



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

## **DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE**

### **PRESENTAZIONE DEI CANDIDATI ALL'ESAME FINALE XXVII CICLO**

#### **Dott.ssa Flavia Temperilli**

La Dott.ssa Flavia Temperilli, durante il corso di Dottorato in Medicina Sperimentale, ha svolto la sua attività di ricerca presso i laboratori del Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma, sotto la direzione del Prof. Fabio Pulcinelli, e presso i laboratori del Sol Sherry Thrombosis Research Center, Temple University School of Medicine, Philadelphia, PA, USA, sotto la supervisione del Dr. Rao Koneti.

Nel corso del Dottorato la Dott.ssa Temperilli si è occupata di valutare se i pazienti in trattamento cronico con Aspirina presentassero livelli di espressione di MRP4 aumentati, e di correlare tali livelli di espressione con la funzionalità piastrinica.

E' noto che ogni giorno milioni di persone assumono basse dosi di Aspirina per prevenire le complicanze aterosclerotiche di malattie cardiovascolari come infarto del miocardio e cerebrale. L'Aspirina (ASA), oltre ad un'azione anti-infiammatoria, esercita un'azione anti-trombotica attraverso l'inibizione della ciclossigenasi 1 (COX-1), enzima coinvolto nella produzione di un agonista piastrinico, il trombossano A2 (TXA2). Tuttavia, diversi studi hanno riportato che l'Aspirina non esercita un'azione antiaggregante piastrinica uguale in tutti i soggetti e in circa un terzo dei pazienti trattati si verifica una ridotta inibizione della funzione piastrinica, che è associata ad un aumentato rischio di eventi cardiovascolari.

Molto recentemente, il gruppo nel quale la Dott.ssa Temperilli ha preparato la sua tesi di Dottorato, ha dimostrato un nuovo meccanismo, finora sconosciuto, che potrebbe spiegare la ridotta inibizione dell'attività piastrinica. E' stato osservato che l'up-regolazione di MRP4, trasportatore unidirezionale di anioni organici presente sulla membrana plasmatica delle piastrine, aumenta il trasporto attivo dell'Aspirina dal citosol all'esterno della cellula, con conseguente riduzione della sua disponibilità ad acetilare la COX-1. MRP4 appartiene alla sottofamiglia MRPs dei trasportatori ATP-binding cassette, che mostrano un aumento dell'espressione dopo esposizione a farmaci e sono coinvolte in meccanismi di resistenza ai farmaci. Nel laboratorio in cui la Dott.ssa Temperilli ha lavorato durante il suo periodo di formazione del Dottorato di Ricerca, è stato dimostrato che è l'Aspirina stessa a determinare overespressione di MRP4. Infatti, è stato visto che il trattamento con Aspirina in vitro aumenta

l'espressione di MRP4 sia in una linea di cellule megacarioblastiche (DAMI), sia in progenitori megacariocitari umani cresciuti in presenza di Aspirina e nelle piastrine da essi derivate. Inoltre, in una popolazione di volontari sani, che avevano assunto Aspirina 300mg/die per 15 giorni, è stato trovato un aumento dell'espressione di MRP4 nelle piastrine al quindicesimo giorno di trattamento, rispetto alle piastrine al primo giorno di trattamento. Questo meccanismo potrebbe rappresentare una risposta adattativa della cellula allo stress tossico indotto dal farmaco.

Nello stesso lavoro è stato dimostrato anche che l'Aspirina induce un aumento dell'espressione di MRP4, attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione PPAR-alfa. Infatti, cellule DAMI, trattate con Aspirina e con un agonista di PPAR-alfa (WY1464325), hanno mostrato aumentati livelli sia dell'mRNA di MRP4 che dell'mRNA di PPAR-alfa, rispetto alle cellule non trattate. Cellule DAMI trasfettate con una RNAsi specifica per PPAR-alfa (PPAR-si) non hanno mostrato un significativo aumento né dell'mRNA né dell'espressione proteica di PPAR-alfa dopo trattamento con Aspirina e WY1464325; mentre le cellule trattate con un siRNA non specifico (Control-si) hanno mostrato un aumento di espressione indotto da Aspirina e WY simile a quello delle cellule di controllo non trasfettate. La Dott.ssa Temperilli ha valutato per prima cosa se anche nei volontari sani il trattamento con Aspirina a basse dosi fosse sufficiente a determinare over-espressione di MRP4. A tale scopo, è stato arruolato un gruppo di 15 volontari sani che hanno assunto Aspirina 100mg/die per 8 settimane. È stato analizzato l'mRNA di MRP4 una volta a settimana durante tutta la durata del trattamento, ed è stato trovato un significativo aumento di mRNA-MRP4 alla settima e ottava settimana di trattamento, rispetto al primo giorno di trattamento. Successivamente, sono stati studiati i pazienti in trattamento cronico con Aspirina 100/mg die. I pazienti sono stati suddivisi in 3 popolazioni: 1 popolazione che assumeva Aspirina da meno di 1 mese (N=50), una popolazione di pazienti in trattamento cronico con Aspirina da più di 2 mesi (N=150) e una popolazione di volontari sani (N=150). I risultati ottenuti hanno dimostrato che nei pazienti in trattamento cronico con Aspirina 100/mg die da più di 2 mesi, è presente un aumento significativo della espressione di MRP4, rispetto ai pazienti che assumevano il farmaco da meno di un mese, e rispetto ai volontari sani. Recentemente è stato dimostrato che l'inibizione del trasporto mediato da MRP4 riduce la funzionalità piastrinica e conseguentemente la formazione di un trombo, perciò è stato ipotizzato che le piastrine che hanno over-espressione di MRP4 siano iper-responsive. La popolazione in trattamento cronico con aspirina da più di 3 mesi è stata suddivisa in quartili in base ai livelli di mRNA-MRP4, ed è stato riscontrato che la popolazione che apparteneva al IV quartile (N=40) aveva le percentuali di aggregazione piastrinica indotta sia da ADP (2 microM) che da collagene (2 microg/ml), statisticamente più elevate rispetto alle popolazioni appartenenti ai primi 3 quartili (N=110). Tali risultati confermano l'ipotesi che i pazienti in trattamento cronico con Aspirina con elevati livelli di MRP4 presentano più elevata reattività piastrinica.

Per quanto riguarda il meccanismo di azione dell'Aspirina sul recettore nucleare PPAR-alfa, in letteratura è riportato che PPAR-alfa può essere attivato dall'Acido Arachidonico o dai suoi metaboliti, Leucotriene B4 e 20-HETE, e perciò è verosimile che in sistemi cellulari dove la COX-1 sia farmacologicamente inibita, sia favorita l'attivazione delle vie metaboliche in cui sono coinvolti gli enzimi insensibili all'Aspirina, quali Lipossigenasi e Citocromo P450, che producono Leucotriene B4 e 20-HETE, con un aumento delle loro concentrazioni citosoliche. Quindi, per verificare che l'aumento delle concentrazioni citosoliche di Acido Arachidonico e dei suoi metaboliti, COX-1 indipendenti, determini l'aumento dell'attività di PPAR-alfa, sono stati valutati anche altri farmaci antinfiammatori in grado di inibire gli enzimi COX-1 e COX-2. Tali esperimenti sono stati condotti sia in vitro che in vivo. Il trattamento delle cellule DAMI con inibitori selettivi della COX-2 (Celecoxib) e farmaci antinfiammatori non steroidei tradizionali (FANS) (Diclofenac e Naprossene), ha determinato un aumento dell'espressione di MRP4 rispetto alle cellule di controllo, che erano state trattate con il solo solvente (DMSO). Per valutare eventuali effetti di questi farmaci sull'espressione della proteina in vivo, sono stati studiati pazienti con Osteoartrosi (OA). L'OA è una patologia degenerativa cronica che colpisce le cartilagini

articolari e tradizionalmente è classificata come un'artrite non infiammatoria. Sono stati selezionati questi pazienti perchè "consumatori abituali di FANS", sono cioè pazienti che assumono regolarmente antinfiammatori da banco, anche senza prescrizione medica, per via dei dolori reumatici muscolo-scheletrici. Sono stati considerati "consumatori abituali" i pazienti che avevano assunto antinfiammatori almeno 2 volte a settimana per 4 settimane consecutive. E' stato riscontrato un significativo aumento sia dell'espressione proteica che dell'mRNA di MRP4 nei pazienti affetti da OA rispetto a volontari sani, che ha confermato i risultati ottenuti in vitro. Questi dati hanno mostrato un aumento di MRP4 sia in vivo che in vitro indotto da FANS. L'espressione di MRP4 e di PPAR-alfa è stata analizzata tramite Q-RT-PCR, western blot e immunofluorescenza. In questi pazienti è stata valutata anche la funzionalità piastrinica attraverso studi di aggregazione piastrinica (indotta da ADP e collagene) e dosaggio del Trombossano B2 indotto da acido arachidonico eseguito su PRP (plasma ricco di piastrine), preincubato con differenti concentrazioni di Aspirina (5 microM e 10 microM). L'aggregazione piastrinica indotta da ADP 0,8 microM e 2 microM è risultata maggiore nei pazienti con OA rispetto ai volontari sani, confermando il dato che in presenza di over-espressione di MRP4 le piastrine sono più reattive. Inoltre, in piastrine ottenute dai pazienti con OA che presentano elevati livelli di MRP4 il trattamento in vitro con Aspirina a basse dosi (5-10 microM) è meno efficace ad inibire la COX-1; infatti, i livelli di Trombossano B2 prodotti dopo attivazione con acido arachidonico in piastrine trattate con Aspirina in vitro sono maggiori nei pazienti con OA rispetto ai volontari sani. Questi risultati indicano che i pazienti che overesprimono MRP4 presentano un aumento della funzionalità piastrinica sia in vivo sia quando le piastrine sono esposte ad Aspirina in vitro.

Durante il periodo di Dottorato all'estero, la Dott.ssa Temperilli ha studiato il ruolo che il fattore di trascrizione RUNX-1, cruciale nell'ematopoiesi e nella megacariopoiesi, svolge come fattore di trascrizione per le proteine appartenenti alla famiglia RAB. RUNX-1 è un eterodimero composto da 2 subunità, la subunità alfa (RUNX-1), che lega il DNA riconoscendo le sequenze TGT/cGGT e la subunità beta, CBF $\beta$  (core binding factor), che stabilizza il legame di RUNX-1 al DNA. RUNX-1 ha un ruolo centrale nella regolazione dell'ematopoiesi ed è necessario per la formazione delle cellule staminali ematopoietiche (HSCs) durante l'embriogenesi. E' alternativamente espresso da 2 promoter: il promoter prossimale (P2), che prevale durante l'ematopoiesi primitiva e il promoter distale (P1), che è coinvolto nella formazione definitiva delle cellule staminali ematopoietiche (HSCs). Runx-1 è essenziale anche per la maturazione megacariocitaria e per la produzione delle piastrine nella ematopoiesi degli adulti. Una mutazione in eterozigosi di RUNX-1 è stata trovata in una rara sindrome piastrinica familiare con predisposizione a sviluppare leucemia mieloide acuta (AML). I pazienti affetti presentano tendenza al sanguinamento, modesta piastrinopenia, difetti di funzionalità piastrinica e sono suscettibili allo sviluppo della AML tra i 30 e i 40 anni.

Il Dr. Rao e il suo gruppo hanno recentemente dimostrato che nei megacariociti i geni ALOX12 (12-lipoxigenase), PRKCQ (protein kinase C- $\theta$ ), PF4 (platelet factor 4) e MYL9 (myosin light chain) sono target di RUNX-1, e che nei pazienti con la mutazione di RUNX-1, questi geni sono down-regolati insieme a numerosi altri geni, tra cui alcuni che codificano per proteine appartenenti della famiglia RAB. Questi dati dimostrano che una singola mutazione di un fattore di trascrizione può alterare l'espressione di numerosi geni e influenzare differenti meccanismi cellulari, provocando simultaneamente un difetto nel numero e nella funzionalità delle piastrine.

Le proteine RAB sono piccole GTPasi appartenenti alla superfamiglia delle proteine RAS, coinvolte in numerosi passaggi del traffico vescicolare cellulare. Negli umani sono presenti più di 60 membri delle proteine RAB, localizzate in differenti compartimenti delle membrane intracellulari. La regione promoter wild type di uno dei geni RAB è stata generata tramite PCR, a partire da DNA genomico. I potenziali siti di legame di RUNX-1 nella regione promoter del gene RAB sono stati analizzati tramite il software TFSEARCHL: l'analisi al computer ha rilevato 4 siti di consenso per RUNX-1. La tecnica di

immunoprecipitazione della cromatina (ChIP), eseguita su cellule di eritroleucemia umana (HEL cells), trattate con PMA per indurre trasformazione megacariocitaria, ha mostrato il legame di RUNX-1 ai siti di consenso di Runx-1 nella regione promoter del gene RAB. Le mutazioni sono state incorporate nei siti di legame di RUNX-1 usando il metodo megaprimer PCR. La regione promotrice wild type e le regioni mutate sono state clonate in vettori plasmidici PGL3, contenenti il gene reporter per la luciferasi. Gli studi preliminari di luciferasi condotti nelle cellule HEL hanno mostrato una diminuzione significativa dell'attività della luciferasi dei siti mutati rispetto alla regione promoter wild type, questo risultato indica che ogni sito di consenso contribuisce alla attività del promoter del gene RAB.

In conclusione, i dati preliminari ottenuti dalla Dott.ssa Temperilli durante il suo periodo di Dottorato, dimostrano che sia i pazienti in trattamento cronico con Aspirina sia i pazienti "consumatori abituali di FANS" presentano livelli di espressione di MRP4 aumentati, e che questo aumento correla con un aumento della reattività piastrinica sia in vivo che in vitro. L'osservazione che anche il trattamento cronico con antinfiammatori non steroidei, sia inibitori selettivi di COX-2 che FANS tradizionali, aumenta l'espressione piastrinica di MRP4 in vivo, induce a pensare che l'Aspirina e gli altri antinfiammatori non steroidei siano in grado di attivare PPAR-alfa, tramite il blocco dell'enzima COX, e che il conseguente aumento dei metaboliti dell'Acido Arachidonico, indipendenti da COX1/2 induca attivazione di PPAR-alfa.

Il Collegio dei Docenti giudica l'attività scientifico-formativa della Dott.ssa **Flavia Temperilli** in modo positivo, in base alla frequenza e all'attività di ricerca complessivamente svolta. Esprime parere favorevole alla presentazione di una tesi di Dottorato dal titolo:

#### **MRP4 UP-REGULATION AND PLATELET FUNCTION**

Il Segretario

Prof.ssa Patrizia Mancini

Il Coordinatore

Prof.ssa Maria Rosaria Torrisi