



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

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA
SPERIMENTALE

XXII CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO

**TIMP3: un nuovo biomarcatore di Aterosclerosi nel
Diabete Mellito di tipo 2. Studi in vivo ed in vitro.**

Dottoranda: Marina Cardellini

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: **Prof. Massimo Federici**

Coordinatore: **Prof. Renato Lauro**

Indice

Sommario	pag. 1
Abstract	pag. 3
Capitolo Primo: INTRODUZIONE	pag. 5
1.1 Diabete ed Aterosclerosi.....	pag. 5
1.2 Diabete, Aterosclerosi e Infiammazione: patofisiologia dalla stria lipidica alla rottura di placca.....	pag. 6
1.3 Ruolo delle Metalloproteasi di membrana 2 e 9 nella lesione aterosclerotica diabetica.....	pag. 9
1.4 TNF- α Converting Enzyme (TACE)/ADAM17.....	pag. 10
1.5 Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 (TIMP3).....	pag. 11
1.6 Il sistema proteolitico di membrana.....	pag. 12
1.7 Deacetilasi SirT1.....	pag. 13
Capitolo Secondo: SCOPO DELLA TESI	pag. 15
Capitolo Terzo: MATERIALI E METODI	pag. 16
3.1 Popolazioni dello studio.....	pag. 16
3.2 Studio sulle placche aterosclerotiche.....	pag. 17
3.3 Analisi istologica delle placche carotidee.....	pag. 18
3.4 Estrazione di RNA totale ed analisi quantitativa mediante Real-time PCR.....	pag. 18
3.5 Estrazione di proteine e saggio di attività di TACE.....	pag. 19
3.6 Attività delle MMP9.....	pag. 20
3.7 Analisi mediante western blot.....	pag. 20
3.8 Determinazioni analitiche.....	pag. 21
3.9 Preparazione, ossidazione e glicazione delle LDL native...pag.	22
3.10 Colture cellulari.....	pag. 22
3.11 Saggio di regolazione del promotore di TIMP3.....	pag. 23
3.12 Analisi statistica.....	pag. 24
Capitolo Quarto: RISULTATI	pag. 25

4.1	Insulino resistenza ed attività del sistema proteolitico di membrana in soggetti con differente localizzazione di aterosclerosi.....	pag. 25
4.2	Correlazioni fra alterazioni metaboliche e attivazione del sistema proteolitico di membrana.....	pag. 28
4.3	Aumento dei livelli dei substrati solubili di TACE/ADAM17 in presenza di alterazioni del metabolismo glucidico.....	pag. 30
4.4	Placche aterosclerotiche di soggetti diabetici di tipo 2 mostrano ridotti livelli di TIMP3.....	pag. 31
4.5	Regolazione dell'espressione di TIMP3 in vitro in cellule muscolari lisce coronariche umane.....	pag. 35
4.6	Regolazione dell'espressione di TIMP3 in vitro in cellule endoteliali e monocitiche umane.....	pag. 36
4.7	Espressione di SirT1 ed alterazioni del metabolismo glucidico.....	pag. 36
4.8	SirT1 regola l'espressione di TIMP3.....	pag. 38
	Capitolo Quinto: DISCUSSIONE.....	pag. 40
	Capitolo Sesto: CONCLUSIONI.....	pag. 44
	Bibliografia.....	pag. 45

Sommario

Nei pazienti affetti da Diabete Mellito di Tipo 2 l'aterosclerosi è fortemente accelerata da meccanismi ancora oggi sconosciuti. Il nostro gruppo recentemente ha identificato l'Inibitore Tissutale delle Metalloproteasi 3 (TIMP3), che è l'inibitore endogeno dell'enzima TNF α Converting Enzyme (TACE), anche chiamato A Disintegrin and Metalloprotease Domain 17 (ADAM17) e di altre MetalloProteasi di Matrice (MMP), come un gene favorente lo sviluppo di insulino resistenza e infiammazione vascolare nel topo.

Abbiamo quindi ipotizzato che un'aumentata attività del sistema proteolitico di membrana extracellulare, dovuta ad una alterata regolazione della diade ADAM17/TIMP3, possa essere un fattore comune allo sviluppo e progressione dell'aterosclerosi, dell'insulino resistenza e del diabete. Ulteriore scopo di questo lavoro è valutare l'associazione di TIMP3 con l'aterosclerosi in pazienti affetti da Diabete Mellito di Tipo 2 (DM2) ed identificare fattori in grado di regolare l'espressione di TIMP3.

I substrati solubili circolanti di ADAM17/TACE, quali sICAM-1, sVCAM-1, sIL6R, sCXCL16 e sTNFR1, sono stati analizzati nei sieri di soggetti sani di controllo (CT, n=70), pazienti con Aterosclerosi Carotidea (CAR-Ats, n=35) e pazienti con Coronaropatia (CAD, n=170). Inoltre abbiamo valutato i livelli di espressione di ADAM10/17, MMP9, TIMP1/2/3/4 in placche aterosclerotiche carotidiche umane (n=60) prelevate da pazienti con e senza diabete sottoposti ad Endoarteriectomia carotidea. Cellule muscolari lisce vascolari umane esposte a diversi stimoli metabolici sono state utilizzate per identificare i regolatori dell'espressione di Timp3. Il silenziamento genico di SirT1 mediante small interference RNA (siRNA), SirT1 cDNA e un vettore reporter per il promotore del gene TIMP3 sono stati usati per studiare la regolazione dell'espressione di TIMP3 da parte di SirT1.

In questo lavoro abbiamo riscontrato che, fra i substrati solubili di ADAM17/TACE, sCXCL16, sICAM-1 e sVCAM1 sono differenzialmente e

significativamente aumentati a seconda della localizzazione della patologia vascolare aterosclerotica e dell'alterazione del metabolismo glucidico.

Abbiamo inoltre mostrato che nelle placche aterosclerotiche carotidee umane i livelli di espressione di TIMP3 sono significativamente ridotti nei soggetti con diabete mellito di tipo 2 con un conseguente aumento dell'attività di ADAM17/TACE e MMP9. La ridotta espressione di TIMP3 è stata associata in vivo ai livelli di SirT1. Nelle cellule muscolari lisce vascolari umane, l'inibizione dell'attività e dei livelli di SirT1 determina una riduzione dell'espressione di TIMP3, mentre una sovra-espressione di SirT1 aumenta l'attività del promotore di TIMP3.

In conclusione, i nostri dati suggeriscono che il sistema proteolitico di membrana è gradualmente attivato in soggetti con differente localizzazione della patologia aterosclerotica. Inoltre nelle placche aterosclerotiche di soggetti con il diabete mellito di tipo 2 la deregolazione dell'attività di ADAM17/TACE e delle MMP9 è correlata con un'inadeguata espressione di TIMP3 SirT1-dipendente. Gli studi effettuati su cellule vascolari confermano il ruolo di Sirt1 nel modulare l'espressione di TIMP3.

Abstract

Atherosclerosis is accelerated in patients with Type 2 Diabetes Mellitus (DM2) by unknown mechanisms. We identified Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 (TIMP3), the endogenous inhibitor of A Disintegrin and Metalloprotease Domain 17 (ADAM17) and other Matrix MetalloProteinase (MMP), as a gene modifier for insulin resistance and vascular inflammation in mice. Therefore we hypothesized that an increased activity of the ectodomain shedding process, due to a dysregulation of ADAM17/Timp3 dyad, may be a common factor linking progression of atherosclerosis to insulin resistance and diabetes. Here we also tested TIMP3 association with atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus (DM2) and identified Sirtuin 1 (SirT1) as a major regulator of TIMP3 expression.

ADAM17 substrates, such as soluble (s)ICAM-1, sVCAM-1, sIL6R, sCXCL16 and sTNFR1, were analyzed in serum from healthy subjects (CT, n=70), patients with Carotid Atherosclerosis (CAR-ATS, n=35) and patients with Coronary Artery Disease (CAD, n=170). Moreover we investigated ADAM10/17, MMP9, TIMP1/2/3/4 expression levels in human carotid atherosclerotic plaques (n=60) from subjects with and without diabetes. Human Vascular Smooth Muscle cells exposed to several metabolic stimuli were used to identify regulators of Timp3 expression. SirT1 small interference RNA (siRNA), cDNA and TIMP3 promoter gene reporter were used to study SirT1 dependent regulation of TIMP3.

We found that, among soluble ADAM17 substrates, sCXCL16, sICAM-1 and sVCAM1 were differently and significantly increased according to location of vascular disease and impairment of glucose metabolism. We showed that in human carotid atherosclerotic plaques TIMP3 was significantly reduced in subjects with DM2 leading to ADAM17 and MMP9 overactivity. Reduced expression of TIMP3 was associated in vivo to SirT1 levels. In smooth muscle cells, inhibition of SirT1 activity and levels reduced TIMP3 expression, while SirT1 overexpression increased TIMP3 promoter activity.

In conclusion, our data suggest that the ectodomain shedding process is gradually activated in patients with different location of atherosclerotic disease. Moreover in atherosclerotic plaques from subjects with Type 2 diabetes the deregulation of ADAM17 and MMP9 activities is related to inadequate expression of TIMP3 via SirT1. Studies in vascular cells confirmed the role of SirT1 in tuning TIMP3 expression.

Capitolo Primo

INTRODUZIONE

1.1 Diabete ed Aterosclerosi

Il diabete mellito di tipo 2 amplifica il rischio di mortalità e morbilità cardiovascolare. Negli ultimi anni si è assistito, nei pazienti diabetici, ad un aumento epidemico delle complicanze microvascolari, quali la retinopatia e la nefropatie, e soprattutto delle complicanze macrovascolari, rappresentate da coronaropatia, arteriopatia obliterante degli arti inferiori e patologia aterosclerotica dei vasi carotidei.

Le manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi si verificano principalmente a livello di 3 distretti vascolari: le arterie coronariche, carotidee extracraniche e degli arti inferiori. Il diabete aumenta l'incidenza e peggiora il decorso clinico delle manifestazioni cliniche correlate all'aterosclerosi.

I pazienti diabetici hanno un rischio di sviluppare patologie cardiovascolari aumentato di 2-4 volte rispetto ai pazienti non diabetici [1]. In uno studio di popolazione, l'incidenza di un primo infarto miocardico o di morte a 7 anni dall'arruolamento è del 20% nei pazienti diabetici contro il 3,5% della popolazione non diabetica [2]. I pazienti diabetici inoltre hanno lo stesso rischio di presentare un evento coronarico acuto dei pazienti non diabetici con un pregresso infarto miocardico acuto ed, in caso di evento, hanno una peggior prognosi precoce e tardiva.

Inoltre i pazienti diabetici hanno una frequenza di aterosclerosi carotidea 5 volte aumentata rispetto ai non diabetici ed un rischio di manifestare un ictus aumentato tra il 150% e il 400%, rischio che aumenta fortemente nei soggetti con età inferiore ai 55 anni [4].

Nella popolazione generale le donne mostrano una protezione dalla comparsa di eventi cardiovascolari: questo effetto protettivo è completamente perso in presenza del diabete.

1.2 Diabete, Aterosclerosi ed Infiammazione: patofisiologia dalla stria lipidica alla rottura di placca

Lo stato metabolico alterato tipico della patologia diabetica, caratterizzato da iperglicemia cronica, dislipidemia e insulino resistenza, causa una disfunzione a livello del sistema vascolare arterioso, coinvolgendo numerose cellule, fra cui le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce e le piastrine. In particolar modo il diabete altera la vasodilatazione endotelio-dipendente, mediata dall'ossido nitrico (NO), già prima dello sviluppo dell'ateroma attraverso vari meccanismi: l'iperglicemia inibisce l'attivazione della NO sintasi endoteliali (eNOS) ed aumenta la produzione di specie reattive dell'ossigeno, gli acidi grassi liberi rilasciati in eccesso dal tessuto adiposo attivano il segnale attraverso la via della protein chiansi C (PKC), inibendo la fostatidilinositolo-3-chinasi (PI3K). Nel soggetto diabetico inoltre è aumentata la produzione di sostanze vasocostrittrici a livello endoteliale, quali endotelina-1, prostanoidi ed angiotensina II [5].

Stimoli proinfiammatori come l'insulino resistenza, l'iperglicemia, l'ipercolesterolemia, l'obesità, l'ipertensione ed il fumo, determinano l'espressione a livello endoteliale di molecole di adesione, come P-selectina e vascular cell adhesion molecole-1 (VCAM-1), che mediano il reclutamento di monociti e linfociti circolanti. Fattori chemiotattici, tra cui il monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), prodotti dalla parete vascolare in risposta all'esposizione a lipoproteine modificate, favoriscono la migrazione e la diapedesi dei monociti aderenti all'endotelio. I monociti aderenti alle cellule endoteliali

aumentano notevolmente la produzione di metalloproteasi di membrana-9 (MMP9), consentendo la successiva infiltrazione di leucociti attraverso lo strato endoteliale e la membrana basale. All'interno dell'intima i monociti maturano in macrofagi sotto lo stimolo del macrophage Colony Stimulating Factor (mCSF), che è sovraespresso nell'intima infiammata, ed aumentano l'esposizione in superficie dei recettori scavenger, che favoriscono l'endocitosi e l'accumulo di esteri di colesterolo nel citoplasma e la conseguente trasformazione del macrofago in cellula schiumosa. Parallelamente i macrofagi proliferano ed amplificano la risposta infiammatoria mediante il rilascio di numerosi fattori di crescita e citochine, tra cui il tumor necrosis factor α (TNF α) e l'interleuchina 1 β (IL1 β). L'accumulo localizzato di cellule schiumose nell'intima determina la formazione della stria lipidica che caratterizza la lesione precoce dell'aterosclerosi (Figura 1.1).

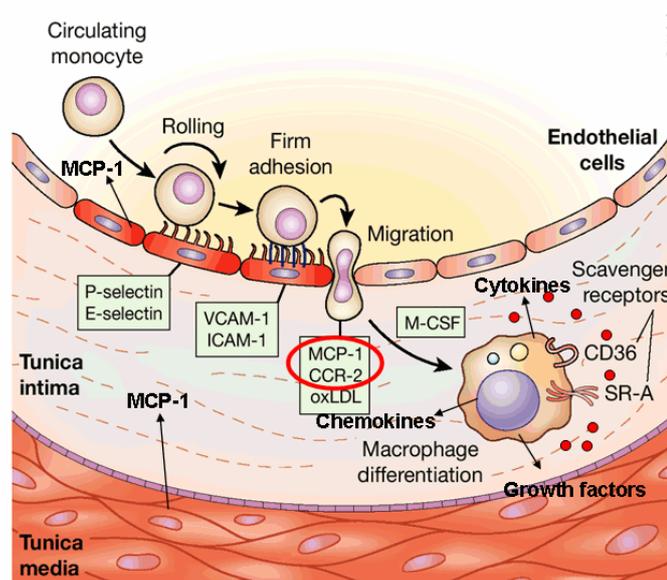


Figura 1.1 – Eventi che conducono alla formazione della stria lipidica: l'attivazione delle cellule endoteliali con l'esposizione di molecole di adesione e la produzione di fattori chemiotattici; il reclutamento, l'adesione e la migrazione dei monociti attraverso lo strato endoteliale e il loro differenziamento in cellule schiumose con produzione di chemochine, citochine e fattori di crescita.

Nella fase iniziale dell'aterogenesi ha un ruolo importante anche il sottotipo CD4+ della cellula T, reattivo ad antigeni associati alle LDL ossidate. Queste cellule amplificano l'attività infiammatoria locale producendo citochine proinfiammatorie quali interferon γ (IFN- γ) e il ligando del CD40 (CD40L) che contribuiscono alla progressione della lesione ateromastica.

La patologia diabetica amplifica tutti questi processi patologici: l'iperglicemia attraverso la diminuzione del NO, l'aumento dello stress ossidativo e l'attivazione del recettore per i prodotti finali della glicazione avanzata (AGE), determina l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare κ B e del attivatore della proteina 1. Questi fattori regolano l'espressione di geni che codificano per un vasto numero di mediatori dell'aterogenesi: per esempio molecole di adesione endoteliali, fattori chemotattici come MCP-1 e mediatori proinfiammatori come $TNF\alpha$ ed IL1.

I macrofagi e le cellule T infiltrano le lesioni aterosclerotiche e si localizzano in particolare nella regione della spalla della placca, dove si accresce l'ateroma. Se l'accumulo delle cellule schiumose a livello dell'intima caratterizza la formazione della stria lipidica, la deposizione di tessuto fibroso caratterizza la lesione aterosclerotica più avanzata. Le cellule muscolari lisce sintetizzano la matrice extracellulare, determinando l'evoluzione della placca: in risposta a vari fattori prodotti dai macrofagi e dalle cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce migrano dalla tunica media all'intima mediante la degradazione della matrice extracellulare favorita dal rilascio di MMP-9 e altre proteasi. Una volta all'interno dell'intima, le cellule muscolari lisce proliferano sotto lo stimolo di vari fattori di crescita e producono proteine della matrice extracellulare. Questo processo causa l'evoluzione della lesione ateromasica ricca in lipidi a placca fibrotica e infine calcifica, che può generare la stenosi del vaso [6].

Oltre ad amplificare l'inizio dell'aterogenesi, il diabete promuove l'instabilità di placca e le sequele cliniche. Le citochine prodotte dalle cellule endoteliali diabetiche determinano la diminuzione della sintesi de novo del collagene da parte delle cellule muscolari lisce. Il diabete inoltre aumenta la produzione di MMP che facilita la rottura del collagene del cappuccio fibroso e stimola l'attività aterogenica delle cellule muscolari lisce. L'iperglicemia attiva la PKC, il recettore per gli AGEs e il fattore di trascrizione nucleare κ B nelle cellule muscolari lisce così come precedentemente descritto per le cellule endoteliali. Le lesioni ateromasiche instabili, che possono rompersi e causare trombosi fatali, sono caratterizzate da un numero ridotto di cellule muscolari lisce [7]. Fukumoto

e collaboratori hanno dimostrato che le placche ateromasiche dei pazienti diabetici contengono un minor numero di cellule muscolari lisce rispetto ai controlli [8].

1.3 Ruolo delle Metalloproteasi di membrana 2 e 9 nella lesione aterosclerotica diabetica

Le metalloproteasi di membrana (MMPs) sono membri della famiglia di endopeptidasi Zn^{2+} e Ca^{2+} dipendenti, essenziali per la migrazione cellulare e il rimodellamento tissutale sia in condizioni fisiologiche sia in condizioni patologiche [9]. Le MMPs sono secrete da molti tipi cellulari sotto forma di proenzimi: dopo l'attivazione mediante un taglio proteolitico, l'enzima attivo è in grado di degradare numerosi componenti della matrice extracellulare. Come evidenziato nel precedente paragrafo, le MMPs rivestono un ruolo molto importante in varie fasi del processo aterogenetico: dall'invasione dei monociti nella parete vascolare alla migrazione delle cellule muscolari lisce. Studi di zimografia in situ e di immunostochimica hanno dimostrato che le MMPs, in particolar modo la MMP-2 (72 kDa gelatinasi A) e la MMP-9 (92 kDa gelatinasi B), sono attivamente sintetizzate nelle placche ateromasiche, prevalentemente nella regione della spalla della placca, sede più frequente di rottura [10]. Sia la MMP-2 che la MMP-9 sono attivate dai radicali liberi dell'ossigeno e la loro espressione sembra essere regolata dallo stress ossidativo. Inoltre l'attività delle MMPs è stata correlata con le manifestazioni cliniche dell'angina instabile, e con la rottura della placca [11].

Il nostro gruppo ha precedentemente dimostrato che l'iperglicemia incrementa l'attività delle MMP-2 e MMP-9 nelle cellule endoteliali delle arterie coronariche umane [12].

1.4 TNF- α converting enzyme (TACE)/ADAM17

Una decina di anni fa venne identificata una nuova MMP di tipo 1 legata alla membrana cellulare: il TNF α converting enzyme (TACE), enzima che appartiene alla famiglia delle proteine ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) conosciuto anche come ADAM-17. TACE/ADAM-17 è responsabile del clivaggio di numerose molecole: fra i suoi substrati troviamo il TNF α ed i suoi recettori, fractalkine, il recettore per interleuchina 6 (IL6R), il recettore per l'epidermal growth factor (EGFR), il recettore per le LDL, CXC3-L1, CXCL-16, molecole di adesione quali L-selectina, VCAM-1 e ICAM1. TACE/ADAM-17, fra tutte le proteine della famiglia ADAM, ha un'alta omologia di sequenza con ADAM-10. Le proteine della famiglia ADAM sono incluse in una categoria più ampia di metalloproteinasi chiamata Metzincine, che comprendono anche le già menzionate MMPs, coinvolte nella degradazione della matrice extracellulare.

L'attività delle MMPs e degli ADAMs è regolata da un gruppo fisiologico di inibitori definiti Inibitori Tissutali delle Metalloproteinasi (TIMPs): l'inibitore fisiologico degli ADAMs è il TIMP3 [13]. Questi enzimi sono i principali attori del sistema definito proteolitico di membrana extracellulare, come meglio descritto in un paragrafo successivo.

Per valutare il ruolo di TACE/ADAM-17 nelle patologie metaboliche, il nostro gruppo ha studiato il topo eterozigote per TACE/ADAM17 (*Tace*^{+/-}), riscontrando che è relativamente protetto dall'obesità indotta dalla dieta e dall'insulino resistenza rispetto al topo di controllo. Infatti se il topo di controllo è alimentato con una dieta con alto contenuto di grassi, sviluppa un'obesità viscerale, aumento dei livelli di acidi grassi liberi ed MCP-1, ipoadiponectinemia, intolleranza glucidica e insulino resistenza, contrariamente al topo *Tace*^{+/-} [14].

Recenti studi hanno inoltre evidenziato che l'attività di TACE/ADAM-17 o del suo inibitore TIMP3 (Figura 1.2) può essere alterata nei soggetti affetti da malattie infiammatorie e metaboliche croniche: essi mostrano un aumento dei livelli circolanti delle forme solubili dei substrati di TACE/ADAM-17, quali il

TNF- α , il recettore solubile del TNF- α di tipo 1 (sTNFR1) ed il recettore solubile per IL6 (sIL6R) [15,16].

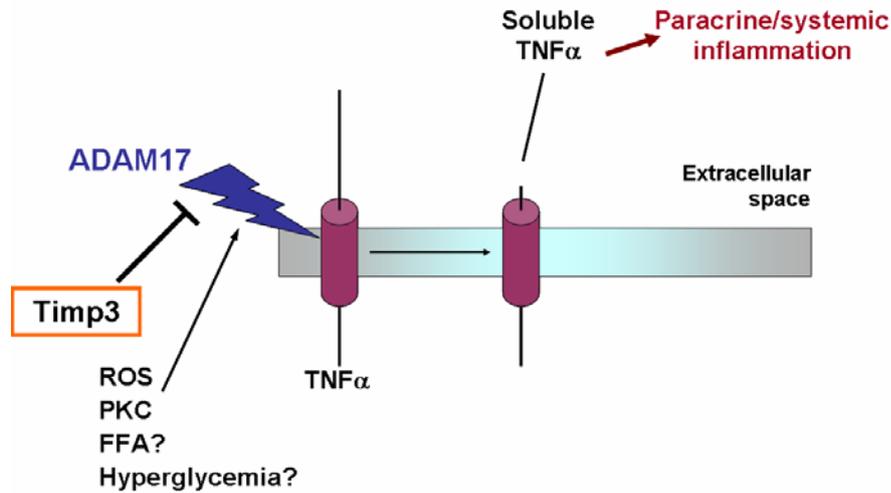


Figura 1.2 – Meccanismo d'azione di TACE/ADAM17 ed del suo inibitore TIMP3. Stimoli quali l'iperglicemia e lo stress ossidativo, attivano l'enzima TACE/ADAM17 che determina la proteolisi di molecole di membrana, come ad esempio il pro-TNF α , con il rilascio in circolo delle forme solubili dei substrati, come nel nostro esempio il TNF α , in grado di determinare infiammazione paracrina e sistemica.

1.5 Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 (TIMP3)

Come accennato nel precedente paragrafo, TIMP3 è fra tutti i TIMPs l'unico in grado di legarsi alla matrice extracellulare, di inibire alcune MMPs, fra cui la 2 e la 9 che rivestono un ruolo cruciale nel processo aterogenetico, e che possiede una sequenza aminoacidica (PFG) necessaria per inibire TACE/ADAM17 [17]. TIMP3 venne identificato inizialmente nel pollo come una proteina molto simile a due ben noti inibitori delle metalloproteasi degradanti la matrice extracellulare dei mammiferi, ma la sua importanza biologica è stata evidenziata nel corso degli anni successivi da numerosi studi [18]. TIMP3 inibisce l'angiogenesi [19], induce l'apoptosi [20], ed impedisce la migrazione cellulare sia in colture tissutale sia in caso di overespressione *in vivo* [21]. La delezione del gene *Timp3* nel topo determina uno spontaneo allargamento degli spazi aerei polmonari, un aumentata apoptosi dell'epitelio mammario, un aumento dell'attività di TACE/ADAM17 con conseguente aumento costitutivo del rilascio

del TNF α e attivazione del segnale del TNF α particolarmente a livello epatico [22].

Il nostro gruppo ha dimostrato che il topo aplo-insufficiente per il recettore dell'insulina (*Insr*^{+/-}), che è diabetico, mostra una ridotta espressione di *Timp3*, con conseguente aumento dell'attività di TACE/ADAM17 e dei livelli circolanti di TNF α . Il conseguente stato infiammatorio causato dalla riduzione di *Timp3*, interagendo con l'aplo-insufficienza per il recettore dell'insulina, determina sia intolleranza glucidica che infiammazione a livello vascolare. In questo modello murino l'inibizione farmacologica di TACE/ADAM17 mediante l'inibitore 1 delle proteasi del TNF α (TAPI-1), comporta una marcata riduzione dell'iperglicemia e dell'infiammazione vascolare [23].

Recentemente Paigen e collaboratori hanno individuato il gene *Timp3* fra le regioni di DNA associate al carattere quantitativo (Quantitative Trait Loci o QTLs) diabete e dislipidemia, identificando una mutazione che causa una riduzione dell'espressione del gene nel topo [24]. Inoltre in un'analisi di microarray di periciti trattati con LDL ossidate, *Timp3* è fra i pochi geni che mostrano una ridotta espressione [25].

Tutte queste evidenze supportano l'idea che modificazioni croniche (geneticamente determinate) ed acute (metabolicamente determinate) delle vie di segnale correlate a *Timp3* possano svolgere un ruolo critico nell'associazione fra lo stato infiammatorio e l'alterato metabolismo glucidico, creando un terreno comune che possa predisporre allo sviluppo del diabete e dell'aterosclerosi.

1.6 Il sistema proteolitico di membrana

Il sistema proteolitico di membrana è composto da enzimi transmembrana e perimembrana con attività proteolitica o di *shedding* che agiscono su substrati localizzati sul versante intracellulare o extracellulare della membrana plasmatica (vedi Figura 1.2). Questo processo genera segnali intracrinici, autocrini e paracrini con effetti sull'infiammazione, la crescita cellulare, la migrazione cellulare e il metabolismo, a seconda dei substrati interessati e del contesto cellulare o tissutale

in cui agisce. I fattori di crescita e le citochine regolate mediante questo sistema sono: TNF- α , TGF- α , Neureguline, HB-EGF, Betacellulina, CXCL3-L1, CXCL-16, EGF ed altri [26,27,28]. Il sistema proteolitico di membrana regola inoltre i livelli di numerosi recettori di membrana, i quali attraverso le loro forme solubili, generate per proteolisi, agiscono sia silenziando che per prolungando l'attività biologica dei loro ligandi [29,30]. I recettori regolati da questo sistema sono il recettore per il TNF α 1 e 2, (TNFR1 e TNFR2), il recettore per interleuchina 6 (IL6R), il recettore per il fattore di crescita epidermale (EGFR) e altri.

L'effetto complessivo e finale del *pathway* ligando/recettore può quindi dipendere sia da fattori che regolano l'espressione del recettore e del ligando che da fattori che regolano lo *shedding* del recettore e del ligando.

La gran parte dei meccanismi di proteolisi di membrana extracellulare è regolata da enzimi appartenenti alla famiglia delle ADAM, in particolar modo ADAM10/12/15/17 e dal loro inibitore endogeno TIMP3.

1.7 Deacetilasi SirT1

SirT1 è una deacetilasi NAD-dipendente localizzata a livello nucleare che agisce come regolatore della trascrizione sia a livello degli istoni sia su fattori di trascrizione, quali ad esempio Forkhead box O1 (FoxO1), Liver X Receptor (LXR) e p53, che su cofattori di trascrizione, quali Peroxisome Proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1a (PGC1a). Recenti studi hanno dimostrato che questa deacetilasi svolge un ruolo chiave nella regolazione di networks trascrizionali in numerosi processi metabolici critici. SirT1 appartiene alla classe III della famiglia delle deacetilasi istroniche, conosciute anche come sirtuine.

SirT1 promuove la longevità nelle specie, dal lievito ai mammiferi, e si pensa che questo effetto protettivo possa derivare in parte dalla regolazione dell'energia e dell'omeostasi metabolica [31].

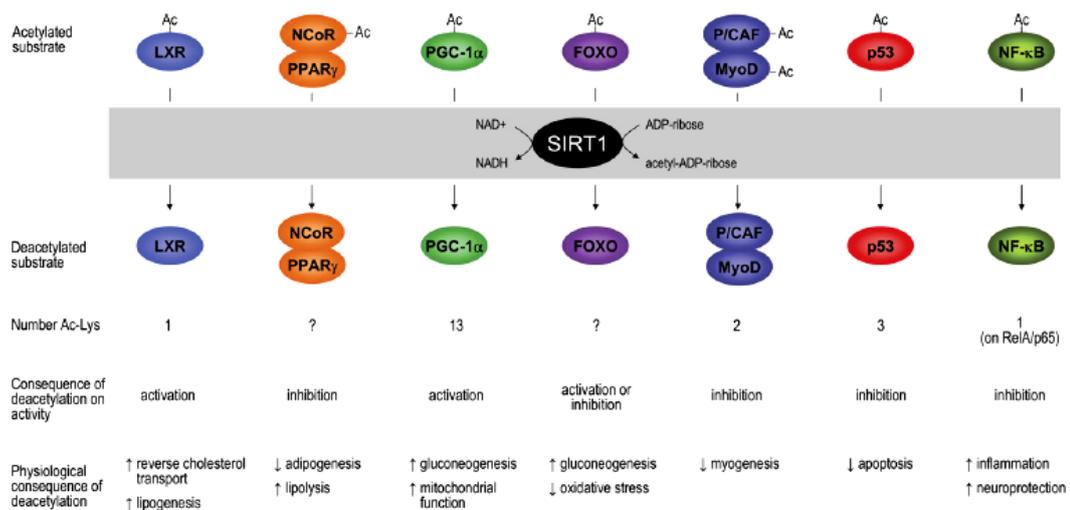


Figura 1.3 – Meccanismo d’azione della deacetilasi SirT1 e i suoi vari substrati, fra cui LXR, PPAR γ , PGC1 α , FoxO1, p53 e NF- κ B.

Essendo l’attività delle sirtuine dipendenti dai livelli di NAD⁺, un indicatore dello stato nutrizionale cellulare, si pensa che esse svolgano un collegamento funzionale fra metabolismo, struttura cromatinica ed invecchiamento.

Recentemente è stato verificato che la perdita dell’attività di SirT1 può essere associata con le malattie metaboliche quali il diabete e l’aterosclerosi [32]. Al contrario, un suo aumento di funzione, attraverso manipolazione genetica oppure attivazione mediante un ligando, può proteggere sia dall’insulino resistenza associata all’obesità che dall’aterosclerosi in modelli sperimentali [33,34].

Capitolo Secondo

SCOPO DELLA TESI

L'ipotesi principale di questo lavoro è che il sistema proteolitico di membrana, che agisce sull'interfaccia fra la membrana plasmatica cellulare e l'ambiente esterno, costituisca un "sistema sensore" in grado di modificare il fenotipo cellulare e innescare un processo infiammatorio sub-clinico tipico delle patologie metaboliche con predisposizione genetica quali il diabete e l'aterosclerosi.

TIMP3, che rappresenta il principale inibitore di questo sistema, è controllato da fattori genetici ed ambientali, e partecipa alla regolazione dello stato infiammatorio, determinante per la progressione del diabete mellito di tipo 2 e dell'aterosclerosi, come dimostrato nei modelli animali.

Lo scopo di questo lavoro è di valutare, inizialmente *in vivo*, se esista un'attivazione del sistema proteolitico di membrana in pazienti affetti da diversa localizzazione aterosclerotica, e se la maggiore attività del sistema sia correlabile ad alterazioni del metabolismo glucidico.

Lo scopo secondario è di studiare se i componenti del sistema proteolitico di membrana, quali gli ADAMs e i TIMPs, con particolare attenzione all'inibitore TIMP3, siano alterati nel tessuto vascolare affetto da aterosclerosi, analizzando placche aterosclerotiche di soggetti diabetici e non diabetici.

Infine analizzeremo *in vitro* quali siano i fattori metabolici che regolano l'espressione dell'inibitore TIMP3 nel tessuto vascolare.

Capitolo Terzo

MATERIALI E METODI

3.1 Popolazioni dello studio

Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale e le indagini descritte in seguito sono state eseguite secondo i principi della Dichiarazione di Helsinki approvata nel 2000. Un consenso informato scritto alla partecipazione allo studio è stato firmato da tutti i soggetti arruolati.

Per il nostro studio abbiamo arruolato soggetti con differente grado di patologie vascolari e del metabolismo afferenti al Centro Aterosclerosi, al Reparto di Chirurgia Vascolare ed al Reparto di Cardiologia del Policlinico “Tor Vergata” di Roma come in seguito indicato e li abbiamo sottoposti al seguente protocollo: dopo 12 ore di digiuno notturno, è stata effettuata una valutazione anamnestica ed antropometrica, comprensiva di indice di massa corporea (body mass index o BMI) e circonferenza della vita, misurazione della pressione arteriosa dopo 5 minuti di riposo, prelievi ematici di base e curva da carico orale di glucosio (75 gr) con prelievi ai tempi 0, 30, 60, 90 e 120 minuti. Le alterazioni del metabolismo glucidico sono state definite secondo i criteri ADA.

1) Soggetti di controllo (CT): Abbiamo studiato 70 soggetti sani, di età compresa fra i 20 ed i 60 anni. Tutti i soggetti dovevano soddisfare i seguenti criteri di inclusione: assenza di diabete mellito (glicemia a digiuno <126 mg/dl e/o glicemia 2 h dopo curva da carico orale di glucosio <200 mg/dl), assenza di patologie in grado di modificare il metabolismo glucidico, assenza di patologie infiammatorie acute o croniche. Le caratteristiche cliniche e biochimiche di questi soggetti sono mostrate nella Tabella 1.

2) Soggetti con Aterosclerosi Carotidea (CAR-Ats): Abbiamo arruolato 35 soggetti con aterosclerosi carotidea asintomatica (CAR-Ats), con una stenosi del vaso >70%, di età compresa fra i 50 e gli 80 anni, ipertesi. Tutti i soggetti dovevano soddisfare i seguenti criteri di inclusione: assenza di diagnosi di diabete mellito (glicemia a digiuno <126 mg/dl), di insufficienza renale e di patologie infiammatorie acute o croniche. Tutti i partecipanti allo studio erano in trattamento con la terapia composta da aspirina, Ace-inibitori o sartani, statine, β -bloccanti e Ω -3. Le caratteristiche cliniche e biochimiche di questi soggetti sono mostrate nella Tabella 2.

3) Soggetti Coronaropatici (CAD): Abbiamo studiato 170 soggetti, di età compresa fra 42 e 78 anni. Tutti i soggetti dovevano soddisfare i seguenti criteri di inclusione: anamnesi positiva per infarto miocardico (evento avvenuto fra 1 e 7 anni prima del ricovero ospedaliero), assenza di diagnosi di diabete mellito, di patologie infiammatorie acute o croniche ed insufficienza renale. L'infarto miocardico è stato definito secondo le linee guida della Società Europea di Cardiologia e dell'American Heart Association come precedentemente descritto [35]. Tutti i partecipanti allo studio erano in trattamento con la classica terapia per la coronaropatia, composta da aspirina, Ace-inibitori o sartani, statine, β -bloccanti e Ω -3. Inoltre, tutti i soggetti sono stati sottoposti ad angiografia coronarica e/o TC coronarica come precedentemente descritto, e suddivisi in coronaropatici monovasali (**mono-CAD**) e multivasali (**multi-CAD**) a seconda del numero dei vasi coronarici interessati dalla patologia aterosclerotica [35]. Le caratteristiche cliniche e biochimiche di questi soggetti sono mostrate nella Tabella 3.

3.2 Studio sulle placche aterosclerotiche

Sessanta placche aterosclerotiche sono state ottenute da 37 pazienti con normale tolleranza glucidica (Normal Glucose Tolerant o NGT) e 23 pazienti con diabete mellito di tipo 2 (Type 2 Diabetes mellitus o DM2) sottoposti ad Endoarteriectomia Carotidea per malattia sintomatica presso il reparto di Chirurgia Vascolare del Policlinico Universitario "Tor Vergata". I pazienti

appartenevano alla categoria DM2 in caso di anamnesi positiva o di diagnosi di diabete mellito dopo esecuzione di curva da carico orale di glucosio (75 gr) secondo i criteri ADA. Le caratteristiche cliniche e biochimiche di questi soggetti sono mostrate nella Tabella 4.

3.3 Analisi istologica delle placche carotidee

Le placche carotidee sono state isolate ed asportate interamente durante l'intervento chirurgico al fine di preservarne la struttura. L'ateroma è stato successivamente suddiviso in due parti: una parte è stata congelata immediatamente in azoto liquido per la successiva analisi di RNA e proteina, mentre l'altra è stata utilizzata per l'analisi istologica.

Per l'analisi istologica i campioni sono stati fissati 24 ore in un tampone con formalina al 10% immediatamente dopo il prelievo, e dopo la decalcificazione, sono stati sezionati trasversalmente ogni 5 mm ed inclusi in paraffina. Per lo studio morfologico è stata utilizzata la colorazione in Ematossilina-Eosina.

L'analisi immunohistochimica è stata effettuata su sezioni seriali, di spessore pari a 3 μm , tagliate dai blocchi di paraffina utilizzando i seguenti anticorpi: a) anticorpo policlonale anti human TIMP3 (Calbiochem, Ca), b) anticorpo monoclonale anti human CD68 (DAKO, Danimarca), c) anticorpo monoclonale anti α -actina del muscolo liscio (Europa Ventana Medical System, S.A., Francia). Gli anticorpi primari sono stati riconosciuti mediante i complessi avidin-biotin-perossidasi (DaKO). Tutti gli anticorpi sono stati utilizzati con controlli positivi e negativi.

3.4 Estrazione di RNA totale ed analisi quantitativa mediante Real-time PCR

Le placche carotidee congelate in azoto liquido sono state omogenizzate utilizzando un omogenizzatore Polytron. L'RNA totale è stato isolato utilizzando

il reagente Trizol (Invitrogen Corp), secondo il protocollo consigliato dalla casa produttrice. La quantità totale di RNA ottenuta è stata misurata spettrofotometricamente a 260 nm. La ratio di assorbanza (260/280 nm) di tutti i campioni era fra 1,8 e 2.

Il cDNA a singolo filamento è stato sintetizzato, in accordo con il protocollo standard dell'Applied Biosystem, da 1 µg di RNA totale usando il kit High-Capacity cDNA Archive Kit. 50 ng di cDNA sono stati successivamente amplificati mediante la tecnica TaqMan Real-Time PCR (ABI PRISM 7900Ht – Applied Biosystem, Foster City, CA), che permette di ottenere una valutazione quantitativa di specifiche sequenze di acido nucleico, basata sulla misurazione real-time dei prodotti. L'entità dell'espressione dei geni studiati è normalizzata su un gene di riferimento (controllo endogeno: subunità 18S) e poi comparata rispetto ad un calibratore, secondo il Metodo di Quantificazione Relativa. Sono stati valutati i livelli di espressione di RNA dei seguenti geni umani: TACE/ADAM17, ADAM10, TIMP3, TIMP1, TIMP2, TIMP4, MMP9, SirT1. I primers sono stati forniti dall'Applied Biosystem e utilizzati secondo il protocollo fornito dalla ditta. Ogni reazione è stata eseguita in duplicato e l'analisi condotta attraverso il metodo $2^{-\Delta Ct}$. Il numero che si ottiene come espressione relativa del gene (ΔCt : ciclo soglia) equivale alla differenza fra il numero di cicli a cui si rileva la fluorescenza generata dal taglio della sonda ed il ciclo soglia basale; il ΔCt viene poi normalizzato sul gene di riferimento e poi comparato a un calibratore.

3.5 Estrazione di proteine e saggio dell'attività di TACE/ADAM17

Le placche congelate sono state polverizzate e risospese in un buffer di lisi ghiacciato (5 mmol/l EGTA, 20 mmol/l TRIS-HCl, pH 7.5, 150 mmol/l NaCl, 20 mmol/l glycerophosphate, 10 mmol/l NaF, 1 mmol/l sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0,1% Tween 20, 1 µg/ml aprotinin, 1 mmol/l PMSF). L'estrazione delle proteine è stata effettuata come già precedentemente descritto [12,14].

L'attività di TACE/ADAM17 è stata rilevata mediante taglio del substrato QXL™ 520/5- FAM FRET, derivato da una sequenza che circonda il sito di taglio di TACE/ADAM17. La forma attiva dell'enzima TACE/ADAM17 taglia il substrato FRET in due frammenti separati, determinando un aumento della fluorescenza 5-FAM (SensoLyte™ 520 TACE Activity Assay kit Fluorimetric, AnaSpec, San Jose CA). La fluorescenza del prodotto di taglio è misurata mediante un Fluorimetro (FLx800, BIO-TEK Instruments, Winooski, VT) a λ_{ex} 490 nm e λ_{em} 520 nm.

3.6 Attività delle MMP9

Le proteine sono state estratte dalle placche carotidee come descritto nel precedente paragrafo. Il saggio enzimatico per valutare l'attività delle MMP9 utilizza la pro-forma di un enzima di detezione che può essere attivato solo dopo il legame con le MMP9 attive, mediante un singolo evento proteolitico (Amersham MMP-9 Biotrack Activity Assay System, GE Healthcare UK). La forma attiva delle MMP-9 è rilevata mediante l'attivazione del pro-enzima di detezione ed il successivo taglio del suo substrato cromogenico. Il colore risultante è stato letto a 450 nm in uno spettrofotometro (Victor 1420).

3.7 Analisi mediante western blot

Gli estratti di matrice extracellulare sono state ottenuti dalle placche carotidee dopo loro omogeneizzazione e risospensione in un tampone di lisi contenente 50 mM Tris (pH 7.5), 0,03% NaN₃, 0,1% Triton X-100, per 5 minuti a 4°C. Nuclei e materiale insolubile sono stati separati mediante ripetute centrifugazioni dei campioni a 11,000 rpm per 10 minuti a 4°C ed infine risospesi in un tampone contenente 50 mM Tris (pH 7.5), 0,03% NaN₃, 10 mmol/l NaF, 1 mmol/l sodio ortovanadato, 1 µg/ml aprotinina, 1 mmol/l PMSF, 0,2 mg/ml condroitinsolfato A, B e 6S, e Pefabloc 1000% ed incubati 30 minuti a 4°C. I campioni sono stati in

ultimo centrifugati a 11,000 rpm per 10 minuti a 4°C ed il soprannatante è stato raccolto. Successivamente, 200 µg di estratti di matrice extracellulare sono stati caricati su un gel al 10% SDS-poliacrilammide, e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa come precedentemente descritto [12,14]. Il filtro è stato bloccato con TBS 1× contenente 5% latte, ed incubato con gli anticorpi primari per tutta la notte a 4°C. Dopo ripetuti lavaggi in TBS 1×, il filtro è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente con gli appropriati anticorpi secondari coniugati con la perossidasi. Gli anticorpi sono stati visualizzati usando un substrato chemiluminescente (Enhanced Chemiluminescence System) seguendo il protocollo della casa produttrice (Amersham Life Sciences, Little Chalfont, U.K.). Gli anticorpi utilizzati sono: anticorpo anti human Timp3 (Santa Cruz Biotechnology - CA, USA) ed anti human actina (Santa Cruz Biotechnology - CA, USA).

3.8 Determinazioni analitiche

Nei soggetti studiati la glicemia plasmatica è stata misurata mediante test fotometrico UV (Modular - Hitachi); le concentrazioni di colesterolo totale e trigliceridi mediante metodo enzimatico colorimetrico (Modular - Hitachi); HDL e LDL sono stati misurati mediante metodo enzimatico colorimetrico omogeneo (Modular - Hitachi). Le concentrazioni sieriche di insulina sono state misurate mediante saggio in elettro-chemiluminescenza (Modular E - Roche), la fibrinogenemia mediante test routinari di laboratorio (Sysmex CA-7000 Automated Coagulation e Sysmex SE9500), i livelli di proteina C reattiva ad alta sensibilità (hsPCR) mediante metodica immunoturbidimetrica potenziata a particelle (Modular - Hitachi). I livelli di emoglobina glicata (HbA1c) sono stati analizzati mediante metodo HPLC con colonna a scambio cationico (TosoG8).

I dosaggi di IL-6 sR, sTNF RI, sVCAM-1, sICAM-1 e CXCL16 sono stati effettuati mediante tecnica quantitativa immunoenzimatica a sandwich (ELISA – Quantikine kit - R&D Systems).

3.9 Preparazione, ossidazione e glicazione delle LDL native

Le LDL umane sono state ottenute da volontari sani e normolipidemicici. La purezza delle LDL è stata controllata mediante elettroforesi su gel di agarosio, che mostrava una singola banda, indicando l'assenza di contaminazione da parte di altre sottoclassi di lipoproteine. Al fine di ottenere l'ossidazione delle LDL, le LDL native (1 mg proteina/ml) sono state incubate con CuSO_4 (20 $\mu\text{mol/l}$ di concentrazione finale) in 1 mol/l PBS pH 7.4 per 17 ore a 37°C. L'ossidazione è stata interrotta aggiungendo EDTA (200 $\mu\text{mol/l}$ di concentrazione finale). La qualità dell'ossidazione è stata controllata mediante l'aumento della mobilità relativa su gel d'agarosio, che indica un aumento della carica negativa delle LDL ossidate. La glicazione non-enzimatica delle LDL è stata indotta mediante l'incubazione di LDL native con 0.3 mmol/l EDTA a 37°C per 6 settimane al buio, in presenza di 25 mmol/l di glucosio, prevenendo l'ossidazione con il gas argon, ed eliminando gli zuccheri non legati mediante ripetute ed estensive dialisi. Le LDL di controllo incubate in assenza di glucosio non mostravano alcun cambiamento. Prima dell'uso, le soluzioni di LDL sono state filtrate due volte al fine di rimuovere Cu^{2+} e/o EDTA. La concentrazione di particelle di LDL è stata portata a 50 μg proteine/ml mediante misurazione delle proteine totali con il metodo dell'acido bicinconinico (Sigma, St Louis, MO, USA).

3.10 Colture cellulari

Le cellule muscolari lisce da arterie coronariche umane (Coronary Artery Smooth Muscle Cells o CASMC) sono state coltivate ed amplificate nel mezzo Sm-GM₂ contenente 5% siero di feto bovino (FBS), 2 ng/ml fattore di crescita per i fibroblasti umani, 0,5 ng/ml fattore di crescita per l'epidermide umana, 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicina, e 5 $\mu\text{g/ml}$ insulina bovina secondo le indicazioni della casa produttrice. Le cellule con passaggi bassi sono state fatte crescere fino al 70% di confluenza e siero deprivate (0,4% FBS, senza fattori di crescita) per 24 ore e quindi stimulate come indicato in seguito.

Le cellule endoteliali umane da vena ombelicale (Human Umbelical Vein Endotelial Cells o HUVEC) sono state coltivate ed amplificate nel mezzo EMB contenente i fattori di crescita EGM singleQuots (Lonza). Le cellule con passaggi bassi sono state fatte crescere fino al 70% di confluenza e siero deprivate (0,4% FBS, senza fattori di crescita) per 24 ore e quindi stimulate come indicato in seguito.

La linea cellulare da leucemia monocitica acuta umana (THP1) è stata coltivata in sospensione nel mezzo RPMI contenente 10% FBS e differenziata per 24 ore con 50 ng/ml PMA, siero deprivata (0,4% FBS, senza fattori di crescita) per 24 ore e quindi stimolata come indicato in seguito.

Le cellule sono state trattate per 24 ore rispettivamente con 100 µg/ml LDL, 100 µg/ml LDL ossidate, 100 µg/ml LDL glicate, 10 µM 22-R-idrossicolesterolo (Sigma-Aldrich), 10 µM 22-S-idrossicolesterolo (Sigma-Aldrich), 5 µM T0901317 (Sigma-Aldrich), 3 µM GW3965 (Sigma-Aldrich), e 50 µM Sirtinolo (Calbiochem). Per le colture in alto glucosio, le cellule sono state trattate per 24 ore con glucosio 20 mM (HG).

Dopo i vari trattamenti, dai vari campioni sono state estratte le proteine e l'RNA totale, e sono stati effettuati i saggi per l'attività di TACE/ADAM17 e valutati i livelli di espressione dei geni Timp3, Timp1, Timp2, Timp4, TACE/ADAM17, ADAM10 e Sirt1, come precedentemente descritto.

Il silenziamento genico di SirT1 nelle CASMC è stato ottenuto trasferendo 1 µg di RNA interferente breve (small interference RNA o siRNA) Sirt1 (sc-40986, Santa Cruz Biotechnology) e 0.8 µg di controllo siRNA-A (sc-40986, Santa Cruz Biotechnology) mediante il protocollo di trasfezione DharmaFECT1 (Dharmacon) secondo le istruzioni della casa produttrice.

3.11 Saggio di regolazione del promotore di Timp3

Per il saggio di regolazione del promotore di Timp3, le cellule CASMC sono state trasferite con 2 µg di SirT1 umano cDNA clone (RG218134, Origene), 10 ng di renilla e del vettore contenente il promotore del gene Timp3 (LR1034, Panomics)

o 2 µg del vettore di controllo TransLucent utilizzando la soluzione Nucleofector con il programma A-033 per cellule muscolari lisce primarie (AMAXA). Il saggio di Luciferasi è stato effettuato con il Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) come indicato dalla casa produttrice.

3.12 Analisi statistica

Il test di Kolmogorov-Smirnov è stato utilizzato per verificare la distribuzione normale dei parametri. La relazione fra le variabili è stata valutata mediante coefficiente di correlazione di Pearson (r) e le differenze fra i gruppi di variabili analizzate mediante t test di Student o ANOVA. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato significativo. Tutte le analisi sono state condotte utilizzando il programma SPSS versione 14.0 per Windows.

Capitolo Quarto

RISULTATI

4.1 Insulino resistenza ed attività del sistema proteolitico di membrana in soggetti con differente localizzazione di aterosclerosi

Nel nostro studio abbiamo inizialmente valutato la relazione esistente fra l'insulino resistenza, l'aterosclerosi e l'attività del sistema proteolitico di membrana, paragonando la popolazione di controllo sana (CT, Tabella 1) con soggetti con differente localizzazione aterosclerotica, quali soggetti con aterosclerosi carotidea stabile ed asintomatica (CAR-Ats, Tabella 2) e soggetti con Coronaropatia stabile e pregresso infarto miocardico, i quali sono stati ulteriormente suddivisi in CAD con patologia monovasale (mono-CAD) e multivasale (multi-CAD) (Tabella 3).

Numero (n)	70
Donne/uomini (n)	26/44
Età (aa)	37,28 ± 9,8
Fumatori (n/tot)	20/70
BMI (kg/m²)	24,2 ± 3,20
Circonferenza Vita (cm)	82,54 ± 10,78
Pressione sistolica (mmHg)	116,74 ± 11,60
Pressione diastolica (mmHg)	76,96 ± 8,24
Colesterolo Totale (mg/dl)	193,17 ± 38,32
Colesterolo HDL (mg/dl)	57,87 ± 14,70
Colesterolo LDL (mg/dl)	119,38 ± 36,02
Trigliceridi (mg/dl)	95,05 ± 55,18
HbA1c (%)	5,25 ± 0,25
Glicemia a digiuno (mg/dl)	90,34 ± 7,74
Glicemia 2h dopo carico (mg/dl)	112,45 ± 24,15
Insulina a digiuno (mU/ml)	9,11 ± 4,87
Insulina 2h dopo carico (mg/dl)	52,29 ± 41,66
HOMA-IR	2,171 ± 1,297
hsPCR (mg/dl)	2,02 ± 1,18
Fibrinogeno (mg/dl)	291,35 ± 79,81

Tabella 1 – Caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione di controllo (CT)

Numero (n)	35
Donne/uomini (n)	17/18
Età (aa)	69,32 ± 6,79
Fumatori (n/tot)	5/30
BMI (kg/m²)	25,01 ± 3,11
Circonferenza Vita (cm)	93,93 ± 10,77
Pressione sistolica (mmHg)	146,29 ± 43,48
Pressione diastolica (mmHg)	84,35 ± 11,08
Colesterolo Totale (mg/dl)	203,13 ± 37,83
Colesterolo HDL (mg/dl)	47,65 ± 11,16
Colesterolo LDL (mg/dl)	125,89 ± 32,47
Trigliceridi (mg/dl)	150,51 ± 81,84
HbA1c (%)	5,64 ± 0,52
Glicemia a digiuno (mg/dl)	103,38 ± 14,97
Glicemia 2h dopo carico (mg/dl)	160,59 ± 57,15
Insulina a digiuno (mU/ml)	9,47 ± 3,94
Insulina 2h dopo carico (mg/dl)	76,72 ± 59,13
HOMA-IR	2,42 ± 1,09
hsPCR (mg/dl)	5,53 ± 8,93
Fibrinogeno (mg/dl)	395,91 ± 82,67

Tabella 2 – Caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione con Aterosclerosi carotidea (CAR-Ats)

	170	Mono-CAD	Multi-CAD
Donne/Uomini (n)	29/141	14/60	10/86
Età (aa)	64,57 ± 9,59	62,02 ± 10,56	65,62 ± 9,02
Mono-CAD/Multi-CAD	74/96	74	96
Fumatori (n/tot)	148/170	60/74	88/96
BMI (kg/m²)	28,01 ± 3,11	28,41 ± 3,82	27,88 ± 3,86
Circonferenza vita (cm)	100,89 ± 10,77	99,31 ± 11,82	101,77 ± 9,7
Pressione sistolica (mmHg)	135,82 ± 20,31	131,53 ± 19,34	137,63 ± 21,36
Pressione diastolica (mmHg)	81,31 ± 10,55	80,00 ± 11,02	81,51 ± 10,28
Colesterolo Totale (mg/dl)	171,75 ± 38,25	167,43 ± 40,44	173,54 ± 36,93
Colesterolo HDL (mg/dl)	45,69 ± 13,85	46,67 ± 12,76	45,13 ± 14,13
Colesterolo LDL (mg/dl)	108,21 ± 34,45	105,56 ± 35,23	110,11 ± 33,12
Trigliceridi (mg/dl)	140,22 ± 69,15	129,98 ± 67,47	144,11 ± 69,43
HbA1c (%)	5,62 ± 0,49	5,59 ± 0,47	5,64 ± 0,45
Glicemia a digiuno (mg/dl)	103,01 ± 16,46	101,44 ± 17,40	103,96 ± 14,95
Glicemia 2h dopo carico (mg/dl)	161,55 ± 54,28	149,44 ± 53,68	168,38 ± 52,52
Insulina a digiuno (mU/ml)	14,53 ± 9,34	14,38 ± 10,44	14,54 ± 8,95
Insulina 2h dopo carico (mg/dl)	94,92 ± 73,88	87,96 ± 80,72	97,41 ± 68,30
HOMA IR	3,84 ± 2,86	3,80 ± 3,22	3,84 ± 2,69
hsCRP (mg/dl)	3,9 ± 7,15	3,08 ± 3,93	4,19 ± 8,24

Tabella 3 – Caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione con Aterosclerosi coronarica (Mono-CAD e Multi-CAD)

L'insulino resistenza, misurata attraverso l'indice HOMA-IR, differisce fra i quattro gruppi a seconda della localizzazione aterosclerotica ed è significativamente aumentata nei soggetti con coronaropatia (mono-CAD: 3.89 ± 3.12 vs CT: 2.02 ± 1.18 $p < 0.001$, multi-CAD: 3.88 ± 2.72 vs CT: 2.02 ± 1.18 $p < 0.001$; mono-CAD: 3.89 ± 3.12 vs CAR-ATS: 2.42 ± 1.09 $p < 0.05$, multi-CAD: 3.88 ± 2.72 vs CAR-ATS: 2.42 ± 1.09 $p < 0.05$) (Figura 4.1).

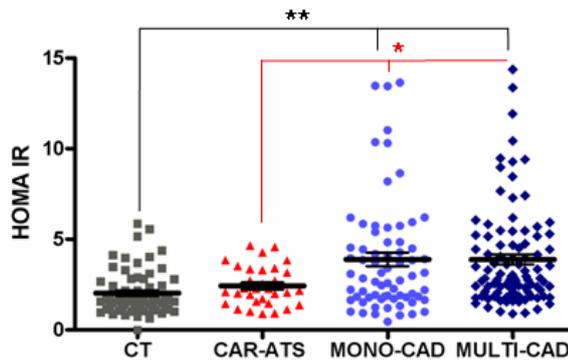


Figura 4.1 – I livelli di insulino resistenza, misurata mediante l'indice HOMA IR, nei quattro gruppi in studio. Nei pazienti mono-CAD e multi-CAD vi è un aumento significativo dell'insulino resistenza rispetto ai CT (** $p < 0.001$ ANOVA) e ai CAR-Ats (* $p < 0.05$ ANOVA)

L'analisi dei substrati solubili di TACE/ADAM17 nelle nostre coorti mostra una significativa tendenza ad aumentati livelli di sIL6R, sICAM1, sVCAM1, CXCL16 e sTNFR1 quando si analizzano le popolazioni per differente localizzazione della patologia aterosclerotica. (sIL6R $p < 0.001$, sVCAM1 $p < 0.001$, sICAM1 $p < 0.001$, sTNFR1 $p < 0.001$ e CXCL16 $p < 0.001$ ANOVA Figura 4.2), e tale differenza rimane significativa dopo correzione per età, sesso e circonferenza vita nei seguenti substrati: sVCAM1 ($p < 0,001$), sICAM1 ($p < 0,005$) e CXCL16 ($p < 0,01$). Il sistema proteolitico di membrana sembra quindi essere maggiormente attivato nei soggetti con differente localizzazione e gravità della patologia aterosclerotica rispetto ai soggetti di controllo.

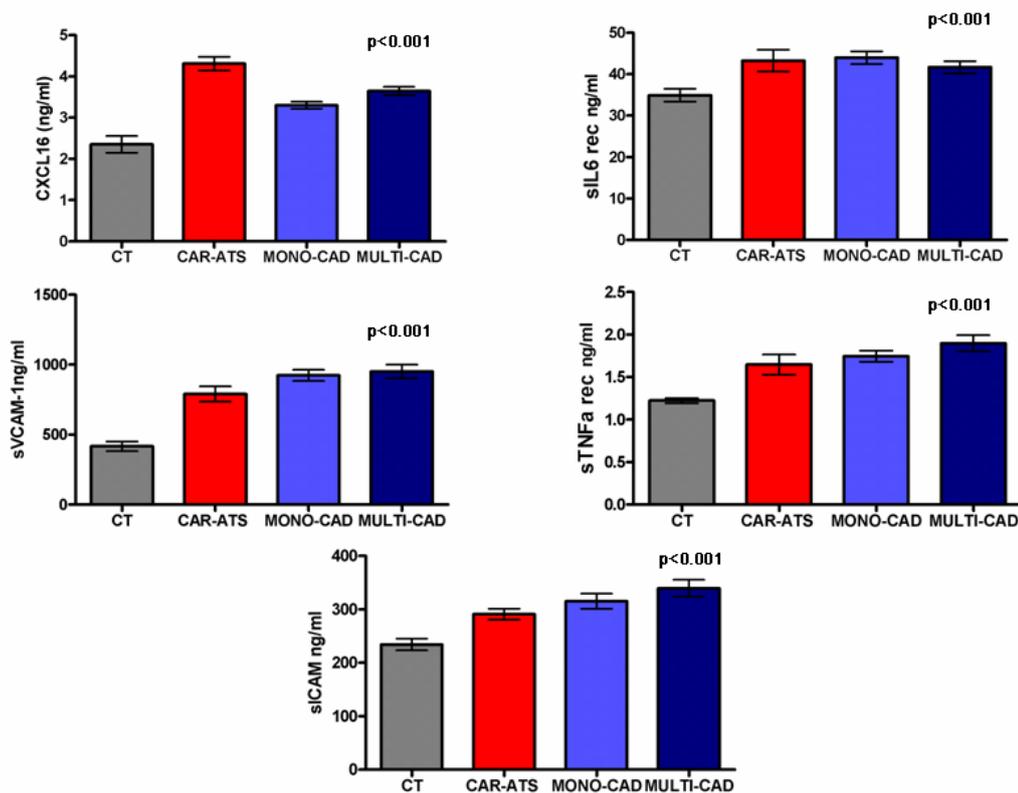


Figura 4.2 – Attivazione del sistema proteolitico di membrana nei soggetti con patologia aterosclerotica. L'analisi dei substrati solubili di TACE/ADAM17 nelle quattro popolazioni in studio dimostra che i soggetti con patologia aterosclerotica carotidea e coronarica, mono e multivasale, hanno concentrazioni sieriche di tutti i substrati più elevate rispetto ai controlli sani ($p < 0.001$ ANOVA).

4.2 Correlazioni fra alterazioni metaboliche ed attivazione del sistema proteolitico di membrana

L'analisi della correlazione fra insulino resistenza, misurata come indice HOMA-IR e i substrati di TACE/ADAM17, in tutti i soggetti arruolati nel nostro studio, mostra una significativa correlazione positiva con i livelli di sVCAM1, sICAM1 e sTNFR1 (sVCAM1 $r = 0,19$ $p < 0.005$, sICAM1 $r = 0,17$ $p < 0.005$, sTNFR1 $r = 0,21$ $p < 0.001$, Figura 4.3).

L'analisi di associazione fra i substrati solubili di TACE/ADAM17 e parametri metabolici evidenzia una correlazione positiva con il diabete ed in particolar modo: fra i livelli di emoglobina glicata (HbA1c) e tutti i substrati (sIL6R $r = 0,19$ $p < 0.003$, sVCAM1 $r = 0,13$ $p < 0.05$, sICAM1 $r = 0,18$ $p < 0.005$, sTNFR1 $r = 0,23$ $p < 0.001$ e CXCL16 $r = 0,23$ $p < 0.001$), fra la glicemia a digiuno e i

livelli di sVCAM1, sICAM1 e sTNFR1 (sVCAM1 $r=0,22$ $p<0.001$, sICAM1 $r=0,29$ $p<0.001$, sTNFR1 $r=0,19$ $p<0.005$) e fra la glicemia 2 ore dopo il carico orale di glucosio e i livelli di sVCAM1, sICAM1 e sTNFR1 (sVCAM1 $r=0,21$ $p<0.005$, sICAM1 $r=0,21$ $p<0.005$, sTNFR1 $r=0,21$ $p<0.001$).

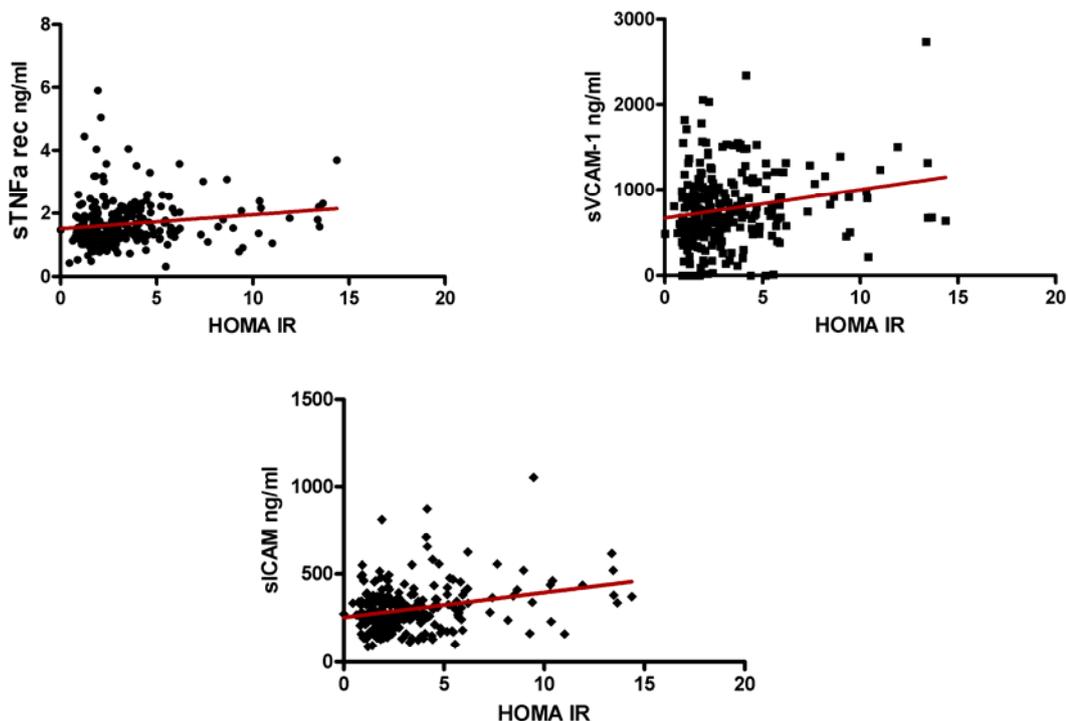


Figura 4.3 – I substrati solubili sTNFR1, sVCAM1 e sICAM1 correlano significativamente con la resistenza insulinica misurata mediante indice HOMA IR (sTNFR1 $r=0,21$ $p<0.001$, sVCAM1 $r=0,19$ $p<0.005$, sICAM1 $r=0,17$ $p<0.005$).

L'analisi della correlazione fra il profilo lipidico ed i substrati solubili di TACE/ADAM17 mostra una significativa correlazione negativa fra i livelli di colesterolo HDL e sIL6R, sVCAM1, sICAM1 e sTNFR1 (sIL6R $r=-0,16$ $p<0,005$, sVCAM1 $r=-0,311$ $p<0.001$, sICAM1 $r=-0,358$ $p<0.001$, sTNFR1 $r=-0,31$ $p<0.001$) ed una correlazione positiva significativa fra i livelli di tutti i substrati e la trigliceridemia (sIL6R $r=0,13$ $p<0.05$, sVCAM1 $r=0,17$ $p<0.005$, sICAM1 $r=0,25$ $p<0.001$, sTNFR1 $r=0,14$ $p<0.05$ e sCXCL16 $r=0,18$ $p<0.005$).

Abbiamo inoltre riscontrato una correlazione positiva fra i livelli di proteina C reattiva ad alta sensibilità (hsPCR) e i livelli di sCXCL16 e sTNFR1 (sTNFR1 $r=0,18$ $p<0.005$ e sCXCL16 $r=0,19$ $p<0.001$).

4.3 Aumento dei livelli dei substrati solubili di TACE/ADAM17 in presenza di alterazioni del metabolismo glucidico

Avendo osservato una correlazione positiva fra i livelli dei substrati solubili TACE/ADAM17 e i valori di emoglobina glicata e di glicemia a digiuno e 2 ore dopo il carico, abbiamo analizzato i soggetti che hanno partecipato allo studio, nessuno dei quali aveva all'arruolamento una diagnosi positiva per diabete o un valore di glicemia a digiuno superiore a 126 mg/dl, suddividendoli in due gruppi: con normale glicemia a digiuno (normal fasting glucose o NFG: glicemia < 110 mg/dl, n=218) e con alterata glicemia a digiuno (impaired fastin glucose o IFG \geq 110 mg/dl, n=57). I soggetti con alterata glicemia a digiuno mostrano un aumento significativo dei livelli di sCXCL16 (NFG vs IFG: $3,21 \pm 1,4$ vs $3,55 \pm 0,8$ p<0,05), sVCAM1 (NFG vs IFG: $752,22 \pm 431,37$ vs $867,96 \pm 396,52$ p<0,05) e sICAM1 (NFG vs IFG: $279,351 \pm 103,55$ vs $374,25 \pm 174,95$ p<0,001) ed una tendenza che sfiora la significatività per aumentati livelli di sIL6R e sTNFR1 (Figura 4.4).

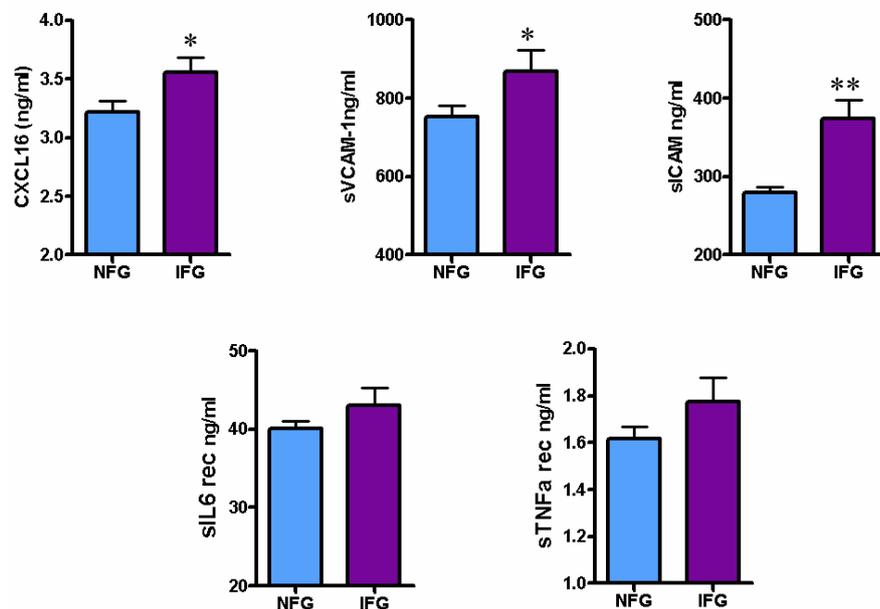


Figura 4.4 – I soggetti con alterata glicemia a digiuno (IFG: glicemia a digiuno > 110 mg/dl) mostrano livelli aumentati dei substrati solubili circolanti rispetto ai soggetti con normale glicemia a digiuno (NFG). * p < 0.05 e ** p < 0.001 t Test di Student.

Tutti i soggetti arruolati nello studio sono stati sottoposti anche a curva da carico orale di glucosio, e sono stati suddivisi, per un'ulteriore analisi, in base alla

presenza o meno di alterazioni del metabolismo glucidico emerse dal carico orale di glucosio in due gruppi: soggetti con normale tolleranza glucidica (normal glucose tolerance o NGT, glicemia a 2 ore dopo il carico <140 mg/dl n=126) e soggetti con alterata curva glucidica, comprendenti sia i soggetti con ridotta tolleranza glucidica (impaired glucose tolerance o IGT, glicemia a 2 ore dopo il carico \geq 140 mg/dl e <200 mg/dl, n=94) che con diabete mellito tipo 2 (type 2 diabetes o T2D glicemia a 2 ore dopo il carico \geq 200 mg/dl, n=55). I soggetti con alterazione del metabolismo glucidico mostrano un aumento significativo dei livelli di sVCAM1 (NGT vs IGT/T2D: $699,23 \pm 442,01$ vs $901,52 \pm 433,72$ $p<0,001$) e sICAM1 (NGT vs IGT/T2D: $271,15 \pm 104,9$ vs $323,91 \pm 149,75$ $p<0,003$) ed una tendenza che sfiora la significatività statistica ad aumentati livelli di sIL6R e sTNFR1 (Figura 4.5).

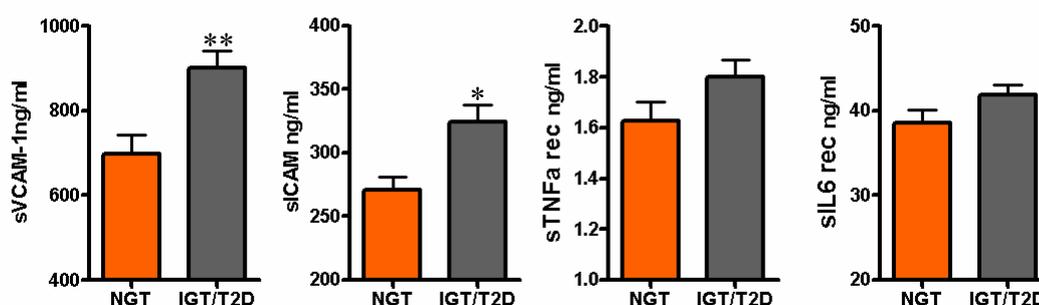


Figura 4.5 – I soggetti con alterazioni del metabolismo glucidico (IGT e T2D) mostrano livelli aumentati di sVCAM1 e sICAM1 rispetto ai soggetti con normale tolleranza glucidica (NGT). * $p<0.003$ e ** $p<0.001$.

4.4 Placche aterosclerotiche di soggetti diabetici di tipo 2 mostrano ridotti livelli di TIMP3

I risultati della prima parte del nostro studio, esposti nei precedenti paragrafi, dimostrano che nell'uomo i livelli solubili circolanti dei substrati di TACE/ADAM17 sono gradualmente associati con la progressione della patologia aterosclerotica, l'insulino resistenza, ed alterazioni del metabolismo glico-lipidico suggerendo che essi possano influenzare sia l'omeostasi glucidica che quella vascolare. Sulla base di queste evidenze, abbiamo analizzato retrospettivamente una banca già disponibile di 60 placche aterosclerotiche carotidiche da pazienti sintomatici al fine di verificare se gli enzimi proteolitici di membrana ed i loro

inibitori fossero differentemente espressi nei pazienti diabetici e non diabetici (Tabella 4).

	NGT	DM2
	37	23
Sesso (uomini/donne)	25/12	14/9
Età (aa)	71,0±6,6	70,6±8,9
BMI (kg/m²)	25,3±3,9	24,1±4,8
Ipertensione (si/no)	29/8	20/3
Terapia anti-ipertensiva (si/no)	23/14	15/8
Terapia antiaggregante (si/no)	35/2	22/1
Statine (si/no)	25/12	15/8
Colesterolo totale (mg/dl)	188,9±31,0	192,35±36,86
Colesterolo HDL (mg/dl)	45,32±10,2	43,3±9,6
Colesterolo LDL (mg/dl)	115,7±24,6	122,18±28,1
Trigliceridi (mg/dl)	125,69±62,26	139,13±72,04
HbA1c (%)	5,6±0,2	7,2±1,6*
Glicemia a digiuno (mg/dl)	89,7±12,0	126,9±51*
Insulina a digiuno	7,38±5,59	6,96±3,51
Terapia Orale/Terapia insulinica	-	15/8

Tabella 4 – Caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione sottoposta ad Endoarteriectomia carotidea. *p<0.001 T test di Student.

Abbiamo riscontrato che fra tutti gli enzimi studiati, ADAM10/17, MMP9 e TIMP1/2/3/4, solamente i livelli di espressione di TIMP3 risultano significativamente ridotti nei pazienti diabetici rispetto ai pazienti non diabetici (Figura 4.6 A e B).

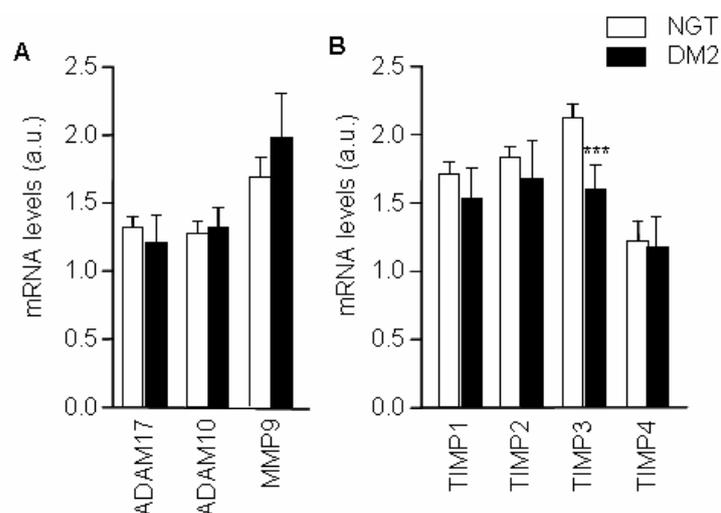


Figura 4.6 – L'espressione di TIMP3 è ridotta nelle placche aterosclerotiche di pazienti con diabete. Livelli di espressione di ADAM10, ADAM17, MMP9 (pannello A) e di TIMP1/2/3/4 (pannello B) nei soggetti NGT (n=37) e DM2 (n=23), ***p<0.001, 1-way Anova.

Per confermare la significativa riduzione dei livelli di TIMP3 nelle placche aterosclerotiche dei pazienti diabetici abbiamo eseguito un'analisi dei livelli proteici dell'inibitore su estratti proteici di matrice extracellulare mediante Western Blot, come mostrato nella Figura 4.7, che ha dimostrato una riduzione dei livelli proteici di TIMP3 nelle placche dei diabetici.

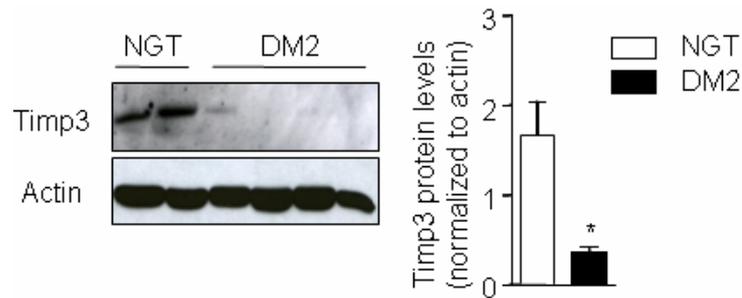


Figura 4.7– Analisi mediante Western blot dei livelli proteici di TIMP3 negli estratti di matrice extracellulare delle placche di pazienti NGT (n=2) e DM2 (n=4). * $p < 0.001$ Test t Student.

Uno studio immunohistochimico effettuato in un sottogruppo di 8 pazienti non diabetici e 8 pazienti diabetici ha confermato il legame fra la ridotta espressione di Timp3 e l'alterato metabolismo glucidico (Figura 4.8).

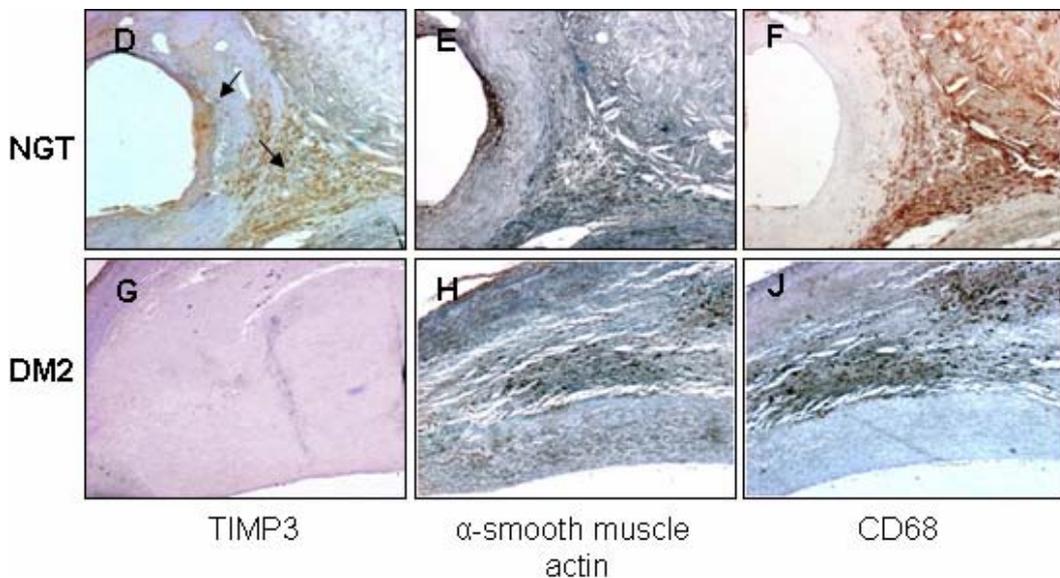


Figura 4.8 – Lo studio di Immunohistochimica conferma che TIMP3 è ridotto nei pazienti DM2 (n=8) rispetto ai pazienti NGT (n=8); un'immagine rappresentativa è mostrata per TIMP3, anti- α -actina muscolo liscio e anti CD68 per i soggetti NGT (D-F, 4x) e DM2 (G-J, 4x).

L'analisi di sezioni consecutive con l'anticorpo anti-CD68, per identificare i macrofagi, e con l'anticorpo anti- α actina del muscolo liscio, dimostra che sia i

macrofagi che le cellule muscolari lisce sono associate con l'espressione di TIMP3 nei pazienti con normale tolleranza glucidica.

Per verificare che la riduzione di TIMP3 nelle placche aterosclerotiche corrispondesse ad un aumento dell'attività degli enzimi TACE/ADAM17 e MMP9, abbiamo eseguito due saggi fluorimetrici di attività. Abbiamo così riscontrato che sia l'attività di TACE/ADAM17 che quella delle MMP9 risultano aumentate nei soggetti diabetici rispetto ai non diabetici (Figura 4.9).

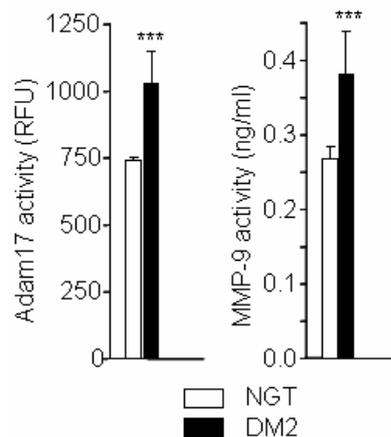


Figura 4.9 – L'attività di TACE/ADAM17 e quella delle MMP9, misurate mediante saggio fluorimetrico, sono aumentate nei soggetti DM2 (n=23) rispetto agli NGT (n=37); ***p<0.001 t test di Student.

L'analisi delle caratteristiche cliniche dei pazienti mostra che l'espressione di TIMP3 correla negativamente con i livelli di colesterolo LDL ($R=-0.29$, $p<0.03$) e con i livelli di emoglobina glicata ($R=-0.31$, $p<0.02$), ma non con il sesso, l'età o i trattamenti farmacologici (figura 4.10).

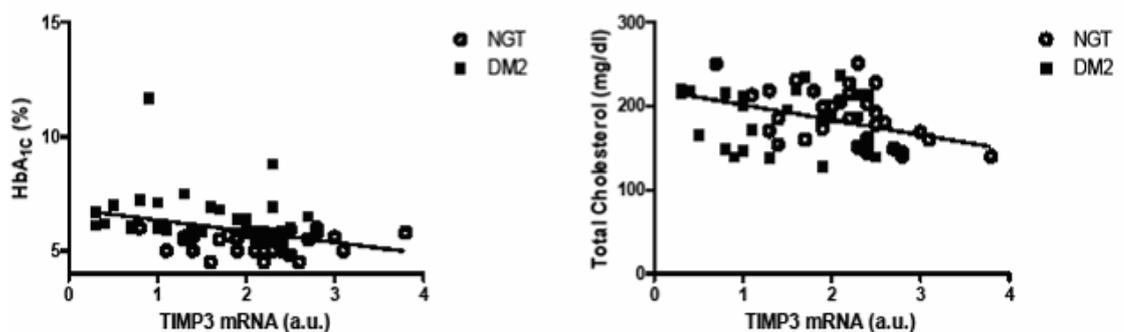


Figura 4.10 – Correlazione inversa fra i livelli di espressione di TIMP3 nelle placche e i livelli ematici di emoglobina glicata (HbA1c: $R=-0.31$, $p<0.02$) e di colesterolo totale ($R=-0.29$, $p<0.03$).

4.5 Regolazione dell'espressione di TIMP3 in vitro in cellule muscolari lisce coronariche umane

Avendo indentificato nello studio in vivo una riduzione dei livelli di espressione e proteici di TIMP3, con un conseguente aumento dell'attività delle MMP9 e TACE/ADAM17 e dei substrati solubili circolanti nei soggetti diabetici affetti da aterosclerosi, abbiamo cercato di identificare quali fattori metabolici siano in grado di ridurre l'espressione di TIMP3 nel tessuto vascolare. A tal fine abbiamo trattato cellule muscolari lisce di arterie coronariche umane (CASMC) con alto glucosio (20mM), mannitolo (20 mM come controllo osmotico), iperinsulinemia (10^{-7} M), LDL, LDL ossidate, LDL glicate (100 μ g/ml). Dati recenti hanno evidenziato che il recettore nucleare Liver X Receptor (LXR), fattore di trascrizione chiave nel metabolismo lipidico e del colesterolo, regola l'espressione di TIMP3 [36,37]. Abbiamo quindi utilizzato, come trattamento per le CASMC, agonisti di LXR quali T0901317, 22-s-idrossicolesterolo e 22-r-idrossicolesterolo e GW3965. Essendo il fattore di trascrizione LXR regolato dalla deacetilasi SirT1 [31], abbiamo utilizzato come stimolo anche l'inibitore di SirT1 Sirtinolo. Come mostrato nella figura 4.11-A, abbiamo riscontrato che nelle cellule CASMC tra i vari trattamenti utilizzati, soltanto l'alto glucosio ed il Sirtinolo riducono significativamente l'espressione di TIMP3. Il trattamento delle CASMC con il Sirtinolo determina inoltre un aumento significativo dell'attività delle metalloproteasi, come dimostrato dal saggio di attività di TACE/ADAM17 (Figura 4.11-B).

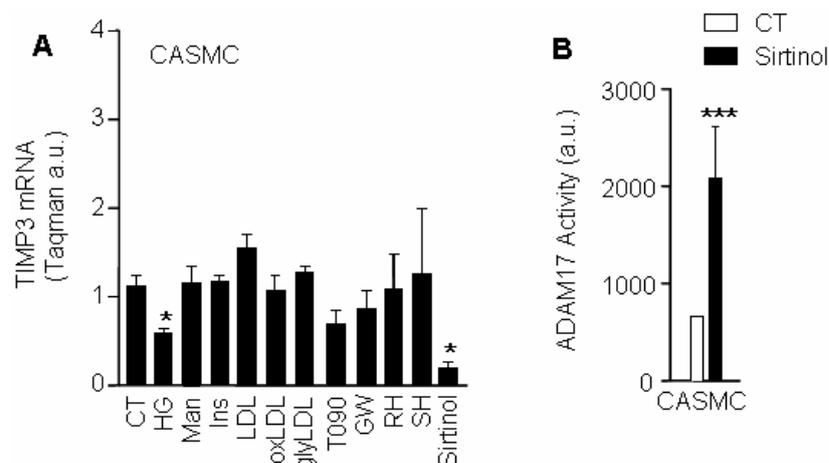


Figura 4.11 – (A) Espressione di TIMP3 in CASMC trattate con diversi stimoli metabolici [HG, High Glucose 20 mM; Man, Mannitolo 20 mM; Ins, Insulina 10^{-7} M; LDL 100 μ g/ml; LDL Ossidate, OxLDL 100 μ g/ml; LDL Glicate, GlyLDL 100 μ g/ml; LXR agonisti (T0901317, T09 5 μ M; GW3965, GW 3 μ M; 22-R-idrossicolesterolo, RH 10 μ M; 22-S-idrossicolesterolo, SH 10 μ M); inibitore di SirT1 Sirtinolo 50 μ M]; n=4 per tutti gli esperimenti; *p<0.05 t test di Student vs Controllo (CT). **(B)** Il Sirtinolo aumenta l'attività di ADAM17 nelle CASMC; n=4 per gli esperimenti; ***p<0.001 t test di Student.

4.6 Regolazione dell'espressione di TIMP3 in vitro in cellule endoteliali e monocitiche umane

Sulla base dei risultati ottenuti nel modello cellulare CASMC, abbiamo valutato l'effetto dei vari trattamenti sull'espressione di TIMP3 in due altri modelli cellulari: le cellule endoteliali di vena ombelicale umana HUVEC e la linea monolitica da leucemia acuta umana THP1. Anche in queste due linee cellulari abbiamo riscontrato che l'espressione di TIMP3 è significativamente ridotta in risposta al trattamento con alto glucosio e Sirtinolo (Figura 4.12).

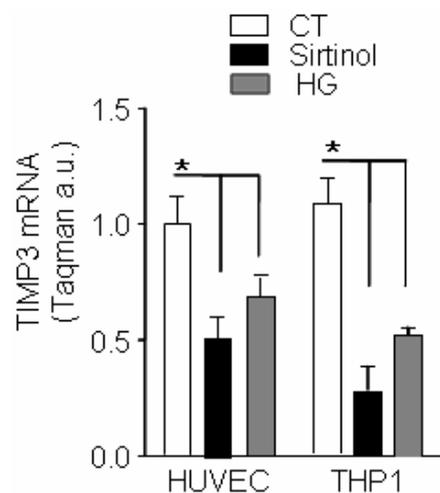


Figura 4.12 – L'espressione di TIMP3 è ridotta nelle HUVEC e nelle THP1 trattate con Sirtinolo e alto glucosio (HG, 20 mM); n=4 per tutti gli esperimenti; *p<0.05 T test di Student vs Controllo (CT).

4.7 Espressione di Sirt1 e alterazioni del metabolismo glucidico

Al fine di valutare se l'espressione della deacetilasi SirT1 venga influenzata da alterazioni del metabolismo glucidico, abbiamo valutato in vitro nelle tre linee cellulari precedentemente studiate i livelli di mRNA di SirT1 dopo trattamento con alto glucosio per 24 ore ed abbiamo osservato una riduzione significativa dell'espressione di SirT1 nelle CASMC e THP1 ed una tendenza nelle HUVEC (Figura 4.13)

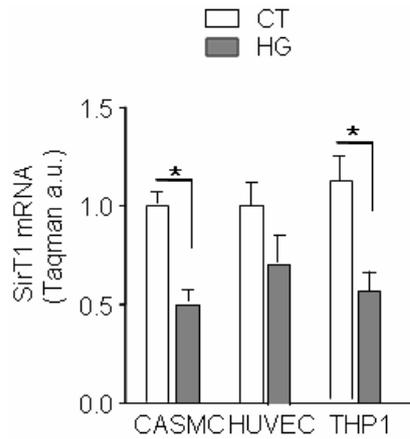


Figura 4.13 – L'espressione di SirT1 è ridotta nelle CASC, HUVEC e THP1 trattate con alto glucosio (HG, 20 mM) rispetto al Controllo (CT); n=4 per tutti gli esperimenti; *p<0.05 t Test di Student.

Sulla base di questo risultato abbiamo analizzato l'espressione di SirT1 nelle placche aterosclerotiche dei pazienti diabetici e non diabetici, riscontrando una significativa riduzione dei livelli di SirT1 negli ateromi dei pazienti diabetici (Figura 4.14 A). Inoltre nelle placche aterosclerotiche l'espressione di TIMP3 correla positivamente con l'espressione di SirT1 ($r=0.4$, $p<0.03$, Figura 3.14 B), nonostante i pazienti diabetici e non diabetici siano stati analizzati insieme ed il diabete possa rappresentare un fattore confondente.

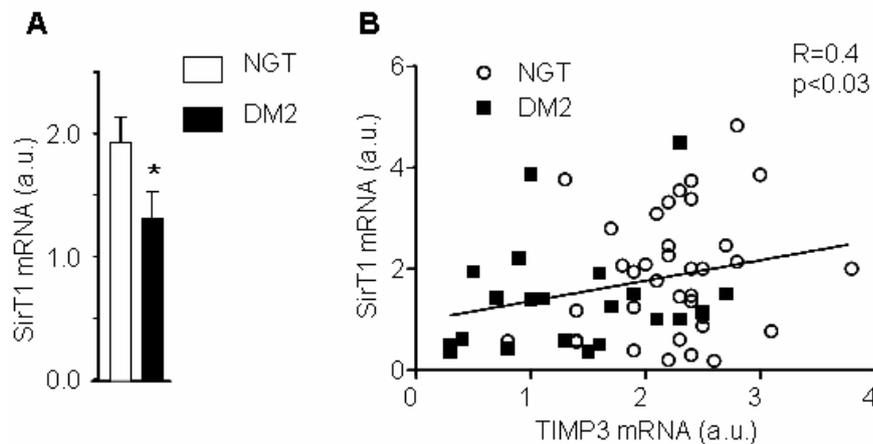


Figura 4.14– (A) I livelli di SirT1 sono ridotti nei soggetti DM2 rispetto agli NGT, *p<0.05 T test di Student; **(B)** SirT1 correla positivamente con TIMP3 nelle placche aterosclerotiche di pazienti NGT (n=37) e DM2 (n=23) ($R=0.4$ e $p<0.03$).

4.8 SirT1 regola l'espressione di TIMP3

Per confermare il ruolo diretto di SirT1 nella regolazione dell'espressione di TIMP3, abbiamo effettuato il silenziamento genico di SirT1 mediante la trasfezione di RNA interferente breve (siRNA). Il silenziamento genico di SirT1 nelle CASMC ha determinato una marcata riduzione dell'espressione di TIMP3 ma non degli altri enzimi coinvolti nella regolazione della proteolisi di membrana, quali TIMP1/2/4 e ADAM10/17/MMP9 (Figura 4.15 A). Il *knockdown* di SirT1 determina la stessa riduzione di espressione di TIMP3 anche nelle linee cellulari HUVEC e THP1 (Figura 4.15 B).

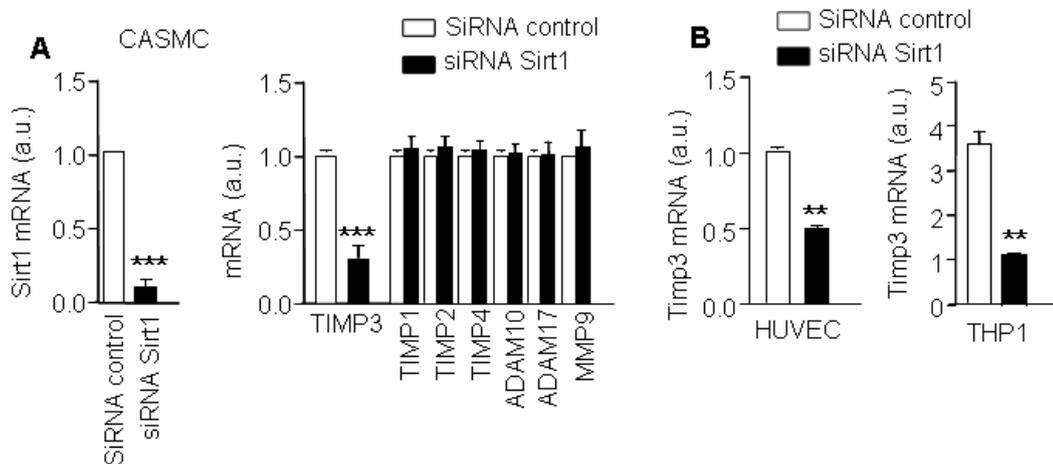


Figura 4.15– Regolazione dell'espressione di TIMP3 nelle CASMC. **(A)** Il *knockdown* di SirT1 riduce l'espressione di TIMP3 ma non di TIMP1/2/4 e ADAM10/ADAM17/MMP9 nelle CASMC; n=4 per tutti gli esperimenti; ***p<0.001 t test di Student vs controllo. **(B)** Il *knockdown* di SirT1 riduce l'espressione di TIMP3 nelle HUVEC e THP1; n=4 per tutti gli esperimenti; ***p<0.001 t test di Student vs controllo.

Al fine di verificare l'effetto regolatorio di SirT1 su TIMP3, abbiamo co-trasfettato le CASMC con cDNA umano SirT1 e il vettore reporter luciferasi contenente il promotore di *Timp3*, confermando che SirT1 modula positivamente l'espressione di TIMP3 (Figura 4.16)

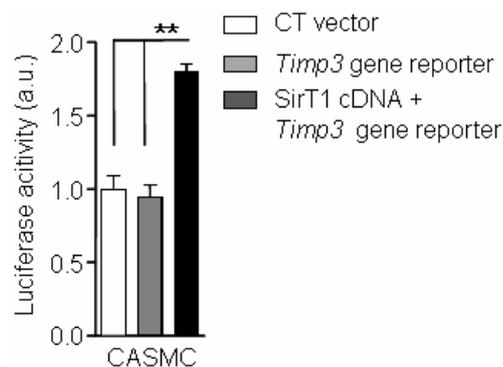


Figura 4.16– La sovra-espressione di SirT1 cDNA aumenta l'attività del promotore di *Timp3*; n=4 per tutti gli esperimenti; **p<0.01 one-way ANOVA.

Infine abbiamo osservato che inducendo una sovra-espressione di Sirt1 si previene la riduzione di TIMP3 in presenza di alte concentrazioni glucosio nelle tre linee cellulari CASMC, HUVEC e THP1 (Figura 4.17).

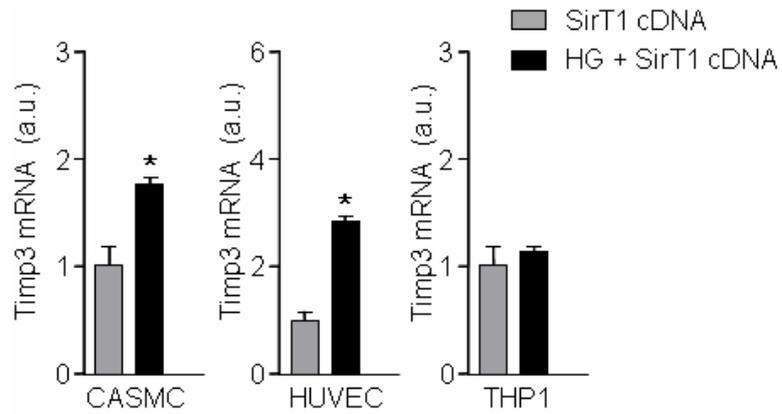


Figura 4.17– La sovra-espressione di SirT1 aumenta e previene la perdita dell'espressione di TIMP3 causata dall' alto glucosio (HG, 20 mM) nelle CASMC, HUVEC e THP1; n=4 per tutti gli esperimenti; *p<0.05 t test di Student.

Capitolo Quinto

DISCUSSIONE

Studi epidemiologici condotti recentemente hanno mostrato che i livelli circolanti delle forme solubili delle proteine transmembrana sono aumentati nelle patologie infiammatorie come l'aterosclerosi ed l'obesità [29] e sono correlati con la progressione e la gravità delle patologie cardiovascolari [38,39]. La produzione delle forme solubili di proteine transmembrana è un processo complesso che coinvolge, nella maggioranza dei casi, il sistema proteolitico di membrana che è regolato da una classe delle metalloproteasi della famiglia ADAM, in particolar modo da TACE/ADAM17, ADAM10 e ADAM12 e dal loro inibitore TIMP3 [40,41]. Studiando questo sistema in modelli murini, abbiamo riscontrato che una ridotta attività dell'inibitore delle metalloproteasi TIMP3 è correlata allo sviluppo di diabete ed infiammazione vascolare [14,23]. Recentemente Page e collaboratori hanno confermato in modelli animali che ridotti livelli di TIMP3 sono geneticamente correlati al diabete [24].

In un nostro precedente lavoro abbiamo osservato che una deficienza di TIMP3 è necessaria per lo sviluppo delle strie lipidiche caratterizzate dall'infiltrato macrofagico nel modello murino eterozigote per il recettore dell'insulina (*Insr*^{+/-}) alimentato con una dieta ricca in lipidi. L'importanza di TIMP3 è dimostrata dal fenotipo invertito causato dalla deficienza di TACE nello stesso modello murino *Insr*^{+/-}, suggerendo che la perdita di TIMP3 può favorire lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche [42]. Per caratterizzare completamente il ruolo di TIMP3 nella progressione della lesione aterosclerotica nel diabete sono necessari studi in altri modelli murini, quali ad esempio i topi *knockout* per ApoE e per il recettore delle LDL.

Partendo da queste premesse, abbiamo ipotizzato che il sistema proteolitico di membrana possa essere coinvolto nella patogenesi del diabete di

tipo 2 e dell'aterosclerosi. Per verificare questa nostra ipotesi abbiamo studiato inizialmente l'attività del sistema proteolitico di membrana in tre coorti di soggetti caratterizzati da differente localizzazione delle lesioni aterosclerotiche ed insulino resistenza. I nostri risultati suggeriscono che livelli crescenti delle molecole solubili di membrana circolanti sono associate con un peggioramento dell'insulino resistenza, del metabolismo glucidico e lipidico e del processo aterosclerotico. Inoltre in presenza di alterazioni del metabolismo glucidico, come la presenza di elevati livelli di glicemia a digiuno o di glicemia 2 ore dopo il carico, abbiamo riscontrato elevati livelli di alcuni dei substrati solubili, e in particolare di sICAM1, sVCAM1.

Nell'uomo non è stata mai analizzata direttamente l'attivazione del sistema proteolitico di membrana nei tessuti metabolici e vascolari. Abbiamo quindi deciso di analizzare placche aterosclerotiche prelevate da pazienti diabetici e non diabetici al fine di valutare l'attività del sistema.

I nostri risultati suggeriscono che le placche aterosclerotiche dei pazienti diabetici mostrano una riduzione dei livelli di espressione di TIMP3, con una conseguente aumentata attività di TACE/ADAM17 e delle MMP9, probabilmente causata dall'iperglicemia, che è stata precedentemente riconosciuta come fattore attivante entrambi gli enzimi mediante un meccanismo PKC-dipendente [12,43,44,45]. Inoltre i nostri dati suggeriscono che la riduzione dei livelli di espressione di TIMP3, determinata da fattori metabolici, può aumentare l'attività di enzimi infiammatori e proteolitici, che possono svolgere un ruolo nel processo di aterotrombosi [46,26].

Uno studio pubblicato da Libby e collaboratori ha mostrato che l'espressione di TIMP3 è aumentata in estratti di ateromi rispetto a tessuto non aterosclerotico in soggetti non diabetici [47]. Alla luce dei nostri risultati, la riduzione di TIMP3 può essere considerata come un fattore specifico nel processo aterosclerotico dei pazienti diabetici.

La diminuita azione di TIMP3 può determinare un incremento del segnale del TNF- α e del recettore del fattore epidermico di crescita (Epidermal Growth Factor Receptor o EGFR), aumentando potenzialmente la carica infiammatoria all'interno della placca aterosclerotica [14,23,42]. Inoltre la riduzione di TIMP3

comporta un aumento dell'attività delle MMP9 nelle placche aterosclerotiche, che è una ben nota caratteristica del sistema vascolare dei soggetti con diabete mellito di tipo 2 [48], e può alterare la stabilità della placca a lungo termine.

Il ruolo dei TIMP nel processo di aterotrombosi del soggetto diabetico è ancora poco chiaro. Dati recenti da modelli animali suggeriscono che un alterato rapporto fra le metalloproteasi e gli inibitori TIMP possa favorire un incremento della degradazione della matrice extracellulare in grado di promuovere la progressione del processo aterosclerotico [49].

I fattori che regolano l'espressione dei vari TIMP nelle placche aterosclerotiche sono ancora indefiniti, sebbene dati dalla letteratura suggeriscano che possano essere implicati fattori di crescita quali TGF- β e PDGF [49]. Nonostante ciò il ruolo e la regolazione di TIMP3 nella patologia vascolare dei pazienti diabetici non è mai stata indagata. I nostri dati mostrano che i livelli di espressione di TIMP3 nelle placche aterosclerotiche sono negativamente associati alle concentrazioni plasmatiche del colesterolo totale e dell'emoglobina glicata. L'esposizione delle CSMC a vari stimoli correlati alla glucotossicità e alla lipotossicità ha evidenziato che sia l'alto glucosio che l'inibizione della deacetilasi SirT1 determinano una riduzione dell'espressione e dell'attività di TIMP3.

Numerose evidenze ottenute negli ultimi anni stanno facendo emergere SirT1 come regolatore chiave di risposte metaboliche integrate alla disponibilità di nutrienti [31-34,50]. Dati ottenuti nei topi *knockout* per il gene ApoE suggeriscono che una sovra-espressione di SirT1 nelle cellule endoteliali può rappresentare un fattore protettivo nella progressione del processo aterosclerotico, sebbene i meccanismi alla base sono ancora poco definiti.

Nel nostro lavoro, attraverso il silenziamento genico o la sovra-espressione di SirT1, evidenziamo il ruolo della deacetilasi SirT1 nella modulazione dell'espressione di TIMP3 nelle cellule muscolari lisce ed nel sistema monocita-macrofagico. SirT1 controlla l'espressione genica mediante la deacetilazione di istoni e fattori di trascrizione: uno od entrambi i meccanismi potrebbero essere coinvolti nella regolazione dell'espressione di TIMP3.

Precedenti studi hanno mostrato che un agonista del fattore di trascrizione LXR, il composto T0901317, è in grado di regolare l'espressione di TIMP3. Nei

nostri sistemi cellulari non abbiamo osservato alcun effetto di T0901317 sull'espressione genica: questo potrebbe dipendere da numerosi fattori fra cui l'utilizzo di modelli sperimentali differenti e diverse condizioni di coltura. Inoltre SirT1 è un regolatore positivo di LXR, così come di altri fattori di trascrizione potenzialmente coinvolti nell'espressione di TIMP3, quale ad esempio FoxO1 [50,51].

Con i nostri risultati abbiamo inoltre evidenziato che la sovra-espressione di SirT1 è in grado di normalizzare l'espressione di TIMP3 in presenza di glucotossicità, ed è quindi speculabile che SirT1 moduli gli eventi correlati alla de-repressione del promotore di TIMP3 attraverso la deacetilazione di fattori di trascrizione come FoxO1 o di istoni.

In letteratura, fino ad oggi, questo è il primo gene/meccanismo correlato a SirT1 identificato nel contesto del diabete e della patologia aterosclerotica utilizzando campioni di tessuto vascolare umano. I nostri risultati inoltre avvalorano la teoria in cui SirT1 riveste un ruolo protettivo nelle malattie metaboliche.

Capitolo Sesto

CONCLUSIONI

La modulazione del sistema proteolitico di membrana extracellulare, attraverso una riduzione dell'espressione di TIMP3 e un'aumentata attività di TACE/ADAM17, può determinare un incremento del rilascio di numerosi fattori proinfiammatori, tra cui i substrati solubili circolanti sICAM1, sVCAM1 e CXCL16, nei soggetti affetti da alterazioni del metabolismo glucidico e patologia aterosclerotica con differente localizzazione.

Abbiamo inoltre osservato che le placche aterosclerotiche carotidee di soggetti con alterazioni del metabolismo glucidico sono caratterizzate da una riduzione dei livelli di TIMP3 ed un'aumentata attività delle metalloproteasi. Gli studi in vitro e le correlazioni cliniche suggeriscono che SirT1 regola l'espressione di TIMP3, il quale sta assumendo un ruolo centrale come fattore specifico per lo sviluppo dell'aterosclerosi nella patologia diabetica.

Bibliografia

- [1] Feskens EJ, Kromhout D. "Glucose tolerance and the risk of cardiovascular disease: the Zutphen Study". *J Clin Epidemiol.* 1992;45:1327-1334.
- [2] Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, et al. "Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction." *N Engl J Med.* 1998;339:229-234.
- [3] Beckman JA, Creager MA, Libby P. "Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management". *JAMA* 2002;287:2570-2581
- [4] Folsom AR, Rasmussen ML, Chambless LE, et al. "Prospective associations of fasting insulin, body fat distribution, and diabetes with risk of ischemic stroke." *Diabetes Care.* 1999;22:1077-1083.
- [5] De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, et al. "Endothelial dysfunction in diabetes". *Br J Pharmacol.* 2000;130:963-974.
- [6] Renè R, Packard S, Libby P. "Inflammation in atherosclerosis : from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction" *Clin Chem* 2008 ; 54 : 24-38.
- [7] Libby P. "Current concept of the pathogenesis of the acute coronary syndromes" *Circulation* 2001;104: 365-372.
- [8] Fukumoto H, Naito Z, Asano G et al. "Immunohistochemical and morphometric evaluations of coronary atherosclerotic plaques associated

with myocardial infarction and diabetes mellitus” *J Atheroscler Thromb* 2000;7: 132-137.

- [9] Nagase H, Woessner JF. “Matrix metalloproteinases.” *J Biol Chem.*1999;274:21491–21494.
- [10] Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. “Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94:2493–2503.
- [11] Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Libby P. “Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions.” *Ann N Y Acad Sci.* 1995;748:501–507.
- [12] Federici M, Menghini R, Mauriello A et al. “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;106:466-472
- [13] Amour A, Slocombe PM, Webster A et al, “TNF α converting enzyme is inhibited by TIMP-3” *FEBS Letters* 1998; 435: 39-44.
- [14] Serino M, Menghini R, Fiorentino L et al “Mice heterozygous for Tumor Necrosis Factor α Converting Enzyme are protected from obesity-induced insulin resistance and diabetes” *Diabetes* 2007; 56: 2541-2546.
- [15] Chu NF, Spiegelman D, Hotamisligil GS et al “Plasma insulin, leptin, and soluble TNF receptors levels in relation to obesity-related atherogenic and thrombogenic cardiovascular disease risk factor among men” *Atherosclerosis* 2001; 157: 495-503.

-
- [16] Shai I, Pischon T, Hu FB et al “Soluble intracellular adhesion molecules, soluble vascular cell adhesion molecules, and risk of coronary artery disease” *Obesity* 2006; 14: 2099-2106.
- [17] Lee, M. H., M. Rapti, and G. Murphy. “Total conversion of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) for specific metalloproteinase targeting: fine-tuning TIMP-4 for optimal inhibition of tumor necrosis factor- α -converting enzyme.” *J. Biol.Chem.* 2005; 280: 15967–15975.
- [18] Staskus PW, Masiarz FR, Pallanck LJ, Hawkes SP. “The 21-kDa protein is a transformation-sensitive metalloproteinase inhibitor of chicken fibroblasts” *J Biol Chem.* 1991; 266: 449-54
- [19] Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, et al “A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2.” *Nat Med.* 2003; 9:407-15.
- [20] Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. “Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis.” *J Clin Invest.* 1998; 101:1478-87
- [21] Van der Laan WH, Quax PH, Seemayer CA, et al “Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene transfer of TIMP-1 and TIMP-3.” *Gene Ther.* 2003; 10:234-42.
- [22] Mohammed FF, Smookler DS, Taylor SEM et al. “Abnormal TNF activity in Timp3 $-/-$ mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration.” *Nat Gen* 2004; 36: 696-677.

-
- [23] Federici M, Hribal ML, Menghini R et al. "Timp3 deficiency in insulin receptor haploinsufficient mice promotes diabetes and vascular inflammation via increased TNFa" *J Clin Invest* 2005; 115: 3494-3505
- [24] Su Z, Tsaih SW, Szatkiewicz J et al. "Candidate genes for plasma triglycerides, free fatty acid, and glucose revealed from an intercross between inbred mouse strains NZB/B1NJ/Lac J." *J Lipid Res* 2008; 49: 1500-1510
- [25] Barth JL, Yu Y, Song W et al "Oxidised, glycated LDL selectively influences Timp3 gene expression and protein production in human retinal capillary pericytes." *Diabetologia* 2007; 50: 2200-2208.
- [26] Garton KJ, Gough PJ, Raines EW. Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *J Leukoc Biol* 2006;79:1105-16
- [27] Fedak PW, et al. TIMP-3 deficiency leads to dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2004;110:2401-9.
- [28] Ohtsu H, et al. ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*. 291:C1-10. 2006
- [29] Levine SJ. Molecular mechanisms of soluble cytokine receptor generation. *J Biol Chem*. 2008 ;283:14177-81.
- [30] Ludwig A, Weber C. "Transmembrane chemokines: versatile 'special agents' in vascular inflammation." *Thromb Haemost*. 2007 May;97(5):694-703.

-
- [31] Feige JN, Auwerx J, “DisSIRting on LXR and cholesterol metabolism” *Cell Metab* 2007; 6: 343-345.
- [32] Purushotham A, Schung TT, Xu Q et al. “Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation” *Cell Metab* 2009; 9: 327-338.
- [33] Banks AS, Kon N, Knight C, et al “SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice.” *Cell Metab* 2008;8:333-341.
- [34] Zhang QJ, Wang Z, Chen HZ, et al. “Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.” *Cardiovasc Res* 2008;80:191-9.
- [35] Rizza S, Clementi F, Porzio O, Cardellini M, et al. “Adiponectin isoforms are not associated with the severity of coronary atherosclerosis but with undiagnosed diabetes in patients affected by stable CAD”. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009 Jan;19: 54-60.
- [36] Lehrke M, Lebherz C, Millington SC et al. “Diet-dependent cardiovascular lipid metabolism controlled by hepatic LXRalpha”. *Cell Metab* 2005;1:297-308
- [37] Hoe HS, Cooper MJ, Burns MP et al. “The metalloprotease inhibitor TIMP-3 regulates amyloid precursor protein and apolipoprotein E receptor proteolysis.” *J Neurosci*, 2007, 27:10895-1090
- [38] Meigs JB, Hu FB, Rifai N, Manson JE. “Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus”. *JAMA.* 2004 ;291:1978-86.

-
- [39] Shai I, Pischon T, Hu FB, et al. “Soluble intercellular adhesion molecules, soluble vascular cell adhesion molecules, and risk of coronary heart disease”. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:2099-106
- [40] Murphy G, Murthy A, Khokha R. Clipping, shedding and RIPping keep immunity on cue. *Trends Immunol*. 2008;29:75-82.
- [41] Overall CM, Blobel CP. In search of partners: linking extracellular proteases to substrates. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:245-57.
- [42] Menghini R, Menini S, Amoruso R, et al “Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 Deficiency Causes Hepatic Steatosis and Adipose Tissue Inflammation in Mice”. *Gastroenterology* 2009;136:663-672
- [43] Uemura S, Matsushita H, Li W, et al “Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress”. *Circ Res* 2001;88:1291-1298
- [44] Chen CD, Podvin S, Gillespie E, et al. “Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19796-801
- [45] Reddy AB, Ramana KV, Srivastava S, et al. “Aldose Reductase Regulates High Glucose-Induced Ectodomain Shedding of Tumor Necrosis Factor (TNF)- α via Protein Kinase C- δ and TNF- α Converting Enzyme in Vascular Smooth Muscle Cells. *Endocrinology* 2009;150:63-74
- [46] Libby P. The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Intern Med* 2008;263:517-527

-
- [47] Fabunmi RP, Sukhova GK, Sugiyama S, Libby P. "Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in human atheroma and regulation in lesion-associated cells: a potential protective mechanism in plaque stability". *Circ Res* 1998;83:270-8
- [48] Chung AW, Hsiang YN, Matzke LA, et al. "Reduced expression of vascular endothelial growth factor paralleled with the increased angiostatin expression resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human type 2 diabetic arterial vasculature." *Circ Res* 2006;99:140-148
- [49] Boden G, Song W, Pashko L, Kresge K. In Vivo Effects of Insulin and Free Fatty Acids on Matrix Metalloproteinases in Rat Aorta. *Diabetes* 2008;57: 476-483
- [50] Ungvari Z, Parrado-Fernandez C, Csiszar A, de Cabo R. "Mechanisms underlying caloric restriction and lifespan regulation: implications for vascular aging." *Circ Res* 2008;102:519-28
- [51] Buzzio OL, Lu Z, Miller CD, Unterman TG, Kim JJ. FOXO1A differentially regulates genes of decidualization. *Endocrinology* 2006;147:3870-3876

