



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
“SISTEMI BIOLOGICI:
STRUTTURA, FUNZIONE ED EVOLUZIONE”

CICLO XIX

COORDINATORE Prof. ENRICO GRAZI

IL SISTEMA
ADENILIL CICLASI/AMP CICLICO
NELLA REGOLAZIONE DELLE FUNZIONI
DEL TROFOBLASTO UMANO

Settore Scientifico Disciplinare BIO/09

Dottorando
Dott.^{ssa} Bruna Gravina

Tutore
Prof.^{ssa} Carla Biondi

(firma)

(firma)

Anni 2004/2006

SOMMARIO

INTRODUZIONE	3
Placentazione	3
Trofoblasto extravilloso	7
<i>Regolazione paracrina ed autocrina dell'attività del trofoblasto</i>	8
<i>Ormoni della placenta</i>	9
Adenilil ciclasi	11
<i>Regolazione mediata dallo ione calcio</i>	13
<i>Regolazione mediata dalla PKC</i>	13
<i>Regolazione tipo specifica</i>	14
<i>cAMP e gravidanza</i>	14
Le Proteine G	16
<i>Subunità α e complesso $\beta\gamma$ delle proteine G</i>	17
<i>La famiglia $G\alpha_s$</i>	18
<i>La famiglia $G\alpha_{i/o}$</i>	18
<i>La famiglia $G\alpha_q$</i>	19
<i>Proteine G e trofoblasto</i>	20
Le prostaglandine	21
<i>I recettori della PGE_2</i>	23
<i>Prostanoidi e trofoblasto</i>	23
<i>Modulazione della risposta cellulare</i>	24
La somatostatina	25
<i>I recettori della SRIF</i>	26
<i>SRIF e Trofoblasto</i>	28
<i>Modulazione della risposta cellulare</i>	28
SCOPO DELLA TESI	29
MATERIALI e METODI	31
<i>Materiali</i>	31
<i>Colture cellulari</i>	31
<i>Determinazione dei livelli intracellulari di cAMP</i>	31
<i>Incorporazione della 5'-bromo-3' deossiuridina</i>	32
<i>Curve di crescita</i>	32
<i>Esperimenti di migrazione</i>	32
<i>Immunocitochimica</i>	33
<i>RT-PCR</i>	33

<i>SQ-RT-PCR</i>	37
<i>Western blotting</i>	39
<i>Determinazione dell'attività dell'enzima adenilil ciclasi</i>	39
<i>Analisi statistica</i>	39
RISULTATI	40
<i>Valutazione dei livelli intracellulari di cAMP</i>	40
<i>Valutazione della proliferazione cellulare</i>	42
<i>Valutazione della migrazione cellulare</i>	45
<i>Identificazione dei sottotipi recettoriali per PGE₂ e SRIF</i>	46
<i>Identificazione dei componenti del sistema del cAMP in cellule HTR-8/SVneo</i>	48
<i>Implementazione della tecnica SQ-RT-PCR</i>	49
<i>Analisi della calcio-dipendenza dell'adenilil ciclasi in cellule HTR-8/SVneo</i>	56
DISCUSSIONE	58
CONCLUSIONI	63
BIBIOGRAFIA	64

INTRODUZIONE

Placentazione

Lo zigote, durante il suo percorso verso la cavità uterina, raggiunge lo stadio di blastocisti, caratterizzato da un polo embrionale interno, che darà origine all'embrione, ed un rivestimento cellulare esterno da cui si svilupperà la massa trofoblastica. Gli elementi di quest'ultima struttura si infiltrano tra le cellule dell'epitelio endometriale, inducendone la degenerazione; il trofoblasto viene così a contatto con lo stroma endometriale, dando origine al processo d'impianto, che si completerà entro il 10° o 11° giorno post-ovulatorio. Nell'embrione di 7 giorni il trofoblasto forma una placca circolare periferica che rapidamente si differenzia in due strati, uno interno formato da grandi cellule citotrofoblastiche (CTB) mononucleate, con membrane limitanti definite, ed uno esterno costituito dal sinciziotrofoblasto multinucleato (STB) (Fig.1).

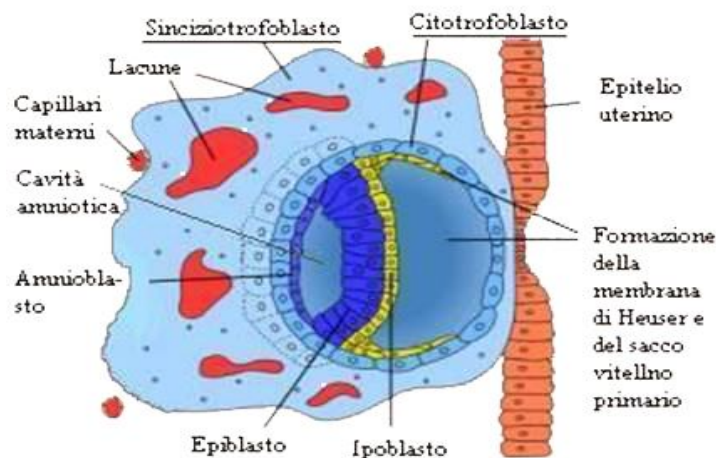


Figura 1: Differenziazione del trofoblasto in sinciziotrofoblasto e citotrofoblasto.

In realtà il sinciziotrofoblasto deriva, durante tutta la gestazione, dal citotrofoblasto; è infatti dimostrato che anche quando il trofoblasto è in rapida crescita, la sintesi di DNA e l'attività mitotica si svolgono esclusivamente nei nuclei delle cellule citotrofoblastiche. Quest'ultimo è coinvolto in due sequenze di differenziazione che portano alla formazione di due distinte popolazioni di cellule del trofoblasto, aventi sia il fenotipo villosa che quello extravillosa. La proliferazione e la differenziazione mediante fusione delle cellule del citotrofoblasto forma il sinciziotrofoblasto (fenotipo villosa), mentre la proliferazione, migrazione ed invasività delle cellule del citotrofoblasto nella decidua e nel miometrio danno origine al fenotipo extravillosa [1].

Terminata la fase d'impianto della blastocisti, nel sincizio si osservano numerose lacune che si ampliano e confluiscono. Questa rete di lacune costituirà in seguito lo spazio intervillosa dove si

riverserà il sangue dei vasi materni in progressiva erosione da parte del trofoblasto extravilloso. In questa fase le lacune sono parzialmente separate da colonne di cellule sinciziotrofoblastiche. Le colonne trabecolari servono da impalcatura per il successivo sviluppo dell'albero villosa, per questo sono meglio conosciute come abbozzi villosi primari (Fig.2).

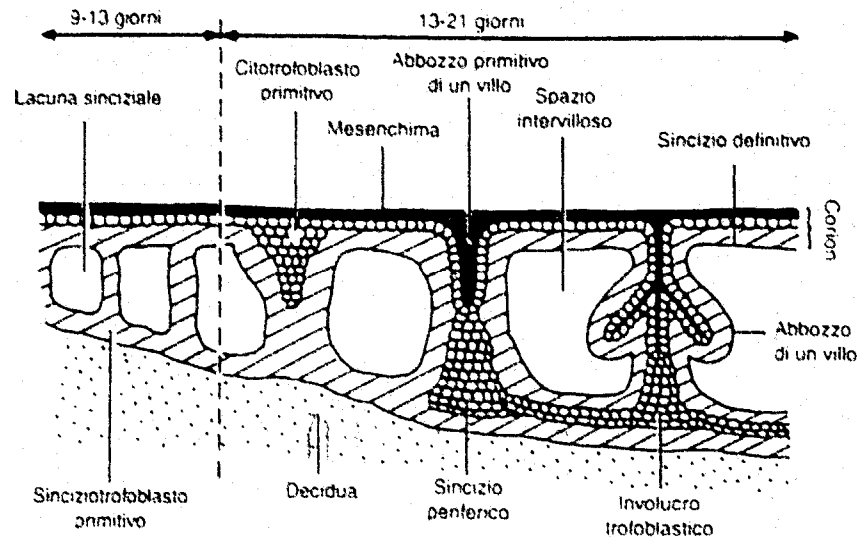


Figura 2: Stadi di sviluppo dei villi placentari. Nella figura si può osservare la sezione trasversale di un villo coriale secondario con un asse mesenchimale circondato da uno strato di cellule citotrofoblastiche e, più esternamente, uno strato sinciziale.

Mentre il citotrofoblasto in crescita si espande progressivamente verso la regione d'impianto deciduale, numerose cellule provenienti dal mesenchima extraembrionale iniziano a penetrare nell'asse centrale dei villi primari. Ne deriva un villo denominato villo coriale secondario. Osservando una sezione trasversale di quest'ultimo, si può notare un asse mesenchimale circondato da uno strato di cellule citotrofoblastiche e, più esternamente, uno strato sinciziale. La parte distale degli abbozzi dei villi è ora costituita, quasi interamente, da cellule citotrofoblastiche che costituiscono le colonne ancorate alla decidua, i cosiddetti villi di ancoraggio. Questi ultimi proliferano e si espandono lateralmente formando una guaina citotrofoblastica continua, che consente la rapida crescita circonferenziale della placenta e che porta ad un'espansione dello spazio intervilloso, nel quale si proiettano le ramificazioni che originano dagli abbozzi villosi primitivi.

Intorno al 20° giorno, nel mesenchima dei villi coriali si differenziano numerose cellule angioblastiche le quali danno origine ai primi capillari sanguigni e stabiliscono, in seguito, una continuità funzionale con altri che si differenziano nel peduncolo embrionale e nel mesenchima corionico interno. La placenta costituisce un organo villosa vascolarizzato a partire dal 21° giorno post-ovulatorio.

Tra il 21° giorno post-ovulatorio e la fine del quarto mese di gestazione, oltre alla crescita continua della placenta, si assiste ad un suo ampio rimodellamento. Mentre i villi orientati verso la decidua capsulare, che guarda la cavità uterina, degenerano e formano il corion leave (il sottile strato deciduale scompare per permettere allo stesso di venire in contatto con la decidua parietale, nella parete opposta dell'utero) i villi presenti sul lato del corion orientato verso la decidua basale proliferano e ramificano progressivamente, formando il corion frondoso, che andrà a costituire la placenta definitiva.

La morfologia villosa varia considerevolmente durante la gravidanza. tuttavia tali modificazioni non avvengono nei singoli villi; in altre parole, un villo del primo trimestre non si trasforma in uno del terzo. I villi presenti nei primi due mesi di gravidanza si trasformano in tronchi villosi, i quali successivamente producono villi intermedi, che rappresentano villi di crescita della placenta; con la maturazione iniziano ad emettere piccole estroflessioni che si trasformano nei villi terminali. Nel secondo trimestre, quindi, la popolazione villosa è costituita da un insieme di villi intermedi immaturi e maturi, mentre nella placenta a termine quasi il 60% di essi è di tipo terminale. Questi ultimi villi, con un elevato rapporto superficie/volume, con i loro vasi sinusoidali e con uno strato trofoblastico in parte differenziato per favorire il trasporto dei gas, rappresentano il tipo di struttura villosa che assicura le condizioni ottimali per gli scambi materno-fetali. L'evoluzione dell'albero villosa porta, infine, alla comparsa di due tipologie definitive di villi:

- *i villi coriali fluttuanti*, liberi all'interno delle lacune piene di sangue, che garantiscono il trasferimento di sostanze nutrienti ed ossigeno dalla madre al feto, e la rimozione di sostanze tossiche ed anidride carbonica [2];

- *i villi coriali ancoranti* la cui funzione è quella di ancorare la placenta alla decidua [3].

Dalle estremità dei villi ancoranti una sottopopolazione di cellule del citotrofoblasto, dotate di capacità proliferativa e migratoria, come già ricordato, penetrano nell'involucro trofoblastico e colonizzano ampiamente la decidua e l'adiacente miometrio, formando il citotrofoblasto extravilloso interstiziale; inoltre, cellule trofoblastiche diffondono nel lume delle arteriole spirali, distruggono il tessuto muscolare-elastico della tunica media e della lamina elastica formando il citotrofoblasto extravilloso endovascolare. L'endotelio viene sostituito da materiale fibrinoide. Questo processo invasivo si completa entro la fine del primo trimestre (Fig.3).

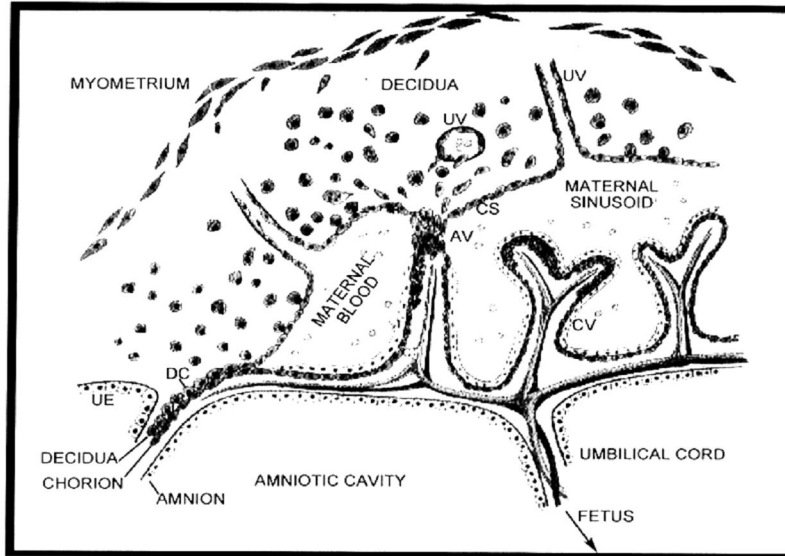


Figura 3: Rappresentazione dei villi ancoranti (AV) fluttuanti (CV) e delle cellule EVT (UV).

In seguito si assiste ad una fase di stasi, ma tra la 14^a e la 16^a settimana di gestazione si verifica una ripresa della migrazione trofoblastica endovascolare con cellule che diffondono estendendosi fino all'origine delle arteriole spirali. Lo stesso processo che si verifica nella porzione intradeciduale delle arteriole spirali si ripete nella porzione intramiometriale. Il risultato finale è la trasformazione delle spesse arteriole spirali in vasi uteroplacentari di maggiore diametro. Quindi, attraverso le cellule trofoblastiche extravilluose, la placenta, nella quale il sangue materno e quello fetale restano separati, stabilisce un sistema vascolare a bassa pressione ed alta portata, assicurando così un elevato rifornimento di ossigeno e sostanze nutritive al feto, oltre che la rimozione di sostanze tossiche e di anidride carbonica.

Entro la fine del quarto mese di gestazione, la placenta raggiunge la sua forma definitiva, tuttavia, la crescita prosegue fino al termine della gravidanza ed è legata principalmente ad una ramificazione continua dell'albero villosa ed alla formazione di nuovi villi. La connessione tra i vasi del feto e la placenta è garantita dal cordone ombelicale. In particolare, il sangue fetale arriva alla placenta attraverso due arterie ombelicali che decorrono a spirale attorno alla vena ombelicale. Raggiunta la placenta, le arterie decorrono nel corion e ciascuna irrorà metà organo placentare. Nell'attraversare il corion, si dividono ripetutamente e penetrano nel tessuto placentare per decorrere nel tronco dei villi primari, secondari e terziari.

Il flusso ematico fetale è di circa 500 ml/min e la forza propulsiva è dovuta, oltre ovviamente alla spinta del cuore fetale, ad un polso villosa periferico. Nei tronchi dei villi fluttuanti ed ancoranti sono infatti presenti fibrocellule muscolari lisce le quali contraendosi possono contribuire al passaggio del sangue dalla placenta al feto. E' stato dimostrato inoltre che i vasi fetali della placenta sono avvolti da cellule miofibroblastiche determinanti nella genesi del polso villosa.

Trofoblasto extravilloso

La placenta è un tessuto emocoriale altamente invasivo [4]. Nell'uomo un elevato livello di invasività è necessario per stabilire e mantenere il sito d'impianto dell'embrione e la conseguente infiltrazione nello stroma endometriale e nei vasi sanguigni per stabilire uno scambio efficiente tra madre e feto. Nei villi ancoranti, come già ricordato, una sottopopolazione di cellule citotrofoblastiche è responsabile dell'invasività cellulare, che permette l'attacco della placenta alla parete uterina, mediante la formazione di colonne multistrato. Questa sottopopolazione è conosciuta con il termine di trofoblasto extravilloso (EVT).

Dalla sommità di tali colonne, una sottopopolazione di queste cellule inizia a muoversi lateralmente formando il cosiddetto guscio trofoblastico e longitudinalmente, invadendo la decidua ed il miometrio più profondo [5]; questi eventi sono fondamentali per il rimodellamento dei vasi uterini (Fig.4). Dal guscio trofoblastico le cellule EVT invadono dapprima lo stroma deciduale e, solo successivamente, quello miometriale [6]; esse sono denominate trofoblasti interstiziali e vanno a circondare e distruggere la tunica media delle arterie spirali che viene sostituita da materiale amorfo fibrinoide. Questa trasformazione costituisce un pre-requisito per la successiva azione delle cellule EVT endovascolari: esse invadono progressivamente il lume arteriolare ed esprimono un fenotipo endoteliale [7] che le rende capaci di sostituirsi alle cellule dell'endotelio vascolare. Il rimodellamento delle arteriole spirali deciduali è evidente a partire dall'ottava settimana di gestazione, mentre l'invasione delle arterie miometriali ha inizio tra la 14^a e la 15^a settimana di gravidanza [8].

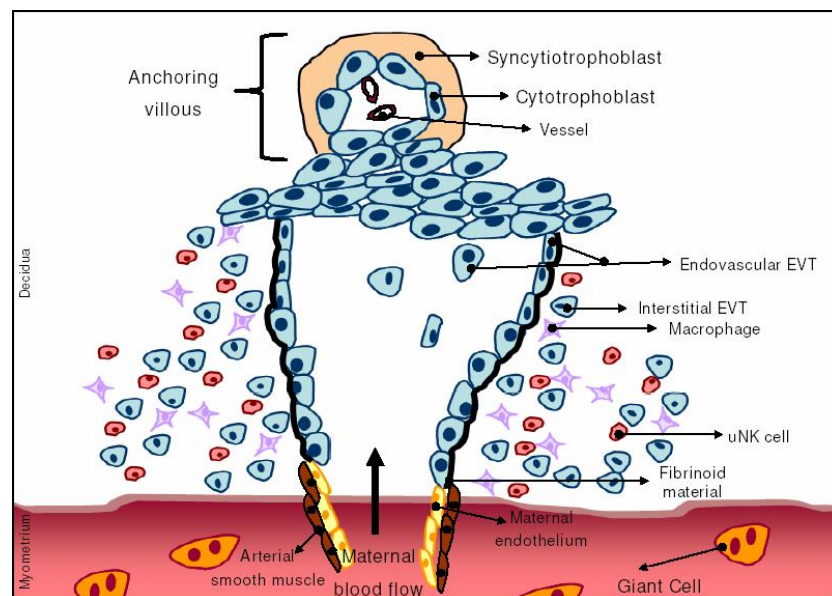


Figure 4: Rimodellamento della arterie spirali materne ad opera delle cellule trofoblastiche extravilluose.

Le cellule extravilluose interstiziali si spingono fino al primo terzo del miometrio, dove si aggregano, dando origine alle cellule giganti placentari (GC) [9]. Considerando che queste cellule multinucleate perdono la loro capacità migratoria ed invasiva, la loro formazione rappresenta probabilmente un meccanismo per prevenire una penetrazione troppo profonda nella parete uterina. La cooperazione dell'attività delle cellule EVT endovascolari ed interstiziali è responsabile della generazione di un flusso sanguigno utero-placentare ad alta capacità e bassa resistenza, condizione essenziale per il successo della gravidanza.

L'attività invasiva delle cellule del trofoblasto in situ è controllata in maniera spazio-temporale. Essa, infatti, diminuisce man mano che il citotrofoblasto invasivo si avvicina alla decidua e man mano che aumenta l'età gestazionale. L'invasività non è dovuta ad una pressione passiva di crescita, ma ad un processo biochimico attivo. La madre ed il feto, infatti, producono una serie di fattori locali e rispondono agli stessi, creando una complessa rete di interazioni tra fattori deciduali e fattori trofoblastici.

Regolazione paracrina ed autocrina dell'attività del trofoblasto

La proliferazione, migrazione ed invasività delle cellule trofoblastiche extravilluose sono processi regolati in modo autocrino e paracrino da vari fattori di crescita, proteine e proteoglicani leganti i fattori di crescita, proteine della matrice extracellulare (ECM) rilasciati dalle cellule del trofoblasto e della decidua, rispettivamente [10]. Un'alterazione di questo meccanismo di controllo può compromettere l'omeostasi uteroplacentare; ad esempio, un'invasione superficiale del trofoblasto delle arterie spirali rappresenta una condizione critica nella patogenesi della preeclampsia, mentre un'invasione incontrollata è associata a patologie della gravidanza quali mola invasiva, placenta accreta e coriocarcinoma.

In vitro, il citotrofoblasto invade e ricostituisce la membrana basale (Matrigel), comportandosi come cellule metastatiche. Questo comportamento invasivo è dovuto alla capacità delle CTB di secernere le metalloproteasi della matrice (MMP) [11]. Nell'uomo questi enzimi, chiamati anche matrixine, sono una famiglia di almeno 17 endopeptidasi zinco-dipendenti. Esse possono degradare essenzialmente tutti i componenti della matrice cellulare. Sulla base del loro substrato specifico e della loro struttura, i membri della famiglia delle MMP possono essere classificati in 4 sottogruppi. Molte MMP sono secrete come zimogeni (pro-enzimi inattivi) che divengono attivi nei compartimenti extracellulari, fanno eccezione la MMP-11 e le MT-MMP.

Benché le cellule del citotrofoblasto si comportino come cellule metastatiche, esse sono solo temporaneamente invasive (primo trimestre) e la loro invasività è normalmente limitata all'endometrio e ad un terzo della parete del miometrio [12].

Diversi fattori sono stati indagati per il loro ruolo nel controllo autocrino e paracrino della proliferazione, migrazione ed invasività delle cellule EVT [3]. Il fattore di crescita trasformante β (TGF- β), la decorina (un proteoglicano della matrice cellulare) e le molecole di adesione cellulare del melanoma (Mel-CAM) sono fattori inibitori, mentre il fattore di crescita insulino-simile (IGF-II), la proteina legante il fattore di crescita 1 (IGFBP-1) e l'endotelina 1 (ET-1) stimolano la migrazione ed invasione delle cellule EVT.

Benché il sinciziotrofoblasto esprima i più alti livelli di recettori hCG/LH, anche il citotrofoblasto extravillioso invasivo, ed in particolare il trofoblasto endovascolare, esprime questi recettori [13]. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che cellule trofoblastiche trasformate sovra-esprimono i recettori hCG/LH. Questi dati suggeriscono che l'hCG possa giocare un ruolo autocrino nella regolazione del differenziamento, crescita ed invasione del trofoblasto.

E' necessario, tuttavia, precisare che i regolatori autocrini e paracrini descritti sono stati testati in vitro, pertanto restano da approfondire i meccanismi che regolano l'invasività del trofoblasto in vivo.

Ormoni della placenta

In aggiunta alla funzione di barriera preposta agli scambi materno-fetali, la placenta è un organo ad azione endocrina, autocrina e paracrina. Essa, infatti, è implicata nella produzione di ormoni peptidici, quali hCG, l'ormone somatotropo placentare (hCS), l'ormone tireotropo placentare (hCT), e di ormoni steroidei, quali estrogeni e progesterone, che sono prodotti anche dal fegato e dal surrene fetali e quindi sotto il profilo endocrino si parla di unità feto-placentare [14]. In molti casi, infatti, la produzione da parte della placenta di fattori che promuovono la crescita è regolata in maniera differente dalle stesse sostanze rilasciate dagli organi materni. Dal punto di vista evolutivo lo sviluppo di questa attività endocrina autonoma, propria della placenta, può essere correlata al fatto che l'unità feto-placentare è effettivamente in competizione con l'organismo materno nell'attingere le risorse nutritive da uno stesso pool. Pertanto, la necessità di segnali endocrini di "upregulation" e di "downregulation" a livello della placenta può interferire con le richieste fisiologiche materne, in particolare negli stadi più avanzati della gravidanza, quando aumenta la velocità di crescita del feto [14]. E' noto che esiste un'ampia interazione tra i fattori prodotti nella placenta, anche se non si ha tuttora una conoscenza completa al riguardo [15]. Ormoni, fattori di crescita, citochine e prostaglandine sono da considerare i principali fattori che regolano la biologia delle cellule del trofoblasto.

Durante la gravidanza, il progesterone e l'estradiolo sono largamente prodotti dall'unità fetoplacentare in percentuale invariata fino al termine. Il ruolo principale di questa produzione

sembra essere quello di mantenere l'utero in uno stato quiescente per garantire la progressione della gravidanza.

Numerosi studi hanno dimostrato che l'estradiolo può modulare la produzione di numerosi ormoni placentari [16], in particolare esso stimola la produzione di hCG e hCS e la formazione del sinciziotrofoblasto [2]. Tali effetti sono dose dipendenti e specifici poiché sono inibiti da tamoxifene. L'azione del progesterone sul trofoblasto è più incerta; molti effetti sono probabilmente dovuti ad un'azione glucocorticoide-simile dello steroide. Tuttavia è stato riportato che anche questo ormone può regolare il rilascio di hCG [16] e che concentrazioni fisiologiche non hanno effetto sulla modulazione della differenziazione del trofoblasto. Infine è stato dimostrato che il progesterone diminuisce la produzione di MMP-9 nel citotrofoblasto del primo trimestre attraverso un'azione mediata dal recettore dell'ormone, infatti tale effetto è inibito dagli anti-progestinici [17]. Questi risultati sono in linea con l'osservazione che la produzione di peptidasi trofoblastiche è più abbondante nel citotrofoblasto del primo trimestre piuttosto che al termine della gravidanza, quando la produzione di progesterone è massimale. Poiché non sono stati riscontrati elementi che rispondono al progesterone nella regione che regola il gene MMP-9, è verosimile che le azioni dell'ormone siano mediate da altri fattori che agiscono a livello intracellulare.

Adenilil ciclasi

L'adenilil ciclasi è un enzima di transmembrana che converte l'adenosina trifosfato (ATP) in adenosina 3',5'-monofosfato ciclico (cAMP), presente sottoforma di *cluster* in prossimità dei recettori accoppiati alle proteine G. L'AMP ciclico, un secondo messaggero intracellulare ed ubiquitario, viene prodotto in seguito ad una cascata di reazioni che prevede l'interazione dell'ormone con il recettore, l'attivazione della proteina G e l'attivazione dell'adenilil ciclasi [18]. Il cAMP ha come principale target intracellulare l'enzima protein chinasi A (PKA). La fosforilazione di specifici substrati proteici da parte della PKA è responsabile infine della risposta cellulare.

Fino ad ora sono state identificate nove isoforme di AC numerate da 1 a 9 (120-150 kD) ed una isoforma solubile (48 kD) [19] [20]. La struttura generale di ciascuna isoforma (Fig.5) è costituita da una corta regione N-terminale, da due lunghi domini citoplasmatici C1 e C2 e due domini idrofobici M1 e M2 ognuno con sei tratti transmembranari. I domini citoplasmatici costituiscono il sito attivo e per questo sono soggetti ad una fine regolazione intracellulare. Le nove isoforme sono codificate da almeno nove geni indipendenti ed i diversi sottotipi sono espressi secondo *pattern* discreti in un limitato numero di tessuti, ma la precisa determinazione delle varie isoforme è resa difficile dai bassi livelli di espressione e dalla mancanza di anticorpi specifici ad alta affinità. Comunque studi dell'espressione dell'mRNA hanno dimostrato che le diverse isoforme dell'AC hanno un pattern di distribuzione tessuto specifica; generalmente tutte le isoforme sono espresse nelle cellule nervose, anche se in misura maggiore AC1, AC3 e AC8, mentre AC5 predomina nel cuore e AC6 nei reni [21].

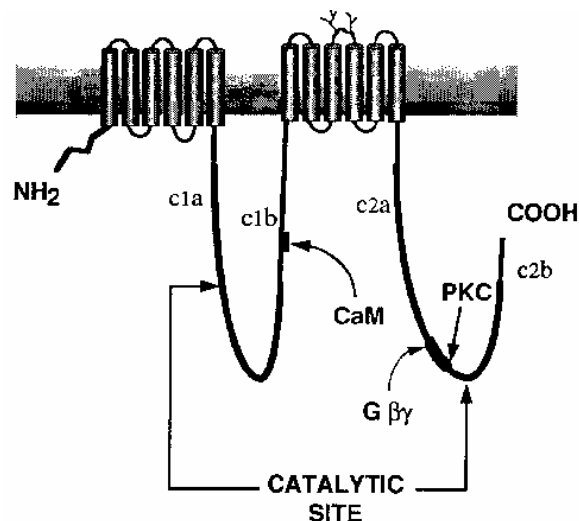


Figura 5: Struttura molecolare dell'adenilil ciclasi. L'enzima è formato da due sezioni, entrambe costituite da una regione transmembranaria a 6 domini e da una regione citoplasmatica (C). I due domini citoplasmatici (C1a-C2a) costituiscono il sito catalitico che converte ATP in cAMP.

Tutte le isoforme dell'AC compresa quella solubile, eccetto l'AC9, sono attivate dal forskolin (FSK), un diterpene estratto dalla radice di una pianta indiana (*Coleus forskohlii*). Il FSK

si lega nella stessa regione contenente il sito attivo e, tramite interazioni idrofobiche e legami idrogeno, unisce i due domini catalitici citoplasmatici, attivando l'enzima [22]. L'isoforma AC9 non è responsiva al FSK, a causa della diversa sequenza aminoacidica nella tasca di legame, anche se per soli due aminoacidi. L'adenosina e vari analoghi del nucleoside, purchè presentino l'anello purinico intatto, inibiscono l'attività dell'AC [23]. Anche se con potenza variabile e con qualche differenza tra le isoforme, tutte risultano inibite dall'adenosina e dai suoi derivati. A causa della correlazione strutturale tra ATP e questi composti, è degno di nota il fatto che l'inibizione è di tipo non competitivo e che la potenza inibitoria apparentemente aumenta quando l'enzima è attivato [24].

L'isoforma solubile (citoplasmatica), identificata per la prima volta negli spermatozoi [19], differisce dalle altre sia nella struttura che nelle proprietà biochimiche [25], ha un peso molecolare di circa 48 kDa, è insensibile ad alcuni noti attivatori dell' AC e possiede una maggiore affinità per il substrato rispetto alla forma di transmembrana. La forma solubile si trova particolarmente espressa negli spermatozoi immaturi, mentre nelle cellule mature si trova legata alla membrana [26].

Per quanto concerne la regolazione dell'attività adenilil ciclasica, numerosi sono gli ormoni, neurotrasmettitori e odoranti che agiscono, via recettore, regolando la formazione di cAMP sia direttamente, attivando una proteina G, che indirettamente, mediante cross-talk con altre vie di trasduzione del segnale [27]. La ciclasi infatti può ricevere segnali da svariate fonti: proteine G, protein kinasi, fosfatasi, calcio ed il complesso calcio/calmodulina (Ca^{2+} /CaM). Le nove isoforme di AC si possono suddividere in quattro gruppi sulla base del tipo di regolazione, il primo gruppo formato da AC1, AC3 e AC8 è stimolato dal complesso Ca^{2+} /CaM. Il secondo gruppo composto da AC2, AC4 e AC7 è attivato dalla subunità $\beta\gamma$ delle proteine G e dalla fosforilazione da parte della protein kinasi C (PKC). Il terzo gruppo, che include AC5 e AC6, è inibito dal calcio a basse concentrazioni. Al quarto gruppo appartiene solamente l'isoforma AC9 che risulta insensibile sia al calcio sia alla subunità $\beta\gamma$ delle proteine G [28]. L'isoforma citosolica risulta invece stimolata direttamente dal bicarbonato, sia in vivo che in vitro, in modo pH-indipendente. Nella tabella I sono riportati i principali fattori che modulano le diverse isoforme dell'AC.

Regolazione mediata da proteine G

Le subunità delle proteine G esercitano effetti specifici sulle ciclasi. Tali effetti, sia inibitori che stimolatori (Tabella I), vengono mediati direttamente dalle subunità $G\alpha$ o indirettamente tramite le loro subunità $G\beta\gamma$. Anche se la regolazione mediata dalle subunità delle proteine G, è apparentemente semplice, resta tuttavia molto da comprendere sulla selettività delle singole ciclasi

nei confronti delle specifiche subunità α e $\beta\gamma$ delle proteine G. Tale selettività, infatti, è dimostrata solamente da saggi in vitro, mentre è ancora sconosciuto il modo in cui si riflette nei sistemi cellulari in vivo. Il meccanismo di attivazione delle proteine G verrà ampiamente descritto oltre.

Regolazione mediata dallo ione calcio

All'interno del primo gruppo si possono evidenziare diverse sensibilità, in vivo, verso il Ca^{2+} . Infatti per l'AC3 ancora non si può affermare, senza incertezze, una stimolazione calcio-mediata; è stato infatti riportato che questa isoforma viene stimolata dal complesso $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ solo in presenza di altri effettori, come la 5-guanililimidodifosfato o il forskolin. L'EC50 per il Ca^{2+} libero è 0.05 μM e 5.0 μM per AC1 e AC3 rispettivamente [29]. AC1 ed AC8 sono entrambe stimolate dal complesso $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ sia in presenza che in assenza di forskolin, con una EC50 di 0.1 μM e 0.5 μM , rispettivamente [30]. Il calcio può anche inibire l'attività dell'AC: a) con bassa affinità in tutti i tessuti; b) con bassa o alta affinità in tessuti come il cuore, l'ipofisi anteriore, lo striato, e svariate linee cellulari [31] [29]. L'inibizione dell'AC calcio-mediata non richiede la calmodulina. Il clonaggio delle AC, nei primi anni '90, ha permesso di caratterizzare le isoforme stimolate dal complesso $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (AC1, AC3, AC8), quelle inibite dal Ca^{2+} con alta affinità (AC5, AC6) e quelle insensibili al Ca^{2+} , ma stimolate dalla PKC (AC2, AC4, AC7) [32].

Infine, numerosi studi hanno messo in luce che gli ormoni responsabili dell'aumento del calcio intercellulare possono inibire la formazione di cAMP, proprio attraverso il meccanismo sopra descritto. È noto, tuttavia, che i livelli intracellulari di cAMP sono fortemente regolati anche dall'attività delle fosfodiesterasi (PDE), enzimi che degradano il nucleotide a 5'-AMP. Alcune forme di PDE risultano stimolate da un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} [33].

Regolazione mediata dalla PKC

La PKC, attivata dalla via di trasduzione dei fosfoinositidi, modula in modo diverso le varie isoforme dell'AC, in particolare, essa stimola le ciclasie calcio insensibili (AC2, AC4, AC7). A questo proposito Levin e Reed nel 1995 hanno identificato una piccola regione vicino all'estremità carbossi terminale come il sito d'attivazione al quale la PKC si lega, inducendo un'aumentata risposta dell'AC2 [34]. L'isoforma AC6, invece, viene inibita dalla PKC mediante fosforilazione a livello dell'estremità amino terminale [35]. Recenti studi hanno dimostrato una perdita dell'inibizione dell'AC6, PKC-mediata, quando vengono mutati due dei tre possibili siti di fosforilazione nelle regioni N e C1 o quando viene indotta una singola mutazione nella regione C2 [36].

Regolazione tipo specifica

Le ciclasi possono essere suddivise anche in base ai differenti regolatori endocrini. Un esempio è rappresentato dal fattore di crescita epidermico (EGF), che stimola l'attività ciclasica con conseguente aumento dei livelli di cAMP intracellulare. L'effetto stimolatorio di EGF è evidente solo in cellule che sovraesprimono AC5, mentre non ha effetto in cellule che sovraesprimono AC1, AC2 o AC6. L'attivazione di recettori tirosin-kinasici da parte del fattore di crescita I insulino-simile, o l'inibizione della tirosin-fosfatasi mediante sodio ortovanadato aumentano l'espressione della AC6. L'isoforma AC9 non è una ciclasi particolarmente attiva, non risponde al forskolin e la sua attività è generalmente piuttosto bassa; tuttavia, questa ciclasi viene inibita dal complesso Ca^{2+} /calcineurina alle medesime concentrazioni di Ca^{2+} che stimolano la AC1 via calmodulina [37] [38].

cAMP e gravidanza

L'osservazione che la sincizializzazione del trofoblasto, in vitro, è accompagnata da un aumento dei livelli intracellulari di cAMP [39], ha permesso di ipotizzare che il nucleotide svolga un ruolo chiave nella differenziazione del trofoblasto. Successivamente, è stato dimostrato che il cAMP è coinvolto in diverse funzioni uterine, sia nell'uomo che in altri mammiferi; infatti è stato dimostrato il suo coinvolgimento nella reazione di decidualizzazione e nell'impianto della blastocisti [40]. Le prove sperimentali della presenza dell'AC nella decidua di donna gravida sono state ottenute per la prima volta nel 1979 [41].

Tabella I. Regolatori delle diverse isoforme dell'adenilil ciclastasi nei mammiferi. ↑ risposta positiva; ↓ risposta negativa; → nessuna risposta. Gruppo 1, Gruppo 2, Gruppo 3, Gruppo 4 [28].

AC isoform	Response to cAMP signaling pathway component					
	Gα _s	Gα _i	Gβγ	FSK	Calcium	Protein kinases
AC1	↑	↓ (CaM- or FSK-stimulated activities)	↓	↑	↑(CaM) ↓(CaM kinase IV)	↑PKC (weak) ↓(CaM kinase IV)
AC2	↑	→	↑ (when stimulated by Gα _s)	↑		↑(PKC)
AC3	↑	↓		↑	↑(CaM) ↓(CaM kinase II)	↑(PKC) ↓(CaM kinase II)
AC4	↑		↑	↑		↑(PKC)
AC5	↑	↓	↓(β ₁ γ ₂)	↑	↓(<1μM)	↓(PKA) ↑(PKC ^{α/ζ})
AC6	↑	↓	↓(β ₁ γ ₂)	↑	↓(<1 μM)	↓(PKA, PKC)
AC7	↑		↑	↑		↑(PKC)
AC8	↑	↓(Ca ²⁺ rises)		↑	↑(CaM)	→(PKC)
AC9	↑	↓		↑ (weak)	↓(calcineurin)	
sAC	→	→		→		

Le Proteine G

Le proteine G svolgono un ruolo chiave nel processo di trasduzione del segnale transmembrana, in quanto prendono parte al processo di selezione di segnali in entrata e regolano la sensibilità del sistema. Infatti, numerosi ormoni, neurotrasmettitori e stimoli sensoriali esercitano i loro effetti biologici attraverso recettori di transmembrana, accoppiati a proteine G (GPCR). Le proteine G, a loro volta, regolano l'attività di effettori come enzimi e canali ionici. Variazioni nell'attività di questi effettori molecolari si traducono in risposte a breve termine, come il controllo dei livelli di secrezione, del tono muscolare e dei processi metabolici, ed effetti a lungo termine come la regolazione della proliferazione e differenziazione cellulari.

Le proteine G sono degli eterotrimeri, composti dalle subunità α , β e γ ; la denominazione G deriva dal fatto che tali proteine legano i nucleotidi guanosinici, GDP o GTP, a livello della subunità α , mentre le subunità β e γ sono così strettamente associate fra loro da poter essere considerate come un'unica entità [42].

Quanto detto sopra mette in evidenza che le proteine G eterotrimeriche non sono semplici trasduttori del segnale, ma rappresentano una parte centrale della sofisticata macchina molecolare capace di ricevere ed elaborare le informazioni portate dai segnali extra-cellulari. Attualmente la conoscenza riguardo a questo importante sistema di trasduzione è principalmente basata sullo studio di strutture cellulari e sub-cellulari, anche se relativamente poco si sa circa il loro ruolo e la loro funzione nello sviluppo dell'organismo. L'attivazione delle proteine G avviene in seguito al legame tra agonista e recettore, che causa una modificazione del dominio intracellulare del recettore stesso, esponendo il terzo loop al legame con una proteina G a livello della subunità α . Nella trasmissione del segnale dal recettore all'effettore, la proteina G subisce un ciclo di attivazione-inattivazione, che le conferisce la funzione di un interruttore molecolare regolabile. Nello stato basale, il complesso $\beta\gamma$ e il GDP sono associati alla subunità α . In questa forma la proteina G può intragire con un recettore ed essere attivata. L'interazione causa il distacco del GDP, che viene sostituito dal GTP, il quale, a sua volta, induce una variazione conformazionale, che porta alla dissociazione tra la subunità α ed il complesso $\beta\gamma$. La subunità α legata al GTP così come il complesso $\beta\gamma$ sono ora liberi d'interagire con proteine effettatrici e regolarne la funzione. Successivamente, l'attività GTPasica della subunità α idrolizza il GTP a GDP, mettendo fine allo stato d'attivazione della proteina G. Il GDP rimane legato alla subunità α , la quale si riassocia al complesso $\beta\gamma$ ritornando nello stato di inattivazione (Fig.6).

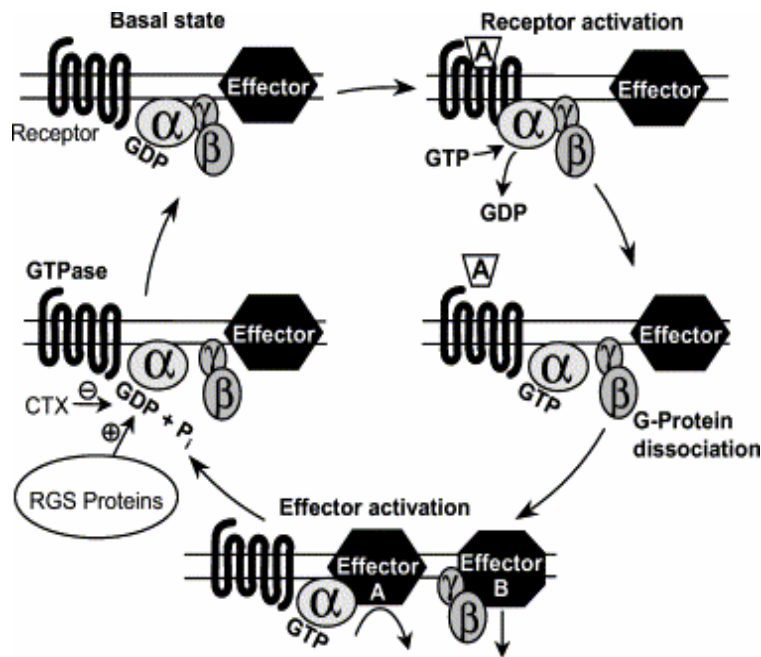


Figura 6: Ciclo delle proteine G. A agonista; CTX tossina del colera; RGS regolatore delle proteine G

Il ciclo di inattivazione delle proteine G è fortemente ed irreversibilmente influenzato da due tossine batteriche. La tossina della pertosse, prodotta da *Bordetella pertussis* e la tossina del colera, prodotta da *Vibrio cholerae*. Queste tossine rappresentano uno strumento importante impiegato negli studi di trasduzione del segnale mediato dalle proteine G e nella caratterizzazione delle stesse. La tossina della pertosse catalizza la reazione di ADP-ribosilazione delle proteine G inibitorie ($G\alpha_i$ e $G\alpha_o$) su un residuo cisteinico, all'estremità carbossi terminale, impedendo l'accoppiamento tra recettore e proteina G e l'attivazione di quest'ultima [43]. La tossina del colera induce l'ADP-ribosilazione delle proteine $G\alpha_s$, bloccando l'attività GTPasica e lasciando la subunità α in uno stato permanentemente attivato [44].

Subunità α e complesso $\beta\gamma$ delle proteine G

Nei mammiferi sono state descritte più di 20 subunità α che possono essere suddivise in 4 sottofamiglie, in base ad omologie strutturali e funzionali [45]. Le principali caratteristiche delle singole proteine G sembrano essere determinate, in gran parte, proprio dall'identità della subunità α . Riguardo alla distribuzione tissutale, le diverse subunità delle proteine G mostrano un *pattern* d'espressione che varia notevolmente: alcune espresse in un numero limitato di tessuti, altre, come ad esempio $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$ e $G\alpha_{13}$, praticamente ubiquitarie.

Riguardo al complesso $\beta\gamma$ sono state identificate 5 subunità β e 20 subunità γ [46]. L'analisi cristallografica del complesso $\beta\gamma$ mostra che tale subunità possiede una struttura formata da 7

foglietti beta. Con l'eccezione della subunità β_5 , espressa maggiormente nel sistema nervoso centrale, le subunità β attualmente conosciute esibiscono una elevata omologia (79-90%). Al contrario, le subunità γ sono molto più eterogenee. Il complesso $\beta\gamma$ è stato a lungo considerato un *partner* passivo della proteina G, ma ora è chiaro che esso svolge un ruolo importante nella regolazione di molti effettori [47]. Esempi di tali effettori sono i canali K^+ regolati dalle proteine G (GIRK) [48], particolari isoforme dell'AC [49] e della fosfolipasi C [50], come pure sottotipi di canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti [51] e le isoforme β e γ dell'enzima fosfoinositide3-kinasi [52]. Con alcune eccezioni, non sembrano esserci molte differenze tra le diverse subunità $\beta\gamma$ riguardo alla loro capacità di regolare enzimi effettori [47].

Gli effetti cellulari e fisiologici indotti dall'attivazione dei GPCR sono determinati dal particolare accoppiamento del recettore ai sottogruppi delle proteine G ($G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$). Mentre i recettori che portano ad effetti cellulari simili o identici, normalmente attivano gli stessi sottotipi di proteine G, non è noto se questi recettori usino lo stesso *pool* di proteine G, e se le subunità $\beta\gamma$ coinvolte siano identiche. Allo stesso tempo recettori diversi sono in grado di attivare più di un sottotipo di proteina G, attivando così diverse vie di trasduzione. Vi sono comunque alcune eccezioni nelle quali i recettori sembrano interagire con proteine G in modo altamente selettivo. Quindi in generale l'interazione recettore-proteina G non avviene né in modo assolutamente specifico e selettivo né in modo molto promiscuo.

La famiglia $G\alpha_s$

La stimolazione delle ciclasti, attraverso i GPCR, coinvolge le proteine G della famiglia $G\alpha_s$, della quale $G\alpha_s$ e $G\alpha_{olf}$ sono i membri principali. Il gene $G\alpha_s$ dà origine a varie forme di splice. Quattro varianti di splice, due forme corte ($G\alpha_{s-S}$) e due lunghe ($G\alpha_{s-L}$), sono correlate strutturalmente e sembrano essere funzionalmente indistinguibili [53] [54] [55] [56]. È stata descritta un'altra forma di splice lungo della $G\alpha_s$ conosciuta come $KL\alpha_s$, che possiede una lunga porzione amino terminale codificata da un singolo esone che contiene la parte essenziale della proteina $G\alpha_s$ [57] [58]. La forma $XL\alpha_s$ è presente sulla membrana plasmatica, lega il GTP e può regolare l'attività dell'AC. Tuttavia non è chiaro se, in condizioni fisiologiche, possa essere attivata attraverso i GPCR [59] [60] [61]. L'altro membro della famiglia, $G\alpha_{olf}$, è espresso nei neuroni sensoriali olfattivi e nel sistema nervoso centrale, dove svolge specifiche funzioni.

La famiglia $G\alpha_{i/o}$

L'inibizione della ciclasti, da parte degli agonisti recettoriali, è mediata dalle proteine $G\alpha_{i/o}$. I membri di questa famiglia sono le proteine $G\alpha_i$, $G\alpha_o$ e $G\alpha_z$.

I componenti della famiglia $G\alpha_{i/o}$ più abbondantemente espressi sono il tipo $G\alpha_i$ ($G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$) che mediano l'inibizione recettore-dipendente di vari tipi di AC [49]. La condivisione da parte delle 3 sottofamiglie di $G\alpha_i$ di alcuni aspetti funzionali suggerisce che esse potrebbero avere azioni in parte ridondanti. Questo è anche indicato dalla mancanza di cambiamenti fenotipici evidenti riscontrati in topi Knock out (KO) per $G\alpha_{i1}$ o $G\alpha_{i3}$ [143]. Inoltre, è stato dimostrato che l'inibizione della ciclasi, mediata da recettore, in colture primarie derivate da topi KO per $G\alpha_{i2}$, come pure in cellule embrionali $G\alpha_{i2}$ (-/-), è mediata da $G\alpha_{i1}$ e $G\alpha_{i3}$ [62] [63].

La subunità $G\alpha_o$ è ampiamente espressa nei neuroni, dove costituisce lo 0.5% delle proteine totali di membrana. E' anche presente, sebbene a livelli più bassi, in altri tessuti come il cuore, l'ipofisi e il pancreas. Nonostante la grande abbondanza nel sistema nervoso, la sua funzione è ancora poco conosciuta. Diversamente da altre proteine G, sembra che molti degli effetti dell'attivazione di $G\alpha_o$ siano mediati dalla subunità $\beta\gamma$, tuttavia i risultati relativi alla regolazione diretta degli effettori da parte di $G\alpha_o$ sono piuttosto controversi.

La subunità $G\alpha_z$, insensibile alla tossina della pertosse, è espressa in vari tessuti come il sistema nervoso, le piastrine e la ghiandola surrenale, dove inibisce le isoforme 1 e 5 dell'AC. Il ruolo fisiologico di questa proteina non è del tutto chiaro, comunque, recenti dati, ottenuti da topi KO per $G\alpha_z$, evidenziano un suo ruolo nell'attivazione piastrinica e nel sistema nervoso centrale. La famiglia $G\alpha_{i/o}$ comprende anche altre subunità α come la gustoducina ($G\alpha_{gust}$) o la transducina ($G\alpha_{t-r}$; $G\alpha_{t-c}$) che sono coinvolte nelle funzioni sensoriali.

La famiglia $G\alpha_q$

I membri della famiglia $G\alpha_q$ mediano la regolazione, insensibile alla tossina della pertosse, delle isoforme β della fosfolipasi C (PLC). La famiglia $G\alpha_q$ consta di quattro membri ($G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15/16}$) le cui subunità α sono espresse da distinti geni, con diversi *pattern* d'espressione. $G\alpha_q$ e $G\alpha_{11}$ sembrano essere espresse più o meno ubiquitariamente, [64] al contrario, la subunità $G\alpha_{15}$ del topo e la sua controparte umana $G\alpha_{16}$ sono espresse solamente in una sottopopolazione di cellule emopoietiche; infine l'espressione della $G\alpha_{14}$ è limitata ad alcuni organi come rene, testicoli e polmone [65] [66].

Questa famiglia di proteine mostra quindi una grande varietà il cui significato però, attualmente, non è chiaro. Nel mammifero, i recettori non discriminano tra $G\alpha_q$ e $G\alpha_{11}$ [67] [68] [69] [70] e sembra esserci poca differenza nella loro capacità di regolare le isoforme β della PLC. Infatti $G\alpha_q$ e $G\alpha_{11}$ attivano indistintamente le isoforme β_1 , β_3 e β_4 della PLC ed entrambe regolano in modo debole la PLC β_2 [64]. Per quanto il preciso *pattern* d'espressione delle subunità $G\alpha_{14}$ e $G\alpha_{15/16}$ faccia supporre che esistano specifiche funzioni in relazione al tipo cellulare considerato,

nessun cambiamento fenotipico evidente si osserva nelle mutazioni che portano all'inattivazione dei geni $G\alpha_{14}$ e $G\alpha_{15}$, almeno nel topo [71]. Similmente, i topi KO per $G\alpha_{11}$ sono apparentemente normali, mentre la mancanza di $G\alpha_q$ porta a vari difetti.

Proteine G e trofoblasto

Contrariamente alle numerose informazioni riportate in letteratura sulle proteine G, poco è noto circa il loro ruolo nella funzione placentare. La presenza delle subunità α_i , α_s e β nella placenta è stata dimostrata per la prima volta da Evans nel 1986 [72]. Le stesse subunità sono state riscontrate nel sinciziotrofoblasto nel 1992 da Jacobs, Li and Illsley [73].

Lo studio relativo al pattern di espressione delle proteine G, da parte di Petit A. nel 1995 [74] ha dimostrato che $G\alpha_s$, $G\alpha_o$, $G\alpha_{12}$ e $G\alpha_{13}$ sono espresse nella placenta umana nel corso della gravidanza.

Recentemente è stato osservato, in vitro, che la diminuzione dell'espressione di G_i è correlata all'aumento dei livelli intracellulari di cAMP, nel differenziamento del trofoblasto [75].

Le prostaglandine

La scoperta delle prostaglandine (PG) risale al 1930, quando due ginecologi di New York osservarono come il fluido seminale maschile era in grado di stimolare "in vitro" la contrazione del tessuto muscolare dell'utero. Un paio d'anni più tardi, in Svezia, Ulf Von Euler ne confermò l'effetto sulla muscolatura viscerale liscia e osservò la riduzione della pressione sanguigna a seguito della loro infusione. Le prostaglandine, insieme ai trombosani (TX) e ai leucotrieni (LT), fanno parte della famiglia degli eicosanoidi, messaggeri che si formano nei tessuti, a partire dagli acidi grassi, in seguito alla loro ossigenazione da parte dell'enzima cicloossigenasi. Gli eicosanoidi (acidi grassi a 20 atomi di carbonio) sono presenti praticamente in ogni tessuto dell'organismo dove esercitano sia un'azione autocrina che paracrina, questo perchè sono rapidamente metabolizzati. Ogni tipo di cellula sembra produrre un tipo prevalente di prostanoide: le piastrine producono quasi esclusivamente trombosani (vasocostrizione); le cellule endoteliali principalmente prostaciline (vasodilatazione); il rene produce principalmente PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 , PGI_2 e TXA_2 . Non sono ormoni in senso stretto e neppure neurotrasmettitori, ma sono in ogni caso considerati corollario del sistema endocrino.

Il precursore più studiato degli eicosanoidi è l'acido arachidonico (AA), un acido grasso poli-insaturo, ovvero che ha nella propria molecola più doppi legami carbonio-carbonio. L'acido arachidonico presente nell'organismo umano è introdotto con la dieta o deriva dall'acido linoleico (acido grasso essenziale). A livello cellulare è legato a fosfolipidi di membrana (fosfatidilinositolo, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina). I prodotti che si formano dal metabolismo dell'AA richiedono una serie di reazioni enzimatiche che regolano una complessa serie di vie biosintetiche a volte definite come la cascata dell'AA. Questi metaboliti sono talmente numerosi che si comprende bene come siano considerati delle molecole essenziali per la vita.

L' AA è liberato dalla molecola di fosfolipide, dall'enzima fosfolipasi A2, dopo di che può andare incontro a tre principali vie di trasformazione che portano alla formazione di:

- 1) endoperossidi policiclici e quindi TX e PGs, sotto l'azione della ciclossigenasi (COX);
- 2) HPETE (acido idroperossi-eicosatetraenoico), intermedio della sintesi dei LT, e di HETE (acido idrossi-eicosatetraenoico), sotto l'azione della lipossigenasi;
- 3) HETE, acidi epossieicosatetraenoici, e acido 19- o 20-idrossiarachidonico, sotto l'azione del citocromo P450.

Le prostaglandine si formano velocemente, esercitano i loro effetti localmente e vengono successivamente degradate per via enzimatica o decadono spontaneamente. Il meccanismo di formazione delle prostaglandine è detto via ciclossigenasica, dall'enzima principale. Quest'ultimo agisce sugli acidi grassi e trasforma l'acido arachidonico nella prostaglandina endoperossido

(PGG_2) che, a sua volta, viene convertita in PGH_2 (Fig.7). Durante questo passaggio si forma un radicale libero dell'ossigeno.

La PGH_2 viene successivamente trasformata, per via enzimatica, in tre prodotti:

- Trombossano A_2 , soprattutto nelle piastrine; si tratta di un composto piuttosto instabile che provoca aggregazione piastrinica e vasocostrizione;
- Prostaciclina (PGI_2), prevalentemente nella parete dei vasi, ha effetti opposti a quelli del Trombossano A_2 , inibisce l'aggregazione piastrinica e induce vasodilatazione;
- Prostaglandine PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 , sintetizzate in diversi distretti dell'organismo, rappresentano i metaboliti più stabili; esercitano numerose azioni sul tono e sulla permeabilità vascolare.

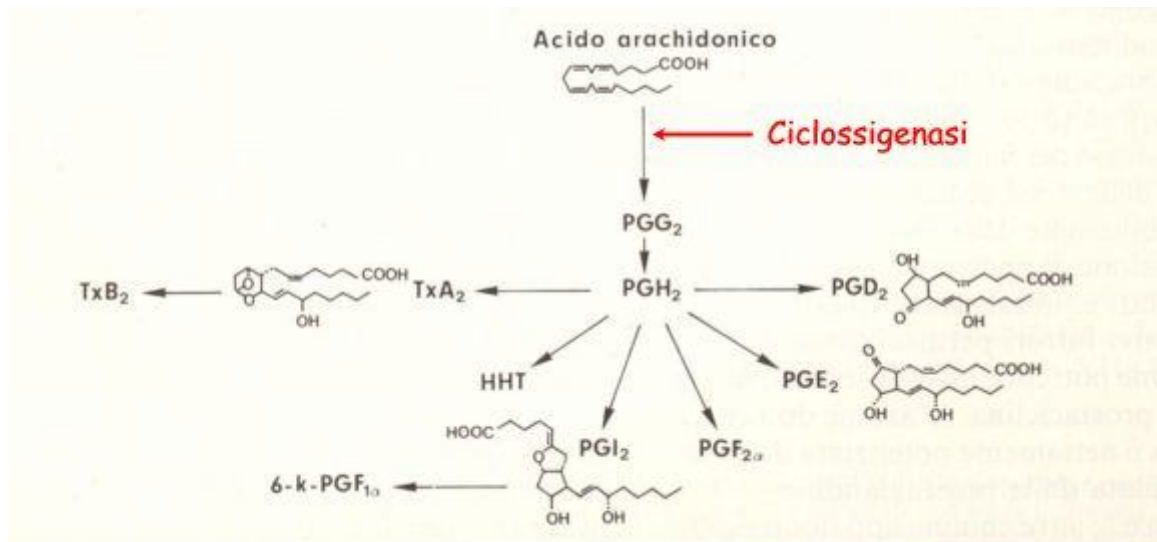


Figura.7: Sintesi delle prostaglandine.

Le azioni dei prostanoidi meglio caratterizzate sono quelle relative al rilascio e alla contrazione della muscolatura liscia [76]. Il ruolo delle prostaglandine, nell'induzione del parto è ormai noto da tempo, infatti il miometrio rappresenta un importante bersaglio muscolare dell'azione delle PG. Questo è anche dimostrato dal fatto che la loro somministrazione è ormai prassi per l'induzione del travaglio, mentre l'inibizione della loro sintesi, in seguito al trattamento con acido acetilsalicilico o indometacina, produce un effetto tocolitico. A partire dalla metà della gravidanza, la produzione di PG aumenta e raggiunge il picco nel corso del travaglio di parto; in particolare i livelli di PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e di altri eicosanoidi aumentano nel liquido amniotico e alcuni di essi anche nel sangue materno, nel caso del parto spontaneo. Questo andamento suggerisce che specifici meccanismi possano controllare la sintesi delle PG nella gravidanza. E' noto che l'estradiolo stimola la loro produzione in cellule endometriali isolate, mentre il progesterone ed i

glucocorticoidi hanno un effetto inibitorio nell'amnios e nella decidua. Al contrario, l'ossitocina, che stimola con meccanismo diretto la contrattilità del miometrio, rappresenta un potente segnale per la produzione di PG, all'inizio del travaglio da parte dei tessuti intrauterini. Altri fattori paracrini come il fattore rilasciante la corticotropina, l'ormone adenocorticotropo, l'activina, il fattore di crescita epiteliale (EGF), il fattore di crescita tumorale- α e citochine proinfiammatorie come IL-1 e IL-6 inducono il rilascio di PG, in particolare di PGE₂ e PGF_{2 α} , dai tessuti intrauterini [77]. Nell'utero umano sono stati riscontrati siti di legame ad alta affinità per la PGE₂ soprattutto nel fondo e nel corpo dell'utero, mentre quelli a bassa affinità, sempre per PGE₂, nel canale cervicale. La PGE₂, prodotta nei vari tessuti gestazionali (placenta, amnios, corion e decidua), presenta numerosi effetti, a volte opposti, a seconda del tessuto considerato.

I recettori della PGE₂

Come precedentemente detto, la PGE₂ induce una varietà di risposte cellulari che dipendono dal tipo di tessuto e dal recettore coinvolto [78]. Una volta sintetizzata e rilasciata dalla cellula, la PGE₂ esplica la propria azione legandosi a recettori di membrana specifici (EP) accoppiati a proteine G. Questi recettori sono stati ben identificati e caratterizzati: presentano 7 domini di transmembrana, con la porzione N-terminale extracellulare e quella C-terminale intracellulare [76] [79] e sono stati classificati in 4 sottotipi (EP1-4). Ogni sottotipo recettoriale è accoppiato a differenti vie di trasduzione del segnale: EP1 induce un aumento di Ca²⁺ e l'attivazione della PKC; EP2 e EP4 attivano l'adenilil cilasi e la PKA; EP1 diminuisce i livelli intracellulari di cAMP [80].

La presenza dei recettori EP è stata localizzata nell'utero, rene, mucosa gastrica, piastrine e macrofagi. EP1 sembra essere coinvolto nella contrazione muscolare liscia, EP2 invece nel rilasciamento della muscolatura liscia vasale, EP3 nell'inibizione della liberazione dei neurotrasmettitori nel SNA, nell'inibizione della secrezione gastrica e nell'inibizione della lipolisi.

Prostanoidi e trofoblasto

Nella gravidanza, come già detto, i prostanoidi svolgono un ruolo cruciale nel controllo di ogni suo stadio, iniziando dall'impianto della blastocisti fino ad arrivare all'induzione del travaglio di parto [81] [82]. Per quanto riguarda le cellule del trofoblasto, oltre che essere in grado di sintetizzare e rilasciare le prostaglandine [83], esse costituiscono anche un bersaglio per l'azione di tali molecole. Il trofoblasto rilascia prostaglandine in risposta a vari stimoli fisiologici, come ormoni quali gonadotropina corionica [84] e citochine proinfiammatorie [85] [86]; un altro importante fattore regolatore della sintesi di PGE₂ è rappresentato dall'ipossia, sulla cui tipologia di azione sono presenti, però, dati di letteratura contraddittori [87] [88]. La PGE₂, come sopra

riportato, può anche agire sulle cellule trofoblastiche: infatti è in grado di aumentare la loro attività endocrina [89], può stimolare l'uptake della leptina da parte di queste cellule [90] e, ad elevate concentrazioni, induce il rilascio di hCG da parte del trofoblasto del primo trimestre di gravidanza [91].

Modulazione della risposta cellulare

Il coinvolgimento della PGE₂ nella modulazione della proliferazione, migrazione ed invasività è noto in particolare per le cellule tumorali [92], ma anche per le cellule normali. Le sue azioni possono essere di tipo stimolatorio o inibitorio; ad esempio è stato riportato che la PGE₂ stimola la proliferazione di cellule epiteliali intestinali [93] e di condrociti in coltura interagendo con il recettore EP1 [94]. Però, è anche in grado, mediante un meccanismo d'azione che coinvolge il cAMP, di inibire la proliferazione e la progressione attraverso la fase G1 del ciclo cellulare di cellule epiteliali mammarie umane [95] ed anche di cellule stellate epatiche murine [96]. La PGE₂, mediante l'interazione con i recettori EP2 ed EP4 stimola la migrazione di cellule dendritiche umane [97], mentre inibisce quella di fibroblasti umani attraverso il recettore EP2 [98].

Mediante l'attivazione del recettore EP1, PGE₂ potenzia le capacità invasive di cellule di carcinoma epatocellulare umane, [99] e di cellule tumorali pancreatiche, aumentando l'espressione e l'attività delle MMPs [100]. Infine, l'interazione con il recettore EP4, in cellule tumorali mammarie umane, promuove inibizione dell'invasività [101].

In letteratura, per quanto riguarda le cellule trofoblastiche, è riportata una diminuzione della invasività di cellule EVT e di coriocarcinoma in presenza di PGJ₂ e PGF_{2 α} , rispettivamente [102] [103].

La somatostatina

La storia della somatostatina (SRIF) ha inizio nel 1968 quando Krulich *et al*, nel tentativo di isolare il fattore ipotalamico capace di stimolare la secrezione della somatotropina o ormone della crescita (GH) isolarono, invece, un peptide a basso peso molecolare con attività inibitoria. Solo nel 1973 il premio Nobel Roger Guillemin e i suoi collaboratori [104] isolarono e sequenziarono un tetradecapeptide capace di inibire la secrezione della somatotropina e per questo lo chiamarono somatostatina. Studi successivi hanno dimostrato che la somatostatina viene prodotta, oltre che a livello ipotalamico, anche a livello del sistema nervoso periferico, a livello pancreatico e nel tratto gastrointestinale.

Nei mammiferi la somatostatina è codificata da un unico gene e sintetizzata come parte di un precursore più grande, la pre-pro-somatostatina, lungo 116 amminoacidi e caratterizzato all'estremità N-terminale da un peptide segnale di 24 residui. Il precursore viene, però, rapidamente trasformato in un peptide lungo 92 amminoacidi, la pro-somatostatina. Nei mammiferi il proormone viene processato ad entrambe le estremità N-terminale e C-terminale a dare i due prodotti biologicamente attivi, la somatostatina-14 (SRIF-14) e la somatostatina-28 (SRIF-28) (Fig.8).

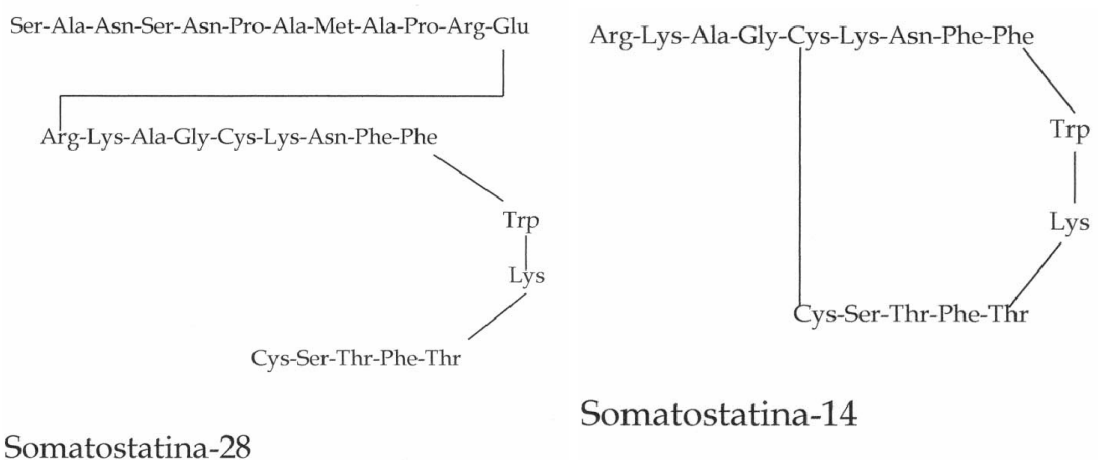


Figura 8: Sequenza amminoacidica della SRIF-14 e della SRIF-28.

La SRIF-28 è costituita da 28 amminoacidi e contiene interamente, all'estremità C-terminale, la struttura della SRIF-14, la quale risulta costituita da 14 amminoacidi tra i quali è presente un ponte disolfuro che lega il terzo e il quattordicesimo residuo. Le differenti forme molecolari di somatostatina non sono distribuite, nei diversi tessuti, in modo uniforme: la SRIF-14 predomina nel tessuto nervoso ed è virtualmente l'unica forma presente nella retina, nel sistema nervoso periferico, nel pancreas e nei neuroni presenti a livello dello stomaco; la SRIF-28 si trova, invece, ad elevate concentrazioni nel cervello, nell'intestino, nel pancreas e nello stomaco. Le

cellule che producono maggiori quantità di SRIF sono quelle del sistema nervoso centrale e periferico, del pancreas endocrino e dell'intestino [105]; è stato dimostrato che molte cellule tumorali sono in grado di secernere SRIF [106].

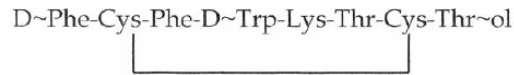
I recettori della SRIF

La SRIF svolge le sue innumerevoli funzioni grazie ad una interazione altamente specifica con alcuni recettori di membrana; questa interazione è stata descritta per la prima volta nel 1978 da Schonbrunn e Tashjian. La presenza dei recettori della somatostatina è stata evidenziata in una grande varietà di tessuti incluso l'intestino, il cervello, l'ipofisi, il pancreas endocrino ed esocrino, il surrene, la tiroide, il rene, cellule immunitarie e la placenta [104] [105].

Sono stati clonati cinque sottotipi recettoriali, sstr1, sstr2, sstr3, sstr4, sstr5 con un peso molecolare compreso tra i 27 e i 228 kDa: ciascuno genera una singola proteina recettoriale, mentre lo *splicing* alternativo dell'mRNA di sst2 dà origine a due isoforme sst2A e sst2B, che differiscono tra loro nella lunghezza e sequenza aminoacidica carbossi-terminale. I recettori per SRIF possono essere suddivisi in due classi in base alla loro affinità per l'octreotide (un agonista del recettore sst2 di SRIF): una classe ad alta affinità comprendente i sottotipi sstr2, sstr3, sstr5, l'altra a minore affinità comprendente i sottotipi sstr1 e sstr4 [105].

L'interazione di SRIF con i propri recettori, tutti accoppiati a proteina G, evoca un'ampia varietà di risposte cellulari, a causa, appunto, della presenza di più sottotipi recettoriali per il peptide. Ciascun recettore, infatti, è in grado di influenzare più vie di traduzione, attraverso la stimolazione di differenti tipi di proteine G [105]. Tutto questo rende difficoltosa l'assegnazione di una particolare via ad un singolo recettore; tuttavia, notevoli progressi sono stati compiuti in tal senso grazie alla produzione di agonisti ed antagonisti specifici per i diversi sottotipi recettoriali, ma grazie anche allo studio delle risposte evocate in linee cellulari transfettate con specifiche isoforme di recettori per SRIF.

Sono numerosi gli analoghi della somatostatina sintetizzati in questi ultimi anni. Sicuramente il più conosciuto e utilizzato è l'octreotide; si tratta di un peptide costituito da 8 amminoacidi, che contiene una porzione identica alla SRIF-14 compresa tra il settimo e il decimo residuo, stabilizzato da un ponte disolfuro che lega la Cys-3 con la Cys-7. All'interno del peptide si trovano due residui, non presenti in natura, la D-Phe e il D-Trp ed una Treonina, contenente un gruppo alcolico (Fig.9).



Octreotide

Figura 9: Sequenza amminoacidica dell'analogo della SRIF, octreotide.

Tra le vie di trasduzione modulate da SRIF troviamo l'adenilil ciclasi, che è stato il primo effettore di SRIF ad essere individuato [106], la PLC, la PLA₂ e i canali ionici (Fig.10). E' generalmente accettato che tutti i cinque sottotipi recettoriali siano accoppiati tramite una proteina G (G $\alpha_{i/o}$) in modo inibitorio all'AC, la cui attivazione causa una diminuzione dei livelli intracellulari di cAMP. Inoltre, in cellule transfettate, è stata dimostrata l'attivazione dell'AC, verosimilmente mediata da una proteina G_s, in seguito all'attivazione da parte di elevate concentrazioni di agonista del recettore sst5 [106]. Per quanto riguarda la PLC è noto un effetto stimolatorio da parte dei recettori sst2, e uno inibitorio per intervento dei recettori sst5 [107]. Similmente, alcuni dati indicano una stimolazione dell'attività della PLA₂, altri una inibizione [108] [109] attraverso sottotipi recettoriali diversi e in relazione al tipo di cellula o tessuto considerato. Per i canali ionici è stata dimostrata sia l'attivazione che l'inibizione dei canali del Ca²⁺ da parte di SRIF [105].

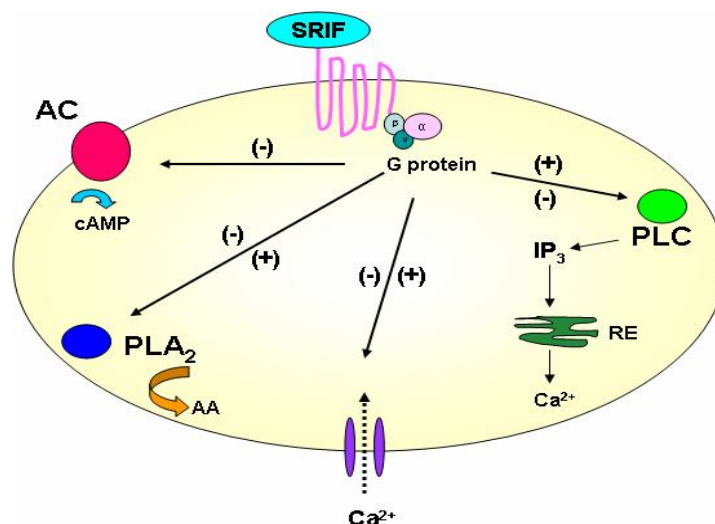


Figura 10: Alcune vie di trasduzione influenzate da SRIF. AC: adenilil ciclasi; PLC: fosfolipasi C; IP3: inositolo trifosfato; RE: reticolo endoplasmatico; PLA2: fosfolipasi A2; AA: acido arachidonico.

SRIF e Trofoblasto

La presenza di SRIF nella placenta umana è stata per la prima volta identificata da Nishihira et al nel 1978, mediante tecniche immunoistochimiche. Essi dimostrarono la presenza del peptide nello strato di cellule citotrofoblastiche, piuttosto che in quello di sinciziotrofoblasto [110]. Dopo qualche anno fu indagata e dimostrata, su membrane placentari, la presenza di recettori per SRIF utilizzando tecniche di binding recettoriale [111]. Inoltre è stata determinata la presenza di mRNA per i sottotipi recettoriali sst1 e sst4 nel tessuto placentare umano e in citotrofoblasti purificati a termine di gravidanza [112].

Modulazione della risposta cellulare

Il coinvolgimento di SRIF nel modulare la proliferazione, la migrazione e l'invasività cellulare è nota sia in cellule normali sia in cellule tumorali [113] [114]. Nella maggioranza dei casi il peptide inibisce tali funzioni, anche se sono state riportate azioni stimolatorie. Studi condotti su cellule di carcinoma epidermoide umano, mostrano che SRIF stimola la proliferazione [115], e che in cellule progenitrici ematopoietiche induce la migrazione [116]. Inoltre è stato dimostrato che SRIF aumenta la velocità di migrazione delle cellule granulari cerebellari di topo vicino al loro sito di origine, ma ne diminuisce la motilità vicino alla loro finale destinazione [117]. Gli effetti del peptide su proliferazione e migrazione cellulare sono stati ascritti in alcuni casi al sistema adenilil ciclasi-cAMP [114] [116] [118], mentre in altri a diverse vie di trasduzione del segnale [115] [117].

SCOPO DELLA TESI

Le cellule trofoblastiche extravilluose svolgono un ruolo determinante nello sviluppo della placenta, organo che consente un adeguato apporto di ossigeno e sostanze nutritive al feto e quindi una corretta crescita dello stesso. Affinché tale fenomeno avvenga in modo fisiologico, consentendo pertanto il successo della gravidanza, è necessario che le risposte delle cellule EVT, quali proliferazione, migrazione ed invasività siano finemente regolate: ciò si raggiunge grazie al bilancio dell'attività dei fattori in grado di stimolare o di inibire tali funzioni. Infatti, una limitata capacità di proliferazione, migrazione ed invasione del del trofoblasto è correlata a patologie della gravidanza come preeclampsia, eclampsia e ritardo della crescita intrauterina, mentre una esaltata invasione delle cellule trofoblastiche extravilluose è associata all'insorgenza di mola invasiva, placenta accreta e coriocarcinoma.

Il sistema adenilil ciclasasi/cAMP, con le sue componenti principali ovvero le proteine G e l'enzima adenilil ciclasasi, rappresenta una via di trasduzione del segnale extracellulare ubiquitario. In molti tipi di cellule la concentrazione intracellulare di cAMP influenza la progressione del ciclo cellulare: in alcune di esse in senso stimolatorio, in altre inibitorio. L'importanza del cAMP e quindi del sistema ciclasico, è stata riportata in vari organismi e in differenti tipi cellulari, tuttavia i meccanismi molecolari coinvolti sono ancora poco conosciuti. La differenziazione delle cellule trofoblastiche, sia verso il fenotipo villosa che extravillosa, comporta molte modificazioni morfologiche e biochimiche. Tali modificazioni si accompagnano ad una variazione dei livelli ormonali e di messaggeri intracellulari quale il cAMP. Per quanto riguarda l'adenilil ciclasasi è stato riportato, in diversi tipi cellulari, che la sua espressione varia in funzione dello sviluppo ma nelle cellule trofoblastiche extravilluose umane la determinazione dell'espressione delle diverse isoforme non è stata fino ad ora determinata.

Considerato il ruolo cruciale svolto dal cAMP in numerosi processi cellulari, insieme alla necessità di identificare nuovi potenziali fattori coinvolti nel processo di placentazione da aggiungere a quelli già noti, lo scopo della ricerca è stato verificare se il sistema adenilil ciclasasi/cAMP è effettivamente coinvolto nella modulazione delle risposte del trofoblasto umano. In particolare, è stato verificato se PGE₂ e SRIF, noti agonisti in grado rispettivamente di attivare ed inibire l'attività ciclasica in molti tipi cellulari, sono coinvolti anche nella modulazione delle funzioni delle cellule EVT, attraverso il sistema AC/cAMP. Al riguardo non sono disponibili dati di letteratura, anche se numerose evidenze, almeno per quanto riguarda il prostanoide, indicano un loro possibile coinvolgimento in tale processo. Infatti è noto che: a) la PGE₂ svolge un ruolo cruciale nella regolazione di tutti gli stadi della gravidanza; b) SRIF e suoi recettori sono presenti a livello della placenta umana; c) sia PGE₂ che SRIF regolano la proliferazione, migrazione ed

invasività cellulare, ovvero le tipiche funzioni che caratterizzano le cellule EVT.

Per effettuare queste indagini, abbiamo utilizzato una linea cellulare derivante da trofoblasto extravilloso umano del primo trimestre di gravidanza, le cellule HTR-8/SVneo: queste cellule mostrano le stesse caratteristiche fenotipiche delle cellule parentali e rispondono ai medesimi fattori di regolazione. Tale linea cellulare rappresenta perciò un modello estremamente adatto allo studio dei meccanismi che stanno alla base della regolazione di proliferazione, migrazione ed invasività del trofoblasto extravilloso umano.

Per valutare se le cellule HTR-8/SVneo fungono da bersaglio per le azioni modulatrici di PGE_2 e di SRIF, e se il sistema adenilil ciclastasi/cAMP è coinvolto in tale modulazione, abbiamo indagato: 1) l'espressione dei vari sottotipi recettoriali per i due fattori in esame; 2) la via di trasduzione del segnale notoriamente accoppiate a tali recettori, ovvero la via dell'adenilato ciclastasi; 3) la modulazione di proliferazione e migrazione cellulare; 4) l'attività adenilil ciclastica; 5) il *pattern* di espressione delle delle proteine G e delle diverse isoforme della subunità catalitica dell'adenilil ciclastasi.

MATERIALI e METODI

Materiali

PGE₂, antisiero anti- PGE₂-BSA, cAMP, epinefrina (EPI), forskolin (FSK), fibronectina (FN), bisbenzimidide (Hoechst blue), fattore di crescita epiteliale (EGF), somatostatina (SRIF) e 1,1,1-trifluorometil-6,9,12,15-eicosatetraen-2-one (AACOCF₃): Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Mezzo di coltura, siero, reagenti per l'estrazione dell'RNA e per la RT-PCR: Invitrogen (Paisley, Scotland, UK). 5'-Bromo-3'-deossiiduridina (BrdU) e anticorpi monoclonali di topo anti-BrdU: Roche (Basel, Switzerland). Anticorpo anti-topo Texas Red coniugato: Jackson Immunoresearch (West Grove, PA, USA). Di I: Molecular Probes (Milano, Italia). EP-2 (H-75), EP-4 (H160), G α_q (E-17), G α_s (K-20) e G α_o (K-20), siero anti-coniglio con IgG di capra coniugato alla perossidasi: Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Anticorpi di coniglio contro la sequenza C-terminale del recettore umano sst1, 2A, 2B, 3, 4 e 5: Immunological Sciences (Roma, Italia). Siero anti-coniglio con IgG di capra purificato e marcato con fluoresceina isotiocianato (FITC): Vector Labs (Burlingame CA, USA). Coomassie Brilliant Blue R250: NTG (Italia). Agonisti (octreotide e SOM230) e antagonisti (D-Tyr⁸-cyanamide 154806 (CYN), SRA-880 e ACQ090) recettoriali della SRIF sono stati gentilmente donati dal Dr Daniel Hoyer, Novartis Pharma AG, Svizzera.

Colture cellulari

La linea cellulare HTR-8/SVneo è stata gentilmente donata dal Dr. CH Graham, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada. Le cellule erano coltivate a 37° C in una atmosfera al 5% di CO₂ utilizzando il mezzo di coltura RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino, penicillina (100U/ml) e streptomicina (100 μ g/ml). Le cellule erano seminate in piastre da: 24 pozzetti per la determinazione dei livelli di cAMP e per il rilascio di acido arachidonico; 6 pozzetti per l'estrazione dell'mRNA e delle proteine, immunocitochimica, saggi di incorporazione della BrdU e determinazione delle curve di crescita; 60 mm per i saggi di migrazione.

Determinazione dei livelli intracellulari di cAMP

Una volta che le cellule avevano raggiunto la confluenza, veniva tolto il mezzo di coltura e sostituito con quello di incubazione (RPMI 1640 senza siero) contenente l'inibitore della cAMP-fosfodiesterasi 3-isobutil-1-metilxantina in assenza o in presenza delle sostanze test. In seguito all'incubazione per i tempi indicati, il mezzo di incubazione veniva aspirato e la reazione bloccata aggiungendo HCl 0.1N. Le piastre erano mantenute a 4°C per 1 h e conservate a -80°C. In seguito

allo scongelamento, i detriti cellulari raccolti erano centrifugati per 10 min a 12500 x g a 4°C e il supernatante neutralizzato con Trizma base 0.5 M. I livelli di cAMP erano determinati secondo il metodo radiochimico di Brown *et al* [119]. La sensibilità del saggio era 0.5 pmoli/10⁶ cellule e i coefficienti di variazione intra- e inter-saggio erano <10%. I dati erano espressi come pmoli di cAMP/10⁶ cellule/tempo.

Incorporazione della 5'-bromo-3' deossiuridina

Le cellule erano piastrate al 30-40% di confluenza e il giorno dopo il mezzo di coltura veniva sostituito con mezzo senza siero per 24 h. Venivano poi incubate per 16 h in presenza di siero al 10% in assenza o in presenza di sostanze test; la BrdU, una volta aggiunta, era lasciata agire per 30 min. La determinazione della BrdU era effettuata mediante uno specifico kit (Roche) in grado di identificare le cellule in fase S. Brevemente, le cellule erano fissate in paraformaldeide al 3% per 20 min a temperatura ambiente, permeabilizzate in Triton X-100 (0.2%) e incubate a temperatura ambiente per 15 min in HCl 1.5 M. In seguito a vari lavaggi con PBS, le cellule erano bloccate in PBS più BSA (0.1%), incubate per 1 h a 37°C con l'anticorpo monoclonale di topo anti-BrdU, e per 30 min con l'anticorpo coniugato anti-topo Texas Red. La colorazione dei nuclei con il colorante Hoechst era effettuata per 10 min a temperatura ambiente. La fluorescenza era analizzata con un microscopio epifluorescente in grado di discriminare la colorazione dei nuclei effettuata da Texas Red e da Hoechst.

Curve di crescita

Le cellule (9.5x10⁵/pozzetto) erano coltivate in mezzo supplementato con siero fetale bovino (FBS) al 5%, in assenza o in presenza delle sostanze test. Il mezzo veniva cambiato ogni 2 giorni. Le cellule erano raccolte e contate ogni giorno per 5 giorni.

Esperimenti di migrazione

Il saggio di migrazione è stato eseguito attraverso un sistema di rilevazione automatico. La parte inferiore delle membrane HTS FluoroblockTM (Necton Dickinson) era ricoperta con fibronectina (FN) 10 µg/ml o con BSA all'1% a 4°C per tutta la notte, quindi saturata per 2 h a temperatura ambiente con BSA. Le cellule erano coltivate con siero per 18 h, staccate con la tripsina, colorate con Di I per 5 min a 37°C, ed infine era loro permessa la ri-espressione delle integrine per 30 min a 37°C. Le cellule (1x10⁵) erano poi piastrate nella camera superiore del FluoroblockTM ed incubate a 37°C in mezzo senza siero fino a 5 h, in assenza o in presenza delle

sostanze test. La fluorescenza era determinata usando uno spectrafluor (Tecan) a 485 nm. La percentuale di cellule migrate era ottenuta dividendo la quantità di fluorescenza rilevata nella parte inferiore per quella totale determinata nella parte superiore al tempo zero.

Immunocitochimica

Le cellule HTR-8/SVneo erano incubate in mezzo senza siero per 24 h e cresciute su un vetrino coprioggetti. La vitalità cellulare veniva testata mediante il Trypan Blu test, prima della fissazione. Le cellule aderenti erano pre-fissate con paraformaldeide al 3% per 3 min, lavate in un tampone fosfato (PBS, 0.01M, pH 7.2) e marcate con diversi anticorpi di coniglio contro i recettori di SRIF (diluizioni di lavoro 1:500, 1:1000, 1:5000 in PBS contenente BSA allo 0.5% e sodio azide allo 0.1%) per 1 h a temperatura ambiente, senza permeabilizzazione cellulare. In seguito alla marcatura, le cellule erano lavate in PBS e incubate con IgG di capra anti-coniglio marcate con FITC (diluite 1:1000 in PBS) per 1 h a temperatura ambiente. I controlli includevano marcatura con solo l'anticorpo secondario, in assenza di quello primario. Le cellule venivano lavate in PBS e acqua distillata, immerse in PBS/glicerolo (1:1) e osservate al microscopio (Nikon Eclipse TE 2000-S, Olanda) con una lunghezza d'onda (488 nm) corrispondente alla fluorescenza della FITC. Le immagini erano catturate con DS-L1 Camera Control Unit (Nikon).

RT-PCR

L'RNA cellulare totale era estratto mediante l'uso di Trizol dalle cellule HTR-8/SVneo ed era sciolto in H₂O contenente dietilpirocarbonato e quantificato mediante spettrofotometria. 2 µg di RNA totale era retroscritto usando 200 U di M-MLV e 1.5 µg di random primers, in 20 µl di volume di reazione a 37° C per 1 h.

La reazione di amplificazione era effettuata usando 0.5 U di Platinum *Taq* DNA Polimerasi in un volume di reazione di 25 µl contenente Tris-HCL 10 mM, pH 8.3, KCl 50mM, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 0.2 mM, 0.4 µM di ogni *primer* specifico per l'amplificato indagato. Nelle Tab. I II III sono riportate le sequenze specifiche dei *primer* utilizzati assieme alle dimensioni dell'amplificato. Ogni ciclo di reazione consisteva di una denaturazione iniziale, un appaiamento e un allungamento eseguito con l'utilizzo di un termociclatore. Per ogni cDNA indagato è stato ottimizzato il ciclo termico in base alle proprie caratteristiche, le Tab. IV V VI riassumono le condizioni ottimali di amplificazione. I prodotti di PCR erano separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente bromuro di etidio 0.05%. Le quantità relative dei prodotti di amplificazione erano determinate mediante densitometria digitale, usando il programma "Gel Doc 2001".

Tabella I. Sequenze dei *primer* specifici per EP1-4 e dimensioni dell'amplificato, * [120] [121].

isoforme	paia basi	sequenza dei primers (5'→3') *
EP1	1037	F CGG ACC GCT TAC CTG CAG CTG R GGT GGG CTG GCT TAG TCG TT
EP2	432	F CGG ACC GCT TAC CTG CAG CTG R TAA TGA AAT CCG ACA ACA GAG
EP3	837	F CGC CTC AAC CAC TCC TAC ACA R GCA GAC CGA CAG CAC GCA CAT
EP4	344	F AGG ATT CGT TCT GTG AAC CCC AT R GAG GTG GTG TCT GCT TGG GTC AG

Tabella II: Sequenze dei *primer* specifici per le subunità α delle proteine G e dimensioni dell'amplificato; * [122].

isoforme	paia basi	sequenza dei primers (5'→3') *
G α i	474	F CAG TCC ATC ATT GCA ATC ATA AGA R CTC AGC CAG AAC AAG GTC ATA ATC
G α o	312	F TCG ACA GCG TCA GCT TGG TTG R GAA ATG GTC CGT AAC CAC CTG
G α q	260	F ATG ACT TGG ACC GTG TAG CCG ACC R CCA TGC GGT TCT CAT TGT CTG ACT
G α s	323	F ACG TGA TCA AGC AGG CTG ACT R GGA ACA GGA TCA CAG AGA TGG

Tabella III: Sequenze dei *primer* specifici per le isoforme di AC; * [123].

isoforme	paia basi	sequenza dei primers (5'→3') *
AC ₃	213	F TAC CCA GCT GTC TTC TGC CT R GAG ATG GCC TCC ACC ATG
AC ₅	316	F CGG GCG AGT ACA CTG CGG R GGT TCT CTG GCG GTT CAT
AC ₆	170	F TCG GGC AAC ACT GCA GTA CCT G R CCC GAG TCC GCT GCA GCT TG
AC ₇	587	F CTC TCT GTG CTG ATG TAC GTC GAG R TCT TGA CGT AGA GGC TGT GGA AGT
AC ₉	166	F GTG GAG CAT CTA TTT TGC GGT C R CGA ACA CCA GCA GGG TGA G
AC ₄	166	F ATG CAC AAC AGG ATG CTG AAC R GCC CCA ATA ACT CCA GCT AC
sAC	566	F AAA ACC TGT CAC CTC CAA CG R TCT AAA GCG TTG AGC CGA AT

Tabella IV: Cicli termici ottimali per ciascuna isoforma di EP.

isoforme	denaturazione	annealing	estensione	numero di cicli
EP1	94°C 30"	57°C 30"	72°C 30"	35
EP2	94°C 30"	50°C 30"	72°C 30"	40
EP3	94°C 30"	51°C 30"	72°C 30"	35
EP4	94°C 30"	55.5°C 30"	72°C 30"	40

Tabella V: Cicli termici ottimali per ciascuna isoforma di AC.

isoforma	denaturazione	annealing	estensione	numero di cicli
AC ₃	94°C 30"	60°C+50°C 30"	72°C 30"	10+25
AC ₅	94°C 15"	53°C 30"	72°C 30"	35
AC ₆	94°C 15"	53°C 15"	72°C 20"	35
AC ₇	94°C 40"	51°C 40"	72°C 50"	35
AC ₉	94°C 30"	50°C 30"	72°C 30"	35
AC ₄	94°C 15"	48°C 15"	72°C 30"	40
sAC	94°C 30"	47°C 30"	72°C 50"	35

Tabella VI: Cicli termici ottimali per ciascuna subunità delle proteine G

isoforme	denaturazione	annealing	estensione	numerodi cicli
Gai	94°C 15"	49°C 30"	72°C 30"	30
Gao	94°C 15"	49°C 30"	72°C 30"	30
Gaq	94°C 15"	50°C 30"	72°C 30"	30
Gas	94°C 15"	50°C 30"	72°C 30"	30

SQ-RT-PCR

La PCR semi quantitativa (SQ-RT-PCR) permette di quantificare indirettamente il numero di copie di DNA o RNA in un dato campione biologico [124] [125]. Essenzialmente questa tecnica prevede l'amplificazione, con *primer* specifici, dei diversi *target* esaminati; le intensità relative all'amplificato vengono poi rapportate all'intensità del segnale di uno *standard* o controllo interno. Poiché l'intensità del segnale è proporzionale al numero di copie del nostro *target* le diverse concentrazioni vengono così determinate. I campioni vengono rapportati ad un controllo interno che è un *housekeeping* gene [126] [127]. Un buon controllo interno, per definizione, deve avere un livello d'espressione costante, assumendo che le condizioni sperimentali non ne alterano i livelli d'espressione [128].

Nel nostro studio sono stati testati, usando *primer* specifici, GAPDH, β -actina e 18S rRNA (Tabella VII); per prima cosa sono stati ottimizzati i cicli termici e le condizioni di amplificazione (Tabelle VIII e IX); successivamente è stato determinato il *range* di cicli nel quale i geni possono essere studiati, partendo dal minimo numero necessario per visualizzare il prodotto di PCR fino al *plateau* che rappresenta il limite oltre al quale per ogni successivo ciclo termico non c'è un aumento dell'amplificato; in fine, per i differenti *standard*, è stata calcolata la varianza.

Tabella VII: Sequenze dei *primer* specifici per i geni *housekeeping* e dimensioni dell'amplificato; * [129]; ° [130]; • [131].

controlli	paia basi	sequenza dei primers (5'→3')
18S *	495	F GGA CCA GAG GCA AAG CAT TTG CC R TCA ATC TCG GGT GGC TGA ACG C
β -Actina °	463	F GGC GAC GAG GCC CAG A R CGA TTT CCC GCT CGG C
GAPDH •	492	F ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC R TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

Dopo aver determinato il controllo interno migliore è stata eseguita l'analisi dei geni indagati. L'immagine del gel è stata acquisita usando "Quantity one" e l'intensità delle bande (densità ottica) è stata espressa in funzione del numero di cicli d'amplificazione costruendo, per ogni proteina d'interesse e per il controllo interno, le curve esponenziali (versione 2.0 Graph Pad Inc).

Dall'analisi della curva esponenziale, ottenuta da almeno sei punti, è stato ricavato il valore dell'EC50 che corrisponde al valore del flesso nella fase esponenziale. In questo punto l'espressione dei diversi geni può essere confrontata. Quindi ogni valore di densità ottica è stato normalizzato con lo *standard* ed i valori ottenuti sono stati confrontati tra loro mediante lo studio statistico ANOVA. In ogni esperimento sono stati utilizzati campioni ottenuti da estrazioni differenti, in modo da differenziare i livelli d'espressione, e ogni esperimento è stato ripetuto almeno 3 volte.

Tabella VIII: Concentrazioni ottimali dei geni *housekeeping* 18S rRNA, GAPDH, β -Actina.

Buffer	MgCl ₂	dNTP	Primer F R	Taq	cDNA
1X	1.5mM	0.2mM	0.3mM	1U	1 μ l

Tabella IX: Cicli termici ottimali dei geni *housekeeping* 18S rRNA, GAPDH, β -Actina.

denaturazione	annealing	estensione	numero di cicli al flesso
94°C 30"	58°C 30"	72°C 40"	19

Western blotting

Le proteine estratte erano determinate utilizzando uno specifico kit cromogenico (Western Breeze, Invitrogen). Le proteine (80 µg) erano risospese in un gel di poliacrilamide Bis-Tris-HCl (4-12%), separate mediante elettroferesi (SDS-PAGE), poi trasferite su membrane PVDF. Gli immunoblots erano eseguiti usando gli anticorpi policlonali per EP2, EP4, Gα_q, Gα_s e Gα_o diluiti (1:200) con un kit per diluire l'anticorpo primario. Per determinare gli anticorpi legati, era aggiunto alle membrane il siero anti-coniglio con IgG di capra coniugato alla perossidasi, e il sistema era incubato a temperatura ambiente per 45 min. Il peso molecolare era determinato usando specifici marcatori.

Determinazione dell'attività dell'enzima adenilil ciclasi

L'attività adenilil ciclasica è determinata secondo il metodo di Clement-Cormier [132]. In breve: le membrane (circa 50 µg di proteine/campione) vengono preincubate per 20 min a 0°C in tampone Tris-HCl 75 mM, pH 7.4, contenente MgSO₄ 1 mM e in presenza di 3-isobutil-1-metilxantina 10 mM, GTP 500 µM, ed EGTA 1 mM, come chelante del Ca²⁺ residuo nella preparazione delle membrane, più le sostanze test. Dove specificato, la guanosina 5'-O-tiotrifosfato (GTPαS) è addizionata alla miscela standard di analisi in assenza di GTP. La reazione viene iniziata con l'aggiunta di ATP 500 µM ed i campioni sono incubati per 10 minuti a 30°C. La reazione viene bloccata mediante bollitura per 2 minuti. I campioni vengono congelati per almeno 24 ore prima del dosaggio del cAMP. I campioni vengono scongelati e centrifugati per 10 min a 3.000 x g e 100 µl di supernatante sono utilizzati per il dosaggio del cAMP, secondo il metodo riportato precedentemente.

Analisi statistica

I dati erano esaminati mediante ANOVA, seguita dal test a comparazione multipla di Bonferroni, dal post-test di comparazione di Dunnet o dal t-test di Student a due code, come appropriato. Le differenze erano considerate significative in presenza di p<0.05. E' stato utilizzato il programma PRISM (versione 2.1, Graph Pad Inc.).

RISULTATI

Valutazione dei livelli intracellulari di cAMP

Effetto di agenti stimolatori (PGE₂, FSK, EPI)

E' stato valutato l'effetto dei due agonisti recettoriali PGE₂ ed epinefrina (EPI) e del FSK (un attivatore diretto della subunità catalitica dell'AC) sulla produzione di cAMP, incubando le cellule HTR-8/SVneo per 15 min. La scelta del tempo di incubazione è stata effettuata sulla base dei risultati ottenuti da esperimenti di time-course, effettuati in assenza o in presenza delle suddette sostanze (dati non riportati). Come mostrato in Fig.1, tutti i composti si sono rivelati in grado di aumentare la produzione di cAMP in modo dose-dipendente, raggiungendo il plateau attorno a 10⁻⁵ M. I valori di EC₅₀ calcolati sono risultati: 338 nM per PGE₂, 690 nM per EPI e 600 nM per FSK. A plateau l'entità della stimolazione è risultata: 32 volte per PGE₂, 15 volte per EPI e 60 volte per FSK.

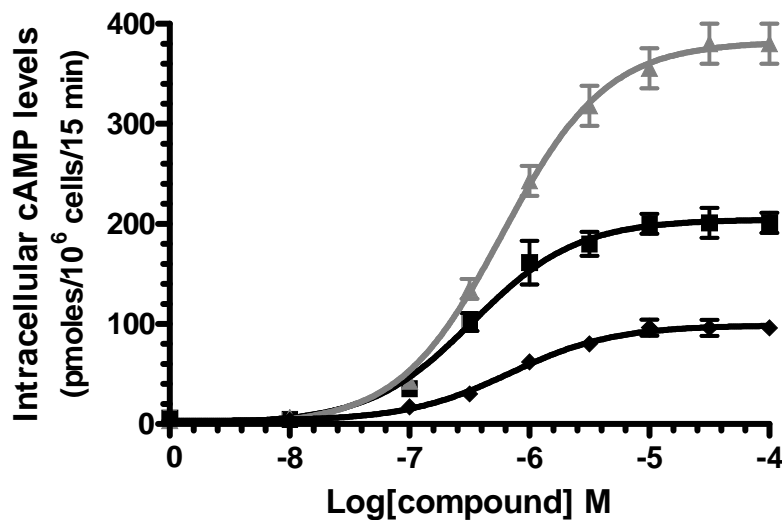


Figura 1: Effetto di concentrazioni crescenti di PGE₂ (■), EPI (◆) e FSK (▲) sui livelli intracellulari di cAMP in cellule HTR-8/SVneo. I livelli basali di cAMP sono pari a 6.3 ± 0.4 pmoles/10⁶ cellule/15 min. I dati sono la media \pm SEM di almeno 4 esperimenti, eseguiti in duplicato su diverse colture cellulari.

Effetto dell'agonista inibitorio SRIF

Per valutare l'effetto dell'agonista somatostatina (SRIF), che notoriamente agisce inibendo il sistema dell'adenilil ciclasi in molteplici modelli sperimentali, sono stati effettuati esperimenti di time-course, incubando le cellule HTR-8/SVneo in assenza ed in presenza di SRIF, FSK e loro combinazione. Come atteso (Fig.2), l'aggiunta di FSK (10⁻⁶ M) evoca un enorme incremento dei livelli di cAMP, massimo a 15 min. SRIF (10⁻⁶ M) non induce alcun effetto sulla produzione basale

di cAMP, mentre sui livelli incrementati da FSK causa una riduzione statisticamente significativa. L'azione inibitoria di SRIF diventa statisticamente significativa dopo 10 min di incubazione e massima dopo 15 min (-31%, $p < 0.001$), per poi rimanere costante almeno fino a 30 min (-29%, $p < 0.001$). Octreotide (10^{-6} M) evoca effetti simili a quelli di SRIF, tuttavia la sua azione sui livelli di cAMP stimolati da FSK presenta un differente andamento temporale. Tale composto, infatti, riduce significativamente i livelli del nucleotide a partire da 3 min di incubazione fino a 7 min, divenendo però inefficace a tempi più lunghi; l'inibizione massima si osserva dopo 3 min di incubazione (-54%, $p < 0.05$).

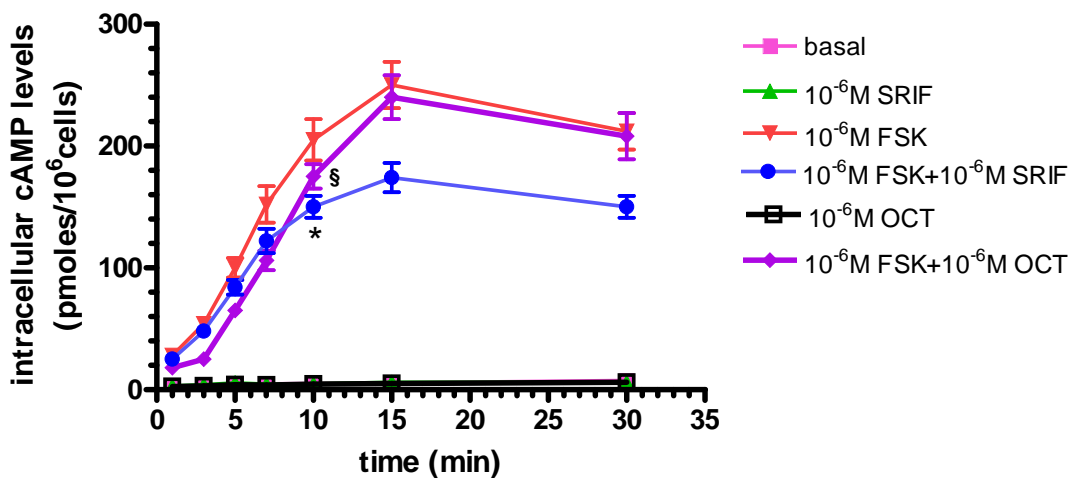


Figura 2: Time-course della produzione di cAMP in cellule HTR-8/SVneo, sia in condizioni basali che in presenza di SRIF, octreotide, FSK e loro combinazioni. I dati sono la media \pm SEM di almeno 4 esperimenti, eseguiti in duplicato su diverse colture cellulari. * tempo al quale l'effetto di SRIF+FSK diventa statisticamente diverso rispetto a quello di FSK da solo ($p < 0.001$); § tempo al quale l'effetto di octreotide+FSK non è più statisticamente diverso rispetto a quello di FSK da solo (ANOVA, seguito dal test di comparazione multipla di Bonferroni).

Per verificare se l'inibizione operata da SRIF è dose-dipendente, abbiamo testato l'effetto di dosi crescenti (10^{-7} - 10^{-5} M) del peptide sui livelli di cAMP prodotti dopo 15 min di incubazione in presenza di FSK o PGE_2 (10^{-6} M). Come mostrato in Fig.3, SRIF riduce in modo dose-dipendente i livelli di cAMP incrementati da entrambi gli attivatori. L'effetto inibitorio del peptide (10^{-5} M) risulta più marcato in presenza di FSK (-44%) rispetto a quello ottenuto in presenza di PGE_2 (-24%). Anche l'octreotide riduce i livelli di cAMP stimolati. Infatti incubando le cellule per 3 min in presenza di FSK o PGE_2 in combinazione con l'agonista sstr2 (10^{-6} M) si osserva un effetto inibitorio statisticamente significativo (dato non riportato). Abbiamo anche saggiato l'effetto dell'antagonista recettoriale sstr2, CYN 154806 (CYN) alla concentrazione 10^{-5} M, e dell'agonista multirecettoriale SOM230 alla concentrazione 10^{-6} M. Come mostrato in Fig.3, CYN è in grado di contrastare quasi completamente l'effetto inibitorio di SRIF sui livelli intracellulari di cAMP

stimolati da FSK o PGE₂, mentre SOM230 riduce la stimolazione da FSK o PGE₂, anche se in misura minore rispetto a SRIF.

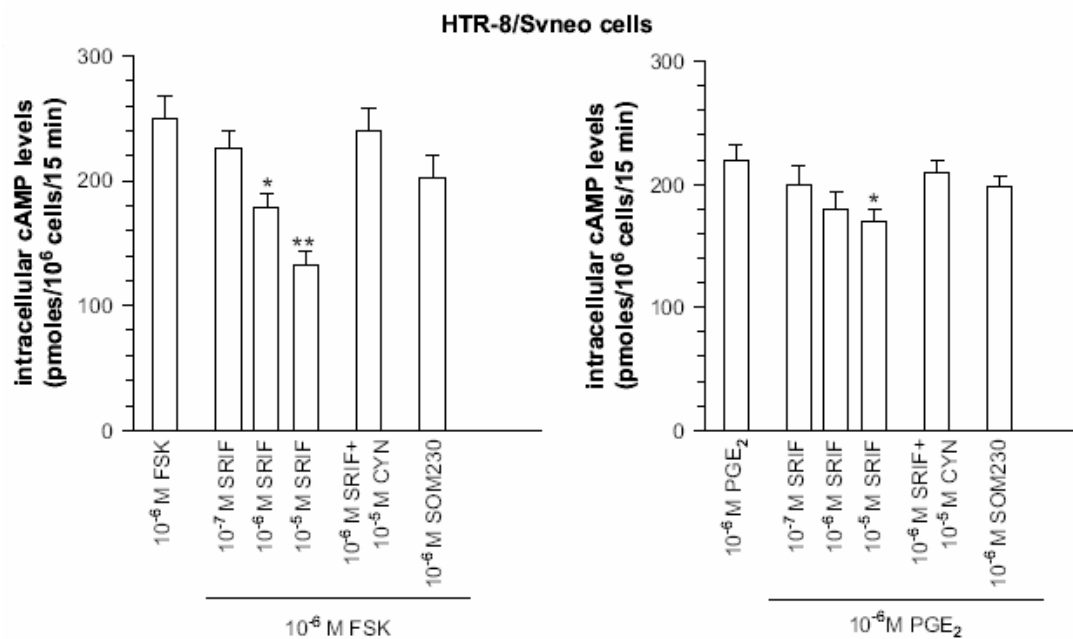


Figura 3: Effetto di SRIF, da sola o in combinazione con CYN, e di SOM230 sui livelli di cAMP stimolati da FSK o PGE₂ in cellule HTR-8/SVneo. I dati sono la media ± SEM di almeno 4 esperimenti, eseguiti in duplicato su diverse colture cellulari. * $p < 0.05$ rispetto all'effetto di FSK o PGE₂ da soli, ** $p < 0.001$ rispetto all'effetto di FSK da solo (ANOVA, seguito dal test di comparazione di Dunnett).

Valutazione della proliferazione cellulare

Effetto di PGE₂

La proliferazione delle cellule HTR-8/SVneo è stata valutata mediante analisi dell'incorporazione della BrdU da parte di cellule preincubate per 24 h in assenza di siero, prima dell'aggiunta delle sostanze test. Incubando le cellule in presenza di Epidermal Growth Factor (EGF) 20 ng/ml o con siero fetale bovino (FBS) al 10% si osserva un aumento significativo delle cellule in fase S (+73% e +63%, rispettivamente), mentre l'aggiunta di PGE₂ (10⁻⁵ M) non evoca alcun effetto (Fig.4, A e B). Dal momento che è noto dalla letteratura che PGE₂ coopera con EGF nel controllo della proliferazione di cellule normali e tumorali [145], abbiamo valutato l'effetto del prostanoido sulla incorporazione di BrdU da parte delle cellule HTR-8/SVneo stimulate con EGF o siero. In entrambi i casi, PGE₂ inibisce significativamente la proliferazione (-21% e -23%, rispettivamente) (Fig.4, A e B).

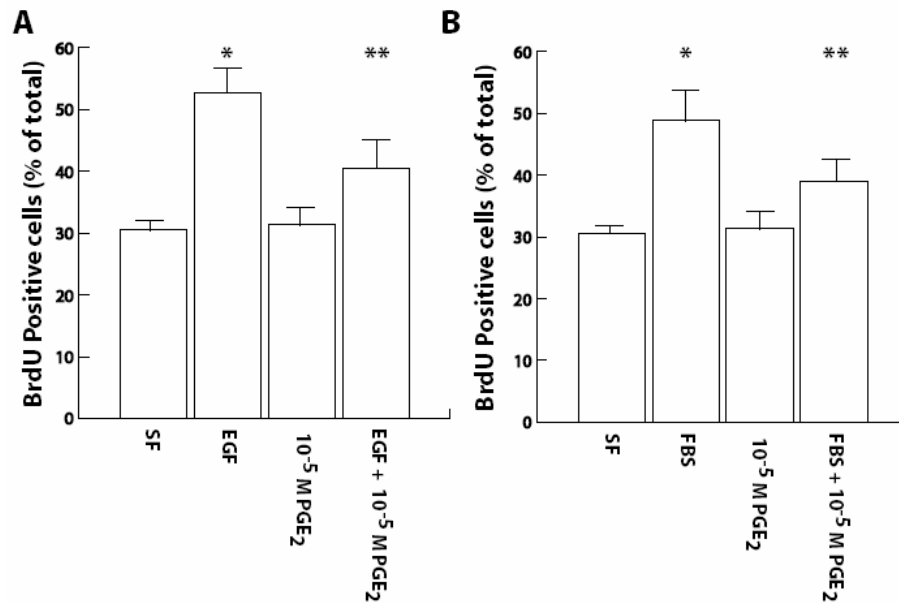


Figura 4: Incorporazione di BrdU da parte di cellule HTR-8/SVneo preincubate per 24 h senza siero (SF) e quindi incubate per 16 h in presenza di EGF 20 ng/ml (A) o siero fetale bovino al 10% (FBS) (B), da soli o in combinazione con PGE₂. I dati rappresentano la media ± SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti nei quali erano contate almeno 500 cellule. In A: * $p < 0.002$ rispetto alle cellule senza siero, ** $p < 0.03$ rispetto ad EGF da solo; in B: * $p < 0.004$ rispetto alle cellule senza siero, ** $p < 0.05$ rispetto a FBS da solo (t-test di Student a due code).

Successivamente è stata testata l'influenza di PGE₂ (10^{-5} e 10^{-6} M) sulla crescita cellulare, mediante conta delle cellule HTR-8/SVneo incubate fino a 5 giorni in assenza o in presenza del prostanoide. Come riportato nella Fig.5, entrambe le concentrazioni di PGE₂ esercitano un effetto inibitorio sulla crescita cellulare, riscontrabile dopo 2 giorni di incubazione; questo effetto si è rivelato statisticamente significativo dopo 4 giorni, rimanendo tale al quinto giorno solo in presenza della concentrazione più elevata di PGE₂. Le cellule di controllo, ma non quelle trattate con il prostanoide, mostrano una diminuzione della crescita a tempi più lunghi, probabilmente a causa dell'inibizione da contatto.

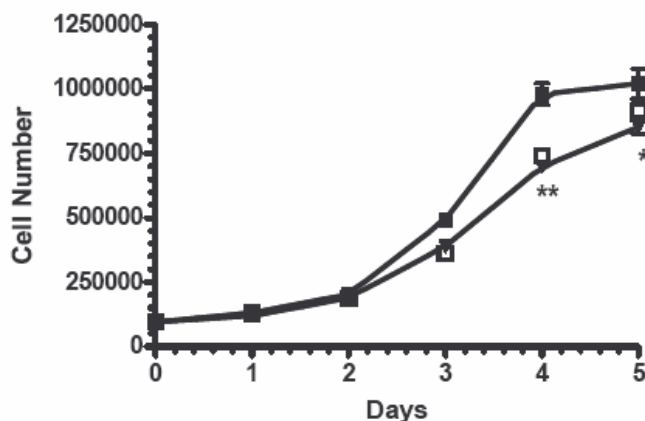


Figura 5: Effetto di PGE₂ sulla capacità di crescita delle cellule HTR-8/SVneo. ■ cellule di controllo; □ PGE₂ 10⁻⁶ M; ▼ PGE₂ 10⁻⁵ M. I dati rappresentano la media ± SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti. **p < 0.01 per entrambe le concentrazioni di PGE₂, *p < 0.05 solamente per PGE₂ 10⁻⁵ M rispetto alle cellule non trattate (ANOVA, seguita dal post-test di Dunnett).

Effetto di SRIF

Il trattamento con SRIF, alla concentrazione 10⁻⁵ M, induce un aumento significativo dell'incorporazione di BrdU (+20%) e una stimolazione altamente riproducibile, benché di minore entità (+10%) si osserva in presenza di octreotide alla stessa concentrazione (Fig.6). Come atteso, PGE₂ inibisce significativamente l'incorporazione di BrdU e pure inibitorio è l'effetto del FSK (-40%), quando testato alla concentrazione di 10⁻⁵ M. Quando SRIF è stata saggiata in combinazione con PGE₂ o FSK, l'incorporazione di BrdU è risultata paragonabile a quella osservata in condizioni di controllo.

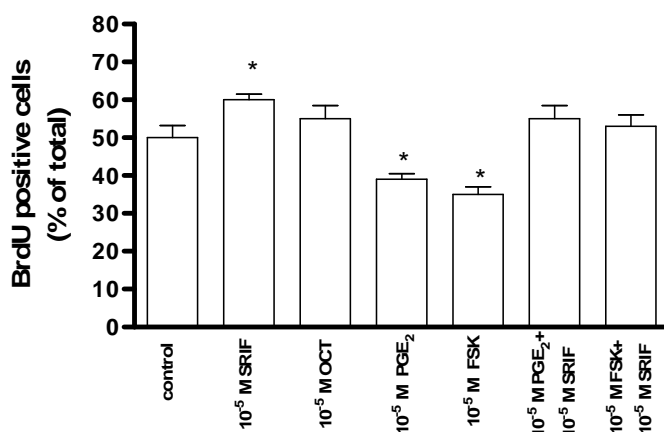


Figura 6: Incorporazione di BrdU da parte delle cellule HTR-8/SVneo preincubate per 24 h senza siero e poi incubate per 16 h con siero in assenza (control) o in presenza delle sostanze test. I dati rappresentano la media ± SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti nei quali erano contate almeno 500 cellule. *p < 0.05, rispetto al controllo (t-test di Student a due code).

E' stata poi saggiata l'influenza delle sostanze sopra menzionate sull'abilità di crescita delle cellule HTR-8/SVneo, fino a 4 giorni di incubazione (Fig.7). Fino al 3° giorno SRIF (10^{-5} M) non modifica sensibilmente la crescita cellulare, mentre esercita un effetto stimolatorio statisticamente significativo al 4° giorno. Come atteso, PGE_2 (10^{-5} M) inibisce la crescita cellulare a partire dal 2° giorno e il suo effetto diventa statisticamente significativo al 3° giorno e massimo al 4° giorno; effetti inibitori ancor più evidenti si osservano in presenza di FSK alla stessa concentrazione. Quando SRIF viene saggiata in combinazione con PGE_2 o FSK, si ottengono curve di crescita del tutto simili a quella di controllo.

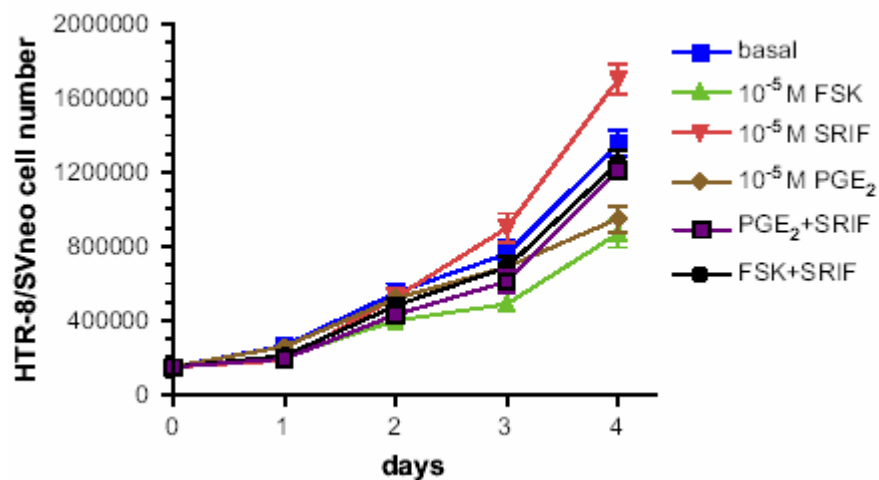


Figura 7: Effetto di SRIF, PGE_2 o FSK, da soli o in combinazione, sulla capacità di crescita delle cellule HTR-8/SVneo. I dati rappresentano la media \pm SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti. La significatività è riportata nel testo (ANOVA, seguito dal test di comparazione multipla di Bonferroni).

Valutazione della migrazione cellulare

La migrazione delle cellule HTR-8/SVneo è stata indagata valutando la loro capacità di migrare attraverso una membrana porosa ricoperta con albumina di siero bovino (BSA) o con fibronectina (FN). Sia in condizioni di controllo che in seguito all'aggiunta delle sostanze in esame, le cellule non sono in grado di migrare attraverso la membrana ricoperta con BSA, dimostrando che per muoversi necessitano di stimoli chemotattici o apoptotici. Inoltre, l'aggiunta delle sostanze test al mezzo di coltura nella camera inferiore non ha potenziato la motilità, suggerendo che esse non esercitano un'azione chemoattrattante per le cellule HTR-8/SVneo (dati non mostrati). Al contrario, utilizzando la FN come chemoattrattante, circa il 40% delle cellule attraversa la membrana ricoperta di FN, dopo 5 h di incubazione in condizioni di controllo.

In seguito all'aggiunta di PGE_2 10^{-5} M al mezzo di coltura, si osserva un drastico calo della migrazione a tutti i tempi testati e solamente il 18% delle cellule è in grado di migrare dopo 5 h di incubazione (Fig.8). Anche FSK (10^{-5} M) esercita un evidente effetto inibitorio a tutti i tempi testati, massimo a 3 h (-78%, $p<0.01$). Al contrario, SRIF stimola la migrazione raggiungendo un effetto

statisticamente significativo a partire da 3 h quando testata a 10^{-6} M, a tutti i tempi quando utilizzata a 10^{-5} M; ad entrambe le concentrazioni, l'effetto massimo si osserva dopo 3 ore (+102%, $p < 0.001$ per SRIF 10^{-6} M e +148%, $p < 0.001$ per SRIF 10^{-5} M). Anche octreotide (10^{-5} M) stimola la migrazione cellulare, evocando un effetto statisticamente significativo a 3 h (+79%, $p < 0.001$), mantenuto quasi costante per tempi di incubazione più lunghi. Quando PGE₂ o FSK (10^{-5} M) vengono testati in combinazione con SRIF (10^{-5} M), la migrazione cellulare si rivela del tutto simile a quella misurata in condizioni di controllo.

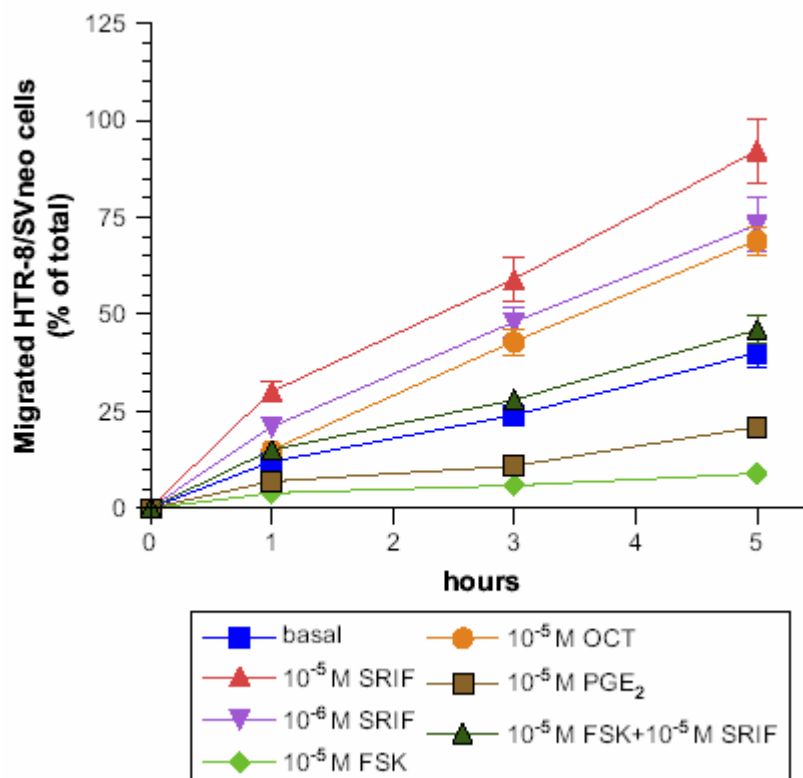


Figura 8: Effetto delle sostanze test sulla motilità delle cellule HTR-8/SVneo. I dati sono la media \pm SEM di almeno 3 esperimenti, eseguiti in duplicato in differenti preparazioni cellulari. La significatività è riportata nel testo (ANOVA, seguito dal test di comparazione multipla di Bonferroni).

Identificazione dei sottotipi recettoriali per PGE₂ e SRIF

Per determinare il *pattern* di espressione dei recettori per PGE₂ sono state utilizzate le tecniche di RT-PCR e western blotting. Nella Fig.9 si osservano due amplificati rispettivamente di 432 bp, corrispondente al recettore EP2 [133], e 344 bp corrispondente al recettore EP4 [134]. Questo risultato è stato confermato dal western blotting, che ha evidenziato l'espressione proteica dei recettori EP2 ed EP4 [135] [136].

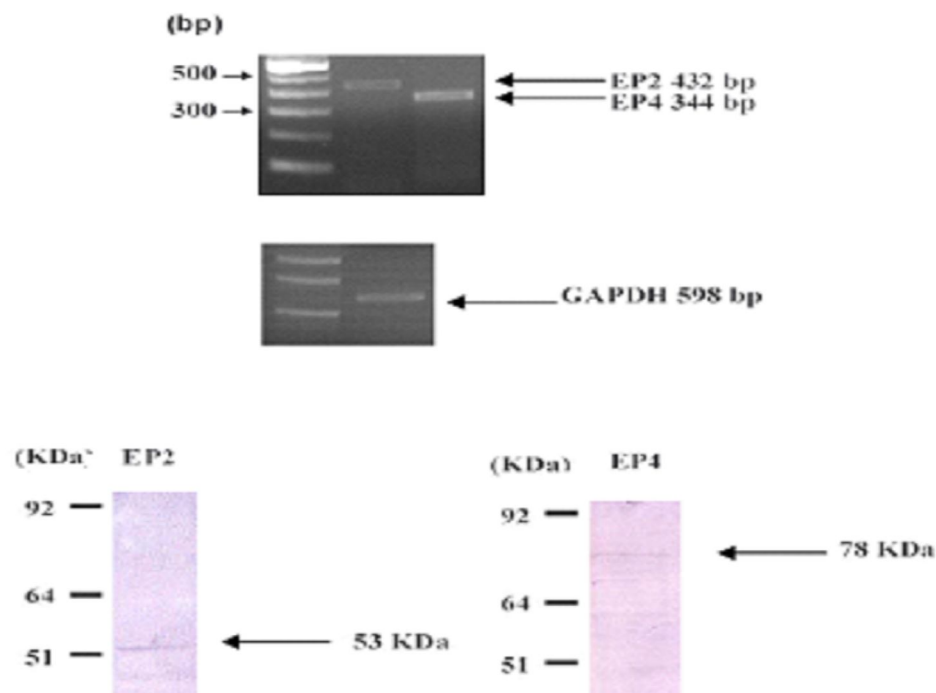


Figura 9: RT-PCR e Western blot dei sottotipi recettoriali per PGE_2 nelle cellule HTR-8/SVneo. **A:** mRNA per i sottotipi recettoriali EP2 e EP4; GAPDH è stata utilizzata come controllo interno. **B:** espressione dei sottotipi recettoriali EP2 and EP4. Sono stati usati 80 μ g di proteine/colonna. Gli esperimenti sono rappresentativi di almeno 4 prove separate.

La presenza dei recettori per SRIF è stata indagata attraverso le tecniche di RT-PCR e marcatura in fluorescenza. La prima ha evidenziato la presenza dei sottotipi recettoriali sst2A e sst2B (Fig.10). Questo risultato ha trovato conferma nella marcatura in fluorescenza; infatti sulle membrane di quasi tutte le cellule HTR-8/SVneo risulta evidente la presenza del recettore sst2A, usando l'anticorpo specifico diluito 1:1000 (Fig.11A). L'esame di campi multipli ha rivelato un sottogruppo minore di cellule immunomarcate con l'anticorpo anti-recettore sst2B, diluito 1:500 (Fig.11B). Gli anticorpi contro i recettori sst3 e sst5 hanno dato una scarsa marcatura delle cellule alla diluizione di 1:500 (non mostrato). Non si è osservata alcuna marcatura utilizzando gli anticorpi anti-recettore sst1 e sst4 (non mostrato).

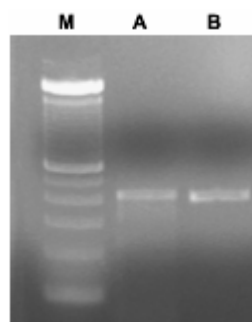


Figura 10: RT-PCR dei recettori per SRIF in cellule HTR-8/SVneo. In **M:** marcatore 100bp; in **A:** Prodotto di PCR per sst2A; in **B:** Prodotto di PCR per sst2B.

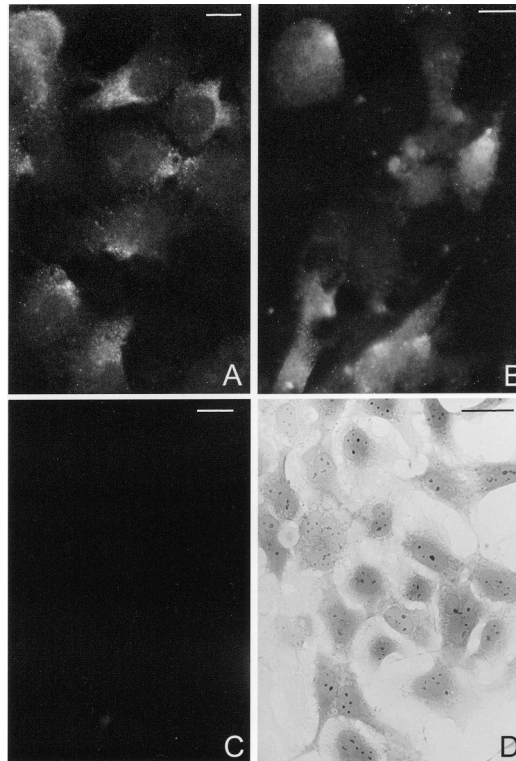


Figura 11: Localizzazione dei recettori per SRIF in cellule HTR-8/SVneo. In **A**: marcatura con anticorpi anti-recettore *sst2A*; in **B**: marcatura con anticorpi anti-recettore *sst2B*; in **C**: controllo negativo. Il pannello **D** mostra cellule aderenti colorate con fucsina acida 1%. Scala = 10 μm in A-C; 20 μm in D.

Identificazione dei componenti del sistema del cAMP in cellule HTR-8/SVneo

Dal momento che le cellule HTR-8/SVneo sono altamente responsive a sostanze in grado di modulare i livelli intracellulari di cAMP e alla luce dell'importante ruolo del nucleotide nel controllo delle funzioni del trofoblasto, abbiamo esaminato l'espressione delle differenti isoforme dell'unità catalitica dell'adenilil ciclasi, nonché delle subunità α delle proteine G sia nella linea cellulare che in villi coriali umani del primo trimestre di gravidanza.

Valutazione dell'espressione genica dell'unità catalitica dell'adenilil ciclasi

Per valutare la presenza dell'mRNA per le differenti isoforme dell'unità catalitica dell'adenilil ciclasi sia di membrana (AC1-AC9) che solubile (ACs), nei modelli in esame, è stata utilizzata la tecnica di RT-PCR. Sia nelle cellule HTR-8/SVneo che nei villi coriali, abbiamo riscontrato la presenza dell'mRNA per specifiche isoforme. I risultati da noi ottenuti dimostrano la presenza di amplificati che corrispondono alle isoforme AC3 (213 bp), AC5 (316 bp), AC6 (170 bp), AC7 (587 bp) ed AC9 (166 bp) nella linea cellulare e nei villi coriali (Fig.12). Gli mRNA per l'isoforma AC4 (166 bp) e per quella solubile ACs (566 bp) [123] sono presenti nel tessuto villosa, ma non nelle

cellule HTR-8/SVneo (dati non riportati). Infine, nessun amplificato, relativo alle isoforme AC1, AC2 e AC8, è stato rilevato nelle cellule HTR-8/SVneo e nel tessuto villosa umano.

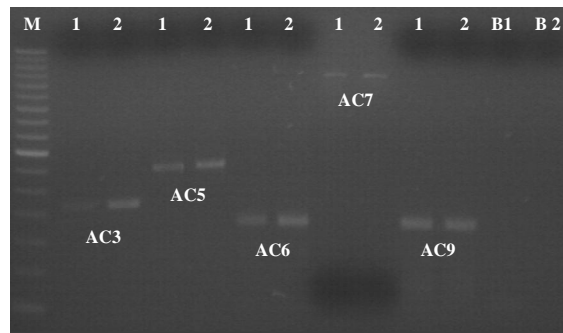


Figura 12: Espressione dell'mRNA per le isoforme dell'adenilil ciclasi in cellule HTR-8/SVneo e in villi coriali umani. Linea **M**: DNA marker 50 bp; Linea **1**: cDNA di cellule HTR-8/SVneo; Linea **2**: cDNA di tessuto villosa umano; Linea **B1**: controllo negativo RT-PCR, HTR-8/SVneo; Linea **B2**: controllo negativo, villi coriali umani.

Valutazione dell'espressione genica delle subunità α delle proteine G

Mediante la stessa tecnica abbiamo esaminato anche la presenza dell'mRNA per le varie subunità α delle proteine G in cellule HTR-8/SVneo e nei villi coriali umani. I risultati ottenuti dimostrano la presenza dell'mRNA di tutte le isoforme investigate, in entrambe le preparazioni: α_s (323 bp), α_i (474 bp), α_o (312 bp) e α_q (260 bp) [122] (Fig.13).

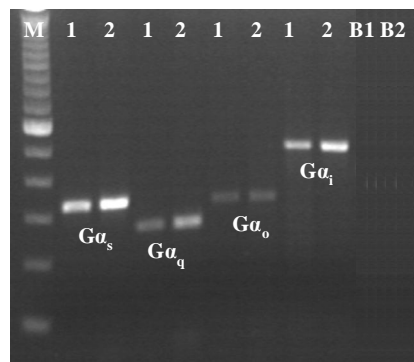


Figura 13: Espressione dell'mRNA per le diverse subunità $G\alpha$ in cellule HTR-8/SVneo e in villi coriali umani. Linea **M**: DNA marker 100 bp, Linea **1**: cDNA di cellule HTR-8/SVneo, Linea **2**: cDNA di tessuto villosa umano, Linea **B1**: controllo negativo RT-PCR, HTR-8/SVneo, Linea **B2**: controllo negativo RT-PCR, villi coriali umani.

Implementazione della tecnica SQ-RT-PCR

Il primo step nell'analisi semiquantitativa è l'individuazione di un gene *housekeeping*, un gene che è espresso in tutti i tipi cellulari sempre allo stesso livello. Per i geni controllo da noi investigati (18S, β -Actina e GAPDH) sono state studiate le curve esponenziali, ed è stato estrapolato il punto di flesso (EC_{50}), ossia il punto in cui l'amplificato è direttamente proporzionale

alla quantità di mRNA di partenza. Per determinare il gene controllo appropriato al nostro modello sperimentale, sono state confrontate le varianze associate ai valori dell'EC₅₀, ottenuti dalla media di almeno 4 esperimenti, dei controlli analizzati. Come si può osservare nella Fig.14, l'amplificato per il gene 18S rRNA mostra un livello d'espressione più uniforme, cioè una varianza minore, rispetto agli altri controlli, e per questo è stato utilizzato come gene *housekeeping* nei passaggi successivi dell'analisi semiquantitativa.

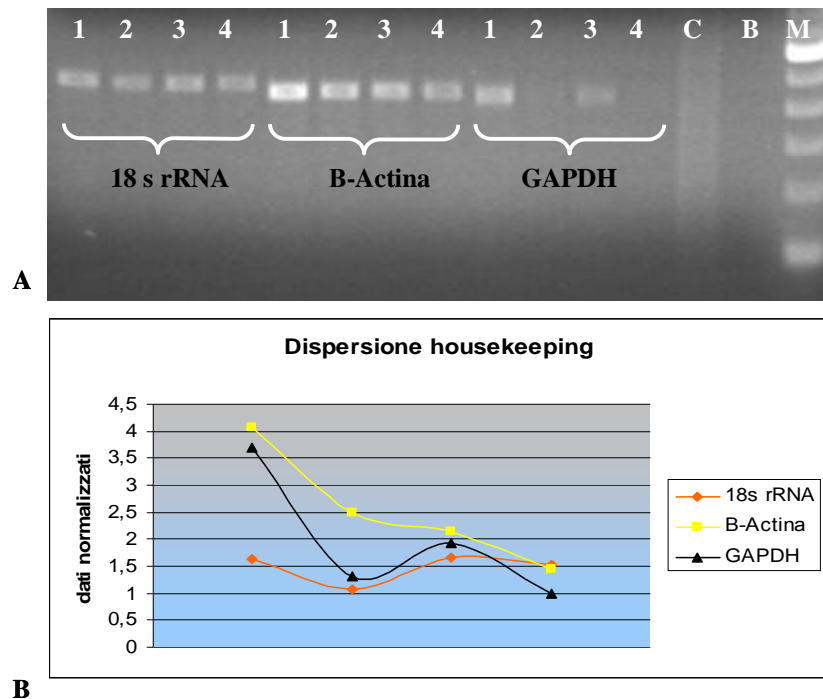


Figura 14: **A:** Espressione genica, in condizioni ottimali (EC₅₀) dei geni *housekeeping* 18S rRNA, β -Actina e GAPDH in cellule HTR-8/SVneo. I numeri da 1 a 4 indicano 4 diversi cDNA impiegati nelle prove. La reazione di amplificazione viene bloccata al ciclo 19, 24, 24 rispettivamente (punto di flesso o EC₅₀). Linea **M**: DNA marker 100 bp; Linea **C**: controllo negativo PCR; Linea **B**: controllo negativo RT-PCR.

B: Dispersione dei dati normalizzati relativi ai geni *housekeeping* 18S rRNA, β -Actina e GAPDH al punto di flesso. I valori sono ottenuti dividendo la densità ottica di ogni amplificato per il valore più basso ottenuto.

Analisi SQ-RT-PCR delle isoforme di adenilil ciclasi

Come per il gene controllo, per le isoforme AC3, AC5, AC6, AC7 e AC9 abbiamo costruito le rispettive curve esponenziali (Fig.15) ed estrapolato il numero dei cicli di amplificazione al flesso (EC₅₀); i valori di densità ottica ottenuti sono stati normalizzati con il controllo interno, 18S rRNA, prima di essere confrontati. I risultati ottenuti (Fig.16) dimostrano che l'isoforma AC6 è la più espressa nella linea cellulare HTR/8 SV-neo e che la differenza di espressione tra questa isoforma e le altre investigate (AC3, AC5, AC7, AC9) è altamente significativa ($p < 0.001$); l'isoforma AC9 risulta significativamente più espressa rispetto ad AC5 e AC7, mentre AC3 risulta significativamente più espressa rispetto ad AC7 (Fig.17).

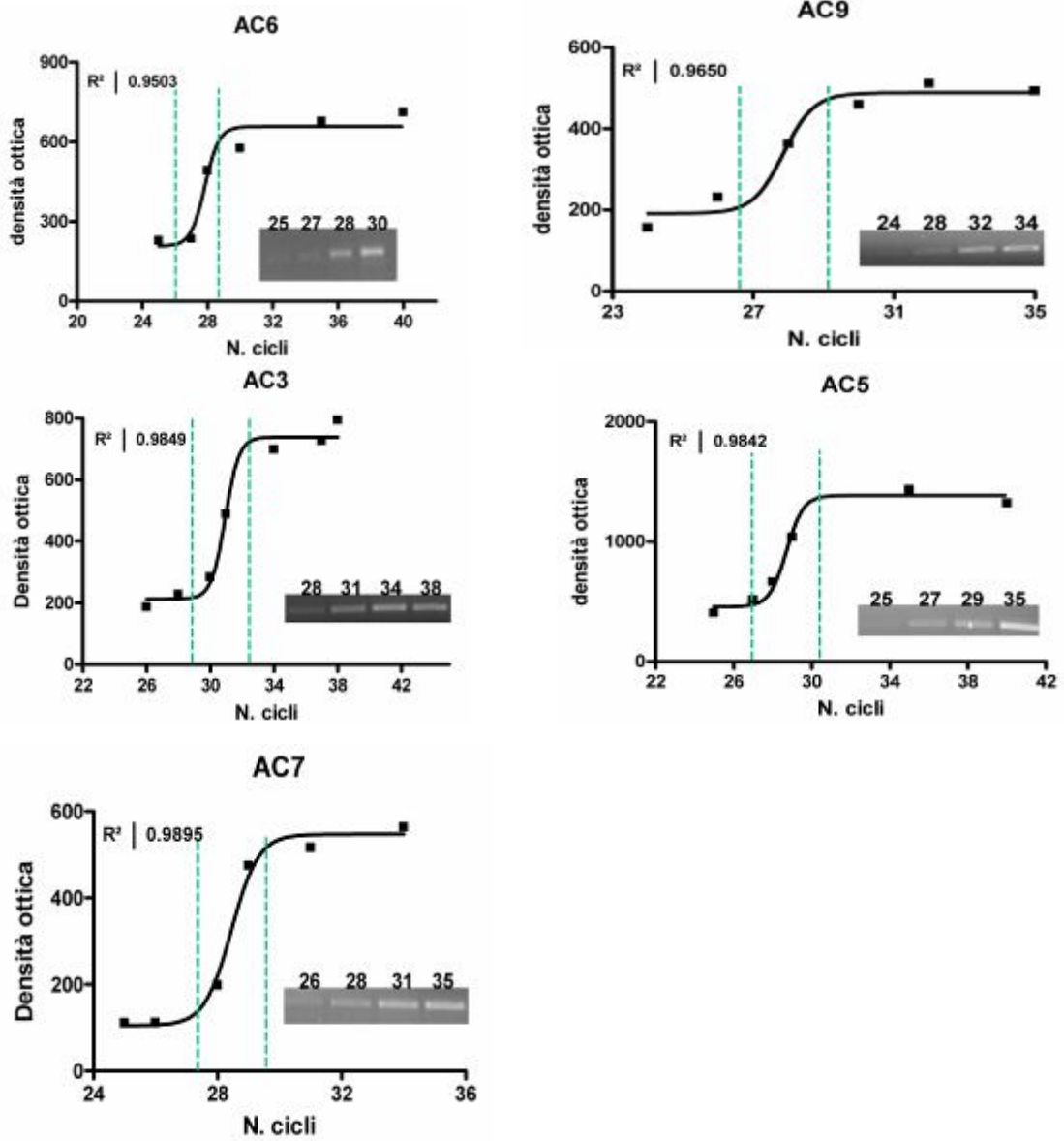


Figura 15: Aumento esponenziale dell'amplificato delle isoforme di AC in funzione del numero di cicli d'amplificazione. Le righe tratteggiate evidenziano la fase esponenziale delle curve, che sono rappresentative e scelte tra 3 esperimenti. Negli inserti sono riportati gel rappresentativi della PCR per ogni isoforma, indicanti il progressivo aumento di intensità delle bande all'aumentare dei cicli termici. R^2 : Coefficiente di correlazione.

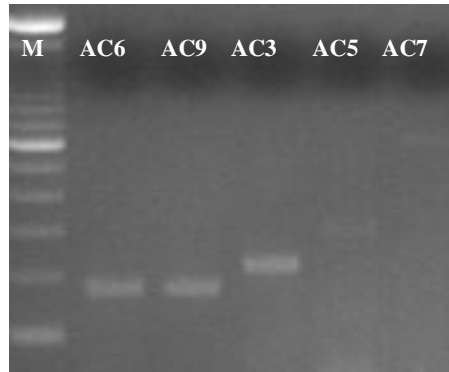


Figura 16: Espressione dell'mRNA, nella fase esponenziale, delle isoforme di AC. La reazione di amplificazione è stata bloccata nel punto del flesso: per AC3 31 cicli, per AC5 30 cicli, per AC6 28 cicli, per AC7 28 cicli, per AC9 28 cicli. Linea **M**: DNA marker 100 bp.

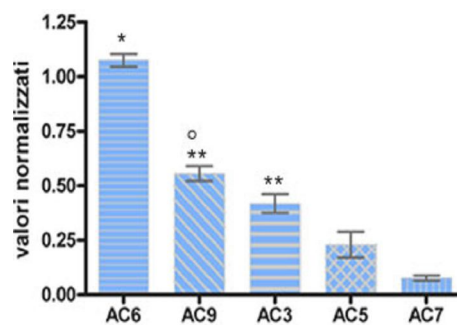


Figura 17: Analisi semiquantitativa dell'espressione del mRNA delle isoforme di AC. Nell'istogramma sono riportate le medie \pm SEM di almeno 3 esperimenti normalizzate con il controllo 18S rRNA. * $p < 0.001$ rispetta AC9, AC3, AC5, AC7; ** $p < 0.001$ rispetto AC7; ° $p < 0.01$ rispetto AC5. (ANOVA, seguito dal test di comparazione multipla di Bonferroni).

Analisi SQ-RT-PCR delle subunità α delle proteine G

L'analisi semiquantitativa delle proteine G è stata condotta utilizzando la stessa procedura descritta per l'unità catalitica dell'adenilil ciclastasi. Nella Fig.18 sono riportate le curve esponenziali e i valori di EC_{50} , relativamente alle sottofamiglie delle proteine $G\alpha$ umane, $G\alpha_q$, $G\alpha_s$, $G\alpha_i$ e $G\alpha_o$. Nella Fig.19 è illustrata la migrazione dei prodotti amplificati nel punto di flesso. I risultati ottenuti mostrano una differenza significativa nell'espressione dell'mRNA delle isoforme $G\alpha_q$ e $G\alpha_s$ rispetto alle isoforme $G\alpha_i$, $G\alpha_o$. Un'ulteriore differenza si evidenzia tra $G\alpha_i$ e $G\alpha_o$, infatti la prima è significativamente più espressa rispetto alla seconda (Fig.20).

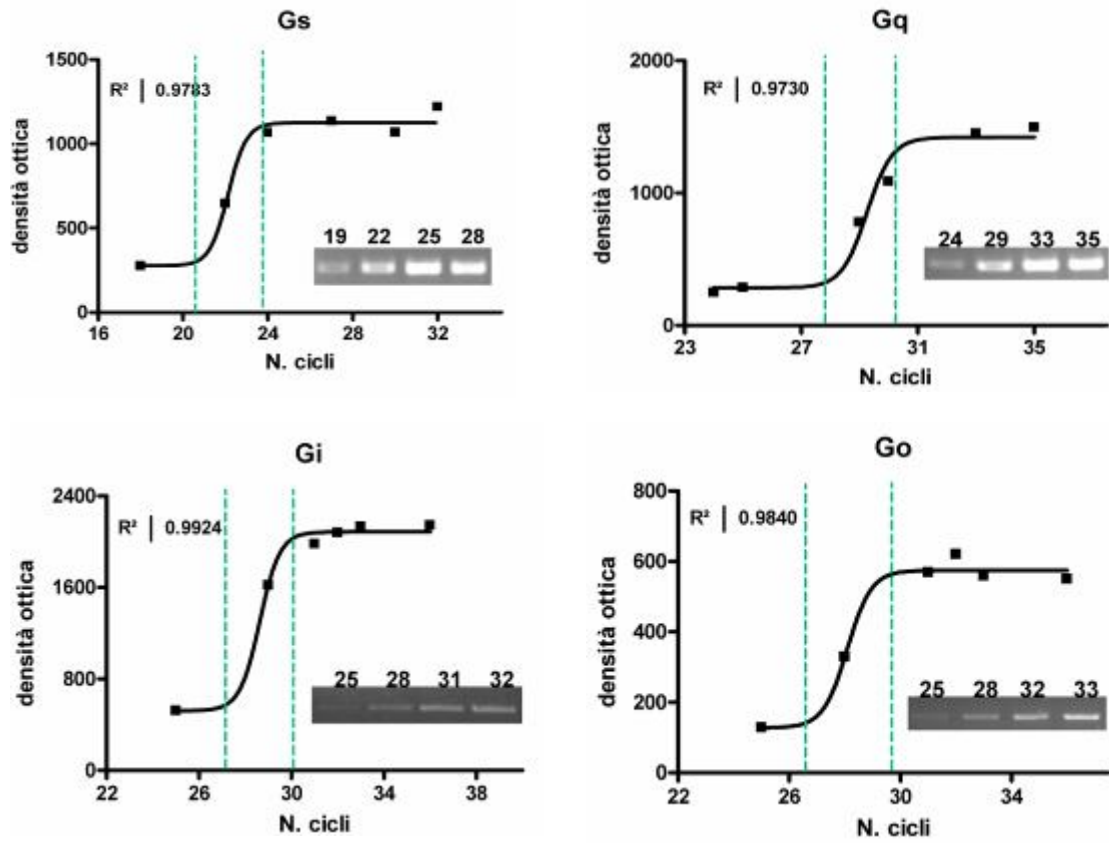


Figura 18: Aumento esponenziale dell'amplificato delle subunità $G\alpha$ in funzione del numero di cicli d'amplificazione. Le righe tratteggiate evidenziano la fase esponenziale delle curve, che sono rappresentative e scelte tra 3 esperimenti. Negli inserti sono riportati gel rappresentativi della PCR per ogni subunità, indicanti il progressivo aumento di intensità delle bande all'aumentare dei cicli termici. R^2 : Coefficiente di correlazione.

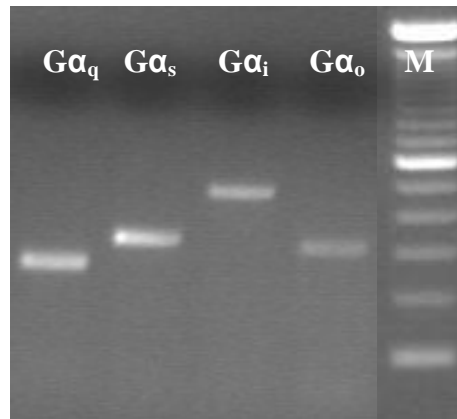


Figura 19: Espressione dell'mRNA, nel punto di flesso, delle subunità α delle proteine G nelle cellule HTR-8/SVneo. La reazione di amplificazione è stata bloccata nel punto del flesso: per $G\alpha_q$ 29 cicli, per $G\alpha_s$ 22 cicli, per $G\alpha_i$ 28 cicli, per $G\alpha_o$ 28 cicli. Linea M: DNA marker 100 bp.

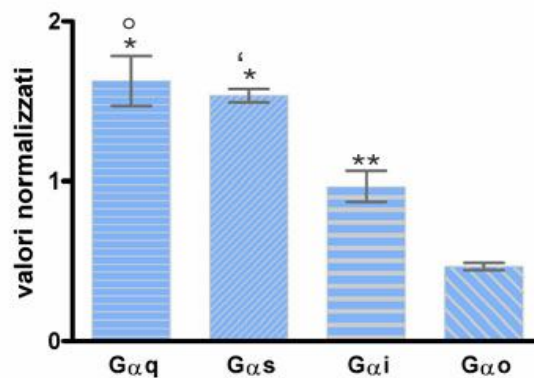


Figura 20: Analisi semiquantitativa dell'espressione del mRNA delle subunità $G\alpha$. I dati rappresentano le medie \pm SEM di almeno 3 esperimenti. I dati sono normalizzati con il controllo 18S rRNA. * $p < 0.001$ rispetto a $G\alpha_o$, ° $p < 0.01$ rispetto a $G\alpha_i$, ' $p < 0.05$ rispetto a $G\alpha_i$, ** $p < 0.05$ rispetto a $G\alpha_o$. (ANOVA, seguito dal test di comparazione multipla di Bonferroni).

Espressione proteica delle subunità α delle proteine G

L'espressione proteica delle subunità α delle proteine G e la loro quantificazione sono state determinate mediante la tecnica western blotting, utilizzando come controllo interno β -actina. La β -actina e le isoforme $G\alpha_q$, $G\alpha_s$, $G\alpha_o$ e $G\alpha_i$ sono state determinate con anticorpi policlonali specifici riportati nella tabella IX in Materiali e Metodi.

I risultati di immunoblotting riportati in Fig.21 dimostrano la presenza, sia nelle cellule HTR-8/SVneo che nei villi coriali, delle seguenti subunità α :

1. $G\alpha_q$ con un peso apparente di 42 KDa;
2. $G\alpha_s$ con due bande di 42 e 46 KDa;
3. $G\alpha_i$ con un peso apparente di 40 KDa;

La subunità $G\alpha_o$ non è stata rilevata nelle cellule HTR-8/SVneo, mentre nel tessuto villosa si evidenzia una banda con peso apparente di 39 KDa, associabile a questa subunità. La Fig.22 riporta

i valori normalizzati con la β -actina. E' ben evidente la diversa espressione delle proteine $G\alpha_s$, $G\alpha_q$ e $G\alpha_i$; in particolare $G\alpha_q$ presenta il più alto livello di espressione, in accordo con i risultati ottenuti nell'analisi dell'espressione genica.

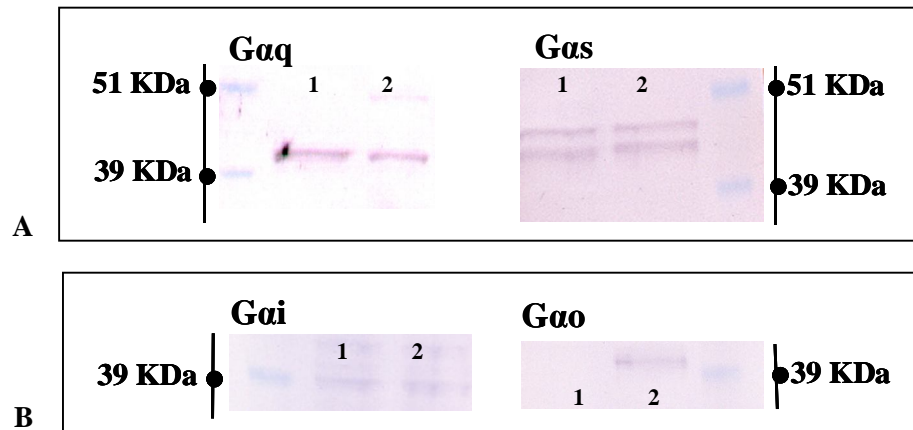


Figura 21: Determinazione dell'espressione proteica delle subunità $G\alpha$ mediante Western blot su cellule HTR-8/SVneo e su villi coriali umani. I dati sono rappresentativi di almeno 3 esperimenti. Linea 1: proteine estratte da membrane di cellule HTR-8/SVneo, Linea 2: proteine estratte da tessuto villosa umano **A:** anticorpo anti $G\alpha_q$ (42 KDa); anticorpo anti $G\alpha_s$ (42 e 46 KDa), **B:** anticorpo anti $G\alpha_i$ (40 KDa); anticorpo anti $G\alpha_o$ (39 KDa).

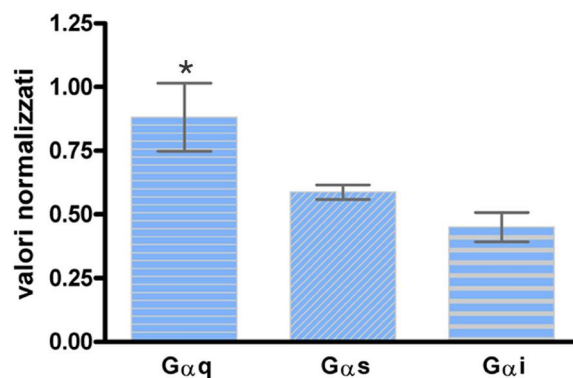


Figura 22: Analisi quantitativa dell'espressione proteica delle subunità $G\alpha$ in cellule HTR-8/SVneo. Nell'istogramma sono riportate le medie \pm SEM di almeno 3 esperimenti normalizzate con il controllo interno β -actina. * $p < 0.05$ rispetto a $G\alpha_i$. (ANOVA, seguito dal test di comparazione multipla di Bonferroni).

Analisi della calcio-dipendenza dell'adenilil ciclasi in cellule HTR-8/SVneo

Alla luce degli evidenti effetti esercitati dallo ione Ca^{2+} sull'attività adenilil ciclasica in diversi tessuti [144], abbiamo valutato l'effetto di differenti concentrazioni del catione, dopo aver depletato le membrane delle cellule HTR-8/SVneo dal calcio endogeno mediante trattamento con il chelante EGTA (0.5 mM). Come mostrato in Fig.23A, in seguito all'aggiunta nel mezzo di incubazione di concentrazioni fisiologiche di Ca^{2+} (10^{-7} M), l'attività basale dell'adenilil ciclasi è di 75.2 ± 5.0 pmoli/mg proteina/10 min. Nelle stesse condizioni sperimentali ed in presenza dell'analogo non idrolizzabile del GTP, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (1 μM), attivatore della subunità α della proteina $\text{G}\alpha_s$, si osserva una stimolazione del 253% rispetto al valore basale. FSK (1 μM) evoca una stimolazione del 302%. In presenza di EGTA ed in assenza di calcio esogeno, l'attività basale dell'adenilil ciclasi è di circa 70 volte più elevata di quella misurata in presenza di concentrazioni fisiologiche di Ca^{2+} ; $\text{GTP}\gamma\text{S}$ e FSK stimolano l'attività enzimatica del 260% e 320%, rispettivamente (Fig.23B). Quando il catione è stato aggiunto al mezzo alla concentrazione di 10^{-3} M, si riduce drasticamente l'attività basale (25.3 ± 1.8 pmoli/mg proteina/10 min) ed in modo evidente quella stimolata dagli attivatori (192% per $\text{GTP}\gamma\text{S}$ e 216% per FSK) (Fig.23C).

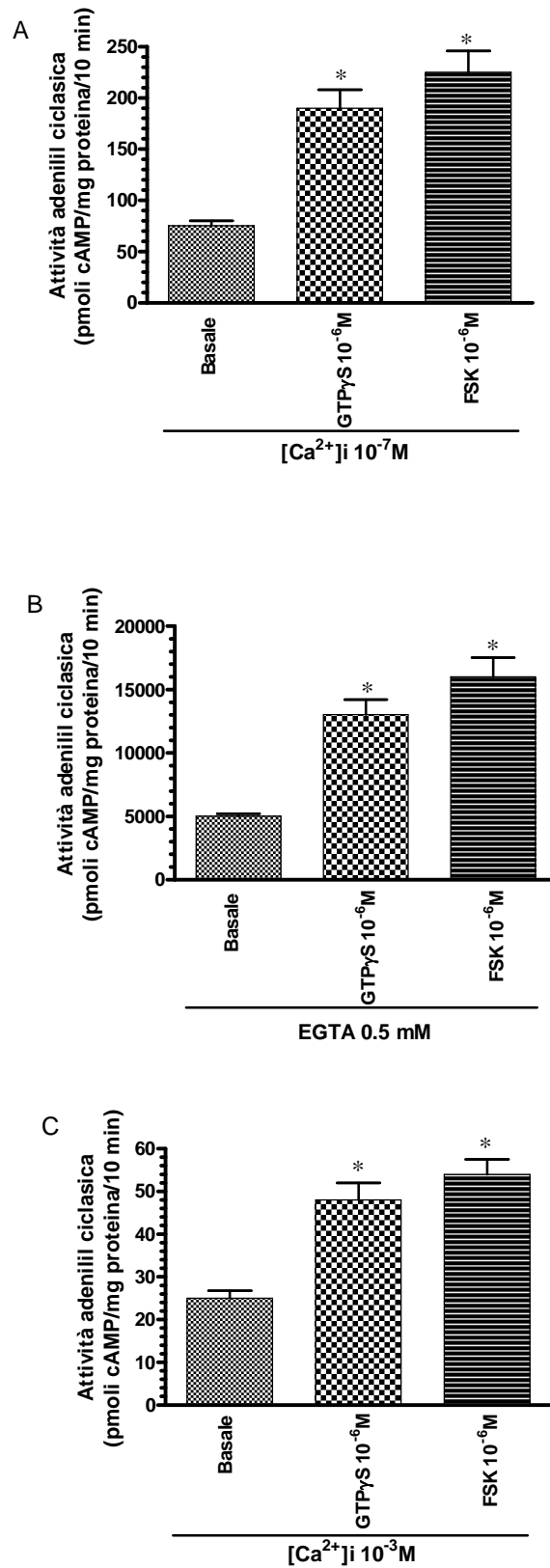


Figura 23: Modulazione dell'attività adenilil cilasica in membrane purificate di cellule HTR-8/SVneo da parte dello ione calcio. **A:** in presenza di concentrazioni fisiologiche (10^{-7} M) di Ca^{2+} ; **B** in assenza di Ca^{2+} ; **C:** in presenza di alte concentrazioni (10^{-3} M) di Ca^{2+} . Nel mezzo d'incubazione è presente l'inibitore delle fosfodiesterasi, IBMX, alla concentrazione 10^{-5} M. I dati rappresentano la media \pm SEM di 4 esperimenti indipendenti, condotti in duplicato su differenti colture cellulari. * $p < 0.001$ rispetto al Basale (t-test di Student a due code).

DISCUSSIONE

Per quanto riguarda le funzioni delle cellule del trofoblasto, è ormai ben documentato che il cAMP è un secondo messaggero coinvolto in numerosi eventi relativi ai processi di differenziamento, proliferazione, migrazione ed invasività [123]. Anche la sincizializzazione, un fenomeno biologico nel quale citotrofoblasti mononucleati si aggregano e si fondono per formare un sincizio multinucleato, metabolicamente attivo, non proliferativo e dotato di attività endocrina, è regolato dal cAMP [134].

Dato dunque che il cAMP svolge un ruolo cruciale nella regolazione delle funzioni del trofoblasto, nel nostro studio abbiamo voluto caratterizzare il sistema AC/cAMP nelle cellule HTR-8/SVneo, una linea cellulare derivata dal trofoblasto extravilloso umano del primo trimestre di gravidanza che ben si presta ad uno studio in vitro del processo di placentazione. In una prima serie di esperimenti abbiamo valutato sia i livelli intracellulari di cAMP che l'attività adenilil ciclasica. I risultati ottenuti dimostrano che le concentrazioni intracellulari di cAMP aumentano significativamente in risposta ad un attivatore classico dell'AC, come il FSK, e ad agonisti recettoriali, quali PGE₂ ed epinefrina. Inoltre, abbiamo dimostrato che la SRIF e octeotide inibiscono in modo significativo i livelli di cAMP stimolati dal FSK e PGE₂. SRIF diminuisce i livelli di cAMP con efficacia minore rispetto a quella mostrata dall'octeotide ai tempi di incubazione più brevi, ma la sua azione persiste fino ad almeno 30 minuti. L'inibizione dell'octeotide, invece, è rapida, infatti si esaurisce entro i primi 10 minuti di incubazione. Questo diverso comportamento temporale potrebbe essere dovuto alle differenze, anche se modeste, dell'affinità di SRIF e octeotide nei confronti del recettore sst2A [105]. Per quanto riguarda l'attività ciclasica, determinata su membrane purificate di cellule trofoblastiche, l'enzima risulta altamente responsivo al FSK e all'anologo non idrolizzabile del GTP, il GTP γ S, e fortemente inibito oltre che da alte (1 mM) anche da basse (100 nM) concentrazioni di calcio.

Poiché è stato dimostrato che PGE₂ e SRIF sono in grado di influenzare la proliferazione e la migrazione di cellule sia normali che alterate, noi abbiamo valutato il loro effetto su tali risposte funzionali da parte delle cellule HTR-8/SVneo. PGE₂, in condizioni basali, è priva di effetto, ma inibisce la proliferazione delle cellule HTR-8/SVneo stimolata da EGF; risultati simili sono stati ottenuti quando il prostanoide viene somministrato a cellule incubate in presenza di siero, suggerendo che il meccanismo che sta alla base dell'azione della prostaglandina non è specifico per la proliferazione stimolata da EGF. Effetti inibitori di PGE₂ sono evidenti anche analizzando la capacità di crescita di questa linea cellulare. Nel loro insieme, questi dati indicano che la PGE₂ riduce la capacità proliferativa del trofoblasto. Per quanto riguarda la SRIF, noi dimostriamo che il peptide induce un aumento della proliferazione e migrazione cellulare.

Probabilmente l'azione di SRIF e PGE₂ è mediata da un meccanismo cAMP-dipendente. Infatti, noi abbiamo dimostrato che gli agenti che aumentano il nucleotide ciclico (PGE₂ e FSK) inibiscono la proliferazione e migrazione cellulare, mentre SRIF e octreotide, che inibiscono la produzione di cAMP, incrementano sia la proliferazione che la migrazione cellulare. Quando SRIF viene saggiato in combinazione con FSK e PGE₂, i loro effetti sulla proliferazione o migrazione si elidono l'un l'altro. Tuttavia, il cAMP potrebbe non essere il solo secondo messaggero responsabile dell'incremento della proliferazione e migrazione cellulare indotto da SRIF; in effetti, il peptide di per se non altera significativamente il cAMP. D'altro canto, il cAMP, come già descritto, è il secondo messaggero maggiormente implicato nel controllo delle funzioni chiave del trofoblasto come la differenziazione, migrazione, proliferazione ed invasività [135] [136]. Nelle cellule HTR-8/Svneo, è stato riportato che l'aumento di cAMP inibisce la migrazione stimolata da IGF II [137]. Tuttavia, anche in altri modelli sperimentali, è stata dimostrata un'azione stimolatoria di SRIF sia sulla proliferazione che sulla migrazione cellulare, mediante una riduzione dei livelli di cAMP [138] [116].

Inoltre, i dati qui riportati dimostrano che le cellule HTR-8/SVneo esprimono recettori funzionali per PGE₂ e SRIF, capaci di modulare sia le vie di trasduzione del segnale che le risposte cellulari. Per quanto riguarda la prostaglandina, abbiamo identificato l'mRNA per i recettori EP2 ed EP4, sia in cellule HTR-8/SVneo che nei villi coriali del primo trimestre di gravidanza. I recettori EP2 ed EP4 sono accoppiati positivamente all'adenilil ciclasi, questo è in accordo con l'aumento dose-dipendente dei livelli di cAMP indotti dalla PGE₂ da noi osservato nelle cellule HTR-8/SVneo. I nostri dati dimostrano per la prima volta la presenza dei recettori sstr in placenta umana da gravidanza precoce e nella linea cellulare HTR-8/SVneo. Abbiamo identificato i trascritti e le proteine per sstr2A e 2B attraverso le tecniche di RT-PCR e immunoprecipitazione. La presenza di siti di interazione per SRIF nella membrana cellulare è fortemente supportata dalle nostre osservazioni che anticorpi specifici contro i sottotipi per i recettori umani sst marcano le cellule fissate, non permeabilizzate. In effetti, quasi tutte le cellule presentano marcatura della superficie con l'anticorpo anti-sstr2A, mentre la marcatura dell'anticorpo anti-sstr2B è stata osservata in un basso numero di cellule intatte. Questi sottotipi di recettori sono stati evidenziati anche in villi coriali, ma con una differente distribuzione. Infatti, sstr2A è stato localizzato nel citotrofoblasto e nel sinciziotrofoblasto differentemente da sstr2B localizzati solo nella membrana esterna del sinciziotrofoblasto (dati non mostrati). In tutte queste preparazioni, i trascritti e le proteine per sstr 1, 3, 4 e 5 non sono state riscontrate. Qui noi dimostriamo un differente *pattern* di espressione dei sstr nel citotrofoblasto, quando comparato con il sinciziotrofoblasto. Nel primo trimestre di gravidanza, sstr2A sembra essere l'isoforma predominante presente nel trofoblasto, e quindi,

presumibilmente, potrebbe essere il mediatore delle azioni di SRIF nelle cellule HTR-8/SVneo. Il coinvolgimento di *sstr2* nel mediare gli effetti di SRIF sulle vie di trasduzione nella nostra linea cellulare, è supportato anche dalle seguenti osservazioni: i) la capacità di CYN di abolire le azioni di SRIF, unita alla inefficacia degli antagonisti per altri sottotipi recettoriali; ii) l'abilità di octreotide di mimare gli effetti di SRIF; iii) la minor efficacia di SOM230, un ligando multirecettoriale caratterizzato da più bassa affinità, rispetto a SRIF, nei confronti del recettore *sstr2*.

La complessità della regolazione del sistema ciclasico, insieme al ruolo altamente specifico del cAMP, quale secondo messaggero intracellulare, suggerisce che un differente *pattern* di espressione delle diverse componenti di tale via di trasduzione possa essere responsabile di funzioni diverse in funzione del tipo cellulare che le esprime.

Mentre la distribuzione e la regolazione delle diverse isoforme dell'AC nei tessuti perinatali e adulti sono state ben stabilite, poche informazioni sono attualmente disponibili riguardo al profilo d'espressione ed al ruolo potenziale dell'AC nelle fasi iniziali della gravidanza, ossia nell'impianto della blastocisti e nello sviluppo della placenta. Per quanto riguarda il ruolo svolto dal sistema adenilil ciclasi/cAMP nell'utero gravido, numerosi sono gli studi relativi al suo coinvolgimento nel mantenimento dello stato di quiescenza del miometrio [139]. Mediante analisi dell'mRNA ed immunoblotting, è stata recentemente dimostrata una differente espressione dell'AC nel miometrio gravido rispetto a quello non gravido. In particolare, i livelli delle isoforme AC1, AC3, AC8 e AC9, notoriamente modulate dal complesso Ca^{2+} /calmodulina, sono risultati più bassi nel miometrio gravido rispetto a quelli riscontrati nell'utero non gravido. Le isoforme AC2, AC4, AC5, AC6 e AC7, modulate dalla subunità $\beta\gamma$ delle proteine G e dalla PKC ma inibite, almeno per quanto riguarda alcune di esse, da basse concentrazioni di Ca^{2+} , sono risultate maggiormente espresse nel miometrio gravido. Questi cambiamenti nel *pattern* di espressione delle diverse isoforme dell'AC, che si verificano nel corso della gravidanza, presentano un indubbio significato dal punto di vista fisiologico; infatti, le isoforme dei gruppi 2 e 3 dell'AC sembrano essere coinvolte nel mantenimento della quiescenza uterina e quindi avere un effetto protettivo nei confronti della gravidanza [139]. E' stato riportato che anche espressione e responsività delle proteine G nell'utero possono essere alterate durante la gravidanza e che esse dipendono dall'espressione relativa di tutti i componenti della cascata del sistema adenilil ciclasico. Il bilancio tra la funzionalità della via che media la stimolazione e di quella coinvolta nell'inibizione del *pathway* dell'AC può avere importanti conseguenze nel controllo dell'attività contrattile del miometrio [140].

A questo proposito, abbiamo studiato l'espressione genica delle diverse isoforme dell'AC nelle cellule in esame e nei villi coriali umani prelevati all'XI settimana di gestazione, mediante villocentesi. Avvalendoci della tecnica di RT-PCR abbiamo dimostrato la presenza dell'mRNA per

le isoforme AC3, AC5, AC6, AC7 ed AC9 nelle cellule HTR-8/SVneo, mentre nei villi coriali abbiamo riscontrato anche l'isoforma AC4 e quella solubile, oltre alle isoforme sopra riportate. In seguito abbiamo quantificato, nelle stesse cellule, l'espressione genica delle diverse isoforme dalla ciclastasi, mediante la tecnica SQ-RT-PCR. I risultati ottenuti hanno evidenziato la netta predominanza dell'amplificato per le isoforme AC6 e AC9.

Dati della letteratura riportano che tutte le isoforme dell'AC, compresa quella solubile, sono espresse sia nel sinciziotrofoblasto che nel citotrofoblasto, anche se nel primo predominano AC4 e AC8, mentre nel secondo sono maggiormente espresse AC1 e AC2. Nel caso delle cellule extravilluose da noi utilizzate, è importante sottolineare che esse rappresentano un fenotipo ben diverso (extravilloso) rispetto a quello del sinciziotrofoblasto (villosità), pur derivando entrambi dal citotrofoblasto. I nostri risultati dimostrano che nelle cellule trofoblastiche extravilluose sono espresse le isoforme AC3, AC5, AC6, AC7, AC9, isoforme che in altri sistemi cellulari sono coinvolte nei processi di proliferazione e migrazione [123]; l'assenza delle ciclastasi coinvolte nel processo di differenziazione (AC1 AC2) non è sorprendente in quanto le cellule extravilluose hanno un fenotipo già differenziato. L'isoforma maggiormente espressa nelle cellule HTR-8/SVneo è l'AC6, un'isoforma inibita, come già ricordato, da concentrazioni fisiologiche (nM) di Ca^{2+} . Essa potrebbe avere un ruolo nella modulazione delle funzioni delle cellule trofoblastiche come proliferazione, migrazione ed invasività. In effetti è stato dimostrato che alcuni agonisti stimolano la migrazione delle cellule trofoblastiche extravilluose attraverso la stimolazione della fosfolipasi C e conseguente aumento della concentrazione intracellulare del Ca^{2+} [141]; d'altra parte è stato riportato che il cAMP svolge un'azione inibitoria su tale risposta [137]. Pertanto, si può ipotizzare che la migrazione sia promossa da un aumento di Ca^{2+} intracellulare anche attraverso la sua azione inibitoria a carico della isoforma AC6. Nel nostro studio, l'espressione dell'isoforma solubile dell'AC è stata riscontrata nei villi coriali, ma non nel trofoblasto extravilloso; si può ipotizzare, dunque, che questa isoforma non sia più espressa nelle cellule extravilluose differenziate e che non sia coinvolta nella regolazione dei processi di proliferazione, migrazione ed invasività, risposte tipiche di queste cellule nelle fasi precoci della gravidanza. Tuttavia, il ruolo dell'isoforma solubile dell'AC nei tessuti gestazionali non è stato ancora definito.

Vista l'interazione funzionale tra la componente catalitica e la proteina G regolatrice nel sistema ciclastico, dopo aver caratterizzato la subunità catalitica dell'enzima, abbiamo studiato l'espressione delle subunità α della proteina G, mediante RT-PCR abbiamo dimostrato la presenza dell'mRNA per tutte le isoforme di $G\alpha$ da noi indagate, ovvero $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_o$ e $G\alpha_q$, nelle cellule HTR-8/SVneo. Successivamente, abbiamo quantificato la loro espressione mediante la tecnica SQ-RT-PCR: i risultati dimostrano che l'mRNA delle isoforme $G\alpha_s$ e $G\alpha_q$ è significativamente più

espresso rispetto a quello delle altre isoforme. Utilizzando poi la tecnica di Western blot, abbiamo dimostrato la presenza di $G\alpha_s$, $G\alpha_i$ e $G\alpha_q$, essendo quest'ultima la più abbondante. Questo risultato, almeno per quanto riguarda le proteine G accoppiate all'AC, è coerente con la dimostrazione che l'enzima presente nelle cellule HTR-8/SVneo è altamente responsivo al $GTP\gamma S$, un potente attivatore della proteina $G\alpha_s$ e che la SRIF è in grado di inibire l'aumento dei livelli di cAMP indotto da FSK. La proteina $G\alpha_q$, altamente espressa nelle cellule in esame, potrebbe essere coinvolta nell'attivazione della fosfolipasi C da parte di agonisti recettoriali, anche se questa via di trasduzione non è ancora stata indagata in queste cellule.

Nelle cellule HTR-8/SVneo non è stata riscontrata alcuna banda che dimostri la presenza della subunità $G\alpha_o$, anche se ne abbiamo identificato l'mRNA. Questo risultato trova una plausibile spiegazione nel fatto che la tecnica di amplificazione della polimerasi presenta una maggiore sensibilità rispetto a quella dell'immunoblotting. In ogni caso, gli studi di espressione genica e la determinazione dei livelli di espressione proteica nelle cellule HTR-8/SVneo hanno evidenziato *pattern* di espressione sovrapponibili, con l'eccezione della proteina $G\alpha_o$. Confrontando i risultati ottenuti nelle cellule trofoblastiche extravilluose con quelli dei villi coriali, si osserva un *pattern* di espressione del tutto simile per quanto riguarda l'mRNA ma non le proteine; l'analisi di immunoblotting, infatti, ha rivelato nei villi coriali la presenza di $G\alpha_o$, non riscontrata nelle cellule trofoblastiche. Sembra dunque che questa proteina non sia coinvolta nella regolazione delle risposte del trofoblasto extravilloso.

Per quanto riguarda l'espressione delle proteine G placentari è stato riportato che essa può variare nel corso della gravidanza. Ad esempio, $G\alpha_{i2}$ e $G\alpha_{i3}$ sono maggiormente espresse nel primo trimestre, mentre i livelli di $G\alpha_s$ e $G\alpha_o$ non cambiano durante la gestazione [142]. Queste osservazioni suggeriscono che le proteine G svolgano ruoli funzionali specifici in relazione all'epoca di gravidanza. A questo proposito, evidenze indirette indicano che la proteina $G\alpha_s$ potrebbe essere implicata nella regolazione di canali per il calcio sensibili alla diidropiridina, responsabili del rilascio dell'ormone lattogeno (hPL) e della gonadotropina (hCG) placentari. La proteina $G\alpha_o$ potrebbe, invece, mediare l'azione inibitoria della dopamina sul rilascio di hPL, che si esplica attraverso il suo legame con il recettore D2, espresso nella placenta umana. E' noto che la proteina $G\alpha_{i2}$ modula l'attività dell'AC e della fosfolipasi C, mentre la $G\alpha_{i3}$ attiva i canali per il potassio, suggerendo un suo ruolo inibitorio sul rilascio di ormoni placentari [74].

CONCLUSIONI

Questa ricerca dimostra che le cellule HTR-8/SVneo, derivate da trofoblasto umano del primo trimestre di gravidanza, esprimono recettori funzionali per PGE₂ e SRIF, capaci di modulare sia le vie di trasduzione del segnale che le risposte cellulari, quali proliferazione e migrazione, probabilmente attraverso meccanismi mediati dal cAMP. Infatti, è ben dimostrato che il nucleotide riveste un importante ruolo nel controllo di queste funzioni cellulari esercitando, a seconda dei casi, effetti stimolatori o inibitori.

Per quanto riguarda l'effetto antiproliferativo della PGE₂ osservato nelle cellule HTR-8/SVneo, il coinvolgimento del cAMP è supportato dalle seguenti osservazioni:

1. presenza dei sottotipi recettoriali EP2 ed EP4 che, come è noto, sono positivamente accoppiati al sistema dell'adenilil ciclasi; il prostanoide aumenta significativamente i livelli di cAMP e inibisce la proliferazione e la migrazione cellulare;
2. il FSK aumenta drasticamente i livelli di cAMP e inibisce la proliferazione e migrazione cellulare.

L'azione antiproliferativa di PGE₂, verosimilmente mediata dal cAMP via recettori EP2/EP4, è in linea con quanto riportato in letteratura, relativamente ad altri modelli sperimentali.

I dati riguardanti gli effetti di SRIF supportano ulteriormente l'ipotesi che il cAMP sia coinvolto nel controllo della proliferazione e migrazione delle cellule HTR-8/SVneo, infatti:

3. SRIF, che riduce la concentrazione intracellulare di cAMP, aumenta sia proliferazione che migrazione;
4. SRIF contrasta gli effetti di FSK o PGE₂ su proliferazione e migrazione cellulare.

I risultati sopra riportati sono coerenti con quelli relativi alla caratterizzazione del sistema ciclasico, sia in termini di espressione delle diverse isoforme della subunità catalitica della ciclasi, nonché della subunità alfa delle proteine G, che in termini di attività e responsività dell'enzima.

Concludendo, a condizione che i nostri dati siano applicabili al trofoblasto in vivo, si può ipotizzare un coinvolgimento del sistema AC/cAMP nel mediare gli effetti della prostaglandina E₂ e della somatostatina sulla proliferazione e migrazione delle cellule trofoblastiche extravilluose, consentendo in tal modo il corretto rimodellamento dei vasi uterini e, pertanto, il normale sviluppo del feto.

Ulteriori studi, tuttavia, sono necessari per meglio caratterizzare il *pattern* di espressione di tutte le componenti del sistema dell'AC e per meglio comprendere i meccanismi che le regolano.

La conoscenza di tali meccanismi, oltre ad avere un valore sul piano conoscitivo, potrebbe essere di utilità per la messa a punto di nuove strategie terapeutiche, volte a garantire l'omeostasi del processo di placentazione e, in ultima analisi, il successo della gravidanza.

BIBIOGRAFIA

- [1] Alsat E., Malassiné A., Tarrase A., Merviel P., Évain-Brion D., *Méd./Sciences*, 1999, 15, 1236.
- [2] Malassiné A, Cronier L, *Endocrine* 2002, 19, 3.
- [3] Chakraborty C., Barbin P. Yousef, Chakraborti S., Chidiac P., Dixon S. Jeffrey Lala K., *Molecular and cellular endocrinology*, 2003, 201, 63.
- [4] Leiser R., Kaufmann P., *Exp. Clin. Endocrinol.*, 1994, 102, 122.
- [5] Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F., *Reprod Biol Endocrinol*, 2007, 5, 10.1186.
- [6] Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA., *Am J Obstet Gynecol*, 2002, 187, 1416.
- [7] Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH., *J Clin Invest*, 1997, 99, 2139.
- [8] Matijevic R, Meekins JW, Walkinshaw SA, Neilson JP, *Obstet Gynecol*, 1995, 86, 289.
- [9] Moffet-King A., *Nature Review Immunology*, 2002, 2, 656.
- [10] Lala P.K., Hamilton, G.S., *Placenta* 1996, 17, 545.
- [11] Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galaray R, Damsky C.H., *J Cell. Biol.*, 1991, 113, 437.
- [12] Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I., *Placenta*, 1980,1, 3.
- [13] Tao YX, Lei ZM, Hofmann GE, Rao C.V., *Biol. Reprod.*, 1995, 53, 899.
- [14] Gootwine E., *Animal reproduction science*, 2004, 82-83, 551.
- [15] Sullivan M. H. F. Review, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004, 228, 102.
- [16] Petraglia F., Florio P., Nappi C., Genazzani A. R., *Endocr. Rev.* 1996, 17, 156.
- [17] Shimonovitz S, Hurwitz A, Hochner-Celnikier D, Dushnik M, Anteby E, Yagel S., *Am J Obstet Gynecol*, 1998, 178, 457.
- [18] Spingel AM., Shenkere A. and Weinstein L.S., *Endocrine Rev.*, 1992, 13, 536.
- [19] Buck J., Sinclair M.L., Schapal L., Cann M.J., Levin L.R., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96, 79.
- [20] Hanoune J., Pouille Y., Eleni T., Shen T., Lipskaya L., Miyamoto N., Suzuki Y., Defer N., *Mol Cell Endocrinol* 1997, 128, 179.
- [21] Wang D. S., Wu R. and A. J. Freeman, *Phys.*, 1993, B 47, 14932.
- [22] Storm D. R., Hansel, C., Hacker, B., Parent, A. Linden, D. J., *Neuron*, 1998, 20, 1199.
- [23] Schaefer M., Petronczki M., Dorner D., Forte M., Knoblich J.A., *Cell*, 2001, 107, 183.
- [24] Hurley JH., *Biol. Chem.*, 1999, 274, 7599.
- [25] Sinclair M.L., Wang X.Y., Mattia M., Conti M., Buck J., Wolgemuth D.J., Levin L.R., *Mol Reprod Dev*, 2000, 56, 6.

- [26] Braun T., Dods R.F., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72, 1097.
- [27] Krupinski J., *Mol Cell Biochem*, 1991, 104, 73.
- [28] Hanoune J., Defer N., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001, 41, 145.
- [29] Guillou J.-L., Nakata H., Cooper D. M. F., *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 35539.
- [30] Fagan K. A., Mahey, R. and Cooper, D. M. F., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 12438.
- [31] Ishikawa Y. and Homcy C. J., *Circ. Res.*, 1997, 80, 297.
- [32] Cooper D. M. F., Mons N., Karpen J. W., *Nature (London)*, 1995, 374, 421.
- [33] Harden T. K., Evans T., Hepler J. R. Hughes A. R., Martin M. W., Meeker R. B., Smith M. M., Tanner L. I., *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.*, 1985, 19, 207.
- [34] Levin L. R., Reed R. R., *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 7573.
- [35] Lai H. L., Lin T. H., Kao Y., Lin W., Hwang M. J., Chern Y., *Mol. Pharmacol.*, 1999, 56, 644.
- [36] Lin T. H., Lai H. L., Kao Y. Y., Sun C. N., Hwang M. J., Chern Y., *J. Biol. Chem*, 2002, 277, 15721.
- [37] Antoni F.A., Barnard R.J., Shipston M.J., Smith S.M., Simpson J., Paterson J. M., *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 28055
- [38] Antoni F.A., Palkovits M., Simpson J., Smith S.M., Leitch A.L., Rosie R., Fink G. Paterson J.M., *J. Neurosci.*, 1998, 18, 9650.
- [39] Kao LC, Caltabiano S, Wu S, Strauss JF 3rd, Kliman HJ., *Dev Biol.*, 1988, 130, 693.
- [40] Rankin J.C., Ledford B.E. and Baggett B., *Biol. Reprod.*, 1997, 17, 549.
- [41] Whitsett J.A. and Johnson C.L., *J. Obstet. Gynecol.*, 1979, 133, 479.
- [42] Offermanns S., *Prog Bioph Mol Bio*, 2003, 83, 101.
- [43] Loch C., Antoine R., "Pertussis toxin". Aktories K., (Ed.) Bacterial Toxins 1997, 33-45 Chapman & Hall, London.
- [44] Zhang G.F., Patton W.A., Moss J., Vaughan M., "Cholera toxin - mechanism of action and potential use in vaccine development". Aktories K., (Ed.) Bacterial Toxins 1997, 1, 13.
- [45] Simon M.I., Strathmann M.P., Gautam N., *Science*, 1991, 252, 802.
- [46] Schwindinger W.F., Robishaw J.D., *Oncogene*, 2001, 20, 1653.
- [47] Clapham D.E., Neer E.J., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1997, 37, 167.
- [48] Yamada M., Inanobe A., Kurachi Y., *Pharmacol. Rev.*, 1998, 50, 723.
- [49] Sunahara R.K., Dessauer C.W., Gilman A.G., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1996, 36, 461.
- [50] Exton J.H., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1996, 36, 481.
- [51] Zamponi G.W., Snutch T.P., *Curr. Opin. Neurobiol.*, 1998, 8, 351.
- [52] Vanhaesebroeck B., Leervers S.J., Ahmadi K., Timms J., Katso R., Driscoll P.C., Woscholski R., Parker P.J., Waterfield M.D., *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, 70, 535.

- [53] Bray P., Carter A., Simons C., Guo V., Puckett C., Kamholz J., Spiegel A., Nirenberg M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 8893.
- [54] Kozasa T., Jiang X., Hart M.J., Sternweis P.M., Singer W.D., Gilman A.G., Bollag G., Sternweis P.C., *Science*, 1998) 280, 2109.
- [55] Mattera R., Graziano M.P., Yatani A., Zhou Z., Graf R., Codina J., Birnbaumer L., Gilman A.G., Brown A.M., *Science*, 1989, 243, 804.
- [56] Freissmuth M., Selzer E., Marullo S., Schutz W., Strosberg A.D., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1991) 88, 8548.
- [57] Kehlenbach R.H., Matthey J., Huttner W.B., *Nature*, 1994, 372, 804.
- [58] Hayward B.E., Moran V., Strain L., Bonthron D.T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 15475.
- [59] Pasolli, H.A., Klemke M., Kehlenbach R.H., Wang Y., Huttner W B., *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 33622.
- [60] Klemke M., Pasolli H.A., Kehlenbach R.H., Offermanns S., Schultz G., Huttner W.B., *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 33633.
- [61] Bastepe M., Gunes Y., Perez-Villamil B., Hunzelman J., Weinstein L.S., Juppner H., *Mol. Endocrinol.*, 2002, 16, 1912.
- [62] Raymond J.R., Arthur J.M., Casanas S.J., Olsen C.L., Gettys T.W., Mortensen R.M., *J. Biol. Chem*, 1994) 269, 13073.
- [63] Rudolph U., Spicher K., Birnbaumer L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 3209.
- [64] Rhee S.G., *Annu. Rev. Biochem.* 2001) 70, 281.
- [65] Amatruda, T.T., Steele D.A., Slepak V.Z., Simon M.I., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991) 88, 5587
- [66] Wilkie T.M., Scherle P.A., Strathmann M.P., Slepak V.Z., Simon M.I., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88, 10049.
- [67] Wange R.L., Smrcka A.V., Sternweis P.C., Exton J.H., *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 11409.
- [68] Wu D., Katz A., Lee C.H., Simon M.I., *J. Biol. Chem*, 267, 1992, 25798.
- [69] Offermanns S., Heiler E., Spicher K., Schultz G., *FEBS Lett.*, 1994 349, 201.
- [70] Xu X., Croy J.T., Zeng W., Zhao L., Davignon I., Popov S., Yu K., Jiang H., Offermanns S., Muallem S., Wilkie T.M., *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 27275.
- [71] Davignon I., Catalina M.D., Smith D., Montgomery J., Swantek J., Croy J., Siegelman M., Wilkie T.M., *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20, 7974.
- [72] Evans T., Brwon ML., Fraser ED., Northup JK., *J. Biol. Chem.*, 1996, 261, 7052.
- [73] Jacobs M., Li and Illsley, *Placenta*, 1992, 13, 123.

- [74] Petit A., Geoffroy P., Bessette P., Prévost J., Bélisle S., *J. Soc. Ginecol. Invest.*, 1995, 5, 1071.
- [75] Daiter E., Makrigiannakis A., Coukos G., Woolkalis JM. And Coutifaris C., *Obstetrics and Gynecology*, 1999, 88, 165.
- [76] Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayand A, Fouron JC, Vazquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, Chemtob, S. *J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001, 281, 1343
- [77] Petraglia F, Florio P, Nappi C, Genazzini AR. *Endocr Rev*, 1996, 17,156
- [78] Chen Y, Hughes-Fulford M. *Br J Cancer*, 2000, 82, 2000
- [79] Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. *Annu Rev Pharmacol* 2001, 41, 661
- [80] Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A., *Biochim Biophys Acta.*, 1995, 26, 109.
- [81] Paria BC, Song H, Dey SK. *Int J Dev Biol* , 2001, 45, 597.
- [82] Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell R, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD. *Placenta*, 2003, 24, S33.
- [83] Meadows JW, Pitzer B, Brockman DE, Myatt L. *Placenta*, 2004, 25, 259.
- [84] North RA, Whitehead R, Larkins RG. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991, 73, 60.
- [85] Shimonovitz S, Yagel S, Anteby EY, Finci-Yeheskel Z, Adaghi EY, Mayer M, Hurwitz A., *J. Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80, 1641.
- [86] Kniss DA, Rovin B, Fertel RH, Zimmerman D. *Placenta*, 2001, 22, 80.
- [87] Blumenstein M, Keelan JA, Mitchell MD. *Placenta*, 2001, 22, 519.
- [88] Nelson DM, Johnson RD, Smith SD, Anteby EY, Sadovsky Y. *Am J Obstet Gynecol*, 1999, 180, 896.
- [89] Qu J, Thomas K. *J Clin Endocrinol Metab* , 1993, 77, 556.
- [90] Duttaroy AK, Taylor J, Gordon MG, Hoggard N, Campbell F. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 299, 432.
- [91] Yagel S, Lala PK, Powell WA, Casper RF. *J Clin Endocrinol Metab*, 1989, 68, 992.
- [92] Backlund MG, Mann JR, Dubois RN. *Oncology*, 2005, 69, 28.
- [93] Shao J, Sheng GG, Mifflin RC, Powell DW, Sheng H. *Cancer Res* , 2006, 66, 846.
- [94] Brochhausen C, Neuland P, Kirkpatrick C, Klaus G. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8, R78.
- [95] Lu S, Yu G, Zhu Y, Archer MC. *Int J Cancer*, 2005, 116, 847.
- [96] Koide S, Kobayashi Y, Oki Y, Nakamura H. *Dig Dis Sci*, 2004, 49,1394.
- [97] Legler DF, Krause P, Scandella E, Singer E, Groettrump M. *J Immunol*, 2006, 176, 966.
- [98] White ES, Atrasz RG, Dickie EG, Aronoff DM, Stambolic V, Mak TW, Moore BB, Petersgolden M. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 32, 135.
- [99] Han C, Michalopoulos GK, Wu T. *J Cell Physiol*, 2006, 207, 261.

- [100] Ito H, Duxbury M, Benoit E, Clancy TE, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. *Cancer Res*, 2004, 64, 7439.
- [101] Reno F, Baj G, Surico N, Cannas M. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2004, 73, 237.
- [102] Staff AC, Ranheim T, Henriksen T, Halvorsen B. *Hypertension*, 2000, 35, 1307.
- [103] Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. *J Neurochem*, 2004, 89, 1057.
- [104] Corleto VD, Nasoni S, Panzuto F, Cassetta S, Delle Fave G. *Dig Livers Dis*, 2004, 36, S8.
- [105] Patel YC. *Front Neuroendocrinol*, 1999, 20, 157.
- [106] Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A, Panetta R, Srikant CB. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 198, 605.
- [107] Cheng H, Yibchok-Anun S, Park SC, Hsu WH. *Biochem J*, 2002, 364, 33.
- [108] Cervia D, Petrucci C, Bluet-Pajot MT, Epelbaum J, Bagnoli P. *Neuroendocrinology*, 2002, 76, 99.
- [109] Lammers CH, CH, Schweitzer P, Facchinetti P, Arrang JM, Madamba SG, Siggins GR, Piomelli D. *J Neurochem*, 1996, 67, 147.
- [110] Nishihira M, Yagihashi S. *Tohoku J Exp Med*, 1978, 126, 397.
- [111] Tsalikian E, Foley TP Jr, Becker DJ. *Pediatr Res*, 1984, 18, 953.
- [112] Caron P, Buscail L, Beckers A, Esteve JP, Igout A, Hennen G, Susini C. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82, 3771.
- [113] Giannetti N, Enjalbert A, Krantic S. *J Cell Biochem*, 2000, 78, 666.
- [114] Krantic S, Benahmed M. *Biol Reprod*, 2000, 62, 1835.
- [115] Kamiya Y, Ohmura E, Arai M, Fujii T, Hayakawa F, Ito J, Kawaguchi M, Tsushima T, Sakuma N. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 191, 302 .
- [116] Oomen SP, van Hennik PB, Antonissen C, Lichtenauer-Kaligis EG, Hofland LJ, Lamberts SW, Lowenberg B, Touw IP. *Exp Hematol*, 2002, 30, 116.
- [117] Yacubova E, Komuro H. *Nature*, 2002, 415, 77.
- [118] Kokudo N, Kothary PC, Eckhauser FE, Raper SE. *J Surg Res*, 1991, 51, 113.
- [119] Brown BL, Ekins RP, Albano JD. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 1972, 2, 25.
- [120] Kyveris A, Maruscak E & Senchyna M. *Mol Vis*, 2002, 8, 51.
- [121] Morath R, Klein T, Seyberth HW, Nüsing RM. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10, 1851.
- [122] Dwivedi Y., Hooriyah S., Conley R., Roberts R., Tamminga C. and Pandey G., *Neuro Psycho Pharmacology*, 2002, 27, 499.
- [123] Bernatchez R., Belkacemi L.; Rassart E., Daoud G., Simoneau L. and Lafond J., *Placenta* 2003, 24, 648.
- [124] Dallman M.J., Porter A.C.G., "Semi-quantitative PCR for the analysis of gene expression".

- M.J. McPherson, P. Quirke, G.R. Taylor(Eds.) 125.
- [125] Gilliland G., Perrin S., Bunn H.F., "*Comparative PCR for quantitation of mRNA*". M.A. Inns., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T. White (Eds), 60.
- [126] Sambrook J., Fritsch EF, Maniatis T., A. Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [127] Chen D, Klebe RJ., *PCR Methods and Application*, 1993, 3, 127.
- [128] Marone M., Mazzetti S., De Ritis D., Piarelli L, Scambia G., *Bio. Proced Online*, 2001, 3, 19.
- [129] Weston E., Spencer, Merrill J. Christensen, *BioTechniques*, 1999, 27, 1044.
- [130] Didier G., Mamessier A., Staquet MJ., Schmitt D., Berthier-Vergnes O., *Analytical Biochemistry*, 2001, 295, 17.
- [131] Xue S., Slater D.M., Bennett P.R., Myatt L., *Prostaglandins*, 1996, 51, 107.
- [132] Clement-Cormier Y.C., Parrish R.G., Petrold G.L., Kebabian J.W. and Greingrand P., *J Neurochem*, 1975, 25, 143.
- [133] Chen Y. and Hughes-Fulford M., *British Journal of Cancer*, 2000, 82, 2000.
- [134] Kudo Y., Boyd A., Sargent I., RedmanW.G., Lee M., Freeman T.C., *Placenta*, 2004, 25, 479.
- [135] Sawai K, Azuma C, Koyama M, Hashimoto K, Kimura T, Samejima Y., *Early Pregnancy* 1996, 2, 244.
- [136] Zygmunt M, Hahn D, Munstedt K, Bischof P, Lang U., *Placenta*, 1998, 19, 587.
- [137] McKinnon T, Chakraborty C, Gleeson LM, Chidiac P, Lala PK. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86, 3665
- [138] Koper JW, Markstein R, Kohler C, Kwekkeboom DJ, Avezaat CJ, Lamberts SW., *J Clin Endocrinol Metab* 1992, 74, 543.
- [139] Price S.A., Pochun I., Phaneuf S., and Lòpez Bernal A., *J. of Endocrinology*, 2000, 164, 21.
- [140] Sanborn B.M., Yue Caiping, Wang Wei, Dodge Kimberly L., "*G protein signalling pathways in myometrium: affecting the balance between contraction and relaxation*". 1998, 3, 196.
- [141] Liu J., Chakraborty C., Graham CH., Barbin YP., Dixon SJ., Lala PK., *Exp Cell Res.*, 2003, 15, 286(1), 138.
- [142] Petit A., Geoffroy P., MSc, Bessette P., Prèvoost J., MSc, Bèlisle S., MD, MSc "*Expression of Human Placental G Proteins During Pregnancy*". *J. Soc. Gynecol. Invest.* 1995, 2, 678.
- [143] Jiang M., Gold M.S., Boulay G., Spicher K., Peyton M., Brabet P., Srinivasan Y., Rudolph U., Ellison G., Birnbaumer L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 3269.
- [144] Willoughb D. Y and Cooper D. M. F., *Physiol. Rev.*, 2007, 87, 965.
- [145] Pai R, Sorengan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. *Nature Medicine*, 2002, 8, 289.