

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO DIAGNOSTICHE
E TERAPIE SPECIALI**

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MEDICHE
CLINICHE E SPERIMENTALI**

**INDIRIZZO: SCIENZE DIABETOLOGICHE
CICLO XXIV**

***RUOLO DI SIRT1 NELLA REGOLAZIONE DI
E-SELECTINE NELLA SINDROME METABOLICA***

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. GAETANO THIENE

Coordinatore di Indirizzo: Ch.mo Prof. ANGELO AVOGARO

Supervisore: Ch.mo Prof. ANGELO AVOGARO

DOTTORANDO: Dr GIULIO CEOLOTTO

SOMMARIO

RIASSUNTO	3
INTRODUZIONE	7
1. SINDROME METABOLICA	3
1.1 SINDROME METABOLICA E INFIAMMAZIONE	10
1.2 SINDROME METABOLICA E DISFUNZIONE ENDOTELIALE	6
2. MOLECOLE DI ADESIONE	8
2.1 I- CAM 1 (CD 54)	9
2.2 V-CAM (CD 106)	10
2.3 E-SELECTINE (ELAM-1)	11
3.FATTORE TRASCRIZIONALE NF-kB	14
3.1 PROPRIETÀ BIOCHIMICHE DI NF-kB	14
3.2 RUOLO FISILOGICO DI NF-kB	16
3.3 NF-kB, PROTEINA PRO-INFIAMMATORIA	17
3.4 ACETILAZIONE DI NF-kB	17
4. SIRTUINE	19
4.1 PROPRIETÀ BIOCHIMICHE DELLE SIRTUINE	20
4.2 SIRT 1	21
4.3 SIRT1 E REGOLAZIONE DELLA CROMATINA	21
4.4 SIRT1 E FATTORI DI TRASCRIZIONE	23
4.5 RESVERATROLO, ATTIVATORE DI SIRT1	25
SCOPO DEL LAVORO	28
MATERIALE E METODI	29
1.ESPERIMENTI SU LINFOMONOCITI DEI SOGGETTI	29
1.1 SOGGETTI	29
1.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE	30
1.3 VALUTAZIONE DELLA SINDROME METABOLICA	30
1.4 PROCEDURE ANALITICHE	31
1.5 ESPRESSIONE DI SIRTUINE NEI LINFOMONOCITI	31
1.5.1 Preparazione della frazione linfomonocitaria	31
1.5.2 Estrazione di RNA	31
1.5.3 Quantificazione di RNA	32
1.5.4 Retrotrascrizione di RNA	32
1.5.5 Espressione genica di sirtuine in linfomonociti umani:PCR- Real Time	32
1.5.6 Western Blot	34
1.6 DOSAGGIO DELLE MOLECOLE DI ADESIONE E DEL TNF- α	35

2. ESPERIMENTI SU CELLULE HUVEC	36
2.1 COLTURA CELLULARE	36
2.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE	36
2.3 VITALITÀ CELLULARE	37
2.4 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE	37
2.5 DOSAGGIO PROTEICO MEDIANTE SAGGIO CON BCA	38
2.6 ESPRESSIONE PROTEICA DI SIRT1 ED NF-kB	38
2.7 ATTIVAZIONE DEL FATTORE NF-kB MEDIANTE IMMUNOPRECIPITAZIONE	38
2.8 DETERMINAZIONE DELLE MOLECOLE DI ADESIONE NEL TERRENO DI COLTURA	39
2.9 ANALISI STATISTICA	39
RISULTATI	41
1. ESPERIMENTI SU LINFOMONOCITI UMANI	41
1.1 SOGGETTI	41
1.2 ESPRESSIONE DI SIRT1 IN LINFOMONOCITI UMANI	42
1.3 CORRELAZIONE TRA L'ESPRESSIONE GENICA DI SIRT1 E LE COMPONENTI DELLA SINDROME METABOLICA	44
1.4 CONCENTRAZIONI PLASMATICHE DELLE MOLECOLE DI ADESIONE E DEL TNF- α	44
1.5 CORRELAZIONE TRA L'ESPRESSIONE DI SIRT1 E LA CONCENTRAZIONE DI E-SELECTINE	47
2. ESPERIMENTI SU CELLULE HUVEC	48
2.1 EFFETTO DEL TNF- α SUL RILASCIO DELLE E-SELECTINE	49
2.2 EFFETTO DEL TNF- α SULL'ESPRESSIONE PROTEICA DI SIRT1 E DI NF-kB	50
2.3 ACETILAZIONE DI NF-kB MEDIATA DA TNF- α ED EFFETTO DEL RESVERATROLO	52
DISCUSSIONE	57
CONCLUSIONE	61
BIBLIOGRAFIA	63

RIASSUNTO

Background. La disfunzione endoteliale e l'infiammazione svolgono un ruolo fisiopatologico fondamentale nello sviluppo della sindrome metabolica (MetS) e delle sue complicanze cardiovascolari. Recenti studi hanno dimostrato che l'espressione della proteina sirtuina 1 (SIRT1), enzima ad attività deacetilasica NAD⁺-dipendente, è ridotta nei linfomonociti (PBMC) di soggetti affetti da MetS, ma le cause di questa alterazione non sono ancora definite. Le sirtuine sono una famiglia di 7 enzimi (SIRT1-7) che vengono attivati dalla restrizione calorica e danno resistenza allo stress, riducono l'apoptosi e regolano il ciclo cellulare. Scopo dello studio è stato, pertanto, studiare, a) in vivo, la relazione tra l'espressione genica di SIRT1 e i markers di disfunzione endoteliale (ICAM, VCAM, E-selectine) e di infiammazione (TNF- α) in soggetti con SM e, b) in vitro, nelle cellule endoteliali (HUVECs) il ruolo di SIRT1 nella regolazione del rilascio di E-selectine stimolato da TNF- α .

Metodi. *In vivo*, sono stati studiati 85 soggetti volontari sani (età 47 ± 0.9 , M 64 e F 21), di cui 21 soddisfacevano i criteri di SM secondo l'ATPIII. Il plasma e linfomonociti sono stati ottenuti da ciascun soggetto per la determinazione della espressione genica di SIRT1 (PCR real time) e delle molecole di adesione e di infiammazione. La concentrazione plasmatica e nel terreno di coltura di ICAM-1, VCAM-1, E-selectine e TNF- α sono state analizzate su piattaforma Luminex (BioPlex System). *In vitro*, le cellule endoteliali (HUVECs) sono state incubate con TNF- α (0.1 $\mu\text{g/ml}$) per determinare il rilascio di E-selectine, l'espressione di SIRT1 e del fattore nucleare-kB (NF-kB), e l'attivazione (acetilazione) di NF-kB. Il silenziamento del gene SIRT1 è stato determinato mediante trasfezione delle cellule con siRNA per SIRT1. L'immunoprecipitazione della cromatina è stata eseguita per misurare il legame tra il fattore trascrizionale NF-kB e il promotore per il gene di E-selectine dopo la stimolazione con TNF- α .

Risultati. L'espressione genica e proteica di SIRT1 sono risultate essere significativamente ridotte nei PBMC dei soggetti affetti da MetS rispetto a quelli non MetS. La concentrazione plasmatica di E-selectine e di TNF- α sono risultate essere significativamente aumentate nei soggetti con SM rispetto a quelli non MetS, mentre ICAM-1 e VCAM-1 non sono risultate differenti nei due gruppi di soggetti. I valori plasmatici di E-selectine si sono correlati positivamente con pressione arteriosa, circonferenza vita, trigliceridi, glicemia e con insulinemia. L'espressione genica di SIRT1 si è correlata negativamente con la concentrazione

plasmatica di E-selectine. *In vitro*, l'incubazione con TNF- α ha aumentato il rilascio di E-selectine e l'espressione e l'attivazione della subunità p65 di NF-kB. Questi effetti sono stati inibiti dalla presenza di resveratrolo, attivatore di SIRT1, ma non dal sirtinolo, inibitore di SIRT1, o dal silenziamento di SIRT1. L'immunoprecipitazione della cromatina ha dimostrato che la subunità p65 di NF-kB si lega al promotore del gene E-selectine e questa interazione viene ridotta dalla presenza di resveratrolo.

Conclusioni Le alterazioni metaboliche presenti nei soggetti con SM si associano ad un incremento della concentrazione plasmatica di E-selectine e ad una riduzione della espressione genica di SIRT1. Nelle cellule endoteliali l'attivazione di SIRT1 mediata da resveratrolo diminuisce il rilascio di E-selectine mediante la riduzione dell'attivazione di NF-kB e dell'interazione con il promotore del gene E-selectine. Pertanto, questi risultati suggeriscono un legame tra disfunzione endoteliale e la regolazione di SIRT1 nella sindrome metabolica.

ABSTRACT

Background. Endothelial dysfunction and inflammation play a pathophysiological role in the development of metabolic syndrome (MetS) and its cardiovascular complications. Recent studies have shown that activation of sirtuin 1 (SIRT1), is reduced in mononuclear cells (PBMC) of patients with MetS, but the causes of this alteration is still undefined. Sirtuins are a family of seven enzymes (SIRT1-7) that are activated by caloric restriction and provide resistance to stress, reduced apoptosis and regulate the cell cycle. The purpose of this study was therefore a) to study the relationship between expression of SIRT1 and markers of endothelial dysfunction (ICAM, VCAM, E-selectin) and inflammation (TNF- α) in patients with MetS; b) to verify, in endothelial cells (HUVECs), the role of SIRT1 in the regulation of E-selectin release induced by TNF- α .

Patients and Methods. We studied 85 healthy volunteers (age 47 ± 0.9 , F 64 and F 21), of which 21 met the criteria for MetS according to ATP III. Gene expression of SIRT1 was determined in mononuclear cells (PBMC) by quantitative real-time PCR analysis and Western Blot. The plasma concentration of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin were analyzed on the Luminex platform (Bio-Plex system) using the Millipore kit 3-plex Human Panel-1 cardiovascular disease. *In vitro*, HUVECs were treated with TNF- α (0.1 $\mu\text{g/ml}$) to measure E-selectin release (Elisa kit), SIRT1 and nuclear factor-kB (NF-kB) expression and NF-kB activation (Immunoprecipitation and Western Blot). SIRT1 silencing was determined by siRNA for SIRT1. Chromatin immunoprecipitation was performed to determine the binding of NF-kB to the E-selectin promoter after TNF- α stimulation.

Results. Gene and protein expression of SIRT1 were significantly reduced in PBMCs of patients with MetS than non-MetS. The plasma concentration of E-selectin and TNF- α were significantly increased in subjects with MS than non-MS, while ICAM-1 and VCAM-1 were not different in the two groups of subjects. The plasma levels of E-selectin were positively correlated with blood pressure, waist circumference, triglycerides, blood glucose and insulin. SIRT1 gene expression was negatively correlated with plasma E-selectin. In HUVECs, TNF- α induced a maximal release of E-selectin after 24h, increased the level and the activation (acetylation) of p65 subunit of NF-kB. These effects were abolished by the presence of resveratrol, an activator of SIRT1, but not by sirtinol, an inhibitor of SIRT1, or in SIRT1-siRNA silencing cells. Finally, chromatin immunoprecipitation analysis

demonstrated the binding of p65 subunit of NF- κ B to the E-selectin promoter induced by TNF- α which was inhibited by resveratrol.

Conclusion The metabolic abnormalities seen in patients with MetS are associated with increased plasma concentrations of E-selectin and a reduction of expression of SIRT1. In HUVECs, the activation of SIRT1 by resveratrol decreases the release of E-selectin by attenuating the activation of NF- κ B and the interaction with E-selectin promoter. Therefore, these results suggest a link between endothelial dysfunction and the regulation of SIRT1 which plays an important role in MetS.

INTRODUZIONE

1. SINDROME METABOLICA

La sindrome metabolica (MetS) è una condizione fisiopatologica in costante crescita che colpisce la popolazione Europea ed ha una forte prevalenza negli Stati Uniti d'America. Si stima che il 25% dei soggetti d'età superiore ai 20 anni e il 45% di quelli superiori ai 50 anni ne sia affetto¹. È una patologia caratterizzata dalla contemporanea presenza nello stesso individuo di alterazioni che riguardano il metabolismo glucidico, lipidico ed energetico e i meccanismi di controllo della pressione arteriosa. Insieme queste alterazioni si associano ad elevato rischio cardiovascolare e di sviluppo della malattia diabetica. Altre caratteristiche, non indispensabili per la diagnosi, che si associano a questa sindrome sono l'iperuricemia, disordini della coagulazione e aumento dei livelli di PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*).

Si ritiene che lo sviluppo della sindrome metabolica sia dovuto all'interazione di fattori genetici e ambientali, quali l'inattività fisica e una dieta ad alto contenuto di carboidrati e di grassi².

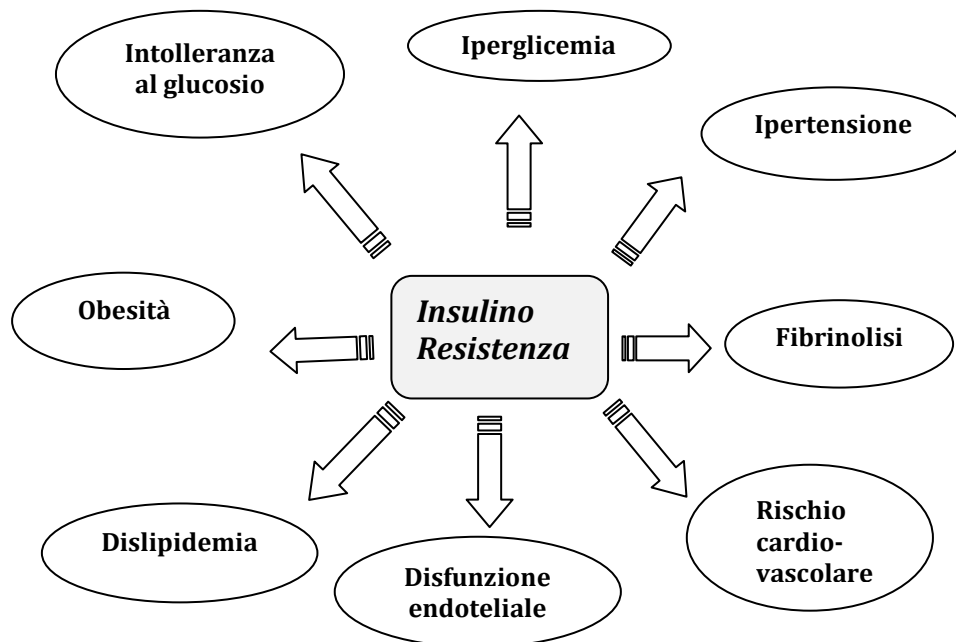


Figura 1. Cause e condizioni della Sindrome Metabolica associate all'insulino-resistenza

Introduzione

Una prima diagnosi della MetS fu proposta nel 1999 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (Tabella 1) che definì "sindrome metabolica" l'associazione di una condizione di insulino-resistenza o di diabete tipo 2 o di alterata glicemia a digiuno o di ridotta tolleranza al glucosio con almeno 2 delle seguenti alterazioni: indice di massa corporea compatibile con obesità, ipertensione arteriosa, ipertrigliceridemia, ridotto colesterolo HDL, microalbuminuria³. (Figura 1). Nel 2002 le linee guida della MetS sono state riviste e semplificate in accordo con gli esperti del National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III), al fine di renderne possibile una definizione clinica e di facilitarne la diagnosi e la prevenzione. La diagnosi può essere posta quando sussistono 3 criteri tra i 5 seguenti: un'alterata glicemia a digiuno (> 100 mg/dL), ipertrigliceridemia (> 150 mg/dL), riduzione del colesterolo HDL (negli uomini < 40 mg/dL, nelle donne < 50 mg/dl), ipertensione arteriosa (> 85/130 mmHg) e obesità addominale, considerata come circonferenza vita (negli uomini > 102 cm, nelle donne > 88 cm)⁴.

La presenza di MetS sembra conferire un significativo aumento del rischio cardiovascolare, al di là della presenza dei singoli fattori, così che una diagnosi "precoce" può essere un utile strumento per identificare quei pazienti ad elevato rischio che, altrimenti, rimarrebbero sconosciuti.

<i>Criteri MetS dell'OMS</i>	<i>Criteri MetS del NCEP-ATP III</i>
Insulino-resistenza o diabete mellito tipo 2 o ridotta tolleranza al glucosio o alterata glicemia a digiuno + almeno due dei seguenti criteri	<i>Per la diagnosi è necessaria la positività di almeno 3 dei seguenti 5 criteri</i>
BMI ≥ 30 kg/m ² o Rapporto addome/fianchi > 0,9 in M > 0,85 in F	<i>Circonferenza vita</i> >102 cm in M > 88 cm in F
* Trigliceridi ≥ 150 mg/dl o * Colesterolo HDL < 35 mg/dl in M < 39 mg/dl in F	* <i>Trigliceridi</i> ≥ 150 mg/dl
* Ipertensione arteriosa $\geq 140/90$ mmHg	* <i>Colesterolo HDL</i> < 40 mg/dl in M < 50 mg/dl in F
Rapporto microalbumina/creatinina > 2,5 mg/mmol in M > 3,5 mg/mmol in F	* <i>Ipertensione arteriosa</i> PAs ≥ 130 mmHg o PAd ≥ 85 mmHg
	* <i>Glicemia</i> ≥ 100 mg/dl
<i>M: uomini, F: donne; PAs: pressione arteriosa sistolica, PAd: pressione arteriosa diastolica; * vengono considerati positivi i criteri in presenza dell'uso di farmaci per la cura del difetto metabolico considerato.</i>	

Tabella 1. Criteri di definizione della sindrome metabolica secondo OMS e il NCEP-ATPIII.

L'attuale approccio clinico alla MetS utilizza la misurazione della circonferenza-vita, differenziata per sesso, per determinare la massa grassa che contribuisce allo sviluppo della MetS. Tale misurazione sembra predire le complicanze metaboliche e cardiovascolari in maniera migliore rispetto al calcolo dell'indice di massa corporea (BMI), poiché è un indice sia del tessuto adiposo sottocutaneo che del tessuto adiposo viscerale.

Anomalie del metabolismo delle proteine e dei lipidi sono tra i maggiori fattori di rischio cardiovascolari, anche nella sindrome metabolica. In particolare la dislipidemia che si associa alla MetS è caratterizzata da un aumento della sintesi epatica di VLDL, da modificazione delle LDL, che diventano più piccole e dense, e dalla riduzione della concentrazione di colesterolo HDL. Le lipoproteine a bassa densità (LDL), sono molto sensibili all'ossidazione e sono coinvolte nelle prime fasi del processo aterosclerotico⁵.

Uno dei fattori che più fortemente danneggia la parete vasale è rappresentato dall'ipertensione arteriosa che, come dimostrato dagli studi Framingham, l'MRFIT⁶ e molti altri, si associa ad un significativo incremento di eventi cardiovascolari, quali infarto miocardico ed ictus. Recentemente è stato dimostrato che anche un lieve aumento della pressione sanguigna può predisporre a tali eventi clinici⁷⁻⁸.

L'interesse clinico delle alterazioni metaboliche è dovuto alla crescente diffusione di queste patologie all'interno della popolazione mondiale ed al loro stretto legame con la malattia cardiovascolare, che rappresenta tuttora la prima causa di morte nei Paesi industrializzati e in molti Paesi in via di sviluppo.

È obiettivo della Ricerca attuale cercare di comprendere in maniera sempre più approfondita i meccanismi che stanno alla base delle alterazioni fisiopatologiche comuni a malattie dismetaboliche e cardiovascolari, identificando i possibili *target* terapeutici.

1.1 SINDROME METABOLICA E INFIAMMAZIONE

La combinazione dei fattori di rischio per la diagnosi della sindrome metabolica fa ipotizzare la concomitante presenza di uno stato infiammatorio generalizzato, che peraltro è stato evidenziato in alcuni studi.

Nei soggetti affetti da MetS sono state riscontrate elevate concentrazioni di PCR (Proteina C Reattiva)⁹, che potrebbe essere in futuro proposta come uno dei criteri di definizione della patologia secondo la NCET-ATP III.

Lo studio di Salmenienni e coll¹⁰. mediante un'analisi fattoriale ha dimostrato in 119 soggetti con familiarità per MetS un significativo aumento d'espressione di PCR, IL-1 β , IL-6, IL-8, elevati livelli di insulinemia e di massa adiposa. Analoghi risultati sono stati riportati da altri studi ¹¹.

Ulteriore supporto alla patogenesi flogistica della MetS è la dimostrazione del ruolo antinfiammatorio delle HDL, la cui riduzione è tra i criteri di definizione della sindrome. Le HDL hanno la capacità di bloccare il contatto tra linfociti T attivati e monociti, inibendo in tal modo la produzione di TNF- α (*tumor necrosis factor α*) e IL-1 β e riducendo l'espressione di VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) e di ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*)¹².

Ad oggi non è stato ancora definito con chiarezza quale dei processi tra sindrome metabolica e flogosi abbia un ruolo di causa e quale di effetto, però è chiaro che le alterazioni metaboliche non sono l'unica chiave fisiopatologica nel quadro diagnostico della patologia.

1.2 SINDROME METABOLICA E DISFUNZIONE

ENDOTELIALE

La sindrome metabolica, come spiegato precedentemente, è causata da un *cluster* di eventi fisiopatologici, che come conseguenza conducono al diabete e a malattie cardiovascolari. Tali eventi agiscono negativamente sull'endotelio vascolare e la presenza di questi fattori porta alla cosiddetta disfunzione endoteliale, situazione in cui le cellule endoteliali non sono più in grado di rispondere fisiologicamente alle variazioni dell'omeostasi vascolare.

Introduzione

La disfunzione endoteliale è, quindi, un'alterazione frequentemente descritta nei soggetti con MetS.

Studi recenti hanno dimostrato che l'iperglicemia, l'insulino-resistenza e un eccesso di acidi grassi inducono disfunzione endoteliale e che la genesi di questo danno funzionale potrebbe essere determinato dallo stress ossidativo. Il danno endoteliale che può insorgere come conseguenza della presenza dei fattori che definiscono la MetS, non è limitato alla sola capacità di ridurre la produzione di NO, ma è più globale e prevede anche alterazioni intracellulari dei monociti circolanti e, in generale, della loro adesività alla parete vascolare¹². I principali mediatori di adesività dei neutrofili e linfociti all'endotelio vascolare sono le molecole di adesione (I-CAM, V-CAM ed E-selectine), che interagiscono tra loro e con altre cellule infiammatorie per modulare la risposta immunitaria¹³.

Pertanto per attuare una valutazione più completa della sindrome metabolica è importante stabilire anche la funzionalità dell'endotelio, organo ubiquitario e piuttosto complesso¹⁴. Ciò è possibile, per esempio, ricorrendo alla determinazione dei livelli di alcuni marcatori plasmatici, (Tabella 2), approccio utile dal punto di vista diagnostico per stabilire il grado di danno *in vivo* nell'uomo.

Marcatore	Recettore	Funzione
Von Willenbrand	Integrina $\beta 3$	Adesione piastrinica al vaso, trasporto fattore VIII
Fibronectina	Integrina $\beta 1$ e $\beta 3$	Riparazione e sintesi tissutale
Trombomodulina	Trombina	Attivazione proteina C
TPA	Plasminogeno	Conversione plasminogeno in plasmina
E-selectine	PSGL-1 /ESL-1	Media il <i>rolling</i> leucocitario
I-CAM	Integrina $\beta 1$ e $\beta 2$	Media l'adesione leucocitaria al vaso
V-CAM	Integrina $\beta 1$ e $\beta 2$	Media l'adesione leucocitaria al vaso

Tabella 2. Marcatori solubili di funzione endoteliale

2. MOLECOLE DI ADESIONE

L'adesione fra cellule si verifica quando un recettore sulla membrana plasmatica forma un legame con una molecola situata nella matrice extracellulare o sulla cellula confinante. Questo è un processo reversibile che può oscillare tra cicli di adesione e di distacco, consentendo alle cellule di muoversi le une rispetto alle altre o nella matrice extracellulare. Quindi l'adesione costituisce un meccanismo importante nei normali processi biologici e nei disordini patologici che coinvolgono le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, quali l'organogenesi, l'immunità, l'infiammazione e le neoplasie.

I recettori di adesione sono proteine integrali di membrana di tipo I che permettono:

1. ai linfociti di migrare nei tessuti e negli organi linfatici secondari (ricircolazione);
2. ai leucociti di migrare verso la zona di infezione e/o di infiammazione (diapedesi);
3. ai linfociti Te B di interagire tra di loro e con le altre cellule coinvolte nella risposta immunitaria.

I leucociti circolanti normalmente non aderiscono all'endotelio normalmente. Tuttavia, quando le cellule endoteliali, esposte a fattori di rischio cardiovascolari, vanno incontro ad attivazione, esprimono molecole di adesione che selettivamente legano i leucociti. Le principali molecole di adesione sono la P-Selectina e la E-selectina, membri della superfamiglia delle Immunoglobuline, la Molecola di Adesione Intercellulare-1 (ICAM-1) e la Molecola di Adesione Vascolare-1 (VCAM-1)¹⁵.

Le molecole di adesione sono classificabili in base alle loro omologie strutturali e funzionali o in base alle cellule di produzione, che possono essere linfociti, monociti, basofili, cellule dendritiche, cellule endoteliali e altre cellule.

Verranno di seguito approfondite solo le molecole secrete dalle cellule endoteliali poiché sono state oggetto di studio per la nostra ricerca.

2.1 I- CAM 1 (CD 54)

Le I-CAM sono glicoproteine trans-membrana appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline, insieme alle V-CAM-1, la MadCAM e la PECAM e sono espresse su leucociti ed endotelio.

Ogni molecola ha 5 distinti domini Ig-simili, uno trans-membrana ed uno terminale citoplasmatico. La proteina intera è codificata da 7 esoni e 6 introni situati sul cromosoma 19. Ogni dominio è codificato da un differente esone. La proteina matura e funzionale è lunga 505 aminoacidi e pesa tra gli 80 e 114 KDa, dipendendo dal livello di glicosilazione, che cambia a seconda del tipo cellulare e dell'ambiente.

Molecola di adesione	CD	Espressione cellulare	Ruolo	Regolazione	Ligando
I-CAM 1	CD 54	Cellule B, T cell.endoteliali e dendritiche, monociti, timociti	Adesione all'endotelio durante l'attivazione e infiammazione	Indotto da IFN γ , TNF- α e IL1	LFA-1 Mac-1
I-CAM 2	CD 102	Cellule endoteliali, linfociti e monociti	Traffico e recircolazione normale	Costitutivo	LFA-1
I-CAM 3	CD 50	Cellule T naive	Adesione alle cellule dendritiche e macrofagi	Costitutivo	LFA-1 Mac-1

Tabella 3. Molecole di adesione intercellulare (I-CAM)

Le I-CAM non sono ubiquitarie, ma si trovano solo in fibroblasti, in cellule epiteliali timiche e del tessuto vascolare, in cellule ematopoietiche immunocompetenti e in cellule dendritiche. Queste molecole, che giocano un ruolo centrale nella risposta immunitaria cellulo-mediata, agiscono grazie al legame con il fattore CD54¹⁶.

Questa interazione, specifica e reversibile, permette la trasduzione del segnale. Poiché ICAM-1 regola processi di attivazione delle T cellule e di reclutamento

dei leucociti, è comprensibile che le alterazioni nella struttura o espressione dell'ICAM-1 siano associate a disordini immunologici¹⁶.

L'espressione del gene ICAM-1 è regolata da segnali a cascata attraverso 4 vie:

1. NFκB /STAT (*signal transducers and activation of transcription*)
2. IFNγ e AP-1
3. MAP kinase
4. PKC.

2.2 V-CAM (CD 106)

La V-CAM 1, *vascular cell adhesion protein 1*, nota anche come CD 106 (*cluster of differentiation 106*) è una sialoglicoproteina che nell'uomo è codificata dal gene omonimo. Ogni molecola ha 6 o 7 distinti domini Ig-simili ed è espressa sia sui piccoli che sui grandi vasi sanguigni dalle cellule endoteliali dopo stimolazione con citochine pro-infiammatorie. Per *splicing* alternativo si ottengono due possibili trascritti di RNA che danno origine a due differenti isoforme umane di V-CAM.

V-CAM1 ha la funzione di reclutare i leucociti nel sito infiammatorio e grazie al legame con l'integrina α4β1, e in parte con l'α4β7, media l'adesione e il "rolling" di linfociti, monociti, basofili ed eosinofili sull'endotelio attivato. Così facendo viene attivata la cascata di trasduzione del segnale che svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo di fenomeni di aterosclerosi e di patologie autoimmuni, quale l'artrite reumatoide.¹⁷ Sebbene strutturalmente sia molto simile ad I-CAM e alle altre molecole di adesione, il *pattern* di regolazione di V-CAM 1 è unico, poiché questa proteina è solo in parte costitutivamente espressa in uno stato fisiologico normale.

La sua espressione è indotta da molte citochine pro-infiammatorie come IL1-β, TNF-α, IFNγ, dalla proteina C reattiva di fase acuta (PCR), dalle interazioni tra CD40 ed il suo ligando (CD40L) e dall'*uptake* delle LDL ossidate da parte del suo recettore¹⁸.

Inoltre, V-CAM1 è coinvolta nel processo metastatico poiché favorisce l'adesione delle cellule mielomatose all'endotelio ed è, per questo, oggetto di studio per alcuni gruppi di ricerca come nuovo possibile *target* di farmaci antitumorali¹⁹.

2.3 E-SELECTINE (ELAM-1)

Le selectine sono glicoproteine trans-membrana costituite da una singola catena polipeptidica (monometriche).

Esse appartengono alla famiglia delle lectine di tipo C (Calcio-dipendenti) e possono essere divisibili in 3 tipi. E-selectine, L-selectine e P-selectine in base alla loro ubicazione. Tutte e 3 le tipologie possiedono, però, caratteristiche strutturali comuni, sia come sequenze aminoacidiche sia per l'organizzazione dei domini.

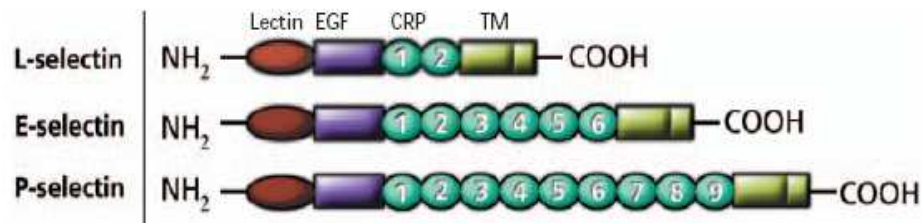


Figura 2. Struttura delle selectine, che si differenziano per il numero di domini CRP

La sequenza proteica di queste molecole è stata ottenuta solo nel 1989 e così anche i domini che le costituiscono (Figura 2):

1. una parte N- terminale è costituita da una lectina Ca dipendente;
2. un dominio simile all' "*epidermal growth factor*" (EGF);
3. domini ripetuti di "*complement regulary proteins*" (CRP);
4. diversi domini trans-membrana ed una corta coda citoplasmatica.

Le selectine sono molecole coinvolte nell'interazione adesiva leucociti-endotelio, che è richiesta per l'extravasazione nei tessuti bersaglio (diapedesi) ed è quindi responsabile nei processi flogistici²⁰.

Molecola di adesione	CD	Espressione cellulare	Ruolo	Regolazione	Ligando
E-selectine	CD62E	Cellule endoteliali	Adesione dei leucociti nella infiammazione	Indotto da IL-1 e TNF- α	ESL-1, PSGL-1
L-selectine	CD62L	Linfociti, neutrofilo, monociti, timociti, eosinofili, cellule NK	Adesione cellulare nell' <i>homing</i>		GlyCAM1, CD34
P-selectine	CD62P	Cellule endoteliali, piastrine	Adesione dei PMN e monociti durante l'infiammazione	Indotto da TNF- α	CD34

Tabella 4. Famiglia delle selectine

L'E-selectine è coinvolta nella prima tappa dell'interazione "endotelio-leucocita" e attiva la cascata di eventi che porta alla fuoriuscita dei leucociti dai vasi. Infatti ad essa è legato il fenomeno del *rolling*, (letteralmente rotolamento) che richiede un'interazione tra un recettore endoteliale ed un contro-recettore sul leucocita in movimento²¹. Quest'interazione deve avere una stabilità intermedia, tale da rompersi rapidamente e ricostituirsi altrettanto rapidamente per riprendere il ciclo. La struttura della selectina garantisce questa velocità di interazione poiché è costituita da segmenti che si ripetono conferendo alla molecola un alto grado di flessibilità. Nello specifico, possiede un residuo lectinico Ca-dipendente che riconosce il ligando glucidico PSGL-1 (*P- Selectin glycoprotein ligand 1*) situato sui leucociti. I ligandi zuccherini possiedono catene molto flessibili permettendo così ai leucociti un rapido adattamento nella nuova posizione sulla cellula endoteliale.

L'espressione sequenziale di P- ed E-selectine consente l'inizio della cascata d'adesione. Mentre P-Selectina viene rapidamente espressa in superficie, l'E-selectine è una molecola inducibile sulla cellula endoteliale e media principalmente l'adesione di neutrofilo e linfociti T²².

La tappa successiva, coinvolge altre molecole di adesione a più alta specificità. La risposta infiammatoria, infatti, può sovraregolare l'espressione delle ICAM-1; in tal modo s'incrementa la natura adesiva dei leucociti e delle cellule endoteliali. Mentre le selectine inducono un comportamento oscillante della natura adesiva dello strato epiteliale, le ICAM-1 interagiscono con LFA-1 o Mac-1 dei leucociti stabilizzandoli per il passaggio attraverso il vaso. I leucociti, così bloccati, cominciano la diapedesi, processo per cui si ha l'attraversamento dello strato epiteliale, che è mediato dalle PECAM (CD31), proteine espresse sia dai leucociti che dalle giunzioni intercellulari delle cellule endoteliali²³.

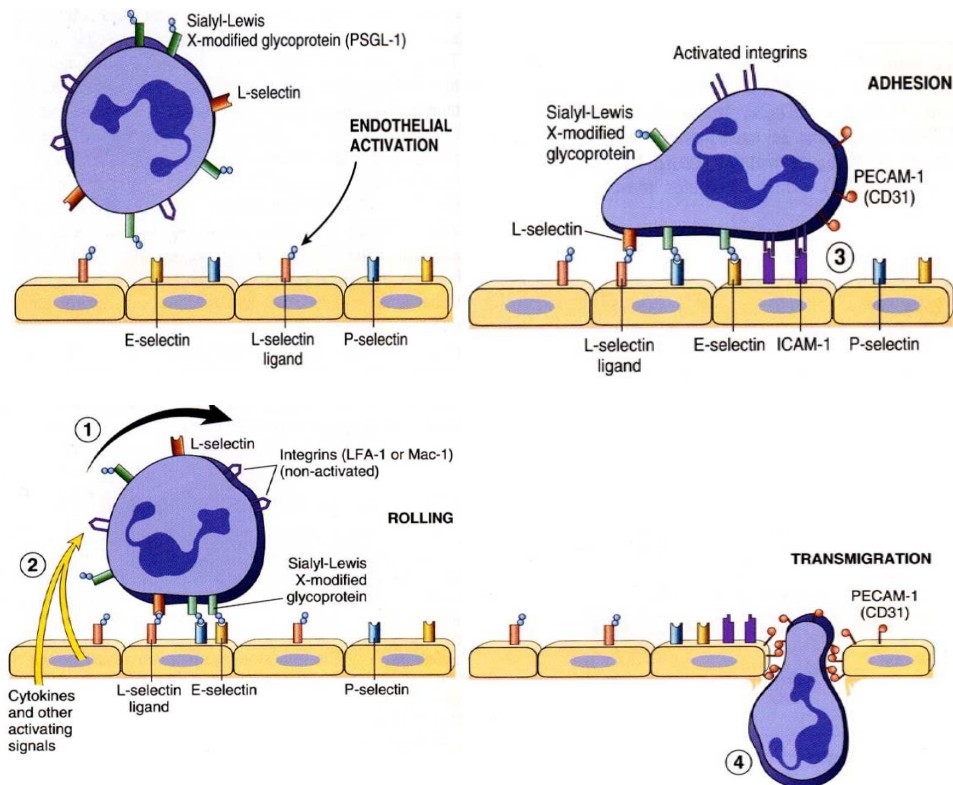


Figura 3. Meccanismo di interazione tra endotelio e leucocita

L'espressione di E-selectine è regolata da citochine pro-infiammatorie, TNF- α e IL-1, e la sua concentrazione plasmatica è considerata *marker* di stato infiammatorio.²⁴⁻²⁵ Una tra le principali proteine pro-infiammatorie, che sembra essere strettamente correlata all'espressione delle molecole d'adesione e che è oggetto dei nostri studi, è il fattore NF-kB che regola la trascrizione di diversi geni coinvolti nella risposta immunitaria e flogistica, oltre che nella proliferazione e nel differenziamento cellulare.

3.FATTORE TRASCRIZIONALE NF-kB

NF-kB è un fattore di trascrizione sequenza-specifico ben conosciuto per il suo coinvolgimento nell'infiammazione e nella risposta immunitaria innata. È sempre più accertato un suo coinvolgimento nello sviluppo tumorale poiché stimola la proliferazione e il differenziamento cellulare. Il nome '*nuclear factor-kB*' è stato attribuito per la prima volta nel 1986 quando si scoprì che questa proteina era un fattore nucleare necessario per la trascrizione della catena leggera k delle immunoglobuline nei linfociti B²⁶.

NF-kB è un fattore dimerico espresso in modo ubiquitario, anche se il suo ruolo è più studiato nelle cellule del sistema immunitario. Nelle cellule B e nelle plasmacellule, NF-kB è localizzato nel nucleo, dove lega una regione di dieci paia di basi dell'*enhancer* intronico 'kappa' e ne promuove così la trascrizione. Nelle altre cellule è mantenuto citoplasmatico dal suo inibitore, IκB (*Inhibitor of NF-kB*).

3.1 PROPRIETÀ BIOCHIMICHE DI NF-kB

Le proteine che costituiscono NF-kB appartengono alla famiglia 'Rel', della quale fanno parte proteine di *Drosophila melanogaster* e di mammifero (p65, RelB, c-Rel, p50, p52). I vari membri di questa famiglia possono associarsi formando complessi eterodimerici od omodimerici, eccetto RelB che forma solo eterodimeri. Il dimerico più frequentemente presente è costituito dalla proteina p65, denominata anche RelA, e dalla proteina p50, chiamata anche NF-kB1. Ci sono però anche altri dimeri trascrizionalmente attivi come p50/c-Rel, p65/p65 e p65/c-Rel. Omodimeri di p50 o di p52 agiscono invece come repressori. Tuttavia nella maggior parte delle cellule l'attività di NF-kB è largamente inducibile e il dimerico più diffuso è p50/p65²⁷.

Ciascun membro della famiglia Rel contiene all'N-terminale una regione costituita da 300 aminoacidi, detta RHD (*Rel Homology Domain*). Il dominio RHD contiene sequenze coinvolte nel legame al DNA e nella dimerizzazione.

Nell'estremità C-terminale del RHD è presente anche una sequenza di localizzazione nucleare (*Nuclear Localization Signal*, NLS).

Le proteine appartenenti alla famiglia Rel si possono suddividere in due classi in base alla loro sequenza C-terminale. I membri della prima classe sono

p105/p50, p100/p52, dove p105 e p100 sono i precursori e quindi esclusivamente citosolici. Queste due proteine sono poi digerite nel dominio N-terminale, a livello di regioni specifiche di 23 aminoacidi ricche in glicina, così da generare p50 e p52. Queste però non hanno domini di trans-attivazione e quindi sono trascrizionalmente inattive²⁸⁻²⁹.

La seconda classe include p65, RelB, c-Rel che contengono uno o più domini di trans-attivazione nella loro regione C-terminale. In particolare, il dominio di trans-attivazione di p65 ne contiene due regioni, una di 30 aminoacidi e la seconda di 90.

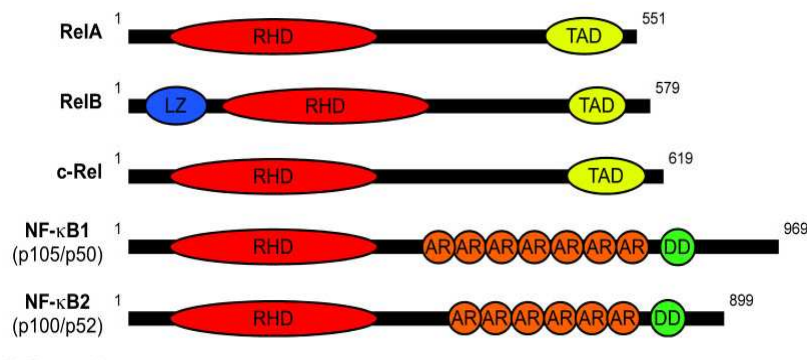


Figura 4. Domini strutturali dei cinque componenti della famiglia di NF-κB

Il meccanismo d'attivazione di NF-κB è piuttosto complesso e basato su una cascata di modificazioni post-traduzionali.

In assenza di uno stimolo infiammatorio, NF-κB è localizzato nel citoplasma complessato con una proteina inibitoria chiamata IκB (*Inhibitor of NF-κB*), la quale maschera la sua sequenza di localizzazione nucleare (NLS). Quando uno stimolo extracellulare attiva la via di NF-κB si attivano le IKK, chinasi specifiche per IκB, che fosforilano IκBα, promuovendo la reazione di poliubiquitinazione sulle lisine e quindi la rapida degradazione di IκB. In sua assenza è dunque smascherata la sequenza di localizzazione nucleare e NF-κB può migrare nel nucleo dove attiva la trascrizione dei geni bersaglio²⁸⁻³⁰. Gli stimoli in grado di attivare NF-κB possono essere raggi UV, intermedi reattivi dell'ossigeno, proteine virali, LPS, ma anche diverse citochine come TNF-α e IL-1³¹.

3.2 RUOLO FISIOLÓGICO DI NF- κ B

I geni bersaglio di NF- κ B contengono nel loro promotore la sequenza consenso di legame al DNA di NF- κ B ossia GGGRNNYYCC (R=purina, Y=pirimidina, N=una base qualsiasi) e sono principalmente geni antiapoptotici e pro-infiammatori.

Possiamo distinguere tra geni precoci, la cui espressione è immediatamente successiva all'ingresso di NF- κ B nel nucleo, come I κ B α , e geni tardivi, che vengono espressi in seguito alla seconda fase dell'attivazione. Tra questi ultimi, la cui sintesi inizia dopo 90 e 120 minuti dall'attivazione, vi sono numerose citochine come IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, INF γ , TNF- α . Fanno parte dei geni bersaglio anche la COX-2 e iNOS, molto importanti per le risposte infiammatorie, e proteine di adesione come VCAM-1 ed ICAM-1³⁰. Citochine come IL-1 e TNF- α , oltre a essere sintetizzate in risposta a NF- κ B, sono anche in grado di attivare NF- κ B, con un meccanismo di *feedback* positivo. Inoltre il ruolo pro-infiammatorio di NF- κ B è dato anche dalla sua attività di controllo dell'attivazione dei linfociti T e B e di coordinazione delle risposte dell'immunità innata ed acquisita.

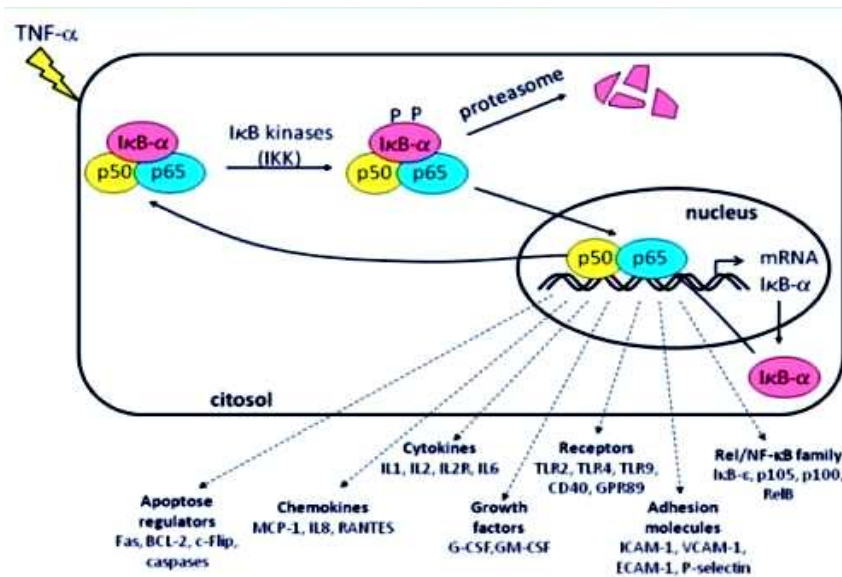


Figura 5. Cascata di attivazione di NF- κ B

Anche nella ricerca oncologica, NF- κ B è una delle proteine più studiate dell'ultimo decennio. L'attivazione di questo fattore è stata messa in relazione con vari aspetti dell'oncogenesi³², tra cui il controllo dell'apoptosi, del ciclo cellulare, del differenziamento e della migrazione cellulare. Inoltre, si è riscontrato un rapporto di causa-effetto tra l'attivazione di NF- κ B e la promozione tumorale associata

all'infiammazione cronica e alla metastatizzazione, dimostrato in vari modelli animali³³.

Infatti è fondamentale il suo ruolo di incremento della proliferazione cellulare, agendo direttamente sul ciclo cellulare. È stato accertato, infatti, che si ha un aumento della proteina durante la transizione dalla fase G0 alla G1, quando la cellula accresce il proprio volume e sintetizza le strutture per sostenerlo.

3.3 NF- κ B, PROTEINA PRO-INFIAMMATORIA

L'attivazione di NF- κ B è coinvolta nella patogenesi di malattie infiammatorie croniche, come l'aterosclerosi, l'asma bronchiale, l'artrite reumatoide e malattie infiammatorie dell'intestino. Molti geni pro-infiammatori importanti per la patogenesi dell'aterosclerosi sono regolati da NF- κ B, che è presente in forma attivata nella placca aterosclerotica. Uno dei primi eventi nell'aterogenesi è l'attivazione dell'endotelio vascolare, che porta al reclutamento di monociti e linfociti T, seguito da una migrazione di cellule muscolari lisce dalla media all'intima con deposizione di matrice extracellulare. Alcuni gruppi hanno rilevato la traslocazione nucleare di NF- κ B nell'intima e nella media di lesioni aterosclerotiche³⁴.

In diversi studi è stato messo in evidenza come l'attivazione dei geni delle citochine da parte di NF- κ B contribuisca alla patogenesi dell'asma, che è caratterizzato da infiltrazione delle cellule infiammatorie e dalla deregolazione di citochine e chemochine nel polmone³⁴⁻²⁸.

Anche nell'artrite reumatoide è coinvolta l'attivazione della via di NF- κ B poiché nel fluido sinoviale di pazienti colpiti da questa malattia si trovano elevati livelli di TNF- α e di altre citochine. La produzione di TNF- α è indotta e a sua volta stimolata, con un meccanismo di *feedback* positivo, da NF- κ B.

3.4 ACETILAZIONE DI NF- κ B

L'acetilazione è una delle principali modalità con cui NF- κ B può essere regolato. Il TNF- α induce l'acetilazione di p65 impedendo così il legame tra p65 e I κ B. Responsabili di questa acetilazione *in vivo* sono enzimi ad attività acetilasica (HAT), primo tra tutti p300/CBP (CREB Binding Protein). L'acetilazione avviene

Introduzione

sia sugli istoni, sia direttamente sul fattore di trascrizione al livello delle lisine 218, 221 e 310 di p65.

Mentre l'acetilazione della Lys 221 aumenta l'affinità del legame con il DNA, quella della Lys 310 è invece necessaria per la completa attività trascrizionale di NF- κ B.³⁵ Al contrario, la sua deacetilazione promuove il legame con I κ B, favorendo il trasporto del complesso dal nucleo al citoplasma e quindi la sua inattivazione.

Il grado di acetilazione di p65 viene anche modulato dalle interazioni del fattore stesso con corepressori, gli enzimi HDACs (istone deacetilasi). Sono tre le famiglie di proteine HDACs che deacetilano i residui di lisina sulle proteine istoniche e sui fattori di trascrizione, trasferendo il gruppo acetile ad un altro substrato: la famiglia di classe I e classe II, e la famiglia di classe III, NAD⁺-dipendente, recentemente scoperta³⁶.

Alla famiglia delle HDACs di classe III appartiene la SIRT1, attivata dal resveratrolo, in grado di deacetilare p65 selettivamente sul residuo Lys 310. Recenti studi dimostrano che l'inibizione farmacologica delle HDACs impedisce la riduzione dell'acetilazione istonica, potenzia la capacità trans-attivante di numerosi fattori di trascrizione, tra cui proprio NF- κ B.

4. SIRTUINE

Le sirtuine (SIRT) costituiscono una famiglia di proteine ad attività deacetilasiica NAD⁺ dipendenti in grado di deacetilare proteine istoniche e diversi fattori trascrizionali.

Originariamente, vennero identificate come appartenenti al gruppo di proteine MAR1 (*Mating-Type Regulator 1*) capaci di agire sulla repressione e/o attivazione genica; in seguito, venne loro riconosciuto un importante ruolo biochimico e molecolare nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* da cui derivò il nome di SIR2 (*Silent Information Regulator 2*). Successivamente, Gottlieb ed Esposito dimostrarono che SIR2 era in grado di reprimere l'espressione di alcuni geni mediante la deacetilazione del gruppo ε-amino di residui di lisina N-terminale degli istoni individuarono nel *S. cerevisiae* la presenza di altri quattro geni omologhi a SIR2 che chiamarono HST 1-4 (*homologues of SIR2*). La scoperta degli omologhi di SIR2 nel lievito e poco dopo anche nei batteri, nelle piante e nei mammiferi, dimostrò che SIR2 è un membro di una grande ed antica famiglia di geni che oggi noi chiamiamo "sirtuine".

Questi enzimi hanno un ruolo chiave nella regolazione di molti aspetti del metabolismo cellulare, da quello energetico a quello di sintesi, modulano la trascrivibilità genica della cromatina e regolano l'attività di diversi fattori trascrizionali quali p53, NF-kB, PGC-1α, FOXO e HSF-1. Le SIRT sono infatti coinvolte nei processi metabolici che ritardano l'invecchiamento e aumentano la durata della vita, nella regolazione del ciclo cellulare, nell'inibizione dell'apoptosi, nell'omeostasi del glucosio e nella secrezione dell'insulina.

Le SIRT hanno guadagnato nel tempo una notevole attenzione in campo medico grazie al loro ruolo di sensori metabolici e di mediatori della sopravvivenza cellulare in condizioni di stress, quali ad esempio la restrizione calorica e l'esercizio fisico, nelle quali la loro trascrizione risulta attivata. La caratterizzazione dei meccanismi molecolari, biochimici e fisiologici coinvolti negli effetti delle SIRT è importante non solo per meglio definire il loro ruolo fisiologico e/o fisiopatologico ma anche per l'identificazione di nuovi potenziali *target* farmacologici nei disordini metabolici, nel diabete, nelle patologie cardiovascolari ed in quelle neurologiche³⁷.

4.1 PROPRIETÀ BIOCHIMICHE DELLE SIRTUINE

Negli Eucarioti, la famiglia delle sirtuine è formata da sette proteine chiamate SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7. Le SIRT sono costituite da un dominio centrale catalitico di 275 amminoacidi capace di legare NAD^+ , altamente conservato nelle cellule eucariotiche, e da una sequenza N-terminale e/o C-terminale di variabile lunghezza (Figura 6) che è responsabile delle diverse proprietà biologiche e funzionali di ciascuna di esse³⁸.

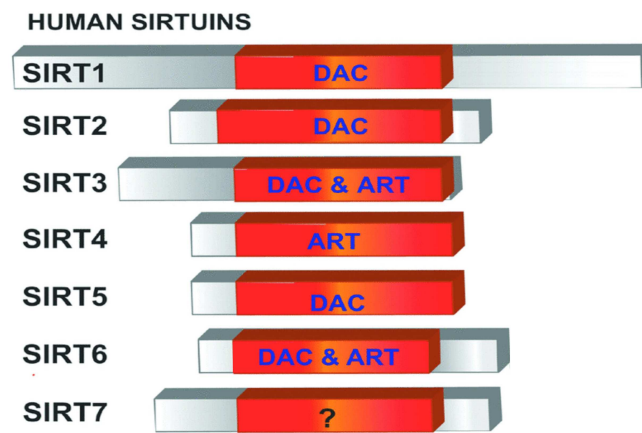


Figura 6. Domini delle 7 sirtuine umane. Tutte hanno un catalitico che agisce come ADP- ribosil transferasi (ART) e/o come deacetilasi (DAC). Possono aggiungersi sequenze N e/o C-terminali

Le sirtuine sono enzimi ad attività deacetilasica che agiscono rimuovendo residui di lisina da substrati proteici o da istoni in presenza del cofattore NAD^+ (*nicotinamide adenin dinucleotide*). I prodotti di questa reazione sono la nicotinamide (NAM), il substrato proteico o istonico deacetilato sui residui lisinici, e la molecola 2'-*O*-acetil-ADP-ribosio³⁹.

NAD^+ è un coenzima implicato in diverse funzioni biologiche, nelle reazioni di ossido-riduzione, nella riparazione del DNA, nelle reazioni di ADP-ribosilazione nella risposta immunitaria e nella regolazione trascrizionale. Un incremento dei livelli cellulari di NAD^+ comporta l'aumento dell'azione di SIRT1, attivando la regolazione della secrezione d'insulina stimolata dal glucosio nelle cellule β -pancreatiche.

Contrariamente alle altre sirtuine, SIRT4 è ad attività transferasica e nello specifico di ADP- ribosilazione di diverse proteine, mentre SIRT3 e SIRT6 possiedono entrambe le attività enzimatiche.

4.2 SIRT 1

Nei mammiferi sono stati identificati sette geni appartenenti alla famiglia delle sirtuine (SIRT1-7). In particolare, il gene omologo a Sir2 è SIRT1 (*Sir2 homolog 1*).

SIRT1 è localizzata prevalentemente nel nucleo ma, in risposta a particolari condizioni fisiologiche o a stimoli, può essere traslocata nel citoplasma attraverso il segnale di esportazione nucleare (NES). Il successivo trasporto dal citoplasma al nucleo avviene attraverso il segnale di localizzazione nucleare (NLS).

È espressa in tutti gli organi ma soprattutto in quelli dove il metabolismo energetico è più sviluppato. Topi Knock-out per SIRT1 muoiono nella fase prenatale, mentre quelli che sopravvivono diventano sterili, presentano infezioni polmonari o atrofia pancreatica⁴⁰.

SIRT1 codifica per una proteina in grado di deacetilare fattori nucleari e citoplasmatici che controllano processi cellulari critici, come l'apoptosi e il metabolismo. Inoltre regola la produzione di insulina e glucosio, il metabolismo lipidico e la sopravvivenza cellulare, mediando gli effetti della restrizione calorica nei mammiferi⁴¹.

Dunque, il potenziale ruolo *antiaging* del gene sembra essere valido poiché coinvolto in un complesso *pattern* proteico che comprende anche enzimi implicati nei meccanismi di riparazione cellulare. Dunque, la restrizione calorica promuove la sopravvivenza cellulare mediante induzione della deacetilasi SIRT1⁴².

4.3 SIRT1 E REGOLAZIONE DELLA CROMATINA

Negli eucarioti la regolazione dell'espressione genica avviene mediante meccanismi di compattamento e decompattamento della cromatina nucleare, la quale, nella sua forma compatta, eterocromatina, ha un effetto repressivo sulla trascrizione genica. Pertanto, l'attivazione dell'espressione genica richiede il decompattamento della cromatina, eucromatina, che è in parte mediato da riarrangiamenti

Introduzione

post-trascrizionali delle code N-terminali degli istoni mediante reazioni di acetilazione e ubiquitinazione delle lisine, di metilazione delle lisine e delle arginine, o di fosforilazione delle serine e probabilmente delle treonine.

Tutte queste modifiche (tranne le metilazioni) rendono più negativa la carica elettrica delle catene laterali interessate, quindi indeboliscono le interazioni tra istoni e DNA, favorendo la decondensazione dell'eterocromatina. Al contrario, i gruppi metilici aumentano la basicità e l'idrofobia delle catene a cui sono legati, quindi tendono a stabilizzare la struttura.

L'acetilazione è un processo reversibile, catalizzata dagli enzimi HAT (istone acetiltransferasi) che, trasferendo il gruppo acetile dall'acetil coenzima A ai residui di lisina presenti nelle code N-terminali degli istoni, determinano il decompattamento della cromatina e quindi la formazione di una struttura trascrizionalmente permissiva. La deacetilazione, invece, è catalizzata dagli enzimi HDAC (istone deacetilasi) che, aumentando l'interazione DNA-istoni e istone-istone, inducono un maggiore compattamento della cromatina e quindi generano una struttura trascrizionalmente inattiva. SIRT1 appartiene alla classe III HDAC perché richiede NAD^+ come cofattore per l'attività deacetilasica mentre le altre classi sono idrolasi zinco-dipendenti⁴³.

SIRT1 è quindi in grado di deacetilare i residui di Lisina dei domini N-terminali, reprimendo l'attività dei geni legati al ciclo cellulare e al differenziamento e favorendo così la riformazione dell'eterocromatina.

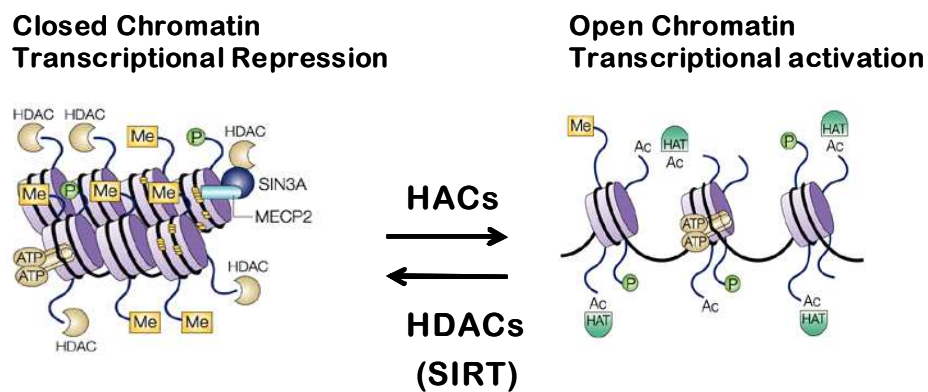


Figura 7. Meccanismo epigenetico della cromatina

4.4 SIRT1 E FATTORI DI TRASCRIZIONE

Le sirtuine hanno la capacità di deacetilare, oltre agli istoni, anche fattori di trascrizione con conseguente interferenza sull'espressione genica. Nella maggior parte dei casi, questi fattori controllano geni legati alla crescita, al ciclo cellulare, all'apoptosi e al metabolismo energetico.

Numerosi fattori di trascrizione vengono regolati negativamente da SIRT1. Questo comporta un'alterazione degli equilibri metabolici e di sopravvivenza cellulare, poiché la deacetilazione di residui lisinici fa diminuire l'espressione di fattori trascrizionali, quali p53, FOXO1, PPAR γ , HSF1, Ku70, PGC-1 α e NF-kB (come spiegato sopra).

SIRT1 e p53: inibizione dell'apoptosi

La proteina p53 è coinvolta nel controllo del ciclo cellulare e possiede nella regione C-terminale vari potenziali siti di acetilazione su residui di lisina dove SIRT1 può esplicare la sua attività catalitica⁴⁴. La p53 in forma acetilata attiva il programma trascrizionale con aumento della proliferazione cellulare e dell'apoptosi. Infatti, nelle cellule tumorali e cancerogene questo fattore di trascrizione è iperacetilato. *In vitro* e *in vivo*, in modelli animali, l'iperespressione di SIRT1 rallenta la proliferazione cellulare e inibisce l'apoptosi mediante la deacetilazione di p53, indicando SIRT1 come un potenziale bersaglio di farmaci antitumorali⁴⁵.

SIRT1 e FOXO1: resistenza allo stress e sopravvivenza cellulare

La famiglia FOXO (*Forkhead box type O*) è formata da 4 proteine (FOXO1-4) coinvolte in varie funzioni cellulari quali la risposta cellulare allo stress ossidativo, la regolazione del ciclo cellulare e la risposta all'insulina. In risposta ad uno stress cellulare, l'aumento di espressione di SIRT1 provoca la deacetilazione del fattore trascrizionale FOXO con conseguente incremento di espressione di geni coinvolti nella resistenza allo stress, nel rallentamento del ciclo cellulare e nella inibizione dell'apoptosi⁴⁶.

L'isoforma FOXO1 è coinvolta nel meccanismo di trasduzione intracellulare dell'insulina. L'insulina, tramite l'enzima Akt, regola l'espressione di diversi enzimi gluconeogenici e lipogenici mediante il controllo dell'attività di FOXO1 che si trova soprattutto nei tessuti responsivi all'insulina, quali il fegato, il tessuto adi-

Introduzione

poso e le β -cellule pancreatiche. L'attivazione di FOXO1 mediante acetilazione di residui lisinici induce la sua traslocazione dal nucleo al citoplasma inibendo l'attivazione degli enzimi gluconeogenici e favorendo l'attivazione dei geni coinvolti nella glicolisi quali la glucosio-6-fosfatasi⁴⁷. In condizioni di digiuno prolungato o di restrizione calorica, la sovrpressione e l'attivazione di SIRT1 inducono la deacetilazione di FOXO1 che ritorna nel nucleo favorendo la gluconeogenesi e inibendo la glicolisi. Pertanto, è fondamentale il ruolo di SIRT1 nella regolazione del metabolismo energetico cellulare.

SIRT1 e PPAR γ : inibizione della lipogenesi e stimolazione della lipolisi

SIRT1 agisce come regolatore negativo nel processo adipogenico. È stato infatti dimostrato che in topi transgenici per SIRT1 il livello intracellulare di trigliceridi era diminuito del 50%, mentre in topi knock-out per SIRT1 la quantità di acidi grassi era notevolmente aumentata⁴⁸. In condizioni di restrizione calorica, SIRT1 inibisce PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*), un fattore trascrizionale essenziale per il differenziamento degli adipociti. Nel tessuto adiposo bianco, in risposta a restrizione calorica, SIRT1 lega PPAR γ attraverso il cofattore PGC-1 α , inibisce l'adipogenesi e stimola la lipolisi, cioè la mobilitazione degli acidi grassi.

SIRT1 e Ku70: aumento dell'attività di riparazione del DNA

SIRT1 interagisce direttamente con Ku70, una proteina coinvolta nella riparazione del DNA, con la quale forma un complesso. L'interazione tra SIRT1 e Ku70 porta ad un aumento dell'attività di riparazione del DNA e promuove la sopravvivenza cellulare in risposta allo stress.

SIRT1 e PGC-1 α : diminuzione della glicolisi a favore della gluconeogenesi

Il fattore PGC-1 α (PPAR γ *co-activator 1 α*) è un coattivatore trascrizionale di recettori nucleari che induce la biogenesi dei mitocondri, promuove il rimodellamento della composizione delle fibre muscolari ed è coinvolto nella regolazione del metabolismo glucidico e lipidico. Grazie alla deacetilazione di PGC-1 α , SIRT1 reprime la glicolisi, favorisce la gluconeogenesi e incrementa l'*output* di glucosio epatico⁴⁹.

SIRT1 e NF-kB: inibizione dell'apoptosi e regolazione della risposta immunitaria

Il fattore nucleare kB, come spiegato nel capitolo precedente, è un fattore dimerico di trascrizione che regola l'espressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria e infiammatoria, nella proliferazione e differenziamento cellulare. Uno dei principali meccanismi di inattivazione di NF-kB è la deacetilazione che avviene tramite interazioni del fattore stesso con corepressori, gli enzimi HDACs. Questi traslocano un gruppo acetile dai cinque residui di lisina della proteina ad altri substrati.

SIRT1 deacetila selettivamente la componente p65 della proteina sul residuo di Lys 310, portando alla sua inattivazione. Un recente studio ha dimostrato che oltre a bloccare la proliferazione cellulare, SIRT1 agendo su NF-kB sensibilizza le cellule all'apoptosi indotta dal TNF- α .

Nelle microglia NF-kB è coinvolto nella morte neuronale indotta dal peptide β -amiloide, il quale causa il morbo di Alzheimer. SIRT1 può dunque giocare un ruolo neuroprotettivo inattivando NF-kB⁵⁰.

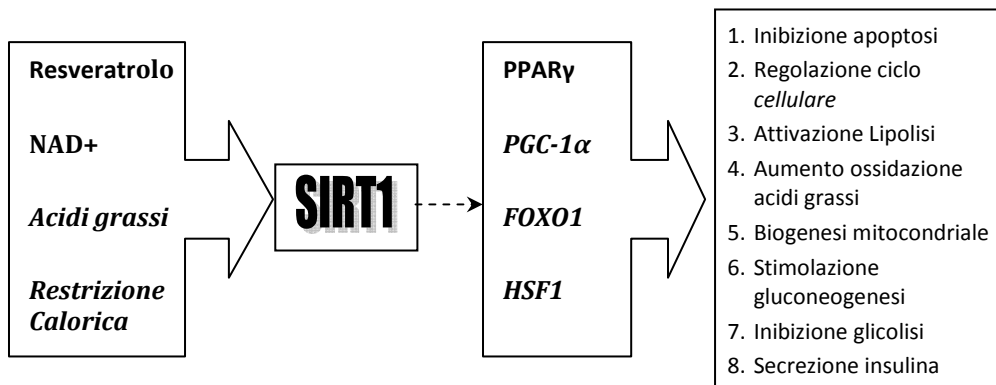


Figura 8. Ruolo fisiologico di SIRT1 nella regolazione del metabolismo e della sopravvivenza cellulare.

4.5 RESVERATROLO, ATTIVATORE DI SIRT1

Nel 2003 un laboratorio di ricerca dell'Harvard Medical School (Boston, USA)⁵¹ ha studiato SIRT1 come target terapeutico, descrivendo così 18 molecole derivate da piante in grado di attivare le sirtuine nei lieviti. Tra essi vi sono i flavoni quercetina e fisetina e gli stilbeni piceatannolo e resveratrolo, che stimolano SIRT1 da 5 a 13 volte.

L'attivatore più potente risulta essere il resveratrolo, un composto polifenolico, presente in quantità apprezzabili nell'uva e nel vino rosso. Questa molecola è già nota per il suo ruolo protettivo nei confronti di numerose patologie, tra cui quelle cardiovascolari, neoplastiche e neurodegenerative⁵².

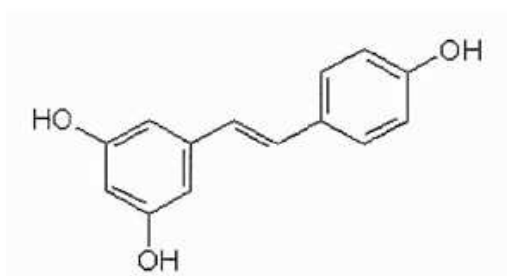


Figura 9. Struttura del resveratrolo, composto polifenolico

Alcuni autori hanno ipotizzato che le piante sintetizzino composti come il resveratrolo in risposta allo stress e restrizione di nutrienti, in maniera da attivare vie metaboliche che vedono coinvolte le sirtuine. Funghi e animali in simbiosi con le piante stimolano le proprie sirtuine utilizzando composti fenolici assunti dalle piante stesse.

In vitro, il resveratrolo (Figura 9) stimola SIRT1 aumentando la biogenesi mitocondriale e migliorando il metabolismo energetico cellulare. *In vivo*, non è stato ancora dimostrato che il resveratrolo sia un attivatore specifico di SIRT1 ma è stato provato che la stimolazione di SIRT1 avviene in modo indiretto.

Uno studio apparso su Nature nel 2004 mostrava che la somministrazione di resveratrolo o l'utilizzo di una dieta ristretta in calorie su lieviti o su *Drosophila Melanogaster* estende l'aspettativa di vita fino al 70%, ma solo se in possesso del gene Sir2.

Anche nell'animale da laboratorio il resveratrolo è in grado di aumentare l'aspettativa di vita stimolando l'attività dell'enzima deacetilasiico NAD-dipendente SIRT1⁵³.

Recentemente sono stati studiati nuovi piccoli attivatori molecolari di SIRT1, 1000 volte più potenti del resveratrolo, come potenziali agenti terapeutici. Questi composti sono strutturalmente diversi dal resveratrolo ma agiscono attraverso lo stesso meccanismo enzimatico, legandosi ad un sito allosterico esposto nel complesso enzimatico ed abbassando di conseguenza la K_m (concentrazione di substrato per la quale la velocità di reazione è uguale a $\frac{1}{2} V_{max}$) di SIRT1 per i suoi

Introduzione

substrati acetilati⁵⁴⁻⁵⁵. Queste molecole mostrano una buona biodisponibilità orale (Fonti da SIRTRIS, a GSK company, USA). Le principali molecole terapeutiche bersaglio di SIRT1 sono rappresentate da:

SRT2104: Questa molecola ha una struttura chimica diversa e molto più potente del resveratrolo. Ha superato la Fase I, è ben tollerata e sicura nei soggetti sani volontari. Si sta valutando il passaggio nella fase II nel trattamento del diabete di tipo 2 e in alcune patologie cardiovascolari. Questa molecola è stata presentata a giugno 2011 al 10^o Congresso Mondiale per l'infiammazione a Parigi per la sua azione benefica sulle malattie infiammatorie, come la psoriasi.

SRT2379: È una nuova molecola diversa dal resveratrolo e da SRT2104 che mostra una buona efficacia per il trattamento di diabete e malattie infiammatorie. È stata recentemente completata la somministrazione in soggetti volontari sani (Fase I) per valutarne la tollerabilità, la farmacocinetica, il metabolismo e la farmacodinamica.

SRT3025: Questa molecola si è dimostrata efficace per il trattamento di patologie infiammatorie, cardiovascolari e neurodegenerative su modelli animali. È stata intrapresa la somministrazione sull'uomo, in volontari sani (Fase I) a luglio del 2011.

SCOPO DEL LAVORO

Il nostro studio si propone di studiare l'interazione tra SIRT1 e le molecole di adesione, e di investigare, *in vivo* e *in vitro*, il ruolo di SIRT1 nell'infiammazione associata alla sindrome metabolica.

In vivo, nei soggetti con diagnosi di MetS, verrà valutata l'associazione tra l'espressione di SIRT1 e le concentrazioni plasmatiche delle molecole di adesione (I-CAM, V-CAM ed E-Selectine) e della citochina pro-infiammatoria, TNF- α . I risultati ottenuti serviranno per valutare il ruolo di SIRT1 nello stato infiammatorio di pazienti affetti da sindrome metabolica.

In vitro, nelle cellule endoteliali, verranno determinati i meccanismi molecolari che possono spiegare l'interazione tra SIRT1 e E-selectine, indotti da uno stimolo pro-infiammatorio come il TNF- α .

Pertanto, verificheremo nelle cellule endoteliali gli effetti del trattamento con TNF- α sul rilascio di E-selectine, sull'espressione proteica di SIRT1 e di NF-kB, e sull'attivazione di NF-kB.

Infine, studieremo l'effetto del resveratrolo e del sirtinolo, rispettivamente attivatore ed inibitore di SIRT1, sull'attivazione di NF-kB e di E-selectine nelle cellule trattate con TNF- α .

MATERIALE E METODI

1.ESPERIMENTI SU LINFOMONOCITI

1.1 SOGGETTI

Ai fini dello studio sono stati reclutati 85 volontari, impiegati di un'Azienda di Padova (64 maschie e 21 femmine) esenti da diabete mellito e da patologie note di rilievo, ad eccezione di ipertensione arteriosa, che era presente in 12 soggetti. La Tabella 5 riassume le principali caratteristiche cliniche dei soggetti. I soggetti che assumevano terapia anti-ipertensiva (8 assumevano ACE-inibitori e 4 sartani) sospendevano l'assunzione del farmaco dai 3 giorni precedenti lo studio. Tutti i soggetti avevano eseguito una curva da carico orale di glucosio nei sei mesi precedenti lo studio, per la valutazione del metabolismo glucidico.

SOGGETTI	
Numero (n°)	85
Sesso (M/F)	64/21
Età (anni)	47,2 ± 0,9
BMI (kg/m ²)	26,6 ± 0,6
Waist (cm)	94,3 ± 1,9
Pressione sistolica (mmHg)	124 ± 1,7
Pressione diastolica (mmHg)	81 ± 1,1
Glicemia a digiuno (mg/dl)	89,4 ± 3
Insulina a digiuno (μU/ml)	11,6 ± 1,0
Trigliceridi (mg/dl)	126,7 ± 10
Colesterolo totale (mg/dl)	197,4 ± 3
Colesterolo HDL (mg/dl)	48,5 ± 1,5
Colesterolo LDL (mg/dl)	124,8 ± 3
Acidi grassi liberi (μmol/l)	606 ± 37

Tabella 5. Principali parametri antropometrici dei soggetti dello studio. I dati sono espressi come Media ± errore standard.

1.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Tutti i soggetti sono stati valutati al mattino, in condizioni di digiuno notturno, presso la divisione di Malattie del Metabolismo del Policlinico Universitario di Padova. In tutti è stata raccolta un'anamnesi accurata relativa alla storia clinica, alla familiarità per patologie cardiovascolari, abitudine al fumo e attività fisica. È stato necessario l'ottenimento della firma del consenso informato e la misura dei principali parametri antropometrici (peso, altezza e circonferenza addominale). È stato quindi svolto un esame obiettivo, con valutazione dei polsi periferici ed un esame ecodoppler dei tronchi sovra aortici, al fine di escludere patologie vascolari aterosclerotiche.

È stato eseguito, inoltre, un prelievo ematico basale finalizzato al dosaggio di insulina, C-peptide, acidi grassi liberi e trigliceridi. Nel prelievo sono stati determinati, anche il colesterolo totale e le sue frazioni HDL e LDL; infine, è stato prelevato un campione ematico utile all'isolamento delle cellule mononucleate circolanti per determinare l'espressione dei geni e delle proteine delle sirtuine.

1.3 VALUTAZIONE DELLA SINDROME METABOLICA

I soggetti sono stati classificati in due grandi gruppi a seconda del grado di insulino-sensibilità e ad alcuni criteri ben precisi.

La sindrome metabolica è stata diagnosticata utilizzando i criteri proposti nel 2001 dal National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III). Com'è noto la diagnosi può essere soddisfatta dalla presenza di almeno 3 delle seguenti alterazioni:

- *Obesità centrale*
 - *circonferenza vita > 102 cm negli uomini*
 - *circonferenza vita > 88 cm nelle donne*
- *Concentrazione di trigliceridi a digiuno > di 150 mg/dL*
- *Colesterolo HDL*
 - *negli uomini < 40 mg/dl*
 - *nelle donne < 50 mg/dl*
- *Pressione arteriosa > 130/85 mmHg*
- *Glicemia a digiuno > 100 mg/dL*

1.4 PROCEDURE ANALITICHE

Il glucosio plasmatico è stato determinato utilizzando il metodo della glucosio ossidasi, mediante analizzatore del glucosio Beckman, Albertville. L'insulina plasmatica e il C-peptide sono stati dosati mediante metodica convenzionale RIA. Le concentrazioni di colesterolo totale, trigliceridi e di acidi grassi liberi sono state determinate con metodo enzimatico standard e il colesterolo HDL è stato misurato utilizzando la precipitazione di polietilene-glicole con quantificazione enzimatica. Per la determinazione del colesterolo LDL è stata applicata la formula di Friedewald.

1.5 ESPRESSIONE DI SIRTUINE NEI LINFOMONOCITI

1.5.1 Preparazione della frazione linfomonocitaria

I linfomonociti (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) sono stati isolati da un prelievo di 30 ml di sangue eparinizzato mediante gradiente di densità, utilizzando una soluzione di Ficoll (Histopaque 1077, Sigma) e centrifugazione a 3000 giri per 30 minuti a temperatura ambiente. La frazione linfomonocitaria così separata è stata risospesa e centrifugata con una soluzione fisiologica (PBS) contenente: 0,01 mol/l tampone Fosfato, 0,027 mol/l KCl, 0,13 mol/l NaCl a pH 7,4.

In seguito, i PBMC sono stati in parte sospesi con la soluzione di RNazol, al fine di estrarre RNA, utile per l'analisi di RT-PCR. Una seconda parte viene messa in una soluzione ipotonica, data da 20 mmol/l HEPES, 2 mmol/l EGTA, 10 mmol/l β -glicerofosfato, 2 mmol/l Na_3VO_4 , 10 mmol/l PMSF, antiproteasi (1 $\mu\text{mol/l}$ leptonina, 5 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$ aprotinina, 100 mM DTT) per l'estrazione delle proteine, necessarie per la metodica di Western Blot. Il tutto è stato posto infine a una temperatura di -80°C .

1.5.2 Estrazione di RNA

L'RNA è stato estratto utilizzando il Kit per l'estrazione totale di RNA da cellule animali (RNeasy Mini Kit, QIAGEN). Con questo metodo l'RNA viene pu-

rificato dagli altri componenti cellulari, come le proteine, senza uso di fenolo o cloroformio.

È stata utilizzata la parte di PBMC che era stata sospesa in soluzione con la soluzione di lisi RNAzol, alla quale viene aggiunto etanolo al 70% e viene poi trasferita su colonnine cromatografiche da 2 mL. L'RNA così si lega al gel di silice, matrice di separazione delle colonne. Vengono fatti vari lavaggi con reattivi differenti al fine di eluire i contaminanti e lasciare solo l'RNA purificato adeso alla fase stazionaria. Infine con acqua ed una centrifugazione ad alta velocità viene staccato l'RNA ed eluito in una eppendorf, pronto per la quantificazione.

1.5.3 Quantificazione di RNA

La determinazione della concentrazione di RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e della sua purezza è stata determinata mediante lettura del valore di assorbanza ottenuto tramite spettrofotometro (NanoDrop 2000C, Thermo Scientific) alle λ di 260, di 280 e di 230 nm. Il valore di assorbanza alla λ di 260 nm ci permette di quantificare l'RNA totale estratto, mentre il rapporto tra i valori di assorbanza 260/280 e 260/230 ci indicano il grado di qualità di RNA (Agilent).

1.5.4 Retrotrascrizione di RNA

La reazione di RT viene utilizzata per amplificare il DNA a doppio filamento a partire da RNA estratto a singolo filamento. Nella fase RT (retrotrascrizione) l'enzima trascrittasi inversa sintetizza una molecola di DNA a singolo filamento (cDNA) complementare all'RNA template.

La reazione di RT è stata condotta utilizzando il Kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad). Il gradiente di temperatura consiste di una prima fase a 25 °C per 5 minuti, una seconda a 42 °C per 30 minuti tale da attivare la trascrittasi inversa e una terza a 85 °C per 5 minuti al fine di inattivare la trascrittasi inversa.

1.5.5 Espressione genica di sirtuine in linfomonociti umani: PCR-Real Time

La quantificazione dell'espressione genica di SIRT1-7 è stata ottenuta mediante reazione di PCR-Real Time con l'uso di specifici primers e di una sonda

fluorescente (SYBR-Green). Questa sonda fluorescente ha la particolarità di emettere fluorescenza solamente quando si lega al doppio filamento del prodotto di amplificazione della sequenza oligonucleotica (circa 300 bp) del gene di interesse. Ne consegue che l'aumento del segnale di fluorescenza sarà proporzionale alla quantità di prodotto di amplificazione ottenuto dalla reazione di PCR che corrisponde al valore del ciclo soglia definito Ciclo Soglia o Threshold Cycle (Ct). Infatti, nella reazione di PCR Real-Time, monitorata in tempo reale per 40 cicli, si ottiene una curva sigmoideale dove i primi 10-15 cicli corrispondono a valori di fluorescenza dati dal rumore di fondo (background), poi tra i 15-25 cicli la reazione ha un andamento esponenziale per poi flettere e raggiungere il *plateau* (30-40 cicli). Il valore di Ct, utilizzato per quantificare il prodotto della reazione di PCR, corrisponde al valore di Ct dove l'aumento di fluorescenza risulta essere significativamente maggiore a quello del livello basale (*background*) misurato nei primi cicli di amplificazione.

La reazione di PCR Real-Time è stata eseguita mediante il sistema di rilevazione i-Cycler iQ5 Real Time (Bio-Rad). La reazione di PCR Real-Time è stata eseguita utilizzando il kit iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) e i primer specifici per i geni di interesse. La reazione di PCR viene svolta con 20 µl totali contenenti 10 µl di PCR-SYBR Green Master Mix 2x (Biorad), 2 µl forward primer (50 nM), 2 µl reverse primer (50 nM), 2 µl H₂O e 4 µl di cDNA (pari a 1/5 del prodotto di retrotrascrizione).

Il profilo termico della reazione prevede un ciclo di reazione a 95 °C per 5 minuti (al fine di attivare l'enzima Taq Polimerasi) e 40 cicli costituiti da 15 secondi a 95 °C (per la fase di denaturazione) e 1 minuto a 60 °C (per la fase di ibridazione ed estensione). Le sequenze oligonucleotidiche dei primer per le sirtuine (SIRT1-7) e per il gene *housekeeping* β-actina sono state disegnate nel nostro laboratorio utilizzando i programmi Primer3 e Operon. La specificità dei *primer* è stata verificata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio e mediante analisi della curva di melting che consente di ottenere la temperatura alla quale metà delle molecole complementari sono ibridate. Quest'ultima consente di verificare l'eventuale presenza di dimeri dei primers o la presenza di prodotti aspecifici nella reazione di PCR. Dopo avere verificato che la scelta dei primers è stata ottimale, sono state fatte delle curve di calibrazione per ciascun gene a concentrazioni scalari (diluizione 1:2) di RNA totale. Questo ha permesso di ottenere l'efficienza della reazione di PCR che deve essere all'incirca del 100%. Mediante la curva di cali-

brazione sono stati ottenuti i valori di pendenza (*slope*), l'intercetta della retta di regressione (*r*) e il coefficiente di correlazione dei punti. Il valore della pendenza viene poi utilizzato per calcolare l'efficienza della reazione di PCR:

$$E(\text{eff}) = 10^{-1/\text{slope}}$$

La quantificazione della espressione del gene di interesse è di tipo relativo in quanto viene normalizzata per un gene *housekeeping* e viene calcolata applicando la seguente formula matematica:

$$\text{espressione} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

dove $-\Delta\Delta Ct = [(Ct(\text{SIRT di un campione}) - Ct(\beta\text{-actina di un campione})) - [(Ct(\text{SIRT di un normalizzatore}) - Ct(\beta\text{-actina di un normalizzatore}))]$.

Per normalizzatore si definisce un campione il cui valore di espressione corrisponde a 1, nel nostro caso la β -actina.

1.5.6 Western Blot

L'analisi della espressione di SIRT1 da linfomonociti umani è stata eseguita mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide e Western Blot. Le proteine (50-200 μ g) sono state denaturate nel tampone di Laemmli, contenente ditiotritolo (DTT) ed SDS, in rapporto 1:9, a 100 °C per 5 minuti. La separazione delle proteine è stata eseguita mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide SDS-PAGE 10%, con il tampone di elettroforesi contenente TRIS 0,12 M; Glicina 1,23 M; SDS 0,01 M. Le proteine sono poi state trasferite mediante elettroblotting (per 180 minuti a 100 V a 4 °C) su una membrana di nitrocellulosa, utilizzando un apparecchio Transblot (Elettrofor, Padova) con la soluzione di blotting contenente TRIS 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 0.037% e Metanolo 20% (vol/vol).

Le proteine, una volta trasferite su membrana, sono state incubate con una soluzione di PBS contenente 0.05% (vol/vol) di Tween (T-PBS) e 5% di latte, *overnight* a 4 °C. Le membrane sono state nuovamente incubate overnight con l'anticorpo primario anti-SIRT1 (diluizione 1:1000, Santa Cruz Biotechnology) seguito da un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (Amersham), coniugato all'enzima perossidasi del rafano.

La rivelazione del legame dell'anticorpo con la proteina in esame è stata realizzata mediante reazione chemiluminescente (ECL) utilizzando il sistema imaging Versa-Doc 3000 (BioRad). L'analisi densitometrica delle bande corrispondenti alla pro-

teina in esame è stata analizzata mediante il software Quantity One (Biorad) che consente di quantificare l'espressione della proteina in esame.

L'anticorpo primario è stato poi rimosso dalla membrana mediante incubazione a 50 °C per 30 minuti in una soluzione contenente TRIS base 0,76 g, SDS 2 g, β -mercaptoetanolo 700 μ l a pH 6,8 e di nuovo incubata con l'anticorpo primario anti-GAPDH (gliceraldeide-3-fosfatodeidrogenasi, 1:5000, Chemicon). L'analisi densitometrica della espressione di GAPDH è stata utilizzata per normalizzare l'espressione della proteina in esame e per correggere eventuali errori di caricamento dei campioni. I risultati sono stati espressi come percentuale rispetto al controllo, che è stato posto come uguale a 100%.

1.6 DOSAGGIO DELLE MOLECOLE DI ADESIONE E DEL TNF- α

Le citochine e le molecole di adesione (I-CAM, V-CAM ed E-Selectine) nei campioni di plasma dei soggetti sono state dosate presso il Centro Regionale per i Biomarcatori, che collabora nel progetto.

È stata utilizzata la metodologia multiplexing (Bio-Plex, Bio-Rad, Hercules, CA) che permette il dosaggio simultaneo di differenti biomolecole in piccoli volumi di campione e in un unico pozzetto di una micro piastra.

Tale sistema si basa su sfere marcate coniugate ad anticorpi monoclonali specifici per una proteina bersaglio o per un peptide. Le sfere coniugate all'anticorpo reagiscono con il campione e con un anticorpo secondario per formare il tipico sistema a *sandwich*. Dopo l'incubazione, il contenuto di ciascun pozzetto verrà prelevato e analizzato dal lettore Bio-Plex. Il flusso delle microsferi sospese verrà eccitato dai laser e il segnale di fluorescenza verrà registrato da processori di segnale digitale ad alta velocità e dal software Bio-Plex Manager (Bio-Rad, Hercules, CA) e tradotto in dati di concentrazione dell'analita. Questa tecnologia innovativa offre una miglior sensibilità (10 pg/mL), affidabilità, recupero e riproducibilità rispetto ai dosaggi ELISA convenzionali.

Per questo progetto, è stato validato un kit multiplexing (kit Millipore 3-plex hCVD Panel-1) per lo studio di molecole di adesione e di citochine, TNF- α in primis, in campioni di plasma di pazienti affetti da sindrome metabolica.

2. ESPERIMENTI SU CELLULE HUVEC

2.1 COLTURA CELLULARE

Gli esperimenti descritti in questo lavoro di tesi sono stati svolti, oltre che su linfomonociti umani, su cellule HUVEC, cellule endoteliali umane estratte dalla vena del cordone ombelicale, ottenute dalla Clonetics Inc. (San Diego, USA). Le cellule sono state coltivate in un terreno (PromoCell, Hidelberg, Germany), con il 10% di fattori di crescita, fetal bovin serum (FBS della Sigma), 1% di penicillina e streptomicina (Sigma) e 0.02% di Supplemental Mix/ Endothelial Cell Growth Medium (Promo Cell, Hidelberg, Germany). Le cellule vengono mantenute sempre in incubatore a 37 °C in atmosfera umidificata, con il 5% di CO₂, in presenza di normali livelli di glucosio (5,5 mmol/L). Vengono normalmente utilizzate tra il terzo ed il sesto passaggio.

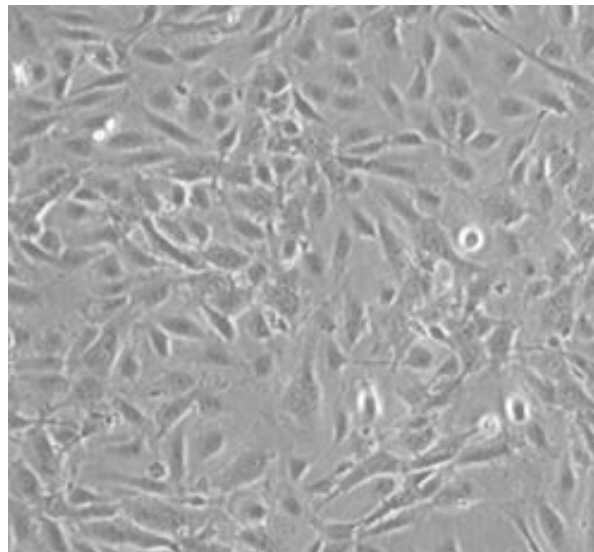


Figura 10. Immagine al microscopio di cellule endoteliali HUVEC.

2.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Le cellule HUVEC sono state incubate con la citochina TNF- α a concentrazione 0.1 μ g/ml. Vengono preparati, in contemporanea, dei controlli nei quali non è stato aggiunto nessuno stimolo infiammatorio.

Durante l'incubazione con il TNF- α o con altre molecole, le cellule vengono poste in quiescenza (al 3% di FBS) nel terreno completo.

Le cellule sono state incubate in intervalli di tempo differenti: 6h, 24h e 48h per valutare le diverse espressioni proteiche di SIRT1 ed NF- κ B.

Infine, quindi, le cellule vengono lisate per l'estrazione di RNA o delle proteine e il terreno di coltura (supernatante) viene mantenuto a -80 °C per la determinazione delle molecole di adesione.

Per gli esperimenti di silenziamento genico di SIRT1 le HUVEC sono state trasfettate con un pool di "ON-target plus SMART" siRNA per SIRT1 o con un pool di "ON-target plus Non-targeting siRNA" (Dharmacon, Celbio, Italy) che sono state diluiti alla concentrazione di 100 μ M. siRNA di SIRT1 è stato aggiunto al medium Accell siRNA per ottenere una concentrazione finale di 1 μ M. Le cellule endoteliali sono state poi incubate con il terreno completo contenente siRNA di SIRT1 per 72h. In seguito, le cellule sono state lisate e le proteine sono state estratte per le successive determinazioni. Le sequenze del pool "ON-target plus SMART siRNA di SIRT1 sono le seguenti: GCAAAGGAGCGAUUAUA; GCGAUUGGGUACCGAGAUUA; GGAUAGGUCCAUAUACUUU; CCACCU-GAGUUGGAUGAUUA; CCACCUGAGUUGGAUGAUUA.

2.3 VITALITÀ CELLULARE

La vitalità cellulare delle cellule endoteliali prima e dopo trattamento con i vari agonisti è stata misurata mediante il colorante Trypan Blue. Questo cromoforo è carico negativamente e non è in grado di attraversare la membrana di cellule intatte, ma attraversa quella delle cellule morte, colorandole di blu. Questo permette la facile discriminazione delle cellule vive (che hanno escluso il colorante) da quelle morte, con semplice osservazione al microscopio. Generalmente, nei nostri esperimenti la vitalità cellulare corrisponde al 80-90%.

2.4 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE

Dopo aver svolto gli esperimenti secondo il protocollo sopra descritto, le cellule devono essere lisate per poter estrarre l'intero contenuto proteico da analizzare.

L'estrazione dalle HUVEC avviene mediante 150 µl di tampone ipotonico ogni ml di terreno di coltura. La soluzione di lisi contiene 20 mmol HEPES, 2mmol EGTA, 10 mmol glicerofosfato, 1mmol di DTT (ditiotritolo), 2mmol di Vanadato, 10 mmol di fluoruro di fenilmetilsulfonile (PMSF), 1 mmol di leupeptina, 1 µg/ml di aprotinina. Le cellule vengono staccate definitivamente dalla base della piastra grazie ad uno "scraper", raccolte e conservate a -80 °C.

In seguito il lisato proteico viene sonicato e poi centrifugato. Tutto ciò deve avvenire a temperatura intorno ai 4 °C per non degradare le proteine.

2.5 DOSAGGIO PROTEICO MEDIANTE SAGGIO CON BCA

Per determinare la concentrazione totale di proteine in una soluzione di lisato è stato utilizzato il saggio con BCA (Acido bicinconinico, Euroclone).

2.6 ESPRESSIONE PROTEICA DI SIRT1 ED NF-κB

Il procedimento di quantificazione dell'espressione proteica di SIRT1 ed NF-κB è uguale a quello descritto nel paragrafo 1.5.6 per i linfomonociti umani.

Gli anticorpi primari utilizzati sono l'anti-SIRT1 (Santa Cruz) che permette di visualizzare la proteina specifica intorno ai 120 kDa.

L'altro anticorpo usato è l'anti-NF-κB, (Cell Signalling), che lega sia il precursore citosolico p105 che il suo prodotto p65, responsabile dell'attività della proteina. Dall'analisi densitometrica al VersaDoc3000 son visibili quindi due bande, prese entrambe in considerazione per i nostri dati.

2.7 ATTIVAZIONE DEL FATTORE NF-κB MEDIANTE IMMUNOPRECIPITAZIONE

L'attivazione del fattore di trascrizione NF-κB è stato determinato mediante analisi quantitativa dei livelli di acetilazione della proteina NF-κB. Le cellule dopo stimolazione con TNF-α, vengono immediatamente lisate con un tampone ipotonico per poter estrarre le proteine.

NF- κ B viene immunoprecipitata dal lisato proteico (1mg) mediante incubazione con 2 μ g di anticorpo anti-NF- κ B (Cell Signalling) e con 30 μ g di EZ view™ Red Protein A Affinity Gel (Sigma) *overnight* a 4 °C. L'immunoprecipitato viene poi lavato più volte con una soluzione di lisi, viene denaturato (Laemmli Buffer) e sottoposto ad elettroforesi su gel di poliacrilamide al 10%.

Le proteine vengono poi trasferite su membrana di nitrocellulosa (Western Blot) e incubate con anticorpo che riconosce i siti di acetilazione sui residui lisinici della proteina (*Ab-acetylated-lysine*, Cell Signalling Tech). La determinazione dei livelli di acetilazione viene eseguita mediante reazione chemio luminescente (Pierce, Celbio di Milano) elaborato dal sistema di immagine molecolare Versa-Doc3000. I livelli di acetilazione di NF- κ B sono stati espressi come incremento rispetto al controllo e normalizzati per l'espressione di NF- κ B totale.

2.8 DETERMINAZIONE DELLE MOLECOLE DI ADESIONE NEL TERRENO DI COLTURA

La concentrazione delle molecole di adesione nel terreno di coltura è stata analizzata mediante kit ELISA (Millipore) presso il Centro Regionale per i Biomarcatori di Venezia, che collabora nel progetto.

2.9 Immunoprecipitazione della Cromatina

Le cellule HUVEC sono state trattate con TNF- α in presenza o in assenza di resveratrolo per 24h. In seguito, sono state incubate per 10' in presenza di 1% Formaldeide per consentire la formazione di legami crociati tra proteine e DNA ("cross-linking"). La reazione è stata poi bloccata aggiungendo una soluzione di glicina 0.125 mM per 5' e le cellule, dopo un lavaggio con PBS, sono state raccolte e centrifugate a 4°C (5' a 1200 rpm). Successivamente sono state risospese in 2 ml di "Cell Lysis Buffer" (5mM PIPES pH 8.0, 85mM KCl, 0,5% NP-40, 1mM PMSF e inibitori delle proteasi 10 μ g/ml), lasciate in ghiaccio per 10' e poi centrifugate a 4°C (5' 5000 rpm). Il precipitato contenente i nuclei è stato risospeso in 2 ml di "Nuclear Lysis Buffer" (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 8% SDS, 1 mM PMSF e inibitori delle proteasi 10 μ g/ml), e sottoposto a sonicazione 5 volte per 30'' in ghiaccio. La frammentazione del DNA della cromatina dopo sonicazione è

Materiale e metodi

stata verificata mediante la visualizzazione di frammenti di circa 1000 bp su gel di agarosio 1%. In seguito, un' aliquota del campione (300 μ l) è stato diluito con "Ripa Buffer" (10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0,1% Na-Deossicolato, 0,1% SDS, 140 mM NaCl) e sottoposto a "preclearing" con 30 μ l di proteina-A agarosio (Amersham) per 1-2 ore a 4°C. Dopo centrifugazione (10' a 14000 rpm), il sovranatante è stato incubato con l'anticorpo Anti-Nf-kB p65 (1 μ g), con l'anticorpo (anti-RNA pol II) come controllo positivo e IgG come controllo negativo, per tutta la notte a 4°C in agitazione. RNA pol II è in grado di legarsi alla regione del promotore del gene GAPDH. Successivamente al campione sono stati aggiunti 30 μ l di Proteina A agarosio per 4 ore a 4°C e centrifugato a 4°C a 14000 rpm. L'immunoprecipitato è stato poi lavato ed eluito con il kit Ez-Chip (Upstate). Dopo l'eluizione, il DNA è stato purificato mediante il kit PCR Purification (Qiagen) per la PCR quantitativa (Q-PCR), utilizzando oligonucleotidi specifici per la amplificazione del promotore del gene E-selectine e per il promotore del gene GAPDH. I primers per E-selectine e GAPDH sono rispettivamente: senso (E-selectine) ATCCAGAGCAACCCACA; antisenso: CATTACACACCA-GCTCAGCT; senso (GAPDH): 5'-TACTAGCGGTTTTACGGGCG, antisenso, 5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGCGA. Mediante l'analisi della curva di melting e l'elettroforesi su gel di agarosio sono state confermate la specificità dei primers che danno un solo prodotto di amplificazione (amplicone). La normalizzazione dei dati ottenuti dalla PCR è stata eseguita mediante il metodo "fold enrichment" del segnale ottenuto dalla immunoprecipitazione della cromatina con l'anticorpo specifico rispetto a quello senza anticorpo (controllo negativo)

2.9 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei dati è stata condotta con software SPSS (versione 15, Statistical Package for Social Science, SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Nella comparazione tra le medie dei parametri tra i diversi gruppi di soggetti è stato utilizzato il test t di Student. Per determinare la relazione esistente tra diverse variabili è stato utilizzato il coefficiente di correlazione di Pearson. Un test è stato considerato statisticamente significativo per valori di $P < 0.05$. I dati sono stati espressi come Media \pm ES (errore standard).

RISULTATI

1. ESPERIMENTI SU LINFOMONOCITI UMANI

1.1 SOGGETTI

Le principali caratteristiche cliniche dei soggetti sono riportate in Tabella 6. I soggetti sono stati suddivisi sulla base dei criteri proposti dall'Adult Treatment Panel III (ATP-III) in affetti da MetS e non da MetS.

Ventuno volontari sono stati considerati affetti da sindrome metabolica, circa il 24% del totale. I soggetti classificati affetti da sindrome metabolica (24%) non differiscono in maniera significativa per età (46.5 ± 1.1 vs. 49.2 ± 1.3) e per sesso ($p = ns$) da quelli che non la presentano.

Caratteristiche	Totale (n=85)	No MetS (n=64)	MetS (n=21)
Sesso (M/F)	64/21	50/14	14/7
Età (anni)	47.2 ± 0.9	46.5 ± 1.1	49.2 ± 1.3
BMI (kg/m^2)	26.6 ± 0.6	24.5 ± 0.5	$31.5 \pm 0.9^*$
Waist (cm)	94.3 ± 1.9	88.1 ± 1.7	$110 \pm 2.4^*$
Pressione sistolica (mmHg)	124 ± 1.7	119.7 ± 1.7	$134.9 \pm 3.0^*$
Pressione diastolica(mmHg)	81 ± 1.1	78.9 ± 1.0	$86.2 \pm 2.0^*$
Glicemia a digiuno (mg/dl)	89.4 ± 3.0	82.6 ± 1.5	$106.6 \pm 7.0^*$
Insulina a digiuno ($\mu\text{U/ml}$)	11.6 ± 1.0	7.5 ± 0.6	$21.8 \pm 1.8^*$
Trigliceridi (mg/dl)	126.7 ± 10	101 ± 6	$190.0 \pm 22^*$
Colesterolo totale (mg/dl)	197.4 ± 3	193 ± 4	$208.3 \pm 6.5^{**}$
Colesterolo HDL (mg/dl)	48.5 ± 1.5	51.7 ± 1.7	$40.2 \pm 2.3^*$
Colesterolo LDL (mg/dl)	124.8 ± 3	121 ± 3.3	$135.7 \pm 5.7^{**}$
Acidi grassi liberi ($\mu\text{mol/l}$)	606 ± 37	606 ± 36	598 ± 50

Tabella 6. Caratteristiche principali dei soggetti dello studio. I dati sono espressi come Media \pm Errore Standard, * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$

1. 2 ESPRESSIONE DI SIRT1 IN LINFOMONOCITI UMANI

Il nostro gruppo ha recentemente dimostrato che in un minor numero di pazienti affetti da sindrome metabolica, l'espressione genica di SIRT1 nei linfomonociti è ridotta rispetto a quella presente nei soggetti non affetti, mentre l'espressione delle altre sirtuine (SIRT2-SIRT7) non è significativamente diversa⁵⁶.

Pertanto, alla luce di questi risultati, abbiamo ampliato la casistica dei soggetti per confrontare l'espressione genica e proteica di SIRT1 nei linfomonociti dei due gruppi presi in esame. Come si può osservare nella Figura 11, l'espressione genica di SIRT1 risulta essere significativamente ridotta nei pazienti con MetS rispetto ai non MetS (1.096 ± 0.050 vs. 0.742 ± 0.048).

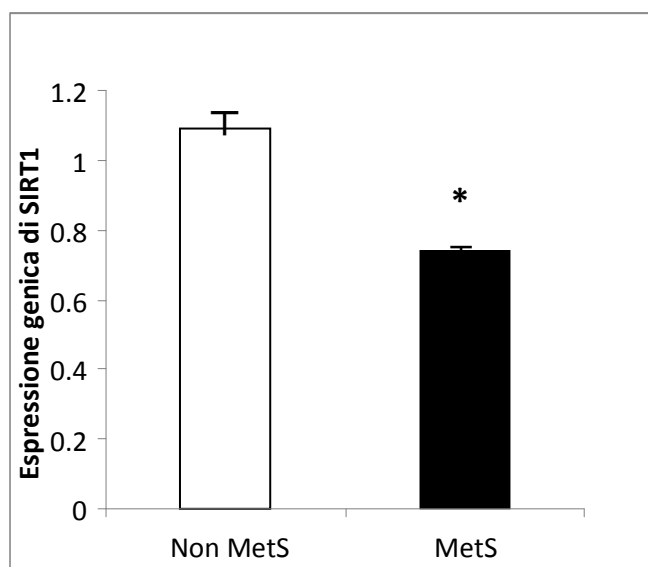


Figura 11. Espressione genica di SIRT1 in soggetti affetti (n=21) e non (n=64) da sindrome metabolica. I dati sono espressi come Media ± Errore Standard. *p<0.01

La ridotta espressione di SIRT1 nei linfomonociti dei soggetti con MetS è stata confermata dall'analisi dell'espressione della proteina SIRT1. La Figura 12 mostra un Western Blot rappresentativo dell'espressione di SIRT1 in linfomonociti umani dove l'anticorpo anti-SIRT1 riconosce la proteina di peso molecolare di circa 120 kDa. Nei linfomonociti di soggetti con MetS l'espressione di SIRT1 è sensibilmente ridotta di circa il 40% rispetto a quella di soggetti non MetS, come cal-

Risultati

colato dall'analisi densitometrica e dal rapporto tra l'espressione di SIRT1 e GAPDH, proteina di riferimento.

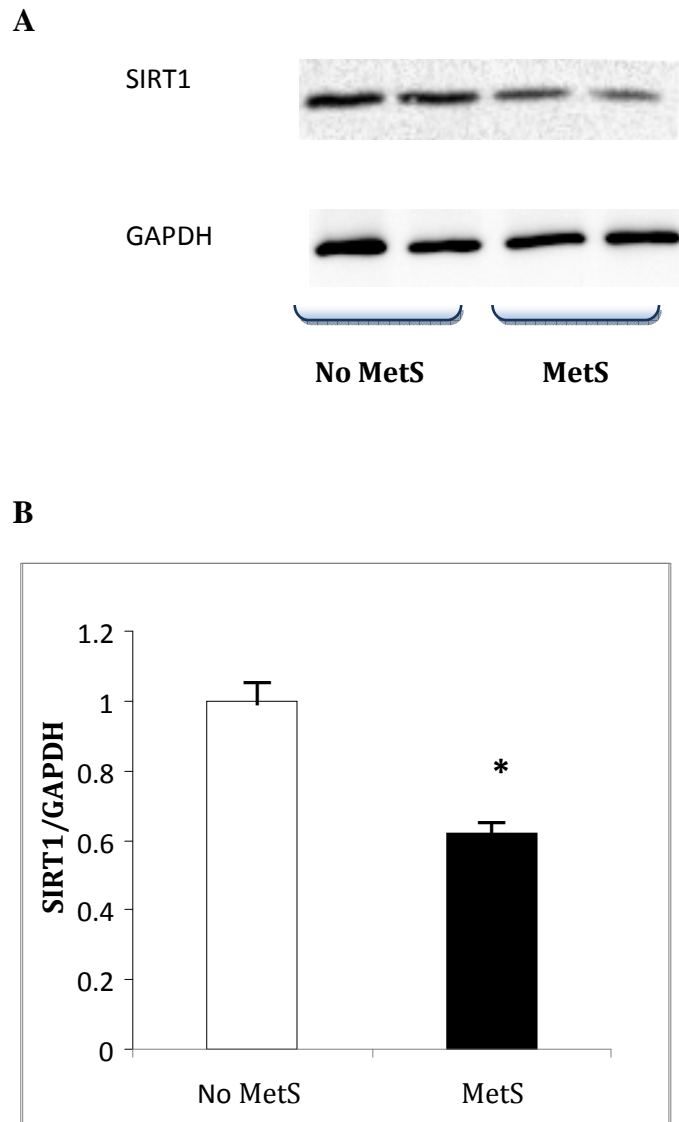


Figura 12. A) Western Blot rappresentativo dell'espressione proteica di SIRT1 in soggetti con e senza sindrome metabolica. B) Analisi densitometrica dell'espressione di SIRT1 nelle condizioni sopra elencate. I valori sono espressi come Medie ± ES; * $p < 0.01$

1.3 CORRELAZIONE TRA L'ESPRESSIONE GENICA DI SIRT1 E LE COMPONENTI DELLA SINDROME METABOLICA

Abbiamo poi studiato l'associazione tra i valori di espressione genica di SIRT1 e le componenti che definiscono la MetS.

La Tabella 7 riporta i valori di correlazione tra l'espressione di SIRT1 e i parametri che definiscono la MetS. SIRT1 si associa negativamente alla circonferenza vita ($r=-0.43$; $p=0.001$), ai trigliceridi ($r=-0.342$; $p=0.014$), alla pressione arteriosa sistolica ($r=-0.290$; $p=0.033$) e alla glicemia a digiuno ($r=-0.281$; $p=0.042$), mentre positivamente alla concentrazione di HDL ($r=0.380$; $p=0.007$).

Fattori di rischio	Correlazione di Pearson r	Valore p
Circonferenza vita	-0.434	0.001 **
Pressione sistolica	-0.290	0.033 *
Glicemia a digiuno	-0.281	0.042 *
Trigliceridi	-0.342	0.014 *
HDL	0.380	0.007 **

Tabella 7. Correlazione tra l'espressione genica di SIRT1 e i fattori di rischio per la Sindrome Metabolica.

* La correlazione è significativa al livello 0.01.

** La correlazione è significativa a livello 0.05.

1.4 CONCENTRAZIONI PLASMATICHE DELLE MOLECOLE DI ADESIONE E DEL TNF- α

La sindrome metabolica è una condizione fisiopatologica data da una combinazione di fattori di rischio cardiovascolare e da uno stato pro-infiammatorio sistemico, caratterizzato da un aumento della concentrazione di citochine e proteine pro-infiammatorie.

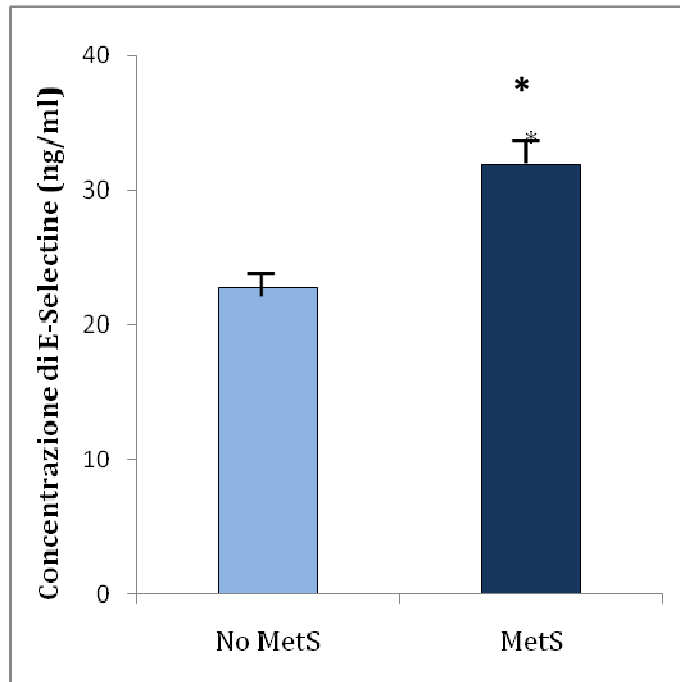
Per approfondire tali associazioni, abbiamo allora determinato la concentrazione plasmatica di 3 importanti molecole di adesione, I-CAM, V-CAM ed E-Selectine, e della citochina pro-infiammatoria TNF- α nei soggetti affetti da MetS e

Risultati

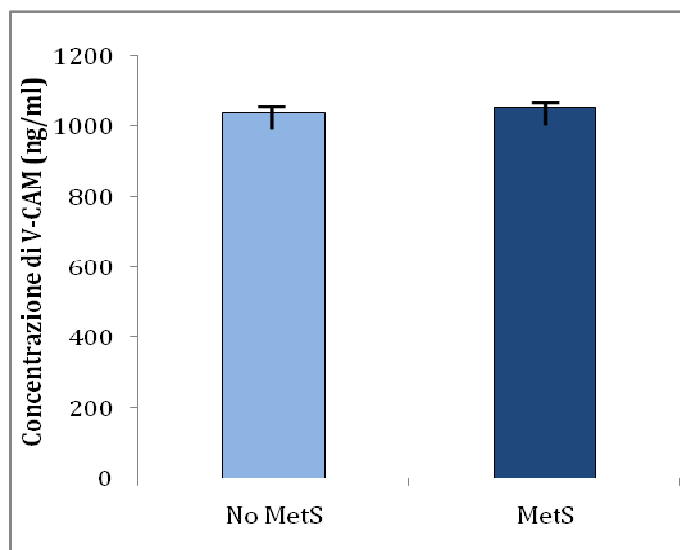
non da MetS. La Figura 13 riporta i valori medi delle concentrazioni plasmatiche di E-selectine, di I-CAM e V-CAM nei due gruppi di soggetti.

La concentrazione plasmatica di E-Selectine è significativamente aumentata nei soggetti con la MetS (22.713 ± 1.112 vs. 31.873 ± 3.266 ng/ml; $p < 0.01$) rispetto ai non MetS, mentre la concentrazione di I-CAM e V-CAM non sono risultate essere significativamente differenti.

A



B



C

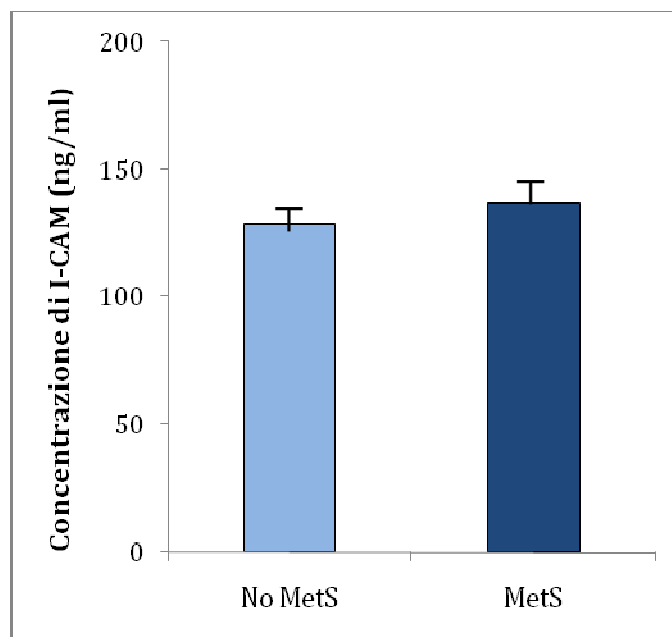


Figura 13 A, B, C) Dosaggio delle molecole d'adesione E-Selectine, V-CAM e I-CAM in soggetti con (n=21) o senza (n=64) sindrome metabolica. I valori sono espressi come Medie \pm ES; * $p < 0.01$

Inoltre, i valori di concentrazione delle E-Selectine sono correlati positivamente alla circonferenza vita ($r=0.261$; $p=0.034$), ai trigliceridi ($r=0.434$; $p=0.000$), alle pressione arteriosa sistolica ($r=0.315$; $p=0.003$), alle glicemia a digiuno ($r=0.256$; $p=0.018$) e negativamente ai valori di HDL ($r=-0.211$; $p=0.051$).

Fattori di rischio	Correlazione di Pearson r	Valore p
Circonferenza vita	0.261	0.034 *
Pressione sistolica	0.315	0.003 **
Glicemia a digiuno	0.256	0.018 *
Trigliceridi	0.434	0.000 **
HDL	-0.211	0.051 *

Tabella 8. Correlazione tra l'espressione della molecola di adesione E-selectine e i fattori di rischio per la Sindrome Metabolica.

* La correlazione è significativa al livello 0.01.

** La correlazione è significativa a livello 0.05.

Infine, sono stati misurati i livelli plasmatici di TNF- α nei due gruppi di studio. La Figura 14 mostra che le concentrazioni risultano significativamente aumen-

tate nei soggetti con sindrome metabolica (1.10 ± 0.08 vs. 1.55 ± 0.21 , $p < 0.01$) rispetto a coloro che non ne sono affetti.

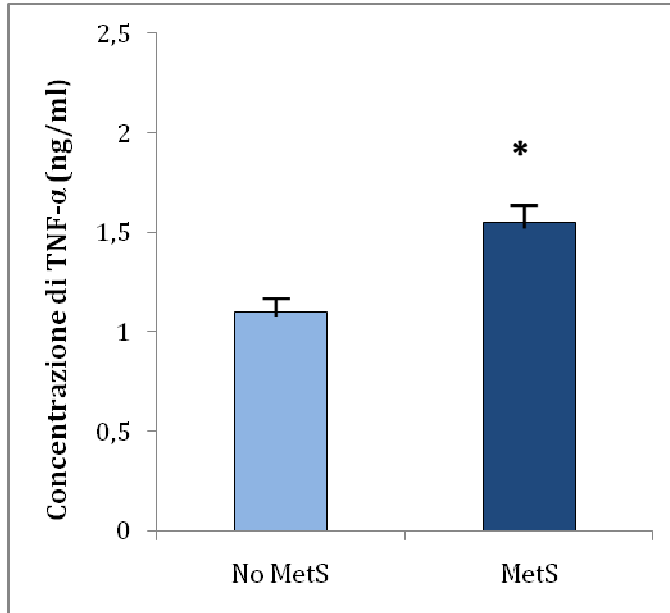


Figura 14. Dosaggio di TNF- α in soggetti con (n=21) o senza (n=64) sindrome metabolica

La concentrazione plasmatica di TNF- α si correla positivamente ai trigliceridi ($r=0.414$, $p=0.003$) e negativamente alle HDL ($r=-0.334$, $p=0.019$). Inoltre i valori di TNF- α si correlano positivamente anche alle concentrazioni plasmatiche di E-selectine ($r=0.412$, $p=0.003$, Figura 15A).

Poiché le molecole di adesione e il TNF- α sono considerati tra i principali *marker* di disfunzione endoteliale, un incremento significativo della loro espressione è sinonimo di un danno funzionale dell'endotelio vascolare nei soggetti con sindrome metabolica.

1.5 CORRELAZIONE TRA L'ESPRESSIONE DI SIRT1 E

LA CONCENTRAZIONE DI E-SELECTINE

La Figura 15B mostra la correlazione tra l'espressione genica di SIRT1 e la concentrazione plasmatica della molecola di adesione E-selectine nei soggetti con e senza sindrome metabolica. Come si può notare, è presente una correlazione negativa tra i due parametri ($r= -0.341$; $p=0.003$). La concentrazione plasmatica di TNF- α , invece, non si correla ai valori di espressione di SIRT1.

Risultati

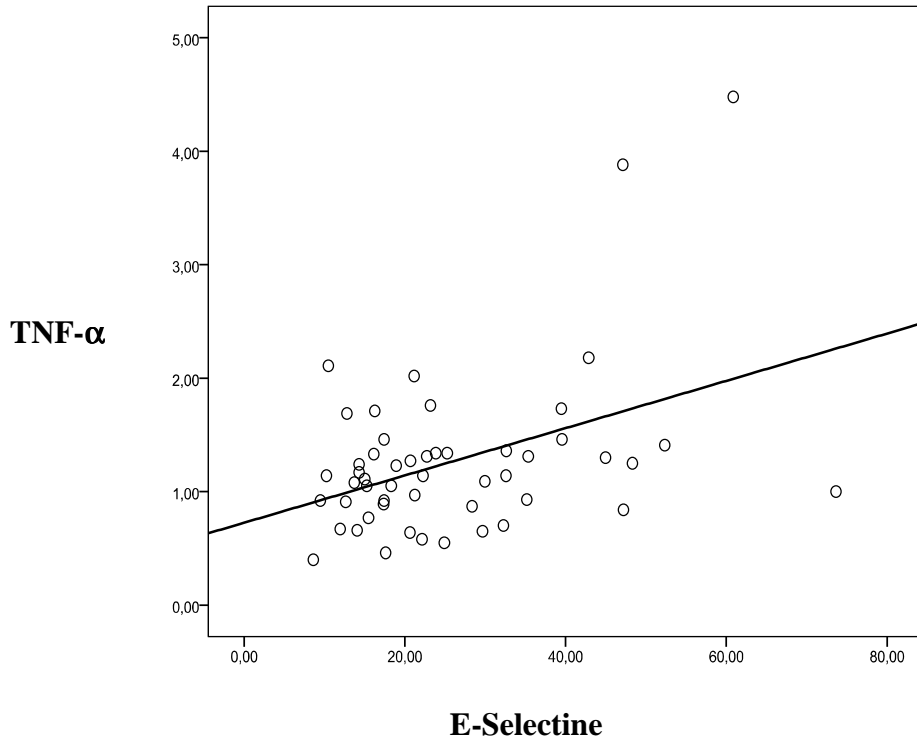


Fig.15A. Correlazione tra la concentrazione plasmatica di TNF α - e la concentrazione di E-selectine

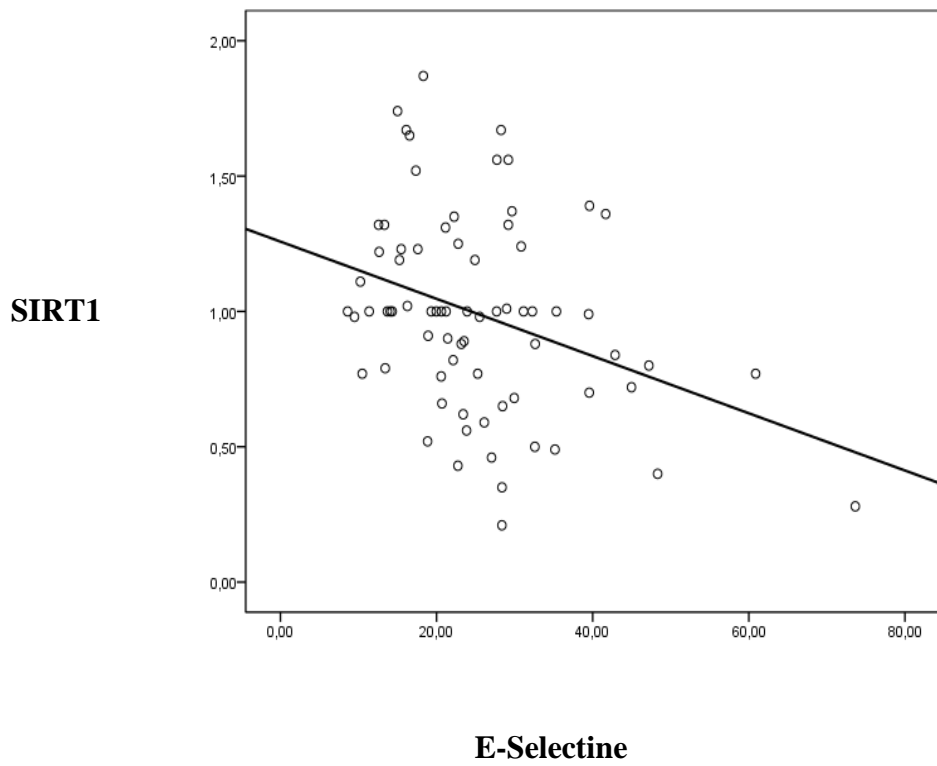


Fig 15B. Correlazione tra l'espressione genica di SIRT1 e la concentrazione plasmatica di E-selectine

2. ESPERIMENTI SU CELLULE HUVEC

Il TNF- α , una citochina che svolge un ruolo fondamentale nei processi infiammatori, è responsabile del rilascio della molecola d'adesione E-selectine dalle cellule endoteliali mediante attivazione della proteina NF-kB. I nostri dati, *in vivo*, dimostrano come il TNF- α e la E-selectine siano aumentati nel plasma dei soggetti con MetS rispetto a coloro che non ne sono affetti. Pertanto, in questa seconda parte, abbiamo voluto verificare gli effetti del trattamento, *in vitro*, nelle cellule endoteliali, del TNF- α sul rilascio di E-selectine, sull'espressione proteica di SIRT1 e di NF-kB, e sulla attivazione di NF-kB. Infine, abbiamo studiato l'interazione tra l'attivazione di SIRT1 indotta dal resveratrolo e l'attivazione di NF-kB indotta dal TNF- α e il conseguente rilascio di E-selectine.

2.1 EFFETTO DEL TNF- α SUL RILASCIO DELLE E-ELECTINE

Le cellule endoteliali sono state incubate con TNF- α a tempi diversi (da 0 a 48h) e il terreno di coltura è stato poi raccolto per il dosaggio di E-selectine.

La Figura 16 dimostra che E-selectine è significativamente aumentata già dopo le prime 6h di incubazione con TNF- α , raggiungendo un picco massimo di concentrazione a 24h ($23 \pm 1,6$ ng/ml).

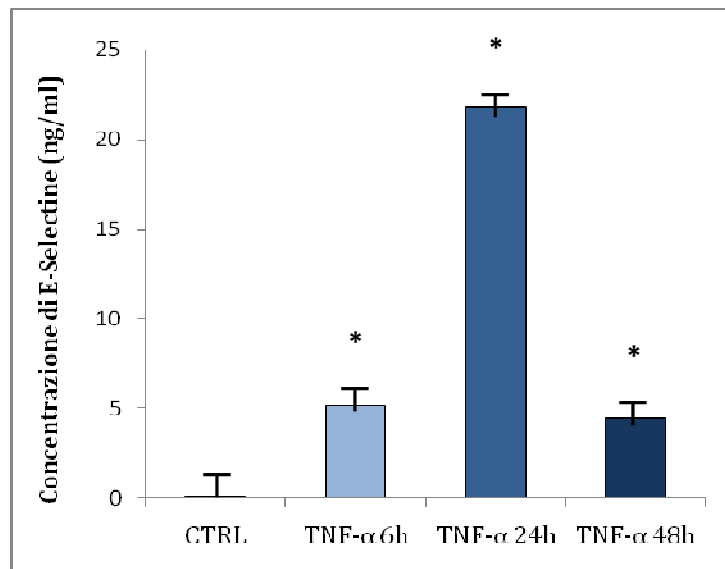


Figura 16. Valori di concentrazione di E-Selectine dopo stimolazione di cellule HUVEC con TNF- α 0.1 μ g/ml. Il dosaggio di E-selectine è stato determinato mediante kit ELISA. I valori sono espressi come Medie \pm ES; * p < 0.01, n=5.

2.2 EFFETTO DEL TNF- α SULL'ESPRESSIONE PROTEICA DI SIRT1 E DI NF- κ B

La Figura 17 mostra un Western Blot rappresentativo dell'espressione proteica di SIRT1 nelle cellule endoteliali trattate con TNF- α a diversi tempi: da 0 a 48h. Come si può notare, non sono presenti differenze di espressione di SIRT1 tra le cellule con TNF- α e il controllo (CTRL).

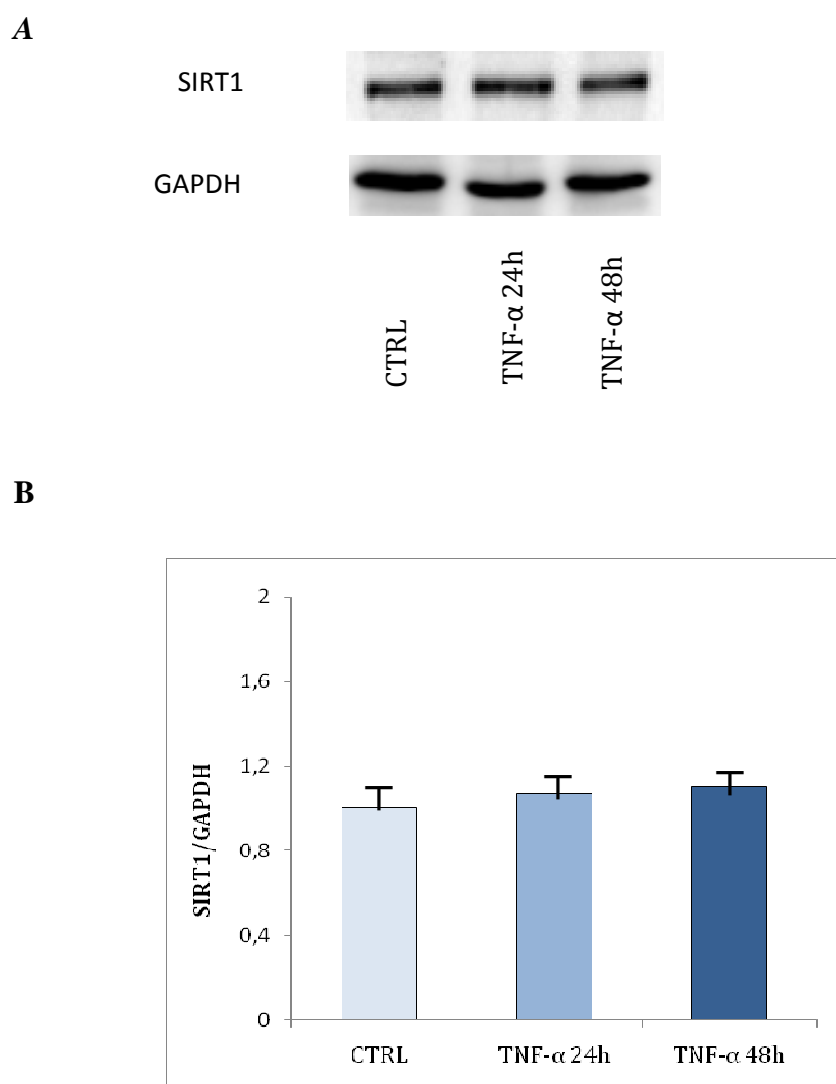


Figura 17. A) Western Blot rappresentativo dell'espressione proteica di SIRT1 in HUVEC stimulate con TNF- α 0.1 μ g/ml. B) Analisi densitometrica dell'espressione di SIRT1 nelle condizioni sopra elencate. I valori sono espressi come Medie \pm ES; * p < 0.01, n=5.

Risultati

Abbiamo poi studiato l'effetto di TNF- α sull'espressione proteica di NF-kB. L'anticorpo da noi utilizzato è il p105/p65, che permette di identificare la presenza di due bande che corrispondono alla subunità p105, precursore citoplasmatico della proteina, e alla subunità p65, prodotto di degradazione che agisce da fattore trascrizionale nucleare. La Figura 18 mostra un Western Blot rappresentativo dell'espressione di NF-kB nelle cellule endoteliali trattate con TNF- α a diversi tempi. Come si può vedere, l'espressione della subunità p65 della proteina NF-kB in cellule trattate con TNF- α dopo 24 ore è aumentata quasi del doppio rispetto al controllo per poi diminuire nel tempo.

A

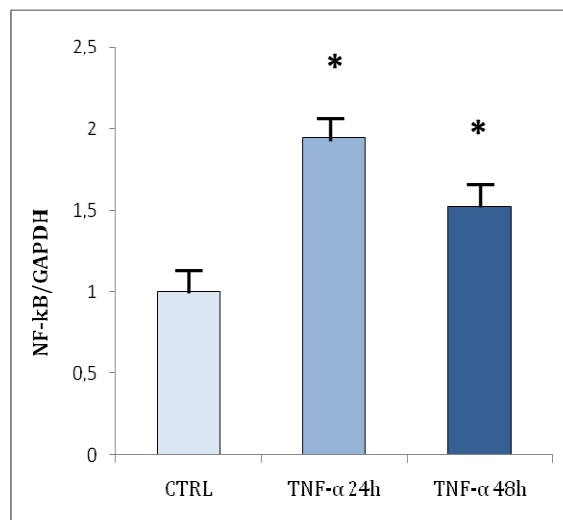
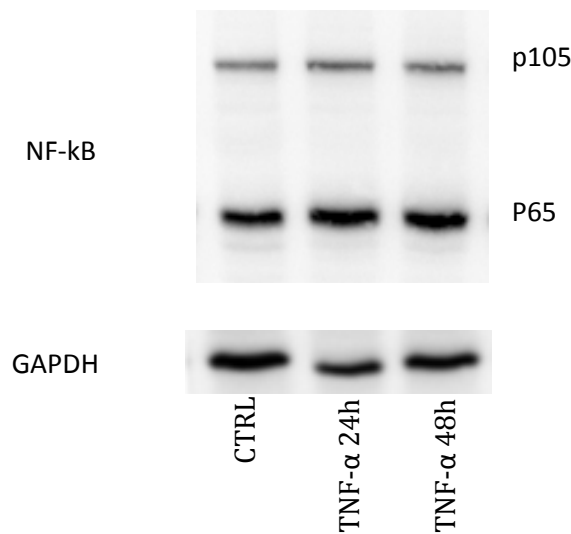


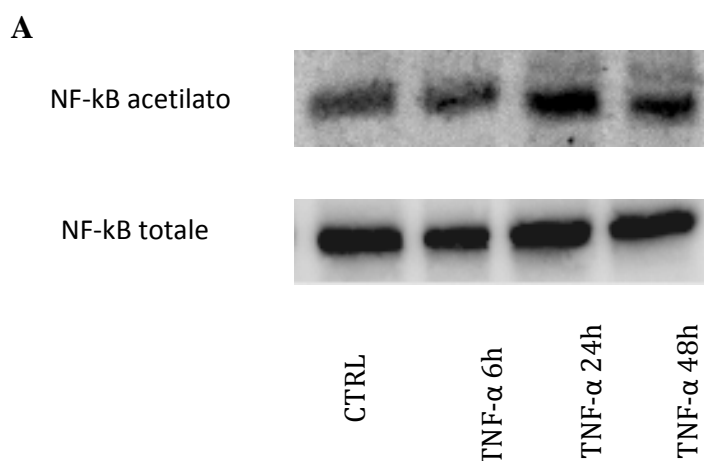
Figura 18. A) Western Blot rappresentativo dell'espressione proteica di NF-kB in cellule HUVEC stimulate con TNF- α 0.1 μ g/ml (n=5). B) Analisi densitometrica dell'espressione di NF-kB nelle condizioni sopra elencate. I valori sono espressi come Medie \pm ES; * p <0.01

2.3 ACETILAZIONE DI NF- κ B MEDIATA DA TNF- α ED EFFETTO DEL RESVERATROLO

L'acetilazione rappresenta uno dei meccanismi post-translazionali più importanti di attivazione del fattore NF- κ B. Gli enzimi acetiltransferasi (HATs) come la p300/CBP, sono responsabili dell'acetilazione della proteina sui residui lisinici, mentre gli enzimi deacetilasi (HDACs) hanno il compito di rimuovere il gruppo acetile dalle lisine di NF- κ B inattivando in questo modo la proteina. SIRT1 appartiene alla famiglia delle HDACs in quanto agisce deacetilando selettivamente i residui lisinici (Lys310), responsabili dell'attività trascrizionale di NF- κ B.

Uno dei nostri obiettivi è stato pertanto quello di valutare il livello di acetilazione di NF- κ B sui residui lisinici indotto dal TNF- α e di verificare se l'attivazione di SIRT1 potesse ridurre l'acetilazione di NF- κ B. Le cellule endoteliali sono state stimulate con TNF- α a diversi intervalli di tempo e i livelli di acetilazione sono stati misurati mediante immunoprecipitazione della subunità p65 della proteina NF κ B. Come mostra la Figura 19A, i livelli di acetilazione della subunità p65 aumentano significativamente dopo 24h di trattamento delle cellule endoteliali con TNF- α .

I valori ottenuti dall'analisi densitometrica sono stati poi rapportati alla quantità di NF- κ B totale, come mostra l'istogramma in Figura 19 B.



B

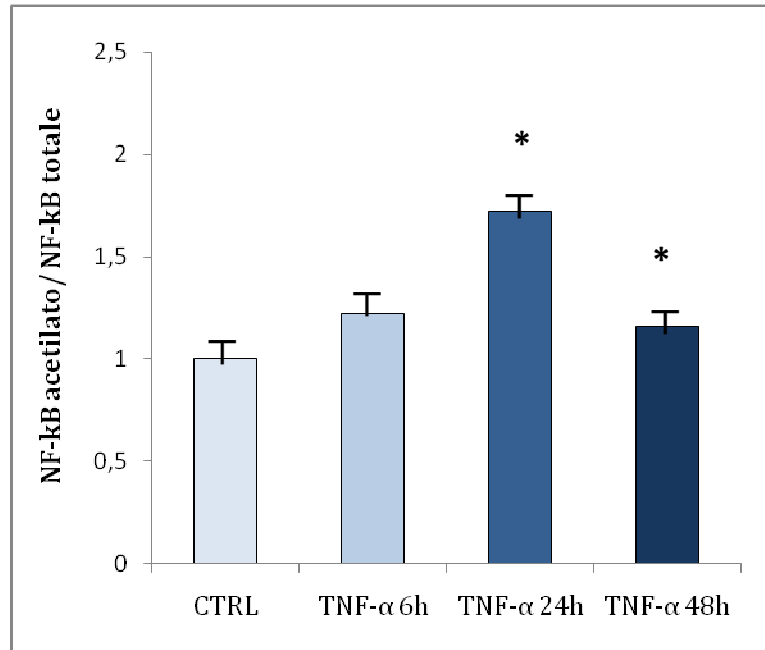
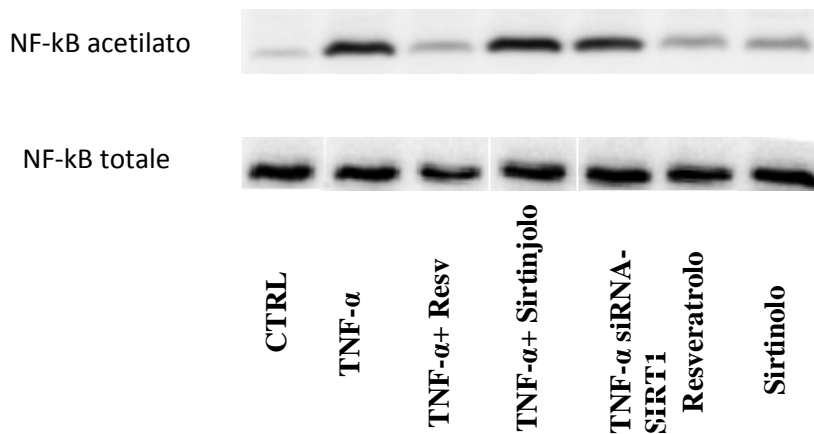


Figura 19. A) Western Blot dopo Immunoprecipitazione dell'acetilazione di NF-kB in cellule HUVEC stimulate con TNF- α (0.1 μ g/ml). B) Analisi densitometrica dell'acetilazione di NF-kB nelle condizioni sopra elencate. I valori sono espressi come Medie \pm ES; * p < 0.01, n=5.

Per verificare se l'attivazione di NF-kB, indotta dal TNF- α , possa essere modulata dall'attivazione di SIRT1, abbiamo trattato le cellule endoteliali con il resveratrolo, attivatore di SIRT1 e con il sirtinolo, inibitore di SIRT1. Pertanto, le cellule sono state trattate per 24h con TNF- α in presenza e in assenza di resveratrolo o di sirtinolo, e i livelli di acetilazione della subunità p65 della proteina NF-kB sono state misurate mediante immunoprecipitazione. Inoltre, abbiamo verificato l'effetto della acetilazione di NF-kB indotta dal TNF- α in cellule silenziate per il gene SIRT1 (siRNA SIRT1)



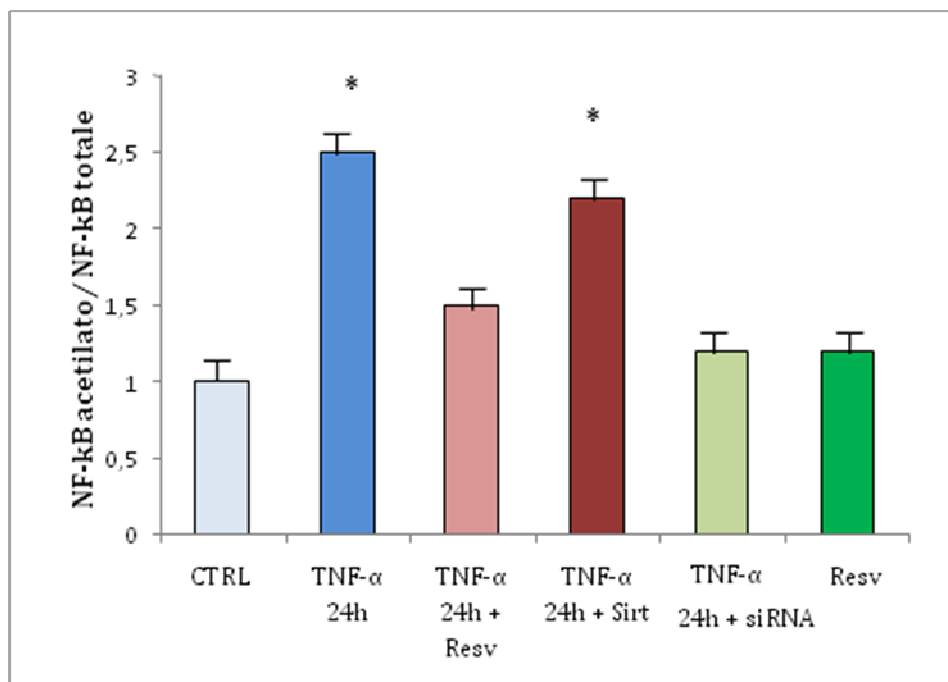


Figura 20. A) Western Blot dopo Immunoprecipitazione dell'acetilazione di NF-kB in cellule HUVEC stimulate con TNF- α 0.1 μ g/ml, sirtinolo 100nM e resveratrolo 100nM. B) Analisi densitometrica dell'acetilazione di NF-kB nelle condizioni elencate in figura. I valori sono espressi come Medie \pm ES; * p <0.01, n=5.

La Figura 20 mostra come il trattamento con resveratrolo riduca i livelli di acetilazione di NF-kB mentre il sirtinolo o in cellule silenziate del gene SIRT1 aboliscono questo effetto.

Questo risultato è ulteriormente confermato dal fatto che il rilascio di E-selectine, indotto dal TNF- α , viene significativamente ridotto dal trattamento delle cellule con resveratrolo, ma non nelle cellule silenziate per il gene SIRT1 (siRNA) (Figura 21). Pertanto, questi dati suggeriscono che l'attivazione di SIRT1 indotta da resveratrolo blocca gli effetti del TNF- α sul rilascio di E-selectine.

Risultati

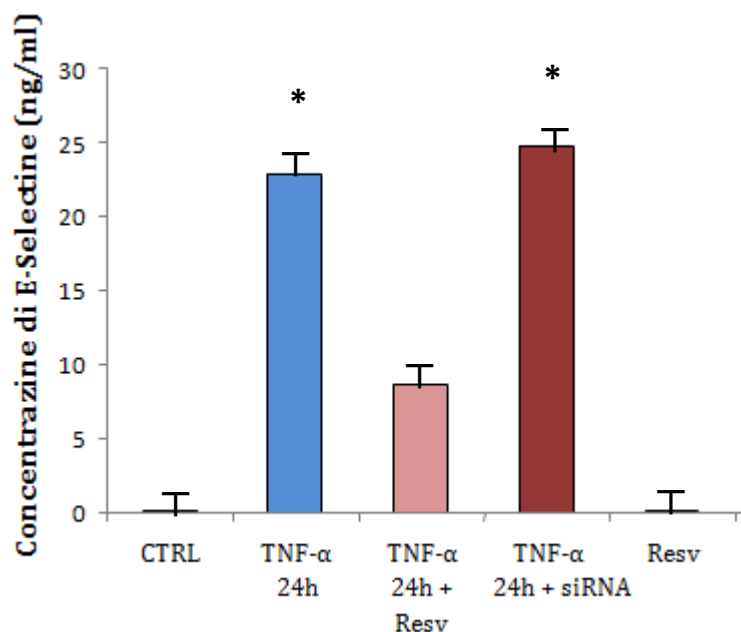


Figura 21. Valori di concentrazione di E-Selectine dopo stimolazione di cellule HUVEC con TNF- α 0.1 μ g/ml, con resveratrolo, e in cellule silenziate per SIRT1 (siRNA) (n=5). I valori sono espressi come Medie \pm ES; * p < 0.01

Infine, abbiamo verificato l'interazione tra il fattore trascrizionale NF- κ B e il promotore del gene E-selectine mediante immunoprecipitazione della cromatina (Chip-Chromatin Immunoprecipitation). Recenti studi hanno dimostrato che una sequenza detta CRR localizzata tra -156 a -66bp a monte del codone di inizio del gene che codifica la E-selectine è fondamentale per la sintesi di E-selectine indotta dalle citochine, come il TNF- α . (Fig.22 A) Questa regione del promotore contiene siti di legame per la proteina NF- κ B. Pertanto mediante la tecnica della immunoprecipitazione della cromatina abbiamo verificato l'interazione tra NF- κ B e il promotore del gene E-selectine indotta dal TNF- α in presenza o in assenza dell'attivatore di SIRT1, il resveratrolo. La Fig. 22B mostra che l'interazione tra NF- κ B e E-selectine viene attenuata quando le cellule vengono pretrattate con resveratrolo rispetto a quelle trattate solo con TNF- α .

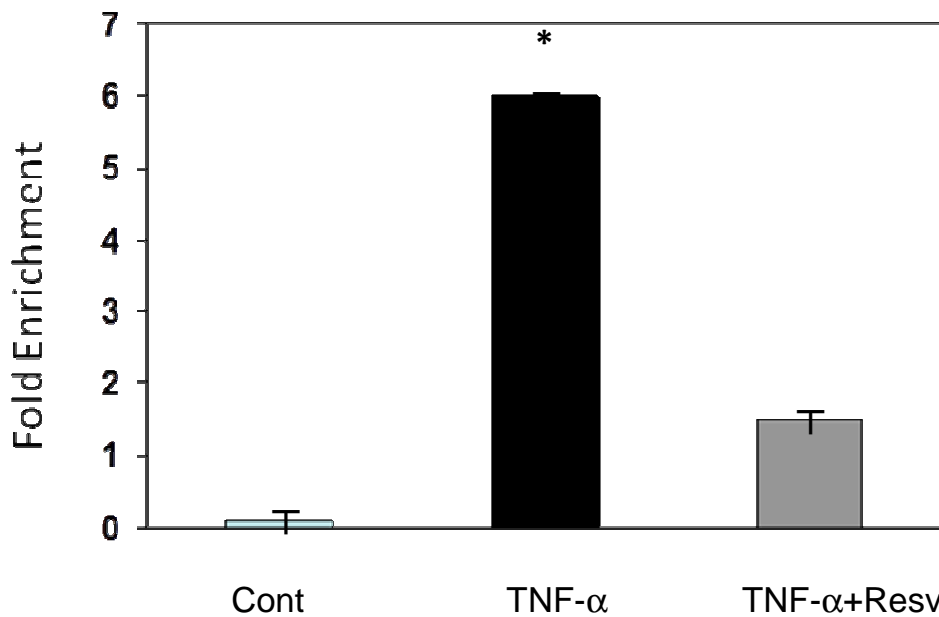
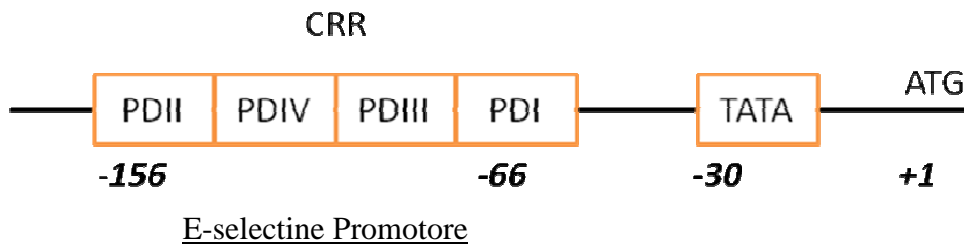


Figura 22. Saggio di immunoprecipitazione della cromatina. HUVEC sono state trattate con TNF- α per 24h in presenza e in assenza di resveratrolo. Poi, sono state trattate con formaldeide 1% in modo da fissare le proteine al DNA. La cromatina è stata immunoprecipitata con l'anticorpo anti-NF- κ B p65 e in assenza di anticorpo (IgG). Una reazione di PCR real time è stata allestita con primers che amplificano la regione del promotore E-selectine contenenti i siti di legame per il fattore trascrizionale NF- κ B. La normalizzazione dei dati ottenuti dalla PCR è stata eseguita mediante il metodo "fold enrichment" del segnale ottenuto dalla immunoprecipitazione della cromatina con l'anticorpo specifico rispetto a quello senza anticorpo (controllo negativo)

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio dimostrano che l'espressione di SIRT1 è ridotta nei linfomonociti di soggetti con MetS e si correla negativamente ai valori plasmatici di E-selectine. Questo risultato è confermato dagli studi *in vitro* che suggeriscono che l'attivazione di SIRT1 abbia un ruolo importante nella regolazione della secrezione della molecola di adesione E-selectine dalle cellule endoteliale mediante l'inibizione del fattore trascrizionale NF- κ B.

La riduzione dell'espressione di SIRT1 nei soggetti con MetS ha un importante significato clinico in quanto SIRT1 è coinvolta nei processi metabolici che ritardano l'invecchiamento⁵⁷ e aumentano la durata della vita⁵⁸, nell'omeostasi del glucosio⁵⁹, nella secrezione dell'insulina e nell'infiammazione. In particolare, SIRT1 regola numerosi attivatori e co-attivatori delle tappe metaboliche glucidiche, aumenta la lipolisi, a livello epatico interagisce con PPAR γ , coattivatore di enzimi della gluconeogenesi⁶⁰. Inoltre, SIRT1 è direttamente coinvolto nel *pathway* intracellulare dell'insulina ed è responsabile della diminuzione dello stato infiammatorio mediante deacetilazione di alcuni fattori trascrizionali pro-infiammatori.

Un aspetto importante del nostro studio è stato quello di verificare la relazione tra l'espressione di SIRT1 e i livelli plasmatici delle molecole di adesione che sono *markers* di infiammazione nella MetS. Tra le molecole di adesione da noi studiate, la concentrazione plasmatica di E-selectine è risultata essere aumentata in soggetti con MetS rispetto ad i non MetS, mentre le altre molecole di adesione, ICAM e V-CAM, non sono risultate essere significativamente differenti nei due gruppi.

La E-selectine è una molecole di adesione coinvolta nei processi flogistici che interviene nell'interazione adesiva tra leucociti ed endotelio. Questa proteina viene rilasciata dalle cellule endoteliali, mediante attivazione del fattore trascrizionale NF- κ B, dopo stimolazione con TNF- α ⁶¹. Infatti, la concentrazione plasmatica di TNF- α , citochina pro-infiammatoria, risulta essere aumentata nei soggetti con MetS rispetto a quelli che non ne sono affetti. Questo dato conferma lo stato infiammatorio presente nel quadro fisiopatologico della sindrome metabolica.

Discussione

L'esistenza di una correlazione tra SIRT1 ed E-Selectina, ma non con il TNF- α , suggerisce che SIRT1 sia coinvolta nella regolazione della secrezione di E-selectine e in qualche modo possa controbilanciare gli effetti del TNF- α .

In vitro, infatti, i nostri risultati dimostrano che la stimolazione delle cellule endoteliali con TNF- α :

1. induce un aumento di secrezione di E-selectine;
2. aumenta l'espressione proteica di NF-kB ma non quella di SIRT1;
3. incrementa i livelli di acetilazione della subunità p65 della proteina NF-kB.

Inoltre, abbiamo osservato che gli effetti del TNF- α sull'acetilazione di NF-kB e sul rilascio di E-selectine sono stati antagonizzati dall'attivazione di SIRT1 mediante il trattamento delle cellule con resveratrolo. Questi risultati dimostrano che vi è un'interazione specifica tra l'attivazione di SIRT1 e i meccanismi molecolari che portano alla secrezione di E-selectine.

La *Figura 1* rappresenta un ipotetico meccanismo di correlazione tra l'attivazione di SIRT1 e il rilascio di E-selectine e il suo possibile coinvolgimento nella sindrome metabolica.

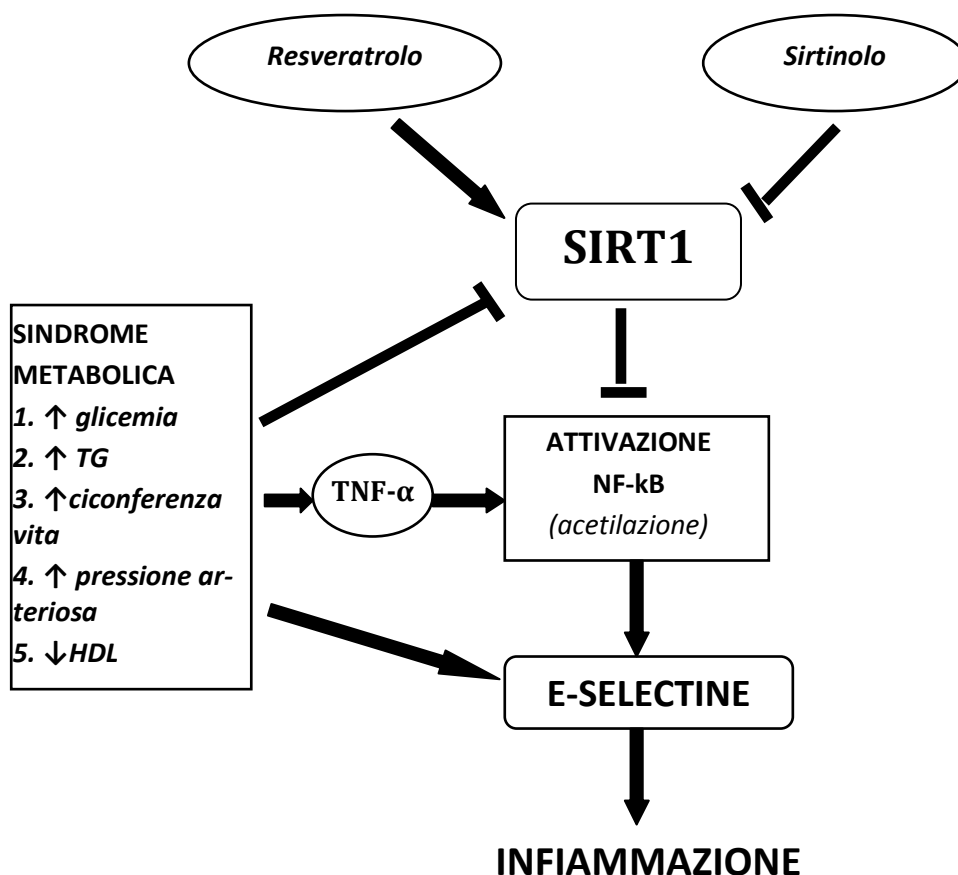


Figura 10. Meccanismo molecolare alla base dell'interazione tra SIRT1 ed E-selectine.

La Sindrome Metabolica è caratterizzata da un insieme di fattori di rischio che portano ad una riduzione dell'espressione di SIRT1, enzima ad attività deacetilasi che svolge la sua azione mediante deacetilazione di numerosi fattori di trascrizione, tra i quali NF-kB. Pertanto, la diminuzione di SIRT1 può favorire un aumento del grado di acetilazione di NF-kB indotta da uno stimolo infiammatorio, come il TNF- α e di conseguenza si ha un aumento del rilascio di E-selectine, grazie al legame dell'NF-kB stesso sul promotore della molecola di adesione.

Nelle cellule endoteliali il trattamento con il resveratrolo, attivatore di SIRT1, riduce i livelli di acetilazione di NF-kB, inibendo così la sua attivazione e il rilascio di E-selectine e comportando probabilmente una diminuzione dello stato infiammatorio sistemico. È noto infatti che il resveratrolo svolge un ruolo importante in numerosi processi fisiologici, tra i quali l'attivazione di proteine coinvolte nel metabolismo (come SIRT1 e AMPK)⁶²⁻⁶³; la diminuzione della sintesi di NO (di conseguenza di ipertensione in modelli animali)⁶⁴; la riduzione di radicali liberi

Discussione

(ROS), grazie all'attivazione di numerosi enzimi antiossidanti. Inoltre, è stato, dimostrato che la somministrazione in modelli animali di resveratrolo riduce la secrezione di citochine, interleuchine e proteina C reattiva, limitando il rischio di patologie infiammatorie⁶⁵⁻⁶⁶.

Di recente, infatti, alcune molecole, attivatori di SIRT1, con struttura simile e non a quella del resveratrolo, sono in fase di sperimentazione clinica per il trattamento di patologie cardiovascolari ed infiammatorie⁶⁷.

CONCLUSIONE

Questo studio offre importanti spunti sulle relazioni esistenti tra SIRT1, sindrome metabolica ed infiammazione e sulla possibilità che SIRT1 possa rappresentare un nuovo *marker* molecolare coinvolto nella regolazione del metabolismo cellulare e nella secrezione delle molecole di adesione.

Inoltre, SIRT1 può rappresentare un nuovo bersaglio farmacologico nel trattamento della sindrome metabolica associata alla infiammazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Kohli P, Greenlad P. *Role of the metabolic syndrome in risk assessment for coronary heart disease*. JAMA. 2006;295:819-821
2. Rader D.J. *Effect of insulin resistance, dyslipidemia, and intra-abdominal adiposity on the development of cardiovascular disease and diabetes mellitus*. The American Journal of medicine; 120.3 Suppl 1:S12-8. 2007
3. WHO Consultation. *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1999.
4. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. *Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)*. JAMA; 285: 2486-97, 2001.
5. Halle M., Berg A., Baumstark M.W., Konig D., Hounker M., Keul J. *Influence of mild to moderately elevated triglycerides on low density lipoprotein subfraction concentration and composition in healthy men with low high density lipoprotein cholesterol levels*. Atherosclerosis; 143: 185-92. 1999
6. Kannel W.B., Gordon T., Schwartz M.J. *Systolic vs. diastolic blood pressure and risk of coronary artery disease*. The Framingham Study. Am J Med; 27: 335-46. 1971.
7. Ferrara N, Corbi G, Scarpa D, Giuliano F, Scioli S, Longobardi G, Furgi G, Rengo F. *Ruolo dell'ipertensione nella sindrome metabolica*. G Gerontol; LII;5:353-359, 2004.

Bibliografia

8. Bonora E. *The Metabolic Syndrome and cardiovascular disease*. Annals of Medicines 38: 64-80, 2006.
9. Ridker PM, Wilson PW, Grundy SM. Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk? Circulation 15;2818-25,2004.
10. Salmenniemi U, Routsalainen E, Pihlajamäki J, Vauhkonen I, Kainulainen S, Punnonen K, et al. *Multiple Abnormalities in Glucose and Energy Metabolism and Coordinated Changes in Levels of Adiponectin, Cytokines, and Adhesion Molecules in Subjects With Metabolic Syndrome*. Circulation; 110: 3842-8, 2004.
11. Herder C, Brunner EJ, Rathmann W, Strassburger K, Tabák AG, Schloot NC, Witte DR. Elevated levels of the anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist precede the onset of type 2 diabetes: the Whitehall II study. Diabetes Care 32;421-3,2008.
12. Vykoukal D., Davies M.G. *Vascular biology of metabolic syndrome*. Journal of Vascular Surgery; 54: 819-831, 2011
13. Avogaro A. *La funzione endoteliale nel diabete mellito*. GIDM Rassegna; 23: 17-27, 2003.
14. Ferrero A., Ferroni F., Spinnler M.T. *Metabolic syndrome in the Cardiology Office: interpretation and management issues*. Cardiologia ambulatoriale; 2:63-67, Giugno 2008.
15. Tedder T. F., Steeber D. A., Chen A., Engel A. P. *The selectins: vascular adhesions molecules*. The FASEB Journal; 9: 866-873, Luglio 1995
16. Gearing Andrew J. H., Hemingway I., Pigcyit A.R., Hughes J., Rees A.J., Cashman J. *Soluble Forms of Vascular Adhesion Molecules, E-Selectin, ICAM-*

Bibliografia

- I, and VCAM-1: Pathological Significance. Annals New York Academy Of Sciences; 324-331, 2006*
17. Ley K., Huo Y., *VCAM-1 is critical in atherosclerosis. The Journal of Clinical Investigation. Vol. 107, n. 10: 1255–1262*
 18. Iademarco M. F., Barks J. L. and Dean D.C. *Regulation of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression by IL-4 and TNF- α in Cultured Endothelial Cells. The Journal of Clinical Investigation. 95(1): 264–271, 1995*
 19. Slack-Davis J.K., Atkins K.A., Harrer C., Hershey E.D., Conaway M., *Vascular cell adhesion molecule-1 is a regulator of ovarian cancer peritoneal metastasis. Cancer Res. 15;69(4):1469-76, 2009*
 20. Kansas G.S. *Selectins and Their Ligands: Current Concepts and Controversies. The Journal of The American Society of Hematology; 88: 3259-3287, 1996.*
 21. Leeuwenberg J. F. M., Smeets E. F., Neefjes J. J., Shaffert M. A., Cinek T., Jeunhomme T. M. A. A., Ahernt T. J., Buurman W. A. *E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. Immunology; 77: 543-549, 1992.*
 22. Binder FP, Ernst B., *E- and P-selectin: differences, similarities and implications for the design of P-selectin antagonists. Chimia (Aarau);65(4):210-3. 2011. Review*
 23. Michell DL, Andrews KL, Woollard KJ, Chin-Dusting JP., *Imaging leukocyte adhesion to the vascular endothelium at high intraluminal pressure. J Vis Exp. 23;(54). Agosto 2011*

Bibliografia

24. Miller M.A., Cappuccio F.P. *Cellular adhesion molecules and their relationship with measures of obesity and metabolic syndrome in a multiethnic population*. International Journal of Obesity; 30: 1176–1182, Marzo 2006
25. Wiese G, Barthel SR, Dimitroff CJ., *Analysis of physiologic E-selectin-mediated leukocyte rolling on microvascular endothelium*. Journal of Vis. Experiment 11;(24) 2009
26. Tergaonkar V. *NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target*. Int J Biochem Cell Biol.38(10):1647-53. 2006
27. Dooher JE, Paz-Priel I, Houg S, Baldwin AS Jr, Friedman AD., *Preferentially Bind NF- κ B p50 Compared with p65 Focusing Therapeutic Targeting on the C/EBP:p50 Interaction*. Mol Cancer Res. 2011
28. Tak P.P., Firestein G.S., *NF-kB: a key role in inflammatory diseases*. The Journal of Clinical Investigation, Vol.1; 107:7-11
29. Ranjan Sen¹ and Stephen T. Smale² *Selectivity of the NF-kB Response*. CSH Perspective in Biology, cap 2.2010
30. Kalia M, Kukol A., *Structure and dynamics of the kinase IKK- β - A key regulator of the NF-kappa B transcription factor*. J Struct Biol. 2011
31. Andrea L. True, Arshad Rahman and Asrar B. Malik, *Activation of NF-kB induced by H₂O₂ and TNF- α and its effects on ICAM-1 expression in endothelial cells* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279:L302-L311, 2000.
32. Brandi G., Pantaleo M.A., Biasco G., *Activated NF-kB in Colorectal Cancer: Predictive or Prognostic Factor?* Journal of Clinical Oncology, Vol 26, No 8: pp. 1388-1389. Marzo 2008

Bibliografia

33. Karin M, Greten FR: *NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression*. Nat Rev Immunol. 5:749-59. 2005
34. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S., *NF-kB, inflammation, and metabolic disease*. Cell Metab. 2011 Jan 5;13(1):11-22. Review.
35. Lanzillotta A., Boroni F., Sarnico I., Benarese M., Spano PF., Pizzi M. *Acetylation of NF-kappaB p50/p65 in the epigenetic regulation of transcription: a neuroprotective target in brain ischemia*. National Congress of the Italian Society of Neuroscience, September 2007, Verona, Italy.
36. Yeung F., Hoberg J.E., Ramsey C.S., Keller M.D., Jones D.R., Frye R.A. *Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase*. EMBO Journal; 23, 2369–2380, 2004
37. Taylor D. M., Maxwell M. M., Luthi-Carter R., Kazantsev A. G. *Biological and Potential Therapeutic Roles of Sirtuin Deacetylases*. Cell. Mol. Life Sci. 65 4000 – 4018. 2008
38. Michan S, Sinclair D. *Sirtuins in mammals: insights into their biological function*. Biochem. J.404:1–13. 2007
39. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, et al. *SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic β cells*. Cell.;126:941–954. 2006
40. Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. (2007) *Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1*. J. Biol. Chem. 282:6823–32

Bibliografia

41. Valter D. Longo, Kennedy B.K. *Sirtuins in aging and age-related disease*, Cell;126:257-268. 2006 Review
42. Marcia C. Haigis and Guarente L. *Mammalian Sirtuins-emerging roles in physiology, aging and calorie restriction*. Genes and development; 20:2913-2921. 2006 Review
43. Alejandro Vaquero *The conserved role of sirtuins in chromatin regulation*. Int. J. Dev. Biol. 53: 303-322. 2009
44. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. *Negative control of p53 by Sir2 α promotes cell survival under stress*. Cell.;107:137-148. 2001
45. Deng CX. *SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor?* Int. J. Biol. Sci. 5:147-52, 2009
46. Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L. *Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors*. Cell; 116: 551-563. 2004
47. . Tadahiro Kitamura, Jun Nakae, Yukari Kitamura, Yoshiaki Kido, William H. Biggs, Christopher V.E. Wright, Morris F. White, Karen C. Arden, and Domenico Accili *The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic β cell growth*. J Clin Invest; 110(12): 1839-1847, 2002
48. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, et al. *Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ* . Nature 429:771-76, 2004
49. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, et al. *Resveratrol improves mito-*

Bibliografia

- chondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α* . Cell;127:1109–1122, 2006
50. Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, Chen LF, Kwon H, Yi S, Mucke L, Gan L. *SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid- β toxicity through inhibiting NF- κ B signaling*. J. Biol. Chem.;280:40364–40374, 2005
51. Wood J.G, Sinclair D. et al., *Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in Metazoans*. Nature; 430, Agosto 2005
52. Blum A., Ellis J.L., Loh C., Yee Ng P., Perni R.B., Stein R.L. *SIRT1. Modulation as a Novel Approach to the Treatment of Diseases of Aging*, J. Med. Chem.;54 (2):417–432, 2011
53. Smith J.J., Kenney R.D., Gagne D.J., Frushour B.P., Ladd W., Galonek H.L., Israelian K., Song J., Razvadauskaite G., Lynch A.V., et al. *Small molecule activators of SIRT1 replicate signaling pathways triggered by calorie restriction in vivo*. BMC Syst Biol. 10: 3-31, 2010
54. Dai H., Kustigian L., Carney D., Case A., Considine T., Hubbard B., Perni R., Riera T., Szczepankiewicz B., Vlasuk G., Stein R. *SIRT1 activation by small molecules - kinetic and biophysical evidence for direct interaction of enzyme and activator*. J Biol Chem. 285(43):32695-703. Agosto 2010
55. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, et al. *Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes*. Nature, 450:712-716,2007
56. Vigili de Kreutzenberg S., Ceolotto G., Papparella I., Bortoluzzi A., Semplicini A., Dalla Man C., Cobelli C., Fadini G.P., Avogaro A. *Downregulation of the Longevity-Associated Protein Sirtuin 1 in Insulin Resistance and Metabolic Syndrome: Potential Biochemical Mechanisms*. Diabetes; 59: 1006-1015, Aprile 2010

Bibliografia

57. Westphal CH, Dipp MA, Guarente L., *A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging?* Trends Biochem Sci.;32(12):555-60, Dicembre 2007. Review
58. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA., *Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase.* Science. 16;305(5682):390-2. Giugno 2004
59. Orimo M., Minamino T., Miyauchi H., Tateno K., Okada S., Moriya J., Komuro I., *Protective role of SIRT1 in diabetic vascular dysfunction.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009 Jun;29(6):889-94. 2009
60. Rodgers J.T., Lerin C., Haas W., Gygi S.P., Spiegelman B.M., Puigserver P., *Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1.* Nature.;434(7029):113-8. 2005
61. Ray K.P., Farrow S., Daly M., Talabot F., Searle N., *Induction of the E-selectin promoter by interleukin 1 and tumour necrosis factor alpha, and inhibition by glucocorticoids.* Biochem J.;328 (Pt 2):707-15. 1997
62. Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K., *AMP-activated protein kinase inhibits NF-kB signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan.* J Mol Med (Berl). Jul;89(7):667-76. 2011
63. Wu Y., Li X., Zhu J.X., Xie W., Le W, Fan Z., Jankovic J., Pan T. *Resveratrol-Activated AMPK/SIRT1/Autophagy in Cellular Models of Parkinson's Disease.* Neurosignals. 2011;19(3):163-74.
64. Bhatt S.R., Lokhandwala M.F., Banday A.A. *Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension*

Bibliografía

- in spontaneously hypertensive rats*. Eur J Pharmacol. 2011 Sep 30;667(1-3):258-64
65. Sánchez-Fidalgo S., Cárdeno A., Villegas I., Talero E., de la Lastra C.A. *Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice*, Eur J. Pharmacol. 10;633(1-3):78-8. 2010
66. Yoshizaki T., Schenk S., Imamura T., Babendure J.L., Sonoda N., Bae E.J., Ohda Y., Lu M., Milne J.C., Westphal C., et al. *SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity*. Am J. Physiol Endocrinol Metab,298(3):E419-428. 2010
67. Guarente L. *Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome*. Nature; 444 (7121): 868-74, 2006. Review