

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



Dipartimento di Medicina e Chirurgia

Corso di Dottorato in Medicina Traslazionale e Clinica

XIV Ciclo

TESI DI DOTTORATO

La Pentraxina 3: un potenziale marcatore di danno endoteliale nell'ipertensione arteriosa

Coordinatore

Ch.ma Prof. Amelia Filippelli

Candidato

Albino Carrizzo

Tutor

Ch.mo Prof. Carmine Vecchione

Anno Accademico 2015/2016

INDICE

Sommario pag. 5

Abstract pag. 6

CAPITOLO I

Introduzione pag. 7

La disfunzione endoteliale pag. 8

Scopo del lavoro pag. 10

CAPITOLO II

Materiali e Metodi pag. 11

Proteine e reagenti pag. 11

Animali pag. 12

Studi di reattività vascolare pag. 13

Misurazione della pressione arteriosa pag. 14

Immunoprecipitazione pag. 14

Elettroforesi su gel e immunoblotting pag. 14

Colture cellulari pag. 16

Misurazione dell'attività della MMP-1 pag. 16

Microscopia elettronica a trasmissione (TEM) pag. 16

Colorazione con Blu di Evans pag. 17

Analisi di immunofluorescenza pag. 17

Analisi citofluorimetrica pag. 19

Campioni umani ed ELISA pag. 19

Analisi statistica pag. 20

CAPITOLO III

Risultati	pag. 23
PTX3 induce disfunzione endoteliale nei vasi di resistenza del topo	pag. 23
La P-selectina media l'azione di PTX3 sull'endotelio	pag. 26
La disfunzione endoteliale determinata da PTX3 è associata ad alterazioni strutturali delle cellule endoteliali	pag. 28
Effetto della PTX3 su cellule endoteliali isolate umane	pag. 31
Le alterazioni strutturali indotte da PTX3 a livello vascolare sono mediate dal pathway P-selectina/metalloproteinasi-1	pag. 32
La PTX3 induce il distacco della caveolina-1 da membrana plasmatica	pag. 34
Effetti in vivo della PTX3 sulla funzione vascolare e la pressione arteriosa	pag. 37
I pazienti ipertesi hanno elevati livelli plasmatici di PTX3, P-selectina e MMP-1	pag. 39

CAPITOLO IV

Discussione	pag. 43
Bibliografia	pag. 50

Sommario

Stato dell'arte - La pentraxina 3 (PTX3) è una proteina della fase acuta dell'infiammazione che rappresenta il prototipo delle pentraxine lunghe. Negli ultimi anni numerosi studi hanno correlato gli elevati plasmatici livelli di PTX3 con patologie cardio e cerebro vascolari e recentemente con l'ipertensione arteriosa. Fino ad oggi non ci sono studi che dimostrano se la PTX3 è in grado di esercitare un'azione diretta sulla componente vascolare.

Metodi e Risultati - Attraverso esperimenti in vitro di reattività vascolare e analisi ultrastrutturali, abbiamo dimostrato che PTX3 induce, di per sé, disfunzione e variazioni morfologiche dello strato endoteliale attraverso la mediazione del complesso P-selectina/metalloproteinasi-1 (MMP1). Studi in vivo hanno dimostrato che la somministrazione di PTX3 in topi wild-type induce disfunzione endoteliale ed aumento della pressione arteriosa, un effetto assente nei topi knockout di P-selectina. Infine, mediante tecnica ELISA, abbiamo dimostrato che i pazienti ipertesi (n=31) hanno livelli plasmatici di PTX3 e dei suoi mediatori P-selectina e MMP1 più alti dei pazienti normotesi (n=22).

Conclusioni - I nostri dati dimostrano, per la prima volta, un ruolo diretto della PTX3 sulla funzione vascolare e nell'omeostasi della pressione arteriosa, identificando i meccanismi molecolari coinvolti. I risultati negli uomini suggeriscono che PTX3, P-selectina ed MMP-1 potrebbero essere nuovi biomarcatori in grado di predire l'inizio della disfunzione vascolare nei pazienti ipertesi.

Abstract

Background - The pentraxin 3 (PTX3) is a protein of the acute phase of inflammation which represents the prototype of the long pentraxins. In the last years, numerous studies have correlated the elevated plasma levels of PTX3 with cardio- and cerebrovascular diseases and recently with high blood pressure. To date, there are no studies showing whether PTX3 is able to exert a direct action on the vascular component.

Methods and Results - Through in vitro experiments of vascular reactivity and ultrastructural analysis, we have shown that PTX3 induces, *per se*, dysfunction and morphological changes in the endothelial layer through the the complex P-selectin / metalloproteinase-1 (MMP1). In vivo studies have shown that the administration of PTX3 in wild-type mice induces endothelial dysfunction and increased blood pressure, an effect which is absent in the P-selectin knockout mice. Finally, by ELISA technique, we demonstrated that hypertensive patients (n = 31) have higher plasma levels of PTX3, P-selectin and MMP1 compared to normotensive patients (n = 22).

Conclusion - Our data show, for the first time, the direct role of PTX3 on vascular function and blood pressure homeostasis, identifying the molecular mechanisms involved. The results obtained in humans, suggest that PTX3, P-selectin and MMP-1 may be new biomarkers to predict the onset of vascular dysfunction in hypertensive patients.

CAPITOLO I

Introduzione

La famiglia delle Pentraxine comprende alcune proteine della fase acuta dell'infiammazione conservatesi durante l'evoluzione fino all'uomo. L'etimologia del nome deriva dalla loro caratteristica struttura multimerica di cinque unità tenute insieme da legami non covalenti. Tale famiglia si suddivide in due grandi sottogruppi di proteine classificate in base alla struttura, in forma corta e lunga, codificate da differenti geni e prodotte da differenti tipi di cellule¹⁻³. La caratteristica che accomuna i due sottogruppi risiede nella presenza di un dominio C-terminale (pentraxin domain) condiviso tra tutte le pentraxine. Al gruppo delle pentraxine corte appartengono l'amiloide sierica A (SAP) e la Proteina C Reattiva (CRP). Quest'ultima rappresenta la prima pentraxina ad essere stata identificata e descritta negli anni trenta come molecola della fase acuta dell'infiammazione nell'uomo. In generale tali pentraxine sono coinvolte nella modulazione dell'immunità innata e rappresentano la prima linea di difesa contro i patogeni.

Tra le pentraxine a catena lunga, la pentraxina 3 (o TGS-14/INF-stimulated gene) ne rappresenta il prototipo. Le PTXs lunghe, differiscono dalle pentraxine corte per la presenza di un caratteristico dominio lungo N-terminale che conferisce la capacità di legare differenti ligandi⁴. In particolare, la PTX3 è codificata dal gene localizzato sul braccio lungo del cromosoma 3 (3q25), che codifica per una proteina dal peso di 45 KDa. È risultata essere altamente conservata dal topi all'uomo (82% identico e 92% di aminoacidi conservati) ed è sintetizzata generalmente in seguito alla risposta immunitaria primaria da una molteplicità di cellule^{5,6}, quali i macrofagi, i fibroblasti, gli

adipociti, le cellule dendritiche, le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce⁵⁻⁷. Contrassegnata come proteina dell'immunità innata, PTX3 non regola soltanto la risposta infiammatoria ma è coinvolta in una serie di importanti meccanismi, inclusa la patologia vascolare. Infatti, i vasi sanguigni producono una grande quantità di PTX3 durante l'infiammazione, e i livelli circolanti di PTX3 si incrementano in diverse condizioni patologiche che interessano il sistema cardiovascolare^{8,9}.

Inoltre, la proteina è abbondantemente presente nelle cellule endoteliali in lesioni aterosclerotiche avanzate e nei pazienti con vasculite^{10,11}.

Quindi, la PTX3 potrebbe essere un indicatore rapido dell'attivazione dell'immunità primaria locale e dell'infiammazione, e un nuovo possibile strumento diagnostico per le malattie vascolari. A tal proposito, recentemente, gli elevati livelli di PTX3 nel plasma sono stati associati alla disfunzione dell'endoteliale in diverse malattie nell'uomo, tra cui la malattia renale cronica e la preeclampsia, una patologia multisistemica associata all'ipertensione¹²⁻¹⁴.

Ad oggi, tale alterazione endoteliale è considerata una delle prime caratteristiche fisiopatologiche dell'ipertensione, ed è strettamente associata ad un aumento delle molecole infiammatorie e di adesione a livello della parete vascolare⁸.

Fino ad oggi, non ci sono stati studi mirati a valutare il possibile ruolo diretto della PTX3, sulla modulazione della funzione endoteliale e nel mantenimento dell'omeostasi vascolare.

La disfunzione endoteliale

La disfunzione endoteliale è una alterazione della normale funzione dell'endotelio, che comporta la perdita di alcune caratteristiche strutturali e/o funzionali.

L'endotelio, infatti, svolge un ruolo di primaria importanza nella modulazione del tono vascolare e, più in generale, di tutti i processi che intervengono nella patogenesi dell'aterosclerosi, della trombosi e dell'ipertensione arteriosa. L'endotelio, un organo costituito da un elevatissimo numero di cellule in grado di produrre sostanze che agiscono in modo autocrino e paracrino. Il principale mediatore fisiologico dell'endotelio è un gas, il monossido d'azoto, conosciuto come ossido nitrico (NO), una molecola fondamentale soprattutto per il sistema cardiovascolare, e per il mantenimento dell'omeostasi. Le cellule endoteliali producono NO attraverso l'enzima NO-sintetasi (NOS). L'attività dell'enzima eNOS è stimolata da numerose sostanze, quali la bradichinina e l'acetilcolina, o da forze meccaniche, principalmente lo "shear stress". L'NO è un gas volatile che ha un'emivita di pochi secondi e che, diffondendo rapidamente verso le sottostanti cellule muscolari lisce, determina il rilascio attraverso l'aumento intracellulare di guanosin-monofosfato ciclico (cGMP) e la conseguente riduzione del calcio intracellulare. La disfunzione endoteliale è quella condizione patologica caratterizzata quindi da una ridotta biodisponibilità di NO che determina un'alterazione dell'omeostasi vascolare.

Scopo del lavoro:

1. Investigare e valutare, mediante esperimenti, in vitro, di reattività vascolare se la PTX3 è in grado di evocare, di per se, un effetto sulla modulazione del tono vascolare
2. Identificare i possibili meccanismi molecolari reclutati dalla PTX3, che mediano l'effetto della proteina sulla componente vascolare.
3. Condurre esperimenti in vitro, su cellule endoteliali umane trattate con pentraxina 3 e misurare i livelli di ossido nitrico prodotti.
4. Analizzare nel sangue dei pazienti ipertesi i livelli di pentraxina 3 e dei suoi mediatori di danno vascolare al fine di validare la PTX3 come possibile biomarcatore di danno endoteliale nell'ipertensione arteriosa

CAPITOLO II

Materiali e Metodi

Abbiamo effettuato studi di reattività vascolare su arterie di topi C57BL6 e di topi knock-out per FC γ R e P-selectina per valutare gli effetti vascolari della PTX3 in vitro. Per testare l'effetto in vivo della PTX3 sulla pressione arteriosa nei topi, abbiamo utilizzato un catetere di polietilene inserito in arteria femorale. Dopo gli esperimenti di reattività vascolare, le proteine sono state rapidamente estratte dai vasi per eseguire studi di immunoprecipitazione e immunoblot. Le analisi morfologiche nelle arterie mesenteriche sono state eseguite utilizzando la microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Le alterazioni macroscopiche sulle arterie mesenteriche sono state valutate con la colorazione con blu di Evans. Cellule endoteliali umane (HUVEC) sono state utilizzate per misurare l'attività della MMP1 attraverso il SensoLyte® Plus 520 MMP-1 Assay Kit *Fluorimetric and Enhanced Selectivity* (Anaspec); la produzione di NO è stata misurata utilizzando il Sievers 280i NO Analyzer.

Infine, i livelli plasmatici di PTX3, P-selectina e MMP-1 sono stati misurati nei soggetti ipertesi e normotesi con un sistema ad alta sensibilità per il plasma umano, saggio immuno-assorbente legato ad un Enzima (ELISA). Lo studio è stato approvato da un comitato istituzionale di revisione e i soggetti hanno dato il loro consenso informato.

Proteine e reagenti. PTX3 ricombinante umano e PTX3 biotinilato sono stati ottenuti come descritto in passato¹⁵. La Proteina sierica amiloide (SAP) ricombinante e la proteina C reattiva (PCR) sono state ottenute dalla Sigma. SiRNA di MMP - 1 e MMP - 9 sono stati acquisiti dalla Santa Cruz Biotechnology, Inc. Il controllo (senza silenziamento) siRNA è stato acquistato da QIAGEN. Sepharose A è stato acquistato da

Sigma. Perossidasi di rafano (HRP) coniugata al frammento immunoglobulinico anti-coniglio, HRP legata a streptavidina, e il reagente di rilevamento chemiluminescente per il Western blotting sono stati acquistati da Amersham Biosciences. OPTI-MEM, reagente Lipofectamine LTX, e FBS sono stati acquistati da Invitrogen.

Animali. Topi con deficit di FC γ -R e P-selectina sono stati acquisiti dall'Instituto Humanitas. Le procedure che coinvolgono gli animali e le loro cure sono state conformi alle linee guida istituzionali. Ogni sforzo è stato fatto per ridurre al minimo il numero di animali utilizzati e le loro sofferenze.

Studi di reattività vascolare. Arterie mesenteriche di secondo ordine sono state rimosse da topi C57BL6 e da topi knock-out per FC γ R e P-selectina per gli studi vascolari eseguiti come descritto in precedenza¹⁶. Brevemente, i vasi sono stati collocati in un bagnetto d'organo del miografo a forze o a pressione riempito con soluzione di Krebs mantenuta a pH 7,4 a 37 ° C. Il grasso avventiziale è stato accuratamente rimosso e le arterie sono state tagliate in segmenti di 2 mm di spessore. Gli anelli sono stati sospesi da due fili di tungsteno (25-micron di diametro) e montati con 0,3 g di tensione di riposo in un sistema miografo a forze (dimensione contenitore 5-mL; DMT danese Myosystem). La tensione isometrica è stata misurata utilizzando un trasduttore di forza accoppiato ad un sistema di acquisizione dati. Dopo un periodo di equilibrio di 60 minuti, gli anelli sono stati precontratti con fenilefrina (1×10^{-9} a 10^{-5} M) fino a raggiungere un plateau. I vasi sono stati poi lavati, e questo è stato ripetuto almeno tre volte per stabilizzare il tessuto. La vasodilatazione endotelio-dipendente e indipendente è stata valutata utilizzando rispettivamente concentrazioni crescenti di acetilcolina (da

10^{-9} M a 10^{-5} M) o nitroglicerina (da 10^{-9} M a 10^{-5} M), in vasi pre-contratti con fenilefrina alla dose necessaria per ottenere un simile livello di pre-contrazione in ciascun anello (80% dell'iniziale contrazione mediata dal KCl). Alcune arterie mesenteriche montate su un miografo a pressione sono state trasfettate con 20 μ g di MMP-1 siRNA o con siRNA di controllo. In particolare, il siRNA è stato diluito in 200 μ l di Opti-MEM I. E' stato aggiunto un volume uguale di reagente PLUS. La miscela è stata incubata per 5 min. Lipofectamine LTX è stata aggiunta, e i composti sono stati incubati per 25 minuti¹⁷. Successivamente, 200 μ L di composto sono stati iniettati nella via P1 (direttamente nel vaso) del miografo a pressione e poi i vasi sono stati perfusi a 100 mmHg per 1 ora e poi a 60 mmHg per 5 ore come descritto in precedenza¹⁷.

Misurazione della pressione arteriosa

Due giorni prima di testare PTX3 sulla pressione arteriosa, i topi sono stati anestetizzati con 0,03 mL di una miscela 2:1 di ketamina (100 mg/ml IM, Aveco Co) e xilazina (20 mg/ml IM, Miles Inc) e posti su una superficie operativa mantenuta a 38 ° C. Un catetere di polietilene (PE-10; Becton Dickinson, Sparks) è stato inserito in un'arteria femorale come precedentemente descritto¹⁸. L'intervento è stato eseguito in modo uniforme da un unico operatore tra le 8 e mezzogiorno. Il catetere è stato riempito con soluzione salina eparinizzata (100 μ U/ml) ed inserito in posizione sottocutanea nella regione interscapolare. È stato collegato ad un trasduttore di pressione (WPI, TBM4M) e la pressione arteriosa è stata monitorata e registrata su un sistema informatico (WPI, Trans Ponte 4M). Dopo l'intervento chirurgico, i topi sono stati alloggiati in gabbie individuali permettendogli il recupero post-chirurgico. La pressione arteriosa è stata

misurata in modo diretto nell'arteria femorale nei topi coscienti, liberi di muoversi dopo il digiuno notturno come precedentemente descritto¹⁸.

La pressione arteriosa è stata valutata in topi WT e Knock-out per P-selectina in condizioni basali e dopo iniezione di PTX3 (100 µg, intraperitoneale). I topi utilizzati come controlli sono stati trattati in modo simile, sostituendo la PTX3 con il solo veicolo. La pressione arteriosa basale è stata valutata anche in topi WT e KO per PTX3 per una settimana. Alla fine della misurazione della pressione sanguigna, alcuni vasi sono stati asportati per effettuare esperimenti di reattività vascolare, western blot e analisi morfologiche.

Immunoprecipitazione. Omogenati di arteria mesenterica sono stati preparati in 5 mM di un tampone di Tris-HCl, a pH 7,5, contenente 1 mM di CaCl₂, 1 mM MgCl₂ e 1 mM di NaHCO₃. I campioni contenenti 1 mg delle proteine totali sono stati lisati per 40 minuti a + 4 ° C con tampone di lisi a pH 7,5 contenente 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM Na₂P₂O₇, 1 mM NaF, EDTA 1 mM, 2 mM NaVO₄, 0,1 mM PMSF, e completato con un cocktail di inibitori di proteasi (Roche), e centrifugato per 15 min a 20.000 g a 4 ° C. I soprannatanti sono stati eliminati con proteina A/G agarosio (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) per 2 ore a 4 ° e incubate o con anticorpi anti P-selectina o anti-Caveolina-1, seguito da precipitazione con proteina A / G-agarosio per 1 ora a 4 ° C. Le perle sono state lavate tre volte con tampone di lisi e due volte con PBS, e infine analizzate con immunoblotting.

Elettroforesi su gel e immunoblotting. L'estrazione delle proteine è stata effettuata da quattro pool di arterie mesenteriche. Le proteine sono state separate su 10% SDS-PAGE

e con elettroblotting trasferito su membrana di nitrocellulosa (Amersham) per 1,5 ore a 250 mA. Immunoblots sono stati incubati con gli anticorpi primari appropriati, seguiti da incubazione con anticorpi secondari marcati con HRP, e visualizzati tramite ECL prime (Amersham & Co.). I marcatori di peso molecolare (Prestained protein standards) sono stati ottenuti da Bio-Rad. Per i confronti quantitativi di chemiluminescenza tra le corsie, le stesse quantità di proteine totali o le stesse quantità di immunoprecipitato sono state caricate in ciascuna corsia. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. I valori di tutti gli esperimenti sono stati utilizzati per calcolare i valori medi e la deviazione standard. La quantificazione della chemiluminescenza è stata effettuata utilizzando il software ImageJ. I confronti tra i gruppi sono stati fatti utilizzando il test statistico “t test”.

Colture cellulari. Le cellule HUVEC sono state coltivate con mezzi di coltura EBM-2. HUVEC sono state coltivate a 37 ° C in 5% di CO₂ / 95% di O₂ con metodologie standard in fiasche da 25 cm² (50 ml di capienza) (Falcon, Becton Dickinson Labware) in presenza di fattori di crescita endoteliale cellulare supplementare. In generale, le HUVEC sono state utilizzate per i nostri esperimenti dopo 3-5 passaggi. Per gli esperimenti di deprivazione nutrizionale, è stato utilizzato un mezzo privo di siero e di fattori di crescita. Per il knockdown genico mediato dal siRNA, le HUVEC sono state cresciute dal 60% al 70% di confluenza e trasfettate con Lipofectamine LTX (Invitrogen) secondo il protocollo del produttore. Come controllo, sono stati utilizzati RNA disordinati. 24 ore dopo la trasfezione del siRNA, le cellule sono state lavate con PBS e poi lasciate per 2 ore in un mezzo privo di siero e di fattori di crescita prima di ciascun trattamento.

Misurazione dell'attività della MMP-1.

Le HUVEC sono state coltivate a 37 ° C in 5% CO₂ / 95% di O₂ in piatti di 100 mm fino a raggiungere il 70-80% di confluenza. Il trattamento con PTX3 (2 e 20 ng/mL) e P-selectina (50 e 100 ng/mL) è stato eseguito in terreno privo di fattore di crescita e di siero. Le cellule sono state trattate per 1 ora; alla fine del trattamento, il mezzo è stato raccolto e concentrato x10 utilizzando Ultra-Amicon 10K (Sigma). L'attività della MMP-1 è stata misurata con TECAN Infinite 200Pro, utilizzando SensoLyte® più 520 MMP-1 Assay Kit * Fluorimetrico ed Enhanced Selettività * (Anaspec) attraverso il monitoraggio a lunghezza d'onda di eccitazione/emissione 490 nm/520 nm al punto finale, seguendo il protocollo del produttore.

Microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Precipitati di HUVEC e arterie mesenteriche provenienti da topi di controllo e KO (5 mm 3 campioni) sono state trattate per le analisi ultrastrutturali con la microscopia elettronica a trasmissione fissandole in paraformaldeide al 2% e 0,1% di glutaraldeide in 0,1 M di PBS, pH 7,4, per 90 min; dopo il lavaggio in PBS, i campioni sono stati fissati successivamente in 1% OsO₄ per 2 ore a 4 ° C. Poi, i campioni sono stati disidratati in alcool etilico ed inclusi in Epon-araldite. Sezioni ultrasottili (50 nm sottile) sono state colorate con acetato di uranile e citrato di piombo e, infine, sono state esaminate con un microscopio elettronico a trasmissione Jeol Jem100SX (Jeol, Tokyo, Giappone).

Per l'immunocitochimica, le arterie mesenteriche sono state trattate come descritto per il TEM comune.

Dopo averle incise è stata eseguita la microscopia immunoelettronica. Sezioni ultrasottili (50 nm) sono state deosmicate con una soluzione acquosa di metaperiodato

di sodio e incubate per 24 ore a 4 ° C con anticorpi primari contro CAV-1 o MMP1 (Sigma-Aldrich) diluiti 1:10 in PBS contenente 0,2% saponina (Sigma) e siero di capra normale 1%. Quindi, le sezioni sono state incubate con anticorpi secondari coniugati con oro (particelle d'oro 20-nm) diluiti 1:10 in soluzione tampone per 1 ora a 25 ° C. Infine, le sezioni sono state fissate con 1% di glutaraldeide, colorate con acetato di uranile e citrato di piombo, e esaminate al microscopio elettronico Jeol JEM SX 100. Sezioni di controllo sono state ottenute omettendo l'anticorpo primario e incubando con il solo anticorpo secondario.

Colorazione con Blu di Evans

Alterazioni della struttura del sistema vascolare sono state valutate su arterie mesenteriche anche utilizzando la colorazione con Blu di Evans (Sigma) secondo il metodo precedentemente descritto²⁰. Brevemente, 50 mL di una soluzione contenente 2 % di blu di Evans diluito in soluzione salina è stato iniettato nella vena della coda 10 minuti prima dell'eutanasia, seguita dal fissaggio con perfusione di paraformaldeide al 4% per 10 minuti. Le immagini sono state catturate con un microscopio LSM 510 (Carl Zeiss MicroImaging).

Analisi di immunofluorescenza

Sui vasi : Le arterie mesenteriche sono state trattate con PTX3 biotinilata (20 ng/ml) per 45 minuti e poi crioconservati in un mezzo Killik (Bioptica). I vasi sono stati elaborati in un criostato per ottenere sezioni di 10 micron disposte su vetrini polarizzati (Carlo Erba). Le sezioni sono state poi ampiamente lavate e trattate con streptavidina fluorescente (1 : 500) e incubate per 2 ore a temperatura ambiente.

Diverse sezioni di arterie mesenteriche provenienti da topi WT e KO per P-selectina sono state elaborate con diversi anticorpi primari (CD31, α -SMA) per valutare l'integrità dello strato endoteliale e muscolare liscio, e poi con i rispettivi anticorpi secondari. Infine, le sezioni sono state visualizzate con un microscopio a fluorescenza Zeiss 2. Le sezioni sono state lavate in TBS e incubate per 20 minuti con anticorpo secondario Novocastra biotinilato (RE7103), una formulazione di anticorpo secondario coniugato alla biotina che riconosce le immunoglobuline di topo e di coniglio. Quindi, le sezioni sono state sciacquate in TBS e incubate per 20 minuti con Novocastra Streptavidina-HRP (RE7104). La reattività della perossidasi è stata visualizzata utilizzando il 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Infine, le sezioni sono state colorate con ematossilina e montate. I risultati sono stati interpretati utilizzando un microscopio ottico LSM 510 (Carl Zeiss MicroImaging). L'espressione immunoistochimica è stata valutata da un patologo.

Sulle cellule: Le HUVEC sono state seminate su vetrini e trattate con 20 ng/ml di PTX per il tempo indicato. Alla fine del trattamento, i vetrini sono stati lavati con PBS, fissati 10 min in PBS-paraformaldeide al 4% e incubati 30 min in PBS contenente 0,5% di BSA e 50 mM NH₄Cl a temperatura ambiente senza permeabilizzazione. Per la colorazione della P-selectina e PTX3, i vetrini sono stati incubati per 1 ora a temperatura ambiente con 10 μ g/ml di anticorpo murino anti-umano CD62p (BD Biosciences) e/o 20 mg/ml di anticorpo policlonale di coniglio specifico per PTX3 (Sigma-Aldrich). Sono stati utilizzati anticorpi secondari coniugati con Alexa 594 e Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch). La colorazione di CD31 è stata eseguita per 1 ora a temperatura ambiente con una diluizione 1:25 di anticorpi policlonali di ratto specifici per CD31. Sono stati utilizzati anticorpi secondari anti-ratto biotinilati e Alexa

488 marcato con streptavidina. I vetrini sono stati montati con il kit Prolong Antifade. Le immagini sono state raccolte con un microscopio a scansione laser confocale (LSM 510; Carl Zeiss MicroImaging) dotato di un piano di Apo 63X, NA 1,4 olio di immersione per la lente dell'obiettivo.

Misure della colocalizzazione. La percentuale della colocalizzazione dei segnali di fluorescenza è stato quantificato in un minimo di 30 cellule differenti. Le immagini limitate a 8-bit sono state analizzate attraverso il coefficiente di colocalizzazione di Manders con il software LSM 510 4.0 SP2. La colocalizzazione percentuale è relativa al focus sul piano z mostrato nei pannelli d'immunofluorescenza.

Analisi citofluorimetrica. Le HUVEC sono state trattate con PTX3 (20 ng/ml) o veicolo per 2 ore e poi incubate con anticorpo anti-P-selectina (Santa Cruz) (diluito 1/25 in PBS) per 30 minuti a 4 °C. Le cellule sono state quindi lavate con PBS e colorate con anticorpo di capra coniugato con PE IgG anti-topo (Sigma-Aldrich) (diluito 1/100 in PBS) per 30 minuti a 4 °C, e poi seguito da lavaggi con PBS. Le misurazioni di citometria a flusso sono state effettuate con il FACSCanto (Becton Dickinson -, San Diego, CA) e analizzate dal software Flow-Jo (Alberio Star Inc. , Ashland, OR).

Campioni umani e ELISA. Trentuno pazienti con ipertensione (definita come DBP ≥ 90 mmHg e/o SBP ≥ 140 mmHg o sulla base dell'uso di farmaci anti-ipertensivi) e 21 soggetti di controllo in buona salute sono stati reclutati presso l'ambulatorio per la prevenzione delle malattie cardiovascolari del presidio ospedaliero G. Da Procida–Azienda Ospedaliera Universitaria San Giovanni di Dio Ruggi d'Aragona.

Lo studio è stato approvato da un comitato scientifico e i soggetti hanno dato il loro consenso informato. I dati clinici di ciascun paziente sono stati raccolti. I pazienti con malattie polmonari, malattie cardiache, malattie infiammatorie acute o croniche, infezioni recenti, neoplasie, in trattamento concomitante con steroidi o farmaci anti-infiammatori non steroidei, o alcolismo sono stati esclusi.

La pressione arteriosa (BP) è stata misurata con il paziente seduto con l'uso di un dispositivo automatico convalidato. Tre letture consecutive sono state registrate, e la media è stata utilizzata per l'analisi. Le caratteristiche dei pazienti sono riportate in Tabella 1.

Il sangue venoso è stato raccolto in contenitori sotto vuoto contenenti EDTA e conservato a -80 ° C. PTX3, P-selectina e MMP-1 sono stati poi misurati utilizzando un sistema di analisi di immunoassorbimento enzimatico ad alta sensibilità (ELISA) per il plasma umano. La preparazione delle placche e dei sandwich ELISA è stata eseguita in conformità alle istruzioni del produttore per ogni kit specifico (PTX3 ELISA umano Kit, Abnova # KA1007; CD62p P-selectina umana ELISA Kit, Abcam # ab100631; MMP1 umana ELISA Kit, Abcam # ab100603).

Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando Prism (GraphPad). Il test t di Student a due code è stato utilizzato per calcolare la significatività statistica degli esperimenti Western Blot. I dati provenienti da tutti gli esperimenti sono riportati come media \pm deviazione standard (SD), fatta eccezione per gli esperimenti di reattività vascolare per i quali i dati sono riportati come media \pm

errore standard della media (SEM). L'analisi delle curve della pressione arteriosa media e di reattività vascolare sono state eseguite utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney. Il p-value <0.05 è stato considerato significativo. Il test di Shapiro-Wilk è stato utilizzato per valutare eventuali deviazioni dalla distribuzione normale delle variabili quantitative dei valori ELISA analizzati (p <0.05). Le variabili quantitative, seguendo la distribuzione normale, sono state descritte da media \pm deviazione standard (SD) o altrimenti dalla mediana (25°- 75° percentile). Il test t di Welch è stato applicato per testare la differenza statisticamente significativa in termini di variabili normalmente distribuite tra ipertesi e soggetti di controllo. La funzione ROC implementata nel pacchetto R, chiamata PROC, è stata utilizzata per stimare l'area sotto la curva ROC (AUROC) ed il corrispondente intervallo di confidenza al 95% per ciascuna variabile. La variabile di risposta per ciascun modello è stata rappresentata dallo stato controllo/iperteso, mentre le variabili predittive sono state: le prime misure di PTX3, P-selectina e MMP-1. Le curve ROC sono state confrontate con la funzione implementata del test ROC nel pacchetto R chiamato "Proc". Per identificare la soglia più informativa per ciascuna variabile, al fine di distinguere i soggetti ipertesi dai controlli, l'insieme dei dati è stato suddiviso in modo casuale con stratificazione in un training set (70% dell'intero campione) e in un test set (30% dei dati), in modo che la proporzione di casi e controlli osservati in tutto il campione venisse mantenuta nelle due sottocorti. Così, le soglie più informative sono state individuate tra tutti i valori possibili osservati nel training set come le uniche che garantivano il più alto Coefficiente di correlazione di Matthew (MCC), che è il parametro più opportuno per l'analisi di dataset caratterizzati da squilibri.

Le performances discriminanti delle variabili analizzate, discretizzate secondo le soglie identificate, sono state valutate sul training indipendente e sul test set in termini di MCC, sensibilità (Sens.), specificità (Spec.), valore predittivo positivo (PPV), valore predittivo negativo (NPV) e F-misurabile (F). I test statistici sono stati eseguiti dal software R v.3.1.0 (www.r-project.org/).

CAPITOLO III

Risultati

PTX3 induce disfunzione endoteliale nei vasi di resistenza del topo.

Elevati livelli di PTX3 sono stati associati alla disfunzione endoteliale nell'uomo^{12-14,21}. Pertanto, abbiamo valutato se la proteina era in grado di influenzare, di per sé, la funzione endoteliale, che risulta essere ridotta nell'ipertensione²². A tal fine, abbiamo testato gli effetti di dosi crescenti di PTX3 (2, 20 e 200 ng/ml) per diversi tempi di preincubazione (15, 30, 45 e 60 minuti) sulla vasodilatazione endoteliale indotta dall'acetilcolina su vasi arteriosi mesenterici di topo precontratti (**Fig. 1**). Abbiamo dimostrato che 2 ng/ml di PTX3 non influenzano la funzione endoteliale (**Fig. 1**). Al contrario, 20 ng/mL inducevano una riduzione significativa nella vasodilatazione mediata dall'acetilcolina dopo 45 minuti di preincubazione; l'effetto era simile a quello osservato dopo 60 minuti (**Fig. 1b**). La vasodilatazione endoteliale osservata in presenza di 200 ng/ml di PTX3 (**Fig.1c**) non era statisticamente differente da quella evocata da 20 ng / mL. Così, abbiamo deciso di utilizzare 20 ng/ml per 45 minuti di preincubazione in tutti i seguenti esperimenti in vitro.

L'immunofluorescenza, utilizzando PTX3 esogeno biotinilato, ha chiaramente dimostrato che la proteina è localizzata nell'endotelio, come dimostra l'interazione specifica tra biotina e streptavidina fluorescente (**Fig. 1d**).

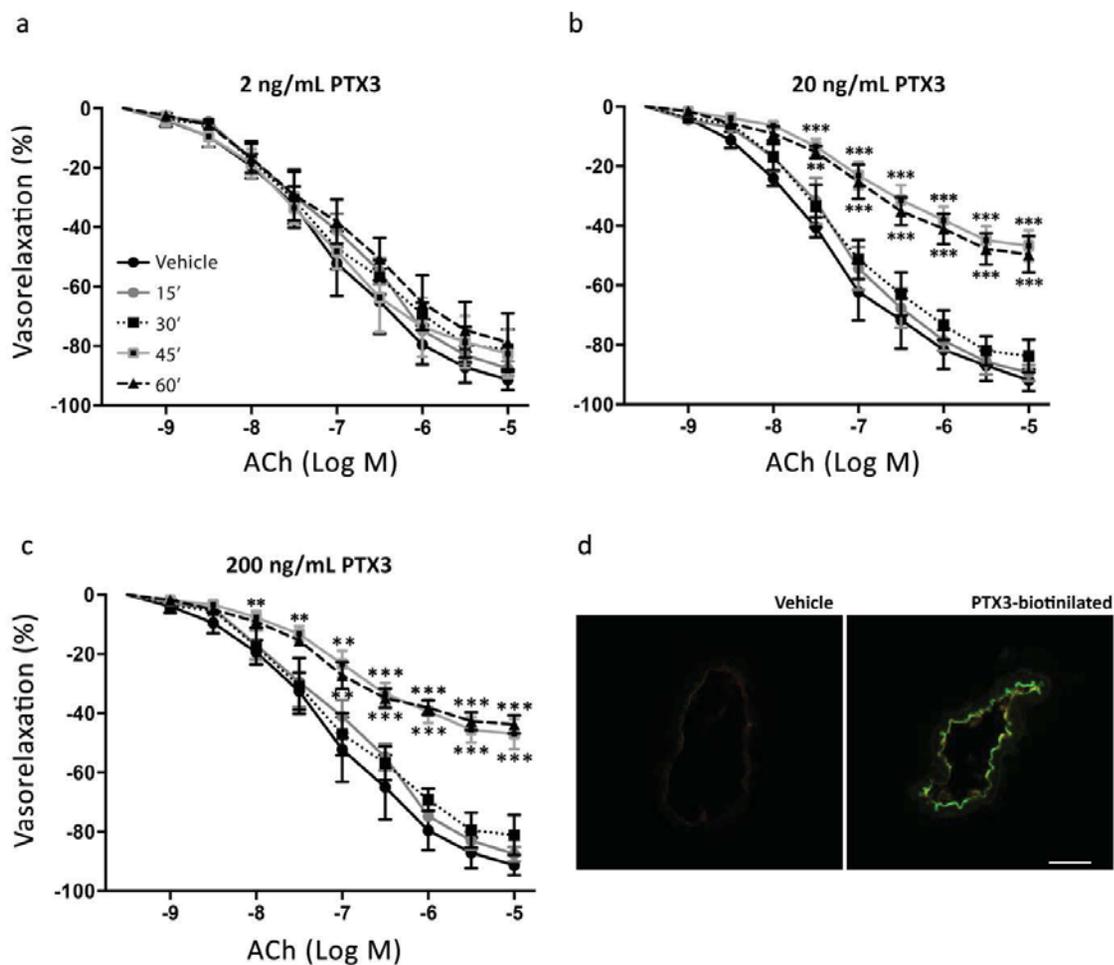


Figura 1. a-c) curva dose-risposta all'acetilcolina (ACh) di arterie mesenteriche di topi C57BL/6N precontratte con fenilefrina. I vasi sono stati pre-esposti alla pentraxina 3 (PTX3) per 15, 30, 45 o 60 minuti a diversi dosaggi (2, 20 o 200 ng/mL). **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ vs veicolo, 15', 30'; $n = 7$ per ciascun gruppo). **d)** colorazione immunoistochimica, utilizzando la fluorescenza della streptavidina, delle arterie mesenteriche di topi C57BL/6N trattati con veicolo o con PTX3 biotinilato. Scala grafica 100 μm .

Per capire se l'azione vascolare della PTX3 sull'endotelio fosse generalizzata o specifica per un distretto vascolare, abbiamo testato il suo effetto su altri letti vascolari, come le arterie femorali e l'aorta. PTX3 induce disfunzione endoteliale a livello dell'arteria femorale (**Fig. 2a**) ma non in vasi di capacitanza come l'aorta (**Fig. 2b**). Inoltre, l'azione

vascolare di PTX3 era specifica sulla funzione endoteliale, dal momento che il rilassamento della muscolatura liscia mediato dalla nitroglicerina come donatore diretto di NO non era influenzato.

Da notare che questo non è stato osservato in aorta, in cui la PTX3 non ha mostrato di esercitare alcun effetto vascolare (**Fig. 2c**). Tali risultati dimostrano che il target dell'azione vascolare di PTX3 è l'endotelio e che induce disfunzione dei vasi di resistenza.

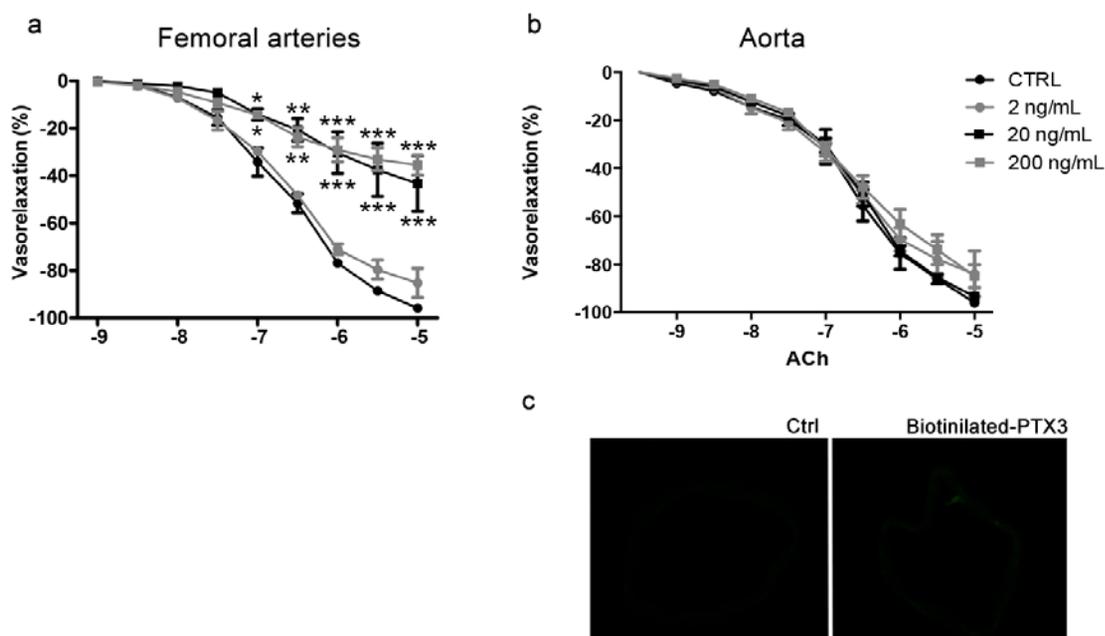


Figura 2 . Effetti della PTX3 su arterie femorali e sull'aorta .

a) curva dose-risposta di arterie femorali precontratte con fenilefrina provenienti da topi C57BL/6N all'acetilcolina dopo 45 minuti di trattamento con PTX3 a diversi dosaggi (2 , 20 , 200 ng/mL). **b)** curve dose-risposta di anelli di aorta precontratti con fenilefrina provenienti da topi C57BL/6N all' acetilcolina dopo 45 minuti di trattamento con PTX3 a diverso dosaggio (2, 20, 200 ng/mL). * , P < 0,05; ** , P < 0,001 ; *** , P < 0,0001 vs controllo o 2 ng/mL. (n = 8 sia per le arterie femorali che per l'aorta. **c)** La colorazione immunoistochimica, utilizzando streptavidina fluorescente, di sezioni di aorta provenienti da topi C57BL/6N trattati con veicolo o con PTX3-biotinilata. Scala grafica, 100 µm. (n = 4).

La P-selectina media l'azione di PTX3 sull'endotelio.

Nel campo dell'immunologia, P-selectina e Fc γ R sono stati identificati come due recettori di PTX3^{23,24}, ma non vi sono dati sulla partecipazione di tali recettori a livello vascolare. Per chiarire questo problema, abbiamo effettuato esperimenti su arterie mesenteriche di topi knockout per P-selectina e Fc γ R, testando l'effetto sull'endotelio vascolare di PTX3. Studi di reattività vascolare dimostrano che PTX3 diminuisce la vasodilatazione mediata dall'acetilcolina nei vasi dei topi knockout per Fc γ R (**Fig. 3a**), ma non esercita alcun effetto in quelli carenti di P-selectina (**Fig. 3b**). Questi risultati candidano la P-selectina come il recettore per PTX3 nelle cellule endoteliali. In accordo con questi risultati P-selectina immunoprecipita con PTX3 in lisati di arteria mesenterica wild-type. Come prevedibile, P-selectina non immunoprecipita in topi Knockout (**Fig. 3c**).

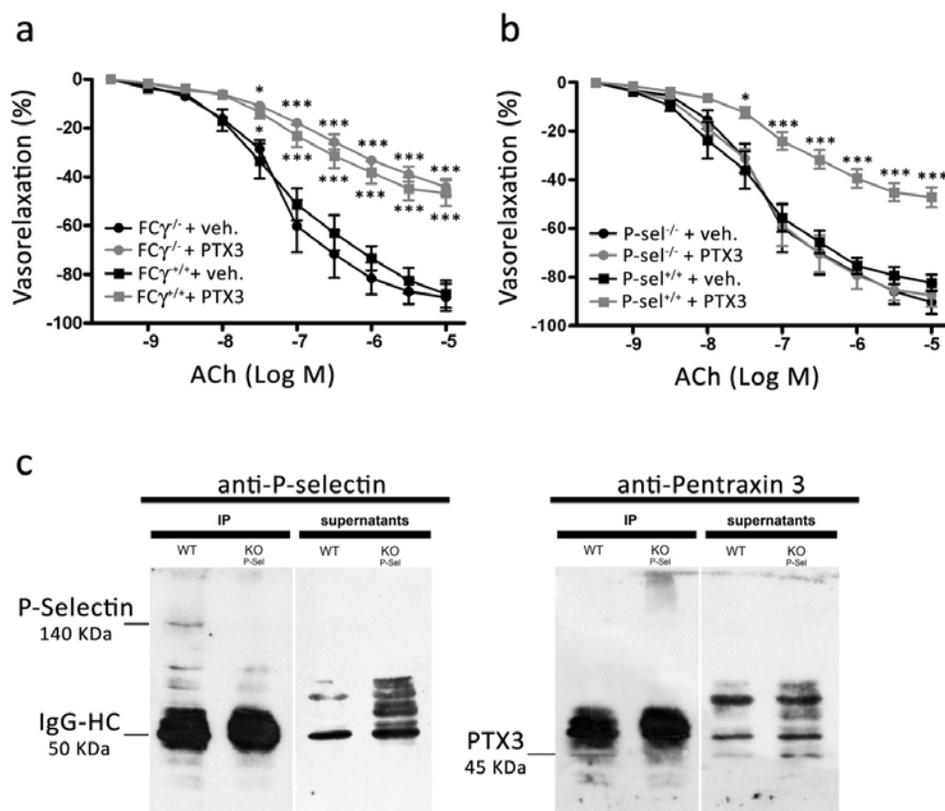


Figura 3. **a)** curva dose-risposta all'acetilcolina (ACh) di arterie mesenteriche Fcγ +/+ e Fcγ -/- precontratte con fenilefrina esposte al veicolo o alla pentraxina 3 (PTX3) per 45 minuti; *, p <0.05; **, P <0,01 vs Fcγ -/- + veicolo e Fcγ +/+ veicolo; n = 5 per ogni gruppo. **b)** curva dose-risposta all'acetilcolina (ACh) di arterie mesenteriche P-selectina +/+ e P-selectina -/- precontratte con fenilefrina dopo 45 minuti di esposizione al veicolo o alla PTX3. *, P <0,05; **, P <0.01 vs P-sel -/- + veicolo, P-sel -/- + PTX3 e P-sel +/+ + veicolo; n = 5 per ogni gruppo. **c)** immunoprecipitato endogeno di P-selectina con PTX3 in lisato di arteria mesenterica di topi wild-type (WT), ma non da topi knockout (KO) per P-selectina. Gli estratti sono stati immunoprecipitati con P-selectina e poi sono stati sondati con anticorpi anti-P-selectina o anti-PTX3; n = 3.

Oltre che con PTX3, P-selectina interagisce anche con l'amiloide sierica A (SAP) in processi immunologici e vascolari²⁵. Abbiamo dimostrato che la disfunzione endoteliale mediata da SAP non esercita alcun effetto nei topi KO per la P-selectina (**Fig. 4a**). Quest'azione non è comune ad altri fattori infiammatori come la proteina C reattiva (PCR) che induce disfunzione endoteliale attraverso l'interazione con il recettore FCγIIB²⁶. In linea con questo dato, la PCR era ancora in grado di indurre il suo effetto vascolare nei topi KO per P-selectina (**Fig. 4b**).

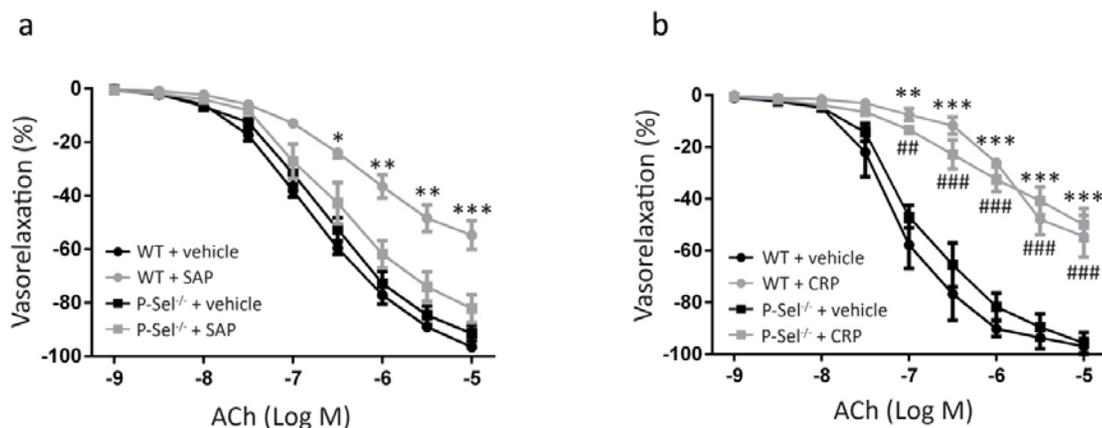


Figura 4. a) Curva dose-risposta all'acetilcolina (ACh) di arterie mesenteriche precontratte con fenilefrina provenienti da topi wild-type(WT) e da topi knockout per la P-selectina (P - sel -/-): i vasi sono stati esposti solo al veicolo o a SAP per 45 minuti (200 ng/ml); n = 4 per ciascun gruppo. **b)** curva dose-risposta all'acetilcolina di arterie mesenteriche precontratte con fenilefrina provenienti da topi WT e KO per la P-selectina: i vasi sono stati esposti al solo veicolo o a CRP per 45 minuti (5 mg/ml) n = 4 per ogni gruppo. *******, $p < 0.0001$ vs WT. **###**, $P < 0.0001$ vs WT.

La disfunzione endoteliale determinata da PTX3 è associata ad alterazioni strutturali delle cellule endoteliali.

Un'interessante osservazione emersa da studi di reattività vascolare è stata che la disfunzione endoteliale era ancora presente dopo ripetuti wash-out della PTX3 dal bagnetto d'organo in cui erano immersi i vasi (**Fig.5a**). Questo risultato ci ha portato ad ipotizzare che PTX3 potesse indurre un'alterazione strutturale. Abbiamo quindi studiato le arterie mesenteriche a livello ultrastrutturale per vedere se il trattamento con PTX3 potesse indurre alterazioni fenotipiche nelle cellule vascolari. Vasi WT trattati con veicolo avevano un'architettura normale con nuclei tipici frastagliati, citoplasma ben organizzato e la membrana plasmatica intatta (**Fig. 5b, pannello 1**). Al contrario, il trattamento con PTX3 induceva la presenza di grandi vacuoli, un citoplasma diluito e la rottura della membrana plasmatica (**Fig. 5b, pannello2**). E' interessante sottolineare che non sono state rilevate alterazioni strutturali nelle cellule endoteliali dell'arteria mesenterica provenienti da topi knockout per P-selectina (-/-) dopo l'esposizione al veicolo o alla PTX3 (**Fig. 5b, pannelli 3 e 4**); inoltre, nessun cambiamento strutturale è

stato osservato nello strato muscolare liscio dopo l'esposizione alla PTX3 (dati non riportati).

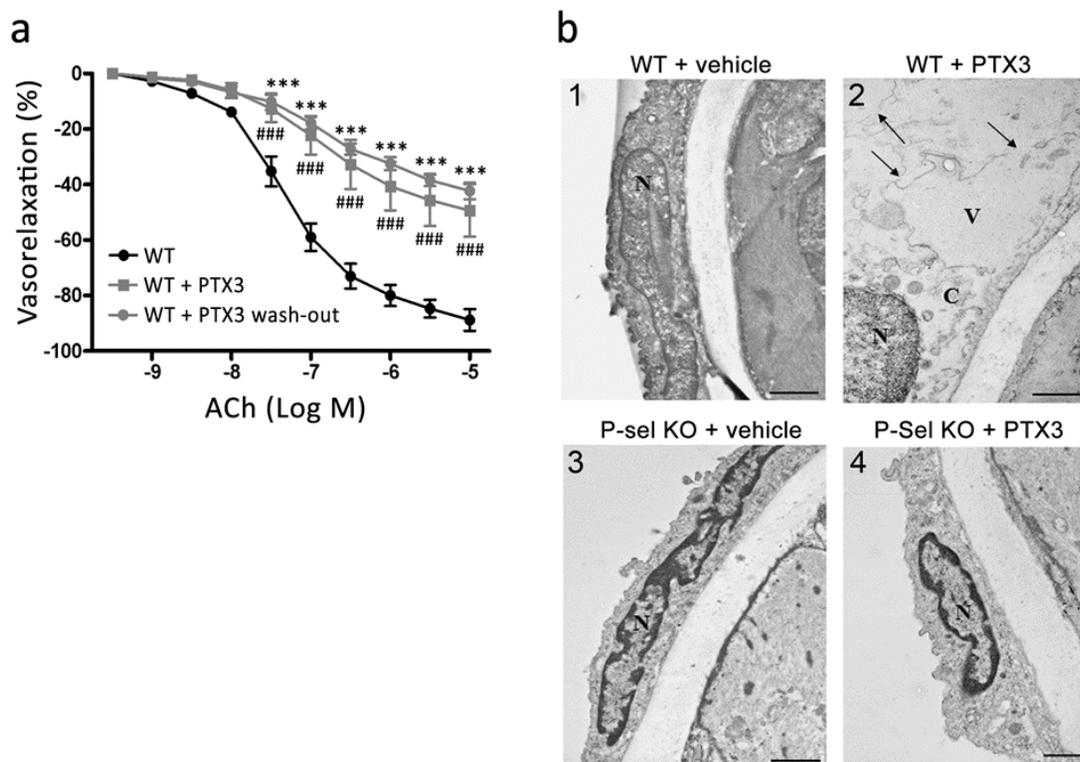


Figura 5. a) curva dose-risposta all'acetilcolina (ACh) di arterie mesenteriche di topi C57BL/6N (WT) precontratte con fenilefreina; i vasi sono stati non trattati, esposti alla pentraxina 3 (PTX3) per 45 minuti (WT + PTX3), o esposti alla PTX3 con continui wash-out (WT + PTX3 wash - out). **, $p < 0,01$ vs WT. ##, $p < 0,01$ vs WT; $n = 6$ per ogni gruppo. **b)** Effetto della PTX3 sull'ultrastruttura delle cellule endoteliali. Micrografie rappresentative delle cellule endoteliali provenienti da topi WT e knockout (KO) per la P-selectina in condizioni basali (pannelli 1 e 3) o dopo esposizione alla PTX3 (pannelli 2 e 4). Cellule endoteliali WT e P-selectina KO in condizioni basali e cellule endoteliali P-selectina KO esposte alla PTX3 avevano il citoplasma e i nuclei ben conservati; cellule endoteliali di arteria mesenterica WT esposte alla PTX3 avevano una diluizione del citoplasma e la rottura della membrana plasmatica (frecche); $n = 4$ per ciascun gruppo. C= il citoplasma, N= nucleo, V= vacuolo. Scala grafica, = 1,17 (1) e = 0,76 μm (2).

In accordo, la colorazione con Blu di Evans (EBD), in grado di identificare il danno vascolare, è stata assorbita solo dai vasi provenienti da topi wild-type pre-trattati con la PTX3 (**Figura 6**).

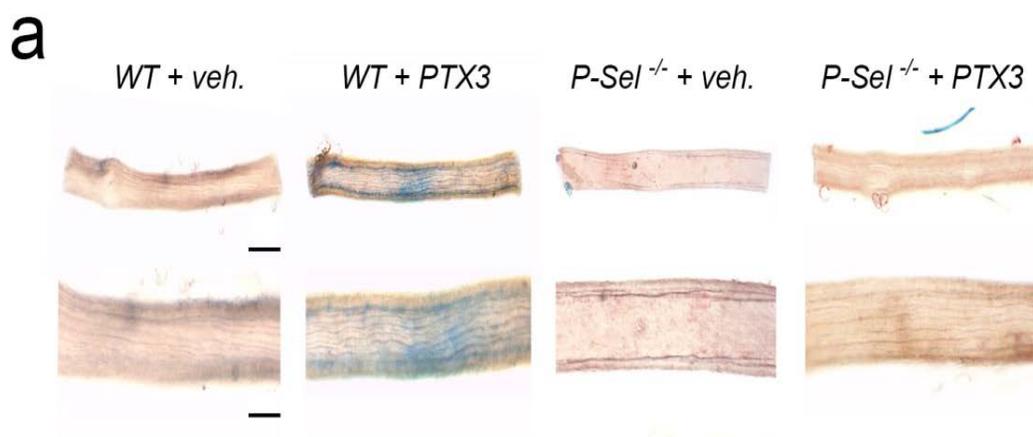


Figura 6. a) Immagini rappresentative della colorazione con blu di Evans-dye su arteria mesenterica di topi WT e KO per P-selectina trattati con veicolo o con PTX3. (n = 3 per ciascun gruppo)

Effetto della PTX3 su cellule endoteliali isolate umane

a) Effetto di PTX3 sull'espressione P-selectina

La microscopia confocale ha rivelato che il trattamento con PTX3 (20 ng / mL per 0-60 minuti) induce l' espressione di P-selectina sulle membrane cellulari delle cellule endoteliali. Per confermare tale risultato abbiamo condotto un'analisi utilizzando la citofluorimetria a flusso, abbiamo potuto osservare che l'esposizione delle cellule

endoteliali alla PTX3 esogena era effettivamente capace di up-regolare la P-selectina espressa in membrana. (**Fig. 7**)

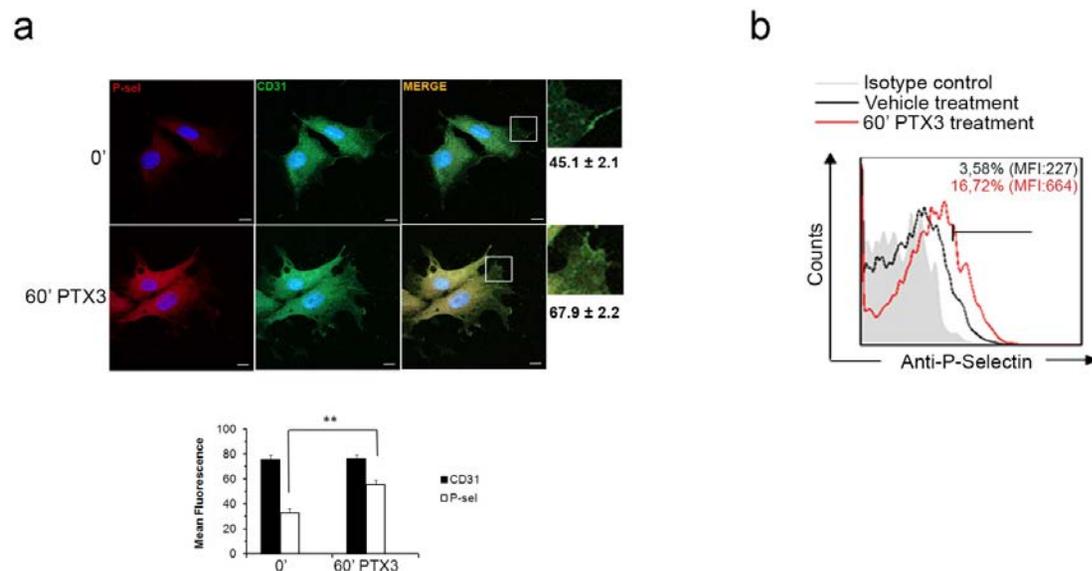


Figura 7. a) Cellule endoteliali non trattate 0' o trattate per 60 minuti con PTX3 (20 ng/mL). La colocalizzazione viene visualizzata in giallo nei pannelli MERGE, e quantificata come Manders coefficienti colocalizzazione nell'istogramma sotto.

**p<0.05. Le cellule sono state trattate per immunofluorescenza con l'anticorpo anti-P-selectina (P-sel) e CD-31 (una specifica-membrana) anticorpi; n = 4. b) analisi citofluorimetrica delle HUVEC trattate per 1 ora con 20 ng / mL PTX3. Il grafico riporta l'incremento in percentuale di P-selectina sulla membrana delle cellule endoteliali umane; n = 4. MFI, media intensità di fluorescenza.

Le alterazioni strutturali indotte da PTX3 a livello vascolare sono mediate dal pathway P-selectina/metalloproteinasi-1.

Sulla base dei risultati dell'analisi ultrastrutturale delle arterie mesenteriche, abbiamo concentrato la nostra attenzione sull'identificazione dei mediatori delle alterazioni strutturali indotte da PTX3, ricercando il coinvolgimento di importanti molecole reclutate nei cambiamenti della struttura vascolare, ossia le metalloproteinasi (MMPs). In primo luogo abbiamo valutato l'effetto sulla funzione endoteliale di PTX3 in presenza di GM6001, un inibitore delle MMP -1, -2, -3, -8 e -9. In linea con le nostre ipotesi, questo inibitore non selettivo delle MMP proteggeva le arterie mesenteriche dalla disfunzione endoteliale mediata dalla PTX3 (**Fig. 8a**). Abbiamo poi deciso di identificare selettivamente quale MMP fosse coinvolta, utilizzando siRNA selettivi per silenziare l'espressione di MMP-1 o MMP-9, che sono MMP altamente presenti nello strato endoteliale. Abbiamo scoperto che il silenziamento della MMP-9 non alterava l'effetto deleterio vascolare indotto PTX3 (**Fig. 7b**); al contrario, il silenziamento della MMP-1 proteggeva dalla disfunzione endoteliale mediata dalla PTX3 (**Fig. 7c**). In accordo, il Western blotting ha rivelato che PTX3 induce l'aumento dell'espressione di MMP1 nell'arteria mesenterica di topi WT (**Fig. 8d**), un effetto assente in vasi P-selectina $-/-$ (**Fig. 8e**), e che le alterazioni ultrastrutturali indotte dalla PTX3 erano assenti nei vasi transfettati con il siRNA di MMP-1 (**Fig. 8f**). Tali risultati dimostrano chiaramente il coinvolgimento del pathway P-selectina/MMP-1 nel danno alla membrana delle cellule endoteliali mediato dalla PTX3.

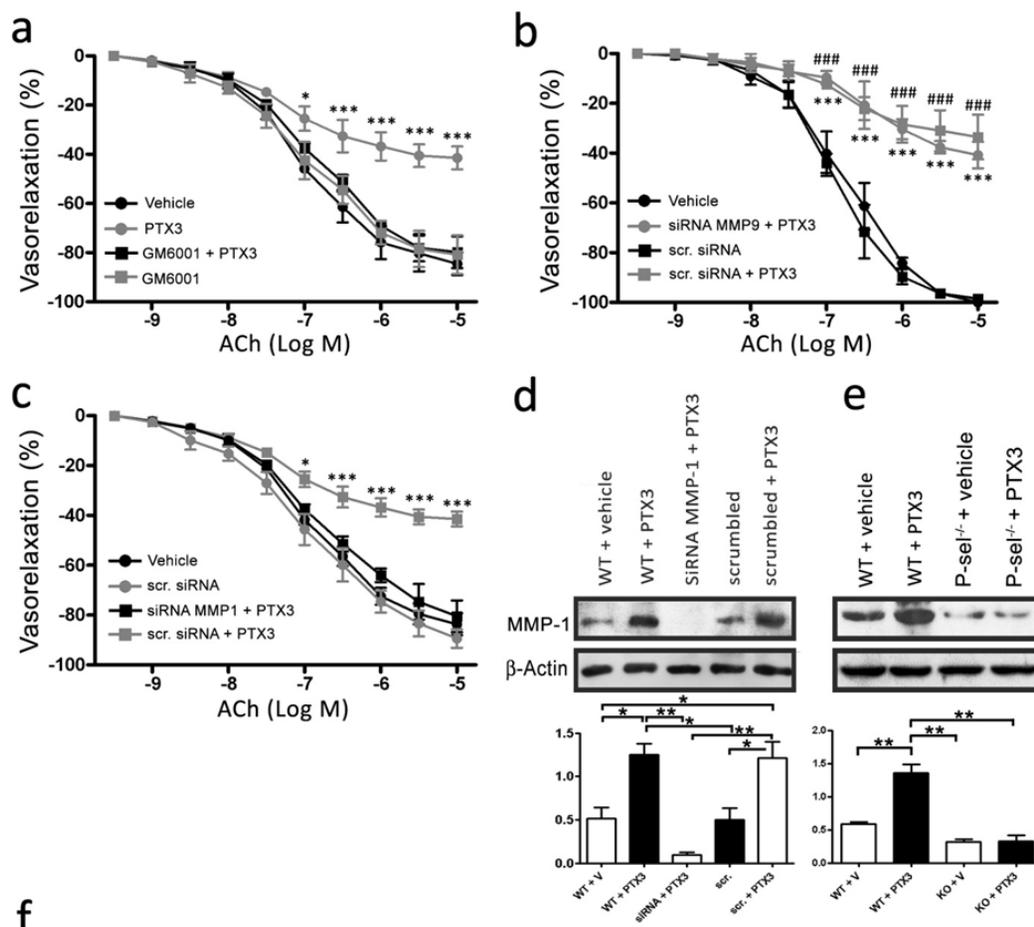
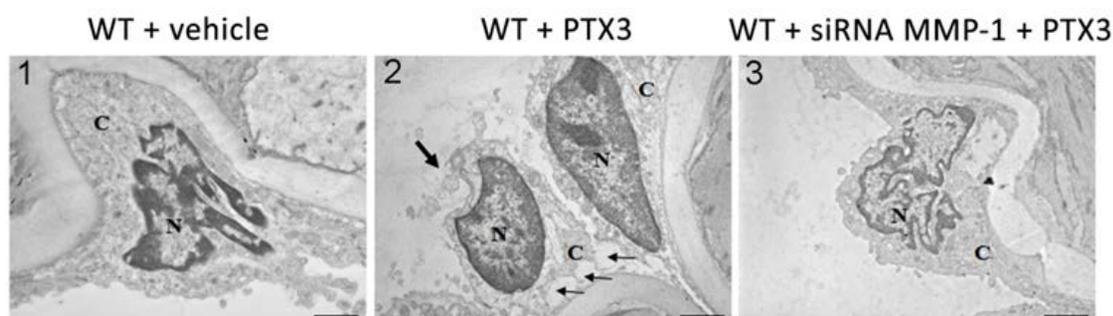


Figura 8. **a**) curva dose-risposta all'acetilcolina (ACh) di arterie mesenteriche di topi C57BL/6N precontratte con fenilefrina: i vasi sono stati esposti al solo veicolo, alla PTX3 per 45 minuti (PTX3), alla GM6001 più PTX3 (GM6001 + PTX3), o alla GM6001 da solo ($n = 6$ per ogni gruppo). *, $P < 0.05$ vs veicolo, GM6001 + PTX3, GM6001; **, $P < 0.01$ vs veicolo, GM6001 + PTX3, GM6001. **b, c**) curva dose-risposta all' ACh di arterie mesenteriche da topi C57BL/6N precontratte con fenilefrina: i vasi sono stati esposti al veicolo o transfettati con siRNA contro MMP-9 (**, $p < 0.01$ vs veicolo, scr siRNA, ###, $p < 0.01$ vs veicolo, scr siRNA) o MMP-1 e quindi esposti alla PTX3; siRNA disordinato è stato utilizzato come controllo. **, $P < 0.01$ vs Veicolo, scr. siRNA e siRNA MMP-1 + PTX3; $n = 8$ per ciascun gruppo. **d**) Campioni di western blot su MMP-1 proveniente da arterie mesenteriche wild-type (WT) esposti al veicolo, alla PTX3, al siRNA per silenziare MMP-1 e/o ad un siRNA disordinato ($n = 3$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. **e**) Campioni di Western blot di MMP1 proveniente da arterie mesenteriche WT e vasi negativi per P-selectina (-/-) esposti a veicolo o a PTX3 ($n = 3$). **, $P < 0.01$.



f) Effetto del silenziamento della MMP-1 sulle alterazioni ultrastrutturali indotte dalla PTX3: **pannello 1**) cellule endoteliali di controllo avevano il citoplasma e il nucleo ben conservato; **Pannello 2**), cellule esposte alla PTX3 avevano il citoplasma diluito con numerosi vacuoli (freccie) e membrane rotte (freccia di spessore); **Pannello 3**) il silenziamento della MMP-1 con un siRNA inibiva le modifiche indotte dalla PTX3. C = citoplasma, N = Nucleo. Scala grafica= 1.1 μm (n = 4 per ogni gruppo).

La PTX3 induce il distacco della caveolina-1 da membrana plasmatica

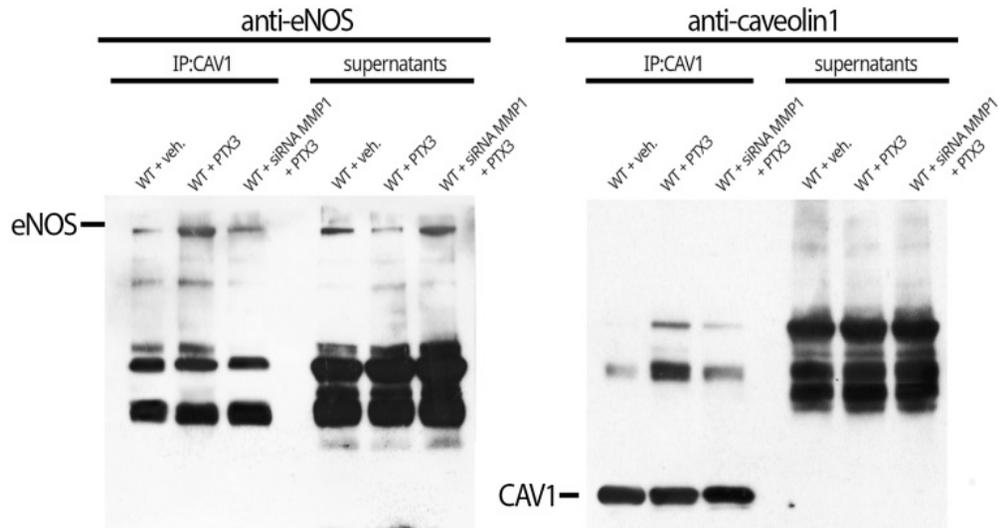
Le caveoline sono proteine di membrana principali costituenti delle caveole, invaginazioni delle membrane plasmatiche presenti in alcune zone delle membrane biologiche a doppio strato fosfolipidico. Esse interagiscono con molecole segnale e costituiscono l'impalcatura per organizzare i preassemblati complessi della segnalazione intracellulare. La caveolina 1 è presente in un'ampia varietà di cellule, endotelio compreso. Nell'endotelio, eNOS è associata alla caveolina 1, mentre nel miocardio principalmente alla caveolina 3; al momento non è chiaro se l'associazione consista in una interazione diretta tra le due proteine, né se queste facciano parte di un più grande complesso multimolecolare. L'interazione di eNOS con la caveolina 1 causa una profonda inibizione dell'enzima. Abbiamo quindi valutato mediante tecnica di immunoprecipitazione lo status di interazione tra eNOS e caveolina 1 in presenza di

PTX3, al fine di valutare la capacità della proteina di interagire con il complesso caveolina/eNOS.

I nostri dati hanno evidenziato che in seguito al trattamento con PTX3 è in grado di evocare il distacco della caveolina 1 dalla membrana plasmatica inibendo quindi il distacco di eNOS dalla caveolina e quindi l'inibizione dell'attività enzimatica. Da notare, che il pretrattamento dei vasi con lo short interfere RNA per MMP-1 era invece in grado di proteggere il vaso da tale alterazione evocata dalla PTX3 (**Fig. 9**). Tale risultato dimostra il diretto coinvolgimento della PTX3/MMP1 nella modulazione di eNOS. Inoltre, mediante tecnica spettrofluorimetrica abbiamo dimostrato che la PTX3 è in grado di stimolare l'attività della MMP-1, molecola in grado di evocare riarrangiamento della membrana plasmatica e di influenzare quindi la funzionalità delle caveole. Inoltre, la misurazione del rilascio di ossido nitrico ha rivelato che le cellule endoteliali trattate con PTX3 mostrano una significativa riduzione del rilascio di ossido nitrico rispetto alle cellule controllo ed alle cellule trasfettate con il siRNA di MMP-1 e poi trattate con PTX3. Tale risultato conferma il coinvolgimento della Metalloproteasi 1 nel signaling reclutato dalla PTX3, conferendo a tale MMP-1 un ruolo di primaria importanza sulla modulazione dell'attività di eNOS.

Tali risultati, che correlano con la disfunzione endoteliale indotta dalla PTX3 a livello dell'arteria mesenterica di topo ci hanno quindi spinti a valutare la pressione arteriosa in vivo in seguito a somministrazione di PTX3.

a



b

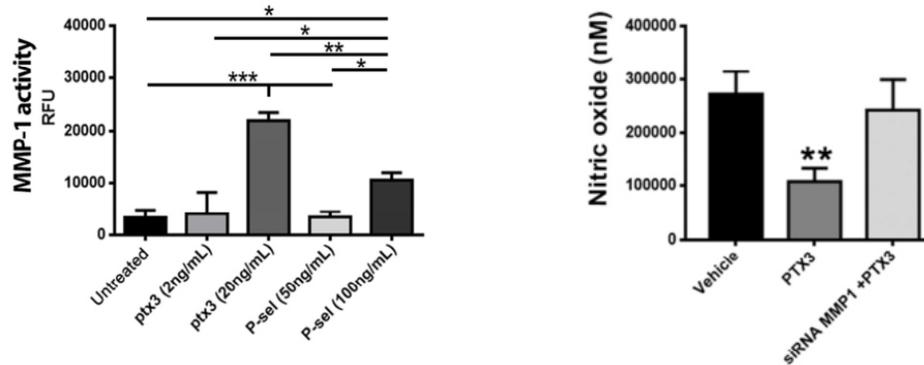


Figura 9. a) Immunoprecipitazione di estratti proteici ottenuti da arterie mesenteriche di topi C57Bl6N trattati con veicolo, PTX3 (20ng/mL) o con siRNA MMP1 e trattati in seguito con PTX3.

b) Misurazione dell'attività della MMP1 in seguito allo stimolo con PTX3 e P-Selectina come molecola controllo. A destra: misurazione del rilascio di ossido nitrico dalle cellule trattate con PTX3 o con siRNA MMP1 + PTX3.

Effetti in vivo della PTX3 sulla funzione vascolare e la pressione arteriosa

La disfunzione endoteliale è un tipico marcatore dell'ipertensione arteriosa⁸. I nostri risultati in vitro ci hanno spinto ad esplorare gli effetti in-vivo della PTX3 sulla pressione arteriosa e la funzione vascolare. A tal fine abbiamo iniettato nei topi PTX3 o il veicolo e abbiamo valutato la pressione arteriosa in un periodo di tempo precedentemente riportato essere sufficiente a far comparire gli effetti in vivo²⁴. Abbiamo dimostrato che la somministrazione della proteina aumentava significativamente la pressione arteriosa in topi wild type (**Fig. 10a**), un effetto neutralizzato dall'assenza della P-selectina (**Fig. 10b**). Inoltre, quando abbiamo asportato i vasi per gli studi di reattività vascolare e di analisi strutturale, abbiamo osservato la tipica disfunzione endoteliale (**Fig. 10c**) ed i cambiamenti strutturali (**Fig. 10d pannello 2**) simili a quelli incontrati negli esperimenti ex vivo. Come ci aspettavamo, la somministrazione di PTX3 non evocava effetti vascolari nei topi knockout per la P-selectina (**Fig. 10c e Fig. 10d pannello 4**). Nessuna differenza significativa è stata osservata tra i topi con ablazione genetica di PTX3 e i loro controlli, suggerendo che l'assenza di PTX3 non influenza i livelli di pressione arteriosa in condizioni basali.

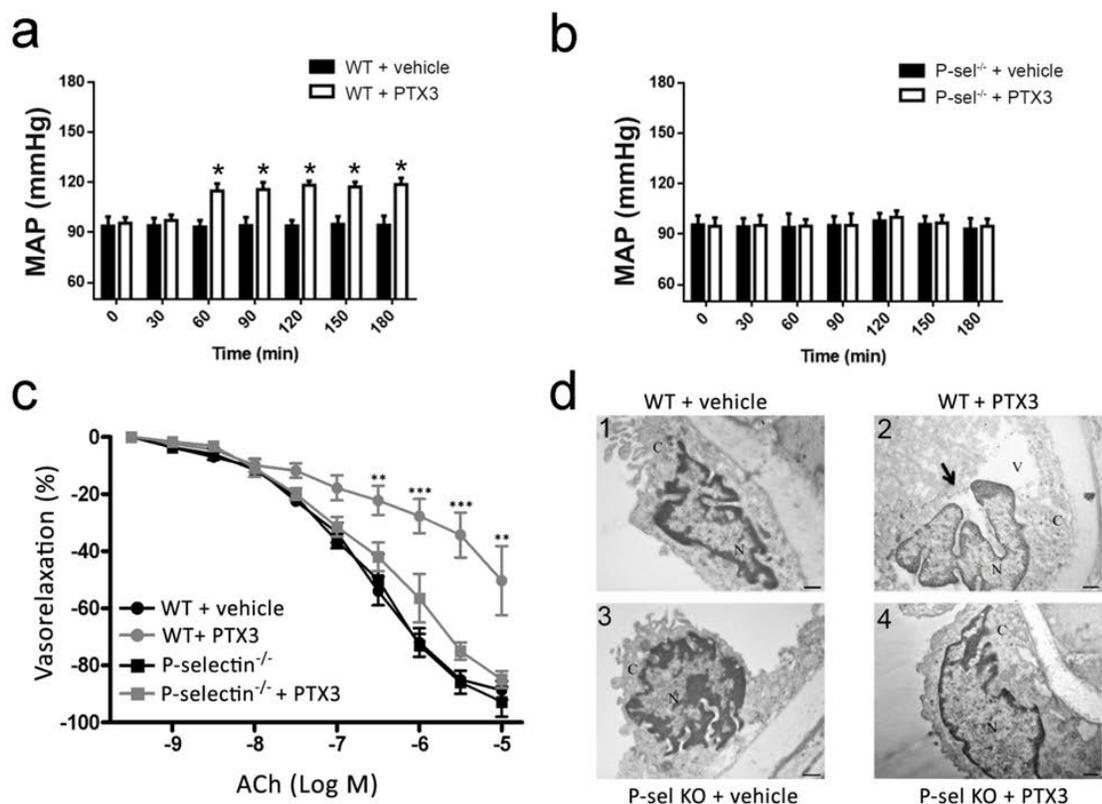


Figura 10. Pressione arteriosa media (MAP) di topi wild-type (a) e topi KO per P-selectina (b) trattati con veicolo o con PTX3. *, $P < 0,05$ vs WT più veicolo; $n = 5$ per ogni trattamento. c) Curva dose-risposta all'acetilcolina (ACh) delle arterie mesenteriche provenienti da topi WT e P-selectina ^{-/-} precontratte con fenilefrina dopo l'iniezione in vivo della PTX3. **, $P < 0.01$ vs WT + veicolo, Pselectin ^{-/-} + Veicoli e P-selectina ^{-/-} + PTX3; $n = 5$ per ogni gruppo. d) effetti in vivo dopo somministrazione della PTX3 sull'ultrastruttura delle cellule endoteliali: pannelli 1 e 3) Micrografie rappresentative di cellule endoteliali provenienti da topi WT e P-selectina ^{-/-} in condizioni basali; pannelli 2 e 4) dopo la somministrazione della PTX3. Nel quadro B, notare un grande vacuolo citoplasmatica (V) e la membrana plasmatica rotta (freccia) di una cellule endoteliale proveniente da un topo Wild Type trattato con PTX3; non si riscontrano alterazioni subcellulari nelle cellule endoteliali provenienti da topi appartenenti agli altri gruppi sperimentali. C = citoplasma, N = nucleo, V = vacuolo. Scala grafica = $0.45 \mu\text{m}$; $n = 4$ per ciascun gruppo.

I pazienti ipertesi hanno elevati livelli plasmatici di PTX3, P-selectina e MMP-1

I risultati dei nostri modelli sperimentali indicano che P-selectina e MMP-1 mediano gli effetti vascolari della PTX3, compreso l'aumento della pressione arteriosa. Per confermare questi risultati anche negli esseri umani, abbiamo misurato i livelli plasmatici di PTX3, P-selectina e MMP-1 in 31 pazienti ipertesi che assumevano farmaci antipertensivi, ma che non avevano un buon controllo pressorio, così come in un gruppo di soggetti che non assumevano farmaci antipertensivi e avevano una pressione sistolica e diastolica normale (**tabella 1**). Abbiamo dimostrato che i pazienti ipertesi avevano concentrazioni plasmatiche significativamente più alte di PTX3, P-selectina e MMP1 in confronto ai soggetti normotesi (**Fig.10 e tabella 1**).

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti ipertesi e dei soggetti di controllo.

Parametri	Ipertesi	Controlli	<i>p</i>
Età, anni	58.63±12.8	5.81±14.6	NS
Sesso, M/F	22/9	15/6	NS
Fumatori, M/F	10/4	8/3	NS
Trattamento anti-ipertensivo, n	31	0	
Pressione sistolica, mmHg	147.5±24	116±11	0.0064
Pressione diastolica, mmHg	86.8±11	72±8	0.0062
PTX3 nel plasma, ng/mL	3.97±2.3	1.72±0.66	<0.0001
P-selectina nel plasma, ng/mL	64.5±15.6	52.06±10	0.0119
MMP-1 nel plasma, pg/mL	304.1±134	116.7±63	0.0002

I dati sono riportati come media ± DS. M, sesso maschile; F, sesso femminile; BP, pressione sanguigna; NS, non statisticamente significativo.

In particolare, il valore di PTX3 raggiungeva la massima accuratezza, come mostrato dall'area sotto la curva ROC (AUROC) rispetto alle altre variabili (**Fig. 9b**).

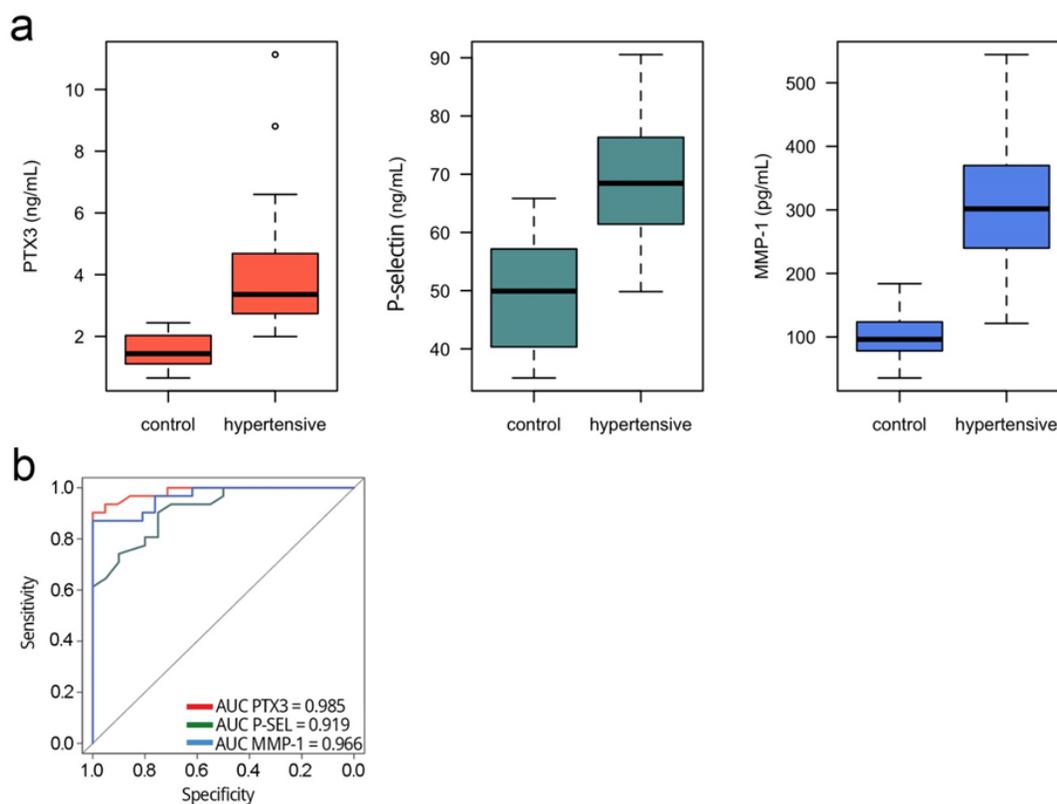


Figura 11. a) i boxplot rappresentano le distribuzioni della PTX3 (a sinistra), P-selectina (al centro) e MMP-1 (a destra) nei soggetti ipertesi e di controllo. Ogni boxplot dà per ciascuna distribuzione, dal basso verso l'alto, i valori corrispondenti a: inferiore non outlier bound, 25 ° percentile, mediana, 75 ° percentile e superiori non outlier bound. I segni rappresentano singole misure outlier. **b)** Curve ROC corrispondenti alla PTX3 (in rosso), SEL -P (in verde) e MMP- 1 (in blu). La legenda dà i valori della AUROC e il 95% dell'intervallo di confidenza (IC 95%) delle tre variabili analizzate.

Test univariati hanno mostrato che i valori di PTX3 (ng/mL), P-selectina (ng/mL) e MMP-1 (pg/ml) sono significativamente più alti nei soggetti ipertesi rispetto ai controlli ($p < 2 \times 10^{-8}$) (**Tabella 2**). E' importante sottolineare che la PTX3 è stato il più forte predittore di ipertensione, raggiungendo la massima p-value, come riportato in Tabella 2. Il secondo obiettivo dell'analisi era identificare le soglie più informative per ciascuna variabile al fine di discriminare i soggetti ipertesi dai controlli. Per ottenere ciò, il set di dati è stato suddiviso in modo casuale in un training set (37 soggetti, il 70% di tutto il campione) e in un test set (15 soggetti, il restante 30% dei dati). Il campionamento casuale è stato eseguito con stratificazione, in modo che la proporzione di casi e controlli osservata in tutto il campione (60% vs. 40%) fosse mantenuta anche nelle due sotto-coorti. Così, il training set è stato utilizzato per identificare la soglia più significativa per ciascuna variabile, come descritto nella sezione Metodi. Il test set è stato poi utilizzato per valutare le prestazioni discriminanti corrispondenti alle variabili discretizzate secondo la soglia identificata. I risultati sono riportati in Tabella 3 e mostrano che la PTX3 discretizzata secondo la soglia corrispondente a ≥ 2.508 raggiunge la massima MCC, sensibilità e F-Score tra le variabili analizzate.

Tabella 2. Prestazioni discriminanti delle variabili analizzate.

Variable	Hypertensive	Control	p-value	AUROC
PTX3 (ng/mL)	3.36 (2.74-4.69)	1.44 (1.11-2.03)	4.01×10^{-9}	0.985
SEL-P (ng/mL)	69.68 ± 11.47	48.84 ± 9.85	8.08×10^{-9}	0.919
MMP-1 (pg/mL)	301.7 (239.9-369.86)	96.25 (78.22-123.66)	1.59×10^{-8}	0.966

Variabile, variabile analizzata; Ipertesi, media \pm SD o mediana (25°-75° percentile) della distribuzione di ciascuna variabile in soggetti ipertesi (n = 31); Controllo, media \pm SD o mediana (25°-75° percentile) della distribuzione di ciascuna variabile in soggetti di controllo (n = 21); p-value, valore di probabilità derivanti dal test t di Welch o dal

test di Wilcoxon a seconda dei casi; AUROC, Area sotto la curva ROC e corrispondente al 95% dell'intervallo di confidenza (CI).

Tabella 3. Prestazioni discriminanti delle variabili analizzate discretizzate in accordo con le soglie identificate.

Variabile	Soglia	Set	MCC	Sens.	Spec.	VPP	VPN	F
PTX3	≥ 2.508 ng/mL	Training	0.850	0.864	1.000	1.000	1.000	0.927
		Test	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
SEL-P	≥ 56.333 ng/mL	Training	0.660	0.909	0.733	0.833	0.833	0.869
		Test	0.720	0.889	0.833	0.889	0.889	0.889
MMP-1	≥ 192.028 pg/mL	Training	0.850	0.864	1.000	1.000	1.000	0.927
		Test	0.870	0.889	1.000	1.000	1.000	0.941

Variabile, variabile analizzata; Soglia, Soglia identificata; training set (22 soggetti ipertesi vs 15 controlli) o test set (9 soggetti ipertesi vs 6 controlli); MCC, coefficiente di Correlazione di Matthew; Sens., sensibilità; Spec., specificità; VPP, valore predittivo positivo; VPN, valore predittivo negativo; F, F-Score .

CAPITOLO IV

Discussione

In questo studio abbiamo dimostrato che: 1) la PTX3 induce, di per sé, disfunzione ed alterazioni morfologiche dello strato endoteliale in modelli sperimentali attraverso il legame ad una molecola di adesione la P-selectina e reclutando MMP1 (metalloproteinasi1) che converge nel signalling dell'ossido nitrico (NO); 2) in vivo, la PTX3, induce disfunzione endoteliale ed un aumento significativo della pressione arteriosa nei modelli murini; 3) PTX3 diminuisce la produzione dell'NO attraverso il pathway della MMP1 nelle cellule endoteliali umane (HUVEC); e 4) PTX3 e i suoi mediatori del danno vascolare, P-selectina e MMP-1, risultano elevati nel plasma di pazienti ipertesi.

Questo studio parte dall'ipotesi che la PTX3 potesse effettivamente rappresentare un potenziale biomarcatore di danno endoteliale nell'ipertensione arteriosa, in quanto numerosi lavori in letteratura associano gli elevati livelli plasmatici della proteina con la disfunzione endoteliale presente in differenti condizioni patologiche legate all'ipertensione, quale preeclampsia, ipertensione polmonare e . Se i precedenti studi sia in vitro che in vivo, si sono principalmente concentrati solo sulle analisi di associazione, tra livelli plasmatici di PTX3 e disfunzione endoteliale, in questo lavoro abbiamo dimostrato, per la prima volta, il ruolo diretto della PTX3 sulla funzione dell'endotelio vascolare, identificando i meccanismi molecolari coinvolti.

In particolare, gli studi di reattività vascolare ci hanno permesso di validare che PTX3 induce disfunzione endoteliale in vasi di resistenza, che rappresentano un importante distretto coinvolto nella modulazione della pressione arteriosa. Inoltre,

l'identificazione della localizzazione della proteina a livello del monostrato endoteliale, mediante l'utilizzo della pentraxina 3 biotinilata, ci ha spinti a considerare la presenza di una possibile recettore membranale in grado di tradurre gli effetti intracellulari evocati dalla PTX3.

Ad oggi, la presenza di recettori della PTX3 era stata descritta solo nelle cellule infiammatorie, in cui è stato dimostrato che la PTX3 interagisce sia con il recettore Fc- γ (Fragment crystallizable gamma region) per amplificare la risposta innata contro i patogeni²⁴ sia con la P-selectina in un feedback negativo per prevenire l'eccessivo reclutamento dei neutrofil²⁵.

In questo lavoro, dimostriamo che la P-selectina è il recettore affine alla PTX3 sulle cellule vascolari endoteliali, dal momento che i vasi di topi knockout per P-selectina sono refrattari alla disfunzione endoteliale mediata dalla PTX3, mentre quelli di topi knockout per il recettore Fc- γ non lo erano.

E' importante sottolineare che P-selectina è sia un recettore che una molecola di adesione, ed è conservata all'interno dei granuli alfa delle piastrine e nei corpi di Weibel-Palade delle cellule endoteliali, ma risulta essere localizzata sulle membrane a bassa concentrazione anche in condizioni basali²⁷⁻²⁸. Studi di citofluorimetria ci hanno permesso di dimostrare che la stimolazione delle cellule endoteliali con la PTX3 induce un aumento di P-selectina sulle membrane delle cellule isolate.

Un'osservazione interessante che emergeva dal nostro studio è che la disfunzione endoteliale è ancora presente dopo la rimozione della PTX3 dal mezzo in cui in era entrata in contatto con il vaso. Questo ci ha portato ad ipotizzare l'attivazione di un meccanismo alternativo in grado di indurre alterazioni nella struttura vascolare. Infatti, l'analisi ultrastrutturale dello strato endoteliale dei vasi ha rivelato un'ampia

vacuolizzazione del citoplasma e la rottura delle membrane basali dopo l'esposizione alla PTX3. Questi risultati sono in accordo con uno studio precedente che dimostrava la capacità della famiglia delle PTX di indurre la rottura della membrana in batteri Gram-negativi²⁹.

Le alterazioni morfologiche osservate nelle cellule endoteliali sono completamente assenti a livello muscolare, indicando l'endotelio come il target specifico dell'azione della PTX3. L'assenza della P-selectina proteggeva dalle alterazioni strutturali e dalla disfunzione vascolare mediata dalla PTX3, portandoci ad ipotizzare che le alterazioni strutturali contribuivano alla disfunzione endoteliale.

Il principale meccanismo che promuove la disfunzione endoteliale nell'ipertensione arteriosa è rappresentato dall'alterazione del pathway dell'ossido nitrico. Riguardo tale punto, i nostri studi hanno dimostrato che la PTX3 induce un'alterazione del signalling dell'ossido nitrico che evoca una disfunzione endoteliale ed un aumento della vasocostrizione muscolare, due caratteristiche tipiche identificate nell'aumento delle resistenze vascolari nell'ipertensione.

Al fine di caratterizzare come le alterazioni morfologiche potessero essere correlate con l'alterazione del segnale dell'ossido nitrico abbiamo condotto degli studi mirati a caratterizzare l'interazione di eNOS con la Caveolina-1. Quest'ultima rappresenta un importante target di regolazione localizzato a ridosso della membrana plasmatica. La sua interazione con eNOS ne determina l'inattivazione mantenendolo localizzato nei domini delle microcaveole in uno stato monomero. Nei vasi trattati con PTX3, abbiamo dimostrato che, dopo la distruzione della membrana plasmatica, CAV-1 si localizzava all'interno del citoplasma cellulare ed risultava essere legato ad eNOS, come dimostrato dagli esperimenti di immunoprecipitazione. Questa condizione inoltre,

si caratterizzava per la presenza di eNOS in uno stato monomero, tipica condizione di inattivazione dell'enzima, incapace quindi di produrre NO.

In precedenza era stato riportato che l'assenza di PTX3 è accompagnata a notevole diminuzione dell'infiammazione e della lesione dei tessuti e a diminuzione delle lesioni e della mortalità dopo riperfusioni di un'arteria mesenterica superiore nei topi, dimostrando che PTX3 è rilevante per il danno tissutale^{30, 31}. In accordo, i topi con overespressione di PTX3 avevano un maggior danno tissutale e mortalità dopo riperfusioni del tratto vascolare ischemico³². La nostra scoperta, che la PTX3 è dannosa per il distretto mesenterico è pienamente in accordo con i precedenti studi che dimostravano come il blocco terapeutico dell'azione della PTX3 può essere in grado di diminuire le lesioni associate a severa ischemia e sindrome da riperfusioni in questa area³³.

Abbiamo anche identificato le molecole di segnalazione reclutate attraverso il pathway PTX3/P-selectina per indurre le alterazioni vascolari. Tra i possibili candidati, le metalloproteinasi giocano un ruolo di primo piano. Questa è una famiglia di endopeptidasi in grado di degradare componenti della matrice extracellulare e digerire la lamina basale endoteliale³³. Inoltre, le MMP sono mediatori dell'infiammazione che collegano l'infiammazione con l'angiogenesi e il rimodellamento vascolare, e sono anche implicate nella patogenesi delle malattie vascolari, come l'aterosclerosi, gli aneurismi aortici, la rottura di placca e l'iperplasia neointimale³⁴.

Abbiamo dimostrato che l'inibizione non selettiva delle MMP con GM6001 protegge dal danno vascolare mediato dalla PTX3. Le principali isoforme di MMP espresse nell'apparato vascolare includono MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9, e tra questi, MMP-1 è secreto prevalentemente dalle cellule endoteliali^{35, 36} ed è stato riscontrato in

associazione con il danno d'organo nell'ipertensione arteriosa³⁷. Abbiamo dimostrato per la prima volta che la PTX3 aumenta l'espressione della MMP-1 nei vasi di resistenza. Le evidenze dimostrano che questo effetto è assente nei vasi P-selectina-/- dimostrando chiaramente che la MMP-1 è un elemento a valle della via PTX3/P-selectina. Per dimostrare definitivamente il coinvolgimento della MMP-1 nelle alterazioni vascolari mediate dalla PTX3, lo abbiamo silenziato con siRNA: in questo contesto sperimentale, la PTX3 non riusciva ad indurre l'alterazione del signalling dell'NO, la delocalizzazione della caveolina-1 e le alterazioni vascolari.

I nostri risultati evidenziano chiaramente che l'endotelio è il target selettivo della PTX3. Quindi abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulle cellule endoteliali isolate, per valutare l'effetto sulla produzione di NO in presenza di PTX3. Abbiamo dimostrato per la prima volta che la PTX3 riduceva i livelli di produzione di NO e che questo effetto era associato con un aumento sia dell'espressione che dell'attività della MMP-1. Il silenziamento di MMP-1 mediante siRNA proteggeva completamente l'effetto dannoso evocato dalla PTX3 su metabolismo dell'ossido nitrico.

Abbiamo anche valutato l'effetto di PTX3 in vivo, iniettando la proteina nel peritoneo alla dose che già era stata dimostrata in grado di modulare la risposta infiammatoria mediata da P-selectina²⁴. Anche in questa serie sperimentale, la PTX3 induceva disfunzione endoteliale, modifiche strutturali a livello vascolare e un incremento dell'espressione di MMP-1.

L'assenza di P-selectina protegge il sistema vascolare dagli effetti nocivi di PTX3. Da sottolineare, che in vivo la somministrazione non è stata seguita da una riduzione dell'accumulo di neutrofili e dello stato infiammatorio, suggerendo che l'effetto osservato non dipende dal meccanismo dell'infiammazione²⁴.

E' importante sottolineare che i nostri risultati in vivo sono simili a quelli ottenuti in vitro, un contesto che non può essere influenzato dalla risposta infiammatoria sistemica. Il topo transgenico con overespressione di PTX3 è un modello sperimentale caratterizzato dalla presenza di livelli di PTX3 superiori al normale. Un'attenta analisi dei dati ha rivelato che la sovraespressione della proteina è indotta da diversi stimoli³⁰,³². Finora, non ci sono dati disponibili di studi sulla pressione arteriosa in questa condizione sperimentale, e studi futuri dovranno perseguire questo obiettivo.

La disfunzione endoteliale è un marcatore tipico di diversi disturbi cardiovascolari, come l'ipertensione arteriosa. E' ancora dibattuto se la disfunzione endoteliale contribuisce all'ipertensione arteriosa o è determinata dall'elevata pressione arteriosa. I nostri esperimenti in vivo dimostrano che PTX3 aumenta significativamente la pressione sanguigna nel periodo durante il quale abbiamo effettuato l'osservazione e che questo effetto emodinamico è mediato dalla P-selectina. Gli esperimenti in vitro hanno dimostrato che PTX3 induce disfunzione endoteliale in una condizione sperimentale non influenzata dagli alti livelli di pressione. I nostri risultati suggeriscono che la disfunzione endoteliale indotta da PTX3 partecipa all'aumento della pressione arteriosa osservata dopo la somministrazione in vivo della proteina.

Oltre alla PTX3, altri fattori infiammatori sono in grado di indurre disfunzione vascolare. E' interessante notare che SAP interagisce con P-selectina nei processi immunologici e induce disfunzione endoteliale tramite lo stesso recettore a livello vascolare. Tuttavia, P-selectina non rappresenta l'obiettivo comune di tutti i fattori infiammatori, poiché la PCR determina il suo effetto deleterio sul distretto vascolare attraverso l'interazione con il recettore FC γ IIB²⁶. Quindi, le molecole infiammatorie

innescano differenti meccanismi per esplicare i loro effetti vascolari; la loro caratterizzazione potrebbe contribuire a definire meglio il loro ruolo in ambito clinico.

Infine, abbiamo dimostrato che i livelli plasmatici di P-selectina e MMP1, due mediatori degli effetti vascolari dannosi di PTX3, sono più alti nei pazienti ipertesi.

I nostri dati sono supportati da precedenti studi che riportano l'associazione di livelli elevati plasmatici di P-selectina con l'ipertensione^{38,39}, e con uno studio in cui la MMP-1 è stata associata con il danno d'organo e la progressione dell'ipertensione³⁷.

In conclusione, abbiamo descritto per la prima volta il coinvolgimento diretto della proteina di fase acuta PTX3 nell'omeostasi cardiovascolare, con la modulazione della funzione vascolare e della pressione arteriosa in modelli sperimentali. I dati ottenuti nell'uomo indicano che PTX3, P-selectina e MMP-1 possono effettivamente rappresentare nuovi biomarcatori in grado di predire l'esordio della disfunzione vascolare nei pazienti ipertesi. E' da notare che questi marcatori sono strettamente collegati, dal momento che P-selectina e MMP1 sono molecole a valle della via di segnalazione iniziata dalla PTX3. Così, il monitoraggio di queste proteine potrebbe diventare parte di una strategia preventiva volta a contenere l'evoluzione dell'ipertensione arteriosa.

Bibliografia

1. Moalli F, Jaillon S, Inforzato A, Sironi M, Bottazzi B, Mantovani A, Garlanda C. Pathogen recognition by the long pentraxin PTX3. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:830421.
2. Inforzato A, Bottazzi B, Garlanda C, Valentino S, Mantovani A. Pentraxins in humoral innate immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2012;946:1-20.
3. Mantovani A, Valentino S, Gentile S, Inforzato A, Bottazzi B, Garlanda C. The long pentraxin PTX3: a paradigm for humoral pattern recognition molecules. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1285:1-14.
4. Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, De Gioia L, Matteucci C, Peri G, Spreafico F, Pausa M, D'Ettorre C, Gianazza E, Tagliabue A, Salmona M, Tedesco F, Introna M, Mantovani A. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem.* 1997;272:32817-32823.
5. Introna M, Alles VV, Castellano M, Picardi G, De Gioia L, Bottazzai B, Peri G, Breviario F, Salmona M, De Gregorio L, Dragani TA, Srinivasan N, Blundell TL, Hamilton TA, Mantovani A. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood.* 1996;87:1862-1872.

6. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:337-366.
7. Basile A, Sica A, d'Aniello E, Breviario F, Garrido G, Castellano M, Mantovani A, Introna M. Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3. Role of NF-kappaB in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta regulation. *J Biol Chem.* 1997;272:8172-8178.
8. Norata GD, Garlanda C, Catapano AL. The long pentraxin PTX3: a modulator of the immunoinflammatory response in atherosclerosis and cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med.* 2010;20:35-40.
9. Parlak A, Aydogan U, Iyisoy A, Dikililer MA, Kut A, Cakir E, Saglam K. Elevated pentraxin-3 levels are related to blood pressure levels in hypertensive patients: an observational study. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2012;12:298-304.
10. Presta M, Camozzi M, Salvatori G, Rusnati M. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. *J Cell Mol Med.* 2007;11:723-738.
11. Booth AD, Jayne DR, Kharbanda RK, McEniery CM, Mackenzie IS, Brown J, Wilkinson IB. Infliximab improves endothelial dysfunction in systemic vasculitis: a model of vascular inflammation. *Circulation.* 2004;109:1718-1723.

12. Witasp A, Ryden M, Carrero JJ, Qureshi AR, Nordfors L, Naslund E, Hammarqvist F, Arefin S, Kublickiene K, Stenvinkel P. Elevated circulating levels and tissue expression of pentraxin 3 in uremia: a reflection of endothelial dysfunction. *PLoS One*. 2013;8:e63493.
13. Hamad RR, Eriksson MJ, Berg E, Larsson A, Bremme K. Impaired endothelial function and elevated levels of pentraxin 3 in early-onset preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2012;91:50-56.
14. Cozzi V, Garlanda C, Nebuloni M, Maina V, Martinelli A, Calabrese S, Cetin I. PTX3 as a potential endothelial dysfunction biomarker for severity of preeclampsia and IUGR. *Placenta*. 2012;33:1039-1044.
15. Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, De Gioia L, Matteucci C, Peri G, Spreafico F, Pausa M, D'Ettorre C, Gianazza E, Tagliabue A, Salmona M, Tedesco F, Introna M and Mantovani A. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem*. 1997;272:32817-23.
16. Zacchigna L, Vecchione C, Notte A, Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, Cifelli G, Ferrari A, Maffei A, Fabbro C, Braghetta P, Marino G, Selvetella G, Aretini A, Colonnese C, Bettarini U, Russo G, Soligo S, Adorno M, Bonaldo P, Volpin D, Piccolo S, Lembo G and Bressan GM. Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. *Cell*. 2006;124:929-42.

17. Vecchione C, Carnevale D, Di Pardo A, Gentile MT, Damato A, Cocozza G, Antenucci G, Mascio G, Bettarini U, Landolfi A, Iorio L, Maffei A and Lembo G. Pressure-induced vascular oxidative stress is mediated through activation of integrin-linked kinase 1/betaPIX/Rac-1 pathway. *Hypertension*. 2009;54:1028-34.
18. Lembo G, Vecchione C, Fratta L, Marino G, Trimarco V, d'Amati G and Trimarco B. Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes*. 2000;49:293-7.
19. Carrizzo A, Puca A, Damato A, Marino M, Franco E, Pompeo F, Traficante A, Civitillo F, Santini L, Trimarco V and Vecchione C. Resveratrol improves vascular function in patients with hypertension and dyslipidemia by modulating NO metabolism. *Hypertension*. 2013;62:359-66.
20. Lindner V, Fingerle J and Reidy MA. Mouse model of arterial injury. *Circ Res*. 1993;73:792-6.
21. Suliman ME, Yilmaz MI, Carrero JJ, Qureshi AR, Saglam M, Ipcioglu OM, Yenicesu M, Tong M, Heimbürger O, Barany P, Alvestrand A, Lindholm B, Stenvinkel P. Novel links between the long pentraxin 3, endothelial dysfunction, and albuminuria in early and advanced chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:976-985.
22. Iiyama K, Nagano M, Yo Y, Nagano N, Kamide K, Higaki J, Mikami H, Ogihara T.

Impaired endothelial function with essential hypertension assessed by ultrasonography.

AmHeart J. 1996;132:779-782.

23. Moalli F, Doni A, Deban L, Zelante T, Zagarella S, Bottazzi B, Romani L, Mantovani A, Garlanda C. Role of complement and Fc{gamma} receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*. *Blood.* 2010;116:5170-5180.

24. Deban L, Russo RC, Sironi M, Moalli F, Scanziani M, Zambelli V, Cuccovillo I, Bastone A, Gobbi M, Valentino S, Doni A, Garlanda C, Danese S, Salvatori G, Sassano M, Evangelista V, Rossi B, Zenaro E, Constantin G, Laudanna C, Bottazzi B, Mantovani A. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat Immunol.* 2010;11:328-334.

25. Ji Z, Ke ZJ, Geng JG. SAP suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Immunol Cell Biol.* 2012;90:388-395.

26. Sundgren NC, Zhu W, Yuhanna IS, Chambliss KL, Ahmed M, Tanigaki K, Umetani M, Mineo C, Shaul PW. Coupling of Fcgamma receptor I to Fcgamma receptor IIb by SRC kinase mediates C-reactive protein impairment of endothelial function. *Circ Res.* 2011;109:1132-1140.

27. Zerr M, Hechler B, Freund M, Magnenat S, Lanois I, Cazenave JP, Leon C, Gachet C. Major contribution of the P2Y(1)receptor in purinergic regulation of TNFalpha-induced vascular inflammation. *Circulation*. 2011;123:2404-2413.
28. Ushiyama S, Laue TM, Moore KL, Erickson HP, McEver RP. Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin. *J Biol Chem*. 1993;268:15229-15237.
29. Harrington JM, Chou HT, Gutschmann T, Gelhaus C, Stahlberg H, Leippe M, Armstrong PB. Membrane pore formation by pentraxin proteins from *Limulus*, the American horseshoe crab. *Biochem J*. 2008;413:305-313.
30. Souza DG, Amaral FA, Fagundes CT, Coelho FM, Arantes RM, Sousa LP, Matzuk MM, Garlanda C, Mantovani A, Dias AA, Teixeira MM. The long pentraxin PTX3 is crucial for tissue inflammation after intestinal ischemia and reperfusion in mice. *Am J Pathol*. 2009;174:1309-1318.
31. Zhu H, Cui D, Liu K, Wang L, Huang L, Li J. Long pentraxin PTX3 attenuates ischemia reperfusion injury in a cardiac transplantation model. *Transpl Int*. 2014;27:87-95.
32. Souza DG, Soares AC, Pinho V, Torloni H, Reis LF, Teixeira MM, Dias AA. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14

transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2002;160:1755-1765.

33. Pardo A, Selman M. MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:283-288.

34 Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002;90:251-262.

35. Lee SW, Song KE, Shin DS, Ahn SM, Ha ES, Kim DJ, Nam MS, Lee KW. Alterations in peripheral blood levels of TIMP-1, MMP-2, and MMP-9 in patients with type-2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;69:175-179.

36. Death AK, Fisher EJ, McGrath KC, Yue DK. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis.* 2003;168:263-269.

37. Morillas P, Quiles J, de Andrade H, Castillo J, Tarazon E, Rosello E, Portoles M, Rivera M, Bertomeu-Martinez V. Circulating biomarkers of collagen metabolism in arterial hypertension: relevance of target organ damage. *J Hypertens.* 2013;31:1611-1617.

38. Blann AD, Nadar SK, Lip GY. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2003;24:2166-2179.

39. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation*. 2001;103:491-495.