



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e
Applicata**

GLICAZIONE DELLE LIPOPROTEINE A BASSA DENSITA'
(LDL):
MODIFICAZIONI COMPOSIZIONALI E RILEVANZA FISIO-
PATOLOGICA.

GLYCATION OF LOW DENSITY LIPOPROTEINS:
COMPOSITIONAL CHANGES AND PHYSIO-PATHOLOGICAL
RELEVANCE

Tesi di Laurea Magistrale di:

Giulia Rodomonti

Relatore

Chiar.mo Prof.ssa

Gianna Ferretti

Correlatore:

Prof.ssa Tiziana Bacchetti

Sessione Straordinaria

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

SCOPO DELLA TESI

Lipoproteine plasmatiche a bassa densità (LDL): struttura e funzioni

Metabolismo lipoproteico e origine delle sottoclassi LDL

Eterogeneità delle LDL

Composizione apoproteica delle lipoproteine

Apoproteina B

Omeostasi del colesterolo. Ruolo delle LDL

Metabolismo intracellulare del colesterolo LDL

Alterazioni del catabolismo delle LDL

Glicazione non enzimatica e rilevanza fisio-patologica

Formazione dei prodotti di glicazione avanzata (AGEs): meccanismi molecolari

Relazione tra glicazione e ossidazione delle LDL

Materiali e metodi

Separazione delle LDL

Dosaggio delle LDL

Glicazione delle LDL con glucosio, fruttosio e metilgliosale

Dosaggio dei livelli di gruppi amminici liberi

Studio della fluorescenza intrinseca del triptofano

Studio della fluorescenza degli AGEs

Proprietà chimico-fisiche delle LDL

Torbidità delle LDL

Statistica

Risultati

Modificazione dei livelli di gruppi amminici

Prodotti di glicazione

Analisi fluorescenza intrinseca del triptofano

Proprietà chimico-fisiche delle LDL glicate

Discussione

Conclusioni

Bibliografia

Ringraziamenti

SCOPO DELLA TESI

Le lipoproteine plasmatiche sono strutture di elevato peso molecolare e costituite da proteine (apo-proteine) e da biomolecole idrofobiche (trigliceridi ed esteri del colesterolo) e anfipatiche (fosfolipidi, sfingolipidi e colesterolo non esterificato). Esse svolgono un ruolo importante nel trasporto di lipidi in circolo. Inoltre ad esse sono attribuiti ruoli modulatori di diverse funzioni cellulari come proliferazione cellulare e apoptosi. Le particelle lipoproteiche sono classificate in base alla loro densità crescente: chilomicroni, lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), lipoproteine a densità intermedia (IDL), lipoproteine a bassa densità (LDL) e lipoproteine ad alta densità (HDL). Durante la loro vita in circolo le lipoproteine sono esposte a modifiche covalenti che ne alterano la composizione, la struttura e le funzioni.

Le LDL sono le principali lipoproteine coinvolte nel trasporto di colesterolo e un aumento dei loro livelli plasmatici è considerato un fattore di rischio cardiovascolare. La presente tesi si propone di affrontare lo studio dei cambiamenti composizionali e strutturali delle lipoproteine a bassa densità (LDL) in seguito alla glicazione. Tale reazione non enzimatica tra molecole come il glucosio con i gruppi amminici liberi di lisina di cui le LDL sono ricche,

come emerge dall'esame nella letteratura, trasforma le LDL in LDL aterogeniche; infatti l'apoB100, la principale apoproteina delle LDL, se si presenta glicata mostra alterazioni strutturali che le impediscono di interagire correttamente con i recettori strutturali. La glicazione è quindi considerata una modificazione aterogena. Un aumento della LDL glicate rappresenta un fattore di rischio nell'insorgenza di patologie dismetaboliche e patologie cardiovascolari.

A tale scopo, le LDL verranno isolate dal plasma di soggetti normolipemici e sottoposte a trattamento di glicazione mediante incubazione con diversi agenti che possono provocare la glicazione: il glucosio, il metilgliosale e il fruttosio. L'interesse per lo studio è supportato da precedenti studi clinici che hanno dimostrato che la reazione di glicazione non enzimatica avviene nel plasma umano in condizioni di elevate concentrazioni di glucosio nel sangue, come nel diabete e nell'iperglicemia. Un ruolo nel favorire la glicazione è attribuito anche al metilgliosale, un metabolita dei carboidrati. Livelli elevati di metilgliosale si evidenziano nei tessuti dei pazienti diabetici. Il fruttosio, tra i monosaccaridi, è stato meno studiato come agente glicante, sebbene *in vitro* anche questa molecola sia in grado di innescare la glicazione non enzimatica.

Lo studio delle alterazioni composizionali delle LDL glicate in diverse condizioni sperimentali, verrà affrontato con tecniche spettroscopiche e il ruolo glicante esercitato dal fruttosio sulle LDL sarà confrontato con gli effetti prodotti dal glucosio e metilgliosale.

LIPOPROTEINE PLASMATICHE A BASSA DENSITA' (LDL): STRUTTURA E FUNZIONI

Metabolismo lipoproteico e origine delle sottoclassi LDL

Le lipoproteine sono complessi macromolecolari di elevato peso molecolare costituite da molecole idrofobiche ed anfipatiche. Il modello strutturale delle lipoproteine prevede la presenza di due microambienti (Gotto AM et al., 1986): un nucleo centrale (core) e uno strato periferico di rivestimento (superficie). Il core è composto di lipidi neutri (trigliceridi e colesterolo esterificato) mentre la superficie è costituita da fosfolipidi e colesterolo non esterificato. Inoltre, sulla superficie vi sono delle proteine, denominate apoproteine, che presentano regioni anfipatiche. Le regioni più idrofobiche si addentrano nel core della lipoproteina, mentre le parti idrofiliche rimangono a contatto con l'ambiente acquoso esterno (Figura 1).

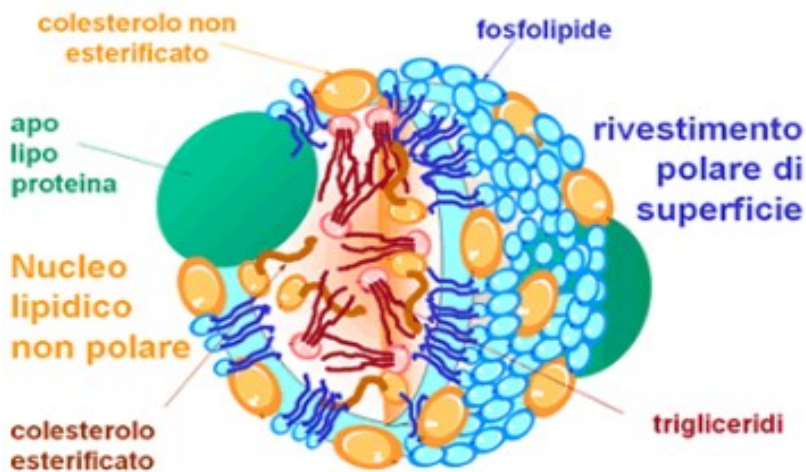


Figura 1: Struttura delle LDL [Fonte: *Principi di biochimica* a cura di John L Tymoczko Jeremy M Berg Lubert Stryer, Zanichelli, 2010, p. 412, fig. 28.12]

Le particelle lipoproteiche sono classificate in base alla loro densità crescente: chilomicroni, lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), lipoproteine a densità intermedia (IDL), lipoproteine a bassa densità (LDL) e lipoproteine ad alta densità (HDL). Esse differiscono per la composizione lipidica e apoproteica e per le diverse caratteristiche chimico-fisiche. Ogni classe lipoproteica presenta una eterogeneità sia da un punto di vista compositivo che funzionale. Le caratteristiche composizionali delle lipoproteine tra cui la componente apoproteica e composizione lipidica, sono riportate nella tabella 1.

Come riassunto, le LDL sono la classe con il maggior contenuto in colesterolo esterificato e pertanto svolgono un ruolo importante nel trasporto del colesterolo.

Tabella 1: Proprietà delle lipoproteine plasmatiche

Lipoproteine plasmatiche	Densità (g/ mL)	Diametro (nm)	Apoproteina	Ruolo fisiologico	TAG %	CE %	C %	PL %	P %
Chilomicroni	<0,95	75-1200	B48, C, E	Trasporto dei grassi della dieta	86	3	1	8	2
Lipoproteine a densità molto bassa	0,95-1,0006	30-80	B100, C, E	Trasporto dei grassi Endogeni	52	14	7	18	8
Lipoproteine a densità intermedia	1,0006-1,019	15-35	B100, E	Precursore delle LDL	38	30	8	23	11
Lipoproteine a bassa densità	1,019-1,063	18-25	B100	Trasporto del Colesterolo	10	38	8	22	21
Lipoproteine ad alta densità	1,063-1,21	7,5-20	A	Trasporto inverso del colesterolo	5-10	14-21	3-7	19-29	33-57

Abbreviazioni: TAG, trigliceridi; CE, esteri del colesterolo; C, colesterolo libero; PL, fosfolipidi; P, proteine.

Il fegato, svolge un ruolo importante nel metabolismo delle lipoproteine. I trigliceridi e colesterolo biosintetizzati sono utilizzati per la sintesi di lipoproteine a densità molto bassa (VLDL). I trigliceridi che si trovano nelle VLDL sono idrolizzati da lipoproteine lipasi (LPL) localizzate sulle superfici dei capillari e gli acidi grassi così liberati sono internalizzati dalle cellule o restano in circolo. Le particelle rimanenti, ricche di esteri del colesterolo, sono dette lipoproteine a densità intermedia (IDL) e possono subire due destini differenti: possono essere captate dal fegato, o essere convertite in lipoproteine a bassa densità (LDL) sempre ad opera della LPL (McKeone BJ et al., 1993) (Figura 2). Fattori congeniti o acquisiti del metabolismo possono contribuire a modificazioni dell'eterogeneità delle LDL.

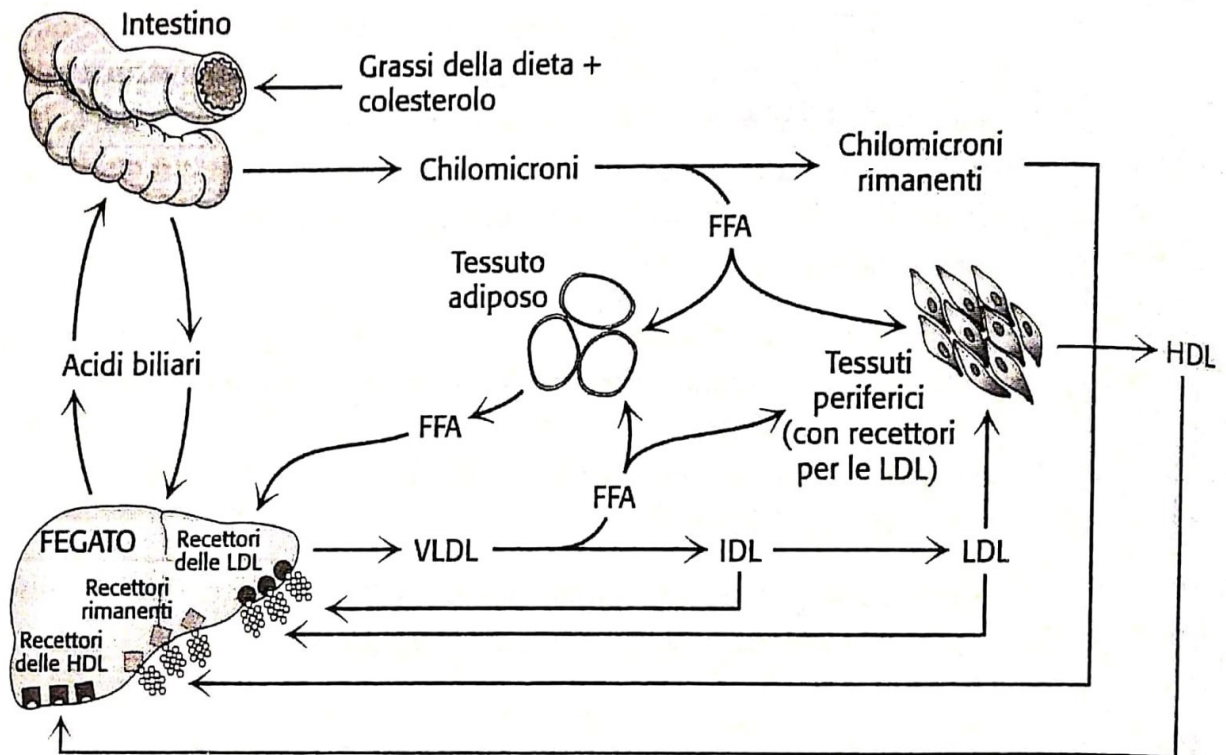


Figura 2: Metabolismo delle particelle lipoproteiche FFA è l'abbreviazione di acidi grassi liberi [Fonte: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, a cura di J.G. Hardman, L.L. Limbird e A.G. Gilman, Mc-Graw-Hill, 2001, p.975, fig. 36.1.]

Eterogeneità delle LDL

Le LDL risultano composte da sottoclassi che differiscono in proprietà chimico-fisiche (densità, taglia molecolare e composizione chimica). Per eterogeneità si intende quell'insieme di differenze chimiche e fisiche che si riscontrano fra le particelle della stessa classe di lipoproteine. Nella tabella 2 è riportata la composizione chimica di tre sottoclassi di LDL, definite come LDL1 (caratterizzate dalla prevalenza di LDL grandi e leggere), LDL2 (intermedie tra le 1 e le 2), LDL3 (caratterizzate da LDL piccole e dense), separate tramite ultracentrifugazione su gradiente di densità (De Graaf J et al., 1991). Un aumento della densità delle particelle è associato ad un aumento del rapporto proteine/lipidi. Alle differenze composizionali delle sottoclassi, si aggiungono differenze nella struttura secondaria dell'apo B100 (Tanfani F. et al. 1997).

Le LDL piccole e dense (SD-LDL) sono considerate maggiormente aterogeniche. Studi precedenti in pazienti affetti da patologie dismetaboliche hanno evidenziato che il pattern di tipo B è caratterizzato dalla prevalenza di LDL di taglia più piccola e di maggiore densità rispetto al pattern A dove prevalgono LDL di taglia maggiore (Dreon et al. 1997). Nel plasma di pazienti affetti da disturbi del metabolismo lipidico e patologie cardiovascolari

prevalgono LDL piccole e dense (Dreon et al. 1997). Si è ipotizzato che la maggiore aterogenicità delle LDL di taglia più piccola sia dovuta ad una maggiore suscettibilità alla perossidazione lipidica e alla capacità di legare proteoglicani della parete endoteliale (De Graaf J et al., 1991). Inoltre, come verrà descritto nei prossimi paragrafi, le LDL di taglia molecolare più piccola sono più sensibili alla glicazione non enzimatica.

Tabella 2: Caratteristiche fisico-chimiche e composizione lipidica delle LDL umane

	LDL1	LDL2	LDL3
Densità (g/ml)	1,030-1,033	1,033-1,040	1,040-1,045
Trigliceridi (%)	4,46	4,29 ± 1,59	5,71 ± 2,55
Colesterolo libero	10,8 ± 1,17	9,85 ± 1,22	9,38 ± 1,23
Colesterolo esterificato (%)	39,61 ± 2,9	39,49 ± 3,82	35,03 ± 4,21
Fosfolipidi (%)	21,31 ± 1,33	20,61 ± 1,62	19,27 ± 0,97
Proteine (%)	23,82 ± 2,98	25,76 ± 2,74	30,62 ± 1,85
Colesterolo/proteine	1,46 ± 0,21	1,31 ± 0,20	0,99 ± 0,11
Vitamina E (mg/g di prot.)	4,53 ± 0,95	4,66 ± 0,65	3,73 ± 0,98
Vitamina E (mg/g di colesterolo)	3,06 ± 0,39	3,46 ± 0,69	3,81 ± 1,02
Totale acidi grassi	2097,6 ± 400,2	2273,9 ± 572,5	3005,4 ± 473,6
Totale acidi grassi poliinsaturi	1,065 ± 210,8	1169,8 ± 278,5	1503,8 ± 288,7

Composizione apoproteica delle lipoproteine

Le apoproteine sono un gruppo di proteine che rappresentano la porzione proteica delle lipoproteine plasmatiche. Se ne distinguono diverse classi (dalla A alla E), ciascuna divisa in sottoclassi: le apoA, che costituiscono la principale classe di apoproteine delle lipoproteine HDL; le apoB, costituenti delle lipoproteine LDL e VLDL; le apoC, presenti nelle VLDL e, in piccola quantità, nelle HDL. Le apo E fungono da trasportatori di colesterolo nel cervello e sono implicate nella sintesi di proteina β -amiloide. Le apoproteine non sono ugualmente distribuite tra le varie classi di lipoproteine; come elencato nella tabella 3 che indica la rappresentazione percentuale nelle classi lipoproteiche. L'ApoB100, formata da 4536 amminoacidi costituisce la principale componente apoproteica delle LDL e VLDL (Mackness MI et al., 1995).

Tutte le apoproteine hanno un ruolo principalmente strutturale in quanto concorrono a stabilizzare la struttura delle lipoproteine mediante interazione fosfolipidi-apoproteine, ma esse svolgono anche ruoli funzionali come mostrato nella tabella 4. È stato dimostrato, infatti, l'apoB100 è la principale componente delle LDL coinvolta nell'interazione con i recettori. Anche l'ApoE è coinvolta

nelle interazioni con i recettori cellulari. Le altre apoproteine sono modulatori di enzimi coinvolti nel metabolismo lipoproteico (come la LCAT e LPL).

Tabella 3: Localizzazione delle principali apoproteine plasmatiche e loro proprietà

APOPROTEINE	PM (KDa)	CLASSE LIPOPROTEICA	CONCENTRAZIONE (mg/dl)
Apo AI	28	Chilomicroni, HDL	100-150
Apo AII	17,5	HDL	30-50
Apo AIV	46	Chilomicroni, VLDL, HDL	15
Apo B48	210	Chilomicroni	5
Apo B100	513	VLDL, IDL, LDL	80-100
Apo CI	70	Chilomicroni, VLDL, HDL	4-7
Apo CII	90	Chilomicroni, VLDL, HDL	3-8
Apo CIII	90	Chilomicroni, VLDL, HDL	8-15
Apo D	22	Chilomicroni, HDL	10
Apo E	34	Chilomicroni, VLDL, HDL	3-6

Tabella 4: Ruoli svolti dalle apoproteine plasmatiche

FUNZIONE	APOLIPOPROTEINA
Biosintesi e secrezione delle lipoproteine	B 48 (intestino) B 100 (fegato)
Attivazione enzimatica -lipoprotein lipasi -lecitin colesterolo aciltransferasi	CII AI CI AIV
Interazione delle lipoproteine Con i recettori cellulari -riconoscimento dei recettori per le LDL (recettore B/E)	B 100 E
Riconoscimento dei recettori per i residui dei chilomicroni	E
Inibizione dell'interazione con i recettori epatici	CI CII CIII

Apoproteina B

L'ApoB è la principale componente proteica delle LDL, delle VLDL e dei chilomicroni (che veicolano i trigliceridi di origine endogena ed esogena). L'ApoB è essenziale per l'assemblaggio, la secrezione e il metabolismo di queste lipoproteine. L'apoB è una glicoproteina di 513 kDa anfipatica con due isoforme: apoB-100, prodotta a livello epatico e apoB-48, sintetizzata a livello dell'intestino tenue (Elovson J et al., 1988). ApoB-48 inoltre è così chiamata perché rappresenta il 48% della sequenza di apoB-100.

Le α -eliche anfipatiche nelle apoproteine sono motivi strutturali comuni, nella maggior parte delle apolipoproteine e permettono alla componente proteica di interagire con i lipidi e contribuiscono alla stabilità della apoproteina.

I domini della apoB-100 in grado di associare i lipidi consistono di due regioni β - foglietto che si alternano con due regioni ad α -elica e un terzo dominio ad α -elica N-terminale a formare una struttura pentapartita (Segrest JP et al., 2001).

È stato dimostrato che i domini all'interno del modello pentapartito sono essenziali per l'assemblaggio della lipoproteina (Manchekar M. et al., 2004). Studi effettuati con apoB mancanti di questo dominio a causa di mutazioni missenso mostrano una secrezione deficitaria di apoB (Burnett JR et al., 2007).

L'interazione con la proteina microsomiale che trasporta i trigliceridi (MPT) risulta inoltre vitale per il legame con i lipidi (Hussain MM et al., 2003; Segrest JP et al., 1999).

Il gene che codifica per l'apoB (APOB), localizzato nel braccio corto del cromosoma 2 (Chen SH et al., 1986), si estende per circa 43 kb ed è organizzato in 29 esoni e 28 introni; è un gene tessuto specifico che, come detto precedentemente, è espresso principalmente nelle cellule epatiche e nelle cellule epiteliali dell'intestino (Knott TJ et al., 1985). L' APOB codifica sia per l'apoB-100 che l'apoB-48. Le due isoforme condividono la sequenza N-terminale. Nel processamento dell'apoB-48 l'editing causa nella sequenza dell'mRNA intestinale dell'apoB il cambiamento della base azotata in posizione 6666 trasformando in codone di stop (UAA) il codone CAA, pertanto apoB-48 non presenta la regione C-terminale di legame con il recettore per LDL a differenza dell'apoB-100 (Chen SH et al., 1987; Innerarity TL et al., 1996). Mutazioni in questo gene causano ipercolesterolemia a seguito del mancato riconoscimento da parte dell'apoB-100 del ligando (Boekholdt M. et al., 2006).

La apoB umana contiene un totale di 357 residui di lisina carica positivamente (Chen SH et al., 1986). Una significativa porzione di queste (225 residui di

lisine) sono esposte sulla superficie delle LDL e la rimanente parte (132 residui di lisina) sono all'interno della porzione lipidica delle LDL (Chen SH et al., 1986).

Omeostasi del colesterolo plasmatico. Ruolo delle LDL

La funzione biologica delle LDL è rappresentata dal trasporto del colesterolo dal fegato alle cellule dei tessuti periferici che lo utilizzano per le loro necessità plastiche, come la costituzione delle membrane plasmatiche, o per quelle metaboliche, come la sintesi di ormoni steroidei e di acidi biliari. La sintesi intracellulare di colesterolo è quasi del tutto soppressa dall'ingresso di colesterolo attraverso le LDL che vengono captate dalla cellula, previo legame con recettori specifici che riconoscono l'apoproteina B-100, cioè la componente proteica principale della particella (Goldstein J.L. et al., 1980). Nell'omeostasi del colesterolo, sono coinvolte anche le lipoproteine ad alta densità (HDL) che interagiscono con il colesterolo rilasciato nel plasma dalle cellule, un processo chiamato trasporto inverso del colesterolo.

Metabolismo intracellulare del colesterolo LDL

Nella figura 2 è riassunta l'omeostasi del colesterolo intracellulare e i principali meccanismi molecolari che sono coinvolti. Un ruolo importante nel metabolismo intracellulare delle LDL è svolto dai recettori delle LDL.

Il recettore per le LDL Il recettore per le LDL è una glicoproteina transmembrana composta da 839 aminoacidi. Contiene catene di carboidrati legate all'asparagina (legame N-glicosidico) e catene con legame O-glicosidico ai residui di treonina. Il recettore funzionalmente può essere distinto in 5 “dominii”. Il “primo dominio” del recettore o “dominio di legame” è formato da una sequenza di 40 aminoacidi che viene ripetuta sette volte per un totale di 292 aminoacidi con terminale aminico. Ha una struttura convoluta cui si lega la parte complementare dell'apoproteina B-100 e dell'apoproteina E. Il “secondo dominio” consiste di 400 aminoacidi, il “terzo dominio” è lungo 58 aminoacidi. Il “quarto dominio” è costituito da una sequenza di 22 aminoacidi idrofobici che attraversano la membrana plasmatica. Il “quinto dominio” è composto da 50 aminoacidi nella regione carbossiterminale ed è proiettato nel citoplasma. Questo dominio è responsabile della raccolta dei recettori in regioni specializzate, le cosiddette “fossette rivestite” (perché la superficie interna della membrana che si

trova al di sotto è rivestita da una proteina, la clatrina). Dopo il legame del recettore con le LDL, si formano delle vescicole endocitiche che trasportano all'interno della cellula il complesso recettore-LDL che si fonde con lisosomi.

Nell'ambiente lisosomiale, a causa del pH acido, i recettori si dissociano dalle LDL e possono tornare alla superficie cellulare per compiere un nuovo ciclo. Ogni ciclo dura circa dieci minuti e centinaia sono i cicli di trasporto che ogni recettore compie durante le trenta ore della sua vita media (Brown M.S., Goldstein J.L., 1986). All'interno del lisosoma le LDL vengono scisse nelle sue componenti per azione degli enzimi acidi lisosomiali (proteasi e lipasi). La componente proteica viene idrolizzata ad aminoacidi e gli esteri del colesterolo a colesterolo libero. Questo svolge importanti compiti di regolazione. In primo luogo inibisce la produzione intracellulare del colesterolo agendo sull'enzima chiave dell'intera via biosintetica degli steroli, la 3-idrossi-3-metilglutaril Coenzima A reduttasi (HMG-CoA reduttasi). In secondo luogo il colesterolo promuove il proprio immagazzinamento attivando un enzima, la acil-colesterol-acil-transferasi (ACAT), che lo esterifica. Infine inibisce, per azione sull'RNA messaggero, la produzione di nuovi recettori. Questo complesso meccanismo di regolazione fa sì che la cellula sia sempre in grado, modulando l'attività recettoriale o attivando la produzione locale di colesterolo, di provvedere al

proprio fabbisogno senza sovraccaricarsi. I recettori per le LDL rappresentano per la cellula periferica il sistema più efficiente per sopperire al proprio fabbisogno in colesterolo, ma rappresentano anche il mezzo di rimozione dal plasma delle LDL circolanti (Brown M.S., Goldstein J.L., 1986).

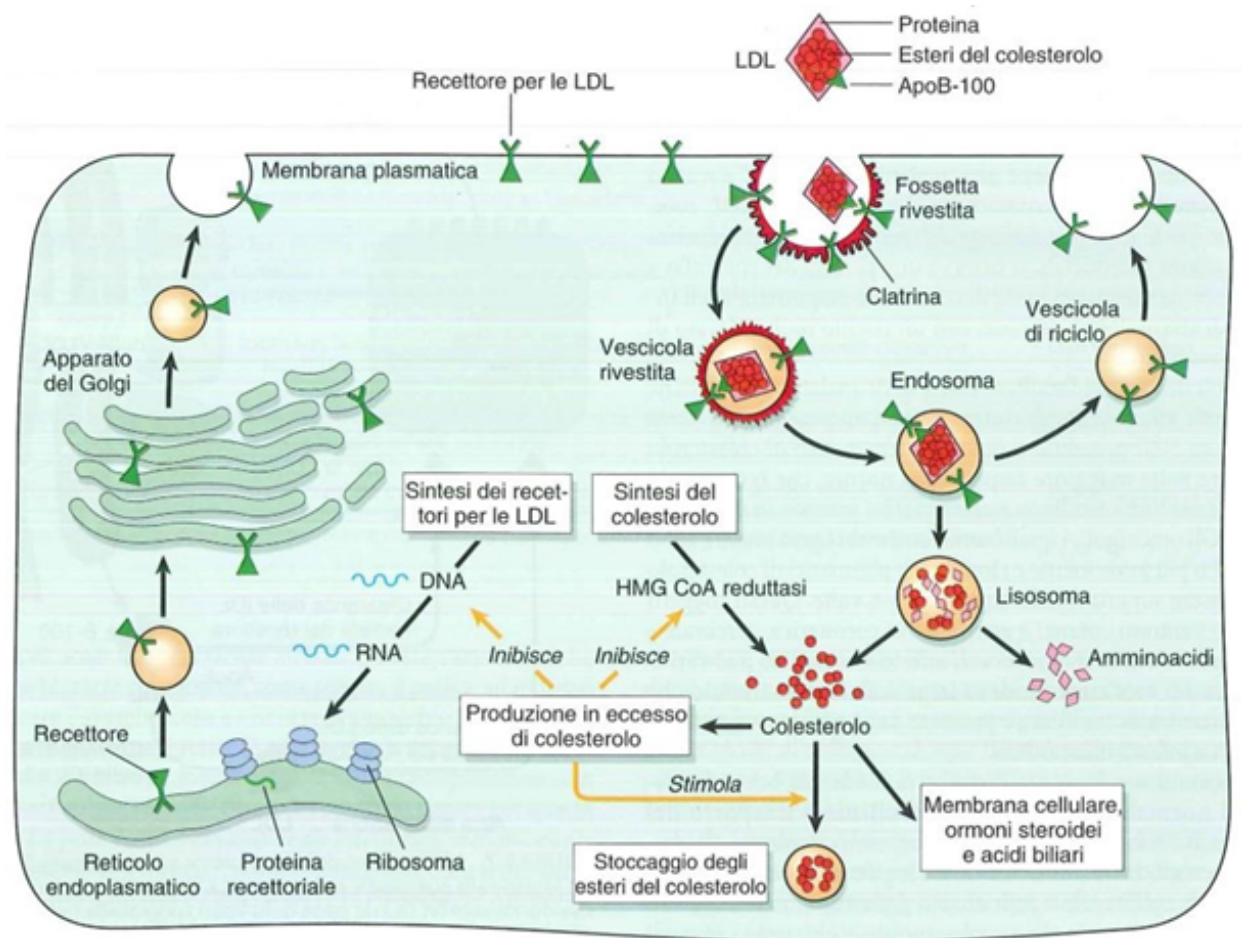


Figura 2: Ciclo dei recettori per le LDL e regolazione del metabolismo del colesterolo

Alterazioni del catabolismo delle LDL

Gli studi di cinetica hanno dimostrato che nel soggetto normale circa il 45% del pool di LDL (corrispondente a 1.500 mg di colesterolo LDL) viene catabolizzata ogni giorno: il 30% (1.000 mg di colesterolo LDL) attraverso la via recettoriale specifica ed il restante 15% attraverso una via indipendente (Brown M.S., Goldstein J.L., 1986). Questo secondo aspetto della rimozione del colesterolo è di estrema importanza nella regolazione della concentrazione plasmatica delle LDL. Infatti la via recettoriale specifica è regolata in modo tale da mantenere l'omeostasi intracellulare del colesterolo e, cioè da proteggere la cellula da un sovraccarico di colesterolo. In altri termini, la sua efficienza catabolica dipende dalla concentrazione intracellulare di colesterolo ed è sganciata dal livello sierico delle LDL. La via alternativa invece non conosce sistemi di regolazione e pertanto la sua efficienza di rimozione aumenta in relazione all'espansione del pool totale del colesterolo. I macrofagi, derivati dai monociti circolanti, rendono in gran parte conto di questa via alternativa (via scavenger). Parte delle LDL viene captata dai macrofagi attraverso meccanismi apparentemente aspecifici e parte attraverso strutture ad alta affinità (recettori) che non riconoscono e, pertanto, non legano le LDL normali ma preferiscono le LDL chimicamente modificate. Le modificazioni delle LDL possono avvenire durante la loro

permanenza in circolo ad opera di aldeidi (tra cui la malon-dialdeide) o per interazione con le cellule endoteliali che possono provocare la perossidazione da specie reattive dell'ossigeno. Una delle modificazioni principali che rende le LDL più aterogeniche è la perossidazione lipidica che provoca alterazioni strutturali e funzionali delle LDL (Esterbauer H et al., 1992). La malon-dialdeide è uno dei prodotti della perossidazione lipidica che può contribuire ad alterazioni delle apoproteine. Le LDL ossidate mostrano un aumento della carica elettrica negativa e alterazioni composizionali dei lipidi e una alterazione dell'apo B-100. A causa di tali modificazioni, le LDL modificate non vengono riconosciute dai normali recettori cellulari per l'apoB e apoE. Al contrario vengono internalizzate dai macrofagi con successiva formazione di cellule schiumose. Oltre alla perossidazione, anche la glicazione è considerata una modifica aterogenica, i meccanismi molecolari coinvolti saranno descritti nel prossimo paragrafo.

GLICAZIONE NON ENZIMATICA E RILEVANZA FISIO-PATOLOGICA

Tutte le proteine, sia plasmatiche che intracellulari, sono sensibili alla glicazione come evidenziato in studi precedenti che hanno evidenziato la presenza di proteine glicate nel plasma o siero di pazienti affetti da patologie dismetaboliche (Younis N et al., 2009). La glicazione non enzimatica interessa anche le lipoproteine, tra cui le LDL. Il livello di apoB glicata in diverse sottoclassi di LDL è stato studiato in soggetti non diabetici. Si è dimostrato che la maggior parte delle apoB glicate era presente nelle LDL con un range di densità di 1,019–1,063 g / ml. Le LDL più piccole e dense (D=1,044–1,063 g / ml) contenevano una concentrazione più alta di apoB glicata rispetto alle LDL1 e LDL2 (D=1,019–1,044 g / ml) (Younis N et al., 2009). Complessivamente, il 3,6% delle apoB circolanti negli individui non diabetici studiati erano glicate. La percentuale nelle LDL piccole e dense (SD-LDL) è significativamente più alta rispetto alle LDL 1 e 2, come mostrato in figura 4. Questo può essere spiegato perché sulla superficie delle SD-LDL vi sono più residui di lisine esposte al glucosio (Younis N et al., 2009). Infatti studi precedenti hanno dimostrato che l'amminoacido che subisce maggiormente la glicazione è la lisina con il 2-17%

di residui di lisine glicate, seguita dall'arginina (Steinbrecher UP et al., 1984); inoltre è dimostrato *in vivo* che le apoB delle LDL in soggetti diabetici hanno una più alta concentrazione di lisine legate con il glucosio se confrontato con le LDL isolate da individui non diabetici (rispettivamente 1,9 contro 0.5 moli di glucosio/ moli di proteine) (Schleicher E et al., 1981). La glicazione delle lisine dell'apoB delle LDL provoca la formazione dei prodotti finali di glicazione avanzata (AGEs) (Ahmed MU et al., 1997; Odani H et al., 1998). *In vivo*, la più lunga emivita delle SD-LDL può contribuire ulteriormente ad una più alta probabilità di glicazione. I metaboliti del glucosio o la presenza di radicali liberi dell'ossigeno o cationi dei metalli di transizione *in vivo* potrebbero accelerare la glicazione (Younis NNSH et al., 2009). La glicazione delle particelle di lipoproteine si verifica anche nella componente lipidica oltre che proteica, sebbene prevalentemente in quest'ultima (Akanji AO et al., 2002).

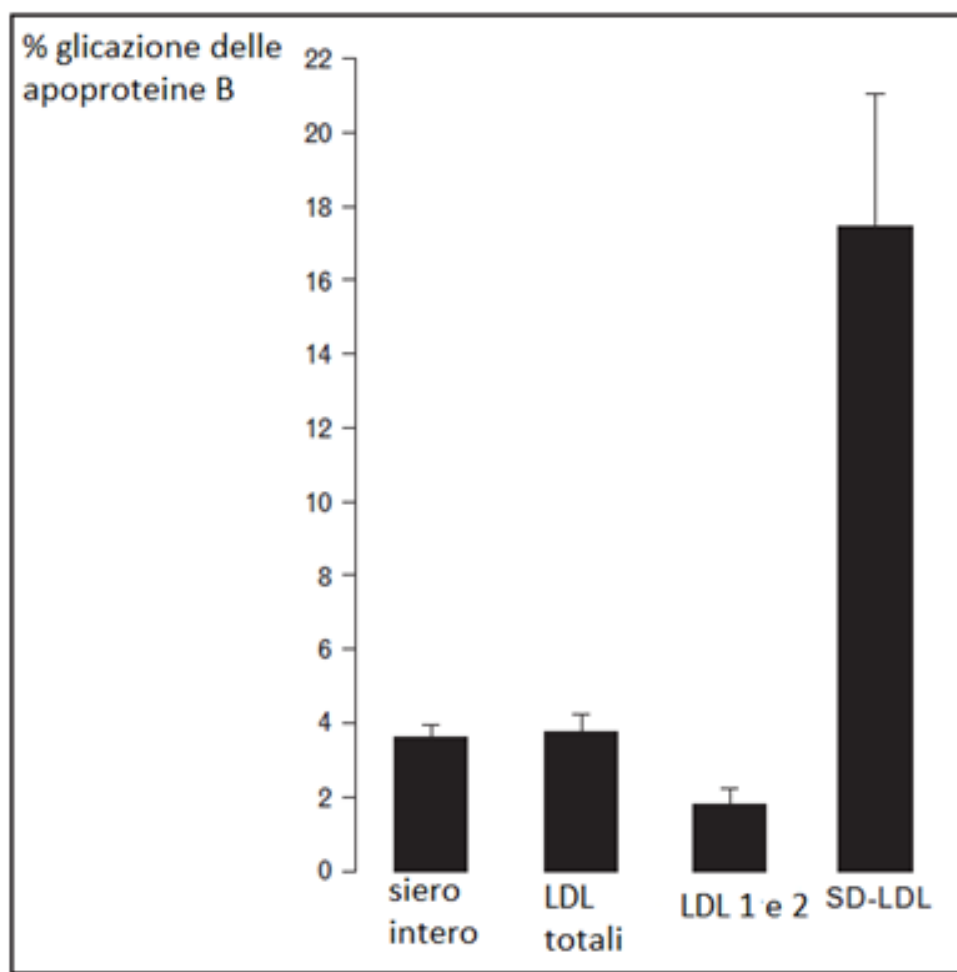


Figura 4: Percentuale di glicazione delle apoproteine B nel siero intero, nelle LDL totali e nelle LDL piccole e dense in soggetti non diabetici [Fonte: *Glycation as an atherogenic modification of LDL* di Younis N. et al., 2008]

Le apoB glicate nel plasma sono strettamente correlate con la concentrazione di apoB glicate nelle LDL (Younis N et al., 2009). Si è ipotizzato che le lipoproteine contenenti apoB ricche di lipidi, come le lipoproteine a densità intermedia (IDL) e VLDL, risultano meno sensibili alla glicazione rispetto alle LDL. Probabilmente le differenze sono dovute alla presenza di meno residui di lisine delle apoB esposte sulla superficie e inoltre le VLDL e le IDL hanno una emivita più breve in circolo (Tomkin GH et al., 2001).

È stato osservato sia in coltura che durante gli studi sul turnover *in vivo* che le LDL glicate hanno un tasso catabolico più lento rispetto a quelle non glicate. (Steinbrecher UP et al., 1984; Wang X et al., 1998). Studi *in vitro* suggeriscono che LDL glicate così come quelle ossidate sono aterogeniche e presentano alterazioni delle interazioni con le cellule in coltura. Le LDL glicate, anche in assenza di un'ossidazione significativa, favoriscono un rapido accumulo di lipidi da parte delle cellule dei macrofagi (Brown BE et al., 2007).

Le LDL isolate da topi J774A esposte al trattamento con la glicolaldeide hanno mostrato un accumulo significativamente più elevato di esteri del colesterolo rispetto alle cellule esposte in assenza dello zucchero (rispettivamente 37% e meno del 7%) (Brown BE et al., 2006). Sia le LDL glicate *in vitro* sia le LDL

glicate isolate da pazienti diabetici hanno diminuito l'espressione ossido nitrico sintasi (eNOS) nell'endotelio, riducendo la proliferazione cellulare e innescano l'apoptosi delle cellule endoteliali vascolari umane (HUVECs) (Artwohl M et al., 2003). Sia le LDL glicate isolate da pazienti diabetici di tipo 1 (Rabini RA et al., 1999) sia quelle glicate *in vitro* (Ferretti G et al., 2002) aumentano la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} delle piastrine isolate e provocano un aumento della loro aggregazione attraverso l'inibizione nella membrana piastrinica della pompa Na^+ / K^+ ATPase e una stimolazione, invece, dell'attività della pompa della Ca^{2+} ATPase (Ferretti G et al., 2002). Tale aumento dell'aggregazione piastrinica potrebbe favorire formazione di trombi.

La formazione di complessi AGE-apoB, che avviene principalmente sui residui lisinici posti all'interno del dominio di legame specifico per il recettore delle LDL, è tale da determinare un'inibizione del legame delle LDL con il loro recettore, diminuendone la clearance rispetto alle LDL native (Steinbrecher UP et al., 1984; Bucala R et al., 1994). Molti studi hanno dimostrato che nei fibroblasti umani in coltura la degradazione delle LDL glicate è compromessa rispetto alle LDL non modificate, e tale alterazione è proporzionale al grado di glicazione (Steinbrecher UP et al., 1984). I macrofagi riconoscono e incorporano le LDL glicate, grazie alla presenza di recettori scavenger non specifici, presenti

sulla superficie cellulare (Klein RL et al., 1995). Nell'intima, il riconoscimento delle LDL glicate da parte dei suddetti recettori macrofagici può indurre l'accumulo intracellulare di esteri del colesterolo favorendone la trasformazione in cellule schiumose, promovendo così il processo aterosclerotico (Klein RL et al., 1995; Sobenin IA et al., 1993).

Ruolo del metilgliossale nella glicazione non enzimatica

Oltre al glucosio, anche molecole derivate dal metabolismo cellulare, come il metilgliossale, possono contribuire alla glicazione come dimostrato in studi precedenti (Mir A.R. et al., 2015). Il metilgliossale (MGO), α -oxaldeide è un composto dicarbonile aciclico altamente reattivo che si forma anche come prodotto secondario del metabolismo del glucosio, lipidi e amminoacidi; il pathway glicolitico rappresenta la più importante fonte endogena di MGO e deriva dal metabolismo della gliceraldeide-3-fosfato (GAP) e diidrossiacetone fosfato (DHAP) (Richard J., 1993).

In condizioni fisiologiche, il sistema delle gliossalasi, un pathway enzimatico citoplasmatico, degrada il MGO in D-lattato con l'aiuto del glutathione (GSH), come descritto in figura 5.

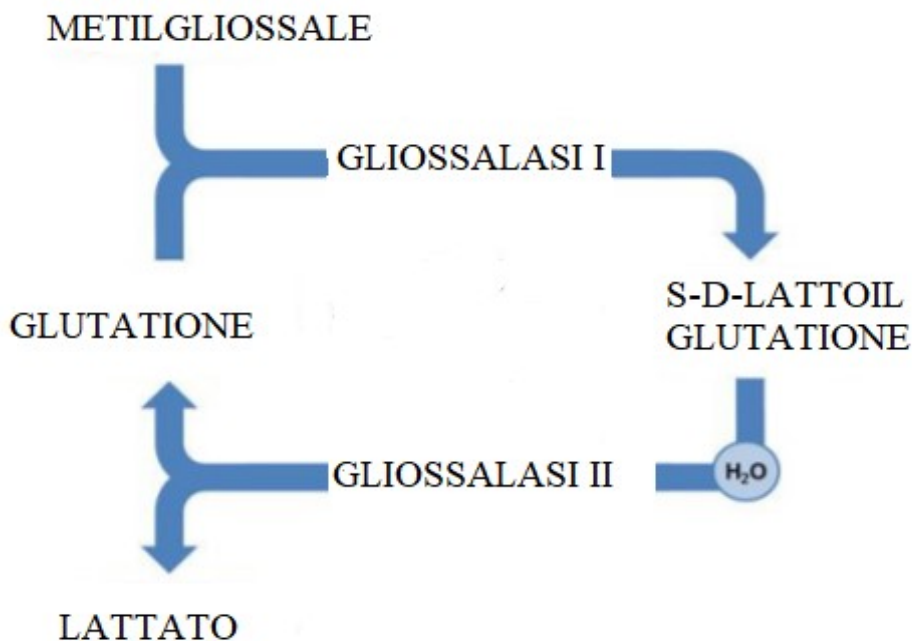


Figura 5: Metabolismo delle gliossalasi

Nell'iperglicemia, un uso ridotto del glucosio e una carenza del trioso fosfato isomerasi determinano un aumento dei livelli di MGO. I livelli ridotti di GSH, causano, inoltre, stress ossidativo (Ahmed N. et al., 2003).

Il MGO è un potente agente glicante, che è ritenuto più efficace del glucosio (Mir A.R. et al., 2015). Questo è considerato tollerabile *in vivo* perché l'efficacia di detossificazione di MGO da parte della gliossalasi 1 (GLO1) mantiene la concentrazione di MGO nel plasma più bassa del glucosio (Rabbani N., Thornalley P.J., 2012). Il MGO rapidamente reagisce con lipidi, acidi nucleici e

con residui di lisine e arginine delle proteine per formare gli AGEs come l'arg-
 pirimidina, idroimidazolo MG-H, MGO- dimeri di lisine derivate e Nε-lisina
 (Thornalley P.J., 2005; Rabbani N., P.J. Thornalley, 2012) (Figura 6).

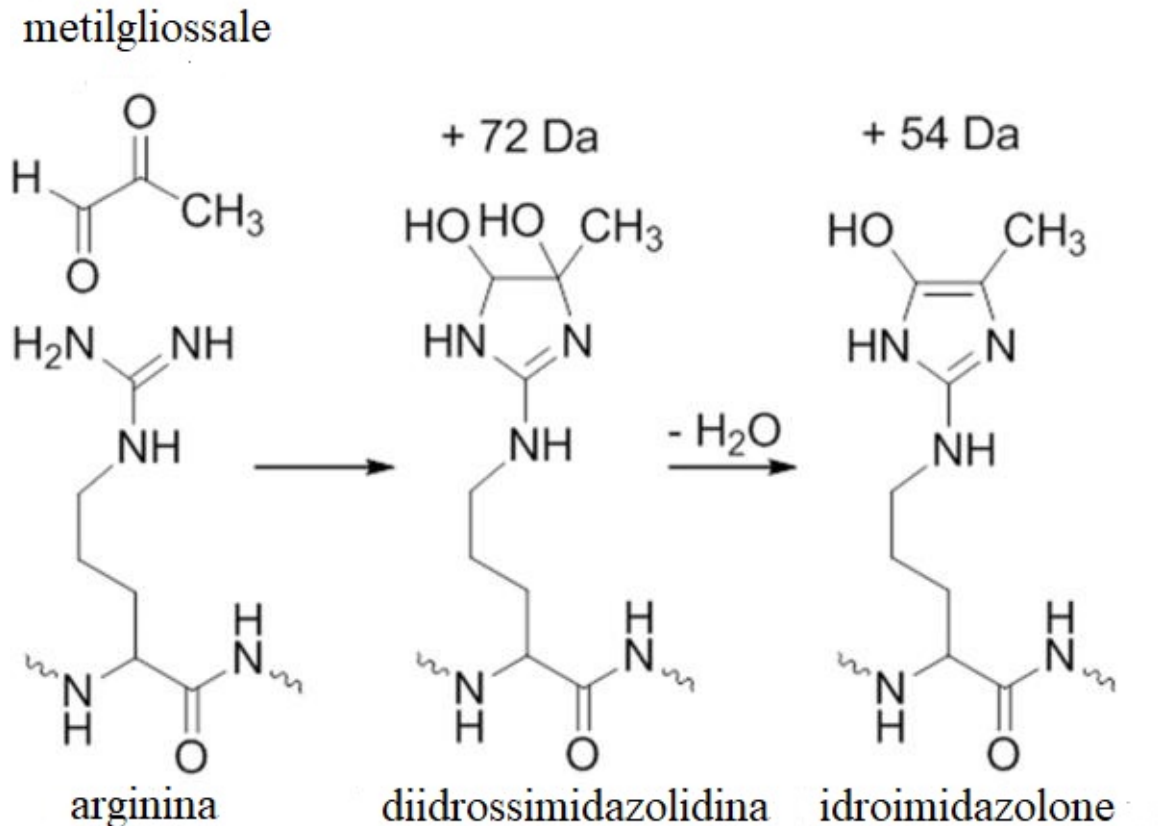


Figura 6: Modificazioni chimiche dell'arginina dovute al metilgliossale

Ruolo del fruttosio nella glicazione non enzimatica

Un altro agente glicante è il fruttosio. Sebbene poco studiato *in vitro*, in quanto presente nel plasma ad una concentrazione più bassa del glucosio, il fruttosio è considerato più reattivo di quest'ultimo (Suárez G et al., 1991). Nei soggetti diabetici, però, la concentrazione di fruttosio intracellulare endogeno aumenta in seguito all'attivazione del pathway dei polioli, raggiungendo così lo stesso ordine di grandezza del glucosio (Gugliucci A, 2016). Quindi si ipotizza che il fruttosio contribuisca alla formazione degli AGEs intracellulari nell'organismo umano.

Il fruttosio oltre a formarsi dal sorbitolo, viene introdotto con la dieta. Il fruttosio esogeno, assorbito a livello intestinale attraverso il trasportatore GLUT 5, raggiunge le cellule epatiche dove viene metabolizzato. La differenza sostanziale tra il glucosio e il fruttosio è che il fruttosio entra nella glicolisi a livello dei triosi fosfati. Pertanto il metabolismo del fruttosio bypassa i principali controlli della glicolisi a livello della fosfofruttochinasi (PFK). L'enzima modula il metabolismo del glucosio mediante l'inibizione allosterica da parte dei livelli di ATP e citrato.

Quindi se presente in eccesso viene immesso comunque nella glicolisi senza controllo rappresentando una fonte non regolata di glicerolo 3-P e acetil CoA per la lipogenesi epatica. Questa fonte non regolata di triosi, inoltre, determina la formazione di metilgliosale (Rabbani N et al., 2015) (Figura 7).

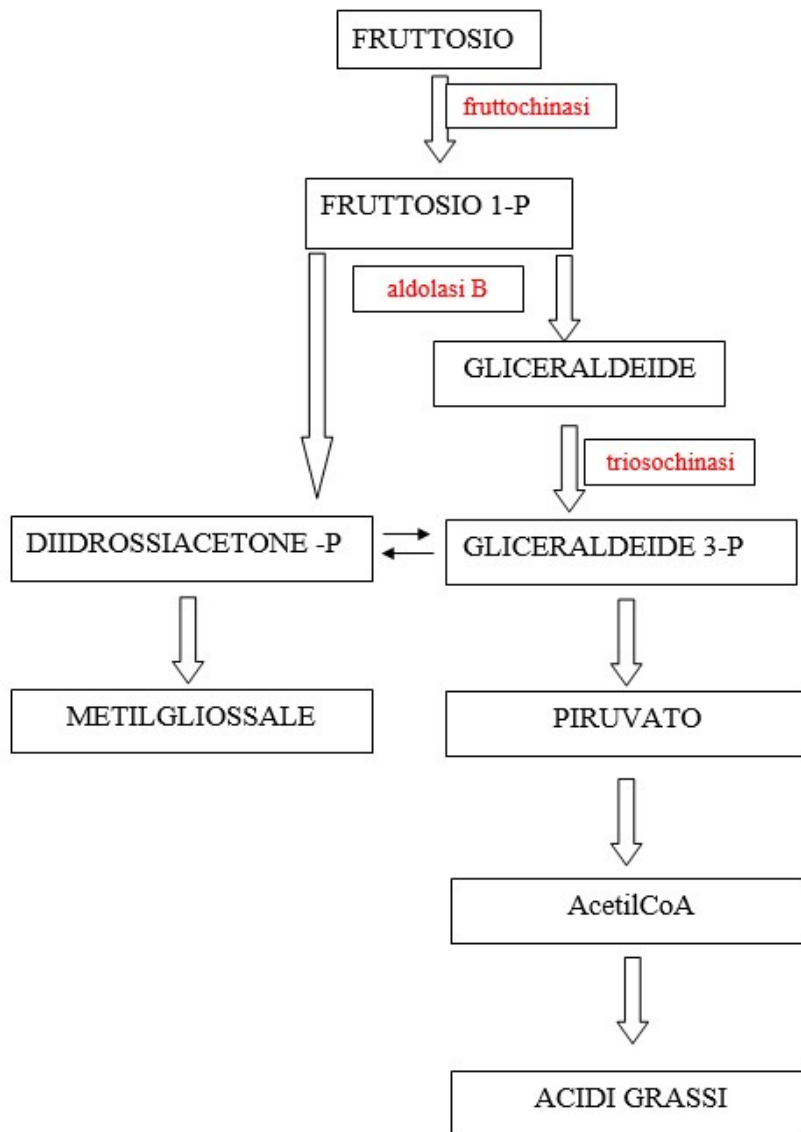


Figura 7: Metabolismo del fruttosio (in rosso sono indicati gli enzimi)

Formazione di prodotti di glicazione avanzata (AGEs): meccanismi molecolari

L'iperglicemia, come detto precedentemente, è considerata uno dei fattori patogenetici chiave nello sviluppo delle complicanze croniche del diabete. Essa agisce attraverso vari meccanismi tra i quali uno dei più importanti è la glicazione non enzimatica delle proteine. Queste reazioni sono divise in una fase precoce e in una tardiva: la prima è costituita dalle reazioni che si verificano fino alla formazione dei prodotti di Amadori, mentre la seconda è rappresentata dalle reazioni che, attraverso l'ossidazione, la disidratazione e la condensazione conducono alla formazione degli AGEs che sono un gruppo eterogeneo di composti che hanno molteplici effetti biologici (Luevano C., 2010; Nedi et al., 2013). I prodotti finali di glicazione avanzata (AGEs) sono il risultato di una catena di reazioni chimiche successive alla reazione di glicazione iniziale, la quale avviene dopo un contatto persistente degli zuccheri riducenti o gli aldeidi a corta catena con le proteine o lipidi; quindi la loro formazione è una parte normale del metabolismo, ma se si raggiungono livelli eccessivamente alti nei tessuti e in circolo possono esercitare effetti dannosi come riassunto nella tabella 5.

Tabella 5: Ruoli fisio-patologici degli AGEs

<ul style="list-style-type: none">• Formazioni di complessi con le lipoproteine plasmatiche LDL (glicazione delle lipoproteine, minore clearance, aumento dei livelli circolanti delle LDL che provoca modificazioni aterogeniche);
<ul style="list-style-type: none">• Formazione di complessi con proteine native cellulari (fibronectina, collagene, ...);
<ul style="list-style-type: none">• Accumuli di AGEs nei reni e nel fegato, provocano alterazioni funzionali;
<ul style="list-style-type: none">• Incremento del danno ossidativo
<ul style="list-style-type: none">• Interazioni con specifici recettori (RAGE)
<ul style="list-style-type: none">• Incremento proprietà chemiotattiche nei confronti di monociti e linfociti-T

Gli AGEs sono quindi il risultato di una catena di eventi che possono derivare da più pathway:

- la reazione di Maillard
- l'ossidazione del glucosio
- l'ossidazione di lipidi
- la via dei polioli.

La formazione degli AGEs con la reazione di Maillard avviene in tre fasi (Figura 8):

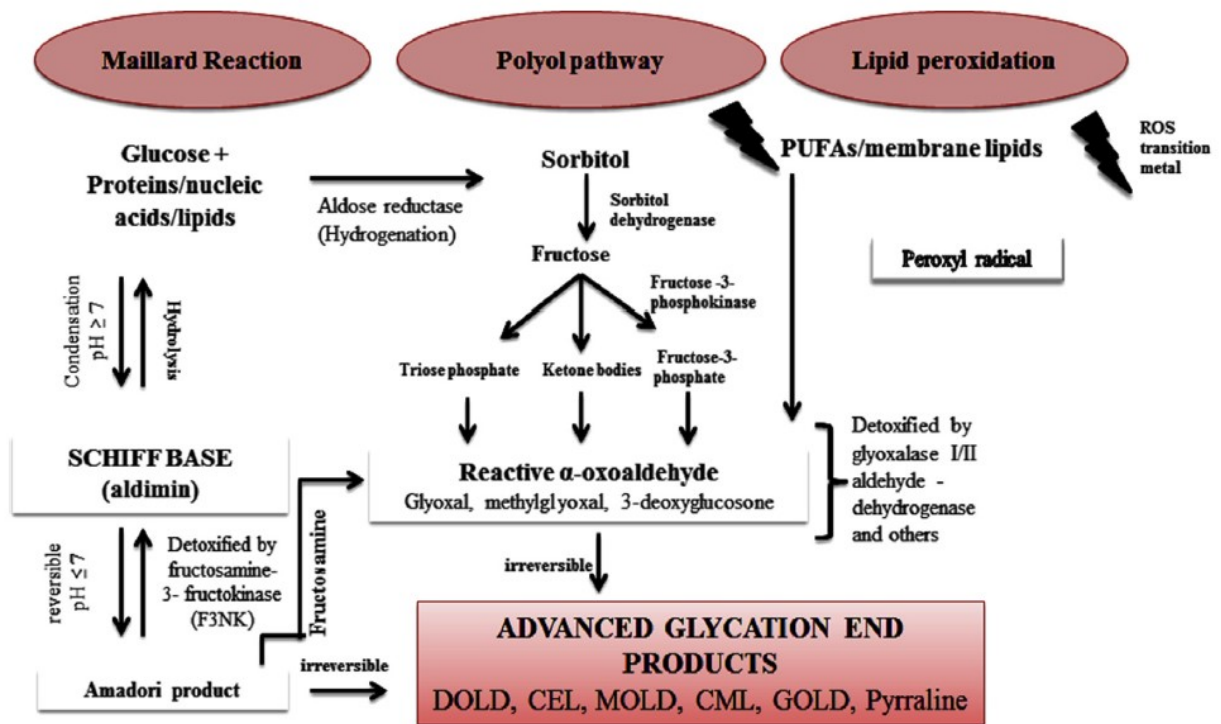


Figura 8: Meccanismi molecolari che portano alla formazione dei prodotti di glicazione (Advanced Glycation end products)

1. Nella prima uno zucchero riducente, come il glucosio, il fruttosio o il galattosio, si lega ad un aminoacido libero (principalmente lisina e arginina) di una proteina, come le apoproteine B (apoB) nelle LDL, di un lipide o del DNA, attraverso una reazione non enzimatica per formare un composto instabile chiamato base di Schiff. L'avvio di questa prima fase dipende dalla concentrazione di glucosio, avviene in poche ore ed è reversibile se la concentrazione di glucosio diminuisce. Tale reazione non enzimatica è influenzata *in vivo* da una serie di fattori tra i quali la durata e l'entità dell'iperglicemia, il turnover delle proteine, la permeabilità cellulare al glucosio e l'accessibilità degli amino gruppi proteici. Il glucosio è stato sino ad ora considerato il più importante iniziatore *in vivo* di tale reazione, sia perché rappresenta il principale zucchero dell'organismo sia perché la sua concentrazione è aumentata nel diabete.

2. Durante la seconda fase, la base di Schiff subisce un riarrangiamento chimico nell'ambito di un processo che dura qualche giorno fino a formare i prodotti di Amadori (prodotti precoci della glicazione). Questi prodotti sono più stabili rispetto ai primi ma la reazione è ancora reversibile. Il prodotto di Amadori raggiunge l'equilibrio dopo 15-20 giorni e tende ad accumularsi sia sulle proteine a breve emivita che su quelle ad emivita più lunga. L'accumulo del

prodotto di Amadori sulle proteine è in grado di alterare le proprietà fisico-chimiche delle stesse.

3. Nell' ultima fase vi è un accumulo di prodotti di Amadori che subiscono riarrangiamenti chimici complessi (ossidazioni, riduzioni e idratazioni) formando, nel corso di settimane o mesi, prodotti finali chiamati AGEs. Questo processo è irreversibile. Gli AGEs sono molto stabili, si accumulano all'interno e all'esterno delle cellule interferendo con le loro funzioni. Alcuni di loro hanno proprietà fluorescenti (Singh R. et al., 2001; King, G.L., 2002), pertanto la fluorescenza è una delle tecniche che possono essere effettuate per rilevare che la glicazione è avvenuta.

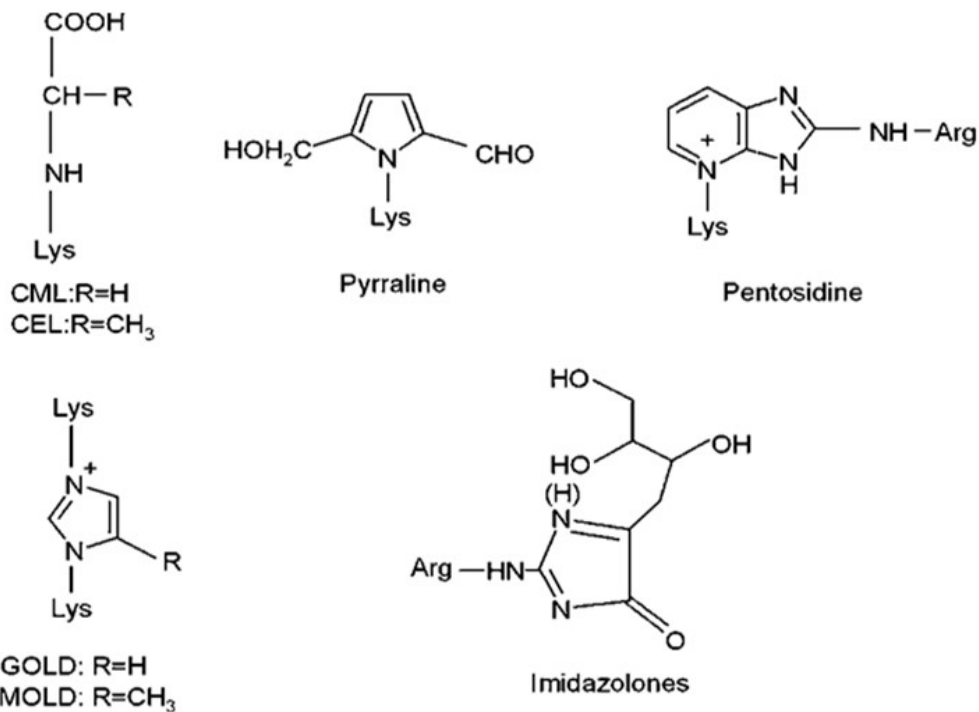
Oltre alla reazione di Maillard, anche l'ossidazione dei lipidi in derivati dicarbonilici, noti come α -oxaldeidi, in seguito ad un aumento dello stress ossidativo possono interagire con amminoacidi per formare AGEs (Luevano Contreras C., Chapman Novakofski K, 2010). I più noti sono il gliosale, il metilgliosale (MGO) e 3-deossiglucosone.

Gli AGEs si formano anche nella via dei polioli in cui il glucosio viene convertito a sorbitolo dall'enzima aldoso reduttasi e poi a fruttosio dall'azione della sorbitolo deidrogenasi. I metaboliti del fruttosio poi (come il fruttosio 3

fosfato), vengono convertiti ad α -oxaldeidi e interagiscono con gli amminoacidi per formare AGEs (Lorenzi, 2007; Luevano Contreras C., Chapman Novakofski K, 2010).

Tra gli AGEs più studiati vi sono la carbossimetil-lisina (CML) e la pirralina che, insieme al metilgliosale, sono utilizzati come biomarcatori per la formazione di AGEs *in vivo* (Singh R. et al., 2001). In particolare la CML è un marker particolarmente utile per lo studio degli AGEs in quanto può derivare dalla glicazione del glucosio e del fruttosio o dalla perossidazione lipidica, rendendo possibile confrontare le varie fonti di AGEs.

Altri AGEs comuni che si formano sono il dimero di lisina 3-deossiglucosone (DOLD), il dimero di lisina gliosale (GOLD), il dimero di lisina metilgliosale (MOLD) e la carbossietillisina (CEL) (Figura 9).



**Figura 9: Strutture di vari AGEs:
 CML (N-carboxymethyllysine); CEL (N-carboxyethyllysine);
 GOLD (glyoxal-lysine dimer); MOLD (methylglyoxal-lysine
 dimer); pirralina.**

Gli effetti biologici degli AGEs vengono esercitati attraverso due meccanismi:

1. uno indipendente dal recettore (danni diretti alla struttura delle proteine di membrana o intracellulari e al metabolismo della matrice extracellulare);
2. uno mediato da un recettore che riconosce gli AGEs come ligandi e che viene chiamato RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproduct).

Come mostrato in figura 10, l'interazione fra AGEs e il recettore (RAGE) attiva la MAP-chinasi (MAPK, Mitogen-activated protein kinase), una serina/treonina chinasi che può essere traslocata nel nucleo, e la fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3-K) con percorsi che porteranno alla attivazione del fattore di trascrizione nucleare NFκB. Dopo l'attivazione, l' NFκB trasloca nel nucleo dove attiva la trascrizione dei geni per citochine, fattori di crescita e molecole come il TNF alfa, l'interleuchina 6, l'interleuchina 1. Nelle cellule endoteliali vascolari, l'attivazione dei RAGE causato dagli AGEs è in grado di indurre l'espressione del gene VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) e la ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) con conseguente aumento, rispettivamente, della permeabilità vascolare, dell'angiogenesi e dell'infiammazione localizzata (Sheetz, M.J, King G.L., 2002). Questo stato infiammatorio è ulteriormente aumentato da un meccanismo di feedback positivo in cui NFκB aumenta

l'espressione a livello trascrizionale del gene che codifica per il recettore RAGE (Claudia Luevano, 2010; Parisa Younessi et al., 2011). Anche TNF α ed estrogeni aumentano la trascrizione genica del RAGE attivando rispettivamente NF κ B e il fattore di trascrizione Sp1 (Sims-Robinson, 2010). Inoltre anche la disfunzione mitocondriale gioca un ruolo in queste risposte pro-infiammatorie in cui è presente un eccesso di produzione di ROS. Il recettore per gli AGEs è stato trovato espresso in un'ampia varietà di cellule e tessuti, comprese le cellule epiteliali alveolari del polmone le cellule vascolari e cellule immunitarie. In condizioni fisiologiche, l'espressione dei RAGE è generalmente bassa negli organi e tessuti ma aumenta in lesioni patologiche quali le placche ateromatose dove gli AGEs si accumulano. Sulla base delle numerose evidenze sperimentali si è ipotizzato che la soppressione dell'azione dei recettori RAGE possa essere utile per prevenire o rallentare l'invecchiamento e lo sviluppo di varie malattie legate all'invecchiamento (Hartog et al 2007; Hegab et al. 2012).

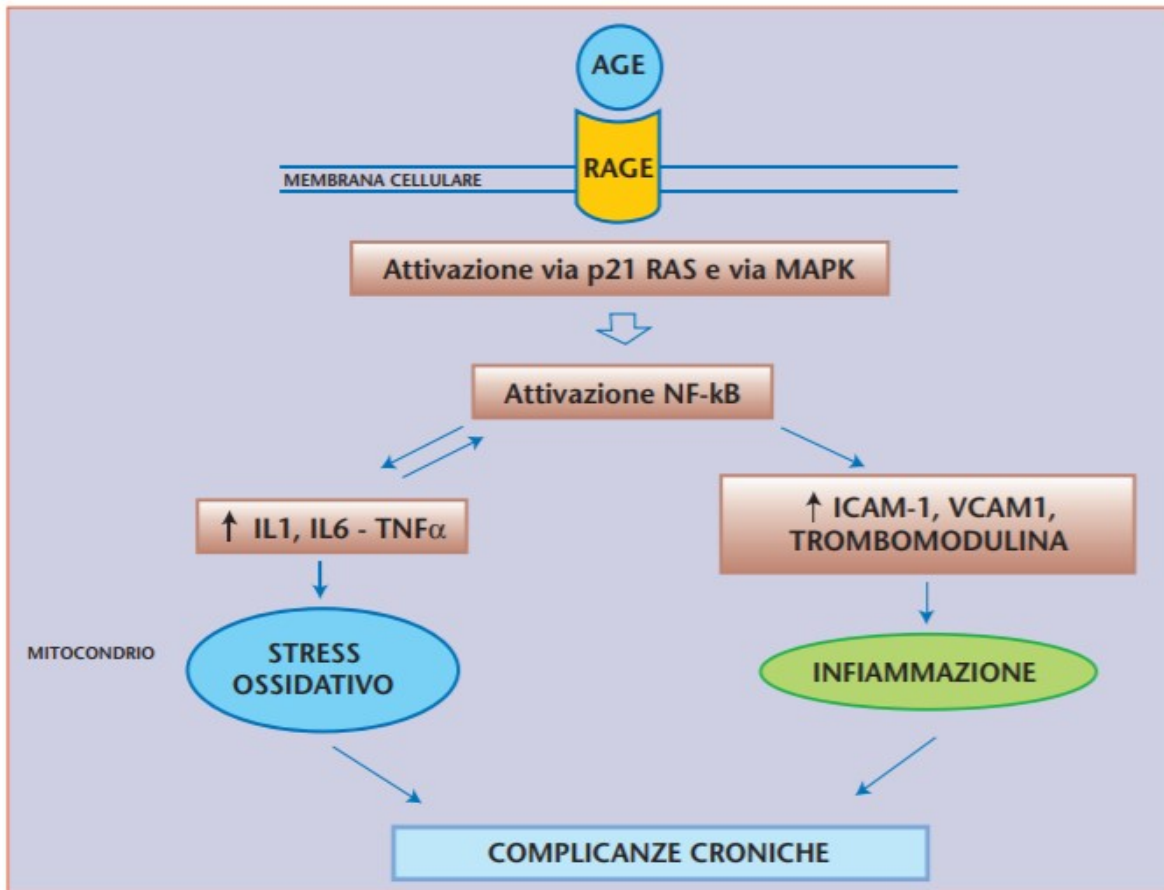


Figura 10: Stress ossidativo e infiammazione. Meccanismi molecolari attivati dalla interazione degli AGEs con il recettore transmembrana RAGE [Fonte: “Ruolo dei prodotti di glicazione avanzata nelle complicanze di microvascolari del diabete di tipo 2: “attori protagonisti” nella memoria metabolica?” di Chilelli NC, Piarulli F, Sartore G, Lapolla A, Dipartimento di Medicina (DIMED), UOC Diabetologia e Dietetica, ULSS 16, Università degli Studi di Padova, Padova]

Relazione tra glicazione e ossidazione delle LDL

Tra i meccanismi molecolari che sono stati ipotizzati per spiegare la maggiore aterogenicità delle LDL glicate, vi è la relazione tra glicazione e ossidazione delle LDL. Infatti tali reazioni possono avvenire *in vivo* e studi *in vitro* hanno confermato che le modificazioni si possono instaurare. La combinazione di glicazione ed ossidazione che generalmente coesistono *in vivo* è definita glicossidazione. Anche in assenza di ossigeno o dei radicali liberi dell'ossigeno che si generano in altri processi, i radicali liberi si possono generare dal glucosio e dai prodotti di Amadori. Questi favoriscono l'ossidazione delle LDL glicate e aumentano la suscettibilità ad un'ulteriore ossidazione (Sobal G et al., 2000; Kobayashi K et al., 1995; Menzel EJ et al., 1997). Sia le LDL glicate che ossidate sono localizzate nelle cellule schiumose derivate dai macrofagi nelle lesioni arteriosclerotiche (Imanaga Y et al., 2000). La formazione di LDL ossidate (ox-LDL) può accadere durante la glicazione, ma le ox-LDL non sono necessariamente glicate, come è stato dimostrato *in vitro* da studi sulla cross-reattività delle LDL ossidate e glicate usando anticorpi contro ox-LDL e le LDL AGEs (Imanaga Y et al., 2000).

Durante l'ossidazione delle LDL si hanno cambiamenti nella composizione proteica; infatti l'ossidazione può provocare la frammentazione ossidativa dell'Apo B100 (Esterbauer H et al., 1992; Parthasarathy S et al., 1992). A seguito dell'ossidazione, si verifica un aumento della carica negativa delle LDL, probabilmente a seguito della derivatizzazione di cariche positive di gruppi amminici attraverso la formazione di una base di Schiff con aldeidi (Steinbrecher UP et al., 1984). Le LDL ossidate mostrano un incremento della densità, aumento della fluidità, aumento degli indici di perossidazione lipidica (TBARS, dieni coniugati, idroperossidi) (Tabella 6).

Tabella 6: Alterazioni composizionali e strutturali delle LDL

ossidate

ALTERAZIONI COMPOSIZIONALI E STRUTTURALI
Aumento mobilità elettroforetica
Diminuzione dei gruppi amminici associati alle apoproteine
Diminuzione della fluorescenza del triptofano
Frammentazione apoproteine
Incremento della densità (small-dense LDL mostrano una maggiore suscettibilità alla ossidazione)
Aumento fluidità
Diminuzione dell'ordine molecolare
Aumento degli indici di perossidazione lipidica come sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS), dieni coniugati, idroperossidi

Materiali e metodi

Separazione delle LDL

I campioni di sangue (8 ml) sono stati prelevati da soggetti normolipemici, utilizzando eparina come anticoagulante. Il plasma è stato separato dalla parte corpuscolata del sangue mediante centrifugazione (3000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente) e la separazione delle lipoproteine è stata eseguita mediante centrifugazione (65000 rpm per 1 ora e 30 minuti, alla temperatura di 10°C, con centrifuga Beckman Optima L-90K Ultracentrifuge) su gradiente di densità di bromuro di potassio (Chung BH, et al., 1986).

Questa procedura per l'isolamento e l'analisi delle lipoproteine plasmatiche oltre che un'ottima risoluzione, presenta numerosi vantaggi per il minor tempo di centrifugazione che comporta un minor rischio di danneggiare le lipoproteine contro la perossidazione. La frazione di LDL ottenuta è stata sottoposta a dialisi per 24 h a 4 °C per rimuovere l'eccesso di sale, utilizzando tampone fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 a cui è stato aggiunto il Chelex-100 (0,05%) come chelante.

Dosaggio delle proteine

La concentrazione proteica delle LDL è stata determinata mediante il metodo Bradford (Bradford, 1976). Viene utilizzata albumina di siero bovino (0,141 mg/ml) come proteina di riferimento.

Glicazione delle LDL con glucosio, fruttosio e metilgliosale

In una fase preliminare dello studio, abbiamo investigato l'effetto della glicazione delle LDL utilizzando come agente di glicazione il glucosio ad una concentrazione di 30 mM. In accordo con la letteratura, una soluzione stock di glucosio è stata preparata utilizzando glucosio disciolto nel tampone costituito da PBS (10 mM, pH 7.4), BHT (25 μ M) e SodioAzide NaN_3 (0,02%). Per ogni esperimento sono stati predisposti campioni di LDL incubati con PBS (controllo) o in PBS contenente glucosio 30 mM (Younis N et al., 2008).

I campioni (con glucosio e senza glucosio) sono stati incubati a 37°C ed a tempi diversi (fino ad un massimo di 7 giorni). Dopo 24 ore e per periodi successivi volumi di campioni sono stati prelevati per le successive analisi (valutazione dei gruppi amminici con metodica TNBS, valutazione della fluorescenza degli AGEs e del triptofano). Prima di eseguire ciascuna prova è stata effettuata una

dialisi dei campioni in una soluzione di NaCl (0.9%) per 24 ore a 4°C, al fine di rimuovere il BHT ed il glucosio.

Il fruttosio, come detto precedentemente, è un altro possibile agente glicante *in vivo*, pertanto è stato studiato l'effetto *in vitro* anche di questa molecola alle stesse concentrazioni del glucosio (Zaman A. et al., 2018).

Per studiare la glicazione delle LDL con il metilgliosale (MGO) i campioni sono stati incubati a 37°C con una soluzione di MGO (1 mM) in PBS (10 mM, pH 7,4), contenente DTPA (0,4 mM) e BHT (25 µM) (Minhal Abidi et al., 2018).

Dosaggio dei livelli di gruppi amminici liberi

La rilevazione dei gruppi amminici liberi in soluzione è stata eseguita mediante il saggio all'acido trinitrobenzensolfonico (TNBSA o TNBS) (Snyder, S. L., Sobocinski, P.Z., 1975), il reattivo si coniuga ai gruppi amminici liberi in soluzione in ambiente alcalino (pH 8,5), formando un trinitrofenil derivato la cui assorbanza, misurata a 420 nm, è direttamente correlabile alla sua concentrazione, e di conseguenza alla quantità di ammine libere (Figura 11); le lisine sono tra gli amminoacidi più sensibili alla reazione con agenti glicanti (Habeeb AF, 1966). Per poter quantificare i gruppi amminici liberi in soluzione è stato necessario costruire una retta di taratura utilizzando come standard l'amminoacido valina (2,5 mM). Lo standard e i campioni sono stati fatti reagire con TNBS al 0.01% (m/v) in metanolo, e portati a volume con bicarbonato di sodio (0,1 M, pH 8,5).

Lo standard e i campioni sono stati incubati a 37°C per 30 minuti per far avvenire la reazione. Quest'ultima è stata bloccata aggiungendo HCl 1M e SDS 10%. L'assorbanza è stata valutata a 420 nm utilizzando lo spettrofotometro Uvikon 941 Plus. I risultati sono espressi in nmoliNH₂/μg di proteina.

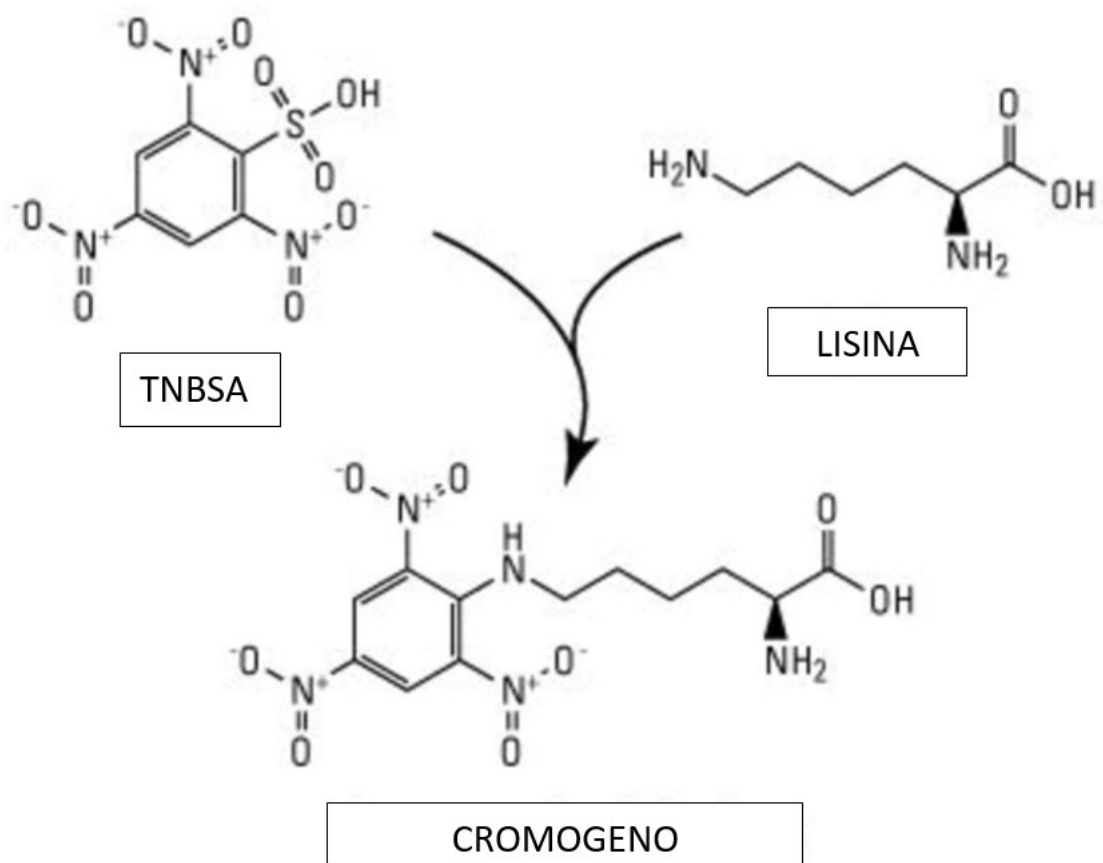


Figura 11: Formazione cromogeno dal TNBSA e l'amminoacido lisina

Studio della fluorescenza intrinseca del triptofano

La fluorescenza intrinseca dei residui di triptofano delle apoproteine è stata studiata sia nelle LDL di controllo che in quelle incubate con il glucosio, fruttosio e con il metilgliosale per valutare le alterazioni della componente apoproteica delle LDL glicate rispetto alle LDL di controllo. Gli spettri di emissione di ciascun campione sono stati registrati a temperatura ambiente, e utilizzando un'onda di eccitazione di 280 nm (spettrofluorimetro Perkin Elmer LS 55) (Allarakha S. et al., 2015).

Studio della fluorescenza degli AGEs

La fluorescenza degli AGEs è stata studiata sia nelle LDL di controllo sia nelle LDL incubate con il glucosio, MGO e fruttosio per verificare se in queste ultime si sono formati i prodotti di glicazione avanzata. Questi composti, infatti, emettono fluorescenza se eccitati a 340 nm (spettrofluorimetro Perkin Elmer LS 55). Come detto precedentemente, durante la reazione di glicazione si formano composti (AGEs), alcuni dei quali sono fluorescenti. I dati sono espressi in unità arbitrarie.

Proprietà chimico-fisiche delle LDL

La sonda 2-Dimethylamino - (6-lauroyl) - naphthalene-naphthalene (Laurdan) è stata acquistata da Molecular Probes, Inc. (Eugene,OR). L'incorporazione del Laurdan con le LDL è stata effettuata incubando 100 µg di LDL in PBS con un volume di Laurdan (soluzione di etanolo) ad una concentrazione finale di 1 uM per 30 minuti alla temperatura di 37° C (Ahmed A et al., 2018). Il calcolo del Gp è stato eseguito sulla base degli spettri di fluorescenza (ex 340 nm) con il metodo riportato da Parasassi et al., 1991 secondo l'equazione:

$Gp = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490})$ dove I_{435} e I_{490} indicano rispettivamente l'intensità di emissione a 440 nm e 490 nm ottenute utilizzando 340 nm come lunghezza d'onda di eccitazione.

Torbidità delle LDL

In diversi tempi di incubazione è stata misurata l'assorbanza a 450 nm dei campioni di LDL con e senza fruttosio o glucosio (Ahmed A. et al. 2018).

Statistica

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard. Le differenze tra i valori dei biomarkes sono state analizzate da un punto di vista statistico. Le differenze sono state considerate significative ad un valore di $p < 0,05$ mediante Student's test.

RISULTATI

Modificazioni dei livelli di gruppi amminici

Una diminuzione di circa del 10% dei livelli dei gruppi amminici nei campioni di LDL glicate è stata osservata dopo 48 ore di incubazione. La diminuzione dimostra che la glicazione delle LDL da parte del glucosio, fruttosio e metilgliosale provoca una modificazione composizionale con una diminuzione dei gruppi amminici. Una diminuzione simile dei livelli di gruppi amminici è stata osservata anche durante l'incubazione con il fruttosio (Figura 12). La diminuzione percentuale è maggiore nelle LDL incubate con il metilgliosale rispetto al glucosio che al fruttosio (Figura 10). Infatti dopo 7 giorni di incubazione con il MGO, la diminuzione dei gruppi amminici è di circa il 40%.

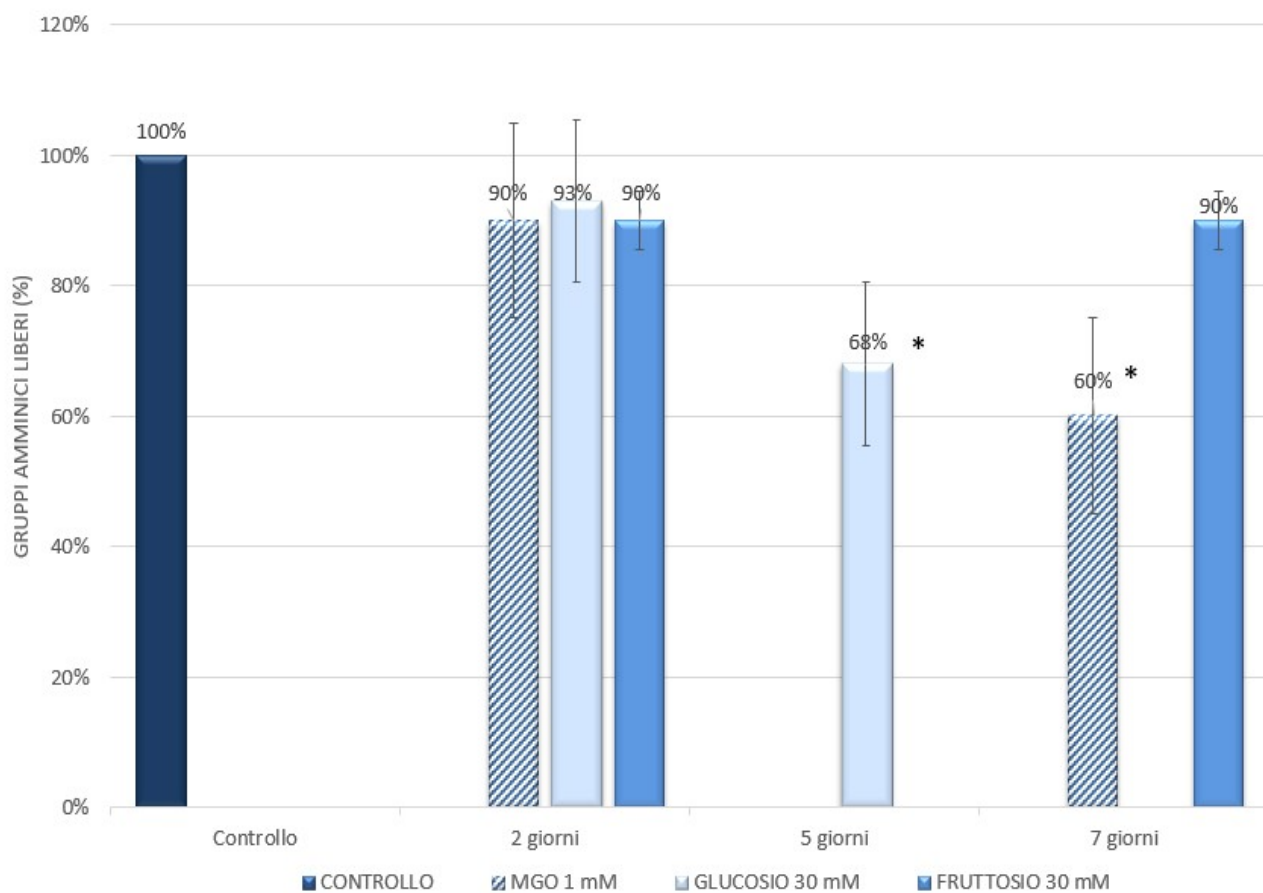


Figura 12: Diminuzione dei gruppi amminici nelle LDL glicate con il glucosio, fruttosio e MGO. *p<0,05 rispetto al controllo

Prodotti di glicazione

La figura 13 mostra uno spettro di emissione di fluorescenza nei campioni di LDL incubati in assenza o in presenza di metilgliosale 1 mM (λ Ex 370 nm). Il massimo di emissione è a 440 nm. A questa lunghezza d'onda si ottengono gli spettri dovuti a molecole di AGEs fluorescenti. L'aumento dell'intensità rispetto alle LDL di controllo conferma che durante l'incubazione con metilgliosale 1mM si sono formati composti fluorescenti derivati dalla glicazione.

La figura 14 mostra il confronto degli incrementi percentuali dell'intensità di fluorescenza in LDL incubate rispettivamente con glucosio 30 mM, fruttosio 30 mM e MGO 1mM. I dati dimostrano che durante l'incubazione con glucosio, fruttosio o metilgliosale si sono formati composti fluorescenti derivati dalla glicazione. L'aumento percentuale è maggiore nei campioni di LDL glicate con il metilgliosale 1 mM. Infatti dopo 48 ore i livelli di AGEs sono raddoppiati e dopo 7 giorni di incubazione sono triplicati rispetto ai controlli.

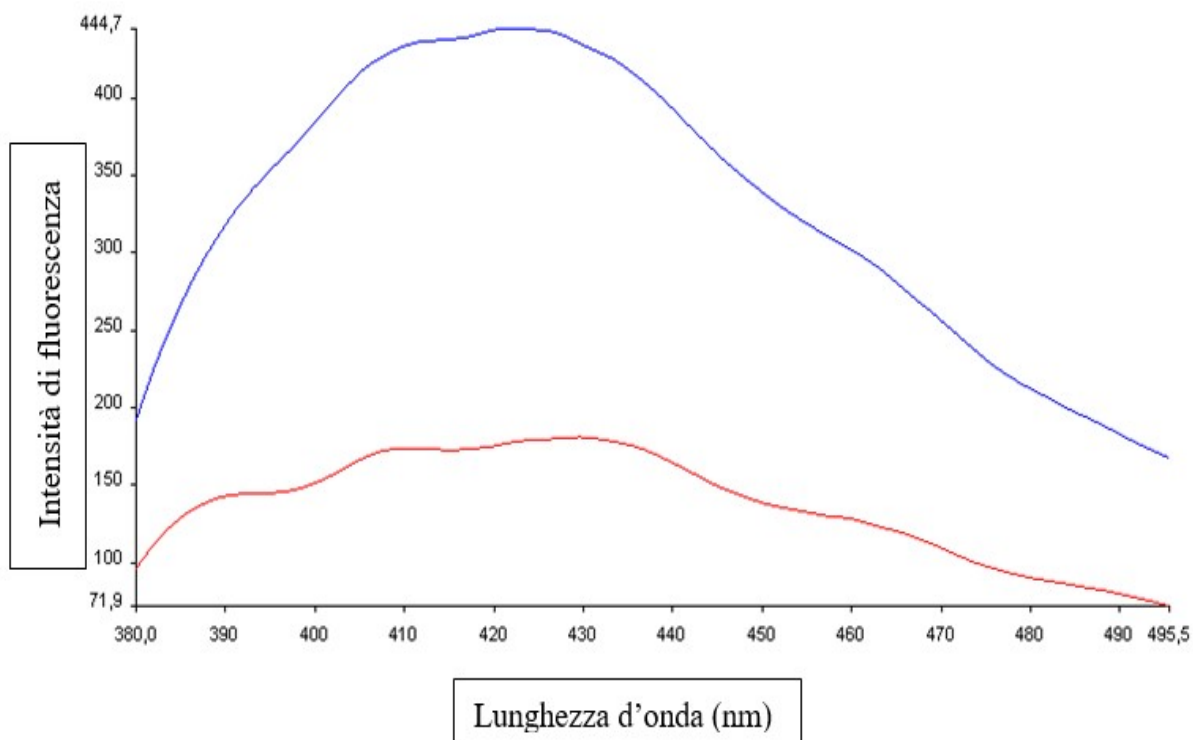


Figura 13: Spettro di emissione di fluorescenza dei prodotti di glicazione avanzata dei campioni glicati con metilgliosale 1 mM (—) e controllo (—)

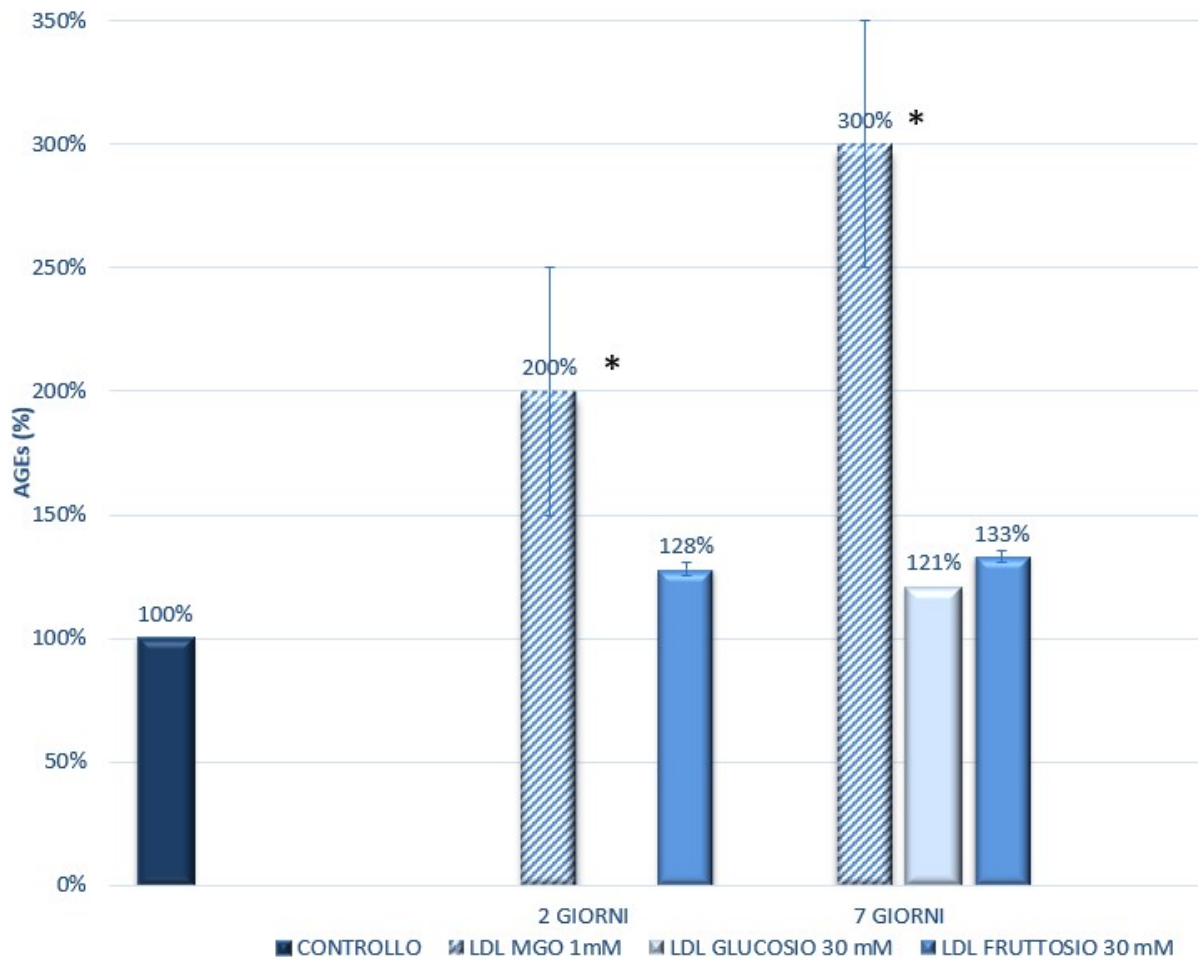


Figura 14: Aumento degli AGEs nelle LDL glicate con il MGO 1 mM, glucosio 30 mM e fruttosio 30 mM. *p<0,05 rispetto al controllo

Analisi della fluorescenza intrinseca del triptofano

Gli spettri della fluorescenza intrinseca del triptofano non hanno evidenziato alterazioni a carico delle LDL in seguito alla glicazione.

Proprietà chimico-fisiche delle LDL glicate

Una diminuzione dei valori della polarizzazione generalizzata (Gp) è stata osservata nelle LDL glicate. Tali dati evidenziano che il trattamento provoca delle modificazioni delle proprietà chimico-fisiche delle lipoproteine nel microambiente che circonda la sonda fluorescente Laurdan. Nelle LDL non trattate il Gp era 0.550 ± 0.020

Nelle LDL incubate con glucosio per tempi diversi il valore Gp è diminuito rispetto alla LDL incubato in assenza di glucosio (Figura 15). La diminuzione si è verificata nella massima misura dopo 72 h di incubazione e indica una diminuzione dell'ordine molecolare nelle LDL glicate rispetto ai campioni non trattati. La diminuzione è maggiore nelle LDL glicate con il metilgliosale.

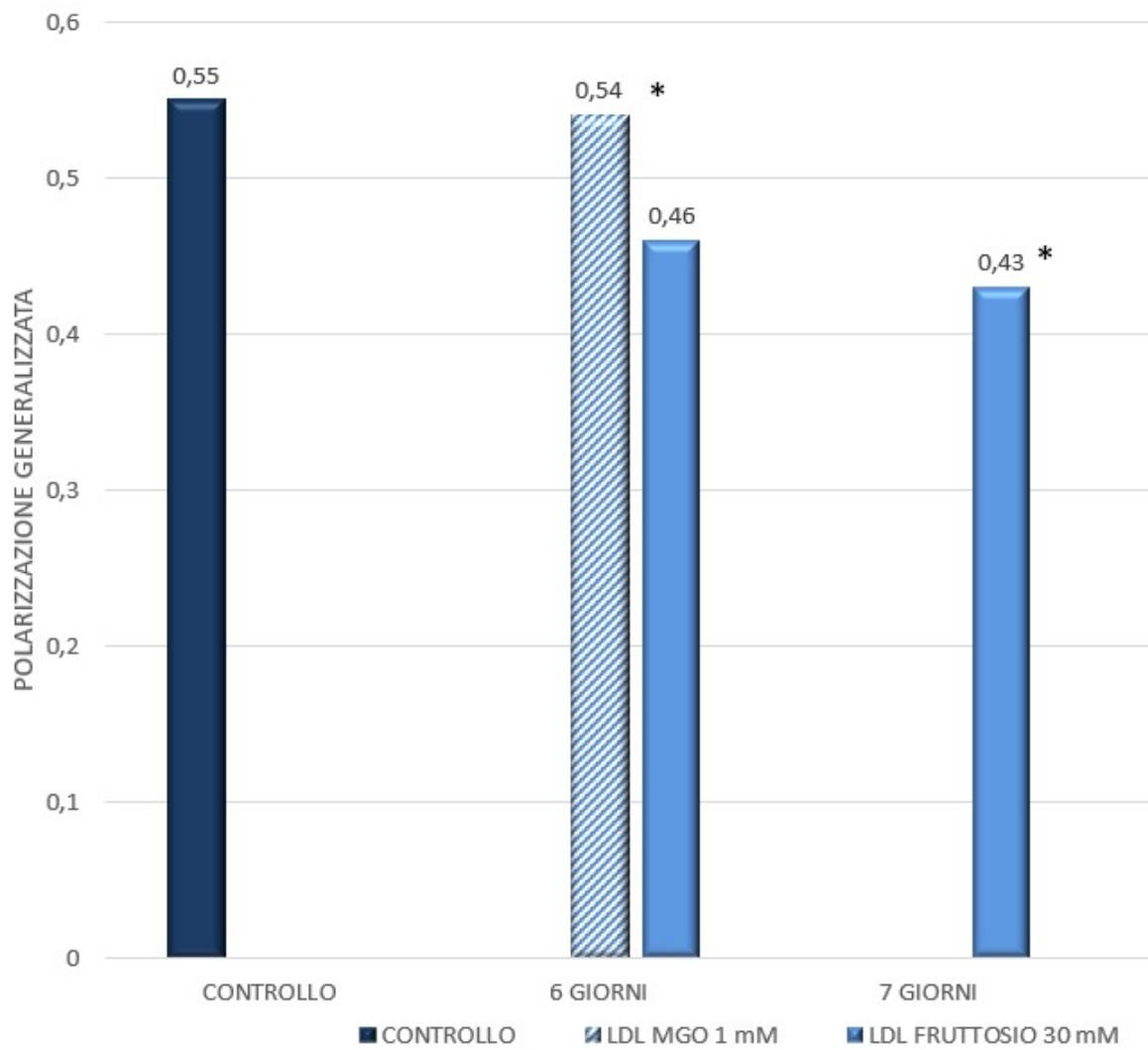


Figura 15: Valori del Gp della sonda del Laurdan in LDL non trattate e LDL glicate. *p<0,05 rispetto al controllo

Aggregazione delle LDL

Come riassunto in figura 16, durante l'incubazione delle LDL con fruttosio 30 mM e con il glucosio 30 mM si osserva un aumento della torbidità evidenziata con un aumento della densità ottica a 450 nm.

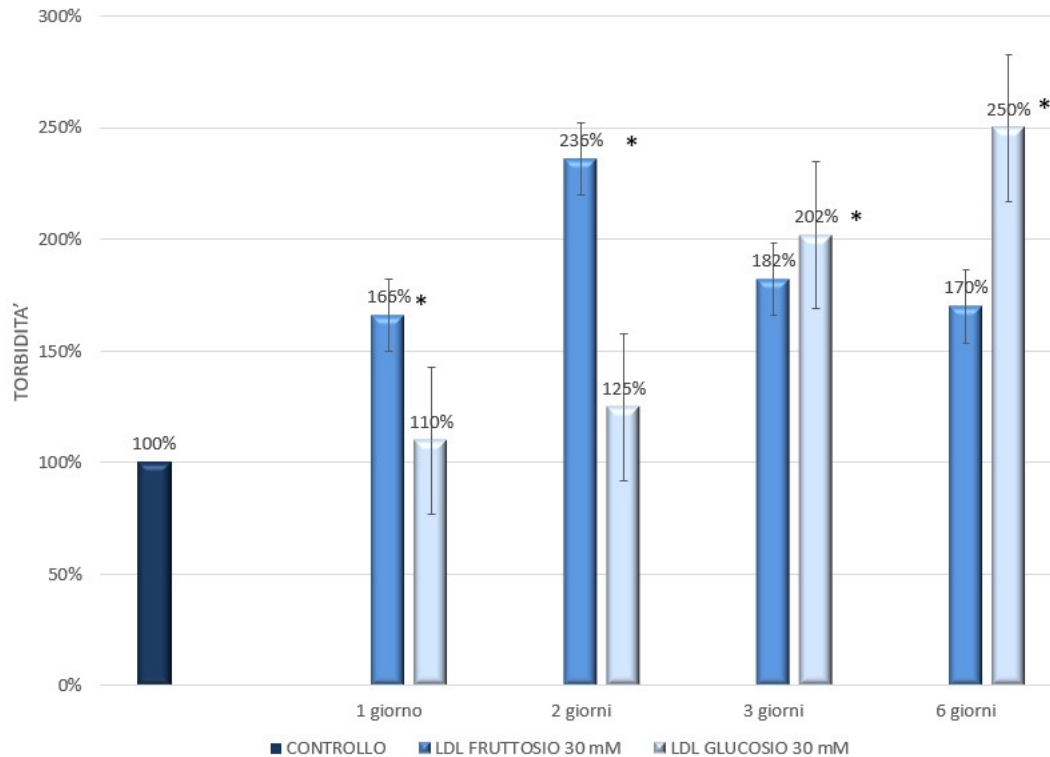


Figura 16: Aggregazione delle LDL glicate con fruttosio 30 mM e con glucosio 30 mM. * $p < 0,05$ rispetto al controllo

DISCUSSIONE

La reazione di glicazione a carico delle LDL è descritta come reazione di Maillard, come descritto nella parte introduttiva. Si tratta di un processo in cui gli zuccheri riducenti reagiscono spontaneamente con gli aminoacidi nelle proteine con formazione di prodotti finali di glicazione avanzata (AGEs). Sebbene un livello elevato di glucosio sia considerato uno dei fattori principali che contribuisce alla reazione di Maillard, il glucosio è considerato uno degli zuccheri meno reattivi a livello dei sistemi biologici. Dalla letteratura emerge che alla formazione di AGEs contribuiscano anche vari metaboliti che si trovano a livello intracellulare e possono partecipare alla reazione di glicazione non enzimatica. Tra questi sono inclusi il fruttosio, alcuni triosi e composti di carbonilici, tra cui il metilgliossale. I dati ottenuti nella parte sperimentale, confermano che le LDL sono sensibili alla glicazione durante le incubazioni con MGO, glucosio o fruttosio. Sono emersi effetti diversi con una attività glicante maggiore per il MGO rispetto al glucosio e fruttosio.

L'effetto del fruttosio sulla glicazione delle LDL non è stato studiato in precedenza. I dati sperimentali dimostrano che il fruttosio provoca la glicazione delle LDL come evidenziato dall'aumento dei livelli di AGEs fluorescenti e dalla

diminuzione dei livelli di gruppi amminici liberi. Le fonti di fruttosio sono sia un apporto esogeno con la dieta sia la formazione endogena dal glucosio attraverso la via metabolica a cui partecipa l'aldoso reduttasi. Nonostante la sua reattività sia elevata come osservato in studi in cui è stata studiata la fruttosilazione, il contributo della glicazione extracellulare da parte del fruttosio è considerata meno probabile di quella del glucosio, a causa della bassa concentrazione plasmatica di fruttosio (5 mmol / L di glucosio contro 35 micro mol / L di fruttosio). Tuttavia è noto che a livello intracellulare, la concentrazione del fruttosio è elevato nei tessuti di pazienti diabetici in cui è attiva la via del poliolo. Nelle cellule di questi tessuti, le concentrazioni di fruttosio e glucosio sono della stessa entità. Pertanto è possibile ipotizzare che l'elevata reattività del fruttosio e dei suoi metaboliti possa contribuire alla formazione di AGEs intracellulari e provocare alterazioni delle proteine cellulari, disfunzione delle cellule e, successivamente, complicanze vascolari.

I dati sperimentali confermano che il MGO è un agente glicante più efficiente del glucosio, infatti le LDL incubate con il MGO mostrano un incremento maggiore dei livelli di AGEs e una diminuzione significativa dei livelli di gruppi amminici. Tali modificazioni si realizzano in quantità maggiore rispetto alle LDL incubate con glucosio e fruttosio. Le modificazioni composizionali sono

supportate da dati della letteratura, infatti è noto che il MGO reagisce con le catene laterali di residui di arginina, lisina e cisteina.

Per quanto riguarda la rilevanza fisiologica dei risultati acquisiti, i livelli di MGO dipendono dalle vie metaboliche a cui partecipa il sistema enzimatico delle gliossalasi. Negli eucarioti, tale sistema è composto da due enzimi citosolici in cui è coinvolto anche il glutatione. Durante una prima tappa, la gliossalasi I (Glo1) catalizza l'isomerizzazione dell'emiacetale, formata dalla reazione spontanea del MGO con glutatione (GSH); successivamente, la gliossalasi II (Glo2) ripristina il livello di GSH consumato durante la prima reazione. La concentrazione di MGO intracellulare può raggiungere concentrazioni micromolari e i suoi livelli riflettono un equilibrio tra il tasso della glicolisi e l'efficienza del sistema delle gliossalasi. *In vivo* la concentrazione di MGO ad opera della gliossalasi mantiene la concentrazione di MGO nel plasma circa 50.000 volte inferiore a quello del glucosio. I livelli possono aumentare nei tessuti de pazienti diabetici.

Le modifiche della composizione delle LDL glicate si riflettono in modificazioni delle proprietà chimico-fisiche come evidenziato da una diminuzione significativa del valore del GP della sonda fluorescente Laurdan. Tali dati

evidenziano modificazioni delle proprietà chimico-fisiche nel microambiente che circonda la sonda fluorescente.

Le LDL glicate mostrano anche un aumento della torbidità. Anche questo dato dimostra alterazioni composizionali provocate dalla glicazione. L'aumento di torbidità può essere messo in relazione con il fenomeno della aggregazione in accordo con studi precedenti (Lu M., Gursky O., 2013). L'aggregazione delle LDL è considerata una tappa che contribuisce alla aterogenicità delle LDL glicate (Lu M., Gursky O., 2013). Infatti quando le LDL sono aggregate mostrano una maggiore capacità di legare proteoglicani a livello endoteliale. Questo è considerato un evento che può essere coinvolto nell'aterogenesi. A conferma di questo, Ruuth M. et al. (2018) hanno dimostrato che la suscettibilità all'aggregazione aumenta nelle LDL isolate da pazienti affetti da patologie cardiovascolari

Le modifiche composizionali delle LDL glicate si possono riflettere in alterazioni delle loro funzioni, infatti l'ApoB100 è coinvolta nelle interazioni con i recettori cellulari e la diminuzione dei livelli di gruppi amminici oltre all'aumento dei prodotti AGEs dimostrano che la struttura delle lipoproteine è alterata e può favorire l'aggregazione. Le modificazioni delle interazioni con i

recettori e l'aggregazione delle LDL possono riflettersi in alterazioni del metabolismo lipoproteico e contribuire ai meccanismi molecolari alla base della maggiore aterogenicità delle LDL glicate (Figura 15).

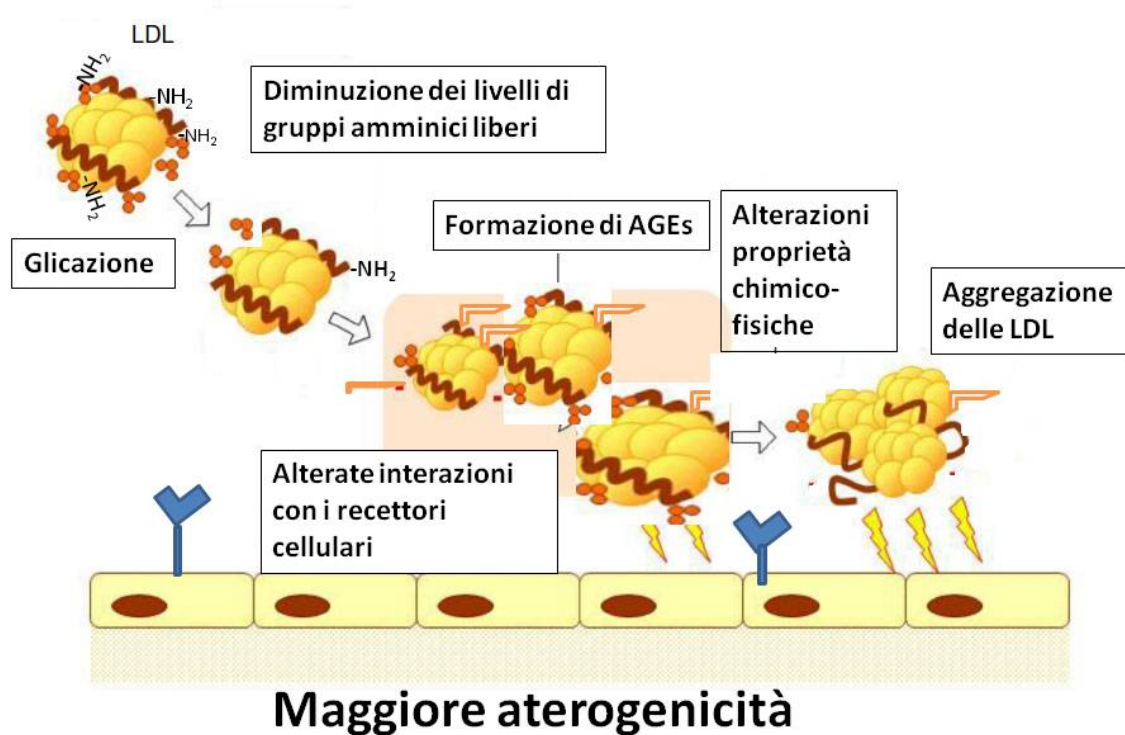


Figura 15: Meccanismi molecolari alla base della maggiore aterogenicità delle LDL glicate

CONCLUSIONI

In conclusione, i dati ottenuti confermano che le LDL sono sensibili alla glicazione e sono emersi effetti diversi: il MGO esercita un effetto glicante maggiore del glucosio e fruttosio.

Il modello sperimentale può essere utile per:

- studiare *in vitro* le proprietà anti-glicanti esercitate da alcune sostanze naturali.

Infatti alcuni polifenoli contenuti nei vegetali sono in grado di interferire con le reazioni che contribuiscono alla glicazione.

- studiare differenze individuali nella sensibilità delle LDL alla glicazione. Infatti le molecole che causano la glicazione, interagiscono con gruppi amminoacidici delle apoproteine. L'esposizione dei gruppi amminoacidici delle lisine potrebbe differire in relazione a differenze nella composizione lipidica e nelle proprietà chimico-fisiche. Infatti da una analisi della letteratura emerge un ruolo conformazionale dei lipidi poiché essi influenzano la struttura dell'ApoB100.

BIBLIOGRAFIA

Ahmed A, Shamsi A, Shahnawaz Khan, Fohad Mabood Husain, Bilqees Bano. Methylglyoxal induced glycation and aggregation of human serum albumin: Biochemical and biophysical approach. *International Journal of Biological Macromolecules* 113 (2018) 269–276

Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, et al. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J* 1997; 324: 565-70.

Ahmed N., Thornalley P.J., Dawczynski, Franke, Strobel, Stein, et al., Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (12) (2003) 5287–5292.

Akanji AO, Abdella N, Mojiminiyi OA. Determinants of glycated LDL levels in nondiabetic and diabetic hyperlipidaemic patients in Kuwait. *Clin Chim Acta* 2002; 317:171–176.

Allarakha S., Ahmad P., Ishtikhar, Zaheer, Shafiq, Moinuddin, Asif Ali. Fructosylation generates neo-epitopes on human serum albumin *Volume*67, *Issue*5 May 2015 *Pages* 338-347.

Artwohl M, Graier WF, Roden M, et al. Diabetic LDL triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Diabetes* 2003; 52:1240–1247.

Boekholdt M., Hack E., Sandhug, Lubeng R., Binghamf S., Warehame N., Petersa, Wouter, Dayg N, Kasteleinb J., Kay-TeeKhaw. C-reactive protein levels and coronary artery disease incidence and mortality in apparently healthy men and women: The EPIC-Norfolk prospective population study 1993–2003. *Atherosclerosis* Volume 187, Issue 2, August 2006, Pages 415-422.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

Brown BE, Mahroof FM, Cook NL, et al. Hydrazine compounds inhibit glycation of low-density lipoproteins and prevent the in vitro formation of model foam cells from glycolaldehyde-modified low-density lipoproteins. *Diabetologia* 2006; 49:775–783

Brown BE, Rashid I, van Reyk DM, Davies MJ. Glycation of low-density lipoprotein results in the time-dependent accumulation of cholesteryl esters and apolipoprotein B-100 protein in primary human monocyte-derived macrophages. *FEBS J* 2007; 274:1530–1541.

Brown M.S., Goldstein J.L. A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34,1986.

Bucala R, Makita Z, Vega G, et al. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 9441-5.

Burnett JR, Zhong S, Jiang ZG, et al. Missense mutations in APOB within the beta1 domain of human APOB100 result in impaired secretion of ApoB and ApoB-containing lipoproteins in familial hypobetalipoproteinemia. *J Biol Chem* 2007;282:24270-83.

Chen SH, Habib G, Yang C-Y, Gu Z-W, Lee BR, Weng S-A, Silberman SR, Cai S-J, Deslypere JP, Rosseneu M, Gotto AM Jr, Li W-H, Chan L. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science*. 1987;238:363-366.

Chen SH, Yang CY, Chen PF, et al. The complete cDNA and amino acid sequence of human apolipoprotein B-100. *J Biol Chem* 1986; 261:12918–12921.

Chen SH, Yang C-Y, Chen P-F, Setzer D, Tanimura M, Li W-H, Gotto AM Jr, Chan L. The complete cDNA and amino acid sequence of human apolipoprotein B-100. *J Biol Chem*. 1986;261:12918-12921.

Chilelli NC, Piarulli F, Sartore G, Lapolla A. Ruolo dei prodotti di glicazione avanzata nelle complicanze microvascolari del diabete di tipo 2: “attori protagonisti” nella memoria metabolica?. Dipartimento di Medicina (DIMED), UOC Diabetologia e Dietetica, ULSS 16, Università degli Studi di Padova, Padova

Chung BH, Segrest JP, Ray MJ, Brunzell JD, Hokanson JE, Krauss RM, Beaudrie K, Cone JT. Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. *Methods Enzymol*. 1986;128:181-209.

De Graaf J, Hak-Lemmers HL, Hectors MP, Demacker PN, Hendriks JC, Stalenhoef AF. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb*. 1991 Mar-Apr;11(2):298-306.

Dreon DM, Fernstrom HA, Williams PT, Krauss RM. LDL subclass patterns and lipoprotein response to a low-fat, high-carbohydrate diet in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Apr;17(4):707-14.

Ellis E.M. Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic intervention, *Pharmacol. Therapeut.* 115 (1) (2007) 13–24.

Elovson J, Chatterton JE, Bell GT, et al. Plasma very low density lipoproteins contain a single molecule of apolipoprotein B. *J Lipid Res* 1988;29:1461-73.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* 1992 Oct;13(4):341-90.

Ferretti G, Rabini RA, Bacchetti T, et al. Glycated low density lipoproteins modify platelet properties: a compositional and functional study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2180–2184.

Ferretti G, Taus M, Dousset N, Solera ML, Valdiguié P, Curatola G. Physico-chemical properties of copper-oxidized high density lipoprotein: a fluorescence study. *Biochem Mol Biol Int.* 1993 Jul;30(4):713-9.

Goldstein J.L., Ho Y.K., Brown MS., Innerarity T.L., Mahley R.W. Cholesteryl ester accumulation in macrophages resulting from receptor mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic canine beta very low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 255:1839,1980.

Gotto AM Jr. Henry J.PownallRichard J.Havel. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods in Enzymology* Volume 128, 1986, Pages 3-41.

Gugliucci A. Fructose surges damage hepatic adenosyl-monophosphatedependent kinase and lead to increased lipogenesis and hepatic insulin resistance. *Med Hypotheses* 2016;93:87–92.

Habeeb AF. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid *Anal Biochem.* 1966 Mar;14(3):328-36.

Hartog JW, Voors AA et al. Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. *Eur J Heart Fail* 9(12) (2007):1146–1155.

Hegab Z, Gibbons S et al. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World J Cardiol* 4(4) (2012) :90–102.

Hussain MM, Shi J, Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res* 2003;44:22-32.

Imanaga Y, Sakata N, Takebayashi S, et al. In vivo and in vitro evidence for the glycooxidation of low density lipoprotein in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2000; 150:343–355.

Innerarity TL, Borén J, Yamanaka S, Olofsson S-O. Biosynthesis of apolipoprotein B48-containing lipoproteins. Regulation by novel posttranscriptional mechanisms. *J Biol Chem*. 1996;271:2353-2356.

King, G.L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 2002, 288, 2579-2588.

Klein RL, Laimins M, Lopes-Virella MF. Isolation, characterization, and metabolism of the glycated and nonglycated subfractions of low-density lipoproteins isolated from type I diabetic patients and nondiabetic subjects. *Diabetes* 1995; 44: 1093-8.

Knott TJ, Rall SC Jr, Innerarity TL, Jacobson SF, Urdea MS, Levy-Wilson B, Powell LM, Pease RJ, Eddy R, Nakai H, Byers M, Priestley LM, Robertson E, Rall LB, Betsholz C, Shows TB, Mahley RW, Scott J. Human apolipoprotein B: structure of carboxyl-terminal domains, sites of gene expression, and chromosomal localization. *Science*. 1985;230:37-43.

Kobayashi K, Watanabe J, Umeda F, Nawata H. Glycation accelerates the oxidation of low density lipoprotein by copper ions. *Endocr J* 1995; 42:461–465.

Lorenzi, M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: Attractive, elusive, and resilient. *Exp. Diabetes Res*. 2007 61038.

Lu M, Gursky O. Aggregation and fusion of low-density lipoproteins in vivo and in vitro. *Biomol Concepts*. 2013 Oct;4(5):501-18. doi: 10.1515/bmc-2013-0016.

Luevano Contreras C., Chapman Novakofski K. Dietary Advanced Glycation End Products and Aging. *Nutrients* 2010, 2, 1247-1265.

Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*. 1995 Jun;115(2):243-53.

Manchekar M, Richardson DE, Forte TM, et al. Apolipoprotein B-containing lipoprotein particle assembly: lipid capacity of the nascent lipoprotein particle. *J Biol Chem* 2004;279:39757-66.

McKeone BJ, Patsch JR, Pownall HJ. Plasma triglycerides determine low density lipoprotein composition, physical properties, and cell-specific binding in cultured cells. *J Clin Invest*. 1993 May;91(5):1926-33.

Menzel EJ, Sobal G, Staudinger A. The role of oxidative stress in the long-term glycation of LDL. *Biofactors* 1997; 6:111–124.

Mir A.R., Habib S., Khan F., Alam K., Ali A., Structural changes in histone H2A by methylglyoxal generate highly immunogenic amorphous aggregates with implications in auto-immune response in cancer, *Glycobiology* (2015) cww082.

Nedi, S. I. S. Rattan, T. Grune & I. P. Trougakos. Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. *Free Radical Research*, August 2013; 47(Suppl. 1): 28–38 Review Article.

Odani H, Shinzato T, Usami J, et al. Imidazolium crosslinks derived from reaction of lysine with glyoxal and methylglyoxal are increased in serum proteins of uremic patients: evidence for increased oxidative stress in uremia. *FEBS Lett* 1998; 427: 381-5.

Parasassi T, De Stasio G, Ravagnan G, Rusch RM, Gratton E. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys J*. 1991 Jul;60(1):179-89.

Parisa Younessi, Ali Yoonessi. Advanced Glycation End-Products and Their Receptor-Mediated Roles: Inflammation and Oxidative Stress. *Iran J Med Sci*. 2011 Sep;36(3):154-66.

Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL. The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu Rev Med*. 1992;43:219-25.

Rabbani N, Thornalley PJ. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;458:221–6.

Rabbani N., Thornalley P.J.. Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino Acids* 42 (4) (2012) 1133–1142.

Rabini RA, Staffolani R, Martarelli D, et al. Influence of low density lipoprotein from insulin-dependent diabetic patients on platelet functions. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3770–3774.

Richard J. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochem. Soc. Trans.* 21 (2) (1993) 549–553.

Ruuth M., Nguyen S.D., Vihervaara T., Hilvo M., et al. Susceptibility of low density lipoprotein particles to aggregate depends on particle lipidome, is modifiable, and associates with future cardiovascular deaths. *European Heart Journal* (2018) 39, 2562–2573 doi:10.1093/eurheartj/ehy319

Schleicher E, Deufel T, Wieland OH. Nonenzymatic glycosylation of human serum lipoproteins. Elevated epsilon-lysine glycosylated low density lipoprotein in diabetic patients. *FEBS Lett* 1981; 129:1–4.

Segrest JP, Jones MK, Dashti N. N-terminal domain of apolipoprotein B has structural homology to lipovitellin and microsomal triglyceride transfer protein: a "lipid pocket" model for self-assembly of apoB-containing lipoprotein particles. *J Lipid Res* 1999;40:1401-16.

Segrest JP, Jones MK, De Loof H, et al. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* 2001;42:1346-67.

Sheetz, M.J.; King, G.L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 2002, 288, 2579-2588.

Sims-Robinson, C.; Kim, B.; Rosko, A.; Feldman, E.L. How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? *Nat. Rev. Neurol.* 2010, 6, 551-559.

Singh R., Barden, Mori, Beilin Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001 (44) : 129-146.

Snyder, S. L., Sobocinski, P. Z. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Anal Biochem* 1975, 64 (1), 284-8.

Sobal G, Menzel J, Sinzinger H. Why is glycated LDL more sensitive to oxidation than native LDL? A comparative study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000; 63:177–186.

Sobenin IA, Tertov VV, Koschinsky T, et al. Modified low density lipoprotein from diabetic patients causes cholesterol accumulation in human intimal aortic cells. *Atherosclerosis* 1993; 100: 41-54.8.

Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis*. 1987 Mar-Apr;7(2):135-43.

Steinbrecher UP, Witztum JL. Glucosylation of low-density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. *Diabetes* 1984; 33: 130-4.

Suárez G, Maturana J, Oronsky AL, Raventos-Suarez C. Fructose-induced fluorescence generation of reductively methylated glycosylated bovine serum albumin: evidence for nonenzymatic glycation of Amadori adducts. *Biochim Biophys Acta* 1991;1075:12–9.

Tames FJ, Mackness MI, Arrol S, et al. Nonenzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and nondiabetic subjects. *Atherosclerosis* 1992; 93:237–244.

Tanfani F., Galeazzi T., Curatola G., Bertoli E., Ferretti G. Reduced beta-strand content in apoprotein B-100 in smaller and denser low-density lipoprotein subclasses as probed by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochem J.* 1997 Mar 15; 322(Pt 3): 765–769. doi: 10.1042/bj3220765

Thornalley P.J. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043 (1) (2005) 111–117.

Tomkin GH, Owens D. Abnormalities in apo B-containing lipoproteins in diabetes and atherosclerosis. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17:27–43.

Wang X, Bucala R, Milne R. Epitopes close to the apolipoprotein B low density lipoprotein receptor-binding site are modified by advanced glycation end products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:7643–7647.

Younis N, Charlton-Menys V, Sharma R, et al. Glycation of LDL in nondiabetic people: small dense LDL is preferentially glycosylated both in vivo and in vitro. *Atherosclerosis* 2009; 202:162–168.

Younis N., Sharma R., Soran H., Charlton-Menys V., Elseweidy M. and Durrington P.N. Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Current Opinion in Lipidology* 2008, 19:378–384

Younis NNSH, Sharma R, Charlton-Menys V, Durrington P. Lipoprotein glycation in atherogenesis. *Clin Lipidol* 2009; 4:781–790.

Zaman A., Arif Z., Moinuddin, Alam K. Fructose-human serum albumin interaction undergoes numerous biophysical and biochemical changes before forming AGEs and aggregates. *International Journal of Biological Macromolecules* 109 (2018) 896–906

RINGRAZIAMENTI

Mi è doveroso dedicare questo spazio del mio elaborato alle persone che hanno contribuito, con il loro instancabile supporto, alla realizzazione dello stesso.

In primis, un ringraziamento speciale al mio relatore prof.ssa Ferretti Gianna e il mio correlatore prof.ssa Bacchetti Tiziana per l'immensa pazienza, per gli indispensabili consigli, per le conoscenze trasmesse durante tutto il percorso di stesura dell'elaborato e per l'infinita disponibilità. Grazie a voi ho accresciuto le mie conoscenze e le mie competenze. Un ringraziamento speciale va al mio Tutor Turco Imma e al dottorando Gabriele Mazzuferi che mi hanno aiutato a condurre le ricerche, oggetto dell'elaborato.

Desidero ringraziare i miei genitori, senza cui il supporto morale ed economico non avrei avuto la possibilità di intraprendere il percorso universitario, la nonna Leda, che mi ha sempre sostenuto, i nonni che non ci sono più e zia Maria, che voleva tanto esserci in questo giorno così importante, tutti gli zii, le mie cugine Alessandra e Federica, e Miriam con i suoi ottimi consigli.

Al mio fidanzato Nicola che, dopo avermi sostenuta e tranquillizzata e incoraggiata per lunghi mesi durante la redazione di questa tesi, meriterebbe

giustamente una laurea ad honorem in psicologia a sua volta. Grazie amore mio per tutto l'affetto e per tutta la forza che ogni giorno mi dai.

Grazie ad Adriana, Ludovica e soprattutto Luna, per avermi offerto un tetto per questi ultimi mesi e mi hanno fatto passare bellissimi momenti. Grazie a Giorgia che insieme a Luna sono le amiche di una vita e ci sono sempre state nonostante la lontananza che spesso ci separa.

Un ringraziamento va alla mia amica Letizia che, anche se ci vediamo poco, mi ha sempre aiutata e con cui ho passato esperienze fantastiche.

Grazie a Deborah che mi ha sempre ascoltato con pazienza.

A Valentina che ha reso tutte le lezioni più divertenti, grazie per avermi aiutato con lo studio e grazie per avermi fatto molto spesso da promemoria su eventi e lezioni dell'UNIVPM.

Ringrazio i miei amici, i miei compagni di corso triennale e magistrale (Livianna, Gloria, Fabrizio, Fabio Di Spalatro, Andrea, Fabio Fabbro, Elisa, Luca, Lucia, Alessia, Lisa, Marco, Mirko, Giovanni): le facce con cui ho condiviso centinaia di ore in facoltà, a lezione, ai seminari, al bar dell'ateneo, le attese agli appelli, le ansie pre-esame e i festeggiamenti post-esame. Senza di voi

arrivare alla laurea sarebbe stato sicuramente molto più noioso e molto meno divertente! Vi voglio bene e vi ringrazio.