

RUOLO DI ALCUNE ISOFORME DI PKC NELLA MODULAZIONE DELL'ANGIOGENESI INDOTTA DA INSULINA ED ENDOTELINA: STUDI IN VITRO

*Alice Reduzzi, Fabio Pellegatta, Claudia Brambilla, Marta Bragheri, A.L. Catapano.
Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano.*

OBIETTIVI. A livello vasale l'insulina modula importanti funzioni quali proliferazione, apoptosi, differenziamento cellulare ed angiogenesi. Condizioni di insulino-resistenza sono spesso caratterizzate da incrementati livelli plasmatici di endotelina. Quest'ultima, è in grado di interferire con l'attività insulinica attraverso l'attivazione di alcune protein chinasi C. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare, in cellule endoteliali umane, l'azione dell'endotelina sull'attività angiogenetica dell'insulina. Si è valutata quindi l'attività di due protein chinasi importanti nell'angiogenesi quali Akt ed ERK1/2 e per studiare l'angiogenesi in vitro sono stati utilizzati i modelli del Matrigel e delle co-culture endotelio-fibroblasti. Si è infine indagato il ruolo che le diverse isoforme di protein chinasi C svolgono in tali processi angiogenetici. **METODI E RISULTATI.** Sia insulina (100nM) che endotelina (10mg/ml) inducono la fosforilazione di Akt ed di ERK1/2 in maniera rispettivamente PI-3K e MAPK dipendente. L'endotelina non interferisce con l'attivazione insulinica di Akt ed ERK1/2. La stimolazione con gli esteri del forbolo (PMA 10-9M) inibisce la fosforilazione di Akt indotta da insulina ed endotelina mentre incrementa quella di ERK1/2. Il trattamento con H89 30 μ M e con Rottlerin 1 μ M (inibitori rispettivamente della PKC μ e δ) riduce la fosforilazione di Akt indotta da insulina ed endotelina e aumenta quella di ERK1/2.

In esperimenti di angiogenesi in vitro su matrigel, l'endotelina e l'insulina facilitano la formazione di anelli angiogenetici. La stimolazione con PMA ritarda significativamente la formazione di tali anelli mentre il trattamento con Go6976 1 μ M (inibitore della PKC α) annulla tale inibizione. L'aggiunta di H89 30 μ M e di Rottlerin 1 μ M riduce la formazione di anelli indotta da insulina ed endotelina.

In esperimenti di co-cultura, sia insulina che endotelina inducono la formazione di microtubuli e tale azione è inibita in maniera differente da H89 30 μ M e Rottlerin 1 μ M.

CONCLUSIONI. Alle concentrazioni ed ai tempi usati l'endotelina facilita i processi angiogenetici e non inibisce quelli stimolati dall'insulina. Abbiamo confermato l'importante ruolo che Akt svolge nelle fasi iniziali dell'angiogenesi mentre l'attività di ERK1/2 risulta essere importante nel mediare i fenomeni proliferativi che caratterizzano le fasi successive. I nostri studi hanno altresì individuato l'importante e differente ruolo che alcune isoforme di protein chinasi C rivestono nel modulare il processo angiogenetico. Le isoforme diacilglicerolo-dipendenti, in particolare la PKC α , sono in grado di modulare negativamente le fasi iniziali dell'angiogenesi attraverso l'inibizione di Akt, ma ne influenzano positivamente il proseguimento, grazie all'attivazione di ERK1/2, mentre le isoforme δ e μ esercitano invece azioni permissive parzialmente differenti sul processo angiogenetico, grazie alla loro attività di stimolo sull'attività di Akt e di inibizione su quella di ERK1/2.