

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE
ORIENTALE**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

**I RAFTS LIPIDICI COORDINANO LA VIA DI
SEGNALAZIONE 17 β -ESTRADIOLO-DIPENDENTE
IN PIASTRINE UMANE**

Coordinatore Scientifico
Prof.ssa F. Sinigaglia

Relazione del 4°anno di Dottorato
in Medicina Molecolare
di Stefania Reineri

Anno Accademico 2005/2006

INDICE

INTRODUZIONE.....	1
ATTIVAZIONE PIASTRINICA.....	2
Cambio di forma e adesione.....	2
Spreading e secrezione.....	2
Aggregazione.....	3
La retrazione del coagulo.....	4
MECCANISMI BIOCHIMICI DELL'ATTIVAZIONE PIASTRINICA.....	5
<i>Agonisti ed antagonisti piastrinici.....</i>	<i>5</i>
<i>Recettori accoppiati a proteine G eterotrimeriche.....</i>	<i>6</i>
<i>Segnalazione piastrinica.....</i>	<i>8</i>
<i>Ruolo delle tirosin chinasi.....</i>	<i>9</i>
RAFTS LIPIDICI.....	12
GLI ORMONI STEROIDEI.....	16
IL RECETTORE PER GLI ESTROGENI.....	22
SCOPO DEL LAVORO.....	26
METODI.....	28
RISULTATI.....	33
DISCUSSIONE.....	42
BIBLIOGRAFIA.....	46

INTRODUZIONE

Le piastrine sono piccoli frammenti cellulari anucleati e discoidali che nell'uomo circolano ad una concentrazione di 250000-350000 cellule per μl di sangue (Majerus, 1987).

Pur essendo i più piccoli elementi cellulari del sangue e prive di nucleo, possiedono una complessità metabolica e funzionale simile a quella delle più grandi cellule sanguigne nucleate (Crawford & Scrutton, 1994).

La loro funzione primaria è quella di prevenire le emorragie in caso di danno alla parete vasale, aderendo e formando un aggregato a livello della ferita. Esse partecipano inoltre all'emostasi primaria, al processo della coagulazione sanguigna ed intervengono nei processi infiammatori e nella risposta immunitaria. Tuttavia, la grande importanza delle piastrine nelle malattie umane, risiede nel loro ruolo nella patogenesi di aterosclerosi e trombosi (Majerus, 1987).

ATTIVAZIONE PIASTRINICA

Le piastrine svolgono un ruolo essenziale nella fase iniziale della risposta emostatica. Quando un vaso sanguigno viene danneggiato sul suo lato luminale, gli elementi del sottoendotelio vengono a contatto con gli elementi del sangue. Le piastrine sono attivate dal collagene sottoendoteliale, dalle microfibrille della matrice e dal fattore von Willebrand: esse vanno incontro ad un rapido cambio di forma, aderiscono al tessuto sottoendoteliale esposto, secernono il contenuto dei granuli e regolano l'espressione e l'affinità di legame di alcuni recettori di adesione. Si forma così il trombo bianco che chiude il vaso sanguigno nel punto in cui è stato danneggiato. In seguito all'attivazione delle piastrine, la cascata coagulativa porta alla formazione delle fibrille di fibrina, che rafforzano il trombo primario e lo trasformano nel trombo rosso (Blockmans et al., 1995).

Cambio di forma e adesione

Quando le piastrine sono esposte ad una superficie non endoteliale, cambiano rapidamente forma, da discoidale a sferica, emettono lunghi e fini filopodi e si appiattiscono le une sulle altre nel sito di lesione (Majerus, 1987).

Le più importanti strutture sottoendoteliali a cui le piastrine possono aderire attraverso i propri specifici recettori sono le fibrille di collagene, il fibrinogeno, la fibronectina ed il fattore von Willebrand (Blockmans et al., 1995).

In condizioni di alto flusso ematico, il principale responsabile dell'adesione piastrinica è rappresentato dal fattore von Willebrand immobilizzato nella matrice sottoendoteliale. Il legame del fattore von Willebrand immobilizzato alle piastrine attraverso il complesso GP Ib-IX-V induce attivazione piastrinica, con conseguente attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e aggregazione.

Spreading e secrezione

In seguito all'adesione delle piastrine su una superficie sottoendoteliale, si verifica il fenomeno dello spreading, in cui le cellule si appiattiscono, si rimodellano e

conseguentemente si attivano. Contemporaneamente al fenomeno di spreading si verifica il processo di secrezione. Le piastrine secernono il contenuto degli α -granuli e dei corpi densi, mentre vi è solo una parziale secrezione degli enzimi lisosomiali. Gli agonisti forti determinano una secrezione del 70-90% del contenuto degli α -granuli e dei corpi densi (Majerus, 1987). La secrezione dei granuli consente il rilascio, nel microambiente sanguigno, di molecole che per prime amplificano la formazione del tappo emostatico e la dissoluzione degli aggregati formati da piastrine e fibrina.

La secrezione richiede la fusione della membrana dei granuli con la membrana plasmatica o con le membrane del sistema canalicolare aperto. La forza contrattile all'interno delle piastrine necessaria alla centralizzazione e secrezione dei granuli è generata dall'interazione dei filamenti di actina con le teste di miosina (Blockmans et al., 1995) e dalla contrazione della banda di microtubuli lungo la circonferenza della cellula (Majerus, 1987).

Aggregazione

La maggior parte delle piastrine che si accumulano nei siti di lesione vascolare non aderiscono direttamente alle strutture sottoendoteliali, ma tra di loro. Questo fenomeno di interazione piastrina-piastrina è definito aggregazione. Sperimentalmente l'aggregazione si può ottenere utilizzando parecchi agonisti fisiologici, tra cui i più importanti sono ADP e trombina; altri potenziali agonisti sono epinefrina, trombossano A_2 ed il PAF (Platelet Activating Factor) (Majerus, 1987).

Agonisti deboli o basse concentrazioni di agonisti forti, causano un'aggregazione reversibile (primaria), mentre agonisti forti causano un'aggregazione irreversibile (secondaria), associata alla sintesi di trombossano A_2 e alle reazioni di rilascio. Le sostanze rilasciate dai corpi densi, in particolare ADP, giocano un ruolo importante nel promuovere l'aggregazione secondaria indotta da altri agonisti (Blockmans et al., 1995).

La trombina è uno dei principali agonisti in grado di promuovere l'attivazione e l'aggregazione piastrinica mediata dal legame del fibrinogeno all'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$: questa via di segnale definita inside-out porterà ad alcuni cambiamenti nel dominio extracellulare dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ rendendo accessibile il sito di legame per il fibrinogeno. L'attivazione dell'integrina potrebbe riflettere un incremento nell'affinità

di $\alpha_{IIb}\beta_3$ per il fibrinogeno o un incremento nell'avidità per il fibrinogeno dovuta all'oligomerizzazione dei recettori $\alpha_{IIb}\beta_3$ consentendo alle piastrine di aggregare. Il legame del fibrinogeno all'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ media il segnale outside-in inducendo una serie di eventi intracellulari che portano al rilascio di vescicole di membrana procoagulanti, alla riorganizzazione del citoscheletro ed alla retrazione del coagulo (Lévi-Toledano, 1999).

In vivo, l'aggregazione piastrinica è dipendente dal flusso ematico: in condizioni di elevato flusso sanguigno l'aggregazione dipende dal fattore von Willebrand che interagisce con il GP Ib-IX-V. Il legame con il GP Ib-IX-V determina un aumento del Ca^{2+} intracellulare per apertura di canali al calcio transmembrana ed un cambio conformazionale nell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ che può legare il fattore von Willebrand stesso e il fibrinogeno formando ponti tra piastrine adiacenti (Blockmans et al., 1995).

La retrazione del coagulo

La retrazione del coagulo ha la funzione di prevenire un eccessivo restringimento del calibro dei vasi sanguigni che potrebbe causare fenomeni trombotici ed ischemici. La forza meccanica necessaria per retrarre il recettore piastrinico $\alpha_{IIb}\beta_3$, internamente legato all'actina ed esternamente alla fibrina presente tra la piastrine aggregate, è fornita dallo scorrimento dei filamenti di actina su quelli di miosina. Le piastrine si contraggono e con esse l'intero trombo.

MECCANISMI BIOCHIMICI DELL'ATTIVAZIONE PIASTRINICA

Numerosi agonisti fisiologici determinano l'attivazione e la conseguente cascata di trasduzione del segnale che porta a cambiamenti biochimici, morfologici e funzionali nella piastrina, culminando nell'aggregazione irreversibile. Tali processi richiedono una precisa coordinazione di molteplici vie di segnalazione all'interno della cellula che coinvolgono il metabolismo dei fosfolipidi di membrana, la mobilizzazione del Ca^{2+} intracellulare, la traslocazione di proteine al citoscheletro actinico, la modulazione dell'avidità delle integrine e la fosforilazione di specifiche proteine su residui di serina, treonina e tirosina (Jackson et al., 1996).

L'attivazione o l'inibizione fisiologica della funzionalità piastrinica inizia quando una molecola segnale extracellulare interagisce con uno specifico recettore presente sulla membrana plasmatica.

Agonisti ed antagonisti piastrinici

I differenti segnali extracellulari che regolano le funzioni piastriniche comprendono costituenti del plasma come trombina, plasmina, catecolammine; prodotti vascolari come PGI_2 , l'EDRF (Endothelium-Derived Relaxing Factor) e il collagene; prodotti piastrinici come ADP, trombossano A_2 (TxA_2) e PGD_2 ; prodotti che derivano dalle cellule del sangue e dai vasi come il platelet-activating factor (PAF), il fattore von Willebrand (vWF) ed endoperossidi prostaglandinici (Kroll & Schafer, 1989). Essi si dividono in agonisti ed antagonisti.

Gli agonisti piastrinici si distinguono in deboli e forti: gli agonisti deboli come ADP, epinefrina, serotonina e vasopressina causano aggregazione solo quando avviene produzione di trombossano A_2 ; con questi agonisti la secrezione segue e dipende dall'aggregazione piastrinica, ma è incompleta.

Gli agonisti forti come trombina, collagene, endoperossidi prostaglandinici, trombossano A₂ e PAF causano aggregazione non dipendente dalla produzione di trombossano A₂ e determinano secrezione sia in presenza sia in assenza di aggregazione. Così, l'aggregazione e la secrezione indotte da trombina avvengono anche in piastrine trattate con aspirina. A basse concentrazioni di agonisti forti, la secrezione dipende sia dall'aggregazione sia dalla produzione di trombossano A₂ (Majerus, 1987).

Gli antagonisti come PGI₂, PGD₂, EDRF controbilanciano l'attivazione piastrinica tramite processi biochimici che attenuano o prevengono le risposte indotte dagli agonisti (Kroll & Schafer, 1989).

Recettori accoppiati a proteine G eterotrimeriche

Nel lavoro di questi quattro anni di Dottorato, sono stati presi in considerazione due agonisti piastrinici i cui recettori sono accoppiati a proteine G eterotrimeriche: la trombina ed il trombossano A₂.

La trombina è il più forte agonista piastrinico; essa attiva le piastrine agendo proteoliticamente sui recettori PAR (Protease Activated Receptor) e tale azione enzimatica è fondamentale ai fini della trasduzione del segnale all'interno della cellula. La trombina taglia una porzione di circa 40 aminoacidi all'estremità NH₂-terminale dei recettori PAR, smascherando una nuova sequenza NH₂-terminale in grado di legarsi al corpo del recettore, determinando la segnalazione intracellulare. Per lo studio di ogni recettore PAR nella trasduzione del segnale vengono utilizzati dei peptidi sintetici denominati TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide) che contengono residui aminoacidici complementari alla nuova sequenza esposta. I PAR sono recettori a sette domini transmembrana accoppiati a proteine G eterotrimeriche; quattro sono i recettori fino ad ora identificati e sulle piastrine umane sono presenti PAR-1 e PAR-4, che possiedono una diversa affinità per la trombina: PAR-4 richiede per la sua attivazione delle concentrazioni di agonista molto più alte rispetto a PAR-1 (Kahn et al., 1998). Una volta attivati, i recettori determinano una segnalazione che comporta cambio di forma, reazione di rilascio del contenuto dei granuli, produzione di trombossano A₂, riorganizzazione del citoscheletro actinico ed aggregazione irreversibile. Lo spegnimento del segnale avviene attraverso un fenomeno di desensitizzazione dei

recettori che li rende refrattari ad una successiva stimolazione: essi vengono fosforilati su residui di serina e treonina nella loro porzione citoplasmatica che ne segnala la rimozione dalla membrana o pur restando in membrana, risultano insensibili ad una successiva stimolazione.

La trombina possiede anche un altro recettore: è la subunità GPIb α del complesso glicoproteico GPIb-IX-V. La trombina si lega alla glicoproteina Ib α senza avere su di essa alcuna azione proteolitica; tale interazione avrebbe la funzione di posizionare correttamente l'enzima favorendo l'azione proteolitica su PAR-1 (Coughlin, 2001).

Il trombossano A₂ è un potente agonista piastrinico che deriva dal metabolismo della fosfolipasi A₂. Il trombossano A₂ agisce da mediatore a feedback positivo nell'attivazione e nel reclutamento di più piastrine nel processo di emostasi primaria (Hourani & Cusack, 1991). Sulla membrana piastrinica sono presenti due recettori per il trombossano A₂, noti come TP α e TP β : TP α è associato a Gq, in grado di attivare la fosfolipasi C e di secernere ADP per rafforzare l'aggregazione piastrinica, TP β sembra essere associato a Gi dal momento che questo accoppiamento è presente anche in cellule diverse dalle piastrine. Entrambi i recettori mediano la stimolazione della fosfolipasi C ed un incremento nelle concentrazioni intracellulari di inositolo 1,4,5-trisfosfato e diacilglicerolo, che inducono un incremento nella concentrazione intracellulare di Ca²⁺ e l'attivazione di PKC, rispettivamente. L'affinità di legame del trombossano A₂ al recettore TP α è molto più alta rispetto a TP β ; inoltre sembra che il recettore a bassa affinità di legame per l'agonista sia in grado di mediare l'aggregazione piastrinica e la secrezione, mentre il recettore a più alta affinità sia interessato nel processo di cambio di forma. Gli studi della via di trasduzione del segnale vengono condotti utilizzando un analogo stabile del trombossano A₂, U46619, che è accoppiato a Gq (Offermanns et al., 1994). U46619 causa mobilizzazione del calcio intracellulare e cambio di forma in piastrine umane, indipendentemente dalla secrezione. Tuttavia, l'aggregazione piastrinica indotta da trombossano A₂ dipende dalla secrezione mediata da altri agonisti piastrinici capaci di accoppiarsi a vie di segnalazione mediate da Gi. In assenza di una segnalazione Gi da altro agonista, U46619 non è in grado di determinare inibizione dell'adenilato ciclasi o aggregazione piastrinica (Paul et al., 1999).

Segnalazione piastrinica

Nella segnalazione piastrinica un ruolo importante è svolto dalle proteine G eterotrimeriche, dalle fosfolipasi C e A₂ e dalla fosfatidilinositolo 3-chinasi.

Le proteine G eterotrimeriche sono associate a recettori a sette domini transmembrana e sono composte da tre subunità di cui la subunità α contiene il sito di legame per il nucleotide guaninico ed è responsabile dell'interazione tra recettori ed effettori. L'eterodimero formato dalle subunità β e γ consente l'ancoraggio della proteina G alla membrana cellulare. L'attivazione dei canali ionici, l'inibizione dell'adenilato ciclasi e l'attivazione della fosfolipasi A₂ sono anch'esse mediate dall'eterodimero $\beta\tilde{\gamma}$. La subunità α è specifica, mentre il dimero $\beta\gamma$ è simile o identico in proteine differenti (Blockmans et al., 1995). Allo stato basale il GDP è strettamente legato alla subunità α . In seguito ad attivazione, il GDP si dissocia dal complesso. Il GTP si lega al suo sito di legame ora libero sulla subunità α (Kroll & Schafer, 1989). In seguito al legame del GTP, l'eterodimero $\beta\gamma$ si dissocia dalla subunità α risultando nell'attivazione, mediata dalla subunità α legante GTP, dell'enzima che costituisce il secondo messaggero. L'attività GTPasica intrinseca della subunità α interrompe l'interazione tra GTP e subunità α stessa: la subunità α , legante ora GDP, si riassocia così all'eterodimero $\beta\gamma$ (Blockmans et al., 1995). Le piastrine contengono proteine G della famiglia G_i, G_q e G₁₂. I membri della famiglia G_q sono potenti attivatori della fosfolipasi C, i membri della famiglia G_i sono accoppiati all'adenilato ciclasi e la loro attivazione determina abbassamento dei livelli di cAMP.

La fosfolipasi C (PLC) è implicata nelle reazioni di secrezione delle piastrine. L'isoforma PLC β è attivata dai dimeri $\beta\gamma$ delle proteine G eterotrimeriche, mentre la PLC γ è attivata dalla fosforilazione delle sequenze ITAM da parte delle chinasi Syk, Src, Fyn, Lck. Le fosfolipasi catalizzano l'idrolisi del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP₂) in diacilglicerolo (DAG) ed inositolo-1,4,5-trisfosfato (IP₃). Il diacilglicerolo attiva la protein chinasi C, regolando in ultimo il riarrangiamento del citoscheletro piastrinico, mentre l'inositolo-1,4,5-trisfosfato induce il rilascio del calcio dal sistema tubulare denso, provocando rilascio dai granuli di ADP e serotonina che potenziano l'attivazione e reclutano altre piastrine (Blockmans et al., 1995).

La fosfolipasi A₂ (PLA₂) è responsabile del rilascio di acido arachidonico. La fonte predominante di acido arachidonico rilasciato dopo l'attivazione piastrinica deriva dall'idrolisi, mediata dalla fosfolipasi A₂, dei fosfolipidi del sistema tubulare denso e della membrana plasmatica. Il substrato preferito è la fosfatidilcolina, ma PLA₂ idrolizza anche fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e, in minor misura, fosfatidilinositolo (Kroll & Schafer, 1989). L'acido arachidonico è poi convertito in trombossano A₂ ad opera di una ciclossigenasi. La PLA₂ è attivata da un aumento del calcio citosolico dovuto alla sintesi di IP₃ indotta da PLC, ma probabilmente anche attraverso l'azione diretta da parte dell'eterodimero βγ della proteina G (Blockmans et al., 1995).

Le fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3-K) sono una famiglia di chinasi che fosforilano in posizione 3 il fosfatidilinositolo, il fosfatidilinositolo 4-fosfato, il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato per dare fosfatidilinositolo 3-fosfato, fosfatidilinositolo 3,4-bisfosfato ed il fosfatidilinositolo 3,4,5-trisfosfato. Le piastrine contengono due isoforme della PI3-K costituite da una subunità adattatrice regolatoria (p85) che contiene due domini SH2 e un dominio SH3 e regola la localizzazione e la funzione della PI3-K e da una subunità catalitica (p110) (Zhang et al., 1998). Nelle piastrine, la sintesi dei 3-fosfoinositidi è regolata in maniera complessa, attraverso meccanismi che coinvolgono le proteine G, la PKC, il reclutamento dell'integrina α_{IIb}β₃ e l'aggregazione. I fosfoinositidi sono prodotti in risposta a vari agonisti tra cui trombina, ADP, trombossano A₂. Un importante effettore a valle di PI3-K è la proteina Akt che viene attivata attraverso la proteina PDK che lega direttamente gli inositoli 3-fosfati. La proteina Akt può svolgere diversi ruoli nell'attivazione piastrinica.

Ruolo delle tirosin chinasi

Il livello di proteine fosforilate in tirosina all'interno della cellula è strettamente regolato dall'azione combinata di tirosin chinasi e tirosin fosfatasi. La maggioranza delle tirosin chinasi identificate nelle piastrine appartiene alle forme citosoliche non recettoriali e comprende 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 importante ai fini dell'attivazione. La fosforilazione in tirosina è un processo

dinamico e reversibile regolato dall'attivazione e dalla redistribuzione subcellulare di tirosin chinasi e fosfatasi citosoliche. Le tirosin fosfatasi citosoliche piastriniche sembrano essere regolate dall'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e sono probabilmente coinvolte nel mediare la defosforilazione di parecchie proteine citosoliche in piastrine attivate. Questi enzimi, inoltre, sembrano svolgere un ruolo importante nel mantenere un basso livello di fosfotirosine all'interno di una cellula a riposo prevenendo una prematura attivazione piastrinica. In piastrine a riposo, solo un piccolo numero di proteine è fosforilato in tirosina. In seguito alla stimolazione con trombina, c'è un forte incremento nel livello di fosforilazione in tirosina di molteplici proteine, che si verifica in tre onde temporali: a 15 secondi, 2 minuti e 5 minuti. La fosforilazione in tirosina è anche osservata in piastrine stimulate con una varietà di altri agonisti, quali ADP, PAF, TxA₂ ed in risposta a molecole di adesione come vWF e collagene, suggerendo che questi eventi di fosforilazione in tirosina rappresentino una caratteristica generale dell'attivazione piastrinica. Le "tre onde" di fosforilazione in tirosina osservate in piastrine attivate, che corrispondono a cicli di fosforilazione e defosforilazione delle proteine, possono essere divise in tre fasi temporalmente distinte.

La prima fase di fosforilazione comprende eventi che avvengono indipendentemente dal legame del fibrinogeno all'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. In questa fase si verifica la fosforilazione di p21rasGAP, della proteina citoscheletrica cortactina, di Syk e di alcuni membri della famiglia di Src (Jackson et al., 1996).

La seconda fase di fosforilazione è dipendente dal legame del fibrinogeno all'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, ma indipendente dall'aggregazione piastrinica. In questa fase vengono fosforilate proteine aventi peso molecolare compreso tra 50-68 kDa e attorno a 140 kDa non ancora completamente identificate (Huang et al., 1993).

La terza fase di fosforilazione avviene in modo dipendente dall'aggregazione e corrisponde alla fosforilazione di FAK, dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e di numerose proteine non identificate di peso molecolare di 84 e 95-97 kDa (Bachelot et al., 1992).

Gli eventi di fosforilazione in tirosina che si verificano precocemente (fasi 1 e 2) nel processo di attivazione piastrinica, sono implicati nella regolazione dell'aggregazione e del rilascio di serotonina. La traslocazione al citoscheletro delle tirosin chinasi citosoliche e la fosforilazione in tirosina di molteplici proteine

citoscheletriche si verificano dopo l'aggregazione (fase 3) e si pensa siano richieste per gli eventi seguenti all'aggregazione come la retrazione del coagulo (Jackson et al., 1996).

RAFTS LIPIDICI

Le zattere lipidiche (lipid rafts) sono piccole piattaforme di membrana altamente organizzate e arricchite in glicosfingolipidi, fosfolipidi saturi e colesterolo. Questi assemblaggi sono fluidi, ma più ordinati e strettamente impaccati rispetto al circostante doppio strato lipidico. La presenza di microdomini liquidi ordinati nelle cellule trasforma il classico modello di membrana a mosaico fluido in un più complesso sistema, in cui proteine e rafts lipidici diffondono lateralmente in uno stato liquido bidimensionale. Residenti costitutivi dei rafts comprendono proteine ancorate a glicofosfatidilinositolo, tirosin chinasi della famiglia di Src, subunità $G\alpha$ delle proteine G eterotrimeriche, la ossido nitrico sintasi endoteliale, proteine transmembrana (Simons & Ehehalt, 2002). Alcune proteine di membrana sono residenti dei rafts regolati e nello stato non oligomerizzato, hanno una debole affinità per i rafts. Solo in seguito al legame di un ligando, esse vanno incontro ad un cambio conformazionale oppure oligomerizzano ed in questo modo la loro affinità per i rafts aumenta (Harder et al., 1998). Il colesterolo svolge l'importante ruolo di spaziatore tra le catene idrocarburiche degli sfingolipidi e di colla dinamica che mantiene compatto l'assemblaggio dei rafts. La rimozione del colesterolo determina la dissociazione di molte proteine dai rafts e le rende non funzionali (Simons & Toomre, 2000). L'associazione con le membrane resistenti a detergenti, rappresenta un utile criterio per stabilire se una determinata proteina associa con i rafts lipidici. In seguito alla solubilizzazione delle membrane o delle cellule con Triton X-100 a 4°C, i lipidi e le proteine associati ai rafts restano insolubili e possono essere fatti flottare a bassa densità mediante centrifugazione in un gradiente di saccarosio. Se il colesterolo fosse estratto con metil-beta-ciclodestrina, le proteine presenti nei rafts, di solito, ma non sempre, diventerebbero solubili nel detergente (London & Brown, 2000). La cellula paga un elevato prezzo utilizzando il colesterolo come spaziatore per mantenere insieme i rafts. Il colesterolo è tossico ed i suoi livelli cellulari sono mantenuti sotto stretto controllo da un'intricata rete di regolazione a livello trascrizionale della biosintesi del colesterolo e del recupero cellulare, così come dalla regolazione della deposizione di colesterolo nelle gocce

lipidiche in forma esterificata e della fuoriuscita dalla cellula. L'alterazione di questi processi altamente regolati determina una varietà di malattie a carico del metabolismo lipidico (Simons & Ikonen, 2000). I rafts lipidici svolgono un ruolo centrale in numerosi processi cellulari, compresi lo smistamento ed il traffico delle membrane, la polarizzazione cellulare e processi di trasduzione del segnale che sono stati studiati in cellule T (Janes et al., 2000), cellule B (Cherukuri et al., 2001) e nelle risposte allergiche (Sheets et al., 1999, Holowka et al., 2001). La modulazione della via di produzione ceramide/sfingomielina, che coinvolge la crescita, la sopravvivenza e la morte cellulare, coinvolge l'assemblaggio dei rafts (Kolesnick, 2002). Inoltre, parecchi agenti patogeni, come batteri, prioni, virus e parassiti si impadroniscono dei rafts lipidici per i loro scopi (van der Goot & Harder, 2001).

Nella membrana plasmatica delle piastrine umane è presente una quantità relativamente alta di sfingomielina, cosa che suggerisce una composizione lipidica in favore della formazione di rafts in queste cellule. Nel 1996, Dorahy et al. isolarono, da lisati piastrinici umani, mediante ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio (5-40%) a 4°C, microdomini di membrana a bassa densità: al termine del procedimento, una banda opaca chiaramente visibile poteva essere individuata a densità compresa tra 10 e 18% di saccarosio. L'analisi di tali microdomini ha mostrato che essi sono arricchiti in colesterolo e glicosfingolipidi, e resistenti a trattamento con 1% Triton X-100. Le prime procedure utilizzate per isolare rafts lipidici da piastrine umane erano basate sull'insolubilità di questi microdomini lipidici in 1% Triton X-100 a 4°C e sulla loro abilità di flottare in un gradiente di densità di saccarosio in seguito ad ultracentrifugazione. Sulla base delle classiche caratteristiche dei rafts lipidici, le procedure di isolamento in cui venivano utilizzate più basse concentrazioni di Triton X-100 (0.1% o meno) sembravano essere più valide nel momento in cui la quantità di piastrine per campione era ben controllata (Bodin et al., 2001). Recentemente si è cominciato ad utilizzare per isolare rafts piastrinici un altro detergente non ionico, Brij 58, che sembra preservare meglio questi microdomini, anche quando viene utilizzato ad alte concentrazioni (Wonerow et al., 2002). Quando isolati con il metodo classico (1% Triton X-100 e gradiente di saccarosio), i rafts piastrinici appaiono, al microscopio elettronico a trasmissione, come vescicole rotonde di dimensioni eterogenee comprese tra i 20 e i 1000 nm di diametro. Possiedono meno dell'1% delle proteine piastriniche

totali, mancano di caveolina (che non è espressa nelle piastrine) e sono molto arricchite nella glicoproteina di membrana CD36. Seppur debolmente rilevate, nei rafts piastrinici sono presenti altre significative glicoproteine di membrana, quali GPIb, GPIIIa e CD9 (Dorahy et al., 1996). Al contrario, la presenza dell'integrina $\beta 1$ è ristretta alla frazione detergente-solubile e potrebbe essere considerata una proteina marcatrice della frazione non-raft (Wonerow et al., 2002). L'adattatore transmembrana LAT (Locke et al., 2002) e le tirosin chinasi della famiglia di Src, in particolare Lyn (Dorahy et al., 1996), sono presenti ad alto livello nei rafts isolati da piastrine allo stato basale. I rafts piastrinici sono arricchiti nel ganglioside GM1, che si localizza in modo preferenziale nei domini liquidi ordinati (Locke et al., 2002). Il rapporto molare colesterolo/fosfolipidi è 1.2 nei rafts contro lo 0.5 nelle piastrine totali, indicando un chiaro arricchimento in colesterolo. La sfingomieline è il principale fosfolipide presente in rafts isolati, e rappresenta circa il 57% dei fosfolipidi totali dei rafts e circa il 35% della sfingomieline piastrinica totale (Bodin et al., 2001).

Gousset et al. (2002) hanno dimostrato che i rafts sono presenti nella membrana plasmatica piastrinica a temperature fisiologiche, e che, in seguito a stimolazione con trombina o collagene, sono in grado di riunirsi in visibili aggregati. L'aggregazione dei rafts è un evento fisiologico, dinamico e reversibile, innescato da attivazione cellulare ed importante nelle vie di segnalazione piastriniche. Eleganti studi hanno dimostrato che i rafts lipidici organizzano la segnalazione attraverso il recettore piastrinico per il collagene, GP VI, che segnala attraverso l'adattatore Fc receptor γ -chain (FcR γ). GPVI-FcR γ non associano costitutivamente con i rafts, ma il complesso è reclutato in essi in seguito a stimolazione del recettore in piastrine umane e la fosforilazione di FcR γ è controllata dall'associazione ligando-dipendente con i rafts lipidici (Locke et al., 2002). Ancora, è stato dimostrato che l'attivazione e l'aggregazione piastrinica indotte da trombina sono legate alla presenza di colesterolo nella membrana piastrinica: attraverso una specifica colorazione per il colesterolo in piastrine quiescenti e adese al fibrinogeno, è stato documentato che durante il processo di spreading i microdomini arricchiti in colesterolo si accumulano alle estremità dei filopodi dove si osserva un contemporaneo arricchimento in Src e CD63. Queste scoperte sono compatibili con il fatto che la formazione di filopodi contribuisce ad ottimizzare l'assemblaggio di

complessi proteici funzionali nei rafts lipidici, concentrando in tali aree la trasduzione del segnale (Heijnen et al., 2003). In piastrine quiescenti il complesso molecolare GPIb-IX-V esprime poche copie nei rafts; in seguito a stimolazione con vWF, il numero di copie di questo complesso glicoproteico incrementa di 6 volte, cambiamento che probabilmente svolge un importante ruolo nel mediare le interazioni e l'attivazione piastrinica sulla parete dei vasi sanguigni. Nei rafts lipidici è stato osservato che il complesso GPIb-IX-V è anche associato al recettore a bassa affinità per il frammento cristallizzabile delle IgG, Fc γ RIIA. Inoltre eventi che influiscono sulla stabilità dei rafts, come la deplezione di colesterolo dalla membrana, influiscono direttamente sulla capacità funzionale del complesso GPIb-IX-V di rispondere al vWF. La reintroduzione del colesterolo in membrana, determina un recupero della capacità del complesso di rispondere al vWF, in condizioni sia di staticità sia di elevato flusso ematico (Shrimpton et al., 2002). I rafts lipidici sembrano quindi rappresentare un collegamento strutturale e funzionale nell'attivazione piastrinica sia nella segnalazione inside-out sia in quella outside-in, che potrebbe portare una sorta di gerarchia nella moltitudine di vie di segnalazione che contribuiscono all'attivazione piastrinica sulla base della concentrazione di complessi di segnale in compartimenti morfologici di membrana ben definiti.

GLI ORMONI STEROIDEI

Gli ormoni steroidei regolano diversi processi biologici come la proliferazione cellulare, la morfogenesi, il differenziamento cellulare, la morte cellulare programmata e l'omeostasi. Essi interagiscono con recettori intracellulari che funzionano come fattori di trascrizione ligando-dipendenti per controllare l'espressione di specifici geni. Questo processo richiede la localizzazione nucleare del recettore per l'ormone steroideo, si manifesta nell'arco di 30-60 minuti ed è conosciuto come azione classica o genomica degli ormoni steroidei. I recettori per gli steroidi possiedono una struttura a domini conservata con tre principali regioni funzionali: un dominio di transattivazione NH₂-terminale, un dominio di legame del DNA localizzato centralmente, un dominio di legame dell'ormone al COOH-terminale. La regione carbossi-terminale contiene un dominio di attivazione della trascrizione addizionale ed una regione cerniera che connette i domini HBD (Hormone-Binding Domain) e DBD (DNA-Binding Domain) (Cato et al., 2002). I recettori per gli ormoni steroidei sono latenti attivatori della trascrizione genica, che richiedono il legame con un ligando per la loro attivazione. Il legame dello steroide induce un cambio conformazionale specifico che risulta nella dissociazione del recettore da un complesso con una proteina chaperone, nella successiva dimerizzazione del recettore steroideo e nel legame del dimero recettoriale a specifici elementi di risposta allo steroide (SRE = Steroid Response Element) situati nella regione regolatoria 5' dei geni bersaglio dell'ormone. A livello del promotore della trascrizione di tali geni, in seguito al legame del recettore steroideo al DNA, vengono reclutati coattivatori della trascrizione e viene assemblato il complesso funzionante per la trascrizione genica (McKenna & O'Malley, 2002).

Recentemente è stata riportata la capacità degli ormoni steroidei di agire rapidamente influenzando differenti aspetti della funzione cellulare, a seconda del tipo di cellula considerato. Dal momento che questi effetti degli steroidi si verificano indipendentemente dalla sintesi di nuovo RNA messaggero e di proteine, essi sono definiti azioni non-genomiche o rapide degli ormoni steroidei e comprendono

cambiamenti nell'attività dell'adenilato ciclasi, delle MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), della fosfatidilinositolo 3-chinasi e aumento della concentrazione intracellulare di calcio. E' possibile raggruppare gli effetti rapidi degli ormoni steroidei in tre classi in base al loro meccanismo d'azione:

1. effetti che si verificano in membrana, ma non sono mediati dal recettore;
2. effetti mediati da recettori associati alla membrana;
3. effetti rapidi mediati dal recettore steroideo classico associato alla membrana.

1. Le azioni rapide degli ormoni che non dipendono dal legame a recettori di membrana o ad altri recettori, si pensa derivino da alterazioni nella fluidità di membrana. A questo proposito sono richieste elevate concentrazioni di steroidi, di solito al di sopra di 10^{-4} M e il rapporto steroidi/fosfolipidi deve essere circa 0.2 (Whiting et al., 2000). La rilevanza fisiologica dei cambiamenti in membrana è tuttavia dibattuta. Gli steroidi possono modulare l'attività di proteine di membrana senza legarsi al recettore, ad esempio il trattamento dei linfociti T con progesterone blocca rapidamente ed in modo reversibile i canali al K^+ voltaggio-dipendenti e quelli attivati dal Ca^{2+} , determinando depolarizzazione cellulare (Ehring et al., 1998).

2. Questi effetti sembra siano mediati da recettori transmembrana diversi dai classici recettori intracellulari per gli steroidi. Le risposte agli steroidi mediate da tali recettori comprendono gli effetti del 17β -estradiolo, degli androgeni, dell'aldosterone e del testosterone su cellule T della milza, osteoblasti, cellule di carcinoma della prostata, macrofagi, cellule T attivate, cellule muscolari scheletriche. L'azione rapida degli steroidi risulta in un incremento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , un aumento di inositolo trisfosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG). Tali effetti sono inibiti dalla neomicina o dalla tossina della pertosse, cosa che indica il coinvolgimento di recettori di membrana accoppiati alla fosfolipasi attraverso una proteina G (Lieberherr et al., 1994). Una delle prove dell'esistenza di un recettore per gli steroidi nella membrana plasmatica distinto dal recettore classico è l'attivazione delle MAPKs ERK1 ed ERK2 ad opera del 17β -estradiolo in cellule di carcinoma mammario che mancano sia di $ER\alpha$ sia di $ER\beta$. In questo modello, l'estrogeno (E_2) interagisce con un recettore associato a proteine G: in seguito a questa interazione la subunità α si dissocia dal complesso eterotrimerico $G\alpha\beta\gamma$. Il segnale mediato dal dimero $G\beta\gamma$ è trasmesso attraverso tirosin

chinasi della famiglia di Src, portando alla fosforilazione di Shc ed alla successiva attivazione Ras-dipendente di ERK1 ed ERK2. La stimolazione del recettore da parte dell'estrogeno risulta anche nella rapida attivazione di un segnale intracellulare, probabilmente via Src chinasi, che stimola l'attività extracellulare di una metalloproteasi transmembrana. Questo determina il processamento extracellulare dell'epidermal growth factor (EGF) legato all'eparansolfato: l'EGF rilasciato interagisce con un ectodominio del recettore per l'EGF scatenando una via di segnalazione intracellulare che culmina con l'attivazione di ERK1 ed ERK2 (Filardo et al., 2002).

3. Le azioni rapide degli ormoni steroidei che si manifestano a partire dal recettore steroideo classico associato alla membrana sono quelle meglio definite. I primi studi sull'identificazione di tali recettori sono stati condotti marcando gli steroidi con sonde fluorescenti e formando complessi proteici in modo tale che lo steroide non potesse attraversare la membrana. In seguito, la presenza di tali recettori è stata confermata utilizzando anticorpi diretti contro regioni diverse dei recettori (Pappas et al., 1994, 1995). Altri lavori sulla localizzazione in membrana di recettori per gli ormoni steroidei sono stati condotti utilizzando tecniche biochimiche e morfologiche (Gametchu et al., 1991, 1991). Studi di trasfezione in cellule CHO hanno dimostrato che un singolo trascritto può codificare sia per il recettore nucleare sia per quello legato alla membrana. La quantità del recettore di membrana è solo il 2% di quello nucleare (Razandi et al., 1999). I recettori sono dinamici e possono spostarsi dal nucleo alla membrana (Russell et al., 2000). E' stato dimostrato che le caveole, particolarmente abbondanti negli epiteli squamosi semplici (cellule endoteliali capillari), nei fibroblasti, nelle cellule muscolari lisce e negli adipociti, sono siti da cui dipartono le azioni rapide degli ormoni steroidei. Le caveole contengono un importante componente strutturale: la caveolina, una fosfoproteina transmembrana che forma una struttura su cui molte molecole segnale si possono assemblare generando dei complessi di segnalazione (Okamoto et al., 1998). E' stata dimostrata l'interazione e la modulazione ad opera della caveolina in molte vie di trasduzione del segnale comprese quelle regolate dai recettori per gli ormoni steroidei. Sia il recettore per gli estrogeni sia quello per gli androgeni è stato identificato nelle caveole, dove interagiscono con la caveolina in maniera ligando-dipendente (Schlegel et al., 1999, Kim et al., 1999, Lu et al., 2001). L'interazione di ER con la caveolina è

importante per la traslocazione del recettore in membrana; tuttavia l'associazione di ER con la caveolina inibisce l'attivazione di ERK1 ed ERK2 mediata dall'estradiolo. Il ruolo della caveolina nelle azioni rapide di ER sarebbe quello di facilitare il trasporto del recettore alla membrana plasmatica. L'espressione della caveolina è controllata trascrizionalmente e traduzionalmente in modo positivo e negativo dall'estrogeno a seconda del tipo cellulare considerato (Razandi et al., 2002). Da qui deriverebbe la natura cellulo-specifica delle azioni rapide degli steroidi osservate.

Sono stati descritti diversi meccanismi con cui gli estrogeni influiscono sul sistema cardiovascolare, compreso il rapido incremento mediato dagli estrogeni nell'attività dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) portando alla produzione di ossido di azoto nelle cellule endoteliali (Chen et al., 1999, Haynes et al., 2000). L'ossido nitrico svolge un ruolo importante nel controllo della pressione sanguigna e del flusso sanguigno attraverso il rilassamento della muscolatura dell'endotelio. L'ossido nitrico è inoltre responsabile della regolazione della funzione piastrinica ed in particolare dell'adesione e aggregazione (Rees et al., 1989, Rees et al., 1990).

Altri studi hanno fatto luce sulla via di trasduzione del segnale che media la rapida e non-genomica attivazione di eNOS ad opera di E_2 e $ER\alpha$: è stato dimostrato che l'attivazione di eNOS nelle cellule endoteliali ad opera di $ER\alpha$ coinvolge la via di segnalazione PI3-K e Akt (Haynes et al., 2000). In uno studio apparso su Nature (Simoncini et al., 2000) è stata dimostrata per la prima volta l'interazione diretta di $ER\alpha$ con la subunità regolatoria p85 di PI3-K. L'estradiolo stimola la fosforilazione di Akt in serina 473 e ne determina l'attivazione (Haynes et al., 2000); Akt attivato fosforila ed attiva eNOS aumentando la sua sensibilità alle concentrazioni di Ca^{2+} basali. Akt è un substrato a valle di PI3-K, suggerendo quindi che PI3-K possa essere regolata dall'estrogeno. Inoltre sono state fornite prove sull'inibizione della eNOS ad opera di wortmannina in cellule endoteliali intatte, sulla diretta stimolazione ad opera dell'estrogeno dell'attività di PI3-K associata a $ER\alpha$ e sulla coimmunoprecipitazione di $ER\alpha$ e p85 con la simultanea produzione del prodotto di PI3-K, il PIP_3 . Nello stesso lavoro, è stato inoltre dimostrato che nelle cellule endoteliali $ER\beta$ non interagisce direttamente con p85 (Simoncini et al., 2000). Il ruolo protettivo degli estrogeni sul

sistema cardiocircolatorio è stato suggerito anche da studi condotti sugli effetti della terapia ormonale sostitutiva dopo la menopausa che hanno dimostrato una significativa riduzione dei rischi di sviluppo di malattia aterosclerotica e tale effetto è stato attribuito ad un aumento del rapporto lipoproteico HDL/LDL: la somministrazione di estrogeni ridurrebbe la concentrazione di LDL plasmatiche accelerando il loro catabolismo, mentre aumenterebbe i livelli di colesterolo HDL (Walsh et al., 1991).

Al contrario, recenti pubblicazioni di studi clinici non supportano un benefico effetto della terapia ormonale sostitutiva nella prevenzione della mortalità e morbilità cardiovascolare. E' stato osservato che donne sottoposte a terapia ormonale sostitutiva manifestavano un più elevato rischio di eventi cardiovascolari durante il primo anno di trattamento e solo negli anni successivi c'era un possibile effetto benefico da parte di estrogeni e progestinici. L'incrementato rischio di eventi cardiovascolari nel primo anno di trattamento è strettamente legato all'associazione di contraccettivi orali e terapia ormonale sostitutiva con la trombosi venosa profonda (Hulley et al., 1998, Jick et al., 1996). L'aumentato rischio di tromboembolismo venoso potrebbe essere correlato all'effetto negativo che gli ormoni sessuali femminili possiedono sull'equilibrio tra il processo di coagulazione e quello fibrinolitico (van Baal et al., 2000).

Studi clinici hanno ulteriormente osservato che il rischio di malattia cardiovascolare aumenta in pazienti che sono già predisposte geneticamente ad eventi trombotici (Herrington, 1999). In questo scenario, l'estrogeno potrebbe agire in modo sinergico con questa predisposizione ed incrementare il rischio di evento cardiaco piuttosto che diminuirlo. Inoltre l'effetto della terapia ormonale sostitutiva sulla funzione vascolare ed endoteliale può differire in donne con diversi fattori di rischio legati ad età, ipercolesterolemia, ipertensione, diabete e fumo (Braunstein et al., 2002). Ancora, è stato osservato che fattori ambientali legati alla terapia con estrogeni esogeni alterano i livelli di proteine coinvolte nell'emostasi ed hanno un effetto dose-dipendente sui fenomeni trombotici. La terapia con contraccettivi orali conferisce un aumento di eventi trombotici venosi pari a sette volte il rischio basale (Bloemenkamp et al., 1995).

Di recente la scienza medica ha riconosciuto che gli estrogeni possono influenzare anche il sistema nervoso. Le azioni degli estrogeni sull'ipotalamo influenzano l'ovulazione ed il comportamento riproduttivo, e solo recentemente è stato

dimostrato che gli estrogeni esercitano molte azioni al di fuori della sfera riproduttiva, compresi effetti su aree del cervello importanti per l'apprendimento e la memoria, le emozioni e lo stato affettivo, la coordinazione motoria e la sensibilità al dolore. Le azioni non-genomiche degli estrogeni si esercitano sulla superficie cellulare e influiscono sull'eccitabilità delle cellule nervose e delle cellule muscolari lisce e sul movimento degli ioni Na^+ , K^+ e Ca^{2+} che creano l'impulso nervoso e modulano lo stato interno dei neuroni. La varietà di effetti degli estrogeni include le azioni rapide sull'eccitabilità delle cellule neuronali e pituitarie, l'attivazione delle vie di segnalazione cAMP-dipendenti e MAPK-dipendenti, effetti sui canali al Ca^{2+} e l'entrata degli ioni Ca^{2+} , la protezione dei neuroni dal danneggiamento da eccitotossine e radicali liberi (Mermelstein et al., 1996, Morley et al., 1992, Green et al., 1996).

IL RECETTORE PER GLI ESTROGENI

Il recettore umano degli estrogeni (ER), fa parte di una superfamiglia di recettori nucleari che include i recettori per gli steroidi, per l'ormone tiroideo, per l'acido retinoico, per la vitamina D ed altri recettori i cui ligandi non sono ancora stati identificati. Fino a pochi anni fa si pensava esistesse un solo recettore responsabile di tutte le azioni biologiche degli estrogeni e degli antiestrogeni. Tuttavia la recente identificazione di ER β (Kuiper et al., 1996), codificato da un gene situato sul cromosoma 14, ha indicato che la risposta cellulare ai ligandi di ER è molto più complessa. I due recettori degli estrogeni, denominati ER α e ER β , hanno una struttura molto simile, con un alto grado di omologia nel DBD (97%) e un moderato grado di conservazione nel HBD (60%), ma considerevoli differenze nella zona NH₂-terminale. ER α è maggiormente coinvolto nella funzione riproduttiva e si trova in grandi quantità nella ghiandola mammaria, nell'utero e nella vagina, mentre ER β è presente in modo ubiquitario nel sistema nervoso centrale, nel sistema cardiovascolare, nel sistema immunitario, nel tratto urogenitale, nel tratto gastrointestinale, nel rene e nel polmone.

Nonostante siano noti da tempo effetti genomici e non-genomici mediati dagli estrogeni attraverso il legame ai loro recettori, relativamente poco si conosce circa gli effetti degli estrogeni sulle piastrine umane. Di recente sono stati scoperti entrambi i recettori ER α (Jayachandran & Miller, 2003) e ER β (Khetawat et al., 2000) in piastrine umane circolanti. Inoltre è stata dimostrata la presenza del trascritto di ER β e della proteina stessa nei megacariociti dove avrebbe localizzazione prevalentemente citosolica (Khetawat et al., 2000). Nelle piastrine ER β sembra essere il recettore più abbondantemente espresso e possiede un peso molecolare di circa 3.7 kDa maggiore di quello della stessa proteina espressa nelle cellule della prostata e della mammella (Nealen et al., 2001). Le maggiori dimensioni, e quindi la ridotta mobilità elettroforetica di ER β piastrinico rispetto a quello delle altre linee cellulari, sono imputabili ad un

processo di glicosilazione piastrino-specifico: ER β piastrinico contiene dei siti di N-glicosilazione (Nealen et al., 2001). Le piastrine rappresentano, quindi, uno dei possibili bersagli dell'azione estrogenica: gli effetti dell'estrogeno sul sistema vascolare potrebbero essere, in tutto o in parte, espressione della diretta modulazione della funzione piastrinica da parte dell'estrogeno stesso. Inoltre, poiché le piastrine sono prive di componenti nucleari, si propongono come utile modello per definire i meccanismi molecolari non trascrizionali attraverso i quali gli estrogeni manifestano i loro effetti sulla funzionalità cellulare. La via di trasduzione del segnale a valle di ER β in piastrine umane è completamente sconosciuta, e le vie di segnalazione non trascrizionali ER β -dipendenti sono state solo in parte caratterizzate, tuttavia sono state riportate prove dell'attivazione estrogeno-dipendente della chinasi Src in tipi cellulari differenti. Il 17 β -estradiolo stimola l'attività chinasi di Src e conseguentemente attiva la via di segnalazione Src/Ras/ERK in una varietà di tipi cellulari, quali linee cellulari di carcinoma mammario MCF-7 o linee cellulari di carcinoma al colon Caco-2 (Migliaccio et al., 1993, Migliaccio et al., 1996, Di Domenico et al., 1996). Src inoltre diventa fisicamente associata a ER attraverso un meccanismo ormone-dipendente: questa associazione è responsabile di una più forte stimolazione dell'attività di Src. Le dirette interazioni proteina-proteina sono responsabili per l'attivazione di Src mediata dagli ormoni steroidei: Src interagisce con ER attraverso il suo dominio SH2 (Migliaccio et al., 2000). Le Src chinasi svolgono un ruolo importante in numerose fasi della via di segnalazione outside-in in numerosi tipi cellulari. La segnalazione outside-in si riferisce al processo in cui il legame tra un'integrina di adesione e il suo ligando stimola segnali intracellulari che agiscono su una serie di risposte cellulari comprese la riorganizzazione del citoscheletro, la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi (Aplin et al., 1998, Giancotti & Ruoslahti 1999, Geiger et al., 2001, Schwartz 2001). Le piastrine contengono parecchi membri della famiglia delle Src chinasi (Src, Fyn, Lyn, Yes, Hck) con Src stessa che è la più abbondante (Golden et al., 1986, Huang et al., 1991, Stenberg et al., 1997). La segnalazione outside-in nelle piastrine si verifica quando il fibrinogeno o il fattore von Willebrand legano l'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ed è dipendente da una relazione strettamente funzionale, se non fisica, tra l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ e il macchinario di segnalazione della cellula (Shattil et al., 1998). I segnali trasdotti dall'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$

regolano l'estensione dei filopodi piastrinici, lo spreading, l'aggregazione e la secrezione dei granuli (Shattil et al., 1998, Phillips et al., 2001). E' stato dimostrato che Src e la sua chinasi regolatoria Csk sono costitutivamente associate all'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ in piastrine a riposo; in seguito al legame dell' $\alpha_{IIb}\beta_3$ al fibrinogeno solubile o in seguito all'adesione piastrinica a fibrinogeno immobilizzato su piastra, Csk si dissocia dall'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e Src diventa attiva, indipendentemente dalla polimerizzazione dell'actina. Src attiva, localizza nella zona periferica delle piastrine attivate, compresi i filopodi (Oberfell et al., 2002). La maggior parte delle integrine sono oggetto di modulazione del loro stato di attivazione nei confronti dei ligandi, un processo noto come segnalazione inside-out (Shimizu et al., 1990, Ginsberg et al., 1992, O'Toole et al., 1994). La regolazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ è un ottimo esempio del significato della necessità di una rapida regolazione dello stato di affinità delle integrine. Le piastrine quiescenti esprimono l'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ in una conformazione inaccessibile ai ligandi, prevenendo così l'attivazione piastrinica. In seguito ad attivazione, la segnalazione inside-out, attraverso l'intervento di tirosin chinasi, determina la conversione dell'integrina in un recettore funzionale (Sims et al., 1991, Hers et al., 1998). E' stato dimostrato che la trombina stimola la segnalazione inside-out verso l'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ attraverso le Src chinasi, che prendono così parte alla regolazione dell'esposizione dell' $\alpha_{IIb}\beta_3$ nella sua conformazione attiva (Hers et al., 2000). Nonostante l'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ interagisca con le proteine citoscheletriche mediante un meccanismo aggregazione-dipendente (Torti et al., 1994) e una significativa quantità di Src sia costitutivamente associata all' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Oberfell et al., 2002), le tirosin chinasi della famiglia di Src non sono coinvolte direttamente nella riorganizzazione del citoscheletro conseguente al cambio di forma piastrinico (Bauer et al., 2001).

Poco si conosce della via di segnalazione a valle della tirosin chinasi Src in piastrine umane. E' stata dimostrata, in linee cellulari megacariocitiche (MCK), l'associazione delle tirosin chinasi Src e Fyn con la tirosin chinasi Pyk2 che localizza a livello delle placche di adesione focale e viene attivata e fosforilata in maniera integrina-dipendente (Li et al., 1996). Pyk2 (Proline-rich Tyrosine Kinase) è una tirosin chinasi citoplasmatica correlata a FAK (Focal Adhesion Kinase), manca di una regione transmembrana, di siti di miristilazione e di domini SH2 e SH3, contiene un dominio

chinasico fiancheggiato da ampi domini NH₂- e COOH-terminali e una regione COOH-terminale ricca di proline da cui deriva la sua capacità di interagire con altre proteine contenenti domini SH3 (Avraham et al., 1995). La stimolazione di piastrine umane con trombina, collagene, ADP, epinefrina induce la fosforilazione in tirosina di Pyk2: tale evento è rapido e non dipende dal legame del fibrinogeno all'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ né dall'aggregazione piastrinica. Ciò suggerisce che la fosforilazione di Pyk2 avviene nelle prime fasi dell'attivazione piastrinica attraverso un meccanismo integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ -indipendente (Raja et al., 1997). Inoltre, anche in piastrine attivate dal legame del fattore von Willebrand al complesso glicoproteico Ib-IX-V, Pyk2 svolge un ruolo nelle prime fasi della trasduzione del segnale (Canobbio et al., 2002). Inoltre è stato dimostrato che Pyk2 coimmunoprecipita con PI3-K sia in piastrine quiescenti sia in piastrine stimulate e che trombina, ADP e collagene a basse dosi inducono la fosforilazione di Pyk2 e l'aggregazione piastrinica in modo PI3-K-dipendente (Koziak et al., 2001). E' stato proposto inoltre un modello in cui Pyk2 è associato con PI3-K in piastrine non stimulate, ma, in seguito ad attivazione, vi è un incremento nella fosforilazione in tirosina di Pyk2 e nella sua attività, e aumenta l'associazione di Pyk2 a PI3-K che potrebbe contribuire ad un incremento nell'attività di PI3-K. Questi eventi si verificano nella fase precoce dell'attivazione piastrinica, indipendentemente dall'aggregazione (Sayed et al., 2000). L'attivazione della PI3-K è un importante evento nella segnalazione cellulare collegato ad una varietà di cambiamenti fisiologici, compresi risposte proliferative a fattori di crescita, differenziamento, processi antiapoptotici, riarrangiamenti citoscheletrici, attivazione di integrine, mobilità cellulare integrino-mediata e invasività dei carcinomi (Kovacsovic et al., 1995, Zhang et al., 1996, Keely et al., 1997, Shaw et al., 1997).

SCOPO DEL LAVORO

In questo contesto abbiamo pensato di studiare il ruolo biologico degli estrogeni sulla funzionalità piastrinica, con l'obiettivo di caratterizzare le vie di trasduzione del segnale attese dagli estrogeni in piastrine umane. Inoltre poiché le piastrine esprimono i recettori per gli estrogeni, si propongono come utile modello per lo studio degli effetti di questi steroidi ed essendo prive di nucleo, possono fornire utili elementi per la comprensione dei meccanismi di trasduzione del segnale di tipo non trascrizionale. Nel lavoro dei precedenti anni di Dottorato abbiamo osservato e dimostrato che in piastrine umane il 17 β -estradiolo è in grado di determinare la rapida fosforilazione delle tirosin chinasi Src e Pyk2, e promuove la formazione, dipendente dall'attività di Src, di un complesso molecolare di segnalazione che comprende Src, Pyk2 e la subunità regolatoria p85 della PI3-K. Entrambi gli eventi dipendono dal reclutamento del recettore ER β . E' stato inoltre dimostrato che mentre Pyk2 risulta essere fosforilato in risposta al trattamento delle piastrine con 17 β -estradiolo, non si osserva invece una significativa attivazione di PI3-K, lasciando supporre che tale proteina non sia coinvolta nella segnalazione estrogenica in piastrine umane. Per quanto riguarda gli effettori a valle di Src e Pyk2, è stato anche osservato che il 17 β -estradiolo è in grado di promuovere una debole, ma rapida fosforilazione di ERK, anche se non è ancora del tutto chiara e completa questa via di segnalazione. E' stato inoltre osservato che il recettore ER β è associato alla membrana piastrinica ed in seguito a trattamento con 17 β -estradiolo non modifica la sua localizzazione cellulare. Analizzando la localizzazione e la possibile redistribuzione delle molecole segnale reclutate da ER β , abbiamo mostrato che, in seguito a trattamento delle piastrine con 17 β -estradiolo, si verifica attivazione delle tirosin chinasi Src e Pyk2 nelle frazioni di membrana, ma non nel citosol. Al contrario, non è stata rilevata una significativa modulazione dell'attività di p85-PI3-K nelle frazioni di membrana analizzate. Pertanto Pyk2 e p85-PI3-K vanno incontro a differente rilocalizzazione cellulare in piastrine trattate con 17 β -estradiolo. Alla luce di

questo risultato e in seguito alla messa a punto del protocollo per l'isolamento di rafts lipidici da campioni di piastrine umane, ci siamo occupati di meglio definire la localizzazione di ER β e di investigare il ruolo dei rafts lipidici nelle vie di segnalazione 17 β -estradiolo-dipendenti in piastrine umane.

Più in generale la ricerca è finalizzata alla definizione dei meccanismi attraverso i quali i rafts lipidici, critici domini di membrana arricchiti in colesterolo che svolgono un ruolo importante nei processi di attivazione piastrinica, siano in grado di mediare le vie di trasduzione del segnale evocate dal 17 β -estradiolo e dai più comuni agonisti piastrinici, con l'obiettivo finale di contribuire al chiarimento dei meccanismi attraverso i quali gli estrogeni esercitano la loro complessa azione sul sistema vascolare.

METODI

Preparazione delle piastrine, trattamento con metil- β -ciclodestrina e misurazione dell'aggregazione piastrinica

Il sangue viene prelevato da donatori volontari che non abbiano assunto farmaci nei dieci giorni precedenti il prelievo. Si utilizza come anticoagulante ACD (1:10). Il PRP viene preparato mediante una prima centrifugazione a 180 x g per 10 minuti. Per la deplezione del colesterolo, il PRP raccolto viene incubato con 20 mM metil- β -ciclodestrina (M β CD) per 30 minuti a 37°C. Le piastrine sono poi recuperate e lavate per due volte in tampone PIPES (20 mM Pipes, 136 mM NaCl, pH 6.5), contenente 5.5 mM glucosio, 3.5 mg/ml BSA. Al termine dei lavaggi, si risospende il pellet in circa 800-1000 μ l di tampone Hepes contenente 0.1% glucosio. La concentrazione finale a cui le piastrine saranno utilizzate per le prove di aggregometria è di 3×10^8 cellule per ml in tampone Hepes contenente 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ e 5.5 mM glucosio. Campioni di piastrine (0.4 ml) vengono pre-condizionate a 37°C in un lumiaggregometro Chrono-log, trattate con tampone o con 100 nM 17 β -estradiolo per 30 secondi e successivamente stimulate con basse dosi di trombina, comprese, a seconda della specifica reattività delle piastrine provenienti da donatori diversi, tra 0.04 e 0.08 U/ml. L'aggregazione piastrinica viene monitorata continuamente per almeno 5 minuti come incremento nella trasmissione della luce.

Isolamento di rafts lipidici

Campioni di piastrine lavate, trattati e non con M β CD come descritto precedentemente, sono portati ad una concentrazione finale di 2.5×10^9 cellule/ml in tampone Hepes contenente 0.1% di glucosio. I campioni piastrinici opportunamente trattati con etanolo o 100 nM 17 β -estradiolo per tempi diversi, vengono lisati con 200 μ l di tampone di lisi 5X contenente 0.1% Brij58 (125 mM MES, 375 mM NaCl, pH 6.5, 5 mM PMSF, 1:50 protease inhibitor cocktail (SIGMA), 10 mM Na₃VO₄, 0.5% Brij 58) oppure con 200 μ l di tampone di lisi 5X contenente 0.1% Triton X-100 (125 mM MES, 375 mM NaCl, pH 6.5, 5 mM PMSF, 1:50 protease inhibitor cocktail (SIGMA), 10 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100) e posti sotto continua agitazione per 30 minuti a 4°C. Al termine della lisi vengono allestiti i gradienti discontinui di saccarosio in opportune provette per ultracentrifuga. Vengono preparate le seguenti soluzioni in percentuale peso/volume di saccarosio: 80%, 30%, 25%, 20%, 10%. Ogni soluzione è preparata singolarmente, in tampone MBS (25 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6.5) a cui verranno aggiunti, poco prima dell'utilizzo 1:100 protease inhibitor cocktail (SIGMA) e 2 mM Na₃VO₄. Ad ogni lisato viene aggiunto un ugual volume di saccarosio 80% per renderlo finale al 40%. Successivamente vengono depositi in ogni tubo per ultracentrifuga, nell'ordine, 2 ml di lisato reso 40% saccarosio, 2 ml di saccarosio 30%, 2 ml di saccarosio 25%, 2 ml di saccarosio 20%, 2 ml di saccarosio 10%, 2 ml di tampone di lisi reso 1X. I campioni sono infine sottoposti ad ultracentrifugazione a 160000 x g per 16-18 ore a 4°C. Vengono poi raccolte 11-12 frazioni in volumi da 1 ml ciascuna a partire dalla cima del tubo: la prima frazione conterrà, così, solo tampone di lisi, mentre l'ultima frazione, quella in fondo al tubo, conterrà la presunta componente citosolica. I rafts lipidici, grazie alla loro abilità di flottare nel gradiente di densità di saccarosio in seguito ad ultracentrifugazione, si presentano come una banda opaca chiaramente visibile a densità compresa tra 10 e 18% di saccarosio e sono presenti generalmente nelle frazioni comprese tra la 4 e la 7. Le frazioni sono analizzate mediante dot blot con tossina colerica coniugata a perossidasi per identificare le frazioni arricchite nel ganglioside di membrana GM1, abbondante nei rafts lipidici.

Aliquote da 60 μ l di frazioni rafts riunite e frazioni non-rafts (solubili) riunite, sono poi analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici anti-pSrc-Tyr418, anti-Src, anti-pPyk2-Tyr402, anti-Pyk2 e anti-p85.

Precipitazione delle proteine con acido tricloroacetico (TCA)

Le proteine contenute nelle frazioni raccolte dall'ultracentrifugazione vengono precipitate con acido tricloroacetico concentrato al 100%. Per ogni campione vengono riunite in parti uguali le frazioni rafts e le frazioni solubili, separatamente. Un volume di acido tricloroacetico al 100% viene aggiunto a 4 volumi di campione proteico; dopo agitazione, i campioni vengono posti in ghiaccio per 30 minuti e successivamente centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il surnatante viene rimosso, lasciando intatto un pellet proteico che viene sottoposto a due lavaggi con 200 µl di acetone e centrifugato ogni volta a 13000 rpm per 5 minuti a 4°C. Al termine dei lavaggi, l'acetone rimasto viene lasciato evaporare sotto cappa chimica per 10 minuti. I campioni così ottenuti sono dissociati mediante l'aggiunta di Laemmly Buffer 3X, scaldati per 5 minuti a 95°C e successivamente analizzati mediante immunoblotting con gli specifici anticorpi anti-ERβ.

Analisi della fosforilazione in tirosina di Src indotta da 17 β -estradiolo

Campioni di piastrine lavate, pretrattati e non con 20 mM M β CD per 30 minuti a 37°C, sono in seguito incubati con 100 nM 17 β -estradiolo per tempi crescenti da 30 secondi a 180 secondi. Aliquote di ogni campione, aventi lo stesso contenuto proteico, sono analizzati mediante immunoblotting con anticorpi anti-pSrc-Tyr418 e anti-Src. Aliquote da 60 μ l di frazioni rafts riunite e frazioni solubili riunite sono poi analizzate mediante SDS/PAGE su un gel lineare di poliacrilamide al 10%, trasferite su membrana PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici anti-Src, anti-Pyk2 e anti-p85-PI3-K. Lo stato di attivazione delle tirosin chinasi Src e Pyk2 viene valutato mediante anticorpi policlonali specifici anti-pSrc-Tyr418 ed anti-pPyk2-Tyr402.

RISULTATI

I rafts lipidici mediano il potenziamento 17 β -estradiolo-dipendente dell'aggregazione piastrinica indotta da trombina

Un gran numero di prove indicano che i rafts lipidici sono implicati nei meccanismi di attivazione piastrinica mediate da agonisti fisiologici, pertanto abbiamo inizialmente investigato l'effetto della distruzione dei rafts lipidici, mediante deplezione del colesterolo dalla membrana, sull'aggregazione piastrinica indotta da basse dosi di trombina.

Campioni di piastrine lavate (3×10^8 cellule/ml), pretrattati e non con 20 mM M β CD per 30 minuti a 37°C, sono stati trattati con 100 nM 17 β -estradiolo per 30 secondi e successivamente stimolati con 0.04 U/ml di trombina oppure con sola trombina 0.04 U/ml e l'aggregazione è stata seguita per 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista.

Dati in letteratura dimostrano che la deplezione del colesterolo con M β CD non inficia l'aggregazione massima piastrinica indotta da elevate dosi di trombina (Bodin et al., 2005), al contrario, è possibile osservare che piastrine trattate con M β CD e stimolate con una bassa dose di trombina sono ancora in grado di cambiare la loro forma, ma non aggregano affatto (figura 1a-b). Come dimostrato nel nostro precedente lavoro (Moro et al., 2005), il 17 β -estradiolo induce un significativo potenziamento dell'aggregazione piastrinica indotta da una bassa dose di trombina (figura 1c). Tuttavia, si può osservare che l'effetto potenziante dell'estrogeno sull'aggregazione indotta da bassa dose di trombina in piastrine pretrattate con M β CD, non è più rilevabile (figura 1d).

Questi risultati indicano che l'integrità dei rafts lipidici è cruciale ai fini della segnalazione estrogenica in piastrine e suggeriscono un ruolo chiave di questi microdomini di membrana nel processo di potenziamento 17 β -estradiolo-dipendente dell'aggregazione piastrinica.

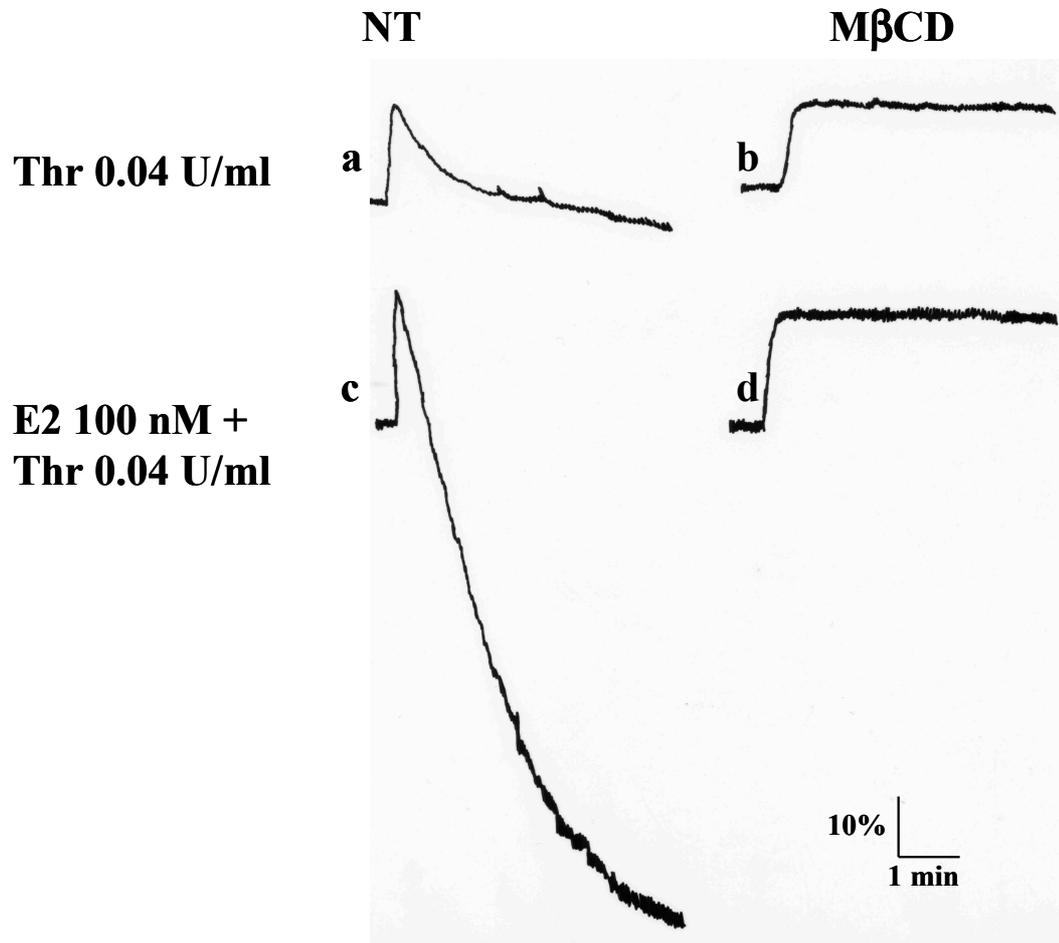


Figura n°1. Campioni di piastrine lavate, pretrattate ($M\beta CD$) e non (NT) con $20\text{ mM } M\beta CD$ per 30 minuti a $37^\circ C$ sono stati stimolati con 0.04 U/ml trombina (Thr) da sola (pannelli a e b), o in combinazione con $100\text{ nM } 17\beta$ -estradiolo (pannelli c e d). L'aggregazione è stata seguita per 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista. In ascissa è espresso il tempo in minuti, mentre in ordinata è indicata la trasmissione della luce espressa in percentuale.

I rafts lipidici sono necessari per l'attivazione della tirosin chinasi Src in piastrine trattate con 17 β -estradiolo

Gli effetti rapidi, non-genomici del 17 β -estradiolo in piastrine umane sono mediati dal recettore per estrogeni di tipo β (ER β), che recluta ed attiva la tirosin chinasi Src (Moro et al., 2005).

Allo scopo di investigare il ruolo dei rafts lipidici nelle vie di segnalazione 17 β -estradiolo-dipendenti in piastrine umane, abbiamo pensato di analizzare l'effetto della deplezione del colesterolo mediante M β CD sull'attivazione della chinasi Src estrogeno-dipendente.

Campioni di piastrine lavate, pretrattati e non con 20 mM M β CD per 30 minuti a 37°C, sono stati in seguito incubati con 100 nM 17 β -estradiolo per tempi crescenti da 30 secondi a 180 secondi. Aliquote di ogni campione, contenenti la stessa quantità di proteine, sono stati successivamente analizzati mediante immunoblotting con anticorpi anti-pSrc-Tyr418 e anti-Src.

In figura 2, è possibile osservare che in piastrine non trattate con M β CD il 17 β -estradiolo promuove un'importante fosforilazione della tirosin chinasi Src, che raggiunge un massimo ad 1 minuto di incubazione con estrogeno e poi rapidamente decresce fino al livello basale. Al contrario, in piastrine pretrattate con M β CD è possibile osservare che il 17 β -estradiolo non è più in grado di modulare la fosforilazione della chinasi Src.

Questo risultato suggerisce che l'integrità dei rafts lipidici è essenziale per l'attivazione 17 β -estradiolo-dipendente della tirosin chinasi Src in piastrine umane.

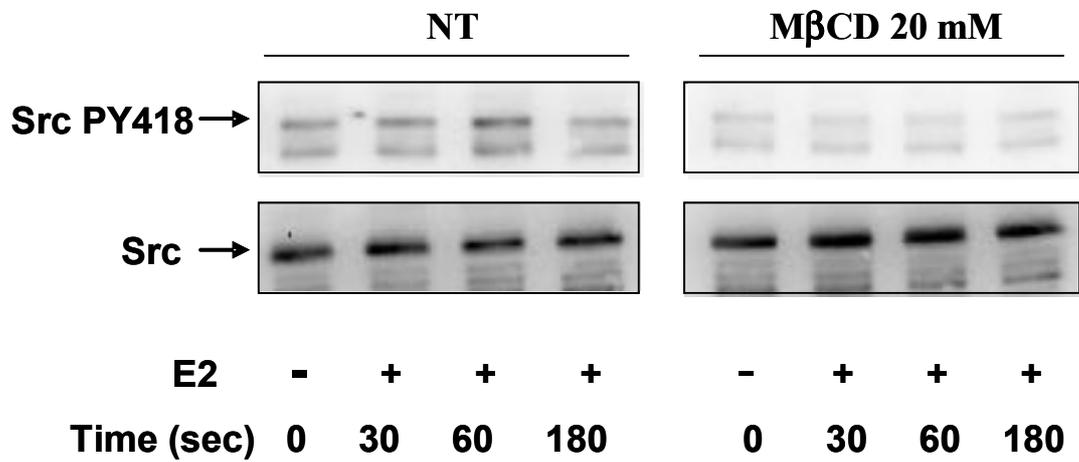


Figura n°2. Campioni di piastrine lavate, non trattate (NT) oppure pretrattate con 20 mM M β CD per 30 minuti a 37°C, sono stati incubati con 100 nM 17 β -estradiolo per tempi crescenti da 30 secondi a 180 secondi. Aliquote di ogni campione contenenti la stessa quantità di proteine, sono stati analizzati mediante immunoblotting con gli anticorpi policlonali specifici anti-pSrc-Tyr418 (pannello in alto) ed anti-Src (pannello in basso).

Il recettore ER β trasloca ai rafts lipidici in seguito a stimolazione delle piastrine con 17 β -estradiolo

Nel lavoro precedente è stato dimostrato che il recettore ER β è localizzato nella membrana piastrinica ed in seguito a trattamento con 17 β -estradiolo non modifica la sua localizzazione cellulare (Moro et al., 2005). A questo punto, la nostra attenzione si è rivolta all'isolamento dei rafts lipidici, piccole piattaforme di membrana altamente organizzate che svolgono un ruolo importante nei processi di attivazione piastrinica, per verificare la presenza del recettore o una sua eventuale localizzazione in seguito a trattamento con 17 β -estradiolo.

Recenti lavori riportano, per l'isolamento dei rafts lipidici da piastrine umane, differenti protocolli sperimentali, che prevedono l'utilizzo dei detergenti Brij58 0.1% oppure Triton X-100 0.1% (Bodin et al., 2003, Quinton et al., 2005). Campioni di piastrine lavate contenenti 2×10^9 cellule (800 μ l in volume) opportunamente trattati con etanolo o 100 nM 17 β -estradiolo per tempi crescenti da 30 secondi a 180 secondi, sono stati lisati in presenza dei due detergenti (0.1% Brij58 oppure 0.1% Triton X-100) e i rafts lipidici sono stati isolati mediante ultracentrifugazione (160000 x g) in gradiente discontinuo di saccarosio. Al termine della centrifugazione, sono state raccolte 12 frazioni in volumi da 1 ml ciascuna a partire dalla cima del tubo: tali frazioni sono state analizzate mediante dot blot con tossina colerica coniugata a perossidasi per identificare le frazioni arricchite nel ganglioside di membrana GM1, abbondante nei rafts lipidici. L'analisi mediante dot blot mostra che in seguito a lisi con Brij58, il ganglioside GM1 è più abbondante nelle frazioni meno dense rispetto alla lisi delle piastrine con Triton X-100 (figura 3). Inoltre, dal momento che risultati più riproducibili sono stati ottenuti con piastrine lisate in presenza di Brij58, questo detergente è stato utilizzato in tutti gli esperimenti successivi. Le frazioni GM1-positive per ogni campione sono state riunite come "frazioni rafts", mentre le frazioni 11 e 12 sono state raccolte separatamente come "frazioni solubili".

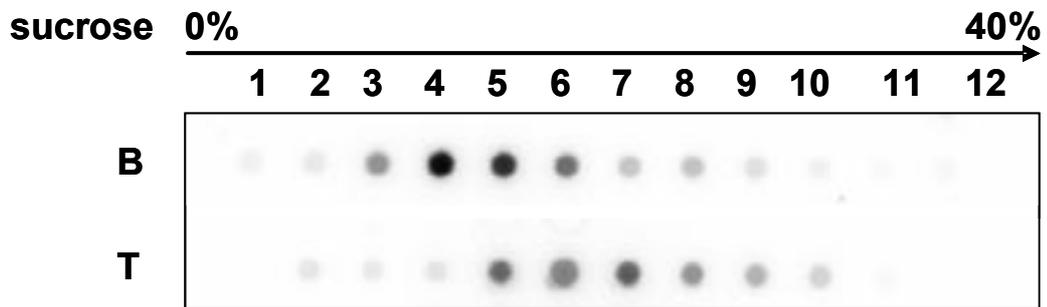


Figura n°3. Campioni di piastrine lavate contenenti 2×10^9 cellule opportunamente trattati con etanolo o 100 nM 17β -estradiolo per tempi crescenti da 30 secondi a 180 secondi, sono stati lisati in presenza di 0.1% Brij58 (B) oppure di 0.1% Triton X-100 (T) e i rafts lipidici sono stati isolati mediante ultracentrifugazione ($160000 \times g$) in gradiente discontinuo di saccarosio. Al termine della centrifugazione, sono state raccolte 12 frazioni in volumi da 1 ml ciascuna a partire dalla cima del tubo: tali frazioni sono state analizzate mediante dot blot con tossina colerica coniugata a perossidasi per identificare le frazioni arricchite nel ganglioside di membrana GM1, abbondante nei rafts lipidici.

Le frazioni rafts riunite e la frazioni solubili riunite sono state poi sottoposte a precipitazione delle proteine con acido tricloroacetico concentrato al 100% ed analizzate mediante immunoblotting con l'anticorpo policlonale specifico anti-ER β . I risultati sono mostrati in figura 4. Abbiamo osservato che ER β localizza nei rafts lipidici di piastrine trattate con 17β -estradiolo, ma non è presente in quelli di cellule non trattate. La traslocazione 17β -estradiolo-dipendente del recettore ER β alle frazioni rafts è transiente ed avviene in maniera tempo-dipendente: la massima associazione del recettore è stata osservata ad 1 minuto di trattamento delle piastrine con estrogeno. È possibile, inoltre, osservare che in seguito a deplezione del colesterolo con M β CD dalla membrana piastrinica, non si è più in grado di rilevare la presenza di ER β nelle frazioni rafts. Questi risultati indicano che l'interazione del 17β -estradiolo con ER β causano il reclutamento del recettore ai rafts lipidici.

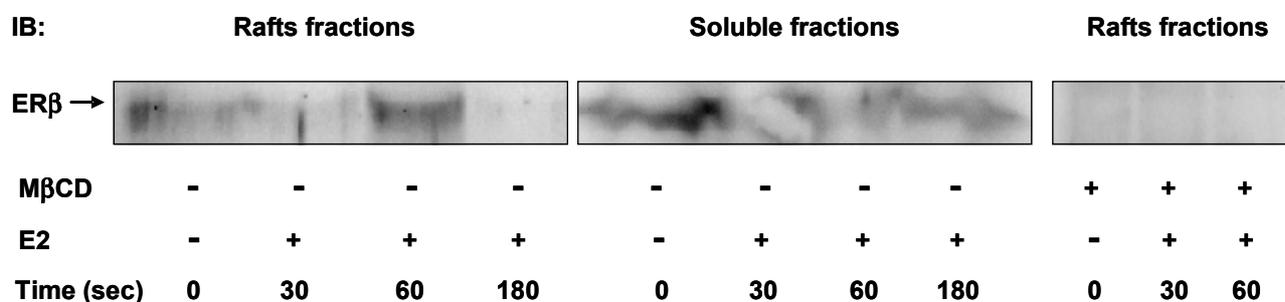


Figura n°4. Campioni di piastrine lavate, pretrattate e non con 20 mM M β CD, contenenti 2×10^9 cellule (800 μ l in volume) opportunamente trattati con etanolo o 100 nM 17 β -estradiolo per tempi crescenti da 30 secondi a 180 secondi, sono stati lisati in presenza di detergente 0.1% Brij58 e i rafts lipidici sono stati isolati mediante ultracentrifugazione in gradiente discontinuo di saccarosio. Per ogni campione sono state riunite in parti uguali le frazioni rafts e le frazioni solubili, separatamente e le proteine in esse contenute sono state precipitate con acido tricloroacetico concentrato al 100%. I campioni così ottenuti sono stati analizzati mediante immunoblotting con l'anticorpo policlonale specifico anti-ER β .

I rafts lipidici mediano la segnalazione del 17 β -estradiolo in piastrine umane

Nel nostro lavoro precedente è stato dimostrato che in seguito a trattamento delle piastrine con 17 β -estradiolo le tirosin chinasi Src e Pyk2 e la subunità regolatoria p85 della PI3-K associano al recettore ER β (Moro et al., 2005). Allo scopo di meglio caratterizzare il ruolo dei rafts lipidici nella segnalazione estrogenica, abbiamo investigato la presenza di questi trasduttori del segnale nelle frazioni rafts di piastrine trattate con 17 β -estradiolo. Campioni di piastrine lavate contenenti 2×10^9 cellule (800 μ l in volume) opportunamente trattati con etanolo o 100 nM 17 β -estradiolo per tempi crescenti da 30 secondi a 180 secondi, sono stati lisati in presenza di detergente 0.1% Brij58 e i rafts lipidici sono stati isolati mediante ultracentrifugazione (160000 x g) in gradiente discontinuo di saccarosio. Al termine della centrifugazione, sono state raccolte 12 frazioni in volumi da 1 ml ciascuna a partire dalla cima del tubo e sottoposte ad analisi mediante dot blot. Aliquote da 60 μ l di frazioni rafts riunite e frazioni solubili riunite, sono poi state analizzate mediante SDS/PAGE su gel di poliacrilammide al 10%, seguito da immunoblotting con gli anticorpi specifici anti-pSrc-Tyr418, anti-Src, anti-pPyk2-Tyr402, anti-Pyk2 e anti-p85-PI3-K. I risultati possono essere osservati in figura 5. In piastrine non stimolate le molecole segnale considerate sono distribuite in maniera diseguale tra le frazioni rafts e le frazioni solubili. Mentre una quantità apprezzabile della tirosin chinasi Src è già presente nei rafts lipidici di piastrine a riposo, Pyk2 e p85-PI3-K sono principalmente localizzate nelle frazioni solubili. In seguito a trattamento con 17 β -estradiolo si verifica una rapida e transiente traslocazione della tirosin chinasi Src nelle frazioni rafts, inoltre, la chinasi Src associata ai rafts risulta essere nella sua forma attiva, fosforilata in tirosina 418. Inoltre, si osserva che il 17 β -estradiolo è in grado di reclutare una discreta quantità di Pyk2 ai rafts lipidici con una cinetica simile a quella di Src; tuttavia mentre l'associazione ai rafts lipidici e l'attivazione di Src indotte da 17 β -estradiolo sembrano essere eventi concomitanti, la fosforilazione della chinasi Pyk2 permane fino a 180 secondi di trattamento con estrogeno. Infine, abbiamo osservato che la subunità regolatoria p85 della fosfatidilinositolo 3-chinasi risulta essere costitutivamente associata ai rafts lipidici ed il

trattamento delle piastrine con 17 β -estradiolo non è in grado di modulare la sua associazione a questi microdomini.

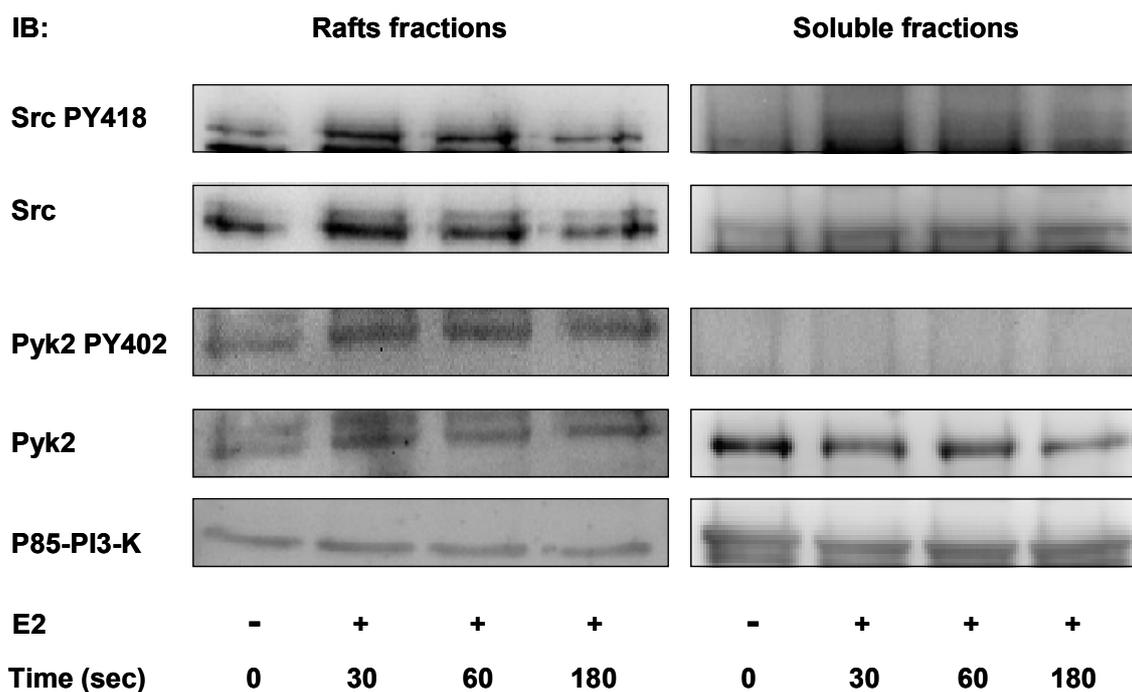


Figura n°5. Campioni di piastrine lavate contenenti 2×10^8 cellule ($800 \mu\text{l}$ in volume) opportunamente trattati con etanolo o 100 nM 17 β -estradiolo per tempi crescenti da 30 secondi a 180 secondi, sono stati lisati in presenza di detergente 0.1% Brij58 e i rafts lipidici sono stati isolati mediante ultracentrifugazione in gradiente discontinuo di saccarosio. Aliquote da $60 \mu\text{l}$ di frazioni rafts riunite e frazioni solubili riunite, sono poi state analizzate mediante SDS/PAGE su gel di poliacrilammide al 10%, seguito da immunoblotting con gli anticorpi policlonali specifici anti-pSrc-Tyr418, anti-Src, anti-pPyk2-Tyr402, anti-Pyk2 e anti-p85-PI3-K.

DISCUSSIONE

Il ruolo degli ormoni steroidei nella regolazione delle funzioni piastriniche è stato investigato per anni, ma risultati contrastanti sono stati riportati (Elkeles et al., 1968, Bar et al., 2000, Bouboulas et al., 2001). La maggior parte delle discrepanze può essere attribuita ai diversi approcci metodologici adottati che comprendono le differenti preparazioni piastriniche (alcuni studi sono stati condotti su piastrine lavate esposte ad alte concentrazioni di ormoni, altri hanno analizzato le risposte funzionali delle piastrine isolate da donatori che erano stati precedentemente trattati con estrogeni), il genere e l'età dei donatori di sangue, la concentrazione di estrogeni utilizzata ed il tempo di esposizione delle piastrine agli estrogeni. Nel nostro precedente lavoro sono state utilizzate piastrine gel-filtrate provenienti da donatori maschi ed esposte ad alte concentrazioni di 17β -estradiolo per tempi molto brevi. Pertanto, gli eventi osservati sono da considerarsi come conseguenza di un trattamento acuto delle piastrine con estrogeni. In realtà, è da rilevare che la risposta cellulare ad alte concentrazioni nanomolari di 17β -estradiolo, come quelle utilizzate nel nostro lavoro, possiede comunque rilevanza fisiologica (White, 2002). Per molti anni, inoltre, la questione riguardante gli effetti degli estrogeni sulla fisiologia delle piastrine umane è stata messa in discussione a causa della supposta assenza del recettore per gli estrogeni in queste cellule anucleate. Recenti studi hanno dimostrato che gli estrogeni, accanto alla regolazione dei processi trascrizionali, sono anche in grado di esercitare effetti rapidi, non-genomici sulle cellule bersaglio (Cato et al., 2002). Inoltre in piastrine umane sono stati identificati entrambi i recettori per gli estrogeni (Jayachandran & Miller, 2003, Khetawat et al., 2000), ma il recettore $ER\beta$ sembra essere il più abbondantemente espresso. Infatti, le recenti prove immunologiche riguardo la presenza di $ER\alpha$ in piastrine umane (Jayachandran & Miller, 2003), non sono state confermate da altri studi in cui in piastrine umane non sono stati rilevati né la proteina, né l'RNA messaggero per $ER\alpha$ (Khetawat et al., 2000). Questo è ben documentato dal fatto che i due recettori hanno differente distribuzione tissutale (Gustafsson, 2003). Le piastrine rappresentano quindi un eccellente modello per lo studio delle vie di segnalazione che mediano gli

effetti non-genomici degli estrogeni. Nel recente lavoro condotto nel nostro laboratorio è stato dimostrato che il 17β -estradiolo è in grado di potenziare significativamente l'aggregazione piastrinica indotta da basse dosi di trombina, avviando una via di segnalazione rapida e reversibile mediata dall'attivazione $ER\beta$ -dipendente delle tirosin chinasi Src e Pyk2 a livello della membrana plasmatica. Alla luce di questo risultato, in questo anno di Dottorato la nostra attenzione si è rivolta all'isolamento dei rafts lipidici, piccole piattaforme di membrana altamente organizzate che svolgono un ruolo importante nei processi di attivazione piastrinica, per meglio definire il loro ruolo nei processi di segnalazione mediati dal 17β -estradiolo.

In questo ultimo lavoro abbiamo osservato che i rafts lipidici svolgono un ruolo importante in questi eventi, dal momento che mediano la segnalazione outside-in estrogeno-dipendente nelle piastrine. Il coinvolgimento dei rafts in questa segnalazione è stato osservato mediante l'utilizzo della $M\beta CD$, agente legante il colesterolo. Abbiamo osservato che in piastrine in cui l'integrità dei rafts lipidici viene meno dopo trattamento con $M\beta CD$, il 17β -estradiolo non si rivela più in grado di promuovere la fosforilazione della tirosin chinasi Src, né di potenziare l'aggregazione piastrinica indotta da dosi subliminali di trombina. Questo risultato indica che i rafts lipidici svolgono uno specifico e fondamentale ruolo nella segnalazione estrogenica in piastrine umane.

Dalla letteratura derivano differenti protocolli sperimentali utili per l'isolamento dei rafts lipidici da numerosi tipi cellulari, comprese le piastrine. Allo scopo di definire quale fossero le condizioni migliori da utilizzare per il nostro modello sperimentale, campioni piastrinici sono stati lisati in presenza di due detergenti diversi, Brij58 e Triton X-100, come descritto da Bodin et al. (2003) e da Quinton et al. (2005), rispettivamente. Pur essendo stati ottenuti risultati molto simili con entrambe le metodiche, il recupero di rafts lipidici da campioni lisati in presenza di detergente Brij58 si è rivelato più riproducibile e pertanto tale metodica è stata utilizzata in tutti gli esperimenti successivi.

Allo scopo di verificare la localizzazione di $ER\beta$ nei rafts lipidici, abbiamo pertanto utilizzato la metodica sopra descritta per isolare questi domini idrofobici di membrana. I rafts lipidici, grazie alla loro abilità di flottare in un gradiente di densità di

saccarosio in seguito ad ultracentrifugazione, si presentano come una banda opaca chiaramente visibile a densità compresa tra il 10 e il 18% di saccarosio e sono presenti nelle frazioni comprese tra la 4 e la 7. Dal momento che la quantità di recettore ER β presente nella membrana piastrinica risulta essere in percentuale molto bassa rispetto alla concentrazione proteica totale, una volta identificate le frazioni arricchite in rafts lipidici, per ogni campione sono state riunite in parti uguali le frazioni rafts e le frazioni solubili, separatamente, ed il loro contenuto proteico è stato arricchito mediante precipitazione delle proteine con acido tricloroacetico concentrato al 100%. Abbiamo così potuto osservare il 17 β -estradiolo induce una rapida ma transiente traslocazione del recettore ER β alle frazioni rafts. Anche se ulteriori prove saranno necessarie per chiarire completamente il meccanismo di questa traslocazione, è probabile che il legame dell'estrogeno possa causare un cambiamento conformazionale di ER β promuovendo la sua selettiva traslocazione nei rafts lipidici. Questo è confermato anche dal fatto che la distruzione dei rafts lipidici con M β CD abolisce completamente tale traslocazione.

Dopo aver meglio definito la localizzazione del recettore, è stato interessante investigare il comportamento delle altre componenti del complesso molecolare associato ad ER β , all'interno dei rafts lipidici in seguito a trattamento delle piastrine con 17 β -estradiolo. In questo caso, una volta identificate le frazioni arricchite in rafts lipidici, una stessa quantità in volume di frazioni rafts riunite e frazioni solubili riunite, per ogni campione, è stata analizzata direttamente mediante immunoblotting. E' stato osservato che in piastrine stimolate con 17 β -estradiolo si verifica il reclutamento delle tirosin chinasi Src e Pyk2 ai rafts lipidici, che è concomitante con la loro rapida e reversibile fosforilazione in tirosina. In accordo con lavori precedenti (Dorahy et al., 1996), abbiamo osservato che la chinasi Src è costitutivamente associata ai rafts anche in piastrine umane. Abbiamo, inoltre, mostrato che l'estrogeno determina un notevole incremento nell'associazione della proteina a questi microdomini e promuove la fosforilazione della forma di Src ad essi associata. Alla luce di questo risultato è possibile supporre che in piastrine trattate con 17 β -estradiolo il recettore ER β è responsabile del reclutamento ai rafts lipidici dei trasduttori coinvolti nella segnalazione estrogenica, in particolare Src e Pyk2. Tuttavia, in contrasto con quanto riportato per altri tipi cellulari, PI3-K non svolge un ruolo attivo nella segnalazione estrogenica in

piastrine umane: abbiamo, infatti, osservato che la distribuzione della subunità regolatoria p85 di PI3-K tra frazioni rafts e frazioni solubili non viene modulata dal 17 β -estradiolo.

Questi dati, insieme a quelli del lavoro precedente, identificano un nuovo possibile meccanismo con cui gli estrogeni influiscono sul sistema cardiovascolare: accanto agli effetti genomici sulle cellule endoteliali e muscolari lisce della parete dei vasi, gli estrogeni possono sensibilizzare direttamente, attraverso un'azione strettamente non-genomica, le piastrine ai piú comuni agonisti fisiologici. Inoltre, ER β è una proteina di membrana poco espressa nelle piastrine. Da ciò si potrebbe pensare che i rafts lipidici rappresentino un legame strutturale e funzionale tra il recettore per estrogeni ed i suoi specifici interattori intracellulari. I rafts lipidici potrebbero, quindi, creare una sorta di gerarchia all'interno delle molteplici vie di segnalazione che contribuiscono all'attivazione piastrinica, concentrando in compartimenti di membrana, morfologicamente ben definiti, i complessi coinvolti nella trasduzione del segnale.

In conclusione, viene proposto che i rafts lipidici svolgano un ruolo chiave nella segnalazione 17 β -estradiolo-dipendente in piastrine umane e siano direttamente coinvolti nel meccanismo molecolare con cui l'estrogeno esercita il suo effetto di potenziamento dell'aggregazione piastrinica indotta da dosi subliminali di trombina.

BIBLIOGRAFIA

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptor: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 197-263.

Avraham S, London R, Fu Y, Ota S, Hiregowdara D, Li J, Jiang S, Pasztor LM, White RA, Groopman JE, Avraham H. Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain. *J Biol Chem* 1995; 270: 27742-27751.

Bachelot C, Cano E, Grelac F, Saleun S, Druker BJ, Lèvi-Toledano S, Fischer S, Rendu F. Functional implications of tyrosine protein phosphorylation in platelets. *Biochem J* 1992; 284: 923-928.

Bar J, Lahav J, Hod M, Ben-Rafael Z, Weinberger I, Brosens J. Regulation of platelet aggregation and adenosine triphosphate release in vitro by 17 β -estradiol and medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women. *Thromb Haemost*. 2000; 84: 695-700.

Bauer M, Maschberger P, Quek L, Bridson SJ, Dash D, Weiss M, Watson SP, Siess W. Genetic and pharmacological analyses of involvement of Src-family, Syk and Btk Tyrosine Kinases in platelet Shape Change. *Thromb Haemost* 2001; 85: 331-340.

Bennett JS, Zigmond S, Vilaire G, Cunningham ME, Bednar B. The platelet cytoskeleton regulates the affinity of the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ for fibrinogen. *J Biol Chem* 1999; 274: 25301-25307.

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

Blockmans D, Deckmin H, Vermylen J. Platelet activation. *Blood Rev* 1995; 9: 143-156.

Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Buller HR, Vandenbroucke JP. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep vein thrombosis associated with oral contraceptives containing third-generation progestagen. *Lancet* 1995; 346: 1593-1596.

Bodin S, Giuriato S, Ragab J, Humbel B, Viala C, Vieu C, Chap H, Payrastre B. Production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidic acid in

platelet rafts: evidence for a critical role of cholesterol-enriched domains in human platelet activation. *Biochemistry* 2001; 40: 15290-15299.

Bodin S, Tronchere H, Payrastre B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1610:247-257.

Bodin S, Soulet C, Tronchère H, Sié P, Gachet C, Plantavid M, Payrastre B. Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. *J. Cell Science* 2005; 118: 759-769.

Bouboulas KD, Cooke GE, Roos CM, Bray PF, Goldschmidt-Clermont PJ. The PIA polymorphism of glycoprotein IIIa functions as a modifier for the effect of estrogen on platelet aggregation. *Arch Pathol Lab Med.* 2001; 125: 112-115.

Braunstein JB, Kershner DW, Bray P, Gerstenblith G, Schulman SP, Post WS, Blumenthal RS. Interaction of hemostatic genetics with hormone therapy. New insights to explain arterial thrombosis in postmenopausal women. *CHEST* 2002; 121: 906-920.

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

Canobbio I, Lova P, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M. Proline-rich tyrosine kinase 2 and focal adhesion kinase are involved indifferent phases of platelet activation by vWF. *Thromb Haemost* 2002; 87: 509-517.

Cato AC, Nestl A, Mink S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE* 2002; 138: RE9. Review.

Chen DB, Bird IM, Zheng J, Magness RR. Membrane estrogen receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway mediates acute activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen in uterine artery endothelial cells. *Endocrinology* 2004; 145: 113-125.

Chen Z, Yuhanna SY, Galchava-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 1999; 103: 401-406.

Cherukuri A, Dykstra M, Pierce SK. Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity* 2001; 14: 657-660.

Coughlin SR. Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb Haemost* 2001; 86: 298-307.

Crawford N, Scrutton MC. Biochemistry of the blood platelet. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD (eds): *Haemostasis and Thrombosis*. Third edition 1994; 4: 89-98.

Di Domenico M, Castoria G, Bilancio A, Migliaccio, Auricchio F. Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res* 1996; 56: 4516-4521.

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

Dorahy DJ, Lincz LF, Meldrum CJ, Burns GF. Biochemical isolation of a membrane microdomain from resting platelets highly enriched in the plasma membrane glycoprotein CD36. *Biochem J* 1996; 319: 67-72.

Ehring GR, Kerschbaum HH, Eder C, Naben AL, Fanger CM, Khoury RM, Negulescu PA, Cahalan MD. A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K⁺ channels, Ca²⁺ signaling, and gene expression in T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 188: 1593-1602.

Elkeles RS, Hampton JR, Mitchell JR. Effect of oestrogens on human platelet behaviour. *Lancet* 1968; 2: 315-318.

Faraday N, Goldschmidt-Clermont PJ, Bray PF. Gender differences in platelet GPIIb-IIIa activation. *Thromb Haemost.* 1997; 77: 748-754.

Fawell SE, White R, Hoare S, Sydenham M, Page M, Parker MG. Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6883-6887.

Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton Jr. AR, Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 70-84.

Gametchu B, Watson CS, Pasko D. Size and steroid-binding characterization of membrane-associated glucocorticoid receptor in S-49 lymphoma cells. *Steroids* 1991; 56: 402-410.

Gametchu B, Watson CS, Shin CC, Dashew B. Studies on the arrangement of glucocorticoid receptors in the plasma membrane of S-49 lymphoma cells. *Steroids* 1991; 56: 411-419.

Ganju RK, Hatch WC, Avraham H, Ona MA, Druker B, Avraham S, Groopman JE. 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* 1997; 185: 1055-1064.

Geiger B, Bersahdsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 793-805.

Giancotti F, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285: 1028-1032.

Ginsberg MH, Du X, Plow EF. Inside-out integrin signalling. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4: 766-771.

Golden A, Nemeth SP, Brugge JS. Blood platelets express high levels of the pp60^{c-src}-specific tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 852-856.

Gousset K, Wolkers WF, Tsvetkova NM, Oliver AE, Filed CL, Walker NJ, Crowe JN, Tablin F. Evidence for a physiological role for membrane rafts in human platelets. *J Cell Physiol* 2002; 190: 117-128.

Green PS, Gridley KE, Simpkins JW. Estradiol protects against b-amyloid (25-35)-induced toxicity in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 1996; 218: 165-168.

Gustafsson JA. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24: 479-485.

Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 1998; 141: 929-942.

Haynes PM, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Rulz M, Seesa WC, Bender JR. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 2000; 37: 677-682.

Heijnen HFG, van Lier M, Waaijenborg S, Ohno-Iwashita Y, Waheed AA, Inomata M, Gorter G, Mobius W, Akkerman JWN, Slot JW. Concentration of rafts in platelet filopodia correlates with recruitment of c-Src and CD63 to these domains. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1161-1173.

Herrington D. The HERS trial results: paradigms lost? *Ann Intern Med* 1999; 131: 463-466.

Hers I, Donath J, van Willigen G, Akkerman JWN. Differential involvement of tyrosine- and serine/threonine kinases in platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 404-414.

Hers I, Donath J, Litjens P, Gijsbert van W, Akkerman J. Inhibition of platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ peptides that interfere with protein kinases and the β_3 tail. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1651-1660.

Holowka D, Baird B. FcεRI as a paradigm for a lipid raft-dependent receptor in hematopoietic cells. *Semin Immunol* 2001; 13: 99-105.

Hourani SM, Cusack NJ. Pharmacological receptors on blood platelets. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 243-298.

Huang MM, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil SJ, Brugge JS. Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with Fyn, Lyn and Yes protein tyrosine kinases in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7844-7848.

Huang M, Lipfert L, Cunningham M, Brugge JS, Ginsberg MH, Shattil SJ. Adhesive ligand binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ stimulates tyrosine phosphorylation of novel protein substrates before phosphorylation of pp125^{FAK}. *J Cell Biol* 1993; 122: 473-483.

Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 1998; 280: 605-613.

Jackson SP, Schoenwaelder SM, Yuan Y, Salem HH, Cooray P. Non-receptor protein tyrosine kinases and phosphatases in human platelets. *Thromb Haemost* 1996; 76: 640-650.

Janes PW, Ley SC, Magee AI, Kabouridis PS. The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signaling. *Semin Immunol* 2000;12: 23-34.

Jayachandran M, Miller VM. Human platelets contain estrogen receptor α , caveolin-1 and estrogen receptor associated proteins. *Platelets* 2003; 14: 75-81.

Jick H, Derby LE, Myers MW, Vasilakis C, Newton KM. Risk of hospital admission for idiopathic venous thromboembolism among users of postmenopausal oestrogens. *Lancet* 1996; 348: 981-983.

Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 1997; 390: 632-636.

Khetawath G, Faraday N, Nealen ML, Vijayan KV, Bolton E, Noga SJ, Bray PF. Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor beta and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression. *Blood* 2000; 95: 2289-2296.

Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, Jo I. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor α localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 257-262.

Kolesnick R. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* 2002; 110: 3-8.

Kovacsovics TJ, Bachelot C, Toker A, Vlahos CJ, Duckworth B, Cantley LC, Hartwig JH. Phosphoinositide 3-kinase inhibition spares actin assembly in activating platelets but reverses platelet aggregation. *J Biol Chem* 1995; 270: 11358-11366.

Koziak K, Kaczmarek E, Park SY, Fu Y, Avraham S, Avraham H. RAFTK/Pyk2 involvement in platelet activation is mediated by phosphoinositide 3-kinase. *British J Haematol* 2001; 114: 134-140.

Kroll MH, Schafer AI. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 1989; 74: 1181-1195.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-A. Finding of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5925-5930.

Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca²⁺-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 1995; 376: 737-745.

Lèvy-Toledano S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a "hierarchy"? *Haemostasis* 1999; 29: 4-15.

Li J, Avraham H, Rogers RA, Raja S, Avraham S. Characterization of RAFTK, a novel focal adhesion kinase, and its integrin-dependent phosphorylation and activation in megakaryocytes. *Blood* 1996; 88: 417-428.

Lieberherr M, Grosse B. Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 7217-7223.

Locke D, Chen H, Liu Y, Liu C, Kahn ML. Lipid rafts orchestrate signaling by the platelet receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem* 2002; 277: 18801-18809.

London E, Brown DA. Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta* 2000; 1508: 182-195.

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

Lu ML, Schnelder MC, Zheng Y, Zhang X, Richie JP. Caveolin-1 interacts with androgen receptor. A positive modulator of androgen receptor mediated transactivation. *J Biol Chem* 2001; 276: 13442-13451.

Majerus PW. Platelets. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varmus H. (eds): *The molecular basis of blood disease*. 1987; 22: 753-785.

McKenna NJ and O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 2002; 108: 465-474.

McNicol A, Shibou TS, Pampolina C, Israels SJ. Incorporation of MAP kinases into the platelet cytoskeleton. *Thromb Res* 2001; 103: 25-34.

Mermelstein PG, Becker JB, Surmeier DJ. Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J Neurosci* 1996;16(2):595-604.

Migliaccio A, Pagano M, Auricchio F. Immediate and transient stimulation of protein tyrosine phosphorylation by estradiol in MCF-7 cells. *Oncogene* 1993; 8: 2183-2191.

Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 1996; 15: 1292-1300.

Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J* 2000; 19: 5406-5417.

Morley P, Whitfield JF, Vanderhyden BC, Tsang BK, Schwartz JL. A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinol* 1992; 131: 1305-1312.

Moro L, Reineri S, Piranda D, Pietrapiana D, Lova P, Bertoni A, Graziani A, Defilippi P, Canobbio I, Torti M, Sinigaglia F. Non-genomic effects of 17 β -estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor β and *Src* kinase. *Blood* 2005; 105: 115-121.

Nealen ML, Vijayan KV, Bolton E, Bray PF. Human platelets contain a glycosylated estrogen receptor beta. *Circ Res* 2001; 88: 438-442.

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

Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 504-508.

Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA, Shattil SJ. Coordinate interactions of Csk, *Src*, and *Syk* kinases with $[\alpha]I\text{Ib}[\beta]3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol* 2002; 157: 265-275.

- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signal complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 1998; 273: 5419-5422.
- O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* 1994; 124: 1047-1059.
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ER- α and ER- β at AP1 sites. *Science* 1997; 277: 1508-1510.
- Pappas TC, Gametchu B, Yannarrello-Brown J, Collins TJ, Watson CS. Membrane estrogen receptors in GH3/B6 cells are associated with rapid estrogen-induced release of prolactin. *Endocrine* 1994; 2: 813-822.
- Pappas TC, Gametchu B, Watson CS. Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J* 1995; 9: 404-410.
- Paul BZS, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism of thromboxane A₂-induced platelet aggregation. Essential role for P2T_{AC} and α_{2A} receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 29108-29114.
- Phillips DR, Prasad KS, Manganello J, Bao M, Nannizzi-Alaimo L. Integrin tyrosine phosphorylation in platelet signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 546-554.
- Quinton TM, Kim S, Jin J, Kunapuli SP. Lipid rafts are required in Galpha(i) signaling downstream of the P2Y1 receptor during ADP-mediated platelet activation. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3: 1036-1041.
- Raja S, Avraham S, Avraham H. Tyrosine phosphorylation of the novel protein-tyrosine kinase RAFTK during an early phase of platelet activation by an integrin glycoprotein IIb-IIIa independent mechanism. *J Biol Chem* 1997; 272: 10941-10947.
- Razandi M, Pedram A, Greens GL, Levin ER. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 307-319.
- Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER. Estrogens associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 100-115.
- Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3375-3378.

Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 746-752.

Russell KS, Hynes MP, Sinha D, Cleriarne E, Bender JR. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5930-5935.

Sayed MR, Sheid MP, Stevens CM, Duronio V. Thrombin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity in platelets is associated with activation of PYK2 tyrosine kinase: activation of both enzymes is aggregation independent. *J Cell Physiol* 2000; 183: 314-320.

Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen SS, Pastell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor α (ER α) signaling. *J Biol Chem* 1999; 274: 33551-33556.

Schlessinger J. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 273-275.

Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998; 91: 2645-2657.

Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HH, Toker A, Mercurio AM. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the $\alpha 6 \beta 4$ integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 1997; 91: 949-960.

Sheets ED, Holowka D, Baird B. Membrane organization in immunoglobulin E receptor signaling. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3: 95-99.

Shimizu Y, van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. Regulated expression and binding of three VLA ($\beta 1$) integrin receptors on T cells. *Nature* 1990; 345: 250-253.

Shrimpton CN, Borthakur G, Larrucea S, Cruz MA, Dong JF, Lopez JA. Localization of the adhesion receptor glycoprotein Ib-IX-V complex to lipid rafts is required for platelet adhesion and activation. *J Exp Med* 2002; 196: 1057-1066.

Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil D P, Ley K, Chin W, Liao J K. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 2000; 407: 538-541.

Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 2002; 110: 597-603.

Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science* 2000; 290: 1721-1726.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 31-39.

- Sims PJ, Ginsberg MH, Plow EF, Shattil SJ. Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1991; 266: 7345-7352.
- Song RX-D, Mcpherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Santen RJ. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER α -Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 116-127.
- Stenberg PE, Pestina TI, Barrie RJ, Jackson CW. The Src family kinases, Fgr, Fyn, Lck, and Lyn, colocalize with coated membranes in platelets. *Blood* 1997; 89: 2384-2393.
- Torti M, Ramaschi G, Sinigaglia F, Lapetina EG, Balduini C. Glycoprotein IIb-IIIa and the translocation of Rap2B to the platelet cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4239-4243.
- Van Baal WM, Emeis JJ, van der Mooren MJ, Kessel H, Kenemans P, Stehouwer CD. Impaired procoagulant-anticouglant balance during hormone replacement therapy? A randomized, placebo-controlled 12-week study. *Thromb Haemost* 2000; 83: 29-34.
- Van der Goot FG, Harder T. Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol* 2001; 13: 89-97.
- Wade CB, Robinson S, Shapiro RA, Dorsa DM. Estrogen receptor ER α and ER β exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2001; 142: 2336-2342.
- Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnikar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 1991; 325: 1196-1204.
- Webb P, Lopez GN, Uht RM, Kushner PJ. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 443-456.
- White RE. Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol*. 2002; 38: 73-80.
- Whiting KP, Restall CJ, Brain PF. Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their roles in non-genomic mechanisms. *Life Sci* 2000; 67: 743-757.
- Wonerow P, Oberfell A, Wilde JI, Bobe R, Asazuma N, Brdicka T, Leo A, Schraven B, Horejsi V, Shattil SJ, Watson SP. Differential role of glycolipid-enriched membrane domains in glycoprotein VI- and integrin-mediated phospholipase C γ 2 regulation in platelets. *Biochem J* 2002; 364: 755-765.

Zhang J, Zhang J, Shattil S J, Cunningham MC, Rittenhouse SE. Phosphoinositide 3-Kinase and p85/Phosphoinositide 3-Kinase in Platelets. Relative activation by thrombin receptor or phorbol myristate acetate and roles in promoting the ligand-binding function of integrin. *J Biol Chem* 1996; 271: 6265-6272.

Zhang J, Banfic H, Straforini F, Tosi L, Volinia S, Rittenhouse SE. A type II phosphoinositide 3-kinase is stimulated via activated integrin in platelets. *J Biol Chem* 1998; 273: 14081-14084.

Seminari seguiti nel corso dei quattro anni di Dottorato

- 19-12-2002
“Il clonaggio molecolare applicato alle malattie ereditarie da alterato metabolismo del ferro”- Dott. A. Roetto
- 08-01-2003
“PI3-Kinase and phospholipase C γ pathways in human cancer”- Dott. M. Falasca
- 16-01-2003
“Akt and stem cells: new tools for heart failure treatment?”- Prof. G. Condorelli
- 16-01-2003
“Nuovi meccanismi di regolazione delle funzioni di p53: Pin-ning a change on p53”- Prof. G. Del Sal
- 23-01-2003
“Applicazioni di medicina molecolare alla diagnosi e prognosi delle neoplasie”- Prof. G. Gaidano
- 28-01-2003
“Strategie di valutazione della malattia minima residua in oncoematologia”- Dott. D. Cilloni
- 29-01-2003
“Farmaci innovativi per il trattamento di malattie neurodegenerative”- Dott. E. Ongini
- 30-01-2003
“Meccanismi molecolari di azione degli anticorpi terapeutici”- Dott. M. Introna
- 27-02-2003
“La *Drosophila melanogaster* come sistema modello: l’esempio del gene *minifly*”- Prof. M. Furia
- 07-03-2003
“TRPV1 (recettore per la capsaicina): possibile ruolo fisiopatologico dalle vie respiratorie all’emicrania”- Prof. P. Geppetti
- 18-03-2003
“Using PPAR γ agonists in neuroinflammatory disease: implications for MS and AD”- Dott. D.L. Feinstein

- 19-03-2003
“Strategie utilizzate nell’identificazione dei geni di suscettibilità per le malattie multifattoriali”- Prof. S. D’Alfonso
- 16-04-2003
“Aspetti e caratterizzazione del trasporto del peptide Tat in cellule epiteliali”- Dott. S. Violini
- 22-05-2003
“Developmental stage-specific epigenetic control of human beta globulin gene expression is set in multipotent hematopoietic progenitor cells”- Dott. S. Bottardi
- 26-05-2003
“Farmacogenetica molecolare e personalizzazione della chemioterapia antineoplastica”- Dott. G. Toffoli
- 29-05-2003
“ I radionuclidi: informazioni tecniche e radioprotezione”- Amersham Biosciences
- 09-06-2003
“Riarrangiamento secondari dei geni delle immunoglobuline nelle malattie linfoproliferative. Implicazioni patogenetiche”- Dott. V. Perfetti
- 18-06-2003
“Regolazione tradizionale dell’espressione genica: microRNA e sintesi dei ribosomi”- Dott. F. Loreni
- Lezioni di Statistica
- 30-09-2003
“Multiplex role of nitric oxide in multiple sclerosis”- Dott. A. Boullerne
- 30-01-2004
“Pharmacogenetics: a tool for a more efficient and safe drug therapy”- Prof. Magnus Ingelman-Sundberg
- 03-02-2004
“Alterazioni del gene della perforina nelle patologie linfoproliferative”
Dott. R. Clementi
- 18-02-2004
“Lipid rafts e recettore per l’ossitocina: modulazione del signalling e del controllo della proliferazione cellulare”- Dr. B. Chini

- 10-03-2004
“Terapie biologiche e autoimmunità”- Prof. G. Valesini
- 31-03-2004
“Espressione epato-specifica del fattore IX antiemofilico mediante l’uso dei vettori lentivirali”- Dr. A. Follenzi
- 01-04-2004
“Recettori dei cannabinoidi e dei vanilloidi: due facce della stessa medaglia?”- Dr. E. Di Marzo
- 03-05-2004
“Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) subtypes”- Prof. F. Rieux-Laucat
- 10-05-2004
Corso Biorad su VERSADOC
- 20-05-2004
“Le artriti croniche nel bambino”- Prof. A. Martini
- 28-05-2004
“Il reticolo endoplasmatico: un labirinto metabolico”- Prof. A. Benedetti
- 14-06-2004
“Biomedical discovery using microarrays”- Prof. D. Murphy
- 14-06-2004
“Host genetic factors and the progression of liver diseases”- Prof. C. Day
- 15-06-2004
“Functional genomics of hypothalamic homeostatic plasticity”- Prof. D. Murphy
- 29-06-2004
“PI3-Kinase γ controls cardiac contractility and hypertrophy through kinase-dependent and independent functions”- Prof. E. Hirsch
- 30-06-2004
“Meccanismi patogenetici della Leucemia Linfatica Cronica”- Prof. M. Ferrarini
- 05-07-2004
“From the bench to the bedside: Galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid lesions”- Prof. A. Bartolazzi
- 07-07-2004
“ Ethanol metabolism and toxicity in pregnancy”- Prof. M. Ronis

- 27-09-2004
“Traffico intra- ed extra-cellulare di nucleotidi-segnale attivi nella regolazione del calcio cellulare”- Prof. A. De Flora
- Da ottobre 2004 ad aprile 2005
Lezioni di Inglese - Prof. Colin Irvingbell
- 19-11-2004
“Le neuroscienze nel Terzo Reich: dalla Torre d'Avorio ai campi di sterminio”- Prof. F. Monaco
- 02-12-2004
“Repertaxin, un nuovo inibitore di IL-8: risultati preclinici e identificazione del meccanismo d'azione”- Dott. R. Bertini
- 18-01-2005
“ProteomeLab PF-2D: analisi di miscele complesse di proteine con una tecnica alternativa in fase liquida bidimensionale”- Workshop Beckman Coulter
- 02-02-2005
“Similarità di sequenze e definizione di peptidi immunogeni”- Prof. D. Kanduc
- 11-03-2005
“Proteomica dell'epitelio intestinale”- Prof. M. Ruoppolo
- 21-03-2005
“Sclerosi multipla: ricerca di geni di suscettibilità nella popolazione finlandese”- Dott. R. Asselta
- 23-03-2005
“Le cellule dendritiche, un giocatore chiave nella risposta immunitaria: quali e quanti tipi?”- Dott. S. Nicola
- 06-04-2005
“Toward regulation of gene expression by chromatin modification: some biomedical model”- Prof. G. Lopez-Rodas
- 30-05-2005
“Il dolore articolare: un problema clinico o biochimico?”- Prof. G. Pescarmona
- 01-06-2005
“Geni e trapianti”- Prof. A. Amoroso
- 17-06-2005
“La tossina della pertosse ed il suo B-oligomero: nuovi farmaci immunostimolanti e anti-HIV?”- Prof. G. Poli

- 15-07-2005
“Molecular mechanisms of Parkinson's disease”- Prof. S. Gustincich
- 25-07-2005
"The complex regulation of autophagy and cell death in neurodegeneration: dissection of the signalling pathways by genetic manipulations"- Dott. Chutima
- 12-09-2005
“Caratteristiche e potenzialità delle cellule isolate dalle membrane fetali umane: amnion e corion” – Dott. O. Parolini
- 13-09-2005
“Functions of ribosomal protein S19: implications for Diamond Blackfan Anemia” – Dott. S. Ellis
- 20-09-2005
“Regolazione dell’apoptosi da parte di glucocorticoidi ed annessina-1” – Prof. L. Parente
- 18-10-2005
“La genetica delle sordità” – Prof. P. Gasparini
- 18-11-2005
“Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits” – Dott. D. Cotella
- 23-11-2005
"HCV-related steatosis: pathogenic mechanisms and clinical implications " – Prof. L.E. Adinolfi
- 25-11-2005
“Mechanisms of transcriptional regulation and disease” – Prof. R. Tjian
- 19-01-2006
“Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation” – Prof. M. Grano
- 13-02-2006
“New perspectives in metabotropic glutamate receptors neurobiology” – Prof. F. Nicoletti
- 15-02-2006
“Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico” – Prof. D. Sblattero

- 20-02-2006
“Tecniche di biologia e genetica molecolare nella diagnostica del carcinoma del colon” – Dott. D. Furlan
- 13-03-2006
“Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia” – Prof. A. Follenzi
- 20-03-2006
“The natural course of preclinical type 1 diabetes” – Prof. M. Knip
- 23-03-2006
“La prevenzione della trasmissione verticale di HIV in Africa Sub Sahariana. L'esperienza del programma DREAM (Drug Resource Enhancement against AIDA and Malnutrition)” – Dott. S. Ceffa
- 06-04-2006
“Aspetti immunogenetici e terapeutici della hairy cell leukemia” – Prof. F. Forconi
- 20-04-2006
“Terapie molecolari nelle malattie mieloproliferative” – Dott. D. Cilloni
- 03-05-2006
“Impatto delle biotecnologie sulle strategie di impresa nel settore della tutela della salute” – Dott. C. Jommi
- 04-05-2006
“Il mesotelioma: un modello di terapia traslazionale” – Dott. L. Mutti
- 15-05-2006

“Strategies to maintain oral food intake in patients with advanced malignant disease: success and failures” – Prof. V.E. Baracos
- 18-05-2006
“L'epatite autoimmune” - Prof. M. Lenzi
- 30-05-2006
“Sperm Mediated Gene Transfer. Storia e Applicazioni” – Prof. M. Lavitrano
- 15-06-2006
“Melusin: a stretch sensor molecule controlling adaptive cardiac remodeling to pressure overload” – Prof. G. Tarone

- 19-06-2006
“Ruolo eziologico dei papilloma virus umani (HPV) nello sviluppo di lesioni neoplastiche nel distretto genitale” – Prof. N. Surico, Prof. M. Gariglio, Prof. R. Boldorini, Prof. M. Sideri
- 22-06-2006
“Epatite ricorrente da HCV dopo trapianto di fegato” – Prof. Pierluigi Toniutto
- 27-06-2006
“Osteointegrazione e superfici implantari” – Prof. L. Rimondini
- 05-07-2006
“DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccines design” – Dott. R. Grifantini
- 13-07-2006
“L’approccio riabilitativo delle malattie cardiovascolari” – Prof. Pantaleo Giannuzzi
- 11-09-2006
“The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis” – Prof. Dieter Bromme

Corsi di formazione

Marzo 2006 Corso teorico-dimostativo “Proteomics”- Proteomic School, presso il Bioindustry Park, Colletterto Giacosa (Torino)

Partecipazione a congressi

Convegno Annuale della Sezione Ligure–Lombardo-Piemontese della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare

Novara, 23 Maggio 2003

"Localizzazione subcellulare di PKC theta e suo ruolo nel controllo della morfologia piastrinica".

Pietrapiana D., Piranda D., Passalacqua M., Lova P., **Reineri S.**, Canobbio I., Bertoni A., Graziani A., Torti M., Sinigaglia F.

VI Congresso Nazionale di biotecnologie (CNB₆)

Padova, 4/5/6 Giugno 2003

"Oestrogens influence platelet function through the formation of a Src-dependent signal transduction complex mediated by a membrane-associated oestrogen-receptor beta".

Reineri S., Piranda D., Pietrapiana D., Bertoni A., Lova P., Torti M., Canobbio I., Moro L., Sinigaglia F.

(Pag. 121)

16° Riunione Nazionale "A. Castellani" dei Dottorandi di Ricerca in Discipline Biochimiche

Brallo di Pregola (PV), 10-13 Giugno 2003

XIX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH 2003)

Birmingham, 12-18 Luglio 2003

"Activation of p38 MAP kinase in human platelets stimulated by von Willebrand factor".

Canobbio I., **Reineri S.**, Sinigaglia F., Balduini C., Torti M.

(Abstract n° PO219)

IV Riunione Gruppo Studio Piastrine

Conegliano Veneto (Treviso), 2-4 Ottobre, 2003

"Gli estrogeni potenziano la risposta piastrinica agli agonisti".

Reineri S., Piranda D., Lova P., Pietrapiana D., Migliaretti A., Canobbio I., Bertoni A., Torti M., Moro L., Sinigaglia F.

"Ruolo di PKC-theta nel controllo della forma in piastrine resting".

Pietrapiana D., **Reineri S.**, Lova P., Bertoni A., Migliaretti A., Canobbio I., Torti M., Sinigaglia F.

Convegno Annuale della Sezione Ligure–Lombardo-Piemontese della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare

Novara, 14 Maggio 2004

“17-beta oestradiol potentiates thrombin-dependent α IIb β 3 activation and platelet aggregation”.

Reineri S., Moro L., Piranda D., Pietrapiana D., Lova P., Bertoni A., Torti M., Sinigaglia F.

17ª Riunione Nazionale “A. Castellani” dei Dottorandi di Ricerca in Discipline Biochimiche

Brallo di Pregola (PV), 8-11 Giugno 2004

49° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare-SIB-

Riccione, 28 Settembre-1 Ottobre 2004

“Study of the mechanism by which 17 β -estradiol potentiates α IIb β 3 activation and platelet aggregation induced by thrombin or thromboxane A2”.

Reineri S., Piranda D., Pietrapiana D., Lova P., Bertoni A., Torti M., Sinigaglia F.

(“The Italian Journal of Biochemistry”, Vol.53 n.3 2004, pag. 120)

Convegno Annuale della Sezione Ligure–Lombardo-Piemontese della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare

Novara, 20 Maggio 2005

18ª Riunione Nazionale “A. Castellani” dei Dottorandi di Ricerca in Discipline Biochimiche

Brallo di Pregola (PV), 7-10 Giugno 2005

“Biochemical study of Estrogen Receptor beta localization and activation in human platelets”. **Reineri S.**

(Poster A-4)

VIII Congresso Nazionale di biotecnologie (CNB₈)

Siena, 7-9 Settembre 2005

“Study Of The Role Of Membrane Lipid Rafts In Estrogen Signaling In Human Platelets”

Reineri S., Piranda D, Mercalli V, Canobbio I, Torti M, Bertoni A, Sinigaglia F
(Comunicazione orale- P26)

Convegno Annuale della Sezione Ligure–Lombardo-Piemontese della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare

Pavia, 19 Maggio 2006

“Study of the role of membrane lipid rafts in estrogen signaling in human platelets”.

Reineri S., Bertoni A., Piranda D., Sanna E., Sinigaglia F.
(Comunicazione orale)

19^a Riunione Nazionale “A. Castellani” dei Dottorandi di Ricerca in Discipline Biochimiche

Brallo di Pregola (PV), 6-9 Giugno 2006

“Membrane lipid rafts coordinate the estrogen signaling in human platelets”

Reineri S.

(Comunicazione orale-Pag.9)

Proteine 2006 (Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare)

Novara, 1-3 Giugno 2006

“Proteomic analysis of lipid rafts from estrogen-activated human platelets”

M. Cavaletto, **S. Reineri**, E. Sanna, V. Cipriani, E. Ranzato, F. Sinigaglia
(Poster-P.11)

IX Congresso Nazionale di biotecnologie (CNB9)

Torino, 7-9 Settembre 2006

“Lipid rafts organization in estrogen-treated human platelets by a proteomic approach”

Cavaletto M, **Reineri S**, Sanna E, Cipriani V, Ranzato E, Sinigaglia F
(Poster)

Pubblicazioni

"A ROLE FOR P38 MAP KINASE IN PLATELET ACTIVATION BY VON WILLEBRAND FACTOR"

Canobbio I., **Reineri S.**, Sinigaglia F., Balduini C., Torti M.
Thromb. Haemost., 2004; 91:102-110.

"NON-GENOMIC EFFECTS OF 17 β -ESTRADIOL IN HUMAN PLATELETS: POTENTIATION OF THROMBIN-INDUCED AGGREGATION THROUGH ESTROGEN-RECEPTOR β AND SRC KINASE"

Moro L., **Reineri S.**, Piranda D., Pietrapiana D., Lova P., Bertoni A., Graziani A., Defilippi P., Canobbio I., Torti M., Sinigaglia F.
Blood, 2005; 105:115-121.

"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.
(Submitted to BBA-Molecular Cell Research)