



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE

PRESENTAZIONE DEI CANDIDATI ALL'ESAME FINALE XXVII CICLO

Dott. Francesco Paneni

Il Dott. Francesco Paneni, durante il corso di Dottorato in Medicina Sperimentale, ha svolto la sua attività di ricerca presso i laboratori del Dipartimento di Medicina Clinica e Molecolare, Sapienza Università di Roma, presso il Cardiology and Cardiovascular Research dell'Università di Zurigo e presso il Department of Medicine, Karolinska University Hospital di Stoccolma, sotto la supervisione del Prof. Francesco Cosentino.

Nel corso del Dottorato, il Dott. Paneni si è occupato di valutare se l'attivazione di $p66^{\text{Shc}}$, indotta dall'iperglicemia, persista nonostante successiva normalizzazione dei livelli di glucosio, contribuendo così ad una continua produzione di radicali liberi e quindi alla progressione delle complicanze vascolari diabetiche.

L'iperglicemia rappresenta un modulatore chiave del danno vascolare nel diabete. Tuttavia, nonostante i progressi nello sviluppo di agenti ipoglicemizzanti estremamente efficaci, negli ultimi anni grandi trial clinici di intervento hanno chiaramente dimostrato come l'attuazione di una terapia ipoglicemizzante intensiva non si associ ad una riduzione significativa degli eventi cardiovascolari nella popolazione diabetica. In questi studi il trattamento insulinico o con ipoglicemizzanti orali è stato attuato in soggetti con una durata media della malattia diabetica variabile da 8 a 11 anni. Tale osservazione suggerisce che uno stato iperglicemico di lunga durata è in grado di determinare un danno vascolare il quale si protrae nonostante una completa normalizzazione dei livelli di glicemia. Negli ultimi anni è stato infatti coniato il termine "memoria iperglicemica" nel tentativo di descrivere la persistenza di effetti deleteri legati all'iperglicemia anche in presenza di un ottimale controllo glicemico. Studi recenti dimostrano come tale fenomeno risulti mediato da un accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nella parete vascolare. Infatti, è noto come l'iperglicemia determini una significativa produzione di ROS a livello mitocondriale e come questo sia responsabile di disfunzione endoteliale e apoptosi cellulare. Tuttavia, i meccanismi molecolari responsabili della memoria iperglicemica non sono ancora stati identificati.

Un importante mediatore della risposta cellulare allo stress ossidativo di recente caratterizzazione è rappresentato dalla proteina mitocondriale $p66^{\text{Shc}}$. Studi sperimentali hanno infatti dimostrato come la delezione genica di $p66^{\text{Shc}}$ ($p66^{\text{Shc}/-}$) comporti un'augmentata resistenza allo stress ossidativo, un prolungamento dell'aspettativa di vita e una notevole riduzione dello sviluppo di aterosclerosi durante dieta iperlipidica. Tutte queste condizioni indicano che la $p66^{\text{Shc}}$ gioca un ruolo determinante nei processi di invecchiamento e nelle malattie degenerative ad esso correlate. A conferma di ciò, topi anziani $p66^{\text{Shc}/-}$ risultano protetti dalla disfunzione endoteliale associata

all'invecchiamento presentando una risposta di vasodilatazione endotelio-dipendente normale rispetto ai controlli *wild type* di pari età. Questi dati indicano chiaramente che la p66^{Shc} rappresenta una componente critica dello stato ossidativo cellulare. Sebbene il ruolo di p66^{Shc} rimane ancora in larga parte poco definito, tale adattatore proteico, estremamente sensibile al *potenziale redox* della cellula, in condizioni di stress cellulare appare responsabile dell'ossidazione del citocromo *c* nella catena respiratoria mitocondriale con conseguente produzione di ROS e induzione di fenomeni proapoptotici. Risulta chiaro come la p66^{Shc} possa svolgere un ruolo chiave nello stress ossidativo e quindi nella patogenesi della malattia cardiovascolare. A questo riguardo, uno studio in vivo ha dimostrato un aumento dell'espressione di p66^{Shc} nei monociti circolanti di pazienti diabetici e tale aumento correla positivamente con elevati livelli plasmatici di isoprostano, marcatore di stress ossidativo. Al contrario, abbiamo recentemente riportato che la delezione di p66^{Shc} in un modello sperimentale di diabete mellito è protettiva nei confronti dello stress ossidativo e del danno endoteliale indotto dall'iperglicemia.

Nell'ambito di questo progetto di ricerca il Dott. Paneni si è proposto di investigare alcuni aspetti specifici. In particolare, si è interessato di valutare se l'attivazione del *pathway* PKCβ-p66^{Shc} secondaria all'iperglicemia persista, nonostante normalizzazione dei livelli di glucosio in cellule endoteliali di aorta umana; di studiare i meccanismi molecolari alla base di tale fenomeno (regolazione epigenetica della trascrizione di p66^{Shc}, modificazioni post-translazionali); di valutare se l'inibizione specifica di tale *pathway* (farmacologica e mediante siRNA) sia in grado di ripristinare l'omeostasi vascolare con conseguente abolizione dei livelli di stress ossidativo e quindi della memoria iperglicemica; di studiare il fenomeno della memoria iperglicemica in un modello sperimentale di diabete e valutare se il silenziamento *in vivo* della proteina p66^{Shc}, insieme al controllo glicemico, sia in grado di normalizzare i livelli di ROS e di ripristinare la funzione endoteliale rispetto alla sola correzione dell'iperglicemia.

I dati ottenuti dimostrano chiaramente che il *pathway* PKCβ-p66^{Shc} gioca un ruolo cruciale nel fenomeno della memoria iperglicemica. Infatti, la normalizzazione dei livelli di glucosio non ha modificato l'attivazione di tale *pathway* in cellule endoteliali umane precedentemente esposte ad elevate concentrazioni di glucosio. Inoltre, l'inibizione farmacologica e mediante siRNA di PKCβ e p66^{Shc}, effettuata al momento della normalizzazione del glucosio, è risultata associata ad una marcata riduzione dei livelli di ROS e della morte cellulare. Al contrario, la sola normalizzazione delle concentrazioni di glucosio non è stata in grado di ripristinare una normale omeostasi cellulare. Tale fenomeno è stato confermato anche in un modello sperimentale di diabete indotto da streptozotocina. Il trattamento dell'iperglicemia mediante insulina, effettuato dopo 3 settimane di diabete, è risultato associato ad una marcata persistenza di disfunzione vascolare, accumulo di radicali liberi e persistente attivazione del *pathway* PKCβ-p66^{Shc} nonostante 3 settimane di normalizzazione della glicemia. Il *silencing* in vivo della proteina p66^{Shc} ha consentito, inoltre, di confermare il ruolo chiave di tale proteina mitocondriale nella patogenesi della memoria iperglicemica. Infatti, il silenziamento in vivo di p66^{Shc}, ottenuto dopo iniezione i.v di un preparato liposolubile contenente un siRNA specifico, ha dimostrato di normalizzare i livelli di stress ossidativo e ristorare la disfunzione endoteliale rispetto alla sola normalizzazione della glicemia ottenuta mediante somministrazione di insulina. Nell'ambito della presente ricerca sono stati studiati i meccanismi alla base della memoria iperglicemica. In particolare, è stato dimostrato che l'iperglicemia è in grado di indurre modificazioni epigenetiche a carico del promotore del gene p66^{Shc}, quali ridotta metilazione del DNA e aumentata acetilazione dell'istone 3 (H3). Tali alterazioni epigenetiche sembrerebbero responsabili della persistente up-regolazione di p66^{Shc} nonostante successiva normalizzazione della glicemia.

PUBBLICAZIONI 2011-2014

Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Obesity-induced Impairment of Pluripotent Stem Cells: Novel Insights into Vascular Repair Strategies. *Eur Heart J*. 2014, *in press*.

Akhmedov A, Montecucco F, Braunersreuther V, Camici GG, Jakob P, Reiner MF, Glanzmann M, Burger F, **Paneni F**, Galan K, Pelli G, Vuilleumier N, Belin A, Vallée JP, Mach F, Lüscher TF. Genetic deletion of the adaptor protein p66Shc increases susceptibility to short-term ischaemic myocardial injury via intracellular salvage pathways. *Eur Heart J*. 2014, *in press*.

Paneni F, Costantino S*, Battista R, Castello L, Capretti G, Chiandotto S, Scavone G, Villano A, Pitocco D, Lanza G, Volpe M, Lüscher TF, Cosentino F. Adverse Epigenetic Signatures by Histone Methyltransferase Set7 Contribute to Vascular Dysfunction in Patients with Type 2 Diabetes. *Circ Cardiovasc Genet* 2014, *in press*.

Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk. *Curr Atheroscler Rep*. 2014;16:419.

Paneni F, Costantino S, Cosentino F. p66(Shc)-induced redox changes drive endothelial insulin resistance. *Atherosclerosis*. 2014;236:426-9.

Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Molecular mechanisms of vascular dysfunction and cardiovascular biomarkers in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2014;4:324-32.

Akhmedov A, Rozenberg I, **Paneni F**, Camici GG, Shi Y, Doerries C, Sledzinska A, Mocharla P, Breitenstein A, Lohmann C, Stein S, von Lukowicz T, Kurrer MO, Borén J, Becher B, Tanner FC, Landmesser U, Matter CM, Lüscher TF. Endothelial overexpression of LOX-1 increases plaque formation and promotes atherosclerosis in vivo. *Eur Heart J*. 2014;35:2839-48.

Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Molecular pathways of arterial aging. *Clin Sci (Lond)*. 2015;128:69-79.

Paneni F, Costantino S, Volpe M, Luscher TF, Cosentino F. Epigenetic signatures and vascular risk in type 2 diabetes: a clinical perspective. *Atherosclerosis* 2013;230(2):191-7.

De Sensi F, **Paneni F**, Addonisio L, Breschi M, Miracapillo G, Severi S. Intrinsic bleeding risk in patients with uninterrupted oral anticoagulation undergoing cardiac implantable electronic device procedures: A pilot study. *Int J Cardiol*. 2014;176:1420-2.

Gregori M, Giammarioli B, Tocci G, Befani A, Ciavarella GM, Ferrucci A, **Paneni F**. Synergic effects of renin and aldosterone on right ventricular function in hypertension: a tissue Doppler study. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2014, *in press*.

Paneni F, Costantino S, Castello L, Battista R, Capretti G, Chiandotto S, D'Amario D, Scavone G, Villano A, Rustighi A, Crea F, Pitocco D, Lanza G, Volpe M, Del Sal G, Lüscher TF, Cosentino F. Targeting prolyl-isomerase Pin1 prevents mitochondrial oxidative stress and vascular dysfunction: insights in patients with diabetes. *Eur Heart J*. 2014, *in press*.

Gregori M, Tocci G, Giammarioli B, Befani A, Ciavarella GM, Ferrucci A, **Paneni F**. Abnormal regulation of renin angiotensin aldosterone system is associated with right ventricular dysfunction in hypertension. *Can J Cardiol*. 2014 Feb;30(2):188-94.

Paneni F. 2013 ESC/EASD guidelines on the management of diabetes and cardiovascular disease: established knowledge and evidence gaps. *Diab Vasc Dis Res.* 2014;11:5-10.

Angeloni E*, **Paneni F***, Landmesser U, Benedetto U, Melina G, Lüscher TF, Volpe M, Sinatra R, Cosentino F. Lack of protective role of HDL-C in patients with coronary artery disease undergoing elective coronary artery bypass grafting. *Eur Heart J.* 2013 [Epub ahead of print] (**equally contribution*).

Paneni F, Cosentino F. Advanced glycation endproducts and plaque instability: a link beyond diabetes. *Eur Heart J.* 2014;35:1095-7.

Paneni F, Volpe M, Lüscher TF, Cosentino F. SIRT1, p66(Shc), and Set7/9 in vascular hyperglycemic memory: bringing all the strands together. *Diabetes.* 2013;62:1800-7.

Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J.* 2013;34:2436-43.

Beckman JA, **Paneni F**, Cosentino F, Creager MA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. *Eur Heart J.* 2013 Aug;34:2444-52.

Gregori M, Tocci G, Marra A, Pignatelli G, Santolamazza C, Befani A, Ciavarella GM, Ferrucci A, **Paneni F.** Inadequate RAAS suppression is associated with excessive left ventricular mass and systo-diastolic dysfunction. *Clin Res Cardiol.* 2013;102(10):725-33.

Paneni F, Osto E, Costantino S, Mateescu B, Briand S, Coppolino G, Perna E, Mocharla P, Akhmedov A, Kubant R, Rohrer L, Malinski T, Camici GG, Matter CM, Mechta-Grigoriou F, Volpe M, Lüscher TF, Cosentino F. Deletion of the activated protein-1 transcription factor JunD induces oxidative stress and accelerates age-related endothelial dysfunction. *Circulation.* 2013 Mar 19;127(11):1229-40, e1-21.

Gregori M, Tocci G, Befani A, Ciavarella GM, Ferrucci A, **Paneni F.** Synergic effect of high renin and aldosterone levels on inappropriate left ventricular mass and systolic function: a tissue Doppler study. *Int J Cardiol.* 2013;168(5):4934-6.

Conti E, Romiti A, Musumeci MB, Passerini J, Zezza L, Mastromarino V, D'Antonio C, Marchetti P, **Paneni F**, Autore C, Volpe M. Arterial thrombotic events and acute coronary syndromes with cancer drugs: are growth factors the missed link?: what both cardiologist and oncologist should know about novel angiogenesis inhibitors. *Int J Cardiol.* 2013;167(6):2421-9.

Paneni F, Gregori M, Marra A, Passerini J, Santolamazza C, Befani A, Ciavarella GM, Magrì D, Tocci G, Ferrucci A, Volpe M. Preclinical effects of healthy obesity on inappropriate left ventricular mass and systolic function. *Int J Cardiol.* 2013 Sep 10;167:3047-9.

Savarese G, Musella F, Volpe M, **Paneni F**, Perrone-Filardi P. Effects of atorvastatin and rosuvastatin on renal function: a meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2013;167:2482-9.

Mocharla P, Briand S, Giannotti G, Doerries C, Jakob P, **Paneni F**, Luscher TF, Landmesser U. AngiomiR-126 expression and secretion from circulating CD34+ and CD14+PBMCs - role for pro-angiogenic effects and alterations in type-2 diabetics. *Blood*, 2012, *in press*.

Spescha RD, Shi Y, Wegener S, Keller S, Weber B, Wyss MM, Lauinger N, Tabatabai G, **Paneni F**, Cosentino F, Hock C, Weller M, Nitsch RM, Lüscher TF, Camici GG. Deletion of the ageing gene p66Shc reduces early stroke size following ischaemia/reperfusion brain injury. *Eur Heart J*. 2012;34:96-103.

Paneni F, Gregori M, Tocci G, Palano F, Ciavarella GM, Pignatelli G, Marra A, Sciarretta S, Ferrucci A, Volpe M. Do diabetes, metabolic syndrome or their association equally affect biventricular function? A tissue Doppler study. *Hypertens Res*. 2012, in press. doi: 10.1038/hr.2012.137.

Paneni F, Mocharla P, Akhmedov A, Costantino S, Osto E, Volpe M, Lüscher TF, Cosentino F. Gene silencing of the mitochondrial adaptor p66(Shc) suppresses vascular hyperglycemic memory in diabetes. *Circ Res*. 2012 Jul 20;111(3):278-89.

Paneni F, Cosentino F, Marrara F, Palano F, Capretti G, Gregori M, Tocci G, Testa M, Volpe M. The clinical relevance of dysfunctional HDL in patients with coronary artery disease: a 3-year follow-up study. *Int J Cardiol*. 2012;158(1):158-60.

Tocci G, **Paneni F**, Palano F, Sciarretta S, Ferrucci A, Kurtz T, Mancia G, Volpe M. Angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin II receptor blockers and diabetes: a meta-analysis of placebo-controlled clinical trials. *Am J Hypertens*. 2011;24(5):582-90.

Paneni F, Cosentino F. p66^{Shc} as the engine of vascular aging. *Curr Vasc Pharmacol* 2012; 10(6):697-9.

Paneni F, Cosentino F, Passerini J, Volpe M. Is there any memory effect of blood pressure lowering in diabetes? *Int J Cardiol*. 2011;151(3):384-5.

Volpe M, Cosentino F, Tocci G, Palano F, **Paneni F**. Antihypertensive therapy in diabetes: the legacy effect and RAAS blockade. *Curr Hypertens Rep*. 2011;13(4):318-24.

Il Collegio dei Docenti giudica l'attività scientifico-formativa del Dott. **Francesco Paneni** in modo positivo, in base alla frequenza e all'attività di ricerca complessivamente svolta. Esprime parere favorevole alla presentazione di una tesi di Dottorato dal titolo:

EPIGENETIC CHANGES, OXIDATIVE STRESS AND VASCULAR DISEASE IN CARDIOMETABOLIC DISTURBANCES

Il Segretario

Prof.ssa Patrizia Mancini

Il Coordinatore

Prof.ssa Maria Rosaria Torrisi