

## RELAZIONE ANNUALE BORSA DI STUDIO FO.DI.RI. 2015

**TITOLO PROGETTO:** *Sopravvivenza e senescenza delle cellule progenitrici cardiache umane nel diabete mellito di tipo 2: ruolo della DPP-4 e dei farmaci incretinici.*

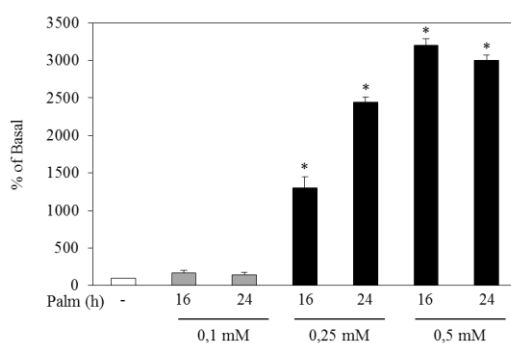
L'obiettivo generale di questo progetto di ricerca consiste nello studio del ruolo della DPP-4 e dei farmaci incretinici (nello specifico l'exendin-4) nella sopravvivenza e nella senescenza delle hCPCs (human cardiac progenitor cells) nel contesto delle alterazioni metaboliche caratteristiche della patologia diabetica.

I principali risultati ottenuti sino ad oggi sono i seguenti:

### **1 INDUZIONE DELL'APOPTOSI NELLE hCPCs ED EFFETTI PROTETTIVI DELL'EXENDIN-4**

Le colture primarie di hCPCs vengono allestite a partire da biopsie dell'auricola destra di pazienti sottoposti a interventi di cardiocirurgia per sostituzione valvolare o bypass coronarico grazie alla collaborazione con la sezione di cardiocirurgia del nostro dipartimento (Laviola L. et al., Endocrinology 2012).

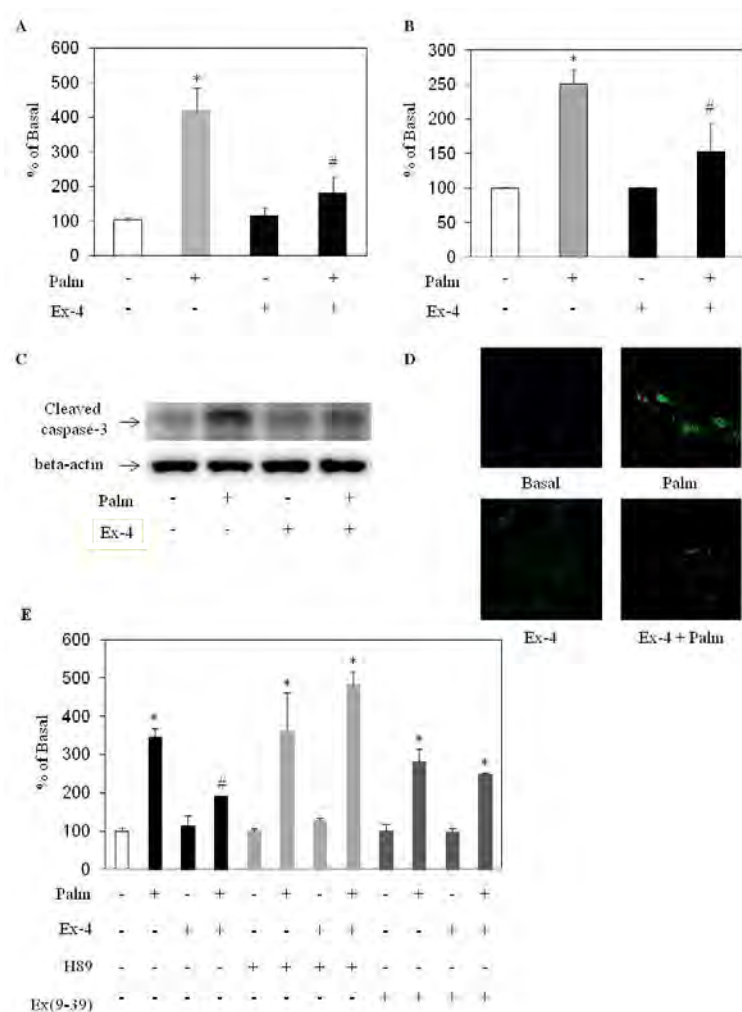
Per mimare gli effetti del milieu diabetico le hCPCs provenienti da pazienti non diabetici sono state esposte al palmitato, ovvero l'acido grasso saturo maggiormente presente nel plasma umano, utilizzando tre differenti concentrazioni, 0,1-0,25-0,5 mM, e due diversi tempi, 16 e 24 h, per poi procedere allo studio dell'apoptosi cellulare attraverso la misurazione degli oligonucleosomi rilasciati nel citoplasma. Il palmitato induce apoptosi nelle hCPCs quando utilizzato alle concentrazioni 0,25 e 0,5 mM per 16 e 24 h ( $p < 0,05$  vs cellule non trattate, Fig. 1).



**Fig. 1.** Valutazione degli effetti del palmitato sull'apoptosi delle hCPCs isolate da soggetti normali mediante saggio ELISA per gli oligonucleosomi citoplasmatici. Il palmitato induce apoptosi nelle hCPCs quando usato alle concentrazioni 0,25 e 0,5 mM per 16 e 24 h; (\*,  $p < 0,05$  vs cellule non trattate).

Per investigare sui potenziali effetti protettivi esercitati dall'agonista del recettore del GLP-1 sull'apoptosi indotta dagli acidi grassi liberi, le hCPCs sono state esposte al palmitato 0,25 mM per 16 h. La preincubazione con l'exendin-4 20 nM per 8 h riduce in maniera statisticamente significativa l'apoptosi indotta dal palmitato nelle hCPCs e valutata mediante saggio ELISA per gli oligonucleosomi citoplasmatici e saggio di attività della caspasi-3 ( $p < 0,05$  vs palmitato, Fig. 2, A e B). L'exendin-4 previene anche l'incremento del clivaggio della caspasi-3 e le rotture a singola strand del DNA, valutate mediante immunoblotting e saggio TUNEL, rispettivamente (Fig. 2, C e D).

Precedentemente il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che gli effetti del GLP-1 sulle hCPCs sono mediati principalmente dall'attivazione del pathway cAMP/proteina chinasi A (PKA)/CREB (Laviola L. et al., Endocrinology 2012). L'esposizione delle hCPCs al GLP-1 risulta in un incremento tempo-dipendente dei livelli intracellulari di cAMP e in un incremento dose- e tempo-dipendente della fosforilazione del fattore di trascrizione CREB, attivato dal GLP-1 attraverso il pathway cAMP/PKA (Laviola L. et al., Endocrinology 2012). La capacità dell'exendin-4 di prevenire l'apoptosi delle hCPCs indotta dal palmitato viene inibita quando le cellule vengono preincubate con l'antagonista del recettore del GLP-1, l'exendin(9-39) o con l'inibitore di PKA, H89 ( $p < 0,05$  vs cellule non trattate, Fig. 2E) confermando il coinvolgimento del recettore canonico del GLP-1 nella protezione mediata dall'exendin-4 nel danno lipotossico delle hCPCs.



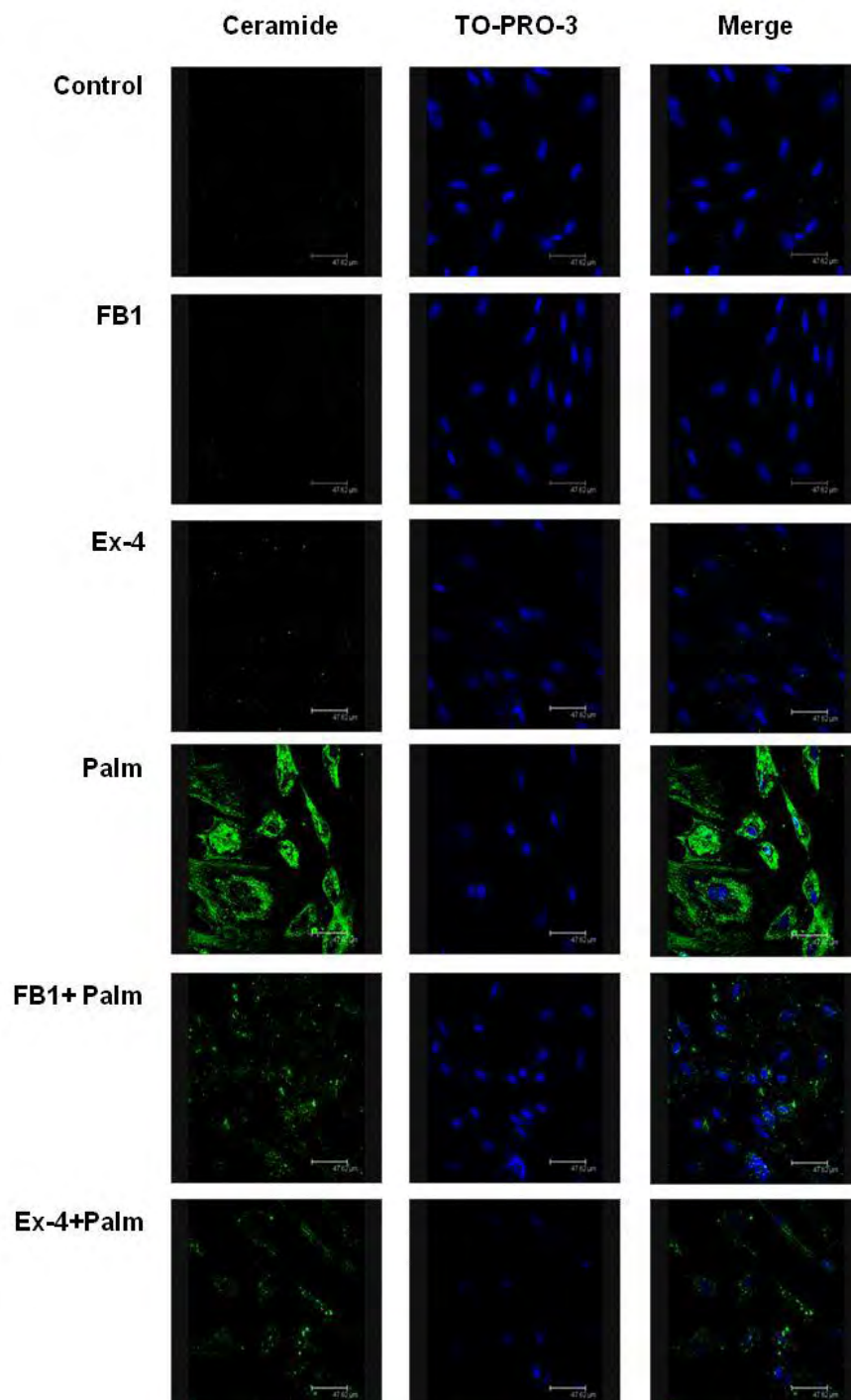
**Fig. 2.** Induzione dell'apoptosi da parte del palmitato nelle hCPCs ed effetto protettivo dell'exendin-4. A, saggio ELISA per gli oligonucleosomi citoplasmatici; B, saggio di attività della caspasi-3; C, immunoblotting per la caspasi-3 clivata; D, saggio TUNEL; E, saggio ELISA per gli oligonucleosomi citoplasmatici dopo inibizione del signaling del GLP-1R. \*,  $p < 0,05$  vs cellule non trattate; #,  $p < 0,05$  vs palmitato.

## 2 EFFETTI DELL'EXENDIN-4 SULL' ACCUMULO DI CERAMIDE INTRACELLULARE IN RISPOSTA AL PALMITATO NELLE hCPCs

In letteratura è noto che le ceramidi rappresentano i principali mediatori dell'apoptosi indotta dagli acidi grassi liberi (Bikman BT et al., J Clin Invest. 2011) e che la ceramide sintasi 5 (CerS5) è uno degli enzimi chiave coinvolti nella sintesi *de novo* della ceramide, una delle principali vie di sintesi della ceramide, a partire dal palmitato nel cuore (Holland WL et al., J Clin Invest. 2011).

L'esposizione delle hCPCs al palmitato 0,25 mM per 16 h determina un incremento del contenuto intracellulare di ceramide valutato mediante immunofluorescenza indiretta (Fig. 3). Questo incremento viene quasi completamente abrogato quando le hCPCs vengono preincubate per 8 h con

l'exendin-4 20 nM o con la fumonisina B1 (FB1) 20  $\mu$ M, un inibitore dell'attività dell'enzima CerS5 (Fig. 3).



**Fig. 3.** Effetti dell'exendin-4 e della FB1 sull'incremento del contenuto intracellulare di ceramide (verde) in risposta all'esposizione al palmitato valutato mediante immunofluorescenza indiretta. I nuclei sono stati evidenziati grazie all'utilizzo del TO-PRO-3 ioduro (blu). Scale bar: 47,62  $\mu$ m.

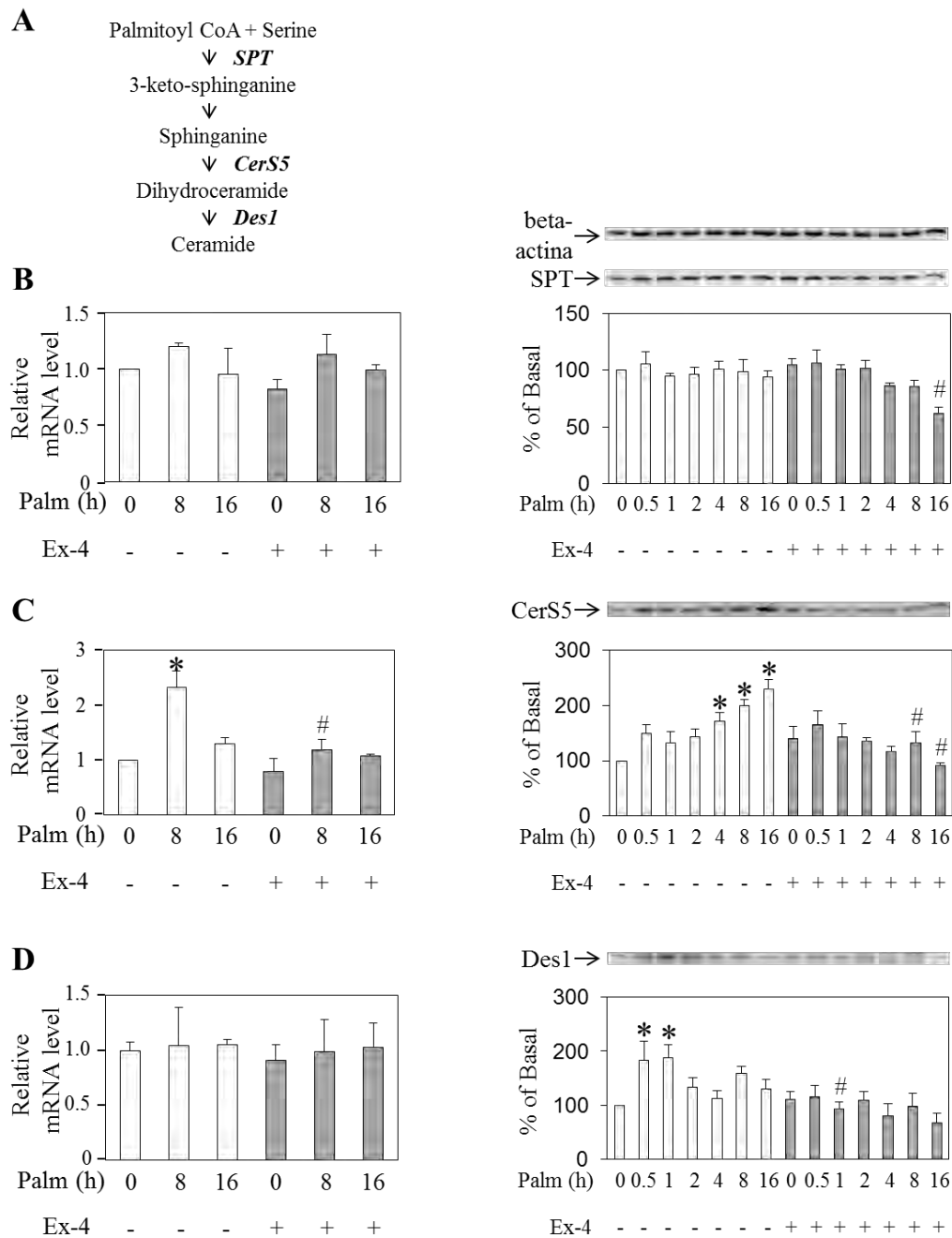
### **3. INDUZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA E PROTEICA DELLA CerS5 NELLE hCPCs ED EFFETTI DELL'EXENDIN-4**

Per comprendere il meccanismo molecolare attraverso cui l'exendin-4 inibisce la sintesi *de novo* della ceramide, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sugli enzimi chiave coinvolti in questa via biosintetica, quali la serina palmitoil tranferasi (SPT), la CerS5 e la ceramide desaturasi (Des1) (Fig. 4A). L'esposizione delle hCPCs al palmitato 0,25 mM per 16 h non modifica l'espressione genica e proteica della SPT (Fig. 4B). Per quanto concerne la CerS5, il palmitato induce un incremento significativo sia dell'espressione genica dopo 8 h che dell'espressione proteica a partire dalle 4h e con un picco alle 16 h valutati mediante real-time PCR e mediante immunoblotting, rispettivamente ( $p < 0,05$  vs cellule non trattate, Fig. 4C). Il palmitato non modifica l'espressione genica della Des1, ma è in grado di incrementarne significativamente l'espressione proteica a partire dai 30 minuti e fino a 1 h ( $p < 0,05$  vs cellule non trattate, Fig. 4D).

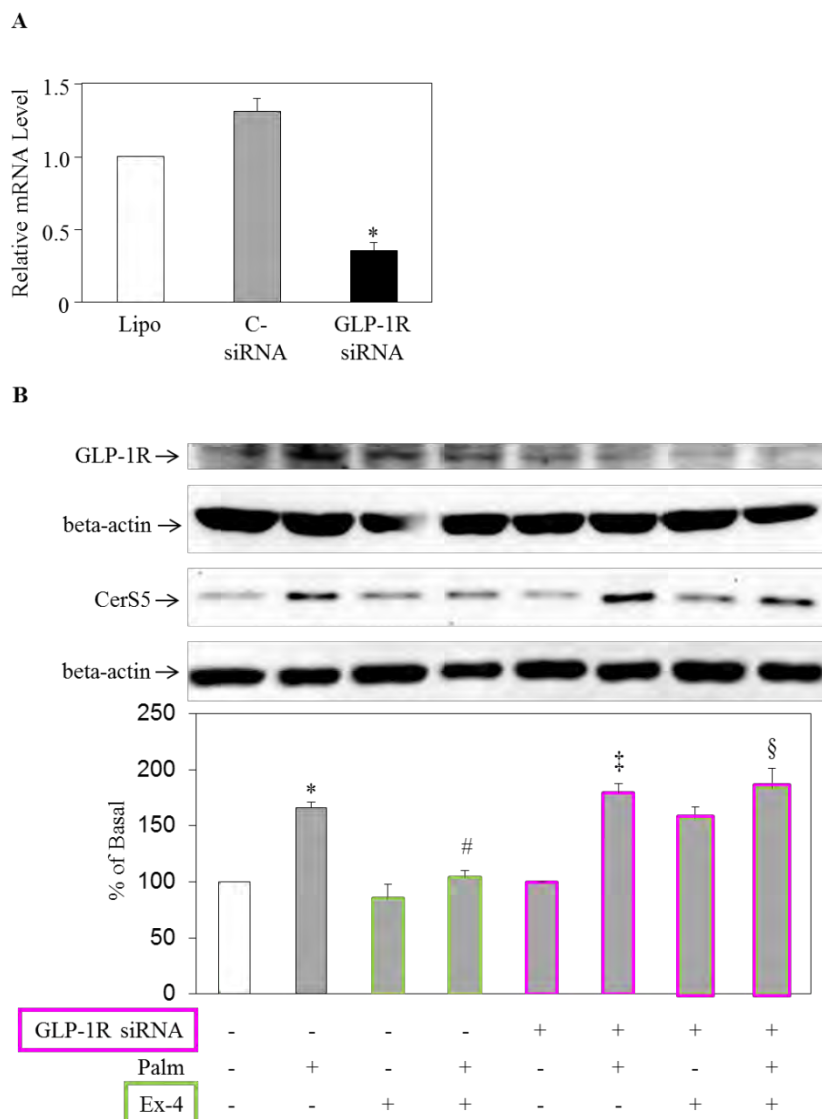
La preincubazione delle hCPCs con l'exendin-4 20 nM per 8 h consente una riduzione significativa dell'espressione della CerS5, sia a livello genico che a livello proteico, e della Des1 a livello proteico ( $p < 0,05$  vs palmitato, Fig. 4, C e D). L'exendin-4 20 nM è anche in grado di ridurre significativamente l'espressione proteica della SPT nelle hCPCs esposte al palmitato 0,25 mM per 16 h ( $p < 0,05$  vs cellule non trattate, Fig. 4B).

La capacità dell'exendin-4 di prevenire l'incremento dell'espressione proteica delle CerS5 è stata confermata mediante l'induzione del knockdown del recettore del GLP-1, prima dell'esposizione all'exendin-4 e al palmitato e in grado di consentire una riduzione dell'espressione genica ( $p < 0,05$  vs lipofectamine, Fig. 5A) e dell'espressione proteica del GLP-1R del 50% circa (Fig. 5B).

Il silenziamento del GLP-1R blocca la capacità dell'exendin-4 di prevenire l'incremento dei livelli proteici della CerS5 che si verifica dopo stimolo con il palmitato ( $p < 0,05$  vs siGLP-1R, Fig. 5B).



**Fig. 4.** Effetti dell'exendin-4 sulla pathway della sintesi *de novo* della ceramide. A, rappresentazione schematica della sintesi *de novo* della ceramide. B, C, D, analisi dell'espressione genica e proteica dei principali enzimi coinvolti nella sintesi *de novo* della ceramide dopo esposizione delle hCPCs al palmitato 0,25 mM, preceduta o meno dal trattamento con l'exendin-4 20 nM per 8 h. \*,  $p < 0,05$  vs cellule non trattate; #,  $p < 0,05$  vs palmitato.



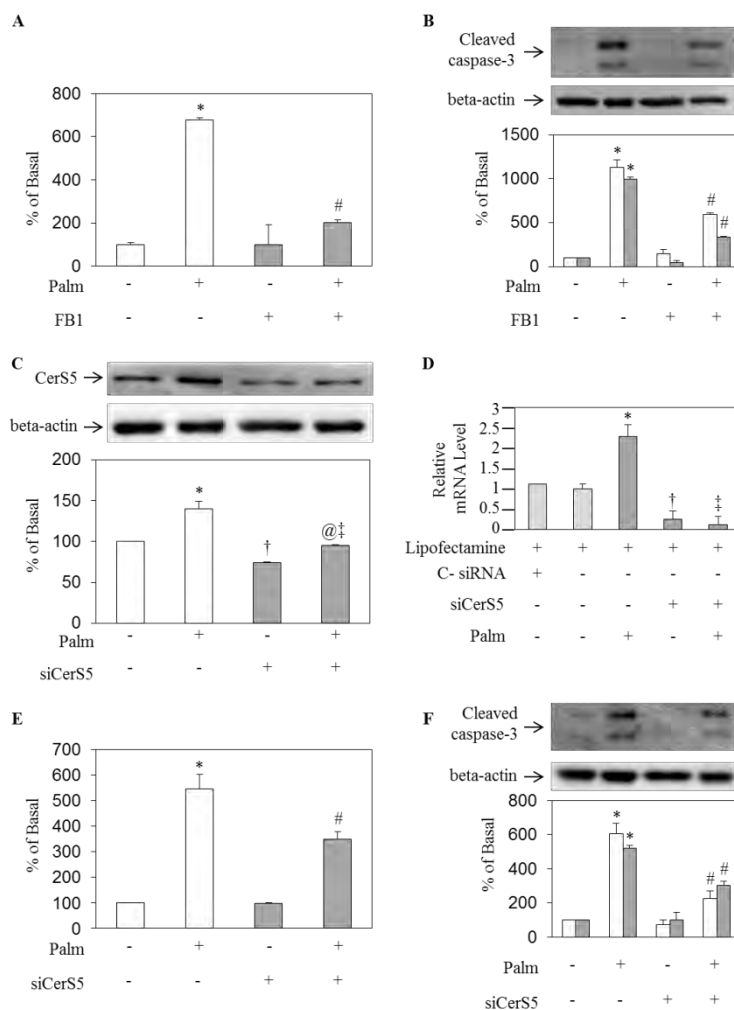
**Fig. 5.** Il knockdown del GLP-1R blocca la capacità dell'exendin-4 di prevenire l'incremento dei livelli proteici della CerS5 che si verifica dopo stimolo con il palmitato. A, analisi dei livelli di espressione genica del GLP-1R dopo induzione del knockdown; B, analisi dei livelli di espressione proteica della CerS5 dopo induzione del knockdown del GLP-1R. \*,  $p < 0,05$  vs lipofectamina; #,  $p < 0,05$  vs lipofectamina e palmitato; ‡,  $p < 0,01$  vs siGLP-1R; §,  $p < 0,05$  vs siGLP-1R.

#### 4. IL BLOCCO DELL'ATTIVITA' DELLA CerS5 PREVIENE L'APOPTOSI INDOTTA DAL PALMITATO NELLE hCPCs

Per confermare il ruolo della CerS5 nell'apoptosi indotta dal palmitato, le hCPCs sono state sia incubate con la fumonisina B1 (FB1), un inibitore chimico di questo enzima, sia trasfettate con un siRNA specifico per esso prima dell'esposizione al palmitato.

Quando le hCPCs vengono preincubate con la FB1 20  $\mu$ M per 8 h, l'apoptosi indotta dal palmitato, valutata mediante saggio ELISA per gli oligonucleosomi citoplasmatici e immunoblotting per la caspasi-3 clivata, viene ridotta significativamente ( $p < 0,05$  vs palmitato, Fig. 6, A e B).

Le hCPCs trasfettate con il siRNA specifico per la CerS5 mostrano una riduzione significativa sia dell'espressione genica che dell'espressione proteica di questo enzima ( $p < 0,05$  vs basale, Fig. 6, C e D); inoltre questo trattamento protegge le hCPCs dall'apoptosi indotta dal palmitato consentendo una riduzione sia del rilascio degli oligonucleosomi citoplasmatici sia dei livelli di caspasi-3 clivata osservati in risposta al palmitato ( $p < 0,05$  vs palmitato, Fig. 6, E e F).



**Fig. 6.** Inibizione dell'apoptosi indotta dal palmitato nelle hCPCs in seguito al blocco dell'attività della CerS5. A, B, inibizione dell'attività enzimatica della CerS5 con FB1 20  $\mu$ M per 8 h e valutazione dell'apoptosi con saggio ELISA e immunoblotting per la caspasi-3 clivata. C, D, valutazione dell'espressione genica e proteica della CerS5 dopo induzione del knockdown. E, F, valutazione dell'apoptosi con saggio ELISA e immunoblotting per la caspasi-3 dopo knockdown della CerS5. \*,  $p < 0,05$  vs cellule non trattate; #,  $p < 0,05$  vs palmitato; †,  $p < 0,05$  vs lipofectamina; ‡,  $p < 0,05$  vs lipofectamina + palmitato; @,  $p < 0,05$  vs siCerS5.

## **5. L'EXENDIN-4 PREVIENE LA FOSFORILAZIONE DI JNK INDOTTA DAL PALMITATO NELLE hCPCs**

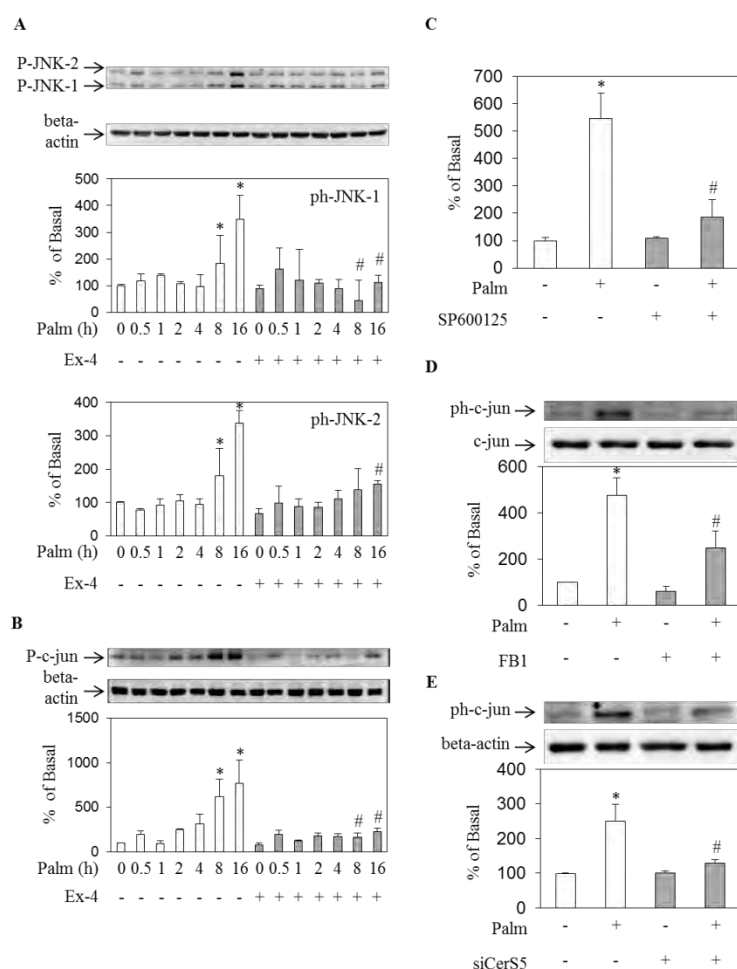
In questo studio è stato valutato anche il signaling responsabile dell'induzione dell'apoptosi da parte del palmitato nelle hCPCs, nonché dell'effetto protettivo esercitato dall'exendin-4. In particolare abbiamo analizzato il coinvolgimento di JNK, una stress chinasi che è noto essere coinvolta nei meccanismi di morte cellulare programmata indotta dal palmitato in vari sistemi cellulari.

L'esposizione delle hCPCs al palmitato 0,25 mM risulta in un incremento tempo-dipendente della fosforilazione di entrambe le isoforme di JNK, JNK1 e JNK2, di 46KDa e 54KDa rispettivamente (Fig. 7A). La fosforilazione di JNK1 e JNK2 incrementa significativamente a partire dalle 8 h di trattamento col palmitato ( $p < 0,05$  vs cellule non trattate, Fig. 7A). La fosforilazione di entrambe le isoforme di JNK in seguito all'esposizione delle hCPCs al palmitato è stata confermata dalla valutazione, mediante immunoblotting, della fosforilazione del substrato di JNK, ovvero il fattore di trascrizione c-jun, che risulta anch'essa incrementata significativamente a partire dalle 8 h ( $p < 0,05$  vs cellule non trattate, Fig. 7B).

La preincubazione con l'exendin-4 è in grado di ridurre, in maniera statisticamente significativa, i livelli di fosforilazione di entrambe le isoforme di JNK e del suo substrato c-jun ( $p < 0,05$  vs palmitato, Fig. 7, A e B).

Per confermare il coinvolgimento di JNK nella cascata apoptotica indotta dal palmitato, le hCPCs sono state preincubate con l'SP600125 10  $\mu$ M, un inibitore chimico specifico di JNK, per poi procedere col saggio ELISA per gli oligonucleosomi citoplasmatici. In questa condizione sperimentale l'apoptosi indotta dal palmitato risulta essere quasi completamente abolita ( $p < 0,05$  vs palmitato, Fig. 7C), confermando il coinvolgimento di JNK nell'apoptosi indotta dal palmitato nelle hCPCs.

Per definire il ruolo della ceramide nell'attivazione del signaling di JNK da parte del palmitato, è stata effettuata la valutazione di c-jun, substrato di JNK, in seguito alla preincubazione con la FB1 e all'induzione del knockdown della CerS5. Entrambi i trattamenti consentono una riduzione significativa della fosforilazione di c-jun indotta in dal palmitato ( $p < 0,05$  vs palmitato, Fig. 7, D ed E), confermando il coinvolgimento della ceramide nell'attivazione del signaling di JNK.

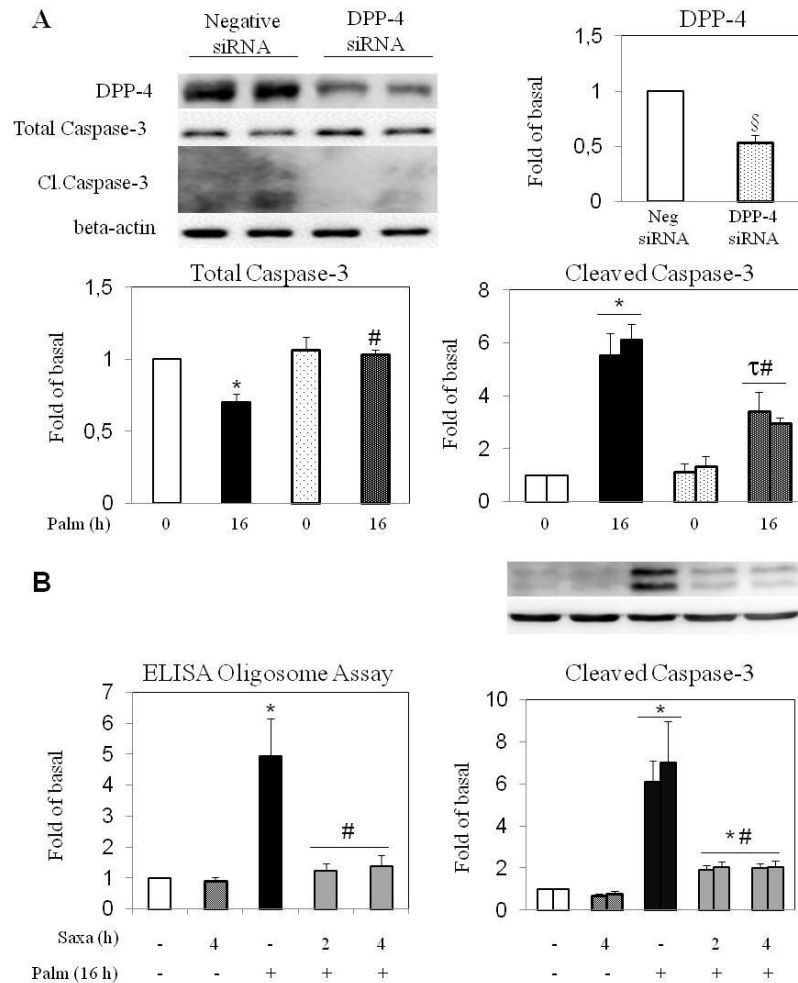


**Fig. 7.** Effetti dell'exendin-4 sul signaling di JNK e coinvolgimento di JNK nell'apoptosi indotta dalla ceramide nelle hCPCs. A, B, time-course per la valutazione della fosforilazione di JNK1/2 e c-jun dopo trattamento con il palmitato preceduto o meno dall'incubazione con exendin-4 20 nM per 8 h. C, valutazione dell'apoptosi mediante saggio ELISA dopo inibizione dell'attività chinasi di JNK con SP600125. D, E, valutazione della fosforilazione di c-jun dopo inibizione dell'attività della CerS5 con FB1 o silenziamento genico, rispettivamente. \*,  $p < 0,05$  vs cellule non trattate; #,  $p < 0,05$  vs palmitato.

## 6. RUOLO DELLA DPP-4 NELL'APOPTOSI INDOTTA DAL PALMITATO NELLE hCPCs UMANE ISOLATE DA SOGGETTI NORMALI

Al fine di comprendere il ruolo dell'enzima DPP-4 (dipeptidilpeptidasi-4) responsabile della degradazione del GLP-1 e del GIP sulla sopravvivenza delle hCPCs isolate da biopsie di pazienti non diabetici ed esposte a danno lipotossico, è stato indotto il silenziamento genico di questo enzima con l'utilizzo di uno specifico siRNA (Fig. 8A). La capacità del palmitato di indurre apoptosi, valutata mediante immunoblotting per la caspasi-3 totale e clivata, è ridotta significativamente nelle hCPCs in seguito al knockdown della DPP-4, a indicare che la DPP-4 è coinvolta nell'azione proapoptotica del palmitato (Fig. 8A).

Analogamente, anche l'inibizione farmacologica della DPP-4 utilizzando il saxagliptin 50  $\mu$ M per 2 h o per 4 h prima dell'esposizione al palmitato 0,25 mM per 16 h, è in grado di ridurre in maniera statisticamente significativa l'apoptosi indotta dallo stimolo lipotossico e valutata mediante sia saggio ELISA per gli oligonucleosomi citoplasmatici che immunoblotting per la caspasi-3 clivata (Fig. 8B).



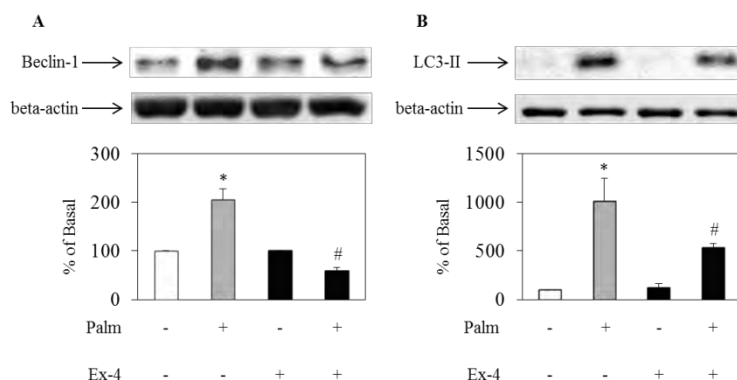
**Fig. 8.** Ruolo della DPP-4 nell'apoptosi indotta dal palmitato nelle hCPCs isolate da soggetti normali. A) Le hCPCs sono state trasfettate con il siRNA della DPP-4 50 nM oppure il siRNA negativo 33 nM e poi sono state esposte al palmitato 0,25 mM per 16 h (§,  $p < 0.0001$  DPP-4 siRNA vs Neg siRNA; \*,  $p < 0.05$  Neg siRNA+palm vs. Neg siRNA; #,  $p < 0.05$  DPP-4 siRNA + palm vs. Neg siRNA + Palm;  $\tau$ ,  $p < 0.05$  DPP-4 siRNA+ palm vs. Neg siRNA). B) Le hCPCs sono state pretrattate con il saxagliptin 50  $\mu$ M per 2 o 4 h e successivamente esposte al palmitato 0,25 mM per 16 h; l'apoptosi è stata valutata mediante saggio ELISA per gli oligonucleosomi citoplasmatici e mediante immunoblotting per la caspasi-3 clivata; (\*,  $p < 0.05$  vs. basal, #,  $p < 0.05$  saxa + palm vs. palm).

## 7. INDUZIONE DELL'AUTOFAGIA DA PARTE DEL PALMITATO NELLE hCPCs ED EFFETTI PROTETTIVI DELL'EXENDIN-4

Un altro meccanismo attraverso cui il palmitato è in grado di indurre tossicità cellulare è l'autofagia.

L'autofagia rappresenta il processo responsabile del reclutamento e della rimozione delle macromolecole citoplasmatiche danneggiate, nonché del mantenimento dell'omeostasi e della sopravvivenza cellulare (Nishida K. et al., Circ Res. 2008; Cao DJ et al., Hypertens Rep. 2009). Un'alterazione dei livelli di autofagia sia in eccesso che in difetto è responsabile della morte cellulare per necrosi o apoptosi (Nishida K. et al., Circ Res. 2008; Cao DJ et al., Hypertens Rep. 2009).

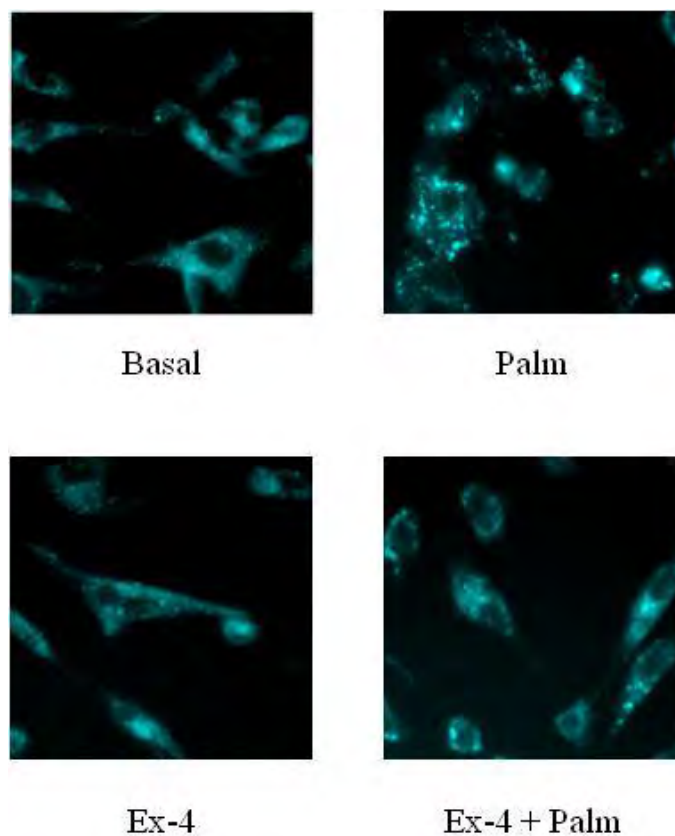
L'esposizione delle hCPCs al palmitato 0,25 mM per 16 h determina anche un incremento statisticamente significativo sia di BECN1 (Beclin-1) sia di LC3-II, due proteine coinvolte nell'induzione del flusso autofagico e nel processo di formazione dell'autofagosoma, rispettivamente ( $p < 0,05$  vs cellule non trattate, Fig. 9, A e B). La proteina LC3-II deriva dalla proteolisi e dalla lipidazione, in prossimità dell'estremità carbossiterminale, della proteina citoplasmatica LC3. La preincubazione con l'exendin-4 20 nM per 8 h riduce in maniera significativa i livelli di entrambe le proteine e quindi i livelli di autofagia ( $p < 0,05$  vs palmitato, Fig. 9, A e B).



**Fig. 9.** Induzione dell'autofagia da parte del palmitato ed effetti protettivi dell'exendin-4 nelle hCPCs isolate da soggetti normali. Valutazione dei livelli di Beclin-1 (A) ed LC3-II (B) dopo trattamento con palmitato, preceduto o meno dall'incubazione con exendin-4 20 nM per 8 h. (\*,  $p < 0,05$  vs cellule non trattate; #,  $p < 0,05$  vs palmitato).

La capacità del palmitato di indurre autofagia, nonché quella dell'exendin-4 di ridurla, è stata confermata mediante la marcatura *in vivo* dei vacuoli autofagici con monodansilcadaverina, apprezzata al microscopio a fluorescenza.

In seguito all'esposizione delle hCPCs al palmitato 0,25 mM per 16 h è possibile apprezzare la presenza di spot più luminosi indice della formazione degli autofagosomi (Fig.10). La preincubazione con l'exendin-4 comporta una riduzione del numero e della dimensione degli autofagosomi e quindi dei livelli di autofagia (Fig. 10).



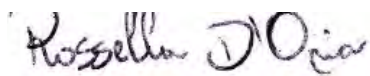
**Fig. 10.** Marcatura *in vivo* degli autofagosomi dopo trattamento con palmitato 0,25 mM per 16 h preceduto o meno dall'incubazione con exendin-4 20 nM per 8 h.

**INFORMAZIONI AMMINISTRATIVE ED ECONOMICHE SULLA BORSA DI STUDIO GIA' ASSEGNATA:** l'intero importo della borsa di studio è stato utilizzato per il pagamento del compenso e della copertura assicurativa della sottoscritta D'Oria Rossella.

**PRODOTTI SCIENTIFICI DERIVATI DAL PROGETTO DI RICERCA OGGETTO**

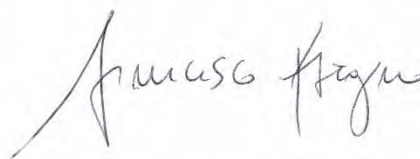
**DELLA BORSA DI STUDIO GIA' ASSEGNATA:** gran parte dei dati ottenuti con l'assegnazione della borsa di studio FO.DI.RI. 2015 sono oggetto di un articolo originale di D'Oria R. et al. dal titolo "GLP-1 receptor activation inhibits palmitate induced apoptosis via ceramide in human cardiac progenitor cells", sottomesso alla rivista internazionale *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, che è in fase di revisione.

Il borsista



---

Il responsabile del gruppo di ricerca



---