



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie Speciali

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI
INDIRIZZO: SCIENZE CARDIOVASCOLARI
CICLO XX

**STUDIO DELLA SINTESI DEL FATTORE V DELLA COAGULAZIONE
ATTRAVERSO IL MODELLO SPERIMENTALE DELLE COLTURE
MEGACARIOCITARIE ED IL MODELLO CLINICO DELLE
FAMIGLIE CON DEFICIT EREDITARIO DI FATTORE V**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Supervisore: Ch.mo Prof. Antonio Pagnan

Dottorando: Luca Spiezia

31 gennaio 2008

Riassunto

Introduzione. Il fattore V (FV) della coagulazione, nell'uomo, circola per circa l'80% nel plasma mentre, per il rimanente 20%, lo si ritrova in forma parzialmente attivata all'interno degli α -granuli delle piastrine (Plts). Il ruolo svolto dal FV all'interno delle Plts non è chiaro. Sappiamo infatti che, quando le Plts vengono attivate, il FV intrapiastrinico è rilasciato nel sito di danno e ciò presumibilmente incrementa la concentrazione locale di FV facilitando l'emostasi sito-specifica. Questa ipotesi non ha trovato, al momento, alcuna conferma sperimentale. Un altro interessante aspetto che non è stato ancora completamente compreso è l'origine del FV all'interno delle Plts. Il FV che circola nel plasma è sintetizzato dal fegato. Per quanto riguarda il FV all'interno delle Plts alcune evidenze sperimentali suggeriscono che questa proteina derivi dall'endocitosi del FV plasmatico da parte dei megacariociti (MKs) mentre altri autori hanno dimostrato la capacità, da parte dei MKs, di sintetizzare il FV che nelle fasi di maturazione verrebbe ceduto alle piastrine. Le ipotesi di lavoro più recenti riconoscono ai MKs la capacità di coordinare l'attivazione di un meccanismo (es. sintesi) rispetto all'altro (es. endocitosi) a seconda delle particolari condizioni in cui si trova la cellula o a seconda delle richieste dell'ambiente esterno. Tuttavia, questi processi di fine regolazione, forse su base recettoriale, rimangono ancora da identificare così come rimane ancora da chiarire il contributo di ciascuno dei due meccanismi (sintesi ed uptake plasmatico) alla formazione del pool di FV intrapiastrinico. Scopo del nostro studio è stato quello di chiarire l'origine del FV all'interno delle Plts utilizzando il "modello sperimentale" delle colture di MKs e di caratterizzare il ruolo svolto da questa proteina della coagulazione attraverso il "modello clinico" delle famiglie con deficit omozigote ed eterozigote di FV.

Materiali e metodi. Previo consenso informato, abbiamo prelevato 30 ml di sangue periferico da 5 soggetti sani e da 5 soggetti con difetto grave di FV. Abbiamo quindi isolato dalle cellule del sangue periferico i progenitori emopoietici circolanti e, utilizzando citochine specifiche

quali trombopoietina (TPO) e interleuchina 3 (IL3), abbiamo indotto la loro differenziazione in MKs. Con tecniche di immunistochemical ed immunofluorescenza abbiamo rilevato la presenza del FV all'interno del citoplasma dei MKs sia in condizioni basali sia aggiungendo al mezzo di coltura FV purificato. Nell'ambito del "modello clinico", previo consenso informato, abbiamo prelevato 20 ml di sangue periferico da 20 soggetti eterozigoti per il deficit di FV, da 55 loro familiari e da 5 familiari dei soggetti con difetto omozigote di FV. Nei gruppi di soggetti arruolati abbiamo determinato i livelli di FV nel plasma e nelle Plts, abbiamo inoltre identificato i soggetti portatori della mutazione del FV Leiden e dell'aplotipo HR2 del gene del FV e abbiamo studiato la possibile influenza di questi due fattori genetici sui livelli di FV.

Risultati. Al giorno +5, +8 e +10 dalla semina, sia nei pozzetti dove erano state seminate le cellule dei soggetti sani sia in quelli dove erano state seminate le cellule dei soggetti con deficit omozigote di FV, abbiamo evidenziato la presenza di elementi cellulari con caratteristiche morfologiche tipiche dei MKs. La positività di questi elementi per il CD41 ha confermato che si trattasse di MKs. Nei pozzetti contenenti MKs di donatori sani abbiamo osservato la capacità di queste stesse cellule di sintetizzare il FV. Abbiamo inoltre dimostrato l'assenza del FV nel citoplasma dei MKs ottenuti da soggetti con difetto omozigote di FV. Nei pozzetti contenenti MKs di soggetti con difetto omozigote di FV, in cui veniva aggiunto nel mezzo di coltura FV purificato, abbiamo osservato la presenza di questa proteina della coagulazione all'interno del citoplasma di queste cellule. Nel "modello clinico" abbiamo osservato che i soggetti con difetto eterozigote di FV avevano livelli di FV intrapiastrinico sovrapponibili ai familiari senza difetto. Inoltre, nella corte di familiari senza difetto, i livelli di FV nel plasma correlavano, in modo lineare, con i livelli di FV nelle Plts.

Discussione. Attraverso il "modello sperimentale" da noi proposto abbiamo dimostrato la capacità dei MKs, ottenuti partendo dal sangue periferico di soggetti sani, di sintetizzare il

FV. Abbiamo inoltre dimostrato l'incapacità dei MKs, ottenuti da soggetti con difetto omozigote di FV, di sintetizzare questa proteina della coagulazione. Aggiungendo FV purificato al mezzo di coltura nei MKs derivati da soggetti con difetto omozigote di FV abbiamo dimostrato, in maniera inequivocabile, la capacità di queste cellule di endocitare il FV. Nel "modello clinico" abbiamo identificato un trend di associazione tra i livelli di FV nel plasma e nelle Plts. Il numero esiguo di soggetti identificati all'interno della nostra popolazione, portatori della mutazione del FV Leiden o dell'aplotipo HR2 del gene del FV, non ci ha permesso di trarre conclusioni definitive circa il possibile ruolo svolto da questi fattori genetici nel modulare i livelli di FV nel plasma e nelle Plts.

Summary

Background. In humans, approximately 80% of the coagulation factor V (FV) circulates in plasma and the remainder is contained within the α -granules of platelets (Plts), in a partially activated form. The role of Plts FV is not clear. Its release at the site of injury, when Plts are activated, probably increases the local concentration of FV. This mechanism facilitates site-specific haemostasis. Plasma-derived FV is synthesized in the liver; however, the origin of platelet FV is still a matter of debate. Platelet-derived FV might originate from plasma through endocytosis or be synthesized by the precursor of platelets, the megakaryocytes (MKs). Although studies on isolated and cultured human MKs have provided evidence for both endogenous FV synthesis and secondary endocytosis of plasma FV, it is not clear in what proportion these two processes contribute to the platelet FV pool and what the mechanisms that regulate these processes are. To clarify the origin of Plts FV in humans and to evaluate the interactions between plasma and Plts FV we have developed an “experimental model” of human MKs cultures obtained from normal subjects and from severe (homozygous) FV deficient individuals and we studied a “clinical model” based on family bearing FV defect.

Materials and Methods. After informed consent we drew, from an antecubital vein, 30 ml of blood from 5 healthy subjects and from 5 severe (homozygous) FV deficient individuals. We isolated, from peripheral blood, the haematopoietic progenitor circulating cells that have been grown in a serum-free medium and have been induced to differentiate into the megakaryocytic lineage in the presence of thrombopoietin (TPO) plus interleukin 3 (IL3). With immunohistochemic and immunofluorescence techniques the presence of FV has been detected inside the cytoplasm of MKs at basal conditions and after supplementation of the culture medium with purified FV. As for the “clinical model”, after informed consent, we drew, from an antecubital vein, 20 ml of peripheral blood from 20 subjects with heterozygous

FV defect, from 55 relatives and 5 subjects with homozygous FV defect. In the group enrolled we determined FV plasma and intra-Plts levels, we have also identify FV Leiden mutation and HR2 aplotipe of FV gene and we have studied the possible influence of these genetic factors on plasma and intra-Plts FV levels.

Results. At day +5, +8, +10 from the seed, we obtained, *in vitro*, cellular elements with morphology analogous to MKs. The positive immunofluorescence test for CD41 confirmed our hypothesis that these cells were MKs. In the 5 healthy individuals we have demonstrated the presence of FV in the cytoplasm of MKs, while in the homozygous FV deficient individuals we have noted the absence of FV. Adding a note concentration of purified FV to the colture medium of Mks derived from homozygous FV defect subjects we observed the positive immunofluorescence test for FV. As for the “clinical model” we observed that subjects with heterozygous FV defect had intra-Plts FV levels similar to that of relatives without defect. Moreover in the relatives without defect, FV plasma levels correlated with intra-Plts.

Discussion. These findings are in agreement with previous observations and confirm that MKs, in healthy individuals, can synthesize FV. We have clarified conclusively that homozygous FV deficient individuals do not synthesize FV. For the first time we have demonstrated the capacity of Mks to endocyte FV when FV was added to the colture medium. In the “clinical model” we identified a trend of association between plasma and intra-Plts FV levels. The mild number od subjects, identified among our study population, bearing FV Leiden mutation and/or HR2 aplotipe of FV gene did not made any conclusion about the possible role of these genetic factor upon the regulation of plasma and intra-Plts FV levels.

INDICE

| | Pag. |
|---|------|
| Riassunto | 1 |
| Summary | 5 |
| Indice | 7 |
| 1. Introduzione | 9 |
| 1.1 Il fattore V (FV) | 9 |
| 1.2 Modello sperimentale: colture megacariocitarie | 12 |
| 1.3 Modello clinico: famiglie con difetto eterozigote ed omozigote del FV | 15 |
| 2. Materiali e Metodi | 17 |
| 2.1 Colture megacariocitarie | 17 |
| 2.2 Purificazione del fattore V | 19 |
| 2.3 Parametri coagulativi, FV plasmatico e FV intrapiastrinico | 21 |
| 3. Risultati | 25 |
| 3.1 Modello sperimentale: colture megacariocitarie | 25 |
| 3.2 Modello clinico: famiglie con difetto eterozigote ed omozigote del FV | 26 |
| 4. Discussione | 29 |
| 5. Bibliografia | 33 |
| 6. Tabelle e Figure | 39 |

1. INTRODUZIONE

1.1 Il Fattore V (FV)

Il FV della coagulazione, nella sua forma attivata (FVa), partecipa, insieme al fattore X attivato (FXa), al Ca^{++} e ai fosfolipidi di membrana, alla formazione della protrombinasi (1), complesso enzimatico preposto alla trasformazione della Protrombina o fattore II (FII) nella sua forma attivata denominata α -trombina (FIIa). Quest'ultima, a sua volta, è in grado di convertire il fibrinogeno in fibrina e quindi di iniziare la formazione delle maglie del "tappo emostatico" (2) [Figura 1]. L'azione del FVa è di tipo cofattoriale e si esplica attraverso due modalità: recettore per il FXa ed effetto catalitico del FXa sulle membrane e sulle superfici cellulari. Il FV svolge inoltre un ruolo chiave anche nei processi deputati ad inibire l'attivazione della cascata coagulativa; esso, infatti, è cofattore nell'attivazione della proteina C (PC) da parte del FIIa, contribuendo all'inattivazione del fattore VIII attivato (FVIIIa) da parte del complesso PC attivata (APC)/Proteina S (PS). Il FV nel plasma umano è presente ad una concentrazione di 20nM come pro-cofattore a singola catena con peso molecolare (PM) di 330 kD. La struttura del FV è omologa a quella del FVIII (3); entrambe queste proteine, infatti, condividono la medesima architettura a domini A1-A2-B-A3-C1-C2. Il gene per il FV è situato sul cromosoma 1q23 e contiene 25 esoni e 24 introni e il deficit di FV è trasmesso come carattere autosomico recessivo (4,5) [Figura 2 e 3]. Il FVa è una molecola composta da una struttura dimerica che comprende una catena pesante (domini A1-A2) con PM di 105 kD e una catena leggera (domini A3-C1-C2) con PM di 74/76 kD, associate tra loro in modo non-covalente attraverso legami Ca^{++} dipendenti (6). La presenza di due isoforme di FV, con peso molecolare rispettivamente di 74 e 76 kD, dipende da una differente glicosilazione dell'aminoacido Asn_{2181} del dominio C2, presente nel FVa_1 (76kD) e assente nel FVa_2 (74kD). La glicosilazione di Asn_{2181} è responsabile della diversa mobilità elettroforetica delle due isoforme. Il FV in circolo e nelle piastrine è composto per il 33% da FVa_1 e per il 67% da

FVa₂. Il FVa₁ rispetto al FVa₂ possiede una minore affinità per i fosfolipidi di membrana e di conseguenza il FVa₁ viene inattivato più lentamente dall'APC. In condizioni fisiologiche le due isoforme posseggono identica attività procoagulante; tuttavia il FVa₁, a causa di una sua più lenta disattivazione e della sua minore attività cofattoriale verso l'APC, si associa ad una trombogenicità più elevata rispetto al FVa₂ (7,8). L'attività del FVa è down-regolata dal complesso enzimatico APC che è in grado di clivare la catena pesante del FVa a livello di tre distinti residui aminoacidici di arginina situati in posizione 306, 506 e 679 [Figura 4]. Nel 1993, Dahlbäck et al. (9) osservarono che il plasma di alcuni soggetti affetti da trombosi venosa richiedeva concentrazioni di APC superiori ai controlli al fine di ottenere il medesimo prolungamento del tempo di coagulazione. Questa condizione, denominata resistenza alla PC attivata (APC resistance), fu identificata come singola mutazione puntiforme nel gene del FV a livello del nucleotide 1691, che determina la sostituzione aminoacidica dell'Arg506 in Glu, che è in grado di modificare il sito di clivaggio dell'APC rendendo il FV mutato (FV Leiden) resistente all'inattivazione da parte dell'APC (10) [Figura 5]. Un'altra causa di APC resistance è l'aplotipo HR2 del FV (11). Questo aplotipo si caratterizza per una serie di polimorfismi associati ad una moderata diminuzione dei livelli plasmatici di FV (12) e ad un aumentato rischio di trombosi venosa (13). Alterazioni nei meccanismi di attivazione del FV o la riduzione congenita e/o acquisita dei livelli di FV circolante comportano disordini coagulativi in senso emorragico (14) mentre alterazioni dei meccanismi di inattivazione del FVa da parte dell'APC comportano turbe della coagulazione in senso trombotico (15, 16).

Come descritto nel 1982 da Tracy et al. (17), circa l'80% del FV è presente nel plasma mentre il rimanente 20% lo si ritrova, in forma parzialmente attivata, all'interno degli α -granuli delle piastrine (Plts). L'importanza del FV intrapiastrinico è dimostrata sia dai pazienti affetti da un disordine emorragico ereditario (FV Quebec) in cui vi è un deficit di FV intrapiastrinico (18) sia da individui con inibitore plasmatico del FV, asintomatici per fenomeni emorragici, data

l'impossibilità dell'anticorpo di inibire la quantità di FV presente all'interno delle Plts (19). Ciononostante il ruolo del FV intrapiastrinico non è chiaro; sappiamo infatti che, quando le Plts vengono attivate, il FV è rilasciato al sito di danno e ciò presumibilmente incrementa la concentrazione locale di FV facilitando l'emostasi sito-specifica. Tuttavia questa ipotesi non ha trovato, al momento, alcuna conferma sperimentale. La frazione plasmatica del FV è sintetizzata nel fegato (20) mentre è ancora dibattuta l'origine del FV all'interno delle Plts. Poiché questi elementi circolanti, essendo privi di nucleo, possiedono una limitata capacità di biosintesi, il FV piastrinico potrebbe derivare dal plasma tramite meccanismi di endocitosi, come avviene per altre molecole quali fibrinogeno (21), albumina e IgG (22), oppure potrebbe essere sintetizzato dai megacariociti (MKs), cellule da cui originano le Plts, come ad esempio avviene per la proteina denominata "fattore piastrinico 4" (PF4) (23), il fattore di von Willebrand (VWF) (24) e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno tipo 1 (PAI-1) (25). Recenti studi su MKs, sia isolati che in coltura, hanno fornito evidenze sia sulla sintesi del FV da parte dei MKs (26) sia sull'endocitosi da parte dei MKs del FV plasmatico (27); non è pertanto ancora chiaro in che misura questi due meccanismi (sintesi e uptake plasmatico) concorrano a formare il pool intrapiastrinico.

1.2 Modello sperimentale: colture megacariocitarie.

Alcuni studi hanno evidenziato la capacità dei MKs di sintetizzare il FV; in particolare, Chiu et al. (28) hanno dimostrato che i MKs, isolati da maiali della Guinea, sono in grado di sintetizzare il FV incubando queste cellule con l'aminoacido radiomarcato [³⁵S]metionina. Le proteine intracellulari radiomarcate, sintetizzate dai MKs, venivano purificate attraverso una colonna di immunoaffinità e veniva quindi dimostrata la loro attività coagulante e la caratteristica di essere riconosciute da un anticorpo di coniglio anti-FV umano. Queste evidenze hanno inoltre confermato che il FV radiomarcato, prodotto dai MKs, era funzionalmente e antigenicamente intatto. Lo stesso gruppo di Autori (27), alcuni anni più tardi, utilizzando MKs derivati da midollo osseo umano e MKs ottenuti in coltura, ha dimostrato che questa popolazione cellulare era in grado sia di legare il FV sulla superficie esterna della propria membrana cellulare sia di sintetizzare questa proteina. Osservavano inoltre come la cellula sviluppasse prima la capacità di legare il FV e solo successivamente comparisse la capacità di sintesi e concludevano che i meccanismi studiati potessero essere espressione di gradi maturativi diversi della cellula. Hanno inoltre dimostrato, utilizzando tecniche di reverse-PCR, la presenza dell' mRNA del FV sia all'interno dei MKs sia all'interno delle Plts (29). Ciononostante, non è stato ancora completamente chiarito se il FV intrapiastrinico sia sintetizzato per intero dai MKs oppure se in parte non possa derivare dall'uptake del FV circolante nel plasma da parte dei MKs. Un modello peculiare per studiare *in vitro* l'origine del FV all'interno delle Plts è quello fornito da soggetti con genotipo wild-type o Leiden del FV che ricevono un trapianto di midollo osseo o un trapianto di fegato da soggetti con genotipo del FV rispettivamente Leiden o wild-type. La differenza che in questo modo si crea tra FV di derivazione midollare e FV di origine epatica permette di riconoscere il tipo e quindi l'organo di sintesi del FV che si ritrova all'interno delle Plts. Infatti in un paziente con genotipo wild-type del FV a cui viene trapiantato un fegato di un paziente con

genotipo Leiden, se all'interno delle Plts si trovasse FV Leiden si deve concludere che questo sia di sintesi epatica, e quindi immagazzinato all'interno degli α -granuli attraverso meccanismi di uptake, mentre se si trovasse FV con genotipo wild-type si deve concludere che questo sia stato sintetizzato dai MKs. Camire ed al. (27) hanno studiato due soggetti eterozigoti per la mutazione del FV Leiden che sono stati sottoposti rispettivamente ad un trapianto allogenico di midollo osseo e ad un trapianto allogenico di fegato da due donatori con genotipo wild-type del FV. L'analisi del FV intrapiastrinico del primo soggetto (sottoposto a trapianto di midollo) ha dimostrato la presenza, all'interno delle Plts, sia di FV wild-type sia di FV Leiden, osservazione questa congruente con l'ipotesi che parte del FV intrapiastrinico fosse derivata dalla sintesi del FV da parte dei MKs (FV Leiden) e parte dall'endocitosi del FV circolante nel plasma (FV wild-type). Nel secondo paziente, sottoposto a trapianto di fegato, la caratterizzazione molecolare del FV intrapiastrinico ha mostrato la presenza di FV wild-type concludendo che questo fosse di derivazione epatica. Questi risultati, che dimostrano in maniera indiretta l'origine epatica del FV all'interno delle Plts, forniscono quindi forti evidenze circa la capacità dei MKs di endocitare il FV dal plasma. Christella et al. (30) hanno studiato un paziente eterozigote per il FV Leiden sottoposto a trapiantato di midollo osseo, prelevato da una sorella omozigote per il FV wild-type, dimostrando, anche in questo caso, che il FV plasmatico all'interno delle Plts mostrava un fenotipo Leiden e concludendo, in accordo con Camire e coll., che il FV all'interno delle Plts originava dall'endocitosi, da parte dei MKs, del FV plasmatico. Gould et al. (31), in collaborazione col nostro gruppo di ricerca, hanno studiato un paziente omozigote per il FV Leiden che ha ricevuto un trapianto di fegato da un donatore omozigote wild-type per il FV. Nove mesi dopo il trapianto, l'analisi fenotipica del FV intrapiastrinico mostrava che quest'ultimo era interamente wild-type concludendo che il FV che si ritrovava all'interno delle Plts derivava completamente dall'endocitosi del FV plasmatico da parte dei MKs. Più

recentemente, Bouchard et al. (32) hanno dimostrato, utilizzando colture cellulari di MKs, che l'uptake del FV dal plasma da parte di queste cellule è una capacità che i MKs sviluppano nel corso della loro differenziazione e che è regolata da una proteina detta "clatrina" presente sulla superficie di membrana di queste cellule.

I MKs nell'uomo rappresentano lo 0.03% del totale delle cellule del midollo osseo e lo 0.001% delle cellule del sangue periferico (33). Le ricerche sui meccanismi che regolano l'origine del FV all'interno delle cellule sono sempre state limitate da problemi tecnici legati all'impossibilità di ottenere una popolazione di MKs relativamente pura e abbondante. La crescita e la differenziazione dei MKs sono processi complessi nei quali un'ampia varietà di segnali regolatori lavorano assieme per portare una risposta altamente specifica alla domanda trombopoietica. La produzione di un gran numero di MKs divenne possibile con l'identificazione ed il clonaggio della trombopoietina (TPO) (34, 35), citochina chiave nella regolazione della megacariopoiesi. Da allora sono stati sviluppati numerosi sistemi di coltura che permettono lo sviluppo di tutti gli stadi del MKs fino alla formazione delle Plts (36-38). Perfezionando le tecniche di coltura *in vitro* dei MKs, Suehiro e coll. (39) hanno recentemente dimostrato che i MKs sono in grado di endocitare ed immagazzinare il FV all'interno degli α -granuli delle Plts. In particolare, partendo da cellule staminali (CD34+) isolate da sangue di cordone ombelicale, questo gruppo di ricercatori ha fornito una prova diretta che i MKs umani sono in grado di endocitare il FV, sottoporlo ad una proteolisi parziale, complessarlo con una proteina detta MMRN1 e immagazzinarlo negli α -granuli delle Plts. Questi Autori hanno inoltre osservato che l'uptake del FV da parte dei MKs è proporzionale alla concentrazione del FV all'interno del mezzo di coltura.

Scopo di questa parte del nostro studio è stato quello di elaborare un modello di colture cellulari che, partendo da sangue periferico di soggetti sani e di soggetti con difetto omozigote di FV, potesse garantire la crescita e la differenziazione, *in vitro*, di una adeguata quantità di

MKs. Questo ci avrebbe permesso, mediante tecniche di immunofluorescenza, di determinare la capacità di questa linea cellulare di sintetizzare il FV e/o endocitare il FV quando aggiunto al mezzo di coltura.

1.3 Modello clinico: famiglie con difetto eterozigote ed omozigote del FV

Il difetto grave di FV fu descritto per la prima volta nel 1947 da Owren e coll. e fu denominato “paraemofilia” (40). Questo difetto autosomico recessivo, caratterizzato da livelli di FV antigene e attività estremamente ridotti, è responsabile di disordini emorragici con una prevalenza di 1 su 10⁶. L’espressione fenotipica della paraemofilia è variabile essendo spesso i soggetti eterozigoti asintomatici per eventi emorragici mentre gli individui omozigoti mostrano una diatesi emorragica con un range di gravità che va da moderato a severo (41). Il primo studio che ha messo in relazione una mutazione “non senso” del gene del FV con un grave deficit plasmatico di FV fu pubblicato nel 1994 (42). Da allora sono state descritte oltre 50 mutazioni associate ad una riduzione dei livelli plasmatici di FV (43) ma a tutt’oggi le basi molecolari di molti difetti di FV sono poco caratterizzate e, nonostante in letteratura vi siano numerose pubblicazioni che documentano il deficit plasmatico del FV, nessuno di questi studi ha preso in considerazione il deficit intrapiastrinico di FV (44).

Scopo di questa parte del nostro studio è stato quello di studiare la concentrazione di FV plasmatica e intrapiastrinica in 13 famiglie con deficit eterozigote di FV ed in 5 famiglie con deficit omozigote di FV. Abbiamo inoltre cercato di approfondire il possibile ruolo svolto da un particolare gruppo di polimorfismi del FV, denominati HR2, nel modulare la concentrazione intrapiastrinica di FV.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Colture megacariocitarie

Dopo consenso informato sono stati prelevati 27 ml di sangue da una vena antecubitale in una siringa preriempita con 3 ml di Na Citrato 105 mM, da 5 soggetti sani e da 5 soggetti omozigoti per il deficit di FV. Durante il prelievo la siringa veniva agitata lentamente così da mescolare in modo omogeneo sangue e anticoagulante. Tutti i passaggi descritti di seguito sono stati eseguiti sotto cappa biohazard a flusso laminare in completa sterilità. Il sangue intero prelevato veniva centrifugato a 1000 g per 10 minuti, senza freno, a 22°C in modo da separare il plasma ricco in piastrine (PRP) dalla componente cellulare. Il PRP, come descritto in seguito, veniva utilizzato per allestire il lisato piastrinico e quindi per valutare la concentrazione e le caratteristiche del FV all'interno degli α -granuli delle Plts. La componente cellulare, dopo essere stata isolata dal PRP per aspirazione di quest'ultimo, veniva diluita 1:3 in tampone salino fosfato (PBS) ed EDTA 50 mM e stratificata su 25 ml di Histopaque-1077 (Sigma Aldrich, Milano, Italy), centrifugata a 1800 g per 30 min, senza freno, a 22°C ottenendo la separazione di un "anello cellulare", composto da cellule mononucleate, che è stato aspirato, diluito con 20 ml di PBS-EDTA e centrifugato a 1300 g per 10 min con freno a 22°C. Questa procedura è stata ripetuta per 3 volte, sostituendo, nel terzo ciclo il reagente PBS-EDTA con PBS. Successivamente, le cellule ottenute dopo l'ultima centrifugazione, una volta aspirato il surnatante, venivano risospese in terreno di coltura (Iscove's modified Dulbecco's Medium [IMDM], Euroclone, Celbio, Milano, Italy) privo di siero (45,46), contaminate con Trypan Blue per verificare la vitalità delle cellule (Sigma Aldrich, Milano, Italy) e seminate (7×10^5 cellule/pozzetto) in piastre da 24 pozzetti contenenti ciascuno un vetrino precedentemente trattato con gelatina 2% (Sigma Aldrich, Milano). Il terreno di coltura veniva supplementato con glutamina (Gibco, Invitrogen Milano, Italy) 2 mM, penicillina (Gibco, Invitrogen Milano, Italy) 100 U/ml, streptomycin (Gibco,

Invitrogen Milano, Italy) 100 µg/ml e insulina (Sigma Aldrich, Milano Italy) 30 µg/ml. Le cellule venivano quindi fatte crescere in ambiente umido con 5% di CO₂ a 37°C ed il terreno veniva cambiato ogni 3 giorni. Per stimolare la differenziazione delle cellule mononucleate verso la filiera megacariocitaria venivano aggiunte, al terreno di coltura fin dal giorno della semina e successivamente ad ogni cambio di terreno di coltura trombopoietina (TPO, Pepro Thec EC, London, United Kingdom) 50 ng/ml e interleuchina 3 (IL3, Pepro Thec EC, London, United Kingdom) 10 ng/ml. In alcuni pozzetti, fin dal giorno della semina e successivamente ad ogni cambio di terreno, veniva aggiunto FV purificato (vedi oltre) alle concentrazioni di 1, 5, 10 e 20 µg/ml. I vetrini venivano quindi fissati con paraformaldeide (PF) al 2% al giorno +5, +8, +10 e +15 dalla semina. L'analisi morfologica è stata condotta sui vetrini fissati sia con microscopio ottico tipo Leica su preparati colorati con May-Grunwald Geimsa oppure ematossilina (Sigma Aldrich Milano, Italy) e con microscopio a fluorescenza tipo Leica DM 5000 (Leica, BM Medical, Padova Italy) usando il contrasto d'interferenza. L'analisi immunocitochimica per la rilevazione del FV all'interno dei preparati cellulari è stata condotta incubando i vetrini fissati con un anticorpo Sheep anti human FV (The Binding Site, Birmingham, England) diluito 1:100 e coniugato con horseradish peroxidase (HRP). Come controllo negativo abbiamo usato un anticorpo rabbit anti human PC, diluito 1:100 e coniugato con HRP, sapendo che questa proteina è assente nei megacariociti. Per eliminare il "rumore di fondo" generato dalle perossidasi endogene i vetrini venivano pretrattati con H₂O₂ al 30% in metanolo. La diluizione degli anticorpi veniva fatta in tampone trisma base contenente 150 mM di NaCl (TBS). Lo sviluppo degli anticorpi si otteneva, dopo aver lavato i vetrini con PBS dall'anticorpo in eccesso, con l'aggiunta di diaminobenzidina (DAB, Fluka, Milano Italy) e i preparati così ottenuti venivano osservati al microscopio ottico con contrasto di fase. L'analisi immunofluorimetrica è stata condotta sui vetrini fissati e trattati con NH₄Cl 50mM per 15 min, per eliminare l'eventuale

autofluorescenza, e con Triton 0.5% in PBS per altri 15 min, per permeabilizzare le membrane cellulari. Gli anticorpi primari utilizzati sono stati: a) anticorpo monoclonale mouse anti human CD41 (BioLegend, San Diego, CA) diluito 1:20 e b) anticorpo monoclonale mouse anti human FV-4156 (Haematologic Thecnologies Inc., USA) diluito 1:100. Come anticorpo secondario abbiamo utilizzato un goat anti mouse IgG (H+L) coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC, Chemicon International, Milano Italy) diluito 1:150. Prima di essere utilizzati, gli anticorpi sono stati diluiti in albumina di siero bovino (BSA) 0.5% in PBS. I vetrini sono stati incubati, con gli anticorpi primari e secondari, in ambiente umido per un'ora a 37°C. Come controllo negativo i vetrini sono stati incubati con le modalità sopra riportate col solo anticorpo secondario senza quello primario. Al termine di ciascun passaggio sopra descritto i vetrini venivano lavati con PBS per eliminare i reagenti in eccesso. Per evidenziare i nuclei delle cellule abbiamo utilizzato il reagente Hoechst 33258 alla concentrazione di 1.5 µg/ml in PBS (Sigma Aldrich, Milano Italy); dopo aver incubato i vetrini per 8 min a temperatura ambiente questi sono stati lavati con H₂O mQ e quindi montati con Mowiol (Sigma Aldrich, Milano Italy). Per l'analisi immunofluorimetrica abbiamo utilizzato un microscopio a fluorescenza tipo Leica DM5000. Il FITC emette fluorescenza verde alla lunghezza d'onda di 550-595 nm (luce eccitazione 490nm) e con il reagente Hoechst 33258 (intercalante del DNA) si possono osservare i nuclei con gli UV (eccitazione 350 nm) di colore blu (emissione 460nm).

2.2 Purificazione del FV

Abbiamo scongelato a bagnomaria (T 37°C) 2000 ml di plasma proveniente da donatori sani. Il plasma è stato preventivamente testato al fine di escludere la presenza di resistenza alla PC attivata (APC resistance test). Abbiamo aggiunto, per bloccare l'attivazione degli enzimi proteolitici endogeni, i seguenti reagenti (Sigma Aldrich, Milano Italy): Soybean trypsin

inhibitor (Cod.T-9003) 20µg/ml, Benzamidina (Cod.200/4) 10mM ed Eparina (Cod. H-3393) 1U/ml. Successivamente abbiamo aggiunto 80 ml/L di BaCl₂ 1M e posto la soluzione così ottenuta in un agitatore automatico per 10 min a 4°C. Al termine, è stato aggiunto del polietilenglicole (PEG) 50% fino ad ottenere una concentrazione finale nel plasma del 4%. Abbiamo quindi nuovamente messo la soluzione in un agitatore automatico per 20 minuti a 4°C. Al termine la soluzione è stata aliquotata in tubi da ultracentrifuga e centrifugata a 2640g per 20 minuti a 4°C (centrifuga: Becman J2-HS). Terminata la centrifuga, abbiamo raccolto il sovrantante e aggiunto PEG 50% fino ad ottenere una concentrazione finale del 10%. Abbiamo quindi nuovamente messo la soluzione in un agitatore automatico per 20 minuti a 4°C e, successivamente, ultracentrifugato a 6000g per 20 minuti a 4°C. Il pellet ottenuto dalla centrifugazione è stato dissolto con TRIS-BASE 20mM, NaCl 150mM a pH 7.4 (TBS) con aggiunta di Benzamidina 10mM, lasciandolo in camera fredda (4°C) su agitatore per 3 ore. Nella soluzione successivamente è stato aggiunto del pefabloc[®] SC in polvere (Sigma Aldrich, Milano Italy) in quantità tale da raggiungere una concentrazione finale di 1mM; la soluzione è stata quindi ultracentrifugata a 5520 g per 10 min a 4°C. Abbiamo raccolto il sovrantante in un cilindro e lo abbiamo caricato nella colonna preriempita con anticorpo anti-fattore V coniugato con Sepharose, ad una temperatura costante di 4°C. Dopo che tutta la soluzione è stata filtrata, la colonna è stata prima lavata con soluzione TBS e poi eluita con uso di alte concentrazioni di NaCl (Buffer di eluizione: Tris-base 20 mM, NaCl 1.8M, pH 7.4). Durante l'eluizione venivano raccolte aliquote del volume di circa 1.5 ml che venivano analizzate sia allo spettrofotometro (usando come "bianco" un volume di 1 ml del buffer di eluizione e come cut-off un'assorbanza di 0.08 a 280 nm) che con Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Milano Italy). Le aliquote con un'assorbanza inferiore a 280 nm venivano eliminate e, controllando anche con il protein assay test, venivano sono state scelte le concentrazioni più

alte di eluito. Al termine dell'eluizione la soluzione ottenuta è stata raccolta in un'unica provetta e posta in ghiaccio a 4°C.

Abbiamo infine filtrato l'eluito in una seconda colonna denominata G-protein column per eliminare le immunoglobuline eventualmente presenti nell'eluito.

Per ottenere FV puro si effettua una precipitazione con solfato d'ammonio. Nella soluzione si aggiungono 0.516 gr/ml di solfato d'ammonio e si lascia in agitatore automatico a 4°C, successivamente si ultracentrifuga a 10000g per 30 min. Il pellet viene risospeso in TBS e si effettua una dialisi con TBS (due volte per due ore ciascuna a temperatura ambiente). La proteina purificata viene aliquotata e conservata a -20°C. Nel nostro caso la concentrazione finale di FV è risultata essere di 5mg/ml. Per verificare che il FV purificato non fosse in forma attivata e corrispondesse al peso molecolare previsto, si è proceduto all'esecuzione di Western blot analysis del prodotto proteico concentrato, che ha consentito di confermare l'elevata integrità e purezza del FV.

2.3 Parametri coagulativi, FV plasmatico e FV intrapiastrinico.

Dopo consenso informato, 18 ml di sangue intero sono stati prelevati da una vena antecubitale in siringhe preriempite con 2 ml di Na citrato 105 mM, da 13 soggetti eterozigoti per il deficit di FV e da 45 loro familiari. Inoltre, oltre ai 5 soggetti con deficit omozigote del FV sopra riportati abbiamo arruolato anche 17 loro familiari. Durante il prelievo la siringa veniva agitata lentamente così da mescolare in modo omogeneo sangue e anticoagulante. Il sangue intero prelevato veniva centrifugato a 1000 g per 10 minuti, senza freno, a 22°C in modo da separare il plasma ricco in piastrine (PRP), dalla componente cellulare. Il PRP veniva aspirato e suddiviso in un'aliquota da 3 ml e almeno 10 aliquote da 1 ml ciascuna. Queste ultime venivano utilizzate per la preparazione del lisato piastrinico (vedi oltre) mentre l'aliquota di PRP da 3 ml veniva ulteriormente centrifugata a 3000 g per 15 minuti ottenendo plasma

povero di piastrine (PPP) utilizzato per la determinazione del tempo di protrombina (PT), del tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT) e dei livelli plasmatici di FV attività (FV:act) tramite un metodo automatico, secondo le specifiche del produttore (Behring Coagulation Timer instrument [BCT], DADE Behring, Germany) e dei livelli plasmatici di FV:Ag mediante metodo ELISA. Una piastra da 96 pozzetti veniva precedentemente trattata con un anticorpo policlonale contro il FV (The Binding Site, Birmingham, England) overnight a 4°C. Si preparava quindi una curva di calibrazione ottenuta diluendo un pool di plasma umano ed il plasma dei campioni in esame alle concentrazioni di 1:200 e 1:400 in tampone Tris-HCl 0.05M-NaCl 0.15M -EDTA5mM pH 7.5 e seminati 100 µl; la piastra veniva quindi incubata per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi con lo stesso tampone si seminava un secondo anticorpo umano contro il FV (Bioline, Giaveno, Italy) coniugato con perossidasi (HRP) e incubato per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi con il tampone le piastre venivano sviluppate con 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB, Sigma Aldrich Milano, Italy) e lette allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 450 nm.

Il Test dell'APC resistance veniva eseguito come indicato dalla ditta utilizzando lo strumento ACL 3000 (IL, Instruments Laboratories Milano, Italy). Il test si effettua per confronto tra un plasma di controllo e quello dei pazienti. Si usa una soluzione composta da CaCl₂ 67mM, APC 0.95 mg/ml (Enzyme Research Laboratories, USA) in tampone 20 mM Tris-HCl- 0.1M NaCl pH 7.4 e CephotestTM (Sentinel Diagnostics, Milano Italy).

Per l'estrazione del DNA, necessaria alla determinazione del genotipo del FV (wild type o Leiden) e dell'eventuale presenza del polimorfismo HR2 si procedeva come descritto. A 50 µl di sangue (componente cellulare) venivano aggiunti 400 µl di 10mM Tris-HCl pH 8.0 contenente 1mM EDTA e 0.5% NONIDET P-40 (Sigma Aldrich, Milano Italy) (TED); il sangue è stato quindi centrifugato per 5 minuti a 10000 g. Il pellet così ottenuto è stato

risospeso con 400 µl di TED e centrifugato nuovamente a 10000 g per 5 minuti. Dopo aver eliminato il surnatante sono stati aggiunti Triton X-100 0.1% e NaOH 0.4M. I campioni sono stati scaldati a 100°C per 3 minuti e poi è stato aggiunto 1M Tris-HCl pH 7.5. Il genotipo del FV Leiden è stato determinato con l'utilizzo dell'enzima di restrizione Mnl I su amplificato dell'esone 10 del gene del FV, le bande ottenute dopo taglio enzimatico sono state separate con elettroforesi su gel di agarosio al 2% secondo la tecnica "Restriction Length Polymorphism Fragments" (RFLP).

Per la preparazione del lisato piastrinico (47), venivano aggiunti, a ciascuna aliquota di PRP da 1 ml precedentemente preparata, 200 µl di PBS/EDTA 2.6%. La soluzione così ottenuta veniva quindi centrifugata a 10000 g per 45 secondi per ottenere un pellet piastrinico che veniva "lavato" 3 volte con PBS/EDTA 2.6% e risospeso in 200 µl di HEPES-Tyrode's. Abbiamo quindi proceduto alla conta delle Plts, mediante camera di Bürker, utilizzando una diluizione 1:100 del campione con Ossalato di Ammonio all' 1%. Le Plts sono quindi state risospese ad una concentrazione finale di $1 \times 10^6/\mu\text{l}$ in HEPES-Tyroide's 5 mmol/L, lisate con Triton X-100 al 10% e stoccate in aliquote con 5% vol/vol di glicerolo a -80 °C (44) per le successive analisi volte alla caratterizzazione del FV intrapiastrinico.

Lo studio della forma (FV/FVa) e del peso molecolare del FV plasmatico e intrapiastrinico veniva effettuato attraverso l'utilizzo della tecnica del Western blot su gel a gradiente 4-15% (FV intrapiastrinico) o 4-4% (FV plasmatico) di poliacrilamide (SDS-PAGE). La membrana utilizzata per il Western blot è l'Immobilon-P (Sigma Aldrich, Milano Italy) e l'anticorpo usato è sheep anti human FV coniugato con HRP (The Binding Site, Birmingham, England) diluito 1:500 in TBS. Lo sviluppo dell'anticorpo veniva effettuato con DAB o in chemiluminescenza. Per l'analisi in Western blot del FV plasmatico 100 µl di plasma vengono mescolati con 100 µl di resina sepharose coniugata con anti human FV e lasciato per 30 minuti in agitazione. Successivamente veniva centrifugato a 10000 g per 1 minuto ed

eliminato il surnatante. Dopo lavaggio in tampone TBS con aggiunta di CaCl_2 5mM si centrifuga a 10000 g per 1 minuto si eliminava il surnatante. La proteina legata all'anticorpo veniva staccata con una soluzione di glicina acida 0.1M pH 2.4 e poi centrifugata a 10000 g per 1 minuto. Al surnatante che contiene la proteina di interesse viene aggiunto Tris-HCl 1M pH 7.4 per bloccare l'azione della glicina acida.

3. RISULTATI

3.1 Modello Sperimentale: colture megacariocitarie

Nella Tabella I sono riportate le caratteristiche demografiche della popolazione studiata nell'ambito del modello sperimentale. Al giorno +5, +8, +10 e +15 dalla semina, sia nei pozzetti dove erano state seminate le cellule dei soggetti sani (controlli) sia in quelli dove erano state seminate le cellule dei soggetti con deficit omozigote del FV (casi), abbiamo evidenziato che circa il 40% degli elementi nucleati presenti nei pozzetti mostravano un nucleo poliploide e prolungamenti citoplasmatici, caratteristiche morfologiche peculiari delle cellule appartenenti alla filiera dei MKs [Figure 6-11]. La positività di queste cellule per il CD41 ha confermato la nostra ipotesi che questi elementi fossero MKs [Figure 12 e 13]. La valutazione immunofologica ha rilevato, nei controlli, una percentuale di cellule CD41+ del $80\pm 15\%$ e del $78\pm 22\%$ nei casi. Nelle cellule fissate dei soggetti sani abbiamo effettuato una colorazione con rabbit anti human PC coniugato con HRP e le cellule sono risultate negative, come ci aspettavamo, per la suddetta colorazione [Figura 14]. Nei pozzetti contenenti colture di MKs ottenute da soggetti sani abbiamo dimostrato, attraverso tecniche di immunofluorescenza, la positività del citoplasma di queste cellule quando cimentate con anticorpo primario mouse anti human FV e secondario goat anti mouse IgG coniugato con FITC, fin dal giorno +5 dalla semina [Figura 15]. Risultava positivo parte del citoplasma nella regione perinucleare con una colorazione grossolana; si osservava inoltre una positività puntiforme anche all'interno delle estroflessioni citoplasmatiche che protrudevano dal corpo dei MKs. Nei pozzetti che contenevano preparati cellulari fissati al giorno +8, +10 e +15 dalla semina abbiamo osservato la presenza di elementi di piccole dimensioni, birifrangenti al microscopio ottico anch'essi positivi all'immunofluorescenza per il FV. Nei pozzetti contenenti MKs di soggetti con difetto omozigote di FV abbiamo osservato la completa assenza di fluorescenza [Figura 16]. Nei vetrini contenenti MKs di soggetti con difetto omozigote di FV in cui veniva aggiunta, nel

mezzo di coltura, una concentrazione di 5 µg/ml di FV purificato si osservava la progressiva comparsa di fluorescenza all'interno del citoplasma di queste cellule già dal giorno +5 dalla semina [Figura 17]. L'aggiunta di FV purificato, alla concentrazione di 5 µg/ml, alle colture cellulari di soggetti sani non influiva in alcun modo sulla crescita e/o sulla differenziazione cellulare delle cellule in coltura. Inoltre non abbiamo evidenziato nessuna differenza né tra le colture di MKs ottenute dai diversi soggetti con difetto omozigote del FV, arruolati nello studio.

3.2 Modello Clinico: famiglie con difetto eterozigote ed omozigote del FV

Nella Tabella II sono riportate le caratteristiche demografiche e i parametri coagulativi dei soggetti con difetto omozigote ed eterozigote di FV e dei loro familiari arruolati nello studio. Nei soggetti con difetto omozigote di FV la concentrazione di questa proteina della coagulazione sia nel plasma che all'interno delle Plts è praticamente trascurabile (FV:Ag $5\pm 2\%$; FV:ag intra-Plts $2\pm 1\%$). Per quanto riguarda i soggetti eterozigoti questi presentavano livelli di FV:ag plasmatici ridotti ($61\pm 16\%$) in maniera statisticamente significativa rispetto ai soggetti wild type ($102\pm 25\%$, T-student test $p < .001$). Analizzando i livelli di FV:ag all'interno delle Plts non abbiamo trovato alcuna differenza statisticamente significativa tra i livelli di FV intrapiastrinico (FV:ag intra-Plt $45\pm 18\%$) dei soggetti con deficit eterozigote di FV se confrontati con i familiari non portatori del difetto (FV:ag intra-Plt $52\pm 20\%$; T-student test, p value 0.132). Analisi del FV plasmatico e intrapiastrinico in Western blot evidenziano l'assenza della banda relativa al peso molecolare del FV nei soggetti con difetto omozigote di questo fattore della coagulazione. Nei soggetti sani il FV del plasma si presentava come unica banda da 330kD invece il FV intrapiastrinico si osservava essere formato da tre bande di peso molecolare 105kD (catena pesante) e 74/76 kD (catene leggere) [Figure 18 e 19]. Abbiamo osservato, valutando nell'insieme sia i soggetti wild type sia i familiari con difetto eterozigote

di FV, un trend di associazione tra i livelli di FV plasmatico ed i livelli di FV intrapiastrinico. In particolare nei soggetti che mostravano livelli plasmatici di FV più elevati si osservavano livelli di FV intrapiastrinico più alti. Purtroppo tale correlazione non raggiungeva una significatività statistica [Figura 20. Panel A]. Prendendo in esame distintamente due sottogruppi di soggetti, quelli portatori della mutazione del FV Leiden (n soggetti 12) e quelli portatori dell'aplotipo HR2 (n soggetti 16) non abbiamo osservato nessuna differenza statisticamente significativa né nei livelli plasmatici di FV né nei livelli di FV intrapiastrinico rispetto ai familiari con FV wild-tipe e/o con aplotipo HR1. Si conferma, purtroppo, anche nel sottogruppo di soggetti portatori dell'aplotipo HR2, un relazione lineare, seppur non statisticamente significativa, tra i livelli di FV plasmatici e i valori di FV intrapiastrinico [Figura 20. Panel B]. In particolare soggetti con livelli più elevati di FV plasmatico mostrano livelli più alti anche di FV intrapiastrinico.

4. DISCUSSIONE

Attraverso il modello sperimentale delle colture di MKs ed il modello clinico, costituito dalle famiglie con difetto omozigote ed eterozigote per il FV, il nostro studio ha chiarito in modo inequivocabile l'origine del FV all'interno degli α -granuli delle piastrine.

Per quanto riguarda la parte del progetto che ha sviluppato le colture di MKs è stato necessario, all'inizio, elaborare dei modelli che, partendo da sangue periferico, potessero produrre un numero adeguato di Mks. Abbiamo avuto inoltre la necessità che il modello di colture cellulari fosse tale per cui le cellule crescessero in adesione e che il mezzo di coltura utilizzato fosse privo di siero contenendo quest'ultimo FV in tracce. Una volta ottimizzata la crescita in vitro e la differenziazione di queste cellule, soprattutto attraverso l'utilizzo di citochine "lineage" specifiche, in particolare TPO e IL3, abbiamo arruolato come donatori (casi) pazienti noti al nostro centro perché affetti da deficit omozigote di FV (soggetti paraemofiliaci). Il minor numero di cellule polinucleate all'interno della coltura evidenziate al microscopio ottico rispetto al più elevato numero di elementi cellulari appartenenti alla filiera megacariocitaria, evidenziati perché positivi all'immunofluorescenza all'anticorpo CD41, ha confermato, così come già descritto in letteratura, la presenza nelle nostre colture di una duplice popolazione di Mks. Una più giovane costituita dalle cellule mononucleate e una più matura costituita dalle cellule polinucleate. Attraverso tecniche di immunofluorescenza abbiamo dimostrato la capacità dei MKs, ottenuti da soggetti senza difetto, di sintetizzare il FV. Un dato molto interessante è stato osservare la presenza di fluorescenza anche all'interno delle piastrine prodotte in coltura dai MKs. Parallelamente, l'assenza di fluorescenza nelle colture cellulari ottenute da soggetti con difetto grave di FV ci ha fatto concludere circa l'incapacità dei MKs di questi soggetti di sintetizzare il FV. Per studiare la possibilità che i MKs dei casi potessero endocitare il FV dall'esterno, abbiamo aggiunto al mezzo di coltura una quantità nota di FV umano precedentemente purificato. Attraverso tecniche di

immunofluorescenza, abbiamo dimostrato la presenza del FV, all'interno del citoplasma dei MKs fin dal giorno +5 dalla semina. Il modello di studio da noi proposto è, a nostra conoscenza, il più innovativo tra quelli descritti in letteratura per dimostrare l'origine del FV all'interno delle Plts. Attraverso il lavoro svolto in questi anni siamo riusciti a chiarire in maniera inequivocabile la capacità propria dei MKs sia di sintetizzare, sia di endocitare il FV. L'ipotesi più probabile, in accordo con le esperienze riportate in letteratura da altri Autori, è quella che uno dei due meccanismi, probabilmente quello dell'endocitosi, attraverso una fine regolazione mediata da recettori di superficie e secondi messaggeri, possa prevalere sul meccanismo di sintesi. La cellula potrebbe avere la facoltà di attivare alternativamente l'una o l'altra via a seconda delle proprie condizioni e degli stimoli che le giungono dall'ambiente esterno. Il futuro delle ricerche in questo ambito sarà finalizzato allo studio e all'identificazione dei meccanismi che guidano la cellula ad attivare preferenzialmente l'uno o l'altro dei due meccanismi (ad esempio inibizione della sintesi del FV da parte dei MKs, mediata da un sistema recettoriale di superficie, qualora siano presenti "adeguate" concentrazioni di FV nel mezzo di coltura/plasma oppure stimolo alla sintesi da parte dei MKs in caso di "insufficienti" concentrazioni di questa proteina in coltura/plasma). Il fatto che il modello clinico abbia evidenziato un trend di associazione tra la concentrazione di FV nel plasma e all'interno degli α -granuli piastrinici rafforza l'idea che questi due compartimenti non siano "a tenuta stagna" ma quanto piuttosto possa intercorrere tra loro un intenso dialogo. Il numero esiguo dei pazienti portatori della mutazione del FV Leiden e dell'aplotipo HR2 del FV non ci ha permesso di trarre conclusioni certe circa il possibile ruolo svolto da questi determinanti genetici nella regolazione della concentrazione plasmatica e/o intrapiastrinica del FV. Il numero differente di bante all'analisi biochimica tra FV di derivazione plasmatica e FV di derivazione intrapiastrinica nei soggetti sani conferma che questo fattore nelle piastrine è parzialmente proteolizzato.

Per quanto riguarda i soggetti con deficit grave (omozigote) di FV (paraemofilici) il risultato dei nostri esperimenti potrebbe avere un'importante applicazione in terapia. In particolare nella profilassi dei sanguinamenti dei soggetti affetti da "paraemofilia". Attualmente la terapia degli eventi emorragici che caratterizzano la storia naturale di questi pazienti viene praticata "on demand" ovvero attraverso l'infusione di plasma fresco concentrato (PFC) in occasione dell'episodio emorragico acuto. La necessità dell'utilizzo di PFC è data dall'indisponibilità di concentrati di FV, così come avviene per l'emofilia A e l'emofilia B. Il modello che abbiamo validato "in vitro" permetterebbe di "caricare" le piastrine dei soggetti con difetto omozigote di FV sottoponendo questi soggetti, ad esempio prima di sottoporsi ad una procedura chirurgica a trasfusioni con PFC. Il FV, somministrato attraverso il PFC verrebbe endocitato da MKs e quindi ceduto alle piastrine ricostituendo così adeguati livelli di FV all'interno degli α -granuli delle piastrine. Il FV sarebbe così prontamente disponibile per attivare la coagulazione nelle sedi di danno vascolare.

5. BIBLIOGRAFIA

- 1) Mann KG, Nesheim ME, Hibbard LS, Tracy PB. The role of factor V in the assembly of the prothrombinase complex. *Ann N Y Acad Sci.* 1981; 370:378-388.
- 2) Dahlback B. Blood coagulation. *Lancet.* 2000; 355:1627-1632.
- 3) Kane WH, Davie EW. Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood.* 1988; 71:539-555.
- 4) Cripe LD, Moore KD, Kane WH. Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry.* 1992; 31:3777-3785.
- 5) Duga S, Asselta R, Tenchini ML. Coagulation factor V. *IJBCB* 2004; 36:1393-1399.
- 6) Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood.* 2003; 101:20-30.
- 7) Rosing J, Bakker HM, Christella ML, Thomassen MC, Hemker HC, Tans G. Characterization of Two Forms of Human Factor Va with Different Cofactor Activities. *J Biol Chem* 1993; 268:21130-6.
- 8) Kim SW, Ortel TL, Quinn-Allen MA, Yoo L, Worfolk L, Zhai X, Lentz BR, Kane WH. Partial Glycosylation at Asparagine-2181 of the Second C-Type Domain of Human Factor V Modulates Assembly of the Prothrombinase Complex. *Biochemistry* 1999; 38:11448-54
- 9) Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:1004-1008.
- 10) Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994; 369:64-67.

- 11) Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E, Lunghi B, Castaman G, Sacchi E, Mannucci PM. A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood*. 1997; 90:1552-1557.
- 12) Faioni EM, Castaman G, Asti D, Lussana F, Rodighiero F. Association of factor V deficiency with factor V HR2. *Haematologica*. 2004; 89:195-200.
- 13) Castaman G, Faioni EM, Tosetto A, Bernardi F. The factor V HR2 haplotype and the risk of venous thrombosis: a meta-analysis. *Haematologica*. 2003;88:1182-9.
- 14) Asselta R, Tenchini ML, Guga S. Inherited defects of coagulation factor V: the hemorrhagic side. *J Thromb Haemost*. 2006; 4:26-34.
- 15) Segers K, Dahlback B, Nicolaes GAF. Coagulation factor V and thrombophilia: Background and mechanisms. *Thromb Haemost*. 2007; 98:530-542.
- 16) Kalafatis M. Coagulation factor V: a plethora of anticoagulant molecules. *Curr Opin Hematol*. 2005; 12:141-8.
- 17) Tracy PB, Eide LL, Bowie EJW, Mann KG: Radioimmunoassay of FV in human plasma and platelets. *Blood*. 1982; 60:59-63.
- 18) Tracy PB, Giles AR, Mann KG, Eide LL, Hoogendoorn H, Rivard GE. Factor V (Quebec): a bleeding diathesis associated with a qualitative platelet Factor V deficiency. *J Clin Invest*. 1984; 74:1221-1228
- 19) Nesheim ME, Nichols WL, Cole TL, Houston JG, Schenk RB, Mann KB, Bowie EJW. Isolation and study of an acquired inhibitor of human coagulation factor V. *J Clin Invest*. 1986; 77:405-415.
- 20) Mazzorana M, Baffet G, Kneip B, Launois B, Guillouzo-Guguen C. Expression of coagulation factor V gene by normal adult Human hepatocytes in primary culture. *Br J Haematol*. 1991; 78:229-235.

- 21) Louache F, Debili N, Cramer E, Breton-Gorius J, Vainchenker W. Fibrinogen is not synthesized by human megakaryocytes. *Blood* 1991; 77:311-16.
- 22) Handagama PJ, Shuman MA, Bainton DF. Incorporation of intravenously injected albumin, immunoglobulin G, and fibrinogen in guinea pig megakaryocyte granules. *J Clin Invest* 1989; 84:73-82.
- 23) George JN, Nurden AT, Phillips DR. Molecular defects in interactions of platelets with the vessel wall. *N Engl J Med.* 1984;311:1084-98.
- 24) Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, Wagner DD. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes *J Clin Invest* 1985; 76:1102-06.
- 25) Konkle BA, Schick PK, He X, Liu RJ, Mazur EM. Plasminogen activator inhibitor-1 mRNA is expressed in platelets and megakaryocytes and the megakaryoblastic cell line CHRF-288. *Arterioscler Thromb.* 1993; 13:669-74.
- 26) Gewirtz AM, Keefer M, Doshi K, Annamalai AE, Chiu HC, Colman RW. Biology of human megakaryocyte factor V. *Blood* 1986; 67:1639-48.
- 27) Camire RM, Pollak ES, Kaushansky K, Tracy PB. Secretable human platelet-derived factor V originates from the plasma pool. *Blood.* 1998; 92:3035-3041.
- 28) Chiu HC, Schick PK, Colman RW. Biosynthesis of factor V in isolated guinea pig megakaryocytes. *J Clin Invest.* 1985; 75:339-346.
- 29) Gewirtz AM, Shapiro C, Shen YM, Boyd R, Colman RW. Cellular and molecular regulation of factor V expression in human megakaryocytes. *J Cell Physiol.* 1992; 153:277-287.
- 30) Christella M, Thomassen LG, Castoldi E, Tans G, Magdeleyns EJ, Delaunoit C, Debusscher L, Van Assche KJ, Rosing J. Endogenous factor V synthesis in megakaryocytes contributes negligibly to the platelet factor V pool. *Haematologica.* 2003; 88:1150-1156.

- 31) Gould WR, Simioni P, Silveira JR, Tormene D, Kalafatis M, Tracy PB. Megakaryocytes endocytose and subsequently modify human factor V in vivo to form the entire pool of a unique platelet-derived cofactor. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:450-456.
- 32) Bouchard BA, Williams JL, Meisler NT, Long MW, Tracy PB. Endocytosis of plasma-derived factor V by megakaryocytes occurs via a clathrin-dependent, specific membrane binding event. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:541-551.
- 33) Lee GR, Bithell TC, Foerester J, Athens JW, Lukens JN (eds). *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia, PA, Lea & Febiger, 1993.
- 34) De Sauvage FJ, Hass PE, Spence SD, Malloy BE, Gurney AL et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994; 369:533-8.
- 35) Wendling F, Maraskovsky E, Debili N, Florindo C, Teepe M, Titeux M, Methia N et al. cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* 1994; 369:571-4.
- 36) Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature*. 1994; 369:568-71.
- 37) Williams JL, Pipia GG, Datta NS, Long MW. Thrombopoietin requires additional megakaryocyte-active cytokines for optimal ex vivo expansion of megakaryocyte precursor cells. *Blood*. 1998 Jun 1;91(11):4118-26.
- 38) Majka M, Baj-Krzyworzeka M, Kijowski J, Reza R, Ratajczak J, Ratajczak MZ. In vitro expansion of human megakaryocytes as a tool for studying megakaryocytic development and function. *Platelets*. 2001; 12:325-32.
- 39) Suehiro Y, Veljkovic DK, Fuller N, Motomura Y, Masse JM, Cramer EM, Hayward. Endocytosis and storage of plasma factor V by human megakaryocytes. *Thromb Haemost.* 2005; 94:585-592.

- 40) Owren PA. Parahemophilia, hemorrhagic diathesis due to the absence of a previously recognized clotting factor. *Lancet*. 1977; 1:446-448.
- 41) Peyvandi F, Mannucci PM. Rare coagulation disorders. *Thromb Haemost*. 1999; 82:1207-1214.
- 42) Murray JM, Rand MD, Egan JO, Murphy S, Kim HC, Mann KG. Factor V New Brunswick: Ala221-to-Val substitution results in reduced cofactor activity. *Blood*. 1995; 86:1820-1827.
- 43) Vos HL. An online database of mutations and polymorphisms in and around the coagulation factor V gene. *J Thromb Haemost*. 2007;5:185-8.
- 44) Tracy PB, Mann KG. Abnormal formation of the prothrombinase complex: Factor V deficiency and related disorders. *Hum Pathol*. 1987; 18:162-169.
- 45) Guerriero R, Testa U, Gabbianelli M, et al. Unilineage megakaryocytic proliferation and differentiation of purified hematopoietic progenitors in serum-free liquid culture. *Blood*. 1995; 86:3725-3736.
- 46) Ivanovic Z, Duchez P, Dazey B, Hermitte F, Lamrissi-Garcia I, Mazurier F, et al. A clinical-scale expansion of mobilized CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells by use of a new serum-free medium. *Transfusion*. 2006; 46:126-131.
- 47) Viskup RW, Tracy PB, Mann KG. The isolation of human platelet factor V. *Blood*. 1987; 69:1188-95.

TABELLE

E

FIGURE