

**Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
*Ciclo XX***

Relazione 3° anno

**MODULAZIONE DELLA FUNZIONALITA'
PIASTRINICA INDOTTA DAL 2-
ARACHIDONOILGLICEROLO**

Candidato: Baldassarri Samantha

Tutor: Prof. Fabiola Sinigaglia

SEZIONE 1
RISULTATI SCIENTIFICI

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
2. SCOPO DEL LAVORO	8
3. MATERIALI E METODI	10
3.1. PREPARAZIONE DELLE PIASTRINE MEDIANTE GEL-FILTRAZIONE.....	10
3.2. ANALISI DELL'AGGREGAZIONE PIASTRINICA.....	10
3.3. ANALISI DELLA SECREZIONE PIASTRINICA.....	11
3.4. QUANTIFICAZIONE DEL TROMBOSSANO A ₂	11
3.5. MISURA DELLA CONCENTRAZIONE CITOPLASMATICA DI CALCIO.....	12
3.6. PREPARAZIONE DI LISATI CELLULARI TOTALI	12
4. RISULTATI	14
4.1. DOSE-RISPOSTA DELL'AGGREGAZIONE PIASTRINICA INDOTTA DAL 2-AG	14
4.2. SECREZIONE INDOTTA DAL 2-AG	15
4.3. RILASCIO DI CALCIO INTRACELLULARE.....	16
4.4. PRODUZIONE DI TROMBOSSANO A ₂ NELLE PIASTRINE STIMOLATE CON 2-AG.....	17
4.5. FOSFORILAZIONE PROTEICA INDOTTA DAL 2-AG.....	18
5. DISCUSSIONE	20
6. BIBLIOGRAFIA	22
7. ATTIVITA' FORMATIVA	29

1. INTRODUZIONE

Gli endocannabinoidi (EC) sono una nuova classe di mediatori lipidici endogeni che mimano alcuni degli effetti psicotropici, ipnotici ed analgesici dei cannabinoidi, i costituenti naturali della *Cannabis Sativa*. I cannabinoidi endogeni comprendono ammidi, esteri ed eteri di acidi grassi poliinsaturi a lunga catena derivanti dall'acido arachidonico. I maggiori esponenti di questa classe di molecole sono l'arachidonoiletanolammide (anandamide o AEA) (Devane W. A. et al., 1992), ammide tra acido arachidonico ed etanolammide, ed il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) (Mechoulam R. et al., 1995; Sugiura T. et al., 1995), acido arachidonico coniugato con glicerolo.

La loro azione si esplica mediante il legame a specifici recettori associati a proteine G eterotrimeriche (G Protein-coupled Receptors o GPCRs), di cui si conoscono due isoforme: il recettore CB₁ (Matsuda L. A. 1997), quasi esclusivamente localizzato nel sistema nervoso, ed il recettore CB₂ (Munro S. 1993), localizzato prevalentemente nei tessuti periferici. L'AEA e il 2-AG sono in grado di mimare gli effetti tipici della marijuana, proprio perché il principio attivo di tale droga, il D9-tetraidrocannabinolo (THC), esplica la sua azione attraverso il legame agli stessi recettori (Devane W. A. et al., 1992; Mechoulam R. et al., 1995).

La caratterizzazione chimica del THC da parte di Gaoni e Mechoulam nel 1964 aveva consentito una serie di importanti chiarificazioni soprattutto riguardo il suo meccanismo d'azione. Inizialmente, infatti, si era erroneamente ritenuto che il THC, essendo una molecola lipofila, interagisse in maniera aspecifica con le membrane cellulari, anche se, la necessità di un determinato enantiomero e di ben precise caratteristiche strutturali per la sua attività, lasciava già intuire l'esistenza di specifici target recettoriali. La scoperta del recettore dei cannabinoidi fu un evento del tutto casuale perché avvenne nel corso di un accurato screening del DNA di ratto per individuare i geni dei recettori per le neurochinine. In quella occasione, infatti, fu rinvenuto un recettore "orfano di ligando", la cui distribuzione cerebrale coincideva con un noto ligando cannabinoide radiomarcato ([³H]-CP-55.940). Il sospetto che si trattava del recettore per i cannabinoidi, fu confermato definitivamente nel 1988, quando, successive indagini decretarono che quel recettore isolato nel cervello di ratto, era effettivamente lo specifico recettore attraverso cui i cannabinoidi mediavano gli effetti farmacologici e comportamentali (Devane W. A. et al., 1988). Questo recettore fu battezzato CB₁, perché, poco dopo, fu individuato un secondo recettore, CB₂, che spiegava gli effetti immunosoppressivi che i derivati della cannabis presentavano nel sistema immunitario.

La rivelazione dell'esistenza di specifici recettori per il THC fu prontamente seguita dalla spasmodica ricerca dei ligandi endogeni per tali proteine, gli endocannabinoidi.

AEA e 2-AG sono stati i primi due EC ad essere identificati e sono pertanto i ligandi endogeni meglio conosciuti. L'AEA è in grado di legare entrambi i sottotipi recettoriali comportandosi come un agonista parziale (Burkey T. H. et al., 1997; Glass M. et al., 1999); anche il 2-AG è in grado di attivare entrambi i sottotipi recettoriali comportandosi però come un agonista pieno (Mechoulam R. et al., 1995). Sono stati individuati anche altri ligandi endogeni in grado di legare e di attivare i recettori cannabici: il noladin (Hanus L. et al., 2001), la virodammina (Porter A. C. et al., 2002) e la NADA (Bisogno T. et al., 2000).

Il 2-AG, come anche l'AEA, viene prodotto "su richiesta" dalle cellule, a partire da precursori di membrana per essere poi rilasciato nel versante extracellulare. Esso appartiene alla famiglia dei monoacilgliceroli e come tale la sua formazione è strettamente associata al metabolismo dei triacilgliceroli e principalmente all'attivazione di una fosfolipasi fosfatidilinositolo-specifica (PLC). Il 2-AG, infatti, può essere formato a partire dai fosfatidilinositoli attraverso l'azione combinata della PLC e della diacilglicerolo lipasi, oppure può essere il prodotto dell'attività della PLA₁ seguita dalla PLC (Kondo S. et al., 1998; Bisogno T. et al., 1999; Sugiura T. et al., 2004). La prima via di sintesi coinvolge la rapida idrolisi, mediata dalla PLC, dei fosfolipidi di membrana e la successiva idrolisi del risultante diacilglicerolo per mezzo della diacilglicerolo lipasi.

Il 2-AG può essere prodotto anche a partire dalla fosfatidilcolina attraverso la PLC o la PLD seguita dall'azione della fosfatasi dell'acido fosfatidico. In alternativa esso può derivare dalla conversione dell'acido fosfatidico o lisofosfatidico. L'utilizzo delle diverse vie di sintesi dipende dal tipo di cellula o tessuto e dai diversi stimoli a cui essi sono sottoposti (Sugiura T. et al., 2004).

Dopo essere stati prodotti, gli endocannabinoidi possono diffondere attraverso la membrana citoplasmatica e legarsi ai recettori delle stesse cellule che li ha prodotti; oppure possono essere rilasciati nel fluido extracellulare e raggiungere altri siti bersaglio (Piomelli D. 2003).

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

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

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

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

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

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

Recenti evidenze sperimentali dimostrano, inoltre, che l'AEA e il 2-AG possono essere substrato sia della cicloossigenasi 2 (COX-2) che di alcune lipoossigenasi (LIPOX), ovvero degli enzimi coinvolti nel metabolismo ossidativo dell'acido arachidonico (Kozak K. R. et al., 2004). La COX-2 converte l'AEA, in prostaglandinaendoperossido- etanolammide, un intermedio metabolico, che a sua volta viene convertito in prostaglandina-etanolammide (prostammide) (Kozak K. R. et al., 2002). Le LIPOX 12 e 15 convertono l'AEA rispettivamente in 12-idrossitetranoiletanolammide (12-HAEA) e 15-idrossitetranoiletanolammide (15- HAEA), ma solo la 12-HAEA mostra affinità per i recettori cannabinici (Kozak K. R. et al., 2002). Il 2-AG invece è convertito in 15 idroperossieicosatetraenoicoglicerilestere (Moody J. S. et al., 2001).

Come detto in precedenza, gli endocannabinoidi riconoscono sulla superficie cellulare specifiche proteine di membrana, i recettori cannabinici. I due principali recettori, CB₁ e CB₂, appartengono alla super famiglia di recettori associati a proteine-G. Tutti i GPCRs possiedono il segmento N-terminale nella matrice extracellulare, sette domini ad alfa elica trans-membrana, tre "anse" extracellulari e tre citosoliche contenenti anche la porzione C-terminale. Nel caso di CB₁ e CB₂ gli agonisti interagiscono con il recettore all'interno del dominio transmembrana.

CB₁ è localizzato principalmente nei neuroni centrali, in quelli periferici e nelle cellule gliali; è espresso inoltre anche nel sistema riproduttivo e nella microcircolazione. La presenza del CB₂ è stata rilevata negli organi linfoidi multipli, soprattutto nei linfociti B ma anche nei monociti, nei

neutrofili polimorfonucleati, nei linfociti T e nelle cellule della microglia (Munro S. et al., 1993; Piomelli D. 2003).

Studi farmacologici hanno rivelato l'esistenza di altri bersagli degli endocannabinoidi, il recettore vanilloide, che però è in grado di legare solo l'AEA, e almeno due recettori non CB₁/CB₂.

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

Recentemente è stato riportato che GPR55, un recettore accoppiato a proteine G il cui ligando non è ancora stato identificato, potrebbe essere un nuovo recettore dei cannabinoidi (Brown A. J. et al., 2005 ; Sjøgren A. et al., 2005) ma questa scoperta necessita di ulteriori conferme.

Entrambi i recettori tipici degli endocannabinoidi, CB₁ e CB₂, sono accoppiati a proteine G del tipo Gi/o, essendo in grado di inibire l'adenilato ciclasi e di attivare le proteine chinasi mitogeno-attivate (MAPK) (Pertwee R. G. 2002). L'attivazione dei CB₁ è in grado anche di inibire i canali del Ca⁺⁺ voltaggio dipendente, sia di tipo N/Q (Mackie K. et al., 1992) che di tipo L (Gebremedhin D. et al., 1999), mentre ha effetto opposto sui canali del potassio di tipo A e del tipo *inwardly rectifying* (Mackie K. et al., 1995). L'attivazione del CB₁ può inoltre stimolare direttamente il rilascio di ossido nitrico (NO) (Stefano G. B. et al., 2000).

In alcuni casi, l'attivazione del CB₁ stimola la fosfolipasi C, indicando quindi un suo accoppiamento con proteine del tipo Gq o Gs (Howlett A. C. 2004).

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

Nel sistema nervoso centrale i loro recettori sono localizzati principalmente nelle sinapsi GABAergiche e glutamminergiche; la conservazione in questi siti nel corso dell'evoluzione, suggerisce un ruolo chiave degli endocannabinoidi nella trasmissione sinaptica. Il principale effetto della stimolazione del recettore degli endocannabinoidi è una locale iperpolarizzazione dovuta all'inibizione sia dell'adenilato ciclasi che dell'ingresso del Ca⁺⁺ entro la cellula. Gli endocannabinoidi nel sistema nervoso centrale influenzano così molti processi quali la comunicazione cellulare, il controllo del movimento e della percezione, le funzioni cognitive, i processi di apprendimento, e gli stati emotivi (Di Marzo V. et al., 1998). Gli effetti cellulari degli endocannabinoidi hanno quindi un profondo impatto sui principali sistemi fisiologici che controllano le funzioni del corpo: sono in grado di regolare anche la nocicezione (sono potenti analgesici), i processi visivi nella retina e lo stimolo della fame. Nel sistema nervoso centrale sono responsabili di un fenomeno noto con il nome DSI (Depolarization-Induced Suppression of Inhibition). Si tratta di una "segnalazione retrograda" in cui gli endocannabinoidi passano dalla

cellula post-sinaptica a quella pre-sinaptica: i neurotrasmettitori depolarizzano la terminazione post-sinaptica con conseguente apertura dei canali del Ca^{++} a voltaggio dipendente; il Ca^{++} induce il rilascio degli endocannabinoidi che vanno ad agire sui recettori CB_1 presenti nella terminazione presinaptica e inibisce il rilascio di GABA (neurotrasmettitore inibitorio del cervello), favorendo così l'azione eccitatoria del glutammato (Rodríguez de Fonseca F et al., 2005).

Nei tessuti periferici gli endocannabinoidi agiscono invece controllando la secrezione di citochine e fattori di crescita in diversi tipi cellulari, quali leucociti e cellule spleniche. Nel sistema cardiovascolare vengono secreti da cellule endoteliali, piastrine, linfociti e macrofagi ed agiscono prevalentemente come vasodilatatori, riducendo il flusso e la pressione sanguigna (Kunos G. et al., 2000).

Altri effetti dimostrati sono la migrazione delle cellule natural killer (Kishimoto S. et al., 2005), la regolazione delle funzioni macrofagiche e l'attivazione piastrinica (Braud S. et al., 2000).

Studi più recenti stanno approfondendo un possibile coinvolgimento del sistema endocannabinoidale nel controllo della proliferazione di cellule tumorali: gli endocannabinoidi, oltre ad essere in grado di ridurre l'angiogenesi, favoriscono l'accumulo di lipidi nelle cellule tumorali promuovendone così l'apoptosi (De Petrocellis L. et al., 1998).

2. SCOPO DEL LAVORO

Benchè l'attività farmacologica *in vivo* ed *in vitro* degli endocannabinoidi sia stata oggetto, negli ultimi anni, di numerosissimi studi, solo in pochi casi si è potuto mettere in relazione la sintesi di tali composti nei tessuti con l'intervento di particolari situazioni fisiopatologiche. Sembra ormai chiaro, comunque, che l'anandamide venga prodotta quando la cellula subisce danni più o meno gravi, prodotti ad esempio, da un'eccessiva concentrazione intracellulare di calcio o durante stati ipotensivi seguenti a shock emorragico e endotossinico (Hansen H. et al., 1998). Questi dati, insieme alle osservazioni farmacologiche che hanno rilevato per tali metaboliti un comportamento analogo a quello dei preparati della Cannabis, sembrano suggerire che gli endocannabinoidi vengano prodotti per proteggere l'organismo da danni causati da varie situazioni patologiche, esercitando azione anti-ossidativa, ipotensiva, immunosoppressiva, antiinfiammatoria e, in particolare, antidolorifica (Calignano A. et al., 1998).

Tra i diversi tipi cellulari in grado di produrre endocannabinoidi, la nostra attenzione si è rivolta alla relazione esistente tra 2-AG e piastrine. Già nel 1983 Prescott e Majerus (Prescott S. M. 1983) hanno descritto un'attività diacilglicerolo lipasica nelle piastrine umane con conseguente accumulo di monoacilgliceroli, e soprattutto di 2-AG. Tuttavia, quest'attività e l'accumulo di 2-AG si registravano solo nelle piastrine stimulate con trombina.

In seguito all'esposizione ad agenti patogeni o allergeni le piastrine vanno incontro a chemotassi, esprimono molecole di adesione, rilasciano una gran quantità di mediatori proinfiammatori, enzimi e proteine che favoriscono l'attivazione di cellule coinvolte nella risposta immunitaria e nell'infiammazione (Steinhubl S. R. 2007). Stati fisiopatologici di questo tipo modulano anche le concentrazioni locali di endocannabinoidi: la velocità di sintesi e liberazione di 2-AG da parte delle piastrine, per esempio, può essere notevolmente incrementata dalla presenza del fattore attivante le piastrine (una proteina cationica rilasciata dalle piastrine quando vengono a contatto con un agente patogeno o un allergene) (Berdyshev E. V. et al., 2001), da stimoli infiammatori di varia natura (come i lipopoliosaccaridi delle membrane batteriche) o semplicemente da concentrazioni fisiologiche dello stesso 2-AG (Maccarrone M. et al., 2001; Berdyshev E. V. et al., 2001; Maccarrone M. et al., 2002; Maccarrone M. et al., 2003).

L'obiettivo del mio progetto di dottorato è quello di chiarire gli effetti del 2-AG sulla funzionalità piastrinica e definire i meccanismi attraverso i quali esso agisce. Lo scorso anno avevo dimostrato che il 2-AG si comporta come un forte agonista piastrinico già alla concentrazione di 10 μ M. Questa azione risultava essere mediata dal recettore CB₂ ma completamente dipendente dal trombossano A₂.

In questo terzo anno ho cercato di meglio caratterizzare gli eventi innescati dal 2-AG nelle piastrine umane andando ad analizzare ulteriori fenomeni che si realizzano nelle piastrine attivate.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Preparazione delle piastrine mediante gel-filtrazione

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

3.2. Analisi dell'aggregazione piastrinica

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

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

I singoli campioni sono stati allestiti in apposite cuvette siliconate e posti nel lumiaggregometro a 37°C sotto costante agitazione magnetica contro tampone. Sulla base delle prove da eseguire, le piastrine vengono preincubate con opportuni agonisti. L'aggregazione piastrinica viene

monitorata su un registratore a carta Chrono-Log Corporation. La percentuale di aggregazione piastrinica viene misurata 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista.

3.3. Analisi della secrezione piastrinica

La secrezione piastrinica viene valutata misurando il rilascio di ATP contenuto nei granuli piastrinici. In questo caso si sfrutta la capacità dell'aggregometro, di misurare la luce emessa da un campione in seguito a reazioni di chemiluminescenza (lumiaggregometro).

I campioni di piastrine gel-filtrate e portate alla concentrazione di 3×10^8 cellule/ml, vengono analizzati all'aggregometro e, quando si osserva una aggregazione stabile, vengono aggiunti del sistema luciferina-luciferasi: in presenza di ATP (secreto durante l'aggregazione), Mg^{++} e O_2 , la D-luciferina viene ossidata in luciferina, con contemporanea emissione di luce che viene registrata graficamente. Tanto maggiore è l'ATP rilasciato dai granuli densi, tanto maggiore sarà l'emissione di luce.

Per quantificare l'ATP secreto, è necessario eseguire un test su un campione aggiunto di una quantità nota di ATP standard. I risultati sono normalmente espressi come nanomoli di ATP rilasciate, che vengono calcati con la seguente formula:

(luminosità del test/guadagno del test) x (guadagno dello standard/luminosità dello standard) x quantità dello standard.

3.4. Quantificazione del trombossano A_2

Il trombossano A_2 (TxA_2) è molto instabile, viene infatti rapidamente trasformato in trombossano B_2 (TxB_2); per questo motivo la misurazione è stata eseguita utilizzando un apposito kit (Thromboxane B_2 Biotrak Assay - Amersham), che misura la concentrazione del TxB_2 da cui si ricava, indirettamente, quella del suo analogo instabile. Le piastrine vengono preparate mediante gel-filtrazione e portate alla concentrazione di 2×10^8 cellule/mL con Tyrode pH 7.4. La stimolazione dei campioni viene eseguita a $37^\circ C$, con o senza il 2-AG, in presenza o assenza degli altri reagenti, e bloccata con rapido congelamento del campione in ghiaccio secco/etanolo. Dopo aver sciolto i campioni a temperatura ambiente, il TxB_2 viene misurato seguendo le istruzioni della azienda produttrice.

3.5. Misura della concentrazione citoplasmatica di calcio

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

La misura del calcio citosolico è stata effettuata su campioni piastrinici contenenti 2x10⁸ cellule/ml. Ciascun campione è stato preriscaldato, sotto leggera agitazione, in uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS3 in presenza di 1mM CaCl₂.

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

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

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

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

F_{max} = fluorescenza registrata dopo lisi delle cellule con 0.1% di Triton X-100 in presenza di 1mM CaCl₂.

F = fluorescenza emessa dalle cellule in relazione alla quantità di Ca²⁺ citoplasmatico presente nelle cellule quiescenti ed attivate dopo la stimolazione.

3.6. Preparazione di lisati cellulari totali

Le piastrine ottenute come descritto precedentemente, sono state suddivise in campioni di volume variabile a seconda dell'esperimento. I campioni sono stati trattati con le stabilite concentrazioni di 2-AG per tempi diversi come specificato nella sezione "Risultati". Le reazioni sono state bloccate mediante l'aggiunta di SDS-sample buffer (6% SDS, 1.5% DTT, 30% glicerolo, β -mercaptoetanololo, 0.03% blu di bromofenolo) addizionato di sodio pirofosfato

40mM, sodio fluoruro 20mM, Na_3VO_4 2mM, glicerolo fosfato 6 mM, EGTA 1 mM e mix di inibitori di proteasi 1:50. Ogni campione viene scaldato a 95°C per 5 minuti e successivamente separato su gel lineare di poliacrilamide, trasferito su membrana di polivinildene di fluoruro (PVDF) ed analizzato mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici.

4. RISULTATI

4.1. Dose-risposta dell'aggregazione piastrinica indotta dal 2-AG

Lo scorso anno ho dimostrato che il 2-AG si comporta come forte agonista piastrinico in quanto in grado di indurre un'aggregazione irreversibile nelle piastrine lavate. Questo effetto è stato osservato stimolando le cellule fino ad un minimo di 10 μM 2-AG.

Per avere un quadro più completo degli effetti di questo endocannabinoide sull'aggregazione delle piastrine, ho utilizzato concentrazioni diverse di 2-AG, inferiori alla concentrazione già massimale di 10 μM .

Le piastrine sono state preparate mediante gel-filtrazione ed i campioni da 400 μl contenenti 3×10^8 cellule/ml sono stati allestiti in apposite cuvette siliconate e posti nel lumiaggregometro a 37°C sotto costante agitazione. I singoli campioni sono stati stimolati con le opportune concentrazioni di 2-AG e l'aggregazione è stata seguita per 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista.

Come si osserva dalla figura 1, le piastrine stimolate con 2-AG danno un'aggregazione che dipende dalla concentrazione di agonista utilizzata. In particolare, anche 5 μM di 2-AG induce un'aggregazione piastrinica irreversibile, seppure di entità inferiore rispetto al 10 μM . Diminuendo la concentrazione di 2-AG, invece, osserviamo aggregazioni reversibili (2-AG 1 μM) ed anche una totale assenza di aggregazione (2-AG 0,5 μM).

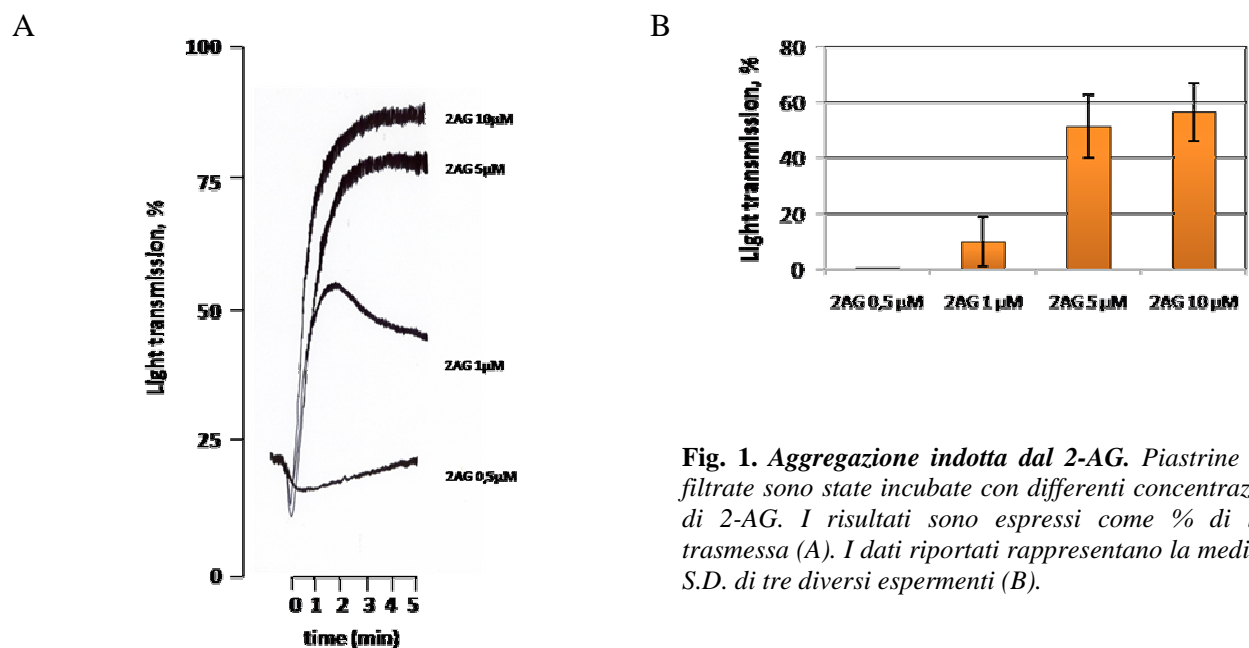


Fig. 1. Aggregazione indotta dal 2-AG. Piastrine gel-filtrate sono state incubate con differenti concentrazioni di 2-AG. I risultati sono espressi come % di luce trasmessa (A). I dati riportati rappresentano la media \pm S.D. di tre diversi esperimenti (B).

4.2. Secrezione indotta dal 2-AG

Un importante funzione piastrinica è il rilascio di sostanze che stimolano o inibiscono le piastrine stesse e altre cellule ematiche e vasali. Affinché possa esserci secrezione, è necessario avvenga una fusione tra la membrana dei granuli e la membrana plasmatica, e che ci sia una forza contrattile generata o dall'interazione dei filamenti di actina con le teste di miosina o dalla contrazione delle bande dei microtubuli dislocati lungo la circonferenza della cellula. Dal momento che il 2-AG induce un'aggregazione irreversibile, massima alla concentrazione di 10 μM , ho voluto verificare che, in quanto agonista forte, esso fosse in grado anche di indurre secrezione.

Le cellule sono state trattate come descritto nel capitolo "Materiali e Metodi". Come risulta dalla figura 2, la stimolazione delle piastrine con 2-AG 10 μM determina rilascio di ATP e quindi è in grado di indurre secrezione piastrinica. Come per l'aggregazione (vedi relazione 2° anno) anche questo fenomeno è mediato dai recettori CB ma dipende completamente dal trombossano e dall'ADP da esso prodotto. Infatti, il pretrattamento delle cellule con SR1 ed SR2 20 μM , antagonisti rispettivamente del CB₁ e del CB₂, riporta i valori di ATP ai livelli basali. La stessa cosa accade nei campioni di piastrine pretrattate con aspirina 100 μM , con l'antagonista del recettore del trombossano (SQ 5 μM) o con il sistema creatina fosfato 5mM/creatina fosfochinasi 40U/ml, che inattiva l'ADP secreto fosforilandolo.

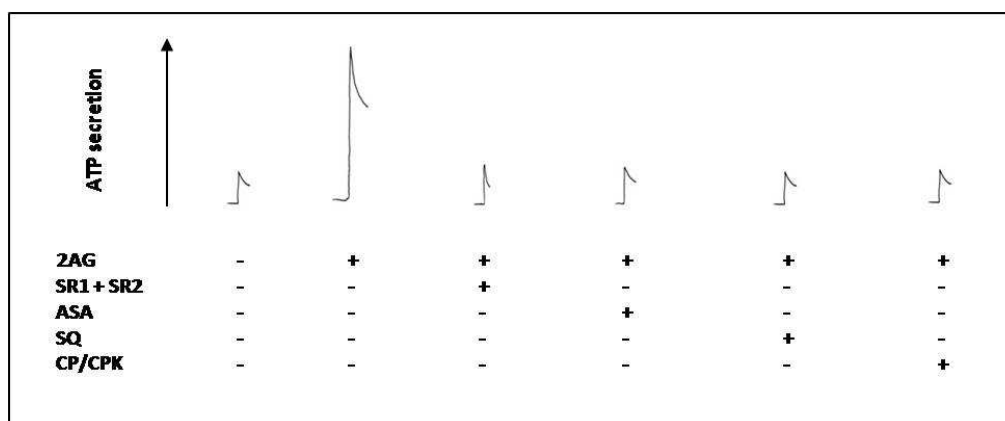


Fig. 2. Secrezione piastrinica indotta dal 2-AG. Piastrine gel-filtrate sono state stimolate con 2-AG 10 μM o pretrattate per cinque minuti con SR1/SR2 ognuno 20 μM , ASA 100 μM , SQ 5 μM o CP 5mM e CPK 40 U/mL. La secrezione è stata valutata misurando all'aggregometro il rilascio di ATP contenuto nei granuli piastrinici. Ciascun valore riportato è rappresentativo di almeno tre esperimenti.

4.3. Rilascio di Calcio intracellulare

Lo scorso anno avevo dimostrato che il 2-AG, alle concentrazioni di 50 e 25 μM , induce rilascio di calcio dai depositi intracellulari. Gli ioni calcio agiscono come secondi messaggeri ed influenzano l'attività enzimatica e le interazioni proteina-proteina. 10 μM 2-AG determinava invece solo una modesta mobilitazione di questo ione. La presenza di BSA nell'eluente delle piastrine mi ha fatto supporre, però, che il mediocre effetto osservato a basse concentrazioni potesse essere riconducibile ad una scarsa disponibilità di 2-AG. Infatti, l'albumina è in grado di legare l'anandamide (Bojesen I. N. and Hansen H. S. 2003) ed è quindi ipotizzabile che lo stessa cosa accada per il 2-AG.

Per dimostrare quest' ipotesi ho ripetuto gli esperimenti di rilascio di calcio con il 2-AG 10 μM in assenza di BSA. Come mostrato in figura 3, la stimolazione delle piastrine con questa concentrazione di 2-AG ha indotto un elevato aumento di calcio citosolico. L'azione del 2-AG è mediata dai suoi recettori di membrana e non richiede la presenza di ADP. Infatti, il pretrattamento delle cellule con l'apirasi, che inattiva l'ADP secreto a causa della sua attività fosfataseica, non ha nessuna influenza sui movimenti di calcio indotti dal 2-AG. Come per tutti i fenomeni precedentemente descritti, anche la mobilitazione di calcio 2-AG-dipendente necessita della produzione di trombossano A_2 , come dimostrato dal blocco totale degli effetti indotti sulla liberazione del calcio osservati nei campioni di piastrine pretrattate 30 minuti con 100 μM di aspirina.

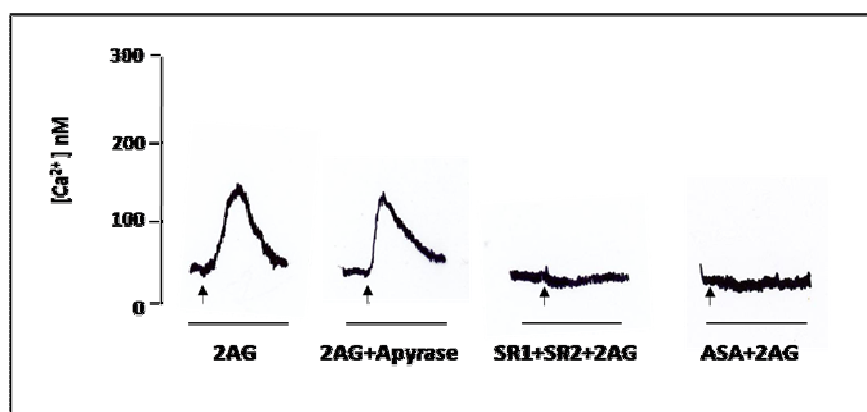


Fig. 4. Aumento della concentrazione di Ca^{2+} indotta dal 2-AG 10 μM . L'aumento della concentrazione citoplasmatica del calcio è stata misurata in uno spettrofluorimetro utilizzando piastrine preincubate con la sonda fluorescente Fura2-AM in presenza di 2mM EGTA. Le piastrine sono state stimolate con solo 2-AG o pretrattate, come indicato in figura, con apirasi 2U/ml, SR1/SR2 20 μM o ASA 100 μM .

4.4. Produzione di trombossano A₂ nelle piastrine stimulate con 2-AG

Un'aggregazione irreversibile, indotta da agonisti forti, si accompagna alla sintesi di trombossano A₂ e al rilascio di sostanze immagazzinate nei granuli piastrinici.

Il trombossano A₂, sintetizzato a partire dall'acido arachidonico, induce una serie di fenomeni quali il cambio di forma delle piastrine, l'aggregazione, la secrezione, l'idrolisi dei fosfoinositidi, la fosforilazione proteica e un incremento nella concentrazione citosolica degli ioni calcio. Una volta prodotto il TxA₂ diffonde attraverso la membrana plasmatica e attiva altre piastrine amplificando quindi, lo stimolo iniziale.

I dati fin'ora ottenuti suggeriscono che gli effetti indotti dal 2-AG nelle piastrine umane abbiano come diretto effettore il trombossano, piuttosto che il 2-AG, sebbene essi siano mediati dai recettori degli endocannabinoidi.

Viene immediato pensare che, nelle piastrine, la stimolazione con il 2-AG induca produzione di Trombossano A₂. Per dimostrare questo ho determinato la quantità di TxB₂ tramite un kit immunoenzimatico, come descritto nel capitolo "Materiali e metodi".

I risultati descritti nella figura 4 indicano che nelle piastrine stimulate per 5 minuti con 2-AG 10 μM si ottiene una significativa sintesi di trombossano che è conseguenza dell'attivazione dei recettori degli endocannabinoidi e non dipende dall'attivazione di quelli per il trombossano.

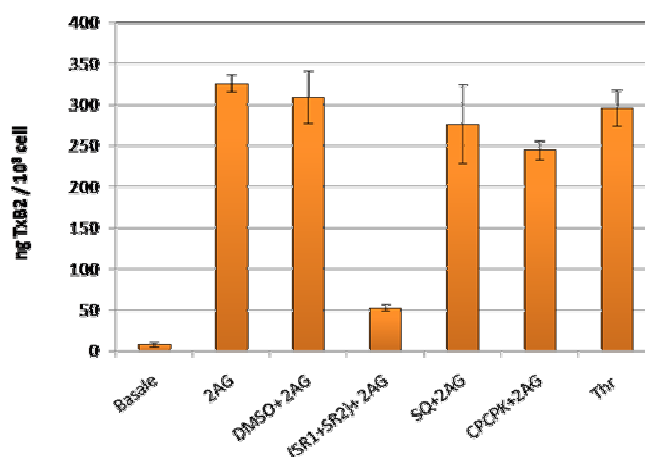


Fig. 5. Produzione di trombossano A₂ indotta dal 2-AG. Piastrine stimulate con 2-AG 10 μM, per 5 minuti, a 37° C, o pretrattate con vari inibitori come indicato in figura. Dopo aver bloccato la reazione con rapido congelamento dei campioni in ghiaccio secco/etanolo e averli successivamente sciolti a temperatura ambiente, il TxB₂ viene misurato con il kit dell'Amersham seguendo le istruzioni dell'azienda produttrice. I risultati sono espressi come la media ± S.D. di tre esperimenti.

4.5. Fosforilazione proteica indotta dal 2-AG

Il principale meccanismo di sintesi del TxA₂ consiste nella conversione, attraverso la via cicloossigenasica, dell'acido arachidonico. Questo viene principalmente liberato dai fosfolipidi di membrana per mezzo della fosfolipasi A₂ citosolica (cPLA₂). È stato dimostrato che la fosforilazione di questo enzima sul residuo di serina 505, e la sua traslocazione in membrana calcio-dipendente, sono fondamentali per la sua attivazione (Lin N. N. et al., 1992; Kramer R. M. et al., 1993; Qui Z. H. 1998; Borsh-Haubold A. G. et al., 1999; Lin N. N. et al., 1993; Channon J. Y. 1990).

Inoltre, Shankar et al. hanno dimostrato che nelle piastrine umane la protein-chinasi Src è a monte della fosforilazione della cPLA₂ ed è essenziale per la generazione di TxA₂ indotta dall'ADP (Shankar H. et al., 2006).

Visti questi dati ho deciso di valutare se il 2-AG fosse in grado di determinare la fosforilazione di molecole coinvolte nella sintesi di TxA₂. Inoltre, visto che la cPLA₂ risulta essere fosforilata in serina ho deciso di analizzare anche l'attivazione delle MAPKs ERK1/2, come già fatto lo scorso anno, e di p38.

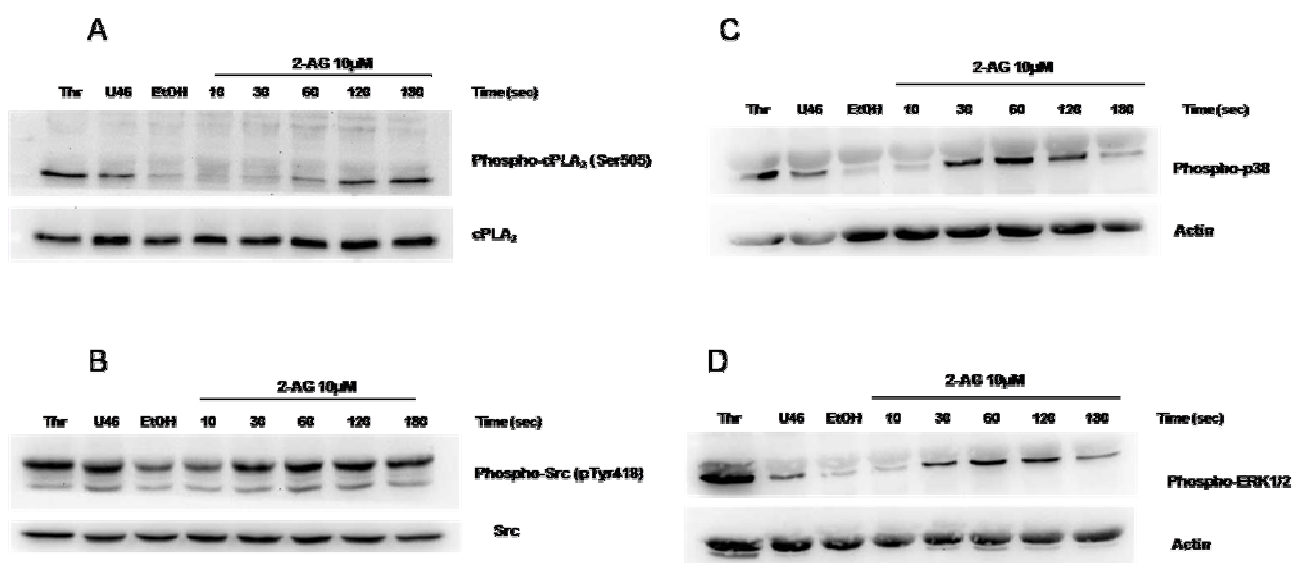


Fig. 6. Fosforilazione proteica indotta dal 2-AG. Campioni di piastrine gel-filtrate sono state stimolate con 2-AG 10 μM per i tempi indicati. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici.

A questo scopo, campioni contenenti 1×10^9 piastrine/ml sono stati stimolati a 37 °C con 2-AG 10 μ M per tempi crescenti da 10 secondi a 3 minuti. Come si evidenzia dalla figura 6, il 2-AG induce una fosforilazione della cPLA₂ che dipende dal tempo di trattamento con l'agonista. In particolare, la cPLA₂ raggiunge il massimo grado di fosforilazione dopo 2 minuti di stimolazione e rimane elevata anche dopo 3 minuti di incubazione con il 2-AG. Inoltre, è preceduta dall'attivazione sia delle ERK 1/2, che di p38 e Src.

Questi risultati ci dimostrano che il 2-AG è in grado di fosforilare l'enzima responsabile della sintesi del trombossano ed attivare molecole che potrebbero essere coinvolte nella sua attivazione.

5. DISCUSSIONE

Numerose evidenze dimostrano che le piastrine sono in grado, attraverso processi di sintesi, rilascio e degradazione, di regolare le concentrazioni locali di endocannabinoidi; possono infatti internalizzare mediante trasportatori specifici sia l'AEA che il 2-AG circolanti e degradarli (Maccarrone M. et al., 2001). Studi dimostrano esserci anche una correlazione tra endocannabinoidi, funzionalità piastrinica e stati infiammatori (Lindemann S. et al., 2007; Sugiura T. et al., 2004).

Le piastrine sono piccoli frammenti cellulari (2-3 μm di diametro), anucleati e discoidali, che nell'uomo circolano trasportate nel sangue ad una concentrazione di 250000-350000 cellule/ μl . Normalmente circolano nei vasi sanguigni come singole entità che non interagiscono tra loro né con altre cellule; la loro funzione primaria è quella di prevenire le emorragie in caso di danno alla parete vasale. Perché siano funzionali, è necessario che le piastrine siano stimulate da opportuni agonisti che interagiscono con caratteristici recettori presenti sulla membrana della piastrina per indurre i fenomeni di aggregazione e secrezione.

In questo contesto si inserisce il mio progetto di dottorato, nato con l'intento di chiarire l'influenza del 2-AG, il principale endocannabinoide prodotto a livello periferico, sulla funzionalità piastrinica.

Lo scorso anno avevo dimostrato che il 2-AG si comporta come un forte agonista piastrinico già alla concentrazione di 10 μM . Questa azione risultava essere mediata dai recettori CB ma completamente dipendente dal trombossano A_2 .

In questo terzo anno ho cercato di meglio caratterizzare gli eventi innescati dal 2-AG nelle piastrine umane andando ad analizzare ulteriori fenomeni che si realizzano nelle piastrine attivate.

Innanzitutto ho rilevato che il 2-AG induce un'aggregazione piastrinica anche a concentrazioni inferiori al 10 μM sebbene al di sotto del 5 μM si osservano aggregazioni reversibili o totale assenza di aggregazione.

La potenza del 2-AG quale induttore di aggregazione lascia supporre che diversi siano i fenomeni evocati dal 2-AG in grado di attivare le piastrine.

Gli agonisti piastrinici forti si caratterizzano per la loro capacità di indurre un aumento del Ca^{++} intracellulare e la secrezione dei granuli. Effettivamente, nelle piastrine stimulate con 2-AG ho osservato sia rilascio di ATP che mobilitazione del Ca^{++} dal sistema tubulare denso. Come per l'aggregazione anche questi fenomeni sono mediati dai recettori CB e completamente dipendenti dal trombossano.

I dati fin'ora ottenuti suggeriscono che gli effetti indotti dal 2-AG nelle piastrine umane abbiano come diretto effettore il trombossano, piuttosto che il 2-AG, sebbene essi siano mediati dai recettori degli endocannabinoidi. Ho quindi voluto verificare se, piastrine stimulate con 2-AG fossero in grado di produrre trombossano. Nei campioni di piastrine stimulate con 2-AG si è osservato un significativo aumento della produzione di trombossano che, a differenza di tutti gli altri fenomeni precedentemente descritti, dipende esclusivamente dall'attivazione dei recettori cannabici.

La conclusione è quindi che il 2-AG si comporta come forte agonista piastrinico in quanto capace di indurre produzione di trombossano A_2 sufficiente ad attivare le piastrine. Poiché il blocco dei recettori CB comporta una inibizione di tutti i fenomeni osservati, l'attivazione di questi recettori risulta essere indispensabile ai fini dell'attivazione piastrinica indotta dal 2-AG.

Negli esperimenti futuri ci proponiamo di verificare secondo quale meccanismo venga prodotto il trombossano.

Data la natura lipofila del 2-AG e visti i risultati ottenuti fin ora, probabilmente due sono i processi responsabili della produzione del trombossano. Da una parte il 2-AG potrebbe entrare nella cellula, essere degradato ad acido arachidonico (ad opera dell'enzima MAGL), ed attivare la via ciclossigenasica. Dall'altra i recettori CB, una volta attivati dal 2-AG, potrebbero attivare delle lipasi (come la $cPLA_2$) in grado di liberare acido arachidonico, poi convertito a trombossano.

Una prima dimostrazione di quest'ultima ipotesi è l'attivazione della $cPLA_2$ osservata in seguito alla stimolazione delle piastrine con il 2-AG. Questa attivazione risulta essere dipendente dal tempo di stimolazione con l'endocannabinoide ed è preceduta dalla fosforilazione di importanti proteine di segnalazione quali: Src, ERK1/2 e la MAP-chinasi p38. Quest'ultimo risultato è una ulteriore prova a sostegno dell'emergente ruolo del 2-AG nei fenomeni di attivazione piastrinica.

6. BIBLIOGRAFIA

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

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

Bisogno, T., Melck, D., De Petrocellis L., and Di Marzo, V. (1999) “Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells stimulated with ionomycin” *J.Neurochem.* 72: 2113-2119.

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

Bisogno, T., Melck, D., Bobrov, M. Y., Gretskaya, N. M., Bezuglov, V. V., De Petrocellis, L., Di Marzo, V. (2000) “N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo” *Biochem J.* 351: 817-24.

Bojesen, I. N., Hansen, H. S. “Binding of anandamide to bovine serum albumin” (2003) *J Lipid Res.* 44: 1790-1794.

Borsch-Haubold, A. G., Ghomashchi, F., Pasquet, S., et al. (1999) “Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in platelets is mediated by multiple stress-activated protein kinase pathways” *Eur J Biochem.* 265: 195-203.

Brauda, S., Bona, C., Touquib, L., Mounier, C. (2000) “Activation of rabbit blood platelets by anandamide through its cleavage into arachidonic acid” *FEBS Lett* 7: 12-16.

Brown, A. J., Ueno, S., Suen, K., Dowell, S. J., Wise, A. (2005) "Molecular identification of GPR55 as a third G protein-coupled receptor responsive to cannabinoid ligands" In: *2005 Symposium on the cannabinoids* p. 16.

Burkey, T. H., Quock, R. M., Consroe, P., Ehlert, F. J., Hosohata, Y., Roeske, W. R., Yamamura, H. I. (1997) "Relative efficacies of cannabinoid CB1 receptor agonists in the mouse brain" *Eur J Pharmacol.* 336(2-3):295-8.

Calignano, A., La Rana, G., Giuffrida, A., Piomelli, D. (1998) "Control of pain initiation by endogenous cannabinoids" *Nature.* 394: 277-281.

Channon, J. Y., Leslie, C. C. (1990) "A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl- hydrolyzing phospholipase A2 with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7" *J Biol Chem.* 265: 5409-5413.

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

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

De Petrocellis, L., Melck, D., Palmisano, A., Bisogno, T., Laezza, C., Bifulco, M., Di Marzo, V. (1998) "The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(14): 8375-80.

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

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

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

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

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

Glass, M., Northup, J. K. (1999) “Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors” *Mol Pharmacol.* 56(6): 1362-9.

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

Hansen, H. S., Lauritzen, L., Moesgaard, B., Strand, A. M., Hansen, H. H. (1998) “Formation of N-acyl-phosphatidylethanolamines and N-acetyethanolamines: proposed role in neurotoxicity” *Biochem. Pharmacol.* 15: 719-725.

Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., Kustanovich, I., Mechoulam, R. (2001) “2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(7): 3662-5.

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

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

Howlett, A. C. (2004) "Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction" *Brit. J Pharmacol.* 142: 1209-1218.

Kishimoto, S., Muramatsu, M., Gokoh, M., Oka, S., Waku, K., Sugiura, T. (2005) "Endogenous cannabinoid receptor ligand induces the migration of human natural killer cells" *J. Biochem.* 137 : 217-223.

Kondo, S., Kondo, H., Nakane, S., Kodaka, T., Tokumura, A., Waku, K., Sugiura, T., (1998) "2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA²⁺-dependent and -independent mechanisms" *FEBS Letters* 429: 152-156.

Kozak, K. R., Prusakiewicz, J. J., Marnett, L. J. (2004) "Oxidative metabolism of endocannabinoids by COX-2" *Curr Pharm Des.* 10(6): 659-67.

Kozak, K. R., Crews, B. C., Morrow, J. D., Wang, L. H., Ma, Y. H., Weinander R, Jakobsson, P. J., Marnett, L. J. (2002) "Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonoylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides" *J Biol Chem.* 277(47): 44877-85.

Kramer, R. M., Roberts, E. F., Manetta, J.V., Hyslop, P.A., Jakubowski, J. A. (1993) "Thrombin-induced phosphorylation and activation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 in human platelets" *J Biol Chem.* 268: 26796- 26804.

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

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

Lin, L. L., Lin, A. Y., Knopf, J. L. (1992) "Cytosolic phospholipase A2 is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 6147-6151.

Lin, L. L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A., Davis, R. J. (1993) “cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase” *Cell*. 72: 269-278.

Lindemann, S., Kramer, B., Seizer, P., Gawaz, M. (2007) “Platelets, inflammation and atherosclerosis” *J. Thromb. Haemost.* 5: 203-211.

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

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

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

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

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

Matsuda, L. A. (1997) “Molecular aspects of cannabinoid receptors” *Crit. Rev. Neurobiol.* 11: 143-166.

McFarland, M. J. and Barker, E. L. (2004) “Anandamide transporter” *Pharmacol Ther.* 104(2): 117-35.

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

Moody, J. S., Kozak, K. R., Ji, C., Marnett, L. J. (2001) "Selective oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylethanolamide by leukocyte-type 12-lipoxygenase" *Biochemistry*. 40(4): 861-6.

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

Pertwee, R. G., Ross, R. A. (2002) "Cannabinoid receptors and their ligands" *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 66(2-3): 101-21.

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

Piomelli, D., Beltramo, M., Glasnapp, S., Lin, S. Y., Goutopoulos, A., Xie, XQ and Makriyannis, A. (1999) "Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5802-5807.

Porter, A. C., Sauer, J. M., Knierman, M. D., Becker, G. W., Berna, M. J., Bao, J., Nomikos, G. G., Carter, P., Bymaster, F. P., Leese, A. B., Felder, C. C. (2002) "Characterization of a novel 138 endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor" *J Pharmacol Exp Ther*. 301(3): 1020-4.

Prescott S. M. and Majerus P. W. (1983) "Characterization of 1,2-Diacylglycerol Hydrolysis in Human Platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate" *Journal of Biological Chemistry* 258: 764–769.

Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Bermudez-Silva, F. J., Bilbao, A., Cippitelli, A., Navarro, M. (2005) "The endocannabinoid system: physiology and pharmacology" *Alcohol Alcohol* 40: 2-14.

Shankar, H., Kahner, B. N., Prabhakarm, J., Lakhani, P., Kim, S., Kunapuli, S. P. (2006) "G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels regulate ADP-induced cPLA2 activity in platelets through Src family kinases" *Blood* 108 (9): 3027-3034.

Sjögren, A., Ryberg, E., Lindblom, A., Larsson, N., Astrand, A., Hjorth, S., et al. (2005) "A new receptor for cannabinoid ligands" In: *2005 Symposium on the cannabinoids* Abstract p. 106.

Stefano, G. B., Bilfinger, T. V., Rialas, C. M., Deutsch, D. G. (2000) "2-arachidonyl-glycerol nitric oxide release from human immune and vascular tissues and invertebrate immunocytes by cannabinoid receptor 1" *Pharmacol Res.* 42(4): 317-22.

Steinhubl, S. R., (2007) "Platelets as mediators of inflammation" *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 21: 115-121.

Sugiura, T., Oka, S., Gokoh, M., Kishimoto, S., Waku, K. (2004) "New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: 2-arachidonoylglycerol as a possible novel mediator of inflammation" *J. Pharmacol Sci.* 96: 367-375.

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

Qiu, Z.H., Gijon, M. A., de Carvalho, M. S., Spencer, D. M., Leslie, C. C. (1998) "The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in regulating arachidonic acid release in macrophages" *J Biol Chem.* 273: 8203-8211.

7. ATTIVITA' FORMATIVA

Seminari seguiti durante il 3° anno di dottorato:

- 24-11-2006
"Vita, opere e miracoli dell'epatocita" – Prof. Marco Tripodi
- 29-11-2006
"Nuove frontiere dei biomateriali: applicazioni cliniche" – Prof. Rolando Barbucci
- 06-12-2006
"La prevenzione delle infezioni congenite da varicella e rosolia" – Dott.ssa Esther Mogni
- 10-01-2007
"Gene Silencing by RNA interference (RNAi)" – Prof.ssa Paola Defilippi
- 12-01-2007
"Autoantibodies in systemic sclerosis: from clinical subsets to pathogenic functions" – Prof. Carlo Chizzolini
- 17-01-2007
"Detection of miRNA target genes through statistical analysis of DNA motifs in human-mouse 3'-UTR regions" – Prof. Michele Caselle
- 25-01-2007
"Nuovi ruoli per le proteine adattatrici p130Cas e p140Cap nella trasformazione tumorale e nel carcinoma alla mammella" – Prof.ssa Paola Defilippi
- 01-02-2007
"Gene therapy strategies for phenylketonuria" – Prof. Beat Thony
- 15-02-2007
"The long hand of the small RNAs reaches into several levels of gene regulation" – Prof. Carlo Cogoni
- 22-02-2007
"Fragile X Syndrome from RNA metabolism impairment to spine dysmorphogenesis" – Prof.ssa Claudia Bagni
- 07-03-2007
"Casi clinici di riserva coronarica con doppler transtoracico" – Dott. Maurizio Galeri
- 09-03-2007
"Vita, Opere e Miracoli dell'Epatocita (Differenziamento, transizione epitelio-mesenchima, ed interazioni con cellule staminali)" – Prof. Marco Tripodi
- 14-03-2007
"Protein microarrays development of new supports for improved sensitivity" – Dott.ssa Marina Cretich

- 15-03-2007
"Le colangiopatie autoimmuni" – Prof. Mauro Podda
- 16-03-2007
"Microarrays di tessuti: una strategia per identificare nuovi biomarcatori tumorali" – Dott.ssa Maria Capra
- 29-03-2007
"Marcatori farmacogenomici nel Carcinoma Coloretale: Quali prospettive per una terapia personalizzata?" – Prof. Enrico Mini
- 12-04-2007
"Relazioni tra struttura e funzione delle proteine mediante analisi del protein data base" – Prof. Marco Milanesio
- 19-04-2007
"Pathogenic viruses: smart manipulators of the Interferon system" – Prof. Otto Haller
- 16-05-2007
"Difetti genetici del pre-B Cell Receptor" – Dott.ssa Simona Ferrari
- 25-05-2007
"The regulation of hematopoietic stem cells by smad signaling" – Prof. Stefan Karlsson
- 28-05-2007
"Translating basic science into therapeutic strategies for shwachman diamond syndrome" – Prof. Steven R. Ellis
- 29-05-2007
"Risk Assessment for Pesticides" – Prof. David Coggon
- 04-06-2007
"Sindromi autoinfiammatorie" – Prof. Alberto Martini
- 14-06-2007
"La genesi dei Gliomi e i suoi risvolti prognostici e terapeutici" – Prof. Davide Schiffer
- 21-06-2007
"Bioinformatics tools for the analysis of UTRs and for the prediction of alternative spliced transcripts" – Dott. Flavio Mignone

SEZIONE 2

CORSI FREQUENTATI:

- **1° anno:** “corso di statistica medica” - Prof. Magnani
- **2° anno:** “Corso d’inglese” - Colin Irving Bell
“Proteomics” 27-30 marzo 2006 – Bioindustry Park, Colletterto Giocosa (TO)
- **3° anno:** “Corso di radioprotezione” 12 giugno 2007 – Novara

CONGRESSI FREQUENTATI:

- **1° anno:** Convegno Annuale della Sezione Ligure-Lombarda-Piemontese della società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare – Novara, 20 maggio 2005.

18^a Riunione Nazionale “A. Castellani” dei Dottorandi di Ricerca in discipline Biochimiche- Brallo di Pregola (PV), 7-10 giugno 2005.

VIII Congresso Nazionale di Biotecnologie- Siena, 7-9 settembre 2005.
- **2° anno:** “Proteine 2006” – Novara, 1-3 giugno 2006

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

6^a Riunione del Gruppo di Studio Piastrine, Montefiascone 15-17 ottobre 2006
- **3° anno:** XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Ginevra 6-12 luglio 2007.

“Congresso Nazionale SIB 2007” – Riccione, 26-28 settembre 2007

COMUNICAZIONI A CONGRESSI :

A) Comunicazioni presentate personalmente:

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

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

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

6^a Riunione del Gruppo di Studio Piastrine, Montefiascone 15-17 ottobre 2006

“The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol regulates platelet function”

Baldassarri S., Bertoni A., Lova P., Reineri S., Sarasso C., Zanfa M., Sanna E., Maccarrone M., Torti M., Sinigaglia F. (Presentazione orale)

XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Ginevra 6-12 luglio 2007.

“Modulation of platelet function by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol”

S. Baldassarri, A. Bertoni, P. Lova, C. Sarasso, M. Zanfa, M. Catani, L. Avigliano, M. Maccarrone, M. Torti, F. Sinigaglia. (Poster)

Congresso Nazionale SIB 2007 – Riccione, 26-28 settembre 2007

“Regulation of platelet function by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol”

Baldassarri S., Bertoni A., Lova P., Sarasso C., Zanfa M., Catani MV., Avigliano L., Maccarrone M., Torti M., Sinigaglia F. (Poster)

B) Altre comunicazioni

XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Ginevra 6-12 luglio 2007.

“Dehydroepiandrosterone inhibits platelets aggregation”

C. Sarasso, **S. Baldassarri**, M. Zanfa, A. Bertoni, F. Sinigaglia. (Poster)

XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Ginevra 6-12 luglio 2007.

“Effect of 8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, on human platelets”

M. Zanfa, **S. Baldassarri**, C. Sarasso, G. Appendino, A. Bertoni, F. Sinigaglia. (Poster)

Congresso Nazionale SIB 2007 – Riccione, 26-28 settembre 2007

“Type-2 cannabinoid receptors and ERK signalling are involved in 2-arachidonoylglycerol-mediated induction of differentiation of haematopoietic progenitor cells”

L. Avigliano, M.V. Catani, F. Fezza, **S. Baldassarri**, V. Gasperi², A. Bertoni, A. Finazzi-Agrò, F. Sinigaglia, M. Maccarrone. (Poster)

**ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL
DOTTORATO:**

S. Reineri, A. Bertoni, E. Sanna, S. Baldassarri, C. Sarasso, M. Zanfa, I. Canobbio, M. Torti, F. Sinigaglia. “Membrane lipid rafts coordinate estrogen-dependent signaling in human platelets”. *Biochim Biophys Acta*. 2007, 1773:273-278.