

L'IPERGLICEMIA AUMENTA ACUTAMENTE L'ATTIVITÀ DELLE ERKS (EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASES) *IN VIVO*, NELL'UOMO

A. GALLO, G. CELOTTO, A. SEMPLICINI, A. AVOGARO

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Padova, Padova

riassunto I picchi iperglicemici potrebbero avere un effetto negativo sulla prognosi a lungo termine dei pazienti affetti da diabete mellito. Le extracellular signal-regulated kinase (ERKs) sono mediatori cellulari di proliferazione cellulare e possono essere attivati in risposta a elevati valori di glicemia. D'altra parte le modificazioni della loro attività in risposta all'iperglicemia sono state poco indagate *in vivo* nell'uomo. Abbiamo quindi pensato di valutare nei monociti circolanti umani: 1. il ruolo dell'iperglicemia sull'attività e fosforilazione delle ERKs; 2. come l'iperglicemia alteri l'attività della MEK (Mitogen Activated protein Kinase Kinase) e l'espressione della MKP-1 (Mitogen Activated Protein Phosphatase 1). Lo studio è stato effettuato su 5 soggetti normali. L'attività delle ERKs in condizioni basali era pari a 60 ± 5 pmol·min⁻¹·mg prot⁻¹; quando veniva indotta un'iperglicemia esogena sia l'attività (81 ± 11 pmol·min⁻¹·mg prot⁻¹, $p < 0,05$) che la fosforilazione delle ERKs nei monociti erano significativamente aumentate ($p < 0,01$). L'attività della MEK era significativamente aumentata in corso di iperglicemia (1251 ± 136 vs 2000 ± 42 cpm, $p = 0,0017$), mentre non si rilevava alcuna modifica nell'espressione della MKP-1. Abbiamo quindi concluso che l'iperglicemia stimola acutamente l'attività e la fosforilazione delle ERKs nei monociti umani attraverso la via delle MEK. Questi dati potrebbero essere importanti per comprendere l'effetto negativo dell'iperglicemia acuta sulla fisiopatologia dei monociti.

Parole chiave. Extracellular regulated kinase, monociti, iperglicemia, mitogen activated protein kinase phosphatase -1.

summary *Hyperglycemia acutely increases monocyte extracellular signal-regulated kinase activity in vivo, in humans. Glycemic spikes may negatively affect the long-term prognosis of patients with diabetes. Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) are intracellular mediators of cell proliferation, and they can be activated in response to high glucose levels. However, the modifications of their activity in response to hyperglycemia have been poorly investigated, in vivo, in humans. Thus, we sought to determine in circulating monocytes: 1. The role of hyperglycemia on ERKs activity and phosphorylation; 2. Whether hyperglycemia affects mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) activity and mitogen-activated protein phosphatase-1 (MKP-1) expression. These goals were performed in 5 normal subjects. Baseline monocyte ERKs activity was 60 ± 5 pmoles·min⁻¹·mg protein⁻¹; when exogenous hyperglycemia was induced both monocyte ERKs activity (81 ± 11 pmoles⁻¹·min protein⁻¹, $p < 0.05$) and phosphorylation significantly increased ($p < 0.01$). MEK activity was significantly increased by hyperglycemia (1251 ± 136 vs 2000 ± 42 cpm, $p = 0.0017$) while no changes were observed in MKP-1 expression. We conclude that hyperglycemia acutely stimulates ERKs activity and phosphorylation in human monocyte by MEK pathway, in vivo. These findings may be relevant in understanding the negative role of acute hyperglycemia on monocytes pathophysiology.*

Key words. Extracellular regulated kinase, monocytes, hyperglycemia, mitogen activated protein kinase phosphatase-1.

Introduzione

L'iperglicemia rappresenta il fattore di rischio principale per lo sviluppo delle complicanze micro- e macrovascolari della malattia diabetica. Il glucosio

infatti esplica il suo effetto tossico attraverso l'iperosmolarità, lo stress ossidativo, e l'attivazione della PKC (protein chinasi C) (1, 2). Noi e altri abbiamo

recentemente dimostrato che l'attivazione della PKC, in particolare l'isoforma β , potrebbe essere responsabile di alcune disfunzioni vascolari osservate nei soggetti diabetici (3, 4).

È stato quindi suggerito che il rischio di sviluppare le complicanze diabetiche possa essere strettamente collegato alle escursioni iperglicemiche postprandiali (5). Queste infatti potrebbero incrementare lo stress ossidativo (6), l'espressione di molecole di adesione sulla superficie endoteliale (7), l'attivazione dei fattori della coagulazione (8).

Le ERKs (extracellular signal-regulated protein kinase) rappresentano una famiglia di serin/treonin chinasi che giocano un ruolo fondamentale nella trasmissione dei segnali intracellulari (9). Queste proteine vengono attivate dalla fosforilazione dei residui di tirosina e treonina a opera della MEK (mitogen activated protein kinase kinase) a doppia azione specifica, mentre sono inattivate dalla defosforilazione da parte della MKP-1 (mitogen activated phosphatase 1) (10). Il grado di fosforilazione e quindi di attivazione delle ERKs deriva quindi da un fine equilibrio tra chinasi e fosfatasi.

Studi recenti hanno dimostrato che l'iperglicemia può influire sulla regolazione dell'attività delle ERKs (11, 12). Non esistono comunque attualmente informazioni sull'attività delle ERKs *in vivo* nell'uomo, e in particolare sul ruolo dell'iperglicemia sulla loro regolazione da parte della MEK e della MKP-1.

Un rapporto sugli effetti dell'iperglicemia sulle ERKs nei monociti circolanti è stato fornito da Goldfine e coll., i quali hanno dimostrato che la somministrazione, ai pazienti diabetici tipo 2, di sodio metavanadato, che mima l'effetto dell'insulina, aumenta di almeno 4 volte l'attività basale delle ERKs in queste cellule (13). Al contrario, recentemente Cusi e coll. hanno dimostrato che nel muscolo scheletrico di soggetti diabetici tipo 2 insulino-resistenti in condizioni di euglicemia, l'insulino-resistenza non altera in alcun modo l'attività delle ERKs (14). Comunque più l'iperglicemia che l'euglicemia sembra essere il segnale che influenza negativamente l'attività mitogenica cellulare.

Per questo motivo abbiamo scelto i monociti circolanti come modello su cui testare le modificazioni intracellulari indotte dall'iperglicemia acuta. Studi recenti hanno dimostrato che molte anomalie nell'interazione leucocita-endotelio nel diabete possono essere correlate all'iperglicemia (15, 16). Le ERKs nei monociti sembrano inoltre essere importanti mediatori della risposta immunologica dal momento che l'attivazione delle MEK/ERKs è fondamentale per la produzione di citochine e PGE2 in risposta al lipopolisaccaride (17).

In questo studio abbiamo quindi pensato di determinare gli effetti dell'iperglicemia sulla regolazione dell'attività delle ERKs nei monociti in soggetti di controllo normali in condizioni basali e dopo 5 ore di iperglicemia indotta.

Materiali e metodi

Per questo studio sono stati reclutati cinque soggetti sani (2 femmine e 3 maschi), che hanno partecipato dopo sottoscrizione di un consenso informato. L'età media era di 29 anni e l'indice di massa corporea pari a $22,5 \pm 1,6$ kg/m². In tutti i soggetti sono stati valutati i seguenti parametri, colesterolo totale ($4,45 \pm 0,17$ mmol/L), colesterolo HDL ($1,22 \pm 0,07$ mmol/L), trigliceridi ($1,52 \pm 0,13$ mmol/L), insulinemia (36 ± 6 pmol/L) e C-peptide ($0,73 \pm 0,14$ mmol/L). Tutti i partecipanti risaltavano in buona salute e nei tre giorni precedenti allo studio avevano assunto almeno 250 g di carboidrati con la dieta. Il comitato etico locale ha approvato il protocollo di studio.

Procedura sperimentale

I soggetti sono stati studiati dopo un digiuno di 12 ore. Alle 7.30, dopo un prelievo basale, è stata iniziata infusione endovenosa combinata di glucosio al 10% p/v e somatostatina (250 μ g/h) portando la glicemia da valori normali medi di 4,7 mmol/L a valori di 13,05 mmol/L. La glicemia è stata monitorata ogni 10 min. Dopo 5 ore dall'inizio dell'infusione di glucosio e somatostatina è stato effettuato un secondo prelievo per la determinazione dell'attività della MAPK, l'immunoblotting e l'espressione delle ERKs nei monociti circolanti.

Analisi di laboratorio

Il glucosio plasmatico è stato determinato con il metodo della glucosio ossidasi (Beckman Glucose analyser, Beckman Instruments, Inc. Palo Alto. CA. USA). L'insulinemia e il C-peptide con metodo RIA (18), il colesterolo e i trigliceridi plasmatici con metodo enzimatico e il colesterolo HDL secondo il metodo di Kostner (19).

Determinazione dell'attività delle ERKs nei monociti circolanti

Preparazione dei monociti

I monociti sono stati estratti dal sangue eparinato, prelevato dai volontari, mediante centrifugazione (400 g \times 30 min a temperatura ambiente) su gra-

diente di densità Histopaque-1077 (Sigma). La frazione contenente i monociti è stata lavata una volta in PBS e due volte in medium RPMI-1640, quindi risospesa in medium RPMI-1640 privo di glucosio e arricchito con FCS al 5%, L-glutamina 2 mmol/L, glucosio 2 mmol/L, penicillina 100 U.ml⁻¹, streptomicina 10 µg. ml⁻¹. Le cellule sono poi state piastrate in capsule di coltura e incubate per 1 ora a 37 °C in ambiente umidificato al 5% di CO₂. Le cellule non aderenti alla superficie della piastra sono state rimosse mediante lavaggi ripetuti con PBS, mentre quelle aderenti sono state mantenute da 1 a 2 ore in RPMI-1649 privo di siero. Più del 90% delle cellule aderenti erano monociti, valutati sia all'esame morfologico microscopico sia con colorazione Diff-Quick. Più del 95% delle cellule sono risultate vitali, evidenziate con il metodo dell'esclusione del tripan blue.

Frazionamento cellulare

I monociti sono stati rapidamente lisati con l'aggiunta di un buffer di lisi freddo contenente: Tris-HCl 12,5 mmol/L (pH 7,4), saccarosio 250 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, β-glicerofosfato 25 mmol/L, sodio vanadato 2 mmol/L, PMSF 10 µmol/L, leupeptina µg.ml⁻¹, aprotinina 5 ml⁻¹. Le cellule sono state ulteriormente frantumate con omogeneizzatore Dounce in ghiaccio per 1 min e poi centrifugate a 800 g per 10 min a 4 °C per rimuovere i detriti cellulari e la frazione nucleare. L'omogeneizzato così ottenuto è stato centrifugato a 14.000 g per 15 min a 4 °C in centrifuga Eppendorf. Il soprannatante è stato rimosso e conservato a -80 °C.

Dosaggio delle proteine

La concentrazione delle proteine è stata determinata con metodo di Bradford utilizzando la sieralbumina bovina come standard di riferimento.

Immunoblotting di ERKs, MEK e MKP-1

Il lisato ottenuto dai monociti umani (40 µg) è stato incubato con anticorpi policlonali di coniglio per ricercare le ERKs, la MEK e la MKP-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Il lisato è stato precedentemente solubilizzato in buffer di Laemmli e quindi separato in elettroforesi su gel di poliaccrilamide al 10%. Le proteine così separate sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa mediante elettroblotting (Hybond ECL, Amersham) in un buffer contenente Tris 48 mmol/L, glicina 39 mmol/L, SDS 0,037%, etanolo 20% (vol/vol) per 2 ore a bassa temperatura in una apposita cella per transblot (Elettrofor, Padova). Le membrane sono state bloccate sulla nitrocellulosa mantenendole per tutta la notte a 4 °C in T-PBS con-

tenete PBS, Tween 0,05% (vol/vol) e sieralbumina bovina al 5%. Le membrane sono state quindi esposte all'anticorpo primario anti-ERKs (diluizione 1:3000), anti-MEK (1:3000) e anti-MKP (1:2000) per una notte a 4 °C. Dopo l'incubazione, le membrane sono state lavate (4 volte x 20 min) con lo stesso buffer e quindi esposte all'anticorpo anti-coniglio (diluizione 1:4000) coniugato con la perossidasi di rafano. La ricerca è stata effettuata con il sistema di chemiluminescenza avanzato (ECL) della Amersham. Le proteine separate sono state esaminate e quantificate con il sistema Bio-Rad Chemiluminescence Molecular Imaging, e i risultati espressi in unità densitometriche.

Stima della fosforilazione delle ERKs (p42/p44)

I campioni (40 µg), per l'analisi delle ERKs fosforilate, sono stati separati mediante elettroforesi su gel di poliaccrilamide al 10% e quindi trasferiti su membrana di nitrocellulosa come sopra descritto. Le membrane sono state poi bloccate in T-PBS e BSA per una notte a 4 °C e quindi incubate con anticorpo anti-phospho-ERKs specifico (diluizione 1:1500) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Le membrane sono state successivamente lavate quattro volte e incubate con anticorpo anti-topo coniugato con la perossidasi di rafano (1:4000) a temperatura ambiente per 1 ora. Le bande sono state rilevate con sistema ECL (Amersham).

Analisi dell'attività delle ERKs

L'attività delle ERKs è stata determinata utilizzando il kit di dosaggio per la MAPK (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA). Il metodo si basa sulla fosforilazione di uno specifico substrato della proteina basica della mielina (MBP) utilizzando il trasferimento di un γ-fosfato della adenosina-5'-trifosfato [32P] ([γ³²P] ATP) ad opera delle ERKs. La procedura è stata eseguita seguendo le indicazioni della ditta fornitrice. In breve, 10 µl di substrato, la miscela di inibitori e il lisato cellulare (10 µg.mL⁻¹ di proteine) sono stati posti in provette da microcentrifuga. La miscela di substrato conteneva 2 mg.mL⁻¹ di MBP diluita in un buffer contenente MOPS 20 mmol/L (pH 7,2), EGTA 5 mmol/L, β-glicerofosfato 25 mmol/L, sodio ortovanadato 1 mmol/L, PKI (inibitore della protein chinasi A) 2 µmol/L, inibitore della PKc 200 µmol/L. la reazione iniziava con l'aggiunta di 10 µL di Mg²⁺/ATP (75 mmol/L di MgCl₂, 500 µmol/L di ATP) contenente [γ³²P]ATP (3000 Ci/mmol) per 10 min a 30 °C. La reazione terminava con il trasferimento di un'aliquota dei campioni (25 µL) su foglio di nitrocellulo-

sa (Whatman P81). Le proteine marcate con P32 venivano contate, dopo quattro lavaggi in acido fosforico 75 mmol/L, in un liquido di scintillazione, da un γ -counter. L'attività delle ERKs è stata espressa in pmol di ATP incorporato nella MBP per mg di estratto cellulare per minuto ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$).

Analisi dell'attività della MEK

L'attività della MEK è stata determinata utilizzando una chinasi ricombinante inattiva GST-MEK1 come substrato (Upstate Biotechnology, Lake Pacific, NY, USA) seguita dall'immunoprecipitazione della chinasi. Il lisato cellulare (300 μg di proteine) è stato incubato con 5 μL di anticorpo anti-MEK per 2 ore a 4 °C. L'immunoprecipitato è stato recuperato incubandolo con la proteina A/G PLUS-agarosio (50 μL , Santa Cruz, Biotech) per una notte a 4 °C, quindi centrifugato e lavato tre volte con buffer di lisi cellulare e una volta in un buffer di chinasi a pH 7,4 contenente HEPES 25 mmol/L, β -glicerofosfato 25 mmol/L, MgCl_2 15 mmol/L, ATP 50 μM , 10 μCi di $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 2 μg di MEK1. L'immunoprecipitato è stato incubato per 15 min a 30 °C. La reazione è stata bloccata con il trasferimento di un'aliquota (25 μL) su foglio di nitrocellulosa (Whatman P81). Le proteine marcate con P32 sono state contate, dopo quattro lavaggi in acido fosforico 75 mmol/L, in un liquido di scintillazione da un γ -counter.

Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati analizzati con test non parametrico di Wilcoxon Sign Rank con software statistico GraphPad vers. 2.00.

Risultati

Parametri metabolici

La glicemia plasmatica è stata aumentata da un valore basale di $4,72\pm 0,36$ mmol/l-1 a $13,21\pm 0,92$ mmol/l-1 ($p<0,001$).

Espressione e attività dell'ERK, MEK e MKP-1

Prima di tutto abbiamo esaminato l'espressione delle ERKs e della MEK con l'immunoblotting degli estratti cellulari, rilevando la loro presenza per mezzo di anticorpi policlonali specifici. La figura 1A mostra un tipico blot per l'espressione delle ERKs nei monociti umani. L'anticorpo per le ERK chinasi ha evidenziato entrambe le bande, con MW corrispondente a 44 KDa (ERK 1) e 42 KDa (ERK 2). La figura 1B mostra un tipico

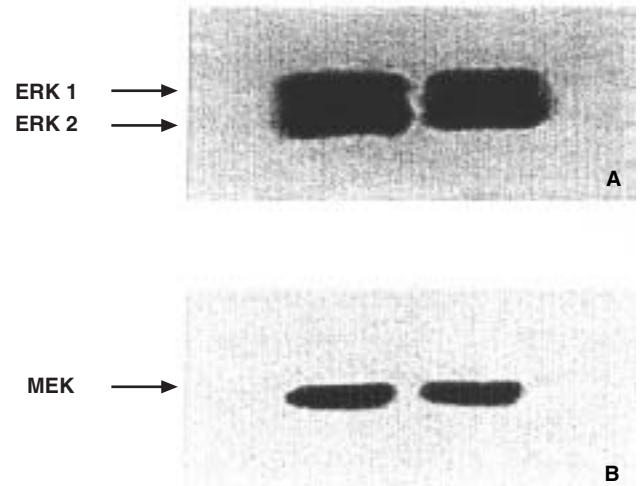


Fig. 1. Immunoblot delle isoforme ERK1 ed ERK2 nei monociti dei soggetti esaminati. Il quadro superiore rappresenta l'immunoblot delle isoforme 44 e 42 kDa delle ERKs. Le proteine (40 μg) sono state separate in gel poliaccrilamide al 10% e trasferite su membrana di nitrocellulosa. I blot sono stati sondati con anticorpi specifici anti-ERKs. Il riquadro inferiore mostra immunoblot rappresentativi della MEK kinase nei monociti provenienti dagli stessi soggetti.

blot per l'espressione della MEK nei monociti umani. L'anticorpo per la MEK ha evidenziato la banda a 45 KDa.

Abbiamo quindi ricercato gli effetti *in vivo* dell'iperglicemia acuta indotta in cinque soggetti, normali per quanto riguarda l'attività e la fosforilazione delle ERKs. Come mostrato in figura 2, l'iperglicemia ha in-

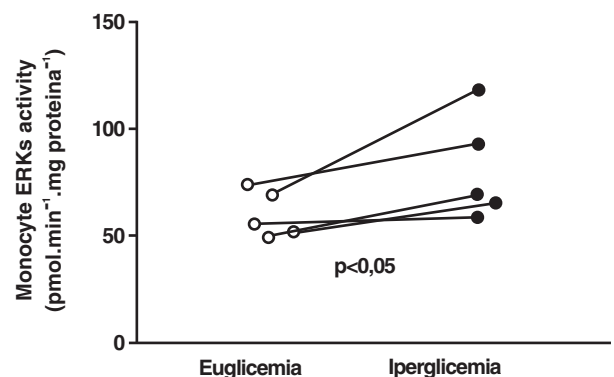


Fig. 2. Effetto dell'iperglicemia acuta indotta sull'attività chinasi delle ERKs *in vivo*. L'attività delle ERKs è stata studiata su monociti prelevati da soggetti di controllo normali in euglicemia (cerchi vuoti) e durante un'iperglicemia indotta per via esogena (cerchi pieni). L'attività delle ERKs è stata misurata come descritto nel paragrafo *Metodi*, con doppie misurazioni per ciascun esperimento.

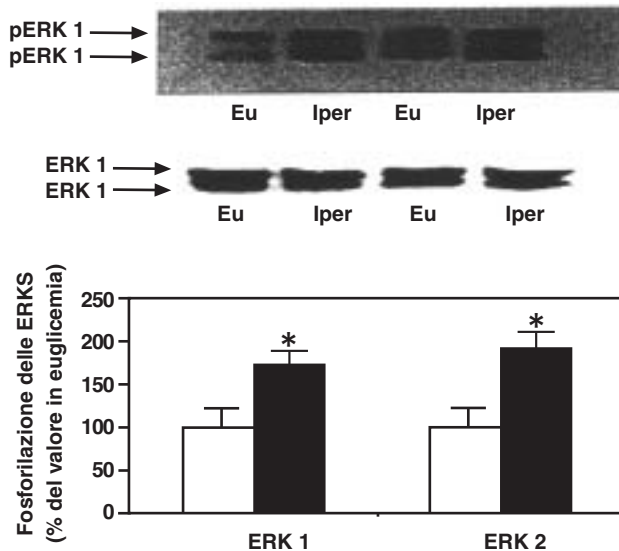


Fig. 3. Il riquadro superiore mostra immunoblot rappresentativi di ERK1 e 2 fosforilate nei lisati monocitari provenienti da due controlli in euglicemia (Eu) e in iperglicemia (Iper) utilizzando un anticorpo antifosfo-ERK come descritto nel paragrafo *Metodi*. Uguali quantità di proteine (40 µg) sono state separate in gel di poliaccrilamide al 10% e incubate con l'anticorpo p-ERK. Lo stesso campione usato nello studio della fosforilazione degli ERK è stato incubato con l'anticorpo anti-ERK come mostrato nel riquadro al centro. Il riquadro inferiore mostra l'analisi densitometrica della fosforilazione delle ERKs. I dati (media ± SE, n=5) sono espressi relativamente allo stato euglicemico, assegnando un valore del 100% al valore di controllo. * $p < 0,01$, euglicemia vs iperglicemia.

dotto un marcato e indicativo incremento dell'attività delle ERKs (da $60,2 \pm 6,9$ a $80,6 \pm 10$, $p < 0,05$). Questo effetto è stato associato con la fosforilazione delle due isoforme delle ERKs, ERK1 e 2, identificate dallo specifico anticorpo fosfo-p44/p42 MAPK (fig. 3A). Nessuna differenza è stata riscontrata nei livelli delle proteine ERK 1 e 2 in soggetti normali dopo l'iperglicemia (fig. 3B). Analisi densitometriche hanno dimostrato che l'iperglicemia acuta porta a un aumento di circa il doppio della fosforilazione p44/p42 ($p < 0,01$) (fig. 3C).

La via dei segnali che porta all'attivazione delle ERKs dipende da effettori a monte, in particolare, dall'attività della MEK (21). Per valutare il contributo della MEK alla stimolazione delle ERKs attraverso l'iperglicemia acuta, abbiamo analizzato la sua attività utilizzando un sistema di anticorpi specifici. Come mostrato in figura 4, l'iperglicemia acuta ha indotto un significativo aumento dell'attività della MEK.

Abbiamo inoltre valutato il possibile effetto dell'iperglicemia acuta sull'espressione della MKP-1 nei monociti umani. Come mostrato in figura 5, la pre-

senza della MKP-1 è stata riscontrata a 50 KDa nei monociti e la sua espressione è stata fortemente indotta dopo 60 min di stimolazione con PMA. Tuttavia l'iperglicemia acuta non ha modificato in maniera rilevante l'espressione della MKP-1 nei monociti umani.

Discussione

Le ERKs sono potenzialmente coinvolte nelle modificazioni cellulari in risposta all'iperglicemia e al danno d'organo. Questi effetti sono stati descritti soprattutto da studi *in vitro*.

Questo studio dimostra che, *in vivo*, l'iperglicemia acuta, indotta per via esogena, aumenta in maniera significativa le attività delle ERKs e della MEK.

Le ERKs svolgono un ruolo fondamentale nella crescita cellulare e nello sviluppo delle complicità diabetiche come trasduttori di segnali indotti dal glucosio (11). Infatti, la loro stimolazione aumenta, attraverso la fosforilazione, l'attività dei fattori di trascrizione. Questi possono alterare l'equilibrio dell'espressione genica, portando a un'alterazione della secrezione insulinica e all'insulino-resistenza nei pazienti diabetici.

In vitro, molti studi hanno confermato il legame tra ERKs e iperglicemia (22, 23). Inoltre Ishiki e coll. hanno scoperto che nelle cellule mesangiali il troglitazone, un agente insulino-sensibilizzante, riporta alla normalità l'attività della PKC-MAPK indotta dall'i-

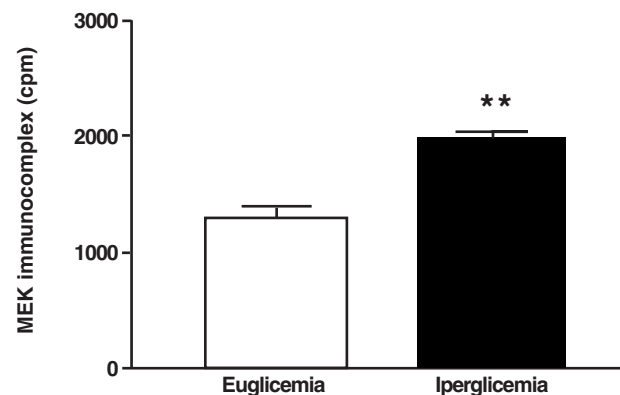


Fig. 4. Effetto sull'attività della MEK chinasi dell'iperglicemia acuta indotta nei monociti umani *in vivo*. L'attività della MEK è stata studiata utilizzando gli immunoprecipitati anti-MEK come descritto nel paragrafo *Metodi*. I valori basali in condizioni di euglicemia sono rappresentati da barre vuote mentre quelli in iperglicemia sono rappresentati da barre piene. I dati sono espressi come medie ± SE. ** $p < 0,01$.

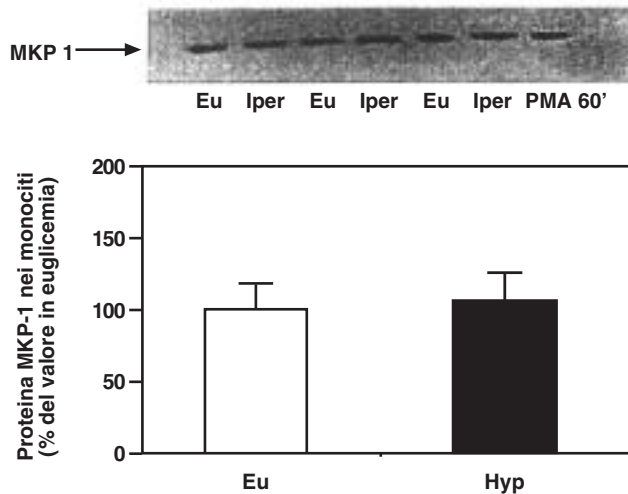


Fig. 5. Effetto dell'iperglicemia acuta indotta sull'espressione della MKP-1 fosfatasi *in vivo*. Il riquadro superiore mostra immunoblot rappresentativi della MKP-1 fosfatasi nei lisati dei monociti prelevati da soggetti normali in euglicemia (Eu) e in iperglicemia (Iper). Un campione di monociti umani è stato inoltre pretrattato per 1 ora con 1 μ M di PMA. Il riquadro inferiore riporta le analisi densitometriche dell'espressione della MKP-1. I dati (media \pm SE, n=5) sono espressi in relazione allo stato euglicemico, assegnando un valore del 100% alla media di controllo. Euglicemia (barre bianche) a confronto con iperglicemia (barre nere).

perglicemia e nei ratti diabetici previene le disfunzioni glomerulari senza modificare i livelli di glucosio nel sangue ma inibendo l'attivazione la via delle PKC-ERKs (24).

Per quel che sappiamo, questo è il primo studio a dimostrare come l'iperglicemia acuta induca un aumento dell'attività delle ERKs, *in vivo*, nell'uomo. Inoltre, il riscontro dell'aumento dell'attività e della fosforilazione delle ERKs durante l'iperglicemia è ragionevolmente spiegata dal parallelo aumento dell'attività della MEK come determinato dall'analisi anticorpale. La MEK è una serin/treonin-tirosin kinase ed è il diretto attivatore a monte delle ERKs (21). Dunque l'iperglicemia ha la particolarità di aumentare l'attività delle ERKs attraverso la stimolazione della MEK. Recentemente, abbiamo scoperto che l'iperglicemia induce la traslocazione dell'isoforma β 2 della PKC dal citosol alla membrana nei monociti umani (3). Questi risultati suggeriscono che l'attivazione glucosio indotta della via PKC/MEK/ERKs potrebbe essere il mediatore putativo attraverso il quale il glucosio causa effetti tossici in condizioni patologiche. Una upregulation, in particolare nei monociti umani, di questa via può portare a un aumento dell'espressione di molecole di adesione cellulare e a incremen-

to del processo monocitario di cattura-legame alle cellule endoteliali. È stato riscontrato, infatti, che in sieri prelevati da pazienti diabetici con iperglicemia vi è una maggiore capacità di adesione monocitaria in confronto ai sieri di pazienti sani (25).

Un altro obiettivo del nostro studio è stato quello di studiare il ruolo della MKP-1 nella regolazione delle ERKs durante l'induzione di un'iperglicemia acuta nei monociti umani. La MKP-1 è una fosfotirosina e una fosfotreonina fosfatasi in grado di defosforilare le ERKs e di bloccare la loro trasmissione del segnale (26). I nostri risultati hanno dimostrato che l'espressione della MKP-1 non si modifica nei monociti umani dopo 5 ore di iperglicemia.

La MKP-1 è principalmente regolata a livello trascrizionale: un rapido aumento nella sua espressione è causato da fattori di crescita o agenti che causano uno stress ossidativo e uno shock termico (27). Dunque, una concentrazione fisiologica di insulina ha rapidamente indotto un aumento nell'espressione della MKP-1 (28). Al contrario l'iperglicemia non sembra influenzare, almeno acutamente, la sua espressione. Per concludere, i nostri risultati mostrano che l'attività nei monociti delle ERKs e la loro fosforilazione sono aumentate in maniera significativa da un'iperglicemia acuta indotta *in vivo* in soggetti normali. Queste modifiche indotte da un'elevata concentrazione di glucosio delle ERKs nei monociti potrebbero avere una particolare importanza nel danno vascolare causato dall'iperglicemia e nello sviluppo del processo aterosclerotico. Sarà dunque di rilevante importanza determinare questo segnale di trasduzione intracellulare nei monociti di pazienti con insulino-resistenza.

Bibliografia

1. Porte D Jr, Schwartzw MW: Diabetes complications: why is glucose potentially toxic? *Science* **272**, 669-700, 1996
2. King GL, Kunisaki M, Nishio Y, Inoguchi T, Shiba T, Xia P: Biochemical and molecular mechanism in the development of diabetic vascular complication. *Diabetes* **45**, S105-S108, 1996
3. Ceolotto G, Gallo A, Miola M, Sartori M, Trevisan R, Del Prato S, Semplicini A, Avogaro A: Protein Kinase C activity is acutely regulated by plasma glucose concentration in human monocytes *in vivo*. *Diabetes* **48**, 1316-1322, 1999
4. Koya D, King GL: Protein Kinase C activation and the development of diabetic complication. *Diabetes* **42**, 801-813, 1998
5. Haffner SM: The importance of hyperglycemia in the nonfasting state to the development of cardiovascular disease. *Endocr Rev* **19**, 583-592, 1998

6. Ceriello A: Acute hyperglycemia and oxidative stress generation. *Diabet Med* **14**, Suppl 3, S45-49, 1997
7. Ceriello A, Falletti E, Bortolotti N, Motz E, Cavarape A, Russo A, Gonano F, Bartoli E: Increased circulating intercellular adhesion molecule-1 in type II diabetic patients: the possible role of metabolic control and oxidative stress. *Metabolism* **45**, 498-501, 1996
8. Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Giacomello R, Stel L, Motz E, Pirisi M: Postmeal coagulation activation in diabetes mellitus: the effect of acarbose. *Diabetologia* **39**, 469-473, 1996
9. Hill CS, Treisman R: Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80**, 199-211, 1995
10. Cobb MH, Goldsmith EJ: How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* **270**, 14843-14846, 1995
11. Tomlinson DR: Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complication. *Diabetologia* **42**, 1271-1281, 1999
12. Henada M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Kikkawa R: Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes* **46**, 847-853, 1997
13. Goldfine AB, Simonson DC, Folli F, Patti ME, Khan CR: Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes mellitus *in vivo* and *in vitro* studies. *J Clin Endocrinol Metab* **80** 3311-3320, 1995
14. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, De Fronzo RA, Mandarino LJ: Insulin resistance differentially affects the PI3-kinase and MAP kinase mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* **105**, 311-320, 2000
15. Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Petterman M, Gessl A, Waldhausl W: Modulation by high glucose of adhesion molecule expression in cultured endothelial cells. *Diabetologia* **38**, 1367-1370, 1995
16. Tsao PS, Niebauer J, Buitrago R, Lin PS, Wang BY, Cooke JP, Chen YD, Reaven GM: Interaction of diabetes and hypertension on determinants of endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 947-953, 1998
17. Valledor AF, Xaus J, Comalada M, Soler C, Celada A: Protein kinase C epsilon is required for the induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Immunol* **164**, 29-37, 2000
18. Kuzuya H, Blix PM, Horwitz DL, Steiner DF, Rubenstein AH: Determination of free and total insulin and C-peptide in insulin-treated diabetics. *Diabetes* **26**, 22-29, 1997
19. Kostener G, Molinari E, Pichler P: Evaluation of a new HDL2/HDL3 quantitation method based on precipitation with polyethylene glycol. *Clin Chim Acta* **148**, 139-147, 1985
20. Chang ZL, Beezhold DH: Protein kinase C activation in human monocytes: regulation of PKC isoforms. *Immunology* **80**, 360-366, 1993
21. Robinson MJ, Cobb MH: Mitogen-activated protein kinase pathway. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 180-186, 1997
22. Kang MJ, Wu X, Ly H, Thai K, Scholey JW: Effect of glucose on stress-activated protein kinase activity in mesangial cells and diabetic glomeruli. *Kidney Int* **55**, 2203-2214, 1999
23. Awazu M, Ishikura K, Hida M, Hoshiya M: Mechanisms of mitogen-activated protein kinase activation in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol* **10**, 738-745, 1999
24. Issihiki K, Haneda M, Koya D, Maeda S, Sugimoto T, Kikkawa R: Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin sensitizing action in diabetic rats. *Diabetes* **1022-1032**, 2000

Corrispondenza a: Dott.ssa Alessandra Gallo, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Via Giustiniani 2, 35100 Padova

Pervenuto in Redazione il 15/9/2000 - Accettato per la pubblicazione il 30/10/2000

A questo lavoro è stato attribuito il 2° Premio Nazionale Roche - Giornale Italiano di Diabetologia e Metabolismo "Diabete, obesità e patologie metaboliche: dalla ricerca alla clinica"