

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare *Ciclo XXIII*

Relazione 3° anno

Candidato: Di Vito Clara
Tutor: Prof. Fabiola Sinigaglia

INDICE

INTRODUZIONE.....	4
Le piastrine.....	4
I megacariociti.....	4
Morfologia e struttura delle piastrine	4
Attivazione ed aggregazione piastrinica	6
Il collagene	6
Segnalazione piastrinica	7
Attivazione piastrinica.....	7
Ruolo delle tirosin chinasi	9
Inibizione piastrinica.....	10
I flavonoidi.....	11
L'8-prenilnaringenina	12
SCOPO DEL LAVORO	13
METODI	14
Preparazione delle piastrine mediante gel-filtrazione	14
Analisi dell'aggregazione piastrinica	14
Analisi della fosforilazione proteica.....	14
Dosaggio del cGMP	15
Adesione delle piastrine al collagene	15
Analisi statistica	15
L'8-PN inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da collagene	16
Effetti dell'8-PN sul pathway NO/cGMP/PKG/VASP	18
Effetti dell'8-PN sulla fosforilazione proteica	22
Effetti dell'8-PN sull'adesione piastrinica.....	24
DISCUSSIONE	26
BIBLIOGRAFIA.....	29

CONGRESSI FREQUENTATI.....	42
COMUNICAZIONI A CONGRESSI.....	43
ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO	47
ALTRI ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI	47

SEZIONE 1
RISULTATI SCIENTIFICI

INTRODUZIONE

Le piastrine

Le piastrine sono piccoli elementi cellulari anucleati e discoidali che circolano nel sangue ad una concentrazione plasmatica di 3×10^8 cellule/ml (*Majerus, 1987*). Pur essendo le più piccole cellule del sangue, possiedono una complessità metabolica e funzionale simile a quella delle più grandi cellule sanguigne nucleate (*Crawford & Scrutton, 1994*). Esse ricoprono un ruolo essenziale nell'emostasi e nella formazione del coagulo, intervengono inoltre nei processi infiammatori e nella risposta immunitaria.

I megacariociti

Le piastrine originano dai megacariociti, cellule ematopoietiche mieloidi che costituiscono circa l'1% della popolazione cellulare residente nel midollo osseo (*Hartwig & Italiano, 2003*). I megacariociti maturi sono cellule con un diametro fino a 100 volte superiore rispetto alle altre cellule, caratterizzate da un nucleo grande, poliploide e multilobato ed un citoplasma ricco di granuli (*Tomer et al, 2004*). Quando la replicazione e la crescita cellulare si arrestano, si assiste alla produzione di granuli citoplasmatici e di estensioni citoplasmatiche, dette propiastrine. Tale evento *in vivo* culmina nel rilascio delle piastrine mature nel torrente circolatorio attraverso l'endotelio dei sinusoidi midollari (*Italiano et al, 2007*).

Morfologia e struttura delle piastrine

Le piastrine a riposo presentano una forma discoidale, prevalentemente liscia, interrotta da aperture simili a pori, che costituiscono un sistema interno di membrane e tubuli, il sistema canalicolare aperto. Esso determina il collegamento tra l'interno e l'esterno della cellula, consente il rilascio del contenuto dei granuli e rappresenta una riserva di proteine e recettori. La membrana piastrinica è inoltre avvolta da un complesso glicocalice a funzione prevalentemente recettoriale. Una sottile zona di citoplasma separa la membrana plasmatica dall'anello marginale di microtubuli, che delimita lo spazio più interno della cellula, dove il citoscheletro di actina avvolge i granuli, gli organelli, il sistema canalicolare aperto ed altri sistemi di membrane specializzati, come il reticolo endoteliale liscio (*Crawford, 1985*). Le piastrine a riposo presentano un citoscheletro ben definito che consente di mantenere la loro forma discoidale, permette la trasmissione di forze meccaniche alla membrana plasmatica quando la piastrina è attivata, determinando il caratteristico cambio di forma (*Fox et al, 1993*) e gioca un ruolo chiave durante i fenomeni di secrezione e di retrazione del

coagulo. Il citoscheletro è costituito dal membranoscheletro che contiene i filamenti di actina, di miosina e la tubulina. Il membranoscheletro è collocato al di sotto della membrana plasmatica ed è formato da una rete di tetrameri di spectrina che prendono contatto con i filamenti di actina e con le membrane del sistema canalicolare aperto. Una funzione importante esercitata dal membranoscheletro è quella di organizzare i recettori piastrinici sulla membrana in modo da aumentare l'efficienza di interazione dei recettori stessi e favorire la trasduzione del segnale all'interno della cellula. In seguito ad un danno vascolare, le piastrine si attivano, i filamenti di actina neoformati prendono contatto con quelli di miosina costituendo una struttura contrattile. Successivamente si assiste alla polimerizzazione dei monomeri di tubulina e al rafforzamento dell'anello di microtubuli già presente in modo da causare il fenomeno del rilascio di diversi mediatori, contenuti in granuli intracellulari (*White & Escolar, 1991*). Tali granuli sono: i granuli densi, gli α granuli e i lisosomi (*King et al, 2002*). I granuli densi presentano un diametro di circa 250 nm e contengono molecole che hanno la funzione di richiamare piastrine al sito del danno vascolare. Essi sono infatti siti di accumulo di serotonina, ATP e ADP. Sono presenti anche cationi bivalenti come calcio e magnesio che servono per la funzionalità delle integrine. Gli α granuli sono i più abbondanti granuli presenti nelle piastrine; sono caratterizzati da una dimensione variabile tra i 200 e i 500 nm e contengono proteine in grado di partecipare a processi adesivi e di stimolare il riparo del danno vascolare (fibrinogeno, fattore V, fattore di von Willebrand, trombospondina), numerosi fattori di crescita (PDGF (Platelet Derived Growth Factor) e TGF (Transforming Growth Factor)). Nelle piastrine sono inoltre presenti i lisosomi, che contengono numerosi enzimi di degradazione, glicosidasi e proteasi, utili per idrolizzare il materiale assorbito per pinocitosi o fagocitosi, granuli di glicogeno, che hanno la funzione di riserva energetica, ed il sistema tubulare denso (*Gerrard et al, 1978*). Quest'ultimo è ritenuto avere una funzione analoga a quella del sistema endoplasmatico liscio, infatti rappresenta il maggior deposito di calcio nelle piastrine. Un complesso sistema di pompe ioniche, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPasi, mantiene la concentrazione di calcio citoplasmatico nell'ordine del nanomolare in condizioni di riposo della cellula. Il sistema tubulare denso presenta inoltre i recettori per l'inositolo 1,4,5-trifosfato, che è in grado di indurre il rilascio di calcio, portando le sue concentrazioni plasmatiche fino a valori dell'ordine del micromolare. Il calcio viene poi accumulato nuovamente nel sistema tubulare denso o estruso all'esterno della cellula.

Attivazione ed aggregazione piastrinica

Le piastrine svolgono un ruolo essenziale nella fase iniziale della risposta emostatica. In seguito alla lesione di un vaso, il fattore di vonWillebrand circolante si lega al sottoendotelio e, insieme al collagene esposto, interagisce con le piastrine che vanno incontro ad un rapido cambio di forma, da discoidale a sferica, grazie al rimodellamento del citoscheletro di actina, emettono lunghi e sottili filopodi e si appiattiscono le une sulle altre a livello della lesione (*Majerus, 1987*). Le più importanti strutture sottoendoteliali a cui le piastrine possono aderire attraverso i propri specifici recettori sono le fibrille di collagene, il fibrinogeno, la fibronectina ed il fattore vonWillebrand (*Blockmans et al, 1995*). In condizioni di alto flusso ematico, il principale responsabile dell'adesione piastrinica è il fattore vonWillebrand immobilizzato nella matrice sottoendoteliale. Il legame del fattore vonWillebrand alle piastrine attraverso il complesso GPIIb-IX-V induce attivazione piastrinica, con conseguente attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e aggregazione. In seguito all'adesione delle piastrine su una superficie sottoendoteliale, si verifica il fenomeno dello spreading, in cui le cellule si appiattiscono, si rimodellano e conseguentemente si attivano. Contemporaneamente avviene il fenomeno della secrezione, attraverso il quale vengono rilasciate le molecole contenute nei granuli, che si fondono con la membrana plasmatica o con le membrane del sistema canalicolare aperto. Tale fenomeno consente di richiamare altre piastrine e neutrofilo al sito di danno e di formare il tappo piastrinico. In seguito si assiste al fenomeno dell'aggregazione che determina la formazione del trombo bianco a cui partecipano nella fase iniziale solo le piastrine (*Furie & Furie, 2007*).

Il collagene

L'evento principale responsabile dell'adesione e dell'aggregazione piastrinica è l'esposizione del collagene sottoendoteliale a livello del vaso danneggiato (*Ruggeri & Mendolicchio, 2007*). Tale processo è mediato da agonisti piastrinici e da diversi recettori di superficie come integrine, recettori IgG-like e recettori accoppiati a proteine G. In particolare una volta esposto il sottoendotelio, le piastrine rallentano la propria velocità interagendo tramite la GPIIb-V-IX con il fattore di vonWillebrand immobilizzato a livello del collagene sottoendoteliale. Tale interazione è rapidamente reversibile e insufficiente per creare un'adesione stabile (*Moroi et al, 1999*). Successivamente si assiste quindi all'attivazione delle integrine, recettori di superficie che mediano l'adesione delle piastrine. Esse sono eterodimeri costituiti da due subunità, α e β , legate in modo non covalente. Le integrine sono presenti nelle piastrine a riposo in una conformazione inattiva, che ha scarsa affinità per il proprio ligando naturale. Le integrine possono passare ad uno stato ad alta affinità grazie ad un inside-out signalling generato dall'interazione di diversi agonisti, come ADP,

trombina, collagene, con i propri recettori. Una volta attivata, l'integrina può interagire col proprio ligando per determinare una nuova segnalazione, l'outside-in signalling (*Shattil & Newman, 2004*). L'attivazione di tali integrine è mediata per lo più dal recettore per il collagene, GPVI. Tale glicoproteina ha un peso molecolare di circa 62 KDa ed è costituita da due domini IgG-like, una regione transmembrana ed una corta regione intracellulare, che si associano con l'FcR γ -chain formando un complesso dimerico. La segnalazione attraverso GPVI-FcR γ -chain porta all'attivazione di Src chinasi e di tirosin chinasi e di diversi effettori enzimatici come fosfolipasi C (PLC) γ 2, piccole proteine G e fosfatidilinositolo-3 chinasi (*Moroi & Jung, 2004*). Tali eventi sono scatenati dal legame specifico del GPVI a sequenze GPO (Gly-Pro-Hyp) del collagene polimerico e porta alla creazione di veri e propri clusters di GPVI sulla superficie piastrinica, che consentono una potente segnalazione intracellulare (*Knight et al, 1999*). Negli ultimi anni sono stati inoltre identificati diversi peptidi presenti nel veleno dei serpenti, come la convulxina, che esplicano la loro funzione legandosi specificatamente alla GPVI. Tali molecole naturali ed il peptide sintetico CRP (collagen-related peptide), che contiene 10 ripetizioni Gly-Pro-Hyp, rappresentano un importante strumento per lo studio dell'azione della GPVI (*Polgár et al, 1997*). Come precedentemente accennato, il ruolo principale di tale glicoproteina è quello di promuovere l'attivazione delle integrine ed in particolar modo dell' $\alpha_2\beta_1$, che medierà poi la vera e propria adesione al collagene a livello di sequenze GFOGER (Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg), in una maniera Mg²⁺-dipendente (*Nieswandt & Watson, 2003*). Il legame al peptide GFOGER induce inoltre spreading piastrinico attraverso il stesso pathway di segnalazione che coinvolge l'attivazione di Src e Syk chinasi e la fosforilazione in tirosina della PLC γ 2 (*Moroi & Jung, 2004*).

Segnalazione piastrinica

Attivazione piastrinica

Numerosi agonisti fisiologici determinano l'attivazione e la conseguente cascata di trasduzione del segnale che porta a cambiamenti biochimici, morfologici e funzionali nella piastrina, culminando in un'aggregazione irreversibile. Tali processi richiedono una precisa coordinazione di molteplici vie di segnalazione all'interno della cellula che coinvolgono il metabolismo dei fosfolipidi di membrana, la mobilitazione del Ca²⁺ intracellulare, la traslocazione di proteine al citoscheletro actinico, la modulazione dell'avidità delle integrine e la fosforilazione di specifiche proteine su residui di serina, treonina e tirosina (*Jackson et al, 1996*). L'attivazione o l'inibizione fisiologica della funzionalità piastrinica inizia quando una molecola segnale extracellulare interagisce con uno specifico recettore presente sulla membrana plasmatica. Nella segnalazione piastrinica un ruolo di

fondamentale importanza è giocato dalle proteine G eterotrimeriche, dalle fosfolipasi C e A₂ e dalla fosfatidilinositolo 3-chinasi.

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

La fosfolipasi C (PLC) è implicata nelle reazioni di secrezione delle piastrine. L'isoforma PLC β è attivata dai dimeri $\beta\gamma$ delle proteine G eterotrimeriche, mentre la PLC γ è attivata dalla fosforilazione delle sequenze ITAM da parte delle chinasi Syk, Src, Fyn. Le fosfolipasi catalizzano l'idrolisi del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP₂) in diacilglicerolo (DAG) ed inositolo-1,4,5-trisfosfato (IP₃). Il diacilglicerolo attiva la protein chinasi C, regolando in ultimo il riarrangiamento del citoscheletro piastrinico, mentre l'inositolo-1,4,5-trisfosfato induce il rilascio del calcio dal sistema tubulare denso, provocando rilascio dai granuli di ADP e serotonina che potenziano l'attivazione e reclutano altre piastrine (*Blockmans et al*, 1995). La fosfolipasi A₂ (PLA₂) è invece responsabile del rilascio di acido arachidonico. La fonte predominante di acido arachidonico rilasciato dopo l'attivazione piastrinica deriva dall'idrolisi mediata dalla fosfolipasi A₂ dei fosfolipidi del sistema tubulare denso e della membrana plasmatica. PLA₂ idrolizza preferenzialmente la fosfatidilcolina, ma anche la fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e, in minor misura, fosfatidilinositolo (*Kroll & Schafer*, 1989). L'acido arachidonico è poi convertito in trombossano A₂ ad opera di una ciclossigenasi. La PLA₂ è attivata da un aumento del calcio citosolico dovuto alla sintesi di IP₃ indotta da PLC, ma probabilmente anche attraverso l'azione diretta da parte dell'eterodimero $\beta\gamma$ della proteina G (*Blockmans et al*, 1995).

Le fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3-K) sono una famiglia di chinasi che fosforilano in posizione 3 il fosfatidilinositolo, il fosfatidilinositolo-4-fosfato, il fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato per dare fosfatidilinositolo-3-fosfato, fosfatidilinositolo-3,4-bisfosfato ed il fosfatidilinositolo-3,4,5-trisfosfato. Le piastrine contengono due isoforme della PI3-K costituite da una subunità adattatrice regolatoria (p85) che contiene due domini SH2 e un dominio SH3 e regola la localizzazione e la funzione della PI3-K e da una subunità catalitica (p110) (*Zhang et al*, 1998). Nelle piastrine, la sintesi dei 3-fosfoinositidi è regolata in maniera complessa, attraverso meccanismi che coinvolgono le proteine G, la PKC, il reclutamento dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e l'aggregazione. I fosfoinositidi sono prodotti in risposta a vari agonisti tra cui trombina, ADP, trombossano A_2 . Un importante effettore a valle di PI3-K è la proteina Akt che viene attivata attraverso la proteina PDK che lega direttamente gli inositoli 3-fosfati. La proteina Akt può svolgere diversi ruoli nell'attivazione piastrinica (*Kroner et al*, 2000).

Ruolo delle tirosin chinasi

La fosforilazione in tirosina di proteine è importante ai fini dell'attivazione piastrinica. Tale processo è dinamico e reversibile e risulta regolato dall'attivazione e dalla redistribuzione subcellulare di tirosin chinasi e fosfatasi citosoliche (*Diaz-Ricart et al*, 2008). La maggioranza delle tirosin chinasi identificate nelle piastrine appartiene alle forme citosoliche non recettoriali e comprende i membri delle famiglie di Src, FAK, Syk e JAK. Queste ultime hanno la funzione di mantenere un basso livello di fosfotirosine all'interno di una cellula a riposo prevenendo una prematura attivazione piastrinica. In seguito alla stimolazione con diversi agonisti, come trombina e collagene, si assiste ad un forte incremento nel livello di fosforilazione in tirosina di molteplici proteine, suggerendo che questi eventi rappresentino una caratteristica generale dell'attivazione piastrinica. La stimolazione di numerosi recettori, inoltre, porta ad un rapido aumento dell'attività enzimatica di una famiglia di serin-treonin chinasi conosciute come MAPKs. Queste chinasi sono in grado di convertire gli stimoli extracellulari in segnali intracellulari che controllano l'espressione genica, la proliferazione, il differenziamento cellulare e l'apoptosi. Le MAPKs sono state classificate in tre sottofamiglie: le chinasi ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), le chinasi JNK/SAPK (c-Jun N-terminal or Stress-Activated Kinase) e la p38 MAP chinasi (*Lopez-Illasaca*, 1998). In seguito all'attivazione le MAPKs trasducono il segnale fosforilando i loro substrati a valle, su residui di treonina e serina adiacenti a residui di prolina (*New & Han*, 1998). Esse sono espresse in modo ubiquitario in tutti i tessuti. Le piastrine contengono diversi membri della famiglia

delle MAP chinasi: ERK1 (p44), ERK2 (p42), alcune isoforme della p38 e JNK1 (*Bugaud et al*, 1999).

Inibizione piastrinica

In condizioni fisiologiche le piastrine si trovano in uno stato inattivo grazie a fattori rilasciati dalle cellule endoteliali della parete vasale, tra cui le prostaglandine (PGE1, PGI2) e il monossido d'azoto (NO) (*Schwarz et al*, 2001).

PGE1 e PGI2 legano il proprio recettore accoppiato a proteine G consentendo alla subunità Gas di attivare l'adenilato ciclasi (AC) aumentando i livelli di cAMP intracellulari. L'ossido nitrico invece stimola direttamente la guanilato ciclasi intracellulare causando un aumento della concentrazione intracellulare di cGMP. I nucleotidi ciclici così prodotti attivano proteine chinasi cGMP e cAMP-dipendenti (PKG e PKA) (*Lohmann et al*, 1997) e le fosfodiesterasi (PDE). Queste ultime controllano i livelli dei nucleotidi ciclici stessi monitorando quindi i segnali inibitori (*Soderling & Beavo*, 2000). La PKA e la PKG attivate invece determinando la fosforilazione di una molte di proteine (*Walter et al*, 1993) e l'inibizione di pathways attivatori. È stato infatti osservato che l'aumento di nucleotidi ciclici causa un'inibizione della PLC, con un meccanismo non del tutto chiarito che porta ad un blocco nel rilascio del calcio dal sistema tubulare denso, agendo probabilmente sul recettore dell'IP3 (*Cavallini et al*, 1996). Inoltre l'attivazione di PKA e PKG causa l'inibizione della secrezione dei granuli piastrinici, bloccando quindi il rilascio di fattori procoagulanti nel sangue e l'esposizione di $\alpha_{IIb}\beta_3$ e di molecole proinfiammatorie, quali P-selectina e CD40-ligand, dagli stores intracellulari alla superficie piastrinica (*Schwarz et al*, 2000). L'aumento di cAMP e cGMP porta anche all'inibizione delle MAP chinasi p38 e p42, entrambe importanti per l'attivazione piastrinica (*Schwarz et al*, 2000). Una delle più importanti azioni mediate dalle due protein chinasi è la fosforilazione di diversi substrati tra cui: ABP, proteina coinvolta nello stabilizzare i filamenti di actina (*Chen & Stracher*, 1989), GPIb, subunità del recettore per il fattore di vonWillebrand (*Fox & Berndt*, 1989), Hsp27, proteina anch'essa coinvolta nella polimerizzazione dell'actina (*Butt et al*, 2001), Rap1b, piccola GTPasi coinvolta nell'adesione cellulare (*Siess et al*, 1990) e VASP.

VASP (Vasodilator-stimulated protein) è una proteina di 46 kDa che si trova associata alla membrana piastrinica dove gioca un ruolo importante nel controllo dell'organizzazione del citoscheletro e della polimerizzazione dell'actina. Essa infatti si trova localizzata a livello di stress fibers, adesioni focali e giunzioni cellula-cellula (*Eigenthaler et al*, 1992). In risposta agli antagonisti piastrinici, NO e PGI2, VASP è substrato sia di PKA che di PKG (*Walter et al*, 1993). La sua fosforilazione è correlata all'inibizione piastrinica in quanto porta ad una diminuzione della

sua affinità per l'F-actina. Sono stati individuati tre diversi siti di fosforilazione di VASP: la Serina 157, la Serina 239 e la Treonina 278. La fosforilazione della Serina 157 determina uno shift della mobilità elettroforetica di VASP in SDS-PAGE da 46 kDa a 50 kDa (*Halbrügge & Walter, 1989; Butt et al, 1994*) ed è dovuta dall'azione preferenziale della PKA. La fosforilazione in Serina 239 è invece dovuta prevalentemente all'azione della PKG.

I flavonoidi

I flavonoidi sono stati considerati pigmenti delle piante per centinaia di anni. La prima osservazione della loro azione biologica risale al 1936 in cui veniva proposta una loro potenziale azione come vitamine (*Rusznayk & Szent-Gyorgyi, 1936*). Essi sono prodotti come metaboliti secondari nelle piante, importanti per la loro crescita e resistenza, e sono costituiti da due anelli benzenici legati tra loro da un anello pirrolico (*Bravo, 1998*). A seconda dei loro sostituenti essi possono essere suddivisi in sei sottoclassi: flavoni, flavonoli, flavononi, catechine, antocianidine e isoflavoni. Nelle ultime decadi è stato osservato che i flavonoidi sono in grado di mediare diverse azioni biologiche, presentano infatti proprietà antiossidanti, antiproliferative, antitrombotiche ed estrogeniche.

Per quanto riguarda l'azione antiossidante dei flavonoidi è stato dimostrato che essi sono in grado di proteggere dai danni al DNA indotti dai radicali liberi (*Anderson et al, 2000*). Inoltre essi sono in grado di aumentare l'attività degli antiossidanti endogeni. È stato infatti riportato che alcuni flavonoidi sono in grado di diminuire lo stress ossidativo agendo sulla glutatione S-transferasi, enzima importante nel prevenire il danno indotto dai radicali liberi nelle cellule aumentando la resistenza allo stress ossidativo causato dal perossido di idrogeno (*Fiander & Schneider, 2000*).

Alcuni studi *in vitro* hanno identificato un'azione dei flavonoidi come inibitori della trasformazione e della proliferazione cellulare. È stato infatti dimostrato che alcuni flavonoidi introdotti con la dieta, in particolare gli isoflavoni, sono in grado di inibire la trasformazione neoplastica indotta da 3-methylcholanthrene in fibroblasti murini (*Franke et al, 1998*). Inoltre Kuntz e colleghi, testando più di 30 flavonoidi, hanno dimostrato che essi presentano un'attività antiproliferativa, ma non citotossica in linee cellulari di tumore al colon (*Kuntz et al, 1999*). Inoltre studi su linee cellulari di tumore al colon affermano che i flavonoidi sono in grado di regolare la trascrizione genica di geni coinvolti nel differenziamento, nella proliferazione e nell'apoptosi (*Wenzel et al, 2000*) e di inibire l'azione della DNA topoisomerasi II, facilitando l'apoptosi (*Gerwirtz, 1991*).

Studi epidemiologici suggeriscono inoltre che una dieta ricca in flavonoidi può essere associata ad una minor incidenza di patologie cardiovascolari (*Shukla et al, 2010*). Tuttavia i meccanismi molecolari alla base di tale correlazione non sono ancora del tutto noti. È stato proposto che tali molecole possano agire a livello molecolare migliorando la funzionalità endoteliale ed inibendo

l'aggregazione piastrinica (*Perez-Vizcaino et al*, 2006). È stato infatti dimostrato che essi agiscono soprattutto inibendo l'attività di enzimi implicati nella funzionalità piastrinica, quali ciclossigenasi, lipossigenasi (*Landolfi et al*, 1984; *Polette et al*, 1996), tirosin chinasi, fosfodiesterasi (*Landolfi et al*, 1984) e fosfolipasi (*Lindahl & Tagesson*, 1997; *Lee et al*, 1997). In particolare è stato riportato che l'assunzione di quercetina, un flavonolo, e di apigenina, un flavone, inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da ADP e da collagene in piastrine lavate ed in plasma (*Janssen et al*, 1998; *Hubbard et al*, 2003).

Come precedentemente accennato alcuni flavonoidi posseggono anche proprietà estrogeniche e per questo sono definiti fitoestrogeni. È stato infatti riportato che popolazioni asiatiche che facevano largo consumo di soia, ricca in flavonoidi, avevano una minor incidenza di tumori estrogeno-dipendenti, quali tumore al seno, all'ovaio, all'endometrio (*Messina et al*, 1994) rispetto alle popolazioni occidentali. Il meccanismo attraverso il quale i fitoestrogeni agiscono non è tuttavia del tutto noto e dipende dal tipo cellulare, inoltre alcuni fitoestrogeni competono con l'estrogeno endogeno nel legame al recettore, altri agiscono inibendo pathways di trasduzione del segnale specifici.

L'8-prenilnaringenina

Uno dei più potenti fitoestrogeni è l'8-prenilnaringenina (8-PN; 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2enyl)chroman-4-one), un prenilflavonoide contenuto nel fiore del luppolo (*Milligan et al*, 1999; *Milligan et al*, 2002). L'assunzione di tale molecola avviene quindi soprattutto attraverso il consumo di birra, in cui la concentrazione di 8-PN è di circa 0.24 mg/l, e di un numero sempre crescente di prodotti erboristici per il controllo delle vampate di calore durante la menopausa (*Stevens et al*, 1999). È stato dimostrato che l'8-PN presenta un'attività estrogenica 100 volte maggiore rispetto ai più noti fitoestrogeni, quali il cumestrol, la genisteina e la daidzeina (*Milligan et al*, 1999; *Milligan et al*, 2002). Diversamente dagli altri fitoestrogeni e similmente al 17 β -estradiolo, l'8-PN è un debole agonista del recettore β degli estrogeni ed un forte agonista nei confronti del recettore α (*Schaefer et al*, 2003). È stato inoltre dimostrato l'8-PN presenta attività estrogenica *in vivo* ed *in vitro*. Esso infatti interviene sul metabolismo dell'osso, aumentandone la densità (*Miyamoto et al*, 1998), presenta attività anti-androgenica (*Zierau et al*, 2003). Inoltre il trattamento con 8-PN è in grado di inibire l'angiogenesi (*Pepper et al*, 2004), di stimolare l'adesione cellula-cellula (*Rong et al*, 2001) e di controllare le vampate di calore in menopausa (*Heyerick et al*, 2006). Per tale motivo è possibile trovare sul mercato un numero sempre crescente di preparati erboristici a base di luppolo per il controllo dei disturbi associati alla menopausa.

SCOPO DEL LAVORO

I fitoestrogeni sono composti naturali derivati dalle piante in grado di mimare, dal punto di vista strutturale e funzionale, gli estrogeni (Cos *et al*, 2003). È stato infatti dimostrato che tali molecole presentano effetti benefici nel trattamento di diverse patologie come cancro, osteoporosi, menopausa (Knight & Eden, 1996). Inoltre una dieta ricca in flavonoidi, e più in particolare di fitoestrogeni, è in grado di diminuire l'incidenza di patologie cardiovascolari. Infatti è stato dimostrato che tali molecole possono intervenire nel modulare la funzionalità piastrinica, inibendo l'adesione e l'aggregazione piastrinica e quindi impedendo la formazione del trombo.

Tra i fitoestrogeni abbiamo focalizzato la nostra attenzione su uno in particolare: l'8-prenilnaringenina. Esso è contenuto nel fiore del luppolo, l'assunzione di tale molecola avviene quindi soprattutto attraverso il consumo di birra e di un numero sempre crescente di preparati erboristici per il controllo dei disturbi associati alla menopausa (Milligan *et al*, 1999; Milligan *et al*, 2002). È stato inoltre dimostrato che l'8-PN ha un potere estrogenico maggiore rispetto agli altri flavonoidi.

Nessuno studio tuttavia è ancora andato ad indagare quale sia il potenziale ruolo dell'8-PN nel modulare l'attivazione e l'aggregazione piastrinica. In questo contesto abbiamo pensato di studiare come l'8-prenilnaringenina intervenga sulla funzionalità piastrinica con lo scopo di caratterizzare le vie di trasduzione del segnale modulate dall'8-PN in piastrine umane. L'obiettivo finale è quello di meglio definire i meccanismi attraverso i quali i fitoestrogeni esercitano la loro azione sul sistema vascolare.

METODI

Preparazione delle piastrine mediante gel-filtrazione

Il sangue è stato prelevato da donatori sani che non abbiano assunto farmaci nei dieci giorni precedenti al prelievo. Come anticoagulante è stato utilizzato ACD (130 mM acido citrico, 152 mM Na-citrato, 112 mM D-glucoso) nella proporzione di una parte ogni nove di sangue.

Il sangue è stato successivamente aliquotato in provette e centrifugato a 120 g per 12 minuti a temperatura ambiente, consentendo la separazione del plasma ricco in piastrine (PRP) dai leucociti ed eritrociti. Il PRP raccolto è stato poi centrifugato a 300 g per 13 minuti a temperatura ambiente, in modo da ottenere il plasma povero in piastrine (PPP), che viene eliminato, e un pellet di piastrine. Le cellule sono state risospese in un piccolo volume di ACD e 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 state contate al microscopio ottico ad un ingrandimento di 40x in camera di Burker, e portate alla concentrazione desiderata con il Tyrode. Le piastrine sono state lasciate riposare per circa 15 minuti prima di essere utilizzate per gli esperimenti.

Analisi dell'aggregazione piastrinica

Per misurare l'aggregazione piastrinica è stato 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.

Le piastrine gel-filtrate sono state portate alla concentrazione di 3×10^8 cellule/ml in Tyrode con l'aggiunta di 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 2 mM glucosio. I singoli campioni sono stati allestiti in apposite cuvette siliconate e posti nel lumiaggregometro. Sulla base delle prove da eseguire, le piastrine sono state preincubate con opportune molecole ed agonisti. L'aggregazione piastrinica viene monitorata su un registratore a carta Chrono-Log Corporation. La percentuale di aggregazione piastrinica viene misurata per almeno 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista.

Analisi della fosforilazione proteica

Piastrine gel-filtrate sono state portate ad una concentrazione di 5×10^8 piastrine/ml in Tyrode ed addizionate di glucosio 5.5 mM. Gli stimoli sono stati effettuati mantenendo il campione a 37°C.

Concluso lo stimolo le piastrine sono state lisate con Leammi buffer 3X (6 % SDS, 1,5 % β -mercaptoetanololo, 30 % glicerolo, 0,03 % blu di bromofenolo) addizionato di inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (9 mM glicerolo fosfato, 20 mM sodio pirofosfato, 3 mM ortovanadato, 30 mM sodio fluoruro, 3 mM EGTA). Ogni campione è stato poi 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 anticorpi specifici.

Dosaggio del cGMP

La preparazione dei campioni per la valutazione dei livelli di cGMP è stata effettuata secondo il protocollo di Dunkern e Hatzelmann (*Dunkern & Hatzelmann, 2005*). Brevemente, le piastrine sono state portate alla concentrazione di 4×10^8 piastrine/ml in Tyrode ed addizionate di glucosio 5.5 mM. Campioni da 200 μ l sono stati incubati a 37° C e stimolati con diverse molecole. Successivamente i campioni sono stati lisati con HCl 0.1 M, incubati a temperatura ambiente per 10 minuti e vortexati di tanto in tanto. Ogni campione è stato poi centrifugato a 1000 g per 10 minuti alla temperatura costante di 4°C. I surnatanti così ottenuti sono stati conservati a -20°C. Il dosaggio del cGMP è stato poi effettuato mediante un'ELISA competitivo (cyclic GMP Complete, assay designs, Stressgen) secondo il protocollo dell'azienda produttrice.

Adesione delle piastrine al collagene

Vetrini coprioggetto (12 mm \emptyset) sono stati incubati per 2 ore a 37°C con 50 μ g/ml di collagene di tipo I o con 0.5% di BSA e saturati per 2 ore a 37°C con 5% di BSA. Successivamente piastrine gel-filtrate, portate alla concentrazione di 3×10^7 piastrine/ml in Tyrode addizionato di Mg e Ca 2 mM e glucosio 5.5 mM, sono state stimulate con 8-PN 30 μ M o con il rispettivo controllo per 5 minuti e lasciate aderire a 37°C al collagene per tempi variabili da 30 a 60 minuti. Le piastrine sono state poi fissate con PBS1X + 4% paraformaldeide + saccarosio 3%, permeabilizzate con triton 0.2% e colorate con falloidina coniugata al fluorocromo Alexa 488. Il numero e la morfologia delle piastrine è stata valutata al microscopio confocale (Leica TCS SP2) e sono state acquisite immagini digitali (63X).

Analisi statistica

I dati riportati sono la media e la deviazione standard di almeno 3 esperimenti indipendenti. Per determinare la significatività statistica sono stati usati test t di Student o Anova. Le differenze riscontrate sono state considerate statisticamente significative per $p < 0.05$. Tutti i calcoli sono stati effettuati con StatMate software, version 2.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA)

RISULTATI

L'8-PN inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da collagene

L'8-PN è un flavonoide che presenta una potente attività estrogenica (*Milligan et al, 1999*). In letteratura è stato riportato che gli estrogeni sono in grado di potenziare l'aggregazione piastrinica indotta da trombina (*Moro et al, 2005*), mentre i flavonoidi presentano un'azione inibitoria sulle piastrine. Nessuno studio tuttavia ad oggi ha indagato quale sia l'effetto dell'8-PN sulla funzionalità piastrinica. A tale scopo abbiamo focalizzato la nostra attenzione sull'effetto dell'8-PN sull'aggregazione piastrinica.

Dato che l'8-PN da solo non aveva effetti sulle piastrine (dati non mostrati), abbiamo valutato se il pretrattamento con l'8-PN potesse modulare l'aggregazione piastrinica indotta da collagene.

Abbiamo quindi indagato gli effetti di diverse concentrazioni di 8-PN sull'aggregazione piastrinica. Piastrine gel-filtrate alla concentrazione di 3×10^8 cellule/ml sono state stimulate per 5 minuti con concentrazioni crescenti di 8-PN da 0.5 μM a 40 μM e successivamente indotte ad aggregare in presenza di collagene (5 $\mu\text{g/ml}$).

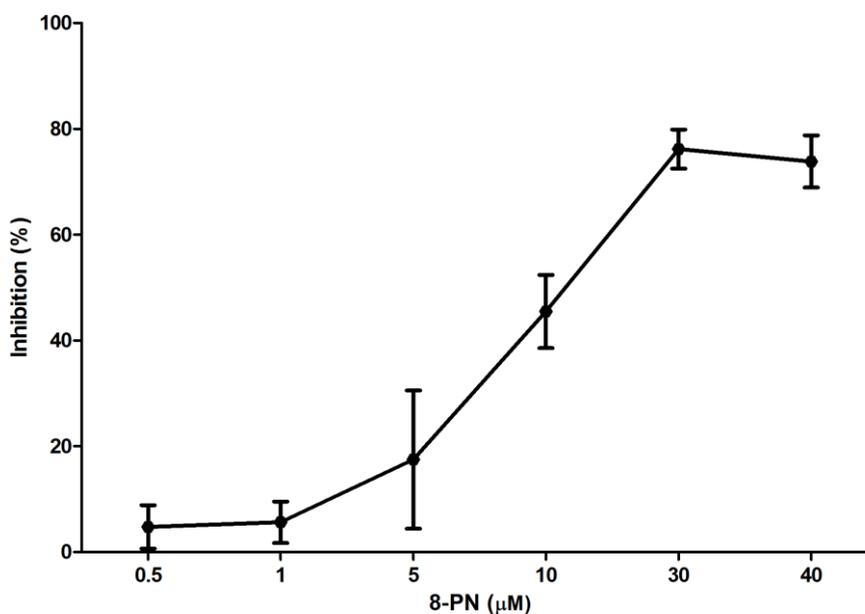


Fig. 1.

Aggregazione indotta da 8-PN. Piastrine gel-filtrate sono state incubate con differenti concentrazioni di 8-PN e successivamente indotte ad aggregare in presenza di collagene 5 $\mu\text{g/ml}$. I risultati sono espressi come % di inibizione dell'aggregazione piastrinica rispetto al controllo, la quale percentuale di aggregazione è stata posta arbitrariamente uguale a 100. I dati riportati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

I dati ottenuti hanno mostrato che l'8-PN è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica in maniera dose dipendente, con un IC50 di 12.8 μ M. L'8-PN 30 μ M risultava invece essere la minima concentrazione che dava un'inibizione massima dell'aggregazione piastrinica pari al 76.17 \pm 3.72% rispetto al controllo (**Fig.1**). È stato quindi deciso di usare la concentrazione di 8-PN di 30 μ M per condurre gli esperimenti successivi.

Per meglio chiarire la dinamica dell'azione inibitoria dell'8-PN sull'aggregazione piastrinica indotta da collagene è stato condotto un *time course*. Le piastrine gel-filtrate sono state stimulate con l'8-PN 30 μ M o con il rispettivo controllo (0.125% di metanolo) per tempi crescenti (da 1 minuto a 2 ore) e successivamente indotte ad aggregare con collagene 5 μ g/ml. I dati ottenuti sono stati normalizzati per un'aggregazione da solo collagene la cui percentuale di aggregazione è stata posta arbitrariamente uguale a 100. I nostri risultati hanno mostrato che l'8-PN è in grado di inibire di circa il 70% l'aggregazione piastrinica costantemente a tutti i tempi considerati (**Fig.2**).

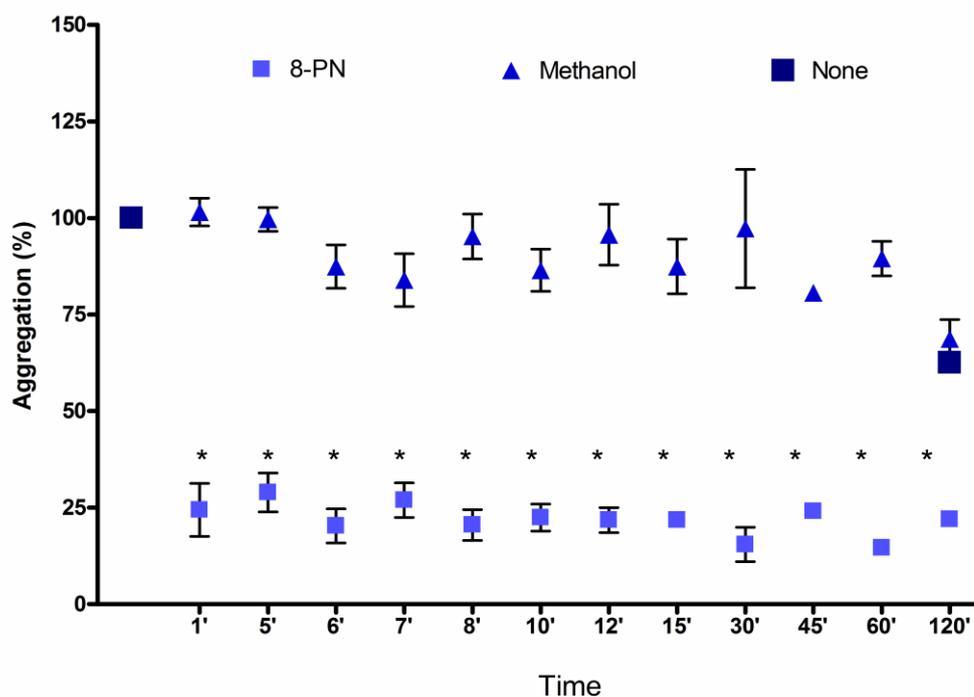


Fig. 2.

L'8-PN inibisce irreversibilmente l'aggregazione piastrinica. Piastrine gel-filtrate sono state incubate con 8-PN 30 μ M o con il rispettivo controllo per tempi crescenti ed indotte ad aggregare in presenza di collagene 5 μ g/ml. I risultati sono espressi come % di inibizione dell'aggregazione piastrinica rispetto al controllo, la quale percentuale di aggregazione è stata posta arbitrariamente uguale a 100. I dati riportati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti (analisi statistica eseguita con test t-Student, * $p < 0.01$).

Successivamente è stato condotto un esperimento di *wash out* per valutare se l'azione dell'8-PN sull'aggregazione piastrinica fosse dovuta alla presenza dell'8-PN in soluzione o se l'effetto dell'8-PN sulle piastrine fosse irreversibile. Piastrine gel-filtrate sono state stimulate con 8-PN 30 μ M o il rispettivo controllo (0.125% di metanolo) per 5 minuti e centrifugate per 10 minuti a 300 g a temperatura ambiente. Il pellet piastrinico è stato risospeso in Tyrode con l'aggiunta di glucosio, calcio e magnesio. Le piastrine sono state indotte ad aggregare in presenza di collagene 5 μ g/ml. Dai risultati ottenuti si osserva che una volta avvenuto lo stimolo, l'inibizione dell'8-PN sull'aggregazione piastrinica non è reversibile anche se tale molecola non è più presente nel mezzo (dati non mostrati).

Effetti dell'8-PN sul pathway NO/cGMP/PKG/VASP

Per individuare il meccanismo attraverso il quale l'8-PN inibisce l'attivazione e l'aggregazione piastrinica, è stata analizzata la fosforilazione di VASP. VASP è una proteina ricca in prolina, substrato della PKA e della PKG, la quale fosforilazione correla parzialmente con l'inibizione piastrinica. La PKG fosforila VASP preferibilmente nella Serina 239, mentre la PKA provoca la fosforilazione della Serina in posizione 157, determinando inoltre uno shift della mobilità elettroforetica della proteina da 46 kDa a 50 kDa (*Halbrügge et al, 1989; Butt et al, 1994*). Per valutare la correlazione tra l'inibizione piastrinica indotta dall' 8-PN e la fosforilazione di VASP, campioni contenenti 5×10^8 piastrine/ml sono stati stimolati per tempi crescenti da 10 secondi a 15 minuti a 37° C con 8-PN (30 μ M) o con metanolo (0.125%). Come mostrato in figura 3, l'8-PN induce una fosforilazione di VASP tempo-dipendente sia sulla Serina in posizione 157 che sulla Serina in posizione 239. In particolare, VASP raggiunge la fosforilazione massima dopo 5 minuti di stimolazione (**Fig. 3**).

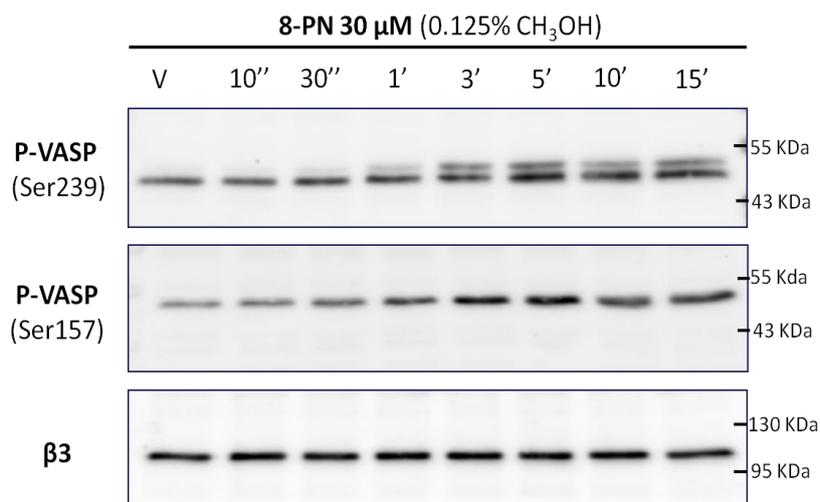


Fig. 3.

Fosforilazione di VASP indotta da 8-PN. Campioni di piastrine gel-filtrate sono state stimulate con l'8-PN 30 μ M o con il rispettivo controllo (V) 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.

Per confermare il coinvolgimento della fosforilazione di VASP nell'inibizione dell'attivazione e dell'aggregazione piastrinica 8-PN-mediata, abbiamo analizzato il contributo dell'attivazione delle NOS e della guanilato ciclasi. Piastrine gel-filtrate sono state preincubate con L-NAME (NG-Nitro-L-arginine Methyl Ester), un inibitore non selettivo di tutte le isoforme delle NOS, e L-NMMA (NG-Monomethyl-L-arginine, Monoacetate Salt), un inibitore delle eNOS e delle iNOS, ad una concentrazione finale di 300 μ M ognuno o con ODQ 2 μ M (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one), un inibitore selettivo che compete con il monossido d'azoto per il legame alla guanilato ciclasi, per 5 minuti. Successivamente le cellule sono state stimulate con 8-PN 30 μ M per 5 minuti ed indotte ad aggregare con collagene 5 μ g/ml. I dati ottenuti hanno mostrato che né il pretrattamento con gli inibitori delle NOS né con l'inibitore della guanilato ciclasi sono in grado di prevenire l'azione inibitoria dell'8-PN sull'aggregazione piastrinica mediata dall'8-PN (**Fig. 4**). Pertanto la differenza di aggregazione rispetto al controllo stimolato col solo metanolo risulta essere statisticamente significativa in tutti i campioni trattati con l'8-PN (analisi statistica eseguita con One-way ANOVA seguita da post-hoc test di Bonferroni, *** $p < 0.0001$).

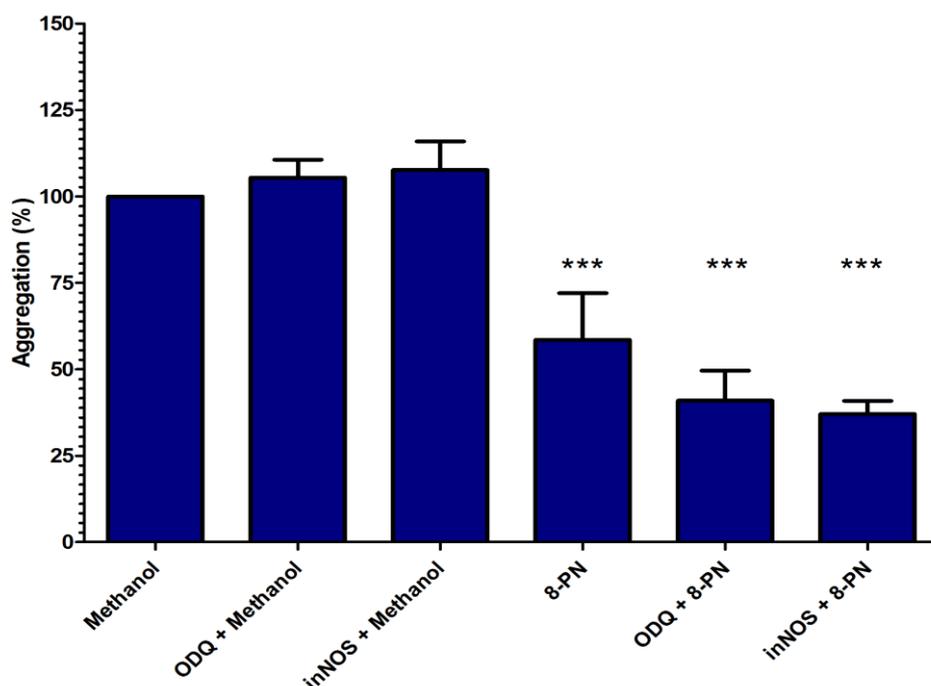
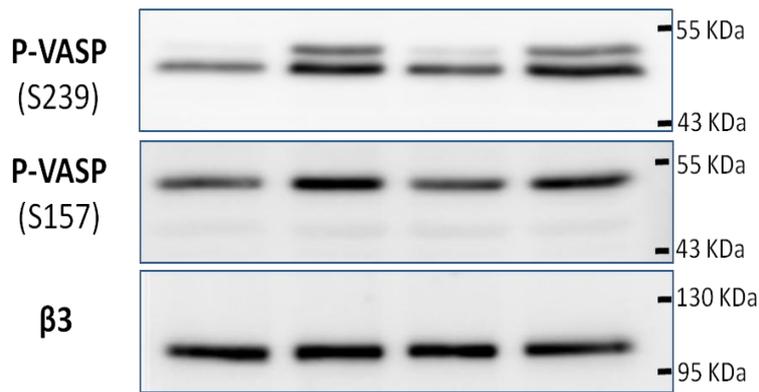


Fig. 4.

Effetto degli inibitori della guanilato ciclasi e delle NOS sull'inibizione dell'aggregazione piastrinica indotta da 8-PN. Piastrine gel-filtrate sono state incubate con 8-PN 30 μ M o con metanolo per 5 minuti, in presenza o in assenza del pretrattamento con ODQ o con gli inibitori delle NOS (inNOS). I risultati sono espressi come % di aggregazione rispetto al controllo trattato con il solo metanolo la cui percentuale di aggregazione è stata posta arbitrariamente uguale a 100. I dati riportati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti (analisi statistica eseguita con One-way ANOVA seguita da post-hoc test di Bonferroni, *** $p < 0.0001$).

Le piastrine sono state inoltre stimulate per 5 minuti con 8-PN 30 μ M in presenza o in assenza della preincubazione con L-NAME e L-NMMA o con l'ODQ per valutare eventuali variazioni nella fosforilazione di VASP e nella concentrazione di cGMP. Come mostrato in figura 5 i due inibitori delle NOS non sono in grado di inibire la fosforilazione di VASP mediata dall'8-PN, mentre il pretrattamento con ODQ è in grado di inibire la fosforilazione di VASP mediata dall'8-PN sia sulla Serina 157 che sulla Serina 239 (**Fig. 5**).



ODQ			X	
NOS inhibitors				X
Methanol	X			
8-PN		X	X	X

Fig. 5.

Effetto degli inibitori della guanilato ciclastasi e delle NOS sulla fosforilazione di VASP indotta da 8-PN. Campioni di piastrine gel-filtrate sono state stimolate con 8-PN 30 μ M o con metanolo per 5 minuti, in presenza o in assenza del pretrattamento con ODQ o con gli inibitori delle NOS. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici.

Per quanto riguarda il dosaggio del cGMP i dati ottenuti hanno mostrato che lo stimolo con 8-PN per 5 minuti causa un aumento significativo dei livelli di cGMP rispetto al controllo. Il pretrattamento con ODQ e con gli inibitori delle NOS (iNOS) causa invece una diminuzione dei livelli di cGMP rispetto all'8-PN. Tali differenze risultano essere statisticamente significative (analisi statistica eseguita con One-way ANOVA seguita da post-hoc test di Bonferroni, $p=0.003$) (**Fig. 6**).

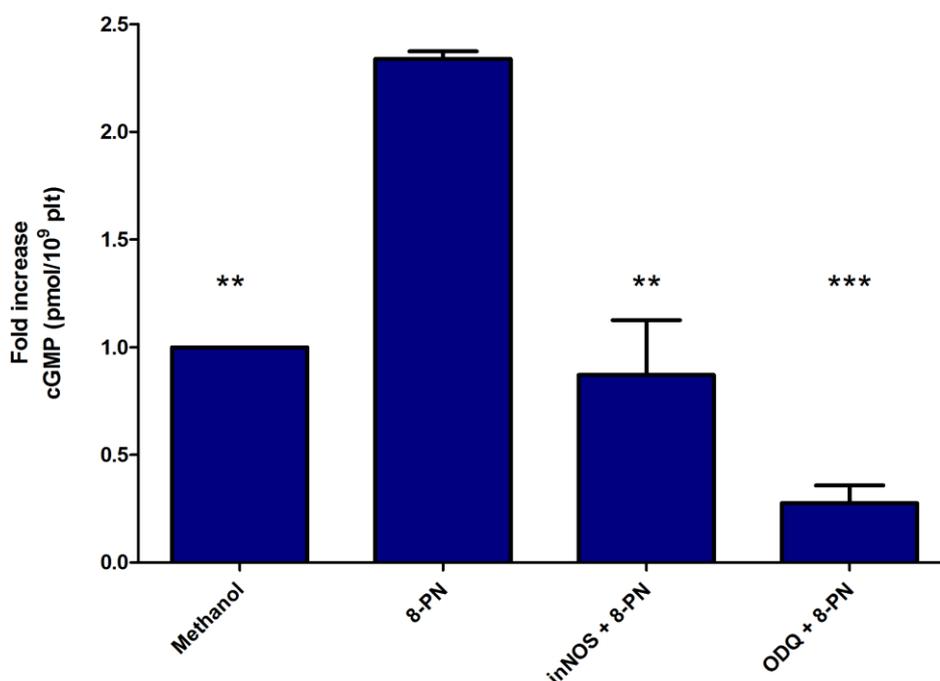


Fig. 6.

Effetti dell'8-PN sui livelli di cGMP. Piastrine stimulate con 8-PN 30 μ M o con 0.125% di metanolo per 5 minuti a 37° C, in presenza od in assenza del pretrattamento per 5 minuti con ODQ o con gli inibitori delle NOS (inNOS), come indicato in figura. Dopo aver bloccato la reazione e lisato le cellule con HCl, i livelli di cGMP sono stati dosati con un ELISA competitivo (Assay Designs, Stressgen) seguendo le istruzioni dell'azienda produttrice. I risultati sono espressi come la media \pm SE di tre esperimenti indipendenti (analisi statistica eseguita con One-way ANOVA seguita da post-hoc test di Bonferroni, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ rispetto all'8-PN).

Effetti dell'8-PN sulla fosforilazione proteica

La fosforilazione in tirosina di proteine è importante ai fini dell'attivazione piastrinica. Tale processo è dinamico e reversibile e risulta regolato dall'attivazione e dalla redistribuzione subcellulare di tirosin chinasi e fosfatasi citosoliche (Diaz-Ricart *et al*, 2008). In seguito alla stimolazione con diversi agonisti, come trombina e collagene, si assiste ad un forte incremento nel livello di fosforilazione in tirosina di molteplici proteine. La stimolazione dei recettori, inoltre, porta ad un rapido aumento dell'attività enzimatica di una famiglia di serin-treonin chinasi, le MAPKs, che trasducono il segnale fosforilando i loro substrati a valle, su residui di treonina e serina adiacenti a residui di prolina (New & Han, 1998). Le piastrine contengono diversi membri della famiglia delle MAP chinasi: ERK1 (p44), ERK2 (p42), alcune isoforme della p38 e JNK1 (Bugaud *et al*, 1999).

Abbiamo quindi analizzato in immunoblotting se l'8-PN fosse in grado di inibire la fosforilazione in tirosina e in serina mediata dal collagene. Campioni contenenti 5×10^8 piastrine/ml sono stati

quindi stimolati per 5 minuti a 37°C con 8-PN (30 µM) o con metanolo (0.125%) e successivamente con collagene 5 µg/ml per tempi crescenti da 0 a 5 minuti. Come atteso la stimolazione con collagene causa un aumento tempo-dipendente della fosforilazione di tutte le proteine analizzate. Il pretrattamento con 8-PN causa invece un'inibizione della fosforilazione in tirosina collagene-mediata (**Fig. 7**).

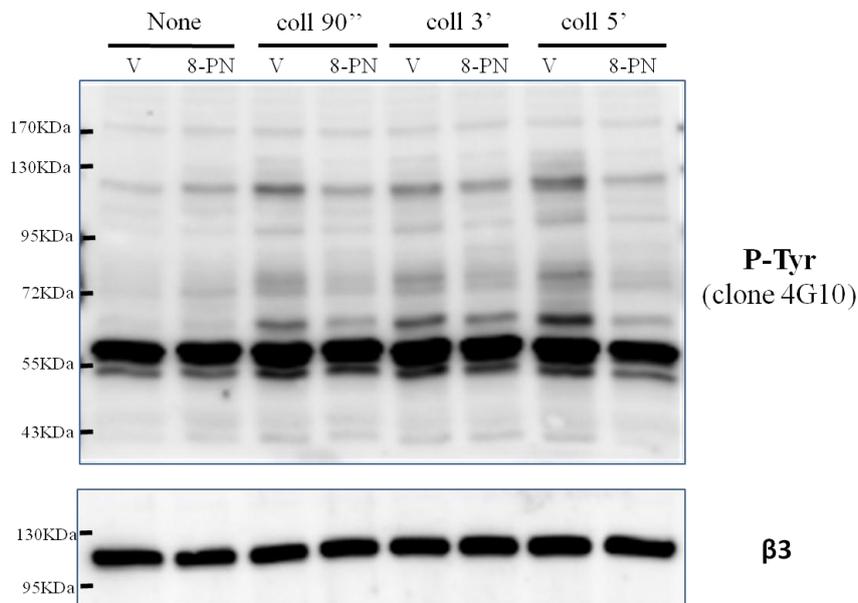


Fig. 7.

Effetto dell'8-PN sulla fosforilazione in tirosina collagene-mediata. *Campioni di piastrine gel-filtrate sono state stimolate con 8-PN 30 µM o con metanolo (V) per 5 minuti, e successivamente stimolate con collagene 5 µg/ml per tempi crescenti da 0 a 5 minuti. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici.*

Per meglio investigare gli effetti dell'8-PN sulla segnalazione piastrinica, abbiamo analizzato inoltre l'azione dell'8-PN sulla fosforilazione di proteine specifiche: Akt (p-Akt-Ser473), p38 (p-p38-Thr180/Tyr182), Pyk2 (p-Pyk2-Tyr402), p42/44 ERK (p-p42/44 Erk-Thr202/Tyr204) (**Fig. 8**). I nostri dati hanno mostrato che la stimolazione con collagene, come atteso, causa un aumento della fosforilazione tempo-dipendente delle proteine considerate. Il trattamento con 8-PN 30 µM invece è influisce sulla fosforilazione proteica di tutte le proteine analizzate. L'effetto dell'8-PN risulta particolarmente evidente sulla fosforilazione di Akt, Pyk2 e Erk ½, ma non su p38 in cui si osserva un effetto solo parziale dell'8-PN.

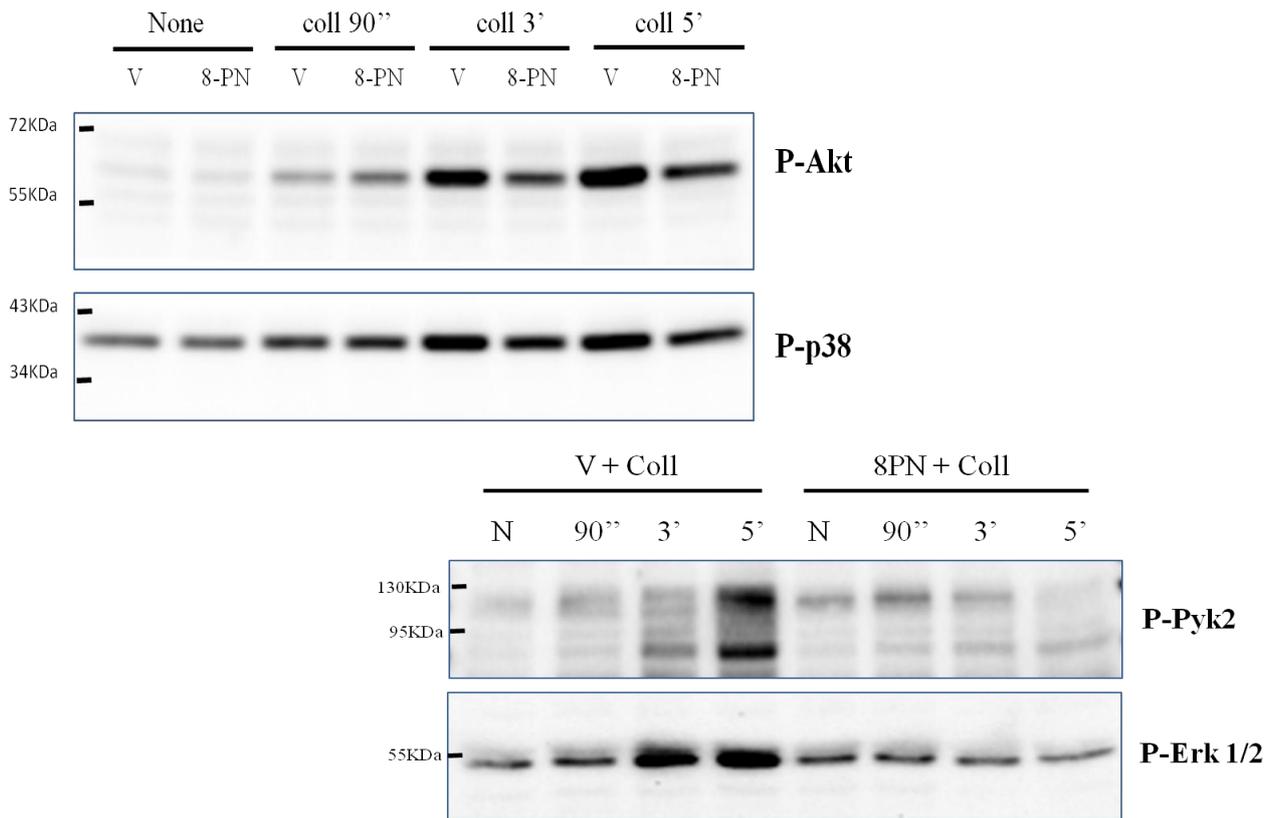


Fig. 8.

Effetto dell'8-PN sulla fosforilazione in proteica di Akt, p38, Pyk2 e Erk1/2 . Campioni di piastrine gel-filtrate sono stati stimolati con 8-PN 30 μ M o con il rispettivo controllo (V) per 5 minuti, e successivamente stimolate con collagene 5 μ g/ml per tempi crescenti: 0 secondi (N), 90 secondi, 3 e 5 minuti. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici.

Effetti dell'8-PN sull'adesione piastrinica

L'attivazione piastrinica mediata dal collagene porta ad una cascata di eventi che comprende la fosforilazione di substrati specifici e riarrangiamenti a livello del citoscheletro, come la polimerizzazione dell'actina ed l'associazione di altre proteine contrattili al citoscheletro. Tali eventi sono rapidamente tradotti in modificazioni della morfologia della piastrina, che porta in ultima analisi alla sua attivazione. È stato dimostrato che l'inibizione della fosforilazione di diversi substrati correla con alterazioni del citoscheletro piastrinico causando una ridotta ed alterata adesione delle piastrine al collagene (Diaz-Ricart *et al*, 2002).

Abbiamo quindi pensato di valutare gli effetti dell'8-prenilnaringenina sull'adesione piastrinica a matrici di collagene. A tale scopo piastrine portate alla concentrazione di 3×10^7 piastrine/ml stimolate con 8-PN 30 μ M o con metanolo 0.125% per 5 minuti sono state fatte aderire a 37°C per 30 e 60 minuti a vetrini coprioggetto ricoperti con 50 μ g/ml di collagene. Successivamente le

piastrine sono state fissate, permeabilizzate e colorate con falloidina coniugata al fluorocromo Alexa 488. Il numero e la morfologia delle piastrine è stata valutata al microscopio confocale (Leica TCS SP2) e sono state acquisite immagini digitali (63X).

I nostri dati preliminari hanno mostrato che il pretrattamento con l'8-PN è in grado di modificare il numero (**Fig. 9 A**), le dimensioni (**Fig. 9 B**) e la morfologia (**Fig. 9 C e D**) delle piastrine aderenti. Tali effetti sono maggiormente osservabili dopo 60 minuti di adesione al collagene (**Fig. 9**).

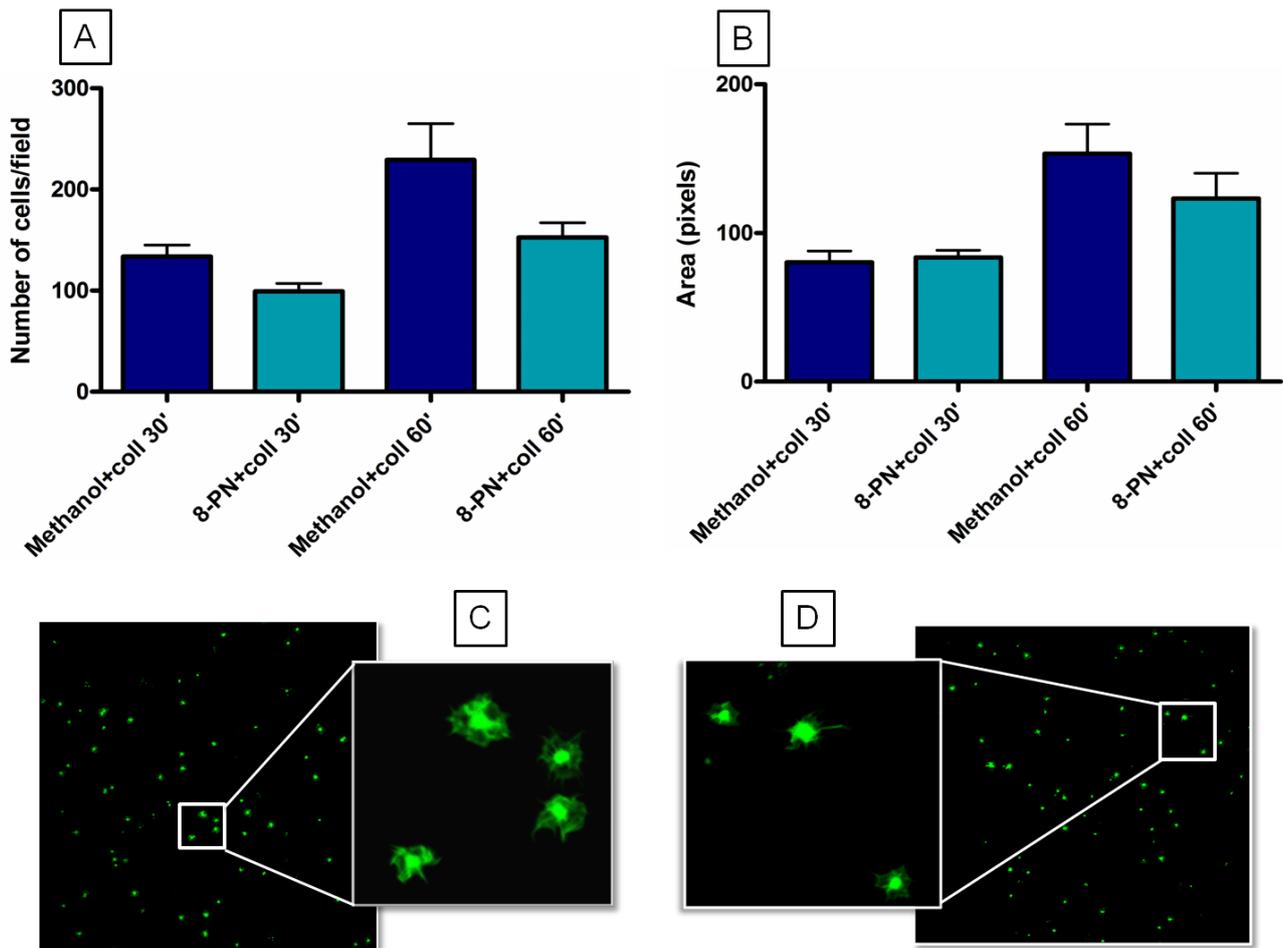


Fig. 9

Effetto dell'8-PN sull'adesione piastrinica. *Campioni di piastrine gel-filtrate sono stati stimolati con 8-PN 30 μ M o con il rispettivo controllo per 5 minuti, e fatte aderire a vetrini ricoperti con collagene 50 μ g/ml per 30 e 60 minuti a 37°C. Il numero e la morfologia delle piastrine aderenti è stata valutata al microscopio confocale (Leica TCS SP2) e sono state acquisite immagini digitali (63X). Il grafico A mostra il numero di piastrine aderenti per campo, il grafico B il numero delle cellule aderenti. Le immagini C e D mostrano la morfologia delle cellule aderenti trattate col metanolo (C) e con l'8-PN (D). I dati sono espressi come media \pm SE di due esperimenti indipendenti.*

DISCUSSIONE

I flavonoidi sono composti polifenolici che è stato dimostrato mediare diverse azioni biologiche. Essi infatti sono potenti antibatterici (*Saleem et al*, 2010), hanno proprietà antitumorali (*Huang et al*, 2010), antiinfiammatorie (*Rathee et al*, 2009), antiossidanti (*Rockenfeller & Madeo*, 2010). Alcuni studi hanno inoltre dimostrato che esiste un'associazione inversa tra l'assunzione di polifenoli con la dieta e il rischio di patologie cardiovascolari (*Knekt et al*, 1996; *Rimm et al*, 1996), probabilmente grazie all'azione diretta di tali molecole sulle piastrine. Infatti è stato dimostrato che alcuni flavonoidi, quali l'apigenina e la quercetina, sono in grado di inibire la funzionalità piastrinica (*Janssen et al*, 1998; *Hubbard et al*, 2003).

Tra i flavonoidi abbiamo rivolto la nostra attenzione ad uno in particolare: l'8-prenilnaringenina. Esso è contenuto nel fiore del luppolo e l'assunzione di 8-PN avviene quindi soprattutto attraverso il consumo di birra e di un numero sempre crescente di prodotti erboristici (*Stevens et al*, 1999). Nell'ultima decade è stato dimostrato che l'8-PN possiede una potente attività estrogenica (*Milligan et al*, 2000), con un'affinità di legame per i recettori degli estrogeni molto maggiore rispetto a quella di altri fitoestrogeni (*Schaefer et al*, 2003). Inoltre l'8-PN presenta diversi effetti biologici. È infatti in grado di aumentare la densità ossea (*Miyamoto et al*, 1998), ha attività antiangiogenetica (*Pepper et al*, 2004) ed antiandrogenica (*Zierau et al*, 2003) ed interviene nel controllo delle vampate di calore in menopausa (*Heyerick et al*, 2006). Nessuno studio tuttavia fino ad oggi è andato ad indagare se e come l'8-PN fosse in grado di agire sulla funzionalità piastrinica.

Come prima cosa siamo andati quindi a valutare l'effetto l'8-PN sull'aggregazione piastrinica. I nostri dati hanno dimostrato che l'8-PN è un agente antiaggregante su piastrine umane. Infatti il pretrattamento con 8-PN causa l'inibizione irreversibile dell'aggregazione piastrinica (**Fig. 1**, **Fig. 2**). Ci siamo quindi chiesti come l'8-PN potesse agire nel mediare il suo effetto. Uno dei pathway chiave nell'inibizione piastrinica è l'aumento di cAMP e cGMP che porta alla fosforilazione e alla conseguente inibizione dell'azione di VASP, proteina coinvolta nella riorganizzazione del citoscheletro piastrinico (*Walter et al*, 1993). I nostri dati hanno mostrato che il trattamento con 8-PN causa l'aumento dei livelli di cGMP (**Fig. 6**) e la conseguente fosforilazione di VASP sia sulla Serina in posizione 157 che sulla Serina in posizione 239 (**Fig. 3**), suggerendo quindi che l'8-PN agisca sia sulla PKA che sulla PKG. Tuttavia il pretrattamento con gli inibitori delle ossido nitrico sintasi, L-NAME e L-NMMA, non porta né alla ripresa dell'aggregazione piastrinica (**Fig. 4**) né alla variazione del profilo di fosforilazione di VASP mediato dall'8-PN (**Fig. 5**). Tuttavia sia il pretrattamento con gli inibitori delle NOS che con l'inibitore della guanilato ciclasi, l'ODQ,

promuove una diminuzione dei livelli di cGMP rispetto alle piastrine trattate col solo 8-PN e anche rispetto al controllo (**Fig. 6**). Inoltre il pretrattamento con ODQ porta all'inibizione della fosforilazione di VASP (**Fig. 7**) mediata dall'8-PN, ma non ad una reversione dell'aggregazione piastrinica (**Fig. 4**). Tali dati suggeriscono quindi che, sebbene l'8-PN causi la fosforilazione di VASP, tale evento non è di primaria importanza nel mediare l'effetto inibitorio che l'8-PN ha sulle piastrine.

Abbiamo quindi rivolto la nostra attenzione ad altri pathways coinvolti nell'inibizione della funzionalità piastrinica. In particolare è noto che in seguito alla stimolazione con diversi agonisti, come trombina e collagene, si assiste ad un forte incremento nel livello di fosforilazione in tirosina di molteplici proteine, suggerendo che questi eventi rappresentino una caratteristica generale dell'attivazione piastrinica. Siamo quindi andati ad analizzare il profilo di fosforilazione in tirosina in piastrine trattate con collagene. I nostri dati hanno mostrato che il pretrattamento con 8-PN è in grado di inibire la fosforilazione in tirosina collagene-mediata (**Fig. 7**).

Siamo quindi passati a valutare più nel dettaglio il profilo di fosforilazione di proteine specifiche ed in particolar modo di alcune MAPK, Erk $\frac{1}{2}$ e p38, attivate a valle dei recettori per gli agonisti piastrinici (*New & Han, 1998*), di Pyk2, una tirosin chinasi coinvolta nell'attivazione precoce delle piastrine indipendente dall'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (*Koziak et al, 2001*) e di Akt, serin-treonin chinasi importante nell'attivazione piastrinica (*Kroner et al, 2000*). Dai nostri esperimenti si è potuto osservare che il trattamento con 8-PN inibisce la fosforilazione proteica di tutte le proteine analizzate. L'effetto dell'8-PN risulta particolarmente evidente sulla fosforilazione di Akt, Pyk2 e Erk $\frac{1}{2}$, ma non su p38 in cui si osserva un effetto solo parziale. Tali dati suggeriscono quindi che l'8-PN possa mediare la propria azione agendo sull'inibizione della fosforilazione proteica, quindi agendo direttamente inibendo le chinasi od attivando le fosfatasi.

In letteratura è riportato che la risposta piastrinica al collagene risulta diminuita se la fosforilazione in tirosina è inibita (*Diaz-Ricart et al, 2008*). Tale processo causa un blocco del cambio di forma e del rimodellamento citoscheletrico. Abbiamo quindi pensato di valutare l'effetto dell'8-PN sull'adesione piastrinica al collagene. I nostri dati preliminari hanno mostrato che l'8-PN è in grado di modulare il numero e le dimensioni delle piastrine aderenti, suggerendo quindi che esso possa essere in grado di agire su pathways coinvolti nella riorganizzazione del citoscheletro.

In conclusione questi dati indicano che l'8-PN è un potente inibitore dell'aggregazione piastrinica precedentemente mai studiato. Esso agisce su più fronti, attivando i pathways dei nucleotidi ciclici ed inibendo la fosforilazione di proteine coinvolte nei segnali attivatori a valle dei recettori per gli agonisti piastrinici.

Studi futuri saranno rivolti ad indagare come l'8-PN intervenga negli altri processi fondamentali ai fini dell'attivazione e dell'aggregazione piastrinica, quali secrezione, aumento dei livelli di calcio citoplasmatici ed attivazione di piccole proteine GTP leganti, fondamentali nei processi di rimodellamento del citoscheletro piastrinico.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson RF, Amarasinghe C, Fisher LJ, Mak WB, Packer JE. *Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids*. Free Radic Res 2000; 33:91-103.
- Blockmans D, Deckmin H, Vermeylen J. *Platelet activation*. Blood Rev 1995; 9:143-156.
- Bravo L. *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutr Rev 1998; 56:317-33.
- Bugaud F, Nadal-Wollbold F, Lévy-Toledano S, Rosa JP, Bryckaert M. *Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets*. Blood 1999; 94:3800-5.
- Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U. *cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets*. J Biol Chem 1994; 269:14509-17.
- Butt E, Immler D, Meyer HE, Kotlyarov A, Laass K, Gaestel M. *Heat shock protein 27 is a substrate of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets: phosphorylation-induced actin polymerization caused by HSP27 mutants*. J Biol Chem 2001; 276:7108-13.
- Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A. *Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation*. J Biol Chem 1996; 271:5545-51.
- Chen M, Stracher A. *In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain*. J Biol Chem 1989; 264:14282-9.
- Crawford N. *Structure and organisation of platelet membranes*. Adv Exp Med Biol 1985; 192:1-13.
- Crawford N, Scrutton MC. *Biochemistry of the blood platelet*. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD (eds): Haemostasis and Thrombosis Third edition 1994; 4:89-98.
- Cos P, De Bruyne T, Apers S, Vanden Berghe D, Pieters L, Vlietinck AJ. *Phytoestrogens: recent developments*. Planta Med 2003; 69:589-99.
- Díaz-Ricart M, Arderiu G, Estebanell E, Pérez-Pujol S, Lozano M, White JG, Escolar G, Ordinas A. *Inhibition of cytoskeletal assembly by cytochalasin B prevents signaling through tyrosine phosphorylation and secretion triggered by collagen but not by thrombin*. Am J Pathol 2002; 160:329-37.
- Díaz-Ricart M, Palomo M, Fuste B, Lopez-Vilchez I, Carbo C, Perez-Pujol S, White JG, Escolar G. *Inhibition of tyrosine kinase activity prevents the adhesive and cohesive properties of platelets and the expression of procoagulant activity in response to collagen*. Thromb Res 2008; 121:873-83.

Dunkern TR, Hatzelmann A. *The effect of Sildenafil on human platelet secretory function is controlled by a complex interplay between phosphodiesterases 2, 3 and 5.* Cell Signal 2005; 17:331-9.

Egenthaler M, Nolte C, Halbrügge M, Walter U. *Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells.* Eur J Biochem 1992; 205:471-81.

Fiander H, Schneider H. *Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics.* Cancer Lett 2000; 156:117-24.

Fox JE, Berndt MC. *Cyclic AMP-dependent phosphorylation of glycoprotein Ib inhibits collagen-induced polymerization of actin in platelets.* J Biol Chem 1989; 264:9520–6.

Fox JE. *The platelet cytoskeleton.* Thromb Haemost 1993; 70:884-93.

Franke AA, Cooney RV, Custer LJ, Mordan LJ, Tanaka Y. *Inhibition of neoplastic transformation and bioavailability of dietary flavonoid agents.* Adv Exp Med Biol 1998; 439:237-48.

Furie B, Furie BC. *In vivo thrombus formation.* J Thromb Haemost 2007; 5:12-7.

Gerrard JM, White JG, Peterson DA. *The platelet dense tubular system: its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux.* Thromb Haemost 1978; 40:224-31.

Gerwitz DA. *Does bulk damage to DNA explain the cytostatic and cytotoxic effects of topoisomerase II inhibitors?* Biochem Pharmacol 1991; 42:2253–58

Halbrügge M, Walter U. *Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets.* Eur J Biochem 1989; 185:41-50.

Hartwig J, Italiano J Jr. *The birth of the platelet.* J Thromb Haemost 2003; 1:1580-6.

Heyerick A, Vervarcke S, Depypere H, Bracke M, De Keukeleire D. *A first prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts.* Maturitas. 2006 May 20;54(2):164-75.

Hubbard GP, Wolfram S, Lovegrove JA, Gibbins JM. *The role of polyphenolic compounds in the diet as inhibitors of platelet function.* Proc Nutr Soc 2003; 62:469-78.

Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. *Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention*. Nutr Cancer 2010; 62:1-20.

Italiano JE Jr, Patel-Hett S, Hartwig JH. *Mechanics of proplatelet elaboration*. J Thromb Haemost 2007; 5:18-23.

Jackson SP, Schoenwaelder SM, Yuan Y, Salem HH, Cooray P. *Non-receptor protein tyrosine kinases and phosphatases in human platelets*. Thromb Haemost 1996; 76:640-50.

Janssen K, Mensink RP, Cox FJ, Harryvan JL, Hovenier R, Hollman PC, Katan MB. *Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study*. Am J Clin Nutr 1998; 67:255-62.

King SM, Reed GL. *Development of platelet secretory granules*. Cell Dev Biol 2002; 13:293-302.

Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. *Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study*. BMJ 1996; 312:478-81.

Knight DC, Eden JA. *A review of the clinical effects of phytoestrogens*. Obstet Gynecol 1996; 87:897-904.

Knight CG, Morton LF, Onley DJ, Peachey AR, Ichinohe T, Okuma M, Farndale RW, Barnes MJ. *Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen*. Cardiovasc Res 1999; 41:450-7.

Koziak K, Kaczmarek E, Park SY, Fu Y, Avraham S, Avraham H. *RAFTK/Pyk2 involvement in platelet activation is mediated by phosphoinositide 3-kinase*. Br J Haematol 2001; 114:134-40.

Kroll MH, Schafer AI. *Biochemical mechanisms of platelet activation*. Blood 1989; 74:1181-95.

Kroner C, Eybrechts K, Akkerman JW. *Dual regulation of platelet protein kinase B*. J Biol Chem 2000; 275:27790-8.

Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. *Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines*. Eur J Nutr 1999; 38:133-42.

Landolfi R, Mower RL, Steiner M. *Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations*. Biochem Pharmacol 1984; 33:1525-30.

Lindahl M, Tagesson C. *Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2*. Inflammation 1997; 21:347-56.

- Lee CA, Manyike PT, Thummel KE, Nelson SD, Slattery JT. *Mechanism of cytochrome P450 activation by caffeine and 7,8-benzoflavone in rat liver microsomes*. Drug Metab Dispos 1997; 25:1150-6.
- Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. *Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases*. Trends Biochem Sci 1997; 22:307-12.
- Lopez-Illasaca M. *Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades*. Biochem Pharmacol 1998; 56:269-77.
- Majerus PW. *Platelets*. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varmus H. (eds): The molecular basis of blood disease 1987; 22:753-785.
- Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S. *Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data*. Nutr Cancer 1994; 21:113-31.
- Milligan SR, Kalita JC, Heyerick A, Rong H, De Cooman L, De Keukeleire D. *Identification of a potent phytoestrogen in hops (Humulus lupulus L.) and beer*. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:2249-52.
- Milligan SR, Kalita JC, Pocock V, Van De Kauter V, Stevens JF, Deinzer ML, Rong H, De Keukeleire D. *The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (Humulus lupulus L.) flavonoids*. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:4912-5.
- Milligan S, Kalita J, Pocock V, Heyerick A, De Cooman L, Rong H, De Keukeleire D. *Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin*. Reproduction 2002; 123:235-42.
- Miyamoto M, Matsushita Y, Kiyokawa A, Fukuda C, Iijima Y, Sugano M, Akiyama T. *Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 2). Estrogenic effects of 8-isopentenylaringenin on bone metabolism*. Planta Med. 1998; 64:516-9.
- Moro L, Reineri S, Piranda D, Pietrapiana D, Lova P, Bertoni A, Graziani A, Defilippi P, Canobbio I, Torti M, Sinigaglia F. *Nongenomic effects of 17beta-estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor beta and Src kinase*. Blood 2005; 105:115-21.
- Moroi M, Jung SM, Nomura S, Sekiguchi S, Ordinas A, Diaz-Ricart M. *Analysis of the involvement of the von Willebrand factor-glycoprotein Ib interaction in platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions*. Blood 1999; 90: 4413-4424.
- Moroi M, Jung SM. *Platelet glycoprotein VI: its structure and function*. Thromb Res 2004; 114:221-33.

- New L, Han J. *The p38 MAP kinase pathway and its biological function*. Trends Cardiovasc Med 1998; 8:220-8.
- Nieswandt B, Watson SP. *Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?* Blood 2003; 102:449-61.
- Pepper MS, Hazel SJ, Hümpel M, Schleuning WD. *8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo*. J Cell Physiol 2004; 199:98-107.
- Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. *Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols*. Free Radic Res 2006; 40:1054-65.
- Polette A, Lemaitre D, Lagarde M, Véricel E. *N-3 fatty acid-induced lipid peroxidation in human platelets is prevented by catechins*. Thromb Haemost 1996; 75:945-9.
- Polgár J, Clemetson JM, Kehrel BE, Wiedemann M, Magnenat EM, Wells TN, Clemetson KJ. *Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from Crotalus durissus terrificus (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor*. J Biol Chem 1997; 272:13576-83.
- Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K. *Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review*. Inflamm Allergy Drug Targets 2009; 8:229-35.
- Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. *Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals*. Ann Intern Med 1996; 125:384-9.
- Rockenfeller P, Madeo F. *Ageing and eating*. Biochim Biophys Acta 2010; 1803:499-506.
- Rong H, Boterberg T, Maubach J, Stove C, Depypere H, Van Slambrouck S, Serreyn R, De Keukeleire D, Mareel M, Bracke M. *8-Prenylnaringenin, the phytoestrogen in hops and beer, upregulates the function of the E-cadherin/catenin complex in human mammary carcinoma cells*. Eur J Cell Biol 2001; 80:580-5.
- Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. *Adhesion mechanisms in platelet function*. Circ Res 2007; 100:1673-85.
- Rusznayk SP, Szent-Gyorgyi A. *Vitamin P: flavonols as vitamins*. Nature 1936; 138:27
- Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, Jabbar A. *Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates*. Nat Prod Rep 2010; 27:238-54.
- Schaefer O, Hümpel M, Fritzemeier KH, Bohlmann R, Schleuning WD. *8-Prenyl naringenin is a potent ERalpha selective phytoestrogen present in hops and beer*. J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 84:359-60.

- Schwarz UR, Kobsar AL, Koksich M, Walter U, Eigenthaler M. *Inhibition of agonist-induced p42 and p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and CD40 ligand/P-selectin expression by cyclic nucleotide-regulated pathways in human platelets*. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1399–407.
- Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. *Taming platelets with cyclic nucleotides*. *Biochem Pharmacol* 2001; 62:1153-61.
- Shattil SJ, Newman PJ. *Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets*. *Blood* 2004; 104:1606-15.
- Shukla SK, Gupta S, Ojha SK, Sharma SB. *Cardiovascular friendly natural products: a promising approach in the management of CVD*. *Nat Prod Res* 2010; 24:873-98
- Siess W, Winegar DA, Lapetina EG. *Rap1-B is phosphorylated by protein kinase A in intact human platelets*. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170:944–50.
- Soderling SH, Beavo JA. *Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions*. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12:174-9.
- Stevens JF, Taylor AW, Clawson JE, Deinzer ML. *Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer*. *J Agric Food Chem* 1999;47:2421-8.
- Tomer A. *Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes*. *Blood* 2004; 104:2722-7.
- Walter U, Eigenthaler M, Geiger J, Reinhard M. *Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets*. *Adv Exp Med Biol* 1993; 344:237-49.
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. *Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells*. *Cancer Res* 2000; 60:3823-31.
- White JG, Escolar G. *The blood platelet open canalicular system: a two-way street*. *Eur J Cell Biol* 1991; 56:233-42.
- Zhang J, Banfić H, Straforini F, Tosi L, Volinia S, Rittenhouse SE. *A type II phosphoinositide 3-kinase is stimulated via activated integrin in platelets. A source of phosphatidylinositol 3-phosphate*. *J Biol Chem* 1998; 273:14081-4.

Zierau O, Morrissey C, Watson RW, Schwab P, Kolba S, Metz P, Vollmer G. *Antiandrogenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin and 8-prenylnaringenin.* *Planta Med.* 2003; 69:856-8.

ATTIVITA' FORMATIVA

Seminari seguiti durante il 3° anno di dottorato:

14 ottobre 2009

Regolazione del metabolismo del ferro: nuove acquisizioni

Prof. C. Camaschella

27 ottobre 2009

Alterazioni molecolari nei carcinomi polmonari: focus sulle terapie bersaglio-specifiche

Dott. M. Frattini

4 novembre 2009

Naproxinod, un nuovo anti-infiammatorio con elevata tollerabilità cardiovascolare

Dott. E. Ongini

17 novembre 2009

ALK e tumorigenesi

Prof. G. Inghirami

30 novembre 2009

Use of MAR epigenetic regulators for therapeutic expression

Prof. N. Mermoud

14 dicembre 2009

Controllo funzionale dei linfociti T da parte di adenosina trifosfato (ATP) extracellulare

Dott. F. Grassi

14 gennaio 2010

Clinical significance of Antinuclear Antibodies in Autoimmune liver disease

Prof. P. Invernizzi

20 gennaio 2010

LSD1, Lysine Specific Demethylase1: insight into a new epigenetic regulator involved in neuronal gene regulation

Dott. E. Battaglioli

21 gennaio 2010

Cellule mesenchimali stromali fetali ed adulte: potenziali applicazioni in patologie ischemiche

Prof. G. Alessandri

28 gennaio 2010

Dal difetto genetico all'infiammazione

Prof. L. Maiuri

9 febbraio 2010

R & D of magnetic-nanoparticles and carriers for drugs

Dott. G. Baldi

11 febbraio 2010

A novel antiviral mechanism mediated by the chemokine receptor CCR6

Prof. A. Garzino-Demo

17 febbraio 2010

Computational analysis of protein-protein interactions

Prof. S. Pieraccini

3 marzo 2010

Basi genetiche del diabete di tipo 1 e della sclerosi multipla: l'esempio della popolazione sarda

Prof. F. Cucca

4 marzo 2010

I virus dell'influenza: aspetti patogenetici, epidemiologici e preventivi

Prof. A. Azzi

5 marzo 2010

The Wonders of Yeast: Yeast as a Model Organism

Prof. S. Ellis

8 marzo 2010

Chromosome 5q deletions in MDS: Genotype/Phenotype Relationships

Prof. S. Ellis

9 marzo 2010

Dasatinib: Transforming an adverse event into a new therapeutic target

Prof. S. Ellis

12 marzo 2010

Marcatori biologici per la diagnosi precoce delle malattie neurodegenerative

Prof. E. Scarpini

19 marzo 2010

Linfomi primitivi cerebrali: diagnosi e trattamento

Dott. A. Silvani

1 aprile 2010

Lo studio invasivo della rigidità aortica nell'uomo

Dott E. Franchi

29 aprile 2010

Alterazioni endocrino-metaboliche in età pediatrica: prevalenza della sindrome metabolica e regolazione del sistema ghrelinergico

Dott.ssa F. Prodam

6 maggio 2010

The Molecular Biology of Human Papillomavirus Infection and Disease

Dott. J. Doorbar

10 maggio 2010

4D Imaging of Tumor Proteolysis: Impact of microenvironment

Prof. B. F. Sloane

13 maggio 2010

L'impatto del background genetico dell'ospite sulla prognosi nelle neoplasie linfoidi B

Dott. S. Rasi

20 maggio 2010

Aspetti endocrino-metabolici in transessuali (trans gender): modello fisiopatologico innovativo?

Prof. D. Ferone

26 maggio 2010

Prediction of RNA-RNA interaction

Dott. H. Tafer

27 maggio 2010

Meccanismi molecolari associati a trasformazione da leucemia linfatica cronica a linfoma aggressivo

Dott. V. R. Spina

4 giugno 2010

Functional nanocomposite for pharmaceutical application from physicochemical viewpoints

Prof. M. Senna

14 giugno 2010

Fenotipo e cellule staminali tumorali nei gliomi maligni

Prof. D. Schiffer

15 giugno 2010

Nuove strategie anticancro: i microRNA come agenti differenziativi per i tumori solidi

Prof. C. Ponzetto

17 giugno 2010

Human CD38: a long journey from prognostic marker to key element in the pathogenesis, maintenance and progression of chronic lymphocytic leukemia

Dott. S. Deaglio

17 giugno 2010

Combating Bioterrorism: New Antidotes for an Old Poison

Dott. S. Ellis

21 giugno 2010

Infezione cronica da virus B conclamata ed occulta: diagnosi ed implicazioni cliniche

Dott. A. Marzano

28 giugno 2010

Insufficienza Venosa Cerebrospinale Cronica: una nuova prospettiva per la Sclerosi Multipla?

Prof. P. Zamboni

28 giugno 2010

Le cellule staminali mesenchimali: potenziale terapeutico nelle malattie del motoneurone e della mielina

Prof. F. Fagioli

30 giugno 2010

Identificazione di antigeni per la diagnosi e la terapia del carcinoma pancreatico mediante l'analisi sierologica del proteoma

Prof. F. Novelli

5 luglio 2010

Role of membrane lipids in neuronal synapses organization

Dott. P. Camoletto

6 luglio 2010

Tissue Transglutaminase, a polyhedric enzyme: friend or foe?

Dott. D. Fortunati

22 settembre 2010

New aspects of cathepsin e functions in host defense mechanisms

Prof. K. Yamamoto

22 Settembre 2010

Dott. R. De Maria

Le cellule staminali tumorali: dalla biologia alla clinica

23 Settembre 2010

Preventing Persisters: Targeting Epigenetic Changes in Cancer Chemotherapy

Dr. Steven R. Ellis

24 settembre 2010

A self-antigen peptidome carried by the human lymph

Prof. L. Santambrogio

24 settembre 2010

Low-dose Bafilomycin is cytoprotective against Lysosome dysfunction, implication of an Autophagy-associated therapeutic target for Neurodegenerative disease

Dott. J. SHACKA

SEZIONE 2

CONGRESSI FREQUENTATI

55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

Milano, 14-17 Settembre 2010

Nottingham Platelet Conference

Nottingham, 15-16 luglio 2010

23^a Riunione Nazionale "A. Castellani" dei Dottorandi di Ricerca in Discipline Biochimiche

Brallo di Pregola, 7-11 giugno 2010

Convegno annuale della sezione ligure – lombardo – piemontese della Societa' Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare (LLP 2010)

Varese, 28 maggio 2010

54th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

Catania, 23-27 Settembre 2009

La medicina riparativa e le biotecnologie: attualità, prospettive e normative

Pavia, 18 Settembre 2009

22^a Riunione nazionale "A. Castellani" dei dottorandi di ricerca in discipline biochimiche

Brallo di Pregola, 9-12 giugno 2009

Cellule staminali mesenchimali in clinica umana e veterinaria Giornata di Studio e aggiornamento

Brescia, 16 Ottobre 2008

10° Congresso nazionale di Biotecnologie CNBX,

Perugia, 17-19 settembre 2008

COMUNICAZIONI A CONGRESSI :

Comunicazioni presentate personalmente:

55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

Milano, 14-17 settembre 2010

Effects of 8-prenylnaringenin on human platelets activation and aggregation

C. Di Vito, A. Rastoldo, A. Bagarotti, S. Sampietro, A. Bertoni, F. Sinigaglia (poster)

Nottingham Platelet Conference

Nottingham, 15-16 luglio 2010

Inhibition of collagen-dependent platelet aggregation by 8-prenylnaringenin

C. Di Vito, A. Rastoldo, A. Bagarotti, S. Sampietro, A. Bertoni, F. Sinigaglia (poster)

23^a Riunione Nazionale "A. Castellani" dei Dottorandi di Ricerca in Discipline Biochimiche - Brallo di Pregola (Pavia), 7-11 giugno 2010

Inhibition of collagen-dependent platelet aggregation by 8-prenylnaringenin

C. Di Vito, A. Rastoldo, A. Bagarotti, S. Sampietro, A. Bertoni, F. Sinigaglia (presentazione orale)

Convegno annuale della sezione ligure – lombardo – piemontese della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare (LLP 2010)

Varese, 28 maggio 2010

Effects of 8-prenylnaringenin on human platelet activation and aggregation

C. Di Vito, A. Rastoldo, A. Bagarotti, S. Sampietro, A. Bertoni, F. Sinigaglia (presentazione orale)

54th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB) - Catania, 23-27 Settembre 2009

Analysis of expression of classical estrogen receptors and GPR30 during megakaryoblastic differentiation

C. Di Vito, S. Bergante, A. Rastoldo, A. Bagarotti, A. Bertoni, F. Sinigaglia (poster)

10° Congresso nazionale di Biotecnologie (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, A. Bertoni (poster)

Altre comunicazioni

55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

Milano, 14-17 settembre 2010

Preliminary analysis of R59022-Diacylglycerol Kinases inhibition during Megakaryocytopoiesis

S. Sampietro, A. Bagarotti, **C. Di Vito**, A. Rastoldo, F. Sinigaglia, A. Bertoni (poster)

55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

Milano, 14-17 settembre 2010

Role of 2-AG catabolism on platelet aggregation

S. Saragozza, A. Bagarotti, S. Sampietro, **C. Di Vito**, A. Rastoldo, F. Sinigaglia, A. Bertoni

55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

Milano, 14-17 settembre 2010

Endocannabinoids and murine Megakaryocytic differentiation

A. Bagarotti, S. Sampietro, **C. Di Vito**, A. Rastoldo, F. Sinigaglia, A. Bertoni

55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

Milano, 14-17 settembre 2010

Modulation of platelet functionality by Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandrosterone-Sulfate

A. Rastoldo, A. Bagarotti, **C. Di Vito**, S. Sampietro, A. Bertoni, F. Sinigaglia

Nottingham Platelet Conference

Nottingham, 15-16 luglio 2010

Effect of Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandrosterone-Sulfate on platelet function

A. Rastoldo, **C. Di Vito**, A. Bagarotti, S. Sampietro, A. Bertoni, F. Sinigaglia

23a Riunione Nazionale "A. Castellani" dei Dottorandi di Ricerca in Discipline Biochimiche

Brallo di Pregola (Pavia), 7-11 giugno 2010

Modulation of murin megakaryocytic differentiation by endocannabinoids

A. Bagarotti, S. Sampietro, **C. Di Vito**, A. Rastoldo, F. Sinigaglia, A. Bertoni

23a Riunione Nazionale "A. Castellani" dei Dottorandi di Ricerca in Discipline Biochimiche

Brallo di Pregola (Pavia), 7-11 giugno 2010

Preliminary analysis of R59022-Diacylglycerol Kinases inhibition during Megakaryocytopoiesis

S. Sampietro, A. Bagarotti, **C. Di Vito**, A. Rastoldo, F. Sinigaglia, A. Bertoni

23a Riunione Nazionale "A. Castellani" dei Dottorandi di Ricerca in Discipline Biochimiche

Brallo di Pregola (Pavia), 7-11 giugno 2010

Inhibition of Thrombin induced platelet aggregation by Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandrosterone-Sulfate

A. Rastoldo, A. Bagarotti, **C. Di Vito**, S. Sampietro, A. Bertoni, F. Sinigaglia

10^a Riunione del Gruppo di Studio Piastrine

Termoli, 4-6 Ottobre 2009

Dehydroepiandrosterone-sulfate inhibits thrombin-induced platelet aggregation

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

21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology Shanghai,

2-7 Agosto 2009

Inhibition of thrombin induced platelet aggregation by dehydroepiandrosterone-sulfate

A. Rastoldo, C. Sarasso, A. Bagarotti, **C. Di Vito**, A. Bertoni, F. Sinigaglia

Platelets 2008: 5th International Symposium, Marine Biological Laboratory

Woods Hole, MA, 15-18 ottobre 2008

Estrogen and its precursor dehydroepiandrosterone directly affect platelet function with opposite effects

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

Platelets 2008: 5th International Symposium, Marine Biological Laboratory

Woods Hole, MA, 15-18 ottobre 2008

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

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

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

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

10° Congresso nazionale di Biotecnologie 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

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO:

Di Vito C, Bergante S, Balduini A, Rastoldo A, Bagarotti A, Surico N, Bertoni A, Sinigaglia F. *The oestrogen receptor GPER is expressed in human haematopoietic stem cells but not in mature megakaryocytes*. Br J Haematol. 2010 Apr;149(1):150-2.

ALTRI ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI:

Di Vito C, Emanuele E, Lista S. *Demineralized bone matrix enriched with human recombinant interleukin-11: a novel therapeutic option in treatment of delayed unions and nonunions?* Med Hypotheses. 69(4): 954, 2007

Minoretti P, Bruno A, **Di Vito C**, Emanuele E. *Leflunomide as an antiatherogenic drug*. Med Hypotheses. 68(5): 1175-6, 2007

Di Vito C, Bruno A, Emanuele E. *Potential usefulness of sevelamer hydrochloride to improve cardiac outcome in patients with coronary disease and normal renal function*. Med Hypotheses. 68(5): 1182-3, 2007.

Minoretti P, Politi P, Coen E, **Di Vito C**, Bertona M, Bianchi M, Emanuele E. *The T393C polymorphism of the GNAS1 gene is associated with deficit schizophrenia in an Italian population sample*. Neurosci Lett, 397: 159–163, 2006.

Minoretti P, Gazzaruso C, **Di Vito C**, Emanuele E, Bianchi M, Coen E, Reino M, Geroldi D. *Effect of the functional toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism on susceptibility to late-onset Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 391: 147–149, 2006.

Geroldi D, Minoretti P, Bianchi M, **Di Vito C**, Reino M, Bertona M, Emanuele E. *Genetic association of alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein polymorphism with late-onset Alzheimer's disease in Italians*. Neurosci Lett, 386: 176–178, 2005.