

Resumen

PAPEL DE C3G EN LA DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN DE LOS MEGACARIOCITOS

Introducción

C3G es un GEF de Rap1 con múltiples funciones

C3G es un factor de intercambio de nucleótidos guanina (GEF) para las proteínas Rap1 y R-Ras implicado en numerosas funciones celulares. C3G participa en la regulación de procesos tales como la proliferación, diferenciación, migración, apoptosis y el mantenimiento de contactos célula-célula. Esto se traduce en un importante papel de C3G en la regulación de procesos fisiológicos tales como el metabolismo de la glucosa en adipocitos y músculo esquelético, la regulación del tamaño del córtex cerebral, la regulación de las funciones de los linfocitos B y T, la maduración vascular, así como un papel en la patología renal (revisado en (Radha, V. et al. 2011)). C3G es una proteína de 1077 aminoácidos (~140 kDa) que consta de varios dominios modulares bien diferenciados entre sí, tanto estructural como funcionalmente. La región C-terminal está formada por un dominio REM y un dominio catalítico (Cat) de tipo CDC25H responsable de la activación de Rap1. La región central, denominada SH3b, contiene varios motivos de secuencia ricos en prolinas (P0-P4) que median la interacción con dominios SH3 presentes en CrkL, Abl y p130Cas, entre otras proteínas. Por último, la región N-terminal contiene un sitio de unión a E-cadherina.

Papel de C3G-Rap1 en la función plaquetaria

Numerosos estudios apoyan el papel de la isoforma de Rap, Rap1b, en aspectos críticos de la función plaquetaria, incluyendo agregación, coagulación y adhesión a través de la activación de la integrina plaquetaria $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Franke, B. et al. 2000, Chrzanowska-Wodnicka, M. et al. 2005). Rap1 plaquetario es activado preferentemente por CalDAG-GEFI, un GEF que responde a señales de calcio intracelular, aunque se ha demostrado también la activación de Rap1 en plaquetas por mecanismos independientes de Ca^{2+} que implican la activación de las rutas de PKC y PI3K (Franke, B. et al. 2000, Bergmeier, W. et al. 2007).

Varias evidencias apuntan a un papel de C3G en la fisiología de las plaquetas. Se ha descrito que el principal efector de C3G, Rap1b, participa en la diferenciación de megacariocitos a plaquetas mediada por trombopoyetina (TPO) (Stork, P.J. et al. 2005). Por otra parte, ratones knock-out para CalDAG-GEFI muestran una activación plaquetaria normal

en respuesta a altas concentraciones de PMA y trombina (Crittenden, J.R. et al. 2004), lo que indica la existencia de rutas de activación de Rap1 independientes de CalDAG-GEFI. En esta línea, nuestro grupo ha demostrado, utilizando modelos de ratón transgénicos, que la sobreexpresión de C3G en plaquetas (Tg-C3G) aumenta la activación y agregación plaquetaria tanto *in vitro* como *in vivo*. Por el contrario, ratones transgénicos que expresan en plaquetas un mutante de C3G delecionado en el dominio GEF, que se comporta como un dominante negativo (Tg-C3G Δ Cat), muestran una deficiente activación y agregación plaquetaria (Gutierrez-Herrero, S. et al. 2012). C3G participa en la activación plaquetaria inducida por trombina, ADP, PMA y colágeno por un mecanismo dependiente de la activación de su efector principal Rap1b. Específicamente, hemos demostrado que, en plaquetas, C3G es un mediador de la activación de Rap1b inducida por trombina y PMA a través de la vía de PKC (Gutierrez-Herrero, S. et al. 2012). Este papel de C3G en plaquetas ha sido avalado por otras investigaciones, donde se ha descrito que C3G formaría un complejo con las proteínas CrkL y VASP para regular a Rap1b en plaquetas (Benz, P.M. et al. 2016).

Megacariopoyesis

La megacariopoyesis es el proceso por el que se forman los megacariocitos maduros (MK) a partir de células hematopoyéticas pluripotentes (HSC, del inglés *Hematopoietic Stem Cells*). En el adulto, la megacariopoyesis, al igual que el resto de la hematopoyesis, tiene lugar en la médula ósea (MO), tanto en humanos como en ratón. La megacariopoyesis se inicia cuando las células HSC se comprometen en la línea mieloide formando los progenitores mieloides o CMP (common myeloid progenitors), que más tarde dan lugar a un progenitor común a las líneas eritrocítica y megacariocítica, el MEP (megakaryocyte-erythroid progenitor). Recientemente se ha postulado un nuevo modelo, en el que una subpoblación de células HSC daría lugar directamente a progenitores megacariocíticos, sin pasar por el estado de MEP (Woolthuis, C.M. et al. 2016).

La megacariopoyesis es un proceso complejo que incluye la proliferación de los progenitores, la maduración de los MK (que conlleva un proceso de endomitosis), la formación de proplaquetas y su escisión en plaquetas en el torrente sanguíneo. En respuesta a citoquinas, los precursores MEP dan lugar secuencialmente a precursores altamente proliferativos denominados HPP-CFU-MK (*potential-colony-forming unit megakaryocytes*), BFU-MK (*burst-forming unit megakaryocytes*) y CFU-MK, siendo estos últimos los primeros progenitores MK portadores de marcadores de superficies específicos (Deutsch, V.R. et al. 2006, Szalai, G. et al. 2006). Los CFU-MK dan lugar a MK inmaduros o megacarioblastos, células no proliferativas que sufren endomitosis para incrementar su tamaño y contenido en

DNA. Además, durante este proceso, los MK acumulan proteínas en diferentes tipos de gránulos, así como grandes cantidades de membrana, lo que da lugar a la formación del denominado Sistema de Demarcación de Membrana o DMS, que actúa como reservorio de membrana de las futuras plaquetas (Behnke, O. 1968, Radley, J.M. et al. 1982). Finalmente, estos MK maduros evaginan la membrana del DMS para formar largas estructuras semejantes a pseudópodos, denominadas proplaquetas, que finalmente se fragmentan en el torrente sanguíneo dando lugar a las plaquetas maduras. El proceso por el que los MK maduros producen plaquetas se denomina trombopoyesis. Este es un proceso terminal, después del cual los MK desprovistos de citoplasma sufren apoptosis, siendo posteriormente eliminados por macrófagos (Radley, J.M. et al. 1983, Severin, S. et al. 2010).

La trombopoyetina o TPO, es la principal citoquina implicada en la megacariopoyesis, aunque otras como las interleucinas IL-3, IL-11 y el factor de células madre (SCF, de *Stem Cell Factor*), contribuyen a incrementar el tamaño de las colonias de megacariocitos (Kaushansky, K. et al. 1995). TPO se une a su receptor, c-Mpl, presente en la membrana de plaquetas, MK y sus progenitores (Li, J. et al. 1999). c-Mpl se asocia con la tirosina quinasa citoplásmica Jak2, la cual se activa por dimerización del receptor, fosforilando y activando, a su vez, a factores de transcripción de la familia STAT, así como a otras quinasas como MAPK y PI3K.

Además de la TPO, los ésters de forbol, como el PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) son capaces de inducir diferenciación MK en líneas celulares eritroleucémicas a través de la activación de su efector PKC (Long, M.W. et al. 1990, Jacquelin, A. et al. 2006, Conde, I. et al. 2010).

Rutas de señalización implicadas en la megacariopoyesis

Existen numerosas evidencias que demuestran la implicación de la ruta MEK/ERK1/2, activada por TPO, en la diferenciación MK. Más controversial es el posible papel de p38 MAPK o de JNK. Estudios con inhibidores de ERK1/2 han revelado un papel positivo de ERK1/2 y un papel negativo de p38 MAPK en la adquisición de los marcadores de superficie megacariocíticos, así como en la poliploidización, migración y formación de proplaquetas (Miyazaki, R. et al. 2001, Mazharian, A. et al. 2009).

La duración de la señal de activación de ERK1/2 es clave en la regulación de las células hematopoyéticas; una activación transitoria (minutos a horas) es suficiente para inducir proliferación, mientras que se requiere una activación sostenida (varios días) de estas quinasas para la inducción de diferenciación y maduración (Marshall, C.J. 1995). En células

K562, ERK1/2 es rápidamente activado en respuesta a PMA, lo que resulta en parada del ciclo celular, incremento del tamaño y contenido en DNA, e incremento en adhesión. Esto está acompañado por un aumento en la expresión de los marcadores de superficie CD41 (también llamado glicoproteína IIb, GPIIb, o integrina α IIb) y CD61 (glicoproteína IIIa, GPIIIa, o integrina β 3), y de una disminución del marcador eritroide GPA (glicoforina A) (Long, M.W. et al. 1990, Herrera, R. et al. 1998). Sin embargo, algunos autores ponen en duda que sea necesaria una activación sostenida de ERK1/2 para la expresión de estos marcadores y existe también controversia sobre su posible papel en la endomitosis (Conde, I. et al. 2010).

Como se ha indicado, el papel de p38 MAPK en la diferenciación MK no está claro. Algunos estudios sugieren un papel negativo de esta quinasa, a través de la inhibición de la ruta de ERK1/2. Otros autores han sugerido que la función de p38 MAPK en diferenciación MK depende de sus niveles. Así, inicialmente, la regulación negativa de su actividad sería necesaria para la expresión de los marcadores MK, mientras que la posterior activación transitoria de p38 MAPK favorecería la parada del ciclo celular y la endomitosis (Conde, I. et al. 2010). Por otra parte, p38 MAPK no parece ser relevante para la migración y la formación de proplaquetas (Mazharian, A. et al. 2009). Por otra parte, se ha sugerido un papel positivo de p38 MAPK en eritropoyesis, ya que la activación de p38 MAPK, acoplada a la inhibición de ERK1/2, promueve la adquisición de marcadores eritroides (Miyazaki, R. et al. 2001, Uddin, S. et al. 2004, Moosavi, M.A. et al. 2007).

De manera similar a lo descrito en p38 MAPK, niveles moderados de JNK favorecerían los primeros estadios de la diferenciación MK, como la adquisición de los marcadores CD41 y CD61, mientras que niveles excesivos podrían tener un efecto negativo en la diferenciación tardía (Jacquel, A. et al. 2006, Sardina, J.L. et al. 2010).

En cuanto a la ruta de PI3K-Akt, parece ser que su activación, inducida por TPO, modula los niveles del inhibidor del ciclo celular p27, necesario para la regulación de la progresión del ciclo celular que conduce a la poliploidía (Geddis, A.E. et al. 2001, Nakao, T. et al. 2008).

Expresión de glicoproteínas durante la diferenciación y maduración megacariocítica

Al igual que el resto de linajes hematopoyéticos, durante su diferenciación los MK van expresando de manera secuencial una serie de marcadores de superficie, que se pueden identificar fácilmente mediante citometría de flujo. A lo largo del proceso de diferenciación, los progenitores megacariocíticos, que, en ratón, inicialmente son Lin-Sca1+c-

Kit+CD34+Flt3-, dan lugar progenitores MPP (Lin-Sca1+c-Kit+CD34+Flt3+), los cuales dan lugar a los progenitores CLP y éstos a los MEP, que son Lin-Sca1-cKit+CD34- (Akashi, K. et al. 2000, Yang, L. et al. 2005, Seita, J. et al. 2010). No obstante, los marcadores característicos del linaje megacariocítico son las glicoproteínas CD41 (GPIIb o integrina α IIb) y CD61 (GPIIIa o integrina β 3). La expresión de CD41 precede la expresión de CD61 y ésta, a su vez, a la aparición de CD42a (GPIX) y CD42b (GPIb), de manera que el patrón CD34+CD41+CD61+CD42- corresponde a megacarioblastos, mientras que el patrón CD34-CD41+CD61+CD42+ identifica a los promegacariocitos y megacariocitos maduros. Adicionalmente, los megacariocitos maduros y las plaquetas expresan otros marcadores se superficie, como CD51 (integrina α V), VWF, PF4, β -tromboglubulina y fibrinógeno, entre otros.

Endomitosis

Una de las principales características de la diferenciación MK es la acumulación de un gran volumen citoplásmico, acompañado de una gran masa nuclear que se produce como resultado de un proceso de poliploidización. Durante la diferenciación, los megacariocitos diploides dejan de proliferar y sufren sucesivas rondas de ciclos celulares incompletos, en los cuales la mitosis aborta en anafase tardía, lo que impide la correcta cariocinesis y citocinesis. Este ciclo celular aberrante recibe el nombre de endomitosis o ciclo endomitótico y da como resultado un incremento en el contenido en DNA de hasta 64n en ratón y 128n en humanos (Zimmet, J. et al. 2000, Geddis, A.E. et al. 2006).

La regulación del ciclo celular durante la diferenciación MK está principalmente mediada por la ciclina D3 y por el inhibidor de CDKs, p21^{WAF1/Cip1}, cuya expresión se encuentra incrementa durante la endomitosis (Zimmet, J.M. et al. 1997). La expresión de p21 está regulada por TPO a través de la ruta Jak2-STAT5 y sus niveles se mantienen elevados desde las etapas tempranas de la diferenciación MK (Kikuchi, J. et al. 1997).

Influencia del microambiente en la maduración de los MK

Las HSC residen en la MO dentro de microambientes dinámicos conocidos como nichos. Este microambiente se compone de células de soporte, factores de crecimiento, componentes metabólicos y factores de matriz, que regulan activamente las funciones de las células HSC. En la MO se distinguen dos tipos de nichos, el nicho osteoblástico o endosteal y el nicho vascular. La mayoría de las HSC se localizan preferentemente en el nicho osteoblástico, donde un complejo entramado de células estromales favorecen el mantenimiento de sus características multipotentes.

La megacariopoyesis y trombopoyesis se produce en estos nichos, mediante interacciones bidireccionales entre los progenitores y el microambiente, ya que si bien TPO e interleucinas presentes en el microambiente favorecen la megacariopoyesis, los MK son capaces de mantener el estado quiescente de las HSC en condiciones normales y estimular su proliferación en una situación de daño.

Dentro del nicho osteoblástico, los osteoblastos secretan diversos factores de crecimiento, como TPO o SDF-1, necesarios para el mantenimiento de la población de HSC, mientras que los osteoclastos facilitan la retención de las HSC mediante la liberación de calcio y SCF (Psaila, B. et al. 2012). El colágeno tipo I, muy abundante en este nicho, regula negativamente la formación de proplaquetas mediante la interacción con su receptor, la integrina $\alpha 2\beta 1$, que conlleva a la activación de la ruta de Rho/ROCK (Sabri, S. et al. 2004). Por el contrario, los colágenos tipo II y IV, abundantes en torno a los vasos sanguíneos de la MO, favorecen la diferenciación MK (Balduini, 2008 #213).

La MO murina está altamente vascularizada, con grandes arterias que se ramifican progresivamente hasta formar las sinusoides venosas, cerca del hueso (nicho osteoblástico). El nicho vascular promueve la diferenciación MK y la formación de proplaquetas, las cuales se liberan al torrente sanguíneo. La quimiocina SDF-1, vía su receptor CXCR4, es producida por las células estromales, creándose un gradiente que facilita la migración y el contacto de los MK con el nicho vascular (Hamada, T. et al. 1998). Este nicho es rico en colágeno tipo IV, fibronectina, fibrinógeno y vWF. Particularmente, la interacción del fibrinógeno con la integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$ de los MK, modula la formación de proplaquetas (Larson, M.K. et al. 2006).

El sistema de demarcación de membrana o DMS

Tras la endomitosis, los megacariocitos sufren una maduración citoplasmática, consistente en la acumulación de gránulos y grandes cantidades de proteínas y lípidos, para crear lo que se denomina el sistema de demarcación de membrana (DMS) o sistema de membrana invaginada (IMS). El DMS presenta continuidad con la membrana plasmática, por lo que se piensa que se forma mediante invaginaciones de la membrana plasmática, y que constituye un reservorio para proveer de membrana a las futuras proplaquetas (Radley, J.M. et al. 1982, Italiano, J.E., Jr. et al. 1999).

Producción de plaquetas

Durante las fases iniciales de la formación de proplaquetas, los MK remodelan su citoplasma para producir pseudópodos, en un proceso dependiente de la remodelación del

citoesqueleto de microtúbulos. Estos pseudópodos se elongan formando proplaquetas, caracterizadas por la presencia de constricciones en toda su longitud (Italiano, J.E., Jr. et al. 1999). Estas estructuras se introducen en el lumen de las sinusoides de la MO, fragmentándose por la acción del flujo sanguíneo, lo que da lugar a proplaquetas que finalmente se fragmentan en plaquetas individuales (Junt, T. et al. 2007). La formación de proplaquetas se ha observado también *in vitro*, tanto en MK derivados de células hepática fetales murinas como en MK humanos (Italiano, J.E., Jr. et al. 1999, Miyazaki, R. et al. 2000, Patel, S.R. et al. 2005). Se ha especulado con la participación de ERK1/2 en el proceso de formación de proplaquetas, donde parece tener un papel en la fosforilación de proteínas asociadas a microtúbulos y en la organización de estos microtúbulos en redes (Mazharian, A. et al. 2009). Además de la ruta MEK/ERK1/2, la PI3K parece estar también implicada a través de la activación de la integrina $\beta 1$ (Kawaguchi, T. et al. 2012).

Un trabajo reciente ha demostrado inequívocamente, mediante experimentos *in vivo*, que los pulmones pueden actuar también como órganos megacariopoyéticos. Parece ser que precursores hematopoyéticos son capaces de migrar a los pulmones y de producir allí plaquetas. Además, estos progenitores pulmonares son también capaces de repoblar la MO y de reconstruir los niveles de plaquetas en una situación de trombocitopenia. Este estudio, además, ha demostrado que los pulmones contribuirían en un 50% a la producción total de plaquetas (Lefrancais, E. et al. 2017).

Liberación de las plaquetas y maduración terminal

Como se ha comentado, una vez que los MK migran al nicho vascular, inician la producción de proplaquetas, las cuales liberan las plaquetas al torrente sanguíneo. Sin embargo, se ha detectado la presencia de proplaquetas en la sangre, lo que indica que el proceso de maduración puede continuar después de la liberación de las proplaquetas a la circulación. De hecho, se ha visto que los MK liberan una mezcla heterogénea de proplaquetas a la sangre, lo que ha llevado a postular la existencia de un estado intermedio denominado preplaqueta (Schwartz, H. et al. 2010). Estas preplaquetas tienen un tamaño cinco veces mayor que las plaquetas maduras (10 μm versus 2 μm de diámetro) y pueden convertirse reversiblemente en proplaquetas con la típica forma de pesa. Finalmente, las preplaquetas se dividen para dar lugar a dos plaquetas maduras (Thon, J.N. et al. 2010).

Resultados

En este trabajo hemos estudiado la implicación de C3G en los procesos que conducen a la diferenciación megacariocítica utilizando dos modelos experimentales: Líneas celulares y modelos animales transgénicos para C3G.

1. Análisis de la implicación de C3G en la diferenciación megacariocítica utilizando líneas celulares

En este estudio hemos utilizado dos líneas celulares hematopoyéticas: K562 y HEL. Ambas se comportan como precursores pluripotentes que expresan, tanto marcadores megacariocíticos como eritroides, pudiéndose diferenciar a ambas líneas dependiendo del estímulo.

La primera evidencia de la posible implicación de C3G en la diferenciación megacariocítica (MK) vino de la observación de que células K562 con sobreexpresión de C3G mostraban un fenotipo aberrante, destacando la presencia de células grandes, con extensiones y altamente vacuoladas, características que recordaban a megacariocitos. Además, el tratamiento con 20 nM de PMA, un buen inductor de la diferenciación MK, durante 3 días, incrementaba la expresión de C3G en células K562 y HEL, lo que se correlacionaba con la adquisición de una morfología megacariocítica.

Con el fin de estudiar este fenómeno con más detalle, creamos una serie de líneas celulares, tanto en K562 como en HEL con sobreexpresión de C3G (líneas pLTR2 y pLTR2-pSuper en K562 y pWpl en HEL) o con silenciamiento o eliminación de su expresión (líneas pSuper y CRISPR en K562, pLVTHM en HEL). En todos los experimentos, la inducción de diferenciación megacariocítica se ha realizado mediante incubación con 20 nM PMA durante 48h.

1.1 C3G modula la expresión de marcadores megacariocíticos

La presencia de PMA en los cultivos de K562 y HEL induce la expresión de las glicoproteínas GPIIb (CD41) y GPIIIa (CD61), dos de los marcadores megacariocíticos más importantes, al tiempo que disminuye la expresión del marcador eritroide GPA. Analizando, mediante citometría de flujo, la expresión de dichos marcadores en los clones de C3G arriba mencionados pudimos comprobar que la sobreexpresión de C3G en los dos clones diferentes de K562 indujo un aumento de los niveles de CD41 y CD61 en la superficie celular, si bien los niveles de GPA no se vieron modificados con respecto a células control. Sin embargo, el silenciamiento de C3G no modificó los niveles de expresión de estos marcadores, ni en los

clones K562-pSuper o CRISPR, ni en los clones HEL-pLVTHM, indicando que el papel de C3G en la regulación de la expresión de estos marcadores no es esencial.

1.2. C3G participa en la diferenciación eritroide inducida por imatinib

A pesar de que C3G no parece modular la expresión de GPA inducida por PMA, si pudimos comprobar un claro efecto inhibitorio sobre la expresión de α -globina, otro marcador eritroide, tanto en células K562 no estimuladas como estimuladas con imatinib-mesilato (STI-571 o Gleevec®), la cual fue analizada por Western Blot.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren un papel modulador de C3G en la expresión de marcadores eritroides y megacariocíticos en células K562 o HEL, contribuyendo a su compromiso al linaje megacariocítico.

1.3. La sobreexpresión de C3G induce la adquisición de una morfología megacariocítica

Se analizó, mediante microscopía confocal de fluorescencia y tinción de May-Grünwald-Giemsa, la morfología de células K562 con sobreexpresión o silenciamiento de C3G. En consonancia con la mayor expresión de CD41 y CD61, las células con sobreexpresión de C3G mostraron características morfológicas típicas de megacariocitos, como aumento del tamaño, núcleos más grandes y polilobulados, expansión del citoplasma y aparición de vesículas membranosas. Estas características se hicieron más patentes en presencia de PMA, que además indujo una mayor proporción de células con estructuras similares a pseudópodos en las células con sobreexpresión de C3G, en comparación con células control o con células con expresión silenciada para C3G.

1.4. C3G induce una mayor poliploidía durante la diferenciación megacariocítica

Una de las principales características de los megacariocitos es la presencia de núcleos polilobulados poliploides que se forman mediante sucesivas rondas de endomitosis, pudiendo adquirir contenidos de DNA de hasta 128n. Se estudió la participación de C3G en este proceso, constatándose que el clon K562-CRISPR-C3G presentaba una menor proporción de células con núcleos poliploides (>8n), acompañado de una mayor proporción de células diploides, frente al clon control K562-CRISPR. Por el contrario, las células con sobreexpresión de C3G, tanto K562-pLTR2-C3G/pSuper como HEL-pWpl-C3G, mostraron una mayor proporción de núcleos poliploides y una menor proporción de núcleos 2n.

La poliploidización de los progenitores megacariocíticos mediante endomitosis requiere la parada del ciclo celular, la cual suele ir acompañada por un incremento en la expresión de p21, un inhibidor de la transición G1-S del ciclo celular, cuyos niveles están

regulados por la ruta de ERK (Crespo, P. et al. 2000). Mediante Western Blot se observó un incremento en los niveles de expresión de p21 en células K562 con sobreexpresión de C3G tratadas con PMA. Dichos niveles no mostraron no se vieron afectados por la falta de C3G en el clon K562-CRISPR-C3G.

Estos resultados son indicativos de una función de C3G en la modulación de la endomitosis durante la diferenciación megacariocítica.

1.5. Determinación del dominio de C3G responsable de su función en la diferenciación MK

Es sabido que C3G puede realizar funciones de forma dependiente de su función catalítica, pero también de forma independiente a través de interacciones proteína-proteína en la que participa su región de poliprolinas (dominio SH3b). Con el fin de determinar que dominio/s de C3G están implicados en la diferenciación MK, se analizó la expresión de los marcadores CD41, CD61 y GPA en clones de K562 transfectados con construcciones de diversos dominios de C3G clonados en el vector pLTR2 (C3G completo, y los mutantes Δ N, que carece de la región de interacción con E-cadherina, RemCat y Δ Cat, que carece del dominio catalítico). En general, todos los mutantes de delección mostraron una menor expresión de CD41 y CD61, en comparación con el clon que expresa C3G completo. Estos mismos resultados se obtuvieron cuando las células se trataron con PMA, a excepción del clon que sobreexpresa el dominio RemCat, el cual mostró niveles similares a los del clon que expresa C3G completo. Estos resultados indicarían que todos los dominios de C3G contribuyen a su función en la diferenciación megacariocítica, pero que el dominio catalítico es suficiente para cumplir esta función en presencia de PMA.

Estos resultados se corroboraron mediante análisis con estos mismos clones, más un clon adicional que solamente sobreexpresa el dominio SH3b, de la expresión de α -globina inducida por imatinib. En este caso se constató que la función catalítica de C3G es necesaria para la prevención de la expresión de α -globina, y que el dominio SH3b parece tener también un papel relevante en la regulación de la expresión de este marcador eritroide, posiblemente mediante la interacción con otras proteínas reguladoras.

En conjunto, todos estos resultados indican que C3G modula la expresión de marcadores megacariocíticos y eritroides en células K562 a través de su función GEF y que los dominios N-terminal y SH3b pueden contribuir, posiblemente modulando la actividad catalítica de C3G o estableciendo interacciones con otras proteínas.

1.6. Implicación de C3G en las rutas de señalización inducidas por PMA en megacariocitos

Una vez demostrada la implicación de C3G en la adquisición de características megacariocíticas inducidas por PMA en las dos líneas celulares en estudio, quisimos determinar la participación de C3G en las rutas de señalización inducidas por PMA que contribuyen a la megacariopoesis.

Estudios anteriores han demostrado la participación de la ruta MEK/ERK1/2 en la diferenciación MK de células K562 estimuladas con PMA, mientras que la ruta activada por p38 MAPK jugaría un papel negativo en la diferenciación MK, al tiempo que contribuiría a la diferenciación eritroide inducida por imatinib (Jacquel, A. et al. 2006, Conde, I. et al. 2010).

1.6.1. Activación de C3G y Rap1 por PMA

En primer lugar, determinamos si PMA activa a C3G analizando los niveles de C3G fosforilado en la tirosina 504 (Y504). Análisis por Western Blot demostraron que la fosforilación de C3G incrementa con el tiempo de tratamiento con PMA, tanto en células K562 como en HEL. A continuación, examinamos como afecta esta fosforilación de C3G a los niveles de activación de su diana Rap1. Mediante ensayos de pull-down realizados en los clones de K562 que sobreexpresan los distintos mutantes de C3G, comprobamos que los niveles de Rap1-GTP incrementaban claramente en el clon con sobreexpresión de C3G completo, sobre todo en condiciones de estimulación con PMA. Estos niveles máximos de activación de Rap1-GTP se observaron también con el clon RemCat, incluso de forma independiente de PMA. Por el contrario, la activación de Rap1 se vio comprometida en los clones con sobreexpresión de los mutantes carentes del dominio N-terminal (ΔN), con sobreexpresión de SH3b y, sobre todo, y como era de esperar, en el clon con sobreexpresión del mutante deletado en el dominio catalítico (ΔCat).

Estos resultados de nuevo revelan un papel esencial del dominio catalítico de C3G en la señalización por PMA, aunque sin excluir un papel modulador de los dominios N-terminal y SH3b.

Estos datos se complementaron mediante un ensayo de actividad Rap1 realizado en células intactas mediante inmunofluorescencia por microscopía confocal. Las células K562 que sobreexpresan C3G mostraron niveles de Rap1-GTP mayores que las células control, que fueron máximos tras 2 minutos de activación con 20 nM PMA. Además, el incremento de fluorescencia debido a Rap1-GTP se correlacionó con un incremento en los niveles de fosfo-C3G. Por otra parte, mientras que las células control mostraron una activación transitoria de

C3G y de Rap1, tanto la fosforilación de C3G como la activación de Rap1 se mantuvieron a lo largo del curso de tiempo con PMA en las células con sobreexpresión de C3G.

1.6.2. Papel de PKC en el efecto de C3G de la diferenciación MK

La proteína quinasa C o PKC es la diana directa del PMA, por lo que su participación en la diferenciación MK está fuera de toda duda (Hong, Y. et al. 1996). Aun así quisimos determinar si PKC está implicada en el efecto de C3G. Para ello analizamos la expresión de los marcadores CD41, CD61 y GPA en células K562 con sobreexpresión de C3G, tratadas con PMA en presencia o ausencia del inhibidor de PKC bisindolilmaleimida (Bis). Como era de esperar, el Bis inhibió completamente el incremento en la expresión de CD41 y CD61, debido al tratamiento con PMA. De igual forma afectó al incremento en la expresión de CD61 debido a la sobreexpresión de C3G, pero solo parcialmente, mientras que no afectó a la expresión de CD41.

Estos resultados indicarían la existencia de rutas alternativas a la ruta PMA-PKC, por las cuales C3G regularía la expresión de esos marcadores

1.6.3. Papel de la ruta de ERK1/2 en el efecto de C3G de la diferenciación MK

La ruta de Raf/MEK/ERK1/2 es una de las principales rutas reguladas por PMA-PKC que contribuyen a la regulación de la diferenciación megacariocítica. Sin embargo, se sabe que esta ruta no está implicada en la regulación de la endomitosis (Conde, I. et al. 2010) y que su regulación negativa en células K562 conduce a la diferenciación eritroide (Jacquel, A. et al. 2006). Para determinar si ERK1/2 están implicadas en el papel de C3G en la diferenciación MK, en primer lugar, analizamos los niveles de estas MAPKs en células K562 con sobreexpresión (clones pLTR2/pSuper) o ablación de C3G (clones CRISPR), tratadas con PMA a tiempos cortos (activación transitoria) o a tiempos largos (activación sostenida). Mientras que a tiempos cortos (entre 10 y 30 minutos) no se observaron grandes diferencias entre los clones, el tratamiento con PMA durante 1 a 3 días, indujo una activación sostenida de ERK1/2 exclusivamente en los clones con sobreexpresión de C3G. Esta activación sostenida fue totalmente inhibida en el clon CRISPR-C3G. Esto indica que C3G es necesario para la activación sostenida de ERK1/2. En este sentido, la activación sostenida de ERK1/2 por Rap1 se ha relacionado con diferenciación en muchos modelos celulares (York, R.D. et al. 1998, Conde, I. et al. 2010, Takahashi, M. et al. 2017).

A continuación, examinamos los niveles de CD41, CD61 y GPA en nuestros clones K562 con sobreexpresión de C3G, así como en células HEL con silenciamiento génico de

C3G, en presencia o ausencia de PMA y el inhibidor de MEK U0126 (U0). Sorprendentemente, dicho inhibidor no modificó los niveles de los marcadores inducidos por PMA, ni en células K562 con sobreexpresión de C3G ni en sus correspondientes controles. Sin embargo, los niveles de GPA incrementaron ligeramente por acción del U0, especialmente en células C3G, lo que está de acuerdo con un papel negativo de la ruta de ERK1/2 en la diferenciación eritroide. Contrariamente a lo observado en células K562, las células HEL control estimuladas con PMA sí mostraron una disminución de los niveles de CD41 y CD61 por acción del U0. Sin embargo, el U0 no modificó los niveles de estos marcadores en las células con silenciamiento génico de C3G, corroborando los hallazgos en los clones de K562 con sobreexpresión. Al igual que en los clones K562 con sobreexpresión de C3G, el U0 también incrementó la expresión de GPA en las células HEL. Por otra parte, si bien la sobreexpresión de C3G incrementa la fosforilación de ERK1/2, ésta no se ve afectada en presencia de BIS.

Todos estos resultados indican que durante la diferenciación megacariocítica C3G modula la activación de ERK1/2 independientemente de la activación de PKC. Sin embargo, no está clara la participación de estas MAPKs en los efectos de C3G en la diferenciación megacariocítica, ya que no parecen contribuir a la regulación de la expresión de los marcadores megacariocíticos.

1.6.4. Papel de la ruta de p38 MAPK en el efecto de C3G de la diferenciación MK

Numerosos estudios han sugerido un papel de p38 MAPK en la ruta que conduce a la activación de ERK1/2, donde actuaría como un modulador negativo de la diferenciación MK, a través de la inhibición de dicha ruta (Herrera, R. et al. 1998, Li, S.P. et al. 2003, Jacquel, A. et al. 2006, Chang, Y.I. et al. 2010). Por otra parte, nuestro grupo ha descrito una relación funcional entre C3G y p38 α , actuando en numerosos contextos celulares, donde C3G actuaría inhibiendo p38 α de forma dependiente o independiente de Rap1 (Maia, V. et al. 2009, Gutierrez-Uzquiza, A. et al. 2010, Maia, V. et al. 2013, Priego, N. et al. 2016).

Se estudió la participación de p38 MAPK en el efecto de C3G sobre la expresión de los marcadores CD41, CD61 y GPA utilizando el inhibidor SB203580 (SB), específico de las isoformas α y β de p38, que a dosis bajas (5-10 μ M) induce diferenciación MK (Jacquel, A. et al. 2006). En células K562 con sobreexpresión de C3G tratadas o no con PMA 20 nM y SB 10 μ M. SB incrementó significativamente la expresión de CD41 en células K562-pLTR2-C3G y modestamente la expresión de CD61 en células K562-pLTR2-C3G/pSuper. Estos resultados estarían de acuerdo con un papel negativo de p38 MAPK en el efecto de C3G en

la diferenciación MK. Sin embargo, el SB apenas modificó el efecto del PMA, indicando que p38 MAPK no tiene un papel relevante en la diferenciación MK inducida por este agonista en células K562.

Hay que tener en cuenta que, en general, la sobreexpresión de C3G tiene un efecto positivo sobre la fosforilación de p38, que se ve incrementado en presencia de PMA. Sin embargo, los niveles de fosfo-p38 son muy dependientes de los niveles de expresión de C3G, ya que niveles excesivos de C3G causan una disminución en los niveles de fosforilación de p38.

Para corroborar los resultados anteriores, se analizó el efecto del SB en clones de K562 y HEL con silenciamiento o depleción de C3G. Además se incluyeron en el análisis clones de K562 con silenciamiento de p38 α o doblemente silenciados para C3G y p38 α . Se observó un modesto incremento en la expresión de CD61 en el clon con silenciamiento para p38 α , en concordancia con el papel positivo que tiene la baja inhibición de p38 en la diferenciación MK (Jacquel, A. et al. 2006). Sin embargo, los niveles, tanto de CD41 como de CD61 disminuyeron en las células doblemente silenciadas tratadas con PMA, al tiempo que se observó un claro incremento en los niveles de GPA. Estos resultados estarían de acuerdo con un efecto cooperativo entre C3G y p38 α en la regulación de la diferenciación megacariocítica y eritroide en células K562.

Para entender mejor este efecto cooperativo entre C3G y p38 MAPK en nuestros modelos celulares, se analizó el estado de fosforilación de ERK1/2 en los clones de K562 y HEL con sobreexpresión o silenciamiento de C3G tratados con PMA en presencia o ausencia de SB. Se incluyó en el análisis los clones de K562 con silenciamiento de p38 α o doblemente silenciados para C3G y p38 α . Como era de esperar, tanto el SB como el silenciamiento de p38 α MAPK, indujo un incremento en la fosforilación de ERK1/2, que fue mayor en las células tratadas con PMA. Además, la sobreexpresión de C3G en células HEL incrementó claramente los niveles de fosfo-ERK1/2 inducidos por SB, existiendo una correlación positiva entre los niveles de C3G y los de ERK1/2, posiblemente relacionada con la menor activación de p38 MAPK (regulador negativo de ERK1/2) en los clones con alta expresión de C3G.

Todos estos resultados sugieren un papel modulador de p38 MAPK en los efectos de C3G en la diferenciación MK de células K562 y HEL inducida por PMA.

1.6.5. Papel de la ruta de PI3K en el efecto de C3G de la diferenciación MK

Se ha postulado un papel positivo para la ruta PI3K-Akt en la diferenciación MK, concretamente en la regulación de la entrada en endomitosis (Geddis, A.E. et al. 2001). Analizamos si esta ruta también está implicada en la regulación de la expresión de los marcadores CD41, CD61 y GPA y si C3G está involucrado en sus acciones. Para ello utilizamos el clon de K562 con sobreexpresión de C3G (pLTR2-C3G), o bien el clon de HEL con silenciamiento de C3G (pLVTHM-C3Gi) y sus respectivos controles que fueron tratados, con PMA durante 48h en presencia o ausencia del inhibidor de PI3K, wortmanina (W). Aunque la W no produjo cambios en las células control, si que indujo una disminución en los niveles de los marcadores megacariocíticos, principalmente en los niveles basales de CD41, en las células con sobreexpresión de C3G. Estos resultados se corroboraron en las células HEL silenciadas, donde se observó un ligero incremento en la expresión de CD61 en las células silenciadas tratadas con PMA.

Estos resultados sugieren un papel positivo de PI3K en la ruta PMA-C3G que conduce a la diferenciación MK de las células K562 y HEL.

2. Análisis de la implicación de C3G en la diferenciación megacariocítica utilizando modelos animales

La megacariopoyesis y trombopoyesis son procesos de múltiples pasos a través de los cuales progenitores hematopoyéticos forman megacariocitos maduros y estos, a su vez, plaquetas. La inducción de megacariopoyesis en células madre hematopoyéticas (HSC) de la médula ósea, tanto fetales como adultas, mediante cultivo con ciertas citoquinas, es un modelo *ex vivo* comúnmente utilizado para estudiar los mecanismos implicados en la expansión y diferenciación de los progenitores megacariocíticos.

Para estudiar la implicación de C3G en megacariopoyesis en un contexto más fisiológico, hemos empleado dos líneas transgénicas de ratón para C3G (Tg-C3G), las líneas 2C1 y 6A6, y una línea transgénica para el mutante C3G Δ Cat (delecionado en el dominio catalítico), la línea 8A3. Todas estas líneas han sido caracterizadas en un trabajo previo del grupo. Ambos transgenes C3G y C3G Δ Cat se expresan bajo el promotor del gen PF4 (*platelet factor 4*), exclusivo de megacariocitos y plaquetas, por lo que constituyen un modelo ideal para estudiar la implicación de C3G en el desarrollo de los megacariocitos murinos.

2.1. Análisis de los marcadores MK en células de médula ósea transgénicas

En primer lugar, analizamos los niveles basales de CD41, CD61 y GPA en células de médula ósea (MO) de ratones Tg-C3G y Tg-C3G Δ Cat. Los resultados indicaron que no existen diferencias, entre ratones transgénicos y control, en la expresión basal de estos marcadores, indicando que C3G no es capaz, *per se*, de estimular la producción de los mismos.

A continuación, realizamos el mismo estudio, pero en cultivos de MO estimulados con 50 ng/ml trombopoyetina (TPO) durante 6 días, una citoquina que, por si misma, es capaz de estimular megacariopoyesis. En este tipo de experimentos, dado que tenemos una población heterogénea de células, es mejor analizar los marcadores mediante porcentaje de células positivas, y no mediante intensidad de fluorescencia.

Los cultivos de MO procedentes de ratones Tg-C3G mostraron un porcentaje significativamente mayor de células positivas para CD41, CD61 o doble positivas CD41/CD61, que los cultivos de MO procedentes de Tg-C3G Δ Cat o control. Por el contrario, los cultivos procedentes de Tg-C3G Δ Cat, mostraron porcentajes de células positivas para estos marcadores significativamente menores que los de los otros grupos. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en las líneas celulares humanas e indicarían un papel positivo de C3G en la adquisición de los marcadores megacariocíticos, que es dependiente de su dominio catalítico.

2.2. Análisis de la ploidía

A continuación, estudiamos el estado de ploidía en los megacariocitos obtenidos de los diferentes transgénicos, mediante cultivo de MO durante 6 días en presencia de TPO y el siguiente cóctel de citoquinas: 10 ng/ml SCF, 10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6 and 10 ng/ml IL-11. El análisis se realizó a diferentes tiempos, 2, 4 y 6 días, sobre la población de células positiva para CD41. Se observó un incremento progresivo en el porcentaje de células CD41+, que fue acompañado por un incremento en el tamaño celular. El estudio de poliploidía se realizó sobre la población de células CD41+ grandes, ya que las de menor tamaño eran predominantemente células inmaduras, diploides.

2.2.1. Efecto de la sobreexpresión de C3G en la poliploidía inducida por C3G *ex vivo*

El análisis en cultivos de MO de las diferentes líneas transgénicas reveló un incremento en la poliploidía en megacariocitos Tg-C3G 2C1. Específicamente, se detectó un porcentaje significativamente mayor de células $>8n$ acompañado de una disminución significativa en el porcentaje de células $2n$. La misma tendencia se observó en la línea 6A6.

2.2.2. Efecto de la sobreexpresión de C3G Δ Cat en la poliploidía inducida por C3G *ex vivo*

Los resultados anteriores se verificaron mediante análisis de la poliploidía en cultivos de MO procedentes de la línea 8A3, transgénica para el mutante C3G Δ Cat. Los resultados indicaron una distribución similar de las diferentes poblaciones poliploides, entre la línea transgénica y su correspondiente línea silvestre.

Estos resultados indican un papel regulador de C3G en la adquisición de poliploidía, a través de un mecanismo que implica su actividad GEF. El hecho de que no existan diferencias entre el mutante C3G Δ Cat y su control implicaría que, o bien, en este contexto, dicho mutante no se comporta como un dominante negativo, o bien existen otros Rap1GEFs que están implicados en esta función.

2.3. Análisis del microambiente celular en cultivos de MO transgénicos

El microambiente de la MO juega un papel esencial durante la diferenciación de los distintos linajes hematopoyéticos, incluido el megacariocítico. Por tanto, hemos estudiado la influencia de dicho microambiente en el efecto de C3G en la diferenciación MK. Como se comentó en introducción, el proceso de megacariopoyesis y producción de plaquetas implica dos nichos diferentes: el osteoblástico y el vascular. Gradientes de citoquinas y factores de crecimiento regulan la migración de los progenitores MK del nicho osteoblástico al vascular, donde se inicia el proceso de formación de proplaquetas. Este proceso está mediado por la interacción entre proteínas de la matriz extracelular e integrinas presentes en la superficie de los megacariocitos, particularmente la integrina α IIb β 3, cuya activación depende de Rap1b.

2.3.1. Papel de C3G en la migración de MK maduros

Teniendo en cuenta la importancia de la migración durante la diferenciación MK, analizamos la movilidad de los MK en nuestras líneas transgénicas. Para ello utilizamos *explantes de MO*, pequeñas secciones transversales de MO obtenida de los fémures de los ratones. Las células de explantes mantenidos en un tampón fisiológico migran progresivamente hacia la periferia del explante, lo que permite visualizar y seguir a los MK, dado su gran tamaño, mediante un microscopio óptico. Con el tiempo, los MK cambian su

morfología, pudiendo diferenciarse: (i) MK esféricos, (ii) MK con proyecciones y (iii) MK con proplaquetas extendidas.

Los resultados mostraron una mayor velocidad de migración y una mayor distancia recorrida de los MK procedentes de los ratones Tg-C3G 6A6 y 2C1, datos que fueron estadísticamente significativos en el caso de la línea 6A6. Por el contrario, los MK de la línea 8A3 mostraron una significativamente menor velocidad de migración y distancias recorrida, en comparación con sus controles silvestres.

2.3.2. Papel de C3G en la adhesión de MK al nicho osteoblástico

La formación de proplaquetas está regulada por las interacciones entre los MK maduros y la matriz extracelular. Particularmente, la interacción de los MK con los colágenos de los tipos III y IV, así como con la fibronectina y vitronectina perivascular, facilita la formación de proplaquetas, mientras que el colágeno tipo I previene la liberación prematura de las proplaquetas a la circulación.

Para estudiar el grado interacción entre los progenitores MK con la matriz extracelular de la MO y el papel de C3G en este proceso, se incubaron los fémures de los distintos ratones transgénicos con colagenasa y dispasa para facilitar la liberación de los progenitores adheridos al hueso. El análisis de estos datos reveló un menor porcentaje de MK Tg-C3G 6A6 (identificados mediante tinción con CD61) unidos a la matriz del hueso, mientras que no se encontraron diferencias entre los MK Tg-C3G Δ Cat y sus controles. Por tanto, estos resultados sugieren un papel de C3G en la movilización de los MK maduros a la circulación.

2.3. Efecto de C3G en la formación de proplaquetas

Para estudiar el efecto de C3G en la fase final de maduración MK, es decir la formación de proplaquetas, utilizamos explantes de MO de los distintos ratones transgénicos y control, en los cuales se marcaron los MK con el anticuerpo anti-CD41, para una mejor visualización. La sobreexpresión de C3G (líneas 2C1 y 6A6) incrementó en un 10-20% la proporción de MK capaces de producir proplaquetas, mientras que la expresión del mutante C3G Δ Cat (línea 8A3) produjo un descenso de casi un 20% en el porcentaje de proplaquetas, en relación a animales control. Estos resultados indican un papel positivo de C3G en esta fase tardía de la diferenciación MK, a través de su función catalítica.

Discusión

En este trabajo hemos examinado la implicación de C3G en la modulación de los diferentes estadios de la diferenciación megacariocítica, incluyendo expresión de marcadores de superficie, cambios morfológicos, poliploidización, migración del nicho osteoblástico al nicho vascular y formación de proplaquetas. Para ello, hemos utilizado dos modelos experimentales: (i) las líneas hematopoyéticas K562 y HEL, en las cuales hemos demostrado que C3G modula la expresión de las glicoproteínas de membrana CD41, CD61 y GPA, así como cambios en la morfología y el estado de ploidía, y (ii) células primarias de la médula ósea de ratones transgénicos para C3G donde, además de lo anterior, hemos demostrado que C3G promueve la migración de los megacariocitos y la formación de proplaquetas.

1. Líneas celulares

Las células K562 y HEL tratadas con PMA exhiben características propias de los megacariocitos, incluido un gran tamaño, presencia de vacuolas y grandes extensiones. Estas mismas características fueron observadas en células K562 que sobreexpresan C3G. Además, la expresión de C3G en estas células incrementaba tras la exposición al PMA durante varios días, indicando que C3G podría estar en la ruta de PMA que conduce a la diferenciación MK. Esto estaría de acuerdo con la participación de C3G en la ruta PMA-PKC que conduce a la activación plaquetaria, previamente descrita (Gutierrez-Herrero, S. et al. 2012). De acuerdo con esto, se observó un claro incremento en la expresión de los marcadores megacariocíticos CD41 y CD61 en clones de K562 con expresión estable de C3G, indicando que C3G *per se* es capaz de iniciar el proceso por el cual estas células se comprometen a la línea megacariocítica. Sin embargo, el hecho de que la expresión de estos marcadores no se viese afectada por la eliminación de la expresión de C3G indicaría que C3G no es esencial en este proceso y que otros Rap1-GEF podría realizar esta función en ausencia de C3G. Un posible candidato sería CalDAG-GEFI, dada su importancia en la biología de las plaquetas (Crittenden, J.R. et al. 2004, Schultess, J. et al. 2005). Sin embargo, no hay datos sobre su posible papel en la diferenciación MK.

De acuerdo con la existencia de un precursor común a las líneas eritroide y megacariocítica, la expresión de los marcadores eritroides GPA y α -globina disminuyó en las células con sobreexpresión de C3G, mientras que sus niveles aumentaron en las células con silenciamiento génico de C3G. Todos estos resultados sugieren un papel de C3G en la regulación de estadios tempranos que conducen al compromiso del precursor MEP a la línea megacariocítica o eritroide. Curiosamente, aunque C3G forma parte de la ruta de PMA, por debajo de PKC, C3G regula la expresión de estos marcadores de forma independiente de PMA.

C3G también es capaz de modular los cambios morfológicos que acompañan la diferenciación MK, tales como aumento de tamaño, vacuolización o formación de largas extensiones citoplasmáticas. Sin embargo, en este caso el efecto de C3G es parcialmente dependiente de PMA.

Por otra parte, C3G también estaría implicado en la adquisición de poliploidía. C3G facilitaría la entrada en endomitosis a través de la regulación de la expresión del inhibidor del ciclo celular p21, y seguramente otros factores. Al igual que su papel en la regulación de la morfología, la función de C3G en la adquisición de poliploidía es dependiente de la estimulación con PMA. Hemos observado que el PMA induce la fosforilación de C3G en la tirosina 504, un evento que, aunque no es esencial para la actividad de C3G, incrementa su activación, posiblemente a través de la neutralización de mecanismos autoinhibitorios (Ichiba, T. et al. 1999, Mitra, A. et al. 2010). Es posible que la fosforilación de C3G por PMA se requiera en etapas más tardías de la diferenciación MK, tales como las que conducen a los cambios morfológicos y a la poliploidía, pero no sea necesaria en las etapas iniciales implicadas en la expresión de los marcadores de superficie.

El análisis, tanto de la expresión de marcadores megacariocíticos y eritroides, como de la activación de Rap1, en células K562 que sobreexpresan distintos mutantes de C3G, revela una regulación compleja de su actividad donde el dominio catalítico o GEF sería esencial para su función reguladora de la megacariopoyesis, pero donde los dominios SH3b y N-terminal (o de unión a E-cadherina) jugarían un papel modulador.

La ruta de ERK1/2 es una de las principales rutas reguladoras de la diferenciación MK. Su activación transiente se requiere en etapas tempranas de la diferenciación para inducir la proliferación de progenitores y la expresión de marcadores de superficie (Jacquel, A. et al. 2006, Conde, I. et al. 2010), mientras que una activación sostenida es necesaria durante la maduración de los megacariocitos. En nuestras células K562 y HEL control, ERK1/2 fue rápidamente y transientemente fosforilado por PMA y su inhibición mediante el inhibidor químico U0126 produjo una disminución de la expresión de los marcadores CD41 y CD61 inducida por PMA, en concordancia con los resultados de otros autores (Jacquel, A. et al. 2006, Conde, I. et al. 2010), aunque en nuestro caso solo fue observada en las células HEL. Lo que si fue claro es que el U0 no afectó a la expresión de los marcadores inducida por C3G, indicando que este efecto de C3G es independiente de ERK1/2. Además, observamos que la sobreexpresión de C3G induce la activación sostenida de ERK1/2, pero no la transiente, y que ésta no es inhibida por el Bis, indicando un desacoplamiento entre la ruta de PMA-PKC y C3G en la activación de ERK1/2. El hecho de que C3G no participe en

la activación transiente de ERK1/2, está de acuerdo con el desacoplamiento entre C3G y ERK1/2 en la regulación de la expresión de los MK megacariocíticos.

Se ha descrito que en células hematopoyéticas la activación transiente de ERK1/2 por TPO está regulada por la ruta de Shc/SOS/Ras/Raf, mientras que la activación sostenida de ERK1/2 requiere la activación de la ruta Rap1-B-Raf (Stork, P.J. et al. 2005). Nuestros resultados sugieren que C3G puede ser el Rap1-GEF que activa esta segunda ruta durante la megacariopoyesis. De hecho, la sobreexpresión de C3G en células K562 indujo una activación sostenida de Rap1 por PMA, correlacionada con una fosforilación sostenida de C3G.

En resumen, todos estos resultados indican que el PMA induce la fosforilación de C3G, lo que resulta en la activación sostenida de ERK1/2 a través de la ruta C3G-Rap1-B-Raf, que es necesaria para la maduración de los megacariocitos. Sin embargo, el efecto de C3G en la expresión de los marcadores MK es independiente de la activación transiente de ERK1/2.

La implicación de la ruta de p38 MAPK en la diferenciación MK está bien documentada (Jacquel, A. et al. 2006, Conde, I. et al. 2010). p38 MAPK puede inducir o inhibir diferenciación MK dependiendo de sus niveles de fosforilación. Así, niveles altos tendrían un efector inhibitorio, mientras que una activación transiente de p38 es necesaria para iniciar el programa de diferenciación, por parada del ciclo celular (Conde, I. et al. 2010). Por otra parte, la inhibición completa de p38 MAPK bloquea la diferenciación MK, induciendo apoptosis (Jacquel, A. et al. 2006).

El análisis de la expresión de los marcadores CD41 y CD61 utilizando el inhibidor de p38 MAPK SB203580 (SB), indicó un ligero efecto positivo de dicho inhibidor en la expresión de los marcadores regulada por C3G, pero no tuvo efecto en la inducida por PMA. Esto indicaría un efecto negativo de p38 ERK en la función de C3G. Sin embargo, el análisis de la expresión de estos marcadores en clones de K562 doblemente silenciados para C3G y p38 α MAPK reveló una interacción compleja entre ambas proteínas en la regulación de estos marcadores. Así el doble silenciamiento indujo una disminución de la expresión de CD41 y CD61 inducida por PMA y un claro incremento en la expresión de GPA, lo que sugiere un efecto cooperativo entre ambas proteínas en el compromiso de precursores hematopoyéticos hacia las líneas eritroide o megacariocítica.

Por otra parte, el análisis de la fosforilación de p38 MAPK, indicó que C3G parece tener un papel modulador de los niveles de activación de p38 MAPK. Así, una sobreexpresión

moderada de C3G incrementaría los niveles basales de fosforilación de p38 MAPK, mientras que una mayor expresión de C3G induciría su inhibición. Se sabe que p38 modula negativamente la fosforilación de ERK1/2 (Li, S.P. et al. 2003). Por lo tanto, la expresión de C3G modularía la activación de ERK1/2 a través de la regulación de los niveles de fosfo-p38. La modulación de la actividad de p38 MAPK por C3G ha sido descrita en varios sistemas celulares (Maia, V. et al. 2009, Gutierrez-Uzquiza, A. et al. 2010, Maia, V. et al. 2013, Priego, N. et al. 2016).

Finalmente, la ruta de PI3K-Akt también parece estar implicada en el efecto regulador de C3G sobre la expresión de los marcadores MK. Sin embargo, y de acuerdo con otros autores, esta ruta no estaría implicada la regulación de la expresión de estos marcadores inducida por PMA (Jacquel, A. et al. 2006, Sardina, J.L. et al. 2010). En lo que si parece haber acuerdo es en el papel de esta ruta en la inducción de la endomitosis (Geddis, A.E. et al. 2001, Conde, I. et al. 2010).

2. Modelos animales

Los experimentos efectuados en líneas celulares se complementaron con estudios realizados en modelos de ratón transgénicos para C3G o el mutante C3G Δ Cat y sus correspondientes hermanos silvestres, en los cuales, además de analizar la expresión de los marcadores megacariocíticos y la poliploidía hemos estudiado la migración de los megacariocitos y la formación de proplaquetas, procesos que son más dependientes del microambiente y que, por tanto, no es posible realizar en modelos *in vitro*.

Al igual que lo observado en las líneas celulares, se detectó un mayor porcentaje de células doblemente positivas para CD41 y CD61 en células de la médula ósea (MO) de los ratones Tg-C3G, y un menor porcentaje en MO de ratones Tg-C3G Δ Cat, en comparación con animales silvestres. Sin embargo, en contraste con los resultados en las líneas celulares, estas diferencias solo fueron visibles cuando las células se cultivaron en presencia de TPO. Esto indicaría que, en un contexto más fisiológico, C3G no es capaz por si solo de modular la expresión de estos marcadores.

La adquisición de marcadores es un evento temprano en la diferenciación MK, donde C3G jugaría un papel. Quedaría, no obstante, por demostrar si C3G participa en eventos aún más tempranos, como es la diferenciación de MEP a HPP-CFU-MK (potenciales unidades formadoras de colonias de megacariocitos), el progenitor megacariocítico más indiferenciado. Se ha reportado que Rap1 se expresa durante la maduración y no durante la diferenciación de los MK (Balduini, A. et al. 2008), por tanto, la participación de C3G en este proceso es poco probable.

Del mismo modo, el análisis de la poliploidía en células de la MO de nuestros ratones demostró la implicación de C3G en este proceso, a través de un mecanismo dependiente de su dominio catalítico, confirmando los resultados observados en las líneas celulares.

Un aspecto esencial en la diferenciación megacariocítica es la migración de los precursores desde el nicho osteoblástico o endosteal al nicho vascular. La interacción de los megacariocitos a la matriz ósea es dependiente del colágeno tipo I, el cual previene la liberación prematura de megacariocitos inmaduros (Pallotta, I. et al. 2009, Zou, Z. et al. 2009). La cuantificación de los megacariocitos adheridos al nicho endosteal, mediante tratamiento de los huesos con colagenasa y dispasa, reveló una menor proporción en los ratones Tg-C3G, frente al resto de genotipos, indicando una menor adhesión de estos megacariocitos transgénicos a la matriz ósea. Estos resultados están de acuerdo con la mayor velocidad de migración y distancia recorrida de estos megacariocitos observada en experimentos de explantes de médula ósea, acompañada de una menor migración por parte de los megacariocitos Tg-C3G Δ Cat. Además, un análisis proteómico realizado en plaquetas de ratones Tg-C3G (2C1) y sus silvestres, reveló la expresión diferencial de numerosas proteínas implicadas en adhesión/migración, tales como inhibidores de la disociación del GDP de Rho, cofilina-1, la cadena β -1 de tubulina, o la proteína 3 relacionada con actina, lo que está a favor de un papel de C3G en la regulación de la adhesión y migración de los megacariocitos durante su maduración.

La expresión transgénica de C3G también indujo una mayor velocidad de migración y distancia recorrida por los megacariocitos, siendo el dominio catalítico responsable de este efecto. Finalmente, también observamos una mayor formación de proplaquetas en los ratones Tg-C3G, mientras que los ratones Tg-C3G Δ Cat mostraron un reducido porcentaje de plaquetas, en comparación con animales silvestres. El papel de C3G en migración está avalado por numerosos estudios, tanto en células hematopoyéticas, como en otros sistemas celulares (Uemura, N. et al. 1999, Voss, A.K. et al. 2008, Nath, P.R. et al. 2014, Priego, N. et al. 2016).

Finalmente, esta mayor formación de proplaquetas en los ratones Tg-C3G no se correlacionó con un mayor recuento plaquetario en la sangre de estos ratones. Podemos especular que la función de C3G en megacariopoyesis esté más relacionada con una situación patológica como el cáncer o la producción de heridas. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado recientemente la implicación de C3G plaquetario en la angiogénesis tumoral y la metástasis. Nuestras futuras investigaciones estarán encaminadas a evaluar esta hipótesis.

Referencias

- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto and I. L. Weissman (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." Nature **404**(6774): 193-197.
- Alsayed, Y., S. Uddin, S. Ahmad, B. Majchrzak, B. J. Druker, E. N. Fish and L. C. Platanias (2000). "IFN-gamma activates the C3G/Rap1 signaling pathway." J Immunol **164**(4): 1800-1806.
- Arai, A., Y. Nosaka, E. Kanda, K. Yamamoto, N. Miyasaka and O. Miura (2001). "Rap1 is activated by erythropoietin or interleukin-3 and is involved in regulation of beta1 integrin-mediated hematopoietic cell adhesion." J Biol Chem **276**(13): 10453-10462.
- Arai, A., Y. Nosaka, H. Kohsaka, N. Miyasaka and O. Miura (1999). "CrkL activates integrin-mediated hematopoietic cell adhesion through the guanine nucleotide exchange factor C3G." Blood **93**(11): 3713-3722.
- Avruch, J., A. Khokhlatchev, J. M. Kyriakis, Z. Luo, G. Tzivion, D. Vavvas and X. F. Zhang (2001). "Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade." Recent Prog Horm Res **56**: 127-155.
- Baccini, V., L. Roy, N. Vitrat, H. Chagraoui, S. Sabri, J. P. Le Couedic, N. Debili, F. Wendling and W. Vainchenker (2001). "Role of p21(Cip1/Waf1) in cell-cycle exit of endomitotic megakaryocytes." Blood **98**(12): 3274-3282.
- Balduini, A., I. Pallotta, A. Malara, P. Lova, A. Pecci, G. Viarengo, C. L. Balduini and M. Torti (2008). "Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes." J Thromb Haemost **6**(11): 1900-1907.
- Balduini, A., A. Pecci, P. Lova, N. Arezzi, C. Marseglia, F. Bellora, C. Perotti, C. Balduini, C. L. Balduini and M. Torti (2004). "Expression, activation, and subcellular localization of the Rap1 GTPase in cord blood-derived human megakaryocytes." Exp Cell Res **300**(1): 84-93.
- Baltanas, F. C., M. Perez-Andres, A. Ginell-Picardo, D. Diaz, D. Jimeno, P. Licerias-Boillos, R. L. Kortum, L. E. Samelson, A. Orfao and E. Santos (2013). "Functional redundancy of Sos1 and Sos2 for lymphopoiesis and organismal homeostasis and survival." Mol Cell Biol **33**(22): 4562-4578.
- Behnke, O. (1968). "An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat." J Ultrastruct Res **24**(5): 412-433.
- Benz, P. M., H. Laban, J. Zink, L. Gunther, U. Walter, S. Gambaryan and K. Dib (2016). "Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (VASP)-dependent and -independent pathways regulate thrombin-induced activation of Rap1b in platelets." Cell Commun Signal **14**(1): 21.
- Bergmeier, W., T. Goerge, H. W. Wang, J. R. Crittenden, A. C. Baldwin, S. M. Cifuni, D. E. Housman, A. M. Graybiel and D. D. Wagner (2007). "Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEFI represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III." J Clin Invest **117**(6): 1699-1707.
- Bertoli, C., J. M. Skotheim and R. A. de Bruin (2013). "Control of cell cycle transcription during G1 and S phases." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(8): 518-528.
- Bertoni, A., S. Tadokoro, K. Eto, N. Pampori, L. V. Parise, G. C. White and S. J. Shattil (2002). "Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin alpha IIb beta 3, and the actin cytoskeleton." J Biol Chem **277**(28): 25715-25721.
- Besancenot, R., R. Chaligne, C. Tonetti, F. Pasquier, C. Marty, Y. Lecluse, W. Vainchenker, S. N. Constantinescu and S. Giraudier (2010). "A senescence-like cell-cycle arrest occurs during megakaryocytic maturation: implications for physiological and pathological megakaryocytic proliferation." PLoS Biol **8**(9).
- Besancenot, R., D. Roos-Weil, C. Tonetti, H. Abdelouahab, C. Lacout, F. Pasquier, C. Willekens, P. Rameau, Y. Lecluse, J. B. Micol, S. N. Constantinescu, W. Vainchenker, E. Solary and S. Giraudier (2014). "JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation vs differentiation." Blood **124**(13): 2104-2115.

- Bhat, A., K. Kolibaba, T. Oda, S. Ohno-Jones, C. Heaney and B. J. Druker (1997). "Interactions of CBL with BCR-ABL and CRKL in BCR-ABL-transformed myeloid cells." J Biol Chem **272**(26): 16170-16175.
- Birge, R. B., C. Kalodimos, F. Inagaki and S. Tanaka (2009). "Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling." Cell Commun Signal **7**: 13.
- Blair, P. and R. Flaumenhaft (2009). "Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates." Blood Rev **23**(4): 177-189.
- Bos, J. L., H. Rehmann and A. Wittinghofer (2007). "GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins." Cell **129**(5): 865-877.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Broudy, V. C., N. L. Lin and K. Kaushansky (1995). "Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro." Blood **85**(7): 1719-1726.
- Buensuceso, C. S. and T. E. O'Toole (2000). "The association of CRKII with C3G can be regulated by integrins and defines a novel means to regulate the mitogen-activated protein kinases." J Biol Chem **275**(17): 13118-13125.
- Conde, I., D. Pabon, A. Jayo, P. Lastres and C. Gonzalez-Manchon (2010). "Involvement of ERK1/2, p38 and PI3K in megakaryocytic differentiation of K562 cells." Eur J Haematol **84**(5): 430-440.
- Crespo, P. and J. Leon (2000). "Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation." Cell Mol Life Sci **57**(11): 1613-1636.
- Crittenden, J. R., W. Bergmeier, Y. Zhang, C. L. Piffath, Y. Liang, D. D. Wagner, D. E. Housman and A. M. Graybiel (2004). "CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation." Nat Med **10**(9): 982-986.
- Cuenda, A. and S. Rousseau (2007). "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1358-1375.
- Chang, Y., D. Bluteau, N. Debili and W. Vainchenker (2007). "From hematopoietic stem cells to platelets." J Thromb Haemost **5 Suppl 1**: 318-327.
- Chang, Y. I., W. K. Hua, C. L. Yao, S. M. Hwang, Y. C. Hung, C. J. Kuan, J. S. Leou and W. J. Lin (2010). "Protein-arginine methyltransferase 1 suppresses megakaryocytic differentiation via modulation of the p38 MAPK pathway in K562 cells." J Biol Chem **285**(27): 20595-20606.
- Che, Y. L., S. J. Luo, G. Li, M. Cheng, Y. M. Gao, X. M. Li, J. M. Dai, H. He, J. Wang, H. J. Peng, Y. Zhang, W. Y. Li, H. Wang, B. Liu and H. Linghu (2015). "The C3G/Rap1 pathway promotes secretion of MMP-2 and MMP-9 and is involved in serous ovarian cancer metastasis." Cancer Lett **359**(2): 241-249.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., S. S. Smyth, S. M. Schoenwaelder, T. H. Fischer and G. C. White, 2nd (2005). "Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice." J Clin Invest **115**(3): 680-687.
- De Falco, V., M. D. Castellone, G. De Vita, A. M. Cirafici, J. M. Hershman, C. Guerrero, A. Fusco, R. M. Melillo and M. Santoro (2007). "RET/papillary thyroid carcinoma oncogenic signaling through the Rap1 small GTPase." Cancer Res **67**(1): 381-390.
- Debili, N., C. Issaad, J. M. Masse, J. Guichard, A. Katz, J. Breton-Gorius and W. Vainchenker (1992). "Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocytic differentiation." Blood **80**(12): 3022-3035.
- Deutsch, V. R. and A. Tomer (2006). "Megakaryocyte development and platelet production." Br J Haematol **134**(5): 453-466.
- Deutsch, V. R. and A. Tomer (2013). "Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside." Br J Haematol **161**(6): 778-793.
- Ding, B. C., T. L. Witt, B. Hukku, H. Heng, L. Zhang and L. H. Matherly (2001). "Association of deletions and translocation of the reduced folate carrier gene with profound loss of gene expression in methotrexate-resistant K562

- human erythroleukemia cells." Biochem Pharmacol **61**(6): 665-675.
- Drachman, J. G., D. F. Sabath, N. E. Fox and K. Kaushansky (1997). "Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes." Blood **89**(2): 483-492.
- Dupuy, A. J., K. Morgan, F. C. von Lintig, H. Shen, H. Acar, D. E. Hasz, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, G. R. Boss and D. A. Largaespada (2001). "Activation of the Rap1 guanine nucleotide exchange gene, CalDAG-GEF I, in BXH-2 murine myeloid leukemia." J Biol Chem **276**(15): 11804-11811.
- Eckly, A., H. Heijnen, F. Pertuy, W. Geerts, F. Proamer, J. Y. Rinckel, C. Leon, F. Lanza and C. Gachet (2014). "Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes." Blood **123**(6): 921-930.
- Feller, S. M., B. Knudsen and H. Hanafusa (1994). "c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk." EMBO J **13**(10): 2341-2351.
- Fernandez-Medarde, A. and E. Santos (2011). "The RasGrf family of mammalian guanine nucleotide exchange factors." Biochim Biophys Acta **1815**(2): 170-188.
- Franke, B., M. van Triest, K. M. de Bruijn, G. van Willigen, H. K. Nieuwenhuis, C. Negrier, J. W. Akkerman and J. L. Bos (2000). "Sequential regulation of the small GTPase Rap1 in human platelets." Mol Cell Biol **20**(3): 779-785.
- Fukuyama, T., H. Ogita, T. Kawakatsu, T. Fukuhara, T. Yamada, T. Sato, K. Shimizu, T. Nakamura, M. Matsuda and Y. Takai (2005). "Involvement of the c-Src-Crk-C3G-Rap1 signaling in the nectin-induced activation of Cdc42 and formation of adherens junctions." J Biol Chem **280**(1): 815-825.
- Garcia, J., J. de Gunzburg, A. Eychene, S. Gisselbrecht and F. Porteu (2001). "Thrombopoietin-mediated sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in UT7-Mpl cells requires both Ras-Raf-1- and Rap1-B-Raf-dependent pathways." Mol Cell Biol **21**(8): 2659-2670.
- Ge, B., H. Gram, F. Di Padova, B. Huang, L. New, R. J. Ulevitch, Y. Luo and J. Han (2002). "MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha." Science **295**(5558): 1291-1294.
- Geddis, A. E. (2010). "Megakaryopoiesis." Semin Hematol **47**(3): 212-219.
- Geddis, A. E., N. E. Fox and K. Kaushansky (2001). "Phosphatidylinositol 3-kinase is necessary but not sufficient for thrombopoietin-induced proliferation in engineered Mpl-bearing cell lines as well as in primary megakaryocytic progenitors." J Biol Chem **276**(37): 34473-34479.
- Geddis, A. E. and K. Kaushansky (2006). "Endomitotic megakaryocytes form a midzone in anaphase but have a deficiency in cleavage furrow formation." Cell Cycle **5**(5): 538-545.
- Gibbins, J. M. and M. P. Mahaut-Smith (2011). Platelets and Megakaryocytes Volume 3, Additional Protocols and Perspectives. Methods in Molecular Biology Ser. New York Secaucus, Humana Press
- Springer Distributor.
- Gotoh, T., S. Hattori, S. Nakamura, H. Kitayama, M. Noda, Y. Takai, K. Kaibuchi, H. Matsui, O. Hatase, H. Takahashi and et al. (1995). "Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G." Mol Cell Biol **15**(12): 6746-6753.
- Gotoh, T., Y. Niino, M. Tokuda, O. Hatase, S. Nakamura, M. Matsuda and S. Hattori (1997). "Activation of R-Ras by Ras-guanine nucleotide-releasing factor." J Biol Chem **272**(30): 18602-18607.
- Guerrero, C., A. Fernandez-Medarde, J. M. Rojas, J. Font de Mora, L. M. Esteban and E. Santos (1998). "Transformation suppressor activity of C3G is independent of its CDC25-homology domain." Oncogene **16**(5): 613-624.
- Guerrero, C., S. Martin-Encabo, A. Fernandez-Medarde and E. Santos (2004). "C3G-mediated suppression of oncogene-induced focus formation in fibroblasts involves inhibition of ERK activation, cyclin A expression and alterations of anchorage-independent growth." Oncogene **23**(28): 4885-4893.
- Gutierrez-Berzal, J., E. Castellano, S. Martin-Encabo, N. Gutierrez-Cianca, J. M. Hernandez, E. Santos and C. Guerrero (2006). "Characterization of p87C3G, a novel, truncated C3G isoform that is overexpressed

- in chronic myeloid leukemia and interacts with Bcr-Abl." *Exp Cell Res* **312**(6): 938-948.
- Gutierrez-Herrero, S., V. Maia, J. Gutierrez-Berzal, N. Calzada, M. Sanz, C. Gonzalez-Manchon, M. Pericacho, S. Ortiz-Rivero, J. R. Gonzalez-Porras, M. Arechederra, A. Porras and C. Guerrero (2012). "C3G transgenic mouse models with specific expression in platelets reveal a new role for C3G in platelet clotting through its GEF activity." *Biochim Biophys Acta* **1823**(8): 1366-1377.
- Gutierrez-Uzquiza, A., M. Arechederra, I. Molina, R. Banos, V. Maia, M. Benito, C. Guerrero and A. Porras (2010). "C3G down-regulates p38 MAPK activity in response to stress by Rap-1 independent mechanisms: involvement in cell death." *Cell Signal* **22**(3): 533-542.
- Hamada, T., R. Mohle, J. Hesselgesser, J. Hoxie, R. L. Nachman, M. A. Moore and S. Rafii (1998). "Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation." *J Exp Med* **188**(3): 539-548.
- Hasegawa, H., E. Kiyokawa, S. Tanaka, K. Nagashima, N. Gotoh, M. Shibuya, T. Kurata and M. Matsuda (1996). "DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane." *Mol Cell Biol* **16**(4): 1770-1776.
- Heijnen, H. F., N. Debili, W. Vainchenker, J. Breton-Gorius, H. J. Geuze and J. J. Sixma (1998). "Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules." *Blood* **91**(7): 2313-2325.
- Herrera, R., S. Hubbell, S. Decker and L. Petruzzelli (1998). "A role for the MEK/MAPK pathway in PMA-induced cell cycle arrest: modulation of megakaryocytic differentiation of K562 cells." *Exp Cell Res* **238**(2): 407-414.
- Hirata, T., H. Nagai, K. Koizumi, K. Okino, A. Harada, M. Onda, T. Nagahata, I. Mikami, K. Hirai, S. Haraguchi, E. Jin, O. Kawanami, K. Shimizu and M. Emi (2004). "Amplification, up-regulation and over-expression of C3G (CRK SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor) in non-small cell lung cancers." *J Hum Genet* **49**(6): 290-295.
- Hogan, C., N. Serpente, P. Cogram, C. R. Hosking, C. U. Bialucha, S. M. Feller, V. M. Braga, W. Birchmeier and Y. Fujita (2004). "Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell-cell contacts." *Mol Cell Biol* **24**(15): 6690-6700.
- Hong, Y., J. F. Martin, W. Vainchenker and J. D. Erusalimsky (1996). "Inhibition of protein kinase C suppresses megakaryocytic differentiation and stimulates erythroid differentiation in HEL cells." *Blood* **87**(1): 123-131.
- Howell, W. H. and D. D. Donahue (1937). "The Production of Blood Platelets in the Lungs." *J Exp Med* **65**(2): 177-203.
- Ichiba, T., Y. Hashimoto, M. Nakaya, Y. Kuraishi, S. Tanaka, T. Kurata, N. Mochizuki and M. Matsuda (1999). "Activation of C3G guanine nucleotide exchange factor for Rap1 by phosphorylation of tyrosine 504." *J Biol Chem* **274**(20): 14376-14381.
- Ichiba, T., Y. Kuraishi, O. Sakai, S. Nagata, J. Groffen, T. Kurata, S. Hattori and M. Matsuda (1997). "Enhancement of guanine-nucleotide exchange activity of C3G for Rap1 by the expression of Crk, CrkL, and Grb2." *J Biol Chem* **272**(35): 22215-22220.
- Ikuta, K. and I. L. Weissman (1992). "Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(4): 1502-1506.
- Italiano, J. E., Jr., P. Lecine, R. A. Shivdasani and J. H. Hartwig (1999). "Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes." *J Cell Biol* **147**(6): 1299-1312.
- Jacquel, A., P. Colosetti, S. Grosso, N. Belhacene, A. Puissant, S. Marchetti, J. P. Breitmayer and P. Auberger (2007). "Apoptosis and erythroid differentiation triggered by Bcr-Abl inhibitors in CML cell lines are fully distinguishable processes that exhibit different sensitivity to caspase inhibition." *Oncogene* **26**(17): 2445-2458.
- Jacquel, A., M. Herrant, V. Defamie, N. Belhacene, P. Colosetti, S. Marchetti, L. Legros, M. Deckert, B. Mari, J. P. Cassuto, P. Hofman and P. Auberger (2006). "A survey of the signaling pathways involved in megakaryocytic differentiation of the human K562 leukemia cell line by molecular and c-DNA array analysis." *Oncogene* **25**(5): 781-794.

- Jiang, F., Y. Jia and I. Cohen (2002). "Fibronectin- and protein kinase C-mediated activation of ERK/MAPK are essential for proplateletlike formation." *Blood* **99**(10): 3579-3584.
- Jin, S., B. Zhai, Z. Qiu, J. Wu, M. D. Lane and K. Liao (2000). "c-Crk, a substrate of the insulin-like growth factor-1 receptor tyrosine kinase, functions as an early signal mediator in the adipocyte differentiation process." *J Biol Chem* **275**(44): 34344-34352.
- Junt, T., H. Schulze, Z. Chen, S. Massberg, T. Goerge, A. Krueger, D. D. Wagner, T. Graf, J. E. Italiano, Jr., R. A. Shivdasani and U. H. von Andrian (2007). "Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow." *Science* **317**(5845): 1767-1770.
- Kaushansky, K. (2006). "Lineage-specific hematopoietic growth factors." *N Engl J Med* **354**(19): 2034-2045.
- Kaushansky, K., V. C. Broudy, N. Lin, M. J. Jorgensen, J. McCarty, N. Fox, D. Zucker-Franklin and C. Lofton-Day (1995). "Thrombopoietin, the Mpl ligand, is essential for full megakaryocyte development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8): 3234-3238.
- Kaushansky, K., S. Lok, R. D. Holly, V. C. Broudy, N. Lin, M. C. Bailey, J. W. Forstrom, M. M. Buddle, P. J. Oort, F. S. Hagen and et al. (1994). "Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin." *Nature* **369**(6481): 568-571.
- Kauts, M. L., C. S. Vink and E. Dzierzak (2016). "Hematopoietic (stem) cell development - how divergent are the roads taken?" *FEBS Lett* **590**(22): 3975-3986.
- Kawaguchi, T., R. Hatano, K. Yamaguchi, K. Nawa, R. Hashimoto and H. Yokota (2012). "Fibronectin promotes proplatelet formation in the human megakaryocytic cell line UT-7/TPO." *Cell Biol Int* **36**(1): 39-45.
- Kiel, M. J. and S. J. Morrison (2008). "Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells." *Nat Rev Immunol* **8**(4): 290-301.
- Kikuchi, J., Y. Furukawa, S. Iwase, Y. Terui, M. Nakamura, S. Kitagawa, M. Kitagawa, N. Komatsu and Y. Miura (1997). "Polyploidization and functional maturation are two distinct processes during megakaryocytic differentiation: involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in polyploidization." *Blood* **89**(11): 3980-3990.
- Kirito, K. and N. Komatsu (2002). "[Signal transduction in hematopoiesis: a functional role of Stat 1 and Stat 3 in erythropoiesis and megakaryopoiesis]." *Rinsho Ketsueki* **43**(4): 278-281.
- Kirsch, K. H., M. M. Georgescu and H. Hanafusa (1998). "Direct binding of p130(Cas) to the guanine nucleotide exchange factor C3G." *J Biol Chem* **273**(40): 25673-25679.
- Knudsen, B. S., S. M. Feller and H. Hanafusa (1994). "Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk." *J Biol Chem* **269**(52): 32781-32787.
- Kondo, M., I. L. Weissman and K. Akashi (1997). "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." *Cell* **91**(5): 661-672.
- Ku, H., Y. Yonemura, K. Kaushansky and M. Ogawa (1996). "Thrombopoietin, the ligand for the Mpl receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice." *Blood* **87**(11): 4544-4551.
- Larson, M. K. and S. P. Watson (2006). "Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin alpha IIb beta3." *Blood* **108**(5): 1509-1514.
- Lee, C. H., H. J. Yun, H. S. Kang and H. D. Kim (1999). "ERK/MAPK pathway is required for changes of cyclin D1 and B1 during phorbol 12-myristate 13-acetate-induced differentiation of K562 cells." *IUBMB Life* **48**(6): 585-591.
- Lefrancais, E., G. Ortiz-Munoz, A. Caudrillier, B. Mallavia, F. Liu, D. M. Sayah, E. E. Thornton, M. B. Headley, T. David, S. R. Coughlin, M. F. Krummel, A. D. Leavitt, E. Passegue and M. R. Looney (2017). "The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors." *Nature* **544**(7648): 105-109.
- Levine, R. F., A. Eldor, P. K. Shoff, S. Kirwin, D. Tenza and E. M. Cramer (1993). "Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs." *Eur J Haematol* **51**(4): 233-246.

- Li, J., Y. Xia and D. J. Kuter (1999). "Interaction of thrombopoietin with the platelet c-mpl receptor in plasma: binding, internalization, stability and pharmacokinetics." Br J Haematol **106**(2): 345-356.
- Li, S. P., M. R. Junttila, J. Han, V. M. Kahari and J. Westermarck (2003). "p38 Mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase1,2." Cancer Res **63**(13): 3473-3477.
- Ling, L., T. Zhu and P. E. Lobie (2003). "Src-CrkII-C3G-dependent activation of Rap1 switches growth hormone-stimulated p44/42 MAP kinase and JNK/SAPK activities." J Biol Chem **278**(29): 27301-27311.
- Liu, Q. and P. A. Hofmann (2004). "Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(6): H2204-2212.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Long, M. W., C. H. Heffner, J. L. Williams, C. Peters and E. V. Prochownik (1990). "Regulation of megakaryocyte phenotype in human erythroleukemia cells." J Clin Invest **85**(4): 1072-1084.
- Lordier, L., J. Pan, V. Naim, A. Jalil, I. Badirou, P. Rameau, J. Larghero, N. Debili, F. Rosselli, W. Vainchenker and Y. Chang (2012). "Presence of a defect in karyokinesis during megakaryocyte endomitosis." Cell Cycle **11**(23): 4385-4389.
- Lozzio, C. B. and B. B. Lozzio (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." Blood **45**(3): 321-334.
- Machlus, K. R. and J. E. Italiano, Jr. (2013). "The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation." J Cell Biol **201**(6): 785-796.
- Maia, V., S. Ortiz-Rivero, M. Sanz, J. Gutierrez-Berzal, I. Alvarez-Fernandez, S. Gutierrez-Herrero, J. M. de Pereda, A. Porras and C. Guerrero (2013). "C3G forms complexes with Bcr-Abl and p38alpha MAPK at the focal adhesions in chronic myeloid leukemia cells: implication in the regulation of leukemic cell adhesion." Cell Commun Signal **11**(1): 9.
- Maia, V., M. Sanz, J. Gutierrez-Berzal, A. de Luis, A. Gutierrez-Uzquiza, A. Porras and C. Guerrero (2009). "C3G silencing enhances STI-571-induced apoptosis in CML cells through p38 MAPK activation, but it antagonizes STI-571 inhibitory effect on survival." Cell Signal **21**(7): 1229-1235.
- Marshall, C. J. (1995). "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation." Cell **80**(2): 179-185.
- Martegani, E., M. Vanoni, R. Zippel, P. Coccetti, R. Brambilla, C. Ferrari, E. Sturani and L. Alberghina (1992). "Cloning by functional complementation of a mouse cDNA encoding a homologue of CDC25, a *Saccharomyces cerevisiae* RAS activator." EMBO J **11**(6): 2151-2157.
- Martin-Encabo, S., E. Santos and C. Guerrero (2007). "C3G mediated suppression of malignant transformation involves activation of PP2A phosphatases at the subcortical actin cytoskeleton." Exp Cell Res **313**(18): 3881-3891.
- Martin, P. and T. Papayannopoulou (1982). "HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression." Science **216**(4551): 1233-1235.
- Matsuda, M., Y. Hashimoto, K. Muroya, H. Hasegawa, T. Kurata, S. Tanaka, S. Nakamura and S. Hattori (1994). "CRK protein binds to two guanine nucleotide-releasing proteins for the Ras family and modulates nerve growth factor-induced activation of Ras in PC12 cells." Mol Cell Biol **14**(8): 5495-5500.
- Matsuda, M., S. Tanaka, S. Nagata, A. Kojima, T. Kurata and M. Shibuya (1992). "Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities." Mol Cell Biol **12**(8): 3482-3489.
- Matsumura, I., J. Ishikawa, K. Nakajima, K. Oritani, Y. Tomiyama, J. Miyagawa, T. Kato, H. Miyazaki, Y. Matsuzawa and Y. Kanakura (1997). "Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakaryoblastic leukemia cell line, CMK, involves transcriptional activation of p21(WAF1/Cip1) by STAT5." Mol Cell Biol **17**(5): 2933-2943.

- Mazharian, A., S. Roger, P. Maurice, E. Berrou, M. R. Popoff, M. F. Hoylaerts, F. Fauvel-Lafeve, A. Bonnefoy and M. Bryckaert (2005). "Differential Involvement of ERK2 and p38 in platelet adhesion to collagen." J Biol Chem **280**(28): 26002-26010.
- Mazharian, A., S. P. Watson and S. Severin (2009). "Critical role for ERK1/2 in bone marrow and fetal liver-derived primary megakaryocyte differentiation, motility, and proplatelet formation." Exp Hematol **37**(10): 1238-1249 e1235.
- Melemed, A. S., J. W. Ryder and T. A. Vik (1997). "Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is involved in and sufficient for megakaryocytic differentiation of CMK cells." Blood **90**(9): 3462-3470.
- Minamiguchi, H., T. Kimura, Y. Urata, H. Miyazaki, T. Bamba, T. Abe and Y. Sonoda (2001). "Simultaneous signalling through c-mpl, c-kit and CXCR4 enhances the proliferation and differentiation of human megakaryocyte progenitors: possible roles of the PI3-K, PKC and MAPK pathways." Br J Haematol **115**(1): 175-185.
- Mitra, A. and V. Radha (2010). "F-actin-binding domain of c-Abl regulates localized phosphorylation of C3G: role of C3G in c-Abl-mediated cell death." Oncogene **29**(32): 4528-4542.
- Miyazaki, R., H. Ogata, T. Iguchi, S. Sogo, T. Kushida, T. Ito, M. Inaba, S. Ikehara and Y. Kobayashi (2000). "Comparative analyses of megakaryocytes derived from cord blood and bone marrow." Br J Haematol **108**(3): 602-609.
- Miyazaki, R., H. Ogata and Y. Kobayashi (2001). "Requirement of thrombopoietin-induced activation of ERK for megakaryocyte differentiation and of p38 for erythroid differentiation." Ann Hematol **80**(5): 284-291.
- Mochizuki, N., Y. Ohba, S. Kobayashi, N. Otsuka, A. M. Graybiel, S. Tanaka and M. Matsuda (2000). "Crk activation of JNK via C3G and R-Ras." J Biol Chem **275**(17): 12667-12671.
- Moosavi, M. A., R. Yazdanparast and A. Lotfi (2007). "ERK1/2 inactivation and p38 MAPK-dependent caspase activation during guanosine 5'-triphosphate-mediated terminal erythroid differentiation of K562 cells." Int J Biochem Cell Biol **39**(9): 1685-1697.
- Munoz-Alonso, M. J., L. Ceballos, G. Bretones, P. Frade, J. Leon and A. Gandarillas (2012). "MYC accelerates p21CIP-induced megakaryocytic differentiation involving early mitosis arrest in leukemia cells." J Cell Physiol **227**(5): 2069-2078.
- Nakao, K. and A. A. Angrist (1968). "Membrane surface specialization of blood platelet and megakaryocyte." Nature **217**(5132): 960-961.
- Nakao, T., A. E. Geddis, N. E. Fox and K. Kaushansky (2008). "PI3K/Akt/FOXO3a pathway contributes to thrombopoietin-induced proliferation of primary megakaryocytes in vitro and in vivo via modulation of p27(Kip1)." Cell Cycle **7**(2): 257-266.
- Nath, P. R., G. Dong, A. Braiman and N. Isakov (2014). "Immunophilins control T lymphocyte adhesion and migration by regulating CrkII binding to C3G." J Immunol **193**(8): 3966-3977.
- Nosaka, Y., A. Arai, N. Miyasaka and O. Miura (1999). "CrkL mediates Ras-dependent activation of the Raf/ERK pathway through the guanine nucleotide exchange factor C3G in hematopoietic cells stimulated with erythropoietin or interleukin-3." J Biol Chem **274**(42): 30154-30162.
- Oda, A., Y. Miyakawa, B. J. Druker, A. Ishida, K. Ozaki, H. Ohashi, M. Wakui, M. Handa, K. Watanabe, S. Okamoto and Y. Ikeda (1996). "Crkl is constitutively tyrosine phosphorylated in platelets from chronic myelogenous leukemia patients and inducibly phosphorylated in normal platelets stimulated by thrombopoietin." Blood **88**(11): 4304-4313.
- Ohba, Y., K. Ikuta, A. Ogura, J. Matsuda, N. Mochizuki, K. Nagashima, K. Kurokawa, B. J. Mayer, K. Maki, J. Miyazaki and M. Matsuda (2001). "Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis." EMBO J **20**(13): 3333-3341.
- Okada, S., H. Nakauchi, K. Nagayoshi, S. Nishikawa, Y. Miura and T. Suda (1992). "In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells." Blood **80**(12): 3044-3050.
- Okada, S. and J. E. Pessin (1997). "Insulin and epidermal growth factor stimulate a conformational change in Rap1 and dissociation of the CrkII-C3G complex." J Biol Chem **272**(45): 28179-28182.

- Okino, K., H. Nagai, H. Nakayama, D. Doi, K. Yoneyama, H. Konishi and T. Takeshita (2006). "Inactivation of Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor (C3G) in cervical squamous cell carcinoma." Int J Gynecol Cancer **16**(2): 763-771.
- Olson, T. S., A. Caselli, S. Otsuru, T. J. Hofmann, R. Williams, P. Paolucci, M. Dominici and E. M. Horwitz (2013). "Megakaryocytes promote murine osteoblastic HSC niche expansion and stem cell engraftment after radioablative conditioning." Blood **121**(26): 5238-5249.
- Pallotta, I., M. Lovett, W. Rice, D. L. Kaplan and A. Balduini (2009). "Bone marrow osteoblastic niche: a new model to study physiological regulation of megakaryopoiesis." PLoS One **4**(12): e8359.
- Pannekoek, W. J., M. R. Kooistra, F. J. Zwartkruis and J. L. Bos (2009). "Cell-cell junction formation: the role of Rap1 and Rap1 guanine nucleotide exchange factors." Biochim Biophys Acta **1788**(4): 790-796.
- Patel, S. R., J. H. Hartwig and J. E. Italiano, Jr. (2005). "The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets." J Clin Invest **115**(12): 3348-3354.
- Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott and D. Baltimore (1993). "Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8392-8396.
- Pendaries, C., S. P. Watson and J. C. Spalton (2007). "Methods for genetic modification of megakaryocytes and platelets." Platelets **18**(6): 393-408.
- Priego, N., M. Arechederra, C. Sequera, P. Bragado, A. Vazquez-Carballo, A. Gutierrez-Uzquiza, V. Martin-Granado, J. J. Ventura, M. G. Kazanietz, C. Guerrero and A. Porras (2016). "C3G knock-down enhances migration and invasion by increasing Rap1-mediated p38alpha activation, while it impairs tumor growth through p38alpha-independent mechanisms." Oncotarget **7**(29): 45060-45078.
- Psaila, B., D. Lyden and I. Roberts (2012). "Megakaryocytes, malignancy and bone marrow vascular niches." J Thromb Haemost **10**(2): 177-188.
- Racke, F. K., K. Lewandowska, S. Goueli and A. N. Goldfarb (1997). "Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells." J Biol Chem **272**(37): 23366-23370.
- Radha, V., A. Mitra, K. Dayma and K. Sasikumar (2011). "Signalling to actin: role of C3G, a multitasking guanine-nucleotide-exchange factor." Biosci Rep **31**(4): 231-244.
- Radha, V., A. Rajanna, R. K. Gupta, K. Dayma and T. Raman (2008). "The guanine nucleotide exchange factor, C3G regulates differentiation and survival of human neuroblastoma cells." J Neurochem **107**(5): 1424-1435.
- Radha, V., A. Rajanna, A. Mitra, N. Rangaraj and G. Swarup (2007). "C3G is required for c-Abl-induced filopodia and its overexpression promotes filopodia formation." Exp Cell Res **313**(11): 2476-2492.
- Radha, V., A. Rajanna and G. Swarup (2004). "Phosphorylated guanine nucleotide exchange factor C3G, induced by pervanadate and Src family kinases localizes to the Golgi and subcortical actin cytoskeleton." BMC Cell Biol **5**: 31.
- Radley, J. M. and C. J. Haller (1982). "The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer?" Blood **60**(1): 213-219.
- Radley, J. M. and C. J. Haller (1983). "Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow." Br J Haematol **53**(2): 277-287.
- Raslova, H., V. Baccini, L. Loussaief, B. Comba, J. Larghero, N. Debili and W. Vainchenker (2006). "Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates both proliferation of megakaryocyte progenitors and late stages of megakaryocyte differentiation." Blood **107**(6): 2303-2310.
- Ravid, K., J. Lu, J. M. Zimmet and M. R. Jones (2002). "Roads to polyploidy: the megakaryocyte example." J Cell Physiol **190**(1): 7-20.
- Ren, R., Z. S. Ye and D. Baltimore (1994). "Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites." Genes Dev **8**(7): 783-795.

- Rojnuckarin, P., J. G. Drachman and K. Kaushansky (1999). "Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis." *Blood* **94**(4): 1273-1282.
- Rojnuckarin, P., Y. Miyakawa, N. E. Fox, J. Deou, G. Daum and K. Kaushansky (2001). "The roles of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C ζ for thrombopoietin-induced mitogen-activated protein kinase activation in primary murine megakaryocytes." *J Biol Chem* **276**(44): 41014-41022.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(2): 320-344.
- Sabri, S., M. Jandrot-Perrus, J. Bertoglio, R. W. Farndale, V. M. Mas, N. Debili and W. Vainchenker (2004). "Differential regulation of actin stress fiber assembly and proplatelet formation by α 2 β 1 integrin and GPVI in human megakaryocytes." *Blood* **104**(10): 3117-3125.
- Samuelsson, J., S. Alonso, T. Ruiz-Larroya, T. H. Cheung, Y. F. Wong and M. Perucho (2011). "Frequent somatic demethylation of RAPGEF1/C3G intronic sequences in gastrointestinal and gynecological cancer." *Int J Oncol* **38**(6): 1575-1577.
- Sardina, J. L., G. Lopez-Ruano, L. I. Sanchez-Abarca, J. A. Perez-Simon, A. Gaztelumendi, C. Trigueros, M. Llanillo, J. Sanchez-Yague and A. Hernandez-Hernandez (2010). "p22phox-dependent NADPH oxidase activity is required for megakaryocytic differentiation." *Cell Death Differ* **17**(12): 1842-1854.
- Sasi Kumar, K., A. Ramadhas, S. C. Nayak, S. Kaniyappan, K. Dayma and V. Radha (2015). "C3G (RapGEF1), a regulator of actin dynamics promotes survival and myogenic differentiation of mouse mesenchymal cells." *Biochim Biophys Acta* **1853**(10 Pt A): 2629-2639.
- Schick, P. K., C. M. Wojenski, X. He, J. Walker, C. Marcinkiewicz and S. Niewiarowski (1998). "Integrins involved in the adhesion of megakaryocytes to fibronectin and fibrinogen." *Blood* **92**(8): 2650-2656.
- Schultess, J., O. Danielewski and A. P. Smolenski (2005). "Rap1GAP2 is a new GTPase-activating protein of Rap1 expressed in human platelets." *Blood* **105**(8): 3185-3192.
- Schumacher, C., B. S. Knudsen, T. Ohuchi, P. P. Di Fiore, R. H. Glassman and H. Hanafusa (1995). "The SH3 domain of Crk binds specifically to a conserved proline-rich motif in Eps15 and Eps15R." *J Biol Chem* **270**(25): 15341-15347.
- Schwartz, H., S. Koster, W. H. Kahr, N. Michetti, B. F. Kraemer, D. A. Weitz, R. C. Blaylock, L. W. Kraiss, A. Greinacher, G. A. Zimmerman and A. S. Weyrich (2010). "Anucleate platelets generate progeny." *Blood* **115**(18): 3801-3809.
- Seita, J. and I. L. Weissman (2010). "Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation." *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**(6): 640-653.
- Severin, S., C. Ghevaert and A. Mazharian (2010). "The mitogen-activated protein kinase signaling pathways: role in megakaryocyte differentiation." *J Thromb Haemost* **8**(1): 17-26.
- Shakyawar, D. K., K. Dayma, A. Ramadhas, C. Varalakshmi and V. Radha (2017). "C3G shows regulated nucleocytoplasmic exchange and represses histone modifications associated with euchromatin." *Mol Biol Cell* **28**(7): 984-995.
- Sher, N., J. R. Von Stetina, G. W. Bell, S. Matsuura, K. Ravid and T. L. Orr-Weaver (2013). "Fundamental differences in endoreplication in mammals and Drosophila revealed by analysis of endocycling and endomitotic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(23): 9368-9373.
- Shivakrupa, R., V. Radha, C. Sudhakar and G. Swarup (2003). "Physical and functional interaction between Hck tyrosine kinase and guanine nucleotide exchange factor C3G results in apoptosis, which is independent of C3G catalytic domain." *J Biol Chem* **278**(52): 52188-52194.
- Snow, J. W., N. Abraham, M. C. Ma, N. W. Abbey, B. Herndier and M. A. Goldsmith (2002). "STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells." *Blood* **99**(1): 95-101.
- Stork, P. J. and T. J. Dillon (2005). "Multiple roles of Rap1 in hematopoietic cells:

- complementary versus antagonistic functions." *Blood* **106**(9): 2952-2961.
- Strassel, C., A. Eckly, C. Leon, C. Petitjean, M. Freund, J. P. Cazenave, C. Gachet and F. Lanza (2009). "Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome." *Haematologica* **94**(6): 800-810.
- Szalai, G., A. C. LaRue and D. K. Watson (2006). "Molecular mechanisms of megakaryopoiesis." *Cell Mol Life Sci* **63**(21): 2460-2476.
- Takahashi, M., Y. Li, T. J. Dillon and P. J. Stork (2017). "Phosphorylation of Rap1 by cAMP-Dependent Protein Kinase (PKA) Creates a Binding Site for KSR to Sustain ERK Activation by cAMP." *J Biol Chem* **292**(4): 1449-1461.
- Takai, S., M. Tanaka, H. Sugimura, K. Yamada, Y. Naito, I. Kino and M. Matsuda (1994). "Mapping of the human C3G gene coding a guanine nucleotide releasing protein for Ras family to 9q34.3 by fluorescence in situ hybridization." *Hum Genet* **94**(5): 549-550.
- Tanaka, S., T. Morishita, Y. Hashimoto, S. Hattori, S. Nakamura, M. Shibuya, K. Matuoka, T. Takenawa, T. Kurata, K. Nagashima and et al. (1994). "C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(8): 3443-3447.
- Tanaka, S., T. Ouchi and H. Hanafusa (1997). "Downstream of Crk adaptor signaling pathway: activation of Jun kinase by v-Crk through the guanine nucleotide exchange protein C3G." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6): 2356-2361.
- Tatin, F., C. Varon, E. Genot and V. Moreau (2006). "A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester." *J Cell Sci* **119**(Pt 4): 769-781.
- Tavassoli, M. and M. Aoki (1981). "Migration of entire megakaryocytes through the marrow-blood barrier." *Br J Haematol* **48**(1): 25-29.
- Thon, J. N., A. Montalvo, S. Patel-Hett, M. T. Devine, J. L. Richardson, A. Ehrlicher, M. K. Larson, K. Hoffmeister, J. H. Hartwig and J. E. Italiano, Jr. (2010). "Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release." *J Cell Biol* **191**(4): 861-874.
- Tomer, A. (2004). "Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes." *Blood* **104**(9): 2722-2727.
- Trakala, M. and M. Malumbres (2014). "The functional relevance of polyploidization in the skin." *Exp Dermatol* **23**(2): 92-93.
- Uchida, M., K. Kirito, R. Shimizu, Y. Miura, K. Ozawa and N. Komatsu (2001). "A functional role of mitogen-activated protein kinases, erk1 and erk2, in the differentiation of a human leukemia cell line, UT-7/GM: a possible key factor for cell fate determination toward erythroid and megakaryocytic lineages." *Int J Hematol* **73**(1): 78-83.
- Uchida, N., A. Tsukamoto, D. He, A. M. Frieria, R. Scollay and I. L. Weissman (1998). "High doses of purified stem cells cause early hematopoietic recovery in syngeneic and allogeneic hosts." *J Clin Invest* **101**(5): 961-966.
- Uddin, S., J. Ah-Kang, J. Ulaszek, D. Mahmud and A. Wickrema (2004). "Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 147-152.
- Uemura, N. and J. D. Griffin (1999). "The adapter protein Crkl links Cbl to C3G after integrin ligation and enhances cell migration." *J Biol Chem* **274**(53): 37525-37532.
- Voss, A. K., J. M. Britto, M. P. Dixon, B. N. Sheikh, C. Collin, S. S. Tan and T. Thomas (2008). "C3G regulates cortical neuron migration, preplate splitting and radial glial cell attachment." *Development* **135**(12): 2139-2149.
- Voss, A. K., P. Gruss and T. Thomas (2003). "The guanine nucleotide exchange factor C3G is necessary for the formation of focal adhesions and vascular maturation." *Development* **130**(2): 355-367.
- Voss, A. K., D. L. Krebs and T. Thomas (2006). "C3G regulates the size of the cerebral cortex neural precursor population." *EMBO J* **25**(15): 3652-3663.

- Whalen, A. M., S. C. Galasinski, P. S. Shapiro, T. S. Nahreini and N. G. Ahn (1997). "Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase." Mol Cell Biol **17**(4): 1947-1958.
- Witthuhn, B. A., F. W. Quelle, O. Silvennoinen, T. Yi, B. Tang, O. Miura and J. N. Ihle (1993). "JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin." Cell **74**(2): 227-236.
- Woo, T. H., B. K. Patel, M. Cinco, L. D. Smythe, M. L. Symonds, M. A. Norris and M. F. Dohnt (1998). "Real-time homogeneous assay of rapid cycle polymerase chain reaction product for identification of *Leptonema illini*." Anal Biochem **259**(1): 112-117.
- Woolthuis, C. M. and C. Y. Park (2016). "Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage." Blood **127**(10): 1242-1248.
- Yang, L., D. Bryder, J. Adolfsson, J. Nygren, R. Mansson, M. Sigvardsson and S. E. Jacobsen (2005). "Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients." Blood **105**(7): 2717-2723.
- Yip, Y. P., T. Thomas, A. K. Voss and J. W. Yip (2012). "Migration of sympathetic preganglionic neurons in the spinal cord of a C3G-deficient mouse suggests that C3G acts in the reelin signaling pathway." J Comp Neurol **520**(14): 3194-3202.
- Yoder, M. C. (2002). "Embryonic hematopoiesis in mice and humans." Acta Paediatr Suppl **91**(438): 5-8.
- Yokote, K., U. Hellman, S. Ekman, Y. Saito, L. Ronnstrand, Y. Saito, C. H. Heldin and S. Mori (1998). "Identification of Tyr-762 in the platelet-derived growth factor alpha-receptor as the binding site for Crk proteins." Oncogene **16**(10): 1229-1239.
- York, R. D., H. Yao, T. Dillon, C. L. Ellig, S. P. Eckert, E. W. McCleskey and P. J. Stork (1998). "Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor." Nature **392**(6676): 622-626.
- Yu, M. and A. B. Cantor (2012). "Megakaryopoiesis and thrombopoiesis: an update on cytokines and lineage surface markers." Methods Mol Biol **788**: 291-303.
- Zhai, B., H. Huo and K. Liao (2001). "C3G, a guanine nucleotide exchange factor bound to adapter molecule c-Crk, has two alternative splicing forms." Biochem Biophys Res Commun **286**(1): 61-66.
- Zhu, T., E. L. Goh and P. E. Lobie (1998). "Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation and association of p125 focal adhesion kinase (FAK) with JAK2. Fak is not required for stat-mediated transcription." J Biol Chem **273**(17): 10682-10689.
- Zimmet, J. and K. Ravid (2000). "Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system." Exp Hematol **28**(1): 3-16.
- Zimmet, J. M., D. Ladd, C. W. Jackson, P. E. Stenberg and K. Ravid (1997). "A role for cyclin D3 in the endomitotic cell cycle." Mol Cell Biol **17**(12): 7248-7259.
- Zou, Z., A. A. Schmaier, L. Cheng, P. Mericko, S. K. Dickeson, T. P. Stricker, S. A. Santoro and M. L. Kahn (2009). "Negative regulation of activated alpha-2 integrins during thrombopoiesis." Blood **113**(25): 6428-6439.