

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE**  
*INDIRIZZO IN SCIENZE CARDIOVASCOLARI*

**XX Ciclo**

**Coordinatore: Prof. Gianni Marone**

**TESI DI DOTTORATO**

**“ EMILINA 1, UNA GLICOPROTEINA DELLA MATRICE  
EXTRACELLULARE, È COINVOLTA NELL’OMEOSTASI  
PRESSORIA ATTRAVERSO LA MATURAZIONE DEL TGF- $\beta$ . ”**

TUTOR

**Chiar.mo**

Prof. Bruno Trimarco

CANDIDATO

Dott. Giulio Selvetella

# Indice

<b>1. Introduzione</b>	<b>pag.</b>	<b>5</b>
<b>2. Materiali e metodi</b>		
- 2.1 Animali	pag.	9
- 2.2 Valutazione della pressione arteriosa	pag.	9
- 2.3 Valutazione della struttura vascolare	pag.	10
- 2.4 Valutazione dell'elasticità vascolare	pag.	11
- 2.5 Valutazione della funzione cardiaca e delle resistenze vascolari periferiche	pag.	12
- 2.6 Plasmidi	pag.	12
- 2.7 Saggi Biologici su <i>Xenopus</i>	pag.	13
- 2.8 Colture Cellulari e Trasfezioni	pag.	13
- 2.9 Immunoprecipitazione e Blotting delle proteine	pag.	14
<b>3. Risultati</b>		
- 3.1 Caratterizzazione del fenotipo vascolare in topi mutati per Emilina-1	pag.	17
- 3.2 Emilina inibisce la segnalazione del TGF $\beta$ attraverso il dominio EMI	pag.	24
- 3.3 Emilina 1 inibisce la maturazione del pro-TGF- $\beta$ da parte delle furino-convertasi	pag.	29
3.4 Correzione del fenotipo ipertensivo dovuto alla mancanza di Emilina1 tramite riduzione del dosaggio del gene di TGF- $\beta$	pag.	41

## **Discussione**

- 4.1 Emilina1 è un antagonista del pro-TGF $\beta$	<b>pag. 49</b>
- 4.2 Meccanismo di azione di Emilina1	<b>pag. 50</b>
- 4.3 Richiesta in vivo di Emilina 1 come antagonista del TGF- $\beta$ per il controllo della pressione arteriosa	<b>pag. 52</b>
- 4.4 Il fenotipo mutante di Emilina1	<b>pag. 54</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>pag. 59</b>

# *1. Introduzione*

L'ipertensione arteriosa rappresenta un importante problema di salute pubblica, dal momento che è un fattore di rischio per malattie renali, cerebrali e coronariche e circa un terzo della popolazione adulta presenta elevati valori pressori (1).

L'ipertensione arteriosa è una complessa combinazione sia di fattori genetici che ambientali. Nonostante è stato osservato che circa il 30-50% dell'ipertensione arteriosa sia dovuta a fattori genetici, le basi molecolari di questa malattia rimangono ancora sconosciute.

L'incremento dei livelli di pressione arteriosa è comunemente dovuto ad un aumento della gittata sistolica e/o delle resistenze vascolari. Fino ad ora gli studi sulla patogenesi dell'ipertensione arteriosa si sono concentrati principalmente sul ruolo delle cellule muscolari lisce e di quelle endoteliali e poco sul ruolo rappresentato dalla matrice extracellulare.

Infatti, per lungo tempo si è pensato che le fibre elastiche, un'importante componente strutturale della matrice extracellulare, giocassero solo un ruolo passivo nelle alterazioni vascolari tipiche dell'ipertensione arteriosa. Recentemente l'uso di animali transgenici ha cambiato questo scenario, suggerendo il coinvolgimento delle fibre elastiche nella patogenesi dell'ipertensione arteriosa (2). In particolare, un precedente studio ha valutato il fenotipo cardiovascolare di topi con aploinsufficienza del gene dell'elastina ( $Eln^{+/-}$ ). Tale modello transgenico

ha mostrato alterazioni nell'emodinamica cardiovascolare e nella struttura della parete vascolare. I topi ( $Eln^{+/-}$ ) presentavano, infatti, elevati valori pressori dalla nascita. L'associazione tra l'ipertensione arteriosa con l'aploinsufficienza del gene dell'elastina suggerisce che come questa proteina anche altre proteine delle fibre elastiche possano, appunto, partecipare alla genesi dell'ipertensione arteriosa.

In questo studio abbiamo concentrato la nostra attenzione su una nuova proteina identificata nella matrice extracellulare, emilina 1. L'emilina 1 è una proteina multimodulare delle fibre elastiche che si trova all'interfaccia tra elastina e microfibrille (3). Emilina 1 riveste un ruolo importante nell'elastogenesi e nell'adesione delle cellule endoteliali e muscolari lisce alle fibre elastiche (4). Dal momento che l'emilina 1 è fortemente espressa nel sistema cardiovascolare durante lo sviluppo e nell'adulto (5), in questo studio abbiamo indagato un suo possibile coinvolgimento nel determinismo del fenotipo cardiovascolare stesso, grazie all'analisi di topi mutanti con inattivazione mirata del gene dell'emilina (4). Questa proteina è, inoltre, costituita da un'estremità terminale C1q importante per il legame alle integrine e da un'estremità ricca in residui di cisteina che costituisce il cosiddetto dominio EMI (5). Partendo, quindi, dall'osservazione che la segnalazione tramite fattori di crescita è regolata da domini ricchi di cisterna di alcune molecole secrete (6) e che le proteine della matrice extracellulare contengono talora dei

domini con un'attività modulatoria (7), abbiamo valutato se anche l'emilina interagisce tramite il suo dominio EMI con fattori di crescita, in particolare il TGF- $\beta$ , per svolgere le sue funzioni.

Il TGF- $\beta$  è, infatti, un fattore chiave sia nello sviluppo che nella fisiopatologia dei vasi sanguigni (8) Le proteine TGF- $\beta$  sono sintetizzate come precursori (proTGF- $\beta$ ) che sono scissi da proteine convertasi (9-10). Questo processo determina la generazione di un complesso dal quale il TGF- $\beta$  maturo deve essere rilasciato per poter interagire con il suo recettore. E' degno di nota il fatto che soltanto una piccola parte di tutto il TGF-  $\beta$  prodotto dalle cellule è reso disponibile per la traduzione del segnale intracellulare. E' sorprendente come si conosca poco sulle molecole che governano tali processi di regolazione del TGF-  $\beta$ .

Scopo del nostro studio è stato, quindi, quello di valutare il ruolo di Emilina-1 nell'omeostasi cardiovascolare e di caratterizzare eventuali meccanismi molecolari implicati in tale processo che coinvolgano la regolazione del TGF- $\beta$ .

## *2. Materiali e Metodi*

## *2.1 Animali*

La generazione di topi con l'inattivazione del gene di Emilina-1 è stata effettuata come precedentemente descritto (4).

I topi con mutazione del gene TGF- $\beta$ 1 su un background misto SvEv129 x C57BL/6 sono stati forniti dal Dott. Roberts (*National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*). Questi topi sono stati accoppiati con quelli Emilina-1<sup>-/-</sup> derivati da incroci del ceppo C57BL/6CrIBR.

I topi Emilina-1<sup>-/-</sup> (KO) e Emilina-1<sup>+/+</sup> (WT) che portano anche un gene reporter sensibile alla segnalazione del TGF- $\beta$  sono stati generati tramite appropriati incroci tra topi Emilina-1<sup>-/-</sup> e transgenici per CAGA12/GFP.

I topi con mutazione ipomorfica *mgR* del gene della Fibrillina1 sono stati forniti dal Dott. F. Ramirez.

## *2.2 Valutazione della pressione arteriosa*

La pressione arteriosa è stata valutata in modo non invasivo tramite tail-cuff. L'analisi con radiotelemetria è stata effettuata incannulando, in anestesia, l'arteria femorale sinistra di topi con un catetere di 0,4mm di diametro collegato ad un dispositivo di radiotelemetria (TA11PA-C20, Data Science International) fissato sottocute. Dopo un periodo di 7 giorni, sono state monitorate pressione arteriosa e frequenza cardiaca in

modo continuo sei volte al giorno per 20 giorni. I valori medi sono stati calcolati con il software DQ ART 1.1 Gold (Data Science International).

### *2.3 Valutazione della struttura vascolare*

L'aorta ascendente, l'arteria mesenterica e le carotidi prive di connettivo e tessuto adiposo sono state posizionate su un miografo (Mulvany) (11-12).

In particolare, sono state espianate arterie mesenteriche corrispondenti alla seconda branca, aventi diametro medio di circa 140-200  $\mu\text{m}$  e circa 2 mm di lunghezza. Nel lume di tali vasi sono stati inseriti due fili metallici del diametro di 40  $\mu\text{m}$ . Il tempo totale di espianto e preparazione è di circa 45 minuti. I vasi sono stati equilibrati per almeno 30 minuti in soluzione di Krebs (NaCl 119 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24 mM, KCl 4,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,17 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM e Glucosio 5,5 mM) mantenuta costantemente a 37°C facendovi gorgogliare una miscela di 5% CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub>. Successivamente, il miografo è stato posizionato su un microscopio con videocamera connessa ad un sistema computerizzato che permette la valutazione funzionale e strutturale del vaso. Successivamente, i vasi sono stati sottoposti ad una tensione pari a 0,1N/m e dopo un periodo di circa due ore, necessario per far

raggiungere al vaso le condizioni ottimali, sono stati misurati i seguenti parametri: *spessore dell'intera parete (WT), spessore della media (MT), spessore dell'avventizia, spessore dell'intima (IT), diametro interno (ID), rapporto media/lume (M/L) ed MCSA.*

Il diametro vascolare è stato valutato anche *in vivo*, mediante ecografia dell'aorta ascendente. L'analisi ecocardiografica è stata effettuata usando un trasduttore di immagini alla frequenza di 7,5 MHz (*HP Sonos 100, Hewlett Packard Co*) o 30 MHz (*Vevo770, Visualsonics Inc.*) (13).

Inoltre, il calibro dell'intera struttura vascolare è stato valutato mediante esame angiografico. I topi sono stati anestetizzati con tribromoetano (14) ed è stata incannulata l'arteria carotide destra. Nel ventricolo sinistro è stato iniettato un mezzo di contrasto (Iohexolo, 30mg I/ml) ed è stata acquisita un'immagine in tempo reale attraverso angiografia digitale (*OEC 9800, General Electric*) ed un sistema di registrazione video.

#### *2.4 Valutazione dell'elasticità vascolare*

Per valutare l'elasticità vascolare, arterie carotidi sono state posizionate su un miografo di pressione (*Mulvany + Biopac system, inc.*), posizionato su un microscopio invertito (*Zeiss*) e connesso ad un dispositivo con telecamera e ad un computer. Tale sistema ha permesso di determinare il diametro esterno ed interno del vaso a livelli crescenti di pressione. La pressione all'interno del vaso è stata aumentata progressivamente da 20 a

200 mmHg. L'elasticità è stata calcolata usando la seguente formula:  
elasticità ad una data pressione (p) = ([diametro a (p + 25 mmHg) –  
diametro a (p – 25 mmHg)] / [diametro a (p – 25 mmHg)]) x 100.

### *2.5 Valutazione della funzione cardiaca e delle resistenze vascolari periferiche*

La funzione cardiaca è stata valutata, in topi anestetizzati con tribromoetano sia mediante esame ecocardiografico sia invasivamente mediante l'utilizzo di catetere Millar (13).

In particolare, un catetere tetrapolare pressione/volume (*Millar 1.4 F, SPR 671, Millar Instruments, Inc., USA*) è stato inserito nel ventricolo sinistro attraverso l'incannulazione dell'arteria carotide di destra. Quindi è stata calcolata la resistenza periferica totale (TPR) dividendo la pressione arteriosa media (MAP), registrata contemporaneamente attraverso l'introduzione di un catetere riempito di liquido nell'arteria femorale, per la gittata cardiaca.

### *2.6 Plasmidi*

I plasmidi pCS2-TGF- $\beta$ 3 sono stati generati tramite PCR come precedentemente descritto (15). Il cDNA di Emilina1 è stato clonato usando RT-PCR e inserito nel plasmide pCS2; il dominio EMI è stato

generato suclonando la porzione N-terminale (aminoacidi 1-230) dell'Emilina 1 cDNA . L'EMI dominio-GPI è una versione del dominio EMI (aa 28-231) fuso all'estremità N-terminale al peptide Chordin (16). Emilina1 $\Delta$ EMI manca degli aminoacidi 57-143. Emilina 1-KDEL è stata generata tramite PCR introducendo un segnale di ritenzione nel RE-Golgi all'estremità C terminale del cDNA di Emilina1 (17).

### *2.7 Saggi Biologici su Xenopus*

Le manipolazioni su embrioni di *Xenopus*, la preparazione dei capped mRNA, e tutte le ibridazioni in situ sono state condotte come descritto in un precedente lavoro (15).

### *2.8 Colture Cellulari e Trasfezioni*

Per i saggi con luciferasi, Cellule HEK293T sono state trasfettate con i plasmidi indicati usando la Lipofectamine2000 (Invitrogen); i fibroblasti embrionici (MEFs) di topi WT e KO per Emilina1 sono stati trasfettati usando LipofectAMINE PLUS (Invitrogen). Il plasmide pCMV-lacZ è stato utilizzato per normalizzare l'efficienza di trasfezione.

Per gli esperimenti di Figura 3I e 3K, le cellule sono state incubate con decanoil-RVKR-clorometilchetone (Alexis) 100 $\mu$ M, aggiungendo il

composto ogni 12 ore, mentre i controlli sono stati trattati con il solo veicolo.

Per gli esperimenti mostrati in figura 3C, le cellule MEFs sono state incubate con SB431542 (Tocris) 5 $\mu$ M per 48 ore in DMEM arricchito con il 2% di FBS. Per gli esperimenti in Figura 3D e 3M, le cellule MEFs sono state incubate con SP600125 (Calbiochem) 20 $\mu$ M per 48 ore in DMEM arricchito con FBS. Per gli esperimenti di mescolamento cellulare, le cellule Stimolatrici e Rispondenti sono state trattate con tripsina e poi mescolate insieme e ripiastrate (per le cellule MEFs Stimolatrici in Figura 3M, dopo mescolamento, sono state poste in coltura in un mezzo privo di farmaco). Dopo 36 ore in DMEM arricchito con FBS 0,1% (cellule HEK293T) o dopo 18 ore in DMEM arricchito con FBS 2% (cellule MEFs), le cellule sono state recuperate per il saggio con la luciferasi. Ogni campione è stato trasfettato in triplicato, e ogni esperimento è stato ripetuto almeno due volte.

### ***2.9 Immunoprecipitazione e Blotting delle proteine***

Le cellule HEK293T sono state trasfettate con il metodo del fosfato di calcio. Tali cellule sono poi state trasferite in una soluzione di inibitori di proteasi a 0°C composta da Tris pH 7,5 25mM, NaCl 150mM, EDTA 2,5mM, Glicerolo al 10%, NP40 1% (Roche); l'NP40 è stato diluito allo 0,1% per somministrazione IP. Dove indicato, sono stati aggiunti 150ng

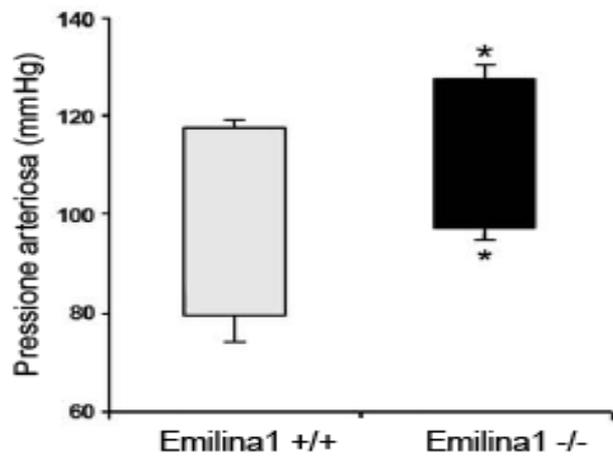
di LAP (R&D) ricombinante purificato per avere un lisato prima della IP (15). Per il Western Blotting, i campioni proteici sono stati risolti in condizioni riducenti e non riducenti tramite SDS-PAGE e trasferiti su membrane PVDF (18).

### *3. Risultati*

### *3.1 Caratterizzazione del fenotipo vascolare in topi mutati per Emilina-1*

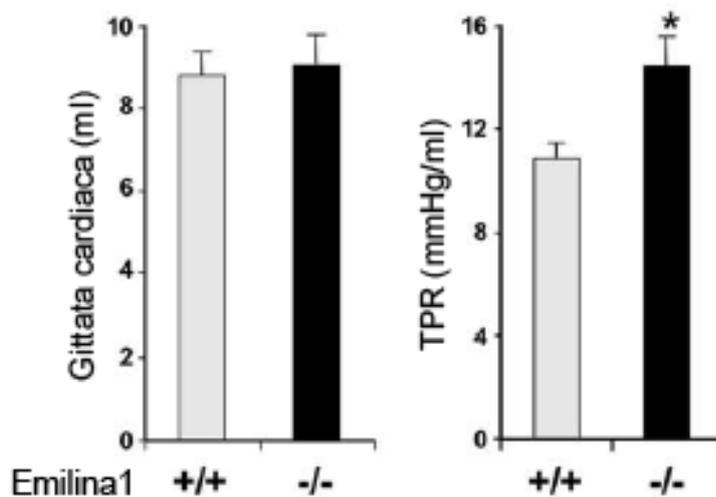
Come osservato precedentemente i topi Emilina 1<sup>-/-</sup> presentano un normale sviluppo embrionale ed appaiono morfologicamente normali (4).

I nostri risultati dimostrano che la pressione arteriosa è significativamente aumentata nei topi KO rispetto ai topi WT, sia valutandola in maniera non invasiva (pressione sistolica [SBP]:  $120 \pm 2$  vs  $101 \pm 1$ , n=46 per gruppo,  $p < 0,01$ ) sia invasivamente con radiotelemetria, che permette di misurare anche i livelli di pressione arteriosa diastolica (Fig. 1A). Interessantemente, topi eterozigoti per Emilina-1 mostrano una pressione arteriosa intermedia tra quella dei wild-type e quella dei knock-out, dimostrando un'aploinsufficienza del gene di Emilina-1 per questo fenotipo. L'incremento di pressione arteriosa è osservabile in tutti gli animali studiati (penetranza del 100%) ed a tutte le età.



**Figura 1 (A).** Pressione diastolica e sistolica valutata con radiotelemetria in topi svegli Emilina-1<sup>+/+</sup> ed Emilina-1<sup>-/-</sup> (n=3 per gruppo). \*p<0,05 rispetto a topi WT. Dati mostrati come media ± ESM.

Per valutare se l'incremento della pressione arteriosa dipendesse da un aumento della funzione cardiaca, abbiamo misurato la gittata cardiaca in topi KO e nei loro rispettivi controlli WT con un catetere tetrapolare pressione/volume.



**Figura 1 (B).** Gittata cardiaca e resistenza periferica totale (TPR) valutata in topi WT e KO per Emilina-1 misurata tramite catetere Millar (n=7 per gruppo).

\*p<0,05 vs topi WT. Dati presentati come media  $\pm$  ESM.

Come mostra la figura 1B, la gittata cardiaca è simile in entrambi i gruppi di topi. Quest'ultima evidenza è inoltre sostenuta da misurazioni di una serie di parametri ecocardiografici ed emodinamici riguardanti la funzione e la struttura cardiaca, che non mostrano alcuna differenza tra i due gruppi di animali (Tabella 1).

**Tabella 1**

Parametri (unità di misura)	Topi di 2-5 mesi di età		Topi di 14 mesi di età	
	Emilina1 <sup>+/+</sup>	Emilina1 <sup>-/-</sup>	Emilina1 <sup>+/+</sup>	Emilina1 <sup>-/-</sup>
BW (g)	24,6 $\pm$ 0,76	24,3 $\pm$ 0,58	24,1 $\pm$ 0,76	23,8 $\pm$ 0,41
LVM (g)	66,7 $\pm$ 1,8	66,5 $\pm$ 4,2	84,6 $\pm$ 1,5	114,7 $\pm$ 7,8
HR (battiti al minuto)	531 $\pm$ 20	517 $\pm$ 17	511 $\pm$ 18	517 $\pm$ 17
LVEDD (mm)	3,2 $\pm$ 0,05	3,36 $\pm$ 0,07	3,45 $\pm$ 0,09	3,55 $\pm$ 0,04
LVESD (mm)	1,37 $\pm$ 0,01	1,41 $\pm$ 0,01	1,59 $\pm$ 0,03	1,73 $\pm$ 0,07
IVSTD (mm)	0,68 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,02	0,91 $\pm$ 0,03*
PWTD (mm)	0,68 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,02	0,91 $\pm$ 0,03*
FS%	57,2 $\pm$ 0,5	57,9 $\pm$ 0,6	54,2 $\pm$ 0,5	51,2 $\pm$ 1,4
EDV ( $\mu$ l)	49,6 $\pm$ 1,6	53,5 $\pm$ 2,1	N.D.	N.D.
ESV ( $\mu$ l)	37,2 $\pm$ 1,4	40,7 $\pm$ 1,3	N.D.	N.D.
dP/dt <sub>MAX</sub>	14380 $\pm$ 891	13103 $\pm$ 520	N.D.	N.D.
dP/dt <sub>MIN</sub>	10837 $\pm$ 808	10926 $\pm$ 708	N.D.	N.D.
$\tau$ (Glanz) (ms)	7,35 $\pm$ 0,7	7,3 $\pm$ 0,6	N.D.	N.D.

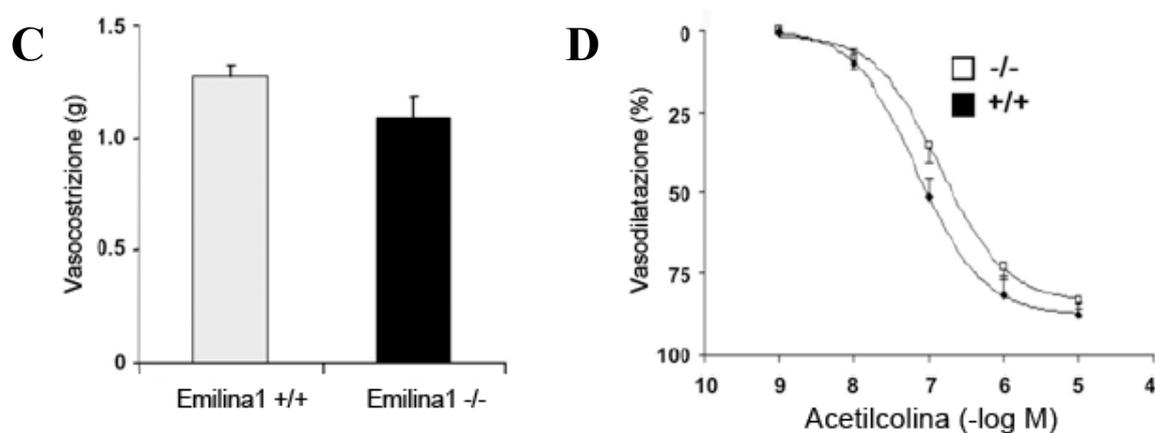
**Abbreviazioni:** BW, peso corporeo; LVM, massa ventricolare sinistra; HR, frequenza cardiaca; LVEDD, diametro del ventricolo sinistro a fine diastole; LVESD,

diametro del ventricolo sinistro a fine sistole; IVSTD, spessore del setto interventricolare a fine diastole; PWTD, spessore della parete posteriore a fine diastole; FS frazione di accorciamento percentuale; EDV, volume a fine diastole; ESV, volume a fine sistole;  $dp/dt_{MAX}$ , derivata massima della pressione ventricolare rispetto al tempo;  $dp/dt_{MIN}$ , derivata minima della pressione ventricolare rispetto al tempo;  $\tau$  (Glanz), costante temporale mono-esponenziale di rilassamento.

Al contrario, le resistenze vascolari sono significativamente aumentate nei topi KO per Emilina-1, suggerendo che il fenotipo ipertensivo possa essere, così, attribuito ad anomalie vascolari (Figura 1B).

Per valutare, quindi, se l'aumento delle resistenze vascolari dipendesse da alterazioni della reattività vascolare, arterie mesenteriche ed aorte sono state stimulate con sostanze vasoattive quali il potassio e l'acetilcolina.

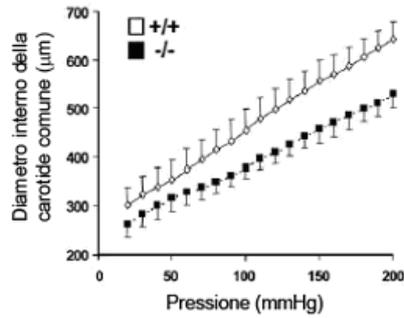
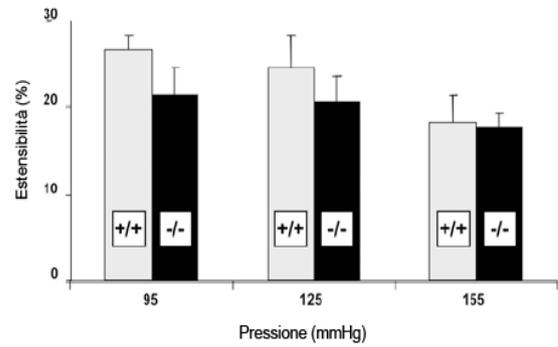
I nostri risultati evidenziano che, sia la vasocostrizione indotta dal potassio sia la vasodilatazione evocata dall'acetilcolina risultano sovrapponibili tra i due ceppi (Fig. 1C e 1D), dimostrando, quindi, che l'aumento delle resistenze periferiche osservato nei topi KO non dipende da una anomala reattività vascolare.



**Figura 1.** (C) Contrazione di aorte di topi WT e KO con KCl 80mM (n=12 per gruppo). (D) Vasodilatazione ottenuta con acetilcolina in aorte di topi Emilina1<sup>+/+</sup> (quadrati neri) e Emilina1<sup>-/-</sup> (quadrati bianchi) precostrette con fenilefrina all'80% della costrizione massima del KCl (n=12 per gruppo). Dati presentati come media ± ESM.

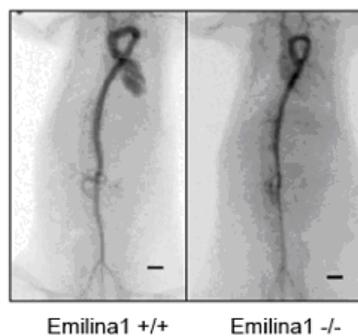
La rigidità delle arterie può essere un'altra possibile causa di ipertensione arteriosa (19). Pertanto, le proprietà meccaniche di arterie di grosso calibro sono state caratterizzate nei topi con ablazione di emilina1 per verificare la presenza di una qualsiasi anomalia vascolare. E' stata valutata, così, la distensibilità vascolare indotta da crescenti livelli di pressione in due differenti tipi di arterie quali l'aorta e le carotidi montati su un miografo nei topi WT e KO.

I nostri risultati mostrano come l'incremento del diametro dei vasi dei due topi in studio durante livelli crescenti di pressione risulti sovrapponibile (fig. 1E e 1F).

**E****F**

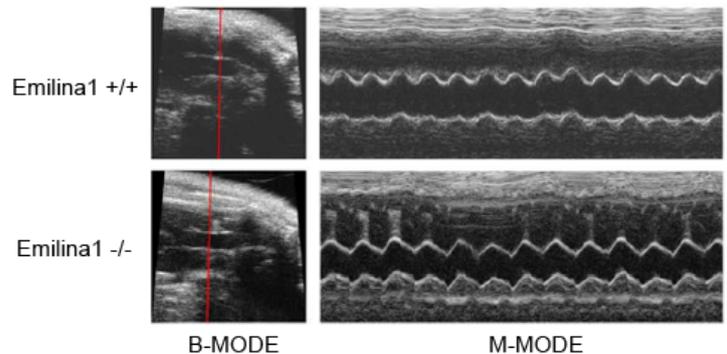
**Figura 1 (E)** Relazione pressione-diametro interno per l'arteria carotide comune di topi WT (quadrati bianchi) e KO (quadrati neri). Le arterie sono state poste su un sistema di pressione Mulvany e sottoposte a livelli crescenti di pressioni (n=6 per gruppo). **(F)** Estensibilità dell'arteria carotide di topi *Emilina1*<sup>+/+</sup> e *Emilina1*<sup>-/-</sup>.

Questa stessa analisi ha evidenziato una significativa riduzione del diametro dei vasi dei topi con ablazione del gene di *Emilina1* rispetto ai controlli ad ogni valore di pressione applicata (figura 1E). Questi dati sono stati confermati dall'analisi angiografica dell'albero vascolare e dall'analisi ecocardiografica in vivo dell'aorta ascendente dei topi WT e KO (figura 1 G-I)

**G**

Emilina1 +/+

Emilina1 -/-

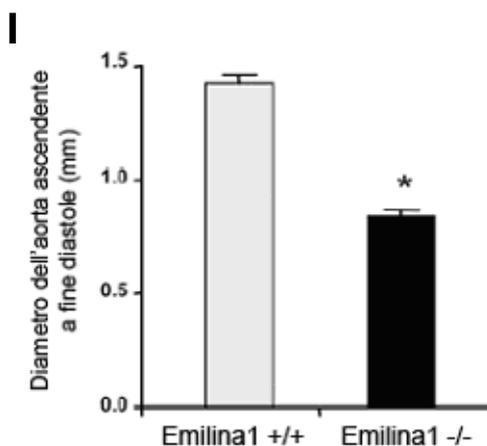
**H**

Emilina1 +/+

Emilina1 -/-

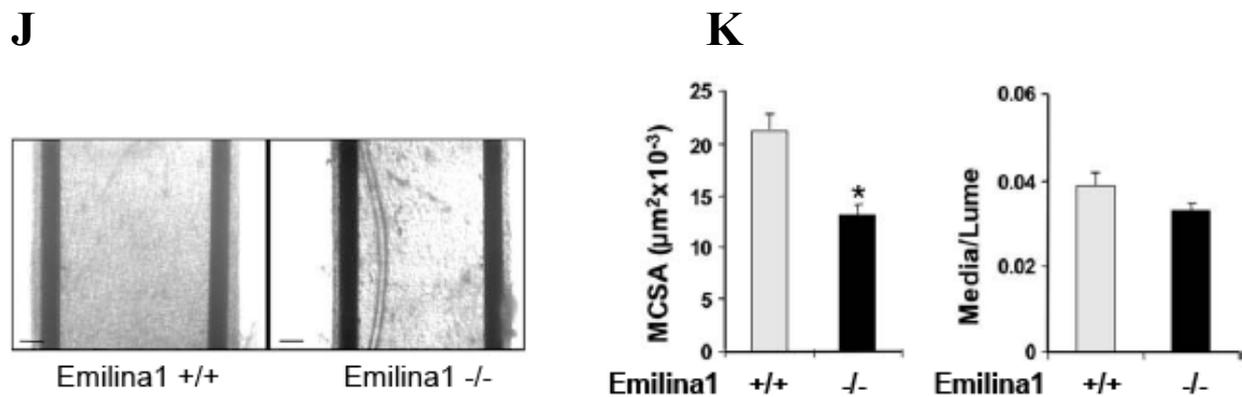
B-MODE

M-MODE



**Figura 1. (G)** Immagine angiografica rappresentativa dell'albero vascolare di topi WT e KO (n=3 per gruppo). **(H)** Riduzione del diametro dell'aorta ascendente nei topi mutanti per Emilina-1 rilevata tramite ecocardiografia. Pannelli a sinistra: immagine ecografia in B-MODE (immagine bidimensionale) che evidenzia la posizione della linea di riferimento. Pannelli a destra: immagini in M-MODE (monodimensionali) relative alle sezioni selezionate in B-MODE. **(I)** Valutazione quantitativa della riduzione del diametro dell'aorta ascendente in topi mutanti per Emilina-1 ottenuta tramite esame ecocardiografico (Figura 10C). \*p<0,01 vs WT (n=6 per gruppo).

Dal momento che i piccoli vasi sono i principali determinanti delle resistenze periferiche e dell'omeostasi pressoria, l'analisi delle dimensioni vascolari è stata estesa ai vasi di resistenza. Abbiamo, quindi, osservato, che il diametro delle arterie mesenteriche è ridotto nei topi Emilina KO rispetto ai WT ( $351 \pm 23$  mm vs  $429 \pm 21$  mm, n = 5 per gruppo, p <0.05) (figura 1 J), suggerendo che la riduzione del diametro dei vasi coinvolga tutti i vasi. Inoltre, abbiamo dimostrato come l'assenza di Emilina-1 realizzi un'architettura distintiva dei vasi di resistenza con una globale riduzione delle loro dimensioni, sia nel lume sia nello spessore della media (figura 1 K).



**Figura 1.(J)** Immagini di arterie mesenteriche da topi controllo e Emilina KO montati sul miografo che mostrano una riduzione del diametro dei vasi dei KO. **(K)** Valutazione dell'area della media in sezione trasversale (MCSA) e del rapporto media/lume (M/L) in arterie mesenteriche di topi WT e KO (n=5 per gruppo). \*p<0,05 vs WT.

Alla luce di tali evidenze possiamo dire che l'assenza di Emilina-1 non condiziona la performance cardiaca e l'estensibilità delle arterie. Al contrario, induce una riduzione generalizzata del diametro dei vasi, un aumento delle resistenze periferiche e quindi ipertensione arteriosa.

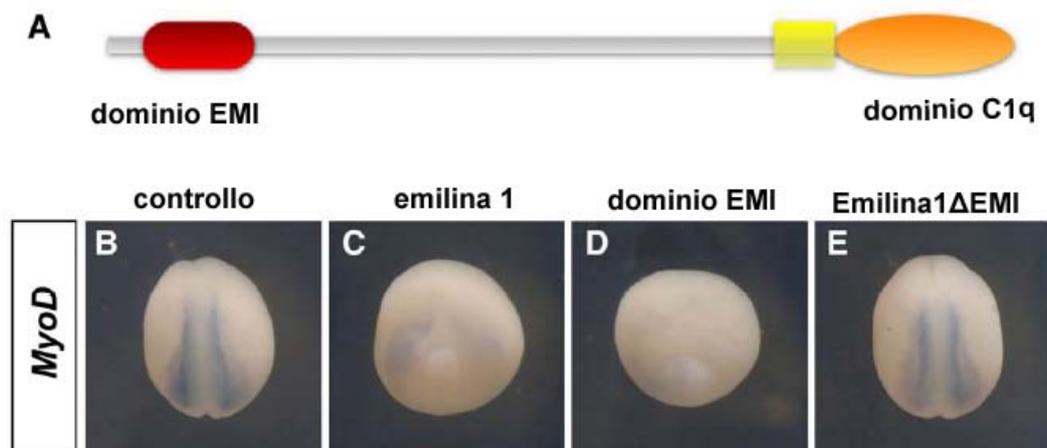
### *3.2 Emilina inibisce la segnalazione del TGF $\beta$ attraverso il dominio EMI*

Per chiarire il meccanismo con cui Emilina 1 controlla il sistema vascolare, ci siamo concentrati sulla struttura primaria della proteina. Emilina 1 è una proteina multimodulare. In particolare essa è costituita

da un'estremità terminale C1q e da un'estremità N-terminale ricca in residui di cisteina che costituisce il cosiddetto dominio EMI (figura 2A). Mentre è noto che l'estremità C-terminale è coinvolta nell'oligomerizzazione di Emilina 1 e nell'adesione cellulare (20), poco si sa sulla funzione del dominio EMI.

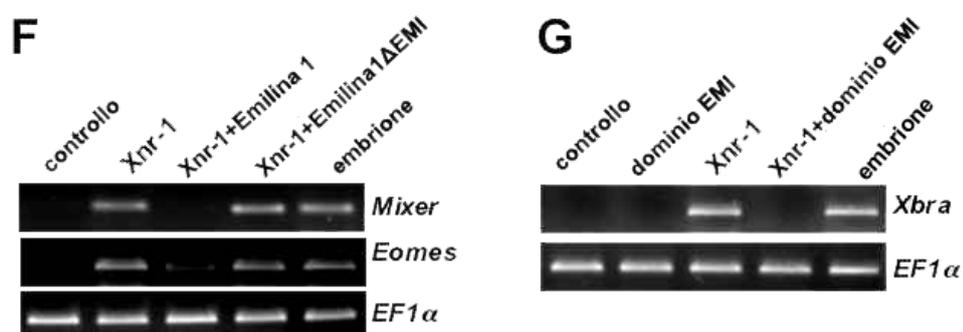
La segnalazione dei fattori di crescita è regolata da molecole con domini ricchi in residui di cisteina, tipicamente ritrovati anche in vari componenti della matrice extracellulare (15). Così abbiamo indagato se Emilina 1 potesse modulare l'attività di un fattore di crescita attraverso il suo dominio EMI. A questo scopo abbiamo utilizzato embrioni di *Xenopus* per studiare la segnalazione e l'attività biologica di Emilina 1 nei confronti di TGF- $\beta$  endogeno ed ectopico. Gli embrioni sono stati iniettati con mRNA di Emilina 1 sintetico e sono stati monitorati per osservare lo sviluppo di una qualsiasi anomalia morfologica. La gastrulazione degli embrioni iniettati con Emilina 1 viene ritardata. A livello molecolare gli embrioni iniettati mostrano una ridotta espressione di MyoD (un marcatore del mesoderma parassiale) come dimostrato dall'ibridazione in situ allo stadio di neurula (figura 2B-2E). È interessante che questo effetto biologico è determinato dal dominio EMI, dal momento che si verifica dopo l'iniezione di mRNA che codifica per il solo dominio EMI (figura 2D), e non dopo iniezione di mRNA di una molecola di Emilina con la delezione del dominio EMI (Emilina $\Delta$ EMI)

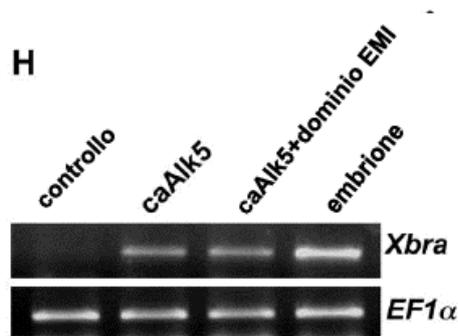
(figura 2E). Inoltre l'overespressione del dominio EMI a dosi elevate (>1 ng) causa l'inibizione dello sviluppo del mesoderma, blocca la gastrulazione e causa lo sviluppo di embrioni con severa riduzione della testa e del tronco. E' importante che questi effetti sono simili a quelli ottenuti negli embrioni con iniezione di mRNA che codifica per antagonisti di Nodal, un membro della famiglia del TGF- $\beta$ , come Cerberus Short (15) o con mRNA che codifica per il dominante negativo del TGF- $\beta$  o un suo mutante che non ne permette il clivaggio (21).



**Figura 2.**(A) Rappresentazione schematica della struttura di Emilina1; (B-E) L'overespressione di Emilina 1 attenua lo sviluppo mesodermico in embrioni di *Xenopus* attraverso il dominio EMI. Espressione del marcatore del mesoderma parassiale MyoD tramite ibridazione in situ. Embrioni di *Xenopus* iniettati con mRNA di Emilina 1 (C), con mRNA che codifica per il solo dominio EMI (D), con mRNA di Emilina con delezione del dominio EMI (Emilina $\Delta$ EMI) (E).

Queste osservazioni hanno generato l'ipotesi che Emilina agisse tramite il suo dominio EMI come un inibitore dell'attività del TGF- $\beta$ . Per verificare questa ipotesi, abbiamo per prima cosa valutato gli effetti dell'espressione di Emilina 1, Emilina  $\Delta$  EMI e del dominio EMI sulla risposta genica indotta da Nodal (Xnr-1). Come mostrato nelle figure 2F e 2G, l'induzione dei marcatori mesodermici Xbra, Eomes e Mixer determinata dall'mRNA di Xnr-1 è antagonizzata dall'iniezione simultanea dell'mRNA di Emilina 1 o del dominio EMI ma non dall'iniezione dell'RNA di Emilina  $\Delta$ EMI. E' interessante che Emilina 1 non sia in grado di inibire la risposta genica indotta da una forma costitutivamente attiva del recettore del TGF- $\beta$  (figura 2H), suggerendo che Emilina 1 agisce ad un livello superiore rispetto all'interazione del ligando stesso con il suo recettore.

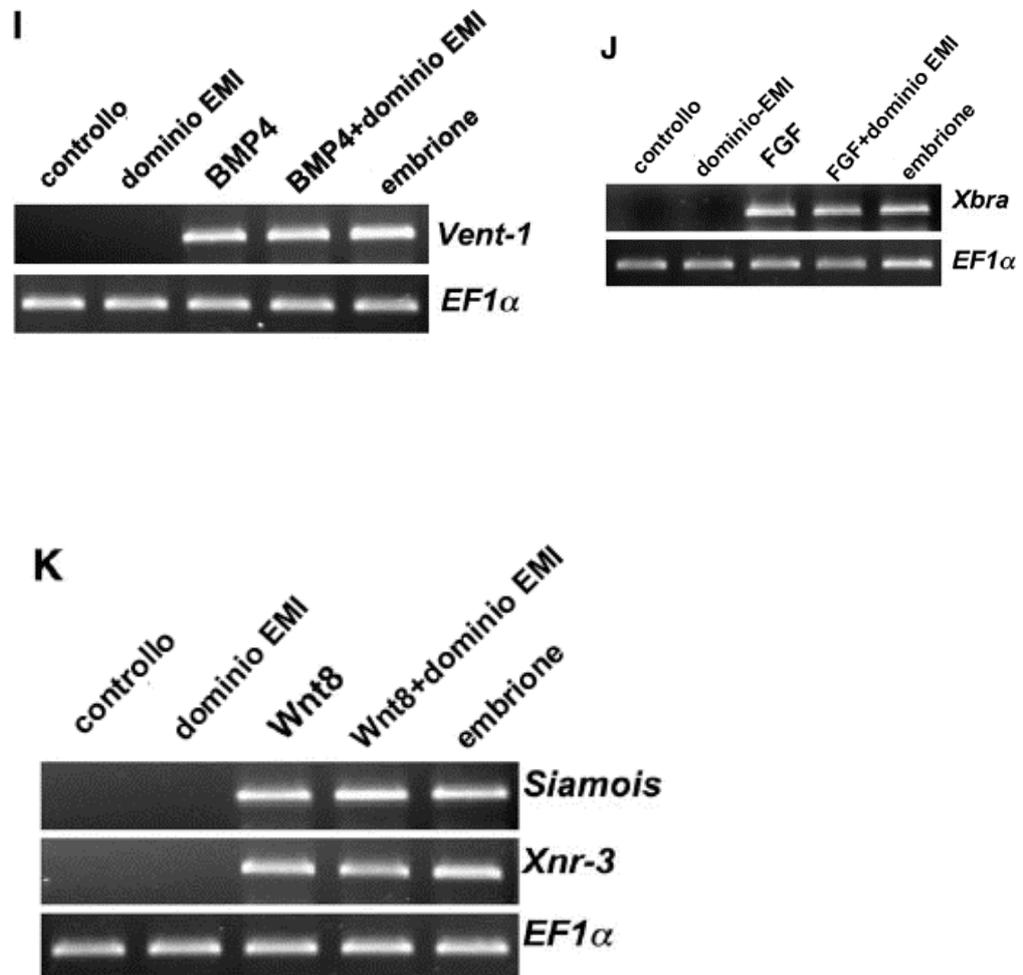




**Figura 2.(F-G)** Emilina 1 inibisce la segnalazione Nodal/TGF $\beta$  tramite il dominio EMI. RT-PCR di embrioni iniettati con gli mRNA indicati. **(F)** L'attivazione dei marcatori del mesoderma Eomes e Mixer da parte dell'mRNA di Xnr-1 è antagonizzata dall'mRNA di Emilina 1 ma non di Emilina1 $\Delta$ EMI. **(G)** L'overespressione dell'mRNA del dominio EMI è sufficiente ad inibire la l'induzione mesodermica dall'iniezione contemporanea di Xnr-1. **(H)** RT-PCR di embrioni iniettati con l'mRNA di un recettore costitutivamente attivo di TGF- $\beta$  tipo I (Alk5) da solo o in combinazione con l'mRNA del dominio EMI. Emilina 1 agisce prima dell'attivazione del recettore del TGF- $\beta$ .

Il fenotipo determinato dal dominio EMI e dall'overespressione di Emilina 1 potrebbe essere compatibile con effetti aggiuntivi su altre segnalazioni che regolano lo sviluppo mesodermico, così come quelle attivate dai fattori di crescita BMP, FGF e Wnt. Per verificare questa ipotesi, abbiamo osservato tramite RT-PCR la risposta genica indotta dall'iniezione degli mRNA di BMP2, eFGF o Wnt8 in assenza o presenza dell'iniezione simultanea dell'mRNA del dominio EMI di Emilina 1. Come mostrato in figura 2I-2K, il dominio EMI non è capace di inibire l'effetto di tali citochine.

Possiamo così concludere che Emilina 1 è un nuovo specifico antagonista del TGF- $\beta$ .

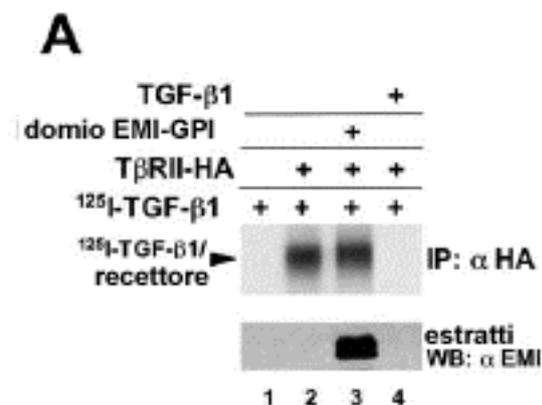


**Figura 2.(I-K)** Gli embrioni sono iniettati come in figura (F) con l'mRNA del dominio EMI in combinazione con gli mRNA di BMP2, eFGF o Xwnt8 e poi sono stati analizzati con RT-PCR per i marcatori indicati. EF1α funziona da controllo.

### *3.3 Emilina 1 inibisce la maturazione del pro-TGF-β da parte delle furino-convertasi*

Emilina 1 può inibire il TGF-β tramite diversi meccanismi. Per prima cosa potrebbe interferire con la secrezione o la maturazione del TGF-β;

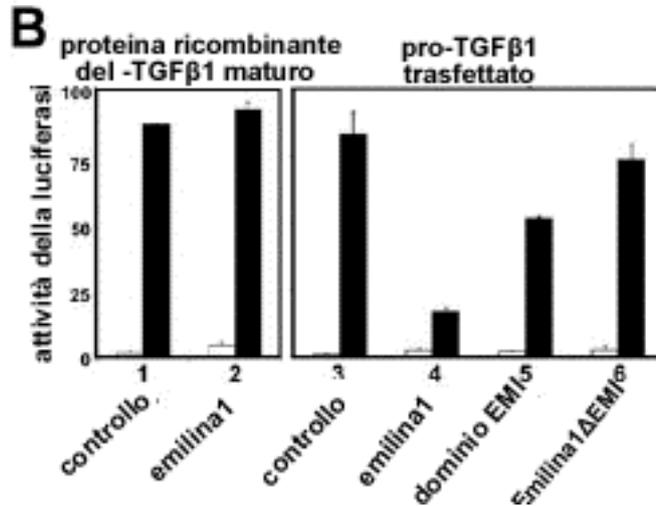
secondo, potrebbe prevenire la presentazione o l'interazione del TGF- $\beta$  con i propri recettori; terzo, potrebbe agire sequestrando sia le forme immature che mature del TGF- $\beta$ . Per verificare se il dominio EMI antagonizza la segnalazione del TGF- $\beta$  prima dell'interazione con il recettore, abbiamo utilizzato dei saggi contenenti recettori marcati con radioattivo in colture monostrato di cellule HEK293T trasfettate con il plasmide di espressione del recettore del TGF- $\beta$  tipo II legato con HA in presenza o in assenza di un plasmide che codifica per una versione del dominio EMI legato al GPI. Il TGF- $\beta$ 1 marcato con  $I^{125}$  è stato aggiunto alle cellule trasfettate e poi lavato; il ligando complessato è stato incrociato con DSS e dopo immunoprecipitato con anticorpi anti-HA. Come mostrato in figura 3A, il TGF- $\beta$ 1 non marcato compete con il legame del TGF- $\beta$ 1 marcato con  $I^{125}$ , mentre il dominio EMI non compete.



**Figura 3.(A)** Il dominio EMI non compete con il TGF $\beta$ 1 radiomarcato per il legame al recettore tipo II del TGF $\beta$ . TGF  $\beta$ 1 non marcato, ma non il dominio EMI, inibisce la formazione del complesso.

Per dimostrare ulteriormente se il dominio EMI possa antagonizzare l'attività del TGF-  $\beta$  maturo senza competere con il suo recettore, abbiamo concentrato il dominio EMI solubile dal soprannatante di cellule HEK293T trasfettate ed abbiamo verificato la sua capacità di inibire l'attivazione della luciferasi PAI-1 da parte del TGF-  $\beta$ 1 in cellule di polmone di visone. Sorprendentemente, abbiamo trovato che l'induzione di PAI-1 luciferasi (lux) da parte di TGF-  $\beta$ 1 non viene influenzata dalla presenza di elevate concentrazioni del dominio EMI. Risultati simili sono stati osservati dopo l'overespressione dell'intera proteina di Emilina1 da un plasmide transfettato: come mostrato in figura 3B, l'induzione della CAGA12-luciferasi (CAGA12-lux), usata per evidenziare Smad, da proteine ricombinanti di TGF-  $\beta$ 1 maturo è simile in cellule che esprimono Emilina 1 o un cDNA di controllo (figura 3B, linea 1 e 2); in contrasto, tuttavia, Emilina 1 è altamente abile ad inibire l'induzione di CAGA-12 lux da parte di un plasmide di espressione del TGF-  $\beta$ 1 cotrasfettato (ad esempio, codificante per il proTGF-  $\beta$ 1 C223S/C225S biologicamente attivo) (figura 3B, linea 3 e 4). Questo effetto è specifico e dipendente dal dominio EMI, poiché Emilina1 $\Delta$ EMI non ha effetto e la trasfezione del solo dominio EMI ha un'attività

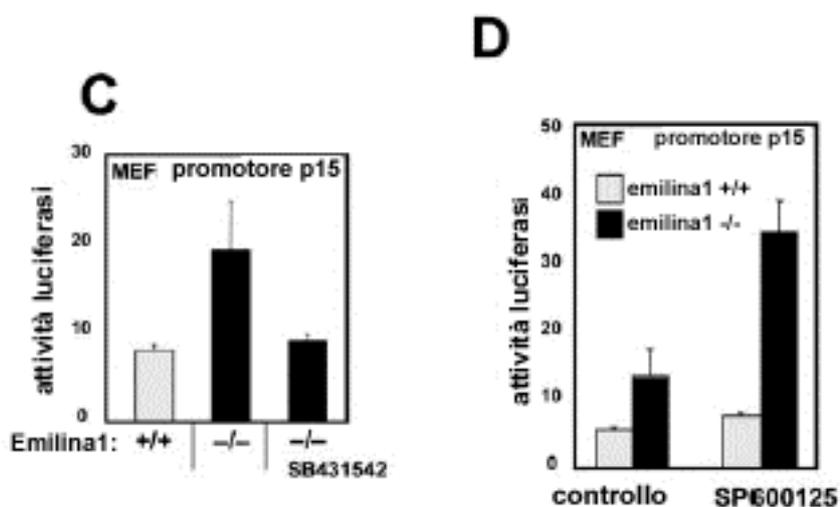
simile, sebbene più debole, di quella dell'Emilina1 completa (figura 3B, linea 5 e 6).



**Figura 3.(B)** L'inibizione della segnalazione del TGFβ1 dipende dal dominio EMI. Emilina1 non può antagonizzare il TGFβ1 maturo.

Per avvalorare tali conclusioni, in condizioni ancora più fisiologiche, abbiamo paragonato la risposta del TGF-β naturale in una coltura primaria di fibroblasti embrionali di topo (MEF) normali e mutanti per Emilina1. A tal proposito, abbiamo usato il promotore di CDK-inhibitor  $p15^{ink4b}$  ( $p15$ -lux). Come mostrato nella figura 3C, la trascrizione del  $p15$ -lux è maggiore nelle cellule KO per Emilina1 quando paragonate con le cellule WT (linea 1 e 2); sorprendentemente, il blocco dell'attività del recettore di TGF-β nelle cellule mutanti tramite il farmaco SB431542 elimina tale effetto (22), indicando che l'Emilina1 endogena è richiesta per moderare l'attività di TGF-β nelle MEF.

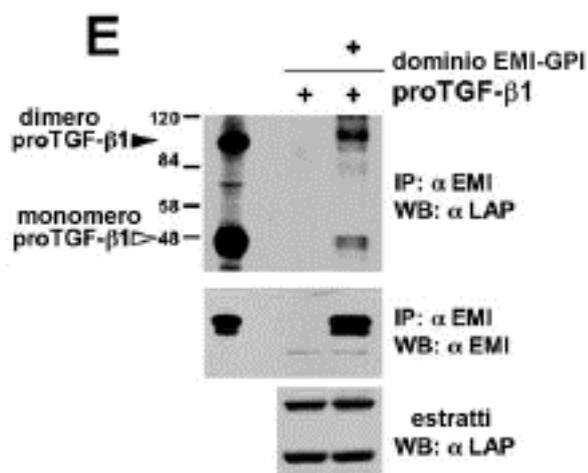
Se Emilina1 limita la segnalazione del TGF- $\beta$  endogeno, un deficit di Emilina1 dovrebbe andare in parallelo con un aumento della risposta alla sintesi autocrina di TGF- $\beta$ . Per provare questa ipotesi, abbiamo trattato cellule MEF WT e mutanti per Emilina1 con un inibitore di JNK1/2(SP600125); in realtà, è stato recentemente dimostrato che una mancanza di JNK attiva la trascrizione dal promotore endogeno di TGF- $\beta$ 1, portando ad una abbondante produzione di TGF- $\beta$ 1 autocrino nelle MEF (23). Come mostrato nella figura 3D, attraverso il saggio p15-lux abbiamo trovato che le MEF mutanti per Emilina1 mostrano una maggiore sensibilità al blocco dell'attività di JNK rispetto alle MEF WT, supportando la tesi che la mancanza di Emilina1 causa un'aberrante segnalazione del TGF- $\beta$ .



**Figura 3.(C-D)** MEF primarie sono state trasfettate con il p15lux reporter del TGF $\beta$ . La maggiore risposta trascrizionale nelle cellule Emilina -/- ritorna ai livelli delle

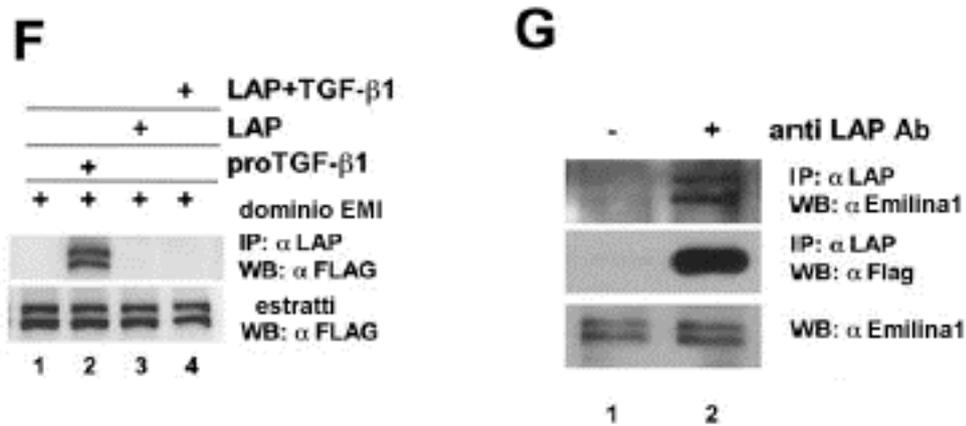
cellule WT con il trattamento con l'inibitore del recettore di TGF $\beta$  SB431542 (C) ed è più evidente dopo trattamento con l'inibitore del JNK SP600125 (D).

Poi, ci siamo chiesti se il bersaglio biochimico di Emilina1 è il proTGF- $\beta$ 1, cioè il precursore immaturo ed inattivo di TGF- $\beta$ 1. Abbiamo trasfettato cellule HEK293T con un costrutto esprimente proTGF- $\beta$ 1 da solo od in combinazione con un plasmide che dirige l'espressione del dominio EMI sulla superficie delle cellule (Flag- e GPI-tagged) (figura 3E). I lisati cellulari sono stati sottoposti a immunoprecipitazione con anticorpo anti-Flag e le proteine copurificate col dominio EMI sono state analizzate con Western blot usando un anticorpo anti-LAP. Come mostrato in figura 3E, il dominio EMI è risultato interagire con il proTGF- $\beta$ 1.



**Figura 3.(E)** Emilina 1 interagisce con il proTGF $\beta$ 1.

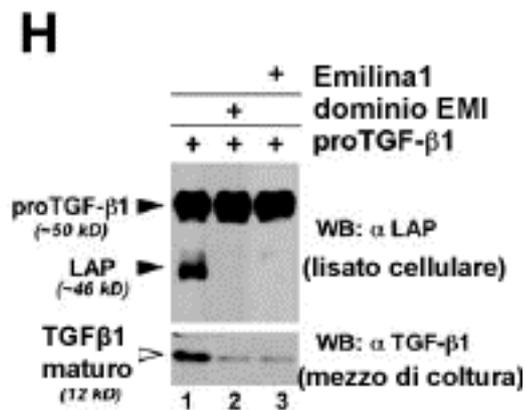
Abbiamo poi voluto verificare se il dominio EMI interagisce specificamente con il proTGF- $\beta$ 1 piuttosto che con il complesso formatosi (LAP legato al TGF- $\beta$  maturo) o con il LAP libero. A tal fine, abbiamo ripetuto l'esperimento di precipitazione usando il dominio EMI con estratti contenenti proTGF- $\beta$ , proteina LAP da sola o un complesso LAP/TGF- $\beta$ 1. Come mostrato in figura 3F, il dominio Emi è legato efficientemente solo al proTGF- $\beta$ 1. Questa interazione è avvenuta anche a livelli fisiologici di Emilina1, come dimostrato dalla copurificazione di Emilina1 e proTGF- $\beta$  endogeni (figura3G).



**Figura 3.(F-G)** Emilina 1 lega efficientemente solo il proTGF $\beta$  e non il complesso LAP/TGF $\beta$ 1 maturo (**F**); TGF $\beta$  overespresso interagisce con Emilina 1 endogena. Cellule HEK293T sono trasfettate con il proTGF $\beta$  da solo e processate come in figura E per rivelare la copurificazione di Emilina 1 endogena (**G**).

La maturazione proteolitica del proTGF- $\beta$  è un passo essenziale nella formazione del TGF- $\beta$  biologicamente attivo. Poiché Emilina1 può

interagire col proTGF- $\beta$ 1, abbiamo saggiato se l'attività inibitrice sulla segnalazione del TGF- $\beta$  agisce tramite l'inibizione del taglio proteolitico del proTGF- $\beta$ . Cellule HEK293T sono state trasfettate con plasmidi esprimenti proTGF- $\beta$  da solo o in combinazione con Emilina1 o con il dominio EMI. Come mostrato in figura 3H, l'immunoblot del lisato cellulare e del mezzo di coltura ha rivelato che sia Emilina1 sia il dominio EMI inibiscono potentemente il taglio del proTGF- $\beta$ 1 in LAP (una banda di circa 46 kDa) e TGF- $\beta$ 1 (una banda di 12 kDa), mentre non ha effetto sulla sintesi del proTGF- $\beta$ 1 (banda di circa 50 kDa). Questa conclusione è supportata dall'inibizione della fosforilazione di Smad2 nelle cellule HepG2 trattate con il mezzo di coltura ricavato dalle cellule esprimenti proTGF- $\beta$ 1 in assenza o presenza di Emilina1.



**Figura 3.(H)** Emilina 1 inibisce la maturazione del ProTGF $\beta$ .

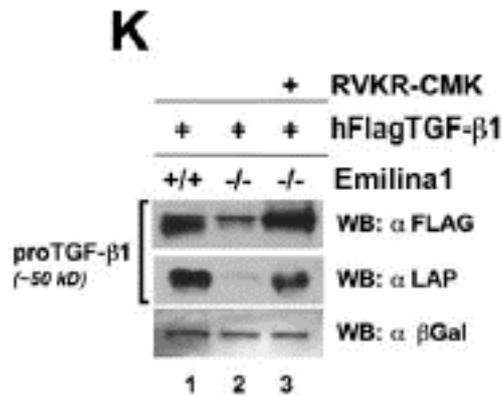
L'effetto di Emilina1 è simile a quello ottenuto col trattamento delle cellule con RVKR-CMK, un farmaco che blocca l'attività delle furine

endogene (figura 3I). L'espressione ectopica della proproteina convertasi SPC1 porta alla comparsa di una banda più piccola di 43 kDa, la cui formazione risulta inibita anche dal dominio EMI trasfettato (figura 3J).



**Figura 3.(I-J)** Emilina 1 riproduce gli effetti dell'inibitore delle furine RVKR-CMK (I); il dominio EMI inibisce il taglio del proTGFβ da parte dell'overespressa furina/SPC1 (J).

Per provare la rilevanza di Emilina1 nel limitare la maturazione del TGF-β1 in vivo, abbiamo paragonato i livelli di proTGF-β1 trasfettato in cellule MEFs WT e KO per Emilina1. Come mostrato in figura 3K, l'assenza di Emilina1 causa la scomparsa della banda del proTGF-β1 a 50 kDa (linea 1 e 2); è risultato fondamentale che il blocco dell'attività della furina recuperi i livelli di proTGF-β1 nelle cellule MEFs KO per Emilina1 (linea 3). Tutte insieme queste evidenze suggeriscono che Emilina1 (o il dominio EMI isolato) protegga il proTGF-β dall'attivazione proteolitica.

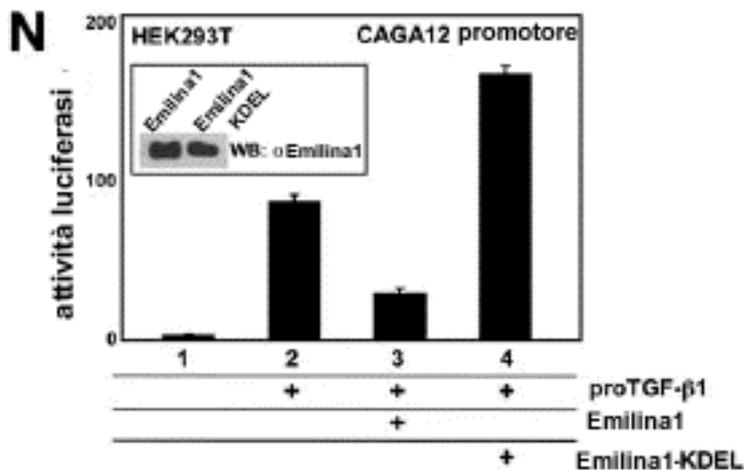
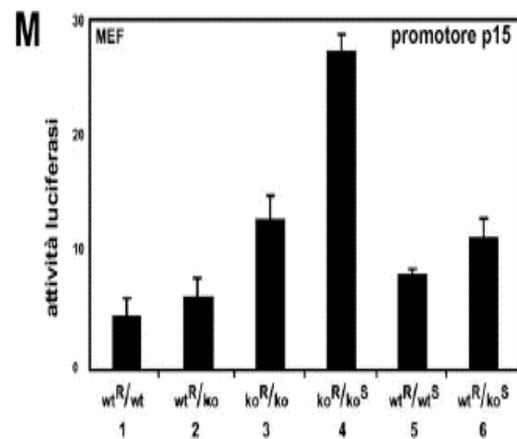
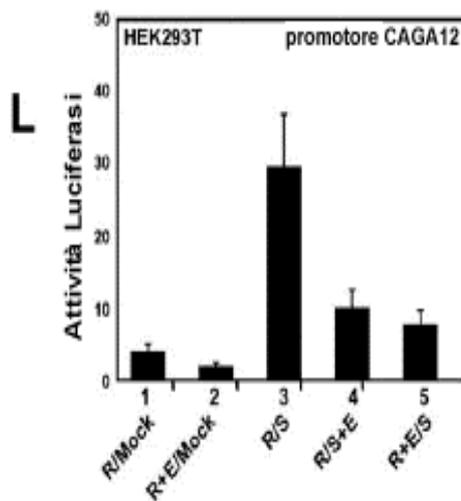


**Figura 3.(K)** Emilina 1 è necessaria per prevenire il taglio del proTGF $\beta$ .

In seguito ci siamo chiesti se l'inibizione di TGF- $\beta$ 1 da parte di Emilina1 avvenga all'interno della cellula o nello spazio extracellulare. Per rispondere a questo quesito, abbiamo preparato due popolazioni di cellule HEK293T - cellule stimolatrici e rispondenti - ed abbiamo effettuato esperimenti mescolando entrambi i tipi. Le cellule rispondenti (indicate con la lettera R nella figura 3L) contengono il TGF- $\beta$  reporter CAGA12-lux; le cellule stimolatrici (indicate con la lettera S nella figura 3L) sono la fonte del TGF- $\beta$ 1. Come previsto, quando le cellule stimolatrici sono mescolate con le cellule rispondenti, avviene l'induzione di CAGA12-lux (figura 3L, linea 1 e 3). Per stabilire dove Emilina blocca il proTGF- $\beta$ 1, abbiamo trasfettato un plasmide esprime Emilina1 completa (indicato come +E in figura 3L) in entrambi i tipi di cellule. E' stato interessante notare che la presenza di Emilina1 sia nelle cellule stimolatrici sia rispondenti inibisce allo stesso

modo la risposta del TGF- $\beta$  (figura 3L, linea 4 e 5), indicando che Emilina1 possa operare in modo autonomo non correlato al tipo di cellula nell'opporci alla segnalazione del proTGF- $\beta$ . Per convalidare questa conclusione anche a livello endogeno, abbiamo condotto esperimenti di mescolamento cellulare usando cellule MEFs WT e Emilina KO (figura 3M). In questo caso, le cellule rispondenti sono state trasfettate con p15-lux e le stimolatrici sono state indotte ad aumentare la produzione di TGF- $\beta$ 1 endogeno trattandole con inibitori di JNK (23). Combinazioni di cellule rispondenti WT con cellule WT non trattate o KO per Emilina1 hanno portato a livelli basali di trascrizione paragonabili (figura 3M, linea 1 e 2), più alti livelli sono stati riscontrati combinando cellule rispondenti mutanti con cellule mutanti non trattate (linea 3), in linea con l'aumentata segnalazione di TGF- $\beta$  nelle cellule mutanti. Come previsto, dopo l'induzione della sintesi di TGF- $\beta$  endogeno con l'inibitore di JNK SP600125, la combinazione cellule rispondenti KO con cellule stimolatrici KO determina una maggiore attivazione del promotore di p15-lux rispetto alla combinazione cellule rispondenti WT/cellule stimolatrici WT (linea 4 e 5). Curiosamente, quando le cellule KO stimolatrici indotte sono mescolate con cellule WT rispondenti, il livello di segnalazione di TGF- $\beta$  è simile alla combinazione di entrambi WT (linea 5 e 6); questo suggerisce che l'Emilina1 endogena nelle cellule rispondenti agisce da antagonista del

proTGF- $\beta$  extracellulare. Questa conclusione è stata infine convalidata usando una Emilina1 che non viene secreta legata con KDEL, un segnale che è stato dimostrato causare la ritenzione delle proteine di secrezione all'interno delle vescicole della parte trans dell'apparato di Golgi. Come mostrato nella figura 3N, le cellule trasfettate con KDEL-Emilina1 hanno mostrato un aumento piuttosto che un'inibizione della risposta al TGF- $\beta$ 1. Questi esperimenti indicano che Emilina1 è importante nel prevenire la maturazione del TGF- $\beta$  all'esterno della cellula.



**Figura 3.(L-N)** Emilina 1 inibisce l'attività del proTGF- $\beta$  nello spazio extracellulare.

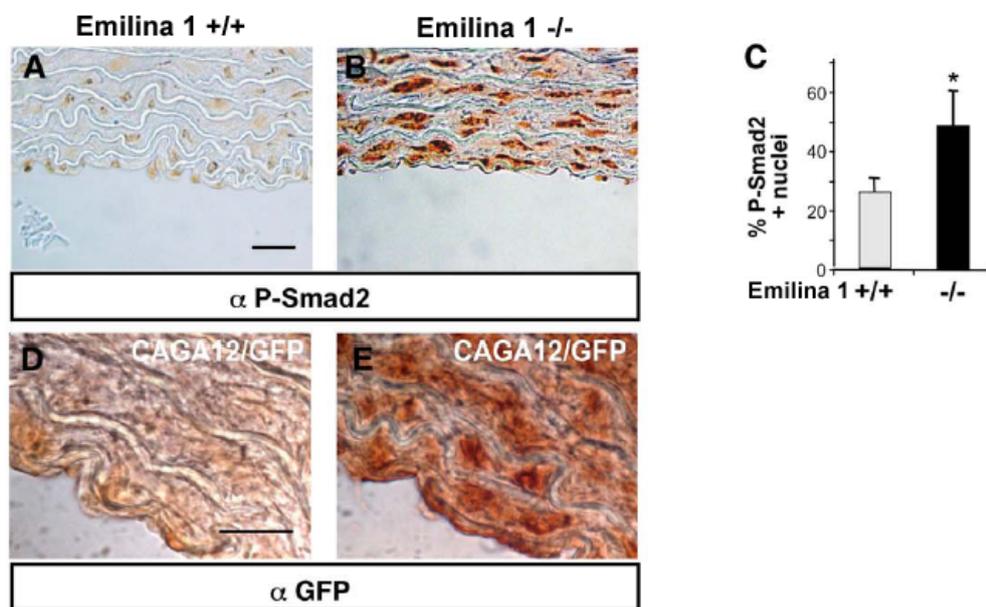
### *3.4 Correzione del fenotipo ipertensivo dovuto alla mancanza di Emilina1, tramite riduzione del dosaggio del gene di TGF- $\beta$*

Poiché Emilina1 e i ligandi TGF- $\beta$  sono coespressi nelle cellule muscolari lisce della parete aortica, i dati presentati precedentemente suggeriscono che Emilina1 giochi un ruolo nella limitazione degli effetti di TGF- $\beta$  nel tessuto del vaso. Per provare l'implicazione di Emilina1 nel controllo della segnalazione di TGF- $\beta$  in vivo, abbiamo cercato una prova dell'incremento della segnalazione di TGF- $\beta$  nel sistema vascolare dei topi Emilina1 KO.

Come primo indicatore della segnalazione di TGF- $\beta$ , è stata misurata la colorazione dei nuclei con anticorpi contro Smad2 fosforilata (P-Smad2).

Il numero di nuclei positivi alla colorazione per P-Smad2 è significativamente aumentato nei nuclei delle aorte dei mutanti (figura 4A-4C). Il costrutto CAGA12-GFP, nel quale il gene reporter GFP è sotto il controllo di molteplici elementi rispondenti a TGF- $\beta$ , è stato usato come secondo ed indipendente indicatore dell'attività di TGF- $\beta$ . I topi transgenici che portano tale costrutto sono stati incrociati con i

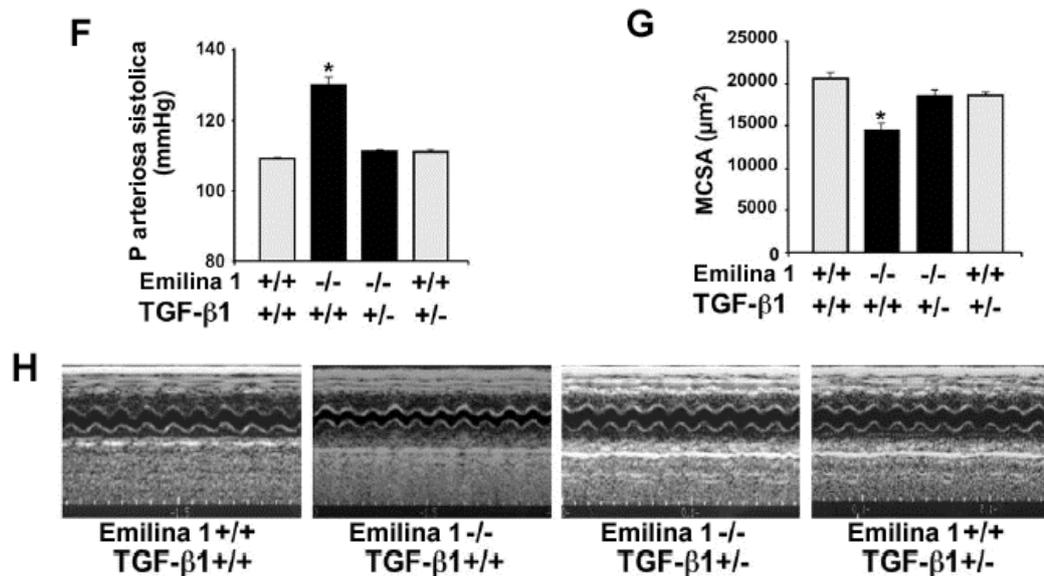
mutanti per Emilina1 ed è stata rilevata l'espressione del gene reporter GFP nelle aorte usando anticorpi anti-GFP su preparati istologici. L'intensità della colorazione immunochimica è più alta nelle aorte dei topi mutanti rispetto ai wild-type (figure 4D e 4E), indicando un incremento dell'attivazione del promotore CAGA-12 nelle aorte di topi Emilina1 KO.



**Figura 4.(A-E)** Aumento della segnalazione del TGF- $\beta$  in aorta di Emilina 1 KO tramite colorazione dei nuclei con anticorpi contro Smad2 fosforilata (A-B); valutazione quantitativa del numero di nuclei positivi a P-Smad2 (C); aumento della segnalazione del TGF- $\beta$  in aorta di Emilina 1 KO tramite espressione del costrutto CAGA12/GFP (D-E).

I dati biochimici e funzionali, insieme, hanno rivelato un interessante ruolo di Emilina1 nel controllo dell'attività di TGF- $\beta$  che potrebbe essere funzionalmente rilevante nel contesto dei vasi sanguigni. Se

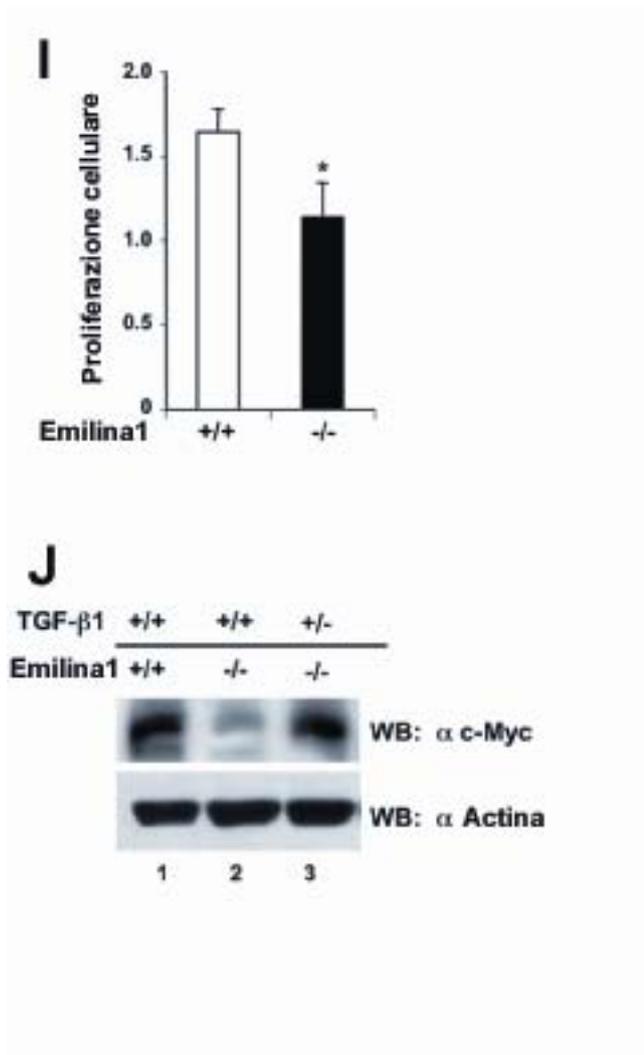
Emilina1 agisce sul metabolismo del TGF- $\beta$  promuovendo un rimodellamento vascolare e l'ipertensione, la riduzione del dosaggio del gene di TGF- $\beta$ 1 dovrebbe attenuare il fenotipo mutante. E' interessante che l'inattivazione di un allele di TGF- $\beta$ 1 negli animali KO per Emilina1 è sufficiente per riportare la pressione sanguigna a livelli normali (figura 4F e 4H). Inoltre, con la riduzione del dosaggio del gene per TGF- $\beta$ 1 le dimensioni dei vasi dei topi KO per Emilina1 ritornano a livelli normali sia nei distretti di resistenza (figura 4G) sia in quelli di conduttanza (figura 4H).



**Figura 4.(F-H)** Dipendenza del fenotipo di Emilina 1 dal dosaggio di TGF- $\beta$ 1(F-G); analisi ecocardiografica dell'aorta ascendente in topi generati dall'incrocio di Emilina 1 +/- e TGF- $\beta$ 1 +/- (H).

La ridotta dimensione dei vasi sanguigni nei topi Emilina1<sup>-/-</sup> suggerisce un ruolo di regolatore positivo della proliferazione cellulare per

Emilina1. Infatti, TGF- $\beta$  è ben noto esercitare un potente segnale citostatico su diversi tipi di cellula, soprattutto su cellule della muscolatura liscia (SMC) (24-25). Per esplorare questa possibilità, abbiamo come prima cosa isolato SMC da aorte di topi WT e mutanti per Emilina1 di 15 giorni di età ed abbiamo misurato la loro capacità di crescita usando un saggio di proliferazione cellulare in vitro. Le SMC mutanti hanno dimostrato una ridotta proliferazione in relazione alle cellule WT (figura 4I). Questi risultati concordano con l'idea che un'attivazione duratura della cascata del TGF- $\beta$  dagli stadi iniziali dello sviluppo fino alla vita adulta abbia risultati negativi sulla crescita delle cellule del vaso, come osservato in una riduzione generalizzata delle dimensioni dei vasi sanguigni nei topi in cui manca Emilina1. Infatti, abbiamo trovato un livello ridotto dell'espressione di c-Myc nel tessuto aortico espianato da topi mutanti per Emilina1 (figura 4J). c-Myc è un bersaglio diretto e regolato negativamente della segnalazione TGF- $\beta$ /Smad e la sua repressione è cardine di un'attivazione ligando mediata di p21<sup>WAF1</sup> e p15<sup>INK4b</sup>, inibitori di CDK (24). Straordinariamente, i livelli di c-Myc ritornano alla normalità nelle aorte in cui vi è la combinazione Emilina1 KO/TGF- $\beta$ +/- (figura 4J, linea 3), un risultato in linea con il recupero del fenotipo vascolare (figura 4F-4H). Messi insieme, questi dati supportano l'idea che Emilina1 sia un nuovo inibitore della disponibilità di TGF- $\beta$  in vivo.



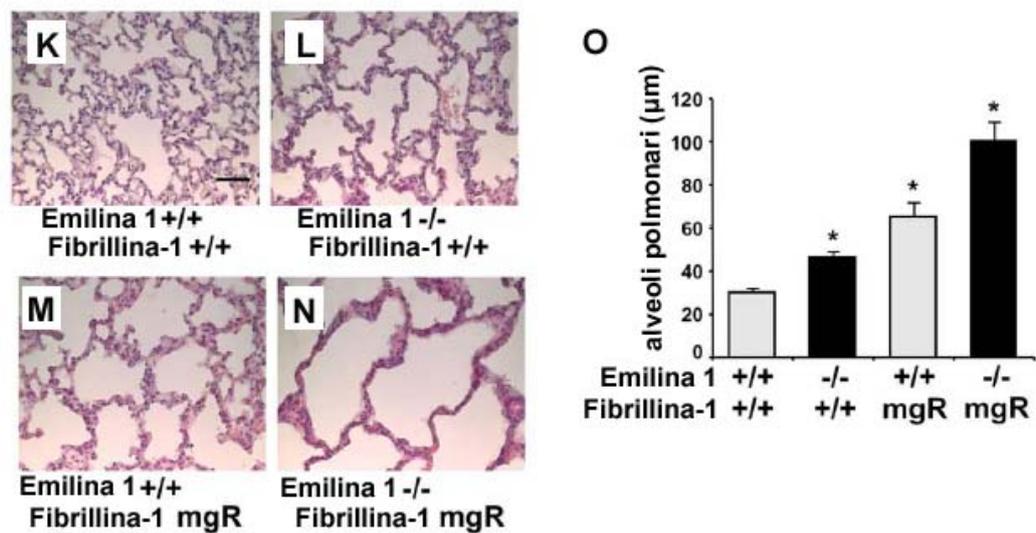
**Figura 4.(I-J)** Ridotta proliferazione delle SMC in topi Emilina1 KO (**I**); Western Blot analisi di aorte espianate da topi con genotipo indicato usando anticorpi anti c-Myc (**J**).

Emilina1 non è l'unica proteina della matrice elastica extracellulare proposta per la regolazione della segnalazione del TGF- $\beta$ . Merita particolare attenzione anche il caso della Fibrillina1, che è stata dimostrata essere una proteina regolatrice negativa del TGF- $\beta$ . In modelli murini transgenici della sindrome di Marfan, l'aumentato volume degli alveoli del polmone è stato correlato con l'aumentata

regolazione del CAGA12, lo stesso presente in questo lavoro. Questo fenotipo del polmone può essere curato con anticorpi che inattivano TGF- $\beta$  (26). Questi dati sostengono la possibilità che Emilina1 possa influenzare la segnalazione del TGF- $\beta$  attraverso un meccanismo secondario che passa per la Fibrillina1. Per questo abbiamo ricercato le conseguenze della deficienza di Emilina1 sulla deposizione e conservazione delle microfibrille di Fibrillina1. Lo schema di distribuzione della Fibrillina1 è sovrapponibile nei topi Emilina 1 WT e KO sia in aorte sia in cellule MEFs. Questi risultati scartano la presenza di grandi anomalie del sistema microfibrillare nei mutanti per Emilina1.

Come la Fibrillina1, Emilina1 è espressa ad alti livelli nel polmone (5). Il modello della Fibrillina1 prevede che l'eccesso di TGF- $\beta$  debba portare ad un incremento degli spazi alveolari (26). Questa ipotesi è stata convalidata sperimentalmente tramite analisi istologiche. Come mostrato in figura 4K-4M, ed analizzato quantitativamente in figura 4O, la mancanza di Emilina1 induce un significativo aumento delle dimensioni alveolari, come accade nella deficienza di Fibrillina1. L'identificazione di tale fenotipo dipendente da TGF- $\beta$  supporta chiaramente il nostro modello riguardante il legame genetico e funzionale tra Emilina1 e TGF- $\beta$ . Inoltre, l'uguaglianza del fenotipo del polmone costituisce un'impostazione ideale per provare la relazione tra Emilina1 e

Fibrillina1. Se Emilina1 agisse attraverso la Fibrillina, dovremmo aspettarci che la mancanza di Emilina1 non abbia grandi effetti sul fenotipo mutante di Fibrillina. Al contrario, i risultati mostrano che la mutazione simultanea dei due geni aggrava pesantemente il fenotipo alveolare (figura 4N e 4O), a favore dell'idea che Emilina1 e Fibrillina agiscano soprattutto attraverso un percorso indipendente e parallelo sulla regolazione della segnalazione del TGF- $\beta$ .



**Figura 4.(K-O)** Sezioni istologiche di polmone da topi generati dall'incrocio di Emilina1 e Fibrillina1 doppi eterozigoti (K-N); valutazione quantitativa dell'effetto descritto in K-N (O).

## *4. Discussione*

#### *4.1 Emilina1 è un antagonista del pro-TGF $\beta$*

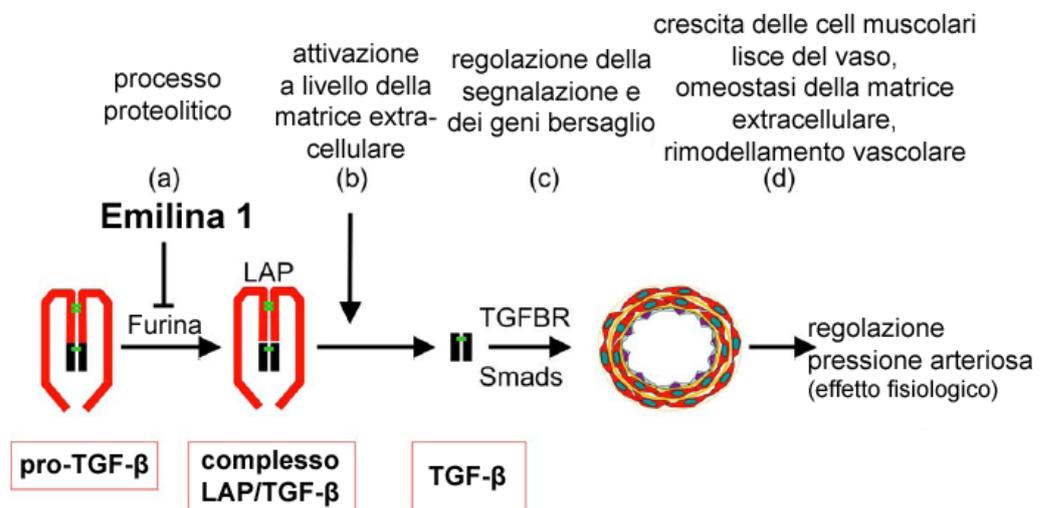
Questo lavoro ha identificato un nuovo meccanismo di regolazione della pressione arteriosa basato sulla funzione di Emilina1, una proteina delle fibre elastiche, come modulatrice della segnalazione del TGF- $\beta$  (figura 5).

Usando embrioni di *Xenopus* e cellule umane come mezzi per evidenziare l'attività del TGF- $\beta$ , abbiamo stabilito il ruolo di Emilina1 come antagonista della segnalazione del TGF- $\beta$ . Abbiamo trovato che una overespressione di Emilina1 non è in grado di contrastare l'attività del TGF- $\beta$ 1 maturo ma è efficace contro la forma immatura del proTGF- $\beta$ . Inoltre, usando cellule derivate da topi KO per Emilina1, abbiamo mostrato che, a livello fisiologico, Emilina1 è richiesta per attenuare l'attività del TGF- $\beta$ . Questa proprietà biologica è dipendente dall'interazione fisica specifica di Emilina1 con il proTGF- $\beta$ . Questo rappresenta una novità nei meccanismi di azione degli antagonisti dei fattori di crescita secreti, come Chordin o Cerberus/Dan, poiché queste molecole agiscono nei confronti dei fattori di crescita in forma matura e competono con i loro recettori (15).

## 4.2 Meccanismo di azione di Emilina1

Abbiamo dimostrato che Emilina1 previene la maturazione del proTGF- $\beta$  in LAP e TGF- $\beta$  maturo, evento chiave della disponibilità del TGF- $\beta$ . L'overespressione di Emilina1 promuove un accumulo di proTGF- $\beta$  immaturo a spese del TGF- $\beta$  maturo; al contrario, il proTGF- $\beta$ 1 è prontamente tagliato nelle cellule mutanti per Emilina1 e la sua stabilità può essere recuperata tramite il blocco delle proteasi furiniche (figura 3H).

E' risultato interessante l'aver trovato un nuovo stadio di regolazione a livello della maturazione del TGF- $\beta$ , dal momento che studi precedenti si sono concentrati principalmente su eventi che avvengono più a valle, così come una corretta localizzazione del complesso latente LAP/TGF- $\beta$  nello spazio extracellulare (27), e su fattori che presentano il TGF- $\beta$  maturo ai suoi recettori (figura 5).



**Figura 5.** Modello di attività di Emilina 1 come antagonista della segnalazione del TGF- $\beta$  nel vaso.

In contrasto, gli studi riguardanti gli stadi iniziali che controllano la biodisponibilità del TGF- $\beta$ , come anche la sua secrezione e la maturazione, hanno ricevuto un'attenzione molto inferiore, probabilmente dovuta alla mancanza di geni specifici o modelli animali di molecole che controllano questi processi. L'identificazione di Emilina1 e la generazione di animali mutanti per tale proteina rappresenta un passo avanti in questo processo.

I nostri dati suggeriscono che Emilina1 previene la maturazione del proTGF- $\beta$  nello spazio extracellulare, come ci si aspetta per una molecola della matrice elastica extracellulare. Prima di tutto, una ritenzione artificiale di Emilina1 nel percorso secretorio non inibisce l'attività del TGF- $\beta$  (figura 3N), suggerendo che Emilina1 deve operare nel compartimento extracellulare per agire come antagonista. Poi, mescolando distinte popolazioni cellulari, abbiamo trovato che Emilina1 è necessaria ed è sufficiente per contrastare il TGF- $\beta$  anche quando presente solo nelle cellule riceventi il segnale (figura 3L e 3M). Questi dati sono in linea con i dati pubblicati da Constam e collaboratori, che hanno mostrato che le proteasi furiniche SPC sono richieste all'esterno

della cellula per far maturare il TGF- $\beta$  e devono agire durante lo sviluppo embrionale (9).

#### *4.3 Richiesta in vivo di Emilina 1 come antagonista del TGF- $\beta$ per il controllo della pressione arteriosa*

In aggiunta agli studi in vitro, abbiamo convalidato l'azione di Emilina1 come antagonista del TGF- $\beta$  esaminando cellule e tessuti espianati da topi KO per Emilina1. Molte evidenze supportano la nostra conclusione, almeno nel sistema vascolare. Primo, il livello di P-Smad2 è aumentato nelle aorte di Emilina 1 KO se paragonate con gli stessi tessuti WT (figura 4C), come ci si aspetta da un mancanza di inibizione del TGF- $\beta$ . Secondo, la trascrizione di un reporter transgenico con TGF- $\beta$  è aumentata nei mutanti per Emilina1. Terzo, i livelli endogeni dei geni bersaglio del TGF- $\beta$ , come PAI-1 e c-Myc, sono aumentati negli espianati vascolari dei mutanti per Emilina1. Inoltre, abbiamo trovato un incremento anormale degli spazi aerei alveolari nei mutanti per Emilina1, un difetto dello sviluppo precedentemente correlato con un'eccessiva segnalazione del TGF- $\beta$  (26).

I nostri dati dimostrano che l'antagonismo del TGF- $\beta$  è cruciale per spiegare l'ipertensione negli animali KO di Emilina1. Quindi, abbiamo osservato che ridurre i livelli di TGF- $\beta$  è sufficiente per recuperare i

difetti vascolari e riportare la pressione arteriosa a livelli normali. Se i difetti di *Emilina1* sono alla base di alcune forme di ipertensione umana è ancora da provare; comunque il nostro studio rivela l'importanza dei meccanismi di regolazione della segnalazione del TGF- $\beta$  nel fare luce su questa malattia umana. Degno di nota è il fatto che variazioni nella segnalazione del TGF- $\beta$ , che possono aumentare la produzione di citochine, sono state già correlate ad un incremento del rischio di ipertensione nell'uomo (28). Nei mutanti per *Emilina1*, l'ipertensione è probabilmente causata da un'anomalia nello sviluppo delle corrette dimensioni del vaso; tuttavia, questa anomalia potrebbe predisporre ad uno sviluppo tardivo, probabilmente acquisito, della malattia portando ad un incremento della resistenza periferica. E' da notare che studi su ratti spontaneamente ipertesi hanno rivelato che l'ipertensione ha inizio con la riduzione del lume dei vasi di resistenza; inoltre, il fenotipo ipertensivo non si manifesta negli animali giovani (29). Questo è un campo che rimane ancora inesplorato.

Pensiamo che una causa importante del fenotipo legato ad *Emilina1* è la ridotta crescita vascolare dovuta ad un eccesso della segnalazione del TGF- $\beta$ . A prova di ciò abbiamo trovato una ridotta capacità di proliferazione delle cellule della muscolatura liscia isolate da vasi di animali mutanti. Questi risultati vanno in parallelo con i livelli di c-Myc, un bersaglio inibito da TGF- $\beta$  ed un mediatore chiave della

proliferazione delle cellule della muscolatura liscia (25): i livelli di c-Myc sono ridotti nelle aorte mutanti ma il fenotipo torna normale quando si mescolano i genotipi *Emilina1*<sup>-/-</sup> e *TGF-β*<sup>+/-</sup>. Questo dimostra che *TGF-β* è una potente citochina avente come bersaglio diversi geni; quindi una sua alterata regolazione può dare inizio ad effetti pleiotropici, che includono cambiamenti nella risposta a fattori di crescita, modificazione del destino, del differenziamento cellulare e del rinnovo dei tessuti ed altro ancora.

#### *4.4 Il fenotipo mutante di Emilina1*

Le fibre elastiche sono costituite da due distinti componenti morfologiche, una parte interna amorfa, composta soprattutto dalla proteina fibrosa Elastina, e da una parte esterna di microfibrille, il cui costituente principale è la Fibrillina1, il cui gene risulta alterato nei pazienti affetti dalla sindrome di Marfan (30). Poiché è stato dimostrato che la Fibrillina1 determina una regolazione negativa dell'attività del *TGF-β* in alcuni tessuti (26), un aspetto che merita discussione è il confronto tra i fenotipi dovuti a *Emilina1* e *Fibrillina1*. Prima di tutto, esiste la possibilità che difetti di *Emilina1* possano essere secondari alla disfunzione di *Fibrillina1*. Però, i nostri dati non sono in accordo con tale possibilità: non solo la distribuzione di *Fibrillina1* è normale nei tessuti

deficienti di Emilina1, ma non abbiamo riscontrato evidenze di una relazione epistatica tra Emilina1 e Fibrillina1. In realtà, la contemporanea mutazione dei due geni concorre ad aggravare il loro fenotipo patologico nel polmone, e i difetti aortici nei topi doppi KO sono una combinazione di quelli trovati nei singoli KO. Quindi, Emilina1 e Fibrillina1 possono regolare il TGF- $\beta$  o tramite meccanismi qualitativamente differenti o agendo a differenti stadi dello sviluppo. Una possibilità è che Emilina1 sia richiesta durante la morfogenesi precoce dei vasi, quindi una sua assenza potrebbe limitare la crescita del vaso, portando ad ipoplasia ed ipertensione; il ruolo principale della Fibrillina1 nell'omeostasi della matrice elastica e della parete vascolare emergerebbe e risulterebbe dominante negli stadi successivi.

Considerando il grado di regolazione determinato da Emilina1 in cellule MEFs in coltura e nell'aorta, il suo fenotipo potrebbe sembrare sorprendentemente blando. D'altronde possono intervenire differenti meccanismi ad attenuare e bilanciare l'effetto di Emilina1 nell'intero organismo. Primo, la famiglia di Emilina annovera sette proteine, il che fa ritenere possibile un'alta complessità nella regolazione della segnalazione del TGF- $\beta$  da parte dei domini EMI: tale ridondanza nella famiglia di Emilina potrebbe compensare l'inattivazione di Emilina1. Secondo, bisogna considerare che il modello di espressione di Emilina1 e del TGF- $\beta$  dovrebbero sovrapporsi strettamente per far sì che le due

molecole controllino una caratteristica fenotipica. Ad esempio, benché Nodal sia bloccato da Emilina1 nei saggi eterologi, Emilina1 e i membri della sua famiglia non sono espressi con Nodal all'inizio dello sviluppo: quindi, gli Emilina1 KO si sviluppano normalmente, senza espansione del mesoderma. Viceversa, TGF- $\beta$ 1 è essenziale per lo sviluppo e l'omeostasi del sistema vascolare (8); infatti, la sola aploinsufficienza di TGF- $\beta$  è sufficiente al recupero del fenotipo di Emilina1 KO. Terzo, mentre la maturazione del proTGF- $\beta$ 1 sembra una tappa essenziale per la disponibilità del TGF- $\beta$  nelle cellule e nei tessuti qui studiati, in altri contesti, eventi extracellulari più a valle possono risultare limitanti, includendo la mobilizzazione del TGF- $\beta$  latente dalla matrice extracellulare o la sua attivazione precedente al legame col recettore (figura 5). Infine, un ulteriore livello di complessità è la presenza di circuiti a feedback tra i membri della famiglia del TGF- $\beta$ , BMPs e i loro regolatori extracellulari: questo potrebbe portare ad un controllo fine della segnalazione e all'evidenza di fenotipi ristretti al tessuto o al contesto (27).

In conclusione, la scoperta di Emilina1 come regolatore della maturazione e dell'attivazione del TGF- $\beta$  potrebbe essere rilevante non solo per l'ipertensione ma anche per molte altre condizioni patologiche nelle quali è stato suggerito che il TGF- $\beta$  giochi un ruolo, come

l'aterosclerosi, l'infiammazione, la riparazione tissutale, la fibrosi ed il cancro.

## *Bibliografia*

- (1) Staessen J.A., Wang J., Bianchi G., and Birkenhager W.H. (2003). Essential hypertension. *Lancet* 361, 1629–1641.
- (2) Faury G., Pezet M., Knutsen R.H., Boyle W.A., Heximer S.P., McLean S.E., Minkes R.K., Blumer K.J., Kovacs A., Kelly D.P., et al. (2003). Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. *J. Clin. Invest.* 112, 1419–1428.
- (3) Bressan G.M., Daga-Gordini D., Colombatti A., Castellani I., Marigo V., and Volpin D. (1993). Emilin, a component of elastic fibers referentially located at the elastin-microfibrils interface. *J. Cell Biol.* 121, 201–212.
- (4) Zanetti M., Braghetta P., Sabatelli P., Mura I., Doliana R., Colombatti A., Volpin D., Bonaldo P., and Bressan G.M. (2004). EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects. *Mol. Cell. Biol.* 24, 638–650.
- (5) Braghetta P., Ferrari A., De Gemmis P., Zanetti M., Volpin D., Bonaldo P., and Bressan G.M. (2004). Overlapping, complementary and site-specific expression pattern of genes of the EMILIN/Multimerin family. *Matrix Biol.* 22, 549–556.
- (6) Garcia Abreu J., Coffinier C., Larrain J., Oelgeschlager M. and De Robertis E.M. (2002). Chordin-like CR domains and the regulation of evolutionarily conserved extracellular signaling systems. *Gene* 287, 39–47. Review
- (7) Altmann C.R., Chang C., Munoz-Sanjuan I., Bell E., Heke M., Rifkin D.B. and Brivanlou A.H. (2002). The latent-TGF $\beta$ -binding-protein-1 (LTBP-1) is expressed in the organizer and regulates nodal and activin signaling. *Dev. Biol.* 248, 118–127.
- (8) Agrotis A., Kalinina N., and Bobik A. (2005). Transforming growth factor-beta, cell signaling and cardiovascular disorders. *Curr Vasc Pharmacol* 3, 55–61.
- (9) Beck S., Le Good J.A., Guzman M., Ben Haim N., Roy K., Beerman F. And Constam D.B. (2002). Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nat. Cell. Bio.* 4, 981–985.
- (10) Annes J.P., Munger J.S. and Rifkin D.B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell. Sci.* 116, 217–224.

- (11) Lembo G., Vecchione C., Fratta L., Marino G., Trimarco V., d'Amati G. and Trimarco B. (2000). Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes* 49, 293-297.
- (12) Vecchione C., Fratta L., Rizzoni D., Notte A., Poulet R., Porteri E., Frati G., Guelfi D., Trimarco V., Mulvany M. J., *et al.* (2002). Cardiovascular influences of alpha1adrenergic receptor defect in mice. *Circulation* 105, 1700-1707.
- (13) De Acetis M., Notte A., Accornero F., Selvetella G., Brancaccio M., Vecchione C., Sbroglio M., Collino F., Pacchioni B., Lanfranchi G., *et al.* (2005). Cardiac overexpression of melusin protects from dilated cardiomyopathy due to long-standing pressure overload. *Circ. Res.* 96, 1087-1094.
- (14) Brancaccio M., Fratta L., Notte A., Hirsch, E., Poulet R., Guazzone S., De Acetis M., Vecchione C., Marino G., Altruda F., *et al.* (2003). Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nat Med* 9, 68-75.
- (15) Piccolo S., Agius E., Leyns L., Bhattacharyya S., Grunz H., Bouwmeester T., and De Robertis E.M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397, 707-710.
- (16) Larrain J., Bachillaer D., Lu B., Agius E., Piccolo S and De Robertis E.M. (2000). BMP-binding modules in chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space. *Development* 127, 821-830.
- (17) Martire G., Mottola G., Pascale M.C., Malagolini N., Tririni I, serafini-Cessi F., Jackson M.R. and Monatti S (1996). Different fate of a single reporter protein containing KDEL or KKXX targeting signals stably expressed in mammalian cells. *JBiol Chem* 271, 3541-3547.
- (18) Biro S., Fu Y. M., Yu Z. X., and Epstein S. E. (1993). Inhibitory effects of antisense oligodeoxynucleotides targeting c-myc mRNA on smooth muscle cell proliferation and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 654-658.
- (19) Izzo J.L., Jr., and Shykoff B.E. (2001). Arterial stiffness: clinical relevance, measurement, and treatment. *Rev. Cardiovasc. Med.* 2, 29-34, 37-40.

- (20) Mongiat M., Mungiguerra G., Bot, S., Mucignat M.T., Giacomello E., Doliana R., and Colombatti A. (2000). Self-assembly and supramolecular organization of EMILIN. *J. Biol. Chem.* 275, 25471–25480.
- (21) Eimon P.M. and Harland R.M. (2002). Effects of heterodimerization and proteolytic processing on Derriere and Nodal activity: implications for mesoderm induction in *Xenopus*. *Development* 129, 3089-3103.
- (22) Inman G.J., Nicolas F.J., Callahan J.F., Harling J.D., Gaster L.M., Reith A.D., Laping N.J. and Hill C.S. (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5 and ALK7. *Mol Pharmacol.* 62, 65-74.
- (23) Ventura J.J., Kennedy N.J, Flavell R.A. and Davis R.J. (2004). JNK regulates autocrine expression of TGF-beta1. *Mol. Cell* 15, 269-278.
- (24) Siegel P.M. and Massague J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 807–821.
- (25) Khanna, A. (2004). Concerted effect of transforming growth factor-beta, cyclin inhibitor p21, and c-myc on smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H1133–H1140.
- (26) Neptune E.R., Frischmeyer P.A., Arking D.E., Myers L., Bunton T.E., Gayraud B., Ramirez F., Sakai L.Y. and Dietz H.C. (2003). Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 33,407-411.
- (27) Koli K., wempe F., Sterner-Kock A., Kantola A., Komor M., Hofmann W.K., von Melchner H. And Keshi-Oja J. (2004). Disruption of LTBP-4 function reduces TGF-beta activation and enhances BMP-4 signaling in the lung. *J Cell Biol* 167, 123-133.
- (28) Suthanthiran M., Li, B., Song J.O., Ding R., Sharma V.K., Schwartz J.E., and August P. (2000). Transforming growth factor-beta 1 hyperexpression in African-American hypertensives: A novel mediator of hypertension and/or target organ damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3479–3484.

(29) Mulvany M.J. (2002). Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol. Sci.* 17, 105–109.

(30) Dietz H.C., Cutting G.R., Pyeritz R.E., Maslen C.L., Sakai L.Y., Corson G.M., Puffenberger E.G., Hamosh A., Nanthakumar E.J., Curristin S.M. et al. (1991). Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 352, 337-339.