

## **IL NITROSSIDO REGOLA LA VIA DEL SEGNALE DI TRASDUZIONE ATTIVATO DAGLI ESTROGENI, ATTRAVERSO LA GENERAZIONE DI GMP CICLICO**

**S. Falcone**<sup>°</sup>, **L. Mauro**<sup>\*</sup>, **G. de Rose**<sup>\*</sup>, **C. Sciorati**<sup>§</sup>, **S. Andò**<sup>\*</sup>, **E. Clementi**<sup>\*§</sup>

<sup>°</sup>Dipartimento di Farmacologia, Università di Milano, <sup>\*</sup>Dipartimento di Biologia cellulare e Farmaco-Biologico, Università della Calabria, <sup>§</sup>DIBIT-Istituto Scientifico H San Raffaele, Via Olgettina 58, 20132 Milano.

Il nitrossido (NO) viene generato dagli estrogeni sia precocemente, per attivazione della NO sintasi endoteliale, sia a lungo termine, in conseguenza dell'aumentata espressione della NO sintasi inducibile. L'NO contribuisce alle azioni fisiologiche degli estrogeni inclusa la protezione contro malattie cardiovascolari. Parte di questo effetto dell'NO può essere ascritto direttamente alle sue proprietà vasodilatanti e di inibizione dell'aggregazione piastrinica. Non è noto, invece, se parte dell'effetto dell'NO possa essere dovuto anche ad una regolazione delle vie di trasduzione del segnale attivate dagli estrogeni. Per verificare questo abbiamo studiato gli effetti dell'NO sulla trasduzione del segnale accesa da estradiolo (E2) nella linea cellulare MCF-7. In presenza del donatore di NO DETA-NO, E2 diviene competente a fosforilare in tirosina, ed attivare, la proteina adattatrice IRS-1. Questo effetto si manifesta nei primi minuti dopo somministrazione di E2 ed NO e si traduce nel reclutamento della fosfatidilinositolo-3-kinasi (PI3K) ed attivazione di Akt. In parallelo, abbiamo osservato che NO inibiva l'attivazione delle MAPK, segnatamente ERK-1/2, che sono note essere tra i segnali precoci di risposta cellulare all'E2. Questo effetto dipendeva dalla attivazione di PI3K/Akt causata dai due mediatori, dal momento che il pre-trattamento con wortmannina, un inibitore di PI3K, restaurava la capacità di E2 di attivare ERK 1/2. Tutti gli effetti dell'NO descritti erano mediati dalla generazione di GMP ciclico. L'attivazione di ERK1/2 contribuisce agli effetti mitogenici di E2. Si è quindi analizzato l'effetto di NO/cGMP sulla crescita cellulare stimolata da E2. La crescita risultava diminuita dalla presenza di NO/cGMP, ed il meccanismo sottostante era l'inibizione dell'attività ERK1/2 in conseguenza dell'attivazione di Akt. Akt ed ERK 1/2 partecipano alla stimolazione da parte di E2 della trascrizione di geni controllati dagli Estrogen Responsive Elements (ERE). Abbiamo quindi studiato se la capacità di NO/cGMP di modulare l'attivazione di ERK 1/2 ed Akt potesse influenzare la trascrizione ERE-dipendente stimolata da E2 in cellule transfettate transientemente con un gene reporter specifico. Il trattamento con E2 in presenza di NO/cGMP non determinava variazioni nella attività ERE. Utilizzando wortmannina e PD98059 abbiamo dimostrato che questo era dovuto al bilanciarsi dei due effetti di NO/cGMP sulle chinasi descritti sopra: stimolazione di Akt (con aumento di attività ERE) ed inibizione di ERK 1/2 (con diminuzione di attività ERE). Questi risultati dimostrano per la prima volta la capacità dell'NO di regolare la trasduzione del segnale accesa dall'estradiolo. Futuri studi aiuteranno a comprendere il ruolo fisiologico di tale regolazione.