

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare *Ciclo XX*

Relazione 4° anno

L'ENDOCANNABINOIDE 2-ARACHIDONOYLGLYCEROLO ATTIVA LE PIASTRINE UMANE ATTRAVERSO RECETTORI NON-CB₁/CB₂

Candidato: Baldassarri Samantha

Tutor: Prof. Fabiola Sinigaglia

SEZIONE 1
RISULTATI SCIENTIFICI

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
2. SCOPO DEL LAVORO.....	8
3. MATERIALI E METODI	9
3.1. Preparazione delle piastrine mediante gel-filtrazione	9
3.2. Analisi dell'aggregazione piastrinica.....	9
3.3. Quantificazione del trombossano A ₂	10
3.4. Immunoblotting.....	10
3.5. Estrazione dell'RNA, trascrizione inversa e PCR.....	10
4. RISULTATI.....	11
4.1. Generazione di TxA ₂ in piastrine stimulate con 2-AG.....	11
4.2. Contributo del metabolismo del 2-AG sull'attivazione piastrinica.....	12
4.3. Il 2-AG induce attivazione piastrinica attraverso recettori non-CB1/CB2	14
5. DISCUSSIONE.....	15
6. BIBLIOGRAFIA	17
7. ATTIVITA' FORMATIVA.....	23

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), ammido 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 cannabinici: il noladin (Hanus L. et al., 2001), la virodamina (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. E' 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). Entrambi questi enzimi liberano acido arachidonico sia dall'AEA che dal 2-AG.

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- idrossitetraanoiletanolammide (12-HAEA) e 15-idrossitetraanoiletanolammide (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 linfoidei 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).

In aggiunta a questi classici recettori cannabinici, studi eseguiti su topi privi dei recettori CB hanno rivelato l'esistenza di altri bersagli degli endocannabinoidi che sono stati collettivamente denominati recettori non CB₁/CB₂. Diversi ricercatori hanno ipotizzato la presenza di questi "nuovi" recettori sulle cellule cerebrali ed endoteliali (Brown A.J. 2007). Tuttavia, le proprietà molecolari ed il significato fisiologico di questi ipotetici recettori cannabinici non sono ancora state comprese.

Recentemente, due GPCRs, i cui ligandi non sono ancora stati identificati, sono stati proposti come recettori cannabinici non CB₁/CB₂ e cioè GPR55 e GPR119.

GPR55 è un recettore accoppiato a proteine G appartenente alla superfamiglia dei recettori purinergici. La prima associazione tra questo recettore e gli endocannabinoidi è stata proposta in un brevetto della GlaxoSmithKline che descriveva l'espressione, in cellule di lievito che mancano di GPCRs endogeni, di una proteina chimerica costituita dal GPR55 umano fuso ad un dominio di lievito. Cellule di lievito così ingegnerizzate erano in grado di rispondere a diversi cannabinoidi (Brown A. J. and Wise A. 2001). L'mRNA di GPR55 è espresso nel cervello e nella milza (Sawzdargo M. et al., *et al.*, 1997) ma l'esatta localizzazione della proteina necessita dello sviluppo di anticorpi adeguati e la loro validazione sui tessuti.

GPR119 è un recettore espresso prevalentemente nel pancreas e nel tratto gastrointestinale (Fredriksson et al., 2003). Esso sembra essere accoppiato a proteine del tipo Gs, essendo in grado di aumentare i livelli intracellulari di cAMP quando trasfettato in cellule di mammifero (Sakamoto Y. *et al.*, 2006). Come per il GPR55, anche in questo caso la scoperta che i cannabinoidi potessero essere i ligandi endogeni del GPR119 è nata da esperimenti condotti con cellule di lievito esprimenti una chimera contenente una porzione del GPR119. Queste cellule erano infatti in grado di rispondere agli endocannabinoidi (Overton H.A. *et al.*, 2006).

Data l'ampia distribuzione del 2-AG nel corpo di un organismo, esso ha un ruolo essenziale in numerosi processi fisiologici. Interviene ad esempio nella regolazione delle trasmissioni sinaptiche, nelle reazioni infiammatorie e nelle risposte immunitarie.

Molti tipi di cellule come ad esempio le cellule endoteliali e le piastrine, producono 2-AG quando stimulate (Sugiura T. *et al.*, 1998; Berdyshev E.V. *et al.*, 2001). Le piastrine umane, inoltre, sono particolarmente attive nel metabolizzare gli endocannabinoidi. Infatti, sia il FAAH che l'AMT sono presenti ed attivi nelle piastrine (Maccarrone M. et al., 2002; Maccarrone M. et al., 2001). Il 2-AG viene secreto dalle piastrine durante i processi di emostasi e trombosi e nel corso di malattie vascolari.

2. SCOPO DEL LAVORO

Tra i diversi tipi cellulari in grado di produrre endocannabinoidi, la nostra attenzione si è rivolta alla relazione esistente tra il 2-AG e le piastrine. Già nel 1983 Prescott e Majerus (Prescott S. M. 1983) hanno descritto un'attività diacilglicerico 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 ad allergeni le piastrine vanno incontro a chemiotassi, esprimono molecole di adesione, rilasciano una gran quantità di mediatori pro-infiammatori, 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).

Maccarrone et al. (Maccarrone M. *et al.*, 2001) hanno dimostrato che nel plasma ricco in piastrine elevate concentrazioni di 2-AG inducono un'aggregazione irreversibile. Le proteine del plasma, ed in particolare l'albumina, possono legare gli endocannabinoidi modificando le reali interazioni tra il 2-AG e le piastrine. Abbiamo quindi deciso di studiare il ruolo di questo endocannabinoido su piastrine gel-filtrate e quindi in assenza di plasma.

Ho già precedentemente dimostrato che il 2-AG induce un'aggregazione piastrinica che è dipendente dalla dose di agonista utilizzata ed è massima alla concentrazione di 10 μM . Inoltre, il 2-AG, come altri agonisti piastrinici, determina il rilascio dei granuli piastrinici e la liberazione di calcio dai depositi intracellulari. Tutti questi fenomeni sono dipendenti dal trombossano A_2 , forte agonista prodotto in seguito a stimolazione con altri attivatori piastrinici. Esperimenti preliminari hanno dimostrato che il 2-AG è in grado di generare una notevole quantità di trombossano A_2 ma il meccanismo attraverso il quale questo processo avviene resta ancora da chiarire.

Lo scopo della mia ricerca è stato quello di completare l'analisi dei fenomeni e dei meccanismi che sono alla base dell'attivazione piastrinica indotta dal 2-AG.

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

3.2. Analisi dell'aggregazione piastrinica

Per misurare l'aggregazione piastrinica si è utilizzato un aggregometro della Chrono Log Corporation, che mette in relazione l'assorbanza di un fascio luminoso da parte di una sospensione piastrinica con la percentuale di aggregazione. La fonte luminosa di tale strumento è costituita da una lampada a tungsteno e la luce viene fatta passare attraverso un monocromatore rosso. Un motore mantiene costante l'agitazione magnetica del campione a 1000 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. Quantificazione del trombossano A₂

Il trombossano A₂ (TxA₂) è molto instabile, viene infatti rapidamente trasformato in trombossano B₂ (TxB₂); per questo motivo la misurazione è stata eseguita utilizzando un apposito kit (Thromboxane B₂ Biotrak Assay - Amersham), che misura la concentrazione del TxB₂ da cui si ricava, indirettamente, quella del suo analogo instabile. Le piastrine vengono preparate mediante gel-filtrazione e portate alla concentrazione di 2x10⁸ cellule/mL con Tyrode pH 7.4. La stimolazione dei campioni viene eseguita a 37°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 TxB₂ viene misurato seguendo le istruzioni della azienda produttrice.

3.4. Immunoblotting

Membrane di piastrine gel-filtrate sono state ottenute tramite lisi con digitonina 0,05% in presenza degli inibitori delle proteasi, come descritto da Moro et al. (Moro L. et al., 2005). Il contenuto proteico dei campioni è stato quantificato mediante dosaggio con acido bicinconico (BCA) e dissociato con SDS-sample buffer (6% SDS, 1.5% DTT, 30% glicerolo, β-mercaptoetanol, 2M glicina, 0.03% blu di bromofenolo) Ogni campione viene scaldato a 95°C per 5 minuti e successivamente separato su gel lineare di poliacrilamide, trasferito su membrana di polivinilidene di fluoruro (PVDF) ed analizzato mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici per i recettori CB₁ e CB₂.

3.5. Estrazione dell'RNA, trascrizione inversa e PCR

Prima di procedere con l'estrazione dell'RNA i pellet di piastrine sono stati trattati secondo le indicazioni del CD45 MicroBeads Kit (Miltenyi Biotec) al fine di eliminare l'eventuale contaminazione da leucociti. L'RNA totale è stato estratto e retro-trascritto seguendo le indicazioni del RETROscript KIT e RNAqueous KIT, rispettivamente (Ambion). Il cDNA così ottenuto è stato amplificato con primers specifici per i recettori CB₁ e CB₂ umani (GENEBank accession numbers NM_016083 and NM_001841, rispettivamente). Le sequenze dei primers utilizzati sono CB₁-forward 5'-ACTTCCACGTGTTCCACCGC-3' e CB₁-reverse 5'-CGCAGTGCCTTCACAAGAGG-3'; CB₂-forward 5'-CATGGGATGGACTTGCTGTC-3' e CB₂-reverse 5'-CACACTTCTTCCAGTGAGCC-3'. L'amplificazione del cDNA del GAPDH è stata eseguita come controllo utilizzando i seguenti primers: GAPDH-forward 5'-TCCCTGAGCTGAACGGGAAG-3' and GAPDH-reverse 5'-GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT-3'.

4. RISULTATI

4.1. Generazione di TxA₂ in piastrine stimulate con 2-AG

In seguito alla stimolazione con agonisti forti le piastrine liberano acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana e lo convertono in TxA₂ attraverso l'azione della cicloossigenasi (COX) e trombassano sintetasi. Il TxA₂ prodotto recluta ed attiva altre piastrine amplificando, quindi, lo stimolo iniziale.

Abbiamo dimostrato che tutti i fenomeni mediati dal 2-AG, osservati fin'ora, richiedono la presenza del trombassano e l'attivazione del suo recettore. Siamo quindi andati a valutare se il 2-AG, *per se*, è in grado di indurre generazione di trombassano. I livelli di TxB₂ (metabolita stabile del TxA₂) sono stati misurati in lisati di piastrine incubate a 37°C con 10 µM 2-AG in presenza o assenza degli opportuni inibitori. Come mostrato in fig.1, il 2-AG, attraverso la via della COX, stimola la produzione di una elevata quantità di TxB₂ (159,28 ng vs 6,92 ng del basale). Infatti, il pretrattamento delle piastrine con aspirina (inibitore della COX) inibisce significativamente (85% di inibizione) la generazione di TxA₂ indotta dal 2-AG. Al contrario, il blocco del recettore del TxA₂, tramite SQ29,548 (antagonista del recettore del trombassano) e l'inattivazione dell'ADP secreto per mezzo del sistema creatina fosfato (CP) e creatina fosfochinasi (CPK) non hanno alcun effetto sulla produzione di TxA₂ dipendente dal 2-AG.

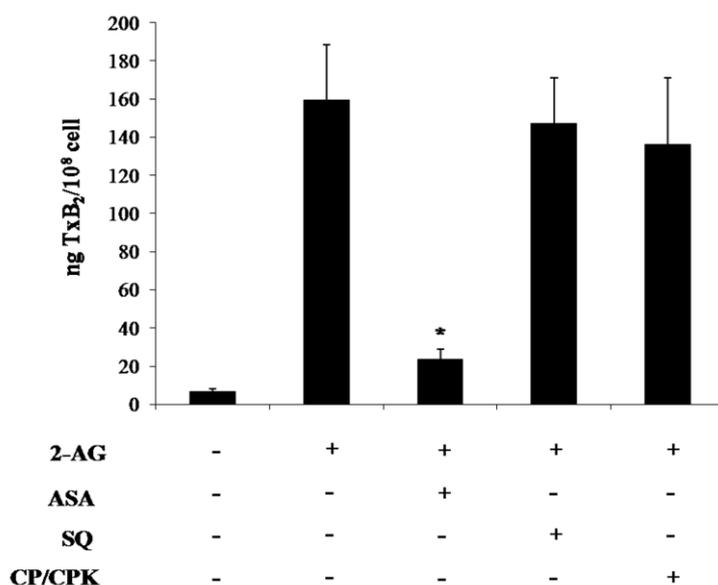


Fig. 1. Produzione di TxA₂ indotta dal 2-AG. Le piastrine sono state pretrattate, dove indicato, per 10 minuti con 5 µM SQ29,549 o 5 minuti con 5mM CP e 40 U/ml CPK prima della stimolazione con 2-AG 10 µM. Il trattamento con 100 µM ASA è stato effettuato per 30 minuti prima della stimolazione con la stessa dose di agonista. Dopo 5 minuti dall'aggiunta del 2-AG la reazione è stata bloccata tramite congelamento dei campioni in ghiaccio secco/etanolo. Dopo scongelamento a temperatura ambiente la quantità di TxB₂ prodotto è stata misurata con uno specifico Kit seguendo le indicazioni dell'azienda produttrice.

4.2. Contributo del metabolismo del 2-AG sull'attivazione piastrinica

Il 2-AG può essere metabolizzato ad acido arachidonico da due diversi enzimi, la monoacilglicerolo lipasi (MAGL) (Di Marzo V. *et al.*, 1999; Dinh T.P. *et al.* 2004) e l'idrolasi delle ammidi degli acidi grassi (FAAH) (Di Marzo V. *et al.*, 1998). L'acido arachidonico è un noto agonista piastrinico; infatti, esso diffonde passivamente attraverso la membrana plasmatica per poi essere rapidamente convertito in vari lipidi biologicamente attivi, in particolare TxA₂, forte agonista piastrinico. Allo scopo di valutare l'eventuale contributo del metabolismo del 2-AG sull'attivazione piastrinica da esso stimolata abbiamo utilizzato due inibitori degli enzimi responsabili della degradazione del 2-AG. In particolare il NAM e l'URB597, rispettivamente inibitore della MAGL e del FAAH.

Nelle piastrine pretrattate con NAM (140 nM-3 µM) e URB597 (1-40 µM), ne l'aggregazione (Tab.1) ne la produzione di TxB₂ indotte dal 2-AG (Fig. 2A) risentono dell'inibizione dei due enzimi. Inoltre, la sintesi di TxB₂ indotta da acido arachidonico 10 µM è inferiore a quella prodotta dalla stessa dose di 2-AG che invece genera una quantità di TxB₂ paragonabile a quella prodotta da 1U/ml di trombina. Le due reazioni, inoltre, hanno anche la stessa cinetica a differenza di quella indotta dall'acido arachidonico (Fig. 2B).

In accordo con i dati fin'ora ottenuti, l'acido arachidonico, anche quando utilizzato ad una concentrazione cinque volte superiore a quella del 2-AG, non induce un'aggregazione piastrinica della stessa intensità (Fig. 2C).

INHIBITORS	AGGREGATION %	p
None	100	—
NAM 140 nM	85,54 ± 11,38	0,746
NAM 1µM	84,51 ± 21,83	0,615
NAM 2µM	67,87 ± 21,14	0,247
NAM 3µM	64,16 ± 30,46	0,583
URB597 1 µM	95,48 ± 9,67	0,813
URB597 10 µM	91,88 ± 6,06	0,751
URB597 40 µM	94,45 ± 8,64	0,794
NAM 3 µM + URB 10 µM	102,34 ± 3,37	0,927

Tabella 1. Influenza degli inibitori della MAGL e FAAH sull'aggregazione piastrinica indotta dal 2-AG. Campioni di piastrine gel-filtrate sono state pretrattate 5 minuti con NAM e URB, alle dose indicate, e poi stimolate con 10 µM 2-AG. Aggregazione è stata monitorata per 5 minuti, a 37 °C, in condizioni di costante agitazione. I risultati sono espressi come % di aggregazione ± SEM rispetto all'aggregazione indotta dal 2-AG posta uguale a 100%. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

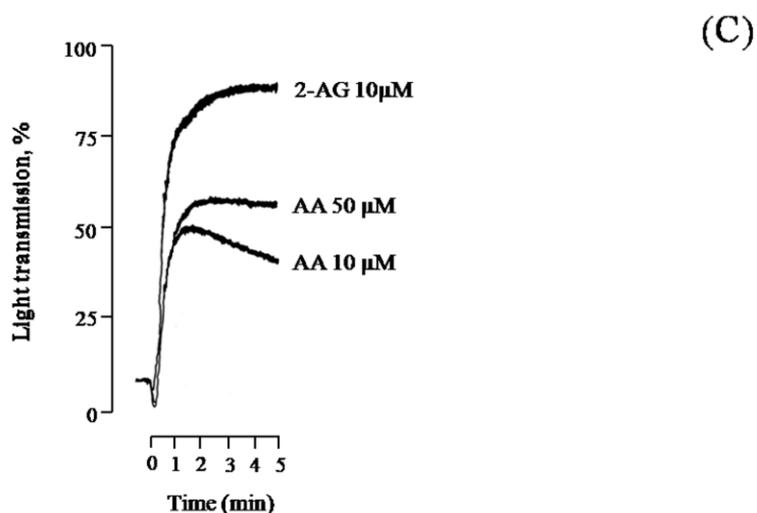
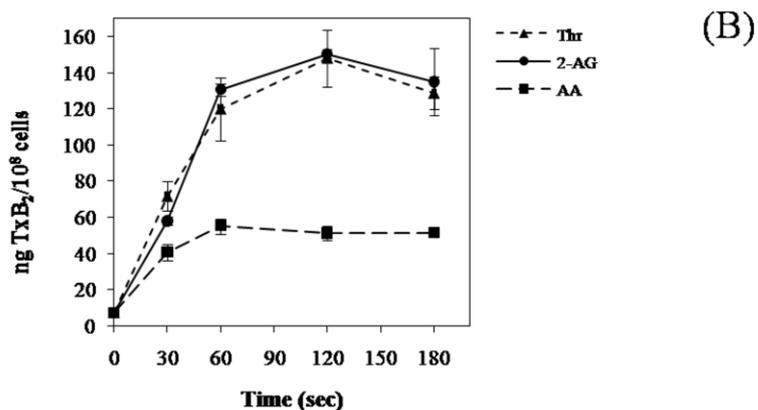
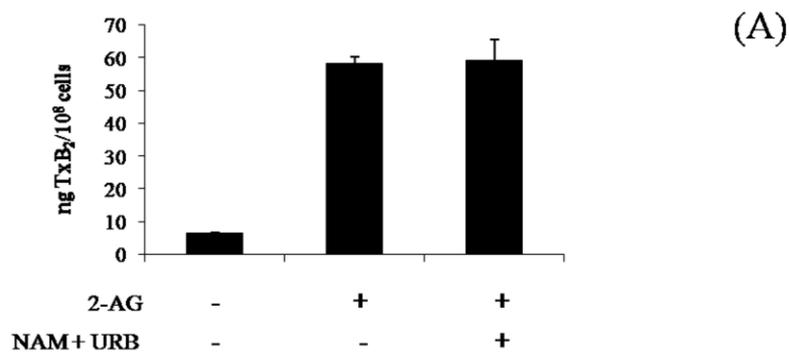


Fig. 2. Contributo del metabolismo del 2-AG sull'attivazione piastrinica. (A) Dosaggio del TXB₂ prodotto in piastrine pretrattate 5 minuti con 3 μM NAM e 10 μM URB597 e poi stimulate con 10 μM di 2-AG per 30 secondi a 37 °C. Dopo aver bloccato la reazione la quantità di TXB₂ prodotto è stata misurata seguendo le indicazioni dello specifico kit. I risultati rappresentano la media ± SEM di tre determinazioni indipendenti. (B) Misura del TXB₂ generato in piastrine stimulate con 10 μM di acido arachidonico (AA), 1U/ml di trombina (Thr) o 10 μM 2-AG. La reazione è stata bloccata ai tempi indicati. I valori rappresentano la media ± SEM di tre determinazioni indipendenti. (C) Misura dell'aggregazione in piastrine stimulate con 10 μM 2-AG o con differenti concentrazioni di acido arachidonico. I risultati sono espressi come aumento della luce trasmessa ed il tracciato è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti.

4.3. Il 2-AG induce attivazione piastrinica attraverso recettori non-CB₁/CB₂

E' stato dimostrato che le piastrine umane sono in grado di legare ed accumulare 2-AG (Maccarrone M. *et al.*, 2001). Gli endocannabinoidi agiscono attraverso l'attivazione di recettori accoppiati a proteine G, il CB₁ ed il CB₂.

Per analizzare il coinvolgimento di questi recettori sull'aggregazione piastrinica mediata dal 2-AG, abbiamo pre-incubato campioni di piastrine con gli antagonisti specifici del CB₁ e del CB₂, SR141716 e SR144528 (ciascuno 1 μ M) rispettivamente, e poi stimolato con 2-AG. Come mostrato in figura 3A, SR141716 e SR144528 non prevengono l'aggregazione piastrinica indotta da 10 μ M 2-AG.

Abbiamo rilevato che gli antagonisti dei recettori CB inibiscono l'aggregazione piastrinica 2-AG-dipendente solo a concentrazioni (20 μ M) superiori a quelle riportate essere specifiche per i CB (Begg M. *et al.*, 2005). Lo stesso risultato è stato ottenuto per il rilascio di ATP e la mobilitazione del calcio intracellulare (data not shown).

Inoltre, 50 nM ACEA, agonista selettivo per il CB₁, e 200 nM JWH015, agonista selettivo per il CB₂, non causano aggregazione piastrinica (Fig. 3A). In accordo con i dati fin'ora ottenuti, analisi di immunoblotting non hanno rilevato la presenza dei classici recettori cannabinici sulle membrane piastriniche (Fig. 3B). Inoltre, l'amplificazione e l'elettroforesi del cDNA sintetizzato dall'RNA isolato dalle piastrine umane non hanno rilevato la presenza di bande di dimensioni attese per i cDNA dei recettori CB₁ e CB₂ (Fig. 3C).

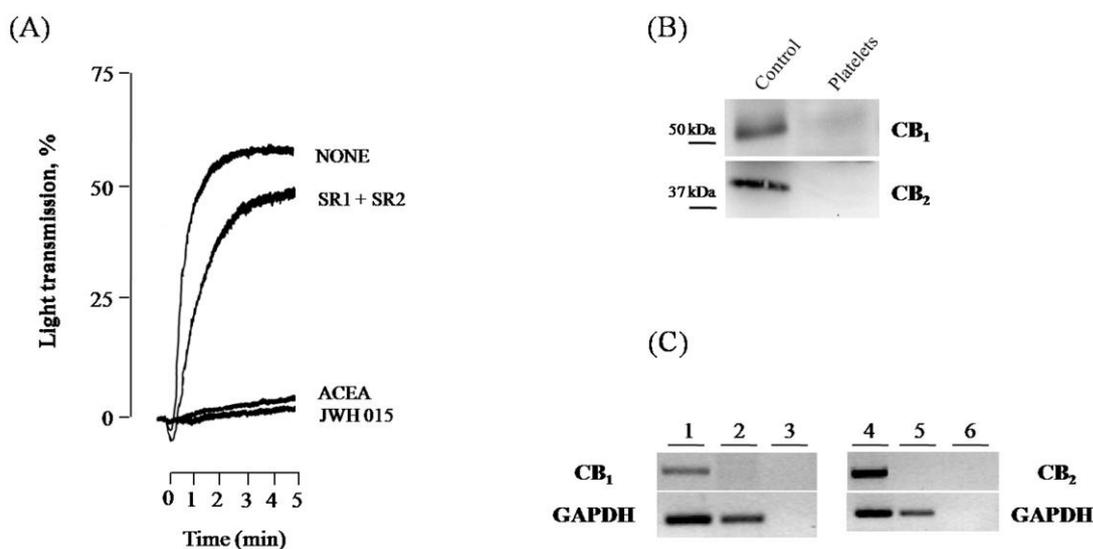


Fig. 3. Ruolo dei recettori cannabinici sull'aggregazione indotta dal 2-AG. (A) La misura dell'aggregazione è stata eseguita in un lumiaggregometro, a 37°C, in condizione di agitazione costante. Le piastrine sono state stimolate con 10 μ M 2-AG da solo o in presenza di 1 μ M SR141716 (SR1) o SR144528 (SR2). SR1 e SR2 sono stati aggiunti 5 minuti prima della stimolazione con 2AG. Le piastrine sono state stimolate anche con 50 nM ACEA e 200 nM JWH015. (B) Le frazioni ricche in membrane sono state preparate come descritto nella sezione "Materiali e Metodi" ed analizzate per immunoblotting con gli anticorpi anti-CB₁ e anti CB₂. I controlli positivi per i recettori CB₁ e CB₂ sono lisati totali di tessuto adiposo sottocutaneo e cellule Jurkat, rispettivamente. (C) Ampliconi dei recettori CB₁ e CB₂ (731 bp 435 bp, rispettivamente) ottenuti dopo l'amplificazione di cDNA preparato dall'RNA di tessuto adiposo sottocutaneo (lane 1), cellule Jurkat (lane 4) e piastrine (lanes 2 e 5). I risultati sono rappresentativi di almeno quattro esperimenti indipendenti.

5. DISCUSSIONE

Le informazioni disponibili riguardo al 2-AG sono, al momento, ancora scarse ed incomplete, anche nel caso del sistema nervoso e di quello immunitario. Inoltre, le funzioni fisiologiche del 2-AG in altri contesti quali ad esempio il sistema riproduttivo ed ematologico sono ancora da chiarire.

Con il lavoro svolto in questo anno di dottorato abbiamo compreso meglio l'influenza del 2-AG sulle piastrine umane. Avevo già dimostrato che il 2-AG si comporta da agonista piastrinico in grado cioè di indurre aggregazione, secrezione dei granuli e mobilitazione del calcio dai depositi intracellulare. Inoltre, tutte le risposte piastriniche indotte dal 2-AG richiedono la presenza del TxA_2 e l'attivazione del suo recettore. Infatti, il 2-AG determina un'elevata sintesi di TxA_2 , che a sua volta induce l'attivazione delle piastrine.

Come già detto nel capitolo precedente, il TxA_2 viene sintetizzato dall'acido arachidonico per mezzo di reazioni catalizzate dalla cicloossigenasi e trombassano sintasi. E' stato dimostrato che il 2-AG può essere internalizzato e metabolizzato ad acido arachidonico in differenti sistemi cellulari, compresi gli astrocitomi umani (Beltramo M. *et al.*, 2000) ed i macrofagi (Di Marzo V. *et al.*, 1999). Anche nelle piastrine il 2-AG potrebbe venir trasformato ad acido arachidonico e contribuire alla formazione di TxA_2 . Abbiamo però dimostrato che l'inibizione della MAGL e del FAAH non inibiscono l'aggregazione e la sintesi di TxA_2 indotte dal 2-AG. Inoltre, la cinetica della produzione di TxA_2 in piastrine stimolate con trombina e 2-AG sono sovrapponibili e differenti da quella osservata nelle piastrine stimolate con acido arachidonico. In aggiunta, l'acido arachidonico, anche ad elevate concentrazioni, non induce un'aggregazione piastrinica della stessa entità di quella indotta dal 2-AG.

Sebbene questi risultati non escludono la possibilità che i metaboliti del 2-AG, nello specifico l'acido arachidonico, partecipino all'attivazione piastrinica mediata dal 2-AG, essi suggeriscono l'esistenza di meccanismi di attivazione piastrinica differenti tra l'acido arachidonico ed il 2-AG.

In piastrine stimolate da agonisti forti l'acido arachidonico viene liberato dai fosfolipidi di membrana per mezzo della cPLA₂. L'attività della cPLA₂ è regolata da due principali fenomeni: la fosforilazione della serina 505 da parte del MAP chinasi ERK1/2 (Grosser T. *et al.*, 2007) e la traslocazione in membrana, calcio-dipendente (Six D.A. and Dennis E.A. 2003).

E' stato dimostrato che il delta 9-tetraidrocannabinolo (THC), il principale componente psicoattivo della *Cannabis Sativa*, e l'anandamide, fosforilano ed attivano la cPLA₂ (Chang M.C. *et al.*, 1991; Wartmann M. *et al.*, 1995). Inoltre, in letteratura è riportata anche l'attivazione delle MAP chinasi ERK1/2 in risposta al 2-AG (Kobayashi Y. *et al.*, 2001).

Nel nostro lavoro abbiamo dimostrato che il 2-AG aumenta i livelli di calcio intracellulare ma questo fenomeno dipende dal TxA_2 generato. Questo calcio non può quindi essere responsabile dell'attivazione della cPLA₂, eventualmente attivata dal 2-AG per produrre acido arachidonico e quindi TxA_2 . Comunque,

non si può escludere che il 2-AG determini un locale movimento di calcio attraverso la membrana plasmatica, non rilevato dallo strumento ma sufficiente per l'attivazione della cPLA₂. Infine, è anche possibile che il 2-AG attivi la cPLA₂ in maniera calcio-indipendente, come già suggerito per altri sistemi biologici (Six D.A. and Dennis E.A. 2003).

Maccarrone *et al.* (Maccarrone M. *et al.*, 2001) hanno mostrato che il 2-AG lega le piastrine con un meccanismo saturabile e temperatura dipendente. Questo implica l'esistenza di un recettore cannabico sulla superficie delle piastrine in grado di avviare una segnalazione cellulare che termina nella generazione di TxA₂. In effetti, la dose-dipendenza dell'aggregazione piastrinica indotta dal 2-AG supporta questa ipotesi. Al momento, due sono i recettori cannabici descritti, il CB₁ ed il CB₂. Abbiamo quindi stabilito di valutare il ruolo di questi recettori sull'attivazione piastrinica indotta dal 2-AG. Abbiamo visto che gli specifici antagonisti dei recettori CB bloccano i fenomeni indotti dal 2-AG solo ad elevate concentrazioni. Inoltre, agonisti sintetici per l'uno o l'altro recettore non sono in grado di indurre aggregazione piastrinica. Questi dati suggeriscono la mancanza dei classici recettori cannabici sulle piastrine umane. Infatti, analisi di immunoblotting e studi di espressione genica non hanno rilevato la presenza né dei recettori CB sulle membrane piastriniche né del loro RNA messaggero.

Questi risultati indicano che il 2-AG può essere considerato un nuovo agonista piastrinico fisiologico in grado di indurre attivazione ed aggregazione attraverso un ipotetico recettore cannabico "piastrino-tipico". E' stato già dimostrato che le piastrine esprimono un legame al canabinoide sintetico ³H-CP55940 consistente con l'espressione di un recettore ma non compatibile con i classici recettori CB (Maccarrone M. *et al.*, 2001). Inoltre, dati di letteratura riportano che diversi fenomeni indotti dagli endocannabinoidi non sono mediati dai recettori CB₁ e CB₂ (Brown A.J. 2007; Begg M. *et al.*, 2005). Questo può essere spiegato dall'esistenza di nuovi targets dei cannabinoidi che sono stati chiamati recettori non-CB₁/CB₂. Recentemente, due GPCRs, i cui ligandi non sono ancora stati identificati, sono stati proposti come recettori cannabici non CB₁/CB₂ e cioè GPR55 e GPR119.

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.

Begg, M., Pacher, P., Bãtkai, S., Osei-Hyiaman, D., Offertàler, L., Mo, F.M., Liu, J., Kunos, G. (2005) “Evidence for novel cannabinoid receptors” *Pharmacol Therapeut.* 106: 133-45.

Beltramo, M., Piomelli, D. (2000) “Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol” *Neuroreport* 11:1231–5.

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., Maccarone, M., De Petrocellis, L., Jarrachian, 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.

Brown, A. J. (2007) “Novel cannabinoid receptors” *Brit j Pharmacol.* 152: 567-75.

Brown A.J., Wise, A. (2001). Identification of modulators of GPR55 activity. Assignee: GlaxoSmithKline. Patent WO00186305.

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.

Chang, M.C., Berkery, D., Laychock, S.G, Schuel, H. (1991) "Reduction of the fertilizing capacity of sea urchin sperm by cannabinoids derived from marihuana. III. Activation of phospholipase A₂ in sperm homogenate by delta 9-tetrahydrocannabinol" *Biochem Pharmacol* 1991. 42: 899-904.

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.

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., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Melck, D., Orlando, P., Wagner, J.A. and George, K. (1999) "Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages" *Eur J Biochem.* 264: 258–67.

Di Marzo, V., Bisogno, T., Sugiura, T., Melck, D., De Petrocellis, L. (1998) "The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide" *Biochem J* 331: 15–9.

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.

Dinh, T.P., Kathuria, S., Piomelli, D. (2004) "RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol" *Mol Pharmacol.* 66: 1260–4.

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.

Grosser, T., Fries, S. and FitzGerald, G.A. (2007) Thromboxane generation. In: Michelson AD ed. *Platelets*. London: Academic Press, 565-74.

Hanus, L., Abu-Lafi, S., Frider, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., Kustanovich, I., Mechoulam, R. (2001) "2-arachidonoyl 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.

Kobayashi, Y., Arai, S., Waku, K., Sugiura, T. (2001) "Activation by 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, of p42/44 mitogen-activated protein kinase in HL-60 cells" *J Biochem* 129: 665–9.

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., 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.

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-arachidonoylglycerol, which activates these cells through a cannabinoid receptor" *Eur. J. Biochem.* 268: 819-25.
- 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-arachidonoylglycerol by leukocyte-type 12-lipoxygenase" *Biochemistry.* 40(4): 861-6.
- Moro, L., Reineri, S., Piranda, D., Pietrapiana, D., Lova, P., Bertoni, A., Graziani, A., Defilippi, P., Canobbio, I., Torti, M., and Sinigaglia, F. (2005) "Nongenomic effects of 17 β -estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor β and Src kinase" *Blood* 105: 115-121.
- Munro, S., Thomas, K. L. and Abu-Shaar, M. (1993) "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids" *Nature* 365: 61–65.
- Overton, H.A., Babbs, A.J., Doel, S.M., Fyfe, M.C.T., Gardner, L.S., Griffin, G. *et al.* (2006). "Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents" *Cell Metab.* 3: 167–175.
- 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.

Sakamoto, Y., Inoue, H., Kawakami, S., Miyawaki, K., Miyamoto, T., Mizuta K et al. (2006) "Expression and distribution of Gpr119 in the pancreatic islets of mice and rats: predominant localization in pancreatic polypeptide-secreting PP-cells" *Biochem Biophys Res Commun* 351: 474–480.

Sawzdargo, M., George, S.R., Nguyen, T., Xu, S.J., Kolakowski, L.F. (1997) "A cluster of four novel human g protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to cd22 gene on chromosome 19q13.1." *Biochem Biophys Res Commun* 239: 543–547.

Six, D.A. and Dennis, E.A. (2003) "Essential Ca²⁺-independent role of the group IVA cytosolic phospholipase A₂ C2 domain for interfacial acitivity" *J Biol Chem* 278: 23842-850.

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., Kodaka, T., Nakane, S., Kishimoto, S., Kondo, S., Waku, K. (1998) "Detection of an endogenous cannabimimetic molecule, 2-arachidonoylglycerol, and cannabinoid CB1 receptor mRNA in human vascular cells: is 2-arachidonoylglycerol a possible vasomodulator?" *Biochem Biophys Res Commun.* 243: 838–43.

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.

Wartmann, M., Campbell, D., Subramanian, A., Burstein, S.H., Davis, R.J. (1995) "The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide" *FEBS Lett* 359: 133-36.

7. ATTIVITA' FORMATIVA

Seminari seguiti durante il 4° anno di dottorato:

- 20 dicembre 2007
"Human papillomavirus loads and its correlation with non-melanoma skin cancer" – Dott. Soenke Weissenborg
- 14 gennaio 2008
" Biologia molecolare e genetica in ambito forense: principali applicazioni e sviluppo delle nuove tecniche" - Tenente Dott. Giorgio Portera
- 21 gennaio 2008
"K⁺ channels in the heart: in and out of control" – Dott. Susanne Radicke
- 23 gennaio 2008
"Integrin trafficking and tumour cell invasiveness" – Dot. Jim Norman
- 24 gennaio 2008
"La Microscopia a Forza Atomica nella ricerca biomedica: dalle immagini alle interazioni" – Prof. Mario Raspanti
- 6 febbraio 2008
"Metodi e applicazioni delle nuove tecnologie di sequenziamento ultramassivo" – Dott. Gianluca DeBellis
- 7 febbraio 2008
"La proteina HMGB1 é un segnale di danno tissutale" – Prof. M. E. Bianchi
- 21 febbraio 2008
"New treatment strategies for multiple myeloma" – Prof. A. Palumbo
- 28 febbraio 2008
"Caratterizzazione molecolare della leucemia linfatica cronica" - Prof. Valter Gattei

- 5 marzo 2008
“Analytic vaccinology and human cytomegalovirus: human monoclonal antibodies as tools to identify novel antigens for protective vaccination” – Dott. Annalisa Macagno
- 6 marzo 2008
“Applications of gene expression profiling to cancer research” – Prof. Enzo Medico
- 7 marzo 2008
“Fatty liver preservation against ischemia-reperfusion injury” - Dott. Joan Rossello Catafau
- 13 marzo 2008
“Il sistema Ghrelin: aspetti endocrini e metabolici” – Prof. F. Broglio e C. Gauna
- 20 marzo 2008
“Immunologia della psoriasi” - Prof. Giampiero Girolomoni
- 3 aprile 2008
“Mutazioni del gene dell’insulina come causa di diabete neonatale/infantile: un nuovo esempio di malattia da misfolding” - Prof. Fabrizio Barbetti
- 9 aprile 2008
“Modificazioni del metabolismo del ferro nella risposta infiammatoria” - Prof. Gaetano Cairo
- 14 aprile 2008
“Interazioni tra tumore e sistema immunitario nella leucemia linfatica cronica: il ruolo della via metabolica del mevalonato” - Prof. Massimo Massaia
- 16 aprile 2008
“The herpesvirus DNA polymerases: a model for new antiviral drug discovery” - Prof. Giorgio Palù
- 17 aprile 2008
“Epidemiologia dell'infezione da HPV e del cancro della cervice uterina: un modello dinamico” - Dott. Iacopo Baussano
- 24 aprile 2008
“Ghrelin e pancreas endocrino” Prof. Riccarda Granata

- 15 maggio 2008
“The mechanisms of cell infection with hepatitis C virus- novel potential targets for therapeutic interventions” - Prof. Agata Budkowska
- 22 maggio 2008
"La ricerca farmacologica: dal laboratorio alla clinica" - Dott. Domenico Valle
- 23 maggio 2008
“Sistema degli Endocannabinoidi: nuovo target terapeutico per l'obesità e le sue complicanze cardio-metaboliche” - Prof. Uberto Pagotto
- 26 maggio 2008
“Copy number variations: non solo ritardo mentale” - Prof. Orsetta Zuffardi
- 5 giugno 2008
“Cap-Analysis Gene Expression (CAGE) Analysis of transcriptional complexity and regulation” - Dr. Piero Carninci
- 3 e 11 giugno 2008
“Il Trasferimento tecnologico dall'università all'impresa” - Fabrizio Conicella , Kevin Romani e Alberto Baldi
- 12 giugno 2008
“Mechanical Ventilation and Multiple Organ Failure” - Dr. Frans B. Plotz
- 13 giugno 2008
“Problem solving in patologia epatica” - Prof. Gavino Faà
- 26 giugno 2008
“Tecniche FISH nello studio dei linfomi non-Hodgkin” Dott.ssa Maria Grazia Tibiletti
- 30 giugno 2008
“From megakaryocytes to platelets regulation, environment and pathology” - Dott.ssa Alessandra Balduini
- 3 luglio 2008
“Recenti aspetti in tema di malattie uromodulina associate” - Prof. Scolari

- 1,2 e 16,18 luglio 2008
 - ✓ “Recombinant protein expression”
 - ✓ “Recombinant antibodies and other affinity reagents”
 - ✓ “Display technologies: phage yeast bacteria and ribosoma”
 - ✓ “Fluorescent proteins” - Dr. Andrew Bradbury

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
- **4° anno:** 9° Riunione del Gruppo di Studio Piastrine – S. Pellegrino Terme, 12-14 ottobre 2008

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)

9^a Riunione del Gruppo di Studio Piastrine, S. Pellegrino Terme 12-14 ottobre 2008

“The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol activates human platelets through non-CB₁/CB₂ receptors”

S. Baldassarri, A. Bertoni, A. Bagarotti, C. Sarasso, M. Zanfa, A. Rastoldo, C. Di Vito, M.V. Catani, L. Avigliano, M. Maccarrone, M. Torti, F. Sinigaglia (Presentazione orale)

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. Gasperi, A. Bertoni, A. Finazzi-Agrò, F. Sinigaglia, M. Maccarrone. (Poster)

Riunione SIB-LLP 2008, Milano 30 maggio 2008

"Dehydroepiandrosterone sulfate inhibits platelets aggregation"

Sarasso C., Rastoldo A., **Baldassarri S.**, Zanfa M., Bertoni A., Sinigaglia F.

CNBX, Perugia 17-19 settembre 2008

"Inhibition of platelet aggregation by the phytoestrogen 8-prenylnaringenin"

M. Zanfa, **S. Baldassarri**, C. Sarasso, A. Bagarotti, A. Rastoldo, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia

CNBX, Perugia 17-19 settembre 2008

"Different expression of estrogen receptors gpr30 and ER β isoforms in megakaryoblastic and erythroleukemia cell lines"

S. Bergante, A. Bagarotti, C. Di Vito, **S. Baldassarri**, A. Rastoldo, M. Zanfa, F. Sinigaglia and A. Bertoni

53° National meeting of Italian Society of Biochemistry and Molecular biology - Riccione, 23-26 settembre 2008

"Dehydroepiandrosterone inhibits platelet aggregation with a cGMP-dependent mechanism"

A. Rastoldo, C. Sarasso, **S. Baldassarri**, M. Zanfa, A. Bagarotti, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia

9^a Riunione del Gruppo di Studio Piastrine, S. Pellegrino Terme 12-14 ottobre 2008

"Study of the mechanisms of platelet inhibition induced by the phytoestrogen 8-PN"

M. Zanfa, **S. Baldassarri**, C. Sarasso, A. Bagarotti, A. Rastoldo, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia

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.
- **S. Baldassarri**, A. Bertoni, A. Bagarotti, C. Sarasso, M. Zanfa, M.V. Catani, L. Avigliano, M. Maccarrone, M. Torti, F. Sinigaglia. “The endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol activates human platelets through non-CB₁/CB₂ receptors”. *In press (Journal of Thrombosis and Haemostasis)*.
- M.V. Catani, F. Fezza, **S. Baldassarri**, V. Gasperi, A. Bertoni, N. Pasquariello, A. Finazzi-Agrò, F. Sinigaglia, L. Avigliano and M. Maccarrone. “Expression of the endocannabinoid system in the bi-potential HEL cell line: commitment to the megakaryoblastic lineage by 2-arachidonoylglycerol”. *In press (Journal of Molecular Medicine)*.