



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CARDIOLOGICHE, TORACICHE
E VASCOLARI

Scuola di Dottorato di Ricerca in SCIENZE MEDICHE, CLINICHE
E SPERIMENTALI

Indirizzo FISIOPATOLOGIA CLINICA E SCIENZE NEFROLOGICHE
Ciclo XXVI

TESI DI DOTTORATO

**EFFETTO DELLE MICROPARTICELLE ENDOTELIALI SULLA
FUNZIONALITA' ENDOTELIALE:
RUOLO DI miR-126 E DI GLP-1R**

DIRETTORE DELLA SCUOLA: CH.MO PROF. GAETANO THIENE
COORDINATORE D'INDIRIZZO: CH.MO PROF. ALDO BARITUSSIO
SUPERVISORE: CH.MO PROF. FABRIZIO FABRIS

DOTTORANDA: ARIANNA CATTELAN

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
1. VESICOLE EXTRACELLULARI	5
1.1 Storia delle vescicole extracellulari.....	6
1.2 Classificazione delle Vescicole Extracellulari.....	7
1.3 Formazione e Rilascio di Vescicole Extracellulari: Biogenesi.....	8
2. MICROPARTICELLE (MP)	9
2.1 Origine delle MP.....	10
2.2 Composizione delle MP.....	13
2.3 Funzioni delle MP.....	16
2.4 Il ruolo fisiologico delle MP.....	19
3. microRNA	21
3.1 Biogenesi dei microRNA.....	22
3.2 microRNA nelle MP.....	24
3.3 microRNA e comunicazione cellulare.....	25
4. GLP-1	26
4.1 Sintesi e secrezione del GLP-1.....	26
4.2 Recettore del GLP-1.....	30
5. DISFUNZIONE ENDOTELIALE	32
SCOPO DEL LAVORO	33
MATERIALE E METODI	35
1. COLTURA CELLULARE.....	38
2. VITALITÀ CELLULARE.....	38
3. GENERAZIONE DI EMP E DI iEMP.....	39
4. CITOFLUORIMETRIA.....	39
5. MICROSCOPIA ELETTRONICA.....	40
6. IMMUNOFLUORESCENZA.....	40
7. PROLIFERAZIONE CELLULARE.....	41
7.1 Saggio con BrDU per la proliferazione cellulare.....	41
7.2 Monitoraggio in tempo reale mediante sistema xCELLigence.....	42

8. MIGRAZIONE CELLULARE	43
8.1 Scratch Assay.....	43
9. ESTRAZIONE DI RNA	43
10. QUANTIFICAZIONE DI RNA	43
11. TaqMan® microRNA ARRAY	44
12. ESPRESSIONE DEI microRNA	44
13. TRASFEZIONE DELLE CELLULE HCAEC.....	46
14. ESTRAZIONE DELLE PROTEINE	47
15. WESTERN BLOT	47
16. ANALISI STATISTICA	48
RISULTATI	47
1. CARATTERIZZAZIONE DELLE EMP	47
2. INCORPORAZIONE DELLE EMP NELLE CELLULE ENDOTELIALI.....	49
3. EFFETTO DELLE EMP SULLA PROLIFERAZIONE E SULLA MIGRAZIONE CELLULARE.....	50
4. MICRORNA NELLE EMP	53
5. EFFETTO DI miR-126 SULLA PROLIFERAZIONE E SULLA MIGRAZIONE	55
6. EFFETTO DI miR-126 SULL'ESPRESSIONE DI SPRED-1	57
7. iEMP: EFFETTO SULLA PROLIFERAZIONE E MIGRAZIONECELLULARE.....	59
8. microRNA NELLE iEMP.....	62
9. EFFETTO DI GLP-1R SULLA PROLIFERAZIONE.....	62
10. EFFETTO DELLE EMP E DELLE iEMP SULL'ATTIVAZIONE DI p- ERK	65
DISCUSSIONE	67
CONCLUSIONE.....	71
BIBLIOGRAFIA	73

RIASSUNTO

Introduzione: Le microparticelle (EMP) sono piccole vescicole liberate dalla superficie di membrana di cellule endoteliali in condizioni sia fisiologiche che patologiche. Recenti studi hanno messo in evidenza che le EMP rappresentano trasportatori di microRNA capaci di modulare la funzionalità endoteliale con meccanismi non ancora definiti. E' noto che l'attività proliferativa delle cellule endoteliali viene regolata da recettori "accoppiati alla proteina G", come il recettore GLP-1 (GLP1R). Obiettivo di questo studio è stato di verificare l'effetto delle microparticelle ottenute da cellule cresciute in condizioni di glucosio normale (EMP) o in condizioni di elevato glucosio (iEMP) sull'espressione di miR-126, sulla proliferazione e sulla migrazione cellulare e sulla espressione di GLP1R nelle cellule endoteliali.

Metodi: Le EMP sono state generate incubando cellule endoteliali umane (HCAEC) per 24h in terreno privo di supplementi di crescita. Le iEMP sono state ottenute pre-stimolando le cellule con elevata concentrazione di glucosio (30mM) per 72h. In seguito, le cellule HCAEC sono state incubate con le EMP o con le iEMP per 24h. L'espressione genica di miR-126 è stata determinata mediante qPCR Real Time e l'espressione proteica di GLP1R mediante Western Blot. L'effetto proliferativo di EMP, iEMP è stato valutato mediante xCELLigence System (Roche) e la migrazione mediante Scratch Assay.

Risultati: Le EMP favoriscono la proliferazione e la migrazione cellulare mediante il trasferimento di miR-126; miR-126 riduce l'espressione di SPRED-1, proteina che regola negativamente la proliferazione cellulare attraverso l'inibizione della via Ras/ERK chinasi; le iEMP invece, hanno un ridotto contenuto di miR-126, attenuano la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali; è ipotizzabile che tale meccanismo sia dovuto alla riduzione dell'espressione proteica del recettore GLP-1R. La riduzione dell'espressione di GLP-1R indotta da iEMP inibisce l'attivazione di ERK

1/2, direttamente coinvolta nella regolazione della proliferazione cellulare endoteliale.

Conclusioni: Questo studio dimostra per la prima volta che i microRNA presenti nelle microparticelle possono agire da mediatori di comunicazione intercellulare in quanto possono essere trasferiti all'interno di cellule target per modularne diverse attività metaboliche, come la proliferazione e migrazione cellulare.

ABSTRACT

Introduction: Microparticle are membrane vesicles shed from the plasma membrane of endothelial cells generated in physiological and pathological conditions. Recent studies have shown that EMP may represent important transporters for cytokines, proteins and microRNA. The aim of this study was to investigate, in endothelial cells, the effect of microparticles (EMP) from HCAEC exposed to normal-glucose condition or to high-glucose condition (iEMP) on miR-126 expression, on cell proliferation and migration.

Methods: EMP were generated from HCAEC exposed to basal medium without growth supplements for 24 h. Microparticles derived from glucose-treated HCAEC were defined as “injured” EMP (iEMP). HCAEC were incubated with EMP or iEMP for 24 h. Microarray analysis was performed by TaqMan microRNA Array. miR-126 expression was determined by qPCR Real-Time, SPRED-1 and GLP-1R protein expression by Western Blot. Cell proliferation was measured using xCELLigence system (Roche) and cell migration by Scratch Assay.

Results: EMP promote cell proliferation and migration by delivering functional miR-126 into recipient cells. This leads to downregulation of target protein SPRED-1, a negative modulator of Ras/ERK pathway. iEMP, which contain a lower amount of miR-126 in comparison to EMP, reduce cell proliferation by repressing GLP-1R protein expression and by decreasing ERK pathway activation.

Conclusion: This study demonstrates for the first time that endothelial function may be improved by EMP through a release of miR-126 but not in the presence of iEMP. Therefore, EMP may represent a new opportunity to transfer a desired biological message into target cells as therapeutic tool in cardiovascular diseases.

INTRODUZIONE

1.VESCICOLE EXTRACELLULARI

La comunicazione cellulare rappresenta un processo cruciale negli organismi multicellulari e comprende una serie complessa di segnali, grazie ai quali le cellule sono in grado di coordinare le proprie attività a diversi livelli fino a regolarne il fenotipo¹. Questi segnali possono originare direttamente all'interno della cellula ed agire direttamente sulla cellula stessa (comunicazione intracellulare), o possono provenire da altre cellule o dall'ambiente extracellulare ed agire su specifiche cellule bersaglio (comunicazione intercellulare).

I segnali cellulari coinvolti nella comunicazione intercellulare possono essere rappresentati da ormoni, neuro-trasmittitori e dalle “vescicole extracellulari”². Mentre per gli ormoni e per i neurotrasmettitori le modalità di secrezione e i meccanismi d'azione sono generalmente ben noti³, per le “vescicole extracellulari” sono ancora poco conosciuti.

Le vescicole extracellulari sono trasportate dai fluidi biologici e sono in grado di trasferire materiale genetico, citochine, molecole di adesione in cellule vicine o in cellule notevolmente distanti dal luogo di produzione⁴.

Attraverso questo “nuovo” sistema di comunicazione, le cellule acquisiscono e si assicurano un ulteriore modo di regolazione delle funzioni cellulari quali la crescita, la proliferazione, la secrezione di molecole specifiche e la sopravvivenza in particolari condizioni pato-fisiologiche⁵. Pertanto, una migliore comprensione dei meccanismi di azione delle vescicole extracellulari può favorire lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche nei confronti di diverse patologie come il cancro, le patologie autoimmuni e infiammatorie, il diabete, le malattie cardiovascolari e le malattie cronico-degenerative.

1.1 Storia delle vescicole extracellulari

Il termine suggerito per descrivere il processo di rilascio delle vescicole fu inizialmente “reocrine”, termine riferito alla secrezione di un recettore cellulare attivo incorporato all'interno della particella e trasferito a cellule target dove esplica le proprie funzioni ectopiche ⁶. Comunque, la scoperta delle vescicole extracellulari risale al 1940, quando Chargaff e West identificarono nel plasma la presenza di fattori subcellulari capaci di promuovere la coagulazione del sangue ⁷. Più di 20 anni dopo, Wolf identificò nel plasma umano frammenti piastrinici che denominò “polvere piastrinica” ⁸. Questa “polvere” conteneva delle vescicole, di diametro inferiore a 0.1 µm, capaci di promuovere la coagulazione. Nel 1983, Pan osservò che dai reticolociti venivano rilasciate vescicole nello spazio extracellulare ⁹. Inizialmente queste vescicole vennero considerate come dei detriti di membrana inerti, privi di significato biologico. Successivamente, nel 1994, Satta osservò che il surnatante dei monociti stimolati con endotossina batterica (lipopolisaccaride, LPS) conteneva il fattore tissutale funzionalmente attivo ¹⁰. Il fattore tissutale, iniziatore della coagulazione, è una proteina di membrana che funziona solo se legato alla membrana cellulare. Questo significava che le cellule stimolate erano in grado di rilasciare parti di membrana biologicamente attive a cui era legato il fattore tissutale.

Da allora, il ruolo delle vescicole extracellulari nella comunicazione intercellulare, attraverso il trasferimento di proteine, lipidi e acidi nucleici, ha acquisito una notevole importanza. Numerosi studi hanno descritto come le vescicole extracellulari, isolate dalla maggior parte dei fluidi corporei, siano in grado di regolare non solo i normali processi fisiologici come la riparazione tissutale e la coagulazione, ma siano anche coinvolte in molti processi patologici come il diabete mellito di tipo 2, l'aterosclerosi, l'ipertensione arteriosa e l'infarto miocardico ^{11,12}. Le vescicole extracellulari e il loro contenuto rappresentano quindi una classe di targets terapeutici in grado di modulare la rigenerazione tissutale e la risposta immunitaria.

1.2 Classificazione delle Vescicole Extracellulari

Le vescicole extracellulari sono dunque un gruppo eterogeneo di particelle che possono essere principalmente suddivise in tre gruppi: esosomi, microparticelle (MP) e corpi apoptotici ¹³. Questa classificazione viene fatta in relazione alla grandezza o dimensione della particella, alla diversa composizione lipidica e alla densità ¹⁴. La Tabella 1 riassume le caratteristiche biofisiche di questi 3 gruppi di vescicole.

Gli esosomi sono le vescicole più piccole, con diametro tra 40 nm e 100 nm, con dimensioni generalmente omogenee mentre le MP presentano una forma irregolare con un diametro massimo di 1000 nm ed una densità non ancora determinata. I corpi apoptotici sono le vescicole più grandi con diametro tra 50 e 4000 nm e densità maggiore rispetto alle altre due classi. Similmente alle MP, i corpi apoptotici hanno una forma estremamente irregolare e ciò rende la loro discriminazione morfologica assai complessa.

Per quanto riguarda la composizione lipidica, esperimenti di spettrometria di massa, in vescicole isolate da differenti linee cellulari, hanno identificato la presenza di differenti classi di lipidi caratterizzate da fosfogliceridi, sfingolipidi e steroidi ¹⁵. La particolare composizione lipidica di ogni categoria di vescicole contribuisce a determinare la rigidità e l'efficienza di trasporto. Peraltro, tutte le vescicole sono accomunate dalla presenza di residui di fosfatidilserina più o meno esposti nelle tre diverse categorie di vescicole ¹⁶.

	Esosomi	Microparticelle	Corpi Apoptotici
Dimensione (diametro)	40-100 nm	100-1000 nm	50-4000 nm
Densità	1,13-1,19 g/cm ³	Non definita	1,16-1,28 g/cm ³
Composizione lipidica	PS Colesterolo Ceramide	PS Colesterolo	PS
Referenze	Vidal et al. (1989); Heijnen et al. (1999); Subra et al. (2007); Trajkovic et al. (2009)	Scott et al. (1984); Zwaal et al. (1992); Bucki et al. (1998)	Stuart et al. (1998)

Tabella 1: Caratteristiche biochimiche delle vescicole extracellulari

1.3 Formazione e Rilascio di Vescicole Extracellulari: Biogenesi

Unitamente alle proprietà biofisiche, anche il diverso meccanismo di rilascio delle vescicole extracellulari concorre a distinguere i tre diversi gruppi di vescicole (Figura 1) ¹⁷. Secondo recenti studi le MP vengono rilasciate nello spazio extracellulare per gemmazione dalla membrana plasmatica come conseguenza di un'attivazione dovuta principalmente a stress cellulare, ad aumento del calcio intracellulare o a diminuzione dei livelli di colesterolo della membrana plasmatica cellulare ^{18,19}.

I corpi apoptotici, come suggerisce il loro nome, vengono rilasciati durante le fasi terminali dell'apoptosi e si originano da cellule apoptotiche per frammentazione ²⁰. Infine, la biogenesi degli esosomi origina dalla formazione di compartimenti multivescicolari a livello citoplasmatico, che vengono rilasciati nell'ambiente extracellulare per fusione con la membrana plasmatica ²¹.

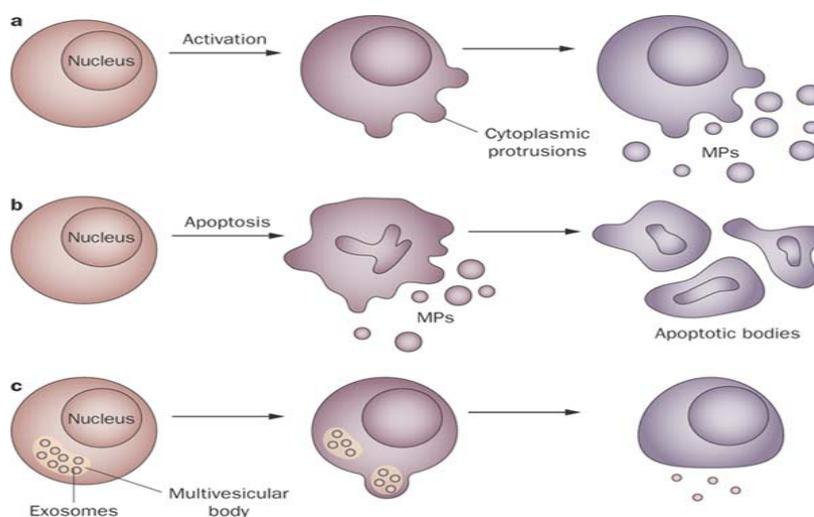


Figura 1. Meccanismi di rilascio delle vescicole extracellulari; a) rilascio di microparticelle; b) rilascio di corpi apoptotici; c) rilascio di esosomi.

In questo studio, verranno prese in esame in particolar modo le MP, poiché recenti studi hanno evidenziato il loro ruolo chiave come biomarkers in malattie cardiovascolari associate a danno endoteliale.

2. MICROPARTICELLE (MP)

La formazione e il rilascio di MP avviene principalmente durante due processi biologici diversi: l'attivazione cellulare indotta da stimoli proinfiammatori o protrombotici e l'apoptosi cellulare²².

Nonostante i meccanismi cellulari che rilasciano le MP non siano stati ancora completamente definiti, la riorganizzazione dei fosfolipidi di membrana e quindi l'architettura della cellula della membrana plasmatica svolge un ruolo fondamentale nella biogenesi delle MP²³.

Nelle cellule quiescenti, la distribuzione dei fosfolipidi nel doppio strato è asimmetrica, con i fosfolipidi dotati di carica (fosfatidilserina) localizzati nello strato interno, mentre i fosfolipidi neutri, come la fosfatidilcolina, in quello esterno. La distribuzione asimmetrica è di tipo dinamico ed è controllata da tre proteine: floppasi, flippasi e scramblasi che sono regolate dal Ca^{2+} intracellulare e da stimoli esogeni ed endogeni.

L'aumento del calcio intracellulare, infatti, provoca l'inibizione della flippasi e l'attivazione della floppasi e della scramblasi inducendo alla lunga un cambiamento della posizione dei fosfolipidi che passano dallo strato interno a quello esterno. Inoltre, l'aumento del calcio intracellulare attiva alcune proteasi tra cui la calpaina, che induce la riorganizzazione e/o la distruzione del citoscheletro. La riorganizzazione del citoscheletro associata all'accumulo dei fosfolipidi nello strato esterno della membrana, soprattutto di fosfatidilserina, permette la formazione e il rilascio di MP. Questi eventi sono illustrati nella Figura 2.

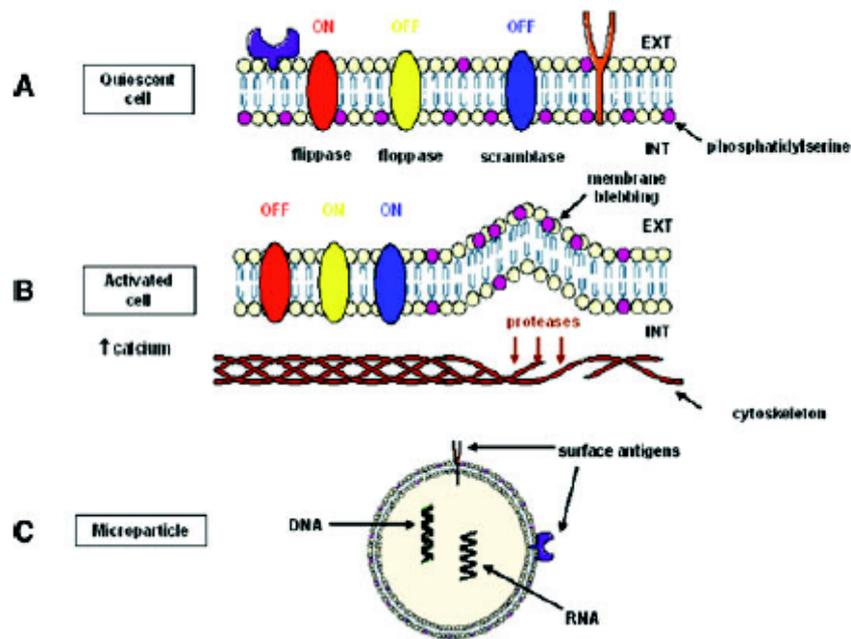


Figura 2. Rappresentazione schematica dei meccanismi di formazione delle microparticelle. (A) In cellule quiescenti solo la flippasi è attiva permettendo la localizzazione della fosfatidilserina (PS) nello strato interno. (B) L'aumento delle concentrazioni di calcio intracellulare attiva la floppasi e la scramblasi e induce la riorganizzazione del citoscheletro. (C) Le microparticelle espongono PS e contengono proteine e acidi nucleici della cellula di origine.

2.1 Origine delle MP

In vitro, il processo di rilascio è stato identificato in diverse tipi di cellule²⁴. Le principali cellule capaci di rilasciare MP sono: eritrociti, globuli bianchi, piastrine e cellule endoteliali.

Eritrociti

Gli studi condotti da Wagner nel 1986 hanno dimostrato che gli eritrociti umani trattati con lo ionoforo del Ca^{2+} (A23187), in presenza di Ca^{2+} , rispondono rilasciando MP²⁵. Anche eritrociti normali rilasciano MP in seguito a deplezione di ATP, trattamento termico (49 °C) o incubazione con

diamide o idrazina (5 mMol/L). MP derivate da eritrociti sono state identificate anche in diverse condizioni patologiche associate a complicanze trombotiche²⁶. Generalmente, queste MP sono individuate mediante il legame di anticorpi con la glicoforina A (CD235a), una proteina unicamente espressa sulla membrana degli eritrociti.

Globuli bianchi

Le MP vengono anche rilasciate dalla maggior parte dei leucociti: monociti, granulociti e linfociti²⁷. Queste cellule hanno un peculiare ruolo nella trombosi e nell'infiammazione, processi coinvolti nello sviluppo e nella progressione delle malattie cardiovascolari.

In seguito ad esposizione a vari stimoli, tra cui l'endotossina lipopolisaccaride, i monociti rilasciano MP nello spazio extracellulare. Alcuni studi hanno dimostrato che queste MP possono avere sia attività trombotica che non trombotica. Infatti, le MP derivate da monociti ed esprimono il fattore tissutale (TF), una glicoproteina necessaria per la formazione della trombina, costituiscono un'importante classe di MP trombogeniche¹⁰. D'altra parte la funzione regolatoria non trombotica è stata dimostrata da Gasser e collaboratori nelle MP rilasciate dai linfociti capaci di aderire ai monociti e conseguentemente di indurre una risposta infiammatoria²⁸.

Le MP rilasciate dai neutrofili invece presentano sulla loro superficie molecole di adesione proinfiammatorie come le selectine, ed enzimi capaci di degradare la matrice extracellulare. Queste MP sono state identificate nel sangue di soggetti normali e in pazienti con sepsi meningococcica²⁹. Le MP derivate da monociti vengono identificate mediante il recettore CD14, un recettore fortemente espresso sulla loro superficie³⁰.

Piastrine

Le MP piastriniche possono essere generate dai megacariociti e sono tipicamente identificate mediante l'espressione di markers piastrinici costitutivi quali CD41, CD42b o CD61³¹. Le microparticelle piastriniche esprimono sulla superficie vari antigeni come la glicoproteina (GP) Ia, GPIIa,

GPIIb, GPIIIa, von Willebrand Factor (VWF), P-selectina, trombospondina e recettori per le chemochine (es. CXCR4). Le caratteristiche immunofenotipiche delle MP piastriniche, la loro composizione fosfolipidica e il contenuto in colesterolo riflettono sia lo stato funzionale delle piastrine rilascianti MP che la natura dello stimolo indotto ³².

La formazione di MP da piastrine avviene come conseguenza dell'attivazione indotta da epinefrina, adenosina difosfato, collagene o trombina ³³. Le MP piastriniche contengono internamente un'elevata densità di P-selectina e di β -integrina, mentre esternamente la superficie risulta essere 50-100 volte più procoagulante rispetto a quella delle piastrine attivate. L'aumentata formazione di MP piastriniche è stata documentata in molte condizioni cliniche associate ad eventi trombotici ³⁴. Inoltre, le MP piastriniche interagiscono attivamente con l'endotelio e con le cellule del sangue contribuendo così alla regolazione delle loro funzioni. Infatti, l'interazione con le cellule endoteliali può favorire l'upregolazione di molecole di adesione ed indurre di conseguenza una risposta infiammatoria ³⁵.

Cellule endoteliali

Le microparticelle endoteliali (EMP) circolanti vengono identificate e misurate mediante antigeni costitutivamente espressi dalle cellule endoteliali mature (es. CD31, CD51, CD105, CD144 e CD146) ³⁶. In modo particolare, CD144 e CD146 rappresentano markers endoteliali specifici poiché sembra che nell'uomo, non siano espressi in nessun'altra cellula del sangue.

Inoltre, l'analisi della composizione antigenica delle EMP, utilizzando metodi di proteomica, ha evidenziato la presenza di molteplici proteine come enzimi metabolici e proteine coinvolte in processi di adesione e fusione, suggerendo quindi il loro ruolo come messaggeri extracellulari ³⁷.

Le cellule endoteliali generano EMP in seguito all'esposizione in vitro con trombina, lipopolisaccaride, citochine (interleuchina-1 e TNF- α). Jimenez e collaboratori dimostrarono che il rilascio di EMP varia quantitativamente e qualitativamente in base allo stimolo indotto. Indipendentemente dalle loro caratteristiche antigeniche, i valori di EMP riflettono la presenza

di disfunzione endoteliale ³⁸. Per esempio, è stata dimostrata una forte associazione tra elevati livelli di EMP (CD31+, CD51+, CD144+) e anomalie vascolari sia dal punto di vista strutturale che funzionale.

Inoltre, nelle patologie cardiovascolari, il numero delle EMP sembra strettamente correlato con la presenza di placche coronariche non calcificate ³⁹. Per di più queste MP possono rappresentare un link tra la disfunzione endoteliale e la trombosi arteriosa. Infatti, in vivo, le MP rilasciate da cellule endoteliali, presentano sulla loro superficie il fattore tissutale. Nonostante il ruolo di questo fenomeno non sia ancora del tutto noto, le EMP sono considerate, insieme alle MP monocitarie, una delle principali fonti di fattore tissutale circolante ⁴⁰.

2.2 Composizione delle MP

Membrana esterna

Le membrane delle MP sono costituite principalmente da lipidi e da proteine, la cui composizione biochimica varia a seconda dello stimolo subito dalle cellule, anche se derivanti dalla stessa linea cellulare. Una rappresentazione schematica della composizione delle MP è riportata in Figura 3. I fosfolipidi carichi negativamente sono raffigurati in nero e sono disposti nello strato interno nella cellula non attivata e nello strato esterno nella cellula attivata e di conseguenza nelle MP. In seguito all'attivazione cellulare alcune molecole localizzate nella membrana cellulare vengono upregolate.

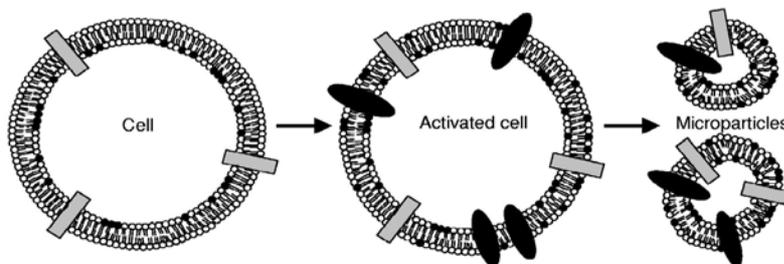


Figura 3. Rappresentazione schematica della generazione e composizione delle MP.

Lipidi

Le MP sono rivestite da un doppio strato fosfolipidico. Nelle cellule, la distribuzione asimmetrica dei fosfolipidi è solitamente alterata durante la formazione delle MP, con conseguente esposizione sulla superficie esterna dei fosfolipidi carichi negativamente, come fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina. Questa collocazione riveste un ruolo importante negli effetti in vivo delle MP poiché la fosfatidilserina lega efficientemente fattori di coagulazione⁴¹. La composizione fosfolipidica delle MP nei soggetti sani consiste principalmente di fosfatidilcolina (circa 60%), di sfingomieline, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina⁴². Fourcade et al riportarono che la composizione fosfolipidica di MP derivanti da pazienti con artrite era maggiormente costituita da fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, sfingomieline e lisofosfolipidi (20-25%) mentre solo una piccola percentuale era costituita da fosfatidilcolina⁴³. Questo suggerisce che la composizione fosfolipidica differisce tra vari tipi di cellule e che stimoli proinfiammatori inducono il rilascio di MP con differente composizione fosfolipica.

Proteine

Le MP espongono sulla superficie della membrana esterna antigeni specifici derivanti dalla cellula di origine. Questa identificazione antigenica è sempre presente sulla superficie cellulare e permette la determinazione dell'origine cellulare delle MP (Figura 4)⁴⁴.

MP	Parent Cell		MP Surface receptors
PMP	platelet		CD31, CD40L, CD41a, CD42a, CD42b, CD61, CD62P, CD63, CD107a, fibrinogen, VWF
MegMP	megakaryocyte		CD41, CD184, filamin A
LMP	lymphocyte		CD3, CD4, CD8, CD11b, CD16, CD19, CD20, CD14, CD45, CD66b
MMP	monocyte		CD14, CD142, CD144, CD162
RMP	red blood cell		CD35, CD235a, IgG, complement
NMP	neutrophil		CD11a, CD11b, CD15, CD16, CD35, CD49, CD59, CD62L, CD66b, CD142
EMP	endothelial cell		CD31, CD34, CD51, CD54, CD62E, CD63, CD105, CD106, CD142, CD144, CD146

Figura 4. Marker di superficie identificativi dell'origine delle MP.

La membrana delle MP contiene anche molecole upregolate o traslocate in seguito ad attivazione cellulare o ad uno stimolo apoptotico. Per esempio, cellule endoteliali attivate rilasciano MP esprimenti E-selectina mentre MP piastriniche espongono molecole come P-selectina e glicoproteina 53, entrambe derivante dalla membrana dei granuli intracellulari^{45,46}.

Interno

Internamente, le MP contengono un ampio spettro di molecole bioattive. Durante il processo di gemmazione, le MP internalizzano anche porzioni di citoplasma della cellula di origine e questo implica che il contenuto è ricco in citochine (IL-1 β , CCL5), enzimi (MMPs, caspasi 1), fattori di crescita (VEGF, bFGF, PDGF) e proteine di segnale. Recentemente è stata dimostrata la presenza anche di mRNA e di microRNA in alcune MP (Figura 5)^{47,48}.

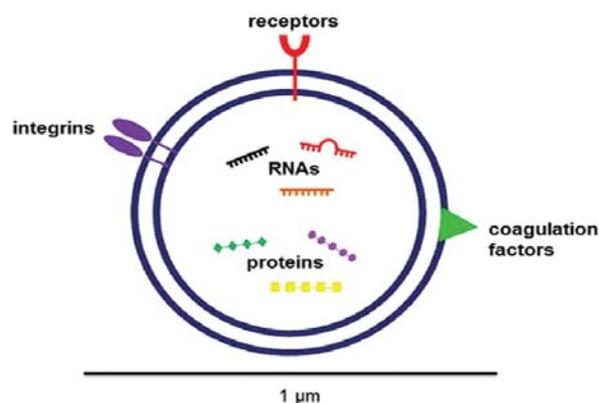


Figura 5. Componenti delle MP.

2.3 Funzioni delle MP

Nonostante le MP siano state inizialmente considerate detriti cellulari inerti, successivamente numerosi studi hanno descritto il loro ruolo come veicoli per lo scambio intercellulare di segnali biologici e di informazioni. Le MP modulano proprietà cellulari e risposte, esponendo molecole bioattive capaci di legarsi e di attivare recettori presenti sulla superficie delle cellule target, o trasferendo direttamente parte del loro contenuto tra cui proteine, lipidi bioattivi o RNA ⁴⁹. Questo trasferimento può essere facilitato da interazioni momentanee o può richiedere una stabile associazione, fusione di membrana o incorporazione delle MP all'interno della cellula target (Figura 6) ^{50,51}.

In base alla loro capacità di trasferire parte del contenuto a cellule target, le MP, quantitativamente e qualitativamente, integrano i tradizionali metodi di comunicazione intercellulari, caratterizzati da secrezione di molecole segnale o interazioni fisiche di proteine di membrana. Questo sistema di trasferimento transcellulare basato sulle MP stabilisce una rete integrata di comunicazione in cui specifiche proprietà ed informazioni possono essere rapidamente condivise tra le cellule e particolari processi, come il mantenimento dell'omeostasi vascolare, vengono più efficacemente coordinati. In particolare, in certe condizioni fisiopatologiche, le MP aggravano processi deleteri come l'infiammazione e la trombosi ⁵².

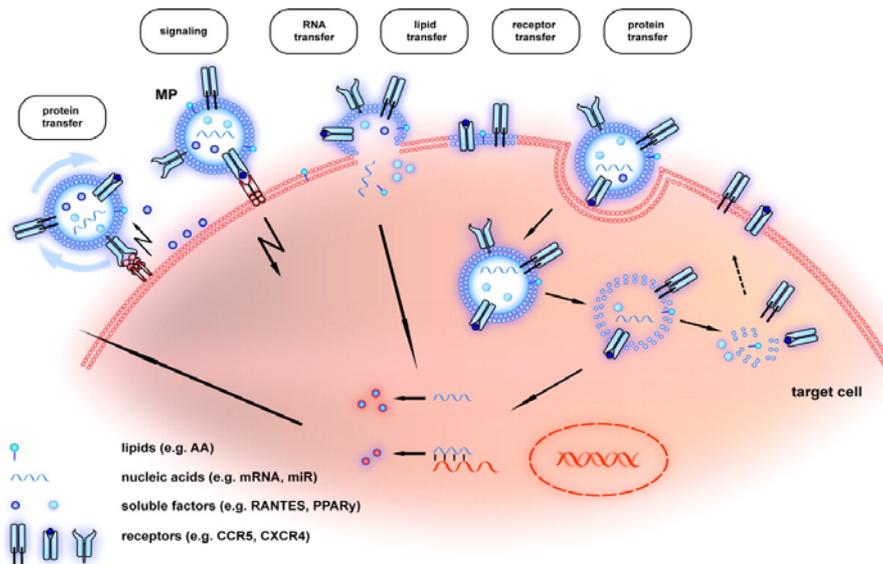


Figura 6: Meccanismi di trasferimento di segnali o di contenuto dalle MP alle cellule target.

Trasferimento di recettori di membrana

Il trasferimento di recettori ancorati alla membrana mediato dalle MP induce alterazioni fenotipiche a livello delle cellule target, rendendo così queste cellule suscettibili a nuove interazioni. Il meccanismo di trasferimento avviene mediante fusione di frammenti di membrana delle MP e successivo rapido trasferimento dei recettori sulla superficie della membrana⁵³.

Rilascio di proteine

Le MP possono anche trasferire proteine come citochine, chemochine e fattori di crescita alle cellule target con conseguente modulazione di proprietà costitutive delle cellule stesse. Numerosi studi hanno dimostrato che le MP contengono e trasferiscono efficientemente citochine proinfiammatorie come l'interleuchina-1 β (IL-1 β). Similmente all'IL-1 β , la citochina CCL5 presente negli α -granuli viene ridistribuita nelle MP piastriniche in seguito all'attivazione piastrinica e anche sulla superficie di endotelio infiammato e aterosclerotico, per promuovere il reclutamento dei monociti⁵⁴. In particolare, CCL5 originato da piastrine attivate viene più efficientemente

trasferito alle cellule endoteliali quando viene secreto attraverso le MP rispetto a quando viene direttamente rilasciato nella sua forma solubile. Inoltre, recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato che il fattore trascrizionale PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor) derivato da piastrine attivate e complessato con il recettore retinoico X è specialmente associato con le MP piastriniche ⁵⁵.

Trasferimento di lipidi bioattivi

Barry et al. hanno dimostrato che le MP possono alterare le funzioni cellulari attraverso il trasferimento di lipidi. Concretamente, è stato dimostrato che le MP piastriniche inducono attivazione piastrinica attraverso il trasporto transcellulare di acido arachidonico (AA), il quale di conseguenza viene metabolizzato a trombossano A₂, un forte agonista piastrinico e vaso-costrittore ⁵⁶. Inoltre, la frazione di AA contenuto nelle MP piastriniche può modulare le funzioni delle cellule endoteliali, attivando una cascata di segnali molecolari che inducono chemiotassi e adesione dei monociti ⁵⁷.

Trasferimento di microRNA

Le MP sono anche in grado di trasferire sostanziali quantità di mRNA e di microRNA. Il trasferimento di informazioni genetiche altera di conseguenza l'espressione di geni sia in cellule vicine che distanti. In seguito alle interazioni con le cellule target e alla successiva internalizzazione, le MP riescono a riprogrammare il fenotipo delle cellule target e conferiscono specifiche caratteristiche, in diverse condizioni ⁵⁸. Esperimenti di microarray e di RT-PCR quantitativa hanno indicato che, in analogia alle proteine e ai recettori di superficie, le MP trasferiscono uno specifico insieme di mRNA. Il meccanismo alla base di questa selettività rimane ancora da chiarire, ma è ipotizzabile che l'RNA immagazzinato nelle MP dipenda dagli stimoli che inducono il rilascio di MP ⁵⁹.

Oltre all'mRNA, è stato recentemente dimostrato che le MP trasferiscono microRNA sia prematuri che maturi ⁶⁰.

2.4 Il ruolo fisiologico delle MP

Le MP svolgono un importante ruolo nella fisiologia cellulare in quanto sono implicate nella comunicazione intercellulare come vettori biologici, capaci di scambiare informazioni genetiche e non ⁶¹. In condizioni normali, il numero di EMP circolanti è molto basso e ciò è dovuto al fatto che il turnover endoteliale è un processo molto lento, che dipende dal bilancio tra la proliferazione e la morte cellulare. In questa condizione, le EMP svolgono in particolare un ruolo benefico nella protezione della funzionalità endoteliale, in quanto sono in grado di aumentare la sopravvivenza cellulare, inibire la apoptosi e la necrosi cellulare e liberare sostanze ad azione anti-coagulativa e anti-infiammatoria ⁶².

In presenza di uno stimolo patologico o meccanico (es. pressione elevata) il turnover endoteliale accelera con conseguente aumento di MP rilasciate dalle cellule. Pertanto le MP rilasciate in seguito a condizioni di stress non differiscono solo in numero, ma anche in composizione e funzione, favorendo la progressione di alterazioni vascolari, come un aumento del grado di infiammazione, di coagulazione e di adesione dei monociti a livello endoteliale ¹². L'effetto procoagulante delle MP è dovuto alla capacità dei residui di fosfatidilserina, esposti sulla loro superficie esterna, di legare ed attivare fattori coagulativi e alla presenza del fattore tissutale (TF), iniziatore della cascata coagulativa. Similmente alla coagulazione, anche i processi infiammatori contribuiscono alla patogenesi delle malattie vascolari. Le MP sono implicate nella risposta infiammatoria, stimolando l'espressione di geni pro-infiammatori nelle cellule endoteliali e promuovendo la produzione di citochine e di molecole di adesione ⁶³.

Inoltre, a livello endoteliale, le EMP possono indurre disfunzione endoteliale, riducendo la sintesi dell'ossido nitrico e aumentando lo stress ossidativo mediante il rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) ⁶⁴.

Riassumendo, le MP sono strutture biologiche complesse che mostrano un ampio spettro di funzioni dipendenti dalla composizione dei fosfolipidi di membrana, dal loro contenuto vescicolare e dall'origine cellulare.

Alla luce dei più recenti studi, il ruolo fisiologico delle MP nella regolazione dell'omeostasi vascolare rimane non del tutto chiarito.

Diversi fenotipi di MP possono essere identificati in vivo e a seconda delle condizioni fisiopatologiche dell'individuo, le MP possono svolgere un ruolo patologico o ricoprire un effetto benefico sull'endotelio (Figura 7) ⁶⁵.

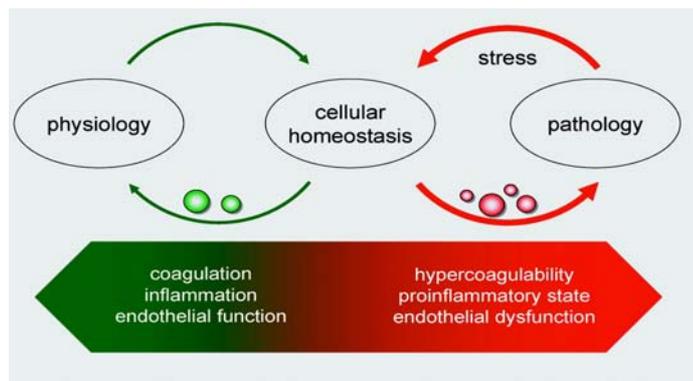


Figura 7. Possibile meccanismo che descrive il ruolo fisiologico e patologico delle MP.

3. microRNA

I microRNA costituiscono una famiglia di RNA, altamente conservati e non codificanti, di lunghezza compresa tra i 21 e i 25 nucleotidi, il cui ruolo fondamentale è quello di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale. I microRNA agiscono mediante il riconoscimento di specifici mRNA targets e ne determinano la degradazione o la repressione della traduzione.

La scoperta dei microRNA avvenne nel 1993 e da allora i microRNA hanno suscitato un notevole interesse grazie alle loro caratteristiche funzioni. Nel corso degli anni, evidenze sperimentali hanno infatti dimostrato che i microRNA sono coinvolti nella regolazione di molteplici processi cellulari come proliferazione, differenziazione, invecchiamento e morte cellulare.

Il primo miRNA individuato, lin-4, è stato identificato nel nematode *Caenorhabditis elegans* ed è coinvolto nella regolazione dello sviluppo delle varie fasi larvali. Da allora, attraverso numerose ricerche, sono state computazionalmente predette e/o direttamente identificate diverse migliaia di questi piccoli RNA regolatori, presenti in numerosi organismi, tra cui per primi *C. elegans*, *Drosophila* e l'uomo⁶⁷. Studi successivi hanno confermato che la regolazione dell'espressione genica effettuata da questi piccoli RNA non è quindi ristretta a poche specie animali e può essere un meccanismo generale presente in molti organismi multicellulari.

Attualmente, i miRNA sono stati identificati in un gran numero di organismi multicellulari ed è stimato che il genoma dei vertebrati può codificare diverse centinaia di miRNA, che possono regolare circa il 30% dei geni⁶⁶.

3.1 Biogenesi dei microRNA

I microRNA sono trascritti dall'enzima RNA polimerasi II a partire da un primo precursore definito primary miRNA (pri-miRNA) (Figura 8).

I pri-miRNA rappresentano molecole di RNA a singolo filamento che si ripiegano a formare una parziale doppia elica in seguito all'appaiamento di sequenze complementari. La struttura dei pri-miRNA è quindi quella di una forcina (stem-loop) da cui origineranno i pre-miRNA ⁶⁸.

Nel nucleo i pri-miRNA vengono processati a livello della base della "forcina" da una RNA-endonucleasi di tipo III, Drosha. Grazie all'azione di questo enzima, dai pri-miRNA generano i pre-miRNA, strutture "stem-loop" di circa 70 nucleotidi. Il riconoscimento da parte di Drosha necessita dell'interazione di questo enzima con una seconda proteina, Pasha (Partner of Drosha), che riconosce la struttura secondaria della base della "forcina" e sequenze fiancheggianti questa regione, generalmente situate a non più di 125 nucleotidi di distanza ⁶⁹. In seguito i pre-miRNA vengono attivamente traslocati al citoplasma grazie all'azione sinergica di Ran-GTP ed Exportin-5.

Una volta nel citoplasma i pre-miRNA vengono sottoposti all'azione catalitica di un'altra RNA-endonucleasi di tipo III: Dicer. Con questo passaggio i filamenti dei pre-miRNA sono processati nella forma di duplex, di circa 23 paia di basi.

Queste molecole di RNA a doppia elica vengono indicate come miRNA:miRNA*, in cui miRNA è il filamento che sarà incluso nell'"RNA-Induced Silencing Complex" (RISC); il filamento miRNA* sarà invece degradato. Il RISC è un complesso ribonucleo-proteico composto dal miRNA a singolo filamento e da una varietà di proteine, tra le quali risultano fondamentali per l'attività del complesso le proteine della famiglia Argonaute.

L'associazione microRNA-RISC comporta la repressione di geni target in seguito a degradazione e/o inibizione translazionale. Il riconoscimento del target richiede la specifica interazione tra microRNA e sequenze di riconoscimento localizzate a livello della regione 3' UTR del mRNA. At-

traverso la repressione di geni target, i microRNA inducono importanti alterazioni a livello di espressione genica implicate in fondamentali aspetti biologici.

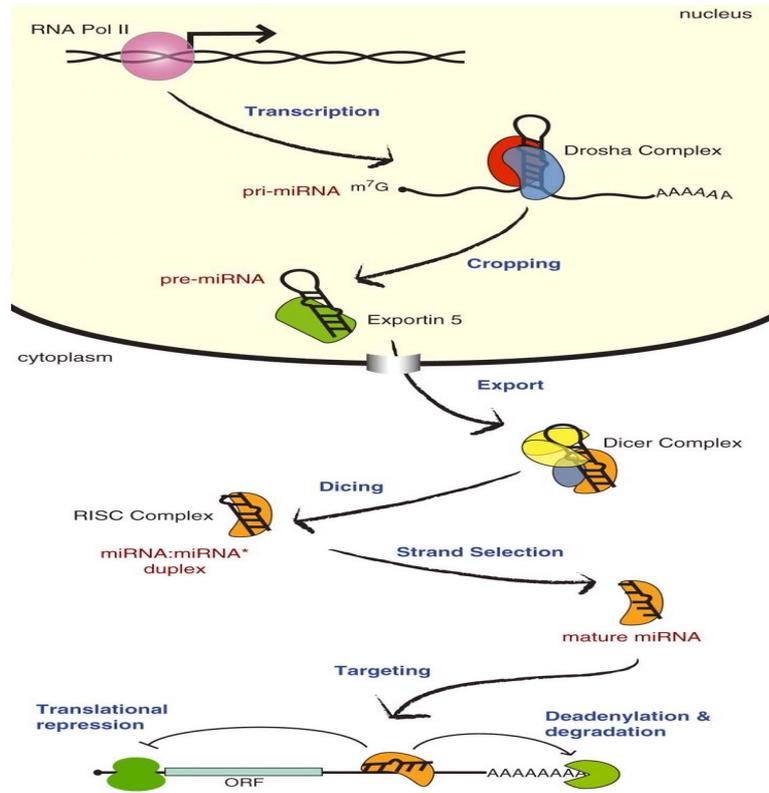


Figura 8. Biogenesi dei microRNA. microRNA viene prodotto nel nucleo come precursore di microRNA maturo (pri-miRNA). Pri-miRNA è una sequenza di RNA a doppio filamento di lunghezza di circa 70 paia di basi che contiene spesso più sequenze microRNA maturi. Pri-miRNA viene sottoposto a processamento che permette di ottenere, attraverso clivaggi successivi, la sequenza di microRNA maturo (circa 20 paia di basi). Esistono due ribonucleasi Drosha (nel nucleo) e Dicer (nel citosol) che, aiutate da specifici cofattori, frammentano pri-miRNA fino ad ottenere la sequenza di microRNA maturo. microRNA maturo si lega alle proteine appartenenti ad "Argonaute Family" per formare il complesso che interagisce con mRNA target.

3.2 microRNA nelle MP

La maggior parte dei microRNA è presente all'interno della cellula; nonostante ciò piccole quantità di microRNA sono state identificate anche a livello extracellulare. Numerosi studi hanno infatti dimostrato la presenza di microRNA nei fluidi corporei tra cui plasma, saliva ed urina ⁷⁰. I microRNA extracellulari risultano notevolmente stabili nonostante l'intensa attività degli enzimi RNasi. Questa stabilità suggerisce che i microRNA usufruiscono di particolari meccanismi capaci di proteggerli dalla digestione da parte delle RNasi.

Recenti studi hanno di fatto dimostrato che i microRNA rilasciati a livello extracellulare vengono immagazzinati all'interno di vescicole (esosomi, MP e corpi apoptotici) o associati a proteine leganti RNA (RNA binding protein, RBP) o a lipoproteine (HDL) (Figura 9) ⁷¹. In questo modo i microRNA vengono protetti dall'inevitabile degradazione indotta da esonucleasi presenti nei fluidi extracellulari.

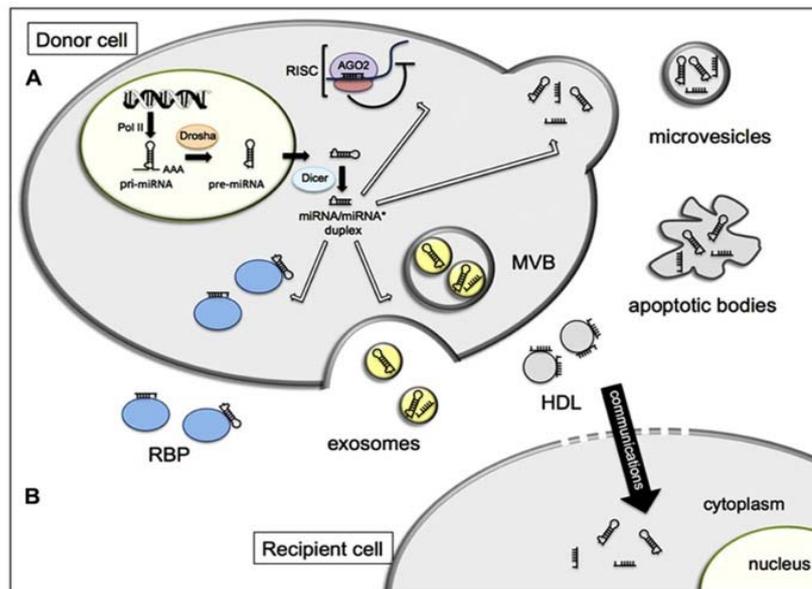


Figura 9. Rappresentazione schematica del processo di rilascio (A) e della comunicazione intercellulare dei microRNA (B).

Inoltre, il profilo di espressione dei microRNA all'interno delle vescicole extracellulari è significativamente differente a seconda dell'origine cellulare, indicando la presenza di un meccanismo attivo di trasferimento e immagazzinamento dei microRNA dalle cellule alle vescicole⁶¹.

3.3 microRNA e comunicazione cellulare

I meccanismi di scambio di microRNA tra le cellule guidano la comunicazione sia tra cellule adiacenti che tra cellule distanti tra loro; questo comporta possibili modificazioni sia in cellule che in tessuti dove normalmente questi microRNA non sono sintetizzati. Numerose evidenze suggeriscono che questa forma di comunicazione avviene essenzialmente nel corso di vari processi fisiopatologici quali l'omeostasi del glucosio e le funzioni endoteliali⁶⁴.

4. GLP-1

Glucagon-like –peptide-1 (GLP-1) è un ormone peptidico secreto principalmente dalle cellule L enteroendocrine dell'ileo distale e del colon capace di regolare il metabolismo glucidico. Nel diabete mellito di tipo 2 ha un ruolo terapeutico in quanto capace di migliorare il controllo glicemico mediante l'inibizione del rilascio di glucagone, l'azione sui sensori del glucosio, l'inibizione dello svuotamento gastrico, la riduzione del senso di appetito e il ridotto assorbimento intestinale dei grassi ⁷².

Inoltre, il GLP-1 rappresenta una promettente nuova area di ricerca non solo per la terapia del diabete di tipo 2 in quanto svolge effetti favorevoli non soltanto nel controllo della glicemia, ma anche sullo sviluppo della complicanza cronica associata al diabete ⁷³.

4.1 Sintesi e secrezione del GLP-1

Il gene proglucagone viene trascritto in gene proglucagone, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 2 ed è espresso nelle α -cellule pancreatiche, nelle cellule L enteroendocrine intestinali, nei neuroni del nucleo del tratto solitario e dell'ipotalamo. Il gene proglucagone è composto da 6 esoni e 5 introni, con l'intera sequenza codificante il GLP-1 localizzata solo nell'esone 4 ⁷⁴. La trascrizione del gene determina la formazione di un singolo RNA messaggero (mRNA), strutturalmente identico nei tre tipi di cellule in cui è espresso ⁷⁵. Il trascritto viene tradotto in una singola proteina precursore di 180 amminoacidi che viene processata in modo differenziale nei vari tipi di cellule a causa dell'espressione tessuto-specifica di enzimi pro-ormone convertasi (PC) ⁷⁶. Nelle cellule L enteroendocrine intestinali, il proglucagone viene processato principalmente dagli enzimi proormone convertasi-1 (PC1) e proormone convertasi-3 (PC3), che comportano la formazione di: glicentina, oxintomodulina, GLP-1, GLP-2 e IP-2 (Figura 10). Gli enzimi PC1 e PC3, localizzati nelle cellule L enteroendocrine intestinali,

sono entrambi necessari e sufficienti per la processazione del proglucagone a livello intestinale ⁷⁷.

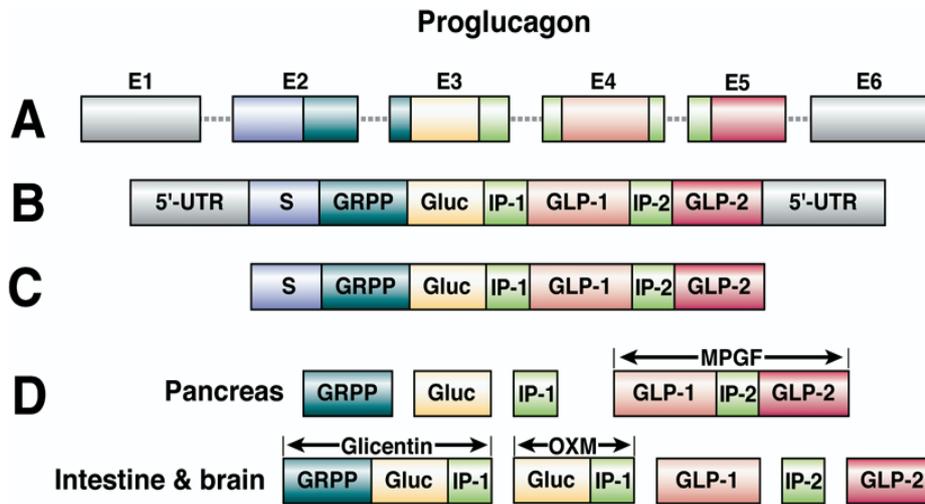


Figura 10. Struttura del gene proglucagone (A), mRNA (B), e proteina (C). Processazione post-traslazionale tessuto-specifica del proglucagone (D). Nel pancreas si generano: GRPP (Glicentin-related polypeptide), Gluc (glucagone), IP-1 (intervening peptide-1) e MPGF (major proglucagon fragment). Nell'intestino e nel sistema nervoso si generano: GLP-1, GLP-2, OXM (oxintomodulina), Glicentina e IP-2 (intervening peptide-2).

La sequenza genica del gene proglucagone è omologa nel topo, nel ratto e nell'uomo e l'analisi delle sequenze amminoacidiche eseguite in numerose specie indicano la conservazione della sequenza completa del GLP-1 nei mammiferi ⁷⁸. L'alto grado di conservazione delle sequenze di GLP-1 durante l'evoluzione stabilisce l'importanza dei processi fisiologici regolati da questo ormone. La conservazione del GLP-1 riflette anche il fatto che sostanzialmente l'intera sequenza amminoacidica del GLP-1 è necessaria per la piena attività biologica dell'ormone ⁷⁹.

Quattro isotipi di GLP-1 sono prodotti e secreti in circolo dalle cellule L enteroendocrine intestinali in seguito all'azione degli enzimi proormone convertasi-1 e 3 (Figura 11).

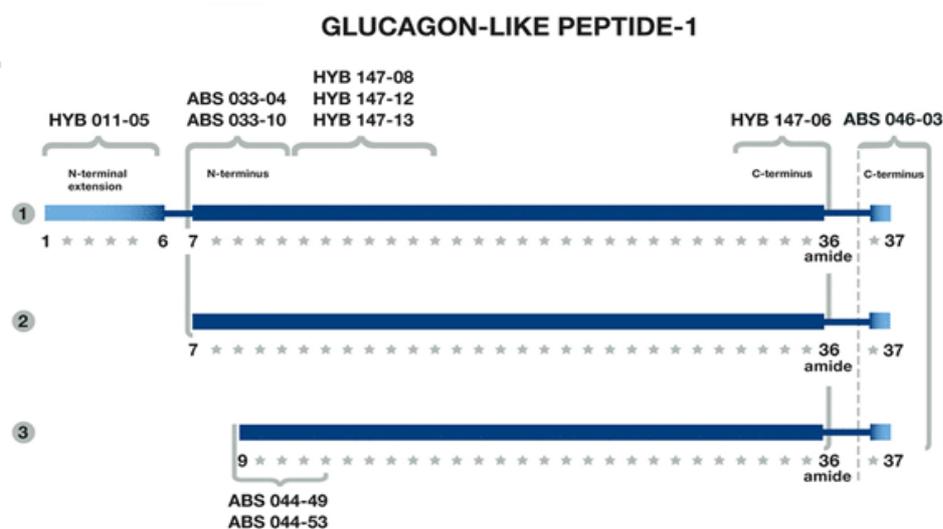


Figura 11: Isotipi di GLP-1 secreti dalle cellule L enteroendocrine intestinali e i suoi metaboliti. GLP-1 in forma integra (1): GLP-1 (1-36) e GLP-1 (1-37); forme bioattive di GLP-1 (2): GLP-1 (7-37) amide, GLP-1 (7-37); metaboliti del GLP-1 (3): GLP-1 (9-36) amide, GLP-1 (9-37).

Le convertasi (PC1 e PC3) processano inizialmente il proglucagone, con conseguente formazione di due peptidi di GLP-1 a catena integra: GLP-1(1-36)NH₂, ricavato dal proglucagone 78-107 e GLP-1(1-37), ricavato dal proglucagone 78-108⁸⁰. Successivamente l'azione delle PC 1/3 sui peptidi GLP-1 a catena integra genera due isotipi di GLP-1 a catena troncata: GLP-1(7-36)NH₂ derivato dal GLP-1 (1-36)NH₂ e GLP-1 (7-37) derivato dal GLP-1 (1-37). Gli isotipi a catena integra di GLP-1 sono inattivi, mentre gli isotipi a catena troncata sono le forme biologicamente attive di GLP-1 che vengono per questo nominati forme bioattive di GLP-1⁸¹. L'aggiunta di un gruppo amidico ai peptidi GLP-1 (1-36)NH₂ e GLP-1(7-36)NH₂ è mediata da un enzima peptidilglicina monoossigenasi, che aggiunge il gruppo amidico al residuo di arginina presente nell'estremità C-terminale dei due peptidi. La funzionalità di tale processo rimane ancora ignota⁸².

Nell'uomo, l'isotipo maggiore di GLP-1 in circolo è il GLP-1(7-36)NH₂, che costituisce circa l'80% del GLP-1 secreto; il restante 20% è invece rappresentato dall'isotipo GLP-1 (7-37)⁸³.

GLP-1(7-36)NH₂ e GLP1-1(7-37) sono equipotenti nell'uomo e stimolano rapidamente la secrezione di insulina glucosio-dipendente, attraverso un meccanismo mediato dal recettore per GLP-1 (GLP-1R) ⁸⁴.

La secrezione di GLP-1 è legata principalmente all'ingestione enterale di nutrienti; in particolare pasti ricchi in carboidrati costituiscono lo stimolo fisiologico primario per la secrezione del GLP-1. Inoltre il rilascio di GLP-1 può essere potenziato da una serie di nutrienti, tra cui i principali sono: glucosio e altri zuccheri, acidi grassi e trigliceridi, amminoacidi essenziali e fibre. La secrezione di GLP-1 è stimolata principalmente dal glucosio introdotto per via orale, mentre il glucosio somministrato per via endovenosa non ne incrementa la secrezione ⁸⁵.

Concentrazioni elevate di glucosio stimolano la secrezione isolata di GLP-1 in colture di cellule intestinali di ratto, anche se risulta improbabile l'azione diretta del glucosio sulle cellule L enteroendocrine intestinali, in quanto, in condizioni di normale alimentazione, la maggior parte del glucosio viene assorbito prima di raggiungere l'ileo. Inoltre, la rapida risposta secretoria di GLP-1 al glucosio orale suggerisce la presenza di un meccanismo di stimolazione della secrezione del GLP-1 diverso dal contatto diretto del glucosio con le cellule L enteroendocrine intestinali ⁸¹.

Oltre ai nutrienti, anche stimoli neuro-ormonali regolano la secrezione di GLP-1. Numerosi studi hanno dimostrato il ruolo del sistema nervoso autonomo (SNA) nella fase precoce di secrezione del GLP-1. Il SNA, mediante l'azione di neurotrasmettitori come l'acetilcolina, il GRP (gastric releasing peptide) e l'ormone incretinico GIP, stimola la secrezione di GLP-1 ⁸¹.

4.2 Recettore del GLP-1

GLP-1R è un recettore a sette domini transmembrana, costituito da 463 amminoacidi, accoppiato alla proteina G stimolatoria ⁸⁶.

GLP-1R nell'uomo presenta un'omologia di sequenza del 90% con il GLP-1R del ratto e con del topo ed il suo gene è localizzato nel cromosoma 6 banda p21 ⁸⁷. Il GLP-1R, è composto da otto domini idrofobici, sette dei quali attraversano la membrana e da un ulteriore dominio extracellulare N-terminale, fondamentale per il legame del GLP-1, legati da loop idrofilici intra ed extracellulari. GLP-1R è espresso in diverse cellule e tessuti, tra cui: insule pancreatiche, intestino, polmone, rene, cuore, endotelio, sistema nervoso periferico e centrale, ipotalamo, ghiandola pituitaria e nucleo del tratto solitario deputato al controllo delle funzioni cardiovascolari ⁸⁸. È stato dimostrato che il GLP-1R è espresso in tutto il sistema cardiovascolare del topo ed in particolare esso è presente nell'endocardio e nell'endotelio. Attualmente la localizzazione tessuto-specifica, e l'importanza funzionale del GLP-1R nell'apparato cardiovascolare non sono ancora del tutto definite.

Sebbene numerosi studi suggeriscano l'esistenza funzionale di un secondo recettore GLP-1, un solo GLP-1R è stato finora identificato. In particolare, si è visto che il metabolita di GLP-1, GLP-1 (9-36)NH₂ esercita diverse azioni tramite meccanismi che escludono il legame del peptide al GLP-1R. Questo aspetto presuppone l'esistenza di altri recettori per il GLP-1 oppure la presenza di azioni da parte dei peptidi svolte per via extrarecettoriale.

Le forme bioattive di GLP-1 si legano in maniera allosterica al recettore, in un sito localizzato nel dominio N-terminale extracellulare. Studi recenti, impiegando sia un agonista del GLP-1R che la modellistica molecolare sulla struttura tridimensionale del recettore, hanno identificato la presenza di un sito di attivazione non-allosterico nel recettore ⁸⁹.

Le forme bioattive di GLP-1 possiedono un'affinità molto elevata per il GLP-1R e si legano selettivamente ad esso a concentrazioni nanomolari, mentre i metaboliti del GLP-1 possiedono un'affinità 1000 volte inferiore

per il recettore. Il legame tra i peptidi bioattivi del GLP-1 e il GLP-1R innesca la cascata enzimatica della proteina G stimolatoria, con la conseguente attivazione dell'adenilato ciclasi e produzione di AMP ciclico (Figura 12).

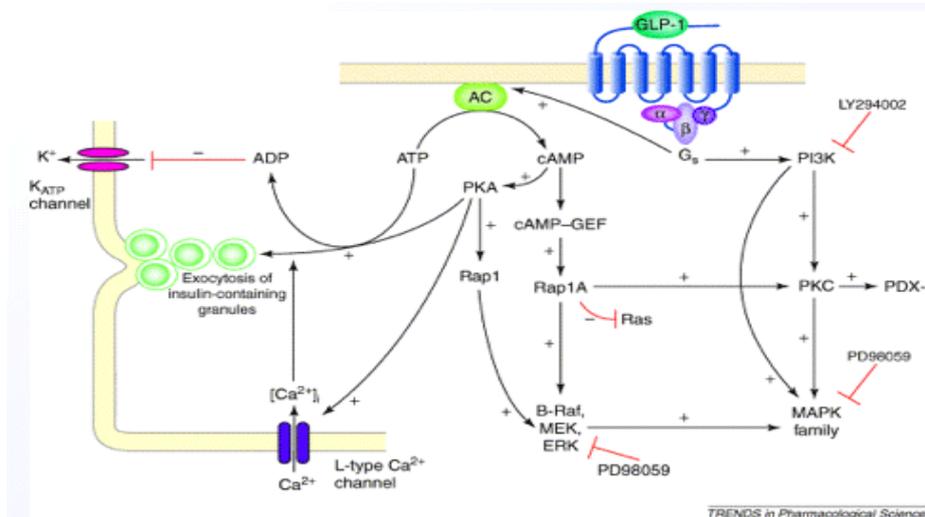


Figura 12. Processi metabolici attivati dal legame di GLP-1 al proprio recettore (GLP-1R) nella beta-cellula pancreatica.

L'AMP ciclico rappresenta il secondo messaggero cellulare della cascata metabolica ed attiva la proteina chinasi A (PKA) e la proteina nucleotide guanina (GEF)⁹⁰. Successivamente vengono innescati una serie di eventi cellulari come: l'inibizione dei canali del K⁺ voltaggio-dipendenti, l'aumento di Ca²⁺ intracellulare e la fosforilazione di importanti enzimi tra i quali gli enzimi a regolazione extracellulare (ERKs), la chinasi AMP-dipendente (AMPK), la proteina chinasi C (PKC), l'enzima fosfoinositide 3-chinasi (PI3K)/Akt e la famiglia delle MAPK (p38 e JNK)⁹¹.

Le varie cascate metaboliche attivate sono responsabili di diversi effetti cellulari che sono l'espressione delle fisiologiche azioni del GLP-1 nei vari organi e tessuti. Nell'endotelio, l'attivazione di GLP-1R induce la stimolazione della proliferazione e la protezione dall'apoptosi mediante l'attivazione della via molecolare mediata da ERK 1/2⁹².

5. DISFUNZIONE ENDOTELIALE

Le principali azioni dell'endotelio sono il mantenimento del tono vascolare, della permeabilità vasale e del fisiologico equilibrio tra proliferazione/apoptosi: un'alterazione o la perdita di una di queste funzioni porta alla cosiddetta disfunzione endoteliale⁹³.

Studi recenti hanno dimostrato che l'iperglicemia rappresenta una condizione capace di indurre disfunzione endoteliale e che la genesi di questo danno può essere determinata dallo stress ossidativo. Il danno endoteliale che può insorgere prevede anche alterazioni intracellulari a carico dell'endotelio come una ridotta sintesi di ossido nitrico ed un aumento del rilascio di specie reattive dell'ossigeno⁹⁴.

A questo riguardo, non vi sono ancora studi che hanno investigato il ruolo delle MP rilasciate dalle cellule endoteliali in presenza di elevata concentrazione di glucosio sulla funzionalità endoteliale.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato di determinare gli effetti delle microparticelle generate da cellule endoteliali coltivate in normali concentrazioni di glucosio (EMP) e con elevate concentrazioni di glucosio (iEMP) su:

- a) proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali;
- b) espressione dei microRNA, in particolare di miR-126 e il suo ruolo nella funzionalità endoteliale;
- c) effetto proliferativo mediato dal recettore GLP-1R.

MATERIALE E METODI

1. COLTURA CELLULARE

In vitro, gli esperimenti sono stati eseguiti su cellule endoteliali umane (HCAEC) estratte dall'arteria coronarica, ottenute dalla PromoCell (Heidelberg, Germany). Le cellule sono state coltivate in un medium completo (PromoCell, Heidelberg, Germany) contenente 0.02% di Supplemental Mix/ Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell, Heidelberg, Germany) e l'1% di penicillina e streptomina (Sigma). Le cellule vengono mantenute in un incubatore a 37 °C in atmosfera umidificata, con il 5% di CO₂ e vengono normalmente utilizzate all'ottavo passaggio.

2. VITALITÀ CELLULARE

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

3. GENERAZIONE DI EMP E DI iEMP

Le cellule HCAEC a confluenza sono state incubate con il terreno privo di Supplemental Mix per 24 ore al fine di indurre le cellule in apoptosi. Successivamente il surnatante delle cellule apoptotiche è stato raccolto e centrifugato per 15 minuti a 1500g per rimuovere i detriti cellulari. In seguito all'eliminazione del pellet, il surnatante è stato centrifugato per 40 minuti a 20000g per precipitare le EMP. Le EMP ottenute sono state lavate con il buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4) sterile e di nuovo centrifugate a per 40 minuti a 20000g. Le EMP così isolate sono state risospese in PBS sterile e utilizzate per gli esperimenti. Per generare microparticelle endoteliali in condizioni di elevate concentrazioni di glucosio (iEMP), le cellule HCAEC a confluenza sono state stimolate con 30 mM di glucosio per 72 ore e poi incubate con il terreno privo di supplementi per 24 ore per generare microparticelle come precedentemente descritto.

4. CITOFUORIMETRIA

Le EMP isolate sono state risospese in 100 µl di annexin V-binding buffer (10mM HEPES, pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) con e senza calcio. Successivamente sono stati aggiunti 5 µl di annexin-V-FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), 4 µl di CD-31-PE (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) ed è stato eseguito il controllo isotipico. Dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente, i campioni sono stati lavati con PBS e centrifugati per 20 minuti a 20000g. Le EMP così precipitate sono state risospese in 200 µl di annexin V-binding buffer e analizzate mediante FACS BD LSR II. Per valutare la dimensione delle EMP isolate e per identificare il corretto gate, sono state utilizzate delle biglie di riferimento fluorescenti della dimensione tra 0,7 e 0,9 µm (Spherotech). Per determinare il numero delle EMP isolate, sono state utilizzate le provette TruCOUNT (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). TruCount™ fornisce

provette contenenti un pellet liofilizzato che si dissolve durante la preparazione del campione, rilasciando un numero noto di biglie fluorescenti. Le EMP positive all'annexin V (AnnV⁺) sono state numerate mediante le biglie TruCOUNT. La concentrazione delle EMP è stata calcolata secondo la seguente formula: (numero di eventi per l'annexin V / numero di eventi nella regione TruCOUNT) x (numero di biglie TruCOUNT per test / volume). Per ogni esperimento il numero di EMP utilizzate è stato di 2000 AnnV⁺/μl.

5. MICROSCOPIA ELETTRONICA

Le EMP isolate sono state fissate con glutaraldeide al 3% in PBS overnight a 4°C. Il precipitato è stato poi lavato con il tampone sodio cacodilato (0,1 M, ph 7,4) e successivamente fissato in tetrossido di osmio 2%, di nuovo lavato con il tampone sodio cacodilato (0,1 M, ph 7,4) e disidratato attraverso soluzioni scalari di etanolo. Il campione è stato incluso nella resina Epon-pur e trasferito nelle camerette d'inclusione. Le immagini sono state acquisite al microscopio elettronico Philips CM 10 e analizzate mediante il software analySiS (Olympus).

6. IMMUNOFLUORESCENZA

Le EMP sono state incubate con calceina AM fluorescente (Invitrogen) per 30 minuti a 37°C, lavate e centrifugate 2 volte a 20000g e risospese in PBS sterile. Le cellule HCAEC sono state fissate con paraformaldeide al 4% (PFA), lavate con BSA (bovine serum albumin) al 5% ed incubate con l'anticorpo primario monoclonale anti-CD31 (Santa Cruz) seguito dall'incubazione con l'anticorpo secondario Cy3-conjugated goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch). Dopo 3 lavaggi, i nuclei sono stati colorati con DAPI (Vector Laboratories). Per visualizzare l'uptake delle EMP nelle

cellule target HCAEC, è stato utilizzato il microscopio Zeiss Axiovert 200M ed il software AxioVision.

In un altro set di esperimenti, alle cellule HCAEC a confluenza, è stato aggiunto il colorante fluorescente di membrana PKH-26 (Sigma Aldrich). Le cellule sono state poi incubate per 24 ore con il terreno privo di Supplemental Mix allo scopo di generare EMP caricate con PKH-26. Per la successiva valutazione dell'uptake delle EMP nelle cellule HCAEC in coltura, le cellule sono state incubate per 6 ore con le EMP caricate con colorante PKH-26. Dopo i lavaggi, le cellule sono state fissate con PFA al 4%, di nuovo lavate con PBS ed incubate con BSA al 5%. Successivamente, le cellule HCAEC sono state incubate con l'anticorpo Flk-1 (Santa Cruz Biotechnology) seguito dall'incubazione con l'anticorpo secondario Cy2-conjugated anti-mouse (Jackson ImmunoResearch). Il DNA nucleare è stato visualizzato mediante il colorante Hoechst 33342 (Sigma Aldrich). I campioni sono stati poi analizzati con il microscopio Zeiss Axiovert 200 (Carl Zeiss Jena, Germany). Per visualizzare l'uptake delle EMP nelle cellule HCAEC è stato utilizzato il software AxioVision.

7. PROLIFERAZIONE CELLULARE

7.1 Saggio con BrDU per la proliferazione cellulare

Per studiare la capacità proliferativa cellulare, in seguito al trattamento con EMP endoteliali, è stato utilizzato un saggio colorimetrico quantitativo, che si basa sulla capacità del nucleotide 5-bromo-2'- deossiuridina (BrdU kit ELISA, Roche cod. 11647229001) di legarsi al DNA, durante la fase replicativa. Poiché la proliferazione cellulare richiede la replicazione del DNA, il monitoraggio della sintesi di DNA diventa un parametro indiretto di proliferazione cellulare. La BrdU è un analogo pirimidinico; esso intercala nel DNA durante la fase mitotica al posto della timidina, che nel passato è stata usata, per lo studio dell'attività mitotica, nella forma di isotopo H3-timidina. Dopo l'incorporazione nel DNA delle cellule del campio-

ne, la BrdU è stata rilevata mediante due passaggi, di immunoreazione e di colorazione, secondo le istruzioni della ditta produttrice del kit utilizzato per il saggio. Perciò, le cellule sono state incubate per 18ore con BrdU 100 μ M; poi, sono state fissate mediante esposizione per 30 minuti al fissativo alcolico contenuto nel kit. I campioni fissati sono stati incubati per 90 minuti con l'anticorpo anti-BrdU e, infine, dopo l'eliminazione dell'anticorpo residuo, i campioni sono stati lavati e trattati con la sostanza colorante; dopo 5minuti si è proceduto all'acquisizione dei dati di assorbimento alla lunghezza d'onda di 405nm, con lettore ELISA ELX808 della BioTek Instruments. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando la funzione di Office Excel t-test.

7.2 Monitoraggio in tempo reale mediante sistema xCELLigence

Il sistema xCELLigence misura l'impedenza elettrica delle cellule in coltura mediante microelettrodi integrati nel fondo di piastre per colture cellulari create specificatamente per questo sistema. Attraverso questa tecnologia, gli eventi cellulari vengono monitorati in tempo reale. Le misure di impedenza forniscono delle informazioni quantitative sullo stato biologico delle cellule, tra cui il numero di cellule, l'adesione e la sopravvivenza. I cambiamenti di impedenza, automaticamente visualizzati come Cell Index, vengono utilizzati per monitorare la sopravvivenza cellulare, il numero, la proliferazione e l'adesione. Il test è stato effettuato in piastre E-16 plates (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) compatibili con il sistema RCTA-DP system (Roche Diagnostics Corporation). Per ogni pozzetto sono state seminate da 5000 a 10000 cellule HCAEC nel terreno completo di supplementi di crescita. Le cellule sono state lasciate nello strumento RTCA DP all'interno dell'incubatore (37°C, 5% CO₂) per 2 ore per favorire l'adesione. Le cellule sono state poi stimolate con EMP, iEMP o con l'agonista recettoriale GLP-1R (7-37) 10 nM fino a 48 ore. Ogni stimolazione è stata effettuata in quadruplicato ed ogni esperimento è stato effettuato almeno 3 volte.

8. MIGRAZIONE CELLULARE

8.1 Scratch Assay

Questo saggio valuta la capacità delle cellule di riformare un monostato confluento dopo l'azione meccanica di taglio eseguita con un puntale sterile per pipette. Si procede togliendo il terreno dalla piastra e lavando con soluzione fisiologica. Si pratica quindi in corrispondenza del diametro della piastra, in senso longitudinale, un'incisione superficiale con un puntale. Si lava di nuovo con soluzione fisiologica per togliere le cellule che si sono sollevate durante operazione. Viene aggiunto quindi terreno senza siero addizionato di EMP ed ad intervalli regolari di tempo, fino ad un massimo di 20 ore, si valuta la capacità delle cellule di rimarginare il taglio.

9. ESTRAZIONE DI RNA

L'RNA è stato estratto dalle micro particelle (EMP e iEMP) utilizzando il kit per l'estrazione totale di RNA da cellule animali (RNeasy Mini Kit, QIAGEN).

10. QUANTIFICAZIONE DI RNA

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

11. TaqMan® microRNA ARRAY

L'analisi di 384 miRNA umani è stata effettuata sulle EMP rilasciate dalle cellule endoteliali HCAEC (EMP) mediante TaqMan® microRNA ARRAY (Applied Biosystems). Per l'analisi del trascrittoma abbiamo utilizzato delle micro-fluidic cards da 384 pozzetti che permettono di effettuare fino a 384 reazioni simultanee di PCR Real-Time. Nella prima fase dell'analisi molecolare è stata effettuata la retrotrascrizione dell'RNA totale estratto dalle EMP come descritto precedentemente. Sono stati retrotrascritti 500 ng di RNA totale utilizzando TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit ed i primers per l'RT Megaplex™ RT Primers, Human Pool A e Pool B (Applied Biosystems), un pool di primers forward e reverse gene specifici in grado di effettuare nel complesso l'RT dei miRNA contenuti in ogni pannello. La reazione è stata condotta in una 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). I campioni di cDNA ottenuti sono stati utilizzati per l'analisi dei miRNA in Real Time PCR. 6 µl di campione sono stati diluiti in 444 µl di H₂O, quindi miscelati con 450 µl di TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e caricati negli otto canali di una TaqMan® Human MicroRNA Array v2.0 card (Applied Biosystems). L'analisi è stata effettuata utilizzando il software DataAnalysis v3.0 Software (Applied Biosystems).

12. ESPRESSIONE DEI microRNA

La quantificazione genica di miR-126 viene determinata utilizzando la reazione di PCR Real-Time di tipo TaqMan, come descritto in letteratura⁹⁵. Questa reazione consiste in una fase di retrotrascrizione (RT) e di amplificazione (PCR). Nella fase di RT viene utilizzato un primer a forma “stem-loop” costituito da una sequenze nucleotidica di circa 70 paia di basi che si lega al miR-126 maturo (Figura 13).

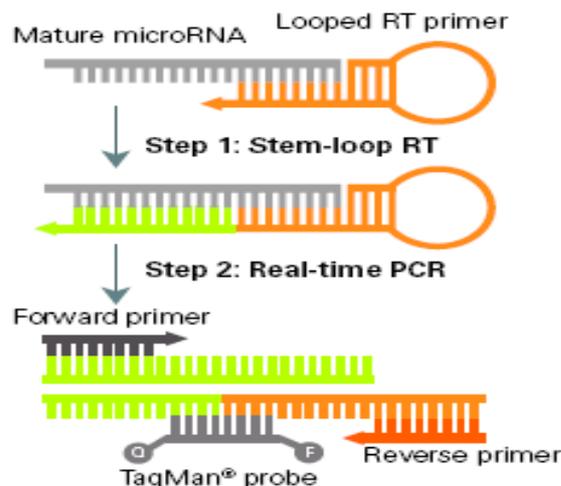


Figura 13. Le due fasi (step 1 e step 2) di RT-PCR. Step 1. Trascrizione inversa: cDNA è retrotrascritto a partire da campioni di RNA, usando specifici miRNAs primers. Step 2. Amplificazione: i campioni di cDNA vengono amplificati.

Il primer “stem-loop” possiede un braccio corto, costituito da 5-8 paia di basi, uno più lungo di 14-15 paia di basi e un'ansa non ripiegata costituita da 40-50 basi. Il braccio più lungo è caratterizzato da alcune basi complementari al braccio più corto che danno la forma “stem-loop” e da altre che sono invece complementari alla sequenza di miR-126. miR-126 maturo verrà così retrotrascritto in modo altamente specifico. Nella reazione di amplificazione (PCR), tutto il cDNA di miR-126 viene denaturato in modo tale che il primer “stem-loop” si estende completamente da poter aggiungere altre basi oligonucleotidiche complementari ai primers e consentire il legame della sonda TaqMan che riconosce solo la sequenza oligonucleotidica del miR-126 maturo. Per azione della TaqMan Polimerasi, la sonda TaqMan verrà degradata e così il segnale di fluorescenza emesso sarà proporzionale alla quantità di amplificato di miR-126.

Per la reazione di quantificazione di miR-126, abbiamo utilizzato un kit specifico TaqMan® MicroRNA Assay (Applied Biosystem). Per la reazione di RT, 10ng di RNA totale sono stati retrotrascritti in una reazione contenente: 100 mM dNTPs, Trascrittasi Inversa, buffer di reazione, inibitori delle Rnasi e primer. La miscela di reazione è stata incubata per 30 min a 16°C (annealing), 30 min a 42°C (retrotrascrizione), 5 min a 85°C (denatu-

razione). Per la reazione di PCR, il prodotto di reazione di RT viene amplificato in una PCR Master Mix, contenente un enzima e primers con un profilo termico di: 10 min a 95°C e 40 cicli a 60°C per 60 sec e 95°C per 15 sec.

RNU-6 è stato utilizzato come controllo endogeno, per normalizzare l'espressione di miR-126.

Il calcolo della quantificazione relativa di miR-126 è stato ottenuto mediante la formula:

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

dove $-\Delta\Delta Ct = [(Ct(\text{miR-126 di un campione}) - Ct(\text{RNU-6 di un campione})) - [(Ct(\text{miR-126 di un normalizzatore}) - (Ct(\text{RNU-6 di un normalizzatore}))]]$.

13. TRASFEZIONE DELLE CELLULE HCAEC

Per generare, EMP^{miR-126-downregulated} e EMP^{mock-transfected}, le cellule HCAEC sono state trasfettate con microRNA-126 mimic, microRNA-126 inhibitor, microRNA mimic control o microRNA inhibitor control (1nM, Applied Biosystems) mediante lipofectamina 2000 (Invitrogen) per 16 ore. Le cellule sono state poi esposte al terreno privo di supplementi di crescita per 24 ore allo scopo di generare EMP modificate. Per gli esperimenti di silenziamento con siRNA, le cellule HCAEC sono state trasfettate con SPRED-1 siRNA o per il siRNA di controllo (10nM, Santa Cruz) mediante lipofectamina 2000 per 16 ore. I saggi funzionali sono stati effettuati nell'arco di 48 ore dall'avvenuto silenziamento.

14. ESTRAZIONE DELLE PROTEINE

L'estrazione dalle cellule HCAEC è stata eseguita utilizzando un tampone ipotonico composto da 20 mmol HEPES, 2mmol EGTA, 10 mmol gli-

cerofosfato, 1mmol di DTT (ditiotritolo), 2mmol di Vanadato, 10 mmol di fluoruro di fenilmetilsulfonile (PMSF), 1 mmol di leupeptina, 1 µg/ml di aprotinina.

La concentrazione totale di proteine è stata misurata mediante il saggio con BCA (Acido bicinconinico, Euroclone).

15. WESTERN BLOT

L'analisi dell'espressione di SPRED-1, di GLP-1R e dell'attivazione (fosforilazione) di ERK nelle cellule HCAEC è stata eseguita mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide e Western Blot. Le proteine (50µg) sono state denaturate nel tampone di Laemmli, contenente ditiotritolo (DTT) ed SDS, in rapporto 1:9, a 100 °C per 5 minuti. La separazione delle proteine è stata eseguita mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide SDS-PAGE 10%, con il tampone di elettroforesi contenente TRIS 0,12 M; Glicina 1,23 M; SDS 0,01 M. Le proteine sono poi state trasferite mediante elettroblotting (per 180 minuti a 100 V a 4 °C) su una membrana di nitrocellulosa, utilizzando un apparecchio Transblot con la soluzione di blotting contenente TRIS 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 0.037% e Metanolo 20%.

Le proteine, una volta trasferite su membrana, sono state incubate con una soluzione di PBS contenente 0.05% (vol/vol) di Tween (T-PBS) e 5% di latte o albumina (per la fosforilazione di ERK), *overnight* a 4 °C. Le membrane sono state poi incubate *overnight* con l'anticorpo primario anti-SPRED-1 (diluizione 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-GLP-1R (diluizione 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), phospho-ERK (diluizione 1:1000, Cell Signalling, Euroclone), ERK (diluizione 1:1000, Cell Signalling, Euroclone) o con anti-GAPDH (gliceraldeide-3-fosfatodeidrogenasi, 1:5000, Chemicon).

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

corrispondenti alla proteina in esame è stata effettuata mediante il software Quantity One (Biorad). L'analisi densitometrica dell'espressione di GAPDH è stata utilizzata per normalizzare l'espressione della proteina in esame.

16. ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei dati è stata condotta con software SPSS (versione 20 Statistical Package for Social Science, SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Per il confronto di variabili continue è stato usato il Test "t di Student" e l'ANOVA univariata con il test Bonferroni per i confronti multipli. Tutti i test statistici erano a due code. I dati sono stati espressi come Media \pm ES (errore standard). Un valore di significatività inferiore a 0.05 è stato ritenuto accettabile.

RISULTATI

1. CARATTERIZZAZIONE DELLE EMP

L'analisi delle microparticelle di origine endoteliali (EMP) ha acquisito negli anni una notevole attenzione come possibile marker diagnostico in grado di fornire importanti informazioni sullo sviluppo di diverse patologie cardiovascolari, nella trombosi, nel diabete mellito e nell'ateriosclerosi.

In questo studio, le EMP vengono generate, in vitro, dalle cellule HCAEC coltivate per 24 ore con il terreno privo di supplementi di crescita. Nella Figura 14 viene illustrato un tipico esperimento di immunofluorescenza che dimostra il rilascio di EMP dalle cellule endoteliali.

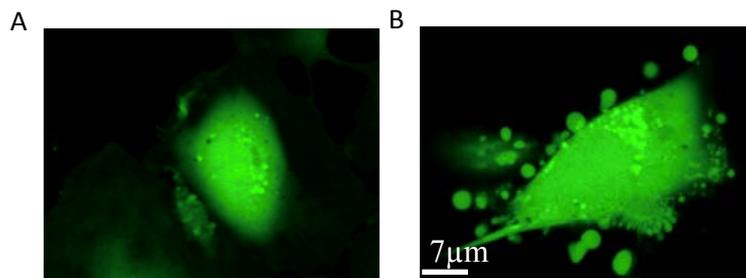


Figura 14. A) Immagine rappresentativa di cellule HCAEC incubate con il colorante fluorescente Calceina-AM rivelate mediante immunofluorescenza; B) Rilascio di EMP da cellule HCAEC in seguito ad incubazione per 24 ore con terreno privo di supplementi di crescita.

Il metodo di isolamento delle EMP si basa su una serie di centrifugazioni e filtrazioni, che consentono una prima separazione delle EMP dai detriti cellulari e poi dagli esosomi. La caratterizzazione delle EMP avviene mediante microscopia elettronica o citofluorimetria. Il metodo di microscopia elettronica fornisce informazioni sul diametro e sull'origine di singole EMP ma non permette di ottenere dati quantitativi. L'analisi mediante citofluorimetria invece, oltre a dare informazioni sulle dimensioni delle microparticelle di origine endoteliale (diametro tra 0,1 e 1 μm) (Figura 15), fornisce anche una analisi di tipo quantitativo. La quantificazione si basa sull'uti-

lizzo di biglie fluorescenti, di quantità nota e con dimensioni simili a quelle delle EMP. Pertanto, mediante l'utilizzo di queste biglie, l'identificazione delle EMP sarà facilitata poiché, nel dotblot, le biglie fluorescenti cadranno nella stessa regione delle EMP che consentirà di caratterizzare e di contare il numero di EMP presenti nel dato campione.

La citofluorimetria consente inoltre di identificare la presenza di markers specifici per il riconoscimento delle EMP come la fosfatidilserina, riconosciuta dall'Annexin V (Figura 16) e il marker endoteliale CD31 (Figura 17).

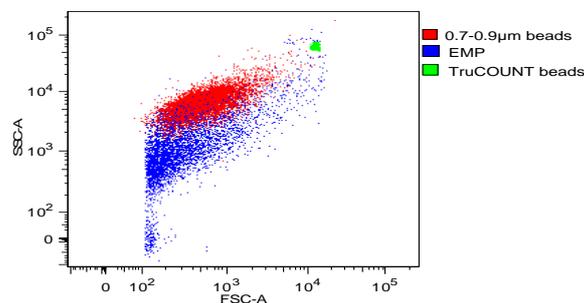


Figura 15. L'analisi citofluorimetrica è stata utilizzata per caratterizzare le dimensioni e per la conta delle EMP isolate. EMP isolate (blu) sono state comparate alle particelle fluorescenti in polistirene (rosse) le quali presentano una dimensione definita tra 0,7 e 0,9 μm.

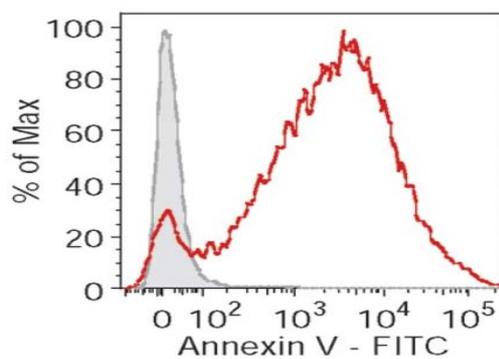


Figura 16. Istogramma citofluorimetrico rappresentativo dell'espressione di fosfatidilserina, riconosciuta dall'annexin V, nelle EMP generate ed isolate dalle cellule HCAEC.

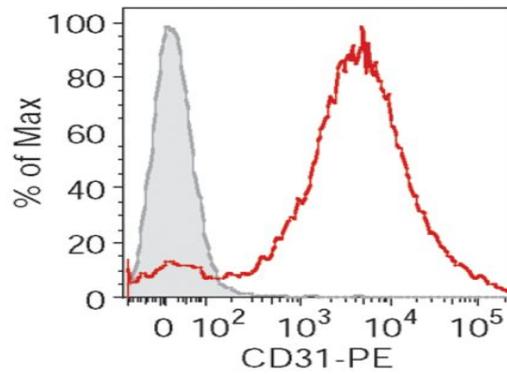


Figura 17. Istogramma citofluorimetrico di espressione del marker endoteliale CD31 nelle EMP.

I nostri protocolli sperimentali consentono di ottenere da 1×10^5 a 1×10^6 EMP partendo da una popolazione di cellule endoteliali 1×10^7 .

2. INCORPORAZIONE DELLE EMP NELLE CELLULE ENDOTELIALI

La valutazione della capacità delle cellule endoteliali di incorporare le EMP è stata determinata mediante saggio di immunofluorescenza. Le EMP sono state caricate con la sonda fluorescente calcein-AM e incubate con le cellule endoteliali a tempi differenti. Gli esperimenti di immunofluorescenza hanno dimostrato che le EMP sono chiaramente identificate nelle cellule endoteliali “target” e che il meccanismo di uptake è tempo-dipendente. La Figura 18 mostra come le EMP sono state incorporate da una cellula HCA-EC, dove la zona rossa è riferita al citoplasma, la zona blu al nucleo mentre in verde sono evidenziate le EMP incorporate dalla cellula.

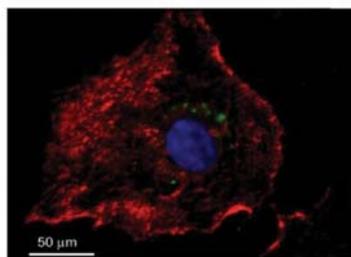


Figura 18. Rappresentazione di EMP caricate con calceina AM incorporate dalle cellule HCAEC. In blu si nota il nucleo, in rosso il citoplasma e in verde le EMP.

Un precedente studio di proteomica sull'analisi dell'espressione delle proteine presenti nelle EMP ha dimostrato la presenza sulla membrana esterna di annexin I in colocalizzazione con la fosfatidilserina (PS). Queste proteine hanno il ruolo di riconoscere i recettori della fosfatidilserina (PSR) responsabili dell'incorporazione delle EMP nelle cellule endoteliali "target"⁶². In questo studio è stato inoltre dimostrato che le EMP, una volta incorporate nelle cellule target HCAEC, sono in grado di mediare la risposta antiapoptotica in seguito a stimolo con camptotecina, alchilante del DNA altamente tossico. Questo studio dimostra un nuovo meccanismo a feedback attraverso il quale le cellule apoptotiche proteggono le cellule adiacenti da ulteriori danni mediante il rilascio di EMP.

3. EFFETTO DELLE EMP SULLA PROLIFERAZIONE E SULLA MIGRAZIONE CELLULARE

I meccanismi di riparazione cellulare utilizzati dalle cellule endoteliali in seguito a danno sono principalmente dipendenti dall'attività proliferativa e migratoria delle cellule endoteliali. Per verificare questi meccanismi, abbiamo incubato le cellule HCAEC con le EMP per 24 ore ed abbiamo valutato la proliferazione cellulare mediante saggio BrdU (Figure 19 e 20) utilizzando la strumentazione xCELLigence (Figura 21) e la migrazione cellulare mediante Scratch assay, come descritto nei Metodi (Figura 22).

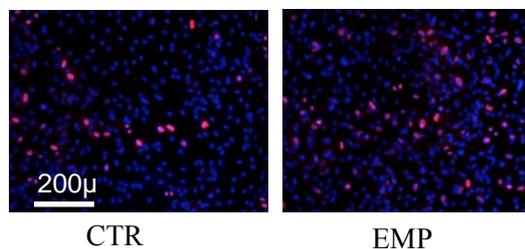


Figura 19. Cellule HCAEC stimulate con EMP per 24 ore. L'incorporazione di BrdU è stata determinata mediante immunofluorescenza (rosso). I nuclei sono identificati mediante DAPI (blu).

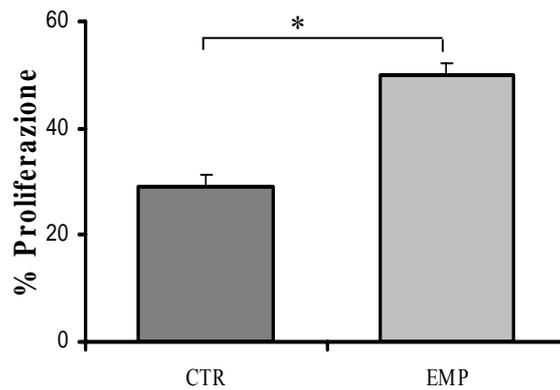


Figura 20. L'istogramma riporta la percentuale di cellule BrdU-positive in cellule di controllo (CTR) ed in cellule trattate con EMP (* $p < 0,01$, $n = 6$).

Il saggio di proliferazione BrdU ha dimostrato che il trattamento delle cellule HCAEC con le EMP per 24 ore induce un aumento significativo della proliferazione rispetto alle cellule di controllo (Figura 20).

Inoltre, utilizzando la strumentazione xCELLigence, abbiamo valutato l'effetto delle EMP sulla proliferazione delle cellule HCAEC in modo tempo-dipendente. Per questo motivo, le cellule HCAEC sono state seminate nelle apposite piastre, compatibili con la strumentazione ed immediatamente dopo l'adesione, sono state stimulate con le EMP.

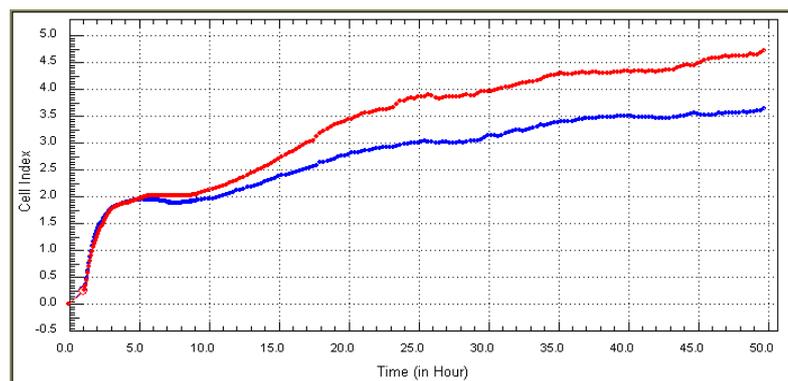


Figura 21. Proliferazione cellulare misurata in tempo reale, mediante strumentazione xCELLigence. CI (Cell Index) = $3,9 \pm 0,03$ vs $3 \pm 0,02$ ($p < 0,01$) calcolato nelle 24 ore nelle HCAEC trattate con EMP (rosso) rispetto alle HCAEC di controllo (blu).

La proliferazione è stata valutata in tempo reale fino a 48 ore. Il monitoraggio della proliferazione dimostra un aumento significativo di proliferazione delle cellule endoteliali trattate con le EMP fino a 24 ore di circa il 40% rispetto al controllo (Figura 21). Dopo 24 ore, la proliferazione tende a stabilizzarsi fino ad arrivare ad un plateau alle 48 ore.

In seguito abbiamo valutato l'effetto del trattamento con le EMP sulla migrazione delle cellule endoteliali. I nostri risultati dimostrano che la migrazione cellulare è significativamente aumentata già dopo 6 ore di incubazione con le EMP, raggiungendo il massimo valore di proliferazione (circa 40-50%) dopo 20 ore rispetto al controllo (Figura 23).

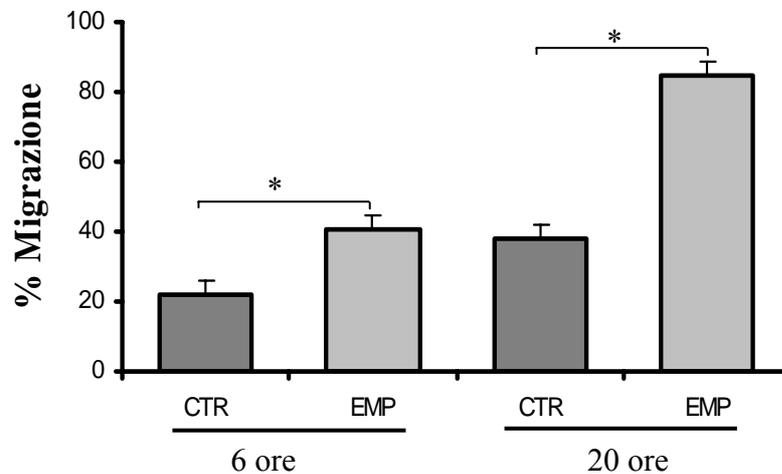


Figura 23. Saggio di migrazione "Scratch assay" in cellule HCAEC di controllo e cellule trattate con EMP per 20 ore. L'analisi quantitativa della migrazione è misurata come percentuale dell'area totale ricoperta da cellule (* $p < 0.01$, $n = 6$)

4. MICRORNA NELLE EMP

Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che le EMP rappresentano degli importanti trasportatori non solo di proteine, citochine e lipidi, ma anche di microRNA e che l'effetto delle EMP dipende, almeno in parte, dai microRNA in esse contenuti^{60,61}. Allo scopo di verificare mediante quale via molecolare le EMP siano in grado di indurre proliferazione e migrazione cellulare, abbiamo eseguito un'analisi di array dei microRNA (TaqMan® microRNA Array) (Figura 24).

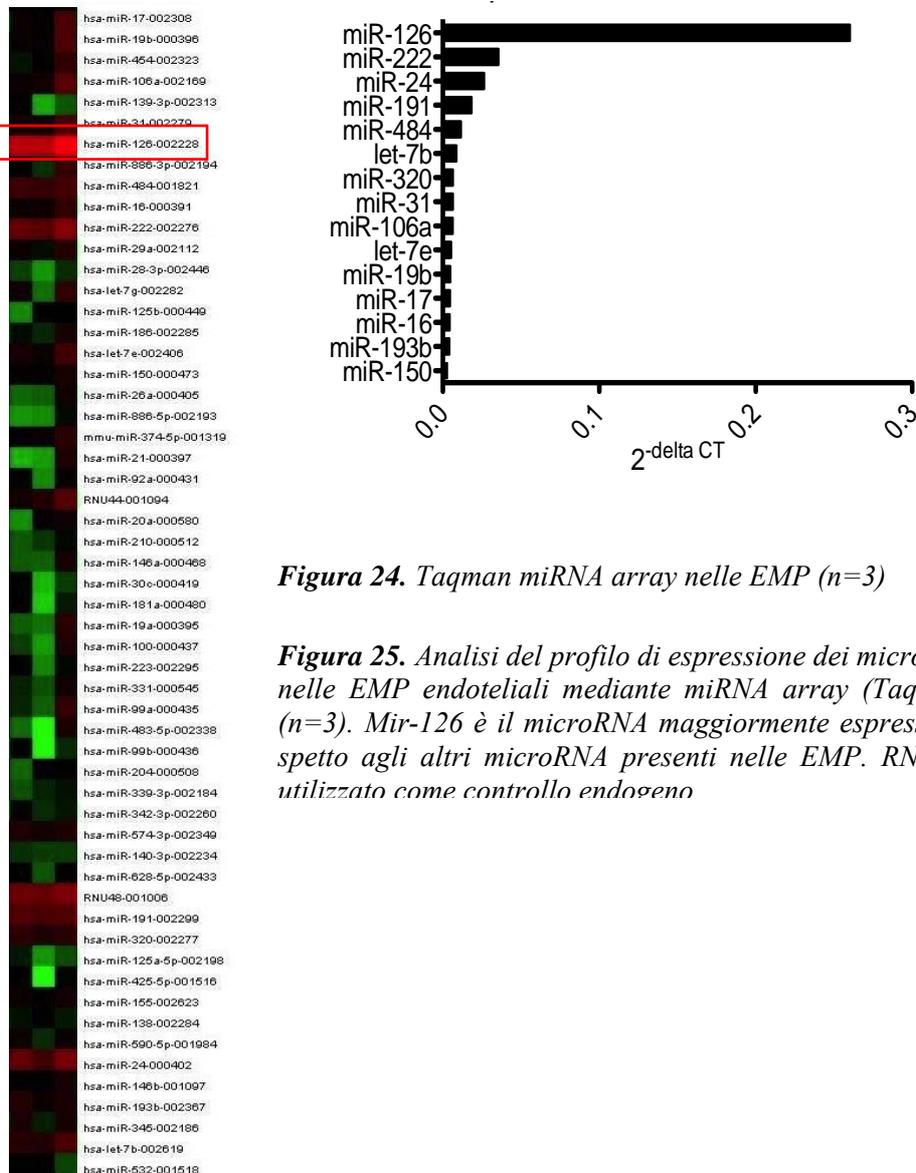


Figura 24. Taqman miRNA array nelle EMP (n=3)

Figura 25. Analisi del profilo di espressione dei microRNA nelle EMP endoteliali mediante miRNA array (TaqMan) (n=3). Mir-126 è il microRNA maggiormente espresso rispetto agli altri microRNA presenti nelle EMP. RNU6 è utilizzato come controllo endogeno

Mediante quest'analisi è stata valutata l'espressione di 384 microRNA nelle EMP ottenute dalle cellule HCAEC incubate per 24 ore con terreno privo di supplementi di crescita. Come mostrato nelle Figure 24 e 25, l'analisi mediante microarray ha evidenziato che i microRNA maggiormente espressi nelle EMP sono rappresentati da miR-126, miR-222, miR-24, miR-191 e miR-484.

Alla luce di queste osservazioni, abbiamo studiato gli effetti di miR-126 sulla proliferazione e sulla migrazione delle cellule HCAEC. Prima di tutto è stata valutata la capacità delle EMP di trasferire miR-126 nelle cellule endoteliali "target". Per questo scopo, abbiamo incubato le cellule HCAEC con le EMP (2000 EMP/ μ l) precedentemente generate e isolate dalle cellule HCAEC stesse.

Successivamente abbiamo valutato l'espressione di miR-126 nelle cellule HCAEC trattate con le EMP e nelle cellule di controllo. L'analisi dell'espressione di miR-126 mediante PCR Real-Time ha dimostrato che il trattamento con le EMP induce un significativo aumento di espressione di miR-126 nelle cellule HCAEC rispetto al controllo (Figura 26).

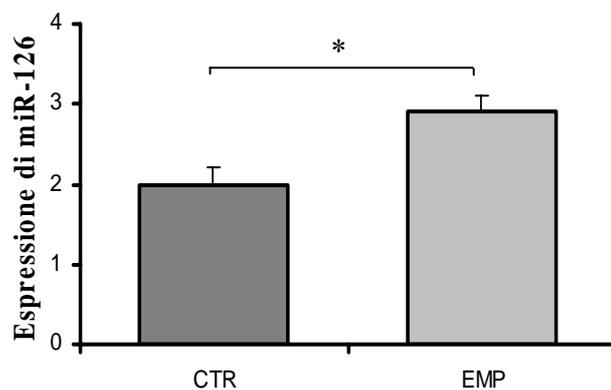


Figura 26. Espressione di miR-126 nelle cellule HCAEC di controllo e nelle cellule trattate con EMP mediante PCR-Real Time (* $p < 0,01$, $n=8$)

5. EFFETTO DI miR-126 SULLA PROLIFERAZIONE E SULLA MIGRAZIONE

Per determinare il ruolo di miR-126 sulla proliferazione e migrazione endoteliale, le cellule HCAEC sono state silenziate con l'antagomiR-126 che specificatamente reprime l'espressione di miR-126. La Figura 27 mostra che l'espressione di miR-126 nelle EMP è ridotta di circa 70-80% dopo trattamento con antagomiR-126 rispetto al controllo e alle cellule mock-trasfected.

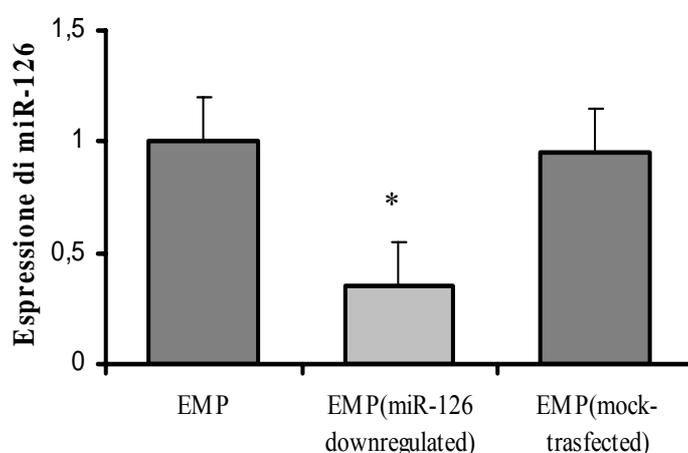


Figura 27. Espressione di miR-126 nelle EMP di controllo, nelle EMP silenziate per miR-126 (*EMP^{miR-126 downregulated}*) e nelle EMP silenziate per il controllo negativo (*EMP^{mock-trasfected}*) mediante PCR-Real Time (* $p < 0,01$, $n=8$)

La proliferazione e la migrazione cellulare sono state determinate nelle cellule HCAEC incubate con le EMP silenziate per miR-126. I nostri risultati dimostrano che la proliferazione endoteliale, in presenza di EMP silenziate per miR-126 è ridotta significativamente rispetto alle EMP non silenziate per miR-126 (controllo) dopo 24 ore (Figure 28 e 29). Anche il monitoraggio in tempo reale dimostra che l'andamento proliferativo delle cellule trattate con le EMP silenziate per miR-126 è diminuito rispetto alle EMP non silenziate ed è simile alla proliferazione delle cellule di controllo (Figura 30).

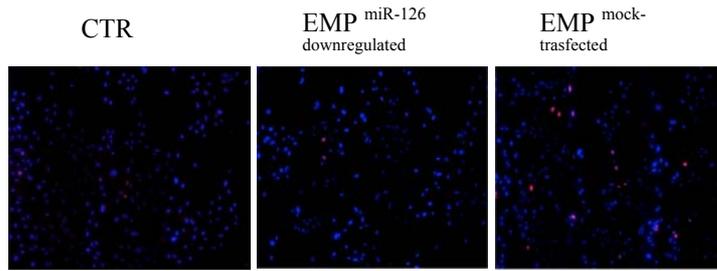


Figura 28. Cellule HCAEC di controllo (CTR), cellule stimulate con EMP^{miR-126} downregulated e con il controllo negativo EMP^{mock-transfected} per 24 ore. L'incorporazione di BrdU è stata determinata mediante immunofluorescenza (rosso). I nuclei sono identificati mediante DAPI (blu).

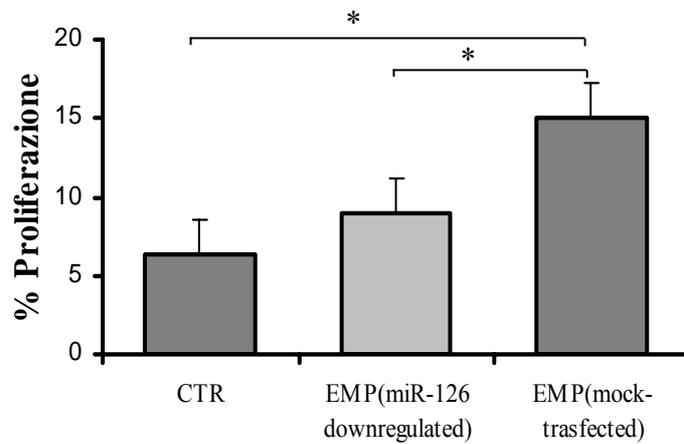


Figura 29. L'istogramma riporta la percentuale di cellule BrdU-positive in cellule di controllo (CTR) ed in cellule trattate con EMP^{miR-126} downregulated e con il controllo negativo EMP^{mock-transfected} per 24 ore (* $p < 0,01$; $n=6$).

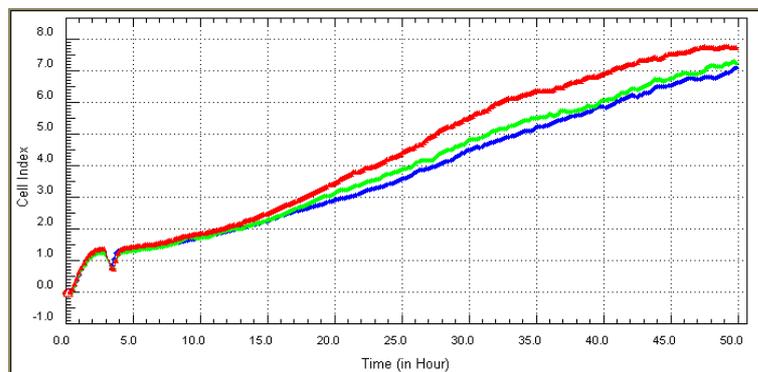


Figura 30. Proliferazione cellulare misurata in tempo reale, mediante strumentazione xCELLigence. CI (Cell Index)= $4,2 \pm 0,03$ (EMP^{mock-transfected}) vs $3,3 \pm 0,02$ (CTR) o vs $3,5 \pm 0,03$ (EMP^{miR-126} downregulated) calcolato nelle 24 ore nelle cellule

HCAEC trattate con EMP *mock-transfected* (rosso), trattate con EMP^{miR-126 downregulated} (verde) e delle cellule di controllo (CTR) (blu). ($p < 0.01$; $n = 10$)

Il trattamento delle cellule endoteliali target con EMP “miR-126 downregulated” riduce anche la migrazione cellulare (Figura 31). Questi risultati suggeriscono che miR-126 ha un ruolo importante nella regolazione della funzionalità endoteliale.

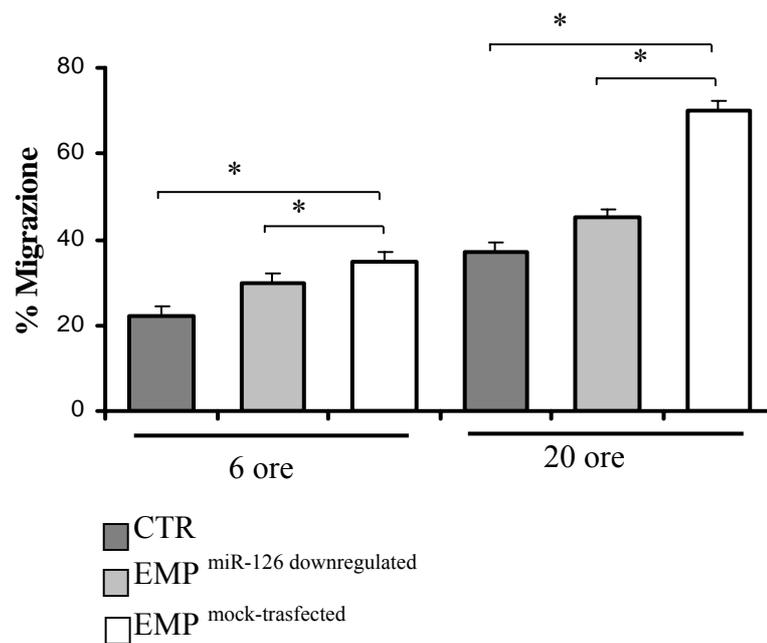


Figura 31. Saggio di migrazione “Scratch assay” in cellule HCAEC di controllo (CTR), in cellule trattate con EMP^{miR-126 downregulated}, con EMP^{mock-transfected} per 6 ore e per 20 ore. L’analisi quantitativa della migrazione è misurata come percentuale dell’area totale ricoperta da cellule ($*p < 0.01$, $n = 6$).

6. EFFETTO DI miR-126 SULL'ESPRESSIONE DI SPRED-1

Per identificare i possibili target di RNA messaggero regolati del miR-126, sono stati consultati 3 diversi software online (PicTar, TargetScanHuman6.0, DIANA LAB). Mediante l’analisi bioinformatica sui predittivi targets di miR-126 sono stati scelti i geni SPRED-1, IRS1 e PLK2. Tra questi, SPRED-1 è maggiormente espresso nell’endotelio ed

è coinvolto nella riduzione della proliferazione e della migrazione cellulare attraverso l'inibizione del segnale mediato dalle chinasi appartenenti alla famiglia Ras/MAP. IRS1 invece è coinvolto principalmente nella via molecolare legata al segnale dell'insulina, mentre PLK2 non sembra essere espresso nell'endotelio. miR-126 è inoltre capace di interagire con la regione 3'UTR di SPRED-1 mRNA. La Figura 32 mostra che miR-126 interagisce in modo specifico con 7 paia di basi della propria sequenza con la regione 3' UTR dell'RNA messaggero di SPRED-1.

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match
Position 525-531 of SPRED1 3' UTR	5' . . .UUUAACUAAAUGUAAGGUACGAA. . .	7mer-1A
hsa-miR-126	3' GCGUAAUAAUGAGUGCCAUGCU	

Figura 32. Legame tra hsa miR-126 e sequenza target 3'UTR di mRNA di SPRED-1.

Per verificare il ruolo di miR-126 nella regolazione di SPRED -1 è stata determinata l'espressione proteica di SPRED-1 nelle cellule HCAEC incubate con EMP silenziate per miR-126 o con EMP di controllo. La Figura 33 mostra un rappresentativo immunoblot di espressione di SPRED-1 e della proteina housekeeping GAPDH nelle condizioni sopraindicate. Come si può notare, il trattamento con le EMP riduce significativamente l'espressione proteica di SPRED-1, mentre nelle EMP silenziate per miR-126 l'espressione di SPRED-1 è risultata essere simile al controllo. L'analisi densitometrica ha confermato questi risultati, suggerendo che la presenza di miR-126 all'interno delle EMP è capace di reprimere la traduzione di SPRED-1 (Figura 34).

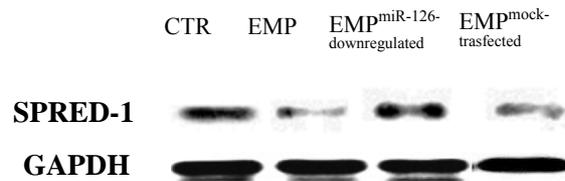


Figura 33. Western Blot rappresentativo dell'espressione proteica di SPRED-1 e della proteina housekeeping GAPDH in cellule HCAEC stimulate con EMP, con EMP^{mock-transfected} e con EMP^{miR-126-downregulated} per 24 ore.

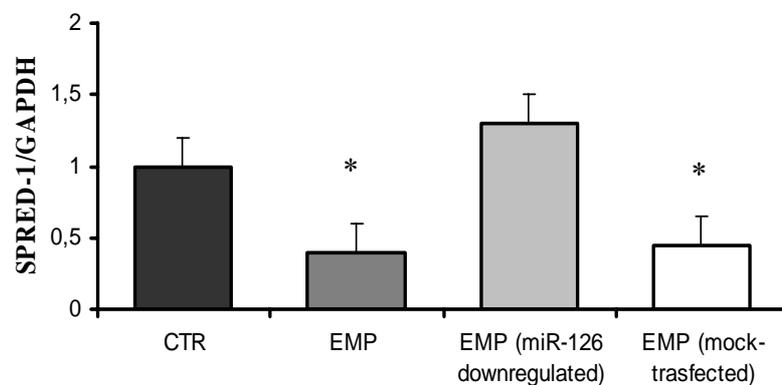


Figura 34. Analisi densitometrica dell'espressione di SPRED-1 nelle condizioni sopraelencate. I valori sono espressi come Medie ± ES; * $p < 0,01$, $n = 6$).

7. iEMP: EFFETTO SULLA PROLIFERAZIONE E MIGRAZIONE-CELLULARE

L'iperglicemia rappresenta uno dei fattori determinanti nello sviluppo e nella progressione del danno endoteliale. In questo contesto, le EMP possono giocare un ruolo importante come regolatori della funzionalità endoteliale. Per tale motivo siamo andati ad indagare l'effetto di EMP generate da cellule endoteliali esposte ad elevate concentrazioni di glucosio (30 mM) per 72 ore. Le microparticelle ottenute da queste condizioni sperimentali sono state definite microparticelle "injured" (iEMP). Non sono state rilevate differenze nella morfologia e nelle dimensioni rispetto alle EMP generate da

cellule endoteliali coltivate in condizioni basali. Infatti, le iEMP hanno un diametro inferiore ad $1\mu\text{M}$, presentano fosfatidilserina ed il marker endoteliale CD31 sulla superficie esterna. Anche il numero di microparticelle rilasciate dopo incubazione con terreno privo di supplementi per 24 ore non differisce tra iEMP e EMP.

Abbiamo poi valutato l'effetto delle iEMP sulla proliferazione e sulla migrazione delle cellule endoteliali. Abbiamo quindi incubato le cellule endoteliali con le iEMP per 24 ore per valutare, mediante saggio BrdU, l'entità della proliferazione cellulare. Come mostrato in Figura 35, la proliferazione delle cellule endoteliali è ridotta in seguito a trattamento con le iEMP rispetto al controllo.

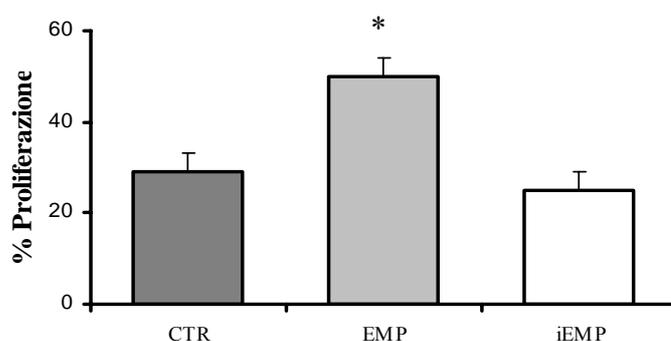


Figura 35. L'istogramma riporta la percentuale di cellule BrdU-positive in cellule di controllo (CTR), in cellule trattate con EMP e in cellule trattate con iEMP per 24 ore (* $p < 0,01$; $n = 6$).

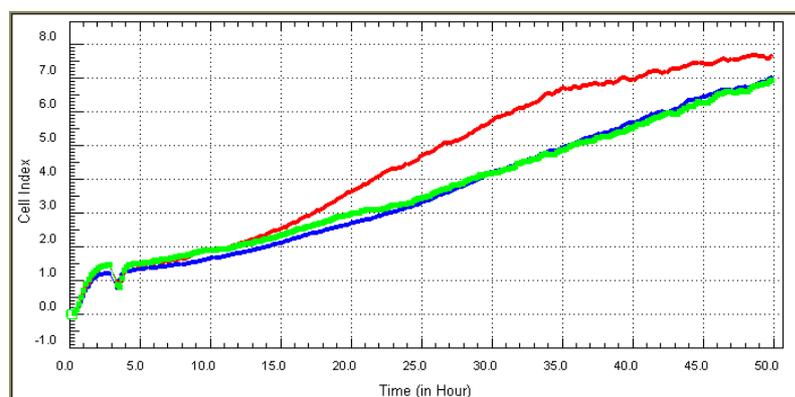


Figura 36. Proliferazione cellulare misurata in tempo reale, mediante strumentazione xCELLigence. CI (Cell Index) = $4,5 \pm 0,03$ (EMP) vs $3,1 \pm 0,02$ (CTR) o vs

$3,2\pm 0,03$ (iEMP) calcolato nelle 24 ore nelle cellule HCAEC trattate con EMP (rosso), trattate con iEMP (verde) e delle cellule di controllo (CTR) (blu). ($p < 0,01$; $n = 10$)

Questi dati sono stati confermati anche dal monitoraggio della proliferazione in tempo reale mediante xCELLigence (Figura 36)

La migrazione delle cellule endoteliali, misurata mediante Scratch assay ha dimostrato che la presenza di iEMP riduce la percentuale di proliferazione rispetto alle cellule trattate con EMP per 20 ore (Figura 37)

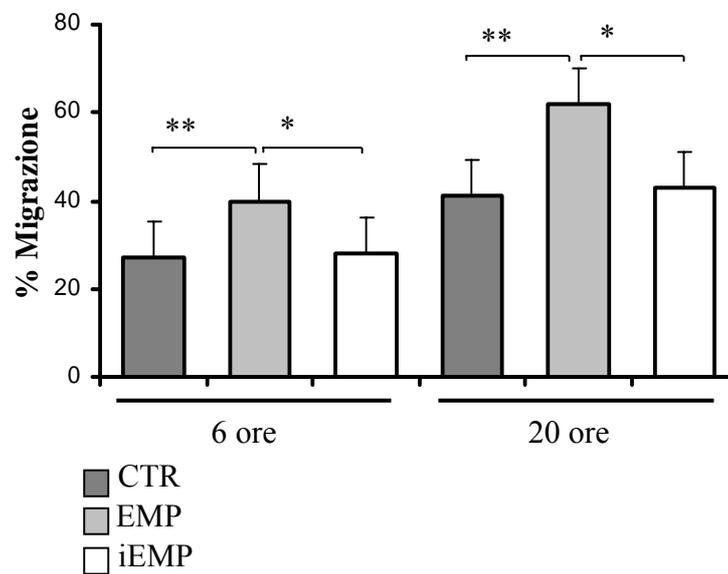


Figura 37. Saggio di migrazione “Scratch assay” in cellule HCAEC di controllo (CTR), in cellule trattate con EMP e con iEMP per 6 ore e per 20 ore. L'analisi quantitativa della migrazione è misurata come percentuale dell'area totale ricoperta da cellule (** $p < 0,05$; * $p < 0,01$; $n = 6$)

8. microRNA NELLE iEMP

Abbiamo infine valutato l'espressione di miR-126 nelle iEMP ottenute dalle HCAEC trattate con elevate concentrazioni di glucosio mediante PCR Real-Time. La Figura 38 mostra che l'espressione di miR-126 è significativamente ridotta di circa 60% nelle iEMP rispetto alle EMP.

Questi dati, complessivamente, indicano che le iEMP, a differenza delle EMP, sono in grado di alterare i meccanismi di riparazione endoteliale, promuovendo la progressione del danno vascolare mediato da un'alterazione dell'espressione e del trasferimento di miR-126.

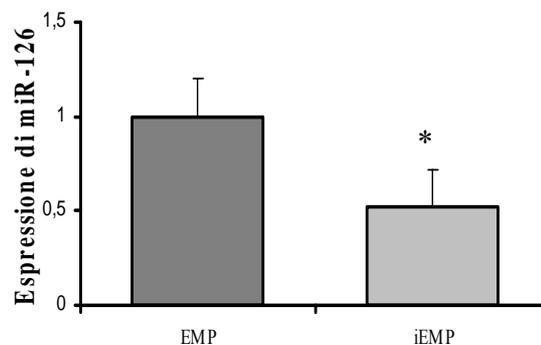


Figura 38. Espressione di miR-126 nelle EMP e nelle iEMP mediante PCR-Real Time (* $p < 0,05$, $n = 8$)

9. EFFETTO DI GLP-1R SULLA PROLIFERAZIONE

È ben noto che l'endotelio svolge un ruolo chiave in numerosi processi fisiologici, quali la regolazione del tono vascolare e la proliferazione. I nostri dati dimostrano che le cellule endoteliali stimolate con EMP aumentano la proliferazione con meccanismo miR-126-SPRED-1 dipendente, mentre le iEMP hanno un effetto antiproliferativo rispetto alle EMP. Nel processo di proliferazione assumono un ruolo importante i recettori sulla superficie della membrana cellulare, in particolare i recettori legati alla proteina G. Studi in vitro su cellule progenitrici endoteliali hanno mostrato che

la stimolazione del recettore “GLP-1R” (Glucagon Like Peptide-1 Receptor), recettore accoppiato alla proteina G, induce un aumento della proliferazione cellulare ⁹². A tal scopo abbiamo verificato il ruolo di GLP-1R nella proliferazione delle cellule HCAEC mediante l’agonista recettoriale GLP-1 (7-37). Come mostrato in Figura 39, la proliferazione delle cellule endoteliali stimulate con GLP-1 (7-37) (linea rossa) aumenta circa dell'80 % fino a 30 ore per poi raggiungere un plateau rispetto alle cellule di controllo. Questo effetto viene abolito dal pre-trattamento delle cellule con l’antagonista recettoriale del GLP-1 (Exendin 9-39) (verde).

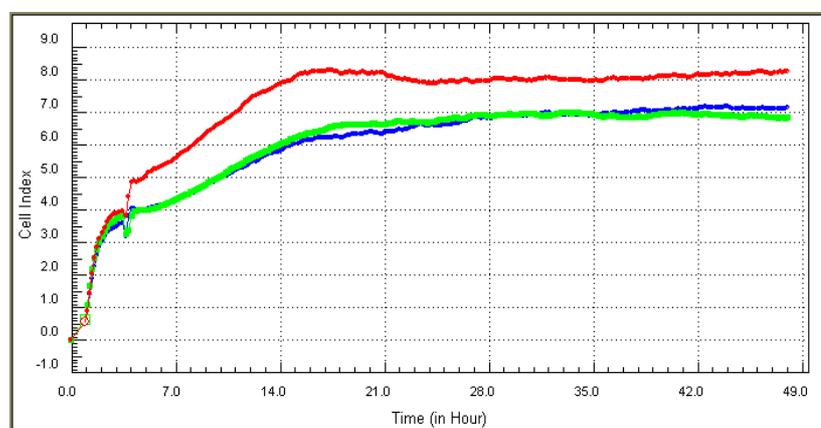


Figura 39. Proliferazione cellulare misurata in tempo reale, mediante strumentazione xCELLigence. CI (Cell Index)= 8 ± 0.02 (GLP-1 7-37) vs $6,3 \pm 0.02$ (CTR) o vs $6,5 \pm 0.03$ (Exendin 9-39 + GLP-1 7-37) calcolato nelle 24 ore nelle cellule HCAEC trattate con GLP-1 (7-37) (rosso), trattate con Exendin 9-39 + GLP-1 (7-37) (verde) e delle cellule di controllo (CTR) (blu). ($p < 0.01$; $n = 10$)

L’effetto proliferativo mediato dal recettore GLP-1R è stato valutato nelle cellule endoteliali in presenza di EMP e di iEMP. Prima di tutto è stata determinata l’espressione proteica di GLP-1R mediante Western Blot. La Figura 40 mostra un rappresentativo immunoblot di espressione di GLP-1R e della proteina housekeeping GAPDH. Come si può notare l’espressione proteica del recettore GLP-1R è nettamente ridotta nelle cellule trattate con le iEMP, rispetto alle cellule trattate con le EMP o alle cellule di controllo (Figura 41).

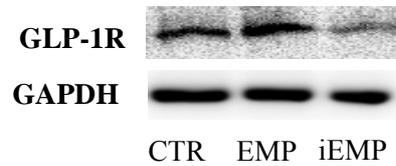


Figura 40. Western Blot rappresentativo dell'espressione proteica di GLP-1R e della proteina housekeeping GAPDH in cellule HCAEC stimulate con EMP e con iEMP per 24 ore.

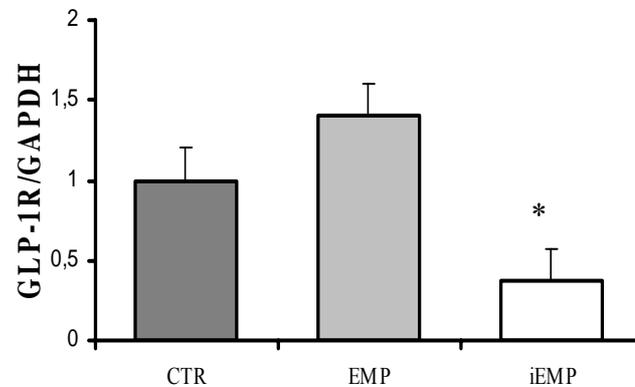


Figura 41. Analisi densitometrica dell'espressione di GLP-1R nelle condizioni sopraelencate. I valori sono espressi come Medie \pm ES; * $p < 0,01$, $n = 6$)

In seguito, è stata determinata la proliferazione cellulare in presenza di EMP o di iEMP indotta dall'agonista recettoriale GLP-1 (7-37) mediante xCELLigence. I nostri risultati dimostrano che la proliferazione cellulare indotta da GLP-1R è significativamente ridotta nelle cellule trattate con le iEMP rispetto a quelle trattate con le EMP (Figura 42).

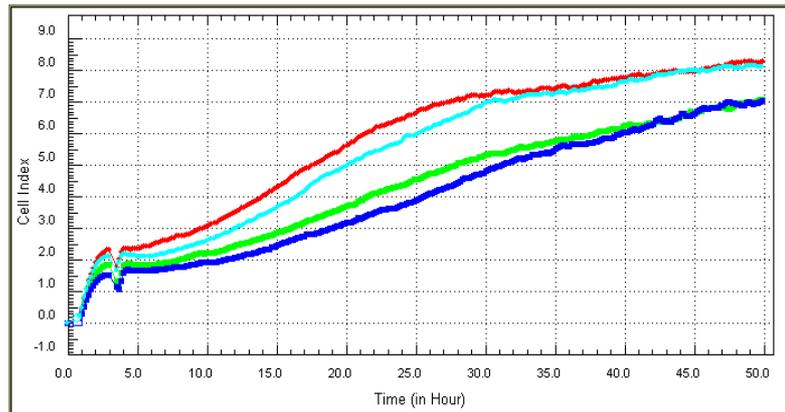


Figura 42. Proliferazione cellulare misurata in tempo reale, mediante strumentazione xCELLigence. CI (Cell Index) = $6,9 \pm 0,02$ (GLP-1 7-37) vs $3,8 \pm 0,02$ (CTR) o vs $6 \pm 0,03$ (GLP-1 7-37 + EMP) o vs $4,3 \pm 0,02$ (GLP-1 7-37 + iEMP) calcolato nelle 24 ore nelle cellule HCAEC di controllo (blu), trattate con le GLP-1 (7-37) (rosso), trattate con GLP-1 (7-37) e con EMP (azzurro), trattate con GLP-1 (7-37) e con iEMP (verde). ($p < 0,01$; $n = 10$)

10. EFFETTO DELLE EMP E DELLE iEMP SULL'ATTIVAZIONE DI p-ERK

Le EMP promuovono in vitro la proliferazione endoteliale mediante il trasferimento alle cellule target di miR-126 con conseguente downregolazione di SPRED-1, enzima coinvolto nell'inibizione del segnale mediato dalle chinasi Ras/MAPK. Poichè il trattamento con le iEMP riduce la proliferazione delle cellule endoteliali rispetto al trattamento con le EMP, abbiamo verificato se le iEMP sono coinvolte nella regolazione della proliferazione mediata dalle chinasi Ras/MAPK ed in particolare dagli enzimi a regolazione extracellulare ERK 1/2. Le cellule HCAEC sono state quindi trattate per 24 ore con le EMP o con le iEMP precedentemente generate ed isolate. Le Figure 43 e 44 mostrano gli effetti delle EMP e delle iEMP sull'attivazione di ERK. L'attivazione di ERK è stata determinata dai livelli di fosforilazione della proteina ERK. Come si nota dall'immunoblot e

dall'analisi densitometrica, la fosforilazione di ERK è aumentata significativamente in seguito al trattamento con le EMP mentre è ridotta dopo incubazione con le iEMP.

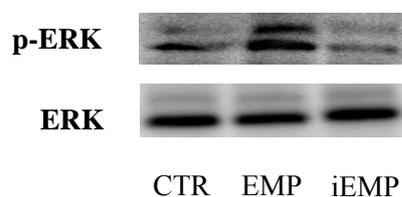


Figura 43. Western Blot rappresentativo dell'espressione proteica di p-ERK e della rispettiva proteina non fosforilata in cellule HCAEC stimulate con EMP e con iEMP per 24 ore.

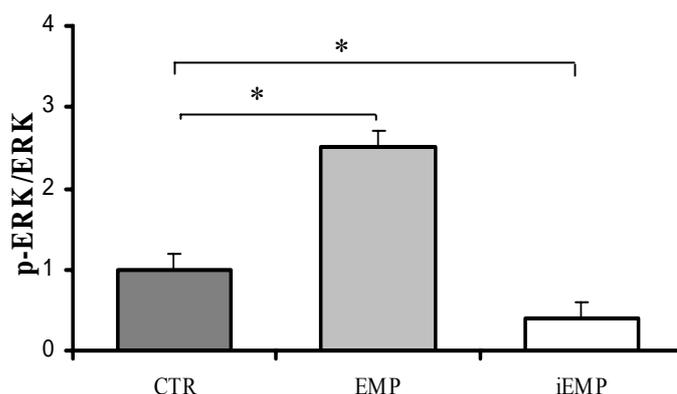


Figura 44. Analisi densitometrica dei livelli di fosforilazione di ERK nelle condizioni sopraelencate. I valori sono espressi come Medie \pm ES; * $p < 0,01$, $n = 6$)

Pertanto questi risultati indicano che i meccanismi molecolari proliferativi mediati dall'attivazione della via ERK e dalla stimolazione del recettore GLP-1R sono ridotti dall'azione antiproliferativa delle iEMP dovuta ad una riduzione di miR-126.

DISCUSSIONE

I principali risultati di questo studio dimostrano che a) le microparticelle (EMP) generate, in vitro, dalle cellule endoteliali favoriscono la proliferazione e la migrazione cellulare mediante il trasferimento di un microRNA (miR-126); b) miR-126 riduce l'espressione di SPRED-1, proteina che regola negativamente la proliferazione cellulare attraverso l'inibizione della via Ras/ERK chinasi; c) le microparticelle generate dalle cellule endoteliali cresciute ad elevata concentrazione di glucosio (iEMP) hanno un ridotto contenuto di miR-126 e attenuano la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali mediante l'inibizione di Ras/ERK 1/2; d) le iEMP riducono l'espressione proteica del recettore GLP-1R direttamente coinvolto nella regolazione della proliferazione cellulare endoteliale.

Questi dati pertanto suggeriscono che nel nostro modello sperimentale la funzionalità endoteliale può essere modulata dalle microparticelle e in particolar modo dal contenuto nelle microparticelle di miR-126. Mentre le EMP generate in condizioni "fisiologiche" possono concorrere a mantenere l'integrità dell'endotelio, le iEMP generate, invece, in condizioni di iperglicemia, compromettono la funzionalità e l'omeostasi endoteliale riducendo i fenomeni rigenerativi e proliferativi⁹⁶.

Evidenze sperimentali hanno dimostrato che le microparticelle di origine endoteliale possono avere un ruolo importante nella fisiologia dell'endotelio ma anche indurre alterazioni della sua funzionalità⁶⁵. Le microparticelle infatti possono promuovere la sopravvivenza cellulare, esercitare effetti antiinfiammatori e indurre la rigenerazione endoteliale

quando la loro generazione e rilascio riflettono un equilibrio tra proliferazione e apoptosi cellulare ⁹⁷. Le EMP sono in grado di ridurre l'apoptosi cellulare riducendo la proteolisi e la attivazione dei fattori pro-apoptotici come la caspase-3. Un altro studio ha dimostrato che, in vitro, il rilascio di EMP indotto dal trattamento farmacologico con statine migliora la funzionalità endoteliale in quanto queste EMP presentano proprietà anti-aterogene e anti-infiammatorie ⁶².

Le microparticelle circolanti possono però esercitare un ruolo negativo sull'omeostasi endoteliale agendo come fattori pro-coagulativi, infiammatori e di stress ossidativo, caratteristiche di diversi stati patologici tra cui la trombosi, le malattie cardiovascolari e le malattie autoimmuni. Per esempio, un'elevata quantità di EMP circolanti si associa alla progressione delle patologie cardiovascolari come la trombosi ⁹⁸, l'infarto cardiaco, o con lo sviluppo del diabete mellito di tipo 2 ⁹⁹. Studi in vitro, hanno documentato che le EMP rilasciate da placche aterosclerotiche aggravano l'infiammazione endoteliale in quanto sono in grado di trasportare e rilasciare citochine pro infiammatorie come il TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) o le molecole di adesione come la E-Selectina o ICAM ⁶³.

Alla luce di queste osservazioni, si può ipotizzare che il ruolo delle EMP nella funzionalità endoteliale è ambivalente in quanto le EMP possono agire in modo positivo o negativo sull'endotelio e ciò molto probabilmente dipende dalla quantità di EMP che vengono rilasciate o dal loro contenuto. In quest'ultimo caso, è molto importante conoscere la composizione delle proteine sulla superficie esterna delle EMP, la presenza di citochine o di molecole di adesione e il loro contenuto in microRNA.

In questo studio, abbiamo confrontato, in vitro, gli effetti di due popolazioni di EMP sulla funzionalità endoteliale misurata come indice di proliferazione e migrazione cellulare. Una popolazione di EMP è stata generata in condizioni “fisiologiche”, mentre l’altra, definita iEMP, da cellule endoteliali trattate con elevate concentrazioni di glucosio, allo scopo di mimare una situazione di disfunzione endoteliale.

Questo è il primo studio che dimostra che le microparticelle, EMP e iEMP non differiscono per numero o per morfologia e nemmeno per il contenuto delle proteine (annexina e fosfatidilserina) presenti sulla superficie esterna, ma differiscono per la presenza di microRNA. Le iEMP infatti presentano un contenuto ridotto di miR-126 rispetto a quello presente nelle EMP.

I dati di microarray indicano che il miR-126 tra i diversi microRNA studiati è quello più espresso nelle microparticelle di origine endoteliale. Inoltre, miR-126 viene attivamente trasferito alle cellule endoteliali “target”, favorendo un aumento della proliferazione e della migrazione cellulare, agendo quindi in modo benefico per la omeostasi dell’endotelio. Le microparticelle invece ottenute da cellule trattate con elevate concentrazioni di glucosio (iEMP), che rappresentano una espressione ridotta di miR-126, riducono la funzionalità endoteliale inibendo sensibilmente sia la proliferazione che la migrazione cellulare. Per il momento, non conosciamo quali siano i meccanismi molecolari che portano una riduzione di miR-126 nelle iEMP, anche se possiamo ipotizzare che il glucosio possa interferire nella biosintesi o aumentare la degradazione di miR-126 mediante una azione di stress ossidativo. A conferma dei nostri risultati, un recente studio, in vivo, ha dimostrato che le microparticelle circolanti ottenute da pazienti diabetici di tipo 2 presentano una riduzione significativa del contenuto di miR-126 rispetto

alle microparticelle circolanti ottenute da soggetti di controllo e che i livelli di miR-126 erano inversamente correlati con la glicemia a digiuno¹⁰⁰. L'aumento dell'attività proliferativa delle cellule endoteliali indotte dal trasferimento dalle EMP di miR-126 è dovuto principalmente a una riduzione della espressione proteica di SPRED-1 (Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein). miR-126 si lega infatti specificatamente alla regione 3' UTR dell'mRNA di SPRED-1 in modo da regolare la sua traduzione¹⁰¹. SPRED-1 è una proteina di membrana che agisce da soppressore dell'attivazione, in risposta ai fattori di crescita, di alcuni pathways intracellulari coinvolti nella proliferazione e migrazione cellulare. L'azione inibitoria di SPRED-1 sulla proliferazione cellulare è mediata soprattutto dall'inattivazione degli enzimi a regolazione extracellulari, ERK1/2¹⁰¹. Pertanto, il nostro studio dimostra che miR-126, contenuto nelle EMP aumenta la proliferazione e migrazione cellulare mediante l'inibizione di SPRED-1, mentre il ridotto contenuto di miR-126 presente nelle iEMP abolisce questi effetti, aumentando l'attivazione e l'espressione di SPRED-1.

Nel processo di proliferazione, inoltre, assumono un ruolo importante i recettori accoppiati alla proteina G, in particolare il recettore GLP-1R (Glucagon Like Peptide-1 Receptor)⁹². GLP-1R è stato identificato nelle cellule β pancreatiche ma è ampiamente espresso anche nei tessuti extrapancreatici, tra cui le cellule endoteliali. Il legame dell'agonista GLP-1 (7-37) con il suo recettore GLP-1R determina l'attivazione di importanti vie metaboliche, tra cui la via ERK 1/2, coinvolta nella regolazione della proliferazione cellulare⁹². I nostri risultati dimostrano per la prima volta che il trattamento delle cellule endoteliali con iEMP riduce la espressione del recettore GLP-1 e abolisce el'effetto proliferativo dell'agonista recettoriale GLP1 (7-37).

CONCLUSIONI

In conclusione, questo studio dimostra per la prima volta che i microRNA presenti nelle microparticelle possono agire da mediatori di comunicazione intercellulare, in quanto possono essere trasferiti all'interno di cellule target per modulare diverse attività metaboliche come la proliferazione e migrazione cellulare. Questi effetti possono essere benefici o negativi per la cellula in rapporto al loro contenuto di microRNA. In particolare, miR-126 può svolgere un ruolo importante come regolatore della funzionalità e integrità endoteliale. Pertanto, le microparticelle potrebbero essere utilizzate manipolando il loro contenuto di microRNA, per interventi terapeutici soprattutto nelle patologie cardiovascolari.

BIBLIOGRAFIA

1. Liebner S, Cavallaro U, Dejana E. *The multiple languages of endothelial cell-to-cell communication*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26(7):1431-8.
2. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. *Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression*. J Cell Science. 2010;123:1603–1611.
3. Vander Molen MA, Rubin CT, McLeod KJ, McCauley LK, Donahue HJ. *Gap junctional intercellular communication contributes to hormonal responsiveness in osteoblastic networks*. J Biol Chem. 1996;271(21):12165-71.
4. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. *Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles*. Pharmacol Rev. 2012;64(3):676-705.
5. EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. *Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities*. Nat Rev Drug Discov. 2013;12(5):347-57.
6. Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. *Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression*. Cell Cycle. 2009;8:2014–2018.
7. Chargaff E, West R. *The biological significance of the thromboplastic protein of blood*. J Biol Chem. 1946;166(1):189-97.

8. Wolf P. *The nature and significance of platelet products in human plasma*. Br J Haematol 1967;13:269-88.
9. Pan BT, Blostein R, Johnstone RM. *Loss of the transferrin receptor during the maturation of sheep reticulocytes in vitro. An immunological approach*. Biochem J.1983;210(1):37-47.
10. Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwège V, et al. *Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide*. J Immunol 1994;153:3245-55.
11. Tsimmerman G, Roguin A, Bachar A, Melamed E, Brenner B, Aharon A. *Involvement of microparticles in diabetic vascular complications*. Thromb Haemost. 2011;106:310–321.
12. Dignat-George F, Boulanger CM. *The many faces of endothelial microparticles*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2011;31:27–33.
13. Raposo G, Stoorvogel W. *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. J Cell Biol. 2013;200(4):373-83.
14. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. *Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles*. Pharmacol Rev. 2012;64(3):676-705.
15. Weerheim AM, Kolb AM, Sturk A, Nieuwland R. *Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-*

- dimensional high-performance thin-layer chromatography*. Anal Biochem. 2002;302(2):191-8.
16. Larson MC, Woodliff JE, Hillery CA, Kearl TJ, Zhao M. *Phosphatidylethanolamine is externalized at the surface of microparticles*. Biochim Biophys Acta. 2012;1821(12):1501-7.
 17. Bucki R, Bachelot-Loza C, Zachowski A, Giraud F, Sulpice JC. *Calcium induces phospholipid redistribution and microvesicle release in human erythrocyte membranes by independent pathways*. Biochemistry. 1998;37(44):15383-91.
 18. Gemmell CH, Sefton MV, Yeo EL.J *Platelet-derived microparticles formation involves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect*. Biol Chem. 1993;268(20):14586-9.
 19. Boulanger CM, Amabile N, Guérin AP, Pannier B, Leroyer AS, Mallat CN, Tedgui A, London GM. *In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease*. Hypertension. 2007;49(4):902-8.
 20. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. *Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies*. J Neurooncol. 2013;113(1):1-11.
 21. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. *Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device*. J Cell Sci. 2000;113.
 22. Simák J, Holada K, Vostal JG. *Release of annexin V-binding membrane microparticles from cultured human umbilical vein endothe-*

- lial cells after treatment with camptothecin.* BMC Cell Biol. 2002;3:11.
23. Morel O, Toti F, Jesel L, Freyssinet JM. *Mechanisms of microparticle generation: on the trail of the mitochondrion!* Semin Thromb Hemost. 2010;36(8):833-44.
24. Freyssinet JM. *Cellular microparticles: what are they bad or good for?* J Thromb Haemost. 2003;1:1655–62.
25. Wagner GM, Chiu DT, Yee MC, et al. *Red cell vesiculation – a common membrane physiologic event.* J Lab Clin Med. 1986;108:315–24.
26. Hugel B, Socie G, Vu T, et al. *Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia.* Blood. 1999;93:3451–6.
27. Mesri M, Altieri DC. *Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway.* J Biol Chem. 1999;274:23111–8.
28. Gasser O, Schifferli JA. *Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis.* Blood. 2004;104(8):2543-8.
29. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, et al. *Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis.* Blood. 2000;95:930–5.
30. Armstrong MJ, Storch J, Dainiak N. *Structurally distinct plasma membrane regions give rise to extracellular membrane vesicles in*

- normal and transformed lymphocytes.* Biochim Biophys Acta. 1988;946:106–12.
31. Lee DH, Warkentin TE, Denomme GA, et al. *A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia: detection of platelet microparticles using flow cytometry.* Br J Haematol. 1996;95:724–31.
32. Horstman LL, Ahn YS. *Platelet microparticles: a wide-angle perspective.* Crit Rev Oncol Hematol. 1999;30:111–42.
33. Bode AP, Orton SM, Frye MJ, et al. *Vesiculation of platelets during in vitro aging.* Blood. 1991;77:887–95.
34. Solum NO. *Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19:2841–6.
35. Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. *In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant.* J Clin Invest. 1999;104:93–102.
36. Sabatier F, Roux V, Anfosso F, et al. *Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity.* Blood. 2002;99:3962–70.
37. Mause SF, Weber C. *Microparticles: Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange.* Circulation Research. 2010;107:1047–1057.
38. Jimenez J, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn ER, Ahn YS, Minagar A. *Elevated endothelial microparticle-monocyte complexes induced by multiple sclerosis plasma and the inhibitory effects of in-*

- terferon-beta 1b on release of endothelial microparticles, formation and transendothelial migration of monocyte-endothelial microparticle complexes.* Mult Scler. 2005;11(3):310-5
39. Rautou P-E, Vion A-C, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, Boulanger CM. *Microparticles, vascular function, and atherothrombosis.* Circulation Research. 2011;109:593–606.
40. Collier ME, Mah PM, Xiao Y, Maraveyas A, Ettelaie C. *Microparticle-associated tissue factor is recycled by endothelial cells resulting in enhanced surface tissue factor activity.* Thromb Haemost. 2013;110(5):966-76.
41. Zwaal R.A., Schroit A.J. *Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells.* Blood 1997;89(4):1121-1132.
42. Weerheim A.M., Kolb A.M., Sturk A., Nieuwland R. *Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography.* Anal. Biochem. 2002;302(2):191-198.
43. Fourcade O., Simon M.F., Viode C., et al. *Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells.* Cell 1995;80(6):919-927.
44. Aupeix K., Hugel B., Martin T., et al. *The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection.* J. Clin. Invest. 1997;99(7):1546-1554.

45. Sims P.J., Faioni E.M., Wiedmer T., Shattil S.J. *Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity.* J. Biol. Chem. 1988;263(34):18205-18212.
46. Sims P.J., Wiedmer T., Esmon C.T., Weiss H.J., Shattil S.J. *Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity.* J. Biol. Chem. 1989;264(29):17049-17057.
47. Akao Y, Iio A, Itoh T, Noguchi S, Itoh Y, Ohtsuki Y, Naoe T. *Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages.* Mol. Ther. 2011;19:395–399.
48. Diehl P, Fricke A, Sander L, Stamm J, Bassler N, Htun N, Ziemann M, Helbing T, El-Osta A, Jowett JBM, Peter K. *Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation.* Cardiovasc. Res. 2012;93:633–644.
49. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. *Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication.* Leukemia. 2006;20:1487–1495.
50. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. *Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation.* Blood. 2005;106:1604–1611.

51. Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gitahi SK, Gehr P, Nicod LP. *Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens.* Am J Pathol. 2006;169:2127–2136.
52. Burnier L, Fontana P, Angelillo-Scherrer A, Kwak BR. *Intercellular communication in atherosclerosis.* Physiology. 2009;24:36–44.
53. Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, Murphy SL, Conover DO, Poncz M, Ratajczak J, Gaulton GN, Ratajczak MZ. *Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV.* AIDS. 2003;17:33–42.
54. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. *Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding.* Immunity. 2001;15:825–835.
55. Ray DM, Spinelli SL, Pollock SJ, Murant TI, O'Brien JJ, Blumberg N, Francis CW, Taubman MB, Phipps RP. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor transcription factors are released from activated human platelets and shed in microparticles.* Thromb Haemost. 2008;99:86–95.
56. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. *Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles.* J Clin Invest. 1997;99:2118–2127.
57. Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. *Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles.* J Clin Invest. 1998;102:136–144.

58. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. *Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery*. *Leukemia*. 2006;20:847–856.
59. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G. *Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mrna*. *Blood*. 2007;110:2440–2448.
60. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, LeeML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. *Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles*. *PLoS One*.2008;3:e3694.
61. Mause SF, Weber C. *Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange*. *Circ Res*. 2010;107(9):1047-57.
62. Jansen F, Yang X, Hoyer FF, Paul K, Heiermann N, Becher MU, Abu Hussein N, Kebschull M, Bedorf J, Franklin BS, Latz E, Nicke-nig G, Werner N. *Endothelial microparticle uptake in target cells is annexin I/phosphatidylserine receptor dependent and prevents apoptosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(8):1925-35.
63. Ham AS, Goetz DJ, Klibanov AL, Lawrence MB. *Microparticle adhesive dynamics and rolling mediated by selectin-specific antibodies under flow*. *Biotechnol Bioeng*. 2007;96(3):596-607.

64. Lumsden NG, Andrews KL, Bobadilla M, Moore XL, Sampson AK, Shaw JA, Mizrahi J, Kaye DM, Dart AM, Chin-Dusting JP. *Endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes post acute coronary syndrome*. Diab Vasc Dis Res. 2013;10(4):368-74.
65. Tushuizen ME, Diamant M, Sturk A, Nieuwland R. *Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: friend or foe?* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31(1):4-9.
66. Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH. *MicroRNA expression in zebrafish embryonic development*. Science. 2005;309(5732):310-1.
67. Erson AE, Petty EM. *MicroRNAs in development and disease*. Clin Genet. 2008;74(4):296-306.
68. Bartel DP. *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell. 2004;116(2):281-97.
69. Yeom KH, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN. *Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing*. Nucleic Acids Res. 2006;34(16):4622-9.
70. Kinet V, Halkein J, Dirkx E, Windt LJ. *Cardiovascular extracellular microRNAs: emerging diagnostic markers and mechanisms of cell-to-cell RNA communication*. Front Genet. 2013;4:214.
71. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. *MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipi-*

- ent cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011;13(4):423-33.
72. Knudsen LB. *Glucagon-like peptide-1: the basis of a new class of treatment for type 2 diabetes.* *J Med Chem.* 2004;47(17):4128-34.
73. Courrèges JP, Vilsbøll T, Zdravkovic M, Le-Thi T, Krarup T, Schmitz O, Verhoeven R, Bugáňová I, Madsbad S. *Beneficial effects of once-daily liraglutide, a human glucagon-like peptide-1 analogue, on cardiovascular risk biomarkers in patients with Type 2 diabetes.* *Diabet Med.* 2008;25(9):1129-31.
74. White JW, Saunders GF. *Structure of the human glucagon gene.* *Nucleic Acids Res.* 1986;14(12):4719-30.
75. Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF. *Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing.* *J Biol Chem.* 1986;261(25):11880-9.
76. Rouillé Y, Martin S, Steiner DF. *Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide.* *J Biol Chem.* 1995;270(44):26488-96.
77. Rothenberg ME, Eilertson CD, Klein K, Zhou Y, Lindberg I, McDonald JK, Mackin RB, Noe BD. *Processing of mouse proglucagon by recombinant prohormone convertase 1 and immunopurified prohormone convertase 2 in vitro.* *J Biol Chem.* 1995;270(17):10136-46.

78. Irwin DM. *Molecular evolution of proglucagon*. Regul Pept. 2001;98(1-2):1-12.
79. Bell GI, Sanchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC. *Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene*. Nature. 1983;304(5924):368-71.
80. Dhanvantari S, Seidah NG, Brubaker PL. *Role of prohormone convertases in the tissue-specific processing of proglucagon*. Mol Endocrinol. 1996;10(4):342-55.
81. Baggio LL, Drucker DJ. *Biology of incretins: GLP-1 and GIP*. Gastroenterology. 2007;132(6):2131-57.
82. Wettergren A, Pridal L, Wøjdemann M, Holst JJ. *Amidated and non-amidated glucagon-like peptide-1 (GLP-1): non-pancreatic effects (cephalic phase acid secretion) and stability in plasma in humans*. Regul Pept. 1998;77(1-3):83-7.
83. Orskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ. *Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans*. Diabetes. 1994;43(4):535-9.
84. Orskov C, Wettergren A, Holst JJ. *Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable*. Diabetes. 1993;42(5):658-61.
85. Unger RH, Ohneda A, Valverde I, Eisentraut AM, Exton J. *Characterization of the responses of circulating glucagon-like im-*

- munoreactivity to intraduodenal and intravenous administration of glucose.* J Clin Invest. 1968;47(1):48-65.
86. Thorens B, Porret A, Bühler L, Deng SP, Morel P, Widmann C. *Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor.* Diabetes. 1993;42(11):1678-82.
87. Stoffel M, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Bell GI. *Human glucagon-like peptide-1 receptor gene. Localization to chromosome band 6p21 by fluorescence in situ hybridization and linkage of a highly polymorphic simple tandem repeat DNA polymorphism to other markers on chromosome 6.* Diabetes. 1993;42(8):1215-8
88. Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefler J, Bolz SS, Drucker DJ, Husain M. *Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways.* Circulation. 2008;117(18):2340-50.
89. Runge S, Schimmer S, Oschmann J, Schiødt CB, Knudsen SM, Jeppesen CB, Madsen K, Lau J, Thøgersen H, Rudolph R. *Differential structural properties of GLP-1 and exendin-4 determine their relative affinity for the GLP-1 receptor N-terminal extracellular domain.* Biochemistry. 2007;46(19):5830-40.
90. Holz GG. *New insights concerning the glucose-dependent insulin secretagogue action of glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells.* Horm Metab Res. 2004;36(11-12):787-94.

91. Arnette D, Gibson TB, Lawrence MC, January B, Khoo S, McGlynn K, Vanderbilt CA, Cobb MH. *Regulation of ERK1 and ERK2 by glucose and peptide hormones in pancreatic beta cells*. J Biol Chem. 2003;278(35):32517-25.
92. Favaro E, Granata R, Miceli I, Baragli A, Settanni F, Cavallo Perin P, Ghigo E, Camussi G, Zanone MM. *The ghrelin gene products and extendin-4 promote survival of human pancreatic islet endothelial cells in hyperglycaemic conditions, through phosphoinositide 3-kinase/Akt, extracellular signal-related kinase (ERK)1/2 and cAMP/protein kinase A (PKA) signalling pathways*. Diabetologia. 2012;55(4):1058-70.
93. Avogaro A, Fadini GP, Gallo A, Pagnin E, de Kreutzenberg S. *Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus*. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2006;16 Suppl 1:S39-45.
94. Avogaro A, Albiero M, Menegazzo L, de Kreutzenberg S, Fadini GP. *Endothelial dysfunction in diabetes: the role of reparatory mechanisms*. Diabetes Care. 2011;34 Suppl 2:S285-90.
95. Jung U, Jiang X, Kaufmann SH, Patzel V. *A universal TaqMan-based RT-PCR protocol for cost-efficient detection of small noncoding RNA*. RNA. 2013;19(12):1864-73.
96. Jansen F, Yang X, Franklin BS, Hoelscher M, Schmitz T, Bedorf J, Nickenig G, Werner N. *High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation*. Cardiovasc Res. 2013;98(1):94-106.

97. Azevedo LC, Pedro MA, Laurindo FR. *Circulating microparticles as therapeutic targets in cardiovascular diseases*. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. 2007;2(1):41-51.
98. Siljander P, Carpen O, Lassila R. *Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis*. Blood. 1996;87(11):4651-63.
99. Tousoulis D, Papageorgiou N, Androulakis E, Siasos G, Latsios G, Tentolouris K, Stefanadis C. *Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches*. J Am Coll Cardiol. 2013;62(8):667-76.
100. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. *Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes*. Circ Res. 2010;107(6):810-7
101. Meng S, Cao JT, Zhang B, Zhou Q, Shen CX, Wang CQ. *Downregulation of microRNA-126 in endothelial progenitor cells from diabetes patients, impairs their functional properties, via target gene Spred-1*. J Mol Cell Cardiol. 2012;53(1):64-72.