

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
"A. AVOGADRO"

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dottorato di Ricerca in MEDICINA MOLECOLARE

XXVI ciclo – 2010/2013

RUOLO DI ENDOCANNABINOIDI,
DEIDROEPIANDROSTERONE-SOLFATO E
8-PRENILNARINGENINA SUL DIFFERENZIAMENTO
MEGACARIOCITARIO E FUNZIONALITÀ PIASTRINICA

Coordinatore del corso:
Prof. Emanuele Albano

Supervisore:
Prof.ssa Fabiola Sinigaglia

Dottoranda
Dott.ssa Michela Nalin

***RUOLO DEI RECETTORI DEGLI ENDOCANNABINOIDI SUL DIFFERENZIAMENTO
MEGACARIOCITARIO E FUNZIONALITA' PIASTRINICA***

INTRODUZIONE	2
La Megacariocitopoiesi	2
Regolazione Della Megacariocitopoiesi	5
Produzione e rilascio delle piastrine	9
Gli Endocannabinoidi	11
Gli Endocannabinoidi: sintesi e degradazione	14
Gli Endocannabinoidi: recettori	17
Gli Endocannabinoidi: ruolo in proliferazione e differenziamento di cellule staminali	23
SCOPO DEL LAVORO	29
METODI	33
Isolamento di cellule staminali ematopoietiche murine	33
Preparazione di lisati cellulari totali e analisi proteica	33
Analisi dell'espressione genica di CB1 e CB2 mediante real time PCR	34
Endocannabinoidi e differenziamento cellulare	35
Endocannabinoidi e differenziamento cellulare: poliploidizzazione - citofluorimetria a flusso	35
Marcatura cellulare con CFSE	36
Aggregometria, conta basale ed espressione dei marcatori	36
RISULTATI	38
Il sistema endocannabinoidale è modulato durante la megacariopoiesi	38
I recettori per gli endocannabinoidi non sono necessari per il differenziamento	41
I recettori CB1 e CB2 regolano il numero dei megacariociti maturi	44
La mAEA promuove il differenziamento megacariocitario	46
Il recettore CB1 regola la proliferazione delle cellule Lin-	49
Gli endocannabinoidi non influenzano il fenotipo piastrinico dei topi KO	50
DISCUSSIONE	54
BIBLIOGRAFIA	59

RUOLO DI ORMONI E FITOESTROGENI SULLA FUNZIONALITA' PIASTRINICA

INTRODUZIONE	71
Piastrine	71
Struttura Delle Piastrine	71
Piastrine: integrine ed immunorecettori	74

Integrine _____	74
Recettori _____	77
Attivazione ed aggregazione piastrinica _____	79
Segnalazione Piastrinica _____	81
Attivazione piastrinica _____	81
Inibizione piastrinica _____	85
Flavonoidi _____	87
8-Prenilnaringenina _____	88
Flavonoidi E Piastrine _____	90
Deidroepiandrosterone _____	91
Meccanismi d'azione del DHEA _____	94
SCOPO DEL LAVORO _____	96
METODI _____	99
Isolamento delle piastrine _____	99
Analisi dell'aggregazione piastrinica _____	99
Elettroforesi ed immunoblotting _____	100
Misurazione della secrezione piastrinica _____	100
Misurazione della concentrazione di Ca ²⁺ citosolico _____	101
RISULTATI SEZIONE DHEAS _____	102
Effetto del DHEA-S sull'attivazione piastrinica _____	102
Il DHEA-S inibisce la secrezione del contenuto dei granuli densi _____	107
DISCUSSIONE DHEA-S _____	113
RISULTATI SEZIONE 8-PN _____	116
L' effetto di inibizione dell'aggregazione indotta da 8-PN non si esplica attraverso il recettore degli estrogeni _____	116
8-PN non coinvolge la via NO/cGMP/PKG nell'inibizione piastrinica _____	118
8-PN inibisce la fosforilazione proteica indipendentemente dal recettore degli estrogeni _____	120
DISCUSSIONE 8-PN _____	122
BIBLIOGRAFIA DHEA-S _____	126
BIBLIOGRAFIA 8-PN _____	130
Papers pubblicati durante il Dottorato _____	137

Abbreviazioni

BFU-MK	Megacaryocyte Burst-Forming Unit
CFU-MK	Megacaryocyte Colony-Forming Unit
TPO	Trombopoietina
DMS	Sistema Di Demarcazione Delle Membrane
OCS	Sistema Canalicolare Aperto
vWF	Fattore Di Von Willebrand
PF4	Fattore Piastrinico 4
STAT	Signal Transducer And Activator Of Transcription
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling
FOG	Friend Of GATA
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif
AML/RUNX1	Acute Myeloid Leukaemia / Runt-Related TF1
AEA	N-arachidonoiletanolammide-anandamide
mAEA	Metanandamide
2-AG	2-arachidonoilglicerolo
NADA	N-arachidonoildopamina
THC	D9-tetraidrocannabinolo
PE	Fosfatidiletanolammina
NArPE	N-arachidonilfosfatidiletanolammina
NAPE-PLD	N-acilfosfatidiletanolammina-fosfolipasi D specifica
ABDH4	Lisonape Lipasi
DAGL α e DAGL β	sn-1 diacilglicerolo lipasi $-\alpha$ e $-\beta$
FAAH	Amide Degli Acidi Grassi
MAGL	Monoacilglicerolo Lipasi
TRPV1	Recettore Vanilloide Di Tipo 1
CSF	Fattore Di Stimolo Delle Colonie
EPO	Eritropoietina

***RUOLO DEI RECETTORI DEGLI
ENDOCANNABINOIDI SUL
DIFFERENZIAMENTO
MEGACARIOCITARIO E FUNZIONALITA'
PIASTRINICA***

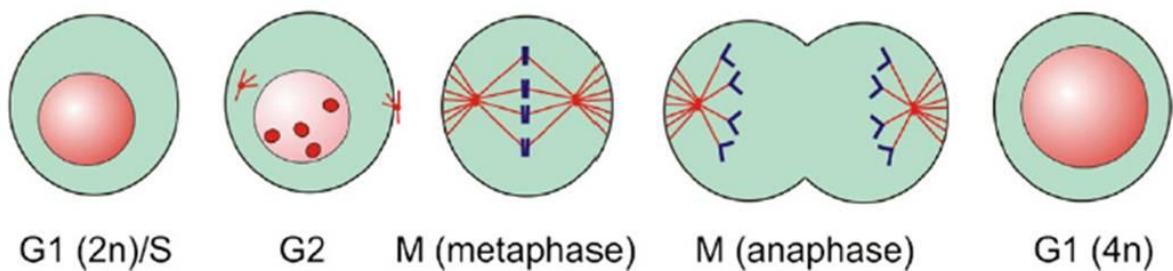
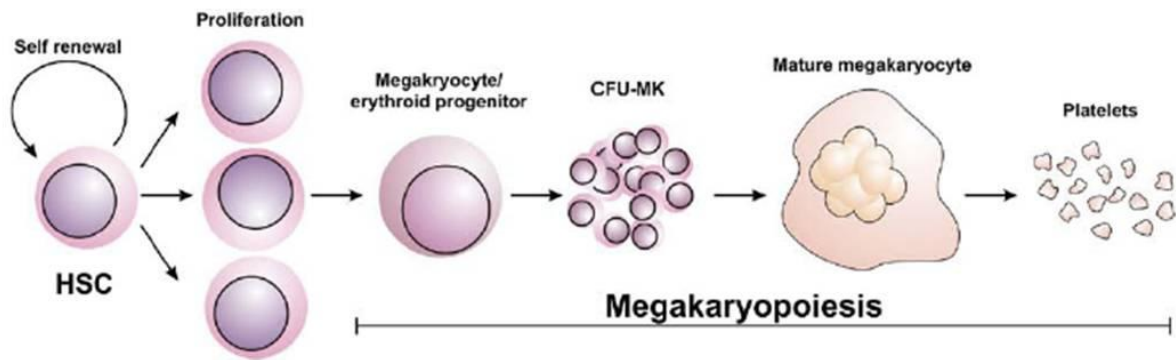
INTRODUZIONE

La Megacariocitopoiesi

I megacariociti sono rare cellule mieloidi che risiedono principalmente nel midollo osseo (Ogawa *et al.*, 1993), ma anche nel polmone e nel sangue periferico. Durante il primo sviluppo, prima che le cavità del midollo siano sufficientemente grandi per supportare la differenziazione delle cellule del sangue, la megacariopoiesi avviene nel sacco vitellino e successivamente nel fegato fetale (Sunita *et al.*, 2005).

Il processo differenziativo del megacariocita inizia quando la cellula staminale emopoietica viene commissionata verso la linea mieloide e produce una progenie di cellule che perde prima la capacità di self-renewal e successivamente quella di multi potenzialità (Bluteau *et al.*, 2009), e continua con il successivo stadio di maturazione da BFU-MK (megacaryocyte burst-forming unit) a CFU-MK (megacaryocyte colony-forming unit). La maturazione di queste cellule porta poi alla formazione dei megacarioblasti e l'intero processo culmina con la formazione dei megacariociti maturi, la sintesi di specifiche proteine piastriniche, l'inizio del processo endomitotico e il successivo rilascio di piastrine.

Nell'uomo il processo di megacariocitopoiesi produce ogni giorno 10^{11} piastrine; a seconda delle necessità la produzione può essere aumentata anche di 10 volte (Kaushansky *et al.*, 2005a).



Adapted from Geddis AE, Seminars in Hematology, 2010

Figura 1: MEGACARIOPOIESI ED ENDOMITOSI. **Megacariopoiesi:** I megacariociti derivano da cellule staminali ematopoietiche (HSC) che proliferano grazie allo stimolo indotto dalla Trombopoietina (TPO). **Endomitosi:** megacariociti diploidi avanzano verso la fase S del ciclo cellulare ed entrano in mitosi. Sebbene l'anafase venga iniziata, con la separazione dei cromatidi fratelli e la formazione del fuso mitotico, prima del completamento della citocinesi il fuso mitotico regredisce, risultando così in una cellula tetraploide che rientra nella fase G1.

I megacariociti, per poter sintetizzare le piastrine, modificano il loro citoplasma: prima che il megacariocita possa rilasciare i trombociti deve infatti ingrossarsi considerevolmente fino a raggiungere un diametro di circa 100 μm ; contemporaneamente deve aumentare anche il numero di ribosomi, che saranno in seguito necessari per la sintesi di proteine piastrino-specifiche (Long *et al.*, 1982). L'ingrossamento della cellula è mediato da cicli ripetuti di endomitosi, un processo di amplificazione del DNA (Odell *et al.*, 1968; Ebbe *et al.*, 1976; Ebbe *et al.*, 1965; Ravid *et al.*, 2002), che è indotto principalmente dalla Trombopoietina (TPO) e che avviene a livello dei precursori dei megacariociti, chiamati anche

promegacarioblasti. In contrasto rispetto ad altre cellule che diventano poliploidi in risposta ad uno stress esterno, i megacariociti appartengono alla categoria di rare cellule che poliploidizzano durante il loro “normale” processo di differenziamento (*Bluteau et al., 2009*). Questo processo, che avviene parallelamente alla maturazione e all’aumento di dimensioni del citoplasma, inizia con la duplicazione dei centrosomi; segue la profase in cui si osserva lo sviluppo del fuso mitotico, la condensazione della cromatina e la rottura della membrana nucleare; durante la metafase vi è l’allineamento dei cromosomi sul piano equatoriale e per ultimo nell’anafase i cromatidi fratelli vengono separati. In un megacariocita poliploide, il fuso è multipolare con un numero di poli corrispondente al livello di ploidia della cellula. Studi compiuti negli ultimi anni portano a pensare che il processo endomitotico corrisponda al fallimento della citocinesi tardiva (*Geddis et al., 2006; Lordier et al., 2008*). Il contenuto di DNA di un megacariocita poliploide varia da 4N fino a 128N.

Oltre alla replicazione del DNA, altri elementi contraddistintivi della maturazione del megacariocita sono lo sviluppo di un complesso sistema di membrane e la formazione di differenti tipi di granuli, tra cui lisosomi, granuli densi e α -granuli. Di particolare importanza è poi la formazione di una grossa rete di interconnessioni di membrane, chiamata sistema di demarcazione delle membrane (DMS), la cui funzione è stata a lungo dibattuta. Inizialmente si pensava potesse servire per dividere il citoplasma del megacariocita in piccole aree in cui le piastrine potevano essere facilmente assemblate e poi rilasciate (*Yamada et al., 1957*). Attualmente si pensa che il DMS, che è in continuità con la membrana plasmatica (*Behnke et al., 1968; Nakao et al., 1968*), possa servire come riserva di materiale di membrana necessario per la formazione di propiastri. Durante la

maturazione del megacariocita, si formano anche una fitta rete tubulare (*Gerrard et al.*, 1976) e il sistema canalicolare aperto (OCS), una rete di canali per il rilascio dei granuli.

Proteine contenute negli α -granuli (granuli secretori), possono essere sintetizzate, come il fattore di Von Willebrand (vWF) e il fibrinogeno, e successivamente indirizzate sulla superficie del megacariocita oppure internalizzate dal plasma tramite processi di endocitosi e/o pinocitosi (*Henijnen et al.*, 1998; *Handagama et al.*, 1987). Proteine sintetizzate, quali il fattore piastrinico 4 (PF4) o vWF, vengono rilevate negli stadi iniziali del differenziamento nel reticolo endoplasmico e nel Golgi di cellule a bassa ploidia (2N) esprimenti le glicoproteine di membrana GPIIb/IIIa e GPIb. Altri granuli secretori presenti all'interno del megacariocita, come i granuli densi, contengono serotonina, catecolammine, adenosina e calcio. Grazie all'intero processo di maturazione il megacariocita è dotato di tutti gli elementi necessari per la biogenesi delle piastrine.

Regolazione Della Megacariocitopoiesi

La megacariocitopoiesi e la produzione delle piastrine avvengono nel midollo osseo, in un microambiente in cui chemochine, citochine ed interazioni adesive giocano un ruolo chiave (*Avecilla et al.*, 2004). I meccanismi che regolano la megacariopoiesi operano a livello della proliferazione e differenziamento dei megacariociti e del rilascio di piastrine (*Gewirtz*, 1995; *Kaushansky*, 2003).

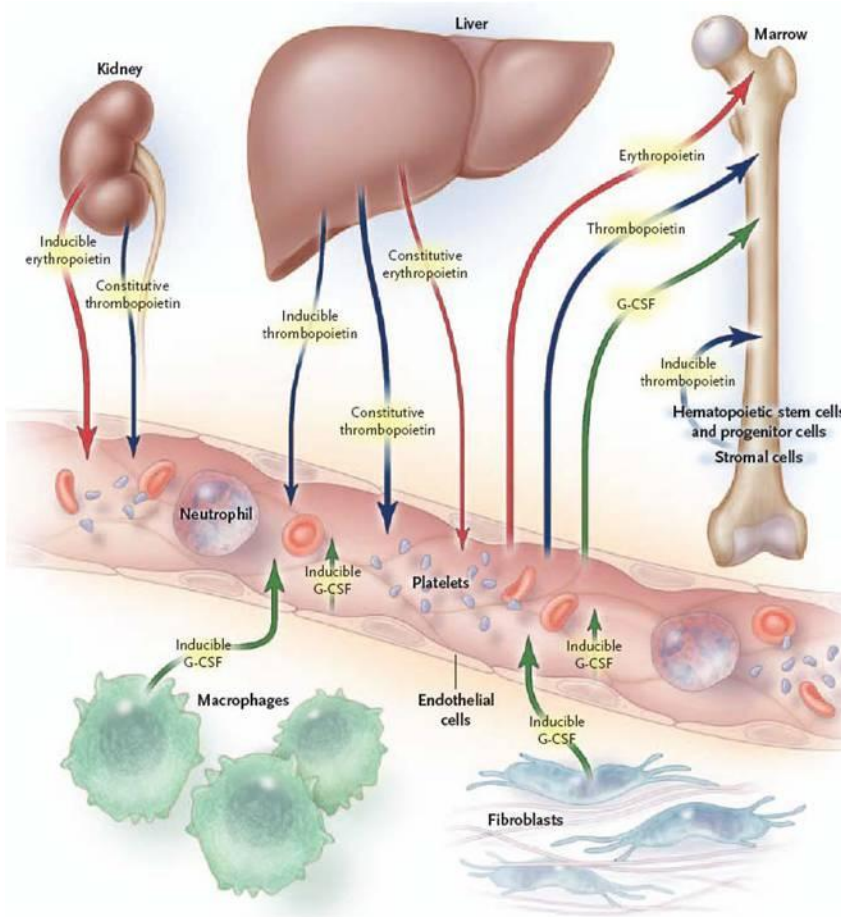


Figura 2: PRODUZIONE DEI FATTORI DI CRESCITA EMATOPOIETICI: la produzione di fattori di crescita dai vari tessuti e cellule (frece) è sia costitutiva che inducibile ed è soggetta al consumo periferico. Il G-CSF (frece verdi) è soprattutto inducibile in tessuti dai fibroblasti e macrofagi e da cellule endoteliali grazie all'azione combinata di mediatori dell'inflammatione (IL-1, IL-6, e TNF α). La TPO (frece blu) è prodotta costitutivamente da fegato (approssimativamente il 50 % del livello basale di TPO) e rene. Sia G-CSF che TPO sono rimossi dalla circolazione da cellule mature (come neutrofili e piastrine) che esprimono sulla superficie gli specifici recettori. Le frecce indicano la produzione e la secrezione dei fattori di crescita ematopoietici.

Kaushansky K, N Engl J Med, 2006

Molti fattori di crescita intervengono nel processo di megacariopoiesi, e il più importante è la TPO (trombopoietina), conosciuta come ligando di c-Mpl, e gioca un ruolo centrale anche nella sopravvivenza e proliferazione delle cellule staminali emopoietiche (Kaushansky, 2005b; 2006). Nell'uomo viene prodotta costitutivamente dal fegato ed i suoi livelli circolanti sono regolati dal legame al suo recettore presente su piastrine circolanti e megacariociti: il legame della TPO al recettore ne comporta l'internalizzazione. La via di segnalazione intracellulare del recettore dipende dall'attivazione della chinasi Jak2, che si associa al box1, un motivo conservato all'interno del dominio intracellulare del recettore, che è un omodimero; il legame alla TPO promuove un cambiamento conformazionale in

cui le code citoplasmatiche del recettore legano alla porzione più prossimale del recettore stesso. Di conseguenza, le molecole Jak2 associate al recettore, sono abbastanza vicine le une alle altre e son in grado di attivarsi attraverso un processo di trans-autofosforilazione (Geddis A, 2010). A seguito dell'attivazione di Jak2, vengono attivate una serie di molecole segnalatrici che mediano le risposte cellulari alla TPO: tra queste vi sono membri delle famiglie di STAT (*signal transducer and activator of transcription*), di MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e di PI3K (*phosphoinositol-3 kinase*), vie di segnalazione importanti per la megacariopoiesi. L'azione fisiologica della TPO, che non sembrerebbe influenzare il rilascio di piastrine, si esplica inducendo l'aumento delle dimensioni cellulari, la ploidia ed il processo di formazione delle propiastriane (Kaushansky et al., 2005). Scoperta nel 1994 tre gruppi di ricerca indipendenti (Bartley et al., 1994; Lok and Foster, 1994; Sohma et al., 1994), la TPO viene attualmente utilizzata per espandere *in vitro* cellule staminali emopoietiche e progenitori dei megacariociti (Kaushansky et al., 2005b; Ivanovic et al., 2006). Sebbene la trombopoietina sia il principale regolatore fisiologico della megacariopoiesi, non è l'unico: altri fattori di crescita pleiotropici stimolano la crescita dei megacariociti da soli o in combinazione con la TPO. Tra questi vi sono il fattore stimolante formazione di colonie granulo-monocitiche (GM-CSF), IL-3, IL-6, IL-11, il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) ed eritropoietina (EPO) (Tomer et al., 1987, 1988; Broudy et al., 1995; Deutsch et al., 1995; Kaushansky et al., 1995; Bruno et al., 2003).

Esistono anche fattori che inibiscono la megacariopoiesi, tra cui: il fattore di crescita trasformante- β 1 (Kuter et al., 1992), il fattore piastrinico 4, l'interleuchina 4 (Han et al., 1991; Zauli et al., 1995) e inibitori di Jak2, come i membri della famiglia SOCS (*suppressor of cytokine signaling*).

Recenti studi mostrano che gli inibitori delle Src chinasi, quando utilizzati *in vitro*, si comportano sia come regolatori negativi della proliferazione megacariocitaria che come induttori del loro differenziamento (Gandhi et al., 2005; Lannutti et al., 2005).

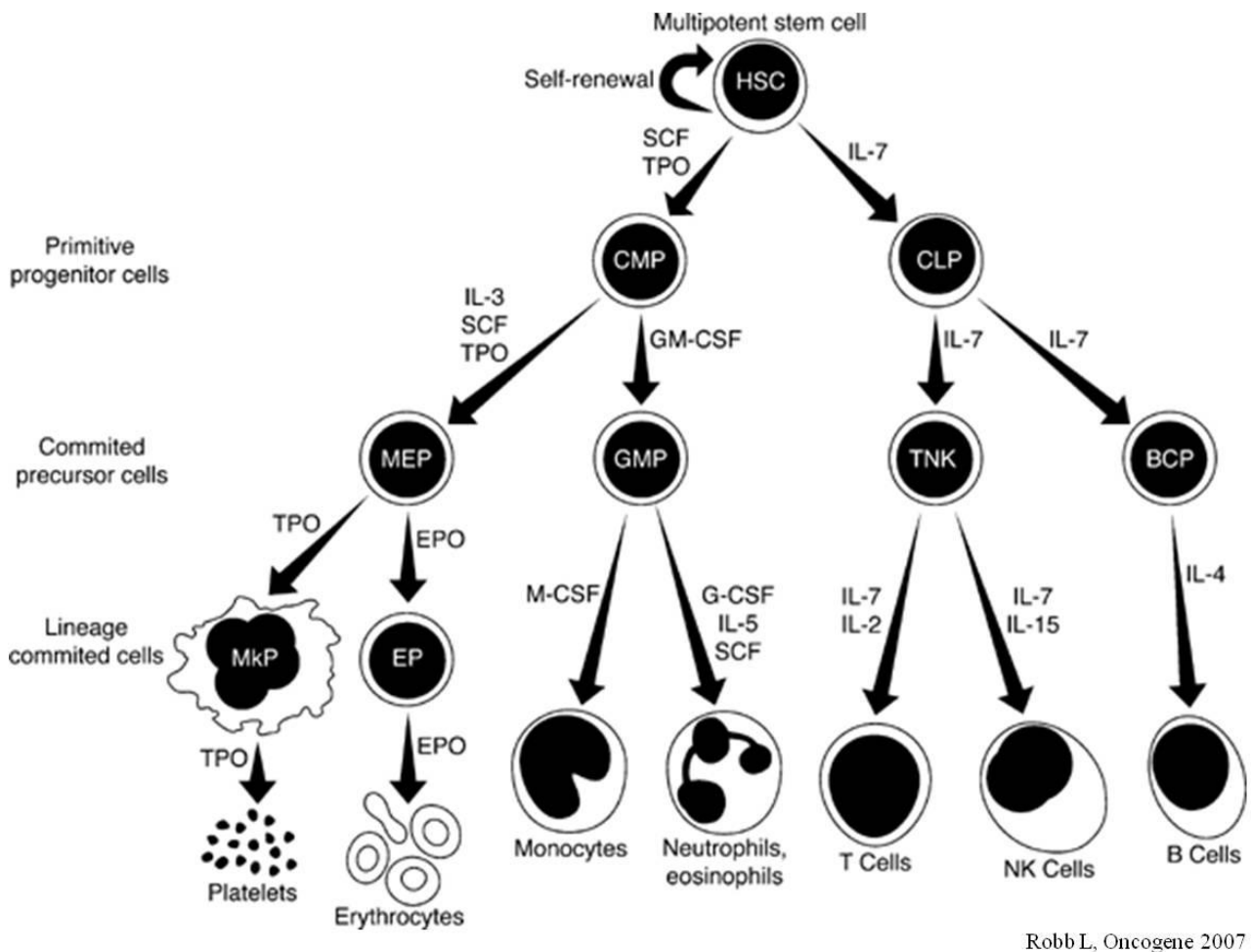


Figura 3: FATTORI COINVOLTI NEL DIFFERENZIAMENTO EMATOPOIETICO: Lo sviluppo di differenti tipi cellulari a partire dalla cellula staminale mieloide, richiede l'azione combinata di più citochine e fattori di crescita. La produzione di piastrine, in particolare, è regolata da trombopoietina (TPO), eritropoietina (EPO), Interleuchina 6 (IL-6), IL-11, IL-3, fattore stimolante formazione di colonie granulo-monocitiche (GM-CSF).

Lo sviluppo di cellule del sangue mature a partire dalla cellula staminale emopoietica (HSCs), comporta anche un progressivo restringimento del potenziale differenziativo

(perdita della staminalità) e modulazione d'espressione di geni linea-specifici. Perché avvenga una corretta megacariocitopoiesi è quindi essenziale l'azione combinata di più fattori di trascrizione che attivino in modo specifico i geni dei precursori megacariocitari e/o inibiscano l'espressione dei geni che supportano invece il differenziamento in altri tipi cellulari. Molti geni megacariocita-specifici, sono co-regolati dai seguenti fattori: GATA, FOG (friend of GATA), AML/RUNX1 (acute myeloid leukaemia / runt-related TF1), FLI1, MYB e NF-E2 (*Schulze et al., 2004*).

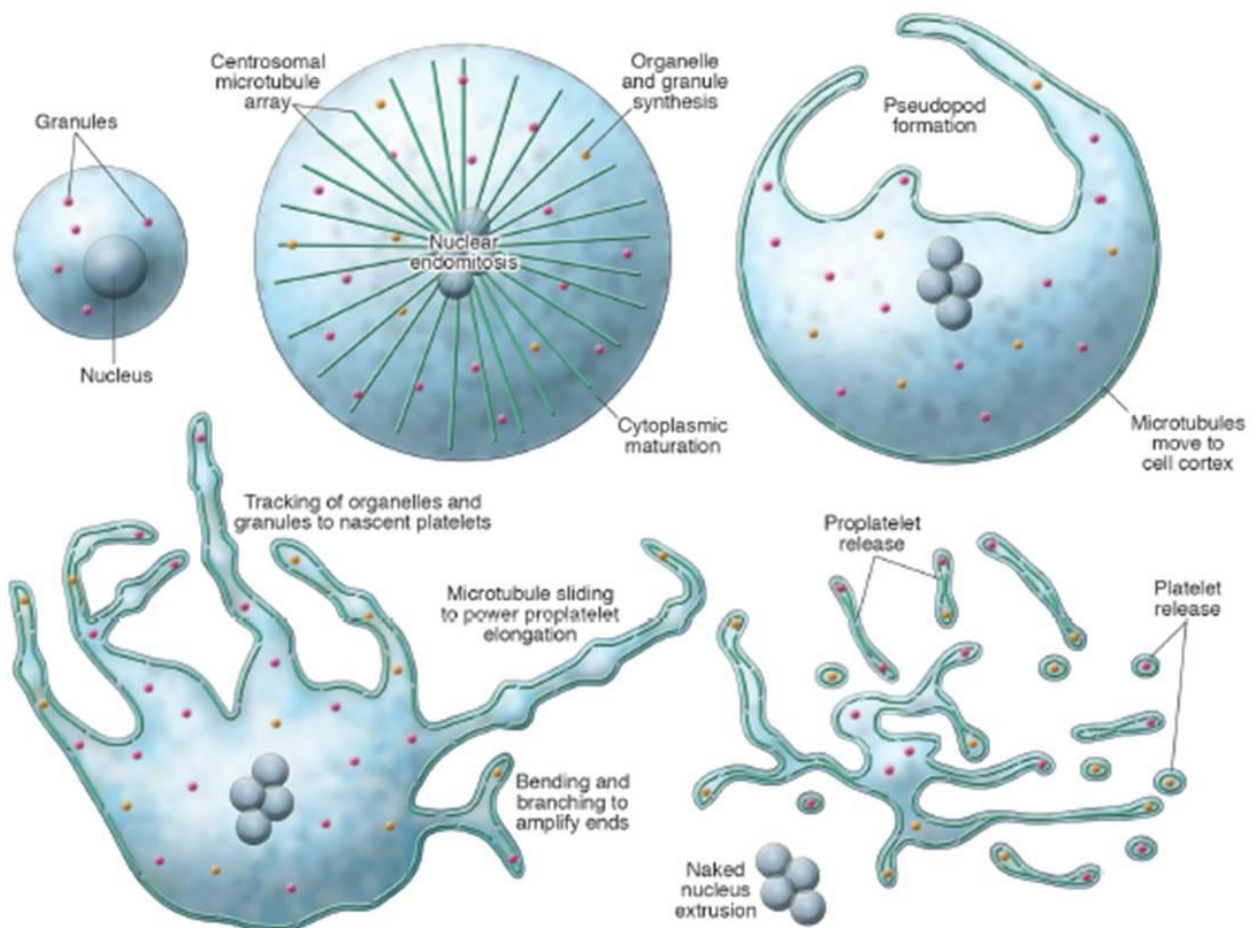
Produzione e rilascio delle piastrine

La sintesi dei trombociti, che segue la formazione delle propiastriane, avviene principalmente in megacariociti altamente polipoidi e completamente differenziati, ma è stata riscontrata anche in megacariociti a bassa ploidia, (2N e 4N), in quanto il processo endomitotico può essere arrestato a qualsiasi grado di ploidia (*Bluteau et al., 2009*): al termine del loro processo di maturazione, i megacariociti formano lunghe protusioni citoplasmatiche (100-500 μm di lunghezza; 2-4 μm di diametro), chiamate propiastriane, solitamente queste protusioni sono multiple (*Italiano et al., 1999; Junt et al., 2007*). Il processo inizia ad un polo del megacariocita grazie ad una riorganizzazione citoscheletrica a carico dei filamenti di actina e prosegue con una fase di allungamento dei microtubuli (*Italiano et al., 1999*). La frammentazione delle propiastriane deve avvenire esclusivamente nel flusso sanguigno, diversamente le piastrine formate rimarrebbero intrappolate nel midollo (*Junt et al., 2007*).

Le principali strutture del megacariocita coinvolte nella sintesi piastrinica sono il DMS, i microtubuli e i filamenti di actina. Il ruolo del DMS è quello di creare un sistema di canali di membrana composti da cisterne appiattite e tubuli che servono come riserve per la

formazione dei trombociti. Prima della formazione delle propiastriane, il DMS si associa sia con i microtubuli sia con filamenti di actina dopo che sono stati incorporati lipidi polifosfatidilinositoli (*Schulze et al., 2006*). Durante il prolungamento delle propiastriane, i fasci di microtubuli si allineano nei fusi propiastriatici, formano degli anelli nelle estremità libere delle estensioni e rientrano attraverso il fuso. I microtubuli sono importanti poiché trasportano mitocondri, granuli e organelli vescicolari all'interno delle piastrine (*Richardson et al., 2005*). Inoltre i microtubuli trasportano i spliceosomi che potrebbero essere importanti per la sintesi di proteine all'interno delle piastrine (*Denis et al., 2005*). Il ruolo dell'actomiosina non è stato completamente chiarito mentre la miosina II gioca un ruolo cruciale nel controllo della formazione delle propiastriane: sembra che la miosina interagisca con i microtubuli per generare la forza necessaria per impedire la formazione delle propiastriane; per questo motivo, piccole proteine G della famiglia di Rho sono essenziali per la formazione delle propiastriane regolando le funzioni actomiosiniche (*Chang et al., 2007*). In aggiunta, vi è un limitato ruolo delle caspasi nella formazione delle propiastriane ma senza coinvolgimento dei processi apoptotici; nonostante ciò ancora non si conoscono i substrati delle caspasi e si pensa possano essere componenti del citoscheletro (*De Botton et al., 2002*).

I megacariociti risiedono nel midollo; quando giungono a maturazione migrano nella regione sub-endoteliale vicino ai sinusoidi venosi, in questo modo le propiastriane sono in grado di attraversare le barriere endoteliali ed entrare nei sinusoidi midollari, essere rilasciate nel flusso sanguigno dove daranno origine alle piastrine per frammentazione delle loro estremità.



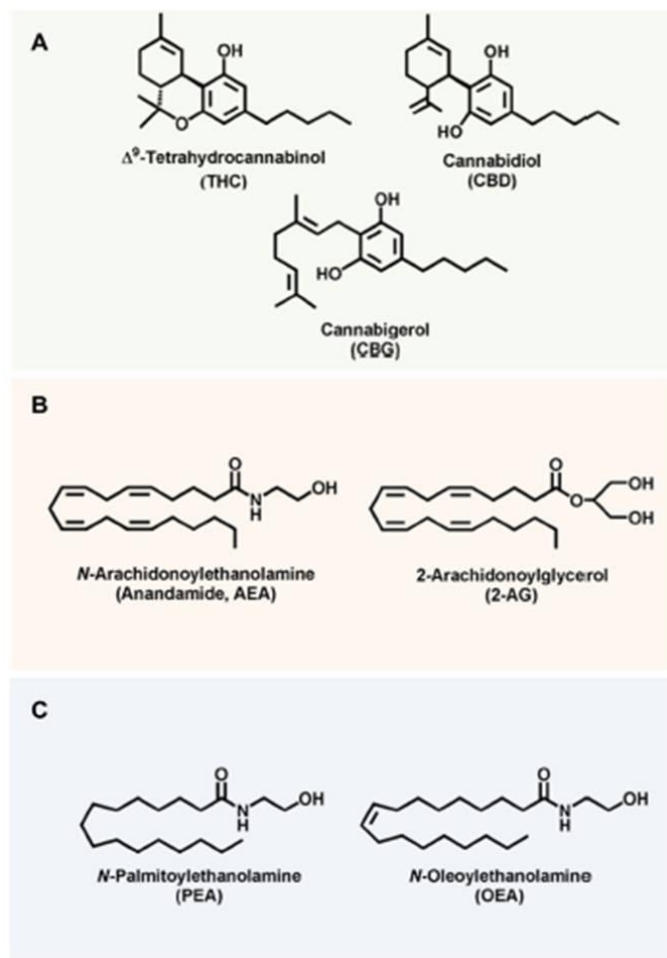
Sunita et al, 2005

Figura 4 : LA TROMBOPOIESI. La produzione di piastrine secondo la teoria delle pro-piastrine.

Gli Endocannabinoidi

Gli endocannabinoidi sono una nuova classe di mediatori lipidici endogeni che sono in grado di mimare alcuni degli effetti psicotropici, ipnotici ed analgesici dei costituenti naturali della *Cannabis sativa*, denominati cannabinoidi; comprendono ammidi, esteri ed eteri di acidi grassi poliinsaturi a catena lunga. L'anandamide AEA (N-arachidonoiletanolammide), ed il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG), sono i maggiori esponenti. Recentemente sono stati isolati dal sistema nervoso centrale altri potenziali

ligandi dei recettori per gli endocannabinoidi. Tra questi vi sono la noladina, analogo chimicamente stabile del 2-AG; la virodamina, molecola in cui l'acido arachidonico e l'etanolanmina sono unite da un legame estereo in maniera opposta a come avviene per l'anandamide; l'N-arachidonoildopamina (NADA), ammine nata dal legame tra acido arachidonico e dopamina.



Galve-Roperh et al, Progress in Lipid Research, 2013

Figura 5 : CANNABINOIDI. Struttura chimica dei maggiori composti derivanti dalle piante (A), cannabinoidi endogeni (B), e composti simili agli endocannabinoidi (C).

La loro azione si esplica mediante il legame a specifici recettori, associati a proteine G eterotrimeriche (G Protein-coupled Receptors o GPCRs), di cui si conoscono due isoforme: il recettore CB1 (*Matsuda, 1997*), quasi esclusivamente localizzato nel sistema nervoso, ed il

recettore CB2 (*Munro et al., 1993*), localizzato prevalentemente nei tessuti periferici. L'AEA e il 2-AG sono in grado di mimare gli effetti tipici della marijuana, proprio perché il principio attivo di tale droga, il D9-tetraidrocannabinolo (THC), esplica la sua azione attraverso il legame a questi stessi recettori (*Devane et al., 1992; Sugiura et al., 1998; Mechoulam et al., 1995*). Gli endocannabinoidi sono coinvolti in moltissimi processi all'interno dell'organismo: ad esempio costituiscono un efficace sistema di neuromodulazione in grado di regolare l'eccitabilità neuronale, mediante inibizione della comunicazione attraverso giunzioni serrate o mediante interazioni con le trasmissioni GABA-ergica (*Katona et al., 1999*), serotoninergica (*Cheer et al., 1999*), glutammaergica (*Hampson et al., 1998*) e dopaminergica (*Beltramo et al., 2000*). Hanno un ruolo nella regolazione dei circuiti cerebrali del vomito (*Darmani NA, 2001*); sono coinvolti nei meccanismi di modulazione dell'appetito e, recentemente, sono stati evidenziati significativi aumenti dei livelli di endocannabinoidi in tre diversi modelli animali di obesità (*Di Marzo et al., 2001*). È stato evidenziato un coinvolgimento del sistema degli endocannabinoidi (ECS) nella modulazione della spasticità associata alla sclerosi multipla (*Baker et al., 2000*); sempre più numerose evidenze testimoniano la attività analgesica degli endocannabinoidi e le loro interazioni sinergiche con il sistema degli oppioidi endogeni (*Meng et al., 1998; Cravatte et al., 2004*). Recentemente è stato ancora evidenziato il ruolo del sistema endocannabinoide nei processi che regolano la memoria con particolare attenzione alla fase di estinzione di memorie aversive (*Marsicano et al., 2002*). Un recente studio ha inoltre approfondito le proprietà anticonvulsivanti degli endocannabinoidi. In particolare l'anandamide si è rivelata efficace in un modello animale di epilessia, indicando che probabilmente l'attività convulsiva è modulata dal tono del sistema endocannabinoide endogeno (*Wallace et al., 2002*). Esistono evidenze a sostegno di un ruolo degli

endocannabinoidi nella regolazione dei processi riproduttivi: in particolare l'anandamide sembra giocare un ruolo cruciale nella regolazione della fertilità, nel processo di attecchimento dell'embrione e nella progressione della gestazione (*Maccarrone et al., 2005*). Gli endocannabinoidi sembrano avere inoltre un ruolo nella modulazione della risposta immunitaria (*Salzet et al., 2000; Croxford et al., 2005*). Gli endocannabinoidi inoltre vengono prodotti per proteggere l'organismo da danni causati da varie situazioni patologiche, esercitando un'azione anti-ossidativa (*Marsicano et al., 2002*). Il sistema degli endocannabinoidi ha anche un ruolo nella regolazione dei processi di proliferazione cellulare che sono alla base della crescita dei tumori (*Bifulco & Di Marzo, 2002*).

Gli Endocannabinoidi: sintesi e degradazione

Sia l'anandamide che il 2-AG sono generati principalmente, in seguito alla risposta a vari stimoli cellulari, a partire dai fosfolipidi di membrana da specifiche idrolasi o dall'azione combinata di aciltransferasi e idrolasi. Dopo aver funzionato come ligandi recettoriali, queste molecole vengono idrolizzate da specifiche idrolasi. Nonostante le loro similitudini strutturali, l'anandamide e il 2-AG hanno vie metaboliche completamente differenti (*Ueda et al., 2010;2011*).

La biosintesi dell'anandamide non è completamente chiara: è generata da un trasferimento enzimatico Ca^{2+} -dipendente di acido arachidonico dalla posizione *sn*-1 dei fosfolipidi di membrana ad un'ammina primaria della fosfatidiletanolamina (PE) per generare N-arachidonil fosfatidiletanolamina (NArPE), seguita da un processo di idrolisi che dà origine all'anandamide. Tuttavia, l'enzima transacilasi Ca^{2+} -dipendente che forma il NArPE non è stato molecolarmente identificato, e la modalità in cui il NArPE viene convertito in anandamide non è completamente definito e sono state ipotizzate diverse

vie: la prima suggerisce una diretta liberazione dell'anandamide da parte di una N-acilfosfatidiletanolamina-fosfolipasi D specifica (NAPE-PLD); una seconda suggerisce una sequenziale deacilazione del NArPE da parte dell'ABDH4 (lisoNAPE lipasi); un'altra suggerisce la deacilazione del NArPE da parte della fosfolipasi A2 e l'idrolisi del legame fosfodiesterico ad opera di una lisoPLD; un'ultima ipotesi suggerisce la conversione del NArPE a fosfoanandamide ad opera di un enzima simile alla fosfolipasi C.

Il 2-AG viene prodotto a partire dall'idrolisi enzimatica di diacilgliceroli contenenti 2-arachidonoile, ad opera degli enzimi sn-1 diacilglicerolo lipasi α e β (DAGL α e DAGL β); la DAGL α con un ruolo principale per la sintesi di 2-AG a livello cerebrale mentre la DAGL β a livello dei tessuti periferici; entrambi le lipasi sono Ca²⁺ sensibili. I diacilgliceroli utilizzati come precursori biosintetici del 2-AG vengono sintetizzati a partire dai fosfolipidi di membrana suggerendo che la via principale di sintesi del 2-AG sia l'idrolisi dell' sn-2 arachidonoil fosfatidilinositolo 4,5 bisfosfato ad opera della PLC β (*Blankman & Cravatt, 2013*).

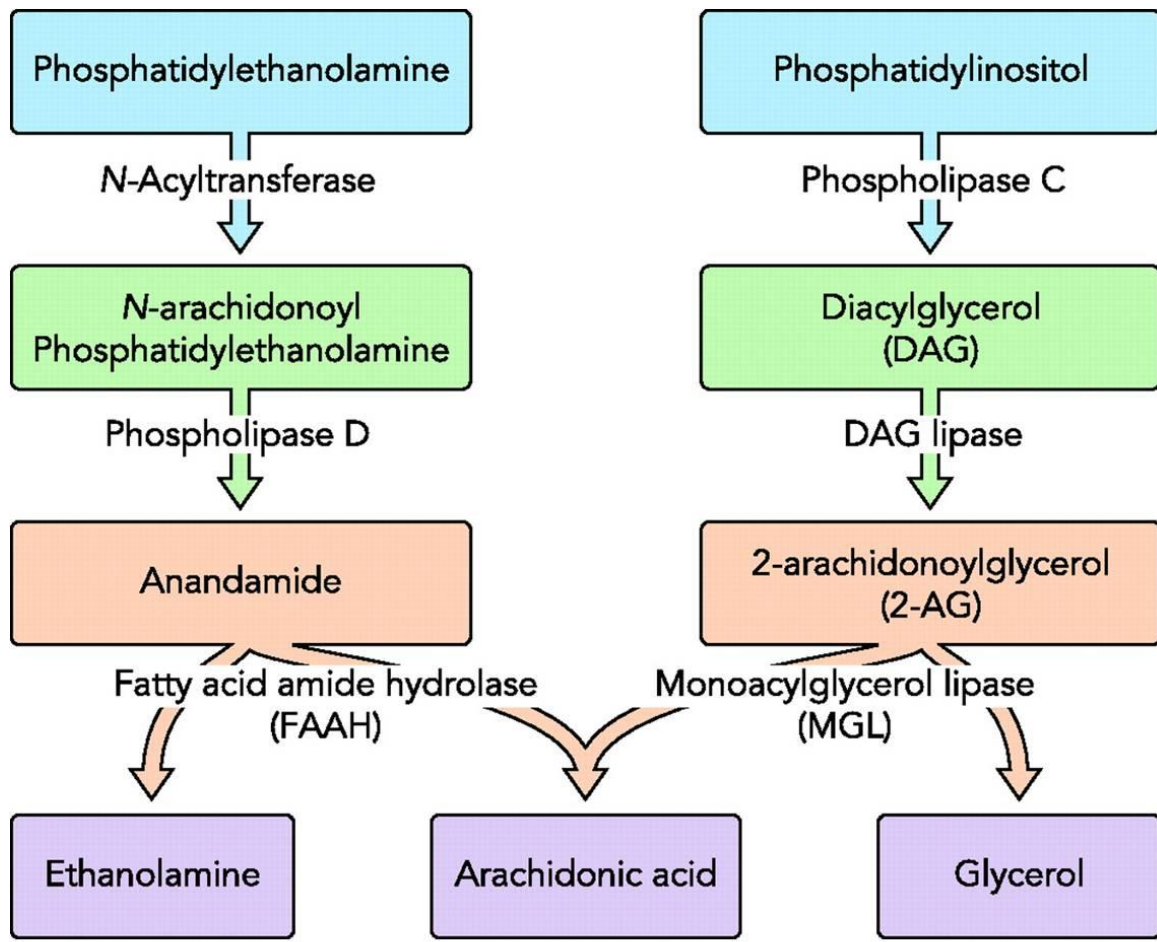
Questi meccanismi biosintetici differenziano gli endocannabinoidi da altri neuromodulatori poiché l'anandamide e il 2-AG vengono sintetizzati a partire dai loro precursori fosfolipidici solamente quando la cellula è stimolata da stimoli esterni, come ad esempio l'ingresso di ioni calcio. Quando sintetizzati, gli endocannabinoidi si legano ai recettori CB presenti su cellule limitrofe o sulla stessa cellula che li ha prodotti, comportandosi come mediatori paracrini o autocrini.

L'azione biologica degli endocannabinoidi viene interrotta mediante meccanismi differenti, come la ricaptazione da parte delle cellule che, nel caso dell'anandamide, viene facilitata dal trasportatore di membrana AMT; la riesterificazione dei prodotti dell'idrolisi in fosfolipidi di membrana e l'idrolisi enzimatica (*Di Marzo et al., 1994; Di Marzo et al., 1996;*

Cravatt et al., 1996). In particolare l'idrolisi dell'anandamide in acido arachidonico ed etanolamina, è catalizzata dall'enzima idrolasi dell'amide degli acidi grassi (FAAH), una serina-idrolasi di membrana contenente una sequenza ricca in prolina riconosciuta da molecole contenenti il dominio SH3 (*Src homology 3*) (*Goparaju et al.*, 1998). In alcune condizioni l'enzima FAAH catalizza anche l'idrolisi del 2-AG (*Cravatt et al.*, 1996), per il quale, comunque, esistono anche altre idrolasi più selettive (MAGL).

La principale via di metabolizzazione del 2-AG è l'idrolisi in acido arachidonico e glicerolo ad opera della monoacilglicerolo lipasi (MAGL), che è presente sia nelle membrane che nelle frazioni citosoliche. Altre idrolasi in grado di metabolizzare il 2-AG sono l'amide degli acidi grassi (FAAH), le monoacilglicerolo lipasi ABHD6 e ABHD12.

Sia il 2-AG che l'anandamide, per quanto riguarda la porzione dell'acido arachidonico, possono essere degradati dalle lipossigenasi e dalla ciclossigenasi 2 (COX-2) originando derivati idroperossidi dal 2-AG e prostaglandine gliceriche dall'anandamide (*Ueda et al.*, 2013).



El Manira & Kyriakatos, Physiology, 2010

Figura 6: SINTESI E DEGRADAZIONE DEGLI ENDOCANNABINOIDI. Principali pathways di sintesi e degradazione degli endocannabinoidi anandamide e 2-AG.

Gli Endocannabinoidi: recettori

I due principali tipi di recettori dei cannabinoidi, CB1 e CB2, appartengono alla super famiglia di recettori associati a proteine-G (*G Protein-coupled Receptors* o *GPCRs*), e come tali presentano un segmento N-terminale nella matrice extracellulare, sette domini ad alfa elica trans-membrana, tre "anse" extracellulari e tre citosoliche contenenti anche la porzione C-terminale. Il sito di legame è localizzato nelle porzioni transmembrana (Xie et al., 2003).

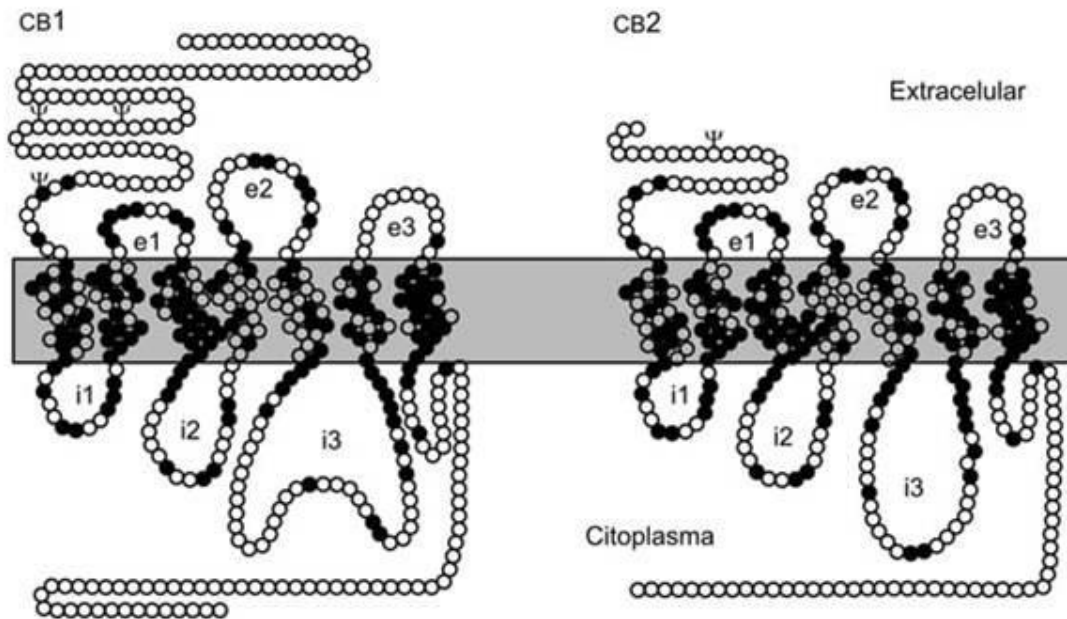


Figura 7: STRUTTURA DETTAGLIATA DEI RECETTORI CB1 E CB2. I recettori per gli endocannabinoidi, essendo legati a proteine G, contengono sette domini trans membrana. Le sequenze proteiche dei due recettori sono simili per circa il 44%. (Sorgente: <http://www.upf.edu>).

CB1 e CB2 sono recettori metabotropici di solito accoppiati a proteine di tipo $G_{i/o}$, e questo innesca il meccanismo di inattivazione dell'attività dell'adenilato ciclasi e la riduzione dei livelli di cAMP (Galve-Roperch et al., 2013).

L'anandamide si comporta come un agonista parziale dei recettori degli endocannabinoidi, mostrando affinità maggiore per il CB1 rispetto al CB2, ma con minore efficacia per il CB2 rispetto al CB1. Anche il 2-AG è un agonista dei recettori per gli endocannabinoidi, ma differisce dalla AEA in quanto è in grado di esibire un'alta affinità per entrambi i recettori (Pertwee et al., 2002). Il 2-AG, inoltre, condivide con l'AEA la localizzazione nelle porzioni transmembrana del sito di legame (Xie et al., 2003).

Il CB1, il primo dei recettori per i cannabinoidi ad essere stato clonato, è il più abbondante all'interno del sistema nervoso centrale, è localizzato nei neuroni centrali, in quelli periferici, nelle cellule gliali, nella regione del globo pallido, ippocampo, corteccia e

sistema limbico; inoltre è espresso anche nel sistema riproduttivo (sia maschile che femminile), nella microcircolazione, nel tessuto adiposo e linfociti T (*Mukhopadhyay et al., 2002*).

Il recettore CB1 è un recettore associato a proteine $G_{i/o}$ che innesca la tipica cascata di segnalazione di questa classe di proteine: chiusura dei canali del calcio, apertura dei canali del potassio, inibizione dell'attività dell'adenilato ciclasi con conseguente diminuzione dei livelli citosolici di cAMP e la stimolazione di diverse tirosin-, treonin- e serin-chinasi (*Piomelli, 2003*).

Il recettore CB2 è principalmente associato a cellule e tessuti del sistema immunitario, con la più alta densità a livello della milza; studi successivi hanno dimostrato la sua presenza anche nei linfociti B, nei monociti, nei neutrofili polimorfonucleati e nelle cellule della microglia (*Pomelli et al., 2003*).

Successivi studi farmacologici hanno dimostrato l'esistenza di altri bersagli dei cannabinoidi endogeni: il recettore vanilloide di tipo 1 (TRPV1) e almeno due recettori non CB1/CB2. Questi ultimi si localizzano nelle terminazioni assoniche ma la loro struttura e funzione rimangono da definire (*Kunos et al., 2000*).

TRPV1 è un canale cationico non selettivo, appartenente alla famiglia dei canali voltaggio-dipendenti che rilasciano calcio in modo transiente, che integra molteplici stimoli nocivi ed è associato alla fisiopatologia di diverse e importanti malattie (*Ross, 2003*).

È costituito da sei domini transmembrana, con le estremità N-terminale e C-terminale situate nella porzione intracellulare. È localizzato nel cervello e nei neuroni sensitivi dove agisce come ligando per protoni e come integratore di stimoli nocicettivi mediante attivazione al calore promuovendo l'ingresso di calcio e il rilascio di neuromediatori, ma anche in altre aree cerebrali come l'ippocampo, l'ipotalamo, la sostanza nera e il locus

coeruleus (*Di Marzo et al., 2002*). È attivato dall'endovanilloide naturale capsaicina, componente "pungente" del peperoncino, che comporta una immediata desensitizzazione (*Jung et al., 2002*). L'anandamide è in grado di attivare questo recettore con una potenza e una efficacia minore a quelle esibite per il CB1, ma è molto relativo al tipo di cellula in cui si innesca l'attivazione. Inoltre, il fatto che la NAPE-PLD è localizzata sia a livello pre- che post-sinaptico, che la FAAH è localizzata in maniera predominante nei neuroni post-sinaptici, dove è facile ritrovare il recettore TRPV1, e che questi enzimi sono molto concentrati nelle membrane cellulari porta a ipotizzare che l'anandamide possa avere un ruolo di mediatore intracellulare, anterogrado o autocrino proprio attraverso questo recettore (*Di Marzo & De Petrocellis, 2012*).

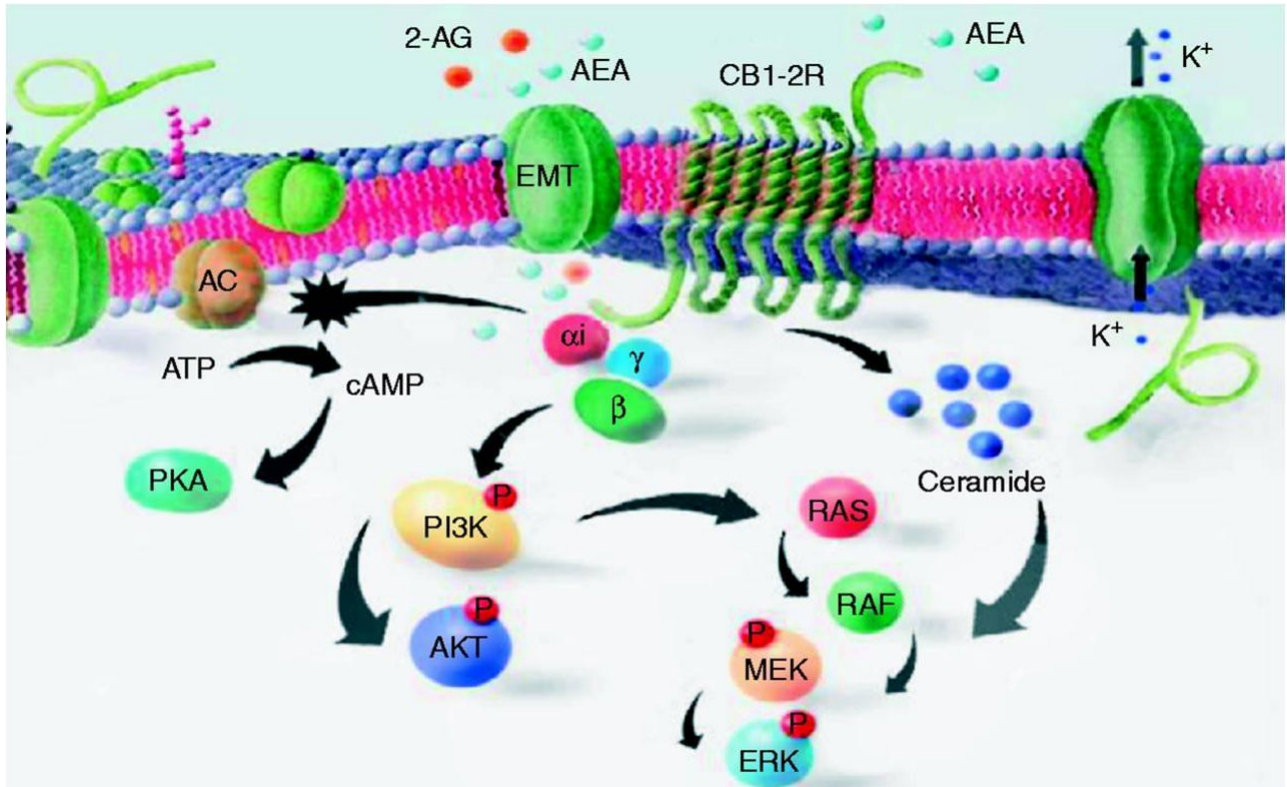
Il recettore TRPV1 è coespresso sia con il CB1 che il CB2 in cellule neuronali e non. In particolare: è colocalizzato con il CB1 nei neuroni sensitivi primari dei gangli spinali nei ratti, dove l'espressione delle due proteine è up-regolata durante i processi infiammatori; colocalizzano nei neuroni perivascolari e nel nervo vago. È localizzato con entrambi i recettori nelle cellule dendritiche derivanti da midollo osseo nei topi, e nelle cellule del muscolo scheletrico umane, cellule muscolari lisce miometriali, negli osteoclasti, nei cheratinociti, nei melanociti, nelle cellule della polpa dentale e nel fegato; è colocalizzato solo con il CB1 nelle cellule spermatiche umane e solo con il CB2 nei sinoviociti (*Di Marzo & De Petrocellis, 2012*).

In particolari condizioni tipiche dell'infiammazione, quali ad esempio pH acido o presenza di ossido nitrico, quando la PKA e PKC sono attivate, l'anandamide è più attiva sul TRPV1 che sui recettori CB1 e CB2 e determina una diversa percezione del dolore (*Di Marzo et al., 2002*).

Il recettore CB1 appare come il più abbondante tra i GPCR nel cervello, e ha un ruolo nell'inibire il rilascio di neurotrasmettitori sia di tipo eccitatorio (come il glutammato) sia di tipo inibitorio (GABA). Infatti è localizzato a livello presinaptico nei assoni terminali, e viene stimolato a seguito dell'azione retrograda dei neurotrasmettitori prodotti a seguito di una depolarizzazione o di una stimolazione recettoriale metabotropica (con conseguente aumento dei livelli intracellulari di Ca^{2+}) delle cellule post-sinaptiche; migrando verso i recettori CB1 presinaptici, questi mediatori possono o inibire o facilitare il rilascio dei trasmettitori sulla stessa sinapsi o su quella vicina. Il 2-AG viene considerato il vero endocannabinoide retrogrado e la DAGL α viene considerata l'enzima che dà origine a questo tipo di segnale; per quanto riguarda l'anandamide, sono veramente pochi i casi in cui viene suggerito un suo ruolo nella regolazione dell'attività sinaptica: questo endocannabinoide ha mostrato però di non farlo in maniera retrograda attraverso il CB1 ma attraverso un meccanismo pre o post sinaptico, molto probabilmente intracellulare, mediato dal TRPV1. La coespressione di CB1 e TRPV1 nelle stesse cellule, o in cellule vicine, come neuroni del midollo spinale, ippocampo e ipotalamo e l'attivazione da parte dello stesso mediatore, come l'anandamide, suggerisce un cross-talk tra i due recettori che è cruciale nella segnalazione del dolore.

Un altro recettore candidato come possibile target degli endocannabinoidi è il recettore orfano, a sette domini transmembrana accoppiato a proteine G, GPR55, definito presunto recettore per gli endocannabinoidi di tipo3 (CB3R). Quest'ultimo è localizzato nel cervello e nella milza, mostra una bassa omologia di sequenza (10%-15%) con gli altri recettori per gli endocannabinoidi e lega proteine G $_{12}$ in maniera agonista e tessuto dipendente (Godlewski *et al.*, 2009; Maccarrone *et al.*, 2010).

Infine un ultimo possibile recettore per endocannabinoidi è il recettore GPR119: è espresso prevalentemente nel pancreas e nel tratto gastrointestinale e sembra essere accoppiato a proteine G α s (Godlewski *et al.*, 2009).



Di Blasio *et al.*, J Mol Endocrinol, 2013

Figura 8: DETTAGLIO DEI PIU' IMPORTANTI PATHWAYS BIOCHIMICI PER L'UPTAKE CELLULARE E LE AZIONI BIOLOGICHE DEI CANNABINOIDI ENDOGENI. I cannabinoidi esplicano il loro effetto legandosi a specifici recettori di membrana legati a proteine G che possono inibire l'adenilato ciclasi (AC); attivano PKA, PI3K, AKT e MAPK; aumentano la corrente di ioni K⁺ e stimolano la produzione di ceramide. La degradazione intracellulare avviene in seguito al loro trasporto attraverso la membrana plasmatica mediata dal trasportatore di membrana per gli endocannabinoidi (EMT).

Gli Endocannabinoidi: ruolo in proliferazione e differenziamento di cellule staminali

Gli endocannabinoidi, o in maniera più precisa, il sistema endocannabinoide (ECS, ovvero l'insieme dei mediatori endogeni e degli enzimi necessari alla sintesi e alla degradazione degli endocannabinoidi) sono coinvolti nella regolazione di una pletera di sistemi, organi, cellule e processi, fisiologici e non. Ad esempio, è stato riportato che un funzionale ECS è presente sia nelle cellule staminali embrioniche (ES) sia nelle cellule staminali del trofoblasto, un tessuto cellulare embrionico che da origine alla placenta e agli annessi embrionali e che serve a nutrire l'embrione (*Paria & Dey, 2000; Bari et al., 2011*). Molti studi hanno dimostrato che l'ECS è in grado di arrestare lo sviluppo dell'embrione precoce verso la blastocisti, principalmente attraverso un meccanismo dipendente dall'attivazione del CB1. Entrambi i recettori per i cannabinoidi e i loro ligandi endogeni sono significativamente indotti durante la formazione dei corpi embrioidi e il blocco dei recettori da parte di inibitori farmacologici suggerisce un coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella sopravvivenza delle cellule staminali embrioniche (*Jiang et al., 2007*). Negli stadi embrionici precoci, il CB1 gioca un ruolo fondamentale nella sorveglianza della normale crescita dell'embrione, mentre il CB2 potrebbe essere responsabile del controllo della popolazione staminale (*Wang et al., 2004*).

I recettori per gli endocannabinoidi svolgono un ruolo regolatorio anche nella proliferazione delle staminali progenitrici neuronali, nel differenziamento e nella mediazione attraverso il CB1 (*Harkany et al., 2007; Diaz-Alonso et al., 2012*). Il CB2, che normalmente è assente nei neuroni, è funzionalmente attivo nelle cellule neuronali indifferenziate e potrebbe partecipare con il CB1 nella regolazione del destino cellulare dei precursori neuronali (*Palazuelos et al., 2006*). Nelle cellule neurali i due recettori mostrano

un differente pattern di espressione, dove il CB1 aumenta, e questo aumento è associato ad un aumento di espressione dei marcatori di differenziamento delle varie linee neuronali mentre il CB2 diminuisce durante il differenziamento neuronale (*Watson et al., 2008*). I recettori per gli endocannabinoidi hanno anche un ruolo attivo nei progenitori neurali: il CB1 in queste cellule attiva le cascate proliferative e/o i segnali di sopravvivenza che contribuiscono al mantenimento della regolazione del ciclo cellulare e allo switch tra la proliferazione delle cellule e il differenziamento o la migrazione (*Mulder et al., 2008; Diaz-Alonso et al., 2012*). In più, il CB1 influenza l'identità e le caratteristiche della cellula regolando il differenziamento neuronale e gliale (*Aguado et al., 2006; Gomez et al., 2010*). In base a queste scoperte i ligandi del sistema endocannabinoide costituiscono nuove molecole di segnalazione coinvolte nella regolazione del destino delle cellule neurali e nella neurogenesi regolando l'attività dei recettori per gli endocannabinoidi e i diversi e distinti enzimi per la metabolizzazione.

I recettori per gli endocannabinoidi non sono solo coinvolti nella regolazione delle cellule del sistema nervoso centrale ma giocano un ruolo nella regolazione del differenziamento delle cellule di tessuti periferici. Un tipo cellulare in cui i recettori per gli endocannabinoidi agiscono sono le cellule del sistema immunitario, infatti esprimono principalmente il CB2, insieme alle cellule NK, monociti/macrofagi e linfociti B (*Graham et al., 2010*). E' stata infatti documentata una down-regolazione del CB2 durante il differenziamento delle cellule B (*Carayon et al., 1998*). Inoltre, il differenziamento delle cellule T negli stadi neonatali e post-natali della vita è profondamente alterata dalla via di segnalazione di entrambi i recettori per gli endocannabinoidi, con un impatto maggiore per la suscettibilità alle malattie e verso altri disordini immunologici (*Lombard et al., 2011*). Recentemente è stato documentato un ruolo della segnalazione del sistema degli endocannabinoidi nella maturazione dei

mastociti (*Sugawara et al., 2012*). Questi ultimi risiedono in molti tessuti derivati dal midollo osseo e giocano il loro ruolo principale nella guarigione delle ferite e nella difesa contro i patogeni, specialmente all'interno del connettivo e dei tessuti delle mucose (*Gurish & Austen, 2012*). È stato dimostrato che i mastociti nella cute umana utilizzano una segnalazione mediata dal CB1 non solo per i loro processi di attivazione e degranulazione, ma anche per la loro maturazione dai progenitori presenti in situ (*Sugawara et al., 2012*). Inoltre, sia il CB1 che il CB2 hanno un ruolo nella regolazione della nuova categoria di cellule caratterizzata, le cellule soppressorie derivanti da cellule mieloidi, una popolazione eterogenea di precursori ematopoietici immaturi, conosciuti per il loro compito di soppressione delle risposte immunitarie durante le infezioni, le infiammazioni croniche, il cancro e i processi di autoimmunità (*Gabrilovich & Nagaraj, 2009*).

Un altro tipo cellulare in cui gli endocannabinoidi sono coinvolti sono le cellule adipose. Queste cellule possiedono i recettori per gli endocannabinoidi e un ECS funzionale (*Matias et al., 2006; Gasperi et al., 2007*); l'espressione del recettore CB1 viene modificata durante il differenziamento adipocitario ed è stato visto che questo stesso recettore stimola la proliferazione degli adipociti. L'anandamide è in grado di promuovere il differenziamento degli adipociti proprio attraverso il CB1 e attraverso l'attivazione del PPAR γ , un noto marker adipogenico (*Gasperi et al., 2007; Bouaboula et al., 2005; Karaliota et al., 2009*).

Gli endocannabinoidi sono importanti anche nella regolazione del rimodellamento osseo, un delicato equilibrio tra la rimozione e la sostituzione della massa ossea grazie a cellule altamente specializzate, gli osteoblasti e gli osteoclasti (*Takeda, 2008; Naylor & Eastell, 2012*). Recenti studi hanno evidenziato che entrambi i recettori giocano ruoli distinti nella regolazione della massa ossea e nel turnover dell'osso. L'equilibrio tra riassorbimento

osseo e formazione di nuovo osso è anche una caratteristica dell'osteoporosi, dove le staminali mesenchimali dell'osso di soggetti anziani hanno una ridotta capacità di differenziare in osteoblasti per differenziare invece in adipociti, meccanismo mediato dai PPAR, che sembra essere regolato dal CB1 (*Gimble et al., 2006*). Il CB1 è quindi unico in quanto regola il picco di massa ossea attraverso l'attività osteoclastica, ma protegge anche la perdita di osso legato all'età regolando la differenziazione adipocitaria e osteoblastica delle cellule stromali del midollo osseo (*Idris et al., 2009*). Inoltre il CB1 gioca un ruolo chiave nella regolazione dell'incremento della massa ossea a seguito di rotture traumatiche dell'osso (*Tam et al., 2006*). Il ruolo del CB2 in questi processi è invece fortemente dibattuto: sembra che regoli la formazione degli osteoclasti e la perdita di massa ossea, ma gioca anche un ruolo chiave nella regolazione della formazione dell'osso (*Ofek et al., 2006*).

Il sistema endocannabinoide ha un ruolo anche nella formazione dell'epidermide, processo che inizia con la migrazione dei cheratinociti dallo strato basale, che è composto da cellule proliferanti e che finisce con la formazione di uno strato cheratinizzato. Per primo è stato visto che l'anandamide era in grado di inibire il differenziamento dei cheratinociti umani agendo attraverso il CB1 (*Maccarrone et al., 2003*), recentemente è stato evidenziato che il CB1 e il CB2 hanno effetti contrapposti nel controllo della permeabilità della barriera epidermica e nel differenziamento dei cheratinociti, con il CB1 che promuove la differenziazione epidermica finale mentre il CB2 risulta inefficace in questo processo (*Roelandt et al., 2012*).

Ultimo, ma non per questo meno importante, il ruolo che il sistema degli endocannabinoidi ha nel differenziamento delle cellule ematopoietiche. L'ematopoiesi è un processo finemente regolato che consente sia di mantenere i livelli fisiologici delle cellule sia di

rispondere a condizioni di tipo patologico; caratteristica peculiare dell'ematopoiesi è la migrazione delle cellule staminali che avviene durante lo sviluppo e in tutta la vita. Per questo, i progenitori ematopoietici si mobilitano e fanno ritorno continuamente da e verso la loro nicchia nel midollo osseo (*Bhattacharya et al., 2009*). Questo traffico cellulare è regolato da vari agenti, inclusi citochine e chemioterapici, e recentemente anche dagli endocannabinoidi (*Wright et al., 2001; Abkowicz et al., 2003*). Infatti l'anandamide stimola l'ematopoiesi mentre il 2-AG la migrazione delle staminali, sinergizzando con diversi fattori tra cui il fattore di stimolo delle colonie (CSF), l'interleuchina 3 (IL-3) e l'eritropoietina (EPO) mediante il CB2 (*Valk et al., 1997; Jorda et al., 2002*). Il 2-AG è anche in grado di incrementare formazione delle colonie CFU-GEMM (progenitori cellulari che daranno origine alle cellule della linea mieloide) e la migrazione attraverso entrambi i recettori per gli endocannabinoidi, mentre l'anandamide incrementa la formazione delle colonie ma inibisce la migrazione sia tramite il CB1 che il CB2 (*Patinkin et al., 2008*). Inoltre l'attivazione di entrambi i recettori nelle cellule staminali murine è in grado di promuovere il differenziamento ematopoietico (*Jiang et al., 2007*). Il CB2 regola il traffico dei precursori mieloidi alterando l'espressione di chemochine e dei loro recettori (*Palazuelos et al., 2008*); infatti cellule staminali ematopoietiche trattate con agonisti per entrambi i recettori per gli endocannabinoidi mostrano significative riduzioni nei livelli di importanti chemochine come il CXCR4 e il VLA-4, suggerendo che tali recettori sono coinvolti nel meccanismo di rilascio delle staminali ematopoietiche dalla nicchia midollare (*Hoggat & Pelus, 2010*). Il 2-AG e lo stimolo dei recettori aumentano anche la formazione di colonie di fibroblasti e il reclutamento delle staminali mesenchimali dal midollo osseo, molto probabilmente attraverso l'attivazione del recettore CB2. Per di più, il 2-AG è in grado di indirizzare le cellule della linea eritroleucemica umana HEL (linea cellulare bipotenziale che esprime in

SCOPO DEL LAVORO

Studi sperimentali hanno evidenziato il ruolo fisiologico degli endocannabinoidi quali molecole coinvolte nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare, sia a livello centrale (*Molina-Holgada et al., 2007*) che a livello periferico (*Matias et al., 2006*). Dati recenti pubblicati in letteratura mostrano che gli endocannabinoidi sono anche implicati nei meccanismi che regolano la proliferazione e/o il differenziamento di cellule sia della linea mieloide sia della linea linfoide (*Valk et al., 1997; Jiang et al., 2007; Randall et al., 2007*). Dalla letteratura è noto infatti che cellule ematopoietiche staminali, oltre a possedere i recettori per gli endocannabinoidi CB1 e CB2, sono in grado di sintetizzare gli endocannabinoidi (*Jiang et al., 2007*). Infatti l'anandamide stimola l'ematopoiesi mentre il 2-AG la migrazione delle staminali mediante il CB2. Il 2-AG è anche in grado di incrementare la formazione delle colonie CFU-GEMM (progenitori cellulari che daranno origine alle cellule della linea mieloide) e la migrazione attraverso entrambi i recettori per gli endocannabinoidi, mentre l'anandamide incrementa la formazione delle colonie ma inibisce la migrazione sia tramite il CB1 che il CB2 (*Galve-Roperh et al., 2013*).

Per di più, il 2-AG è in grado di indirizzare le cellule della linea eritroleucemica umana HEL (linea cellulare bipotenziale che esprime in superficie antigeni sia della linea eritroide che della linea megacariocitaria) verso il differenziamento di tipo megacariocitario potenziando l'espressione di marker specifici del differenziamento in senso megacariocitario mentre in parallelo riduce la trascrizione dei marker specifici della linea eritroide (*Catani et al., 2009*).

Nonostante il crescente interesse, ancora pochi sono i dati disponibili riguardo al ruolo degli endocannabinoidi durante il differenziamento megacariocitario, soprattutto dell'endocannabinoide anandamide.

È stato inoltre riportato che le piastrine esprimono i recettori per gli endocannabinoidi CB1, CB2 (*Randall et al., 2007*) e TRPV1 (*Authi, 2007*). Tuttavia, poco è noto riguardo al corredo recettoriale delle cellule ematopoietiche della linea megacariocito/eritroide, precursori di piastrine e globuli rossi.

Recentemente è stato dimostrato che cellule staminali ematopoietiche embrionali murine non solo esprimono i recettori CB1 e CB2 ma sono anche in grado di sintetizzare gli endocannabinoidi.

L'aggiunta di cannabinoidi esogeni aumenta la formazione dei corpi embrioidi derivanti da queste cellule indicando che essi, attraverso l'attivazione dei recettori cannabici, inducono il differenziamento ematopoietico di cellule staminali embrionali murine e dei corpi embrioidi da esse derivanti (*Jiang et al., 2007*).

Questi dati suggeriscono che i recettori per gli endocannabinoidi ed i loro ligandi possano essere coinvolti nel mantenimento delle cellule staminali embrionali e che il sistema endocannabinoidale sia essenziale per la sopravvivenza e il differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche.

In questo contesto si inserisce il mio progetto di Dottorato, nato con l'intento di valutare la presenza dei recettori per gli endocannabinoidi sui precursori megacariocitari murini, studiarne l'eventuale modulazione durante la megacariocitopoiesi, e chiarire l'eventuale ruolo degli endocannabinoidi nel processo di differenziamento.

Dati precedenti ottenuti nel nostro laboratorio, effettuando esperimenti di differenziamento di cellule staminali ematopoietiche ottenute da topi BALB/c con R-1 MetAnandamide (mAEA, analogo molto più stabile dell'anandamide), hanno mostrato che l'utilizzo della mAEA su queste cellule promuove il differenziamento verso la linea megacariocitaria, ovvero favorisce l'aumento del numero di cellule indirizzate verso il

differenziamento a megacariociti ma non modifica né il grado di ploidia di queste cellule né l'espressione del marker di superficie CD41 (integrina α IIb, porzione dell'integrina α IIb/ β 3, recettore di membrana presente in megacariociti e piastrine), i due principali marker di differenziamento in senso megacariocitario.

A questo scopo, al fine di valutare la presenza dei recettori per gli endocannabinoidi sui precursori megacariocitari murini, studiarne la modulazione durante la megacariocitopoiesi, e chiarire il ruolo degli endocannabinoidi nel processo di differenziamento, abbiamo effettuato lo stesso tipo di esperimenti ma su topi C57Bl/6 knockout (KO) per i recettori degli endocannabinoidi CB1 e CB2; le cellule staminali ematopoietiche ottenute da questi topi sono state differenziate in vitro in presenza di un opportuno cocktail di citochine e fattori di crescita (ma con una metodica diversa dalla precedente effettuata sui topi BALB/c) e il differenziamento, in presenza o meno di mAEA, è stato valutato in base all'aumento delle dimensioni e alla variazione dei principali marker per il differenziamento in senso megacariocitario, ovvero la ploidia e l'espressione del CD41. Sono anche stati condotti esperimenti di proliferazione delle cellule ottenute da midollo mediante l'utilizzo della marcatura con CFSE, marcatore cellulare che, una volta integrato nelle cellule, riduce la sua intensità di segnale man mano che le cellule vanno incontro a processi di replicazione cellulare e valutati mediante citofluorimetria a flusso.

Al fine di valutare poi il fenotipo piastrinico di questi topo KO per i recettori degli endocannabinoidi, sono state isolate le piastrine e condotti esperimenti di conta basale, espressione dei marcatori e prove di aggregometria in presenza di endocannabinoidi e agonisti dell'aggregazione piastrinica. La presenza dei vari recettori per gli

endocannabinoidi è stata valutata sia come trascritto tramite RT-PCR, sia come proteina, in esperimenti di Western Blotting.

METODI

Isolamento di cellule staminali ematopoietiche murine

Cellule del midollo osseo sono state prelevate dalle tibie e dai femori di topi C57Bl/6 di 6-8 settimane e raccolte in PBS contenente 2% BSA, 0.38% trisodio citrato e 1 U/ml di DNAsi. Le cellule mononucleate sono state isolate tramite centrifugazione in gradiente di Ficoll Hypaque (1.084 g/ml, GE Healthalcare) per 30min a 400xg. Le cellule così ottenute sono poi state ulteriormente selezionate al fine di ottenere una popolazione Lin-/cKit+ (Miltenyi) e coltivate ad una densità iniziale di 1×10^6 /mL in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) con aggiunta di 20 ng/ml di SCF per 48 ore; successivamente vengono messe in presenza di 100 ng/mL di Trombopoietina, 10 ng/mL di Interleuchina-6 e 10 ng/mL di Interleuchina-11, murine per quattro giorni (PeproTech).

Le cellule utilizzate al giorno 0 del differenziamento corrispondono alle cellule poste in coltura con SCF per 48 ore senza l'aggiunta della TPO, raccolte e centrifugate per 10 minuti a 400xg. Le cellule lasciate a differenziare per quattro giorni vengono invece centrifugate per 10 minuti a 300xg. Dopo 4 giorni di coltura la popolazione di megacariociti maturi e poliploidi è stata arricchita sedimentando le cellule per gravità per 1 ora, a 37° C, in provette coniche e poi applicandole su un gradiente discontinuo di 1% - 2% - 3% BSA in PBS, pH 7.4 e lasciandole nuovamente sedimentare per gravità (30 minuti a 37° C).

Preparazione di lisati cellulari totali e analisi proteica

I megacariociti isolati come precedentemente descritto sono stati lisati con RIPA 5X (75 mM NaCl, 50 mM TRIS, 1% Nonidet P40, 0,1% SDS e 0,5% sodio deossicolato), in presenza di inibitori di proteasi. I campioni, dissociati mediante l'aggiunta di SDS-sample buffer (

96 mM glicina a pH 8.3; 0,5% DTT; 2% SDS; 10% glicerolo; 12.5 mM TRIS; 0.01% blu di bromofenolo), sono poi stati scaldati a 95° C, per 5 minuti. Successivamente le proteine sono state separate mediante corsa su gel lineare di poliacrilamide, trasferite con Western Blotting su membrana PVDF (polivinildene di fluoruro) e marcate con anticorpi anti-CB1, anti-CB2 e anti- TRPV-1.

Analisi dell'espressione genica di CB1 e CB2 mediante real time -PCR

L'RNA presente nelle cellule ai diversi giorni del differenziamento, è stato estratto utilizzando il reagente Trizol (Ambion), seguendo le istruzioni indicate dalla ditta produttrice; dopo l'estrazione l'RNA è stato precipitato e successivamente risospeso in acqua RNase free (Sigma). Dopo aver quantificato l'RNA così ottenuto (Nanodrop ND1000 Spectrophotometer), il campione è stato purificato da eventuali contaminazioni genomiche e retrotrascritto in cDNA, utilizzando l'apposito kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen). Per la real-time PCR la reazione è stata eseguita in un volume finale di 20 µL contenenti: sonda TaqMan 250 nM e primers 900 nM specifici per il trascritto (Applied Biosystem), 2 µL di cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione, TaqMan gene expression master mix 1X (Applied Biosystem) e acqua sterile (quanto necessario per portare a volume). Gli esperimenti sono stati eseguiti con ABI Prism Sequence Detection System 7000 (Applied Biosystem) seguendo il seguente protocollo: 10 minuti a 95° C seguiti da 40 cicli di 95° C per 15 secondi, 50° C per 2 minuti e 60° C per 1 minuto. Come controllo endogeno abbiamo utilizzato la GAPDH (gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi).

Endocannabinoidi e differenziamento cellulare

Al fine di investigare un possibile ruolo degli endocannabinoidi nel differenziamento megacariocitario, cellule staminali ematopoietiche murine sono state isolate come precedentemente descritto e messe a differenziare in presenza o meno di 10 μ M R-1 metanandamide, un analogo sintetico dell'anandamide ma più stabile. Le cellule sono state differenziate nel terreno e poi raccolte ai diversi giorni del differenziamento come descritto nel primo paragrafo della sezione "metodi". Per il differenziamento in piastra le cellule sono state risospese in IMDM alla densità di 0.5×10^6 /ml a cui sono stati aggiunti: TPO 100 ng/ml, IL-6 e IL-11 10 ng/ml. 700 μ l di sospensione cellulare sono stati seminati in una wells da 24 pozzetti (una piastra per ciascun ceppo).

Endocannabinoidi e differenziamento cellulare: poliploidizzazione - citofluorimetria a flusso

I campioni raccolti e pellettati ai giorni 0, 3 e 5 del differenziamento come precedentemente descritto sono stati delicatamente risospesi in 130 μ L di PBS e poi aggiunti goccia a goccia di 1170 μ L di Et-OH 70% freddo. Le cellule sono quindi state centrifugate 10', 123xg, temperatura ambiente (ad esclusione di quelle raccolte al quinto giorno che sono state sedimentate) e successivamente lavate in PBS. I campioni sono infine stati lentamente risospesi e poi incubati 30' al buio, in una soluzione contenente 100 μ g/mL di propidio ioduro ed RNasi (0,2 mg/mL). Il materiale così preparato è stato acquisito con citofluorimetro FACScalibur ed analizzato con il software CellQuest (Becton Dickinson).

Marcatura cellulare con CFSE

Parte delle cellule staminali ematopoietiche ottenute con l'isolamento sono state risospese in PBS -BSA 0.1% e marcate con 5 μ M CFSE (Sigma) a 37°C per 10 minuti. La marcatura è stata quindi bloccata con 5 volumi di RPMI con 10%FCS freddo per 5 minuti. Le cellule vengono lavate per 3 volte con il terreno di coltura (in questo caso terreno IMDM contenente antibiotici) centrifugando a 400 x g per 10 min. Per ogni giorno di differenziamento le cellule vengono prelevate e acquisite con citofluorimetro FACScalibur ed analizzato con il software CellQuest (Becton Dickinson).

Aggregometria, conta basale ed espressione dei marcatori

Dai topi WT e KO per i recettori degli endocannabinoidi viene prelevato 1 ml di sangue circa mediante puntura cardiaca. Il prelievo è stato effettuato utilizzando 100 μ l di ACD (anticoagulante). Dopo aver aggiunto 1 ml di Tyrode Buffer (Hepes 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 29 mM ed NaHCO₃ 12 mM; pH 7,4) addizionato di glucosio (5,5 mM), il sangue è stato centrifugato per 6 minuti a 200 x g al fine di ottenere il PRP (Plasma Ricco in Piastrine). A quest'ultimo sono stati aggiunti 1 U/ml di apirasi, 1 μ M PGE1 e 10 μ M indometacina e centrifugato per 10 minuti a 600 x g al fine di ottenere il pellet piastrinico, il quale è stato lavato con 10 ml di PIPES (PIPES 20 mM, NaCl 136 mM; pH 6,5). Infine, le piastrine sono state risospese in Tyrode buffer addizionato di glucosio e portate alla concentrazione richiesta dall'esperimento.

Per la conta basale, campioni di sangue intero di topi WT e KO per i recettori sono stati diluiti 1:20 in ammonio cloruro (NH₄Cl, 0.38% IN H₂O) per lisare i rossi e dopo 5 minuti contati nella camera di burker.

Per le aggregazioni, le piastrine derivanti da topi WT e CB1-CB2 KO sono state diluite ad una concentrazione di 2×10^8 /ml in Tyrode buffer e glucosio. I campioni da 250 μ l sono stati preriscaldati per 2 minuti a 37 °C in aggregometro (Modello 490, Chrono -log Corporation) ed addizionati di $MgCl_2$ (1 mM) immediatamente prima di effettuare gli stimoli. Le piastrine sono state poi stimulate con diverse concentrazioni di 2-AG (1 μ M, 10 μ M) e di trombina (0.05 U/ml). Ogni aggregazione è stata valutata per almeno 5 minuti e l'analisi dei dati è stata effettuata con il software Aggro/Link (Chronolog Corporation). Per l'espressione dei marcatori, sono stati prelevati 50 μ l di sangue mediante puntura retro-orbitale con pasteur silanizzata a seguito di anestesia da topi WT e KO per i recettori degli endocannabinoidi e messo in eppendorf con 200 μ l di ACD. Per l'analisi citofluorimetrica è stato seguito il protocollo presente sul sito della Emfret.

RISULTATI

Il sistema endocannabinoide è modulato durante la megacariopoiesi

Per valutare la presenza dei recettori degli endocannabinoidi CB1 e CB2, lisati di megacariociti murini sono stati analizzati mediante Immunoblotting. Per questo motivo, cellule staminali ematopoietiche murine sono state isolate come descritto, e indotte al differenziamento megacariocitario. Al quinto giorno dall'induzione del differenziamento, grazie al significativo aumento di dimensioni, i megacariociti maturi sono stati separati dal resto della popolazione cellulare tramite sedimentazione. L'immunocolorazione è stata eseguita con specifici anticorpi commerciali: anti-CB1 e anti-CB2 e anti-TRPV1 (Cayman chemical).

Come è possibile vedere nell'immagine 9 solo i livelli dei recettori CB1 e TRPV1 aumentano durante il processo differenziativo mentre rimangono invariati i livelli di espressione del recettore CB2.

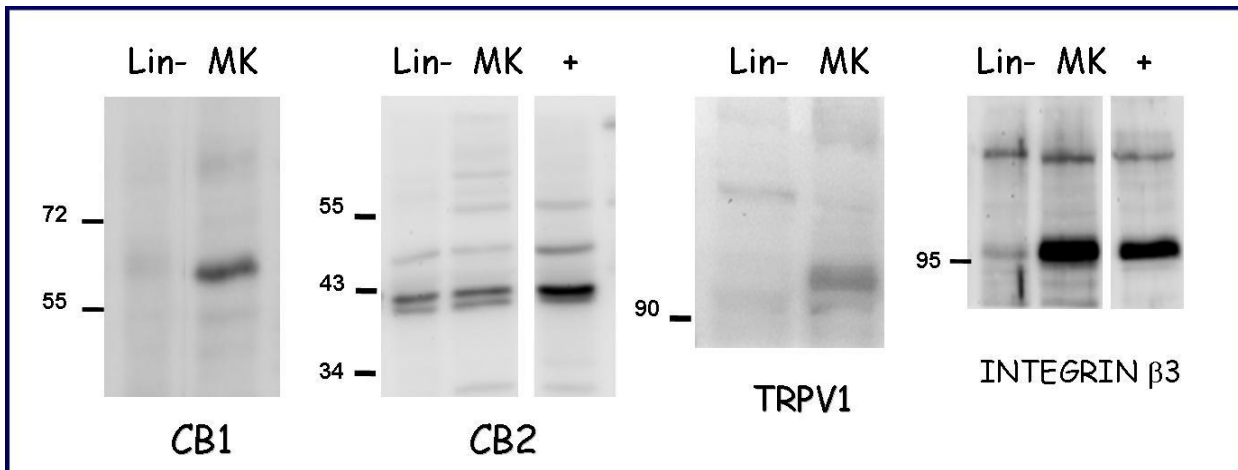


Figura 9: IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE E' MODULATO DURANTE LA MEGACARIOPOIESI: Cellule murine derivanti da midollo osseo vengono isolate e messe a differenziare per 4 giorni in presenza di TPO, IL-6 e IL-11. Cellule Lin-/c-kit+ (cellule al giorno 0) e megacariociti maturi (MK) vengono lisati in seguito a gradiente discontinuo di BSA (3%-2%-1%); le proteine separate mediante corsa su gel lineare di poliaccrilamide, trasferite con Western Blotting su membrana PVDF (polivinildene di fluoruro) e marcate con i specifici anticorpi. L'integrina $\beta 3$ rappresenta il marker di differenziamento (controllo positivo : piastrine murine) e come controllo positivo per la presenza del recettore CB2: cellule Jurkat (+). L'immagine è rappresentativa di 3 esperimenti indipendenti.

Data la presenza e la modulazione dell'espressione dei recettori per gli endocannabinoidi, abbiamo deciso di studiare l'espressione del sistema endocannabinoide, che comprende oltre agli endocannabinoidi gli enzimi deputati alla sintesi e alla degradazione degli stessi, a livello trascrizionale durante il differenziamento mediante analisi di Real-Time PCR semi-quantitativa. Cellule staminali ematopoietiche murine sono state raccolte da midollo osseo ed indotte al differenziamento. L'RNA estratto è stato opportunamente quantificato, retrotrascritto ed amplificato mediante real-time PCR semi-quantitativa. La presenza dei trascritti è stata valutata in base ai valori dei rispettivi $2^{-\Delta Ct}$ (ΔCt : ciclo soglia del trascritto in analisi meno ciclo soglia del controllo endogeno GAPDH), in modo tale da evidenziare le differenze di espressione tra i vari geni ai differenti tempi di differenziamento senza dover necessariamente scegliere un normalizzatore. Come si vede nel grafico in figura 10, GATA 1, che è il controllo endogeno, è altamente espresso nelle cellule differenziate mentre è poco espresso nelle cellule presenti al giorno 5 ma non megacariociti. Per quanto

riguarda i recettori per gli endocannabinoidi il CB1 è espresso in maniera statisticamente significativa nelle cellule differenziate rispetto a quelle non differenziate e ai non megacariociti; il CB2 è espresso a bassi livelli senza differenze tra i tre tipi cellulari mentre il TRPV1, recettore su cui agisce l'endocannabinoide AEA, è poco espresso ma lo è in maniera statisticamente significativa nei megacariociti. Per quanto riguarda l'espressione degli enzimi coinvolti nella degradazione degli endocannabinoidi, come FAAH e MAGL, è fortemente ridotta; anche nelle cellule Lin-/cKit+ l'enzima ABHD12 è espresso ma non è ulteriormente modulato, mentre l'enzima ABHD6 non è espresso nei megacariociti (dati non mostrati).

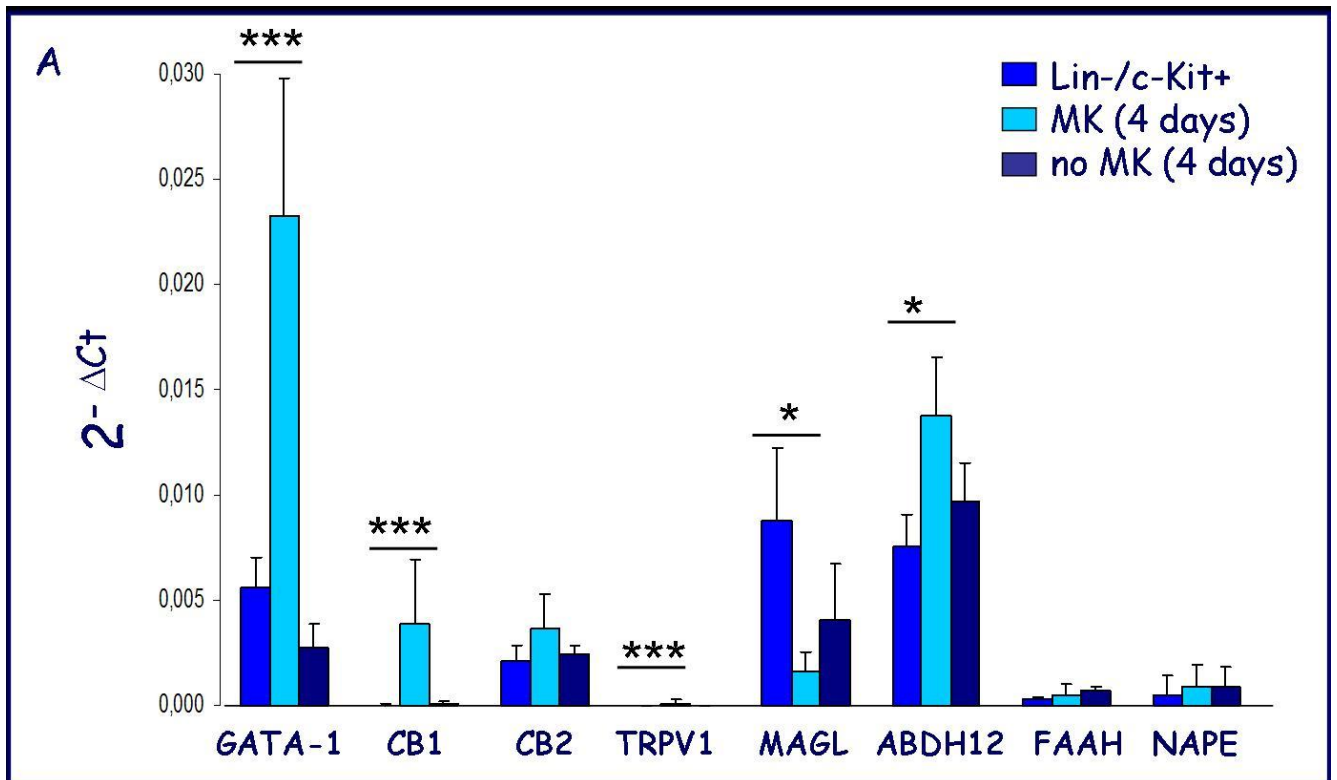


Figura 10: IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE E' MODULATO DURANTE LA MEGACARIOPOIESI: cellule murine Lin-/c-kit+ derivanti da midollo osseo vengono fatte differenziare in presenza di TPO, IL-6, e IL-11. RNA viene estratto da cellule Lin-/c-kit+, da megacariociti maturi e da cellule non megacariocitiche (no MK) a seguito di gradiente discontinuo di BSA (3%-2%-1%). Analisi in Real-Time del sistema endocannabinoide, i livelli dell'amplificato vengono normalizzati rispetto al gene housekeeping di controllo, GAPDH. I trascritti di mRNA vengono valutati in base ai valori dei rispettivi ΔC_t . Le barre rappresentano la media \pm la deviazione standard di 5 esperimenti indipendenti. Analisi statistica: t-test *** $p < 0.01$; ** $p < 0.05$; * $p < 0.1$.

I recettori per gli endocannabinoidi non sono necessari per il differenziamento

Per valutare se gli endocannabinoidi fossero in grado di influire sul differenziamento ho deciso di valutare l'aumento di dimensioni cellulari in esperimenti tipo, in grado appunto di valutare se il differenziamento è avvenuto e se, e come, viene modulato il grado di ploidia, in esperimenti di citofluorimetria a flusso. I campioni raccolti ai giorni 0, 3 e 5 del differenziamento sono stati acquisiti con citofluorimetro FACScalibur e analizzati in un dot-plot che correla dimensioni cellulari (FSC) e granulosità cellulare (SSC). Com'è

possibile osservare in figura 11, già al giorno 3 e in maniera ancor più consistente al giorno cinque, è presente una popolazione di cellule chiaramente differenziate. L'area selezionata in rosso rappresenta il gate scelto per le successive analisi: contiene cellule con aumentate dimensioni e complessità cellulare, quindi differenziate.

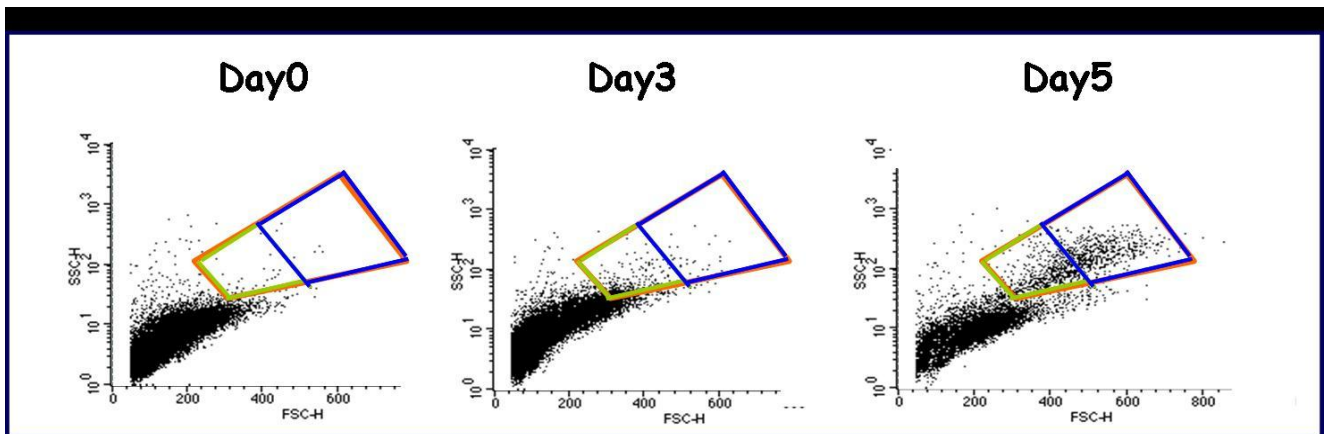


Figura 11: AUMENTO DI DIMENSIONI CELLULARI DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO – SCATTER PLOT: cellule ai giorni 0, 3 e 5 di differenziamento sono state analizzate mediante citofluorimetria a flusso e sortate rispetto alle dimensioni in un dot-plot SSC vs FSC. L'area selezionata (—) rappresenta il gate selezionato per le successive analisi e contiene cellule che presentano aumentate dimensioni cellulari e aumentata complessità all'interno della cellula (quindi marker di differenziamento all'interno del nostro sistema); (—) MK maturi; (—) MK intermedi. Le immagini sono rappresentative di quelle ottenute in tre diversi esperimenti indipendenti. Come atteso, con il trascorrere del tempo, si osserva un aumento significativo delle dimensioni e complessità delle cellule in fase differenziativa.

La stessa tipologia di esperimenti l'ho successivamente applicata a cellule derivanti da topo KO per i recettori CB1 e CB2. Cellule isolate e indotte al differenziamento sono state raccolte al giorno 5 mediante gradiente di sedimentazione, acquisite con citofluorimetro FACScalibur e analizzate sia per le variazioni del grado di ploidia sia per la variazione dell'espressione dell'integrina $\alpha IIb\beta$, marker del differenziamento megacariocitario mediante una doppia colorazione con ioduro di propidio e con l'anticorpo specifico per il CD41. Come si evince dalla figura 12 sia i megacariociti derivanti da topi KO per il CB1 sia topi KO per il CB2 differenziano fino al grado di 128N, senza nessuna differenza

significativa quando comparati al controllo; lo stesso vale per l'espressione del CD41 (FIGURA 13 B).

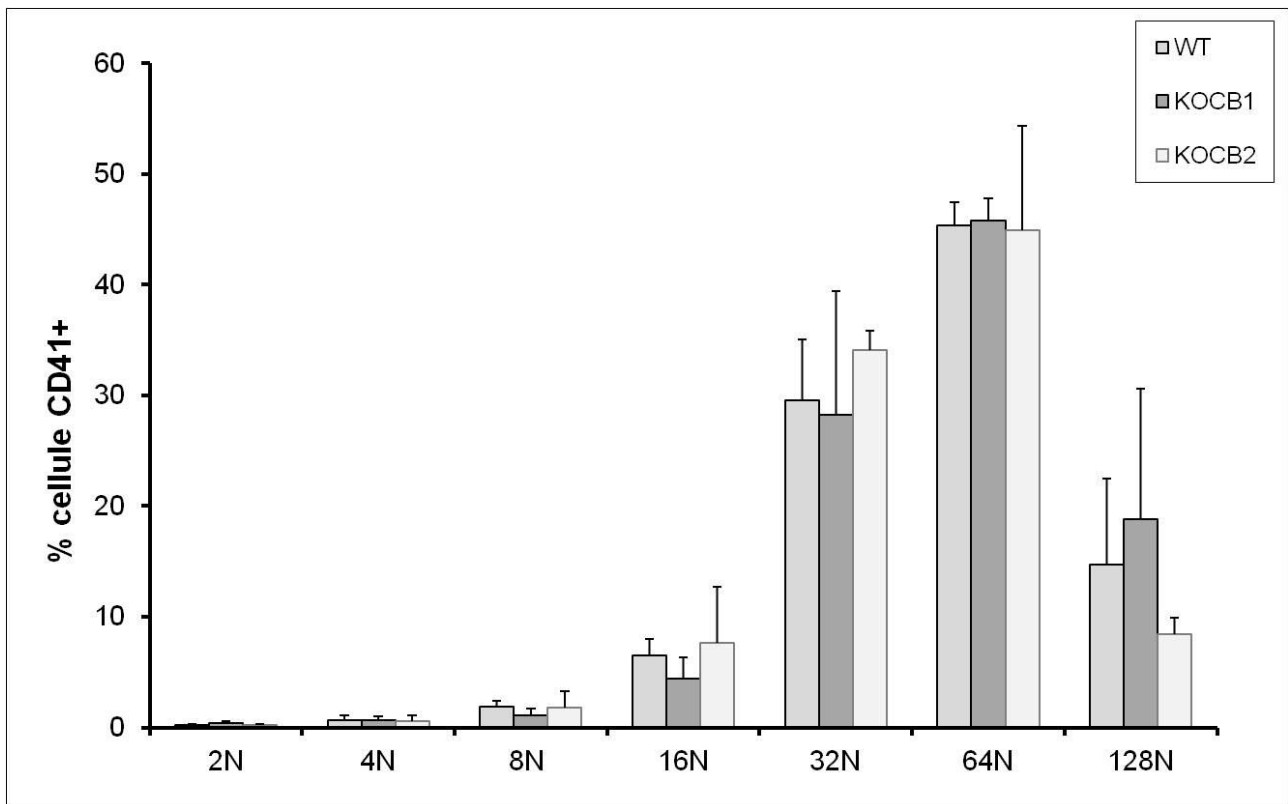


Figura 12: ESPRESSIONE DEL GRADO DI PLOIDIA DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO: cellule di topi KO per i recettori degli endocannabinoidi prelevate al giorno 5 di differenziamento sono state analizzate mediante citofluorimetria a flusso e sortate rispetto alle dimensioni in un dot-plot SSC vs FSC. I grafici a barre mostrano il numero di cellule mature al giorno 5 del differenziamento. Le barre rappresentano la media \pm la deviazione standard di tre diversi esperimenti.

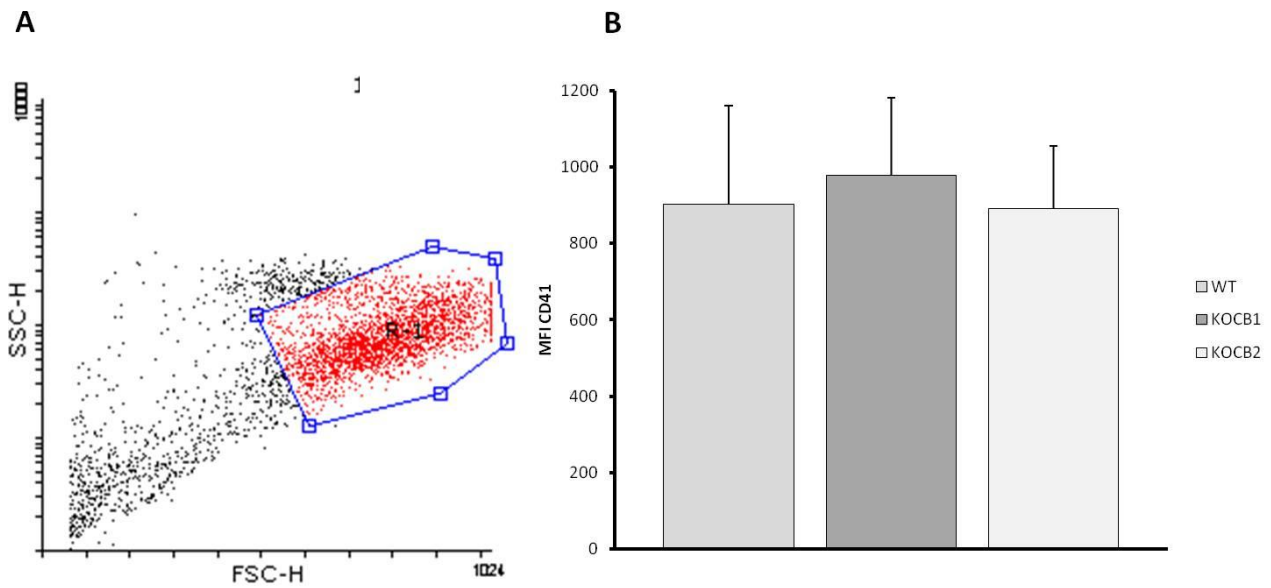


Figura 13: ESPRESSIONE DEL GRADO DI PLOIDIA ed ESPRESSIONE DEL CD41 DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO: Nella figura A un dot-plot SSC vs FSC rappresentativo delle cellule analizzate mediante citofluorimetria a flusso; il gate R-1 (—) rappresenta il gate composto da cellule chiaramente differenziate selezionato per le analisi; la figura B mostra l'intensità di fluorescenza intesa come espressione del CD41.

I recettori CB1 e CB2 regolano il numero dei megacariociti maturi

Gli esperimenti effettuati in citofluorimetria a flusso sulle cellule ottenute dal midollo di animali KO per i recettori degli endocannabinoidi non ci hanno permesso di evidenziare eventuali differenze tra il grado di differenziamento dei megacariociti KO per il CB1 e megacariociti KO per il CB2 mentre abbiamo riscontrato differenze nel numero di questi megacariociti maturi. Allo scopo di meglio investigare il ruolo dei recettori CB nel regolare il numero dei megacariociti differenziati, abbiamo compiuto esperimenti di differenziamento di queste cellule in piastra, in modo da seguire al meglio il differenziamento delle cellule selezionate, poiché la preparazione delle cellule per il tipo di esperimenti precedenti comportava una serie di manipolazioni e passaggi che ci faceva perdere una consistente parte delle cellule ottenute mediante il differenziamento; anche la

stessa metodica di selezione ha fatto sì che il numero di partenza non fosse mai lo stesso, e di conseguenza era diverso il numero delle cellule differenziate. Inoltre, la metodica di separazione su gradiente discontinuo di BSA ci faceva perdere molto materiale. Cellule Lin⁻ di topi KO per i recettori degli endocannabinoidi, e cellule di controllo di topi WT sono state isolate mediante la metodica descritta nei materiali e metodi, coltivate con SCF per 48 ore in fiasca e successivamente differenziate in presenza di Trombopoietina, Interleuchina-6 e Interleuchina-11 (murine) per quattro giorni. Le cellule sono state fotografate mediante microscopio ottico (Axiovert 40 CFL) ai giorni 3 e 4 di differenziamento e sono state analizzate per il numero di cellule differenziate e per il diametro. Arbitrariamente abbiamo deciso di considerare come cellule differenziate, e successivamente divise in due gruppi, cellule che avessero diametri compresi tra 41-45 μm e maggiori di 45 μm , in quanto sono le cellule che sappiamo che, se separate mediante gradiente discontinuo di BSA, iniziano a sedimentare. I risultati che abbiamo ottenuto mostrano che il numero dei megacariociti ottenuti da topi KO per il CB1 aumenta in maniera considerevole rispetto ai megacariociti di topi KO per il CB2, suggerendo un ruolo di entrambi i recettori nel differenziamento megacariocitario.

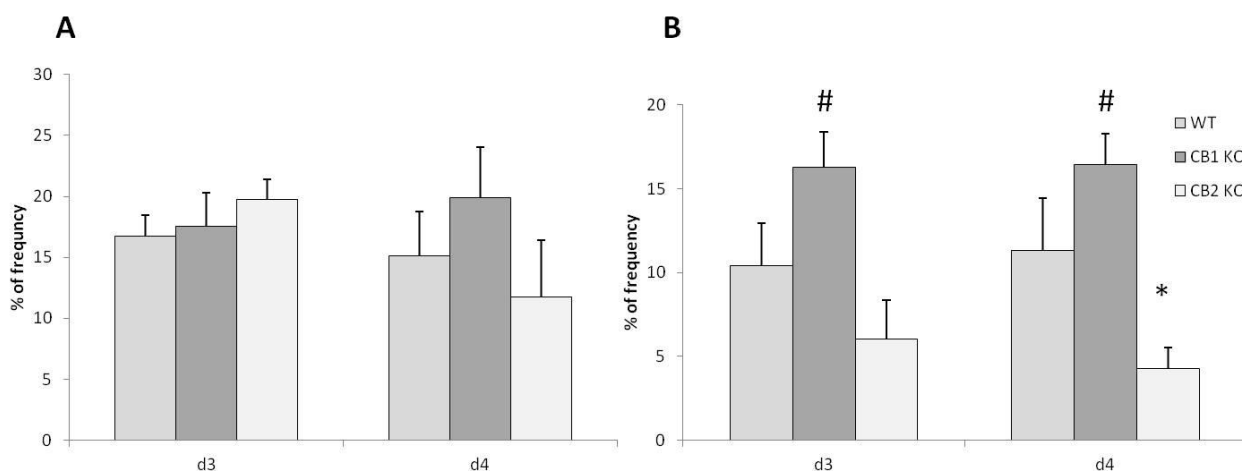


Figura 14: I RECETTORI CB REGOLANO IL NUMERO DEI MEGACARIOCITI MATURI: Nella figura è mostrato un grafico relativo al differenziamento delle cellule Lin⁻ in presenza di Trombopoietina, Interleuchina-6 e Interleuchina-11 (murine) per quattro giorni. Il pannello **A** è relativo a cellule con diametro compreso tra 41-45 μm mentre il pannello **B** a cellule con diametro superiore a 45 μm. I dati riportati rappresentano la media ± SD di tre esperimenti indipendenti. (* p<0.05 CB2 comparato al WT; # p<0.05 CB1 comparato al WT).

La mAEA promuove il differenziamento megacariocitario

Dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio effettuando esperimenti di differenziamento di cellule staminali ematopoietiche ottenute da topi BALB/c con R-1 MetAnandamide (mAEA, analogo molto più stabile dell'anandamide), hanno mostrato che l'utilizzo della mAEA su queste cellule promuove il differenziamento verso la linea megacariocitaria, ovvero favorisce l'aumento del numero di cellule indirizzate verso il differenziamento a megacariociti (megacariociti 1.37 ±0.08; megacariociti intermedi 1.5 ±0.17). Per capire quindi quale potrebbe essere il recettore per gli endocannabinoidi coinvolto nel differenziamento megacariocitario, ho condotto la stessa tipologia di esperimenti ma su cellule ottenute dai topi C57Bl/6 KO per i recettori degli endocannabinoidi. I risultati ottenuti mostrano che sia il numero di cellule ottenute dai topi KO per il CB1 che quelle ottenute dai topi KO per il CB2 aumentano in presenza di mAEA, come già visto in precedenza su un ceppo differente e con una metodica diversa,

anche se quelle KO per il CB1 aumentano in maniera più consistente rispetto a quelle KO per il CB2, quando comparate alle cellule di controllo ottenute da topi WT. Questo risultato non ci permette di poter discriminare se il differenziamento di queste cellule agisce in maniera preferenziale attraverso un recettore rispetto all'altro.

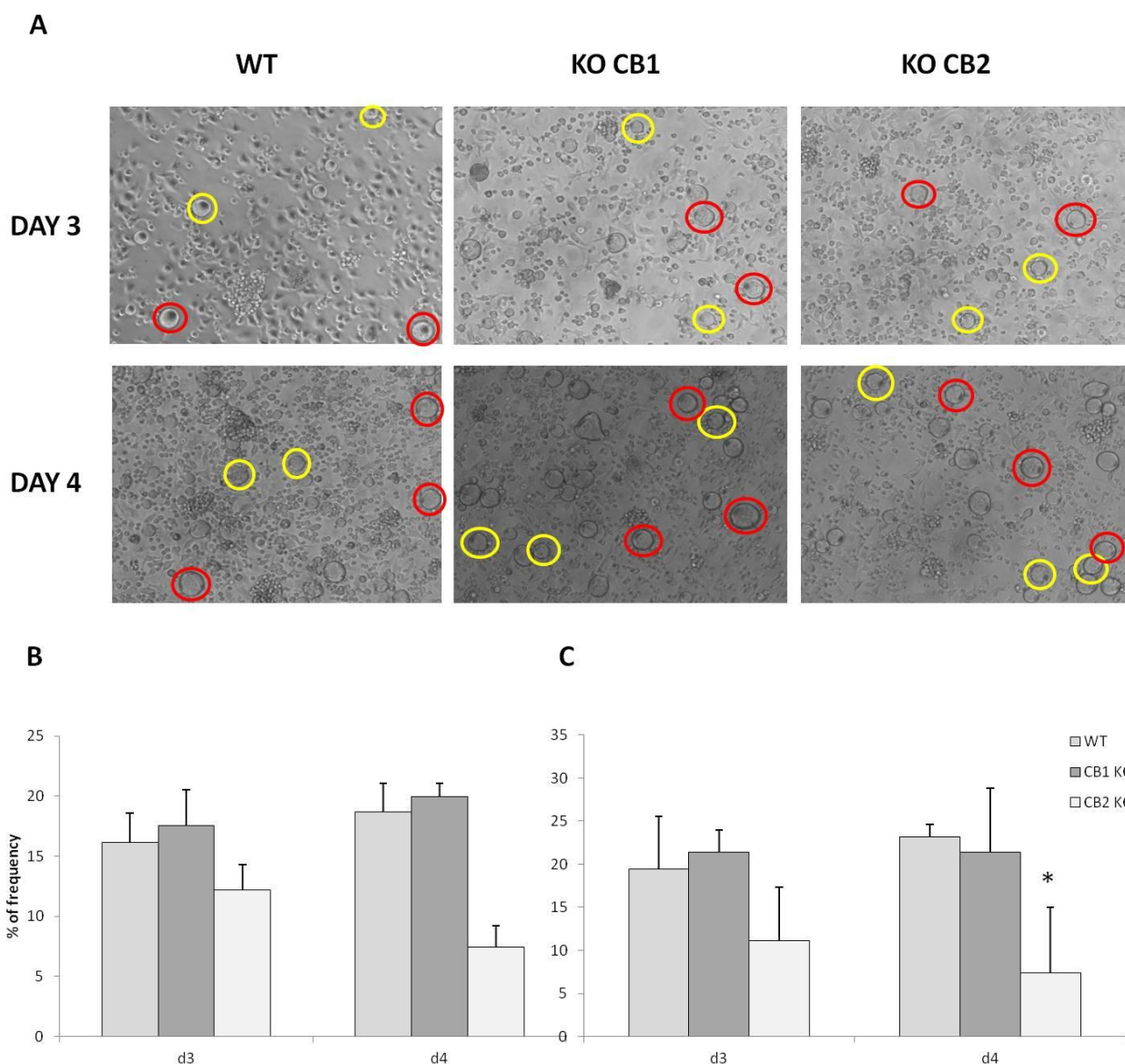


Figura 15: LA mAEA PROMUOVE IL DIFFERENZIAMENTO MEGACARIOCITARIO: Nel pannello **A** sono riportate foto rappresentative del differenziamento delle cellule Lin⁻ in presenza di mAEA, in giallo (o) sono cerchiato le cellule con diametro compreso tra 41-45 μm mentre in rosso (o) sono cerchiato le cellule con diametro maggiore di 45 μm. Il pannello **B** è relativo a cellule con diametro compreso tra 41-45 μm mentre il pannello **C** è relativo a cellule con diametro superiore a 45 μm. I dati riportati rappresentano la media ± SD di tre esperimenti indipendenti. (* p<0.05 CB2 comparato al WT).

Il recettore CB1 regola la proliferazione delle cellule Lin-

La differenza nel numero di cellule che abbiamo ottenuto in seguito al differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche di topi KO per i recettori degli endocannabinoidi ci ha indotto a pensare che ci potesse essere un diverso ruolo dei due recettori nei processi di proliferazione e successivo differenziamento. Abbiamo quindi condotto esperimenti di proliferazione delle cellule ottenute da midollo mediante l'utilizzo della marcatura con CFSE, un marcatore cellulare che, una volta integrato nelle cellule, riduce la sua intensità di segnale man mano che le cellule vanno incontro a processi di replicazione cellulare. Cellule staminali ematopoietiche ottenute con l'isolamento sono state risospese in PBS - BSA 0.1% e marcate con 5 μ M CFSE a 37°C per 10 minuti. Per ogni giorno di differenziamento (da 0 a 4) le cellule sono state prelevate e acquisite mediante citofluorimetria a flusso. I risultati che abbiamo ottenuto mostrano una minor proliferazione nelle cellule KO per il CB1, suggerendoci che potrebbero già essere più indirizzate e quindi più in stato di differenziamento, mentre le cellule KO per il CB2 proliferano in maniera paragonabile al WT.

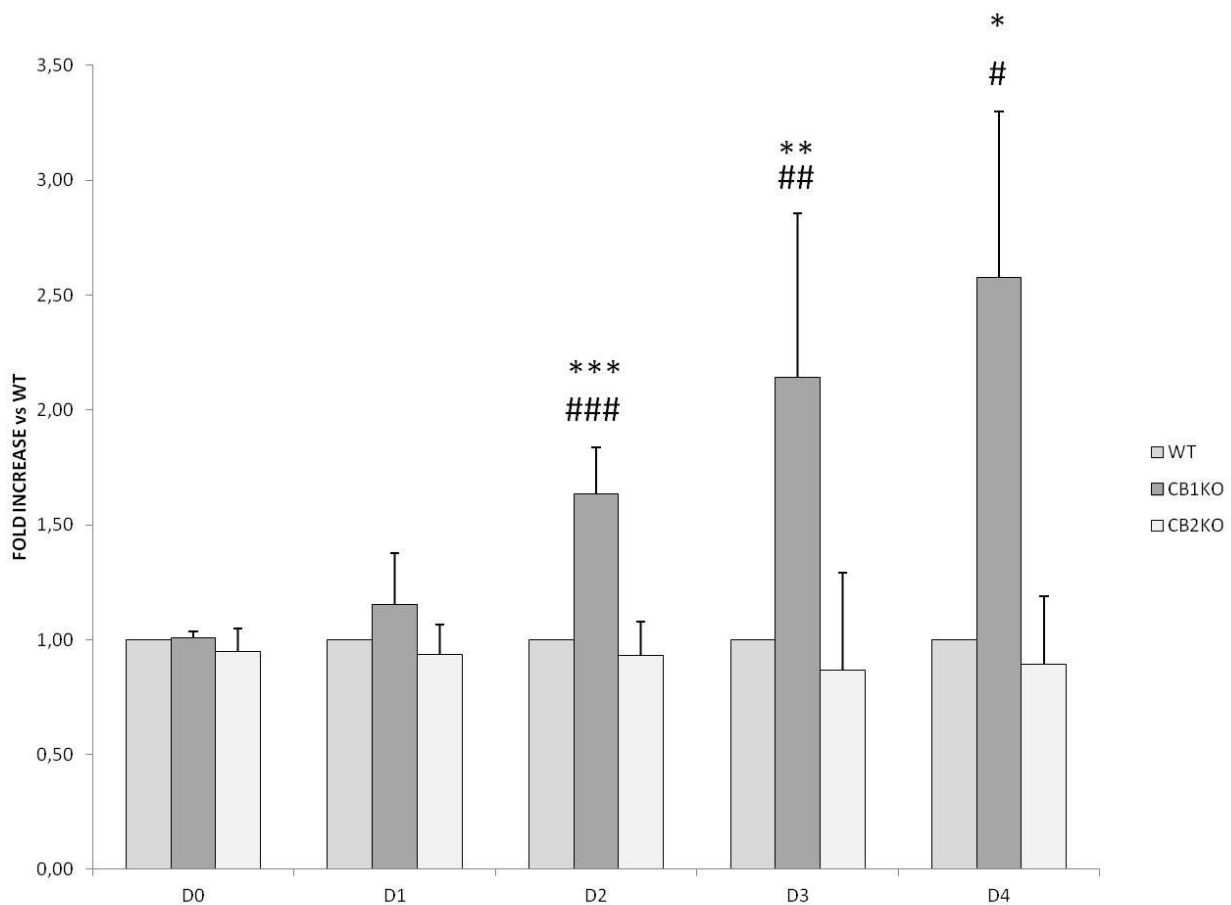


Figura 16: IL RECETTORE CB1 REGOLA LA PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE Lin-: Nella figura è mostrato un grafico relativo alla proliferazione delle cellule Lin- intesa come intensità di fluorescenza del CFSE: maggiore è il valore dell'intensità, minore è il grado di proliferazione delle cellule. I dati riportati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. (* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ CB1 comparato al WT; # $p < 0.1$, ## $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ CB2 comparato al CB1; CB2 comparato al WT ns).

Gli endocannabinoidi non influenzano il fenotipo piastrinico dei topi KO

Al fine di valutare il fenotipo delle piastrine di topi KO per i recettori degli endocannabinoidi abbiamo valutato la conta piastrinica, l'espressione dei marcatori espressi in superficie e l'aggregazione. Ho effettuato la conta delle piastrine isolate da topi KO per i recettori per evidenziare se basalmente vi fossero delle differenze nel numero delle piastrine tra topi KO per il CB1 e topi KO per il CB2. Piastrine isolate mediante la metodica descritta nei materiali e metodi sono state diluite in Tyrode Buffer e contate

mediante camera di Burker all'ingrandimento 40x. La media delle conte ottenute non mostra differenze tra il numero basale di piastrine dei topi CB1 e CB2 KO.

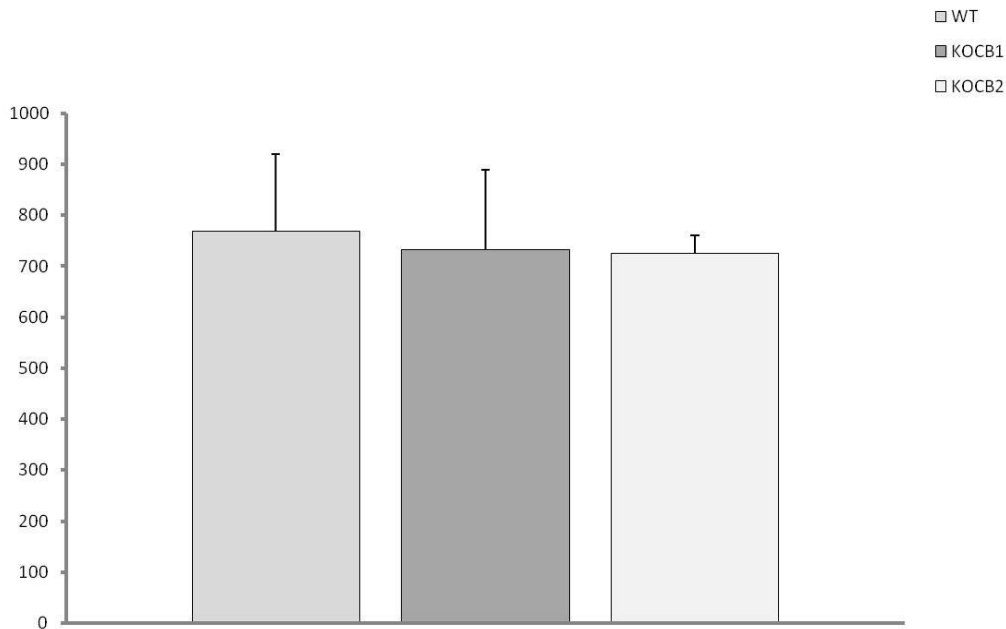


Figura 17: GLI ENDOCANNABINOIDI NON INFLUENZANO IL NUMERO BASALE DI PIASTRINE:il grafico in figura mostra la conta basale delle piastrine di topi WT e KO per i recettori degli endocannabinoidi. I dati riportati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

Ho poi condotto esperimenti per la valutazione dell'espressione dei marcatori di superficie mediante analisi al citofluorimetro. Campioni di piastrine di topi WT e KO per i recettori degli endocannabinoidi sono stati incubati con gli anticorpi specifici per i marker analizzati per 30 minuti e letti al FACS. I risultati ottenuti mostrano che non vi sono differenze nei livelli di espressione dei vari marcatori tra topi KO e WT.

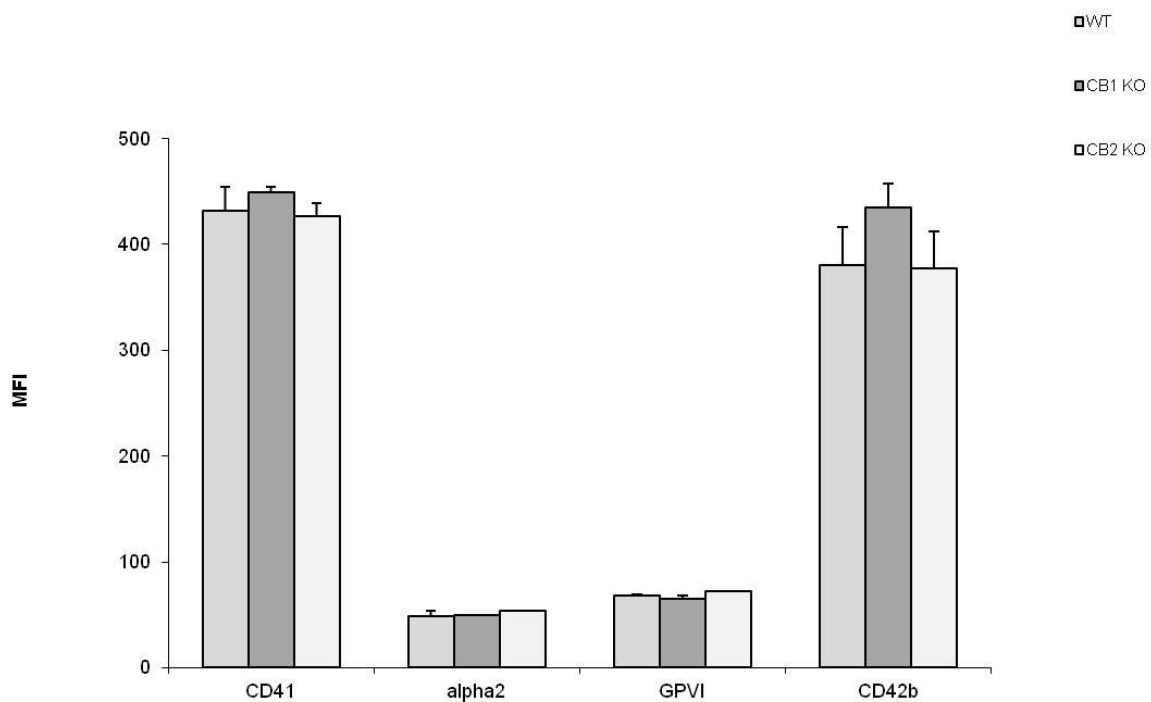


Figura 18: ESPRESSIONE DEI MARCATORI DI SUPERFICIE PIASTRINICA: Il grafico in figura mostra l'espressione dei marcatori di superficie ottenuta mediante esperimenti di citofluorimetria a flusso; l'espressione viene mostrata come intensità di fluorescenza degli specifici anticorpi. I dati riportati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

Infine, abbiamo valutato la funzionalità piastrinica valutando l'aggregazione in risposta a trombina (Thr) e all'endocannabinoide 2-AG, poiché dati prodotti in precedenza nel nostro laboratorio hanno mostrato che l'endocannabinoide AEA non ha alcun effetto sull'aggregazione piastrinica, così come è noto dalla letteratura (*Brantl et al., 2013*); inoltre nel nostro laboratorio è stato dimostrato che il 2-AG è in grado di attivare le piastrine umane (*Baldassarri et al., 2008*) e abbiamo deciso di vederne gli effetti sulle piastrine murine. I risultati che abbiamo ottenuto non mostrano differenze statisticamente significative tra le piastrine di controllo e le piastrine dei topi KO per i recettori.

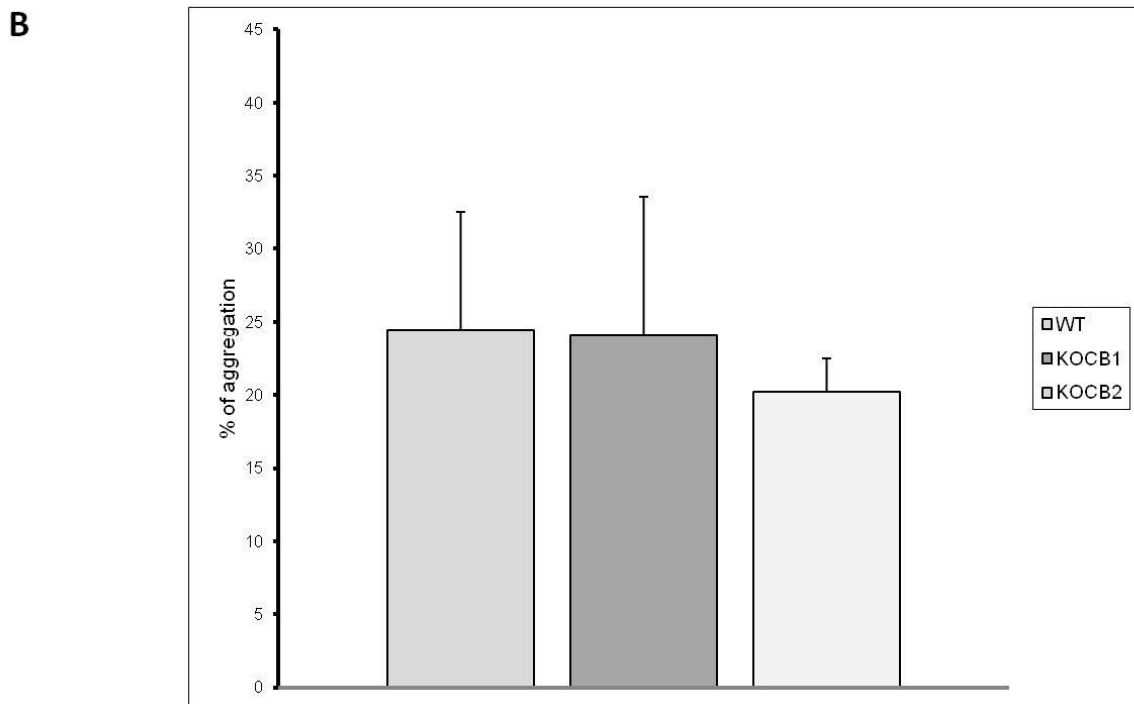
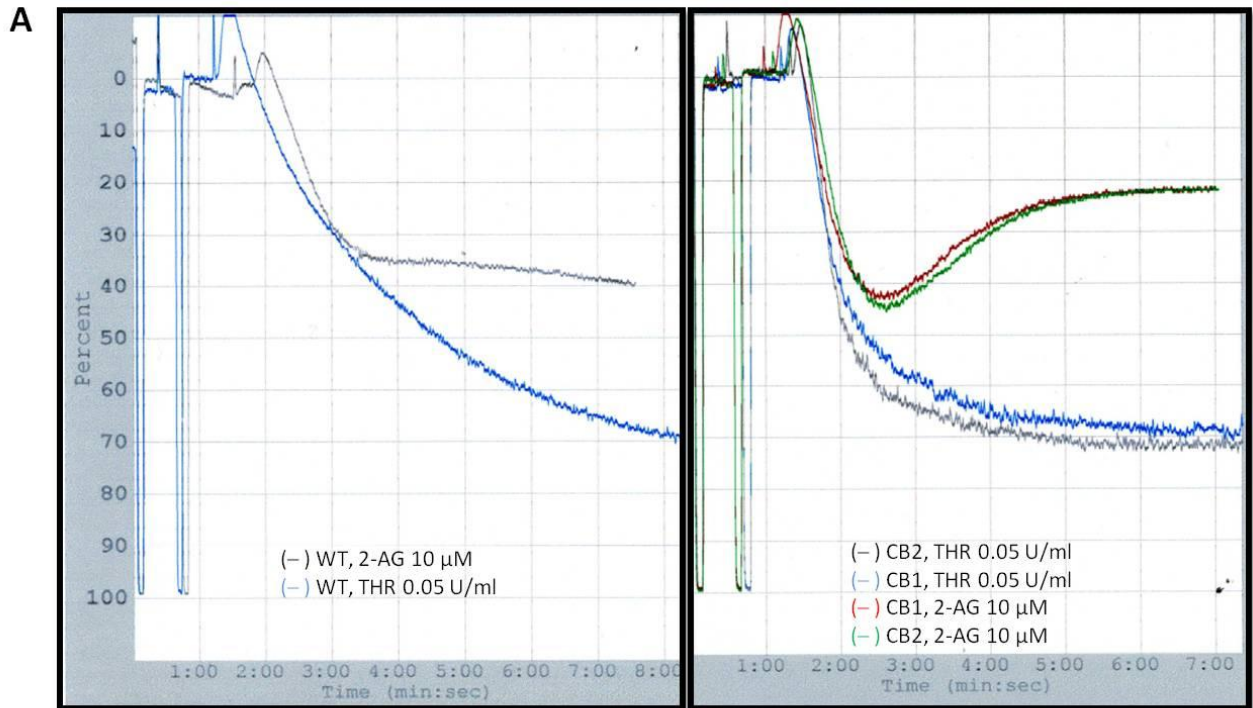


Figura 19: IL 2-AG NON INIBISCE L'AGGREGAZIONE PIASTRINICA INDOTTA DA AGONISTI: campioni di piastrine di topi WT, CB1 e CB2 KO sono stati indotti ad aggregare con trombina 0.05 U/ml e 2-AG 10 μ M. Nel pannello **A** sono rappresentati profili di aggregazione che si ottengono dalla stimolazione delle piastrine con gli agonisti. Il pannello **B** mostra i risultati dell'inibizione dell'aggregazione piastrinica indotta da 2-AG. I dati riportati sono la media \pm DS di tre esperimenti indipendenti.

DISCUSSIONE

Gli endocannabinoidi sono mediatori lipidici endogeni che comprendono ammidi, esteri ed eteri di acidi grassi poliinsaturi a catena lunga: l'anandamide AEA (N-arachidonoiletanolammide), ed il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG), sono i maggiori esponenti. La loro azione si esplica mediante il legame a specifici recettori, associati a proteine G eterotrimeriche (G Protein-coupled Receptors o GPCRs), di cui si conoscono due isoforme: il recettore CB1 (*Matsuda, 1997*) ed il recettore CB2 (*Munro et al., 1993*). Recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato un nuovo ruolo fisiologico per gli endocannabinoidi quali molecole coinvolte nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare, sia nel sistema nervoso (*Molina-Holgada et al., 2007*) che a livello periferico (*Matias et al., 2006*). Dati recentemente pubblicati in letteratura dimostrano che gli endocannabinoidi sono anche implicati nei meccanismi che regolano proliferazione e/o differenziamento di cellule sia della linea mieloide che linfoide. Nonostante il crescente interesse, ancora pochi sono i dati disponibili riguardo al ruolo degli endocannabinoidi nel differenziamento megacariocitario.

Il mio progetto di Dottorato nasce con l'intento di valutare il ruolo dei recettori per gli endocannabinoidi nei processi di megacariopoiesi. Per prima cosa ho quindi deciso di indagare la presenza dei recettori per gli endocannabinoidi su megacariociti maturi. La presenza dei principali recettori per gli endocannabinoidi, CB1, CB2 e TRPV-1 aumenta progressivamente negli stadi differenziativi considerati ad eccezione del recettore CB2 che rimane invariata.

Per valutare se gli endocannabinoidi svolgono un ruolo nel differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche murine verso la linea megacariocitaria, ho condotto diversi

esperimenti : in Real Time-PCR per valutare i livelli di espressione del sistema endocannabinoide, che comprende oltre agli endocannabinoidi gli enzimi deputati alla sintesi e alla degradazione degli stessi, e ho trovato che GATA 1, il controllo endogeno, è altamente espresso nelle cellule differenziate mentre è poco espresso nelle cellule presenti al giorno 5 ma non megacariociti. Per quanto riguarda i recettori per gli endocannabinoidi il CB1 è espresso in maniera statisticamente significativa nelle cellule differenziate rispetto a quelle non differenziate e ai non megacariociti; il CB2 è espresso a bassi livelli senza differenze tra i tre tipi cellulari mentre il TRPV1, recettore su cui agisce l'endocannabinoide AEA, è poco espresso ma lo è in maniera statisticamente significativa nei megacariociti. Per quanto riguarda l'espressione degli enzimi coinvolti nella degradazione degli endocannabinoidi, come FAAH e MAGL, è fortemente ridotta; anche nelle cellule Lin-/cKit+ l'enzima ABHD12 è espresso ma non è ulteriormente modulato, mentre l'enzima ABHD6 non è espresso nei megacariociti (dati non mostrati). Possiamo quindi dire che vi è un coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella regolazione del differenziamento.

Successivamente sono andata a valutare se gli endocannabinoidi fossero in grado di influire sul grado di poliploidizzazione megacariocitaria e ho deciso di valutare l'aumento di dimensioni cellulari in esperimenti di citofluorimetria a flusso. I dati che ho ottenuto mostrano come già al giorno 3 e in maniera ancor più consistente al giorno cinque, è presente una popolazione di cellule chiaramente differenziate ad indicare in maniera certa un coinvolgimento degli endocannabinoidi nel differenziamento; questa popolazione è quella scelta per gli esperimenti successivi in quanto contiene cellule con aumentate dimensioni e complessità cellulare, quindi differenziate.

La stessa tipologia di esperimenti l'ho successivamente condotta su cellule derivanti da topi KO per i recettori degli endocannabinoidi, per andare a valutare il grado di ploidia e l'espressione del CD41, ovvero l'integrina $\alpha\text{IIb}\beta$, che sono i marker di riferimento per la differenziazione in senso megacariocitario. Anche queste cellule differenziano fino allo stadio di 128N, senza differenze tra le cellule di topi KO per il CB1 e topi KO per il CB2.

Le analisi su cellule di topi KO per i recettori degli endocannabinoidi effettuate mediante citofluorimetria a flusso non ci hanno però permesso di evidenziare eventuali differenze tra i megacariociti derivanti da topi KO per il CB1 e megacariociti derivanti da topi KO per il CB2, inoltre la preparazione delle cellule per questo tipo di esperimenti comportava una serie di manipolazioni e passaggi che ci faceva perdere una parte consistente del numero di cellule ottenute mediante il differenziamento; anche la stessa metodica di selezione che abbiamo utilizzato non ci permetteva di avere mai lo stesso numero di partenza, e di conseguenza avevamo anche un diverso numero di cellule differenziate. Anche la metodica di separazione su gradiente discontinuo di BSA ci faceva perdere molto materiale, e a questo punto abbiamo deciso di optare per una diversa metodica che, pur con meno campioni, ci ha permesso di seguire al meglio il differenziamento delle cellule selezionate, ovvero il differenziamento in piastre di coltura. Fotografando le cellule nei vari giorni di differenziamento abbiamo deciso di concentrarci su cellule che avevano diametri compresi tra 41-45 μm e maggiori di 45 μm , in quanto sono le cellule che sappiamo che, se separate mediante gradiente discontinuo di BSA, iniziano a sedimentare. Queste cellule sono state analizzate sia per il numero sia per il diametro e i risultati che abbiamo ottenuto mostrano che il numero dei megacariociti ottenuti da topi KO per il CB1 aumenta in maniera considerevole rispetto ai megacariociti di topi KO per il CB2, suggerendo un ruolo del recettore CB2 nel differenziamento megacariocitario.

Dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio effettuando esperimenti di differenziamento di cellule staminali ematopoietiche ottenute da topi BALB/c con R-1 MetAnandamide (mAEA, analogo molto più stabile dell'anandamide), hanno mostrato che l'utilizzo della mAEA su queste cellule promuove il differenziamento verso la linea megacariocitaria, ovvero favorisce l'aumento del numero di cellule indirizzate verso il differenziamento a megacariociti.

Per indagare quindi quale potesse essere il recettore per gli endocannabinoidi coinvolto nel differenziamento dei megacariociti ho condotto la stessa tipologia di esperimenti ma su cellule ottenute dai topi C57Bl/6 KO per i recettori degli endocannabinoidi. I risultati ottenuti mostrano che sia il numero di cellule ottenute dai topi KO per il CB1 che quelle ottenute dai topi KO per il CB2 aumentano in presenza di mAEA, anche se quelle KO per il CB1 aumentano in maniera più consistente rispetto a quelle KO per il CB2, quando comparate alle cellule di controllo ottenute da topi WT. Questo risultato non ci permette di poter discriminare se il differenziamento di queste cellule agisca in maniera preferenziale attraverso un recettore rispetto all'altro, ed inoltre ci porta ad ipotizzare che possa esserci un coinvolgimento di endocannabinoidi sintetizzati *de novo* dalle cellule, poichè il sistema utilizzato è paragonabile ad una situazione da stress, in quanto è noto in letteratura che vi è un coinvolgimento degli endocannabinoidi durante le situazioni di stress (*Marsicano et al., 2002*).

Il diverso numero di cellule ottenute in seguito al differenziamento ci ha portato a pensare che ci potesse essere un diverso ruolo dei due recettori nei processi di proliferazione. Abbiamo quindi condotto esperimenti di proliferazione cellulare marcando le cellule del midollo osseo ottenute mediante isolamento con CFSE, un intercalante fluorescente che

viene integrato nelle cellule e che perde la sua intensità man mano che le cellule vanno incontro a cicli di replicazione cellulare: grazie a questa marcatura è possibile evidenziare il numero di divisioni cellulari che avvengono nell'arco di un determinato tempo. I risultati che abbiamo ottenuto mostrano una minor proliferazione nelle cellule KO per il CB1, suggerendoci che potrebbero essere già più indirizzate e quindi più in stato di differenziamento, mentre le cellule KO per il CB2 proliferano in maniera più consistente, suggerendo così che i due recettori possono agire in momenti differenti durante il percorso di differenziamento di queste cellule.

Abbiamo successivamente deciso di analizzare anche il fenotipo piastrinico dei topi KO per i recettori degli endocannabinoidi, per vedere se vi fossero differenze tra topi KO per il CB1 e topi KO per il CB2: abbiamo effettuato la conta piastrinica basale, esperimenti in citofluorimetria a flusso per l'espressione dei marcatori di superficie ed esperimenti in aggregometria. I risultati di questi esperimenti ci hanno portato alla conclusione che non vi sono differenze riguardo la funzionalità piastrinica dei topi KO per i recettori per gli endocannabinoidi.

In conclusione possiamo dire che in questo studio non abbiamo rilevato un ruolo predominante di un recettore per gli endocannabinoidi rispetto all'altro; sicuramente saranno necessari altri esperimenti per meglio caratterizzare il ruolo di ogni singolo recettore durante i processi di proliferazione e differenziamento verso la linea megacariocitaria ed indagare i meccanismi a valle dell'attivazione di questi recettori in quanto ipotizziamo una loro attivazione in tempi diversi durante il differenziamento.

BIBLIOGRAFIA

- Abkowitz JL, Robinson AE, Kale S, Long MW, Chen J. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood*. 2003 Aug 15;**102**(4):1249-53.
- Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J Neurosci*. 2006 Feb 1;**26**(5):1551-61.
- Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklin DJ, Bohlen P, Eaton D, Lyden D, de Sauvage F & Rafii S. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature Medicine*. 2004; **10**, 64-71
- Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW, Layward L. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature*. 2000 Mar 2;**404**(6773):84-7.
- Baldassarri S, Bertoni A, Bagarotti A, Sarasso C, Zanfa M, Catani MV, Avigliano L, Maccarrone M, Torti M, Sinigaglia F. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol activates human platelets through non-CB1/CB2 receptors. *J Thromb Haemost*. 2008; **6**(10):1772-9.
- Bari M, Tedesco M, Battista N, Pasquariello N, Pucci M, Gasperi V, Scaldaferrri ML, Farini D, De Felici M, Maccarrone M. Characterization of the endocannabinoid system in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2011 Jan;**20**(1):139-47.
- Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell*. 1994; **77**(7):1117-24.
- Basavarajappa BS. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett*. 2007; **14**(3):237-46.
- Bátkai S, Pacher P. Endocannabinoids and cardiac contractile function: pathophysiological implications. *Pharmacol Res*. 2009; **60**(2):99-106. Review.
- Behnke O. An electron microscope study of megakaryocytes of rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J Ultrastruct. Res*. 1968; **24**:412-433.
- Beltramo M, de Fonseca FR, Navarro M, Calignano A, Gorriti MA, Grammatikopoulos G, Sadile AG, Giuffrida A, Piomelli D. Reversal of dopamine D(2) receptor responses by an anandamide transport inhibitor. *J Neurosci*. 2000 May 1;**20**(9):3401-7.
- Berdyshev EV, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH. Activation of PAF receptors results in enhanced synthesis of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in immune cells. *FASEB J*. 2001; **15**(12):2171-8.
- Bhattacharya D, Czechowicz A, Ooi AG, Rossi DJ, Bryder D, Weissman IL. Niche recycling through division-independent egress of hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2009 Nov 23;**206**(12):2837-50.
- Bifulco M, Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: a call for further research. *Nat Med*. 2002 Jun;**8**(6):547-50. Review.
- Bisogno T, Sepe N, Melck D, Maurelli S, De Petrocellis L, Di Marzo V. Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem J*. 1997; **322**(Pt 2):671-7.

- Blankman JL, Cravatt BF. Chemical probes of endocannabinoid metabolism. *Pharmacol Rev.* 2013 Mar 19;65(2):849-71.
- Bluteau D, Lordier L, Di Stefano A, Chang Y, Raslova H, Debili N, Vainchenker W. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *J ThrombHaemost.* 2009 Jul;7 Suppl 1:227-34.
- Bouaboula M, Hilairet S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol.* 2005 Jul 11;517(3):174-81.
- Braud S, Bon C, Touqui L, Mounier C. Activation of rabbit blood platelets by anandamide through its cleavage into arachidonic acid. *FEBS Lett.* 2000; 471(1):12-6.
- Brantl SA, Khandoga AL, Siess W. Mechanism of platelet activation induced by endocannabinoids in blood and plasma. *Platelets.* 2013 Jun 21.
- Brantl SA, Khandoga AL, Siess W. Activation of platelets by the endocannabinoids 2-arachidonoylglycerol and virodhamine is mediated by their conversion to arachidonic acid and thromboxane A2, not by activation of cannabinoid receptors. *Platelets.* 2013 Oct 8.
- Broudy VC & Kaushansky K. Thrombopoietin, the c-mpl ligand, is a major regulator of platelet production. *Journal of Leukocyte Biology.* 1995; 57:719-725.
- Bruno S, Gunetti M, Gammaitoni L, Dane A, Cavalloni G, Sanavio F, Fagioli F, Aglietta M & Piacibello W. In vitro and in vivo megakaryocyte differentiation of fresh and ex-vivo expanded cord blood cells: rapid and transient megakaryocyte reconstitution. *Haematologica.* 2003; 88:379-387.
- Caine YG, Vlodavsky I, Hersh M, Polliack A, Gurfel D, Or R, Levine RF & Eldor A. Adhesion, spreading and fragmentation of human megakaryocytes exposed to subendothelial extracellular matrix: a scanning electron microscopy study. *Scandinavian Electron Microscopy.* 1986; 3:1087-1094.
- Carayon P, Marchand J, Dussosoy D, Derocq JM, Jbilo O, Bord A, Bouaboula M, Galiègue S, Mondière P, Pénarier G, Fur GL, Defrance T, Casellas P. Modulation and functional involvement of CB2 peripheral cannabinoid receptors during B-cell differentiation. *Blood.* 1998 Nov 15;92(10):3605-15.
- Catani MV, Fezza F, Baldassarri S, Gasperi V, Bertoni A, Pasquariello N, Finazzi-Agrò A, Sinigaglia F, Avigliano L, Maccarrone M. Expression of the endocannabinoid system in the bi-potential HEL cell line: commitment to the megakaryoblastic lineage by 2-arachidonoylglycerol. *J Mol Med (Berl).* 2009 Jan;87(1):65-74.
- Chang Y, Auradé F, Larbret F, Zhang Y, Le Couedic JP, Momeux L, Larghero J, Bertoglio J, Louache F, Cramer E, Vainchenker W, Debili N. Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood.* 2007 May 15;109(10):4229-36.
- Cheer JF, Cadogan AK, Marsden CA, Fone KC, Kendall DA. Modification of 5-HT2 receptor mediated behaviour in the rat by oleamide and the role of cannabinoid receptors. *Neuropharmacology.* 1999 Apr;38(4):533-41.
- Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC, Hunt P. Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood.* 1995; 85: 402-13.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* 1996; 384(6604):83-7.
- Cravatt BF, Lichtman AH. The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *J Neurobiol.* 2004 Oct;61(1):149-60.

- Croxford JL, Yamamura T. Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J Neuroimmunol*. 2005; **66**(1-2):3-18. Review.
- Darmani NA. Delta(9)-tetrahydrocannabinol and synthetic cannabinoids prevent emesis produced by the cannabinoid CB(1) receptor antagonist/inverse agonist SR 141716A. *Neuropsychopharmacology*. 2001 Feb;**24**(2):198-203.
- De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, Kroemer G, Vainchenker W, Debili N. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*. 2002; **100**(4):1310-7.
- Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*. 2005 Aug 12;**122**(3):379-91.
- Deutsch VR, Olson TA, Nagler A, Slavin S, Levine RF & Eldor A. The response of cord blood megakaryocyte progenitors to IL-3, IL-6 and aplastic canine serum varies with gestational age. *British Journal of Haematology*. 1995; **89**: 8-16.
- Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol*. 2006; **134**(5):453-66.
- Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988; **5**:605-13.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992; **258**(5090):1946-9.
- Di Marzo V, Blumberg PM, Szallasi A. Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin Neurobiol*. 2002; **12**(4):372-9.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Sugiura T, Waku K. Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; **227**(1):281-8.
- Di Marzo V, De Petrocellis L. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012 Dec 5;**367**(1607):3216-28. Review.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 1994; **372**(6507):686-91.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járjai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*. 2001 Apr 12;**410**(6830):822-5.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*. 1998-b; **21**(12):521-8.
- Di Marzo V. 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta*. 1998-a; **1392**(2-3):153-75.
- Díaz-Alonso J, Aguado T, Wu CS, Palazuelos J, Hofmann C, Garcez P, Guillemot F, Lu HC, Lutz B, Guzmán M, Galve-Roperh I. The CB(1) cannabinoid receptor drives corticospinal motor neuron differentiation through the Ctip2/Satb2 transcriptional regulation axis. *J Neurosci*. 2012 Nov 21;**32**(47):16651-65.

- Díaz-Alonso J, Guzmán M, Galve-Roperh I. Endocannabinoids via CB₁ receptors act as neurogenic niche cues during cortical development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012 Dec 5;**367**(1607):3229-41.
- Ebbe S, Stohlman F. Megakaryocytopoiesis in the rat. *Blood.* 1965; **26**:20-34.
- Ebbe S. Biology of megakaryocytes. *Prog. Hemost. Thromb.* 1976; **3**:211-229.
- Eldor, A., Levine, R.F., Caine, Y.G., HyAm, E. & Vlodavsky, I. Megakaryocyte interaction with the subendothelial extracellular matrix. *Progress in Clinical and Biological Research.* 1986; **215**:399-404.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009 Mar;**9**(3):162-74.
- Galve-Roperh I, Chiurchiù V, Díaz-Alonso J, Bari M, Guzmán M, Maccarrone M. Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. *Prog Lipid Res.* 2013 Oct;**52**(4):633-50.
- Gandhi MJ, Drachman JG, Reems JA, Thorning D & Lannutti BJ. A novel strategy for generating platelet-like fragments from megakaryocytic cell lines and human progenitor cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 2005; **35**:70-73.
- Gasperi V, Fezza F, Pasquariello N, Bari M, Oddi S, Agrò AF, Maccarrone M. Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Jan;**64**(2):219-29.
- Geddis AE, Kaushansky K. Endomitotic megakaryocytes form a midzone in anaphase but have a deficiency in cleavage furrow formation. *Cell Cycle.* 2006 Mar;**5**(5):538-45.
- Geddis AE. Megakaryopoiesis. *Semin Hematol.* 2010 Jul;**47**(3):212-9. Review.
- Gerrard J, White J, Rao G, Townsend D. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *Am. J. Pathol.* 1976; **101**:353-364.
- Gewirtz, A.M. Megakaryocytopoiesis: the state of the art. *Thrombosis and Haemostasis.* 1995; **74**, 204-209.
- Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME. Playing with bone and fat. *J Cell Biochem.* 2006 May 15;**98**(2):251-66. Review.
- Godlewski G, Offertáler L, Wagner JA, Kunos G. Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009 Sep;**89**(3-4):105-11.
- Gomez O, Arevalo-Martin A, Garcia-Ovejero D, Ortega-Gutierrez S, Cisneros JA, Almazan G, Sánchez-Rodríguez MA, Molina-Holgado F, Molina-Holgado E. The constitutive production of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol participates in oligodendrocyte differentiation. *Glia.* 2010 Dec;**58**(16):1913-27.
- Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, Yamamoto S. Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett.* 1998; **422**(1):69-73.
- Graham ES, Angel CE, Schwarcz LE, Dunbar PR, Glass M. Detailed characterisation of CB₂ receptor protein expression in peripheral blood immune cells from healthy human volunteers using flow cytometry. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010 Jan-Mar;**23**(1):25-34.
- Greco R, Gasperi V, Maccarrone M, Tassorelli C. The endocannabinoid system and migraine. *Exp Neurol.* 2010; **224**(1):85-91. Review.
- Gurish MF, Austen KF. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity.* 2012 Jul 27;**37**(1):25-33.

- Hampson AJ, Bornheim LM, Scanziani M, Yost CS, Gray AT, Hansen BM, Leonoudakis DJ, Bickler PE. Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J Neurochem.* 1998 Feb;**70**(2):671-6.
- Han, Z.C., Bellucci, S. & Caen, J.P. Megakaryocytopoiesis: characterization and regulation in normal and pathologic states. *International Journal of Hematolog.* 1991; **54**:3-14.
- Handagama PJ, George M, Shuman R, McEver R, Bainton DF. Incorporation of circulating protein into megakaryocyte and platelet granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987; **84**:861-865.
- Harkany T, Guzmán M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA, Mackie K. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci.* 2007 Feb;**28**(2):83-92.
- Hartwig J, Italiano J Jr. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost.* 2003; **1**: 1580-6.
- Hébert TE, Bouvier M. Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. *Biochem Cell Biol.* 1998; **76**(1):1-11.
- Henijnen HF, et al. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha granules. *Blood.* 1998;**91**:2313-2325.
- Hermann A, Kaczocha M, Deutsch DG. 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) membrane transport: history and outlook. *AAPS J.* 2006; **8**(2):E409-12.
- Hoggatt J, Pelus LM. Eicosanoid regulation of hematopoiesis and hematopoietic stem and progenitor trafficking. *Leukemia.* 2010 Dec;**24**(12):1993-2002.
- Horstman LL, Jy W, Ahn YS, Zivadinov R, Maghzi AH, Etemadifar M, Steven Alexander J, Minagar A. Role of platelets in neuroinflammation: a wide-angle perspective. *J Neuroinflammation.* 2010; 7:10. Review.
- Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002; **68-69**:619-31.
- Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 2003; **9**(1):61-7.
- Idris AI, Sophocleous A, Landao-Bassonga E, Canals M, Milligan G, Baker D, van't Hof RJ, Ralston SH. Cannabinoid receptor type 1 protects against age-related osteoporosis by regulating osteoblast and adipocyte differentiation in marrow stromal cells. *Cell Metab.* 2009 Aug;**10**(2):139-47.
- Italiano JE Jr, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell. Biol.* 1999; **147**: 1299-312.
- Ivanovic, Z., Duchez, P., Dazey, B., Hermitte, F., Lamrissi-Garcia, I., Mazurier, F., Praloran, V., Reiffers, J., Vezon, G. & Boiron, J.M. A clinical-scale expansion of mobilized CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells by use of a new serum-free medium. *Transfusion.* 2006; **46**:126-131.
- Jiang S, Fu Y, Williams J, Wood J, Pandarinathan L, Avraham S, Makriyannis A, Avraham S, Avraham HK. Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells. *PLoS ONE.* 2007; **2**(7):e641.
- Jordà MA, Lowenberg B, Delwel R. The peripheral cannabinoid receptor Cb2, a novel oncoprotein, induces a reversible block in neutrophilic differentiation. *Blood.* 2003; **101**(4):1336-43.
- Jorda MA, Rayman N, Valk P, De Wee E, Delwel R. Identification, characterization, and function of a novel oncogene: the peripheral cannabinoid receptor Cb2. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; **996**:10-6.

- Jordà MA, Verbakel SE, Valk PJ, Vankan-Berkhoudt YV, Maccarrone M, Finazzi-Agrò A, Löwenberg B, Delwel R. Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Blood*. 2002 Apr 15;**99**(8):2786-93.
- Jung J, Lee SY, Hwang SW, Cho H, Shin J, Kang YS, Kim S, Oh U. Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem*. 2002; **277**(46):44448-54.
- Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE Jr, Shivdasani RA, von Andrian UH. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*. 2007 Sep 21;**317**(5845):1767-70.
- Karaliota S, Siafaka-Kapadai A, Gontinou C, Psarra K, Mavri-Vavayanni M. Anandamide increases the differentiation of rat adipocytes and causes PPARgamma and CB1 receptor upregulation. *Obesity (Silver Spring)*. 2009 Oct;**17**(10):1830-8.
- Katona I, Sperlách B, Sík A, Káfalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci*. 1999 Jun 1;**19**(11):4544-58.
- Kaushansky K, Drachman JG. The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Oncogene*. 2002; **21**:3359-3367.
- Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *New England Journal of Medicine*. 2006; **354**:2034-2045.
- Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*. 1995; **86**:419-431.
- Kaushansky, K The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *Journal of Clinical Investigation*. 2005a; **115**:3339-3347.
- Kaushansky, K. Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005b; **1044**:139-141.
- Kaushansky, K. Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003; **1**:1587-1592.
- Kile BT. The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death. *J Thromb Haemost*. 2009; **1**:214-7
- Kirito K, Kaushansky K. Transcriptional regulation of megakaryopoiesis: thrombopoietin signaling and nuclear factors. *Curr Opin Hematol*. 2006; **13**(3):151-6.
- Kunos G, Járαι Z, Bátkai S, Goparaju SK, Ishac EJ, Liu J, Wang L, Wagner JA. Endocannabinoids as cardiovascular modulators. *Chem Phys Lipids*. 2000; **108**(1-2):159-68.
- Kunos G, Osei-Hyiaman D, Bátkai S, Sharkey KA, Makriyannis A. Should peripheral CB(1) cannabinoid receptors be selectively targeted for therapeutic gain? *Trends Pharmacol Sci*. 2009; **30**(1):1-7. Review.
- Kuter DJ, Gminski DM & Rosenberg RD. Transforming growth factor beta inhibits megakaryocyte growth and endomitosis. *Blood*. 1992; **7**:619-626 .
- Lannutti BJ, Blake N, Gandhi MJ, Reems JA & Drachman JG. Induction of polyploidization in leukemic cell lines and primary bone marrow by Src kinase inhibitor SU6656. *Blood*. 2005; **105**:3875-3878.
- Leoncini G, Signorello MG, Segantin A, Giacobbe E, Armani U, Piana A, Camicione P. In retinal vein occlusion platelet response to thrombin is increased. *Thromb Res*. 2009; **124**(6):e48-55.

- Levine RF. Isolation and characterization of normal human megakaryocytes. *Br J Haematol.* 1980; **45**(3):487-97.
- Lindemann S, Krämer B, Seizer P, Gawaz M. Platelets, inflammation and atherosclerosis. *J Thromb Haemost.* 2007 ; 5 Suppl 1:203-11.
- Lok S, Foster DC. The structure, biology and potential therapeutic applications of recombinant thrombopoietin. *Stem Cells.* 1994; **12** (6):586-98.
- Lombard C, Hegde VL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Perinatal exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol triggers profound defects in T cell differentiation and function in fetal and postnatal stages of life, including decreased responsiveness to HIV antigens. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Nov;**339**(2):607-17.
- Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, Pavón FJ, Serrano AM, Selley DE, Parsons LH, Lichtman AH, Cravatt BF. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol.* 2009; **5**(1):37-44.
- Long M, Williams N, Ebbe S. Immature megakaryocytes in the mouse: physical characteristics, cell cycle status, and in vitro responsiveness to thrombopoietic stimulatory factor. *Blood.* 1982; **59**:569-575.
- Lordier L, Jalil A, Aurade F, Larbret F, Larghero J, Debili N, Vainchenker W, Chang Y. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood.* 2008 Oct 15;**112**(8):3164-74.
- Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A, Bernabò N, Gasperi V, Pistilli MG, Fezza F, Lucidi P, Mattioli M. Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J Cell Sci.* 2005 Oct 1;**118**(Pt 19):4393-404.
- Maccarrone M, Bari M, Del Principe D, Finazzi-Agrò A. Activation of human platelets by 2-arachidonoylglycerol is enhanced by serotonin. *Thromb Haemost.* 2003; **89**(2):340-7.
- Maccarrone M, Bari M, Menichelli A, Giuliani E, Del Principe D, Finazzi-Agrò A. Human platelets bind and degrade 2-arachidonoylglycerol, which activates these cells through a cannabinoid receptor. *Eur J Biochem.* 2001; **268**(3):819-25.
- Maccarrone M, Dainese E, Oddi S. Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem Sci.* 2010 Nov;**35**(11):601-8.
- Maccarrone M, Del Principe D, Finazzi-Agrò A. Endocannabinoids: new physiological (co-)agonists of human platelets. *Thromb Haemost.* 2002; **88**(1):165-6.
- Maccarrone M, Di Rienzo M, Battista N, Gasperi V, Guerrieri P, Rossi A, Finazzi-Agrò A. The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase. *J Biol Chem.* 2003 Sep 5;**278**(36):33896-903.
- Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem.* 2002 Feb;**80**(3):448-56.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature.* 2002 Aug 1;**418**(6897):530-4.
- Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V. Regulation, function, and dysregulation

- of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; **91**(8):3171-80.
- Matsuda LA. Molecular aspects of cannabinoid receptors. *Crit Rev Neurobiol.* 1997;**11**(2-3):143-66. Review.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995; **50**(1):83-90.
- Meng ID, Manning BH, Martin WJ, Fields HL. An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature.* 1998 Sep 24;**395**(6700):381-3.
- Molina-Holgado F, Rubio-Araiz A, García-Ovejero D, Williams RJ, Moore JD, Arévalo-Martín A, Gómez-Torres O, Molina-Holgado E. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur J Neurosci.* 2007; **25**(3): 629-634.
- Mori, M., Tsuchiyama, J. & Okada, S. Proliferation, migration and platelet release by megakaryocytes in long-term bone marrow culture in collagen gel. *Cell Structure and Function.* 1993; **18**:409-417.
- Mukhopadhyay S, Shim JY, Assi AA, Norford D, Howlett AC. CB(1) cannabinoid receptor-G protein association: a possible mechanism for differential signaling. *Chem Phys Lipids.* 2002; **121**(1-2):91-109.
- Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabás K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L, Monory K, Marsicano G, Di Marzo V, Hurd YL, Guillemot F, Mackie K, Lutz B, Guzmán M, Lu HC, Galve-Roperh I, Harkany T. Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jun 24;**105**(25):8760-5.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993; **365**(6441):61-5.
- Nagata N, Muro Y, Todokoro K. Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *J. Cell Biol.* 1997; **139**:449-457.
- Nakao K, Angrist A. Membrane surface specialization of blood platelet and megakaryocyte. *Nature.* 1968; **217**:960-961.
- Naylor K, Eastell R. Bone turnover markers: use in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2012 Jun 5;**8**(7):379-89
- Odell T, Jackson C, Friday T. Megakaryocytopoiesis in rats with special reference to polyploidy. *Blood.* 1970; **35**:775-782.
- Odell TT Jr, Jackson CW, Reiter RS. Generation cycle of rat megakaryocytes. *Exp. Cell Res.* 1968; **53**:321-328.
- Ofek O, Karsak M, Leclerc N, Fogel M, Frenkel B, Wright K, Tam J, Attar-Namdar M, Kram V, Shohami E, Mechoulam R, Zimmer A, Bab I. Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 17;**103**(3):696-701.
- Ogawa D. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 1993; **81**:2844-2853.
- Pacher P, Mukhopadhyay P, Mohanraj R, Godlewski G, Bátkai S, Kunos G. Modulation of the endocannabinoid system in cardiovascular disease: therapeutic potential and limitations. *Hypertension.* 2008; **52**(4):601-7.
- Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 2006 Nov;**20**(13):2405-7.

- Palazuelos J, Davoust N, Julien B, Hatterer E, Aguado T, Mechoulam R, Benito C, Romero J, Silva A, Guzmán M, Nataf S, Galve-Roperh I. The CB(2) cannabinoid receptor controls myeloid progenitor trafficking: involvement in the pathogenesis of an animal model of multiple sclerosis. *J Biol Chem*. 2008 May 9; **283**(19):13320-9.
- Paria BC, Dey SK. Ligand-receptor signaling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. *Chem Phys Lipids*. 2000 Nov; **108**(1-2):211-20. Review.
- Patel SR, Hartwig JH & Italiano JE. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *Journal of Clinical Investigation*. 2005; **115**:3348-3354.
- Patinkin D, Milman G, Breuer A, Fride E, Mechoulam R. Endocannabinoids as positive or negative factors in hematopoietic cell migration and differentiation. *Eur J Pharmacol*. 2008 Oct 24; **595**(1-3):1-6.
- Pertwee RG, Ross RA. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002; **66**:101-21.
- Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*. 2003; **4**(11):873-84.
- Prescott SM, Majerus PW. Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate. *J Biol Chem*. 1983; **258**(2):764-9.
- Radley JM, Scurfield G. The mechanism of platelet release. *Blood*. 1980; **56**: 996-9.
- Randall MD, Kendall DA, O'Sullivan S. The complexities of the cardiovascular actions of cannabinoids. *Br J Pharmacol*. 2004 May; **142**(1):20-6. Review.
- Randall MD. Endocannabinoids and the haematological system. *Br J Pharmacol*. 2007; **152**(5):671-5.
- Ravid K, Zimmet JM, Jones MR. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J. Cell. Physiol*. 2002; **190**:7-20.
- Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE Jr. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood*. 2005 Dec 15; **106**(13):4066-75.
- Roelandt T, Heughebaert C, Bredif S, Giddelo C, Baudouin C, Msika P, Roseeuw D, Uchida Y, Elias PM, Hachem JP. Cannabinoid receptors 1 and 2 oppositely regulate epidermal permeability barrier status and differentiation. *Exp Dermatol*. 2012 Sep; **21**(9):688-93.
- Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol*. 2003 Nov; **140**(5):790-801. Review.
- Salzet M, Breton C, Bisogno T, Di Marzo V. Comparative biology of the endocannabinoid system possible role in the immune response. *Eur J Biochem*. 2000 Aug; **267**(16):4917-27. Review.
- Schulze H, Korpál M, Hurov J, Kim SW, Zhang J, Cantley LC, Graf T, Shivdasani RA. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*. 2006 May 15; **107**(10):3868-75.
- Schulze H, Shivdasani RA. Mechanisms of thrombopoiesis. *J. Thromb Hemost*. 2005; **3**:1717-1724.
- Schulze H, Shivdasani RA. Molecular mechanisms of megakaryocyte differentiation. *Semin Thromb Hemost*. 2004; **30**(4):389-98.
- Sohma Y, Akahori H, Seki N, Hori T, Ogami K, Kato T, Shimada Y, Kawamura K, Miyazaki H. Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett*. 1994; **353**(1):57-61.
- Steinhuyl SR. Platelets as mediators of inflammation. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007; **21**(1):115-21.

- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 1997; **388** (6644):773-8.
- Straiker A, Hu SS, Long JZ, Arnold A, Wager-Miller J, Cravatt BF, Mackie K. Monoacylglycerol lipase limits the duration of endocannabinoid-mediated depolarization-induced suppression of excitation in autaptic hippocampal neurons. *Mol Pharmacol*. 2009; **76**(6):1220-7.
- Sugawara K, Bíró T, Tsuruta D, Tóth BI, Kromminga A, Zákány N, Zimmer A, Funk W, Gibbs BF, Zimmer A, Paus R. Endocannabinoids limit excessive mast cell maturation and activation in human skin. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Mar;**129**(3):726-738.
- Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Kishimoto S, Kondo S, Waku K. Detection of an endogenous cannabimimetic molecule, 2-arachidonoylglycerol, and cannabinoid CB1 receptor mRNA in human vascular cells: is 2-arachidonoylglycerol a possible vasomodulator? *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; **243**(3):838-43.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; **215**(1):89-97.
- Sugiura T, Oka S, Gokoh M, Kishimoto S, Waku K. New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: 2-arachidonoylglycerol as a possible novel mediator of inflammation. *J Pharmacol Sci*. 2004; **96**(4):367-75.
- Takeda S. Central control of bone remodelling. *J Neuroendocrinol*. 2008 Jun;**20**(6):802-7.
- Tam J, Ofek O, Fride E, Ledent C, Gabet Y, Müller R, Zimmer A, Mackie K, Mechoulam R, Shohami E, Bab I. Involvement of neuronal cannabinoid receptor CB1 in regulation of bone mass and bone remodeling. *Mol Pharmacol*. 2006 Sep;**70**(3):786-92.
- Tomer A, Harker LA & Burstein SA. Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes. *Blood*, 1988; **71**:1244-1252.
- Tomer A, Harker LA & Burstein SA. Purification of human megakaryocytes by fluorescence-activated cell sorting. *Blood*. 1987; **70**, 1735-1742.
- Ueda N, Tsuboi K, Uyama T, Ohnishi T. Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Biofactors*. 2011 Jan-Feb;**37**(1):1-7. Review.
- Ueda N, Tsuboi K, Uyama T. Metabolism of endocannabinoids and related N-acylethanolamines: canonical and alternative pathways. *FEBS J*. 2013 May;**280**(9):1874-94.
- Ueda N, Tsuboi K, Uyama T. N-acylethanolamine metabolism with special reference to N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *Prog Lipid Res*. 2010 Oct;**49**(4):299-315.
- Valk P, Verbakel S, Vankan Y, Hol S, Mancham S, Ploemacher R, Mayen A, Löwenberg B, Delwel R. Anandamide, a natural ligand for the peripheral cannabinoid receptor is a novel synergistic growth factor for hematopoietic cells. *Blood*. 1997; **90**(4):1448-57.
- Von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2007; **100**(1):27-40.
- Wallace MJ, Martin BR, DeLorenzo RJ. Evidence for a physiological role of endocannabinoids in the modulation of seizure threshold and severity. *Eur J Pharmacol*. 2002 Oct 11;**452**(3):295-301.
- Wang H, Guo Y, Wang D, Kingsley PJ, Marnett LJ, Das SK, DuBois RN, Dey SK. Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos. *Nat Med*. 2004 Oct;**10**(10):1074-80.

Watson S, Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A. The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Mol Cell Neurosci*. 2008 May;**38**(1):89-97.

Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*. 2001 Nov30;**294**(5548):1933-6.

Xie XQ, Chen JZ, Billings EM. 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor. *Proteins*. 2003; **53**(2):307-19.

Yamada F. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat. (Basel)*. 1957; **29**:267-290.
Zauli G, & Catani L. Human megakaryocyte biology and pathophysiology. *Critical Reviews in Oncology/hematology*. 1995; **21**:135-157.

Ziegelstein RC, Parakh K, Sakhuja A, Bhat U. Platelet function in patients with major depression. *Intern Med J*. 2009; **39**(1):38-43.

Zucker-Franklin D, & Petursson S. Thrombocytopoiesis – Analysis by membrane tracer and freeze-fracture studies on fresh human and cultured mouse megakaryocytes. *Journal of Cell Biology*. 1984; **99**:390-402.

***RUOLO DI ORMONI E FITOESTROGENI
SULLA FUNZIONALITA' PIASTRINICA***

INTRODUZIONE

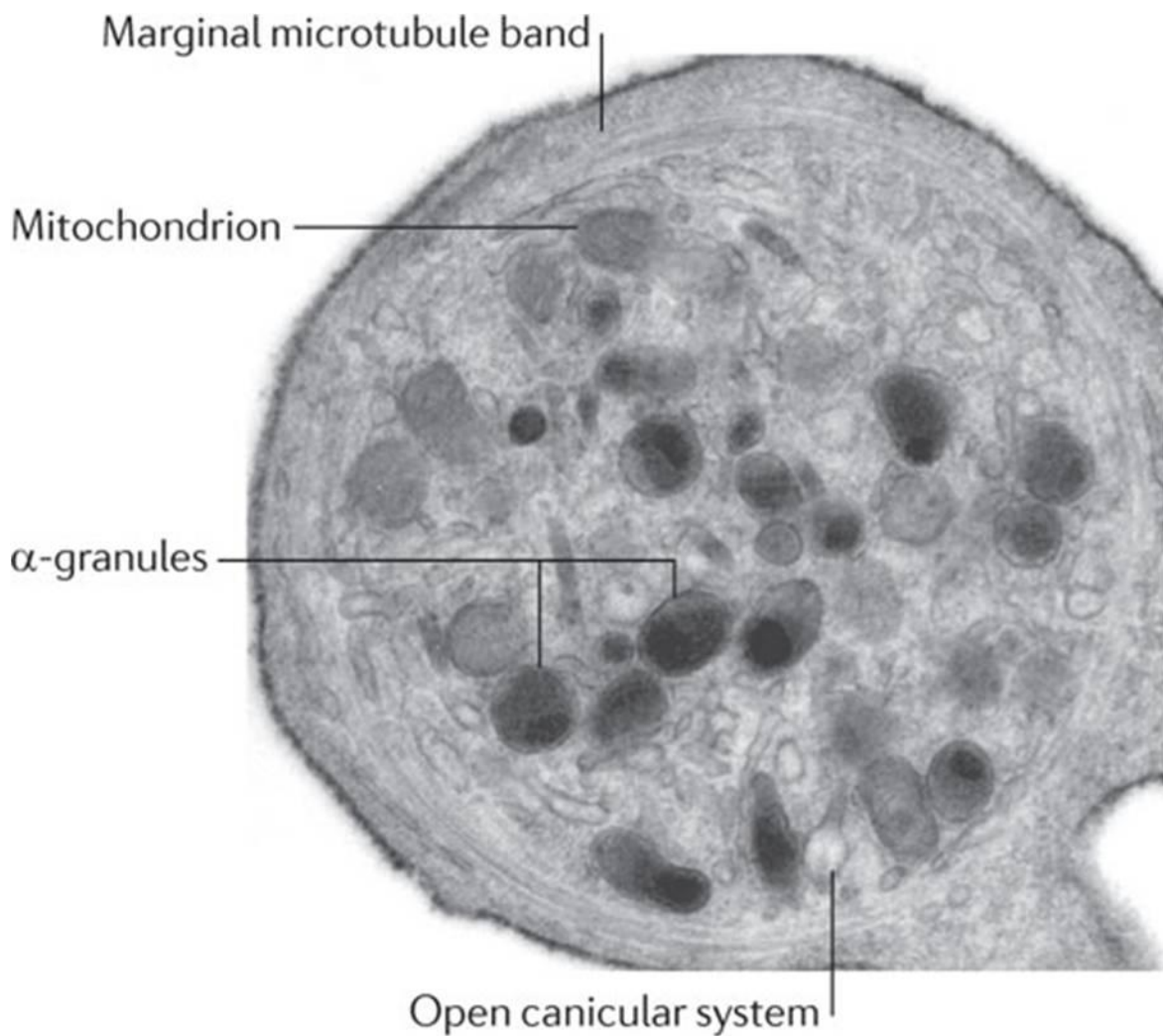
Piastrine

Le piastrine sono piccoli, rotondi frammenti anucleati, con un diametro di circa 3 μm derivanti dalla frammentazione del citoplasma dei megacariociti, grandi cellule presenti nel midollo osseo (*Radley & Scurfield, 1980*). Negli adulti il numero di piastrine circolanti è di $2.5-3.5 \times 10^5$ cells/ μl e hanno un'emivita di 7/10 giorni. Nonostante le piastrine siano i più piccoli elementi corpuscolati del sangue e manchino di nucleo, possiedono una complessa funzionalità e un complesso metabolismo simile a molte cellule nucleate del sangue. La loro funzione primaria è quella di prevenire emorragie a seguito di un danno vascolare aderendo al sottoendotelio esposto e formando un aggregato esattamente nel sito del danno. Inoltre hanno un ruolo nell'emostasi primaria, nella coagulazione, nell'infiammazione e nella guarigione delle ferite (*Bouchard & Tracy, 2001*).

Struttura Delle Piastrine

La struttura delle piastrine è estremamente complessa, in modo tale che si attivino soltanto in risposta a stimoli precisi e ben determinati. Hanno una forma discoidale piatta, interrotta solo da invaginazioni facenti parte del "sistema canalicolare aperto" (OCS), la cui funzione è quella di permettere gli scambi tra l'esterno e il citoplasma della piastrina. Il sistema canalicolare aperto infatti è un complesso sistema di condotti interni che fungono da passaggio dall'esterno verso l'interno della piastrina; inoltre funziona come serbatoio di recettori di membrana, proteine e membrane plasmatiche necessarie per lo *spreading* della cellula. La membrana plasmatica delle piastrine presenta una asimmetrica distribuzione

dei fosfolipidi: sfingomieline e fosfatidilcolina sono abbondanti nel foglietto esterno mentre fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina sono confinate verso il lato citoplasmatico dove possono diventare substrati per le fosfolipasi (*Blockmans et al., 1995*). Le proteine di membrana possono essere totalmente o parzialmente inserite all'interno dello strato lipidico e alcune di esse sono legate covalentemente a catene di carboidrati a formare il cosiddetto "glicocalice". Questa struttura dinamica serve come punto di primo contatto, essendo in grado di captare i cambiamenti all'interno del comparto vascolare, cambiamenti che richiedono l'attivazione della risposta emostatica delle piastrine al sito di danno vascolare. Il glicocalice infatti è ricoperto di recettori necessari a facilitare l'adesione della piastrina alla superficie danneggiata, ad innescare la completa attivazione piastrinica e la successiva aggregazione, l'interazione con altri elementi cellulari, e per accelerare il processo di retrazione del coagulo (*Okumura & Jamieson, 1976*).



Seiple et al, Nature Reviews Immunology, 2011

Figura 20: PIASTRINA. Sezione di piastrina a riposo in cui è visibile l'organizzazione subcellulare mediante microscopia elettronica.

Segmenti di glicoproteine transmembrana, ricchi di residui idrofobici, ancorano le proteine al doppio strato lipidico. Molti di questi segmenti presentano un corto dominio citoplasmatico C-terminale che, in alcuni casi, può creare legami transienti o permanenti con le proteine del citoscheletro che è contrapposto al foglietto interno del doppio strato lipidico. Le interazioni tra le glicoproteine di membrana e le proteine del citoscheletro

potrebbero limitare i movimenti di altri costituenti all'interno del doppio strato lipidico e potrebbero essere importanti nel mantenimento della forma piastrinica nello stato inattivo (*Blockmans et al., 1995*).

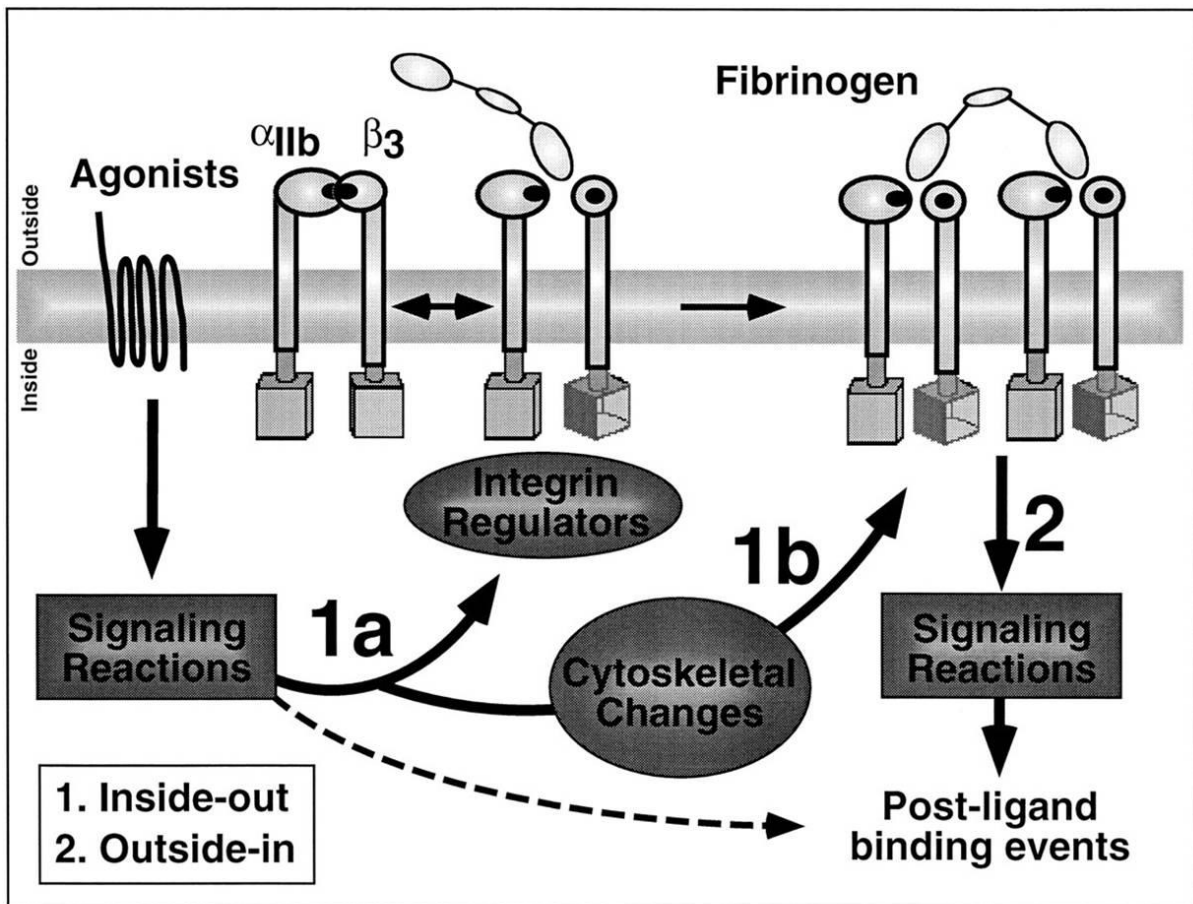
Piastrine: integrine ed immunorecettori

Integrine

Le integrine sono una famiglia di proteine eterodimeriche composte da subunità α e β legate in maniera non covalente. Ogni subunità è composta da un dominio extracellulare, un dominio transmembrana singolo e un corto dominio citoplasmatico di circa 40-70 amminoacidi (*Hynes, 2002*). Le piastrine esprimono cinque integrine: α IIb β 3, α V β 3, α 2 β 1, α 5 β 1 e α 6 β 1. Queste sono assemblate durante la sintesi nei megacariociti in modo da formare subunità costituite da una pesante catena extracellulare legata alla membrana e una catena leggera intracellulare (*Hynes, 2002*). Sia la porzione dell'integrina β 3 che l'integrina α 5 β 1 coinvolgono ligandi della matrice extracellulare che contengono il canonico motivo Arg-Gly-Asp, RGD. Il legame tra le integrine e i loro ligandi è regolato da un cambiamento recettoriale che passa da uno stato a bassa affinità ad uno stato di alta affinità per il ligando innescando il processo cellulare conosciuto come segnale "*inside-out signalling*". Inoltre, il legame con i ligandi della matrice extracellulare può essere promosso attraverso la formazione di cluster o l'oligomerizzazione delle integrine (*Carman & Springer, 2003*). Il legame tra il ligando e l'integrina specifica innesca un altro processo cellulare, definito "*outside-in signalling*", una serie di segnali che cooperano con quelli derivanti dal legame con le integrine o con i recettori accoppiati alle proteine G e che

induce risposte come la polimerizzazione dell'actina e la riorganizzazione del citoscheletro.

L'integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ è la più abbondante integrina espressa sulla superficie delle piastrine, e presenta un ulteriore pool di riserva che può essere reclutato a seguito dell'attivazione piastrinica dal sistema canalicolare aperto e dal contenuto degli α -granuli (*Shattil et al.*, 1985). L' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ può legare diversi domini RGD come fibrinogeno, fattore di von Willebrand (vWF), vitronectina, fibronectina e trombospondina. Questa integrina è necessaria per l'aggregazione piastrinica, per il cambio di forma delle piastrine e per la retrazione del coagulo. Gli aggregati piastrinici infatti sono formati da legami tra integrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ presenti su piastrine adiacenti che possono legare molecole di fibrinogeno solubile a basso gradiente di velocità o vWF ad alto gradiente di velocità (*Savage et al.*, 1998). Inoltre, in condizioni di danno più importanti, il vWF può legare il suo recettore alternativo, GPIb-IX-V, che può essere sufficiente per sostenere un'aggregazione piastrinica indipendente da un'attivazione indotta da segnali precisi (*Ruggeri et al.*, 2006). In piastrine non stimolate, l'integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, ma anche le altre integrine, è presente in uno stato di bassa affinità e non è in grado di legare ligandi solubili. Agonisti solubili come la trombina, il trombossano A2 o l'adenosina difosfato possono dare inizio al segnalazione "inside-out" attraverso recettori a sette domini transmembrana legati a proteine G, mentre mobilizzano agonisti come il vWF o il collagene; il processo inizia con l'interazione con il recettore GPIb-IX-V o i recettori per il collagene, il GPVI o l' $\alpha\text{2}\beta\text{1}$. Il segnale "inside-out" è Ca^{2+} -dipendente e implica un cambiamento conformazionale sia nella regione extracellulare deputata al legame con il recettore sia nelle code citoplasmatiche dei recettori coinvolti.



Shattil et al, Blood, 1998

Figura 21: ATTIVAZIONE DELLE INTEGRINE. segnalazione Inside-out ed Outside-in

Il legame all'integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ stimola il processo cellulare chiamato "outside-in signalling", che promuove l'adesione piastrinica alla matrice extracellulare e il cambio di forma delle piastrine, la retrazione del coagulo di fibrina, lo sviluppo dell'attività procoagulante delle piastrine e la generazione di microparticelle in risposta ad una serie di stimoli, come quelli indotti dallo stimolo con collagene e trombina. Uno dei primi passaggi di questo processo coinvolge l'oligomerizzazione dei recettori e una complessa regolazione ad opera di tirosin-chinasi e fosfatasi per attivare le chinasi della famiglia Src, come c-Src e Syk (De Virgilio et al., 2004). Queste reazioni portano alla formazione di un complesso composto da

enzimi addizionali, molecole adattatrici e substrati, come la fosfolipasi C, proteine adattatrici responsabili dell'adesione e della degranulazione, NcK e cdc42, che promuove la polimerizzazione dell'actina e la riorganizzazione del citoscheletro.

Recettori

Gli immunorecettori sono essenziali in tutti i tipi di cellule ematopoietiche, incluse le piastrine. La loro segnalazione avviene grazie ad una fosforilazione in tirosina nel dominio intracellulare; il recettore attivo agisce attraverso delle sequenze ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) che vengono fosforilate dalle chinasi della famiglia Src durante la segnalazione indotta dal recettore (*Reth, 1989; Gibbins et al., 1996*). Una volta fosforilate, queste sequenze legano i domini SH2 delle tirosin-chinasi intracellulari, come Syk, attivando la segnalazione a valle del legame. Queste vie di segnalazione spesso sono bilanciate da recettori di tipo inibitorio che legano sequenze ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*), che legano i domini SH2 di fosfatasi a valle della segnalazione. Le sequenze ITAM e ITIM sono parte integrante del recettore e sono localizzate nel dominio intracellulare.

Uno degli immunorecettori più importanti all'interno delle piastrine è il recettore GPVI, che è espresso esclusivamente nelle piastrine e nei megacariociti maturi, dove è associato alla proteina transmembrana adattatrice Fc γ R (Fragment crystallizable γ receptor) contenente le sequenze ITAM. Il recettore GPVI- Fc γ R è l'unico recettore per il collagene in grado di attivare le piastrine: quando le piastrine circolanti giungono a contatto con il collagene sottoendoteliale a seguito di un danno vasale, il GPVI- Fc γ R è il recettore che genera il primo segnale da parte del collagene (*Chen & Kahn., 2003*). Sebbene sia noto che

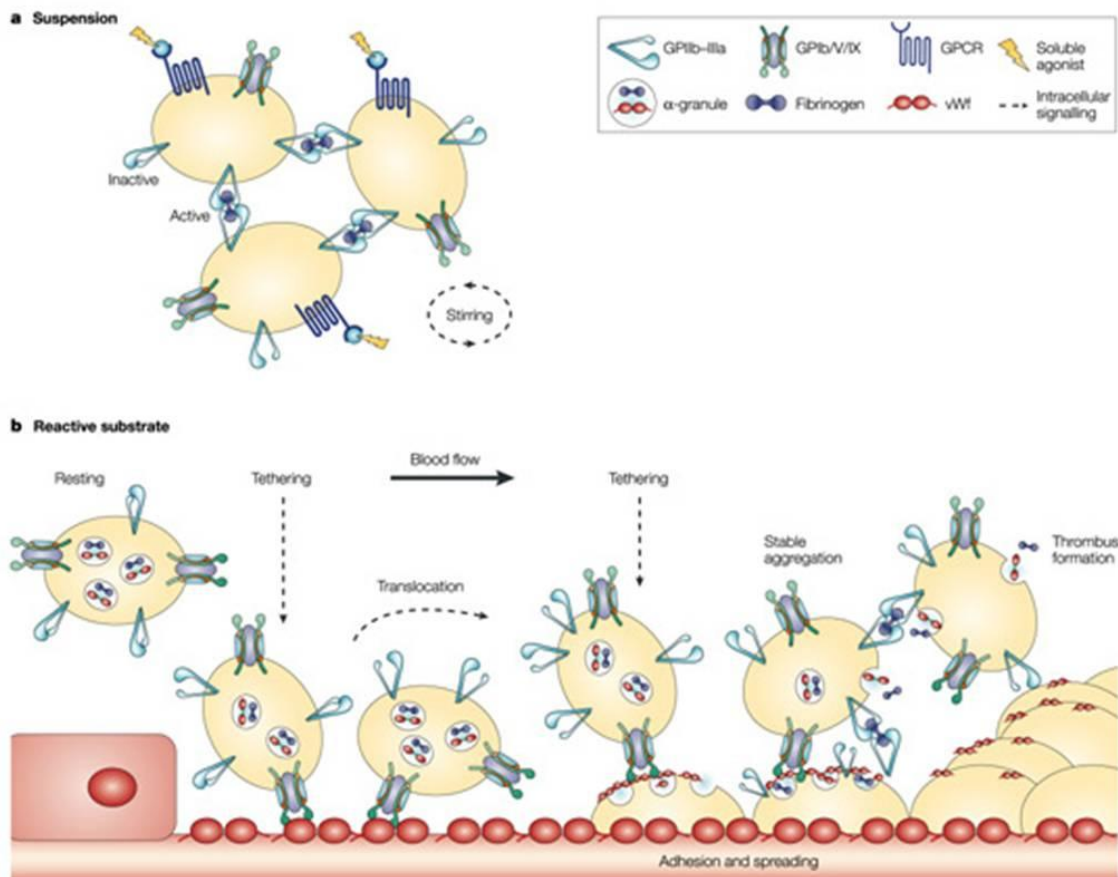
la stimolazione ad opera del collagene può indurre il legame con il fibrinogeno (*Lecut et al., 2004*), è spesso difficoltoso discriminare le risposte innescate attraverso il GPVI e il $\alpha 2\beta 1$.

Le sequenze ITAM legate alla proteina Fc γ R di recettori clusterizzati vengono fosforilati da chinasi della famiglia Src e di conseguenza legano e attivano la chinasi Syk, che guida la segnalazione a valle attraverso la fosforilazione di un certo numero di substrati, tra cui le proteine adattatrici SLP-76 e LAT e per ultimo attiva la fosfolipasi $\gamma 2$. La stimolazione del GPVI- Fc γ R amplifica l'attivazione piastrinica inducendo il rilascio del contenuto dei granuli densi e la generazione di nuovo trombossano A₂.

Un altro importante recettore coinvolto nei processi di aggregazione piastrinica è il complesso GPIb-IX-V, composto da quattro proteine transmembrana: il GPIb α e GPIb β sono legati in maniera non covalente con il GPIX e il GPV in rapporto 2:2:2:1 (*Lopez & Dong, 1997*). Questo complesso glicoproteico rappresenta il secondo recettore maggiormente espresso sulla superficie piastrinica dopo l' α IIb β 3. Il ligando preferenziale per il GPIb-IX-V è il vWF contenuto nella parete vasale: questa interazione è importante per il rallentamento delle piastrine circolanti consentendo così la formazione dei trombi (*Savage et al., 1998*). L'attivazione piastrinica indotta dal GPIb-IX-V è analoga a quella indotta dal GPVI, ovvero attraverso le sequenze ITAM (*Kasiker-Friede et al., 2004*).

Attivazione ed aggregazione piastrinica

Le piastrine giocano un ruolo essenziale nella prima parte del processo emostatico. Quando un vaso viene danneggiato, vengono esposti i componenti del sottoendotelio che entrano in contatto con gli elementi del sangue. Quando le piastrine giungono a contatto con una superficie danneggiata vanno incontro ad un rapido cambio di forma da discoide a sferica, con delle lunghe e fini ramificazioni, aderiscono al sottoendotelio e si appiattiscono.



Jackson & Schoenwaelder, Nature Rev Drug Discovery, 2003

Figura 22: ATTIVAZIONE ED AGGREGAZIONE PIASTRINICA.

Le strutture sottoendoteliali a cui le piastrine aderiscono attraverso i loro specifici recettori sono il collagene, il fibrinogeno, la fibronectina, e il vWF. Quando la velocità del torrente circolatorio è elevata, l'adesione piastrinica è dipendente in gran parte vWF, che interagisce con il GPIb-IX-V presente sulle proteine. Questa interazione porta all'attivazione delle piastrine e alla generazione del segnale intracellulare piastrinico necessario ad attivare l'integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ che porta all'adesione irreversibile delle piastrine e alla conseguente aggregazione.

A seguito dell'adesione alla superficie del sottoendotelio, le piastrine vanno incontro ad un fenomeno noto come "*spreading*": durante questo processo, le piastrine rilasciano il contenuto degli α -granuli e dei granuli densi, e in parte enzimi dai lisosomi. La secrezione permette il rilascio in circolo di molecole che contribuiscono alla formazione del coagulo e successivamente alla dissoluzione dell'aggregato di piastrine e fibrina. Il rilascio del contenuto dei granuli piastrinici avviene a seguito della fusione delle membrane dei granuli con la membrana plasmatica o con le membrane che sono in connessione con il sistema canalicolare aperto. Le forze necessarie per la secrezione dei granuli sono generate dall'interazione dei filamenti di actina con la miosina e dalla contrazione dei microtubuli che circondano la cellula.

Molte delle piastrine che giungono al sito di danno vascolare non aderiscono direttamente al sottoendotelio, ma si legano le une alle altre, dando origine all'aggregato piastrinico. Questo fenomeno può essere innescato da diversi agonisti fisiologici, ADP e trombina i più importanti, ma anche da trombossano A_2 , epinefrina, e il fattore di attivazione piastrinica 1 (PAF1). A basse concentrazioni queste potenti molecole possono causare un tipo di aggregazione definita reversibile, mentre se usati ad elevate concentrazioni

causano aggregazioni irreversibili associate alla sintesi e al rilascio di prostaglandine. La stessa reazione di aggregazione causa la sintesi di nuovo trombossano A_2 (*Blockmans et al.*, 1995).

Le piastrine possono anche partecipare al processo di retrazione del coagulo, un meccanismo necessario per prevenire una eccessiva stenosi dei vasi sanguigni che possono causare eventi ischemici e trombotici. L'apparato contrattile actomiosinico delle piastrine è la via attraverso cui avviene la retrazione dell'integrina $\alpha IIb\beta 3$, che internamente è legata all'actina ed esternamente alla fibrina tra le piastrine aggregate. Attraverso l'interazione tra i filamenti di actina e le teste miosiniche, le piastrine vengono ritratte e con esse tutto il coagulo.

Segnalazione Piastrinica

Attivazione piastrinica

Molti agonisti fisiologici contribuiscono all'attivazione piastrinica e alle multiple vie di segnalazione che innescano cambiamenti biochimici, morfologici e funzionali che portano ad una aggregazione di tipo irreversibile. Queste vie di segnalazione coinvolgono una serie di fattori tra cui attivazione del metabolismo dei fosfolipidi di membrana, la mobilizzazione del calcio intracellulare, la fosforilazione di specifiche proteine su diversi residui, la traslocazione di diverse proteine e non ultima la modulazione delle integrine (*Jackson*, 1996). Proteine G, fosfolipasi C (PLC) e A_2 (PLA₂), e la fosfatidilinositolo-3 chinasi giocano un ruolo chiave in tutte le vie di segnalazione piastrinica.

Le proteine G eterotrimeriche sono legate a diversi recettori e sono composte da tre diverse subunità, α , β e γ (*Blockmans et al.*, 1995). Le piastrine esprimono 10 diverse proteine G_{α} , divise in diverse famiglie: la famiglia delle proteine G_i (G_{i1a} , G_{i2a} , G_{i3a} e G_{za}), che con la loro attivazione regolano i livelli di cAMP, la famiglia G_q (G_{q_a} e G_{16a}), potente attivatore della PLC, la famiglia G_{12} (G_{12a} e G_{13a}) e la proteina G_s (*Gilman*, 1987).

La PLC è coinvolta nelle risposte primarie a diversi agonisti ed ha un ruolo nella secrezione. In particolare esistono diversi tipi di PLC: PLC β , è attivata dalla proteina G_{q_a} e dai dimeri $\beta\gamma$ delle proteine G_i , mentre la PLC γ è attivata dalla fosforilazione delle sequenze ITAM mediata da diverse tirosin chinasi come Src e Syk. Queste fosfolipasi sono implicate nell'idrolisi di fosfatidilinositoli di membrana (PIP_2) in secondi messaggeri come l'inositolo trifosfato (IP_3), che consente la mobilitazione del Ca^{2+} intracellulare, il quale innesca la secrezione dai granuli e il rilascio di ADP e serotonina in grado di potenziare l'attivazione piastrinica, e diacilglicerolo (DAG), che attiva la proteina chinasi C (PKC), che contribuisce alla fosforilazione proteica, alla secrezione dei granuli e all'esposizione dei recettori (*Blockmans et al.*, 1995).

La PLA $_2$ è coinvolta nella via di segnalazione dell'acido arachidonico: durante l'attivazione piastrinica, questa fosfolipasi agisce sui fosfolipidi di membrana rilasciando appunto acido arachidonico, che, viene rapidamente metabolizzato in diversi prodotti biologicamente attivi ad opera di ciclossigenasi e lipossigenasi. In particolare nelle piastrine umane le ciclossigenasi convertono l'acido arachidonico in prostaglandine attive che vengono convertite in trombano A $_2$.

La PI3-K (fosfatidilinositolo-3 chinasi) appartiene ad una famiglia di chinasi che agiscono sui fosfatidilinositoli. Le piastrine umane ne esprimono due isoforme, chiamate Ia e Ib,

composte da una subunità regolatoria adattatrice (p85) e una subunità catalitica (p110) (Zhang *et al.*, 1998). L'attivazione della PI3-K avviene ad opera di diversi agonisti piastrinici come la trombina, l'ADP e il trombossano: questa attivazione è essenziale e necessaria per differenti cambi fisiologici all'interno delle piastrine, come risposte proliferative a fattori di crescita, eventi antiapoptotici, attivazione delle integrine e riarrangiamento del citoscheletro; tutte queste risposte avvengono a causa della presenza dei prodotti di questa chinasi nella parte interna della membrana plasmatica, che può attivare la PLC γ o la via mediata da Akt, che gioca diversi ruoli nell'attivazione piastrinica.

Un ruolo importante nella regolazione dell'attività piastrinica è giocato dalla famiglia delle tirosin chinasi. Queste sono divise in due gruppi: quelle facenti parte della famiglia dei recettori transmembrana ed il gruppo dei recettori non citosolici. Nel primo gruppo sono inclusi recettori per fattori di crescita solubili ed ormoni, mentre nel secondo vi fanno parte chinasi come Src, Csk, Syk e Fak. Queste ultime sono molto abbondanti nelle piastrine dove appunto hanno un ruolo fondamentale nella loro attivazione. In letteratura infatti è riportato che un'inibizione delle tirosin chinasi è in grado di diminuire le risposte dalle piastrine mentre un'inibizione delle fosfatasi aumenta i livelli di fosforilazione all'interno delle cellule promuovendo così l'attivazione piastrinica (Jackson *et al.*, 1996). Nelle piastrine a riposo, solo un piccolo numero di proteine sono fosforilate in tirosina, mentre nelle piastrine stimolate con diversi agonisti aumenta il numero di fosforilazioni in numerose proteine, suggerendo così che questo processo rappresenta una caratteristica fondamentale per l'attivazione piastrinica. Questo processo di fosforilazione è un processo dinamico regolato sia da chinasi che da fosfatasi, soprattutto queste ultime giocano un

ruolo maggiore nel mantenere bassi i livelli di fosfotirosine nelle piastrine a riposo prevenendo così una prematura attivazione piastrinica.

Chinasi della famiglia Src. I membri di questa famiglia espressi nelle piastrine sono Fyn, Lyn, Yes e c-Src. Queste chinasi sono composte da una porzione N-terminale che presenta un sito di miristoilazione, un sito catalitico, una porzione carbossi-terminale, un dominio SH2 e un dominio SH3, importanti per la regolazione delle interazioni tra proteine intra- ed extra-cellulari. Quando proteine specifiche legano questi residui, la struttura di Src va incontro ad un cambiamento conformazionale che porta ad attivazione della chinasi, che così è in grado di fosforilare proteine del citoscheletro. Questi domini, insieme alla sequenza di miristoilazione sono essenziali per l'adesione e per promuovere lo spreading delle piastrine.

Tirosina chinasi Pyk2. Questa chinasi, composta da un dominio catalitico, da un abbondante dominio N-terminale e da un dominio C-terminale che contiene residui necessari per l'interazione con proteine contenenti domini SH3. È noto dalla letteratura che la stimolazione delle piastrine con diversi agonisti come trombina o collagene induce una fosforilazione di Pyk2 nelle prime fasi dell'attivazione piastrinica, in maniera indipendente dalla integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Pyk2 gioca inoltre un ruolo nella trasduzione del segnale attivato dal legame del vWF con il complesso GPIb-IX-V (Canobbio et al., 2002).

Chinasi della famiglia MAP. Le chinasi di questa famiglia sono in grado di convertire gli stimoli ricevuti dall'ambiente extracellulare in segnali intracellulari che sono in grado di controllare l'espressione genica, la proliferazione e il differenziamento. Vi sono tre classi in cui le chinasi della famiglia MAP vengono divise: classe delle chinasi ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), la classe delle chinasi JNK/SAPK (*c-Jun N-terminal or Stress activated*

kinase) e la classe composta dalla p38 MAP chinasi (Lopez-Illasaca, 1998). Le chinasi Map vengono attivate dalle MAP chinasi chinasi (MEK) attraverso una doppia fosforilazione su residui conservati presenti nelle sequenze TXY (T treonina, X qualsiasi amminoacido, Y tirosina). Nelle piastrine sono stati descritti tre metodi che possono portare all'attivazione delle MAP chinasi: due sono conseguenza dell'immediata attivazione di recettori collegati a proteine G, il primo derivante da un'attivazione Ca²⁺-dipendente della chinasi Pyk2, il secondo da un'attivazione di Shc dipendente dalla PI3K γ . Il terzo metodo è una conseguenza indiretta dell'attivazione recettoriale in quanto è il risultato della segnalazione "outside-in" che si innesca a seguito del coinvolgimento delle integrine (Lopez-Illasaca, 1998).

Inibizione piastrinica

Una eventuale prematura attivazione piastrinica viene bloccata da processi biochimici che vanno ad attenuare le risposte in seguito ad uno stimolo. I più potenti meccanismi di inibizione delle piastrine sono quelli derivanti dall'aumento dei livelli intracellulari di cAMP e di cGMP; questi livelli sono up-regolati attraverso la sintesi di questi stessi composti ad opera delle adenilato (AC) e guanilato ciclasti (GC) e down-regolati mediante la loro degradazione da parte delle fosfodiesterasi. L'adenilato ciclasti è una glicoproteina integrale di membrana che catalizza la sintesi del cAMP a partire da ATP; nelle piastrine viene stimolata dalla porzione α delle proteine G stimolatorie (G_{as}) e fortemente inibite dalla porzione α delle proteine G di tipo inibitorio (G_{ai}) (Offermans, 2000). Il legame delle prostaglandine con i loro recettori, accoppiati a proteine G_s provoca la formazione di cAMP, così come l'adenosina e agenti α -adrenergici. Molecole invece come trombina,

epinefrina o ADP inducono proteine $G_{\alpha i}$ provocando così la down-regolazione dei livelli di cAMP. Le guanilato ciclastasi esistono sia in forma solubile che legata alla membrana, nelle piastrine esiste solo la forma solubile, localizzata a livello del citoplasma.

Le chinasi che dipendono dai nucleotidi ciclici, come la PKA e la PKG, sono i maggiori mediatori degli effetti indotti dalla formazione dei tali fattori. Rispetto ad altre cellule, le piastrine umane presentano elevati livelli di entrambe le chinasi (*Eigenthaler, 1992*): l'attivazione di queste chinasi nelle piastrine porta alla fosforilazione di un elevato numero di proteine. Nelle piastrine uno dei substrati più importanti della PKA e della PKG è la proteina VASP (*cytoskeleton-associated vasodilator-stimulated phosphoprotein*), presente qui in elevate concentrazioni (*Eigenthaler, 1992*), ma presente anche in altri tipi cellulari a livello delle adesioni focali e a livello del punto di contatto cellula-cellula (*Reinhard et al, 2001*). VASP gioca un ruolo principale nel controllo dell'organizzazione del citoscheletro in quanto regola il dinamismo dell'actina (*Laurent et al, 1999*). Questa proteina contiene tre siti di fosforilazione: a livello della Serina 157, fosforilata preferenzialmente dalla PKA, a livello della Serina 239, bersaglio della fosforilazione della PKG, e a livello della Treonina 278. Nelle piastrine, la fosforilazione a livello della Serina 157 causa un cambiamento di peso molecolare apparente della proteina, che passa da 46 a 50 kDa, visibile mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide; questo cambiamento è strettamente correlato all'inibizione del recettore per il fibrinogeno (*Horstrup et al, 1994*). La partecipazione di questa proteina nei processi di riorganizzazione del citoscheletro e la sua fosforilazione indotta da antagonisti piastrinici stanno ad indicare un suo ruolo importante nella regolazione dell'inibizione delle piastrine. VASP non è però l'unico substrato delle PKA e PKG nel citoscheletro piastrinico: è stato riportato che agiscono su altre proteine come la glicoproteina $Ib\beta$ (*Wardell et al, 1998*) e Rap1b (*Siess et al, 1990*).

Diversi studi hanno mostrato che un aumento dei livelli di cAMP e cGMP causano inibizione del rilascio del calcio citosolico e la secrezione piastrinica, ma anche inibizione dell'attività della PKC (*Ryningen et al, 1998*). Tuttavia, nelle piastrine umane la PKA e la PKG fosforilano direttamente i recettori per l'IP3, mediando il rilascio del calcio dal sistema tubulare denso (*Cavallini et al, 1996*).

Flavonoidi

I flavonoidi sono noti fin dal 1936, quando per la prima volta venne pubblicato uno studio in cui si parlava della loro attività biologica e dove vennero proposti come vitamine (*Rusznjak & Szent-Gyorgyi, 1936*).

Essi appartengono ad un gruppo di composti polifenolici largamente presenti in alimenti di origine vegetale. Strutturalmente sono composti da due anelli aromatici legati da tre atomi di carbonio (*Croft, 1998*) e possono essere divisi in sei classi in base alle variazioni dell'anello eterociclico aromatico: flavoni, flavonoli, flavononi, catechine, antocianidine e isoflavoni (*Bravo, 1998*).

I flavonoidi sono oggetto di studio in quanto sono stati osservati degli effetti biologici *in vitro*: è stato infatti riportato che possono avere effetti antiossidanti, antiestrogenici e attività antiproliferativa, che possono così spiegare il loro potenziale nel ridurre l'insorgenza di malattie cardiovascolari e del cancro. Diversi studi condotti *in vitro* hanno dimostrato un loro ruolo nell'inibire la proliferazione e trasformazione cellulare: è stato visto che i flavonoidi sono in grado di inibire la trasformazione neoplastica di fibroblasti

murini (*Franke et al, 1998*) e che hanno effetti antiproliferativi in assenza di citotossicità cellulare in due linee tumorali umane (*Kuntz et al, 1999*).

È stato anche riportato che i flavonoidi presentano una potente attività estrogenica, infatti sono dei composti che strutturalmente o funzionalmente mimano gli effetti degli estrogeni presenti nei mammiferi (*Cos et al, 2003*). Sono inoltre conosciuti per avere effetti benefici sulla salute, specialmente contro il cancro, l'osteoporosi, la sindrome da menopausa irregolare, malattie cardiovascolari e malattie neurodegenerative (*Knight & Eden, 1996*).

8-Prenilnaringenina

8-Prenilnaringenina (8-PN) appartiene al gruppo dei flavononi prenilati, gruppo che include la 6- prenilnaringenina, che può essere ritrovata nella birra in concentrazioni di 0.24 mg/l (*Rong et al, 2001*). La birra viene prodotta a partire dalla pianta del luppolo (*Humulus Lupulus*); l'infiorescenza femminile, il cono del luppolo, è ricco in composti polifenolici che sono ampiamente usati come agenti conservanti ed aromatizzanti durante la produzione della birra. Inoltre i coni del luppolo sono stati a lungo utilizzati per scopi medici, ad esempio per il trattamento dei disordini legati al sonno o per l'attivazione delle funzioni gastriche (*Dixon, 2004*).

Negli ultimi venti anni diversi studi sono stati condotti per investigare la composizione dei coni del luppolo e di altre parti della pianta, al fine di isolare e identificare composti farmacologicamente rilevanti come i flavonoidi, a cui l'8-PN appartiene. Molti studi hanno identificato questa molecola come la più potente tra i fitoestrogeni presenti nel luppolo, con una potenza maggiore di altri noti fitoestrogeni come ad esempio la genisteina (*Kitaoka*

et al, 1998; *Milligan et al*, 2000; *Zierau et al*, 2002). È noto che la struttura molecolare dell'8-PN è simile a quella dell'estradiolo, mentre la presenza della catena prenilica nella posizione C-8 dell'8-PN apparentemente si traduce in una maggior affinità con il recettore degli estrogeni rispetto alla naringenina, che mostra solo una debole proprietà estrogenica (*Milligan et al*, 1999; *Van Lipzig et al*, 2004).

Altri studi hanno dimostrato che l'8-PN ha effetti antiangiogenici (*Pepper et al*, 2004) ; è in grado di up-regolare le funzioni del complesso caderina/catenina nelle cellule del carcinoma mammario umano (*Rong et al*, 2001) ed inoltre è un inibitore degli isoenzimi del citocromo P450 (*Henderson et al*, 2000).

Nonostante tutte le capacità dell'8-PN nel trattare e prevenire un'ampia gamma di patologie, ad oggi questa molecola si ritrova solo nella birra e in un numero sempre maggiore di integratori dietetici che contengono estratti di luppolo e permettono di ridurre i disagi associati alla menopausa (*Nikolic et al*, 2004) e per indurre l'aumento del seno (*Milligan et al*, 1999).

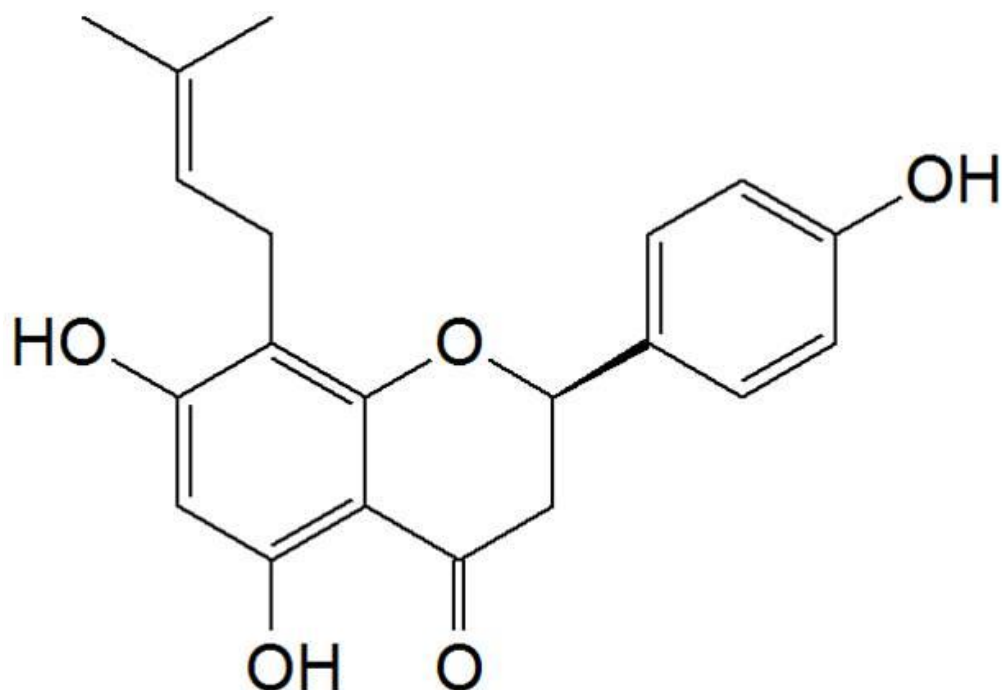


Figura 23: STRUTTURA DELL'8-PN.

Flavonoidi E Piastrine

In letteratura sono presenti molti studi che ipotizzano il coinvolgimento dei flavonoidi nell'inibire la segnalazione piastrinica, mettendo in relazione la loro struttura come motore dell'effetto inibitorio. I flavonoidi hanno infatti mostrato un ruolo nell'interferire con l'attività di alcuni enzimi coinvolti in processi di segnalazione cellulare come ciclossigenasi e lipossigenasi (Polette *et al*, 1996), fosfodiesterasi (Landolfi *et al*, 1984) e fosfolipasi (Lee *et al*, 1997). Inoltre incidono sulla mobilizzazione del calcio dai depositi e sulla successiva attivazione della secrezione piastrinica (Navarro-Nunez *et al*, 2009). È altresì noto che la genisteina ha un ruolo nell'inibire fortemente sia il processo di "inside-out" che "outside-in signalling" nelle piastrine umane, e questo si ripercuote sull'adesione delle piastrine al collagene, sullo spreading (Hubbard *et al*, 2003).

Deidroepiandrosterone

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è un ormone steroideo, precursore di ormoni quali estrogeni e androgeni (*Labrie et al.*, 2001). È l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), che viene secreto dalla ghiandola ipofisaria (*Jesse et al.*, 1995), a stimolare la corteccia del surrene a sintetizzare DHEA a partire dal colesterolo.

La sintesi del DHEA avviene in 3 distinte reazioni di cui due citocromo P450-dipendente. Nella prima reazione catalizzata dall'enzima 21-desmolasi il colesterolo viene idrossilato in posizione 21, originando pregnenolone. Successivamente l'enzima 17 α -idrossilasi catalizza la seconda reazione di idrossilazione che converte il pregnenolone in 17 α -idrossipregnenolone. Infine dall'azione di una liasi (C17,20 liasi) si forma il DHEA che poi può essere convertito in estrogeno o testosterone. Questa ultima trasformazione è dipendente da diversi fattori che variano da individuo a individuo come ad esempio il sesso e l'età (*Nawata et al.*, 2002).

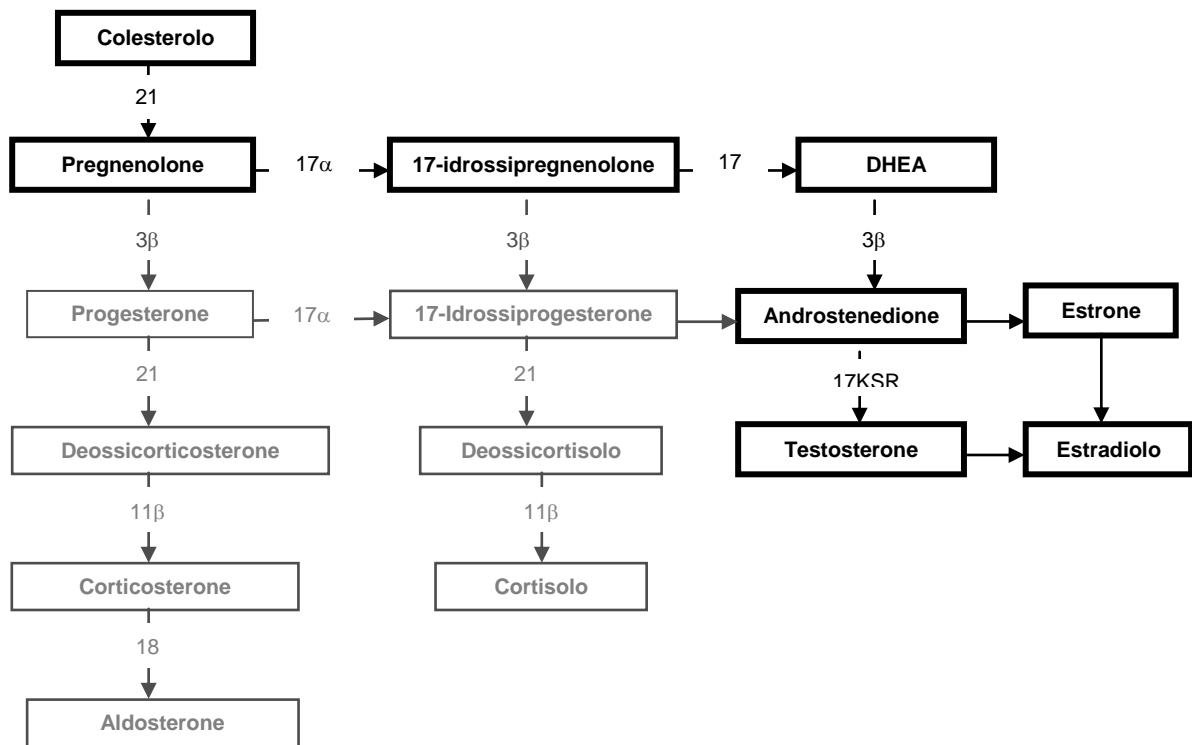


Figura 24: via di sintesi del DHEA.

Nel circolo sanguigno il DHEA è il più abbondante ormone steroideo ed è presente soprattutto nella forma idrosolubile DHEA solfato (DHEA-S). La conversione da DHEA a DHEA-S è catalizzata da una specifica sulfotransferasi (SULT2A1) ed avviene principalmente nel surrene, ma anche nel fegato e nell'intestino (*Chang et al., 2004*). La forma solfata rappresenta una riserva di DHEA, consentendo quindi di mantenere i livelli stabili nell'arco della giornata ed ha emivita più lunga (7-10 ore contro 15-30 minuti del DHEA): questo è dovuto ad una più ridotta eliminazione, mentre la frazione non solfata ha notevoli variazioni giornaliere (*Porsovà-Dutoit, 2000*). La concentrazione plasmatica del DHEA-S risulta massima intorno ai ventuno anni (3 µg/l), si mantiene costante per circa dieci anni, per poi diminuire rapidamente dopo i quaranta anni (1.5-2 µg/l), tanto che ad

ottanta anni il livello di questo ormone non supera il 10 % della concentrazione massima raggiunta a vent'anni (Jesse et al., 1995).

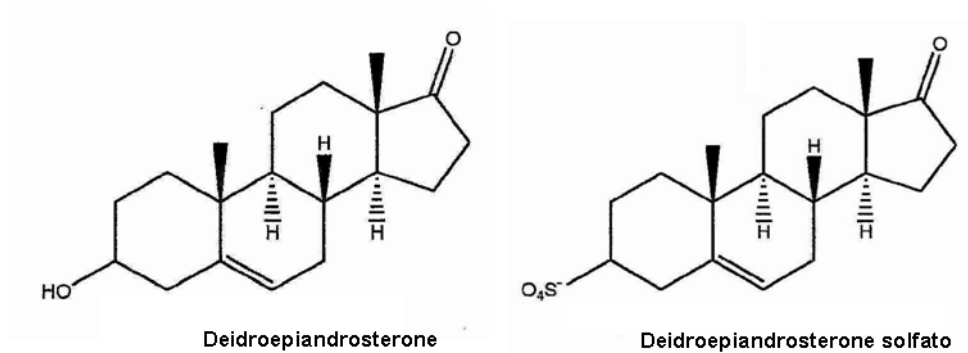


Figura 25: struttura di DHEA e DHEA-S.

Il DHEA, oltre ad essere un precursore ormonale, viene utilizzato nella terapia di alcune malattie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico (*van Vollenhoven et al., 1994*) ed inibisce l'attività dell'enzima glucosio 6 fosfato deidrogenasi (G6PD) spesso associata ad alcuni processi cancerogenici (*Jesse et al., 1995*). Inoltre il DHEA è in grado di stimolare la dilatazione delle arterie coronarie in seguito alla sua conversione in estradiolo o in testosterone, due ormoni vasodilatatori, esercitando così un'azione cardioprotettiva (*Porsovà-Dutoit et al., 2000*), inoltre diminuisce l'aggregazione e l'adesione piastrinica alle cellule endoteliali, riducendo quindi il rischio d'insorgenza di placche aterosclerotiche. Ha anche un'azione antiaterogena (*Porsovà-Dutoit et al., 2000*) e accresce la risposta immunitaria ottimizzando l'effetto dei vaccini, potenziando così il sistema immunitario (*Ribeiro et al, 2007*); ancora, il DHEA può avere un'azione anti-stress (*Morgan et al., 2004*).

Di notevole rilevanza sono gli studi che recentemente hanno dimostrato che il DHEA è anche in grado di contrastare efficacemente problemi legati all'invecchiamento come l'osteoporosi, aumentando la densità minerale ossea (*Labrie et al., 1997*); la formazione di anomalie pigmentarie della pelle aumentando sensibilmente la produzione di sebo (*Mills et al., 2005*) e la degenerazione delle cellule cerebrali migliorando la memoria (*Charalampopoulos et al., 2006; Mellan, 2007*).

Meccanismi d'azione del DHEA

Sebbene gli effetti del DHEA siano noti, i meccanismi d'azione attraverso cui agisce sono spesso di difficile interpretazione. E' stato infatti dimostrato che il DHEA agisce sui vasi sanguigni attivando la ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), una famiglia di enzimi che produce ossido nitrico (NO) (*Martina et al., 2006*). In cellule endoteliali e cellule derivanti dalla cresta neurale sembra che gli effetti del DHEA siano mediati dal reclutamento di una proteina G accoppiata al recettore (GPCR) (*Liu & Dillon, 2002; Charalampopoulos et al., 2006*), escludendo quindi la competizione con gli altri ormoni steroidei (estrogeni e androgeni) per i loro recettori (*Williams et al., 2004*). A contatto con cellule del tessuto osseo o della pelle invece il DHEA può esercitare la sua azione protettiva legandosi ai recettori degli estrogeni (ER) o degli androgeni (AR) (*Notelovitz, 2002; Mills et al., 2005*). Questi studi suggeriscono quindi che il DHEA potrebbe agire grazie alla presenza di uno specifico recettore che attualmente non è ancora stato individuato (*Simoncini et al., 2003*).

Il principale meccanismo d'azione del DHEA si basa sull'aumento della sintesi dell'NO (*Simoncini et al., 2003*), molecola segnale gassosa in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana cellulare e agire come potente vasodilatatore, come inibitore della

proliferazione nel muscolo liscio e come inibitore dell'adesione e aggregazione piastrinica. L'NO viene sintetizzato dalle NOS a partire dall'aminoacido L-arginina nella reazione che porta alla formazione di citrullina (*Martina et al., 2006*).

Sono note tre isoforme di ossido nitrico sintasi: NOS1 (NOS neuronale), NOS2 (NOS inducibile) e NOS3 (NOS endoteliale) (*Marjanovic et al., 2005*). Generalmente l'attività della NOS3 può essere aumentata attraverso meccanismi trascrizionali, ma considerata la rapidità di risposta sembra più probabile che il DHEA agisca indipendentemente dall'attivazione dell'espressione genica e dalla sintesi proteica (*Simoncini et al., 2003*).

La sintesi di NO porta all'attivazione della guanilato ciclastasi solubile (sGC) che produce a partire dal GTP un aumento dei livelli di GMP ciclico (cGMP) implicato nell'attivazione della proteina chinasi GMP ciclico dipendente (cGPK o PKG) dalla cui azione dipendono gli effetti biologici dell'ormone (*Marjanovic et al., 2005*). La PKG è un dimero costituito da una subunità catalitica (C) e da una subunità regolatoria (R) (*Richie-Jannetta et al., 2006*): quando il cGMP si lega alla subunità R avviene un cambio conformazionale e si ha il rilascio della subunità C che media la fosforilazione di substrati su residui di serina e treonina. Il DHEA, favorendo la sintesi di NO, sarebbe quindi implicato nella stimolazione diretta dell'attività della sGC (*Martina et al., 2006*).

SCOPO DEL LAVORO

I fitoestrogeni sono composti derivati da piante che sono in grado di esercitare benefici effetti sulla salute umana, specialmente contro tumori ormono-dipendenti (*Messina et al., 1991*), osteoporosi, sindrome da menopausa irregolare e patologie cardiovascolari e neurodegenerative (*Dixon, 2004*). L'8-PN è un flavonone prenilato scoperto nel 1992 (*Roseblum et al., 1992*) in grado di mostrare effetti simili agli estrogeni. Estratto dalle ghiandole del fiore del luppolo, lo ritroviamo nella birra e in un numero sempre maggiore di integratori alimentari utilizzati per ridurre i disagi associati alla menopausa (*Nikolic et al., 2004*) e per indurre l'aumento del seno (*Milligan et al., 1999*). Negli ultimi anni, è stato oggetto di studio e considerato il nuovo fitoestrogeno con la più alta affinità per il recettore degli estrogeni rispetto ad altri fitoestrogeni oggetto di altri studi (*Milligan et al., 2000*).

Nel nostro laboratorio ci si è orientati a studiare come l'8-PN potesse influenzare la funzionalità piastrinica con l'obiettivo di definire i meccanismi attraverso cui questo fitoestrogeno agisce.

I dati ottenuti hanno mostrato che l'8-PN è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica in maniera dose-dipendente indotta da diversi agonisti piastrinici, come collagene e trombina, e l'adesione piastrinica; inoltre l'inibizione indotta da questo fitoestrogeno agisce indipendentemente dall'attivazione della via dell'NO/cGMP/PKG.

Altri dati ottenuti nel nostro laboratorio hanno poi mostrato che l'8-PN non ha effetti sulla fosforilazione di una serie di chinasi coinvolte per gli eventi di attivazione ed aggregazione piastrinica.

È riportato in letteratura che l'8-PN è in grado di legare con alta affinità il recettore per gli estrogeni (*Milligan et al.*, 2002), mimando gli effetti degli estrogeni su diversi tessuti ed organi. Inoltre, il nostro laboratorio ha dimostrato in due lavori (*Moro et al.*, 2005; *Reineri et al.*, 2007) che il 17 β -estradiolo è in grado di esercitare effetti sull'aggregazione indotta da trombina attraverso un meccanismo dipendente dal coinvolgimento del recettore degli estrogeni.

In questo punto del progetto si inserisce il mio contributo, volto a valutare se l'8-PN potesse agire attraverso il recettore degli estrogeni per esplicitare il suo ruolo di inibizione piastrinica.

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è il precursore di estrogeni e androgeni (*Jesse et al., 2001*). Nel circolo sanguigno il DHEA è l'ormone steroideo più abbondante ed è presente soprattutto nella forma idrosolubile DHEA solfato (DHEA-S). La forma solfata rappresenta una riserva per il DHEA, mantiene i livelli stabili nell'arco della giornata ed ha un'emivita più lunga per via di una ridotta eliminazione (*Porsovà-Dutoit et al., 2000*). La concentrazione plasmatica di DHEA (e DHEA-S) decresce nel corso della vita (*Jesse et al., 2001*); infatti sono attribuiti a questo ormone effetti protettivi verso l'insorgenza di malattie tipiche dell'anziano, quali per esempio l'aterosclerosi.

Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che il DHEA-S inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da trombina e la fosforilazione di proteine essenziali ai fini della funzionalità piastrinica. Tuttavia il meccanismo attraverso cui il DHEA-S agisse inibendo le piastrine non era del tutto caratterizzato.

A tale scopo durante il percorso di dottorato ho valutato quale fosse l'effetto del DHEA-S sull'attivazione di proteine e sul rilascio del contenuto dei granuli densi piastrinici, eventi di fondamentale importanza ai fini dell'attivazione e dell'aggregazione piastrinica.

METODI

Isolamento delle piastrine

I campioni di sangue sono stati raccolti da volontari sani che non avevano assunto farmaci nei dieci giorni antecedenti la donazione. Il prelievo è stato effettuato usando come anticoagulante l'ACD (130 mM acido citrico, 152 mM Na-citrato, 112 mM D-glucosio) nella proporzione di una parte ogni nove di sangue. I campioni aliquotati sono stati centrifugati a 120 x g per 10 minuti a temperatura ambiente in modo da separare il plasma ricco in piastrine (PRP) dagli altri elementi del sangue. Il PRP è stato quindi raccolto e centrifugato a 300 x g per 10 minuti a temperatura ambiente per separare il plasma povero in piastrine (PPP), che è stato eliminato, dal pellet piastrinico che è stato successivamente risospeso in ACD. Le piastrine sono state poi purificate mediante gel-filtrazione su colonna di Sepharose 2B equilibrata in Tyrode a pH 7,4 (10 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2,9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃). Le piastrine ottenute sono state contate al microscopio ottico su camera di Burker e portate alla concentrazione desiderata in Tyrode.

Analisi dell'aggregazione piastrinica

L'aggregazione piastrinica è stata seguita utilizzando un aggregometro Chrono Log modello 560CA. Le piastrine sono state portate alla concentrazione di 3×10^8 /ml e addizionate di glucosio (5,5 mM), CaCl₂ (2 mM) e MgCl₂ (2 mM). Campioni da 250 µl sono stati preincubati per 1 minuto con DHEA (10 nM), con DHEA-S (0,3 mM) o con 8-PN (30 µM) a 37° C sotto agitazione magnetica costante e successivamente stimolati con trombina (0,05 U/ml), da sola o in associazione con ADP (10 µM), con collagene (2µg/ml) e con un

analogo del Trombossano A2, U46,619 (1 μ M). L'aggregazione è stata monitorata per almeno 5 minuti.

Elettroforesi ed immunoblotting

Piastrine gel-filtrate sono state portate alla concentrazione di 3×10^8 /ml, poste a 37° C sotto agitazione magnetica costante e trattate con DHEA-S (0,3 mM) o metanolo (0.3%) come controllo per 1 minuto e successivamente trattate con trombina (0.05 U/ml) per 5 minuti da sola o in associazione con ADP (10 μ M). Sono state poi lisate in ghiaccio con Laemmly Buffer 3x (6 % SDS, 1,5 % DTT, 30 % glicerolo, 0,03 % blu di bromofenolo) addizionato di inibitori (1 mM inibitori di proteasi, 3 mM glicerolo fosfato, 20 mM sodio pirofosfato, 1 mM ortovanadato, 10 mM sodio fluoruro, 1 mM EGTA). I campioni sono stati caricati su gel di poliacrilammide e le proteine sono state separate in SDS-PAGE, trasferite su membrana PVDF e analizzate mediante immunoblotting utilizzando anticorpi anti-p-Akt (Ser⁴⁷³), anti-p-p44/42ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), anti-p-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²), anti-p-Src chinasi Tyr⁴¹⁸ e anti-integrina β 3.

Misurazione della secrezione piastrinica

Campioni di piastrine gel-filtrate sono state poste a 37°C sotto costante agitazione magnetica e stimulate con 8-PN (30 μ M) o con il veicolo (Metanolo 0.125%) per 5 minuti e successivamente indotte ad aggregare in presenza di collagene (5 μ g/ml). La reazione di aggregazione è stata bloccata aggiungendo EDTA 10 mM. Le piastrine sono state poi centrifugate a 10000 x g per 5 minuti, e il surnatante recuperato posto a -20°C. Il contenuto di ATP è stato valutato mediante l'utilizzo di un kit per la detenzione dell'ATP seguendo

il protocollo della casa madre. La luminescenza è stata misurata in un luminometro (Lucy 1, Rost Anthos, Austria).

Misurazione della concentrazione di Ca²⁺ citosolico

Plasma ricco in piastrine ottenuto da sangue preso da volontari sani che non avevano assunto farmaci nei dieci giorni antecedenti la donazione, è stato incubato con 3 μ M di FURA 2-AM a 37°C per 30 minuti e al buio. Le piastrine sono state successivamente isolate mediante gel-filtrazione ed eluite con tyrode buffer addizionato di MgCl₂ (2 mM) e glucosio (5.5 mM). Le piastrine sono state poi contate e portate alla concentrazione di 2×10^8 cells/ml. La misurazione della concentrazione del Ca²⁺ citosolico è stata effettuata in uno spettrofluorimetro (F-4500 Fluorecence Spectrophotometer, Hitachi) in presenza di EDTA 2 mM. Le piastrine sono state incubate con 8-PN (30 μ M) o con il veicolo (Metanolo 0.125%) per 5 minuti e stimulate con collagene (5 μ g/ml) o trombina (0.05U/ml) per 5 minuti. Il segnale della fluorescenza dato dal FURA 2-AM è stato tarato secondo il metodo di Pollock et al (*Pollock et al*, 1986).

RISULTATI sezione DHEA-S

Effetto del DHEA-S sull'attivazione piastrinica

Negli anni precedenti nel nostro laboratorio è stato dimostrato che il DHEA-S, forma di riserva dell'ormone, ma non il DHEA, forma attiva, inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da trombina senza coinvolgere il recettore degli estrogeni (Fig. 1A). L'aggregazione piastrinica può essere attivata da vari agonisti che attivano vie multiple di segnalazione che possono essere divise in eventi comuni a tutti gli agonisti ed in eventi specifici legati a classi di recettori, come i recettori accoppiati a proteine G, integrine e recettori legati alle sequenze ITAM. Per verificare se il DHEA-S fosse in grado di inibire solo l'aggregazione indotta da trombina, campioni di piastrine gel-filtrate sono stati pre-incubati con DHEA-S (0.3 mM) e Metanolo (0.3%) come controllo per 1 minuto e successivamente stimulate con collagene (2 µg/ml), che attiva recettori legati alle sequenze ITAM ed integrine, e con un analogo del trombossano A₂, l'U46,619 (1 µM), che segnala attraverso recettori accoppiati a proteine G, nel caso specifico G_q-G_{12/13} come la trombina. Abbiamo visto che il DHEA-S, ma non il DHEA, è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica indotta da entrambi gli agonisti (fig. 30B e 30C).

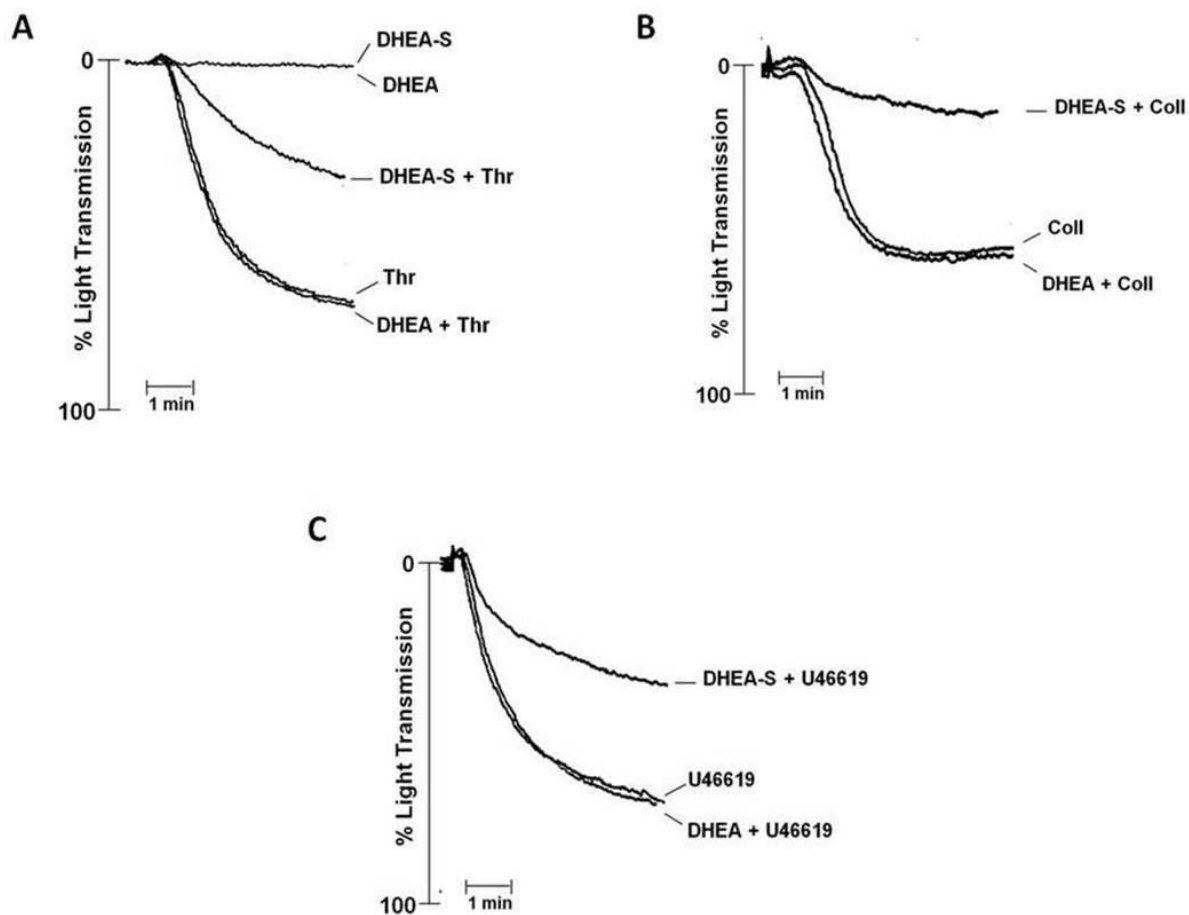


FIGURA 30: EFFETTO DEL DHEA-S E DEL DHEA SULL'AGGREGAZIONE PIASTRINICA. Campioni di piastrine gel-filtrate 3×10^8 /ml sono stati pretrattati con Metanolo (V), 0.3 mM di DHEA-S, 10 nM di DHEA per 1 minuto, e successivamente stimolati con 0.05 U/ml di trombina (A), 2 μ g/ml di collagene (B) e 1 μ M di U46,619 (C) per 5 minuti. Le figure mostrano i tracciati di aggregazione di un esperimento rappresentativo di 3 condotti su piastrine ottenute da diversi donatori.

Il DHEA-S è in grado di inibire l'aggregazione indotta da trombina, senza coinvolgere il recettore degli estrogeni ma con un meccanismo non ancora identificato. Per meglio indagare la cinetica dell'inibizione causata dal DHEA-S sull'aggregazione, campioni di piastrine sono stati pre-incubati con differenti concentrazioni di DHEA-S (da 0.068 mM a 1 mM) e successivamente stimolate con diverse dosi di trombina, 0.025 U/ml, 0.02U/ml e 0.05 U/ml. L'inibizione promossa dal DHEA-S è risultata essere dose-dipendente: l'effetto è massimo a concentrazioni maggiori di 0.5 mM, che causano una completa inibizione dell'aggregazione indotta da tutte le dosi di trombina utilizzate (figura 31). L'inserito presente in figura 31 mostra come la concentrazione fisiologica del DHEA-s, 0.068 mM, è in grado di inibire l'aggregazione indotta dalle concentrazioni di trombina 0.025 U/ml e 0.02U/ml, mentre non mostra alcun effetto sulla concentrazione pari a 0.05 U/ml di trombina.

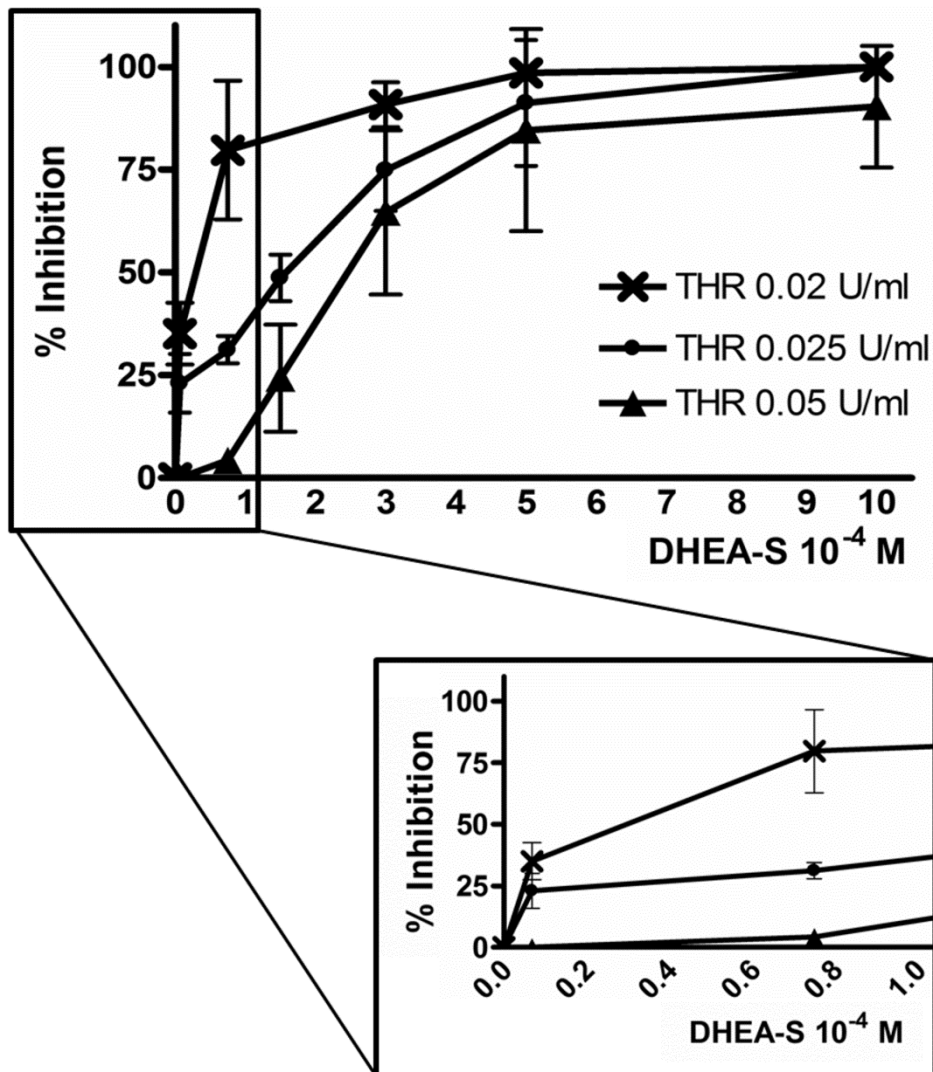


FIGURA 31: EFFETTI DELLA CONCENTRAZIONE FISIOLÓGICA DEL DHEA-S SULL'AGGREGAZIONE. Campioni di piastrine gel-filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono stati pretrattati con Metanolo (V), diverse concentrazioni di DHEA-S (da 0.068 mM a 1 mM) per 1 minuto, e successivamente stimolati con differenti concentrazioni di trombina (0.025 U/ml, 0.02 U/ml e 0.05 U/ml). (Significatività statistica effettuata con One Way Anova con test post-hoc di Bonferroni; ** $p < 0.01$). L'inserto è un ingrandimento della parte iniziale dell'asse delle x.

I risultati dell'aggregazione indotta da basse dosi di trombina hanno mostrato una forte variabilità interindividuale. Per questo motivo, negli esperimenti successivi abbiamo deciso di utilizzare la concentrazione di 0.05 U/ml di trombina per la stimolazione delle piastrine e la concentrazione di DHEA-S 0.3 mM, che corrisponde alla concentrazione corrispondente all'IC₅₀ per la concentrazione di trombina scelta. Siccome però la concentrazione scelta per il DHEA-S è 44 volte maggiore rispetto a quella utilizzata, sono andata ad investigare se anche alte concentrazioni di DHEA potessero causare un'inibizione simile sull'aggregazione. Così, piastrine gel-filtrate sono state incubate per 1 minuto con diverse concentrazioni di DHEA 10 nM, 0.3 mM, e la concentrazione fisiologica, 0.068 mM, e poi indotte ad aggregare con 0.05 U/ml di trombina. I risultati mostrano che nessuna delle dosi di DHEA utilizzate è in grado di inibire l'aggregazione indotta dalla trombina (figura 32A). Allo stesso modo, per valutare se alte concentrazioni di steroidi potessero dare effetti non specifici legati alla presenza del gruppo solfato o del nucleo steroideo, le piastrine sono state incubate con 0.3 mM DHEA-S, la stessa concentrazione per il DHEA, 0.3 mM 17β estradiolo e 0.3 mM 17β estradiolo-solfato o con il veicolo per 1 minuto e indotte ad aggregare con 0.05 U/ml trombina. I nostri dati mostrano che solo il DHEA-S e non altri steroidi, è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica indotta da trombina (figura 32B).

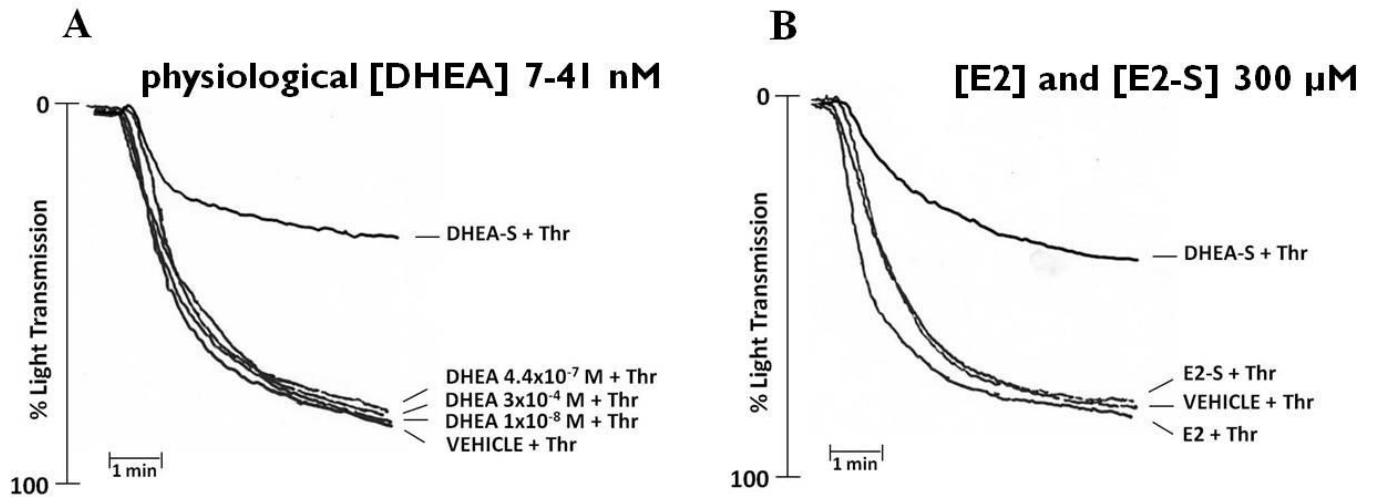


FIGURA 32: EFFETTI DI DHEA E ALTRI STEROIDI SULL'AGGREGAZIONE. (A) Campioni di piastrine gel-filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono stati pretrattati con Metanolo (V), diverse concentrazioni di DHEA (0.068 mM, 0.3 mM e 1 mM) per 1 minuto, e successivamente stimolati con trombina 0.05 U/ml. (B) Campioni di piastrine gel-filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono stati pretrattati con Metanolo (V), con concentrazioni di 17β estradiolo 0.3 mM e 17β estradiolo-solfato 0.3 mM per 1 minuto, e successivamente stimolati con trombina 0.05 U/ml. Le figure mostrano i tracciati di aggregazione di un esperimento rappresentativo di 3 condotti su piastrine ottenute da diversi donatori.

Il DHEA-S inibisce la secrezione del contenuto dei granuli densi

Gli agonisti piastrinici, e in particolare agonisti forti come la trombina, sono in grado di attivare cascate di segnalazione che portano all'attivazione mediante fosforilazione di alcune chinasi come Src (Golden & Brugge, 1989), le MAP chinasi ERK 1/2 (Kramer et al., 1995), p38 MAPK (Papkoff et al., 1994) e Akt (Kroner et al., 2000), importanti nel rilascio del contenuto dei granuli densi (ADP) e per potenziare dell'aggregazione (Adam et al., 2008).

Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio non sono stati in grado di chiarire attraverso quale meccanismo il DHEA-S agisse nell'inibire l'aggregazione piastrinica e abbiamo ipotizzato che il DHEA-S potesse agire sulle piastrine inibendo selettivamente il rilascio del contenuto dei granuli densi.

Per confermare questa ipotesi piastrine gel-filtrate sono state pre-incubate con DHEA-S (0.3 mM) e Metanolo (0.3%) come controllo per 1 minuto e successivamente indotte ad aggregare con trombina (0.05 U/ml) da sola e in associazione con ADP (10 μ M).

I nostri dati hanno mostrato che l'aggiunta di ADP è in grado di revertire l'effetto inibitorio del DHEA-S sull'aggregazione indotta da trombina (figura 33).

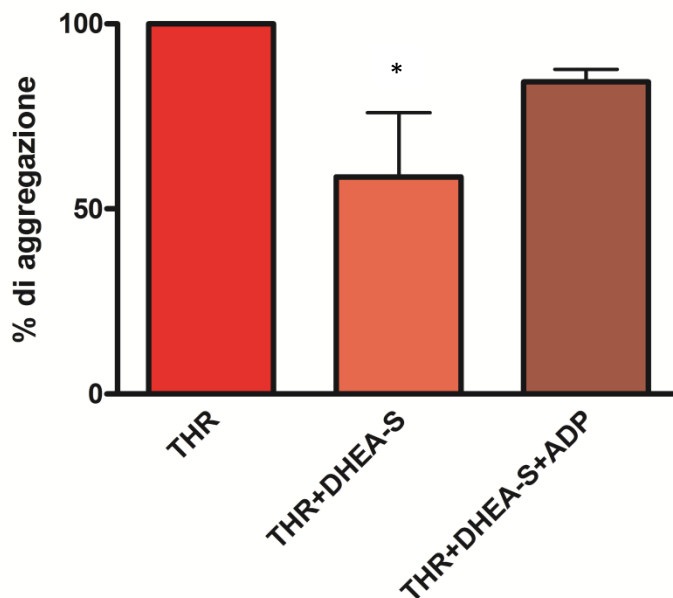


FIGURA 33: L'ADP REVERTE L'EFFETTO DEL DHEA-S SULL'AGGREGAZIONE. Campioni di piastrine gel-filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono stati pretrattati con solvente o 0.3 mM di DHEA-S per 1 minuto e stimolati con 0.05 di U/ml trombina da sola o in associazione con 10 μ M di ADP. I risultati sono espressi come % di aggregazione rispetto al controllo (100%). I dati riportati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. (* $p < 0.01$).

Le stesse piastrine usate in aggregazione sono state successivamente lisate in ghiaccio con Laemmli Buffer 3x addizionato di inibitori e analizzate in immunoblotting con gli anticorpi specifici per le forme fosforilate di Akt e ERK1/2 e con l'anticorpo β 3.

I nostri risultati hanno dimostrato che il DHEA-S è in grado di inibire la fosforilazione indotta da trombina delle proteine analizzate. Tuttavia l'aggiunta di ADP esogeno è in grado di ripristinare il pattern di fosforilazione riscontrato nel campione trattato con la sola trombina (figura 34).

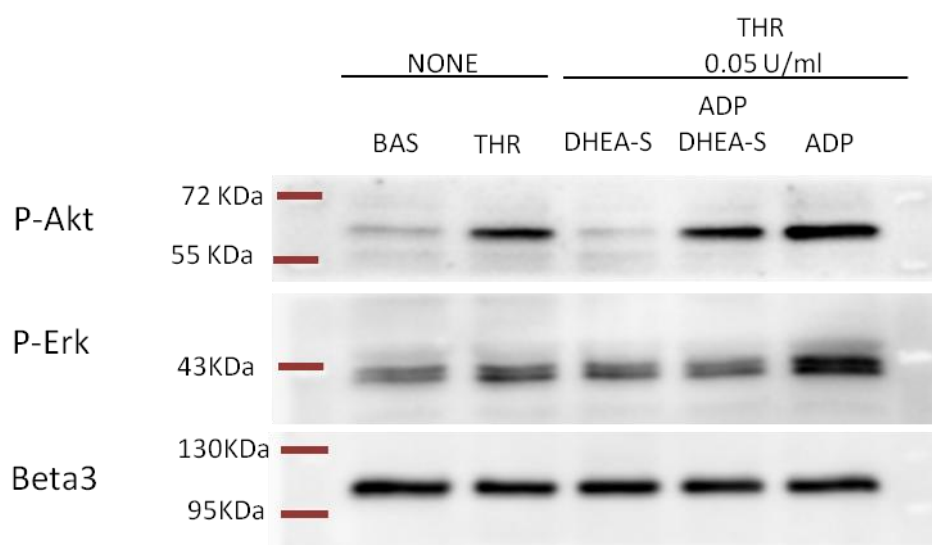
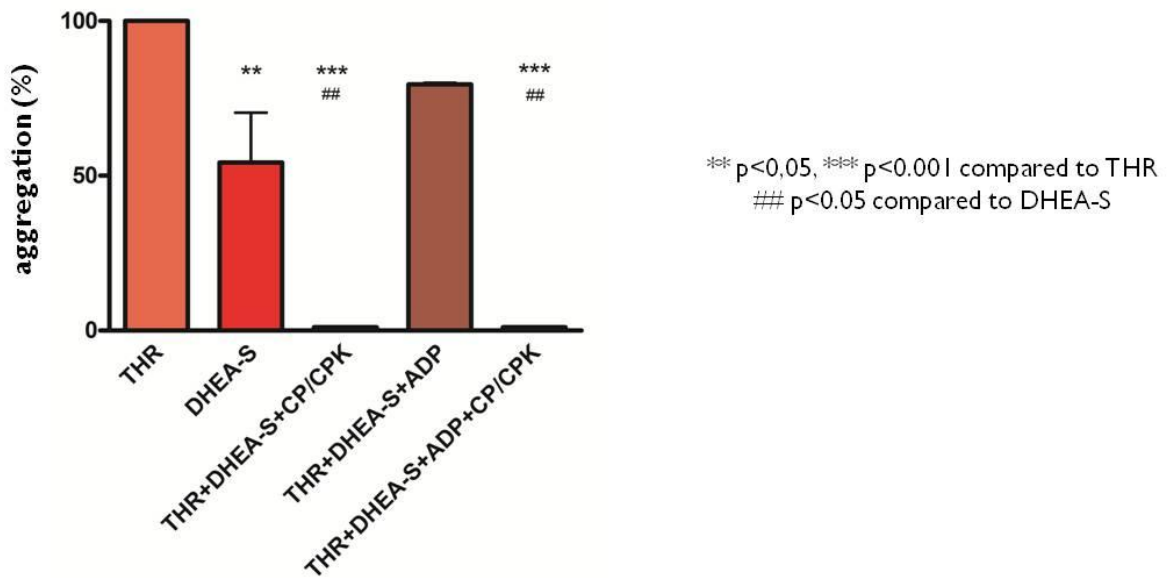


FIGURA 34: L'ADP REVERTE L'EFFETTO DEL DHEA-S SULL'INIBIZIONE DELLA FOSFORILAZIONE PROTEICA. Campioni di piastrine gel-filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono stati pretrattati con solvente (BAS), $0.3 \mu\text{M}$ di DHEA-S per 1 minuto e successivamente stimolati con 0.05 U/ml di trombina da sola o in associazione con ADP ($10 \mu\text{M}$) per 5 minuti. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici. In figura è riportato un esperimento rappresentativo di 3 condotti su piastrine di diversi donatori.

Per valutare se l'effetto del DHEA-S sull'inibizione piastrinica fosse dovuto ad un coinvolgimento dell'ADP, piastrine gel-filtrate sono state pre-incubate con DHEA-S (0.3 mM), Metanolo (0.3%) e con CP/CPK (5 mM per il CP e 40 U/ml per il CPK), una chinasi che è in grado di degradare tutto l'ADP secreto dalle piastrine, ed indotte ad aggregare con trombina (0.05 U/ml) e ADP ($10 \mu\text{M}$) in associazione. Successivamente le piastrine

sono state lisate in ghiaccio con Laemmli Buffer 3x addizionato di inibitori e analizzate in immunoblotting con gli anticorpi specifici per le forme fosforilate di Akt e ERK1/2 e con l'anticorpo $\beta 3$. (Figura 35A e 35B).

A



B

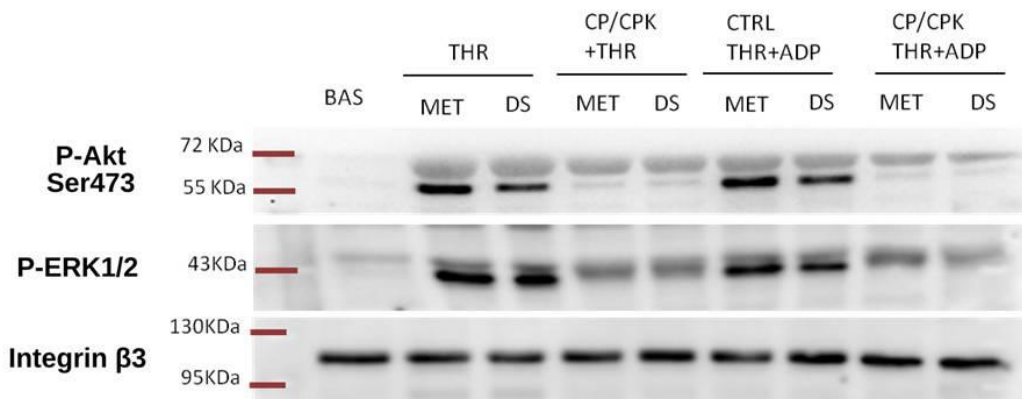


Figura 35:(A) Effetto del trattamento con CP/CPK sull'aggregazione piastrinica. Campioni di piastrine gel filtrate concentrate 3×10^8 /ml vengono pretrattati con solvente, DHEA-S (0.3 mM) o CP/CPK (5 mM CP e 40 U/ml CPK) per 1 minuto e stimolati con trombina (0,05 U/ml) da sola o in associazione con ADP (10 μ M). I risultati sono espressi come % di aggregazione piastrinica rispetto al controllo, la quale è stata posta arbitrariamente uguale a 100. I dati riportati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti (** p<0,05, *** p<0.001 comparato al controllo; ## p<0.05 comparato al DHEA-S).

(B) Il DHEA-S riduce la fosforilazione di Akt e P-Erk 1/2. Campioni di piastrine gel-filtrate concentrate 3×10^8 /ml sono stati pretrattati con solvente (BAS), DHEA-S (0.3 μ M) o CP/CPK (5 mM CP e 40 U/ml CPK) per 1 minuto e successivamente stimolati con 0.05 U/ml di trombina sola o in associazione con ADP (10 μ M) per 5 minuti. Le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE, trasferite su membrana di PVDF ed analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici. In figura è riportato un esperimento rappresentativo di 3 condotti su piastrine di diversi donatori.

Il trattamento con CP/CPK inibisce totalmente l'aggregazione piastrinica indotta da trombina, sia in presenza di DHEA-S che in presenza di ADP esogeno, questo ad indicare che l'inibizione esplicata dal DHEA-S sul rilascio del contenuto dei granuli densi è parziale e non totale.

DISCUSSIONE DHEA-S

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è un ormone steroideo, precursore di ormoni quali estrogeni e androgeni (*Labrie et al., 2001*). L'ormone adrenocorticotropo (ACTH), secreto dalla ghiandola ipofisaria (*Jesse et al., 1995*), stimola la corteccia del surrene a produrre DHEA a partire dal colesterolo.

La sua concentrazione diminuisce con il trascorrere del tempo a partire dai trent'anni e questo decremento viene associato ad un aumento nella suscettibilità di insorgenza di malattie tipiche dell'età avanzata come malattie aterosclerotiche, cardioprotettive ed autoimmuni (*Porsovà-Dutoit et al., 2000*); per questo motivo è noto da tempo il suo ruolo protettivo nei confronti di tali malattie.

Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che il DHEA-S inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da trombina.

Durante il percorso di dottorato sono andata a valutare il meccanismo attraverso cui il DHEA-S provoca l'inibizione dell'aggregazione piastrinica.

L'aggregazione piastrinica può essere attivata da vari agonisti che attivano vie multiple di segnalazione, che possono essere divise in eventi comuni a tutti gli agonisti ed in eventi specifici legati a classi di recettori, come i recettori accoppiati a proteine G, integrine e recettori associati alle sequenze ITAM. Ho quindi verificato se il DHEA-S potesse inibire l'aggregazione piastrinica indotta da agonisti diversi dalla trombina, come il collagene e un analogo del Trombossano A₂, l'U46,619. I risultati che ho ottenuto mostrano che il DHEA-S è in grado di inibire l'aggregazione indotta da tali agonisti, portandomi alla conclusione che il DHEA-S agisce inibendo una via di segnalazione comune a tutti gli

agonisti. Il DHEA-S è in grado di inibire l'aggregazione indotta da trombina, senza coinvolgere il recettore degli estrogeni ma con un meccanismo non ancora identificato. Per meglio indagare la cinetica dell'inibizione causata dal DHEA-S sull'aggregazione ho condotto esperimenti di dose-risposta con diverse concentrazioni di trombina ottenendo come risultato che il DHEA-S induce una inibizione dell'aggregazione indotta da trombina in maniera dose-dipendente, e che gli effetti massimali dell'inibizione da DHEA-S si ottengono a concentrazioni dello steroide superiori a 0.5 mM; tuttavia, la concentrazione necessaria per ottenere il 50% dell'inibizione variava molto in relazione alle concentrazioni di trombina utilizzata e alle variazioni interpersonali, e per i successivi esperimenti abbiamo deciso di utilizzare uno schema sperimentale che fosse in grado di darci forti e riproducibili risultati sperimentali, ovvero trombina concentrata 0.05 U/ml e DHEA-S 0.3 mM. Questa concentrazione di DHEA-S è però molto elevata rispetto a quella fisiologica, che si aggira intorno alle 0.068 nM, e ci siamo quindi chiesti se elevate concentrazioni della forma non solfata DHEA potessero dare gli stessi effetti: aggregazioni compiute con diverse concentrazioni di DHEA (fisiologica, quella scelta per gli esperimenti e quella 44 volte maggiore) non danno alcuna inibizione dell'aggregazione indotta da trombina quando paragonata all'aggregazione indotta dal DHEA-S. Un altro dubbio è sorto dalla considerazione che elevati livelli di steroidi potessero dare effetti non specifici legati o alla presenza del gruppo solfato o del nucleo steroideo, e abbiamo indotto quindi le piastrine ad aggregare in presenza di altri steroidi, il 17 β -estradiolo e la sua forma solfata, 17 β -estradiolo solfato, e trombina, e il risultato è stato che solamente il DHEA-S è in grado di inibire l'aggregazione indotta da trombina mentre gli altri steroidi non danno effetti di inibizione portandoci alla conclusione che è il DHEA-S ad agire in maniera specifica sulle piastrine.

In seguito a questi risultati mi sono chiesta se la via di segnalazione coinvolta dall'inibizione del DHEA-S fosse quella della secrezione dei granuli densi: ho quindi verificato i livelli di fosforilazione delle più importanti chinasi coinvolte nella via secretoria come Akt e la MAP chinasi ERK 1/2 a seguito di esperimenti di aggregometria dove le piastrine sono state indotte ad aggregare in presenza di trombina sola o in associazione ad ADP. I nostri risultati hanno dimostrato che il DHEA-S è in grado di inibire la fosforilazione indotta da trombina delle proteine analizzate. Tuttavia l'aggiunta di ADP esogeno è in grado di ripristinare il pattern di fosforilazione riscontrato nel campione trattato con la sola trombina.

Per valutare se l'effetto del DHEA-S sull'inibizione piastrinica fosse dovuto ad un coinvolgimento dell'ADP, ho eseguito esperimenti in aggregometria trattando le piastrine con DHEA-S e con CP/CPK, una chinasi in grado di degradare tutto l'ADP secreto dalle piastrine e indotte ad aggregare con trombina sola o in associazione ad ADP, e successivamente ho analizzato i profili di fosforilazione delle chinasi della via secretoria.

I risultati ottenuti mostrano che il DHEA-S inibisce solo parzialmente la secrezione del contenuto dei granuli densi.

Questi risultati suggeriscono quindi che il DHEA-S agisce mantenendo le piastrine in uno stato resting, agendo attraverso vie multiple di segnalazione, e questo avviene principalmente quando la funzionalità dell'endotelio vascolare è compromesso.

RISULTATI sezione 8-PN

L' effetto di inibizione dell'aggregazione indotta da 8-PN non si esplica attraverso il recettore degli estrogeni

È noto in letteratura che l'8-PN, così come altri fitoestrogeni, è in grado di agire attraverso il recettore degli estrogeni (Milligan *et al.*, 2002). Per questo motivo siamo andati a valutare se questi recettori fossero coinvolti nei meccanismi di inibizione dell'aggregazione piastrinica indotti dall'8-PN sulle piastrine, analizzando gli effetti del trattamento delle piastrine con un'antagonista del recettore per gli estrogeni, ICI 182,780. Campioni di piastrine gel-filtrate sono stati pretrattati con diverse concentrazioni di questo agonista, da 1 a 150 μM , trattati con 30 μM 8-PN e successivamente indotti ad aggregare con 5 $\mu\text{g/ml}$ di collagene. I dati ottenuti mostrano che l'antagonista non è in grado di abolire l'effetto dell'inibizione dell'aggregazione indotta da 8-PN quando usato a basse dosi (1 μM e 10 μM). Alte concentrazioni di ICI 182,780 (75 μM) reversiono solo parzialmente l'inibizione indotta dall'8-PN, mentre concentrazioni ancora più alte (100 μM e oltre) inibiscono da sole l'aggregazione piastrinica indotta da collagene.

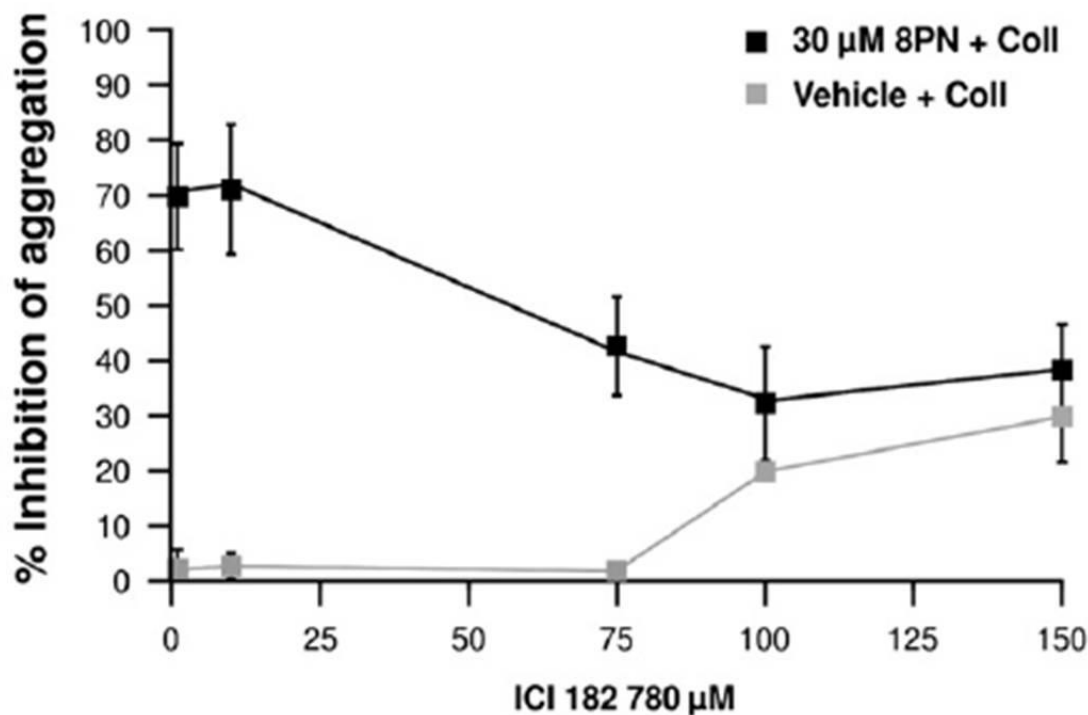


Fig. 26: L'INIBIZIONE DELL'8-PN NON AVVIENE ATTRAVERSI IL RECETTORE DEGLI ESTROGENI. Campioni di piastrine gel-filtrate $3 \times 10^8/\text{ml}$ sono stati pretrattati con diverse concentrazioni di ICI 182,780 (1–150 μM) per 5 minuti, trattate poi con il veicolo o 8-PN 30 μM per 5 minuti e successivamente indotte ad aggregare con collagene 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. I risultati sono espressi come percentuale di inibizione dell'aggregazione piastrinica a seguito della normalizzazione rispetto all'aggregazione indotta da solo collagene in ogni esperimento. I dati riportati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

Abbiamo quindi riefettuato esperimenti di dose-risposta su piastrine trattate con 8-PN (da 1 a 50 μM), indotte ad aggregare con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di collagene e pretrattate con concentrazioni di ICI 182,780 10 μM e 75 μM : di nuovo la concentrazione di ICI 182,780 pari a 10 μM non è stata in grado di modificare la cinetica di inibizione dell'aggregazione indotta dall'8-PN mentre la concentrazione pari a 75 μM è stata in grado di dimezzare l'effetto dell'8-PN su ognuna delle concentrazioni del fitoestrogeno utilizzato.

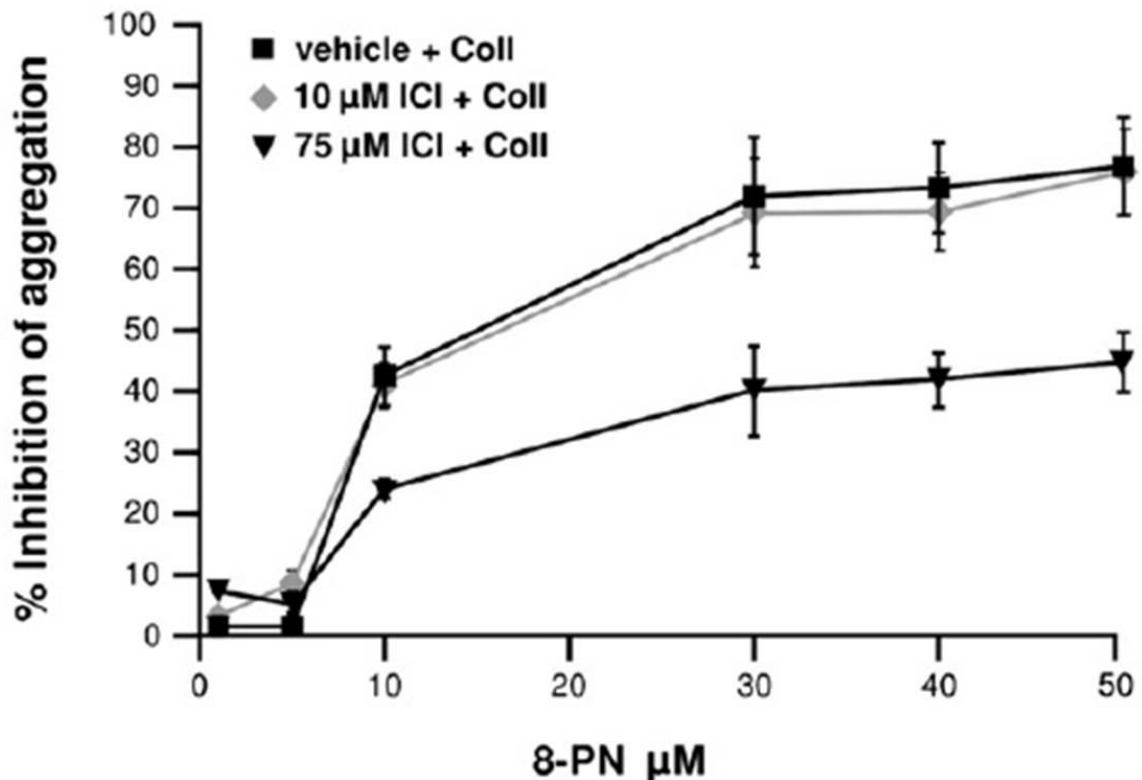


Fig 27: 8-PN INIBISCE L'AGGREGAZIONE INDOTTA DA AGONISTI IN MANIERA DOSE-DIPENDENTE. Campioni di piastrine gel-filtrate $3 \times 10^8/\text{ml}$ sono stati pretrattati con il veicolo, 10 o 75 μM di ICI 182,780 per 5 minuti, trattati con diverse concentrazioni di 8-PN (0.5-50 μM) per 5 minuti e successivamente indotte ad aggregare con collagene 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. I dati riportati rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

8-PN non coinvolge la via NO/cGMP/PKG nell'inibizione piastrinica

Sempre nell'ottica di valutare il coinvolgimento del recettore degli estrogeni negli effetti inibitori dati dall'8-PN, siamo andati a valutare il ruolo del recettore per gli estrogeni nella fosforilazione di VASP, che è nota giocare un ruolo principale nel controllo dell'organizzazione del citoscheletro in quanto regola il dinamismo dell'actina (Laurent *et al.*, 1999), ed è coinvolta nei meccanismi di inibizione piastrinica. Abbiamo quindi trattato piastrine per 5 minuti con 10 μM e 75 μM ICI 182,780 o con il veicolo (DMSO) e

successivamente incubate per 5 minuti con 8-PN 30 μ M. Le piastrine sono state successivamente lisate in ghiaccio con Laemmli Buffer 3x addizionato di inibitori e analizzate in immunoblotting con gli anticorpi specifici per le forme fosforilate di VASP Ser157, VASP Ser239 e per l'integrina β 3. Il risultato mostra che la concentrazione piú bassa di ICI 182,780 utilizzata non modifica i livelli di fosforilazione di VASP, mentre la concentrazione piú alta, 75 μ M, abbatte completamente la fosforilazione a livello della Ser157, lasciando per lo piú inalterata la fosforilazione a livello della Ser239.

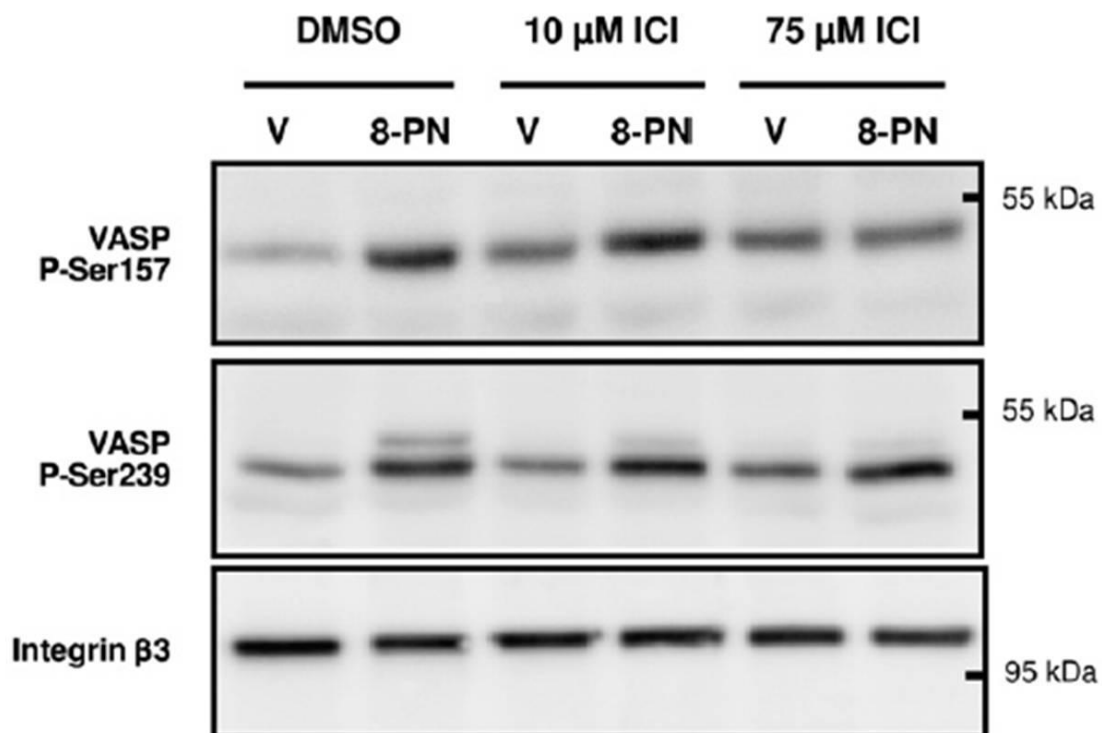


Fig 28: L'INIBIZIONE DELL'8-PN NON COINVOLGE IL PATHWAY NO/CGMP/PKG. Campioni di piastrine gel-filtrate 5×10^8 /ml sono stati trattati con DMSO, 10 o 75 μ M di ICI 182,780 prima della stimolazione con il veicolo (V) o 30 μ M 8-PN per 5 minuti. Le aliquote contenenti la stessa quantit  di proteine sono state analizzate mediante immunoblotting con gli anticorpi specifici per le forme fosforilate di VASP Ser239, VASP Ser157 e con l'anticorpo per l'integrina β 3. Gli immunoblot sono rappresentativi di 3 esperimenti identici condotti con piastrine ottenuti da donatori differenti.

8-PN inibisce la fosforilazione proteica indipendentemente dal recettore degli estrogeni

La fosforilazione proteica è un evento cruciale nell'attivare le piastrine; dati ottenuti nel nostro laboratorio hanno mostrato che l'8-PN non esplica i suoi effetti a livello della fosforilazione del pattern delle proteine fosforilate in tirosina. Tuttavia, è in grado di inibire ampiamente le fosforilazioni in tirosina innescata sia da collagene che da trombina. Tirosin-chinasi e fosfatasi regolano molte vie di segnalazione a valle dei recettori attivati da collagene e trombina (*Jackson et al., 1996*). Risultati ottenuti nel nostro laboratorio sulla fosforilazione di alcune chinasi come Pyk2, Akt, ERK 1/2, p38 MAP chinasi e Src in piastrine stimulate con collagene e trombina in presenza o assenza di 8-PN hanno mostrato che il pretrattamento delle piastrine con il fitoestrogeno inibisce fortemente la fosforilazione a seguito dello stimolo da agonisti di Pyk2, Akt ed ERK 1/2 mentre la fosforilazione di p38 MAP chinasi è solo leggermente inibita e quella di Src non modificata.

A questo punto, ci siamo chiesti se l'inibizione della fosforilazione indotta da 8-PN coinvolgesse il recettore degli estrogeni. Campioni di piastrine sono stati pretrattati con il veicolo (V), con 10 μ M e 75 μ M ICI 182,780 per 5 minuti, trattate con 8-PN e veicolo (V) per 5 minuti, stimulate con 5 μ g/ml collagene e 0.05 U/ml trombina. Le piastrine sono state poi lisate in ghiaccio con Laemmli Buffer 3x addizionato di inibitori e analizzate in immunoblotting con gli anticorpi specifici per le forme fosforilate di Src, Akt, ERK 1/2 e per l'integrina β 3. I risultati che abbiamo ottenuto mostrano che nessuna delle concentrazioni utilizzate di ICI 182,780 ha effetto sull'inibizione della fosforilazione indotta dall'8-PN indotta da entrambi gli agonisti utilizzati.

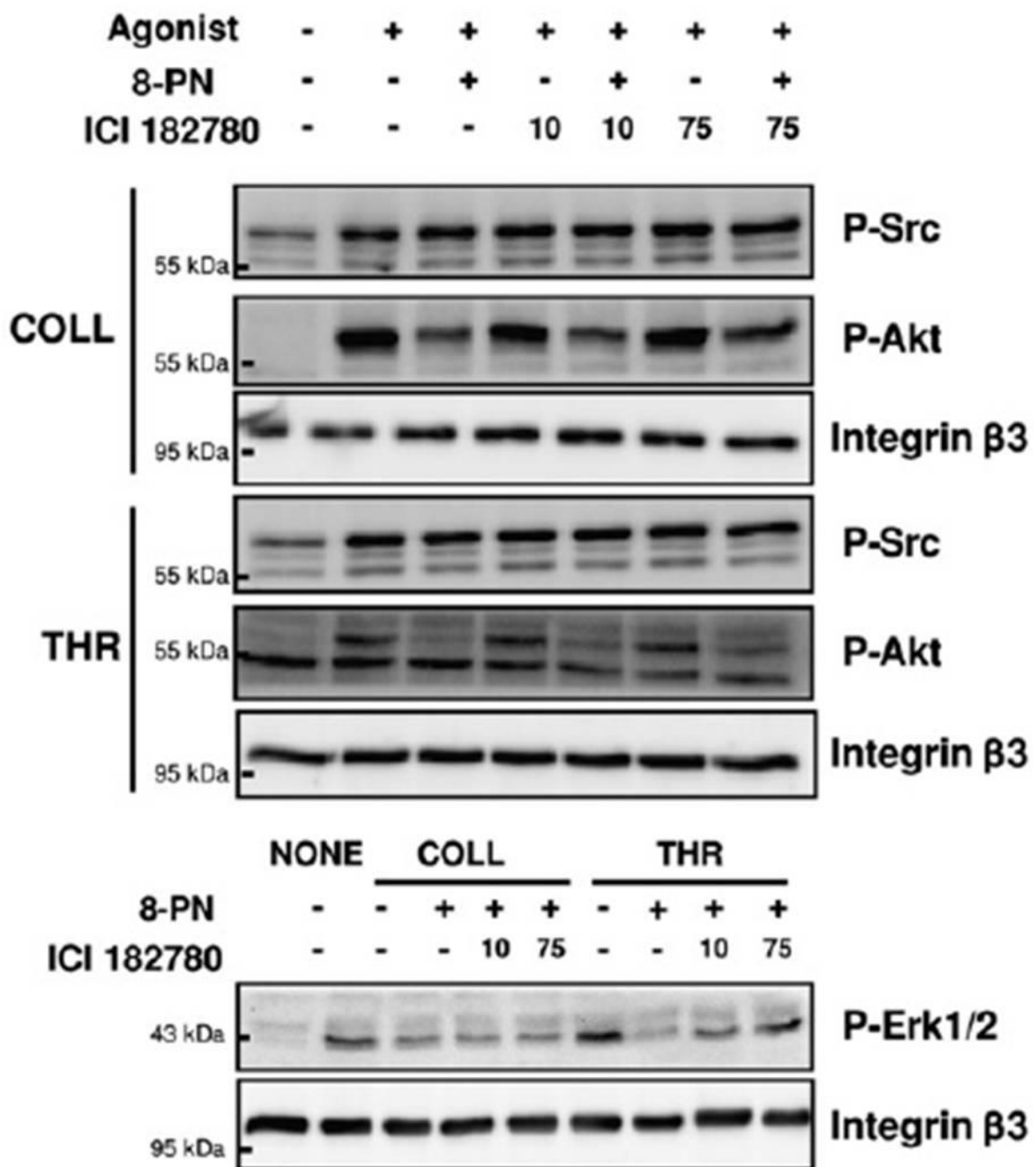


Fig 29: 8-PN INIBISCE LA FOSFORILAZIONE PROTEICA NELLE PIASTRINE. Campioni di piastrine gel-filtrate 5×10^8 /ml sono stati incubati con il veicolo (-), 10 o 75 μ M ICI 182,780 per 5 minuti, trattate con il veicolo (-) o 30 μ M 8-PN per 5 minuti e successivamente stimulate o meno (-) con collagene (COLL) 5 μ g/ml o trombina (THR) 0.05 U/ml per 5 minuti. Le immagini sono rappresentative di 3 esperimenti identici condotti con piastrine ottenuti da donatori differenti.

DISCUSSIONE 8-PN

I fitoestrogeni sono composti derivati da piante che sono in grado di esercitare benefici effetti sulla salute umana, specialmente contro tumori ormono-dipendenti (*Messina et al., 1991*), osteoporosi, sindrome da menopausa irregolare e patologie cardiovascolari e neurodegenerative (*Dixon, 2004*). L'8-PN è un flavonone prenilato scoperto nel 1992 (*Roseblum et al., 1992*) in grado di mostrare effetti simili agli estrogeni. Estratto dalle ghiandole del fiore del luppolo, lo ritroviamo nella birra e in un numero sempre maggiore di integratori alimentari utilizzati per ridurre i disagi associati alla menopausa (*Nikolic et al., 2004*) e per indurre l'aumento del seno (*Milligan et al., 1999*). Negli ultimi anni, è stato oggetto di studio e considerato il nuovo fitoestrogeno con la più alta affinità per il recettore degli estrogeni rispetto ad altri fitoestrogeni oggetto di altri studi (*Milligan et al., 2000*).

Nel nostro laboratorio ci si è orientati a studiare come l'8-PN potesse influenzare la funzionalità piastrinica con l'obiettivo di definire i meccanismi attraverso cui questo fitoestrogeno agisce.

I dati ottenuti hanno mostrato che l'8-PN è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica in maniera dose-dipendente indotta da diversi agonisti piastrinici, come collagene e trombina, e l'adesione piastrinica.

È noto che la fosforilazione di VASP, causata da elevati livelli di cAMP e cGMP, gioca un ruolo essenziale nell'inibizione piastrinica: VASP fosforilata infatti mostra una riduzione dell'abilità della proteina a legare proteine del citoscheletro, che porta ad un'inibizione della riorganizzazione del citoscheletro, evento importante per una aggregazione

irreversibile (*Reinhard et al.*, 2001). Dati ottenuti nel nostro laboratorio hanno mostrato che il trattamento di piastrine con l'8-PN promuove la fosforilazione di VASP sia sulla Ser157 che sulla Ser239 in maniera tempo-dipendente, suggerendo che sia la PKG che la PKA sono coinvolte. Inoltre il trattamento con l'8-PN aumenta i livelli dei nucleotidi ciclici. L'aumento dei livelli di cGMP comporta un aumento della produzione di ossido nitrico (NO) ad opera delle NOS, ossido nitrico sintetasi. Il trattamento di piastrine con inibitori delle NOS è in grado di prevenire la fosforilazione di VASP in piastrine trattate con l'8-PN, suggerendo che l'inibizione indotta da questo fitoestrogeno agisce indipendentemente dall'attivazione della via dell'NO/cGMP/PKG.

Altri dati ottenuti nel nostro laboratorio hanno poi mostrato il ruolo dell'8-PN sulla fosforilazione di una serie di chinasi coinvolte per gli eventi di attivazione ed aggregazione piastrinica: l'8-PN non ha effetti sullo stato di attivazione basale di queste chinasi, tra cui Akt, ERK 1/2 e Src.

È riportato in letteratura che l'8-PN è in grado di legare con alta affinità il recettore per gli estrogeni (*Milligan et al.*, 2002), mimando gli effetti degli estrogeni su diversi tessuti ed organi. Inoltre, il nostro laboratorio ha dimostrato in due lavori (*Moro et al.*, 2005; *Reineri et al.*, 2007) che il 17 β -estradiolo è in grado di esercitare effetti sull'aggregazione indotta da trombina attraverso un meccanismo dipendente dal coinvolgimento del recettore degli estrogeni.

In questo punto del progetto si inserisce il mio contributo, volto a valutare se l'8-PN potesse agire attraverso il recettore degli estrogeni per esplicitare il suo ruolo di inibizione piastrinica.

Per prima cosa sono andata a valutare il coinvolgimento del recettore per gli estrogeni nell'aggregazione piastrinica indotta da collagene in presenza di 8-PN utilizzando un'antagonista del recettore degli estrogeni, ICI 182,780. I dati ottenuti mostrano che l'antagonista non è in grado di abolire l'effetto dell'inibizione dell'aggregazione indotta da 8-PN quando usato a basse dosi (1 μ M e 10 μ M). Alte concentrazioni di ICI 182,780 (75 μ M) reversiono solo parzialmente l'inibizione indotta dall'8-PN, mentre concentrazioni ancora più alte (100 μ M e oltre) inibiscono da sole l'aggregazione piastrinica indotta da collagene. Ho quindi riefettuato esperimenti di dose-risposta su piastrine trattate con 8-PN (da 1 a 50 μ M), indotte ad aggregare con collagene e pretrattate con concentrazioni di ICI 182,780 10 μ M e 75 μ M: di nuovo la concentrazione di ICI 182,780 pari a 10 μ M non è stata in grado di modificare la cinetica di inibizione dell'aggregazione indotta dall'8-PN mentre la concentrazione pari a 75 μ M è stata in grado di dimezzare l'effetto dell'8-PN su ognuna delle concentrazione del fitoestrogeno utilizzato.

Sempre nell'ottica di valutare il coinvolgimento del recettore degli estrogeni negli effetti inibitori dati dall'8-PN, siamo andati a valutare il ruolo del recettore per gli estrogeni nella fosforilazione di VASP, che è nota giocare un ruolo principale nel controllo dell'organizzazione del citoscheletro in quanto regola il dinamismo dell'actina (*Laurent et al*, 1999), ed è coinvolta nei meccanismi di inibizione piastrinica, e di diverse chinasi coinvolte nei meccanismi di attivazione ed aggregazione piastrinica, come Akt, ERK 1/2, p38 MAP chinasi e Src. I risultati hanno mostrato che basse concentrazioni dell'antagonista non influiscono sulla fosforilazione di VASP sia sulla Ser157 che Ser239, e che non ripristinano la fosforilazione indotta da collagene di chinasi come Akt e ERK 1/2. Al contrario, alte concentrazioni di ICI 182,780 (75 μ M) bloccano la fosforilazione di VASP sulla Ser157 e non influiscono sulla fosforilazione di Akt, ERK 1/2 e VASP sulla Ser239.

Tutti questi risultati portano alla conclusione che l'azione inibitoria dell'8-PN sulla funzionalità piastrinica non è legata alla sua capacità di legare il recettore degli estrogeni e che l'8-PN agisce agendo su vie di segnalazione diversa.

BIBLIOGRAFIA DHEA-S

- Adam F, Kauskot A, Rosa JP, Bryckaert M. Mitogen-activated protein kinases in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2008 Dec;**6**(12):2007-16.
- Bernardi B, Guidetti GF, Campus F, Crittenden JR, Graybiel AM, Balduini C, Torti M. The small GTPase Rap1b regulates the cross talk between platelet integrin alpha2beta1 and integrin alphaIIb beta3. *Blood.* 2006 Apr 1;**107**(7):2728-35.
- Blockmans D, Deckmyn H, Vermylen J. Platelet activation. *Blood Rev.* 1995 Sep;**9**(3):143-56. Review.
- Böhm SK, Khitin LM, Grady EF, Aponte G, Payan DG, Bunnett NW. Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem.* 1996 Sep 6;**271**(36):22003-16.
- Bugaud F, Nadal-Wollbold F, Lévy-Toledano S, Rosa JP, Bryckaert M. Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets. *Blood.* 1999 Dec 1;**94**(11):3800-5.
- Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem.* 1994 May 20;**269**(20):14509-17.
- Butt E, Immler D, Meyer HE, Kotlyarov A, Laass K, Gaestel M. Heat shock protein 27 is a substrate of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets: phosphorylation-induced actin polymerization caused by HSP27 mutants. *J Biol Chem.* 2001 Mar 9;**276**(10):7108-13.
- Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem.* 1996 Mar 8;**271**(10):5545-51.
- Chang HJ, Shi R, Rehse P, Lin SX. Identifying androsterone (ADT) as a cognate substrate for human dehydroepiandrosterone sulfotransferase (DHEA-ST) important for steroid homeostasis: structure of the enzyme-ADT complex. *J Biol Chem.* 2004 Jan 23;**279**(4):2689-96.
- Charalampopoulos I, Alexaki VI, Lazaridis I, Dermitzaki E, Avlonitis N, Tsatsanis C, Calogeropoulou T, Margioris AN, Castanas E, Gravanis A. G protein-associated, specific membrane binding sites mediate the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone. *FASEB J.* 2006 Mar;**20**(3):577-9.
- Chen M, Stracher A. In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain. *J Biol Chem.* 1989 Aug 25;**264**(24):14282-9.
- Chen X, Earley K, Luo W, Lin SH, Schilling WP. Functional expression of a human thrombin receptor in Sf9 insect cells: evidence for an active tethered ligand. *Biochem J.* 1996 Mar 1;**314** (Pt 2):603-11.
- Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;**3**(8):1800-14. Review.
- Diaz-Ricart M, Palomo M, Fuste B, Lopez-Vilchez I, Carbo C, Perez-Pujol S, White JG, Escolar G. Inhibition of tyrosine kinase activity prevents the adhesive and cohesive properties of platelets and the expression of procoagulant activity in response to collagen. *Thromb Res.* 2008;**121**(6):873-83.
- Egenthaler M, Nolte C, Halbrügge M, Walter U. Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur J Biochem.* 1992 Apr 15;**205**(2):471-81.

- Fox JE, Berndt MC. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of glycoprotein Ib inhibits collagen-induced polymerization of actin in platelets. *J Biol Chem*. 1989 Jun 5;**264**(16):9520-6.
- Golden A, Brugge JS. Thrombin treatment induces rapid changes in tyrosine phosphorylation in platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Feb;**86**(3):901-5.
- Halbrügge M, Walter U. Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem*. 1989 Oct 20;**185**(1):41-50.
- Harper MT, Poole AW. Isoform-specific functions of protein kinase C: the platelet paradigm. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov;**35**(Pt 5):1005-8. Review.
- Hellevo K, Yoshimura M, Mons N, Hoffman PL, Cooper DM, Tabakoff B. The characterization of a novel human adenylyl cyclase which is present in brain and other tissues. *J Biol Chem*. 1995 May 12;**270**(19):11581-9.
- Hellevo K, Welborn R, Menninger JA, Tabakoff B. Human adenylyl cyclase type 7 contains polymorphic repeats in the 3' untranslated region: investigations of association with alcoholism. *Am J Med Genet*. 1997 Feb 21;**74**(1):95-8.
- Holinstat M, Voss B, Bilodeau ML, McLaughlin JN, Cleator J, Hamm HE. PAR4, but not PAR1, signals human platelet aggregation via Ca²⁺ mobilization and synergistic P2Y₁₂ receptor activation. *J Biol Chem*. 2006 Sep 8;**281**(36):26665-74.
- Jackson SP, Schoenwaelder SM, Yuan Y, Salem HH, Cooray P. Non-receptor protein tyrosine kinases and phosphatases in human platelets. *Thromb Haemost*. 1996 Nov;**76**(5):640-50. Review.
- Jensen BO, Selheim F, Døskeland SO, Gear AR, Holmsen H. Protein kinase A mediates inhibition of the thrombin-induced platelet shape change by nitric oxide. *Blood*. 2004 Nov 1;**104**(9):2775-82.
- Jesse RL, Loesser K, Eich DM, Qian YZ, Hess ML, Nestler JE. Dehydroepiandrosterone inhibits human platelet aggregation in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Dec **29**;774:281-90.
- Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 7;**95**(14):8070-4.
- Kramer RM, Roberts EF, Strifler BA, Johnstone EM. Thrombin induces activation of p38 MAP kinase in human platelets. *J Biol Chem*. 1995 Nov 17;**270**(46):27395-8.
- Kroll MH, Schafer AI. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood*. 1989 Sep;**74**(4):1181-95. Review.
- Kroner C, Eybrechts K, Akkerman JW. Dual regulation of platelet protein kinase B. *J Biol Chem*. 2000 Sep 8;**275**(36):27790-8.
- Labrie F, Diamond P, Cusan L, Gomez JL, Bélanger A, Candas B. Effect of 12-month dehydroepiandrosterone replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Oct;**82**(10):3498-505.
- Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol*. 2001 Jul;**22**(3):185-212. Review.
- Lawrence DW, Pryzwansky KB. The vasodilator-stimulated phosphoprotein is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase during neutrophil spreading. *J Immunol*. 2001 May 1;**166**(9):5550-6.
- Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci*. 1997 Aug;**22**(8):307-12. Review.

- Lopez-Illasaca M. Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem Pharmacol*. 1998 Aug 1;**56**(3):269-77. Review.
- Lova P, Campus F, Lombardi R, Cattaneo M, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M. Contribution of protease-activated receptors 1 and 4 and glycoprotein Ib-IX-V in the G(i)-independent activation of platelet Rap1B by thrombin. *J Biol Chem*. 2004 Jun 11;**279**(24):25299-306.
- Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). *J Biol Chem*. 2002 Jun 14;**277**(24):21379-88.
- Marjanovic JA, Li Z, Stojanovic A, Du X. Stimulatory roles of nitric-oxide synthase 3 and guanylyl cyclase in platelet activation. *J Biol Chem*. 2005 Nov 11;**280**(45):37430-8.
- Martina V, Benso A, Gigliardi VR, Masha A, Origlia C, Granata R, Ghigo E. Short-term dehydroepiandrosterone treatment increases platelet cGMP production in elderly male subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Mar;**64**(3):260-4.
- Mellon SH. Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacol Ther*. 2007 Oct;**116**(1):107-24. Review.
- Mills SJ, Ashworth JJ, Gilliver SC, Hardman MJ, Ashcroft GS. The sex steroid precursor DHEA accelerates cutaneous wound healing via the estrogen receptors. *J Invest Dermatol*. 2005 Nov;**125**(5):1053-62.
- Morgan CA 3rd, Southwick S, Hazlett G, Rasmusson A, Hoyt G, Zimolo Z, Charney D. Relationships among plasma dehydroepiandrosterone sulfate and cortisol levels, symptoms of dissociation, and objective performance in humans exposed to acute stress. *Arch Gen Psychiatry*. 2004 Aug;**61**(8):819-25.
- Nawata H, Yanase T, Goto K, Okabe T, Ashida K. Mechanism of action of anti-aging DHEA-S and the replacement of DHEA-S. *Mech Ageing Dev*. 2002 Apr 30;**123**(8):1101-6. Review.
- New L, Han J. The p38 MAP kinase pathway and its biological function. *Trends Cardiovasc Med*. 1998 Jul;**8**(5):220-8.
- Notelovitz M. Androgen effects on bone and muscle. *Fertil Steril*. 2002 Apr;**77** Suppl 4:S34-41. Review.
- Papkoff J, Chen RH, Blenis J, Forsman J. p42 mitogen-activated protein kinase and p90 ribosomal S6 kinase are selectively phosphorylated and activated during thrombin-induced platelet activation and aggregation. *Mol Cell Biol*. 1994 Jan;**14**(1):463-72.
- Porsová-Dutoit I, Sulcová J, Stárka L. Do DHEA/DHEAS play a protective role in coronary heart disease? *Physiol Res*. 2000;49 Suppl 1:S43-56. Review.
- Ribeiro F, Lopes RP, Nunes CP, Maito F, Bonorino C, Bauer ME. Dehydroepiandrosterone sulphate enhances IgG and Interferon-gamma production during immunization to tuberculosis in young but not aged mice. *Biogerontology*. 2007 Apr;**8**(2):209-20.
- Richie-Jannetta R, Busch JL, Higgins KA, Corbin JD, Francis SH. Isolated regulatory domains of cGMP-dependent protein kinase Ialpha and Ibeta retain dimerization and native cGMP-binding properties and undergo isoform-specific conformational changes. *J Biol Chem*. 2006 Mar 17;**281**(11):6977-84.
- Schwarz UR, Kobsar AL, Kokschi M, Walter U, Eigenthaler M. Inhibition of agonist-induced p42 and p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and CD40 ligand/P-selectin expression by cyclic nucleotide-regulated pathways in human platelets. *Biochem Pharmacol*. 2000 Nov 1;**60**(9):1399-407.
- Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol*. 2001 Nov 1;**62**(9):1153-61. Review.

- Siess W, Winegar DA, Lapetina EG. Rap1-B is phosphorylated by protein kinase A in intact human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Jul 31;**170**(2):944-50.
- Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Varone G, Caruso A, Genazzani AR. Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms. *Endocrinology*. 2003 Aug;**144**(8):3449-55.
- Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Hönig-Liedl P, Jarchau T, Hoschuetzky H, Walter U. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem*. 1998 Aug 7;**273**(32):20029-35.
- Soderling SH, Beavo JA. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 Apr;**12**(2):174-9. Review.
- van Vollenhoven RF, Engleman EG, McGuire JL. An open study of dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1994 Sep;**37**(9):1305-10.
- Walter U, Eigenthaler M, Geiger J, Reinhard M. Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. *Adv Exp Med Biol*. 1993;**344**:237-49. Review.
- Williams MR, Dawood T, Ling S, Dai A, Lew R, Myles K, Funder JW, Sudhir K, Komesaroff PA. Dehydroepiandrosterone increases endothelial cell proliferation in vitro and improves endothelial function in vivo by mechanisms independent of androgen and estrogen receptors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Sep;**89**(9):4708-15.
- Zhang J, Banfić H, Straforini F, Tosi L, Volinia S, Rittenhouse SE. A type II phosphoinositide 3-kinase is stimulated via activated integrin in platelets. A source of phosphatidylinositol 3-phosphate. *J Biol Chem*. 1998 Jun 5;**273**(23):14081-4.
- Zieve PD, Greenough WB 3rd. Adenyl cyclase in human platelets: activity and responsiveness. *Biochem Biophys Res Commun*. 1969 May 22;**35**(4):462-6.

BIBLIOGRAFIA 8-PN

- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 1987; **262**:5592-5.
- Anderson RF, Amarasinghe C, Fisher LJ, Mak WB, Packer JE. Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids. *Free Radic Res.* 2000; **33**:91-103.
- Aszódi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S, Fässler R. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.* 1999; **18**:37-48.
- Atkinson BT, Jarvis GE, Watson SP. Activation of GPVI by collagen is regulated by alpha2beta1 and secondary mediators. *J Thromb Haemost.* 2003 Jun; **1**(6):1278-87.
- Bergmeier W, Piffath CL, Goerge T, Cifuni SM, Ruggeri ZM, Ware J, Wagner DD. The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; **103**:16900-5.
- Blockmans D, Deckmyn H, Vermeylen J. Platelet activation. *Blood Rev.* 1995; **9**:143-56.
- Bouchard BA, Tracy PB. Platelets, leukocytes, and coagulation. *Curr Opin Hematol.* 2001; **8**:263-9.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998; **56**:317-33.
- Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem.* 1994; **269**:14509-17.
- Butt E, Immler D, Meyer HE, Kotlyarov A, Laass K, Gaestel M. Heat shock protein 27 is a substrate of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets: phosphorylation-induced actin polymerization caused by HSP27 mutants. *J Biol Chem.* 2001; **276**:7108-13.
- Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol.* 2003; **15**:547-56.
- Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem.* 1996; **271**:5545-51.
- Chen H, Kahn ML. Reciprocal signaling by integrin and nonintegrin receptors during collagen activation of platelets. *Mol Cell Biol.* 2003; **23**:4764-77.
- Chen M, Stracher A. In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain. *J Biol Chem.* 1989; **264**:14282-9.
- Clements JL, Lee JR, Gross B, Yang B, Olson JD, Sandra A, Watson SP, Lentz SR, Koretzky GA. Fetal hemorrhage and platelet dysfunction in SLP-76-deficient mice. *J Clin Invest.* 1999; **103**:19-25.
- Cos P, De Bruyne T, Apers S, Vanden Berghe D, Pieters L, Vlietinck AJ. Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med.* 2003; **69**:589-99.

- Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; **854**:435-42.
- de Virgilio M, Kiosses WB, Shattil SJ. Proximal, selective, and dynamic interactions between integrin α IIb β 3 and protein tyrosine kinases in living cells. *J Cell Biol.* 2004; **165**:305-11.
- Diaz-Ricart M, Palomo M, Fuste B, Lopez-Vilchez I, Carbo C, Perez-Pujol S, White JG, Escolar G. Inhibition of tyrosine kinase activity prevents the adhesive and cohesive properties of platelets and the expression of procoagulant activity in response to collagen. *Thromb Res.* 2008; **121**:873-83.
- Diel P, Thomae RB, Caldarelli A, Zierau O, Kolba S, Schmidt S, Schwab P, Metz P, Vollmer G. Regulation of gene expression by 8-prenylnaringenin in uterus and liver of Wistar rats. *Planta Med.* 2004; **70**:39-44.
- Dixon RA. Phytoestrogens. *Annu Rev Plant Biol.* 2004; **55**:225-61.
- Dunkern TR, Hatzelmann A. The effect of Sildenafil on human platelet secretory function is controlled by a complex interplay between phosphodiesterases 2, 3 and 5. *Cell Signal.* 2005; **17**:331-9.
- Duthie G, Crozier A. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2000; **3**:447-51.
- Egenthaler M, Nolte C, Halbrügge M, Walter U. Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur J Biochem.* 1992; **205**:471-81.
- Fiander H, Schneider H. Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics. *Cancer Lett.* 2000; **156**:117-24.
- Fox JE. The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost.* 1993; **70**:884-93.
- Franke AA, Cooney RV, Custer LJ, Mordan LJ, Tanaka Y. Inhibition of neoplastic transformation and bioavailability of dietary flavonoid agents. *Adv Exp Med Biol.* 1998; **439**:237-48.
- Gibbins J, Asselin J, Farndale R, Barnes M, Law CL, Watson SP. Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain in collagen-stimulated platelets. *J Biol Chem.* 1996; **271**:18095-9.
- Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem.* 1987; **56**:615-49.
- Gross BS, Melford SK, Watson SP. Evidence that phospholipase C-gamma2 interacts with SLP-76, Syk, Lyn, LAT and the Fc receptor gamma-chain after stimulation of the collagen receptor glycoprotein VI in human platelets. *Eur J Biochem.* 1999; **263**:612-23.
- Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 1994; **344**:721-4.
- Han J, Lim CJ, Watanabe N, Soriani A, Ratnikov B, Calderwood DA, Puzon-McLaughlin W, Lafuente EM, Boussiotis VA, Shattil SJ, Ginsberg MH. Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin α IIb β 3. *Curr Biol.* 2006; **16**:1796-806.
- Hathaway DR, Eaton CR, Adelstein RS. Regulation of human platelet myosin light chain kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Nature.* 1981; **291**:252-6.

- Henderson MC, Miranda CL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR. In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica*. 2000;**30**:235-51.
- Hettasch JM, Sellers JR. Caldesmon phosphorylation in intact human platelets by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *J Biol Chem*. 1991; **266**:11876-81.
- Heyerick A, Vervarcke S, Depypere H, Bracke M, De Keukeleire D. A first prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts. *Maturitas*. 2006; **54**:164-75.
- Horstrup K, Jablonka B, Hönig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, Walter U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem*. 1994; **225**:21-7.
- Hubbard GP, Stevens JM, Cicmil M, Sage T, Jordan PA, Williams CM, Lovegrove JA, Gibbins JM. Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components of the glycoprotein VI signaling pathway. *J Thromb Haemost*. 2003; **1**:1079-88.
- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002; **110**:673-87.
- Jackson SP, Schoenwaelder SM, Yuan Y, Salem HH, Cooray P. Non-receptor protein tyrosine kinases and phosphatases in human platelets. *Thromb Haemost*. 1996; **76**:640-50.
- Janssen K, Mensink RP, Cox FJ, Harryvan JL, Hovenier R, Hollman PC, Katan MB. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr*. 1998;**67**:255-62.
- Jung SM, Moroi M. Signal-transducing mechanisms involved in activation of the platelet collagen receptor integrin alpha(2)beta(1). *J Biol Chem*. 2000; **275**:8016-26.
- Kasirer-Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM, Shattil SJ. Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors. *Blood*. 2004;**103**:3403-11.
- Keely PJ, Parise LV. The alpha2beta1 integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase Cgamma2 in platelets. *J Biol Chem*. 1996; **271**:26668-76.
- Kitaoka M, Kadokawa H, Sugano M, Ichikawa K, Taki M, Takaishi S, Iijima Y, Tsutsumi S, Boriboon M, Akiyama T. Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8-isopentenylnaringenin and an initial study on its structure-activity relationship. *Planta Med*. 1998; **64**:511-5.
- Knight DC, Eden JA. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet Gynecol*. 1996; **87**:897-904.
- Knight DC, Eden JA. Phytoestrogens--a short review. *Maturitas*. 1995; **22**:167-75.
- Kroll MH, Schafer AI. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood*. 1989; **74**:1181-95.
- Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr*. 1999; **38**:133-42.
- Landolfi R, Mower RL, Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol*. 1984; **33**:1525-30.

- Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Gröbe L, Jockusch BM, Wehland J, Gertler FB, Carlier MF. Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* 1999;**144**:1245-58.
- Lecut C, Schoolmeester A, Kuijpers MJ, Broers JL, van Zandvoort MA, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H, Jandrot-Perrus M, Heemskerk JW. Principal role of glycoprotein VI in alpha2beta1 and alphaIIb beta3 activation during collagen-induced thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; **24**:1727-33.
- Lee HS, Ko HR, Ryu SY, Oh WK, Kim BY, Ahn SC, Mheen TI, Ahn JS. Inhibition of phospholipase C gamma 1 by the prenylated flavonoids from *Sophora flavescens*. *Planta Med.* 1997; **63**:266-8.
- Lindahl M, Tagesson C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation.* 1997; **21**:347-56.
- López JA, Dong JF. Structure and function of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Curr Opin Hematol.* 1997 Sep;**4**(5):323-9.
- Lopez-Illasaca M. Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem Pharmacol.* 1998; **56**:269-77.
- McNicol A, Shibou TS, Pampolina C, Israels SJ. Incorporation of map kinases into the platelet cytoskeleton. *Thromb Res.* 2001; **103**:25-34.
- Messina M, Barnes S. The role of soy products in reducing risk of cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1991; **83**:541-6.
- Michelson AD, Benoit SE, Furman MI, Breckwoldt WL, Rohrer MJ, Barnard MR, Loscalzo J. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol.* 1996; **270**:H1640-8.
- Milligan SR, Kalita JC, Heyerick A, Rong H, De Cooman L, De Keukeleire D. Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; **84**:2249-52.
- Milligan SR, Kalita JC, Pocock V, Van De Kauter V, Stevens JF, Deinzer ML, Rong H, De Keukeleire D. The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; **85**:4912-5.
- Moro L, Reineri S, Piranda D, Pietrapiana D, Lova P, Bertoni A, Graziani A, Defilippi P, Canobbio I, Torti M, Sinigaglia F. Nongenomic effects of 17beta-estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor beta and Src kinase. *Blood.* 2005; **105**:115-21.
- Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res.* 2004; **114**:221-33.
- Nakamura T, Jamieson GA, Okuma M, Kambayashi J, Tandon NN. Platelet adhesion to native type I collagen fibrils. Role of GPVI in divalent cation-dependent and -independent adhesion and thromboxane A2 generation. *J Biol Chem.* 1998 ;**273**:4338-44.
- Navarro-Núñez L, Rivera J, Guerrero JA, Martínez C, Vicente V, Lozano ML. Differential effects of quercetin, apigenin and genistein on signalling pathways of protease-activated receptors PAR(1) and PAR(4) in platelets. *Br J Pharmacol.* 2009; **158**:1548-56.
- Navarro-Núñez L, Lozano ML, Martínez C, Vicente V, Rivera J. Effect of quercetin on platelet spreading on collagen and fibrinogen and on multiple platelet kinases. *Fitoterapia.* 2010; **81**:75-80.
- Nikolic D, Li Y, Chadwick LR, Grubjesic S, Schwab P, Metz P, van Breemen RB. Metabolism of 8-prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops (*Humulus lupulus*), by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2004 Feb;**32**(2):272-9.

- Nolte C, Eigenthaler M, Horstrup K, Hönig-Liedl P, Walter U. Synergistic phosphorylation of the focal adhesion-associated vasodilator-stimulated phosphoprotein in intact human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating platelet inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 1994; **48**:1569-75.
- Offermanns S. The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation. *Biol Chem.* 2000; **381**:389-96.
- Okumura T, Jamieson GA. Platelet glycoprotein. I. Orientation of glycoproteins of the human platelet surface. *J Biol Chem.* 1976; **251**:5944-9.
- Pasquet JM, Gross B, Quek L, Asazuma N, Zhang W, Sommers CL, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Judd B, Lee JR, Koretzky G, Love PE, Samelson LE, Watson SP. LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase cgamma2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI. *Mol Cell Biol.* 1999; **19**:8326-34.
- Pasquet JM, Quek L, Pasquet S, Poole A, Matthews JR, Lowell C, Watson SP. Evidence of a role for SHP-1 in platelet activation by the collagen receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem.* 2000; **275**:28526-31.
- Pearce AC, Senis YA, Billadeau DD, Turner M, Watson SP, Vigorito E. Vav1 and vav3 have critical but redundant roles in mediating platelet activation by collagen. *J Biol Chem.* 2004; **279**:53955-62.
- Pearson DA, Paglieroni TG, Rein D, Wun T, Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Gosselin R, Schmitz HH, Keen CL. The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. *Thromb Res.* 2002; **106**:191-7.
- Pepper MS, Hazel SJ, Hümpel M, Schleuning WD. 8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 2004; **199**:98-107.
- Polette A, Lemaitre D, Lagarde M, Véricel E. N-3 fatty acid-induced lipid peroxidation in human platelets is prevented by catechins. *Thromb Haemost.* 1996; **75**:945-9.
- Polini N, Rauschemberger MB, Mendiberri J, Selles J, Massheimer V. Effect of genistein and raloxifene on vascular dependent platelet aggregation. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; **267**:55-62.
- Praticò D, Dogné JM. Vascular biology of eicosanoids and atherogenesis. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2009; **7**:1079-89.
- Quek LS, Bolen J, Watson SP. A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. *Curr Biol.* 1998; **8**:1137-40.
- Quinton TM, Kim S, Dangelmaier C, Dorsam RT, Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Protein kinase C- and calcium-regulated pathways independently synergize with Gi pathways in agonist-induced fibrinogen receptor activation. *Biochem J.* 2002; **368**:535-43.
- Radley JM, Scurfield G. The mechanism of platelet release. *Blood.* 1980; **56**:996-9.
- Reinhard M, Jarchau T, Walter U. Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins. *Trends Biochem Sci.* 2001; **26**:243-9.
- Reineri S, Bertoni A, Sanna E, Baldassarri S, Sarasso C, Zanfa M, Canobbio I, Torti M, Sinigaglia F. Membrane lipid rafts coordinate estrogen-dependent signaling in human platelets. *Biochim Biophys Acta.* 2007; **1773**:273-8.
- Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature.* 1989; **338**:383-4.

- Rong H, Boterberg T, Maubach J, Stove C, Depypere H, Van Slambrouck S, Serreyn R, De Keukeleire D, Mareel M, Bracke M. 8-Prenylnaringenin, the phytoestrogen in hops and beer, upregulates the function of the E-cadherin/catenin complex in human mammary carcinoma cells. *Eur J Cell Biol.* 2001; **80**:580-5
- Ruggeri ZM, Orje JN, Habermann R, Federici AB, Reininger AJ. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood.* 2006; **108**:1903-10.
- Rusznayk SP, Szent-Gyorgyi A. Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature.* 1936; **138**:27
- Ryningen A, Olav Jensen B, Holmsen H. Elevation of cyclic AMP decreases phosphoinositide turnover and inhibits thrombin-induced secretion in human platelets. *Biochim Biophys Acta.* 1998; **1394**:235-48.
- Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* 1996; **84**:289-97.
- Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell.* 1998 Sep 4; **94**(5):657-66.
- Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem.* 1985; **260**:11107-14.
- Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood.* 2004; **104**:1606-15.
- Siess W, Winegar DA, Lapetina EG. Rap1-B is phosphorylated by protein kinase A in intact human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; **170**:944-50.
- Stevens JF, Taylor AW, Deinzer ML. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1999; **832**:97-107.
- Strick R, Strissel PL, Borgers S, Smith SL, Rowley JD. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; **97**:4790-5.
- Tuckwell D, Calderwood DA, Green LJ, Humphries MJ. Integrin alpha 2 I-domain is a binding site for collagens. *J Cell Sci.* 1995; **108**:1629-37.
- Van de Walle GR, Vanhoorelbeke K, Majer Z, Illyés E, Baert J, Pareyn I, Deckmyn H. Two functional active conformations of the integrin $\alpha_2\beta_1$, depending on activation condition and cell type. *J Biol Chem.* 2005; **280**:36873-82.
- van Lipzig MM, ter Laak AM, Jongejan A, Vermeulen NP, Wamelink M, Geerke D, Meerman JH. Prediction of ligand binding affinity and orientation of xenoestrogens to the estrogen receptor by molecular dynamics simulations and the linear interaction energy method. *J Med Chem.* 2004; **47**:1018-30.
- Vinogradova O, Velyvis A, Velyviene A, Hu B, Haas T, Plow E, Qin J. A structural mechanism of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell.* 2002; **110**:587-97.
- Wang D, Feng J, Wen R, Marine JC, Sangster MY, Parganas E, Hoffmeyer A, Jackson CW, Cleveland JL, Murray PJ, Ihle JN. Phospholipase C γ 2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity.* 2000; **13**:25-35.
- Wardell MR, Reynolds CC, Berndt MC, Wallace RW, Fox JE. Platelet glycoprotein Ib beta is phosphorylated on serine 166 by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1989; **264**:15656-61.

Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000 Jul 15;**60**(14):3823-31.

White JG, Escolar G. The blood platelet open canalicular system: a two-way street. *Eur J Cell Biol.* 1991; **56**:233-42.

White JG. Platelet ultrastructure. In: Bloom A.L., Forbes C.D., Thomas D.P., Tuddenham E.G.D. (eds): *Haemostasis and Thrombosis*. Third edition. 1994; **3**:49-87.

Wollny T, Aiello L, Di Tommaso D, Bellavia V, Rotilio D, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L. Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. *Br J Pharmacol.* 1999; **127**:747-55.

Zhang J, Banfić H, Straforini F, Tosi L, Volinia S, Rittenhouse SE. A type II phosphoinositide 3-kinase is stimulated via activated integrin in platelets. A source of phosphatidylinositol 3-phosphate. *J Biol Chem.* 1998; **273**:14081-4.

Zierau O, Gester S, Schwab P, Metz P, Kolba S, Wulf M, Vollmer G. Estrogenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin and 8-prenylnaringenin. *Planta Med.* 2002; **68**:449-51.

Papers pubblicati durante il Dottorato:

“DEHYDROEPIANDROSTERONE-SULFATE INHIBITS THROMBIN-INDUCED PLATELET AGGREGATION”

Bertoni A, Rastoldo A, Sarasso C, Di Vito C, Sampietro S, Nalin M, Bagarotti A, Sinigaglia F.

Steroids. 2012 Feb;77(3):260-8. Epub 2011 Dec 13.

"THE PHYTO-OESTROGEN 8-PRENYLNARINGENIN INHIBITS AGONIST-DEPENDENT ACTIVATION OF HUMAN PLATELETS"

Di Vito C, Bertoni A, Nalin M, Sampietro S, Zanfa M, Sinigaglia F.

Biochim Biophys Acta. 2012 Nov;1820(11):1724-33. Epub 2012 Jul 3.



Dehydroepiandrosterone-sulfate inhibits thrombin-induced platelet aggregation

Alessandra Bertoni^{a,b,1}, Alessandro Rastoldo^{a,1}, Chiara Sarasso^a, Clara Di Vito^a, Sara Sampietro^a, Michela Nalin^a, Alessandra Bagarotti^a, Fabiola Sinigaglia^{a,b,*}

^a Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Piemonte Orientale A. Avogadro, Novara, Italy

^b Center of Biotechnology for Applied Medical Research (BRMA), University of Piemonte Orientale A. Avogadro, Novara, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 August 2011

Received in revised form 19 October 2011

Accepted 2 December 2011

Available online 13 December 2011

Keywords:

Platelets

Dehydroepiandrosterone-sulfate

Signal transduction

Platelet aggregation

Platelet secretion

cGMP

ABSTRACT

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated form, DHEA-S, are the most abundant steroids circulating in human blood. DHEA stimulates endothelial cells to release high amounts of nitric oxide in the circulation. Nitric oxide activates guanylyl cyclase in platelets thus decreasing the responsiveness of these cells to physiological agonists. However, the impact of DHEA-S and DHEA on platelet function and their possible role in modulating the response of human platelets to physiological agonists were not yet investigated. Here, DHEA-S, but not DHEA, inhibited *in vitro* thrombin-dependent platelet aggregation in a dose-dependent manner. DHEA-S exerted this effect by decreasing thrombin-dependent dense granule secretion, and so impairing the positive feed-back loop provided by ADP. Furthermore, DHEA-S inhibited thrombin-dependent activation of Akt, ERK1/2, and p38 MAP kinase. Although both DHEA-S and DHEA directly activated in platelets the inhibitory cGMP/PGK/VASP pathway, these events were not responsible for the inhibitory action of DHEA-S in platelets. In addition DHEA-S acted in synergism with nitric oxide in inhibiting platelet aggregation. In conclusion DHEA-S inhibited platelet activation caused by a mild stimulus without completely hampering platelet functionality and thus DHEA-S may participate in the physiological mechanisms that maintain circulating platelets in a resting state. The role played by DHEA-S could be relevant mainly when the functionality of the vascular endothelium is compromised.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated form, DHEA-S, are the most abundant steroids circulating in human blood [1]. A considerable number of data reports beneficial roles of DHEA administration in both animals and humans. Indeed, in humans oral administration of DHEA stimulated immune responses, enhanced cognitive ability and exerted antidepressant effects [2–4]. Moreover, clinical and population-based studies suggest that DHEA/DHEA-S could play a protective role against atherosclerosis and coronary artery disease [5,6].

DHEA is an intermediate metabolite in the androgenic pathway leading to the production of sex steroid hormones including estrogens, hence some of the positive effects of DHEA may be related to the effects of metabolically active downstream steroids [7]. Although the mechanisms through which DHEA functions in the vasculature are still largely unknown, recent evidence has shown that in endothelial cells DHEA stimulates nitric oxide (NO) production by a cell surface-initiated G-protein-coupled mechanism

[8]. DHEA circulates in blood mainly in its sulfated form, DHEA-S, which is primarily synthesized in the adrenal cortex and liver from DHEA by DHEA-sulfotransferase 2A1 (SULT2A1) [9]. Whereas in human blood the concentration of DHEA-S is in the micromolar range, 1000-fold higher than that of DHEA [10], DHEA-S did not participate in endothelial cell stimulation, and the biological role of this abundant blood component, if any, is totally unknown. It is well-established that endothelium-derived NO activates guanylyl cyclase in platelets and decreases the responsiveness of these cells to physiological agonists [11]. Since endothelium-derived NO is one of the most effective tools against undesirable platelet aggregation and thrombus formation, DHEA could play a relevant role in the molecular mechanisms that physiologically maintain platelets in a resting state. In this context, DHEA-S may also contribute to the protection from thrombosis in circulation.

Despite the evidence that *in vivo* the positive cardiovascular effects of DHEA seem to lead back to inhibition of platelet function by the endothelium-derived NO, little is known of a possible direct effect of this steroid hormone on human platelets. It has been reported that DHEA-S is able to inhibit human platelet aggregation promoted by arachidonic acid in plasma [12]. However, the impact of DHEA and DHEA-S on platelet function and their possible role in modulating the response of human platelets to physiological agonists have not yet been investigated.

* Corresponding author. Address: Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Piemonte Orientale A. Avogadro, Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy. Tel./fax: +39 0321 660 608.

E-mail address: fabiola.sinigaglia@med.unipmn.it (F. Sinigaglia).

¹ These two authors equally contributed to this study.

Here we characterized the effects of DHEA-S and DHEA on platelet function. We found that DHEA-S, but not DHEA, inhibited *in vitro* thrombin-dependent platelet aggregation in a dose-dependent manner. DHEA-S exerted this effect by affecting dense granule secretion and the phosphorylation of Akt, ERK1/2, and p38 MAPK. Moreover, we found that the treatment of platelets with both DHEA-S and DHEA directly activated one of the best characterized inhibitory pathway in platelets by increasing intracellular cGMP levels and promoting PKG-dependent VASP phosphorylation. However, our data demonstrates that the activation of this pathway does not mediate the inhibitory action of DHEA-S on platelet function.

2. Experimental

2.1. Materials

Sodium nitroprusside was from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland) cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay system was from GE Healthcare (Milan, Italy) cGMP complete EIA kit was from Assay Design (Vinci, FI Italy). Monoclonal antibody against phospho-vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP (P-Ser239 and P-Ser157), l-NMMA, l-NAME were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Polyclonal antibody against phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204), polyclonal antibody against phospho-p38 MAPK, were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), polyclonal antibody against phospho-Akt was from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). CHRONO-LUME reagent was from CHRONO-LOG Corporation (Havertown, PA, USA). Enhanced chemiluminescence reagent was from Perkin–Elmer Life Science (Boston, MA, USA). Monoclonal antibody against integrin β 3 was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Thrombin, dehydroepiandrosterone-sulfate, dehydroepiandrosterone, 17 β -estradiol, 17 β -estradiol-sulfate, EMATE, forskolin, and phosphospecific polyclonal antibody against anti-Src kinase P-Tyr418 were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). ODQ and ICI 182,780 were from Tocris Bioscience (Bristol, UK). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Preparation of platelets

Blood was withdrawn from healthy donors in ACD (1.3×10^{-1} M citric acid, 1.52×10^{-1} M sodium citrate, 1.12×10^{-1} M glucose), accordingly to the Declaration of Helsinki and after informed consent was obtained. Platelets were purified by gel-filtration as previously described [13] and eluted with HEPES buffer (1×10^{-2} M HEPES, 1.37×10^{-1} M NaCl, 2.9×10^{-3} M KCl, 1.2×10^{-2} M NaHCO₃, pH 7.4). Platelet count was adjusted in HEPES buffer and cell suspension was rendered 2×10^{-3} M CaCl₂, 2×10^{-3} M MgCl₂, and 5×10^{-3} M glucose.

2.3. Evaluation of platelet aggregation and ATP secretion

Samples of gel-filtered platelets (3×10^8 cells/ml) were pre-warmed at 37 °C in a CHRONO-LOG lumiaggregometer for 2 min, incubated with DHEA (1×10^{-8} , 4.4×10^{-7} , 3×10^{-4} M), DHEA-S (0.068 – 10×10^{-4} M), 17 β -estradiol (3×10^{-4} M), 17 β -estradiol-sulfate (3×10^{-4} M), or 0.3% methanol, as vehicle, for 1 min and then stimulated with thrombin (0.02–0.1 U/ml), 2×10^{-6} g/ml collagen, or 1×10^{-6} M U46619, as indicated. Aggregation was monitored continuously for at least 5 min. In some experiments inhibitors were added before DHEA-S. ODQ was used at 2×10^{-6} M for 5 min, ICI 182,780 at 1×10^{-5} M for 10 min, and EMATE at 1×10^{-5} M for 1 min. For all inhibitors control samples were treated with vehicle for the same times. Measurement of platelet secretion was carried out by adding the luciferin–luciferase CHRONO-LUME reagent 5 min after thrombin.

2.4. Analysis of contents of cyclic nucleotides

Samples of gel-filtered platelets (4×10^8 cells/ml for cGMP and 1×10^8 cells/ml for cAMP assay) were incubated for 1 min with 3×10^{-4} M DHEA-S, 1×10^{-8} M DHEA, 1×10^{-5} M forskolin, as positive control for cAMP, or 1×10^{-4} M sodium nitroprusside, as positive control for cGMP. In some experiments platelets were treated with l-NMMA and l-NAME 3×10^{-4} M for 5 min or ODQ 2×10^{-6} M for 5 min before stimulation. The reaction was stopped by adding 2 vol. of ice-cold 96% ethanol or 0.1 M HCl, for cAMP and cGMP assay, respectively. Lysates were centrifuged at 15,500g for 10 min at 4 °C, and supernatants were recovered. The supernatants were pulled and lyophilized for the cAMP analysis or stored at -20 °C for cGMP analysis. The lyophilized samples were dissolved in bidistilled water and analyzed for their content in cAMP or cGMP following the manufacturer's instruction for the acetylation protocol.

2.5. Electrophoresis and immunoblotting analysis

Samples of gel-filtered platelets (1×10^9 cells/ml) were preincubated with 3×10^{-4} M DHEA-S, 1×10^{-8} M DHEA or 0.3% methanol from 1 to 5 min at 37 °C, as indicated. In some experiments 2×10^{-6} M ODQ was added 5 min before stimulation. Stimulation was stopped by adding 0.5 vol. of 3 \times Laemmli sample buffer (6% SDS, 1.5% DTT, 30% glycerol, 0.03% bromophenol blue, 3 \times protease inhibitors mix, 3×10^{-3} M phosphate glycerol, 2×10^{-2} M sodium pyrophosphate, 1×10^{-3} M Na₃VO₄, 1×10^{-2} M NaF, 1×10^{-3} M EDTA). Proteins were separated by SDS–PAGE, transferred to PVDF membranes and probed with specific antibodies. Immunoreactive bands were detected by an ECL reaction using a Versadoc instrument and analyzed with QuantityOne software (Bio-Rad, Milan, Italy).

2.6. Statistical analysis

Statistical differences were determined by one-way ANOVA with a post hoc Tukey HSD test. Results were considered to be significant at $p < 0.05$ (*/#) and $p < 0.01$ (**/##).

3. Results

3.1. DHEA-S, and not DHEA, inhibited platelet aggregation caused by thrombin

With the aim to investigate the role of DHEA and DHEA-S in platelet function, samples of gel-filtered platelets were stimulated with 3×10^{-4} M DHEA-S, a concentration shown to inhibit platelet aggregation [12] or 1×10^{-8} M DHEA, physiological concentration. Neither DHEA nor DHEA-S were able to induce any appreciable aggregation of human platelets (Fig. 1A). Thus, platelets were preincubated for 1 min with 3×10^{-4} M DHEA-S, 1×10^{-8} M DHEA or vehicle and then stimulated with 0.05 U/ml thrombin, a concentration that caused about 70% of platelet aggregation. Surprisingly, while DHEA, the active form of the hormone, did not exert any appreciable effect, DHEA-S inhibited the platelet response to thrombin by $64.58 \pm 19.96\%$ (Fig. 1A).

In order to better characterize the kinetics of DHEA-S inhibition of thrombin-induced platelet aggregation, platelets were preincubated with different concentrations of DHEA-S (0.068 – 10×10^{-4} M) and then stimulated with 0.05, 0.025 or 0.02 U/ml thrombin. As expected, these concentrations of thrombin elicited in platelets different extents of aggregation, $66.75 \pm 17.52\%$, $46.67 \pm 23.25\%$, and $42.75 \pm 14.63\%$, respectively (data not shown). Fig. 2 shows that DHEA-S inhibited thrombin-induced platelet

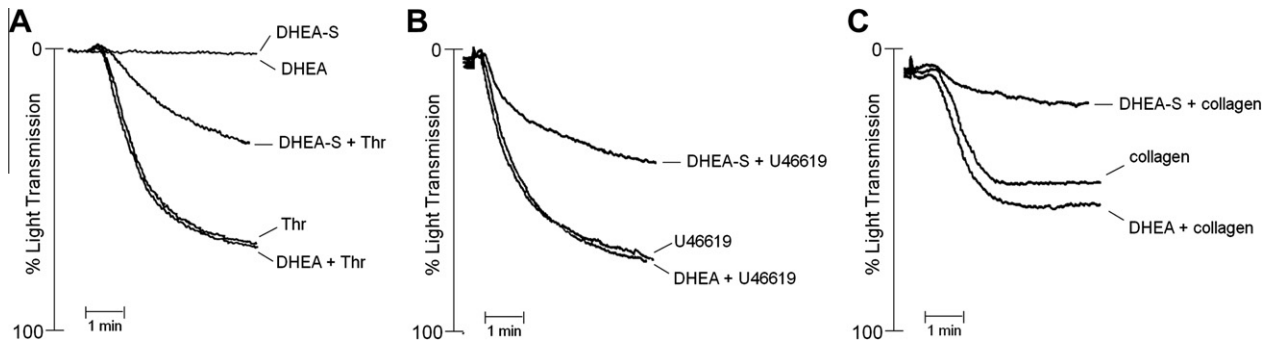


Fig. 1. DHEA-S, and not DHEA, inhibits platelet aggregation. (A) Platelets were pretreated with 3×10^{-4} M DHEA-S, 1×10^{-8} M DHEA or vehicle for 1 min and then stimulated with 0.05 U/ml thrombin (Thr) (A), 1×10^{-6} M U46619 (B), or 2×10^{-6} g/ml collagen (Coll) (C), as indicated. Aggregation traces are from a representative experiment out of three performed with platelets obtained from different donors.

aggregation in a dose-dependent manner. The inhibitory effect of DHEA-S was maximal at concentrations higher than 5×10^{-4} M DHEA-S, which caused a complete inhibition of platelet aggregation induced by all the concentrations of thrombin tested. As shown in the insert of Fig. 2 the physiological concentration of DHEA-S (0.068×10^{-4} M) was able to inhibit by $24.57 \pm 15.74\%$ and $15.81 \pm 13.41\%$ the aggregation induced by 0.02 and 0.025 U/ml thrombin, respectively. However, the same concentration of DHEA-S did not affect the aggregation induced by 0.05 U/ml thrombin.

Furthermore, the concentrations of DHEA-S necessary to obtain 50% inhibition (IC_{50}) of platelet aggregation were approximately 0.15×10^{-4} , 1.5×10^{-4} and 2.6×10^{-4} M for 0.02, 0.025 and 0.05 U/ml thrombin, respectively.

The extent of platelet aggregation induced by low doses of thrombin such as 0.02 or 0.025 U/ml displayed high individual variability. In order to minimize the impact of this behavior, in the fol-

lowing experiments we used 0.05 U/ml thrombin to stimulate platelets and consequently DHEA-S was employed at 3×10^{-4} M, a concentration corresponding to the IC_{50} for the dose of thrombin chosen. These experimental conditions ensured about 50% inhibition of the aggregation induced by 0.05 U/ml thrombin.

Because 3×10^{-4} M is a concentration of DHEA-S about 44-fold higher than the physiological concentration, we investigated whether a higher concentration of DHEA would cause a similar inhibition of platelet aggregation. Platelets were incubated for 1 min with different concentrations of DHEA, 1×10^{-8} M, the physiological concentration, or 44×10^{-8} M, a concentration 44-fold higher, and then aggregated with 0.05 U/ml thrombin. None of the doses of DHEA used was able to inhibit platelet aggregation induced by thrombin (data not shown).

It is possible that a high concentration of steroids such as 3×10^{-4} M might exert some non-specific effect due to the presence of the steroid nucleus and/or the sulfate group. Thus, to evaluate the possible non-specific effects of DHEA-S, platelets were incubated with 3×10^{-4} M DHEA-S, 3×10^{-4} M DHEA, 3×10^{-4} M 17β -estradiol, 3×10^{-4} M 17β -estradiol-sulfate, or vehicle for 1 min before stimulation with 0.05 U/ml thrombin. DHEA-S, but none of the other steroids, was able to inhibit thrombin-dependent platelet aggregation (data not show).

The different effects of DHEA and DHEA-S on thrombin-dependent platelet aggregation could be a consequence of diverse platelet membrane permeability to these compounds. It has been shown that DHEA-S can be actively transported across the plasma membrane by the organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1) [14], which has also been described in platelets [15]. Once in the cell DHEA-S can be metabolized by the platelet estrone/DHEA sulfatase to DHEA and/or to active downstream steroids. Thus, platelets were preincubated with 1×10^{-5} M EMATE, an inhibitor of the estrone/DHEA sulfatase [16], and then DHEA-S or vehicle were added before stimulation with thrombin. The presence of EMATE was not able to prevent the inhibitory effects of DHEA-S on thrombin-dependent aggregation (Table 1). Hence, we concluded that neither DHEA- nor DHEA-S-derived steroids but DHEA-S was actually able to negatively affect thrombin-triggered signals leading to platelet aggregation. At present little is known of the pathways through which DHEA/DHEA-S signal in different cell types. In DHEA-treated endothelial cells estrogen receptors were engaged by both DHEA and DHEA-derived estrogens [7]. Estrogen receptors are also expressed in human platelets, and the β isoform is the main estrogen receptor in these cells [17].

To investigate the role of estrogen receptors in DHEA-S signaling in human platelets, samples of gel-filtered platelets were incubated with 1×10^{-5} M ICI 182,780 and then treated with DHEA-S before stimulation with 0.05 U/ml thrombin. ICI 182,780 binds to estrogen receptors and inhibits the effect of 17β -estradiol in many

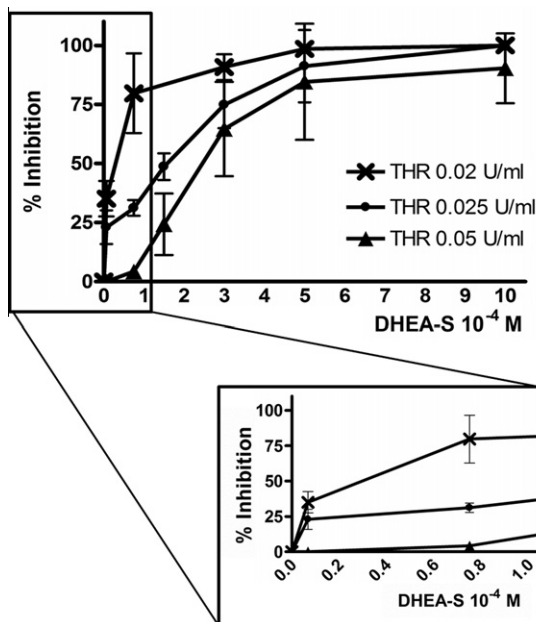


Fig. 2. DHEA-S inhibits platelet aggregation in a dose-dependent manner. Platelets were incubated for 1 min with increasing concentrations of DHEA-S (0.068 – 10×10^{-4} M) and then stimulated with different doses of thrombin (Δ 0.05; \bullet 0.025; \times 0.02 U/ml). Results are expressed as percentage of inhibition after normalization to the aggregation induced by the correspondent thrombin concentration in each experiment. Data are means \pm SD of three independent experiments. $**p < 0.01$. Inset: enlargement of the boxed area showing an expanded concentration scale on the x-axis.

Table 1

DHEA-S inhibits platelet aggregation independently of its metabolism and estrogen receptors signaling.

Treatment	% Aggregation (relative to Thr aggregated sample)
Thr	100
DHEA-S + Thr	52.1 ± 2.6
EMATE + DHEA-S + Thr	50.3 ± 3.7
ICI 182,780 + DHEA-S + Thr	49.5 ± 5.2

Thrombin (Thr) was used at 0.05 U/ml. 3×10^{-4} M DHEA-S was added 1 min before Thr. 1×10^{-5} M ICI 182,780 (estrogen receptor antagonist) or 1×10^{-5} M EMATE (estrone sulfatase inhibitor) were added 30 min before stimulation with DHEA-S.

cell types including platelets [13]. ICI 182,780 treatment did not modify the extent of thrombin-dependent platelet aggregation in the presence of DHEA-S (Table 1). Thus, the platelet estrogen receptors were not recruited by DHEA-S, DHEA or DHEA(S)-derived estrogens in this process.

Platelet aggregation can be triggered by various agonists activating multiple signaling cascades that can be divided into events common to all agonists and events specific to classes of receptors such as G-protein-coupled receptors, integrins, and ITAM-bearing receptors.

To verify how generalized the effects of DHEA-S and DHEA are, we investigated the inhibitory effects of 3×10^{-4} M DHEA-S and 1×10^{-8} M DHEA on platelet aggregation induced by the thromboxane A2 analogue, U46619 (1×10^{-6} M), which signals through G_q - $G_{12/13}$ -associated receptors as thrombin, and collagen (2×10^{-6} g/ml), which uses both an ITAM-bearing receptor and an integrin. As shown in Fig. 1B and C we found that DHEA-S, and not DHEA, was also able to inhibit platelet aggregation induced by both U46619 and collagen by $55.56 \pm 18.73\%$ and $63.34 \pm 19.38\%$, respectively.

3.2. DHEA-S and DHEA activate the NOS/cGMP/PKG pathway in human platelets

One of the best characterized inhibitory pathways in platelets is activated by the endothelium-derived NO and leads to intraplatelet cGMP increase, activation of PKG and phosphorylation of many substrates, among which is VASP, vasodilator-stimulated phospho-protein. Phosphorylated VASP has reduced ability to bind to cytoskeletal proteins, thus leading to inhibition of cytoskeleton reorganization, an event essential for irreversible platelet aggregation [18]. Although in platelets the presence of nitric oxide synthase (NOS) and the endogenous synthesis of NO are still matter of debate [11], we decided anyway to analyze the contribution to DHEA-S signaling of some components of the NOS/cGMP/PKG pathway. Furthermore, because in endothelial cells only DHEA, but not DHEA-S, activated NOS, we also evaluated the effect of DHEA on the activation of the NOS/cGMP/PKG signaling pathway.

At first we investigated the phosphorylation state of VASP. VASP is a major substrate for PKG and also PKA. PKA and PKG preferentially phosphorylate VASP on Ser157 and Ser239, respectively. Notably, phosphorylation on Ser157 produces a characteristic electrophoretic mobility shift of VASP from 46 to 50 kDa [18]. Thus, platelets were incubated for increasing times with DHEA-S or DHEA and analyzed by immunoblotting with anti-PSer239- or anti-PSer157-VASP antibodies. In contrast with the effect of the hormones on platelet aggregation, we found that in human platelets not only DHEA-S but also DHEA promoted a rapid and sustained phosphorylation of VASP on both Ser239 and Ser157 (Fig. 3A).

Although VASP was phosphorylated by both hormones also on Ser157, the low extent of the phosphorylation on Ser157 and the absence of a 50 kDa shifted band in the P-Ser239 blot led us to speculate that the kinase upstream of VASP phosphorylation was PKG and not PKA, suggesting that both DHEA-S and DHEA could

activate in platelets the NO/cGMP/PKG pathway. Indeed, a similar mechanism has already been described downstream of DHEA in endothelial cells [8].

To confirm this hypothesis, we analyzed the concentration of the cyclic nucleotides cGMP and cAMP in platelets treated with DHEA or DHEA-S (forskolin or sodium nitroprusside (SNP) were used as positive controls). Neither DHEA-S nor DHEA were able to induce any detectable modification of the cAMP content with respect to the basal level (data not shown). By contrast, both DHEA-S and DHEA caused a significant increase in the cGMP level that was blunted by inhibition of either guanylyl cyclase with ODQ or NOS with L -NAME/ L -NMMA (Fig. 3B). These results suggest that both DHEA-S and DHEA activate the NO/cGMP/PKG pathway in human platelets.

3.3. Activation of NOS/cGMP/PKG pathway in human platelets is not involved in DHEA-S inhibition of platelet aggregation

We showed that both DHEA-S and DHEA were able to promote the activation of the cGMP/PKG/VASP pathway, although only DHEA-S inhibited thrombin-induced platelet aggregation. In order to investigate this discrepancy, platelets were treated for 5 min

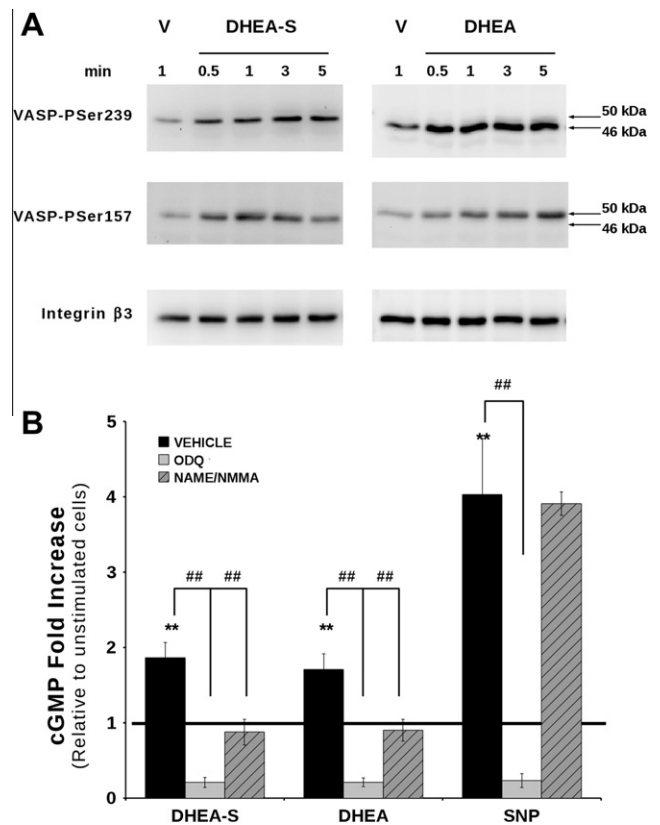


Fig. 3. DHEA-S and DHEA activate the NO/cGMP/PKG pathway leading to VASP phosphorylation. (A) Platelets were incubated at 37 °C with vehicle (V), 3×10^{-4} M DHEA-S or 1×10^{-8} M DHEA for the indicated times. Aliquots containing the same amount of proteins were analyzed by immunoblotting with anti-VASP-PSer239, anti-VASP-PSer157 and anti-integrin $\beta 3$ antibodies. The immunoblotting experiment shown is representative of three identical experiments performed with platelets obtained from different donors. (B) Gel-filtered platelets were incubated with vehicle (VEHICLE), 2×10^{-6} M ODQ for 5 min, or 3×10^{-4} M L -NAME plus 3×10^{-4} M L -NMMA (NAME/NMMA) for 5 min and then stimulated with 3×10^{-4} M DHEA-S, 1×10^{-8} M DHEA or 1×10^{-4} M SNP for 1 min at 37 °C. cGMP levels were determined by the cGMP complete EIA kit. Results are expressed as fold increase relative to unstimulated cells set arbitrarily to 1 (solid line). Graphics represent the means \pm SEM of at least three independent experiments. The ** represent statistical significance ($p < 0.01$) compared to basal cGMP levels, while ## represent statistical significance ($p < 0.01$) compared to the correspondent DHEA-S-, DHEA- or SNP-treated sample.

with 2×10^{-6} M ODQ, inhibitor of soluble guanylyl cyclase, or 3×10^{-4} M L-NAME/L-NMMA, inhibitors of NOS, and then with DHEA-S or DHEA for 1 min. We found that the inhibition of soluble guanylyl cyclase or NOS was able to completely block VASP phosphorylation on both Ser239 and Ser157 induced by both hormones (Fig. 4A). Nevertheless, the inhibition of platelet aggregation caused by DHEA-S was not reverted by the inhibition of either guanylyl cyclase or NOS activity (Fig. 4B).

Therefore, the inhibitory NO/cGMP/PKG pathway, although activated in human platelets by both DHEA-S and DHEA, does not seem to be a relevant event in DHEA-S-mediated inhibition of platelet function.

3.4. DHEA-S inhibited dense granule secretion and the phosphorylation of Akt, ERK1/2, and p38 MAPK

Platelet aggregation requires a coordinated series of events that lead to secretion of granule content (e.g., fibrinogen and ADP) and culminate in the activation of integrin α IIb β 3 through a process known as “inside-out” signaling [19]. To promote platelet secretion and activation of integrin α IIb β 3, thrombin induces activation of various protein kinases including Src, the MAP kinases p38 MAPK and ERK1/2, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. Full activation of MAP kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt and integrin α IIb β 3 requires the recruitment of the P2Y12 receptor by the ADP released from dense granules upon thrombin stimulation [20]. Furthermore, in collagen-stimulated platelets VASP phosphorylation was linked to the inhibition of platelet aggregation

but not to the inhibition of granule secretion [21]. This led us to hypothesize that DHEA-S modulates some processes important for platelet aggregation that are not dependent on VASP.

Thus, to better characterize the inhibition of platelet function by DHEA-S, we investigated dense granule secretion and the phosphorylation of Akt, ERK1/2, p38 MAPK, and Src in thrombin-stimulated platelets.

To evaluate the effect of DHEA-S and DHEA on dense granule secretion, platelets preincubated with DHEA-S or DHEA were stimulated with thrombin and then allowed to aggregate. After 5 min the amount of secreted ATP was measured by adding luciferin-luciferase. DHEA-S, but not DHEA, inhibited dense granule secretion in thrombin-stimulated cells (Fig. 5A). To verify if the inhibition of secretion was dependent on the activation by DHEA-S of the NO/cGMP/PKG pathway, ATP release was measured in the presence of ODQ to inhibit cGMP increase and consequently VASP phosphorylation. As shown in Fig. 5B, ODQ treatment did not modify the ability of DHEA-S to inhibit thrombin-induced ATP release.

These results suggest that DHEA-S modulated dense granule secretion independently of the NO/cGMP/PKG pathway.

To evaluate the effect of DHEA-S and DHEA on the phosphorylation of Akt, ERK1/2, p38 MAPK, and Src in thrombin-stimulated platelets, cells preincubated with DHEA-S, DHEA or vehicle were stimulated with thrombin for 5 min and analyzed in immunoblotting with antibodies specific to the active phosphorylated forms of Akt, ERK1/2, p38 MAPK, and Src P-Tyr418. Fig. 6 shows that in the presence of DHEA-S, but not DHEA, the phosphorylation of Akt and ERK1/2 were significantly decreased, the phosphorylation of p38

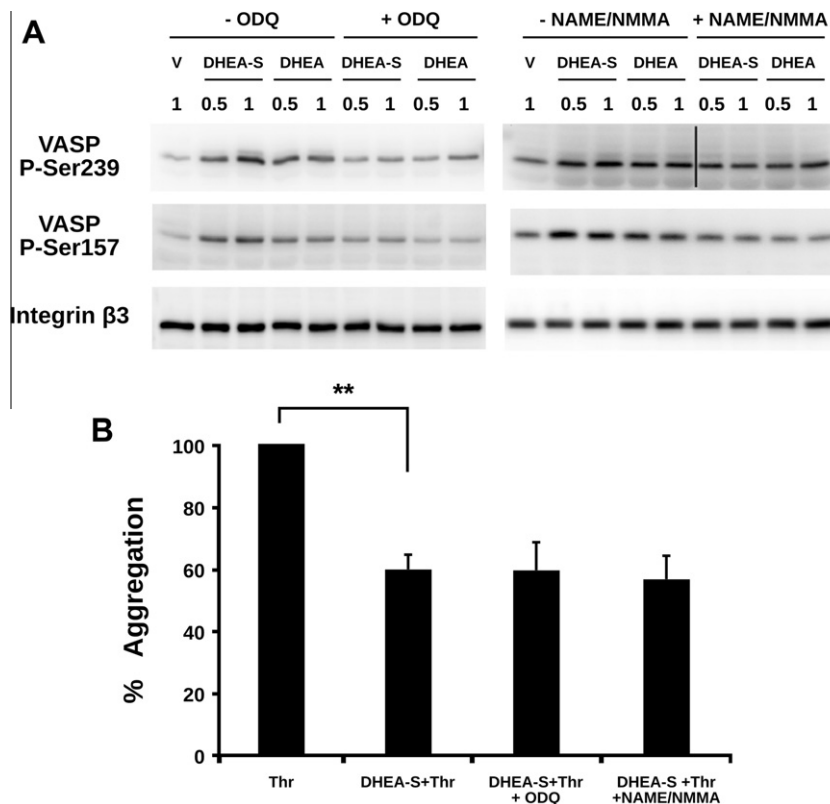


Fig. 4. DHEA-S inhibits platelet aggregation independently of NO/cGMP/PKG pathway. (A) Platelets were incubated with (+ ODQ) or without (– ODQ) 2×10^{-6} M ODQ for 5 min at 37 °C or with (+ NAME/NMMA) or without (– NAME/NMMA) 3×10^{-4} M NAME and NMMA for 5 min at 37 °C and then stimulated with 3×10^{-4} M DHEA-S or 1×10^{-8} M DHEA for the indicated times. Control cells were stimulated with vehicle (V) for 1 min. Aliquots containing the same amount of proteins were analyzed by immunoblotting with anti-VASP-P-Ser239, anti-VASP-P-Ser157 or anti-integrin β 3 antibodies. Immunoblottings are representative of three identical experiments performed with platelets obtained from different donors. $**p < 0.01$. (B) Samples of gel-filtered platelets incubated with vehicle or 2×10^{-6} M ODQ or 3×10^{-4} M NAME and NMMA for 5 min at 37 °C followed by pretreatment with 3×10^{-4} M DHEA-S were then aggregated with 0.05 U/ml of thrombin. Aggregation was measured in a lumiaggregometer for 5 min at 37 °C under stirring conditions. Data are means \pm SD from three independent experiments normalized to the aggregation induced by 0.05 U/ml thrombin, set arbitrarily at 100%.

MAPK was only slightly inhibited, while the phosphorylation of Src was unaffected.

Finally, to investigate whether the decreased secreted ADP could be responsible for the inhibition of platelet function induced by DHEA-S, the phosphorylation of Akt, ERK1/2, and p38 MAPK and platelet aggregation were analyzed in the presence or absence of extracellular ADP.

Thus, secreted ADP was removed by the ADP scavenger apyrase or exogenous ADP was supplemented together with thrombin to overcome DHEA-S inhibition of dense granule secretion.

As shown in Fig. 7A, the removal of secreted ADP with apyrase inhibited thrombin-induced protein phosphorylation at the same extent as DHEA-S for all the substrates tested. Furthermore, when DHEA-S-treated platelets were stimulated with thrombin in the presence of exogenously added ADP, the phosphorylation of Akt, ERK1/2, and p38 MAPK was recovered to a level similar to that of thrombin alone.

Moreover, the treatment of the platelets with either DHEA-S or apyrase inhibited thrombin induced-aggregation to a similar ex-

tent. However, when the loss of secreted ADP was compensated with exogenous ADP, the inhibition of aggregation by DHEA-S was almost completely abolished (Fig. 7B).

In conclusion, our results indicate that in the presence of DHEA-S both dense granule secretion and protein phosphorylation caused by thrombin were inhibited by DHEA-S, and that exogenous ADP was able to restore both protein phosphorylation and platelet aggregation. These data suggest that the inhibition of ADP secretion plays a major role in the inhibition of platelets by DHEA-S.

3.5. DHEA-S potentiates NO-dependent inhibition of platelet aggregation

The main effect of DHEA on the vasculature is to cause endothelium-derived NO increase, which leads to platelet cGMP increase and inhibition of these cells in the circulation. We showed that DHEA-S action on platelets is independent of the activation of the NO/cGMP/PKG pathway but selectively targets dense granule secretion. In order to understand the contribution of these two pathways to the inhibition of platelet aggregation, we analysed the effect of DHEA-S or DHEA in platelets treated with the NO-donor SNP. To this end DHEA-S and DHEA were used at concentrations that give a comparable increase in cGMP content and were previously shown not to inhibit platelet aggregation induced by 0.1 U/ml thrombin. Indeed, when platelets were treated with 3×10^{-4} M DHEA-S or 1×10^{-8} M DHEA for 1 min and then aggregated with 0.1 U/ml thrombin, we found no inhibition of aggregation, as expected. Under these non-inhibiting conditions, we incubated platelets with 1×10^{-7} M SNP along with DHEA-S or DHEA before stimulation with thrombin. The dose of SNP used was able to inhibit platelet aggregation induced by 0.1 U/ml thrombin by $40.51 \pm 7.56\%$ (Fig. 8 solid line). Our results show that in DHEA-treated platelets SNP inhibited platelet aggregation at the same extent as SNP alone. By contrast, when platelets were treated with DHEA-S along with SNP, thrombin-induced aggregation was completely impaired. This data indicate that DHEA-S can act synergistically with SNP in inhibiting platelet aggregation.

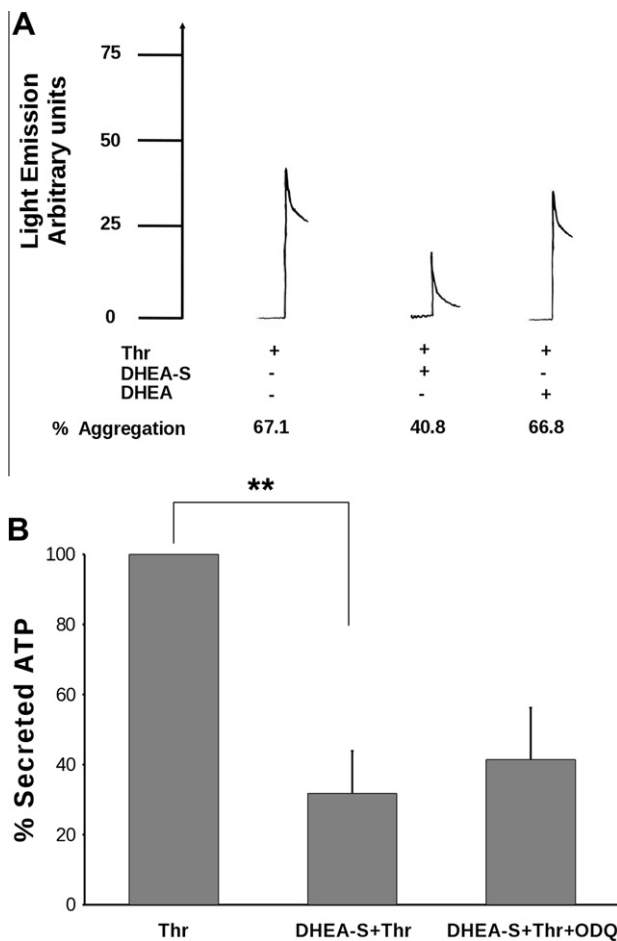


Fig. 5. DHEA-S inhibits thrombin-induced dense granule secretion independently of cGMP/PKG signaling. Measurement of platelet secretion was carried out by evaluating the ATP released after 5 min of stimulation with thrombin 0.05 U/ml using the CHRONO-LUME reagent. The activation of platelets was performed in a lumiaggregometer at 37 °C with stirring. (A) Samples of gel-filtered platelets were treated with vehicle, 3×10^{-4} M DHEA-S or 1×10^{-8} M DHEA for 1 min at 37 °C and then stimulated with thrombin. The results are expressed in arbitrary light emission units. The correspondent percentage of aggregation are also reported. Traces are from a representative experiment out of three performed. (B) Samples of gel-filtered platelets were incubated with vehicle or 2×10^{-6} M ODQ for 5 min at 37 °C, then with 3×10^{-4} M DHEA-S for 1 min and finally aggregated with 0.05 U/ml of thrombin. Data are means \pm SEM from three independent experiments normalized to the aggregation induced by 0.05 U/ml thrombin, set arbitrarily at 100%. ** $p < 0.01$.

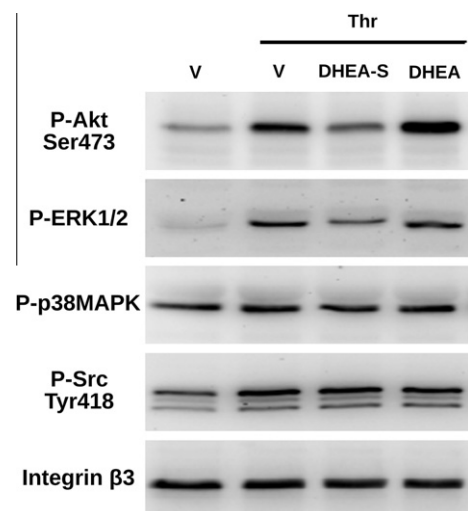


Fig. 6. DHEA-S, and not DHEA, inhibits protein phosphorylation. Samples of platelets were pretreated with 3×10^{-4} M DHEA-S, 1×10^{-8} M DHEA or vehicle (V) for 1 min and then stimulated with 0.05 U/ml thrombin (Thr) for 5 min at 37 °C. Aliquots from each sample were analyzed by immunoblotting with anti-P-Akt Ser473, anti-P-ERK1/2, anti-P-p38 MAPK, anti-P-Src Tyr418 and anti-integrin β 3 antibodies. Integrin β 3 was used to verify the equal loading. The image reported is representative of three identical experiments performed with platelets obtained from different donors.

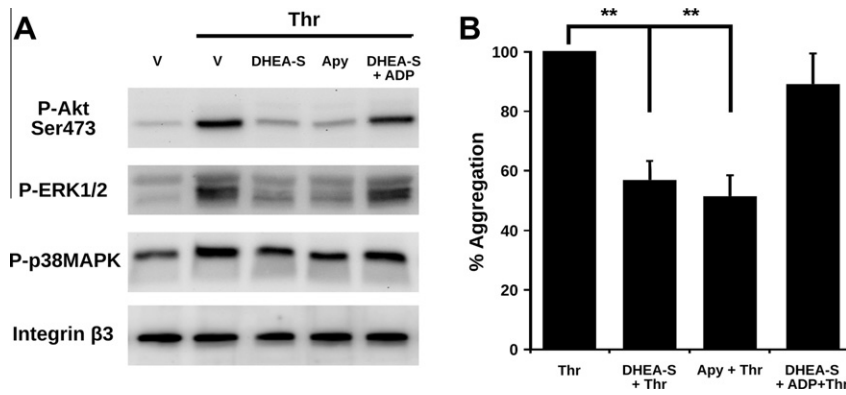


Fig. 7. DHEA-S inhibition of protein phosphorylation and platelet aggregation is dependent on secreted ADP. Samples of platelets were pretreated with 3×10^{-4} M DHEA-S or vehicle (V) for 1 min, or 5 U/ml apyrase (Apy) for 5 min and then stimulated with 0.05 U/ml thrombin (Thr) alone or 0.05 U/ml thrombin plus 1×10^{-5} M ADP for 5 min at 37 °C, as indicated. (A) Aliquots from each sample were analyzed by immunoblotting with anti-P-Akt Ser473, anti-P-ERK1/2, anti-P-p38 MAPK, and anti-integrin β 3 antibodies. Integrin β 3 was used to verify the equal loading. The image reported is representative of three identical experiments performed with platelets obtained from different donors. (B) Aggregation was measured in a lumiaggregometer for 5 min at 37 °C under stirring conditions. Data are means \pm SD from three independent experiments normalized to the aggregation induced by 0.05 U/ml thrombin, set arbitrarily at 100%. ** $p < 0.01$.

4. Discussion

The aim of this study was to investigate *in vitro* the effect on platelet function of DHEA and DHEA-S, the most abundant steroid hormones in circulating blood [1]. Although many reports have shown evidence that DHEA stimulates endothelial cells to produce higher amounts of NO in the circulation leading to platelet inhibition [8], the effects of these hormones on platelet function have not yet been investigated in detail.

We found that DHEA-S, but not DHEA, was able to inhibit platelet function and in particular the aggregation of platelets stimulated with thrombin. The ability of DHEA-S to counteract the effect of thrombin was dependent on the concentration of DHEA-S and on the concentration of thrombin used. The IC_{50} was approximately 0.15×10^{-4} , 1.5×10^{-4} and 2.6×10^{-4} M for 0.02, 0.025, and 0.05 U/ml thrombin, respectively. Aggregation was completely abolished when platelets were treated with 5×10^{-4} M DHEA-S, independently of the dose of agonist tested.

DHEA-S at physiological concentration inhibited platelet aggregation induced only by low doses of thrombin.

It is well known that the response of platelets to stimulation with low doses of thrombin displays high individual variability [22].

The aim of this study was to investigate the mechanisms by which DHEA-S inhibits platelet aggregation, thus we chose an experimental setting that allowed stronger cellular effects and more reproducible results. All the experiments were carried out using DHEA-S at 3×10^{-4} M and stimulating platelets with 0.05 U/ml thrombin. This concentration of DHEA-S is higher than the physiological concentration in blood, thus we also verified the effects on platelet aggregation of an equally higher concentration of DHEA, the active form of the hormone. DHEA did not exert any inhibitory action on platelet aggregation when used at either physiological or supra-physiological concentrations.

Anyway, a supra-physiological concentration of steroid might exert some non-specific action due to either the steroid nucleus or the sulfated group. This issue was addressed by comparing the effects on thrombin-dependent aggregation of DHEA-S, DHEA, 17 β -estradiol and 17 β -estradiol-sulfate when used at 3×10^{-4} M. Only DHEA-S strongly inhibited platelet aggregation, while all the other steroids tested were totally ineffective, leading to conclude that the inhibitory action of DHEA-S on platelets is specific.

The ability of DHEA-S to impair platelet aggregation was not restricted to thrombin stimulation but was more generalized as DHEA-S was able to inhibit platelet aggregation induced by collagen and the thromboxane A2 analogue, U46619. Collagen activates

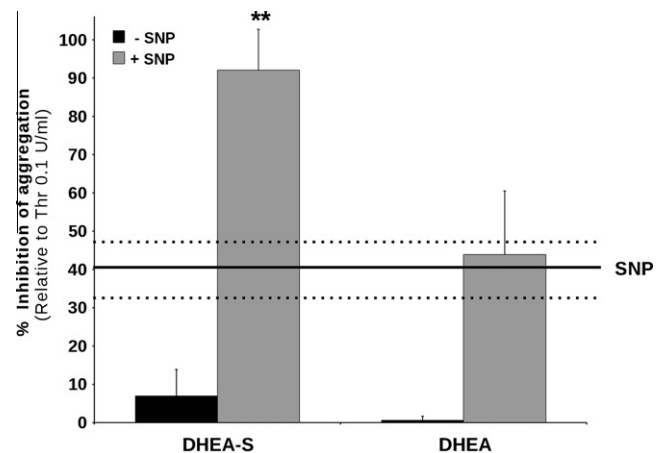


Fig. 8. DHEA-S potentiates NO-dependent inhibition of platelet aggregation. Samples of gel-filtered platelets were incubated with (+ SNP) or without (– SNP) 1×10^{-7} M SNP for 1 min at 37 °C, treated with 3×10^{-4} M DHEA-S or 1×10^{-8} M DHEA and then aggregated with 0.1 U/ml of thrombin. Aggregation was measured in a lumiaggregometer for 5 min at 37 °C under stirring conditions. Data are means \pm SD from three independent experiments expressed as percentage of inhibition after normalization to the aggregation induced by 0.1 U/ml thrombin, set arbitrarily at 100%. The average inhibition caused by the \pm SNP alone is indicated by the solid line, with the dotted lines representing the \pm 1SD interval. ** $p < 0.01$.

platelet signaling through ITAM-bearing receptors and integrins, while both thrombin and U46619 signal through G_q - and $G_{12/13}$ -associated receptors. This suggests that the event targeted by DHEA-S action is shared among many signaling pathways leading to platelet aggregation. Some of such events are secretion of granule content (e.g., fibrinogen and ADP), activation of integrin α IIb β 3 and reorganization of the cytoskeleton.

The most significant signaling pathways triggered by thrombin and leading to platelet secretion and activation of integrin α IIb β 3 activates the protein kinases Src, p38 MAPK, ERK1/2, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. Full activation of MAP kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt and integrin α IIb β 3 requires the recruitment of the P2Y₁₂ receptor by the ADP released from dense granules upon thrombin stimulation [20].

We demonstrated that in thrombin-stimulated platelets DHEA-S, but not DHEA, was able to inhibit both the secretion of dense granules and the activation of Akt, ERK1/2, and p38 MAPK, whilst the activation of Src was unaffected. Furthermore, our data showed that the inhibition of both aggregation and phosphorylation of tar-

get proteins induced by DHEA-S could be mostly overcome by addition of exogenous ADP, suggesting that the inhibitory action of DHEA-S on platelet aggregation induced by thrombin results from its inhibition of platelet secretion of dense granule ADP. It is to note that the activation by thrombin of the signaling pathways involving Akt and the MAP kinases p38 and ERK1/2 has been shown to be important both upstream and downstream of granule secretion [20]. Indeed the activation of these signaling pathways is required to promote granule secretion, but also full activation of those same pathways is achieved when the platelets are co-stimulated by thrombin and dense granule-derived ADP. Thus, we cannot exclude that the inhibition by DHEA-S of Akt, ERK1/2 and p38 MAPK activation plays a role also in the inhibition of granule release. Phosphorylation of VASP leads to inhibition of cytoskeleton reorganization, an event essential for irreversible platelet aggregation [18]. Our data shows that both DHEA-S and DHEA caused the increase of cGMP levels in the platelet cytoplasm, thus activating PKG and leading to VASP phosphorylation. This finding was dependent on NO production by platelets and activation of platelet guanylyl cyclase. However, the inhibition of platelet guanylyl cyclase with ODQ or inhibition of NOS with NAME/NMMA did not prevent the inhibition of either aggregation or dense granule secretion induced by thrombin. This data suggests that the inhibition of platelet secretion and aggregation mediated by DHEA-S does not rely on the activation of the platelet NO/cGMP/PKG pathway, and indeed DHEA activated the same pathway but was able to inhibit neither secretion nor aggregation in thrombin-stimulated platelets.

In any case, this evidence could be relevant to determine the biological effect of DHEA-S that is undetectable in resting platelets but becomes dramatically evident in platelets stimulated with low doses of thrombin or when the blood NO was elevated. The second important point raised in this paper is the demonstration of direct action of DHEA-S on platelets, resulting in important biological effects. Here evidence is shown of DHEA-S-dependent inhibition of platelet function, which does not depend on the stimulation of NOS activity of endothelial cells.

It is generally accepted that DHEA-S is formed by action of steroid sulfotransferases that are expressed in different cell types [9], including platelets [23] and serves as reservoir of DHEA, which in turn can modulate cell function by either genomic or nongenomic mechanisms [24]. However, we found that DHEA did not inhibit platelet aggregation caused by thrombin, collagen or U46619, while DHEA-S did. Moreover, in the presence of EMATE, which inhibits both estrone and dehydroepiandrosterone sulfatase [16], the effect of DHEA-S on thrombin-dependent aggregation was not decreased, supporting the evidence that DHEA-S, but not DHEA, inhibits thrombin-dependent platelet aggregation. Hence, in this paper we showed that DHEA-S *per se* can influence cell function and trigger specific responses in target cells. The literature reports a direct interaction of DHEA with both estrogen and androgen receptors, with agonistic and antagonistic effect, respectively [10]. Human megakaryocytes and platelets express the estrogen receptor β and the androgen receptor [17]. Recently we investigated the effect of 17 β -estradiol on human platelet function and demonstrated that 17 β -estradiol *in vitro* exerted a priming effect and potentiated the aggregation caused by low doses of thrombin [13]. Here we demonstrated that the inhibition of platelet aggregation caused by DHEA-S does not require the recruitment of estrogen receptors. Hence the evidence that 17 β -estradiol and DHEA-S generate signals with opposite effects on platelet function leads to the conclusion that 17 β -estradiol and DHEA-S trigger different signals in the platelet.

Many reports in literature support the hypothesis that the main effect of DHEA, but not DHEA-S, in the vasculature is to cause endothelium-derived NO increase, which leads to platelet cGMP increase and inhibition of these cells in the circulation.

Our results suggest that DHEA-S might also play some important role in this context. We showed that DHEA-S inhibits platelet aggregation induced by low doses of agonists while ineffective when platelets are stimulated with high concentration of thrombin. Moreover, in these non-inhibiting conditions DHEA-S acted in synergism with endothelium-derived NO in completely blocking platelet aggregation.

In conclusion, we demonstrated that DHEA-S inhibits the aggregation of platelets stimulated with various agonists including thrombin, collagen and the thromboxane A2 analogue, U46619. Furthermore, the inhibitory effect of DHEA-S on platelets is mediated by inhibition of dense granule secretion, thus impairing the positive feed-back loop provided by ADP, essential because it potentiates the action of many platelet agonists. Although the molecular mechanisms involved are not completely characterized, it is possible to conclude that DHEA-S functions with multiple mild mechanisms that do not hamper completely the functionality of platelets, allowing them to be fully active when stimulated by high doses of thrombin. However, since DHEA-S was able to efficiently counteract platelet activation caused by a mild stimulus, it may be hypothesized that DHEA-S participates in maintaining platelets in a resting state, mainly when the functionality of vascular endothelium is compromised, for instance by the development of the atherosclerotic plaque [7].

Acknowledgments

SS was supported by a De Agostini Foundation fellowship. This work was supported by grants from Ministero dell'Università e della Ricerca-PRIN 2007 (to F.S.), from Regione Piemonte -Ricerca Sanitaria Finalizzata 2006, 2008, 2009 and -Ricerca Scientifica Applicata 2004, and from Università del Piemonte Orientale-Ricerca Locale.

References

- Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, Vogelmann JH. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:551–5.
- Khorrani O, Vu L, Yen SS. Activation of immune function by dehydroepiandrosterone (DHEA) in age-advanced men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1997;52:M1–7.
- Evans TG, Judd ME, Dowell T, Poe S, Daynest RA, Araneot BA. The use of oral dehydroepiandrosterone sulfate as an adjuvant in tetanus and influenza vaccination of the elderly. *Vaccine* 1996;14:1531–7.
- Wolkowitz OM, Reus VI, Roberts E, Manfredi F, Chan T, Ormiston S, et al. Antidepressant and cognition-enhancing effects of DHEA in major depression. *Ann NY Acad Sci* 1995;774:337–9.
- Barrett-Connor E, Goodman-Gruen D. The epidemiology of DHEAS and cardiovascular disease. *Ann NY Acad Sci* 1995;774:259–70.
- Trivedi DP, Khaw KT. Dehydroepiandrosterone sulfate and mortality in elderly men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4171–7.
- Hayashi T, Esaki T, Muto E, Kano H, Asai Y, Thakur NK, et al. Dehydroepiandrosterone retards atherosclerosis formation through its conversion to estrogen the possible role of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:782–92.
- Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. *Steroids* 2004;69:279–89.
- Peredo HA, Mayer M, Faya IR, Puyò AM, Carranza A. Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents the prostanoid imbalance in mesenteric bed of fructose-induced hypertensive rats. *Eur J Nutr* 2008;47:349–56.
- Chen F, Knecht K, Birzin E, Fisher J, Wilkinson H, Mojena M, et al. Direct agonist/antagonist functions of dehydroepiandrosterone. *Endocrinology* 2005;146:4568–76.
- Naseem KM, Riba R. Unresolved roles of platelet nitric oxide synthase. *J Thromb Haemost* 2008;6:106–9.
- Jesse RL, Loesser K, Eich DM, Qian YZ, Hess ML, Nestler JE. Dehydroepiandrosterone inhibits human platelet aggregation *in vitro* and *in vivo*. *Ann NY Acad Sci* 1995;774:281–90.
- Moro L, Reineri S, Piranda D, Pietrapiana D, Lova P, Bertoni A, et al. Nongenomic effects of 17 β -estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor beta and Src kinase. *Blood* 2005;105:115–21.

- [14] Pizzagalli F, Varga Z, Huber RD, Folkers G, Meier PJ, St-Pierre MV, et al. Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3902–12.
- [15] Niessen J, Jedlitschky G, Grube M, Bien S, Schwertz H, Ohtsuki S, et al. Human platelets express organic anion-transporting peptide 2B1, an uptake transporter for atorvastatin. *Drug Metab Dispos* 2009;37:1129–37.
- [16] Purohit A, Williams GJ, Howarth NM, Potter BV, Reed MJ. Inactivation of steroid sulfatase by an active site-directed inhibitor, oestrone-3-O-sulfamate. *Biochemistry* 1995;34:11508–14.
- [17] Khetawat G, Faraday N, Nealen ML, Vijayan KV, Bolton E, Noga SJ, et al. Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor beta and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression. *Blood* 2000;95:2289–96.
- [18] Halbrugge M, Walter U. Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem* 1989;85:41–50.
- [19] Shattil SJ, Newman PJ. Integrins, dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004;104:606–15.
- [20] Kahner BN, Shankar H, Murugappan S, Prasad GL, Kunapuli SP. Nucleotide receptor signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2006;4:2317–26.
- [21] Aszódi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, et al. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J* 1999;18:37–48.
- [22] Lasne D, Krenn M, Pingault V, Arnaud E, Fiessinger JN, Aiach M, et al. Interdonor variability of platelet response to thrombin receptor activation: influence of PIA2 polymorphism. *Br J Haematol* 1997;99:801–7.
- [23] Yanai H, Javitt NB, Higashi Y, Fuda H, Strott CA. Expression of cholesterol sulfotransferase (SULT2B1b) in human platelets. *Circulation* 2004;109:92–6.
- [24] Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Varone G, Caruso A, Genazzani AR. Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms. *Endocrinology* 2003;144:3449–55.



The phytoestrogen 8-prenylnaringenin inhibits agonist-dependent activation of human platelets

Clara Di Vito ^{a,1}, Alessandra Bertoni ^{a,b,1}, Michela Nalin ^a, Sara Sampietro ^a,
Manuela Zanfa ^a, Fabiola Sinigaglia ^{a,b,*}

^a Department of Translational Medicine, Novara, University of Piemonte Orientale A. Avogadro, Italy

^b Center of Biotechnology for Applied Medical Research (BRMA), Novara, University of Piemonte Orientale A. Avogadro, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 April 2012

Accepted 24 June 2012

Available online 3 July 2012

Keywords:

Platelets

8-Prenylnaringenin

Signal transduction

Thrombin

Collagen

Cyclic nucleotides

ABSTRACT

Background: Phytoestrogens are plant-derived polyphenolic compounds that exert beneficial effects on human health, mostly related to their estrogen mimetic activity. In particular a strong correlation between phytoestrogens intake and a lower risk of cardiovascular diseases has been reported. The flavanone 8-prenylnaringenin, extracted from hop flowers, has been identified as a novel phytoestrogen, unique with respect to estrogen receptors specificity and potency. However, to date no investigations on the 8-prenylnaringenin role in modulating platelet function have been undertaken.

Methods: We evaluated the effect of 8-prenylnaringenin on platelet aggregation, intracellular calcium mobilization and protein phosphorylation triggered by thrombin and collagen, and platelet adhesion and dense granule secretion triggered by collagen.

Results: 8-Prenylnaringenin inhibited platelet aggregation induced by different agonists and platelet adhesion to collagen matrix. 8-Prenylnaringenin directly increased intracellular cAMP and cGMP levels and thus promoted VASP phosphorylation. However, these molecular events were not responsible for the inhibitory action of 8-prenylnaringenin on platelets. Moreover, 8-prenylnaringenin inhibited the phosphorylation of Pyk2, Akt, and ERK1/2. Finally, 8-prenylnaringenin suppressed the mobilization of calcium and the secretion of dense granules. All these effects were independent of estrogen receptors recruitment.

Conclusions: 8-Prenylnaringenin exerted anti-aggregatory and anti-adhesive effects on human platelets, independently of estrogen receptors, acting as an inhibitor of multiple proteins essential for the morphological and biochemical transformations that occur during platelet activation and aggregation.

General significance: 8-Prenylnaringenin may represent a useful tool in the therapy and prevention of vascular diseases associated with platelet aggregation, such as atherosclerosis, myocardial infarction, coronary artery disease, and thrombosis.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Phytoestrogens are plant-derived compounds that structurally or functionally mimic mammalian estrogen molecules [1]. Similar with estrogens, phytoestrogens exert beneficial effects on human health, especially against hormone-dependent tumors [2], osteoporosis,

irregular menopause syndrome, and cardiovascular, and neurodegenerative diseases [3].

The biological effects of a phytoestrogen compound depend on its peculiar structure and the target cell type, and now it is generally accepted that these molecules function through the engagement of estrogen receptors.

Although phytoestrogens do not have a steroid structure, they can interact with the estrogen receptors on target cells triggering signals that mimic mammalian estrogens [1]. Among all, the cardiovascular system, which undergoes aging- and inflammation-dependent injury resulting in atherosclerotic disease, seems to be one of the most promising targets for phytoestrogen-based therapies. Interestingly, some dietary phytoestrogens are able to inhibit the function of platelets, anucleated cell fragments known to play an important role in the development of atherosclerotic disease [4].

Studies in rats have demonstrated that the phytoestrogens genistein and raloxifene might inhibit platelet aggregation by increasing

Abbreviations: 8-PN, 8-prenylnaringenin; BSA, bovine serum, albumin; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NO, nitric oxide; ODQ, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one; PKA, protein kinase A; PKG, protein kinase G; sGC, soluble guanylyl cyclase; SNP, sodium NitroPrusside; VASP, vasodilator-stimulated phosphoprotein

* Corresponding author at: Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Piemonte Orientale A. Avogadro, via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy. Tel./fax: +39 0321 660 608.

E-mail address: fabiola.sinigaglia@med.unipmn.it (F. Sinigaglia).

¹ These two authors equally contributed to this study.

nitric oxide (NO) synthesis and enhancing phospholipase A₂ activity and prostacyclin release in an estrogen receptor-dependent manner [4]. By contrast, previous studies in our laboratory have reported that 17 β -estradiol causes a strong potentiation of integrin α IIb β 3 activation and aggregation in platelets stimulated with low concentrations of thrombin in an estrogen receptor β -dependent manner [5] with a mechanism coordinated by membrane lipid rafts. Indeed, in platelets the estrogen receptor β reversibly translocated to the lipid raft fractions in a hormone-dependent manner and promoted the rapid and transient recruitment and activation of the tyrosine kinases Src and Pyk2 within the membrane raft domains [6].

It has been reported that a considerable number of phytoestrogens and flavonoids are able to impair the activity of enzymes involved in cell signaling such as cyclooxygenases and lipoxygenases [7], phosphodiesterases [8], tyrosine kinases [9], and phospholipases [10,11] and to inhibit calcium mobilization and subsequent platelet secretion [12].

8-Prenylaringenin (8-PN) is a prenylated flavone discovered in 1992 by Rosenblum and colleagues [13], which displays an estrogen-like activity, stronger than that of genistein or coumestrol [14–16]. 8-PN, extracted from glands of the hop flowers, is present in beer in a concentration of 0.24 mg/l [17,18] and in an increasing number of dietary supplements containing hop extracts used to reduce the discomforts associated to menopause [19] and to induce “breast enhancement” [20]. Studies of molecular modeling underline that 8-PN and 17 β -estradiol display similar structural features, mainly due to the presence of the prenyl-side chain at the C-8 position in 8-PN. Indeed, 8-PN binds to estrogen receptors with higher affinity than naringenin, which exhibits only weak estrogenic properties [20–23].

Despite this evidence, until now no investigations on the possible role of 8-PN in modulating platelet function have been undertaken. This paper focuses on the effects of 8-PN on platelet function, demonstrating that this phytoestrogen behaves *in vitro* as a powerful inhibitor of agonist-induced platelet aggregation. The molecular mechanism of this inhibitory effect was also investigated. Our data have demonstrated that 8-PN interacts with human platelets through a complex mechanism, not mediated by platelet estrogen receptors. We found that 8-PN prevents agonist-dependent activation of Akt, ERK1/2, and Pyk2, key modulators of platelet activation, calcium mobilization, and dense granule secretion and increases cyclic nucleotides within the platelets.

2. Methods

2.1. Materials

Collagen used in the aggregation studies was from Mascia Brunelli (Milano, Italy), while the collagen used in the adhesion assays was provided by Prof. M. E. Tira (University of Pavia, Italy). Thrombin, U46619, and sodium nitroprusside (SNP) were from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). ICI 182,780 and ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one) were from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Monoclonal antibody anti-phosphotyrosine (4G10) was from Millipore (Billerica, MA); monoclonal antibodies against vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP (phospho-Ser 239 and phospho-Ser 157) were both from Calbiochem (San Diego, CA, USA); antibodies against phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), phospho-p38 MAPK and phospho-Pyk2 were all from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA); phosphospecific polyclonal antibody against Src kinases (Tyr418), FURA 2-AM, and PGE₁ were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); polyclonal antibody against phospho-Akt and Alexa488-phalloidin were from Invitrogen (Milano, Italy); polyclonal antibody against integrin β 3 was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Secondary anti-rabbit and anti-mouse antibodies, Hybond-P polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, and cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) system were from GE Healthcare (Milan, Italy); cyclic GMP

Complete was from Assay Designs (Vinci, FI, Italy). Western Lightning Plus-ECL was from Perkin Elmer (Boston, MA, USA); ATP Determination Kit was from Biaffin GmbH & Co KG (Kassel, Germany). 8-Prenylaringenin (5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2enyl)chroman-4-one) was synthesized by Prof. G. Appendino (University of Piemonte Orientale A. Avogadro, Italy) according to literature methods, and 8-PN was identified by spectroscopic comparison (¹H- and ¹³C-NMR, MS, IR) with an authentic sample available from previous work [24]. Purity, when evaluated by HPLC, was 96%.

2.2. Platelet preparation

Blood was withdrawn, according to the Declaration of Helsinki and after informed consent was obtained, from healthy volunteers who had not taken any drugs for at least 10 days before venipuncture, using ACD (130 mM citric acid, 152 mM sodium citrate, 112 mM glucose) or 0.32% citrate as anti-coagulant. The blood was centrifuged at 120 \times g for 10 min at room temperature. The platelet rich plasma (PRP) was collected. To prepare gel-filtered platelets PRP was centrifuged at 300 \times g for 10 min. Platelets were then purified by gel filtration on Sepharose CL-2B and eluted with Tyrode buffer (10 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, pH 7.40). Platelets were counted, and their concentration was adjusted in Tyrode buffer containing 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ and 5.5 mM glucose.

2.3. Measurement of platelet aggregation

Samples of PRP or gel-filtered platelets (3 \times 10⁸ cells/ml) were prewarmed at 37 $^{\circ}$ C under constant stirring (1000 rpm), incubated with different concentrations of 8-PN or vehicle (0.125% methanol) for 5 min and then induced to aggregate with collagen type I (0.25 or 5 μ g/ml), thrombin (0.05 U/ml) or U46619 (0.25 or 2 μ M). Transmittance of platelet suspension was monitored continuously for at least 5 min in a Chronolog aggregometer (Mascia Brunelli). In some experiments platelets were incubated with 2 μ M ODQ, 0.1–150 μ M ICI 182,780, or vehicle (0.1% ethanol) for 5 min or with 1 μ M SNP for 1 min prior to stimulation with 8-PN. For wash-out experiments, gel-filtered platelets (3 \times 10⁸ cells/ml) were incubated for 5 min with 30 μ M 8-PN or vehicle, centrifuged at 300 \times g for 10 min, resuspended in Tyrode buffer at 3 \times 10⁸ cells/ml and induced to aggregate with 5 μ g/ml collagen.

2.4. Adhesion assay

Glass coverslips were coated for 2 h at 37 $^{\circ}$ C with 100 μ g/ml of type I collagen or 0.5% BSA/PBS and then blocked with 5% BSA in PBS for 2 h at 37 $^{\circ}$ C. Human gel-filtered platelets (3 \times 10⁷/ml, 0.2 ml) were incubated with 30 μ M 8-PN or vehicle (0.125% methanol) for 5 min and added to the coated coverslips for 15, 30 or 60 min at 37 $^{\circ}$ C. Non-adherent cells were removed and coverslips were washed with PBS. Adherent platelets were fixed with 3% paraformaldehyde-4% sucrose in PBS for 10 min at room temperature, permeabilized by 0.2% Triton-X100 for 5 min, and stained with Alexa488-phalloidin. Platelets were viewed on a confocal microscope (Leica TCS SP2) and digital images (63 \times) were acquired. The number of adherent cells and the average cell area (index of platelet spreading) were determined using the Image-Pro Plus software, version 7.0. For each specimen, at least 20 different fields were analyzed.

2.5. Electrophoresis and immunoblotting analysis

Samples of gel-filtered platelets (5 \times 10⁸ cells/ml) were incubated with 30 μ M 8-PN or vehicle (0.125% methanol) from 30 s to 15 min at 37 $^{\circ}$ C and then stimulated with 5 μ g/ml collagen or 0.05 U/ml thrombin for 5 min, as indicated. In some experiments platelets were incubated with 2 μ M ODQ, ICI 182,780 or vehicle (0.1% ethanol) for 5 min

prior to stimulation. The reaction was stopped by adding 3× Laemmli buffer (Tris–HCl 0.2 M pH 6.8, 6% SDS, 1.5% DTT, 30% glycerol, 0.03% bromophenol blue, 3× protease inhibitors mix, 3 mM phosphate glycerol, 20 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM EDTA). Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and probed with specific antibodies. Immunoreactive bands were detected by an ECL reaction using a Versadoc instrument and analyzed by QuantityOne software (Bio-Rad, Milano, Italy).

2.6. Platelet cAMP determination

Gel-filtered platelets (10⁸ cells/ml) were stimulated for 5 min with 30 μM 8-PN, 0.125% methanol, or 2 μM PGE₁ for 1 min. After 5 min the reaction was stopped with 96% ice-cold ethanol. Subsequently samples were centrifuged at 15,000 ×g for 10 min at 4 °C. The supernatants were dried under vacuum and platelet cAMP levels were measured using the cAMP EIA system following the manufacturer's instructions for the acetylation protocol.

2.7. Platelet cGMP determination

Platelet samples were prepared as previously described by Dunkern [25]. Briefly, gel-filtered platelets (4 × 10⁸ cells/ml) were incubated for 5 min with 30 μM 8-PN or vehicle (0.125% methanol). In some experiments, platelets were incubated with 2 μM ODQ or vehicle (0.1% ethanol) for 5 min prior to stimulation with 8-PN. The reaction was stopped by adding HCl to a final concentration of 0.1 M. Lysates were centrifuged at 1000 ×g for 10 min at 4 °C. The supernatants were recovered and stored at –20 °C. Samples were then analyzed for their cGMP content using the cyclic GMP Complete assay following the manufacturer's instructions for the acetylation protocol.

2.8. Measurement of dense granule secretion

Samples of gel-filtered platelets were prewarmed at 37 °C under constant stirring, stimulated with 30 μM 8-PN or vehicle (0.125% methanol) for 5 min and then induced to aggregate with 5 μg/ml collagen. The reaction was stopped after 5 min by adding 10 mM EDTA. Platelet suspension was centrifuged at 10,000 ×g for 5 min, the supernatants were recovered and kept at –20 °C. ATP content was determined using the ATP Determination Kit following the manufacturer's instructions. The luminescent signal was then measured in a luminometer (Lucy 1, Rosys Anthos, Austria).

2.9. Measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration

Platelet-rich plasma was incubated with 3 μM FURA 2-AM at 37 °C for 30 min in the dark. Platelets were then isolated by gel filtration and eluted with tyrode buffer containing 2 mM MgCl₂ and 5.5 mM glucose. Platelet count was then adjusted to 2 × 10⁸ cells/ml. Measurement of cytosolic Ca²⁺ was performed in a spectrofluorimeter (F-4500 Fluorescence Spectrophotometer, Hitachi) in the presence of 2 mM EGTA. Platelets were incubated with 30 μM 8-PN or vehicle (0.125% methanol) for 5 min and stimulated with 5 μg/ml collagen or 0.05 U/ml thrombin for 5 min. FURA-2 fluorescence signals were calibrated according to the method of Pollock et al. [26].

2.10. Statistical analysis

Data reported are means ± SD or SEM, as indicated, of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed by the Student's *t* test or one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test, as indicated. Significant differences were accepted at at least *P* < 0.05. Data were analyzed using StatMate software, version 4.0 (GraphPad).

3. Results

3.1. 8-PN inhibits agonist-induced platelet aggregation.

To evaluate the effect of 8-PN on platelet aggregation, platelets were incubated with 0.5 to 50 μM 8-PN, concentrations consistent with the IC₅₀ reported for other flavonoids in platelets [12]. 8-PN was not able to elicit platelet aggregation per se (data not shown). Thus, we investigated whether this molecule was able to modulate platelet aggregation caused by physiological agonists.

8-PN inhibited platelet aggregation in a dose-dependent manner with an IC₅₀ of 13 μM and maximal inhibition (75.17 ± 3.48%) at 30 μM (Fig. 1A and D). Thus, this dose of 8-PN was used in all subsequent experiments.

Furthermore, 30 μM 8-PN was able to maximally inhibit platelet aggregation induced by collagen when added as early as 1 min before agonist stimulation and remained as such up to 2 h of 8-PN treatment. On the contrary, 8-PN was not effective when added simultaneously or 1 min after the agonist (data not shown). Finally, wash-out experiments showed that the 8-PN inhibitory effect on platelet aggregation occurred in a reversible manner (data not shown).

In order to verify if 8-PN exerts its inhibitory effect only on collagen stimulated cells, human platelets treated with 30 μM 8-PN were stimulated with 0.05 U/ml thrombin or 2 μM U46619. 8-PN inhibited in a very effective manner also the aggregation caused by both thrombin and U46619 (Fig. 1B and C), suggesting that 8-PN is inhibiting some key pathway or activating some inhibitory pathways in human platelets. Furthermore, to test if 8-PN was able to inhibit platelet aggregation in a physiological setting, we measured platelet aggregation in plasma. 150 μM 8-PN was able to strongly inhibit platelet aggregation induced by 250 ng/ml collagen and 250 nM U46619, doses of agonists that induced full platelet aggregation (Fig. 1F and G). Also in plasma, 8-PN inhibited platelet aggregation induced by collagen and U46619 in a dose-dependent manner with an IC₅₀ of 114 μM and 109 μM, respectively, with maximum inhibition at 150 μM (data not shown).

It has been reported that 8-PN, as well as the other phytoestrogens, is able to signal through the estrogen receptors [15]. To evaluate the involvement of these receptors in the inhibitory action of 8-PN on platelet aggregation, we analyzed the effect of the pure estrogen receptor antagonist ICI 182,780. Platelets were incubated with various concentrations of ICI 182,780 (1–150 μM) before addition of 30 μM 8-PN and stimulation with 5 μg/ml collagen. Fig. 1E shows that ICI 182,780 was not able to abolish the inhibitory action of 8-PN on platelet aggregation when used at either 1 or 10 μM, concentrations able to completely revert the effects of 17β-estradiol on platelet aggregation (Fig. S1) [5,27]. However, when ICI 182,780 was used at higher concentration (75 μM) reversed only partially the effect of 30 μM 8-PN. Concentrations of ICI 182,780 100 μM or higher inhibited per se platelet aggregation induced by collagen (Fig. 1E). Therefore, we repeated the dose–response curve of 8-PN on collagen-induced aggregation in presence of 10 or 75 μM ICI 182,780. Again, 10 μM ICI 182,780 did not modify the kinetics of 8-PN inhibition of platelet aggregation (IC₅₀ 12 μM), while 75 μM ICI 182,780 halved the effect of 8-PN on platelet aggregation at any 8-PN inhibiting concentrations (IC₅₀ 260 μM) (Fig. 1D). Similar results were obtained when platelets were induced to aggregate with thrombin or U46619 (data not shown).

3.2. 8-PN inhibits the adhesion of platelets to collagen

In vivo, one of the major events that triggers platelet activation and aggregation is the exposure of the subendothelial collagen. To investigate the effect of 8-PN on platelet adhesion to collagen, gel-filtered platelets were incubated with 30 μM 8-PN or vehicle for 5 min and then allowed to adhere to collagen coated coverslips for

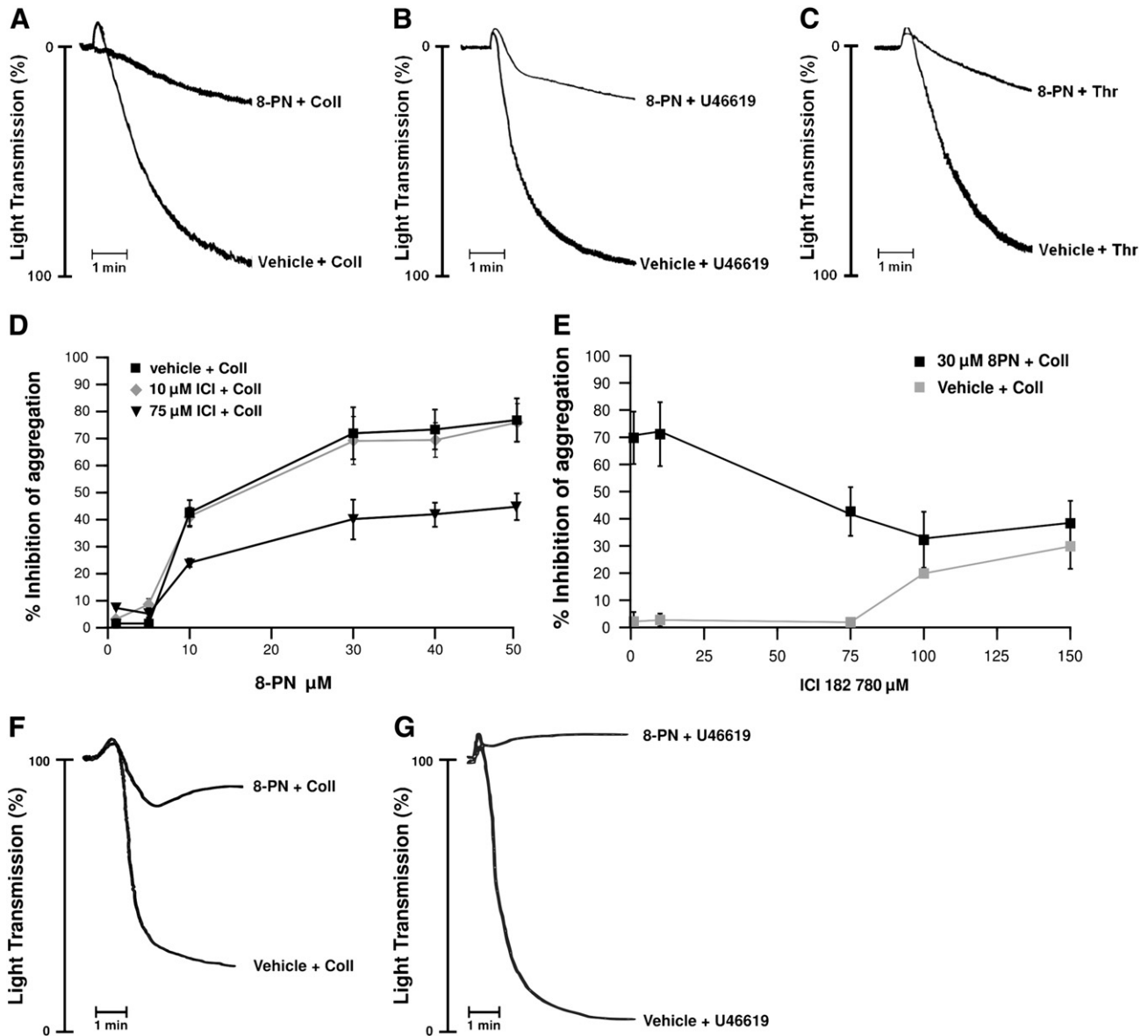


Fig. 1. 8-PN inhibits agonist-induced platelet aggregation in a dose-dependent manner. 3×10^8 /ml gel-filtered platelets (A–E) were incubated with 30 μ M 8-PN for 5 min and then induced to aggregate with (A) 5 μ g/ml collagen (Coll), (B) 2 μ M U46,619, or (C) 0.05 U/ml thrombin (Thr). Results are expressed as percentage of light transmission. Aggregation traces are representative of one experiment out of three performed. (D) platelets were preincubated with vehicle, 10 or 75 μ M ICI 182,780 (ICI) for 5 min, treated with 0.5–50 μ M 8-PN for 5 min, and then aggregate with 5 μ g/ml collagen (Coll). (E) platelets were preincubated with 1–150 μ M ICI 182,780 for 5 min, treated with vehicle or 30 μ M 8-PN for 5 min, and then aggregate with 5 μ g/ml collagen (Coll). Results are expressed as percentage of inhibition of platelet aggregation after normalization to the aggregation induced by collagen alone in each experiment. Data reported are means \pm SD of at least three independent experiments. 0.25 ml PRP (F, G) were incubated with 30 μ M 8-PN or vehicle and then induced to aggregate with 5 μ g/ml collagen (Coll) (F) or 2 μ M U46619 (G). Results are expressed as percentage of light transmission. Aggregation traces are representative of one experiment out of three performed.

15, 30 or 60 min at 37 °C. The number of adherent cells and the average cell area were analyzed. As shown in Fig. 2, at 15 min of adhesion 8-PN inhibited the average area of adherent platelets, without affecting the number of adherent cells, while at 60 min of adhesion 8-PN decreased the number of adherent platelets to collagen matrix but did not affect the cell area, suggesting that 8-PN may impact the initial phase of the adhesion process.

3.3. 8-PN activates PKA and PKG pathways in human platelets

One of the major inhibitory pathways in platelets is represented by the NO/cGMP/PKG pathway which results in VASP phosphorylation [28]. To investigate whether 8-PN activates this pathway, platelets were incubated for increasing periods of time (from 10 s to 15 min) with 30 μ M 8-PN or vehicle, and VASP phosphorylation

was analyzed in immunoblotting with specific antibodies to P-Ser239 or P-Ser157, residues preferentially phosphorylated by PKA and PKG, respectively [29].

Our data show that 8-PN promotes the phosphorylation of VASP on both Ser239 and Ser157 in a time-dependent manner with maximum phosphorylation at 5 min (Fig. 3A), suggesting that both PKG and PKA undergo activation in 8-PN-treated cells.

Also estrogens activate the NOS/NO/cGMP pathway in many cell types, including platelets [27,30], to understand the role of estrogen receptors in the phosphorylation of VASP, platelets were treated for 5 min with either 10 or 75 μ M ICI 182,780 or DMSO and then incubated with 30 μ M 8PN for 5 min. 10 μ M ICI 182,780 did not affect the phosphorylation of VASP, while 75 μ M ICI 182,780 completely abolished only the phosphorylation on Ser157, leaving mostly unaffected the phosphorylation on Ser239 (Fig. 3B).

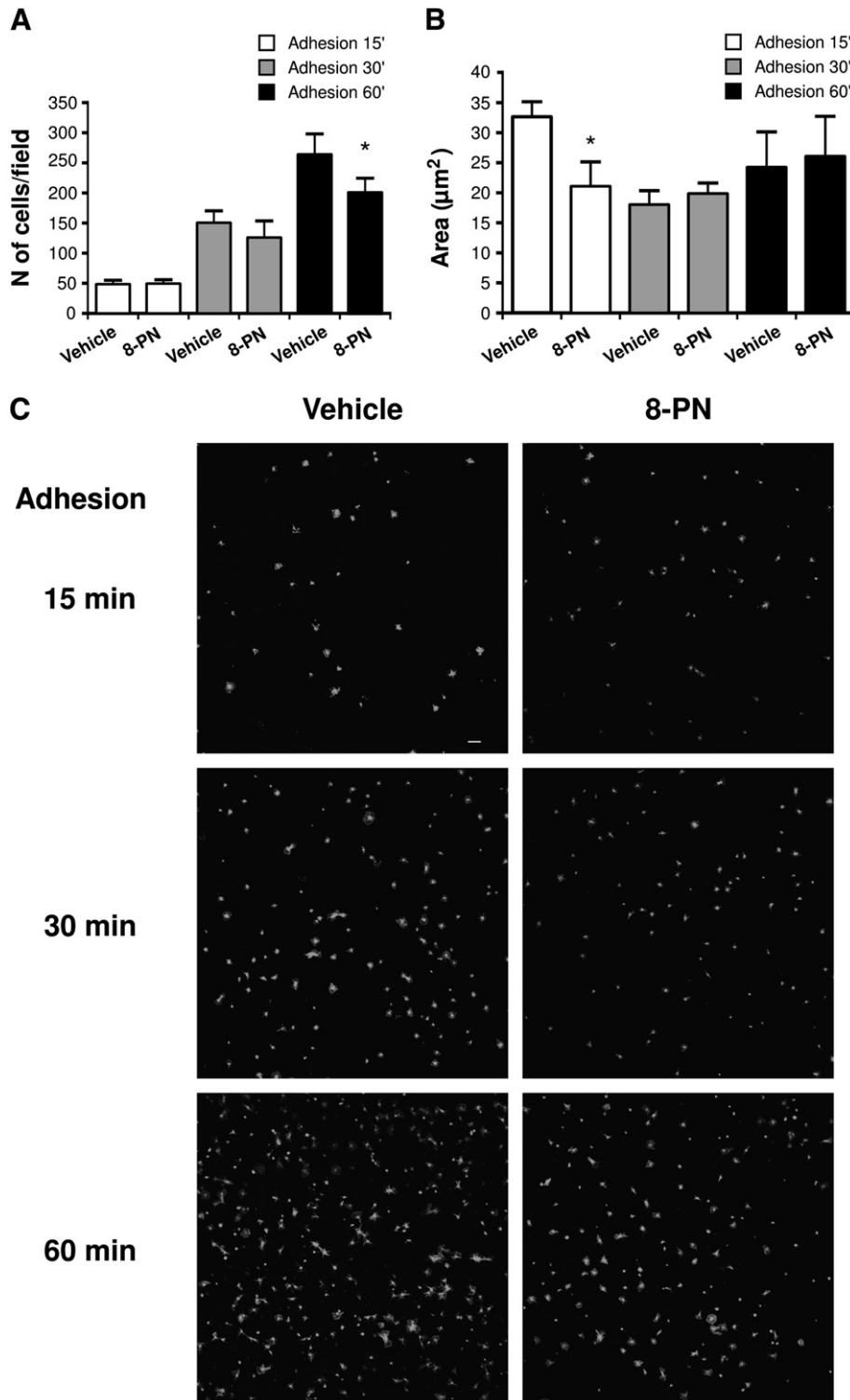


Fig. 2. Effect of 8-PN on platelet adhesion to collagen matrix. Gel-filtered platelets (3×10^8 cells/ml) were incubated with $30 \mu\text{M}$ 8-PN or vehicle for 5 min and then added to coverslips coated with collagen for 15, 30 or 60 min. Adherent platelets were fixed, permeabilized, and stained with Alexa488-phalloidin. Platelets were viewed on a confocal microscope and digital images ($63\times$) were acquired. The number of adherent cells (A) and the average cell area (B) were determined using the Image-Pro Plus software, version 7.0. For each specimen at least 20 different fields were analyzed. Histograms represent means \pm SEM. Asterisks represent statistical significance compared to vehicle-treated cells determined by Student's *t* test ($*P < 0.05$ 8-PN vs. vehicle-treated cells). (C) Representative images. Bar, $10 \mu\text{m}$.

It is well known that PKG and PKA activation is dependent on the availability of cGMP and cAMP, respectively. Therefore, we measured the intracellular content of cyclic nucleotides in platelets in response to 8-PN stimulation. Fig. 4A shows that in this condition $30 \mu\text{M}$ 8-PN was actually able to slightly increase (1.35 ± 0.16 fold over basal

level) cAMP levels, whereas treatment with $2 \mu\text{M}$ PGE₁ for 1 min increased the cAMP content of 27.50 ± 0.46 folds over basal level.

Subsequently, we evaluated the effect of 8-PN on platelet cGMP levels. Our data demonstrate that $30 \mu\text{M}$ 8-PN induces a 2.34 ± 0.03 fold increase in cGMP with respect to non-treated cells (Fig. 4B).

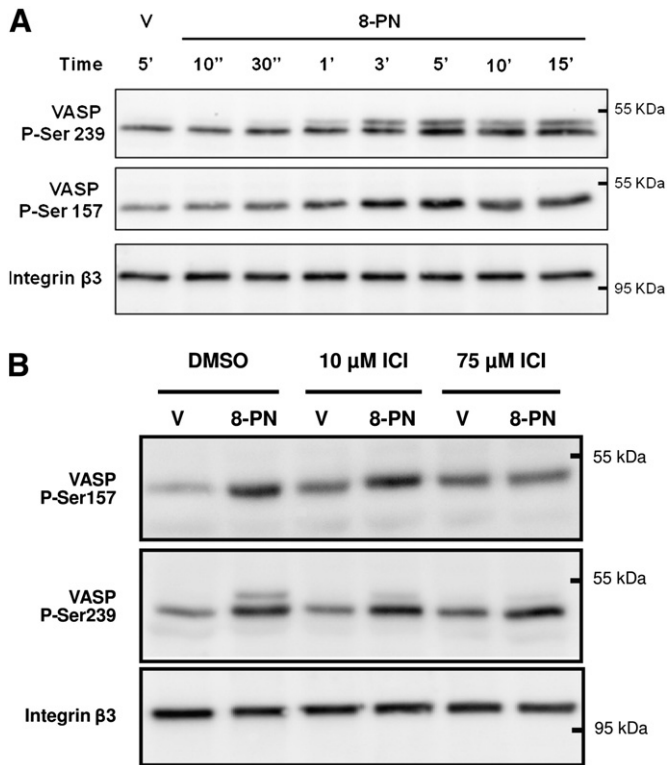


Fig. 3. 8-PN phosphorylated VASP in a time-dependent manner. Gel-filtered platelets (5×10^8 cells/ml) were incubated at 37 °C with (A) vehicle (V) or 30 μ M 8-PN for the indicated times. (B) platelets were treated with DMSO, 10 or 75 μ M ICI 182,780 (ICI) before stimulation with vehicle (V) or 30 μ M 8-PN for 5 min. Aliquots containing the same amount of proteins were analyzed by immunoblotting with anti-P-Ser239-VASP, anti-P-Ser157-VASP and anti-integrin β 3 antibodies. The immunoblottings shown are representative of one out of three identical experiments performed with platelets obtained from different donors.

To evaluate the involvement of soluble guanylyl cyclase (sGC) in 8-PN signaling, platelets were incubated with 2 μ M ODQ, an irreversible competitive inhibitor of sGC, for 5 min prior to stimulation with 30 μ M 8-PN or vehicle. ODQ prevented the increase of cGMP caused by 8-PN (Fig. 4B). Moreover, in platelets treated with ODQ prior to incubation with 8-PN or vehicle, 8-PN-mediated VASP phosphorylation on both Ser157 and Ser239 was also prevented (Fig. 4C), allowing us to conclude that 8-PN triggers in platelets a signal which causes sGC activation.

In order to verify whether the inhibition of agonist-induced platelet aggregation is a consequence of the activation of the NO/cGMP/PKG pathway induced by 8-PN, platelets were treated with ODQ for 5 min, then stimulated with 8-PN, vehicle or the NO donor sodium nitroprusside (SNP), and induced to aggregate with 5 μ g/ml collagen. Surprisingly, the inhibition of platelet aggregation caused by 8-PN was not reverted by the inhibition of the sGC. By contrast, in SNP-treated platelets ODQ reverted the effect of the NO-donor, as expected (Fig. 5D). These results suggest that the NO/cGMP/PKG pathway, although activated in human platelets by 8-PN, was not involved in 8-PN-mediated inhibition of platelet function.

3.4. 8-PN inhibits protein phosphorylation events in human platelets

Protein phosphorylation is a crucial event in the activation of platelets. Therefore, we analyzed the effect of 8-PN on the protein tyrosine phosphorylation in resting and stimulated platelets. Platelets were incubated with vehicle or 30 μ M 8-PN for 5 min and then stimulated with 5 μ g/ml collagen or 0.05 U/ml thrombin. We found that the treatment of platelets with 30 μ M 8-PN did not have any effect on the basal pattern of protein tyrosine phosphorylation; however,

8-PN was able to extensively inhibit protein tyrosine phosphorylation triggered by both collagen and thrombin (Fig. 6A).

Tyrosine kinases and phosphatases regulate many signaling pathways activated downstream of collagen and thrombin receptors engagement [31]. Therefore, we analyzed the phosphorylation level of several kinases, such as Pyk2, Akt, ERK1/2, p38 MAP kinase, and Src, in platelets stimulated with collagen or thrombin in the presence or absence of 8-PN. Identical aliquots of each sample were analyzed by immunoblotting with phospho-specific antibodies recognizing the active forms of the tyrosine kinases analyzed. As shown in Fig. 6B, pretreatment of platelets with 8-PN strongly inhibited agonist-induced phosphorylation of Pyk2, Akt, ERK1/2, while the phosphorylation of p38MAPK was slightly inhibited and Src phosphorylation was not affected.

In order to understand whether the 8-PN inhibition of protein phosphorylation was dependent on recruitment of estrogen receptors, the phosphorylation state of Src, Akt and ERK1/2 was evaluated in platelets treated with 10 or 75 μ M ICI 182,780. As shown in Fig. 5C ICI 182,780, at any concentration tested, did not affect 8-PN inhibitory effect on protein phosphorylation induced by either collagen or thrombin. These data suggest that 8-PN inhibits protein phosphorylation independently of estrogen receptors.

3.5. 8-PN inhibits dense granule secretion and calcium release in platelets

Platelets stimulated by physiological agonists release their granule content, including ADP, contributing to the amplification of platelet response to agonists. Binding of ADP to its receptors promotes shape change, aggregation, and Ca^{2+} mobilization. These events culminate in the activation of integrin α IIb β 3 through the process called “inside-out signaling” [32].

Therefore, to better understand the effect of 8-PN on platelet function, we investigated whether this flavonoid could influence dense granule secretion. Platelets were incubated for 5 min with 30 μ M 8-PN or vehicle and then stimulated with 5 μ g/ml collagen. As shown in Fig. 6A, the treatment with 8-PN was able to strongly inhibit ATP release from dense granules induced by collagen (3.72 ± 0.24 nM versus 7.46 ± 1.3 nM).

The effect of 8-PN on Ca^{2+} release from the platelet dense tubular system was also investigated. FURA 2-loaded platelets were added with 30 μ M 8-PN or vehicle for 5 min and then stimulated with 5 μ g/ml collagen or 0.05 U/ml thrombin. The measurement of cytosolic Ca^{2+} concentration revealed that 8-PN inhibited the release of Ca^{2+} from the platelet dense tubular system induced by both the agonists (Fig. 6B).

4. Discussion

Phytoestrogens are plant-derived compounds that exert beneficial effects against cardiovascular diseases [3], mainly inhibiting platelet function [4]. In the last decade the prenylated flavanone 8-prenylnaringenin, extracted from glands of the hop flowers, has been regarded as a novel phytoestrogen with higher affinity for the estrogen receptors than any other phytoestrogens so far investigated [20].

This study represents one of the first attempts to give molecular support to a great body of evidence reported in literature of the beneficial effects of 8-PN on human health, and in particular in cardiovascular diseases [3]. Our results have shown for the first time that 8-PN is able to dramatically inhibit platelet aggregation induced by physiological agonists in both gel-filtered platelets and platelet-rich plasma (PRP), indicating that this flavanone actually works in a physiological environment. In PRP a higher concentration of 8-PN is required to inhibit platelets, probably due to the presence of proteins binding hydrophobic compounds, and thus leaving only a fraction of them free to signal.

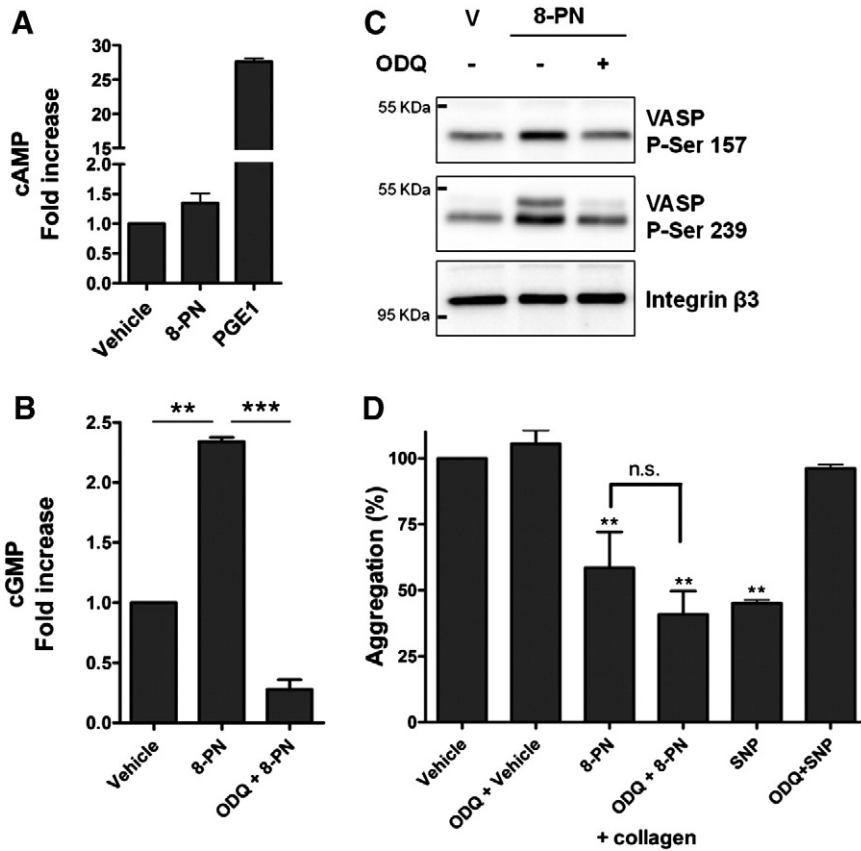


Fig. 4. Effects of 8-PN on PKA and PKG pathways. (A) Gel-filtered platelets (1×10^8 /ml) were treated with Vehicle, 30 μ M 8-PN, or 2 μ M PGE1, as indicated. Platelet cAMP levels were measured. Histograms represent means \pm SEM of three different experiments. (B) Gel-filtered platelets (4×10^8 /ml) were treated with 2 μ M ODQ, where indicated, prior to stimulation with Vehicle or 30 μ M 8-PN. cGMP levels were determined by the cGMP Complete EIA Kit. Histograms represent means \pm SEM of three independent experiments. Asterisks represent statistical significance compared to 8-PN cGMP levels determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. (** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. 8-PN-treated sample). (C) Gel-filtered platelets (5×10^8 /ml) were incubated with 2 μ M ODQ for 5 min at 37 $^{\circ}$ C, where indicated, prior to stimulation with vehicle (V) or 30 μ M 8-PN for 5 min. Aliquots containing the same amount of proteins were analyzed by immunoblotting with anti-P-Ser239-VASP, anti-P-Ser157-VASP and anti-integrin β 3 antibodies. The immunoblotting shown is representative of one out of three identical experiments performed with platelets obtained from different donors. (D) Gel-filtered platelets (3×10^8 /ml) were incubated with 2 μ M ODQ for 5 min, where indicated, prior to stimulation with Vehicle, 30 μ M 8-PN for 5 min or 1 μ M SNP for 1 min and then induced to aggregate with 5 μ g/ml collagen. Results are expressed as percentage of platelet aggregation with respect to cells treated with vehicle alone (100%). Data are means \pm SD from three independent experiment. Asterisks represent statistical significance determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test (** $P < 0.01$).

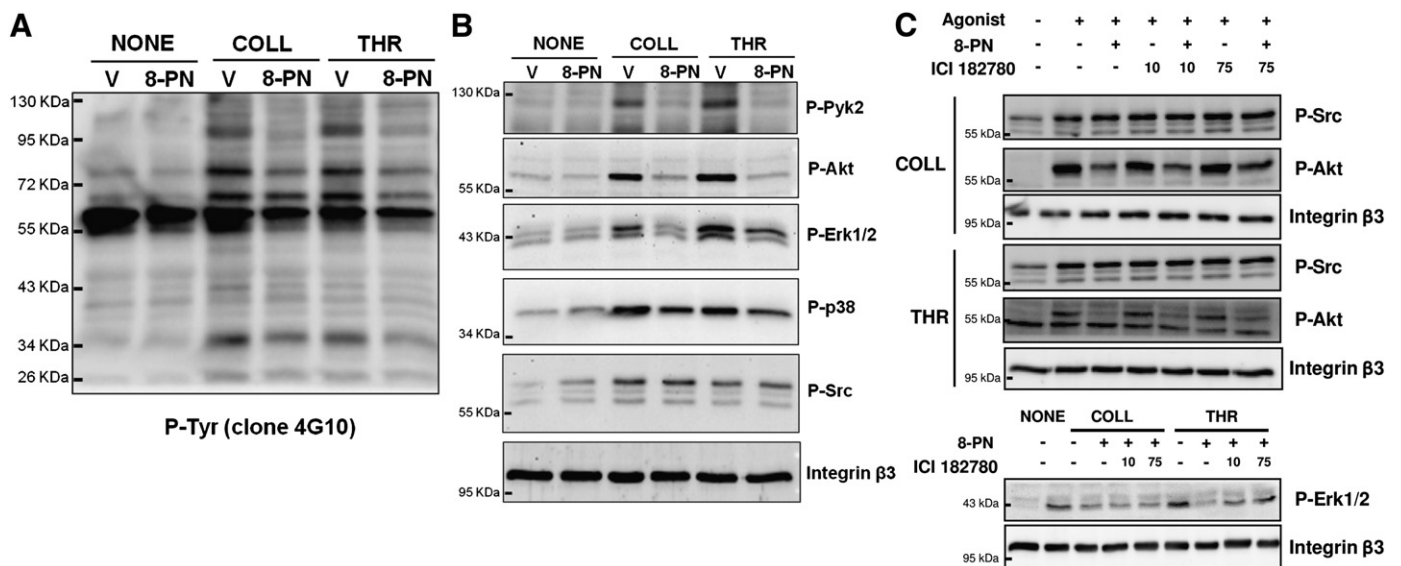


Fig. 5. 8-PN inhibits protein phosphorylation events in platelets. Samples of gel-filtered platelets (5×10^8 /ml) were incubated at 37 $^{\circ}$ C with vehicle (V) or 30 μ M 8-PN for 5 min and then stimulated or not (NONE) with 5 μ g/ml collagen (COLL) or 0.05 U/ml thrombin (THR) for 5 min. Aliquots containing the same amount of proteins were analyzed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine (clone 4 G10) (A) or with phosphospecific antibodies (B). (C) Platelets were incubated with vehicle (-), 10 or 75 μ M ICI 182780 for 5 min, as indicated, treated with vehicle (-) or 30 μ M 8-PN for 5 min and then stimulated or not (-) with 5 μ g/ml collagen (COLL) or 0.05 U/ml thrombin (THR) for 5 min. The images shown are representative of one out of three identical experiments performed with platelets obtained from different donors.

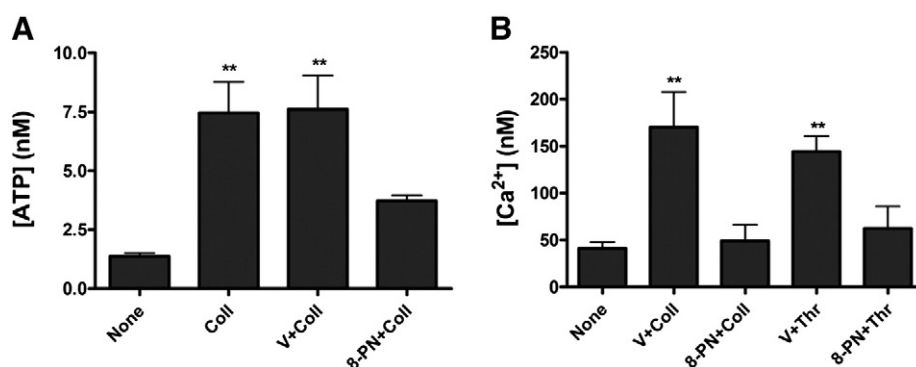


Fig. 6. 8-PN inhibits dense granule secretion and calcium release. (A) Gel-filtered platelets (3×10^8 /ml) were incubated for 5 min with 30 μ M 8-PN or vehicle (V) and then aggregated with 5 μ g/ml collagen (Coll). ATP content was measured using the ATP Determination Kit following the manufacturer's instructions. Histograms represent means \pm SEM of three independent experiments. Asterisks represent statistical significance determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test (** $P < 0.01$ vs. unstimulated platelets). (B) FURA 2-loaded platelets (2×10^8 /ml) were incubated for 5 min with 30 μ M 8-PN or vehicle (V) and then with 5 μ g/ml collagen or 0.05 U/ml thrombin. Measurement of cytosolic Ca^{2+} was performed in a spectrofluorimeter. Histograms represent means \pm SEM of three independent experiments. Asterisks represent statistical significance determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test (** $P < 0.01$ vs. unstimulated platelets).

Here we show that 8-PN inhibited collagen-induced aggregation in a reversible and dose-dependent manner with an IC_{50} value of 13 μ M and a maximum inhibitory activity at 30 μ M in gel-filtered platelets, whereas in PRP the IC_{50} was 100 μ M and the maximum inhibitory effect at 150 μ M.

Collagen exerts its function on platelets activating ITAM-bearing receptors and integrins, which also mediate the adhesion of platelets to the exposed subendothelium. Actually our data demonstrate that in both PRP and gel-filtered platelets 8-PN also inhibits aggregation induced by both thrombin and the thromboxane A_2 analogue U46619, agonists signaling through G_q - and $G_{12/13}$ -associated receptors. This evidence supports the hypothesis that 8-PN may act on one or more molecules common to multiple pathways in human platelets and may have an impact on platelets also *in vivo*.

The dose of 8-PN necessary to inhibit platelet aggregation is consistent with previous data obtained for 8-PN and other flavonoids in various cell types, including platelets [12,33,34].

Although 8-PN inhibits platelet aggregation in PRP, to investigate the molecular mechanisms by which 8-PN affect platelet function, we chose gel-filtered platelets as experimental model, because platelets are resuspended in a physiological buffer under well-defined conditions, i.e., the presence of plasmatic ionic calcium concentrations and the absence of plasma components. One of the main advantages of using gel-filtered platelets is that cell activation can be more finely modulated (e.g., concentration of agonists, proteins, inorganic ions) and the molecular analysis performed is more accurate.

One of the essential events for irreversible platelet aggregation is the reorganization of the cytoskeleton. VASP is one of the major actors in this respect. When phosphorylated, VASP shows a reduced ability to bind to cytoskeletal proteins, which in turn lose their ability to undergo the structural reorganization characteristic of activated platelets [28]. 8-PN promoted VASP phosphorylation on both Ser157 and Ser239 in a time-dependent manner, suggesting that both cAMP and cGMP elevation and the subsequent PKA and PKG activation occurred. Indeed it has been demonstrated that in a purified system, PKA and PKG preferentially phosphorylate VASP on Ser157 and Ser239, respectively [28]. Hence, we directly measured the increase of both cAMP and cGMP upon 8-PN treatment.

Actually 8-PN induced the increase of both cyclic nucleotides in intact platelets. Cyclic nucleotides levels in cells may increase because of either active synthesis by specific cyclases or inhibition of phosphodiesterases. 8-PN induced a very low increase in cAMP levels compared to PGE₁, a well known platelet antagonist acting through a G_s -coupled receptor. This cAMP elevation was more consistent with the inhibition of the phosphodiesterase 3 than with the activation of adenylyl cyclase. In fact it is known that cGMP, at concentrations that activate PKG [28,35],

competes with cAMP at the catalytic site of phosphodiesterase 3, causing the inhibition of the enzyme and cAMP increase. The increase of cGMP in platelets entails stimulation of NOS to produce NO, which activates sGC. We tested the involvement of sGC activation by means of the pharmacological inhibitor ODQ. Our data have shown that in platelets ODQ prevents 8-PN-induced elevation of cGMP and VASP phosphorylation on both serines. However, ODQ was not able to overcome the inhibitory effect of 8-PN on platelet aggregation. Taken together, these data suggest that inhibition of platelet aggregation mediated by 8-PN does not actually rely on activation of the platelet NO/cGMP/PKG pathway triggered by 8-PN. Hence, different pathways are triggered by 8-PN in platelets.

One of the major events during platelet aggregation is the release of dense granule content that amplify platelet response to agonists. Secreted ADP binds to its receptors promoting shape change, aggregation and Ca^{2+} mobilization [32]. We found that 8-PN inhibits the release of ATP from the platelet dense granules caused by collagen. Moreover, this phytoestrogen inhibited the increase in cytoplasmic Ca^{2+} in platelets treated with both thrombin and collagen, suggesting that in 8-PN-treated platelets the activation of phospholipase C is compromised.

Protein phosphorylation plays an important role in regulating diverse functions in platelets. It occurs in response to many stimuli, involves multiple pathways, and has functional implications. Although an increasing number of studies in literature have investigated this topic, the precise role of protein tyrosine phosphorylation in signal transduction in platelets is not fully elucidated. Diaz-Ricart et al. [36] have reported that protein tyrosine phosphorylation is a crucial event in the development of platelet activation and functional activity. When challenged with two of the strongest physiological agonists, thrombin or collagen, platelets undergo a series of morphological and biochemical transformations including shape change, secretion, and aggregation. It can be inferred that all these events are orchestrated by phosphorylation of key proteins [36], which activity, in turn, is regulated by tyrosine kinase and tyrosine phosphatase activities. 8-PN did not have any effect on the basal state of protein phosphorylation, suggesting that it does not influence tyrosine phosphatase activities. However, 8-PN extensively inhibited the agonist-induced phosphorylation on tyrosine residues and the activation of specific kinases, such as Pyk2, Akt, and ERK1/2, but not p38 MAPK and Src. This indicates that 8-PN affects the activity of specific signaling enzymes regulating or being regulated by defined signaling pathways. Indeed, Pyk2 to be fully activated requires phosphorylation by Src and increase in cytosolic calcium ions and has been shown to be required for activation of the pathway PI3K/Akt, leading to integrin α IIb β 3 activation and full platelet aggregation [37]. Furthermore, the activation of ERK1/2

has been linked to thromboxane A₂ generation and secretion of platelet granules, thus providing the second wave of platelet activation required for a stable hemostatic plug [38].

It has been reported that 8-PN is able to bind with high affinity to and to signal through estrogen receptors [15], mimicking the effects of estrogens on different tissues and organs, in particular the cardiovascular system. Notably, we previously demonstrated that in vitro 100 nM 17 β -estradiol exerts a priming effect on thrombin-dependent platelet aggregation, with a mechanism dependent on estrogen receptor β engagement and Src kinase activation [5,6]. On the other hand Wu et al. showed that 17 β -estradiol at higher concentration (10 μ M) inhibited collagen-induced platelet aggregation by activating the cAMP/eNOS/NO/cGMP and inhibiting the MAP kinases, p38 and JNK [27]. All of the effects of 17 β -estradiol on platelets were completely reverted by the pure estrogen antagonist ICI 182,780 [5,6,27]. Furthermore, it has been shown that 8-PN has 100 times less affinity for estrogen receptors (both α and β isoforms) than 17 β -estradiol or ICI 182,780 [15] and the estrogenic effects of 8-PN both in vitro and in vivo were counteracted by a 100-fold lower concentration of ICI 182,780 [18,39].

In the present study ICI 182,780 at concentrations higher than 100 μ M showed unspecific effects, indeed inhibited per se platelet aggregation induced by physiological agonists. Therefore, we employed two concentrations of antagonist, 10 and 75 μ M. 10 μ M was the concentration of ICI 182,780 that block the effects of estrogens in platelets [5,6,27] and was shown to inhibit the estrogenic effects of 8-PN in other cell and animal models [18,39]; at this concentration ICI 182,780 did not revert the 8-PN-dependent inhibition of platelet aggregation, did not affect the phosphorylation of VASP on both Ser239 and Ser157, and furthermore did not restore agonist-induced phosphorylation of signaling protein kinases, such as Akt and ERK1/2.

On the other hand, 75 μ M ICI 182,780 did not affect the phosphorylation state of Akt, ERK1/2 and VASP Ser239, was able to only halve the inhibition of aggregation by any active 8-PN concentrations, and blocked the phosphorylation of VASP on Ser157.

However, using ODQ we demonstrated that the phosphorylation VASP was not related to the ability of 8-PN to inhibit platelet aggregation. 75 μ M ICI 182,780 prevented VASP phosphorylation on Ser157 and thus partly reverted collagen-induced platelet aggregation, this may be explained by the finding that the negative regulation of phosphorylation of VASP on Ser157 lead to suppression of actin polymerization and reduction of filopodia formation, event critically required for collagen-induced platelet aggregation [40]. Although 75 μ M ICI 182,780 did not affect collagen-induced aggregation per se, we cannot exclude some unspecific effects when used at such high concentration and in an inhibited platelet. Taken together, we can conclude that the inhibitory action of 8-PN on platelet function was not related to its ability to bind to platelet estrogen receptors.

Although the pathways through which 8-PN inhibits platelet function are not completely characterized, our results suggest that the flavonone 8-PN functions affecting different signal transduction pathways. As shown for other flavonoids [4], 8-PN may act as an inhibitor of some key enzyme important for cellular signaling, thus blocking essential events in platelet activation and aggregation, such as dense granules secretion and Ca²⁺ release.

Further studies will be necessary to better clarify the mechanisms by which 8-PN works. Anyway, we can conclude that 8-PN may represent a useful tool in the therapy and prevention of vascular diseases associated with platelet aggregation, such as atherosclerosis, myocardial infarction, coronary artery disease, and thrombosis.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.06.018>.

Statement of conflicts of interest

None

Acknowledgments

The authors thank Prof G. Appendino (University of Piemonte Orientale A. Avogadro, Italy) for providing 8-PN and Prof. M.E. Tira (University of Pavia, Italy) for the generous gift of type I collagen. This work was supported by grants from Ministero dell'Università e della Ricerca-PRIN 2007 (to FS), from Regione Piemonte-Ricerca Sanitaria Finalizzata 2006, 2008, 2009 and -Ricerca Scientifica Applicata 2004, and from Università del Piemonte Orientale-Ricerca Locale.

References

- [1] P. Cos, T. De Bruyne, S. Apers, D. Vanden Berghe, L. Pieters, A.J. Vlietinck, Phytoestrogens: recent developments, *Planta Med.* 69 (2003) 589–599.
- [2] M. Messina, S. Barnes, The role of soy products in reducing risk of cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 83 (1991) 541–546.
- [3] R.A. Dixon, Phytoestrogens, *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 (2004) 225–261.
- [4] M. El Haouari, J.A. Rosado, Modulation of platelet function and signaling by flavonoids, *Mini Rev. Med. Chem.* 11 (2011) 131–142.
- [5] L. Moro, S. Reineri, D. Piranda, D. Pietrapiana, P. Lova, A. Bertoni, A. Graziani, P. Defilippi, I. Canobbio, M. Torti, F. Sinigaglia, Nongenomic effects of 17 β -estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor β and Src kinase, *Blood* 105 (2005) 115–121.
- [6] S. Reineri, A. Bertoni, E. Sanna, S. Baldassarri, C. Sarasso, M. Zanfa, I. Canobbio, M. Torti, F. Sinigaglia, Membrane lipid rafts coordinate estrogen-dependent signaling in human platelets, *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (2007) 273–278.
- [7] A. Polette, D. Lemaitre, M. Lagarde, E. Véricel, N-3 fatty acid-induced lipid peroxidation in human platelets is prevented by catechins, *Thromb. Haemost.* 75 (1996) 945–949.
- [8] R. Landolfi, R.L. Mower, M. Steiner, Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure–activity relations, *Biochem. Pharmacol.* 33 (1984) 1525–1530.
- [9] T. Akiyama, J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, Y. Fukami, Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 5592–5595.
- [10] M. Lindahl, C. Tagesson, Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2, *Inflammation* 21 (1997) 347–356.
- [11] H.S. Lee, H.R. Ko, S.Y. Ryu, W.K. Oh, B.Y. Kim, S.C. Ahn, T.I. Mheen, J.S. Ahn, Inhibition of phospholipase C gamma 1 by the prenylated flavonoids from *Sophora flavescens*, *Planta Med.* 63 (1997) 266–268.
- [12] L. Navarro-Núñez, J. Rivera, J.A. Guerrero, C. Martínez, V. Vicente, M.L. Lozano, Differential effects of quercetin, apigenin and genistein on signalling pathways of protease-activated receptors PAR(1) and PAR(4) in platelets, *Br. J. Pharmacol.* 158 (2009) 1548–1556.
- [13] E.R. Rosenblum, I.M. Campbell, D.H. Van Thiel, J.S. Gavalier, Isolation and identification of phytoestrogens from beer, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 16 (1992) 843–845.
- [14] M. Kitaoka, H. Kadokawa, M. Sugano, K. Ichikawa, M. Taki, S. Takaiishi, Y. Iijima, S. Tsutsumi, M. Boriboon, T. Akiyama, Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8-isopentenylaringenin and an initial study on its structure-activity relationship, *Planta Med.* 64 (1998) 511–515.
- [15] S. Milligan, J. Kalita, V. Pocock, A. Heyerick, L. De Cooman, H. Rong, D. De Keukeleire, Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylaringenin, *Reproduction* 123 (2002) 235–242.
- [16] O. Zierau, S. Gester, P. Schwab, P. Metz, S. Kolba, M. Wulf, G. Vollmer, Estrogenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin and 8-prenylaringenin, *Planta Med.* 68 (2002) 449–451.
- [17] J.F. Stevens, A.W. Taylor, M.L. Deinzer, Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 832 (1999) 97–107.
- [18] H. Rong, T. Boterberg, J. Maubach, C. Stove, H. Depypere, S. Van Slambrouck, R. Serreyn, D. De Keukeleire, M. Mareel, M. Bracke, 8-Prenylaringenin, the phytoestrogen in hops and beer, upregulates the function of the E-cadherin/catenin complex in human mammary carcinoma cells, *Eur. J. Cell Biol.* 80 (2001) 580–585.
- [19] D. Nikolic, Y. Li, L.R. Chadwick, S. Grubjesic, P. Schwab, P. Metz, R.B. van Breemen, Metabolism of 8-prenylaringenin, a potent phytoestrogen from hops (*Humulus lupulus*), by human liver microsomes, *Drug Metab. Dispos.* 32 (2004) 272–279.
- [20] S.R. Milligan, J.C. Kalita, A. Heyerick, H. Rong, L. De Cooman, D. De Keukeleire, Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (1999) 2249–2252.
- [21] S.R. Milligan, J.C. Kalita, V. Pocock, V. Van De Kauter, J.F. Stevens, M.L. Deinzer, H. Rong, D. De Keukeleire, The endocrine activities of 8-prenylaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (2000) 4912–4915.
- [22] T.F. Bovee, R.J. Helsdingen, I.M. Rietjens, J. Keijer, R.L. Hoogenboom, Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors alpha and beta, and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 91 (3) (2004) 99–109.
- [23] M.M. Van Lipzig, A.M. ter Laak, A. Jongejan, N.P. Vermeulen, M. Wamelink, D. Geerke, J.H. Meerman, Prediction of ligand binding affinity and orientation of xenoestrogens to the estrogen receptor by molecular dynamics simulations and the linear interaction energy method, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1018–1030.
- [24] T. Poletti, S. Fallarini, F. Gugliesi, A. Minassi, G. Appendino, G. Lombardi, Anti-inflammatory and vascularprotective properties of 8-prenylapigenin, *Eur. J. Pharmacol.* 620 (2009) 120–130.

- [25] T.R. Dunkern, A. Hatzelmann, The effect of Sildenafil on human platelet secretory function is controlled by a complex interplay between phosphodiesterases 2, 3 and 5, *Cell. Signal.* 17 (2005) 331–339.
- [26] W.K. Pollock, T.J. Rink, R.F. Irvine, Liberation of [3H]arachidonic acid and changes in cytosolic free calcium in fura-2-loaded human platelets stimulated by ionomycin and collagen, *Biochem. J.* 235 (1986) 869–877.
- [27] G.J. Wu, J.J. Lee, D.S. Chou, T. Jayakumar, G. Hsiao, W.F. Chen, J.R. Sheu, Inhibitory signaling of 17 β -estradiol in platelet activation: the pivotal role of cyclic AMP-mediated nitric oxide synthase activation, *Eur. J. Pharmacol.* 15 (2010) 140–149.
- [28] U.R. Schwarz, U. Walter, M. Eigenthaler, Taming platelets with cyclic nucleotides, *Biochem. Pharmacol.* 62 (2001) 1153–1161.
- [29] E. Butt, K. Abel, M. Krieger, D. Palm, V. Hoppe, J. Hoppe, U. Walter, cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 14509–14517.
- [30] E.R. Levin, Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen, *Mol. Endocrinol.* 19 (2005) 1951–1959.
- [31] S.P. Jackson, S.M. Schoenwaelder, Y. Yuan, H.H. Salem, P. Cooray, Non-receptor protein tyrosine kinases and phosphatases in human platelets, *Thromb. Haemost.* 76 (1996) 640–650.
- [32] B.N. Kahner, H. Shankar, S. Murugappan, G.L. Prasad, S.P. Kunapuli, Nucleotide receptor signaling in platelets, *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 2317–2326.
- [33] M.S. Pepper, S.J. Hazel, M. Hümpel, W.D. Schleuning, 8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo, *J. Cell. Physiol.* 199 (2004) 98–107.
- [34] O. Wesołowska, J. Wiśniewski, K. Sroda, A. Krawczyński, A. Bielawska-Pohl, M. Paprocka, D. Duś, K. Michalak, 8-Prenylnaringenin is an inhibitor of multidrug resistance-associated transporters, P-glycoprotein and MRP1, *Eur. J. Pharmacol.* 644 (2010) 32–40.
- [35] T. Wollny, L. Aiello, D. Di Tommaso, V. Bellavia, D. Rotilio, M.B. Donati, G. de Gaetano, L. Iacovello, Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increase nitric oxide production, *Br. J. Pharmacol.* 127 (1999) 747–755.
- [36] M. Diaz-Ricart, M. Palomo, B. Fuste, I. Lopez-Vichez, C. Carbo, S. Perez-Pujol, J.G. White, G. Escolar, Inhibition of tyrosine kinase activity prevents the adhesive and cohesive properties of platelets and the expression of procoagulant activity in response to collagen, *Thromb. Res.* 121 (2008) 873–883.
- [37] A. Consonni, L. Cipolla, G. Guidetti, I. Canobbio, E. Ciraolo, E. Hirsch, M. Falasca, M. Okigaki, C. Balduini, M. Torti, Role and regulation of phosphatidylinositol 3-kinase β in platelet integrin α 2 β 1 signaling, *Blood* 119 (2012) 847–856.
- [38] H. Shankar, A. Garcia, J. Prabhakar, S. Kim, S.P. Kunapuli, P2Y12 receptor-mediated potentiation of thrombin-induced thromboxane A2 generation in platelets occurs through regulation of Erk1/2 activation, *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 638–647.
- [39] J. Bowe, X.F. Li, J. Kinsey-Jones, A. Heyerick, S. Brain, S. Milligan, K. O'Byrne, The hop phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, reverses the ovariectomy-induced rise in skin temperature in an animal model of menopausal hot flushes, *J. Endocrinol.* 191 (2006) 399–405.
- [40] G. Pula, K. Schuh, K. Nakayama, K.I. Nakayama, U. Walter, A.W. Poole, PKC δ regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation, *Blood* 108 (2006) 4035–4044.