

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



Dottorato di Ricerca

in

Medicina Molecolare

Ciclo XXIII

Relazione 3° anno

TITOLO:

**Deidroepiandrosterone-solfato inibisce l'aggregazione
piastrinica trombina dipendente**

Candidato: Rastoldo Alessandro

Tutor: Prof. Sinigaglia Fabiola

INDICE

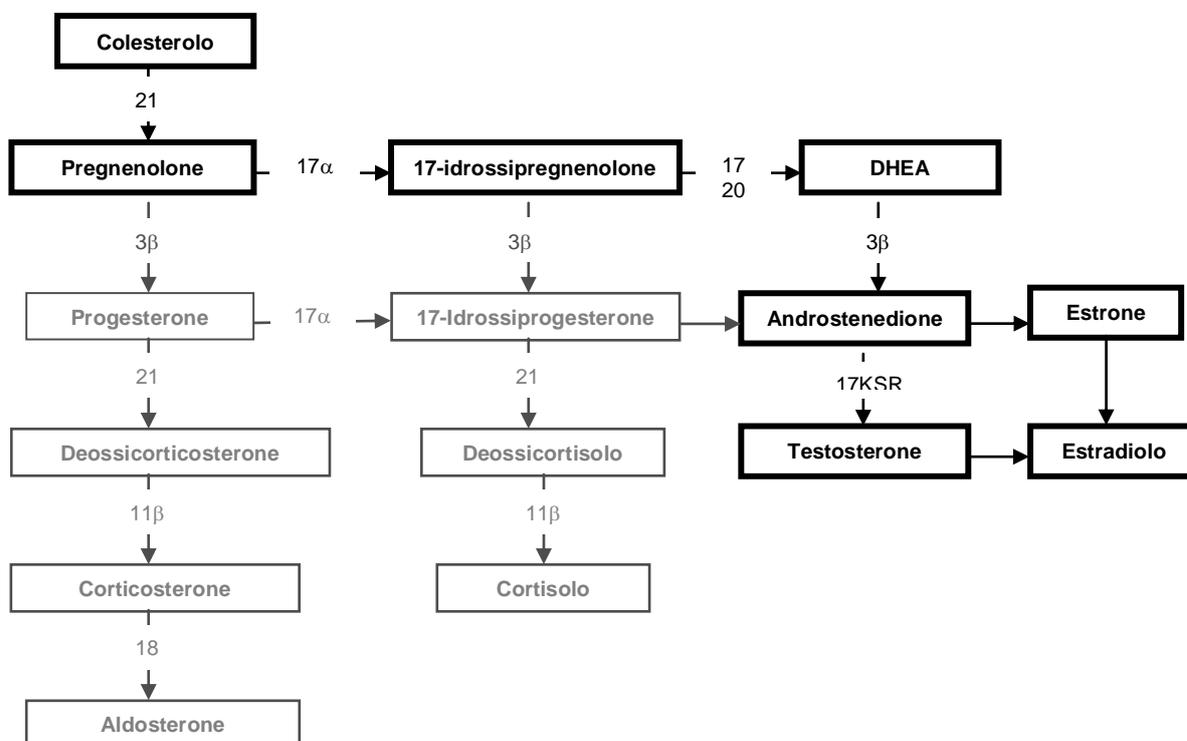
1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 Deidroepiandrosterone	3
1.2 Meccanismi d'azione del DHEA.....	5
1.3 Trombina	7
2. SCOPO DEL LAVORO	8
3.1 Materiali	9
3.2 Isolamento delle piastrine.....	9
3.3 Analisi dell'aggregazione piastrinica.....	10
3.4 Elettroforesi ed immunoblotting	10
3.5 Saggio cGMP	11
4.1 Effetto del DHEA-S sull'attivazione piastrinica.....	12
4.2 Effetto del DHEA-S sulla via del cGMP.....	16
4.3 Effetto del DHEA-S sull'attività della PKC	20
5. DISCUSSIONE	23
6. BIBLIOGRAFIA	25
7. ATTIVITA' FORMATIVA	27

SEZIONE 1
RISULTATI SCIENTIFICI

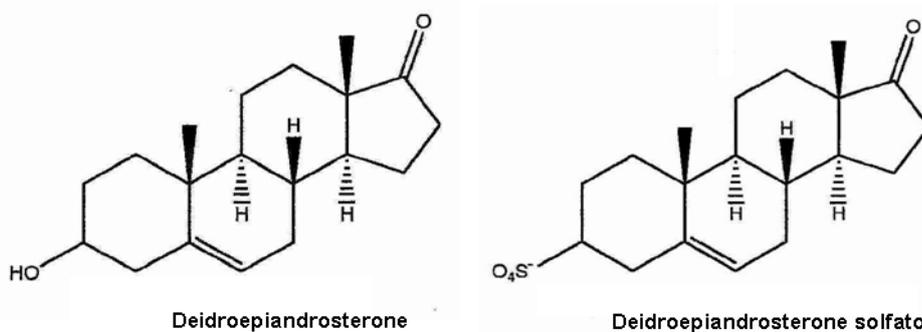
1. INTRODUZIONE

1.1 Deidroepiandrosterone

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è un ormone steroideo prodotto dalla corteccia surrenale quando stimolata dall'ormone adrenocorticotropo (ACTH) secreto dalla ghiandola ipofisaria (1). Lo stimolo con ACTH promuove nella corteccia la conversione del colesterolo in DHEA, che a sua volta è precursore di ormoni steroidei quali estrogeni e androgeni (2). La sintesi del DHEA si attua in 3 reazioni distinte di cui due citocromo P450-dipendente. Nella prima reazione catalizzata dall'enzima 21-desmolasi il colesterolo viene idrossilato in posizione 21 con formazione di pregnenolone. Successivamente l'enzima 17α -idrossilasi catalizza la seconda reazione di idrossilazione che converte il pregnenolone in 17α -idrossipregnenolone. Infine per azione di una liasi (C17,20 liasi) si forma il DHEA che a sua volta può essere convertito in estrogeno o testosterone. Questa ultima trasformazione è dipendente da diversi fattori che variano da individuo a individuo come ad esempio il sesso e l'età (3).



Nel circolo sanguigno il DHEA è il più abbondante ormone steroideo ed è presente soprattutto nella forma idrosolubile DHEA solfato (DHEA-S). La conversione da DHEA a DHEA-S è catalizzata da una specifica sulfotransferasi (SULT2A1) principalmente nella surrene, ma può avvenire anche nel fegato e nell'intestino (4). La forma solfata rappresenta una riserva per il DHEA, mantiene livelli stabili nell'arco della giornata ed ha emivita più lunga (7-10 ore contro 15-30 minuti del DHEA) per via di una più ridotta eliminazione, mentre la frazione non solfata presenta importanti variazioni giornaliere (5). La concentrazione plasmatica di DHEA-S risulta massima intorno all'età di ventuno anni (3 µg/l), si mantiene costante per circa dieci anni, poi diminuisce più rapidamente dopo i quaranta (1.5-2 µg/l) tanto che ad ottanta il livello non supera il 10 % della concentrazione massima raggiunta a vent'anni (2).



Il DHEA, oltre ad essere un precursore ormonale, è utile nella terapia di malattie autoimmuni (lupus) (6) e inibisce l'attività dell'enzima glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G6PD) spesso associata ad alcuni processi cancerogenici (2). Inoltre il DHEA:

- stimola la dilatazione delle arterie coronarie successivamente alla sua conversione in estradiolo o in testosterone, due ormoni vasodilatatori, esercitando un'azione cardioprotettiva (5);
- diminuisce l'aggregazione e l'adesione piastrinica alle cellule endoteliali, riducendo in tal modo il rischio dell'insorgenza di placche aterosclerotiche. Azione antiaterogena (5);
- accresce la risposta immunitaria e ottimizza l'effetto dei vaccini potenziando così il sistema immunitario (7);
- può avere un'azione anti-stress (8).

Di notevole rilevanza sono gli studi che recentemente hanno dimostrato che il DHEA è anche in grado di contrastare efficacemente problemi legati all'invecchiamento come:

- l'osteoporosi, aumentando la densità minerale ossea (9);
- la formazione di anomalie pigmentarie della pelle aumentando sensibilmente la produzione di sebo (10);
- la degenerazione delle cellule cerebrali migliorando la memoria (11,12).

1.2 Meccanismi d'azione del DHEA

Gli effetti del DHEA sono da tempo noti, ma i suoi meccanismi d'azione sono di difficile interpretazione. Documentata è l'azione del DHEA sui vasi sanguigni: la sua attività è basata sull'attivazione della ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), una famiglia di enzimi che produce ossido nitrico (NO) (13). In cellule endoteliali e cellule derivanti dalla cresta neurale sembra poi che gli effetti siano mediati dal reclutamento di una proteina G accoppiata al recettore (GPCR) (14, 11), escludendo quindi la competizione con gli altri ormoni steroidei (estrogeni e androgeni) per i loro recettori (15). Infine a contatto con cellule del tessuto osseo o della pelle, il DHEA può esercitare la sua azione protettiva legandosi ai recettori degli estrogeni (ER) o degli androgeni (AR) (16,10). Da questa serie di studi è emerso che gli effetti del DHEA potrebbero dipendere dalla presenza di uno specifico recettore che attualmente però non è ancora stato individuato (17).

Il principale meccanismo d'azione del DHEA è basato sull'aumento della sintesi dell'NO (17), molecola segnale gassosa in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana cellulare e agire come potente vasodilatatore, come inibitore della proliferazione nel muscolo liscio e come inibitore dell'adesione e aggregazione piastrinica (13). Viene sintetizzato dalle NOS a partire dall'aminoacido L-arginina nella reazione che porta alla formazione di citrullina (13).

Sono note tre isoforme di ossido nitrico sintasi: NOS1 (NOS neuronale), NOS2 (NOS inducibile) e NOS3 (NOS endoteliale) (18). Generalmente l'attività della NOS3 può essere aumentata attraverso meccanismi trascrizionali, ma considerata la rapidità di risposta sembra più probabile che il DHEA agisca indipendentemente dall'attivazione dell'espressione genica e dalla sintesi proteica (17).

La sintesi di NO porta all'attivazione della guanilato ciclasi solubile (sGC) che produce a partire dal GTP un aumento dei livelli di GMP ciclico (cGMP) implicato poi nell'attivazione

della proteina chinasi GMP ciclico dipendente (cGPK o PKG) dalla cui azione dipendono gli effetti biologici dell'ormone (18). La PKG è un dimero costituito da una subunità catalitica (C) e da una subunità regolatoria (19). Quando il GMP ciclico si lega alla subunità R avviene un cambio conformazionale e si ha il rilascio della subunità C che media la fosforilazione di substrati su residui di serina e treonina. Il DHEA, favorendo la sintesi di NO, sarebbe quindi implicato nella stimolazione diretta dell'attività della sGC (13).

Nelle piastrine, contrariamente alle altre linee cellulari, la via del cGMP attiva un segnale di tipo inibitorio. Una seconda via inibitoria nota è quella cAMP dipendente. Perché questa si attivi è necessario che ligandi come adenosina, PGI₂, PGE₁, e PGD₂ si leghino ai rispettivi recettori di membrana per stimolare, attraverso la subunità G α s delle proteine G, l'adenilato ciclasi (AC) (20). (Altri ligandi come ADP e adrenalina legandosi ai rispettivi recettori mediano l'inibizione dell'adenilato ciclasi attraverso il legame alla subunità G α i (21)). Sono conosciute 9 isoforme di AC; nelle piastrine quella maggiormente espressa è l'isoforma 7 (22). L'adenilato ciclasi è una proteina strutturale di membrana che catalizza la trasformazione dell'ATP in cAMP la cui funzione è quella di attivare la proteina chinasi cAMP dipendente (cAPK o PKA) (23). Tra i bersagli di PKG e PKA c'è la proteina VASP ("vasodilator-stimulated phosphoprotein") (24).

VASP (46 kDa) è un membro della famiglia delle proteine ricche in prolina ed ha localizzazione citoscheletrica (24). La forma attiva (defosforilata) lega filamenti di actina (F-actina) e profilina, una proteina che forma complessi con la G-actina, svolgendo un ruolo importante nella riorganizzazione del citoscheletro e nella motilità cellulare (eventi implicati nell'attivazione piastrinica) (25). Oltre che nelle piastrine, VASP si trova in un'ampia varietà di tipi cellulari come: fibroblasti, neutrofili, cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule del muscolatura liscia dei vasi (25).

PKA e PKG sono responsabili dell'inattivazione di VASP mediante fosforilazione sulla serina¹⁵⁷, serina²³⁹ e sulla treonina²⁷⁸, ma se la via attivata è GMP ciclico dipendente il sito maggiormente fosforilato è sulla serina²³⁹, mentre se la via è AMP ciclico dipendente il principale sito coinvolto è sulla serina¹⁵⁷. Il legame di un gruppo fosfato a questa serina porta ad un apparente cambio di peso molecolare, che passa da 46 kDa a 50 kDa, facilmente apprezzabile in elettroforesi (24, 26).

1.3 Trombina

La trombina è un forte agonista piastrinico (27). Circola nel plasma sotto forma di zimogeno inattivo (protrombina) che viene convertita in seguito all'azione delle serine proteasi (fattori della coagulazione) attivate lungo la cascata coagulativa mediante taglio proteolitico (27).

La trombina induce l'attivazione e l'aggregazione piastrinica promuovendo il legame del fibrinogeno all'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$: segnalazione inside-out. Tale legame media a sua volta il segnale outside-in inducendo una serie di eventi intracellulari che portano al rilascio di vescicole di membrana procoagulanti, alla riorganizzazione del citoscheletro ed alla retrazione del coagulo (28).

Questo agonista attiva le piastrine agendo proteoliticamente sui recettori PAR (Protease Activated Receptor) (29). I PAR sono recettori a sette domini transmembrana accoppiati a proteine G eterotrimeriche (27). Quattro sono i recettori fino ad ora identificati, ma sulle piastrine umane sono presenti solo PAR-1 e PAR-4 che possiedono una diversa affinità per la trombina: PAR-4 richiede per la sua attivazione concentrazioni di agonista molto più alte rispetto a PAR-1 (27). La trombina taglia una porzione di circa 40 aminoacidi all'estremità NH₂-terminale dei recettori PAR esponendo una nuova sequenza NH₂-terminale in grado di legarsi al corpo del recettore, che va così incontro ad un cambio conformazionale che attiva la proteina G associata (30). L'azione della trombina determina infine reazioni di rilascio del contenuto dei granuli, produzione di trombossano A₂, riorganizzazione del citoscheletro ed aggregazione irreversibile (30). Lo spegnimento del segnale avviene attraverso un fenomeno di desensitizzazione dei recettori che li rende refrattari ad una successiva stimolazione: vengono infatti fosforilati su residui di serina e treonina nella loro porzione citoplasmatica che ne segnala la rimozione dalla membrana o pur restando in membrana risultano insensibili ad una successiva stimolazione (31 e 32).

La trombina possiede anche un altro recettore cioè la subunità GPIb α del complesso glicoproteico GPIb-IX-V, a cui si lega senza avere su di essa alcuna azione proteolitica. Tale interazione avrebbe la funzione di posizionare correttamente l'enzima favorendo l'azione proteolitica su PAR-1 (29).

2. SCOPO DEL LAVORO

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è un ormone steroideo ed è il precursore di estrogeni e androgeni (2). Nel circolo sanguigno il DHEA è l'ormone steroideo più abbondante ed è presente soprattutto nella forma idrosolubile DHEA solfato (DHEA-S). La forma solfata rappresenta una riserva per il DHEA, mantiene livelli stabili nell'arco della giornata ed ha un'emivita più lunga per via di una ridotta eliminazione, mentre la frazione non solfata presenta importanti variazioni giornaliere (5). La concentrazione plasmatica di DHEA (e DHEA-S) decresce nel corso della vita (2); infatti sono attribuiti a questo ormone effetti protettivi verso l'insorgenza di malattie tipiche dell'anziano.

In questo lavoro abbiamo già dimostrato che il DHEA-S inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da trombina (forte agonista piastrinico) e la fosforilazione di proteine attivate da diversi agonisti. Abbiamo poi quantificato i livelli di nucleotidi ciclici presenti al momento del trattamento con DHEA-S e la fosforilazione inibitoria della proteina citoscheletrica VASP. Lo studio è proseguito con l'intento di caratterizzare e completare il segnale di trasduzione coinvolto. E' stata considerata la via attivatoria che porta al rilascio del contenuto dai granuli densi, sono state così considerate proteine come ERK1/2, p38MAPK, Akt e Src e i loro livelli di fosforilazione a seguito del trattamento con DHEA-S. E' stata poi considerata la via inibitoria attraverso la misurazione dei livelli di cGMP e la correlata attivazione della guanilato ciclasi, nonché il coinvolgimento delle fosfodiesterasi piastriniche. Questo studio ci ha permesso di definire meglio alcuni aspetti legati all'inibizione piastrinica DHEA-S dipendente, ma rimangono ancora da chiarire alcuni aspetti legati alle fasi iniziali di tale attività.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

Sodio Nitroprussiato (SNP) acquistato dalla Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). Il kit cGMP (EIA) Assay design, hybond-P polyvinylidene difluoride (PVDF) membrana per il trasferimento acquistati dalla Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). L'anticorpo monoclonale anti-VASP-P239 anti-topo, anti-VASP-P157 anti-topo, l'anticorpo policlonale anti-VASP anti-coniglio forniti dalla Calbiochem (San Diego, CA). Gli anticorpi policlonali anti-fosfo-Akt (Ser473), anti-fosfo-p44/42 MAP chinasi (Thr202/Tyr204) e anti-fosfo-p38MAPK, anti-integrina β 3 forniti dalla Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Reagenti CHRONO-LUME forniti dalla CHRONO-LOG Corporation (Havertown, PA). L'anticorpo monoclonale anti-Actina fornito dalla Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anticorpo policlonale anti-Src chinasi (Tyr418), trombina, ADP, indometacina, apirasi, deidroepiandrosterone 3-solfato (DHEA-S), 3- β -Hydroxy-5-androsten-17-on (DHEA), zaprinast forniti dalla Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO). 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), ICI 182,780 e Ro 318220 acquistati dalla Tocris Bioscience (Bristol, UK).

Metodi

3.2 Isolamento delle piastrine

I campioni di sangue provengono da volontari sani che non abbiano assunto farmaci nei dieci giorni precedenti alla donazione. Il prelievo si effettua in presenza di ACD (130 mM acido citrico, 152 mM Na-citrato, 112 mM D-glucosio) nella proporzione di una parte ogni nove di sangue. I campioni aliquotati sono centrifugati a 120 x g per 10 minuti a temperatura ambiente in modo da separare il plasma ricco in piastrine (PRP) da globuli rossi e bianchi. Il PRP è quindi raccolto e centrifugato a 300 x g per 10 minuti a temperatura ambiente per separare il plasma povero in piastrine (PPP), che viene eliminato, dal pellet piastrinico che viene risospeso in gocce di ACD. Le piastrine vengono poi purificate mediante gel filtrazione su colonna di Sepharose 2B lavata in Tyrode a pH 7,4 (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2,9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃). Le piastrine ottenute vengono quindi contaminate al microscopio ottico su camera di Burker e portate alla concentrazione desiderata in Tyrode.

3.3 Analisi dell'aggregazione piastrinica

L'aggregazione piastrinica viene seguita utilizzando un aggregometro Chrono Log modello 560CA. Lo strumento registra le variazioni dell'assorbanza ottenuta dal passaggio di un fascio luminoso attraverso la sospensione piastrinica.

Le piastrine portate alla concentrazione di 3×10^8 /ml sono addizionate di glucosio (5,5 mM), CaCl_2 (2 mM) e MgCl_2 (2 mM) e lasciate riposare 30 minuti a temperatura ambiente prima di iniziare l'esperimento. Campioni da 400 μl vengono preincubati per 1 minuto con DHEA (10 nM) o con DHEA-S (0,3 mM) a 37°C sotto costante agitazione magnetica e poi stimolati con trombina (0,05 U/ml) da sola o in associazione con ADP (10 μM). L'aggregazione viene monitorata per almeno 5 minuti. In alcuni esperimenti le piastrine sono state trattate con (1 U/ml) apirasi, incubate con gli inibitori (1 μM) Zaprinast, (2 μM) Chelerritrina per 5 e 15 minuti, rispettivamente, prima dello stimolo con DHEA-S.

3.4 Elettroforesi ed immunoblotting

Piastrine gel-filtrate sono portate alla concentrazione di 1×10^9 /ml, addizionate di glucosio (5,5 mM) e lasciate riposare per 30 minuti a temperatura ambiente.

Campioni da 100 μl sono incubati per diversi tempi da 30 secondi a 5 minuti a 37°C con 0,3 mM DHEA-S, con 10 nM DHEA o Sodio Nitroprussiato (SNP). In alcuni esperimenti questo trattamento è stato preceduto dalla preincubazione con 2 μM ODQ (per 5 minuti), 1 μM Indometacina (per 10 minuti), 1 U/ml Apirasi (per 10 minuti) o 2 μM Chelerritrina (per 15 minuti), mentre in altri è stato effettuato uno stimolo con 0,05 U/ml trombina o 10 μM ADP. Le cellule vengono lisate in ghiaccio con Laemly Buffer 3x (6 % SDS, 1,5 % DTT, 30 % glicerolo, 0,03 % blu di bromofenolo) addizionato di inibitori (1 mM inibitori di proteasi, 3 mM glicerolo fosfato, 20 mM sodio pirofosfato, 1 mM ortovanadato, 10 mM sodio fluoruro, 1 mM EGTA). I campioni sono separati con SDS-PAGE su gel di poliacrilammide (10 %), trasferite su membrana PVDF e analizzati mediante immunoblotting utilizzando anticorpi anti-fosfo-Akt (Ser473), anti-fosfo-p44/42ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), anti-fosfo-p38 MAPK, anti-pTyr⁴¹⁸ Src chinasi, anti-VASP-Pser239, anti-VASP-Pser239, anti-VASP, anti-integrina β_3 e anti-actina.

3.5 Saggio cGMP

Piastrine gel-filtrate sono portate alla concentrazione di 4×10^8 /ml ed addizionate di glucosio 5,5 mM. Campioni da 200 μ l sono posti a 37° C, pretrattati o no con 2 μ M ODQ per 5 minuti e successivamente incubati con 0,3 mM DHEA-S, 10 nM DHEA o 100 μ M SNP per 1 minuto. Dopo aver bloccato la reazione e lisato le cellule con HCl, incubati a temperatura ambiente per 10 minuti e vortexati di tanto in tanto, i campioni vengono centrifugati a 1000xg per 10 minuti a 4° C per separare il precipitato dal surnatante che viene raccolto. I surnatanti così ottenuti sono stati conservati a -20°C. I livelli di cGMP sono stati dosati con un ELISA competitivo.

4. RISULTATI

4.1 Effetto del DHEA-S sull'attivazione piastrinica

Nei primi anni di dottorato abbiamo dimostrato che il DHEA-S (in circolo presente come forma di riserva) ma non il DHEA (forma attiva dell'ormone) inibisce l'aggregazione piastrinica e la secrezione dai granuli densi indotta da trombina senza coinvolgere il recettore degli estrogeni. Gli agonisti piastrinici, e in particolare un'agonista forte come la trombina, sono in grado di attivare dei meccanismi che portano alla fosforilazione diverse proteine chinasi come Src (33), le MAP chinasi ERK 1/2 (34) e p38 MAPK (35) e Akt (36). In seguito alla stimolazione con trombina si ha quindi la conseguente attivazione di queste proteine che porta al rilascio del contenuto dei granuli densi (ADP) e quindi potenziamento dell'aggregazione (37).

Dimostrato l'effetto inibitorio da parte del DHEA-S sull'attivazione piastrinica, abbiamo formulato delle ipotesi attraverso cui questo poteva diventare possibile. La prima considerazione fatta ci ha portato ad indagare la fosforilazione delle chinasi ERK 1/2, p38 MAPK, Akt indotta da trombina; la presenza di DHEA-S poteva ridurre questa fosforilazione come conseguenza di una ridotta secrezione di ADP o ridotta attivazione di Src.

Per dimostrare questa ipotesi campioni di piastrine [1×10^9 /ml] gel-filtrate sono stati pre-incubati a 37 °C con solvente, con 0,3 mM DHEA-S, con 10 nM DHEA o 1 μ M SNP per 1 minuto e successivamente stimolati con 0,05 U/ml trombina per 3 minuti. Successivamente alla lisi cellulare sono stati analizzati in immunoblotting con gli anticorpi specifici per le forme fosforilate Akt, ERK1/2, p38 MAPK. In figura 1A si può notare come in presenza di DHEA-S e SNP la fosforilazione di Akt, ERK1/2 e p38 MAPK causata da trombina sia notevolmente diminuita.

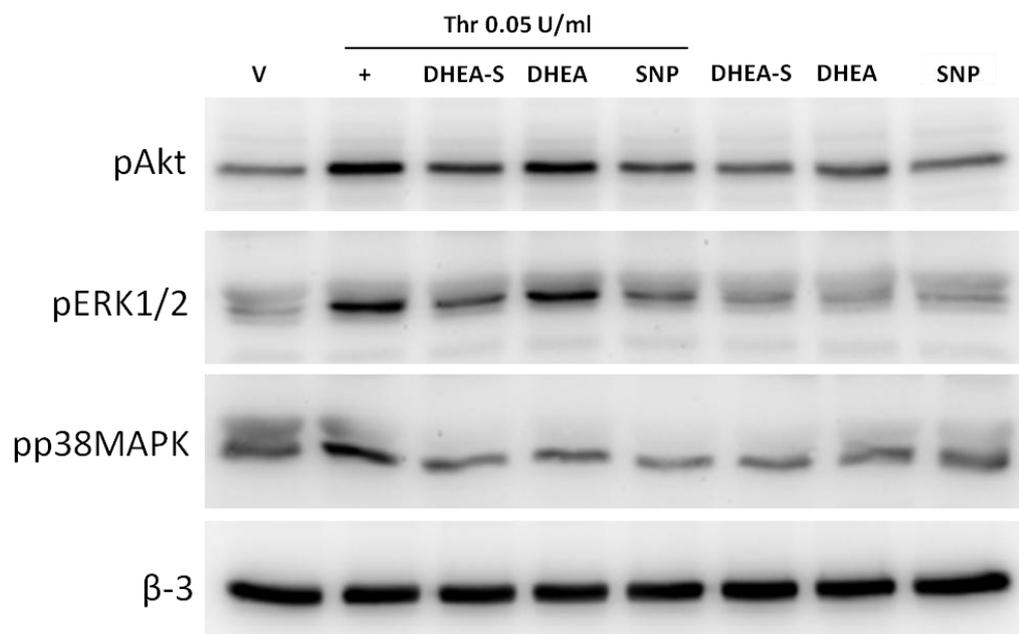


Fig. 1A

Effetto del DHEA-S e del DHEA sulla fosforilazione proteica di Akt, Erk1/2, p38. Campioni di piastrine gel-filtrate concentrate 1×10^9 /ml sono stati pretrattati con solvente (V), $0,3 \mu\text{M}$ DHEA-S, 10 nM DHEA o $1 \mu\text{M}$ SNP per 1 minuto e successivamente stimolati con $0,05 \text{ U/ml}$ trombina per 3 minuti. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici. In figura è riportato un esperimento rappresentativo di 3 condotti su piastrine di diversi donatori.

Analogamente a questo tipo di esperimento abbiamo proseguito lo studio utilizzando Indometacina e Apirasi come controllo; queste due molecole agiscono inibendo le cicloossigenasi e degradando l'ADP secreto, rispettivamente. Allo stesso modo i campioni sono stati trattati con $0,3 \text{ mM}$ DHEA-S, $1 \mu\text{M}$ SNP per 1 minuto o con $1 \mu\text{M}$ Indometacina e $0,2 \text{ U/ml}$ Apirasi per 10 minuti e successivamente stimolati con $0,05 \text{ U/ml}$ trombina per 1 e 3 minuti. In figura 1B l'immagine di immunoblotting per le forme fosforilate di Src, ERK 1/2 e p38MAPK mostra come ci sia una massiccia inibizione della fosforilazione sulle proteine ERK 1/2 e su p38MAPK nei campioni trattati con le diverse molecole, mentre nel caso della chinasi Src non è possibile ottenere nessun tipo di inibizione. Con questa prima serie di dati, si può affermare che il DHEA-S è in grado di inibire l'attivazione piastrinica attraverso lo spegnimento del segnale che porta al rilascio del contenuto dei granuli e al potenziamento dell'aggregazione stessa.

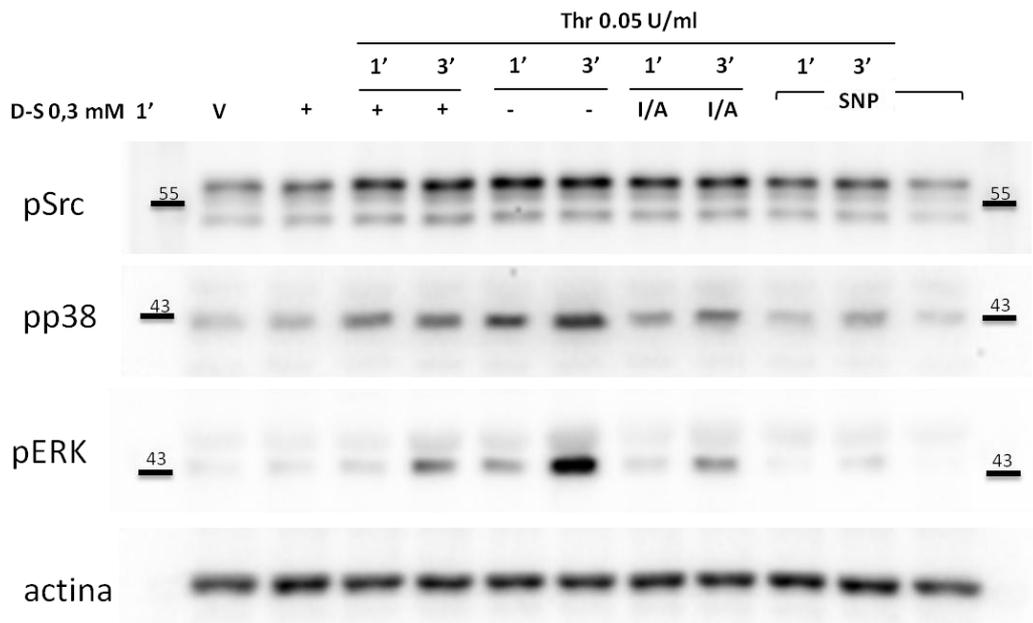


Fig. 1B

Effetto del DHEA-S sulla fosforilazione proteica di Src, Erk1/2, p38. Campioni di piastrine gel-filtrate concentrate 1×10^9 /ml sono stati pretrattati con solvente (V), 0,3 μ M DHEA-S o 1 μ M SNP per 1 minuto o con 1 μ M Indometacina e 0,2 U/ml Apirasi per 10 minuti e successivamente stimolati o no con 0,05 U/ml trombina per 1 e 3 minuti. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici. In figura è riportato un esperimento rappresentativo di 3 condotti su piastrine di diversi donatori.

Con lo scopo di completare queste prime evidenze abbiamo proseguito considerando le aggregazioni fatte in presenza di ADP nell'ambiente extracellulare. Secondo la nostra ipotesi il DHEA-S potrebbe esercitare la sua azione inibitoria attraverso il blocco della secrezione; lo stimolo con trombina in associazione con ADP permette alle piastrine di avere una concentrazione di ADP sufficiente per completare l'aggregazione anche in campioni trattati con DHEA-S. A questo punto, due serie di campioni della stessa preparazione di piastrine e stimolati in modo analogo, sono stati utilizzati per misurazioni in aggregometria e per la preparazione di lisati cellulari. I campioni sono stati pre-incubati con solvente o con 0,3 mM DHEA-S per 1 minuto e poi stimolati con 0,05 U/ml trombina da sola o in associazione con 10 μ M ADP. Dal grafico riportato (figura 1C) emerge che la presenza di ADP può potenziare leggermente l'aggregazione ma annulla completamente l'effetto inibitorio del DHEA-S; mentre dall'immagine in immunoblotting (figura 1D) è evidente come il DHEA-S continui ad esercitare il suo effetto inibitorio, benché ci sia un leggero incremento della fosforilazione nel

campione trattato con trombina e ADP rispetto al corrispettivo con sola trombina. Questi dati portano a confermare la nostra ipotesi: il DHEA-S agisce inibendo l'attivazione delle proteine Akt ed ERK1/2 e la conseguente secrezione dai granuli densi. Le piastrine aggregano invece in modo paragonabile al controllo quando il DHEA-S viene somministrato in presenza di ADP. Lo stesso esperimento è stato condotto anche utilizzando la forma attiva dell'ormone (DHEA), ma in questo caso non è stato possibile individuare neanche una lieve inibizione (dati non mostrati).

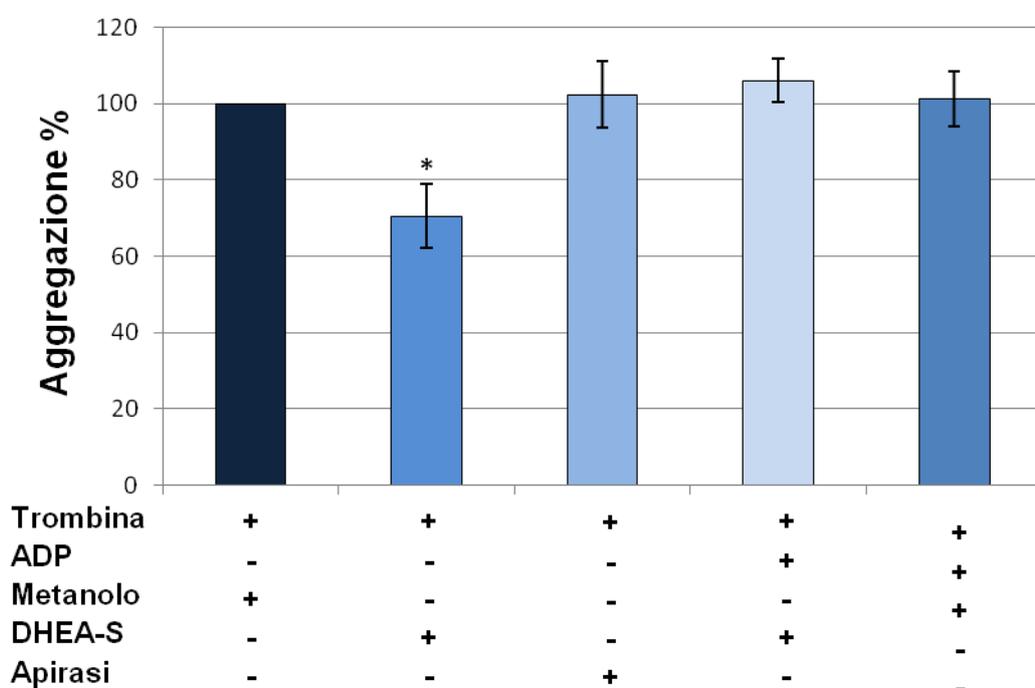


Fig. 1C

Il DHEA-S riduce l'aggregazione piastrinica indotta da trombina. Campioni di piastrine gel filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono pretrattati con solvente o 0,3 mM DHEA-S per 1 minuto e stimolati con 0,05 U/ml trombina da sola o in associazione con 10 μ M ADP. I risultati sono espressi come % di aggregazione piastrinica rispetto al controllo, la quale è stata posta arbitrariamente uguale a 100. I dati riportati rappresentano la media \pm SE di tre esperimenti indipendenti (analisi statistica eseguita con test t-Student, * $p < 0,05$).

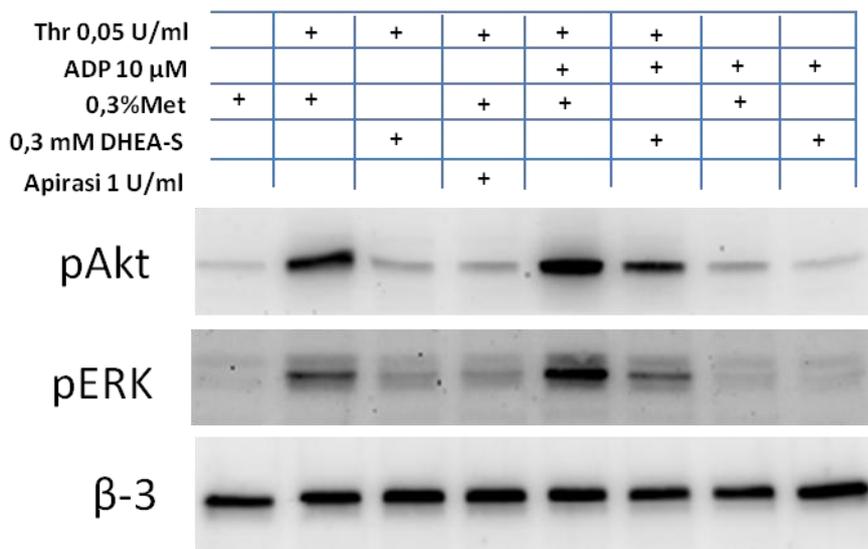


Fig. 1D

Il DHEA-S riduce la fosforilazione proteica di Akt, Erk1/2. Campioni di piastrine gel filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono pre-incubati con solvente o 0,3 mM DHEA-S per 1 minuto e stimolati con 0,05 U/ml trombina da sola o in associazione con 10 μ M ADP. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici. In figura è riportato un esperimento rappresentativo di 3 condotti su piastrine di diversi donatori.

4.2 Effetto del DHEA-S sulla via del cGMP

Negli anni precedenti, per individuare il meccanismo attraverso il quale il DHEA-S inibisce l'attivazione e l'aggregazione piastrinica, abbiamo considerato le vie del cAMP e del cGMP. Abbiamo dimostrato che il DHEA-S non modifica i livelli di cAMP e che invece porta alla fosforilazione (inibitoria) di VASP e all'aumento dei livelli di cGMP.

Per meglio definire quali enzimi partecipassero in tale via di trasduzione abbiamo analizzato sia in aggregometria che in immunoblotting il possibile coinvolgimento della guanilato ciclasi (sGC), enzima chiave nella formazione di cGMP.

Piastrine gel-filtrate [3×10^8 /ml] sono state preincubate con solvente o con 2 μ M ODQ (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 trattate con 0,3 mM DHEA-S o con il solo solvente per 1 minuto e poi stimolate con 0,05 U/ml trombina a 37° C. Come già precedentemente riportato il DHEA-S (0,3 mM) è in grado di ridurre in modo significativo l'aggregazione indotta da 0,05 U/ml trombina, mentre il

pretrattamento dei campioni con ODQ non porta ad una reversione degli effetti del DHEA-S su questo tipo esperimento (dati non mostrati).

Abbiamo così considerato la fosforilazione della proteina VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) una proteina citoscheletrica, attiva in forma defosforilata, in grado di legare filamenti di actina e profilina coinvolti nella riorganizzazione del citoscheletro e nella motilità cellulare, mentre inattiva in forma fosforilata (in serina¹⁵⁷ e serina²³⁹) dissociata dalle componenti citoscheletriche (25). L'inibizione delle piastrine umane è generalmente legata all'aumento dei nucleotidi ciclici AMP e/o GMP che portano all'attivazione di proteine chinasi PKA e PKG che catalizzano le reazioni di fosforilazione su residui di serina/treonina, eventi che portano ad inibizione piastrinica. VASP è un substrato di PKA e PKG e viene fosforilato principalmente su serina 157 e serina 239, rispettivamente. A seguito della fosforilazione cAMP dipendente sulla serina 157 VASP subisce un apparente cambio di peso molecolare, che passa da 46 kDa a 50 kDa, facilmente apprezzabile in elettroforesi (24, 26). Piastrine [1×10^9 /ml] sono state pretrattate o no con 2 μ M ODQ per 5 minuti e successivamente incubate con tampone, 0,3 mM DHEA-S o 10 nM DHEA per 1 minuto a 37° C. I lisati cellulari ottenuti sono stati analizzati con anticorpi specifici in grado di riconoscere le forme fosforilate di VASP sulla serina 157 e sulla serina 239. Dall'immagine 2A si può notare come l'ODQ sia in grado di prevenire totalmente la fosforilazione di VASP nel campione trattato con DHEA-S. Questo risultato indica una possibile attivazione della guanilato ciclasi.

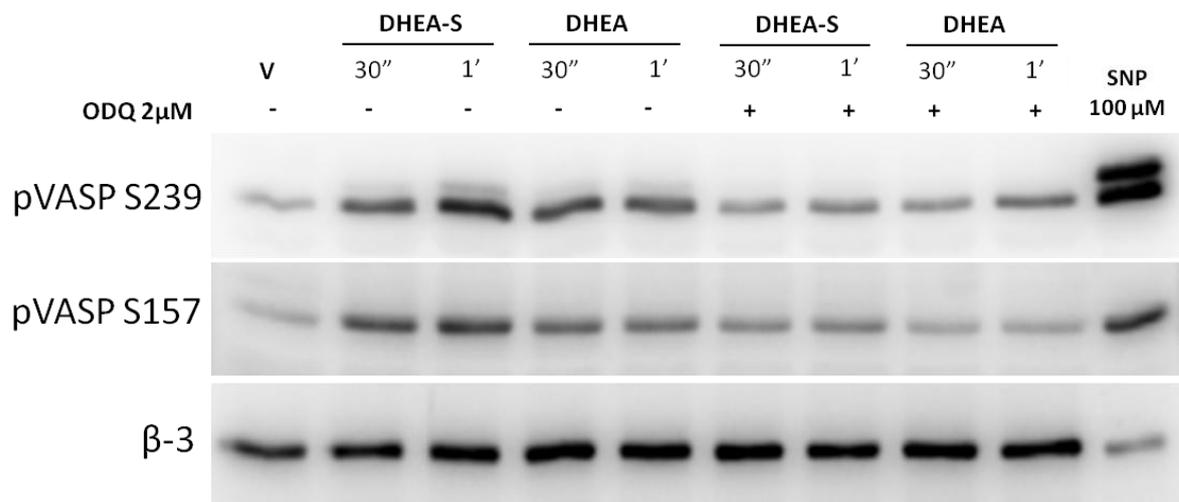


Fig. 2A

Fosforilazione di VASP indotta da DHEA-S e DHEA. Campioni di piastrine gel-filtrate concentrate $1 \times 10^9/ml$ sono state pretrattate con ODQ o il suo solvente per 5 minuti e successivamente con 0,3 mM DHEA-S o 10 nM DHEA o rispettivo controllo (V) per i tempi indicati. Il campione con SNP è stato caricato in quantità dimezzata rispetto agli altri per aver una migliore chiarezza di segnale. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici. In figura è riportato un esperimento rappresentativo di 3 condotti su piastrine di diversi donatori.

Per confermare la validità di questo dato, abbiamo misurato i livelli di cGMP in cellule trattate con tampone (NT), con 0,3 mM DHEA-S, con 10 nM DHEA o con 10 μM SNP in presenza o meno di 2 μM ODQ. I dati ottenuti (figura 2B) mostrano che i trattamenti con DHEA-S e DHEA inducono aumento, significativo solo nel caso del DHEA-S, dei livelli di cGMP rispetto al controllo. Il pretrattamento con l'ODQ causa invece una diminuzione della concentrazione di cGMP rispetto al campione corrispondente. Tali differenze risultano essere statisticamente significative in ogni caso. Questi dati, insieme a quelli ottenuti negli anni precedenti, indicano che il DHEA-S può esercitare la sua azione inibitoria attivando almeno parzialmente la via del cGMP (non abbiamo mai riscontrato né aumenti dei livelli di NO né attivazione delle ossido nitrico sintasi).

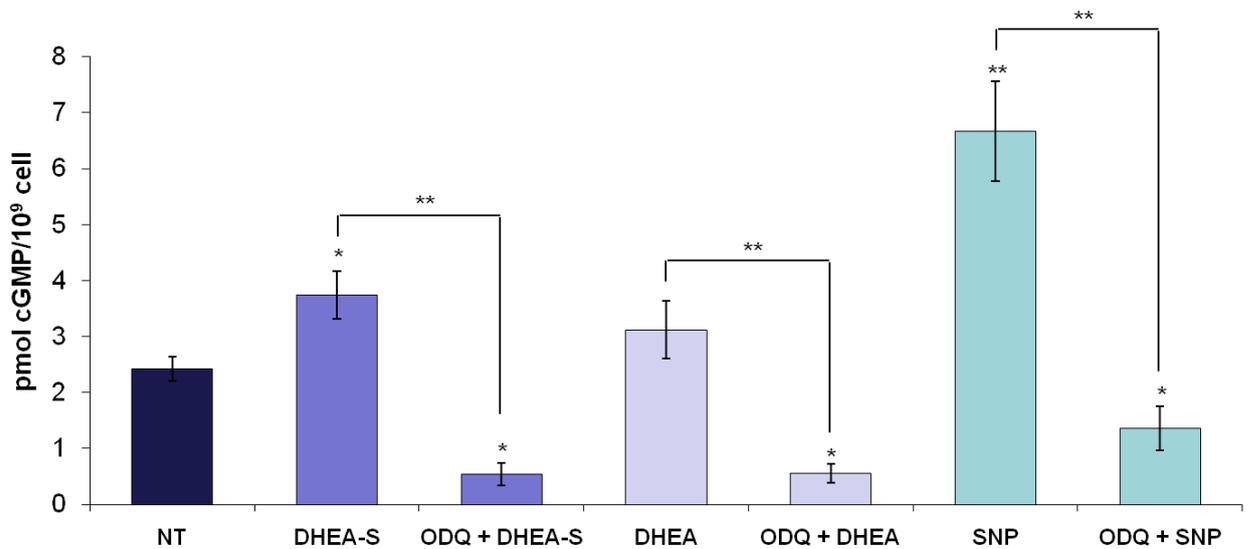


Fig. 2B

Effetti del DHEA-S e del DHEA sui livelli di cGMP. Piastrine concentrate 4×10^8 /ml trattate con 0,3 mM DHEA-S, 10 nM DHEA o 10 μ M SNP per 1 minuto, in presenza o assenza del pretrattamento con ODQ. 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 il protocollo fornito dell'azienda. I dati riportati rappresentano la media \pm SE di tre esperimenti indipendenti (analisi statistica eseguita con test t-Student, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$).

In ultima analisi abbiamo verificato il possibile coinvolgimento delle fosfodiesterasi piastriniche. Questi enzimi sono responsabili dell'idrolisi del cGMP e quindi dello spegnimento del segnale inibitorio. Visiti gli aumenti dei livelli di cGMP ma l'incompleta spiegazione di come tale via sia attivata, abbiamo ipotizzato che il DHEA-S potesse agire inibendo anche l'attività delle fosfodiesterasi. In aggregometria, piastrine [3×10^8 /ml] sono state trattate con solvente o con 1 μ M Zaprinast (inibitore specifico per la fosfodiesterasi 5) per 5 minuti precedentemente allo stimolo con 0,3 mM DHEA-S (o il suo solvente) per 1 minuto e poi con 0,05 U/ml trombina. Dal grafico riportato si può notare come l'inibitore dato da solo non sia in grado di inibire l'aggregazione indotta da trombina, mentre dato in associazione con DHEA-S può incrementare la percentuale di inibizione rispetto al campione trattato con solo DHEA-S. Con questi dati possiamo concludere che il DHEA-S attiva la guanilato ciclasi solubile, induce incremento nei livelli di cGMP e la fosforilazione di VASP, mentre si può escludere una sua azione sulle fosfodiesterasi.

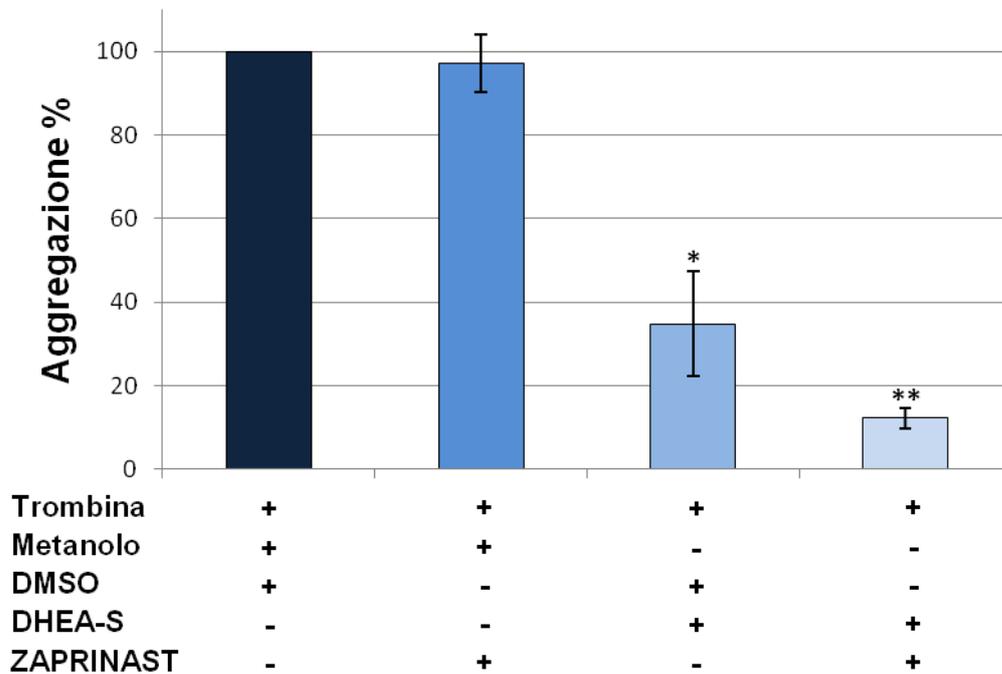


Fig. 2C

Il DHEA-S riduce l'aggregazione piastrinica senza coinvolgere le fosfodiesterasi. Campioni di piastrine gel filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono pretrattati con solvente o $1 \mu\text{M}$ Zaprinast per 5 minuti, successivamente trattati con solvente o $0,3 \text{ mM}$ DHEA-S per 1 minuto e poi stimolati con $0,05 \text{ U/ml}$ trombina. I risultati sono espressi come % di aggregazione piastrinica rispetto al controllo, la quale è stata posta arbitrariamente uguale a 100. I dati riportati rappresentano la media \pm SE di tre esperimenti indipendenti (analisi statistica eseguita con test t-Student, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$).

4.3 Effetto del DHEA-S sull'attività della PKC

Con lo scopo di completare il pannello degli enzimi coinvolti nella via di segnalazione del DHEA-S abbiamo considerato il ruolo della proteina chinasi C (PKC). Questa proteina chinasi viene attivata normalmente in seguito alla generazione di diacilglicerolo formato a sua volta a seguito dell'attivazione della fosfolipasi $C\gamma$. In letteratura è riportato che una isoforma specifica di PKC può regolare negativamente l'attività di VASP (38), così il nostro scopo è stato quello di valutare se l'attivazione di questa chinasi potesse in qualche modo intervenire sulla fosforilazione di questa proteina citoscheletrica.

Piastrine [1×10^9 /ml] sono così state pretrattate con solvente o con $2 \mu\text{M}$ cheleritina (inibitore specifico di PKC) per 15 minuti precedentemente al trattamento con solvente o con $0,3 \text{ mM}$ DHEA-S per tempi crescenti da 30 secondi a 5 minuti. I lisati cellulari ottenuti sono stati analizzati con anticorpi specifici in grado di riconoscere la forma fosforilata di VASP sulla

serina 239. Dall'immagine riportata in figura 3A si può notare come il DHEA-S induca fosforilazione su questa proteina e che il trattamento con cheleritrina non sia in grado di generare nessun tipo di inibizione. Per completare l'indagine gli stessi stimoli sono stati effettuati in aggregometria. Piastrine [3×10^8 /ml] sono state trattate con cheleritrina e con DHEA-S e successivamente stimulate con 0,05 U/ml trombina. Dal grafico riportato in figura 3B emerge che l'uso del solo inibitore non modifica la percentuale di inibizione rispetto al controllo (contrariamente a quanto atteso) e che l'uso di inibitore in associazione a DHEA-S non modifica in maniera significativa la percentuale di aggregazione. Anche in questo caso siamo portati a scartare un'azione diretta di quest'enzima nella segnalazione DHEA-S mediata. Gli stessi esperimenti sono stati condotti anche con Ro 318220, un altro inibitore di PKC (specifico per tre isoforme α , β , γ), ma anche in questo caso non è stato possibile apprezzare nessuna differenza di aggregazione né di fosforilazione in campioni trattati con DHEA-S (dati non riportati).

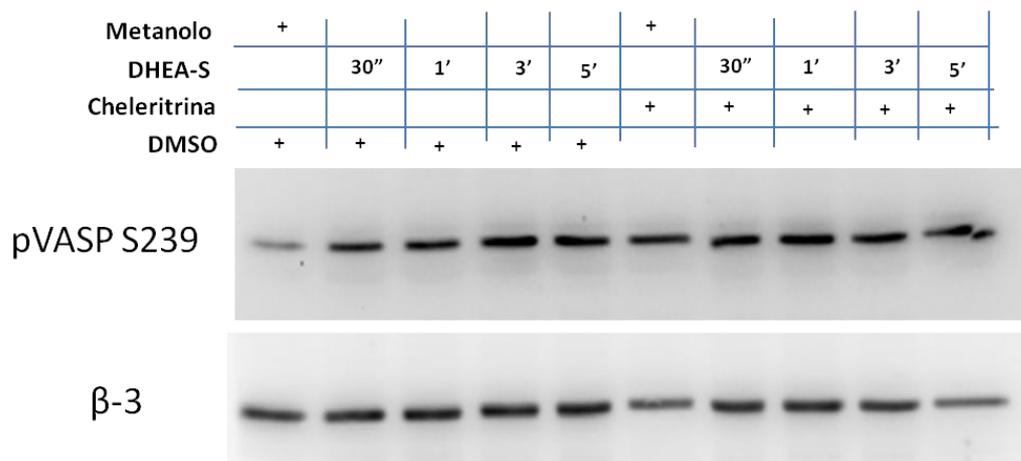


Fig. 3A

Fosforilazione di VASP. Campioni di piastrine gel-filtrate concentrati 1×10^9 /ml sono stati pretrattati con $2 \mu\text{M}$ Cheleritrina o con il suo solvente per 15 minuti e successivamente trattati con 0,3 mM DHEA-S o con solvente 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. In figura è riportato un esperimento rappresentativo di 3 condotti su piastrine di diversi donatori.

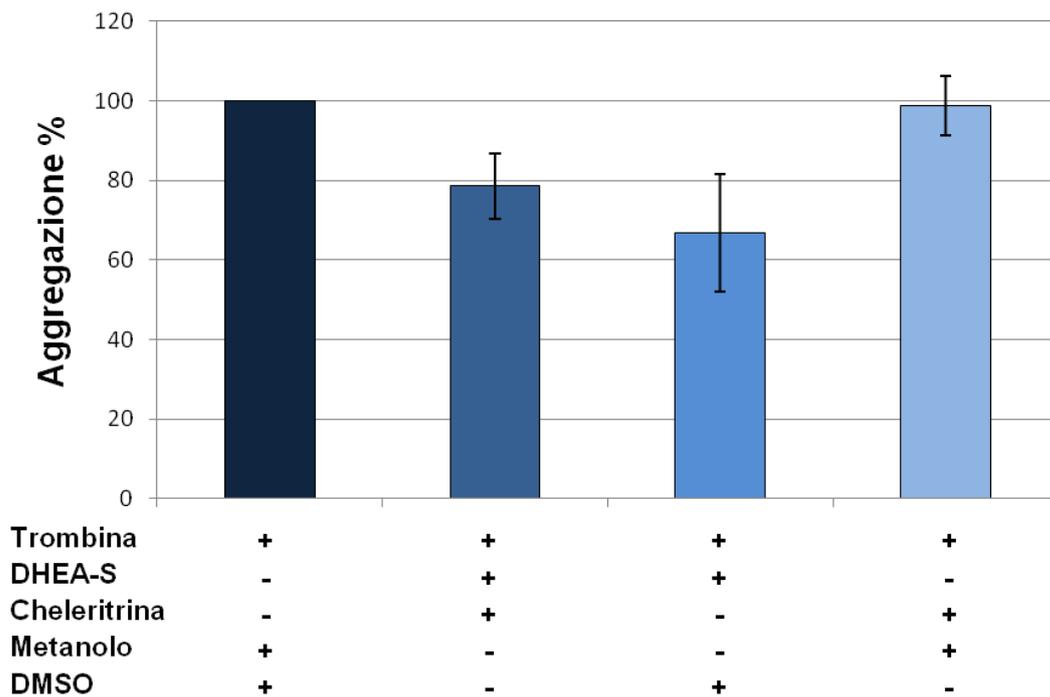


Fig. 3B

Il DHEA-S riduce l'aggregazione piastrinica senza coinvolgere la PKC. Campioni di piastrine gel filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono pretrattati con solvente o 2 μ M Chelitrina per 15 minuti, successivamente trattati con solvente o 0,3 mM DHEA-S per 1 minuto e poi stimolati con 0,05 U/ml trombina. I risultati sono espressi come % di aggregazione piastrinica rispetto al controllo, la quale è stata posta arbitrariamente uguale a 100.

5. DISCUSSIONE

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è il più abbondante ormone steroideo presente nel circolo sanguigno, viene secreto dalla ghiandola surrenale a partire dalla pubertà e viene convertito in estrogeni e testosterone. La sua concentrazione diminuisce con il trascorrere del tempo a partire dai trent'anni e questo decremento viene associato ad un aumento nella suscettibilità di insorgenza di malattie tipiche dell'età avanzata; per questo motivo è noto da tempo il suo ruolo protettivo nei confronti di malattie aterosclerotiche, cardioprotettive e autoimmuni. In letteratura è riportato inoltre che il DHEA-S è in grado di portare ad inibizione dell'aggregazione piastrinica indotta da acido arachidonico (2) attraverso meccanismi non ben definiti.

Tra le due forme in cui il deidroepiandrosterone si trova nel circolo sanguigno, la forma solfata, DHEA-S, è risultata quella in grado di dare *in vitro* un effetto apprezzabile sull'aggregazione di piastrine gel-filtrate. Già precedentemente abbiamo dimostrato: che solo il DHEA-S è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica indotta da trombina; che risultano aumentati i livelli di cGMP in presenza di DHEA-S; che vi è fosforilazione sulla proteina VASP.

Con questa serie di dati ci siamo proposti di investigare più a fondo quali proteine venivano coinvolte in tale sistema e quali eventualmente erano marginali. Come prima cosa il nostro intento è stato capire se il DHEA-S (e magari anche il DHEA) agisse come inibitore della via secretoria; abbiamo così verificato che nei campioni trattati con DHEA-S vi era una notevole riduzione dei livelli di fosforilazione in proteine come Src, Akt e le MAP chinasi ERK1/2 e p38. Il controllo con apirasi (enzima che degrada l'ADP presente nell'ambiente extracellulare) e indometacina (inibitore delle cicloossigenasi) mantiene livelli di fosforilazione paragonabili a quelli indotti con DHEA-S. Esperimenti di aggregometria e di immunoblotting condotti in parallelo stimolando le piastrine con trombina e ADP per sopperire alle eventuali carenze nella secrezione riportano dati differenti; la percentuale di aggregazione subisce delle variazioni solo nel campione trattato con DHEA-S, indicando un'inibizione dipendente dalla secrezione, mentre nel caso dei western blot la stimolazione fatta in presenza di ADP non modifica l'inibizione della fosforilazione delle proteine prese in considerazione.

Abbiamo poi cercato di correlare questi eventi con altri di tipo inibitorio e abbiamo indagato la via del cGMP. Per prima cosa abbiamo studiato la fosforilazione di VASP dipendente da DHEA-S e DHEA in presenza o meno di ODQ. Dai dati ottenuti è emerso che il DHEA-S può indurre fosforilazione di VASP e che questa viene ridotta in presenza dell'inibitore della

guanilato ciclastasi indicando un coinvolgimento di questo enzima. Ad ulteriore conferma abbiamo misurato anche i livelli di cGMP su campioni stimolati in modo analogo. Con il dosaggio effettuato è possibile affermare che il DHEA-S aumenta i livelli di cGMP e che questi vengono ridotti in modo significativo in presenza dell'inibitore della guanilato ciclastasi. Confermando una sua attivazione. Abbiamo poi ipotizzato che il DHEA-S agisca influenzando negativamente le fosfodiesterasi cGMP-dipendenti, contribuendo così a mantenere alti i livelli di cGMP e quindi prolungando la fase inibitoria. Dagli esperimenti di aggregometria effettuati è emerso che non vi è coinvolgimento delle fosfodiesterasi dipendente dal DHEA-S. In ultima analisi abbiamo indagato se vi era un'attivazione della proteina chinasi C (PKC) come enzima potenzialmente responsabile della fosforilazione di VASP. Dagli esperimenti di aggregometria ed immunoblotting effettuati siamo portati ad escludere anche un tale coinvolgimento.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Labrie, F., Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., (2001) *Front Neuroendocrinol* 22:185-212.
2. Jesse, RL., Loesser, K., Eich, DM., Qian, YZ., Hess, ML., Nestler, JE., (1995) *Ann N Y Acad Sci* 774:281-90.
3. Nawata, H., Yanase, T., Goto, K., Okabe, T., Ashida, K., (2002) *Mech Ageing Dev* 123:1101-6.
4. Chang, HJ., Shi, R., Rehse, P., Lin, SX., (2004) *J Biol Chem* 279:2689-96.
5. Porsová-Dutoit, I., Sulcová, J., Stárka, L., (2000) *Physiol Res* 49: S43-56.
6. van Vollenhoven, RF., Engleman, EG., MnGuire, JL., (1994) *Arthritis Rheum* 37:1305-1310.
7. Ribeiro, F., Lopes, RP., Nunes, CP., Maito, F., Bonorino, C., Bauer, ME., (2007) *Biogerontology* 8:209-20.
8. Morgan, CA. 3rd., Southwick, S., Hazlett, G., Rasmusson, A., Hoyt, G., Zimolo, Z., Charney, D., (2004) *Arch Gen Psychiatry* 61:819-25.
9. Labrie, F., Diamond, P., Cusan, L., Gomez, JL., Bélanger, A., Candas, B., (1997) *J Clin Endocrinol Metab* 82:3498-505.
10. Mills, SJ., Ashworth, JJ., Gilliver, SC., Hardman, MJ., Ashcroft, GS., (2005) *J Invest Dermatol* 125:1053-62.
11. Charalampopoulos, I., Alexaki, VI., Lazaridis, I., Dermitzaki, E., Avlonitis, N., Tsatsanis, C., Calogeropoulou, T., Margioris, AN., Castanas, E., Gravanis, A., (2006) *FASEB J* 20:577-9.
12. Mellon, SH., (2007) *Pharmacol Ther* 116:107-24.
13. Martina, V., Benso, A., Gigliardi, VR., Masha, A., Origlia, C., Granata, R., Ghigo, E., (2006) *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:260-4.
14. Liu, D., Dillon, JS., (2002) *J Biol Chem* 277:21379-88.
15. Williams, MR., Dawood, T., Ling, S., Dai, A., Lew, R., Myles, K., Funder, JW., Sudhir, K., Komesaroff, PA., (2004) *J Clin Endocrinol Metab* 89:4708-15.
16. Notelovitz, M., (2002) *Fertil Steril* 77:S34-41.
17. Simoncini, T., Mannella, P., Fornari, L., Varone, G., Caruso, A., Genazzani, AR., (2003) *Endocrinology* 144:3449-55.
18. Marjanovic, JA., Li, Z., Stojanovic, A., Du, X., (2005) *J Biol Chem* 280:37430-8.

19. Richie-Jannetta, R., Busch, J.L., Higgins, K.A., Corbin, J.D., Francis, S.H., (2006) *J Biol Chem.* 281:6977-84.
20. Hellevuo, K., Yoshimura, M., Mons, N., Hofman, P.L., Cooper, D.M., Tabakoff, B., (1995) *J Biol Chem.* 270:11581-9.
21. Jin, J., Kunapuli, S.P., (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8070-4.
22. Hellevuo, K., Welborn, R., Menninger, J.A., Tabakoff, B., (1997) *Am J Med Genet.* 74:95-8.
23. Zieve, P.D., Greenough, W.B., 3rd., (1969) *Biochem Biophys Res Commun* 35:462-6.
24. Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Hönig-Liedl, P., Jarchau, T., Hoschuetzky, H., Walter, U., (1998) *J Biol Chem.* 273:20029-35.
25. Lawrence, D.W., Pryzwansky, K.B., (2001) *J Immunol* 166:5550-6.
26. Jensen, B.O., Selheim, F., Døskeland, S.O., Gear, A.R., Holmsen, H., (2004) *Blood* 104:2775-82.
27. Holinstat, M., Voss, B., Bilodeau, M.L., McLaughlin, J.N., Cleator, J., Hamm, H.E., (2006) *J Biol Chem* 281(36):26665-74.
28. Bernardi, B., Guidetti, G.F., Campus, F., Crittenden, J.R., Graybiel, A.M., Balduini, C., Torti, M., (2006) *Blood* 107:2728-35.
29. Lova, P., Campus, F., Lombardi, R., Cattaneo, M., Sinigaglia, F., Balduini, C., Torti, M., (2004) *J Biol Chem* 279:25299-306.
30. Coughlin, S.R., (2005) *J Thromb Haemost* 3:1800-14.
31. Chen, X., Earley, K., Luo, W., Lin, S.H., Schilling, W.P., (1996) *Biochem. J.* 314:603±611.
32. Böhm, S.K., Khitin, L.M., Grady, E.F., Aponte, G., Payan, D.G., Bunnett, N.W.J., (1996) *Biol Chem.* 271:22003-16.
33. Golden A., Brugge J.S., (1989) *Cell Biology.* 86:901-905.
34. Kramer R.M., Roberts E.F., Striffler B.A., Johnstone E.M., (1995) *J Biol Chem.* 270:27395-27398.
35. Papkoff J., Chen R.H., Blenis J., Forsman J., (1994) *Mol Cell Biol.* 14:463-472.
36. Kroner C, Eybrechts K, Akkerman J.W. Dual regulation of platelet protein kinase B. *J Biol Chem* 2000; 275:27790-8.
37. Adam F., Kauskot A., Rosa J.-P., Bryckaert M., (2008) *J Thromb and Haemost.* 6:2007–2016.
38. Harper M.T., Poole A.W. (2007) *Biochemical Society.*

7. ATTIVITA' FORMATIVA

Seminari 2009/2010:

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. Mermod

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'inflammatione

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:

PARTECIPAZIONE AI CONGRESSI:

- X Riunione Gruppo di Studio delle Piastrine, 4-6 Ottobre 2009 Termoli
- 23^a Riunione Nazionale "A. Castellani" dei Dottorandi di Ricerca in Discipline Biochimiche - Brallo di Pregola (Pavia)
- Nottingham Platelet Conference - Nottingham, 15-16 luglio 2010
- 55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB) – Milano, 14-17 settembre 2010

COMUNICAZIONI A CONGRESSI

A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

X Riunione Gruppo di Studio delle Piastrine, 4-6 Ottobre 2009 Termoli. *Dehydroepiandrosterone-sulfate inhibits thrombin-induced platelet aggregation*. **A. Rastoldo**, C. Sarasso, S. Baldassarri, A. Bagarotti, M. Zanfa, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia (presentazione orale)

23^a 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 (poster)

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 (poster)

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 (poster)

B) Altre comunicazioni

Convegno annuale della sezione ligure – lombardo – piemontese della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare (LLP 2010) - Varese, 28 maggio 2010. *Effects of 8-prenylningenin on human platelet activation and aggregation*. C. Di Vito, **A. Rastoldo**, A. Bagarotti, S. Sampietro, A. Bertoni, F. Sinigaglia

23^a 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 (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-prenylningenin*. C. Di Vito, **A. Rastoldo**, A. Bagarotti, S. Sampietro, A. Bertoni, F. Sinigaglia

23^a 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

Nottingham Platelet Conference - Nottingham, 15-16 luglio 2010. *Inhibition of collagen-dependent platelet aggregation by 8-prenylningenin*. C. Di Vito, **A. Rastoldo**, A. Bagarotti, S. Sampietro, A. Bertoni, F. Sinigaglia (poster)

55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB) – Milano, 14-17 settembre 2010. *Effects of 8-prenylningenin on human platelets activation and aggregation*. C. Di Vito, **A. Rastoldo**, A. Bagarotti, S. Sampietro, A. Bertoni, F. Sinigaglia (poster)

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 (poster)

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 (poster)