima volta che nelle piastrine resting: (i) PKC- θ colocalizza ed associa i microtubuli piastrinici attraverso un'interazione debole sensibile alla lisi con detergenti. A seguito di stimolazione con trombina (ii) PKC- θ trasloca sulla membrana; (iii) diviene cataliticamente attiva; (iiii) PKC- θ viene fosforilata in tirosina da una chinasi attivata dalla trombina; (iiiii) PKC- θ associa con α -tubulina mediante interazioni resistenti al trattamento con detergenti. L'inibizione dell'attività enzimatica di PKC- θ mediante l'utilizzo di un peptide con una sequenza analoga a quella del substrato, θ -PS (iiiii) inibisce la depolimerizzazione dei microtubuli indotta da trombina; (iiiii) aumenta il cambio di forma piastrinico. Sebbene siano necessari ulteriori esperimenti per caratterizzare meglio il tipo di azione e di interazione di PKC- θ sui microtubuli, nel presente lavoro è stato dimostrato che l'isoforma θ di PKC svolge un ruolo nel cambio di forma indotto da agonisti in piastrine umane probabilmente mediato dall'azione dell'enzima sul processo di depolimerizzazione dei microtubuli.

RISULTATI 2

PKC- θ nel differenziamento megacariocitico

Cambio di forma indotto dal PMA

Le HEL sono cellule che crescono in sospensione, se osservate al microscopio appaiono di forma tondeggianti 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.

Figura 1

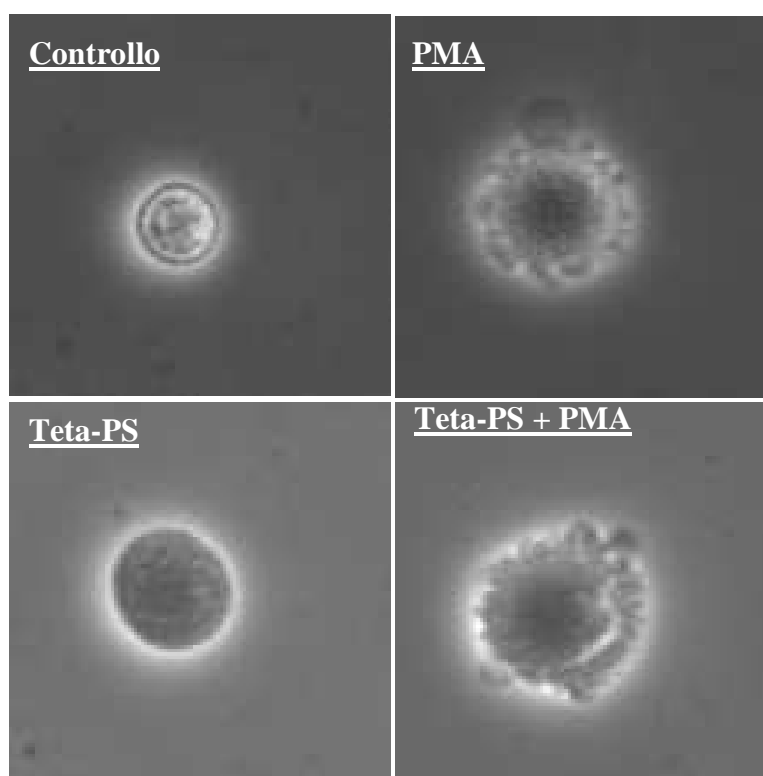
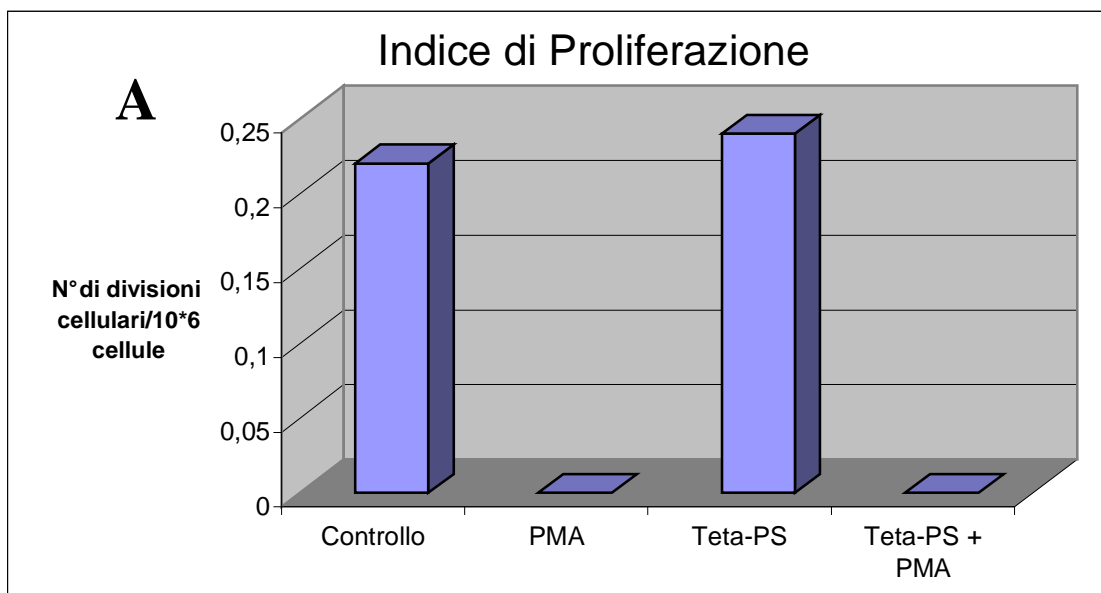


Fig. 1. Immagini ottenute con il microscopio a contrasto di fase di celle HEL.

Arresto della proliferazione nelle cellule differenziate

Fiasche contenenti 10^6 cellule/ml sono state trattate con 0.0001% DMSO (cellule di controllo), 100 nM PMA, 100 nM θ -PS e 100 nM PMA + 100 nM θ -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



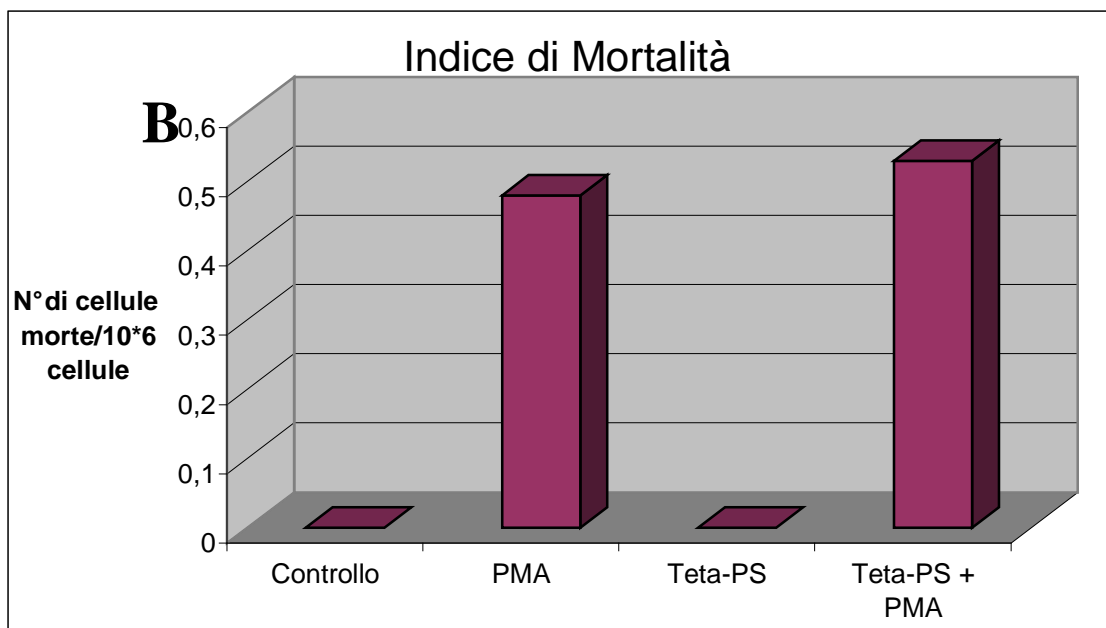


Tabella 1

	Proliferazione	Mortalità
Controllo	0.22 ± 0.01*	0
PMA	0	0.48 ± 0.06*
θ-PS	0.24 ± 0.06*	0
θ-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 θ-PS non influenza in maniera significativa né la proliferazione cellulare né la mortalità. Le cellule trattate con θ-PS da solo o con θ-PS in presenza di PMA non mostrano variazioni di rilievo rispetto agli stessi campioni in assenza dell'inibitore.

PKC-θ non influenza lo scattering indotto da PMA

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 dello scattering. 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 per 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 , θ -PS non influenza lo scattering della popolazione.

Figura 3

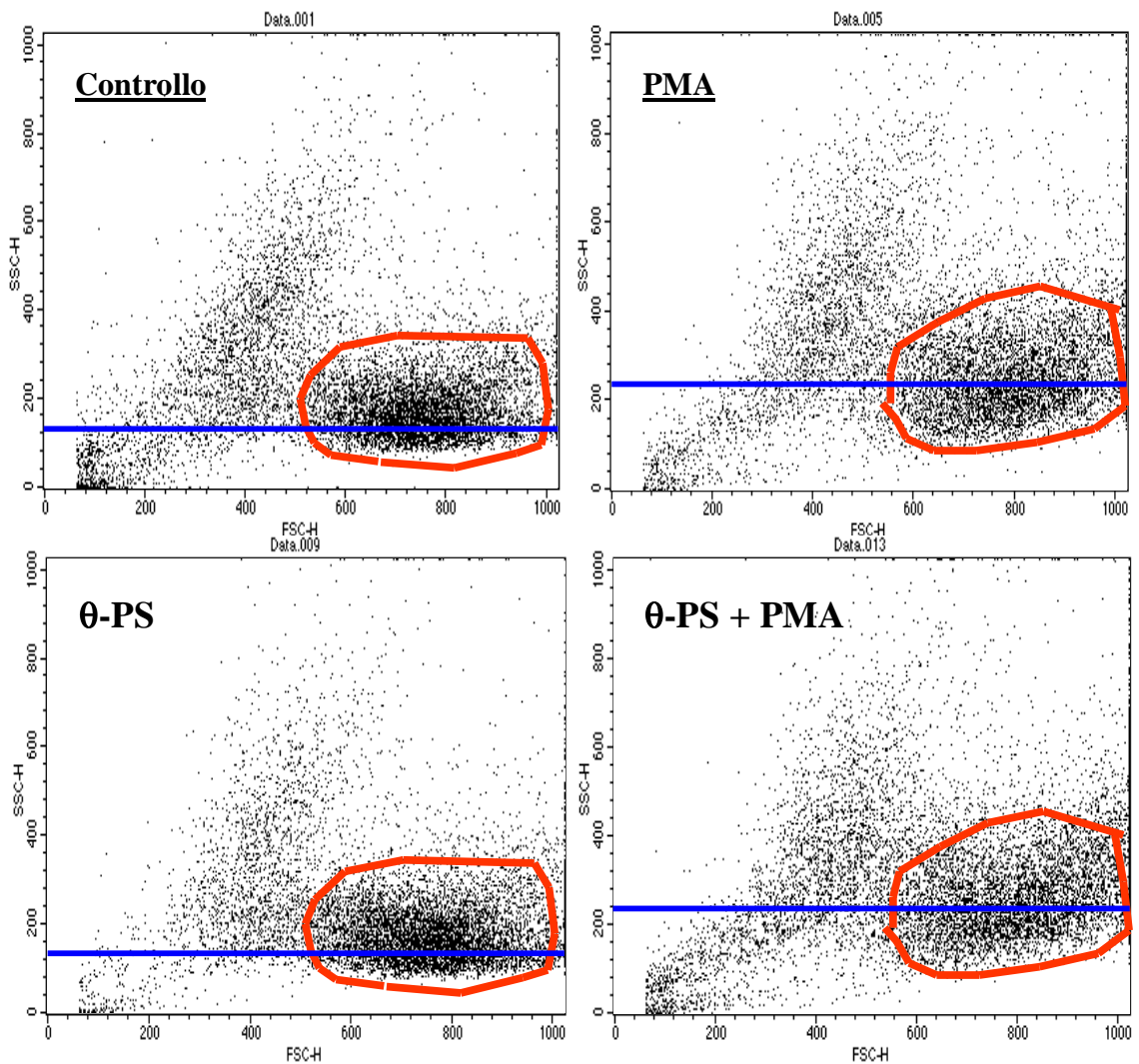


Fig.2. Analisi dello scatter al citofluotimetro. La linea rossa indica la popolazione su cui è stata fatta l'analisi. La line blu indica la media del SSC della popolazione

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

PKC-θ non influenza l'incremento d'espressione del CD41 indotto da PMA

Le stesse cellule utilizzate per la caratterizzazione dello scattering sono state marcate con un anticorpo monoclonale anti-CD41 coniugato FITC ed analizzate al citofluorimetro. In figura 4A è riportato il grafico che illustra la distribuzione della fluorescenza nelle popolazioni di cellule stimolate 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).

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 θ-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 θ-PS e tra le cellule trattate con PMA e quelle trattate con PMA e θ-PS.

Figura 4A

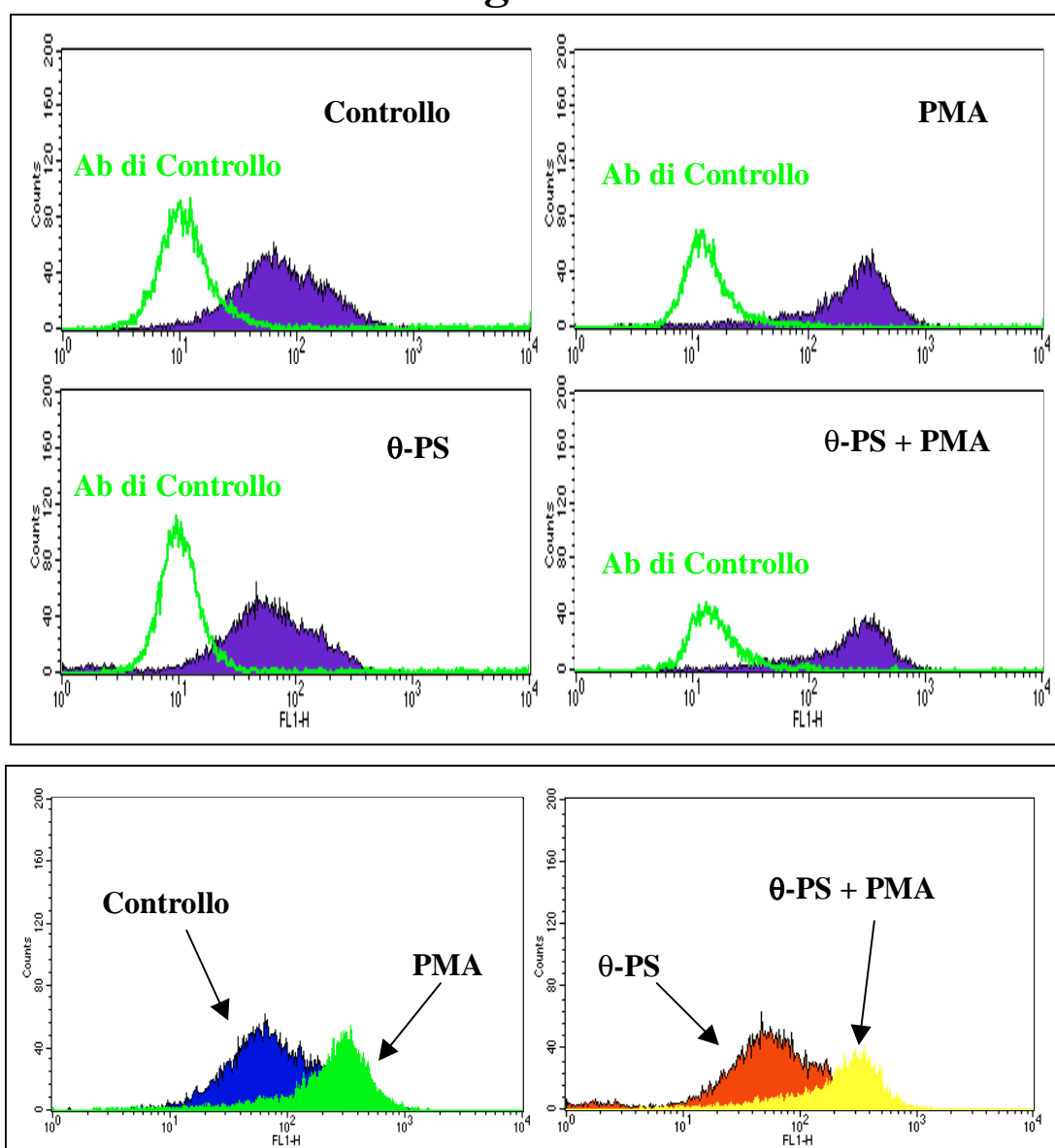


Fig. 4A. Analisi citofluorimetrica dell'espressione del CD41 o integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Nei due riquadri più in basso sono messe a confronto le popolazioni di cellule trattate con o senza PMA (a sinistra), θ -PS non varia le intensità di fluorescenza delle due popolazioni (a destra).

Il PMA non induce un'aumento rilevabile del CD42

Con un procedimento analogo al CD41, le cellule sono state marcate con un anticorpo monoclonale anti-CD42 coniugato PE e lette al citofluorimetro. In figura 4B sono riportate le curve di distribuzione dell'espressione del CD42 sulla superficie cellulare; dopo 72 ore di incubazione dalla stimolazione, non si apprezzano significativi aumenti della fluorescenza tra le cellule di controllo e quelle stimulate 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.

Figura 4B

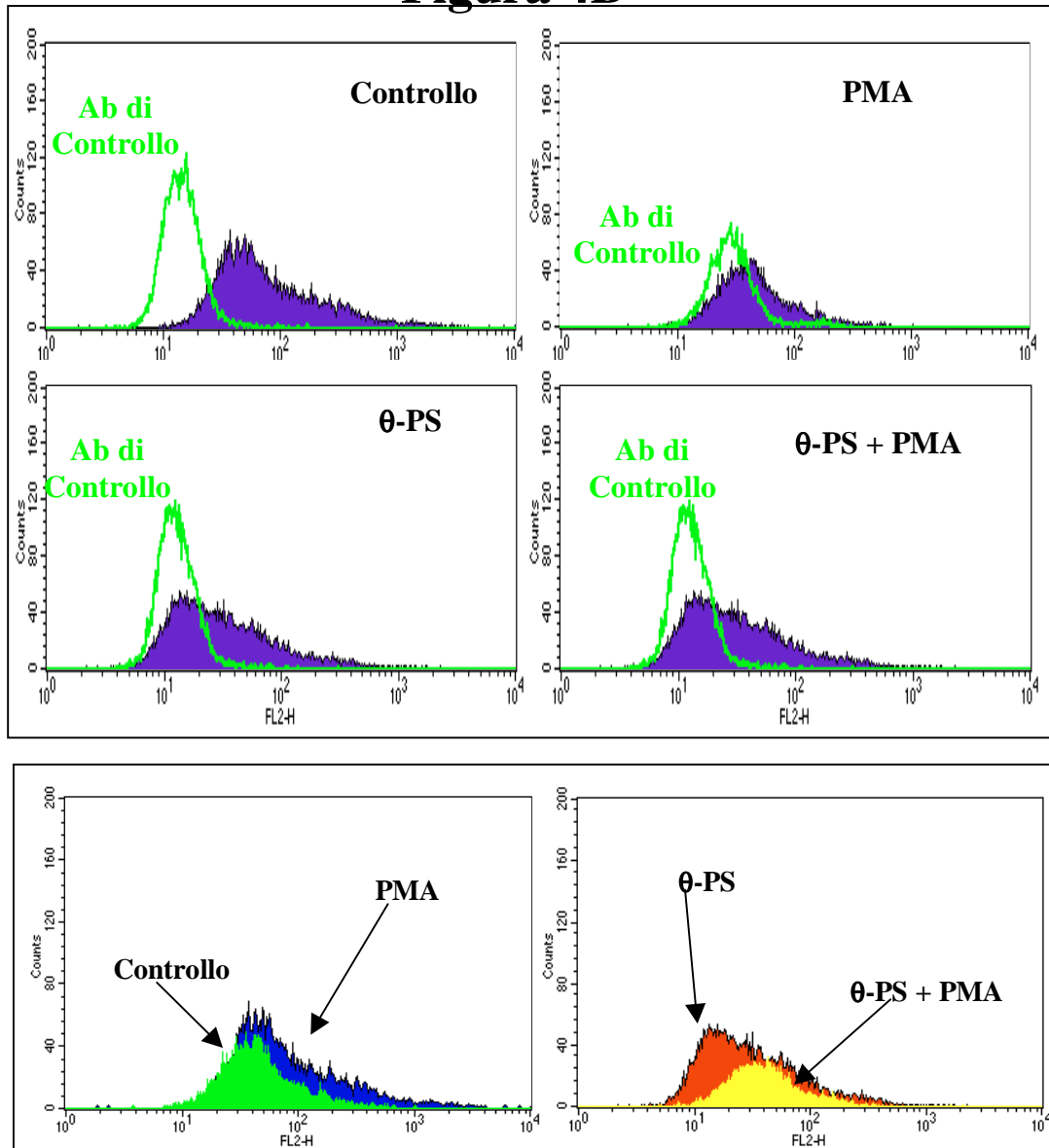


Fig. 4B. Analisi citofluorimetrica dell'espressione del CD42 o GPIb. Nei due riquadri più in basso sono messe a confronto le popolazioni di cellule trattate con o senza PMA (a sinistra), θ -PS non varia le intensità di fluorescenza delle due popolazioni (a destra).

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. 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.

Tabella 3

	Controllo	PMA	θ-PS	θ-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 4C

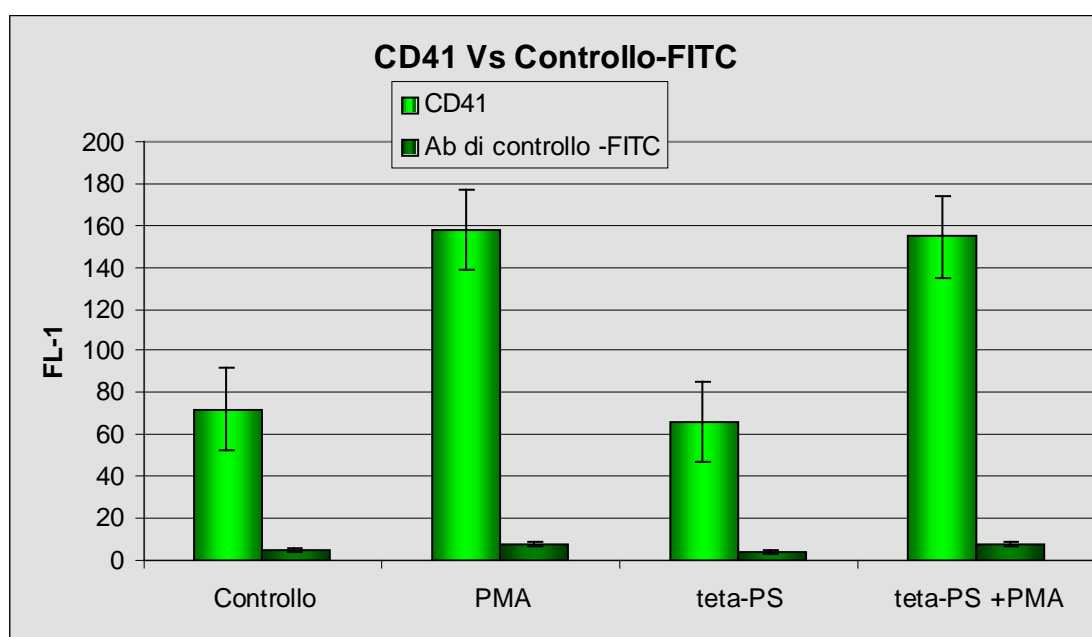


Fig. 4C. Confronto tra le medie delle intensità di fluorescenza dei campioni marcati con anticorpo anti CD41-FITC e gli stessi campioni marcati con anticorpo di controllo coniugato FITC (n=4).

Figura 4D

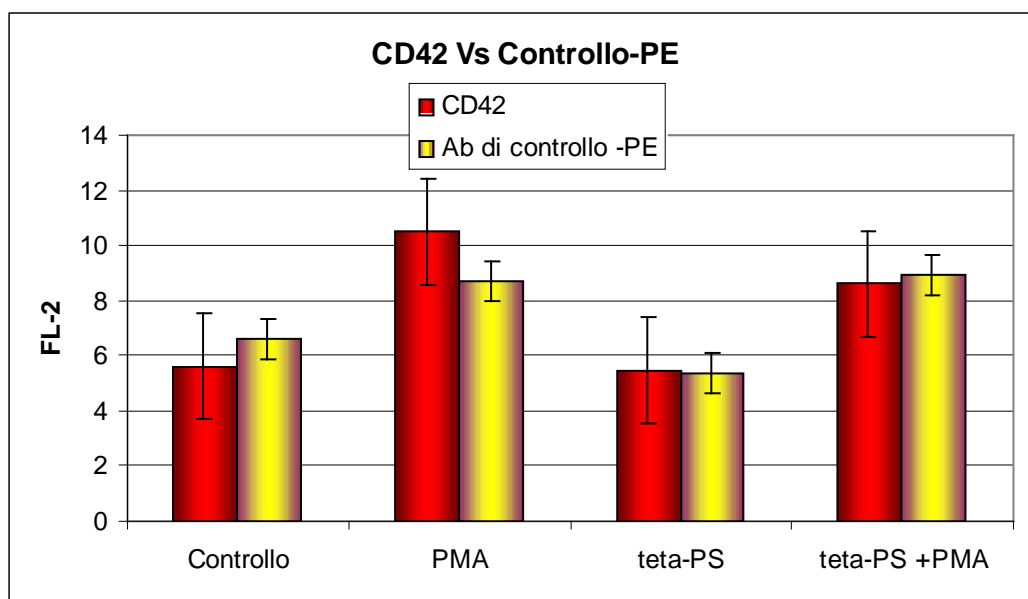


Fig. 4C. Confronto tra le medie delle intensità di fluorescenza dei campioni marcati con anticorpo anti CD42-PE e gli stessi campioni marcati con anticorpo di controllo coniugato PE (n=4).

L'inibizione di PKC- θ inibisce il processo di poliploidia indotta da PMA

Cellule messe in coltura per 3 giorni in presenza di PMA, θ -PS e θ -PS e PMA, sono state trattate secondo il protocollo per l'analisi della poliploidia riportato nei metodi. I risultati ottenuti da 5 diversi esperimenti sono riportati in figura 5.

Figura 5A raffigura alcuni grafici rappresentativi dei tipici tracciati che si ottengono con questa analisi. Il picchi rappresentano rispettivamente le cellule con corredo cromosomico 2N, 4N e >4N rispettivamente. I dati sono stati raccolti e sono state calcolate le percentuali di eventi presenti di 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.

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 θ -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 θ -PS è in grado di inibire il processo di poliploidizzazione indotto dal PMA. Questo effetto inibitorio sulle endomitosi è messo in evidenza dal calcolo dell' "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 sotto forma di istogramma in figura 5C. 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 θ -PS.

Figura 5A

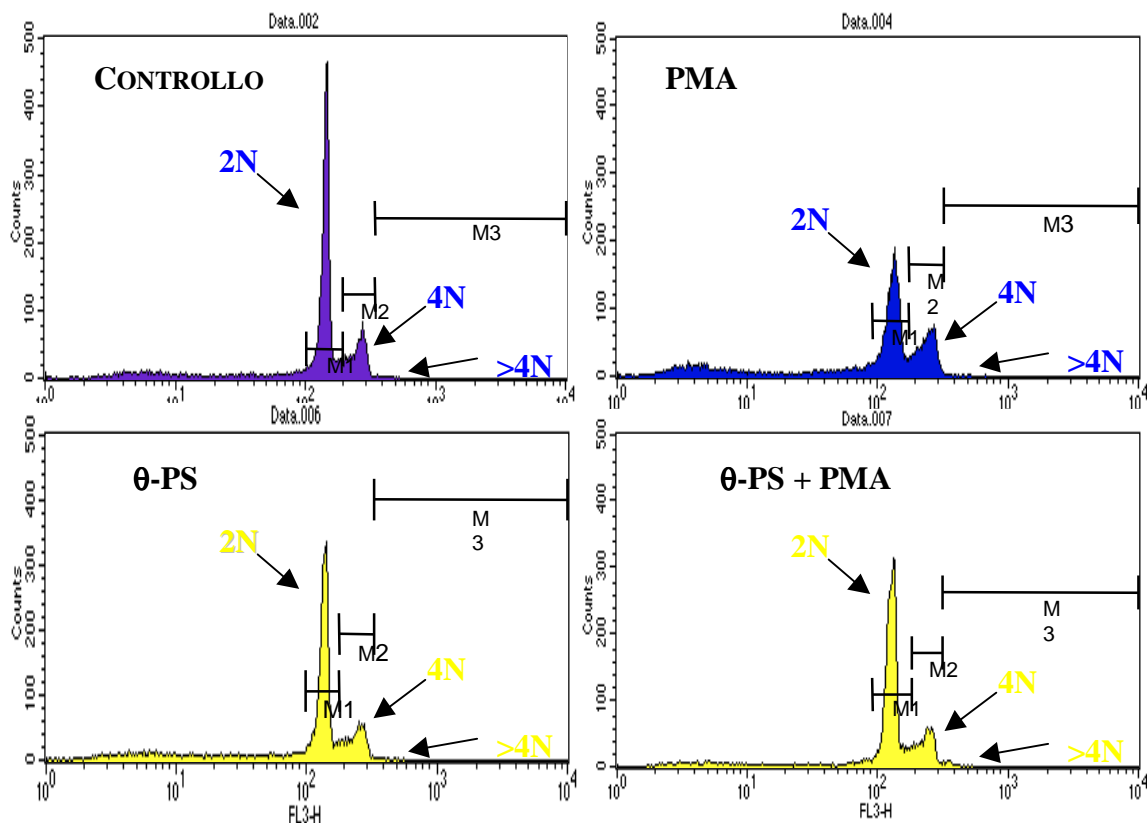


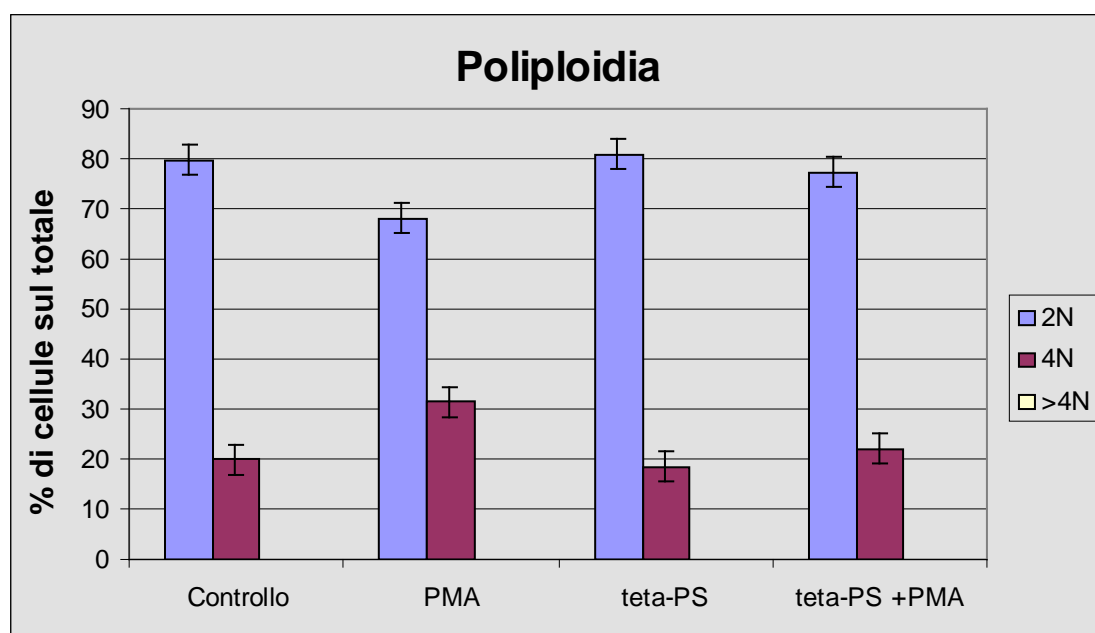
Fig. 5A. Analisi citofluorimetrica della poliploidia. Ciascun picco corrisponde alle cellule che condividono lo stesso corredo cromosomico. Il picco più a sinistra corrisponde alle celle a corredo normale (2N), mentre quello più a sinistra corrisponde alle cellule diploidi (4N).

Tabella 4

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

*Deviazione standard
n=4

Figura 5B



*Errore medio standard

Fig. 5B. Analisi citofluorimetrica della poliploidia. Percentuale di cellule presenti di ciascun picco di fluorescenza rispetto al numero di eventi totali: i dati numerici sono riportati in tabella 4.

Sempre dai dati riportati in tabella 4 risulta evidente che la percentuale delle cellule con corredo cromosomico superiore a 4N, 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

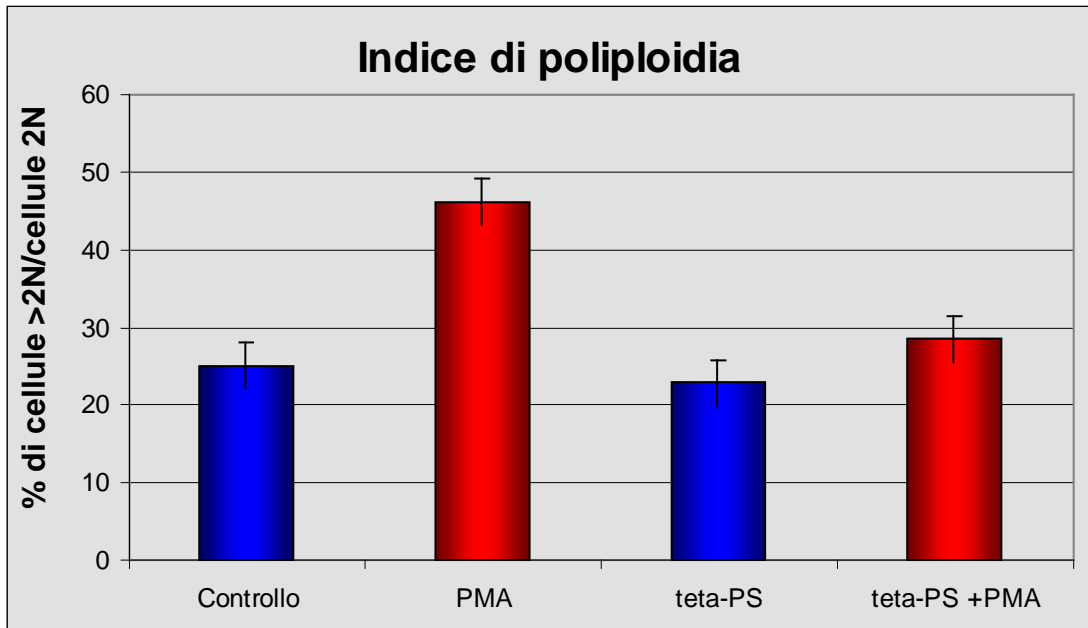


Fig. 5C. “Indice di poliploidia” delle cellule sottoposte ai vari trattamenti. L’indice corrisponde al rapporto tra le medie delle percentuali delle cellule 4N e le medie delle percentuali delle cellule con normale corredo cromosomico 2N moltiplicato per 100 (dati riportati in tabella 5).

Tabella 5

Controllo	PMA	θ-PS	θ-PS +PMA
25.01	46.17	22.81	28.53

Errore Medio Standard = 2.99
n=4

Analisi dell'espressione di PKC- θ nelle HEL ed associazione con α -tubulina

Nelle piastrine avevamo osservato una associazione tra PKC- θ e α -tubulina che era già presente nelle piastrine resting ma diventava molto più evidente nelle piastrine stimulate con trombina (Figura 3 dei Risultati 1). Partendo dai dati ottenuti dalle piastrine, ci è sembrato interessante se tale interazione fosse riscontrabile anche nelle HEL le quali possiedono anch'esse i recettori per la trombina (Vittet et al., 1992). A questo scopo abbiamo stimolato 10^7 cellule con 1U/ml per 30 minuti. Quindi le cellule sono state lisate ed immunoprecipitate con anticorpo anti α -tubulina. I risultati ottenuti (Figura 6) indicano che PKC- θ associa la α -tubulina a seguito di stimolazione con trombina. Negli immunoprecipitati di α -tubulina da cellule stimulate con trombina era infatti presente una notevole quantità di PKC- θ , contrariamente alle cellule stimulate in cui è presente una banda di minore intensità.

Figura 6

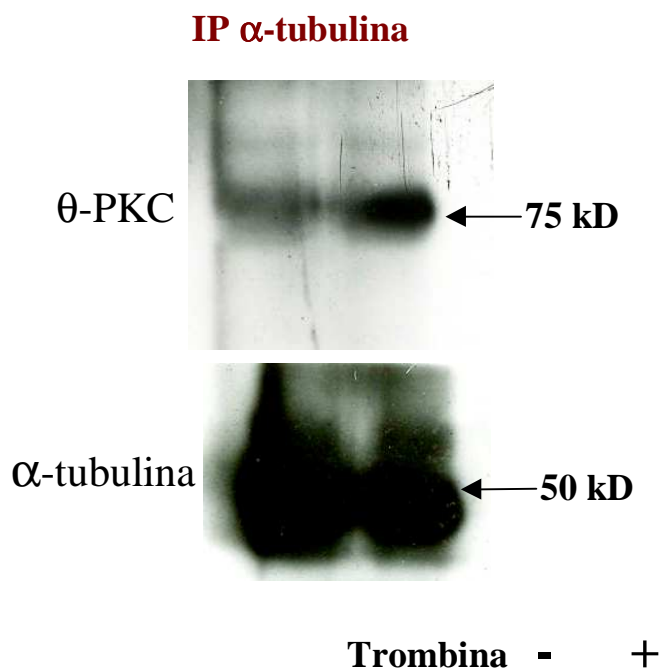


Fig.6. Associazione di PKC- θ con α -tubulina nelle HEL. Lo stimolo con trombina induce un aumento della quantità di α -tubulina rilevabile negli immunoprecipitati di PKC- θ .

DISCUSSIONE 2

L'obiettivo principale del presente lavoro è stato la valutazione del ruolo della isoforma θ di PKC nel differenziamento megacariocitico. Il lavoro è stato strutturato essenzialmente in due fasi: la prima è stata 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; la seconda è stata la valutazione degli effetti dell'inibizione di PKC- θ nel differenziamento megacariocitico utilizzando un peptide inibitore nel sistema sperimentale messo a punto.

Nella prima fase sono stati eseguiti 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. Partendo da esperimenti pilota, abbiamo effettivamente verificato che a 72 ore di trattamento con PMA (100 nM) il processo di differenziamento è il massimo raggiungibile (dati non riportati), per questo motivo abbiamo utilizzato questo tempo di incubazione per tutti gli esperimenti successivi.

L'analisi di questa linea cellulare al microscopio a contrasto di fase ha effettivamente evidenziato un cambio nella morfologia cellulare indotto da PMA, che consiste nella perdita della forma sferica e nella emissione di pseudopodi. 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 alla comparsa dei filopodi.

Abbiamo inoltre verificato, com'era atteso, che le cellule stimulate con PMA cessano 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 cellule HEL sono in grado, una volta indotte a differenziare, di aumentare l'espressione dell'integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, che è un tipico marcatore di piastrine e megacariociti. $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ è risultata essere già espressa dalle

HEL non stimulate, tuttavia dopo 3 giorni di stimolazione, la sua espressione risulta perlomeno raddoppiata.

L'espressione della GPIb nelle HEL trattate con PMA è controversa (Zauli et al. 1996, Tabilio et al., Rajagopalan et al., Kiefferet al.) e dai nostri dati emerge che le HEL non esprimono la glicoproteina Ib ed il trattamento con PMA non è in grado di indurne l'espressione. Peraltro Kiefferet e colleghi hanno dimostrato che la GpIb è presente nelle HEL in una forma incompleta e glicosilata in maniera anomala. Un'ipotesi interessante potrebbe essere quella di considerare il CD41 o GPIb 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 (risultati non presentati).

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. Il fatto che pochissime cellule abbiano corredi cromosomici superiori a 4N, suggerisce che le HEL siano in grado solo di iniziare il processo differenziativo, di arrivare cioè ad uno stadio paragonabile a quello delle cellule CFU-meg, ovvero i progenitori della linea megacariocitica, o al massimo ad uno stadio megacarioblastico precoce.

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 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 .

Nelle piastrine abbiamo dimostrato che trombina promuove la formazione di una interazione stabile con la α -tubulina. Gli esperimenti effettuati nelle HEL di coimmunoprecipitazione di PKC- θ con α -tubulina hanno indicato che dopo 30 minuti di stimolazione con trombina, l'enzima associa i microtubuli. Questo risultato suggerisce un ruolo analogo di PKC- θ nelle HEL e nelle piastrine sulla regolazione dei microtubuli. Sebbene non sia stato possibile verificare direttamente l'azione dell'enzima sullo stato di polimerizzazione dei microtubuli, è ragionevole supporre un effetto di regolazione sull'assemblaggio dei microtubuli in entrambe i tipi cellulari.

Banan et al., hanno dimostrato che, in una linea cellulare intestinale, PKC- θ induce la fosforilazione della β -tubulina, 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 interagendo con la struttura microtubulare. Passalacqua e colleghi hanno recentemente pubblicato un lavoro in cui dimostrano che PKC- θ colocalizza con i cinetocori ed i centrosomi nelle cellule mitotiche. Inoltre Zauli et al. hanno dimostrato che, subito dopo lo stimolo con PMA, PKC- θ migra nel nucleo delle HEL. Mettendo insieme gli indizi riportati in letteratura con le evidenze sperimentali da noi ottenute, si potrebbe speculare che il ruolo di PKC- θ nel differenziamento megacariocitico sia quello di partecipare a quei riarrangiamenti microtubulari che avvengono nel nucleo e che sono coinvolti nella formazione del fuso mitotico, anche in

condizioni di stimolazione che inibiscono la proliferazione cellulare. Tutto questo avrebbe come effetto la promozione della poliploidia attraverso il processo di endomitosi.

In conclusione è stato messo a punto un valido sistema sperimentale per studiare il differenziamento megacariocitico di progenitori mieloidi.

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

- Altman A, Isakov N, Baier G. Protein kinase C θ : a new essential superstar on the T-cell stage. *Immunol Today*. 2000; 21(11):567-73. Review.
- 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* 1985; 7: 97-106..
- Barry FA and Gibbins JM. Protein Kinase B is regulated in platelets by the collagen receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem*. 2002;277:12874-78.
- Bauer M, Maschberger P, Quek L, Briddon SJ, Dash D, Weiss M, Watson SP, Siess W. Genetic and pharmacological analyses of involvement of Src-family, Syk and Btk tyrosine kinases in platelet shape change. Src-kinases mediate integrin α IIb β 3 inside-out signalling during shape change. *Thromb Haemost*. 2001;85(2):331-40.
- Bell RM, Burns DJ. Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1991;266:4661-4.
- Bearer EL. Cytoskeletal domains in the activated platelet. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1995;30: 50-66.
- Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK: The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost* 2001; 86: 178-88.
- 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* 1996; 87: 968-76.
- Chang JD, Xu Y, Raychowdhury MK, Ware JA. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a novel isoenzyme of protein kinase C (nPKC). A new member of the nPKC family expressed in skeletal muscle, megakaryoblastic cells, and platelets. *J Biol Chem*. 1993; 268:14208-14.
- Clemetson KJ: Platelet GPIb-V-IX complex. *Thromb Haemost* 1997; 78: 266-70.
- Crosby D, Poole AW. Interaction of Bruton's tyrosine kinase and protein kinase C θ in platelets. Cross-talk between tyrosine and serine/threonine kinases. *J Biol Chem*. 2002; 277:9958-65.

- 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* 1998; 9: 639-50..
- Deranleau DA, Dubler D, Rothen C, Luscher EF. Transient kinetics of the rapid shape change of unstirred human blood platelets stimulated with ADP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:7297-301.
- Dorit R and Kazanietz MG. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB journal*. 1999; 13:1658-76.
- 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* 2001; 105: 297-306.
- Edwards AS, Newton AC. Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1997; 272:18382-90.
- Eichholtz T, de Bont DB, de Widt J, Liskamp RM, Ploegh HL. A myristoylated pseudosubstrate peptide, a novel protein kinase C inhibitor. *J Biol Chem*. 1993; 268:1982-6.
- Escolar G, Sauk J, Bravo ML, Krumwiede M, White JG. Immunogold staining of microtubules in resting and activated platelets. *Am J Haematol*. 1987; 24:177-88.
- Falet H, Pain S, Rendu F. Tyrosine Unphosphorylated Platelet SHP-1 is a Substrate for Calpain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 252:51-55.
- Farago A, Nishizuka Y. Protein kinase C in transmembrane signalling. *FEBS Lett*. 1990; 268:350-4.
- Grabarek J, Raychowdhury M, Ravid K, Kent KC, Newman PJ, Ware JA. Identification and functional characterization of protein kinase C isozymes in platelets and HEL cells. *J Biol Chem*. 1992; 267:10011-7.
- Handin R, Lux S, Stossel T: *Blood – Principles and Practice of Hematology* (2nd Edition). Lippincot Williams & Wilkins.

- Hansra G, Garcia-Paramio P, Prevostel C, Whelan RD, Bornancin F, Parker PJ. Multisite dephosphorylation and desensitization of conventional protein kinase C isoforms. *Biochem J*. 1999; 342:337-44.
- Hantgan RR. A study of the kinetics of ADP-triggered platelet shape change. *Blood*. 1984; 64:896-906.
- Holmsen H. Significance of testing platelet functions in vitro. *Eur J Clin Invest*. 1994; 24:3-8.
- Hong Y, Martin JF, Vainchenker W, Erusalimsky JD: Inhibition of protein kinase C suppresses megakaryocytic differentiation and stimulates erythroid differentiation in HEL cells. *Blood* 1996; 87: 123-31.
- Hoshi M, Akiyama T, Shinohara Y, Miyata Y, Ogawara H, Nishida E, Sakai H. Protein-kinase-C-catalyzed phosphorylation of the microtubule-binding domain of microtubule-associated protein 2 inhibits its ability to induce tubulin polymerization. *Eur J Biochem*. 1988; 174:225-30.
- Huang FL, Yoshida Y, Nakabayashi H, Knopf JL, Young WS 3rd, Huang KP. Immunochemical identification of protein kinase C isozymes as products of discrete genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987; 149 946-52.
- 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. 1997; pp 3-30.
- Jameson L, Caplow M. Modification of microtubule steady-state dynamics by phosphorylation of the microtubule-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78:3413-7.
- Jerushalmy Z, Englender T, Shaklai M. Phorbol-myristate-acetate-induced platelet aggregation in the presence of inhibitors. *Acta Haematol*. 1988; 80:210-5.
- Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P and Pfizenmaier K. PKCmu is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem*. 1994; 269:6140-6148.
- 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*. 1986; 261:15854-62.

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* 1993; 64: 387-93.

Liu Y, Graham C, Li A, Fisher RJ, Shaw S. Phosphorylation of the protein kinase C-theta activation loop and hydrophobic motif regulates its kinase activity, but only activation loop phosphorylation is critical to in vivo nuclear-factor-kappaB induction. *Biochem J.* 2002; 361:255-65.

Liu Y, Witte S, Liu YC, Doyle M, Elly C, Altman A. Regulation of protein kinase Ctheta function during T cell activation by Lck-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 2000 Feb 4;275(5):3603-9.

Long MW, Heffner CH, Williams JL, Peters C, Prochownik EV. Regulation of megakaryocyte phenotype in human erythroleukemia cells. *J Clin Invest.* 1990; 85(4):1072-84.

Meller N, Liu YC, Collins TL, Bonnefoy-Berard N, Baier G, Isakov N, Altman A. Direct interaction between protein kinase C theta (PKC theta) and 14-3-3 tau in T cells: 14-3-3 overexpression results in inhibition of PKC theta translocation and function. *Mol Cell Biol.* 1996; 16:5782-91.

Mochly-Rosen D. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science.* 1995; 268 247-51.

Negrescu EV, de Quintana KL, Siess W. Platelet shape change induced by thrombin receptor activation. Rapid stimulation of tyrosine phosphorylation of novel protein substrates through an integrin- and Ca(2+)-independent mechanism. *J Biol Chem.* 1995; 270:1057-61.

Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 1992; 258:607-14.

Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature.* 1988; 334:661-665.

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

Oshevski S, Le Bousse-Kerdiles MC, Clay D, Levashova Z, Debili N, Vitral N, Jasmin C, Castagna M. Differential expression of protein kinase C isoform transcripts in human

hematopoietic progenitors undergoing differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 5;263(3):603-9.

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

Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* 2000; 19:496-503.

Passalacqua M, Patrone M, Sparatore B, Melloni E, Pontremoli S. Protein kinase C-theta is specifically localized on centrosomes and kinetochores in mitotic cells. *Biochem J.* 1999;337:113-8.

Paul BZS, Daniel JL and Kunapuli SP. Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and -independent signalling pathways. *J Biol Chem.* 1999; 274:28293-28300.

Pietromonaco SF, Simons PC, Altman A, Elias L. Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J Biol Chem.* 1998;273:7594-603.

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.* 1992; 1; 80:153-61.

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

Ron D, Kazanietz MG. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* 1999;13(13):1658-76.

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* 2001; 97: 2238-47.

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

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.

Sparatore B, Passalacqua M, Pedrazzi M, Ledda S, Patrone M, Gaggero D, Pontremoli S and Melloni E. Role of the kinase activation loop on Protein Kinase C - θ activity and intracellular localisation. FEBS letters. 2003, (in press). First on line publication: Oct 8.

Spyridopoulos I, Luedemann C, Chen D, Kearney M, Chen D, Murohara T, Principe N, Isner JM, Losordo DW. Divergence of angiogenic and vascular permeability signalling by VEGF: inhibition of protein kinase C suppresses VEGF-induced angiogenesis, but promotes VEGF-induced, NO-dependent vascular permeability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:901-6.

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

Takai Y, Kishimoto A, Inoue M, Nishizuka Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem.* 1977; 252: 7603-7609.

Taniguchi T, Endo H, Chikatsu N, Uchimar 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* 1999; 93: 4167-78.

Theurkauf WE, Vallee RB. Extensive cAMP-dependent and cAMP-independent phosphorylation of microtubule-associated protein 2. *J Biol Chem.* 1983;258:7883-6.

Torti M, Bertoni A, Canobbio I, Sinigaglia F, Lapetina EG, Balduini C. Rap1B and Rap2B translocation to the cytoskeleton by von Willebrand factor involves Fc γ II receptor-mediated protein tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1999; 274:13690-7.

Torti M, Ramaschi G, Sinigaglia F, Lapetina EG, Balduini C. Association of the low molecular weight GTP-binding protein rap2B with the cytoskeleton during platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:7553-7.

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

Wang F, Naik UP, Ehrlich YH, Freyberg Z, Osada S, Ohno S, Kuroki T, Suzuki K, Kornecki E. A new protein kinase C, nPKC eta, and nPKC theta are expressed in human platelets: involvement of nPKC eta and nPKC theta in signal transduction stimulated by PAF. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 191:240-6.

- Wheeler-Jones CP, Learmonth MP, Martin H, Aitken A. Identification of 14-3-3 proteins in human platelets: effects of synthetic peptides on protein kinase C activation. *Biochem J.* 1996; 315:41-7.
- White JG, Rao G HR. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. *Am J Pathol.* 1998; 152:597-609.
- Wurzinger LJ. Histophysiology of the circulating platelet. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 1990; 120:1-96.
- 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* 1988; 72:1478-86.
- 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* 1996; 92: 530-36.
- Zimmet JM, Jackson CW, Stenberg PE, Ladd D, Ravid K: A role for cyclin D3 in the endomitotic cell cycle. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 7248-59.