



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA E BIOTECNOLOGIE**

**INDIRIZZO BIOTECNOLOGIE**

**CICLO XXII**

**EFFETTI CELLULA-SPECIFICI E COMPENSAZIONE  
FUNZIONALE DI EMILINA-1 E MULTIMERINA-2 NEL  
SISTEMA CARDIOVASCOLARE**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Giorgio Valle

**Supervisore :** Ch.mo Prof. Giorgio M. Bressan

**Dottorando :** Gaia Litteri



# INDICE

ABBREVIAZIONI	5
SOMMARIO	7
ABSTRACT	9
INTRODUZIONE	11
Matrice extracellulare, fibre elastiche e fattori di crescita	11
<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> (TGF- $\beta$ )	13
Superfamiglia EDEN	15
Emilina-1	16
Multimerina-2	17
MATERIALI E METODI	21
Creazione dei costrutti di DNA	21
Topi mutanti e transgenici	25
Caratterizzazione dei topi transgenici	26
Immunoistochimica	27
Microscopia elettronica	28
Colture cellulari, trasfezione e saggi funzionali	28
Western blotting	29
Misurazione della pressione sanguigna	29
Analisi bioinformatica	30
Analisi statistica	30
RISULTATI	31
Immunolocalizzazione di Emilina-1 e Multimerina-2 nei tessuti adulti	31
Approfondimento sullo studio del fenotipo vascolare di topi <i>Emilin1<sup>-/-</sup></i> e <i>Mmrn2<sup>-/-</sup></i>	32
Generazione delle linee di topi transgenici	33
Caratterizzazione delle linee di topi transgenici generati	34
Analisi del recupero del fenotipo cardiovascolare dei topi <i>Emilin1<sup>-/-</sup></i>	38
Analisi del recupero del fenotipo cardiovascolare dei topi <i>Mmrn2<sup>-/-</sup></i>	40
Studio della compensazione funzionale tra Emilina-1 e Multimerina-2	41

DISCUSSIONE	45
FIGURE	51
BIBLIOGRAFIA	92

# ABBREVIAZIONI

BMP: *bone morphogenic protein*

BSA: bovine serum albumine

C-terminale: carbossi terminale

E: età embrionale

GAG: glicosaminoglicano

gC1q: *globular C1q-like*

kb: kilo basi

kDa: kilo Dalton

LAP: *latency associated peptide*

LLC: *large latent complex*

LTBP: *latent TGF $\beta$ -binding protein*

MEC: matrice extracellulare

Neo<sup>R</sup>: resistenza alla neomicina

N-terminal: amino terminale

pb: paia di basi

PCR: *polimerase chain reaction*

PECAM: *Platelet endothelial cell adhesion molecule*

PGK: fosfoglicerato chinasi

SLC: *small latent complex*

TGF- $\beta$ : *transforming growth factor beta*

TNF: *tumor necrosis factor*



## SOMMARIO

La famiglia delle Emiline/Multimerine è costituita da glicoproteine della matrice extracellulare caratterizzate da una comune organizzazione strutturale multimodulare con la presenza di un dominio detto EMI, che ha la proprietà di inibire l'attività del fattore di crescita TGF- $\beta$ . Nei mammiferi essa comprende 4 membri, tra cui Emilina-1 e Multimerina-2, che, oltre all'organizzazione strutturale, condividono l'espressione nel sistema cardiovascolare, benché parzialmente sovrapponibile. Topi *Emilin1*<sup>-/-</sup> e *Mmrn2*<sup>-/-</sup> manifestano la presenza di un fenotipo cardiovascolare, caratterizzato da ipertensione arteriosa sistemica associata ad aumento delle resistenze vascolari periferiche e da riduzione del lume delle arterie. In entrambi i casi, il fenotipo è legato al ruolo delle due proteine come inibitori del TGF- $\beta$ 1. Inoltre, in topi *Emilin1*<sup>-/-</sup> i vasi mostrano alterazioni ultrastrutturali, rappresentate da frequenti zone di distacco delle cellule endoteliali dalla lamina elastica interna e da un notevole aumento di cellule muscolari lisce dalla morfologia alterata (cellule poco aderenti alle lamine elastiche con organelli membranosi espansi e talora condensazioni nucleari).

Nonostante queste proteine presentino omologie nell'organizzazione strutturale, parziali sovrapposizioni della distribuzione nel sistema cardiovascolare e una identica attività biochimica *in vitro* nella regolazione del TGF- $\beta$ 1, lo sviluppo di fenotipi simili in seguito ad inattivazione genica indica l'esistenza di sostanziali differenze tra le due molecole per cui una non è in grado di rimpiazzare la mancanza dell'altra. Le cause della mancata fisiologica compensazione funzionale possono essere molteplici.

Una consiste nella differenza di distribuzione di Emilina-1 e Multimerina-2 nei vasi, nei quali Multimerina-2 è espressa solo dall'endotelio, mentre Emilina-1 è prodotta dalle cellule endoteliali, dalle cellule muscolari lisce della media e dai fibroblasti dell'avventizia. Per comprendere quale contributo danno cellule endoteliali e cellule muscolari lisce vascolari nell'insorgenza del fenotipo cardiovascolare dei topi mutanti per Emilina-1 è stato studiato il recupero del fenotipo dei topi *Emilin1*<sup>-/-</sup> grazie all'espressione di costrutti transgenici in cui la trascrizione del cDNA di Emilina-1 è guidata da promotori specifici per cellule endoteliali o per cellule muscolari lisce. I risultati mostrano che l'espressione di Emilina-1 nelle cellule muscolari lisce è in grado di correggere l'ipertensione, il rimodellamento ipotrofico e le alterazioni ultrastrutturali della tonaca media, mentre non ha effetto sulle alterazioni ultrastrutturali delle cellule endoteliali. Al contrario, l'espressione della proteina nell'endotelio ripristina la normale

adesione delle cellule endoteliali alla lamina elastica interna, ma lascia inalterata l'ipertensione e i danni della tonaca media dei vasi arteriosi. Questi risultati suggeriscono che un corretto controllo della pressione sanguigna e della struttura della media richiedono l'espressione di Emilina-1 da parte delle cellule muscolari lisce, mentre la produzione della proteina da parte delle cellule endoteliali ha una funzione al momento sconosciuta.

Le indagini rivolte alla comprensione dell'assenza di fisiologica compensazione funzionale tra Emilina-1 e Multimerina-1 riguardano le cellule endoteliali, unico tipo di cellule da cui sono prodotte entrambe le proteine. In questo distretto, né la sintesi fisiologica di Emilina-1 né la sua sovraespressione sono sufficienti per sostituire le funzioni di Multimerina-2 quando assente. Infatti, in esperimenti finalizzati allo studio del recupero del fenotipo dei topi *Mmrn2*<sup>-/-</sup> mediante espressione di un transgene che sovraesprime il cDNA di Emilina-1, non abbiamo osservato ripristino dei normali valori di pressione arteriosa, concludendo che la mancanza di compensazione non è dovuta ad insufficiente produzione di Emilina-1 dall'endotelio. Questi risultati portano a ipotizzare l'esistenza di differenze funzionali tra Emilina-1 e Multimerina-2 legate a regioni strutturali diverse dal dominio EMI, che per le due proteine ha *in vitro* la stessa funzione. È possibile che differenze di sequenza e/o struttura ne regolino diversamente i processi di biosintesi o le proprietà di interazione con altre molecole o i processi di aggregazione sovramolecolare rendendo Emilina-1 e Multimerina-2 geneticamente non ridondanti.

## ABSTRACT

Emilin/Multimerin family consists of extracellular matrix glycoproteins with a common multimodular structural organization. In mammals four proteins belong to this family and two of these are Emilin-1 and Multimerin-2. They have a particularly domain called EMI with TGF- $\beta$  inhibitory activity. These proteins share structural organization and partially cardiovascular expression. *Emilin1*<sup>-/-</sup> e *Mmrn2*<sup>-/-</sup> mice show a cardiovascular phenotype characterized by reduction of arterial calibre and systemic arterial hypertension caused by increase of peripheral vascular resistances. This phenotype is linked to the inhibitory role of Emilin-1 and Multimerin-2 in TGF- $\beta$ 1 processing. Moreover, vessels of *Emilin1*<sup>-/-</sup> mice have ultrastructural alterations, represented by defective anchorage of endothelial cells to inner elastic lamina and notable increase of smooth muscle cells with abnormal morphology (cells are detached from elastic lamellae and exhibit enlarged organelles and sometimes condensed chromatin).

Although these proteins share similarities in structural organization and cardiovascular distribution and, *in vitro*, they have the same biochemical activity in the regulation of TGF- $\beta$ 1 processing, the existence of a *knockout* phenotype indicates that the two proteins cannot compensate for each other. Causes for lack of functional compensation could be various.

One is the different localization of Emilin-1 and Multimerin-2 in arterial vessels. Here Multimerin-2 is expressed only in the endothelium whereas Emilin-1 is secreted by endothelial cells, smooth muscle cells and adventitia fibroblasts. To understand endothelial and muscular contribution in the cardiovascular phenotype of Emilin-1 *knockout* mice, we have studied phenotype rescue by expressing transgenes that drive expression of Emilin-1 cDNA only in endothelial or smooth muscle cells. We have found that Emilin-1 expression by vascular smooth muscle cells recovers hypertension, hypotrophic remodelling and ultrastructural changes of tunica media, but it does not improve endothelial ultrastructural alterations. Instead, protein expression by endothelium rescues normal anchorage of endothelial cells to inner elastic lamina, but it does not recover hypertension and smooth muscle cell damages. Our results suggest that Emilin-1 expression is required in vascular smooth muscle cells to maintain normal blood pressure and tunica media structure of arterial vessels, while the function of the protein produced by endothelial cells is presently unknown.

To analyse reasons of physiological lack of functional compensation between Emilin-1 and Multimerin-2, we have chosen to study especially endothelial cells, because they produce both

proteins. In this region, Multimerin-2 deficiency is not compensated by Emilin-1 physiological synthesis or overexpression. In fact, overexpression of Emilin-1 cDNA in the endothelium does not restore normal blood pressure in *Mmrn2*<sup>-/-</sup> mice. These results suggest the existence of functional differences between Emilin-1 and Multimerin-2 linked to structural regions different from EMI domain, the region responsible for the TGF- $\beta$  inhibitory activity. Probably, Emilin-1 and Multimerin-2 sequential and/or structural diversities differentially regulate their processing or interactions with other molecules or the multimeric aggregation within the extracellular matrix.

# INTRODUZIONE

## MATRICE EXTRACELLULARE, FIBRE ELASTICHE E FATTORI DI CRESCITA

Emilina-1 e Multimerina-2 sono glicoproteine secrete che si depositano sotto forma di aggregati nella matrice extracellulare (MEC). La MEC è una struttura presente nei tessuti connettivi, costituita da varie proteine secrete dalle cellule e finemente organizzate in una rete tridimensionale. Notoriamente, i componenti della MEC svolgono funzioni di stabilizzazione della struttura fisica, definizione delle proprietà meccaniche e mantenimento dell'omeostasi dei tessuti. Negli ultimi anni inoltre è stato scoperto che proteine e strutture della MEC hanno un ruolo determinante nel regolare differenziamento, proliferazione, sopravvivenza, polarità e migrazione cellulare grazie al loro ruolo nell'adesione e nella segnalazione alle cellule mediata da recettori di adesione come le integrine (Hynes, 2002; Legate et al., 2009) e alle loro caratteristiche meccaniche che influenzano il comportamento cellulare (Discher et al., 2009). Tra l'altro, molti componenti della MEC possono legare e modulare l'attività di diversi fattori di crescita, tra cui TGF- $\beta$  e BMP (Zhu et al., 1999; Rifkin, 2005), per cui stabiliscono dei gradienti che hanno ruoli essenziali nei processi di sviluppo dei diversi compartimenti dell'organismo (Hynes, 2009).

Nella MEC di tessuti sottoposti a particolare stress meccanico, tra cui cute, polmoni e grossi vasi arteriosi, alcune proteine si organizzano a formare strutture più complesse chiamate fibre elastiche, che conferiscono elasticità ed estensibilità. Esse sono formate da due componenti morfologicamente distinti: un grosso nucleo amorfo costituito principalmente da Elastina, formata dalla polimerizzazione del monomero secreto di tropoelastina; strutture microfibrillari altamente organizzate attorno al nucleo centrale e formate principalmente da Fibrillina-1 e Fibrillina-2 (Wagenseil e Mecham, 2007). Numerosi altri componenti sono associati alle fibre elastiche, tra cui *Microfibril Associated Glycoprotein* -1 e -2 (MAGP); Fibuline -1, -2, -3, -4 e -5; *Latent TGF- $\beta$  Binding Protein* (LTBP) -1, -2, -3 e -4; Emilina-1 (Kielty et al., 2002). Nell'uomo mutazioni ai geni dei componenti delle fibre elastiche sono spesso associate a malattie che coinvolgono il sistema cardiovascolare, respiratorio e/o cutaneo (Urban et al., 2002; Judge e Dietz, 2005), causate certamente da alterazioni strutturali delle fibre elastiche, ma non solo. Con la scoperta che i componenti della MEC si comportano in casi sempre più documentati

da segnalatori per l'attività cellulare e da regolatori della biodisponibilità di fattori di crescita, con l'essenziale contributo degli studi condotti su topi mutanti, oggi per alcune di queste manifestazioni fenotipiche si conoscono anche le cause biomolecolari.

Topi *knockout* per Elastina, muoiono entro quattro giorni dalla nascita per occlusione arteriosa causata da eccessiva proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari ed accumulo di materiale di matrice nella tonaca media (Li et al., 1998). I topi eterozigoti per la mutazione nulla sopravvivono, nonostante abbiano sostanziale ipertensione, che si sviluppa già negli ultimi giorni prima della nascita ed è causata da diminuzione del diametro dei vasi che hanno la parete più sottile, proprietà meccaniche alterate e aumento delle unità lamellari (Faury et al., 2003; Wagenseil et al., 2005). Queste alterazioni sembrano essere dovute alla mancata inibizione da parte di Elastina della proliferazione cellulare, per un meccanismo mediato da recettori accoppiati a proteine G (Karnik et al., 2003). Anche topi mutanti per Fibulina-4 e Fibulina-5 manifestano difetti nella formazione delle fibre elastiche con conseguenti tortuosità nell'andamento dell'aorta, danni alla funzionalità polmonare e alterazioni cutanee, enfatizzando il ruolo che queste proteine hanno nell'assemblaggio delle fibre elastiche (de Vega et al., 2009). I topi *Fbln5*<sup>-/-</sup> manifestano anche ipertensione sistolica dovuta a ridotta *compliance* dell'aorta (Yanagisawa et al., 2002) e significativo aumento della gemmazione di nuovi vasi, probabilmente causati da aumentata proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari, di cui Fibulina-5 potrebbe essere un modulatore (de Vega et al., 2009). Fenotipo ipertensivo con riduzione del diametro dei vasi si osserva anche in topi *Emilin1*<sup>-/-</sup> (Zacchigna et al., 2006), che inoltre manifestano alterazioni alle fibre elastiche di aorta e pelle (Zanetti et al., 2004), essendo Emilina-1 localizzata all'interfaccia tra il nucleo amorfo e le microfibrille delle fibre elastiche (Bressan et al., 1993). Chiaramente l'ipertensione di questi topi è direttamente causata da alterazioni al processo di maturazione del TGF- $\beta$ 1, per cui Emilina-1 è un inibitore. Dimezzamento *in vivo* del dosaggio genico di TGF- $\beta$ 1 infatti recupera il fenotipo dei topi mutanti (Zacchigna et al., 2006).

È stato dimostrato che la segnalazione dei TGF- $\beta$  è coinvolta nella regolazione di molti processi, tra cui lo sviluppo e l'omeostasi del sistema cardiovascolare (Wharton e Derynck, 2009) e che, nell'uomo, i livelli di TGF- $\beta$  nel sangue e la presenza di alcuni polimorfismi genici sono correlati ad ipertensione (Suthanthiran et al., 2000; Cambien et al., 1996). Topi mutanti per Smad6, proteina che inibisce la segnalazione intracellulare del TGF- $\beta$  attivo, manifestano anch'essi elevati valori pressori (Galvin et al., 2000).

Tuttavia anche Fibrillina-1 modula l'attivazione del TGF- $\beta$ , benché i topi *Fbn1*<sup>-/-</sup> non manifestano ipertensione. Nell'uomo mutazioni al gene della Fibrillina-1 sono responsabili della sindrome di Marfan, una malattia del tessuto connettivo che si manifesta principalmente con aneurisma dell'aorta, dislocazioni del cristallino, crescita anomala delle ossa lunghe e in alcuni casi enfisema polmonare (Judge e Dietz, 2005). I topi *knockout* per la Fibrillina-1 muoiono entro due settimane dalla nascita per complicazioni vascolari e polmonari simili ai tratti fenotipici della malattia umana, tra cui aneurisma dell'aorta, nella cui parete le fibre elastiche sono sottili e frammentate, ed enfisema polmonare (Carta et al., 2006). Questo fenotipo era stato originariamente attribuito alle conseguenze meccaniche dei difetti strutturali, ma oggi, con la scoperta che Fibrillina-1 interagisce con le LTBP modulando l'attivazione del TGF- $\beta$ , si sa che questo morfogeno ha un ruolo fondamentale nel causare le manifestazioni patologiche. Nei topi mutanti si osserva eccessiva attivazione della sua segnalazione e molti dei tratti fenotipici possono essere migliorati con la somministrazione di antagonisti del TGF- $\beta$  (Ramirez e Dietz, 2009).

I dati sperimentali suggeriscono quindi che molti componenti delle fibre elastiche si comportano da modulatori chiave per le funzioni delle cellule vascolari e che, mediante questa azione, sono coinvolti nella regolazione del rimodellamento strutturale dei vasi e nel mantenimento di importanti parametri fisiologici, tra cui la pressione sanguigna.

## ***TRANSFORMING GROWTH FACTOR $\beta$ (TGF- $\beta$ )***

I TGF- $\beta$  appartengono ad una vasta famiglia di citochine secrete, conservate nell'evoluzione, che si comportano da fattori di crescita con ruoli determinanti in molti processi biologici durante lo sviluppo embrionale e nell'adulto. Infatti, alterazione dei processi coinvolti nella loro sintesi, secrezione, maturazione e/o attivazione e alterazione dei meccanismi di segnalazione intracellulare sono implicate in molte patologie umane, tra cui tumori, fibrosi, malattie cardiovascolari e autoimmuni (Wharton e Derynck, 2009). Mediante esperimenti di *gene targeting* sono stati generati topi mutanti che hanno permesso di intuire il loro ruolo regolatore nei processi di morfogenesi cardiovascolare. In topi con assetto genetico nullo per TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2 è stato infatti osservato un elevato tasso di letalità embrionale o perinatale causato rispettivamente da difetti nei processi di ematopoiesi e differenziamento endoteliale nei tessuti extraembrionali e malformazioni cardiache (Dickson et al., 1995; Bartram et al., 2001). Inoltre la mancanza di altri componenti coinvolti nella segnalazione dei TGF- $\beta$  (recettori e trasduttori

intracellulari) è causa di anomala formazione dei primitivi plessi vascolari con alterata integrità della parete dei vasi (Goumans et al., 2009).

Nei mammiferi sono presenti tre isoforme di TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3); esse sono secrete in forma latente che deve essere attivata prima di legare il recettore per avviare la segnalazione intracellulare (Annes et al., 2003). Il processo proteolitico di maturazione comincia nel citoplasma dove il pre-pro-TGF- $\beta$  perde il proprio peptide segnale; la forma pro- rimasta dimerizza e convertasi furiniche tagliano un peptide all'estremità N-terminale, conosciuto come LAP (*Latency Associated Peptide*). Dopo il taglio, sia nelle vescicole di secrezione che nello spazio extracellulare, il LAP rimane associato con legami non covalenti al TGF- $\beta$  maturo e questo complesso è chiamato SLC, *Small Latent Complex* (Beck et al., 2002), incapace di legare i recettori di superficie cellulare (ten Dijke e Arthur, 2007). Lo SLC covalentemente si lega alle LTBP (*Latent TGF- $\beta$  Binding Proteins*) per formare il *Large Latent Complex* (LLC) (Saharinen et al., 1996), che interagisce con proteine di matrice, tra cui fibrilline e fibronectine (ten Dijke e Arthur, 2007). Per essere attivato il TGF- $\beta$  deve essere incorporato sotto forma di LLC nella MEC, dove in seguito a diversi meccanismi è convertito nella forma biologicamente attiva. TGF- $\beta$  è attivato quando è rilasciato dal LLC; questo processo può essere dovuto alla degradazione delle proteine di matrice che lo legano (per esempio fibrilline o direttamente le LTBP) oppure a taglio proteolitico o cambio di conformazione del LAP, che può essere indotto anche dall'interazione con altre proteine di matrice (per esempio Trombospondina-1) o con molecole di superficie cellulare (ad esempio integrine  $\alpha$  $\nu$  $\beta$  $_6$  e  $\alpha$  $\nu$  $\beta$  $_8$ ) (Hynes, 2009). I recettori per il TGF- $\beta$ , di tipo I e di tipo II, sono proteine transmembrana con attività serin/treonin chinasi (Schmierer e Hill, 2007). Quando TGF- $\beta$  lega il proprio recettore induce la formazione di un complesso eteromero in cui il dominio chinasi costitutivamente attivo del recettore di tipo II transfosforila il recettore di tipo I, che viene attivato. Esso propaga il segnale nel citoplasma cellulare attraverso la fosforilazione di proteine trasduttrici del segnale, chiamate *receptor-regulated* (R-) Smad2 e Smad3. Le R-Smad attivate formano un complesso eteromero con una Smad comune (Co-Smad4 nei mammiferi) che è accumulato nel nucleo dove può legare elementi promotoriali del DNA e/o agire da fattore di trascrizione, co-attivatore e co-repressore (Moustakas e Heldin, 2009).

I processi biologici regolati dal TGF- $\beta$  sono molteplici, perciò le vie di segnalazione attivate dal ligando sono allo stesso tempo diverse, ma molto specifiche. Per assicurare che ciò avvenga esistono differenti e molteplici meccanismi di regolazione della sua segnalazione (ten Dijke e Arthur, 2007). Anche Emilina-1 è un precoce regolatore extracellulare dell'attività del TGF- $\beta$ 1;

legando con il proprio dominio EMI il pro-TGF- $\beta$ 1 ne previene la maturazione da taglio enzimatico delle convertasi furiniche (Zacchigna et al., 2006).

## **SUPERFAMIGLIA EDEN**

La superfamiglia EDEN (*Emi Domain ENdowed*) è costituita da proteine della MEC che condividono la presenza di un particolare dominio strutturale, il dominio EMI, molto probabilmente comparso durante l'evoluzione dei vertebrati (Doliana et al., 2000; M. Milanetto e Paolo Bonaldo, dati non pubblicati). Esso fu originariamente identificato nella porzione N-terminale dell'Emilina-1 (Doliana et al., 1999) ed è una sequenza ricca di cisteine, con una parziale sequenza consenso EGF-*like*. Altre proteine (ad esempio Fibrillina-1) hanno domini ricchi di cisteine ma solo il dominio EMI ne ha sette (C1-C7), molto conservate, contro le sei o otto solitamente presenti. La similarità tra i domini EMI delle diverse proteine umane e murine è mediamente del 60%. La sua lunghezza varia, ma la distanza tra le cisteine è costante; un'eccezione è rappresentata dalla seconda cisteina, che per esempio in Multimerina-2 è spostata di quattro posizioni verso il C-terminale. Oltre ai residui cisteinici, anche la sequenza WRCCPG(Y/F)xGxxC di residui aromatici ed idrofobici è molto conservata ed è stata riscontrata finora solo nel dominio EMI (Doliana et al., 2000).

La EDEN è composta nei mammiferi da sette proteine a loro volta raggruppate in tre diverse famiglie: le Emiline/Multimerine, le Emiline tronche e le EMU (Braghetta et al., 2004; figura 1). Nel corso degli anni, i nomi dei membri di questa superfamiglia hanno subito diversi cambiamenti; la nomenclatura adesso adottata è consultabile all'indirizzo <http://www.genenames.org/genefamily/emilin.html>.

Emilina-1 e Multimerina-2 appartengono alla famiglia delle Emiline/Multimerine, caratterizzata da un comune arrangiamento dei domini strutturali. A partire dall'estremità N-terminale esse presentano il peptide segnale per la secrezione nell'ambiente extracellulare, il dominio EMI, una regione di circa 700 amminoacidi con elevata probabilità a formare strutture di tipo *coiled-coil* e/o collageniche compatibili con la formazione di omotrimeri, il dominio gC1q (*globular C1q-like domain*) (Colombatti et al., 2000). Quest'ultimo è presente in numerose proteine secrete ed ha un aspetto compatto per formazione di strutture a foglietto  $\beta$ . La sua struttura è simile a quella del dominio THD (*TNF homology domain*) delle proteine della famiglia dei *Tumor Necrosis Factor* (TNF). Esiste quindi un legame evoluzionistico che ha permesso di definire la superfamiglia gC1q/TNF (Kishore et al., 2004) a cui Emilina-1 e Multimerina-2 appartengono.

L'insieme dei dati di comparazione delle sequenze e le similarità strutturali suggeriscono possibilità di ridondanza genica e compensazione funzionale tra i membri della famiglia. Inoltre, studi sulla loro espressione genica a diversi stadi di sviluppo hanno permesso di dimostrare che in alcuni casi le diverse Emilina/Multimerine hanno distribuzione sovrapponibile.

## **Emilina-1**

Inizialmente isolata da estratti di aorta di pulcino e denominata gp115 (Bressan et al., 1983), più tardi fu rinominata Emilina (*Elastin Microfibril Interface Located proteIN*), perché localizzata nelle fibre elastiche all'interfaccia tra il nucleo di elastina e le microfibrille (Bressan et al., 1993), e poi Emilina-1 in seguito all'identificazione di altre proteine a struttura simile.

Il gene *Emilin1*, costituito da otto esoni e nove introni, è localizzato nel cromosoma 5, banda B1. All'estremità 5' è fiancheggiato dal gene *2310016E03Rik* con orientamento testa-testa; all'estremità 3' la sequenza di poliadenilazione è circa 650 pb distante dal gene *Khk*. Saggi di attività promotoriale, studi dei siti ipersensibili alla *DNasiI*, comparazioni di sequenze e studi di espressione genica in topi transgenici per il gene *lacZ* hanno chiarito l'organizzazione della regione regolatoria di *Emilin1*, costituita dal promotore basale, da *enhancer* presenti sia nella regione fiancheggiante in 5' che nel gene stesso, e da un silenziatore, a monte del sito di inizio trascrizione, che ne limita l'espressione ectopica. Inoltre, l'espressione genica sembra essere controllata dall'attività cooperativa di più elementi regolatori piuttosto che dipendere da singoli elementi attivanti in *cis*, specifici per i singoli tessuti (Fabbro et al., 2005).

La proteina è costituita da 996 amminoacidi, prodotta come polipeptide di 90 kDa, glicosilato per formare la proteina matura di 115 kDa, che è secreta nella MEC dove si assembla a formare omotrimeri e multimeri ad alto peso molecolare, che si depositano nella MEC formando una rete di fibre (Mongiati et al., 2000). Ha la struttura multimodulare delle proteine della famiglia delle Emilina/Multimerine, ma nella regione centrale sono presenti anche due domini *leucine zipper* e un breve segmento collagenico, compatibili con la formazione di omotrimeri a cui conferiscono maggiore stabilità (Doliana et al., 1999; Mongiati et al., 2000). Anche il dominio gC1q sembra coinvolto nel processo di multimerizzazione oltre che essere responsabile del peculiare legame di Emilina-1 alle cellule muscolari lisce mediante l'integrina  $\alpha_4\beta_1$  (Spessotto et al., 2003; Verdone et al., 2008).

Studi di espressione in topo hanno dimostrato che l'mRNA è trascritto durante lo sviluppo embrionale in molti tessuti interstiziali ed abbondantemente nel sistema cardiovascolare, dove la sua espressione comincia in associazione coi vasi per poi estendersi nel cuore. Durante la vita

postnatale e nell'adulto l'mRNA è abbondante in vasi e cuore oltre che in utero, polmoni, rene e milza (Braghetta et al., 2002). La precoce produzione di Emilina-1 durante lo sviluppo dell'aorta, in cui è associata alle microfibrille in maturazione delle fibre elastiche, hanno indotto a studiarne il ruolo nell'elastogenesi, in cui risulta coinvolta (Bressan et al., 1993). Infatti i topi *knockout* presentano le lamine elastiche dei grossi vasi arteriosi danneggiate con conseguente alterazione dell'ancoraggio e della morfologia delle cellule endoteliali e delle cellule muscolari lisce vascolari (Zanetti et al., 2004). Studi su topi *Emilin1<sup>-/-</sup>* hanno dimostrato inoltre la presenza di due aspetti fenotipici distinti.

Uno coinvolge il sistema cardiovascolare con manifestazione di ipertensione arteriosa sistemica e riduzione del lume dei vasi arteriosi. Ciò è dovuto ad alterazioni del processo di segnalazione di TGF- $\beta$ 1, di cui Emilina-1 è un antagonista. Essa, mediante il proprio dominio EMI, lega specificamente il pro-TGF- $\beta$ 1 impedendone la maturazione da parte delle convertasi furiniche e quest'azione è rilevante nel contesto dei vasi sanguigni; è sufficiente, infatti, dimezzare il dosaggio genico del TGF- $\beta$ 1 per ripristinare i normali valori pressori (Zacchigna et al., 2006). Da studi più recenti, è emerso che Emilina-1 è coinvolta nella regolazione della crescita dei vasi linfatici e nel mantenimento della loro integrità. In topi mutanti, infatti, essi risultano iperplastici e dilatati e i filamenti di ancoraggio sono significativamente ridotti; la loro funzionalità è alterata con conseguente edema dovuto ad insufficiente drenaggio linfatico (Danussi et al., 2008).

## **Multimerina-2**

Multimerina-2, chiamata inizialmente Emilina3, è stata identificata *in silico* mediante comparazione di EST (*expressed sequence tag*) umane e murine presenti in *GenBank* (Doliana et al., 2000). La proteina umana, inizialmente denominata EndoGlyx-1, fu identificata nello studio di tessuti umani normali e tumorali alla ricerca di nuovi marcatori endoteliali (Sanz-Moncasi et al., 1994); è un complesso glicoproteico di superficie con apparente peso molecolare di circa 500 kDa, formato da quattro diverse subunità proteiche (p110, p125, p140 e p200) unite da ponti disolfuro (Christian et al., 2001). L'espressione di MULTIMERINA-2 è ristretta all'endotelio dei vasi sanguigni (ad eccezione dei sinusoidi epatici e splenici), anche in capillari e focolai di neoangiogenesi tumorali, per cui è stato suggerito un potenziale ruolo nella vasculogenesi, angiogenesi ed emostasi (Christian et al., 2001; Leimeister et al., 2002).

Il gene *Mmrn2*, costituito da sette esoni e otto introni, è localizzato nel cromosoma 14, banda B14, fiancheggiato al 5' dal gene *Sncg* per la Sinucleina- $\gamma$  con orientamento testa-testa e al 3' dal gene *Bmpr1a*, recettore di tipo 1A per BMP, conosciuto come ALK3.

La proteina murina è formata da 943 residui amminoacidici e, come le altre Emiline/Multimerine, ha un peptide segnale N-terminale, il dominio EMI, una lunga regione centrale in grado di formare strutture *coiled-coil* e un dominio gC1q C-terminale. Ha, tuttavia, tratti caratteristici, tra cui la posizione della seconda cisteina del dominio EMI, più a valle di quattro posizioni, e la presenza, tra la regione *coiled-coil* ed il dominio gC1q, di un *cluster* di amminoacidi basici che presenta una sequenza consenso per il legame a GAG (M. Milanetto e P. Bonaldo, dati non pubblicati). Come Emilina-1, anche Multimerina-2 sembra formi omotrimeri per interazioni non covalenti tra i domini gC1q e, successivamente, omomultimeri più grandi tramite ponti disolfuro intercatena (M. Milanetto e P. Bonaldo, dati non pubblicati).

Esperimenti di RT-PCR in topo hanno dimostrato che Multimerina-2 è espressa, in stadi precoci dello sviluppo del sistema vascolare nello strato esterno di cellule delle isole sanguigne e, a stadi successivi, nelle cellule endoteliali di tutti i vasi sanguigni e nell'endocardio, con un'intensità particolarmente elevata tra E9.5 ed E11.5. Durante lo sviluppo postnatale, i suoi livelli di espressione si riducono e l'mRNA diviene scarsamente rilevabile in molti organi adulti (Braghetta et al., 2004).

Per avere informazioni sulla funzione di Multimerina-2 *in vivo*, il gene *Mmrn2* è stato inattivato in topo mediante *gene targeting* (P. Braghetta e P. Bonaldo, dati non pubblicati). Alla ricerca di un fenotipo cardiovascolare, considerato che Multimerina-2 è espressa nell'endocardio e principalmente dalle cellule endoteliali, è stato scoperto che i topi *Mmrn2*<sup>-/-</sup> hanno ipertensione arteriosa sistemica e riduzione del diametro dei vasi. La manifestazione di questo fenotipo è correlata ad aumento dell'attività del TGF-β1, infatti, dimezzandone il dosaggio genico, se ne osserva la reversione (D. Bizzotto; G. Bressan e G. Lembo, dati non pubblicati). Non è ancora chiara la ragione per cui l'alterazione della segnalazione endoteliale di TGF-β1 si manifesti con ipertensione. Molte malattie cardiovascolari, prime fra tutte ipertensione ed aterosclerosi, sono causate da alterazioni che coinvolgono la parete dei vasi sanguigni. È stato scoperto che l'endotelio svolge un ruolo critico nella regolazione e nel mantenimento dell'omeostasi vascolare e le alterazioni fenotipiche a carico delle cellule endoteliali sono elementi chiave in molti meccanismi patogenetici. È noto, infatti, che le cellule endoteliali controllano il tono della sottostante muscolatura liscia mediante il rilascio di fattori di contrazione e rilassamento; negli ultimi anni, inoltre, è stato scoperto un meccanismo alternativo di controllo dell'omeostasi vascolare, che può regolare il diametro dei vasi sanguigni provocando variazioni del potenziale di membrana delle cellule muscolari lisce, conosciuto come risposta mediata da EDHF (*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*) (Schmidt et al., 2008; Feletou e Vanhoutte,

2009). Il TGF- $\beta$  prodotto dalle cellule endoteliali, la cui biodisponibilità è regolata anche da Multimerina-2, potrebbe avere un ruolo importante in questi meccanismi, regolando per esempio l'espressione genica di proteine coinvolte in questi processi (Bobik, 2006; Tacheau et al., 2008).



# MATERIALI E METODI

## CREAZIONE DEI COSTRUTTI DI DNA

### cDNA transgenici

Il clonaggio del cDNA di Emilina-1 (pCS2-Emilina-1) è stato precedentemente descritto in Zacchigna et al., 2006. In esso è presente il polimorfismo C 1080 T che genera una sequenza consenso per l'enzima di restrizione *SalI*. In diversi ceppi murini è stata caratterizzata la sua presenza mediante digestione con *SalI* di un amplificato di 1000 pb che, in presenza del sito *SalI*, genera due frammenti di 600 e 400 pb. I primer utilizzati per l'amplificazione sono i seguenti: 5'-CAG TCA TTC GCC TTT CTC TC-3' e 5'-GGA TCT CAT TGA CCC GAG AA-3'.

Il cDNA di Multimerina-2 (pCS2-Multimerina-2) è stato retrotrascritto da RNA totale di polmone di topo adulto di ceppo C57BL/6 e amplificato con PCR utilizzando i primer: 5'-AAATCG ATC TCA CCA TGA TCC CGA CAC T-3' e 5'-AAT CTA GAC AGG CGG ATC TAC CAT GTC T-3'. Le sequenze sottolineate sono quelle dei siti di restrizione (*ClaI* e *XbaI*) utilizzati per il clonaggio in vettore pCS2. Usando come stampo questa sequenza, è stata generata mediante mutagenesi mirata (Higuchi et al., 1988), una mutazione puntiforme silente C 1781 A per introdurre la sequenza consenso per l'enzima di restrizione *BamHI*. Sono state amplificate due diverse regioni utilizzando le seguenti coppie di primer: 5'-AGA TGC CAT GTC TTC AGC AA-3' e 5'-CAG GGC TGT GAA GAA **TCC** G-3'; 5'-CTA CTG CAC **GGA** TCC TTC-3' e 5'-GCC TCC TCT GAC ATC TCG TC-3', di cui il nucleotide in grassetto sostituisce la base endogena generando la mutazione e la sequenza per *BamHI*, usata per legare in *pGEM-T Easy Vector* (Promega) i due frammenti. Dopo essere stata sequenziata, la sequenza mutata è stata clonata nel plasmide pCS2-Multimerina-2 con taglio enzimatico di *SmaI* per generare il plasmide pCS2-Multimerina-2<sup>B</sup>.

Per generare il cDNA ibrido E1/M2/E1 sono state amplificate: la sequenza del peptide segnale e del dominio EMI di Emilina-1 dal vettore pCS2-Emilina-1 (475 pb), una sequenza di 2250 pb da pCS2-Multimerina-2 a partire dalla base 396 del cDNA di Multimerina-2; la sequenza del dominio gC1q di Emilina-1 e del polyA di SV40 in pCS2-Emilina-1 (530 pb). I primer utilizzati sono riportati nella seguente tabella:

<b>Peptide segnale + dominio EMI Emilina-1</b>	5' - <u>aaaatcgat</u> taaggcagcaaggaacatt - 3' 5' -aagtggtgtggagggtgct- 3'
<b>regione centrale Multimerina-2</b>	5' - GGG <u>GCGATG</u> ACTGTGGAGAG cacaatcccacagcaaacc - 3' 5' - tgaagaaccggcatagaagg - 3'
<b>gC1q Emilina-1 + polyA SV40</b>	5'-CTGG <u>GAGCTCT</u> GGGAGACAGGCTCCCCTGTG gcatttcagctgcctgag-3' 5' - <u>aaaatcgat</u> ggcggatctaccatgctc - 3'

Alcuni primer sono stati disegnati con code di DNA non complementari alle sequenze da amplificare (indicate dal carattere maiuscolo), che derivano dal cDNA dell'altra proteina e hanno le sequenze consenso per gli enzimi di restrizione (caratteri sottolineati) che sono stati usati per legare tra loro, in *pGEM-T Easy Vector* (Promega), i diversi frammenti senza aggiunta di sequenze estranee. Con l'enzima *BtgZI*, peptide segnale e dominio EMI di Emilina-1 sono stati legati alle regioni centrali di Multimerina-2, che sono state legate al gC1q di Emilina-1 mediante il sito *SacI*.

Analogamente è stato generato il cDNA ibrido M2/E1/M2. Con i primer riportati nella tabella sottostante sono state amplificate: la sequenza del peptide segnale e del dominio EMI di Multimerina-2 dal vettore pCS2-Multimerina-2 (435pb), una sequenza di 2230 pb da pCS2-Emilina-1 dalla base 361 del cDNA di Emilina-1; la sequenza del gC1q di Multimerina-2 e del polyA di SV40 in pCS2-Multimerina-2 (470 pb). I diversi frammenti sono stati legati tra loro in *pGEM-T Easy Vector* (Promega), mediante gli enzimi di restrizione *ApaI* (peptide segnale e dominio EMI di Multimerina-2 alle regioni centrali di Emilina-1) e *AvrII* (regioni centrali di Emilina-1 e gC1q di Multimerina-2).

<b>Peptide segnale + dominio EMI Multimerina-2</b>	5' - <u>aaaatcgat</u> ctcacatgatcccagact - 3' 5' - GCTGGG <u>CCCAGA</u> ACGGAAGCAGGGCC gtctggcagctctggtccct - 3'
<b>regione centrale Emilina-1</b>	5' - aggtgctgtcagggttatgg -3' 5' - gcagctgaaaatgctacccta -3'
<b>gC1q Multimerina-2 + polyA SV40</b>	5' - GTGCCTAGGGTA gccttctatgccggttcttc - 3' 5' - <u>aaaatcgat</u> ggcggatctaccatgctc - 3'

In alcuni primer, i caratteri minuscoli sottolineati indicano la sequenza di taglio per l'enzima *ClaI*, usato per il clonaggio delle intere sequenze dei cDNA ibridi.

Tutte le PCR sono state eseguite con *Expand High Fidelity PCR System* (Roche). I plasmidi ricombinanti sono stati propagati in DH5 $\alpha$  (*E. coli*). Il DNA plasmidico è stato isolato e purificato usando *PureYield<sup>TM</sup> Plasmid Maxiprep System* (Promega).

#### Transgeni *Emilin1*-Emilina-1 e *Emilin1*-Multimerina-2

Da un clone di BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) di 135 kb (Genome System), è stato derivato un frammento *HindIII/HindIII* di 16.8 kb, contenente il gene *Emilin1* e le regioni fiancheggianti in 5' e 3', che è stato subclonato in vettore pKSII+ (Stratagene) privato dei siti di restrizione *ClaI*, *SalI* e *NotI*. Le 79 pb dal sito d'inizio trascrizione al sito *XhoI* sono state sostituite con un breve *polylinker* contenente le sequenze per gli enzimi di restrizione *ClaI*, *SalI* e *NotI*. Per generare il transgene *Emilin1*-Emilina-1, in esso è stato inserito il cDNA transgenico di Emilina-1 seguito dal polyA di SV40, isolato per digestione *ClaI/NotI* dal vettore pCS2. Il plasmide ricombinante è stato propagato in XL10Gold (*E. coli*) ed isolato e purificato usando *PureYield<sup>TM</sup> Plasmid Maxiprep System* (Promega). Il taglio enzimatico *HindIII/HindIII* ha permesso di isolare il transgene di circa 20 kb dalle sequenze vettoriali.

Nella generazione del transgene *Emilin1*-Multimerina-2 è stata utilizzata la tecnologia del *recombineering* (*recombinat-mediated genetic engineering*), metodo basato sull'attività di ricombinazione omologa tra sequenze di DNA uguali in *E. Coli*. In questo caso la ricombinazione omologa è mediata da proteine del fago  $\lambda$ , i cui geni *exo*, *bet* e *gam* sono stati inseriti nel genoma batterico di alcuni ceppi disponibili al sito <http://recombineering/ncifcrf.gov>. Batteri di ceppo SW102 sono stati trasformati con il BAC contenente il gene *Emilin1* e le regioni fiancheggianti in 5' e 3'. Dopo induzione temperatura-sensibile della produzione delle proteine fagiche, è stato introdotto, mediante elettroporazione, un frammento di DNA lineare contenente il cDNA transgenico di Multimerina-2 seguito dalla sequenza del polyA di SV40, fiancheggiati da due braccia di 400 pb e 410 pb omologhe rispettivamente alle sequenze comprese tra -400 e +1 pb e +79 e +488 pb del gene *Emilin1*. Le braccia di omologia sono state amplificate dal plasmide contenente il frammento *HindIII/HindIII* di 16.8 kb del BAC. Le coppie di primer utilizzate sono le seguenti: 5'-AAA AAG CTT TCA TCA GGG AAC AGA ACA GG-3' e 5'-AAA ATC GAT TCT AGA GGT GAA ATG TTC CTT GC-3' (braccio di omologia al 5'); 5'-AAA GCG GCC GCG CCT CTA CAC AGG AGG CAC T-3' e 5'-AAA CCG CGG GCC AAG GAA GCC CTA GAG AA-3' (braccio di omologia al 3'). I caratteri sottolineati indicano le sequenze degli enzimi di restrizione utilizzati per legare i due frammenti ottenuti in pCS2-Multimerina-2<sup>B</sup> e per isolare l'intero frammento da elettroporare (*HindIII/ClaI* per la sequenza al 5' e *NotI/SacI* per quella al

3'). Le PCR sono state eseguite con *Expand High Fidelity PCR System* (Roche). Il BAC ricombinante è stato propagato in SW102 (*E. coli*) ed isolato e purificato mediante il *QIAGEN® Plasmid Midi Kit* (Qiagen). Un taglio enzimatico *HindIII/HindIII* ha permesso d'isolare il transgene di circa 20 kb dalle sequenze del vettore.

#### Transgeni *Tie2*-Emilina-1, *Tie2*-Multimerina-2, *Tie2*-E1/M2/E1 e *Tie2*-M2/E1/M2

Da un plasmide pKSII+ in cui è stato subclonato il promotore al 5' e le sequenze del primo esone e del primo introne del gene murino *Tie2* (donato dal prof. T. Sato), sono stati isolati un frammento *HindIII/HindIII* di 2,1 kb (promotore essenziale di *Tie2*) e un frammento *NaeI/SalI* di 9.8 kb, contenente la sequenza *enhancer* per il promotore. Un plasmide pKSII+ è stato modificato con l'inserzione, tra i siti *SalI* e *KpnI*, di un altro sito *NotI*. In esso è stato clonato il frammento di 2,1 kb e, successivamente, legati tra loro, le sequenze del cDNA transgenico e dell'*enhancer*. Il cDNA transgenico di Emilina-1 e di Multimerina-2 e i cDNA E1/M2/E1 e M2/E1/M2 sono stati isolati, insieme alla sequenza del polyA di SV40 del vettore pCS2, con taglio enzimatico *ClaI/NotI*. I plasmidi ricombinanti sono stati propagati in XL10Gold (*E. coli*) ed isolati e purificati mediante *PureYield™ Plasmid Maxiprep System* (Promega). La linearizzazione e l'isolamento dei transgeni dalle sequenze vettoriali è stata effettuata con digestione *NotI/NotI* (*Tie2*-Emilina-1 e *Tie2*-M2/E1/M2) o con digestione *NotI/SalI* (*Tie2*-Multimerina-2, *Tie2*-E1/M2/E1).

#### Transgene *SM22α*-Emilina-1

Il cDNA transgenico di Emilina-1 seguito dal polyA di SV40 isolato con *ClaI/KpnI* dal vettore pCS2-Emilina-1 è stato clonato in plasmide pKSII+. In questo sono state successivamente clonate le sequenze del promotore *SM22α* (plasmide donato dal prof. M. Miano) tra i siti *BamHI* ed *EcoRV*. Il plasmide ottenuto è stato propagato in DH5α (*E. coli*) e purificato con *PureYield™ Plasmid Maxiprep System* (Promega). Il transgene è stato isolato dalle sequenze vettoriali con digestione *NotI/NotI*.

Tutti i frammenti di DNA da microiniettare sono stati purificati con gel d'agarosio, elettroeluiti in tubo da dialisi per una notte ed estratti quattro volte con fenolo e una con cloroformio. Il DNA precipitato con EtOH assoluto/CH<sub>3</sub>COONa 3M pH5.2 e risospeso in tampone per la microiniezione (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM pH 8) è stato purificato in colonna (*Bio-Spin 30 Chromatography Column*, Bio Rad) e filtrato (0.22 μm *Ultrafree Filter MC*, Millipore). Il

DNA ottenuto è stato diluito in tampone di microiniezione alla concentrazione di circa 1.000 copie di transgene/pl.

## TOPI MUTANTI E TRANSGENICI

Il mantenimento e tutte le procedure che hanno interessato gli animali sono stati condotti in accordo con le direttive istituzionali e la legislazione nazionale.

I topi *Emilin1*<sup>-/-</sup> sono stati generati come già descritto in Zanetti et al., 2004 mentre i topi *Mmrn2*<sup>-/-</sup> sono stati generati dal prof. P. Bonaldo e dalla dott.ssa P. Braghetta (Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università di Padova, Italia), usando le procedure standard di *gene targeting* (Nagy et al., 2003). Per la generazione dei topi transgenici, i costrutti di DNA linearizzato precedentemente descritti sono stati microiniettati in oociti fecondati di topi B6D2F1xB6D2F1(Charles River Italia). Gli oociti microiniettati e vitali sono stati impiantati in utero di tope pseudogravide di ceppo CD1 (Charles River Italia), usando le procedure standard (Nagy et al., 2003). Le procedure di microiniezione sono state effettuate dalla dott.ssa P. Braghetta. Embrioni e topi *knockout* e/o transgenici sono stati identificati mediante analisi di PCR su DNA genomico estratto con fenolo/cloroformio rispettivamente da sacco vitellino o biopsia di coda. Le coppie di oligonucleotidi utilizzati sono riportati nella tabella seguente.

<b>Allele <i>Emilin1</i> <i>wild type</i></b>	5'-GAGGAGAGCGGAAGGAACTGAGG-3'	792 pb
	5'-GAGGGAACAGAGCAGGAGGAGTG-3'	
<b>Allele <i>Emilin1</i> <i>knockout</i></b>	5'-CGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAG-3'	968 pb
	5'-GAGGGAACAGAGCAGGAGGAGTG-3'	
<b>Allele <i>Mmrn2</i> <i>wild type</i></b>	5'-CCCCAATTCCATAGGTCAG-3'	745 pb
	5'-AGAGCGAGAACAGGCACAAG-3'	
<b>Allele <i>Mmrn2</i> <i>knockout</i></b>	5'-GCTGCCCCGCTGTGTGATTCT-3'	773 pb
	5'-TGACCGCTTCCTCGTGCTTT-3'	
<b>cDNA transgenico di <i>Emilina-1</i></b>	5'-TTCAGCCTCATTCTGCCACT-3'	300 pb
	5'-TTTTCACTGCATTCTAGTTGTG-3'	
<b>cDNA transgenico di <i>Multimerina-2</i></b>	5'-TAATCCAAGGGTCAGCAACC-3'	210 pb
	5'-TTTTCACTGCATTCTAGTTGTGG-3'	

Le amplificazioni sono state effettuate in 50 µl di soluzione di reazione che contengono: 1 µg DNA, Tris-HCl 10 mM pH 9.0, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, Triton X-100 0.1%, dNTPs 0.2 mM, 20 pmol di ogni primer e 2 U di Taq DNA polimerasi (Fynnzymes). I prodotti di amplificazione sono stati separati su gel d'agarosio all'1% e visualizzati con etidio bromuro 0.3 µg/ml mediante esposizione a luce ultravioletta. Per identificare gli animali *knockout* è stata sfruttata la presenza della cassetta PGK-Neo<sup>R</sup> nell'allele mutato, invece, per l'individuazione degli animali transgenici è stata utilizzata la sequenza del polyA di SV40, assente nelle sequenze genomiche murine e derivante dal vettore di espressione pCS2.

Tutti i topi adulti utilizzati nelle procedure sperimentali descritte hanno un'età compresa tra i 2 e i 4 mesi.

## CARATTERIZZAZIONE DEI TOPI TRANSGENICI

Per stimare il numero di copie di transgene integrate nel genoma, il DNA genomico è stato estratto con fenolo/cloroformio da biopsie di coda di topi transgenici ed eterozigoti per *Emilina-1* o *Multimerina-2* e amplificato con PCR utilizzando le seguenti coppie di oligonucleotidi:

<b>Allele <i>Emilin1</i> o cDNA transgenico di <i>Emilina-1</i></b>	5'-TCTTGCTCAGTGTGCCTGAC-3'	445 pb
	5'-CAGCTTTTCTAGCCGTCCTG-3'	
<b>Allele <i>Mmrn2</i> o cDNA transgenico di <i>Multimerina-2</i></b>	5'-GCAAGGTAGAGAGGCAGGTG -3'	600 pb
	5'-GCCTCCTCTGACATCTCGTC -3'	

Gli amplificati (445 e 600 pb) sono stati digeriti rispettivamente con *SalI* e *BamHI*, per discriminare l'amplificato del gene endogeno dall'amplificato transgenico, dai quali si ottengono rispettivamente dei frammenti di 270 e 175 pb e di 500 e 100 pb. I frammenti sono stati separati su gel d'agarosio al 2,5% e visualizzati mediante etidio bromuro 0.3 µg/ml. Mediante il programma *Kodak 1D Image Analysis Software* è stata calcolata l'intensità di ogni banda. Per stimare il numero di copie di transgene integrate nel genoma sono state utilizzate le seguenti equazioni:

a)  $N^{\circ} \text{ copie} = I_B + I_C / (I_A - (I_B + I_C) / 2)$  per gli animali *Emilin1*-Emilina-1, in modo da considerare il contributo, nell'amplificato non digerito di 445 pb, sia della sequenza endogena dell'esone IV che di quella transgenica presente nelle sequenze promotoriali;

b)  $N^{\circ} \text{ copie} = I_B + I_C / (I_A / 2)$  per tutti gli altri.

$I_A$  è la stima dell'intensità della banda di amplificato non digerita;  $I_B$  e  $I_C$  sono le stime delle intensità delle bande derivate dalla digestione degli amplificati transgenici (figura 8A).

Per stimare i livelli di espressione dei transgeni in organi adulti, è stato estratto RNA totale da cuore, aorta, polmone e rene di topi transgenici ed eterozigoti per Emilina-1 e Multimerina-2, utilizzando *TRIzol Reagent* (Gibco-BRL) come raccomandato dal produttore. Da 1 µg di RNA è stato sintetizzato il cDNA usando la *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen) e una miscela di esanucleotidi *random* (pd[N]<sub>6</sub>, Amersham Bioscience) come primer. 0.1-0.3 µg di cDNA sono stati amplificati mediante PCR utilizzando gli oligonucleotidi riportati nella tabella precedente. Gli amplificati ottenuti sono stati digeriti con *SalI* o *BamHI* per discriminare gli amplificati derivanti dal cDNA endogeno e dal cDNA transgenico. I frammenti ottenuti (270 e 175 pb per il cDNA transgenico di Emilina-1; 500 e 100 pb per il cDNA transgenico di Multimerina-2) sono stati separati su gel d'agarosio al 2,5%, visualizzati con etidio bromuro 0.3 µg/ml. Utilizzando il programma *Kodak 1D Image Analysis Software*, è stata stimata l'intensità di ogni banda. Con le equazioni descritte precedentemente, per ogni organo considerato, sono stati stimati i livelli di espressione di ogni transgene rispetto ad una copia del gene endogeno.

## IMMUNOISTOCHEMICA

Tessuti di topi adulti sono stati inclusi in OCT (Sakura), congelati e conservati a -80°C. Al criostato sono state tagliate sezioni di spessore pari a 7 µm che successivamente sono state seccate a temperatura ambiente e conservate a -20°C. Prima dell'incubazione con l'anticorpo, le sezioni sono state idratate con tampone fosfato salino (PBS) e saturate con siero di capra o di asino (Sigma) al 10% in PBS. Gli anticorpi primari utilizzati sono i seguenti: policlonale di coniglio anti-Emilina-1 (donato dal prof. D. Forrest), monoclonale di ratto anti-Multimerina-2 (donato dal prof. A. Colombatti), policlonale di capra anti-PECAM (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Le sezioni sono state incubate con gli anticorpi primari diluiti in siero di capra o di asino al 5% per una notte a 4°C. Dopo un lavaggio di 30 minuti con PBS, le sezioni sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari diluiti in siero di capra o di asino al 5%. Gli anticorpi secondari usati sono i seguenti: anticorpo di capra coniugato a Cy-2 contro IgG

di coniglio (Jackson Immuno Research); anticorpo di asino coniugato a Cy-2 contro IgG di ratto (Jackson Immuno Research); anticorpo di asino coniugato a Cy-3 contro IgG di capra (Jackson Immuno Research); anticorpo di capra coniugato a Cy-3 contro IgG di ratto (Jackson Immuno Research). I nuclei sono stati marcati con ioduro di propidio 0.05 µg/ml (Sigma). I vetrini trattati sono stati montati in glicerolo all'80% in PBS e le sezioni osservate con un microscopio Zeiss Axioplan equipaggiato con epifluorescenza ottica o con un microscopio confocale Bio-Rad.

## **MICROSCOPIA ELETTRONICA**

Aorte dissezionate da topi adulti di controllo, *Emilin1*<sup>-/-</sup> e transgenici mutanti per l'Emilina-1 sono state fissate per un'intera notte con glutaraldeide 2,5% in tampone cacodilato Na 0.1 M pH 7.4, lavate per una notte con tampone cacodilato Na 0.1 M pH 7.4 e trattate con acido tannico al 2% in tampone cacodilato Na 0.1 M pH 7.4. I campioni sono stati disidratati con etanolo e inclusi in Epon E812. All'ultramicrotomo sono state tagliate sezioni ultrafini e colorate con citrato di piombo e acetato di uranile. L'osservazione è stata svolta dalla dott.ssa P. Sabatelli (IGM-CNR c/o Istituto Ortopedico Rizzoli -Bologna-) mediante un microscopio elettronico a trasmissione Philips EM 400.

## **COLTURE CELLULARI, TRASFEZIONE E SAGGI FUNZIONALI**

Cellule HEK293T sono state coltivate in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), contenente 4.5 g/L di glucosio, HEPES 25 mM, L-Glutammina 2 mM (Invitrogen), a cui sono aggiunti 10% di siero fetale bovino (Invitrogen), 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomycina (Invitrogen). Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Prima della trasfezione, sono state seminate al 50% di confluenza su piastre Petri con 60 mm di diametro. Le trasfezioni sono state eseguite usando il metodo del calcio fosfato (Sambrook et al., 1989). Il DNA è stato disciolto in acqua sterile con CaCl<sub>2</sub> 250 mM e questa soluzione è aggiunta ad un uguale volume di tampone salino HEPES (HBS: NaCl 280 mM; KCl 10 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 mM; destrosio 12 mM; HEPES 50 mM). La soluzione con fosfati di calcio e DNA co-precipitati è stata sparsa sulle cellule piastrate. Per eliminare i precipitati che non sono stati veicolati dentro le cellule, dopo circa 6 ore dalla trasfezione, il terreno è stato sostituito. Prima della raccolta, le cellule sono coltivate per circa 24 ore in terreno senza siero (*OPTIMEM-Glutamax I*, Invitrogen).

Per studiare l'attività del TGF- $\beta$ 1 sul proprio gene *reporter* in presenza o assenza delle proteine in esame, è stato messo a punto un saggio funzionale su cellule HEK293T. Con la metodologia appena descritta, le cellule sono state trasfettate con i seguenti plasmidi : CAGA12-LUX, gene *reporter* per l'attività del TGF- $\beta$ 1 (donato dal prof. P. ten Dijke); TGF- $\beta$ 1<sup>C223S/C225S</sup> porcino, costitutivamente attivo dopo il taglio furinico del proTGF-beta (donato dal prof. J.M. Davidson); CMV-lacZ (donato dal prof. S. Piccolo), utilizzato per correggere i valori di attività del TGF- $\beta$ 1 in base all'efficienza di trasfezione; cDNA codificanti per le proteine da analizzare. Le cellule trasfettate sono state raccolte con un tampone di lisi (Tris-HCl 25 mM pH 7.8; EDTA 2.5 mM; Glicerolo 10%; NP40 1%; DTT 2 mM). Per ogni campione sono state misurate l'attività della luciferasi e della beta-galattosidasi per la normalizzazione dei dati. Ogni campione è stato trasfettato almeno in triplo e ogni esperimento ripetuto due volte.

## **WESTERN BLOTTING**

Cellule HEK293T, trasfettate mediante calcio fosfato con plasmidi che esprimono le proteine in analisi e la beta-galattosidasi, sono state raccolte in un tampone di lisi (Tris-HCl 25 mM pH 7.5; EDTA 2.5 mM; NP40 1%; inibitori di proteasi). Il contenuto proteico è stato normalizzato sull'efficienza di trasfezione in base all'attività beta-galattosidasi del gene *lacZ*. I campioni proteici sono separati per SDS-PAGE in gel NuPAGE® Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen) e trasferiti su membrana di polivinilidene difluoruro (PVDF) (Millipore). La membrana è stata bloccata in latte (Biorad) al 5% in tampone TBS-T (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; NaCl 150 mM; Tween20 0,1%). Gli anticorpi primari utilizzati sono: monoclonale di ratto anti-Multimerina-2 (donato dal prof. A. Colombatti), diluito 1:15; policlonale di coniglio anti-Emilina-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), diluito 1:100. La membrana è stata incubata per una notte con l'anticorpo primario in latte al 3% in TBS-T a 4°C. Dopo 3 lavaggi in TBS-T la membrana è stata incubata con un anticorpo secondario coniugato a perossidasi di rafano (Amersham Bioscience) per un'ora a temperatura ambiente. Le bande sono state rilevate con il substrato *Super signal West-pico HRP* (Pierce).

## **MISURAZIONE DELLA PRESSIONE SANGUIGNA**

I parametri cardiovascolari dei topi sono stati misurati nel laboratorio del prof. G. Lembo (dipartimento di Angiocardioneurologia, I.R.C.C.S. Istituto Neuromed, Pozzilli -IS). La

pressione sanguigna è stata misurata in maniera non invasiva sull'arteria caudale mediante un pletismografo.

## **ANALISI BIOINFORMATICA**

I cDNA sintetizzati, clonati nel vettore pCS2, sono stati sequenziati con il metodo di Sanger dal laboratorio BMR Genomics (Padova), utilizzando oligonucleotidi sui promotori SP6 e T3.

L'allineamento delle sequenze è stato eseguito mediante il *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). L'allineamento proteico è stato eseguito con il *software T-Coffee*, disponibile all'indirizzo [http://www.igs.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee\\_cgi/index.cgi](http://www.igs.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi).

## **ANALISI STATISTICA**

Per le misure della pressione arteriosa sono riportati i valori medi e l'errore standard della pressione sistolica misurata su almeno quattro animali. La significatività statistica è stata valutata facendo analisi della varianza (ANOVA); per valori  $p < 0.05$  è stata assegnata significatività.

Nei saggi funzionali sono riportati, per ogni condizione analizzata, i valori medi e le deviazioni standard; la significatività statistica è stata calcolata usando il test di Bonferroni o il test t di Student. Un valore  $p < 0.05$  è stato considerato significativo.

# RISULTATI

## IMMUNOLOCALIZZAZIONE DI EMILINA-1 E MULTIMERINA-2 NEI TESSUTI ADULTI

Nell'interpretazione delle funzioni di una proteina mediante esperimenti di *gene targeting* e transgenesi, importante è studiare la sua espressione e localizzazione sia nei tessuti embrionali che in quelli adulti, per comprendere in quali momenti dello sviluppo e in quali distretti anatomici essa sia prodotta e che conseguenze potrebbe avere la sua assenza. Studi di co-localizzazione di diverse proteine, inoltre, possono permettere di intuire loro possibili interazioni funzionali oltre che strutturali, utili per approfondire le relazioni su cui si basa la manifestazione fenotipica in animali transgenici e *knockout*.

Mediante studi di *northern blotting* e ibridazione *in situ* su tessuti embrionali e adulti di topo, è emerso che *Emilin1* e *Mmrn2* sono intensamente espressi nell'apparato cardiovascolare.

*Emilin1* è espresso nell'arco aortico e nell'aorta dorsale già allo stadio E9.5 e, negli stadi di sviluppo successivi (E10.5-13.5), la sua espressione risulta più marcata nel cuore (cuscinetti cardiaci, pericardio) e nell'endotelio capillare. Nell'adulto l'mRNA è abbondante nel cuore (Braghetta et al., 2002). Analisi di localizzazione mediante immunofluorescenza indiretta su aorta di topo adulto dimostrano che Emilina-1 è presente nelle diverse regioni della parete del vaso: nella tonaca intima, tra le cellule muscolari lisce della tonaca muscolare e nella tonaca avventizia. Nei vasi di resistenza, in particolare nelle ramificazioni delle arterie mesenteriche, è riproposta questa stessa organizzazione, con localizzazione meno evidente tra le poche cellule muscolari della parete (figura 2).

Nell'embrione *Mmrn2* è espresso dalle cellule endoteliali di tutti i vasi sanguigni e nell'endocardio, con un'intensità particolarmente elevata tra E9.5 e E11.5 (Braghetta et al., 2004). Nell'adulto la localizzazione di Multimerina-2 ricorda l'espressione embrionale. Lo studio di vasi adulti, conferma l'associazione di Multimerina-2 solo all'endotelio vascolare, sia nell'aorta che nelle arteriole mesenteriche (figura 3). Nel cuore, la proteina presenta una distribuzione tipicamente vascolare con marcatura endoteliale e, debolmente, endocardica; anche nel rene è presente solo nei vasi, sia dei glomeruli che tra i tubuli. Doppie immunofluorescenze con PECAM (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*), un marcatore endoteliale, hanno confermato che la distribuzione della proteina nel distretto vascolare di questi organi è tipicamente endoteliale (figura 4).

Studi più dettagliati di co-localizzazione con PECAM hanno permesso di comprendere meglio come Emilina-1 e Multimerina-2 siano rispettivamente distribuite nel comune territorio endoteliale. In aorta di topo adulto, Emilina-1 risulta co-distribuita con il PECAM prevalentemente nella regione sub-endoteliale della tonaca intima, infatti mentre PECAM marca la superficie apicale delle cellule endoteliali, Emilina-1 sembra essere presente all'interno delle cellule (figura 5A). Multimerina-2 è prevalentemente presente solo nella matrice extracellulare tra la lamina elastica interna e la superficie basale delle cellule endoteliali, dove è co-localizzata al PECAM (figura 5B). Doppie immunofluorescenze per Emilina-1 e Multimerina-2 confermano l'ipotesi che le proteine siano co-localizzate solo nello strato sub-endoteliale (figura 5C).

## **APPROFONDIMENTO SULLO STUDIO DEL FENOTIPO VASCOLARE DI TOPI *Emilin1*<sup>-/-</sup> E *Mmrn2*<sup>-/-</sup>**

Con questo progetto di ricerca si vogliono approfondire le cause della manifestazione del fenotipo vascolare in topi mutanti per Emilina-1 e studiare le relazioni funzionali che esistono tra Emilina-1 e Multimerina-2 nel tessuto vascolare.

È emerso che TGF- $\beta$ 1 ha un ruolo fondamentale nell'insorgenza del fenotipo mutante per Emilina-1 (Zacchigna et al., 2006), provocando modifiche alle risposte fisiologiche delle cellule muscolari lisce con conseguente alterazione della morfologia e funzionalità vascolare. Nei vasi, Emilina-1 è espressa sia dalle cellule muscolari lisce che dalle cellule endoteliali e un primo obiettivo è stato comprendere quale è il contributo di questi due tipi cellulari nella manifestazione del fenotipo *knockout*.

Considerate le somiglianze dell'organizzazione modulare, dell'espressione vascolare e della funzione biochimica *in vitro* esercitata durante il processamento del TGF- $\beta$ 1 (Zacchigna et al., 2006; D. Bizzotto e G. Bressan, dati non pubblicati), forse tra Emilina-1 e Multimerina-2, nel distretto vascolare, esistono rapporti di compensazione funzionale. Verificarne l'esistenza fisiologica e studiarne la potenzialità è stato il secondo obiettivo di questo lavoro di ricerca.

In entrambi i casi, l'approccio sperimentale è consistito nella generazione di topi transgenici e nello studio del recupero del fenotipo vascolare di animali mutanti in cui sia espresso il transgene in esame.

## Generazione delle linee di topi transgenici

Nello svolgimento di questo lavoro sono state generate e analizzate diverse linee di topi transgenici. Gli animali transgenici ottenuti sono classificati in due gruppi: a) transgenici dell'Emilina-1 e b) transgenici della Multimerina-2. Per ottenere i primi, in oociti fecondati di topo è stato microiniettato DNA linearizzato in cui l'espressione del cDNA dell'Emilina-1 è guidata da differenti promotori in maniera tessuto-specifica (figure 6A, 6B, 6C). Le linee transgeniche generate sono tre: *Emilin1*-Emilina-1, *Tie2*-Emilina-1 e *SM22 $\alpha$* -Emilina-1. In esse, rispettivamente, il cDNA dell'Emilina-1 è espresso in tutti i distretti di espressione tipici dell'Emilina-1 dal suo stesso promotore endogeno, nell'endotelio dal promotore di *Tie2* e nelle cellule muscolari lisce dal promotore del gene *SM22-alpha* (o *Transgelin*). Analogamente, nel secondo gruppo di animali transgenici, i promotori di *Emilin1* e di *Tie2* guidano l'espressione tessuto-specifica del cDNA della Multimerina-2 nei territori dell'Emilina-1 e nelle cellule endoteliali rispettivamente (figure 6D e 6E).

La sequenza utilizzata come promotore endogeno di Emilina-1 è lunga 16.8 kb ed include: l'intero gene, costituito da otto esoni; una regione, fiancheggiante in 5', di 7.6 kb che contiene l'estremità iniziale del gene *2310016E03Rik* e la sequenza che lo separa da *Emilin1*; una sequenza di 0.6 kb fiancheggiante in 3' che separa *Emilin1* dal gene per l'enzima chetoesochinasi, *Khk*. Mediante saggi di attività promotoriale, studi dei siti ipersensibili alla *DNaseI*, comparazioni di sequenze e studi di espressione genica in topi transgenici è stata chiarita l'organizzazione di questa regione regolatoria, che risulta costituita dal promotore basale, dalla presenza di *enhancer* interni sia alla regione fiancheggiante 5' che alla sequenza genica, e da un silenziatore, localizzato immediatamente a monte del sito di inizio trascrizione, che limita l'espressione ectopica di Emilina-1 (Fabbro et al., 2005). La sequenza utilizzata come promotore endoteliale è rappresentata da una regione di 2.1 kb fiancheggiante in 5' il sito di inizio trascrizione del gene *Tie2* e da una regione genomica, definita *enhancer*, che si estende per circa 10 kb all'interno del primo introne, a partire dall'estremità 3' del primo esone. Dati sperimentali infatti dimostrano che l'espressione endotelio-specifica di un gene *reporter* in tutti i vasi sanguigni di un embrione allo stadio E11.5 è garantita dall'utilizzo concomitante di queste due regioni (Schlaeger et al., 1997). Il costrutto *SM22 $\alpha$* -Emilina-1 è stato progettato utilizzando una regione regolatoria di circa 2.8 kb, che si estende da -2753 a +65 pb rispetto al sito di inizio trascrizione del gene *SM22alpha*. Dati sperimentali suggeriscono che l'attività promotoriale di questa regione comincia ad essere ristretta alla muscolatura liscia vascolare già a partire dallo

stadio E13.5, escludendone l'espressione sia a livello endoteliale che a livello delle cellule muscolari lisce viscerali (Li. et al, 1996).

Per poter individuare i cDNA di Emilina-1 e di Multimerina-2 utilizzati per la generazione dei costrutti transgenici e quindi ricavare, in maniera semplice, informazioni circa il numero di copie integrate nel DNA genomico e i livelli di espressione dei transgeni relativamente ai geni endogeni, è stato utilizzato un elemento distintivo nella loro sequenza. Nel caso dell'Emilina-1 è un polimorfismo nucleotidico singolo (C > T) presente nel quarto esone, in posizione 1080 del suo mRNA (NM\_133918), che introduce la sequenza consenso per l'enzima di restrizione *SalI* (G' TCGAC). La sequenza di questo cDNA è stata derivata da mRNA del ceppo murino C57BL/6. Per la Multimerina-2, invece, mediante mutagenesi mirata, è stata generata nel cDNA retrotrascritto da mRNA di ceppo C57BL/6 una mutazione puntiforme silente (C > A) in posizione 1781 nel sesto esone (NM\_153127), per introdurre la sequenza consenso per l'enzima di restrizione *BamHI* (G' GATCC). Amplificazione delle regioni del DNA genomico che comprendono la sequenza d'interesse e seguente digestione degli amplificati con l'enzima di restrizione in esame, hanno permesso di osservare che in tutti i ceppi murini utilizzati per la generazione e successiva amplificazione delle linee transgeniche, *Mmrn2* non ha polimorfismi che introducono la sequenza consenso per *BamHI*, mentre solo nel ceppo 129/SvJ, il gene *Emilin1* è privo del polimorfismo C 1080 T, pertanto, mediante incroci opportuni, i transgeni dell'Emilina-1 sono stati portati in questo assetto genetico (figura 7B).

La sequenza mutata del cDNA della Multimerina-2 è correttamente espressa e tradotta e la proteina sintetizzata ha funzione paragonabile a quella della proteina selvatica. Il suo peso molecolare e la migrazione in un gel riducente di poliacrilammide sono gli stessi di quelli della proteina endogena, come dimostrato con *western blotting* eseguito con anticorpo anti Multimerina-2 (figura 7C-a). Inoltre, l'azione di inibizione svolta sull'attività del TGF- $\beta$ 1, come verificato con un saggio funzionale che misura l'attività luciferasica del gene CAGA12-LUX, *reporter* per il TGF- $\beta$ 1, a parità di quantità di plasmide trasfettato, è del tutto comparabile a quella della proteina selvatica (figura 7C-b).

### **Caratterizzazione delle linee di topi transgenici generati**

Tutti gli animali nati dagli embrioni microiniettati coi costrutti transgenici e impiantati in utero, sono stati genotipizzati per selezionare solo quelli transgenici. L'analisi è stata effettuata mediante PCR, sfruttando la sequenza di poliadenilazione dell'SV40, che rappresenta un elemento distintivo del transgene rispetto alle sequenze murine endogene. Per i transgenici

dell'Emilina-1 si ottiene un amplificato di 300 pb e per i transgenici della Multimerina-2 un amplificato di 210 pb (figura 8). Nelle tabelle in figura 8, sono riportati per ogni costrutto transgenico, il numero degli embrioni impiantati, dei topi nati e dei topi transgenici individuati. Con questo *screening* sono stati trovati 5 animali transgenici per il costrutto *Emilin1*-Emilina-1, 11 per il costrutto *Tie2*-Emilina-1, 20 per il costrutto *SM22 $\alpha$* -Emilina-1, 4 per il costrutto *Emilin1*-Multimerina-2 e 10 per il costrutto *Tie2*-Multimerina-2, con rapporti percentuali di topi transgenici sul totale dei nati compresi tra il 4.6% e l'11.2%. L'accoppiamento dei topi transgenici e l'analisi genotipica della generazione F<sub>1</sub> ha permesso di individuare gli animali che, avendo integrato il costrutto nelle cellule germinali, sono in grado di trasmetterlo alla progenie. Essi sono considerati i fondatori delle linee transgeniche, riportati nell'ultima riga delle tabelle di figura 8.

Nei topi della generazione F<sub>1</sub>, è stato analizzato il numero di copie di transgene integrato nel DNA genomico e i suoi livelli di espressione in alcuni organi adulti. Questo studio è stato compiuto sfruttando il sito enzimatico diagnostico presente nel cDNA transgenico, che lo differenzia dall'allele endogeno di Emilina-1 o Multimerina-2 presente in eterozigosi negli animali di generazione F<sub>1</sub>. Usando coppie di oligonucleotidi che amplificano una regione dell'esone quattro del gene endogeno e dei cDNA endogeno e transgenico di Emilina-1 e una regione dell'esone sei di quelli di Multimerina-2, sono stati ottenuti rispettivamente amplificati di 450 pb e 600 pb, che comprendono nel solo cDNA transgenico la sequenza di taglio per *SaI*I o *Bam*HI. La digestione di questi amplificati ha permesso di discriminare il cDNA transgenico e di stimare, paragonando l'intensità delle bande indigerite di DNA e cDNA endogeni a quelle derivate dalla digestione del cDNA transgenico, il numero di copie integrate (figura 9A) e i livelli di espressione (figure 10A e 11A) dei transgeni. Per ogni costrutto microiniettato, sono riportate le linee transgeniche ottenute e caratterizzate con i rispettivi numero di copie integrate nel DNA genomico (figura 9B) e, negli organi analizzati, i livelli di espressione per singola copia di transgene (figure 10B e 11B).

Considerato che il fenotipo in esame in questo studio è quello cardiovascolare dei topi mutanti di Emilina-1 e Multimerina-2, gli organi da cui, per tutte le linee transgeniche individuate, è stato estratto RNA totale per analizzare i livelli di espressione del transgene sono coinvolti nella regolazione della pressione sanguigna. L'espressione nel polmone è stata analizzata perché tutti e tre i promotori utilizzati sono in esso attivi (Fabbro et al., 2005; Korhonen et al., 1995; Moessler et al., 1996). I livelli di espressione dei transgeni sono variabili tra linee diverse e, all'interno di

una stessa linea, tra organi diversi. Probabilmente, la loro espressione è influenzata dal sito in cui il costrutto si è integrato nel DNA genomico.

Per ogni costrutto microiniettato sono state scelte per le analisi successive solo quelle linee in cui i livelli di espressione dell'mRNA transgenico suggerivano che la proteina fosse prodotta in quantità tale da riuscire a equiparare o superare i livelli di traduzione endogeni, soprattutto in cuore, aorta e rene.

#### Linea transgenica *Emilin1-Emilina-1*

Dei topi *Emilin1-Emilina-1* è stata scelta la linea n° 73, in cui una copia del transgene esprime come circa un allele endogeno in tutti gli organi analizzati. Per verificare che all'espressione del transgene conseguiva la traduzione di una proteina matura e che le sequenze promotoriali guidino l'espressione del cDNA transgenico con distribuzione simile al gene endogeno, mediante immunofluorescenza, è stata analizzata la distribuzione dell'Emilina-1 sia in tessuti embrionali sia in tessuti adulti con assetto genetico nullo per l'Emilina-1. Negli organi considerati, la proteina risulta distribuita come quella selvatica. In particolare, sia in grossi vasi elastici di conduttanza (aorta) che in piccoli vasi periferici di resistenza (seconda ramificazione dell'arteria mesenterica), Emilina-1 transgenica è presente nell'intero spessore della parete vascolare, suggerendo che essa sia prodotta sia dalle cellule endoteliali che dalle cellule muscolari lisce e dai fibroblasti avventiziali (figura 12A).

#### Linea transgenica *Tie2-Emilina-1*

Le linee scelte per il costrutto *Tie2-Emilina-1* sono la n° 71, in cui una copia del transgene esprime come circa metà di un allele di *Emilin1*, e la n° 73, in cui il transgene, negli organi analizzati, è espresso da 2.5 a 5 volte l'allele endogeno. Nonostante le cellule endoteliali rappresentino una piccola sottopopolazione cellulare negli organi considerati, per questo transgene è sempre stato possibile misurare il livello di espressione, che, in alcune linee, è risultato elevato. Per escludere la possibilità che il promotore di *Tie2* abbia un'attività non specifica malgrado la presenza della sua sequenza *enhancer*, su sezioni di organi embrionali e adulti di topo transgenico, *knockout* per Emilina-1, è stata localizzata la proteina mediante immunofluorescenza. Negli organi analizzati, l'Emilina-1 è espressa solo dall'endotelio e ciò è mostrato nei vasi adulti. In entrambe le linee transgeniche analizzate, sia nell'aorta che nella seconda ramificazione delle arterie mesenteriche, solamente la tonaca intima risulta marcata dopo incubazione con anticorpo anti Emilina-1 (figura 12B).

### Linea transgenica *SM22 $\alpha$ -Emilina-1*

La linea n° 165 dei topi transgenici *SM22 $\alpha$ -Emilina-1* è stata considerata la migliore linea sperimentale ottenuta, nonostante il livello di espressione del transgene sia, negli organi considerati, molto basso, addirittura non osservabile, con la metodologia scelta per l'analisi, in cuore e rene.

Le dimensioni del costrutto microiniettato sono modeste e la regione promotoriale del gene *SM22 $\alpha$*  non presenta elementi *enhancer* che possano incrementare l'attività del promotore stesso; probabilmente la sua espressione è strettamente dipendente dal sito d'inserzione. Inoltre l'espressione del transgene potrebbe essere rilevata con difficoltà perchè calcolata su cDNA retrotrascritto da RNA totale, in cui quello prodotto dalle cellule muscolari lisce è solo una piccola frazione. In esperimenti rivolti allo studio della sua attività promotoriale in organi adulti e nella vascolatura, il promotore *SM22 $\alpha$*  risulta espresso soprattutto durante le fasi di sviluppo embrionale e nei neonati, per cominciare gradualmente a decrescere già dopo due settimane dalla nascita; nella vita adulta mantiene bassi livelli di espressione nell'aorta e non è rilevabile in altri organi, tra cui polmone e rene (Xu et al., 2002). È possibile, quindi, che nei topi transgenici analizzati all'età di circa otto settimane, l'espressione del transgene sia molto diminuita e non rilevabile con la metodologia di analisi utilizzata. Immunofluorescenze eseguite per localizzare Emilina-1 transgenica in animali con assetto genetico *Emilin1<sup>-/-</sup>* hanno infatti dimostrato la presenza della proteina che, come atteso, è distribuita sia in tessuti embrionali sia in tessuti adulti solo nei pressi delle cellule muscolari lisce, come risulta chiaramente osservabile dall'analisi di vasi adulti di conduttanza e resistenza, mostrati in figura 12C. Anche negli organi in cui non è stato possibile misurare l'espressione del transgene, per esempio nel rene, la proteina risulta presente, espressa dalle cellule mesangiali del glomerulo (dati non mostrati).

### Linea transgenica *Emilin1-Multimerina-2*

Entrambe le linee ottenute dei transgenici *Emilin1-Multimerina-2* sono state analizzate. Negli organi considerati, il promotore di Emilina-1 esprime il cDNA transgenico di Multimerina-2 a bassi livelli e in alcuni casi, per esempio nel rene, la sua espressione non è rilevabile con la metodologia utilizzata (figura 11B). Per verificare che, nonostante i bassi livelli di espressione del cDNA transgenico, la proteina sia comunque prodotta negli organi considerati importanti per la regolazione pressoria e che essa sia espressa nelle regioni di espressione tipiche dell'Emilina-1

dal suo promotore endogeno, saranno condotte immunofluorescenze anti Multimerina-2 su sezioni di organi embrionali e adulti di topi *Mmrn2*<sup>-/-</sup>.

#### Linea transgenica *Tie2*-Multimerina-2

Dei topi transgenici appartenenti alla linea *Tie2*-Multimerina-2 sono state scelte le linee n° 6 e n° 15, in cui il cDNA transgenico è rispettivamente espresso come circa un allele endogeno di Multimerina-2 e dalle 2.5 alle 3.5 volte una copia di *Mmrn2* a seconda dell'organo considerato (figura 11B). La Multimerina-2 è espressa endogenamente solo nell'endotelio, quindi, in assetto genetico nullo per essa, il promotore endoteliale *Tie2* esprime la proteina transgenica in maniera selvatica. Ciò è stato verificato con immunofluorescenze su organi adulti di topo *Mmrn2*<sup>-/-</sup>. In figura 13, sono riportate le localizzazioni eseguite su vasi adulti di conduttanza e resistenza.

### **ANALISI DEL RECUPERO DEL FENOTIPO CARDIOVASCOLARE DEI TOPI *Emilin1*<sup>-/-</sup>**

Emilina-1 è abbondantemente espressa nel sistema cardiovascolare, sia durante lo sviluppo embrionale (Braghetta et al., 2002) che nell'adulto. I primi studi svolti per la comprensione della sua funzione *in vivo* condotti sui topi *knockout* hanno riguardato dunque l'analisi del sistema cardiovascolare, dimostrando la presenza di un fenotipo che lo coinvolge. I topi *Emilin1*<sup>-/-</sup> manifestano ipertensione sistemica, causata da un aumento delle resistenze periferiche e dalla diminuzione del diametro dei vasi arteriosi. La crescita delle cellule muscolari lisce vascolari appare ridotta e ciò sembra essere dovuto ad un eccesso della segnalazione del TGF-β1, di cui Emilina-1 è un regolatore negativo. Essa, attraverso il proprio dominio EMI, lo inibisce legandone la forma immatura e prevenendone la maturazione da taglio proteolitico (Zacchigna et al., 2006). Inoltre, dall'analisi istologica ed ultrastrutturale, nell'aorta risulta una deposizione irregolare di elastina tra le lamine elastiche, che sono alterate, hanno un decorso irregolare, delaminazioni ed interruzioni frequenti, e l'ancoraggio ad esse delle cellule endoteliali e muscolari lisce vascolari risulta danneggiato. Anche la morfologia di queste cellule è alterata; le cellule endoteliali appaiono vescicolose e protendono nello spazio tra le lamine elastiche, le cellule muscolari lisce risultano frastagliate con organelli alterati e cromatina condensata (Zanetti et al., 2004).

Per studiare il contributo delle cellule endoteliali e delle cellule muscolari lisce all'insorgenza del fenotipo cardiovascolare nei topi mutanti per Emilina-1, le linee dei topi transgenici per

l'Emilina-1 sono stati portati in assetto genetico *Emilin1*<sup>-/-</sup> e di questi animali è stato studiato il sistema cardiovascolare, misurandone la pressione arteriosa e analizzandone l'ultrastruttura dell'aorta.

Con incroci ripetuti tra topi transgenici *Emilin1*-Emilina-1 n° 73 e topi mutanti per l'Emilina-1, sono stati generati animali *knockout* in cui il cDNA di Emilina-1 è espresso nelle proprie regioni di espressione dal proprio promotore, come dimostrato dall'analisi di immunolocalizzazione già descritta. Come atteso, la produzione della proteina transgenica riesce a sostituire l'assenza di quella endogena. Sia in termini fisiologici che ultrastrutturali, i difetti caratteristici del topo mutante sono recuperati con livelli pressori del tutto paragonabili a quelli degli animali di controllo e le varie parti della parete dell'aorta risultano morfologicamente normali (figura 14). Anche il diametro dei vasi arteriosi periferici risulta normale se paragonato a quello di topi selvatici di controllo (dati non mostrati).

Analogamente, per il transgene *Tie2*-Emilina-1, sono state esaminate le linee n° 71 e n° 73, in modo da analizzare la possibilità che esistano differenze di comportamento nel caso in cui Emilina-1 sia rispettivamente meno o più espressa nel distretto endoteliale. In entrambe non è stato osservato un recupero dell'ipertensione arteriosa e i livelli pressori di questi animali sono simili a quelli degli *Emilin1*<sup>-/-</sup> (figura 15A). All'analisi ultrastrutturale dell'aorta, invece, sono state osservate significative differenze morfologiche. L'espressione del transgene n° 71 permette il recupero della morfologia delle cellule endoteliali, le quali risultano adese alla sottostante lamina elastica interna e mancano dell'aspetto vescicoloso tipico di quelle *knockout*. Tuttavia sia le lamine elastiche sia le cellule muscolari lisce appaiono ancora danneggiate, con anomale delaminazioni, distaccamenti e frastagliature (figura 15B). Il considerevole aumento dell'espressione dell'Emilina-1 nel distretto endoteliale per opera del transgene n° 73 addirittura peggiora l'aspetto morfologico dell'intima di questi animali. Non solo lamine elastiche e cellule muscolari lisce risultano ancora alterate, ma le cellule endoteliali presentano numerose dilatazioni vescicolari e distacchi dalla sottostante lamina elastica (figura 15C). È probabile che l'aumentata sintesi porti all'accumulo della proteina nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi e al rigonfiamento di questi organuli nelle cellule endoteliali.

L'analisi del transgene *SM22α*-Emilina-1 in topi *Emilin1*<sup>-/-</sup>, ha permesso di dedurre che Emilina-1 è necessaria e sufficiente per svolgere correttamente tutte le sue funzioni solo nelle cellule muscolari lisce. Gli studi fisiologici hanno dimostrato, infatti, che l'espressione del cDNA transgenico da parte del promotore *SM22α* è da sola sufficiente a riportare i valori della pressione arteriosa a livelli simili a quelli degli animali selvatici e anche il diametro dei vasi

arteriosi risulta normale. All'esame ultrastrutturale, le cellule muscolari lisce e le lamine elastiche presentano un aspetto normale, mentre le cellule endoteliali, in qualche caso, non manifestano pieno recupero della loro morfologia (figura 16).

## **ANALISI DEL RECUPERO DEL FENOTIPO CARDIOVASCOLARE DEI TOPI *Mmrn2*<sup>-/-</sup>**

I topi *knockout* per la Multimerina-2 sono stati generati nel laboratorio del prof. P. Bonaldo (P. Braghetta e P. Bonaldo, dati non pubblicati). Come Emilina-1, anche Multimerina-2 è espressa nel sistema cardiovascolare embrionale (Braghetta et al., 2004) ed adulto e ha con essa similarità di sequenza e struttura. A partire da queste osservazioni, è stato scelto d'investigare negli animali *Mmrn2*<sup>-/-</sup> le funzioni e la morfologia dell'apparato cardiovascolare, in particolare del tessuto vascolare, considerando che la proteina in oggetto è espressa dall'endotelio. Da analisi ultrastrutturali, l'aorta del topo mutante non presenta grossolane alterazioni morfologiche; ad un esame più attento la superficie endoteliale si presenta più sottile con estroflessioni protese verso il lume del vaso (dati non mostrati). Rispetto al topo normale, quello mutante per la Multimerina-2 manifesta ipertensione arteriosa, raggiungendo livelli simili a quelli della pressione del topo *Emilin1*<sup>-/-</sup>. Inoltre, il diametro dei vasi arteriosi è diminuito, anche se in modo molto minore rispetto a quello dei mutanti di *Emilin1*. Anche in questo caso, potrebbe esserci un coinvolgimento dell'attività del TGF- $\beta$ 1, considerato che evidenze biochimiche mostrano come anche Multimerina-2, attraverso il proprio dominio EMI, ha un ruolo nel regolare negativamente la sua attivazione (si veda, ad esempio, figura 7C). Peraltro ad avvalorare quest'ipotesi è il fatto che, *in vivo*, l'inattivazione di un allele di TGF- $\beta$ 1 in topi *Mmrn2*<sup>-/-</sup> è sufficiente a riportare i valori pressori a livelli normali (D. Bizzotto, G. Bressan e G. Lembo, dati non pubblicati).

Analogamente a quanto fatto per i transgeni dell'Emilina-1, anche il costrutto *Tie2*-Multimerina-2, mediante opportuni incroci ripetuti, è stato espresso in topi *Mmrn2*<sup>-/-</sup>. Come mostrato con immunolocalizzazione, la proteina transgenica è prodotta e distribuita nel solo endotelio (figura 13). Nonostante non sia stato utilizzato il suo promotore endogeno, non ancora caratterizzato, il promotore di *Tie2* assicura che l'espressione di Multimerina-2 avvenga nelle sole regioni di espressione endogena. Quindi, questo transgene permetterà di studiare il recupero del fenotipo cardiovascolare dei topi mutanti; analisi che al momento sono in corso.

Questi animali serviranno da controllo positivo per gli esperimenti mirati a studiare la possibilità che Multimerina-2 compensi Emilina-1. Infatti, permetteranno di confermare che l'espressione

della Multimerina-2 transgenica dalle cellule endoteliali, distretto caratteristico dell'espressione endogena, ha, *in vivo*, le stesse funzioni di quella normale.

## **STUDIO DELLA COMPENSAZIONE FUNZIONALE TRA EMILINA-1 E MULTIMERINA-2**

Una problematica affrontata da questo progetto di ricerca riguarda la comprensione della possibilità che Emilina-1 e Multimerina-2, considerate le loro somiglianze di sequenza, struttura ed espressione, possano, nel sistema cardiovascolare, compensare l'una le funzioni dell'altra. Fisiologicamente ciò non avviene. Animali con assetto genetico nullo per Emilina-1 manifestano un fenotipo cardiovascolare con ipertensione arteriosa e diminuzione del calibro vascolare (Zacchigna et al., 2006). Analogamente, anche in topi *Mmrn2*<sup>-/-</sup> la pressione sistemica è significativamente aumentata per aumento delle resistenze vascolari periferiche (D. Bizzotto, G. Bressan e G. Lembo, dati non pubblicati).

La mancanza di compensazione di Emilina-1 da parte di Multimerina-2 potrebbe essere spiegata considerando che Emilina-1, per svolgere le proprie funzioni, è richiesta nelle cellule muscolari lisce, dove, endogenamente, Multimerina-2 non è espressa. Per studiare se l'espressione di Multimerina-2 nelle cellule muscolari lisce vascolari può compensare l'assenza di Emilina-1, sono in corso esperimenti su topi *Emilin1*<sup>-/-</sup> in cui, mediante opportuni e ripetuti incroci, il transgene *Emilin1*-Multimerina-2 è stato espresso.

Più complesso è trovare una spiegazione alla mancata compensazione fisiologica di Multimerina-2 da parte di Emilina-1, perché entrambe sono espresse nell'endotelio. Le ipotesi avanzate per spiegare questo comportamento sono due: a) l'espressione endogena di Emilina-1 nell'endotelio ha un dosaggio troppo basso per impedire la comparsa di un fenotipo vascolare nei topi mutanti per Multimerina-2; b) Multimerina-2 ha peculiari proprietà funzionali che la rendono indispensabile per svolgere le proprie funzioni.

Utilizzando le linee transgeniche *Tie2*-Emilina-1 generate, è stato possibile, con ripetuti incroci opportuni, sovraesprimere nel solo endotelio di topi *Mmrn2*<sup>-/-</sup> il cDNA di Emilina-1, che, come dimostrato, produce una proteina funzionale. Gli animali incrociati con la linea transgenica n° 71 sono ancora in analisi; invece ai topi, in cui il transgene *Tie2*-Emilina-1 n° 73 esprime Emilina-1 a livelli considerevolmente superiori rispetto al gene endogeno, è già stata misurata la pressione arteriosa. Essi risultano ancora ipertesi, con valori del tutto paragonabili a quelli del topo *Mmrn2*<sup>-/-</sup>. Per assicurare che l'elevata espressione di Emilina-1 nell'endotelio non procuri essa

stessa un danno tale da alterare la normale funzionalità vascolare, il transgene n° 73 è stato espresso in topo selvatico; in questi animali i valori pressori sono normali e paragonabili a quelli degli animali di controllo (figura 17).

La mancanza di compensazione di Multimerina-2 da parte di Emilina-1, anche quando sovraespressa, avvalorava l'ipotesi per cui è possibile che Multimerina-2 abbia caratteristiche insostituibili, che, per il momento, sono state ricercate nella sua struttura proteica.

Emilina-1 e Multimerina-2 sono strutturalmente simili: hanno un peptide segnale per la secrezione nell'ambiente extracellulare, un dominio EMI N-terminale ricco di cisteine, una regione centrale ricca in  $\alpha$ -eliche con un'elevata probabilità a formare strutture *coiled-coil* e un dominio gC1q C-terminale (Colombatti et al., 2000). Utilizzando opportuni *software* di allineamento le due proteine sono state paragonate in base alla sequenza amminoacidica, alle caratteristiche dei residui e alle predizioni di struttura secondaria e terziaria (figura 18). Nonostante nelle proprie regioni centrali, dal C-terminale del dominio EMI all'N-terminale del dominio gC1q, entrambe le proteine condividano *heptad repeat* necessari per la formazione della struttura *coiled-coil*, esse risultano poco conservate sia all'analisi della sequenza che della struttura. In Emilina-1, infatti, sono presenti anche due domini simili a *leucine zipper* e un breve segmento collagenico, forse implicati nel mantenere la stabilità degli omotrimeri (Mongiati et al., 2000); in Multimerina-2 un *cluster* di amminoacidi basici, che presenta una sequenza consenso per il legame a GAG (eparina ed eparan solfato) (M. Milanetto e P. Bonaldo, dati non pubblicati). Finora questi sotto-domini sono stati poco studiati, per cui è possibile che le peculiarità funzionali delle due proteine siano intrinseche proprio ad essi.

Multimerina-2 è endogenamente espressa solo nell'endotelio e ciò rappresenta una semplificazione in questo tipo di studio. Ammettendo, infatti, che le regioni centrali di Multimerina-2 siano le sole necessarie per il corretto svolgimento delle sue funzioni, sarà sufficiente la loro espressione dalle cellule endoteliali per impedire la manifestazione del fenotipo cardiovascolare negli animali mutanti.

L'approccio sperimentale è consistito nella generazione di cDNA ibridi in cui tutta la sequenza delle regioni centrali è stata scambiata tra Emilina-1 e Multimerina-2. Ciò dovrebbe garantire la corretta traduzione di proteine mature, i normali processi di maturazione post-traduzionale, la secrezione nell'ambiente extracellulare e l'assemblaggio in multimeri.

Mediante *western blotting* è stato dimostrato che entrambi i cDNA ibridi sono correttamente tradotti. Per individuare la proteina ibrida in cui la regione di Multimerina-2 è inserita tra il dominio EMI e il dominio gC1q di Emilina-1 (E1/M2/E1) è stato utilizzato un anticorpo che

riconosce la regione centrale della Multimerina-2 e viceversa per il riconoscimento della proteina in cui tra il dominio EMI e il gC1q della Multimerina-2 è stata inserita la regione centrale dell'Emilina-1 (M2/E1/M2). Esse migrano in gel riducente di poliacrilammide in maniera del tutto paragonabile alle proteine selvatiche, rispettando il peso molecolare presunto (figura 19B). Esse, inoltre, in opportuni saggi funzionali risultano avere attività di inibizione sul TGF- $\beta$ 1 paragonabile a quella delle rispettive proteine selvatiche (figura 19C). Questi esperimenti dimostrano che le regioni centrali di Emilina-1 e di Multimerina-2 non interferiscono negativamente sull'attività dei reciproci domini EMI, che, come è risultato da studi precedentemente svolti *in vitro*, è sufficiente da solo per inibire l'attività del TGF- $\beta$ 1 sul proprio gene *reporter* (Zacchigna et al., 2006; D. Bizzotto e G. Bressan, dati non pubblicati).

Le sequenze promotoriali ed *enhancer* del gene *Tie2* sono state utilizzate per generare transgeni in cui l'espressione dei cDNA ibridi appena descritti sia attivata solo nei distretti endoteliali (figura 19A), per studiare il recupero del fenotipo vascolare in topi dall'assetto genetico nullo per Multimerina-2. Al momento i due transgeni ottenuti sono stati microiniettati in oociti fecondati, per la generazione di animali transgenici che dovranno essere caratterizzati.



## DISCUSSIONE

Questo studio si è proposto l'analisi di due aspetti diversi, che riguardano entrambi un approfondimento sulla manifestazione del fenotipo cardiovascolare in topi con assetto genetico nullo per Emilina-1 e Multimerina-2. Essi non presentano evidenti alterazioni fenotipiche e sono fertili. Studi del loro sistema cardiovascolare, dove entrambe le proteine hanno espressione embrionale ed adulta diffusa, hanno dimostrato la presenza di ipertensione arteriosa sistemica dovuta ad aumento delle resistenze periferiche. Questo fenotipo è causato da un aumento della segnalazione del TGF- $\beta$ 1 dovuto al fatto che sia Emilina-1 (Zacchigna et al., 2006) che Multimerina-2 (D. Bizzotto, G. Bressan e G. Lembo, dati non pubblicati) sono inibitori del suo processo di maturazione.

Poiché Emilina-1 è prodotta sia dalle cellule endoteliali che dalle cellule muscolari lisce ed entrambi i tipi di cellule influiscono sulla regolazione della pressione arteriosa (Schmidt et al., 2008; Feletou e Vanhoutte, 2009; Halayko e Solway, 2001), il primo quesito che ci siamo posti è stato quello di definire il contributo dei due tipi cellulari nell'insorgenza del fenotipo ipertensivo dovuto alla mancanza di questa proteina. Mediante la ri-espressione di Emilina-1 in entrambi i tipi cellulari grazie all'uso di promotori tessuto-specifici, abbiamo studiato il recupero del fenotipo mutante. Dai risultati ottenuti, abbiamo potuto concludere che Emilina-1, per intervenire correttamente a prevenire il processo di maturazione del TGF- $\beta$ 1, è richiesta solo nelle cellule muscolari lisce vascolari e che la frazione di TGF- $\beta$ 1 prodotta e attivata in questo distretto è determinante nella regolazione dell'omeostasi vascolare. L'espressione del cDNA di Emilina-1 solo in queste cellule (transgene *SM22 $\alpha$ -Emilina-1*) si è dimostrata sufficiente per garantire la diminuzione dei valori della pressione e il ripristino della dimensione del diametro dei vasi arteriosi, che sono paragonabili a quelli degli animali transgenici *Emilin1-Emilina-1* di controllo e a quelli degli animali selvatici. L'esame ultrastrutturale dell'aorta dei topi transgenici *SM22 $\alpha$ -Emilina-1 knockout* per Emilina-1 ha dimostrato che oltre alle cellule muscolari lisce anche le lamine elastiche hanno morfologia paragonabile a quella dei topi di controllo, per cui è possibile che Emilina-1 per svolgere il proprio ruolo nell'elastogenesi (Zanetti et al., 2004) debba essere espressa proprio nelle cellule muscolari lisce. Le cellule endoteliali, invece, presentano qualche alterazione, in particolare distaccamenti dalla lamina elastica interna. È noto che Emilina-1 mediante il proprio dominio gC1q ha funzione adesiva per le cellule (Spessotto et al., 2003) ed è possibile che sia necessaria per garantire corrette interazioni di esse con i

componenti della matrice extracellulare circostante. Infatti, l'espressione, a livelli simili a quelli del gene endogeno, del cDNA di Emilina-1 nelle sole cellule endoteliali per attività del promotore del gene *Tie2* (transgene *Tie2*-Emilina-1.71) consente un recupero della loro morfologia. Tuttavia, quando l'espressione della proteina transgenica raggiunge livelli notevolmente superiori rispetto all'espressione endogena (linea transgenica *Tie2*-Emilina-1.73), le cellule endoteliali presentano alterazioni morfologiche, in particolare dilatazioni del reticolo endoplasmatico. Fisiologicamente, come indicato nelle indagini di immunofluorescenza, Emilina-1 oltre che essere secreta e depositata nello strato sotto-endoteliale è presente all'interno delle cellule perchè è possibile che le cellule endoteliali la secernano con un processo lento, trattenendone una frazione dentro il citoplasma. L'aumento della sintesi della proteina non necessariamente è associato ad un incremento del rilascio extracellulare della stessa, che, accumulandosi ulteriormente nel citoplasma cellulare, potrebbe essere responsabile di rigonfiamento del reticolo endoplasmatico e dell'apparato di Golgi.

Nonostante il livello di espressione del transgene *SM22 $\alpha$* -Emilina-1.165 nell'aorta di topi mutanti sia sensibilmente inferiore rispetto all'espressione del gene endogeno, esso complessivamente ha permesso un recupero del fenotipo pressorio. Esperimenti di immunolocalizzazione, finalizzati a studiare la distribuzione della proteina transgenica in aorta e nelle piccole ramificazioni dell'arteria mesenterica di topo adulto, hanno tuttavia dimostrato che essa è abbondantemente depositata e rilevabile in entrambi questi tessuti. È possibile che, come già riportato in letteratura, nell'adulto l'attività di espressione del promotore di *SM22 $\alpha$*  decresca progressivamente nei grossi vasi (Xu et al., 2002). Inoltre potrebbe essere che nei piccoli vasi di resistenza, importanti nel regolare la pressione sanguigna, per cui non sono stati stimati i livelli di espressione del transgene, il cDNA sia più abbondantemente espresso rispetto all'aorta.

La seconda problematica che abbiamo affrontato durante questo progetto di ricerca, riguarda la possibilità che Emilina-1 e Multimerina-2 nel sistema cardiovascolare abbiano ridondanza genetica e possano compensare una le funzioni dell'altra. Questo problema riguarda specificatamente gli endoteli, poiché Multimerina-2 è prodotta peculiarmente solo da questo tipo di cellule. Per quanto appena discusso, tuttavia, per svolgere correttamente le proprie funzioni ed impedire la manifestazione del fenotipo mutante, Emilina-1 è necessaria e sufficiente nelle cellule muscolari lisce vascolari dove Multimerina-2 non è espressa.

L'osservazione dei fenotipi cardiovascolari dei topi *Emilin1*<sup>-/-</sup> e *Mmrn2*<sup>-/-</sup> induce ad escludere l'ipotesi della ridondanza genetica e della compensazione funzionale fisiologica, nonostante le due proteine condividano un'organizzazione proteica multimodulare simile e simile funzione sul

TGF- $\beta$ 1. La ragione principale per cui Multimerina-2 fisiologicamente non compensa la deficienza di Emilina-1 potrebbe risiedere nel fatto che essa non sia prodotta dalle cellule muscolari lisce. Studi sul recupero del fenotipo dei topi mutanti mediante dimezzamento del dosaggio genico di TGF- $\beta$ 1 hanno permesso di stabilire che i due fenotipi cardiovascolari dipendono dall'attività di questo fattore di crescita e saggi funzionali e biochimici *in vitro* hanno dimostrato che Emilina-1 e Multimerina-2 esercitano, con modalità del tutto paragonabili, la loro azione di regolatori negativi sul processamento del TGF- $\beta$ 1 con i propri domini EMI (Zacchigna et al., 2006; D. Bizzotto, G. Bressan e G. Lembo, dati non pubblicati). Pertanto, pur esistendo la possibilità che Multimerina-2 abbia in sé quelle caratteristiche necessarie a sostituire le funzioni di Emilina-1 sul processo di maturazione di TGF- $\beta$ 1, solo l'espressione di Multimerina-2 dalle cellule muscolari lisce di topi *Emilin1*<sup>-/-</sup> e lo studio del loro fenotipo vascolare (esperimento al momento in corso) potrà rispondere al quesito se, a livello delle cellule muscolari lisce dei vasi, l'azione di inibizione sul processo di maturazione del TGF- $\beta$ 1 deve necessariamente essere espletata dall'Emilina-1 o possa venire compensata dalla Multimerina-2. Anche se le condizioni create negli animali transgenici sono non fisiologiche e molto particolari, i risultati daranno un'informazione importante permettendoci di mettere in evidenza eventuali differenze funzionali tra le due molecole, che potrebbero riguardare la loro biosintesi o secrezione o deposizione nella matrice extracellulare.

Se la ragione per cui Multimerina-2 non compensa Emilina-1 può essere semplicemente compresa, più complesso è trovare una spiegazione alla mancanza di compensazione fisiologica di Multimerina-2 da parte di Emilina-1. Come menzionato sopra, nei vasi Multimerina-2 è espressa soltanto dalle cellule endoteliali, depositandosi prevalentemente nella matrice extracellulare tra l'endotelio e la lamina elastica interna. In questa regione le due proteine risultano essere co-localizzate, eppure il topo *Mmrrn2*<sup>-/-</sup> manifesta comunque un fenotipo cardiovascolare. Le ipotesi che abbiamo formulato per spiegare questo aspetto sono le seguenti: a) l'espressione di Emilina-1 da parte delle cellule endoteliali risulta insufficiente in mancanza di Multimerina-2 per inibire correttamente il processo di maturazione di TGF- $\beta$ 1; b) nella tonaca intima le due proteine condividono solo parzialmente la propria distribuzione; c) Emilina-1 e Multimerina-2 hanno caratteristiche peculiari per cui non sono vicendevolmente sostituibili.

Per sviluppare una tesi di supporto alla prima ipotesi e studiare il recupero del fenotipo iperteso dei topi *Mmrrn2*<sup>-/-</sup>, abbiamo sovraespresso Emilina-1 nelle regioni endoteliali utilizzando i transgeni *Tie2-Emilina-1*. Essi, nell'aorta, esprimono il cDNA transgenico a livelli paragonabili a quelli di un allele *Emilin1* (linea n° 71) o di molto superiori (linea n° 73). È necessario

considerare, però, che questa stima è fatta relativamente al gene endogeno, espresso sia dalle cellule muscolari lisce che dalle cellule endoteliali. All'osservazione, la parete dell'aorta risulta avere mediamente 5 o 6 strati di cellule muscolari lisce nella tonaca media e uno strato di cellule endoteliali nella tonaca intima, che, quindi, rappresentano circa il 20% sul totale dei tipi cellulari presenti. Perciò, se volessimo considerare solo il contributo delle cellule endoteliali all'espressione del gene endogeno, i valori di espressione del transgene andrebbero corretti di un fattore di almeno 5. Pertanto i valori di espressione del cDNA transgenico sono, di fatto, sempre superiori a quelli del gene endogeno. Dall'analisi del fenotipo, tuttavia, questi animali risultano ancora ipertesi, suggerendoci che la mancanza di compensazione di Multimerina-2 non è dovuta ad insufficiente produzione di Emilina-1 dall'endotelio. Qui è interessante ricordare una parziale differenza nella distribuzione delle due proteine. Come già descritto, esse sono prevalentemente co-localizzate nello strato sotto-endoteliale, ma Emilina-1 è anche rilevabile all'interno delle cellule endoteliali, cosa che ci ha indotto a pensare che essa possa subire processi di biosintesi e/o secrezione più lenti di quelli di Multimerina-2, per la quale la localizzazione intracellulare non è apprezzabile. Nonostante la simile funzione biochimica sul TGF- $\beta$ 1 rilevata con saggi *in vitro*, è possibile che nelle cellule endoteliali biosintesi, secrezione e deposizione di queste due proteine abbiano una regolazione spazio-temporale diversa, che le renda diversamente disponibili e funzionali per svolgere la propria azione di inibizione sul processamento del proTGF- $\beta$ 1.

Bisogna anche considerare la possibilità che la deposizione nella matrice extracellulare di Emilina-1 e Multimerina-2 abbia degli aspetti caratteristici. Entrambe si associano a formare grossi aggregati molecolari per associazioni successive di omotrimeri con la formazione di ponti disolfuro (Mongiat et al., 2000; M. Milanetto e P. Bonaldo, dati non pubblicati), ma se Emilina-1, tramite il proprio dominio gC1q si lega sulla superficie cellulare (Spessotto et al., 2003), ciò non è vero per Multimerina-2 che, d'altro canto, presenta una sequenza consenso per interazione con glicosaminoglicani (Christian et al., 2001; M. Milanetto e P. Bonaldo, dati non pubblicati). Potrebbe essere che anche queste differenze siano causa della mancata compensazione della rispettiva funzione endoteliale.

È infine possibile che Emilina-1 e Multimerina-2 abbiano delle caratteristiche peculiari indispensabili per il corretto funzionamento dell'endotelio nella regolazione dell'omeostasi vascolare. Alla ricerca di elementi caratteristici, abbiamo individuato differenze strutturali che, in alcuni casi, trovano riscontro in differenze funzionali. Nella loro organizzazione multimodulare, le due proteine sono molto simili, condividendo la presenza dall'N- al C-

terminale di peptide segnale, dominio EMI, regioni centrali con *heptad repeat* necessari per la formazione di strutture *coiled-coil*, dominio gC1q (Colombatti et al., 2000). I domini EMI sono molto conservati ed in essi sembra sia racchiusa la funzione di inibizione del processo di maturazione del TGF- $\beta$ 1 per entrambe le proteine (Zacchigna et al., 2006; D. Bizzotto e G. Bressan, dati non pubblicati). Nel topo, il dominio gC1q tra Emilina-1 e Multimerina-2 ha un grado di similarità di circa il 40%. In entrambe sembra essere coinvolto nei processi di trimerizzazione (Mongiat et al., 2000; M. Milanetto e P. Bonaldo, dati non pubblicati), ma solo in Emilina-1 promuove l'adesione alle cellule (Doliana et al., 1999) mediante l'interazione con l'integrina  $\alpha_4\beta_1$  (Spessotto et al., 2003). Tuttavia le meno conservate risultano le regioni centrali in cui sono presenti caratteristici domini strutturali poco studiati che potrebbero conferire specifiche funzioni.

Per semplicità di approccio, considerato che Multimerina-2 è endogenamente espressa solo dall'endotelio e che il promotore di *Tie2* è un forte e specifico promotore endoteliale, abbiamo cominciato con lo studio, attualmente in corso, della funzione *in vivo* delle regioni centrali di Multimerina-2. La proteina ibrida che le contiene tra i domini EMI e gC1q di Emilina-1 espressa nell'endotelio di topi *Mmrn2*<sup>-/-</sup> ne permetterà il recupero del fenotipo se in esse soltanto, indipendentemente dagli altri domini proteici, fossero racchiuse le caratteristiche necessarie per lo svolgimento delle funzioni di Multimerina-2. Mentre, al contrario, l'espressione della proteina ibrida con dominio EMI e gC1q di Multimerina-2, ma regione centrale di Emilina-1, non dovrebbe recuperare il fenotipo cardiovascolare.

In conclusione, quello che emerge da questo lavoro di ricerca è che Emilina-1 è necessaria solo nelle cellule muscolari lisce per svolgere le sue funzioni e che con Multimerina-2 non svolge funzioni ridondanti nel sistema cardiovascolare, in particolare nell'endotelio. È probabile che questo sia dovuto, almeno in parte, a domini strutturali caratteristici che conferiscono funzioni peculiari da cui forse non è possibile prescindere affinché tutti i normali meccanismi cellulari siano garantiti. Inoltre le due proteine potrebbero avere diversi processi di biosintesi o secrezione nell'ambiente extracellulare o deposizione nella MEC, aspetti avvalorati dal fatto che Emilina-1 e Multimerina-2 hanno distribuzione solo parzialmente sovrapponibile nel distretto endoteliale.

# FIGURE

### **Figura 1: Superfamiglia EDEN (EMI domain endowed)**

La superfamiglia proteica EDEN è costituita da proteine che condividono la presenza del dominio N-terminale EMI. Essa è composta da tre distinte famiglie proteiche:

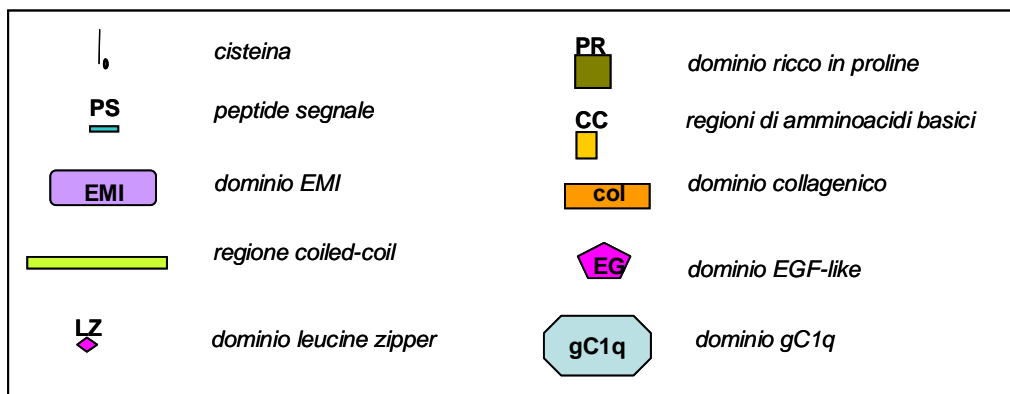
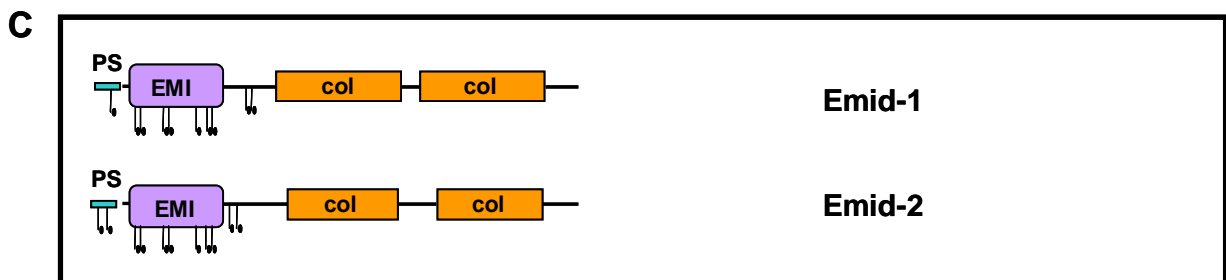
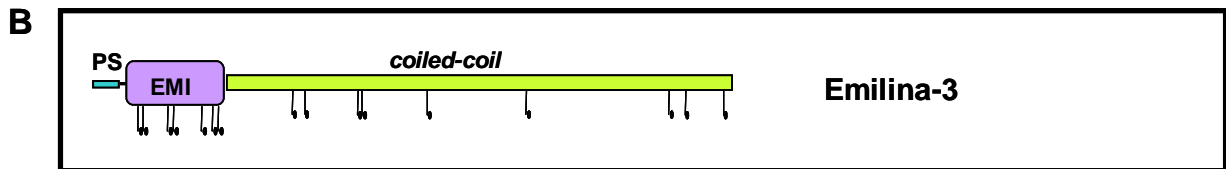
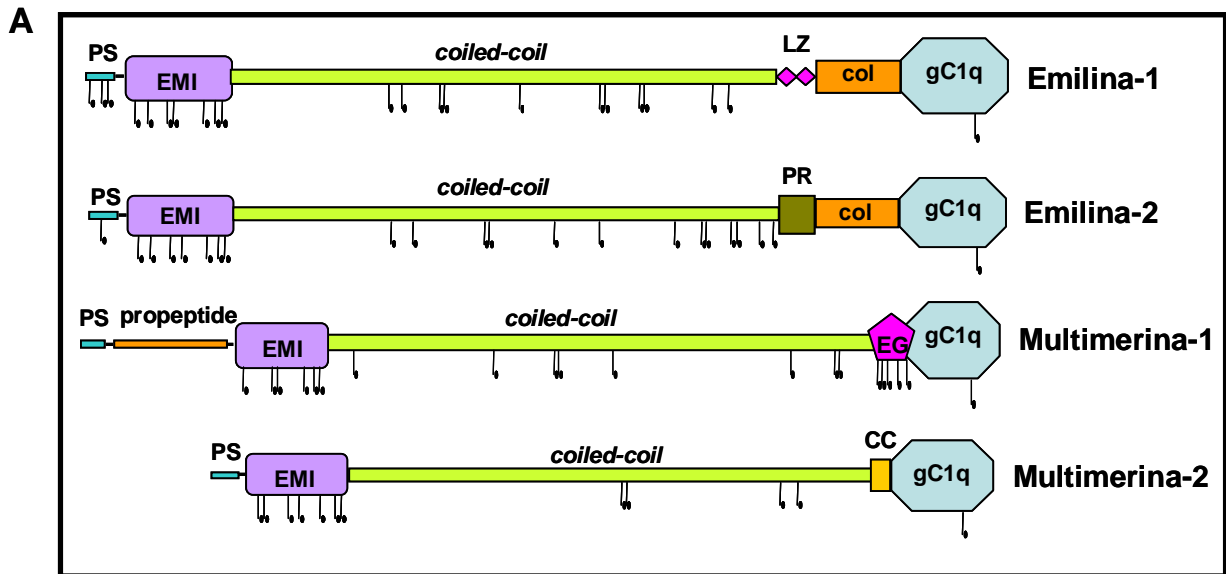
**A** Emiline/Multimerine, costituita da quattro membri che, oltre al dominio EMI, condividono una regione centrale ad  $\alpha$ -elica con elevata probabilità di formare strutture *coiled-coil* e il dominio C-terminale gC1q.

**B** Emiline tronche, rappresentate da un solo membro, l'Emilina-3, che, rispetto alle Emiline/Multimerine, manca del dominio gC1q.

**C** Emu, formata da Emid-1 e Emid-2, caratterizzate dalla presenza del dominio EMI e di regioni collageniche.

In basso è rappresentata una legenda dei differenti domini proteici presenti.

# Superfamiglia EDEN

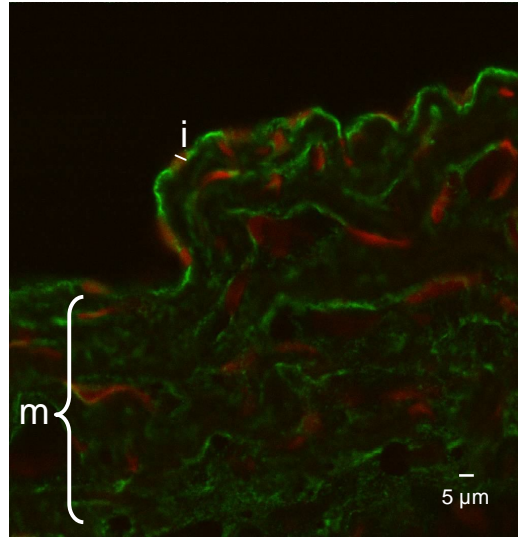
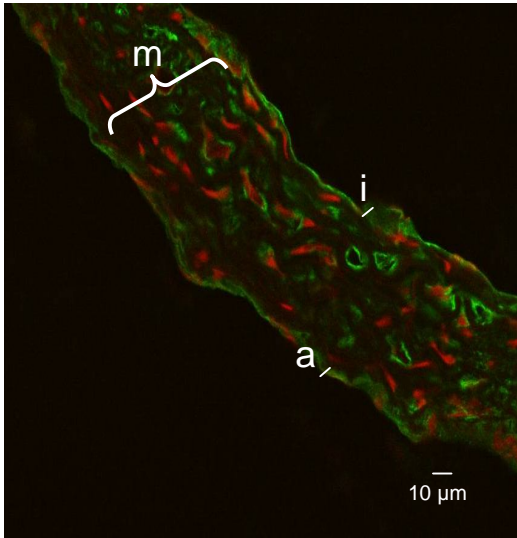


## **Figura 2: Distribuzione di Emilina-1 nel tessuto vascolare adulto**

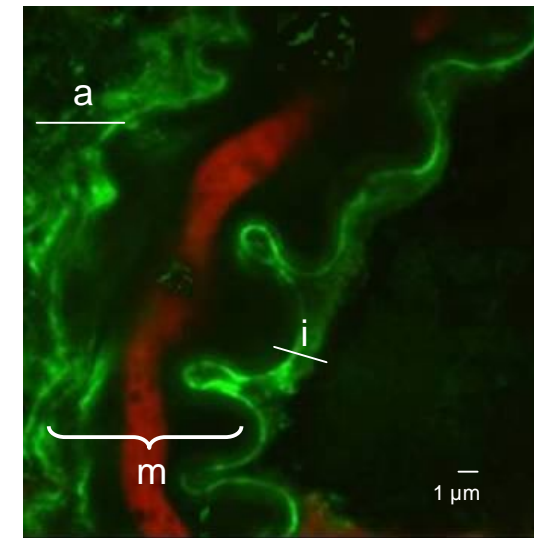
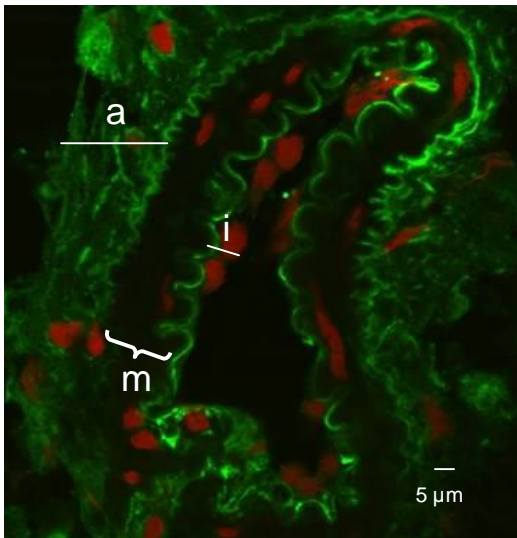
Nei vasi di topo adulto, Emilina-1 è localizzata nella tonaca intima (i), nella tonaca muscolare (m) e nella tonaca avventizia (a). Qui sono mostrate immunofluorescenze contro Emilina-1 (verde) su sezioni congelate di aorta toracica e arteriola mesenterica (seconda ramificazione dell'arteria mesenterica). Con ioduro di propidio (rosso) sono marcati i nuclei.

Tutte le sezioni analizzate hanno uno spessore di 7  $\mu\text{m}$ . Su ogni immagine è riportata la scala d'ingrandimento.

## AORTA



## ARTERIOLA MESENTERICA



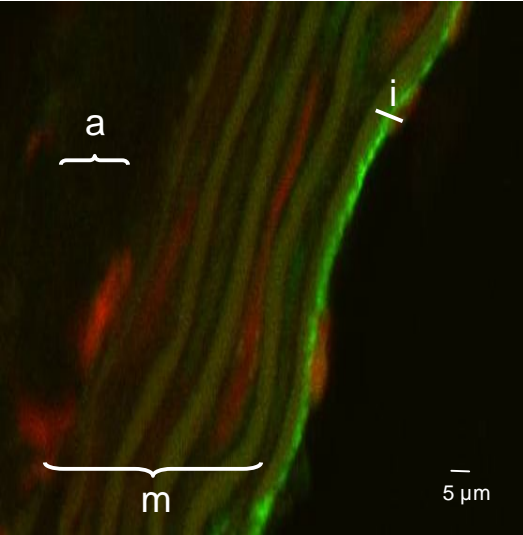
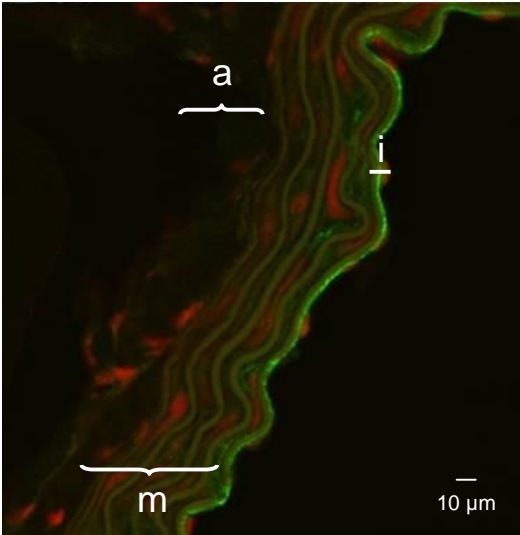
### **Figura 3: Distribuzione di Multimerina-2 nel tessuto vascolare adulto**

Multimerina-2 è localizzata solo nella tonaca intima (i) dei vasi di topo adulto.

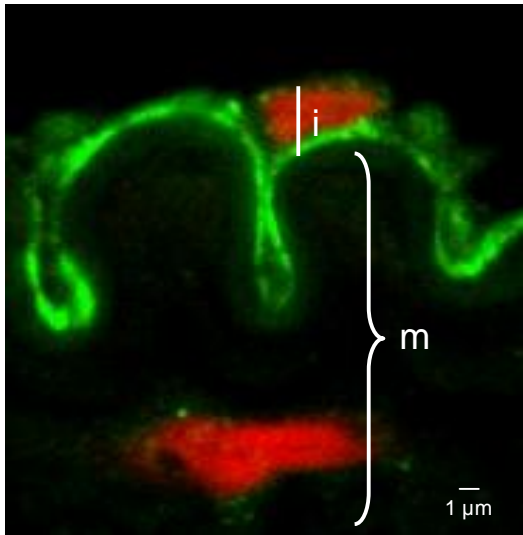
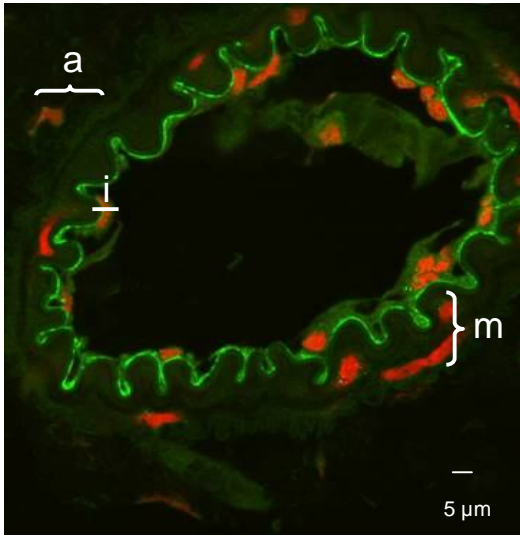
Qui rappresentati due differenti ingrandimenti di immunofluorescenze contro Multimerina-2 (verde) su sezioni congelate di aorta toracica e seconda ramificazione delle arterie mesenteriche. I nuclei (rosso) sono marcati con ioduro di propidio.

Tutte le sezioni analizzate hanno uno spessore di 7  $\mu\text{m}$ . Su ogni immagine è riportata la scala d'ingrandimento. m: tonaca muscolare; a: tonaca avventizia.

**AORTA**



**ARTERIOLA MESENTERICA**



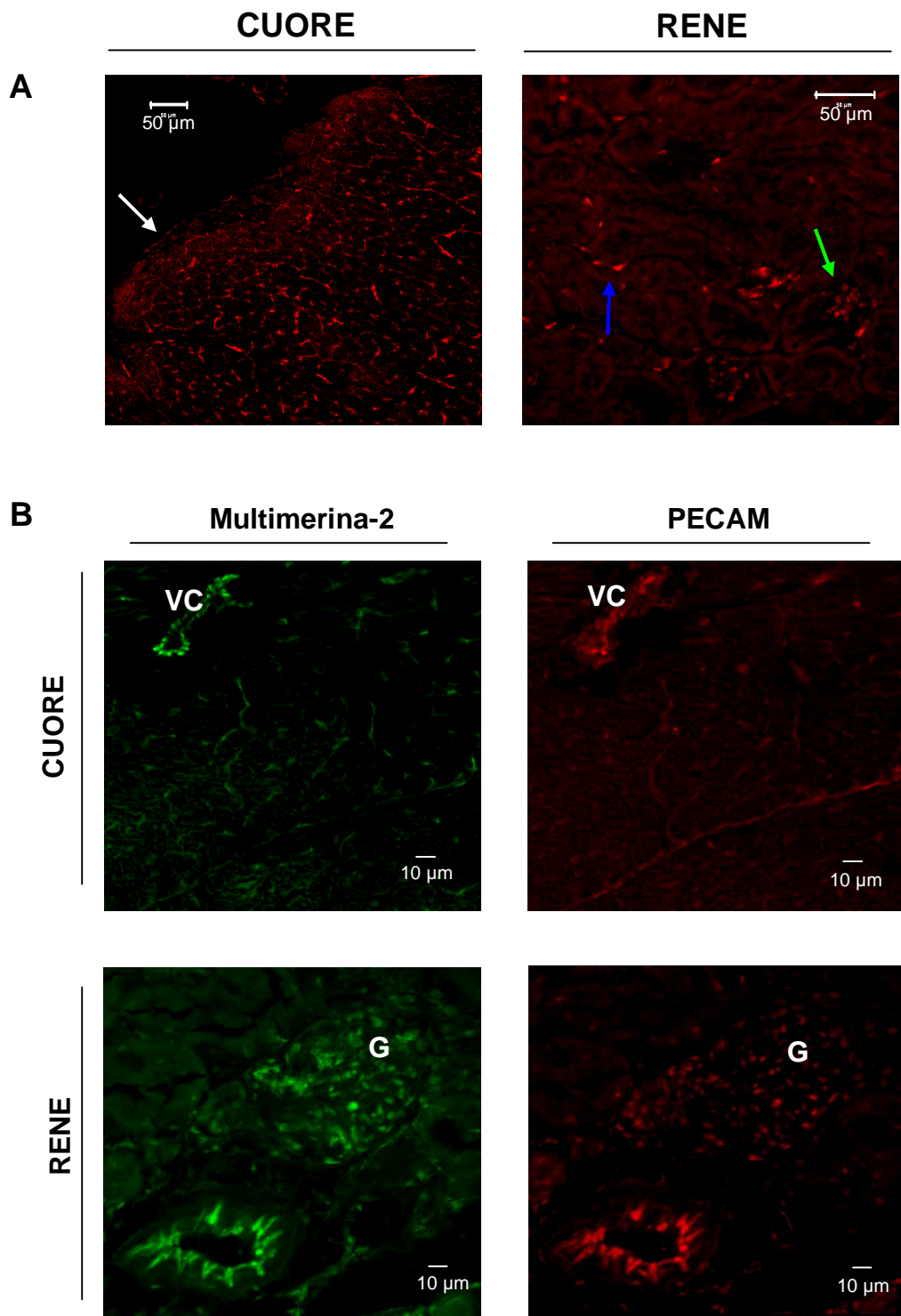
#### **Figura 4: Distribuzione di Multimerina-2 in organi adulti**

**A** Immunofluorescenze anti Multimerina-2 (rosso) su sezioni congelate di cuore e rene di topo adulto. La proteina è distribuita nei vasi del miocardio e, debolmente, nell'endocardio (freccia bianca). Nel rene è localizzata nei vasi dei glomeruli (freccia verde) e in quelli tra i tubuli (freccia blu).

**B** Localizzazione mediante immunofluorescenza di Multimerina-2 (verde) e PECAM (rosso) su sezioni congelate di cuore e rene di topo adulto. Multimerina-2 risulta prevalentemente co-localizzata al PECAM.

VC: vaso coronarico; G:glomerulo

Tutte le sezioni analizzate hanno uno spessore di 7  $\mu\text{m}$ . Su ogni immagine è riportata la scala d'ingrandimento.



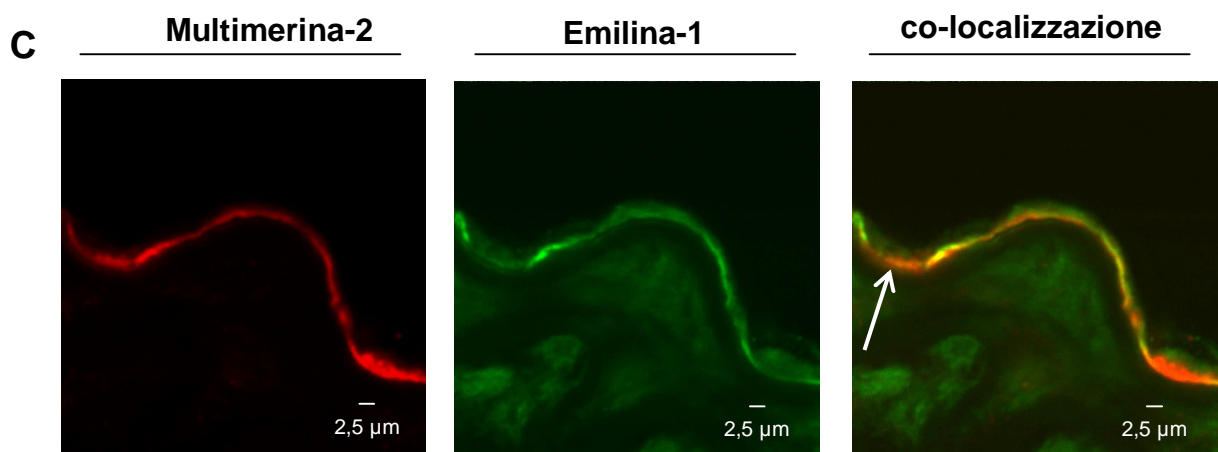
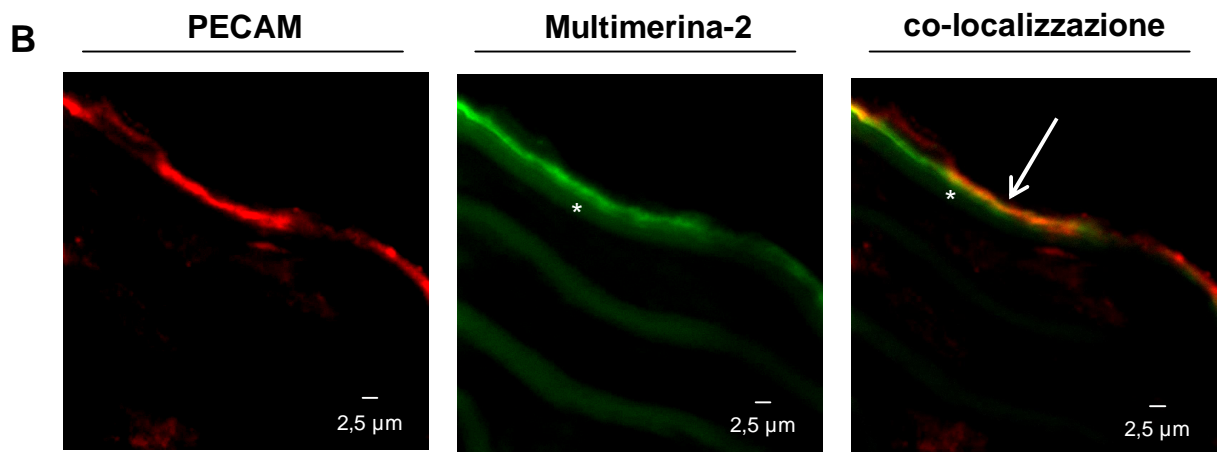
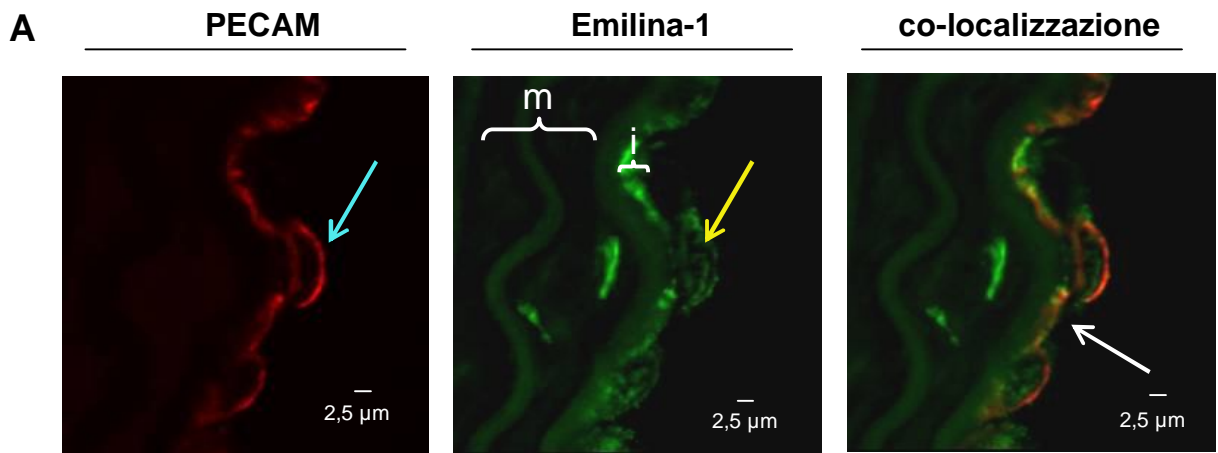
### **Figura 5: Co-localizzazione di Emilina-1 e Multimerina-2 nell'aorta di topo adulto**

**A** Immagini confocali di immunofluorescenze anti PECAM (rosso) e anti Emilina-1 (verde) su sezioni congelate di aorta toracica. PECAM è distribuita solo nella tonaca intima (i), Emilina-1 è localizzata sia nell'intima (i) che nella tonaca muscolare (m). Le due proteine sono prevalentemente co-distribuite nello strato sotto endoteliale (freccia bianca); nelle cellule, PECAM è distribuito sulla superficie apicale (freccia azzurra) ed Emilina-1 soprattutto all'interno (freccia gialla).

**B** Immagini confocali di immunofluorescenze anti PECAM (rosso) e anti Multimerina-2 (verde) su sezioni congelate di aorta toracica. Multimerina-2 è co-localizzata al PECAM prevalentemente solo nella regione sotto endoteliale (freccia bianca), tra la lamina elastica interna (visibile per autofluorescenza e marcata con \*) e l'endotelio.

**C** Immagini confocali di immunofluorescenze anti Multimerina-2 (rosso) e anti Emilina-1 (verde) su sezioni congelate di aorta toracica. Esse risultano sovrapposte prevalentemente solo nella regione sotto endoteliale (freccia bianca).

Tutte le sezioni analizzate hanno uno spessore di 7  $\mu\text{m}$ . Su ogni immagine è riportata la scala d'ingrandimento.



## Figura 6: Schema dei costrutti transgenici

**A** *Emilin1*-Emilina-1: il cDNA di Emilina-1 è stato clonato all'interno delle sequenze promotoriali del gene di Emilina-1 (arancio).

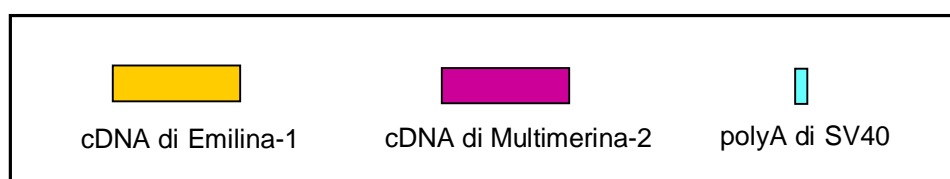
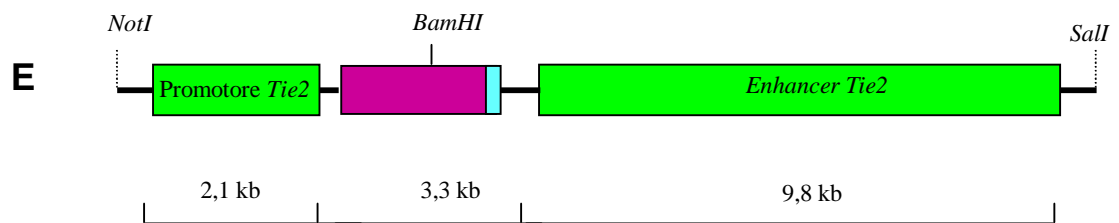
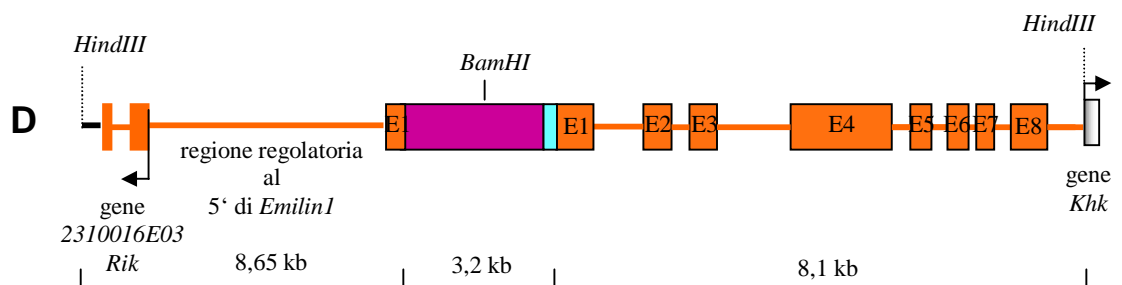
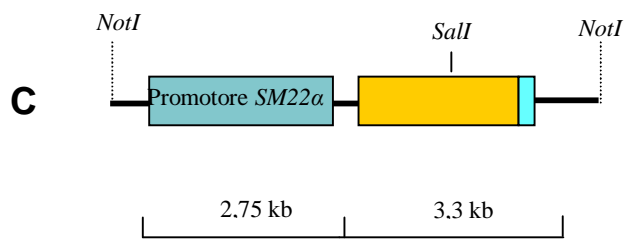
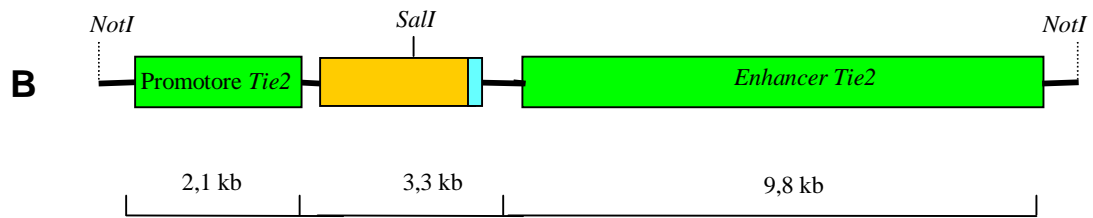
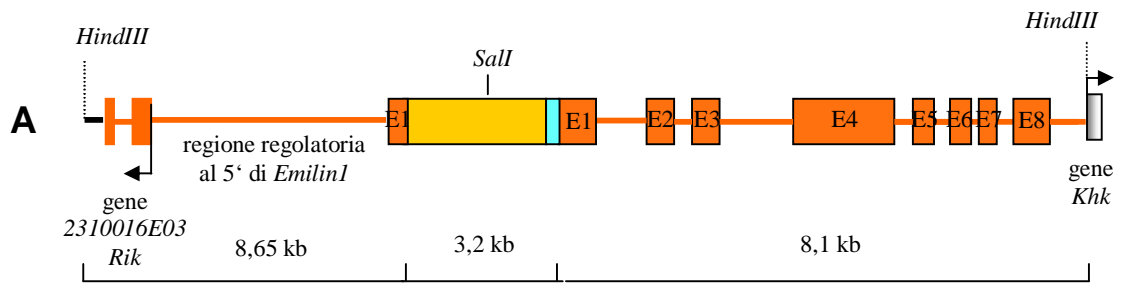
**B** *Tie2*-Emilina-1: il cDNA di Emilina-1 è stato fuso al 3' del promotore del gene *Tie2* e al 5' delle sue sequenze *enhancer* (verde).

**C** *SM22 $\alpha$* -Emilina-1: al 3' del promotore del gene *SM22 $\alpha$*  (azzurro) è stato clonato il cDNA di Emilina-1.

**D** *Emilin1*-Multimerina-2<sup>B</sup>: il cDNA della Multimerina-2, mutato per introdurre il sito BamHI, è stato clonato all'interno delle sequenze promotoriali di Emilina-1 (arancio).

**E** *Tie2*-Multimerina-2<sup>B</sup>: tra l'estremità 3' del promotore del gene *Tie2* e l'estremità 5' delle sue sequenze *enhancer* (verde) è stato clonato il cDNA mutato della Multimerina-2.

Per ogni costrutto sono riportate le dimensioni dei diversi frammenti che lo costituiscono e gli enzimi di restrizione utilizzati per l'isolamento dalle sequenze vettoriali. In basso raffigurata la legenda per i cDNA transgenici, su cui sono indicati gli enzimi di restrizione diagnostici utilizzati per la loro discriminazione. Le sequenze del polyA di SV40 sono quelle presenti nel plasmide pCS2 utilizzato per il clonaggio.

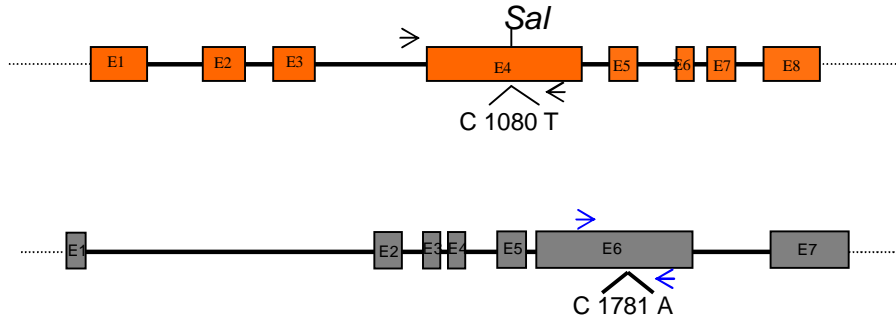
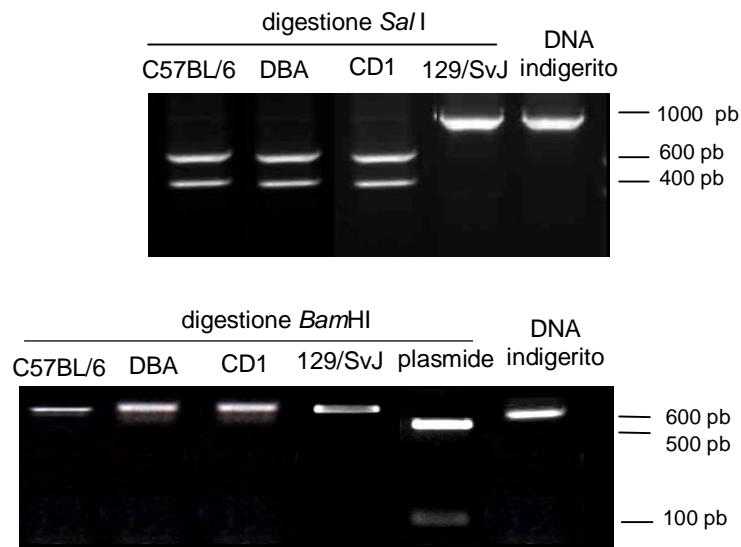
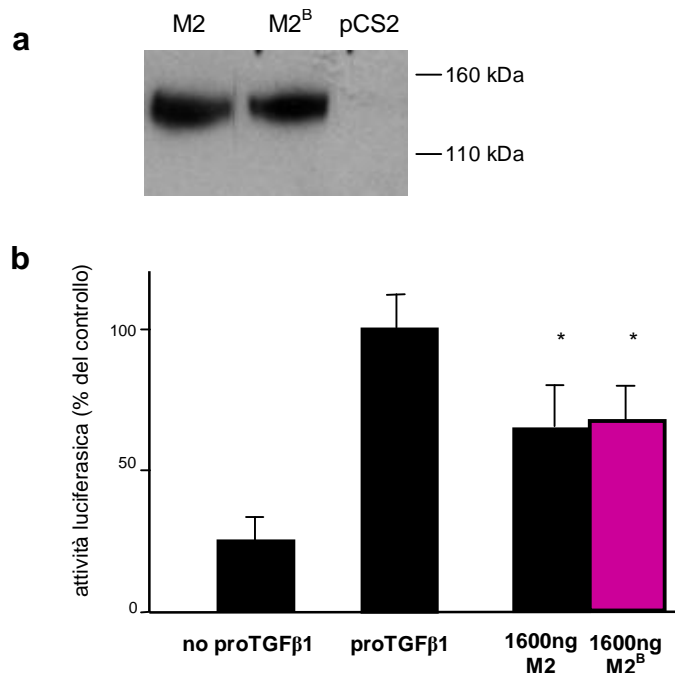


## **Figura 7: cDNA di Emilina-1 e Multimerina-2 utilizzato per la generazione dei costrutti transgenici**

**A** Rappresentazioni schematiche del gene *Emilin1* (arancio) e del gene *Mmrn2* (grigio). Sono rispettivamente indicate le posizioni del polimorfismo *SalI* e della mutazione silente generata nel cDNA della Multimerina-2 per introdurre la sequenza consenso per *BamHI*. Le frecce indicano le coppie di oligonucleotidi usate per ottenere un amplificato di 1000 pb nel gene di Emilina-1 (nero) e di 600 pb in quello di Multimerina-2 (blu), che contengono le sequenze di restrizione descritte.

**B** Digestioni degli amplificati di 1000 pb e 600 pb del gene *Emilin1* e *Mmrn2* di vari ceppi murini. Dalla digestione con *SalI* dell'amplificato di *Emilin1* originano due frammenti di 600 e 400 pb; la digestione di *BamHI* dell'amplificato di *Mmrn2* dà origine a due frammenti di 500 e 100 pb. Solo il gene del ceppo 129/SvJ non ha il polimorfismo *Sal I*, mentre in nessun ceppo murino tra quelli analizzati esiste una sequenza consenso per *BamHI* nel gene della Multimerina-2 (plasmide: cDNA mutato di Multimerina-2 clonato nel vettore pCS2).

**C** Verifica della sintesi di una proteina matura dal cDNA mutato della Multimerina-2 mediante western blotting eseguito con anticorpo anti Multimerina-2 (**a**) e verifica della sua funzione di inibitore del TGF- $\beta$ 1 (**b**). \*  $p < 0.05$  (M2: Multimerina-2, proteina selvatica di controllo; M2B: Multimerina-2 sintetizzata dal cDNA mutato; pCS2: vettore di espressione utilizzato).

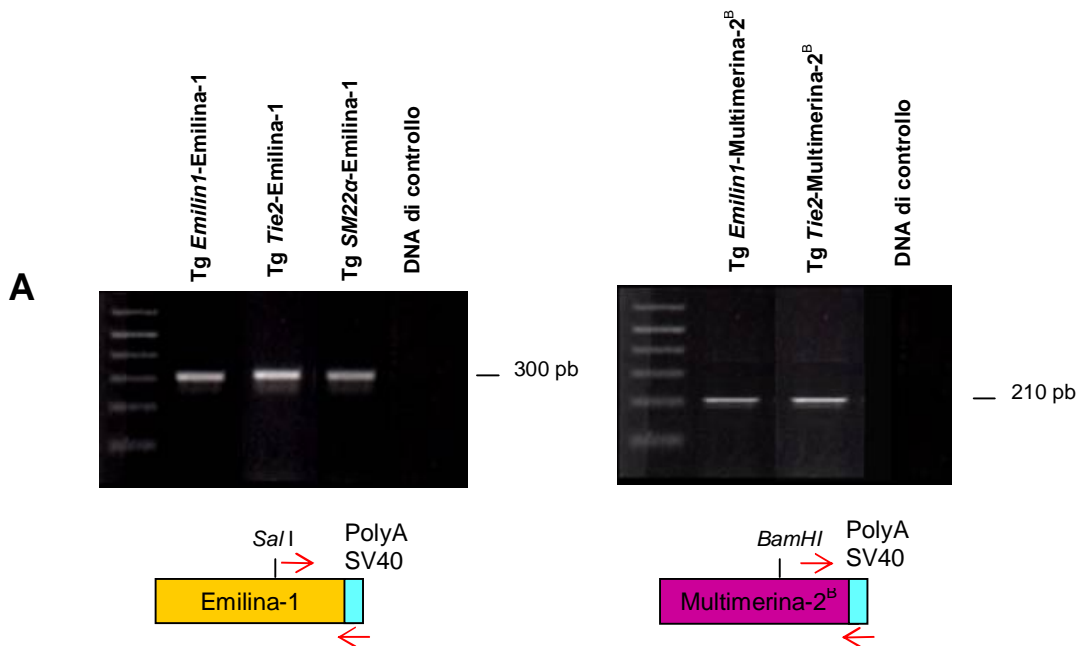
**A****B****C**

### **Figura 8: Individuazione dei topi transgenici generati**

**A** Amplificazione con PCR di DNA genomico di topi nati da embrioni microiniettati coi costrutti generati per l'individuazione degli animali transgenici appartenenti alle diverse linee. Le coppie di oligonucleotidi utilizzate (rosso) sono schematicamente riportate sul cDNA transgenico di Emilina-1 (giallo) e di Multimerina-2 (viola). In entrambe le coppie, il *primer* in 3' è complementare alla sequenza del polyA dell'SV40 (azzurro), derivato dal vettore pCS2.

DNA di controllo: DNA genomico estratto da topo selvatico.

**B** Tabelle riassuntive per le cinque linee transgeniche generate.



**B**

	<i>Emilin1</i> - <i>Emilina-1</i>	<i>Tie2</i> - <i>Emilina-1</i>	<i>SM22α</i> - <i>Emilina-1</i>
Embrioni impiantati	446	608	603
Topi nati	105	144	179
% Nati/Impiantati	22,5%	23,6%	29,6%
Topi transgenici	5	11	20
% Transgenici/Nati	4,8%	7,6%	11,2%
Fondatori di linee transgeniche	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>2</b>

	<i>Emilin1</i> - <i>Multimerina-2<sup>B</sup></i>	<i>Tie2</i> - <i>Multimerina-2<sup>B</sup></i>
Embrioni impiantati	458	320
Topi nati	87	96
% Nati/Impiantati	19%	30%
Topi transgenici	4	10
% Transgenici/Nati	4,6%	10,4%
Fondatori di linee transgeniche	<b>2</b>	<b>8</b>

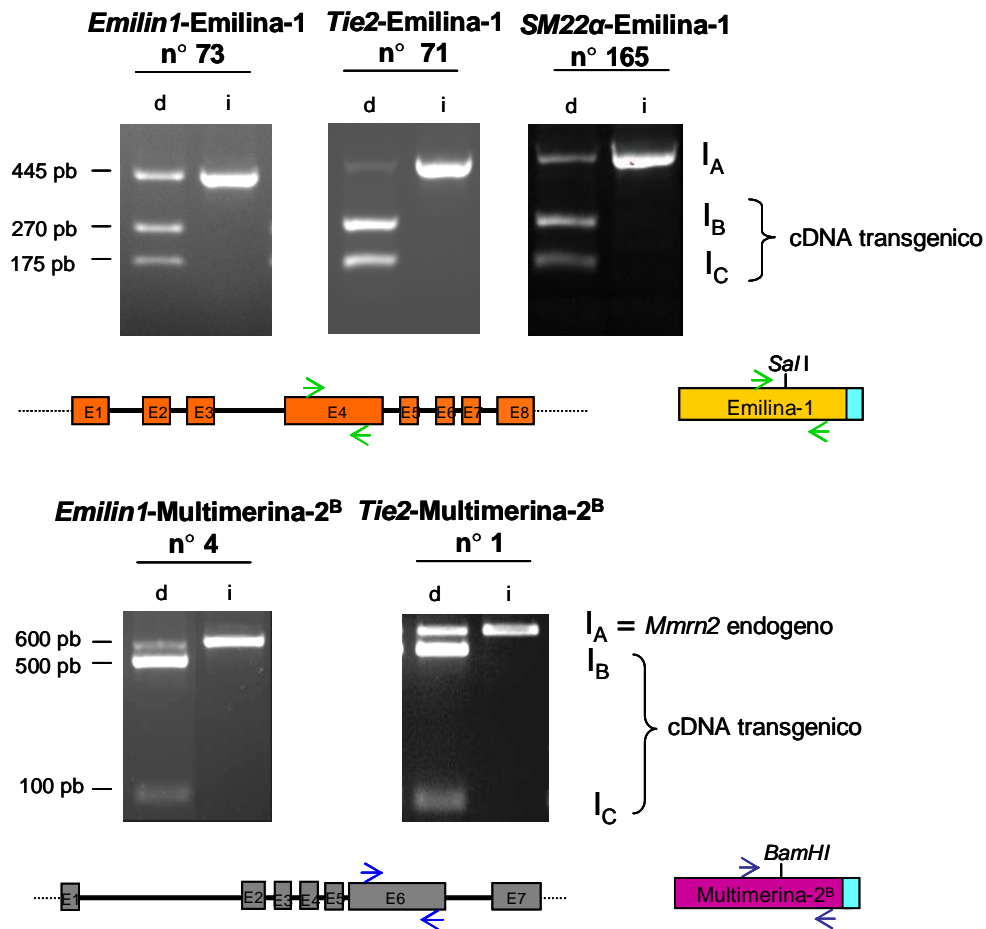
## **Figura 9: Stima del numero di copie di transgene integrate nel genoma murino**

**A** Amplificazione, seguita da digestione enzimatica, di una regione del DNA endogeno e transgenico comprensiva della sequenza consenso per l'enzima di restrizione diagnostico.

Usando le coppie di *primer* schematizzate su gene endogeno e cDNA transgenico di Emilina-1 (frecche verdi) e di Multimerina-2 (frecche blu), sono state amplificate regioni endogene e transgeniche di Emilina-1 (445 pb) e di Multimerina-2 (600 pb) in topi di generazione F1, transgenici ed eterozigoti. Con la digestione enzimatica di *SalI* o *BamHI* si originano due frammenti (270 e 175 pb; 500 e 100 pb) solo dall'amplificato del cDNA transgenico. Usando il *Kodak 1D Image Analysis Software*, sono state stimate l'intensità delle bande e calcolato il numero di copie di transgene integrate nel genoma. Sono riportati gene endogeno (arancio) e cDNA transgenico (giallo) di Emilina-1 e quelli di Multimerina-2 (rispettivamente grigio e viola). IA: intensità, espressa in pixel, della banda di amplificato non digerita; IB e IC: intensità delle bande derivate dalla digestione degli amplificati transgenici. d: digerito; i: indigerito.

**B** Tabelle riassuntive dei numeri di copie integrate nel genoma murino per tutte le linee transgeniche ottenute.

**A**



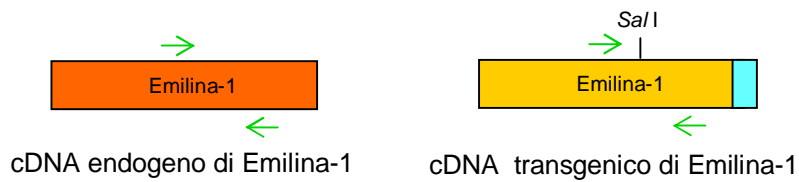
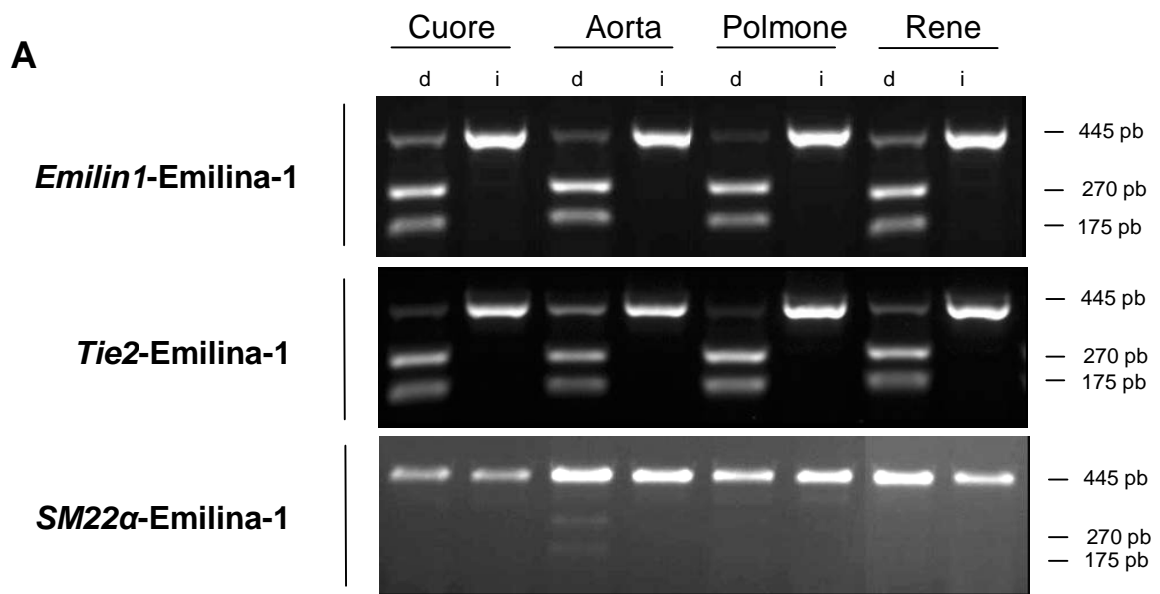
**B**

Linee <i>Emilin1-Emilina-1</i>	39	73	81	88				
Copie di transgene integrate nel genoma	1	2	1	2				
Linee <i>Tie2-Emilina-1</i>	71	73	114	131	136			
Copie di transgene integrate nel genoma	14	4	12	1	2			
Linee <i>SM22α-Emilina-1</i>	15	165						
Copie di transgene integrate nel genoma	1	6						
Linee <i>Emilin1-Multimerina-2<sup>B</sup></i>			1	4				
Copie di transgene integrate nel genoma			1	6				
Linee <i>Tie2-Multimerina-2<sup>B</sup></i>	1	6	12	14	15	18	23	25
Copie di transgene integrate nel genoma	6	8	2	5	2	4	2	4

**Figura 10: Stima dei livelli di espressione dei transgeni dell'Emilina-1 in organi di topo adulto *Emilin1* +/-**

**A** Amplificazione, seguita da digestione enzimatica, di una regione del cDNA endogeno e transgenico comprensiva della sequenza consenso per l'enzima di restrizione *SaII*. cDNA ottenuto da retrotrascrizione di RNA totale estratto dagli organi adulti riportati di topi transgenici ed eterozigoti per Emilina-1. d: digerito; i: indigerito.

**B** Tabelle riassuntive dei livelli di espressione dei transgeni dell'Emilina-1, calcolati relativamente all'espressione di un allele endogeno. I valori riportati si riferiscono all'espressione di una singola copia di transgene. n.m.: non misurabile.



**B**

Linee <i>Emilin1-Emilina-1</i>	Livelli di espressione			
	Cuore	Aorta	Polmone	Rene
39	0,05	0,02	0,05	n.m.
73	0,9	0,9	1,6	1
81	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
88	0,3	0,5	0,25	0,02

Linee <i>Tie2-Emilina-1</i>	Livelli di espressione			
	Cuore	Aorta	Polmone	Rene
71	0,5	0,5	2,7	1
73	5	2,5	5	3,5
114	3,6	1,5	3,5	2,8
131	2,5	1	4	0,5
136	1	0,3	0,5	n.m.

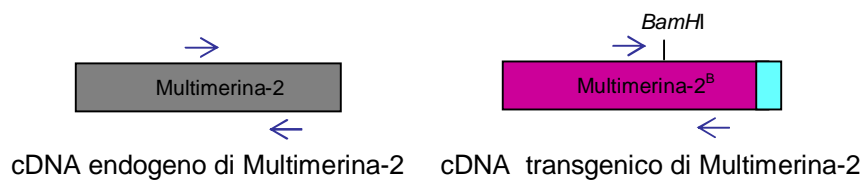
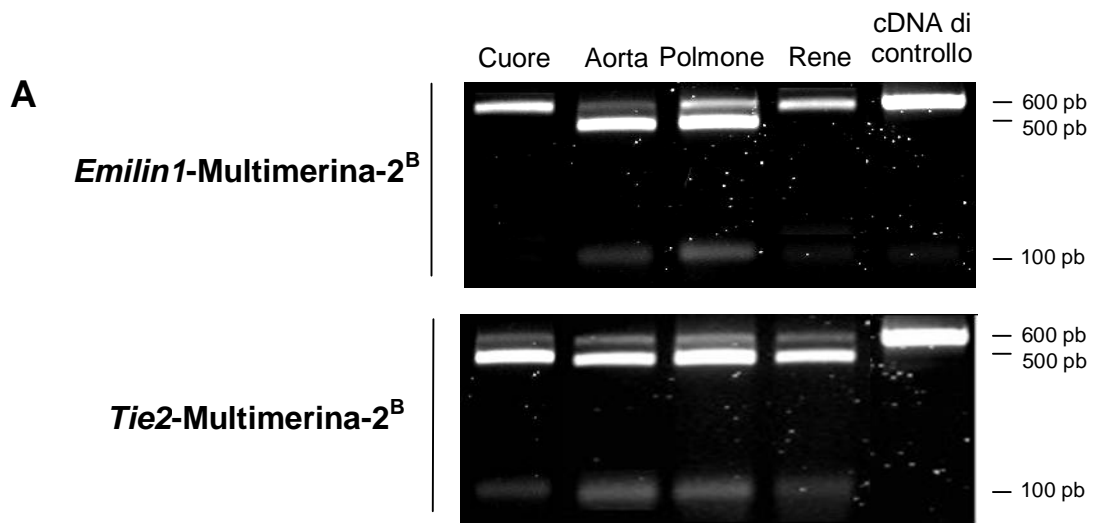
Linee <i>SM22α-Emilina-1</i>	Livelli di espressione			
	Cuore	Aorta	Polmone	Rene
15	n.m.	0,04	n.m.	n.m.
165	n.m.	0,1	n.m.	n.m.

**Figura 11: Stima dei livelli di espressione dei transgeni della Multimerina-2 in organi di topo adulto *Mmrn2*<sup>+/-</sup>**

**A** Amplificazione, seguita da digestione enzimatica, di una regione del cDNA endogeno e transgenico comprensiva della sequenza consenso per l'enzima di restrizione *Bam*HI. cDNA ottenuto da retrotrascrizione di RNA totale estratto dagli organi adulti riportati di topi transgenici ed eterozigoti per la Multimerina-2.

cDNA di controllo: cDNA retrotrascritto da RNA di cuore di topo selvatico.

**B** Tabelle riassuntive dei livelli di espressione dei transgeni della Multimerina-2, calcolati relativamente all'espressione di un allele endogeno. I valori riportati si riferiscono all'espressione di una singola copia di transgene. n.m.: non misurabile.



**B**

Linee <i>Emilin1</i> -Multimerina-2 <sup>B</sup>	Livelli di espressione			
	Cuore	Aorta	Polmone	Rene
1	n.m.	0,8	0,7	n.m.
4	0,3	0,3	0,4	n.m.

Linee <i>Tie2</i> -Multimerina-2 <sup>B</sup>	Livelli di espressione			
	Cuore	Aorta	Polmone	Rene
1	0,9	0,8	1	1
6	1	0,95	0,9	0,9
12	5	4	5	4,5
14	2	1	2	1,5
15	2,5	3,5	3,5	3
18	2	1	1	1,5
23	3	1,5	2	3
25	2	1,5	1,25	1,5

## **Figura 12: Analisi della distribuzione tessuto-specifica di Emilina-1 espressa dai promotori transgenici**

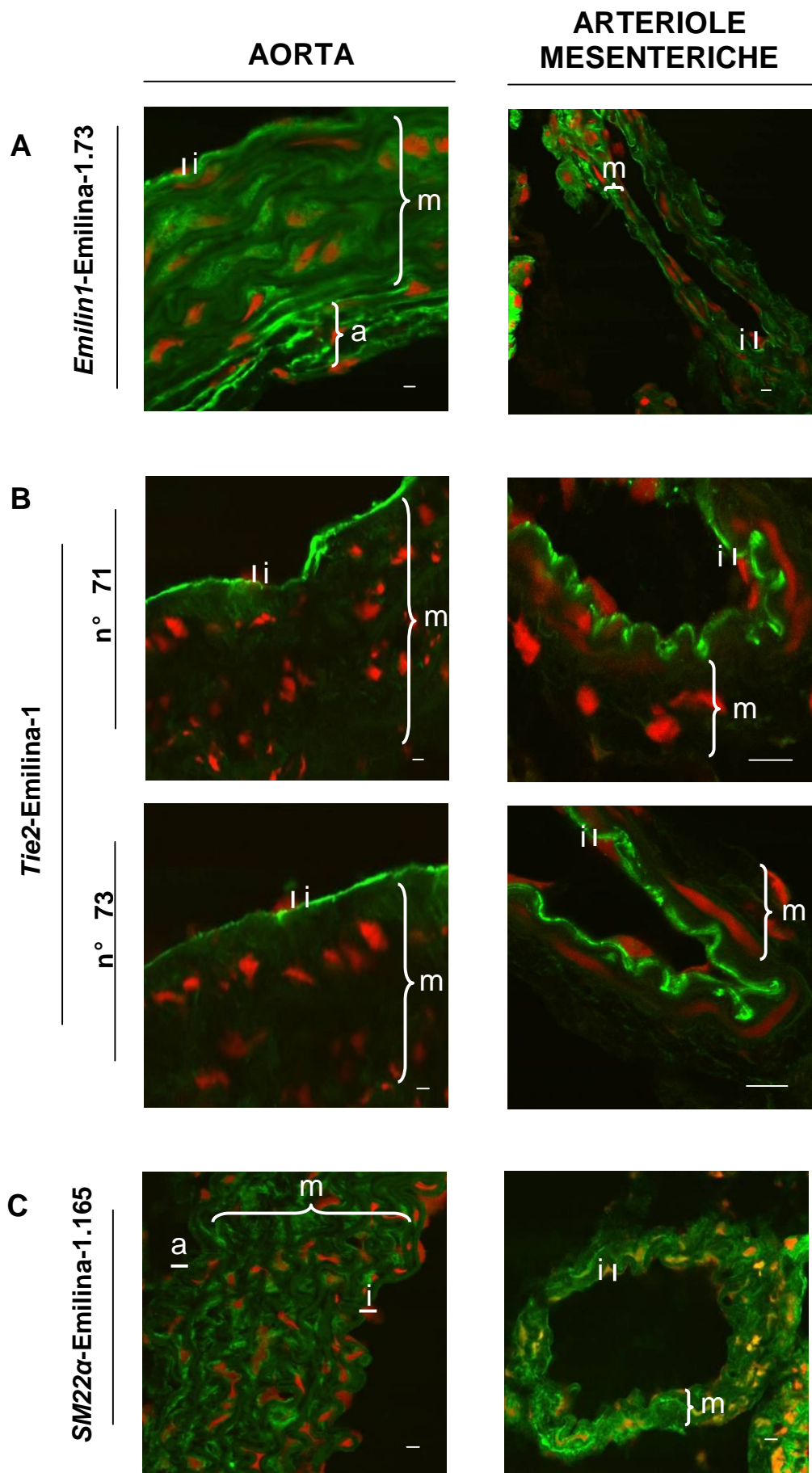
I promotori utilizzati per la costruzione dei transgeni sono attivi nei siti tissutali previsti. Mediante immunofluorescenza è stata analizzata la distribuzione di Emilina-1, espressa dai promotori in esame, in topi *Emilin1*<sup>-/-</sup>. Sono riportate fotografie di sezioni congelate di aorta toracica e seconda ramificazione di arterie mesenteriche, in cui Emilina-1 è marcata in verde e i nuclei in rosso. Tutte le sezioni analizzate hanno uno spessore di 7 µm. Barra= 5 µm.

i: tonaca intima; m: tonaca muscolare; a: tonaca avventizia.

**A** Distribuzione di Emilina-1 espressa dal promotore del gene *Emilin1* nella linea transgenica n° 73. Essa è localizzata nella tonaca intima, nella tonaca muscolare e nell'avventizia.

**B** I transgeni *Tie2*-Emilina-1 n° 71 e n° 73 esprimono Emilina-1 solo nella tonaca intima dei vasi analizzati.

**C** Emilina-1 è espressa soltanto nelle cellule muscolari lisce dal promotore del gene *SM22α* nel transgene n° 165; essa risulta infatti localizzata solo nella tonaca muscolare dei vasi analizzati.



**Figura 13: Analisi della distribuzione tessuto-specifica di Multimerina-2 espressa dal promotore *Tie2***

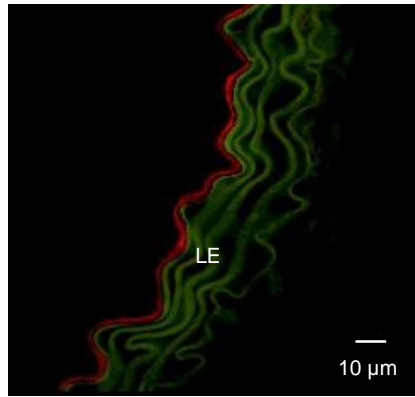
Il promotore *Tie2* esprime in maniera endotelio-specifica il cDNA transgenico di Multimerina-2 in vasi adulti di animali *Mmrn2*<sup>-/-</sup>. Sono riportate immunofluorescenze su sezioni congelate di aorta toracica e seconda ramificazione di arterie mesenteriche di topi adulti *Tie2*-Multimerina-2 mutanti per Multimerina-2. Multimerina-2 è marcata in rosso e le lamine elastiche sono visibili per autofluorescenza in verde.

Tutte le sezioni analizzate hanno uno spessore di 7 µm. Barra=5 µm. LE: lamina elastica.

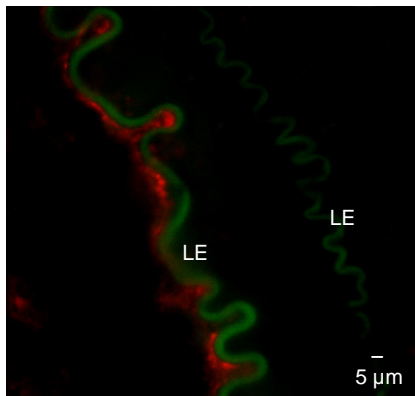
Su ogni immagine è riportata la scala d'ingrandimento.

**Tie2-Multimerina-2.15**

---



**AORTA**



**ARTERIOLO  
MESENERICA**

**Figura 14: Recupero del fenotipo cardiovascolare di topi *Emilin1*<sup>-/-</sup> dall'espressione del transgene *Emilin1*-Emilina-1**

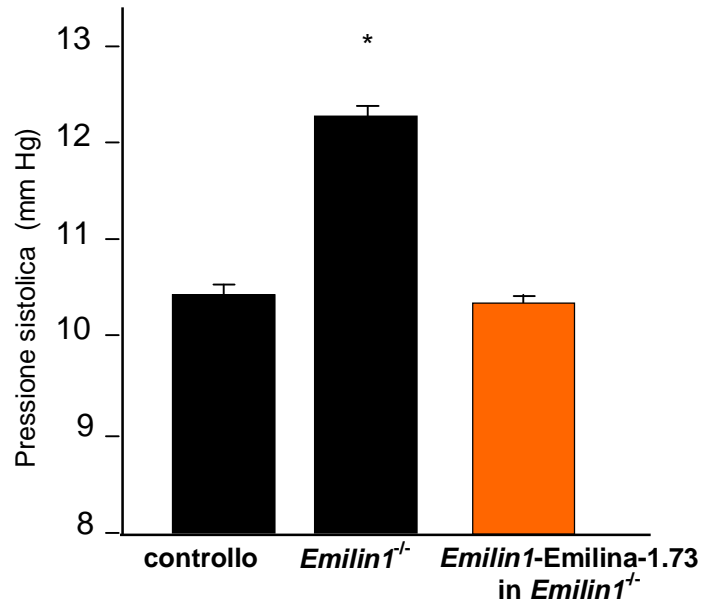
In topo *knockout*, l'espressione del cDNA di Emilina-1 dal promotore del gene *Emilin1* ne recupera il fenotipo cardiovascolare, sia l'ipertensione che la morfologia dell'aorta.

**A** Rappresentazione dei valori della pressione sistolica di topi transgenici e mutanti per Emilina-1 (arancio) paragonati a quelli di topi selvatici (controllo) ed *Emilin1*<sup>-/-</sup>. \* p< 0.05.

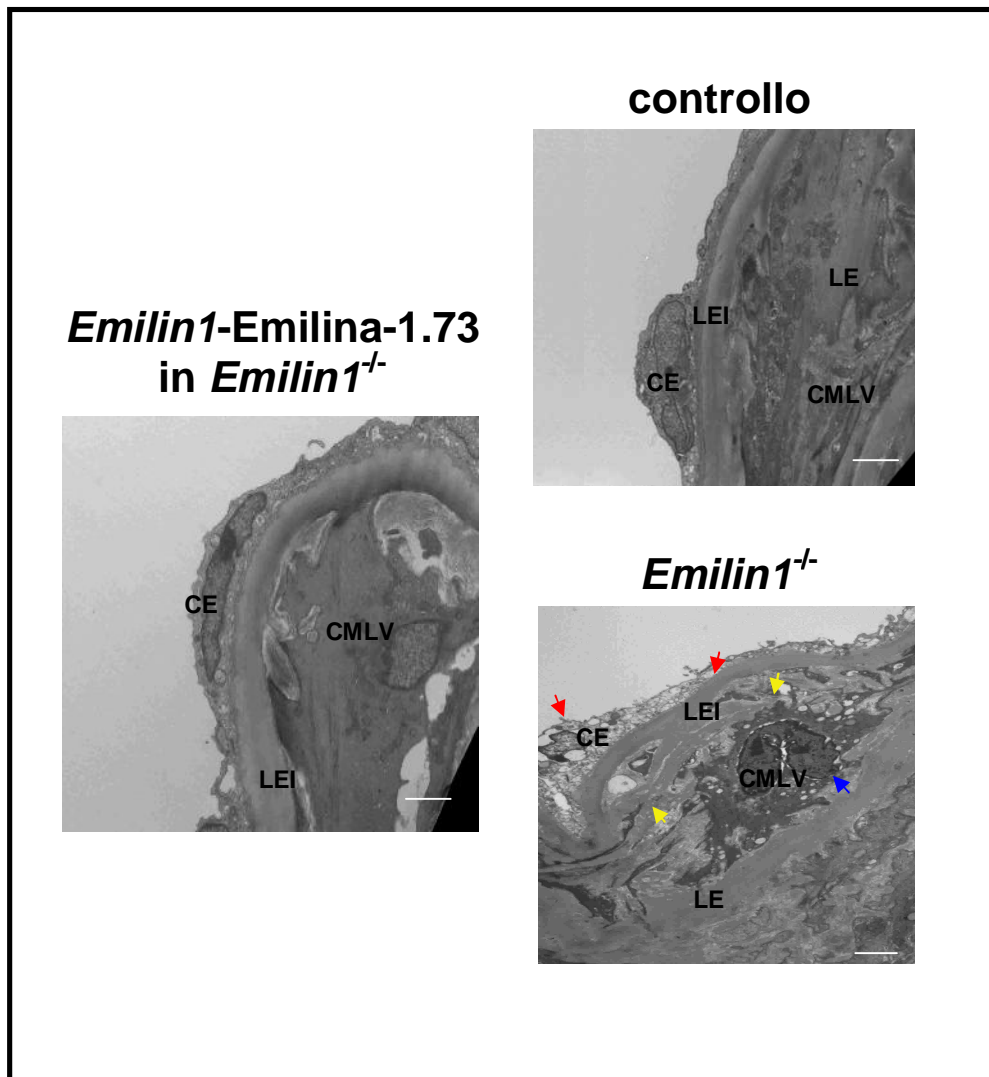
**B** Microscopia elettronica a trasmissione su sezioni di aorta di topo adulto transgenico e mutante comparata ad aorta selvatica di controllo e *knockout*, in cui sono indicati i distaccamenti delle cellule endoteliali dalla lamina elastica interna (freccie rosse), le frammentazioni e le irregolarità delle lamine elastiche (freccie gialle) e i distaccamenti delle cellule muscolari lisce da esse (freccie blu).

Barra=5 μm. CE: cellule endoteliali; CMLV: cellule muscolari lisce vascolari; LEI: lamina elastica interna; LE: lamina elastica.

**A**



**B**



## **Figura 15: L'espressione del transgene *Tie2-Emilina-1* in topi *Emilin1<sup>-/-</sup>* non ne recupera il fenotipo cardiovascolare**

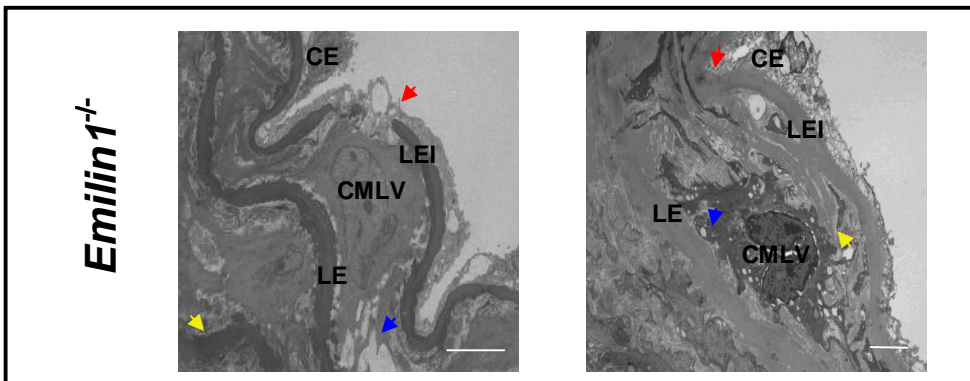
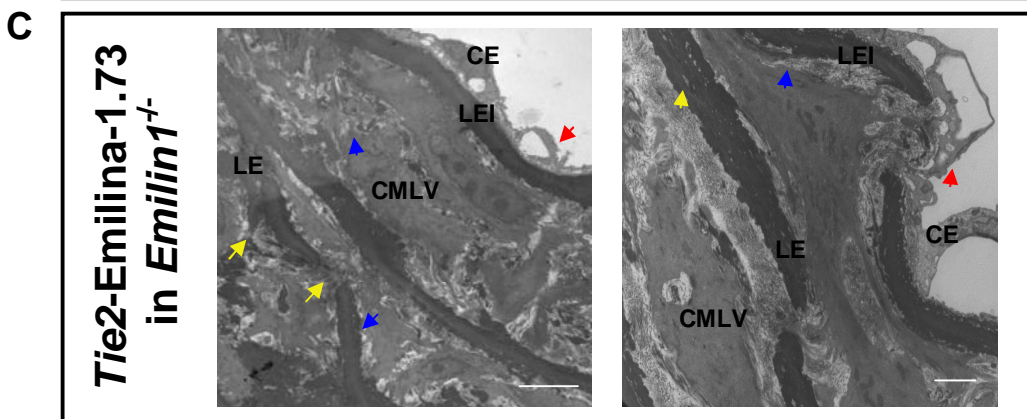
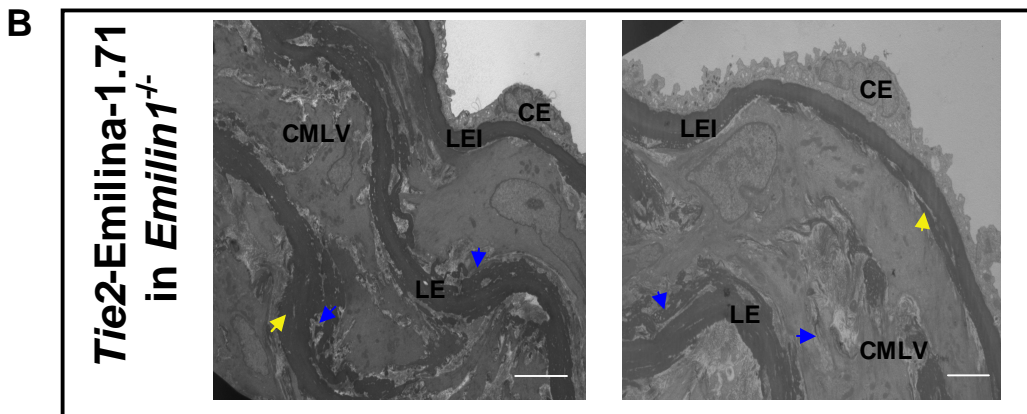
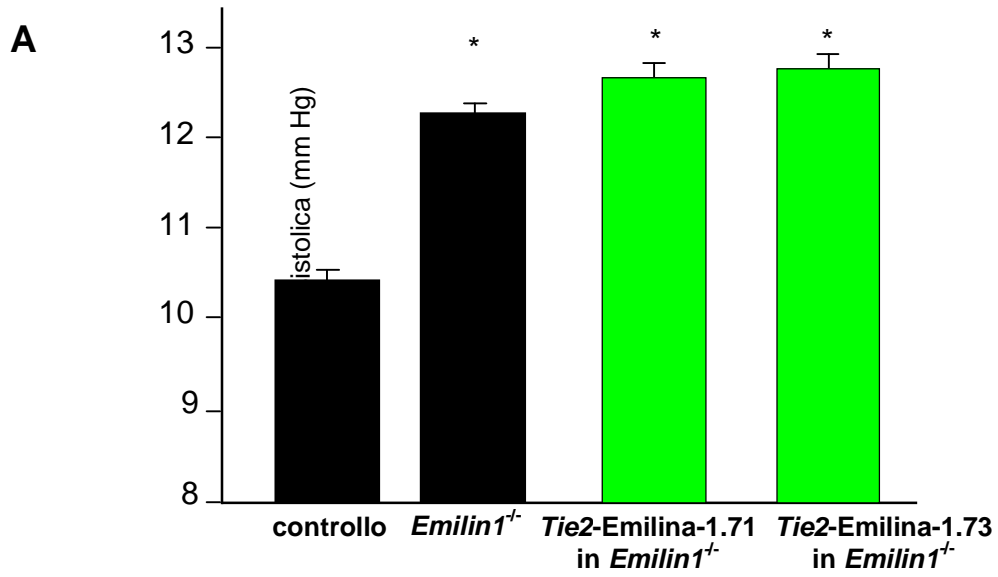
Espressa dalle sole cellule endoteliali, Emilina-1 non ripristina il fenotipo selvatico in topi *knockout*.

**A** Rappresentazione dei valori della pressione sistolica di topi transgenici *knockout* per Emilina-1 (verde) paragonati a quelli di topi selvatici (controllo) e *knockout*. Sia quando Emilina-1 è espressa dal promotore *Tie2* a livelli simili a quelli endogeni (linea n° 71) che quando è sovraespressa (linea n° 73), i valori della pressione sistolica rimangono elevati, paragonabili a quelli del topo mutante. \*  $p < 0.05$ .

**B** Microscopia elettronica a trasmissione su sezioni di aorta di topo adulto *Tie2-Emilina-1.71* in assetto genetico nullo per Emilina-1. Rispetto al topo *knockout*, si osserva recupero della morfologia endoteliale, ma non di quella delle lamine elastiche, che risultano delaminate (freccie gialle), e delle cellule muscolari lisce, che risultano frastagliate e mal ancorate alle lamine elastiche (freccie blu). Barra=5  $\mu\text{m}$ . CE: cellule endoteliali; CMLV: cellule muscolari lisce vascolari; LEI: lamina elastica interna; LE: lamina elastica.

**C** Microscopia elettronica a trasmissione su sezioni di aorta di topo adulto *Tie2-Emilina-1.73* in assetto genetico nullo per Emilina-1. Elevati livelli di espressione di Emilina-1 nell'endotelio non recuperano alcun danno strutturale dell'aorta rispetto a quelli del topo *knockout*. Le lamine elastiche sono delaminate e interrotte (freccie gialle), le cellule endoteliali rigonfie e vescicolose con tendenza a staccarsi dalla lamina elastica interna (freccie rosse), le cellule muscolari lisce frastagliate, scarsamente adese alle lamine elastiche e rigonfie (freccie blu).

Barra=5  $\mu\text{m}$ . CE: cellule endoteliali; CMLV: cellule muscolari lisce vascolari; LEI: lamina elastica interna; LE: lamina elastica.

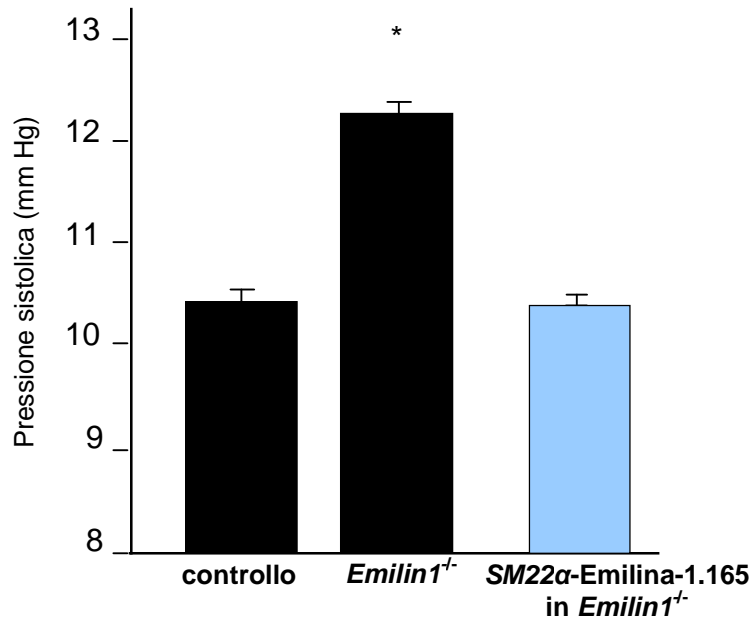
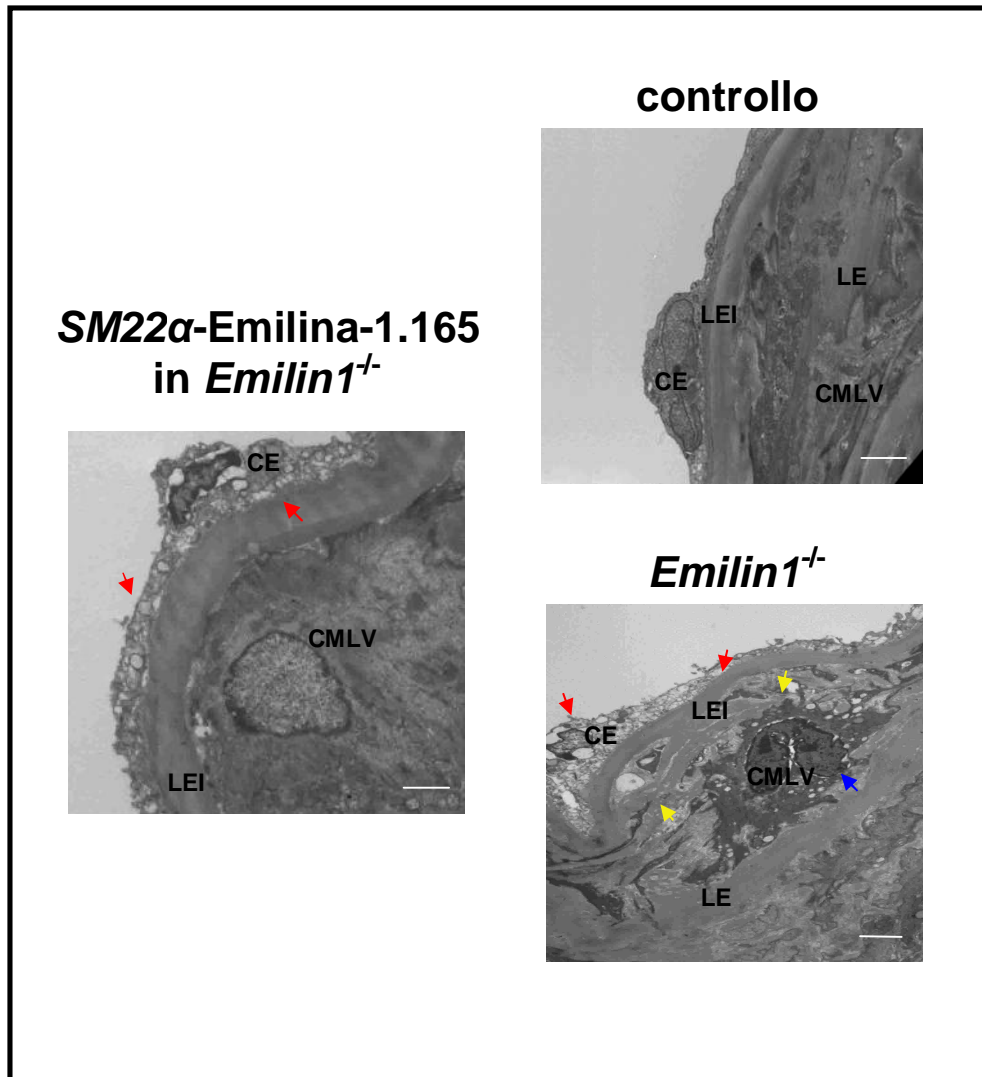


**Figura 16: Recupero del fenotipo cardiovascolare di topi *Emilin1*<sup>-/-</sup> dall'espressione del transgene *SM22 $\alpha$ -Emilina-1***

L'espressione di Emilina-1 dalle cellule muscolari lisce vascolari garantisce il recupero del fenotipo cardiovascolare dei topi *knockout* con valori pressori paragonabili ai livelli normali. Cellule muscolari lisce e lamine elastiche dell'aorta recuperano la morfologia selvatica, le cellule endoteliali presentano ancora vescicolazioni e distaccamenti (freccette rosse).

**A** Rappresentazione dei valori della pressione sistolica di topi transgenici *knockout* per Emilina-1 (azzurro) paragonati a quelli di topi selvatici (controllo) e *knockout*. \*  $p < 0.05$ .

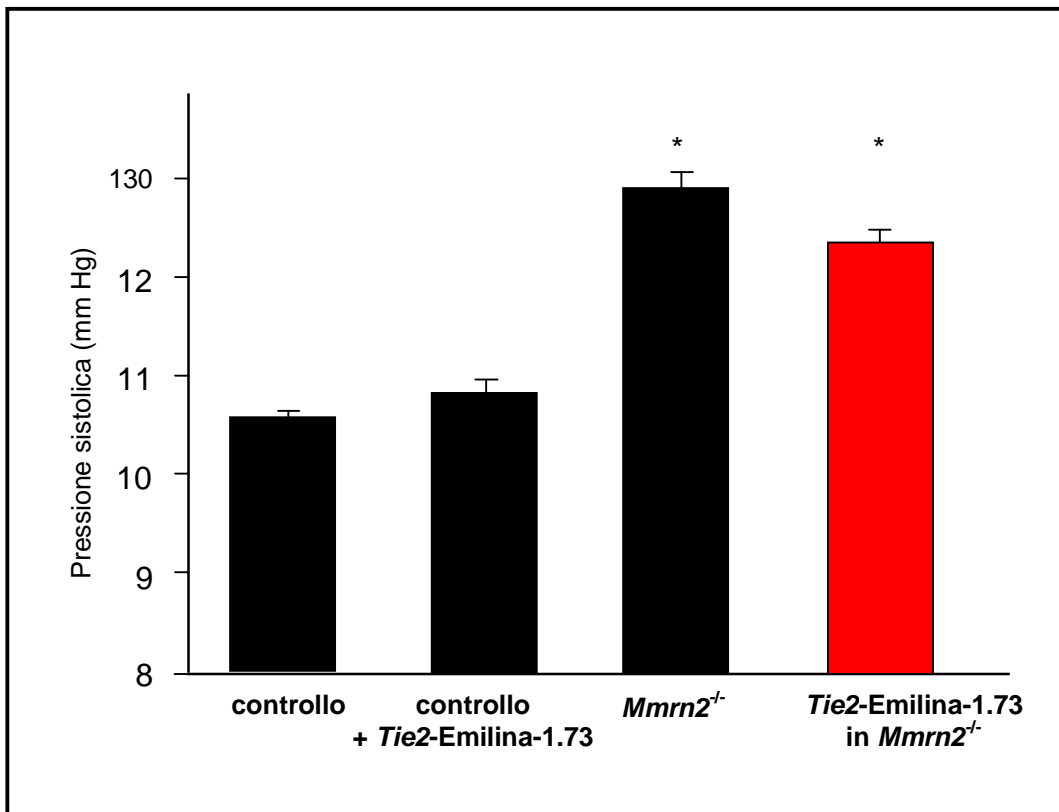
**B** Microscopia elettronica a trasmissione su sezioni di aorta di topo adulto transgenico *knockout* comparata ad aorta di controllo e *knockout*. Le frecce indicano le alterazioni delle cellule endoteliali (rosso), delle lamine elastiche (giallo) e delle cellule muscolari lisce (blu) visibili sulla parete dell'aorta del topo mutante. Barra=5  $\mu$ m. CE: cellule endoteliali; CMLV: cellule muscolari lisce vascolari; LEI: lamina elastica interna; LE: lamina elastica.

**A****B**

### **Figura 17: Espressione del transgene *Tie2-Emilina-1* in topi *Mmrn2*<sup>-/-</sup>**

Sovraespressione di Emilina-1 dal promotore *Tie2* nell'endotelio di topi mutanti per Multimerina-2 non ne recupera il fenotipo cardiovascolare. Come riportato nel grafico, i valori della pressione arteriosa di topi transgenici *Tie2-Emilina-1.73* e *knockout* per Multimerina-2 (rosso) sono paragonabili a quelli degli animali *Mmrn2*<sup>-/-</sup>, significativamente superiori a quelli degli animali selvatici (controllo). Nel topo selvatico, l'espressione di questo transgene non provoca significative alterazioni dei normali livelli pressori (controllo+ *Tie2-Emilina-1.73*).

\* p< 0.05.

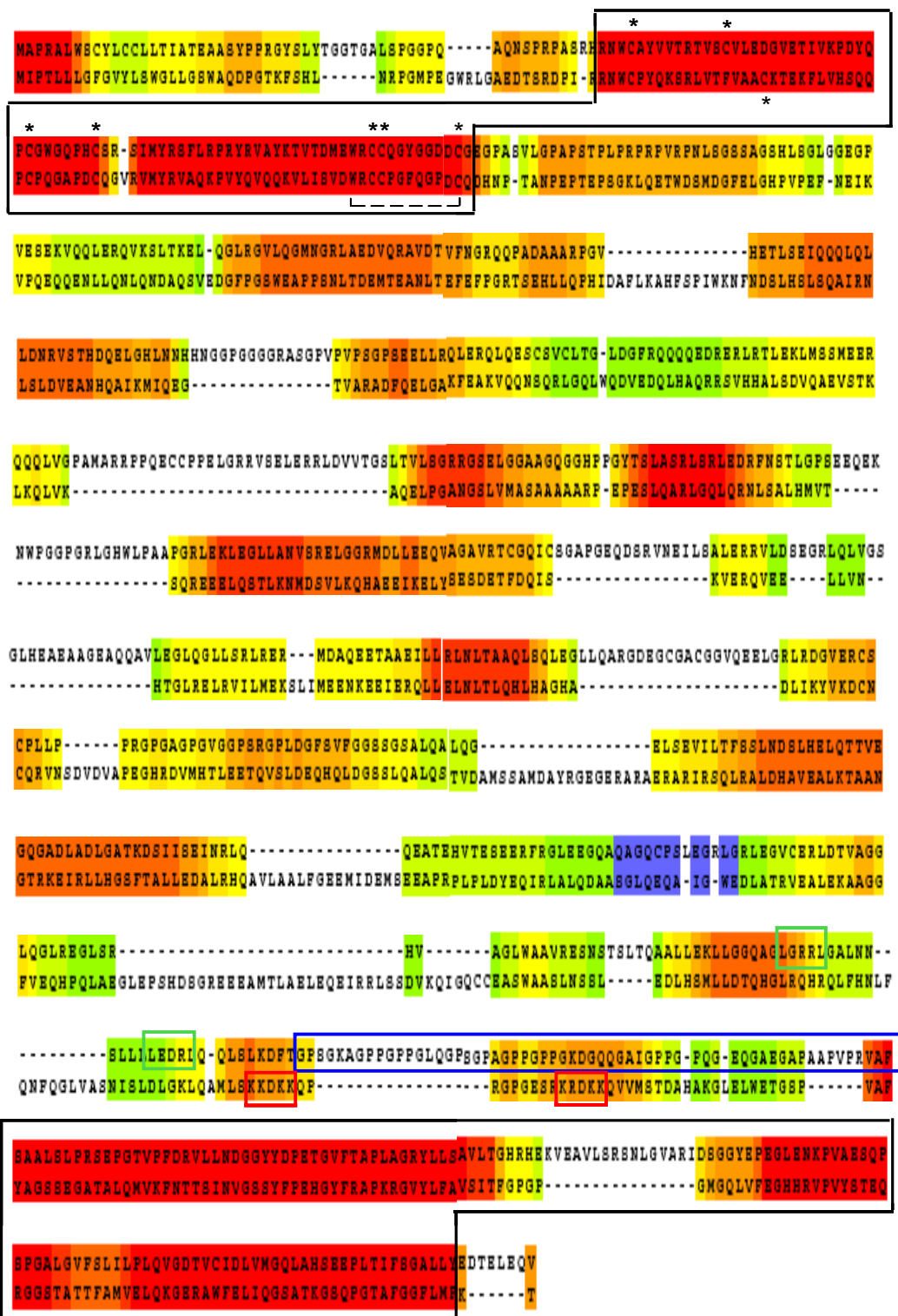


## **Figura 18: Allineamento delle sequenze proteiche di Emilina-1 e Multimerina-2**

Le sequenze dei domini EMI e dei domini gC1q di Emilina-1 e Multimerina-2 risultano molto conservate. Le regioni centrali, dal C-terminale del dominio EMI all’N-terminale del dominio gC1q, sono quelle meno simili. Le sequenze proteiche allineate corrispondono a quella di Emilina-1 (NP\_598679, prima linea) e di Multimerina-2 (NP\_694767, seconda linea) murine. I riquadri in nero delimitano le regioni del dominio EMI (in alto) e del dominio gC1q (in basso). Per i domini EMI, sono segnate le cisteine (\*) e una sequenza conservata di amminoacidi idrofobici ( \\_ \_ \_ ).

Sulla sequenza di Emilina-1 sono segnati un dominio collagenico (riquadro blu) e due domini simili a *leucine zipper* (riquadri verde). Sulla sequenza della Multimerina-2 regioni ricche in amminoacidi basici forse coinvolte per il legame a GAG sono riquadrate in rosso.

In legenda è riportata la scala di colori utilizzata per stimare le similitudini proteiche: dal blu fino al rosso, che indicano rispettivamente gli amminoacidi con caratteristiche meno o più simili. Allineamento eseguito con *T-Coffee software*.



Legenda: BAD AVG GOOD

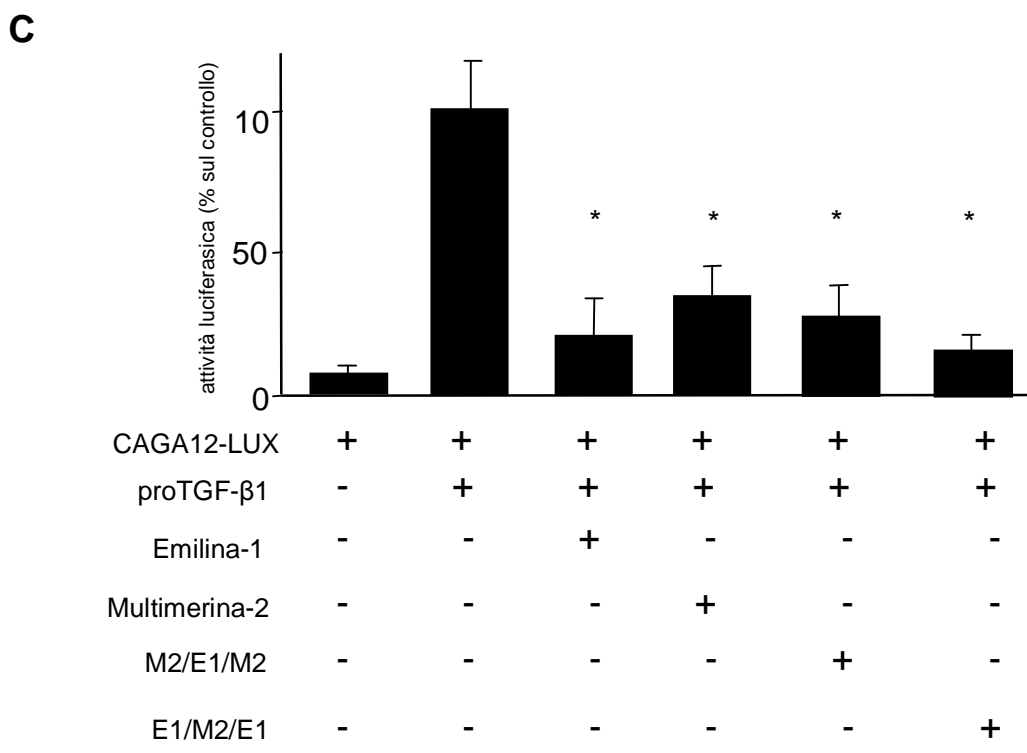
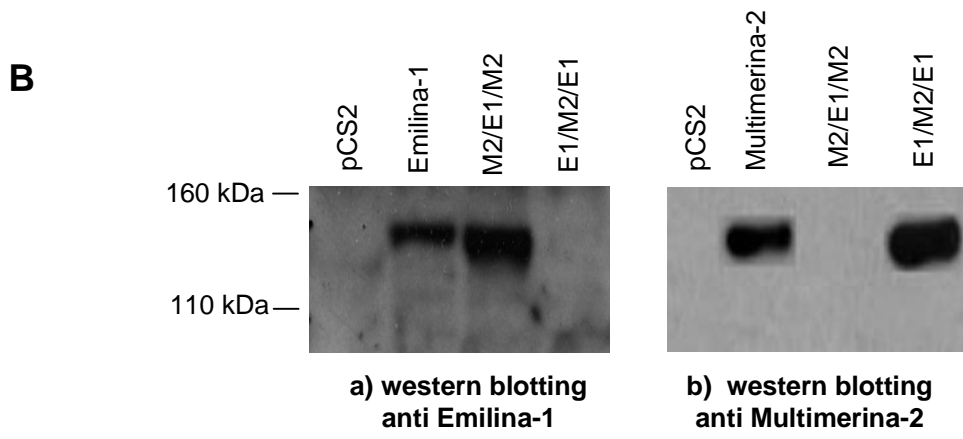
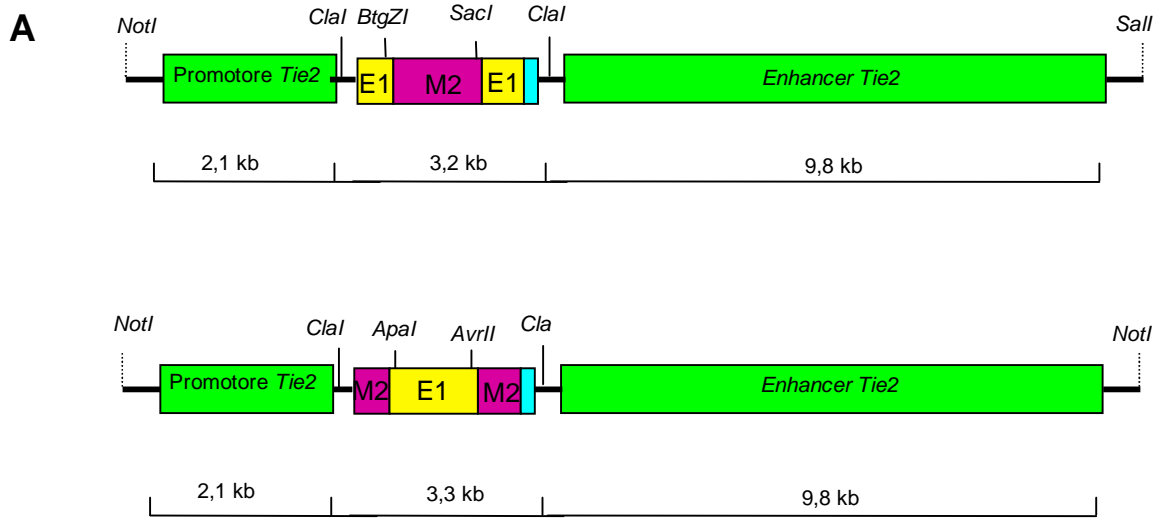
### **Figura 19: Transgeni *Tie2-E1/M2/E1* e *Tie2-M2/E1/M2***

**A** Costrutti transgenici *Tie2-E1/M2/E1* e *Tie2-M2/E1/M2*. Per ogni costrutto sono riportati: le dimensioni dei diversi frammenti che lo costituiscono, gli enzimi di restrizione utilizzati per il clonaggio dei cDNA ibridi e quelli utilizzati per l'isolamento dalle sequenze vettoriali.

PolyA di SV40 in azzurro.

**B** Western blotting eseguiti con anticorpo che riconosce le regioni centrali di Emilina-1 (**a**) e anticorpo che riconosce le regioni centrali di Multimerina-2 (**b**). Le proteine ibride sono tradotte e migrano come quelle selvatiche. pCS2: vettore di espressione utilizzato.

**C** Saggio funzionale di inibizione dell'attività di TGF- $\beta$ 1. Le proteine ibride, a parità di plasmide trasfettato (1600 ng) in cellule HEK293T, inibiscono l'attività del TGF- $\beta$ 1 in modo paragonabile alle rispettive proteine selvatiche. \*  $p < 0.05$ .





## BIBLIOGRAFIA

- Adam F., Zheng S., Joshi N., Kelton D.S., Sandhu A., Suehiro Y., Jeimy S.B., Santos A.V., Massè J.M., Kelton J.G., Cramer E.M., Hayward C.P.M. (2005). Analyses of cellular multimerin 1 receptors: in vitro evidence of binding mediated by  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and  $\alpha$ v $\beta$ 3. *Thromb. Haemost.* **94**, 1004-1011.
- Adams J.C., Watt F.M. (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* **117**, 1183-1198.
- Aird W.C., Jahroud N., Weiler-Guettler H., Rayburn H.B., Rosenberg R. D. (1995) Human von Willebrand factor gene sequences target expression to a subpopulation of endothelial cells in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 4567-4571
- Amma L.L., Goodyear R., Faris J.S., Jones I., Ng L., Richardson G., Forrest D. (2003). An emilin extracellular matrix protein identified in the cochlear basilar membrane. *Mol. Cell. Neurosc.* **23**, 460-472.
- Annes J.P., Munger J.S., Rifkin D.B. (2003). Making sense of latent TGF $\beta$  activation. *J Cell Sci* **116**, 217-224.
- Bartram U., Molin DGM, Wisse L.J., Mohamad A., Sanford L.P., Doetschman T., Speer C.P., Poelmann R.E., Gittenberger-de Groot A.C. (2001). Double-outlet right ventricle and overriding tricuspid valve reflect disturbances of looping, myocardialisation, endocardial cushion differentiation, and apoptosis in TGF-beta2-knockout mice. *Circulation* **103**, 2745-2752.
- Beck S., Le Good J.A., Guzman M., Ben Haim N., Roy K., Beermann F., Constam D.B. (2002). Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nat Cell Biol* **4**, 981-985.
- Bobik A. (2006). Transforming Growth Factor- $\beta$  and Vascular Disorders. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1712-1720.
- Bornstein P. (2001). Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest* **107**, 929-934.
- Braghetta P., Ferrari A., de Gemmis P., Zanetti M., Volpin D., Bonaldo P., Bressan G.M. (2002). Expression of the EMILIN-1 gene during mouse development. *Matrix Biol.* **21**, 603-609.

- Braghetta P., Ferrari A., de Gemmis P., Zanetti M., Volpin D., Bonaldo P., Bressan G.M. (2004). Overlapping, complementary and site-specific expression pattern of genes of the EMILIN/Multimerin family. *Matrix Biol.* **22**, 549-556.
- Bressan G.M., Castellani I., Colombatti A., Volpin D. (1983). Isolation and characterization of a 115,000-dalton matrix-associated glycoprotein from chick aorta. *J. Biol. Chem.* **258**, 13262-13267.
- Bressan G.M., Daga-Gordini D., Colombatti A., Castellani I., Marigo V., Volpin D. (1993). Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface. *J. Cell Biol.* **121**, 201-212.
- Cambien F., Ricard S., Troesch A., Mallet C., Générénaz L., Evans A., Arveiler D., Luc G., Ruidavets J.B., Poirier O. (1996). Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension* **28**, 881-887.
- Carta L., Pereira L., Arteaga-Solis E., Lee-Arteaga S.Y., Lenart B., Starcher B. (2006). Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. *J Biol Chem* **281**, 8016-8023.
- Christian S., Ahorn H., Novatchkova M., Garin-Chesa P., Park J.E., Weber G., Eisenhaber F., Rettig W.J., Lenter M.C. (2001). Molecular cloning and characterization of EndoGlyx-1, an EMILIN-like multisubunit glycoprotein of vascular endothelium. *J. Biol. Chem.* **276**, 48588-48595.
- Colombatti A., Doliana R., Bot S., Canton A., Mongiat M., Mungiguerra G., Paron-Cilli S., Spessotto P. (2000). The EMILIN protein family. *Matrix Biol.* **19**, 289-301.
- Dabovic B., Chen Y., Colarossi C., Obata H., Zambuto L., Perle M.L., Rifkin D.B. (2002). Bone abnormalities in latent TGF- $\beta$  binding protein (Ltbp)-3-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF- $\beta$  bioavailability. *J. Cell Biol.* **156**, 227-232.
- Danussi C, Spessotto P, Petrucco A, Wassermann B, Sabatelli P, Montesi M, Doliana R, Bressan GM, Colombatti A (2008). *Emilin1* deficiency causes structural and functional defects of lymphatic vasculature. *Mol Cell Biol* **28**, 4026-4039.
- de Vega S., Iwamoto T., Yamada Y. (2009). Fibulins: multiple roles in matrix structures and tissue functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1890-1902.
- Dickson M.C., Martin J.S., Cousins F.M., Kulkarni A.B., Karlsson S., Akhurst R.J. (1995). Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor  $\beta$ 1 knock out mice. *Development* **121**, 1845-1854

- Discher D. E., Mooney D. J., Zandstra P. W. (2009) *Science* **324**, 1673-1677.
- Doliana R., Bot S., Bonaldo P., Colombatti A. (2000a). EMI, a novel cysteine-rich domain of EMILINs and other extracellular proteins, interacts with the gC1q domains and participates in multimerization. *FEBS Lett.* **484**, 164-168.
- Doliana R., Bot S., Mungiguerra G., Canton A., Paron Cilli S., Colombatti A. (2001). Isolation and characterization of EMILIN-2, a new component of the growing EMILINs family and a member of the EMI domain-containing superfamily. *J. Biol. Chem.* **276**, 12003-12011.
- Doliana R., Mongiat M., Bucciotti F., Giacomello E., Deutzmann R., Volpin D., Bressan G.M., Colombatti A. (1999). EMILIN, a component of the elastic fiber and a new member of the C1q/tumor necrosis factor superfamily of proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 16773-16781.
- Drews F., Knöbel S., Moser M., Muhlack K.G., Mohren S., Stoll C., Bosio A., Gressner A.M., Weiskirchen R (2008). Disruption of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 gene causes alteration in facial structure and influences TGF-beta bioavailability. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 34-48.
- Faury G., Pezet M., Knutsen R.H., Boyle W.A., Heximer S.P., McLean S.E., Minkes R.K., Blumer K.J., Kovacs A., Kelly D.P., Li D.Y., Starcher B., Mecham R.P. (2003). Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. *J Clin Invest* **112**, 1419-1428.
- Feletou M., Vanhoutte P. M. (2009). EDHF: an update. *Clinical Science* **117**, 139-155.
- Franzén P., ten Dijke P., Ichijo H., Yamashita H., Schulz P., Heldin C.H., Miyazono K. (1993). Cloning of a TGF $\beta$  type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF $\beta$  type II receptor. *Cell* **75**, 681-692.
- Galvin K.M., Donovan M.J., Lynch C.A., Meyer R.I., Paul R.J., Lorenz J.N., Fairchild-Huntress V., Dixon K.L., Dunmore J.K., Gimbrone Jr M.A., Falb D., Huszar D. (2000). A role for Smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nature Genetics* **24**, 171-174.
- Goumans M.J., Liu Z., ten Dijke P. (2009). TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* **19**, 116-27.
- Goumans M.J., Valdimarsdottir G., Itoh S., Rosendahl A., Sideras P., ten Dijke P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- $\beta$  type I receptors. *EMBO J* **21**, 1743-1753.

- Halayko A.J., Solway J. (2001). Molecular mechanism of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J. Appl. Physiol.* **90**, 358-368.
- Heydarkhan-Hagvall S., Helenius G., Johansson B.R., Li J.Y., Mattsson E., Risberg B. (2003). Co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells affects gene expression of angiogenic factors. *J Cell Biochem* **89**, 1250-1259.
- Higuchi R., Krummel B., Saiki R.K. (1988). A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* **16**, 7351-7367.
- Hynes R. O. (2002) *Cell* **110**, 673-687,
- Hynes R. O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**, 1216-1219.
- Judge D.P., Biery N.J., Keene D.R., Geubtner J., Myers L., Huso D.L., Sakai L.Y., Dietz H.C. (2004). Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**,172-181.
- Judge D.P., Dietz H.C. (2005). Marfan's syndrome. *Lancet* **366**, 1965-1976.
- Karnik S.K., Brooke B.S., Bayes-Genis A., Sorensen L., Wythe J.D., Schwartz R.S., Keating M.T., Li D.Y. (2003). A critical role for elastic signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development* **130**, 411-423.
- Kielty C.M., Sherratt M.J., Shuttleworth C.A. (2002). Elastic fibres. *J Cell Sci.* **115**, 2817-28.
- Kishore U., Gaboriaud C., Waters P., Shrive A.K., Greenhough T.J., Reid K.B., Sim R.B., Arlaud G.J. (2004) C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends Immunol.* **25**, 551-561
- Korhonen J., Lahtinen I., Halmekyto M., Alhonen L., Janne J., Dumont D., Alitalo K. (1995). Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo. *Blood* **86**, 1828-1835.
- Legate K. R., Wickstrom S. A., Fassler R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* **23**, 397-418.
- Leimeister C., Steidl C., Schumacher N., Erhard S., Gessler M. (2002). Developmental expression and biochemical characterization of Emu family members. *Dev Biol* **249**, 204-218.
- Li D.Y., Brooke B., Davis E.C., Mecham R.P., Sorensen L.K., Boak B.B., Eichwald E., Keating M.T. (1998). Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* **393**, 276-280.

- Li L., Miano J.M., Mercer B., Olson E.N. (1996). Expression of the SM22alpha promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* **132**, 849-859.
- Miyazono K., Olofsson A., Colosetti P., Heldin C.H. (1991). A role of the latent TGF- $\beta$ -binding protein in the assembly and secretion of TGF- $\beta$ . *EMBO J* **10**, 1091-2101.
- Moessler H., Mericskay M., Li Z., Nagl S., Paulin D., Small J.V. (1996). The SM22 $\alpha$  promoter directs tissue-specific expression in arterial but not in venous or visceral smooth muscle cells in transgenic mice. *Development.* **122**, 2415-2425.
- Mongiat M., Mungiguerra G., Bot S, Mucignat M.T., Giacomello E., Doliana R., Colombatti A. (2000). Self-assembly and supramolecular organization of EMILIN. *J. Biol. Chem.* **275**, 25471-25480.
- Moustakas A., Heldin C.H. (2009). The regulation of TGF- $\beta$  signal transduction. *Development.* **136**, 3699-714.
- Nagy A., Gertsenstein M., Vinterstein K., Behringer R. Manipulation the mouse embryo-A laboratory manual-Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
- Nunes I., Munger J.S., Harpel J.G., Nagano Y., Shapiro R.L., Gleizes P.E., Rifkin D.B. (1996). Structure and activation of the large latent transforming growth factor-beta complex. *Int J Obes Relat Metab Disord* **20 Suppl 3**, S4-S8.
- Parmacek M.S. (2001). Transcriptional programs regulating vascular smooth muscle cell development and differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* **51**, 69-89.
- Ramirez F., Dietz H.C. (2009). Extracellular microfibrils in vertebrate development and disease processes. *J. Biol Chem.* **284**,14677-81
- Ramirez F., Rifkin H.C. (2009). Extracellular microfibrils in vertebrate development and disease processes. *J. Biol. Chem.* **284**, 14677-14681.
- Rifkin D.B. (2005). Latent transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) binding proteins: orchestrators of TGF- $\beta$  availability. *J Biol Chem* **280**, 7409-7412.
- Roskelley C.D., Srebrow A., Bissell M.J. (1995). A hierarchy of ECM-mediated signalling regulates tissue-specific gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 736-747.
- Saharinen J., Keski-Oja J. (2000). Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF- $\beta$  binding proteins, LTBP, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF- $\beta$ . *Mol Biol Cell* **11**, 2691-2704.

- Saharinen J., Taipale J., Keski-Oja J. (1996). Association of the small latent transforming growth factor- $\beta$  with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J.* **15**, 245-253.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning-A laboratory manual-Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sanz-Moncasi M.P., Garin-Chesa P., Stockert E., Jaffe E.A., Old L.J., Rettig W.J. (1994). Identification of a high molecular weight endothelial cell surface glycoprotein, endoglyx-1, in normal and tumor blood vessels. *Lab. Invest.* **71**, 366-373.
- Schaleger T.M., Bartunkova S., Lawitts J.A., Teichmann G., Risau W., Deutsch U., Sato T.N. (1997). Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 3058-3063.
- Schmidt V.J., Wölfle S.E., Boettcher M., de Wit C. (2008). Gap junctions synchronize vascular tone within the microcirculation. *Pharmacological Reports* **60**, 68-74.
- Schmierer B., Hill C.S. (2007). TGF $\beta$ -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 970-982.
- Shimizu R.T., Blank R.S., Jervis R, Lawrenz-Smith S.C., Owens G.K. (1995). The smooth muscle  $\alpha$ -actin gene promoter is differentially regulated in smooth muscle versus non-smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 7631-7643.
- Spessotto P., Cervi M., Mucignat M.T., Mungiguerra G., Sartoretto I., Doliana R., Colombatti A. (2003)  $\beta_1$  integrin-dependent cell adhesion to EMILIN-1 is mediated by the gC1q domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 6160-6167.
- Sterner-Kock A., Thorey I.S., Koli K., Wempe F., Otte J., Bangsow T., Kuhlmeier K., Kirchner T., Jin S., Keski-Oja J., von Melchner H. (2002). Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colonrectal cancer. *Gen. Devel.* **16**, 2264-2273.
- Suri C., Jones P.F., Patan S., Bartunkova S., Maisonpierre P.C., Davis S., Sato T.N., Yancopoulos G.D. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* **87**, 1171-80.
- Suthanthiran M., Li B., Song J.O., Ding R., Sharma V.K., Schwartz J.E., August P. (2000). Transforming growth factor- $\beta_1$  hyperexpression in african-american hypertensives: a novel mediator of hypertension and/or target organ damage. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 3479-3484.

- Tacheau C., Fontaine J., Loy J., Mauviel A., Verrecchia F. (2008). TGF- $\beta$  induces connexin43 gene expression in normal murine mammary gland epithelial cells via activation of p38 and PI3K/AKT signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* **217**, 759-768.
- Taipale J., Keski-Oja J. (1997). Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J* **11**, 51-59.
- ten Dijke P., Arthur H.M. (2007). Extracellular control of TGF $\beta$  signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 857-869
- Urban Z., Riazi S., Seidl T.L., Katahira J., Smoot L.B., Chitayat D., Boyd C.D., Hinek A. (2002). Connections between elastin haploinsufficiency and cell proliferation in patients with supravalvular aortic stenosis and Williams-Beuren syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 30-44.
- Verdone G., Doliana R., Corazza A., Colebrooke S.A., Spessotto P., Bot S., Bucciotti F., Capuano A., Silvestri A., Viglino P., Campbell I.D., Colombatti A., Esposito G. (2008). The solution structure of EMILIN1 globular C1q domain reveals a disordered insertion necessary for interaction with the  $\alpha 4\beta 1$  integrin. *J. Biol. Chem.* **283**, 18947-18956.
- Wagenseil J. E. and Mecham R. P. (2007) New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Research* **81**, 229-240.
- Wagenseil J.E., Nerurkar N.L., Knutsen R.H., Okamoto R.J., Li D.Y., Mecham R.P. (2005). Effects of elastin haploinsufficiency on the mechanical behavior of mouse arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **289**, H1209-17.
- Wendel D.P., Taylor D.G., Albertine K.H., Keating M.T., Li D.Y. (2000). Impaired distal airway development in mice lacking elastin. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **23**, 320-326.
- Wharton K., Derynck R. (2009). TGF- $\beta$  family signalling: novel insights in development and disease. *Development.* **136**, 3691-3697.
- White S.L., Low R.B. (1996). Identification of promoter elements involved in cell-specific regulation of rat smooth muscle myosin gene transcription. *J. Biol. Chem.* **271**, 15008—15017.
- Xu R., Ho Y.S., Ritchie R.P., Li L. (2003). Human SM22 $\alpha$  BAC encompasses regulatory sequences for expression in vascular and visceral smooth muscles at fetal and adult stages. *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol.* **284**, 1398-1407.
- Yanagisawa H., Davis E.C., Starcher B.C., Ouchi T., Yanagisawa M., Richardson J.A., Olsen E.N. (2002). Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature* **415**, 168-171.

- Zacchigna L., Vecchione C., Notte A., Maretto S., Cifelli G., Dupont S., Ferrari A., Maffei A., Marino G., Cordenonsi M., Selvetella G., Aretini A., Colonnese C., Bettarini U., Russo G., Fabbro C., Soligo S., Adorno M., Braghetta P., Bonaldo P., Volpin D., Piccolo S., Lembo G., Bressan G.M. (2006). Emilin-1, a cysteine-rich glycoprotein of elastic fibers, is required for blood pressure homeostasis by regulation TGF- $\beta$  maturation. *Cell* **124**, 929-942.
- Zagris N., Stavridis V. (1995). The expression of the genes for laminin in the early embryo. In: Zagris N., Duprat A.M., Durston A. (Eds.). *Organization of the Early Vertebrate Embryo*, vol. 279. Plenum Press, New York, pp. 169-182.
- Zanetti M., Braghetta P., Sabatelli P., Mura I., Doliana R., Colombatti A., Volpin D., Bonaldo P., Bressan G.M. (2004). EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects. *Mol. Cell Biol.* **24**, 638-650.
- Zhu Y., Oganessian A., Keene D.R., Sandell L.J. (1999). Type IIA procollagen containing the cysteine-rich amino propetide is deposited in the extracellular matrix of prechondrogenic tissue and binds to TGF- $\beta$ 1 and BMP-2. *J Cell Biol* **144**, 1069-1080.

