



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

**Ruolo della Tirosin Chinasi Ricca in Prolina Pyk2
nel potenziamento dell’attivazione piastrinica
indotto da lipopolisaccaride**

Relatrice:

Prof.ssa Ilaria Canobbio

Correlatrice:

Dott.ssa Lucia Campomilla

Tesi Sperimentale di

Lisa Rubuano

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

INTRODUZIONE	1
LE PIASTRINE	1
<i>Origine delle piastrine</i>	<i>1</i>
<i>Morfologia delle piastrine</i>	<i>3</i>
<i>Ruolo delle piastrine nell'emostasi</i>	<i>8</i>
LE PIASTRINE NELLA TROMBOINFIAMMAZIONE.....	15
<i>Recettori piastrinici emostatici</i>	<i>16</i>
<i>Pattern Recognition Receptors</i>	<i>18</i>
<i>Lipopolisaccaride.....</i>	<i>22</i>
TIROSINA CHINASI RICCA IN PROLINA 2 PYK2	26
<i>Struttura di Pyk2</i>	<i>26</i>
<i>Meccanismo di attivazione di Pyk2.....</i>	<i>29</i>
<i>Ruolo biologico di Pyk2</i>	<i>30</i>
<i>Ruolo di Pyk2 nelle piastrine</i>	<i>32</i>
SCOPO DELLA RICERCA.....	37
MATERIALI	38
METODI.....	40
<i>Tecnica 1: Prelievo di sangue murino</i>	<i>40</i>
<i>Tecnica 2: Purificazione di piastrine da sangue murino.....</i>	<i>40</i>
<i>Tecnica 3: Analisi dell'aggregazione piastrinica</i>	<i>41</i>
<i>Tecnica 4: Preparazione dei campioni totali.....</i>	<i>41</i>
<i>Tecnica 5: Elettroforesi SDS-PAGE</i>	<i>42</i>
<i>Tecnica 6: Western Blotting.....</i>	<i>43</i>
<i>Tecnica 7: Immunoblotting.....</i>	<i>44</i>
<i>Tecnica 8: Analisi statistica</i>	<i>45</i>
RISULTATI.....	46
<i>LPS potenzia l'attivazione piastrinica indotta da TRAP4</i>	<i>46</i>
<i>Analisi dell'aggregazione.....</i>	<i>46</i>
<i>Analisi delle vie di segnalazione</i>	<i>48</i>

<i>Fosforilazione dei substrati di PKC.....</i>	<i>49</i>
<i>Fosforilazione di Pyk2</i>	<i>51</i>
<i>Fosforilazione di proteine delle vie di segnalazione PI3K e MAPK</i>	<i>52</i>
<i>Il potenziamento promosso da LPS in piastrine stimulate con TRAP4 coinvolge il recettore di LPS, TLR4</i>	<i>55</i>
<i>Analisi dell'aggregazione.....</i>	<i>55</i>
<i>Analisi delle vie di segnalazione</i>	<i>56</i>
<i>Fosforilazione dei substrati di PKC.....</i>	<i>56</i>
<i>Fosforilazione di Pyk2</i>	<i>58</i>
<i>Fosforilazione di proteine delle vie di segnalazione PI3K e MAPK</i>	<i>59</i>
<i>Il potenziamento promosso da LPS in piastrine stimulate con TRAP4 coinvolge l'attivazione di PKC.....</i>	<i>61</i>
<i>Analisi dell'aggregazione.....</i>	<i>61</i>
<i>Analisi delle vie di segnalazione.....</i>	<i>62</i>
<i>Fosforilazione di Pyk2</i>	<i>62</i>
<i>Fosforilazione di proteine delle vie di segnalazione PI3K e MAPK</i>	<i>64</i>
<i>Il potenziamento promosso da LPS in piastrine stimulate con TRAP4 coinvolge Pyk2</i>	<i>66</i>
<i>Analisi dell'aggregazione.....</i>	<i>66</i>
<i>Analisi delle vie di segnalazione</i>	<i>67</i>
<i>Fosforilazione dei substrati di PKC.....</i>	<i>67</i>
<i>Fosforilazione di proteine delle vie di segnalazione PI3K e MAPK</i>	<i>68</i>
DISCUSSIONE.....	70
CONCLUSIONI	76
BIBLIOGRAFIA.....	77

INTRODUZIONE

Le piastrine

Le piastrine sono piccoli frammenti cellulari anucleati di forma discoidale che circolano nel sangue. Hanno un diametro di circa 2-4 μm e una concentrazione compresa tra 150 alle 350 x 10⁹ piastrine/L in un individuo sano adulto (Gremmel et al., 2024).

La capacità delle piastrine attivate di aderire alla parete di un vaso sanguigno danneggiato e di formare aggregati fu descritta per la prima volta nel XIX secolo da Bizzozzero (Brewer, 2006).

Oltre al loro ruolo nell'emostasi e nella trombosi, le piastrine sono oggi sempre più riconosciute come attori chiave in numerosi altri processi fisiologici, tra cui la risposta infiammatoria (Li et al., 2012) l'angiogenesi (Battinelli, 2019), la difesa antimicrobica (Engelmann et al., 2013) e il processo di guarigione delle ferite (Etulain, 2018). Sono, inoltre, coinvolte in diversi processi patologici, come l'aterosclerosi, la crescita e la metastasi tumorale (Gay e Felding-Habermann, 2011) e la malattia di Alzheimer (AD) (Canobbio et al., 2015).

Le piastrine circolanti nel sangue vengono prodotte giornalmente dai megacariociti (MK) nel midollo osseo, una volta in circolo hanno una durata di vita di circa 8-10 giorni, al termine dei quali vengono eliminate nel sistema reticoloendoteliale della milza (Quach et al., 2018).

Origine delle piastrine

Le piastrine sono prodotte dalla frammentazione del citoplasma dei MK, i quali sono a loro volta prodotti da cellule staminali ematopoietiche pluripotenti residenti nel midollo osseo (Morita et al., 2011). I MK sono le cellule più grandi del midollo osseo (50-100 μm) e anche tra le più rare, rappresentando circa lo 0,01% delle cellule nucleate (Machlus e Italiano, 2013).

Il midollo osseo rappresenta il principale sito di produzione piastrinica; tuttavia, anche i polmoni contribuiscono alla biogenesi delle piastrine (Lefrançois e Looney, 2019). Un gran numero di MK provenienti da siti extrapolmonari come il midollo osseo, circola nei polmoni e rilascia piastrine in questo distretto. Nei polmoni sono presenti popolazioni di MK maturi e immaturi, oltre a progenitori ematopoietici localizzati negli spazi extravascolari. In condizioni di trombocitopenia o di carenza di cellule staminali del midollo osseo, questi progenitori possono migrare verso il midollo osseo, contribuendo alla sua ripopolazione e al ripristino della conta piastrinica (Lefrançois et al., 2017).

Un importante regolatore della crescita e dello sviluppo dei MK è la trombopoietina (TPO), che si lega al suo recettore specifico c-Mpl espresso sui MK (Kaushansky, 2024).

La formazione delle piastrine viene convenzionalmente suddivisa in due fasi strettamente coordinate.

La prima fase consiste nella maturazione e sviluppo dei MK e richiede alcuni giorni e fattori di crescita specifici. Durante questo processo, i MK diventano poliploidi tramite endomitosi, un meccanismo regolato dalla TPO, in cui avviene la replicazione del DNA senza divisione cellulare. L'endomitosi si verifica a causa di un difetto nella citocinesi tardiva, che determina una formazione incompleta del solco di clivaggio, necessario per la divisione cellulare.

La poliploidizzazione consente un'intensa attività trascrizionale e di sintesi proteica, permettendo la produzione di grandi quantità di mRNA e delle proteine necessarie per l'impacchettamento nelle future piastrine (Vainchenker e Raslova, 2020).

Parallelamente, si verifica un marcato ingrossamento del citoplasma dei MK, con accumulo di proteine del citoscheletro, granuli piastrinici e una quantità di membrana sufficiente per poter completare il processo di assemblaggio delle piastrine (Machlus e Italiano, 2013).

La seconda fase è più veloce e viene completata in poche ore, in questa fase i MK maturi generano le piastrine. I MK maturi migrano dalla nicchia osteoblastica a quella vascolare, dove la maggior parte del loro citoplasma viene impacchettato in lunghi prolungamenti chiamati pro-piastrine, mentre il nucleo viene estruso (Vainchenker e Raslova, 2020).

Un MK può estendere da 10 a 20 pro-piastrine, che iniziano come protrusioni smussate, che nel tempo si allungano, si assottigliano e si ramificano ripetutamente (Machlus e Italiano, 2013).

Le pro-piastrine vengono rilasciate nei vasi sanguigni del midollo osseo e da esse originano le pre-piastrine, le quali subiscono eventi di fissione portando alla formazione delle piastrine con la caratteristica forma discoidale. Durante questo processo, granuli e organelli vengono distribuiti lungo le pro-piastrine grazie all'azione delle proteine citoscheletriche, sotto forma di flussi di particelle (Mbiandjeu et al., 2022).

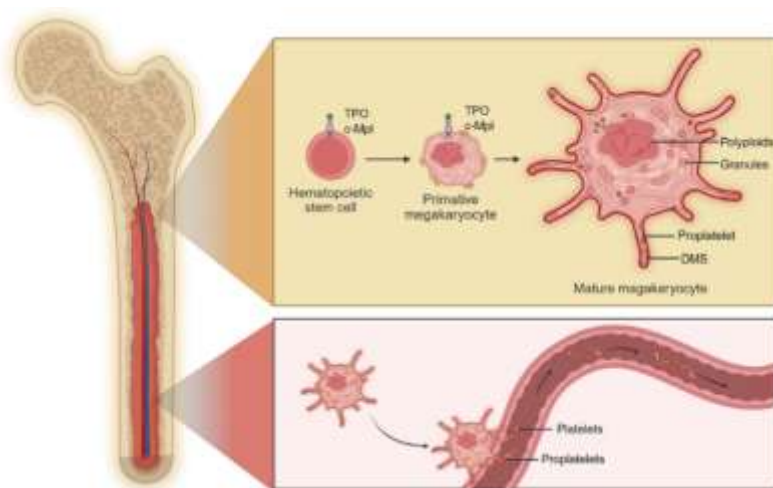


Figura 1. L'origine delle piastrine. Le piastrine derivano principalmente dai MK presenti nel midollo osseo. I MK primitivi maturano gradualmente sotto l'azione della TPO formando sistemi di membrane complessi e granuli. I MK maturi formano estroflessioni chiamate pro-piastrine, le quali si estendono nei vasi, dove vengono esposte alle forze di taglio del flusso sanguigno che ne inducono la frammentazione e il rilascio di piastrine mature (Tian et al., 2025).

Il tempo necessario per far sì che i MK completino la poliploidizzazione, maturino e rilascino le piastrine è di circa 5 giorni (Malara e Balduini, 2012).

Le piastrine vengono infine eliminate tramite fagocitosi da parte dei macrofagi nel sistema reticoloendoteliale, localizzati a livello della milza (Machlus e Italiano, 2013).

Morfologia delle piastrine

Le piastrine possiedono una membrana plasmatica che delimita il contorno della cellula, due sistemi di membrane interne: sistema canalicolare aperto (OCS) e sistema tubulare denso (DTS), uno scheletro di membrana a base di spettina, un citoscheletro acto-miosinico, una rete di microtubuli marginali e una serie di organelli dispersi casualmente all'interno del citoplasma, tra cui α -granuli, granuli densi, perossisomi, lisosomi e mitocondri (Thon e Italiano, 2012).

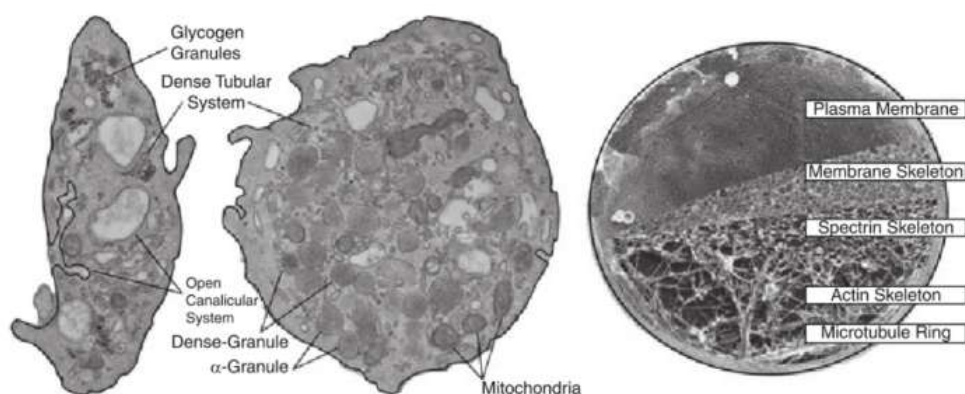


Figura 2. Sezioni sottili di piastrine discoidali (piani trasversale ed equatoriale). I componenti includono: l'OCS, il DTS, i granuli di glicogeno, gli α -granuli, i granuli densi, i mitocondri, la membrana plasmatica, lo scheletro di membrana, lo scheletro di spettina, lo scheletro di actina e l'anello di microtubuli (Tratto da Thon e Italiano, 2012).

Trascrittoma e proteoma piastrinico

Le piastrine sono piccoli frammenti anucleati e pertanto sono privi di DNA. Tuttavia, contengono un **trascrittoma** complesso di mRNA, miRNA, lncRNA, pre-mRNA e RNA circolare. Questi trascritti vengono acquisiti dalle cellule precursori dei MK durante il distacco delle pro-piastrine nel processo di trombopoiesi (Burkhart et al., 2012).

Le piastrine hanno la capacità di elaborare i pre-mRNA per generare mRNA che può essere tradotto in proteine. Il trascrittoma piastrinico non è statico, ma varia in risposta a stimoli esterni, come segnali infiammatori, agenti patogeni invasori e metastasi tumorali, attraverso l'utilizzo di siti di inizio e fine della trascrizione alternativi, salto di esoni e ritenzione di introni. Questa plasticità consente alle piastrine di modulare la loro funzione in modo rapido, nonostante l'assenza di nucleo (Davizon-Castillo et al., 2020). Le piastrine attivate sono, inoltre, in grado di sintetizzare

molte proteine come: l'interleuchina 1- β , il fattore tissutale (TF), la ciclo-ossigenasi 1 (COX-1), la P-selectina, Bcl-3 e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1 (Xu et al., 2016).

La prima analisi del proteoma piastrinico ha confermato la presenza di quasi 4000 proteine (Burkhart et al., 2012). Gran parte delle proteine piastriniche vengono ereditate dai MK, come il fattore di von Willebrand. Altre componenti, come la serotonina e proteine plasmatiche come il fibrinogeno provengono dal plasma grazie a eventi di endocitosi e pinocitosi, e vengono inglobate all'interno dei granuli secretori (Faria et al., 2021).

Nel prossimo futuro l'adozione di tecniche proteomiche più avanzate permetterà di ottenere una copertura ancora più completa del proteoma piastrinico, offrendo una comprensione più dettagliata delle principali proteine coinvolte nell'attivazione piastrinica e dei potenziali biomarcatori piastrinici associati a patologie ematologiche e ad altri disturbi (Burkhart et al., 2012).

Membrana plasmatica

La membrana plasmatica racchiude il citoplasma piastrinico e possiede un glicocalice molto sviluppato rispetto ad altre cellule ematiche. Il glicocalice costituisce il rivestimento esterno delle piastrine ed è una struttura molto dinamica, che permette la comunicazione con l'ambiente circostante. Contiene numerose glicoproteine di superficie necessarie per l'interazione delle piastrine con le strutture subendoteliali della parete vascolare danneggiata, facilitando adesione, attivazione, aggregazione piastrinica, nonché per la retrazione del coagulo. In particolare, i complessi recettoriali GPIb-IX-V e integrina α IIb β 3 sono abbondantemente espressi sulla superficie delle piastrine a riposo e rivestono grande importanza nell'emostasi (Gremmel et al., 2024).

Sotto al glicocalice si trova la membrana plasmatica costituita da un doppio strato fosfolipidico, che appare morfologicamente simile alle membrane di altri tipi cellulari, ma svolge un ruolo molto importante nel processo di coagulazione. Sulla superficie delle piastrine è presente il TF in una conformazione inattiva, grazie alla presenza di fosfolipidi carichi negativamente nel foglietto interno della membrana plasmatica, come la fosfatidilserina e fosfatidilinositolo (Gremmel et al., 2024).

Durante il processo di attivazione piastrinica, i fosfolipidi carichi negativamente vengono esposti sulla superficie della membrana tramite un processo ATP-dipendente mediato da floppasi e un processo calcio-dipendente mediato da scramblasi (Thon e Italiano, 2012).

Recettori piastrinici

Sulla superficie delle piastrine sono presenti numerosi recettori di membrana, coinvolti nei processi di adesione, attivazione e aggregazione. Tra questi, il complesso glicoproteico GPIb-IX-

V che lega il fattore di von Willebrand (vWF), l'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ che interagisce con il fibrinogeno e la fibronectina, l'integrina $\alpha 2\beta 1$ e la GPVI che legano il collagene, i recettori PAR1 e PAR4 che costituiscono i recettori per la trombina, P2Y₁₂ e P2Y₁ che sono recettori per l'ADP e infine il recettore per il trombossano A₂ (TxA₂). Il legame di questi recettori con i loro rispettivi ligandi contribuisce all'adesione, attivazione e amplificazione della risposta piastrinica. A questi si aggiungono i recettori per l'adrenalina ($\alpha 2\text{A}$) e per la serotonina (5-HT_{2A}), che modulano ulteriormente l'attivazione piastrinica (Estevez e Du, 2017).

Le piastrine esprimono anche recettori coinvolti nella risposta immunitaria, tra cui il recettore Fc γ RIIA (recettore per la porzione Fc delle IgG) e diversi Pattern Recognition Receptor (PRR). Tra questi, le principali famiglie sono i C-type Lectin Receptors (CLRs), i NOD-like Receptors (NLRs) e i Toll-like Receptors (TLRs), che permettono alle piastrine di riconoscere i patogeni.

I CLR e i TLR sono espressi sulla membrana, mentre gli NLR sono localizzati nel citosol (Dib et al., 2020). Questi recettori coinvolti nella risposta immunitaria piastrinica saranno approfonditi nel capitolo "Le piastrine nella tromboinfiammazione".

Inoltre, un ruolo chiave nell'interazione tra piastrine e leucociti è svolto dalla P-selectina (CD62P), che viene traslocata sulla superficie delle piastrine in seguito alla loro attivazione, in risposta a segnali intracellulari come l'aumento del calcio (Ca^{2+}) e l'esocitosi degli α -granuli (Tian et al., 2025).

Oltre alla membrana plasmatica, le piastrine possiedono altri due sistemi di membrane interne: il sistema canalicolare aperto e il sistema tubulare denso.

Sistema canalicolare aperto

L'OCS è formato da una serie di rientranze della membrana plasmatica disposte in modo continuo e da canali che si estendono verso l'interno della piastrina. L'OCS consente l'ingresso di sostanze extracellulari, come il fibrinogeno, all'interno delle piastrine e media il rilascio del contenuto dei granuli all'esterno durante l'attivazione piastrinica.

I canali dell'OCS possono essere proiettati verso l'esterno e facilitare la formazione di filopodi, in seguito all'adesione delle piastrine alla parete del vaso danneggiato (Selvadurai e Hamilton, 2018). L'OCS può servire anche come sito di stoccaggio per le glicoproteine della membrana plasmatica, ad esempio la GPIb-IX-V viene selettivamente sequestrata dall'OCS in seguito all'attivazione piastrinica da parte della trombina (Thon e Italiano, 2012).

Sistema tubulare denso

Il DTS è un sistema di membrana interno che non possiede delle comunicazioni con l'esterno. Rappresenta un residuo del reticolo endoplasmatico liscio dell'MK progenitore. È formato da una serie di canali dispersi nel citoplasma della piastrina. La sua funzione principale è quella di sequestrare il Ca^{2+} . La calreticulina, localizzata nel DTS, è una proteina che lega il Ca^{2+} e consente il suo sequestro da parte del DTS. Il rilascio di Ca^{2+} intracellulare dal DTS porta alla redistribuzione dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, alla riorganizzazione citoscheletrica e al rilascio di granuli (Gremmel et al., 2024).

Citoscheletro

La forma discoidale delle piastrine a riposo è mantenuta da un citoscheletro altamente specializzato, che supporta la membrana citoplasmatica e l'OCS.

I tre principali componenti del citoscheletro di una piastrina a riposo sono: lo scheletro di membrana, il citoscheletro di actina e i microtubuli marginali.

Lo scheletro di membrana è formato da molti filamenti di spettina che si connettono ai filamenti di actina. È localizzato sotto alla membrana plasmatica ed è legato a essa tramite glicoproteine di superficie (Thon e Italiano, 2012).

Il citoscheletro di actina è formato dai microfilamenti di actina ed è localizzato all'interno del citoplasma. I microfilamenti di actina formano la matrice dove sono sospesi i vari organelli separati gli uni dagli altri e separati dalla membrana plasmatica (White, 2013).

In seguito all'attivazione delle piastrine, il citoscheletro di actina costringe i microtubuli marginali verso il centro delle piastrine. Questo porta alla secrezione del contenuto degli α -granuli e dei granuli densi attraverso l'OCS. La riorganizzazione delle proteine citoscheletriche, determina il cambiamento di forma delle piastrine, durante il quale le piastrine acquisiscono prima una forma sferica e successivamente formano pseudopodi, assumendo una forma irregolare, che garantisce la corretta adesione delle piastrine al sito di danno (Cuenca-Zamora et al., 2019).

Organelli secretori

Le piastrine possiedono tre tipi di organelli secretori: α -granuli, granuli densi e lisosomi; all'interno dei quali immagazzinano molte molecole biologicamente attive. La formazione dei granuli inizia già nei MK e la loro maturazione continua, poi, nelle piastrine circolanti (Flaumenhaft, 2013).

Gli **α -granuli** sono i granuli più abbondanti, presenti in un numero di 50-80 per piastrina. Hanno una forma ovale e diametro di 200-500 nm, occupando circa il 10% del volume piastrinico. Sono

costituiti da un nucleotide denso di elettroni, una matrice luminale e un ammasso di tubuli periferici. Nelle piastrine a riposo, sono separati gli uni dagli altri grazie al citoscheletro di actina. Contengono proteine associate alla membrana e proteine solubili, coinvolte in vari processi, tra cui: la coagulazione, l'angiogenesi, l'infiammazione, la difesa dell'ospite e l'adesione piastrinica (Sharda e Flaumenhaft., 2018)

Nella zona sub-membranale contengono il vWF in strutture a forma tubulare, mentre nella zona periferica sono presenti varie proteine sintetizzate dai MK, come il fattore V della coagulazione, la trombospandina, la P-selectina, e il fattore piastrinico 4 (PF4). In questa zona sono presenti anche proteine extracellulari che vengono endocitate dal plasma, come il fibrinogeno e ammine biogene come la serotonina (Gremmel et al., 2024).

Gli α -granuli ottengono il loro contenuto molecolare attraverso la sintesi proteica endogena, ma anche dall'assorbimento e impacchettamento di proteine plasmatiche esogene, mediante un processo di endocitosi e pinocitosi. Contengono oltre 30 proteine regolatrici dell'angiogenesi, che consentono loro di funzionare come regolatori mobili della crescita di nuovi vasi sanguigni, nonché chemochine con proprietà microbicide che contribuiscono alla difesa dell'ospite (Blair e Flaumenhaft, 2009).

In seguito all'attivazione piastrinica, le proteine granulari legate alla membrana vengono traslocate sulla superficie delle piastrine, mentre le proteine granulari solubili vengono rilasciate nell'ambiente extracellulare. La P-selectina, trasloca dagli α -granuli alla membrana plasmatica e favorisce la formazione di aggregati piastrine-leucociti (PLA) e interagisce con le cellule endoteliali dei vasi sanguigni. Essa, viene espressa solamente sulla superficie delle piastrine attivate, pertanto può essere usata come marcatore selettivo dell'attivazione piastrinica (Michelson, 2010).

Gli α -granuli contengono anche la proteina precursore di amiloide e il peptide β -amiloide, rendendo le piastrine la principale fonte di peptide β -amiloide nel plasma (Inyushin et al., 2019). I granuli sono coinvolti anche nell'infiammazione e nell'aterosclerosi, attraverso la secrezione di elevate quantità di fattori pro-infiammatori (Xu et al., 2016).

I **granuli densi** hanno un diametro di 150 nm, sono presenti in un numero di 3-8 per piastrina e possiedono un nucleo centrale denso di elettroni. L'ambiente interno dei granuli densi è mantenuto a un pH di circa 5,4 grazie a una pompa protonica H^+ -ATPasi (Sharda e Flaumenhaft, 2018). Contengono una varietà di molecole biologicamente attive che vengono secrete durante l'attivazione piastrinica, tra cui: ADP, ATP, serotonina, catecolamine, Ca^{2+} , pirofosfato e magnesio.

L'ADP è un debole agonista piastrinico, che innesca il cambiamento di forma delle piastrine, il rilascio e l'aggregazione dei granuli. Il Ca^{2+} contenuto nei granuli densi viene rilasciato all'esterno durante il processo di secrezione e aiuta l'aggregazione piastrinica e la formazione del coagulo (Gremmel et al., 2024).

Le piastrine contengono anche **perossisomi** e 0-2 **lisosomi** sferici leggermente più piccoli degli α -granuli (200-250 nm). I lisosomi contengono enzimi di degradazione proteica, come idrolasi acide, tra cui la catepsina D ed E, elastasi e collagenasi; enzimi che degradano carboidrati, come glucosidasi e galattosidasi ed enzimi che scindono gli esteri fosfatici, come la fosfatasi acida.

La proteina lisosomiale associata alla membrana (LAMP)-1 e 2 e la proteina CD63, si trovano associate alla membrana lisosomiale in uno stato altamente glicosilato e migliorano il ruolo di protezione svolto dai lisosomi, i quali degradano materiale esogeno potenzialmente dannoso (Flaumenhaft, 2013). Tuttavia, il ruolo dei lisosomi nelle piastrine e nell'emostasi rimane ancora largamente sconosciuto.

Oltre a questi organelli secretori, le piastrine contengono **mitocondri**, che svolgono un ruolo rilevante nel metabolismo energetico. Sono presenti anche **glicosomi** e **inclusioni tubulari**, entrambe le strutture contengono glicogeno che può essere utilizzato come fonte di energia (Gremmel et al., 2024).

Ruolo delle piastrine nell'emostasi

Il ruolo principale delle piastrine è regolare l'emostasi, ovvero il processo che consente di bloccare la fuoriuscita di sangue da un vaso sanguigno danneggiato. In condizioni fisiologiche, le piastrine rimangono in uno stato inattivato, in quanto l'endotelio rilascia inibitori dell'attivazione piastrinica (Golebiewska e Alastair, 2015).

In seguito a un danno vascolare, le piastrine vengono esposte alle proteine adesive della matrice subendoteliale, come collagene e vWF, oltre che ad agonisti solubili. Il collagene viene riconosciuto dall'integrina $\alpha 2\beta 1$ e dalla glicoproteina VI (GPVI), mentre il vWF interagisce con il complesso GPIb-IX-V (Estevez e Du, 2017).

Inizialmente, le piastrine stabiliscono interazioni deboli con queste proteine attraverso un fenomeno chiamato rolling, durante il quale rallentano il loro movimento senza fermarsi completamente. Successivamente, si arrestano e aderiscono saldamente alle proteine subendoteliali tramite recettori specifici (Versteeg et al., 2013).

Segue il processo di spreading, durante il quale la piastrina cambia forma, passando da una forma discoidale a una più estesa e irregolare. Questo cambiamento è mediato dall'emissione di

pseudopodi e filopodi, che aumentano l'area di contatto delle piastrine con la superficie del danno. Lo spreading è accompagnato da una serie di eventi biochimici, noti come attivazione piastrinica, caratterizzata dalla riorganizzazione del citoscheletro e dall'aumento del Ca^{2+} intracellulare. L'attivazione culmina con il rilascio del contenuto dei granuli, che amplifica ulteriormente il processo di attivazione piastrinica, reclutando e attivando anche piastrine adiacenti. In particolare, agonisti solubili come ADP e TxA_2 svolgono un ruolo chiave nell'amplificare l'attivazione piastrinica, legandosi ai rispettivi recettori di membrana (Estevez e Du, 2017).

Questo passaggio è seguito dall'aggregazione piastrinica, durante la quale le piastrine si uniscono tra loro per formare un tappo emostatico stabile, il quale serve per bloccare il sangue e riparare la parete del vaso sanguigno danneggiato. Questo processo è mediato da recettori specifici e da proteine adesive come il fibrinogeno, che media l'interazione tra due piastrine adiacenti legandosi all'integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$.

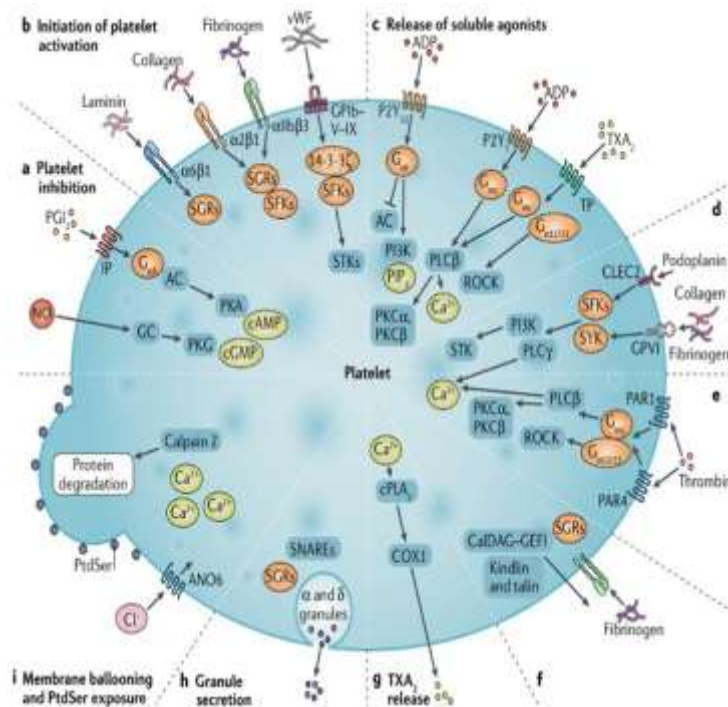


Figura 3. Principali eventi di segnalazione e risposte durante l'attivazione piastrinica. a. inibizione piastrinica tramite il rilascio di NO, PGI_2 e cAMP; b. legame tra integrina $\alpha_2\beta_1$ e collagene, tra fibrinogeno e integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$; c. rilascio di ADP e TxA_2 che si legano rispettivamente ai recettori $\text{P2Y}_{1/2}$ e P2Y_1 e al recettore TP; d. amplificazione dell'attivazione piastrinica tramite la GPVI e il C-type lectin receptor 2 (CLEC2), che portano all'attivazione della fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K) e fosfolipasi $\text{C}\gamma_2$ (PLC γ_2) e al rilascio di Ca^{2+} nel citoplasma; e. la trombina agisce come potente agonista legandosi ai recettori PAR1 e PAR4; f. cambio conformazionale dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ da una forma a bassa affinità ad una ad alta affinità g. rilascio di TxA_2 in seguito all'attivazione della fosfolipasi A2 (PLA2) e di COX-1; h. secrezione dei granuli (Tratto da Van der Meijden e Heemskerk, 2019).

L'aggregazione piastrinica deve essere finemente controllata, infatti, le piastrine stimolano le cellule endoteliali a produrre delle molecole che limitano l'estensione del trombo. Nel caso di un'attivazione patologica delle piastrine, esse possono indurre la formazione di un trombo

occlusivo, con conseguenti eventi ischemici, come infarto e ictus, che rappresentano le principali cause di morte a livello mondiale (Broos et al., 2011).

Diversi recettori di adesione piastrinica, precedentemente considerati passivi, oggi sono riconosciuti come importanti nella mediazione e nell'amplificazione dei segnali di attivazione piastrinica. Inoltre, numerose interazioni ligando-recettore, già note per essere coinvolte nelle risposte immunitarie o infiammatorie dei leucociti, contribuiscono anche all'attivazione piastrinica e al coinvolgimento delle piastrine nelle risposte immunitarie o infiammatorie, evidenziando il legame tra trombosi e infiammazione (Estevez e Du, 2017).

Adesione

Le piastrine in condizioni fisiologiche circolano nel flusso sanguigno e rimangono inattive, in quanto l'endotelio rilascia ossido nitrico e prostaglandine (PG), che regolano negativamente l'attivazione piastrinica. In seguito alla rottura della parete di un vaso, la produzione di questi inibitori viene meno, di conseguenza le piastrine sono in grado di aderire con la matrice extracellulare del vaso danneggiato e iniziare il processo emostatico (Varga-Szabo et al., 2008).

L'adesione iniziale delle piastrine alla parete del vaso danneggiata richiede il legame tra il vWF, immobilizzato sulla superficie dell'endotelio vascolare, con il complesso proteico GPIb-IX-V presente sulla membrana piastrinica. Il vWF è una glicoproteina multimerica sintetizzata dalle cellule endoteliali e dai MK, conservato nei corpi di Weibel-Palade delle cellule endoteliali e all'interno degli α -granuli delle piastrine. La subunità di legame del complesso GPIb-IX-V è la subunità GPIb α , la quale contiene un dominio di legame per il dominio A1 del vWF (Cruz et al., 2000).

Questo primo legame è transitorio e permette alle piastrine di rotolare sulla matrice sottoendoteliale esposta, in quanto la struttura multimerica del vWF permette alle piastrine di distaccarsi e riattaccarsi a diverse molecole di vWF presenti sulla matrice (Estevez e Du, 2017). Un effetto di questa interazione iniziale è una prima attivazione intracellulare, con riarrangiamento del citoscheletro, attivazione della famiglia delle Src chinasi (SFK), della PI3K e di alcune GTPasi (Versteeg et al., 2013).

Il legame tra vWF e GPIb-IX-V viene stabilizzato dal legame dell'integrina $\alpha 2\beta 1$ e della GPVI con il collagene.

La GPVI è un membro della superfamiglia delle immunoglobuline. È formata da due domini extracellulari di tipo immunoglobulinico, una regione transmembrana e una breve coda citoplasmatica. Il dominio citoplasmatico possiede un dominio di legame per il dominio SH3 di alcune tirosine chinasi, tra cui Src. Attraverso il dominio transmembrana, la GPVI si associa alla catena FcR γ , che contiene un motivo di attivazione a base di tirosina dell'immunorecettore

(ITAM) essenziale per la trasduzione del segnale. L'attivazione di questo pathway culmina nell'attivazione della PLC γ 2 e della PI3K (Jung e Moroi, 2008)

L'integrina α 2 β 1 è un recettore transmembrana eterodimerico che contiene un dominio di legame per il collagene. Il legame con il collagene avviene attraverso un passaggio dalla conformazione a bassa affinità a quella ad alta affinità per il ligando.

In seguito alla formazione di questi legami e all'attivazione delle rispettive vie di segnalazione, si ha l'attivazione dell'integrina α IIb β 3 attraverso il processo "*inside-out*", ovvero un processo che parte dall'interno della cellula e porta all'attivazione dell'integrina localizzata in membrana. Questa integrina agisce come recettore per il fibrinogeno, vWF e per molte altre proteine adesive della matrice ed è importante per l'aggregazione piastrinica, in quanto il fibrinogeno può legare due integrine attivate presenti su due piastrine adiacenti, fungendo da ponte tra di esse (Li et al., 2010).

Ci sono ulteriori interazioni che contribuiscono a modulare la risposta piastrinica in base alla natura della matrice sottoendoteliale esposta, tra cui il legame tra la fibronectina e l'integrina α V β 3 e α 5 β 1 e tra la laminina e l'integrina α 6 β 1 (Sang et al., 2021).

Attivazione

Dopo l'adesione alle proteine della parete del vaso danneggiato, le piastrine vengono attivate tramite differenti vie di trasduzione del segnale, sia dall'interazione con molecole di adesione, che dal legame con agonisti solubili, tra cui la trombina. Questi agonisti piastrinici agiscono tramite recettori tirosin chinasi o recettori accoppiati a proteine G (GPCR).

Il legame tra il vWF e GPIb-IX-V induce l'attivazione delle SFK, promuovendo la riorganizzazione del citoscheletro. Mentre, il legame tra GPVI e il collagene induce il reclutamento di alcune tirosin chinasi, tra cui la chinasi Syk. Questo processo è mediato dalla fosforilazione dei motivi ITAM della catena Fc γ associata a GPVI, da parte delle chinasi Fyn e Lyn. La chinasi Syk attivata innesca una cascata di segnalazione che coinvolge l'attivazione della PI3K. PI3K viene traslocata sulla membrana plasmatica e media la fosforilazione e l'attivazione della PLC γ 2. PLC γ 2 idrolizza il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP2) in diacilglicerolo (DAG) e inositolo 1, 4, 5 trisfosfato (IP3) (Sang et al., 2021).

IP3 legandosi al suo recettore sul DTS porta al rilascio del Ca²⁺ immagazzinato al suo interno. L'innalzamento di Ca²⁺ nel citosol, insieme al DAG legato alla membrana determinano l'attivazione della protein chinasi C (PKC). La PKC induce cambiamenti ultrastrutturali correlati al citoscheletro che inducono la formazione di proiezioni citoplasmatiche, consentendo alle piastrine di aderire stabilmente nel sito di lesione e di rilasciare il contenuto granulare (Vilahur et al., 2018).

Il più potente agonista solubile dell'attivazione piastrinica è la trombina, la quale viene prodotta durante la cascata coagulativa a partire dalla protrombina attraverso un taglio proteolitico mediato dal fattore X attivato. La trombina attiva si lega ai recettori attivati dalle proteasi (PAR). Le piastrine umane esprimono i recettori PAR1 e PAR4, che appartengono alla famiglia dei GPCR. PAR1 è sensibile anche a basse dosi di trombina, mentre PAR4 innesca l'attivazione e aggregazione piastrinica solo ad alte dosi di trombina. Nelle piastrine murine, invece, sono espressi i recettori PAR3 e PAR4, mentre non si osserva espressione di PAR1 (Sang et al., 2021).

I recettori PAR sono accoppiati alle proteine Gq e G12/13. La via Gq induce l'attivazione della fosfolipasi C β , con produzione di IP3 e DAG e conseguente attivazione della PKC. La via G12/13, invece, porta all'attivazione della chinasi Rho, che induce la fosforilazione della catena leggera della miosina, determinando la contrazione del citoscheletro e contribuendo alla stabilizzazione del trombo (Varga Szabo et al., 2009).

La trombina può interagire anche con il complesso GPIb-IX-V, portando all'attivazione dei membri della famiglia delle chinasi attivate da mitogeni (MAPK), tra cui ERK1/2 e p38. Queste chinasi fosforilano e attivano la PLA2, contribuendo all'amplificazione della risposta piastrinica (Canobbio et al., 2014).

Le vie di segnalazione mediate da GPVI e dai recettori PAR convergono nell'aumento dei livelli intracellulari di Ca²⁺ e nell'attivazione della PKC, eventi centrali per l'attivazione piastrinica.

L'aumento dei livelli intracellulari di Ca²⁺, è essenziale per molte funzioni, tra cui l'adesione stabile alla parete del vaso danneggiata, il cambiamento di forma (da discoidale ad appiattita con lamellipodi), l'aggregazione, la secrezione dei granuli e il processo di retrazione del coagulo (Estevez et al., 2016).

Inoltre, favorisce l'esposizione di vari fosfolipidi, in particolare della fosfatidilserina, sul foglietto esterno della membrana plasmatica, aumentandone la carica negativa e conferendo alla superficie piastrinica proprietà pro-coagulanti. Questa condizione supporta l'assemblaggio del complesso della protrombinasi, che catalizza la conversione della protrombina in trombina durante la cascata coagulativa (Reddy e Rand, 2020).

La PKC è coinvolta anche nell'attivazione della PLA2, che idrolizza l'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana. L'acido arachidonico viene convertito in PGH2 dall'enzima cicloossigenasi-1 (COX-1). COX-1 è l'isoforma costitutivamente espressa nelle piastrine, mentre COX-2 è una forma inducibile che viene espressa durante l'infiammazione in una piccola percentuale di piastrine. La PGH2 viene convertita dall'enzima TxA2 sintetasi in TxA2. Il TxA2 è un potente agonista piastrinico, interagisce con il suo recettore TP e aumenta l'attivazione delle piastrine e la formazione del coagulo (Khan e Ilies, 2023).

Nel complesso, l'attivazione piastrinica è un processo che prevede l'attivazione di numerose proteine, tra cui: le SFK, le chinasi di adesione focale FAK e Pyk2, serin-treonin chinasi PI3K/Akt, e alcune proteine della famiglia delle MAPK, come ERK e p38 (Faria et al., 2021).

La segnalazione a valle dei recettori tirosin-chinasici è complessa e dipende in larga misura dall'attività delle SFK. Nelle piastrine attivate da trombina, l'attivazione Ca^{2+} -dipendente delle SFK determina l'attivazione di Pyk2, un membro della famiglia delle chinasi di adesione focale (FAK) (Senis et al., 2014).

Le SFK contribuiscono anche all'attivazione della proteina PI3K/proteina chinasi B, nota come Akt. La PI3K è associata anche all'aggregazione piastrinica in risposta alla stimolazione con ADP. Parallelamente, i membri della famiglia delle MAPK, come ERK1/2 e p38, agiscono come modulatori positivi della funzione piastrinica. ERK svolge un ruolo importante nell'aggregazione piastrinica, nei cambiamenti morfologici e nella retrazione del coagulo, mentre p38 regola il rimodellamento citoscheletrico e il rilascio di Ca^{2+} , contribuendo all'amplificazione dell'aggregazione piastrinica (Faria et al., 2021).

Secrezione del contenuto granulare e amplificazione

In seguito all'attivazione piastrinica, avviene il rilascio del contenuto granulare, che comporta un'amplificazione del segnale, reclutando e attivando le piastrine adiacenti. Gli α -granuli rilasciano fibrinogeno e vWF, i quali promuovono l'interazione tra piastrine e tra piastrine e l'endotelio vascolare, partecipando, in questo modo, all'emostasi primaria. Gli α -granuli partecipano anche all'emostasi secondaria, rilasciando alcuni fattori della coagulazione, come il fattore V e IX. Si ritiene che siano coinvolti nel mantenimento dell'equilibrio emostatico tramite la secrezione di proteine che limitano la coagulazione, come l'antitrombina (Gremmel et al., 2024). La secrezione dei granuli aumenta anche il numero di integrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ sulla membrana piastrinica, il che aumenta ulteriormente le interazioni piastrina-piastrina e permette l'esposizione della P-selectina in superficie, utilizzata come marcatore di attivazione piastrinica (Blair e Flaumenhaft, 2009).

I granuli densi rilasciano ADP, il quale è considerato un potente agonista dell'attivazione piastrinica. L'ADP si lega ai recettori P2Y1 e P2Y12, l'attivazione di P2Y1 inizia il processo di aggregazione piastrinica ed è fondamentale per il cambiamento di forma delle piastrine. Il legame tra l'ADP e P2Y12, che è associato a subunità G inibitoria, inibisce la funzione dell'adenilato ciclastasi e di conseguenza inibisce l'attività della protein chinasi A (PKA), che ha un ruolo chiave nel mantenere le piastrine in uno stato di riposo. I granuli densi rilasciano anche serotonina, che supporta l'aggregazione piastrinica, e ioni Ca^{2+} e polifosfati, che contribuiscono alla formazione e stabilizzazione del coagulo (Flaumenhaft, 2013).

Durante l'attivazione piastrinica si verifica la sintesi di TxA₂, a partire dall'acido arachidonico liberato dai fosfolipidi di membrana ad opera della PLA₂. Il TxA₂ è un potente mediatore dell'amplificazione della risposta piastrinica e contribuisce alla formazione di un trombo stabile attraverso il legame con il recettore TP (Estevez e Du, 2017).

Aggregazione

L'ultimo passaggio dell'emostasi primaria è la formazione di un trombo ricco in fibrinogeno nel sito di lesione. L'attivazione piastrinica indotta dai molti agonisti innesca una cascata di eventi che terminano con il cambiamento conformazionale dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, la quale passa da una forma a bassa affinità a una ad alta affinità per il fibrinogeno. Questo processo prende il nome di segnalazione *inside-out* dell'integrina e porta alla formazione di aggregati piastrinici (Huang et al., 2019).

L'aumento dell'affinità dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ per il fibrinogeno è mediato dalla proteina Rap1 (una piccola GTPasi), la quale induce il legame dalla proteina talina all'integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$. La talina si lega alla coda citoplasmatica dell'integrina e determina il passaggio del dominio extracellulare alla conformazione ad alta affinità per i ligandi (Stefanini e Bergmeier, 2019).

Il fibrinogeno è in grado di legarsi contemporaneamente a due integrine attivate di due piastrine adiacenti, formando un trombo primario. In seguito al legame dell'integrina con il fibrinogeno, inizia la segnalazione *outside-in*, che parte dall'esterno della cellula e porta all'innescare di una cascata di eventi intracellulari responsabili dei processi piastrinici tardivi, come la diffusione delle piastrine, il consolidamento del trombo e la retrazione del coagulo (Li et al., 2010).

Questa segnalazione è molto complessa e coinvolge numerosi enzimi, adattatori di segnalazione e componenti del citoscheletro. In particolare, si osserva l'attivazione di c-Src, della via della PI3K/Akt e delle chinasi di adesione focale FAK e Pyk2. Le piastrine carenti di FAK mostrano difetti nella diffusione sul fibrinogeno e un prolungamento dei tempi di sanguinamento nel modello murino di sezione della coda, confermando il ruolo cruciale di questa proteina nella segnalazione *outside-in* e nella stabilità del trombo (Hitchcock et al., 2008).

In questa fase, la trombina contribuisce ulteriormente alla stabilizzazione del trombo mediante il taglio proteolitico del fibrinogeno in fibrina, che forma una rete insolubile in grado di rinforzare la struttura del coagulo (Durrant et al., 2017).

Le piastrine nella tromboinfiammazione

Le piastrine svolgono un ruolo cruciale anche nell'infiammazione e nelle risposte immunitarie. Diversi studi hanno evidenziato che la terapia con farmaci antiaggreganti piastrinici è associata a una riduzione della mortalità nelle infezioni e nella sepsi, suggerendo una possibile rilevanza clinica della modulazione dell'attività piastrinica nei processi infiammatori sistemici (Wang e Zhou, 2025).

Le piastrine sono in grado di modulare l'attività dei leucociti e dell'endotelio in condizioni infiammatorie. Inoltre, formano aggregati con i leucociti e ne promuovono l'adesione all'endotelio vascolare, principalmente attraverso l'esposizione della P-selectina. Per queste proprietà, le piastrine sono considerate importanti regolatori delle risposte immunitarie innate e adattative (Thomas e Storey, 2015).

Le piastrine sono cellule altamente sensibili agli stimoli ambientali e sono in grado di rilevare la presenza intravascolare di patogeni, tra cui parassiti, batteri e virus. Esse rappresentano una delle prime popolazioni cellulari reclutate nei siti di infezione e infiammazione, dove svolgono un ruolo fondamentale nella modulazione della risposta immunitaria (Trivigno et al., 2023).

Il riconoscimento dei patogeni può avvenire attraverso i recettori integrinici e i PRR oppure mediante complessi patogeno-immunoglobulina riconosciuti dai recettori Fc e del complemento. Inoltre, le piastrine possono rispondere agli agenti patogeni anche indirettamente attraverso l'interazione con i leucociti e l'endotelio vascolare nell'area di lesione o infiammazione locale. Il riconoscimento dell'agente patogeno porta all'attivazione piastrinica. Una volta attivate, le piastrine possono sequestrare direttamente il patogeno oppure orchestrare la sua eliminazione attivando neutrofili e macrofagi (Sharma et al., 2022).

L'interazione tra piastrine e neutrofili promuove la formazione di trappole extracellulari di neutrofili (NET), che amplificano l'attivazione e l'aggregazione piastrinica, contribuendo alla formazione di microtrombi. Un'attivazione piastrinica intravascolare non controllata può determinare un'esacerbazione della risposta infiammatoria, favorendo disfunzione endoteliale e trombosi. Questi eventi risultano dannosi per l'ospite e contribuiscono allo sviluppo della tromboinfiammazione (Guo e Rondina, 2019).

Il termine tromboinfiammazione descrive un processo complesso che porta alla formazione di trombi, come risultato dell'interazione tra infiammazione, emostasi e trombosi. Questa condizione può verificarsi in diverse patologie, tra cui la trombosi venosa profonda, l'ictus, l'aterosclerosi e le malattie infettive. In questo contesto, le piastrine svolgono un ruolo centrale nel mediare l'interconnessione tra sistema immunitario e coagulazione (Grover et al., 2018).

L'importanza delle piastrine nelle infezioni è ulteriormente supportata dall'osservazione che la trombocitopenia, una condizione caratterizzata da un basso numero di piastrine, rappresenta un importante indicatore prognostico sfavorevole in molte malattie infettive (Raadsen et al., 2021). Nei pazienti con sepsi, la trombocitopenia è associata a una prognosi peggiore e a un aumento della mortalità rispetto ai pazienti con conta piastrinica normale (Claushuis et al., 2016).

Questo legame tra numero di piastrine ed esito clinico è stato confermato anche in diversi modelli murini, nei quali la deplezione piastrinica è associata a una maggiore disseminazione del patogeno e a un aumento della mortalità rispetto agli animali con conta piastrinica conservata (Amison et al., 2018).

La capacità delle piastrine di riconoscere i patogeni e di modulare risposte immunitarie specifiche è mediata sia dai PRR, specializzati nel riconoscimento diretto dei patogeni durante l'infezione, sia dai recettori emostatici, principalmente coinvolti nella risposta emostatica e trombotica (Portier e Campbell, 2021).

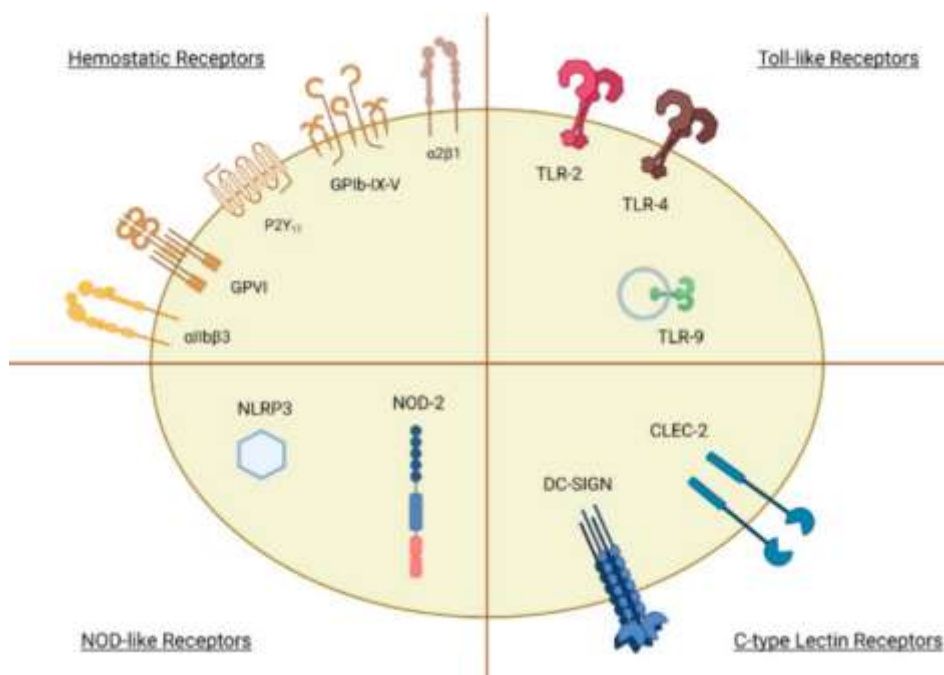


Figura 4. Recettori piastrinici emostatici e PRR. I recettori emostatici sono: GPIb, GPVI, integrina $\alpha IIb\beta 3$, P2Y₁₂ e integrina $\alpha 2\beta 1$. Mentre i PRR sono: TLR (TLR2 e 4 di superficie e TLR9 endosomiale), NLR (NLRP3 e NOD-2), CLR (DC-SIGN e CLEC-2) (Tratto da Trivigno et al., 2023).

Recettori piastrinici emostatici

I recettori di membrana sono essenziali per promuovere l'attivazione piastrinica nell'emostasi e nella trombosi, ma alcuni svolgono ruoli importanti anche nel riconoscimento dei patogeni (Trivigno et al., 2023).

La GPVI è fondamentale per la trasduzione del segnale indotta dal collagene, ma è coinvolta anche nella risposta alle infezioni virali e batteriche. Essa interagisce con il virus dell'epatite C (HCV)

attraverso domini extracellulari simili alle immunoglobuline Ig e svolge un ruolo importante nel trasporto e nella persistenza virale (Zahn et al., 2006).

La GPVI è implicata anche nell'infezione da batteri Gram-negativi, tra cui *Klebsiella pneumoniae*, e Gram-positivi, come *Staphylococcus aureus* (Claushuis et al., 2018; Hu et al., 2011). Nella sepsi causata da *Klebsiella pneumoniae*, la GPVI piastrinica supporta il reclutamento e l'attivazione delle piastrine nel sito dell'infezione, influenzando la formazione di PLA, l'attivazione dei leucociti e la fagocitosi batterica (Claushuis et al., 2018).

La proteina superantigenica stafilococcica 5 (SSL5) è un'esotossina secreta da *Staphylococcus aureus* che induce l'attivazione, l'adesione e l'aggregazione piastrinica attraverso l'interazione con la GPVI, così come con GPIIb e integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Questo processo può portare alla coagulazione intravascolare disseminata associata a insufficienza multiorgano e trombocitopenia. L'importanza della GPVI nell'infezione è stata confermata nei pazienti settici, nei quali le piastrine risultano iporeattive e la cascata di segnalazione di GPVI è gravemente compromessa (Hu et al., 2011).

La GPIb (nota anche CD42) è un componente del complesso GPIb-V-IX e si lega al vWF, consentendo il rotolamento delle piastrine e l'adesione al sito della lesione. Questo recettore interagisce con diversi tipi di modelli molecolari associati ai patogeni (PAMP) batterici, tra cui la proteina A ricca di serina (SrpA) di *Streptococcus sanguinis* (Plummer et al., 2005), le proteine di superficie GspB e Hsa di *Streptococcus gordonii* (Bensing et al., 2004) e la proteina A (Spa) espressa sulla superficie di *Staphylococcus aureus*. In quest'ultimo caso, il riconoscimento di Spa da parte della GPIb è mediato dal vWF solubile. Questo meccanismo rappresenta un esempio di come le molecole solubili possono agire da mediatori del legame tra cellule ospiti e patogeni (O' Seaghdha et al., 2006; Alfar e Whiteheart, 2025). In questo contesto, il vWF con il supporto dell'IgG, media anche l'interazione tra GPIb e l'*Helicobacter pylori* (Byrne et al., 2003; Cox, 2023).

L'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ è il recettore piastrinico di membrana più abbondante e supporta diverse risposte chiave legandosi a proteine contenenti domini RGD come il fibrinogeno e la fibronectina. Inoltre, permette l'interazione delle piastrine con agenti patogeni, tra cui Hantavirus (Bondu et al., 2017), Adenovirus (Gupalo et al., 2013) e con proteine batteriche (Trivigno et al., 2023).

La proteina G con ripetizioni di serina-aspartato (SdrG) di *Staphylococcus epidermidis* induce l'aggregazione piastrinica tramite interazioni dirette tra il dominio B di SdrG e l'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ e interazioni indirette che coinvolgono il legame del fibrinogeno e del recettore IgG Fc γ RIIa (Brennan et al., 2009). Altri ligandi dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ che supportano l'adesione ai patogeni e l'aggregazione piastrinica sono la proteina di adesione piastrinica A (PadA) di *Streptococcus gordonii* (Petersen et al., 2010) e le proteine determinanti di superficie (Isd) di *Staphylococcus aureus* (Miajlovic et al., 2010).

Il recettore piastrinico FcγRIIa (noto anche CD32a) è un recettore a bassa affinità per la regione costante dell'IgG e media il legame dei complessi immuni e delle cellule opsonizzate con IgG. La segnalazione attraverso FcγRIIa si basa su una cascata di tirosin chinasi, che porta alla mobilitazione del Ca^{2+} e al potenziamento dell'attivazione piastrinica (Arman e Krauel, 2015). Un esempio di questo meccanismo è rappresentato dagli immunocomplessi del virus dell'influenza A (H1N1) con IgG cross-reattive, che attivano le piastrine attraverso FcγRIIA (Boilard et al., 2014).

Pattern Recognition Receptors

I PRR sono stati inizialmente identificati nelle cellule immunitarie innate e sono coinvolti nella difesa primaria contro le malattie infettive. I PRR riconoscono due gruppi distinti di modelli molecolari: i modelli molecolari associati al danno (DAMP) e i modelli molecolari associati ai patogeni (PAMP). I DAMP sono segnali di pericolo endogeni rilasciati dalle cellule dell'ospite in condizioni di stress, come danno tissutale, mentre i PAMP derivano direttamente dai patogeni e rappresentano dei segnali esogeni per l'ospite. Alcuni esempi di PAMP includono componenti della membrana e della parete batterica, strutture del capsido virale e motivi CpG non metilati (Trivigno et al., 2023).

Le piastrine esprimono tre classi di PRR: CLR, NLR e TLR (Ebermeyer et al., 2021).

CLR

I CLR sono espressi principalmente dalle cellule mieloidi e sono specializzati nel riconoscimento dei glicani attraverso domini conservati di legame ai carboidrati. Sono recettori transmembrana monopasso composti da uno o più domini lectinici di tipo C (CTLD) e una regione collo (neck) che insieme costituiscono il dominio extracellulare (ECD), seguiti da un dominio transmembrana e da una coda intracellulare (Reis e Sousa et al., 2024).

Attraverso i domini CTLD, si legano a una varietà di DAMP e PAMP. Il legame non è limitato ai glicani, ma include anche glicoproteine, glicolipidi e cristalli inorganici (Fischer et al., 2022).

I recettori CLR espressi dalle piastrine sono: il recettore 2 simile alla lectina di tipo C (CLEC-2) e la proteina non integrinica che lega ICAM-3 specifica delle cellule dendritiche (DC-SIGN).

CLEC-2 (noto anche come CLEC1B) è un recettore transmembrana dimerico ed è il principale recettore per l'aggregina, una tossina del veleno di serpente che attiva le piastrine. È coinvolto nella stabilizzazione dei coaguli e svolge un ruolo importante nell'infiammazione legandosi alla podoplanina sui macrofagi, supportando il riconoscimento e l'interazione con i patogeni (Suzuki-Inoue, 2019).

Inoltre, CLEC-2 media l'attivazione piastrinica indotta dal virus Dengue, stimolando la secrezione degli α -granuli e dei granuli densi e il rilascio di vescicole extracellulari. Queste possono interagire con i recettori CLEC5A e TLR2 espressi sulla superficie dei neutrofili e dei macrofagi (Suang et al., 2019), promuovendone il reclutamento nel sito di infezione, la formazione di NET e il rilascio di citochine proinfiammatorie (Schulz et al., 2020).

Nell'infezione da HIV, CLEC-2 media la cattura e l'internalizzazione del virus nei compartimenti endosomiali, un processo che si verifica in modo più efficiente nelle piastrine attivate. Dopo l'internalizzazione, PF4 interagisce con la glicoproteina virale gp120 e inibisce la replicazione virale (Chaipan et al., 2006). CLEC-2 è stato inoltre associato alla risposta piastrinica al DNA batterico ricco di CpG non metilato (Trivigno et al., 2023).

DC-SIGN è una glicoproteina transmembrana che riconosce carboidrati ricchi in mannosio associati ai patogeni. È espresso principalmente sulla superficie dei macrofagi e delle cellule dendritiche, ma è stato rilevato anche nelle piastrine. DC-SIGN è coinvolto nell'inglobamento di HIV e DV e nella loro inibizione attraverso l'attività di PF4. Il ruolo effettivo delle piastrine nelle infezioni da HIV e DV rimane controverso: da un lato producono e rilasciano molecole che riducono la sopravvivenza del virus, dall'altro possono fungere da rifugio per i virioni e facilitarne la diffusione nel circolo sanguigno. L'interazione tra piastrine e HIV contribuisce inoltre allo sviluppo della trombocitopenia osservata nei pazienti (Chaipan et al., 2006).

DC-SIGN può legare anche il mtDNA extracellulare, inducendo attivazione piastrinica e formazione di trombi (Xin et al., 2017).

NLR

I NLR sono recettori citosolici caratterizzati da una ripetizione C-terminale ricca di leucine (LRR), un dominio centrale di legame ai nucleotidi, noto come dominio NACHT e un dominio effettore N-terminale. Il dominio LRR è responsabile del riconoscimento dei PAMP e DAMP, il dominio NACHT è coinvolto nell'attività ATPasica e nell'oligomerizzazione, mentre il dominio effettore si associa a diverse molecole adattatrici per mediare la trasduzione del segnale (Voss et al., 2025). Questi recettori riconoscono numerosi ligandi derivati da patogeni, tra cui componenti della parete batterica, tossine, peptidoglicano, flagellina, RNA virale e ife fungine, ma anche segnali endogeni di danno tissutale, come ATP, cristalli di colesterolo e acido urico, nonché fattori ambientali, quali sali di alluminio, amianto, silice e radiazioni UV (Kim et al., 2016).

Le piastrine esprimono due NLR citoplasmatici: la proteina 3 contenente domini NACHT, LRR e PYD (NLRP3) e la proteina 2 contenente il dominio di oligomerizzazione legante i nucleotidi (NOD2) (Hottz et al., 2018).

NLRP3 agisce come sensore citoplasmatico e attiva l'inflammasoma in risposta a segnali di danno, come le specie reattive dell'ossigeno (ROS) generate a seguito dell'interazione con i PAMP. NLRP3 attivo recluta la proteina ASC (apoptosis-associated speck-like protein), che a sua volta attiva la caspasi-1, risultando nella formazione dell'inflammasoma e secrezione della citochina pro-infiammatoria IL-1 β . In particolare, la caspasi-1 scinde la pro-IL-1 β nella forma attiva, che si accumula nelle piastrine e viene successivamente rilasciata tramite vescicole extracellulari (Lien et al., 2021).

L'IL-1 β può legarsi al recettore IL-1R sulla superficie piastrinica, inducendo la fosforilazione di c-Src e Syk e regolando il consolidamento del trombo e la retrazione del coagulo attraverso la segnalazione *outside-in* dell'integrina α IIb β 3 (Qiao et al., 2018).

Uno studio ha dimostrato la co-localizzazione di NLRP3 e ASC nelle piastrine in seguito a stimolazione con lipopolisaccaride (LPS) e nelle piastrine isolate da ratti settici sottoposti a legatura e puntura del cieco (CLP). Nello stesso modello è stata osservata un'aumentata attività della caspasi-1 e secrezione di IL-1 β , associate a permeabilità endoteliale alterata e danno multiorgano (Cornelius et al., 2019).

NOD2 è una proteina citoplasmatica espressa nelle piastrine umane e murine. Durante l'infezione, i batteri Gram-positivi e Gram-negativi rilasciano diversi componenti immunomodulatori nel flusso sanguigno, tra cui il muramil dipeptide (MDP), un frammento della parete cellulare. Gli MDP circolanti possono essere trasportati nel citosol tramite riciclo endosomiale, dove interagiscono con NOD2 (Negroni et al., 2018). La stimolazione di NOD2 da parte degli MDP potenzia l'attivazione e l'aggregazione piastrinica, suggerendo che questo recettore possa contribuire alla reattività piastrinica all'infezione. Inoltre, l'attivazione di NOD2 promuove l'accumulo di IL-1 β nelle piastrine in modo dipendente dalla caspasi-1 (Zhang et al., 2015).

TLR

I TLR sono proteine transmembrana caratterizzate da un dominio extracellulare LRR, coinvolto nel riconoscimento del ligando, un dominio transmembrana e un dominio citosolico del recettore Toll/Interleuchina-1 (TIR) che interagisce con proteine adattatrici necessarie per la trasduzione del segnale (Tang et al., 2023).

Sono stati identificati 10 TLR nell'uomo (TLR1-10) e 12 nel topo (TLR1-9 e TLR11-13). (Kawasaki e Kawai, 2014).

I TLR si suddividono in due gruppi in base alla localizzazione cellulare e alla loro specificità per PAMP/DAMP. TLR1, 2, 4, 5, 6 e 10 sono espressi sulla superficie cellulare e rispondono principalmente a componenti microbici extracellulari, come lipidi e proteine batteriche. TLR3, 7, 8 e 9 sono localizzati nei compartimenti intracellulari e rilevano acidi nucleici microbici derivati

da patogeni internalizzati. La maggior parte dei TLR trasduce il proprio segnale tramite omodimerizzazione in seguito al legame con il ligando. Un'eccezione è rappresentata da TLR2, che eterodimerizza con TLR1 o TLR6, permettendo il riconoscimento rispettivamente di lipopeptidi triacilati e diacilati (Hally et al., 2020).

Nelle piastrine, TLR2, 4 e 9, sono i recettori più abbondantemente espressi, mentre TLR1, 3, 5, 6 e 8 sono espressi a livelli inferiori. I recettori TLR7 e 10 sono poco esaminati dai vari studi, pertanto, è difficile determinare il loro livello di espressione sulle piastrine o all'interno di esse. I TLR riconoscono sia i PAMP che i DAMP e regolano diverse funzioni, tra cui attivazione e aggregazione piastrinica, interazione con i leucociti e rilascio di mediatori infiammatori (Trivigno et al., 2023).

TLR9 è un recettore endosomiale, che in seguito all'attivazione piastrinica indotta da agonisti come trombina, ADP e collagene, può traslocare sulla superficie cellulare. La sua stimolazione mediante oligodeossinucleotidi sintetici induce il rilascio degli α -granuli e dei granuli densi (Dib et al., 2020). Inoltre, l'attivazione da parte di DAMP endogeni, come gli addotti carbossi-proteici (alchilpirrolici), promuove attivazione e aggregazione piastrinica *in vitro* e contribuisce alla trombosi in modelli murini aterosclerotici (Panigrahi et al., 2013).

TLR2 è un recettore di membrana la cui espressione risulta aumentata nelle piastrine di pazienti con sindromi coronariche acute (SCA) (Heger et al., 2019). Al contrario, nei pazienti settici non sono state osservate variazioni significative nell'espressione di TLR2, nonostante la presenza di una risposta infiammatoria di entità simile a quella osservata nella SCA. Allo stesso modo, anche nei pazienti con trombocitemia essenziale, una condizione clinica associata a trombocitosi e tromboinfiammazione, non è stato osservato alcun aumento dell'espressione di TLR2. Questi dati suggeriscono che il TLR2 piastrinico è regolato in modo variabile durante l'infiammazione e sembra avere un ruolo specifico nella patologia cardiovascolare (Marín Oyarzún et al., 2020).

La segnalazione mediata da TLR2 durante la batteriemia parodontale ha un ruolo centrale nell'attivazione piastrinica e nell'infiammazione sistemica, rappresentando un potenziale fattore di rischio per le malattie cardiovascolari (Leishman et al., 2010).

Il citomegalovirus umano (HCMV) è un agente patogeno in grado di stabilire un'infezione cronica; la sua infezione e riattivazione sono associate a un aumentato rischio cardiovascolare. HCMV si lega a TLR2 espresso sulle piastrine, inducendo la formazione di PLA. Inoltre, le piastrine potenziano l'attivazione dei neutrofili mediata da HCMV, l'adesione leucocitaria e la transmigrazione. Tuttavia, HCMV non induce risposte protrombotiche, come l'aggregazione piastrinica (Hally et al., 2020).

TLR4 è il recettore più abbondantemente espresso dalle piastrine e riconosce diversi PAMP e DAMP, tra cui gli istoni extracellulari, il loro riconoscimento induce la traslocazione della P-selectina, l'aggregazione piastrinica e la secrezione di chemochine (Dib et al., 2020).

Esperimenti *in vitro* e *in vivo* con knockout specifico del TLR4 piastrinico hanno dimostrato che la proteina HMGB1 (high-mobility group box 1) induce attivazione piastrinica e trombosi attraverso la segnalazione mediata da TLR4 e cGMP (Vogel et al., 2015).

Altri studi hanno dimostrato che la proteina non strutturale 1, un PAMP secreto dalle cellule infettate da DV, stimola l'attivazione piastrinica attraverso TLR4 (Chao et al., 2019).

Il TLR4 è un recettore piastrinico molto studiato, in quanto in grado di legare LPS di *Escherichia coli*.

Lipopolisaccaride

LPS è una molecola di grandi dimensioni composta da componenti lipidiche e glucidiche, con struttura e massa molto variabili tra i diversi batteri Gram negativi, a causa della diversa composizione e complessità delle catene oligosaccaridiche. La struttura più comunemente descritta è quella di *E.coli*. ed è composta da tre domini: lipide A, oligosaccaride centrale e antigene O (Galgano et al., 2022).

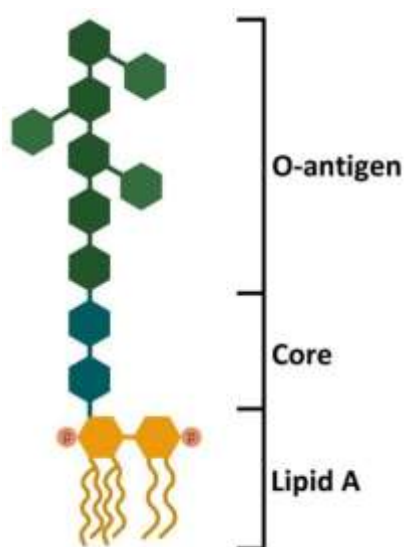


Figura 5. Struttura di LPS di *E.coli*. La struttura è suddivisa in tre domini distinti: lipide A, oligosaccaride centrale (core) e antigene O (tratto da Galgano et al., 2022).

Il lipide A è localizzato nella membrana esterna dei batteri Gram-negativi ed è responsabile del riconoscimento e del legame con il recettore. È composto da un disaccaride di glucosammina con legame β -1-6, altamente acilato (in posizione 2' e 3') e in *E. coli*, anche fosforilato (in posizione 1' e 4'). Il residuo di glucosammina distale contiene due catene aciliche secondarie, rendendo la porzione lipidica A di *E. coli* esa-acilata.

L'oligosaccaride centrale è una struttura lineare o ramificata che collega il lipide A all'antigene O. È composto principalmente da acido 3-deossi-D-manno-oct-2-ulosonico, esosi, eptosi e ottanosi

che possono essere modificati mediante coniugazione con fosfati o altri sostituenti come la fosfoetanolamina (Vallance et al., 2017).

L'antigene O rappresenta la porzione più variabile di LPS e funge da scudo contro il riconoscimento da parte degli anticorpi. È formato da unità oligosaccaridiche ripetute (da due a otto zuccheri) e può variare notevolmente tra le diverse specie batteriche per struttura e composizione, e alcuni batteri non lo sintetizzano (Liu et al., 2020). In *E.coli*, zuccheri comuni dell'oligosaccaride dell'antigene O includono N-acetilglucosamina-fosfato, mannosio, galattosio e ramnosio (Galgano et al., 2022).

La funzione principale di LPS è quella di componente strutturale della membrana esterna dei batteri Gram-negativi. La porzione acilica del lipide A conferisce un carattere idrofobico alla membrana, limitando il passaggio di molecole idrofile e contribuendo alla resistenza a numerosi composti antimicrobici. Inoltre, LPS svolge un ruolo importante nelle interazioni ospite-patogeno, modulando le risposte immunitarie dell'ospite (Bertani e Ruiz, 2018).

Poiché LPS è presente sulla superficie di molti batteri patogeni, viene riconosciuto dal sistema immunitario come PAMP. La risposta immunitaria è diretta principalmente verso la porzione più conservata di LPS, il lipide A, il cui recettore primario è il TLR4 (Bertani e Ruiz, 2018).

LPS-TLR4 nelle piastrine

LPS esa-acilato e difosforilato, come quello di *E.coli* (O111:B4), è uno degli agonisti più potenti del TLR4, mentre le forme sotto-acilate e defosforilate hanno un'attività pro-infiammatoria più debole, soprattutto nelle cellule umane (Steimle et al., 2016).

Il riconoscimento di LPS da parte di TLR4 richiede la presenza della proteina legante LPS (LBP), di CD14 e della proteina MD-2, stabilmente associata al dominio extracellulare di TLR4. La necessità di MD-2 per l'attivazione del TLR4 da parte di LPS è stato dimostrato dall'assenza di risposta a LPS nei macrofagi di topi knockout per MD-2 (Nagai et al., 2002).

LBP lega gli aggregati di LPS e ne facilita la monomerizzazione, trasferendoli a CD14, che li trasporta verso il complesso TLR4-MD-2. CD14 è una proteina ancorata al glicosilfosfatidilinositolo, localizzata nei raft di membrana, domini arricchiti di colesterolo e sfingolipidi. CD14 esiste anche in forma solubile nel siero. Le piastrine non esprimono la forma di membrana, ma possono internalizzare CD14 solubile e rilasciarlo dopo la stimolazione con LPS (Berthet et al., 2012).

L'interazione di TLR4/MD-2 con due molecole di LPS induce la dimerizzazione del recettore, che assume una caratteristica conformazione a M (Galgano et al., 2022).

Il legame di LPS a TLR4 attiva due principali vie di segnalazione: la segnalazione dipendente dal fattore di differenziazione mieloide-88 (MyD88) e quella indipendente da MyD88 (Lu et al., 2008).

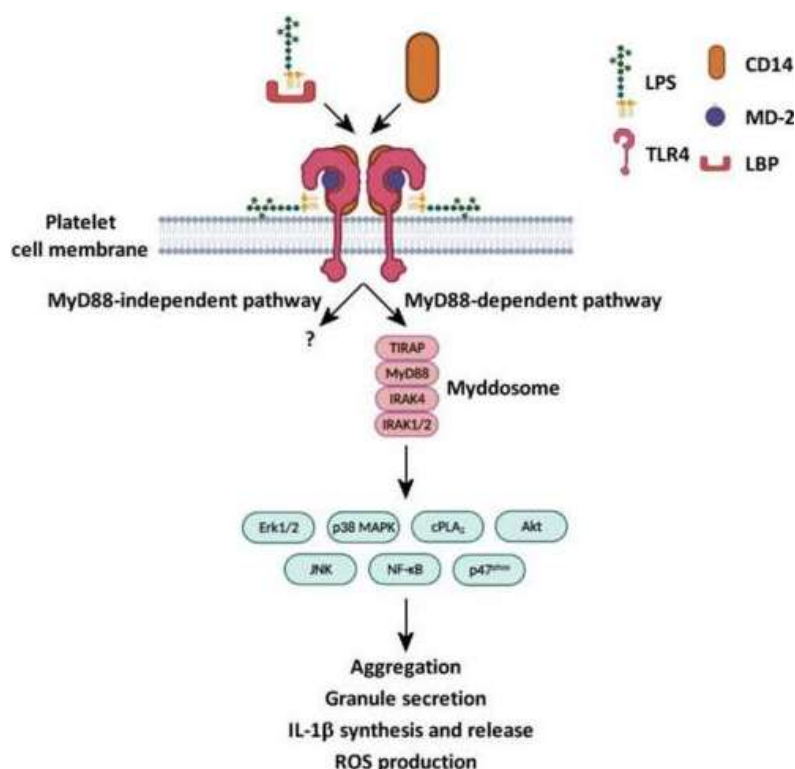


Figura 6. Segnalazione di LPS-TLR4 nelle piastrine. LPS attiva la cascata di segnalazione dipendente da MyD88, che attiva molti effettori (ERK1/2, p38 MAPK, cPLA₂, Akt, JNK, NF-κB e p47^{phox}), portando al potenziamento dell'aggregazione, alla secrezione dei granuli, alla sintesi e il rilascio di IL-1β e alla produzione di ROS. Il ruolo della via indipendente da MyD88 non è ancora chiaro (Tratto da Galgano et al., 2022).

La segnalazione dipendente da MyD88 prevede l'interazione tra il dominio citosolico del TLR4 e la proteina adattatrice contenente il dominio TIR (TIRAP). MyD88 si lega a TIRAP e media il reclutamento delle chinasi IRAK4 e IRAK2, con formazione di un complesso macromolecolare denominato Myddosoma. Questo complesso promuove la fosforilazione di bersagli a valle, tra cui ERK1/2 e p38MAPK e del nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha (IκBα). Il pathway culmina con l'attivazione del fattore di trascrizione AP-1 (activator protein 1) e del nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB), che regolano la sintesi di interferone di tipo I e di altre citochine proinfiammatorie (Vallance et al., 2017).

La segnalazione indipendente da MyD88 nelle cellule nucleate viene avviato dal legame del TLR4 con le proteine adattatrici TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β) e TRAM (TRIF-related adaptor molecule), con successiva attivazione del fattore di trascrizione IRF3

(interferon regulatory factor 3), responsabile della trascrizione di citochine proinfiammatorie. Il ruolo di questo pathway nelle piastrine non è ancora chiarito (Vallance et al., 2017).

Il ruolo di LPS nell'attivazione piastrinica è ancora oggetto di dibattito a causa di risultati sperimentali contrastanti, dovuti alle diverse metodologie utilizzate.

Nelle piastrine, il legame di LPS con TLR4 promuove la maturazione e la secrezione di IL-1 β attraverso una cascata di segnalazione che coinvolge la PI3K/Akt e la chinasi c-Jun N-terminale (JNK). È stato osservato che LPS è più potente della trombina nell'indurre la maturazione di IL-1 β , sebbene non attivi da solo le classiche risposte piastriniche. Questo suggerisce che LPS attivi vie infiammatorie alternative rispetto a quelle dell'emostasi (Brown et al., 2013).

L'attivazione piastrinica favorisce l'interazione con i leucociti, inducendo la formazione di PLA attraverso l'interazione tra P-selectina e CD40L delle piastrine e il ligando glicoproteico della P-selectina-1 (PSGL1) e CD40 dei leucociti. A seguito di questa interazione, i neutrofili si attivano e rilasciano NET, strutture extracellulari di DNA che agiscono come trappole per catturare e neutralizzare i patogeni (Fuchs et al., 2010).

In un modello murino di sepsi indotta da iniezione intraperitoneale di LPS, la NETosi risulta aumentata (Sakurai et al., 2017). *In vitro*, le piastrine attivate da LPS si legano ai neutrofili aderenti in condizioni di flusso, mentre le piastrine a riposo non mostrano questo comportamento. Questo effetto è mediato da TLR4, poiché è completamente inibito da un anticorpo specifico per il TLR4 (McDonald et al., 2007).

Inoltre, LPS promuove il rilascio degli α -granuli in risposta a stimolazione con trombina, l'analogo stabile del TxA₂ (U46619) e il peptide correlato al collagene (CRP). Questo effetto è stato dimostrato valutando l'esposizione della P-selectina sulla superficie piastrinica (Lopes et al., 2017). LPS aumenta l'aggregazione piastrinica e la generazione di ROS nelle piastrine stimulate con U46619, CRP, collagene e ADP (Lopes et al., 2017). Infine, può stimolare il rilascio di molecole proinfiammatorie dai granuli piastrinici, tra cui PF4 (Cognasse et al., 2008).

Questi risultati evidenziano che LPS svolge un ruolo significativo, sebbene non ancora completamente chiarito, nell'attivazione piastrinica e nell'infiammazione di origine piastrinica. Non agisce come agonista piastrinico classico, ma come segnale di priming, potenziando l'attivazione e l'aggregazione in seguito a stimolazione con agonisti tradizionali (Vallance et al., 2017).

Tirosina chinasi ricca in prolina 2 Pyk2

Le principali vie di segnalazione coinvolte nell'attivazione piastrinica convergono verso un numero limitato di effettori intracellulari comuni, tra cui PLC, PI3K e tirosin chinasi (Guidetti et al., 2015).

Le piastrine esprimono numerose tirosin chinasi non recettoriali coinvolte nell'attivazione piastrinica attraverso meccanismi differenti. Le SFK rappresentano il primo gruppo di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale, in quanto sono reclutate direttamente dai recettori di membrana e sono responsabili degli eventi precoci dell'attivazione piastrinica. Ad esempio, Lyn e Fyn, che fanno parte delle SFK, sono associate a recettori quali GPVI, FcγRIIA e CLEC-2 e sono necessarie per la transfosforilazione dei motivi ITAM, avviando così la cascata di segnalazione intracellulare (Senis et al., 2014).

Il secondo gruppo di tirosin chinasi coinvolte nella trasduzione del segnale comprende enzimi che non sono attivati direttamente dai recettori di membrana, ma agiscono a valle delle SFK. Questo gruppo include Syk, le chinasi della famiglia Tec (Btk e Tec) e le FAK, tra cui la tirosin chinasi ricca in prolina 2 (Pyk2) (Guidetti et al., 2019).

Pyk2 è una tirosina chinasi non recettoriale coinvolta nell'adesione cellulare e nei processi di rimodellamento del citoscheletro. È espressa nel cervello, negli osteoclasti, nelle cellule endoteliali e nelle cellule ematopoietiche, dove svolge un ruolo importante nei processi di adesione, attivazione e aggregazione cellulare. La proteina è distribuita in tutto il citoplasma, con arricchimenti nelle regioni perinucleari (Guidetti et al., 2019).

Pyk2 è codificata dal gene *PTK2B* (protein tyrosine kinase 2 beta) localizzato a livello del braccio corto del cromosoma 8 in posizione 21.2. Il gene umano si estende per circa 149 kb, mentre nel topo si trova sul cromosoma 14 ed è lungo circa 128 kb (UCSC, ENST00000346049.10; ENSMUST00000022622.14).

Struttura di Pyk2

Pyk2 è l'omologo di FAK e, nell'uomo le due proteine condividono il 46% di identità di sequenza e il 65% di similarità, ma mostrano profili di espressione distinti e alcune proprietà differenti.

Pyk2 (UniProt, Q14289; Q8C2G0) è una proteina di circa 110 kDa costituita da 1009 aminoacidi. È organizzata in tre domini principali: un dominio 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM) N-terminale, un dominio chinamico centrale e un dominio targeting di adesione focale (FAT) C-terminale. Inoltre, possiede tre regioni ricche in prolina (PR1, PR2 e PR3): una localizzata nella regione di collegamento tra il dominio FERM e il dominio catalitico, mentre le altre due si trovano tra il dominio catalitico e il dominio FAT (Guidetti et al., 2019).

Pyk2 possiede quattro principali siti di fosforilazione: Y402, Y579, Y580 e Y881, ma non contiene domini SH2 o SH3. Il residuo Y402 è un sito di autofosforilazione ed è in grado di reclutare e attivare le SFK, in particolare Src e Fyn grazie al legame con il loro dominio SH2. Inoltre, queste chinasi possono legarsi anche al dominio PR1 di Pyk2 (Li e Götz, 2018).

I residui Y579 e Y580 si trovano a livello del dominio chinamico e vengono fosforilati dalle SFK. Inoltre, le SFK possono fosforilare anche il sito Y881 e portare alla completa attivazione di Pyk2. Questo residuo favorisce il legame con proteine contenenti domini SH2 (Ostergaard e Lysechko, 2005).

Oltre alla forma principale a lunghezza intera, esistono altre due isoforme codificate dallo stesso gene. Un'isoforma espressa dalle cellule emopoietiche, denominata Pyk2-H, manca di un esone che codifica per 42 aminoacidi localizzati tra PR2 e PR3 (Dikic et al, 1998; Xiong et al., 1998). La seconda isoforma deriva da un sito interno di inizio della trascrizione, è priva del dominio FERM e del dominio chinamico ed è denominata Pyk2-related non-kinase (PRKN). PRKN è espressa in molti tessuti, incluso il cervello, e può agire come regolatore endogeno dell'attività di Pyk2 (Xiong et al., 1998).

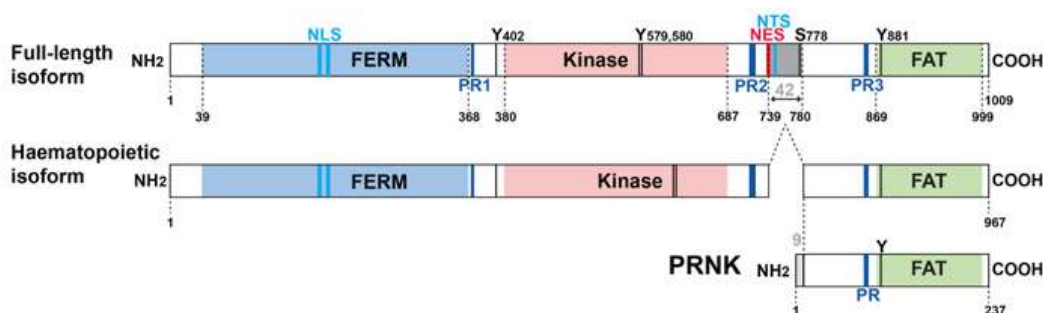


Figura 7. Struttura di Pyk2. Rappresentazione schematica delle isoforme di Pyk2. L'isoforma a lunghezza intera comprende il dominio FERM, il dominio chinamico e il dominio FAT, i siti di fosforilazione Y402, Y579, Y580, Y881 e PR1, PR2 e PR3. Nell'isoforma ematopoietica è assente l'esone che codifica per 42 aminoacidi (riquadro grigio). PRNK è un'isoforma corta costituita dalla regione C-terminale di Pyk2 con 9 residui aggiuntivi all'estremità N-terminale (Tratto e modificato da de Pins et al., 2021).

Dominio FERM

Il dominio FERM è costituito da circa 330 residui aminoacidici ed è preceduto da 38 aminoacidi all'estremità N-terminale la cui funzione non è ancora nota. Il dominio FERM possiede una struttura a forma di trifoglio composto da tre moduli strutturali, denominati A, B e C oppure F1, F2 e F3, che mediano sia l'interazione della proteina con la membrana che le interazioni proteina-proteina (Lipinski e Loftus, 2010).

L'attività funzionale delle proteine prototipiche del dominio FERM, ezrina, radixina e moesina, è regolata da associazioni intramolecolari mediate dal dominio stesso (Edwards e Keep, 2001).

Il legame con la membrana è mediato da residui basici presenti in una fessura tra i sottodomini F1 e F3 che interagiscono con PIP2. Le interazioni tra il dominio FERM e le molecole di PIP2 presenti nella membrana inducono cambiamenti conformazionali che espongono i siti di interazione delle proteine contenenti il dominio FERM, favorendone il legame con le code citoplasmatiche delle proteine transmembrana. Inoltre, il dominio FERM interagisce anche con numerose proteine citoplasmatiche (Hamada et al., 2000).

Il sottodominio F1, costituito dagli 82 residui aminoacidici N-terminali, si ripiega in una struttura $\alpha+\beta$ caratterizzata da una lunga α -elica ($\alpha 1A$) e da un foglietto β a cinque filamenti ($\beta 1A-\beta 5A$). Il sottodominio F2 comprende i residui aminoacidici 96-195 ed è costituito da quattro α -eliche più lunghe ($\alpha 1B-\alpha 4B$) e da un'elica corta ($\alpha 2'B$). Esso è collegato al sottodominio F1 tramite un linker di 13 residui contenente una corta α -elica ($\alpha 1'B$) (Hamada et al., 2000).

La calmodulina si lega all'elica $\alpha 2'B$, promuovendo la formazione di un omodimero di Pyk2 e stimolando la transfosforilazione (Kohn et al., 2008).

Il sottodominio F3 comprende i residui aminoacidici 204-297 ed è collegato al sottodominio F2 tramite un linker costituito da 8 residui aminoacidi conservati. Questo sottodominio presenta un tipico dominio di legame alla fosfotirosina o di omologia alla plecstrina, caratterizzato da un nucleo a sandwich β costituito da sette filamenti ($\beta 1C-\beta 7C$) e da un' α -elica ($\alpha 1C$) (Hamada et al., 2000).

Il dominio FERM interagisce inoltre con la famiglia di proteine Nir, le quali legano il Ca^{2+} , possiedono proprietà di trasferimento del fosfatidilinositolo e vengono fosforilate da Pyk2 in risposta alla sua attivazione da parte di agonisti (Lipinski e Loftus, 2010).

Dominio chinasico

Il dominio chinasico è collegato al dominio FERM mediante un linker di circa 40 aminoacidi che contiene un motivo Pro-XX-Pro ai residui 377-380 e il sito di autofosforilazione Y402. La fosforilazione in Y402 fornisce un sito di legame per proteine contenenti SH2, tra cui Src e p85. Il legame di Src porta alla fosforilazione dei residui Y579 e Y580 di Pyk2 all'interno dell'ansa di attivazione del dominio chinasico e alla completa attivazione dell'attività chinasica di Pyk2 (Lipinski e Loftus, 2010).

Questo dominio presenta una struttura bilobata simile a quella osservata in altri domini chinasici. Inoltre, mostra una variabilità conformazionale unica del motivo DFG presente nell'ansa di attivazione, caratteristica che potrebbe risultare utile nella progettazione di inibitori selettivi della chinasi (Han et al., 2009).

Inoltre, è stato identificato che la proteina FIP200 si lega al dominio chinasico e potrebbe funzionare come potenziale inibitore endogeno di Pyk2 (Ueda et al., 2000).

Dominio FAT

Il dominio FAT è organizzato in un fascio antiparallelo di quattro eliche ed è preceduto da due sequenze ricche in prolina che mediano l'interazione di Pyk2 con numerose proteine contenenti domini SH3. Questa regione è ben conservata rispetto al corrispondente dominio FAT di FAK. Tuttavia, nonostante questa conservazione, il dominio FAT di Pyk2 non interagisce con la talina, il che potrebbe contribuire alla diversa localizzazione cellulare di Pyk2 (Lipinski e Loftus, 2010). Il dominio FAT di Pyk2 contiene due siti di legame per i motivi leucina-aspartato (LD) della paxillina, una proteina scaffold fondamentale nelle adesioni focali, e della leupaxina, isoforma leucocitaria della paxillina. Pyk2 interagisce con leupaxina nelle cellule linfoide, dove queste proteine possono formare un complesso di segnalazione specifico per questo tipo cellulare. Inoltre, l'associazione tra queste due proteine può modulare la migrazione, l'adesione e la motilità cellulare nel cancro alla prostata (Sahu et al., 2007).

Il dominio FAT di Pyk2 interagisce anche con l'N-terminale di Hic-5. Poiché Hic-5 è strettamente correlata alla paxillina e contiene motivi LD altamente conservati, presumibilmente interagisce con Pyk2 mediante meccanismi analoghi (Vanarotti et al., 2016).

Inoltre, il dominio FAT interagisce con un motivo LD presente nel C-terminale della gelsolina e ne regola l'attività, collegando Pyk2 alla regolazione dell'organizzazione del citoscheletro di actina (Wang et al., 2003).

A livello del dominio FAT è presente Y881 che, una volta fosforilata da SFK, funge da sito di legame per l'adattatore Grb2, collegando Pyk2 alla via di segnalazione delle MAPK (Blaukat et al., 1999).

Meccanismo di attivazione di Pyk2

In assenza di stimoli, Pyk2 si trova in una conformazione chiusa dovuta a un'interazione intramolecolare tra il dominio FERM e il dominio chinasi, che impedisce l'accesso ai siti di fosforilazione (Lietha et al., 2006). Questa interazione potrebbe contribuire alla formazione di oligomeri che promuovono l'autofosforilazione intermolecolare, mentre un eccesso di dominio FERM libero riduce l'autofosforilazione di Pyk2 (Riggs et al., 2011).

L'attivazione di Pyk2 può essere indotta dal legame con il complesso Ca^{2+} /calmodulina (CaM), per il quale sono stati identificati diversi potenziali siti di interazione, tra cui il dominio FERM, il dominio chinasi e il linker tra il dominio chinasi e il dominio FAT. Si ritiene che il legame del complesso Ca^{2+} /CaM al sottodominio F2 del dominio FERM favorisca la dimerizzazione di Pyk2, consentendo l'autofosforilazione del residuo Y402 e il reclutamento delle SFK (Kohn et al., 2008).

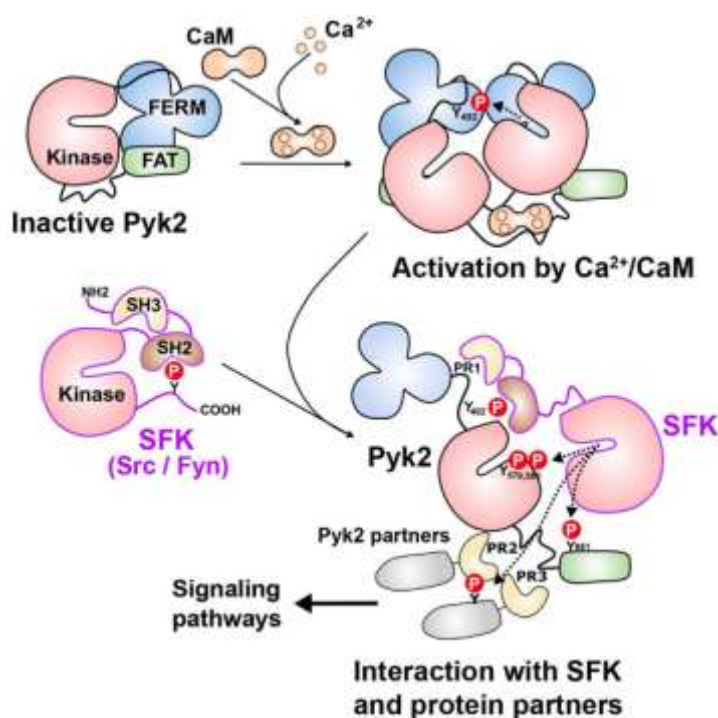


Figura 8. Attivazione di Pyk2. L'aumento del Ca^{2+} intracellulare e il legame con CaM favoriscono la dimerizzazione di Pyk2 e l'autofosforilazione di Y402, che consente il reclutamento delle SFK. Le SFK fosforilano Y579-Y580 e altri residui tirosinici, amplificando l'attività catalitica di Pyk2 e promuovendo la formazione di complessi di segnalazione multiproteici (Tratto da de Pins et al., 2021).

Una volta reclutate e attivate, le SFK fosforilano i residui Y579 e Y580 nel dominio chinasi, nonché Y881 nel dominio FAT, determinando la completa attivazione di Pyk2 e il reclutamento di ulteriori proteine contenenti domini SH2. Le SFK, così come Pyk2, possono fosforilare proteine associate, incluse le proteine che interagiscono con i motivi PR2 e PR3 attraverso i loro domini SH3. Questo processo favorisce la formazione di complessi multiproteici e l'attivazione di varie vie di segnalazione intracellulare. In alternativa, le SFK attivate possono bypassare la fase dipendente da Ca^{2+} /CaM fosforilando direttamente Y402. In entrambi i casi, l'interazione tra SFK e Pyk2 costituisce un meccanismo di attivazione a feedback positivo (Das et al., 2021).

Ruolo biologico di Pyk2

Le funzioni biologiche di Pyk2 sono associate a processi quali la riorganizzazione del citoscheletro di actina, la migrazione, l'adesione e la proliferazione cellulare, lo sviluppo neuronale e la plasticità sinaptica, l'invasività tumorale e il rimodellamento osseo. A differenza di FAK, Pyk2 non svolge un ruolo essenziale nell'embriogenesi; infatti, i topi knockout per Pyk2 (Pyk2 KO) risultano vitali e fertili (Okigaki et al., 2003).

Nei **neuroni**, Pyk2 regola la plasticità sinaptica (Girault et al., 1999) e la funzione delle sinapsi eccitatorie dell'ippocampo, ed è, inoltre, implicato nell'AD (Dourlen et al., 2017). La sovraespressione di Pyk2 nei monociti e nei macrofagi residenti è associata all'AD a esordio tardivo e a un aumento dell'accumulo di placche amiloidi; al contrario, una riduzione

dell'espressione di Pyk2 si associa a una diminuzione delle placche amiloidi, riducendone gli effetti deleteri sulla plasticità sinaptica (Salazar et al. 2019).

Studi più recenti hanno evidenziato un ruolo neuroprotettivo di Pyk2 nella taupatia, caratterizzata dall'accumulo di proteina Tau iperfosforilata. Nei topi PS19, un modello transgenico di taupatia che esprime la forma mutante P301S della Tau umana, l'assenza di Pyk2 determina un aumento della fosforilazione di Tau, del suo accumulo patologico e del deterioramento cognitivo, suggerendo che Pyk2 possa sopprimere gli effetti patologici associati alla proteina Tau (Brody et al., 2022).

Nelle **cellule ematopoietiche**, Pyk2 contribuisce al mantenimento dell'omeostasi dei monociti promuovendone il turnover (Llewellyn et al., 2017) e regola la morfologia e la migrazione dei macrofagi (Xie et al., 2025).

Inoltre, controlla l'adesione e la funzione delle cellule B e T (Chapman e Houtman, 2014; Guinamard et al., 2000). Nei timociti, la stimolazione del TCR induce la fosforilazione di Pyk2, che a sua volta regola lo sviluppo e l'attivazione dei timociti attraverso il riarrangiamento del citoscheletro (Chapman e Houtman, 2014). Nelle cellule B, invece, Pyk2 partecipa alla regolazione della motilità cellulare e della risposta a integrine e chemochine. Inoltre, contribuisce alla fagocitosi mediata dal complemento (Paone et al., 2016).

Nei neutrofili, Pyk2 svolge un ruolo chiave nell'adesione mediata dalle integrine, nell'interazione dell'integrina $\alpha M\beta 2$ con il fibrinogeno e nella produzione di ROS. In particolare, regola le fasi iniziali dell'adesione dei neutrofili al fibrinogeno, attiva vie di segnalazione intracellulare coinvolte nella regolazione di PI3K e MAPK e modula la produzione di ROS in seguito alla stimolazione del recettore TLR4 nei neutrofili aderenti (Canino et al., 2020).

Kamen e collaboratori hanno dimostrato che i neutrofili privi di Pyk2 presentano una ridotta migrazione su superfici rivestite di fibrinogeno e un difetto nella degranulazione indotta dal legame dell'integrina $\alpha M\beta 2$ al fibrinogeno, con conseguente ridotto rilascio di proteine antimicrobiche e compromissione delle risposte di difesa contro le infezioni batteriche (Kamen et al., 2011).

Coerentemente con il ruolo di Pyk2 nella segnalazione mediata dalle integrine, Evangelista e collaboratori hanno dimostrato che le SFK e Pyk2 svolgono un ruolo chiave nella stabilizzazione dell'adesione dei neutrofili alle piastrine aderenti nei siti di lesione vascolare. In particolare, l'attivazione di questo pathway promuove l'adesione mediata dall'integrina $\alpha M\beta 2$, mentre l'inibizione della segnalazione SFK/Pyk2 riduce significativamente la capacità dei neutrofili di aderire stabilmente alle piastrine (Evangelista et al., 2007).

Il ruolo di Pyk2 nelle piastrine sarà discusso nel prossimo capitolo.

Pyk2 è coinvolta nell'**osteogenesi**, regolando la funzione delle cellule osteoprogenitrici, la differenziazione e la migrazione degli osteoblasti e la formazione ossea (Buckbinder et al., 2007; Eleniste et al., 2016), oltre a influenzare la fisiologia e la patologia degli osteoclasti (Xiong e Feng, 2003). Per questo motivo, gli inibitori di Pyk2 potrebbero rappresentare un approccio anabolico promettente per il trattamento dell'osteoporosi (Buckbinder et al., 2007).

Pyk2 svolge un ruolo importante anche a **livello ipotalamico**. Uno studio di Hadley e collaboratori ha dimostrato che Pyk2 e FAK svolgono un ruolo fondamentale nella segnalazione della leptina e nel controllo del metabolismo energetico. In particolare, l'inibizione dell'istone deacetilasi 6 (HDAC6) aumenta la sensibilità alla leptina attraverso l'attivazione di Pyk2 e FAK nell'ipotalamo. Al contrario, la perdita o l'inibizione di Pyk2 compromette gli effetti anoressizzanti sia della leptina sia degli inibitori di HDAC6, evidenziando il ruolo cruciale di questa chinasi nel controllo centrale dell'omeostasi energetica (Hadley et al., 2026).

Inoltre, è stato dimostrato che Pyk2 è sovraespressa in numerosi **tumori** umani e che la sua elevata espressione nei tessuti tumorali è correlata a una prognosi sfavorevole. Pyk2 attiva molteplici vie di segnalazione oncogeniche, tra cui Wnt/ β -catenina, PI3K/Akt, MAPK/ERK e TGF- β /EGFR/VEGF, favorendo la carcinogenesi, la migrazione cellulare, l'invasione, la transizione epitelio-mesenchimale e le metastasi. Pertanto, Pyk2 rappresenta un bersaglio terapeutico di notevole interesse clinico (Zhu et al., 2018).

Ruolo di Pyk2 nelle piastrine

Pyk2 è espressa nei megacariociti e nelle piastrine, dove viene attivata da numerosi agonisti piastrinici, tra cui trombina, collagene (Canobbio et al., 2015) e vWF (Canobbio et al., 2002), a valle delle integrine $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha I Ib\beta 3$ e dei GPCR (Guidetti et al., 2019).

Nel laboratorio di Biochimica delle piastrine dell'Università di Pavia, presso cui ho svolto il mio internato di tesi, il ruolo di Pyk2 nelle piastrine è stato ampiamente studiato mediante l'utilizzo di inibitori specifici. Questi inibitori stabilizzano la conformazione inattiva di Pyk2, con un' EC50 nell'intervallo nanomolare, e mostrano un'elevata specificità senza influenzare l'attività di altre protein chinasi (Bhattacharya et al., 2012). Due di questi inibitori (PF-4594755 e PF-4520440) non alterano le risposte funzionali delle piastrine che non esprimono Pyk2, indicando l'assenza di effetti off-target in queste cellule e la loro elevata specificità (Guidetti et al., 2016).

I risultati ottenuti con inibitori selettivi sono stati confermati in un modello murino che non esprime Pyk2 in nessun tessuto, Pyk2 knockout, KO (Okigaki et al., 2003). I topi Pyk2 KO sono vitali e fertili e non mostrano evidenti alterazioni nella crescita. Questi topi sono stati gentilmente donati

dal Professor Okigaki del Dipartimento di Medicina Cardiovascolare dell'Università di Kyoto (Giappone) e sono attualmente stabulati presso lo stabulario dell'Università di Pavia. I topi Pyk2 KO sono un valido strumento per studiare il ruolo di Pyk2 in esperimenti *in vivo*.

Ruolo di Pyk2 nell'attivazione piastrinica

Pyk2 viene fosforilata e attivata da numerosi agonisti piastrinici, tra cui trombina, collagene (Canobbio et al., 2015) e vWF (Canobbio et al., 2002).

Nelle piastrine stimulate con trombina, l'aumento del Ca^{2+} intracellulare induce l'attivazione di Pyk2 attraverso l'interazione del complesso $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ con il dominio FERM, promuovendo l'autofosforilazione del residuo Y402. La fosforilazione di Y402 crea un sito di legame per le SFK, tra cui Fyn e Lyn, determinando l'attivazione di un circuito di feedback positivo tra Pyk2 e le SFK. In particolare, Fyn amplifica ulteriormente l'attività di Pyk2 mediante la fosforilazione dei residui Y579-Y580, favorendo la fosforilazione di numerose molecole di segnalazione coinvolte nell'attivazione e nell'aggregazione piastrinica (Canobbio et al., 2015).

Nelle piastrine stimulate con trombina, Pyk2 regola il rilascio dei granuli e la sintesi di TxA_2 (Canobbio et al., 2013), processi che rinforzano l'attivazione piastrinica. Come conseguenza, le piastrine isolate da topi Pyk2 KO mostrano una ridotta aggregazione in risposta alla stimolazione con trombina rispetto a piastrine isolate da topi WT. Questo difetto è in gran parte dovuto alla diminuita produzione di TxA_2 , come dimostrato dal ripristino della risposta di aggregazione delle piastrine Pyk2 KO dopo stimolazione del recettore del TxA_2 con U46619 (Canobbio et al., 2013). La produzione di TxA_2 dipende dall'attivazione della cPLA2, che nelle piastrine viene attivata mediante fosforilazione da parte della p38MAPK. Studi condotti su piastrine ottenute da topi Pyk2 KO hanno dimostrato che Pyk2 promuove l'attivazione della p38MAPK e la successiva fosforilazione della cPLA2 (Kim et al., 2013). Anche le SFK, tra cui Lyn, localizzata a valle di Pyk2 nelle piastrine attivate dalla trombina, rappresentano importanti regolatori della produzione di TxA_2 , suggerendo che l'attivazione della cPLA2 mediata da Pyk2 dipende dalle SFK (Canobbio et al., 2013).

Pyk2 nella segnalazione outside-in dell'integrina $\alpha 2\beta 1$

L'adesione delle piastrine umane e murine ai ligandi dell'integrina $\alpha 2\beta 1$, tra cui il collagene monomerico e il peptide mimetico del collagene GFOGER, induce un'attivazione tempo-dipendente di Pyk2 e ne stimola l'autofosforilazione sul residuo Y402. Analogamente a quanto avviene per l'integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$, l'attivazione di Pyk2 a valle dell'integrina $\alpha 2\beta 1$ è necessaria per la stimolazione di $\text{PI3K}\beta$, la fosforilazione di Akt e l'attivazione $\text{PI3K}\beta$ -dipendente della piccola GTPasi Rap1b. Tuttavia, il meccanismo di attivazione di Pyk2 a valle dell'integrina $\alpha 2\beta 1$

differisce da quello descritto per l'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, evidenziando la notevole versatilità di questa chinasi (Consonni et al., 2012).

Sebbene le SFK partecipino alle fasi iniziali della segnalazione *outside-in* dell'integrina $\alpha 2\beta 1$ (Senis et al., 2014; Guidetti et al., 2009), l'asse Pyk2-PI3K β -Rap1b è controllato principalmente dalla segnalazione dipendente del Ca^{2+} . L'attivazione di Pyk2 mediata dal Ca^{2+} reindirizza l'intero percorso di segnalazione a valle dell'integrina $\alpha 2\beta 1$ sotto il controllo dell'attività della PLC $\gamma 2$. Infatti, la fosforilazione di Pyk2 e Akt, così come l'attivazione di Rap1b, risultano inibite dalla chelazione intracellulare del Ca^{2+} e sono assenti nelle piastrine dei topi knockout per PLC $\gamma 2$ (Consonni et al., 2012).

Pyk2 non è necessario per la fosforilazione di c-Cbl indotta dall'integrina $\alpha 2\beta 1$ e c-Cbl non media l'attivazione di PI3K β da parte di Pyk2 (Manganaro et al., 2015).

L'adesione al collagene mediata dall'integrina $\alpha 2\beta 1$ induce inoltre l'attivazione *inside-out* dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Questa cooperazione tra le integrine $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha\text{IIb}\beta 3$ è fondamentale per supportare la formazione del trombo. In questo contesto, Pyk2 agisce come una molecola di segnalazione piuttosto che come tipica chinasi di adesione focale. Infatti, l'assenza di Pyk2 non altera lo spreading mediato dall'integrina $\alpha 2\beta 1$, ma riduce significativamente l'attivazione *inside-out* dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ nelle piastrine aderenti al collagene, compromettendo la formazione del trombo (Consonni et al., 2012).

Pyk2 nella segnalazione outside-in dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$

Pyk2 è coinvolta nella segnalazione *outside-in* mediata dall'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$. In seguito all'adesione delle piastrine al fibrinogeno, le SFK promuovono la rapida fosforilazione di Y579-580 nel dominio catalitico di Pyk2, seguita dalla sua attivazione e successiva autofosforilazione di Y402. L'attivazione di Pyk2 a valle di questa integrina è un evento diretto e non coinvolge effettori a valle, quali PLC $\gamma 2$ o l'ADP rilasciato dalle piastrine (Cipolla et al., 2013).

La formazione dei lamellipodi è significativamente ridotta nelle piastrine murine prive di Pyk2 o nelle piastrine umane trattate con inibitori specifici, indicando che Pyk2 attivata propaga i segnali intracellulari necessari allo spreading piastrinico. A valle dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, Pyk2 promuove l'attivazione di PI3K mediante la fosforilazione della proteina adattatrice c-Cbl, che si lega direttamente alla subunità regolatrice p85 di PI3K, stimolandone dell'attività catalitica. Coerentemente, la carenza di PI3K compromette l'adesione e lo spreading delle piastrine sul fibrinogeno (Buitrago et al., 2011).

Poiché la PI3K β rappresenta la principale isoforma coinvolta nella segnalazione *outside-in* dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, essa costituisce il principale bersaglio regolato da Pyk2 attraverso c-Cbl. Di conseguenza, i difetti di spreading delle piastrine murine prive di Pyk2 risultano paragonabili a

quelli osservati in seguito all'ablazione genetica o all'inibizione selettiva di PI3K β (Canobbio et al., 2009; Laurent et al., 2015).

La piccola GTPasi Rap1b, essenziale per l'adesione delle piastrine al fibrinogeno, integra i segnali dell'asse c-Cbl-Pyk2-PI3K β durante l'interazione con l'integrina α IIb β 3. Infatti, l'accumulo della forma attiva Rap1b-GTP risulta ridotto in misura comparabile sia in assenza di Pyk2 sia in seguito all'inattivazione di PI3K β . Tuttavia, né la perdita di Pyk2 né l'ablazione dell'attività di PI3K β aboliscono completamente l'attivazione di Rap1b e dello spreading piastrinico, suggerendo il possibile coinvolgimento di FAK nelle risposte residue indipendenti da Pyk2 (Cipolla et al., 2013).

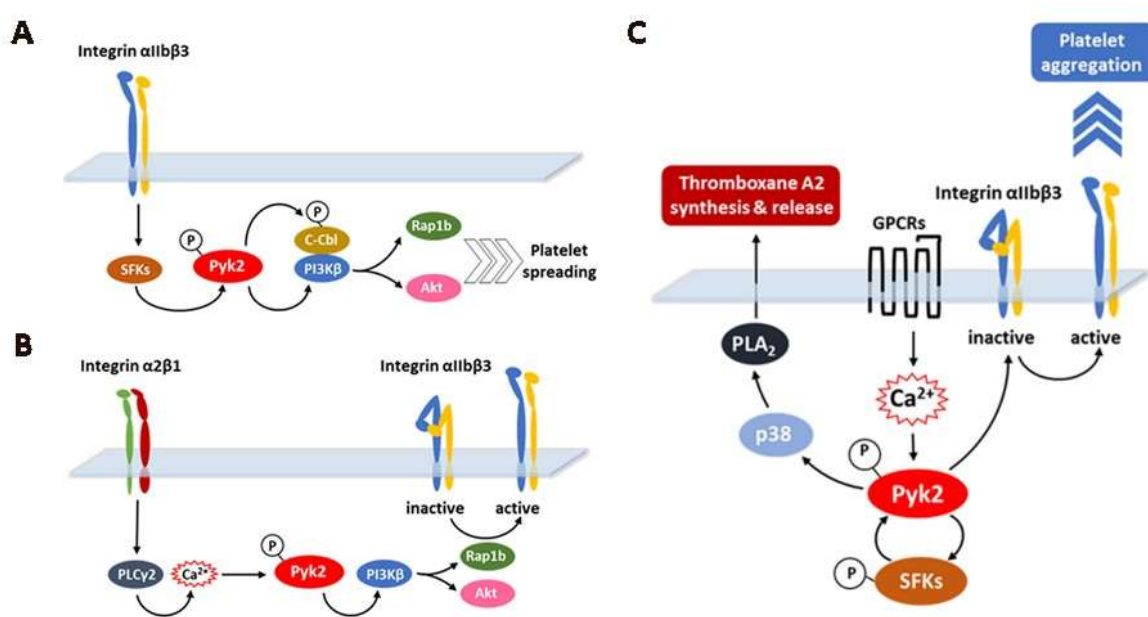


Figura 9. Attivazione di Pyk2 nelle piastrine. A. Attivazione di Pyk2 a valle dell'integrina α IIb β 3. B. Attivazione di Pyk2 a valle dell'integrina α 2 β 1. C. Ruolo di Pyk2 nell'attivazione e nell'aggregazione piastrinica mediate dai GPCR. La spiegazione della via di segnalazione è riportata dettagliata nel testo (Tratto e modificato da Guidetti et al., 2019).

Ruolo di Pyk2 nella trombosi

In vivo, i modelli murini Pyk2 KO mostrano una formazione ritardata di trombi arteriosi occlusivi, un prolungamento del tempo di sanguinamento della coda e una protezione nei confronti della tromboembolia polmonare, indicando che Pyk2 rappresenta un importante regolatore dell'emostasi e della trombosi (Canobbio et al., 2013).

In un modello di danno fotochimico all'arteria femorale, il tempo necessario per l'occlusione totale del vaso è risultato raddoppiato nei topi Pyk2 KO rispetto ai WT, confermando il ruolo di Pyk2 nella trombosi arteriosa. Inoltre, i topi Pyk2 KO hanno mostrato una mortalità ridotta e una minore percentuale di vasi polmonari occlusi da trombi dopo l'iniezione di una miscela di collagene ed epinefrina. Sebbene la trombosi risulti fortemente ridotta, il tempo di sanguinamento della coda è solo lievemente aumentato nei topi Pyk2 KO, indicando che l'inibizione di Pyk2 può limitare la

formazione di trombi patologici senza compromettere gravemente l'emostasi primaria (Canobbio et al., 2013).

Il contributo principale di Pyk2 all'attivazione e all'aggregazione piastrinica è correlato alla sua capacità di regolare la produzione di TxA₂. La ridotta produzione di TxA₂, insieme alle alterazioni dello spreading mediato dall'integrina α IIb β 3 e del crosstalk tra integrine, è probabilmente responsabile della ridotta trombosi arteriosa osservata nei topi Pyk2 KO. Questi risultati dimostrano che Pyk2 potrebbe essere un potenziale bersaglio per nuove strategie terapeutiche antitrombotiche (Guidetti et al., 2019).

Un altro studio ha dimostrato che Pyk2 svolge un ruolo importante nella trombosi venosa profonda, un processo che deriva dall'azione cooperativa di leucociti, piastrine e cellule endoteliali e fattori della coagulazione. In un modello murino di legatura parziale della vena cava inferiore (IVC), i topi knockout per Pyk2 sviluppano raramente trombi venosi profondi oppure formano trombi significativamente più piccoli rispetto ai topi WT. La ridotta trombosi venosa osservata nei topi Pyk2 KO sottoposti a ligazione della IVC è attribuibile al ruolo di Pyk2 nella regolazione dell'espressione di molecole adesive nelle cellule endoteliali attivate, dell'espressione del TF nei monociti e nelle cellule endoteliali, dell'adesione di neutrofili e piastrine all'endotelio, della formazione di aggregati neutrofili-piastrine e della NETosi (Momi et al., 2022). Pertanto, mentre nella trombosi arteriosa il contributo di Pyk2 è prevalentemente legato alla funzione piastrinica, nella trombosi venosa profonda la sua azione coinvolge anche cellule immunitarie innate, endotelio e meccanismi della coagulazione.

Ruolo di Pyk2 nella tromboinfiammazione

Pyk2 svolge un ruolo importante anche nella tromboinfiammazione associata all'endotossemia e alla sepsi.

Duan e collaboratori hanno dimostrato che, in un modello di infezione polmonare acuta indotta da LPS, l'inibizione farmacologica di Pyk2 protegge dalla risposta infiammatoria. In particolare, il trattamento con TAT-Pyk2-CT, una proteina di fusione costituita dal peptide TAT unito al dominio C-terminale di Pyk2, riduce l'infiltrazione dei neutrofili negli spazi alveolari e nel tessuto polmonare (Duan et al., 2012). Più recentemente, Alves e collaboratori hanno dimostrato che Pyk2 e FAK svolgono un ruolo cruciale nella patogenesi della sepsi, contribuendo all'infiammazione e al danno d'organo. Utilizzando un modello murino di sepsi polimicrobica indotta da legatura e puntura cecale, gli autori hanno osservato che l'inibizione farmacologica di Pyk2 e FAK mediante PF-562271 protegge dall'infiammazione e dal danno d'organo, aumentando la sopravvivenza dei topi (Alves et al., 2022).

SCOPO DELLA RICERCA

Pyk2 è una tirosina chinasi non recettoriale appartenente alla famiglia delle FAK, coinvolta nei processi di adesione cellulare e nel rimodellamento del citoscheletro. È espressa nel cervello, negli osteoclasti, nelle cellule endoteliali e nelle cellule ematopoietiche, tra cui le piastrine (Guidetti et al., 2019).

Nelle piastrine, Pyk2 partecipa a numerose vie di segnalazione coinvolte nell'emostasi e nella trombosi. In particolare, regola l'adesione dell'integrina $\alpha 2 \beta 1$ al collagene (Consonni et al., 2012) e dell'integrina $\alpha IIb \beta 3$ al fibrinogeno (Cipolla et al., 2013); inoltre, modula il rilascio dei granuli e la sintesi di TxA₂, processi che rinforzano l'attivazione piastrinica (Canobbio et al., 2013). Pyk2 è coinvolta anche nella formazione di trombi arteriosi, nel tromboembolismo (Canobbio et al., 2013) e nello sviluppo della trombosi venosa profonda (Momi et al., 2022).

Recenti evidenze hanno dimostrato il coinvolgimento di Pyk2 nei processi di tromboinfiammazione associati a endotossemia e sepsi. In particolare, l'inibizione di Pyk2 riduce l'infiammazione indotta da LPS in un modello di infezione polmonare acuta (Duan et al., 2012). Analogamente, in un modello murino di sepsi polimicrobica, l'inibizione farmacologica di Pyk2 e FAK mediante PF-562271 protegge dall'infiammazione sistemica e dal danno d'organo, aumentando la sopravvivenza dei topi (Alves et al., 2022).

Alla luce di queste evidenze, in questo lavoro di tesi abbiamo studiato il ruolo di Pyk2 nell'infezione indotta da LPS, focalizzandoci sui meccanismi molecolari attraverso cui LPS modula l'attivazione piastrinica *in vitro* e sulle vie di segnalazione intracellulari coinvolte nell'attivazione di Pyk2 e sui suoi potenziali substrati.

Per questo studio sono stati utilizzati modelli murini WT e Pyk2 KO, e inibitori farmacologici specifici, per dissezionare le vie di segnalazione intracellulari coinvolte. Nello specifico, sono state analizzate l'aggregazione piastrinica e l'attivazione della segnalazione intracellulare. Sono state utilizzate piastrine isolate da sangue di topo WT C57BL/6, preincubate con LPS 0111:B4 di *E. coli* e stimulate con l'agonista piastrinico TRAP4, al fine di mimare le condizioni che si realizzano durante l'infezione batterica. I recettori e le molecole di segnalazione coinvolte a monte di Pyk2 sono state studiate con inibitori specifici. Per valutare il ruolo di Pyk2 e i suoi effettori a valle, gli stessi esperimenti sono stati compiuti su piastrine isolate da topi Pyk2 KO.

MATERIALI E METODI

Materiali

Reagenti e agonisti

Il TRAP4 (NH₂-AYPGKF-COOH) è stato acquistato dall'azienda GenScript, LPS di *E. coli* O111:B4 e Ro 31-8220 da Calbiochem. TAK-242, i reagenti di grado analitico, l'inibitore PGE1 e l'Apyrasi I sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich.

I reagenti, la strumentazione per SDS-PAGE e Western blotting, le Precision Plus Protein Standards All Blue sono della ditta Bio-Rad. Il kit per la chemiluminescenza è stato acquistato da Millipore.

Anticorpi

Gli anticorpi primari utilizzati per l'analisi di immunoblotting sono i seguenti: anti-fosfo-Akt (S473, #9271), anti-fosfo-ERK1/2 MAPK (T202/Y204, #9101), anti-Pyk2 (#3292) e anti-fosfo-Pyk2 (Y402, #3291) e anti-fosfo-PKC Substrates (#2261) sono stati forniti dall'azienda Cell Signaling Technology. L'anticorpo anti-fosfo-Pyk2 (Y579-580, #44-636G) è stato acquistato da Invitrogen. L'anticorpo primario anti-Pleckstrin (#ab-17020) è stato acquistato dall'azienda Abcam, mentre l'anticorpo primario anti-Tubulina (DM1A: sc-32293) da Santa Cruz Biotechnology. Gli anticorpi secondari anti-rabbit, anti-mouse e anti-goat coniugati all'enzima perossidasi di rafano (HRP, *Horseradish peroxidase*) sono stati acquistati dall'azienda Sigma-Aldrich.

Modelli murini

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando topi della specie *Mus musculus*, con genotipi C57BL/6OlaHsd wild-type (WT) e Pyk2 Knock-Out (KO). I topi WT sono stati acquistati presso l'azienda Charles River Laboratories, mentre i topi Pyk2 KO, generati su background genetico C57BL/6, sono stati gentilmente forniti dal Professor Okigaki del Dipartimento di Medicina Cardiovascolare dell'Università di Kyoto, Giappone (Okigaki et al., 2003). I topi Pyk2 KO non esprimono la proteina Pyk2 in nessun tessuto e presentano normali capacità riproduttive e vitalità. La colonia viene mantenuta allestendo accoppiamenti eterozigoti. Questa strategia di allevamento consente di ottenere in media per ogni parto il 25% dei topi Pyk2 KO, il 25% di topi WT e il 50%

di topi eterozigoti. La genotipizzazione viene effettuata su frammento di coda, e gli esperimenti vengono condotti preferibilmente su topi fratelli.

I topi Pyk2 KO e i rispettivi controlli WT sono stabulati in gabbie di plastica mantenute in condizioni ambientali controllate, con temperatura compresa tra 21 e 23 °C, umidità relativa del 50–60% e ciclo luce/buio di 12 ore, con libero accesso a cibo e acqua.

Gli animali sono mantenuti presso il Centro Interdipartimentale di Servizio per la Gestione Unificata delle Attività di Stabulazione e di Radiobiologia dell'Università di Pavia (Polo Botta II). Tutti gli esperimenti condotti su topi C57BL/6J wild-type (WT) e Pyk2KO sono stati approvati dal Comitato Etico dell'Università di Pavia e dal Ministero della Salute italiano (numeri di autorizzazione 459/2023) in conformità con la Direttiva UE 2010/63/UE sulla sperimentazione animale.

Soluzioni e tamponi

- ACD (Acido Citrico Destroso): 130 mM acido citrico, 152 mM trisodio citrato, 112 mM glucosio; in H₂O.
- Sodio citrato: 3,8% Na₃C₆H₅O₇ in H₂O.
- Tyrode: 10 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃; in H₂O (pH 7.4).
- Pipes: 137 mM NaCl, 20 mM Pipes; in H₂O (pH 6.5).
- SDS sample buffer 3XR: 30% glicerolo, 6% sodio dodecil solfato (SDS), 1,5% ditiotreitolo (DTT), 0,03% blu di bromofenolo (BBF), 3% β- mercaptoetanol, in Tris-Glicina.
- Tris-Glicina: 192 mM Glicina, 25 mM Tris, 0,1% SDS; in H₂O (pH 8.3).
- Tampone da blotting: 20 mM Tris, 150 mM glicina, 20% metanol; in H₂O.
- PBS 1X: 140 mM NaCl, 2 mM NaH₂PO₄- H₂O, 8 mM NaHPO₄ -anidro; 0,1% Tween20; in H₂O (pH 7.4).
- TBS 1X: 500 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,1% Tween20; in H₂O (pH 7.5).

Metodi

Tecnica 1: Prelievo di sangue murino

Il topo viene sacrificato e il sangue viene prelevato dalla vena cava inferiore utilizzando una siringa da 2 ml con un ago 23G contenente 200 µl di anticoagulante, composto da una soluzione di citrato di sodio al 3,8% e ACD in rapporto 1:2. I topi WT e Pyk2 KO utilizzati hanno un'età compresa tra le 8 e le 12 settimane e sono dello stesso genere quando impiegati nello stesso esperimento. Viene prelevato circa 1 ml di sangue, che viene poi trasferito in una provetta eppendorf da 2 ml.

Tecnica 2: Purificazione di piastrine da sangue murino

L'isolamento delle piastrine avviene attraverso una serie di centrifugazioni eseguite a temperatura ambiente, finalizzate alla separazione della componente piastrinica dalle altre cellule del sangue. Al sangue prelevato vengono aggiunti 900 µl di Tyrode; il campione viene risospeso e centrifugato a 120g per 10 minuti utilizzando una centrifuga MPW 232. La centrifugazione separa il sangue intero in tre componenti: plasma ricco in piastrine (PRP) nella fase superiore, buffy coat nella fase intermedia ed eritrociti nella fase inferiore. Il PRP viene prelevato e trasferito in una nuova eppendorf, mentre il sangue rimanente viene risospeso con 1 ml di tampone Tyrode e centrifugato nuovamente a 120g per 7 minuti. Questo passaggio viene ripetuto una seconda volta al fine di massimizzare il recupero piastrinico. Ai PRP raccolti vengono aggiunti gli inibitori dell'attivazione piastrinica: PGE1 (1 µM), una prostaglandina che inibisce l'attivazione piastrinica e apirasi I (0,02 U/ml), che degrada l'ADP secreto dalle piastrine. Il campione viene successivamente centrifugato a 500g per 8 minuti. Al termine della centrifugazione, viene eliminato il plasma povero in piastrine (PPP) e il pellet piastrinico viene risospeso in 1,5 ml di tampone PIPES. Questo passaggio consente il lavaggio del campione da eventuali residui di eritrociti e leucociti. Per favorire la sedimentazione delle piastrine, si esegue un'ulteriore centrifugazione a 500g per 8 minuti. Dopo aver eliminato il PPP, il pellet di piastrine viene risospeso in 500 µl di tampone Tyrode.

Si procede quindi con la conta piastrinica: le piastrine purificate vengono diluite 1:200 in tampone Tyrode e contate mediante camera di Bürker utilizzando un microscopio ottico Olympus CK40 con ingrandimento 20×. Si contano le piastrine presenti in 10 rettangoli casuali e si sommano. La concentrazione piastrinica per ml di soluzione viene calcolata utilizzando la formula: $\sum 10 \text{ campi} \times 0,02 \times 10^9$ piastrine/ml. Successivamente, le piastrine vengono portate alla concentrazione desiderata in tampone Tyrode, alla quale si aggiungono glucosio (5,5 mM), CaCl₂ (1 mM) e MgCl₂

(0,5 mM). Infine, le piastrine sono lasciate riposare per 30 minuti a 37°C prima dell'inizio degli esperimenti.

Tecnica 3: Analisi dell'aggregazione piastrinica

Lo strumento utilizzato per studiare l'aggregazione piastrinica *in vitro* è un aggregometro di Born a trasmissione luminosa (Born e Cross, 1963) della Chrono Log Corporation, dotato di due canali nei quali vengono inserite le cuvette contenenti il campione. La sorgente luminosa è una lampada al tungsteno, la cui luce passa attraverso un apposito monocromatore. L'assorbanza del fascio di luce trasmessa è messa in relazione con la percentuale di aggregazione delle piastrine in sospensione. L'aggregazione è misurata con il metodo turbidimetrico di Born, che prevede la misurazione nel tempo, tramite un fotometro, della luce trasmessa attraverso il campione di piastrine stimolato con adeguati agonisti dell'aggregazione piastrinica. Inizialmente, la sospensione piastrinica appare torbida e la luce trasmessa è ridotta, in seguito alla stimolazione con agonisti, le piastrine iniziano ad aggregare, la sospensione diventa progressivamente più trasparente e la quantità di luce trasmessa aumenta.

Negli studi di aggregazione, le piastrine purificate secondo la *tecnica 2* vengono portate alla concentrazione di 3×10^8 piastrine/ml in tampone Tyrode. Campioni di 300 μ l vengono aliquotati nelle cuvette in vetro siliconato alla temperatura costante di 37°C, all'interno delle quali è inserito un magnete per una costante agitazione del campione. Dove indicato, le piastrine vengono preincubate con gli inibitori da testare per 30 minuti a 37°C e con LPS per 10 minuti a 37°C. Successivamente, l'aggregazione viene indotta mediante aggiunta del rispettivo agonista. L'aggregazione è monitorata in continuo e sotto costante agitazione per 5 minuti e registrata da un computer collegato all'aggregometro. Il computer è dotato del software Aggro/link, che consente la visualizzazione in tempo reale del tracciato di aggregazione. Nel tracciato è possibile distinguere il cambio di forma e l'intera curva di aggregazione, fino al raggiungimento del plateau. Il grafico risultante riporta il tempo, espresso in minuti, sull'asse delle ascisse e la percentuale di aggregazione sull'asse delle ordinate.

Tecnica 4: Preparazione dei campioni totali

Le piastrine purificate secondo la *tecnica 2* sono portate alla concentrazione di 5×10^8 piastrine/ml in tampone Tyrode e aliquotate in eppendorf da 1.5 ml. Successivamente, quando previsto, vengono preincubate con gli inibitori da testare per 30 minuti o con LPS per 10 minuti e stimolate con gli opportuni agonisti a 37°C, oppure non stimolate (campione basale).

Al termine della stimolazione, i campioni sono dissociati mediante l'aggiunta di metà volume di dissociante per elettroforesi SDS 3XR contenente il 3% di β -mercaptoetanolo.

Il SDS è un detergente anionico che si lega alle proteine denaturandole e conferisce una carica negativa proporzionale alla lunghezza della catena polipeptidica, rendendo il rapporto carica/massa approssimativamente costante. Il β -mercaptoetanolo, insieme al DTT, riduce i ponti disolfuro presenti nella struttura terziaria delle proteine. Di conseguenza, tutte le proteine perdono la struttura tridimensionale e rimangono nella loro forma primaria, acquisendo una carica negativa uniforme. Il glicerolo aumenta la densità del campione, mentre il BBF funge da tracciante per il monitoraggio della corsa elettroforetica.

I campioni vengono successivamente posti a 96 °C per 3 minuti in agitazione (550 rpm), centrifugati a 18000 g per 30 secondi e conservati a -20 °C.

Tecnica 5: Elettroforesi SDS-PAGE

L'elettroforesi è una tecnica utilizzata per la separazione delle molecole presenti in una miscela in base alle loro proprietà chimico-fisiche. L'elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) utilizza il SDS, che si lega alle proteine conferendo loro carica negativa, rendendo uniforme il loro rapporto carica/massa. In questo modo, le proteine si separano esclusivamente in base al peso molecolare quando sono soggette a un campo elettrico che ne causa la migrazione dal polo negativo verso il polo positivo.

Il gel di poliacrilamide agisce come un setaccio, una struttura tridimensionale che permette di intrappolare le proteine a seconda del loro peso molecolare. La porosità del gel dipende dalla concentrazione di acrilamide: all'aumentare della concentrazione, diminuisce la dimensione dei pori, facilitando la separazione delle proteine a basso peso molecolare.

Il gel di separazione ha dimensioni pari a 88 × 55 mm e uno spessore di 1.5 mm ed è costituito da due sezioni: *stacking gel* e *running gel*, che differiscono per volume, concentrazione di acrilamide e pH, come riportato nella *Tabella 1*. I campioni vengono caricati nello *stacking gel*, che presenta una concentrazione di acrilamide del 3% e si trova nella parte superiore rispetto al *running gel*. In questa regione, i pori più ampi consentono il concentramento delle proteine in una banda sottile e omogenea, indipendentemente dal loro peso molecolare. Il *running gel* (10% oppure 5-15% di acrilamide) presenta pori più piccoli e consente la separazione delle proteine in funzione del loro peso molecolare. Il gel è posto tra due vetrini, uno interno più sottile e uno esterno più spesso, che sono fissati insieme verticalmente mediante un supporto.

La matrice del gel di poliacrilamide è costituita da legami crociati tra acrilamide e N,N'-metilenbisacrilamide, che formano una rete polimerica reticolata. I legami incrociati vengono formati in seguito all'aggiunta di due agenti crosslinkanti e polimerizzanti: N, N, N', N'-

tetrametiletano-1,2-diammina (TEMED) e persolfato di ammonio (APS), aggiunti appena prima di inserire la soluzione fra i vetrini.

Il gel in gradiente 5–15% viene preparato mediante uno strumento costituito da due vasi comunicanti: nel primo è presente la soluzione a minore concentrazione di acrilamide, nel secondo quella più concentrata, insieme a un magnete. I vasi sono posti su un agitatore magnetico e collegati a una pompa peristaltica, che consente la colata controllata della soluzione tra i vetrini per la formazione del running gel, successivamente lasciato polimerizzare per circa 20 minuti, come nel caso del gel al 10%. Successivamente, viene aggiunto lo *stacking gel* al 3% e inserito un pettine di teflon per la formazione dei pozzetti di caricamento.

I campioni totali preparati secondo la *tecnica 4* sono caricati nei rispettivi pozzetti del gel insieme a uno standard a peso molecolare noto, utilizzato per la determinazione del peso molecolare delle proteine analizzate. La corsa elettroforetica avviene nell'apposita cameretta elettroforetica in tampone Tris-Glicina a voltaggio costante di 150V per circa 90 minuti, fin quando la linea del fronte di migrazione non è completamente uscita dal gel.

I gel sono preparati secondo le indicazioni riportate nella tabella seguente:

Soluzione	Running gel			Stacking gel
	Gel in gradiente		10%	3%
	5%-15%			
Acrilamide 30%	750 µl	2250 µl	3000 µl	250 µl
Tris HCl 1.5 M, pH 8.8	1125 µl	1125 µl	2250 µl	-
Tris HCl 1.25 M, pH 6.8	-	-	-	250 µl
SDS 10%	45 µl	45 µl	90 µl	25 µl
H ₂ O bidistillata	2310 µl	810 µl	3210 µl	1700 µl
Temed 1%	225 µl	225 µl	450 µl	250 µl
APS 10%	45 µl	45 µl	90 µl	25 µl
Volume totale	4500 µl	4500 µl	9000 µl	2500 µl

Tabella 1. Ricette della preparazione dei gel con concentrazione di acrilammide pari a 5-15%, 10% e 3%.

Tecnica 6: Western Blotting

Al termine della corsa elettroforetica, le proteine vengono trasferite dal gel di poliacrilamide a una membrana di polivinilidenfluoruro (PVDF), che funge da supporto solido. Si procede alla preparazione del cosiddetto “sandwich”, costituito da due spugne e quattro fogli di carta assorbente, precedentemente imbevuti di tampone da blotting. Al centro del sandwich si pongono

a contatto il gel di poliacrilamide e la membrana di PVDF, attivata precedentemente mediante immersione in metanolo a cui segue un passaggio in acqua distillata e tampone da blotting.

Il “sandwich” viene inserito in una cella di trasferimento (Mini Trans-Blot, Bio-Rad), contenente il tampone da blotting. Il trasferimento avviene attraverso l'applicazione di un campo elettrico con amperaggio costante di 200 mA, a 4 °C per 2 ore. Durante il trasferimento, il gel è posizionato verso il polo negativo e la membrana PVDF verso il polo positivo, in quanto le proteine possiedono una carica negativa e quindi tendono a migrare verso il polo positivo e vengono così trasferite sulla membrana di PVDF.

Tecnica 7: Immunoblotting

Al termine del trasferimento delle proteine dal gel di poliacrilamide alla membrana di PVDF, quest'ultima viene incubata per 2 ore a temperatura ambiente in TBS contenente 5% BSA, in lenta agitazione, al fine di saturare i siti di legame aspecifici dell'anticorpo primario.

Successivamente, la membrana viene incubata overnight a 4°C con l'anticorpo primario, diluito 1:1000 in TBS contenente 5% BSA, 0,1% Tween-20 e 0,02% NaN₃, in lenta agitazione. Al termine dell'incubazione, l'anticorpo primario viene recuperato e le membrane vengono sottoposte a lavaggio per rimuovere l'eccesso di anticorpo. In particolare, per gli anticorpi anti-fosfo-proteine vengono effettuati 6 lavaggi da 5 minuti in TBS 1X contenente 0,1% Tween-20, mentre per gli anticorpi diretti contro proteine non fosforilate vengono effettuati 5 lavaggi da 5 minuti in PBS 1X contenente 0,1% Tween-20.

Le membrane vengono quindi incubate con l'anticorpo secondario coniugato a HRP, diretto contro le IgG della specie in cui è stato prodotto l'anticorpo primario. L'anticorpo secondario anti-rabbit viene diluito 1:2000 nel tampone di lavaggio, mentre gli anticorpi anti-mouse e anti-goat vengono diluiti 1:5000. L'incubazione avviene a 4°C per 45 minuti nel caso di membrane incubate con anticorpi anti-fosfo-proteine oppure a temperatura ambiente per 1 ora nel caso di anticorpi diretti contro proteine non fosforilate.

Al termine dell'incubazione con l'anticorpo secondario, le membrane vengono nuovamente sottoposte a 6 o 5 lavaggi da 5 minuti utilizzando il tampone di lavaggio appropriato.

La rivelazione del segnale avviene mediante chemiluminescenza, sfruttando l'attività della HRP attraverso l'utilizzo di un kit commerciale ECL contenente perossido di idrogeno e luminolo in rapporto 1:1. L'acquisizione delle immagini viene effettuata mediante il sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad) e il software Quantity One.

Tecnica 8: Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata eseguita con il programma GraphPad Prism 10. Per il confronto tra due gruppi è stato utilizzato il test non parametrico di Wilcoxon per dati appaiati (Wilcoxon signed-rank test), mentre per il confronto tra più gruppi è stata applicata l'analisi della varianza one-way ANOVA, seguita dal test post hoc di Tukey per confronti multipli.

I dati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard (SD) degli esperimenti eseguiti (n). La significatività statistica è stata fissata a $p < 0.05$ ed è stata indicata come segue: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

RISULTATI

LPS potenzia l'attivazione piastrinica indotta da TRAP4

Analisi dell'aggregazione

LPS è una molecola presente sulla superficie di batteri Gram negativi, come *E.coli*, che viene riconosciuto dal sistema immunitario come PAMP principalmente attraverso la sua porzione più conservata, il lipide A, il cui recettore principale è il TLR4 (Bertani e Ruiz, 2018).

Il ruolo di LPS nell'attivazione e nell'aggregazione piastrinica è ancora oggetto di dibattito a causa di risultati sperimentali contrastanti, probabilmente dovuti alle diverse metodologie utilizzate (Galgano et al., 2022). Alcuni studi suggeriscono che LPS non agisca come agonista piastrinico classico, ma piuttosto come segnale di priming, potenziando l'attivazione e l'aggregazione in seguito a stimolazione con agonisti tradizionali (Vallance et al., 2017; Lopes et al., 2017).

In questo lavoro di tesi, abbiamo verificato se la preincubazione con LPS influenzi l'aggregazione di piastrine murine utilizzando il TRAP4 come agonista piastrinico.

Il TRAP4 (*thrombin receptor-activating peptide 4*) è un esapeptide sintetico che attiva il recettore PAR4. Esso corrisponde agli amminoacidi 42-47 di PAR4 esposti in seguito alla scissione del recettore da parte della trombina. In condizioni fisiologiche, la trombina attiva PAR4 mediante la scissione dell'estremità N-terminale, generando una nuova sequenza che agisce come ligando e ne induce l'attivazione. Il TRAP4 corrisponde a questa sequenza ed è quindi in grado di attivare il recettore indipendentemente dalla scissione proteolitica operata dalla trombina (Landesberg et al., 2005).

Per gli esperimenti, sono utilizzate piastrine isolate da topi WT come illustrato nelle *tecniche 1 e 2*, alla concentrazione di 3×10^8 piastrine/ml, a cui sono aggiunti CaCl_2^+ (1 mM), MgCl_2 (0,5 mM) e glucosio (5,5 mM). Sono allestiti campioni da 300 μl di piastrine in cuvette di vetro siliconate, che vengono preincubati con 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS a 37°C per 10 minuti e quindi stimolati con 0,75 mM TRAP4 per 5 minuti sotto costante agitazione a temperatura controllata di 37 °C. La concentrazione di TRAP4 è scelta per ottenere un livello intermedio di aggregazione piastrinica e permettere di valutare eventuali effetti modulatori di LPS. Come controllo sono allestiti campioni preincubati solo con LPS o stimolati solo con TRAP4.

L'aggregazione è monitorata in continuo per 5 minuti mediante aggregometro di Born a trasmissione luminosa (*tecnica 3*) e i tracciati di aggregazione sono ottenuti grazie al software

Aggro/link. Ciascun tracciato riporta l'andamento della percentuale di luce trasmessa attraverso il campione nel tempo. Il software consente di misurare l'ampiezza massima dell'aggregazione dopo 5 minuti (aggregazione) e la pendenza della curva (slope), che fornisce un'indicazione della rapidità con cui le piastrine aggregano. Entrambi i parametri sono utilizzati per l'analisi quantitativa dei risultati ottenuti nei diversi esperimenti.

Un tracciato rappresentativo è mostrato in *figura R1 (i)*. Sull'asse delle ascisse è riportato il tempo di aggregazione e sull'asse delle ordinate la percentuale di aggregazione piastrinica.

La sola preincubazione con LPS non induce aggregazione piastrinica. Dopo stimolazione con TRAP4, le piastrine raggiungono un'aggregazione massima del $35\% \pm 12$ dopo circa 4 minuti che poi raggiunge un plateau, con una slope media pari a 30 ± 13 . In seguito alla preincubazione con LPS e alla successiva stimolazione con TRAP4, le piastrine mostrano un cambiamento di forma più rapido, con una slope media aumentata fino a 40 ± 15 . Inoltre, la percentuale di aggregazione massima raggiunge il $55\% \pm 14$, dimostrando che la preincubazione con LPS potenzia l'aggregazione piastrinica indotta da TRAP4.

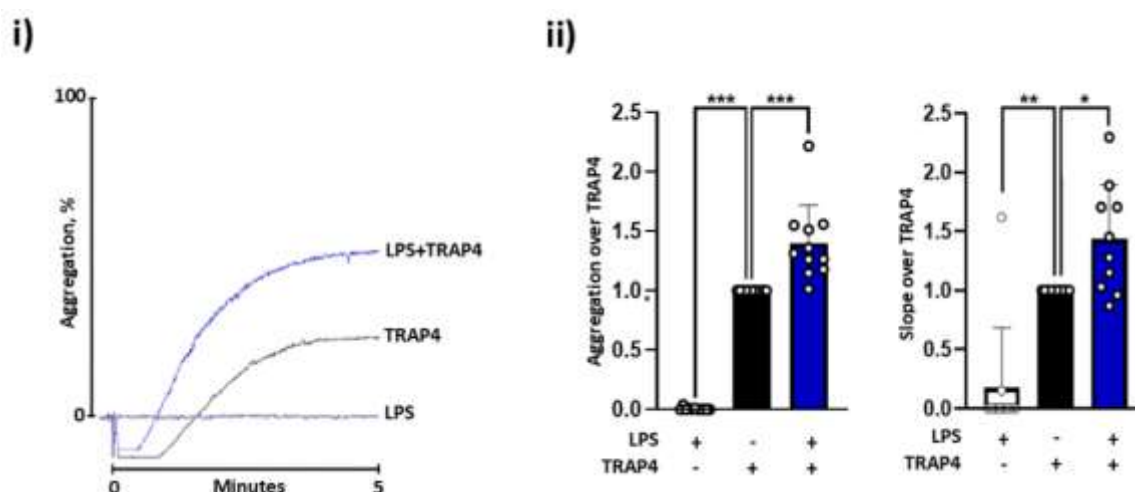


Figura R1. LPS potenzia l'aggregazione piastrinica indotta da TRAP4.

i. Piastrine murine isolate da topi WT ($300 \mu\text{l}$, $3 \times 10^8 \text{ plt/ml}$) sono stimulate con $10 \mu\text{g/ml}$ LPS (LPS) oppure $0,75 \text{ mM}$ TRAP4 (TRAP4) oppure preincubate con LPS e stimulate con TRAP4 (TRAP4+LPS) a 37°C e agitazione costante. L'aggregazione è analizzata per 5 minuti mediante l'utilizzo di un aggregometro collegato al software Aggro/link. Il tracciato mostra un esperimento rappresentativo, in cui sull'asse delle ascisse è riportato il tempo di aggregazione in minuti, mentre sull'asse delle ordinate è riportata la percentuale di aggregazione.

ii. L'istogramma a sinistra riporta la media $\pm$ SD dell'aggregazione dei risultati ottenuti in 11 differenti esperimenti. Nell'istogramma di destra è riportata la media $\pm$ SD di 10 esperimenti riferita alla slope (slope over TRAP4) della curva di aggregazione. L'analisi statistica è effettuata tramite il software GraphPad Prism 10, utilizzando il test non parametrico di Wilcoxon per dati appaiati (Wilcoxon signed-rank test) ponendo come valore critico $p < 0.05$.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

I dati raccolti (ampiezza massima dell'aggregazione a 5 minuti e velocità di aggregazione) sono utilizzati per effettuare l'analisi quantitativa. L'istogramma di sinistra in *figura R1 (ii)* riporta la

media $\pm$ SD dell'aggregazione ottenuta in 11 esperimenti indipendenti. Sull'asse delle ordinate è riportato il livello di aggregazione, riferito al campione stimolato con TRAP4 in ciascun esperimento. Siccome la stessa dose di TRAP4 può indurre livelli massimali di aggregazione variabili tra esperimenti indipendenti, a causa sia di differenze nella funzionalità del recettore PAR4 (Li et al., 2021), che a variazioni delle condizioni sperimentali, come agonisti, temperatura, prelievo e preparazione dei campioni, abbiamo deciso di porre uguale a 1 la massima aggregazione ottenuta con la stimolazione delle piastrine WT con 0,75 mM TRAP4 a 5 minuti e di valutare l'effetto di LPS rispetto al corrispondente controllo TRAP4 in ciascun esperimento.

Come si può osservare dall'istogramma, la preincubazione con LPS aumenta in modo significativo l'aggregazione piastrinica indotta da TRAP4. Inoltre, l'aggregazione osservata nel campione stimolato con TRAP4 risulta significativamente superiore rispetto a quella del campione trattato con solo LPS, confermando che LPS non agisce come agonista piastrinico classico, ma come segnale di priming in grado di potenziare l'attivazione e l'aggregazione in seguito a stimolazione con agonisti tradizionali (Vallance et al., 2017).

L'istogramma di destra mostra la media $\pm$ SD di 10 esperimenti indipendenti. Anche in questo caso, per i motivi descritti precedentemente, la pendenza nel campione stimolato con TRAP4 è posta uguale a 1. Come riportato nell'istogramma, la preincubazione con LPS promuove una più rapida aggregazione piastrinica rispetto alla sola stimolazione con TRAP4 e tale differenza risulta statisticamente significativa.

Questi risultati dimostrano che LPS potenzia l'aggregazione piastrinica indotta da TRAP4. I nostri risultati sono in accordo con lo studio di Lopes e collaboratori, che hanno dimostrato che LPS aumenta l'aggregazione piastrinica nelle piastrine stimulate con l'analogo stabile del TxA₂, U46619, collagene e ADP (Lopes et al., 2017).

Analisi delle vie di segnalazione

Per valutare come LPS influenzi l'attivazione piastrinica indotta da TRAP4, abbiamo analizzato la fosforilazione di proteine coinvolte nelle principali vie di trasduzione del segnale associate all'attivazione piastrinica, tra cui PKC, Pyk2, PI3K/Akt e MAPK.

Una delle principali vie di segnalazione attivate a valle dei recettori PAR coinvolge la PLC, che promuove l'attivazione della PKC e l'aumento della concentrazione intracellulare di Ca²⁺. La PKC è una serin/treonin chinasi che fosforila numerosi substrati, tra cui la plecstrina, e svolge un ruolo centrale nell'attivazione piastrinica, favorendo il riarrangiamento del citoscheletro, la secrezione dei granuli e la stabilizzazione dell'adesione piastrinica nel sito di lesione vascolare (Vilahrut et

al., 2018). Inoltre, contribuisce all'attivazione della cPLA2, che promuove il rilascio di acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana e la conseguente sintesi di TxA2, un potente mediatore dell'attivazione e dell'aggregazione piastrinica (Khan e Ilies, 2023).

Un'altra via di segnalazione attivata a valle dei recettori PAR è quella di Pyk2, che svolge un ruolo chiave nell'emostasi e nella trombosi (Canobbio et al., 2013). L'attivazione di Pyk2 avviene mediante autofosforilazione sul residuo Y402, che consente il legame delle SFK e la fosforilazione dei residui Y579-Y580 nel dominio chinasi e Y881 nel dominio FAT, determinando la completa attivazione della proteina (Guidetti et al., 2019).

Tra le vie attivate a valle di Pyk2 vi è quella di PI3K/Akt/GSK3. PI3K è una famiglia di enzimi in grado di fosforilare i fosfoinositidi in posizione 3 dell'anello dell'inositolo. Uno dei principali effettori di questa via è Akt, che viene reclutata alla membrana plasmatica e attivata mediante fosforilazione dei residui T308 e S473. Una volta attivata, Akt fosforila numerosi substrati coinvolti nella regolazione della sopravvivenza, della crescita, della migrazione e del metabolismo cellulare, anche attraverso l'inibizione di GSK3 (Guidetti et al., 2019).

Un'ulteriore via di segnalazione coinvolta nell'attivazione piastrinica a valle di Pyk2 è quella delle MAPK. Le MAPK sono una famiglia di chinasi coinvolte nella regolazione di diversi processi cellulari, tra cui proliferazione, differenziamento e sopravvivenza cellulare. Nelle piastrine, ERK1/2 viene attivata a valle di recettori di superficie, inclusi GPCR e integrine, e svolge un ruolo importante nell'aggregazione piastrinica, nei cambiamenti morfologici e nella retrazione del coagulo (Faria et al., 2021).

Per valutare se queste proteine di segnalazione fossero coinvolte nella segnalazione promossa da LPS e TRAP4 abbiamo utilizzato piastrine murine, isolate da topi WT secondo le *tecniche 1 e 2*, alla concentrazione di 5×10^8 piastrine/ml. Le piastrine sono state preincubate con 10 µg/ml di LPS per 10 minuti a 37 °C e quindi stimulate con 0,75 mM TRAP4 per 5 minuti. Un campione non stimolato è utilizzato come controllo basale.

Al termine della stimolazione, la reazione è bloccata mediante aggiunta di dissociante per elettroforesi SDS 3XR contenente il 3% di β-mercaptoetanololo, come descritto nella *tecnica 4*. Le proteine sono state successivamente separate mediante SDS-PAGE (*tecnica 5*), trasferite su membrana PVDF (*tecnica 6*) e analizzate mediante immunoblotting utilizzando anticorpi specifici diretti contro le forme fosforilate delle proteine di interesse, come descritto qui di seguito.

Fosforilazione dei substrati di PKC

L'attivazione di PKC è stata analizzata utilizzando un anticorpo che riconosce i substrati fosforilati della PKC, diretto in modo specifico contro motivi contenenti una serina fosforilata all'interno di

una sequenza consenso caratterizzata dalla presenza di residui basici in posizione -2 e +2 e di un residuo idrofobico in posizione +1. Il controllo di uguale caricamento è stato effettuato utilizzando un anticorpo diretto contro la pleckstrina (47 kDa), principale substrato della PKC nelle piastrine.

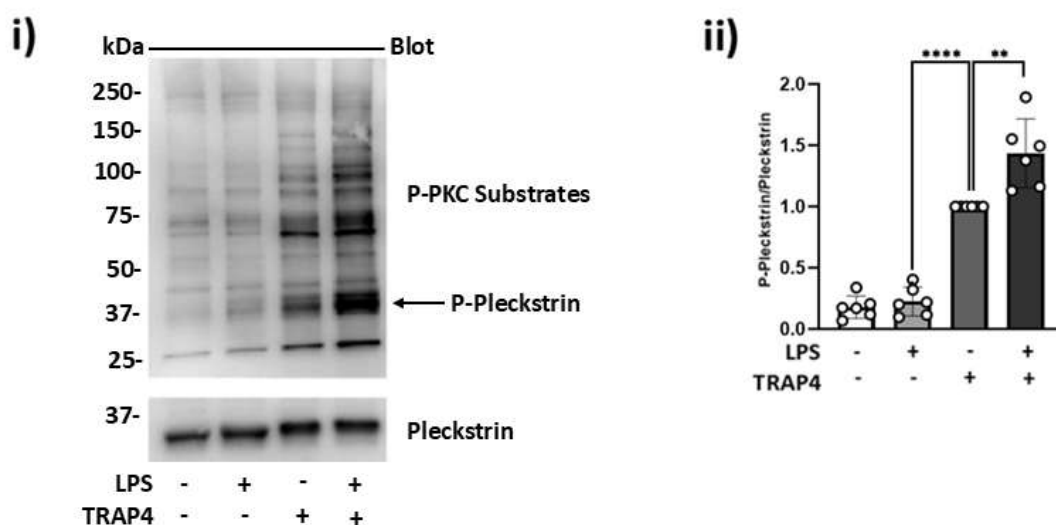


Figura R2. Analisi della fosforilazione dei substrati di PKC.

Piastrine murine WT (100 μ l; 5×10^8 plt/ml) sono preincubate con 10 μ g/ml LPS per 10 minuti a 37°C, stimulate con 0,75 mM TRAP4 per 5 minuti a 37°C, oppure solo con LPS o solo con TRAP4. Un campione non stimolato è utilizzato come controllo basale. La reazione è bloccata con dissociante per elettroforesi SDS 3XR + 3% β -mercaptoetanolo.

i) 20 μ l di piastrine dissociate sono caricate su gel di poliaccrilamide al 5-15%, trasferite su PVDF e analizzate tramite immunoblotting con l'anticorpo anti-fosfo-PKC substrates e anti-Pleckstrin.

ii) Gli istogrammi mostrano la media $\pm$ SD di 6 esperimenti. Il campione stimolato con TRAP4 è posto uguale a 1 in ciascun esperimento. L'analisi statistica è effettuata tramite software GraphPad Prism 10 utilizzando il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli, ponendo come valore critico $p < 0.05$.

** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

Come riportato in figura R2 (i), l'intensità delle bande del campione basale è bassa e comparabile a quella del campione stimolato con LPS, indicando che LPS da solo non induce la fosforilazione dei substrati di PKC. La stimolazione con TRAP4 induce un aumento del numero e dell'intensità delle bande riconosciute dall'anticorpo anti-substrati fosforilati di PKC, con una banda molto intensa all'altezza di 47 kDa, peso molecolare atteso della pleckstrina. La preincubazione con LPS seguita dalla stimolazione con TRAP4 determina un ulteriore aumento della fosforilazione di diversi substrati della PKC, tra cui la pleckstrina a 47 kDa.

Il pannello inferiore mostra la colorazione con l'anticorpo anti-pleckstrina, utilizzato come controllo di uguale caricamento. L'intensità delle bande è uniforme in tutti i campioni, indicando un uguale caricamento delle proteine nei diversi pozzetti.

L'intensità della banda corrispondente alla pleckstrina fosforilata (P-Pleckstrin) è quantificata tramite il software Quantity One e normalizzata su pleckstrina. Per ciascun esperimento l'intensità della banda del campione stimolato con TRAP4 è posta uguale a 1.

L'istogramma riportato in figura R2 (ii) mostra la media $\pm$ SD di 6 esperimenti indipendenti. Sull'asse delle ordinate è riportato il livello di fosforilazione. L'analisi statistica è effettuata mediante il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli.

La preincubazione con solo LPS non promuove la fosforilazione di plecstrina e i livelli risultano comparabili a quelli del campione basale, mentre la stimolazione con TRAP4 induce una significativa fosforilazione di plecstrina, che risulta ulteriormente aumentata in seguito a preincubazione con LPS.

Questi risultati indicano che LPS non attiva direttamente la PKC, ma potenzia significativamente la fosforilazione dei suoi substrati indotta da TRAP4.

Fosforilazione di Pyk2

Per valutare se LPS fosse in grado di promuovere l'attivazione di Pyk2 o di modularne l'attivazione in risposta alla stimolazione con TRAP4, è stata analizzata la fosforilazione dei residui Y402 e Y579-Y580 in piastrine stimulate con TRAP4 in presenza o assenza di LPS.

La membrana PVDF è colorata con gli anticorpi anti-fosfo-Pyk2 (Y402), anti-fosfo-Pyk2 (Y579-580) e anti-Pyk2.

Come riportato in figura R3 (i), l'anticorpo diretto contro i residui Y579-Y580 riconosce una banda all'altezza di 110 kDa, che corrisponde al peso molecolare atteso di Pyk2. L'intensità della banda del campione basale è comparabile a quella del campione stimolato con LPS, indicando che LPS da solo non induce la fosforilazione di Pyk2. La stimolazione con TRAP4 determina un aumento della fosforilazione di Pyk2 e la preincubazione con LPS seguita dalla stimolazione con TRAP4 induce un ulteriore aumento dell'intensità della banda. Un potenziamento analogo si osserva anche con l'anticorpo diretto contro il residuo Y402, che riconosce una banda all'altezza attesa di 110 kDa.

Il pannello inferiore mostra la colorazione con l'anticorpo anti-Pyk2, l'intensità delle bande è uniforme in tutti i campioni, indicando un uguale caricamento delle proteine nei diversi pozzetti. La preincubazione con solo LPS non induce la fosforilazione di Pyk2 né sui residui Y579-Y580, né sul residuo Y402, e i livelli risultano comparabili a quelli del campione basale. La stimolazione con TRAP4 promuove una significativa fosforilazione di entrambi i siti, mentre la preincubazione con LPS seguita dalla stimolazione con TRAP4 determina un ulteriore incremento significativo della fosforilazione.

È stata quindi effettuata l'analisi quantitativa, misurando l'intensità di ciascuna banda tramite il software Quantity One. Per ciascun esperimento l'intensità della banda del campione stimolato con TRAP4 è posta uguale a 1 e i risultati sono mostrati negli istogrammi di figura R3 (ii) che riportano la media $\pm$ SD di 10-11 esperimenti indipendenti. Sull'asse delle ordinate è riportato il

livello di fosforilazione rispetto alla quantità di proteina totale. L'analisi statistica effettuata mediante il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli conferma l'effetto di potenziamento indotto da LPS.

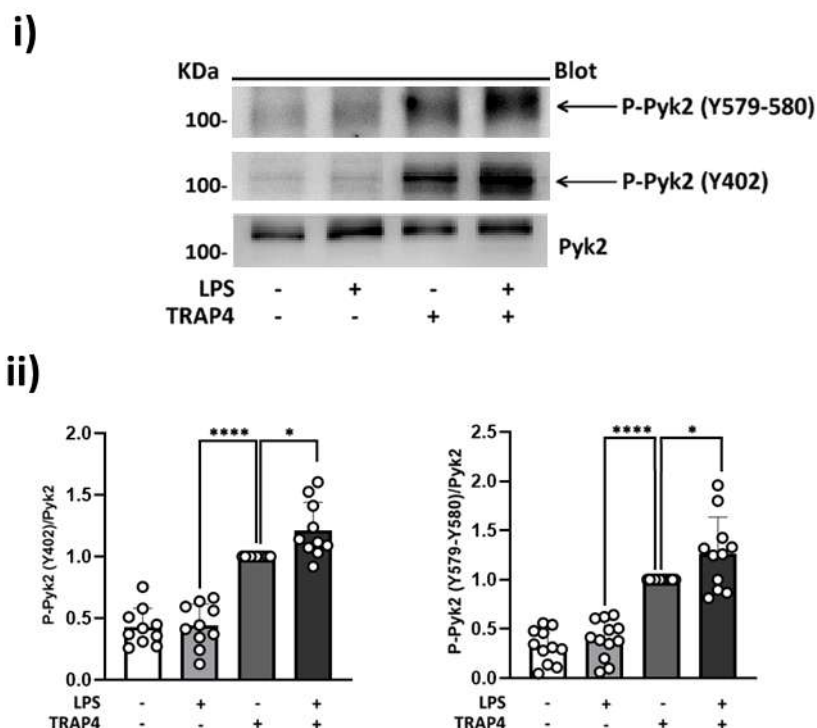


Figura R3. Analisi della fosforilazione di Pyk2.

Piastrine murine WT (100 μ l; 5×10^8 plt/ml) sono preincubate con 10 μ g/ml LPS per 10 minuti a 37°C, stimulate con 0,75 mM TRAP4 per 5 minuti a 37°C, oppure solo con LPS o solo con TRAP4. Un campione non stimolato è stato utilizzato come controllo basale. La reazione è bloccata con dissociante per elettroforesi SDS 3XR + 3% β -mercaptoetanolo.

i) 20 μ l di piastrine dissociate sono caricate su gel di poliacrilamide al 10%, trasferite su membrana PVDF e analizzate tramite immunoblotting con l'anticorpo anti-fosfo-Pyk2 (Y579-Y580), anti-fosfo-Pyk2 (Y402) e anti-Pyk2.

ii) Gli istogrammi mostrano la media $\pm$ SD di 10-11 esperimenti. Il campione stimolato con TRAP4 è posto uguale a 1 in ciascun esperimento. L'analisi statistica è effettuata tramite software GraphPad Prism 10 utilizzando il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli, ponendo come valore critico $p < 0.05$.

* $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$.

Questi risultati dimostrano che LPS potenzia significativamente la fosforilazione di Pyk2 indotta da TRAP4, suggerendo un coinvolgimento di questa chinasi nei meccanismi attraverso cui LPS amplifica l'attivazione piastrinica.

Fosforilazione di proteine delle vie di segnalazione PI3K e MAPK

Per approfondire i meccanismi attraverso cui LPS modula le vie di segnalazione intracellulari attivate da TRAP4, è stata analizzata l'attivazione delle vie PI3K e MAPK, valutando rispettivamente la fosforilazione di Akt e di ERK1/2.

Come riportato in *figura R4 (i)*, la membrana di PVDF è colorata con l'anticorpo anti-fosfo-Akt che riconosce il residuo fosforilato S473, l'anticorpo anti-fosfo-ERK1/2 che riconosce i residui fosforilati T202 e Y204 e con l'anticorpo anti-tubulina.

L'anticorpo diretto contro il residuo S473 di Akt riconosce una banda di circa 60 kDa che corrisponde al peso molecolare atteso della proteina. L'intensità della banda osservata nel campione basale è comparabile a quella del campione stimolato con LPS, indicando che LPS da solo non induce la fosforilazione di Akt. La stimolazione con TRAP4 determina un aumento nella fosforilazione di Akt, mentre la preincubazione con LPS seguita dalla stimolazione con TRAP4 determina un ulteriore aumento della fosforilazione della proteina.

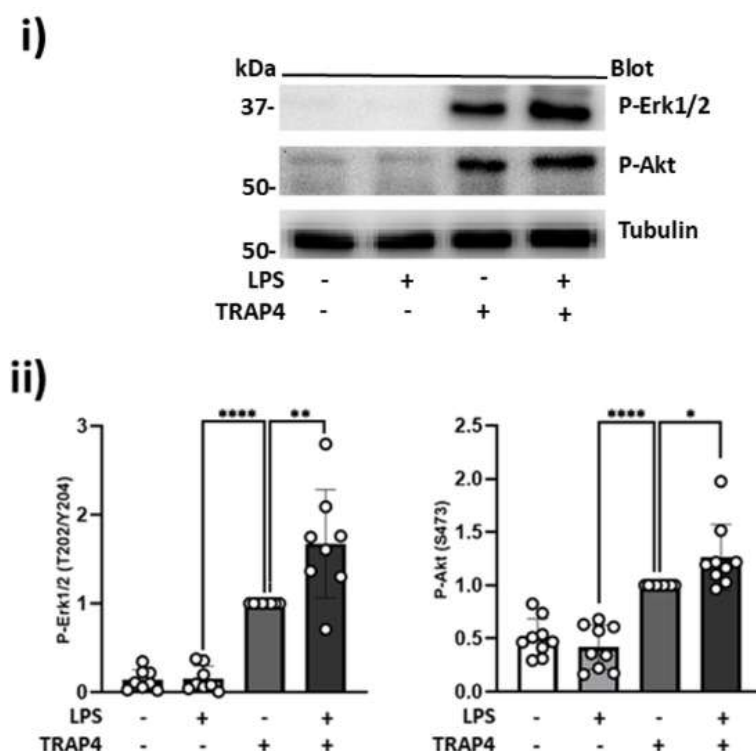


Figura R4. Analisi della fosforilazione di Akt ed ERK1/2.

Piastrine murine WT (100 μ l; 5×10^8 plt/ml) sono preincubate con 10 μ g/ml LPS per 10 minuti a 37°C e stimulate con 0,75 mM TRAP4 per 5 minuti a 37°C oppure solo con LPS o solo con TRAP4. Un campione non stimolato è utilizzato come controllo basale.

i) 20 μ l di piastrine dissociate con dissociante per elettroforesi SDS 3XR + 3% β -mercaptoetanolo sono caricate su gel di poliacrilamide al 10%, trasferite su PVDF e analizzate tramite immunoblotting con l'anticorpo anti-fosfo-Akt (S473), anti-fosfo-ERK1/2 (T202/Y204) e anti-Tubulin.

ii) Gli istogrammi mostrano la media $\pm$ SD di 8-9 esperimenti. Il campione stimolato con TRAP4 è posto uguale a 1 in ciascun esperimento. L'analisi statistica è effettuata tramite software GraphPad Prism 10 utilizzando il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli, ponendo come valore critico $p < 0.05$.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

Un andamento analogo si osserva per ERK1/2. L'anticorpo diretto contro i residui T202/Y204 di ERK1/2 riconosce due bande di circa 42 e 44 kDa, corrispondenti alle forme fosforilate di ERK1 ed ERK2. La stimolazione con TRAP4 induce un aumento della fosforilazione di ERK1/2, che risulta ulteriormente potenziata dalla preincubazione con LPS.

La tubulina, proteina costitutivamente espressa nelle cellule eucariotiche e con peso molecolare di circa 55 kDa (Janke e Magiera, 2020), è stata utilizzata come controllo di uguale caricamento. L'intensità uniforme delle bande nei diversi campioni conferma un uguale caricamento proteico nei vari pozzetti.

Gli istogrammi in *figura R4 (ii)* mostrano la media $\pm$ SD di 8-9 esperimenti indipendenti. Sull'asse delle ordinate è riportato il livello di fosforilazione. L'analisi statistica è stata effettuata mediante one-way ANOVA seguita dal test post hoc di Tukey. I dati quantitativi confermano i risultati osservati in *figura R4 (i)*.

Da questi risultati emerge che LPS potenzia significativamente la fosforilazione di Akt ed ERK1/2 indotta da TRAP4, suggerendo un effetto modulatore sulle vie di segnalazione PI3K/Akt e MAPK.

Il potenziamento promosso da LPS in piastrine stimulate con TRAP4 coinvolge il recettore di LPS, TLR4

Analisi dell'aggregazione

Il TLR4 è un recettore piastrinico ampiamente studiato, in quanto riconosce LPS dei batteri Gram-negativi, come *E. coli*. L'attivazione di TLR4 da parte di LPS induce segnali intracellulari in grado di modulare la risposta piastrinica (Lu et al., 2008).

Per valutare se il potenziamento dell'aggregazione piastrinica indotto da LPS dipendesse dal coinvolgimento di TLR4, è stato utilizzato TAK-242 (resatorvid), un inibitore selettivo della segnalazione di TLR4. TAK-242 si lega al residuo C747 del dominio intracellulare di TLR4, interrompendo l'interazione con le proteine adattatrici TIRAP e TRAM e inibendo la trasduzione del segnale a valle del recettore (Matsunaga et al., 2011).

Per gli esperimenti sono utilizzate piastrine isolate da topi WT (*tecniche 1 e 2*), alla concentrazione di 3×10^8 piastrine/ml. Una parte delle piastrine viene preincubata con 1 μ M TAK-242 per 30 minuti a 37 °C e una parte con il solo tampone. Al termine della preincubazione, campioni da 300 μ l di piastrine vengono stimolati con 0,75 mM TRAP4 in presenza o meno di 10 μ g/ml LPS e l'aggregazione è analizzata tramite aggregometro di Born (*tecnica 3*).

Il risultato ottenuto è mostrato in *figura R5*, dove è presentato un tracciato di aggregazione rappresentativo di 5 esperimenti indipendenti.

In linea con i risultati riportati in *figura R1*, la preincubazione con LPS potenzia l'aggregazione indotta da TRAP4 (TRAP4 $30\% \pm 8$; LPS+TRAP4 $60\% \pm 13$). La preincubazione con TAK-242, che blocca il legame di LPS con il suo recettore, inibisce completamente il potenziamento dell'aggregazione indotto da TRAP4 in presenza di LPS. In queste condizioni, le piastrine raggiungono un'aggregazione massima del $28\% \pm 8$. Al contrario, TAK-242 non modifica l'aggregazione indotta dal solo TRAP4, che risulta pari al $28\% \pm 7$.

Per quanto riguarda la rapidità dell'aggregazione, misurata come pendenza della curva (slope), nelle piastrine preincubate con TAK-242 e successivamente stimulate con TRAP4 essa diminuisce a 20 ± 7 SD, mentre nelle piastrine preincubate con TAK-242, trattate con LPS e successivamente stimulate con TRAP4 diminuisce a 30 ± 16 . Le differenze nella pendenza della curva, tuttavia, non sono statisticamente significative.

I risultati sono confermati dall'analisi quantitativa. Gli istogrammi in *figura R5 (ii)* si riferiscono alla media $\pm$ SD dell'aggregazione e della slope di 5 esperimenti indipendenti. Come detto in precedenza, per uniformare i risultati ottenuti in diversi esperimenti, l'aggregazione e la slope in piastrine stimulate con TRAP4 è stata posta arbitrariamente uguale a 1.

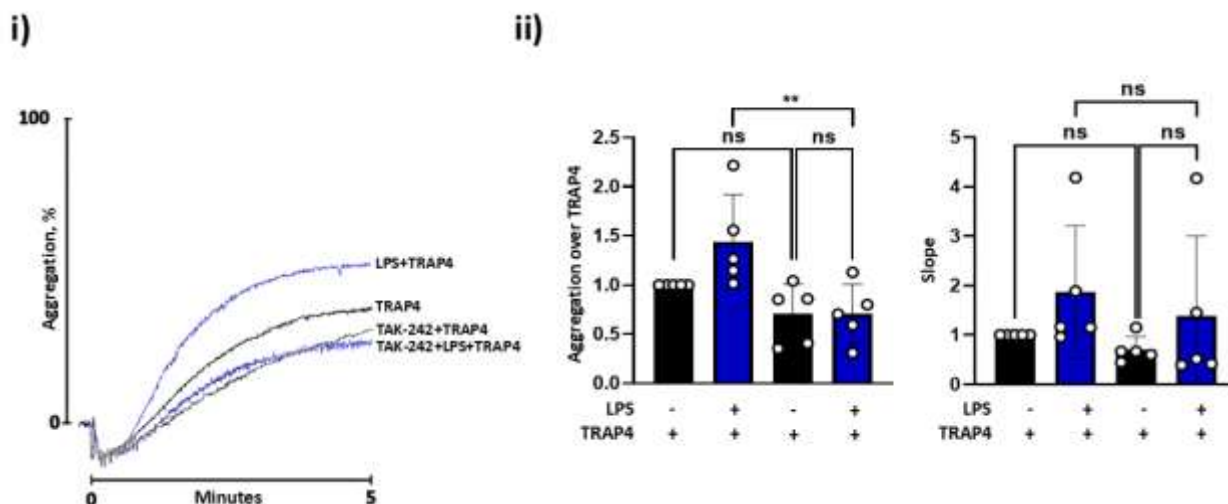


Figura R5. Analisi dell'inibizione di TLR4 sul potenziamento dell'aggregazione piastrinica indotto dal LPS.

i. Piastrine murine isolate da topi WT ($300 \mu\text{l}$, $3 \times 10^8 \text{ plt/ml}$) sono preincubate con $1 \mu\text{M}$ TAK-242 per 30 minuti e successivamente stimulate con $0,75 \text{ mM}$ TRAP4 per 5 minuti a 37°C sotto agitazione costante, in assenza (tracciato nero) o presenza di $10 \mu\text{g/ml}$ LPS (tracciato blu). Lo stesso protocollo è applicato a campioni non trattati con TAK-242. L'aggregazione è analizzata per 5 minuti a 37°C mediante l'utilizzo di aggregometro collegato al software Aggro/link. Il grafico mostra sull'asse delle ascisse il tempo di aggregazione in minuti e sull'asse delle ordinate la percentuale di aggregazione.

ii. L'istogramma di sinistra riporta la media $\pm$ SD dei risultati ottenuti in 5 differenti esperimenti. L'aggregazione con TRAP4 è posta uguale a 1 in ciascun esperimento e gli altri valori sono espressi rispetto al relativo controllo (aggregation over TRAP4). Nell'istogramma di destra istogramma è riportata la media $\pm$ SD di 5 esperimenti riferita alla slope (slope over TRAP4) della curva di aggregazione, con le stesse modalità. L'analisi statistica è effettuata tramite il software GraphPad Prism 10 utilizzando il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli, ponendo come valore critico $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che il potenziamento dell'aggregazione piastrinica promosso da LPS in piastrine stimulate con TRAP4 dipende dal legame di LPS con il suo recettore TLR4.

Analisi delle vie di segnalazione

Fosforilazione dei substrati di PKC

Poiché i risultati precedenti hanno mostrato che LPS potenzia la fosforilazione dei substrati di PKC in risposta a TRAP4 (Figura R2), abbiamo valutato se l'inibizione di TLR4 influenzasse l'attivazione di questa chinasi, analizzando la fosforilazione dei suoi substrati mediante immunoblotting.

A tale scopo, piastrine isolate da topi WT alla concentrazione di 5×10^8 piastrine/ml sono preincubate o meno con $1 \mu\text{M}$ TAK-242 a 37°C , e successivamente stimulate con $0,75 \text{ mM}$

TRAP4 per 5 minuti, previa preincubazione o meno con 10 µg/ml LPS per 10 minuti. I campioni sono analizzati in immunoblotting con gli anticorpi anti-fosfo-substrati della PKC e anti-plecstrina. Come riportato in *figura R6 (i)*, l'intensità della banda del campione basale è comparabile a quella del campione stimolato con LPS, sia nei campioni preincubati con TAK-242 che in quelli non trattati, confermando che LPS da solo non induce la fosforilazione dei substrati di PKC. La stimolazione con TRAP4 determina un aumento della fosforilazione che viene ulteriormente potenziato dalla preincubazione con LPS. Tale effetto di potenziamento non è più osservabile nei campioni trattati con l'inibitore di TLR4 TAK-242.

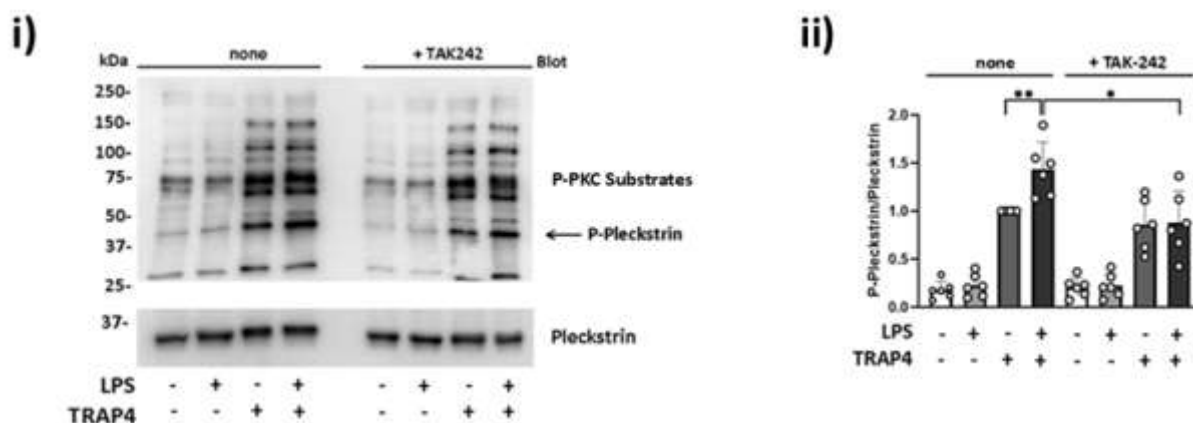


Figura R6. Analisi della fosforilazione dei substrati di PKC.

Piastrine murine WT (100 µl; 5×10^8 plt/ml) sono preincubate con TAK-242 1 µM per 30 minuti e successivamente stimolate con TRAP4 0,75 mM per 5 minuti a 37°C, con 10 µg/ml LPS per 10 minuti a 37°C oppure con una combinazione dei due. Un campione non stimolato è utilizzato come controllo basale. Lo stesso protocollo è applicato a campioni non trattati con TAK-242. La reazione è poi bloccata con dissociante per elettroforesi SDS 3XR + 3% β-mercaptoetanolo.

i) 20 µl di piastrine dissociate sono caricate su gel di poliacrilamide al 5-15%, trasferite su PVDF e analizzate tramite immunoblotting con l'anticorpo anti-fosfo-PKC substrates e anti-Pleckstrin.

ii) Gli istogrammi mostrano la media ± SD di 6 esperimenti. Il campione stimolato con TRAP4 è posto uguale a 1 in ciascun esperimento. L'analisi statistica è effettuata tramite software GraphPad Prism 10 utilizzando il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli, ponendo come valore critico $p < 0.05$.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Il pannello inferiore mostra la colorazione con l'anticorpo anti-plecstrina, utilizzato come controllo di uguale caricamento. L'intensità delle bande è uniforme in tutti i campioni, indicando un uguale caricamento delle proteine nei diversi pozzetti.

L'intensità della banda corrispondente alla P-Pleckstrin è quantificata tramite il software Quantity One, normalizzata su Pleckstrin e per ciascun esperimento l'intensità della banda del campione stimolato TRAP4 non trattato con TAK-242 è posta uguale a 1.

L'istogramma riportato in *figura R6 (ii)* mostra la media ± SD di 6 esperimenti indipendenti. Sull'asse delle ordinate è riportato il livello di fosforilazione.

Il potenziamento della fosforilazione della plecstrina non si osserva nei campioni trattati con TAK-242, nei quali la fosforilazione risulta significativamente ridotta rispetto alle piastrine preincubate

con LPS e successivamente stimulate con TRAP4 in assenza dell'inibitore, mentre non modifica la fosforilazione indotta da TRAP4.

Questi risultati dimostrano che il potenziamento della fosforilazione dei substrati di PKC da parte di LPS dipende dal suo legame a TLR4.

Fosforilazione di Pyk2

Alla luce dei risultati riportati in *figura R3*, per verificare se il potenziamento della fosforilazione di Pyk2 indotto da LPS dipendesse dal suo legame a TLR4, è stata analizzata la fosforilazione di Pyk2 sui residui Y402 e Y579-Y580 in presenza di TAK-242.

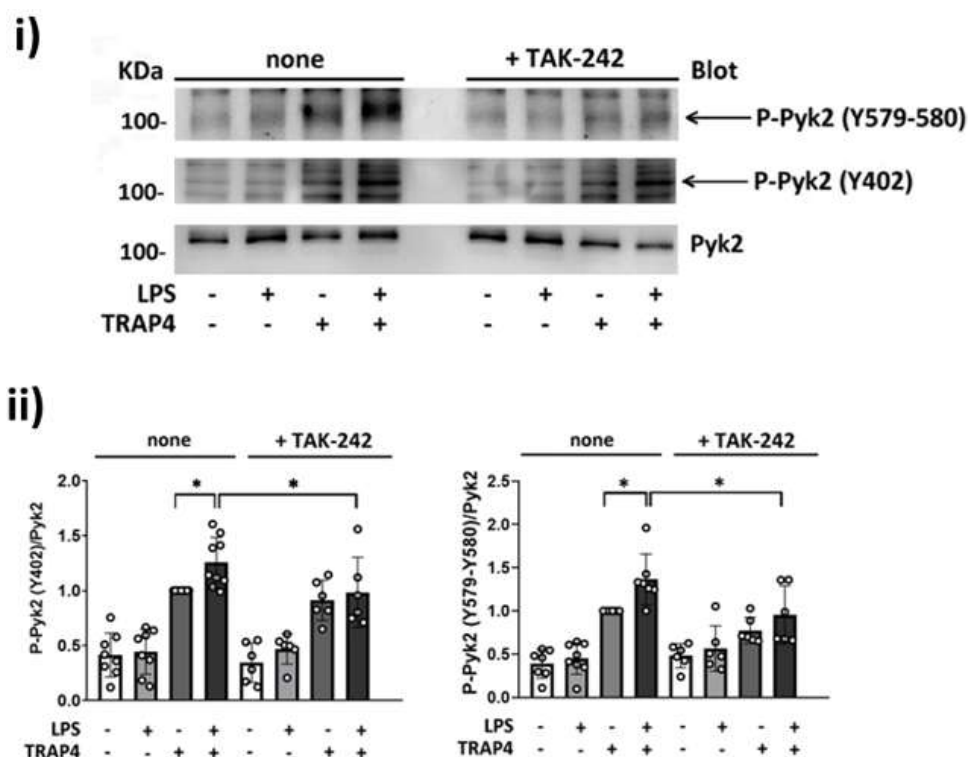


Figura R7. Analisi della fosforilazione di Pyk2.

Piastrine murine WT (100 μ l; 5×10^8 plt/ml) sono preincubate con TAK-242 1 μ M e successivamente stimulate con 0,75 mM TRAP4 per 5 minuti a 37°C, con 10 μ g/ml LPS per 10 minuti a 37°C oppure con una combinazione dei due trattamenti. Un campione non stimolato è utilizzato come controllo basale. Lo stesso protocollo è applicato a campioni non trattati con TAK-242. La reazione è bloccata con dissociante per elettroforesi SDS 3XR + 3% β -mercaptoetanolo.

i) 20 μ l di piastrine dissociate sono caricate su gel di poliacrilamide al 10%, trasferite su membrana PVDF e analizzate tramite immunoblotting con l'anticorpo anti-fosfo-Pyk2 (Y579-Y580), anti-fosfo-Pyk2 (Y402) e anti-Pyk2.

ii) Gli istogrammi mostrano la media $\pm$ SD di 6-9 esperimenti. Il campione stimolato con TRAP4 è posto uguale a 1 in ciascun esperimento. L'analisi statistica è effettuata tramite software GraphPad Prism 10 utilizzando il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli, ponendo come valore critico $p < 0.05$.

* $p < 0.05$.

Come riportato in *figura R7 (i)*, l'intensità della banda del campione basale è comparabile a quella del campione stimolato con LPS, sia nei campioni preincubati con TAK-242 che in quelli non trattati, indicando che LPS da solo non induce la fosforilazione di Pyk2. La stimolazione con TRAP4 determina un aumento della fosforilazione di Pyk2 sia sui residui Y579-Y580, che sul residuo Y402 e la preincubazione con LPS seguita dalla stimolazione con TRAP4 induce un ulteriore aumento dell'intensità della banda, in linea con i risultati riportati in *figura R3*.

In seguito al trattamento con TAK-242, il potenziamento della fosforilazione di Pyk2 indotto dalla preincubazione con LPS e dalla successiva stimolazione con TRAP4 non è più osservabile.

Il pannello inferiore mostra la colorazione con l'anticorpo anti-Pyk2, utilizzato come controllo di uguale caricamento.

Queste osservazioni sono confermate dall'analisi quantitativa. L'intensità di ciascuna banda è quantificata tramite il software Quantity One, normalizzata su Pyk2 e per ciascun esperimento l'intensità della banda del campione stimolato TRAP4 non trattato con TAK-242 è posta uguale a 1.

Da questi risultati emerge che LPS potenzia significativamente la fosforilazione di Pyk2 indotta da TRAP4 e che tale effetto dipende dal legame di LPS con il suo recettore TLR4.

Fosforilazione di proteine delle vie di segnalazione PI3K e MAPK

Alla luce dei risultati precedenti (*figura R4*) e per valutare il coinvolgimento di TLR4 nella modulazione delle vie di segnalazione PI3K e MAPK da parte di LPS, è stata analizzata la fosforilazione di Akt ed ERK1/2 in presenza dell'inibitore TAK-242.

Come riportato in *figura R8 (i)*, la membrana di PVDF è stata colorata con l'anticorpo anti-fosfo-Akt (S473), l'anticorpo anti-fosfo-ERK1/2 (T202/Y204) e con l'anticorpo anti-tubulina.

Per entrambe le proteine, l'effetto di potenziamento della fosforilazione di Akt ed ERK1/2 indotto da LPS non è più osservabile nei campioni trattati con TAK-242, nei quali LPS non è più in grado di aumentare la fosforilazione indotta da TRAP4. Il risultato è confermato dall'analisi quantitativa come riportato nell'istogramma di *figura R8 (ii)*, in cui si osserva una tendenza alla riduzione anche se in alcuni casi le differenze non sono statisticamente significative.

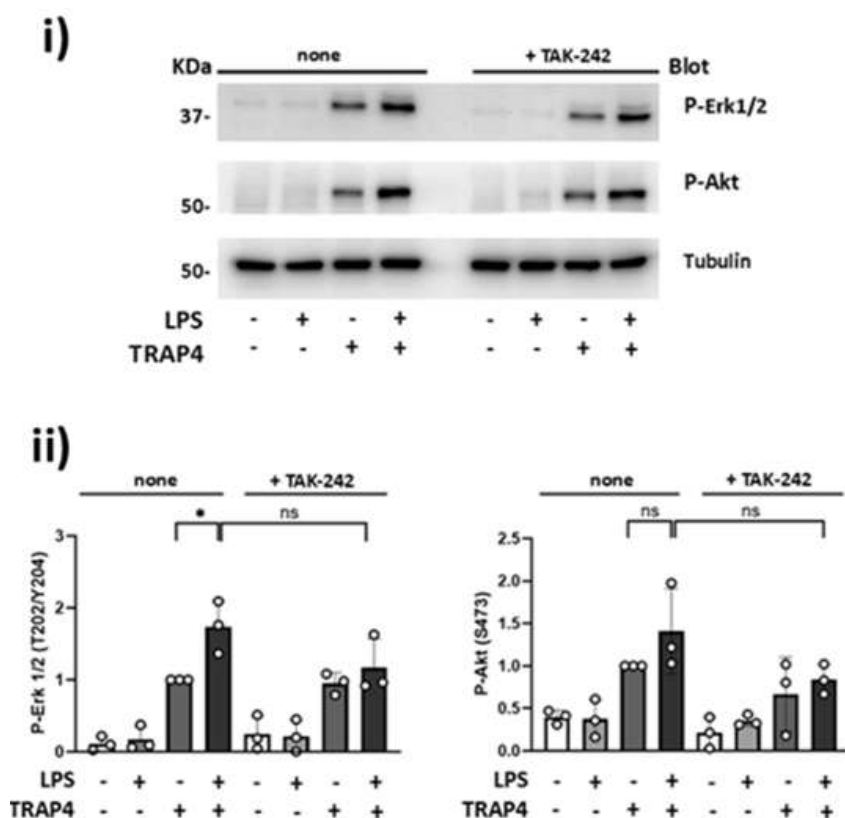


Figura R8. Analisi della fosforilazione di Akt ed ERK1/2.

Piastrine murine WT (100 μ l; 5×10^8 plt/ml) sono preincubate con TAK-242 1 μ M e successivamente stimulate con 0,75 mM TRAP4 per 5 minuti a 37°C, con 10 μ g/ml LPS per 10 minuti a 37°C oppure con una combinazione dei due. Un campione non stimolato è utilizzato come controllo basale. Lo stesso protocollo è applicato a campioni non trattati con TAK-242. La reazione è poi bloccata con dissociante per elettroforesi SDS 3XR + 3% β -mercaptoetanolo.

i) 20 μ l di piastrine dissociate sono caricate su gel di poliacrilamide al 10%, trasferite su PVDF e analizzate tramite immunoblotting con l'anticorpo anti-fosfo-Akt (S473), anti-fosfo-ERK1/2 (T202/Y204) e anti-Tubulin.

ii) Gli istogrammi mostrano la media $\pm$ SD di 3 esperimenti. Il campione stimolato con TRAP4 è posto uguale a 1 in ciascun esperimento. L'analisi statistica è effettuata tramite software GraphPad Prism 10 utilizzando il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli, ponendo come valore critico $p < 0.05$.

* $p < 0.05$.

Il potenziamento promosso da LPS in piastrine stimulate con TRAP4 coinvolge l'attivazione di PKC

Analisi dell'aggregazione

Poiché i risultati precedenti hanno mostrato che LPS aumenta la fosforilazione dei substrati della PKC in risposta alla stimolazione con TRAP4 (*figura R2*), abbiamo valutato se il potenziamento dell'aggregazione piastrinica indotto da LPS dipendesse dall'attività di questa chinasi. A tale scopo è stato utilizzato Ro 31-8220, un inibitore della PKC appartenente alla classe dei bisindolilmaleimidi, che agisce competendo con l'ATP per il sito catalitico della chinasi e ne blocca l'attività enzimatica (Mayati et al., 2015).

Per gli esperimenti sono utilizzate piastrine isolate da topi WT (*tecniche 1 e 2*), alla concentrazione di 3×10^8 piastrine/ml. Una parte delle piastrine viene preincubata con 10 μ M Ro 31-8220 per 30 minuti a 37 °C e una parte con il solo tampone. Al termine della preincubazione, campioni da 300 μ l di piastrine vengono stimolati con 0,75 mM TRAP4 in presenza o meno di 10 μ g/ml LPS e l'aggregazione è analizzata tramite aggregometro di Born (*tecnica 3*).

Il risultato ottenuto è mostrato in *figura R9 (i)*, dove è riportato un tracciato di aggregazione rappresentativo di 3 esperimenti indipendenti.

In linea con i risultati riportati nelle *figure R1 e R5*, la preincubazione con LPS seguita dalla stimolazione con TRAP4 conferma l'effetto di potenziamento osservato, evidenziato dall'aumento sia dell'ampiezza che della velocità dell'aggregazione.

La preincubazione con Ro 31-8220 abolisce il potenziamento dell'aggregazione indotto da LPS, riportando i livelli di aggregazione a valori comparabili a quelli osservati nel campione stimolato con solo TRAP4. Al contrario, l'inibizione della PKC non modifica in modo evidente l'aggregazione indotta da TRAP4.

Per quanto riguarda la slope, nelle piastrine preincubate con Ro 31-8220 e successivamente stimulate con TRAP4 essa diminuisce, indicando che, sebbene la percentuale di aggregazione rimanga invariata, la cinetica dell'aggregazione viene rallentata. Nelle piastrine preincubate con Ro 31-8220, trattate con LPS e successivamente stimulate con TRAP4, la slope diminuisce ulteriormente, suggerendo un rallentamento ancora più marcato della velocità di aggregazione.

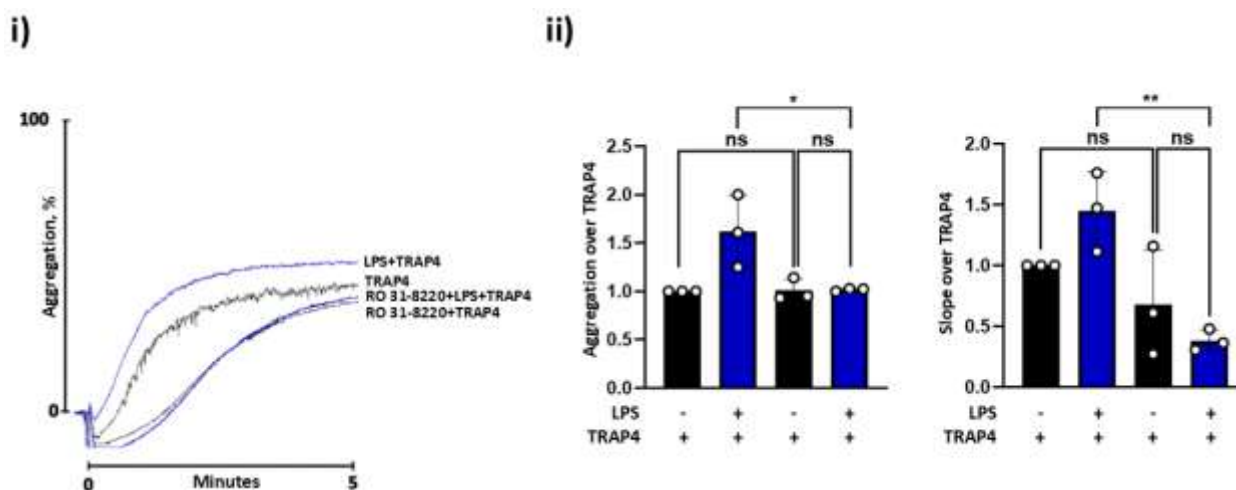


Figura R9. Analisi dell'inibizione di PKC sul potenziamento dell'aggregazione piastrinica indotto dal LPS.

i. Piastrine murine isolate da topi WT ($300\ \mu\text{l}$, $3 \times 10^8\ \text{plt/ml}$) sono preincubate con $10\ \mu\text{M}$ Ro 31-8220 e successivamente stimulate con $0,75\ \text{mM}$ TRAP4 per 5 minuti a 37°C sotto agitazione costante, in assenza (tracciato nero) o presenza di $10\ \mu\text{g/ml}$ LPS (tracciato blu). Lo stesso protocollo è applicato a campioni non trattati con Ro 31-8220. L'aggregazione è analizzata per 5 minuti a 37°C mediante l'utilizzo di un aggregometro collegato al software Aggro/link. Il grafico mostra sull'asse delle ascisse il tempo di aggregazione in minuti e sull'asse delle ordinate la percentuale di aggregazione.

ii. L'istogramma di sinistra riporta la media $\pm$ SD dei risultati ottenuti in 3 differenti esperimenti. L'aggregazione con TRAP4 è posta uguale a 1 in ciascun esperimento e gli altri valori sono espressi rispetto al relativo controllo (aggregation over TRAP4). Nell'istogramma di sinistra è riportata la media $\pm$ SD di 3 esperimenti riferita alla slope (slope over TRAP4) della curva di aggregazione, con le stesse modalità. L'analisi statistica è effettuata tramite il software GraphPad Prism 10 utilizzando il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli, ponendo come valore critico $p < 0.05$.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

I dati raccolti da 3 esperimenti indipendenti sono utilizzati per effettuare l'analisi statistica. Gli istogrammi in figura R9 (ii) riportano la media $\pm$ SD dell'aggregazione e della slope.

Nel complesso, questi risultati indicano che l'attività della PKC è necessaria per il potenziamento dell'aggregazione piastrinica indotto da LPS in risposta alla stimolazione con TRAP4.

Analisi delle vie di segnalazione

Fosforilazione di Pyk2

Per approfondire i meccanismi molecolari attraverso cui LPS modula l'attivazione piastrinica e identificare le vie di segnalazione intracellulari coinvolte, abbiamo valutato se l'inibizione della PKC mediante Ro 31-8220 influenzasse l'attivazione di Pyk2. Poiché l'attivazione di Pyk2 è strettamente regolata dall'aumento della concentrazione citosolica di Ca^{2+} e Ca^{2+} e DAG rappresentano i principali secondi messaggeri coinvolti nell'attivazione della PKC (Estevez e Du, 2017), abbiamo ipotizzato che Pyk2 potesse rappresentare un importante effettore a valle di questa via di segnalazione durante il potenziamento della risposta piastrinica indotto da LPS.

A tale scopo, piastrine isolate da topi WT alla concentrazione di 5×10^8 piastrine/ml sono preincubate o meno con 10 μ M Ro 31-8220 a 37 °C, e successivamente stimulate con 0,75 mM TRAP4 per 5 minuti, previa preincubazione o meno con 10 μ g/ml LPS per 10 minuti. I campioni sono analizzati mediante immunoblotting per valutare la fosforilazione di Pyk2 sui residui Y402 e Y579-Y580.

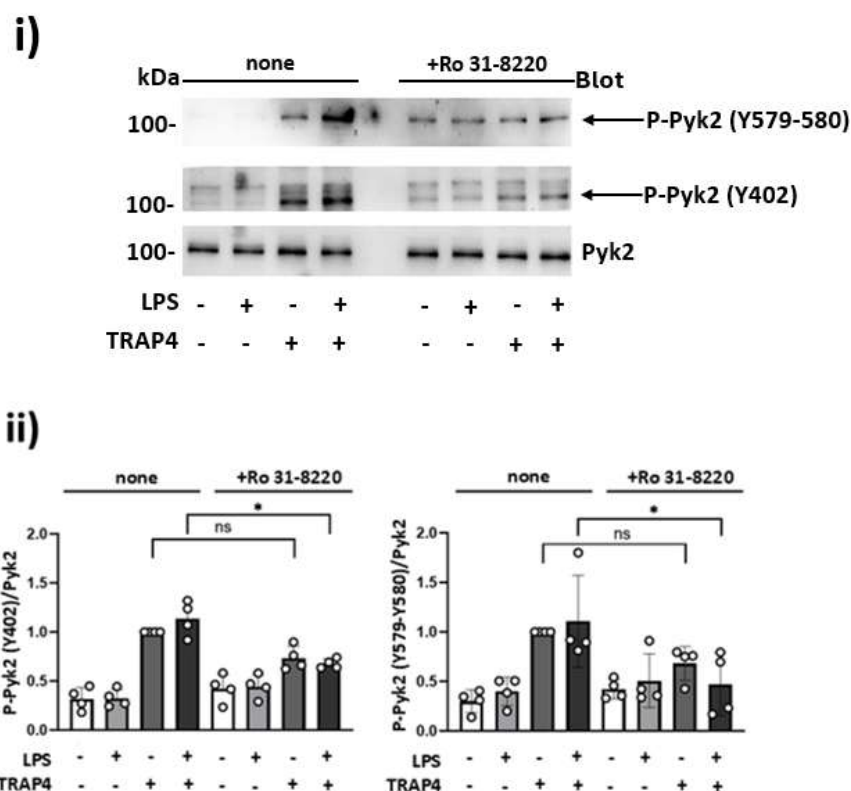


Figura R10. Analisi della fosforilazione di Pyk2.

Piastrine murine WT (100 μ l; 5×10^8 plt/ml) sono preincubate con Ro 31-8220 10 μ M e successivamente stimulate con 0,75 mM TRAP4 per 5 minuti a 37°C, con 10 μ g/ml LPS per 10 minuti a 37°C oppure con una combinazione dei due trattamenti. Un campione non stimolato è utilizzato come controllo basale. Lo stesso protocollo è applicato a campioni non trattati con Ro 31-8220. La reazione è bloccata con dissociante per elettroforesi SDS 3XR + 3% β -mercaptoetanolo.

i) 20 μ l di piastrine dissociate sono caricate su gel di poliaccrilamide al 10%, trasferite su membrana PVDF e analizzate tramite immunoblotting con l'anticorpo anti-fosfo-Pyk2 (Y579-Y580), anti-fosfo-Pyk2 (Y402) e anti-Pyk2.

ii) Gli istogrammi mostrano la media $\pm$ SD di 4 esperimenti. Il campione stimolato con TRAP4 è posto uguale a 1 in ciascun esperimento. L'analisi statistica è effettuata tramite software GraphPad Prism 10 utilizzando il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli, ponendo come valore critico $p < 0.05$.

* $p < 0.05$.

Come riportato in figura R10, la stimolazione con TRAP4 determina un aumento della fosforilazione di Pyk2 su entrambi i residui analizzati. La preincubazione con LPS seguita dalla stimolazione con TRAP4 induce un ulteriore aumento dell'intensità della banda, indicando un potenziamento della fosforilazione di Pyk2 indotto da LPS. In seguito al trattamento con Ro 31-

8220, il potenziamento della fosforilazione di Pyk2 indotto dalla preincubazione con LPS e dalla successiva stimolazione con TRAP4 non è più osservabile. Inoltre, si osserva una diminuzione della fosforilazione di Pyk2 anche nei campioni sottoposti alla sola stimolazione con TRAP4 in presenza dell'inibitore.

I risultati sono stati confermati dall'analisi quantitativa riportata in figura *R10 (ii)*, in cui gli istogrammi mostrano la media $\pm$ SD di 4 esperimenti indipendenti.

Nel complesso, questi risultati indicano che il potenziamento della fosforilazione di Pyk2 indotto da LPS in risposta alla stimolazione con TRAP4 dipende dall'attivazione della PKC. Inoltre, la riduzione della fosforilazione osservata nei campioni trattati con il solo TRAP4 suggerisce che questa chinasi contribuisca anche all'attivazione di Pyk2 a valle del recettore PAR4. Questi dati supportano pertanto l'ipotesi che Pyk2 rappresenti un importante effettore della via di segnalazione mediata da PKC a valle di TRAP4 durante il potenziamento della risposta piastrinica indotto da LPS.

Fosforilazione di proteine delle vie di segnalazione PI3K e MAPK

Per valutare il coinvolgimento di PKC nella modulazione delle vie di segnalazione PI3K e MAPK da parte di LPS è stata analizzata la fosforilazione di Akt ed ERK1/2 in presenza dell'inibitore Ro 31-8220.

Come riportato in *figura R11 (i)*, la membrana di PVDF è colorata con l'anticorpo anti-fosfo-Akt (S473), l'anticorpo anti-fosfo-ERK1/2 (T202/Y204) e con l'anticorpo anti-tubulina.

L'inibizione della PKC mediante Ro 31-8220 elimina completamente il potenziamento dell'attivazione di Akt ed ERK1/2 indotto da LPS. Inoltre, si osserva una riduzione della fosforilazione di entrambe le proteine anche nei campioni stimolati esclusivamente con TRAP4.

Gli istogrammi in *figura R11 (ii)* mostrano la media $\pm$ SD di 4 esperimenti indipendenti.

Nei campioni trattati con Ro 31-8220 il potenziamento della fosforilazione di Akt ed ERK1/2 indotto da LPS viene abolito e i livelli di fosforilazione risultano significativamente ridotti rispetto ai campioni preincubati con LPS e successivamente stimolati con TRAP4 in assenza dell'inibitore. Inoltre, la fosforilazione indotta dal solo TRAP4 risulta ridotta, sebbene tale differenza non raggiunga la significatività statistica.

Nel complesso, questi risultati indicano che l'attivazione della PKC è necessaria per il potenziamento della fosforilazione di Akt ed ERK1/2 indotto da LPS in risposta alla stimolazione con TRAP4.

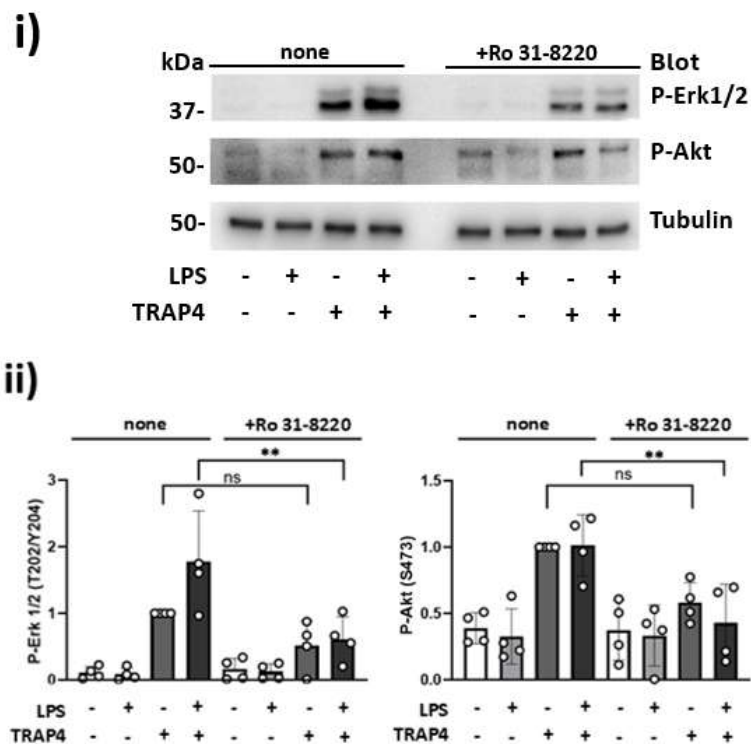


Figura R11. Analisi della fosforilazione di Akt ed ERK1/2.

Piastrine murine WT (100 μ l; 5×10^8 plt/ml) sono preincubate con Ro 31-8220 10 μ M e successivamente stimulate con 0,75 mM TRAP4 per 5 minuti a 37°C, con 10 μ g/ml LPS per 10 minuti a 37°C oppure con una combinazione dei due. Un campione non stimolato è utilizzato come controllo basale. Lo stesso protocollo è applicato a campioni non trattati con TAK-242. La reazione è poi bloccata con dissociante per elettroforesi SDS 3XR + 3% β -mercaptoetanolo.

i) 20 μ l di piastrine dissociate sono caricate su gel di poliacrilamide al 10%, trasferite su PVDF e analizzate tramite immunoblotting con l'anticorpo anti-fosfo-Akt (S473), anti-fosfo-ERK1/2 (T202/Y204) e anti-Tubulin.

ii) Gli istogrammi mostrano la media $\pm$ SD di 4 esperimenti. Il campione stimolato con TRAP4 è posto uguale a 1 in ciascun esperimento. L'analisi statistica è effettuata tramite software GraphPad Prism 10 utilizzando il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli, ponendo come valore critico $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

Il potenziamento promosso da LPS in piastrine stimulate con TRAP4 coinvolge Pyk2

Analisi dell'aggregazione

I risultati ottenuti precedentemente in questo lavoro di tesi hanno mostrato che LPS potenzia la fosforilazione di Pyk2 in piastrine stimulate con TRAP4 (*figura R3*), suggerendo un possibile coinvolgimento di questa chinasi nell'effetto di priming esercitato da LPS.

Per valutare il ruolo di Pyk2 nel potenziamento dell'aggregazione piastrinica indotto da LPS, sono eseguiti esperimenti di aggregazione utilizzando piastrine isolate da topi WT e da topi Pyk2 KO (*tecniche 1 e 2*). Campioni da 300 μ l di piastrine, alla concentrazione di 3×10^8 piastrine/ml, vengono stimolati con 0,75 mM TRAP4 in presenza o meno di 10 μ g/ml LPS e l'aggregazione è analizzata tramite aggregometro di Born (*tecnica 3*).

Il risultato ottenuto è mostrato in *figura R12 (i)*, dove sono riportati dei tracciati di aggregazione rappresentativi di 11-20 esperimenti indipendenti.

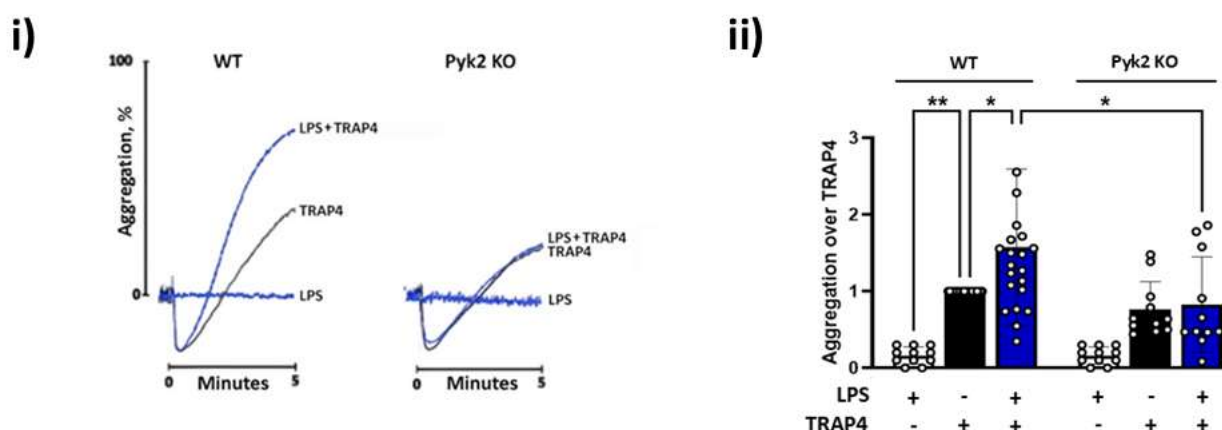


Figura R12. Analisi del ruolo di Pyk2 sul potenziamento dell'aggregazione piastrinica indotto dal LPS.

i. Piastrine murine isolate da topi WT e Pyk2 KO (300 μ l, 3×10^8 plt/ml) sono stimolate con 0,75 mM TRAP4 per 5 minuti a 37°C sotto agitazione costante, in assenza (tracciato nero) o presenza di 10 μ g/ml LPS (tracciato blu). L'aggregazione è analizzata per 5 minuti a 37 °C mediante l'utilizzo di aggregometro collegato al software Aggro/link. Il grafico mostra sull'asse delle ascisse il tempo di aggregazione in minuti e sull'asse delle ordinate la percentuale di aggregazione.

ii. L'istogramma riporta la media $\pm$ SD dei risultati ottenuti in 11-20 differenti esperimenti. L'aggregazione delle piastrine WT stimulate con TRAP4 è posta uguale a 1 in ciascun esperimento e gli altri valori sono espressi rispetto al relativo controllo (aggregation over TRAP4). L'analisi statistica è effettuata tramite il software GraphPad Prism 10 utilizzando il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli, ponendo come valore critico $p < 0.05$.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Nelle piastrine WT la stimolazione con TRAP4 induce un'aggregazione massima di circa il 40% $\pm$ 10, mentre la preincubazione con LPS seguita dalla stimolazione con TRAP4 determina un

aumento dell'aggregazione fino al $60\% \pm 13$, confermando il potenziamento osservato negli esperimenti precedenti. L'assenza di Pyk2 porta a una riduzione dell'aggregazione piastrinica indotta da TRAP4 ($30\% \pm 8$) confermando che Pyk2 è implicato nella segnalazione indotta da trombina e da agonisti associati a GPCR (Canobbio et al., 2013). Inoltre, l'assenza di Pyk2 previene la capacità di LPS di aumentare la risposta indotta da TRAP4 ($30\% \pm 10$). L'analisi quantitativa su 11-20 esperimenti indipendenti conferma questi risultati. Gli esperimenti sulle piastrine WT e Pyk2 KO sono realizzati in parallelo e per questo motivo si è scelto di porre uguale ad 1 l'aggregazione indotta da TRAP4 nelle piastrine WT, e di confrontare tutte le altre.

Nel complesso, questi risultati indicano che Pyk2 è necessaria per l'aggregazione indotta da TRAP4 ed è responsabile del potenziamento dell'aggregazione piastrinica indotta da LPS in risposta alla stimolazione con TRAP4.

Analisi delle vie di segnalazione

Fosforilazione dei substrati di PKC

Per definire la posizione di Pyk2 nella cascata di segnalazione attivata da TRAP4 e potenziata da LPS, abbiamo valutato in immunoblotting la fosforilazione delle proteine delle vie di segnalazione PKC, PI3K e MAPK nelle piastrine di topi che non esprimono Pyk2.

Piastrine isolate da topi WT e Pyk2 KO (*tecniche 1 e 2*) sono preincubate con 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS per 10 minuti, successivamente stimulate con 0,75 mM TRAP4 per 5 minuti oppure solo con LPS o solo con TRAP4. Inoltre, un campione non stimolato è utilizzato come controllo basale.

Per valutare se Pyk2 si collocasse a valle o a monte della PKC, è stata analizzata la fosforilazione dei substrati di questa chinasi.

Come riportato in *figura R13 (i)*, nelle piastrine WT la stimolazione con TRAP4 determina un aumento della fosforilazione dei substrati della PKC, ulteriormente potenziato dalla preincubazione con LPS. Nelle piastrine Pyk2 KO, la fosforilazione indotta da TRAP4 risulta sovrapponibile a quella osservata nelle piastrine WT. L'analisi quantitativa, riportata nell'istogramma di *figura R13(ii)*, conferma l'assenza di differenze significative tra i due genotipi. Questi risultati indicano che l'assenza di Pyk2 non modifica la fosforilazione dei substrati della PKC, in particolare della plecstrina, suggerendo che PKC agisca a monte di Pyk2 nella cascata di segnalazione attivata da TRAP4 e potenziata da LPS.

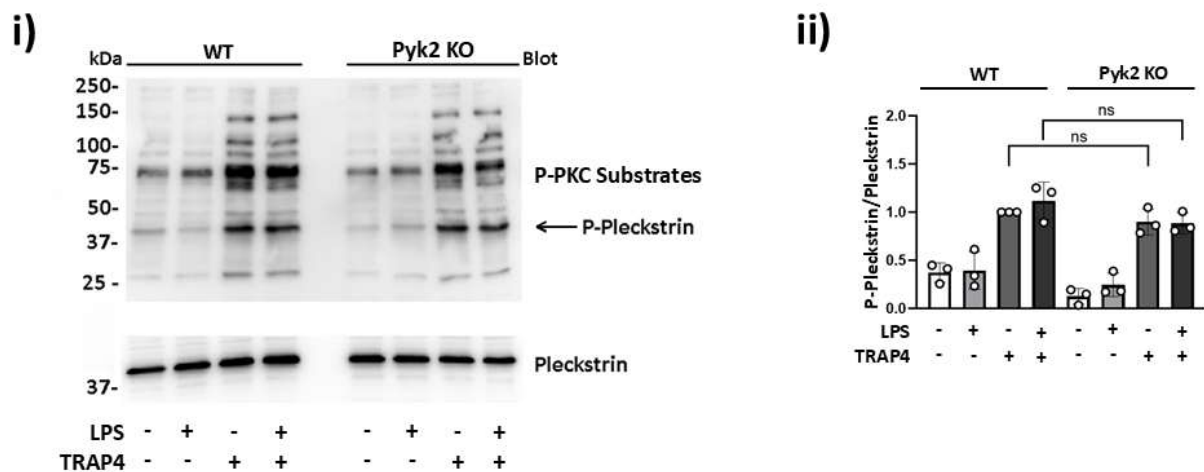


Figura R13. Analisi della fosforilazione dei substrati di PKC.

Piastrine murine isolate da topi WT e Pyk2 KO ($100 \mu\text{l}$; $5 \times 10^8 \text{ plt/ml}$) sono preincubate con $10 \mu\text{g/ml}$ LPS per 10 minuti a 37°C , stimulate con $0,75 \text{ mM}$ TRAP4 per 5 minuti a 37°C , oppure solo con LPS o solo con TRAP4. Un campione non stimolato è utilizzato come controllo basale. La reazione è bloccata con dissociante per elettroforesi SDS 3XR + 3% β -mercaptoetanolo.

i) $20 \mu\text{l}$ di piastrine dissociate sono caricate su gel di poliacrilamide al 5-15%, trasferite su PVDF e analizzate tramite immunoblotting con l'anticorpo anti-fosfo-PKC substrates e anti-Pleckstrin.

ii) Gli istogrammi mostrano la media $\pm$ SD di 3 esperimenti. Il campione WT stimolato con TRAP4 è posto uguale a 1 in ciascun esperimento. L'analisi statistica è effettuata tramite software GraphPad Prism 10 utilizzando il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli, ponendo come valore critico $p < 0.05$.

Fosforilazione di proteine delle vie di segnalazione PI3K e MAPK

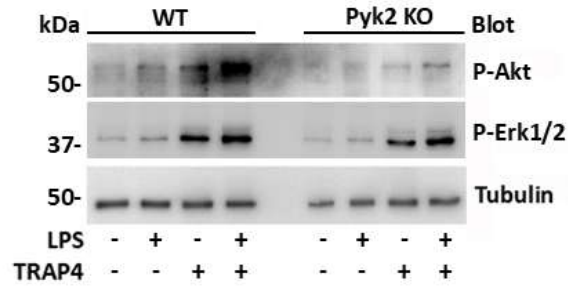
Infine, abbiamo valutato se ERK1/2 e Akt rappresentassero degli effettori a valle di Pyk2 analizzando la loro fosforilazione in piastrine isolate da topi WT e Pyk2 KO. Anche in questo caso abbiamo confrontato piastrine WT con piastrine Pyk2 KO, preincubate con LPS e stimulate con TRAP4.

Come riportato in figura R14 (i), nelle piastrine WT la stimolazione con TRAP4 determina un aumento della fosforilazione di Akt e di ERK1/2, che viene potenziato dalla preincubazione con LPS. Nelle piastrine Pyk2 KO si osserva una riduzione marcata della fosforilazione di Akt e meno evidente per quanto riguarda ERK1/2 sia della fosforilazione indotta da TRAP4 che del potenziamento promosso dalla preincubazione con LPS.

La diminuzione della fosforilazione è confermata dall'analisi quantitativa riportata nell'istogramma di figura R14 (ii), che evidenzia una riduzione statisticamente significativa.

Questi risultati dimostrano che l'assenza di Pyk2 altera la fosforilazione di Akt ed ERK1/2, suggerendo che queste proteine rappresentino effettori a valle di Pyk2 nella cascata di segnalazione attivata da TRAP4 e potenziata da LPS.

i)



ii)

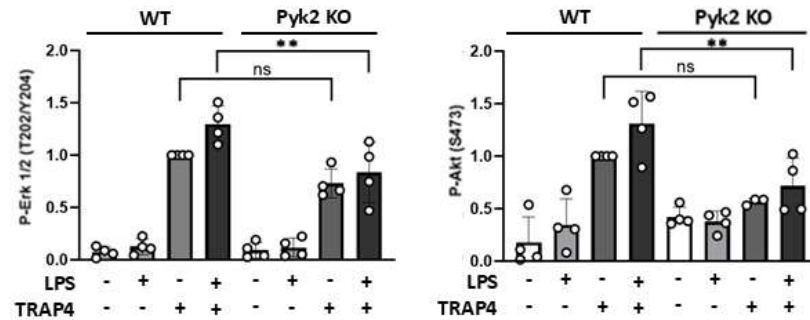


Figura R14. Analisi della fosforilazione di Akt ed ERK1/2.

Piastrine murine isolate da topi WT e Pyk2 KO (100 μ l; 5×10^8 plt/ml) sono preincubate con 10 μ g/ml LPS per 10 minuti a 37°C, stimulate con 0,75 mM TRAP4 per 5 minuti a 37°C, oppure solo con LPS o solo con TRAP4. Un campione non stimolato è utilizzato come controllo basale. La reazione è bloccata con dissociante per elettroforesi SDS 3XR + 3% β -mercaptoetanololo.

i) 20 μ l di piastrine dissociate sono caricate su gel di poliacrilamide al 10%, trasferite su PVDF e analizzate tramite immunoblotting con l'anticorpo anti-fosfo-Akt (S473), anti-fosfo-ERK1/2 (T202/Y204) e anti-Tubulin.

ii) Gli istogrammi mostrano la media $\pm$ SD di 4 esperimenti. Il campione WT stimolato con TRAP4 è posto uguale a 1 in ciascun esperimento. L'analisi statistica è effettuata tramite software GraphPad Prism 10 utilizzando il test one-way ANOVA seguito dal test post hoc di Tukey per confronti multipli, ponendo come valore critico $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi abbiamo studiato il ruolo di Pyk2 nell'infezione indotta da LPS, focalizzandoci sui meccanismi molecolari attraverso cui LPS modula l'attivazione piastrinica *in vitro*, sulle vie di segnalazione intracellulari coinvolte nell'attivazione di Pyk2 e sui suoi potenziali substrati.

LPS è un componente della membrana esterna dei batteri Gram negativi, come *E.coli*, riconosciuto dal sistema immunitario come PAMP principalmente attraverso il recettore TLR4 (Bertani e Ruiz, 2018). La sua presenza in circolo rappresenta un potente stimolo infiammatorio ed è coinvolta nello sviluppo dei fenomeni di tromboinfiammazione, un processo che integra infiammazione, emostasi e trombosi con conseguente formazione di trombi. Questo meccanismo è oggi riconosciuto come un elemento patogenetico chiave in numerose condizioni cliniche, tra cui sepsi, infezioni batteriche, aterosclerosi, trombosi venosa profonda e ictus ischemico, nelle quali le piastrine svolgono un ruolo centrale nel collegare risposta immunitaria e coagulazione (Grover et al., 2018).

Durante l'infezione, le piastrine partecipano attivamente alla risposta immunitaria grazie all'espressione di PRR, che consentono il riconoscimento di PAMP e DAMP (Trivigno et al., 2023). Nelle fasi iniziali acquisiscono uno stato di iperreattività che favorisce la formazione di aggregati piastrinici e microtrombi localizzati, un fenomeno noto come immunotrombosi. Questo rappresenta un importante meccanismo di difesa dell'ospite, volto a limitare la diffusione dei patogeni e facilitarne l'eliminazione. Tuttavia, se non adeguatamente controllata, l'immunotrombosi può evolvere in tromboinfiammazione patologica, caratterizzata da trombosi intravascolare, danno microvascolare e disfunzione d'organo (Guo e Rondina, 2019).

L'effetto diretto di LPS sulle piastrine rimane tuttora oggetto di dibattito, poiché i risultati presenti in letteratura sono contrastanti (Galgano et al., 2022). Le evidenze più recenti suggeriscono che LPS non agisca come un agonista piastrinico classico, ma induca uno stato di *priming* che aumenta la sensibilità delle piastrine a successivi stimoli. In particolare, Lopes e collaboratori hanno dimostrato che l'esposizione a LPS potenzia la risposta a diversi agonisti, sia in termini di aggregazione che di attivazione delle principali vie di segnalazione intracellulari (Lopes et al., 2017). Tale sensibilizzazione rappresenta un vantaggio fisiologico durante l'infezione, consentendo una risposta più rapida ed efficiente anche a basse concentrazioni di stimolo. Un fenomeno analogo è stato osservato anche per altri PAMP, come il peptidoglicano o il CpG DNA, suggerendo che il *priming* costituisca un meccanismo generale di pre-attivazione piastrinica nell'ambito della risposta infiammatoria (Guo e Rondina, 2019).

Per approfondire i meccanismi molecolari responsabili di questo fenomeno abbiamo utilizzato un modello *in vitro* che mima le condizioni *in vivo* di endotossemia a basso grado, ottenuto mediante preincubazione delle piastrine con LPS prima della stimolazione con TRAP4. Quest'ultimo è stato scelto in quanto agonista selettivo del recettore PAR4, principale recettore della trombina nelle piastrine murine, consentendo di valutare la modulazione della risposta piastrinica senza gli effetti aggiuntivi esercitati dalla trombina sulla cascata coagulativa (Sang et al., 2021).

Il modello di endotossemia a basso grado è stato precedentemente caratterizzato dal gruppo di Violi, che ha dimostrato come la somministrazione intraperitoneale di una dose non letale di LPS (0,5 mg/kg) induca uno stato infiammatorio lieve e reversibile, associato a iperreattività piastrinica e accelerata formazione del trombo (Carnevale et al., 2020). La concentrazione di LPS in circolo dopo iniezione risulta di circa 40 pg/mL, concentrazioni che di fatto si realizzano in presenza di alterazioni della barriera intestinale che favoriscono la traslocazione in circolo dell'LPS prodotto dal microbiota, come nelle malattie infiammatorie intestinali, oppure da un moderato incremento di LPS conseguente all'ingestione di alimenti contaminati da endotossine batteriche (Violi et al., 2023).

Le concentrazioni di LPS utilizzate *in vitro* sono molto variabili, da 15 pg/mL fino a 100 µg/mL; tuttavia, la maggior parte degli studi utilizza concentrazioni comprese tra 1 e 10 µg/mL, nettamente superiori a quelle riscontrabili *in vivo* (Galgano et al., 2022). Ciò riflette il fatto che, nell'organismo, LPS agisce su molteplici popolazioni cellulari, tra cui cellule immunitarie, endoteliali e piastrine, generando una risposta integrata difficilmente riproducibile in piastrine isolate.

L'impiego di un modello *in vitro* consente di valutare l'effetto diretto di LPS sulle piastrine in condizioni controllate, riducendo la variabilità biologica tra animali e permettendo un'analisi selettiva delle vie di segnalazione intracellulari coinvolte.

Nel nostro laboratorio Pyk2 è stata ampiamente studiata per il suo ruolo nell'emostasi e nella trombosi arteriosa e venosa (Canobbio et al., 2013; Momi et al., 2022), mentre il suo coinvolgimento nella risposta piastrinica indotta da LPS non era ancora stato approfondito. Evidenze in letteratura suggeriscono un ruolo di Pyk2 nei processi di tromboinfiammazione associati a endotossemia e sepsi. In particolare, Duan e collaboratori hanno dimostrato che l'inibizione di Pyk2 riduce la risposta infiammatoria indotta da LPS in un modello murino di danno polmonare acuto (Duan et al., 2012), mentre Alves e collaboratori hanno osservato che l'inibizione farmacologica di Pyk2 e FAK protegge i topi sottoposti a sepsi polimicrobica dall'infiammazione sistemica e dal danno d'organo, migliorandone la sopravvivenza (Alves et al., 2022).

Sulla base di queste evidenze abbiamo ipotizzato che Pyk2 contribuisca alla modulazione della risposta piastrinica indotta da LPS e ne abbiamo valutato il ruolo nel modello sperimentale descritto.

Per verificare se anche nel nostro modello *in vitro* LPS fosse in grado di esercitare un effetto di potenziamento, abbiamo innanzitutto valutato la sua capacità di potenziare l'aggregazione piastrinica indotta da TRAP4, un esapeptide sintetico che attiva il recettore della trombina PAR4 (Landesberg et al., 2005). Per questo scopo, piastrine isolate da topi WT C57BL/6 sono state preincubate con 10 µg/ml di LPS per 10 minuti e successivamente stimulate con una bassa concentrazione di TRAP4, così da evidenziare un eventuale effetto di potenziamento di LPS. LPS da solo non ha indotto aggregazione piastrinica, ma ha aumentato significativamente la risposta indotta da TRAP4 (*Risultato R1*).

Per comprendere i meccanismi molecolari responsabili dell'effetto di potenziamento indotto da LPS, abbiamo analizzato le principali vie di segnalazione coinvolte nell'attivazione piastrinica, focalizzandoci sulla PKC, su Pyk2 e sulle vie PI3K/Akt e MAPK/ERK (*Risultati R2, R3, R4*). Abbiamo osservato che la preincubazione con LPS potenzia significativamente la fosforilazione di tutte queste proteine in risposta a TRAP4, confermando quanto descritto da Lopes e collaboratori (Vallance et al., 2017; Lopes et al., 2017).

Per stabilire se questo effetto fosse mediato dal legame specifico di LPS con TLR4, abbiamo utilizzato TAK-242 (resatorvid), un inibitore selettivo della segnalazione di TLR4 (Matsunaga et al., 2011). L'inibizione di TLR4 ha abolito completamente il potenziamento dell'aggregazione indotto da LPS, indicando che questo effetto dipende dal legame di LPS al recettore TLR4 (*Risultato R5*), indipendentemente dal TRAP4.

Abbiamo quindi valutato se l'inibizione di TLR4 influenzasse anche l'attivazione delle principali vie di segnalazione intracellulari. Il trattamento con TAK-242 ha abolito il potenziamento della fosforilazione dei substrati della PKC e di Pyk2 indotto da LPS (*Risultati R6 e R7*) e ha determinato una marcata riduzione anche della fosforilazione di Akt ed ERK1/2, sebbene in quest'ultimo caso le differenze non abbiano raggiunto la significatività statistica (*Risultato R8*). Nel complesso, questi dati indicano che l'effetto di priming esercitato da LPS sull'attivazione piastrinica dipende dal suo legame con TLR4.

Per procedere nella dissezione della via di segnalazione attivata dalla cooperazione tra TLR4 e PAR4, abbiamo valutato se il potenziamento dell'aggregazione piastrinica indotto da LPS dipendesse dall'attivazione della PKC. A tale scopo, abbiamo utilizzato Ro 31-8220, un inibitore della PKC appartenente alla classe dei bisindolilmaleimidi, che compete con l'ATP per il sito catalitico della chinasi bloccandone l'attività enzimatica (Mayati et al., 2015).

L'inibizione della PKC ha abolito il potenziamento dell'aggregazione indotto da LPS, mentre non ha modificato in modo significativo l'aggregazione indotta da TRAP4. Tuttavia, ha determinato una riduzione della velocità di aggregazione delle piastrine stimulate con TRAP4, che è risultato ancora più marcato nelle piastrine preincubate con LPS e successivamente stimulate con TRAP4 (*Risultato R9*). Questi risultati dimostrano che l'attivazione della PKC è un requisito necessario per il potenziamento dell'aggregazione piastrinica mediato da LPS.

Ad oggi, in letteratura non sono disponibili studi che dimostrino direttamente una convergenza delle vie di segnalazione di PAR4 e TLR4 a livello della PKC. Tuttavia, Feng e collaboratori hanno dimostrato che la stimolazione di TLR4 da parte di LPS promuove l'attivazione della PKC attraverso un meccanismo dipendente dalla produzione di ROS intracellulari, contribuendo al potenziamento dell'aggregazione piastrinica (Feng et al., 2018). Questo dato suggerisce che la via di segnalazione del TLR4 potrebbe contribuire all'attivazione di PKC. Inoltre, è noto che una delle principali vie di segnalazione attivate a valle dei recettori PAR coinvolge la PLC, che promuove l'attivazione della PKC e l'aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} . Sebbene manchino prove dirette di una convergenza tra queste due vie, i nostri risultati supportano questa ipotesi, poiché la maggiore fosforilazione dei substrati della PKC osservata nelle piastrine pretrattate con LPS e successivamente stimulate con TRAP4 suggerisce che i segnali attivati da TLR4 e PAR4 possano cooperare nel promuovere l'attivazione della PKC.

Poiché l'attivazione di Pyk2 è strettamente regolata dall'aumento della concentrazione citosolica di Ca^{2+} , e considerando che il Ca^{2+} e DAG rappresentano i principali secondi messaggeri coinvolti nell'attivazione della PKC (Estevez e Du, 2017), abbiamo ipotizzato che Pyk2 potesse rappresentare un importante effettore a valle di questa via di segnalazione durante il potenziamento della risposta piastrinica indotto da LPS. Coerentemente con questa nostra ipotesi, l'inibizione della PKC mediante Ro 31-8220 ha abolito il potenziamento della fosforilazione di Pyk2 indotto da LPS e ha determinato una riduzione della fosforilazione indotta dal solo TRAP4, sebbene quest'ultima non fosse statisticamente significativa (*Risultato R10*). Questi risultati supportano l'ipotesi che Pyk2 si collochi a valle della PKC nella cascata di segnalazione attivata da PAR4 e amplificata da LPS.

Abbiamo poi valutato l'effetto dell'inibizione della PKC sull'attivazione di Akt e di ERK1/2. In linea con i risultati precedenti, la preincubazione con Ro 31-8220 ha abolito il potenziamento della fosforilazione di entrambe le proteine indotto da LPS. Inoltre, nei campioni stimolati con TRAP4 si è registrata una tendenza alla diminuzione della fosforilazione (*Risultato R11*). Questi risultati dimostrano che l'attivazione della PKC è necessaria per il potenziamento della fosforilazione di Akt ed ERK1/2 indotto da LPS in risposta alla stimolazione con TRAP4.

Per valutare il ruolo di Pyk2 nel potenziamento dell'aggregazione piastrinica indotto da LPS, abbiamo eseguito esperimenti comparativi su piastrine isolate da topi WT e Pyk2 KO. I nostri risultati dimostrano che l'assenza di Pyk2 abolisce completamente il potenziamento dell'aggregazione piastrinica indotto da LPS. Inoltre, si è osservata anche una riduzione dell'aggregazione piastrinica indotta da TRAP4 (*Risultato R12*). Queste osservazioni indicano che Pyk2 non solo è coinvolta nella segnalazione a valle dei GPCR ed è necessaria per l'aggregazione indotta da TRAP4 (Canobbio et al., 2013), ma svolge anche un ruolo cruciale nel potenziamento della risposta promosso da LPS. Questa conclusione è in accordo con un recente studio di Gemme e collaboratori, condotto nel laboratorio in cui ho svolto il mio internato di tesi, che ha dimostrato il ruolo di Pyk2 nell'attivazione piastrinica indotta da TRAP4 in un modello di endotossemia a basso grado sia mediante l'utilizzo di topi Pyk2 KO sia attraverso l'inibizione farmacologica selettiva della chinasi con PF-4594755 (Gemme et al., 2026).

È noto che Pyk2 regola la segnalazione *outside-in* mediata dall'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, promuovendo la riorganizzazione del citoscheletro e la formazione delle adesioni focali necessarie alla stabilizzazione dell'aggregato piastrinico (Canobbio et al., 2013). Tuttavia, il difetto di aggregazione osservato nelle piastrine Pyk2 KO non esclude un possibile coinvolgimento di Pyk2 anche nella regolazione dell'attivazione *inside-out* dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$. In prospettiva futura, questa ipotesi potrebbe essere verificata mediante citofluorimetria a flusso, valutando il legame dell'anticorpo JON/A, specifico per la forma attivata dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ murina (Bergmeier et al., 2002).

Per completare la caratterizzazione della cascata di segnalazione attivata da TLR4 e PAR4, abbiamo cercato di definire la posizione di Pyk2 rispetto alla PKC e di identificare i principali effettori attivati a valle di questa tirosin chinasi. A questo scopo, abbiamo confrontato la fosforilazione dei substrati della PKC in piastrine isolate da topi WT e Pyk2 KO. L'assenza di Pyk2 non ha modificato la fosforilazione dei substrati della PKC indotta da TRAP4, indicando che l'attivazione della PKC è indipendente da Pyk2 (*Risultato R13*). Questo dato, insieme ai risultati ottenuti mediante l'inibizione farmacologica della PKC con Ro 31-8220, suggerisce che la PKC si collochi a monte di Pyk2 nella cascata di segnalazione attivata da TRAP4 e amplificata dall'attivazione di TLR4.

Infine, abbiamo valutato se Akt ed ERK1/2 rappresentassero effettori a valle di Pyk2. Nelle piastrine Pyk2 KO, la fosforilazione di entrambe le proteine è risultata ridotta sia in risposta alla stimolazione con TRAP4 sia nel potenziamento promosso da LPS (*Risultato R14*). Nel complesso, questi dati indicano che Pyk2 contribuisce all'attivazione delle vie PI3K/Akt e MAPK/ERK durante la risposta piastrinica, in accordo con gli studi di Consonni e collaboratori e di Canobbio

e collaboratori, che hanno dimostrato il coinvolgimento di Pyk2 nell'attivazione sia della via PI3K/Akt che della via MAPK nelle piastrine (Consonni et al., 2012; Canobbio et al., 2013). Nel complesso, i risultati ottenuti consentono di proporre un modello della via di segnalazione attraverso cui LPS, legandosi a TLR4, amplifica la risposta piastrinica indotta dall'attivazione di PAR4. In questo modello, la PKC rappresenta un punto di convergenza tra le due vie di segnalazione e promuove l'attivazione di Pyk2, che a sua volta contribuisce all'attivazione delle vie PI3K/Akt e MAPK/ERK, culminando nel potenziamento della risposta piastrinica (*Figura 10*). Per superare alcuni limiti del modello *in vitro*, il recente studio condotto nel nostro laboratorio da Gemme e collaboratori ha esteso l'analisi a un modello *in vivo*, dimostrando il ruolo di Pyk2 nella regolazione dell'attivazione piastrinica e della trombosi microvascolare in un modello murino di endotossemia a basso grado (Gemme et al., 2026).

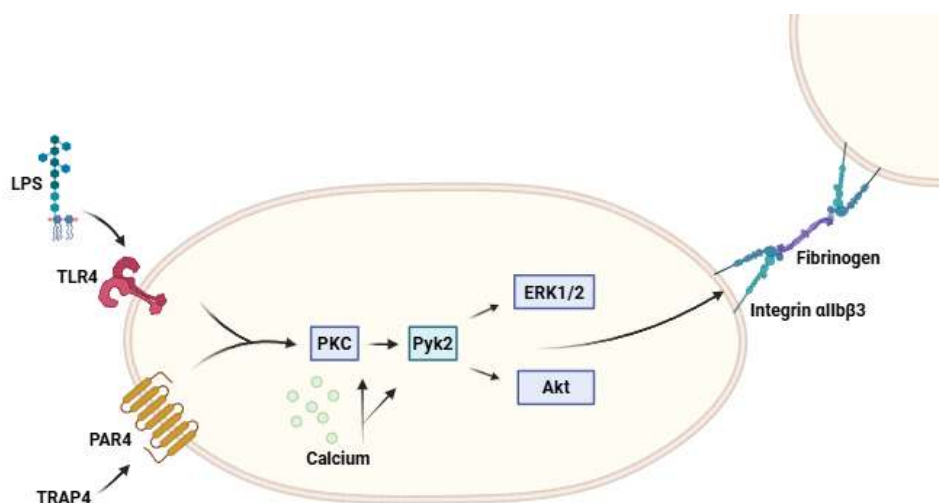


Figura 10. Modello della via di segnalazione mediata da LPS e TRAP4. La stimolazione delle piastrine con LPS e TRAP4 attraverso i rispettivi recettori TLR4 e PAR4 converge su PKC, che promuove l'attivazione di Pyk2, la quale a sua volta coordina le vie di segnalazione PI3K/Akt ed ERK1/2 per promuovere l'aggregazione piastrinica attraverso il legame tra fibrinogeno e due integrine αIIbβ3 presenti su due piastrine adiacenti (Creato con Biorender).

CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi ci ha permesso di approfondire i principali meccanismi molecolari attraverso cui LPS modula la risposta piastrinica e di chiarire il ruolo di Pyk2 nella cascata di segnalazione coinvolta nel potenziamento dell'attivazione piastrinica indotto da LPS.

I risultati ottenuti confermano che LPS non agisce come un agonista piastrinico diretto, ma induce uno stato di sensibilizzazione che amplifica la risposta a successivi stimoli agonisti. In particolare, la preincubazione *in vitro* con LPS ha determinato un significativo aumento dell'aggregazione piastrinica indotta da TRAP4 e della fosforilazione di PKC, Pyk2, Akt ed ERK1/2. L'inibizione di TLR4 mediante TAK-242 ha abolito tali effetti, dimostrando che il potenziamento indotto da LPS dipende dal suo legame a TLR4.

L'analisi delle vie di segnalazione intracellulari ha evidenziato che la PKC rappresenta un punto di convergenza tra la segnalazione di TLR4 e quella di PAR4. L'inibizione della PKC con Ro 31-8220 ha infatti abolito il potenziamento dell'aggregazione piastrinica e della fosforilazione di Pyk2, Akt ed ERK1/2 indotti da LPS, indicando che PKC si colloca a monte di Pyk2 nella cascata di segnalazione.

L'utilizzo di piastrine isolate da topi Pyk2 KO ha consentito di dimostrare il ruolo essenziale di Pyk2 nel potenziamento della risposta piastrinica mediato da LPS. L'assenza di Pyk2 ha abolito completamente l'effetto di potenziamento di LPS e ha ridotto la risposta a TRAP4, confermando il suo coinvolgimento sia nella segnalazione a valle dei recettori PAR sia nella cooperazione funzionale tra TLR4 e PAR4. Inoltre, i risultati ottenuti dimostrano che Pyk2 contribuisce all'attivazione delle vie PI3K/Akt e MAPK/ERK, mentre non influenza l'attivazione della PKC, suggerendo che Pyk2 agisce a valle di quest'ultima.

Nel complesso, questo lavoro contribuisce ad ampliare le conoscenze sui meccanismi molecolari alla base del potenziamento dell'attivazione piastrinica indotto da LPS e propone un modello di segnalazione in cui l'attivazione di TLR4 e PAR4 converge sulla PKC, che a sua volta promuove l'attivazione di Pyk2 e delle vie PI3K/Akt e MAPK/ERK, culminando nel potenziamento della risposta piastrinica. Questi risultati suggeriscono che Pyk2 possa rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico nella modulazione della tromboinfiammazione e costituiscono una base per futuri studi *in vivo* e per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

BIBLIOGRAFIA

Alfar HR, Whiteheart SW.

Bacterial interactions with platelets: defining key themes.
Front Immunol. 2025 Jul 3; 16: 1610289-1610319.

Alves GF, Aimaretti E, Einaudi G, Mastrocola R, de Oliveira JG, Collotta D et al.

Pharmacological Inhibition of FAK-Pyk2 Pathway Protects Against Organ Damage and Prolongs the Survival of Septic Mice.
Front Immunol. 2022; 13: 837180-837194.

Amison RT, O'Shaughnessy BG, Arnold S, Cleary SJ, Nandi M, Pitchford SC et al.

Platelet Depletion Impairs Host Defense to Pulmonary Infection with *Pseudomonas aeruginosa* in Mice.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2018; 58: 331-340.

Arman M, Krauel K.

Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis.
J. Thromb. Haemost. 2015; 13: 893–908.

Battinelli EM.

2019: The Role of Platelets in Angiogenesis.
In: Platelets (Michelson AD, editor). 4th ed. San Diego: Elsevier/Academic Press, p. 433-441.

Bensing BA, López JA, Sullam PM.

The *Streptococcus gordonii* surface proteins GspB and Hsa mediate binding to sialylated carbohydrate epitopes on the platelet membrane glycoprotein Ibα.
Infect. Immun. 2004; 72: 6528–6537.

Bergmeier W, Schulte V, Brockhoff G, Bier U, Zirngibl H, Nieswandt B.

Flow cytometric detection of activated mouse integrin αIIbβ3 with a novel monoclonal antibody.
Cytometry. 2002; 48: 80-6.

Bertani B, Ruiz N.

Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides.
EcoSal Plus. 2018; 8: 10.1128.

Berthet J, Damien P, Hamzeh-Cognasse H, Arthaud CA, Eyraud MA, Zéni F et al.

Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion.
Clin Immunol. 2012; 145: 189-200.

Bhattacharya SK, Aspnes GE, Bagley SW, Boehm M, Brosius AD, Buckbinder L et al.

Identification of novel series of pyrazole and indole-urea based DFG-out PYK2 inhibitors.
Bioorg Med Chem Lett. 2012; 22: 7523-7529.

Blair P, Flaumenhaft R.

Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates.
Blood Rev. 2009; 23: 177-189.

Blaukat A, Ivankovic-Dikic I, Grönroos E, Dolfi F, Tokiwa G, Vuori K et al.

Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades.

J Biol Chem. 1999; 274: 14893-14901.

Boilard E, Paré G, Rousseau M, Cloutier N, Dubuc I, Lévesque T et al.

Influenza virus H1N1 activates platelets through FcγRIIA signaling and thrombin generation.

Blood. 2014; 123: 2854–2863.

Bondu V, Wu C, Cao W, Simons PC, Gillette J, Zhu J et al.

Low-affinity binding in cis to P2Y2R mediates force-dependent integrin activation during hantavirus infection.

Mol Biol Cell. 2017; 28: 2887-2903.

Born GV, Cross MJ.

The aggregation of blood platelets.

J Physiol. 1963; 168:178-195.

Brennan MP, Loughman A, Devocelle M, Arasu S, Chubb AJ, Foster TJ et al.

Elucidating the role of Staphylococcus epidermidis serine–aspartate repeat protein G in platelet activation.

J. Thromb. Haemost. 2009; 7: 1364–1372.

Brewer DB.

Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet.

Br J Haematol. 2006; 133: 251-259.

Brody AH, Nies SH, Guan F, Smith LM, Mukherjee B, Salazar SA et al.

Alzheimer risk gene product Pyk2 suppresses tau phosphorylation and phenotypic effects of tauopathy.

Mol Neurodegener. 2022; 17: 32-65-.

Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H.

Platelets at work in primary hemostasis.

Blood Reviews. 2011; 25: 155-167.

Brown GT, Narayanan P, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM.

Lipopolysaccharide stimulates platelets through an IL-1β autocrine loop.

J Immunol. 2013; 191: 5196-5203.

Buckbinder L, Crawford DT, Qi H, Ke HZ, Olson LM, Long KR et al.

Proline-rich tyrosine kinase 2 regulates osteoprogenitor cells and bone formation, and offers an anabolic treatment approach for osteoporosis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104: 10619-10624.

Buitrago L, Langdon WY, Sanjay A, Kunapuli SP.

Tyrosine phosphorylated c-Cbl regulates platelet functional responses mediated by outside-in signaling.

Blood. 2011; 118: 5631-5640.

Burkhart JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L et al.

The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways.

Blood. 2012; 120: 73-82.

Byrne MF, Kerrigan SW, Corcoran PA, Atherton JC, Murray FE, Fitzgerald DJ et al.

Helicobacter pylori binds von Willebrand factor and interacts with GPIb to induce platelet aggregation. *Gastroenterology*. 2003; 124: 1846–1854.

Canino J, Guidetti GF, Galgano L, Vismara M, Minetti G, Torti M et al.

The proline-rich tyrosine kinase Pyk2 modulates integrin-mediated neutrophil adhesion and reactive oxygen species generation.

Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2020; 1867:118799-118808.

Canobbio I, Abubaker AA, Visconte C, Torti M, Pula G.

Role of amyloid peptides in vascular dysfunction and platelet dysregulation in Alzheimer's disease.

Front Cell Neurosci. 2015; 9: 65-80.

Canobbio I, Cipolla L, Consonni A, Momi S, Guidetti G, Oliviero B et al.

Impaired thrombin-induced platelet activation and thrombus formation in mice lacking the Ca²⁺-dependent tyrosine kinase Pyk2.

Blood. 2013; 121: 648-57.

Canobbio I, Cipolla L, Guidetti GF, Manganaro D, Visconte C, Kim S et al.

The focal adhesion kinase Pyk2 links Ca²⁺ signalling to Src family kinase activation and protein tyrosine phosphorylation in thrombin-stimulated platelets.

Biochem J. 2015; 469: 199-210.

Canobbio I, Guidetti GF, Oliviero B, Manganaro D, Vara D, Torti M.

Amyloid β -peptide-dependent activation of human platelets: essential role for Ca²⁺ and ADP in aggregation and thrombus formation.

Biochem J. 2014; 462: 513-523.

Canobbio I, Lova P, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M.

Proline-rich tyrosine kinase 2 and focal adhesion kinase are involved in different phases of platelet activation by vWF.

Thromb Haemost. 2002; 87: 509-517.

Canobbio I, Stefanini L, Cipolla L, Ciruolo E, Gruppi C, Balduini C et al.

Genetic evidence for a predominant role of PI3K β catalytic activity in ITAM- and integrin mediated signaling in platelets.

Blood. 2009; 114: 2193-6.

Carnevale R, Sciarretta S, Valenti V, di Nonno F, Calvieri C, Nocella C et al.

Low-grade endotoxaemia enhances artery thrombus growth via Toll-like receptor 4: implication for myocardial infarction.

Eur Heart J. 2020; 41: 3156-3165.

Chaipan C, Soilleux EJ, Simpson P, Hofmann H, Gramberg T, Marzi A et al.

DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets.

J. Virol. 2006; 80: 8951–8960.

Chao CH, Wu WC, Lai YC, Tsai PJ, Perng GC, Lin YS et al.

Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4, leading to thrombocytopenia and hemorrhage.

PLoS Pathog. 2019; 15: e1007625.

Chapman NM, Houtman JC.

Functions of the FAK family kinases in T cells: beyond actin cytoskeletal rearrangement.
Immunol Res. 2014; 59:23-34.

Cipolla L, Consonni A, Guidetti G, Canobbio I, Okigaki M, Falasca M et al.

The proline-rich tyrosine kinase Pyk2 regulates platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ outside-in signaling.
J Thromb Haemost. 2013; 11: 345-356.

Claushuis TA, van Vught LA, Scicluna BP, Wiewel MA, Klein Klouwenberg PM, Hoogendijk AJ et al.

Molecular Diagnosis and Risk Stratification of Sepsis Consortium. Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients.
Blood. 2016; 127: 3062-3072.

Claushuis TAM, de Vos AF, Nieswandt B, Boon L, Roelofs JJTH, de Boer OJ, et al.

Platelet glycoprotein VI aids in local immunity during pneumonia-derived sepsis caused by gram-negative bacteria.
Blood. 2018; 131:864-876.

Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Delezay O, Pozzetto B, McNicol A et al.

Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets.
Br. J. Haematol. 2008; 141: 84–91.

Consonni A, Cipolla L, Guidetti G, Canobbio I, Ciraolo E, Hirsch E et al.

Role and regulation of phosphatidylinositol 3-kinase β in platelet integrin $\alpha 2\beta 1$ signaling.
Blood. 2012; 119: 847-856.

Cornelius DC, Baik CH, Travis OK, White DL, Young CM, Austin Pierce W et al.

NLRP3 inflammasome activation in platelets in response to sepsis.
Physiol. Rep. 2019; 7: 14073-14082.

Cox D.

Sepsis - it is all about the platelets.
Front Immunol. 2023; 14: 1210219-1210235.

Cruz MA, Diacovo TG, Emsley J, Liddington R, Handin RI.

Mapping the glycoprotein Ib-binding site in the von willebrand factor A1 domain.
J Biol Chem 2000; 275: 19098–19105

Cuenca-Zamora EJ, Ferrer-Marin F, Rivera J, Teruel-Montoya R.

Tubulin in platelets: When the Shape Matters.
Int J Mol Sci. 2019; 20: 3484-3497.

Das P, Pal S, Oldfield CM, Thillai K, Bala S, Carnevale KA et al.

A PKC β -LYN-PYK2 Signaling Axis Is Critical for MCP-1-Dependent Migration and Adhesion of Monocytes.
J Immunol. 2021; 206: 181-192.

Davizon-Castillo P, Rowley JW, Rondina MT.

Megakaryocyte and Platelet Transcriptomics for Discoveries in Human Health and Disease.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020; 40: 1432-1440.

de Pins B, Mendes T, Giralt A, Girault JA.

The Non-receptor Tyrosine Kinase Pyk2 in Brain Function and Neurological and Psychiatric Diseases. *Front Synaptic Neurosci.* 2021; 13: 749001-749028.

Dib PRB, Quirino-Teixeira AC, Merij LB, Pinheiro MBM, Rozini SV, Andrade FB et al.

Innate immune receptors in platelets and platelet-leukocyte interactions. *J Leukoc Biol.* 2020; 108: 1157-1182.

Dikic I, Dikic I, Schlessinger J.

Identification of a new Pyk2 isoform implicated in chemokine and antigen receptor signaling. *J Biol Chem.* 1998; 273: 14301-14308.

Dourlen P, Fernandez-Gomez FJ, Dupont C, Grenier-Boley B, Bellenguez C, Obriot H et al.

Functional screening of Alzheimer risk loci identifies PTK2B as an in vivo modulator and early marker of Tau pathology. *Mol Psychiatry.* 2017; 22: 874-883.

Duan Y, Learoyd J, Meliton AY, Leff AR, Zhu X.

Inhibition of Pyk2 blocks lung inflammation and injury in a mouse model of acute lung injury. *Respir Res.* 2012; 13: 4-14.

Durrant TN, van den Bosch MT, Hers I.

Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ outside-in signaling. *Blood.* 2017; 130:1607-1619.

Ebermeyer T, Cognasse F, Berthelot P, Mismetti P, Garraud O, Hamzeh-Cognasse H.

Platelet Innate Immune Receptors and TLRs: A Double-Edged Sword. *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 7894-7924.

Edwards SD, Keep NH.

The 2.7 Å crystal structure of the activated FERM domain of moesin: an analysis of structural changes on activation. *Biochemistry.* 2001; 40: 7061-7068.

Eleniste PP, Patel V, Posritong S, Zero O, Largura H, Cheng YH et al.

Pyk2 and Megakaryocytes Regulate Osteoblast Differentiation and Migration Via Distinct and Overlapping Mechanisms. *J Cell Biochem.* 2016; 117: 1396-1406.

Engelmann B, Massberg S.

Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13: 34-45.

Estevez B, Du X.

New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology.* 2017; 32:162-177.

Estevez B, Kim K, Delaney MK, Stojanovic-Terpo A, Shen B, Ruan C et al.

Signaling-mediated cooperativity between glycoprotein Ib-IX and protease-activated receptors in thrombin-induced platelet activation. *Blood.* 2016; 127: 626–636.

Etulain J.

Platelets in wound healing and regenerative medicine.
Platelets. 2018; 29: 556-568.

Evangelista V, Pamuklar Z, Piccoli A, Manarini S, Dell'elba G, Pecce R et al.

Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets.
Blood. 2007; 109: 2461-2469.

Faria AVS, Andrade SS, Peppelenbosch MP, Ferreira-Halder CV, Fuhler GM.

The role of phospho-tyrosine signaling in platelet biology and hemostasis. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2021; 1868:118927.

Feng G, Yang X, Li Y, Wang X, Tan S, Chen F.

LPS enhances platelets aggregation via TLR4, which is related to mitochondria damage caused by intracellular ROS, but not extracellular ROS.
Cell Immunol. 2018; 328: 86-92.

Flaumenhaft R.

2013. Platelet secretion.
In: Platelets (Michelson AD, editor). 3rd ed. San Diego: Elsevier/Academic Press, p. 343-346.

Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr et al.

Extracellular DNA traps promote thrombosis.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107: 15880-15885.

Galgano L, Guidetti GF, Torti M, Canobbio I.

The Controversial Role of LPS in Platelet Activation In Vitro.
Int J Mol Sci. 2022; 23 :10900-10915.

Gay LJ, Felding-Habermann B.

Contribution of platelets to tumour metastasis.
Nat Rev Cancer. 2011; 11: 123-34.

Gemme M, Galgano L, Rustichelli S, Di Pasqua LG, Zarà M, Campomilla L et al.

The Proline-Rich Tyrosine Kinase Pyk2 Regulates Platelet Activation and Microvascular Thrombosis in a Model of Low-Grade Endotoxemia.
Thromb Haemost. 2026. doi: 10.1055/a-2876-1250. Epub ahead of print. PMID: 42150591.

Girault JA, Costa A, Derkinderen P, Studler JM, Toutant M.

FAK and PYK2/CAKbeta in the nervous system: a link between neuronal activity, plasticity and survival?
Trends Neurosci. 1999; 22:257-63.

Golebiewska EM, Poole AW.

Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond.
Blood Rev. 2015; 29: 153-162.

Gremmel T, Frelinger AL 3rd, Michelson AD.

Platelet Physiology.
Semin Thromb Hemost. 2024; 50:1173-1186.

Grover SP, Bergmeier W, Mackman N.

Platelet Signaling Pathways and New Inhibitors.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018; 38: 28-35.

Guidetti GF, Bernardi B, Consonni A, Rizzo P, Gruppi C, Balduini C et al.

Integrin $\alpha 2\beta 1$ induces phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent activation of phospholipase C $\gamma 2$ in platelets: role of Src kinase and Rac GTPase.
J Thromb Haemost. 2009; 7: 1200-1206.

Guidetti GF, Canobbio I, Torti M.

PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis.
Adv Biol Regul. 2015; 59: 36-52.

Guidetti GF, Torti M, Canobbio I.

Focal Adhesion Kinases in Platelet Function and Thrombosis.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2019; 39: 857-868.

Guidetti GF, Zarà M, Canobbio I, Visconte C, Di Nunzio G, Torti M.

Novel pharmacological inhibitors demonstrate the role of the tyrosine kinase Pyk2 in adhesion and aggregation of human platelets.
Thromb Haemost. 2016; 116: 904-917.

Guinamard R, Okigaki M, Schlessinger J, Ravetch JV.

Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response.
Nat Immunol. 2000; 131-6.

Guo L, Rondina MT.

The Era of Thromboinflammation: Platelets Are Dynamic Sensors and Effector Cells During Infectious Diseases.
Front Immunol. 2019; 10: 2204-2218.

Gupalo E., Kuk C., Qadura M., Buriachkovskaia L., Othman M.

Platelet–adenovirus vs. inert particles interaction: Effect on aggregation and the role of platelet membrane receptors.
Platelets. 2013; 24: 383–391.

Hadley CK, Galgano L, Gui Y, Carvalho da Silva AM, Porter DT et al.

The focal adhesion kinases regulate leptin action and the weight reducing effect of HDAC6 inhibition.
Nat Commun. 2026; 17: 1212-1229.

Hally K, Fauteux-Daniel S, Hamzeh-Cognasse H, Larsen P, Cognasse F.

Revisiting Platelets and Toll-Like Receptors (TLRs): At the Interface of Vascular Immunity and Thrombosis.
Int J Mol Sci. 2020; 21: 6150-6178.

Hamada K, Shimizu T, Matsui T, Tsukita S, Hakoshima T.

Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain.
EMBO J. 2000; 19: 4449-4462.

Han S, Mistry A, Chang JS, Cunningham D, Griffor M, Bonnette PC et al.

Structural characterization of proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2) reveals a unique (DFG-out) conformation and enables inhibitor design.

J Biol Chem. 2009; 284: 13193-13201.

Heger LA, Hortmann M, Albrecht M, Colberg C, Peter K, Witsch T et al.

Inflammation in acute coronary syndrome: Expression of TLR2 mRNA is increased in platelets of patients with ACS.

PLoS One. 2019; 14: e0224181.

Hitchcock IS, Fox NE, Prévost N, Sear K, Shattil SJ, Kaushansky K.

Roles of focal adhesion kinase (FAK) in megakaryopoiesis and platelet function: studies using a megakaryocyte lineage specific FAK knockout.

Blood. 2008;111: 596-604.

Hottz ED, Bozza FA, Bozza PT.

Platelets in Immune Response to Virus and Immunopathology of Viral Infections.

Front. Med. 2018; 5: 121-138.

Hu H, Armstrong PC, Khalil E, Chen YC, Straub A, Li M et al.

GPVI and GPIIb α mediate staphylococcal superantigen-like protein 5 (SSL5) induced platelet activation and direct toward glycans as potential inhibitors.

PLoS ONE. 2011; 6: e19190.

Huang J, Li X, Shi X, Zhu M, Wang J, Huang S.

Platelet integrin α IIb β 3: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting.

J Hematol Oncol. 2019; 12: 26-48.

Inyushin M, Zayas-Santiago A, Rojas L, Kucheryavykh Y, Kucheryavykh, L.

Platelet-generated amyloid beta peptides in Alzheimer's disease and glaucoma. Histology and histopathology, 2019; 34: 843–856.

Janke C, Magiera MM.

The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2020; 21: 307-326.

Jung SM, Moroi M.

Platelet glycoprotein VI.

Adv Exp Med Biol. 2008; 640: 53-63.

Kamen LA, Schlessinger J, Lowell CA.

Pyk2 is required for neutrophil degranulation and host defense responses to bacterial infection.

J Immunol. 2011; 186: 1656-1665.

Kaushansky K.

Thrombopoietin, the Primary Regulator of Platelet Production: From Mythos to Logos, a Thirty-Year Journey.

Biomolecules. 2024; 14: 489-503.

Kawasaki T, Kawai T.

Toll-like receptor signaling pathways.
Front Immunol. 2014; 5: 461-469.

Khan SA, Ilies MA.

The Phospholipase A2 Superfamily: Structure, Isozymes, Catalysis, Physiologic and Pathologic Roles.
Int J Mol Sci. 2023; 24:1353-1388.

Kim S, Cipolla L, Guidetti G, Okigaki M, Jin J, Torti M, et al.

Distinct role of Pyk2 in mediating thromboxane generation downstream of both G12/13 and integrin α IIb β 3 in platelets.
J Biol Chem. 2013; 288: 18194-18203.

Kim YK, Shin JS, Nahm MH.

NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases.
Yonsei Med J. 2016; 57: 5-14.

Kohno T, Matsuda E, Sasaki H, Sasaki T.

Protein-tyrosine kinase CAK β /PYK2 is activated by binding Ca²⁺/calmodulin to FERM F2 α 2 helix and thus forming its dimer.
Biochem J. 2008; 410: 513-523.

Landesberg R, Burke A, Pinsky D, Katz R, Vo J, Eisig SB et al.

Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide.
J Oral Maxillofac Surg. 2005; 63: 529-35.

Laurent PA, Séverin S, Hechler B, Vanhaesebroeck B, Payrastre B, Gratacap MP.

Platelet PI3K β and GSK3 regulate thrombus stability at a high shear rate.
Blood. 2015; 125: 881-888.

Lefrançois E, Looney MR.

Platelet Biogenesis in the Lung Circulation.
Physiology (Bethesda). 2019; 34: 392-401.

Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM et al.

The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors.
Nature. 2017; 544:105-109.

Leishman SJ, Do HL, Ford PJ.

Cardiovascular disease and the role of oral bacteria.
J Oral Microbiol. 2010; 2.

Li C, Götz J.

Pyk2 is a Novel Tau Tyrosine Kinase that is Regulated by the Tyrosine Kinase Fyn.
J Alzheimers Dis. 2018; 64: 205-221.

Li C, Li J, Li Y, Lang S, Youghare I, Zhu G et al.

Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries.
Adv Hematol. 2012; 2012: 384685-384699.

Li S, Tarlac V, Christanto RBI, French SL, Hamilton JR.

Determination of PAR4 numbers on the surface of human platelets: no effect of the single nucleotide polymorphism rs773902.

Platelets. 2021; 32: 988-991.

Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X.

Signaling during platelet adhesion and activation.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010; 30: 2341–2349.

Lipinski CA, Loftus JC.

Targeting Pyk2 for therapeutic intervention.

Expert Opin Ther Targets. 2010; 14: 95-108.

Liu B, Furevi A, Perepelov AV, Guo X, Cao H, Wang Q et al.

Structure and genetics of Escherichia coli O antigens.

FEMS Microbiol Rev. 2020; 44: 655-683.

Llewellyn RA, Thomas KS, Gutknecht MF, Bouton AH.

The nonreceptor protein tyrosine kinase Pyk2 promotes the turnover of monocytes at steady state.

J Leukoc Biol. 2017; 102: 1069-1080.

Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS.

LPS/TLR4 signal transduction pathway.

Cytokine. 2008; 42: 145-151.

Machlus KR, Italiano JE Jr.

The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation.

J Cell Biol. 2013; 201:785-796.

Malara A, Balduini A.

Blood platelet production and morphology.

Thromb Res. 2012; 129: 241-244.

Manganaro D, Consonni A, Guidetti GF, Canobbio I, Visconte C, Kim S et al.

Activation of phosphatidylinositol 3-kinase β by the platelet collagen receptors integrin $\alpha 2\beta 1$ and GPVI:

The role of Pyk2 and c-Cbl.

Biochim Biophys Acta. 2015; 1853: 1879-1888.

Marín Oyarzún CP, Glembotsky AC, Goette NP, Lev PR, De Luca G, Baroni Pietto MC et al.

Platelet Toll-Like Receptors Mediate Thromboinflammatory Responses in Patients with Essential Thrombocythemia.

Front. Immunol. 2020; 11:705-717.

Matsunaga N, Tsuchimori N, Matsumoto T, Ii M.

TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules.

Mol Pharmacol. 2011; 79: 34-41.

- Mayati A, Bruyere A, Moreau A, Jouan E, Denizot C, Parmentier Y et al.**
Protein Kinase C-Independent Inhibition of Organic Cation Transporter 1 Activity by the Bisindolylmaleimide Ro 31-8220.
PLoS One. 2015; 10: e0144667.
- Mbiandjeu S, Balduini A, Malara A.**
Megakaryocyte Cytoskeletal Proteins in Platelet Biogenesis and Diseases.
Thromb Haemost. 2022; 122: 666-678.
- McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E et al.**
Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood.
Nat. Med. 2007; 13: 463–469.
- Miajlovic H, Zapotoczna M, Geoghegan JA, Kerrigan SW, Speziale P, Foster TJ.**
Direct interaction of iron-regulated surface determinant IsdB of *Staphylococcus aureus* with the GPIIb/IIIa receptor on platelets.
Microbiology. 2010; 156: 920–928.
- Michelson AD.**
Therapies for the treatment of cardio-vascular disease.
Nat Rev Drug Discov. 2010; 9:154–169.
- Momi S, Canino J, Vismara M, Galgano L, Falcinelli E, Guglielmini G et al.**
Proline-rich tyrosine kinase Pyk2 regulates deep vein thrombosis.
Haematologica. 2022; 107: 1374-1383.
- Morita Y, Iseki A, Okamura S, Suzuki S, Nakauchi H, Ema H.**
Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen.
Exp Hematol. 2011;39: 351-359.
- Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S et al.**
Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution.
Nat Immunol. 2002; 3: 667-672.
- Negroni A., Pierdomenico M., Cucchiara S., Stronati L.**
NOD2 and inflammation: Current insights.
J. Inflamm. Res. 2018;11:49–60.
- Okigaki M, Davis C, Falasca M, Harroch S, Felsenfeld DP, Sheetz MP et al.**
Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100: 10740-10745.
- O'Seaghda M, van Schooten CJ, Kerrigan SW, Emsley J, Silverman GJ, Cox D et al.**
Staphylococcus aureus protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions.
Febs J. 2006; 273: 4831–4841.
- Ostergaard HL, Lysechko TL.**
Focal adhesion kinase-related protein tyrosine kinase Pyk2 in T-cell activation and function.
Immunol Res. 2005; 31: 267-282.

Panigrahi S, Ma Y, Hong L, Gao D, West XZ, Salomon RG, Byzova TV, Podrez EA.

Engagement of platelet toll-like receptor 9 by novel endogenous ligands promotes platelet hyperreactivity and thrombosis.

Circ Res. 2013; 112: 103-112.

Paone C, Rodrigues N, Ittner E, Santos C, Buntru A, Hauck CR.

The Tyrosine Kinase Pyk2 Contributes to Complement-Mediated Phagocytosis in Murine Macrophages.

J Innate Immun. 2016; 8: 437-451.

Petersen HJ, Keane C, Jenkinson HF, Vickerman MM, Jesionowski A, Waterhouse JC et al.

Human platelets recognize a novel surface protein, PadA, on *Streptococcus gordonii* through a unique interaction involving fibrinogen receptor GPIIb/IIIa.

Infect. Immun. 2010; 78: 413-422.

Plummer C, Wu H, Kerrigan SW, Meade G, Cox D, Ian Douglas CW

A serine-rich glycoprotein of *Streptococcus sanguis* mediates adhesion to platelets via GPIb.

Br. J. Haematol. 2005; 129: 101-109.

Portier I, Campbell RA.

Role of Platelets in Detection and Regulation of Infection.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2021; 41: 70-78.

Qiao J, Wu X, Luo Q, Wei G, Xu M, Wu Y et al.

NLRP3 regulates platelet integrin α IIb β 3 outside-in signaling, hemostasis and arterial thrombosis.

Haematologica. 2018; 103: 1568-1576.

Quach ME, Chen W, Li R.

Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage.

Blood. 2018; 131: 1512-1521.

Raadsen M, Du Toit J, Langerak T, van Bussel B, van Gorp E, Goeijenbier M.

Thrombocytopenia in Virus Infections.

J Clin Med. 2021; 10: 877-910.

Reddy EC, Rand ML.

Procoagulant Phosphatidylserine-Exposing Platelets in vitro and in vivo.

Front Cardiovasc Med. 2020; 7:15.

Reis e Sousa C, Yamasaki S, Brown GD.

Myeloid C-type lectin receptors in innate immune recognition.

Immunity. 2024; 57: 700-717.

Riggs D, Yang Z, Kloss J, Loftus JC.

The Pyk2 FERM regulates Pyk2 complex formation and phosphorylation.

Cell Signal. 2011; 23: 288-296.

Sahu SN, Nunez S, Bai G, Gupta A.

Interaction of Pyk2 and PTP-PEST with leupaxin in prostate cancer cells.

Am J Physiol Cell Physiol. 2007; 292: 2288-2296.

Salazar SV, Cox TO, Lee S, Brody AH, Chyung AS, Haas LT et al.

Alzheimer's Disease Risk Factor Pyk2 Mediates Amyloid- β -Induced Synaptic Dysfunction and Loss.
J Neurosci. 2019; 39: 758-772.

Sang Y, Roest M, de Laat B, de Groot PG, Huskens D.

Interplay between platelets and coagulation.
Blood Rev. 2021; 46: 100733.

Sakurai K, Miyashita T, Okazaki M, Yamaguchi T, Ohbatake Y, Nakanuma S et al.

Role for Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and Platelet Aggregation in Early Sepsis-induced Hepatic Dysfunction.
In Vivo. 2017; 31: 1051-1058.

Schulz C, Gabriel G, von Köckritz-Blickwede M.

Detrimental Role of Neutrophil Extracellular Traps during Dengue Virus Infection.
Trends Immunol. 2020; 41: 3–6.

Selvadurai MV, Hamilton JR.

Structure and function of the open canalicular system - the platelet's specialized internal membrane network.
Platelets. 2018; 29:319-325.

Senis YA, Mazharian A, Mori J.

Src family kinases: at the forefront of platelet activation.
Blood. 2014; 124: 2013-2024.

Sharda A, Flaumenhaft R.

The life cycle of platelet granules.
F1000Res. 2018 Feb 28; 7: 236-248.

Sharma S, Tyagi T, Antoniak S.

Platelet in thrombo-inflammation: Unraveling new therapeutic targets.
Front. Immunol. 2022; 13: 1039843-1039860.

Stefanini L, Bergmeier W.

RAP GTPases and platelet integrin signaling.
Platelets. 2019; 30:41-47.

Steimle A, Autenrieth IB, Frick JS.

Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens.
Int J Med Microbiol. 2016; 306: 290-301.

Sung PS, Huang TF, Hsieh SL.

Extracellular vesicles from CLEC2-activated platelets enhance dengue virus-induced lethality via CLEC5A/TLR2.
Nat. Commun. 2019; 10: 2402-2415

Suzuki-Inoue K.

Platelets and cancer-associated thrombosis: Focusing on the platelet activation receptor CLEC-2 and podoplanin.
Blood. 2019; 134: 1912–1918.

Tang X, Xu Q, Yang S, Huang X, Wang L, Huang F et al.

Toll-like Receptors and Thrombopoiesis.

Int J Mol Sci. 2023; 24: 1010-1036.

Thomas MR, Storey RF.

The role of platelets in inflammation.

Thromb Haemost. 2015; 114: 449-458.

Thon JN, Italiano JE.

Platelet: production, morphology and ultrastructure.

Handb Exp Pharmacol. 2012; 210: 3-22.

Tian Y, Zong Y, Pang Y, Zheng Z, Ma Y, Zhang C et al.

Platelets and diseases: signal transduction and advances in targeted therapy.

Sig Transduct Target Ther 2025; 10: 159-188.

Trivigno SMG, Guidetti GF, Barbieri SS, Zarà M.

Blood Platelets in Infection: The Multiple Roles of the Platelet Signalling Machinery.

Int J Mol Sci. 2023; 24: 7462-7480.

Ueda H, Abbi S, Zheng C, Guan JL.

Suppression of Pyk2 kinase and cellular activities by FIP200.

J Cell Biol. 2000; 149: 423-430.

Vainchenker W, Raslova H.

Megakaryocyte polyploidization: role in platelet production.

Platelets. 2020; 31: 707-716.

Vallance TM, Zeuner MT, Williams HF, Widera D, Vaiyapuri S.

Toll-Like Receptor 4 Signalling and Its Impact on Platelet Function, Thrombosis, and Haemostasis.

Mediators Inflamm. 2017; 2017: 9605894-9605907.

Vanarotti MS, Finkelstein DB, Guibao CD, Nourse A, Miller DJ, Zheng JJ.

Structural Basis for the Interaction between Pyk2-FAT Domain and Leupaxin LD Repeats.

Biochemistry. 2016; 55: 1332-1345.

Van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM.

Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives.

Nat Rev Cardiol. 2019; 16:166-179.

Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B.

Calcium signaling in platelets.

J Thromb Haemost. 2009; 7:1057–1066.

Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B.

Cell adhesion mechanisms in platelets.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008; 28:403-12.

Versteeg H, Heemskerk J, Levi M, Reitsma P.

New fundamentals in hemostasis.

Physiol Rev. 2013; 93: 327-358.

Vilahur G, Gutiérrez M, Arzanauskaite M, Mendieta G, Ben-Aicha S, Badimon L.

Intracellular platelet signalling as a target for drug development.
Vascul Pharmacol. 2018; 111:22-25.

Violi F, Cammisotto V, Bartimoccia S, Pignatelli P, Carnevale R, Nocella C.

Gut-derived low-grade endotoxaemia, atherothrombosis and cardiovascular disease.
Nat Rev Cardiol. 2023; 20: 24-37.

Vogel S, Bodenstein R, Chen Q, Feil S, Feil R, Rheinlaender J et al.

Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis.
J Clin Invest. 2015; 125: 4638-4654.

Voss TD, Hezinger L, Kufer TA.

Pattern Recognition by NOD-Like Receptors.
Adv Exp Med Biol. 2025; 1476: 83-105.

Wang Q, Xie Y, Du QS, Wu XJ, Feng X, Mei L et al.

Regulation of the formation of osteoclastic actin rings by proline-rich tyrosine kinase 2 interacting with gelsolin.
J Cell Biol. 2003; 160: 565-575.

Wang X, Zhou H.

Impact of antiplatelet therapy on outcomes of sepsis: A systematic review and meta-analysis.
PLoS One. 2025; 20: e0322293.

White JG.

2013. Platelet structure. In: Platelets (Michelson AD, editor).
3rd ed. San Diego: Elsevier/Academic Press, p.117–144.

Xie W, Yu X, Yang Q, Ke N, Wang P, Kong H et al.

The Immunomechanical Checkpoint PYK2 Governs Monocyte-to-Macrophage Differentiation in Pancreatic Cancer.
Cancer Discov. 2025; 15: 1740-1765.

Xiong WC, Feng X.

PYK2 and FAK in osteoclasts.
Front Biosci. 2003; 8: 1219-1226.

Xiong WC, Macklem M, Parsons JT.

Expression and characterization of splice variants of PYK2, a focal adhesion kinase-related protein.
J Cell Sci. 1998; 111: 1981-1991.

Xu X, Zhang D, Oswald B, Carrim N, Wang X, Hou Y, Zang Q. et al.

Platelets are versatile cells: New discovery in hemostasis, thrombosis. Immune responses, tumor metastasis and beyond.
Crit Rev Clin Lab Sci. 2016; 53:409-430.

Zahn A, Jennings N, Ouwehand WH, Allain JP.

Hepatitis C virus interacts with human platelet glycoprotein VI.
J Gen Virol. 2006; 87: 2243-2251.

Zhang S, Zhang S, Hu L, Zhai L, Xue R, Ye J et al.

Nucleotide-binding oligomerization domain 2 receptor is expressed in platelets and enhances platelet activation and thrombosis.

Circulation. 2015; 131: 1160–1170.

Zhu X, Bao Y, Guo Y, Yang W.

Proline-Rich Protein Tyrosine Kinase 2 in Inflammation and Cancer.

Cancers. 2018; 10: 139-153.