

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE
ORIENTALE**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

**RUOLO DEGLI ESTROGENI NELLA MODULAZIONE
DELLA RISPOSTA PIASTRINICA AGLI AGONISTI:
CARATTERIZZAZIONE DEL MECCANISMO DI
SEGNALAZIONE E VALUTAZIONE DEL RUOLO DEL 17 β -
ESTRADIOLO SULLA ATTIVAZIONE DA BASSE DOSI DI
TROMBOSSANO A2**

Coordinatore Scientifico
Prof.ssa F. Sinigaglia

Relazione del 2°anno di Dottorato
in Medicina Molecolare
di Stefania Reineri

Anno Accademico 2003/2004

INDICE

INTRODUZIONE	2
ATTIVAZIONE PIASTRINICA	3
Cambio di forma e adesione	3
Spreading e secrezione.....	3
Aggregazione	4
La retrazione del coagulo.....	5
MECCANISMI BIOCHIMICI DELL' ATTIVAZIONE PIASTRINICA	6
Agonisti ed antagonisti piastrinici.....	6
Recettori accoppiati a proteine G eterotrimeriche.....	7
Segnalazione piastrinica.....	8
Ruolo delle tirosin chinasi	10
RAFTS LIPIDICHE	12
LE MAP CHINASI	16
Le chinasi ERK.....	17
GLI ORMONI STEROIDEI	21
IL RECETTORE PER GLI ESTROGENI	27
SCOPO DEL LAVORO	32
METODI	34
Preparazione delle piastrine mediante gel-filtrazione.....	34
Preparazione delle piastrine mediante lavaggio con tampone PIPES	35
Preparazione di lisati cellulari totali	36
Analisi dell'aggregazione piastrinica	37
Esperimenti di frazionamento cellulare	38
Isolamento di rafts lipidiche	39
RISULTATI	40
Fosforilazione in tirosina della tirosin chinasi Src in piastrine trattate con 17 β -estradiolo	40
Il 17 β -estradiolo induce una debole fosforilazione delle MAP chinasi ERK1/2	42
Ruolo del 17 β -estradiolo nella localizzazione subcellulare di ER β , Src, p85/PI3-K e Pyk2.....	44
Isolamento di rafts lipidiche	46
Il 17 β -estradiolo potenzia l'aggregazione piastrinica indotta da basse dosi di trombossano A2	51
Il 17 β -estradiolo e il trombossano A2 promuovono la fosforilazione in tirosina 416 della chinasi Src con meccanismo additivo	54
DISCUSSIONE	56
BIBLIOGRAFIA	62

INTRODUZIONE

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

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

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

ATTIVAZIONE PIASTRINICA

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

Cambio di forma e adesione

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

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

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

Spreading e secrezione

In seguito all'adesione delle piastrine su una superficie sottoendoteliale, si verifica il fenomeno dello spreading, in cui le cellule si appiattiscono, si rimodellano e conseguentemente si attivano. Contemporaneamente al fenomeno di spreading si verifica il processo di secrezione. Le piastrine secernono il contenuto degli α -granuli e dei corpi densi, mentre vi è solo una parziale secrezione degli enzimi lisosomiali. Gli agonisti forti

determinano una secrezione del 70-90% del contenuto degli α -granuli e dei corpi densi (Majerus, 1987). La secrezione dei granuli consente il rilascio di molecole nel microambiente sanguigno che per prime amplificano la formazione del tappo emostatico e la dissoluzione degli aggregati formati da piastrine e fibrina.

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

Aggregazione

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

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

La trombina è uno dei principali agonisti in grado di promuovere l'attivazione e l'aggregazione piastrinica mediata dal legame del fibrinogeno all'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$: questa via di segnale definita inside-out porterà ad alcuni cambiamenti nel dominio extracellulare dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ rendendo accessibile il sito di legame per il fibrinogeno. L'attivazione dell'integrina potrebbe riflettere un incremento nell'affinità di $\alpha_{IIb}\beta_3$ per il fibrinogeno o un incremento nell'avidità per il fibrinogeno dovuta all'oligomerizzazione dei recettori $\alpha_{IIb}\beta_3$ consentendo alle piastrine di aggregare. Il legame del fibrinogeno all'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ media il segnale outside-in inducendo una serie di eventi intracellulari che portano al

rilascio di vescicole di membrana procoagulanti, alla riorganizzazione del citoscheletro ed alla retrazione del coagulo (Lévi-Toledano, 1999).

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

La retrazione del coagulo

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

MECCANISMI BIOCHIMICI DELL'ATTIVAZIONE PIASTRINICA

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

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

Agonisti ed antagonisti piastrinici

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

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

Gli agonisti forti come trombina, collagene, endoperossidi prostaglandinici, trombossano A_2 e PAF causano aggregazione non dipendente dalla produzione di

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

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

Recettori accoppiati a proteine G eterotrimeriche

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

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

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

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

Segnalazione piastrinica

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

Le proteine G eterotrimeriche sono associate a recettori a sette domini transmembrana e sono composte da tre subunità di cui la subunità α contiene il sito di legame per il nucleotide guaninico ed è responsabile dell'interazione tra recettori ed

effettori. L'eterodimero formato dalle subunità β e γ consente l'ancoraggio della proteina G alla membrana cellulare. L'attivazione dei canali ionici, l'inibizione dell'adenilato ciclasi e l'attivazione della fosfolipasi A_2 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. Il GTP si lega al suo sito di legame ora libero sulla subunità α (Kroll & Schafer, 1989). In seguito al legame del GTP, l'eterodimero $\beta\gamma$ si dissocia dalla subunità α risultando nell'attivazione, mediata dalla subunità α legante GTP, dell'enzima che costituisce il secondo messaggero. L'attività GTPasica intrinseca della subunità α interrompe l'interazione tra GTP e subunità α stessa: la subunità α , legante ora GDP, si riassocia così all'eterodimero $\beta\gamma$ (Blockmans et al., 1995). Le piastrine contengono proteine G della famiglia G_i , G_q e G_{12} . I membri della famiglia G_q sono potenti attivatori della fosfolipasi C, i membri della famiglia G_i sono accoppiati all'adenilato ciclasi e la loro attivazione determina abbassamento dei livelli di cAMP.

La fosfolipasi C (PLC) è implicata nelle reazioni di secrezione delle piastrine. L'isoforma PLC β è attivata dai dimeri $\beta\gamma$ delle proteine G eterotrimeriche, mentre la PLC γ è attivata dalla fosforilazione delle sequenze ITAM da parte delle chinasi Syk, Src, Fyn, Lck. Le fosfolipasi catalizzano l'idrolisi del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP $_2$) in diacilglicerolo (DAG) ed inositolo-1,4,5-trisfosfato (IP $_3$). 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 A_2 (PLA $_2$) è responsabile del rilascio di acido arachidonico. La fonte predominante di acido arachidonico rilasciato dopo l'attivazione piastrinica deriva dall'idrolisi, mediata dalla fosfolipasi A_2 , dei fosfolipidi del sistema tubulare denso e della membrana plasmatica. Il substrato preferito è la fosfatidilcolina, ma PLA $_2$ idrolizza anche fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e, in minor misura, fosfatidilinositolo (Kroll & Schafer, 1989). L'acido arachidonico è poi convertito in trombossano A_2 ad opera di una ciclossigenasi. La PLA $_2$ è attivata da un aumento nel 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 A₂. Un importante effettore a valle di PI3-K è la proteina Akt che viene attivata attraverso la proteina PDK che lega direttamente gli inositoli 3-fosfati. La proteina Akt può svolgere diversi ruoli nell'attivazione piastrinica.

Ruolo delle tirosin chinasi

Il livello di proteine fosforilate in tirosina all'interno della cellula è strettamente regolato dall'azione combinata di tirosin chinasi e tirosin fosfatasi. La maggioranza delle tirosin chinasi identificate nelle piastrine appartiene alle forme citosoliche non recettoriali e comprende i membri delle famiglie di Src, FAK, Syk e JAK.

La fosforilazione in tirosina di proteine piastriniche, ad opera di Src ed altre chinasi, è importante ai fini dell'attivazione. La fosforilazione in tirosina è un processo dinamico e reversibile regolato dall'attivazione e dalla ridistribuzione subcellulare di tirosin chinasi e fosfatasi citosoliche. Le tirosin fosfatasi citosoliche piastriniche sembrano essere regolate dall'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e sono probabilmente coinvolte nel mediare la defosforilazione di parecchie proteine citosoliche in piastrine attivate. Questi enzimi, inoltre, sembrano svolgere un ruolo importante nel mantenere un basso livello di fosfotirosine all'interno di una cellula a riposo prevenendo una prematura attivazione piastrinica. In piastrine a riposo, solo un piccolo numero di proteine è fosforilato in tirosina. In seguito alla stimolazione con trombina, c'è un forte incremento nel livello di fosforilazione in tirosina di molteplici proteine, che si verifica in tre onde temporali: a 15 secondi, 2 minuti e 5 minuti. La

fosforilazione in tirosina è anche osservata in piastrine stimulate con una varietà di altri agonisti, quali ADP, PAF, TxA₂ ed in risposta a molecole di adesione come vWF e collagene, suggerendo che questi eventi di fosforilazione in tirosina rappresentino una caratteristica generale dell'attivazione piastrinica. Le “tre onde” di fosforilazione in tirosina osservate in piastrine attivate, che corrispondono a cicli di fosforilazione e defosforilazione delle proteine, possono essere divise in tre fasi temporalmente distinte.

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

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

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

Gli eventi di fosforilazione in tirosina che si verificano precocemente (fasi 1 e 2) nel processo di attivazione piastrinica, sono implicati nella regolazione dell'aggregazione e del rilascio di serotonina. La traslocazione al citoscheletro delle tirosin chinasi citosoliche e la fosforilazione in tirosina di molteplici proteine citoscheletriche si verificano dopo l'aggregazione (fase 3) e si pensa siano richieste per gli eventi seguenti all'aggregazione come la retrazione del coagulo (Jackson et al., 1996).

RAFTS LIPIDICHE

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

del colesterolo e del recupero cellulare, così come dalla regolazione della deposizione di colesterolo nelle gocce lipidiche in forma esterificata e della fuoriuscita dalla cellula. L'alterazione di questi processi altamente regolati determina una varietà di malattie a carico del metabolismo lipidico (Simons & Ikonen, 2000). Una fonte di confusione è costituita dalla relazione tra rafts e caveole. Le caveole sono piccole invaginazioni superficiali presenti in molti tipi cellulari e sembrano possedere funzioni strettamente tessuto-specifiche. Alcuni tipi cellulari, quali adipociti, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, presentano una membrana plasmatica con numerose caveole, che si pensa siano formate dall'assemblaggio di più rafts sulla superficie cellulare (Kurzchalia & Parton, 1999). Le invaginazioni caveolari derivano dalla polimerizzazione delle caveoline, di cui ve ne sono tre: caveolina-1, -2, -3. Come le rafts, anche le caveole sono strutture dinamiche, che di solito restano attaccate alla superficie cellulare, ma possono essere endocitate; il collegamento tra proteine e lipidi delle rafts sulla superficie cellulare potrebbe risultare nel loro movimento all'interno delle caveole, dove questi complessi resterebbero intrappolati. Le caveole potrebbero servire primariamente per immagazzinare e sottoregolare proteine delle rafts oppure potrebbero agire da riserva di rafts (Sowa et al., 2001). Le rafts lipidiche svolgono un ruolo centrale in numerosi processi cellulari, compresi lo smistamento ed il traffico delle membrane, la polarizzazione cellulare e processi di trasduzione del segnale che sono stati studiati in cellule T (Janes et al., 2000), cellule B (Cherukuri et al., 2001) e nelle risposte allergiche (Sheets et al., 1999, Holowka et al., 2001). La modulazione della via di produzione ceramide/sfingomielina, che coinvolge la crescita, la sopravvivenza e la morte cellulare, coinvolge l'assemblaggio delle rafts (Kolesnick, 2002). Inoltre, parecchi agenti patogeni, come batteri, prioni, virus e parassiti si impadroniscono delle rafts lipidiche per i loro scopi (van der Goot & Harder, 2001).

Nella membrana plasmatica delle piastrine umane è presente una quantità relativamente alta di sfingomielina, cosa che suggerisce una composizione lipidica in favore della formazione di rafts in queste cellule. Nel 1996, Dorahy et al. isolarono, da lisati piastrinici umani, mediante ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio (5-40%) a 4°C, microdomini di membrana a bassa densità: al termine del procedimento, una banda opaca chiaramente visibile poteva essere individuata a densità compresa tra 10 e 18% di saccarosio. L'analisi di tali microdomini ha mostrato che essi sono arricchiti in colesterolo

e glicosfingolipidi, e resistenti a trattamento con 1% Triton X-100, ma non presentano l'aspetto apparente o le caratteristiche morfologiche delle caveole. Le prime procedure utilizzate per isolare rafts lipidiche da piastrine umane erano basate sull'insolubilità di questi microdomini lipidici in 1% Triton X-100 a 4°C e sulla loro abilità di flottare in un gradiente di densità di saccarosio in seguito ad ultracentrifugazione. Sulla base delle classiche caratteristiche delle rafts lipidiche, le procedure di isolamento in cui venivano utilizzate più basse concentrazioni di Triton X-100 (0.1% o meno) sembravano essere più valide nel momento in cui la quantità di piastrine per campione era ben controllata (Bodin et al., 2001). Recentemente si è cominciato ad utilizzare per isolare rafts piastriniche un altro detergente non ionico, Brij 58, che sembra preservare meglio questi microdomini, anche quando viene utilizzato ad alte concentrazioni (Wonerow et al., 2002). Quando isolate con il metodo classico (1% Triton X-100 e gradiente di saccarosio), le rafts piastriniche appaiono, al microscopio elettronico a trasmissione, come vescicole rotonde di dimensioni eterogenee comprese tra i 20 e i 1000 nm di diametro. Possiedono meno dell'1% delle proteine piastriniche totali, mancano di caveolina (che non è espressa nelle piastrine) e sono molto arricchite nella glicoproteina di membrana CD36. Seppur debolmente rilevate, nelle rafts piastriniche sono presenti altre significative glicoproteine di membrana, quali GPIb, GPIIIa e CD9 (Dorahy et al., 1996). Al contrario, la presenza dell'integrina $\beta 1$ è ristretta alla frazione detergente-solubile e potrebbe essere considerata una proteina marcatrice della frazione non-raft (Wonerow et al., 2002). L'adattatore transmembrana LAT (Locke et al., 2002) e le tirosin chinasi della famiglia di Src, in particolare Lyn (Dorahy et al., 1996), sono presenti ad alto livello nelle rafts isolate da piastrine allo stato basale. Le rafts piastriniche sono arricchite nel ganglioside GM1, che si localizza in modo preferenziale nei domini liquidi ordinati (Locke et al., 2002). Il rapporto molare colesterolo/fosfolipidi è 1.2 nelle rafts contro lo 0.5 nelle piastrine totali, indicando un chiaro arricchimento in colesterolo. La sfingomieline è il principale fosfolipide presente in rafts isolate, e rappresenta circa il 57% dei fosfolipidi totali delle rafts e circa il 35% della sfingomieline piastrinica totale (Bodin et al., 2001).

Gousset et al. (2002) hanno dimostrato che le rafts sono presenti nella membrana plasmatica piastrinica a temperature fisiologiche, e che, in seguito a stimolazione con trombina o collagene, sono in grado di riunirsi in visibili aggregati. L'aggregazione delle rafts è un evento fisiologico dinamico e reversibile innescato da attivazione cellulare ed

importante nelle vie di segnalazione piastriniche. Eleganti studi hanno dimostrato che le rafts lipidiche organizzano la segnalazione attraverso il recettore piastrinico per il collagene, GP VI, che segnala attraverso l'adattatore Fc receptor γ -chain (FcR γ). GPVI-FcR γ non associano costitutivamente con le rafts, ma il complesso è reclutato nelle rafts in seguito a stimolazione del recettore in piastrine umane e la fosforilazione di FcR γ è controllata dall'associazione ligando-dipendente con le rafts lipidiche (Locke et al., 2002). Ancora, è stato dimostrato che l'attivazione e l'aggregazione piastrinica indotte da trombina sono legate alla presenza di colesterolo nella membrana piastrinica: attraverso una specifica colorazione per il colesterolo in piastrine quiescenti e adese al fibrinogeno, è stato documentato che durante il processo di spreading i microdomini arricchiti in colesterolo si accumulano alle estremità dei filopodi dopo si osserva un contemporaneo arricchimento in Src e CD63. Queste scoperte sono compatibili con il fatto che la formazione di filopodi contribuisce ad ottimizzare l'assemblaggio di complessi proteici funzionali nelle rafts lipidiche, concentrando in tali aree la trasduzione del segnale (Heijnen et al., 2003). In piastrine quiescenti il complesso molecolare GPIb-IX-V esprime poche copie nelle rafts; in seguito a stimolazione con vWF, il numero di copie di questo complesso glicoproteico incrementa di 6 volte, cambiamento che probabilmente svolge un importante ruolo nel mediare le interazioni e l'attivazione piastrinica sulla parete dei vasi sanguigni. Nelle rafts lipidiche è stato osservato che il complesso GPIb-IX-V è anche associato al recettore a bassa affinità per il frammento cristallizzabile delle IgG, Fc γ RIIA. Inoltre eventi che influiscono sulla stabilità delle rafts, come la deplezione di colesterolo dalla membrana, influiscono direttamente sulla capacità funzionale del complesso GPIb-IX-V di rispondere al vWF. La reintroduzione del colesterolo in membrana, determina un recupero della capacità del complesso di rispondere al vWF, in condizioni sia di staticità sia di elevato flusso ematico (Shrimpton et al., 2002). Le rafts lipidiche sembrano quindi rappresentare un collegamento strutturale e funzionale nell'attivazione piastrinica sia nella segnalazione inside-out sia in quella outside-in, che potrebbe portare una sorta di gerarchia nella moltitudine di vie di segnalazione che contribuiscono all'attivazione piastrinica sulla base della concentrazione di complessi di segnale in compartimenti morfologici di membrana ben definiti.

LE MAP CHINASI

La stimolazione di numerosi recettori con attività tirosin chinasi porta ad un rapido aumento dell'attività enzimatica di una famiglia di serin-treonin chinasi conosciute come MAP chinasi. Queste chinasi sono in grado di convertire gli stimoli extracellulari in segnali intracellulari che controllano l'espressione genica, la proliferazione ed il differenziamento cellulare e l'apoptosi. Le MAP chinasi 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).

Le MAP chinasi sono attivate attraverso una duplice fosforilazione su residui conservati di treonina e tirosina all'interno di una sequenza consenso specifica TXY (T, treonina, X, aminoacido qualunque, Y, tirosina) ad opera dei loro diretti attivatori, le MAP chinasi. In seguito all'attivazione le MAP chinasi trasducono il segnale fosforilando i loro substrati a valle, su residui di treonina e serina adiacenti a residui di prolina (New & Han, 1998).

I recettori con attività tirosin chinasi e i recettori accoppiati a proteine G condividono gli stessi componenti biochimici che portano all'attivazione della via di trasduzione del segnale mediata dalle MAP chinasi. Nel caso dei recettori con attività tirosin chinasi, in seguito a dimerizzazione, attivazione dell'attività tirosin chinasi e autofosforilazione del recettore, inizia una cascata di interazioni intermolecolari che coinvolge proteine adattatrici come Shc e Grb2, fattori di scambio come Sos, proteine con attività GTPasica come Ras e chinasi quali Raf e MEK che in ultimo portano all'attivazione delle MAP chinasi. Quando Grb2 interagisce con un recettore di membrana fosforilato in tirosina, posiziona Sos in prossimità della membrana plasmatica dove può indurre l'attivazione di Ras. In seguito alla formazione del complesso di Grb2/Sos con Ras, viene promossa l'attività di scambio del nucleotide su Ras, generando la forma Ras-GTP, che consente la trasduzione del segnale e la conseguente attivazione di alcune proteine come PI3-K, PKC e alcune MAP chinasi. Le MAP chinasi, una volta attivate, traslocano così al nucleo dove regolano diversi fattori di trascrizione (Lopez-Illasaca, 1998).

Alcuni agonisti forti legandosi al loro recettore accoppiato a proteine G, stimolano l'idrolisi dei fosfoinositidi di membrana e l'attivazione della PKC: questo meccanismo è implicato nell'attivazione delle MAP chinasi ed è sufficiente per avviare la progressione del ciclo cellulare. E' stato anche proposto che la subunità $\beta\gamma$ delle proteine G eterotrimeriche sia in grado di trasdurre il segnale attraverso l'interazione con proteine che contengono un dominio PH. La subunità $\beta\gamma$ è in grado di controllare la funzione di Ras, legandosi ad un dominio PH di una o più proteine regolatorie di Ras, pertanto, la localizzazione della subunità $\beta\gamma$ in prossimità della membrana è un importante requisito per indurre l'attivazione delle MAP chinasi (Lopez-Illasaca, 1998).

Le MAP chinasi 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 MAP chinasi e recentemente è stata scoperta anche la presenza di JNK1 (Bugaud et al., 1999).

Le chinasi ERK

Nel nostro lavoro ci siamo interessati delle chinasi ERK1/2. L'attivazione delle chinasi ERK è stata caratterizzata come componente centrale di vie di trasduzione del segnale legate alla crescita cellulare. Nelle piastrine il modello proposto per l'attivazione di ERK1/ERK2 suggerisce che l'attivazione del recettore, mediata sia da proteine G che da tirosin chinasi, porti all'attivazione della proteina G a basso peso molecolare Ras, che recluta in prossimità della membrana la serin-treonin chinasi Raf. Raf fosforila ed attiva le chinasi MEK1 e MEK2 che in seguito attivano ERK1/2 tramite fosforilazione in treonina e tirosina nella sequenza consenso TEY (Thr-Glu-Tyr). Questa cascata di attivazione è implicata in numerose risposte cellulari come la proliferazione cellulare e il movimento.

Le isoforme ERK1 e ERK2 presenti nelle piastrine vengono traslocate al citoscheletro in seguito ad attivazione piastrinica indotta da trombina e TxA_2 . La traslocazione è associata alla fosforilazione e all'attivazione della proteina. L'incorporazione nel citoscheletro avviene in modo simile alle altre proteine quali miosina, actina, ABP, α -actinina, tropomiosina e cortactina. Potenzialmente, ognuna di queste proteine potrebbe essere il substrato ed essere regolata da ERK1 ed ERK2. Il citoscheletro potrebbe quindi agire come una trama che allinea spazialmente le MAP chinasi con i loro substrati in una via di trasduzione del segnale altamente integrata. Il pretrattamento delle

piastrine con il peptide RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser), inibitore del legame del fibrinogeno all'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, potenzia la traslocazione al citoscheletro e l'attivazione di ERK, indicando che l'attività di ERK1 e ERK2 viene regolata negativamente dall'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (McNicol et al., 2001).

Vari lavori hanno dimostrato che in numerosi tipi cellulari Pyk2 svolge un ruolo importante nella trasduzione del segnale da un ampio spettro di recettori transmembrana alle MAP chinasi (Lev et al., 1995, Dikic et al., 1996, Ganju et al., 1997). Studi su cellule renali embrionali umane, hanno identificato i complessi Src-Grb2/Sos come fattori critici nell'accoppiare Pyk2 con l'attivazione delle MAP chinasi. L'inibizione delle Src chinasi non solo determina una forte riduzione della fosforilazione di Pyk2 e la sua associazione con Grb2, ma inibisce anche l'attivazione di ERK indotta da Pyk2 (Blaukat et al., 1999). La formazione del complesso Pyk2-Src attraverso il legame alla Tyr 402 autofosforilata di Pyk2 ha una doppia funzione. Da una parte permette a Src di fosforilare Pyk2 al COOH-terminale in Tyr 881 e probabilmente nel dominio catalitico (Tyr 579 e Tyr 580), promuovendo così il legame a Grb2 e l'attività chinasi di Pyk2, rispettivamente; dall'altra, Src attivato e legato a Pyk2 potrebbe fosforilare direttamente altre proteine cellulari adiacenti, come Shc e amplificare così il segnale da Pyk2 agli effettori a valle (Blaukat et al., 1999). E' noto che un evento chiave nella regolazione della via di segnalazione di ERK sia l'intervento del complesso adattatore Grb2/Sos che trasloca in membrana nelle vicinanze di Ras (Schlessinger, 1993). Nel caso di Pyk2, la traslocazione del complesso Grb2/Sos è mediata dal legame diretto del dominio SH2 di Grb2 alla Tyr 881 di Pyk2, oppure dall'associazione con la proteina adattatrice Shc fosforilata in tirosina da Pyk2-Src (Blaukat et al., 1999).

Studi su cellule MCF-7 di carcinoma mammario, hanno dimostrato che tali cellule utilizzano una via classica di segnalazione innescata da fattori di crescita per mediare gli effetti non genomici dell'estrogeno. Questa via di segnalazione coinvolge l'associazione diretta del recettore ER α con la proteina adattatrice Shc, la fosforilazione di Shc e la formazione del complesso Shc-Grb2-Sos. Il dominio SH2 di Shc nella regione COOH-terminale ed il dominio di legame delle fosfotirosine (PTB) nella regione NH2-terminale sono i siti di interazione con ER α e la regione AF-1 del recettore ER α è richiesta per l'interazione con Shc. L'effetto non genomico dell'estrogeno nelle cellule MCF-7 determina cambiamenti morfologici: l'estrogeno induce rapidamente la formazione di

pseudopodi e determina la traslocazione di ER α alla membrana e nelle regioni perimembranali degli pseudopodi. ER α , come mediatore chiave, è richiesto per l'azione dell'estrogeno nell'associazione Shc/ER α e nella fosforilazione di Shc e delle MAPK. ER α è richiesto per la fosforilazione di Shc e l'associazione di ER α a Shc sembra essere importante per l'attivazione di Shc stessa. Nella fosforilazione di Shc indotta dall'estrogeno è funzionalmente coinvolto un membro della famiglia delle Src chinasi, nonostante Src non sia individuabile nel complesso ER α /Shc. ER α , Src e Shc sono tutti componenti regolatori dell'attivazione delle MAPK come dimostra il fatto che l'impiego dell'antiestrogeno ICI, dell'inibitore delle MAP chinasi PD98059 e dell'inibitore di Src PP2, determina un blocco nella fosforilazione delle MAPK indotta dall'estrogeno (Song et al., 2002). Un lavoro condotto su fibroblasti trasfettati con cDNA di ER α e ER β , ha dimostrato che la trasfezione di uno o dell'altro recettore è sufficiente per determinare fosforilazione delle MAPK estrogeno-dipendente. ER α mostra la massima attivazione delle MAPK a 15 minuti, che torna però a livelli di controllo nel giro di poco tempo. Anche le cellule trasfettate con ER β raggiungono un picco di attivazione delle MAPK a 15 minuti, che resta però significativa fino ad un'ora dopo il trattamento con estrogeno. Probabilmente questo pattern di sostenuta attivazione delle MAPK mediata da ER β potrebbe essere determinante nell'influenzare le funzioni cellulari oppure il differenziamento (Wade et al., 2001). L'antiestrogeno ICI 182,780 si pensa inibisca la dimerizzazione del recettore (Fawell et al., 1990) e riduce la vita media delle proteine ER. Prove più recenti hanno dimostrato che composti dell'ICI, come il tamoxifene, possono agire da agonisti per il processo di trascrizione ER β -mediato (Webb et al., 1995, Paech et al., 1997). Nel lavoro in fibroblasti trasfettati, è stato osservato che mentre ICI è in grado di antagonizzare l'attivazione delle MAPK estrogeno-dipendente mediata da ER α , ER β è relativamente insensibile a questo composto. Prove condotte utilizzando estrogeno coniugato a BSA, per renderlo impermeabile alla membrana, hanno dimostrato che si ottiene un incremento nell'attivazione delle MAPK simile a quello ottenuto con il solo estrogeno, dimostrando che i recettori estrogenici nucleari sono in grado di funzionare a livello della membrana plasmatica (Wade et al., 2001). In cellule endoteliali dell'arteria uterina è stato recentemente osservato che il 17 β -estradiolo e lo stesso composto membrana-impermeabile, coniugato con BSA, sono entrambi in grado di indurre attivazione ER-dipendente dell'enzima ossido nitrico sintasi endoteliale e la conseguente

produzione di NO, fosforilazione ed attivazione di ERK1/2 senza alcuna apparente fosforilazione di Akt o alcuna misurabile mobilitazione del Ca^{2+} intracellulare (Chen et al., 2004). La massima fosforilazione di ERK1/2 è stata ottenuta con una concentrazione di estrogeno compresa tra 100 nM e 1 μM , è già osservabile a 2 minuti di trattamento con estrogeno, possiede un picco massimo a 5 minuti e si mantiene fino a 60 minuti. Dal momento che l'estrogeno coniugato con BSA è in grado di indurre fosforilazione di ERK1/2 in tali cellule, è stato postulato che l'attivazione della via di segnalazione Raf-1-MEK-1-ERK1/2 estrogeno-dipendente fosse mediata da un recettore estrogenico di membrana (Chen et al., 2004).

GLI ORMONI STEROIDEI

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

Recentemente è stata riportata la capacità degli ormoni steroidei di agire rapidamente influenzando differenti aspetti della funzione cellulare, a seconda del tipo di cellula considerato. Dal momento che questi effetti degli steroidi si verificano indipendentemente dalla sintesi di nuovo RNA messaggero e di proteine, essi sono definiti azioni non genomiche o rapide degli ormoni steroidei e comprendono cambiamenti nell'attività dell'adenilato ciclasi, delle MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), della fosfatidilinositolo 3-chinasi e aumento della concentrazione intracellulare di calcio. E'

possibile raggruppare gli effetti rapidi degli ormoni steroidei in tre classi in base al loro meccanismo d'azione:

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

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

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

di una metalloproteasi transmembrana. Questo determina il processamento extracellulare dell'epidermal growth factor legato all'eparansolfato: l'EGF rilasciato interagisce con un ectodominio del recettore per l'EGF scatenando una via di segnalazione intracellulare che culmina con l'attivazione di ERK1 e ERK2 (Filardo et al., 2002).

3. Le azioni rapide degli ormoni steroidei che si manifestano a partire dal recettore steroideo classico associato alla membrana sono quelle meglio definite. I primi studi sull'identificazione di tali recettori sono stati condotti marcando gli steroidi con sonde fluorescenti e formando complessi proteici in modo tale che lo steroide non potesse attraversare la membrana. In seguito, la presenza di tali recettori è stata confermata utilizzando anticorpi diretti contro regioni diverse dei recettori (Pappas et al., 1994, 1995). Altri lavori sulla localizzazione in membrana di recettori per gli ormoni steroidei sono stati condotti utilizzando tecniche biochimiche e morfologiche (Gametchu et al., 1991, 1991). Studi di trasfezione in cellule CHO hanno dimostrato che un singolo trascritto può codificare sia per il recettore nucleare sia per quello legato alla membrana. La quantità del recettore di membrana è solo il 2% di quello nucleare (Razandi et al., 1999). I recettori sono dinamici e possono spostarsi dal nucleo alla membrana (Russell et al., 2000). E' stato dimostrato che le caveole, particolarmente abbondanti negli epitelii squamosi semplici (cellule endoteliali capillari), nei fibroblasti, nelle cellule muscolari lisce e negli adipociti, sono siti da cui dipartono le azioni rapide degli ormoni steroidei. Le caveole contengono un importante componente strutturale: la caveolina, una fosfoproteina transmembrana che forma una struttura su cui molte molecole segnale si possono assemblare generando dei complessi di segnalazione (Okamoto et al., 1998). E' stata dimostrata l'interazione e la modulazione ad opera della caveolina in molte vie di trasduzione del segnale comprese quelle regolate dai recettori per gli ormoni steroidei. Sia il recettore per gli estrogeni sia quello per gli androgeni è stato identificato nelle caveole, dove interagiscono con la caveolina in maniera ligando-dipendente (Schlegel et al., 1999, Kim et al., 1999, Lu et al., 2001). L'interazione di ER con la caveolina è importante per la traslocazione del recettore in membrana; tuttavia l'associazione di ER con la caveolina inibisce l'attivazione di ERK1 e ERK2 mediata dall'estradiolo. Il ruolo della caveolina nelle azioni rapide di ER sarebbe quello di facilitare il trasporto del recettore alla membrana plasmatica. L'espressione della caveolina è controllata trascrizionalmente e traduzionalmente in modo positivo e negativo

dall'estrogeno a seconda del tipo cellulare considerato (Razandi et al., 2002). Da qui deriverebbe la natura cellulo-specifica delle azioni rapide degli steroidi osservate.

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

Altri studi hanno fatto luce sulla via di trasduzione del segnale che media la rapida e non-genomica attivazione di eNOS ad opera di E_2 e $ER\alpha$: è stato dimostrato che l'attivazione di eNOS nelle cellule endoteliali ad opera di $ER\alpha$ coinvolge la via di segnalazione PI3-K e Akt (Haynes et al., 2000). In uno studio apparso su Nature (Simoncini et al., 2000) è stata dimostrata per la prima volta l'interazione diretta di $ER\alpha$ con la subunità regolatoria p85 di PI3-K. L'estradiolo stimola la fosforilazione di Akt in serina 473 e ne determina l'attivazione (Haynes et al., 2000); Akt attivato fosforila ed attiva eNOS aumentando la sua sensibilità alle concentrazioni di Ca^{2+} basali. Akt è un substrato a valle di PI3-K, suggerendo quindi che PI3-K possa essere regolata dall'estrogeno. Inoltre sono state fornite prove sull'inibizione della eNOS ad opera di wortmannina in cellule endoteliali intatte, sulla diretta stimolazione ad opera dell'estrogeno dell'attività di PI3-K associata a $ER\alpha$ e sulla coimmunoprecipitazione di $ER\alpha$ e p85 con la simultanea produzione del prodotto di PI3-K, il PIP_3 . Nello stesso lavoro, è stato inoltre dimostrato che nelle cellule endoteliali $ER\beta$ non interagisce direttamente con p85 (Simoncini et al., 2000). Il ruolo protettivo degli estrogeni sul sistema cardiocircolatorio è stato suggerito anche da studi condotti sugli effetti della terapia ormonale sostitutiva dopo la menopausa che hanno dimostrato una significativa riduzione dei rischi di sviluppo di malattia aterosclerotica e tale effetto è stato attribuito ad un aumento del rapporto lipoproteico HDL/LDL: la somministrazione di estrogeni ridurrebbe la concentrazione di LDL plasmatiche accelerando il loro catabolismo, mentre aumenterebbe i livelli di colesterolo HDL (Walsh et al., 1991).

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

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

Di recente la scienza medica ha riconosciuto che gli estrogeni possono influenzare anche il sistema nervoso. Le azioni degli estrogeni sull'ipotalamo influenzano l'ovulazione ed il comportamento riproduttivo, e solo recentemente è stato dimostrato che gli estrogeni esercitano molte azioni al di fuori della sfera riproduttiva, compresi effetti su aree del cervello importanti per l'apprendimento e la memoria, le emozioni e lo stato affettivo, la coordinazione motoria e la sensibilità al dolore. Le azioni non genomiche degli estrogeni si esercitano sulla superficie cellulare e influiscono sull'eccitabilità delle cellule nervose e delle cellule muscolari lisce e sul movimento degli ioni Na^+ , K^+ e Ca^{2+} che creano l'impulso nervoso e modulano lo stato interno dei neuroni. La varietà di effetti degli

estrogeni include le azioni rapide sull'eccitabilità delle cellule neuronali e pituitarie, l'attivazione delle vie di segnalazione cAMP-dipendenti e MAPK-dipendenti, effetti sui canali al Ca^{2+} e l'entrata degli ioni Ca^{2+} , la protezione dei neuroni dal danneggiamento da eccitotossine e radicali liberi (Mermelstein et al., 1996, Morley et al., 1992, Green et al., 1996).

IL RECETTORE PER GLI ESTROGENI

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

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

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

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

Poco si conosce della via di segnalazione a valle della tirosin chinasi Src in piastrine umane. E' stata dimostrata, in linee cellulari megacariocitiche (MCK), l'associazione delle tirosin chinasi Src e Fyn con la tirosin chinasi Pyk2 che localizza a livello delle placche di adesione focale e viene attivata e fosforilata in maniera integrina-dipendente (Li et al., 1996). Pyk2 (Proline-rich Tyrosine Kinase) è una tirosin chinasi citoplasmatica correlata a FAK (Focal Adhesion Kinase), manca di una regione transmembrana, di siti di miristilazione e di domini SH2 e SH3, contiene un dominio chinasi fiancheggiato da ampi domini NH2- e COOH-terminale e una regione COOH-terminale ricca di proline da cui deriva la sua capacità di interagire con altre proteine contenenti domini SH3 (Avraham et al., 1995). La stimolazione di piastrine umane con trombina, collagene, ADP, epinefrina induce la fosforilazione in tirosina di Pyk2: tale

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

SCOPO DEL LAVORO

In questo contesto abbiamo pensato di studiare il ruolo biologico degli estrogeni sulla funzionalità piastrinica, con l'obiettivo di caratterizzare le vie di trasduzione del segnale accese dagli estrogeni in piastrine umane. Inoltre poiché le piastrine esprimono i recettori per gli estrogeni, si propongono come utile modello per lo studio degli effetti di questi steroidi ed essendo prive di nucleo, possono fornire utili elementi per la comprensione dei meccanismi di trasduzione del segnale di tipo non trascrizionale. Nel lavoro dello scorso anno di Dottorato abbiamo osservato e dimostrato che in piastrine umane il 17 β -estradiolo è in grado di determinare la rapida fosforilazione delle tirosin chinasi Src e Pyk2, e promuove la formazione, dipendente dall'attività di Src, di un complesso molecolare di segnalazione che comprende Src, Pyk2 e PI3-K associati al recettore ER α . E' stato inoltre dimostrato che mentre Pyk2 risulta essere fosforilato in risposta al trattamento delle piastrine con 17 β -estradiolo, non si osserva invece una significativa attivazione di PI3-K, lasciando supporre che tale proteina non sia coinvolta nella segnalazione estrogenica in piastrine umane. Infine abbiamo osservato che il 17 β -estradiolo non è in grado di indurre direttamente da solo alcuna risposta piastrinica, ma risulta efficace nel potenziare sia l'attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ sia l'aggregazione piastrinica indotte da basse dosi di trombina. Tali effetti sono risultati essere mediati da un'azione sinergica di estrogeno e trombina sull'attivazione della tirosin chinasi Src. Alla luce di questi risultati, ci siamo ora occupati di verificare se la fosforilazione e l'attivazione di Src, oltre ad essere estrogeno-dipendenti, fossero anche dipendenti dal recettore per l'ormone e dal momento che ER β sembra essere, tra i due, quello maggiormente espresso nelle piastrine, la nostra attenzione si è focalizzata su tale recettore. Il lavoro è poi proseguito da una parte ricercando quali altri effettori a valle di Src e Pyk2 potessero essere coinvolti nella segnalazione estrogenica e dall'altra indagando quale fosse la localizzazione cellulare di ER β e delle altre componenti molecolari del complesso di segnalazione estrogeno-dipendente. A questo proposito,

accanto ad esperimenti di frazionamento cellulare, abbiamo avviato una serie di prove per l'isolamento delle rafts lipidiche da piastrine trattate e non con 17β -estradiolo. Dal momento che uno dei possibili effetti degli estrogeni è quello di rendere le piastrine più o meno sensibili all'azione dei più comuni agonisti fisiologici, abbiamo valutato la risposta piastrinica a basse dosi di un altro agonista, il trombossano A₂, mantenendo come parametro di confronto l'azione estrogenica su piastrine stimulate con basse dosi di trombina. A questo proposito sono stati valutati sia il parametro di aggregazione sia il pattern di fosforilazione della tirosin chinasi Src.

Più in generale la ricerca è finalizzata alla definizione dei meccanismi attraverso i quali le vie di trasduzione del segnale evocate dai più comuni agonisti possano essere modulate dall'interazione ligando-ER, con l'obiettivo finale di contribuire al chiarimento dei meccanismi attraverso i quali gli estrogeni esercitano la loro complessa azione sul sistema vascolare.

METODI

Preparazione delle piastrine mediante gel-filtrazione

Il sangue viene prelevato da donatori volontari maschi che non abbiano assunto farmaci nei dieci giorni precedenti il prelievo. Si utilizza come anticoagulante ACD (130 mM acido citrico, 152 mM Na-citrato, 112 mM D-glucoso) nella proporzione di una parte ogni nove di sangue. Il sangue subisce due centrifugazioni. La prima centrifugazione viene eseguita a 830 rpm (120 x g) per dieci minuti a temperatura ambiente: questa centrifugazione permette di separare gli eritrociti ed i leucociti dal plasma ricco in piastrine (PRP). Il PRP viene, quindi, aspirato con una pasteur di vetro siliconata e centrifugato a 1350 rpm (300 x g) per 10 minuti. Questa seconda centrifugazione permette la sedimentazione di un pellet di piastrine. Si allontana il plasma e il pellet di piastrine è risospeso in un piccolo volume di ACD. Le piastrine vengono poi purificate dai componenti plasmatici mediante gel-filtrazione su colonna Sepharose CL-2B equilibrata con tampone Hepes (10 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, pH 7.4). Le piastrine eluite, sono contate al microscopio ottico ad un ingrandimento di 10 x 40 su camera di Burkner, e portate ad una concentrazione di 10⁹ cellule/ml con tampone Hepes. Le piastrine vengono lasciate riposare circa 15 minuti a 37°C prima di essere utilizzate per gli esperimenti.

Preparazione delle piastrine mediante lavaggio con tampone PIPES

Il sangue viene prelevato da donatori volontari che non abbiano assunto farmaci nei dieci giorni precedenti il prelievo. Si utilizza come anticoagulante ACD (1:10). Il sangue subisce una prima centrifugazione a 830 rpm per 10 minuti. Si raccoglie il PRP in una falcon e vi si aggiungono 0.2 U/ml di Apirasi e 1 μ M di PGE1. L'Apirasi provoca il distacco di due unità di acido fosforico dalla molecola dell'ATP, formando AMP ed inoltre neutralizza l'ADP, trasformandolo in AMP, e in altri trifosfo- e difosfo-nucleosidi. La PGE1 è un inibitore dell'attivazione piastrinica, che agisce determinando l'aumento di cAMP intracellulare. Si fa una seconda centrifugazione a 1600 rpm per 15 minuti. Terminata la centrifugazione si elimina il surnatante e si risospende il pellet con tampone Pipes (20 mM Pipes, 136 mM NaCl, pH 6.5) in presenza di Apirasi e PGE1. Si centrifuga a 1600 rpm per 15 minuti. Al termine si risospende il pellet in 1 ml circa di tampone Hepes contenente 5.5 mM glucosio e si fa la conta piastrinica nel modo descritto precedentemente.

Prima di utilizzare le piastrine si lasciano riposare per 30 minuti, perché la concentrazione di cAMP ritorni a livelli normali.

Preparazione di lisati cellulari totali

Le piastrine ottenute come descritto nelle tecniche precedenti, vengono suddivise in campioni di volume variabile, ma generalmente compreso tra 100 e 250 μ l. I campioni sono preincubati in assenza o in presenza di particolari inibitori e successivamente trattati con 100 nM 17 β -estradiolo per tempi diversi come specificato nella sezione “Risultati”. Le reazioni vengono bloccate mediante l’aggiunta di un ugual volume di tampone di lisi 2X contenente 2% NP-40 come detergente.

Il contenuto proteico di ogni campione viene determinato mediante dosaggio con acido bicinconinico (BCA). I campioni vengono dissociati mediante l’aggiunta di 0.5 volumi di SDS-sample buffer 3X (37.5 mM Tris, 288 mM glicina, pH 8.3, 6% SDS, 1.5% DTT, 30% glicerolo, 0.03% blu di bromofenolo) e scaldati a 95°C per 5 minuti. Una stessa quantità di proteine per ogni campione viene successivamente separata su gel lineare di poliacrilamide al 10%, trasferita su membrana PVDF mediante western blotting e analizzata mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici.

Analisi dell'aggregazione piastrinica

Per misurare l'aggregazione piastrinica si è utilizzato un aggregometro della Chrono Log Corporation, che mette in relazione l'assorbanza di un fascio luminoso da parte di una sospensione piastrinica con la percentuale di aggregazione. La fonte luminosa di tale strumento è costituita da una lampada a tungsteno e la luce viene fatta passare attraverso un monocromatore rosso. Un motore mantiene costante l'agitazione magnetica del campione a 500 rpm e la temperatura d'esercizio viene mantenuta a 37°C. Campioni di piastrine gel-filtrate (3×10^8 cellule/ml), resi 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 2 mM glucosio, vengono allestiti in apposite cuvette siliconate e posti nel lumiaggregometro a 37°C sotto costante agitazione magnetica contro tampone. Sulla base delle prove da eseguire, le piastrine vengono preincubate con opportuni inibitori ed in seguito trattate con 100 nM 17β-estradiolo, oppure pretrattate con estrogeno per 30 secondi e successivamente stimulate con basse dosi di trombina oppure U46619 (analogo del trombossano A₂), oppure trattate solamente con estrogeno. L'aggregazione piastrinica viene monitorata su un registratore a carta Chrono-Log Corporation. La percentuale di aggregazione piastrinica viene misurata 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista.

Esperimenti di frazionamento cellulare

Campioni piastrinici contenenti 0.4×10^9 cellule vengono opportunamente trattati con tampone o 100 nM 17β -estradiolo per tempi crescenti. La reazione viene bloccata mediante l'aggiunta di un ugual volume di tampone Hepes seguita da una prima centrifugazione a 13000 rpm per 1 minuto a temperatura ambiente. Il pellet ottenuto viene risospeso e lisato in 200 μ l di tampone Hepes contenente lo 0.05% di digitonina in presenza di mix di inibitori 1X, NaF 1 mM, Na_3VO_4 1 mM. La lisi viene condotta per 10 minuti in ghiaccio accompagnata da lisi meccanica su vortex e seguita da una centrifugazione a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il surnatante ottenuto corrisponde alla frazione citosolica. Il pellet, costituito da membrana e citoscheletro, viene risospeso in 200 μ l di tampone di estrazione del citoscheletro 1X (10 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO_3 , 1% Triton X-100, 5 mM EGTA, 1X mix di inibitori, 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , pH 7.4), agitato vigorosamente e posto in ghiaccio per 10 minuti. Il materiale Triton-insolubile viene recuperato tramite centrifugazione dei campioni a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il surnatante ottenuto corrisponde alla frazione di membrana delle piastrine, mentre il pellet costituisce la componente citoscheletrica. Il citoscheletro viene lavato con 1 ml di tampone di estrazione del citoscheletro 1X e ricentrifugato a 13000 rpm per 5 minuti a 4°C. Al termine, il pellet ottenuto viene risospeso in 100 μ l di 4% SDS ed incubato a 100°C per consentire la solubilizzazione delle proteine. Il contenuto proteico dei campioni corrispondenti alle varie frazioni ottenute (citosol, membrana, citoscheletro) viene poi valutato mediante dosaggio con acido bicinconinico (BCA). Prima dell'analisi elettroforetica i campioni vengono dissociati mediante l'aggiunta di 0.5 volumi di SDS-sample buffer 3X (37.5 mM Tris, 288 mM glicina, pH 8.3, 6% SDS, 1.5% DTT, 30% glicerolo, 0.03% blu di bromofenolo) e scaldati a 95°C per 5 minuti.

Isolamento di rafts lipidiche

Campioni di piastrine lavate contenenti 1.5×10^9 cellule (800 μ l in volume) opportunamente trattati con tampone o 100 nM 17β -estradiolo per tempi diversi, vengono lisati con 200 μ l di tampone di lisi 5X (125 mM MES, 375 mM NaCl, 5 mM PMSF, 50 μ g/ml leupeptina, 50 μ g/ml aprotinina, 10 mM Na_3VO_4 , 0.5% Brij 58, pH 6.5) e posti sotto continua agitazione per 30 minuti a 4°C. Al termine della lisi vengono allestiti i gradienti discontinui di saccarosio in opportune provette per ultracentrifuga. Vengono preparate le seguenti soluzioni in percentuale peso/volume di saccarosio: 80%, 30%, 25%, 20%, 10%. Ogni soluzione è preparata singolarmente, in tampone MBS (25 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6.5) a cui verranno aggiunti, poco prima dell'utilizzo 1 mM PMSF e 2 mM Na_3VO_4 . Ad ogni lisato viene aggiunto un ugual volume di saccarosio 80% per renderlo finale al 40%. Successivamente vengono depositi in ogni tubo per ultracentrifuga, nell'ordine, 2 ml di lisato reso 40% saccarosio, 2 ml di saccarosio 30%, 2 ml di saccarosio 25%, 2 ml di saccarosio 20%, 2 ml di saccarosio 10%, 2 ml di tampone di lisi 1X. I campioni sono infine sottoposti ad ultracentrifuga a 34000 rpm (160000 g) per 16-18 ore a 4°C. Vengono poi raccolte 11-12 frazioni in volumi da 1 ml a partire dal fondo del tubo per ultracentrifuga: dalla prima frazione, quella sul fondo del tubo, si potrà ottenere la componente citoscheletrica, mentre l'ultima, quella in cima al gradiente conterrà, così, solo tampone di lisi. Le rafts lipidiche, grazie alla loro abilità di flottare nel gradiente di densità di saccarosio in seguito ad ultracentrifugazione, si presentano come una banda opaca chiaramente visibile a densità compresa tra 10 e 18% di saccarosio e sono presenti nelle frazioni comprese tra 6 e 10. Per rilevare le frazioni arricchite in rafts lipidiche viene eseguito un dot blot utilizzando la tossina colerica che riconosce quelle frazioni arricchite nel ganglioside di membrana GM1, ovvero le rafts. Prima dell'analisi elettroforetica i campioni vengono dissociati mediante l'aggiunta di 0.25 volumi di Laemmly Buffer 5X e scaldati a 95°C per 5 minuti. Per rilevare le frazioni arricchite in rafts lipidiche, in immunoblotting viene utilizzato l'anticorpo anti-LAT. LAT è una proteina adattatrice che ha una localizzazione preferenziale nelle rafts e per questo motivo viene utilizzata come marcatore positivo.

RISULTATI

Fosforilazione in tirosina della tirosin chinasi Src in piastrine trattate con 17 β -estradiolo

Dal momento che la tirosin chinasi Src è coinvolta nelle vie di segnalazione innescate dal 17 β -estradiolo in numerosi tipi cellulari (Migliaccio et al. 1993, 1996, Di Domenico et al. 1996) ed è la più abbondante tirosin chinasi espressa in piastrine umane (Golden et al. 1986, Huang et al. 1991, Stenberg et al. 1997), abbiamo riconfermato la capacità dell'ormone di attivare la tirosin chinasi Src in queste cellule.

Campioni di piastrine gel-filtrate sono stati incubati con tampone o con concentrazioni crescenti di 17 β -estradiolo per 30 secondi. Il contenuto proteico dei campioni è stato analizzato mediante dosaggio con acido biconinico (BCA), un'identica quantità di proteine piastriniche è stata separata su gel lineare di poliacrilamide al 10% ed analizzata mediante immunoblotting con l'anticorpo specifico per il riconoscimento della forma attivata, fosforilata sul residuo di Tyr416, della chinasi Src. I risultati sono osservabili in figura 1A. Il 17 β -estradiolo determina fosforilazione della chinasi Src in maniera dose-dipendente. Dal momento che la massima attivazione di Src si verifica con 100 nM 17 β -estradiolo, tale concentrazione è stata utilizzata in tutti gli esperimenti successivi. Abbiamo quindi verificato la cinetica di fosforilazione della chinasi Src in seguito a trattamento con 17 β -estradiolo. Campioni di piastrine gel-filtrate sono stati incubati con tampone o con 100 nM 17 β -estradiolo per tempi crescenti da 30 secondi a 3 minuti. Un'identica quantità di proteine piastriniche per campione è stata analizzata mediante immunoblotting con l'anticorpo specifico per il riconoscimento della forma attivata, fosforilata sul residuo di Tyr416, della chinasi Src. I risultati sono osservabili in figura 1B. Il 17 β -estradiolo promuove una rapida e transiente fosforilazione in Tyr416 della chinasi Src: dopo 30 secondi di trattamento Src raggiunge il suo massimo grado di fosforilazione in tirosina che rapidamente decresce e nel corso di 3 minuti ritorna al suo stato basale. Inoltre, la fosforilazione della chinasi Src viene completamente abolita in

seguito alla preincubazione delle piastrine con l'antagonista del recettore per gli estrogeni ICI 182,780, dimostrando che questo effetto è mediato dall'intervento di un recettore per estrogeni espresso nelle piastrine.

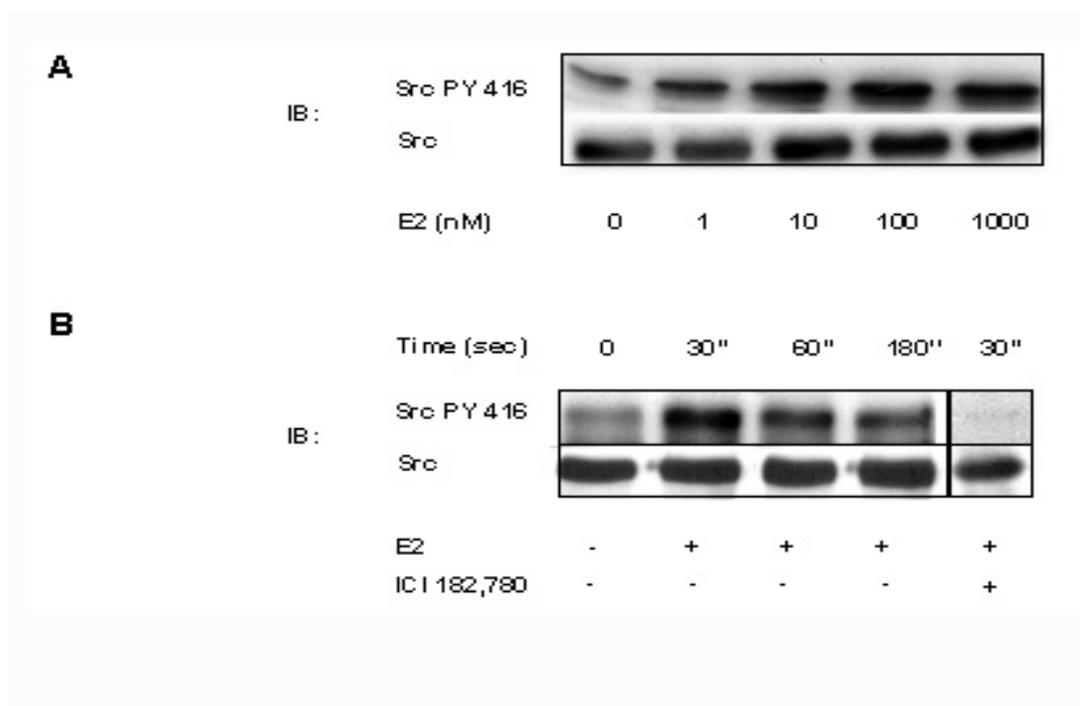


Figura n°1. (A) Campioni di piastrine gel-filtrate sono stati incubati con tampone o con concentrazioni crescenti di 17 β -estradiolo per 30 secondi. Il contenuto proteico dei campioni è stato analizzato mediante dosaggio BCA, un'identica quantità di proteine piastriniche è stata separata su gel lineare di poliacrilamide al 10% ed analizzata mediante immunoblotting con l'anticorpo specifico per il riconoscimento della forma attivata, fosforilata sul residuo di Tyr416, della chinasi Src. In parallelo identiche quantità degli stessi campioni sono stati analizzati mediante immunoblotting con l'anticorpo anti-Src per verificare che in ogni campione ci fosse la stessa quantità di proteine. (B) Campioni di piastrine gel-filtrate sono stati incubati con tampone o 100 nM 17 β -estradiolo per tempi crescenti da 30 secondi a 3 minuti. Un'identica quantità di proteine piastriniche per campione è stata analizzata mediante immunoblotting con l'anticorpo specifico per il riconoscimento della forma fosforilata della tirosin chinasi Src sul residuo di tirosina 416. La membrana PVDF è stata sottoposta ad un processo di stripping e successivamente reincubata con l'anticorpo specifico anti-Src.

Il 17 β -estradiolo induce una debole fosforilazione della MAP chinasi ERK2

Nel lavoro dello scorso anno di Dottorato è stato dimostrato che il 17 β -estradiolo promuove la formazione, dipendente dall'attività di Src, di un complesso molecolare di segnalazione che comprende Src, Pyk2 e PI3-K associati al recettore ER β e che Pyk2 risulta essere fosforilato in risposta al trattamento delle piastrine con estrogeno. Dal momento che il 17 β -estradiolo stimola l'attività chinasi di Src e conseguentemente attiva la via di segnalazione Src/Ras/ERK in una varietà di tipi cellulari (Migliaccio et al., 1993, Migliaccio et al., 1996, Di Domenico et al., 1996) e che in numerosi tipi cellulari Pyk2 svolge un ruolo importante nella trasduzione del segnale da un ampio spettro di recettori transmembrana alle MAP chinasi (Lev et al., 1995, Dikic et al., 1996, Ganju et al., 1997), abbiamo deciso di indagare se nel nostro modello sperimentale, il 17 β -estradiolo fosse in grado di determinare fosforilazione delle MAP chinasi ERK1/2.

Piastrine gel-filtrate sono state incubate con tampone o con 1 U/ml di trombina per tempi crescenti da 30 secondi a 5 minuti. Il contenuto proteico dei campioni è stato analizzato mediante dosaggio con acido bicinconinico (BCA), un'identica quantità di proteine piastriniche è stata separata su gel lineare di poliacrilamide al 10% ed analizzata mediante immunoblotting con l'anticorpo specifico per il riconoscimento della forma fosforilata sui residui di Thr202/Tyr204 delle MAP chinasi ERK1/2. I risultati sono osservabili in figura 2A. E' possibile osservare che la trombina è in grado di promuovere fosforilazione delle MAP chinasi ERK, già rilevabile a 30 secondi dallo stimolo, ma che raggiunge un picco massimo a 3 minuti dall'aggiunta dell'agonista alla sospensione piastrinica. Il controllo positivo per le successive prove con estrogeno è stato quindi fornito dalla fosforilazione di ERK2 a 3 minuti dallo stimolo con trombina. Piastrine gel-filtrate sono state incubate con tampone o con 100 nM 17 β -estradiolo per tempi crescenti da 30 secondi a 10 minuti. Un'identica quantità di proteine per ogni campione è stata analizzata mediante immunoblotting con l'anticorpo specifico per il riconoscimento della forma fosforilata sui residui di Thr202/Tyr204 della MAP chinasi ERK2. I risultati sono osservabili in figura 2B. Il 17 β -estradiolo promuove una debole,

ma rapida fosforilazione di ERK2 già rilevabile a 30 secondi e che mostra un picco massimo a 3 minuti di trattamento con estrogeno. L'intensità della fosforilazione subisce un calo tra i 5 ed i 7 minuti, per mostrare poi un secondo picco a 9 minuti dall'aggiunta dell'estrogeno alla sospensione piastrinica.

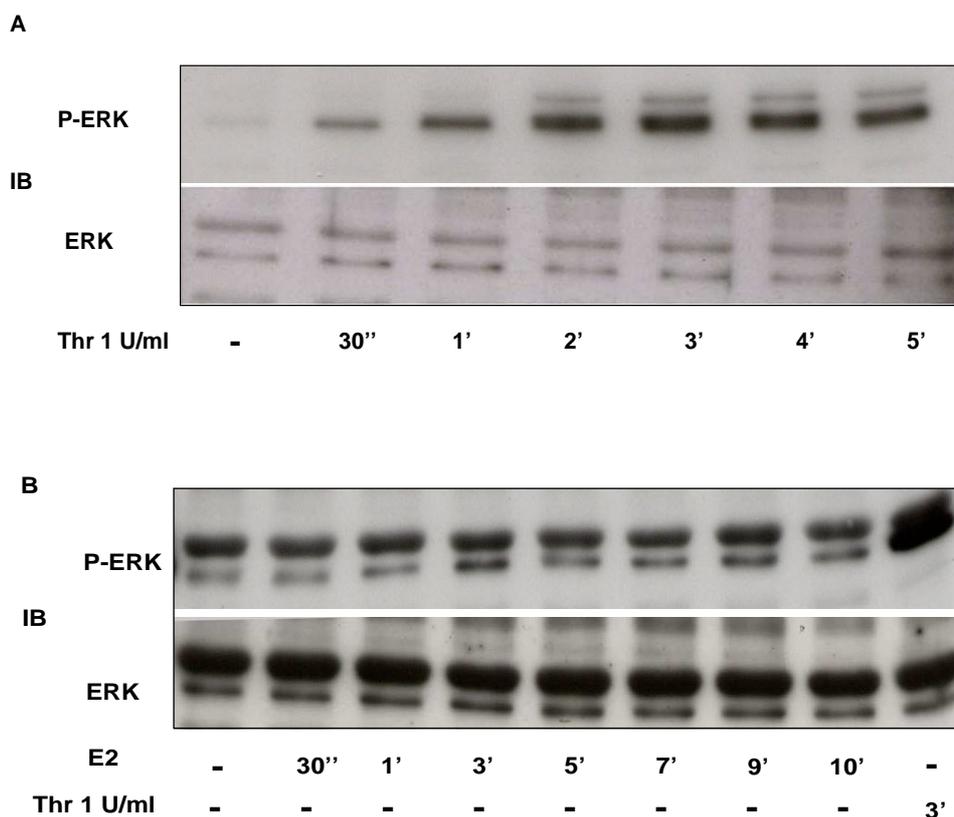


Figura n°2. (A) Piastrine gel-filtrate sono state incubate con tampone o con 1 U/ml di trombina per tempi crescenti da 30 secondi a 5 minuti. Il contenuto proteico dei campioni è stato analizzato mediante dosaggio BCA, un'identica quantità di proteine è stata separata su gel lineare di poliacrilamide al 10% ed analizzata mediante immunoblotting con l'anticorpo specifico per il riconoscimento della forma fosforilata sui residui di Thr202/Tyr204 delle MAP chinasi ERK1/2. (B) Piastrine gel-filtrate sono state incubate con tampone o con 100 nM 17 β -estradiolo per tempi crescenti da 30 secondi a 10 minuti. Un'identica quantità di proteine per ogni campione è stata analizzata mediante immunoblotting con l'anticorpo specifico per il riconoscimento della forma fosforilata sui residui di Thr202/Tyr204 delle MAP chinasi ERK2. In parallelo, sia in (A) sia in (B), identiche quantità degli stessi campioni sono state analizzate mediante immunoblotting con l'anticorpo anti-ERK2 per verificare che in ogni campione ci fosse la stessa quantità di proteine.

Ruolo del 17 β -estradiolo nella localizzazione subcellulare di ER β , Src, p85/PI3-K e Pyk2

Dal momento che il 17 β -estradiolo è in grado di indurre la formazione di un complesso molecolare Src-dipendente associato al recettore ER β e comprendente Src, Pyk2 e p85/PI3-K, è stato interessante verificarne la localizzazione subcellulare.

Campioni di piastrine gel-filtrate sono stati trattati con tampone oppure con 100 nM 17 β -estradiolo per tempi crescenti ed in seguito a lisi con digitonina, come descritto nella sezione “Metodi”, sono state preparate per ogni campione le frazioni di membrana e citosol. Il contenuto proteico dei campioni è stato analizzato mediante dosaggio con acido bicinconinico (BCA), un’identica quantità di proteine appartenenti alle frazioni di membrana e citosol è stata separata su gel lineare di poliacrilamide all’8% ed analizzata mediante immunoblotting con anticorpi anti-ER β o anti-caspasi-9. I risultati sono osservabili in figura 3A: ER β è presente esclusivamente nelle frazioni di membrana, ma non in quelle citosoliche, sia in piastrine a riposo sia in quelle trattate con 17 β -estradiolo. Al contrario, la caspasi-9, come previsto, è rilevata solo nelle frazioni citosoliche. Pertanto, il recettore ER β è localizzato nella membrana piastrinica ed in seguito a trattamento con 17 β -estradiolo non modifica la sua localizzazione.

Le frazioni di membrana sono poi state successivamente analizzate per indagare la localizzazione e la possibile redistribuzione delle molecole segnale reclutate da ER β in seguito a trattamento delle piastrine con 17 β -estradiolo. In figura 3B si può osservare che identiche quantità di Src sono presenti nella membrana di piastrine a riposo o trattate con 17 β -estradiolo, tuttavia la forma attiva di Src fosforilata in Tyr416 associata alla membrana aumenta rapidamente ed in modo transiente in seguito a trattamento delle piastrine con 17 β -estradiolo. Inoltre è possibile osservare che in seguito a stimolazione con 17 β -estradiolo si verifica una significativa, ma transiente traslocazione di Pyk2 nella membrana piastrinica, mentre identiche quantità di p85/PI3-K sono rilevabili in tutte le frazioni di membrana analizzate. Si può pertanto concludere che Pyk2 e p85/PI3-K vanno incontro a differente rilocalizzazione in piastrine trattate con 17 β -estradiolo.

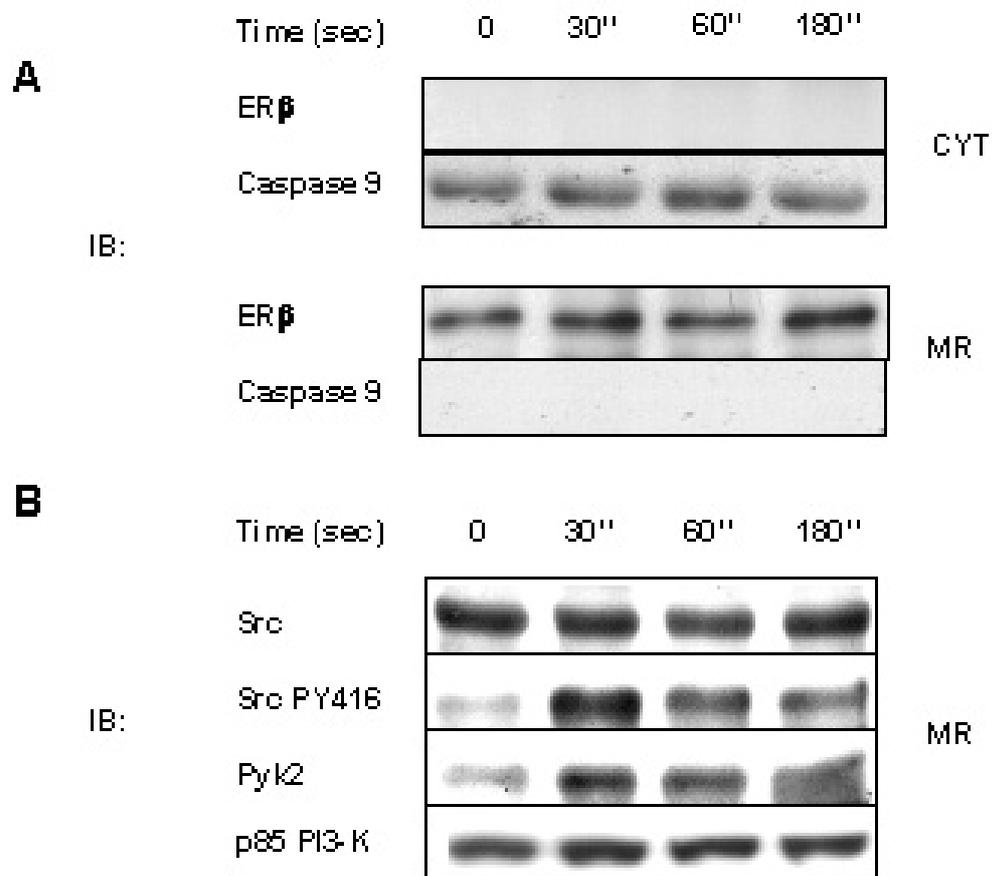


Figura n°3. Campioni di piastrine gel-filtrate sono stati trattati con tampone oppure con 100 nM 17β-estradiolo per tempi crescenti ed in seguito a lisi con digitonina, sono state preparate per ogni campione le frazioni di membrana e citosol. Il contenuto proteico dei campioni è stato analizzato mediante dosaggio BCA, un'identica quantità di proteine appartenenti alle frazioni di membrana e citosol è stata separata su gel lineare di poliacrilamide all'8% ed analizzata mediante immunoblotting con anticorpi anti-ERβ o anti-caspasi-9 (A). Le frazioni di membrana sono poi state successivamente analizzate con anticorpi anti-Src, anti-pSrc-Tyr416, anti-Pyk2 e anti-p85/PI3-K per indagare la localizzazione e la possibile redistribuzione delle molecole segnale reclutate da ERβ in seguito a trattamento delle piastrine con 17β-estradiolo (B).

Isolamento di rafts lipidiche

Una volta dimostrata la presenza di ER β e delle altre componenti del complesso molecolare associato al recettore in membrana, la nostra attenzione si è rivolta all'isolamento delle rafts lipidiche, piccole piattaforme di membrana altamente organizzate e arricchite in glicosfingolipidi, fosfolipidi saturi e colesterolo, per verificare la presenza del recettore o una sua eventuale localizzazione in seguito a trattamento con 17 β -estradiolo.

Il nostro lavoro è iniziato partendo dall'utilizzo di piastrine lavate provenienti da sacche di plasma ricco in piastrine: in un primo tempo, lo scopo è stato quello di ottenere le condizioni ottimali in termini di concentrazione cellulare e di lisi. Pertanto, campioni di piastrine lavate contenenti 1×10^9 cellule (800 μ l in volume) oppure 2×10^9 cellule (800 μ l in volume) allo stato basale, non stimolato, sono stati lisati in presenza di detergenti diversi, 1% Triton X-100 oppure 0.1% Brij 58, e le rafts lipidiche sono state isolate mediante ultracentrifugazione in gradiente discontinuo di saccarosio. Le frazioni ottenute sono state poi analizzate mediante dot blot per rilevare quelle più arricchite nel ganglioside di membrana GM1 e mediante immunoblotting con anticorpo specifico anti-LAT, proteina adattatrice di membrana e marcatore positivo per rafts. I risultati possono essere osservati in figura 4A: le frazioni arricchite in rafts lipidiche risultano essere quelle comprese tra la posizione 6 e la posizione 10, ciò si osserva in modo estremamente chiaro nel caso in cui i campioni siano stati lisati in presenza di Brij 58 sia con una concentrazione cellulare di 1×10^9 , sia di 2×10^9 . Nei campioni lisati in presenza di Triton X-100 solamente in presenza di una concentrazione molto elevata di cellule è possibile rilevare le frazioni arricchite in rafts lipidiche. Il motivo di tale diversità, nel nostro modello sperimentale, potrebbe essere attribuito al fatto che mentre il Triton X-100 è un detergente molto forte, il Brij 58 ha un'azione più blanda e preserva meglio i microdomini di membrana. Le stesse frazioni risultate positive per la presenza di ganglioside GM1, in immunoblotting si sono dimostrate positive anche per la presenza della proteina LAT (figura 4B). A partire da questo lavoro preliminare, abbiamo pensato di utilizzare per l'isolamento delle rafts lipidiche come concentrazione ottimale di cellule, una compresa tra 1.5×10^9 e 2×10^9 e di utilizzare, nel procedimento

di lisi, il detergente più blando Brij 58 confidando nella sua proprietà di preservare i microdomini di membrana in modo migliore. Abbiamo così deciso di utilizzare piastrine lavate provenienti da sangue fresco. Campioni di piastrine lavate contenenti 1.5×10^9 cellule (800 μ l in volume) opportunamente trattati con tampone o 100 nM 17β -estradiolo per tempi diversi o con 0.6 U/ml trombina, sono stati lisati in presenza di detergente 0.1% Brij 58 e le rafts lipidiche sono state isolate mediante ultracentrifugazione in gradiente discontinuo di saccarosio. Le frazioni ottenute sono state poi analizzate mediante dot blot per rilevare quelle più arricchite nel ganglioside di membrana GM1 e mediante immunoblotting con anticorpi specifici anti-CD42b, che riconosce la subunità GPIIb α del complesso glicoproteico GPIb-IX-V, anti-GPIIb, che riconosce la subunità GPIIb della glicoproteina GPIIbIIIa, anti-ER β . I risultati possono essere osservati in figura 5: da verifica mediante dot blot è possibile osservare che, come già risultato con l'utilizzo di sacche piastriniche, anche nelle piastrine da sangue fresco le frazioni arricchite in rafts lipidiche sono comprese tra la numero 6 e la numero 10. E' di particolare interesse, in questo caso, il fatto che nel confronto tra stato basale e stato stimolato si osserva uno spostamento verso il basso delle frazioni provenienti dai campioni stimolati. Tale motivo di interesse sarà sviluppato nella ricerca durante il successivo anno di Dottorato. In figura 6 è possibile osservare i risultati delle prove di immunoblotting: la subunità GPIb è rilevabile abbondantemente nelle frazioni rafts come già indicato anche in letteratura (Dorahy et al., 1996) sia in campioni allo stato basale sia in quelli trattati con 17β -estradiolo o con trombina. La subunità GPIIb è invece presente sia nelle frazioni rafts sia in quelle non rafts, sia in campioni resting sia in campioni stimolati: in letteratura il quadro della glicoproteina GPIIb non è molto chiaro, i lavori sono contrastanti, ma si sa della presenza della subunità GPIIIa (Dorahy et al., 1996) che si manifesta con un quadro molto simile. Per quanto riguarda la presenza del recettore ER β , il quadro risulta essere ancora poco chiaro.

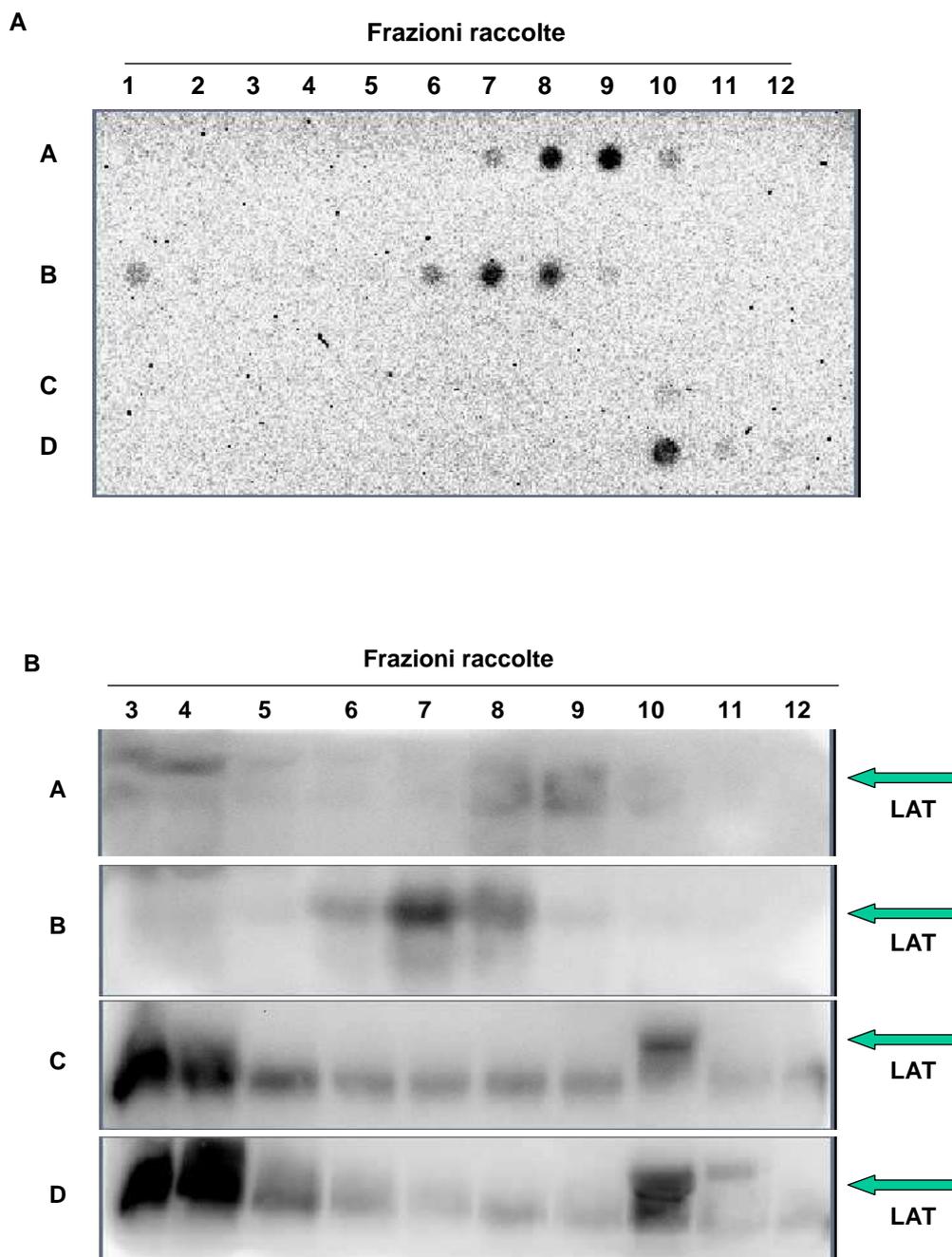


Figura n°4. Campioni di piastrine lavate contenenti 1×10^9 cellule ($800 \mu\text{l}$ in volume) (A, C) oppure 2×10^9 cellule ($800 \mu\text{l}$ in volume) (B, D) allo stato basale, non stimolato, sono stati lisati in presenza di detergenti diversi, 1% Triton X-100 (C, D) oppure 0.1% Brij 58 (A, B) e le rafts lipidiche sono state isolate mediante ultracentrifugazione in gradiente discontinuo di saccarosio. Le frazioni ottenute sono state poi analizzate mediante dot blot per rilevare quelle più arricchite nel ganglioside di membrana GM1 (figura 4A) e mediante immunoblotting con anticorpo specifico anti-LAT, proteina adattatrice di membrana e marcatore positivo per rafts (figura 4B).

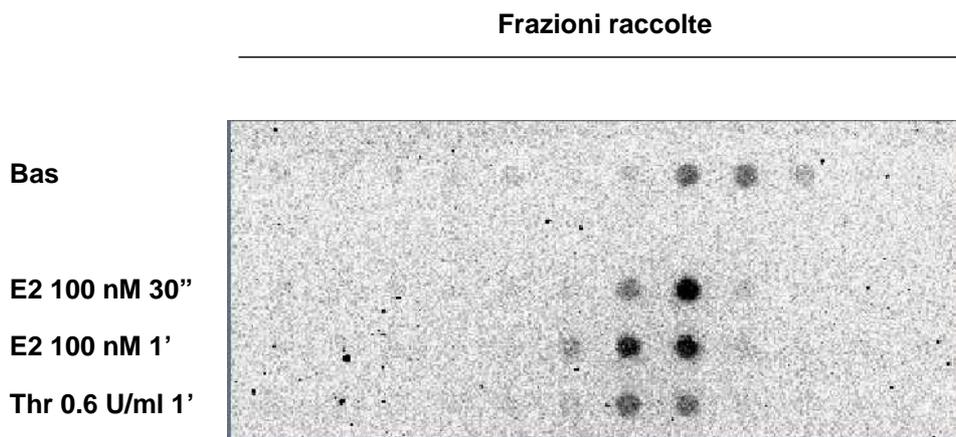
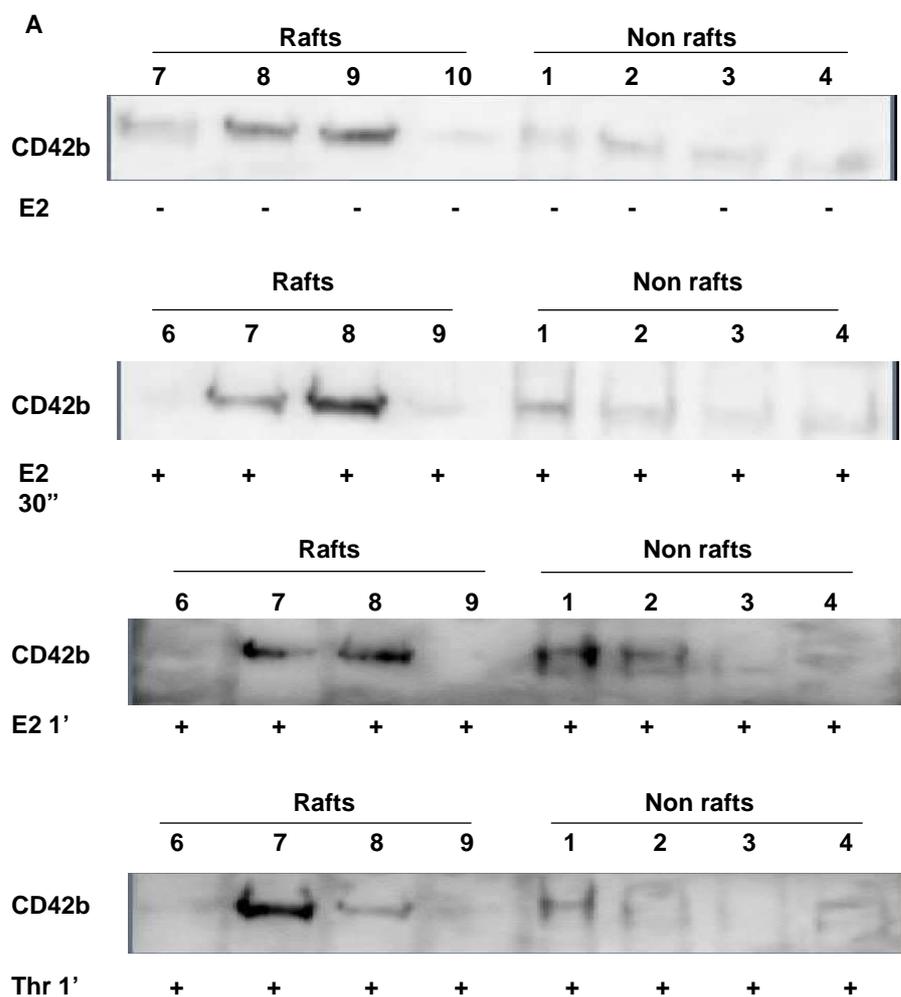


Figura n°5. Campioni di piastrine lavate contenenti 1.5×10^8 cellule ($800 \mu\text{l}$ in volume) opportunamente trattati con tampone o 100 nM 17β -estradiolo per tempi diversi o con 0.6 U/ml trombina, sono stati lisati in presenza di detergente 0.1% Brij 58 e le rafts lipidiche sono state isolate mediante ultracentrifugazione in gradiente discontinuo di saccarosio. Le frazioni ottenute sono state poi analizzate mediante dot blot per rilevare quelle più arricchite nel ganglioside di membrana GM1.



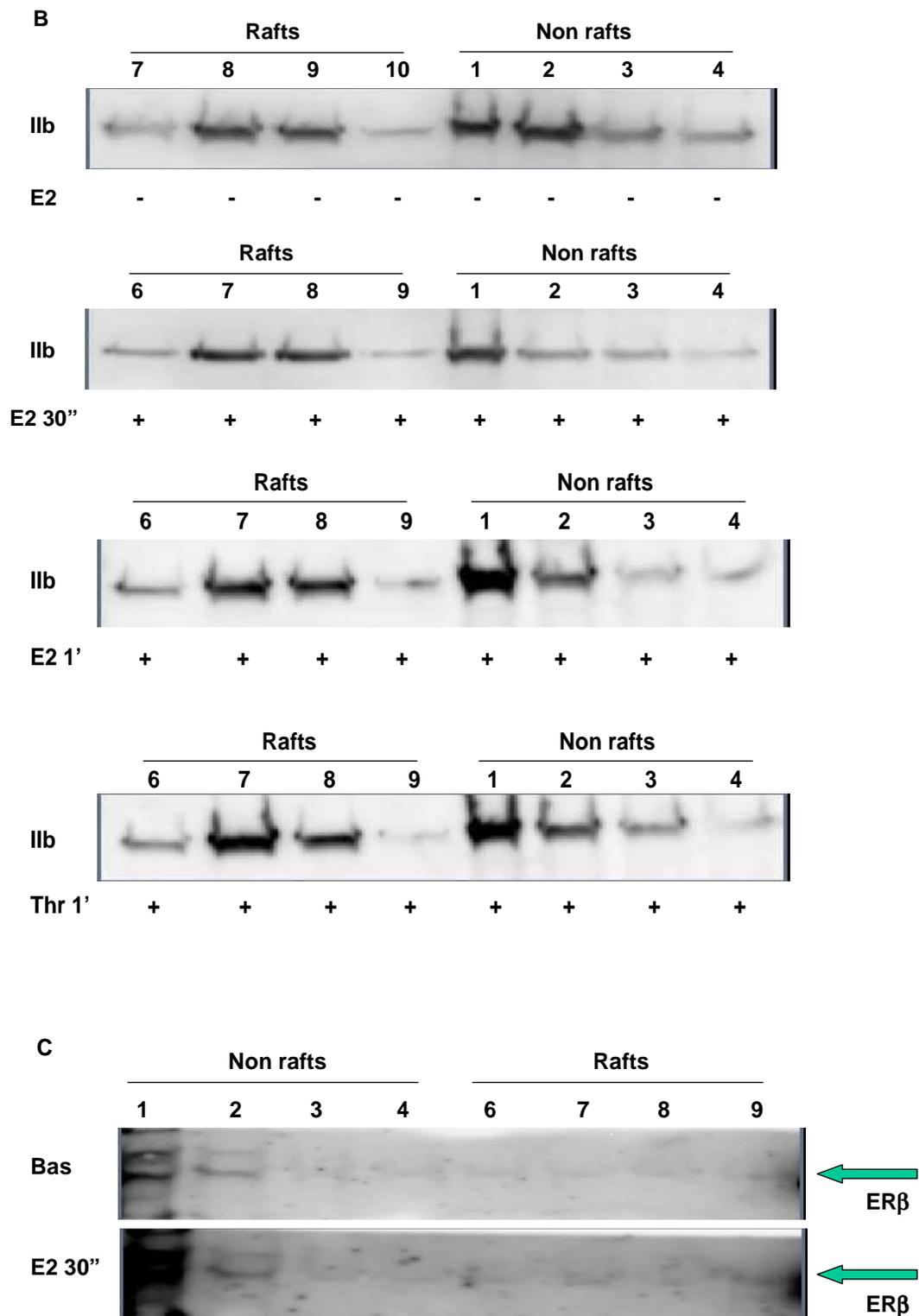


Figura n°6. Campioni di piastrine lavate contenenti 1.5×10^9 cellule ($800 \mu\text{l}$ in volume) opportunamente trattati con tampone o 100 nM 17β -estradiolo per tempi diversi o con 0.6 U/ml trombina, sono stati lisati in presenza di detergente 0.1% Brij 58 e le rafts lipidiche sono state isolate mediante ultracentrifugazione in gradiente discontinuo di saccarosio. Le frazioni ottenute sono state poi analizzate mediante immunoblotting con anticorpi specifici anti-CD42b (A), anti-IIb (B), anti-ER β (C).

Il 17 β -estradiolo potenzia l'aggregazione piastrinica indotta da basse dosi di trombossano A₂

Nel lavoro dello scorso anno, abbiamo dimostrato che il 17 β -estradiolo è in grado di potenziare l'aggregazione piastrinica indotta da basse dosi di trombina. E' stato interessante verificare, allora, se lo stesso effetto di potenziamento potesse essere rilevato anche in presenza di stimolo delle piastrine con dosi subliminali di U46619, analogo stabile del trombossano A₂. Per condurre queste prove, sono state utilizzate, inizialmente, piastrine lavate con tampone PIPES in presenza di apirasi, ma si è subito presentato un ostacolo che consisteva nell'impossibilità di riuscire a trovare quella concentrazione subliminale critica di agonista che desse un 30% di aggregazione, in rapporto all'aggregazione massima, e che, come nel caso della trombina, potesse essere utilizzata per verificare un eventuale effetto dell'estrogeno. Con le stesse piastrine sono state condotte prove in presenza di trombina, ma si è riproposto lo stesso problema. A questo punto è stato necessario verificare in parallelo la risposta di piastrine lavate e gel-filtrate a trombina, U46619 ed estrogeno.

Campioni di piastrine lavate o gel-filtrate (3×10^8 cellule/ml) preconditionati a 37°C per 5 minuti sotto costante agitazione magnetica, sono stati trattati con 100 nM 17 β -estradiolo per 30 secondi e successivamente stimolati con alte (1 U/ml) o basse (0.02 U/ml) dosi di trombina oppure con alte (2 μ M) o basse (0.1 μ M) dosi di U46619 e l'aggregazione è stata seguita per 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista. I risultati mostrati in figura 7 riguardano esclusivamente le prove condotte in presenza di U46619: si osserva, nel caso di piastrine lavate, l'impossibilità di trovare una concentrazione critica di agonista necessaria affinché l'aggregazione piastrinica possa essere influenzata dall'estrogeno, in quanto si ottiene un'aggregazione massima o un'aggregazione nulla, senza avere una condizione intermedia. Questo fatto potrebbe essere dovuto alla presenza di apirasi nel tampone di lavaggio che impedirebbe anche a quella minima quantità di ADP rilasciato di contribuire ad una maggiore responsività da parte delle piastrine. Sarà questo problema oggetto di studi futuri per verificare se anche l'ADP abbia un ruolo nel potenziamento dell'aggregazione piastrinica da parte

dell'estrogeno, nel nostro modello sperimentale. Nel caso di piastrine gel-filtrate, si può osservare invece che, come per la trombina, si ha un forte potenziamento 17β -estradiolo-dipendente dell'aggregazione piastrinica indotta da basse dosi di U46619. Infatti, come mostra la figura 8, la stimolazione delle piastrine con $0.1 \mu\text{M}$ U46619 induce l' $1.84 \pm 0.05\%$ di aggregazione, mentre in presenza di 17β -estradiolo l'aggregazione indotta da bassa dose di U46619 subisce un forte potenziamento: $73.7 \pm 1.85\%$. Quando le piastrine sono invece stimolate con alte dosi di U46619, l'ormone è completamente privo di effetto (i tracciati sono infatti sovrapponibili).

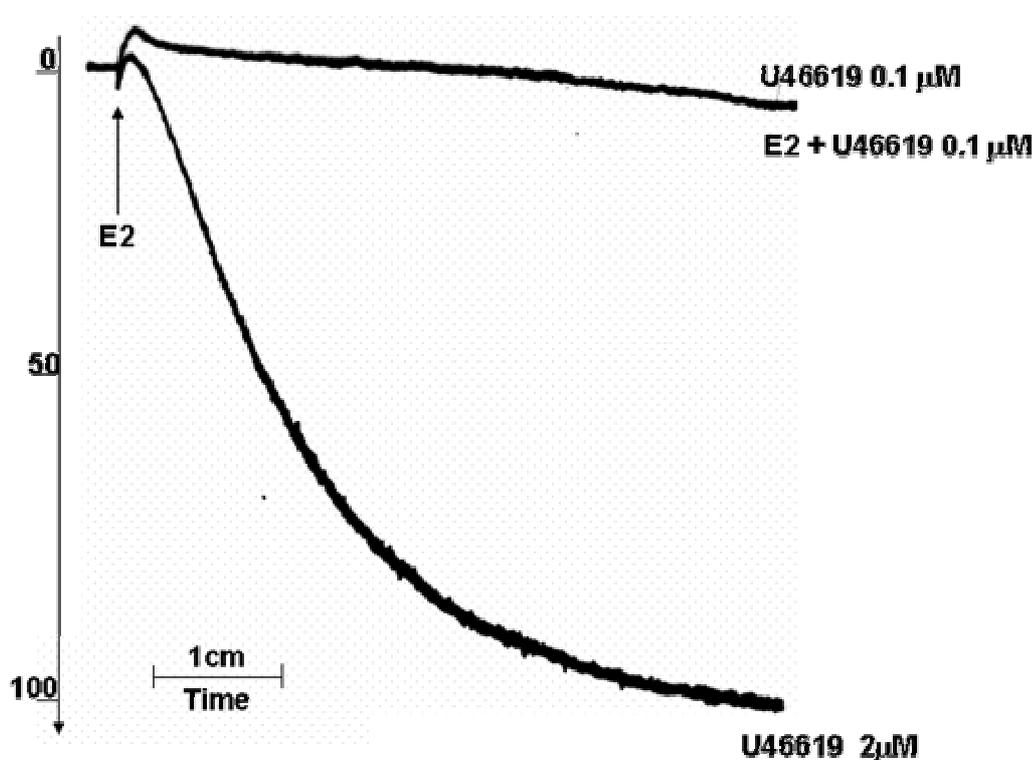


Figura n°7. Il grafico mostra l'impossibilità di trovare una concentrazione critica di agonista necessaria affinché l'aggregazione piastrinica possa essere influenzata dall'estrogeno, in quanto si ottiene un'aggregazione massima o un'aggregazione nulla, senza avere una condizione intermedia. Campioni di piastrine lavate in tampone PIPES (3×10^8 cellule/ml) preconditionati a 37°C per 5 minuti sotto costante agitazione magnetica, sono stati trattati con 100 nM 17β -estradiolo per 30 secondi e successivamente stimolati con alte (2 μM) o basse (0.1 μM) dosi di U46619 e l'aggregazione è stata seguita per 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista. In ascissa è espresso il tempo in minuti, mentre in ordinata è indicata la trasmissione della luce espressa in percentuale.

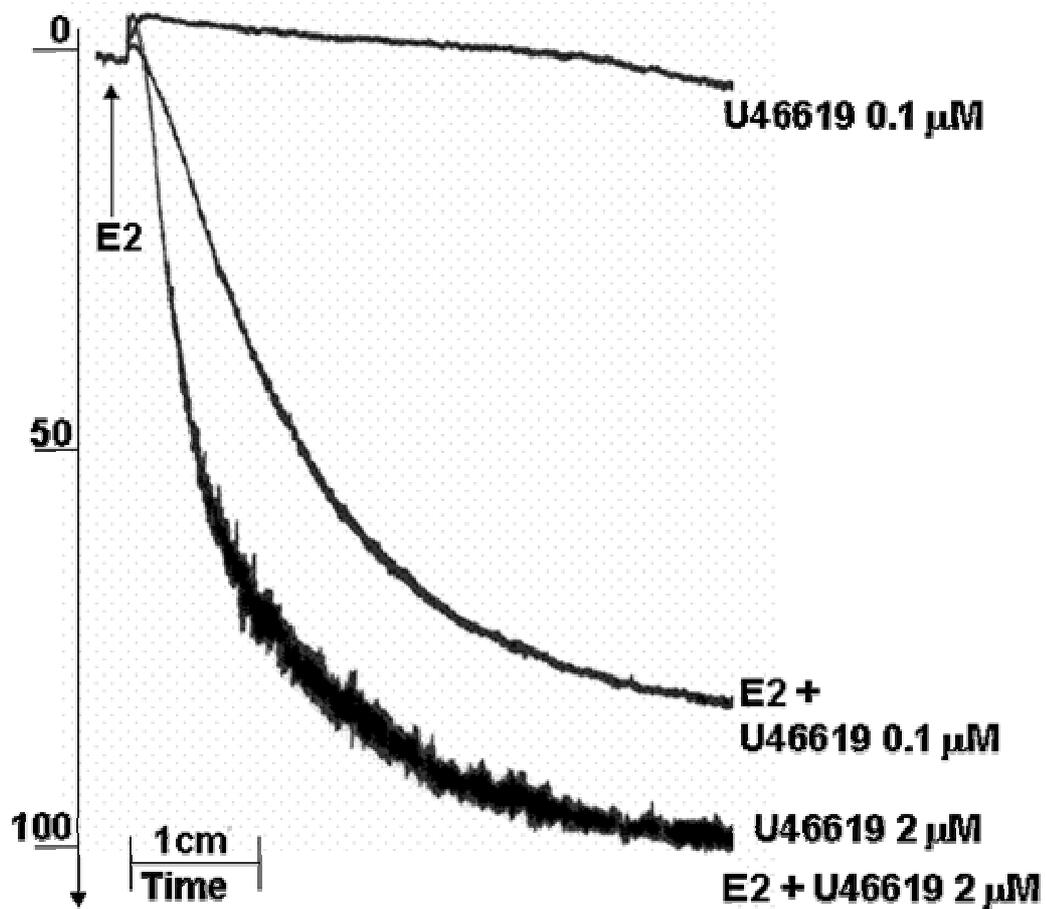


Figura n°8. Il grafico mostra il confronto tra l'aggregazione piastrinica indotta da alte e basse dosi di U46619 in presenza e in assenza di pretrattamento con 17β -estradiolo. Campioni di piastrine gel-filtrate (3×10^8 cellule/ml) preconditionati a 37°C per 5 minuti sotto costante agitazione magnetica, sono stati trattati con 100 nM 17β -estradiolo per 30 secondi e successivamente stimolati con alte ($2 \mu\text{M}$) o basse ($0.1 \mu\text{M}$) dosi di U46619 e l'aggregazione è stata seguita per 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista. In ascissa è espresso il tempo in minuti, mentre in ordinata è indicata la trasmissione della luce espressa in percentuale.

Il 17 β -estradiolo e il trombossano A2 promuovono la fosforilazione in tirosina 416 della chinasi Src con meccanismo additivo

Una volta dimostrato che il 17 β -estradiolo potenzia l'aggregazione piastrinica indotte da basse dosi di U46619 e poiché anche questo agonista è in grado di indurre fosforilazione della chinasi Src, abbiamo deciso di indagare se, come nel caso della trombina, vi fosse un effetto sinergico tra U46619 e 17 β -estradiolo ai fini della fosforilazione della tirosin chinasi Src.

Campioni di piastrine gel-filtrate sono stati stimolati con 0.1 μ M U46619, oppure trattate con il solo 100 nM 17 β -estradiolo, oppure stimolate simultaneamente con estrogeno e U46619 per tempi crescenti da 15 secondi a 1 minuto. Il contenuto proteico di ogni campione è stato valutato mediante dosaggio con acido bicinconinico (BCA) e una stessa quantità di proteine per campione è stata separata su gel lineare di poliacrilamide al 10% ed analizzata mediante immunoblotting con l'anticorpo specifico per la forma fosforilata in Tyr416 della chinasi Src. I risultati sono riportati in figura 9. Sia il 17 β -estradiolo sia l'U46619 causano attivazione della chinasi Src, ma con cinetiche differenti: mentre nelle piastrine stimolate con U46619 la fosforilazione di Src è rilevabile già a 30 secondi, ma è massima ad 1 minuto dallo stimolo, nei campioni trattati con estrogeno lo stesso livello di fosforilazione viene raggiunto in 1 minuto. Quando le piastrine sono trattate sia con il 17 β -estradiolo sia con U46619 la fosforilazione della chinasi Src aumenta già a 15 secondi e non reverte, indicando che estrogeno e U46619 agiscono con un meccanismo additivo. Si può pensare quindi che anche gli effetti di U46619 ed estrogeno si manifestino presumibilmente utilizzando differenti vie di segnalazione che convergono sulla tirosin chinasi Src.

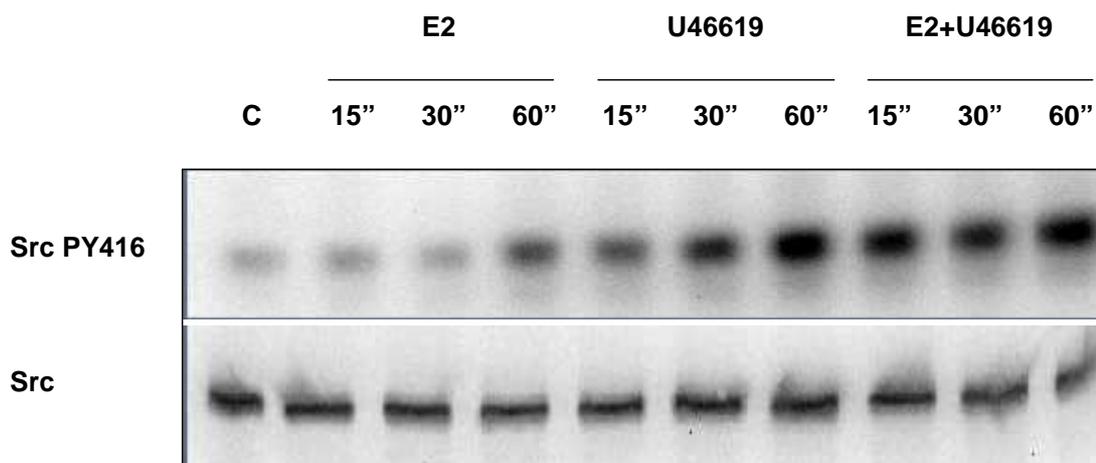


Figura n°9. Campioni di piastrine gel-filtrate sono stati stimolati con 0.1 μ M U46619, oppure trattate con il solo 100 nM 17 β -estradiolo, oppure stimulate simultaneamente con estrogeno e U46619 per tempi crescenti da 15 secondi a 1 minuto. Il contenuto proteico di ogni campione è stato valutato mediante dosaggio BCA ed una stessa quantità di proteine per campione è stata separata su gel lineare di poliacrilamide al 10% ed analizzata mediante immunoblotting con l'anticorpo specifico per la forma fosforilata in Tyr416 della chinasi Src.

DISCUSSIONE

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

quindi un eccellente modello per lo studio delle vie di segnalazione che mediano gli effetti non genomici degli estrogeni. Nel lavoro dello scorso anno di Dottorato abbiamo osservato e dimostrato che in piastrine umane il 17β -estradiolo è in grado di determinare la rapida fosforilazione delle tirosin chinasi Src e Pyk2, e di promuovere la formazione, dipendente dall'attività di Src, di un complesso molecolare di segnalazione comprendente ER β , Src, Pyk2 e PI3-K. E' stato inoltre dimostrato che mentre Pyk2 risulta essere fosforilato in risposta al trattamento delle piastrine con 17β -estradiolo, non si osserva invece una significativa attivazione di PI3-K, lasciando supporre che tale proteina non sia coinvolta nella segnalazione estrogenica in piastrine umane. Infine abbiamo osservato che il 17β -estradiolo non è in grado di indurre direttamente da solo alcuna risposta piastrinica, ma risulta efficace nel potenziare sia l'attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ sia l'aggregazione piastrinica indotte da basse dosi di trombina. Tali effetti sono risultati essere mediati da un'azione sinergistica di estrogeno e trombina sull'attivazione della tirosin chinasi Src.

Alla luce di questi risultati, ci siamo ora occupati di verificare se la fosforilazione e l'attivazione di Src oltre ad essere estrogeno-dipendenti fossero anche dipendenti dal recettore ER β . Il lavoro è poi proseguito da una parte ricercando quali altri effettori a valle di Src e Pyk2 potessero essere coinvolti nella segnalazione estrogenica e dall'altra indagando quale fosse la localizzazione cellulare di ER β e delle altre componenti molecolari del complesso di segnalazione estrogeno-dipendente. Dal momento che uno dei possibili effetti degli estrogeni è quello di rendere le piastrine più o meno sensibili all'azione dei più comuni agonisti fisiologici, abbiamo valutato la risposta piastrinica a basse dosi di un altro agonista, il trombossano A2, mantenendo come parametro di confronto l'azione estrogenica su piastrine stimulate con basse dosi di trombina.

Dal momento che la tirosin chinasi Src è coinvolta nelle vie di segnalazione innescate dal 17β -estradiolo in numerosi tipi cellulari (Migliaccio et al. 1993, 1996, Di Domenico et al. 1996) ed è la più abbondante tirosin chinasi espressa in piastrine umane (Golden et al. 1986, Huang et al. 1991, Stenberg et al. 1997), abbiamo riconfermato la capacità dell'ormone di attivare la tirosin chinasi Src in queste cellule. Il 17β -estradiolo promuove una rapida e transiente fosforilazione in Tyr416 della chinasi Src: dopo 30

secondi di trattamento Src raggiunge il suo massimo grado di fosforilazione in tirosina che rapidamente decresce e nel corso di 3 minuti ritorna al suo stato basale. Inoltre, la fosforilazione della chinasi Src viene completamente abolita in seguito alla preincubazione delle piastrine con l'antagonista del recettore per gli estrogeni ICI 182,780, dimostrando che questo effetto è mediato dall'intervento di un recettore per estrogeni espresso nelle piastrine.

Numerosi studi hanno dimostrato che il 17β -estradiolo stimola l'attività chinasi di Src e conseguentemente attiva la via di segnalazione Src/Ras/ERK in una varietà di tipi cellulari (Migliaccio et al., 1993, Migliaccio et al., 1996, Di Domenico et al., 1996) e che in numerosi tipi cellulari Pyk2 svolge un ruolo importante nella trasduzione del segnale da un ampio spettro di recettori transmembrana alle MAP chinasi (Lev et al., 1995, Dikic et al., 1996, Ganju et al., 1997). A questo proposito abbiamo deciso di indagare se, nel nostro modello sperimentale, il 17β -estradiolo fosse in grado di determinare fosforilazione delle MAP chinasi ERK1/2. Utilizzando come controllo positivo la fosforilazione di ERK1/2 ad opera di trombina, è possibile concludere che il 17β -estradiolo promuove una debole, ma rapida fosforilazione di ERK2 già rilevabile a 30 secondi e che mostra un picco massimo a 3 minuti di trattamento con estrogeno. L'intensità della fosforilazione subisce un calo tra i 5 ed i 7 minuti, per mostrare poi un secondo picco a 9 minuti dall'aggiunta dell'estrogeno alla sospensione piastrinica.

Dal momento che il 17β -estradiolo è in grado di indurre la formazione di un complesso molecolare Src-dipendente associato al recettore $ER\beta$ e comprendente Src, Pyk2 e p85/PI3-K, è stato interessante verificarne la localizzazione subcellulare. È stato dimostrato che il recettore $ER\beta$ è localizzato nella membrana piastrinica ed in seguito a trattamento con 17β -estradiolo non modifica la sua localizzazione cellulare. Analizzando la localizzazione e la possibile redistribuzione delle molecole segnale reclutate da $ER\beta$ in seguito a trattamento delle piastrine con 17β -estradiolo, abbiamo osservato che identiche quantità di Src sono presenti nella membrana di piastrine a riposo o trattate con estrogeno, tuttavia la forma attiva di Src fosforilata in Tyr416 associata alla membrana aumenta rapidamente ed in modo transiente in seguito a trattamento delle piastrine con 17β -estradiolo. Inoltre in seguito a stimolazione con 17β -

estradiolo si verifica una significativa, ma transiente traslocazione di Pyk2 nella membrana piastrinica, mentre identiche quantità di p85/PI3-K sono rilevabili in tutte le frazioni di membrana analizzate. Pertanto Pyk2 e p85/PI3-K vanno incontro a differente rilocalizzazione cellulare in piastrine trattate con 17 β -estradiolo.

Una volta dimostrata la presenza in membrana di ER β e delle altre componenti del complesso molecolare associato al recettore, la nostra attenzione si è rivolta all'isolamento delle rafts lipidiche, piccole piattaforme di membrana altamente organizzate e arricchite in glicosfingolipidi, fosfolipidi saturi e colesterolo, per verificarne la presenza del recettore o una sua eventuale localizzazione in seguito a trattamento con 17 β -estradiolo. Le frazioni arricchite in rafts lipidiche risultano essere quelle comprese tra la posizione 6 e la posizione 10, ad una percentuale di saccarosio compresa tra il 10% ed il 18%: ciò si osserva in modo estremamente chiaro nel caso in cui i campioni siano stati lisati in presenza di Brij 58 con una concentrazione cellulare compresa tra 1×10^9 e 2×10^9 . Nei campioni lisati in presenza di Triton X-100 solamente in presenza di una concentrazione molto elevata di cellule è possibile rilevare le frazioni arricchite in rafts lipidiche. Il motivo di tale diversità, nel nostro modello sperimentale, potrebbe essere attribuito al fatto che, mentre il Triton X-100 è un detergente molto forte, il Brij 58 ha un'azione più blanda e preserva meglio i microdomini di membrana. A partire da questo lavoro preliminare, abbiamo pensato di utilizzare per l'isolamento delle rafts lipidiche come concentrazione ottimale di cellule, una compresa tra 1.5×10^9 e 2×10^9 e di utilizzare, nel procedimento di lisi il detergente più blando Brij 58 confidando nella sua proprietà di preservare i microdomini di membrana in modo migliore. Utilizzando piastrine isolate da sangue fresco abbiamo potuto osservare che nel confronto tra stato basale e stato stimolato si verifica uno spostamento verso il basso delle frazioni provenienti da campioni stimolati; ciò risulta di particolare interesse e sarà motivo di sviluppo nella ricerca durante il successivo anno di Dottorato. In piastrine isolate da sangue fresco abbiamo osservato che la subunità GPIb α del complesso glicoproteico di membrana GPIb-IX-V è abbondantemente presente nelle frazioni rafts come già indicato anche in letteratura (Dorahy et al., 1996) sia in campioni allo stato basale sia in quelli trattati con 17 β -estradiolo o con trombina. La subunità GPIIb, appartenente alla glicoproteina IIb/IIIa, è invece presente sia nelle

frazioni rafts sia in quelle non rafts, sia in campioni resting sia in campioni stimolati: in letteratura il quadro della glicoproteina GPIIb non è molto chiaro, i lavori sono contrastanti, ma si sa della presenza della subunità GPIIIa (Dorahy et al., 1996) che si manifesta con un quadro molto simile. Per quanto riguarda la presenza del recettore ER β , il quadro risulta essere ancora poco chiaro ed uno sviluppo di questo lavoro consisterà nel verificare la localizzazione di ER β nelle rafts in seguito a trattamento con estrogeno e di valutare il ruolo di alte o basse concentrazioni di colesterolo nell'organizzazione delle rafts lipidiche piastriniche in risposta al 17 β -estradiolo.

Nel lavoro dello scorso anno, abbiamo dimostrato che il 17 β -estradiolo è in grado di potenziare l'aggregazione piastrinica indotta da basse dosi di trombina. E' stato interessante verificare, allora, se lo stesso effetto di potenziamento potesse essere rilevato anche in presenza di stimolo delle piastrine con dosi subliminali di U46619, analogo stabile del trombossano A₂. Per condurre queste prove, sono state messe a confronto due diverse preparazioni piastriniche. Nell'utilizzo di piastrine lavate con tampone PIPES in presenza di apirasi, si è subito presentata l'impossibilità di trovare quella concentrazione subliminale critica di agonista che desse un 30% di aggregazione, in rapporto all'aggregazione massima, e che come nel caso della trombina potesse essere utilizzata per verificare un eventuale effetto dell'estrogeno. Con le stesse piastrine sono state condotte prove in presenza di trombina, ma si è riproposto lo stesso problema. Questo fatto potrebbe essere dovuto alla presenza di apirasi nel tampone di lavaggio che impedirebbe anche a quella minima porzione di ADP rilasciato di contribuire ad una maggiore responsività da parte delle piastrine. Sarà questo problema oggetto di studi futuri per verificare se anche l'ADP abbia un ruolo nel potenziamento dell'aggregazione piastrinica da parte dell'estrogeno, nel nostro modello sperimentale. Utilizzando, invece, piastrine gel-filtrate, è stato osservato, come già per la trombina, un forte potenziamento 17 β -estradiolo-dipendente dell'aggregazione piastrinica indotta da basse dosi di U46619.

Dopo aver dimostrato che il 17 β -estradiolo potenzia l'aggregazione piastrinica indotte da basse dosi di U46619 e dal momento che anche questo agonista è in grado di indurre fosforilazione della chinasi Src, abbiamo deciso di indagare se, come nel caso della trombina, vi fosse un effetto sinergico tra U46619 e 17 β -estradiolo ai fini della

fosforilazione della tirosin chinasi Src. Sia il 17 β -estradiolo sia l'U46619 causano attivazione della chinasi Src, ma con cinetiche differenti: mentre nelle piastrine stimulate con U46619 la fosforilazione di Src è rilevabile già a 30 secondi, ma è massima ad 1 minuto dallo stimolo, nei campioni trattati con estrogeno lo stesso livello di fosforilazione viene raggiunto in 1 minuto. Quando le piastrine sono trattate sia con il 17 β -estradiolo sia con U46619 la fosforilazione della chinasi Src aumenta già a 15 secondi e non reverte, indicando che estrogeno e U46619 agiscono con un meccanismo additivo. Si può pensare quindi che anche gli effetti di U46619 ed estrogeno si manifestino presumibilmente utilizzando differenti vie di segnalazione che convergono sulla tirosin chinasi Src.

Questi dati, insieme a quelli del lavoro precedente, identificano un nuovo possibile meccanismo con cui gli estrogeni influiscono sul sistema cardiovascolare: accanto agli effetti genomici sulle cellule endoteliali e muscolari lisce della parete dei vasi, gli estrogeni possono sensibilizzare direttamente, attraverso un'azione strettamente non-genomica, le piastrine ai più comuni agonisti fisiologici. Questo è da tenere in seria considerazione soprattutto per le implicazioni cliniche che può avere, ad esempio, è stato riportato che nonostante non ci siano differenze nel numero totale di integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ espressa sulle piastrine maschili e femminili, la stimolazione delle piastrine femminili con agonisti porta alla conversione nella conformazione attiva di una più grande proporzione di integrina rispetto alla situazione maschile (Faraday et al., 1997). I nostri risultati suggeriscono che tale osservazione potrebbe essere correlata alla più alta e variabile concentrazione di estrogeni nel plasma femminile. Come conseguenza, la diretta azione degli estrogeni sulle piastrine circolanti, accanto ad altri fattori, dovrebbe essere presa in considerazione nel programmare un uso acuto di estrogeni per migliorare la circolazione sanguigna nei vasi, oppure nell'utilizzare basse dosi di ormone come contraccettivo o in menopausa. Uno sviluppo di questo lavoro potrà essere una migliore definizione a livello molecolare dell'interazione estrogeni/piastrine ed in particolare una migliore caratterizzazione delle vie di trasduzione del segnale coinvolte servirà a comprendere il ruolo biologico degli estrogeni relativamente alla funzionalità piastrinica, prendendo in considerazione anche le altre componenti plasmatiche del sangue dei donatori da cui le piastrine saranno isolate.

BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bodin S, Giuriato S, Ragab J, Humbel B, Viala C, Vieu C, Chap H, Payrastra B. Production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidic acid in platelet rafts: evidence for a critical role of cholesterol-enriched domains in human platelet activation. *Biochemistry* 2001; 40: 15290-15299.

- Bodin S, Tronchere H, Payrastra B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1610:247-257.
- Bouboulas KD, Cooke GE, Roos CM, Bray PF, Goldschmidt-Clermont PJ. The PIA polymorphism of glycoprotein IIIa functions as a modifier for the effect of estrogen on platelet aggregation. *Arch Pathol Lab Med.* 2001; 125: 112-115.
- Braunstein JB, Kershner DW, Bray P, Gerstenblith G, Schulman SP, Post WS, Blumenthal RS. Interaction of hemostatic genetics with hormone therapy. New insights to explain arterial thrombosis in postmenopausal women. *CHEST* 2002; 121: 906-920.
- Bugaud F, Nadal- Wollbold F, Lèvi-Toledano S, Rosa JP, Bryckaert M. Regulation of c-Jun-NH2 terminal Kinase and Extracellular-signal Regulated Kinase in human platelets. *Blood* 1999; 94: 3800-3805.
- Canobbio I, Lova P, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M. Proline-rich tyrosine kinase 2 and focal adhesion kinase are involved indifferent phases of platelet activation by vWF. *Thromb Haemost* 2002; 87: 509-517.
- Cato AC, Nestl A, Mink S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE* 2002; 138: RE9. Review.
- Chen DB, Bird IM, Zheng J, Magness RR. Membrane estrogen receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway mediates acute activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen in uterine artery endothelial cells. *Endocrinology* 2004; 145: 113-125.
- Chen Z, Yuhanna SY, Galchava-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 1999; 103: 401-406.
- Cherukuri A, Dykstra M, Pierce SK. Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity* 2001; 14: 657-660.
- Coughlin SR. Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb Haemost* 2001; 86: 298-307.
- Crawford N, Scrutton MC. Biochemistry of the blood platelet. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD (eds): *Haemostasis and Thrombosis*. Third edition 1994; 4: 89-98.
- Di Domenico M, Castoria G, Bilancio A, Migliaccio, Auricchio F. Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res* 1996; 56: 4516-4521.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ganju RK, Hatch WC, Avraham H, Ona MA, Druker B, Avraham S, Groopman JE. RAFTK, a novel member of the focal adhesion kinase family, is phosphorylated and associates with signaling molecules upon activation of mature T lymphocytes. *J Exp Med* 1997; 185: 1055-1064.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Kurzchalia TV, Parton RG. Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 424-431.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signal complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 1998; 273: 5419-5422.

O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* 1994; 124: 1047-1059.

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta at AP1 sites. *Science* 1997; 277: 1508-1510.

Pappas TC, Gametchu B, Yannarlello-Brown J, Collins TJ, Watson CS. Membrane estrogen receptors in GH3/B6 cells are associated with rapid estrogen-induced release of prolactin. *Endocrine* 1994; 2: 813-822.

Pappas TC, Gametchu B, Watson CS. Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J* 1995; 9: 404-410.

Paul BZS, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism of thromboxane A₂-induced platelet aggregation. Essential role for P2T_{AC} and α_{2A} receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 29108-29114.

Phillips DR, Prasad KS, Manganello J, Bao M, Nannizzi-Alaimo L. Integrin tyrosine phosphorylation in platelet signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 546-554.

Raja S, Avraham S, Avraham H. Tyrosine phosphorylation of the novel protein-tyrosine kinase RAFTK during an early phase of platelet activation by an integrin glycoprotein IIb-IIIa independent mechanism. *J Biol Chem* 1997; 272: 10941-10947.

Razandi M, Pedram A, Greens GL, Levin ER. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 307-319.

Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 100-115.

Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3375-3378.

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

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

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

- Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen SS, Pastell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor α (ER α) signaling. *J Biol Chem* 1999; 274: 33551-33556.
- Schlessinger J. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 273-275.
- Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998; 91: 2645-2657.
- Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HH, Toker A, Mercurio AM. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the α 6 β 4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 1997; 91: 949-960.
- Sheets ED, Holowka D, Baird B. Membrane organization in immunoglobulin E receptor signaling. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3: 95-99.
- Shimizu Y, van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. Regulated expression and binding of three VLA (β 1) integrin receptors on T cells. *Nature* 1990; 345: 250-253.
- Shrimpton CN, Borthakur G, Larrucea S, Cruz MA, Dong JF, Lopez JA. Localization of the adhesion receptor glycoprotein Ib-IX-V complex to lipid rafts is required for platelet adhesion and activation. *J Exp Med* 2002; 196: 1057-1066.
- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil D P, Ley K, Chin W, Liao J K. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 2000; 407: 538-541.
- Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 2002; 110: 597-603.
- Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science* 2000; 290: 1721-1726.
- Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 31-39.
- Sims PJ, Ginsberg MH, Plow EF, Shattil SJ. Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1991; 266: 7345-7352.
- Song RX-D, Mcpherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Santen RJ. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER α -Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 116-127.
- Sowa G, Pypaert M, Sessa WC. Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs caveolae. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 14072-14077.

Stenberg PE, Pestina TI, Barrie RJ, Jackson CW. The Src family kinases, Fgr, Fyn, Lck, and Lyn, colocalize with coated membranes in platelets. *Blood* 1997; 89: 2384-2393.

Torti M, Ramaschi G, Sinigaglia F, Lapetina EG, Balduini C. Glycoprotein IIb-IIIa and the translocation of Rap2B to the platelet cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4239-4243.

Van Baal WM, Emeis JJ, van der Mooren MJ, Kessel H, Kenemans P, Stehouwer CD. Impaired procoagulant-anticouglulant balance during hormone replacement therapy? A randomized, placebo-controlled 12-week study. *Thromb Haemost* 2000; 83: 29-34.

Van der Goot FG, Harder T. Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol* 2001; 13: 89-97.

Wade CB, Robinson S, Shapiro RA, Dorsa DM. Estrogen receptor ER α and ER β exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2001; 142: 2336-2342.

Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnikar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 1991; 325: 1196-1204.

Webb P, Lopez GN, Uht RM, Kushner PJ. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 443-456.

White RE. Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol*. 2002; 38: 73-80.

Whiting KP, Restall CJ, Brain PF. Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their roles in non-genomic mechanisms. *Life Sci* 2000; 67: 743-757.

Wonerow P, Oberfell A, Wilde JI, Bobe R, Asazuma N, Brdicka T, Leo A, Schraven B, Horejsi V, Shattil SJ, Watson SP. Differential role of glycolipid-enriched membrane domains in glycoprotein VI- and integrin-mediated phospholipase C γ 2 regulation in platelets. *Biochem J* 2002; 364: 755-765.

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

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

Seminari seguiti nel corso dei primi due anni di Dottorato

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

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

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

- 07-07-2004
“ Ethanol metabolism and toxicity in pregnancy”- Prof. M. Ronis
- 27-09-2004
“Traffico intra- ed extra-cellulare di nucleotidi-segnale attivi nella regolazione del calcio cellulare”- Prof. A. De Flora

Partecipazione a congressi

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

Novara, 23 Maggio 2003

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

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

VI Congresso Nazionale di biotecnologie (CNB₆)

Padova, 4/5/6 Giugno 2003

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

Reineri S., Piranda D., Pietrapiana D., Bertoni A., Lova P., Torti M.,
Canobbio I., Moro L., Sinigaglia F.
(Pag. 121)

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

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

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

Birmingham, 12-18 Luglio 2003

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

Canobbio I., **Reineri S.**, Sinigaglia F., Balduini C., Torti M.
(Abstract n° PO219)

IV Riunione Gruppo Studio Piastrine

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

“Gli estrogeni potenziano la risposta piastrinica agli agonisti”.

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

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

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

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

Novara, 14 Maggio 2004

“17-beta oestradiol potentiates thrombin-dependent alphaIIb beta3 activation and platelet aggregation”.

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

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

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

Pubblicazioni

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

Canobbio I., **Reineri S.**, Sinigaglia F., Balduini C., Torti M.
Thromb. Haemost. 2004 Jan, 91 (1): 102-110.

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

Moro L., **Reineri S.**, Piranda D., Pietrapiana D., Lova P., Bertoni A., Graziani
A., Defilippi P., Canobbio I., Torti M., Sinigaglia F.
Blood, 15 June 2004 (in press)