

Università degli Studi del Piemonte Orientale
“A. Avogadro”

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Scienze Mediche

XX Ciclo di Dottorato in “Medicina Molecolare”

***INDAGINI SUI MECCANISMI DI MODULAZIONE
DELLA RISPOSTA PIASTRINICA AGLI AGONISTI:
RUOLO DEL 2-ARACHIDONOILGLICEROLO***

Relazione del 2 anno di:
Samantha Baldassarri

Relatore:
Prof. Fabiola Sinigaglia

Anno Accademico 2005/2006

INDICE

1.INTRODUZIONE.....	1
1.1. Sintesi e rilascio.....	2
1.2. Uptake e degradazione.....	3
1.3. Recettori.....	4
1.4. Vie di segnalazione attivate dagli endocannabinoidi e loro funzioni.....	5
2.SCOPO DEL LAVORO.....	8
3.MATERIALI E METODI.....	10
3.1. Preparazione delle piastrine mediante gel-filtrazione.....	10
3.2. Analisi dell'aggregazione piastrinica	10
3.3. Preparazione di lisati cellulari totali.	11
3.4. Misura della concentrazione citoplasmatica di calcio.....	11
3.5. Dosaggio del cAMP.....	12
4.RISULTATI	13
4.1. Analisi della funzionalità piastrinica dopo stimolazione con 2-AG.....	13
4.2. Inibizione dell'adenilato ciclasi	14
4.3. Rilascio di Ca ²⁺ intracellulare.....	14
4.4. Attivazione di Src e delle ERK1/2 dopo stimolazione con 2-AG.....	15
5.CONCLUSIONI.....	17
6.BIBLIOGRAFIA.....	19

1. INTRODUZIONE

L'estesa ricerca sulla struttura e l'attività dei costituenti naturali della *Cannabis sativa*, denominati cannabinoidi, e lo sviluppo di composti sintetici con elevata potenza e stereoselettività ha portato all'identificazione delle principali funzioni fisiologiche modulate da questa nuova classe di molecole (Howlett, A. C. et al., 1990).

La scoperta del recettore dei cannabinoidi (CB1) ha condotto, inoltre, all'identificazione di una famiglia di trasmettitori lipidici che fungono da ligandi endogeni del suddetto recettore: l'arachidonoiletanolammide (anandamide o AEA) (Devane W. A. et al., 1992) e il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) (Mechoulam R. et al., 1995; Sugiura T. et al., 1995) (Fig. 1).

Gli endocannabinoidi sono mediatori lipidici che includono ammidi ed esteri di acidi grassi poliinsaturi a lunga catena derivanti dall'acido arachidonico. In particolare, l'AEA è l'amide tra acido arachidonico e l'etanolammide mentre il 2-AG è acido arachidonico coniugato con glicerolo. Entrambi sono stati riscontrati nel cervello, nel plasma e nei tessuti periferici.

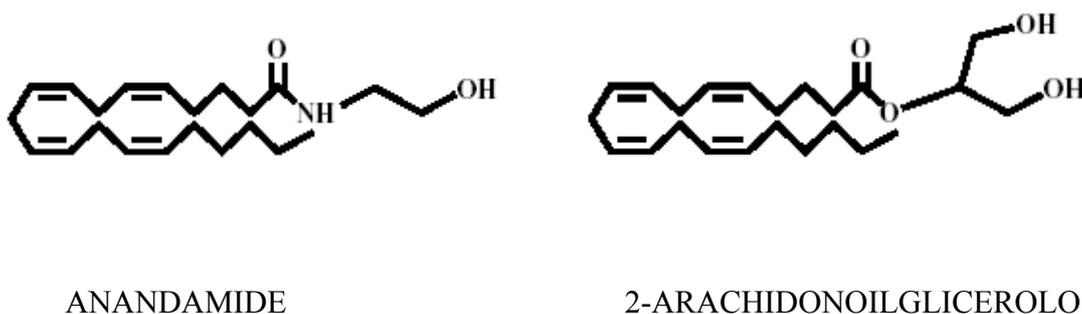


Figura 1. Struttura dei due principali cannabinoidi endogeni, l'anandamide (sinistra) e il 2-arachidonoilglicerolo (destra).

1.1. Sintesi e rilascio

L'anandamide si forma in seguito al taglio di un precursore fosfolipidico di membrana, l' N-arachidonoil-fosfatidiletanolammide (NAPE). Questa reazione è mediata da una specifica fosfolipasi D (PLD) che viene attivata dalla depolarizzazione o dalla stimolazione di recettori associati a proteine-G (GPCR).

Il NAPE è sintetizzato dall'enzima N-aciltransferasi (NAT) il quale trasferisce una molecola di acido arachidonico dalla fosfatidilcolina alla fosfatidiletanolamina. L'attività del NAT richiede la presenza di ioni Calcio ed è aumentata in seguito alla fosforilazione da parte della protein chinasi A (PKA) la cui attività è cAMP dipendente (Cadas, H. et al., 1996; Pomelli, D. et al., 2003).

Il 2-AG appartiene alla famiglia dei monoacilgliceroli e come tale la sua formazione è strettamente associata al metabolismo dei triacilgliceroli e principalmente all'attivazione di una fosfolipasi fosfatidilinositolo-specifica (PLC). Il modello standard propone l'attivazione di recettori metabotropici accoppiati alla PLC e alla via di segnalazione della diacilglicerolo lipasi che determina un aumento nella produzione di 2-AG (Fig. 2) (Stella, N. et al., 1997; Pomelli, D. 2003).

Dopo essere stati prodotti, gli endocannabinoidi possono diffondere attraverso la membrana citoplasmatica e legarsi ai recettori delle stesse cellule che li ha prodotti; oppure possono essere rilasciati nel fluido extracellulare e raggiungere altri siti bersaglio (Pomelli, D. 2003). Nel sistema nervoso centrale, ad esempio, l'anandamide è associata ad un fenomeno di segnalazione a ritroso noto come "soppressione dell'inibizione indotta dalla depolarizzazione" o DSI (Depolarization-Induced Suppression of Inhibition). In questa forma di comunicazione molecolare, invece di viaggiare in avanti come di consueto, cioè da un neurone presinaptico ad uno postsinaptico, gli endocannabinoidi fluiscono all'indietro viaggiando dalla cellula postsinaptica a quella presinaptica. La DSI ha inizio con la depolarizzazione, indotta da neurotrasmettitori, della terminazione post-sinaptica che determina l'apertura di canali del calcio voltaggio dipendenti. Gli ioni calcio a loro volta, inducono il rilascio dell'anandamide tramite l'attivazione del NAT. L'AEA rilasciata dalla terminazione post-sinaptica va ad agire sui recettori CB1 presenti sulla superficie della membrana pre-sinaptica dove inibisce il rilascio del GABA, il principale neurotrasmettitore inibitorio del cervello. (Alger, B. E. 2002; Pomelli, D. 2003).

1.2. Uptake e degradazione

La segnalazione mediata dagli endocannabinoidi è terminata attraverso due processi: il trasporto all'interno della cellula e l'idrolisi.

L'ingresso degli endocannabinoidi nella cellula è una questione ancora dubbia ed in fase di studi. Data la loro natura idrofobica ed elettricamente neutra, queste molecole potrebbero attraversare la membrana plasmatica per semplice diffusione passiva ma prove dirette di questo fenomeno non sono ancora state fornite.

L'ingresso dell'AEA è mediato da un trasportatore specifico (AMT) che, analogamente ad altri trasportatori lipidici, non richiede energia (Bisogno T. et al., 2001; Piomelli D. et al., 1999).

Ci sono prove a supporto dell'ipotesi che anche il 2-AG attraversi la membrana tramite un trasportatore ma non è ancora chiaro se questo sia lo stesso dell'AEA o se invece si tratti di una proteina diversa (Hermann, A. et al., 2006).

Un' altro possibile meccanismo attraverso il quale gli endocannabinoidi potrebbero essere internalizzati è rappresentato dall'endocitosi mediata dai raft lipidici ma anche questa ipotesi richiede ulteriori dimostrazioni (McFarland MJ et al., 2004; Bari M. et al., 2005).

La degradazione degli endocannabinoidi avviene per mezzo di due specifici sistemi enzimatici: l'idrolasi delle ammidi degli acidi grassi denominata FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase) (Cravatt, B. F. et al., 1996) e la lipasi dei monoacilgliceridi, o MAGL (Dinh, T. P. et., 2002).

Il FAAH è un enzima di membrana che appartiene alla famiglia delle serine-idrolasi. E' distribuita su tutto il corpo con elevate concentrazioni nel cervello e nel fegato e può degradare numerose ammidi degli acidi grassi. Sebbene il FAAH possa inattivare anche il 2-AG, il principale enzima responsabile della sua degradazione è il MAGL. Questo enzima è anch'esso una serina idrolasi ed è presente sia nelle membrane che nelle frazioni citosoliche (Di Marzo V. et al., 1998; De Petrocellis L. et al., 2004; Dinh T. P. et al., 2002; Bari M. et al., 2006).

1.3. Recettori

I due principali recettori dei cannabinoidi, CB1 e CB2, appartengono alla super famiglia di recettori associati a proteine-G (G Protein-coupled Recceptors o GPCRs). Tutti i GPCRs possiedono il segmento N-terminale nella matrice extracellulare, sette domini ad alfa elica trans-membrana, tre “anse” extracellulari e tre citosoliche contenenti anche la porzione C-terminale. Nel caso di CB1 e CB2 gli agonisti interagiscono con il recettore all’interno del dominio transmembrana.

Il primo recettore dei cannabinoidi ad essere stato clonato è stato CB1 il cui gene murino codifica per una proteina di 473 amminoacidi e manifesta un’identità amminoacidica con la proteina umana del 97-99% (Gerard, C. M. et al., 1991; Chakrabarti, A. et al., 1995).

CB1 è localizzato principalmente nei neuroni centrali, in quelli periferici e nelle cellule gliali; è espresso inoltre anche nel sistema riproduttivo e nella microcircolazione .

Il gene del secondo recettore, CB2, è stato clonato da una libreria a cDNA di cellule umane promielocitiche, le HL60 (Munro, S. et al., 1993). La proteina da esso codificata è costituita da 360 amminoacidi ed ha un’omologia del 44% con il recettore CB1 umano.

La sua presenza è stata rilevata negli organi linfoidei multipli, soprattutto nei linfociti B ma anche nei monociti, nei neutrofilii polimorfonucleati, nei linfociti T e nelle cellule della microglia (Munro, S. et al., 1993; Galiègue, S. et al., 1995; Piomelli, D. 2003).

Studi farmacologici hanno rivelato l’esistenza di altri bersagli degli endocannabinoidi, il recettore vanilloide e almeno due recettori non CB1/CB2.

Questi ultimi si localizzano nelle terminazioni assoniche ma la loro struttura e funzione sono ancora da definire. (Hajos, N. et al., 2001; Howlett, A. C. et al., 2002; Kunos, G. et al., 2002).

Il recettore vanilloide di tipo 1 appartiene alla famiglia dei canali a potenziale rilascio transiente di calcio (recettori TRP). E’ un recettore costituito da sei domini trans-membrana ed è localizzato nel cervello e nei neuroni sensitivi dove risponde al calore aprendo canali cationici che promuovono l’ingresso del Calcio ed il rilascio di neuromediatrici. Esso viene anche attivato dal componente “pungente” del peperoncino, la

Capsaicina. Studi condotti su ceppi di topi “knockout” per il recettore VR1 hanno dimostrato che questa proteina è coinvolta nei fenomeni di iperalgesia termale e di infiammazione (Davis, J. B. 2000; Caterina, M. J. et al., 2000). Comunque, l’attivazione di VR1 da parte della Capsaicina è quasi immediatamente seguita da desensitizzazione al punto che analoghi sintetici di essa non esibiscono attività pungente e sono stati proposti come antiinfiammatori orali e composti analgesici (Dray, A. 1992).

Il primo accenno che l’anandamide e la capsaicina potessero avere un “target” molecolare in comune venne dalla somiglianza delle loro strutture chimiche e dalla successiva osservazione che un analogo della capsaicina inibiva l’uptake cellulare dell’anandamide da parte del suo recettore. Forme ricombinanti di VR1 di ratto over-espresse in cellule embrionali renali umane (HEK293) e oociti di *Xenopus* hanno dimostrato che l’anandamide è in grado di attivare questo recettore anche in un sistema di espressione eterologo (Zygmunt, P. M. et al., 1999).

Esperimenti condotti con questo recettore ricombinante hanno evidenziato che il sito di legame dell’AEA sul recettore VR1 è intracellulare (Jung, J. et al., 1999) e corrisponde al dominio che lega la capsaicina. E’ stato anche dimostrato che un ruolo chiave nell’interazione VR1-AEA è svolto dal trasportatore AMT (De Petrocellis, L. et al., 2001). L’attività dell’anandamide nei confronti del recettore vanilloide è inoltre aumentata in presenza di ossido nitrico, quando la PKC o PKA sono attivate (De Petrocelli, L. et al., 2001; Premkumar, L. S. et al., 2000; Vellani, V. et al., 2001) ed in condizioni di pH acido (5.5). E’ quindi possibile che, durante un’infiammazione o in caso di danni cellulari, quando la PKC è attivata e il pH diminuito, l’AEA sia più attivo su VR1 che sui recettori CB1/CB2, determinando una differente percezione del dolore, dell’infiammazione e della sopravvivenza cellulare a seconda che esso attivi solamente il recettore VR1 o anche lo desensitizzi (Di Marzo, V. et al., 2002).

1.4. Vie di segnalazione attivate dagli endocannabinoidi e loro funzioni

Entrambi i due recettori tipici degli endocannabinoidi, CB1 e CB2, sono accoppiati a simili sistemi di trasduzione. I segnali mediati da questi recettori vengono trasdotti dalle proteine G_{ω} le quali determinano sintesi di ossido nitrico (Prevot, V. et al., 1998) e inibizione dell’adenilato ciclasi che causa diminuzione dei livelli di cAMP (Devane, W. A. et al., 1998; Howlett, A. C. et al., 1990) e inibizione dell’attività della protein-chinasi A

(PKA). Ulteriori studi hanno dimostrato che i recettori dei cannabinoidi sono anche accoppiati a canali ionici attraverso la proteina G_{olf} , determinando un'inibizione del flusso di ioni Calcio all'interno della cellula (Mackie, K. e Hille, B. 1992; Twitchell, W. et al., 1997; Gebremedhin, D. et al., 1999) e, conseguentemente, aumento della conduttanza al Potassio (Mackie, K. et al., 1995).

Una via di segnalazione attivata dagli endocannabinoidi è quella delle proteine chinasi che attivano la mitogenesi (MAPKs).

Le MAPKs risultano attivate, dopo stimolazione del recettore CB1, in colture di astrociti e sistemi di espressione (Bouaboula, M. et al., 1995b); l'attivazione mediata da CB2 è stata invece dimostrata in colture di cellule umane promielocitiche (HL60) ed, anche in questo caso, in sistemi di espressione (Bouaboula, M. et al., 1996).

Sono state proposte due vie di segnalazione attraverso le quali le MAPKs sono in grado di trasdurre i segnali degli endocannabinoidi.

La prima consiste nella stimolazione, mediata dal recettore, della subunità α della proteina $G_{i/o}$ la quale va ad attivare la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K). La PI3K può mediare la fosforilazione in tirosina e l'attivazione di Raf-1 che a sua volta attiva la via delle MAP chinasi.

Il secondo meccanismo di stimolazione delle MAPKs è iniziato dall'idrolisi della sfingomieline, rilascio di ceramide e successiva attivazione della cascata Raf/MAPK (Howlett, A. C. e Mukhopadhyay, S. 2000).

L'attivazione delle MAPKs può essere associata all'espressione di geni precoci e fattori di trascrizione importanti nella regolazione di fenomeni quali la proliferazione cellulare e il differenziamento (Bouaboula, M. et al., 1995a; Bouaboula, M. et al., 1996).

L'attivazione del recettore dei cannabinoidi accoppiato alle proteine G_i determina anche la fosforilazione in tirosina della chinasi dell'adesione focale (FAK) (Derkinderen, P. et al., 1996). Questa proteina è importante nell'integrazione tra i cambiamenti citoscheletrici e gli eventi di trasduzione.

La stimolazione con endocannabinoidi, sempre in cellule neuronali, media l'attivazione della fosfolipasi C (PLC) e un aumento delle concentrazioni intracellulari di inositolo 1,4,5-trisfosfato (IP3) e diacilglicerolo, che inducono un incremento nella concentrazione intracellulare di Ca^{2+} e l'attivazione di PKC, rispettivamente. (Sugiura, T. et al., 1997).

Data l'ampia distribuzione dei recettori CB1 e CB2 gli endocannabinoidi svolgono numerose funzioni in un organismo.

Nel sistema nervoso centrale essi influenzano molti processi, quali la comunicazione cellulare, i processi di apprendimento, il coordinamento motorio, le funzioni cognitive e le risposte emozionali (Di Marzo, V. et al., 1998; Di Marzo, V. et al., 2001; Navarro, M. et al., 2001; Gomez, R. et al., 2002).

I cannabinoidi sono, come detto precedentemente, i responsabili di quel processo di segnalazione retrograda noto con il nome di DSI che inibendo il rilascio del GABA consente ai segnali eccitatori trasmessi dal glutammato di attivare la cellula postsinaptica. Bloccare temporaneamente l'inibizione accresce una forma di apprendimento conosciuta come "potenziamento a lungo termine", il processo di rinforzo delle sinapsi che permette di archiviare informazioni. Trattandosi di molecole liposolubili, gli endocannabinoidi nell'ambiente acquoso extracellulare del cervello non si diffondono a grande distanza. I meccanismi di captazione e di degradazione assicurano che essi agiscano in uno spazio confinato e per un breve periodo ed è per questo che la DSI è un effetto locale e di breve durata.

Gli endocannabinoidi sono anche associati ai fenomeni di migrazione in vari tipi cellulari come le cellule HL60 e le colture di monociti e neutrofilo (Szabo, I. et al., 2002; Deroq, J. M. et al., 2000).

Manifestano, inoltre, un'attività anti-tumorale in diversi sistemi cellulari promuovendo l'apoptosi (Schwarz, H. et al., 1994), inducendo l'accumolo di lipidi nelle cellule tumorali (Recht, L. D. et al., 2001) e attraverso la soppressione dell'angiogenesi (Blazquez, C. et al., 2003).

Nei tessuti periferici, i cannabinoidi controllano la secrezione di citochine e fattori di crescita in diversi tipi cellulari, quali leucociti e cellule spleniche. Nel sistema cardiovascolare questi mediatori vengono secreti da cellule endoteliali, piastrine, linfociti e macrofagi ed agiscono prevalentemente come vaso dilatatori, riducendo il flusso e la pressione sanguigna (Kunos, G. et al., 2000). Altri effetti dimostrati sono l'inibizione delle attività citotossiche e "natural killer" dei linfociti e la regolazione delle funzioni macrofagiche.

2. SCOPO DEL LAVORO

Numerose evidenze dimostrano che le piastrine, oltre al ben noto ruolo nella fisiopatologia dell'emostasi e della trombosi, svolgono un ruolo determinante nella eziopatogenesi di patologie cardiovascolari, quali l'infiammazione, le malattie allergiche e i tumori.

In seguito ad esposizione all'agente patogeno o all'allergene le piastrine, pur essendo anucleate vanno incontro a chemiotassi, esprimono molecole di adesione, rilasciano una gran quantità di mediatori proinfiammatori, enzimi e proteine cationiche, favorendo così il reclutamento e l'attivazione di vari tipi cellulari coinvolti nella risposta immunitaria e nell'infiammazione.

Un meccanismo attraverso il quale le piastrine possono contribuire alla modulazione di risposte immunitarie ed infiammatorie è rappresentato dal controllo dei livelli locali di endocannabinoidi.

Stimoli infiammatori infatti, oltre a stimolare il rilascio di AEA da linfociti e macrofagi, promuovono attiva sintesi e rilascio di 2-AG da parte delle piastrine. Concentrazioni fisiologiche di 2-AG stimolano le piastrine a secernere questo endocannabinoide che, rilasciato all'esterno, può svolgere una funzione paracrina su altri tipi cellulari ed autocrina, andando a stimolare ulteriormente la sintesi e la secrezione di 2-AG da parte delle stesse piastrine che lo hanno prodotto (Maccarrone, M. et al., 2001; Berdyshev, E. V. et al., 2001; Maccarrone, M. et al., 2002; Maccarrone, M. et al., 2003).

Dati recenti riportati in letteratura lasciano intravedere la possibilità che gli endocannabinoidi possano esercitare un articolato controllo della funzionalità piastrinica attraverso dei meccanismi di modulazione di specifiche attività recettoriali (Maccarrone, M. et al., 2002).

Nonostante queste evidenze, non è ancora chiara l'influenza che il 2-AG esercita sull'attivazione delle piastrine e sui meccanismi molecolari implicati. E' appunto in questo contesto che si inserisce il mio progetto di ricerca.

Lo scorso anno ho concentrato l'attenzione su dosi di 2-AG piuttosto elevate quali 200 μ M perché riportate essere fisiologiche ed attivare le piastrine in plasma (Maccarrone, M. et al., 2003). Nelle nostre condizioni abbiamo però visto che già alla concentrazione di 10 μ M le piastrine aggregano in maniera significativa ed abbiamo quindi deciso di lavorare a

concentrazioni più basse e valutare i meccanismi molecolari responsabili dell'attivazione piastrinica dipendente dal 2-AG.

In seguito ad attivazione, la fosforilazione in residui di tirosina o serina/treonina di diverse proteine rappresenta uno dei più importanti meccanismi di trasduzione del segnale promosso da numerosi agonisti e necessario per la secrezione e l'aggregazione. Per questo ho cercato di caratterizzare le vie di segnalazione attivate dopo stimolazione con 2-AG iniziando da importanti proteine di segnalazioni quali Src ed ERK1/2.

L'attivazione piastrinica è inoltre accompagnata da un drammatico incremento della concentrazione citosolica di ioni calcio in forma libera. Gli ioni calcio agiscono come secondi messaggeri e, come le protein chinasi, influenzano l'attività enzimatica e le interazioni proteina-proteina. Per meglio caratterizzare i fenomeni innescati dal 2-AG nelle piastrine abbiamo quindi deciso di indagare l'eventuale influenza di questa molecola sui movimenti di calcio intracellulari.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Preparazione delle piastrine mediante gel-filtrazione

Il sangue viene prelevato da donatori volontari che non abbiano assunto farmaci nei dieci giorni precedenti il prelievo. Come anticoagulante si utilizza ACD (130 mM acido citrico, 152 mM Na-citrato, 112 mM D-glucosio) nella proporzione di una parte ogni nove di sangue. Il sangue subisce due centrifugazioni. La prima centrifugazione viene eseguita a 830 rpm (120 x g) per dieci minuti a temperatura ambiente: questa centrifugazione permette di separare gli eritrociti ed i leucociti dal plasma ricco in piastrine (PRP). Il PRP viene poi aspirato con una pasteur di vetro siliconata e centrifugato a 1350 rpm (300 x g) per 10 minuti. Questa seconda centrifugazione permette la sedimentazione di un pellet di piastrine. Si allontana il plasma ed il pellet di piastrine è risospeso in un piccolo volume di ACD. Le piastrine vengono poi purificate dai componenti plasmatici mediante gel-filtrazione su colonna Sepharose CL-2B equilibrata con tampone Tyrode (10 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, pH 7.4). Le piastrine eluite, sono contate al microscopio ottico ad un ingrandimento di 10 x 40 su camera di Burkner, e portate alla concentrazione desiderata con il Tyrode. Le piastrine vengono lasciate riposare circa 15 minuti a 37°C prima di essere utilizzate per gli esperimenti.

3.2. Analisi dell'aggregazione piastrinica

Per misurare l'aggregazione piastrinica si è utilizzato un aggregometro della Chrono Log Corporation, che mette in relazione l'assorbanza di un fascio luminoso da parte di una sospensione piastrinica con la percentuale di aggregazione. La fonte luminosa di tale strumento è costituita da una lampada a tungsteno e la luce viene fatta passare attraverso un monocromatore rosso. Un motore mantiene costante l'agitazione magnetica del campione a 500 rpm e la temperatura d'esercizio viene mantenuta a 37°C.

Ho seguito l'aggregazione in piastrine gel-filtrate (3×10^8 cellule/ml) rese 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 2 mM glucosio.

I singoli campioni sono stati allestiti in apposite cuvette siliconate e posti nel lumiaggregometro a 37°C sotto costante agitazione magnetica contro tampone. Sulla base delle prove da eseguire, le piastrine vengono preincubate con opportuni agonisti. L'aggregazione piastrinica viene monitorata su un registratore a carta Chrono-Log Corporation. La percentuale di aggregazione piastrinica viene misurata 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista.

3.3. Preparazione di lisati cellulari totali

Le piastrine ottenute come descritto precedentemente, sono state suddivise in campioni di volume variabile a seconda dell'esperimento. I campioni sono stati trattati con le stabilite concentrazioni di 2-AG per tempi diversi come specificato nella sezione "Risultati". Le reazioni sono state bloccate mediante l'aggiunta di SDS-sample buffer (6% SDS, 1.5% DTT, 30% glicerolo, β -mercaptoetanol, 0.03% blu di bromofenolo) addizionato di sodio pirofosfato 40mM, sodio fluoruro 20mM, Na_3VO_4 2mM, glicerolo fosfato 6 mM, EGTA 1 mM e mix di inibitori di proteasi 1:50. Ogni campione viene scaldato a 95°C per 5 minuti e successivamente separato su gel lineare di poliacrilamide, trasferito su membrana di polivinilidene di fluoruro (PVDF) ed analizzato mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici.

3.4. Misura della concentrazione citoplasmatica di calcio

Il plasma ricco in piastrine (PRP) è stato incubato con la sonda fluorescente per il calcio Fura2-AM ad una concentrazione di 3 μ M per 30 minuti a 37°C. Le piastrine sono state recuperate mediante centrifugazione a 300g per 10 minuti a temperatura ambiente e risospese in un piccolo volume di plasma autologo (0.3-0.5 ml). Le cellule sono state gel filtrate su resina CL-2B Sepharose ed eluite con Tyrode contenete 0.5% di albumina sierica bovina (BSA) e 5.5 mM glucosio.

La misura del calcio citosolico è stata effettuata su campioni piastrinici conteneti 2x10⁸ cellule/ml. Ciascun campione è stato preriscaldato, sotto leggera agitazione, in uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS3 in presenza di 1mM CaCl_2 .

La molecola Fura2-AM è in grado di legare il calcio libero e, in questa forma, rappresenta un cromoforo fluorescente con una lunghezza d'onda di eccitazione pari a 340nm ed una di emissione pari a 510nm. Il segnale di fluorescenza è stato monitorato continuamente mediante un registratore a carta connesso con lo spettrofluorimetro. La concentrazione di calcio intracellulare è stata calcolata applicando la formula:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F}$$

K_d = costante di dissociazione per il calcio, pari a 224nM.

F_{min} = fluorescenza minima registrata dopo lisi delle cellule in presenza di 10mM EGTA in grado di chelare tutto il calcio del sistema.

F_{max} = fluorescenza registrata dopo lisi delle cellule con 0.1% di Triton X-100 in presenza di 1mM $CaCl_2$.

F = fluorescenza emessa dalle cellule in relazione alla quantità di Ca^{2+} citoplasmatico presente nelle cellule quiescenti ed attivate dopo la stimolazione.

3.5. Dosaggio del cAMP

I livelli di cAMP sono stati determinati tramite il Biotrack Enzymeimmunoassay System Kit dell'Amersham Bioscience. L'analisi è stata effettuata su campioni di piastrine gel-filtrate e portate alla concentrazione di 1×10^8 cellule/ml con Tyrode pH 7,4 contenente lo 0,5 % di BSA e 1mM $CaCl_2$.

Ciascun campione è stato trattato con Forskolina 10 μ M per 1' a 37°C e poi stimolato con le opportune molecole. La reazione è stata bloccata dall'aggiunta di etanolo al 96% freddo e centrifugate a 13000 rpm a 4°C; il surnatante è stato recuperato ed il solvente evaporato in un evaporatore rotante ad una temperatura di 45°C sotto vuoto.

Il saggio è poi stato effettuato in condizioni acetilanti secondo le indicazioni dell'azienda produttrice.

4. RISULTATI

4.1. Analisi della funzionalità piastrinica dopo stimolazione con 2-AG

Durante questo anno di Dottorato ho cercato di chiarire l'effetto del 2-AG sulla funzionalità piastrinica intesa come capacità di aggregazione.

Le piastrine sono state preparate mediante gel-filtrazione ed i campioni da 400 μ l contenenti 3×10^8 cellule/ml sono stati allestiti in apposite cuvette siliconate e posti nel lumiaggregometro a 37°C sotto costante agitazione. I singoli campioni sono stati stimolati con le opportune molecole e l'aggregazione è stata seguita per 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista.

Stimolando con concentrazioni di 2-AG comprese tra 80 μ M e 10 μ M osserviamo aggregazioni irreversibili che vengono bloccate dal peptide Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) e sono quindi dipendenti dall'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Per i successivi studi ho utilizzato la concentrazione di 10 μ M perché da ancora un'aggregazione significativa e possiede una bassa dose di solvente.

In queste condizioni ho trattato le piastrine per 5min con diverse concentrazioni dell'antagonista del recettore CB2 (SR2) ed ho osservato una parziale inibizione dell'aggregazione indotta dal 2-AG 10 μ M già con dosi di SR2 pari a 10 μ M anche se la massima inibizione la osserviamo alle concentrazioni di 50 μ M e 100 μ M SR2.

L'aggregazione da 2-AG è, inoltre, potenziata da epinefrina e ADP ma non dalla serotonina. Degno di nota è il blocco dell'aggregazione dipendente dal 2-AG da parte del sistema della fosfocreatina/creatina fosfochinasi (CPCPK) il quale inattiva l'ADP secreto fosforilandolo.

Abbiamo poi deciso di analizzare il ruolo dei due recettori dell'ADP, il P2Y12 (GPCR associato a Gi) e il P2Y1 (associato a Gq), tramite l'utilizzo di antagonisti specifici. Bloccando il P2Y12 con il MeSAMP osserviamo un'inibizione dell'aggregazione da 2-AG mentre se blocchiamo il P2Y1 con il MRS2179 osserviamo ancora aggregazione se pur di minor entità.

Ogni volta che osserviamo inibizione dell'aggregazione da 2AG come nel caso del GRGDS, del CPCPK e dell'SR2 le piastrine continuano comunque a fare cambio di forma; se invece trattiamo le piastrine con un antagonista del recettore del trombossano o con

acido acetilsalicilico sia l'aggregazione che il cambio di forma sono completamente bloccati indicando che la produzione e l'attività del trombossano A₂ sono indispensabili per l'attivazione piastrinica indotta dal 2-AG.

4.2. Inibizione dell'adenilato ciclasi

Come detto nella parte introduttiva, i due recettori tipici degli endocannabinoidi, CB1 e CB2, sono recettori accoppiati a proteine G. In particolare, i segnali da essi mediati vengono trasdotti dalle proteine G_i le quali determinano sintesi di ossido nitrico (Prevot, V. et al., 1998) e inibizione dell'adenilato ciclasi con conseguente diminuzione dei livelli di cAMP (Devane, W. A. et al., 1998; Howlett, A. C. et al., 1990) e inibizione dell'attività della protein-chinasi A (PKA).

Non c'è ancora prova diretta dell'esistenza di un tipico recettore CB2 sulle piastrine. Nonostante questo, abbiamo dimostrato che il 2-AG è in grado di indurre in queste cellule risposte quali l'aggregazione che, seppure solo parzialmente bloccate da un antagonista specifico per il CB2, hanno comunque una componente recettoriale.

Con l'intento di chiarire i meccanismi molecolari avviati dal 2-AG nel nostro sistema cellulare, sono andata a verificare se, come in altri sistemi, anche nelle piastrine esso inibisce l'adenilato ciclasi e quindi determini una diminuzione dei livelli di cAMP.

Come descritto nella sezione "Materiali e Metodi" ho utilizzato un Kit dell'Amersham Bioscience. Tutti i campioni sono stati stimolati a 37°C con 10 µM di forskolina per 1 minuto in modo da innalzare i livelli cellulari di cAMP. La stimolazione con 2-AG determina una diminuzione significativa dei livelli di cAMP innalzati dalla forskolina. Già con 2-AG 10µM osservo un abbassamento della concentrazione di cAMP di circa il 65% che aumenta fino al 96% con 2-AG 50 µM e 100 µM. Trattando le piastrine con SR2, o acido acetilsalicilico o con l'antagonista del recettore del trombossano A₂ l'effetto del 2-AG sull'adenilato ciclasi è completamente bloccato. Inoltre, stimolando con anandamide o con un analogo stabile del 2-AG non osserviamo nessuna inibizione.

4.3. Rilascio di Ca²⁺ intracellulare

Nelle piastrine i depositi di calcio sono localizzati principalmente a livello dei corpi densi. La concentrazione di ioni calcio nelle piastrine inattive è di circa 0,1 µM, agonisti

forti innalzano questa concentrazione a valori pari o superiori a $1\mu\text{M}$ mentre agonisti deboli possono avere poca o nessuna influenza sulla concentrazione citosolica di questo ione.

Data l'importanza del calcio nelle piastrine, ho deciso di andare a valutare se il 2-AG determini rilascio di calcio dai depositi intracellulari.

La stimolazione con 2-AG induce un notevole incremento della concentrazione del calcio citosolico in maniera dose-dipendente. In particolare, alla concentrazione di $50\mu\text{M}$ e $25\mu\text{M}$ osserviamo che la quantità di calcio liberata è paragonabile a quella osservata per agonisti forti.

Come per le aggregazioni e per il saggio del cAMP, anche in questo caso l'effetto del 2-AG è parzialmente bloccato dall'SR2 e completamente dall'ASA e dall'antagonista del recettore del trombossano A_2 .

4.4. Attivazione di Src e delle ERK1/2 dopo stimolazione con 2-AG

La maggioranza delle proteine ad attività tirosin-chinasica identificate nelle piastrine appartengono alle forme citosoliche non recettoriali e comprendono i membri delle famiglie di Src, FAK, Syk e JAK. La fosforilazione in tirosina di proteine piastriniche, ad opera di Src ed altre chinasi, è molto importante ai fini dell'attivazione ed influenza l'attività di numerose altre molecole.

La stimolazione di numerosi recettori, inoltre, compresi i recettori accoppiati a proteine-G, porta ad un rapido aumento dell'attività enzimatica di una famiglia di serin-treonin chinasi conosciute come MAPKs. Queste chinasi sono in grado di convertire gli stimoli extracellulari in segnali intracellulari che controllano l'espressione genica, la proliferazione, il differenziamento cellulare e l'apoptosi. Le MAPKs sono state classificate in tre sottofamiglie: le chinasi ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), le chinasi JNK/SAPK (c-Jun N-terminal or Stress-Activated Kinase) e la p38 MAP chinasi (Lopez-Illasaca, M. 1998). In seguito all'attivazione le MAPKs trasducono il segnale fosforilando i loro substrati a valle, su residui di treonina e serina adiacenti a residui di prolina (New, L. e Han, J. 1998). Esse sono espresse in modo ubiquitario in tutti i tessuti. Le piastrine contengono diversi membri della famiglia delle MAP chinasi: ERK1 (p44), ERK2 (p42), alcune isoforme della p38 e JNK1 (Bugaud, F. et al., 1999).

Come detto nella parte introduttiva, in numerosi sistemi cellulari è stato rilevato un coinvolgimento di questa via di segnalazione in seguito a trattamento con endocannabinoidi. Sono quindi andata a vedere se anche nelle piastrine stimulate con 2-AG si ha modulazione di queste vie di segnalazione.

A questo scopo, campioni contenenti 1×10^9 piastrine/ml sono stati stimolati a 37 °C con 2-AG 10 μ M e 2AG 25 μ M per tempi crescenti da 15 secondi a 3 minuti e trattati come descritto. Ho utilizzato entrambe le concentrazioni dopo aver visto che il 2-AG μ M induceva la liberazione di una minor concentrazione di calcio intracellulare. Mi sono quindi chiesta se questo determinasse una differenza a livello di fosforilazioni protiche o se, come nel caso delle aggregazioni, non comportasse nessuna variazione.

Per la valutazione dell'attivazione di Src ho utilizzato un anticorpo specifico per il riconoscimento della forma attivata, fosforilata sul residuo di Tyr 418. Per la proteina totale è stato utilizzato un anticorpo che riconosce la regione C-terminale.

La fosforilazione delle proteine ERK1/2 è stata analizzata con un anticorpo policlonale che riconosce in modo specifico la treonina in posizione 202 e la tirosina 204 di entrambe.

Ho osservato che la stimolazione delle piastrine con 2-AG 10 μ M con 2-AG 25 μ M determina un incremento transiente ma significativo sia della fosforilazione di Src che delle ERK1/2, con un picco massimo di attivazione ad 1 minuto di stimolazione e diminuzione già dopo 3 minuti senza però tornare ai livelli basali. Anche se l'andamento della fosforilazione delle proteine di interesse è identico per le due concentrazioni di agonista, la stimolazione con 2-AG 25 μ M induce un maggior grado di attivazione.

5. CONCLUSIONI

E' ormai assodato che l'anandamide e il 2-arachidonoilglicerolo siano stati scoperti mentre si era alla ricerca di ligandi endogeni per i recettori dei cannabinoidi. E' per questo che il primo composto ad essere stato individuato è stato chiamato "anandamide", dalla parola sanscrita "*ananda*" che vuol dire "beatitudine". Successivamente è stato proposto di formare una nuova classe di composti chiamati, appunto, endocannabinoidi (Di Marzo, V. e Fontana, A. 1995; Di Marzo, V. 1998).

Come già detto in precedenza, essi svolgono numerosissime funzioni. Nel sistema nervoso centrale influenzano fenomeni come la comunicazione cellulare, i processi di apprendimento, il coordinamento motorio, le funzioni cognitive e le risposte emozionali (Di Marzo, V. et al., 1998; Di Marzo, V. et al., 2001; Navarro, M. et al., 2001; Gomez, R. et al., 2002).

Nel sistema cardiovascolare gli endocannabinoidi agiscono da vasodilatatori, inibiscono l'attività citotossica dei linfociti e regolano le funzioni macrofagiche. Inoltre, essi vengono secreti da cellule endoteliali, piastrine, linfociti e macrofagi (Kunos, G. et al., 2000).

Ancora poco è noto riguardo alla relazione esistente tra il 2-AG, l'endocannabinoide maggiormente prodotto nei sistemi periferici, e le piastrine. Con il mio lavoro sto cercando di chiarire l'influenza che questo composto ha sull'attivazione piastrinica e sui meccanismi che ne sono alla base.

Sono andata innanzitutto a verificare se il 2-AG sia in grado di indurre aggregazione piastrinica. Stimolando piastrine gel filtrate con concentrazioni di 2-AG comprese tra 80 μ M e 10 μ M osserviamo aggregazioni irreversibili che vengono bloccate dal peptide Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) e sono quindi dipendenti dall'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Già alla concentrazione di 10 μ M il 2-AG si comporta quindi da forte agonista. Abbiamo anche verificato, tramite misurazione dei livelli di cAMP, che la segnalazione del 2-AG attiva una proteina Gi. Esso, inoltre, è in grado di liberare il calcio dai depositi intracellulari. La presenza di EGTA nella sospensione piastrinica ci permette di affermare che il calcio mosso deriva dall'apertura dei depositi intracellulari e quindi dall'attività dell'inositolo 1,4,5-trifosfato (IP3). Il 2-AG attiva quindi una PLC la quale è responsabile della produzione di IP3. Rimane però da chiarire se gli effetti indotti dal 2-AG nelle

piastrine siano mediate direttamente da esso o se dall'acido arachidonico eventualmente prodotto in seguito alla sua degradazione. L'acido arachidonico, infatti, viene convertito a trombossano A₂ che, essendo in grado di indurre secrezione e quindi ADP, è un forte agonista piastrinico. L'ipotesi che il 2-AG induca produzione di trombossano, e che sia quest'ultimo l'effettore delle risposte osservate, è supportata dall'inibizione totale di aggregazione, di movimenti di calcio e di inibizione dell'adenilato ciclasi che osserviamo trattando le piastrine con acidoacetilsalicilico o con l'antagonista di un recettore del trombossano.

E' ancora da dimostrare se e come il 2-AG induce produzione di trombossano, se tramite un meccanismo recettoriale, se entrando nella cellula o se con entrambi i meccanismi.

Va inoltre considerato che se blocco il recettore CB2 con uno specifico antagonista, osservo comunque una seppur parziale inibizione degli effetti mediate dal 2-AG. Questo fa quindi supporre che, qualunque sia il destino del 2-AG all'interno della cellula, c'è comunque un qualche meccanismo che coinvolge il recettore dei cannabinoidi. Queste ultime considerazioni saranno da me prese in analisi nei lavori futuri.

6. BIBLIOGRAFIA

Bari, M., Battista, N., Fezza, F., Gasperi, V., and Maccarrone, M. (2006) “New insights into endocannabinoid degradation and its therapeutic potential” *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 6: 257-268.

Barinaga, M. (2001) “How cannabinoids work in the brain” *Science* 291: 2530–2531.

Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A., and Piomelli, D. (1997) “Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition” *Science* 277: 1094–1097.

Berdyshev, E. V., Schmid, P. C., Krebsbach, R. J., Schmid, H. H. (2001) “Activation of PAF receptors results in enhanced synthesis of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in immune cells” *FASEB J.* 15: 2171-8.

Bisogno, T., Maccarone, M., De Petrocellis, L., Jarraghan, A., Finazzi-Agrò, A., Hillard, C., and Di Marzo, V., (2001) “The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors” *Eur.J.Biochem.* 268: 1982-1989.

Blaukat, A., Dikic, II., Gronroos, E., Dolfi, F., Tokiwa, G., Vuori, K., Dikic, I. (1999) “Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades” *J. Biol. Chem.* 274: 14893-14901.

Blazquez, C., Casanova, M. L., Planas, A., Del Pulgar, T. G., Villanueva, C., Fernandez-Acenero, M. J., Aragonés, J., Huffman, J. W., Jorcano, J. L., Guzman, M. (2003) “Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids” *FASEB J.* 17: 529–531.

Bouaboula, M., Bourrie, B., Rinaldi-Carmona, M., Shire, D., LeFur, G., Casellas, P. (1995a) “Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces *krox-24* expression in human astrocytoma cells” *J. Biol. Chem.* 270: 13973–13980.

Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrie, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Casellas, P. (1995b) "Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1" *Biochem. J.* 312: 637–641.

Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Marchand, J., Canat, X., Bourrie, B., Rinaldi-Carmona, M., Calandra, B., LeFur, G., Casellas, P. (1996) "Signalling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinases and induction of Krox-24 expression) *Eur. J. Biochem.* 237: 704–711.

Bugaud, F., Nadal-Wollbold, F., Lèvi-Toledano, S., Rosa, J. P., Bryckaert, M. (1999) "Regulation of c-Jun-NH2 terminal Kinase and Extracellular-signal Regulated Kinase in human platelets" *Blood* 94: 3800-3805.

Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L. and Piomelli, D. (1996) "Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and camp" *Journal of Neuroscience* 16: 3934–3942.

Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G. and Casellas, P. (1995) "Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations" *European Journal of Biochemistry* 232: 54–61.

Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton J., Petersen-Zeitz, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I., Julius, D. (2000) "Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor" *Science* 288: 306-313.

Chakrabarti, A., Onaivi, E., Chaudhuri, G. (1995) "Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein" *DNA Seq.* 5: 385–388.

Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., and Gilula, N. B. (1996) "Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides" *Nature* 384: 83–87.

Davis, J. B. (2000) "Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia" *Nature* 405: 183-188.

De Petrocellis, L, Bisogno, T., Maccarrone, M., Davis, J. D., Finazzi-, A., Di Marzo, V. (2001) "The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism" *J. Biol. Chem.* 276: 12 856-12 863.

De Petrocellis, L, Harrison, S., Bisogno, X., Xognetto, M., Brandi, L., Smith, G. D., Creminon, C., Davis, J. B., Geppetti, P., Di Marzo, V. (2001) "The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase" *J. Neurochem.* 77: 1660-1663.

De Petrocellis, L., Cascio, M., G., and Di Marzo, V., (2004) "The endocannabinoid system: a general view and latest additions" *British Journal of Pharmacology* 141: 765-774.

Derkinderen, P., Toutant, M., Burgaya, F., Le Bert, M., Siciliano, J.C., de Franciscis, V., Gelman, M., Girault, J.-A. (1996) "Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide" *Science* 273: 1719–1722.

Derocq, J. M., Jbilo, O., Bouaboula, M., Segui, M., Clere, C., Casellas, P. (2000) "Genomic and functional changes induced by the activation of the peripheral cannabinoid receptor CB2 in the promyelocytic cells HL-60. Possible involvement of the CB2 receptor in cell differentiation". *J. Biol. Chem.* 275, 15621–15628.

Devane, W. A., Dysarz, F. A. 3rd, Johnson, M., Melvin, L. S. and Howlett, A. C. (1988) "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain" *Molecular Pharmacology* 34 : 605–613.

Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A. *et al.* (1992) "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor" *Science* 258: 1946–1949.

Di Marzo, V. (1998) “Endocannabinoids and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance” *Biochim. Biophys. Acta* 1392: 153-175.

Di Marzo, V., De Petrocelli, L., Fezza, F., Ligresti, A., Bisogno, T. (2002) “Anandamide receptors” *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 66:377-391.

Di Marzo, V., Fontana, A. (1995) “Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: killing two birds with one stone” *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 53: 1-11.

Di Marzo, V., Goparaju, S. K., Wang, L. *et al.* (2001) “Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake” *Nature* 410: 822–825.

Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T. and De Petrocellis, L. (1998) “Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action” *Trends in Neurosciences* 21: 521–528.

Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S. A., Schlessinger, J. (1996) “A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation” *Nature* 383: 547-550.

Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L., Kathuria, S. and Piomelli, D. (2002) “Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 10819–10824.

Dray, A. (1992) “Neuropharmacological mechanisms of capsaicin and related substances” *Biochem Pharmacol* 44: 611-615.

Fegley, D., Kathuria, S., Mercier, R., Li, C., Goutopoulos, A., Makriyannis, A. and Piomelli, D. (2004) “Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase

activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8756–8761.

Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Ganju, R. K., Hatch, W. C., Avraham, H., Ona, M. A., Druker, B., Avraham, S., Groopman, J. E. (1997) “RAFTK, a novel member of the focal adhesion kinase family, is phosphorylated and associates with signaling molecules upon activation of mature T lymphocytes” *J. Exp. Med.* 185: 1055-1064.

Gebremedhin, D., Lange, A. R., Campbell, W. B., Hillard, C. J. and Harder, D. R. (1999) “Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current” *American Journal of Physiology* 276: H2085–2093.

Gerard, C. M., Mollereau, C., Vassart, G., Parmentier, M. (1991) “Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis” *Biochem. J.* 279: 129–134.

Giuffrida, A., Beltramo, M. and Piomelli, D. (2001) “Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298: 7–14.

Gomez, R., Navarro, M., Ferrer, B. *et al.* (2002) “A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding” *Journal of Neuroscience* 22: 9612–9617.

Hajos, N., Ledent, C. and Freund, T. F. (2001) “Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus” *Neuroscience* 106: 1–4.

Hermann, A., Kaczocha, M., and Deutsch D.G. (2006) “2-Arachidonoylglycerol (2-AG) membrane transport: history and outlook” *AAPS Journal* 8: E409-412.

Howlett, A. C. and Mukhopadhyay, S. (2000) “Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol” *Chemistry and Physics of Lipids* 108: 53-70.

Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I. *et al.* (2002) “International Union of Pharmacology XXVII. Classification of cannabinoid receptors” *Pharmacological Reviews* 54: 161–202.

Howlett, A. C., Bidaut-Russell, M., Devane, W. A., Melvin, L. S., Johnson, M. R. and Herkenham, M. (1990) “The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization” *Trends in Neurosciences* 13: 420–423.

Jung, J., Hwang, S. W., Kwak, J., Lee, S. Y., Kang, C. J., Kim, W. B., Kim, D., Oh, M. (1999) “Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel” *Neurosci.* 19: 529-538.

Kunos, G., Batkai, S., Offertaler, L., Mo, F., Liu, J., Karcher, J. and Harvey-White, J. (2002) “The quest for a vascular endothelial cannabinoid receptor” *Chemistry and Physics of Lipids* 121: 45–56.

Kunos, G., Jarai, Z., Batkai, S., Goparaju, S. K., Ishac, E. J., Wang, L., Wagner, J. A. (2000) “Endocannabinoids as cardiovascular modulators” *Chem. Phys. Lipids* 108: 159-68.

Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J. M., Plowman, G. D., Rudy, B., Schlessinger, J. (1995) “Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions” *Nature* 376: 737-745.

Lopez-Illasaca, M. (1998) “Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades” *Biochem Pharmacol* 56: 267-277.

Maccarrone, M., Del Principe, D., Finazzi-Agrò, A. (2002) “Endocannabinoids: new physiological (co-) agonists of human platelets” *Thromb. Haemost.* 88: 165-166.

Maccarrone, M., Bari, M., Del Principe, D., Finazzi-Agrò, A. (2003) “Activation of human platelets by 2-arachidonoylglycerol is enhanced by serotonin” *Thromb. Haemost.* 89: 340-7.

Maccarrone, M., Bari, M., Menichelli, A., Giuliani, E., Del Principe, D., Finazzi-Agrò, A. (2001) "Human platelets bind and degrade 2-archidonoylglycerol, which activates these cells through a cannabinoid receptor" *Eur. J. Biochem.* 268: 819-25.

Mackie, K. and Hille, B. (1992) "Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 3825-3829.

Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R. and Mitchell, R. (1995) "Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor" *Journal of Neuroscience* 15: 6552-6561.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L. *et al.* (1995) "Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors" *Biochemical Pharmacology* 50: 83-90.

Munro, S., Thomas, K. L. and Abu-Shaar, M. (1993) "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids" *Nature* 365: 61-65.

Munro, S., Thomas, K. L., Abu-Shaar, M. (1993) "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids" *Nature* 365: 61-65.

Navarro, M., Carrera, M. R., Fratta, W. *et al.* (2001) "Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug selfadministration" *Journal of Neuroscience* 21: 5344-5350.

New, L., Han, J. (1998) "The p38 MAP kinase pathway and its biological function" *Trends Cardiovasc. Med.* 8: 220-229.

Nurden, P., Puoojol, C., Nurdet, A. T. (1997) "The evolution of megakaryocytes to platelets" *Baillieres clin. Haematol.* 10: 1-27.

Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T. and Ueda, N. (2004) "Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners" *Journal of Biological Chemistry* 279: 5298–5305.

Piomelli, D. (2003) "The molecular logic of endocannabinoid signalling" *Nature Reviews Neuroscience* 4: 873–884.

Premkumar, L. S., Ahern, G. P. (2000) "Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C" *Nature* 408: 985-990.

Prevot, V., Rialas, C. M., Croix, D., Salzet, M., Dupouy, J. P., Poulain, P., Beauvillain, J. C., Stefano, G. B. (1998) "Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation" *Brain Res.* 790: 236–244.

Recht, L. D., Salmonsén, R., Rosetti, R., Jang, T., Pipia, G., Kubiátowski, T., Karim, P., Ross, A. H., Zurier, R., Litofsky, N. S., Burstein, S. (2001) "Antitumor effects of ajulemic acid (CT3), a synthetic non-psychoactive cannabinoid" *Biochem. Pharmacol.* 62, 755–763.

Rueda, D., Navarro, B., Martínez, Serrano., Guzman, M., Galve-Roperh, I. (2002) "The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1B-Raf/ERK pathway" *J. Biol. Chem.* 277: 46645-50.

Stella, N., Schweitzer, P. and Piomelli, D. (1997) "A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation" *Nature* 388: 773–778.

Sugiura, T., Kodaka, T., Kondo, S., Nakane, S., Kondo, H., Waku, K., Ishima, Y., Watanabe, K., Yamamoto, I. (1997) "Is the cannabinoid CB1 receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor? Structural requirements for triggering a Ca²⁺ transient in NG108-15 cells" *J. Biochem.* 122: 890– 895.

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A. and Waku, K. (1995) "2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain" *Biochemistry Biophysics Research Communications* 215: 89–97.

Szabo, I., Chen, X. H., Xin, L., Adler, M. W., Howard, O. M., Oppenheim, J. J., Rogers, T. J. (2002) "Heterologous desensitization of opioid receptors by chemokines inhibits chemotaxis and enhances the perception of pain" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 10276–10281.

Twitchell, W., Brown, S. and Mackie, K. (1997) "Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons" *Journal of Neurophysiology* 78: 43–50.

Vellani, V., Mapplebeck, S., Moribondo, A., Davis, J. B., McNaughton, P. A. (2001) "Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide" *Physiol.* 534: 813-825.

Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D., Hogestatt, E. D. (1999) "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide" *Nature* 400: 452-457.

Seminari seguiti durante il secondo anno di Dottorato:

- 18-10-2005
"La genetica della sordità"- Prof. Paolo Gasparini
- 18-11-2005
"Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits"- Prof. Diego Cotella
- 23-11-2005
"HCV-related steatosis: pathogenic mechanism and clinical implications"- Prof. Luigi Elio Adinolfi
- 25-11-2005
"Mechanisms of Transcriptional Regulation and Disease"- Prof. Robert Tjian
- 15-03-2006
"Indicazioni cliniche e aspetti tecnici della radioterapia stereotassica extracranica"
– Prof. Umberto Ricardi
- 23-03-2006
"La prevenzione della trasmissione verticale di HIV in Africa Sub Sahariana. L'esperienza del programma DREAM (Drug Resource Enhancement against AIDS and Malnutrition)"- Dott. Susanna Ceffa
- 06-04-2006
"Aspetti immunogenetici e terapeutici della "hairy cell leukemia""- Dott. Francesco Forconi
- 20-04-2006
"Terapie molecolari nelle malattie mieloproliferative"- Dott. Daniela Cilloni
- 03-05-2006
"Impatto delle biotecnologie sulle strategie d'impresa nel settore della tutela della salute - Prof. Claudio Jommi
- 04-05-2006
"Il mesotelioma: un modello di terapia traslazionale" – Dott. Luciano Mutti
- 18-05-2006

"L'epatite autoimmune"- Dott. Marco Lenzi

- 30-05-2006
"Sperm mediated gene transfer. Storia ed applicazioni" - Prof. M. Lavitrano

- 15-06-2006
"Melusin: a Stretch Sensor Molecule Controlling Adaptive Cardiac Remodeling to Pressure Overload" - Prof. Guido Tarone

- 19-06-2006
"Ruolo eziologico dei papillomavirus umani (HPV) nello sviluppo di lesioni neoplastiche nel distretto genitale" – Prof. N. Surico, Prof.ssa M. Gariglio, Prof. R. Boldorini, Dott. M. Sideri.

- 22-06-2006
"Epatite ricorrente da HCV dopo trapianto di fegato" - Prof. Pierluigi Toniutto

- 27-06-2006
"Osteointegrazione e superfici implantari" - Prof. Lia Rimondini

- 13-07-2006
"L'approccio riabilitativo delle malattie cardiovascolari" - Prof. Pantaleo Giannuzzi

- 04-09-2006
"Proton Radiation Therapy of Skull Base Tumors: The Massachusetts General Hospital Experience"- Prof. Norbert J. Liebsch

Corsi:

"Corso d'inglese" – prof. Colin Irving Bell

"Proteomics" 27-30 marzo 2006 – Bioindustry Park, Colletterto Giocosa (TO)

Congressi:

- "Proteine 2006" – Novara, 1-3 giugno 2006

- “Congresso Nazionale SIB 2006” – Riccione, 28-30 settembre 2006

Poster presentati:

Congresso Nazionale SIB 2006 – Riccione, 28-30 settembre 2006

“Study of the role of 2-arachidonoylglycerol in platelet activation”

Baldassarri S., Bertoni A., Lova P., Zanfa M., Catani MV., Avigliano L., Maccarrone M., Torti M., Sinigaglia F.

Articoli sottomessi:

“Membrane lipid rafts coordinate estrogen-dependent signaling in human platelets”

Reineri S., Bertoni A., Sanna E., **Baldassarri S.**, Sarasso C., Canobbio I., Torti M., Sinigaglia F. (BBA-Molecular Cell Research)