



**Studio della glicazione proteica non enzimatica nel tessuto adiposo
viscerale (VAT) di pazienti obesi con o senza diabete di tipo 2 e impatto
del trattamento in vitro con GLP1-agonisti di pre-adipociti esposti a
condizioni di aumentata glicazione, mediante spettrometria di massa
(MALDI-TOF) e analisi citofluorimetrica**

Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Medicina DIMED

Relazione semestrale: stato di avanzamento del progetto, primi risultati e linee guida
per il semestre successivo

Riassunto premesse fisiopatologiche e cliniche

Questo progetto di studio si propone di approfondire il legame fra prodotti di glicazione avanzata (AGE), alterazioni morfologiche e status ossidativo/infiammatorio del tessuto adiposo viscerale nel paziente obeso con o senza diabete tipo 2.

Gli obiettivi posti sono di verificare nuove ipotesi sul ruolo della glicazione tissutale nei meccanismi di memoria metabolica e l'eventuale impatto in questo sistema di alcune terapie farmacologiche, attualmente indicate per il paziente obeso e diabetico (nella fattispecie, analoghi del GLP1 e inibitori della DPP4).

Gli step ipotizzati in dettaglio erano:

- Determinazione quantitativa degli AGE e dei loro recettori (AGER) presenti nel tessuto adiposo viscerale (VAT) di pazienti obesi, con o senza diabete di tipo 2, e soggetti sani, correlandoli con il fenotipo clinico (durata di malattia, controllo glicemico, assetto lipidico, markers sierici di infiammazione...)
- Esposizione *in vitro* di linee cellulari 3T3-L1 (pre-adipociti) in condizioni favorenti la glicazione proteica (es. esposizione prolungata ad elevate concentrazioni di glucosio), in presenza o assenza di GLP-1 agonisti.
- Determinazione *in vivo* di GLP1-R (recettore del GLP-1) per confrontare l'espressione di questo recettore nel VAT di pazienti diabetici vs pazienti obesi non diabetici

Da una rivalutazione della letteratura già pubblicata su questi aspetti sono emerse queste evidenze:

Gaens KHJ, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014 → E' stato provato un accumulo della carbossimetil-lisina (CML), uno dei più comuni precursori degli AGE, nel tessuto adiposo sottocutaneo (SAT) in un piccolo campione di **pazienti obesi** (n=10) vs **non obesi** (n=9), e nel VAT vs SAT di pazienti **gravi obesi** (n=44). CML determinata con spettrometria di massa (UPLC-tandem MS) per la quantificazione e staining immunoistochimico per la localizzazione.¹

Nello stesso lavoro sono stati incubati in vitro con CML preadipociti e adipociti umani, trovando un incremento dei RAGE, dell'IL-6 e del PAI-1 dopo 1 ora di incubazione. L'incubazione con anticorpi anti-RAGE ripristinava i livelli dei markers infiammatori.

In un modello animale di topi Lept^{DB-/-} è stato identificato un accumulo selettivo di CML-albumina nello stroma vascolare del tessuto adiposo, nel citosol e nella membrana degli adipociti.

E' stata infine dimostrata una correlazione inversa fra CML e BMI di pazienti umani, identificando come spiegazione che nei soggetti obesi è attivo un meccanismo di “trapping” dal plasma al t. adiposo di CML. Inoltre, nei soggetti sottoposti a chirurgia bariatrica, i livelli plasmatici di CML tornavano ad aumentare. Correlazione diretta fra CML e insulino sensibilità di questi pazienti, studiata con clamp iperinsulinemico-euglicemico

Vendrell J et al, Endocrinology, 2011 → analisi GLP1-R (valutata come espressione dell'mRNA e della proteina) in 3T3-L1 e preadipociti umani di soggetti obesi. Analisi condotta in 22 soggetti obesi non diabetici con BMI >50 e 73 soggetti con BMI < 40 (composti da soggetti sani, sovrappeso e obesi).²

Dimostrato calo progressivo dell'espressione del GLP1-R nel tessuto adiposo viscerale per gradi crescenti di BMI, tranne nel gruppo di obesi ad alta resistenza insulinica che avevano alti livelli di GLP1-R. Lo **staining immunoistochimico** ha dimostrato che sia l'adipocita sia la frazione vasculo-stromale presentano espressione di GLP1-R, maggiormente nella seconda.

L'incubazione di preadipociti 3T3-L1 con GLP1 ha dimostrato un aumento della lipolisi.

Dimostrazione di una correlazione (non statisticamente significativa) fra i livelli di GLP1-R e il miglioramento dell'HOMA index dopo chirurgia bariatrica dei 22 soggetti con BMI > 50 → i soggetti con alta espressione di GLP1-R nel tessuto adiposo viscerale sono quelli che rispondono di più alla chirurgia bariatrica.

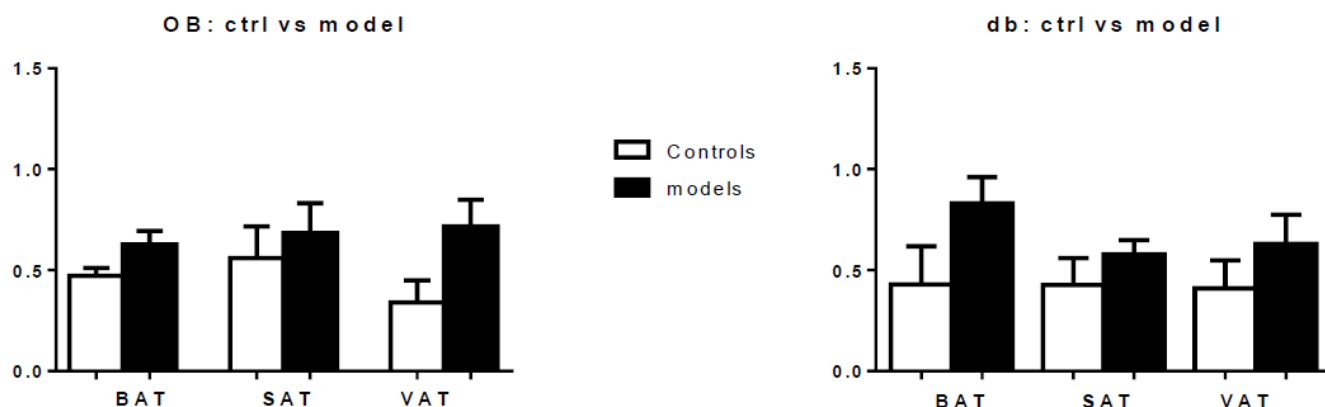
Rodrigues T et al, Journal of Diabetes Research, 2013 → dimostrazione che il trattamento di ratti Wistar con metilglicosale per os per 8 settimane si traduce in un accumulo di carbossietil-lisina (CEL) nel tessuto adiposo (valutato con Western blot), in particolar modo a livello del microcircolo (grazie ad una metodica di PAS staining su sezioni di tessuto adiposo), con fibrosi e disfunzione endoteliale. Inoltre il trattamento con metilglicosale ha determinato un profilo metabolico aterogenico nei ratti, riducendo i livelli delle HDL e aumentando i FFA sierici.³

Presentazione dei primi risultati e delle difficoltà incontrate:

Espressione AGER nel tessuto adiposo

Il recettore per gli AGE (AGER) è una proteina appartenente alla super-famiglia delle immunoglobuline, e pertanto presenta porzioni frazioni costanti e frazioni variabili con numerosissimi siti di splicing alternativo, che complica la scelta della sequenza per le analisi di RT-PCR. Le indagini sono state svolte facendo riferimento all'isoforma AGER1-V1.

In ogni caso, la valutazione effettuata sui modelli murini, sia OB che db, non ha evidenziato differenze significative di espressione di AGER1 nel tessuto adiposo sottocutaneo, rispetto a quello viscerale o al tessuto adiposo bruno. E' stata evidenziata invece una grande variabilità nell'espressione del recettore nei vari tessuti. E' in corso di valutazione se esiste una associazione fra presenza del recettore ed espressione di alcuni markers di infiammazione e ossidazione (GLO1, SIRT1 e 3, GPX1 e 3, IL1 β e IL6).



Per quanto concerne l'espressione nel tessuto adiposo umano, è ancora in fase preliminare la messa a punto per il dosaggio nei soggetti di controllo, obesi, diabetici o pre-diabetici, nel SAT, nel VAT e a livello della frazione vasculo-stromale). Anche in questo modello sarà valutata l'associazione con alcune proteine di status infiammatorio, in particolare S100, GLO1, oltre che con l'espressione del GLP1-R.

Sono stati presi in considerazione alcuni dati presentati in occasione del Convegno Europeo sull'Obesità a Maggio 2015, inerenti la correlazione fra livelli sierici di sRAGE e esRAGE (2 isoforme solubili circolanti dei recettori per gli AGE) e i determinanti della sindrome metabolica. In particolare queste 2 isoforme, i cui livelli sono risultati correlati strettamente fra loro in adolescenti con obesità centrale, risulterebbero inversamente correlate al grado di obesità.

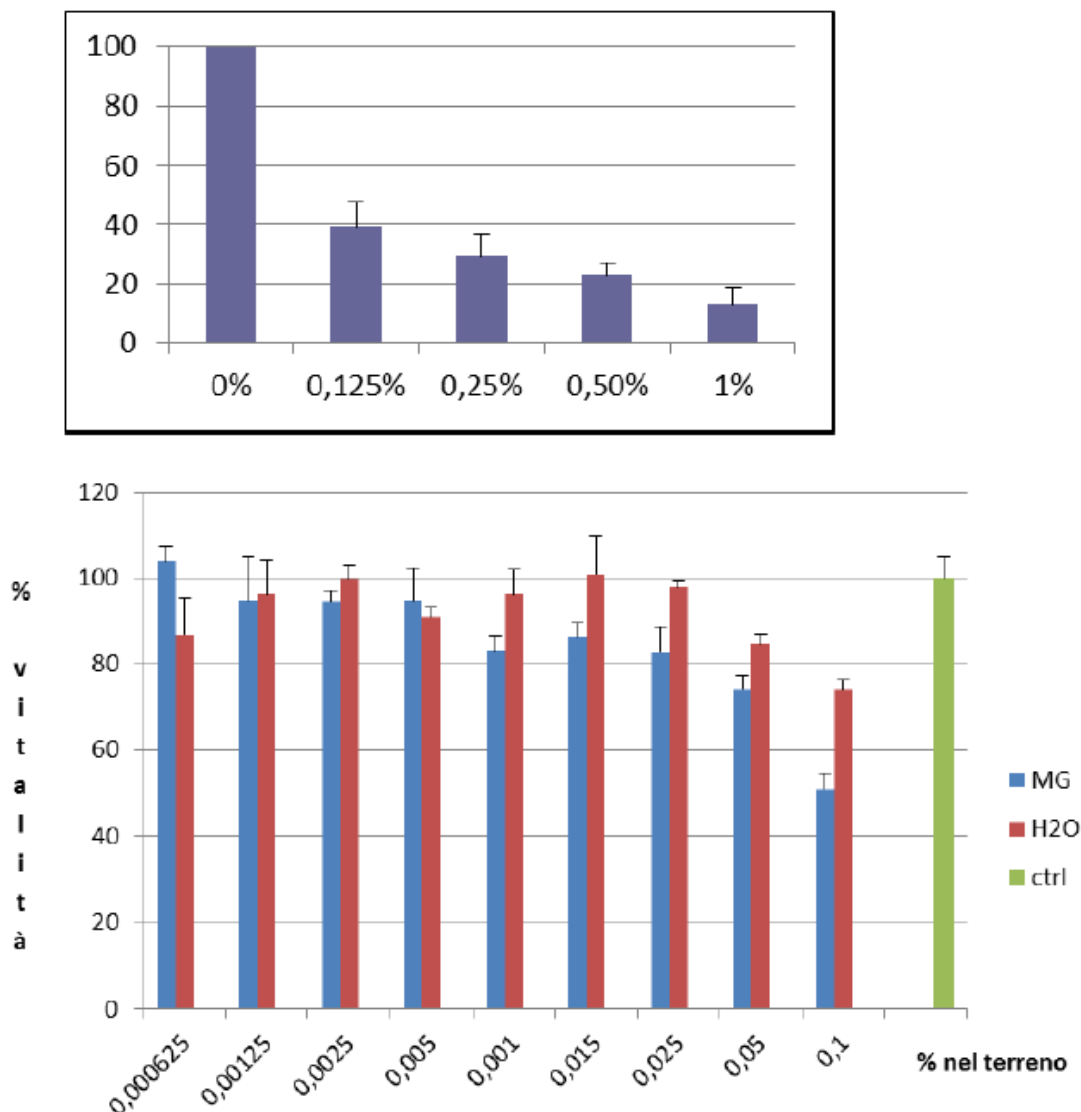
L'inclusione di questi biomarkers sierici per il nostro studio risulterebbe tuttavia “rischiosa”, essendovi dati contrastanti in letteratura riguardo il significato clinico di Srage e esRAGE, tutt'ora oggetto di dibattito. ⁴

Analisi di glicazione cellule 3T3-L1

Rispetto alle valutazioni svolte nel periodo precedente, sono state eseguiti differenzamenti dei preadipositi 3T3-L1 in condizioni di concentrazioni di glucosio più basse (5mM) e per maggior tempo con la già sperimentata condizione di glucosio 100 mM. Oltre a ciò sono state effettuate prove con zuccheri alternativi quali il saccarosio, il lattosio e il fruttosio (tutti ad una concentrazione di 20 mM addizionati a 5 mM di glucosio).

All'analisi microscopica dopo lisi finale è risultata una buona differenziazione per i terreni di coltura con glucosio 25mM e fruttosio 20Mm+glucosio 5mM; il terreno differenziato interamente con glucosio 100 mM ha presentato caratteristiche di citotossicità, mentre nel terreno con glucosio 5Mm è risultata una apparente scarsa differenziazione. Così pure le differenziazioni in esposizione a saccarosio e lattosio non hanno dato buon esito, per cui è stato deciso di scartarle. La valutazione del differente contenuto di lipidi degli adipociti differenziati, con metodica di Oil-staining, è in fase di analisi.

Si è pensato inoltre di tentare una differenziazione in presenza di metilgliossale (MG, uno tra i più comuni precursori degli AGEs) e glucosio 5 mM, dato il nostro interesse a verificare anche gli effetti della glicazione diretta.



Tuttavia, i test di vitalità per valutare la sopravvivenza dei preadipociti in presenza di MG, hanno evidenziato una elevata citotossicità anche a concentrazioni di MG molto basse: in particolare già in presenza di concentrazioni dello 0,1 % si aveva una sopravvivenza del solo 50% del pool cellulare iniziale dopo 24 h di esposizione.

Dopo una rivalutazione della letteratura in merito alle concentrazioni di MG utilizzate nelle analisi in vitro e in vivo, si è deciso di ripetere i test di vitalità con concentrazioni più basse (10-

25-50-100 μM), prima di proseguire nelle cinetiche di differenziamento adipogenico in presenza del precurose degli AGE.

Spunti ulteriori

E' stata evidenziata la potenzialità dello sfruttamento di nuovissime metodiche per eventuali analisi ulteriori in questo campo, in particolar modo i microRNA (miRNA), che negli ultimi anni sono stati sempre di più associati a studi sulle complicanze croniche del diabete. Tuttavia, per ragioni economiche e di fattibilità, si è scartata l'ipotesi di approfondire questa strada.

Le ultime analisi hanno posto alcuni punti cruciali da risolvere per il proseguimento ulteriore delle analisi:

- mettere a punto una metodica di differenziamento valida e affidabile dei preadipociti 3T3-L1, nei vari terreni utilizzati. In particolare è necessario quantificare con esattezza le percentuali di differenziamento nei vari esperimenti, per poter avere risultati confrontabili;
- valutare l'espressione proteica quantitativa dei recettori GLP1 e AGER nel tessuto adiposo, accanto all'espressione genica con RT-PCR, che può fornire solo un'idea parziale della presenza in toto di questi recettori nel tessuto adiposo (*ndr, effettivamente anche negli studi in letteratura i dati di espressione sul GLP1-R sono mostrati sia con RT-PCR che western blot*). Inoltre si è pensato di studiare l'impatto della glicazione sul "sistema incretinico" (con i sistemi enzimatici/proteine ad esso correlati), piuttosto che sul singolo recettore del GLP1.
- pensare ad eventuali "induttori" del GLP1-R, da utilizzare per aumentarne l'espressione nel tessuto adiposo.

Analisi spettrometrica con MALDI

Le maggiori difficoltà si sono rivelate in merito a 2 aspetti:

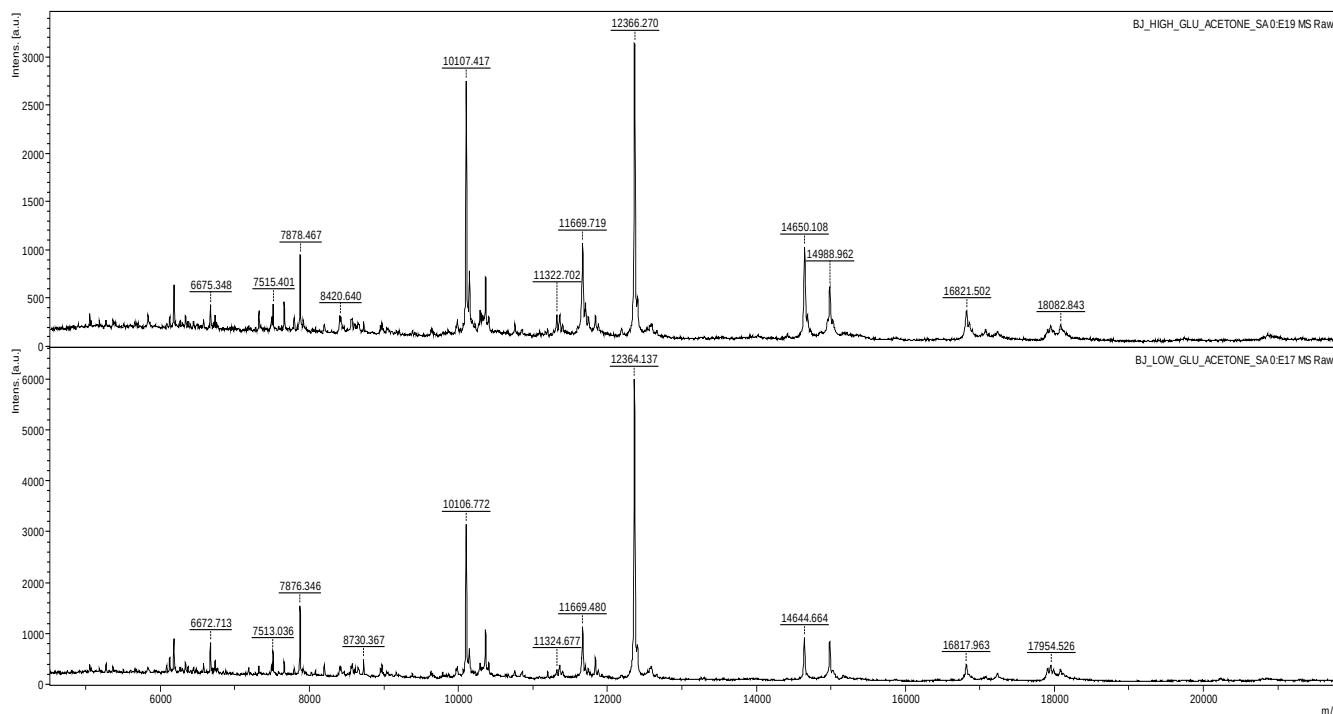
- incompatibilità tra i tamponi utilizzati e le colture cellulari 3T3-L1;
- concentrazione troppo bassa delle proteine da analizzare e "interferenza" dell'albumina, presente a concentrazione troppo alta e difficilmente purificabile dai campioni.

Il lavaggio con bicarbonato d'ammonio 50 mM e la lisi con TFA 0.1% ha permesso di eliminare (considerando il limite di rivelabilità strumentale) le contaminazioni da albumina e da sali (tipo PBS).

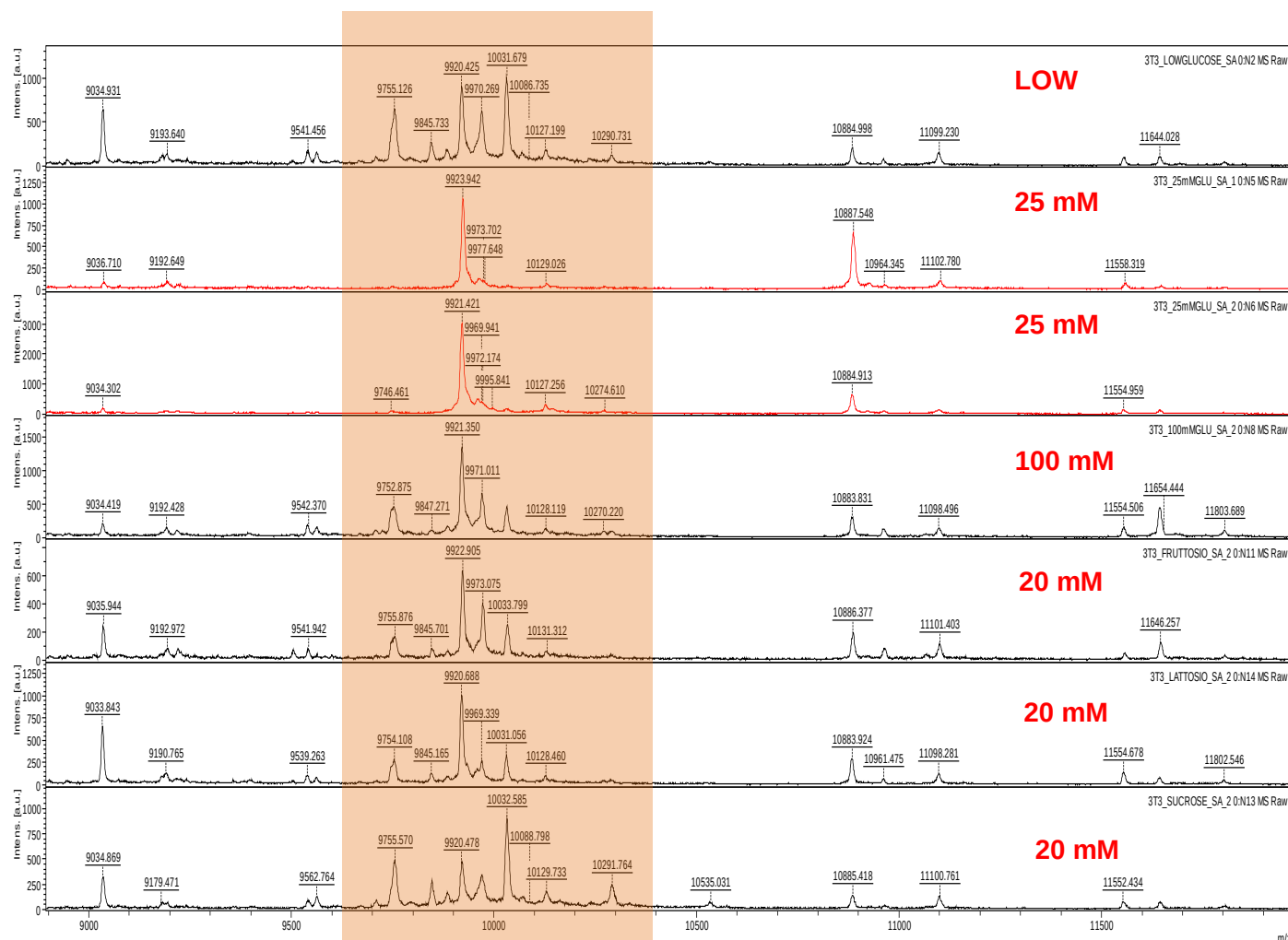
L'analisi effettuata sui **fibroblasti BJ** ha evidenziato il non esserci grosse differenze in termini di segnale fra le cellule trattate con high glucose (25 Mm) e low glucose (5 Mm), anche dopo analisi del pellet risospeso.

Direttore: Prof. Angelo Gatta

Via Giustiniani, 2 – 35128 Padova – tel + 39 049 8212927 / 2261 – fax + 39 049 8211886 – direzione.dimed@unipd.it



L'analisi spettrometrica effettuata sulle **3T3-L1** differenziate secondo i protocolli citologici ha mostrato invece alcune differenze, specie nella regione compresa fra i 9700 e 10300 Da.

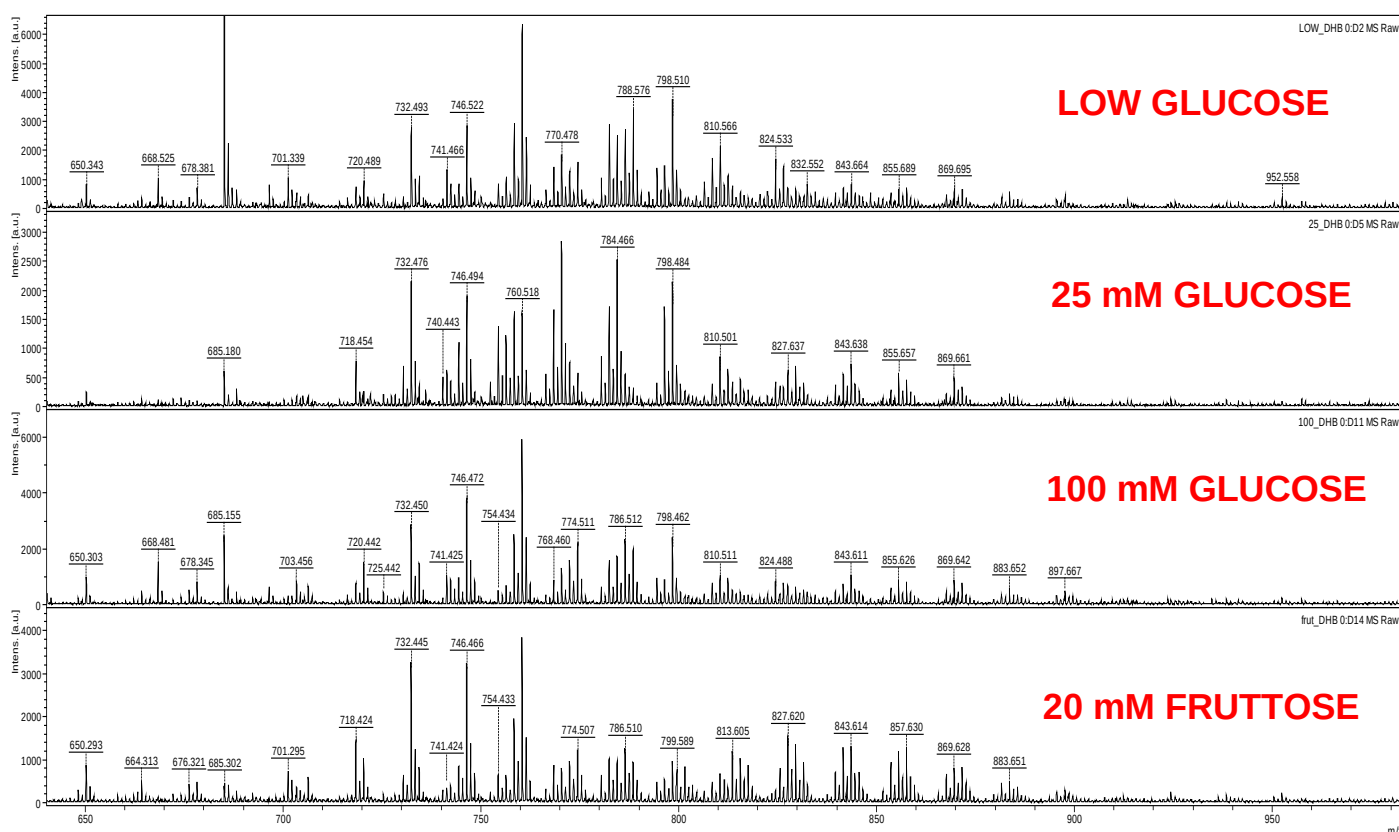


Da una prima osservazione sembrerebbe esserci una differenza di segnale fra le colture trattate con 25 mM e quelle trattate con 100 mM; un'osservazione ulteriore è stata che lo spettro delle 3T3-L1 esposte a glucosio 100 mM è risultato simile a quello delle stesse cellule in presenza di fruttosio 25 mM. Considerato che il fruttosio ha notoriamente un "potere di glicazione" più rapido ed efficiente del glucosio, queste differenze potrebbero avvalorare l'ipotesi che le differenze osservate al MALDI abbiano a che fare effettivamente con proteine modificate da reazioni di glico-ossidazione.

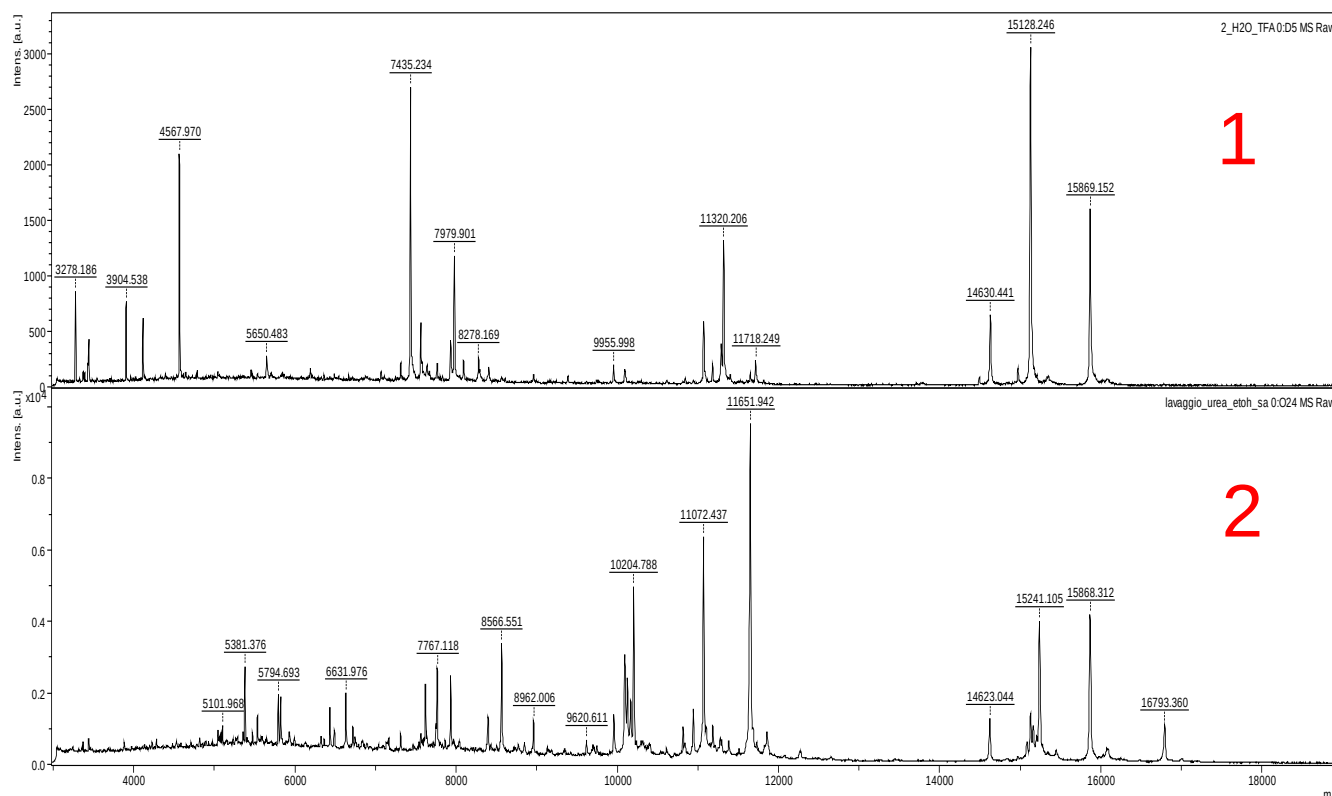
Lo spettro delle 3T3-L1 trattate con glucosio 5 mM, pur essendo diverso da tutti gli altri, non è stato considerato per ora confrontabile, perlomeno fino a quando non si sarà verificata l'effettiva percentuale di differenziamento dei preadipociti in tale condizione: è necessario

infatti accertare che le popolazioni cellulari ottenute al termine dei differenziamenti siano omogenee.

E' stata inoltre eseguita una analisi della frazione lipidica delle cellule 3T3-L1 differenziate in vitro, in seguito ad estrazione con cloroformio: anche in questo caso si sono registrate alcune differenze, fra la differenziazione in glucosio 25 Mm e 100 Mm, e fruttosio 20 mM, che andranno analizzate e interpretate.



E' stata infine approntata l'analisi sul tessuto adiposo sottocutaneo dei pazienti obesi. In particolare sono stati provati 4 diversi metodi di purificazione prima di eseguire l'analisi MALDI. Al termine delle prove è risultato che il tessuto adiposo, proprio per l'elevata componente lipidica, risulta particolarmente "ostico" da sottoporre all'analisi spettrometrica. Inoltre è risultata una certa contaminazione da parte dell'albumina e dell'emoglobina. Tuttavia, i lavaggi con PBS e ammonio bicarbonato hanno permesso in parte di eliminare i contaminanti



1. Lisi con TFA 0.1%, ultrasuoni (2x 5min), centrifuga (10 min 13000 rpm), lavaggio del surnatante con cloroformio, centrifuga (10 min 13000 rpm). Analisi della fase acquosa
2. Lavaggio tessuto con ammonio bicarbonato 50 mM (2x), lisi con UREA buffer, precipitazione proteine con acetone -20°C, risospensione pellet TFA 0.1%

Spunti ulteriori

La difficoltà interpretativa dei risultati del MALDI, che per loro stessa natura non forniscono indicazioni “qualitative” sulla natura delle specie osservate, impone di concentrare gli sforzi scegliendo accuratamente cosa “andare a vedere” del tessuto adiposo, piuttosto che tentare di analizzare le differenze negli spettri complessivi, e in particolare indirizzandosi alle proteine e agli enzimi di maggior interesse del tessuto adiposo (es adiponectina, leptina)

Direttore: Prof. Angelo Gatta

Via Giustiniani, 2 – 35128 Padova – tel + 39 049 8212927 / 2261 – fax + 39 049 8211886 – direzione.dimed@unipd.it

Abbiamo riconsiderato quanto già noto in letteratura sulla determinazione dei prodotti di glicazione avanzata “free”, rispetto agli AGE legati alle proteine, e come opinione collettiva è risultato fondamentale capire quali specie dosare tramite spettrometria di massa, se solo gli AGE o anche i loro precursori, i prodotti di Amadori e gli altri prodotti di glicazione intermedia della reazione di Maillard.

Altre osservazioni emerse dopo l’analisi degli ultimi risultati:

- considerate le apparenti omologie di segnale fra le analisi ottenute con glucosio 100 Mm e fruttosio 20 Mm, si è sottolineata l’importanza di approfondire le analisi con quest’ultimo zucchero, e studiarne maggiormente l’effetto a livello del tessuto adiposo.
- potrebbe essere interessante, se le metodologie di purificazione e di estrazione lo consentiranno, valutare la differente espressione degli AGE (o delle proteine ipoteticamente modificate da reazioni di glico-ossidazione) nella frazione vasculo-stromale vs a livello intracellulare.
- in base a quanto discusso le analisi ulteriori ex vivo del tessuto adiposo dei pazienti obesi potrebbero vertere sulla determinazione di AGE e precursori degli AGE free (CML, MG, gliosale, 3-deossiglucosone) e legati a proteine nella frazione vasculo stromale; determinazione della leptina glicata.
- di ulteriore interesse saranno le analisi MALDI sulla frazione lipidica del tessuto adiposo, in particolare sono già stati prospettati diversi disegni sperimentali volti ad approfondire la *lipidomica tissutale* dei pazienti obesi, specie in relazione alle complicanze dell’obesità e ai fattori di successo/insuccesso degli interventi di chirurgia bariatrica.

Padova, lì 30 Settembre 2015

In fede,

Chilelli Nino Cristiano
