



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
Fisiopatologia sperimentale**

**XXII Ciclo**

**Fisiopatologia della Disfunzione Epatica nel Diabete di Tipo 2:  
Nuovi Biomarker di Rischio e/o Patologia**

**Dr. Andrea Coppola**

**A.A. 2009/2010**

**Relatore: Prof. Davide Lauro**

**Coordinatore: Prof. Renato Lauro**

Sommario .....	3
Abstract .....	5
INTRODUZIONE .....	7
<i>Signaling dell'insulina</i> .....	10
<i>HMGB1 come effettore dello stato infiammatorio</i> .....	14
<i>Acidi grassi liberi( free fatty acid-FFA) come collegamento tra insulino resistenza e stato infiammatorio</i> .....	19
<i>HGMB1 come collegamento tra stress iperglicemico e stato infiammatorio</i> .....	20
<i>Stress ossidativo come conseguenza della glucotossicità</i> .....	23
<i>HMGB1 nel Diabete Mellito</i> .....	24
<i>Infiammazione e morte cellulare: rilascio di HMGB1 come conseguenza di apoptosi e necrosi</i> .....	29
SCOPO DELLA TESI .....	31
MATERIALI E METODI .....	32
<i>Colture cellulari</i> .....	32
<i>Immuno fluorescenza</i> .....	33
<i>Rilevazione Reactive Oxygen Spicies(ROS)</i> .....	34
<i>Saggio Apoptosi/Necrosi</i> .....	34
<i>Saggio ELISA(Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay)</i> .....	35
<i>Estrazione del siero umano</i> .....	36
RISULTATI PRELIMINARI .....	37
RISULTATI .....	45
<i>Localizzazione di HMGB1 in risposta ad uno stimolo iperglicemico ed a glucosamina</i> ..	45
<i>Secrezione di HMGB1 in risposta ad uno stimolo iperglicemico ed a glucosamina</i> .....	47
<i>Produzione ROS in Hep wt ed IRKO in risposta ad uno stimolo iperglicemico ed a glucosamina</i> .....	48
<i>Apoptosi e necrosi in Hep wt ed IRKO in risposta ad uno stimolo iperglicemico ed a glucosamina</i> .....	50
<i>Localizzazione di HMGB1 in risposta al trattamento con acido oleico(OA) 0.66 mM, acido palmitico(PA) 0,33mM ed OA+PA</i> .....	51
<i>Secrezione di HMGB1 in risposta in risposta al trattamento con acido oleico(OA) 0.66 mM, acido palmitico(PA) 0,33mM ed OA+PA 1m M</i> .....	54
<i>Produzione ROS in Hep wt ed IRKO al trattamento con acido oleico(OA) 0.66 mM, acido palmitico(PA) 0,33mM ed OA+PA 1m M</i> .....	55

<i>Apoptosi e necrosi in Hep wt ed IRKO in risposta al trattamento con acido oleico(OA) 0.66 mM, acido palmitico(PA) 0,33mM ed OA+PA</i> .....	57
<i>Localizzazione di HMGB1 in risposta al TNF-<math>\alpha</math> per 24 ore</i> .....	58
<i>Secrezione di HMGB1 in risposta al TNF-<math>\alpha</math> 100 ng/mL per 24 ore</i> .....	60
<i>Produzione ROS in Hep wt ed IRKO in seguito al trattamento con al al TNF-<math>\alpha</math> 100 ng/mL per 24 ore</i> .....	61
<i>Saggio apoptosi e necrosi in Hep wt ed IRKO in seguito al trattamento con al TNF-<math>\alpha</math> 100 ng/mLper 24 ore</i> .....	62
<i>Dosaggio di HGMB1 nel siero di pazienti diabetici</i> .....	64
<i>Dosaggio HGMB1 su sieri di pazienti diabetici affetti da steatosi epatica non alcoolica</i> .....	66
DISCUSSIONE.....	<b>Errore. Il segnalibro non è definito.</b>
CONCLUSIONI.....	75
BIBLIOGRAFIA.....	79

## SOMMARIO

La determinazione di nuovi biomarker nel Diabete di tipo 2(DM2) rappresenta una nuova frontiera per lo sviluppo di nuovi farmaci e ulteriori approcci terapeutici;

l'identificazione di biomarker può inoltre avere una grande importanza per la diagnosi precoce e lo sviluppo di terapie mirate ad evitare l'insorgenza del Diabete Mellito di tipo 2.

HMGB1 è una proteina non-istonica associata alla cromatina possiede una duplice funzione a seconda dello stato in cui si trova la cellula: in condizioni basali si trova nel nucleo e favorisce l'interazione di alcuni fattori di trascrizione con il DNA, in condizioni infiammatorie viene secreta nello spazio extracellulare ed esercita le funzioni di una citochina pro-infiammatoria.

Utilizzando come modello cellulare epatociti murini WT ed epatociti IRKO abbiamo effettuato una serie di trattamenti che mimano le condizioni

patologiche che si riscontrano nel DT2: stato iperglicemico (Glucosio 30mM), complicanze associate al DT2 (Glucosamina 7.5 mM), obesità (acido oleico 0.66mM e/o acido palmitico 0.33mM), stato infiammatorio cronico (TNF- $\alpha$  100ng/mL).

Abbiamo dimostrato che, in condizioni di stress infiammatorio (trattamenti con glucosamina, acidi grassi e TNF- $\alpha$ ) nei nostri modelli cellulari si osserva secrezione di HMGB1 che è molto maggiore nelle WT rispetto agli epatociti IRKO. L'esposizione ad iperglicemia non induce secrezione. La funzionalità del recettore dell' insulina è quindi cruciale per la secrezione della HMGB1.

In risposta ai nostri trattamenti, gli epatociti IRKO risultano più esposti alla produzione di ROS e all'apoptosi rispetto agli epatociti WT.

Sono state dosate concentrazioni di HMGB1 nei sieri di pazienti diabetici e pazienti diabetici affetti o meno da steatosi epatica non alcolica in cura presso la Fondazione Policlinico di Tor Vergata: da risultati ottenuti su una coorte di 51 pazienti in terapia.

Risulta una correlazione inversa tra secrezione di HMGB1 e livello di steatosi mentre è presente una correlazione diretta tra livello di steatosi e secrezione di insulina e steatosi e livelli di PCR e Gamma GT anche se queste ultime non raggiungono la significatività statistica.

*Keywords:* HGMB1, infiammazione, secrezione, epatociti, glucosio, glucosamina, acidi grassi, TNF- $\alpha$ , steatosi epatica

## **ABSTRACT**

New biomarker determination in Type 2 Diabetes(T2D) represents a new perspective in the development of new drugs and further therapeutics approaches: their identification can have a great importance for early diagnosis and potentially lead to development of new therapies to avoid the onset of type 2 diabetes

Our study focused on High Mobility Group Box 1(HMGB1), because in our laboratory, by using proteomic techniques, we previously showed that HMGB1 is differently expressed in hepatocytes WT(Hep WT) and in insulin receptor knock out (IRKO) hepatocytes.

HMGB1 is a chromatin-linked non-histonic protein that has a dual function depending on the cellular condition: in the basal condition, HMGB1 is inside the nucleus and helps the interaction of transcriptional factors with DNA, however in an inflammatory condition it is secreted into extracellular space and acts as a pro-inflammatory cytokine.

Using murine Hep WT and Hep IRKO as cellular models we performed some treatments that reproduce Type 2 Diabetes pathological conditions: hyperglycemia (Glucose 30mM), Type 2 Diabetes-related complications (Glucosamine 7.5 mM), obesity (Oleic acid 0.66mM and/or Palmitic acid 0.33 mM), chronic inflammatory state (TNF- $\alpha$  100ng/mL).

In our models we showed that HMGB1 is secreted under the inflammatory stress condition; however this secretion is much higher in Hep WT than Hep IRKO.

Treatment with Glucose does not induce secretion of HMGB1: our data support the hypothetical importance of insulin receptor functionality.

Under our experimental conditions, Hep IRKO produce more Reactive Oxygen Species(ROS) than Hep WT do and are also more sensitive to apoptosis.

Our study also focused on HMGB1 dosage in human sera. In particular we concentrated on diabetic patients as well as on diabetics with non alcoholic steatosis. Both these groups patients received treatment at PTV.

We performed our experiments on a 51 patients cohort, and we demonstrated that there is an inverse correlation between HMGB1 secretion and hepatic steatosis. This is despite a direct correlation between hepatic steatosis and all of the following: insulin secretion, CRP and gamma GT

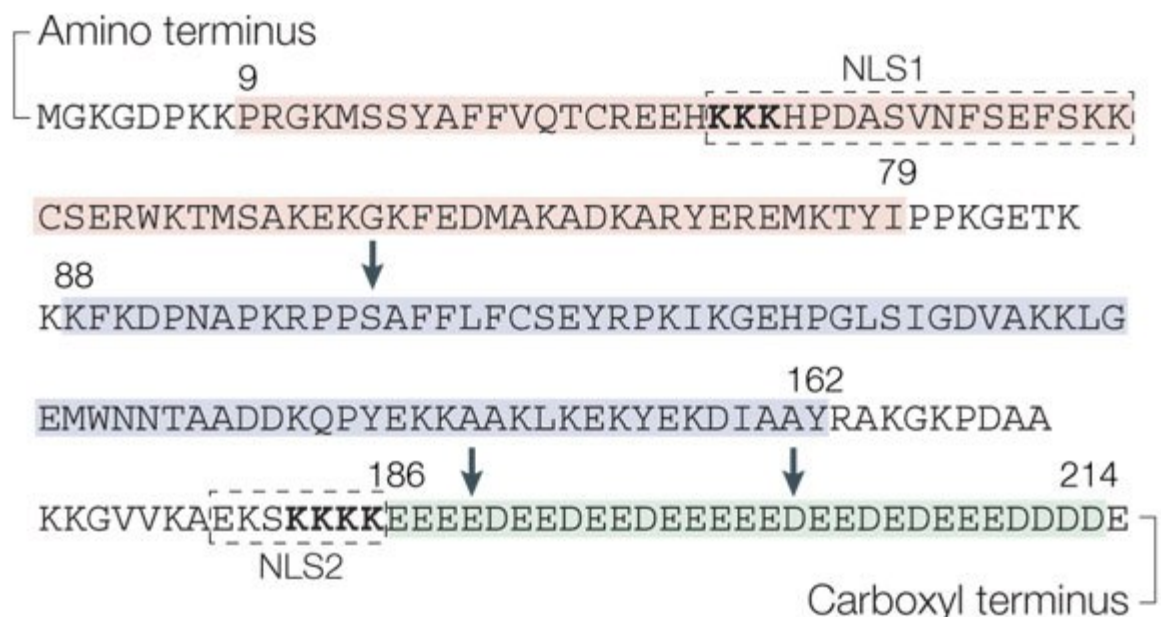
*Keywords:* HGMB1, inflammation, secretion, hepatocytes, glucose, glucosamine, free fatty acid, TNF- $\alpha$ , hepatic steatosis

## INTRODUZIONE

La proteina High Mobility Group Box 1 (HMGB1), precedentemente nota come amfoterina o HMG1, è un fattore architetturale non istonico del DNA; Il suo nome deriva dalla rapida mobilità che la caratterizza in SDS-PAGE. Da un punto di vista biochimico la HMGB1 è una proteina di 216 residui (30 kD) con il 100% di omologia di sequenza aminoacidica tra topo e ratto e più del 98% tra topo e uomo.(Walker et al 1980)( Yotov et al 1992)

Da un punto di vista strutturale, è costituita da tre domini: due domini omologhi che legano il DNA, chiamati “Box A” e “Box B” ed un dominio C terminale carico negativamente (figural); è una proteina estremamente abbondante (è stato calcolato circa un milione di proteine per cellula (Bianchi et al, 2004) ed è distribuita in tutti i tessuti dei mammiferi.

Esistono proteine HMGB1-simili anche in lieviti, batteri e piante (Bianchi et al 1994)(Stemmer et al 1997)(Wittmeyer et al, 1997).



**Figura 1** : *Struttura primaria della proteina HMGB1:Box A(evidenziata in rosso) Box B (evidenziata in blu) C-tail (evidenziata in verde); evidenziate le sequenze di localizzazione nucleare1 (NLS 1 aa28-44) e 2 (NLS aa 179-185)(vedi testo). (Lotze et Nature Reviews Immunology 2005).*

Come fattore architetturale, HMGB1 lega il solco minore del DNA senza specificità di sequenza ed induce una distorsione (bending) della doppia elica, consentendo l'interazione fisica tra DNA e fattori di trascrizione come p53, NF-κB, proteine contenenti homeobox, recombination activating gene 1/ 2 (RAG1/ 2) e recettori di ormoni steroidei (Bianchi et al 2004). Queste funzioni risultano essenziali per la vita in quanto è stato osservato che topi Knockout per *Hmgb1* muoiono rapidamente dopo la nascita, mostrando caratteristiche fenotipiche che includono la taglia ridotta e assenza di grasso (Calogero et al, 1999). HMGB1 è una proteina che mostra un grande dinamismo: diversi studi hanno evidenziato che l'intero pool cellulare di HMGB1 vaga per il nucleo restando in contatto con il DNA per un tempo molto breve (Scaffidi et al 2002)(Phair et al 2004).

Oltre alla localizzazione nucleare, alcune cellule esprimono HMGB1 anche sulla membrana plasmatica coinvolgendola in processi quali la chemiotassi cellulare del muscolo liscio e la metastasi della cellula tumorale (Tainiguchi et al 2000)(Degryes et al 2001). Una caratteristica di questa proteina è il fatto che venga rilasciata nel mezzo extracellulare secondo differenti modalità: si osserva infatti una secrezione passiva nel mezzo extracellulare di cellule necrotiche e secrezione attiva da cellule del sistema immunitario (Scaffidi et al 2002)(Gardella et al 2002) al contrario l'evento apoptotico non induce rilascio di HMGB1.

La traslocazione tra il nucleo ed il citoplasma è strettamente controllata da due sequenze di localizzazione nucleare (NLS): NLS1 è la regione compresa tra gli aa 28-44 e NLS2 che si trova tra gli aa 180-185: quando residui di serina di



queste sequenze sono fosforilati, la frazione nucleare di HMGB1 trasloca dal nucleo al citoplasma (Youn et al 2006) studi effettuati su cellule di carcinomi coloretali dimostrano che questa fosforilazione coinvolge i residui di serina in posizione 35, 39 e 42 della sequenza NLS1 (Kang et al 2009) Questa fosforilazione risulta a carico della proteina chinasi C (protein kinase C, PKC). Nei monociti, inoltre, è stato riportato che l'acetilazione dei residui di lisina di NLS inibisce l'entrata nel nucleo favorendo il trasporto attivo dal nucleo allo spazio extracellulare mediante speciali lisosomi secretori. L'acetilazione di HMGB1 risulta a carico della CREB-Binding Protein (CBP), di p300 e p300/CBP associated factor (PCAF) (Gardella et al 2002, Bonaldi et al 2003).

Altri effetti importanti si notano a livello polmonare, nervoso, e a livello delle articolazioni (pazienti affetti da artrite reumatoide possiedono elevati livelli di HMGB1 nel liquido sinoviale (Taniguchi et al 2003)( Kokkola et al 2002).

HMGB1 è in grado di mediare anche i processi di crescita e differenziamento cellulare come nel caso delle cellule ematopoietiche (Wang, et al. 1996). L'interleuchina 4 (IL 4) legandosi al suo recettore regola lo stato di fosforilazione di HMGB1 utilizzando come mediatori dapprima IRS1 che attiva la proteina PI3chinasi, e successivamente la proteina p70S6 chinasi. La fosforilazione di HMGB1 in questi esperimenti è sensibile: 1) alla rapamicina, inibitore della sintesi proteica attraverso il legame ad mTOR (mammalian target of rapamicyn), 2) alla wortmannina noto inibitore della proteina PI3 chinasi, 3) alla deplezione della proteina IRS1 (Wang D, et al. 1997).

Tra i fattori di trascrizione che interagiscono con HMGB1 di particolare interesse è il fattore di trascrizione SREBP1. Infatti, HMGB1 promuove la dimerizzazione del fattore di trascrizione aumentandone la capacità di legame alle sequenze SRE. Tale interazione ha bisogno però di ulteriori approfondimenti per comprendere il ruolo di HMGB1 nel meccanismo di regolazione della lipogenesi e dell'adiposità (Najima, et al. 2005). E' stato

osservato che topi mancanti di Hmgb1 nascono vivi ma dopo 24 ore muoiono per ipoglicemia (Calogero, et al. 1999). Questi animali sopravvivono per parecchi giorni dopo infusione di glucosio parenterale. Si è osservato inoltre che tali topi mancano completamente del tessuto adiposo, questo tipo di lipodistrofia potrebbe essere correlato all'interazione con SREBP; infatti SREBP è responsabile di un altro tipo di lipodistrofia causata dalla mancanza della lamina A/C (Lloyd DJ, et al. 2002).

La proteina HMGB1 appartiene ad una famiglia di proteine dette High Mobility Group proteins che possiedono una struttura simile, in particolare, oltre ad HMGB1, membro della famiglia delle HMGB(B1, B2, B3), troviamo:

- Proteine HMGA che si lega alle regioni ricche in AT del DNA interagendone con il solco minore.
- Proteine HMGN che si legano nei nucleosomi tra il DNA e l'ottamero di istoni.

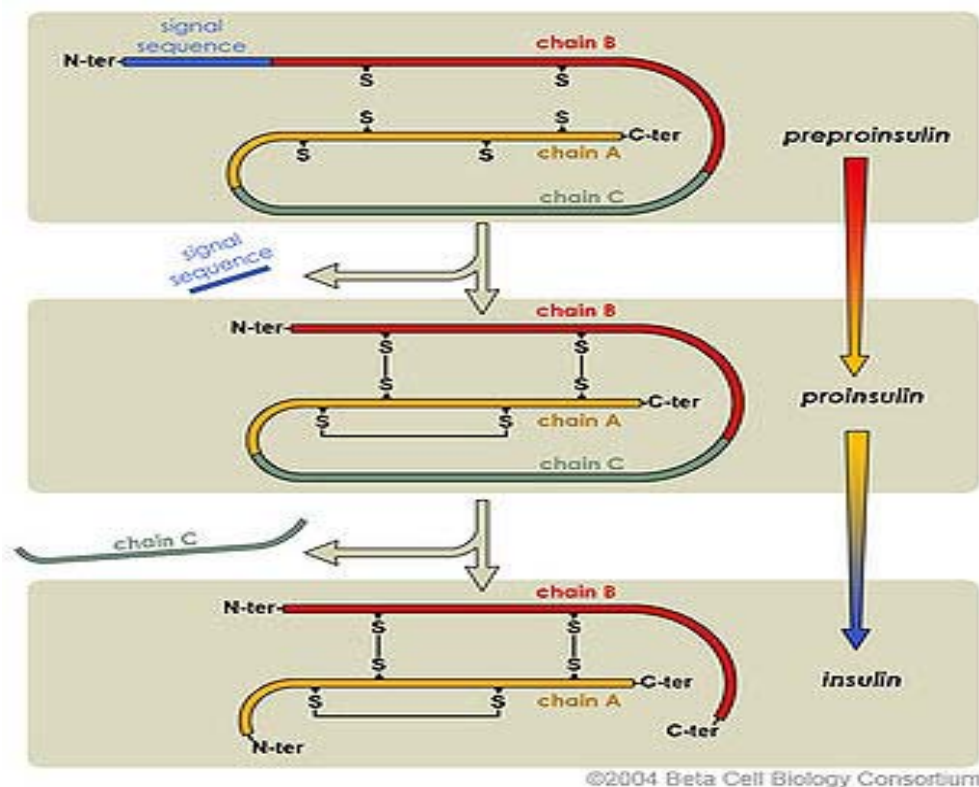
Di particolare interesse è l'azione biologica della proteina HMGA1: è stato infatti scoperto che HMGA1 interagisce con numerosi siti nel promotore del gene del recettore dell' insulina (*INSR*): questo studio ha infatti messo in evidenza come HMGA1 dia conto degli alti livelli di espressione del gene *INSR* nei tessuti che sensibili all'insulina (Brunetti et al 2001). È inoltre stato dimostrato che pazienti affetti da insulino resistenza possiedano bassi livelli di espressione di HMGA1 come risultato di delezioni e/o mutazioni del suo mRNA, in modelli umani e murini (Foti et al 2005).

### **Signaling dell'insulina**

L'insulina è un ormone rilasciato dalle cellule beta del pancreas endocrino in risposta all'aumento dei livelli di sostanze nutritive nel sangue.

Le cellule Beta delle isole di Langerhans sintetizzano l'insulina partendo da un precursore costituito da una singola catena polipeptidica di 110Kda 110 aminoacidi detto *preproinsulina*, che viene trasformata prima in *proinsulina* mediante il taglio proteolitico della sequenza segnale all'N-terminal e poi in *insulina*.

Nella conversione della proinsulina umana in insulina, quattro amminoacidi basici e il restante peptide di connessione, o peptide C, vengono asportati per proteolisi. Questo distacco dà origine alle due catene polipeptidiche (A e B) che costituiscono la molecola di insulina, la quale contiene un ponte disolfuro all'interno di una delle due subunità (catena A) e due ponti disolfuro che uniscono le due subunità (Figura 2).



**Figura 2** Processo di maturazione dell'insulina: il precursore *preproinsulina* subisce un taglio proteolitico e matura in *proinsulina*; il successivo taglio del peptide C completa il processo di maturazione (Beta cell Biology Consortium 2004).

L'insulina favorisce l'assorbimento del glucosio, degli acidi grassi e degli amminoacidi nel tessuto adiposo, nel muscolo e nel fegato promuovendo l'accumulo di queste molecole sotto forma, rispettivamente, di glicogeno, lipidi e proteine.

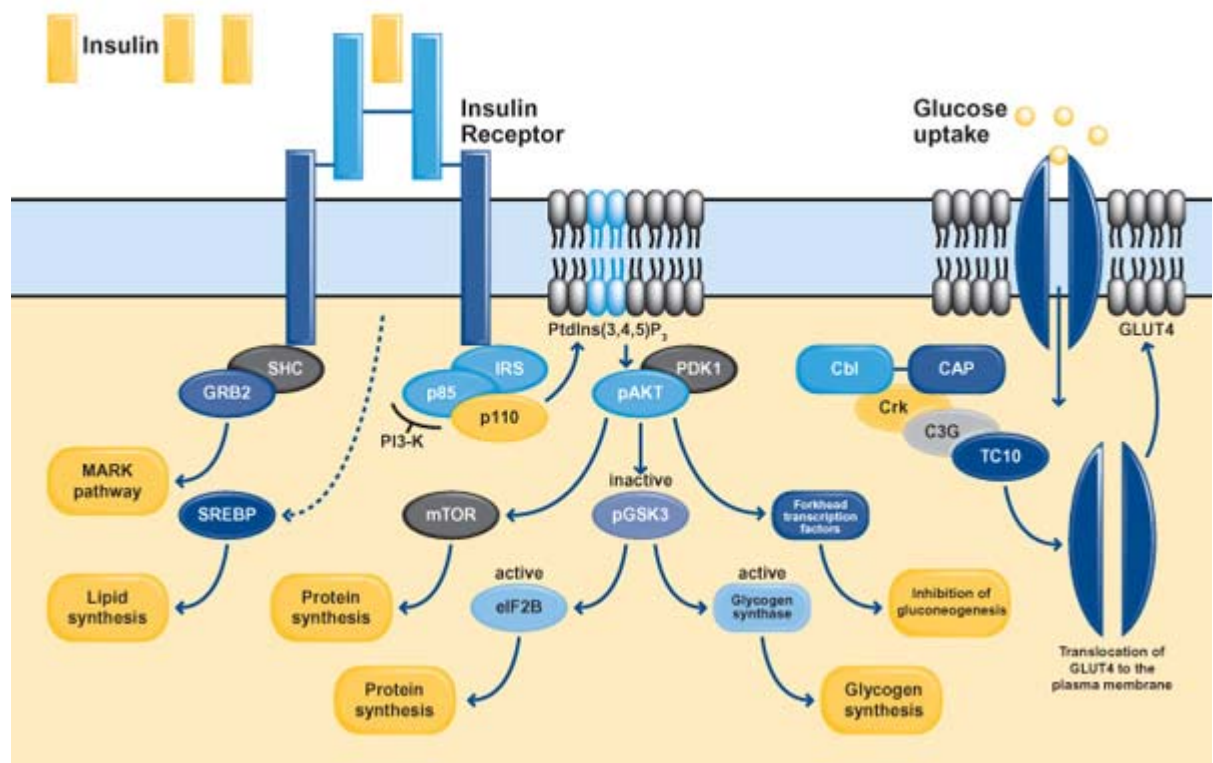
L'azione biologica dell'insulina inizia con il legame al suo recettore, una proteina con attività autocatalitica composta da due subunità transmembrinarie e due sub unità extracellulari tenuti insieme da ponti disolfuro: il legame con l'insulina induce un cambiamento conformazionale che provoca autofosforilazione di una serie di residui di tirosina presenti nella sub unità transmembrinaria (Van Obberghen et al., 2001). L'attivazione del recettore porta alla fosforilazione di residui di tirosina sulle proteine substrato del recettore (insulin receptor substrate- IRS) che interagiscono con la sub unità regolatoria p85 della fosfatidil inositolo 3 chinasi( Phosphatidil inositolo 3 kinase-PI3K); l'azione biologica dell PI3K è il risultato dell'interazione tra sub unità regolatoria p 85 e sub unità catalitica p110 e fosforila il fosfatidil inositolo, 4,5 bifosfato per formare il fosfatidil inositolo 3,4,5 fosfato (PDT3,4,5)P<sub>3</sub> T.

Tra gli effettori chiave del (PDT3,4,5)P<sub>3</sub> c'è AKT che, una volta attivato entra nel citoplasma, fosforila ed attiva la glicogeno sintasi chinasi 3 (glycogen synthase kinase 3-GSK3) un enzima che catalizza la formazione del glicogeno.

L'insulina inibisce, inoltre, la produzione ed il rilascio di glucosio bloccando la gluconeogenesi e la glicogeno lisi (Saltiel and Kahn 2001). L'insulina controlla direttamente l'attività di una serie di enzimi tramite eventi di fosforilazione e de fosforilazione regolando così l'espressione di enzimi epatici (foxo forkhead) coinvolti nella gluconeogenesi (Schmoll et al., 2000)(Barthel *et al* 2001).

Contemporaneamente l'insulina è stimola l'assorbimento di glucosio nelle cellule inducendo la traslocazione del trasportatore di glucosio GLUT4: il

legame con il recettore attiva la fosforilazione di CBL che è associata con la proteina adattatrice CAP-CBL; questo complesso interagisce con la proteina adattatrice Crk che è associata con il fattore della famiglia Rho, C3G, che promuove la traslocazione di GLUT4 nel citoplasma (Saltiel and Kahn 2001).



**Figura 3.** Le tre vie di trasduzione del segnale dell'insulina: l'interazione con il recettore promuove: 1-la sintesi di glicogeno e blocca della gluconeogenesi (via del GSK3), 2- l'assorbimento del glucosio(via del GLUT 4) e la proliferazione cellulare(via delle MAP chinasi).

L'azione dell'insulina provoca l'attivazione del pathway delle chinasi miogeno attivate (miogeno activates kinase –MAP), chinasi serina/treonina che rispondono a stimoli extracellulari e regolano diverse attività cellulari come espressione genica, differenziamento e proliferazione.

### **HMGB1 come effettore dello stato infiammatorio.**

Lo stato infiammatorio viene clinicamente distinto in acuto e cronico:

lo infiammatorio acuto è caratterizzato da una risposta immediata e precoce ad uno stimolo lesivo che comporta la migrazione di leucociti (o cellule bianche del sangue ) dal letto capillare al tessuto interessato dallo stimolo: questo evento è accompagnato a livello endoteliale, dalla produzione di ossido nitrico (NO) che ha come effetto la vasodilatazione e il conseguente rallentamento del flusso sanguigno nella zona colpita dallo stimolo infiammatorio.

Al contrario, lo stato infiammatorio cronico, si caratterizza per la lunga durata della risposta e per la presenza di macrofagi nel sito interessato dallo stimolo: l'infiammazione cronica può essere il risultato di una infiammazione acuta pre-esistente o, più comunemente, essere l'effetto di una serie di patologie che prevedano l'infiltrazione di cellule come macrofagi, linfociti e plasmacellule, la necrosi tissutale e il tentativo di riparazione del tessuto danneggiato, (angiogenesi e fibrosi) (Kumar et al 2006).

Da un punto di vista biochimico lo stato infiammatorio è il risultato dell'espressione e la secrezione di diverse molecole biologicamente attive chiamate citochine che possono avere un effetto autocrino e/o paracrino.

Possono essere prodotte da diversi tessuti in risposta ad uno stimolo di natura infiammatoria e possiamo distinguerle in:

- citochine prodotte dal sistema immunitario: che vengono chiamate linfocine o interleuchine e possono essere distinte in base alla loro struttura, in quattro famiglie: ematopoietine, famiglia dei Tumor Necrosis Factor(TNF), chemochine, interleuchine ed interferoni;(Kindt et al, 2007).

- citochine prodotte dal tessuto adiposo: che vengono chiamate adipocitochine e si distinguono in adiponectina, leptina, resistina, plasminogen attivato inibitor-1 (PAI-1) e TNF- $\alpha$  (Spiegelman et al 2001) e rivestono un ruolo importante nell'insorgenza di patologie quali l'obesità ed il diabete di tipo 2.

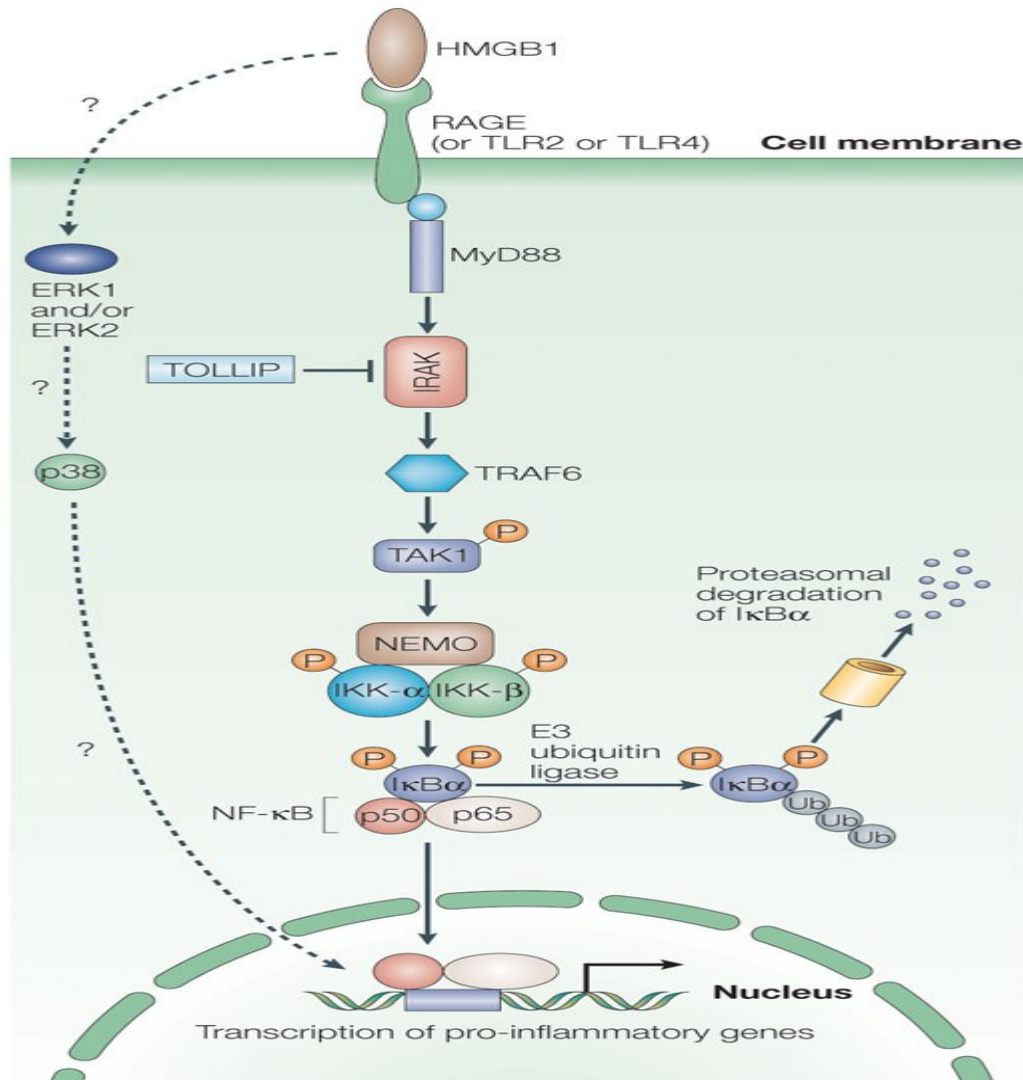
Recenti studi hanno fornito le prove di come la citochina TNF- $\alpha$  rivesta un ruolo importante nell'inizio e nella progressione del cancro (Balkwill 2006) fornendo un importante collegamento tra stato infiammatorio e neoplasie; tale collegamento risulta evidente da studi condotti su modelli animali che mostrano come esista una correlazione tra la sovra espressione di molecole come TNF-alpha, Interleuchina-1(IL-1) ed Interleuchina 6(IL-6)(Wellen et al 2005) e l'instaurarsi dell'insulino resistenza, caratteristica distintiva del diabete di tipo 2.

La secrezione di HMGB1 nello spazio extracellulare risulta controllata da un meccanismo calcio dipendente (Oh et al, 2009) e riveste un ruolo importante poiché è stato dimostrato che monociti e macrofagi secernono HMGB1 in seguito a stimoli infiammatori indotti con lipopolisaccaride (LPS), fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e/o interleuchina-1 (IL-1) (Wang et al 1999).

In seguito al suo rilascio, HMGB1 interagisce con una serie di recettori posti sulla membrana cellulare in particolare con:

- recettori RAGE (Receptor of Advanced Glycation Endproduct) l'interazione di HMGB1 con questo tipo di recettori (Figura 4) induce l'attivazione della trascrizione di NF- $\kappa$ B, che ha come effettore il Tumor Necrosis Factor -Alpha(TNF- $\alpha$ ) il quale, interagendo con il suo recettore attiva la chinasi JNK e IKK- $\beta$  responsabile della fosforilazione

e della inattivazione delle Insulin Receptor Substrate 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2). Questa inattivazione provoca insulina resistenza (Chen et al 2002)

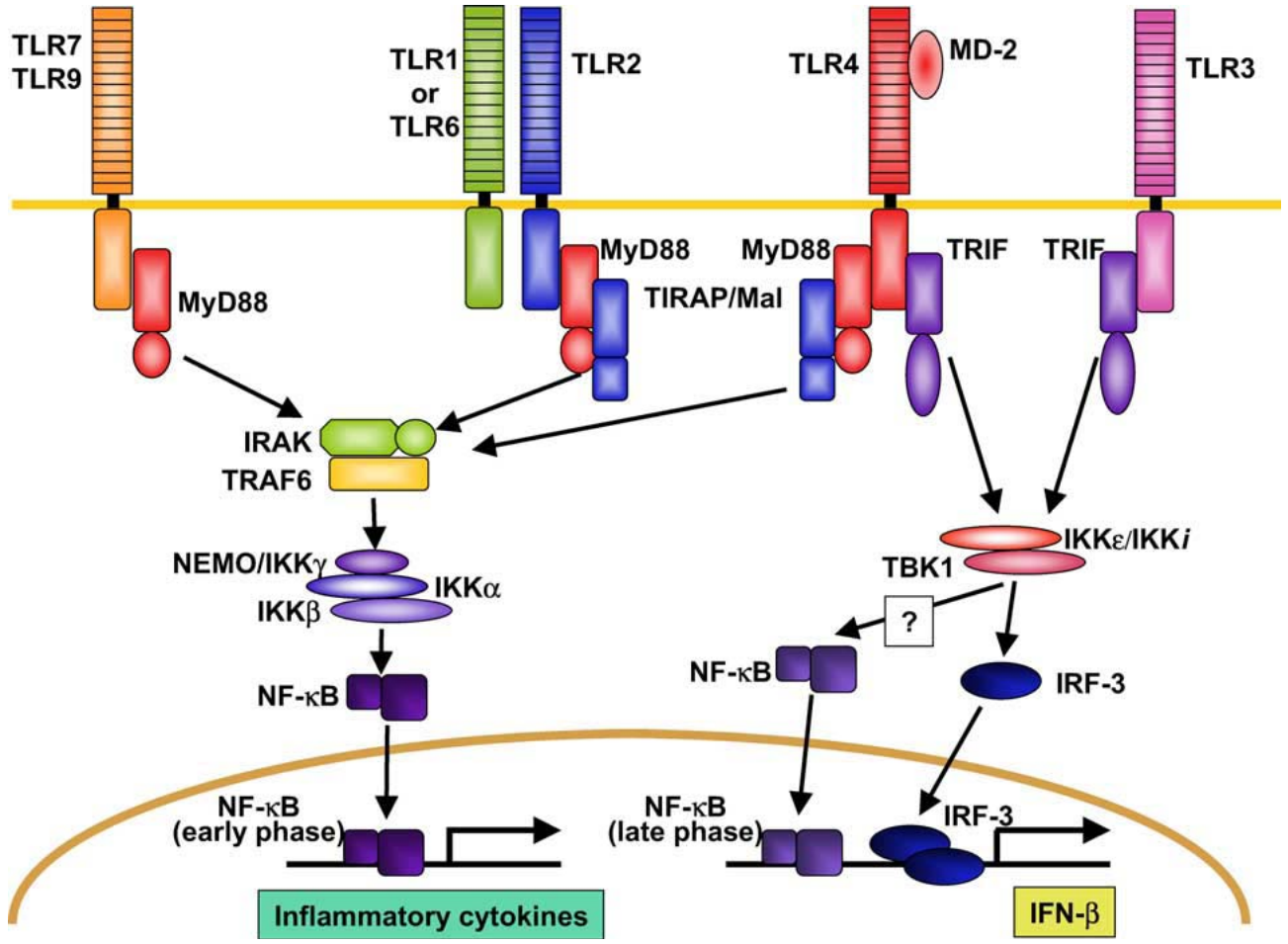


**Figura 4** Pathway di trasduzione del segnale di RAGE in risposta all'interazione del recettore con HMGB1 ed ipotetica via di trasduzione mediata da p38 (Lotze et al 2005)

- recettori TLR-2 e TLR-4 (Toll-Like receptor 2 e 4): (Figura 5) l'interazione con questi recettori porta all'attivazione di chinasi mitogeno attivate(MAPK), che portano al rilascio di citochine proinfiammatorie come tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleuchina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleuchina 1 alpha (IL-



1 $\alpha$ ), interleuchina 6 (IL-6) e la proteina infiammatoria dei macrofagi (Anderson et al 2000)(Degryse et al.2001)( Stern et al 2002).



**Figura 5.** Pathway di trasduzione del segnale dei recettori della famiglia Toll-like: TLR2 e TLR 4 sono i recettori che interagiscono con HMGB1 una volta secreta nel mezzo extracellulare (Takeda et al. TRL signaling pathways, Seminars in Immunology 2004)

In virtù della presenza di un meccanismo di rilascio attivo ed un sistema recettore/signaling è ragionevole considerare HMGB1, non semplicemente come un fattore strutturale di rimodellamento del DNA, ma anche come una molecola di importanza fisiologica. Recenti studi hanno messo in evidenza come il rilascio di HMGB1 dai nuclei dei macrofagi attivati e/o dalle cellule

necrotiche, rivesta un ruolo importante nel contesto del sistema immunitario agendo come coadiuvante immune [Anderson et al 2000] tramite attivazione di cellule dendritiche, macrofagi e cellule T; inoltre il suo ruolo biologico su cellule progenitrici gli attribuisce un ruolo importante nella rigenerazione e nel riparo di tessuti danneggiati [Bianchi et al 2007].

La secrezione di HMGB1 da parte dei macrofagi possiede un ruolo centrale nella progressione dello stadio infiammatorio (Gardella et al 2000; Scaffidi et al 2002) e fino a poco tempo fa si riteneva che questo fosse un evento esclusivamente a carico delle cellule del sistema immunitario.

Tuttavia è stato notato che il rilascio di HMGB1 possa avvenire anche a carico del tessuto endoteliale sottoposto ad uno stimolo di natura infiammatoria (Mullins et al 2004); questo studio ha dimostrato come nelle cellule endoteliali del cordone ombelicale umano (HUVEC), in presenza di uno stimolo di natura infiammatoria, come il lipopolisaccaride (LPS), si assista ad una rilocalizzazione cellulare di HMGB1 che trasloca dal nucleo al citoplasma (Bianchi et al 2004) e successivamente allo spazio extracellulare dove esercita la funzione di una citochina pro-infiammatoria inducendo la secrezione di fattori quali il tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) e il nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) La progressione dello stato infiammatorio non è quindi a carico esclusivamente delle cellule del sistema immunitario.

Data questa particolare rilevanza, HMGB1 ha dimostrato di essere un potenziale target terapeutico in modelli sperimentali per infezioni e disordini infiammatori come sepsi, traumi, cancro ed artrite reumatoide (Gardella et al, 2002, Ulloa et al 2005, Marrak et al 2005). L'azione di HMGB1 è di particolare interesse a livello gastrointestinale poiché incrementa sia la permeabilità della mucosa ileale sia la traslocazione batterica nei nodi linfoidi mesenterici attraverso un meccanismo che è dipendente dalla formazione di ossido nitrico (NO) (Sappington et al 2002) (Yang et al 2005).

### **Acidi grassi liberi ( free fatty acid-FFA) come collegamento tra insulino resistenza e stato infiammatorio.**

La presenza di elevati livelli di acidi grassi liberi nel sangue è la caratteristica principale della condizione di obesità (Chen et al 1987) che, da un punto di vista medico viene definita come uno stato in cui si osserva un eccesso di massa adiposa che può dare origine a complicanze di natura medica: I criteri diagnostici per l'obesità sono:

- Indice di massa corporea (body mass index-BMI) uguale o superiore a  $30 \text{ kg/m}^2$
- Circonferenza vita uguale o superiore a 102 cm nell'uomo e a 88cm nella donna

Da un punto di vista fisiopatologico l'obesità rappresenta uno squilibrio del bilancio energetico che consiste in un aumento dell'energia introdotta con gli alimenti associata ad una diminuzione dell'energia spesa: di conseguenza si osserva un accumulo di lipidi negli adipociti.

La natura infiammatoria dell'obesità è stata messa in luce da studi che dimostrano come esista una infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo (Weisberg et al 2003; Xu et al 2003); in modelli murini, la percentuale di macrofagi infiltrati nei depositi di tessuto adiposo sottocutaneo, mesenterico, perirenale e perigonadale correla positivamente con BMI, percentuale di grasso e dimensioni degli adipociti(Weisberg et al 2003); allo stesso modo, l'infiltrazione dei linfociti nel tessuto adiposo correla con la circonferenza addominale nei pazienti con diabete mellito tipo 2(Kintscher et al 2008)

Lo stato infiammatorio che si riscontra nell'obesità e la conseguente azione di HMGB1 ha come effetto l'insorgenza di uno stato di insulino resistenza causato dalle secrezione endocrina da parte degli adipociti di TNF- $\alpha$ , e IL-6, che sono stimolati da NF $\kappa$ B un fattore di trascrizione attivato da numerosi stimoli infiammatori (oltre che da raggi UV e/o da ROS) i quali portano alla fosforilazione e alla conseguente inattivazione degli inibitori del NF $\kappa$ B (IKB1, IKB2); in modelli murini, l'inibizione farmacologica di NF $\kappa$ B con elevate dosi di salicilati migliora la sensibilità all'insulina revertendo parzialmente lo stato di insulino resistenza (Yuan et al, 2001)

### **HMGB1 come collegamento tra stress iperglicemico e stato infiammatorio.**

Lo stato iperglicemico, caratteristica di numerose patologie, promuove infiammazione attraverso l'induzione di numerose citochine secrete da monociti e/o adipociti; conseguenza principale dello stato iperglicemico è la formazione degli AGEs, l'attivazione della proteina chinasi C (PKC) e l'incremento del pathway delle esosamine (Aronson 2009).

La produzione delle citochine pro-infiammatorie, normale risposta dell'organismo ad un attacco esterno in condizioni fisiologiche (vedi sopra), è caratteristica comune di molti disordini metabolici (obesità, diabete, etc) in condizioni patologiche: la diretta conseguenza dello stato iperglicemico è una condizione è nota come insulino resistenza, condizione nella quale le quantità fisiologiche di insulina producono una risposta biologica ridotta diminuendo l'assorbimento di glucosio da parte di tessuti target, in particolare del fegato e

del muscolo scheletrico, di conseguenza si osserva una elevata concentrazione di glucosio circolante che reagisce chimicamente con il gruppo amminico delle proteine del sangue tramite un processo di glicazione non enzimatico, chiamato reazione di Maillard; (Figura 6) i prodotti finali di questa reazione sono chiamati prodotti di glicazione avanzata (Advance Glycation Endproducts-AGEs)(Wells-Knecht et al 2005).

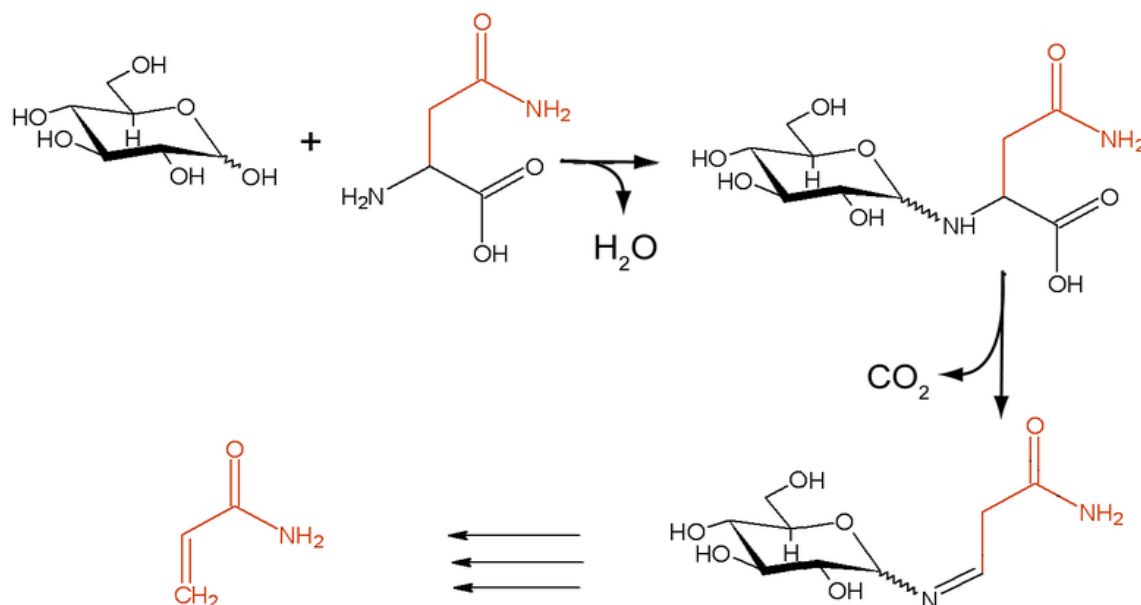


Figura.6. Esempio di reazione di Maillard: reazione tra glucosio ed asparagina con formazione di un prodotto di glicazione avanzata (AGEs).

La formazione degli AGEs è conseguenza dell'interazione del gruppo amminico di molecole biologiche con zuccheri riducenti (glucosio, fruttosio, galattosio e ribosio) ma anche con intermedi del metabolismo glucidico (glucosio-6-fosfato, fruttosio-6-fosfato, ribosio-5-fosfato, deossiribosio-5-fosfato e gliceraldeide) e metaboliti della via dei polioli (fruttosio, fruttosio-6-fosfato) (Dunn et al 1989).

Si parla di insulina resistenza, come conseguenza di uno stato iperglicemico, quando la concentrazione di glucosio nel sangue si assesta tra i 100 e di i 125mg/dL.

In seguito all'instaurarsi dell'insulino-resistenza, la concentrazione di glucosio nel sangue rimane a livelli elevati, condizione definita con il termine di gluco-tossicità: questo causa un rilascio ulteriore di insulina da parte delle cellule beta del pancreas, necessaria ad abbassare i livelli di glucosio inducendo così una condizione di iperinsulinemia.

Lo stato iperinsulinemico ha effetto al livello epatico, provocando un incremento nella produzione di glucosio causato dall'incapacità di sopprimere la gluconeogenesi. Lo stato di iperglicemia cronica instaurato favorisce lo sviluppo del diabete mellito di tipo 2 (DT2), e modifica la capacità secretoria delle cellule beta che a sua volta incrementa la concentrazione di glucosio nel sangue; tale meccanismo porta ad una condizione per la quale le cellule beta non sono più in grado di secernere insulina (LeRoith et al 2002) (Dubois et al 2007).

È stato dimostrato che la condizione di IR è accompagnata dalla sovra espressione di molecole quali il TNF- $\alpha$ , e che elevati livelli di questa molecola contribuiscano all'instaurarsi di tale condizione (Hotamisligil 1999).

La condizione di stress iperglicemico è strettamente connessa con la sovra espressione e la secrezione di HMGB1 in diversi modelli sperimentali (Hagiwara et al 2005) nei quali si osserva, inoltre, come elevate dosi di insulina possano essere usate come trattamento per inibire la secrezione di HMGB1. Elevate concentrazioni di insulina inibiscono l'azione di NF- $\kappa$ B e questa inattivazione si può mettere in relazione con l'inibizione della secrezione di HMGB1 in risposta ad uno stress iperglicemico (Ulloa et al 2005). A supporto di questi dati, un recente lavoro condotto su sieri di pazienti diabetici di tipo 1 ha evidenziato una notevole concentrazione di HMGB1 (Devaraj et al 2009).

### *Stress ossidativo come conseguenza della glucotossicità.*

La produzione di specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species – ROS) come superossidi ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicale idrossile (OH $\cdot$ ), radicali perossidici ( $ROO^{\cdot}$ ) ed ossido nitrico (NO) è un evento comune nel contesto delle reazioni metaboliche; tuttavia a livello cellulare, esistono numerose molecole ad azione antiossidante (che tengono basso il livello dei ROS nelle cellule).

Si parla di stress ossidativo quando l'equilibrio fisiologico tra ossidanti ed anti ossidanti si sposta a favore dei primi, ed in particolare quando si osserva un aumento delle specie reattive dell'ossigeno a carico del mitocondrio che è accompagnato dalla diminuzione della concentrazione di specie anti ossidanti come l'N-acetil-L cisteina (Yeh et al 2001) e le vitamine C ed E (Huang et al 2007).

Nel contesto delle molecole che possiedono proprietà redox, HMGB1 occupa un posto importante poiché può trovarsi sia in ambienti riducenti (nucleo) che in ambienti ossidanti (ambiente extracellulare) (Hoppe G et al 2006). Da un punto di vista strutturale, contiene, due residui di cisteina in posizione 22 (Cys 22) e 44 (Cys 44) nella box A (vedi sopra), ed un residuo di cisteina in posizione 105 (Cys 105) nella box B. I due residui di cisteina nella box A possono formare ponti disolfuro intramolecolari che stabilizzano il folding della proteina e le permettono di accumularsi sotto forma ossidata in condizione di stress ossidativo, mentre all'interno del nucleo si trova prevalentemente in forma ridotta (Sahu et al 2008). Dalla letteratura è noto che gli epatociti in condizioni di ipossia secernono HMGB1 attraverso un meccanismo attivo facilitato dalla produzione dei ROS dipendente da TLR-4. Esperimenti in vivo dimostrano come questa secrezione possa essere ridotta tramite l'utilizzo di molecole anti ossidanti e/o inibitori del rilascio calcio dipendente (Tsong et al 2007); a livello degli epatociti lo stato iperglicemico cronico induce stress ossidativo causando un danno alla funzionalità del fegato (Ling et al 2003).

L'importanza dello stress ossidativo nell' induzione dell'insulino resistenza è stato messo in luce grazie ad uno studio condotto su una linea cellulare adipocitaria (3T3-L1) nella quale tale condizione causa l'inibizione della traslocazione di GLUT-4 sulla membrana plasmatica, impedendo di fatto l'assorbimento del glucosio(Rudich et al 1998)

La condizione di iperglicemia cronica causa la formazione di numerosi AGEs, e l'interazione di questi ultimi con i recettori RAGE induce stress ossidativo con un meccanismo dipendente dall'attivazione di NF-KB (Herold et al 2007) che può causare danni a livello del DNA dei lipidi e/o delle proteine(Vincent et al 2004).

La suscettibilità ai ROS varia da tessuto a tessuto a seconda della quantità di enzimi anti ossidanti espressi: tra le cellule più sensibili ai ROS troviamo le cellule beta del pancreas poiché esprimono una quantità molto bassa di enzimi anti ossidanti (Robertson et al 2006).

Lo stato di stress ossidativo persistente sembra essere la causa molte patologie correlate al diabete di tipo 2 come ad esempio le complicazioni macro e micro vascolari(King et al 2004), la retinopatia diabetica (Kowluru et al 2007) e la neuropatia diabetica (Van Dam et al 2007).

### **HMGB1 nel Diabete Mellito.**

Il Diabete Mellito (DM) è una patologia che comprende una serie di disordini metabolici che condividono il fenotipo iperglicemico; esistono diversi tipi di diabete mellito e sono causati da una complessa interazione di fattori genetici e/o ambientali come pure dallo stile di vita.

Vengono classificati principalmente due tipi di diabete mellito: il diabete mellito di tipo 1 (DT1), risultato dalla distruzione auto immune delle cellule



beta del pancreas all'interno delle quali si riscontra una notevole infiltrazione di macrofagi (Foulis et al 1991), e che porta ad uno stato di insulino-deficienza, ed il diabete mellito di tipo 2 (DT2) caratterizzato da vari gradi di insulino-resistenza, alterata secrezione di insulina ed un incremento della produzione di glucosio a livello epatico. Seguendo una classificazione sulla base della terapia farmacologica somministrata ai pazienti affetti da questa patologia, il DT2 viene comunemente definito come non insulino dipendente (non insulin dependent diabetes mellitus NIDDM) per distinguerlo dal DT1, definito invece insulino dipendente (insulin dependent diabetes mellitus IDDM).

I criteri diagnostici del diabete mellito sono :

- glicemia a digiuno superiore o uguale a 126 mg/dl (o 7 mmol/l);
- glicemia superiore a 200 mg/dl (o 11,1 mmol/l) 2 ore dopo aver assunto per os 75 g di glucosio (*test di tolleranza al glucosio*);
- *glicemia random* maggiore o uguale di 200 mg/dl (o 11,1 mmol/l).

L'insulino resistenza e l'iperinsulinemia sono condizioni necessarie per lo sviluppo del DT2: sebbene esistano controversie a riguardo, diversi studi supportano l'evidenza che il diabete si sviluppi solo se la secrezione insulinica venga in qualche maniera compromessa.

Sia che si parli di DT1 o di DT2, lo stato iperglicemico ed il conseguente stato infiammatorio sono caratteristiche comuni di queste patologie: si osserva inoltre una riduzione della quantità nucleare di HMGB1 dovuta alla sua secrezione in risposta allo stato infiammatorio.

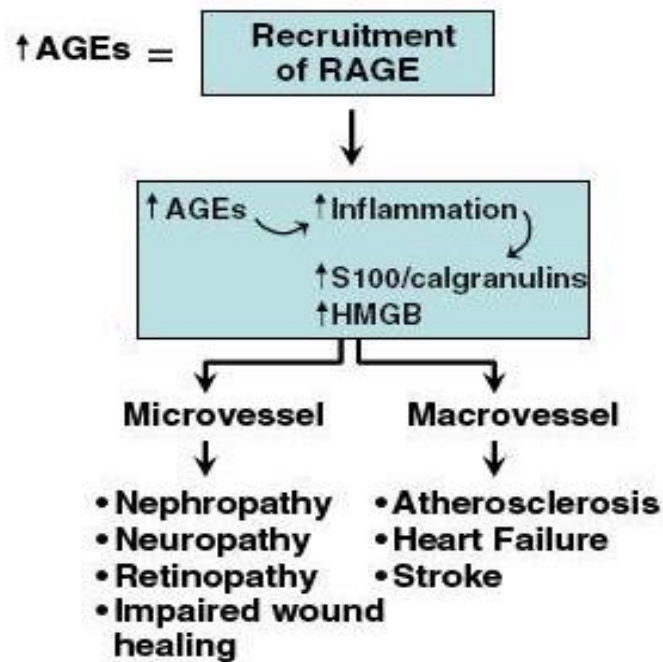
Recentemente è stato infatti osservato che nel siero di pazienti affetti da DT2 esiste un incremento dei livelli di HMGB1 rispetto a soggetti sani (Yan XX et al 2009); questo incremento nel siero dei pazienti diabetici si accompagna con l'aumento di una serie di citochine infiammatorie come TNF- $\alpha$  e IL-6 ed a un decremento del recettore endogeno RAGE (endogenous secretory RAGE-

esRAGE). La presenza di HMGB1 nel siero umano non rappresenta di per se il marker di una qualche patologia: un recente studio ha testato i livelli di HMGB1 nel siero di pazienti sani intorno a 1.65 ng/mL (Fukami et al 2009). Inoltre sembra che i livelli di RAGE solubile (sRAGE), importante mediatore del signaling di HMGB1 (vedi sopra), correlino indipendentemente con i livelli di HMGB1. Ciò indica come esista una interazione tra sRAGE e HMGB1 e come questa interazione possa catturare ed eliminare l' HMGB1 circolante preservando i tessuti da reazioni pro-infiammatorie (Taguchi et al 2000) (Tan et al 2006 ).

### **HMGB1 e glucosamina nelle complicanze associate al DM2.**

Le complicanze dovute al DT2 si dividono in acute e croniche e possono essere a carico di diversi organi e/o sistemi: Sebbene lo stato iperglicemico sia un fattore eziologico importante per lo sviluppo delle complicanze associate al DM2, i meccanismi molecolari che ne sono alla base sono oggetto di discussione, in particolare l'iperglicemia porta alla formazione di AGEs ( vedi sopra) che accelerano il processo di aterosclerosi e promuovono la disfunzione glomerulare ed endoteliale, oltre a ridurre la sintesi di ossido nitrico (Harrison et al 2005)

Lo stato infiammatorio conseguenza dell'interazione tra AGEs e RAGE sembra essere alla base dello sviluppo di molte delle complicanze associate al diabete sia acute che croniche; RAGE è uno dei recettori con cui può interagire HMGB1.

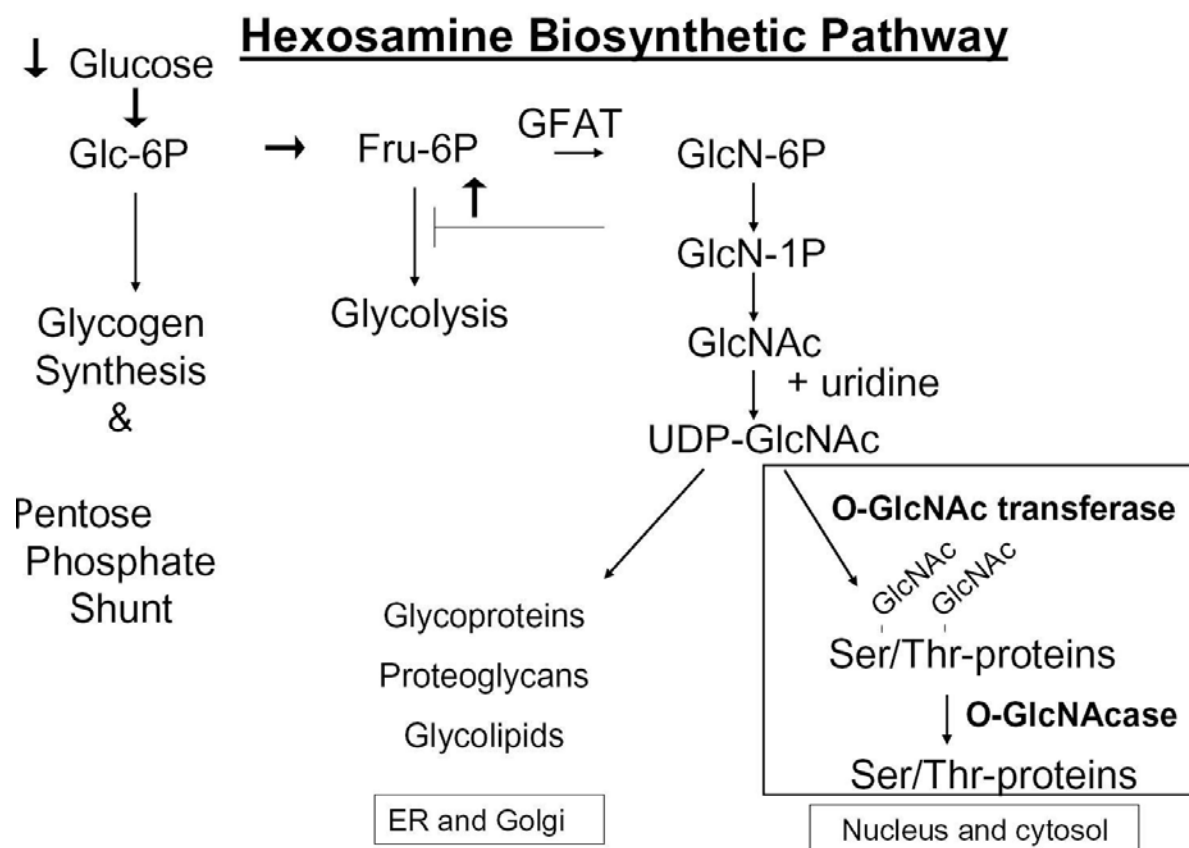


**Figura 7.** L'effetto dell'interazione AGEs-RAGE nelle complicanze associate al diabete; il legame AGEs-RAGE causa stato infiammatorio e la conseguente espressione e secrezione di HMGB1 E DI S100/calgranulina (Yan et al 2009).

L'importanza di questa interazione per lo sviluppo delle patologie associate al diabete ci viene sottolineato da uno studio nel quale topi mancanti del recettore RAGE resi diabetici non sviluppavano le complicanze associate alla patologia diabetica (Paavonen et al 2008) (Figura 7).

Un secondo aspetto delle complicanze associate al diabete sta nell' incremento del flusso attraverso il pathway delle esosamine. Lo stato iperglicemico aumenta la quantità di glucosio, normalmente basso, che entra nel pathway delle esosamine aumentando di conseguenza la concentrazione di fruttosio-6-fosfato. Questo zucchero viene convertito in glucosamina-6-fosfato dall'enzima glucosamina-fruttosio-6-fosfato amino transferasi (glucosamine-fructose-6-phosphate amidotransferase- GFAT); la glucosamina viene poi convertita in N-acetilglucosamina che è trasferita sui residui di serina/tronina di diverse proteine tramite un legame O-linked (Kreppel et al 1997)( Lubas et al 1997)

(Figura 8). Tra le proteine che subiscono questa reazione ci sono IRS-1 e 2 (Patti et al 1999)( Federici et al 2002) ( Vosseller et al 2002); in modelli sperimentali, questa reazione provoca insulino resistenza e può essere la (con)causa dello sviluppo delle complicanze associate al diabete.



**Figura 8.** Il pathway delle esosamine: la maggior parte del glucosio assimilato nella cellula viene smistata alla glicolisi; una parte alla sintasi di glicogeno e pentoso fosfati; il rimanente segue la via delle esosamine che ha come prodotto finale l'UDP-N-acetil glucosamina che può essere usato per la produzione di glicoproteine, proteoglicani e/o glicolipidi oltre ad essere usato come substrato di reazione per la glicosilazione O-linked (Buse MG 2006).

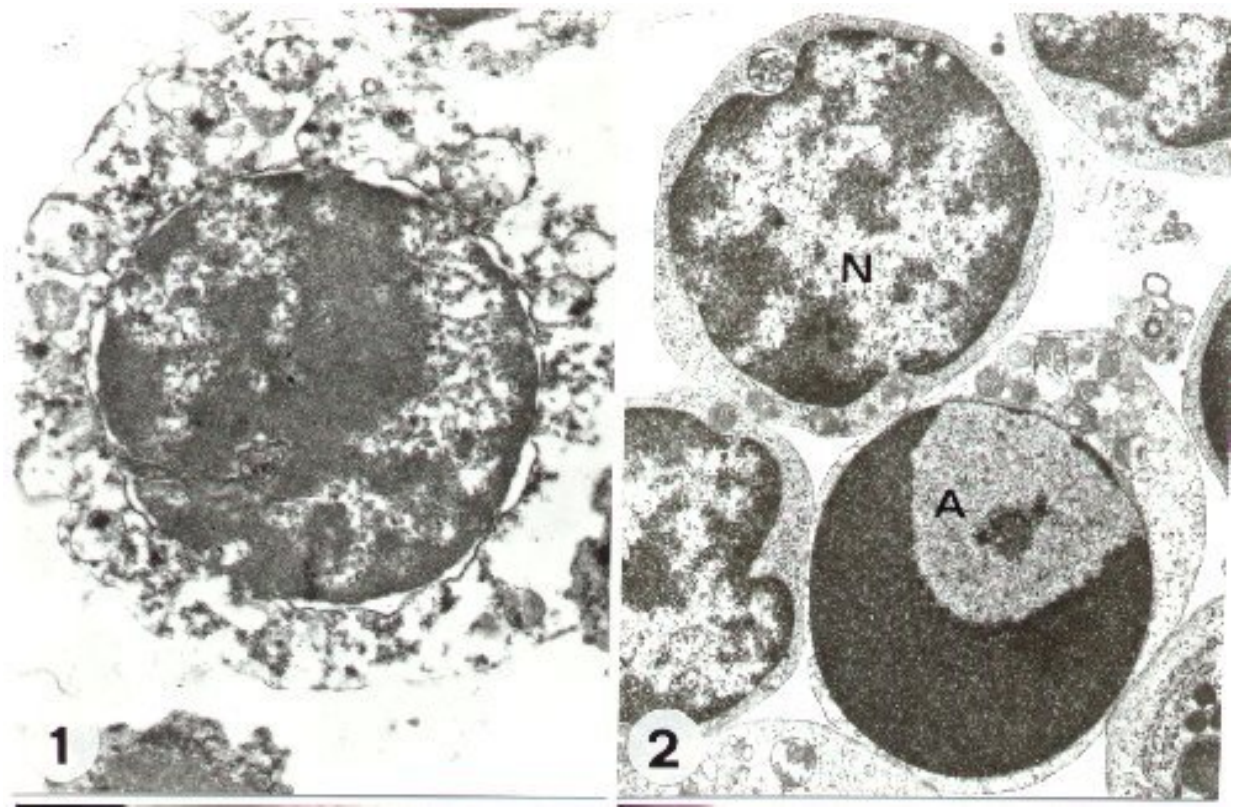
## **Inflammation e morte cellulare: rilascio di HMGB1 come conseguenza di apoptosi e necrosi.**

La morte cellulare è un evento che avviene ubiquitariamente (ed inevitabilmente) senza avere conseguenze sul piano medico. Nel caso delle patologie infiammatorie, si osserva un aumento di questo fenomeno che può essere distinto in apoptosi o necrosi (Figura9).

L'apoptosi è portata avanti in modo ordinato e regolato, richiede consumo di energia e generalmente porta ad un vantaggio durante il ciclo vitale dell'organismo, in particolar modo nella sviluppo; viceversa la necrosi è un evento non programmato e non controllato che non richiede energia. Nell'evento di morte, si osserva rilascio di HMGB1 con diverse modalità che si distinguono in rilascio passivo e rilascio attivo: il rilascio passivo è conseguenza di un danno meccanico alla cellula o ad un evento di necrosi, mentre il rilascio attivo è un evento che avviene in risposta ad uno stimolo di natura infiammatoria dal momento che HMGB1 non possiede sequenze di esportazione nel Golgi (Palumbo et al 2004).

Durante la necrosi, HMGB1 lascia rapidamente la cellula perché il suo legame con la cromatina è più debole rispetto agli istoni riversandosi nel mezzo extracellulare; sebbene alcuni studi abbiano suggerito che non c'è rilascio di HMGB1 durante l'apoptosi, un recente lavoro ha invece dimostrato che esiste una piccola quantità di HMGB1 rilasciata nel mezzo extracellulare (Bell et al 2006).

Il rilascio di HMGB1 nel mezzo extracellulare può essere considerato un collegamento tra evento apoptotico o necrotico e perpetuazione dello stato infiammatorio.



**Figura 9.** Immagini al microscopio elettronico a trasmissione di una cellula necrotica (1) ed apoptotica(2): è visibile nell' immagine1 la distruzione della membrane cellulare e degli organelli (ingrandimento 10,000 X). L'immagine 2 confronta una cellula apoptotica (A) con un necrotica (N), si nota il riarrangiamento della cromatina rispetto alla cellula non apoptotica; le membrane sono intatte rispetto alla situazione di necrosi (Ingrandimento 10,000 X )(Vitale et al Purdue Cytometry CD-ROM Series,volume 4).

## **SCOPO DELLA TESI**

Il rilascio attivo di HMGB1 da parte dei monociti è un fenomeno ben noto in letteratura (Wang et al 1999, Gardella et, al 2002, Bonaldi et al 2003), tuttavia solo recentemente è stato scoperto che può essere effettuato da cellule che non fanno parte del sistema immunitario. Dati ottenuti nel nostro laboratorio dimostrano un'alterazione nella produzione di una serie di proteine, tra cui HMGB1, nella linea di epatociti mancanti del recettore dell'insulina (Insulin Receptor Knock Out-IRKO).

Scopo del lavoro è quello di analizzare il ruolo della proteina HMGB1 nella fisiopatologia della Steatosi Epatica non Alcolica (NAFLD). Nel nostro lavoro sono state utilizzate linee cellulari epatiche di derivazione murina (IRKO e WT) in cui è stata analizzata l'espressione di HMGB1 in risposta a differenti insulti e come la stessa correlasse con l'induzione dello stress ossidativo, dell'apoptosi e della necrosi. Inoltre è stata analizzata la correlazione tra i livelli ematici di HMGB1 e la NAFLD in pazienti affetti da DT2.

## **MATERIALI E METODI**

### **Colture cellulari**

Fibroblasti epatocitari murini(Hep) *wild type*(wt) e mancanti del recettore per l'insulina (Inulin Receptor Knock Out-IRKO)sono stati fatti crescere a 33 °C e 5%CO<sub>2</sub> in terreno Mem-Alpha (No.22561, Lot:18563, Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA) complementato con Foetal Bovine serum 4% (FBS)(-No 1027-016 Lot:4161260K Gibco BRL Gaithersburg MD, USA) PenStrep 1%(No:15140, Lot:584873 10000U/mL Penicellina+10000 µg/ mL Streptomicina Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA), L-glutammina 1mM (No:25030, Lot: 409772 Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA), Dexametasone (1α-Fluoro-16α-Metilprednisolone) 200nM(No:D-4902 Lot:81K1105 Sigma-Aldrich, St.Louis MO-USA).

La linea cellulare IRKO ci è stata donata dal Prof. Domenico Accili (National Institute of Health-NIH- Bethesda MD, USA) ed è stata ottenuta tramite estrazione di epatociti da topi fetali IR<sup>+/+</sup> e IR<sup>-/-</sup> tra il 18° e il 21° giorno di gestazione e trasformazione con virus mutante SV40 come descritto precedentemente (Accili et al 1998).

L'induzione al fenotipo differenziato è avvenuta mediante incubazione dei fibroblasti epatocitari wt ed IRKO al 70% di confluenza, a 40°C e 5%CO<sub>2</sub> in per 4 ore (91): una volta differenziate le cellule sono state mantenute a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Per gli esperimenti che prevedevano il saggio ELISA (vedi dopo) le cellule sono state fatte differenziare e successivamente trattate in terreno Mem Alpha



senza rosso fenolo (No:41061-029, Lot:611495 Gibco BRL Gaithersburg MD, USA) complimentato come sopra ma in assenza di L-glutamina in quanto già presente nel mezzo.

### **Immuno fluorescenza**

Gli esperimenti di immunofluorescenza sono stati eseguiti facendo crescere e differenziando gli epatociti wt ed IRKO su Lab-Tek Chamber slide -8 wells- (No: 177402, Lot:647242 Nunc, Rochester, NY USA); le cellule sono state fissate in paraformaldeide (No:P-6148 Lot121K1259 Sigma-Aldrich, St.Louis MO-USA) 4% con PBS pH 7.4 al buio per 20 minuti e permeabilizzate con metanolo (No:M-3641 Sigma-Aldrich, St.Louis MO-USA) 50% con H<sub>2</sub>O bi-distillata a -20°C per 5 minuti.

Il blocco è stato effettuato incubando a temperatura ambiente con Tris-Glicina pH 7.5 più 10%FBS; soluzione ottenuta sciogliendo 30 gr di Trizma Base( No:T-0-6066 Lot:108K54041 Sigma-Aldrich, St.Louis MO-USA) e 144 gr di Glicina (No: G-8898 Lot: 078K00971 Sigma-Aldrich, St.Louis MO-USA) in 1 litro di H<sub>2</sub>O bi-distillata e portata a pH 7.4 con HCl.

L'incubazione con anticorpo primario viene diluito con PBS-Tween 0,05% e albumina di siero bovino 2%(bovine serum albumin -BSA- No:A8022 Lot:018K0672 Sigma-Aldrich, St.Louis MO-USA) è avvenuta overnight a +4°C in agitazione.

L'incubazione con anticorpo secondario coniugato con Alexafluor 488 (Molecular Probes, Eugene OR, USA) diluito 1/1000 con PBS-Tween 0,05% e albumina di siero bovino 2%(bovine serum albumin -BSA- No:A8022 Lot:018K0672 Sigma-Aldrich, St.Louis MO-USA) è avvenuta per 45' a temperatura ambiente, al termine della quale si aggiunge Hoechst 33342 ( No:

H3570, Lot:40801A Molecular Probes, Eugene OR, USA) 1µL per ogni 500 µL di buffer.

Dopo rapidi lavaggi in PBS, si è montato il vetrino copri oggetto con glicerolo/PBS 3:1 e si è lasciato asciugare il vetrino per 24 ore a -20 °C.

La rivelazione della fluorescenza è avvenuta utilizzando il microscopio a fluorescenza confocale Nikon Eclipse C1 (Nikon Corporation Chiyoda-ku, Tokyo, Japan) e l'acquisizione è avvenuta usando l'applicativo EZC-1.

### **Rilevazione Reactive Oxygen Species(ROS)**

L'analisi della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species-ROS) è stata eseguita su cellule Hep WT ed IRKO tramite incubazione con la sonda dihidrorodamine 123 (No: D23806 Lot:563656 Molecular Probes, Eugene OR, USA); le cellule sono state staccate dalla piastra con tripsina (No 25300 Lot:545167 Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA) ed incubate con la sonda sciolta nel terreno di crescita Mem-Alpha (No.22561, Lot:18563, Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA) senza FBS ad una concentrazione finale di 50µM per 10 minuti.

La rivelazione dei ROS è avvenuta utilizzando il citofluorimetro FACSCalibur (Becton&Dickinson,-BD- Franklin Lakes, NJ USA); l'acquisizione è avvenuta usando l'applicativo della BD- Cellquest.

### **Saggio Apoptosi/Necrosi**

L'apoptosi e la necrosi cellulare sono state determinate utilizzando l' "Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit" (No:APOAF Sigma-Aldrich, St.Louis MO-

USA) seguendo le istruzioni del produttore; brevemente, cellule Hep wt ed IRKO sono state fatte crescere e differenziate(vedi sopra): dopo i dovuti trattamenti(vedi dopo) sono state staccate con tripsina (No 25300 Lot:545167 Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA), lavate con PBS, risospese con il Binding Buffer 1X (No: B9796 Sigma-Aldrich, St.Louis MO-USA) ed incubate per 10 minuti con 5  $\mu$ L di Annessina marcata con ficoeritrina isotiocianato (FITC)(No: A9210 Sigma-Aldrich, St.Louis MO-USA) e 10  $\mu$ L di Iodurio di Propidio (PI)(No:P2667 Sigma-Aldrich, St.Louis MO-USA); binding buffer 1X, Annessina e Ioduro di propidio sono inclusi nel kit.

La rivelazione è avvenuta utilizzando il citofluorimetro FACSCalibur (Becton&Dickinson,-BD- Franklin Lakes, NJ USA); l'acquisizione è avvenuta usando l'applicativo della BD- Cellquest.

### **Saggio ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

La secrezione di HMGB1 è stata dosata utilizzando il kit ELISA "HMGB1 Elisa Kit II"(No: 326054329 Shino-test Corporation, Kanagawa, Japan) seguendo le istruzioni del produttore; brevemente 10  $\mu$ L di supernatante concentrato con tubi VIVASPIN 20 con cut off pari a 3000MW(No: VS2092 Lot: 08VS2048, Sartorius stedim biotech, Goettingen, Germany) sono stati caricati nei pozzetti della piastra 96 well inclusa nel kit.

Dopo un'incubazione variabile tra 20 e 24 ore in agitazione a 37°C , i campioni sono stati incubati per 2 ore a 25°C con la soluzione *POD-conjugate*(anticorpo monoclonale coniugato con la perossidasi anti-HMGB1) inclusa nel kit.

I campioni sono stati successivamente incubati con *substrate solution* (3,3',5,5'tetrametil-benzindine ed un buffer contenete 0,005mol/L di perossido di idrogeno) per 30 minuti a temperatura ambiente e *stop solution* (0.35mol/L di acido solfidrico): *substrate solution* e *stop solution* sono incluse nel kit.

La lettura della concentrazione di HMGB1 è stata effettuata a 450 nm utilizzando il lettore di piastra Victor 1420 multilabel counter(Wallac-Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

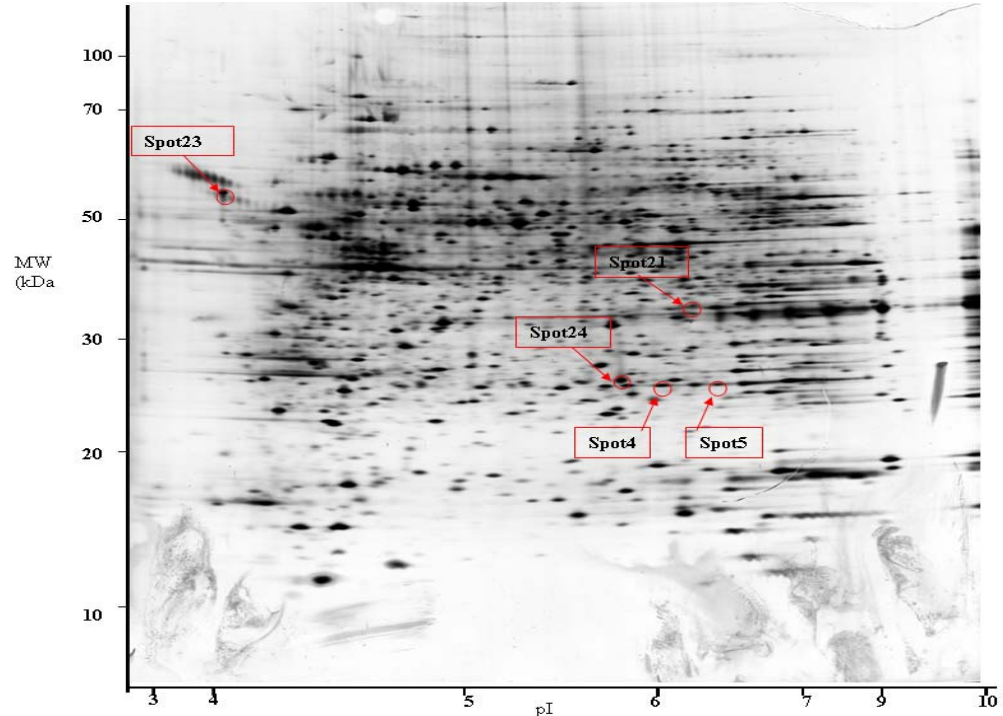
### **Estrazione del siero umano**

Il sangue periferico di pazienti diabetici e soggetti sani di controllo è stato prelevato per via endovenosa utilizzando tubi Vacutimer SSP2-Advance (Becton&Dickinson,-BD- Franklin Lakes, NJ USA-Ref 368968). Per estrarre il siero, 5mL di sangue sono stati centrifugati a 1000 rpm per 15min usando la centrifuga Adams compact II(BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, NJ USA); questa centrifugazione ha prodotto 2mL di siero che è stato poi utilizzato per dosare HMGB1, con saggio ELISA secondo le indicazioni del produttore (vedi sopra).

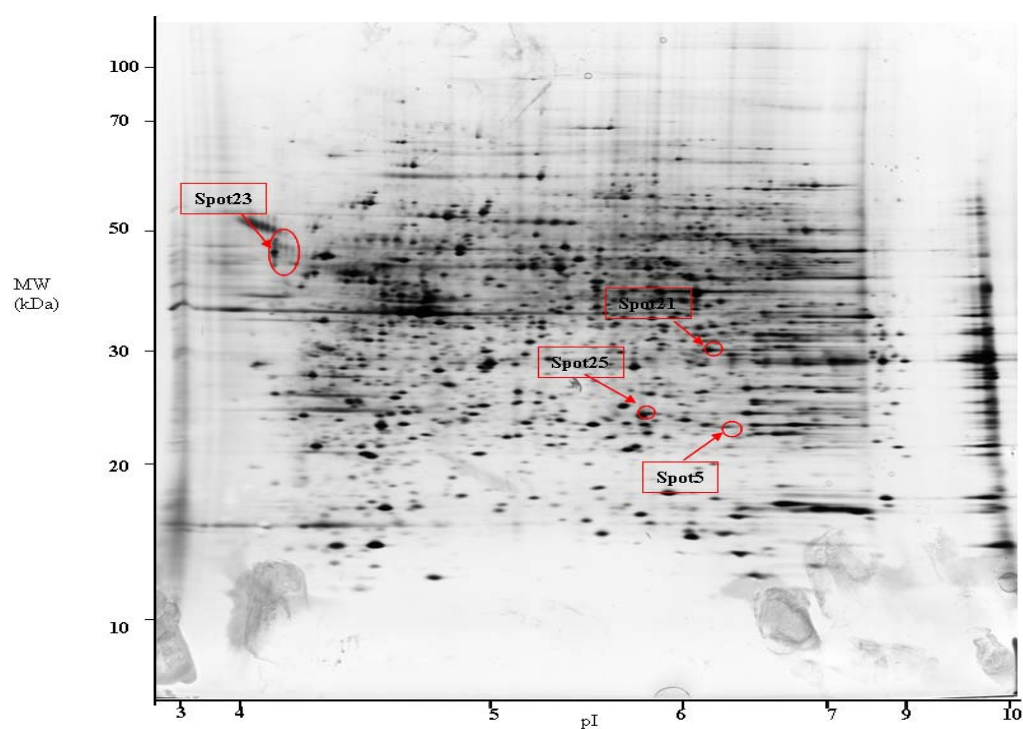
## RISULTATI PROTEOMICA

Nel nostro Laboratorio è stato condotto uno studio comparato fra due pattern proteici ottenuti dalla linea epatica WT e quella mancante del recettore dell'insulina (IRKO). Le mappe proteiche sono state ottenute mediante elettroforesi bidimensionale, mentre il confronto dei due pattern proteici è stato eseguito con l'ausilio del software Image Master Platinum; tale programma ci ha permesso di sovrapporre le immagini dei gel, determinare le differenze di espressione degli spot e validare statisticamente i risultati.

A



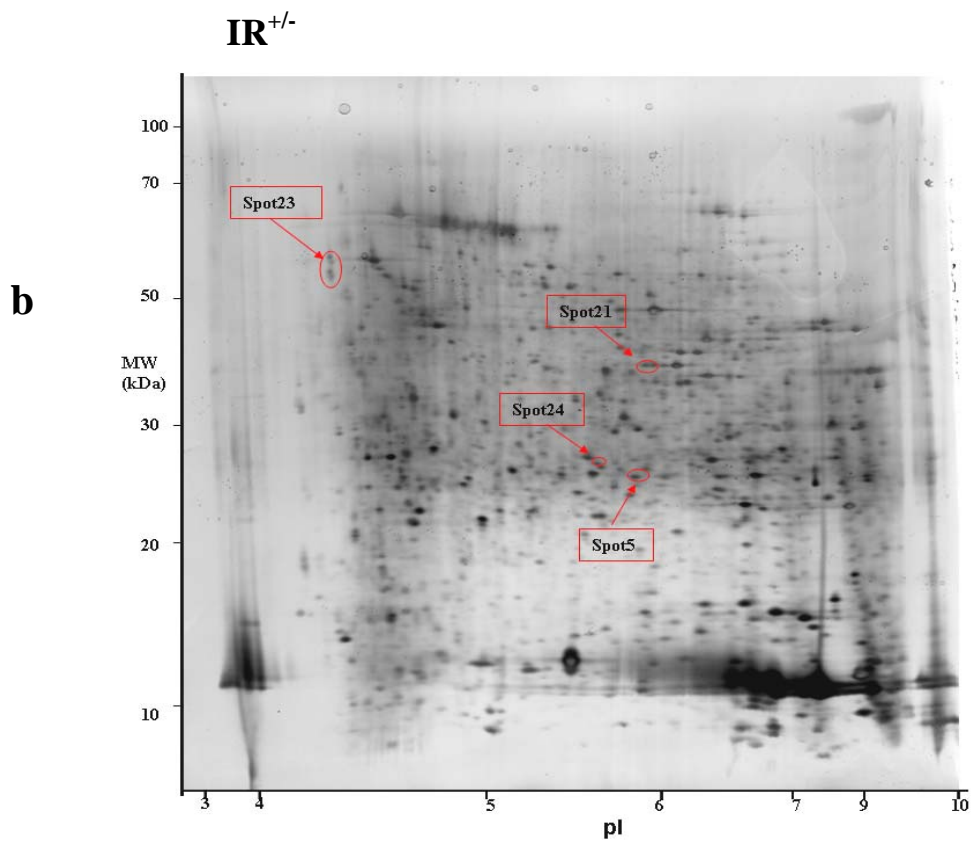
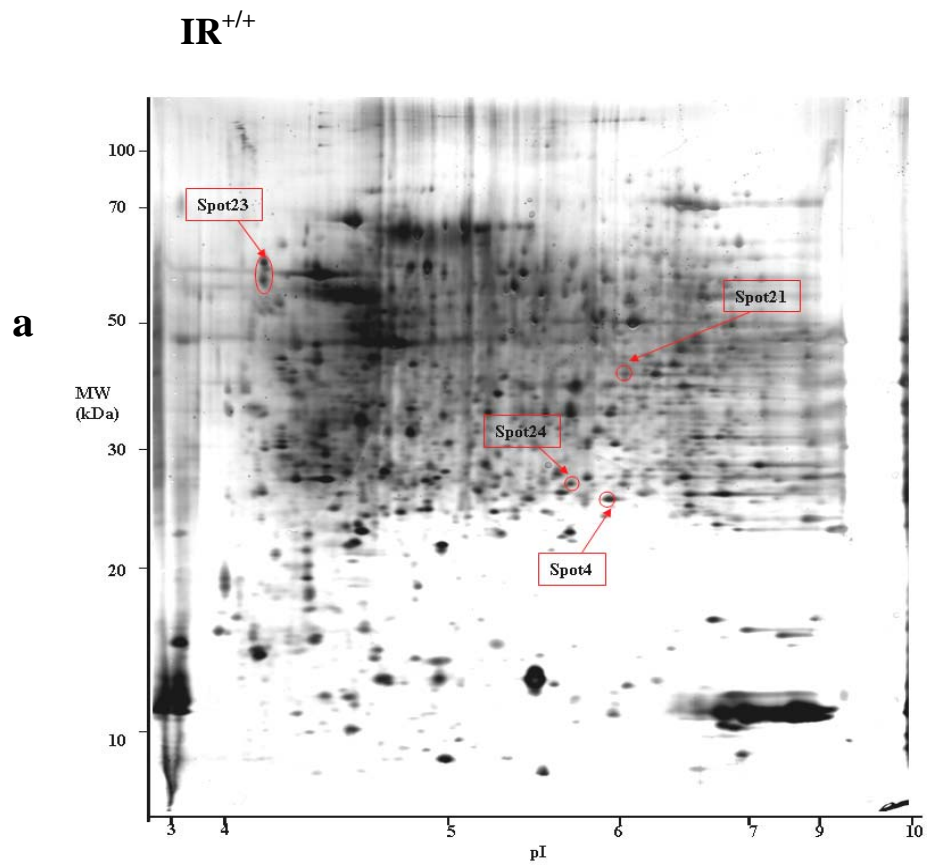
B

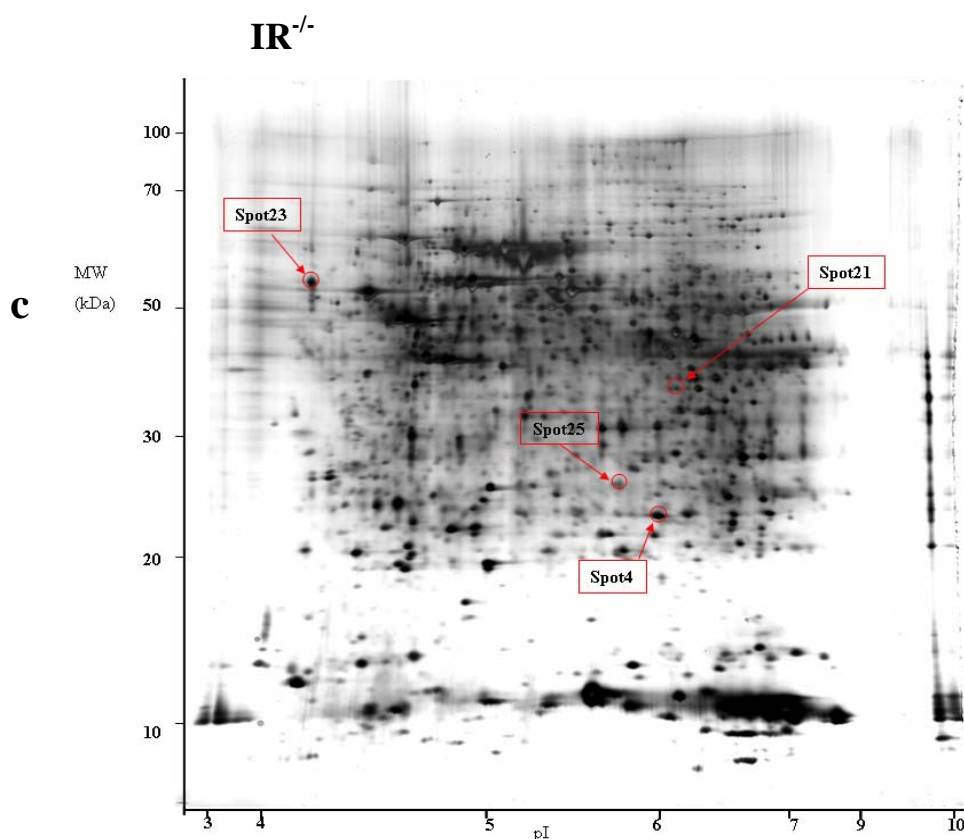


**Figura 10.** Analisi 2D gel: 100  $\mu$ g di proteine estratte da linee cellulari epatiche fetali immortalizzate, ottenute da topi Hep IR<sup>+/+</sup> diff (A) e Hep IR<sup>-/-</sup> diff (B) e differenziate a 39°C. Sono state analizzate in prima dimensione su “strip” pH 3-10 (GE-Amersham) e in seconda dimensione su gel a gradiente 4-20% SDS-PAGE.

Per comprendere se il differente pattern di espressione proteica fosse limitato al sistema cellulare utilizzato, abbiamo eseguito lo stesso tipo di analisi su estratti proteici ottenuti da fegati di animali wild type (WT), Eterozigoti per il

recettore dell'insulina (ET) e Knock-out per il recettore dell'insulina (IRKO)  
(Figura10).



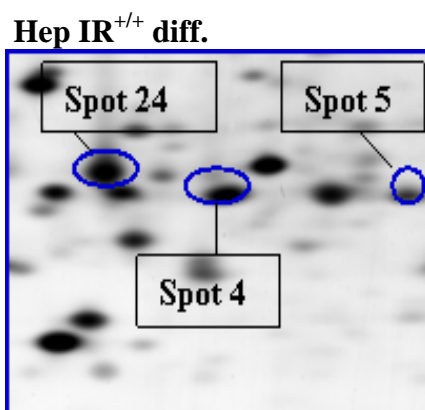


**Figura 11.** Analisi 2D Gel: 100  $\mu$ g di proteine estratte da tessuto epatico di topi IR<sup>+/+</sup> (a) e IR<sup>+/-</sup> (b) e IR<sup>-/-</sup> (c). Sono state analizzate in prima dimensione su “strip” a pH 3-10 (GE-Amersham) e in seconda dimensione su gel a gradiente 4-20% SDS-PAGE.

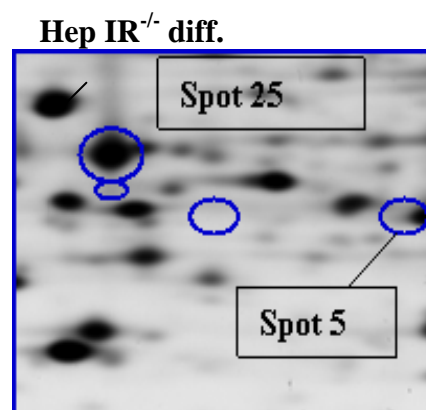
In entrambi i modelli sono state trovate almeno 50 proteine differentemente espresse: nel modello in vivo ne sono state identificate circa 25 mediante spettrometria di massa MALDI TOF (Tabella 1) e al momento 5 di queste proteine hanno lo stesso profilo di espressione nel modello in vitro (Figura 12 e Figura 13), e sono: la peroxiredoxin 6 (PRDX6) spot 4 e spot 5, Calreticulina spot 23, Annessina 1 (ANXA1) spot 21, XRN2 spot 24 e HMGB1 spot 25.

Tra queste proteine abbiamo concentrato la nostra attenzione su HMGB1 in quanto espressa in maniera peculiare nel fenotipo IRKO e non nel WT in entrambi i modelli.

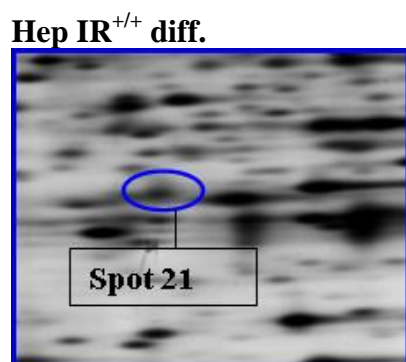




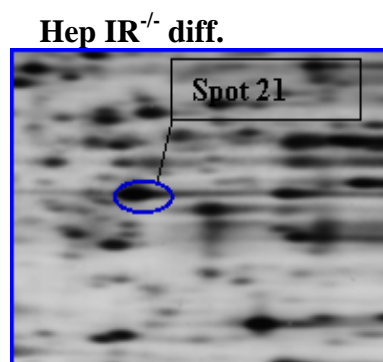
a) spot 4 = PRDX 6 ossidata  
spot 5 = PRDX 6 nativa  
spot 24 = XRN2



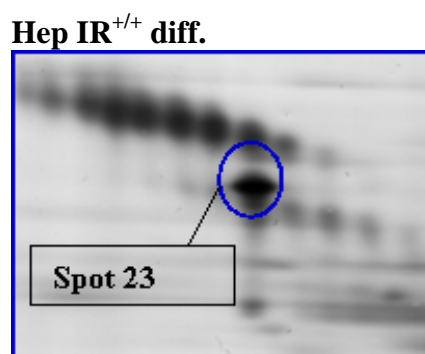
b) spot 5 = PRDX6 nativa  
spot 25 = HMGB1



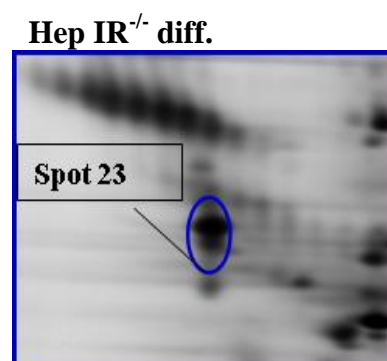
c) spot 21 = ANXA I



d) spot 21 = ANXA I

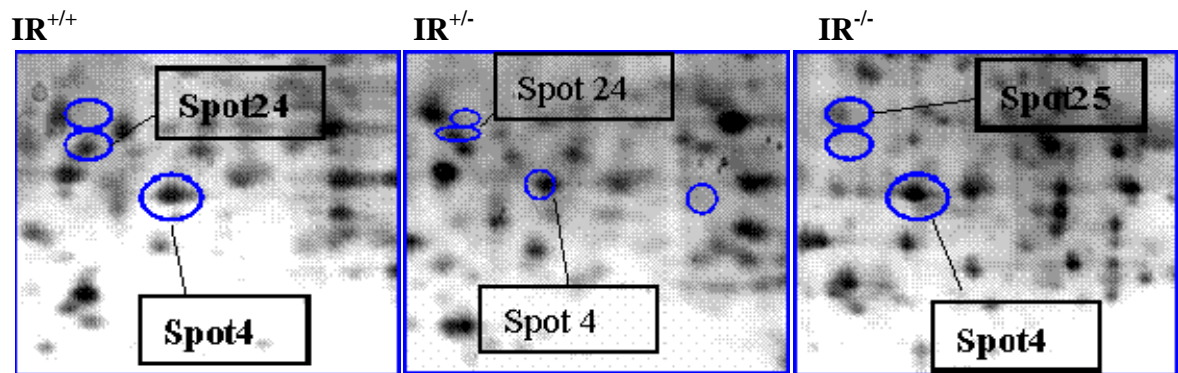


e) spot 23 = Calreticulina

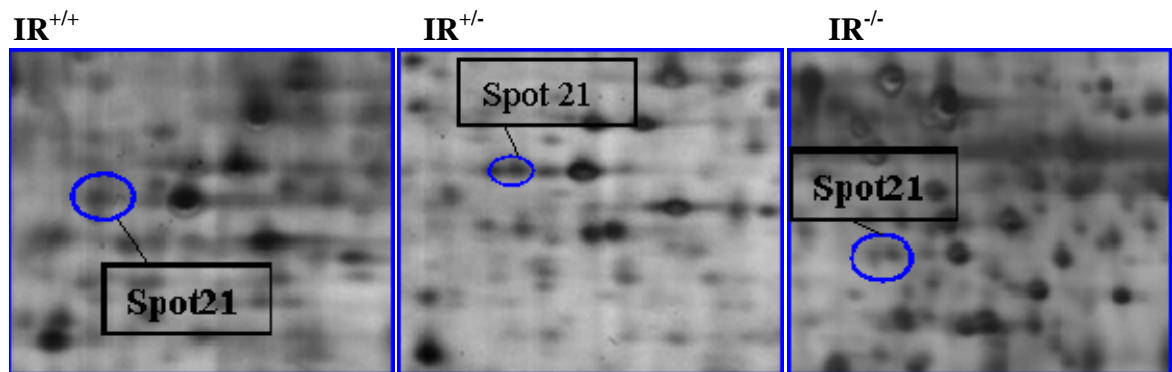


f) spot 23 = Calreticulina

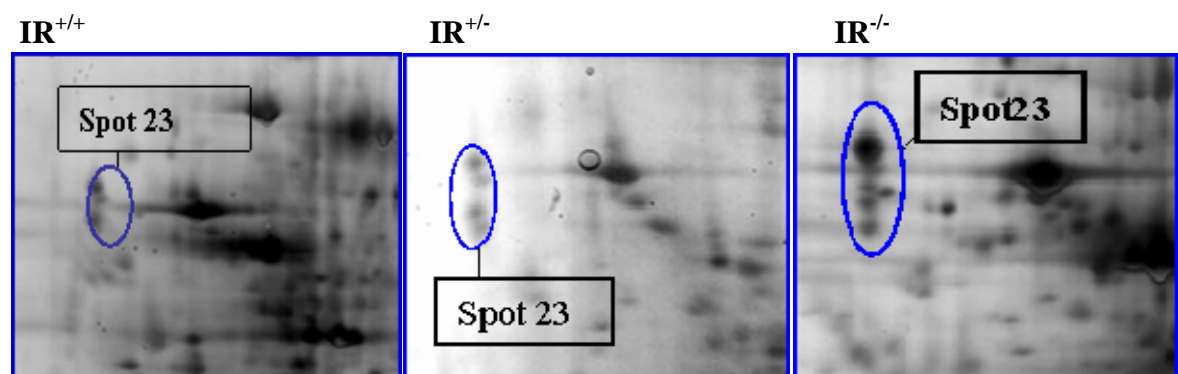
**Figura 12.** *Analisi 2D Gel: Ingrandimenti degli spot relativi alle proteine ottenute dall'analisi 2D gel (Fig. 19). Le proteine relative sono state identificate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.*



a) spot 4 = PRDX6 ossidata  
spot 24 = XRN2      b) spot 4 = PRDX6 ossidata  
spot 24 = XRN2      c) spot 4 = PRDX6 ossidata  
spot 25 = HMGB1

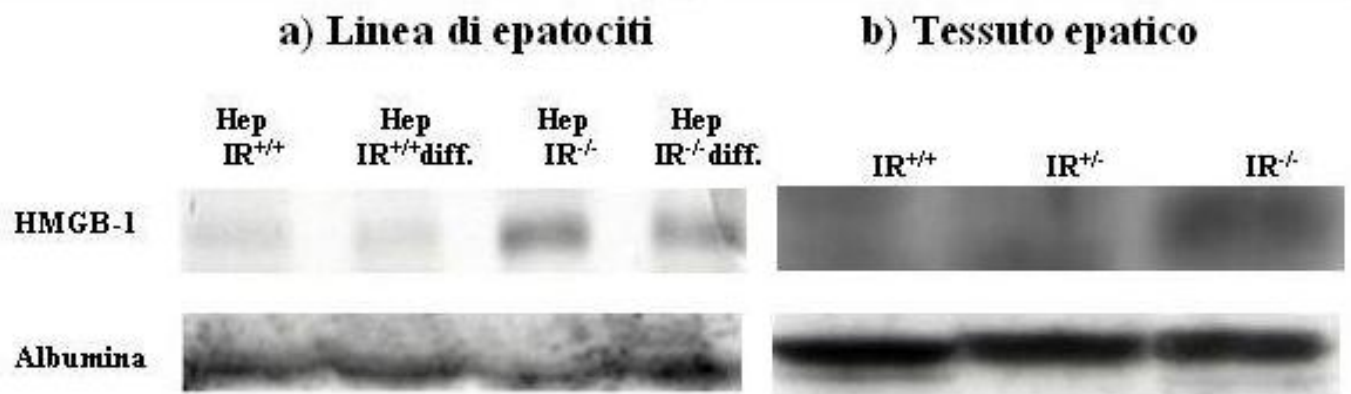


d) spot 21 = ANXA1      e) spot 21 = ANXA1      f) spot 21 = ANXA1



g) spot 23= calreticulina      h) spot 23= calreticulina      i) spot 23= calreticulina

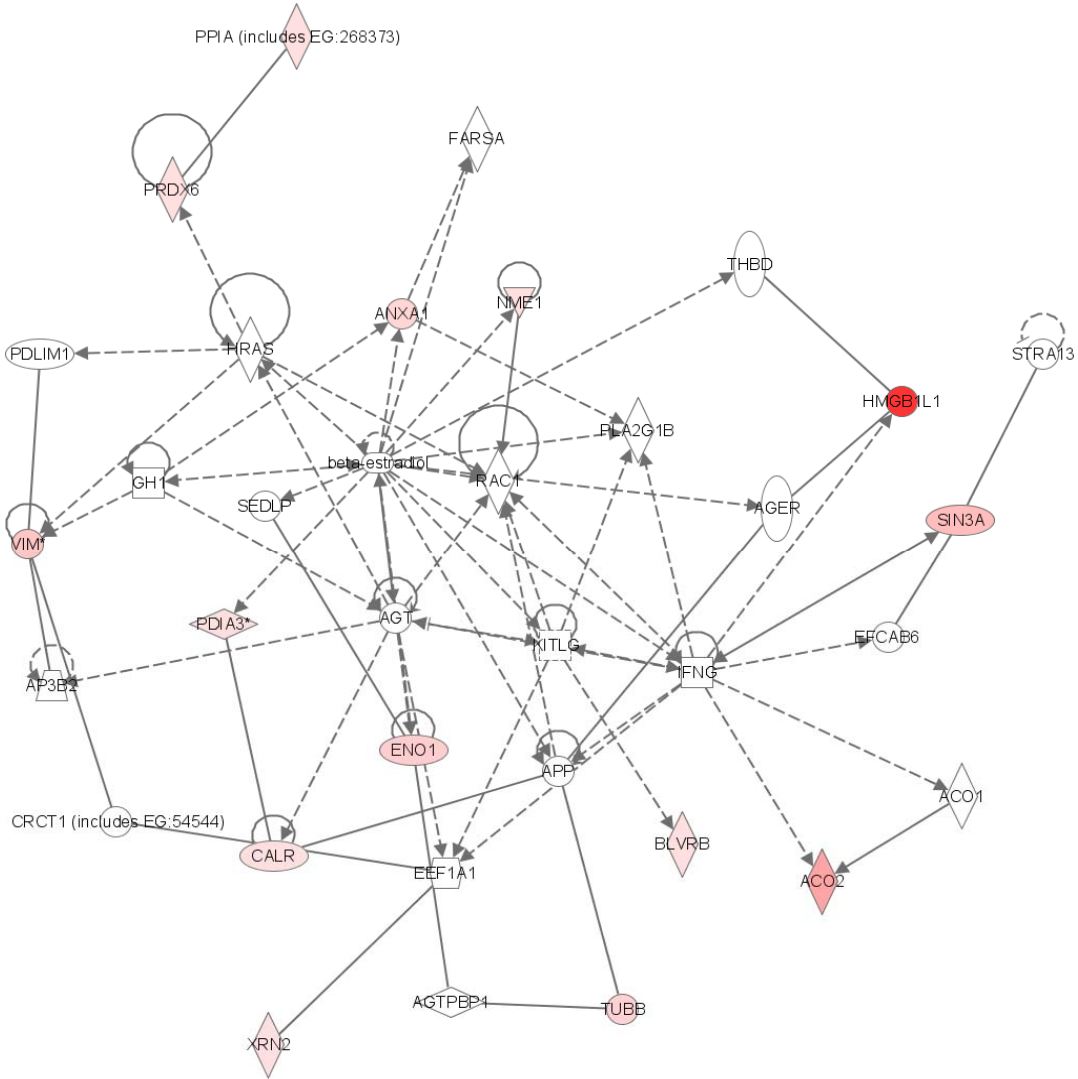
**Figura 13.** *Ingrandimenti degli spot relativi alle proteine ottenute dall'analisi 2D gel (Fig. 21). Le proteine relative sono state identificate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.*



**Figura14.** Analisi Western Blot: 100  $\mu$ g di lisato proteico estratto: **a)** dalla linea di epatociti trasformati Hep IR<sup>+/+</sup>; Hep IR<sup>+/+</sup> diff.; Hep IR<sup>-/-</sup>; Hep IR<sup>-/-</sup> diff.; e da **b)** tessuto epatico proveniente da topi IR<sup>+/+</sup>; IR<sup>+/-</sup>; IR<sup>-/-</sup>. Le proteine separate su SDS-PAGE al 12% vengono blottate con anticorpi che rivelano rispettivamente le proteine differentemente espresse individuate mediante analisi 2D.

Spot	gl	Gene ID	NOME	Score
1	gil18079339	11429	Aconitase 2	173
2			IgG	57
3	gil74138891	14827	PDI	158
4	gil200397	18794	Fosfolipasi C	82
6			cheratina	78
7			tubulina	68
10	gil21450325	233016	biliverdina reduttasi	112
11	gil6679439	268373	PDI	90
12	gil2078001	22352	vimentina	61
13	gil2078001	22352	vimentina	105
15	gil91980275	20466	Sin3A	63
16	gil154550673	18102	nucleoside difosfato chinasi I	71
17	gil240120112	14085	fumarilacetoacetato idrolasi	77
18	gil7106255	11846	arginase 1	65
20	gil6677739	19733	regucalcina	93
21	gil31980648	11947	mitochondrial ATP sintasi subunità beta	102
23	gil187466062	13806	Eno 1	74
24	gil7948999	53381	Peroxiredoxin 4	78
25	gil3219774	11758	Peroxiredoxin 6	130
26	gil113945	16952	Annexin 1	76
27	gil6680836	12317	Calreticulin	101
28	gil13278447	24128	XRN2	75
29	gil6754208	15289	HMGB1	75

**Tabella 1.** Elenco delle proteine differentemente espresse nei modelli sperimentali identificate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.



© 2000-2009 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

**Figura 15.** Network ottenuto dall'applicativo Ingenuity Pathway Analysis dopo inserimento delle proteine identificate nei modelli sperimentali studiati.

Mediante l'utilizzo del software Ingenuity Pathway Analysis mostrato in Figura 15 è stato possibile ottenere un network di collegamento fra le proteine identificate nei modelli sperimentali analizzati.

## **RISULTATI**

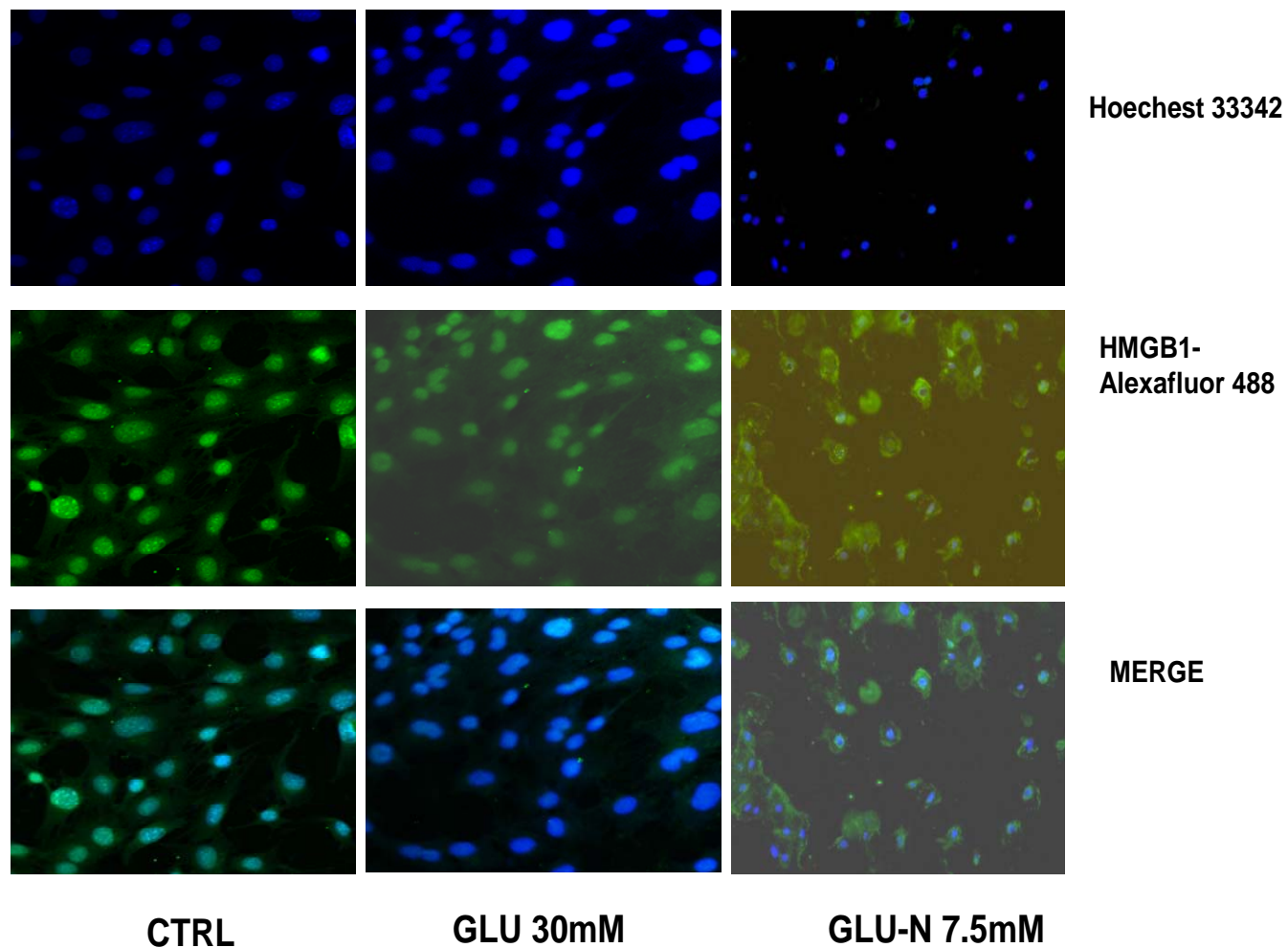
### **Localizzazione di HMGB1 in risposta ad uno stimolo iperglicemico ed a glucosamina.**

La localizzazione di HMGB1 è stata valutata nei nostri modelli cellulari mediante immunofluorescenza; si nota dalle Figure 16 e 17 come esista una rilocalizzazione cellulare in risposta ai trattamenti.

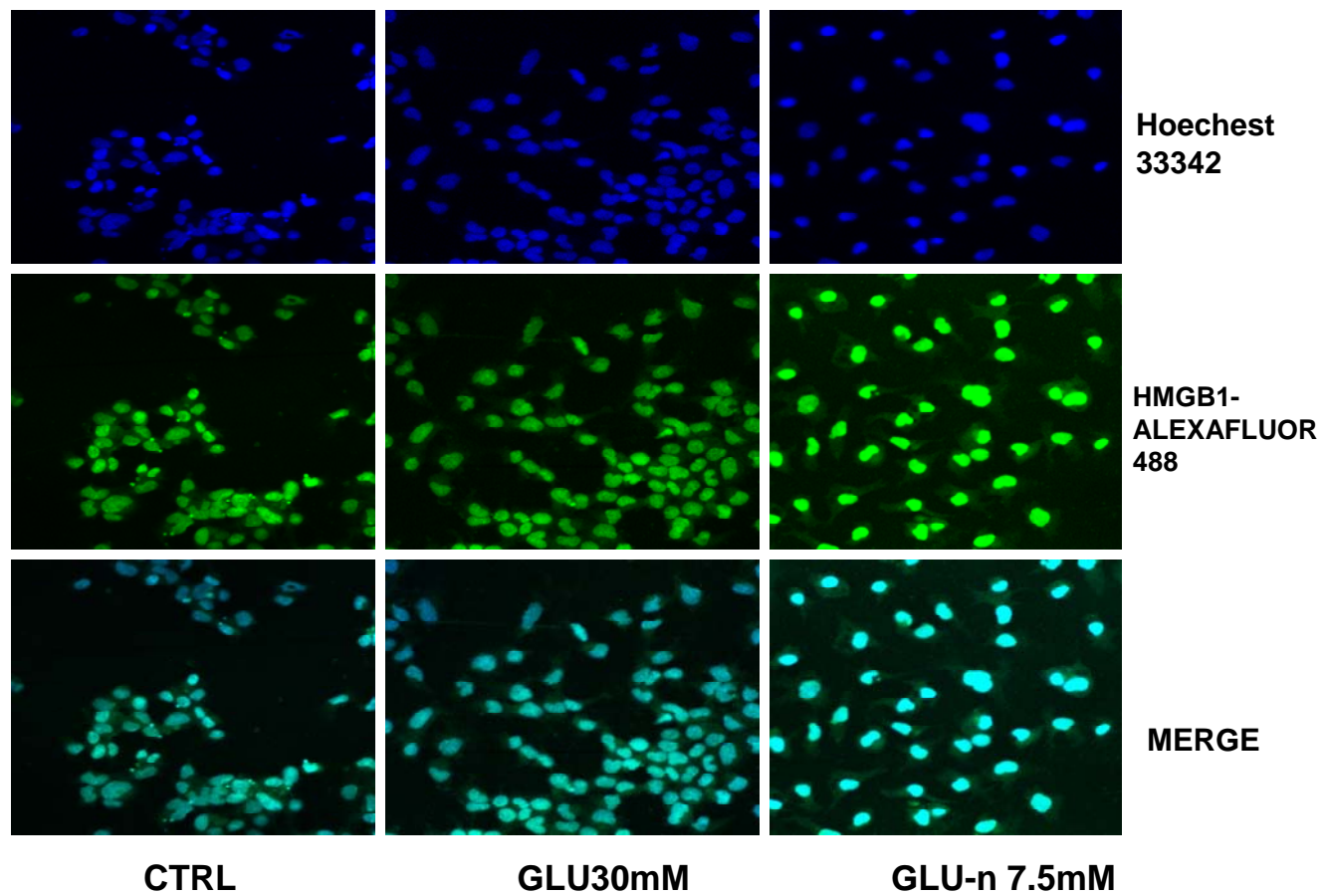
In particolare si osserva come nelle cellule Hep WT trattate con glucosio 30 mM, il segnale della HMGB1 nel nucleo e nel citoplasma venga attenuato rispetto al controllo, mentre il trattamento con glucosamina provoca una importante localizzazione citoplasmatica.

Nelle cellule IRKO il trattamento con glucosio induce una maggiore espressione nucleare e citoplasmatica rispetto al controllo, mentre il trattamento con glucosamina genera lo stesso effetto ma in proporzioni maggiori rispetto al controllo.

Nel controllo delle cellule IRKO si nota inoltre una maggiore quantità di HGMB1 rispetto alle Hep WT sia nel nucleo, che nel citoplasma; questo dato conferma il precedente dato del nostro laboratorio utilizzando tecniche di elettroforesi bidimensionale.



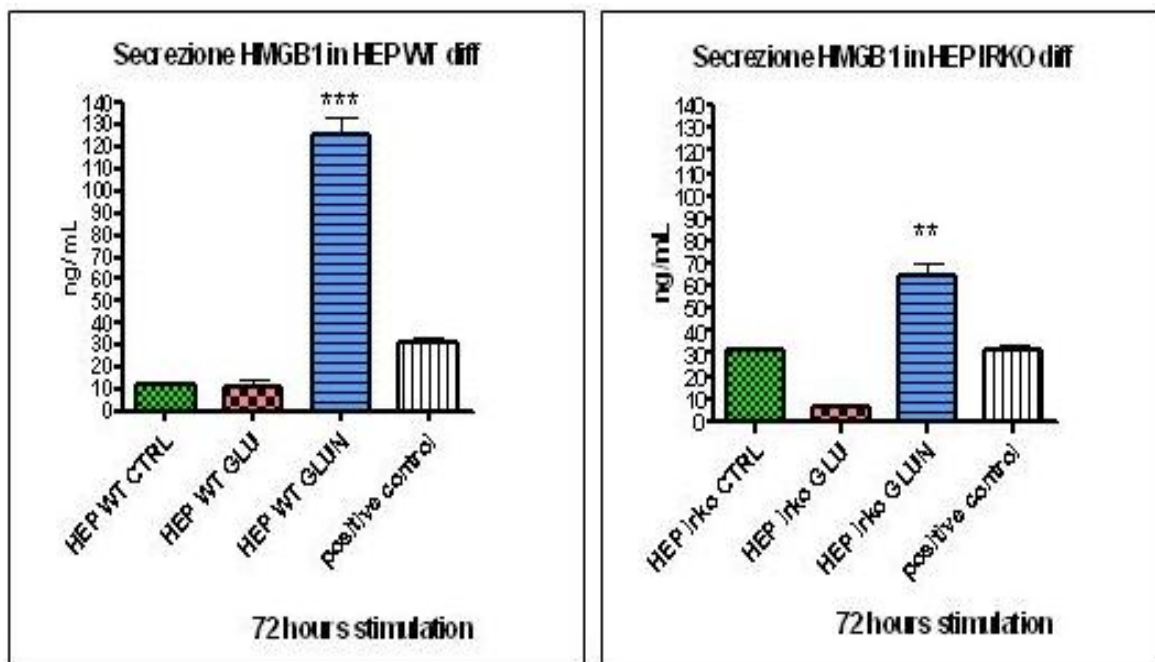
**Figura 16** *Immunofluorescenza su Hep WT:  $4 \times 10^5$  cellule differenziate incubate con anticorpo anti\_HMGB1 marcato con AlexaFluor 488( verde) ed Hoechst 33342 ( blu) per identificare i nuclei; la traslocazione è valutabile nel riquadro merge.*



**Figura 17.** Immunofluorescenza su Hep IRKO:  $4 \times 10^5$  cellule differenziate incubate con anticorpo anti\_HMGB1 marcato con AlexaFluor 488 (verde) ed Hoechst 33342 (blu) per identificare i nuclei; la traslocazione è valutabile nel riquadro merge.

**Secrezione di HMGB1 in risposta ad uno stimolo iperglicemico ed a glucosamina**

La secrezione della HMGB1 in condizione basali ed in risposta ad uno stimolo iperglicemico ed a glucosamina nelle Hep WT e nelle Hep IRKO è stata valutata tramite saggio ELISA .



**Figura 18** :Saggio ELISA per HMGB1 su Hep wt ed IRKO: 10 $\mu$ L di supernatante concentrato sono stati usati per eseguire il saggio; l'esperimento è stato eseguito in triplicato.(\*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\* $P < 0,0005$ )

La secrezione di HMGB1 risulta incrementata significativamente ( $p < 0,005$ ) dal trattamento con la glucosamina rispetto al controllo in entrambi i fenotipi. Lo stato iperglicemico( glucosio 30 mM) non sembra alterare la secrezione di HMGB1 nei nostri modelli cellulari; al contrario lo stato infiammatorio indotto da glucosamina induce la secrezione di una notevole quantità di HMGB1 che risulta dimezzata in mancanza del recettore dell' insulina.

### **Produzione ROS in Hep WT ed IRKO in risposta ad uno stimolo iperglicemico ed a glucosamina**

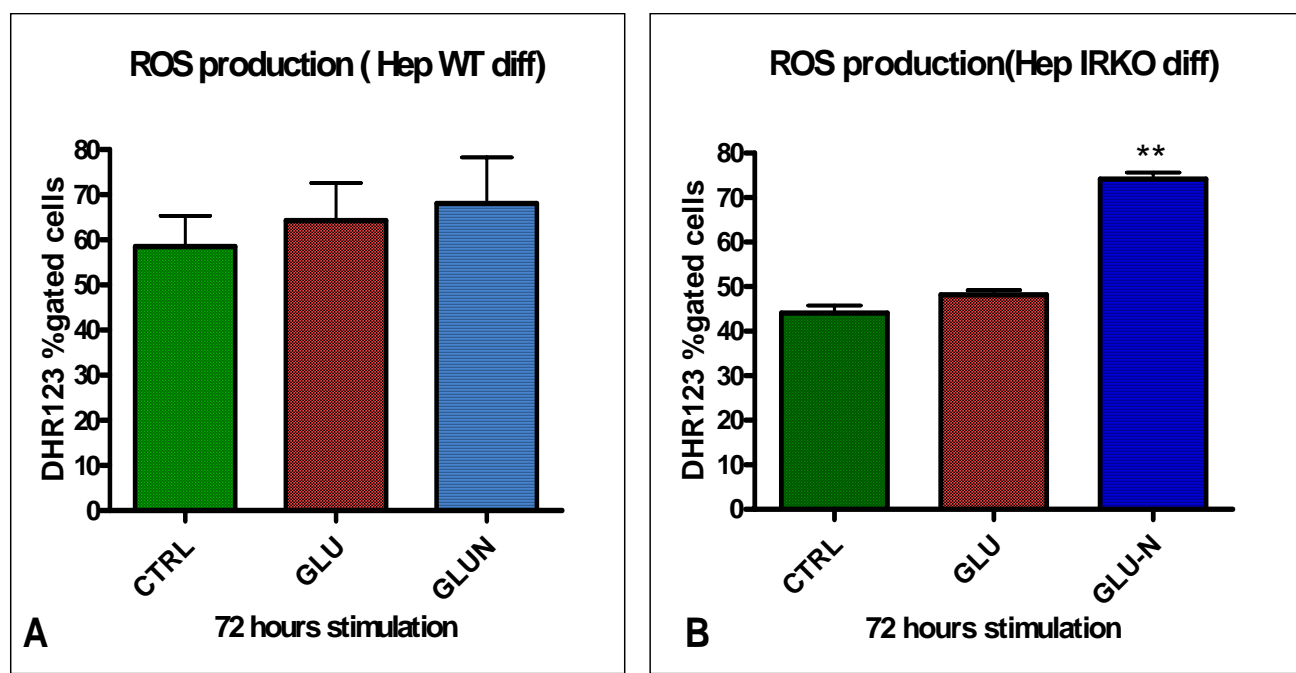
Gli esperimenti sulla produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono stati eseguiti incubando le cellule Hep WT ed IRKO con la diidrorodamina.



Il trattamento con glucosamina 7.5 mM per 72ore induce una maggiore produzione di ROS rispetto al controllo e al trattamento con glucosio 30mM sia nelle Hep WT che nelle IRKO (figura19 A e B), sebbene questa maggiore produzione sia più marcata nelle Hep IRKO(figura17B).

In risposta allo stimolo iperglicemico le cellule Hep WT producono una quantità maggiore di ROS rispetto alle IRKO (Figura 18); sembra che l' azione del glucosio induce una minore produzione di ROS rispetto al trattamento con glucosamina.

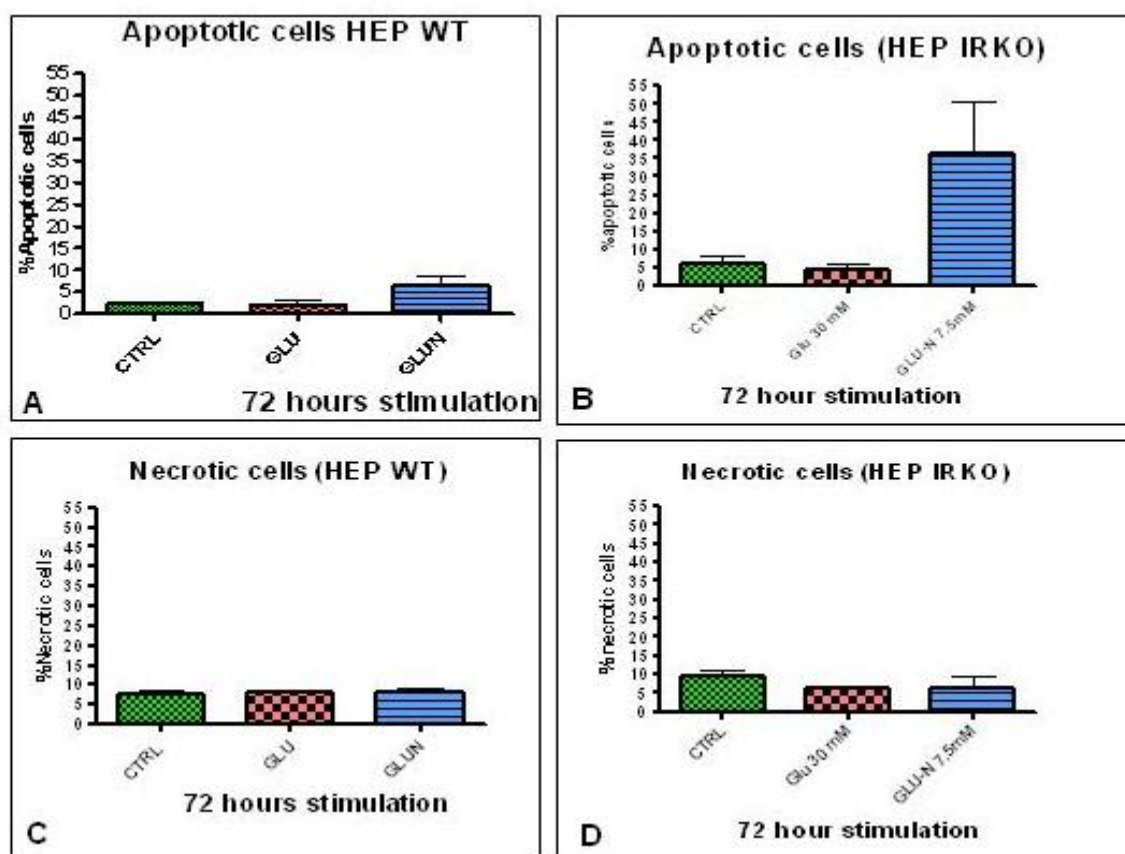
Infine la produzione di ROS nell Hep IRKO conseguente al trattamento con glucosamina 7.5 m M per 72 ore risulta statisticamente significativa rispetto al controllo( $p<0,005$ )



**Figura 19** Produzione dei ROS in Hep wt (A) ed IRKO(B):la rivelazione dei ROS è avvenuta tramite incubazione con diidrorodamina( DHR123) e lettura al citofluorimetro .utilizzando il canale FL2(\*\*  $P<0,005$ )

## Apoptosi e necrosi in Hep WT ed IRKO in risposta ad uno stimolo iperglicemico ed a glucosamina

L'apoptosi e la necrosi come conseguenza di uno stress sono state valutate con il metodo dell'annexina-propidio



**Figura 20.** Saggio apoptosi/necrosi su Hep WT ed IRKO:  $9 \times 10^5$  cellule Hep wt e  $5 \times 10^5$  cellule Hep IRKO sono state fatte crescere, differenziate ed incubate con annexina e propidio: la lettura è avvenuta con il citofluorimetro, compensando i canali di fluorescenza FL1 ed FL2

Come mostrato in figura 20, la percentuale di cellule IRKO in apoptosi è molto maggiore rispetto alle cellule WT. Infatti la mancanza del recettore

dell'insulina favorisce l'entrata nel processo di morte cellulare programmata. In particolare il trattamento con glucosamina 7.5 mM induce apoptosi in una percentuale di circa sei volte maggiore rispetto al trattamento con glucosio 30 mM (Figura 20 A e B). La necrosi non è influenzata dai trattamenti nei nostri modelli cellulari.(Figura 20 C e D ).

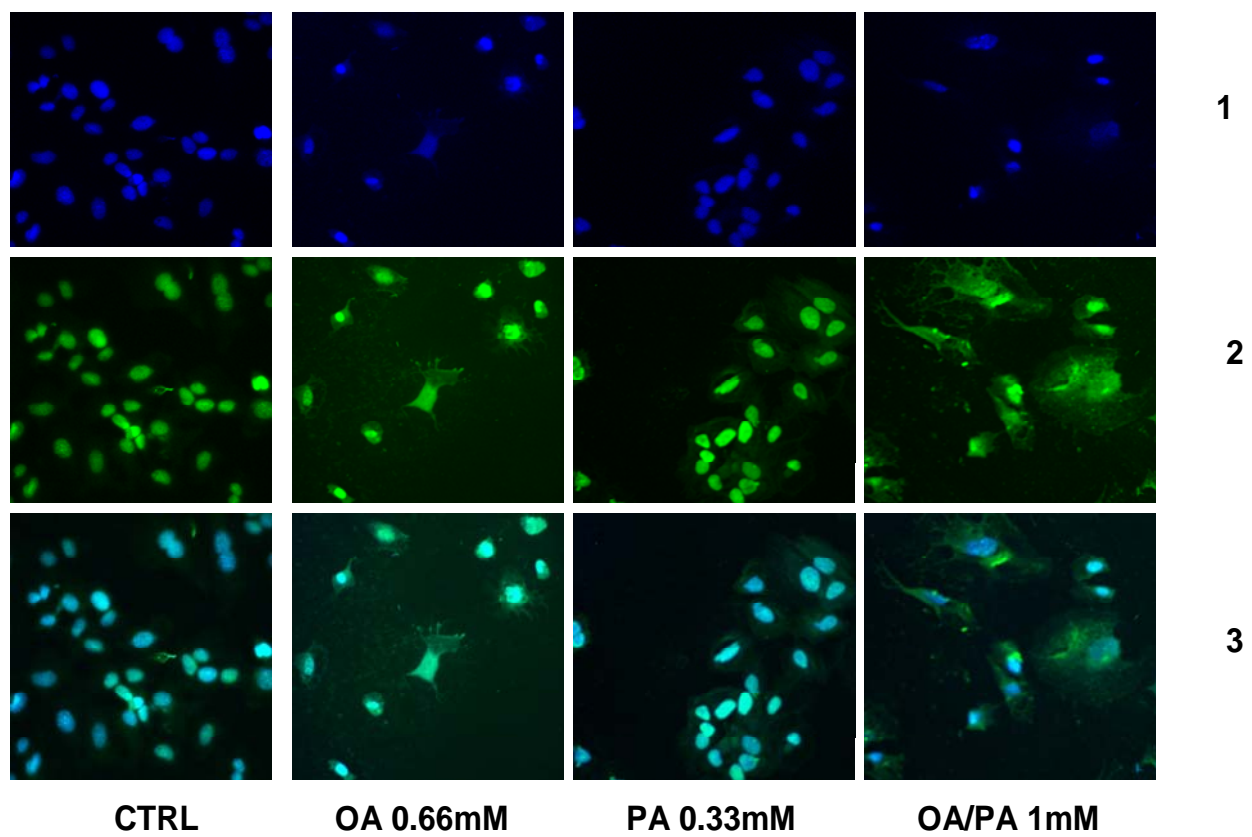
**Localizzazione di HMGB1 in risposta al trattamento con acido oleico(OA) 0.66 mM, acido palmitico(PA) 0,33mM ed OA+PA**

La localizzazione di HMGB1 in risposta al trattamento con acidi grassi è stata valutata mediante immunofluorescenza.

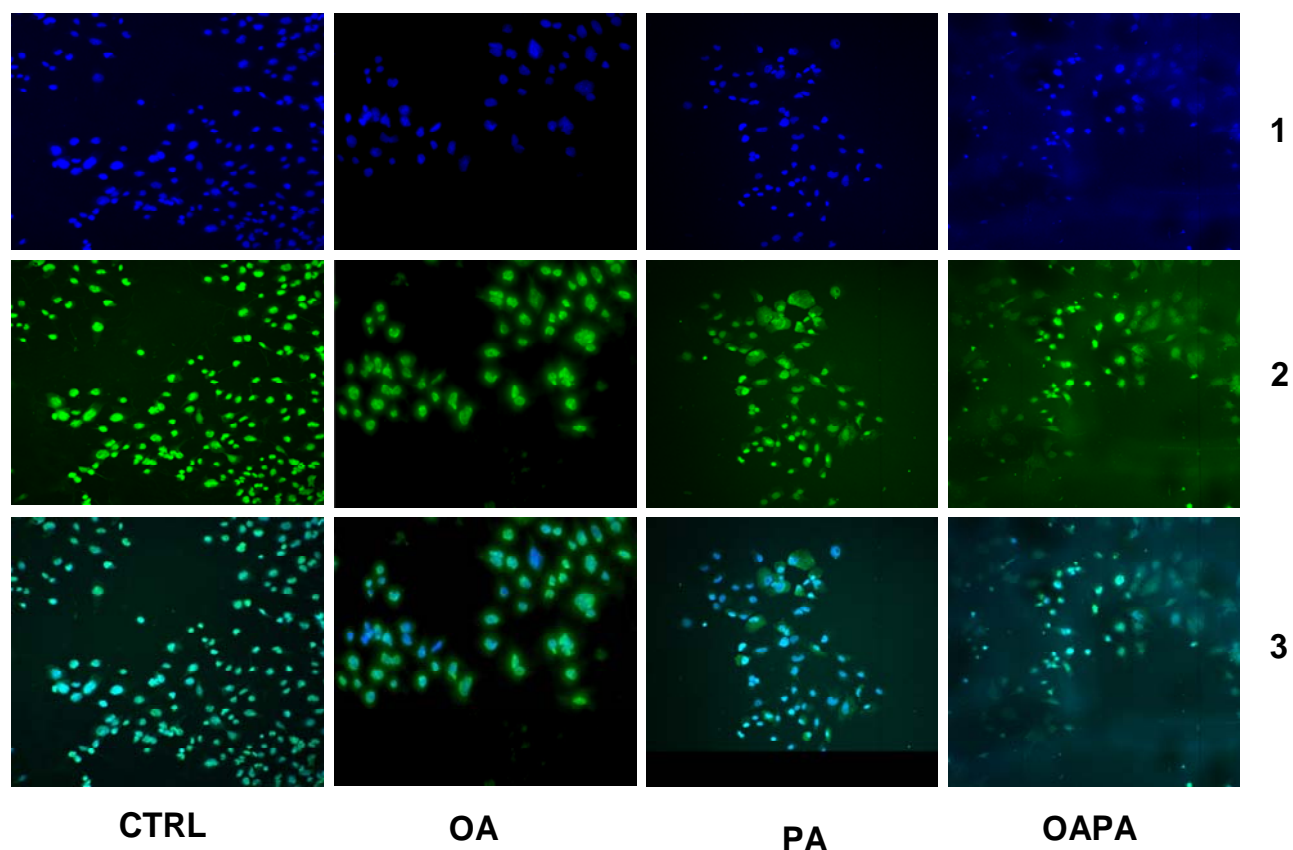
Le immagini al microscopio confocale a fluorescenza (vedi sopra) che evidenziano la localizzazione della HMGB1, rispettivamente in Hep WT ed in Hep IRKO.

Nelle Hep WT, si nota come il trattamento con acido oleico ed il trattamento con acido oleico ed acido palmitico aumentino la traslocazione di HMGB1 in maniera rilevante rispetto al trattamento con il solo acido palmitico.(Figura 21 lane 3)

La localizzazione citoplasmatica della HGMB1 nelle HEP IRKO viene indotta dall'acido oleico e da acido oleico in combinazione con acido palmitico. Il trattamento con acido palmitico ha un minore effetto sulla traslocazione citoplasmatica di HGMB1(lane 3 Figura 21).



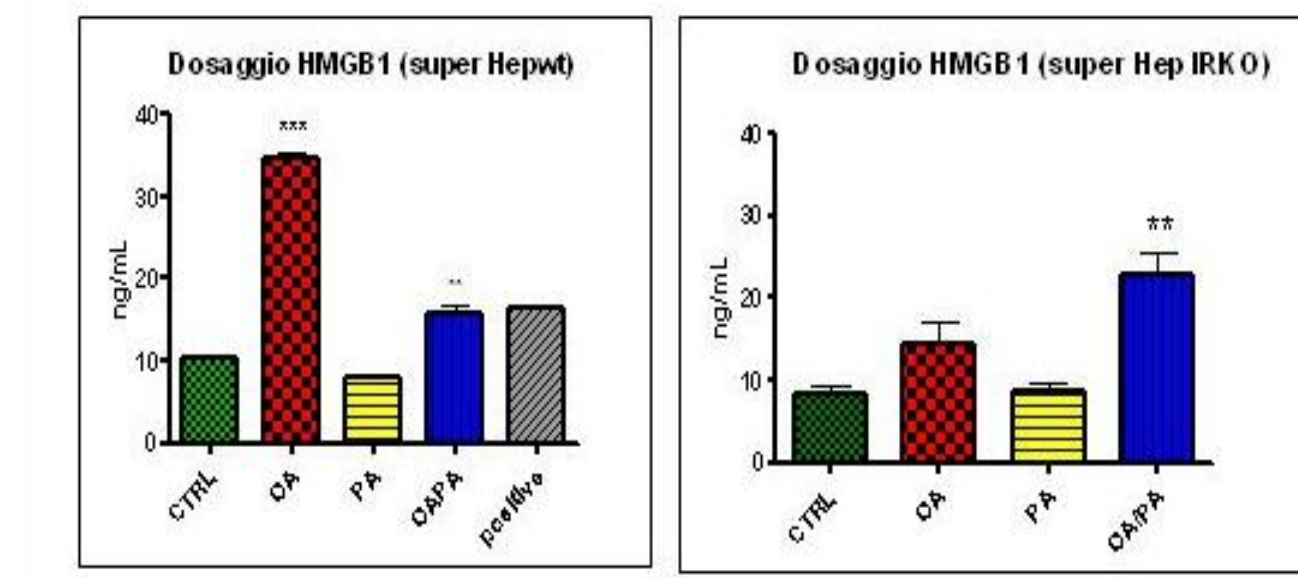
**Figura 21.** *Immunofluorescenza su Hep WT:  $2 \times 10^5$  cellule differenziate incubate con anticorpo anti\_HMGB1 marcato con AlexaFluor 488( lane 2) ed Hoechst 33342 (lane1 )per identificare i nuclei; la traslocazione è valutabile nel riquadro merge( lane3 ). Ingrandimento 40X.*



**Figura 22.** *Immunofluorescenza su Hep IRKO:  $3 \times 10^5$  cellule differenziate incubate con anticorpo anti-HMGB1 marcato con AlexaFluor 488( lane 2) ed Hoechst 33342 (lane1 )per identificare i nuclei; la traslocazione è valutabile nel riquadro merge( lane3 ).ingrandimento 20X*

**Secrezione di HMGB1 in risposta in risposta al trattamento con acido oleico(OA) 0.66 mM, acido palmitico(PA) 0,33mM ed OA+PA 1m M**

Il dosaggio della HMGB1 rilasciato nel mezzo di coltura dalle Hep WT e dalle Hep IRKO\_in risposta ad un trattamento con FFA è stato effettuato utilizzando il kit ELISA secondo le indicazioni del produttore.



**Figura 23.** Saggio ELISA per HMGB1 su supernatanti concentrate di Hep WT e di Hep IRKO: 10  $\mu$ L di supernatante concentrato sono stati usati per eseguire il saggio; la stimolazione con FFA è stata eseguita per 24 ore e l'esperimento in triplicato. (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,005$ , \*\*\* $P < 0.0005$ )

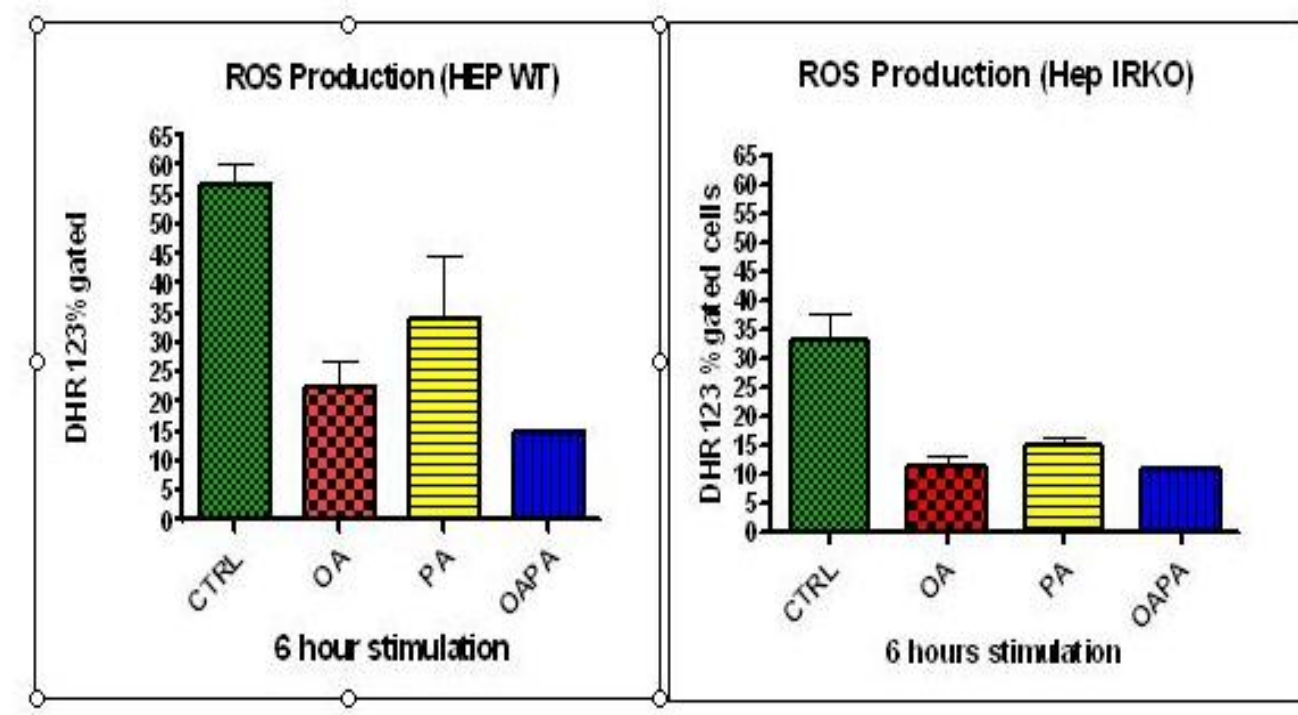
Nelle Hep WT, il trattamento con acido oleico induce una forte secrezione di HMGB1 (Figura 23) mentre il trattamento con acido palmitico non sembra influenzare la secrezione.

Nelle Hep IRKO, la secrezione di HMGB1 risulta significativamente maggiore rispetto al controllo ( $p < 0.005$ ) dopo il trattamento contemporaneo con acido oleico e palmitico.

L'effetto dell'acido oleico risulta maggiore nel caso delle Hep WT rispetto alle Hep IRKO.

**Produzione ROS in Hep wt ed IRKO al trattamento con acido oleico(OA) 0.66 mM, acido palmitico(PA) 0,33mM ed OA+PA 1mM**

Gli esperimenti sulla produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono stati eseguiti incubando le cellule Hep WT ed IRKO con la diidrorodamina.



**Figura 24.** Produzione di ROS in cellule Hep WT ed IRKO: il trattamento con acidi grassi è stato condotto per 6 ore e la quantità di ROS è stata rilevata tramite incubazione con DHR 123. (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,005$ , \*\*\* $P < 0.0005$ ).

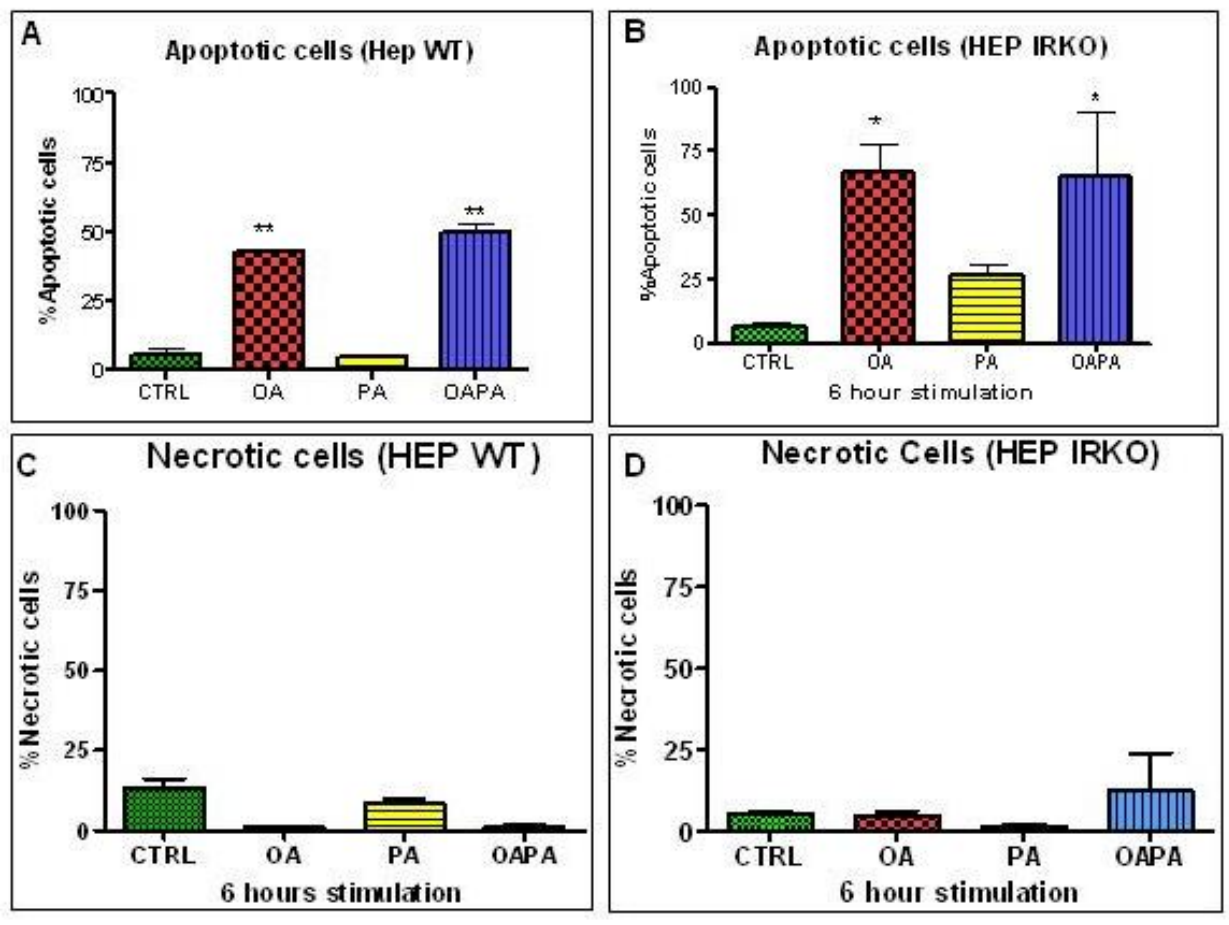
L'incubazione con acido oleico e/o palmitico determina un calo nella produzione dei ROS sia negli epatociti differenziati wild type che nella linea mancante il recettore dell'insulina rispetto al controllo.

In particolare, il trattamento con acido palmitico sembra indurre una maggiore produzione di ROS rispetto agli altri trattamenti(Figura 24 ), sebbene in misura molto inferiore rispetto al controllo.



**Apoptosi e necrosi in Hep wt ed IRKO in risposta al trattamento con acido oleico(OA) 0.66 mM, acido palmitico(PA) 0,33mM ed OA+PA**

La percentuale di cellule in apoptosi e/o in necrosi è stata valutata tramite incubazione con annessina marcata con ficoeritrina isotiocianato (FITC) e Ioduro di Propidio.



**Figura 25:** Saggio apoptosi/necrosi su Hep WT ed IRKO:  $9 \times 10^5$  cellule Hep wt e  $5 \times 10^5$  cellule Hep IRKO sono state fatte crescere, differenziate ed incubate con annessina e propidio: la lettura è avvenuta con il citofluorimetro, compensando i canali di fluorescenza FL1 ed FL2. (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,005$ )

I trattamenti con FFA inducono una maggiore percentuale di cellule in apoptosi nelle Hep IRKO che nelle Hep WT

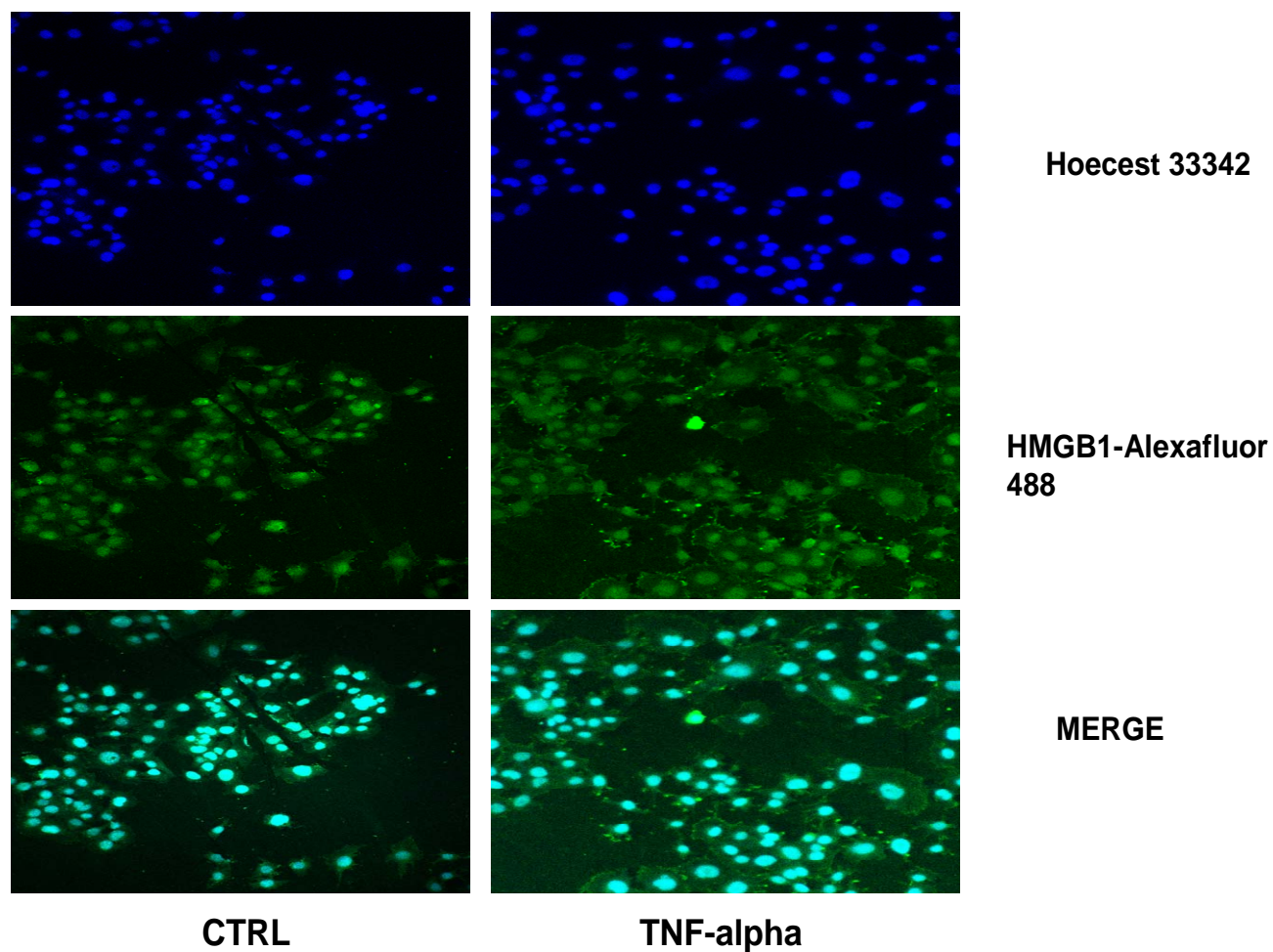
In particolare, il trattamento con acido oleico 0.66 mM induce apoptosi sia nelle Hep WT (Figura 25 A) che nelle Hep IRKO (Figura 25 B) ma non influenza la necrosi (Figura 25 C e D): il trattamento con acido palmitico 0.33 mM induce moderatamente apoptosi nelle Hep IRKO (Figura 25 B) ma non ha effetto sull'apoptosi nelle Hep WT (Figura 25 A).

La percentuale di cellule necrotiche dopo il trattamento con acido palmitico risulta prossima allo zero nelle Hep IRKO (Figura 25 D), ma non nelle Hep wt, sebbene inferiore al controllo (Figura 25 C).

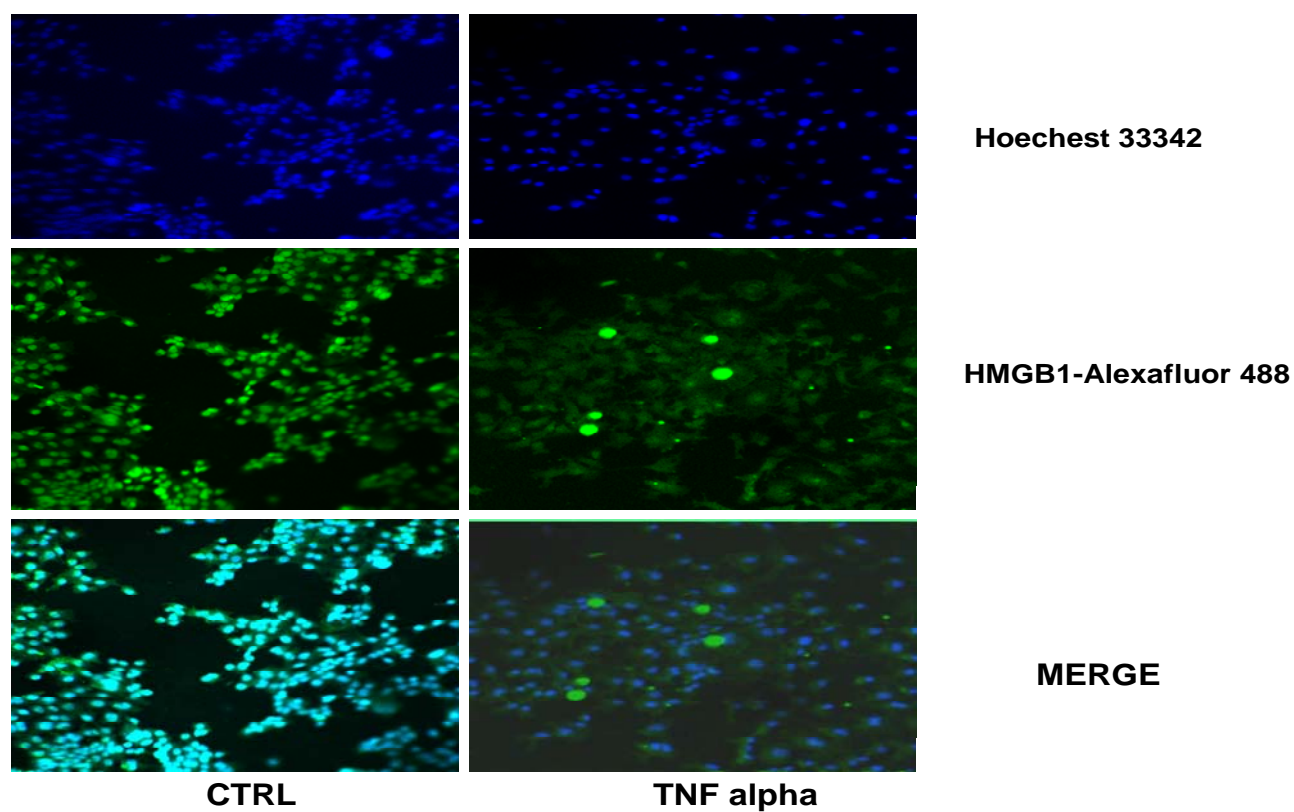
Il trattamento con acido oleico insieme ad acido palmitico, induce elevati livelli di apoptosi sia nelle Hep WT (circa il 50%) che Hep IRKO (Figure 25 A e B); questo trattamento induce livelli di necrosi maggiori nelle Hep IRKO piuttosto che nelle WT.

### **Localizzazione di HMGB1 in risposta al TNF- $\alpha$ per 24 ore**

La localizzazione di HMGB1 in risposta al trattamento con TNF- $\alpha$  100 ng/mL è stata valutata tramite immunofluorescenza: il trattamento induce rilocalizzazione citoplasmatica di HMGB1 nelle Hep WT sebbene una quantità considerevole di HMGB1 rimanga espressa nel nucleo (Figura 26). Nelle cellule mancanti del recettore dell'insulina la localizzazione di HMGB1 sembra esclusivamente citoplasmatica.



**Figura 26.** *Immuofluorescenza di Hep W T t:  $2 \times 10^5$  cellule differenziate incubate con anticorpo anti\_HMGB1 marcato con Hoechst 33342 (lane 1 ) ed anticorpo secondario marcato con AlexaFluor 488( lane 2. Ingrandimento 20x.*



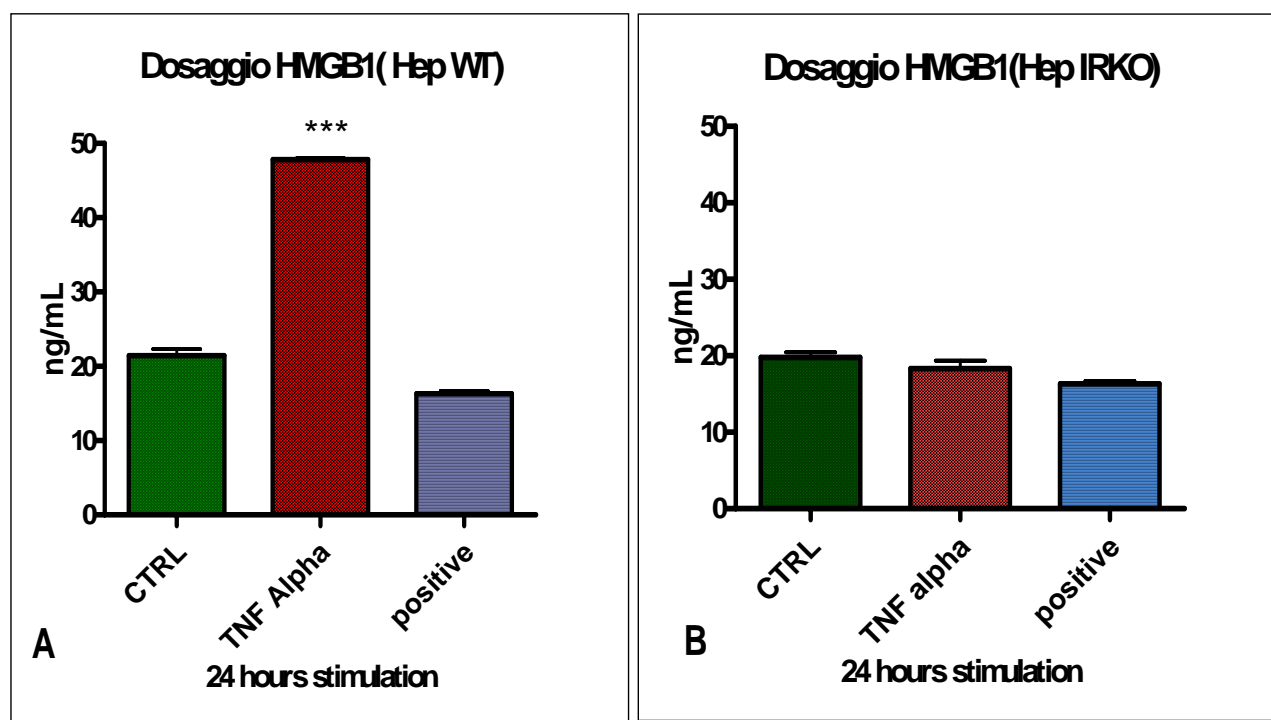
**Figura 27.** *Immuofluorescenza di Hep IRKO :  $5 \times 10^5$  cellule differenziate incubate con anticorpo anti\_HMGB1 marcato con Hoechest 33342 (lane 1 ) ed anticorpo secondario marcato con AlexaFluor 488( lane 2). Ingrandimento 20x.*

### **Secrezione di HMGB1 in risposta al TNF- $\alpha$ 100 ng/mL per 24 ore**

Il dosaggio della HMGB1 rilasciato nel mezzo di coltura dalle Hep wt e dalle Hep IRKO\_in risposta ad uno trattamento con TNF- $\alpha$  per 24 ore è stato effettuato utilizzando il kit ELISA secondo le indicazioni del produttore.

La secrezione della HMGB1 risulta significativamente aumentata ( $p < 0,0005$ ) dal trattamento come si nota dalla figura 16 A.

La figura 28B mostra invece che il TNF- $\alpha$  per 24 ore non sembra invece indurre secrezione nelle Hep IRKO.

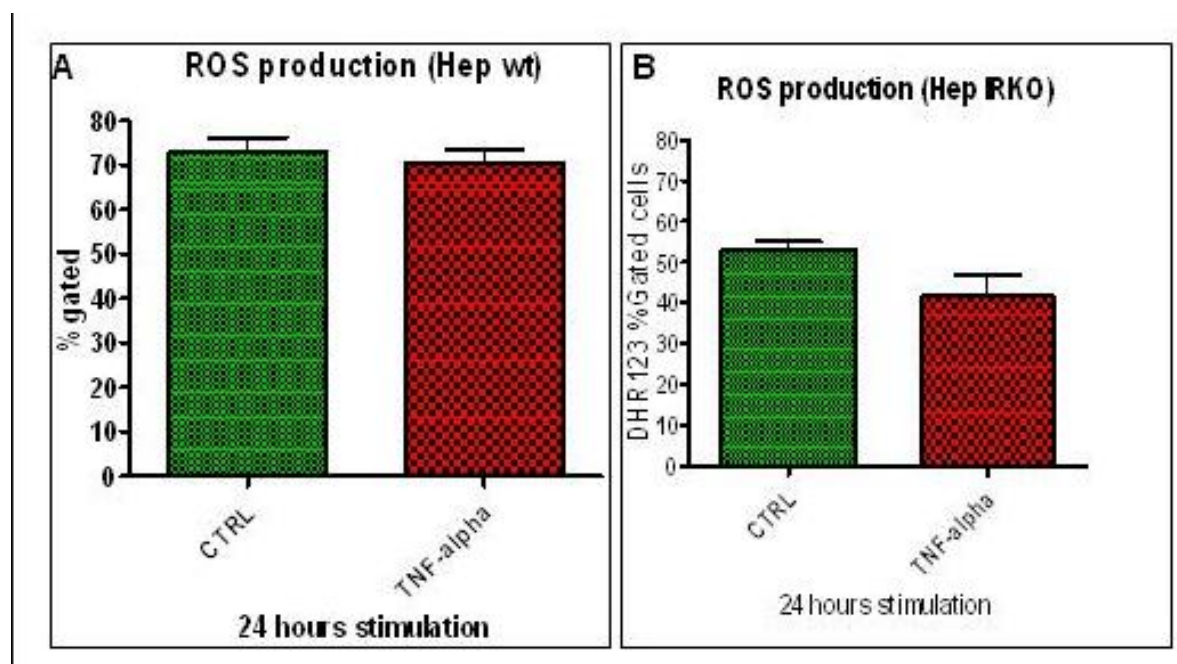


**Figura 28** . saggio ELISA per HMGB1 su supernatanti concentrati di Hep WT(A) e di Hep IRKO(B): 10  $\mu$ L Di supernatante concentrato sono stati usati per eseguire il saggio; la stimolazione con FFA è stata eseguita per 24 ore e l'esperimento in triplicato

### **Produzione ROS in Hep wt ed IRKO in seguito al trattamento con al al TNF- $\alpha$ 100 ng/mL per 24 ore**

Gli esperimenti sulla produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono stati eseguiti incubando le cellule Hep WT ed IRKO con la diidrorodamina:

i dati evidenziano che il trattamento con TNF  $\alpha$  non induce produzione di ROS sia nelle cellule HEP WT che nelle IRKO come mostrato dalle Figure 29 A e 29 B.



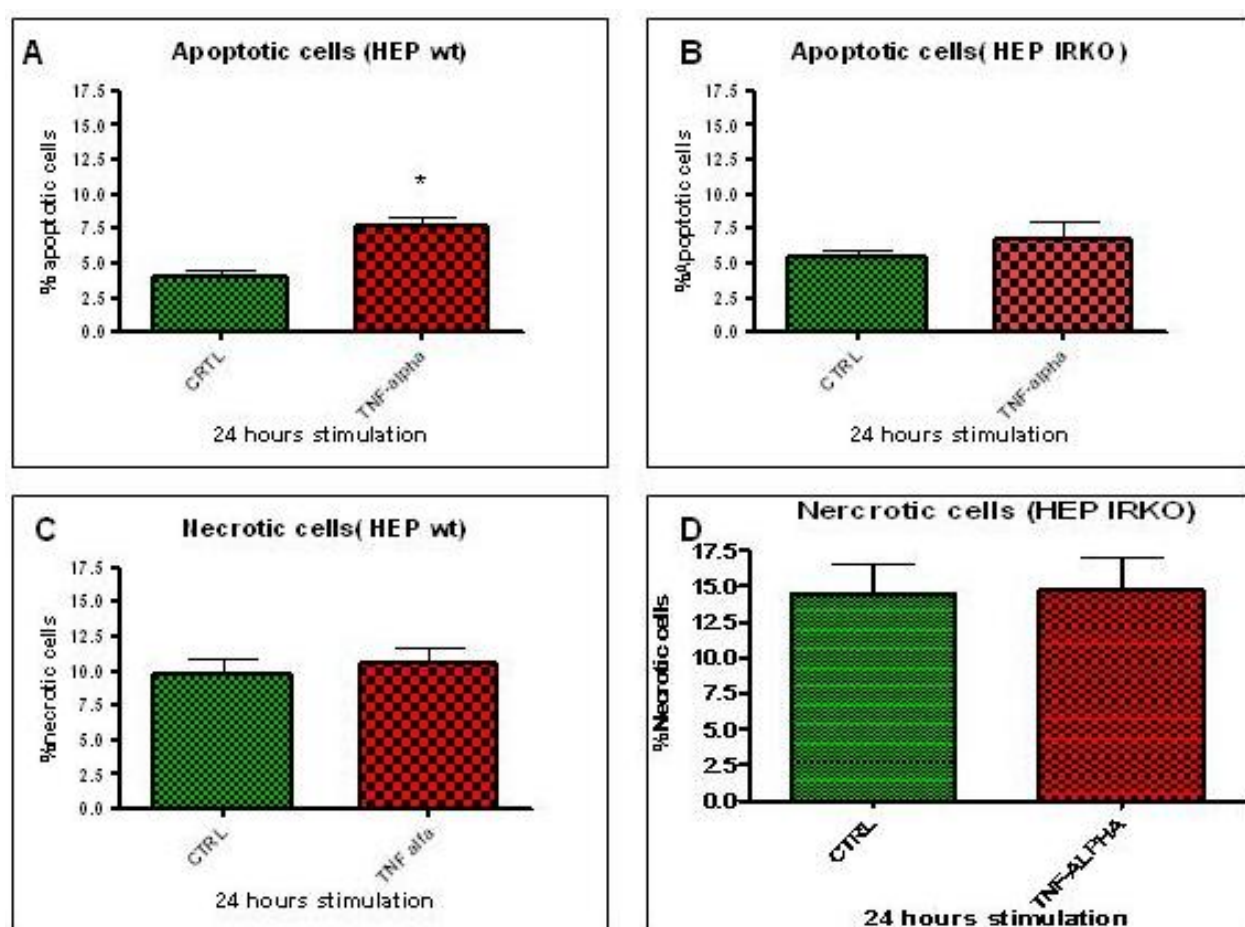
**Figura 29** Produzione dei ROS in Hep wt (A) ed IRKO(B):la rivelazione dei ROS è avvenuta tramite incubazione con diidrorodamina( DHR123) e lettura al citofluorimetro .utilizzando il canale FL2.

### Saggio apoptosi e necrosi in Hep wt ed IRKO in seguito al trattamento con al TNF- $\alpha$ 100 ng/mL per 24 ore

La percentuale di cellule in apoptosi e/o in necrosi è stata valutata tramite incubazione con annessina marcata con fico eritrina isotiocianato(FITC) e Ioduro di Propidio.

Il trattamento con TNF- $\alpha$  induce apoptosi in maniera significativa nelle Hep WT (Figura 30 A) ma ha un effetto molto pronunciato nelle Hep IRKO (figura 30 B).

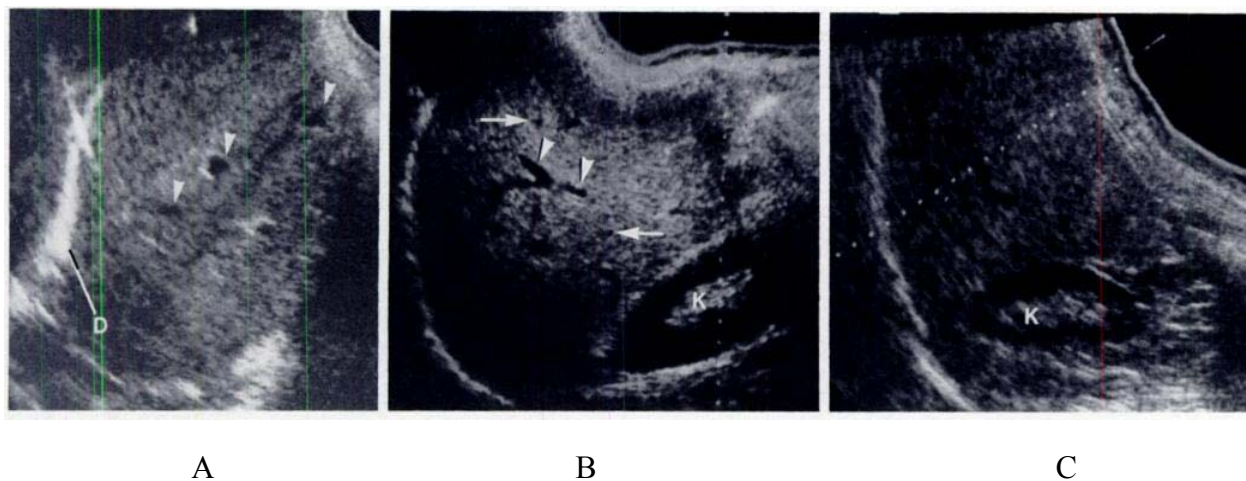
Non si osserva aumento significativo di necrosi in seguito a questo trattamento.



**Figura 30** Apoptosi e necrosi in cellule Hep WT ed Hep IRKO  $10^5$  cellule Hep wt e  $5 \times 10^5$  cellule Hep IRKO sono state fatte crescere, differenziate ed incubate con annessina e propidio: la lettura è avvenuta con il citofluorimetro, compensando i canali di fluorescenza FL1 ed FL2. (\* $P < 0,05$ ).

### **Dosaggio di HGMB1 nel siero di pazienti diabetici.**

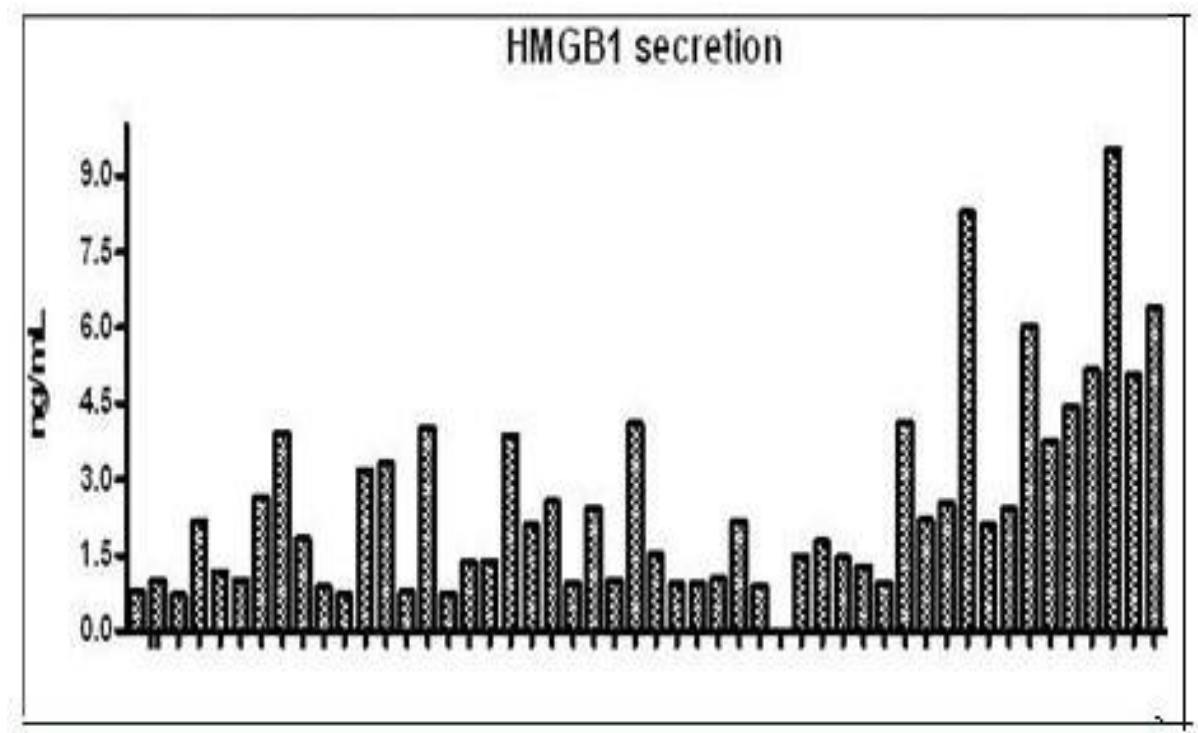
Sono stati arruolati nel presente studio 29 soggetti (14 donne, 15 uomini) di età compresa fra 50 e 70 anni, affetti da DM2 in terapia ipoglicemizzante orale e discreto compenso glicometabolico (Hb A1c <7.5%), tra i pazienti normalmente afferenti all'Ambulatorio di Diabetologia del Centro per l'Aterosclerosi del Policlinico Tor Vergata. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad anamnesi completa, esame obiettivo, ECG, misurazione della pressione arteriosa in posizione supina mediante sfigmomanometro, misurazione dei parametri antropometrici (peso, altezza, circonferenza vita). E' stata inoltre eseguita valutazione ecografica della presenza e dell'eventuale grado di steatosi epatica. A tal proposito a tutti i pazienti è stato assegnato uno "score" ecografico per una valutazione quantitativa della steatosi (0= assenza di steatosi; 1=steatosi di grado lieve; 2= steatosi di grado moderato; 3= steatosi di grado severo) come descritto da Needleman et al.



**Figura 31:** *Quadri ecografici di steatosi epatica rispettivamente di grado lieve, moderato e severo.*



La concentrazione di HMGB1 nel siero di pazienti diabetici è stata determinata tramite saggio ELISA secondo le istruzioni del produttore.



**Figura 32.** *Dosaggio di HMGB1 in pazienti diabetici: un'aliquota di siero è stata usata per eseguire un saggio ELISA.*

L'analisi è stata condotta in cieco su una coorte di 51 pazienti con diagnosi di diabete di tipo 2 ed è stato preso in considerazione il solo dosaggio di HMGB1 nel siero. Abbiamo classificato questi pazienti come sovra esprimenti HMGB1, sulla base di quanto noto in letteratura): il valore soglia per considerare HMGB1 nella norma è una concentrazione sierica maggiore o uguale a 1.6ng/mL (Fukami et al, 2009)

Si nota, dal risultato mostrato in figura si nota che 26 pazienti su 51 totali possiedono un valore di HGMB1 maggiore o uguale ad 1.6ng/mL il che li colloca oltre la soglia di patologia.

### **Dosaggio HGMB1 su sieri di pazienti diabetici affetti da steatosi epatica non alcolica**

Il dosaggio di HGMB1 è stato messo in relazione con il livello di steatosi epatica non alcolica la cui patologia è stata identificata tramite grading ecografico presso il Policlinico di Tor Vergata.

In virtù di questo esame la coorte di 51 pazienti è stata catalogata in: livello 0 (assenza di steatosi), livello 1 (lieve steatosi), livello 2 (moderata steatosi) e livello 3 (severa steatosi). I parametri antropometrici (BMI e circonferenza vita) ed i marcatori biochimici (GOT, GPT, PCR, HGMB1) dei 51 pazienti sono indicati nella Tabella 2.

	Femmine (n=14)	Maschi (n=15)
Età (anni)	54.5±5.6	53.9±5.2
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	30.4±3.4	27.9±5.1
Circonferenza vita (cm)	100.1±9.3	101.4±14.4
PAS (mmHg)	132.2±9.7	131.0±9.6
PAD (mmHg)	80.0±12.7	88.0±8.5
Colesterolo totale (mg/dl)	188.3±48.2	174.5±36.4
HDL-C (mg/dl)	43.8±8.8	39.8±14.1
Trigliceridi (mg/dl)	128.2±46.7	149.1±56.7
Glicemia a digiuno (mg/dl)	116.7±17.2	112.4±16.3
Hb A1C (%)	6.4±0.5	6.1±0.3
GOT (U/l)	22.9±7.3	21.9±4.9
GPT (U/l)	32.3±19.3	28.6±9.9
Gamma-GT (mg/dl)	25.3±14.3	26.3±16.8

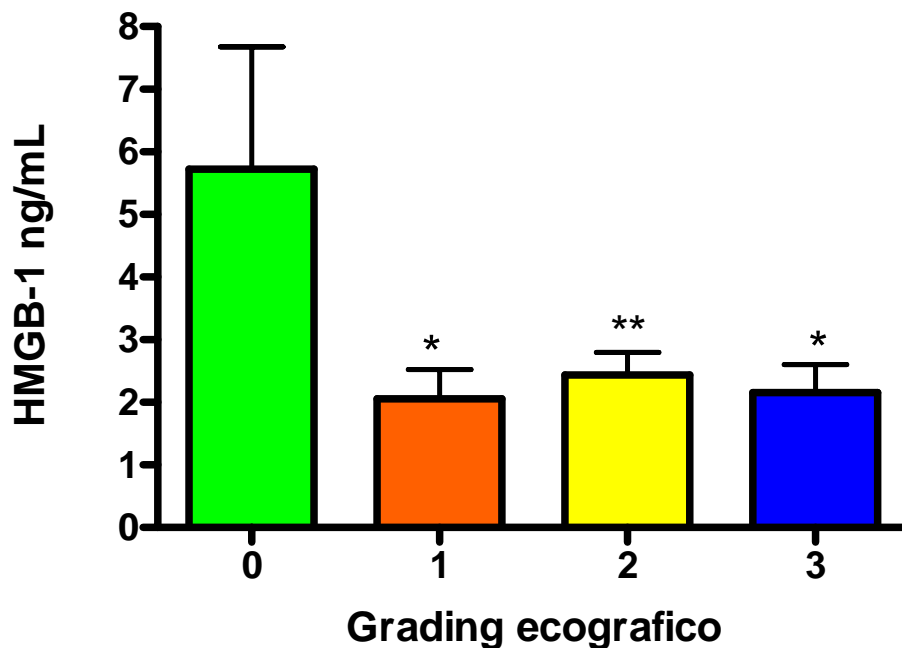
Fosfatasi alcalina (mg/dl)	70.8±19.6	60.6±17.5
Creatinina (mg/dl)	0.7±0.1	0.8±0.1
Microalbuminuria (µg/min)	25.5±31.1	9.8±11.2
Fibrinogeno (mg/dl)	368.0±68.2	313.5±53.5
PCR HS (mg/l)	4.7±4.9	4.1±3.6
TNF-alfa (pg/ml)	4.9±7.7	10.7±12.2
IL-6 (pg/ml)	10.1±4.1	7.8±5.9
HMGB-1 (ng/ml)	3.3±2.3	3.9±2.9

**Tabella 2.** Caratteristiche di inclusione utilizzate nello studio. Questa ricerca ha visto la partecipazione volontaria di 24 donne e 27 uomini.

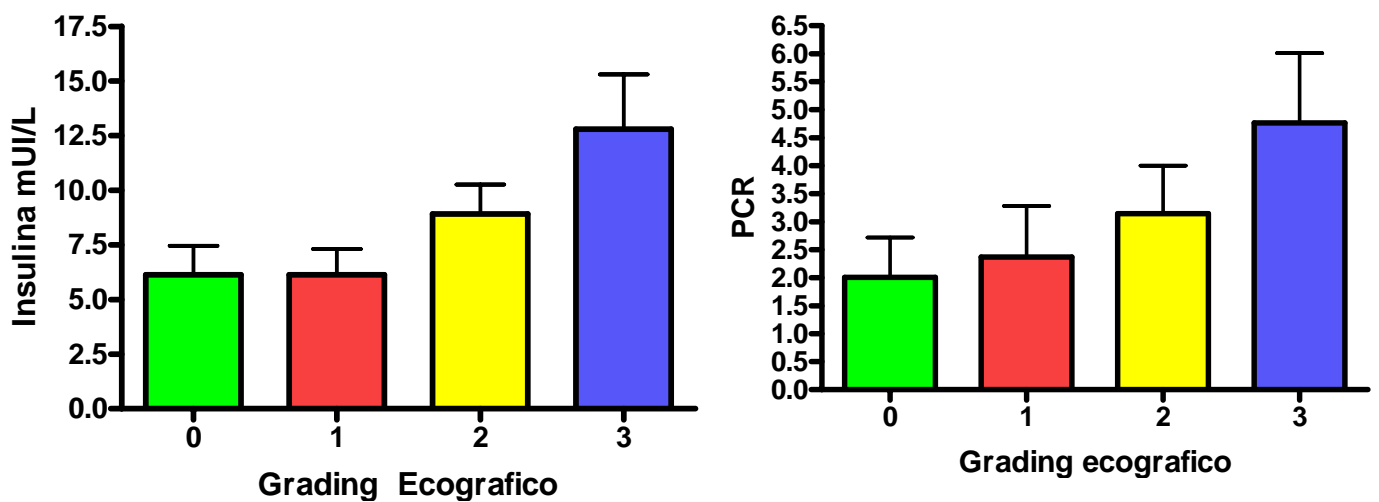
	Low steatosis (n=19)	High steatosis (n=32)	<i>p</i> *
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	27.2 ± 2.2	30.2 ± 3.2	<i>P</i> < 0.05
<b>Circonferenza vita (cm)</b>	91.7 ± 10.2	100.6 ± 12.2	<i>P</i> < 0.05
<b>GOT (U/l)</b>	20.5 ± 30.2	26.7 ± 112.2	<i>P</i> < 0.05
<b>GPT (U/l)</b>	22.6 ± 15.2	40.2 ± 20.2	<i>P</i> < 0.01
<b>PCR HS (mg/l)</b>	2.2 ± 3.4	3.7 ± 12.2	<i>P</i> < 0.05
<b>HMGB-1 (ng/ml)</b>	2.8 ± 6.8	2.2 ± 2.4	<i>P</i> < 0.05

**Tabella 3.** Dati antropometrici e parametri biochimici della coorte di pazienti sottoposti a gradind ecografico divisa in bassa steatsi ed alta steatosi..

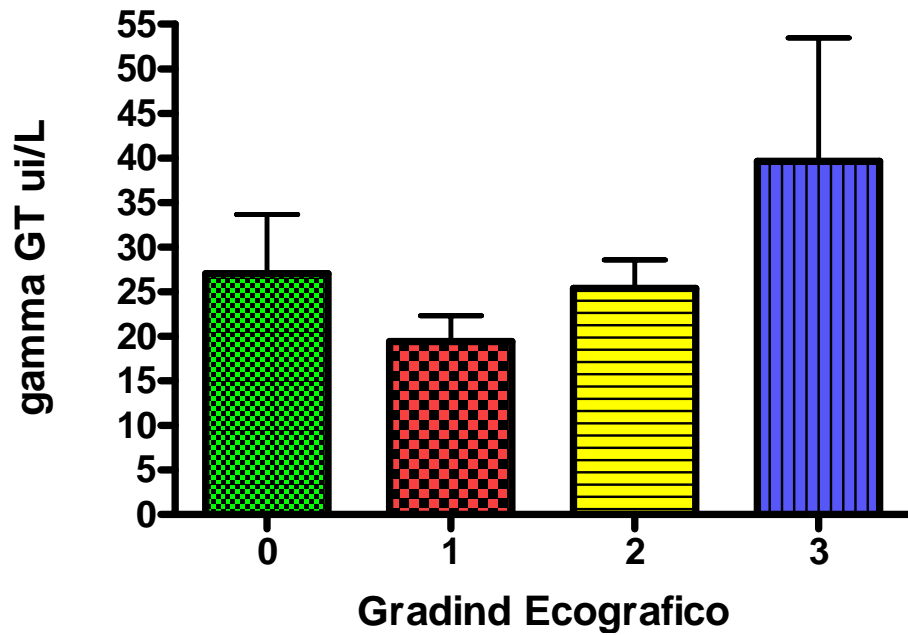
Il livello di steatosi è stato messo in relazione con la secrezione di HMGB1 con i livelli sierici di insulina, i livelli di proteina C reattiva e le gamma GT come mostrato nelle Figure 33, 34, 35.



**Figura 33** relazione tra secrezione di HMGB1 e grading ecografico livello 0 (assenza di steatosi), livello 1 (lieve steatosi) livello 2 (moderata steatosi) e livello 3 (severa steatosi)



**Figura 34.** Relazione tra secrezione di insulina e PCR e grading ecografico livello 0 (assenza di steatosi), livello 1 (lieve steatosi) livello 2 (moderata steatosi) e livello 3 (severa steatosi).



**Figura 35.** Relazione tra secrezione di insulina e gamma GT e grading ecografico livello 0 (assenza di steatosi), livello 1 (lieve steatosi) livello 2 (moderata steatosi) e livello 3 (severa steatosi).

Si nota come all'aumentare del livello di steatosi (Figura 33) la secrezione di HMGB1 si assesti intorno ad un valore costante: in particolare si osserva una diminuzione significativa ( $p < 0,01$ ) steatosi di livello 1 e 3 steatosi di livello 2) rispetto al livello zero di steatosi che identifica l'assenza di tale patologia (individui diabetici ma non steatotici); il livello di steatosi correla inversamente con la secrezione di HGMB1.

La secrezione insulinica aumenta all'aumentare dei livelli di steatosi così come il valore del dosaggio della proteina C reattiva (Figura 34).

Il valore delle gamma GT dei livello 3 di steatosi (Figura 35) è considerevolmente maggiore del controllo livello zero mentre i valori dei livelli 1 e 2 si assestano leggermente al di sotto del controllo.

## **DISCUSSIONE**

HMGB1 possiede una duplice funzione a seconda dello stato in cui si trova la cellula: in condizioni fisiologiche è un fattore strutturale del DNA ma in condizioni di stress si comporta come una citochina infiammatoria, fuoriuscendo dal nucleo e venendo secreta attraverso un meccanismo  $Ca^{2+}$  dipendente (Passalacqua et al. 1997) (Oh et al 2009)

A causa della presenza di un meccanismo di rilascio attivo (Wang H et al 1999) ed un sistema recettore/signaling (Anderson et al 2000) (Degryse et al, 2001) (Stern et al 2002) è ragionevole considerare HMGB1 non semplicemente come un fattore strutturale di rimodellamento del DNA, ma soprattutto come una molecola di importanza fisiologica; Kokkola e colleghi hanno dimostrato (2002) come rivesta un ruolo nell'inizio e nella progressione dello stato infiammatorio. La secrezione di HMGB1 da parte delle cellule del sistema immunitario è nota in letteratura (Anderson et al 2000) (Semino et al 2005, 2007), tuttavia si pensava che questo fenomeno fosse ristretto alle sole cellule del sistema immunitario. Studi recenti dimostrano come HMGB1 possa essere secreta dalle cellule endoteliali in risposta ad uno stimolo infiammatorio (Mullins et al 2004) ed in condizioni tumorali (Kang HJ et al 2009).

Nel nostro laboratorio, utilizzando tecniche di elettroforesi bidimensionale, abbiamo precedentemente dimostrato come, nel confronto tra epatociti differenziati wild type e mancanti del recettore per l'insulina, esistano alterazioni nei livelli di espressione di una serie di proteine tra cui HMGB1: in particolare negli epatociti IRKO esistono alti livelli di espressione di HMGB1 che non si riscontrano negli epatociti WT.

Gli esperimenti di immunofluorescenza condotti in questo studio confermano questo dato.

L'immunofluorescenza dimostra che HMGB1 può essere localizzato a livello citoplasmatico o ai livelli nucleari in risposta a differenti stimoli utilizzati (Scaffidi et al 2002)( Bianchi et al 2004): in risposta alla stimolazione con iperglicemia e glucosamina la localizzazione citoplasmatica di HMGB1 è maggiore negli epatociti WT rispetto agli IRKO. È interessante notare come la mancanza del recettore insulinico provochi un maggiore localizzazione nucleare in risposta ai nostri trattamenti. Difatti negli epatociti mancanti del recettore dell'insulina si osserva una minore quantità di HMGB1 secreto rispetto agli WT. Si può ipotizzare un probabile ruolo attivo dell'insulina nella secrezione di HMGB1. Dalla letteratura (Oh et al 2009) è noto che la fosforilazione di HMGB1 è indotta dalla proteina chinasi C (PKC) una serina/treonina chinasi che viene attivata dalla fosfoatidil inositolo 3 chinasi(PI-3K); L'assenza del recettore dell'insulina, può spiegare la minore secrezione di HGMB1 nelle Hep IRKO rispetto alle Hep WT che invece hanno una normale e intatta via di trasmissione dell' insulina.

Al fine di valutare le conseguenze della lipotossicità a livelli epatici in relazione alla secrezione di HMGB1 abbiamo trattato le nostre cellule con acidi grassi .

Dai nostri dati è evidente come la miscela di un acido grasso saturo ed un insaturo provochi una drastica localizzazione citoplasmatica di HGMB1.

Questa localizzazione citoplasmatica nelle Hep WT è conseguenza dell'insulto lipotossico associato alla probabile attivazione della PKC mediato dagli acidi grassi stessi o dall'azione dell'insulina, mentre negli epatociti IRKO è meno evidente. La mancanza del recettore dell'insulina attenua infatti la localizzazione cellulare di HMGB1. L'attivazione della proteina chinasi C o un altro meccanismo attivato in conseguenza dell'insulto lipotossico può spiegare la localizzazione citoplasmatica di HMGB1 nelle cellule epatiche IRKO. Questa differenza, probabilmente, è mediata dalla mancata attivazione del segnale insulinico nelle cellule prive del recettore insulinico.

La rilocalizzazione di HMGB1 è evidente sia nelle Hep WT che nelle Hep IRKO anche dopo il trattamento con  $\text{TNF-}\alpha$ , (nota in letteratura come citochina che caratterizza lo stato infiammatorio cronico) la presenza nel citoplasma è conseguenza dello stato infiammatorio indotto dall'attivazione di JNK ed IKK. (Anderson et al 2000)(Degryse et al 2001)(Stern et al 2002)(Meshkani et al 2008). In questo caso, la localizzazione nucleare nelle cellule IRKO risulta sensibilmente minore rispetto alla cellule WT.

La funzionalità del recettore dell'insulina è condizione necessaria anche per la secrezione di HMGB1: dai nostri esperimenti risulta infatti che, rispetto alle Hep WT, le Hep IRKO hanno valori ridotti di HMGB1 secreto.

Difatti, la secrezione di HMGB1 è funzione della sua fosforilazione che ne previene l'ingresso nel nucleo. Questa modificazione è a carico della chinasi PKC una proteina effettrice del pathway dell'insulina: nel caso delle Hep IRKO, venendo a mancare tale chinasi abbiamo ad una ridotta localizzazione rispetto al modello WT. Con questo lavoro abbiamo dimostrato come la secrezione di HMGB1 in risposta ad iperglicemia, lipotossicità e stimolo pro-infiammatorio avvenga anche negli epatociti. Dai nostri esperimenti risulta inoltre che il trattamento con glucosamina uno dei substrati che viene indotto dopo esposizione ad iperglicemia e che può essere preso a modello nella valutazione del danno cellulare e/o tissutale in risposta ad iperglicemia.

Contemporaneamente alla valutazione della traslocazione e secrezione, abbiamo voluto valutare i danni in termini di apoptosi e/o necrosi arrecati alle nostre linee cellulari in conseguenza dei trattamenti sopra descritti: dalla letteratura sappiamo che i trattamenti con glucosamina ed acidi grassi incrementano l'apoptosi poiché attivano rispettivamente il pathway di NFkB



(James et al 2002) e di JNK(Malhi et al 2006), mentre il TNF- $\alpha$  è uno stimolo che induce l'attivazione della via estrinseca dell'apoptosi.

Gli acidi grassi, in particolare l'acido oleico, inducono apoptosi nelle nostre linee cellulari, mentre il TNF- $\alpha$  induce apoptosi nelle Hep WT ma non nelle IRKO; presi insieme, questi dati ci indicano che nel nostro modello sperimentale la principale condizione che porta all'apoptosi è l'esposizione agli acidi grassi ( che mima la condizione di obesità).

Questi dati indicano che la presenza del recettore dell'insulina e, quindi, dell'attivazione del network cellulare indotto dall'insulina previene l'apoptosi dopo insulto glucotossico (glucosamina). Differentemente l'attivazione del segnale insulinico associato alla stimolazione con il TNF- $\alpha$  attiva il processo apoptotico, almeno nel nostro modello cellulare. La presenza o meno del recettore insulinico non induce l'attivazione della necrosi.

In ultimo un aumento della sintesi e della secrezione della HMGB1 sembra essere correlato in maniera inversa ai livelli di apoptosi.

Dalla letteratura è noto che un'eccessiva concentrazione di ROS accompagnata da un decremento della concentrazione di molecole anti ossidanti costituiscono la base di numerose patologie (Czene et al 1995)(Chopra and Wallace1998):quindi abbiamo valutato la produzione di ROS nei nostri modelli sperimentali.

Le cellule Hep WT trattate con glucosio e glucosamina non mostrano un significativo incremento nella produzione dei ROS al contrario degli epatociti IRKO. Questo è giustificato dal fatto che il trattamento con glucosamina inibisce l'attività della AKT-1(vedi sopra). In condizioni di stress ossidativo, infatti, questa molecola svolge una funzione anti apoptotica (Datta et al 1991). La mancanza dell'attivazione di AKT-1 nelle Hep IRKO giustifica la maggiore concentrazione di ROS.

Nel caso dei trattamenti con acidi grassi, si nota un decremento della produzione di ROS in entrambe le linee cellulari dovuto all'inibizione da parte

dei trattamenti della funzione biologica del complesso III del mitocondrio (Schönfeld et al 2007).

La produzione di ROS risulta attenuata nel trattamento con il TNF- $\alpha$  alle nostre condizioni sperimentali in entrambe le linee cellulari. Secondo recenti lavori condotti su epatociti, l'azione di NF-kB inibisce l'attivazione di JNK indotta da TNF- $\alpha$  e per questo effetto si osserva una modulazione della produzione di ROS che possiede un effetto protettivo nei confronti della citotossicità indotta da TNF- $\alpha$ . (Wuallert et al 2006)

Abbiamo inoltre valutato le concentrazioni ematiche di HMGB1 in pazienti affetti da DT2 correlandolo con il grado di steatosi epatica.

HMGB1 può essere considerato un marker precoce di infiammazione perchè le concentrazioni aumentano nei sieri di pazienti affetti da sepsi e/o artrite reumatoide (Wang et al 2007).

Un recente lavoro ha stabilito che la concentrazione di HGMB1 nel siero controlli sani è di 1.69 ng/mL (Fukami et al 2009); basandoci su questo lavoro, abbiamo determinato che circa il 47% (N=51) dei pazienti da noi esaminati si assesta su valori maggiori di 1.60 ng/mL. Questo dato suggerisce che la HMGB1 può avere un ruolo nella patogenesi del DT2 e potrebbe essere un indicatore della severità della patologia e/o del rischio di sviluppare le complicanze croniche ad essa associate.

Secondariamente abbiamo preso in esame i livelli sierici di HGMB1 in pazienti diabetici affetti o meno da steatosi epatica non alcolica.

E' stata riscontrata una correlazione inversa tra valori di HMGB1 e grado di steatosi ed una correlazione diretta fra concentrazioni d'insulina e steatosi epatica. Questi dati sono indipendenti dal grado di obesità e dai valori di trigliceridi. Quindi la HMGB1 può essere considerato un marcatore precoce di disfunzione epatica nei pazienti diabetici.

## CONCLUSIONI

L'identificazione di nuovi marker che definiscano una patologia o che ne determinino la gravità è alla base dello sviluppo di nuovi e più mirati approcci terapeutici, che potranno condurre alla produzione di nuovi farmaci.

Nel contesto del Diabete Mellito di tipo 2, la proteina HMGB1 risulta essere un buon candidato per la sua capacità di agire come citochina infiammatoria in grado di perpetuare lo stato infiammatorio; con il nostro lavoro abbiamo dimostrato che la secrezione di questa proteina non è caratteristica solamente delle cellule del sistema immunitario o, come più recentemente dimostrato, del tessuto endoteliale (Mullins et al 2004), ma risulta essere presente negli epatociti; l'iperglicemia non sortisce effetti sulla secrezione della HMGB1, mentre i trattamenti che mimano le complicanze del diabete (glucosamina), l'obesità ( FFA ) e l'infiammazione (TNF) hanno effetti. Questo può indicare che la secrezione di HMGB1 è un fenomeno che si riscontra nelle fasi tardive dello sviluppo del diabete.

L'importanza di HMGB1 come biomarker si può riscontrare nel suo dosaggio nei sieri di pazienti diabetici; nonostante la terapia, una percentuale non trascurabile possiede valori di HMGB1 al di sopra della norma. In pazienti diabetici affetti da steatosi epatica non alcolica si riscontra una correlazione inversa tra livello di steatosi e secrezione di HMGB1.

Il dato sulla steatosi risulta ancor più interessante se si tiene presente che all'aumentare del livello di steatosi, i parametri che rendono conto del danno epatico(gamma GT), della secrezione di insulina e del livello di infiammazione (PCR) aumentano al contrario della secrezione di HMGB1 che però risulta elevata in pazienti diabetici senza steatosi. Un recente lavoro(Konho et al 2009) ha assegnato ad HMGB1 un ruolo protettivo: in particolare HMGB1

potrebbe avere un ruolo essenziale nel processo di guarigione nel periodo post-infarto; è interessante notare come al livello metabolico la secrezione di HGMB1 possa essere associata ad apoptosi, necrosi e produzione di ROS mentre ad altri livelli rivesta un ruolo protettivo.

## **RINGRAZIAMENTI**

Nessun lavoro può essere condotto da soli, specialmente nel nostro Mestiere; E' per questo che alla fine del mio lavoro di dottorato desidero ringraziare le persone senza le quali non avrei potuto svolgerlo: Innanzitutto il Prof. Renato Lauro, Magnifico Rettore dell' Università degli studi di Roma "Tor Vergata", che mi ha ospitato nei Suoi Laboratori dandomi l'opportunità di svolgere questo lavoro.

Il Prof. Davide Lauro, mio Docente Guida che mi è stato accanto con dedizione e scrupolosa professionalità.

La Dott.ssa Giulia Donadel, responsabile del Laboratorio di Medicina Molecolare, per i suoi consigli e per la pazienza con la quale mi ha assistito.

La Dott.ssa Barbara Capuani, mio tutor, che mi è stata accanto nella quotidianità del laboratorio, il cui appoggio umano ed intellettuale mi è stato di enorme aiuto in questi tre anni.

Il Dott. Marco Lombardo che mi ha insegnato ad utilizzare il citofluorimetro ed il microscopio confocale e che si è rivelato un prezioso collega ed amico.

La Dott.ssa Francesca Ferrelli per tutto l'appoggio umano e scientifico che non ha mai mancato di elargirmi

La Dott.ssa Donatella Pastore la cui professionalità e la cui contagiosa allegria hanno fatto la differenza in alcuni giorni bui

La Dott.ssa Katia Basello che ha condiviso con me i miei primi due anni di dottorato e molti momenti lieti sia dal punto di vista umano che professionale

Il Dott. Roberto Arriga per tutto il suo appoggio ed il suo aiuto

La Dott.ssa Sara Caratelli che aiutato me , semi-sconosciuto, nella correzione delle bozze di questo lavoro fermandosi anche fino a tardi.

Tutti i ragazzi e le ragazze ed i Ragazzi del Laboratorio di Medicina Molecolare ed il tecnico Ezio, per aver reso meno difficile e pesante il lavoro di tutti i giorni.

Ringrazio tutta la mia Famiglia che mi ha appoggiato fino ad ora e a cui devo la mia formazione Umana prima e solo dopo, professionale

Ringrazio Valentina che mi è sempre stata accanto in questi tre anni non mollandomi nemmeno per un attimo anche quando c'erano più di 2000 Km di distanza tra noi.

Ringrazio tutti miei amici che mi hanno supportato e sopportato per tutto questo tempo.

## **BIBLIOGRAFIA**

**American Diabetes Association.** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. . Diabetes Care. (gennaio 2009).

**Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ.**High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes J. Exp Med 2000

**Aronson D** Hyperglycemia and the Pathobiology of Diabetic Complications Cardiovascular Diabetology: *Clinical, Metabolic and Inflammatory Facets* (2009)

**Balkwill F.** TNF- $\alpha$  in promotion and progression of cancer Cancer Metastasis Review 2006

**Bell CW, Jiang W, Reich CF 3rd, Pisetsky DS.** The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. American journal of physiology. *Cell physiology* (2006)

**Bianchi ME, Manfredi AA** High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. Immunological review 2007

**Bianchi ME.** Prokaryotic HU and eukaryotic HMG1: a kinked relationship Molecular Microbiology 1994)

**Bianchi, ME.** Significant (re)location: how to use chromatin and/or abundant proteins as messages of life and death. Trends in cell biology 2004.

*Biochemical Pharmacology* (1998)

**Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, Rubartelli A, Agresti A, Bianchi ME** Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion *EMBO J* 2003)

**Brunetti A, Manfioletti G, Chiefari E, Goldfine ID, Foti D** Transcriptional regulation of human insulin receptor gene by the high-mobility group protein HMGI(Y). *FASEB Journal* 2001

**Buse M** Hexosamines, insulin resistance and the complications of diabetes: current status. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* (2006)

**Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtländer T, Ferrier P, Ferrari S, Bianchi ME.** The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes

**Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtländer T, Ferrier P, Ferrari S, Bianchi ME..** The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nature. Genetics.* (1999)

**Chen G, Goeddel DV.** TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway *Science* 2002

**Chen YD, Golay A, Swislocki ALM, Reaven GM.** Resistance to insulin suppression of plasma free fatty acid concentrations and insulin stimulation of glucose uptake in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* (1987)

**Chopra S, Wallace HM.** Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in

**Chuo JY** Establishment of rat fetal liver lines and characterization of their metabolic and hormonal properties: use of temperature-sensitive SV40 virus. *Methods in Enzymology* (1985)

**Creager MA, Lüscher TF, Cosentino F, Beckman JA.** Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Circulation* (2003)



**Czene S, Tiback M, Harms-Ringdahl M.** pH-dependent DNA cleavage in permeabilized human fibroblasts. *Biochemical Journal* (1997)

**Datta SR, Brunet A, Greenberg ME.** Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Development* (1991)

**Davis SN SN, Umpierrez GE.** Diabetic ketoacidosis in type 2 diabetes mellitus pathophysiology and clinical presentation Nature clinical practice. *Endocrinology and Metabolism* (2007)

**DeFronzo RA, Ferrannini E.** Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* (1991).

**Degryse B Bonaldi T, Scaffidi P, Müller S, Resnati M, Sanvito F, Arrighi G, Bianchi ME** The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *Journal of Cell Biology.* (2001)

**Derecka K, Wang CK, Flint AP.** “Interactions Between the Cytomegalovirus Promoter And The Estrogen responsive element: Implication for design on estrogen-responsive Reporter Plasmids” *Journal of biomolecular techniques* (2006)

**Devaraj S, Dasu M. R. , Park S. H., Jialal I.** Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes *Diabetologia* (2009)

**Dubois M, Vacher P, Roger B, Huyghe D, Vandewalle B, Kerr-Conte J, Pattou F, Moustaid-Moussa N, Lang J.** Glucotoxicity inhibits late steps of insulin exocytosis. *Endocrinology* (2007);

**Dunn JA, Patrick JS, Thorpe SR, Baynes JW.** Oxidation of glycosylated proteins: age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in lens proteins. *Biochemistry,* (1989)

**Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R.** Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation

modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells.

*Circulation* (2002)

**Foti D, Chiefari E, Fedele M, Iuliano R, Brunetti L, Paonessa F, Manfioletti G, Barbetti F, Brunetti A, Croce CM, Fusco A, Brunetti A:**

Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice *Nature Medicine* (2005)

**Foulis AK, McGill M, Farquharson MA.** Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man — macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *Journal of Pathology* (1991)

**Frangioudakis G, Cooney GJ** Acute elevation of circulating fatty acids impairs downstream insulin signalling in rat skeletal muscle *in vivo* independent of effects on stress signalling *Journal of Endocrinology* (2008)

**Fukami A, Adachi H, Yamagishi SI, Matsui T, Ueda SI, Nakamura K, Enomoto M, Otsuka M, Kumagae SI, Nanjo Y, Kumagai E, Esaki E, Murayama K, Hirai Y, Imaizumi T.** Factors associated with serum high mobility group box 1 (HMGB1) levels in a general population. *Metabolism Clinical and Experimental* (2009)

**Fukami A, Adachi H, Yamagishi SI, Matsui T, Ueda SI, Nakamura K, Enomoto M, Otsuka M, Kumagae SI, Nanjo Y, Kumagai E, Esaki E, Murayama K, Hirai Y, Imaizumi T.** Factors associated with serum high mobility group box 1 (HMGB1) levels in a general population. *Metabolism* (2009)

**Fukami A, Adachi H, Yamagishi SI, Matsui T, Ueda SI, Nakamura K, Enomoto M, Otsuka M, Kumagae SI, Nanjo Y, Kumagai E, Esaki E, Murayama K, Hirai Y, Imaizumi T.** Factors associated with serum high mobility group box 1 (HMGB1) levels in a general population. *Metabolism* (2009)

**Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrissi MR, Bianchi ME, Rubartelli A.** The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO rep.* 2002

**Hagiwara S, Iwasaka H, Hasegawa A, Koga H, Noguchi T** Effects of hyperglycemia and insulin therapy on high mobility group box 1 in endotoxin-induced acute lung injury in a rat model *Critical care medicine* (2005)

**Harrison et al** Internal Medicine 16th edition *McGraw Hill*

**Herold K, Moser B, Chen Y, Zeng S, Yan SF, Ramasamy R, Emond J, Clynes R, Schmidt AM.** Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in a dash to the rescue: inflammatory signals gone awry in the primal response to stress. *J Leukoc Biol* 2007

**Hoppe G, Talcott KE, Bhattacharya SK, Crabb JW, Sears JE.** Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmgb *Experimental cell research* (2006)

**Hotamisligil GS.** Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 1999

**Hottamisilgil GS, Shargill NS, Spiegelman BM.** Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance *Science* (1993)

**Huang JH et al** "Binding of Estrogen Receptor □ to Estrogen Response Element in situ Is Independent of Estradiol and Impaired by Its Amino Terminus" *Molecular Endocrinology* 2005

**Huang PL** Unraveling the links between diabetes obesity and cardiovascular disease *Circulation Research* (2005)

**Huang PL.** A comprehensive definition for metabolic syndrome *Disease model and mechanism*(2009)

**Huang WJ, Tung CW, Ho C, Yang JT, Chen ML, Chang PJ, Lee PH, Lin CL, Wang JY.** Ras activation modulates methylglyoxal-induced mesangial cell apoptosis through superoxide production. *Renal Failure* 2007

human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species.

**James LR,<sup>1</sup> Tang D., Ingram A., Ly H, Thai K,<sup>1</sup> Cai L,<sup>1</sup>** Scholey WJ Flux Through the Hexosamine Pathway Is a Determinant of Nuclear Factor  $\kappa$ B-Dependent Promoter Activation *Diabetes* (2002)

**Jones PS, Parrott E, White IN.** Activation of Transcription by Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  Is Cell Type and Promoter dependent *The journal of biological chemistry* 1999

**Kang HJ, Lee H, Choi HJ, Youn JH, Shin JS, Ahn YH, Yoo JS, Paik YK, Kim H.** Non-histone nuclear factor HMGB1 is phosphorylated and secreted in colon cancers. *Laboratory Investigation* 2009

**Kindt TJ , Goldsby RA, Osborne BA, Kuby** Immunology, 6a ed. *UTET*

**King GL, Loeken MR.** Hyperglycaemia- induced oxidative stress in diabetes complications *Histochem Cell Biology* 2004

**Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Blüher M, Unger T, Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N..** T-lymphocyte Infiltration in Visceral Adipose Tissue: A Primary Event in Adipose Tissue Inflammation and the Development of Obesity-Mediated Insulin Resistance. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* (2008)

**Kokkola R, Sundberg E, Ulfgren AK, Palmblad K, Li J, Wang H, Ulloa L, Yang H, Yan XJ, Furie R, Chiorazzi N, Tracey KJ, Andersson U, Harris HE.** High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 a Novel Proinflammatory Mediator in Synovitis *Arthritis Rheum* (2002)

**Kowluru RA, Chan PS.** Oxidative stress in and diabetic retinopathy *Experimental diabetes research* 2007

**Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW.** Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc

transferase with multiple tetratricopeptiderepeats. *Journal of Biological Chemistry* (1997)

**Kumar V, Abbass A.K., Fausto N.** Le Basi Patologiche delle Malattie (7a edizione), *Torino, Elsevier, 2006*

**Landin K, Tengborn L, Smith U** Elevated fibrinogen and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in hypertension are related to metabolic risk factors for cardiovascular disease. *Journal of Internal Medicine* (1990)

**Lemieux I, Pascot A, Prud'homme D, Alméras N, Bogaty P, Nadeau A, Bergeron J, Després JP.** Elevated C-reactive protein: another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, (2001)

**LeRoith D.** Beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *American Journal of Medicine* (2002); lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nature Genetics* 1999)

**Ling PR, Bistrrian BR** Hperglycaemia induced by glucose infusion causes oxidative stress and systemic inflammation, but not STAT3 or MAP kinase activation in liver in rats. *Metabolism* (2003)

**Liu H, Yao YM, Yu Y, Dong N, Yin HN, Sheng ZY** Role of Janus kinase/ signal trasducer and activator of transcriptional pathway in regulation of expression and inflammation promoting activity of high mobility group box protein 1 in rat peritoneal macrophages *Shock* 2007

**Lloyd DJ, Trembath RC, Shackleton S.** A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodistrophy and other laminopathies. 2002. *Hum. Mol. Genet.* (2002)

**Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA.** O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J Journal of Biological Chemistry* (1997)

**Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW Gores GJ** Free fatty acids induce JNK dependent hepatocytes lipoapoptosis *Journal of Biological Chemistry* (2006)

**Marrack P, Kappler J.** Control of T cell viability. *Annual Review of Immunology* 2004

**Medarova Z, Pham W, Farrar C, Petkova V, Moore A.** In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors *Nature medicine* 2007

**Meshkani R, Adeli K.** Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease *The Canadian Society of Clinical Chemists* (2009)

**Monaco F** Endocrinologia clinica III Ed. *SEU-Roma*

**Morey-Holton ER, Globus RK.** Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *Journal of Applied Physiology*, 2002

**Mullins GE, Sunden-Cullberg J, Johansson AS, Rouhiainen A, Erlandsson-Harris H, Yang H, Tracey KJ, Rauvala H, Palmblad J, Andersson J, Treutiger CJ.** Activation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells leads to relocation and release of high mobility group box chromosomal protein 1 *Scandinavian Journal of Immunology Immunology* (2004)

**Najima Y, Yahagi N, Takeuchi Y, Matsuzaka T, Sekiya M, Nakagawa Y, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Okazaki S, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Kadowaki T, Ishibashi S, Yamada N, Osuga J, Shimano H.** High mobility group protein-B1 interacts with sterol regulatory element-binding protein to enhance their DNA binding. *Journal of Biological Chemistry* (2005)

**Obrosova IG.** Increased Sorbitol Pathway Activity Generates Oxidative Stress

**Oh YJ, Youn JH, Ji Y, Lee SE, Lim KJ, Choi JE, Shin JS.** HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium-dependent mechanism. *Journal of Immunology* 2009

**Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, Cossu G, Bianchi ME** Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *Journal of Cell Biology*. 2004

**Passalacqua M, Zicca A, Sparatore B, Patrone M, Melloni E, Pontremoli S.** Secretion and binding HMG1 protein to the external surface of the membrane are required for murine erytroleukemia cell differentiation. *FEBS*. (1997)

**Patti ME, Virkamaki A, Landaker EJ, Kahn CR, Yki-Jarvinen H.** Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes* (1999)

**Pessin JE, Saltiel AR.** Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance *the journal of clinical investigation* (2000)

**Phair RD, Scaffidi P, Elbi C, Vecerová J, Dey A, Ozato K, Brown DT, Hager G, Bustin M, Misteli T** Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins. *Mol Cell Biol*. (2004)

**Qin B., Anderson RA, Adeli K** Tumor necrosis factor- $\alpha$  directly stimulates the overproduction of hepatic apolipoprotein B100-containing VLDL via impairment of hepatic insulin signaling *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* (2008)

Reversal obesity and diet induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I $\kappa$ B- $\beta$  *Science* (2001)

**Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, Fantoni LI, Marra F, Bertolotti M, Banni S, Lonardo A, Carulli N, Loria P.** Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of gastroenterology and hepatology* (2008)

**Robretson RP.** Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes *Current Opinion in Pharmacology* (2006)

**Ross R, Aru J, Freeman J, Hudson R, Janssen I.** Abdominal adiposity and insulin resistance in obese men. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, (2002)

**Rudich A Tirosh A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H, Bashan N.** Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes *Diabetes* (1998)

**Sahu D, Debnath P, Takayama Y, Iwahara J.** Redox properties of the A-domain of the HMGB1 protein. *FEBS letters* (2008)

**Sappington PL, Yang R, Yang H, Tracey KJ, Delude RL, Fink MP.** HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology* 2002

**Scaffidi P Misteli T, Bianchi ME.** Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation *Nature* 2002)

**Schönfeld P, Wojtczak L** Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochimica et biophysica Acta* (2007)

**Semenkovich CF** Insulin resistance and atherosclerosis *Journal of clinical investigation* (2006).

**Semino C, Angelini G, Poggi A, Rubartelli A** NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1 *Blood* (2005)

**Semino C, Ceccarelli J., Lotti LV., Torrisi, MR Angelini G Rubartelli A,** The maturation potential of NK cell clones toward autologous dendritic cells correlates with HMGB1 secretion *Journal of leukocyte biology* (2007)

**Sims CA, Wattanasirichaigoon S, Menconi MJ, Ajami AM, Fink MP.** Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion-induced intestinal mucosal injury in rats. *Critical Care Medicine* 2001

**Soro-Paavonen A, Watson AM, Li J, Paavonen K, Koitka A, Calkin AC, Barit D, Coughlan MT, Drew BG, Lancaster GI, Thomas M, Forbes JM,**



**Nawroth PP, Bierhaus A, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA.** Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes*(2008)

**Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP.** Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs *Nature* 2007

**Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, Smith SR.** A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* 2005

**Spiegelman BM, Flier JS.** Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001;

**Stemmer C, Ritt C, Igloi GL, Grimm R, Grasser KD.** Variability in *Arabidopsis thaliana* chromosomal high-mobility-group-1-like proteins. *European journal of biochemistry / FEBS* 1997

**Stern D Yan SD, Yan SF, Schmidt AM.** Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2002

**Stimson L, Rowlands MG, Newbatt YM, Smith NF, Raynaud FI, Rogers P, Bavetsias V, Gorsuch S, Jarman M, Bannister A, Kouzarides T, McDonald E, Workman P, Aherne GW.** Isothiazolones as inhibitors of PCAF and p300 histone acetyltransferase activity *Molecular Cancer Therapeutics*. 2005)

**Suzuki T, Hirata K, Elkind MS, Jin Z, Rundek T, Miyake Y, Boden-Albala B, Di Tullio MR, Sacco R, Homma S.** Metabolic syndrome, endothelial dysfunction, and risk of cardiovascular events: the Northern Manhattan Study (NOMAS). *American Heart Journal* (2008).

**Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM.** Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumor growth and metastase *Nature* (2000)

**Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM.** Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* (2000)

**Tan KC, Shiu SW, Chow WS, Leng L, Bucala R, Betteridge DJ.** Association between serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and circulating advanced glycation end products in type 2 diabetes. *Diabetologia* (2006)

**Tang D, Shi Y, Kang R, Li T, Xiao W, Wang H, Xiao X.** Hydrogen peroxide stimulates macrophages and monocytes to actively release HMGB1. *Journal of Leukocyte Biology* 2007

**Taniguchi N Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, Inoue K, Yamada S, Ijiri K, Matsunaga S, Nakajima T, Komiya S, Maruyama I.** High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 2003

**Tsung A, Klune JR, Zhang X, Jeyabalan G, Cao Z, Peng X, Stolz DB, Geller DA, Rosengart MR, Billiar TR.** HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *Journal of experimental medicine* (2007)

**Ulloa L, Ochani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, Yang R, Czura CJ, Fink MP, Tracey KJ.** Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003

**Ulloa L, Ochani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, Yang R, Czura CJ, Fink MP, Tracey KJ.** Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis in the hospital setting: The case for improved control among non-dietics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2005)

**Ulloa L, Tracey KJ.** The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends in Molecular Medicine* 2005

**Ulloa L.** The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. *Nature Review Drug Discovery* 2005

**Van Dam PS.** Oxidative stress and diabetic neuropathy: pathophysiological mechanism and treatment perspectives *Diabetes Metabolic Research Review* (2002)

**Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, Desouza CA.** Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity* (2006)

**Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL.** Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy *Endocrinological Review* 2004

**Vosseller K, Wells L, Lane MD, Hart GW.** Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002)

**Walker , Gooderham K, Hastings JR, Mayes E, Johns EW.** The primary structure of non histone chromosomal proteins HMG-1 and 2 *FEBS lett* 1980)

**Wang D, Zamorano J, Keegan AD, Boothby M.** HMG-1(Y) phosphorylation status as a nuclear target regulated through insulin receptor substrate 1 and the I4R motif of the interleukin 4 receptor. *Journal of Biological Chemistry* (1997)

**Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama**

**A, Tracey KJ.** HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice (*Science* 1999)

**Wang H, Li W, Goldstein R, Tracey KJ, Sama AE.** HMGB1 as a potential therapeutic target. *Novartis Found Symp* (2007)

**Wang X, Phelan SA, Petros C, Taylor EF, Ledinski G, Jürgens G, Forsman-Semb K, Paigen B.** Peroxiredoxin-6 deficiency and atherosclerosis susceptibility in mice: significance of genetic background for assessing atherosclerosis. *Atherosclerosis*. (2004).

**Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr.** Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *Journal of Clinical Investigation* .(2003)

**Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr.** Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue *Journal of clinical investigation* (2003)

**Wellen KE, Hotamisligil GS,** Inflammation, stress, and diabetes, *Journal of Clinical Investigation*. 2005

**Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW.** "Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose".*Biochemistry*. (1995).

**Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW.** Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose".*Biochemistry*. 1995

**Wittmeyer J, Formosa T.** The *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase alpha catalytic subunit interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMG1-like protein *Journal of molecular cell biology* 1997)

- Wullaert A, Heyninck K, Beyaert R.** Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF-kappaB and JNK activation in hepatocytes. *Biochemical pharmacology* (2006)
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H.,** Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance, *J. Clin. Invest.* (2003),
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H.** Chronic inflammation in fat plays a crucial role in development of obesity related insulin resistance *Journal of clinical investigation* (2003)
- Yan XX, Lu L, Peng WH, Wang LJ, Zhang Q, Zhang RY, Chen QJ, Shen WF.** Increased serum HMGB1 level is associated with coronary artery disease in nondiabetic and type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* (2009)
- Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ.** The cytokine activity of HMGB1. *Journal of Leukocyte Biology* 2005
- Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjerkke RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L.** Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes*, (2001)
- Yotov WV, St-Arnaud R.** Nucleotide sequence of a mouse cDNA encoding the non histone chromosomal high mobility group protein-1 (HMG1). *Nucleic Acid Res* 1992)
- Youn JH, Shin JS.** Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *Journal of Immunology* (2006)