

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**

***FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA***

**DOTTORATO DI RICERCA IN RIPRODUZIONE, SVILUPPO  
ED ACCRESCIMENTO DELL'UOMO**

**COORDINATORE: PROF. C. PIGNATA**

**TESI SPERIMENTALE**

**FATTORI DI CRESCITA E SISTEMA RIPRODUTTIVO**

**RELATORE**

Chiar.mo  
Prof. C. Di Carlo

**CANDIDATO**

Dott. Giuseppe Bifulco

*ANNO ACCADEMICO 2006/2007*

## **INDICE**

**Introduzione**

**Fattori di crescita ed unità materno-fetale**

**Materiali e Metodi**

**Effetto dell'insulina sulla proliferazione placentare**

**Effetto della leptina sulla proliferazione placentare**

**Conclusioni**

**Miomi uterini e trasmissione del segnale proliferativi**

**Materiali e Metodi**

**Effetto degli analoghi del GnRH sulla proliferazione cellulare  
in miomi uterini**

**Conclusioni**

## **INTRODUZIONE**

I fattori di crescita sono polipeptidi che modulano prevalentemente la proliferazione e la differenziazione cellulare, operando attraverso legami con specifici recettori della membrana cellulare, agendo localmente e funzionando in maniera paracrina ed autocrina.

E' noto come diversi fattori di crescita siano in grado di modulare l'attività degli organi e tessuti appartenenti al sistema riproduttivo mediante meccanismi complessi e non ancora del tutto chiariti.

Affinché mitogenesi e la differenziazione avvengano, le cellule devono essere esposte ad una serie di fattori di crescita, con importanti limitazioni per quanto riguarda la durata e le concentrazioni. I fattori di crescita appaiono quindi di fondamentale importanza per tutto ciò che riguarda lo sviluppo e la crescita embrionale e fetale e per l'insorgenza di malattie neoplastiche benigne e maligne.

Nel corso degli anni numerosi studi sono stati effettuati allo scopo di chiarire i meccanismi molecolari alla base di tali eventi anche in considerazione del fatto che cellule derivanti da organi del sistema riproduttivo non solo presentavano grandi quantità di

recettori ma erano anche in grado di garantire una produzione costante di tali fattori di crescita.

La gran parte di tali studi hanno focalizzato la loro attenzione sui cambiamenti ormonali collegati agli episodi morfologici e autocrini/paracrini che avvengono nell'ovaio e che rendono la coordinazione di questo sistema uno degli episodi più straordinari che esistono in biologia umana.

Negli studi eseguiti dal nostro gruppo di ricerca è stato negli anni indagato il ruolo di ormoni/fattori di crescita nella genesi di due patologie molto frequenti in ostetricia e ginecologi: il diabete gestazionale e le alterazioni placentari ad esso correlate e la miomatosi uterina e le modificazioni indotte dalla terapia medica con analoghi del GnRH.

## **FATTORI DI CRESCITA ED UNITA'**

### **MATERNO-FETALE**

Durante la gravidanza il feto e la placenta formano un'unica unità funzionale, con la placenta che, sin dalle fasi iniziali della gestazione, svolge un ruolo centrale nella regolazione della crescita fetale attraverso la sua complessa attività metabolica ed endocrina. La stretta relazione esistente tra sviluppo della placenta e crescita fetale è ben dimostrata dal fatto che il peso della placenta e quello fetale tendono ad aumentare proporzionalmente nel corso della gravidanza.

Per quanto attiene al trasporto dei glicidi, la placenta regola selettivamente il trasporto del glucosio dal compartimento materno a quello fetale e viceversa. In caso di diabete materno, l'iperglicemia materna tende ad alterare non soltanto il trasporto materno-fetale del glucosio, ma anche l'intrinseco metabolismo placentare del glucosio e del glicogeno.

Diversi studi in letteratura indicano che le gravidanze complicate da diabete mellito (GDM) sono caratterizzate da placente più grosse e più pesanti e da un incrementato passaggio

di glucosio dal compartimento materno a quello fetale con conseguente iperglicemia fetale, iperinsulinemia reattiva e macrosomia fetale.

Numerosi studi sperimentali hanno dimostrato che diversi fattori di crescita sono coinvolti nel processo di ipercellularità placentare; in particolar modo è stato osservato che l'EGF (epidermal growth factor), l'IGF1 (insulin-like growth factor) ed il TGF $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ) sono in grado di stimolare la proliferazione di cellule di citotrofoblasto in coltura e la loro capacità di produrre hCG e progesterone.

E' tuttavia ben noto che il GDM va ad alterare la normale funzione dei fattori di crescita e diversi studi indicano che il fisiologico incremento di IGF-II che si verifica nel corso di una gravidanza non complicata è marcatamente ridotto nelle gravidanze complicate da diabete. Il mancato aumento di IGF-II potrebbe avere implicazioni dirette sulle anomalie placentari in gravidanza e indirette sullo sviluppo e metabolismo fetali.

L'insulina e la leptina, fattori di crescita i cui livelli ematici appaiono elevati in corso di gravidanze complicate da diabete, sono in grado di stimolare la risposta proliferativa e

metabolica in diversi tessuti. E' noto che la placenta normalmente contiene un gran numero di recettori per l'insulina e per la leptina che sono distribuiti sulla superficie del sinciziotrofoblasto.

Lo scopo di questa linea di ricerca è stato quello di indagare l'effetto di insulina, leptina e glucosio sulla proliferazione cellulare, sul metabolismo glucidico e sulle diverse vie di trasmissione del segnale mitogenico e metabolico in cellule umane di corioncarcinoma (cellule JAr), che rappresentano un valido modello sperimentale per lo studio in vivo delle funzioni del trofoblasto.

## **MATERIALI E METODI**

### ***Culture cellulari***

La linea cellulare di corioncarcinoma di placenta umana (JAR) è stata acquistata da American Type Culture Collection (Rockville, MD) ed è stata cresciuta a 37°C in CO<sub>2</sub> al 5% in mezzo RPMI-1640, con l'aggiunta di 10% di siero fetale bovino.

### ***Trasfezione e frazionamento cellulare***

Gli esperimenti di trasfezione transiente sono stati eseguiti utilizzando il metodo della Lipofectamina. Le cellule alla confluenza del 50-80% sono state lavate due volte con Optimum ed incubate per 8 ore con 10 µg dell'oligonucleotide antisenso di SHP-2. Il mezzo è stato quindi sostituito con DMEM supplementato con 10% FCS.

Le frazioni subcellulari sono state preparate mediante una modificazione del metodo di Simpson (24). Le cellule sono state lavate con Buffer A (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 255 mM saccarosio, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 5 µg/ml aprotinina, 5 µg/ml leupeptina), lisate mediante passaggio in ago 27-gauge e centrifugate a 800 x



g per 5 min a 4°C per pellettare i nuclei. Il sovrinatante è stato centrifugato a 16,000 x g per 20 min a 4°C. Il pellet è stato caricato su di un cuscinetto di saccarosio 1.12 M e centrifugato a 212,000 x g per 70 min allo scopo di separare le membrane plasmatiche. Il sovrinatante è stato quindi centrifugato a 212,000 x g per 20 min per separare le membrane interne (pellet) ed il citosol (sovrinatante).

### ***Incorporazione di timidina***

Le cellule sono state tenute in coltura in multi-well da 24 pozzetti e incubate per 12 ore in mezzo contenente 10% di siero fetale bovino e 100mg/ml di glucosio. Il mezzo è stato poi rimosso e le cellule rese quiescenti mediante privazione da siero e da glucosio per 16 ore in mezzo contenente 0.25% BSA. Le cellule sono state quindi incubate per tempi differenti (1-4 giorni) in DMEM, contenente 0.25% BSA con 6mM (NG) o 25mM (HG) di glucosio in assenza o in presenza di insulina (100nM), leptina (10 nM), IGF-I (100nM), EGF (100ng/ml) e FBS (10%). Nelle ultime 4 ore sono state aggiunti 5µCi/ml di timidina triziata per monitorare la sintesi del DNA. Dopo questo periodo finale

d'incubazione, le cellule sono state lisate in NaOH 1N ed è stata misurata la radioattività.

### ***Saggio di proliferazione cellulare***

Le cellule sono state tenute nel normale mezzo di coltura con l'aggiunta di 6mM o 25mM di glucosio. Per determinare l'effetto di insulina, leptina, IGF-I, EGF e FBS sul numero totale, le cellule sono state piastrate in multi-well da 24 pozzetti con mezzo contenente 0.25% BSA e sono stati poi aggiunti i fattori di crescita per tempi differenti (2-7 giorni). Le cellule sono state poi staccate dalla piastra mediante tripsinizzazione e contate in un contatore Coulter.

### ***Frammentazione del DNA***

Le cellule JAr sono state private da siero e da glucosio per 12 ore e poi sono state incubate in DMEM, senza siero, e con 6mM o 25mM di glucosio per 48 ore con TNF $\alpha$  (25ng/ml) e in assenza o in presenza di insulina e leptina. Per analizzare la frammentazione del DNA, è stato isolato il DNA da  $2 \times 10^6$  cellule. Le cellule sono state lisate in 0.5 ml di buffer di lisi (10mM Tris (pH 7.5), 0.6% SDS, 10mM EDTA); è stata poi aggiunta una soluzione di RNAsi alla concentrazione di 15 $\mu$ g/ml

ed il lisato è stato incubato a 37°C. E' stato poi aggiunto NaCl 1M e i tubi sono stati incubati a 4°C per 2 ore. I tubi sono stati poi centrifugati (14.000 × g; 4°C per 30 minuti) ed è stato estratto il DNA nel sovrinatante mediante precipitazione con fenolo-cloroformio ed etanolo. Dopo la centrifugazione a 14,000 × g , il DNA è stato essiccato e risospeso in 20µl di buffer TE (10mM Tris, 10mM EDTA). Il DNA è stato poi separato su gel di agarosio all'1.5% contenente 0.5µg/ml di etidio bromuro e il risultato della migrazione elettroforetica è stato poi osservato alla luce UV.

### ***Binding dell'insulina***

Le cellule JAr sono state private da siero e da glucosio per 16 ore e poi sono state incubate in DMEM senza siero e con 6mM o 25mM di glucosio per 48 ore. Dopo questo lasso di tempo, le cellule sono state incubate con insulina marcata con I<sup>125</sup> (approssimativamente 20,000 cpm) in un volume finale di 1 ml di binding buffer con un pH di 7.8 che conteneva 25mM di Tris-HCl, 120mM NaCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub> , 2.5mM KCl 0.1% (w/v), 2% BSA e 1 mg di Bacitracina. Il binding non specifico è stato determinato come misura della radioattività rimasta legata in presenza di un grande eccesso di insulina non marcata ( $8.5 \times 10^{-5}$

) e, sottraendo tale quota alla radioattività totale legata, si è calcolato il legame specifico.

### ***Fosforilazione e contenuto totale di IR***

Le cellule JAr sono state private da siero e da glucosio per 12 ore e poi sono state incubate in RPMI-1640 senza siero e con 6mM o 25mM di glucosio per 48 ore in assenza o in presenza di insulina. Dopo il periodo d'incubazione le cellule sono state lisate in 50mM HEPES ad un pH di 7.5, 150mM NaCl, 10% glicerolo, 1% Triton X-100, 10mM EDTA, 10mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10µg/ml aprotinina, 10µg/ml leupeptina, 100mM NaF, 1mM fenilmetilsulfonil fluoride (TAT buffer). I lisati sono stati precipitati con anticorpi specifici anti-IR ed è stato poi eseguito un western blot con anticorpi anti-fosfotirosina per la valutazione della fosforilazione di tali proteine e con anticorpi anti-IR per determinare il contenuto totale di tali proteine.

### ***Fosforilazione e contenuto totale di IRS1 e MAPK***

Le cellule sono state trattate come descritto precedentemente. Dopo incubazione le cellule sono state lisate in TAT buffer. I lisati sono stati precipitati con anticorpi specifici anti-IRS1 ed è stato poi eseguito un western blot con anticorpi anti-fosfotirosina

o con anticorpi anti-fosfo-MAPK per la valutazione della fosforilazione di tali proteine e con anticorpi anti-IRS1 o anti-MAPK per determinare il contenuto totale di tali proteine.

### ***Attività tirosino-fosfatase***

Le cellule JAr sono state incubate con glucosio ed insulina come descritto precedentemente. Per valutare l'attività tirosino-fosfatase le cellule sono state incubate con o senza 2mM di vanadato in un buffer senza fosfato per 20 minuti a 37°C. Le cellule sono state poi lisate in 0.5% Triton-X-100 e i lisati sono stati immunoprecipitati con anticorpi specifici anti-IR e anti-IRS1. L'immunopellet è stato lavato e risospeso in un buffer contenente 50mM HEPES, pH 7.0. La reazione è stata iniziata con l'aggiunta di 20mM di pNPP a 37°C per 15 minuti e poi è stata terminata con l'aggiunta di 1N NaOH; la quantità totale di p-nitrofenolo rilasciata è stata dosata con metodiche spettrofotometriche.

### ***Associazione di SHP-2 ad IRS1***

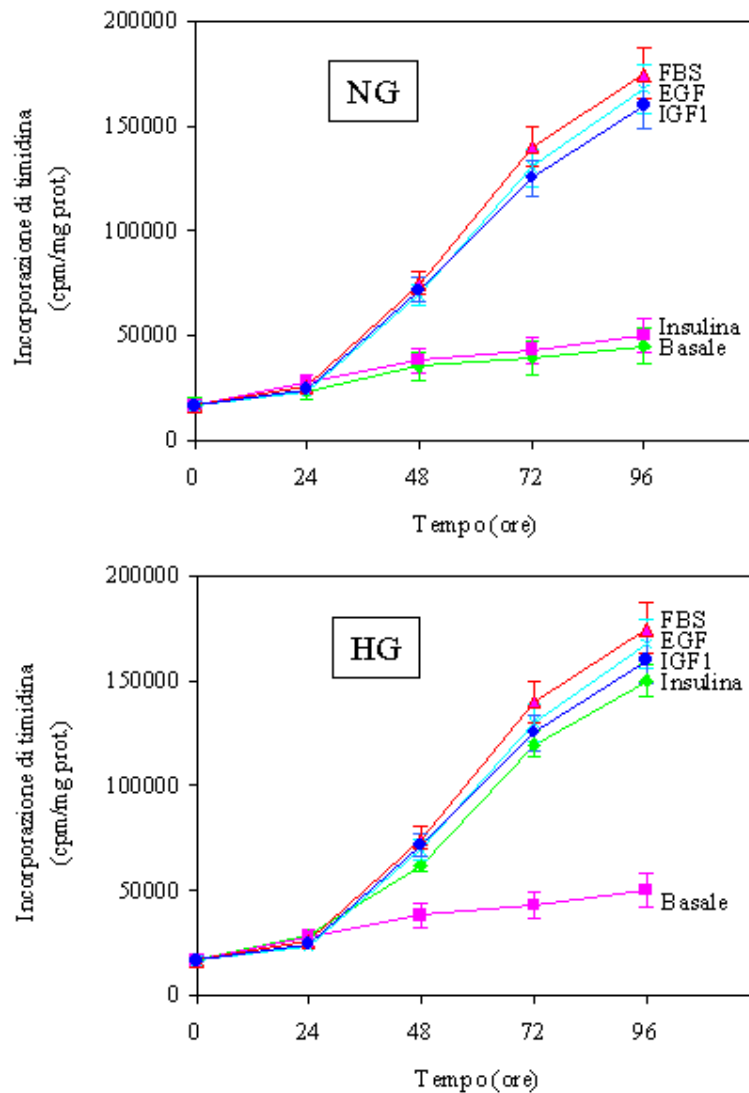
Per eseguire esperimenti di co-precipitazione, sono stati utilizzati estratti cellulari ottenuti da cellule JAr trattate come è stato descritto precedentemente. Ogni piastra di coltura è stata lisata in

TAT buffer e gli estratti sono stati incubati con anticorpi anti-IR e anti-IRS1. I campioni separati elettroforeticamente sono stati trasferiti su carta da filtro di nitrocellulosa ed i filtri sono stati incubati con anticorpi anti-SHP-2.

### ***Effetti dell'insulina sulla proliferazione placentare***

#### **RISULTATI**

L'effetto del glucosio (6-25 mM), in presenza o assenza di insulina (100nM), sulla proliferazione cellulare è stato valutato determinando l'incorporazione di timidina triziata da parte delle cellule JAr, utilizzata come indice della sintesi di DNA e quindi di replicazione cellulare. In assenza di insulina, le cellule JAr cresciute in mezzo con alte concentrazioni di glucosio (HG) (Fig. 1B) presentavano un decremento del 20% nell'incorporazione della timidina triziata rispetto alle cellule coltivate in mezzo contenente basse concentrazioni di glucosio (NG) (Fig. 1A). L'insulina non induceva l'incorporazione di timidina triziata da parte delle cellule JAr NG. Al contrario, nelle cellule HG l'insulina incrementava l'incorporazione di timidina triziata di circa 4 volte dopo 96 ore. Questi risultati dimostrano che l'insulina è in grado di aumentare l'incorporazione di timidina triziata solo quando le cellule JAr sono tenute in un mezzo di coltura con elevate concentrazioni di glucosio.

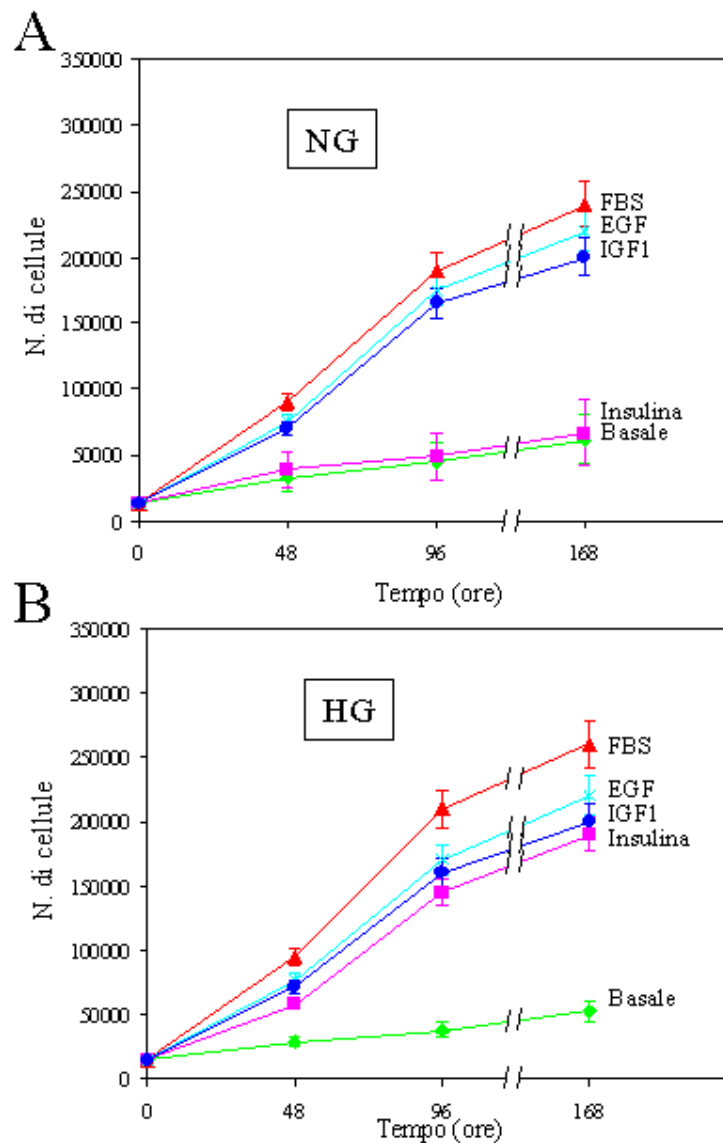


**Figura 1:** Effetto di glucosio ed insulina sulla incorporazione di timidina di cellule JAr. A) Presenza di 100 mg/dl glucosio; B) Presenza di 450 mg/dl glucosio.

Gli effetti del glucosio sulla proliferazione cellulare insulina-dipendente delle cellule JAr sono stati anche valutati mediante un saggio teso a valutare il numero di cellule. L'aggiunta di 100nM di insulina a cellule JAr piastrate in mezzo di coltura in assenza di siero fetale bovino non era in grado di indurre la proliferazione



cellulare in presenza di basse concentrazioni di glucosio (Fig. 2A). Al contrario quando le cellule erano incubate in alte concentrazioni di glucosio, la crescita cellulare insulino-dipendente aumentava di 3.5 volte dopo 168 ore (Fig. 2B).

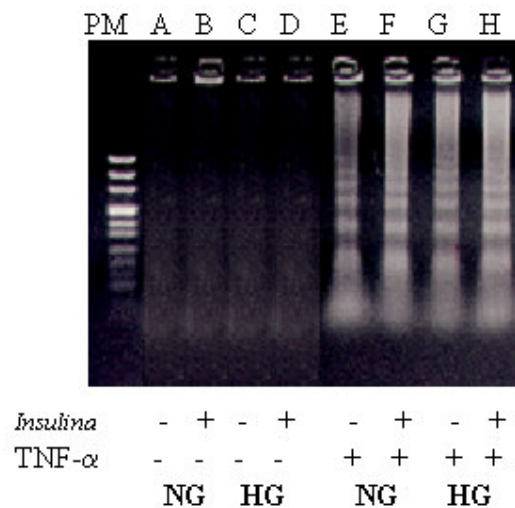


**Figura 2:** Effetto del glucosio e dell'insulina sul numero di cellule JAR. A) Presenza di 100 mg/dl glucosio; B) Presenza di 450 mg/dl glucosio.

Per valutare la specificità dell'effetto sinergico di glucosio ed insulina sulla proliferazione delle cellule JAr sono stati utilizzati differenti fattori di crescita. Le cellule JAr sono state tenute per 48 ore in mezzo di coltura con alte o basse concentrazioni di glucosio in presenza o assenza di IGF-I, EGF e FBS ed è stata poi misurata l'incorporazione di timidina triziata (Fig. 1 A-B). In presenza di 100nM di IGF-I, l'incorporazione di timidina triziata aumentava sia nelle cellule HG che in quelle NG rispettivamente di 4.0 e 4.5 volte dopo 72 ore. Risultati simili sono stati ottenuti dopo aggiunta al mezzo di coltura di EGF e FBS.

In letteratura è stato ampiamente dimostrato che il glucosio è un importante regolatore dell'apoptosi cellulare. Per valutare la possibilità che le differenze tra cellule HG e NG fossero dovute non ad una differenza della proliferazione cellulare bensì ad una diversa attivazione del meccanismo della morte cellulare programmata nei due gruppi di cellule è stata effettuata un'analisi della frammentazione del DNA. Come mostrato in Figura 3, non si riscontrata frammentazione del DNA, espressione del meccanismo apoptotico, né nelle condizioni NG o HG né in assenza o presenza di 100nM di insulina. Per verificare che effettivamente la frammentazione del DNA fosse il marcatore dell'apoptosi in questo tipo cellulare, abbiamo usato il  $\text{TNF}\alpha$ , un

tipico induttore dell'apoptosi. Come si può osservare (Fig. 3, linee F,H), il TNF $\alpha$  determinava una frammentazione del DNA sia nelle cellule HG che nelle cellule NG. Questi dati dimostrano che gli effetti del glucosio sulla proliferazione insulino-mediata delle cellule JAr non è dovuto a differenza nell'attivazione del meccanismo dell'apoptosi.



**Figura 3:** *Effetto di glucosio ed insulina sull'apoptosi di cellule JAr.*

### ***Effetti del glucosio sul binding del recettore per l'insulina (IR)***

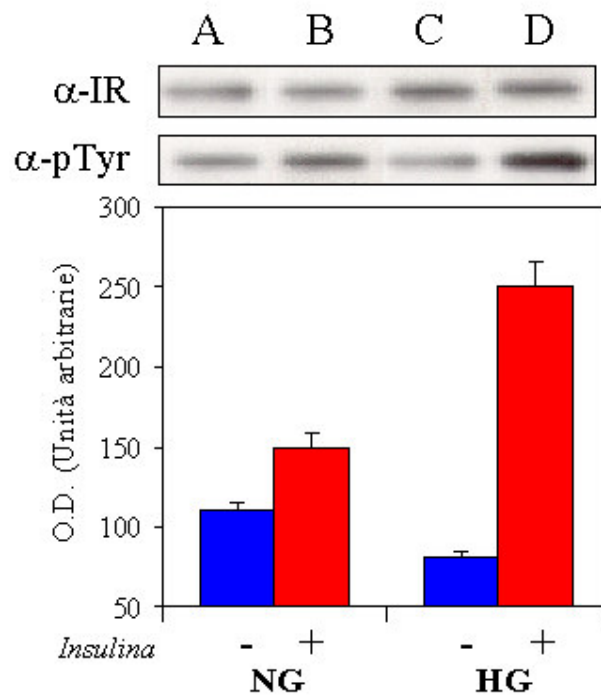
L'insulina induce le risposte metaboliche e proliferative mediante il legame al suo recettore. Per indagare il meccanismo molecolare alla base della alterata proliferazione delle cellule JAr mediata dall'insulina e potenziata da alte concentrazioni di glucosio (HG), è stato valutato il legame dell'insulina al proprio recettore.

Non sono state osservate differenze significative nel binding del recettore nelle cellule tenute a basse o ad alte concentrazioni di glucosio per 48h (rispettivamente  $11.7 \pm 1.7\%$  e  $12.2 \pm 2.0\%$ ), dimostrando che le caratteristiche del mezzo di coltura non hanno effetto sul binding dell'insulina. La capacità di legame, valutata con lo scatchard plot, non ha mostrato alcuna differenza significativa tra cellule NG e HG. Questi dati indicano quindi che l'effetto sinergico del glucosio e dell'insulina sulla proliferazione cellulare non è dovuto ad un incrementato legame dell'insulina al proprio recettore.

***Effetti di glucosio ed insulina sulla fosforilazione del recettore per l'insulina***

Per indagare la possibilità che il glucosio potesse regolare la fosforilazione di IR nelle cellule JAr, sono stati eseguiti saggi di Western Blot utilizzando anticorpi anti-fosfotirosina su estratti cellulari immunoprecipitati con anticorpi anti- $\beta$ -subunità di IR (Figura 4). In cellule HG, la fosforilazione insulino-indipendente del recettore era ridotta del 40% rispetto alle cellule NG. In presenza di insulina, la fosforilazione di IR risultava incrementata in maniera significativa solo in presenza di elevate concentrazioni di glucosio. Questi dati dimostrano quindi che

l'esposizione cronica delle cellule JAr ad alte concentrazioni di glucosio determina una diminuzione della autofosforilazione basale del recettore per l'insulina mentre incrementa questo effetto in presenza di insulina. Come mostrato, tutte le differenze osservate non erano dovute a modificazioni del contenuto totale di tali proteine (Figura 4).



**Figura 4:** Effetto di glucosio ed insulina sulla fosforilazione del recettore per l'insulina

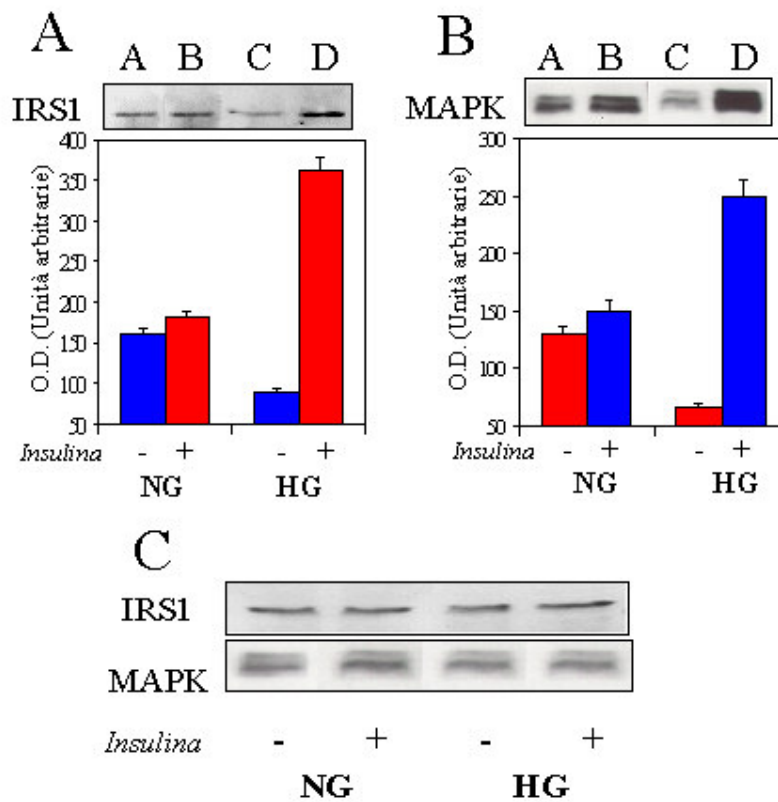
#### ***Effetti di glucosio ed insulina sull'attivazione di IRS1 e MAPK***

Dopo la sua fosforilazione, il recettore per l'insulina provvede alla fosforilazione di residui di tirosina di alcune proteine,

mediatori precoci del signaling intracellulare, tra cui IRS1, coinvolta nella via mitogenica. Per comprendere più a fondo il meccanismo molecolare alla base della proliferazione delle cellule Jar mediata dall'insulina e potenziata da alte concentrazioni di glucosio, è stata valutata la fosforilazione e l'attivazione di IRS1. In assenza di insulina, l'immunoprecipitazione di IRS1 in cellule HG, seguita da analisi di immunoblot con anticorpi anti-fosfotirosina, ha rilevato una riduzione del 50% della fosforilazione di IRS1 in confronto alle cellule NG. In presenza di insulina la fosforilazione di IRS1 nelle cellule HG incrementava di 4 volte, mentre nelle cellule NG l'insulina non era in grado di indurre la fosforilazione della proteina (Fig. 5).

In diversi tipi di cellule la fosforilazione di IRS1 è seguita dall'attivazione di altre proteine intracellulari come per esempio MAPK (mitogen activated protein kinase). Come mostrato (Fig. 5), la fosforilazione insulino-indipendente di MAPK si riduceva del 50% in cellule HG rispetto alle cellule NG. In maniera analoga a quanto osservato per IRS1, l'insulina era invece in grado di indurre la fosforilazione della MAPK di 4 volte solo nelle cellule HG. Come mostrato in Figura 5, tutte le differenze

osservate non erano dovute a modificazioni del contenuto totale di tali proteine.



**Figura 5:** Effetto di glucosio ed insulina sulla fosforilazione di IRS1 e MAPK.

### *Effetto di glucosio e insulina sull'attività tirosino-fosfataseica*

Per comprendere meglio il meccanismo molecolare attraverso cui alte concentrazioni di glucosio regolano la fosforilazione di IR e di IRS1 e l'attivazione di MAPK, abbiamo studiato il ruolo delle

proteine con attività tirosino-fosfatase (PTPs), cioè in grado di modulare la fosforilazione di altri substrati intracellulari.

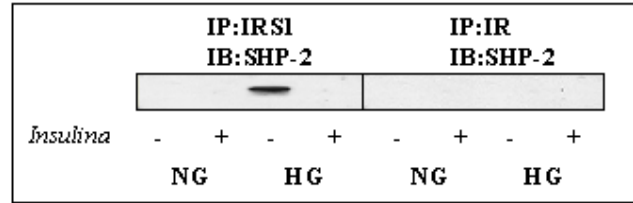
Tali proteine sono infatti coinvolte nella regolazione del signaling intracellulare dell'insulina. Innanzitutto abbiamo valutato se l'effetto indotto da alti livelli di glucosio sulla fosforilazione di IR ed IRS1 potesse essere mediato da differenze nell'attività delle PTPs. A tale scopo è stato eseguito un saggio teso a valutare l'attività tirosino-fosfatase in cellule HG e NG utilizzando come substrato il p-nitrofenilfosfato (pNPP). Per identificare selettivamente l'attività tirosino-fosfatase sono stati usati potenti inibitori dell'attività tirosino-fosfatase come il vanadato e il pervanadato. L'attività tirosino-fosfatase totale e associata a IR e IRS1 è stata valutata come attività tirosino-fosfatase inibita dal vanadato. Come mostrato nella Tabella I, l'attività PTPs associata ad IRS1 era rilevabile solo in cellule HG ed in assenza di insulina. Inoltre, in presenza di insulina, l'attività tirosino-fosfatase era ridotta di 2.7 volte. Al contrario di quanto accadeva per IRS1, nessuna attività tirosino-fosfatase associata ad IR veniva misurata nelle cellule HG. Questi dati dimostrano l'importante ruolo svolto dalle tirosino-fosfatasi come selettivi regolatori della fosforilazione glucosio/insulina mediata di IRS1.



	TOTALE		IR		IRS1	
	NG	HG	NG	HG	NG	HG
- Ins	0.8±0.04	2.3±0.04	0.31±0.013	0.4±0.02	0.6±0.03	2.17±0.37
+Ins	0.6±0.02	0.9±0.02	0.29±0.011	0.39±0.023	0.5±0.012	0.8±0.021

**Tabella I: Attività tirosino-fosfatase (PTPs) in cellule JAr.**

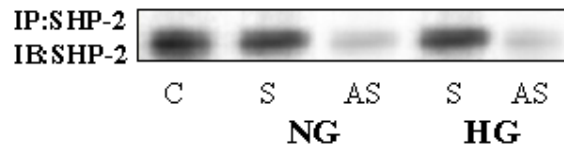
Per identificare la PTP coinvolta nella regolazione del segnale IR nelle cellule JAr, abbiamo eseguito esperimenti di co-precipitazione tra IR, IRS1 e SHP-2, una proteina con attività tirosino-fosfatase descritta essere associata alla via del recettore per l'insulina. In modo molto interessante, come mostrato nella Figura 6, SHP-2 co-precipita con IRS1 nelle cellule HG in assenza di insulina mentre, in presenza di insulina, la co-precipitazione IRS1-SHP-2 non è misurabile. Al contrario, nessuna co-precipitazione è stata osservata tra IR e SHP-2 sia nelle cellule HG che NG. Questi dati confermano che una attività tirosino-fosfatase associata ad IRS1 viene indotta da alte concentrazioni di glucosio e che l'insulina è in grado di revertire questo effetto.



**Figura 6:** *Effetto di glucosio ed insulina sull'associazione SHP-2/ IRS1 e SHP-2/IR.*

***Effetto dell'inibizione di SHP-2 sull'attivazione del signaling insulinico e sulla proliferazione cellulare***

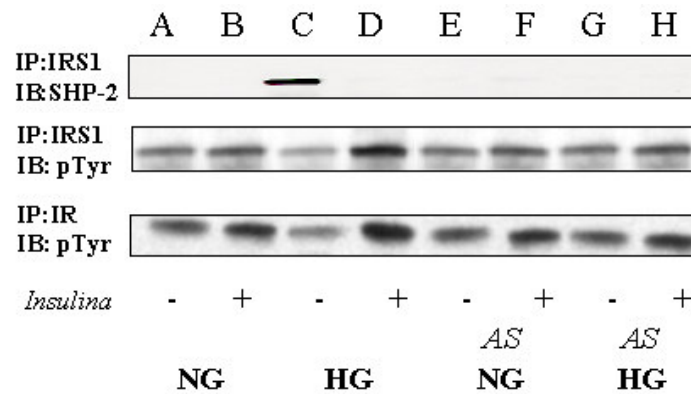
Allo scopo di verificare il coinvolgimento della proteina SHP-2 nella genesi delle alterazioni della crescita cellulare insulino-indotta, abbiamo trasfettato in maniera transiente un oligonucleotide antisenso (SHP-2-AS) in cellule JAr. Come mostrato in Figura 7, l'antisenso riduce l'espressione della proteina SHP-2 di circa l'80%.



**Figura 7:** *Inibizione dell'espressione della fosfatasi SHP-2 con oligonucleotide antisenso*

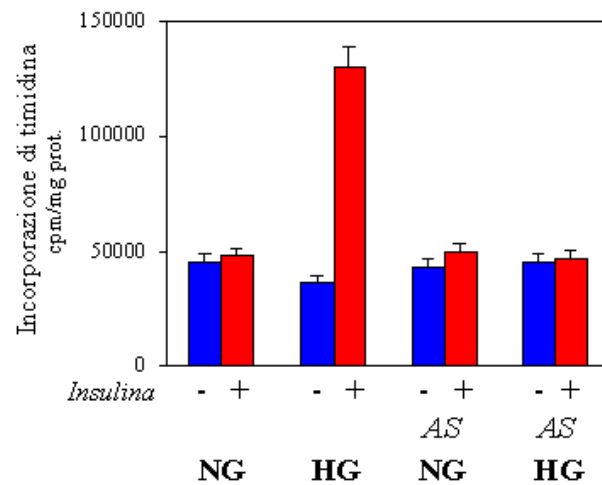
L'antisenso di SHP-2 inibisce completamente l'associazione SHP-2/IRS1 in cellule coltivate in presenza di elevate concentrazioni di glucosio (Fig. 8).

Inoltre, in cellule HG, l'inibizione dell'espressione di SHP-2 incrementa la fosforilazione insulino-indipendente di IR e di IRS1, rispettivamente del 30% e del 50% ( $p < 0.01$ ). L'effetto dell'antisenso era accompagnato da una riduzione del 300% della fosforilazione insulino-dipendente di IR e di IRS1.



**Figura 8:** Effetto dell'inibizione dell'espressione di SHP-2 sull'attivazione di IRS1 e di IR

Inoltre, il trattamento con l'antisenso di SHP-2 di cellule HG, riportava l'incorporazione di timidina basale ed insulino-stimolata ai livelli osservabili in presenza di bassi livelli di glucosio (Figura 9).



**Figura 9:** *Effetto dell'antisense di SHP-2 sull'incorporazione di timidina*

### ***Localizzazione intracellulare di SHP-2 e di IRS1***

Allo scopo di comprendere in che modo il glucosio potesse regolare l'interazione tra IRS1 e SHP-2, è stata indagata la localizzazione intracellulare delle due proteine. A questo scopo, abbiamo effettuato una preparazione di membrane interne (IM) e di frazioni citosoliche (Cyt) da cellule JAr.

Come mostrato in Figura 10, in cellule coltivate in presenza di basse concentrazioni di glucosio, la proteina SHP-2 risultava ampiamente citosolica sia in presenza che in assenza di insulina. In presenza di elevate concentrazioni di glucosio si determinava una delocalizzazione nelle membrane interne. L'esposizione all'insulina causava una traslocazione della proteina SHP-2

nuovamente nel citosol. La proteina IRS1 risultava ugualmente distribuita sia nel citosol che nelle IM di cellule coltivate in mezzo contenente elevate o basse concentrazioni di glucosio. In seguito allo stimolo con insulina circa l'80% di IRS1 trasloca dal citosol verso le membrane interne sia in presenza di 6 che di 25 mM glucosio (Figura 10).

Quindi, in cellule JAr il glucosio induce la traslocazione di SHP-2 verso le IM dove è presente la gran parte di IRS1 risulta fosforilata. La stimolazione con insulina rilocalizza SHP-2 nel citosol e promuove la fosforilazione di IRS1.

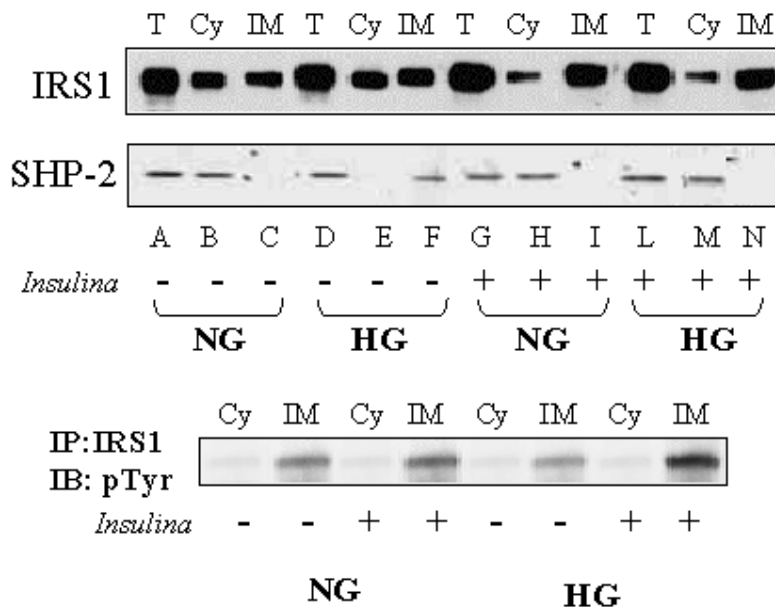
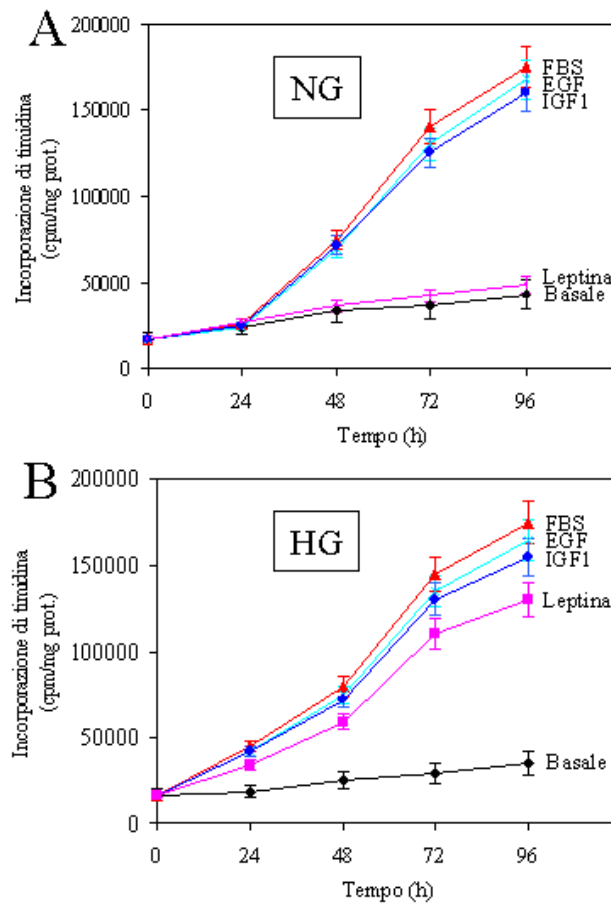


Figura 10: Localizzazione intracellulare di SHP-2 e di IRS1.

### *Effetti della leptina sulla proliferazione placentare*

#### **RISULTATI**

L'effetto del glucosio (6-25 mM), in presenza o assenza di leptina (10nM), sulla proliferazione cellulare è stato valutato determinando l'incorporazione di timidina triziata da parte delle cellule JAr. In assenza di leptina, le cellule JAr cresciute in mezzo con alte concentrazioni di glucosio (Fig. 11B) presentavano un decremento del 20% nell'incorporazione della timidina triziata rispetto alle cellule coltivate in mezzo contenente basse concentrazioni di glucosio (Fig. 11A). La leptina non induceva l'incorporazione di timidina triziata da parte delle cellule JAr NG. Al contrario, nelle cellule HG, la leptina determinava un incremento dell'incorporazione di timidina triziata di circa 4 volte a 96 ore. Questi risultati dimostrano che la leptina è in grado di stimolare l'incorporazione di timidina triziata solo quando le cellule JAr venivano tenute in un mezzo di coltura con elevate concentrazioni di glucosio.



**Figura 11: Effetto di glucosio e leptina sulla proliferazione di cellule JAr.**  
A) Presenza di 100 mg/dl glucosio; B) Presenza di 450 mg/dl glucosio.

Gli effetti del glucosio sulla proliferazione cellulare leptina-dipendente delle cellule JAr sono stati anche valutati mediante un saggio teso a valutare il numero di cellule. L'aggiunta di 10 nM leptina a cellule JAr piastrate in mezzo di coltura non era in grado di indurre la proliferazione cellulare in presenza di basse concentrazioni di glucosio. Al contrario quando le cellule erano incubate in alte concentrazioni di glucosio, la crescita cellulare

dipendente da insulina e leptina aumentava di circa 3 volte dopo 96 ore.

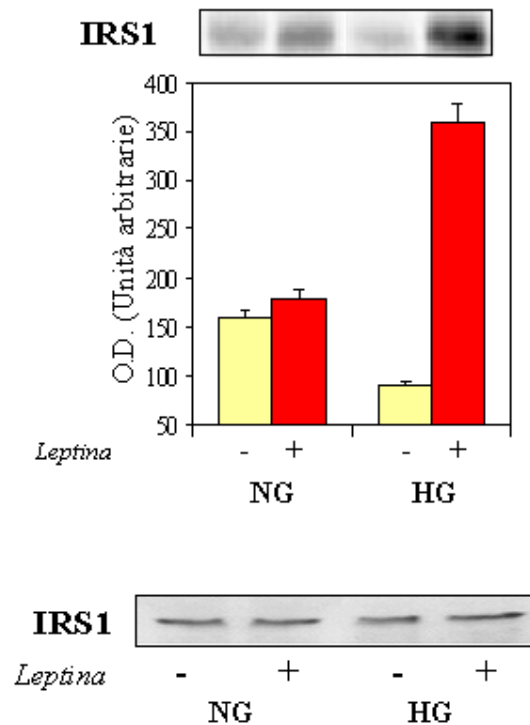
Per valutare la specificità dell'effetto sinergico di glucosio e leptina sulla proliferazione delle cellule JAr sono stati utilizzati differenti fattori di crescita. Le cellule JAr sono state tenute in mezzo di coltura con alte o basse concentrazioni di glucosio in presenza o assenza di insulin-like growth factor I (IGF-I), epidermal growth factor (EGF) e siero fetale bovino (FBS) ed è stata poi misurata l'incorporazione di timidina triziata (Fig. 1). In presenza di 100nM di IGF-I, l'incorporazione di timidina triziata aumentava sia nelle cellule HG che in quelle NG rispettivamente di 4.0 e 4.5 volte dopo 72 ore. Risultati simili sono stati ottenuti dopo aggiunta al mezzo di coltura di EGF e FBS.

#### ***Effetti di glucosio e leptina sull'attivazione di IRS1 e MAPK***

Dopo il legame della leptina ai propri recettori si verifica la fosforilazione di residui di tirosina di alcune proteine, mediatori precoci del signalling intracellulare, tra cui IRS1, substrato coinvolto nella trasmissione del segnale mitogenico. Per comprendere più a fondo il meccanismo molecolare alla base della proliferazione delle cellule JAr mediata dalla leptina e

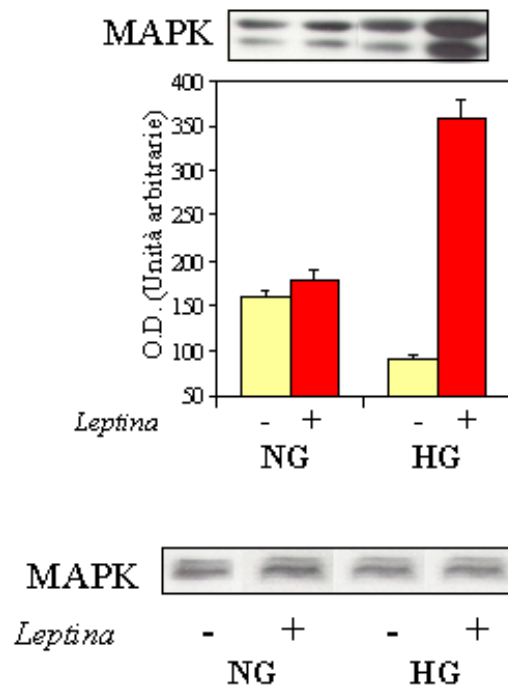


potenziata da alte concentrazioni di glucosio, è stata valutata la fosforilazione e l'attivazione dell'insulin receptor substrate 1 (IRS1) (Fig. 12). In assenza di leptina, l'immunoprecipitazione di IRS1 in cellule HG, seguita da analisi di immunoblot con anticorpi anti-fosfotirosina, ha rilevato una riduzione del 50% della fosforilazione di IRS1 in confronto alle cellule NG. In presenza di leptina, la fosforilazione di IRS1 nelle cellule HG incrementava di 4 volte, mentre nelle cellule NG la leptina non era in grado di indurre la fosforilazione di IRS1.



**Figura 12:** *Effetto di glucosio e leptina sulla attivazione dell'insulin receptor substrate 1 (IRS1)*

Abbiamo quindi valutato l'effetto della leptina sull'attivazione di MAPK. Come mostrato (Fig. 13), la fosforilazione di MAPK leptina-indipendente si riduceva del 50% in cellule HG rispetto alle cellule NG. In maniera analoga a quanto osservato per IRS1, la leptina era invece in grado di indurre la fosforilazione della MAPK di 4 volte solo nelle cellule HG.



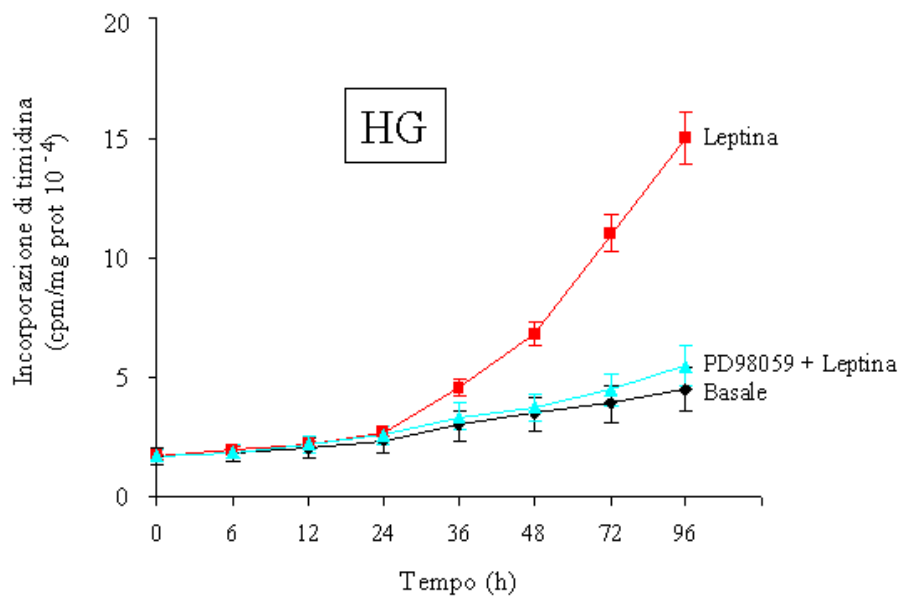
**Figura 13:** *Effetto di glucosio e leptina sulla attivazione della mitogen activated protein kinase (MAPK).*

Come mostrato, tutte le differenze osservate non erano dovute a modificazioni del contenuto totale di tali proteine.

### ***Effetto di un inibitore specifico (PD 98059) della MAPK sulla proliferazione cellulare***

Per verificare che gli effetti indotti dalla leptina sulla proliferazione cellulare fossero effettivamente legati ad una attivazione della MAPK, è stato eseguito un saggio di incorporazione di timidina in presenza di un inibitore specifico della MAPK, il PD98059.

Come mostrato in Figura 14, il pretrattamento con il PD98059 era in grado di inibire la proliferazione di cellule JAr coltivate in presenza di elevate concentrazioni di glucosio ed in presenza di leptina.



**Figura 14:** *Effetto del PD98059 sull'incorporazione di timidina leptina-dipendente.*

## CONCLUSIONI

Gli stati diabetici durante la gravidanza sono caratterizzati da iperglicemia materna, ipercellularità e aumentato peso della placenta. I meccanismi molecolari attraverso i quali il glucosio è in grado di indurre l'ipercellularità della placenta non sono stati ancora chiariti. Nel nostro studio ci siamo posti l'obiettivo di individuare tali meccanismi molecolari e abbiamo riprodotto in vitro le condizioni di iperglicemia osservabili nel GDM e negli altri stati diabetici durante la gravidanza, utilizzando una linea cellulare di corioncarcinoma umano (cellule JAr), valido modello sperimentale per lo studio della placenta. In letteratura è descritto che, durante una normale gravidanza, l'insulina e la leptina sono fattori di crescita poco potenti in placenta, se paragonati a IGF1 e IGF2. In modo analogo a quanto accade in vivo, la leptina e l'insulina in vitro non inducono proliferazione delle cellule JAr, laddove vi sia una condizione di euglicemia (NG). Al contrario, in presenza di insulina e di leptina, le cellule JAr tenute in un mezzo di coltura con alte concentrazioni di glucosio (HG) presentano un incremento della proliferazione cellulare. I nostri risultati dimostrano che tale effetto è dovuto all'effetto sinergico e specifico del glucosio sul segnale mitogenico dell'insulina e della leptina, dal momento che le cellule JAr NG e HG non

mostravano alcuna significativa differenza nella proliferazione cellulare se stimolate con IGF1, EGF o siero fetale bovino. In definitiva appare chiaro che la leptina e l'insulina esercitano i loro effetti mitogenici nelle cellule JAr HG, ma non nelle cellule JAr NG.

Dati precedenti in letteratura identificavano nel glucosio un importante modulatore dell'apoptosi in diversi sistemi cellulari, pur non essendo chiaro se il glucosio protegga o stimoli la morte cellulare programmata. Per esempio, nelle cellule  $\beta$  pancreatiche, alte concentrazioni di glucosio (HG) sono in grado di indurre l'apoptosi durante lo sviluppo del diabete, mentre bassi livelli di glucosio sono in grado di attivare il pathway mitocondriale apoptotico nei miociti cardiaci.

Comunque i nostri dati hanno dimostrato che le differenze nella proliferazione cellulare tra cellule HG e NG, in presenza di insulina o di leptina, non sono da attribuire ad un'incrementata apoptosi nelle cellule NG. Tale risultato ancor di più va a sottolineare l'importanza del glucosio nel potenziare l'effetto mitogenico di insulina e leptina.

Nel nostro studio abbiamo dimostrato che nelle cellule JAr, similmente a quanto osservato per la crescita cellulare, la fosforilazione di IRS1 dipende fortemente dalle concentrazioni di

glucosio ed infatti la leptina e l'insulina non erano in grado di stimolare la fosforilazione di IRS1 nelle cellule NG mentre inducevano tale effetto nelle cellule HG.

Una volta attivato, IRS1 è in grado di fosforilare la proteina MAPK, substrato fondamentale per la trasmissione dei segnali mitogenici in diversi sistemi cellulari.

Abbiamo quindi indagato l'effetto della leptina, dell'insulina e di diverse concentrazioni di glucosio sull'attivazione di MAPK. Similmente a quanto osservato per IRS1, sia l'insulina che la leptina erano in grado di attivare tale substrato in presenza di elevate concentrazioni di glucosio e questo effetto non era evidente quando le cellule venivano coltivate in mezzo contenente basse concentrazioni di glucosio.

Sono ipotizzabili diversi meccanismi molecolari per spiegare l'effetto del glucosio sulla proliferazione cellulare insulino-mediata. Una ipotesi sarebbe quella secondo cui il glucosio potrebbe regolare la funzione del recettore per l'insulina modulando il suo stato di fosforilazione. Tra le proteine coinvolte nella defosforilazione del recettore per l'insulina, le tirosinofosfatasi (PTPs) svolgono un ruolo di primo piano, essendo in grado di ridurre l'attività tirosino-chinasi del recettore per l'insulina e inibire la trasmissione del segnale (29). Il nostro

studio ha dimostrato che l'attività tirosino-fosfataseica era misurabile solo nelle cellule HG non stimolate e che l'insulina era in grado di inibire completamente tale attività. Questi dati indicano quindi che il glucosio e l'insulina esercitano effetti opposti sull'attività PTPasica nelle cellule JAr. Per spiegare il meccanismo attraverso il quale l'attività tirosino-fosfataseica controllerebbe lo stato di fosforilazione/defosforilazione del recettore per l'insulina, si potrebbe ipotizzare la presenza di una PTP associata al recettore per l'insulina. I nostri dati mostrano che non vi è alcuna attività PTP associata al recettore per l'insulina, né nelle cellule NG, né nelle cellule HG. Questi dati, se analizzati insieme a quelli relativi alla fosforilazione di IRS1, suggeriscono che una PTP potrebbe mediare gli effetti del glucosio sulla proliferazione delle cellule JAr, agendo su qualche proteina più a valle di IR nel pathway di trasduzione del segnale mitogenico dell'insulina.

In accordo con questa ipotesi, abbiamo dimostrato che, in assenza di insulina, esiste una attività tirosino-fosfataseica associata a IRS1 nelle cellule HG e che l'insulina è in grado di inibire tale attività. Tutti i dati sembravano quindi avvalorare l'ipotesi secondo la quale il glucosio era in grado di indurre

un'attività tirosino-fosfataseica in grado di regolare la fosforilazione di IRS1 nelle cellule JAr.

Un ligando di IRS1 che sembrerebbe essere coinvolto nella mediazione del segnale proliferativo è la proteina con attività tirosino-fosfataseica SHP-2 (29). SHP-2 è una proteina con attività tirosino-fosfataseica espressa ubiquitariamente, che presenta domini di legame SH2, responsabili dell'associazione con proteine tirosino-fosforilate. Abbiamo dimostrato che SHP-2 co-precipita con IRS1 nelle cellule HG non stimolate e che l'insulina è in grado di inibire completamente tale associazione. Inoltre non abbiamo riscontrato alcuna associazione tra SHP-2 e IR né nelle cellule HG né nelle cellule NG. Questi dati indicano che SHP-2 lega specificamente IRS1 nelle cellule JAr e che tale associazione è fortemente dipendente dai livelli di glucosio. Sulla base di questi dati, abbiamo proposto che SHP-2 defosforili IRS1 nelle cellule JAr non stimolate, permettendo all'insulina di poter determinare un potenziamento della fosforilazione di IRS1. Allo scopo di verificare questa ipotesi, cellule JAr sono state trasfettate con un oligonucleotide antisense di SHP-2 in grado di inibire l'espressione della proteina. La presenza dell'antisense era in grado di riportare l'attivazione di IRS1 ai livelli osservati in presenza di basse concentrazioni di glucosio.



SHP-2 è una proteina con attività tirosino-fosfataseica a localizzazione citosolica. In questo studio, abbiamo mostrato che l'esposizione delle cellule JAr ad elevate concentrazioni di glucosio determina una traslocazione della proteina dal citosol verso le membrane interne. Questo compartimento contiene la gran parte di IRS1 fosforilato in assenza di stimolazione con l'insulina. Quindi SHP-2 può legare IRS1 fosforilato. La successiva stimolazione con insulina riporta SHP-2 nel compartimento citosolico. Quindi, l'esposizione cronica ad alti livelli di glucosio rilocalizza SHP-2 in un compartimento diverso rispetto a quello dove è presente IRS1 fosforilato e previene l'associazione SHP-2-IRS1.

Quindi, possiamo concludere che in cellule placentari umane, il glucosio è in grado di modulare l'effetto proliferativo di insulina e leptina attivando la via che coinvolge IRS1 e MAPK. Questi dati sperimentali sembrano correlare con quanto osservato nell'uomo. Infatti, le gravidanze complicate da diabete ed in presenza di uno scarso compenso glicemico, sono caratterizzate da alterazioni della crescita fetale e placentare. Inoltre in questi casi è osservabile una iperinsulinemia e una iperleptinemia materne secondarie che probabilmente giocano un ruolo fondamentale nella genesi delle suddette complicanze.

**BIBLIOGRAFIA**

American Diabetes Association 1995 Screening for diabetes. *Diabetes Care* 18 (Suppl.1): 5-7

Aplin JD 1991 Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 99: 681-692

Bahn RS, Speeg KV, Ascoli M, Rabin D 1980 Epidermal growth factor stimulates production of progesterone in cultured human choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 107: 2121-2123

Beguilot F, Kahn CR, Moses AC, Smith RJ (1986) The development of insulin receptors and responsiveness in an early marker of differentiation in the muscle cell line L6. *Endocrinology* 118, 446-455

Bialik S, Cryns VL, Drincic A, Miyata S, Wallwiick AL, Srinivasan A, Kitsis RN 1999 The mitochondrial apoptotic pathway is activated by serum and glucose deprivation in cardiac myocytes. *Circ Res* 85: 403-414

Boileau P, Cauzac M, Pereira MA, Girard J, Hauguel de Mouzon S (2001) Dissociation between insulin-mediated signaling pathways and biological effects in placental cells: role of protein kinase B and MAPK phosphorylation. *Endocrinology* 142, 3974-3979

Calera MR, Vallega G, Pilch PF (2000) Dynamics of protein-tyrosine phosphatase in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 6308-6312

Catalano P, Tyzbier ED, Roman NR et al. (1991) Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in non-obese pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 165: 1667

Chen CF, Kuraki H, Fujida Y 1988 Changes in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid level in human placenta and isolated trophoblast cell during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 923-928

Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N (1999) Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 48, 738-744

Dooley SL, Metzger BE, Cho NH 1991 Gestational diabetes mellitus: influence of race on disease prevalence and perinatal outcome in a U.S. population. *Diabetes* 40 (Suppl.2): 25-29

Dornhorst A, Paterson CM, Nicholls JSD; Wadsworth J, Chiu DC, Elkeles RS, Johnston DG, Beard RW 1992 High prevalence of gestational diabetes in women from ethnic minority groups. *Diabet Med* 9: 820-825

Gewolb IH, Barret C, Warshaw JB 1983 Placental growth and glycogen metabolism streptozotocin diabetic rats. *Pediatr Res* 17:587-591

Han VK, Hunter ES, Pratt RM 1987 Expression of rat transforming growth factor alpha during development occurs predominantly in the maternal decidua. *Mol Cell Biol* 7: 2335-2343

Hollingsworth DR, Grundy SM, (1981) Pregnancy-associated hypertriglyceridemia in normal and diabetic woman: differences in insulin-dependent, non-insulin-dependent, and gestational diabetes. *Diabetes* 31: 1092

Jacobson JD, Cousins L 1989 A population-based study of maternal and perinatal outcome in patients with gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 161: 981-986

Jonas HA, Harrison LC 1985 The human placenta contains two distinct binding and immunoreactive species of insulin-like growth factor I receptors. *J Biol Chem* 260: 2288-2294

Kalkhoff RK, Kissebah AH, Kim HJ (1979) Carbohydrate and lipid metabolism during normal pregnancy: relationship to gestational hormone action. In Merkatz IR, Adam PAJ (eds) *The Diabetic Pregnancy: a Perinatal Perspective*. New York: Grune&Stratton.

Kaplan SL (1974) Human chorionic somatomammotropin secretion, biologic effects and physiologic significance. In Jaffe RB (ed) *The Endocrine Milieu of Pregnancy, Puerperium and Childhood*, p. 75 Columbus, OH: Ross Laboratories.

Khune MR, Pawson T, Lienhard GE, Feng GS 1993 The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *J Biol Chem* 268: 11479-11481

Lao TT, Lee CP, Wong WM 1997 Placental weight to birthweight ratio is increased in mild gestational glucose intolerance. *Placenta* 18: 227-230

Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation *Cell* 80,179.

Martin AO, Simpson JL, Ober C, Freikel N 1985 Frequency of Diabetes Mellitus in mothers of probands with gestational diabetes: possible maternal influence on the predisposition to gestational diabetes. *Am Obstet Gynecol* 151: 471-475

Miele, C., Caruso, M., Calleja, V., Auricchio, R., Oriente, F., Formisano, P., Condorelli, G., Cafieri, A., Sawka-Verhelle, D., Van Obberghen, E., Beguinot, F. (1999) Differential role of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in L6 skeletal muscle cells expressing the Arg 1152→Gln insulin receptor. *J Biol Chem* 274, 3094-3102

Posner BI 1974 Insulin receptors in human and animal placental tissue. *Diabetes* 27: 209-217

Sands J, Dobbing J 1985 Continuing growth and development of the third-trimester human placenta. *Placenta* 6: 13-21

Shen SJ, Wang CY, Nelson KK 1986 Expression of insulin-like growth factor II in human placentas from normal and diabetic pregnancies. *Proc Natl Acad Sci* 83: 9179-9182

Simpson IA, Yver DR, Hissin PJ, Wardzala LJ, Karnieli E, Salans LB, Cushman SW (1983) Insulin-stimulated translocation of glucose transporters in the isolated rat adipose cells: characterization of subcellular fractions. *Biochim Biophys Acta* 19, 393-407

Simpson JL, Elias S, Martin AO et al. (1983) *Diabetes in Pregnancy, Northwestern University Series (1977-1981). I. Prospective study of anomalies in offspring of mothers with diabetes mellitus. American Journal of Obstetrics and Gynecology* 146: 263

Susa JB, Neave C, Sehgal P, Singer DB, Zeller WP, Schwartz R 1984 Chronic hyperinsulinemia in the fetal rhesus monkey. Effect of the physiologic hyperinsulinemia on fetal growth and composition. *Diabetes* 33: 656-660

Weiss U, Cervar M, Puerstner P, Schmut O, Haas J, Mauschwitz R, Arikian G, Desoye G (2000) Hyperglycaemia in vitro alters the proliferation and mitochondrial activity of the choriocarcinoma cell lines BeWo, JAR and

JEG-3 as models for human first-trimester trophoblast. *Diabetologia* 44, 209-219

Yen SSC (1973) Endocrine regulation of the metabolic homeostasis during pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 16: 130

## **MIOMI UTERINI E TRASMISSIONE DEL SEGNALE PROLIFERATIVO**

I miomi uterini sono tumori benigni che originano dal muscolo liscio durante l'età riproduttiva. Questi tumori presentano recettori per gli estrogeni e per il progesterone e la loro crescita è estremamente sensibile ad estrogeni e/o progesterone. Infatti la carenza di questi steroidi induce una regressione significativa del volume dei miomi.

Il Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) viene rilasciato dall'ipotalamo e mediante recettori ipofisari regola la sintesi di gonadotropine determinando così una modulazione dell'attività ovarica. Gli analoghi del GnRH riducono la secrezione di estrogeni e di progesterone da parte dell'ovaio, tanto che sono stati in passato utilizzati nel trattamento dei tumori ormono-dipendenti come il cancro della mammella, della prostata, del pancreas, dell'endometrio e dell'ovaio. Sebbene l'effetto sembra essere mediato da un meccanismo indiretto, vi sono evidenze sperimentali che dimostrano che gli analoghi del

GnRH sopprimono *in vitro* la proliferazione tumorale e che diversi tumori presentano siti di legame specifici per il GnRH.

Diversi studi hanno dimostrato che la terapia con analoghi del GnRH riduce significativamente il volume dei miomi mediante una inibizione della proliferazione cellulare ed una induzione dell'apoptosi, ma i meccanismi molecolari coinvolti sono tuttora da chiarire.

Lo scopo di questa linea di ricerca è stato quello di indagare i meccanismi molecolari coinvolti nell'effetto anti-proliferativo di un analogo del GnRH, il leuprolide acetato (LA), in miomi uterini ottenuti da 6 pazienti trattate con LA per 3 mesi prima della chirurgia (Gruppo B) e da 6 pazienti non trattate (Gruppo A). A questo scopo è stato valutato l'effetto del LA su differenti vie di trasmissione del segnale intracellulare coinvolte nella regolazione del bilancio tra proliferazione cellulare e apoptosi.

## **MATERIALI E METODI**

### ***Pazienti***

Nello studio sono state arruolate 12 pazienti con mioma uterino sintomatico che si riferivano al nostro Dipartimento per essere sottoposte ad intervento chirurgico.

I criteri di inclusione sono stati i seguenti: anamnesi positive per infertilità, abortività ripetuta, sanguinamento uterino, dolore pelvico, presenza di mioma intramurale con diametro ecografico di 5-8 cm.

I criteri di esclusione sono stati i seguenti: presenza di mioma sottomucoso identificazione mediante isteroscopia, iperplasia con atipie o carcinoma dell'endometrio, PAP test anomalo, test di gravidanza positivo, presenza di mioma con calcificazioni, patologia epatica, malattia cardiovascolare, dislipidemia, diabete, trombosi venosa acuta o recente, tumore della mammella.

Il Gruppo A prevedeva sei pazienti alle quali veniva somministrato solo ferro per via orale (2 cp/die) (Isairon; Pfizer, Italia). Al Gruppo B, composto anche esso da 6 pazienti veniva somministrato Leuprolide acetate i.m. (Enantone 3.75; Takeda, Italia) 3.75 mg ogni 28 giorni oltre che ferro per via orale (2



cp/die) (Isairon; Pfizer). Il trattamento veniva proseguito per tre cicli. La miomectomia per via laparoscopica veniva eseguita durante la quarta settimana dopo la terza iniezione di Leuprolide acetato.

In corso di chirurgia veniva prelevato un campione di mioma e conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Tutte le procedure sono state eseguite da operatori non consapevoli del tipo di trattamento farmacologico effettuato.

### ***Immunoblot***

I campioni sono stati omogeneizzati in un buffer contenente 50 mmol/l HEPES (pH 7.6), 150 mmol/l NaCl, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 2 mmol/l sodio ortovanadato, 100 mmol/l NaF, 1 mmol/l phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 100 IU/ml aprotinina, 20  $\mu\text{mol/l}$  leupeptina and 1% (v/v) Triton X-100 (TAT buffer) a  $4^{\circ}\text{C}$ . Le aliquote (200  $\mu\text{g}$ ) di lisato sono state quindi centrifugate a 5000 g per 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . I campioni sono stati quindi o immunoprecipitati con anticorpi specifici o direttamente separati su gel di poliacrilamide e poi trasferiti su membrana (Immobilon-P; Millipore Corp., USA). Le membrane

sono state trattate per 1 h in TBS (10 nmol/l Tris-HCl, 140 mmol/l NaCl, pH 7.4) contenente 4% w/v BSA e quindi incubate con l'anticorpo specifico.

#### ***Determinazione dell'attività di PI 3-kinase***

Le cellule sono state solubilizzate per 40 min a 4°C in 50 mmol/l HEPES, pH 7.5, 150 mmol/l NaCl, 10% glicerolo, 1% Nonidet P-40, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 mmol/l sodio ortovanadato, 10 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 100 mmol/l NaF, 1 mmol/l PMSF. Le aliquote (200 µl) di lisato sono state precipitate con un anticorpo anti-fosfotirosina per 2 h a 4°C. L'attività della PI3K è stata determinata sugli immunoprecipitati come descritto da Filippa *et al.* (1999).

#### ***Analisi statistica***

Le differenze tra i due gruppi sono state valutate mediante l'utilizzo del Student's *t*-test per dati non appaiati utilizzando using Statistica for Windows (StatSoft; Italia). La significatività statistica è stata definite come  $P < 0.05$ .

## **Effetto degli analoghi del GnRH sulla proliferazione cellulare in miomi uterini**

### **RISULTATI**

Nessuna differenza statisticamente significati era evidenziabile tra le caratteristiche basali dei due Gruppi di pazienti (Gruppo A: controllo; Gruppo B: trattamento con Leuprolide Acetato (LA)) (Tabella II).

Caratteristiche	Gruppo A (n = 6)	Gruppo B (n = 6)	Significatività
Età (anni)	34.6 ± 3.8	35.2 ± 3.7	NS
Peso (kg)	63.7 ± 4.3	62.7 ± 3.9	NS
Dimensioni mioma (cm)	6.2 ± 1.1	6.4 ± 1.2	NS
No. miomi	1.3 ± 0.4	1.4 ± 0.5	NS

**Tabella II: Caratteristiche delle pazienti.**

### ***Effetto del LA su PI3K, PKB e BAD***

Nel Gruppo B, l'attività di PI3K era ridotta del 60% in confronto con il gruppo di controllo (Grupop A) ( $P < 0.01$ ) (Figura 17A), determinando una riduzione di circa il 50% della attività di PKB, misurata come fosforilazione della serina 473 in ( $P < 0.05$ ) (Figure 17B). Normalmente PKB promuove la proliferazione

cellulare attivando la proteina BAD. Infatti, in parallelo alla riduzione dell'attività di PKB nei campioni trattati con LA, si osservava una riduzione del 60% della fosforilazione di BAD che rappresenta il suo principale substrato ( $P < 0.01$ ) (Figure 18). La riduzione della fosforilazione di PKB e BAD, come mostrato in figura 15 e 16, non era legata a modificazioni della quantità totale delle due proteine.

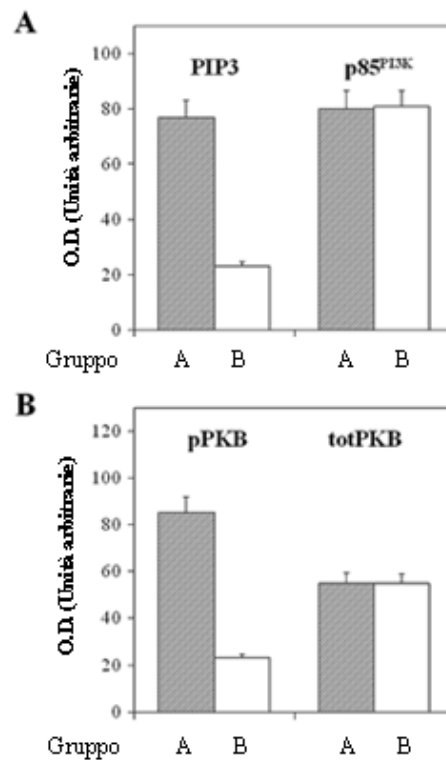
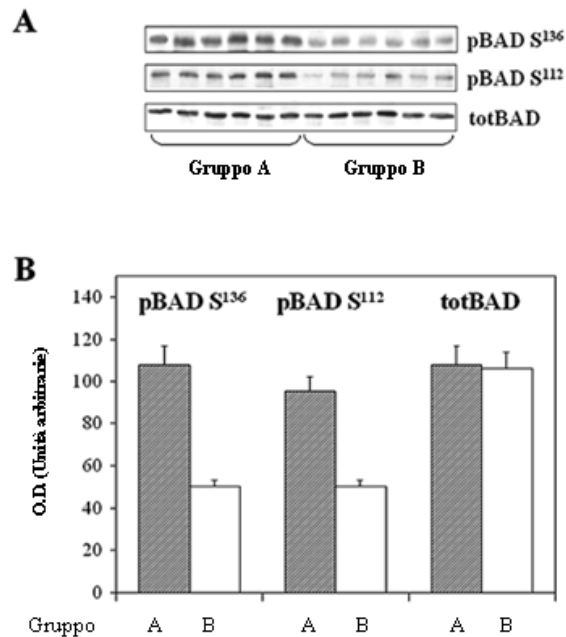


Figura 15: Effetto del LA su PI3K e PKB



**Figura 16: Effetto del LA su BAD**

Nessuna differenza significativa tra i due Gruppi era osservabile andando a valutare la quantità totale della proteina Bcl-xL (Figura 17A). Al contrario, l'espressione di 14.3.3 era ridotta del 50% nei campioni trattati con LA ( $P < 0.05$ ) (Figure 17B). L'associazione Bcl-xL/BAD non era modificata in maniera significativa nei campioni trattati con LA (Figure 17A), mentre l'associazione tra BAD fosforilato e 14.3.3 appariva

significativamente ridotta nei miomi prelevati da pazienti trattati con LA ( $P < 0.01$ ) (Figure 17B).

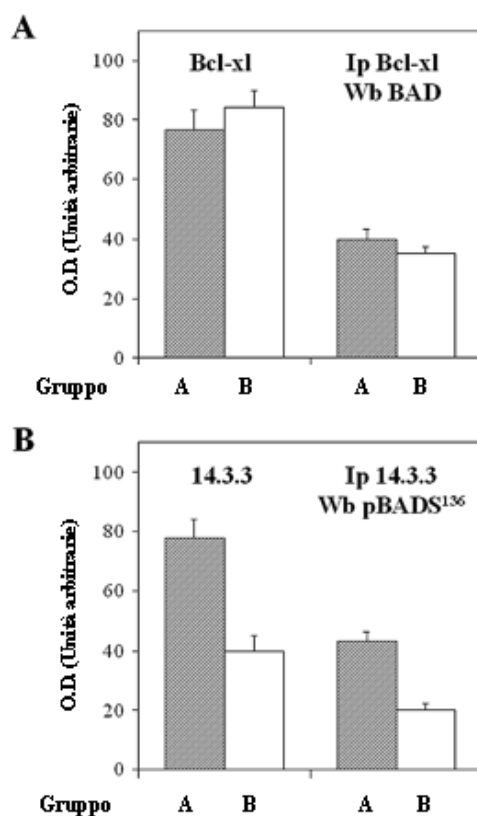
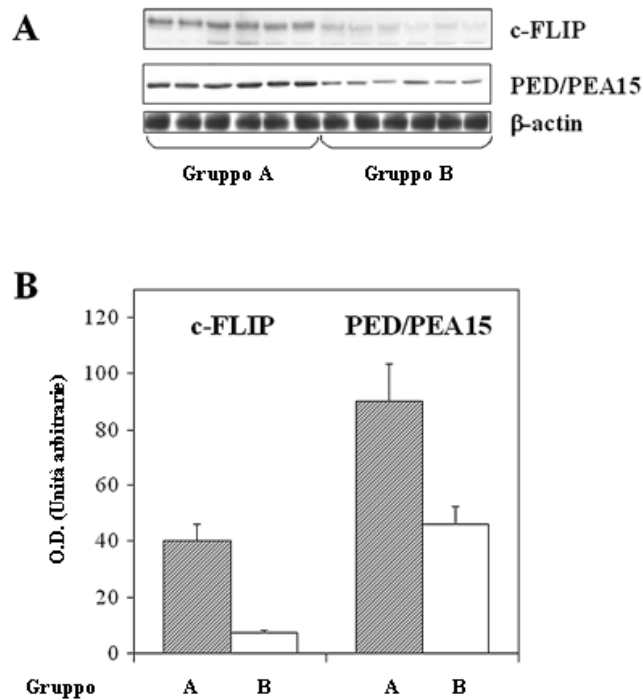


Figura 17: Effetto del LA su Bcl-x1 e 14.3.3

### *Effetto del LA su proteine coinvolte nell'apoptosi*

Il LA era in grado di ridurre l'espressione della proteina antiapoptotica FLIP del 70% in confronto al campione di controllo ( $P < 0.01$ ) (Figure 18A e B). In maniera similare, i livelli della

proteina PED apparivano ridotti del 50% nel Gruppo B ( $P < 0.05$ ) (Figure 18A e B).

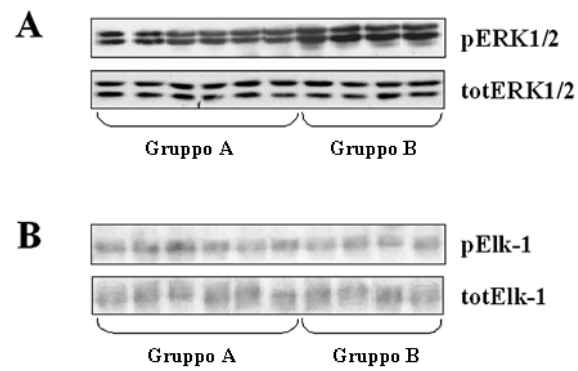


**Figura 18: Effetto del LA su c-FLIP e PED**

### ***Effetto del LA sulle MAPK***

L'attivazione delle isoforme p42 e p44 MAPK, misurata come livello di fosforilazione delle due isoforme con anticorpi specifici, appariva aumentata del 30% nel gruppo B ( $P < 0.05$ ) (Figure 19A). Comunque, la fosforilazione del substrato nucleare

Elk1 non sembrava essere modificata dal tipo di trattamento (Figure 19B).



**Figura 19: Effetto del LA sulle MAPK**



## **DISCUSSIONE**

E' noto inoltre come i miomi uterini, tumori benigni che originano dal muscolo liscio, rappresentano una buona quota della patologia ginecologica che colpisce la donna nell'età riproduttiva, determinando sia alterazioni della fertilità che episodi di sanguinamenti genitali anomali. Questi tumori presentano recettori per gli estrogeni e per il progesterone e la loro crescita è estremamente sensibile ad estrogeni e/o progesterone. Infatti, la carenza di questi steroidi induce una regressione significativa del volume dei miomi.

Diversi studi hanno dimostrato che la terapia con analoghi del GnRH riduce significativamente il volume dei miomi mediante una inibizione della proliferazione cellulare ed una induzione dell'apoptosi, ma i meccanismi molecolari coinvolti rimanevano ancora da chiarire.

In questo studio abbiamo mostrato come il trattamento con LA induce una riduzione dell'attività di PI3K, determinando una riduzione significativa della fosforilazione di Akt. Normalmente Akt promuove la proliferazione cellulare attivando la proteina

BAD. Nel gruppo trattato infatti, la fosforilazione di BAD appare decisamente ridotta se confrontata con il gruppo non sottoposto a trattamento medico.

Oltre all'inibizione della via mediata da PI3K/PKB, nel sottoposto a trattamento è presente anche una significativa riduzione del contenuto totale di almeno due proteine antiapoptotiche (PED/PEA15 e FLIP), e nessuna modificazione significativa del contenuto di Elk1, substrato nucleare di MAPK, proteina coinvolta nella trasmissione del segnale proliferativo.

Questi dati suggeriscono che il Leuprolide Acetato, oltre ad inibire la produzione di estrogeni, determina una inibizione dell'attivazione di alcune proteine fondamentali per la proliferazione cellulare e riduce l'espressione di proteine antiapoptotiche. La combinazione di questi due eventi sposta quindi il bilancio a favore della morte cellulare (Fig. 20).

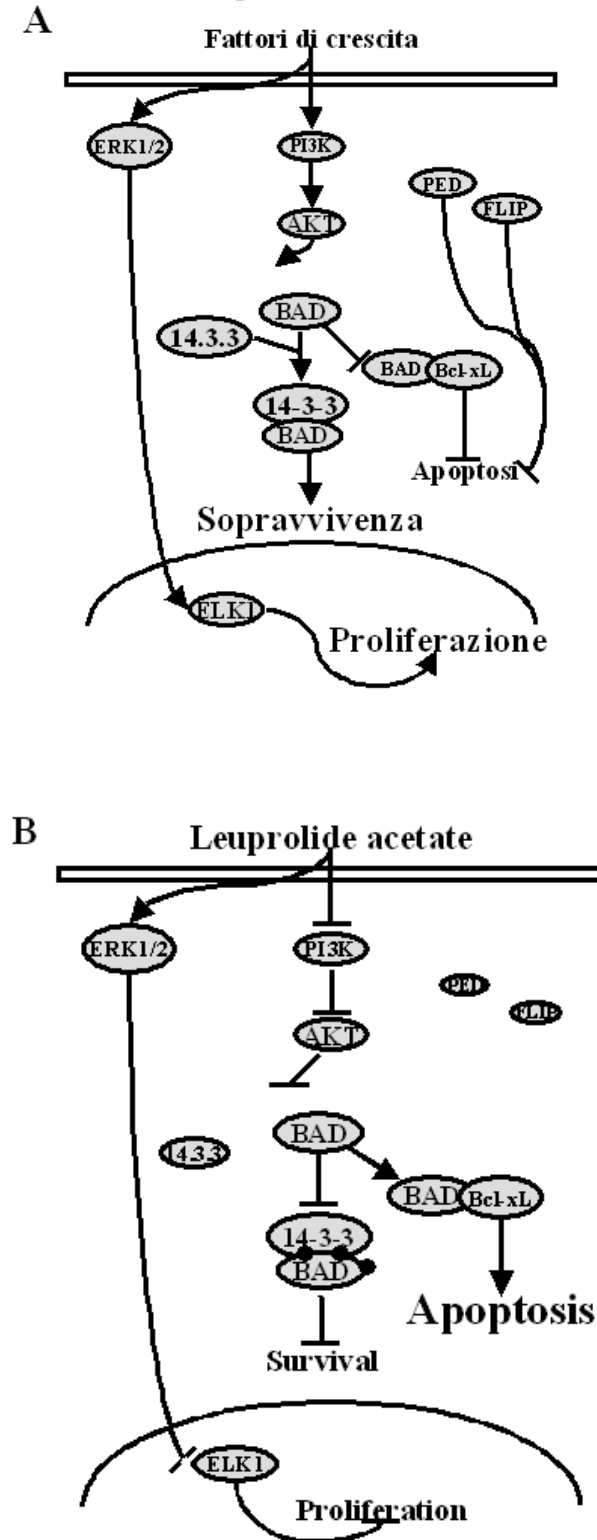


Fig. 20: Rappresentazione schematica del bilancio proliferazione/apoptosi normale (A) e modificato dal Leuprolide Acetato (B).

**BIBLIOGRAFIA**

Andreyko JL, Blumenfeld Z, Marshall LA, Monroe SE, Hricak H and Jaffe RB (1988) Use of an agonist analog of gonadotropin-releasing hormone (nafarelin) to treat leiomyomas: assessment by magnetic resonance imaging. *Am J Obstet Gynecol* 158,903–910.

Beland G, Elhilali M, Frader Y, Laroche B, Ramsey EW and Trachtenberg J (1990) A controlled trial of castration with and without Nilutamide in metastatic prostatic carcinoma. *Cancer* 66,1074–1079.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S and Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282,1318–1321.

Chegini N, Rong H, Dou Q, Kipersztok S and Williams RS (1996) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogues on myometrial smooth muscle cells and interaction with the ovarian steroids in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 81,3215–3221.

Cheng YM, Chou CY, Huang SC and Lin HC (2001) Oestrogen deficiency causes DNA damage in uterine leiomyomas cells: a possible mechanism for shrinkage of fibroids by GnRH agonists. *Br J Obstet Gynecol* 108,95–102.

Condorelli G, Vigliotta G, Cafieri A, Trencia A, Andalo P, Oriente F, Miele C, Caruso M, Formisano P and Beguinot F (1999) PED/PEA-15: an anti-apoptotic molecule that regulates FAS/TNFR1-induced apoptosis. *Oncogene* 18,4409–4415.

Conn PM and Crowley WF Jr (1991) Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med* 324,93–103.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y and Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91,231–241.

del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R and Nunez G (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278,687–689.

Eidne KA, Flanagan CA, Harris NS and Millar RP (1987) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-binding sites in human breast cancer cell lines and inhibitory effects of GnRH antagonists. *J Clin Endocrinol Metab* 64,425–432.

Emons G, Ortmann O, Becker M, Immer G, Springer B, Laun R, Holzel F, Schulz KD and Schally AV (1993) High affinity binding and direct antiproliferative effects of LHRH analogues in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 53,5439–5446.

Emons G, Ortmann O, Pahwa GP, Hackenberg R, Oberheuser F and Schultz KD (1992) Intracellular actions of gonadotropic and peptide hormones and the therapeutic value of GnRH agonist in ovarian cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand* 71,31–38.

Filicori H, Hall DA, Loughlin JS, Rivier J, Vale W and Crowley WF (1983) A conservative approach to the management of uterine leiomyoma: pituitary desensitisation by a luteinizing hormone-releasing hormone analogue. *Am J Obstet Gynecol* 147,726–727.

Filippa N, Sable CL, Filloux C, Hemmings B and Van Obberghen E (1999) Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 19,4989–5000.

Formstecher E, Ramos JW, Fauquet M, Calderwood DA, Hsieh JC, Canton B, Nguyen XT, Barnier JV, Camonis J, Ginsberg MH and Chneiweiss H (2001) PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev Cell* 1,239–250.

Franke TF, Kaplan DR and Cantley LC (1997) PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88,435–437.

Friedman AJ (1993) Treatment of uterine myomas with GnRH agonists. *Semin Reprod Endocrinol* 11,154–161.

Gallagher CJ, Oliver RT, Oram DH, Fowler CG, Blake PR, Mantell BS, Slevin ML and Hope Stone HF (1991) A new treatment for endometrial cancer with gonadotropin releasing-hormone analogue. *Br J Obstet Gynecol* 98,1037–1041.

Gonzales-Barcena D, Ibarro-Olmons MA, Garcia-Carrasco F, Gutierrez-Sampeiro C, Comarus-Schally AM and Schally AV (1989) Influence of D-Trp-6-LH-RH on the survival time in patients with advanced pancreatic cancer. *Biomed Pharmacother* 43,313–317.

Kang SK, Tai CJ, Cheng KW and Leung PC (2000) Gonadotropin-releasing hormone activates mitogen-activated protein kinase in human ovarian and placental cells. *Mol Cell Endocrinol* 170,143–151.

Kleinman D, Douvdevani A, Schally AV, Levy J and Sharoni Y (1994) Direct growth inhibition of human endometrial cancer cells by the

gonadotropin-releasing hormone SB-75: role of apoptosis. *Am J Obstet Gynecol* 170,96–102.

Krey LC (1993) Action of GnRH agonists on gonadotrope physiology. *Semin Reprod Endocrinol* 11,105–111.

Manni A, Santen R, Harvey H, Lipton A and Max D (1986) Treatment of breast cancer with gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev* 7,89–113.

Mizutani T, Sugihara A, Nakamuro K and Terada N (1998) Suppression of cell proliferation and induction of apoptosis in uterine leiomyoma by gonadotropin-releasing hormone agonist (leuprolide acetate). *J Clin Endocrinol Metab* 83,1253–1255.

Moley KH, Chi MM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Mueckler MM 1998 Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nat Med* 4: 1421-1424

Raga F, Casan EM, Kruessel JS, Wen Y, Huang HY, Nezhat C and Polan ML (1998) Quantitative gonadotropin-releasing hormone gene expression and immunohistochemical localization in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biol Reprod* 59,661–669.

Rein MS and Nowak RA (1992) Biology of uterine myomas and myometrium in vitro. *Semin Reprod Endocrinol* 10,310–319.

Rein MS, Barbieri RL and Friedman AJ (1995) Progesterone: a critical role in the pathogenesis of uterine myomas. *Am J Obstet Gynecol* 172,14–18.

Salvesen GS and Dixit VM (1997) Caspase: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91,443–446.

Vanhaesebroeck B and Alessi DR (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346,561–576.

Wiznitzer A, Marbach M, Hazum E, Insler V, Sharoni Y and Levy J (1988) Gonadotropin-releasing hormone specific binding sites in uterine leiomyoma. *Biochem Biophys Res Commun* 152,1326–1332.

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB and Korsmeyer SJ (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80,285–291.

Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J and Korsmeyer SJ (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87,619–628.

Zullo F, Pellicano M, De Stefano R, Zupi E and Mastrantonio P (1998) A prospective randomized study to evaluate leuprolide acetate treatment before laparoscopic myomectomy: efficacy and ultrasonographic predictors. *Am J Obstet Gynecol* 178,108–112.