



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Ruolo della proteina CD93
nell’attivazione piastrinica indotta da CpG ODN

Relatrice:

Dott.ssa Marta Zarà

Correlatore:

Prof. Gianni Francesco Guidetti

Tesi Sperimentale di
Alice Cassinari

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

INTRODUZIONE.....	1
1 <i>Le Piastrine</i>.....	1
1.1 I Molteplici Ruoli Delle Piastrine: Dalle Funzioni Fisiologiche Alle	
Implicazioni Patologiche	2
Le piastrine nei processi di emostasi e trombosi	2
Le piastrine nei tumori.....	3
Le piastrine nelle malattie neurodegenerative	4
Le piastrine nella risposta immunitaria	4
1.2 Le piastrine nei processi di emostasi e trombosi.....	6
Morfologia	6
Adesione piastrinica	10
Attivazione piastrinica	11
Aggregazione piastrinica	14
1.3 Le Piastrine nella Risposta Immunitaria.....	16
2 <i>CpG oligodeossinucleotidi (CpG ODN)</i>.....	19
2.1 Classi di CpG ODN.....	20
2.2 Meccanismo d'azione a valle dei CpG ODN	19
2.3 Applicazioni terapeutiche dei CpG ODN	20
2.4 Attivazione piastrinica mediata da CpG ODN	21
3 <i>La proteina CD93</i>	23
3.1 Struttura ed Espressione.....	23
3.2 Funzioni	24
CD93 nella risposta immunitaria e nei processi infiammatori	28
SCOPO DELLA RICERCA	30
MATERIALI E METODI	31

Materiali.....	31
Modelli murini.....	31
Anticorpi.....	31
Reagenti.....	32
Buffer e Soluzioni.....	33
Metodi.....	34
Identificazione dei topi e prelievo di tessuto per l'estrazione del DNA.....	34
Estrazione del DNA dalle biopsie caudali.....	34
Reazione a catena della polimerasi (PCR) ed elettroforesi del DNA.....	34
Preparazione di piastrine murine lavate.....	37
Microscopia a fluorescenza e citometria a flusso per l'analisi di interazione tra CpG ODN e piastrine.....	38
Analisi del rilascio di PF4	38
Analisi del rilascio di ATP	39
Analisi dell'esposizione di P-selectina	39
Preparazione di campioni per analisi di immunoblotting.....	40
RISULTATI.....	41
Espressione di CD93 in piastrine murine WT e CD93 KO	41
Il legame di CpG ODN alle piastrine non dipende da CD93	43
CD93 è coinvolto nel rilascio di α -granuli indotto da CpG ODN.....	46
CD93 non controlla il rilascio dei granuli densi indotto da CpG ODN	49
CpG ODN inducono attivazione piastrinica mediata da CD93	50
Il rilascio di PF4 indotto CpG ODN dipende dall'azione del TxA2	53
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	56
BIBLIOGRAFIA	60

INTRODUZIONE

1 Le Piastrine

Le piastrine furono descritte per la prima volta da Giulio Bizzozero nel diciannovesimo secolo, che scoprì la loro capacità di aderire e formare aggregati a livello di lesioni dei vasi sanguigni (Gremmel *et al.*, 2024; Thon e Italiano, 2012). Esse sono frammenti cellulari anucleati con una forma discoidale, di diametro compreso tra 2 e 5 μm , uno spessore di 0,5 μm e un volume medio tra 6 e 10 fL (Gremmel *et al.*, 2024; Machlus e Italiano, 2013). Dopo gli eritrociti, le piastrine sono le componenti del sangue più abbondanti e in un individuo sano circolano ad una concentrazione di $150\text{-}400 \times 10^9/\text{L}$ (Sang *et al.*, 2021).

Questi frammenti cellulari originano dai megacariociti a partire da un processo definito trombopoiesi, che avviene principalmente a livello del midollo osseo. La più importante proteina regolatrice di questo meccanismo è la trombopoietina (TPO) che promuove la nascita e lo sviluppo dei megacariociti dalle cellule staminali ematopoietiche. Essa dirige un meccanismo chiave della trombopoiesi, l'endomitosi, con cui i megacariociti diventano poliploidi, grazie ad una replicazione del proprio DNA in assenza di citodieresi. I megacariociti maturi estendono lunghi processi, definiti pro-piastrine, all'interno dei vasi sanguigni sinusoidali del midollo osseo. Da queste strutture membranose originano le piastrine che vengono così rilasciate in circolo, dove sopravvivono dai sette ai dieci giorni (Machlus e Italiano, 2013). Una volta raggiunta la senescenza funzionale, le piastrine perdono le molecole di acido sialico dalle glicoproteine di membrana, esponendo quindi residui saccaridici che vengono riconosciuti dai macrofagi nel fegato e nella milza, che le eliminano mediante fagocitosi (Reusswig *et al.*, 2024).

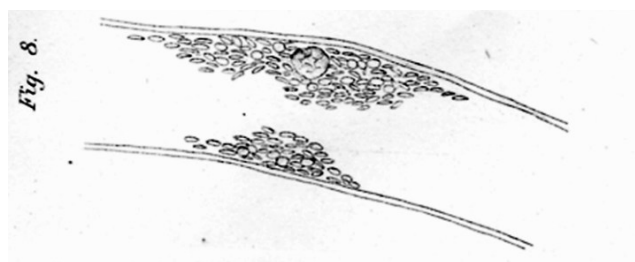


Figura 1: Disegno di Bizzozero che raffigura due trombi murali in una piccola arteria del mesentero di una cavia in cui si osservano le piastrine e un leucocita (Brewer, 2006).

1.1 I Molteplici Ruoli Delle Piastrine: Dalle Funzioni Fisiologiche Alle Implicazioni Patologiche

Le piastrine hanno un ruolo centrale nell'emostasi e nella trombosi ma, negli ultimi anni, è emerso con sempre maggiore chiarezza che le piastrine sono coinvolte in molti altri processi fisiologici, tra cui la progressione tumorale, le malattie neurodegenerative, la rigenerazione tissutale e la risposta immunitaria (Chaudhary PK *et al.*, 2022; Canobbio *et al.*, 2025).

Le piastrine nei processi di emostasi e trombosi

La funzione principale delle piastrine è l'arresto dell'emorragia in seguito a danno vascolare. Durante questo processo, le piastrine iniziano un movimento di rotolamento sulla matrice extracellulare esposta a causa della lesione alla parete vascolare, che porta al loro ancoraggio e alla vera e propria adesione piastrinica. Quest'ultimo fenomeno dà il via a una cascata di trasduzione del segnale mediata da proteine tirosin-chinasiche e da recettori accoppiati a proteine G, determinando l'attivazione piastrinica e il rilascio dei granuli, responsabile del reclutamento di ulteriori piastrine nel sito di danno. In questo modo ha inizio l'emostasi primaria, che forma una superficie pro-coagulante che supporta la cascata coagulativa dell'emostasi secondaria, che termina con formazione di un tappo emostatico stabilizzato dalla fibrina (Broos *et al.*, 2011).

Mentre l'emostasi rappresenta una risposta fisiologica e localizzata al sito del danno vascolare, la trombosi ne costituisce la controparte patologica, nella quale si forma un trombo all'interno di un vaso sanguigno integro che ostacola il flusso ematico. Un trombo si presenta come una massa solida, costituita da fibrina e componenti ematiche e può colpire sia le arterie sia le vene. I trombi arteriosi sono ricchi di piastrine, mentre quelli venosi sono maggiormente ricchi di fibrina ed eritrociti. L'aterosclerosi è un processo di infiammazione cronica delle pareti arteriose, innescato da un continuo accumulo di lipidi e cellule del sistema immunitario; questo fenomeno determina un ispessimento della tonaca intima e la genesi della placca aterosclerotica. La trombosi arteriosa si verifica proprio in concomitanza della rottura di tale placca: l'evento porta ad aggregazione piastrinica seguita dalla formazione del trombo, con il rischio di infarto miocardico o ictus ischemico, che oggi sono tra le principali cause di morte e comorbidità a livello mondiale (Koupenova *et al.*, 2017; Sang *et al.*, 2021; Pahwa e Jialal, 2026).

Le piastrine sono protagoniste anche dei processi di riparazione delle ferite e di angiogenesi, fasi strettamente connesse al ripristino dell'integrità tissutale. Il tappo fibrinico, che si forma in seguito ad aggregazione piastrinica, richiama cellule della risposta infiammatoria e molecole tra cui citochine chemochine e fattori di crescita che controllano la fase precoce della risoluzione delle ferite. Neutrofili e piastrine cooperano in questo processo infiammatorio rilasciando molecole che favoriscono la riparazione del tessuto e polarizzando i macrofagi verso un fenotipo riparativo. Le piastrine inoltre rilasciano un *pool* di fattori di crescita e angiogenici che promuovono la vascolarizzazione necessaria nel processo di guarigione (Locatelli *et al.*, 2021).

Le piastrine nei tumori

Oltre al loro coinvolgimento nei processi emostatici e trombotici, è oggi ampiamente riconosciuto che le piastrine partecipano attivamente alla progressione tumorale, instaurando un dialogo bidirezionale con le cellule neoplastiche.

Durante il processo metastatico, le cellule tumorali si distaccano dal tumore primario, entrando nel circolo sanguigno con un meccanismo di intravasazione. Qui il tumore viene riconosciuto e attaccato dalle cellule del sistema immunitario ed è sottoposto ad un alto *shear stress* che rende il sangue un ambiente ostile per le cellule tumorali circolanti. In numerosi studi è stato dimostrato che, in questa fase, le piastrine si comportano da scudo, proteggendo le cellule tumorali circolanti dalla risposta immunitaria e dallo *shear stress* e supportandone l'adesione alle pareti dei vasi e l'extravasazione (Zarà *et al.*, 2018). Inoltre, molti tipi di tumori sono in grado di indurre attivazione piastrinica che poi risulta in un'aumentata incidenza di complicanze trombotiche in pazienti oncologici. Le cellule tumorali promuovono anche il rilascio di vescicole extracellulari dalle piastrine (*Platelet-derived Extracellular Vesicles*, PEVs), che a loro volta sono in grado di incrementare il profilo invasivo delle cellule tumorali (Zarà *et al.*, 2017). La comunicazione bidirezionale tra piastrine e cellule tumorali porta anche a un rimodellamento del contenuto molecolare delle piastrine, in particolare il loro profilo di RNA: tali piastrine, definite "*tumor-educated platelets*" (TEP), riflettono nel proprio trascrittoma la presenza e persino il tipo di neoplasia, configurandosi come promettenti biomarcatori in ambito di biopsia liquida (Best *et al.*, 2015).

Le piastrine nelle malattie neurodegenerative

Nonostante la differente derivazione embrionale e la diversa funzione, piastrine e neuroni condividono numerose caratteristiche strutturali e funzionali. Molte molecole tipicamente espresse dalle cellule neuronali e con azione sul sistema nervoso centrale sono infatti presenti ad alte concentrazioni anche nelle piastrine; tra queste vi sono neurotrasmettitori e amine biologiche come la serotonina e il BDNF. Le due tipologie cellulari condividono inoltre i meccanismi della funzione secretoria: l'esocitosi del contenuto dei granuli piastrinici è un processo omologo al rilascio di neurotrasmettitori nel sistema nervoso. Per tali ragioni, le piastrine sono oggi utilizzate come modello periferico per lo studio di diverse patologie neuropsichiatriche. Esse rappresentano la seconda fonte principale di peptidi A β nella malattia di Alzheimer dopo i neuroni, e sono studiate nella schizofrenia a causa di un'alterazione dell'attività delle monoamino ossidasi (MAO). Tali alterazioni misurabili a livello piastrinico, possono riflettere processi che avvengono a livello centrale, rendendo questi elementi corpuscolati una finestra accessibile sui meccanismi patologici del sistema nervoso. Infine, il coinvolgimento piastrinico è ampiamente documentato anche in altre condizioni quali depressione, malattia di Parkinson e disturbi dello spettro autistico (Canobbio *et al.*, 2025).

Le piastrine nella risposta immunitaria

Le malattie infettive sono tra le maggiori cause di morte nel mondo, soprattutto nei paesi meno sviluppati. La risposta immunitaria dei vertebrati comprende due linee di difesa fondamentali: il sistema immunitario innato e il sistema immunitario adattativo. Il sistema immunitario innato viene considerato la prima linea di difesa dell'organismo contro infezioni e danni tissutali e riconosce pattern molecolari altamente conservati tipici dei patogeni invasori, definiti PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Alcuni esempi di PAMPs sono le componenti delle membrane o pareti dei batteri, dei capsidi virali, e acidi nucleici, tra cui sequenze CpG non metilate. I PAMPs vengono riconosciuti da specifici recettori presenti sulle cellule del sistema immunitario innato, i PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) (Trivigno *et al.*, 2023; Akbarzadeh *et al.*, 2025).

Le piastrine sono ormai considerate parte del sistema immunitario; esse infatti sono tra le prime cellule ad essere reclutate nei siti di infiammazione e infezione, dove cooperano con

leucociti e cellule endoteliali nelle risposte immunitarie intravascolari (Trivigno *et al.*, 2023).

Gli studi del ruolo delle piastrine nel sistema immunitario sono notevolmente aumentati con la pandemia da Sars-Cov-2. Nei pazienti affetti da COVID-19 infatti, le piastrine sono in uno stato iperattivato e, tramite il rilascio di molecole contenute negli α -granuli, richiamano cellule del sistema immunitario, tra cui monociti e neutrofili. L'interazione tra le piastrine, cellule immunitarie e la cascata coagulativa, porta alla formazione di micro-trombi in un processo noto come immunotrombosi. Nei casi gravi, questo fenomeno avviene in modo incontrollato e può portare ad insufficienza d'organo (De Nardi *et al.*, 2024).

Essendo questo ruolo di fondamentale importanza per questa tesi, esso verrà approfondito nel Capitolo 1.5.

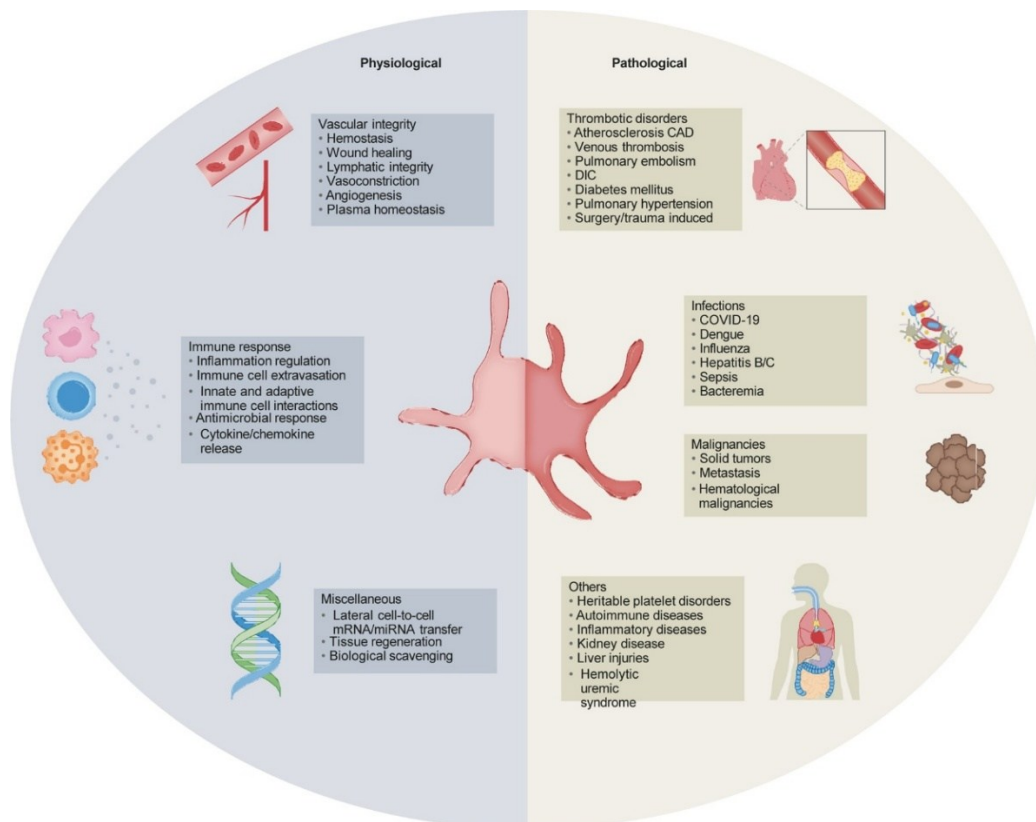


Figura 2: Rappresentazione schematica dei meccanismi fisiologici e patologici in cui le piastrine prendono parte (Tyagi *et al.*, 2022)

1.2 Le piastrine nei processi di emostasi e trombosi

Morfologia

A livello morfologico, la membrana plasmatica delle piastrine è caratterizzata da un doppio strato fosfolipidico, in cui sono contenuti colesterolo, glicolipidi e glicoproteine. La distribuzione dei fosfolipidi è asimmetrica e riflette lo stato di attivazione delle piastrine: nelle piastrine a riposo, i fosfolipidi carichi negativamente, come la fosfatidilserina, sono presenti principalmente nel foglietto interno ma, in seguito ad attivazione, questi vengono esposti sul foglietto esterno, per formare una superficie pro-coagulante (Thon e Italiano, 2012).

Lo strato di glicocalice sulla membrana delle piastrine è più spesso rispetto alle altre cellule del sangue; questo è dato da una elevata quantità di glicoproteine (GP) necessarie alle loro funzionalità di adesione, interazione e aggregazione (Gremmel *et al.*, 2024).

Connesso con la membrana plasmatica, è presente un sistema definito canalicolare aperto (*Open Canalicular System*, OCS), che funge sia come via di trasporto bidirezionale, sia per l'aumento della superficie piastrinica necessario durante il fenomeno di *spreading* (Heijnen e Korporaal, 2017). Le piastrine presentano anche un sistema tubulare denso (*Dense Tubular System*, DTS), derivato dal reticolo endoplasmatico dei megacariociti, che ha il ruolo di riserva intracellulare di calcio (Ca^{2+}), rilasciandolo quando la piastrina viene stimolata (Fritsma, 2015).

Il citoscheletro delle piastrine è composto da tre elementi principali: microtubuli il membranoscheletro e lo scheletro di actina. Oltre a mantenere l'integrità cellulare, il citoscheletro è una struttura dinamica che subisce riarrangiamenti funzionali al cambiamento di forma delle piastrine necessario al loro ruolo nel processo di emostasi (Thomas, 2019).

Il membranoscheletro riveste la superficie citoplasmatica dell'OCS e della membrana plasmatica ed è costituito da fibre di spettina interconnesse tramite filamenti di actina (Thon e Italiano, 2012). La rete di actina filamentosa si estende dal centro verso la superficie della membrana plasmatica e la sua quantità aumenta rapidamente in seguito ad attivazione piastrinica, in quanto è necessaria per il mantenimento della struttura cellulare durante il movimento nel circolo sanguigno, per resistere alle forze di *shear*. (Heijnen e Korporaal, 2017; Thomas, 2019).

Altrettanto importanti sono i microtubuli, localizzati alla periferia delle piastrine, che permettono alle piastrine di mantenere la forma discoidale che le caratterizza. Questo è garantito dalla presenza di β 1-Tubulina, la più importante componente dei microtubuli e specifica per i megacariociti e le piastrine (Heijnen e Korporaal, 2017).

Il sistema di organelli caratteristico delle piastrine è composto da organelli con funzione secretoria, comprendenti α -granuli, granuli densi, e un numero limitato di mitocondri, lisosomi e perossisomi (Gremmel *et al.*, 2024).

Gli α -granuli sono gli organelli secretori più abbondanti nelle piastrine (50-80 per piastrina). Essi possono originare sia dalla via endocitica, mediante cui proteine del plasma vengono internalizzate da megacariociti o piastrine, sia da quella sintetica dei megacariociti. In quest'ultima, proteine neosintetizzate dal reticolo endoplasmatico rugoso vengono veicolate attraverso un sistema vescicolare che termina negli α -granuli (Sharda e Flaumenhaft, 2018). Le vescicole contenenti proteine cargo degli α -granuli possono quindi generare dalla rete trans-Golgi (*Trans Golgi Network*, TGN), o dalla membrana plasmatica. Gli α -granuli racchiudono proteine solubili e proteine di membrana che, in seguito ad attivazione piastrinica, vengono rispettivamente rilasciate nell'ambiente extracellulare o esposte sulla superficie della membrana plasmatica (Gremmel *et al.*, 2024). Tra le molecole contenute negli α -granuli sono presenti proteine adesive coinvolte nell'emostasi primaria, come il fattore di Von Willebrand e il fibrinogeno, ma anche molecole appartenenti ai meccanismi di coagulazione, infiammazione e angiogenesi, tra cui *Platelet factor 4* (PF4), β -tromboglobulina (CXCL7), interleuchina-8 (IL-8), *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) e *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Heijnen e Korporaal, 2017). A livello della membrana degli α -granuli inoltre, è presente P-selectina, che viene esposta sulla membrana plasmatica delle piastrine in seguito ad attivazione e rilascio degli α -granuli, e promuove l'interazione con diversi tipi cellulari coinvolti nel processo di infiammazione. Proprio a causa dell'eterogeneità di molecole contenute, i ruoli di questi organelli sono molteplici e solo parzialmente compresi (Blair e Flaumenhaft, 2009).

Type	Examples
Integral membrane proteins	$\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, GPIb-IX-V, GPVI, P-selectin
Coagulants, anticoagulants, and fibrinolytic proteins	Factors V, IX, XIII, antithrombin, protein S, tissue factor pathway inhibitor, plasminogen, α_2 -macroglobulin
Adhesion proteins	Fibrinogen, von Willebrand factor, thrombospondin
Chemokines	CXCL1 (GRO- α), CXCL4 (PF4), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL8), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES)
Growth factors	Epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor, transforming growth factor β
Angiogenic factors and inhibitors	Vascular endothelium growth factor, fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, angiostatin, endostatin
Microbicidal proteins	Thymosin- β4 , thrombocidins1 and 2
Immune mediators	Complement C3 precursor, complement C4 precursor, IgG

Tabella 1: Contenuto degli α -granuli (Gremmel et al., 2024)

I granuli densi (δ -granuli) sono la seconda tipologia di granuli più abbondanti nelle piastrine (3-8 per piastrina). Essi sono organelli correlati ai lisosomi (*Lysosome-Related Organelles*, LRO) e hanno un pH intra-granulare acido. Si differenziano dagli altri organelli secretori in quanto derivano dal sistema endosomale e non dalla rete trans-Golgi. Questi granuli contengono ammine bioattive, tra cui serotonina e istamina, ADP, ATP, polifosfati e pirofosfati, calcio e potassio (Gremmel et al., 2024). A livello della membrana, i granuli densi comprendono anche CD63, LAMP1/LAMP2, che vengono esposti sulla superficie cellulare in seguito ad attivazione e rilascio dei granuli (Heijnen e Korporaal, 2017).

La cinetica e l'entità dell'esocitosi mediata dai granuli piastrinici dipende fortemente dalla concentrazione e dalla potenza dell'agonista usato. Inoltre, questo processo prevede sia la fusione con la membrana plasmatica, sia con il sistema canalicolare aperto (Sharda e Flaumenhaft, 2018).

Il meccanismo di fusione di membrana avviene attraverso l'interazione tra le proteine di membrana SNARE: le v-SNAREs sono associate alla membrana dei granuli, mentre le t-SNAREs si trovano sulla membrana bersaglio, con cui i granuli entrano in contatto. v-SNARE e t-SNARE interagiscono mediante domini ad α -elica, i domini SNARE, e il loro legame genera l'energia necessaria per la fusione di membrana; in particolare, un dominio SNARE di v-SNARE forma una struttura *coiled-coil* con tre domini SNARE di t-SNARE. La maggioranza delle v-SNARE delle piastrine è data dalla famiglia di proteine VAMPs (VAMP-2, -3, -7, e -8), mentre alle t-SNARE appartengono le proteine syntaxina 11 e SNAP-23 (Sharda e Flaumenhaft, 2018 Blair e Flaumenhaft, 2009).

Type	Examples
Cations	Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+}
Phosphates	Polyphosphate, pyrophosphate
Bioactive amines	Serotonin, histamine
Nucleotides	ADP, ATP, UTP, GTP

Tabella 2: *Contenuto dei granuli densi (Gremmel et al., 2024)*

Adesione piastrinica

In seguito a danno vascolare, alcuni elementi della matrice sub-endoteliale vengono esposti al flusso sanguigno tra cui il Fattore di Von Willebrand (VWF), il collagene di tipo I e di tipo III, fibronectina, laminina e trombospondina. Ciascuno di essi si lega a diversi recettori sulla superficie piastrinica. L'interazione iniziale delle piastrine con il sub-endotelio dipende dalle condizioni del flusso sanguigno: in condizioni di basso *shear stress*, come nel sistema venoso, l'adesione piastrinica è mediata dai recettori per il collagene, per la fibronectina e la laminina. In condizioni ad alto *shear stress*, come nelle arterie e arteriole, le piastrine si ancorano ai vasi a livello del fattore di Von Willebrand e del collagene, iniziando un processo di rotolamento (*rolling*) seguito da una ferma adesione (Broos *et al.*, 2011). Il fattore di Von Willebrand è una glicoproteina di adesione multimerica, sintetizzata dalle cellule endoteliali, dove viene immagazzinata nei granuli di Weibel-Palade, e dai megacariociti che la veicolano alle piastrine, negli α -granuli. Responsabile del legame con il VWF è il complesso GPIb-IX-V, in particolare l'estremità N-terminale della subunità GPIb α che si lega al dominio A1 del VWF (Andrews *et al.*, 2003; De Meyer *et al.*, 2009). Il dominio citoplasmatico di GPIb α è ancorato ai filamenti di actina. In questo modo viene preservata la struttura piastrinica durante il processo di adesione, quando la forza di taglio del flusso sanguigno è elevata. L'interazione tra GPIb α e il VWF è relativamente debole; ciò consente il rotolamento delle piastrine lungo la direzione del flusso sanguigno. Per permettere un'adesione stabile delle piastrine, esse instaurano un ulteriore legame tra VWF e l'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa). Il VWF funge da ponte molecolare tra la glicoproteina GPIb e il collagene, legandosi a GPIb α mediante il dominio A1 e al collagene principalmente tramite il dominio A3.

Il collagene è considerato una delle componenti della parete vascolare più potenti nell'induzione dell'adesione e aggregazione piastrinica. I recettori piastrinici responsabili del legame diretto con il collagene sono la glicoproteina VI (GPVI) e l'integrina $\alpha_2\beta_1$ (Broos *et al.*, 2011). GPVI appartiene alla famiglia delle immunoglobuline: essa comprende due domini extracellulari immunoglobulinici, un dominio *mucin-like*, una regione transmembrana e una corta coda citoplasmatica. Quest'ultima è associata alla catena γ del recettore Fc (FcR γ), portatore di un dominio ITAM (*Immuno Receptor Tyrosine based Activation Motifs*), un elemento chiave nella segnalazione a valle del recettore. Diversi recettori piastrinici comprendono motivi ITAM, tra cui il recettore per gli immunocomplessi Fc γ RIIA e il recettore lectinico CLEC-2 (Estevez e Du, 2017). L'integrina $\alpha_2\beta_1$ si lega al collagene mediante il passaggio di conformazione da bassa ad alta affinità tipico delle

integrine, mediante meccanismi non ancora del tutto definiti. Questo legame promuove una segnalazione di tipo *outside-in*, rinforzando l'interazione tra GPVI e il collagene, e attivando l'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, responsabile del legame con il fibrinogeno che funge da ponte tra le piastrine nel processo di aggregazione. L'adesione attiva una cascata di segnalazione che porta ad attivazione piastrinica, che termina a sua volta con l'attivazione ad uno stato ad alta affinità delle integrine $\beta 1$ e $\beta 3$, che promuovono la ferma adesione piastrinica sulla matrice extracellulare (Broos *et al.*, 2011).

Attivazione piastrinica

Una volta attivata GPIb-IX-V, vengono richiamate sul suo dominio citoplasmatico la proteina adattatrice 14-3-3 ζ , una chinasi appartenente alla famiglia di Src e la Fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K), che porta, attraverso la via di Akt, all'attivazione delle MAP-chinasi (MAPK) e della chinasi LIM 1 (LIMK1), e infine l'attivazione della fosfolipasi A_2 citosolica e la conseguente sintesi di trombossano TXA_2 (Broos *et al.*, 2011; Estevez e Du, 2017).

GPVI è associata tramite il dominio citoplasmatico con alcune Src tirosin chinasi, tra cui Fyn e Lyn, mediante il loro dominio *Src Homology 3* (SH3). In seguito al legame con il collagene, queste tirosin chinasi fosforilano i motivi ITAM, dando inizio alla cascata di segnalazione collagene-dipendente. CLEC-2 è il recettore per la podoplanina, una glicoproteina di membrana espressa da diversi tipi cellulari. Il legame con questa molecola innesca un meccanismo di attivazione dipendente da PI3K e dalla famiglia di chinasi Tec (Broos *et al.*, 2011; Estevez e Du, 2017). A livello dei domini ITAM fosforilati, i tre recettori legano una tirosin chinasi non recettoriale definita Syk (*Spleen Tyrosin Kinase*). Essa permette l'assemblaggio di un complesso di proteine adattatrici ed effettrici, tra cui LAT, GRB2, GADS e SLP-76, che reclutano la fosfolipasi $C\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$) a livello della membrana. Una volta fosforilata, PLC $\gamma 2$ idrolizza il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP $_2$) sulla membrana plasmatica, causando il rilascio di inositolo 1,4,5-trisfosfato (IP $_3$) e diacilglicerolo (DAG). Queste due molecole permettono l'attivazione della protein chinasi C (PKC) e l'aumento del Ca^{2+} intracellulare. In particolare, IP $_3$ si lega al suo recettore (IP $_3$ R) presente sul DTS, nonché un canale cationico che permette l'efflusso di Ca^{2+} dal DTS al citoplasma. A livello di questo sistema di endomembrane è presente anche STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*) che, a livello del dominio interno al DTS, presenta un motivo

responsabile del legame con il Ca^{2+} . Quando questo ione viene richiamato nel citoplasma, le sue concentrazioni all'interno del DTS diminuiscono, conseguentemente esso non è più legato a STIM1. Questa proteina migra quindi a livello della membrana plasmatica, dove si lega a ORAI1, il poro del canale CRAC (*Calcium release-activated calcium channel protein 1*), causando l'apertura di questo canale e promuovendo l'ingresso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare al citoplasma (SOCE, *Store Operated Calcium Entry*). Il risultato finale dell'attivazione di questi complessi meccanismi è il potenziamento della sintesi di TXA_2 , la secrezione di granuli e la segnalazione *inside-out* (Estevez e Du, 2017; Lee *et al.*, 2019). Molti agonisti responsabili dell'attivazione piastrinica si legano a specifici recettori di membrana, che fanno parte della famiglia dei Recettori Accoppiati a Proteine G (GPCR). Questi presentano sette domini transmembrana che, in seguito al legame con il ligando, attivano proteine G eterotrimeriche. Esse sono caratterizzate da un complesso di tre subunità: α , β e γ . Nello stato inattivo, la subunità α è legata a GDP ma l'interazione tra GPCR e l'agonista causa un cambiamento conformazionale che permette la sostituzione di GDP con GTP. La subunità α si dissocia quindi dalla subunità $\beta\gamma$ ed entrambe interagiscono con proteine effettrici a valle. Le proteine G eterotrimeriche si suddividono in $\text{G}\alpha_{i/o/z}$, $\text{G}\alpha_s$, $\text{G}\alpha_{q/11}$ e $\text{G}\alpha_{12/13}$ (Estevez e Du, 2017). Diversi agonisti piastrinici presentano più recettori sulla superficie che cooperano nell'attivazione piastrinica. La trombina è uno dei più potenti agonisti piastrinici e presenta almeno tre recettori: PAR1, PAR4 e GPIb-IX sulle piastrine umane mentre PAR3, PAR4 e GPIb-IX sulle piastrine murine. La trombina attiva i recettori PAR mediante il taglio proteolitico di una sequenza consenso localizzata all'N-terminale, generando una nuova estremità definita *tethered ligand*, che induce l'attivazione del recettore. PAR1 e PAR4 sono accoppiati sia alle proteine $\text{G}\alpha_{q/11}$ che alle proteine $\text{G}\alpha_i$. Le proteine $\text{G}\alpha_i$ inibiscono l'attività dell'adenilato ciclasi nella sintesi di cAMP, un secondo messaggero inibitorio nelle piastrine. Le proteine $\text{G}\alpha_{q/11}$ invece, una volta attivate, si dissociano dal recettore e attivano la fosfolipasi C β (PLC β) che promuove la formazione di IP_3 e DAG. Il TXA_2 invece, attiva i recettori TP, anch'essi coniugati alla proteina $\text{G}\alpha_{q/11}$. Il trombassano e la trombina sono in grado di attivare anche le proteine $\text{G}\alpha_{12/13}$ che, a loro volta, promuovono l'attivazione delle Rho GEF (*Guanine Nucleotide Exchange Factor*). Queste catalizzano lo scambio di GDP con GTP su RhoA, convertendola nella sua forma attiva. RhoA-GTP si lega e attiva ROCK (*Rho-associated coiled-coil protein kinase*), che fosforila e inibisce MLCP (*Myosin Light Chain Phosphatase*). Di conseguenza, le catene leggere della miosina rimangono fosforilate, favorendo l'interazione tra actina e miosina e aumentando la contrattilità actomiosinica. Questo meccanismo contribuisce al cambiamento

di forma delle piastrine e ai processi contrattili coinvolti nell'emostasi. L'ADP, rilasciato dai granuli densi delle piastrine o da cellule e tessuti danneggiati, si lega sia a recettori accoppiati a proteine $G_{q/11}$ (P_2Y_1), sia a recettori accoppiati a proteine G_{i_1} (P_2Y_{12}). La proteina G_{i_1} attiva anche l'isoforma β della fosfatidilinositolo 3 chinasi ($PI3K\beta$) che produce fosfatidilinositolo 3,4,5 trisfosfato (PIP3). Esso lega proteine con domini PH e, in particolare, media la traslocazione della chinasi 3-fosfoinositide dipendente (PDK1) e della serin/treonin chinasi Akt. Tra gli effettori di Akt, la ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) è responsabile della sintesi di ossido nitrico che si lega alla guanilato ciclasi, attivandola e portando alla sintesi di cGMP che promuove l'attivazione di PKG. Questa via, dagli anni '80, è considerata come regolatore negativo dell'attivazione piastrinica. Tuttavia, studi recenti hanno rivelato che questo *pathway* ha un ruolo bifasico: basse concentrazioni di NO e cGMP, sintetizzate endogenamente durante l'attivazione, agiscono come promotori dell'attivazione piastrinica. Questo aumenta significativamente la sensibilità delle piastrine a basse dosi di altri agonisti (come quelli dei recettori GPIb-IX, ITAM e GPCR). Solo concentrazioni elevate di NO e analoghi del cGMP mostrano un effetto inibitorio, principalmente attraverso l'aumento dei livelli di cAMP (adenosina monofosfato ciclico) e l'attivazione della proteina chinasi A (PKA) (Broos *et al.*, 2011; Estevez e Du, 2017). Diversi agonisti promuovono un meccanismo di segnalazione definito “*inside out*”, aumentando l'affinità delle integrine per i loro ligandi, rinforzando l'attivazione piastrinica. L'integrina maggiormente espressa sulla superficie piastrinica è l'integrina $\alpha IIb\beta 3$, recettore di fibrinogeno, VWF, vitronectina e altre molecole di adesione. Il meccanismo responsabile della sua attivazione coinvolge l'attivazione di un fattore di scambio di nucleotidi GEF, regolata da DAG e Ca^{2+} (CaIDAG-GEFI), che attiva la GTPasi Rap1b (*RAS-Related Protein 1b*). Rap1b-GTP favorisce il reclutamento e l'attivazione di talina-1 e kindlin-3 presso la coda citoplasmatica della subunità $\beta 3$ dell'integrina $\alpha IIb\beta 3$, inducendo il cambiamento conformazionale che ne aumenta l'affinità per i ligandi (Janus-Bell e Mangin, 2023).

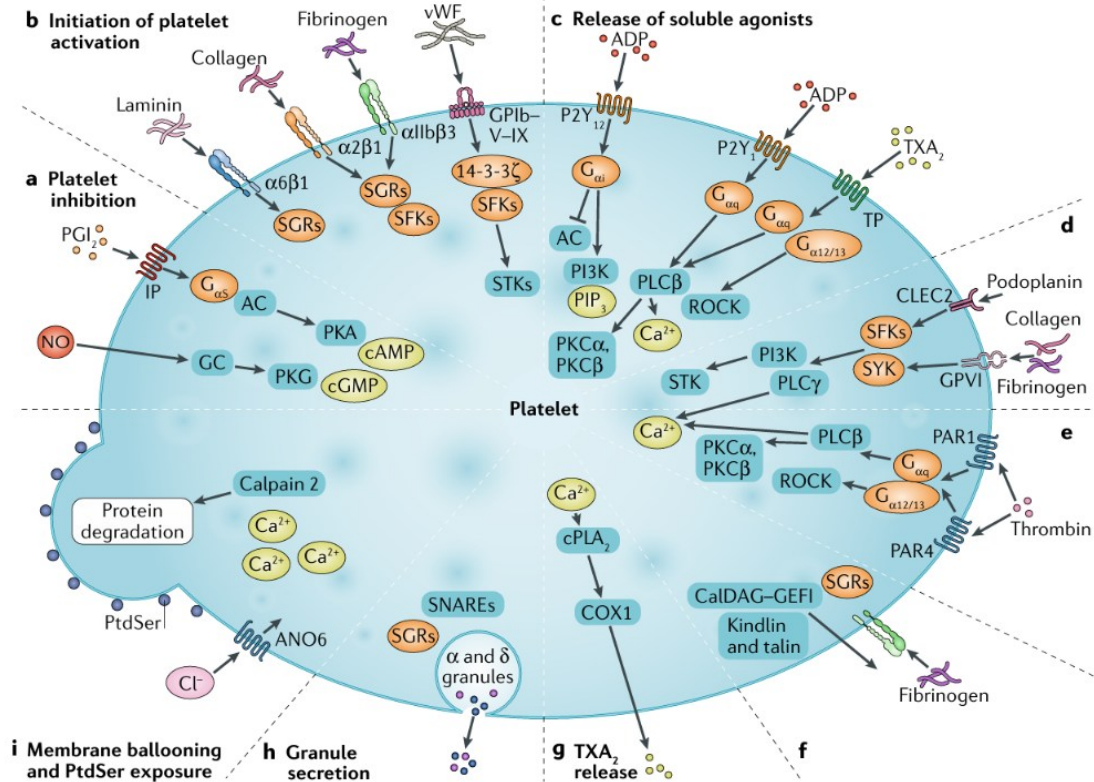


Figura 3: Meccanismi molecolari responsabili dell'attivazione piastrinica (van der Meijden e Heemskerk, 2019)

Aggregazione piastrinica

L'attivazione delle piastrine culmina con la loro aggregazione. L'aumento della concentrazione del Ca²⁺ libero nelle piastrine le porta a cambiamenti strutturali e funzionali, durante i quali esse formano lunghe proiezioni di membrana necessarie alla loro interazione (Rumbaut e Thiagarajan, 2010). L'aggregazione piastrinica avviene in seguito all'interazione dell'integrina αIIbβ3 con il fibrinogeno che permette la formazione di ponti intermolecolari tra le piastrine fino alla formazione dei veri e propri aggregati. Nelle fasi iniziali di adesione e aggregazione, si possono formare piccoli aggregati piastrinici reversibili, grazie al legame dei recettori GPIb/IX/V e integrina αIIbβ3 con VWF e fibrinogeno. In questo modo, tra le diverse piastrine si concentrano gli agonisti solubili TxA₂, ADP e trombina, che attivano le piastrine inducendo il cambiamento di forma, la degranulazione e l'aumento di Ca²⁺ intracellulare. Questo induce l'attivazione dell'integrina αIIbβ3, e la sua interazione con il fibrinogeno, VWF e fibronectina per formare

degli aggregati piastrinici stabili (Broos *et al.*, 2011). L'interazione tra integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ e fibrinogeno attiva una segnalazione *outside-in* che guida le fasi tardive dell'attivazione piastrinica e le modifiche del citoscheletro alla base del cambiamento di forma piastrinico e della retrazione del coagulo. Tale processo è un passaggio importante nella coagulazione perché la contrazione della rete di fibrina rende il coagulo più piccolo e compatto, espellendo così il liquido in eccesso (Guidetti e Torti, 2012). Durante questa fase avviene il reclutamento e l'attivazione della chinasi Src tramite trans-fosforilazione. Questo porta all'attivazione della tirosina chinasi Syk. Le chinasi Src e Syk fosforilano molte proteine fisicamente e funzionalmente associate al citoscheletro piastrinico, tra cui PLC $\gamma 2$ e le chinasi delle adesioni focali FAK e Pyk2. Quest'ultima supporta nell'attivazione di PI3K β , un meccanismo chiave per il processo di *spreading*, mediante il quale le piastrine aderenti si appiattiscono inizialmente nei siti di lesione vascolare e aumentano la loro area di contatto tramite la deformazione della membrana plasmatica (Cipolla *et al.*, 2013; Durrant, van den Bosch e Hers, 2017; Lee *et al.*, 2012). Il trombo viene infine stabilizzato da una rete di fibrina, originata al termine della cascata coagulativa (Broos *et al.*, 2011).

1.3 Le Piastrine nella Risposta Immunitaria

Le piastrine partecipano a numerosi processi nel contesto della risposta immunitaria. In risposta ad un'infezione microbica, uno dei primi meccanismi messi in atto è definito immunotrombosi. In questo processo, le piastrine, insieme alle cellule immunitarie e ai fattori della coagulazione, promuovono la formazione di microtrombi che intrappolano i patogeni nel sito di infezione, limitandone la disseminazione nel circolo sanguigno e favorendone l'eliminazione da parte del sistema immunitario (Iba *et al.*, 2022). Per limitare ulteriormente l'estensione dell'infezione, le piastrine si estendono attorno al patogeno e lo intrappolano, mediante l'espansione dei canali dell'OCS (White, 2005). Una volta immobilizzato l'agente esterno, le piastrine esercitano anche una funzione citotossica, rilasciando molecole quali chemochine, come il PF-4 con azione anti-microbica, anti-virale e anti-parassitaria, peptidi cationici come le β -defensine, e ribonucleasi (Aquino-Domínguez *et al.*, 2021).

Le piastrine non adottano solo un meccanismo diretto contro il patogeno invasore ma esercitano anche un'azione indiretta, tramite il reclutamento e l'attivazione dei leucociti contro l'infezione in atto. Questo avviene attraverso l'esposizione sulla superficie cellulare di specifiche molecole di adesione e recettoriali, e il rilascio del contenuto dei granuli, in modo stimolo-specifico (Rossaint *et al.*, 2018). Uno dei più noti fenomeni di *cross-talk* appena citati, è quello che avviene tra le piastrine e i neutrofili. I neutrofili appartengono alla classe dei granulociti e hanno un ruolo chiave nella risposta immunitaria innata (Mandel *et al.*, 2022). Tra le molecole espresse sulla superficie delle piastrine coinvolte in questa interazione vi sono le integrine: le piastrine esprimono principalmente integrine della famiglia $\beta 1$ e $\beta 3$. L'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ è la molecola di adesione maggiormente espressa sulla superficie delle piastrine e nella sua conformazione attiva è in grado di legarsi a diverse molecole, tra cui il fibrinogeno, che funge da ponte nel legame con l'integrina $\alpha_M\beta_2$ presente sulla superficie dei neutrofili. Un ruolo chiave, inoltre, è svolto dalla famiglia delle selectine; la P-selectina contenuta negli α -granuli, in seguito ad attivazione piastrinica, viene esposta sulla membrana plasmatica delle piastrine. Questo le permette di essere disponibile per il legame con specifiche glicoproteine, in particolare PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), sulla membrana dei neutrofili (Rossaint *et al.*, 2018). L'interazione tra queste due cellule attiva i neutrofili e induce la formazione dei NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*), strutture reticolari contenenti DNA, istoni, mieloperossidasi e altre molecole rilasciate dai

neutrofili. Esse costituiscono una trappola per i patogeni e hanno un'azione battericida e pro-trombotica (Li *et al.*, 2025).

Le piastrine, inoltre, esprimono sulla propria superficie recettori in grado di rilevare infezioni di virali, parassitarie e batteriche. Essi appartengono sia alla famiglia dei PRRs, sia dei recettori coinvolti nei processi emostatici. (Trivigno *et al.*, 2023).

Tra i PRRs espressi dalle piastrine vi sono i *Toll-like receptors* (TLRs), *C-type Lectine receptors* (CLRs) e i *Nod-like receptors* (NLRs). I TLRs maggiormente rappresentati sulla superficie di queste cellule sono i TLR2 e 4. TLR4 riconosce specificatamente i lipopolisaccaridi (LPS) della parete dei batteri Gram negativi, mentre TLR2 si lega a componenti peptidiche sia dei Gram positivi che dei Gram negativi. È stato osservato inoltre, che TLR2 attivato aumenta l'espressione di CD40L sulla superficie piastrinica, inducendo la formazione di aggregati piastrine-neutrofili. Il compartimento endosomale interno invece, comprende i TLR 3, 7 e 9: TLR3 riconosce RNA a doppio filamento, TLR7 RNA a singolo filamento, infine TLR9 è tipicamente responsabile del riconoscimento di DNA a doppio filamento caratterizzato dalla presenza di isole CpG non metilate derivanti da batteri o virus (Portier e Campbell, 2021; Nicolai *et al.*, 2024). TLR2, 4 e 9 attivano una cascata del segnale che dipende da Myd88. Alcuni studi suggeriscono che TLR4 stimola la via cGMP-PKG dipendente da Myd88. Questo meccanismo non è stato invece indagato per TLR2 e TLR9 che, tuttavia, attivano una cascata che coinvolge SFK (*Src Family Kinase*) e PI3K/Akt, attivatori a monte del *pathway* NO-cGMP, o il segnale ITAM (Estevez e Du, 2017).

Tra i CLRs più noti sulla superficie piastrinica, vi sono DC-SIGN e CLEC-2. DC-SIGN lega specifiche modificazioni proteiche presenti, ad esempio, a livello dei virus HIV-1 e DENV, ma anche DNA mitocondriale extracellulare. CLEC-2 è un recettore transmembrana di tipo II e, tra le varie componenti, presenta un dominio N-terminale citoplasmatico costituito da motivi hemITAM (*Hemi-Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*, caratterizzato da metà di un dominio ITAM convenzionale), responsabile del *signaling* intracellulare. Tra i ligandi endogeni, è stata riconosciuta la podoplanina, una glicoproteina transmembrana espressa in diversi tipi cellulari. I principali ligandi esogeni di CLEC-2 sono la rodocitina e HIV-1. Il legame tra CLEC-2 e HIV-1 è indiretto ed è mediato dalla podoplanina, incorporata all'interno del virus durante la sua replicazione. (Deppermann e Kubes, 2016; Meng *et al.*, 2021).

Oltre ai PRRs, le piastrine esprimono anche il recettore FcγRIIa, in grado di riconoscere gli immuno-complessi IgG mediante il legame alla regione costante della molecola anticorpale. Inoltre, le piastrine processano gli antigeni patogenici attraverso il Complesso Maggiore di

Istocompatibilità di classe I (MHC-I). Alcune molecole recettoriali coinvolte nei processi di emostasi, sono altrettanto importanti durante la risposta immunitaria, tra cui GPVI e GPIb. Quest'ultima, non solo regola l'adesione piastrinica sotto condizioni di alto *shear* ma è anche in grado di legare proteine di origine microbica, attivando la risposta piastrinica (Portier e Campbell, 2021).

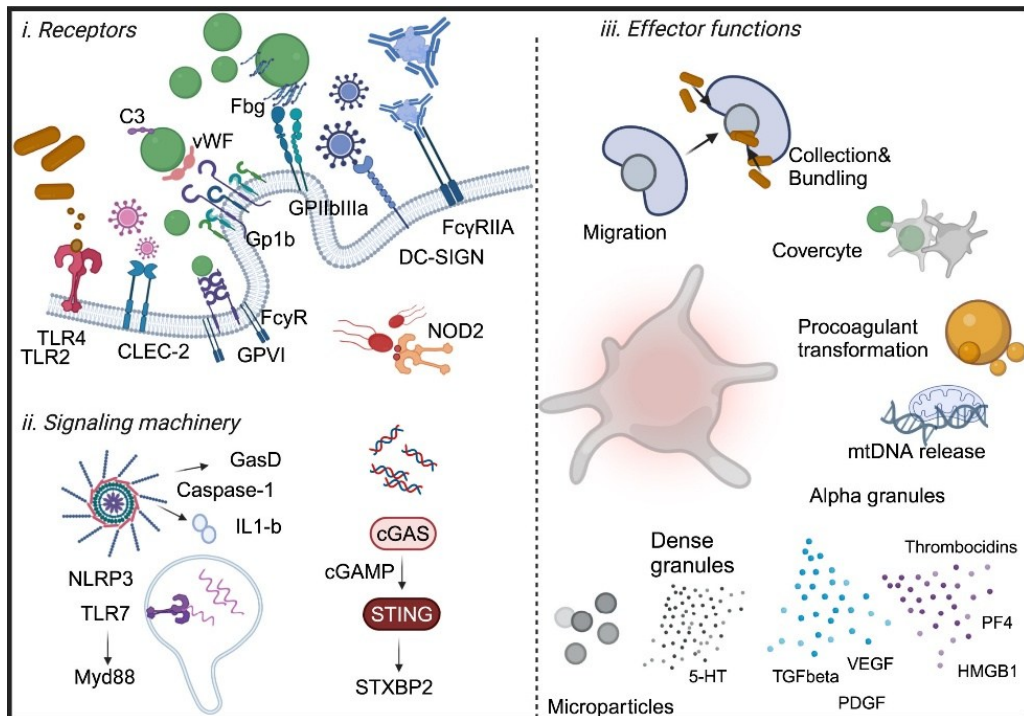


Figura 4: Recettori e pathways molecolari coinvolti nella risposta immunitaria delle piastrine (Nicolai et al., 2024)

2 CpG oligodeossinucleotidi (CpG ODN)

Oltre a costituire il materiale genetico, alcune forme di DNA possiedono ruoli immunogenici e immunostimolatori. È stato dimostrato che il DNA batterico è in grado di attivare una risposta immunitaria di tipo innato e adattativo. Questa capacità è attribuibile, in particolare, all'elevata presenza di motivi CpG (citosina-fosfato-guanosina) non metilati. Questi vengono riconosciuti dal recettore TLR9, espresso principalmente dalle cellule linfocitarie B e dalle cellule dendritiche plasmacitoidi. Al contrario, il DNA eucariotico risulta generalmente meno immunostimolante, poiché i motivi CpG sono meno frequenti e spesso metilati.

Gli oligodeossinucleotidi CpG (CpG ODN) sono corte molecole di DNA a singolo filamento, di origine sintetica, lunghe 18-20 nucleotidi e che contengono 1 o più dinucleotidi CpG non metilati. Essi mimano l'effetto del DNA batterico e, per questo motivo, vengono utilizzati come farmaci immunostimolanti. Tuttavia, queste molecole perdono il loro effetto immunostimolatorio se metilati o se sostituiti nelle citosine con molecole di 5-metilcitosina. Per conferire resistenza all'azione delle Dnasi e potenziarne l'efficacia in terapia, i CpG ODN hanno uno scheletro costituito parzialmente o interamente da legami fosforotioati (PS) anziché fosfodiesteri (Jurk e Vollmer, 2007; Hanagata, 2012; Zhou e Deng, 2021).

2.1 Meccanismo d'azione a valle dei CpG ODN

I CpG ODN vengono internalizzati nell'ambiente intracellulare mediante endocitosi. In condizioni basali, TLR9 è localizzato nel reticolo endoplasmatico da cui viene traslocato a livello della membrana endosomiale, dove acquisisce la capacità di riconoscere i CpG ODN. Nei compartimenti endosomiali acidi, il legame dei CpG ODN a TLR9 innesca la dimerizzazione del recettore, portando a cambiamenti conformazionali nei domini citoplasmatici che reclutano la proteina Myd88. Quest'ultima, a sua volta, attiva una cascata di segnalazione che porta all'attivazione di NF- κ B e, in parallelo, delle MAPKs che inducono l'attivazione di AP-1. NF- κ B e AP-1 inducono l'espressione di citochine pro-infiammatorie, tra cui IL-6, IL-12 e TNF (*Tumor Necrosis Factor*), e promuovono la maturazione delle cellule dendritiche mediante l'aumento di espressione di molecole costimolatorie, come CD80 e CD86. Nelle cellule dendritiche plasmacitoidi invece, pathway

MyD88-dipendente porta anche all'attivazione di IRF7, che induce la produzione di interferoni di tipo I. (Huang X e Yang Y, 2010).

2.2 Applicazioni terapeutiche dei CpG ODN

Grazie al loro meccanismo d'azione i CpG ODN vengono impiegati in numerose terapie farmacologiche.

Uno dei campi di applicazione più esplorati è l'utilizzo dei CpG ODN come adiuvanti per i vaccini. Queste molecole, infatti, collegano efficacemente la risposta immunitaria innata a quella adattativa. In particolare, i CpG ODN creano un microambiente che favorisce la polarizzazione verso risposte adattative di tipo Th1, con cui vengono prodotti IFN- γ (Interferone γ) e IL-2, che attivano i macrofagi, i linfociti T citotossici (CD8+) e le cellule NK (Krieg AM, 2007). Un esempio fondamentale, dell'utilizzo dei CpG ODN come adiuvanti immunologici è stata l'approvazione dalla *Food and Drug Administration* (FDA) di Hepsiv-B, un vaccino contro l'epatite B ad attività potenziata che sfrutta l'oligonucleotide sintetico CpG 1018 (Champion CR, 2021).

I CpG ODN sono importanti anche per il loro possibile impiego nei trattamenti antitumorali. I primi studi clinici condotti utilizzando queste molecole hanno dimostrato che i CpG ODN sono sicuri e ben tollerati ma non hanno mostrato un'efficacia antitumorale sufficiente in monoterapia. Questo è dovuto principalmente alla capacità del tumore di creare un microambiente che sopprime la risposta immunitaria. Per questo oggi, i CpG ODN vengono studiati in combinazione con farmaci inibitori dei checkpoint immunitari, i quali ripristinano l'attività antitumorale del sistema immunitario. (Adamus T e Kortylewski M, 2018).

2.3 Classi di CpG ODN

Le molecole di CpG ODN DNasi resistenti si dividono in almeno quattro classi.

La classe A (o tipo D) presenta una regione centrale con uno scheletro di legami fosfodiesterici e motivi CpG palindromici, fiancheggiato all'estremità da sequenze di poli(G) legate tramite legami fosforotioati. Essa viene riconosciuta da TLR9 di cellule dendritiche plasmacitoidi, inducendo il rilascio di IFN- α , ma porta raramente ad una attivazione dei linfociti B.

La classe B (o tipo K) presenta uno scheletro di legami fosforotioati e induce la proliferazione e attivazione dei linfociti B ma induce una produzione minima di IFN- α da parte delle cellule dendritiche plasmacitoidi.

Le molecole CpG ODN di classe C sono caratterizzate prevalentemente da una sequenza palindromica con legami fosforotioati e, all'estremità 5', da uno o due motivi CpG con legami fosfodiesterici. Questa classe combina le proprietà immunostimolatorie delle classi A e B, inducendo sia la produzione di IFN- α , sia l'attivazione dei linfociti B.

Infine, la classe P presenta due motivi palindromici con uno scheletro di legami fosforotioati e la capacità di produrre IFN- α e di attivare NF-kB. (Hanagata, 2012).



Figura 5: Classi di CpG ODN: la sottolineatura indica una sequenza palindromica; i tratti neri e rossi indicano rispettivamente i legami fosfodiesterici e fosforotioati (Hanagata, 2012).

2.4 Attivazione piastrinica mediata da CpG ODN

Diversi ricercatori hanno indagato l'impatto delle molecole CpG ODN sulle piastrine. Uno studio ha dimostrato che l'attivazione piastrinica indotta da CpG ODN 2395 dipende principalmente dalla presenza dello scheletro fosforotioato (PS) e risulta indipendente da TLR9. In particolare, nelle piastrine umane, viene dimostrata un'elevata affinità di legame delle CpG ODN 2395 verso il recettore del collagene GPVI, rispetto ad altre tipologie di oligonucleotidi (come i 2'MOE, 2'-O-Methoxy Ethyl/phosphorothioate). La stimolazione

con questa classe di molecole porta ad un forte aumento dell'espressione della P-selectina sulla superficie piastrinica e del rilascio dei granuli α , nonché all'innescò di aggregazione piastrinica (Slingsby *et al.*, 2021). Altri studiosi hanno dimostrato che le CpG ODN C sono in grado di attivare sia le piastrine umane, che quelle murine attraverso il recettore CLEC-2, inducendo la sua dimerizzazione e internalizzazione. Questo culmina nell'attivazione e aggregazione piastrinica dipendente dal recettore P2Y12 per l'ADP e alla formazione di aggregati piastrine-neutrofili e piastrine-monociti. Nelle piastrine murine, CLEC-2 risulta essenziale per l'*uptake* e l'attivazione indotti dai CpG ODN (Delierneux *et al.*, 2017). La segnalazione a valle di GPVI e CLEC-2 dipende dall'attivazione della tirosin-chinasi Syk; inoltre, nella via mediata da CLEC-2 sembra essere coinvolta anche PI3K (Delierneux *et al.*, 2017; Slingsby *et al.*, 2021; Johansson *et al.*, 2024). Recentemente è stato dimostrato che la somministrazione di CpG ODN in modelli murini può anche indurre trombocitopenia. Questo fenomeno è legato alla formazione di aggregati piastrine-leucociti che vengono poi rimossi dal circolo sanguigno, attraverso la fagocitosi mediata da macrofagi, e non da una ridotta genesi piastrinica (Slingsby *et al.*, 2021; Johansson *et al.*, 2024).

3 La proteina CD93

CD93 (anche descritta come C1qr1, C1qRp e AA4) è una glicoproteina transmembrana di tipo I altamente glicosilata composta da 652 amminoacidi. Il peso molecolare teorico di CD93 è di 68 kDa, tuttavia il peso molecolare apparente determinato tramite SDS-PAGE è di circa 120 kDa, poiché la proteina è fortemente glicosilata (Nepomuceno *et al.*, 1999). Il gene codificante questa proteina è localizzato sul cromosoma 20 umano e sul cromosoma 2 murino. Essa appartiene al gruppo 14 delle glicoproteine transmembrana con dominio *C-type lectin-like*, in cui rientrano anche trombomodulina, CLEC14A e CD248 (Khan *et al.*, 2019; Cai *et al.*, 2025). CD93 non esiste solo in forma transmembrana ma anche in forma solubile (Cai *et al.*, 2025).

3.1 Struttura ed Espressione

Proseguendo dalla regione N-terminale alla regione C-terminale, CD93 è costituita da un peptide segnale, seguito da dominio *C-type lectin-like* (CTLD) contenente otto residui di cisteina conservati, un dominio *sushi-like*, cinque domini *EGF-like*, un sito di potenziale N-glicosilazione, una regione *mucin-like* con diverse O-glicosilazioni, un dominio transmembrana e, infine, una coda citoplasmatica contenente potenziali siti di fosforilazione tirosin-chinasici. Il dominio CTL di CD93 permette il legame di molecole di diversa natura chimica, inclusi carboidrati, proteine, lipidi e molecole inorganiche, in modo Ca^{2+} -indipendente. Esso è caratterizzato da una struttura definita “*loop-in-a-loop*”, stabilizzata da un insieme di residui conservati che contribuiscono a formare un nucleo idrofobico distintivo. Una regione fondamentale del dominio CTL è il cosiddetto *long loop region*, spesso coinvolta nel legame con i ligandi di CD93 (Zelensky e Gready, 2005; Tossetta *et al.*, 2023; Cai *et al.*, 2025).

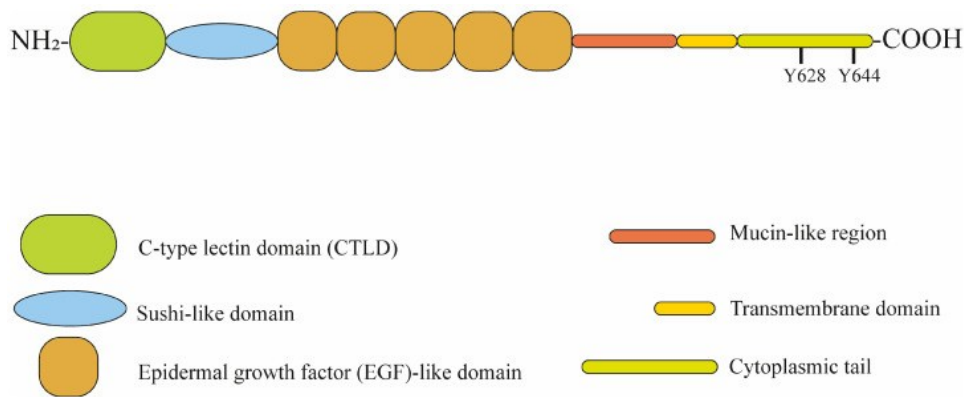


Figura 6: Struttura di CD93 (Tossetta *et al.*, 2023)

CD93 è espressa principalmente a livello delle cellule endoteliali, dove contribuisce al processo di angiogenesi. Tuttavia la sua presenza è stata rilevata anche in altre cellule, in particolare neuroni, cellule staminali ematopoietiche, monociti, citotrofoblasto, neutrofili, cellule B, cellule natural killer (NK) e piastrine (Trivigno *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2023; Cai *et al.*, 2025).

3.2 Funzioni

CD93 e la sua forma solubile (sCD93) sono coinvolti nella regolazione dell'efferocitosi e dell'angiogenesi. L'efferocitosi, ovvero la rimozione delle cellule apoptotiche mediante fagocitosi, è un processo essenziale per mantenere l'omeostasi tissutale e prevenire patologie infiammatorie e autoimmuni. È stato dimostrato che i topi privi di CD93 presentano difetti significativi nella rimozione delle cellule apoptotiche *in vivo*. Tuttavia, questo deficit non è dovuto a un'alterazione della capacità fagocitica dei macrofagi, ma alla mancanza di sCD93. sCD93 agisce infatti come un'opsonina: si lega alle cellule apoptotiche tramite il suo dominio CTLD e ne facilita il riconoscimento e l'ingestione da parte dei macrofagi interagendo con l'integrina $\alpha\beta 2$ (Linton *et al.*, 2016). Durante il processo di angiogenesi CD93 interagisce con molteplici fattori. La coda citoplasmatica di CD93 presenta una carica positiva che permette l'interazione con la molecola di moesina, un membro della famiglia di proteine ERM (*Ezrin, Moesin, Radixin*). Queste proteine si associano mediante la regione N-terminale a molecole di adesione localizzate sulla membrana plasmatica mentre, tramite la regione C-terminale, legano l'actina. Esse sono così coinvolte nel mantenimento,

rimodellamento e formazione dell'organizzazione del citoscheletro corticale di actina (Tsukita e Yonemura, 1999). In particolare, l'interazione tra la proteina moesina e CD93 può mediare il rimodellamento polarizzato del citoscheletro di actina e, nelle cellule endoteliali, permette di regolare l'adesione e le interazioni intercellulari (Zhang *et al.*, 2005; Langenkamp *et al.*, 2015). Tra i *partner* intracellulari di CD93 vi è anche GIPC (*Gα interacting protein (GAIP)-interacting protein C-terminus*). Il legame è dipendente dal dominio PDZ di classe I localizzato nella regione contenente gli ultimi undici aminoacidi (C11) all'estremità C-terminale di CD93 e tramite la regione ad alta carica positiva in prossimità della membrana, costituita da residui carichi positivamente (RKRR). CD93-GIPC è coinvolto in diversi meccanismi cellulari. Ad esempio, è stato osservato che, trattando monociti umani con un peptide di sequenza amminoacidica corrispondente alla regione C11 di CD93, si assiste ad un aumento della fagocitosi. I ricercatori hanno attribuito la capacità regolativa di questo processo al legame tra GIPC e la regione C-terminale di CD93. Inoltre, il complesso CD93-GIPC permette a GIPC di mediare il trasporto polarizzato di molecole, attraverso la ramificazione dei fasci di fibre di actina lineari, che permette di direzionare il movimento di determinate componenti verso localizzazioni specifiche. Infine, GIPC funge da ponte tra CD93 e altre proteine, come la miosina VI e l' α -actinina che sono coinvolte nel movimento delle vescicole all'interno della cellula, durante i processi di endocitosi. (Bohlson *et al.*, 2005). GIPC è infatti un regolatore della migrazione cellulare e uno studio ha osservato che la sua sovraespressione blocca la migrazione di cellule endoteliali HUVEC (Gao *et al.*, 2000).

Il principale ligando del recettore CD93 è la proteina Multimerina-2 (MMRN2) un componente della matrice extracellulare endoteliale. Questa interazione è stata dimostrata essere fondamentale per promuovere la funzionalità delle cellule endoteliali, tra cui l'angiogenesi (Orlandini *et al.*, 2014; Galvagni *et al.*, 2017). Più in dettaglio, il legame tra queste due proteine è essenziale per l'attivazione dell'integrina $\beta 1$ e regola la deposizione e l'organizzazione di fibronectina che sono necessarie per la stabilità dei vasi e dei processi di fibrosi (Lugano *et al.*, 2018).

Un ulteriore ligando di CD93 è IGFBP7 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7*) che induce l'espressione di proteine di giunzione per promuovere la formazione del lumen dei vasi, supportando le cellule endoteliali nel processo di adesione e favorendo la stabilizzazione e maturazione vascolare (Komiya *et al.*, 2012, Komiya *et al.*, 2014). Nell'ambiente tumorale, il legame tra CD93 e IGFBP7 è alterato, portando alla formazione

di un sistema vascolare tumorale caotico, caratterizzato da vasi fragili e permeabili (Sun *et al.*, 2024).

Alcuni studi suggeriscono inoltre che CD93 è coinvolta nel legame con VE-caderina, limitando la sua fosforilazione e il suo turnover. VE-caderina è una proteina transmembrana specifica delle cellule endoteliali, che promuove l'adesione intercellulare, regolando l'integrità vascolare (Lugano *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2025).

In molti tipi di cancro, quali il glioblastoma e l'adenocarcinoma gastrico, è stato osservato un aumento significativo del livello di espressione di CD93 nei tessuti tumorali rispetto a quelli sani adiacenti. In particolare, l'elevata espressione di questa molecola è correlata ad angiogenesi tumorale, infiltrazione delle cellule immunitarie, peggiore prognosi e stadio TNM avanzato. Essa risulta frequentemente associata ad un aumento dell'infiltrazione di macrofagi M2, che favoriscono la crescita tumorale (Zhang *et al.*, 2022). Tuttavia, alti livelli di CD93 hanno mostrato di avere un effetto protettivo nel carcinoma renale a cellule chiare (Campagna *et al.*, 2021). CD93 è coinvolto nelle proprietà invasive di diversi tipi tumorali e può, inoltre, essere valutato come biomarker della prognosi e dell'infiltrazione immunitaria (Tong *et al.*, 2021).

Trivigno *et al.* hanno inoltre dimostrato che CD93 nelle piastrine stabilizza l'espressione sulla superficie cellulare del recettore PAR4, rivelando un nuovo ruolo di CD93 nell'attivazione piastrinica indotta da trombina. Utilizzando piastrine provenienti da modelli murini WT e CD93 KO è stato osservato che, in seguito a stimolazione con TRAP4, agonista del recettore PAR4, quest'ultimo viene internalizzato più rapidamente in assenza di CD93, rispetto a condizioni WT. A causa di questa rapida internalizzazione, piastrine CD93 KO mostrano un'attivazione ridotta se stimulate con basse dosi di trombina o TRAP4. Questo si traduce in una riduzione dell'aggregazione piastrinica, del rilascio dei granuli α e dell'attivazione dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (Trivigno *et al.*, 2024).

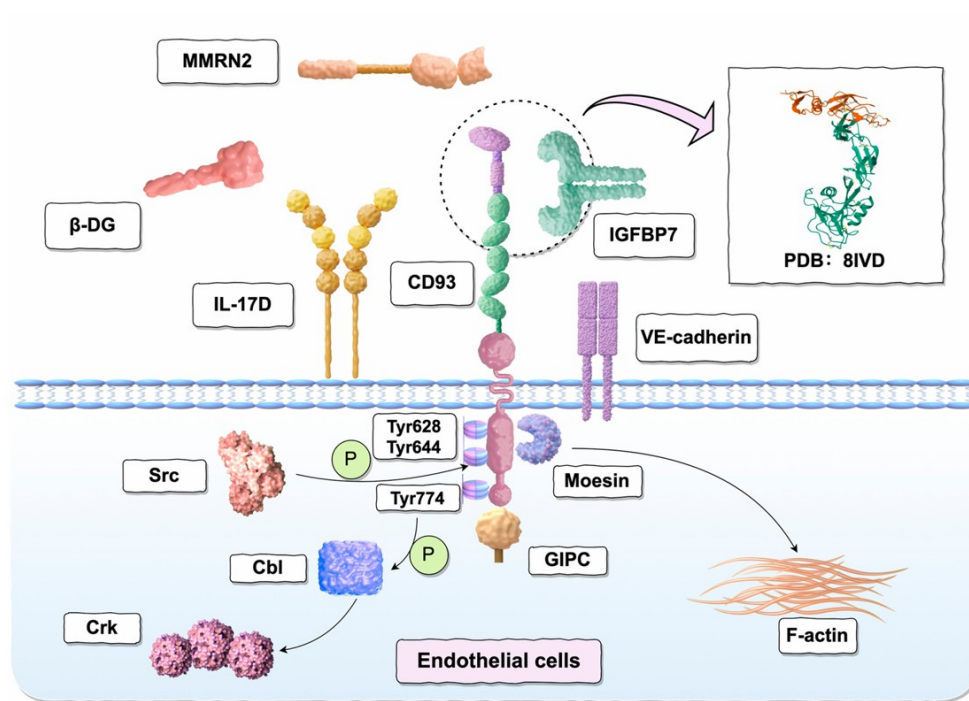


Figura 7: I diversi ligandi di CD93 e le proteine di interazione: il dominio extracellulare di CD93 può legarsi a diversi ligandi, tra cui la multimerina-2 (MMRN2), la proteina legante il fattore di crescita insulino-simile 7 (IGFBP7), il β -destroglicano (DG), l'interleuchina-17D (IL-17D) e la caderina endoteliale vascolare (VE-caderina). Il dominio intracellulare di CD93 può interagire con le proteine adattatrici Cbl, Moesina e GIPC. Il legame di CD93 al β -DG porta alla fosforilazione dei residui di tirosina Tyr628 e Tyr644 nella coda citoplasmatica di CD93 da parte della chinasi Src, che stimola la fosforilazione dell'effettore a valle Cbl. La fosforilazione di Cbl al residuo Tyr774 permette la funzione di proteina adattatrice, facilitando il reclutamento di Crk e inducendo la migrazione cellulare e la formazione di strutture tubulari. Inoltre, l'interazione tra CD93 e GIPC può mediare il trasporto polarizzato attraverso la ramificazione dei fasci lineari di fibre di actina (Immagine modificata da Cai et al., 2025)

CD93 nella risposta immunitaria e nei processi infiammatori

L'infiammazione è un insieme di risposte al danno tissutale causato principalmente da fattori quali sostanze chimiche tossiche, agenti ambientali, traumi, sovraccarico o infezioni. Quando il processo infiammatorio persiste in modo anomalo, o si forma anche in assenza di infezione o lesione, si sviluppa l'infiammazione cronica. Essa può danneggiare cellule, tessuti e organi sani, portando a malattie come cancro, malattie cardiache, morbo di Alzheimer e malattie autoimmuni (Zubair e Burns, 2026).

CD93 è attivamente coinvolto nella regolazione della risposta infiammatoria attraverso diversi meccanismi. In particolare, CD93 svolge un ruolo importante nella neuroinfiammazione, un processo infiammatorio che interessa il cervello e il midollo spinale (DiSabato *et al.*, 2016). Nel sistema nervoso centrale (SNC), questa molecola non è espressa soltanto dalle cellule endoteliali e neuronali, ma anche dalla microglia, la quale costituisce la principale linea di difesa immunitaria locale; qui, CD93 sembra contribuire ai processi di attivazione e migrazione cellulare (Griffiths *et al.*, 2018; Hong *et al.*, 2022). Il coinvolgimento di questa proteina è supportato da studi su modelli murini CD93 *knock-out*, affetti da ischemia cerebrale: questi animali mostrano un marcato incremento dei processi neuroinfiammatori rispetto ai controlli *wild type*. Analogamente, un aumento della risposta infiammatoria è stato osservato in topi CD93 *knock-out* in due differenti modelli di encefalomyelitis (Harhausen *et al.*, 2010; Griffiths *et al.*, 2018). Ulteriori evidenze emergono da modelli di induzione di infiammazione tramite iniezione di lipopolisaccaride (LPS) nel ventricolo laterale in cervelli di ratto. In questo lavoro, nelle fasi precoci della neuroinfiammazione, si osserva un incremento transitorio dell'espressione di CD93 sulla membrana delle cellule della corteccia cerebrale, in particolare nei neuroni e nella microglia, il quale decresce gradualmente nel tempo. Nelle fasi iniziali, l'aumento di CD93 correla con l'attivazione dei meccanismi fagocitici da parte della microglia, a cui segue una sotto-regolazione dell'espressione della molecola. Questo andamento suggerisce che CD93 possa esercitare un ruolo pro-infiammatorio nelle fasi iniziali della risposta immunitaria, seguito da una riduzione dei suoi livelli con finalità prevalentemente protettiva (Liu *et al.*, 2014). L'attenuazione della risposta infiammatoria tramite CD93 avviene grazie alla down-regolazione delle serin/treonin chinasi TAK1 (*Transforming Growth Factor-B-Activated Kinase 1*) e all'inibizione di NF- κ B (Hong *et al.*, 2022).

In uno studio su monociti primari umani e su una linea di monociti, è stato dimostrato che la forma solubile di CD93 induce il rilascio di Interleuchina-6 (IL-6), Interleuchina-1 β (IL-1 β)

e il Fattore di Necrosi Tumorale α (TNF- α), promuovendo il differenziamento dei monociti in cellule simili ai macrofagi (Jeon *et al.*, 2010).

La funzione di CD93 è stata studiata anche nella risposta a PAMPs. In uno studio del 2019, CD93 viene indagato come recettore delle molecole CpG ODN. Esso si basa sulla dimostrazione che, in cellule nucleate, i CpG ODN si leghino sulla superficie cellulare tramite DEC-205, una molecola *C-type lectin*, anch'essa in grado di interagire con molecole di DNA batterico cariche negativamente, mediante il suo dominio CTLD. In questo modo, CpG ODN vengono internalizzate nelle cellule, attivano i meccanismi del sistema immunitario innato tramite il recettore endosomiale TLR9. Gli autori ipotizzano che CD93 possa svolgere un ruolo analogo a DEC-205, permettendo il trasporto del DNA dalla membrana cellulare agli endosomi. L'interazione tra queste CD93 e CpG ODN è stata prima dimostrata mediante saggi ELISA e saggi di fluorescenza del triptofano, in cui i risultati hanno mostrato che il dominio purificato CTLD di CD93 si lega sia al DNA di *E. Coli* sia ai CpG ODN. Inoltre, CD93 si lega con affinità comparabile al DNA a singolo e a doppio filamento e l'interazione è influenzata dal pH: essa è massima a pH acido o neutro (6.5-7.5) e scompare a pH 8.5, suggerendo che le cariche positive della proteina attraggano quelle negative del DNA. Il legame tra CD93 e CpG ODN è stato successivamente dimostrato anche in modelli cellulari: cellule di neuroblastoma deficienti di CD93, sono state trasfettate con questo recettore e i risultati hanno mostrato un incremento significativo del legame con i CpG sulla superficie cellulare e della secrezione di IL-6. Utilizzando cellule reporter HEK293, è stato dimostrato che l'aumento dell'attivazione di NF- κ B mediato da CD93, avviene solo in presenza di TLR9, confermando il ruolo di supporto di CD93 in questa via di segnalazione (Nativel *et al.*, 2019).

Grazie all'utilizzo di modelli murini CD93 *knock-out*, è stato osservato il contributo di CD93 nelle fasi tardive del differenziamento delle cellule B, per il mantenimento di un alto titolo anticorpale e per la sopravvivenza delle plasmacellule nel midollo osseo. In particolare, i topi CD93 $-/-$ non mantengono un elevato titolo anticorpale durante l'immunizzazione e presentano un minore numero di plasmacellule antigene-specifiche nel midollo osseo (Chevrier *et al.*, 2009).

SCOPO DELLA RICERCA

Le piastrine sono ormai riconosciute come elementi chiave nella risposta immunitaria. L'interazione con il patogeno induce attivazione piastrinica che innesca meccanismi di difesa non solo indiretti, mediante l'attivazione leucocitaria, ma anche diretti, tramite il rilascio di molecole infiammatorie e antimicrobiche. Uno dei meccanismi di riconoscimento coinvolti nella risposta immunitaria delle piastrine è l'interazione con il DNA batterico, ricco di motivi CpG non metilati (Trivigno *et al.*, 2023). Gli oligodeossinucleotidi CpG (CpG ODN) sono molecole sintetiche di DNA che mimano l'effetto del DNA microbico, innescando una forte risposta immunitaria da parte dell'organismo. Per questo motivo essi vengono impiegati come adiuvanti in vaccini, terapie antimicrobiche e trattamenti contro il cancro (Jurk e Vollmer, 2007). I CpG ODN interagiscono con le piastrine e inducono i processi di aggregazione, rilascio di granuli e formazione di aggregati piastrine-neutrofili e piastrine-monociti (Delierneux *et al.*, 2017). CD93 è una proteina coinvolta principalmente nei processi di angiogenesi ed efferocitosi, ma nelle piastrine, CD93 regola la stabilizzazione del recettore PAR4 sulla superficie cellulare e la risposta piastrinica mediata da questo recettore. Recentemente è stato dimostrato che, in cellule nucleate, CD93 può agire come mediatore dell'interazione con i CpG ODN.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è indagare il contributo della proteina CD93 nei meccanismi che regolano la risposta piastrinica indotta da CpG ODN. Per realizzare questo studio, sono stati utilizzate piastrine provenienti da modelli murini WT e CD93 KO, in modo da definire le conseguenze dell'assenza di CD93 sulla risposta piastrinica ai CpG ODN di tipo C. Sono stati sfruttati approcci diversi per determinare se CD93 fosse coinvolto nel legame con queste molecole. Successivamente è stato valutato il ruolo di CD93 nel rilascio dei granuli piastrinici e nell'attivazione di meccanismi di trasduzione del segnale indotti da CpG ODN. Infine, è stato valutato il coinvolgimento del trombassano A2 (TxA2) in questo processo e il possibile ruolo di CD93 nella degranulazione sostenuta da questo agonista secondario

MATERIALI E METODI

Materiali

Modelli murini

I topi CD93 KO [B6.Cg-Tg(Thy1-APP)3Somm/J] e i rispettivi controlli wild type (WT) sono stati stabulati in gabbie contenenti cibo ed acqua liberamente accessibili. I topi CD93 KO sono stati ottenuti allestendo accoppiamenti tra un maschio e due femmine eterozigoti. Tale strategia di allevamento consente di ottenere in media per ogni parto il 25% di topi CD93 KO, il 25% di topi WT ed il 50% di topi eterozigoti.

Tutti i topi sono stati mantenuti nello stabulario del Centro di Servizio per la Gestione Unificata dell'Attività di Stabulazione e di Radiologia – Polo Botta II, dell'Università degli Studi di Pavia, in accordo con quanto previsto dalla normativa vigente in merito all'utilizzo degli animali a fini scientifici (D.Lgs 26/2014 e Direttiva UE 63/2010).

Anticorpi

Anticorpi primari (anti-)	Origine	Company
CD41-BV510	Rat	BD Biosciences
CD62P-BV421	Rat	BD Biosciences
α -tubulin	Mouse	Santa Cruz Biotechnology
CD93 (EPR5386)	Rabbit	Abcam
Phospho-Akt (S473)	Rabbit	Cell Signaling Technology
Akt	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology
Phospho-PLC γ 2 (Y1217)	Rabbit	Cell Signaling Technology
PF4	Rabbit	Abcam

Anticorpi secondari (anti-)	Origine	Company
Mouse IgG-HRP	Goat	Enzo Life Sciences
Rabbit IgG-HRP	Goat	Sigma-Aldrich

Reagenti

Reagenti	Company
Apyrase (grade I)	Sigma-Aldrich
Bovine serum albumin (BSA)	Serva
Chemiluminescence (ECL) kit	Sigma-Aldrich
CpG ODN type C 2395	InvivoGen
CpG ODN - FITC	InvivoGen
Heparin sodium salt	Sigma-Aldrich
ProLong Gold Antifade	ThermoFisher Scientific
Prostaglandin E1 (PGE1)	Santa Cruz Biotechnology
U46619 (TxA2 analogue)	Enzo Life Sciences
SQ29548	Alexis Biochemical
Proteinasi K	PanReac AppliChem
Taq Polimerasi 1X	New England Biolabs - B9015S
Taq Polimerasi	New England Biolabs - M0273
dNTPs	EuroClone
Primers	Eurofins Genomics
ATP determination kit	Invitrogen

Buffer e Soluzioni

Soluzioni	Ricetta
Acid-citrate-dextrose (ACD)	Sodio citrato 152 mM Acido Citrico 130 mM Glucosio 112 mM
HEPES flow buffer; pH 7.4	Tyrode's buffer con l'aggiunta di: CaCl ₂ 2 mM MgCl ₂ 2 mM BSA 0.1% (w/v)
PBS (Phosphate Buffered Saline); pH 7.4	NaCl 140 mM Na ₂ HPO ₄ - anidro 8 mM Na ₂ HPO ₄ -H ₂ O 2 mM
PIPES buffer; pH 6.5	PIPES 20 mM NaCl 136 mM
Running buffer; pH 8.3	Tris-HCl 25 mM Glicina 192 mM SDS 0.1% (w/v)
SDS-sample buffer 3X; pH 8.3	Tris 37.5 mM Glicina 288 mM SDS 6% (w/v) DTT 1.5% (w/v) Glicerolo 30% (w/v) Blu di Bromofenolo 0.03% (w/v) β-mercaptoetanolo 3% (w/v)
TBS (Tris Buffered Saline); pH 7.5	Tris 100 mM NaCl 2,5 M
Transfer Buffer	Tris-HCl 20 mM Glicina 150 mM Metanolo 20% (w/v)
Tyrode's buffer; pH 7.4	HEPES 10 mM NaCl 137 mM KCl 2.9 mM NaHCO ₃ 12 mM

Metodi

Identificazione dei topi e prelievo di tessuto per l'estrazione del DNA

Il DNA genomico necessario per la determinazione del genotipo è stato ottenuto da piccole biopsie di tessuto prelevate dall'estremità terminale della coda (caudectomia). La biopsia caudale è stata eseguita con un'apposita forbice, prelevando circa 2 mm di tessuto dall'estremità terminale della coda. Subito dopo, ogni animale è stato identificato applicando una targhetta auricolare numerata mediante una apposita pinza.

Estrazione del DNA dalle biopsie caudali

Per estrarre il DNA necessario per la determinazione del genotipo dei topi, il tessuto ottenuto dalla biopsia caudale è stato digerito con 40 µg/ml di Proteinasi K (PanReac AppliChem – A4392) diluita in 60 µl di tampone della Taq polimerasi 1X (New England Biolabs – B9015S) in assenza di MgCl₂. I campioni sono stati incubati per 3 ore in un *Thermomixer* a 60°C in agitazione a 550 rpm. Al termine della digestione, la Proteinasi K è stata inattivata incubando i campioni a 96°C per 7 minuti. Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 13000g per 60 secondi. Il surnatante, contenente il DNA estratto, è stato recuperato e conservato a -20°C sino all'allestimento della PCR per la determinazione del genotipo.

Reazione a catena della polimerasi (PCR) ed elettroforesi del DNA

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica che consente di ottenere un'elevata quantità di materiale genetico, amplificando una specifica sequenza di DNA. Tale tecnica è stata utilizzata per l'identificazione del genotipo dei topi.

La PCR è stata eseguita preparando una mix di reazione contenente:

- 0,025 U/µl *Taq* DNA polimerasi (New England Biolabs – M0273),
- tampone della *Taq* DNA polimerasi 1X contenente MgCl₂ (New England Biolabs – B9014),
- nucleotidi (dNTPs) (200 µM ognuno) (EuroClone – EMR415001)

- *primers* (0,2 μ M ognuno) (Eurofins Genomics).

Per ogni campione, sono stati aggiunti alla mix di reazione 1,5 μ l di DNA genomico precedentemente estratto. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 30 μ l per ogni campione. Per determinare il genotipo dei topi, nella mix di PCR sono stati utilizzati i primers:

mClqRp/W+, sequenza 5'-AGGGATCCCAGCGAGGAAGGGCAACTG-3'.

mClqRp/U-, sequenza 5'-GTCCTGGCACTCATCTATATC-3'

neomycin 3', sequenza 5'-GGGATCGGCAATAAAAAGAC-3'

La PCR è stata eseguita in un Termociclatore (Bio-Rad T100 Thermal Cycler) utilizzando il protocollo riportato di seguito:

Numero passaggio	Fase	Temperatura	Durata
1	Denaturazione iniziale	95°C	5'
2	Denaturazione	95°C	30''
3	Appaiamento	57°C	60''
4	Estensione	68°C	60''
5	Ripetizione passaggi 2, 3 e 4 per 29 cicli		
6	Estensione finale	68°C	5'
7	Stoccaggio al termine della reazione	4°C	∞

Al termine della reazione, i campioni sono stati ripresi con 6 μ l di tampone di caricamento 6X (0.03% w/v Blu di Bromofenolo, 60% v/v glicerolo) e i frammenti di DNA sono stati separati tramite elettroforesi in gel di agarosio. 20 μ l di campione sono stati caricati in gel di agarosio 1% in tampone TAE (40 mM Tris, 20 mM Acido Acetico, 1mM EDTA), contenente 0,5 μ g/ml Etidio Bromuro. La corsa elettroforetica è stata condotta a 120V costanti in tampone TAE, sino alla completa separazione dei frammenti di DNA. Il gel è stato poi analizzato con un transilluminatore UV (Bio-Rad ChemiDOC XRS). Il genotipo dei topi è stato determinato sulla base dei frammenti di DNA amplificati, ottenuti a seguito della PCR, secondo lo schema seguente:

- nel caso il topo sia wild type si ottiene un amplificato di 721 paia di basi;
- nel caso il topo sia KO si ottiene un amplificato di 480 paia di basi;
- nel caso il topo sia eterozigote si ottengono entrambe gli amplificati di 480 e 721 paia di basi.

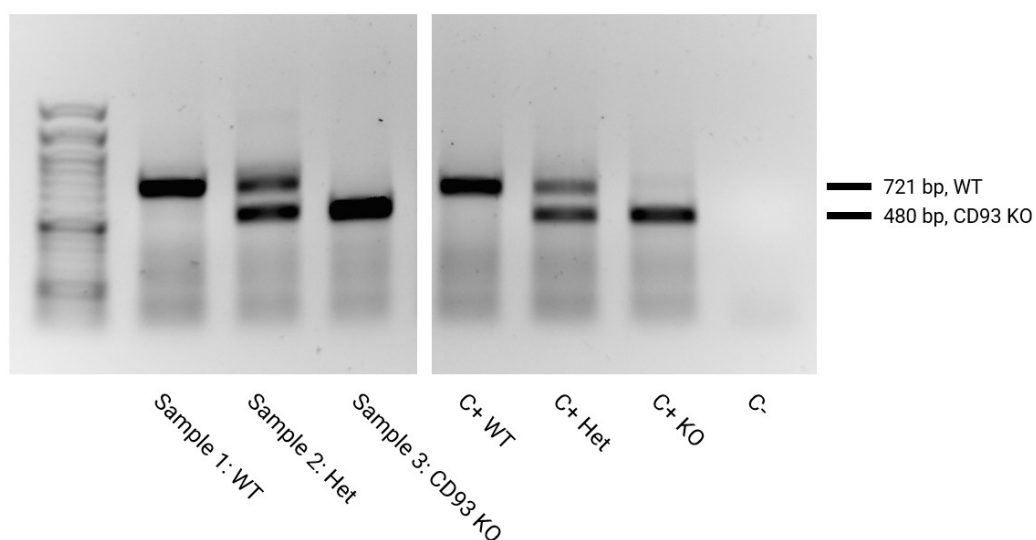


Figura 8: Reazione a catena della polimerasi ed elettroforesi del DNA per la determinazione del genotipo murino. Nel riquadro a sinistra sono mostrati campioni di DNA estratto mediante digestione enzimatica da code di topi WT, CD93 KO ed eterozigoti. Questi sono amplificati mediante PCR e caricati su gel di agarosio all'1%, contenente 0,5 µg/ml Etidio Bromuro. L'amplificazione del gene CD93 wild-type produce un amplicone di 721 bp, mentre l'amplificazione del gene CD93 knockout produce un amplicone di 480 bp. Nel riquadro a destra sono mostrati campioni di controllo. Come controllo negativo è allestito un campione contenente H₂O (Neg) che non genera alcuna banda.

Preparazione di piastrine murine lavate

Il sangue murino è stato prelevato tramite puntura venosa nella vena cava utilizzando una miscela di ACD e citrato di sodio al 3,8% (2:1) come anticoagulante. Il sangue intero è stato diluito 1:1 nel tampone Tyrode e centrifugato (centrifuga ALC-PK130 con rotore a cestello oscillante ALC-T535) a $120\times g$ per 10 minuti per ottenere il plasma ricco in piastrine (PRP). Il PRP è stato quindi trasferito in nuove provette e i globuli rossi rimanenti sono stati diluiti con tampone di Tyrode e centrifugati nuovamente alla stessa velocità per 8 minuti. Il PRP è stato raccolto e questo passaggio è stato ripetuto, per aumentare il numero di piastrine recuperate. Apirasi (0,02 U/ml) e PGE1 (1 μ M) sono state quindi aggiunte al PRP prima della centrifugazione a $550\times g$ per 8 minuti per prevenire l'attivazione e la desensibilizzazione delle piastrine. Il plasma povero di piastrine (PPP) è stato scartato e il pellet piastrinico è stato lavato una volta con tampone PIPES per rimuovere eventuali contaminanti plasmatici. Dopo un'altra centrifugazione a $550\times g$ per 8 minuti, le piastrine sono state risospese nel tampone Tyrode. Le piastrine purificate sono state diluite alla concentrazione desiderata e mantenute a 37 °C in presenza di 5,5 mM di glucosio, 1 mM di CaCl_2 e 0,5 mM di MgCl_2 , salvo diversa indicazione.

Microscopia a fluorescenza e citometria a flusso per l'analisi di interazione tra CpG ODN e piastrine

Le piastrine ad una concentrazione di 3×10^8 cellule/ml sono state incubate con concentrazioni 0,5 μ M, 1 μ M e 5 μ M di CpG ODN-FITC per 15 minuti a 37°C. Al termine della stimolazione i campioni sono stati diluiti a concentrazioni di 10^7 cellule/ml con Tyrode contenente 1 mM CaCl_2 +0.5 mM MgCl_2 +5.5 mM Glucosio. Da ciascun campione è stata prelevata un'aliquota per l'analisi in citometria a flusso, fissata con paraformaldeide (PFA) allo 0,5% e analizzata utilizzando il citofluorimetro BD FACSLytic (BD Biosciences). Il volume restante di ciascun campione è stato destinato all'analisi in microscopia a fluorescenza: i campioni sono stati fissati con PFA allo 0,5% e, in una piastra da 12 pozzetti precedentemente allestita con dei vetrini coprioggetto, è stato trasferito 1 ml di sospensione piastrinica per ogni pozzetto. La piastra è stata sottoposta a citospin a 100xg per 10 minuti. Una volta montati sui rispettivi supporti utilizzando ProLong™ Gold Antifade, sono stati conservati a 4°C fino all'acquisizione al microscopio. Le immagini sono state acquisite utilizzando un obiettivo 100X su un microscopio Leica DM6B.

Analisi del rilascio di PF4

Le piastrine lavate WT e CD93 KO (3×10^8 cellule/mL) sono state stimulate con 10 μ M di ODN CpG o 2 μ M di U46619 per 30 minuti a 37 °C. La stimolazione è stata bloccata aggiungendo 2 μ M di PGE1 e i campioni sono stati centrifugati a 650xg per 15 minuti. Il pellet è stato scartato e il surnatante è stato analizzato. Il fattore piastrinico 4 (PF4) rilasciato è stato misurato mediante analisi di immunoblotting.

In alcuni esperimenti, campioni di piastrine di topi WT, concentrate 3×10^8 /mL, sono state trattate con SQ29548: antagonista del recettore TP del trombossano TxA_2 , prima della stimolazione con CpG ODN. In particolare, le piastrine sono state incubate per 10 minuti con SQ29548 ad una concentrazione finale di 10 μ M. Al termine del pre-trattamento, i campioni sono stati stimolati con CpG ODN ad una concentrazione finale di 10 μ M per 30 minuti. La stimolazione è stata bloccata aggiungendo 2 μ M di PGE1 e i campioni sono stati centrifugati a 650xg per 15 minuti. Il pellet è stato scartato e il surnatante è stato analizzato in immunoblotting.

Analisi del rilascio di ATP

Le piastrine lavate WT e CD93 KO (3×10^8 cellule/mL) sono state stimulate con 10 μ M di ODN CpG per 30 minuti a 37 °C. La stimolazione è stata bloccata aggiungendo 2 μ M di PGE1 e i campioni sono stati centrifugati a 650xg per 15 minuti. Il pellet è stato scartato e il surnatante è stato analizzato. La concentrazione di ATP nel surnatante è stata misurata utilizzando un kit di determinazione di ATP basato su una reazione di bioluminescenza, seguendo le istruzioni del produttore. Questo saggio si basa su una reazione catalizzata dall'enzima Luciferasi, che converte la Luciferina in ossiluciferina e dipende dal consumo di una molecola di ATP e una molecola di O₂ che vengono trasformate rispettivamente in AMP e pirofosfato, e CO₂. Questa reazione libera luce ad una lunghezza d'onda λ di 560nm, la cui intensità è proporzionale alla concentrazione di ATP presente nel campione. Questa è stata misurata utilizzando il lettore di piastra TECAN.

Analisi dell'esposizione di P-selectina

I livelli di esposizione di P-selectina sono stati valutati su campioni di sangue intero prelevato dalla vena cava di topi WT e CD93 KO, utilizzando come anticoagulante eparina 10 U/ml. Una volta raccolto il sangue intero da ogni topo, questo è stato aliquotato in provette contenenti Tyrode 2.5 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, anticorpi anti-CD41-BV510 e anti-CD62P-BV421 e uno dei due componenti mostrati di seguito:

- Veicolo come controllo negativo
- CpG ODN 10 μ M

I diversi campioni sono stati posti a 37°C per 30 minuti e, al termine della stimolazione fissati con l'impiego di PFA 0,5% in PBS. In seguito i diversi campioni sono stati acquisiti in citometria a flusso, utilizzando BD FACS Lyric instrument (BD Biosciences) e analizzati mediante il software FlowJo 10 (come precedentemente descritto).

Preparazione di campioni per analisi di immunoblotting

I campioni piastrinici, a una concentrazione $3 \times 10^8/\text{mL}$, sono stati stimolati sono stati stimolati a 37 °C con l'agonista specifico previsto per ciascun esperimento. Le condizioni sperimentali, inclusi il tipo di stimolo, la concentrazione utilizzata e i tempi di incubazione, sono indicate nel testo, nelle singole figure e nelle relative didascalie. Per ogni condizione sperimentale sono stati allestiti campioni basali non stimolati, utilizzati come controllo negativo. I campioni piastrinici sono stati lisati mediante l'aggiunta di mezzo volume di tampone campione SDS 3X, quindi riscaldati a 96 °C per 3 minuti. Proteine contenute in egual volumi di campioni diversi sono state separate mediante SDS-PAGE su gel di acilammide al 7,5% e al 10% e trasferite su membrane di polivinilidenfluoruro (PVDF). Le membrane sono state prima bloccate con BSA al 5% in TBS e poi incubate con gli anticorpi indicati nel testo e nelle didascalie delle figure. Infine, le proteine sono state visualizzate utilizzando un kit di chemiluminescenza potenziata (ECL). Le immagini delle bande reattive sono state acquisite utilizzando un apparecchio Chemidoc XRS (Bio-Rad) e la quantificazione dell'intensità delle bande è stata eseguita utilizzando il software Image Lab.

RISULTATI

Espressione di CD93 in piastrine murine WT e CD93 KO

L'espressione di CD93 è stata valutata in piastrine ottenute da topi WT e CD93 KO, precedentemente genotipizzati utilizzando la tecnica di PCR ed elettroforesi di DNA estratto da biopsie caudali.

Le piastrine sono state purificate da topi WT e CD93 KO come descritto nella sezione Materiali e Metodi, e, in seguito a dissociazione, i campioni sono stati separati mediante SDS-PAGE e analizzati in *immunoblotting* utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-CD93, che riconosce specificatamente la regione C-terminale di CD93 di origine sia umana che murina.

Come si può osservare nel pannello superiore della figura 9, nel campione di piastrine murine WT, collocato a sinistra nel pannello superiore dell'immagine, è presente una banda marcata ad altezza 120 kDa, identificabile con CD93. Al contrario, nel campione a destra nella figura invece, corrispondente a piastrine murine CD93 KO, la banda è completamente assente. Come controllo di *equal loading* è stato utilizzato un anticorpo anti-tubulina, le cui bande ad altezza 55 kDa sono riportate nel pannello inferiore per entrambi i campioni di piastrine murine WT e CD93 KO. Il risultato ottenuto permette di confermare che i due campioni contenessero effettivamente la stessa quantità di proteine totali.

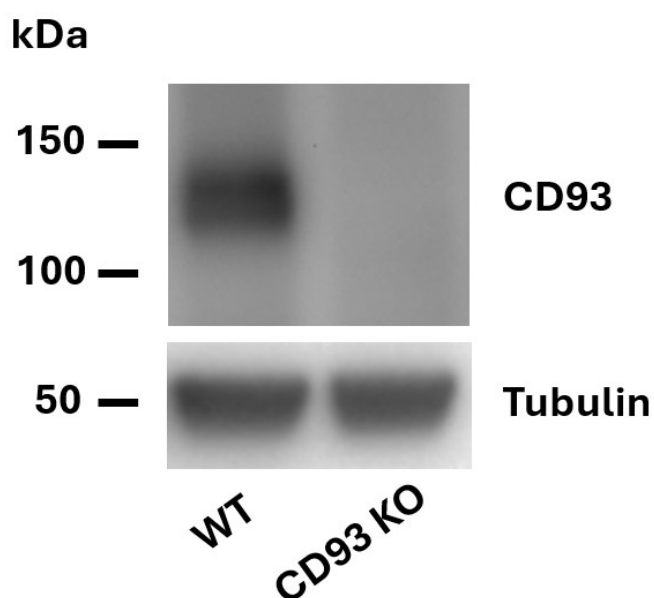


Figura 9: Espressione di CD93 in piastrine murine WT e CD93 KO. Campioni di piastrine murine lavate WT e CD93 KO (3×10^8 cellule/mL) sono stati analizzati in immunoblotting, utilizzando un anticorpo monoclonale anti-CD93. La colorazione con un anticorpo monoclonale anti-tubulina è stata utilizzata come controllo di equal loading. A sinistra sono rappresentati i pesi molecolari in kDa.

Il risultato ottenuto ha permesso quindi di confermare l'affidabilità della genotipizzazione tramite PCR confermando l'espressione della proteina CD93 in piastrine murine WT e la sua assenza in piastrine CD93 KO.

Il legame di CpG ODN alle piastrine non dipende da CD93

Inizialmente è stato valutato se CD93 fosse direttamente coinvolta nel legame piastrinico a CpG ODN. A tale scopo, piastrine isolate da topi WT e CD93 KO sono state incubate con CpG ODN coniugati al fluorocromo FITC (CpG ODN-FITC) come specificato nella sezione *Materiali e Metodi* e l'entità dell'interazione è stata valutata tramite microscopia a fluorescenza (Figura 10). Come è possibile osservare nelle immagini rappresentative nella Figura 10, i CpG ODN-FITC interagiscono efficacemente sia con le piastrine WT, sia con le piastrine CD93 KO. Nel riquadro in basso a destra sono riportati due ingrandimenti di singole piastrine che permettono di apprezzare la distribuzione del segnale fluorescente che, in entrambi i campioni, è localizzato in punti discreti. Inoltre, l'interazione tra CpG ODN-FITC e piastrine murine CD93 KO non presenta evidenti differenze rispetto al campione di piastrine WT.

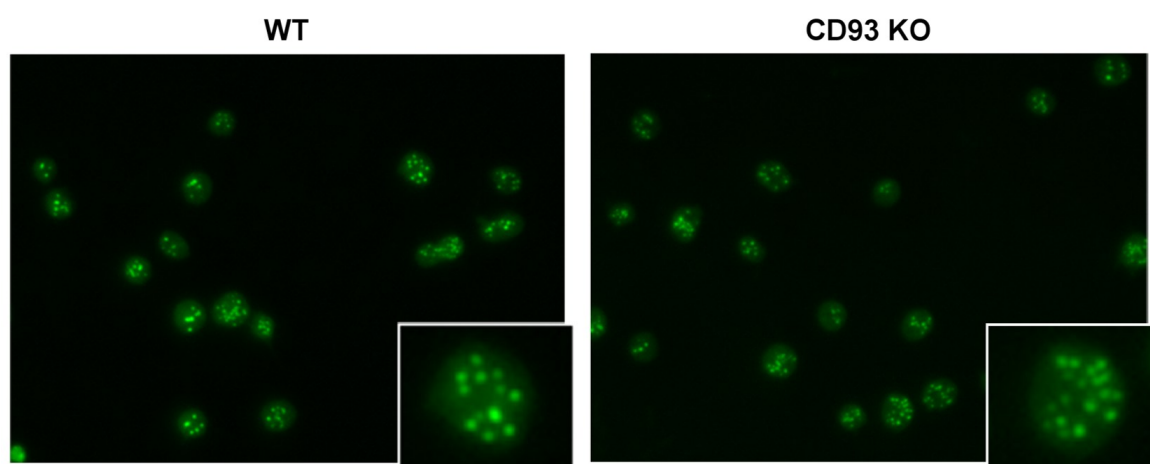


Figura 10: Analisi di interazione tra piastrine murine lavate e CpG ODN tramite microscopia a fluorescenza. Piastrine murine lavate WT e CD93 KO (3×10^8 cellule/mL) sono state incubate con $1 \mu\text{M}$ di FITC-CpG ODN per 15 minuti a 37°C . Le cellule sono state diluite a 10^7 cellule/mL, fissate con lo 0,5% di PFA e sottoposte a citospin su vetrini coprioggetto. Sono riportate immagini rappresentative ottenuto con ingrandimento $100\times$ ($n = 5$ topi/gruppo).

Per indagare in modo più approfondito se l'assenza di CD93 potesse influenzare il legame delle piastrine a CpG ODN, tale interazione è stata analizzata anche tramite citometria a flusso. Piastrine murine lavate WT e CD93 KO sono state incubate con concentrazioni crescenti di CpG ODN-FITC come descritto nella sezione *Materiali e Metodi* e analizzati al citofluorimetro.

Nella Figura 11(i) sono riportati gli istogrammi rappresentativi che mostrano sull'asse delle ascisse l'intensità di fluorescenza del fluorocromo FITC e sull'asse delle ordinate il numero di eventi per ogni valore di fluorescenza rilevata. Le diverse concentrazioni di CpG ODN-FITC utilizzate sono state riportate utilizzando un codice colore che va dal giallo per i campioni non trattati, a diverse gradazioni di verde per i campioni trattati con 0,5 μ M, 1 μ M e 5 μ M CpG ODN-FITC. Le analisi quantitative della percentuale di piastrine positive al segnale FITC e dei valori mediani di intensità fluorescenza (MFI) sono riportate nella Figura 11(ii) e (iii), rispettivamente. In entrambi i grafici della figura B i campioni di piastrine WT sono indicati in grigio mentre quelli di piastrine CD93 KO in bianco.

Come è possibile osservare dalla Figura 11, in entrambi i genotipi è evidente un incremento dose-dipendente dell'intensità di fluorescenza e della percentuale di eventi positivi al FITC. Infatti, il legame di CpG ODN-FITC alle piastrine WT è già rilevabile alla dose più bassa di 0,5 μ M, in cui l'80% di cellule risulta positivo al segnale (Figura 11 ii). La percentuale di cellule positive aumenta ulteriormente a concentrazioni pari a 1 μ M, per raggiungere quasi il 100% nei campioni trattati con concentrazione massima di 5 μ M. Allo stesso modo, la mediana di intensità di fluorescenza (MFI), utilizzata per analizzare la distribuzione indicativa della quantità di CpG ODN-FITC legata ad ogni piastrina, aumenta sensibilmente con l'aumentare della dose di CpG ODN, con valori medi di MFI tra 800-900 nei campioni trattati con 5 μ M di CpG ODN-FITC.

Come è possibile osservare, non ci sono differenze statisticamente significative di legame tra piastrine murine WT e CD93 KO con le molecole di CpG-ODN a nessuna concentrazione utilizzata.

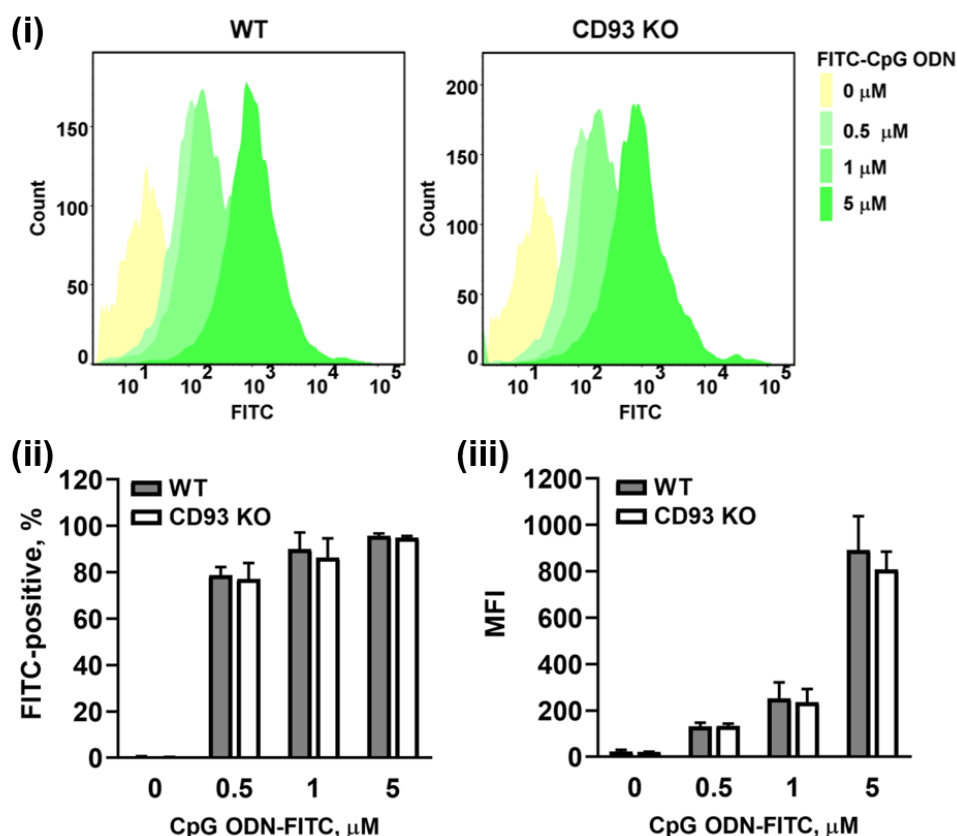


Figura 11: Analisi di interazione tra piastrine murine lavate e CpG ODN in citometria a flusso: Le piastrine lavate con KO con WT e CD93 sono state lasciate non trattate o trattate con le quantità riportate (0,5, 1, 5 μM) di FITC-CpG ODN per 15 minuti a 37°C. È stata effettuata un'analisi di citometria a flusso del legame piastrinico alla ODN CpG e in figura sono riportati gli istogrammi rappresentativi e l'analisi di quantificazione rispettivamente in (i) e (ii-iii). I dati sono espressi come percentuale di piastrine positive per la colorazione FITC-CpG ODN (ii) e come intensità mediana di fluorescenza (MFI) (iii). Le barre grigie sono riferite ai campioni di piastrine WT e le barre bianche a campioni di piastrine CD93 KO ($n = 6$ topi/gruppo). I dati sono espressi come media $\pm$ SD.

Questi risultati dimostrano che l'assenza di CD93 non influenza l'interazione tra le piastrine e le molecole di CpG ODN e suggeriscono che questo recettore non abbia una funzione predominante nel riconoscimento degli oligonucleotidi.

CD93 è coinvolto nel rilascio di α -granuli indotto da CpG ODN.

Dopo aver caratterizzato il ruolo di CD93 nell'interazione tra CpG ODN e piastrine, è stato valutato il coinvolgimento di CD93 nel rilascio degli α -granuli. All'interno di questi granuli sono presenti anche molecole con un ruolo fondamentale nei processi di difesa immunitaria, tra cui la chemochina PF4 (CXCL4), ad azione microbica.

In questo studio, sono stati quantificati i livelli di PF4 rilasciati da piastrine murine WT e CD93-KO in seguito a stimolazione con CpG ODN, come descritto in *Materiali e Metodi*. Per determinare se le piastrine di topi WT e CD93 KO avessero il medesimo contenuto di PF4 totale, sono state condotte analisi di *immunoblotting* su campioni di lisati piastrinici totali WT e CD93 KO come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*.

In Figura 12 A(i) è riportata l'immagine rappresentativa dall'analisi in *immunoblotting* dove non è possibile apprezzare differenze nell'intensità delle bande di PF4 tra i campioni WT e CD93 KO. In accordo con quanto riportato in letteratura, la proteina PF4 viene rilevata in *immunoblotting* con una doppia banda con peso molecolare compreso tra 10 e 15 kDa. Come controllo di *equal loading* è stato utilizzato un anticorpo diretto contro Tubulina, che ha permesso di verificare che i campioni contenessero la stessa quantità di proteine totali. L'analisi densitometrica quantitativa riportata in Figura 12 A(ii) ha confermato che non vi sono differenze statisticamente significative di contenuto totale di PF4 tra piastrine di topi WT e CD93 KO.

Dopo aver verificato che non ci fossero differenze nel contenuto totale di PF4 nei due genotipi, abbiamo valutato il rilascio di PF4 come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*. Brevemente, le piastrine (WT e CD93 KO) sono state stimulate con CpG ODN 10 μ M per 30 minuti e, dopo aver allontanato le piastrine, il surnatante è stato analizzato tramite *immunoblotting*.

Come mostrato nell'immagine 12 B(i), la stimolazione piastrinica con CpG ODN induce il rilascio di PF4, dimostrando che il trattamento con CpG ODN induce fenomeni di attivazione piastrinica e, in particolare, il rilascio di granuli α . Tuttavia, la quantità di PF4 rilasciato dalle piastrine CD93 KO trattate con CpG ODN, risulta inferiore, in modo statisticamente significativo, rispetto al campione di piastrine WT. La quantificazione del rilascio, normalizzata sul contenuto totale di PF4 di ogni rispettivo topo, è riportata nel

grafico a destra (Figura 12 B(ii)) e mostra che tale riduzione è circa pari al 33% e risulta essere statisticamente significativa.

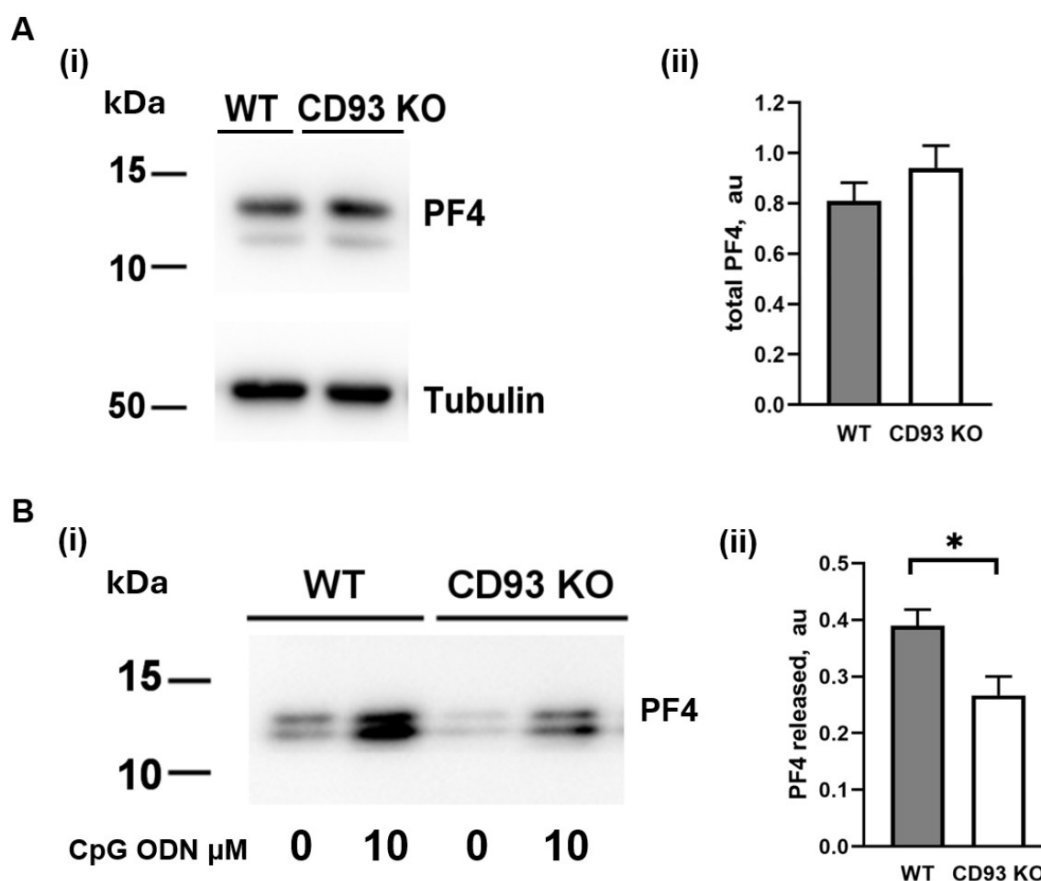


Figura 12: Analisi in dei quantitativo di PF4 nelle piastrine e nel surnatante piastrinico in seguito a stimolazione con CpG ODN. In A sono mostrate le analisi in immunoblotting (i) e relativa quantificazione (ii) del contenuto totale di PF4 in lisati di piastrine purificate da topi WT (barre grigie) e CD93 KO (barre bianche) (3×10^8 cellule/mL). L'anticorpo anti- β -Tubulina è stato utilizzato come controllo di equal loading. In B sono riportate l'analisi in immunoblotting (i) e quantificazione del rilascio di PF4 (ii) nel surnatante di piastrine WT e CD93 KO in condizioni basali o in seguito a stimolazione con CpG ODN 10 μ M per 30 minuti. I valori di PF4 rilasciato sono stati normalizzati sul rispettivo contenuto di PF4 totale. I dati sono espressi come media $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Il rilascio di granuli α indotto dalla stimolazione con CpG ODN è stato valutato anche tramite analisi dell'esposizione di P-selectina in citometria a flusso, come descritto nel paragrafo . La P-selectina, infatti, è espressa sulla membrana dei granuli α e, in seguito ad attivazione

piastrinica, viene esposta sulla superficie piastrinica. A tale scopo, sangue intero prelevato da topi WT e CD93 KO è stato trattato con CpG ODN e marcato con anticorpi anti-CD62P e anti-CD41 (per l'identificazione del gate delle piastrine).

Come riportato in Figura 13, in campioni di sangue intero WT (grigio) e CD93 KO (bianco) non stimolati, le piastrine positive all'esposizione di CD62P sono prossime, rispettivamente, all'8% e al 6%. In seguito a stimolazione con CpG ODN, sia in campioni WT che CD93 KO si osserva un aumento della percentuale di piastrine positive al CD62P, a dimostrazione dell'effettiva secrezione dei granuli α . Tuttavia, la percentuale di piastrine positive all'esposizione di P-selectina risulta inferiore in campioni CD93 KO, rispetto a campioni WT. Tale riduzione è pari circa al 20% rispetto al WT e risulta essere statisticamente significativa.

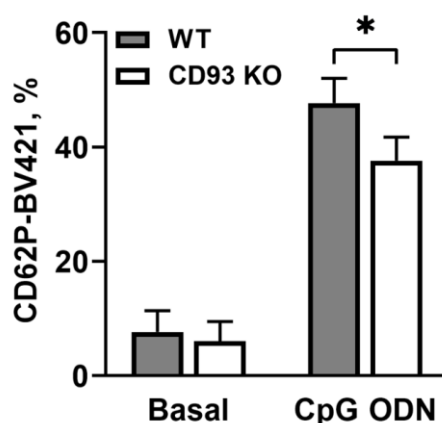


Figura 13: Analisi in citometria a flusso dell'esposizione di P-selectina. L'esposizione di P-selectina è stata analizzata in sangue intero da topi WT (barre grigie) e CD93 KO (barre bianche) stimolati con 10 μ M di CpG ODN. Dati dell'intera popolazione piastrinica sono espressi come percentuale di cellule positive a CD62P-BV421 ($n = 6$ topi/gruppo). I dati sono espressi come media $\pm$ SD. * $p < 0,05$

I risultati ottenuti da questi esperimenti suggeriscono che CD93 sia coinvolto nella secrezione di α -granuli indotta in seguito alla stimolazione con CpG ODN e che la sua espressione sia essenziale per il corretto rilascio di PF4 e una completa esposizione delle P-selectina.

CD93 non controlla il rilascio dei granuli densi indotto da CpG ODN

Per determinare se CD93 influenzasse anche il processo di esocitosi di granuli densi indotto da CpG ODN è stato quantificato il rilascio di ATP da parte di piastrine murine WT e CD93KO, utilizzando un saggio di determinazione basato su luciferasi, come specificato nel capitolo *Materiali e Metodi*.

In Figura 14 viene mostrato il grafico in cui sull'asse delle ordinate è riportata la concentrazione di ATP presente nel surnatante piastrinico. Sull'asse delle ascisse sono riportate le concentrazioni di CpG ODN utilizzate per la stimolazione. In particolare, si osserva che, in condizioni basali, la quantità di ATP rilasciata è circa pari a 200 nM. In seguito ad una stimolazione di 30 minuti con CpG ODN ad una concentrazione di 10 μ M, la concentrazione di ATP ritrovabile nel surnatante delle piastrine raggiunge una concentrazione di circa 600 nM e non sono evidenziabili differenze tra campioni WT e CD93 KO.

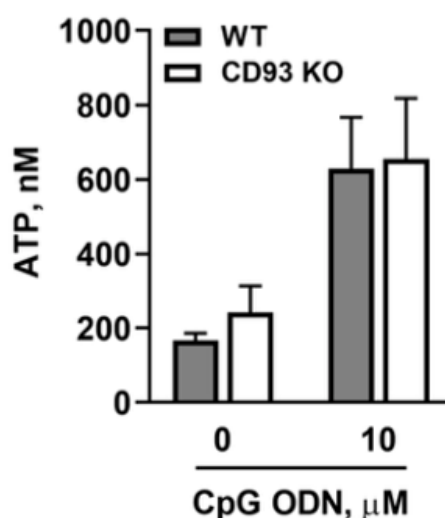


Figura 14: Analisi del rilascio di granuli densi in seguito a stimolazione con CpG ODN. Le piastrine lavate WT e CD93 KO (3×10^8 cellule/mL) sono state stimulate con 10 μ M di CpG ODN per 30 minuti e il rilascio di ATP è stato misurato tramite un saggio di luciferasi, seguendo le istruzioni del produttore ($n = 5$ topi/gruppo). I dati sono espressi come media $\pm$ SD.

Da questo esperimento risulta quindi che l'assenza di CD93 non influenza il rilascio di granuli densi da parte delle piastrine, in seguito a stimolazione con CpG ODN, nonostante fosse necessario per la corretta secrezione dei granuli α .

CpG ODN inducono attivazione piastrinica mediata da CD93

Dopo aver valutato il ruolo di CD93 nel rilascio dei granuli indotto da CpG ODN, sono state effettuate analisi mirate ad osservare se l'attivazione piastrinica a valle della stimolazione con CpG ODN fosse compromessa in assenza della proteina CD93. Per farlo sono stati condotti esperimenti di *immunoblotting* per analizzare la fosforilazione di Akt e PLC γ 2 in seguito a stimolazione con CpG ODN. La scelta di analizzare queste due molecole è dovuta al loro fondamentale ruolo nell'attivazione piastrinica. In particolare, Akt risiede a monte della cascata del segnale che porta alla sintesi di TxA₂ e alla conseguente amplificazione del segnale di attivazione piastrinica, mentre PLC γ 2 induce a valle un aumento di Ca²⁺ intracellulare, responsabile della secrezione dei granuli piastrinici.

Campioni di piastrine murine WT e CD93 KO sono stati stimolati con 10 μ M CpG ODN per 5 e 10 minuti a 37 °C come specificato nella sezione *Materiali e Metodi*. Come controllo, sono stati allestiti campioni di piastrine basali non stimolate. In seguito a stimolazione, i campioni piastrinici sono stati lisati e analizzati mediante *immunoblotting* utilizzando anticorpi monoclonali anti-fosfo-Akt e anti-fosfo-PLC γ 2 e i risultati ottenuti sono riportati nella Figura 15.

Nella Figura 15 A(i) viene mostrato il risultato dell'analisi di *immunoblotting* diretto contro fosfo-Akt, la cui banda si trova ad un'altezza di 60 kDa. La stimolazione con CpG ODN aumenta, in maniera tempo dipendente, la fosforilazione di Akt sia in piastrine WT che in piastrine CD93 KO. Tuttavia, nelle piastrine CD93 KO stimulate, la banda corrispondente a fosfo-Akt appare visibilmente meno intensa rispetto a quella osservata nelle piastrine WT stimulate (Figura 15 Ai). In linea con questa osservazione, l'analisi densitometrica mostra che i livelli di fosforilazione di Akt risultano significativamente ridotti nelle piastrine CD93 KO rispetto alle WT, sia dopo 5 sia dopo 10 minuti di stimolazione (Figura 15 Aii). Il controllo di *equal loading* ottenuto utilizzando un anticorpo anti-Akt dimostra che la quantità totale di proteina è identica in tutti i campioni considerati di piastrine WT e CD93 KO.

L'analisi della fosforilazione di PLC γ 2 ha mostrato un andamento simile (Figura 15 B). Nella Figura 15 B(i) è riportata l'immagine rappresentativa dell'analisi di *immunoblotting* di fosfo-PLC γ 2, la cui banda si trova ad un'altezza di 150 kDa. In entrambi i campioni di piastrine (WT e CD93 KO), la stimolazione con CpG ODN induce un aumento, in maniera

tempo-dipendente, della fosforilazione di PLC γ 2 che, anche in questo caso, risulta ridotta nelle piastrine CD93 KO. A differenza di quanto osservato con Akt, dopo 5 minuti di stimolazione, la differenza di fosforilazione tra WT e KO non è statisticamente significativa. Dopo 10 minuti, la fosforilazione di PLC γ 2 raggiunge il massimo nelle piastrine WT, mentre nelle piastrine CD93 KO si mantiene a livelli inferiori, pari a circa il 70% del valore massimo osservato nel campione WT di controllo. Questi dati suggeriscono che l'assenza di CD93 compromette l'attivazione completa di PLC γ 2 in risposta a CpG ODN. Come controllo di equal loading è stato utilizzato un anticorpo anti-tubulina, la cui banda è rilevabile a circa 55 kDa, confermando una quantità comparabile di proteine totali in tutti i campioni analizzati.

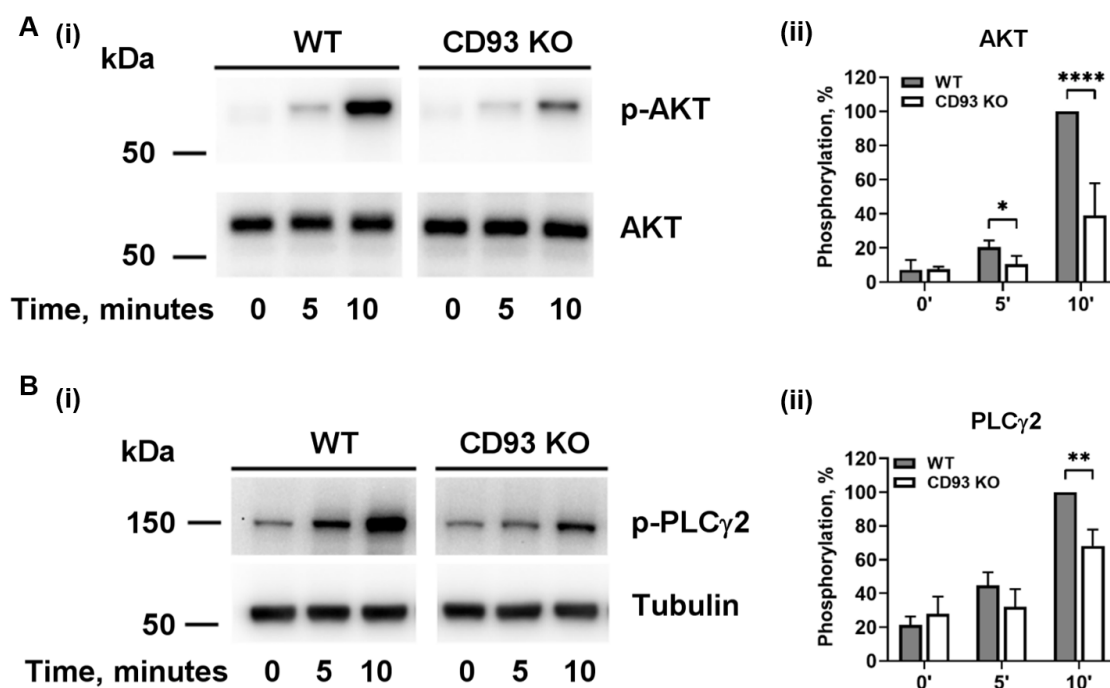


Figura 15: Analisi di immunoblotting dell'attivazione piastrinica a valle della stimolazione con CpG ODN. Piastrine lavate WT e CD93 KO (3×10^8 cellule/mL) sono state stimulate con $10 \mu\text{M}$ di CpG ODN per il tempo indicato. Le aliquote di ciascun campione sono state testate utilizzando i seguenti anticorpi: anti-fosfo-Akt, anti-Akt, anti-fosfo-PLC γ 2 e anti-Tubulina. In A(i) è mostrato un'immagine rappresentativa dell'immunoblotting di campioni WT e CD93 KO stimolati con CpG ODN al tempo 0, 5 e 10 minuti e incubate con anticorpo anti-fosfo-Akt (pannello superiore) e anti-Akt (pannello inferiore). In B(i) è mostrata l'immagine dell'immunoblotting relativo a campioni WT e CD93 KO stimolati con CpG ODN al tempo 0, 5 e 10 minuti e incubate con anticorpo anti-fosfo-PLC γ 2 (pannello superiore) e anti-Tubulina (pannello inferiore). Nelle figure A(ii) e B(ii) è riportata la quantificazione della intensità di banda espressa in percentuale, normalizzata considerando al 100% la massima fosforilazione rilevata per i campioni WT dopo 10 minuti di stimolazione ($n = 3-6$ topi/gruppo). I dati sono espressi come media $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

I dati ottenuti dimostrano che la stimolazione delle piastrine con CpG ODN porta all'attivazione di importanti vie di segnalazione piastrinica. Tuttavia, in assenza di CD93, l'attivazione di queste vie di segnalazione da parte di CpG ODN risulta fortemente compromessa. Questo suggerisce che la proteina CD93 sia coinvolta nella cascata di trasduzione del segnale a valle dell'interazione piastrinica con CpG ODN.

Il rilascio di PF4 indotto CpG ODN dipende dall'azione del TxA2

Infine, è stato valutato se, a valle del legame tra piastrine e CpG ODN, il rilascio di PF4 fosse dipendente anche da vie classiche di amplificazione del segnale ed è stato analizzato, in modo preliminare, il possibile coinvolgimento del TxA2. A tale scopo, è stato utilizzato un antagonista del recettore TP di TxA2, SQ29548. Questa molecola lega il recettore TP e si insedia nella tasca di legame per TxA2, causando un ingombro sterico che impedisce il legame all'agonista. Inoltre, SQ29548 stabilizza la conformazione tridimensionale del recettore nella sua forma inattiva.

Campioni di piastrine murine WT sono state trattate con SQ29548 e, successivamente, stimulate con CpG ODN come descritto nel capitolo *Materiali e Metodi*. Il rilascio di PF4 è stato valutato, come in precedenza, tramite analisi in *immunoblotting* di campioni di surnatante ricavati dai diversi campioni piastrinici.

Come si può osservare in Figura 16 (i), nel campione di surnatante derivante da piastrine trattate unicamente con CpG ODN è evidente la presenza delle bande corrispondenti a PF4. Il pre-trattamento con l'inibitore SQ29548 determina una marcata riduzione dell'intensità del segnale. Come si osserva nel grafico a barre (ii) dove è riportata la scansione densitometrica della membrana, i livelli di PF4 rilasciato dal campione di piastrine pre-trattate con SQ29548 è ridotto circa del 30% rispetto al campione trattato unicamente con CpG ODN.

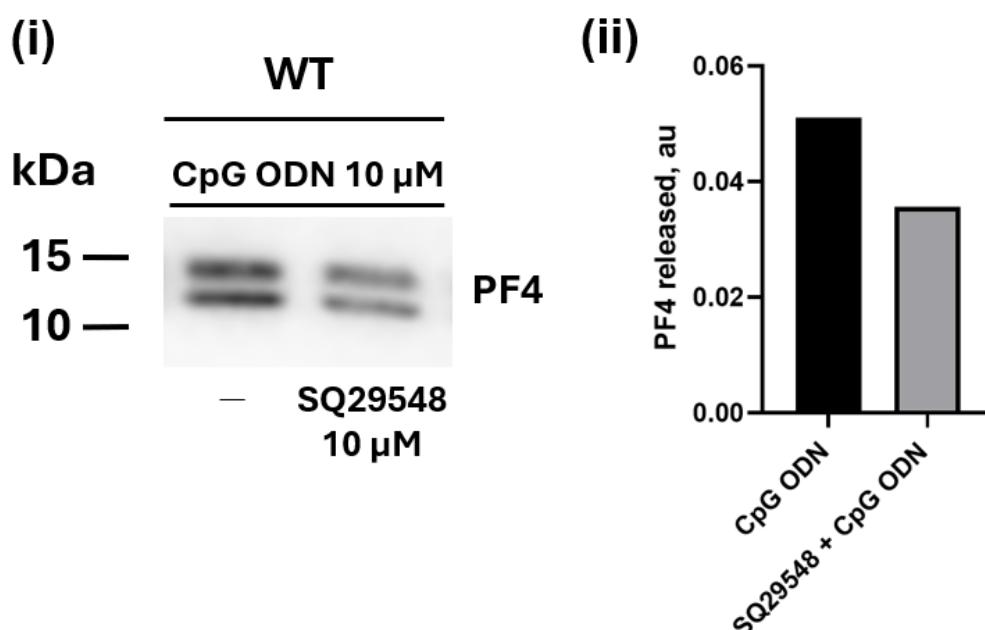


Figura 16: *Analisi preliminare del possibile ruolo del TxA2 nel rilascio di PF4 indotto da CpG ODN in piastrine WT. Analisi in immunoblotting (i) e quantificazione del rilascio di PF4 espresso in arbitrary units (ii) nel surnatante di piastrine WT trattate unicamente con CpG ODN 10 μ M o in presenza di SQ29548 10 μ M. I valori di PF4 rilasciato sono stati normalizzati sul rispettivo contenuto di PF4 totale.*

Il risultato di questa analisi preliminare suggerisce che la via di amplificazione mediata dal TxA2 è coinvolta nella secrezione di PF4 a valle della stimolazione con CpG ODN.

Per approfondire questo aspetto, abbiamo valutato il possibile ruolo di CD93 nel rilascio di PF4 indotto dalla stimolazione diretta del recettore del TxA2 TP.

A tale scopo, piastrine lavate WT e CD93 KO sono state trattate con un analogo stabile del TxA2, la molecola U46619. In seguito alla stimolazione con 2 μ M U46619, il surnatante di questi campioni è stato raccolto e analizzato in *immunoblotting* per valutare il quantitativo di PF4 rilasciato. Come è possibile osservare (Figura 17), la stimolazione diretta del recettore TP con U46619 induce un marcato rilascio di PF4 nei campioni WT mentre, nei campioni CD93 KO, il rilascio è ridotto, in maniera statisticamente significativa, di circa il 50%.

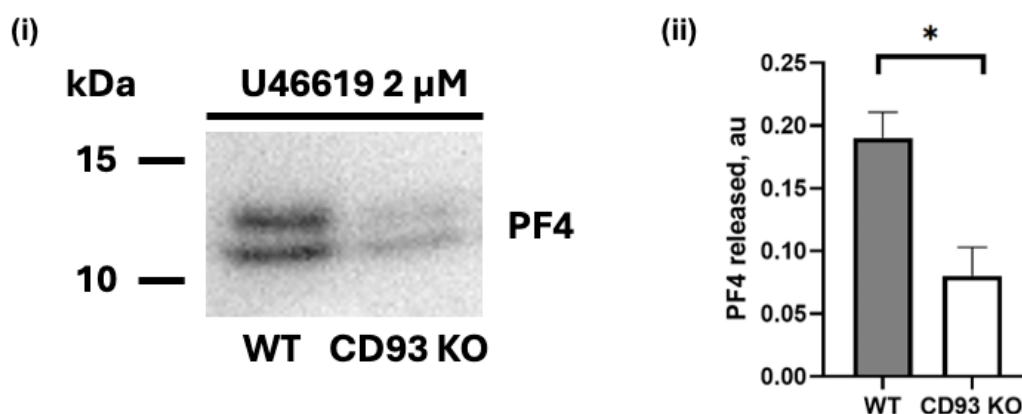


Figura 17: Immunoblotting del PF4 rilasciato da campioni di piastrine WT CD93 KO a seguito della stimolazione con U46619. Analisi in immunoblotting (i) e quantificazione del rilascio di PF4 espresso in arbitrary units (ii) nel surnatante di piastrine WT e CD93 KO trattate con U46619 2 μ M. (n= 3 topi/gruppo). I dati sono espressi come media $\pm$ SD.
* $p < 0,5$.

I risultati ottenuti dimostrano che, in piastrine prive della proteina CD93, la via che porta al rilascio di PF4 a valle del TxA2 è compromessa. Questo suggerisce che CD93 abbia un ruolo chiave nella segnalazione biochimica del TxA2 che regola la secrezione dei granuli α .

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le piastrine hanno un ruolo fondamentale nella risposta dell'organismo contro gli agenti patogeni. In particolare, esse impediscono la diffusione di tali agenti esogeni ed esercitano meccanismi di difesa volti ad eradicare l'infezione dall'organismo o ad attivare le altre cellule del sistema immunitario contro il patogeno. Uno dei meccanismi chiave in questo processo, è il rilascio del contenuto dei granuli piastrinici, ricchi di molecole coinvolte nella difesa immunitaria (Trivigno *et al.*, 2023). Inoltre, le piastrine esprimono un numero elevato di PRRs, responsabili del riconoscimento di PAMPs. A quest'ultima classe di molecole appartengono i CpG ODN (Akbarzadeh *et al.*, 2025). I CpG ODN sono molecole di DNA che agiscono come analoghi sintetici del DNA batterico e vengono utilizzati come adiuvanti in diverse terapie farmacologiche per potenziare la risposta immunitaria contro infezioni microbiche e tumori (Jurk e Vollmer, 2007). I CpG ODN inducono attivazione piastrinica, promuovendo così l'avvio delle risposte immunitarie intrinseche di queste cellule (Trivigno *et al.*, 2023).

Fino ad ora, la letteratura scientifica offre un numero limitato di studi riguardanti i processi innescati dall'interazione tra piastrine e CpG ODN.

Tra i PRRs espressi sulla superficie piastrinica, risiede il recettore CD93, un recettore lectinico di tipo C che, secondo uno studio degli ultimi anni, lega le molecole di CpG ODN a livello delle cellule nucleate (Nativel *et al.*, 2019).

Il gruppo di ricerca presso cui ho svolto il mio internato di tesi ha precedentemente indagato il ruolo della proteina CD93 nell'attivazione piastrinica, dimostrando che CD93 è presente sia in piastrine umane che murine e che, in queste ultime, è in grado di regolare la stabilizzazione del recettore PAR4 sulla superficie cellulare (Trivigno *et al.*, 2024). Questi studi hanno suscitato l'interesse rivolto al possibile ruolo di CD93 nell'interazione delle piastrine con i CpG ODN, diventando oggetto di indagine di questa tesi.

Per realizzare questo studio, sono stati utilizzati modelli murini WT e CD93 KO le cui piastrine isolate sono state trattate con CpG ODN di tipo C (ODN2395), che combinano gli elementi strutturali e gli effetti immunostimolanti delle classi A e B e sono, inoltre, la classe più utilizzata negli studi scientifici per analizzare la risposta piastrinica agli oligodeossinucleotidi CpG.

Questo studio ha permesso di ottenere i seguenti risultati:

- Il legame tra le molecole di CpG ODN e le piastrine è indipendente da CD93;
- CD93 regola la secrezione piastrinica di α -granuli indotta da CpG ODN;
- CD93 non è un regolatore del meccanismo di secrezione dei granuli densi;
- CD93 regola la trasduzione del segnale attivata dai CpG ODN;
- Il TxA₂ contribuisce a supportare il rilascio di PF4 indotto da CpG ODN e CD93 è coinvolto in questa funzione

Le analisi in microscopia a fluorescenza e citometria a flusso ottenute stimolando piastrine murine WT e CD93 KO con CpG ODN hanno mostrato che l'assenza della proteina CD93 non influisce sulle capacità delle piastrine di legare i CpG ODN. CD93 non sembra quindi essere fondamentale per il legame quantitativo dei CpG ODN. Tuttavia, questo non esclude che i CpG ODN possano entrare in contatto con CD93. Infatti, in diversi contesti cellulari, i CpG ODN interagiscono con recettori di membrana sulla superficie cellulare che ne permettono l'internalizzazione e il successivo legame con recettori intracellulari, in particolare con il TLR9 (Jurk e Vollmer, 2007). CD93 potrebbe essere coinvolta nella via di trasporto intracellulare di queste molecole nei compartimenti cellulari, senza intervenire nell'iniziale contatto tra le piastrine e i CpG ODN.

Nonostante nelle piastrine CD93 non sia il recettore necessario al legame con i CpG ODN, è stata osservata una diminuzione nei livelli di attivazione piastrinica a valle della stimolazione con queste molecole. Stimolando piastrine di topi WT e CD93 KO con CpG ODN è stato possibile monitorare, mediante *immunoblotting*, i livelli di fosforilazione di due importanti molecole coinvolte nell'attivazione piastrinica responsabili dei meccanismi di amplificazione del segnale e di aumento di Ca²⁺ intracellulare, Akt e PLC γ 2. Le analisi mostrano che l'assenza di CD93 è associata alla riduzione dell'attivazione di queste due molecole in seguito al trattamento con CpG ODN, delineando un suo ruolo fondamentale

nella cascata di attivazione piastrinica derivante dalla stimolazione indotta da oligodeossinucleotidi.

Un importante marker di attivazione piastrinica è rappresentato dall'esocitosi del contenuto dei granuli α e granuli densi, ricchi di molecole coinvolte nella risposta immunitaria. Per questa ragione, lo studio si è successivamente focalizzato sul rilascio di questi organelli. Il rilascio dei granuli densi è stato determinato mediante la quantificazione dell'ATP presente nel surnatante. Nel valutare l'esocitosi dei granuli densi, la misurazione dell'ATP è stata preferita ai classici saggi con [^{14}C]-serotonina (Zarà *et al.*, 2018) principalmente per ragioni di sicurezza in laboratorio, evitando così l'impiego di traccianti radioattivi e i relativi rischi. Inoltre, l'analisi di rilascio di ADP è stata condotta sulla base del rapporto di equimolarità tra ATP e ADP: quantificando l'ATP rilasciato è possibile risalire alla quantità di ADP secreto grazie al rapporto stechiometrico 1:1 tra le due molecole. Dall'analisi effettuata CD93 non risultat essere implicata nel rilascio dei granuli densi.

Viceversa, è emerso che, in seguito a stimolazione con CpG ODN, l'assenza di CD93 compromette fortemente l'esocitosi dei granuli α , risultando in una drastica diminuzione del contenuto di PF4 rilasciato e una ridotta esposizione di P-selectina. Questo suggerisce che CD93 è un regolatore chiave della secrezione dei granuli α in piastrine stimulate con CpG ODN.

Lo studio si è successivamente focalizzato, in maniera preliminare su PF4, che svolge un ruolo fondamentale nella risposta infiammatoria. Questa molecola presenta una forte carica positiva ed è in grado di legarsi alla superficie delle cellule batteriche, ricche in molecole cariche negativamente. In questo modo PF4 forma dei complessi PF4/polianioni che vengono riconosciuti da anticorpi specifici contro di essi, necessari al riconoscimento da parte di macrofagi, aumentando la fagocitosi batterica (Liu *et al.*, 2024)

Dalle analisi in *immunoblotting* di piastrine WT pre-trattate con l'inibitore del recettore del TxA2 e stimulate con CpG ODN, emerge una chiara riduzione nel rilascio di PF4, suggerendo un coinvolgimento del TxA2 nella risposta piastrinica a valle di CpG ODN. Per questa ragione, è stato verificato se la proteina CD93 fosse coinvolta nel rilascio di PF4 indotto dall'attivazione piastrinica mediata da TxA2. I risultati di *immunoblotting* mostrano che la secrezione di PF4, in seguito a stimolazione con l'analogo del trombossano U46619, è nettamente ridotta nelle piastrine di topi CD93 KO rispetto ai WT. Si delinea così un nuovo ruolo regolatorio di CD93 nella secrezione di PF4 a valle del segnale del TxA2.

Questi dati permettono di correlare la riduzione di PF4 rilasciato da piastrine prive di CD93 e trattate con CpG ODN, ad un'alterazione nella via di amplificazione del segnale mediata da TxA2. Ciò apre la strada a futuri possibili studi sul ruolo specifico di CD93 nella trasduzione del segnale a valle dei CpG ODN. Studi futuri includono analisi quantitative del TxA2 rilasciato da piastrine WT e CD93 KO trattate con CpG ODN, ad esempio tramite un saggio ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). In questo modo sarà possibile determinare se CD93 possa essere coinvolto direttamente nella sintesi di TxA2. Sarà inoltre fondamentale uno studio che permetterà di verificare che CD93 non sia necessario per l'attivazione piastrinica indotta da altri agonisti piastrinici, differenti da PAR4 e U46619, includendo in questo lavoro un "controllo positivo" delle analisi.

BIBLIOGRAFIA

Adamus T e Kortylewski M. The revival of CpG oligonucleotide-based cancer immunotherapies. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2018;22(1A):56-60

Akbarzadeh R et al. Editorial: Innate immune dysregulation: a driving force of autoimmunity and chronic inflammation. *Front Immunol*. 2025;16.

Andrews RK et al. Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(8):1170–4.

Aquino-Domínguez AS et al. Recent Advances in the Discovery and Function of Antimicrobial Molecules in Platelets. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19):10230.

Best MG et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell*. 2015;28(5):666-676.

Blair P e Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009;23(4):177-189.

Bohlson SS et al. CD93 interacts with the PDZ domain-containing adaptor protein GIPC: implications in the modulation of phagocytosis. *J Leukoc Biol*. 2005;77(1):80–9.

Brewer DB. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *Br J Haematol*. 2006;133(3):251–8. .5.

Broos K et al. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev*. 2011;25(4):155–67.

Cai M et al. CD93 in Health and Disease: Bridging Physiological Functions and Clinical Applications. *Int J Mol Sci*. 2025;26(17):8617.

Campagna R et al. The Utility of Nicotinamide N-Methyltransferase as a Potential Biomarker to Predict the Oncological Outcomes for Urological Cancers: An Update. *Biomolecules*. 2021;11(8):1214.

Canobbio I, Torti M, Guidetti G. 2025. Platelets in Neurodegenerative Diseases. In *Platelets in Disease: Thrombotic Disorders and Disorders not Involving Hemorrhage or*

Thrombosis. (Gresele P, Lopez J A, Angiolillo D J, Page C P). Volume 4. Cham, Switzerland: Springer Nature, pp. 1893–1905

Champion CR. Hecplisav-B: A Hepatitis B Vaccine With a Novel Adjuvant. *Ann Pharmacother*. 2021;55(6):783-791.

Chaudhary P K *et al.* An Insight into Recent Advances on Platelet Function in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23, 6022.

Chevrier S *et al.* CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(10):3895–900.

De Meyer SF *et al.* von Willebrand factor to the rescue. *Blood*. 2009;113(21):5049–57.

De Nardi AC *et al.* Immunothrombosis and its underlying biological mechanisms. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2024;46(1):49–57.

Delierneux C *et al.* Targeting of C-type lectin-like receptor 2 or P2Y12 for the prevention of platelet activation by immunotherapeutic CpG oligodeoxynucleotides. *J Thromb Haemost*. 2017;15(5):983–97.

Deppermann C e Kubes P. Platelets and infection. *Semin Immunol*. 2016;Hemostasis28(6):536–45.

DiSabato DJ *et al.* Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*. 2016;139 Suppl 2(Suppl 2):136–53.

Estevez B e Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology*. 2017;32(2):162–77.

Fritsma, G.A. Platelet Structure and Function. 2015. *Clin Lab Sci* 2015;28(2):125

Galvagni F *et al.* Dissecting the CD93-Multimerin 2 interaction involved in cell adhesion and migration of the activated endothelium. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2017;64:112–27.

Gao Y *et al.* Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J Cell Physiol*. 2000;184(3):373–9.

- Gremmel T *et al.*** Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost.* 2024;50(8):1173–86.
- Griffiths MR *et al.*** CD93 regulates central nervous system inflammation in two mouse models of autoimmune encephalomyelitis. *Immunology.* 2018;155(3):346–55.
- Haining E J, Nicolson P L R, Onselaer M B, Poulter N S, Rayes J, Thomas M R, Watson S P.** 2019. GPVI and CLEC-2. In: *Platelets* (Michelson A D). 4th ed. Cambridge. Academic Press. p. 213–26.
- Hanagata N.** Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:2181–95.
- Harhausen D *et al.*** CD93/AA4.1: a novel regulator of inflammation in murine focal cerebral ischemia. *J Immunol.* 2010;184(11):6407–17.
- Heijnen, H.F.G e Korpelaar, S.J.A.** 2017. Platelet Morphology and Ultrastructure. In *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders.* (Gresele P, Kleiman N S, Lopez J A, Page C P). Cham, Switzerland: Springer Nature. p21-28
- Hong X *et al.*** Deficiency of CD93 exacerbates inflammation-induced activation and migration of BV2 microglia by regulating the TAK1/NF- κ B pathway. *Neurosci Lett.* 2022;791:136914.
- Huang X e Yang Y.** Targeting the TLR9-MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses. *Expert Opin Ther Targets.* 2010;14(8):787-796.
- Janus-Bell E e Mangin PH.** The relative importance of platelet integrins in hemostasis, thrombosis and beyond. *Haematologica.* 2023;108(7):1734–47.
- Jeon JW *et al.*** Soluble CD93 induces differentiation of monocytes and enhances TLR responses. *J Immunol.* 2010;185(8):4921–7.
- Johansson K *et al.*** CpG oligonucleotides induce acute murine thrombocytopenia dependent on toll-like receptor 9 and spleen tyrosine kinase pathways. *J Thromb Haemost.* 2024;22(11):3266–76.
- Jurk M e Vollmer J.** Therapeutic applications of synthetic CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists for immune modulation. *BioDrugs.* 2007;21(6):387-401.

Khan KA *et al.* C-type lectin domain group 14 proteins in vascular biology, cancer and inflammation. *Febs J.* 2019;286(17):3299–332.

Komiya E *et al.* Angiomodulin, a marker of cancer vasculature, is upregulated by vascular endothelial growth factor and increases vascular permeability as a ligand of integrin $\alpha v\beta 3$. *Cancer Med.* 2014;3(3):537–49.

Komiya E *et al.* Elevated expression of angiomodulin (AGM/IGFBP-rP1) in tumor stroma and its roles in fibroblast activation. *Cancer Sci.* 2012;103(4):691–9.

Koupenova M *et al.* Thrombosis and platelets: an update. *Eur Heart J.* 2017;38(11):785–91.

Krieg AM. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1184–1194.

Langenkamp E *et al.* Elevated Expression of the C-Type Lectin CD93 in the Glioblastoma Vasculature Regulates Cytoskeletal Rearrangements That Enhance Vessel Function and Reduce Host Survival. *Cancer Res.* 2015;75(21):4504–16.

Lee R H, Stefanini L, Bergmeier W. 2019. Platelet Signal Transduction. In: *Platelets* (Michelson A D). 4th ed. Cambridge. Academic Press. p. 329–48.

Li H *et al.* Neutrophils: Linking Inflammation to Thrombosis and Unlocking New Treatment Horizons. *Int J Mol Sci.* 2025;26(5):1965.

Li Y *et al.* Angiogenesis modulated by CD93 and its natural ligands IGFBP7 and MMRN2: a new target to facilitate solid tumor therapy by vasculature normalization. *Cancer Cell Int.* 2023;23:189.

Linton MF *et al.* Macrophage Apoptosis and Efferocytosis in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2016;80(11):2259–68.

Liu C *et al.* CD93 and GIPC expression and localization during central nervous system inflammation. *Neural Regen Res.* 2014;9(22):1995–2001.

Liu S *et al.* The Interaction Between Vasculogenic Mimicry and the Immune System: Mechanistic Insights and Dual Exploration in Cancer Therapy. *Cell Prolif.* 2025;58(6):e13814.

Liu Z *et al.* Platelet factor 4(PF4) and its multiple roles in diseases. *Blood Rev.* 2024;64:101155.

Locatelli L *et al.* Platelets in Wound Healing: What Happens in Space? *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:716184.

Lugano R *et al.* CD93 maintains endothelial barrier function by limiting the phosphorylation and turnover of VE-cadherin. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2023;37(4):e22894.

Lugano R *et al.* CD93 promotes β 1 integrin activation and fibronectin fibrillogenesis during tumor angiogenesis. *J Clin Invest.* 2018;128(8):3280–97.

Machlus KR e Italiano JE. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol.* 2013;201(6):785–96.

Mandel J *et al.* Beyond Hemostasis: Platelet Innate Immune Interactions and Thromboinflammation. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):3868.

Meng D *et al.* The Role of CLEC-2 and Its Ligands in Thromboinflammation. *Front Immunol.* 2021;12:688643.

Nativel B *et al.* CD93 is a cell surface lectin receptor involved in the control of the inflammatory response stimulated by exogenous DNA. *Immunology.* 2019;158(2):85–93.

Nepomuceno RR *et al.* C1qRP Is a Heavily O-Glycosylated Cell Surface Protein Involved in the Regulation of Phagocytic Activity¹. *J Immunol.* 1999;162(6):3583–9.

Nicolai L *et al.* Platelets: Orchestrators of immunity in host defense and beyond. *Immunity.* 2024;57(5):957–72.

Orlandini M *et al.* The characterization of a novel monoclonal antibody against CD93 unveils a new antiangiogenic target. *Oncotarget.* 2014;5(9):2750–60.

Portier I e Campbell RA. Role of Platelets in Detection and Regulation of Infection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(1):70–8.

Reusswig F et al. Platelet life cycle during aging: function, production and clearance. *Platelets*. 2024;35(1):2433750.

Rossaint J et al. Role of Platelets in Leukocyte Recruitment and Resolution of Inflammation. *Front Immunol*. 2018;9:2712.

Rumbaut RE e Thiagarajan P. 2010 Platelet Aggregation. In: *Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis* (Rumbaut RE, Thiagarajan P). Chapter 4. San Rafael (CA). Morgan & Claypool Life Sciences.

Sang Y et al. Interplay between platelets and coagulation. *Blood Rev*. 2021;46:100733.

Sharda A e Flaumenhaft R. The life cycle of platelet granules. *F1000Res*. 2018;7:236. 2018

Slingsby MHL et al. Sequence-specific 2'-O-methoxyethyl antisense oligonucleotides activate human platelets through glycoprotein VI, triggering formation of platelet-leukocyte aggregates. *Haematologica*. 2021;107(2):519–31.

Sun J et al. IGFBP7 mediates oxLDL-induced human vascular endothelial cell injury by suppressing the expression of SIRT1. *Heliyon*. 2024;10(15):e35359.

Thomas S G. The structure of resting and activated platelets. *Platelet*. 2012 47-70

Thon J N e Italiano J E. Platelets: production, morphology and ultrastructure *Handbook of experimental pharmacology*. 2012 ;210 : 3-22.

Tong W et al. Pan-Cancer Analysis Identified CD93 as a Valuable Biomarker for Predicting Patient Prognosis and Immunotherapy Response. *Front Mol Biosci*. 2021;8:793445.

Tossetta G et al. Role of CD93 in Health and Disease. *Cells*. 2023;12(13):1778.

Trivigno SMG et al. Blood Platelets in Infection: The Multiple Roles of the Platelet Signalling Machinery. *Int J Mol Sci*. 2023;24(8):7462.

Trivigno SMG et al. The C-Type Lectin Receptor CD93 Regulates Platelet Activation and Surface Expression of the Protease Activated Receptor 4. *Thromb Haemost*. 2024;124(2):122-134

Tsukita S e Yonemura S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem.* 1999;274(49):34507–10.

Tyagi T *et al.* A guide to molecular and functional investigations of platelets to bridge basic and clinical sciences. *Nat Cardiovasc Res.* 2022;1(3):223–37.

Van der Meijden PEJ e Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol.* 2019;16(3):166–79.

White JG. Platelets are coverocytes, not phagocytes: Uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. *Platelets.* 2005;16(2):121–31.

Zarà M *et al.* Molecular mechanisms of platelet activation and aggregation induced by breast cancer cells. *Cell Signal.* 2018;48:45–53. .8.

Zarà M *et al.* Release of Prometastatic Platelet-Derived Microparticles Induced by Breast Cancer Cells: A Novel Positive Feedback Mechanism for Metastasis. *TH Open Companion J Thromb Haemost.* 2017;1(2):e155–63. .

Zelensky AN e Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 2005;272(24):6179–217.

Zhang M *et al.* Modulated interaction of the ERM protein, moesin, with CD93. *Immunology.* 2005;115(1):63–73.

Zhang Z *et al.* CD93 Correlates With Immune Infiltration and Impacts Patient Immunotherapy Efficacy: A Pan-Cancer Analysis. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:817965.

Zhou J e Deng GM. The role of bacterial DNA containing CpG motifs in diseases. *J Leukoc Biol.* 2021;109(5):991–8.

Zubair M e Burns B. Pathology, Inflammation. 2024. In: *StatPearls* Treasure Island (FL): StatPearls.