

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**SCIENZE BIOMEDICHE:
Scienze Morfologiche Umane e Molecolari**

Ciclo XXVII

SC: 05/H1

SSD: BIO/16

**CARATTERIZZAZIONE E RUOLO DI PKC ϵ
E PKC δ IN MODELLI DI DIFFERENZIAMENTO
MEGACARIOCITARIO NORMALE E PATOLOGICO**

Presentata da

Dott.ssa Valeria Queirolo

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof. Lucio Cocco

Relatore

Chiar.mo Prof. Lucio Cocco

Co-Relatore

Chiar.mo Prof. Marco Vitale

Esame finale A.A. 2013-2014

SOMMARIO

INTRODUZIONE	1
1. EMATOPOIESI	1
1.1 Le citochine nel processo ematopoietico	3
1.1.1 Trombopoietina (TPO)	6
1.2 Megacariocitopoiesi	8
1.2.1 Poliploidia	10
1.2.2 Generazione delle piastrine	13
1.2.3 Piastrine	14
1.2.4 Granuli	16
2. FAMIGLIA DELLE PROTEINE CHINASI C (PKC)	18
2.1 Struttura	19
2.2 Regolazione e funzione delle PKCs	20
2.3 PKC EPSILON (PKCϵ)	23
2.3.1 Ruolo di PKCϵ nella linea mieloide	26
2.3.2 Ruolo di PKCϵ in patologie umane	26
2.4 PKC DELTA (PKCδ)	30
2.4.1 Ruolo di PKCδ nella linea mieloide	33
2.4.2 Ruolo di PKCδ in patologie umane.	33
3. Rho GTPasi	36
3.1 RhoA	38
3.2 RhoA nei megacariociti e nelle piastrine	39
4. Famiglia Bcl-2	41
4.1 Bcl-xl nell'apoptosi di megacariociti e piastrine	42
5. Mielofibrosi (MF)	46
MATERIALI E METODI	51
1. COLTURE CELLULARI E TRATTAMENTI	52
1.1. Isolamento di cellule progenitrici ematopoietiche murine	52
1.2. TPO	52
1.3. Isolamento di MK murine differenziate	52
1.4. Isolamento di CD34+ umane	53
2. Western Blot SDS-Page	53

3. Morfologia cellulare dei MK	54
4. Citochimica	54
5. Citometria a flusso	55
6. ShRNA e infezione.....	55
6.1. Modello murino	55
6.2. Modello umano	55
7. Analisi statistica.....	56

RISULTATI..... 57

1. PKC ϵ e PKC δ sono selettivamente regolate durante il differenziamento MK murino	58
2. Nel modello murino PKC ϵ induce la produzione piastrinica via RhoA.....	60
3. Nel modello umano PKC ϵ e PKC δ inducono la produzione piastrinica via Bcl-xL.....	63
4. L'overespressione di PKC ϵ inibisce, via Bcl-xL, il corretto differenziamento MK in cellule CD34+ da PMF	68
5. La forzata down-regolazione di PKC ϵ ripristina un corretto differenziamento MK in PMF.....	69

DISCUSSIONE 71

CONCLUSIONI..... 76

BIBLIOGRAFIA 78

INTRODUZIONE

1. EMATOPOIESI

Il processo di Ematopoiesi, grazie ad un sistema finemente regolato e controllato di proliferazione, self-renewal e differenziazione di cellule note come Hematopoietic Stem Cells (HSCs), consente la costante e continua produzione di cellule del sangue: ogni giorno circa 10^{12} cellule vengono generate nel midollo osseo adulto, rendendo il sangue uno dei tessuti a più alta capacità rigenerativa del nostro organismo. La generazione di nuove cellule del sangue, infatti, non solo garantisce il regolare reintegro delle unità perse nel normale turnover delle cellule differenziate, ma consente anche una risposta rapida ed efficiente agli stress e alle ferite.

Le HSCs sono forse le cellule staminali più estensivamente caratterizzate, a partire dal 1963, quando Becker *et al.* dimostrarono la natura clonale delle cellule di midollo osseo murino trapiantate nella milza di ospiti irradiati e la presenza, nelle stesse colonie originatesi, di cellule presentanti diverse caratteristiche differenziate (Becker AJ *et al.*, J Immunol 2014). Successivamente Siminovitch *et al.* ne approfondirono ulteriormente l'analisi dimostrando la capacità di self-renewal di alcune delle cellule presenti all'interno delle colonie spleniche, portando quindi al concetto di colony-forming cell (CFC) in grado di ricostituire tutte le popolazioni cellulari del sangue e aprendo così la strada ai successivi studi sulla natura e la biologia del processo ematopoietico (Siminovitch L *et al.*, J Cell Physiol 1963).

Queste cellule staminali sono riscontrabili durante tutta la vita di un individuo a partire dalle prime fasi dello sviluppo embrionale in cui esse vengono originate in un complesso processo che vede coinvolti diversi siti anatomici quali il sacco vitellino, la regione del mesonefro gonade-aorta, la placenta e il fegato fetale. Nell'età adulta esse risiedono invece nel midollo osseo, all'interno del quale la regolazione dello stato di quiescenza, proliferazione e differenziazione delle HSCs avviene nel contesto di un microambiente altamente controllato: la nicchia.

La nicchia è un'entità dinamica la cui sua ultrastruttura viene determinata da tre principali elementi: la componente cellulare, le glicoproteine della matrice e lo spazio tridimensionale. Il rapporto tra questi elementi consente quelle interazioni molecolari che risultano critiche nella regolazione delle cellule staminali e della loro attività.

Nella nicchia vengono infatti originati una serie di segnali che hanno effetti diretti sulle HSCs, tra questi molecole esposte sulla superficie cellulare e molecole secrete dalle cellule presenti

nel microambiente della nicchia stessa, ma anche stimoli di natura fisica, quali la tensione dell'ossigeno, la concentrazione ionica, la temperatura, lo stress tensivo e le forze contrattili. Ma la nicchia cellulare è in grado di rispondere anche e soprattutto a stimoli provenienti dall'esterno, quali ad esempio gli inputs provenienti dal sistema nervoso, dall'attività metabolica di tessuti in sua prossimità, da secreti paracrini e endocrini e, in definitiva, dai segnali provenienti da ed attraverso il sistema vascolare (Scadden DT, Nature 2006).

Per quanto riguarda la composizione della nicchia bisogna quindi sottolineare che sono numerosi i tipi cellulari da prendere in considerazione per la loro azione, diretta o indiretta, sulle HSCs. Tra questi sicuramente le cellule stromali perivascolari, le cellule endoteliali, i macrofagi, i neuroni ortosimpatici, le cellule di Schwann e le cellule reticolari CXCL12-abundant (CAR cells), ma anche gli osteoblasti, gli osteoclasti e gli adipociti (Mendelson A & Frenette PS, Nat Med 2014).

Oggi sappiamo che le HSCs sono cellule clonogeniche che accompagnano l'ospite per tutta la sua vita, capaci di illimitato self-renewal e in grado di dare origine a progenitori oligo-potenti che, a loro volta, producono progenie a capacità differenziativa commissionata.

Sulla base di queste conoscenze è possibile comprendere come queste cellule staminali ematopoietiche non siano soltanto le unità responsabili dello sviluppo del sistema ematolinfoidale, ma siano anche responsabili del suo mantenimento e rigenerazione (Weissman, Cell 2000).

In breve quindi l'ematopoiesi può essere intesa come la gerarchica progressione maturativa di HSCs multipotenti che gradualmente perdono una o più opzioni differenziative.

Come schematizzato in figura 1 e già accennato, la HSC può dare infatti origine a due possibili cellule progenitrici primitive: la common lymphoid progenitor (CLP) e la common myeloid progenitor (CMP). Queste cellule a loro volta possono andare incontro ad ulteriore maturazione producendo progenitori distinguibili a seconda del commissionamento cellulare per T cells e natural killer cells (le cellule TNKs), granulociti e macrofagi (le GMs) o megacariociti e cellule eritroidi (le MEPs). Infine questi progenitori più differenziati produrranno cellule monopotenti per la genesi di linfociti B (BCPs), cellule NK (NKPs), linfociti T (TCPs), granulociti (GPs), monociti (MPs), globuli rossi (EPs) e megacariociti (MkPs) (Kaushansky K, N Engl J Med 2006).

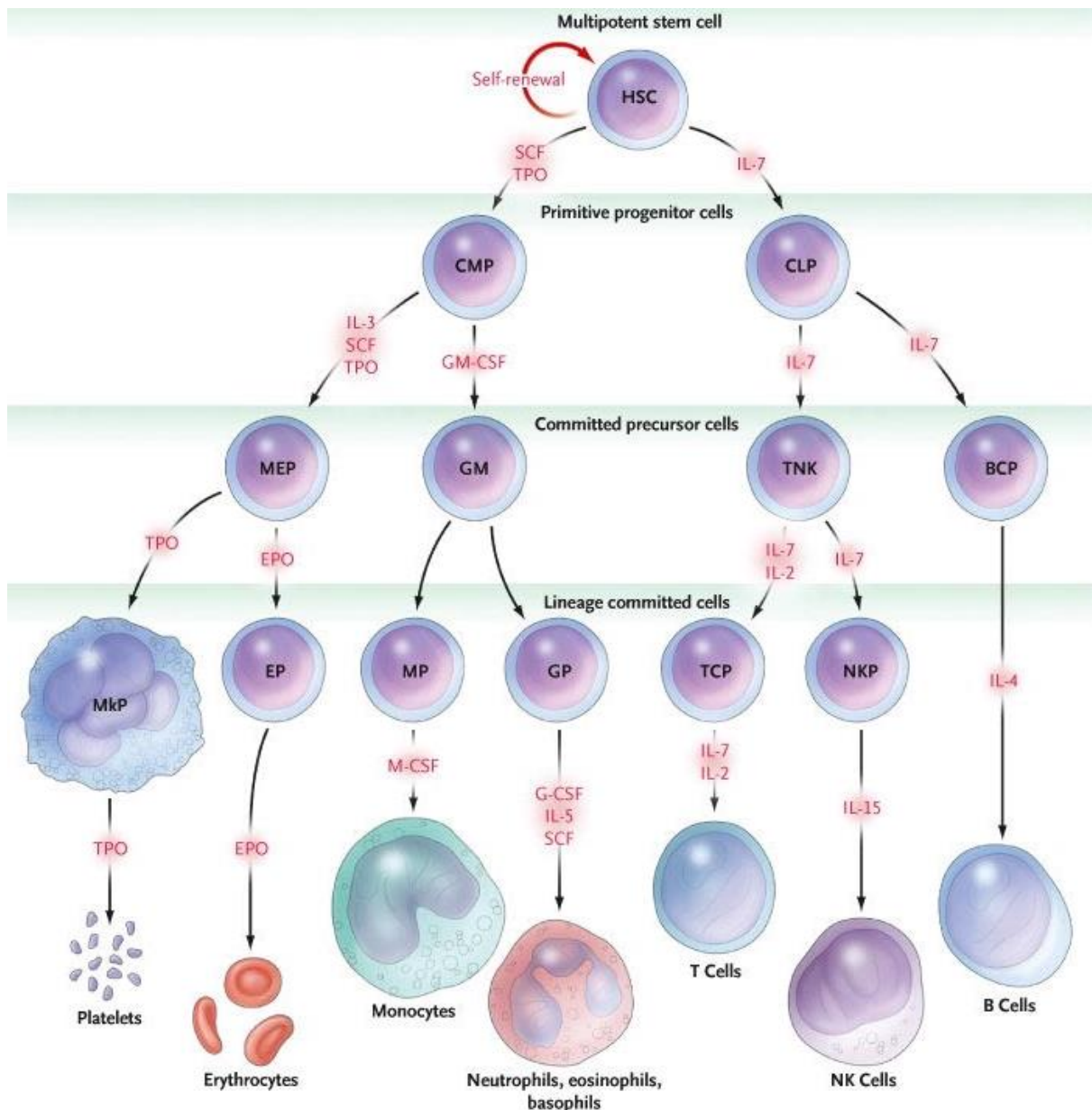


Figura 1. Rappresentazione schematica del processo ematopoietico e delle principali citochine coinvolte (Kaushansky K, N Engl J Med 2006)

1.1 Le citochine nel processo ematopoietico

Il complesso sistema di regolazione dell'ematopoiesi, sia di quella basale che quella di emergenza a fronte di stimoli non fisiologici, è basato in larga misura sull'attività di specifici ligandi extracellulari noti comunemente con il nome di citochine, proteine solubili che possono sia essere secrete che legate alla membrana cellulare e la cui attività si svolge in collaborazione con i rispettivi recettori, espressi sulla superficie delle cellule bersaglio. Tale azione determina, in ultimo, l'insorgere di una risposta cellulare da parte delle HSCs o dei diversi precursori (Robb L, Oncogene 2007).

Le citochine attuano la propria azione attraverso differenti classi di recettori, tra cui le due più rappresentate sono quella dei recettori tirosin-chinasici (RTKs) e la superfamiglia dei recettori citochinici associati a chinasi. Ugualmente importanti sono i recettori appartenenti alla famiglia dei recettori per il tumor growth factor-beta (TGF- β), dei recettori per il tumor necrosis factor (TNF) e dei recettori accoppiati a proteine G.

Le citochine coinvolte nel processo ematopoietico presentano talvolta un'attività di tipo pleiotropico, su tipi cellulari diversi, così come su cellule dello stesso lineage, ma in diversi stadi di maturazione. L'azione che queste molecole svolgono è quindi fortemente legata anche alla combinazione di altri fattori legati al contesto in cui la cellula si trova, quali ad esempio la disponibilità di molecole di segnalazione e dei fattori di trascrizione o l'attivazione di altre cascate di segnalazione.

Sebbene la presenza di citochine ridondanti possa talvolta determinare *in vivo* meccanismi compensatori e nonostante i pathways di segnalazione attivati siano spesso sovrapposti, l'attivazione dei recettori porta, comunque, ad una segnaletica downstream mirata alla modulazione dell'espressione genica linea-specifica che determina quindi l'indirizzamento, esclusivo e spesso irreversibile, di un progenitore verso la generazione di una cellula appartenente ad un determinato lineage ematopoietico (Endele M *et al.*, Exp Cell Res 2014).

Come questo obiettivo sia raggiunto però rimane ad oggi un punto ancora discusso: non è stato infatti ancora perfettamente chiarito se il commissionamento e quindi il progredire differenziativo di una cellula verso un particolare tipo cellulare ematopoietico sia dovuto a fattori interni alla cellula, come ad esempio la fluttuazione di particolari fattori di trascrizione, cui segue un'azione di selezione da parte delle citochine (tramite favoreggiamento della sopravvivenza e della proliferazione) o se, al contrario, le citochine stesse "istruiscano" le cellule a intraprendere un particolare programma trascrizionale lineage-specifico.

Come osservabile in figura 2 sono dunque due i modelli ad oggi proposti a spiegazione del meccanismo di azione citochinica: il modello "di istruzione" e quello "permissivo/selettivo".

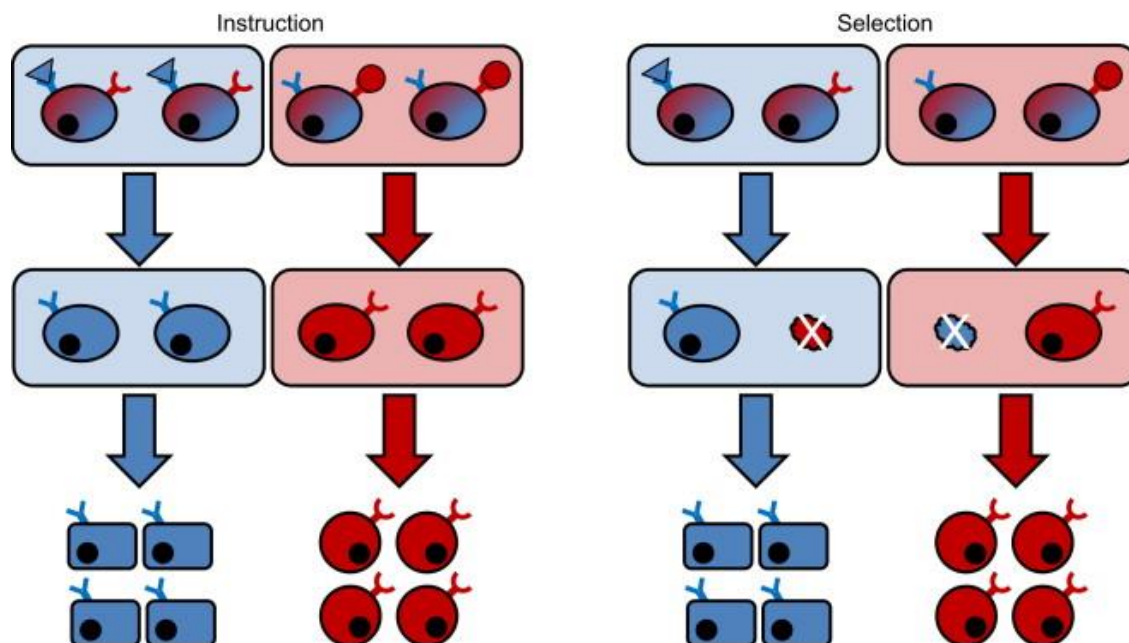


Figura 2. Confronto dei due possibili modelli di commissione cellulare nel lineage ematopoietico ad opera dello stimolo citochinico: Instructive versus Permissive/Selective (Endele M *et al.*, Exp Cell Res 2014)

Ovviamente molteplici sono i fattori estrinseci richiesti per la sopravvivenza e il differenziamento delle cellule coinvolte nei diversi stadi del processo ematopoietico.

Tra questi, in particolare in relazione alle prime fasi di maturazione:

- ligando per il recettore c-kit tyrosine kinase, stem cell factor (SCF), (Williams DE *et al.*, Dev Biol 1992);
- ligando per Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3 ligand) (Small D *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1994);
- granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Arcese W *et al.*, Curr Opin Hematol 2012);
- interleuchine IL2, IL3 ed IL7 (Donahue RE *et al.*, Science 1988; Broudy VC, Blood 1997);
- pleiotropina (Himburg HA *et al.*, Nat Med 2010);
- stromal cell-derived factor-1 α (CXCL12);
- angiopoietina 1 (ANGPT1);
- TGF β ;
- Trombopoietina.

I progenitori MK condividono la nicchia con le HSC e, conseguentemente, anche molte citochine che influenzano l'attività di quest'ultime possono avere un effetto sulla

trombopoiesi e *vice versa*: in modello murino, ad esempio, il TPO è stato visto influenzare lo stato di quiescenza delle HSC (Psaila B *et al.*, Br J Haematol 2010). La migrazione dei MK è influenzata dall'azione della CXCL12 e dall'Angiopoiatina 1, prodotta tra l'altro, oltre che dagli osteoblasti, dalle cellule endoteliali e dai periciti, anche dai MK stessi.

Ma l'angiopoiatina 1, così come la 2 (ANGPT2), oltre che ad agire in modo autocrino stimolando la differenziazione dei MK, induce anche quiescenza delle HSC presenti nella nicchia (Psaila B *et al.*, J Thromb Haemost 2012; Saulle E *et al.*, PLoS One 2012). Allo stesso modo CXCL12, come accennato noto per essere un potente chemoattraente per i MK (che sulla propria superficie ne esprimono il recettore CXCR4), è stato anche associato positivamente allo stato di quiescenza e alla capacità di self-renewal delle HSC (Mazharian A, Methods Mol Biol 2012; Anthony BA & Link DC, Trends Immunol 2014).

1.1.1 Trombopoietina (TPO)

La trombopoietina è, attualmente, la sola citochina nota richiesta dai megacariociti per garantire il mantenimento di un costante volume di piastrine e sebbene altre citochine, quali IL-3, IL-6 ed IL-11, collaborino con essa, non risultano essere essenziali per la maturazione megacariocitica (Kaushansky, K, J. Clin. Invest 2005; Kaushansky K & Drachman JG, Oncogene 2002).

Il TPO consiste in un polipeptide di 70 KDa, composto da 353 amminoacidi tra cui anche una sequenza leader per la secrezione, che presenta importanti modificazioni post-traduzionali: diversi carboidrati partecipano infatti al 50% circa del peso finale del TPO.

La regione N terminale in particolare contiene il dominio di legame (RDB) responsabile per l'interazione con il recettore, la segnaletica e l'effetto pro-proliferativo del TPO, mentre la regione C terminale aumenta invece la secrezione della proteina così come ne incrementa l'emivita in circolo.

La sintesi di questa citochina avviene per la maggior parte a carico del fegato, ma anche i reni e i muscoli scheletrici partecipano alla produzione di questo ormone. I livelli di TPO in circolo sono inversamente proporzionali al numero di piastrine nel sangue e ai megacariociti nel midollo in virtù di un loop autoregolatorio.

In uno studio del 2013, Olson *et al.* osservarono come il TPO sia anche coinvolto nella migrazione delle cellule staminali MK verso le nicchie ematopoietiche in topi irradiati e che l'inibizione di tale migrazione recettore-dipendente porti ad una drastica diminuzione del

homing delle cellule trapiantate (Odell TT Jr & Jackson CW, Blood 1969). Al contrario, i topi in cui TPO veniva over-espresso sviluppavano malattie mieloproliferative con trombocitosi, leucoicitosi e mielofibroisi.

Questa proteina non solo è il principale regolatore della proliferazione e differenziazione dei megacariociti, ma svolge la sua funzione agendo anche su altre cellule progenitrici, allargando quindi la sua sfera di influenza a tutto l'ambiente midollare. Infatti, oltre che a stimolare la megacariocitopoiesi, TPO ha anche un importante ruolo nella sopravvivenza ed espansione delle cellule staminali ematopoietiche ed è stato osservato come il *k.o.* del gene codificante per TPO porti ad una forte riduzione, fino a 8 volte, del numero delle cellule staminali con capacità di ripopolare il midollo e ad una diminuzione della loro capacità proliferativa dopo il trapianto in ospite irradiato. Il meccanismo mediante cui ciò avviene si basa sulla modulazione e localizzazione nucleare di diversi fattori di trascrizione, come il homeobox B4 e A9, così come sulla produzione autocrina di VEGF.

Patologie come trombocitopenia amegacariocitica congenita sono state ricondotte ad una deficienza del recettore per il TPO nei pazienti affetti e, nei bambini colpiti da questa patologia, in età precoce spesso si sviluppa anche un'anemia aplastica dovuta ad un esaurimento delle cellule staminali, fenomeno che ha fornito un'ulteriore conferma dell'effetto induttivo del TPO sulle HSCs.

Dopo la scoperta nel 1994 del recettore per questa molecola, il c-Mpl, numerosi studi hanno portato a chiarire i meccanismi molecolari alla base della sua attività. Esso è un recettore trans-membrana di tipo I, appartenente alla superfamiglia dei recettori citochinici ematopoietici, il cui dominio intracitoplasmatico non possiede attività enzimatiche intrinseche. L'azione del recettore avviene quindi mediante omodimerizzazione e reclutamento di molecole segnale: a seguito del legame con TPO quindi c-Mpl dimerizza e vengono attivati alcuni pathways di segnalazione downstream tra cui PI3K, Akt, MAPK, ERK1/ERK2.

L'ormone sostiene la sopravvivenza ed induce la proliferazione dei progenitori mediante un aumento dell'espressione della Ciclina D, regolatore del ciclo cellulare, e Bcl-Xl, molecola antiapoptotica, così come la soppressione dell'inibitore del ciclo cellulare p27. In modello murino, l'eliminazione di uno dei due attori principali di questo sistema, l'ormone o il suo recettore, riduce i livelli di produzione dei megacariociti e delle piastrine di circa dieci volte e può portare anche a gravi trombocitopenie dovute ad una riduzione sia dei progenitori megacariocitici che dei megacariociti maturi.

Non solo i megacariociti, ma anche le piastrine, presentano sulla propria superficie il recettore per il TPO e sono così in grado legarlo, rimuovendolo così dal circolo: conseguentemente, più il numero delle piastrine aumenta, più i livelli di TPO nel sangue diminuiscono.

Oltre a questo sistema di bilanciamento dell'omeostasi del TPO, le cellule stromali del midollo osseo possono, in condizioni di grave trombocitopenia, indurre un aumento della sintesi dell'ormone. In modo analogo la produzione da parte del fegato del TPO può essere aumentata da mediatori dell'infiammazione, quale ad esempio IL6, come osservato in pazienti affetti da artrite reumatoide, malattia di Chron e in altre condizioni di infezione o di infiammazione.

A livello delle piastrine, il TPO induce queste cellule ad aggregare anche in presenza di livelli altrimenti insufficienti di trombina, collagene o adenosina difosfato, principalmente mediante attivazione del pathway del fosfoinositolo trifosfato.

1.2 Megacariocitopoiesi

I megacariociti sono presenti principalmente nel midollo osseo, ma si possono ritrovare anche nel polmone e nel sangue periferico. Sono una popolazione mieloide piuttosto rara, costituendo solo 1% delle cellule di questo lineage (Ogawa M, Blood 1993).

Analogamente alle cellule eritroidi, ai monociti e ai granulociti, anche i megacariociti sono originati a partire dal medesimo precursore, il CMP, e la loro differenziazione porta ai MEP, progenitori comuni per i megacariociti e gli eritrociti; questi progenitori commissionati presentano una più limitata capacità proliferativa e danno origine ai promegacarioblasti, la cui ulteriore maturazione porta alla differenziazione terminale dei megacariociti, cellule precursore altamente specializzate la cui unica funzione risiede nel formare e rilasciare piastrine al fine di mantenerne costante il livello in circolo e garantire così la minimizzazione della perdita di sangue in caso di danni al sistema circolatorio.

Il tempo necessario per un MK per completare la propria maturazione e rilasciare piastrine è, nell'uomo, di circa 5 giorni, mentre nel ratto dai 2 ai 3 giorni (Odell TT Jr & Jackson CW, Blood 1968).

I progenitori ematopoietici esprimono specifici marker di superficie noti come Cluster of Differentiation (CD) 34 e 41, ma in particolare le cellule poi commissionate per il lineage megacariocitario, presentano successivamente anche l'espressione di CD61 e ancor più elevati livelli di CD41.

In specifico il CD34, proteina di membrana a single pass, altamente glicosilata e coinvolta nei processi cellulari di adesione, è ad oggi il solo marker fenotipico disponibile per l'identificazione selettiva di cellule progenitrici ematopoietiche (Fackler MJ *et al.*, Blood 1995). Le cellule positive per questo antigene hanno infatti dimostrato di possedere potenziale di formazione colonia, la capacità di mantenere tale proprietà in culture *in vitro* e di consentire la differenziazione di cellule mature del sangue in topi irradiati e trapiantati (Engelhardt M, Leukemia 2002).

CD41 indica invece l'integrina α IIb che, in associazione non covalente con il CD61 -ossia l'integrina β 3IIIa-, forma il complesso GPIIb/III3 (α IIb β 3), espresso sulla superficie di megacariociti e piastrine e recettore per molteplici molecole di adesione, compreso il fibrinogeno, il von Willebrand factor, la vitronectina e la trombospondina. Questa integrina, pur essendo essenzialmente lineage-specifica, è stata riscontrata in esperimenti clonogenici in più del 80% dei progenitori, compresi quelli megacariocitari, granulo-macrofagici, eritroidi e pluripotent, derivanti da corpo embrioide, un dato che ha permesso di considerare questa molecola un marker anche di fasi precoci della differenziazione ematopoietica (Mitjavila-Garcia MT, Development 2002).

Durante il progredire della maturazione megacariocitaria anche altri recettori vengono però up-regolati, tra questi i più importanti sono sicuramente il recettore per la trombopoietina e il von Willebrand factor (VWF). Altri markers, sempre presenti a livello delle HSC, risultano essere invece down-modulati: tra questi ad esempio CD117 (c-kit, recettore per SCF), CD150 (SLAM, recettore per il measles virus), Tie-2 (recettore per angiopoietina I) e CD45 (antigene leucocitario comune).

Da un punto di vista molecolare, la determinazione e differenziazione dei megacariociti è orchestrata da alcuni fattori di trascrizione di cui queste cellule sembrano relativamente ricche e che agiscono in un complesso sistema di antagonismo o collaborazione al fine di consentire il processo maturativo.

Il fattore di trascrizione a dita di zinco GATA-1 e il suo cofattore FOG1 hanno mostrato di avere un ruolo chiave nel differenziamento MK visto che mutazioni nel gene codificante per questo fattore di trascrizione portano a gravi trombocitopenie e ad un arresto differenziativo del lineage megacariocitario (Freson K *et al.*, Blood 2001 98:85-92; Nichols KE *et al.*, Nat Genet 2000).

Un altro fattore specifico della maturazione in senso megacariocitario risultano essere gli Ets, una famiglia di pro-oncogeni, tra cui Fli-1 in particolare sembra giocare un ruolo chiave, interagendo con GATA-1 nella regolazione dell'espressione genica di queste cellule.

Sempre appartenete alla famiglia Ets è il fattore di trascrizione Pu.1 la cui interazione con i membri della famiglia GATA risulta in una modulazione della differenziazione cellulare megacariocitaria mediante un meccanismo essenzialmente antagonista: nei progenitori ematopoietici precoci, legandosi a GATA-2, Pu.1 risulta essere inibito nella sua funzione di induzione dei geni associati alla linea mieloide. Durante la differenziazione, il legame di GATA-1 a Pu.1 blocca la coattivazione da parte di c-Jun dei geni regolati da Pu.1 (Nutt SL *et al.*, J Exp Med. 2005).

Runx1, un altro fattore di trascrizione coinvolto nella differenziazione megacariocitaria, agisce in associazione con AML-1 e GATA-1, mediante la formazione di un complesso con CBF β . Molteplici studi hanno mostrato come mutazioni a carico di RUNX1 portino a difetti piastrinici, l'insorgere di leucemie mieloidi acute o ad un arresto del processo differenziativo.

Il fattore di trascrizione c-Myb ha mostrato di essere essenziale per una corretta e completa maturazione dei progenitori ematopoietici; in particolare risulta necessario che l'attività di questo fattore sia ridotta affinché venga permesso il differenziamento in senso megacariocitario (Br J Haematol. (Metcalf D *et al.*, Blood, 2005; Deutsch VR & Tomer A, Br J Haematol. 2006).

Infine, anche i microRNA - piccoli frammenti di RNA che modulano l'espressione proteica interferendo con il messaggero e causandone la degradazione - si sono dimostrati elementi chiave nella regolazione della megacariocitopoiesi.

In particolare, ma non esclusivamente, miR-150, avente un effetto di promozione della differenziazione megacariocitaria, sia *in vivo* che *in vitro*, e miR-155, la cui espressione riduce il numero di megacariociti dopo trapianto di HCS nel midollo osseo di un ospite irradiato. Ma anche miR-34, la cui attività (studiata nelle linea cellulare eritroleucemica K562) appare essere pro-megacariocitopoiesi, e miR-146, la cui influenza sul processo differenziativo è probabilmente da attribuirsi agli effetti che questo miRNA ha sull'espressione di IL6 (Edelstein LC & Bray PF, Blood 2011).

1.2.1 Poliploidia

La poliploidizzazione è un processo fondamentale per una corretta produzione piastrinica e viene ottenuta grazie ad un fenomeno noto come endomitosi: alla fine della fase proliferativa,

il precursore megacariocitario mononucleare esce dallo stato diploide per differenziare e, attraverso ripetuti cicli di replicazione del DNA senza successiva divisione cellulare, ottiene multipli del normale contenuto cromosomico, da 4 a 128N. Tale poliploidizzazione permette un'amplificazione della funzione genica con conseguente aumento della sintesi proteica e aumento delle dimensioni cellulari.

Il precursore megacariocitario inizia il ciclo cellulare fino a raggiungere l'anafase A, ma senza proseguire con le fasi successive: il nucleo cellulare si disgrega e si forma un fuso mitotico sferico anomalo; dopo l'attacco dei cromosomi, questi si spostano verso i rispettivi poli, ma a questo punto il processo si interrompe e non avviene l'allontanamento dei centromeri, la membrana nucleare si ricostituisce portando alla formazione di un nucleo lobato di dimensioni maggiori rispetto a quello precedente. La cellula salta quindi la telofase e la citochinesi ed entra direttamente in G1.

Le basi molecolari di questo fenomeno riportano al complesso multiproteico noto come mitosis promoting factor (MPF), composto dalla chinasi mitotica Cdc2 e dalla ciclina mitotica B, i cui livelli sono ridotti o del tutto assenti nelle cellule poliploidi (Zhang Y *et al.*, J. Biol. Chem. 1996).

Inoltre durante lo switch dalla mitosi all'endomitosi, il fattore di trascrizione RUNX1 down-modula la miosina II, catena pesante IIB (MYH10), la quale, in associazione con la F-actina, compone l'anello contrattile responsabile della separazione cellulare. L'effetto derivante da questa incapacità da parte della cellula di costruire il complesso citoscheletrico che le permetterebbe la divisione, si va poi a sommare alla down-modulazione di GEF-H1 e ECT2, molecole coinvolte positivamente nella localizzazione e attivazione di RhoA, una GTPase che regola il meccanismo di contrazione necessario per il completamento della citochinesi (Gao Y *et al.*, Dev. Cell. 2012).

Il primo precursore megacariocitario morfologicamente riconoscibile nel midollo è il promegacarioblasto mentre, immediatamente successivo nel percorso maturativo, il megacarioblasto (o megacariocita di stadio I) è una cellula di diametro tra i 10 e i 50 μm , con un nucleo ovale da 4N e un rapporto nucleo/citoplasma a favore del primo. Il citoplasma risulta basofilo, ricco di ribosomi, ma presenta ancora pochi granuli.

Il promegacariocita (o megacariocita di stadio II) è invece di dimensioni maggiori rispetto al promegacarioblasto -dai 20 ai 80 μm - e presenta un citoplasma policromato: è in definitiva quindi meno basofilo in virtù dei granuli in via di formazione.

Alla fine del processo di endomitosi il megacariocita inizia la fase di maturazione in cui si può progressivamente osservare la formazione del caratteristico e complesso Demarcation Membrane System (DMS), un vero e proprio network di cisterne e tubuli in continuazione con la membrana plasmatica, la cui funzione sembra essere quella di riserva di membrane da evaginare per la formazione delle pro-piastrine.

Un'altra struttura specializzata che si viene a formare nella fase di maturazione è il sistema tubulare denso e il sistema canalicolare aperto (OCS), per la formazione dei granuli. Quindi, in definitiva, si ha l'indirizzamento da parte del megacariocita alla produzione di proteine piastriniche e organelli che verranno successivamente divisi e accolti nelle piastrine in formazione.

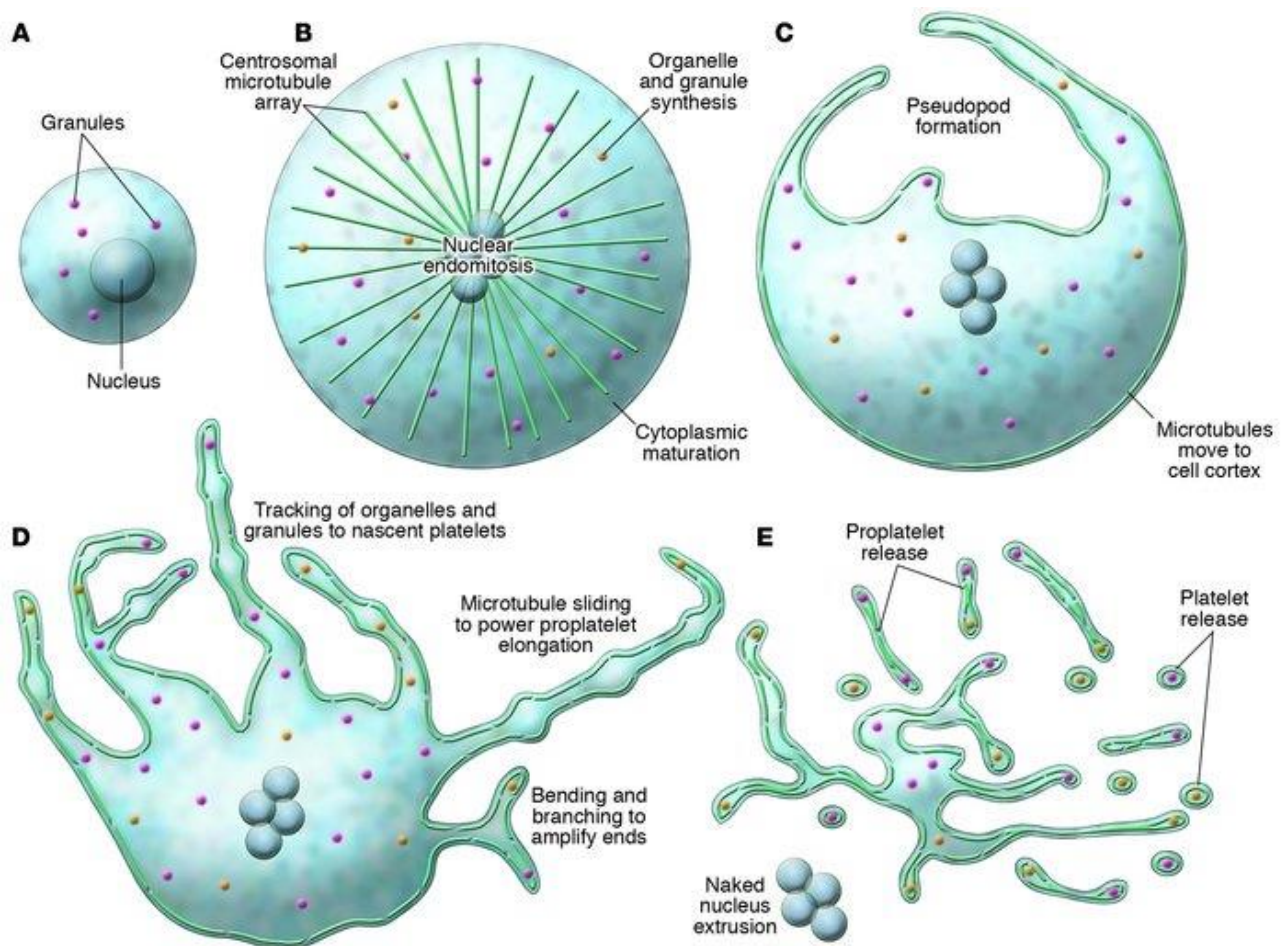


Figura 3. Rappresentazione schematica delle principali fasi della generazione di piastrine: **A.** cellula immatura; **B.** Endomitosi, sintesi degli organelli, organizzazione dei microtubuli intorno ai centrosomi; **C.** disorganizzazione dei centrosomi e traslocazione dei microtubuli; **D.** formazione di pseudopodi che daranno origine alle propiastrine; **E.** elongazione delle propiastrine e accumulo alle loro estremità degli organelli; la cellula continua ad espandere le proprie propiastrine mentre contemporaneamente ne aumenta le ramificazioni. Il processo continua fino a quando tutto il citoplasma non è convertito in propiastrine alle cui estremità sono originate le piastrine; il nucleo viene quindi estruso e le singole piastrine rilasciate nel torrente circolatorio (Patel SR *et al*, J Clin Invest.2005).

1.2.2 Generazione delle piastrine

Nel corso degli anni molti modelli sono stati proposti per spiegare il meccanismo di formazione della piastrine a partire dal megacariocita. Tra queste i più rilevanti sono stati:

- Budding di piastrine – ossia l’originarsi di piastrine che “esfoliano” dalla porzione più periferica del citoplasma cellulare del megacariocita (Djaldeiti M et al. *Thromb Haemost*, 1979), modello ad oggi abbandonato.
- Frammentazione citoplasmica – che prevede la formazione delle piastrine ad opera della determinazione, da parte del DMS all’interno del megacariocita, di “territori” di sviluppo di questi corpuscoli, fenomeno a seguito del quale la cellula va incontro ad una massiva frammentazione (Shaklai M & Tavassoli M J *Ultrastruct Res*, 1978).
Anche questo modello è oggi considerato non adeguato in quanto non pienamente chiarifico del meccanismo di formazione delle piastrine.
- Formazione di propiastri - le propiastri sono processi citoplasmatici, sottili e piuttosto lunghi, osservati sia *in vivo* che *in vitro*, emanati dal megacariocita maturo e caratterizzate da rigonfiamenti, delle dimensioni di una piastrina, uniti tra loro da fini ponti citoplasmatici. Esse sono considerate le strutture intermedie nel passaggio da megacariocita a piastrina (Becker RP & De Bruyn PP, *Am J Anat* 1976).

Quest’ultimo meccanismo è quello più accreditato e prevede che dal megacariocita vengano estroflessi spessi pseudopodi che si allungano, assottigliandosi progressivamente fino ottenere tubuli con un diametro di 2-4 μm . Questi si ramificano e ripiegano progressivamente fino a portare alla completa conversione del corpo megacariocitario in un network anastomizzato di propiastri circondanti il nucleo (Italiano JE Jr *et al.*, *J Cell Biol* 1999).

Il citoscheletro è fortemente implicato in questo processo e va incontro ad una drastica riorganizzazione per poter consentire la formazione di pro-piastrine. In particolare, tra le proteine coinvolte nella formazione dei microtubuli, la Tubulina $\beta 1$ è l’isoforma principale espressa nei MK e, in associazione con la Dineina citoplasmatica, “motore proteico” in grado di accoppiare l'idrolisi dell'ATP con la generazione di energia meccanica di movimento, è una degli attori principali del complesso di riarrangiamento citoscheletrico osservato durante la maturazione del MK.

La F-actina forma invece i punti di assemblaggio richiesti dalle propiastri per la biforcazione e la torsione.

Questi lunghi filamenti citoscheletrici percorrono la pro-piastrina nella sua lunghezza e, alle sue estremità distali, formano un loop delle dimensioni di una piastrina (Patel SR et al., Blood 2005): in tale regione si accumulano gli organelli e i granuli che vengono appunto trasportati lungo i microtubuli e indirizzati verso la piastrina in formazione.

Un'altra proteina citoscheletrica, la Spettrina, contribuisce al processo mediante la formazione di una sorta di scheletro o matrice che garantisce la stabilità del DMS e la biogenesi delle propiastriane (Patel-Hett S et al., Blood 2011).

I megacariociti maturi dunque estendono le proprie propiastriane verso i vasi sanguigni sinusoidali del midollo osseo. La presenza sulla superficie di queste cellule di strutture, note come podosomi, in grado di degradare la matrice extracellulare, permette alle propiastriane di attraversare la membrana basale dei vasi mediante un meccanismo dipendente dall'azione di Metalloproteinasi (MMPs) e Miosina II (Schachtner H et al., Blood 2013).

Il movimento avviene mediante l'intervento della Sfingosina 1 fosfato (S1P), la cui concentrazione risulta essere elevata nel sangue, e del suo recettore S1Pr1, presente sulla superficie dei MK. S1P infatti funge da segnale per l'elongazione della propiastriana e il rilascio delle piastrine in circolo. In questo modo le propiastriane vanno quindi incontro ad ulteriore frammentazione in piastrine mentre il nucleo nudo entra in apoptosi (Zhang Y et al., Blood 2012): una volta che le sue propiastriane vengono esposte nel lume vascolare e sottoposte allo shear stress esercitato dalla pressione sanguigna dei sinusoidi, il MK rilascia in circolo una popolazione di frammenti pro-piastrinici di diverse dimensioni e la formazione terminale delle piastrine avviene dunque molto probabilmente in tale distretto.

La sopravvivenza delle piastrine umane nel sangue è di 7-10 giorni (Harker LA, Clin Haematol. 1977).

1.2.3 Piastrine

Le piastrine, con un diametro di 2 μm ed uno spessore di 0,5 μm , sono le cellule del sangue più piccole presenti in circolo. Morfologicamente queste entità presentano diverse zone che possono essere considerate separatamente per una più schematica descrizione:

1. la zona periferica,
2. il Sol Gel,
3. gli organelli,
4. il sistema di membrane.

La membrana è composta dal classico doppio strato lipidico, morfologicamente indistinguibile da quello di altre cellule, la cui funzione però è nelle piastrine particolarmente importante per l'accelerazione del processo di coagulazione: una volta attivata, infatti, la piastrina espone sulla propria superficie esterna la Fosfatidilserina, una molecola anionica in grado di legare la Trombina, l'elemento terminale della cascata di attivazione dei fattori della coagulazione, e dare così il via alla formazione del trombo (Lentz BR, Prog Lipid Res 2003).

La membrana è una struttura incompressibile e non elastica: la superficie viene quindi ampliata solo in virtù della presenza di piccole pieghe e solchi che la attraversano. Sulla sua superficie è inoltre possibile osservare i punti di connessione con l'esterno del OCS, il sistema canalicolare aperto, che permette l'esposizione di molecole altrimenti compartimentalizzate in vescicole o isole lipidiche all'interno della cellula.

La membrana presenta un caratteristico glicocalice piuttosto spesso: oltre a fungere da barriera, grazie alla presenza di recettori glicoproteici, esso facilita l'adesione piastrinica. Questi recettori innescano inoltre l'attivazione e promuovono l'aggregazione e l'interazione con altri componenti cellulari.

Tra i recettori più importanti:

- GPIb-IX – complesso accoppiato al citoscheletro sottostante la membrana che permette il legame al von Willebrand factor e attiva la formazione dei filamenti di actina citoscheletrica nelle piastrine in adesione.
- GPVI e $\alpha 2\beta 1$ – recettori per il collagene, stabilizzano l'attacco della piastrina; in particolare GPVI, in collaborazione con GPIb-IX, attiva GPIIb/IIIa.
- GPIIb/IIIa (integrina $\alpha IIb\beta 3$) – recettore in grado di legare fibrinogeno e fibronectina e che quindi, in ultima analisi, consente la formazione di aggregati piastrinici.

La zona denominata del Sol Gel è una matrice formata da una rete fibrosa in cui le vescicole e gli organelli si trovano "intrappolati", il cui stato di polimerizzazione e il cui movimento influenzano la morfologia discoide della piastrina.

Nell'area immediatamente sotto la membrana plasmatica è possibile osservare la presenza di fini filamenti la cui funzione risiede nel consentire la traslocazione di molecole sulla superficie, regolare il signalling e permettere i cambiamenti morfologici delle piastrine. In tale regione infatti trovano contatto i domini citosolici delle glicoproteine plasmidiche che quindi possono interagire con proteine come la filamina, la calmodulina, la miosina e i brevi filamenti di actina che consentono la genesi delle forze contrattili che permettono la traslocazione dei recettori.

Oltre a questi, un coil di microtubuli che si distribuisce lungo la circonferenza maggiore della cellula fornisce un sistema di supporto citoscheletrico che, insieme al sistema di filamenti di Actomiosina, garantisce la possibilità di cambiamenti morfologici, trasformazioni interne e la contrazione del tappo emostatico.

Il complesso sistema di microfilamenti presente nella piastrina ha un ruolo separato rispetto a quello dei filamenti contrattili citoscheletrici riscontrati nella regione della sub-membrana. Se nelle piastrine inattive (resting) esso ha la funzione di sostenere e mantenere separati gli organelli, nella piastrina attivata il citoscheletro di actomiosina acquisisce una funzione contrattile, comprime il coil e porta i granuli verso il centro della piastrina, permettendo quindi la fusione di questi con il sistema OCS per la successiva secrezione.

Per quanto riguarda invece il sistema di membrane piastriniche esso comprende essenzialmente il sistema di canalicoli che si apre all'esterno ed è in continuità con la membrana di superficie, l'OCS. Esso aumenta significativamente la superficie esposta al plasma dalle piastrine e fornisce una via di passaggio per varie molecole, da e verso l'interno della piastrina. Inoltre questa struttura è coinvolta nel processo emostatico in quanto, a seguito dell'attivazione, le piastrine estendono rapidamente dei filopodi, la cui membrana viene appunto ricavata da quella dell'OCS (Alan DM, Platelets, Academic Press).

1.2.4 Granuli

Come accennato, la maturazione dei megacariociti è caratterizzata dalla progressiva formazione di granuli secretori di varia natura, organelli che verranno poi ritrovati anche nelle piastrine mature. Tra questi:

- α granuli – di diametro tra i 200 e i 500 nm, contenenti molecole neosintetizzate dalla stessa cellula. La distribuzione di queste molecole all'interno dei granuli vede a livello sub-membrana la presenza del von Willebrand factor, mentre nella zona più periferica, meno elettrondensa, altre proteine quali il fattore piastrinico 4, la β -tromboglobulina e proteine di membrana essenziali per l'attività piastrinica, quali α II β 3, CD62P (P-Selectina), CD36 (recettore per il Collagene I e la Trombospondina) e CD154 (o CD40 ligand, che permette di indurre una risposta infiammatoria da parte di cellule presentanti il CD40, cioè monociti, macrofagi, cellule dendritiche ed endoteliali). Sempre all'interno di questi granuli sono presenti molecole acquisite per endocitosi o pinocitosi dal plasma, come ad esempio il Fibrinogeno.

- Granuli densi o δ granuli – con un diametro inferiore a quello degli α granuli, intorno ai 250 nm, presentano un aspetto maggiormente elettrondenso al centro, separato dalla membrana da una regione “vuota”. Talvolta questi organelli presentano filamenti che protrudono dal cuore alla membrana o, esternamente, numerose estensioni filamentose. I granuli contengono diverse sostanze emo-attive, quali Serotonina (associata a pirofosfato), catecolamine, ATP, ADP, magnesio e calcio, rilasciate a seguito dell’attivazione piastrinica.
- Lisosomi – di dimensioni inferiori a quelle degli α granuli, i lisosomi sono granuli di forma sferoidale la cui funzione non è ancora ben definita e il cui contenuto (idrolasi, Catepsina E, Catepsina D, WAMP-1 e CD63) viene rilasciato solo a fronte di forte stimolazione *in vitro*.
- Cluster e catene elettrondense – presenti come corpi esagonali disposti appunto in catene o in cluster, sono dimensionalmente simili ai corpi densi, ma privi dell’aspetto a “occhio di bue”; la loro origine e funzione non è ancora stata pienamente chiarita.
- Glicosomi – di dimensioni simili agli altri organelli fino ad ora descritti e contenenti particelle di glicogeno.
- Mitocondri – la loro struttura è relativamente semplice, ma risultano chiave per il metabolismo energetico delle piastrine che dal megacariocita si origineranno; sono probabilmente anche la principale, sebbene non esclusiva, fonte di Ca per l’attivazione delle piastrine.

2. FAMIGLIA DELLE PROTEINE CHINASI C (PKC)

La PKC è stata una delle prime chinasi ad essere identificate (Inoue M *et al.*, J Biol Chem 1977) e, sebbene inizialmente si pensasse che PKC fosse un'unica proteina calcio e fosfolipide-dipendente (Nishizuka Y, Nature 1984), oggi è noto che all'acronimo fa riferimento un'ampia famiglia di enzimi serin-treonin chinasi, inizialmente identificati mediante uno screening a progressivo grado di stringenza di librerie a cDNA da tessuto cerebrale. Questi studi hanno permesso prima di identificare e clonare le isoforme α , β (il cui messaggero può andare incontro a splicing permettendo così la sintesi due diverse proteine che differiscono per soli 43 amminoacidi al C terminale, la β I e la β II) e γ (Parker PJ *et al.*, Science 1986; Coussens L *et al.*, Science 1986), successivamente le PKC δ , ϵ e ζ (Ono Y *et al.*, FEBS Lett 1987) ed infine la η , la θ e la ι -il cui omologo murino viene indicato come PKC λ - (Osada S *et al.*, Mol Cell Biol 1992; Selbie LA *et al.*, J Biol Chem 1993).

Le isoforme della famiglia delle PKCs, pur essendo tutte chinasi lipido-dipendenti (necessitano infatti il legame alla Fosfatidilserina (PS) per poter svolgere la propria attività), differiscono per struttura, distribuzione tissutale, localizzazione subcellulare, modalità di attivazione e specificità di substrato.

In particolare, sulla base di caratteristiche quali appunto la struttura e la modalità di attivazione, i diversi isoenzimi – al momento ne sono noti almeno 12 - vengono classificati in tre gruppi:

- PKC classiche o convenzionali (cPKCs) - PKC α , PKC β I, PKC β II e PKC γ - calcio dipendenti e attivati sia da PS e diacilglicerolo (DAG).
- PKC novel (nPKCs) – PKC σ , PKC δ , PKC ϵ , PKC η e PKC θ - calcio indipendenti, ma sempre attivate da PS e DAG.
- PKC atipiche (aPKCs) – PKC ζ e PKC ι/λ - calcio indipendenti, non richiedono DAG per l'attivazione, ma la loro funzione viene comunque regolata da PS.

Infine, nel 1995, Palmer *et al.* descrissero l'identificazione di una famiglia di proteine chinasi che pur presentando sequenze ammino-terminali differenti, possedevano un dominio correlato a quello delle PKCs, ossia le protein-kinase-C-related kinase (PRKs) 1, 2 e 3 (Palmer RH *et al.*, Eur J Biochem 1995). Similmente alle PKC atipiche, anche queste chinasi sono insensibili al Ca^{2+} , agli esteri del forbolo e al DAG. Le PRKs possono essere attivate dal legame con membri della famiglia Rho GTPases grazie ad una regione di legame presente al N-terminale

nota come dominio HR1 – a,b e c - (Watanabe G *et al.*, Science 1996; Vincent S & Settleman J Mol Cell Biol 1997; Hutchinson CL *et al.*, Biochemistry 2013).

2.1 Struttura

Tutte le PKCs sono strutturalmente un unico polipeptide, composto essenzialmente da una porzione al N-terminale, a funzione regolatoria, ed una regione C-terminale catalitica, per un totale approssimativo di circa 70-80 KDa.

I primi studi sugli isoenzimi di questa famiglia (Coussens L *et al.*, Science 1986) rivelarono la presenza di domini conservati, denominati poi C1-C4 (vedi figura 4), la cui funzione è oggi ben nota.

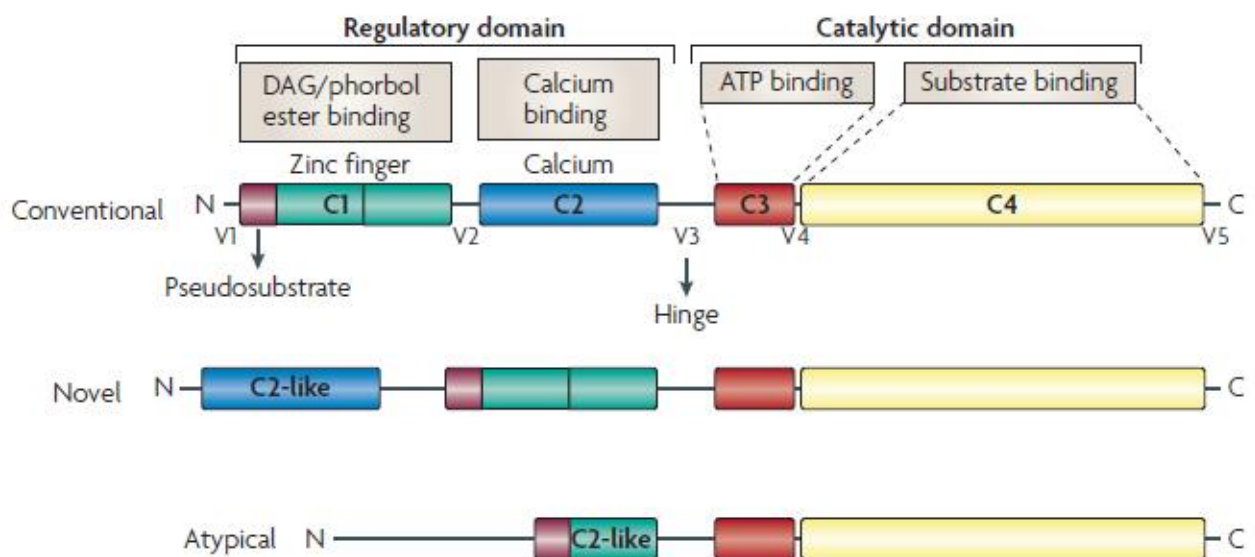


Figura 4. Rappresentazione schematica della struttura e classificazione degli isoenzimi PKC: PKC ha 4 domini conservati (C1-4): C1 comprende uno o due motivi ricchi in Cys che formano il sito di legame per il DAG e gli esteri del forbolo. C2 contiene il sito di riconoscimento per lipidi e, in alcuni enzimi, per il calcio. C3 e C4 formano la regione di legame nel sito catalitico per ATP e il substrato. Nelle nPKCs il dominio C2 manca degli amminoacidi necessari per il legame del calcio. Le aPKCs vi è solo un dominio ricco di cisteine per tanto il legame con l'estere del forbolo non è possibile (Mackay HJ & Twelves CJ, Nat Rev Cancer 2007).

In breve, la regione C1 e quella C2 sono generalmente comprese nel dominio regolatorio delle PKCs. In particolare, C1 porta sequenze, spesso ripetute, ricche in cisteina (Cys) ed è responsabile per la coordinazione con 2 ioni Zn^{2+} (in corrispondenza di C1a e di C1b).

Studi mutazionali e di delezione hanno permesso di capire che C1 rappresenta il sito di legame per il forbolo e il DAG; prive del dominio C1, le PRKs e le aPKC risultano non essere responsive agli esteri del forbolo, sebbene le ultime presentino comunque un motivo a dita di zinco. Ulteriori studi, portati avanti in specifico su PKC δ , hanno chiarito che i due motivi a

dita di zinco in C1 non sono equivalenti nel processo di traslocazione della chinasi: mutazioni a carico di C1b risultano infatti in una più drammatica riduzione dell'affinità di legame con il forbolo (Szallasi Z *et al.*, J Biol Chem 1996).

Di seguito si trova la regione C2 per il riconoscimento degli acidi grassi e, per alcuni isoenzimi, anche del Ca^{2+} . Gli studi che hanno permesso la comprensione della funzione di questo dominio sono stati eseguiti su Fosfolipasi C e Sinaptotagmina, proteine che presentano tale regione: due loop all'estremità carbossi- e quella ammino-terminale di C2 si organizzano a formare una tasca presentante 5 residui di Asp in grado di coordinarsi a 2 ioni Ca^{2+} . Tale interazione porta ad un aumento dell'idrofobicità della proteina e ad un cambiamento conformazionale che a sua volta permette la formazione di una tasca per il legame con il fosfolipide (Shao X *et al.*, Science. 1996; Grobler JA *et al.*, Nat Struct Biol 1996).

Le regioni C3 e quella C4 presentano sequenze conservate in tutte le PKCs e presentano i siti per il legame al substrato e all'adenosina trifosfato (ATP) (Pears CJ & Parker PJ, J Cell Sci 1991). Quando l'enzima è legato alla membrana, la regione che congiunge quella catalitica e quella regolatoria diventa sensibile all'azione proteolitica e il dominio chinasi che conseguentemente si ottiene risulta costitutivamente attivo (Newton AC, J Biol Chem 1995).

Tutti gli isoenzimi fino ad ora descritti presentano al N-terminale, immediatamente prima della regione C1, anche una sequenza pseudosubstrato ad azione inibitoria che, in assenza di legame alla membrana, mantiene la PKC in uno stato inattivo occupando appunto la regione di legame al substrato (Marín-Vicente C *et al.*, J Mol Biol. 2008).

2.2 Regolazione e funzione delle PKCs

Nello stato inattivo la maggioranza delle PKCs si trova normalmente associata al citoscheletro mentre, a seguito della fosforilazione, queste proteine vengono reclutate a livello della membrana. Sotto stimolazione delle citochine o dei fattori di crescita, le Fosfolipasi C (PLC) β o γ vengono attivate e il Fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato (PIP2) clivato per generare DAG e il secondo messaggero Inositolo Trifosfato (IP3). DAG recluta cPKCs e nPKCs, le quali vanno quindi incontro ad una traslocazione, si legano alla membrana cellulare e subiscono il cambiamento conformazionale che porta all'ottenimento della forma attiva di queste chinasi (Rosse C *et al.*, Nat Rev Mol Cell Biol 2010).

Alcuni enzimi possono essere attivati da più vie, come il rilascio di Ca^{2+} e la produzione di DAG, altri, come ad esempio PKC ζ , presentano una selettività nei confronti della Ceramide.

Anche altre molecole possono però indurre l'attivazione della chinasi imitando gli effetti del DAG, tra questi appunto gli esteri del Forbolo (es PMA e PDBu) e la Briostatina, un lattone macrolitico. Questi farmaci permettono una più prolungata attivazione dell'enzima grazie alla loro inferiore metabolizzazione nel tempo rispetto a DAG (Griner EM & Kazanietz MG *Nat Rev Cancer* 2007).

Esperimenti di pulse-labeling su linea cellulare di tumore mammario MDA-MB-231, hanno dimostrato che le PKCs sono sintetizzate in una forma inattiva, defosforilata, di peso molecolare pari a circa 74 kDa, che viene successivamente sostituita da una forma fosforilata transiente a peso molecolare maggiore, 77-kDa ed, infine, da una forma matura finale da 80-kDa (Borner C *et al.*, *J Biol Chem* 1989).

Analisi di spettrometria di massa hanno poi permesso di rivelare che le PKCs presentano 3 diverse fosforilazioni; le PKCs "maturano" quindi fino alla forma attiva grazie ad una serie di fosforilazioni in regioni conservate dell'enzima: il segmento di loop immediatamente precedente al sito attivo, la regione di giro a livello del lobo del dominio chinasi, e la regione idrofobica. Queste fosforilazioni sono costitutive, ordinate, strettamente accoppiate e sono fondamentali per la stabilità dell'enzima (ne ritardano la degradazione) e la sua funzionalità catalitica (Newton AC, *Biochem J* 2003).

Per quanto riguarda le cPKC e le nPKC, è stata poi identificata al C-terminale una regione conservata, indicata come motivo PXXP, responsabile del controllo del processo di fosforilazione. Studi di immunoprecipitazione hanno dimostrato come questa regione interagisca con la Chaperonina heat shock protein-90 (HSP90) e la co-chaperonina Cdc37 e come l'inibizione di quest'ultime riduca drasticamente la fosforilazione della chinasi (Gould CM *et al.*, *J Biol Chem* 2009).

Un altro attore chiave in questo processo di fosforilazione della PKC si è dimostrato essere il mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 2 (mTORC2), una struttura composta dalla chinasi mTOR, Sin1, Rictor e mLST8 (Ikenoue T *et al.*, *EMBO J* 2008).

La localizzazione subcellulare risulta un fattore di volta per la specifica funzione di una particolare isoforma e la diversa compartimentalizzazione contribuisce ad un'attivazione differenziale. Ciò si ottiene grazie a specifiche proteine di ancoraggio che agiscono come selettivi recettori per le PKC attivate, le RACKs, in grado di portare le PKCs in prossimità di un particolare substrato (Ron D & Mochly-Rosen D *J Biol Chem* 1994; Csukai M & Mochly-Rosen *Pharmacol Res* 1999). Numerosi studi riguardanti l'utilizzo di peptidi sintetici in grado di interagire con le chinasi nel medesimo sito di legame con le RACK – che agiscono quindi

da antagonisti e prevenendo conseguentemente la traslocazione della proteina attivata- hanno permesso di elucidare l'importanza del processo di traslocazione per le PKCs (Mackay K & Mochly-Rosen D, J Mol Cell Cardiol 2001).

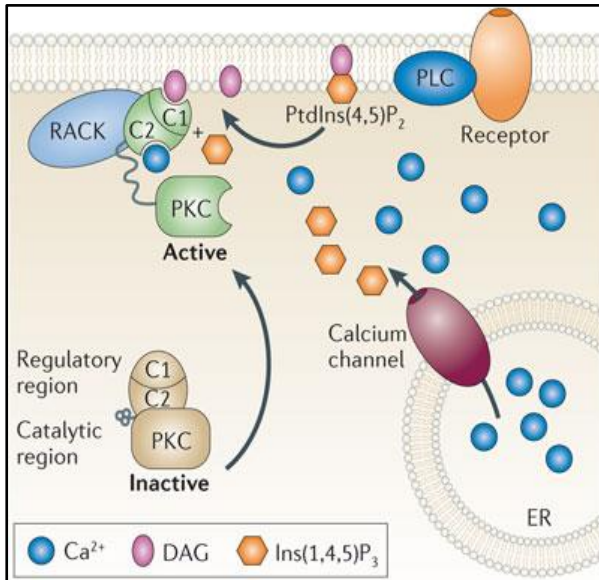


Figura 5. Rappresentazione del meccanismo di attivazione e localizzazione delle PKCs in virtù dell'associazione con RACKs: secondi messaggeri vengono generati a seguito del legame, ai rispettivi recettori, di ormoni, fattori di crescita o neurotrasmettitori. Ciò si ha grazie all'attivazione della PLC e alla conseguente idrolisi di PIP2 a dare IP3 e DAG. IP3 determina il rilascio di Calcio dal reticolo endoplasmatico: quest'ultimo porta alla prima parte del processo di attivazione della PKC, alla sua traslocazione e all'ancoraggio a RACK. A seguito di ciò la PKC lega DAG ed è definitivamente attivata per agire sul proprio substrato, fosforilandolo (Mochly-Rosen D *et al.*, Nat Rev Drug Discov 2012).

Gli eventi downstream successivi all'attivazione delle PKCs sono tutt'oggi intensamente studiati ed è risaputo che questa famiglia è in grado di influenzare diversi pathways cellulari. La maggior parte delle PKCs, in effetti, presentano *in vitro* un overlapping e possono interagire per controllare diversi aspetti della vita della cellula, come il ciclo cellulare, la proliferazione, l'apoptosi, l'adesione cellulare e la capacità metastatica.

Le principali vie di segnalazione su cui si hanno maggiori dati sono sicuramente la mitogen activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase (MEK-ERK) e il pathway PI3K-Akt, ma ci sono evidenze anche per la via di attivazione di NF-kB, della glycogen synthase kinase 3β (GSK3β), della myosin light chain kinase (MLCK) e delle Istone Deacetilasi (HDACs).

L'inattivazione della chinasi contrariamente avviene a seguito del metabolismo del DAG o per via della degradazione o rimozione della fosforilazione da parte di enzimi indotti da agonisti (Newton AC, Am J Physiol Endocrinol Metab 2010).

2.3 PKC EPSILON (PKC ϵ)

La protein chinase C epsilon, di cui sono presenti due isoforme di peso molecolare pari a 87KDa e 95KDa, appartiene alla famiglia delle novel PKC e come tale è una serina-treonina chinasi, DAG ed esteri del forbolo- dipendente e Ca²⁺ indipendente (Ono Y *et al.*, J Biol Chem 1988). Questa proteina, in presenza o assenza di DAG, non possiede una particolare specificità per PS, mentre dimostra avere affinità per PIP2 e, in grado ancor maggiore, per l'acido fosfatidico; il fattore principale che induce l'interazione tra la proteina e la membrana appare essere la carica negativa dei fosfolipidi (Medkova M & Cho W, Biochemistry 1998; Eur. J. Biochem. (2001) 268:1107–1117).

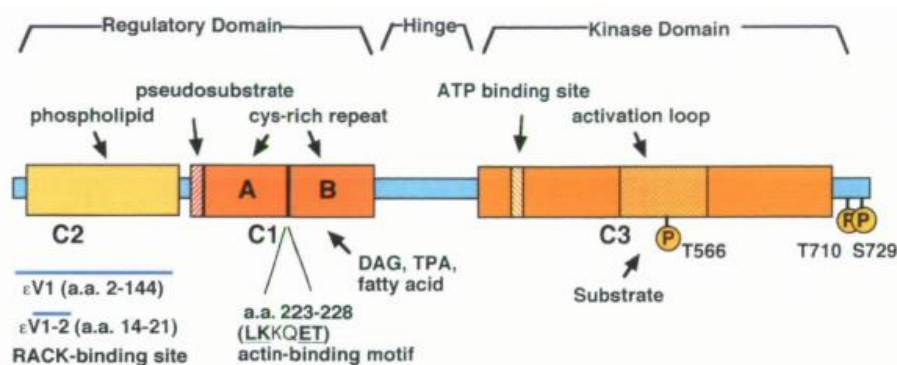


Figura 5. Struttura della PKC ϵ : questo enzima condivide la struttura comune delle novel PKC con una regione C2 di interazione al RACK, lo pseudosubstrato inattivante, la regione C1 (composta dalle porzioni C1A e C1B, a diversa selettività per DAG e per gli esteri del forbolo), una regione di unione coinvolta nel cambiamento conformazionale a seguito di attivazione e, in direzione C-terminale una regione C3, contenente il sito di legame per ATP oltre che, a livello del loop di attivazione, uno dei tre siti di fosforilazione essenziali per l'attività e stabilità enzimatica (Akita Y, J Biochem 2002).

In cellule inattive PKC ϵ è presente sotto forma di piccoli granuli simili al reticolo endoplasmatico (Totoñ E *et al.*, Pharmacol Rep. 2011).

Così come anche per le altre nPKC, la fosforilazione di tre distinti siti risulta essere fondamentale per rendere la proteina capace di rispondere agli stimoli dei secondi messaggeri. Tali fosforilazioni interessano la Thr-566, nel loop di attivazione, la Ser-729, nella regione idrofobica al C-terminale, la cui fosforilazione può essere mediata sia da chinasi eterologhe che dalla PKC ϵ stessa, ed infine, sempre in posizione C-terminale, la THR-710, che risulta essere un sito di autofosforilazione.

Mutare la PKC ϵ in uno dei siti 566 o 710 porta ad una chinasi privata della sua attività catalitica, oltre che ad una sua diversa distribuzione spaziale nella cellula. Studi portati avanti su linea cellulare COS-7 da rene di scimmia, avevano infatti dimostrato già nel 2000 come la

PKC ϵ in forma immatura, parzialmente o completamente non fosforilata, si trovi normalmente ancorata alla proteina “Centrosome and Golgi localized PKN- associated” (CG-NAP) attraverso il sito catalitico e come, al contrario, la forma matura completamente fosforilata non presenti questa capacità di associazione e si dissocia dalla proteina di ancoraggio per divenire sensibile ai secondi messaggeri (Takahashi M *et al.*, J Biol Chem. 2000).

PKC ϵ viene indirizzata a diversi distretti subcellulari in parte in modo dipendente dal tipo di secondo messaggero che va a legarsi alla regione C1 della proteina: l'acido arachidonico e quello linoleico inducono una lenta traslocazione della PKC alla regione perinucleare, a livello del Golgi, mentre gli acidi grassi inducono al contrario una rapida traslocazione alla membrana plasmatica (Shirai Y *et al.*, J Cell Biol 1998).

In uno studio del 1994, su linea cellulare fibroblastica (NIH-3T3) sottoposta a stimolazione da parte di esteri del forbolo, l'enzima era stato identificato in prossimità dei complessi dei pori nella membrana nucleare (Beckmann R *et al.*, Eur J Biochem 1994). Studi più recenti, effettuati non solo su NIH-3T3, ma anche in feocromocitoma di ratto (PC12), neuroblastoma di ratto (NG108-15) e su cultura di miociti, hanno mostrato come l'esposizione a esteri del forbolo induca la traslocazione della PKC ϵ dalla regione perinucleare al nucleo (Xu TR & Rumsby MG, FEBS Letters 2004).

Unica tra le PKCs, PKC ϵ contiene una sequenza specifica per il legame all'actina citoscheletrica, una sequenza localizzata tra la prima e la seconda regione ricche in cisteina nel dominio C1 della chinasi, tra i residui 223 e 228. Questa regione è quindi direttamente responsabile per la localizzazione dell'enzima, costitutivamente attivo, alla matrice citoscheletrica delle terminazioni presinaptiche a livello neuronale per il suo ruolo nel processo PKC-mediato di esocitosi del neurotrasmettitore (Prekeris R *et al.*, J Cell Biol 1996) e nella crescita del neurite (Zeidman R *et al.*, Mol Biol Cell 2002).

Un altro elemento chiave determinante la corretta organizzazione spaziale (localizzazione) e temporale nella trasduzione del segnale per le PKCs, risulta essere l'interazione con particolari proteine adattatrici isoenzima-specifici, le RACKs, di cui è già stato accennato nel capitolo dedicato alla famiglia PKC. Pur essendo in grado di legare anche RACK1, nel caso di PKC ϵ la specifica proteina adattatrice è RACK2, precedentemente nota con il nome di β 'COP' (Schechtman D & Mochly-Rosen D, Oncogene 2001). Questa proteina colocalizza con PKC ϵ , ma qualora la chinasi non sia fosforilata, RACK2 non coimmunoprecipita con essa, segno che l'interazione tra le due avviene solo a seguito dell'attivazione della prima.

RACK2, pur essendo influenzata nella sua trascrizione dai livelli di PKC ϵ , non è oggetto dell'azione diretta di fosforilazione della chinasi, ma ne aumenta l'attività enzimatica nei confronti del substrato (Ron D *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1994; Schechtman D *et al.*, Biol Chem 2004).

Sia il dominio C1 che quello C2 della PKC ϵ partecipano al legame alla membrana, il secondo indirizzando la proteina verso una specifica regione e il legame attraverso l'interazione dei loop 1 e 3, il primo stabilendo successivamente un più stabile ancoraggio (García-García J Eur. J. Biochem 2001).

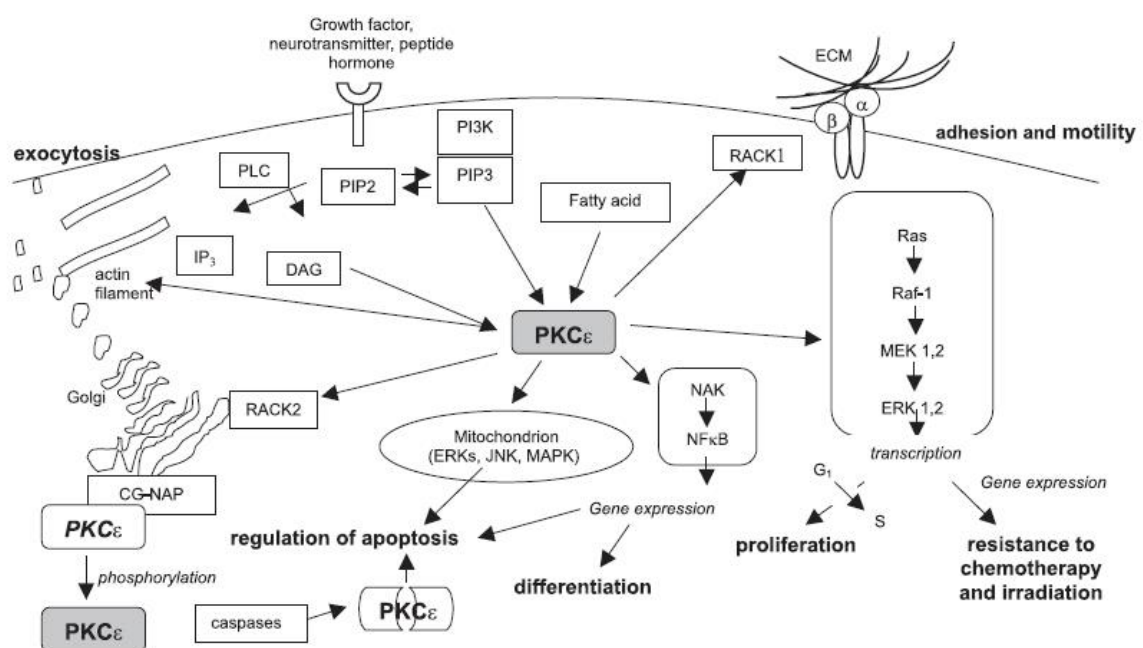


Figura 6. Alcuni dei principali meccanismi di attivazione e funzioni della PKC ϵ nella cellula (Totoñ E *et al.*, Pharmacol Rep. 2011). Acronimi presenti: ECM, matrice extracellulare; α e β , integrine; CG-NAP; DAG; IP₃; PI3K; PIP₃; PLC, fosfolipase; RACK1; Raf-1, serin treonina chinasi; RAS, proteine della cascata segnaletica; ERK, chinasi regolate da segnali extracellulari; JNK, chinasi N terminale c-Jun; MAPK, chinasi mitogeno-attivata.

L'espressione di PKC ϵ è stata riscontrata in molti tessuti e risulta essere coinvolta nelle cascate di segnalazione di una moltitudine di attività e funzioni cellulari, sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Tra queste ad esempio l'espressione genica, la proliferazione, la differenziazione, la contrazione muscolare, il metabolismo, l'esocitosi e l'endocitosi, risultando così implicata nelle funzioni del sistema nervoso, infiammatorio, immunitario e circolatorio.

2.3.1 Ruolo di PKCε nella linea mieloide

- **Sostegno della differenziazione eritroide:** nell'ambito della differenziazione della linea mieloide, PKCε ha dimostrato di giocare un ruolo chiave nella produzione e attività dei globuli rossi, sia in condizioni normali che patologiche: uno studio del 1999 di Baldini et al. (Bassini A et al., Blood 1999) ha dimostrato infatti che la downmodulazione di PKCε in cellule CD34+ umane, aumenta sensibilmente il numero di colonie eritroidi ottenute, così come più elevato risulta essere il numero di colonie EPO-dipendenti ottenute a seguito dello stesso trattamento su linea cellulare mieloblastica murina 32D. In oltre l'analisi dei messaggeri aveva evidenziato come nella differenziazione eritroide la PKCε non venisse espressa, mentre fosse presente in quella granulo-monocitaria.
- **Inibizione della differenziazione MK terminale:** più recentemente, il gruppo di ricerca nel quale sono inserita ha dimostrato che durante la megacariocitopoiesi umana *in vitro* i livelli della chinasi epsilon presentano un picco intorno al sesto giorno di coltura, presentando poi una diminuzione delle fasi terminali della differenziazione, dati che hanno suggerito la necessità della downmodulazione di PKCε per la maturazione della cellula MK.

Tale ipotesi è stata confermata da esperimenti di over-espressione dal giorno 8 di coltura: nelle cellule trasfettate infatti la completa differenziazione MK veniva inibita, mentre veniva indotto il pathway pro-sopravvivenza Bcl-xL-mediato (Gobbi G *et al.*, Stem Cells 2007).

- **Azione pro-leucemica:** sempre il gruppo di ricerca nel quale sono inserita ha permesso di chiarire il ruolo della PKCε nel contesto della leucemia mieloide acuta (AML) (Gobbi G et al., Blood 2009). Nella AML questa chinasi è infatti over-espressa e la sua down-modulazione *in vitro* rende le cellule sensibili all'azione proapoptotica di TRAIL, sostenendo e promuovendo al contempo la loro completa differenziazione MK.

2.3.2 Ruolo di PKCε in patologie umane.

Alterati livelli di PKCs sono stati osservati in numerose condizioni patologiche indirizzando la comunità scientifica a concentrare i propri sforzi sulla elucidazione del ruolo di queste chinasi nei diversi fenomeni. Per studiare se lo scopo della loro alterata attivazione sia anti o pro-patologia e per comprendere quindi come le diverse PKCs siano implicate in eventi quali

il tumore, il diabete, l'ischemia, l'autoimmunogenicità, *etc.* (Akita Y *et al.*, J Biochem. 2002 Dec;132(6):847-52.), è stato fatto principalmente uso di tecniche di indagine genetica e farmacologica.

- **Tumore:** PKC ϵ è uno degli oncogeni meglio compresi e più estensivamente studiati e questa sua natura è ben nota fin dalle prime indagini, nel 1993 (Mischak H *et al.*, J Biol Chem 1993); la proteina ha dimostrato avere un ruolo nella proliferazione e sopravvivenza, esercitando un'attività anti-apoptotica - attraverso la modulazione delle Caspasi e delle Bcl2 - e pro-sopravvivenza - mediante l'attivazione del pathway Akt/PKB. L'enzima svolge la propria funzione anche mediante la modulazione del pathway di segnalazione di Ras, notoriamente coinvolto nella biologia tumorale (Ueffing M *et al.*, Oncogene 1997), e influenzando sullo stato di attivazione della ciclina D1 ed E (Soh JW *et al.*, J Biol Chem 2003). Questa chinasi influenza anche il fenotipo metastatico di molti tumori deregolando la capacità di adesione e la capacità di migrazione delle cellule in senso positivo. Ciò avviene anche in virtù della regolazione da parte della PKC ϵ di proteine coinvolte direttamente o indirettamente con l'apparato citoscheletrico quali F-actina, integrina β , il pathway di ERK, quello di RhoA e RhoC (Hernandez RM *et al.*, J Cell Biochem 2001; Ivaska J *et al.*, EMBO J 2002; Pan Q *et al.*, Cancer Res 2006).
- **Ischemia cardiaca:** Un possibile meccanismo di attivazione della PKC ϵ coinvolge le specie reattive dell'ossigeno e l'ossido nitrico, prodotti appunto durante l'evento ischemico. L'enzima agisce poi sul pathway delle ERKs andando ad inibire proteine pro-apoptotiche (Inagaki K *et al.*, Cardiovasc Res 2006). Una volta attivata quindi, l'azione della PKC ϵ è quella di proteggere le funzioni mitocondriali: infatti la traslocazione chinasi al mitocondrio della cellula cardiaca diminuisce l'apoptosi - attraverso l'apertura dei canali mitocondriali adenosina-trifosfato dipendenti (mitoKATP)- e l'oncosi (Churchill EN & Mochly-Rosen D, Biochem Soc Trans 2007); l'overespressione cardiaco-specifica della chinasi o una sua attivazione tramite peptide attivatore conferiscono cardioprotezione da danni da ischemia o da ri-perfusione. Essa garantisce inoltre l'attività proteosomiale, permettendo così che il proteosoma vada ad agire e quindi degradare la PKC δ , la quale, al contrario di PKC ϵ , è nota per essere mediatore del danno ischemico.
- **Insufficienza cardiaca:** è stato osservato come la PKC ϵ possa indurre *in vitro* ipertrofia in miociti cardiaci neonatali e che la sua attivazione risulti essere protettiva

nei confronti di un evento come l'infarto del miocardio, ma come risulti al contrario dannosa nel caso di insufficienza cardiaca indotta da ipertensione (Palaniyandi SS *et al.*, Cardiovasc Res 2009).

Topi transgenici in cui la PKC ϵ viene attivata in maniera costitutiva mostrano un ispessimento delle pareti anteriori e posteriori del cuore determinando ipertrofia concentrica, così come, più tardivamente, cardiomiopatia (Takeishi Y *et al.*, Circ Res 2000; Goldspink PH *et al.*, Circ Res 2004).

- **Dolore:** PKC ϵ viene espressa anche dai neuroni nociceptivi in cui media l'attività del recettore della capsaicina transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1), coinvolto nella percezione del dolore infiammatorio e termico (Premkumar LS & Ahern GP. Nature 2000). Un altro meccanismo di azione vede invece l'interazione della chinasi con i canali ionici voltaggio dipendenti (VDCC) di tipo N attraverso una proteina nota come enigma homologue, che funge da carrier per l'enzima (Maeno-Hikichi Y *et al.*, Nat Neurosci 2003).
- **Ictus:** tra le diverse PKCs, l'isoforma epsilon è fortemente coinvolta nella segnaletica successiva al preconditioning ischemico ed ha quindi un ruolo importante nella protezione del cervello nei confronti del fenomeno ischemico. Il meccanismo molecolare si basa sull'attivazione di altri pathways quali le chinasi Src, p38, MAP/ERK e Akt (Perez-Pinzon MA *et al.*, J Cereb Blood Flow Metab 2012). Più recentemente, uno studio che ha visto l'impiego di un agonista per PKC ϵ selettivo per i mitocondri ha permesso di evidenziare l'azione di protezione nei confronti della funzione mitocondriale, una riduzione della morte degli astrociti e, forse ancor più interessante, una diretta protezione del cervello nei confronti dell'ictus quando l'agonista veniva amministrato per via periferica in topi.
- **Patologie del polmone:** in cellule muscolari lisce da arteria polmonare, PKC ϵ , in risposta ad una stimolazione da parte di 15-HETE (mediatore della vasocostrizione polmonare ipossica), trasloca dal citoplasma alla membrana e contribuisce al processo di contrazione (Li X *et al.*, Prostaglandins Other Lipid Mediat 2010). L'uso di Grelina, una molecola che agisce anche tramite una down-modulazione di PKC ϵ , è stato suggerito come agente terapeutico nel trattamento della vasocostrizione ipossica polmonare (Alipour MR *et al.*, J Endocrinol Invest. 2011).

In non-small cell lung cancer (NSCLC) lo sbilanciamento tra proliferazione e apoptosi risulta a carico dell'attività di PKC ϵ che, in queste cellule, risulta over-espressa (Zhang N *et al.*, FEBS Lett. 2013).

determinazione della funzione sulla base dei diversi pathway di attivazione coinvolti da caso a caso.

I siti di fosforilazione di PKC δ comprendono il loop a livello della Thr-505, la regione di giro alla Ser-643 ed infine il motivo idrofobico della Ser-662. In particolare, però, la perdita della fosforilazione in posizione 505 a seguito di mutazione puntiforme del relativo amminoacido non sembra influenzare l'attività della proteina, al contrario di quanto non avvenga per altre PKCs mutate nell'analogo residuo (Stempka L *et al.*, J Biol Chem 1997); la fosforilazione di Thr-505 sembra però necessaria per la stabilità dell'enzima in cellule di mammifero (Balendran A *et al.*, FEBS Lett 2000). La Ser-643 è autofosforilata, mentre la Ser-662, la cui defosforilazione è poi evitata da Thr-505, richiede l'intervento di chinasi a monte (come ad esempio la PKC ζ) e coinvolge il pathway del mammalian target of rapamycin (mTOR) (Parekh D *et al.*, J Biol Chem 1999).

Un altro meccanismo di “maturazione” della proteina è rappresentato dalla fosforilazione dei residui tirosinici: queste fosforilazioni riguardano per delta i residui Tyr-52, 155 e 187 nella regione regolatoria, Tyr-311 e 332 in quella di collegamento, Tyr- 512 e 565 nel dominio catalitico. Tutte queste, con eccezione di Tyr-512, non sono conservate tra le PKCs e sono isoforma-specifici: le modificazioni post-traduzionali, attuate da tirosin-chinasi come Scr, Fyn, Lyn, Abl, Lkc e il recettore per il fattore di crescita, alterano la specificità dell'enzima PKC δ , la selettività di localizzazione subcellulare o la sua attività catalitica (Steinberg SF, Biochem J 2004).

Più recentemente è stata dimostrata la auto-fosforilazione, a seguito di stimolazione con esteri del forbolo, in tre siti della regione V3, quindi a livello della cerniera tra il dominio regolatorio e quello catalitico: i siti, esclusivi di PKC δ , sono Ser-229, Ser-302 e Ser-304 e, sicuramente almeno per quanto riguarda il primo, possono essere considerati come marker di attivazione (Durgan J *et al.*, FEBS Lett 2007).

Infine, un ultimo meccanismo di attivazione riguarda la proteolisi dell'enzima e la generazione di un frammento attivo. L'azione enzimatica di taglio tra Asp-327 e Asp-328 è a carico delle caspasi attivate a seguito di stimolo apoptotico: una volta formatosi, il peptide inibisce l'attività di altre chinasi DNA-dipendenti legandovisi e fosforilandole. Questo porta all'inibizione dell'interazione tra queste chinasi e il DNA, così come all'inibizione della fosforilazione dei target a valle, quali ad esempio p53, con conseguente contributo al processo apoptotico (Bharti A *et al.*, Mol Cell Biol 1998).

Come per tutte le PKCs, anche per PKC δ la localizzazione risulta un punto chiave nella determinazione dell'attività della chinasi. Tra i primi studi effettuati, Wang QJ. *et al.* osservarono, mediante l'impiego di una PKC in fusione con la green fluorescent protein (GFP), una diversa localizzazione a seguito di attivazione ottenuta con differenti molecole: in condizioni di inattivazione PKC delta è riscontrabile principalmente a livello citoplasmatico, ma se sottoposta a stimolo da parte di PMA, viene indotta a traslocare verso la membrana citoplasmatica e, in misura minore, verso il nucleo. La Briostatina 1 porta invece ad un'esclusiva traslocazione a livello della membrana nucleare, mentre un analogo del DAG, il B8-DL-B8-, così come la Ceramide, porta la PKC δ a localizzarsi a livello del Golgi (Wang QJ *et al.*, J Biol Chem 1999); il trattamento con TPA causa invece una traslocazione dal Golgi al citoplasma (Kajimoto T *et al.*, Mol Cell Biol 2001 Mar).

Altri fenomeni di traslocazione di questa chinasi sono stati osservati in cellule sottoposte a stimolo con interferon gamma, o a seguito di stress di varia natura, come stress ossidativo o da radiazioni UV. In questo caso la funzione che questa chinasi svolge, anche e soprattutto in virtù del processo di traslocazione verso i mitocondri o verso il reticolo endoplasmatico (ER), è di regolazione dell'apoptosi (Gomel R *et al.*, Mol Cancer Res 2007).

Così come precedentemente descritto per la PKC ϵ , anche per l'isoforma delta sono state identificate proteine di ancoraggio che le consentono la specifica localizzazione in diversi domini subcellulari, in particolare la p32 (C1qBP), una proteina multicompartimentale di 32KDa espressa ubiquitariamente (Ghebrehiwet B *et al.*, Immunol Rev 2001): essa non risulta essere substrato per la chinasi delta e trasloca dal citoplasma al nucleo a seguito di stimolo da parte di esteri del forbolo. La PKC δ si lega solo a seguito di attivazione e la presenza di p32 ha un effetto stimolatorio nei confronti della chinasi (Robles-Flores M *et al.*, J Biol Chem 2002).

L'espressione di PKC δ , come per PKC ϵ , è ubiquitaria e questa chinasi è stata implicata nella regolazione di diversi processi cellulari, compresi il ciclo cellulare (Poli A *et al.*, Biochem Soc Trans 2014) e l'apoptosi (Emoto Y *et al.*, EMBO J 1995; Humphries MJ *et al.*, J Biol Chem 2006) e così quindi nella modulazione del sistema immunitario (Mecklenbräuker I Nature 2002), nell'ancoraggio e migrazione cellulare (Kiley SC *et al.*, Oncogene 1999; Gan X *et al.*, Nat Cell Biol 2012), nel processo differenziativo (Cerdeira SR *et al.*, Gastroenterology

2001; Patel NA *et al.*, Gene Expr 2006) e nella risposta cellulare a diversi stress (Mingo-Sion AM *et al.*, Breast Cancer Res Treat 2005; Chen JL *et al.*, Autophagy 2009).

2.4.1 Ruolo di PKC δ nella linea mieloide

- **Inibizione della differenziazione eritroide:** questa chinasi è espressa e attivata durante la proliferazione, ma è richiesta una sua downmodulazione per la differenziazione dei globuli rossi, come dimostrato da esperimenti di overespressione della proteina dove, conseguentemente, il processo differenziativo era impedito. Sempre nello stesso studio l'inibizione farmacologica della PKC δ risultava in un aumento di CD235a, ossia la sialoglicoproteina glicoforina,, marcatore di differenziazione eritroide (Lanuti P *et al.*, Exp Hematol 2006). Una downregolazione del gene della β -globina, hall-mark di differenziazione, è stato osservato a seguito della progressiva inibizione farmacologica della PKC δ (oltre che delle isoforme α e ζ) (Marchisio M *et al.*, Cell Physiol 2005).
- **Differenziazione MK:** in realtà poco è noto sul ruolo della PKC δ nella megacariocitopoiesi: in un articolo del 2004 Kashiwagi *et al.* osservarono *in vitro* la presenza di questa chinasi in CMK, una linea megacarioblastica umana, quando essa veniva attivata da ribavirina, un farmaco che aumenta in queste cellule i livelli della glicoproteina Ib (GPIb), la cui espressione è a sua volta associata a quella della alpha IIb beta 3 (Kashiwagi H *et al.*, J Thromb Haemost 2004). In linea cellulare K562, modello di leucemia mieloide cronica esprimente ALCAM, PKC- δ risultava essere chiaramente attivato nell'induzione della differenziazione MK e ciò determinava un aumento del fenomeno apoptotico in queste cellule (Tan F *et al.*, BMC Mol Biol).

2.4.2 Ruolo di PKC δ in patologie umane.

- **Tumore:** il ruolo di PKC δ nella trasformazione e metastatizzazione del carcinoma è stato investigato da lungo tempo e i primi studi dimostrarono come questa PKC regoli la crescita ancoraggio-indipendente in cellule tumorali mammarie (Kiley SC *et al.*, Oncogene 1999). Per fare solo qualche esempio, nei tumori polmonari PKC δ è coinvolta nella progressione in un meccanismo che la vede effettore a valle di K-ras (Symonds JM *et al.*, Cancer Res 2011); PKC δ , già nota per essere coinvolta nel cancro alla prostata, è stata studiata anche nell'ambito dell'influenza che l'attivazione della

chinasi esercita nei confronti del progredire del fenomeno angiogenico in questa patologia (Kim J *et al.*, Prostate 2011). L'inibizione della chinasi in tumori neuroendocrini risulta in una soppressione della crescita e della clonogenicità delle cellule tumorali con un meccanismo Ras-mediato (Chen Z *et al.*, Endocr Relat Cancer 2011); in seguito questo dato è stato confermato e la PKC δ è oggi riconosciuta come target letale in molti tipi di tumori presentanti una segnaletica di RAS aberrante. Più recentemente è stato poi osservato come PKC δ sia implicata nei processi di proliferazione e sopravvivenza di cellule staminali tumorali, *in vitro* ed *in vivo* (Chen Z *et al.*, BMC Cancer 2014).

- **Diabete:** in modello murino l'inattivazione, globale o specificatamente epatica, del gene codificante per PKC δ risulta in un aumento della segnaletica dell'isulina e in una diminuzione dell'espressione degli enzimi glucogenici e lipogenici (Bezy O *et al.*, J Clin Invest 2011). Sempre in ambito diabetico è stato inoltre osservato che condizioni di iperglicemia attivano in maniera persistente la chinasi, portando all'espressione di Src homology-2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1): essa induce la defosforilazione del recettore β per PDGF con conseguente induzione dell'apoptosi NF-kB-indipendente dei periciti e retinopatia diabetica (Gerald P *et al.*, Nat Med 2009).
- **Ischemia cardiaca:** PKC δ media il danno da riperfusione dopo ischemia cardiaca (Inagaki K *et al.*, Circulation 2003); in cuori sottoposti ad ipossia cronica –una condizione nota per conferire cardioprotezione prolungata- i livelli della chinasi risultano elevati, la proteina è fosforilata (Ser 643) e la sua localizzazione si sposta ai mitocondri e alle membrane del sarcolemma (Hlaváčková M *et al.*, Mol Cell Biochem 2010).
- **Psoriasi:** la chinasi è stata studiata in relazione a diverse patologie autoimmuni ed è noto come essa sia coinvolta nel pathway pro-apototico di ERK delle cellule B auto-reattive (Limnander A *et al.*, Nat Immunol 2011); in particolare l'attivazione del signalling di STAT1, i cui livelli e lo stato di attivazione risultano aumentati nella pelle psoriasica, è mediata da PKC δ (Hald A *et al.*, Br J Dermatol 2013) e l'uso di inibitori di questa chinasi sono stati proposti per il trattamento della patologia (Maioli E & Valacchi G, Curr Drug Metab 2010).
- **Infiammazione:** le proteine PKCs sono un importante anello di congiunzione tra i pathway metabolici e quelli infiammatori. Ad esempio PKC δ , nelle cellule del

muscolo liscio, è coinvolta nella risposta proinfiammatoria indotta da TRAIL (Song S *et al.*, Cell Death Dis 2011) così come risulta essere, insieme all'isoforma β , un target per terapie dell'arteriosclerosi, patologia causata dall'infiammazione cronica dei vasi arteriosi (Fan HC *et al.*, Biochem Pharmacol 2014).

- **Ictus:** I livelli di PKC δ , sia in termini di messaggero che di proteina, sono aumentati nel tessuto ischemico (Koponen S *et al.*, J Cereb Blood Flow Metab 2000) e la sua assenza in modello murino riduce marcatamente il danno da riperfusione a seguito di ischemia transiente, fenomeno probabilmente legato ad una minore infiltrazione di neutrofili nel tessuto, dovuta ad una loro incapacità ad aderire, migrare e degranulare correttamente (Chou WH *et al.*, J Clin Invest 2004). Sempre in modello murino è stato osservato che l'inibizione dell'attività della chinasi mediante specifico peptide inibitore riduce le dimensioni dell'area necrotica dopo ischemia cerebrale.
- **Parkinson:** la chinasi è coinvolta nel meccanismo di morte cellulare, indotta da stress ossidativo, di cellule dopaminergiche con un meccanismo caspasi dipendente (Kaul S *et al.*, Eur J Neurosci 2003) e una downmodulazione della proteina previene completamente tale morte cellulare (Latchoumycandane C *et al.*, J Pharmacol Exp Ther 2005). L'inibizione di PKC delta conferisce neuroprotezione contro danno ai neuroni dopaminergici in modelli animali di Parkinson (Zhang D *et al.*, J Pharmacol Exp Ther 2007).
- **Patologie del polmone:** come accennato PKC δ ha dimostrato *in vitro* di regolare signalling proinfiammatorio in cellule endoteliali, epiteliali e in neutrofili: in modello animale di sindrome da stress respiratorio nell'adulto (ARDS), l'inibizione dell'attività della chinasi risulta in una diminuzione dell'infiltrazione cellulare, della distruzione dell'architettura polmonare e dell'edema associato a danno polmonare indotto da sepsi (Kilpatrick LE *et al.*, J Leukoc Biol 2011). Un'implicazione della chinasi è stata valutata anche nell'asma: in particolare PKC δ media, negli eosinofili, la mobilità, il rilascio di MMP9 e l'espressione dell'integrina CD11b, recettore per il fibrinogeno (Langlois A *et al.*, J Leukoc Biol 2009). Nel 2012 è stata studiata la aumentata espressione e traslocazione della delta nell'arteria di ratto in condizioni di ipertensione cronica da ipossia (Shi Y *et al.*, Med Sci Monit 2012).

3. Rho GTPasi

La famiglia delle Rho guanosina trifosfatasi (GTPasi) è composta da quasi una trentina di proteine a peso molecolare ridotto, intorno ai 20-30 KDa, appartenenti alla superfamiglia delle Ras: nell'uomo i loci codificanti per Rho sono 23, ma fenomeni di splicing alternativo permettono di ottenere fino a 26 diverse proteine (Bustelo XR *et al.*, Bioessays 2007).

A sua volta la famiglia Rho è suddivisibile in 7 sottofamiglie sulla base della similarità di sequenza amminoacidica:

- le Rho classiche: Rho (RhoA, RhoB e RhoC); Cdc42 (Cdc42, TC10 e TCL); Rif (Rif e RhoD) e Rac (Rac1, Rac2, Rac3 e RhoG).
- Le Rho atipiche: CHP e WRCH1; RhoH; Rho BTB (RhoBTB1, RhoBTB2); RND (RND1, RND2 e RND3);

Le proteine della famiglia Rho condividono comunque tutte una identità di sequenza amminoacidica pari al 85%, con differenze principalmente associate al C-terminale.

Tra queste GTPasi, le più estensivamente studiate sono sicuramente Rho, Rac e Cdc42 (Heasman SJ & Ridley AJ, Nat Rev Mol Cell Biol 2008).

L'attivazione di queste proteine è regolata dal passaggio dalla forma inattiva, legata alla guanosina-5'-difosfato (GDP), a quella attiva che è legata invece alla guanosina-5'-trifosfato (GTP). Tale passaggio è coadiuvato da guanine nucleotide exchange factors (GEFs), fattori di scambio che permettono appunto lo scambio tra GDP e GTP. L'inattivazione avviene invece grazie all'azione di GTPase activating proteins (GAPs) che spingono le Rho GTPasi a idrolizzare GTP a GDP.

Un'altra classe di molecole, le guanine dissociation inhibitors (GDIs), partecipa a regolare l'attività delle Rho GTPasi sequestrando nel citosol la forma inattiva di questi enzimi. La dissociazione dalle GDIs avviene solo a seguito della traslocazione alla membrana e all'attivazione delle GTPasi (vedi figura 9).

Quando l'enzima è attivo può interagire con una varietà di molecole effettore a valle, attivare diversi signalling e, quindi, determinare diverse risposte cellulari.

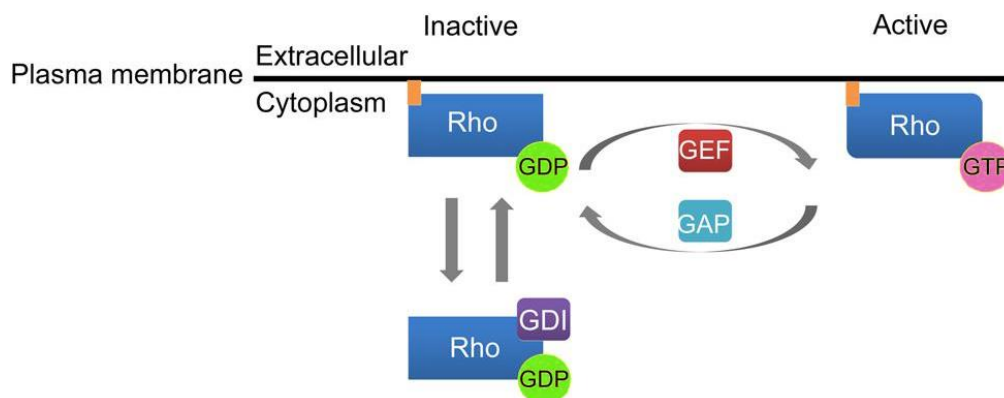


Figura 8. Rappresentazione schematica del meccanismo di attivazione e inattivazione delle GTPasi Rho (Stankiewicz TR & Linseman DA, Front Cell Neurosci 2014)

L'attivazione dell'enzima a seguito dello scambio tra GTPm e GDP avviene in virtù di una sequenza conservata all'interno della famiglia Rho GTPasi: tutte le Rho contengono infatti un dominio Dbl Homology (DH) di circa 200 aminoacidi affiancato, al C-terminale, da un dominio pleckstrin homology (PH). Il primo facilita l'interazione con GEF, mentre il secondo lega i fosfoinositidi per il legame alla membrana (Stankiewicz TR & Linseman DA, Front Cell Neurosci 2014).

Studi più recenti hanno messo in evidenza il ruolo di altre molecole nella regolazione dell'attività delle Rho, tra questi il pathway ubiquitina-proteosoma, che influenza processi come la polarizzazione, la migrazione e la riorganizzazione citoscheletrica (Ding F *et al.*, Curr Top Med Chem 2011).

Le Rho GTPasi presentano al C-terminale una prenilazione che permette loro l'interazione con le membrane cellulari, passaggio chiave per la loro localizzazione e funzione: queste proteine richiedono infatti il legame alle membrane cellulari per poter svolgere le proprie funzioni e questo passaggio non è ottenuto immediatamente a seguito della sintesi proteica, ma richiede una serie di eventi perché si attui. Primo fra tutti è appunto la modificazione post-traduzionale del CAAX box, che comporta l'aggiunta di un gruppo geranylgeranilico o farnesilico ad opera delle rispettive transferasi di tipo I. Questo è un punto chiave del processo di attivazione della proteina nella quasi totalità delle Rho.

La prenilazione promuove la traslocazione delle GTPase al reticolo endoplasmatico (ER) dove avviene il taglio proteolitico del tripeptide di coda AAX grazie allo specifico enzima Rce1. A seguito di questo, la cisteina C-terminale neo-esposta viene metilesterificata al gruppo α -carbossile dalla carbossil-metiltransferasi ICMT. Alcune Rho sono poi ulteriormente

modificate nel ER con l'aggiunta di gruppi palmitato a cisteine vicine al CAAX box. Queste modificazioni, al contrario della prenilazione, sono necessarie solo per specifiche traslocazioni a regioni subcellulari (Bustelo XR *et al.*, *Bioessays* 2007).

Molteplici studi hanno dimostrato il ruolo di queste GTPasi in diverse funzioni cellulari come l'organizzazione dell'actina citoscheletrica e la trascrizione genica (Hall A, *Science* 1998), la connessione tra recettori di membrana e il citoscheletro, così come l'adesione focale e la divisione cellulare (Ridley AJ, *Curr Opin Genet Dev* 1995), il ciclo cellulare (Olson MF *et al.*, *Science* 1995) ed infine la vitalità e la morte cellulare (Heasman SJ & Ridley AJ, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008)).

3.1 RhoA

Questa proteina appartenente alla famiglia delle Rho è stata, come già accennato, tra le prime ad essere identificata e tra le più estensivamente studiate. Come le altre Rho, anche RhoA agisce da switch molecolare intracellulare, con un ciclo che va dalla forma inattiva in legame con GDP e quella attiva, legata a GTP. Attraverso l'interazione con effettori downstream, RhoA trasmette segnali e regola diversi processi cellulari.

Negli anni, lo studio di questa proteina e dei suoi meccanismi molecolari è stato portato avanti in modelli basati principalmente sull'uso di colture cellulari, primarie o immortalizzate, e talvolta hanno previsto la modulazione dell'attività della proteina mediante over-espressione. Questi sistemi hanno dimostrato avere delle limitazioni legate ad un alterato comportamento della proteina in modelli diversi e/o tumorali, così come all'originarsi di effetti dovuti ad una diversa o ridotta selettività di azione dell'enzima e delle molecole coinvolte nel suo pathway rispetto alle condizioni *wt*. Ad oggi l'approccio più corretto per lo studio di RhoA sembra essere l'uso di topi knockout.

RhoA è noto per regolare la attività della miosinaII e, una volta attivato, stimolare la formazione di fibre di stress, l'adesione focale e la fosforilazione di residui di tirosina in cellule quiescenti. In quest'ottica l'effettore chiave risulta essere la chinasi Rho (ROCK) (Miyazaki K *et al.*, *Cell Biochem Biophys* 2006). Le due isoforme ROCK1 and ROCK2 attivano la miosinaII attraverso la fosforilazione della regione regolatoria myosin light chain (MLC): una volta fosforilata alla Ser19, la miosinaII tende ad assemblarsi in filamenti bipolari e viene stimolata nell'attività ATPasica. La fosforilazione dunque precede la formazione delle fibre da stress, le adesioni focali ed è accompagnata da un aumento della contrattilità (Chrzanowska-Wodnicka M & Burridge K, *J Cell Biol* 1996). Allo stesso modo RhoA,

attraverso l'effettore mDia1, attiva la polimerizzazione dell'actina e, indirettamente, aumenta la stabilità dei suoi filamenti (Lessey EC, Biochemistry 2012).

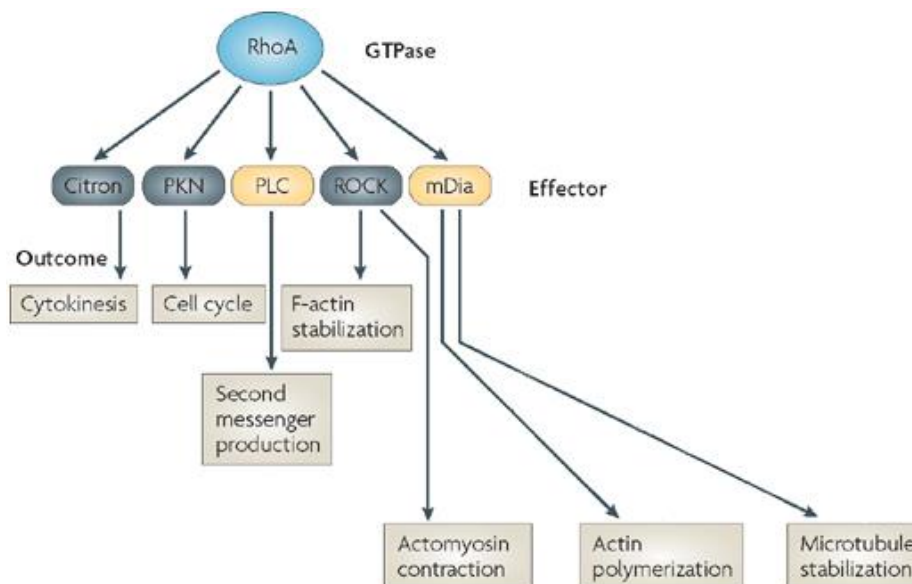


Figura 9. RhoA regola diversi eventi cellulari, tra questi la retrazione della membrana a seguito della contrazione delle fibre da stress, progressione del ciclo cellulare e divisione cellulare. Acronimi: formin mammalian diaphanous (mDia) PKN, protein kinase N; PLC, phospholipase C. (adattata da Nat Rev Mol Cell Biol 2008, Iden S & Collard JG)

3.2 RhoA nei megacariociti e nelle piastrine

Durante la mitosi RhoA si accumula nel solco di scissione cellulare e determina l'attivazione di effettori come Rock, la chinase citron, la chinase LIM e mDia/formine. Questo pathway porta alla contrazione dell'anello contrattile di actinmiosina fino al completamento della citodieresi, oltre che ad influire sui cambiamenti morfologici della cellula in anafase B (Wadsworth P, Curr Biol 2005; Hickson GR, Curr Biol 2006).

È stato quindi ipotizzato che alterazioni di tale signalling siano alla base del fenomeno di endomitosi megacariocitaria: studi su questo processo in CD34+ umane in differenziamento MK, hanno dimostrato una localizzazione di RhoA nel solco di scissione durante l'endomitosi da 2N a 4N e l'assenza di accumulo di miosinaIIA nella stessa regione durante l'anafase (Geddis AE & Kaushansky K, Cell Cycle 2006), mentre si è osservato che RhoA e actina tendono in parte ad accumularsi al centro della cellula MK, determinando una sorta di "citochinesi al contrario".

Inoltre, l'utilizzo dell'inibitore di RhoA TatC3, ha permesso di osservare in queste cellule il mancato reclutamento nella regione centrale, oltre che di RhoA, anche della F-actina e quindi è stato possibile ipotizzare un ruolo di RhoA anche nell'allungamento del fuso mitotico

durante l'anafase B. Infine l'inibizione o la downmodulazione dell'effettore di RhoA ROCK aumenta la poliploidizzazione dei MK in differenziazione (Lordier L, Blood 2008).

Nel megacariocita murino differenziato *in vitro* i GEFs sono downregolati durante l'endomitosi, condizione che porta ad una deattivazione di RhoA e quindi ad un disassemblaggio dell'anello contrattile e ad una regressione del solco di scissione (Gao Y *et al.*, Dev Cell 2012).

Durante la coltura *in vitro* di MKs derivanti da CD34+ umani, RhoA oltre a svolgere una funzione di controllo del processo endomitotico, agisce anche nella formazione delle piastrine: è stato osservato come il TPO attivi Rho sia in megacariociti immaturi (a 7 gg di differenziamento MK), che in cellule più mature (12 gg di coltura), ma che tale attivazione risulta anche essere modestamente down-regolata durante tale processo differenziativo; in questo modello la overespressione di un RhoA dominante-negativo porta ad un incremento nella formazione delle propiastri. Ciò ha permesso di affermare che RhoA funge da regolatore negativo della formazione delle propiastri e che quindi, se attivato, RhoA inibisce tale processo (Chang Y *et al.*, Blood 2007).

Suzuki *et al.* hanno dimostrato che in modello murino la perdita di RhoA nei megacariociti determina *in vivo* forte macrotrombocitopenia, con megacariociti di maggiori dimensioni, maggiore ploidia e membrane meno elastiche: apparentemente i megacariociti non subivano alterazioni evidenti nella loro capacità di rilasciare piastrine, ma queste piastrine, troppo rapidamente prodotte e dimensionalmente anomale, una volta entrate in circolo presentavano clearance più elevata da parte dei macrofagi (tradotta quindi nella sopracitata macrotrombocitopenia). RhoA risulta quindi chiave nella normale megacariocitopoiesi e per la formazione di piastrine sane (Suzuki A *et al.*, PLoS One 2013).

In uno studio portato avanti in modello *in vitro* di differenziamento MK murino a partire da cellule isolate da fegato fetale e di cui parte dei risultati verranno approfonditi in questa tesi, il gruppo di ricerca nel quale sono inserita ha recentemente dimostrato il ruolo regolativo che la PKC ϵ esercita sull'attività di RhoA e, conseguentemente, sulla formazione delle propiastri *in vitro*. I dati sono stati pubblicati nell'articolo "Proplatelet generation in the mouse requires PKC ϵ -dependent RhoA inhibition", pubblicato nel 2013 sulla rivista medica peer-reviewed Blood (Gobbi G *et al.*, Blood 2013).

4. Famiglia Bcl-2

La famiglia delle Bcl-2 comprende una serie di proteine la cui funzione risiede nella regolazione dell'apoptosi: esse rappresentano un checkpoint critico per il processo agendo a monte delle caspasi (Chao DT & Korsmeyer SJ, *Annu Rev Immunol* 1998). Esse possono essere distinte in:

- anti-apoptotiche, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2A-1,
- pro-apoptotiche, effettori del pathway intrinseco di apoptosi - Bax, Bak1,
- pro-apoptotiche "BH3-only" che agiscono su Bax e Bak - Bim (Bcl2L11), Bi, Bad, Puma (BBC3), Noxa (PMAIP1), Bmf, Bik e Hrk.

Queste proteine condividono una struttura che comprende almeno una delle 4 regioni conservate, le Bcl homology domains (BH1-4). Tali domini controllano la capacità di queste proteine di dimerizzare in omo- o eterodimeri e ne regolano la funzione: Bcl-2 e Bcl-xL, per esempio, presentano residui chiave nelle regioni BH1 e BH2 necessari sia per la omodimerizzazione che per la eterodimerizzazione con BAX. La perdita di tali residui compromette la capacità di dimerizzazione e di repressione del processo apoptotico (Yin XM *et al.*, *Nature* 1994).

Le proteine Bcl-2 pro-apoptotiche presentano invece come unica sequenza comune, la BH3, un dominio alifatico che è risultato essere il dominio responsabile del legame ad una tasca idrofobica presente a livello di HD1 e HD2 di Bcl-2 anti-apoptotiche. Tale legame neutralizza la proteina ed è responsabile dell'azione pro-apoptotica di alcune Bcl2, che agiscono quindi da ligando di morte e antagoniste delle altre proteine pro-sopravvivenza (Wang K *et al.*, *Genes Dev* 1996).

È infatti il rapporto tra i due sottogruppi della famiglia delle Bcl2 che, in parte, determina la suscettibilità delle cellule ai segnali di morte: nelle cellule sane, le proteine pro-sopravvivenza agiscono per una "predominanza" che previene l'azione di perturbazione delle membrane, in particolare quelle mitocondriali, da parte delle proteine pro-apoptotiche.

Un quarto dominio, BH4, identificato al N-terminale in tutte le Bcl-2 anti-apoptotiche, risulta essere importante per l'azione di repressione dell'apoptosi da parte di Bcl-2 e Bcl-xL, oltre che ad essere coinvolto in ulteriori interazioni proteiche, in particolare con RAF-1 (Reed JC, *Nature* 1997).

Le proteine dei due sottogruppi presentano una diversa localizzazione in regioni subcellulari distinte: in assenza di segnale di morte, le Bcl2 anti-apoptotiche sono sostanzialmente

proteine di membrana a livello del mitocondrio, del ER e del nucleo. La maggior parte delle proteine appartenenti al sottogruppo pro-apoptotico invece tendono a localizzarsi sul citoscheletro o nel citosol, ma a seguito del segnale apoptotico (es. danno al DNA) si osserva un'attivazione delle BH3-only da up-regolazione trascrizionale o modificazione post-traduzionale che, a sua volta, porta all'attivazione di Bax o Bak. Esse subiscono un cambiamento conformazionale che permette loro di dirigersi verso la membrana, in particolare quella mitocondriale, ed esserne integrate e dove possono poi dimerizzare e svolgere la propria attività.

Tali attività si rispecchiano in disfunzioni del mitocondrio quali, ad esempio, un alterato potenziale di membrana ($\Delta\Psi_m$), produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e, in alcuni casi, rilascio di citocromo c (cyt c) che a sua volta attiva le caspasi. Il compito di Bcl-2 o Bcl-xL sembra essere quello di contrastare tali effetti, ma come questo avvenga ancora non è stato completamente definito. Tra le ipotesi più accreditate viene ipotizzato che le Bcl-2 agiscano sul mitocondrio formando o regolando piccoli canali ionici o nel contesto di un più complesso canale di membrana detto permeability transition pore (PTP) (per una completa descrizione del processo si fa riferimento alla review di Gross A, Genes Dev 1999).

Le Bcl-2 anti-apoptotiche giocano un ruolo importante nel contesto tumorale potendo prevenire il normale turnover cellulare dovuto a morte cellulare fisiologica e favorendo così l'espansione neoplastica, senza agire direttamente sulla proliferazione cellulare. Queste proteine hanno dimostrato di avere un ruolo nella resistenza alle terapie convenzionali antitumorali e possono essere quindi considerate una nuova classe di oncogeni (Korsmeyer SJ, Blood 1992; Huang Z, Oncogene 2000).

Elevati livelli di espressione di Bcl-2 sono stati trovati in diversi tumori ed è stato valutato come il ripristino dell'inattivazione di Bcl-2 o Bcl-xL possa ristabilire il fisiologico processo apoptotico nelle cellule neoplastiche o renderle nuovamente farmaco/trattamento-sensibili mediante, ad esempio l'uso di oligonucleotidi anti-senso per il gene codificante Bcl-2 o anticorpi diretti contro la proteina stessa.

4.1 Bcl-xl nell'apoptosi di megacariociti e piastrine

Le Bcl-2 anti-apoptotiche sono coinvolte nella sopravvivenza di diversi lineage ematopoietici e risultano essere spesso sregolati nelle neoplasie ematopoietiche.

La struttura tridimensionale della Bcl-xL, omologa di Bcl-2 e prima ad essere definita, è stata determinata da Muchmore *et al.* mediante cristallografia e spettroscopia NMR (Muchmore SW

et al., Nature 1996): essa consiste in 8 α -eliche connesse da diversi loop; tra queste, le centrali, fortemente idrofobiche, $\alpha 5$ and $\alpha 6$, formano il cuore della proteina. La sequenza NWGR, immediatamente precedente a queste due eliche, ha invece un ruolo strutturale e funzionale nel legame alle proteine pro-apoptotiche BH3-only Bak e Bad (Petros AM *et al.*, Biochim Biophys Acta 2004). Come anche per Bcl-2, di particolare importanza risulta essere la tasca idrofobica composta dai domini conservati BH1, BH2 e BH3: tale regione è fondamentale per l'azione anti-apoptotica della proteina e mutazioni a suo carico risultano in una completa perdita di funzionalità della stessa.

Già precedentemente era noto che Bcl-xL è necessario per sostenere le cellule della linea eritroide (Wagner KU *et al.*, Development 2000) in cui l'abolizione di Bcl-xL determina un'incapacità a portare a termine il differenziamento così come una tendenza all'emolisi. Topi mutati per questa proteina mostrano a 3 mesi di età severa anemia emolitica, iperplasia delle cellule eritroidi immature e splenomegalia. Allo stesso modo Bcl-xL appare essere coinvolto anche nella sopravvivenza delle cellule neuronali (Motoyama N *et al.*, Science 1995): anche in questo caso, topi deficienti per questa proteina mostravano elevata morte postmitotica di neuroni immaturi e non superavano il giorno 13 di gestazione.

Forse più interessante, sempre in questo studio, è stata l'osservazione uno stato di apoptosi delle cellule ematopoietiche nel fegato fetale e un'influenza di Bcl-xL sulla sopravvivenza dei linfociti immaturi. Queste osservazioni, confermate anche in seguito su anche linfociti T (Watts TH, J Immunol 2010) e, molto più recentemente, su macrofagi immaturi e maturi (Busca A *et al.*, J Leukoc Biol 2014) permettono quindi di associare Bcl-xL alla sopravvivenza delle cellule coinvolte nell'ematopoiesi.

Così come verrà poi detto per le piastrine, anche i loro progenitori, i megacariociti, mostrano di essere sottoposti al pathway apoptotico intrinseco che vede coinvolte le proteine della famiglia Bcl-2 e le caspasi, proteine che, in ultima analisi, ne regolano l'equilibrio tra la vita e la morte.

Nel topo i megacariociti diventano dipendenti da Bcl-xL nel momento maturativo della produzione delle piastrine: in modello *in vitro* in cui il Bcl-xL è inattivo, i megacariociti vanno incontro a normale sviluppo, ma non sono poi in grado di produrre propiastri e mostrano forti alterazioni ultrastrutturali, in particolare in co-presenza di knockout di Mcl-1 (Kodama T *et al.*, Cell Death Differ 2012).

Da notare che la up-regolazione del signalling, osservata nella trombocitemia essenziale e nella leucemia megacarioblastica, determina un aumento della sopravvivenza dei

megacariociti e delle piastrine: in colture di megacariociti (sia primarie che linee cellulari) *in vitro*: nello studio di Kozuma *et al.* su cellule megacariocitarie derivanti da staminali, è stato osservato che Bcl-xL risulta espresso durante le fasi precoci ed intermedie di differenziazione cellulare e tale espressione è mantenuta fino alla fase di produzione piastrinica. La deplezione di TPO determina una forte diminuzione dei livelli di Bcl-xL con un meccanismo di regolazione post-traduzionale (Kozuma Y *et al.*, J Thromb Haemost 2007); TPO regola positivamente la trascrizione di Bcl-xL stimolando la sopravvivenza megacariocitaria attraverso l'attivazione del pathway di signalling di JAK-STAT e PI3K (Kirito K *et al.*, J Biol Chem 2002).

In un individuo sano la vita media di una piastrina si aggira tra gli 8 e i 9 giorni e ciò che permette di regolarne il turnover *in vivo* è appunto il pathway apoptotico intrinseco: la presenza delle Bcl-2 e delle caspasi nelle piastrine è documentata fin dagli studi di Vanags *et al.* del 1997 (Vanags DM *et al.*, Br J Haematol 1997). Oggi è noto che la proteina Bcl-xL, in particolare, è fondamentale per il mantenimento della vitalità di queste cellule anucleate; l'ottenimento di topi knockout per il gene di Bcl-xL ha permesso di osservare come la perdita di questa proteina porti ad una iperproliferazione dei megacariociti ed una diminuzione del numero di piastrine in circolo (Wagner KU *et al.*, Development 2000) e, sempre in modello murino, mutazioni a carico di Bcl-xL sono state osservate determinare una drastica riduzione della vitalità piastrinica in modo dose-dipendente. Secondo quanto suggerito da Mason *et al.*, Bcl-xL agirebbe come una sorta di orologio molecolare per determinare la sopravvivenza piastrinica: questa molecola presenta infatti un'emivita inferiore rispetto alle Bcl-2 proapoptotiche (BAK1 in particolare). Essendo la neosintesi di queste proteine quasi nulla, ne consegue che nel tempo i livelli di Bcl-xL si riducono più velocemente della controparte, fino al punto di non essere più in grado di contrastare gli effetti di BAK1 e consegnando la cellula alla morte apoptotica (Mason KD *et al.*, Cell 2007). Sebbene questo modello sia ad oggi in parte superato, esso permette di intuire la complessità di regolazione del processo apoptotico nelle piastrine.

In uno studio del 2009, Florena *et al.* (J Clin Pathol. 2009) hanno valutato i diversi profili immunofenotipici di apoptosi dei megacariociti in trombocitemia essenziale (ET) e mielofibrosi primaria (PMF): in queste patologie la via di morte cellulare attiva risultava essere esclusivamente quella intrinseca e, tra le molecole coinvolte ed analizzate dal gruppo di ricerca nell'ambito di questo studio, Bcl-xL era stata vista essere espressa nei megacariociti con una percentuale pari al 50.5% nelle ET e al 35% nelle PMF. Per quanto riguarda invece

Bax e Bad, esse mostrano un'espressione maggiore nelle PMF (55% e 52%) rispetto alle ET (30.5% e 41%). Questi dati, riportati da una valutazione *in vivo*, differiscono dalle osservazioni di studi precedenti eseguiti *in vitro*, in cui risultava invece una down-modulazione di Bcl-xL nelle prime fasi di ET e una upmodulazione nelle PMF. L'autore suggerisce che ciò sia attribuibile ai diversi stimoli pro-sopravvivenza che i megacariociti hanno nei due modelli, così come ad una possibile variabile espressione della proteina da paziente a paziente.

5. Mielofibrosi (MF)

I neoplasmi mieloproliferativi cromosoma Philadelphia negativi (Phneg MPNs) sono disordini clonali di progenitori ematopoietici multipotenti, patogeneticamente e biologicamente correlati.

Queste patologie, caratterizzate appunto dall'assenza della traslocazione $t(9;22)(q34;q11)$ che porta alla forma aberrante nota come cromosoma Philadelphia, comprendono la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Essenziale (ET) e mielofibrosi (MF) (Levine RL & Gilliland DG Blood 2008).

Nell'ambito di un'accurata discriminazione tra le diverse Phneg MPNs e dell'identificazione quindi di parametri clinici, morfologici e molecolari standardizzati per queste patologie, la World Health Organization (WHO) aveva fornito gli strumenti per poter correttamente diagnosticare le Phneg MPNs fin dalle fasi più precoci e, in seguito, aumentarne la sensibilità e la specificità (Kvasnicka HM, Curr Hematol Malig Rep 2013).

La mielofibrosi può essere primaria (PMF) o originarsi dall'evoluzione della policitemia vera (PPV-MF) o della trombocitemia essenziale (PET-MF).

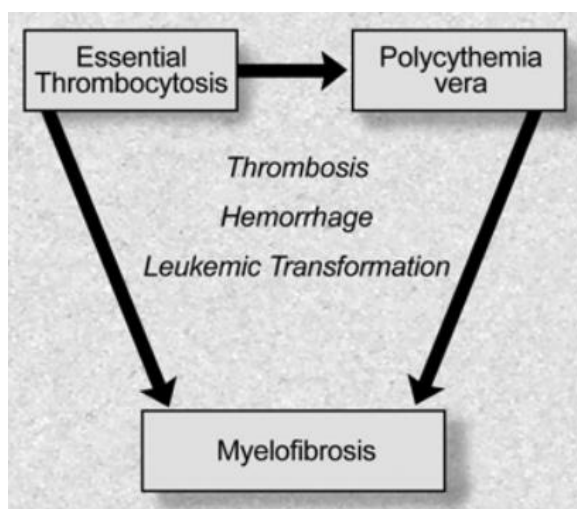


Figura 10. Classificazione delle Phneg MPNs di William Damsheknel e la loro stretta correlazione, 1951 (Levine RL & Gilliland DG, Blood 2008)

La PMF è la Phneg MPN più sintomatica e prognosi meno favorevole (Vannucchi AM, Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2011), con una sopravvivenza media di 5,7 anni: nel 31% dei casi la causa di morte risulta essere la leucemia, nel 19% l'evoluzione senza trasformazione leucemica, nel 14% la trombosi, 5% emorragia, 10% infezione, 4% ipertensione, 4% neoplasia secondaria.

Questa patologia risulta anche la più severa in termini di qualità di vita: essa è infatti caratterizzata da sintomi altamente debilitanti come anemia, trombocitemia, trombosi, progressiva fibrosi del midollo osseo, angiogenesi, ematopoiesi extramidollare ed elevato rischio di trasformazione leucemica.

Caratteristiche:

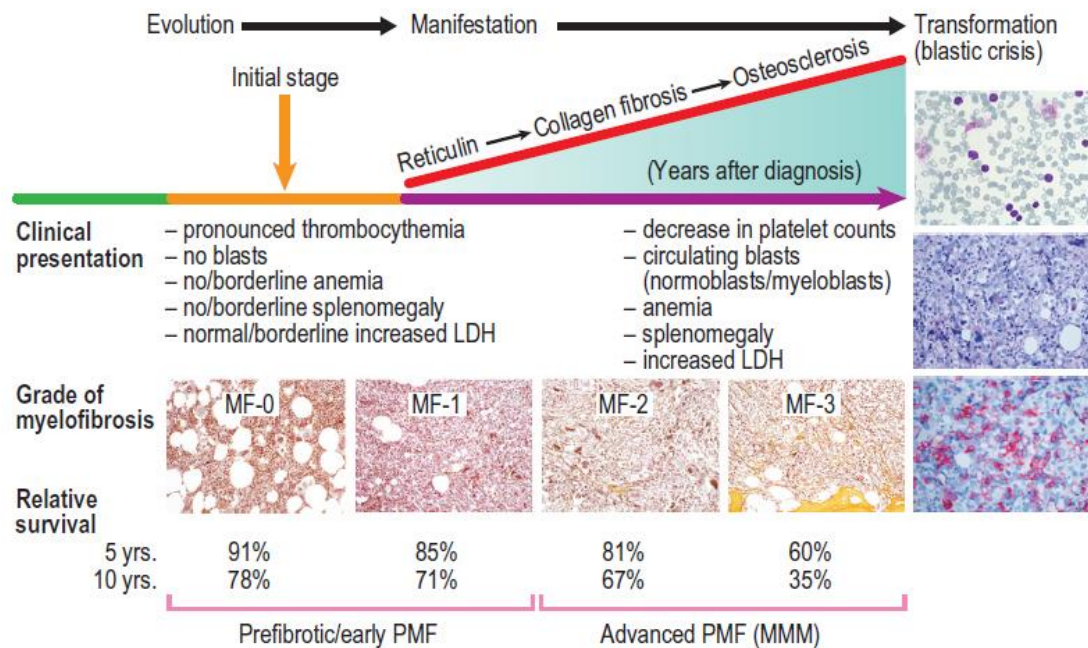


Figura 11. Dinamiche del progredire della PMF e corrispondenti cambiamenti degli aspetti clinici e della morfologia del midollo osseo. Associazione con il grado di rischio e la media di sopravvivenza relativa. PMF è una patologia ematologica cronica caratterizzata dall'evoluzione progressiva da una fase iniziale prefibrotica (caratterizzata da ipercellularità, minima o assente fibrosi) ad una avanzata fibrotica (con fibrosi e, spesso osteosclerosi) (Porwit A *et al.*, Blood and Bone Marrow Pathology 2011).

La PMF si manifesta inizialmente con un midollo osseo ipercellulare, mieloproliferazione della componente granulocitica e megacariocitaria e un contemporaneo arresto della maturazione della linea eritroide.

La caratteristica più rilevante rimane comunque la megacariocitopoiesi anormale: nel midollo si manifesta con un'alterazione della topografia istologica e la formazione di cluster di megacariociti localizzati in prossimità del margine endostale. Le cellule megacariocitarie presentano displasia (elemento caratterizzante la PMF, specialmente nella fase prefibrotica/precoce) ed elevato livello di pleomorfismo, con dimensioni variabili, alterato rapporto nucleo/citoplasma e un largo nucleo bulboso ipercromatico.

Le fasi più avanzate della patologia sono caratterizzate da un aumento della deposizione di reticolina e da fasci disorganizzati di collagene - una condizione che viene definita fibrosi-

splenomegalia, epatomegalia e anemia, oltre che sinusoidi dilatati ed ematopoiesi intraluminare. La caratteristica principale rimane comunque la megacariocitopoiesi atipica con la presenza, tra l'altro, di numerosi nuclei nudi di megacariociti (Thiele J, Am J Clin Pathol 2009).

Nella fase terminale osteosclerotica della PMF, lo spazio midollare è progressivamente sostituito da trabecole ampie ed irregolari date da apposizioni di tessuto osseo.

L'aumento nel midollo o nel sangue periferico dei blasti (con valori però inferiori al 20%) e così anche delle CD34+, con la formazione di cluster o localizzazione endoosteale anomala, sono indicatori di una fase accelerata della patologia.

Se la percentuale di queste cellule nel midollo o nel sangue periferico sale oltre il 20% si è di fronte ad una trasformazione blastica, ad esempio leucemia mieloide acuta (AML).

I recettori citochinici sono, come già descritto nel paragrafo relativo, critici per la normale mielopoiesi; in particolare, ricordo brevemente, il TpoR, recettore per la trombopoietina, il G-CSFR, recettore per il fattore CSF granulocitario ed il EpoR, recettore per l'eritropoietina.

La proliferazione clonale nelle Phneg MPN è anche accompagnata da un'alterazione del profilo citochinico riscontrabile a livello del sangue, fenomeno di risposta infiammatoria che, nel paziente, contribuisce allo sviluppo del fenotipo clinico sopra descritto.

In particolare però risulta essere rilevante il contributo di una particolare citochina, il transforming growth factor- β (TGF- β), un potente stimolatore della sintesi di collagene nei fibroblasti che risulta essere up-modulato nelle piastrine, megacariociti e monociti di pazienti affetti da PMF.

Studi *in vivo* hanno dimostrato che i livelli di questa citochina nel siero da midollo correlano positivamente con il grado di fibrosi dei pazienti. Inoltre la concentrazione di TGF- β è legata alla fibrosi di reticolina e ai livelli del propeptide N-terminale del protocollagene di tipo III (PIIINP), marker di turnover del collagene, associato a diverse patologie che vedono un coinvolgimento del tessuto connettivo. In modello animale, il TGF- β è necessario per la fibrosi del midollo indotta da TPO e topi irradiati ed innestati con midollo da topo knockout per TGF- β e trasfettato per una up-modulazione di TPO, sviluppano una sindrome mieloproliferativa come i topi che avevano ricevuto il midollo *wt*, ma non la grave fibrosi (sia di reticolina che di collagene), l'osteosclerosi e l'aumento dei livelli di TGF- β plasmatico che questi ultimi mostravano (Kuter DJ *et al.*, Br J Haematol 2007).

Un'altra citochina coinvolta nel fenomeno della fibrosi nelle patologie mieloproliferative è la platelet derived growth factor (PDGF), un potente stimolatore della crescita e dello sviluppo dei fibroblasti e secreto anch'esso da megacariociti e piastrine (Groopman JE, *Ann Intern Med* 1980); infine due citochine che giocano un ruolo chiave nella patogenesi sono il vascular endothelial growth factor (VEGF) e il fibroblast growth factor- β (FGF - β).

Normalmente JAK2 si localizza dal citoplasma alla membrana dove si trova legato, non covalentemente ed in forma inattiva, alla porzione intracellulare del recettore di classe I attraverso un dominio N-terminale noto come FERM. A seguito del legame del corrispettivo ligando al recettore, viene indotto un cambiamento conformazionale che attiva JAK2 che quindi attua autofosforilazioni e transfosforilazioni, attivando così la segnalazione downstream, segnalazione che coinvolge MAPK, PI3K, e STAT.

Molteplici studi avevano precedentemente dimostrato nelle MPNs la presenza di geni deregolati, ma più recentemente è stato identificato un allele comune alla maggioranza dei pazienti affetti da PV (in più del 80% dei casi) (James C *et al.*, *Nature* 2005), ET (57%) e PMF (50%) (Baxter EJ *et al.*, *Lancet* 2005): *JAK2V617F* (Levine RL *et al.*, *Cancer Cell* 2005).

Questa mutazione in JAK2 non è presente nella linea germinale ed è conseguentemente acquisita solo nel compartimento ematopoietico. Essa consiste in una sostituzione guanina a timina, con conseguente mutazione nella proteina che presenta quindi una fenilalanina al posto di una valina.

Anche se l'attivazione costitutiva di JAK2, sia essa dovuta a fattori genetici o epigenetici, è un fenomeno comune a diverse neoplasie umane, l'allele *JAK2V617F* è esclusivo delle neoplasie mieloidi (Levine RL & Gilliland DG *Blood*, 2008).

Altre alterazioni molecolari, in grado di spiegare l'eziologia delle MPNs -ad esempio quel 5% di pazienti PV non Phnegativi-, comprendono anche mutazioni somatiche (delezioni, missenso, inserzione) all'esone 12 di JAK2 (Scott LM *et al.*, *N Engl J Med* 2007) e mutazioni attivanti a carico del recettore della trombopoietina (Myeloproliferative leukemia virus oncogene - MLP) a livello del codone 515 (Kilpivaara O & Levine RL. *Blood* 2008).

Ancora, altre alterazioni riscontrate nelle MPNs, sono: JAK2V66F, che porta ad un'attivazione di JAK2; la mutazione eterozigote inattivante di SH2B3, gene che codifica per l'adattatore di signalling LNK; le mutazioni a livello di CBL, molecola di regolazione per il signalling della tirosin-chinase; le mutazioni epigenetiche inattivanti di TET2, una famiglia di 3 enzimi che

servono per la conversione di 5-metilcitosina in 5-idrossimetilcitosina; le mutazioni in isocitrato-deidrogenasi 1 e 2 (IDH1 e IDH2) e nel policombo group ASX1 e EZH2 (Cross NC, Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2011).

Nel 2007 Ciurea *et al.* valutarono in vitro la differenziazione megacariocitaria di CD34+ da pazienti affetti da MF idiopatica: mantenendo le cellule in coltura con TPO e SCF, esse maturavano mostrando le atipie tipiche della patologia, in particolare una aumentata capacità proliferativa ed una inferiore apoptosi. In particolare quest'ultima caratteristica è stata attribuita alla marcata over-espressione in queste cellule di Bcl-xL (Ciurea SO *et al.*, Blood 2007).

Sempre a seguito di differenziazione in vitro, le CD34+ derivanti da PMF mostrano, in modo peculiare rispetto quelle di altre MPNs, la capacità di originare un numero maggiore di megacariociti, ma che manifestano dimensioni ridotte (a causa di una compromessa maturazione cellulare), una minore ploidia e la presenza di nuclei bulbosi, caratteristiche già precedentemente osservate *in vivo*.

Ancor più interessante è forse l'aspetto legato alle caratteristiche delle propiastri: quelle generate da PMF presentano forti alterazioni rispetto alle propiastri da cellule CD34+ sane. In particolare esse sono in numero minore, presentano uno stato di ramificazione fortemente variabile e, spesso, manifestano un'assenza dell'apice piastrina-generante.

È stata inoltre osservata una correlazione positiva tra le propiastri ottenute in vitro e la conta piastrinica da sangue periferico (Balduini A *et al.*, PLoS One 2011). Queste stesse anomalie delle propiastri erano state anche osservate in sezioni istologiche di midollo osseo di pazienti PMF (Muth M *et al.*, Leuk Res 2010).

MATERIALI E METODI

1. COLTURE CELLULARI E TRATTAMENTI

I trattamenti di seguito descritti sono stati eseguiti con l'approvazione del comitato etico dell'Ospedale Universitario di Parma e del comitato etico sulla sperimentazione animale dell'Università di Parma.

1.1. Isolamento di cellule progenitrici ematopoietiche murine

Cellule staminali progenitrici ematopoietiche sono state isolate da fegato fetale murino (FLC) di embrioni CD1 al 13.5 giorno di gestazione e la coltura di cellule in sospensione ottenuta come descritto da Thon JN *et al.* (J Cell Biol 2010) è stata quindi mantenuta per 5 giorni in medium Dulbecco's modified Eagle low glucose (DMEM, Invitrogen), 10% fetal calf serum (FCS, Sigma), 2 mmol/L l-glutamina, 50 U/mL penicillina e 50 mg/mL streptomina (Euroclone), addizionato di TPO murino, incubata a 37°C e 5% CO₂.

1.2. TPO

La Trombopoietina da utilizzare nel modello murino per il differenziamento MK è stata ottenuta dalla linea cellulare fibroblastica murina GP122 (Villevall JL *et al.*, Blood 1997). Brevemente, le cellule sono state seminate alla concentrazione 2×10^5 cell/ml in DMEM, 10% FCS, 2 mmol/L l-glutamina, 50 U/mL penicillina e 50 mg/mL streptomina. 24 ore dopo il raggiungimento della confluenza, il surnatante è stato raccolto, aliquotato e conservato a -20°C. Nella coltura di staminali ematopoietiche murine, per l'indirizzamento in senso MK, il surnatante delle GP122 è stato aggiunto al terreno di coltura alla diluizione finale di 1:100.

1.3. Isolamento di MK murine differenziate

A diversi time-points (giorno 2, 3, 4 e 5), le FLC indotte al differenziamento MK sono state stratificate su un gradiente single-step composto da PBS (Euroclone) addizionato con 1,5% e 3% di bovine serum albumine (BSA, Sigma); successivamente le cellule sono state lasciate sedimentare per 30'. Per quanto riguarda le cellule in differenziamento più avanzato – giorno 5 - e quindi già presentati propiastri è risultato necessario farle sedimentare su un secondo gradiente, identico al precedente, e gli stadi intermedi nella formazione delle propiastri sono stati raccolti nei diversi layers del gradiente di separazione: i megacariociti più rotondi sedimentano infatti sul fondo, le cellule formanti propiastri si localizzano nella regione intermedia e le propiastri rilasciate o le singole piastrine si trovano nella regione più superficiale.

1.4. Isolamento di CD34+ umane

Circa 30 ml di sangue periferico di soggetti identificati, secondo le linee guida del WHO del 2008, come affetti da PMF, sono stati raccolti in provette da prelievo venoso con anticoagulante EDTA. Sacche di leucoferesi da donatori mobilitati con G-CSF sono state utilizzate come controllo sano.

La frazione di cellule mononucleate è stata ottenuta mediante sedimentazione su gradiente di Ficoll (Cedarlane) e la popolazione di cellule CD34+ ricavata con separazione immunomagnetica positiva (MiltenyiBiotec) come descritto da Gobbi *et al.* (Blood 2009).

La purezza delle cellule CD34+ isolate è stata valutata in citofluorimetria marcando 10^5 cellule con mAb anti-CD34-PE (Beckman Coulter); solo campioni con una purezza maggiore al 95% sono stati utilizzati per gli esperimenti successivi.

Le CD34+ sono state quindi coltivate fino a 14 giorni in terreno serum-free X-vivo (Lonza), supplementato con 200 ng/mL human recombinant TPO, 50 ng/mL SCF e 3 ng/mL IL-3 (PeproTech), alla concentrazione di 10^6 cell/ml. Le citochine sono state aggiunte ogni 72 ore e la vitalità e il numero delle cellule sono stati valutati mediante osservazione in emocitometro con colorazione Tripan Blue (Sigma). Le cellule sono state raccolte a time-points di 6, 9, 11 e 14 giorni di coltura per le successive analisi ed esperimenti.

2. Western Blot SDS-Page

Le cellule in coltura raccolte ai diversi tempi e pellettate dopo lavaggio, sono state risospese in buffer di lisi (50mM Tris-HCl, pH7.4; 1% NP-40; 0.25% sodium deoxycholate; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM PMSF; 1mM Na_3VO_4 ; 1mM NaF) con aggiunta a fresco di inibitori delle proteasi (Sigma). La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il BCATM protein assay kit (Pierce) e su gel di poliacrilamide al 7,5% sono stati fatti migrare 30 μg di proteina totale addizionata di un uguale volume di sample buffer (contenente 5% di β -Mercaptoetanolo). Di seguito le proteine sono state trasferite su un filtro di nitrocellulosa e successivamente processate per la marcatura immunologica. Le membrane di nitrocellulosa contenenti le proteine sono state bloccate ed incubate con anticorpo primario, secondo le indicazioni del produttore.

In particolare:

<i>Anticorpo (ab)</i>	<i>tipo</i>	<i>Ditta</i>	<i>Diluizione di utilizzo</i>
Anti-PKC ϵ	Ab policlonale (rabbit)	Millipore (#06-991)	1:1000
Anti-PKC δ	Ab monoclonale (mouse)	BD Pharmigen (#610397)	1:500
Anti-Bcl-xL	Ab policlonale (rabbit)	Cell Signalling (#2762)	1:1000
Anti-GAPDH	Ab monoclonale (mouse)	Millipore (MAB374)	1:5000

Le membrane al termine dell'incubazione sono state lavate in opportuna washing solution, come indicato dal produttore, e successivamente incubate con appropriato anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (HRP):

<i>Anticorpo (ab)</i>	<i>tipo</i>	<i>Ditta</i>	<i>Diluizione di utilizzo</i>
Anti- mouse IgG (HRP)	Ab policlonale (goat)	Sigma (A4416)	1:2000
Anti- rabbit IgG (HRP)	Ab policlonale (goat)	Pierce (#31460)	1:5000

La specifica reazione è stata evidenziata mediante il sistema di rivelazione ECL Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) e il segnale acquisito su lastra fotografica e successivamente valutato in analisi densitometrica mediante ImageJ.

3. Morfologia cellulare dei MK

I cambiamenti morfologici delle cellule indotte al differenziamento a diversi giorni di coltura sono stati analizzati per mezzo microscopio ottico a contrasto DMIL (Leica) ad ingrandimento 20x/30 e 40x/0.5 e le immagini sono state acquisite mediante telecamera ICC5A HD (Leica). Nel modello murino e in quello umano la percentuale di cellule formanti piastrine è stata calcolata in 3 campi rappresentativi di tre differenti esperimenti.

Nel modello patologico il diametro cellulare è stato calcolato su 100 cellule per campi rappresentativi di 3 differenti esperimenti tramite analisi ImageJ.

4. Citochimica

La valutazione della morfologia delle CD34+, ottenute da paziente PMF e controllo sano, indotte a differenziare in senso MK è stata anche valutata al T14 di coltura mediante

microscopia ottica, a seguito di colorazione May-Grünwald Giemsa (Microscopio ECLIPSE 80i, camera digital sight DS-L1 (Nikon); ingrandimento 100x/1.4 NA oil objective).

5. Citometria a flusso

Per verificare il differenziamento in senso megacariocitario, aliquote di 0.3×10^6 cellule/punto sono state marcate con mAb anti-CD42b (DB Pharmagen) coniugato a cyanin-5 (-Cy5).

CD61 (Pharmingen, Becton Dickinson, San Jose, CA) coniugato con R-ficoeritrina (RPE), mentre IgG1 (mouse) -Cy5 (IOTest) è stato utilizzato come controllo isotipico.

L'analisi dei campioni così marcati (FAC) è stata effettuata mediante Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter) e Expo ADC software (Beckman Coulter).

6. ShRNA e infezione

6.1. Modello murino

Per silenziare PKC ϵ si è fatto uso della tecnica del short hairpin RNA (shRNA) – based gene silencing: un vettore lentivirale pLKO.1 codificante per shRNA contro la PKC ϵ (ShRNA ϵ) murina (NM_011104) è stato ottenuto dalla Open-Biosystem (Thermo Scientific), mentre un plasmide contenente un inserto ShRNA che non targhetta alcun gene conosciuto di alcuna specie, il MISSION pLKO.1-puro Non-Target(Sigma-Aldrich), è stato utilizzato come controllo (shRNACT). I virus sono stati prodotti in cellule competenti 293TL come da indicazioni del produttore. Le cellule FLC, isolate a T0, sono state infettate e messe in coltura in terreno pro-differenziativo (3 ng/ml IL-3, 40 ng/ml SCF, 100 ng/ml TPO). Successivamente, a T3, le cellule infettate sono state selezionate mediante puromicina (2 μ g/ml, Sigma) mantenendole in coltura con TPO. Al tempo T4 i MK sono stati isolati mediante gradiente di BSA e ulteriormente coltivati per ulteriori 24 ore, nelle condizioni di coltura appena descritte.

Aliquote sono state raccolte per analisi WB.

6.2. Modello umano

Anche per il silenziamento della PKC ϵ umana si è fatto uso di vettore lentivirale pLKO.1 codificante per ShRNA ϵ umana (NM_005400) (Thermo Scientific), e come ShRNA CT

MISSION pLKO.1-puro Non-Target(Sigma-Aldrich). I virus sono stati prodotti in cellule competenti 293TL cells come da indicazioni del produttore.

I PMF MKs sono stati infettati al T5 di coltura e coltivati in presenza di TPO e SCF. Le cellule infettate sono state selezionate mediante addizione nel terreno di coltura di puromicina come precedentemente descritto.

7. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita mediante uso di t-test o analisi di varianza (ANOVA) e Dunnett, quando applicabile (Primer software).

RISULTATI

I complessi meccanismi alla base del processo differenziativo dei megacariociti sono a tutt'oggi un argomento di grande interesse nello studio dell'ematopoiesi normale e patologica. Infatti, nonostante i progressi a cui è stato possibile assistere negli ultimi decenni in relazione alla definizione e comprensione dei meccanismi genetici e molecolari alla base di questo fenomeno, molto rimane ancora da elucidare per quanto riguarda le precise cinetiche delle molecole coinvolte e le interazioni tra queste, l'ambiente in cui le cellule sono immerse e gli stimoli esterni a cui esse rispondono.

PKC ϵ e PKC δ sono chinasi ubiquitariamente distribuite e ad azione pleiotropica. Esse hanno dimostrato di essere implicate nel differenziamento, sopravvivenza e proliferazione cellulare sia nell'ambito dell'ematopoiesi normale che in quella patologica (Bassini A *et al.* Blood 1999; Lanuti P *et al.*, Exp Hematol 2006, Mirandola P *et al.*, Blood 2006; Gobbi G *et al.*, Stem Cells 2007; Gobbi G *et al.*, Blood 2009).

Ho quindi voluto indagare le cinetiche *in vitro* di queste proteine durante il differenziamento MK da cellule staminali mieloidi, in due distinti modelli, quello umano e quello murino, al fine di valutare se in questi due sistemi il comportamento e il ruolo delle chinasi risulti sovrapponibile o se, al contrario, esse svolgano funzioni diverse.

Questo studio permette quindi di definire, anche la validità dell'uso del topo come modello animale per lo studio della megacariocitopoiesi e dei fenomeni di anomala differenziazione MK, come ad esempio quella osservata nelle PMF.

1. PKC ϵ e PKC δ sono selettivamente regolate durante il differenziamento MK murino

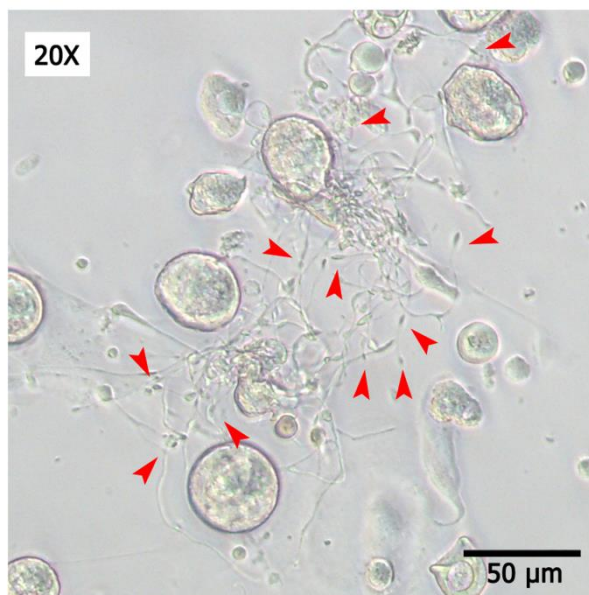
Ho valutato le cinetiche delle proteine PKC ϵ e PKC δ nel modello *in vitro* murino, partendo da cellule staminali epatiche fetali mantenute in condizioni pro-differenziative in senso MK per 5 giorni (**fig. 1.1.A-C**).

Per quanto riguarda la PKC ϵ , in queste cellule è possibile rilevare una netta up-modulazione della chinasi già nei primi giorni di coltura (T2-3); questi elevati livelli di espressione sono mantenuti costanti fino al termine della coltura (T5), così come anche nelle propiastri - forma intermedia nella formazione delle piastrine e quindi, a parità di giorno di coltura, considerabili ad uno step maturativo più avanzato rispetto alle cellule MK mature-.

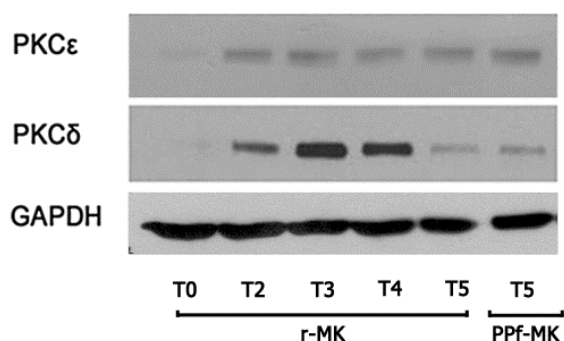
Al contrario, la PKC δ , pur risultando essere up-modulata durante la differenziazione MK murina, vede una diminuzione dei propri livelli di espressione a tempi di coltura avanzati (T5)

e subisce un drastico calo nelle propiastriane, suggerendo che tale proteina possa interferire con le fasi più tardive della maturazione e formazione delle piastrine.

A



B



C

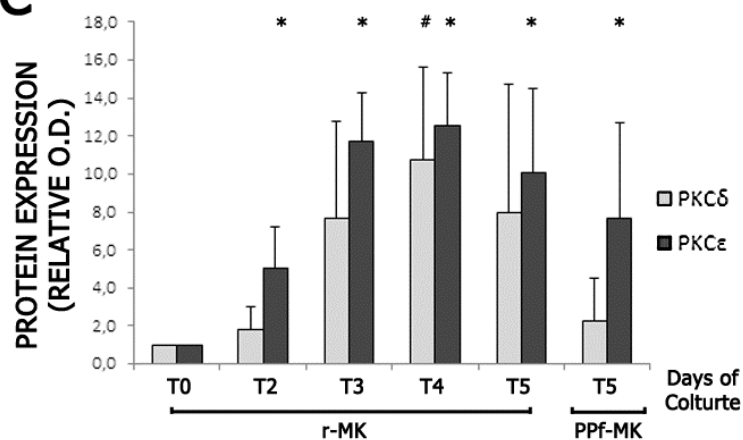


Figura 1.1. Pannello A. Immagine rappresentativa di megacariociti murini formanti propiastriane (PPf-MK) al T5 di coltura in presenza di TPO. Le frecce rosse indicano propiastriane in cui è evidente, alle terminazioni, la presenza di piastrine; **Pannello B.** L'analisi dell'espressione delle proteine PKCε e PKCδ è stata effettuata mediante Western Blot. Le proteine sono state rivelate mediante anticorpi specifici e GAPDH è stata valutata come controllo interno di corretto bilanciamento dei campioni. Le cellule sono state raccolte ai time points T0, T2, T3, T4 e T5 (rispettivamente 0, 2, 3, 4 e 5 giorni di coltura). A T5 le cellule presentanti propiastriane (PPf-MK) sono state separate dalla popolazione di MK più immaturi (round MK, r-MK) mediante gradiente; **Pannello C.** Analisi densitometrica dell'espressione di PKCε e PKCδ in 4 differenti esperimenti, ottenuta mediante software ImageJ. Valori medi ± SD, vs T0 *P<0,01, #P<0,05, Anova e Dunnett Test.

2. Nel modello murino PKC ϵ induce la produzione piastrinica via RhoA

Alla luce dei ruoli chiave, precedentemente definiti, di PKC ϵ e RhoA nella maturazione MK (Geddis AE & Kaushansky K, Cell Cycle 2006; Chang Y *et al.*, Blood 2007; Suzuki A *et al.*, PLoS One 2013) e a fronte di piú recenti studi che hanno dimostrato il coinvolgimento di PKC ϵ nel processo di citodieresi RhoA-mediato (Saurin AT *et al.*, Cell Cycle 2009;) e, nel neurone, l'azione inibitoria di RhoA sull'attività di stimolazione della crescita del neurite indotta da parte di PKC ϵ (Ling M *et al.*, Exp Cell Res 2004), mi sono chiesta se il meccanismo di maturazione in cellule staminali mieloidi indotte al differenziamento MK e che porta alla formazione delle propiastriane, vedesse un coinvolgimento di PKC ϵ nel pathway di RhoA.

La **figura 2.1 (pannelli A-B)** mostra i livelli di espressione della proteina GTPase RhoA, misurata a diversi time-point durante la differenziazione MK da staminali epatiche fetali. Essi presentano un aumento statisticamente rilevante a T3 e T4, mentre l'espressione di RhoA risulta ridotta a T5, fase tardiva di differenziazione in cui è possibile apprezzare nella coltura la presenza di numerosi MK maturi presentanti propiastriane.

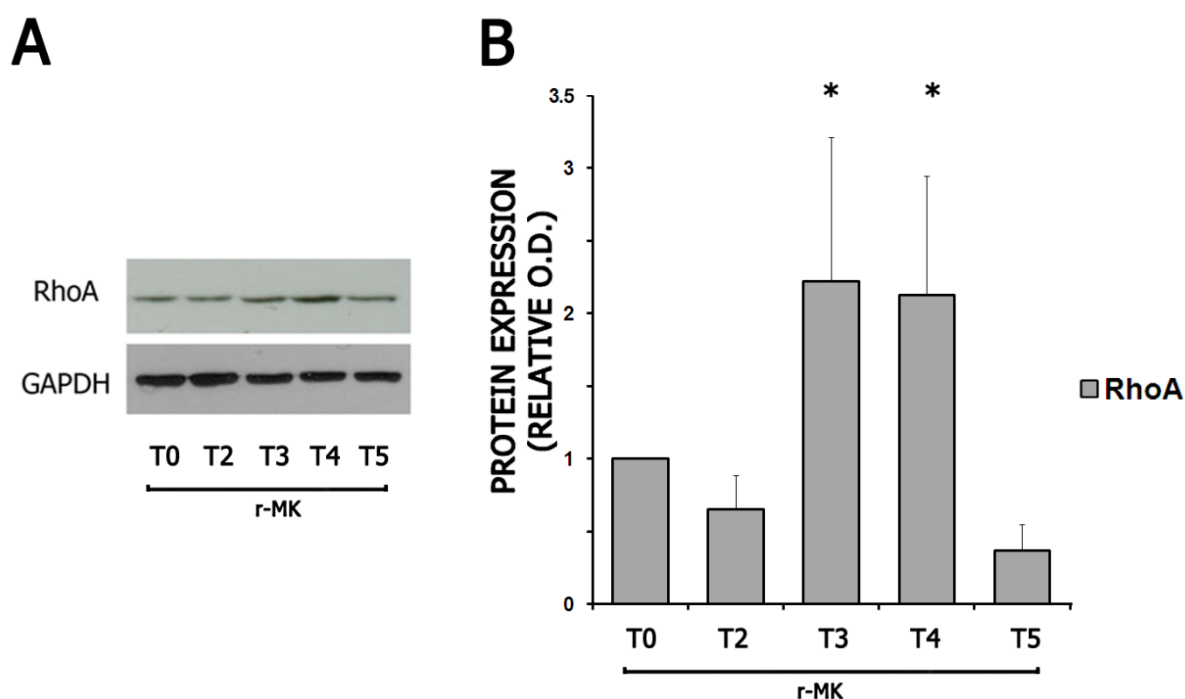


Figura 2.1. Pannello A. L'analisi dell'espressione della GTPase RhoA è stata effettuata mediante Western Blot. La proteina è stata rivelata mediante anticorpo specifico; GAPDH è stata valutata come controllo interno di corretto bilanciamento dei campioni. Le cellule sono state raccolte ai time points T0, T2, T3, T4 e T5; **Pannello B.** Analisi densitometrica dell'espressione di RhoA in 5 differenti esperimenti, ottenuta mediante software ImageJ. Valori medi \pm SD, vs T0 *P<0,05, Anova e Dunnett Test.

A fronte degli elevati livelli di espressione della proteina PKC ϵ osservati durante la maturazione MK nel topo, ho valutato come l'espressione di RhoA fosse modulata in presenza di una forzata down-modulazione di PKC ϵ , ottenuta mediante uso di ShRNA isotipo specifico, fin dal tempo T0 della coltura di cellule staminali da fegato fetale.

Come apprezzabile nella **figura 2.2 (pannelli A-B)**, a seguito del knock-down della chinasi, è possibile osservare a 5 giorni di coltura (T5) un netto aumento dei livelli proteici di RhoA, mentre PKC δ risulta sostanzialmente invariata. Ho infatti voluto anche accertare la specificità di isoforma degli ShRNA impiegati in questa ricerca per assicurarmi che gli effetti sulla maturazione dei MK a seguito dell'infezione, non fossero dovuti ad un'inattesa azione modulatrice degli ShRNA su altri enzimi della famiglia PKC.

Come si evince dal **pannello C, figura 2.2**, con l'esclusione di PKC ϵ , nessuna delle isoforme principalmente coinvolte nel processo megacariocitopoietico risulta essere down-modulata a seguito del trattamento con ShRNA.

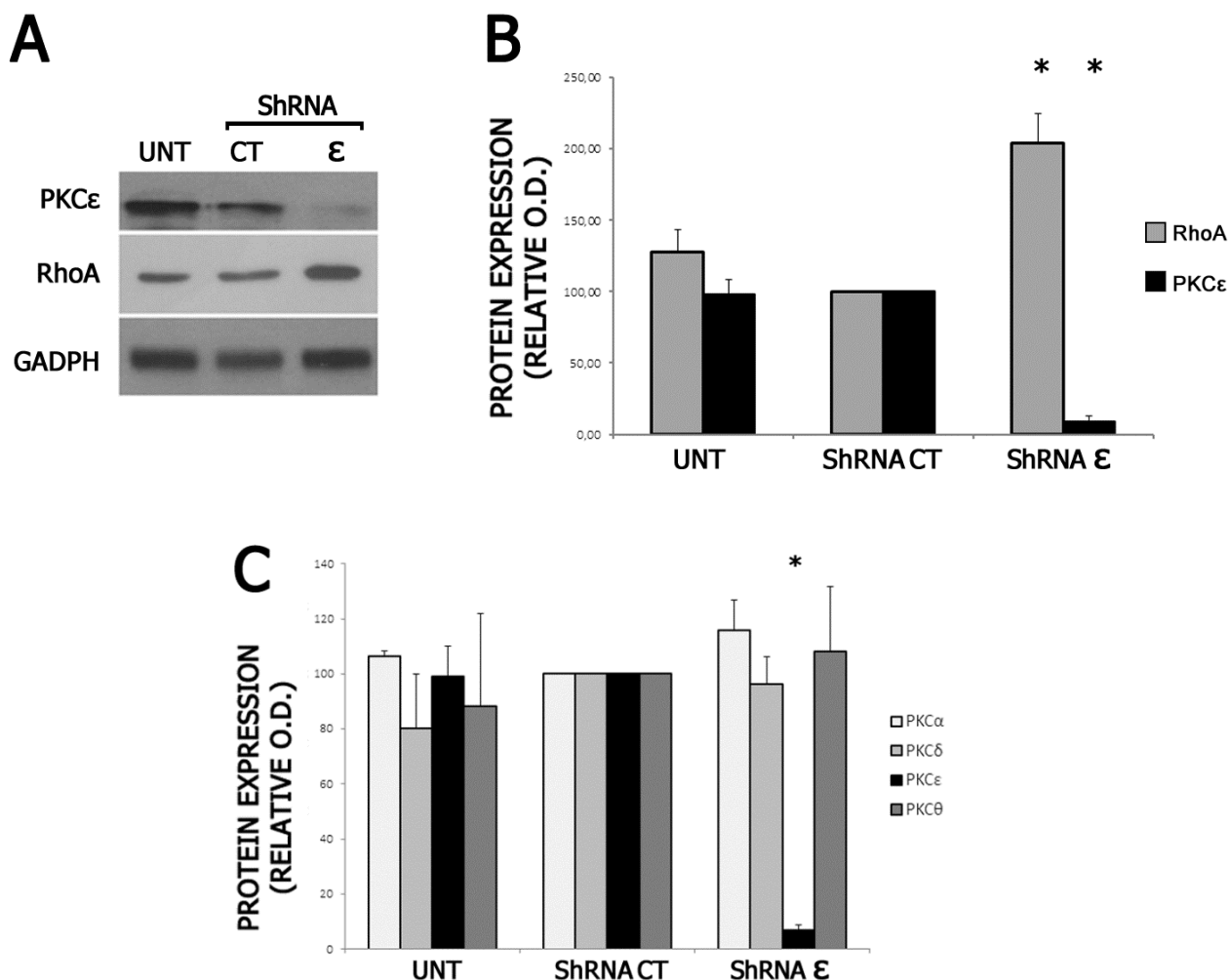


Figura 2.2. Pannello A. Western Blot di PKC ϵ e RhoA. GAPDH è stata valutata come controllo interno di corretto bilanciamento dei campioni. Le cellule sono state raccolte a T5 e analizzate in immunoblotting **Pannello B.** Analisi densitometrica dell'espressione proteica per valutare l'efficacia degli ShRNA nel knock-down della PKC ϵ e la modulazione di RhoA in 5 differenti esperimenti, ottenuta mediante software ImageJ. Le cellule erano state infettate con ShRNA per l'isoforma ϵ (ShRNA ϵ), con ShRNA di controllo (ShRNA CT) o non infettate (UNT). Valori medi \pm SD, vs CT *P<0,05, Anova e Dunnett Test. **Pannello C.** La selettività di isotipo del ShRNA impiegato contro PKC ϵ murina e il rispettivo ShRNA di controllo è stata valutata mediante analisi Western Blot per le proteine PKC α , δ , ϵ e θ . Valori medi \pm SD vs CT (campione non trattato), *P<0,05, Anova e Dunnett.

L'analisi al microscopio ottico delle cellule in cui l'espressione di PKC ϵ è stata abrogata, ha permesso di osservare come esse presentino una significativa riduzione nella capacità di acquisire le caratteristiche morfologiche di un fenotipo MK maturo e, in particolare, di produrre propiastri. Al contrario le cellule di controllo mantengono chiaramente tale capacità al pari delle cellule non trattate (**fig. 2.3, pannelli A-B**).

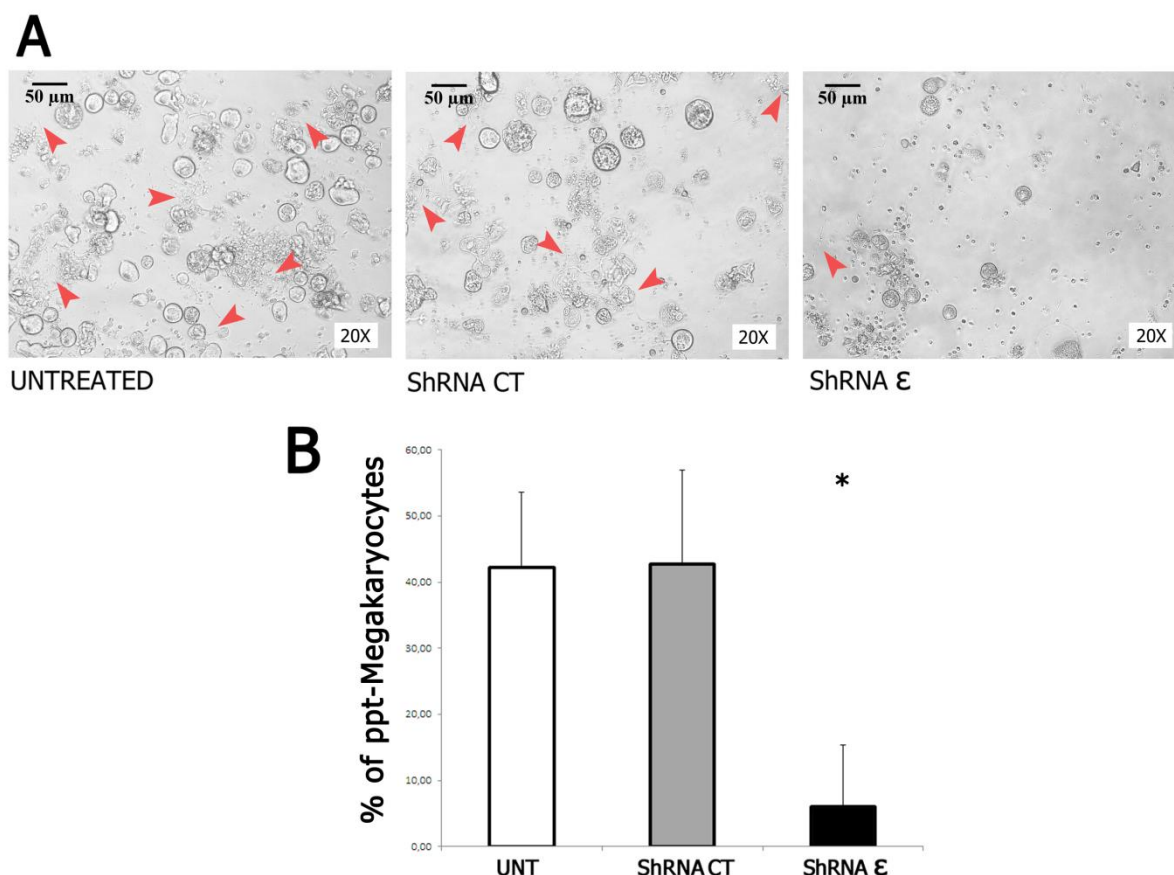


Figura 12 Figura 2.3. Pannello A. Campi rappresentativi di FLC indotte al differenziamento MK, a 5 giorni di coltura a seguito o meno (UNT) dell'infezione con ShRNA per PKC ϵ (ShRNA ϵ) o con ShRNA di controllo (ShRNA CT) (microscopio ottico a contrasto DMIL, Leica; ingrandimento 20x/30). Le frecce rosse indicano cellule presentanti propiastri; **Pannello B.** Calcolo della percentuale di Mk murini presentanti propiastri (ppt-MK) in coltura. Valori medi di 3 distinti esperimenti \pm SD, vs CT, *P<0,05, Anova e Dunnett Test.

3. Nel modello umano PKC ϵ e PKC δ inducono la produzione piastrinica via Bcl-xL

Visti i risultati ottenuti nel topo, ho voluto quindi valutare se il pathway identificato nella maturazione MK murina potesse essere coinvolto anche nella megacariocitopoiesi *in vitro* di un differente modello, quello umano, a partire da CD34⁺ ricavate da sangue periferico.

Le cellule sono state coltivate fino a 14 giorni, in presenza di TPO ricombinante umano, fino al raggiungimento del differenziamento terminale, in cui la cellula presenta caratteristiche morfologiche e fenotipiche specifiche tra cui la formazione delle propiastri e marcatori di superficie quale, ad esempio, CD61 (fig. 3.1, pannelli A-B).

Nella **figura 3.1 pannello D**, vengono riportate le cinetiche delle proteine PKC ϵ , PKC δ e RhoA durante i 14 giorni di coltura in condizioni pro-differenziative in senso MK.

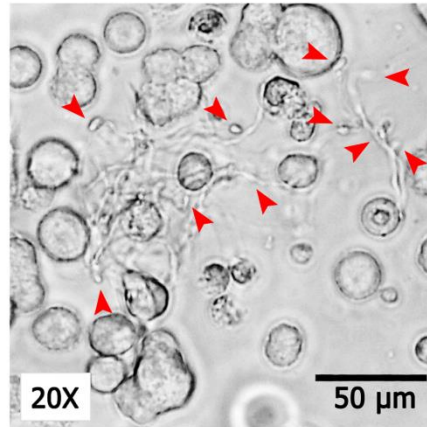
Come osservabile nel modello umano ho riconfermato il dato di letteratura relativo alla cinetica di PKC ϵ durante la maturazione del MK terminale (Gobbi G *et al.*, Stem Cells 2007), studio che aveva dimostrato come la down-modulazione della proteina fosse richiesta affinché tale processo di differenziazione potesse avvenire. Le cellule CD34⁺ presentano infatti bassi livelli di espressione della chinasi a T0, ma è possibile osservare inizialmente una up-modulazione della proteina al T3 di coltura in terreno addizionato di TPO ed assistere successivamente ad una drastica diminuzione della sua espressione a tempi di coltura più tardivi (T9-14).

Parallelamente ho studiato il comportamento della proteina PKC δ nei medesimi campioni (**fig. 3.1, pannello C**), apprezzando come la cinetica di questa chinasi, anch'essa appartenente alla sottofamiglia delle novel PKC, si discosti da quella della PKC ϵ durante il differenziamento MK: essa risulta infatti progressivamente upmodulata durante i primi giorni di coltura (T0-T6) per poi mantenere un'espressione costante nelle ultime fasi del processo differenziativo (T9-14).

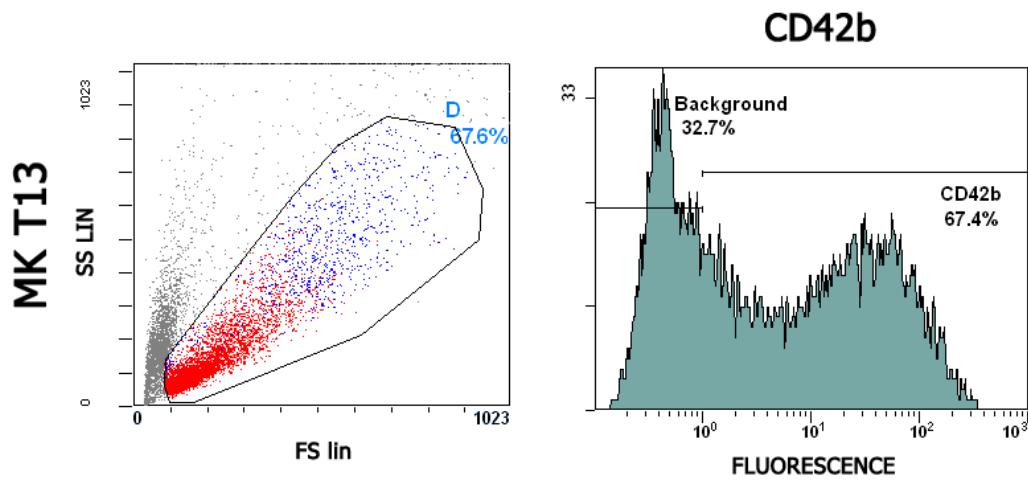
Dall'analisi dei dati è immediatamente apprezzabile come la cinetica di PKC δ nell'uomo risulti sovrapponibile a quella di PKC ϵ osservata precedentemente nel topo: i livelli di espressione della proteina risultano infatti aumentati al progredire della coltura e vengono mantenuti elevati nelle fase tardive del differenziamento MK. Al contrario, dopo un picco iniziale a T3, nel megacariocita in maturazione la PKC ϵ nell'uomo tende a diminuire (T6-14). Inaspettatamente, al contrario di quanto avvenga nel topo, nel modello umano normale i livelli di RhoA tendono a mantenersi costanti durante la coltura e non è possibile apprezzare una modulazione della proteina durante alcuna fase della maturazione MK.

È dunque ipotizzabile che *in vitro*, nel modello umano, le due chinasi svolgano un differente ruolo nella promozione del fenomeno differenziativo MK e siano probabilmente coinvolte in altri processi, quali ad esempio sopravvivenza e proliferazione dei precursori megacariocitici.

A



B



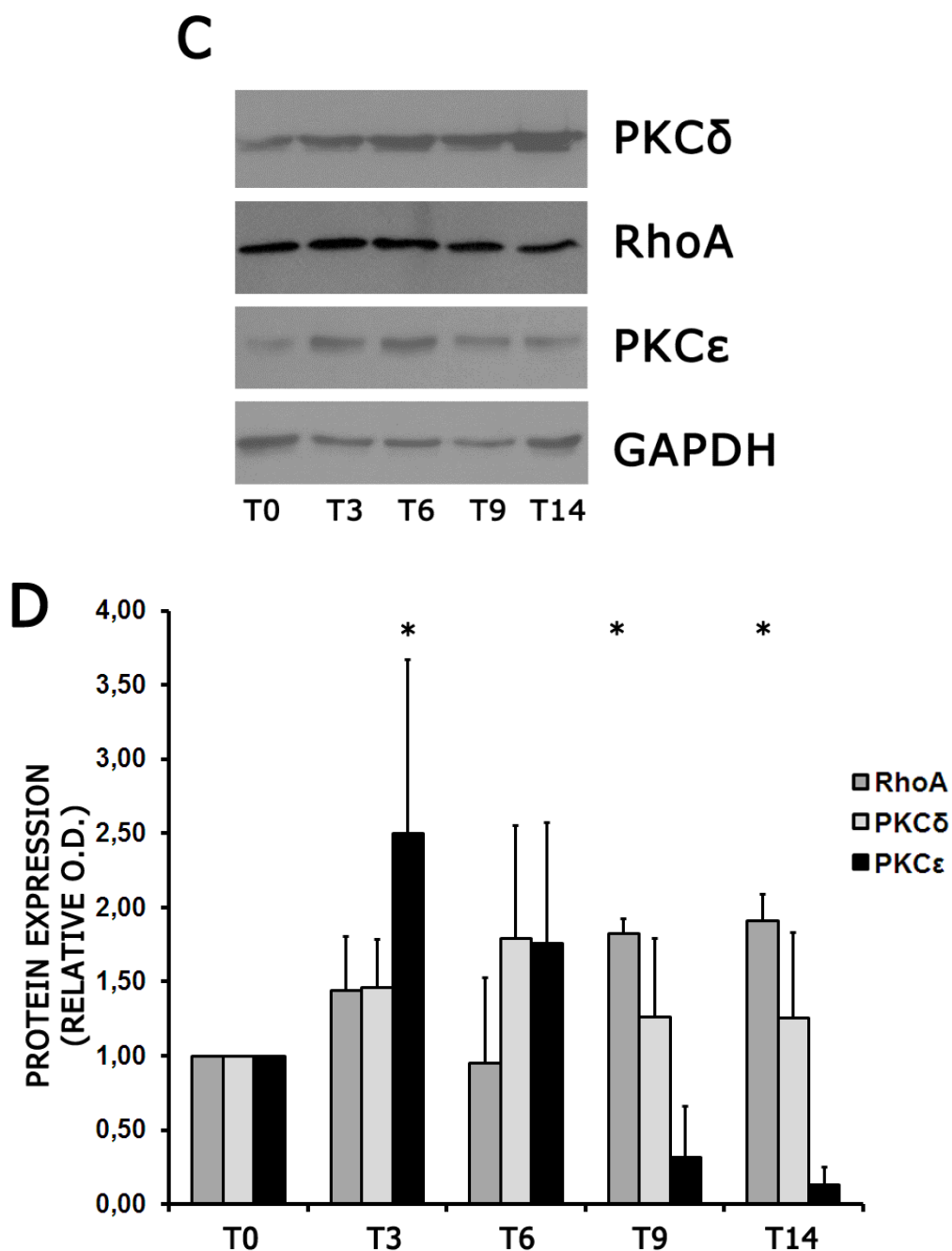


Figura 3.1. Pannello A. Immagine rappresentativa di un megacariocita umano formante propiastri (ppf-MK) al T13 di coltura. Le frecce rosse indicano propiastri in cui è evidente, alle terminazioni, la presenza di piastrine; **Pannello B.** Immagine rappresentativa di un immunofenotipizzazione per CD42b di cellule MK a 13 giorni di coltura in presenza di TPO ricombinante umano; **Pannello C.** L'analisi dell'espressione delle proteine PKC δ , PKC ϵ e RhoA è stata effettuata grazie a Western Blot. Le proteine sono state rivelate mediante anticorpi specifici e GAPDH è stata valutata come controllo interno di corretto bilanciamento dei campioni. Le cellule sono state raccolte a diversi time points (T0-14) di coltura. **Pannello D.** Analisi densitometrica ottenuta mediante software ImageJ, di 4 diversi esperimenti, per la valutazione dell'espressione proteica di PKC δ , PKC ϵ e RhoA, durante i 14 giorni di coltura in condizioni di differenziazione MK. Valori medi \pm SD, vs T0 *P<0.05, Anova e Dunnett Test.

Visti i risultati ottenuti sul comportamento delle chinasi nei due modelli, - quello umano e quello murino-, ovvero una cinetica di espressione opposta e reciproca, ho ipotizzato che nel processo maturazione dei MK umani, portante alla formazione delle propiastri, fosse

coinvolta la PKC δ , a fronte della sua evidente up-modulazione nelle fasi tardive della differenziazione di queste cellule.

Per meglio valutare il meccanismo di regolazione della megacariocitopoiesi umana da parte di tale proteina e valutare un possibile coinvolgimento di RhoA, ho infettato cellule CD34+ con ShRNA selettivi per l'isoforma delta, determinando quindi il knock-down della chinasi in queste cellule staminali mieloidi prima di indurme il differenziamento in senso MK.

Nella **figura 3.2** vengono riportati i dati densitometrici dell'analisi proteica di PKC ϵ , PKC δ e RhoA a seguito di tale trattamento, dati da cui risulta che la proteina RhoA non appare essere modulata dalla down-modulazione di PKC δ .

È stato quindi presa in considerazione un'altra proteina nota per essere coinvolta nei processi di sopravvivenza e differenziazione dei megacariociti, la proteina Bcl-xL.

Ho valutato la sua modulazione a fronte del knock down di PKC δ nel modello umano: come riportato sempre dalla **figura 3.2** si può apprezzare come la forzata riduzione dell'espressione della proteina PKC δ si accompagni ad un netto aumento dei livelli di Bcl-xL a 14 giorni di coltura dopo l'infezione con ShRNA.

Le cellule CD34+ in cui viene indotta la down modulazione di PKC δ presentano una ridotta capacità maturativa traducibile in una deficitaria capacità di generare propiastri (fig. 3.2, **pannello A**) al termine dei 14 giorni di coltura in presenza di TPO, al contrario delle cellule infettate con ShRNA di controllo e, ovviamente, le non trattate, che mantengono invece tale proprietà.

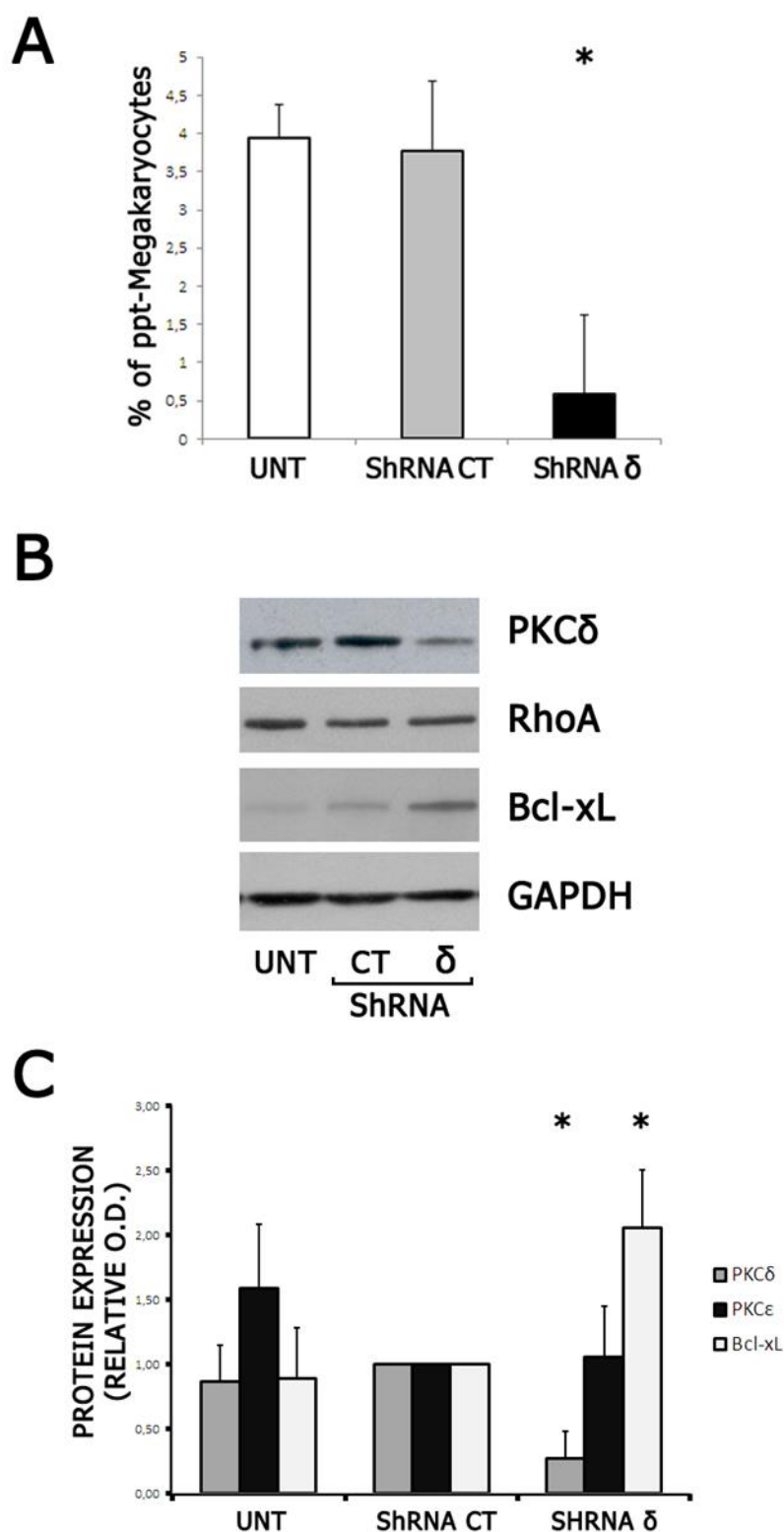


Figura 3.2 Pannello A. Calcolo della percentuale dei ppt-MK umani presentanti propiastri a 14 giorni di coltura. Valori medi di 3 distinti esperimenti \pm SD, vs CT, * $P < 0,05$, Anova e Dunnett Test; **Pannello B.** WB rappresentativa dell'espressione delle proteine PKC δ , RhoA e Bcl-xL in CD34+ in cui è stato effettuato il knock-down di PKC δ e successivamente indotte al differenziamento MK. **Pannello C.** Analisi densitometrica ottenuta mediante software ImageJ, di 4 diversi esperimenti. Valori medi \pm SD, vs T0 * $P < 0,05$, Anova e Dunnett Test.

4. L'overespressione di PKC ϵ inibisce, via Bcl-xL, il corretto differenziamento MK in cellule CD34+ da PMF

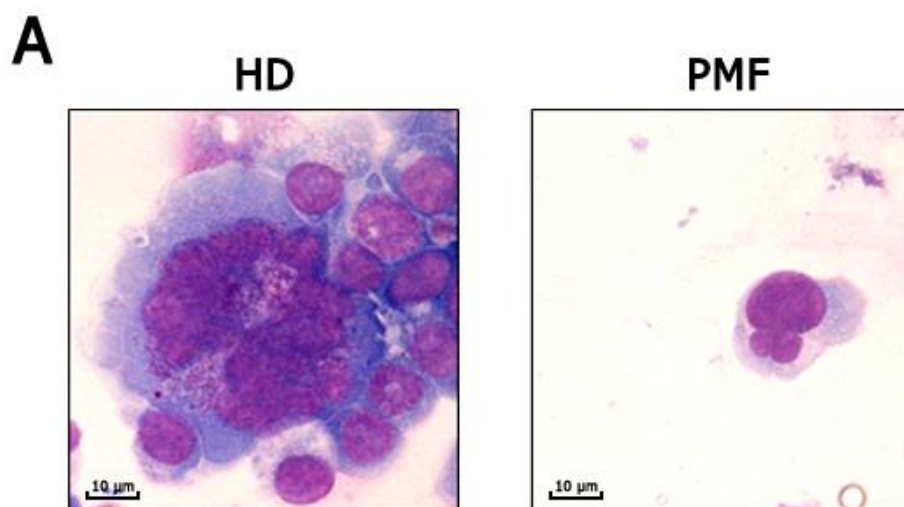
Ho quindi voluto studiare i pathways coinvolti nel differenziamento MK, in un modello umano patologico caratterizzato da megacariocitopoiesi anormale e ridotta produzione piastrinica. A tale scopo ho scelto la PMF ((fig. 4.1, pannello A).

Cellule CD34+ isolate da sangue periferico di pazienti affetti da PMF sono state messe in coltura in condizioni identiche a quanto precedentemente descritte e al time-point 14 giorni, esse sono state raccolte per lo studio della cinetica delle proteine di interesse durante il differenziamento in senso MK.

Dalla **figura 4.1, pannelli B-C**, si evidenzia come l'espressione di PKC ϵ e Bcl-xL si discosti da quella dei soggetti sani. In particolare, nella mielofibrosi, dall'analisi effettuata è risultata un'anomala upmodulazione di PKC ϵ . Nelle precedenti osservazioni invece, durante il differenziamento MK di CD34+ da donatori sani, la chinasi risultava downmodulata e tale riduzione era funzionale per una corretta maturazione del MK.

Interessatamente, al contrario, l'espressione nei PMF di Bcl-xL appare essere fortemente ridotta durante la coltura cellulare per 14 giorni in presenza di TPO, se comparata con il comportamento della proteina nei donatori sani.

Sebbene i livelli di PKC δ siano significativamente più bassi nella PMF rispetto ai controlli sani, la sua cinetica di espressione non si discosta da quella precedentemente osservata nei soggetti sani, presentando quindi un'upmodulazione nelle fasi terminali di differenziazione in senso megacariocitario.



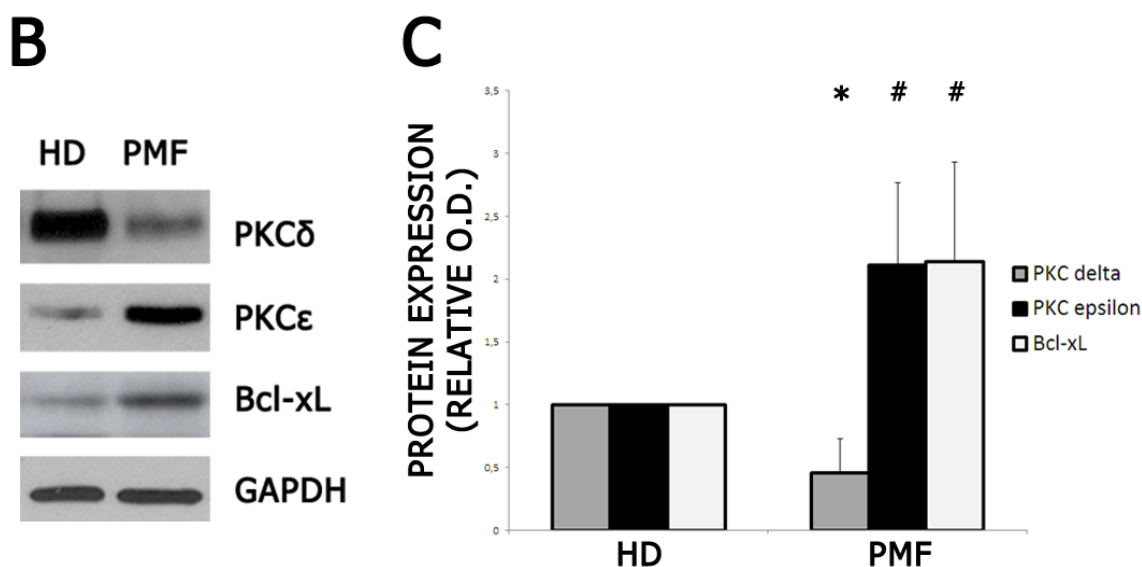


Figura 4.1 **Pannello A.** Immagine rappresentativa MK da donatore sano (HD) o affetto da PMF (PMF) a T11 di coltura in presenza di TPO; **Pannello B.** Immagine rappresentativa di Western Blot per PKCε, PKCδ e Bcl-xL, a T14 di coltura in differenziamento MK; **Pannello C.** Analisi densitometrica dell'espressione di PKCε, PKCδ e Bcl-xL in 5 differenti esperimenti, ottenuta mediante software ImageJ. Valori medi ± SD vs HD, *P≤0.002, #P<0.01 t-Test.

5. La forzata down-regolazione di PKCε ripristina un corretto differenziamento MK in PMF.

A questo punto, visto l'anomalo comportamento della PKCε osservato nella PMF e la parallela disregolazione di Bcl-xL durante la coltura in vitro, ho ipotizzato un coinvolgimento della chinasi nella deficitaria differenziazione dei MK nel contesto della PMF, probabilmente attraverso una alterata modulazione downstream dell'attività di Bcl-xL in tali cellule.

Al fine di confermare questa ipotesi, ho analizzato gli effetti del knock-down di PKCε sulla maturazione dei MK da PMF, grazie all'impiego di ShRNA specifici per PKCε.

I risultati sono stati paragonati alla coltura PMF di controllo, infettata con ShRNACT e quella non trattata (UNT).

Come mostrato in **figura 5.1, pannelli A-B**, ho potuto osservare come la forzata down-regolazione di PKCε nelle PMF a seguito dell'infezione con ShRNA, porti al ripristino della normale espressione della proteina Bcl-xL in queste cellule.

Inoltre, l'aumento dei livelli di PKC ϵ nelle cellule mantenute in presenza del fattore di crescita TPO, rende quest'ultime in grado di intraprendere il processo maturativo, come apprezzabile dalla **figura 5.1, pannello C** in cui si può notare una ripresa della capacità di formare propriastriane da parte delle cellule. Tale recupero nell'acquisizione di un fenotipo MK maturo non è presente nelle PMF trattate con ShRNA CT e nelle non trattate.

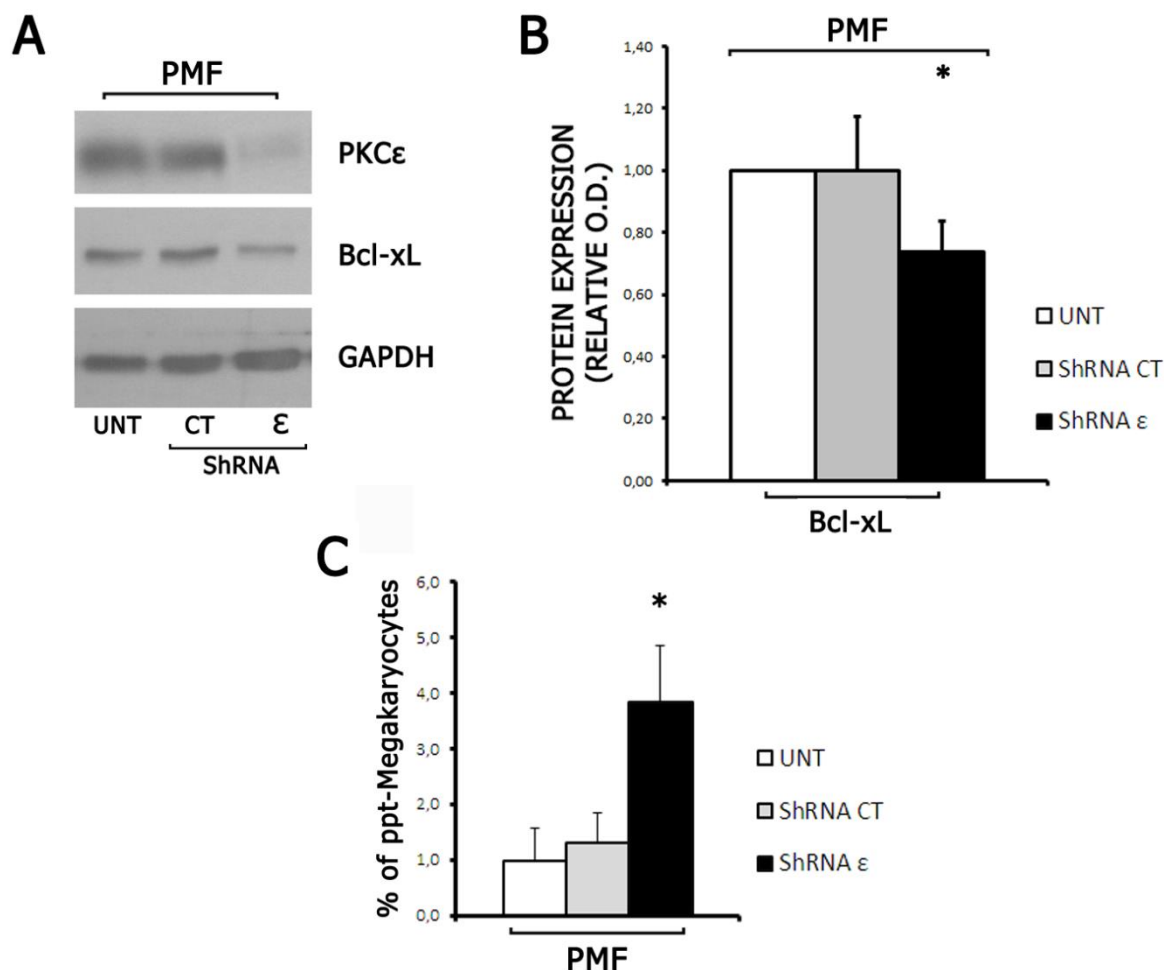


Figura 5.1 Pannello A. Immagine rappresentativa di Western Blot per PKC ϵ e Bcl-xL, a T14 di coltura in differenziamento MK dopo infezione con ShRNA per PKC ϵ (ShRNA ϵ), ShRNA di controllo (ShRNA CT) o in assenza di trattamento (UNT); **Pannello B.** Analisi densitometrica dell'espressione di Bcl-xL, ottenuta mediante software ImageJ. Valori medi di 3 differenti esperimenti \pm SD vs ShRNA CT, *P<0.05, Anova e Dunnett Test; **Pannello C.** Valori percentuali di ppt-MK in coltura, a 14 giorni opo infezione con ShRNA. Valori medi di 3 differenti esperimenti \pm SD vs ShRNA CT, *P<0.05, Anova e Dunnett Test.

DISCUSSIONE

Nel corso dell'evoluzione, alcuni pathway biologici umani sono rimasti conservati tra le diverse specie di mammiferi consentendo così ai ricercatori di poterli approfonditamente indagare in modelli animali. Tra le diverse specie che trovano applicazione nella ricerca biomedica, il *mus musculus* si è dimostrato essere il più diffuso ed impiegato: esso presenta una forte similarità in termini di anatomia, fisiologia e genetica con l'uomo ed inoltre, caratteristiche quali un accelerato metabolismo, l'omogeneità genetica, la rapidità del raggiungimento della maturità e dell'età fertile, così come i costi contenuti per il suo mantenimento e trattamento, ne fanno un *tool* prezioso per la ricerca scientifica.

In particolare, l'uso del modello murino nell'ambito dello studio dell'Ematopoiesi, ha permesso di elucidare alcuni dei complessi sistemi alla base del processo di mantenimento del *pool* di cellule progenitori e del loro avanzamento lungo la filiera differenziativa.

Sempre grazie all'impiego di questo modello è stato possibile raggiungere una migliore comprensione di alcuni fenomeni patologici legati ad un'alterata e anomala Ematopoiesi e, talvolta, arrivare a definire una cura per i pazienti affetti da tali patologie (Cook GJ & Pardee TS, Cancer metastasis rev 2013). Ad esempio, nell'ultimo decennio, lo studio dei neoplasmi mieloproliferativi ha fortemente beneficiato dell'uso del modello murino, modello che ha permesso la definizione delle anomalie genetiche delle cellule staminali ematopoietiche e dei progenitori, così come ha fornito la possibilità di testare *in vivo* nuovi agenti terapeutici per le neoplasie mieloproliferative (Mullally A *et al.*, Hematol Oncol Clin North Am 2012).

Sebbene questi successi siano innegabili, bisogna però tener presente anche dei limiti che l'impiego di modelli animali inevitabilmente presenta: proprio in virtù dell'estensivo studio del modello murino, nel corso degli anni è stata messa in evidenza l'esistenza, tra l'uomo e il topo, di differenze critiche nel fenotipo, funzione e meccanismi regolativi e di differenziazione nell'ematopoiesi, che devono essere attentamente considerate (Parekh C & Crooks GM, J Clin Immunol 2013). A fronte di queste informazioni risulta infatti evidente la necessità nella ricerca di base e, soprattutto, in quella translazionale, di valutare molto attentamente quelle che possono essere importanti differenze tra differenti modelli nell'espressione, regolazione e, più in generale, nel comportamento dei fattori coinvolti nell'Ematopoiesi.

PKC ϵ e PKC δ , come estensivamente descritto nella parte introduttiva di questa tesi, sono chinasi implicate nel differenziamento, sopravvivenza e proliferazione cellulare (Bassini A *et al.*, Blood 1999).

Esse svolgono un ruolo importante nel processo differenziativo delle cellule staminali ematopoietiche e in molti fenomeni patologici associati al compartimento sanguigno.

In particolare, nell'uomo, PKC ϵ è coinvolta a sostegno della differenziazione eritroide (Bassini A et al., Blood 1999) e inibisce la differenziazione MK terminale attraverso un meccanismo che vede coinvolto il pathway pro-sopravvivenza Bcl-xL-mediato (Gobbi G et al., Stem Cells 2007). La chinasi mostra anche avere un'azione pro-leucemica e la sua down-modulazione rende le cellule AML sensibili all'azione proapoptotica di TRAIL e favorisce il recupero della loro capacità differenziativa in senso MK (Gobbi G et al., Blood 2009).

PKC δ invece ha una funzione inibitoria nei confronti della differenziazione eritroide (Lanuti P et al., Exp Hematol 2006), mentre nell'ambito della differenziazione MK, studi su linee cellulari ne hanno ipotizzato un ruolo anche in questo processo con un'attività prodifferenziativa e proapoptotica (Kashiwagi H et al., J Thromb Haemost 2004).

Queste due chinasi sono inoltre note per avere effetti differenti e talvolta opposti: PKC ϵ è universalmente riconosciuta per essere un oncogene e ha, in generale, un'attività stimolatoria per la crescita cellulare e il differenziamento, mentre PKC δ è risultata essere proapoptotica.

Un esempio della opposta attività di queste chinasi è riscontrabile nel cuore, dove PKC ϵ gioca un ruolo positivo nel preconditioning ischemico (Inagaki K et al., Cardiovasc Res 2006), mentre al contrario PKC δ ha un effetto inibitorio ed è mediatore del danno ischemico (Churchill EN et al., Cardiovasc Res 2010).

In ambito ematologico è noto inoltre che le piastrine umane, al contrario di quelle murine, non esprimono PKC ϵ ma presentano alti livelli di PKC δ e un'espressione specie specifica e un'apparente reciprocità di questi due enzimi nel modello umano e murino sono state osservate in queste cellule anucleate (Pears CJ et al., PLoS One 2008).

Nel corso del dottorato ho quindi voluto studiare *in vitro* le cinetiche e, soprattutto, il ruolo di PKC ϵ e PKC δ nel contesto del differenziamento megacariocitario. In particolare è stata caratterizzata l'espressione e la funzione di queste chinasi nel modello umano (con cellule CD34+) e nel modello murino (cellule staminali epatiche fetali) di MKpoiesi.

Recentemente è stato dimostrato che PKC ϵ è coinvolta nel rimodellamento citoscheletrico e nella citodieresi cellulare, agendo sul pathway di RhoA, una guanosina trifosfatasi (GTPasi) della famiglia delle proteine Rho (Saurin AT et al., Cell Cycle 2009).

Considerando la precisa cinetica della PKC ϵ durante la megacariocitopoiesi e a fronte del coinvolgimento di RhoA nell'aberrante citodieresi dei MK (Geddis AE & Kaushansky K, Cell Cycle 2006) e della sua necessaria fine regolazione per il raggiungimento della fase terminale di differenziazione MK che vede la formazione delle propiastri (Chang Y *et al.*, Blood 2007; Suzuki A *et al.*, PLoS One 2013), ho dunque ipotizzato una correlazione tra PKC ϵ e RhoA nella megacariocitopoiesi terminale.

Al fine di confermare questa ipotesi, ho inizialmente studiato nel modello murino la cinetica di queste due proteine, PKC ϵ e RhoA, durante la maturazione MK che esita, come accennato, con la produzione delle propiastri da cui verranno poi liberate le piastrine.

I dati ottenuti dimostrano che l'espressione delle due proteine è correlata e, in particolare, nelle fasi tardive (T5) del differenziamento MK murino, a fronte di una up-modulazione della chinasi epsilon, è possibile osservare una parallela drastica riduzione di espressione di RhoA. RhoA mostra quindi una cinetica opposta a PKC ϵ durante la finestra temporale che corrisponde, nei MK maturi, alla generazione di propiastri.

Tramite esperimenti di down-modulazione con l'uso di ShRNA, ho evidenziato come in queste cellule l'espressione della GTPase dipenda dalla modulazione di PKC ϵ e che questa chinasi sostenga la formazione di propiastri nel modello murino.

Sulla nozione, precedentemente accennata, di un coinvolgimento reciproco della chinasi epsilon e delta in modelli differenti, ho valutato se la reciprocità di funzione valesse anche nei confronti di una possibile regolazione di RhoA da parte di PKC δ nella differenziazione MK da CD34+ umane. Le osservazioni svolte su colture primarie hanno permesso di determinare le cinetiche di PKC δ e RhoA e, sebbene la downmodulazione della chinasi porti ad una riduzione della percentuale di megacariociti formanti propiastri, non è stato possibile osservare una downmodulazione di RhoA.

Ho infatti osservato che l'attività della PKC δ nella differenziazione MK dell'uomo coinvolge un differente pathway, ossia quello di Bcl-xL, proteina appartenente alla famiglia delle Bcl-2, già noto per la sua attività antiapoptotica e per il suo coinvolgimento nel processo di maturazione megacariocitica e di formazione di propiastri (Kodama T *et al.*, Cell Death Differ 2012; Kirito K *et al.*, J Biol Chem 2002). Gli esperimenti descritti hanno valutato la cinetica di questa proteina e di PKC δ durante il differenziamento MK e sono giunta a definire una correlazione tra esse. Infatti, ad una forzata riduzione dell'espressione della proteina PKC δ corrisponde un aumento dei livelli di Bcl-xL.

Per verificare infine se un aberrante differenziamento MK nell'uomo, quale si verifica nella PMF, potesse essere associata a difetti di espressione di PKC ϵ e/o PKC δ , ho utilizzato cellule staminali primarie di pazienti affetti da MF indotte al differenziamento MK in vitro. Gli esperimenti di analisi dell'espressione proteica hanno permesso di determinare i livelli delle due isoforme di PKC (ϵ e δ) e di Bcl-xL, mettendo in evidenza come essi siano fortemente alterati nella PMF rispetto al controllo sano. In particolare è l'espressione di PKC ϵ e Bcl-xL che si discosta da quella dei soggetti sani: nelle PMF si manifesta una netta upmodulazione di PKC ϵ mentre Bcl-xL e PKC δ appaiono essere ridotti se comparati con i livelli di espressione dei donatori sani durante la differenziazione in senso megacariocitario delle CD34+ PMF. Ho dimostrato inoltre che la downmodulazione forzata di PKC ϵ nel modello PMF porta ad un ripristino di un normale livello di espressione di Bcl-xL così come della popolazione di megacariociti formanti propiastri in coltura.

Riassumendo, i risultati ottenuti mostrano che:

- PKC ϵ e PKC δ siano selettivamente regolate durante il differenziamento MK;
- l'espressione di PKC ϵ e PKC δ nel differenziamento MK è specie-specifica e reciproca;
- nel modello murino le chinasi inducono la produzione piastrinica via RhoA;
- nel modello umano le chinasi inducono la produzione piastrinica via Bcl-xL;
- l'overespressione di PKC ϵ inibisce, via Bcl-xL, il corretto differenziamento MK in cellule CD34+ da PMF;
- la forzata down-regolazione di PKC ϵ ripristina un corretto differenziamento MK in PMF.

CONCLUSIONI

Confrontando le cinetiche dei due modelli presi in analisi nel mio studio, quello murino e quello umano, è stato possibile osservare come, pur presentando le cellule staminali mieloidi tempi di differenziazione terminale diversi (14 giorni per l'uomo contro 5 giorni nel topo), in entrambi i modelli le proteine PKC ϵ e PKC δ dimostrino avere una chiara e specifica modulazione nel progredire del processo differenziativo di tali cellule.

In particolare nell'uomo i livelli di PKC ϵ devono essere down-modulati, mentre nel topo, al contrario, i livelli della chinasi risultano essere up-modulati durante lo stesso processo.

Analogamente, le CD34+ in differenziazione presentano una costante e maggiore espressione di PKC δ durante la maturazione MK, mentre nel modello murino tale proteina risulta down-modulata nella fase più tardiva di formazione della piastrina.

Questi dati, se confrontati, permettono di affermare che le chinasi PKC ϵ e PKC δ presentano un pattern di espressione opposto e, nel modello umano rispetto a quello murino, reciproco.

Le due chinasi mostrano in oltre di agire, nei due modelli, attraverso due pathways distinti e cioè RhoA nel topo e Bcl-xL nell'uomo.

In particolare poi ho dimostrato che il processo di megacariocitopoiesi anomala osservato nel modello patologico della PMF passa attraverso una deregolazione della proteina chinasi epsilon. L'effetto di questa up-modulazione della chinasi si manifesta in un'alterata espressione di Bcl-xL e si traduce con un'incapacità da parte della cellula di progredire verso il normale percorso differenziativo.

I dati ottenuti indicano quindi che PKC ϵ e PKC δ svolgono un ruolo importante nel corretto differenziamento MK e che PKC ϵ potrebbe essere un potenziale nuovo target terapeutico nelle PMF.

Per ciò che riguarda PKC δ nel contesto delle PMF, al momento è ancora in fase di studio se la deregolazione di tale chinasi osservata sia conseguenza della up-modulazione della PKC ϵ o se, più probabilmente, sia essa stessa co-responsabile dell'aberrata capacità delle cellule CD34+ PMF di differenziare correttamente. Dati non ancora pubblicati, ottenuti dal gruppo di ricerca nel quale lavoro, hanno infatti evidenziato come nella CD34+ umana normale, la forzatura della fobice PKC ϵ -PKC δ favorisca la produzione piastrinica.

BIBLIOGRAFIA

- Akita Y. **Protein kinase C-epsilon (PKC-epsilon): its unique structure and function.** J Biochem. 2002 Dec;132(6):847-52.
- Alan DM. **Platelets**, Academic Press, third edition (2013), chapter 7:117-144
- Alipour MR, Aliparasti MR, Keyhanmanesh R, Almasi S, Halimi M, Ansarin K, Feizi H. **Effect of ghrelin on protein kinase C- ϵ and protein kinase C- δ gene expression in the pulmonary arterial smooth muscles of chronic hypoxic rats.** J Endocrinol Invest. 2011 Nov;34(10):e369-73.
- Anthony BA, Link DC. **Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells.** Trends Immunol. 2014 Jan;35(1):32-7.
- Arcese W, De Angelis G, Cerretti R.. **Granulocyte-mobilized bone marrow.** Curr Opin Hematol. 2012 Nov;19(6):448-53.
- Balduini A, Badalucco S, Pugliano MT, Baev D, De Silvestri A, Cattaneo M, Rosti V, Barosi G. **In vitro megakaryocyte differentiation and proplatelet formation in Ph-negative classical myeloproliferative neoplasms: distinct patterns in the different clinical phenotypes.** PLoS One. 2011;6(6):e21015.
- Balendran A., Hare GR, Kieloch A, Williams MR, Alessi DR. **Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms.** FEBS Lett. 2000 Nov 10;484(3):217-23.
- Bassini A, Zauli G, Migliaccio G, Migliaccio AR, Pascuccio M, Pierpaoli S, Guidotti L, Capitani S, Vitale M. **Lineage-restricted expression of protein kinase C isoforms in hematopoiesis.** Blood. 1999 Feb 15;93(4):1178-88.
- Basu A, Sivaprasad U. **Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision.** Cell Signal. 2007 Aug;19(8):1633-42.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR; Cancer Genome Project. **Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders.** Lancet. 2005 Mar 19-25;365(9464):1054-61.
- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. **Pillars article: Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.** Nature. 1963. **197:452-454.** J Immunol. 2014 Jun 1;192(11):4945-7

Becker RP, De Bruyn PP. **The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation.** Am J Anat. 1976 Feb;145(2):183-205.

Beckmann R, Lindschau C, Haller H, Hucho F, Buchner K. **Differential nuclear localization of protein kinase C isoforms in neuroblastoma x glioma hybrid cells.** Eur J Biochem. 1994 Jun 1;222(2):335-43.

Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck G, Harrison CN, Green AR. **MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort.** Blood. 2008 Jul 1;112(1):141-9.

Bezy O, Tran TT, Pihlajamäki J, Suzuki R, Emanuelli B, Winnay J, Mori MA, Haas J, Biddinger SB, Leitges M, Goldfine AB, Patti ME, King GL, Kahn CR. **PKC δ regulates hepatic insulin sensitivity and hepatosteatosis in mice and humans.** J Clin Invest. 2011 Jun;121(6):2504-17.

Bharti A, Kraeft SK, Gounder M, Pandey P, Jin S, Yuan ZM, Lees-Miller SP, Weichselbaum R, Weaver D, Chen LB, Kufe D, Kharbanda S. **Inactivation of DNA-dependent protein kinase by protein kinase Cdelta: implications for apoptosis.** Mol Cell Biol. 1998 Nov;18(11):6719-28.

Borner C, Filipuzzi I, Wartmann M, Eppenberger U, Fabbro D. **Biosynthesis and posttranslational modifications of protein kinase C in human breast cancer cells.** J Biol Chem. 1989 Aug 15;264(23):13902-9.

Broudy VC. **Stem Cell Factor and Hematopoiesis** Blood. 1997 August 15;90(4): 1345-64.

Busca A, Saxena M, Iqbal S, Angel J, Kumar A. **PI3K/Akt regulates survival during differentiation of human macrophages by maintaining NF- κ B-dependent expression of antiapoptotic Bcl-xL.** J Leukoc Biol. 2014 Sep 15. pii: jlb.1A0414-212R. [Epub ahead of print]

Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM. **GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo.** Bioessays. 2007 Apr;29(4):356-70.

Cerda SR, Bissonnette M, Scaglione-Sewell B, Lyons MR, Khare S, Mustafi R, Brasitus TA. **PKC-delta inhibits anchorage-dependent and -independent growth, enhances differentiation, and increases apoptosis in CaCo-2 cells.** Gastroenterology. 2001 Jun;120(7):1700-12.

- Chang Y, Auradé F, Larbret F, Zhang Y, Le Couedic JP, Momeux L, Larghero J, Bertoglio J, Louache F, Cramer E, Vainchenker W, Debili N. **Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway.** *Blood.* 2007 May 15;109(10):4229-36.
- Chao DT, Korsmeyer SJ. **BCL-2 family: regulators of cell death.** *Annu Rev Immunol.* 1998;16:395-419.
- Chen JL, Lin HH, Kim KJ, Lin A, Ou JH, Ann DK. **PKC delta signaling: a dual role in regulating hypoxic stress-induced autophagy and apoptosis.** *Autophagy.* 2009 Feb;5(2):244-6.
- Chen Z, Forman LW, Miller KA, English B, Takashima A, Bohacek RA, Williams RM, Faller DV. **Protein kinase C δ inactivation inhibits cellular proliferation and decreases survival in human neuroendocrine tumors.** *Endocr Relat Cancer.* 2011 Dec 1;18(6):759-71.
- Chen Z, Forman LW, Williams RM, Faller DV. **Protein kinase C-delta inactivation inhibits the proliferation and survival of cancer stem cells in culture and in vivo.** *BMC Cancer.* 2014 Feb 14;14:90.
- Chou WH, Choi DS, Zhang H, Mu D, McMahan T, Kharazia VN, Lowell CA, Ferriero DM, Messing RO. **Neutrophil protein kinase Cdelta as a mediator of stroke-reperfusion injury.** *J Clin Invest.* 2004 Jul;114(1):49-56.
- Chou WH, Messing RO. **Protein kinase C isozymes in stroke.** *Trends Cardiovasc Med.* 2005 Feb;15(2):47-51.
- Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K. **Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions.** *J Cell Biol.* 1996 Jun;133(6):1403-15.
- Churchill EN, Ferreira JC, Brum PC, Szweda LI, Mochly-Rosen D. **Ischaemic preconditioning improves proteasomal activity and increases the degradation of deltaPKC during reperfusion.** *Cardiovasc Res.* 2010 Jan 15;85(2):385-94.
- Churchill EN, Mochly-Rosen D. **The roles of PKCdelta and epsilon isoenzymes in the regulation of myocardial ischaemia/reperfusion injury.** *Biochem Soc Trans.* 2007 Nov;35(Pt 5):1040-2.
- Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, Ishii T, Zhao Y, Hu W, Bruno E, Barosi G, Xu M, Hoffman R. **Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis.** *Blood.* 2007 Aug 1;110(3):986-93.

Cook GJ & Pardee TS. **Animal Models of Leukemia: Any closer to the real thing?** *Cancer metastasis rev.* 2013;32(0):63-76.

Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng TL, Chen E, Waterfield MD, Francke U, Ullrich A. **Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways.** *Science.* 1986 Aug 22;233(4766):859-66.

Cross NC. **Genetic and epigenetic complexity in myeloproliferative neoplasms.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:208-14.

Csukai M, Mochly-Rosen D. **Pharmacologic modulation of protein kinase C isozymes: the role of RACKs and subcellular localization.** *Pharmacol Res.* 1999 Apr;39(4):253-9.

Deutsch V, Hubel E, Kay S, Ohayon T, Katz BZ, Many A, Zander A, Naparstek E, Grisaru D. **Mimicking the haematopoietic niche microenvironment provides a novel strategy for expansion of haematopoietic and megakaryocyte-progenitor cells from cord blood.** *Br J Haematol.* 2010 Apr;149(1):137-49.

Deutsch VR, Tomer A. **Megakaryocyte development and platelet production.** *Br J Haematol.* 2006 Sep;134(5):453-66.

Ding F, Yin Z, Wang HR. **Ubiquitination in Rho signaling.** *Curr Top Med Chem.* 2011 Dec;11(23):2879-87.

Djaldetti M, Fishman P, Bessler H, Notti I. **SEM observations on the mechanism of platelet release from megakaryocytes.** *Thromb Haemost.* 1979 Aug 31;42(2):611-20.

Donahue RE, Seehra J, Metzger M, Lefebvre D, Rock B, Carbone S, Nathan DG, Garnick M, Sehgal PK, Laston D, et al. **Human IL-3 and GM-CSF act synergistically in stimulating hematopoiesis in primates.** *Science.* 1988 Sep 30;241(4874):1820-3.

Durgan J, Michael N, Totty N, Parker PJ. **Novel phosphorylation site markers of protein kinase C delta activation.** *FEBS Lett.* 2007 Jul 24;581(18):3377-81.

Edelstein LC, Bray PF. **MicroRNAs in platelet production and activation.** *Blood.* 2011 May 19;117(20):5289-96.

Egea-Jiménez AL, Corbalán-García S, Gómez-Fernández JC. **The C1B domains of novel PKC ϵ and PKC η have a higher membrane binding affinity than those of the also novel PKC δ and PKC θ .** *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jul;1838(7):1898-909.

Emoto Y, Manome Y, Meinhardt G, Kisaki H, Kharbanda S, Robertson M, Ghayur T, Wong W W, Kamen R, Weichselbaum R. **Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells.** EMBO J. Dec 15, 1995; 14(24): 6148–6156.

Endele M, Etzrodt M, Schroeder T. **Instruction of hematopoietic lineage choice by cytokine signaling.** Exp Cell Res. 2014 Dec 10;329(2):207-213.

Engelhardt M, Lübbert M, Guo Y. Leukemia. **CD34(+) or CD34(-): which is the more primitive?.** 2002 Sep;16(9):1603-8.

Fackler MJ, Krause DS, Smith OM, Civin CI, May WS. **Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells.** Blood. 1995 Jun 1;85(11):3040-7.

Fan HC, Fernández-Hernando C, Lai JH. **Protein kinase C isoforms in atherosclerosis: pro- or anti-inflammatory?** Biochem Pharmacol. 2014 Mar 15;88(2):139-49.

Florena AM, Tripodo C, Di Bernardo A, Iannitto E, Guarnotta C, Porcasi R, Ingraio S, Abbadessa V, Franco V. **Different immunophenotypical apoptotic profiles characterise megakaryocytes of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis.** J Clin Pathol. 2009 Apr;62(4):331-8.

Freson K, Devriendt K, Matthijs G, Van Hoof A, De Vos R, Thys C, Minner K, Hoylaerts MF, Vermynen J, Van Geet C. **Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel GATA1 mutation.** Blood. 2001 98:85-92.

Gan X, Wang J, Wang C, Sommer E, Kozasa T, Srinivasula S, Alessi D, Offermanns S, Simon MI, Wu D. **PRR5L degradation promotes mTORC2-mediated PKC- δ phosphorylation and cell migration downstream of G α 12.** Nat Cell Biol. 2012 May 20;14(7):686-96.

Gao Y, Smith E, Ker E, Campbell P, Cheng EC, Zou S, Lin S, Wang L, Halene S, Krause DS. **Role of RhoA-specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes.** Dev Cell 2012 22:573–584.

García-García J, Gómez-Fernández JC, Corbalán-García S. **Structural characterization of the C2 domain of novel protein kinase Cepsilon.** Eur J Biochem. 2001 Feb;268(4):1107-17.

Geddis AE, Kaushansky K. **Endomitotic megakaryocytes form a midzone in anaphase but have a deficiency in cleavage furrow formation.** Cell Cycle. 2006 Mar;5(5):538-45.

Geraldes P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, Clermont A, Leitges M, Marette A, Aiello LP, Kern TS, King GL. **Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy.** Nat Med. 2009 Nov;15(11):1298-306.

Ghebrehiwet B, Lim BL, Kumar R, Feng X, Peerschke EI. **gC1q-R/p33, a member of a new class of multifunctional and multicompartamental cellular proteins, is involved in inflammation and infection.** Immunol Rev. 2001 Apr;180:65-77.

Gobbi G, Mirandola P, Carubbi C, Masselli E, Sykes SM, Ferraro F, Nouvenne A, Thon JN, Italiano JE Jr, Vitale M. **Proplatelet generation in the mouse requires PKC ϵ -dependent RhoA inhibition.** Blood. 2013 Aug 15;122(7):1305-11.

Gobbi G, Mirandola P, Carubbi C, Micheloni C, Malinverno C, Lunghi P, Bonati A, Vitale M. **Phorbol ester-induced PKCepsilon down-modulation sensitizes AML cells to TRAIL-induced apoptosis and cell differentiation.** Blood. 2009 Mar 26;113(13):3080-7.

Gobbi G, Mirandola P, Sponzilli I, Micheloni C, Malinverno C, Cocco L, Vitale M. **Timing and expression level of protein kinase C epsilon regulate the megakaryocytic differentiation of human CD34 cells.** Stem Cells. 2007 Sep;25(9):2322-9.

Goldspink PH, Montgomery DE, Walker LA, Urboniene D, McKinney RD, Geenen DL, Solaro RJ, Buttrick PM. **Protein kinase Cepsilon overexpression alters myofilament properties and composition during the progression of heart failure.** Circ Res. 2004 Aug 20;95(4):424-32.

Gomel R, Xiang C, Finniss S, Lee HK, Lu W, Okhrimenko H, Brodie C. **The localization of protein kinase Cdelta in different subcellular sites affects its proapoptotic and antiapoptotic functions and the activation of distinct downstream signaling pathways.** Mol Cancer Res. 2007 Jun;5(6):627-39.

Gould CM, Kannan N, Taylor SS, Newton AC. **The chaperones Hsp90 and Cdc37 mediate the maturation and stabilization of protein kinase C through a conserved PXXP motif in the C-terminal tail.** J Biol Chem. 2009 Feb 20;284(8):4921-35.

Griner EM, Kazanietz MG. **Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer.** Nat Rev Cancer. 2007 Apr;7(4):281-94.

Grobler JA, Essen LO, Williams RL, Hurley JH. **C2 domain conformational changes in phospholipase C-delta 1.** Nat Struct Biol. 1996 Sep;3(9):788-95.

Groopman JE. **The pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferative disorders.** Ann Intern Med. 1980 Jun;92(6):857-8.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. **BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis.** Genes Dev. 1999 Aug 1;13(15):1899-911.

Hald A, Andrés RM, Salskov-Iversen ML, Kjellerup RB, Iversen L, Johansen C. **STAT1 expression and activation is increased in lesional psoriatic skin.** Br J Dermatol. 2013 Feb;168(2):302-10.

Hall A. **Rho GTPases and the actin cytoskeleton.** Science. 1998 Jan 23;279(5350):509-14.

Harker LA. **The kinetics of platelet production and destruction in man.** Clin Haematol. 1977 Oct;6(3):671-93.

Heasman SJ, Ridley AJ. **Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Sep;9(9):690-701.

Hernandez RM, Wescott GG, Mayhew MW, McJilton MA, Terrian DM. **Biochemical and morphogenic effects of the interaction between protein kinase C-epsilon and actin in vitro and in cultured NIH3T3 cells.** J Cell Biochem. 2001;83(4):532-46.

Hickson GR, Echard A, O'Farrell PH. **Rho-kinase controls cell shape changes during cytokinesis.** Curr Biol. 2006 Feb 21;16(4):359-70.

Himburg HA, Muramoto GG, Daher P, Meadows SK, Russell JL, Doan P, Chi JT, Salter AB, Lento WE, Reya T, Chao NJ, Chute JP. **Pleiotrophin regulates the expansion and regeneration of hematopoietic stem cells.** Nat Med. 2010 Apr;16(4):475-82.

Hlaváčková M, Kožichová K, Neckář J, Kolář F, Musters RJ, Novák F, Nováková O. **Up-regulation and redistribution of protein kinase C-δ in chronically hypoxic heart.** Mol Cell Biochem. 2010 Dec;345(1-2):271-82.

Huang Z. **Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design.** Oncogene. 2000 Dec 27;19(56):6627-31.

Humphries MJ, Limesand KH, Schneider JC, Nakayama KI, Anderson SM, Reyland ME. **Suppression of apoptosis in the protein kinase Cdelta null mouse in vivo.** J Biol Chem. 2006 Apr 7;281(14):9728-37.

Hutchinson CL, Lowe PN, McLaughlin SH, Mott HR, Owen D. **Differential binding of RhoA, RhoB, and RhoC to protein kinase C-related kinase (PRK) isoforms PRK1,**

PRK2, and PRK3: PRKs have the highest affinity for RhoB. *Biochemistry*. 2013 Nov 12;52(45):7999-8011.

Iden S, Collard JG. **Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization.** *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Nov;9(11):846-59.

Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X, Guan KL. **Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling.** *EMBO J*. 2008 Jul 23;27(14):1919-31.

Inagaki K, Chen L, Ikeno F, Lee FH, Imahashi K, Bouley DM, Rezaee M, Yock PG, Murphy E, Mochly-Rosen D. **Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo.** *Circulation*. 2003 Nov 11;108(19):2304-7.

Inagaki K, Churchill E, Mochly-Rosen D. **Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart.** *Cardiovasc Res*. 2006 May 1;70(2):222-30. Epub 2006 Feb 23.

Inoue M, Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y. **Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain.** *J Biol Chem*. 1977 Nov 10;252(21):7610-6

Italiano JE Jr, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. **Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes.** *J Cell Biol*. 1999 Dec 13;147(6):1299-312.

Ivaska J, Whelan RD, Watson R, Parker PJ. **PKC epsilon controls the traffic of beta1 integrins in motile cells.** *EMBO J*. 2002 Jul 15;21(14):3608-19.

James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. **A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera.** *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1144-8.

Kajimoto T, Ohmori S, Shirai Y, Sakai N, Saito N. **Subtype-specific translocation of the delta subtype of protein kinase C and its activation by tyrosine phosphorylation induced by ceramide in HeLa cells.** *Mol Cell Biol*. 2001 Mar;21(5):1769-83.

Kashiwagi H, Shiraga M, Honda S, Kosugi S, Kamae T, Kato H, Kurata Y, Tomiyama Y. **Activation of integrin alpha IIb beta 3 in the glycoprotein Ib-high population of a**

megakaryocytic cell line, CMK, by inside-out signaling. J Thromb Haemost. 2004 Jan;2(1):177-86.

Kaul S, Kanthasamy A, Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG. **Caspase-3 dependent proteolytic activation of protein kinase C delta mediates and regulates 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced apoptotic cell death in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress in dopaminergic degeneration.** Eur J Neurosci. 2003 Sep;18(6):1387-401.

Kaushansky K, Drachman JG. **The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production.** Oncogene. 2002. 21:3359-3367.

Kaushansky K. **Lineage-specific hematopoietic growth factors.** N Engl J Med. 2006 May 11;354(19):2034-45.

Kaushansky, K. **The molecular mechanisms that control thrombopoiesis.** J. Clin. Invest. 2005. 115:3339-3347

Kikkawa U, Matsuzaki H, Yamamoto T. **Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions.** J Biochem. 2002 Dec;132(6):831-9.

Kile BT. **The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets.** Br J Haematol. 2014 Apr;165(2):217-26.

Kiley SC, Clark KJ, Duddy SK, Welch DR, Jaken S. **Increased protein kinase C delta in mammary tumor cells: relationship to transformation and metastatic progression.** Oncogene. 1999 Nov 18;18(48):6748-57.

Kilpatrick LE, Standage SW, Li H, Raj NR, Korchak HM, Wolfson MR, Deutschman CS. **Protection against sepsis-induced lung injury by selective inhibition of protein kinase C- δ (δ -PKC).** J Leukoc Biol. 2011 Jan;89(1):3-10.

Kilpivaara O, Levine RL. **JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science.** Leukemia. 2008 Oct;22(10):1813-7.

Kim J, Koyanagi T, Mochly-Rosen D. **PKC δ activation mediates angiogenesis via NADPH oxidase activity in PC-3 prostate cancer cells.** Prostate. 2011 Jun 15;71(9):946-54.

Kirito K, Watanabe T, Sawada K, Endo H, Ozawa K, Komatsu N. **Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol 3-kinase activation pathways.** J Biol Chem. 2002 Mar 8;277(10):8329-37.

Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, Shigekawa M, Shimizu S, Hayashi Y, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Kiyomizu K, Tadokoro S, Tomiyama Y, Hayashi N, Takehara T. **Mcl-1 and Bcl-xL regulate Bak/Bax-dependent apoptosis of the megakaryocytic lineage at multistages.** *Cell Death Differ.* 2012 Nov;19(11):1856-69.

Koivunen J, Aaltonen V, Peltonen J. **Protein kinase C (PKC) family in cancer progression.** *Cancer Lett.* 2006 Apr 8;235(1):1-10.

Koopmans SM, Schouten HC, van Marion AM. **Anti-apoptotic pathways in bone marrow and megakaryocytes in myeloproliferative neoplasia.** *Pathobiology.* 2014;81(2):60-8.

Koponen S, Goldsteins G, Keinänen R, Koistinaho J. **Induction of protein kinase Cdelta subspecies in neurons and microglia after transient global brain ischemia.** *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Jan;20(1):93-102.

Korsmeyer SJ. **Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death.** *Blood.* 1992 Aug 15;80(4):879-86.

Kozuma Y, Kojima H, Yuki S, Suzuki H, Nagasawa T. **Continuous expression of Bcl-xL protein during megakaryopoiesis is post-translationally regulated by thrombopoietin-mediated Akt activation, which prevents the cleavage of Bcl-xL.** *J Thromb Haemost.* 2007 Jun;5(6):1274-82.

Kuter DJ, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP. **Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres.** *Br J Haematol.* 2007 Nov;139(3):351-62.

Kvasnicka HM. **WHO classification of myeloproliferative neoplasms (MPN): A critical update.** *Curr Hematol Malig Rep.* 2013 Dec;8(4):333-41.

Langlois A, Chouinard F, Flamand N, Ferland C, Rola-Pleszczynski M, Laviolette M. **Crucial implication of protein kinase C (PKC)-delta, PKC-zeta, ERK-1/2, and p38 MAPK in migration of human asthmatic eosinophils.** *J Leukoc Biol.* 2009 Apr;85(4):656-63.

Lanuti P, Bertagnolo V, Gaspari AR, Ciccocioppo F, Pierdomenico L, Bascelli A, Sabatino G, Miscia S, Marchisio M. **Parallel regulation of PKC-alpha and PKC-delta characterizes the occurrence of erythroid differentiation from human primary hematopoietic progenitors.** *Exp Hematol.* 2006 Dec;34(12):1624-34.

- Latchoumycandane C, Anantharam V, Kitazawa M, Yang Y, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. **Protein kinase Cdelta is a key downstream mediator of manganese-induced apoptosis in dopaminergic neuronal cells.** *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Apr;313(1):46-55.
- Lentz BR. **Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation** *Prog Lipid Res.* (2003) Sept;42(5):423–438
- Lessey EC, Guilluy C, Burridge K. **From mechanical force to RhoA activation.** *Biochemistry.* 2012 Sep 25;51(38):7420-32.
- Levine RL, Gilliland DG. **Myeloproliferative disorders.** *Blood.* 2008 Sep 15;112(6):2190-8.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. **Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis.** *Cancer Cell.* 2005 Apr;7(4):387-97.
- Li X, Ma C, Zhu D, Meng L, Guo L, Wang Y, Zhang L, Li Z, Li E. **Increased expression and altered subcellular distribution of PKC- δ and PKC- ϵ in pulmonary arteries exposed to hypoxia and 15-HETE.** *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010 Nov;93(3-4):84-92.
- Limnander A, Depeille P, Freedman TS, Liou J, Leitges M, Kurosaki T, Roose JP, Weiss A. **STIM1, PKC- δ and RasGRP set a threshold for proapoptotic Erk signaling during B cell development.** *Nat Immunol.* 2011 May;12(5):425-33.
- Ling M, Trollér U, Zeidman R, Lundberg C, Larsson C. **Induction of neurites by the regulatory domains of PKCdelta and epsilon is counteracted by PKC catalytic activity and by the RhoA pathway.** *Exp Cell Res.* 2004 Jan 1;292(1):135-50.
- Lordier L, Jalil A, Aurade F, Larbret F, Larghero J, Debili N, Vainchenker W, Chang Y. **Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling.** *Blood.* 2008 Oct 15;112(8):3164-74.
- Mackay HJ, Twelves CJ. **Targeting the protein kinase C family: are we there yet?** *Nat Rev Cancer.* 2007 Jul;7(7):554-62.
- Mackay K, Mochly-Rosen D. **Localization, anchoring, and functions of protein kinase C isozymes in the heart.** *J Mol Cell Cardiol.* 2001 Jul;33(7):1301-7

Maeno-Hikichi Y, Chang S, Matsumura K, Lai M, Lin H, Nakagawa N, Kuroda S, Zhang JF. **A PKC epsilon-ENH-channel complex specifically modulates N-type Ca²⁺ channels.** *Nat Neurosci.* 2003 May;6(5):468-75.

Maioli E, Valacchi G. **Rottlerin: bases for a possible usage in psoriasis.** *Curr Drug Metab.* 2010 Jun 1;11(5):425-30.

Marchisio M, Santavenere E, Paludi M, Gaspari AR, Lanuti P, Bascelli A, Ercolino E, Di Baldassarre A, Miscia S. **Erythroid cell differentiation is characterized by nuclear matrix localization and phosphorylation of protein kinases C (PKC) alpha, delta, and zeta.** *J Cell Physiol.* 2005 Oct;205(1):32-6.

Marín-Vicente C, Nicolás FE, Gómez-Fernández JC, Corbalán-García S. **The PtdIns(4,5)P₂ ligand itself influences the localization of PKCalpha in the plasma membrane of intact living cells.** *J Mol Biol.* 2008 Apr 4;377(4):1038-52.

Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, Kelly PN, Ekert PG, Metcalf D, Roberts AW, Huang DC, Kile BT. **Programmed anuclear cell death delimits platelet life span.** *Cell.* 2007 Mar 23;128(6):1173-86.

Mazharian A. **Assessment of megakaryocyte migration and chemotaxis.** *Methods Mol Biol.* 2012;788:275-88.

Mecklenbräuker I, Saijo K, Zheng NY, Leitges M, Tarakhovsky A. **Protein kinase Cdelta controls self-antigen-induced B-cell tolerance.** *Nature.* 2002 Apr 25;416(6883):860-5.

Medkova M, Cho W. **Differential membrane-binding and activation mechanisms of protein kinase C-alpha and -epsilon.** *Biochemistry.* 1998 Apr 7;37(14):4892-900.

Mendelson A, Frenette PS. **Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration.** *Nat Med.* 2014 Aug;20(8):833-46.

Metcalf D, Carpinelli MR, Hyland C, Mifsud S, Dirago L, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. **Anomalous megakaryocytopoiesis in mice with mutations in the c-Myb gene.** *Blood.* 2005 May 1;105(9):3480-7.

Mingo-Sion AM, Ferguson HA, Koller E, Reyland ME, Van Den Berg CL. **PKCdelta and mTOR interact to regulate stress and IGF-I induced IRS-1 Ser312 phosphorylation in breast cancer cells.** *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Jun;91(3):259-69.

Mirandola P, Gobbi G, Ponti C, Sponzilli I, Cocco L, Vitale M. **PKCepsilon controls protection against TRAIL in erythroid progenitors.** *Blood.* 2006 Jan 15;107(2):508-13.

- Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron G, Schaehtle C, Kazanietz MG, Blumberg PM, Pierce JH, Mushinski JF. **Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity.** J Biol Chem. 1993 Mar 25;268(9):6090-6.
- Mitjavila-Garcia MT, Cailleret M, Godin I, Nogueira MM, Cohen-Solal K, Schiavon V, Lecluse Y, Le Pesteur F, Lagrue AH, Vainchenker W. **Expression of CD41 on hematopoietic progenitors derived from embryonic hematopoietic cells.** Development. 2002 Apr;129(8):2003-13.
- Miyazaki K, Komatsu S, Ikebe M. **Dynamics of RhoA and ROKalpha translocation in single living cells.** Cell Biochem Biophys. 2006;45(3):243-54.
- Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV. **Protein kinase C, an elusive therapeutic target?** Nat Rev Drug Discov. 2012 Dec;11(12):937-57.
- Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S, et al. **Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice.** Science. 1995 Mar 10;267(5203):1506-10.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettlesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW. **X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death.** Nature. 1996 May 23;381(6580):335-41.
- Mullally A, Lane SW, Brumme K, Ebert BL. **Myeloproliferative neoplasm animal models.** Hematol Oncol Clin North Am. 2012 Oct;26(5):1065-81.
- Muth M, Büsche G, Bock O, Hussein K, Kreipe H. **Aberrant proplatelet formation in chronic myeloproliferative neoplasms.** Leuk Res. 2010 Nov;34(11):1424-9
- Newton AC. **Protein kinase C: poised to signal.** Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010 Mar;298(3): 395-402.
- Newton AC. **Protein kinase C: structure, function, and regulation.** J Biol Chem. 1995 Dec 1;270(48):28495-8.
- Newton AC. **Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm.** Biochem J. 2003 Mar 1;370(Pt 2):361-71.

Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, White JG, Orkin SH, Maris JM, Weiss MJ **Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1.** Nat Genet 2000; 24: 266-270.

Nishizuka Y. **The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion.** Nature. 1984 Apr 19-25;308(5961):693-8.

Nutt SL, Metcalf D, D'Amico A, Polli M, Wu L. **Dynamic regulation of PU.1. expression in multipotent hematopoietic progenitors.** J Exp Med. 2005 Jan 17;201(2):221-31.

Odell TT Jr, Jackson CW. **Polyploidy and maturation of rat megakaryocytes.** Blood. 1968 32:102-110.

Ogawa M. **Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells.** Blood. 1993 Jun 1;81(11):2844-53

Olson MF, Ashworth A, Hall A. **An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1.** Science. 1995 Sep 1;269(5228):1270-2.

Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. **Identification of three additional members of rat protein kinase C family: delta-, epsilon- and zeta-subspecies.** FEBS Lett. 1987 Dec 21;226(1):125-8.

Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. **The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family.** J Biol Chem. 1988 May 15;263(14):6927-32.

Osada S, Mizuno K, Saïdo TC, Suzuki K, Kuroki T, Ohno S. **A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle.** Mol Cell Biol. 1992 Sep;12(9):3930-8.

Palaniyandi SS, Sun L, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. **Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target?** Cardiovasc Res. 2009 May 1;82(2):229-39

Palmer RH, Ridden J, Parker PJ. **Cloning and expression patterns of two members of a novel protein-kinase-C-related kinase family.** Eur J Biochem. 1995 Jan 15;227(1-2):344-51

Pan Q, Bao LW, Teknos TN, Merajver SD. **Targeted disruption of protein kinase C epsilon reduces cell invasion and motility through inactivation of RhoA and RhoC GTPases in head and neck squamous cell carcinoma.** Cancer Res. 2006 Oct 1;66(19):9379-84.

- Parekh C, Crooks GM. **Critical differences in hematopoiesis and lymphoid development between humans and mice.** *J Clin Immunol.* 2013 May;33(4):711-5.
- Parekh D, Ziegler W, Yonezawa K, Hara K, Parker PJ. **Mammalian TOR controls one of two kinase pathways acting upon nPKCdelta and nPKCepsilon.** *J Biol Chem.* 1999 Dec 3;274(49):34758-64.
- Parker PJ, Coussens L, Totty N, Rhee L, Young S, Chen E, Stabel S, Waterfield MD, Ullrich A. **The complete primary structure of protein kinase C--the major phorbol ester receptor.** *Science.* 1986 Aug 22;233(4766):853-9.
- Patel NA, Song SS, Cooper DR. **PKCdelta alternatively spliced isoforms modulate cellular apoptosis in retinoic acid-induced differentiation of human NT2 cells and mouse embryonic stem cells.** *Gene Expr.* 2006;13(2):73-84.
- Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE Jr. **The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets.** *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(12):3348-54.
- Patel SR, Richardson JL, Schulze H, Kahle E, Galjart N, Drabek K, Shivdasani RA, Hartwig JH, Italiano JE Jr. **Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes.** *Blood.* 2005 Dec 15;106(13):4076-85.
- Patel-Hett S, Wang H, Begonja AJ, Thon JN, Alden EC, Wandersee NJ, An X, Mohandas N, Hartwig JH, Italiano JE Jr. **The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane systems and is essential for proplatelet and platelet formation.** *Blood.* 2011 Aug 11;118(6):1641-52
- Pears CJ, Parker PJ. **Domain interactions in protein kinase C.** *J Cell Sci.* 1991 Dec;100 (Pt 4):683-6.
- Pears CJ, Thornber K, Auger JM, Hughes CE, Grygielska B, Prottly MB, Pearce AC, Watson SP. **Differential roles of the PKC novel isoforms, PKCdelta and PKCepsilon, in mouse and human platelets.** *PLoS One.* 2008;3(11):e3793.
- Perez-Pinzon MA, Stetler RA, Fiskum G. **Novel mitochondrial targets for neuroprotection.** *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Jul;32(7):1362-76.
- Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. **Structural biology of the Bcl-2 family of proteins.** *Biochim Biophys Acta.* 2004 Mar 1;1644(2-3):83-94.
- Poli A, Mongiorgi S, Cocco L, Follo MY. **Protein kinase C involvement in cell cycle modulation.** *Biochem Soc Trans.* 2014 Oct;42(5):1471-6.

Porwit A, McCullough J, Erber WN Elsevier, **Blood and Bone Marrow Pathology**, second edition (2011), chapter 23: 347-359

Prekeris R, Mayhew MW, Cooper JB, Terrian DM. **Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function.** J Cell Biol. 1996 Jan;132(1-2):77-90.

Premkumar LS, Ahern GP. **Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C.** Nature. 2000 Dec 21-28;408(6815):985-90.

Psaila B, Lyden D, Roberts L. **Megakaryocytes, malignancy and bone marrow vascular niches.** J Thromb Haemost. 2012 Feb;10(2):177-88.

Reed JC. **Double identity for proteins of the Bcl-2 family.** Nature. 1997 Jun 19;387(6635):773-6.

Ridley AJ. **Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle.** Curr Opin Genet Dev. 1995 Feb;5(1):24-30.

Robb L. **Cytokine receptors and hematopoietic differentiation.** Oncogene. 2007 Oct 15;26(47):6715-23.

Robles-Flores M, Rendon-Huerta E, Gonzalez-Aguilar H, Mendoza-Hernandez G, Islas S, Mendoza V, Ponce-Castaneda MV, Gonzalez-Mariscal L, Lopez-Casillas F. **p32 (gC1qBP) is a general protein kinase C (PKC)-binding protein; interaction and cellular localization of P32-PKC complexes in ray hepatocytes.** J Biol Chem. 2002 Feb 15;277(7):5247-55.

Ron D, Chen CH, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D. **Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 1;91(3):839-43.

Ron D, Mochly-Rosen D. **Agonists and antagonists of protein kinase C function, derived from its binding proteins.** J Biol Chem. 1994 Aug 26;269(34):21395-8.

Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJ, Boeckeler K, Parker PJ. **PKC and the control of localized signal dynamics.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Feb;11(2):103-12.

Saulle E, Guerriero R, Petronelli A, Coppotelli E, Gabbianelli M, Morsilli O, Spinello I, Pelosi E, Castelli G, Testa U, Coppola S. **Autocrine role of angiotensins during megakaryocytic differentiation.** PLoS One. 2012;7(7):e39796.

Saurin AT, Brownlow N, Parker PJ. **Protein kinase C epsilon in cell division: control of abscission.** Cell Cycle. 2009 Feb 15;8(4):549-55.

- Scadden DT. **The stem-cell niche as an entity of action.** Nature. 2006 Jun 29;441(7097):1075-9.
- Schachtner H, Calaminus SD, Sinclair A, Monypenny J, Blundell MP, Leon C, Holyoake TL, Thrasher AJ, Michie AM, Vukovic M, Gachet C, Jones GE, Thomas SG, Watson SP, Machesky LM. **Megakaryocytes assemble podosomes that degrade matrix and protrude through basement membrane.** Blood 2013. 121:2542–2552.
- Schechtman D, Craske ML, Kheifets V, Meyer T, Schechtman J, Mochly-Rosen D. **A critical intramolecular interaction for protein kinase Cepsilon translocation.** J Biol Chem. 2004 Apr 16;279(16):15831-40.
- Schechtman D, Mochly-Rosen D. **Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction.** Oncogene. 2001 Oct 1;20(44):6339-47.
- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR. **JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis.** N Engl J Med. 2007 Feb 1;356(5):459-68.
- Selbie LA, Schmitz-Peiffer C, Sheng Y, Biden TJ. **Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells.** J Biol Chem. 1993 Nov 15;268(32):24296-302.
- Shaklai M, Tavassoli M. **Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: a membrane reorganization process.** J Ultrastruct Res. 1978 Mar;62(3):270-85.
- Shao X, Davletov BA, Sutton RB, Südhof TC, Rizo J. **Bipartite Ca²⁺-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C.** Science. 1996 Jul 12;273(5272):248-51.
- Shi Y, Wang C, Han S, Pang B, Zhang N, Wang J, Li J. **Determination of PKC isoform-specific protein expression in pulmonary arteries of rats with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension.** Med Sci Monit. 2012 Feb;18(2):BR69-75.
- Shirai Y, Kashiwagi K, Yagi K, Sakai N, Saito N. **Distinct effects of fatty acids on translocation of gamma- and epsilon-subspecies of protein kinase C.** J. Cell Biol. 1998 Oct 19;143(2):511-21.
- Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. **The distribution of colony-forming cells among spleen colonies.** J Cell Physiol. 1963 Dec;62:327-36

Small D, Levenstein M, Kim E, Carow C, Amin S, Rockwell P, Witte L, Burrow C, Ratajczak MZ, Gewirtz AM, et al. **STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jan 18;91(2):459-63.

Soh JW, Weinstein IB. **Roles of specific isoforms of protein kinase C in the transcriptional control of cyclin D1 and related genes.** J Biol Chem. 2003 Sep 5;278(36):34709-16.

Song S, Choi K, Ryu SW, Kang SW, Choi C. **TRAIL promotes caspase-dependent pro-inflammatory responses via PKC δ activation by vascular smooth muscle cells.** Cell Death Dis. 2011 Nov 3;2:e223.

Stankiewicz TR, Linseman DA. **Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration.** Front Cell Neurosci. 2014 Oct 7;8:314.

Steinberg SF. **Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta.** Biochem J. 2004 Dec 15;384(Pt 3):449-59.

Stempka L, Girod A, Müller HJ, Rincke G, Marks F, Gschwendt M, Bossemeyer D. **Phosphorylation of protein kinase Cdelta (PKCdelta) at threonine 505 is not a prerequisite for enzymatic activity. Expression of rat PKCdelta and an alanine 505 mutant in bacteria in a functional form.** J Biol Chem. 1997 Mar 7;272(10):6805-11.

Sun X, Budas GR, Xu L, Barreto GE, Mochly-Rosen D, Giffard RG. **Selective activation of protein kinase C ϵ in mitochondria is neuroprotective in vitro and reduces focal ischemic brain injury in mice.** J Neurosci Res. 2013 Jun;91(6):799-807.

Suzuki A, Shin JW, Wang Y, Min SH, Poncz M, Choi JK, Discher DE, Carpenter CL, Lian L, Zhao L, Wang Y, Abrams CS. **RhoA is essential for maintaining normal megakaryocyte ploidy and platelet generation.** PLoS One. 2013 Jul 23;8(7):e69315.

Symonds JM, Ohm AM, Carter CJ, Heasley LE, Boyle TA, Franklin WA, Reyland ME. **Protein kinase C δ is a downstream effector of oncogenic K-ras in lung tumors.** Cancer Res. 2011 Mar 15;71(6):2087-97.

Szallasi Z, Bogi K, Gohari S, Biro T, Acs P, Blumberg PM. **Non-equivalent roles for the first and second zinc fingers of protein kinase Cdelta. Effect of their mutation on phorbol ester-induced translocation in NIH 3T3 cells.** J Biol Chem. 1996 Aug 2;271(31):18299-301

Takahashi M, Mukai H, Oishi K, Isagawa T, Ono Y. **Association of immature hypophosphorylated protein kinase epsilon with an anchoring protein CG-NAP.** J Biol Chem. 2000 Nov 3;275(44):34592-6.

Takeishi Y, Ping P, Bolli R, Kirkpatrick DL, Hoit BD, Walsh RA. **Transgenic overexpression of constitutively active protein kinase C epsilon causes concentric cardiac hypertrophy.** Circ Res. 2000 Jun 23;86(12):1218-23.

Tan F, Ghosh S, Mbeunkui F, Thomas R, Weiner JA, Ofori-Acquah SF. **Essential role for ALCAM gene silencing in megakaryocytic differentiation of K562 cells.** BMC Mol Biol. 2010 Dec 2;11:91.

Thiele J. **Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disease.** Am J Clin Pathol. 2009 Aug;132(2):261-80

Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, Devine MT, Richardson JL, Ehrlicher A, Larson MK, Hoffmeister K, Hartwig JH, Italiano JE Jr. **Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release.** J Cell Biol. 2010 Nov 15;191(4):861-74.

Totoń E, Ignatowicz E, Skrzeczkowska K, Rybczyńska M. **Protein kinase C ϵ as a cancer marker and target for anticancer therapy.** Pharmacol Rep. 2011;63(1):19-29.

Ueffing M, Lovrić J, Philipp A, Mischak H, Kolch W. **Protein kinase C-epsilon associates with the Raf-1 kinase and induces the production of growth factors that stimulate Raf-1 activity.** Oncogene. 1997 Dec 11;15(24):2921-7.

Vanags DM, Orrenius S, Aguilar-Santelises M. **Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis.** Br J Haematol. 1997 Dec;99(4):824-31.

Vannucchi AM. **Management of myelofibrosis.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011;2011:222-30.

Villeval JL, Cohen-Solal K, Tulliez M, Giraudier S, Guichard J, Burstein SA, Cramer EM, Vainchenker W, Wendling F. **High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice.** Blood. 1997 Dec 1;90(11):4369-83.

Vincent S, Settleman J. **The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization.** Mol Cell Biol. 1997 Apr;17(4):2247-56.

Wadsworth P. **Cytokinesis: Rho marks the spot.** Curr Biol. 2005 Nov 8;15(21):R871-4.

- Wagner KU, Claudio E, Rucker EB 3rd, Riedlinger G, Broussard C, Schwartzberg PL, Siebenlist U, Hennighausen L. **Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly.** Development. 2000 Nov;127(22):4949-58.
- Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. **BID: a novel BH3 domain-only death agonist.** Genes Dev. 1996 Nov 15;10(22):2859-69.
- Wang QJ, Bhattacharyya D, Garfield S, Nacro K, Marquez VE, Blumberg PM. **Differential localization of protein kinase C delta by phorbol esters and related compounds using a fusion protein with green fluorescent protein.** J Biol Chem. 1999 Dec 24;274(52):37233-9.
- Watanabe G, Saito Y, Madaule P, Ishizaki T, Fujisawa K, Morii N, Mukai H, Ono Y, Kakizuka A, Narumiya S. **Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein raphilin as targets of small GTPase Rho.** Science. 1996 Feb 2;271(5249):645-8
- Watts TH. **Staying alive: T cell costimulation, CD28, and Bcl-xL.** J Immunol. 2010 Oct 1;185(7):3785-7.
- Weissman **Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution.** Cell. 2000 Jan 7;100(1):157-68.
- Williams DE, de Vries P, Namen AE, Widmer MB, Lyman SD. **The Steel factor.** Dev Biol. 1992 Jun;151(2):368-76.
- Xu TR, Rumsby MG. **Phorbol ester-induced translocation of PKC epsilon to the nucleus in fibroblasts: identification of nuclear PKC epsilon-associating proteins.** FEBS Lett. 2004 Jul 16;570(1-3):20-4.
- Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. **BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax.** Nature. 1994 May 26;369(6478):321-3.
- Zeidman R, Trollér U, Raghunath A, Pählman S, Larsson C. **Protein kinase C epsilon actin-binding site is important for neurite outgrowth during neuronal differentiation.** Mol Biol Cell. 2002 Jan;13(1):12-24.
- Zhang D, Anantharam V, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. **Neuroprotective effect of protein kinase C delta inhibitor rottlerin in cell culture and animal models of Parkinson's disease.** J Pharmacol Exp Ther. 2007 Sep;322(3):913-22.

Zhang N, Su Y, Xu L. **Targeting PKC ϵ by miR-143 regulates cell apoptosis in lung cancer.** FEBS Lett. 2013 Nov 15;587(22):3661-7.

Zhang Y, Conti MA, Malide D, Dong F, Wang A, Shmist YA, Liu C, Zerfas P, Daniels MP, Chan CC, Kozin E, Kachar B, Kelley MJ, Kopp JB, Adelstein RS. **Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A.** Blood. 2012 Jan 5;119(1):238-50.

Zhang Y, Wang Z, Ravid K. **The cell cycle in polyploid megakaryocytes is associated with reduced activity of cyclin B1-dependent cdc2 kinase.** J Biol Chem 1996. 271:4266–4272.