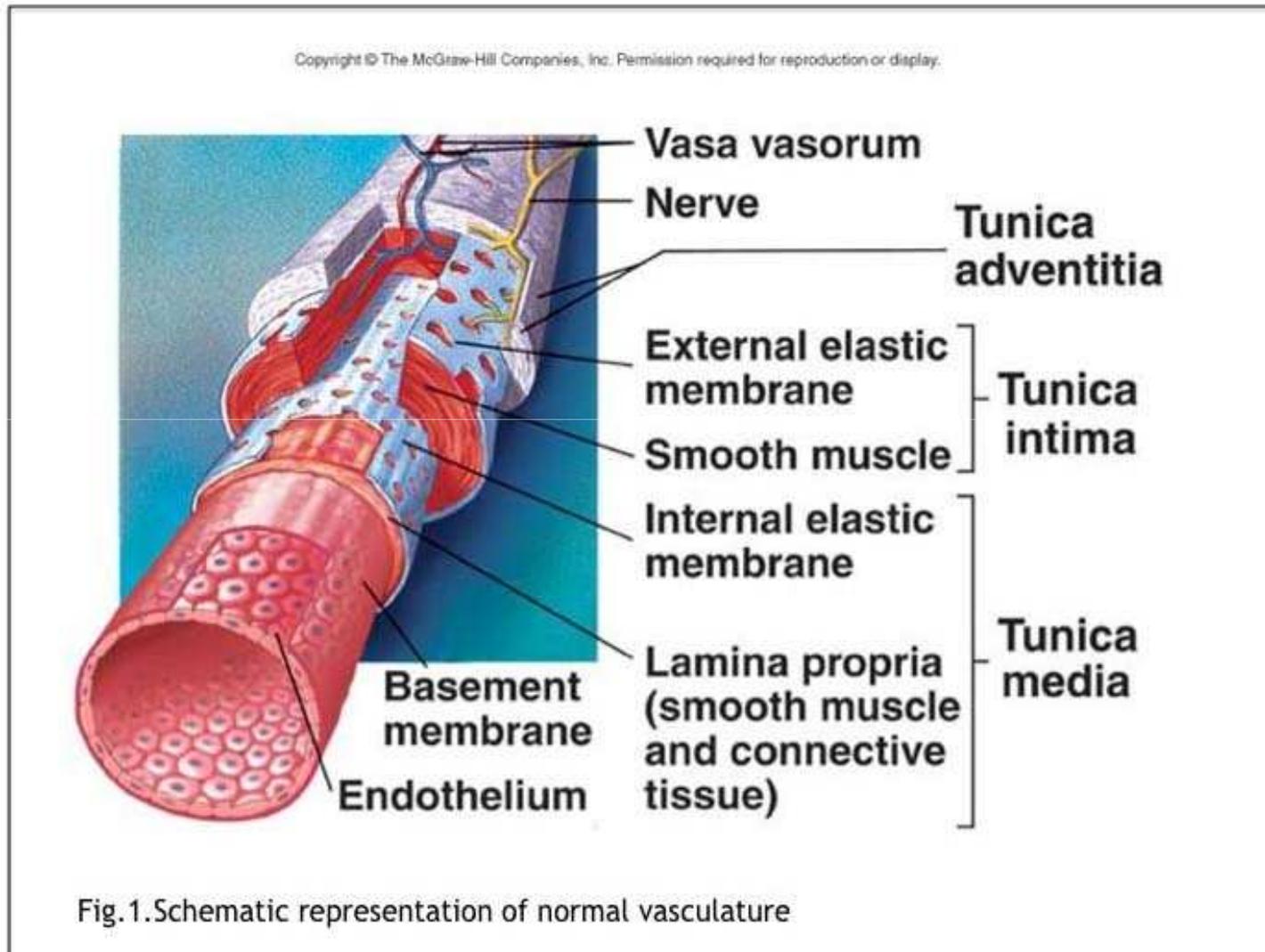
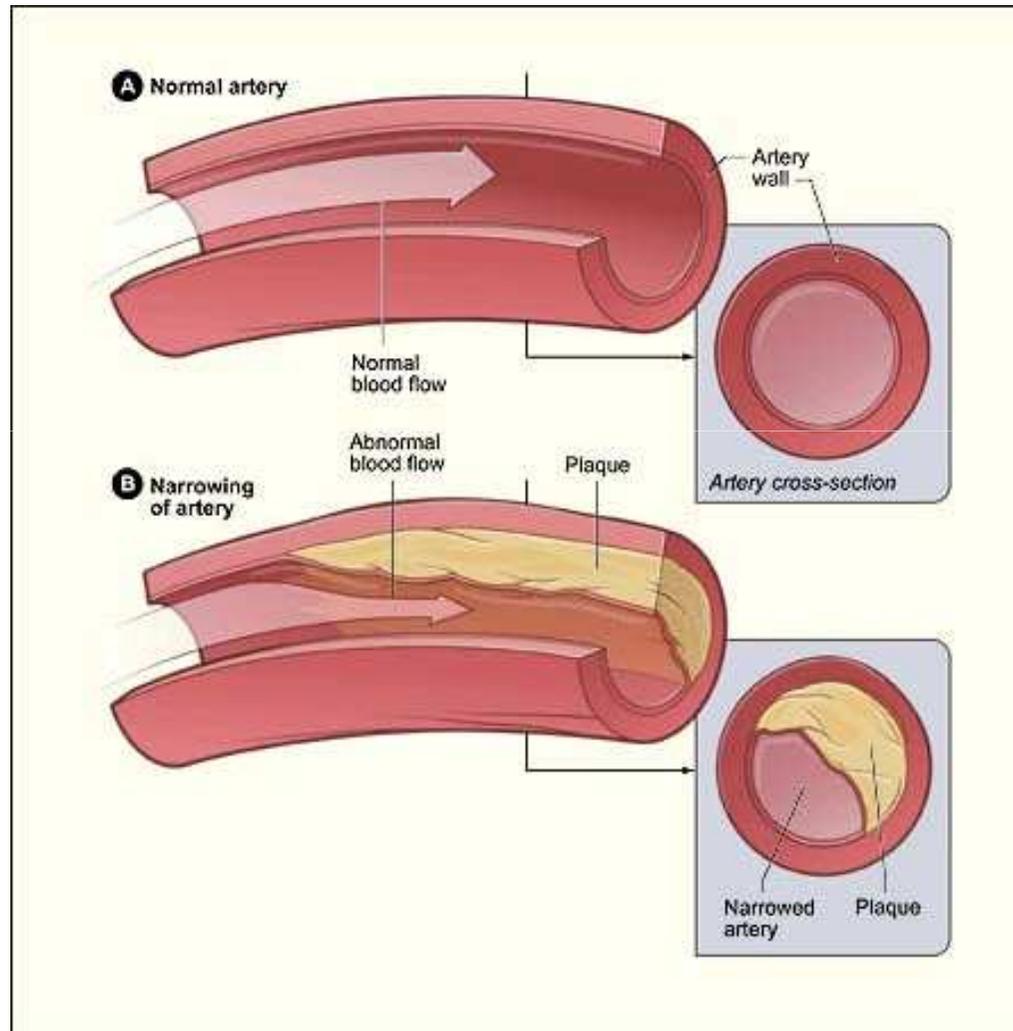




# Struttura di un vaso normale



# Arteria normale vs Arteria con Placca



# Il processo Aterosclerotico

Processo infiammatorio



Placche Ateromatose

- Arterie elastiche e muscolari

- Zona ricca di lipidi e residui necrotici



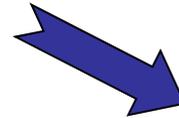
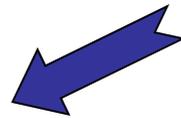
- Diminuità elasticità
- Stenosi

# Il processo Aterosclerotico



Malattia multifattoriale

Fattori di rischio cardiovascolare



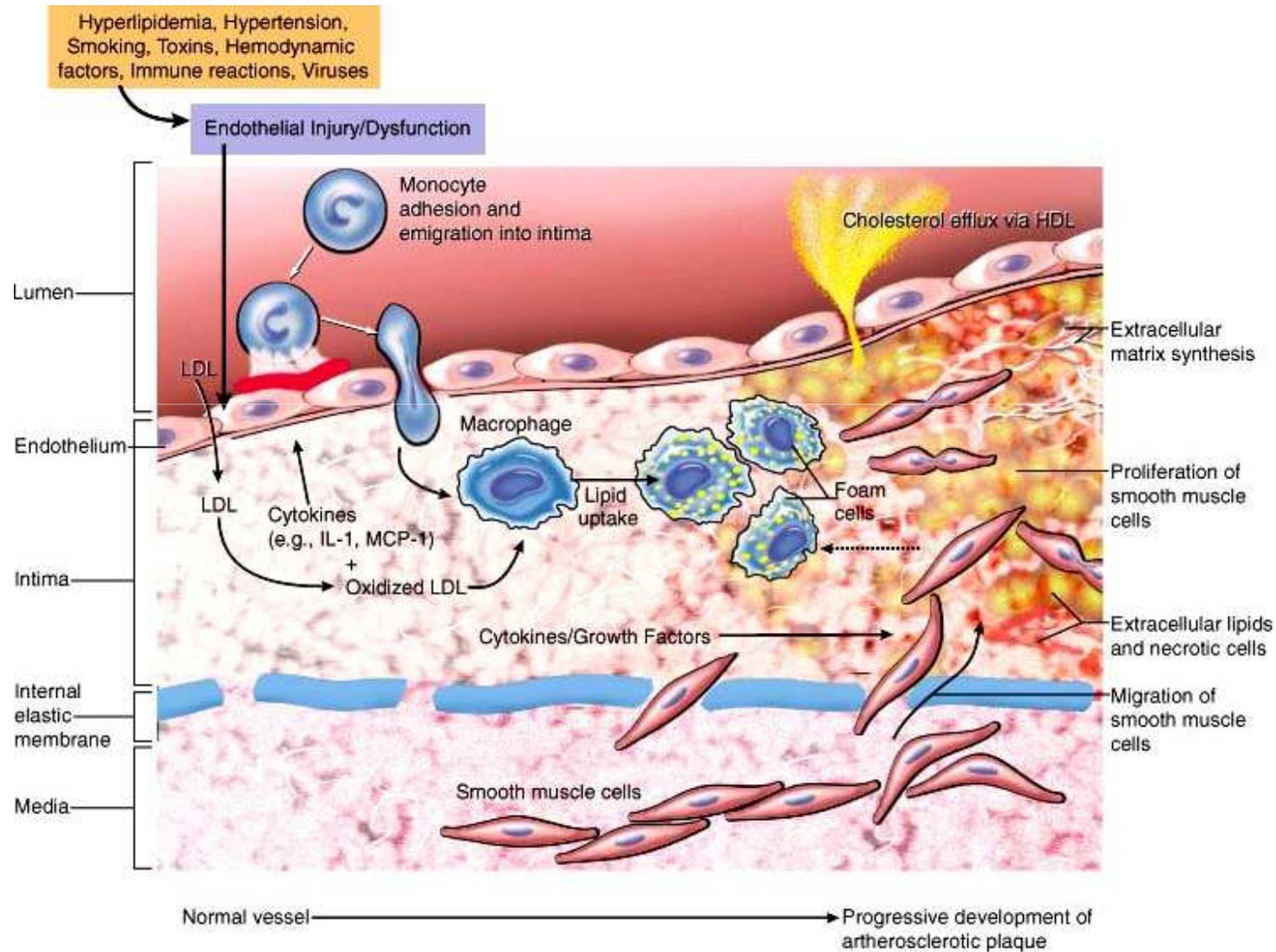
Modificabili

- Fumo
- Ipertensione arteriosa
- Livelli di colesterolo elevati
- Alcool
- Diabete
- Obesità
- Inattività fisica

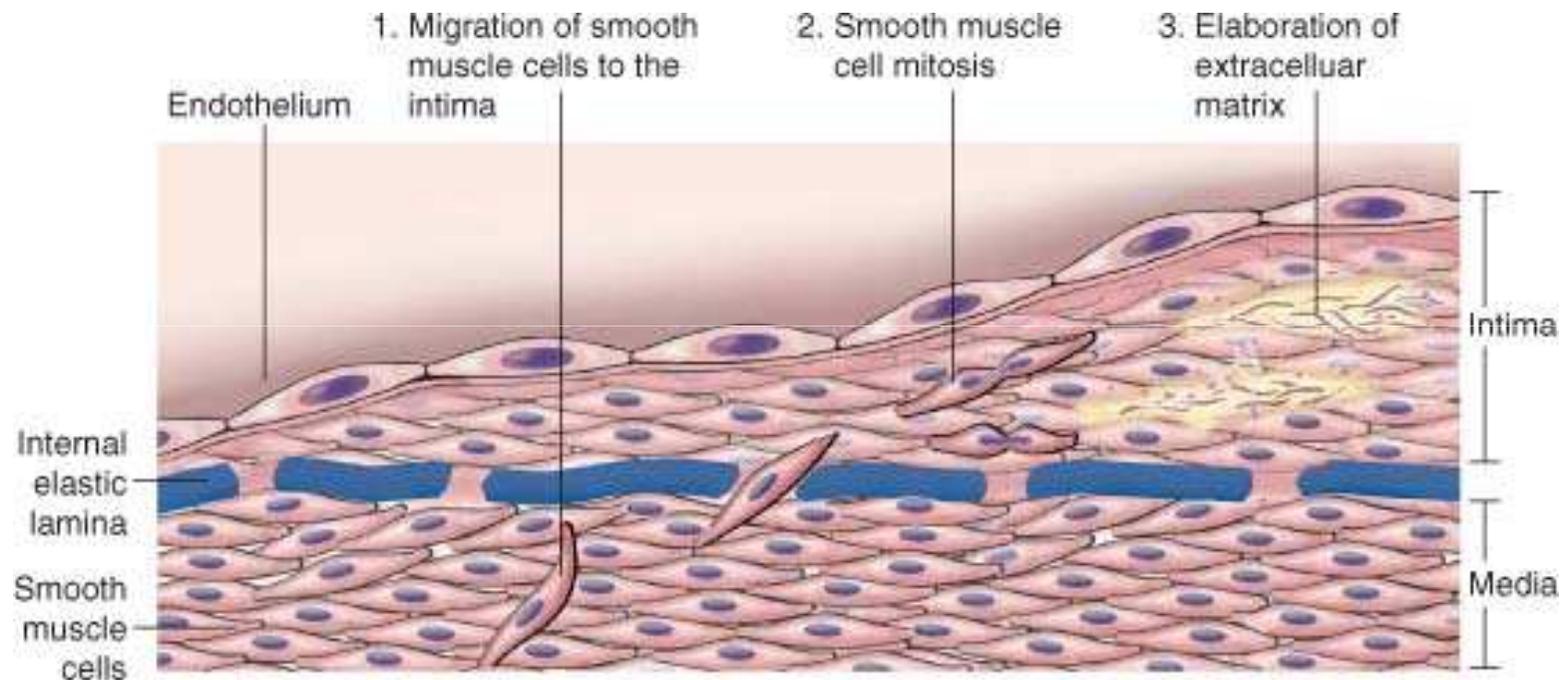
Non modificabili

- Età
- Sesso
- Familiarità

# Sviluppo e progressione della Placca Aterosclerotica



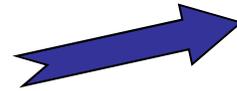
# Ruolo delle cellule muscolari lisce vascolari nella placca aterosclerotica



Durante la migrazione verso l'intima, le VSMC passano da un fenotipo contrattile ad un fenotipo sintetico

# Terapia dell'aterosclerosi

Farmaci



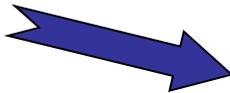
Statine



Fibrati

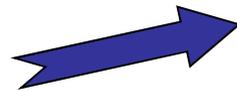


Resine



Acido acetilsalicilico  
(potere antiaggregante)

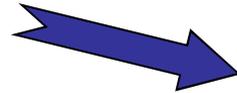
Intervento chirurgico



Angioplastica



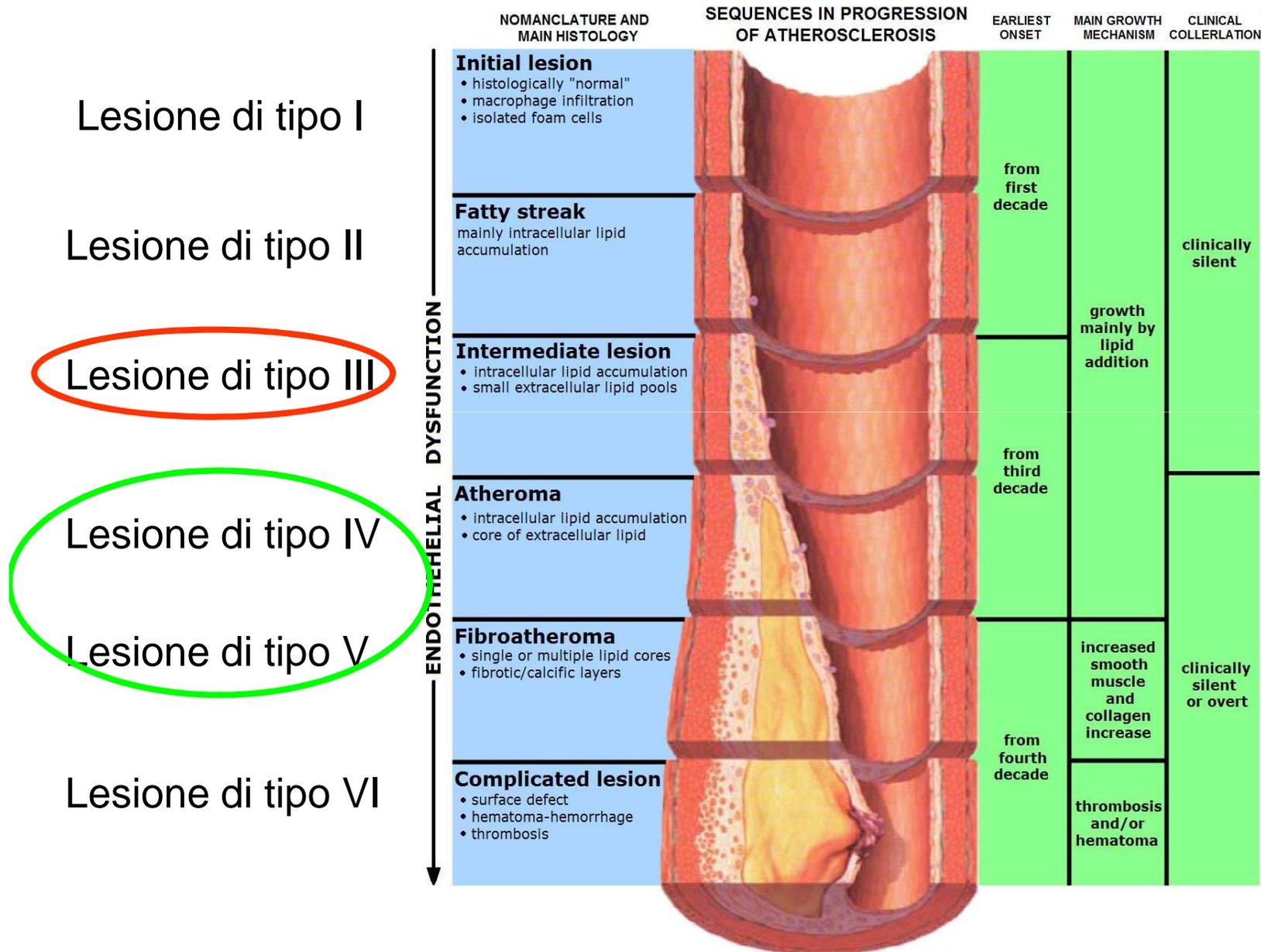
Bypass



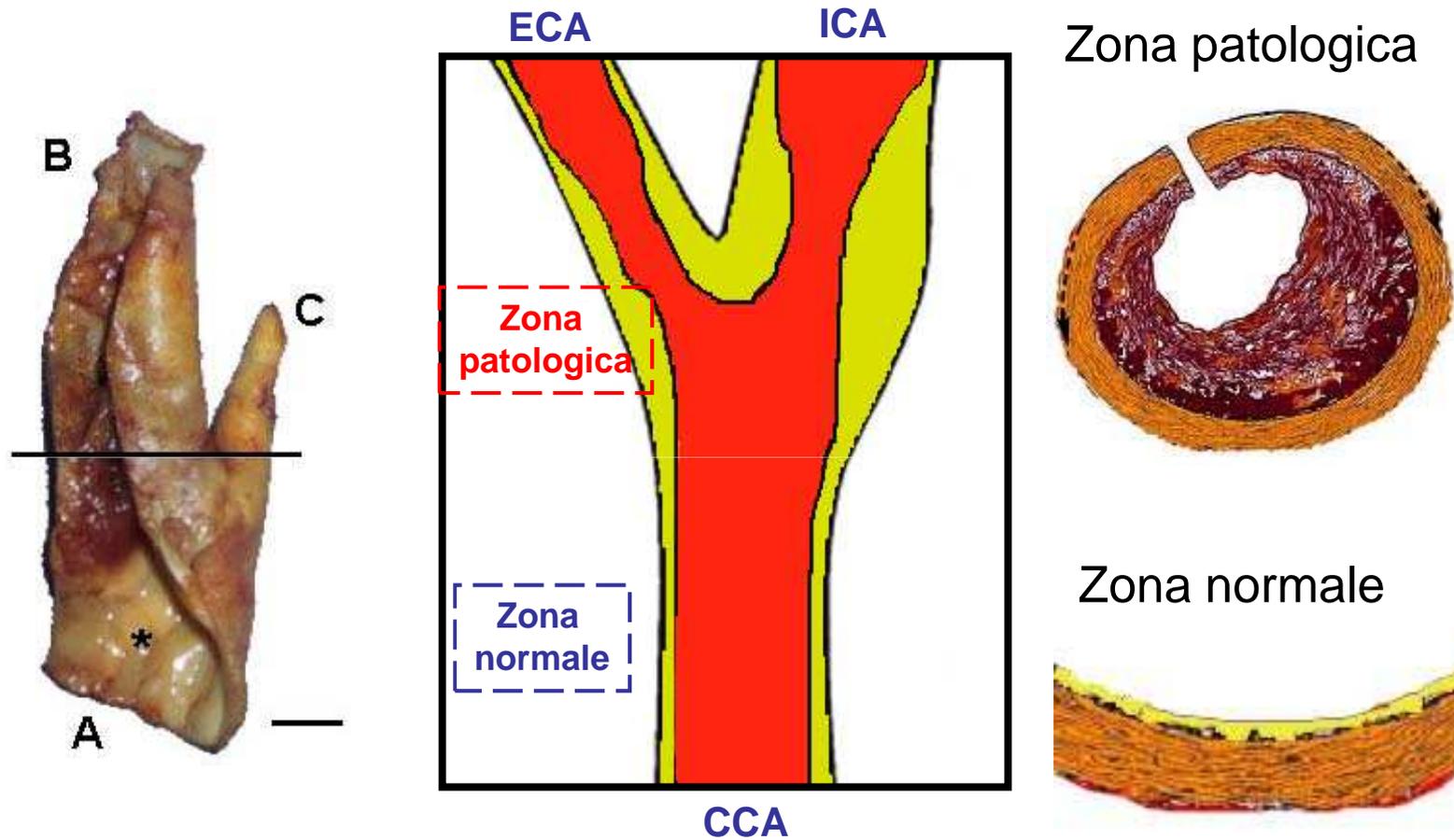
**TEA**

**(Tromboendarteriectomia)**

# Classificazione dei tipi delle lesioni



# Espianti tissutali derivanti da Tromboendarterectomia carotidea (TEA)



C = Arteria carotidea esterna (ECA))

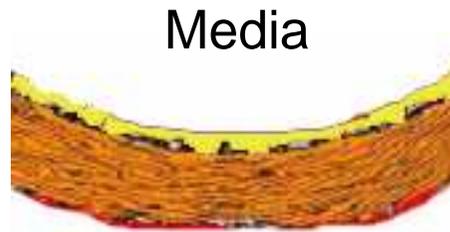
B = Arteria carotidea interna (ICA)

A= Arteria carotidea comune (CCA)

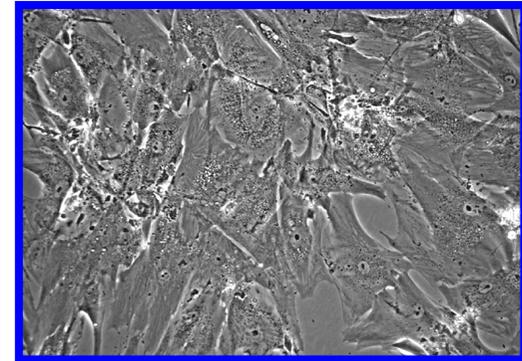
# Espianto tissutale



## Espianto tissutale dalla zona normale

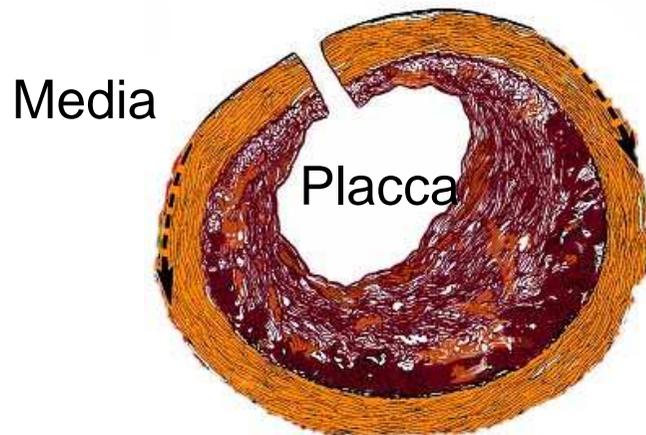


Crescita a monostrato

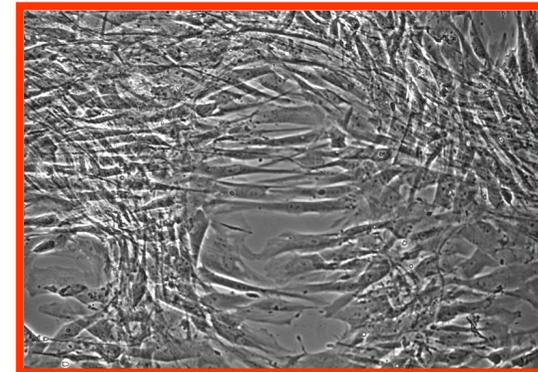


LARGE ( L-SMC)

## Espianto tissutale dalla zona patologica

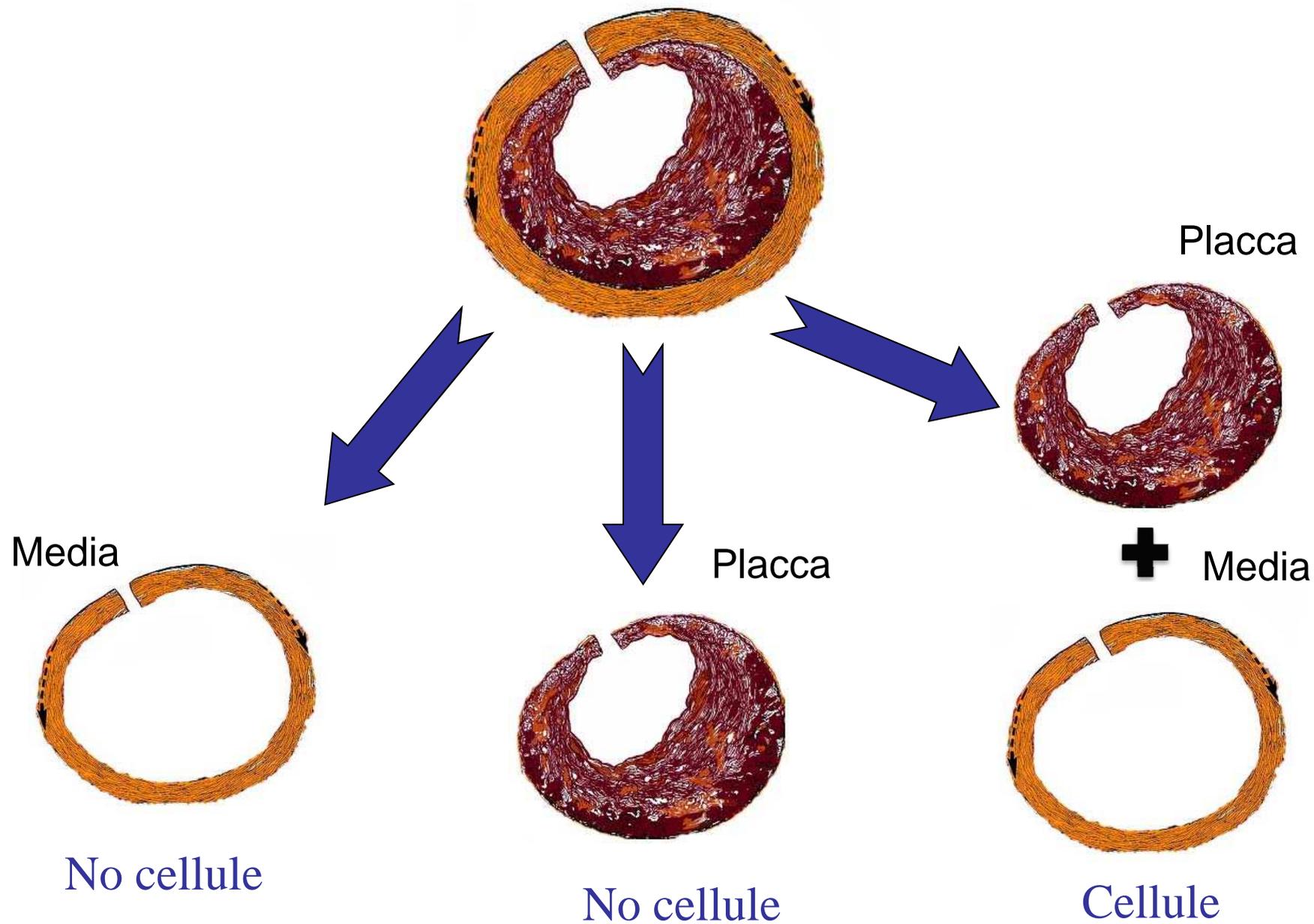


Crescita a multistrato



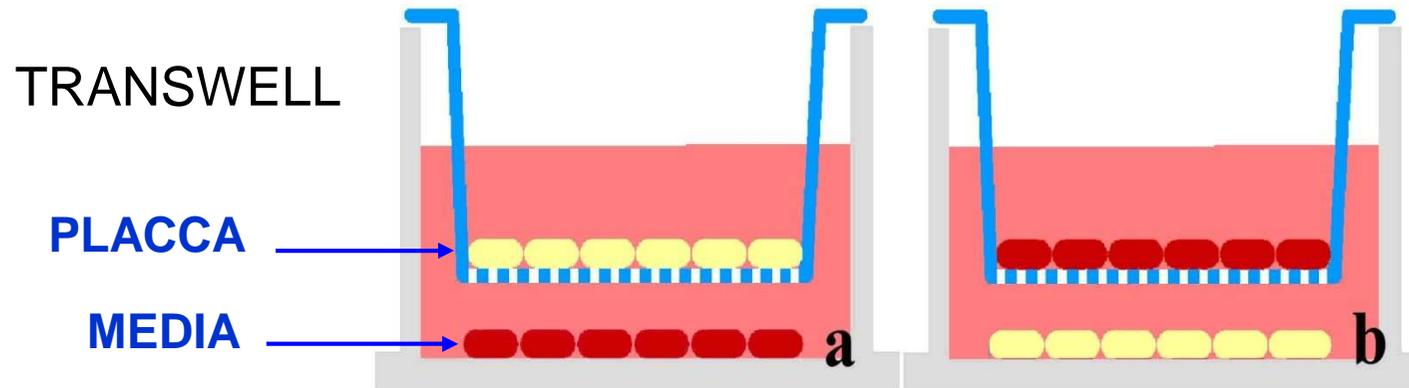
SMALL (S-SMC)

# Crescita cellulare dalla zona patologica



# Co-cultura

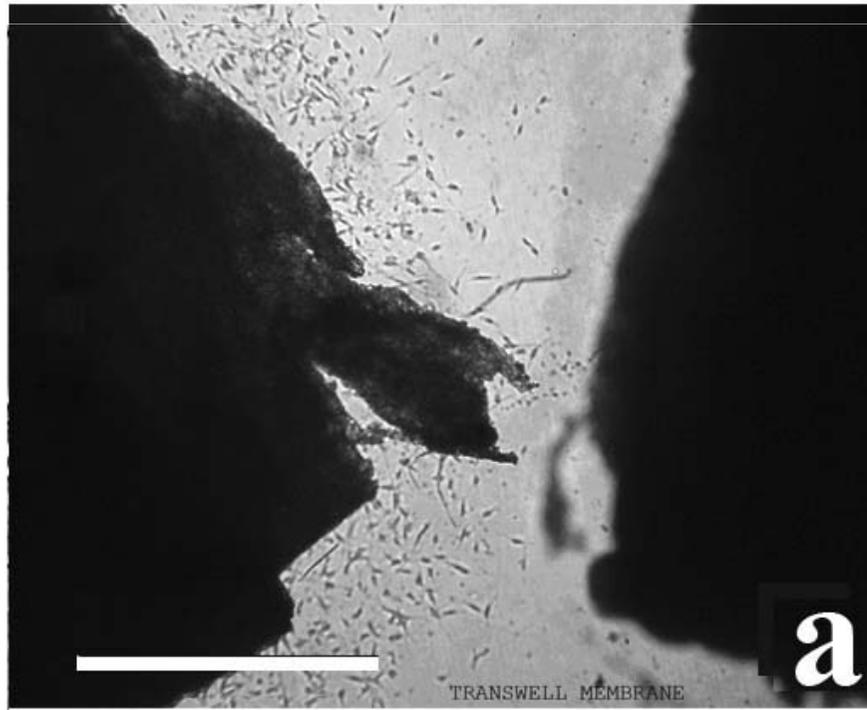
Da dove proliferano le cellule?



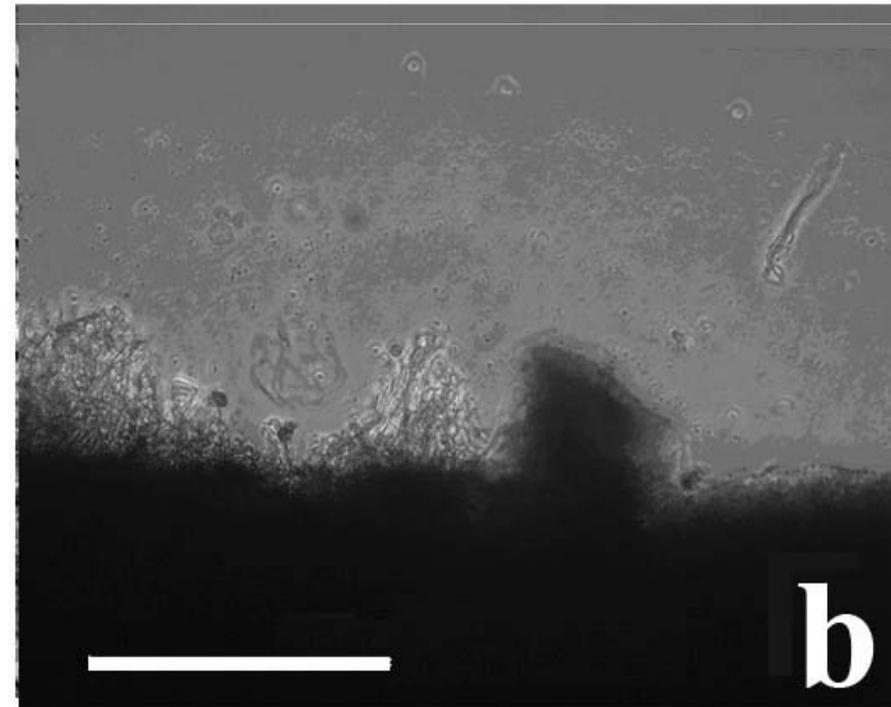
Numero di casi	orientamento rispetto alla membrana	Numero di esperimenti	strato	outgrowth ratio
7	<i>M up - P down</i>	11	M	6/11
			P	0/11
	<i>P up - M down</i>	9	M	4/9
			P	0/9

**La tonaca media è il compartimento proliferante  
ma la placca è essenziale per la proliferazione  
cellulare**

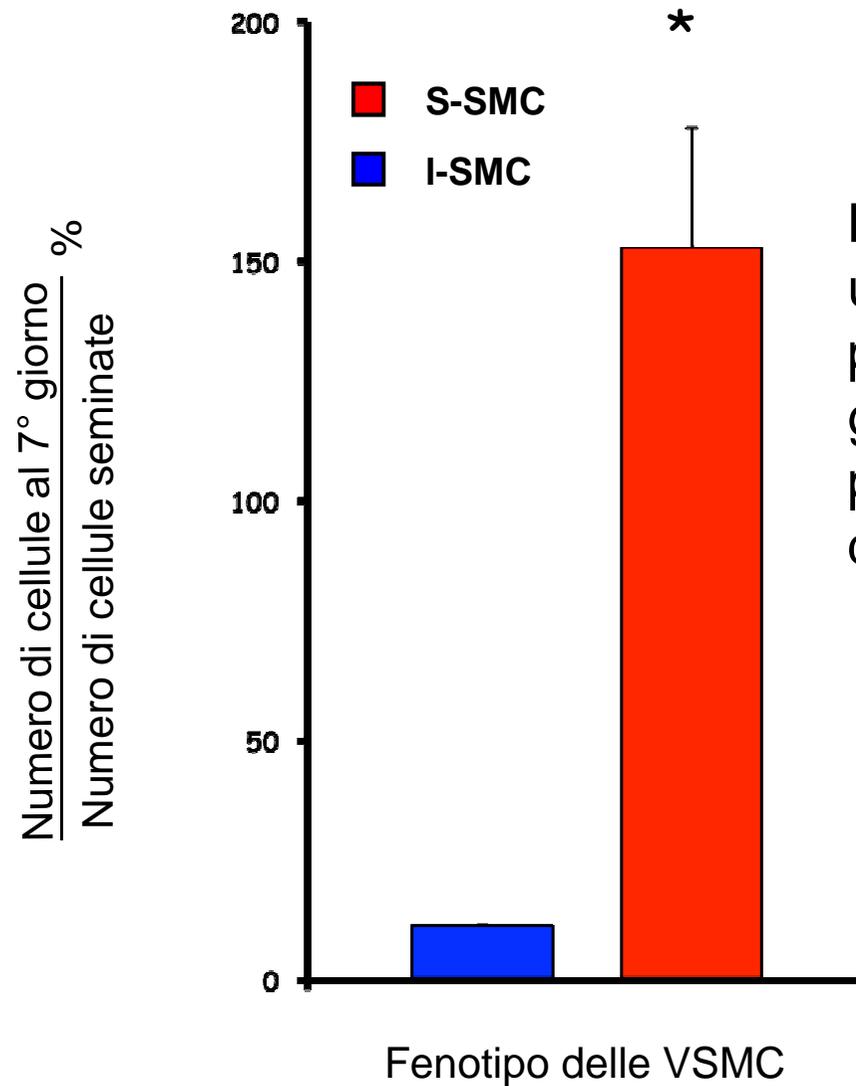
**FUORIUSCITA DI CELLULE  
DALLA TONACA MEDIA**



**PLACCA (INGRANDIMENTO )**



# Attività proliferativa delle L-SMC e delle S-SMC



Le S-SMC esibiscono una più alta attività proliferativa dopo 7 giorni di coltura paragonata a quella delle L-SMC

# Proteine del citoscheletro e marcatori di differenziazione

**$\alpha$ -actina** → L'isoforma più abbondante nelle cellule muscolari lisce adulte, compare fin dai primi stadi di sviluppo delle SMC.

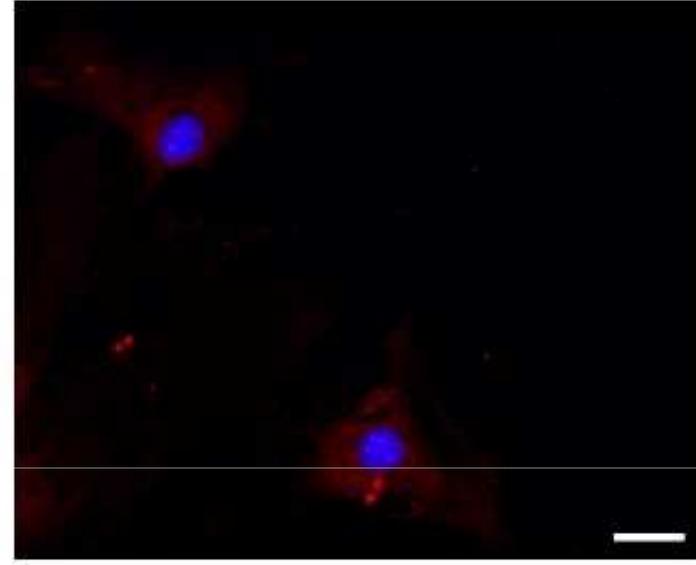
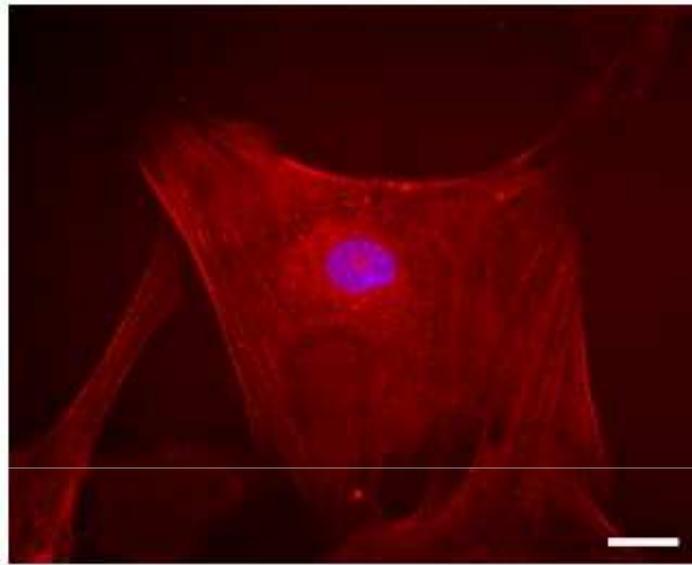
**Miosina** → È un esamero composto da 2 catene pesanti (**SMMHC**), da 2 catene leggere (SMMLC) e da 2 catene fosforilabili, compare più tardivamente nello sviluppo delle SMC

# Marcatori di espressione delle VSMC

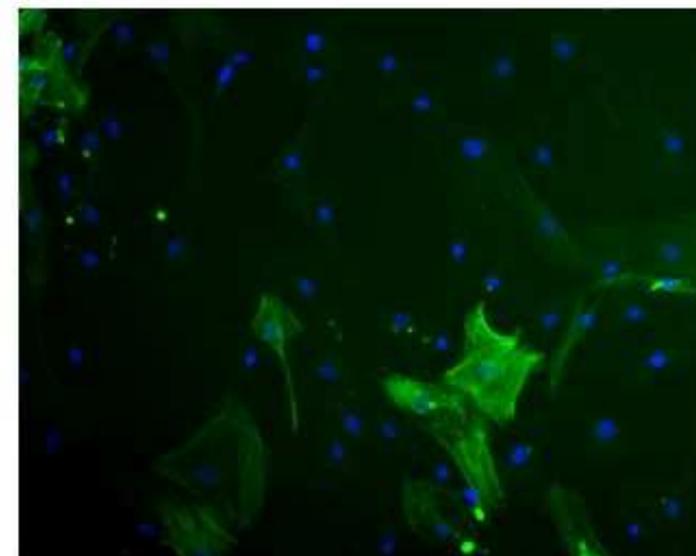
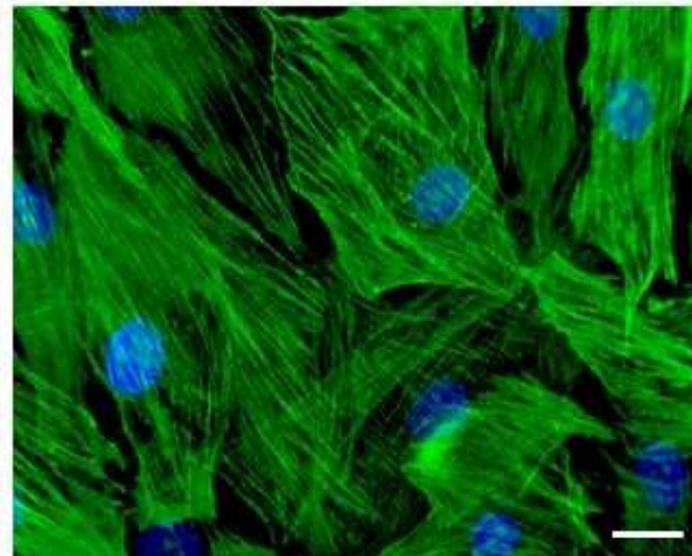
L-SMC

S-SMC

SMMHC



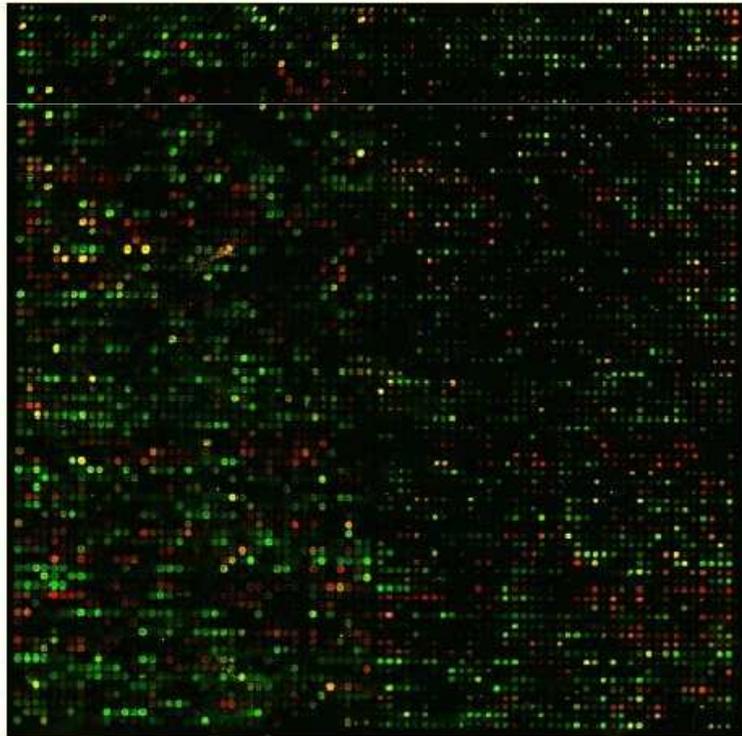
$\alpha$ -SMA



# Esperimenti di Microarray

## Microarray Agilent 60-mer Whole Human Genome , 41.000 trascritti umani

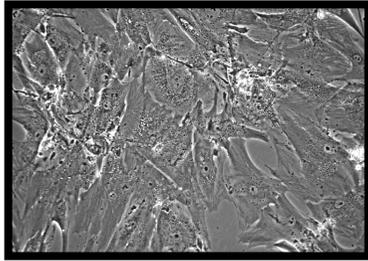
Matrice solida di vetro, plastica o silicio su cui sono immobilizzare, in posizione ben definita, migliaia di molecole di DNA (probe)



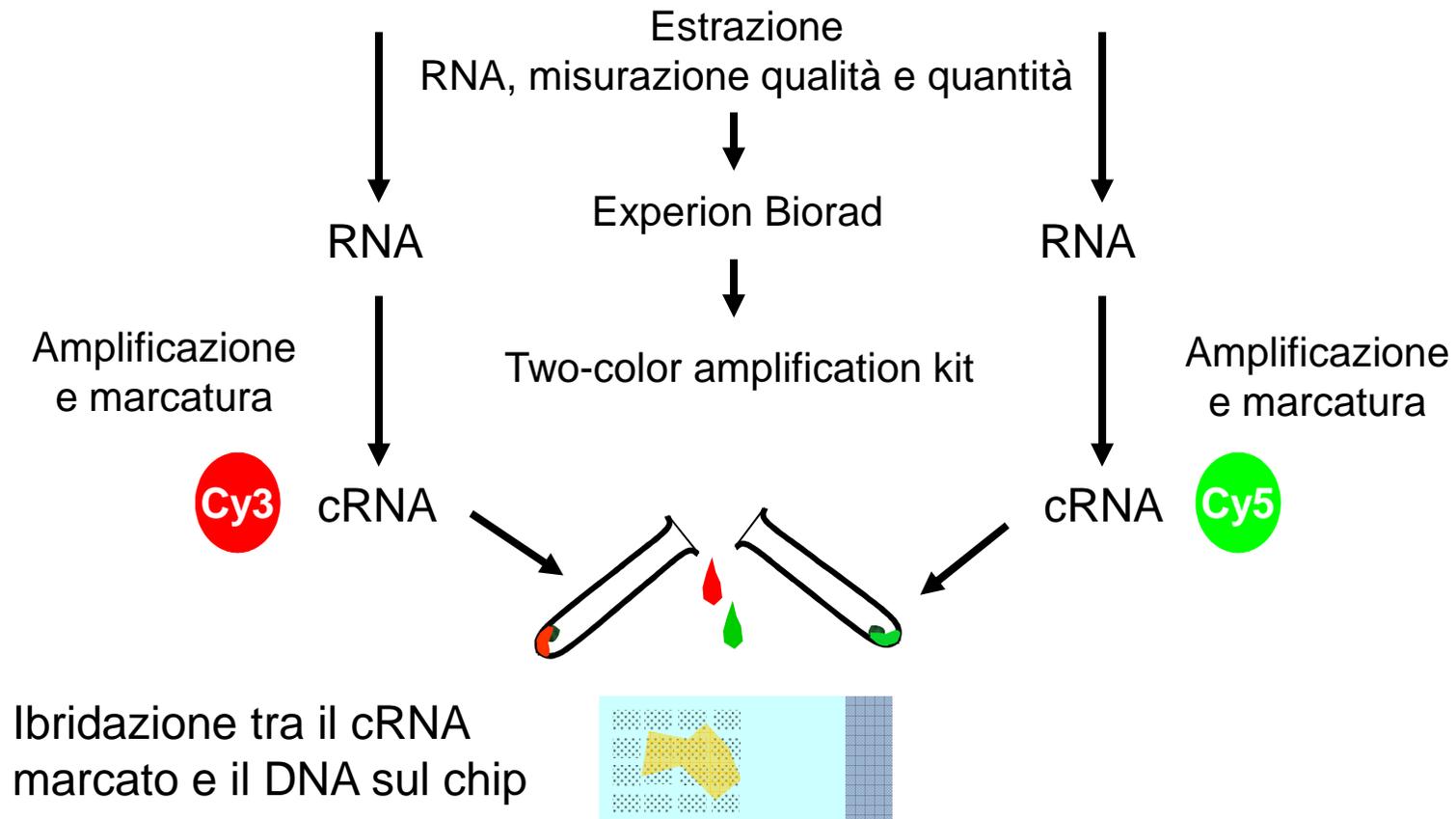
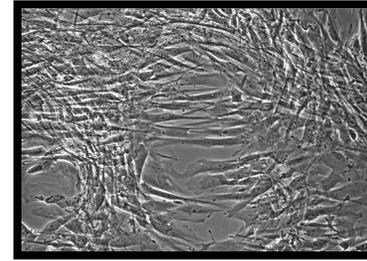
- Permettono l'analisi dell'espressione genica di migliaia di geni simultaneamente
- Sfruttano una tecnica di ibridazione inversa
- Il campione da analizzare viene marcato con delle cianine

# Preparazione dei campioni per Microarray

**LARGE(L)-SMCs**



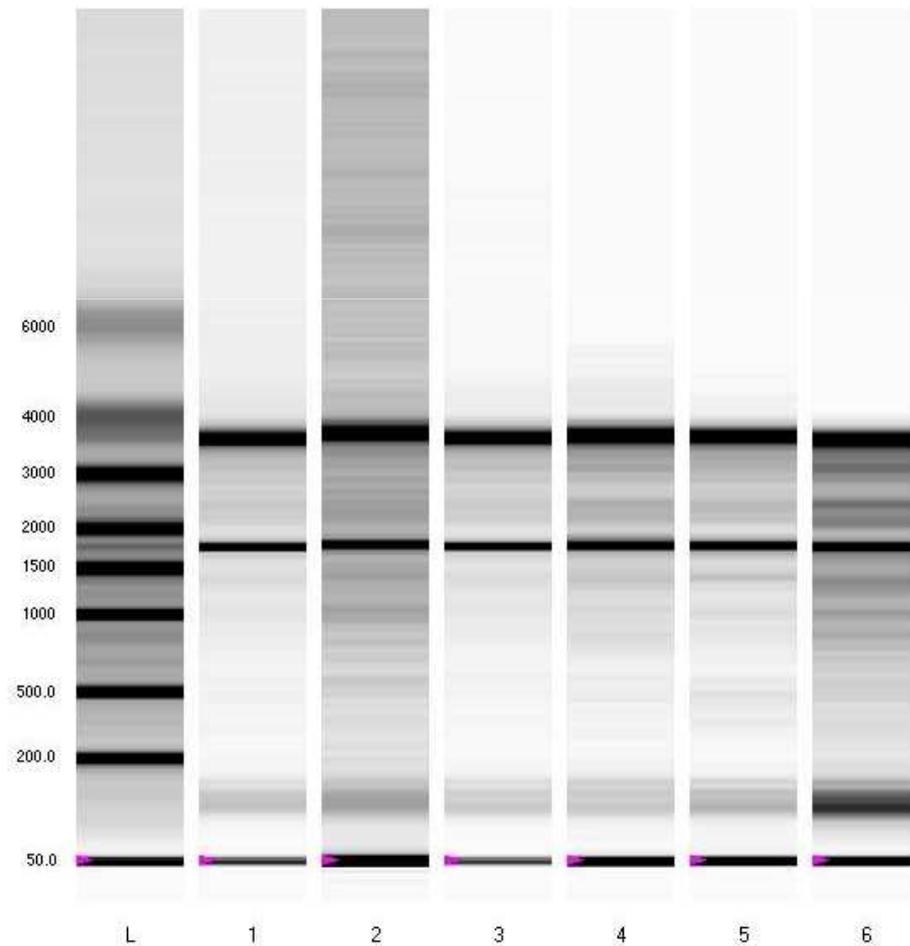
**SMALL(S)-SMCs**



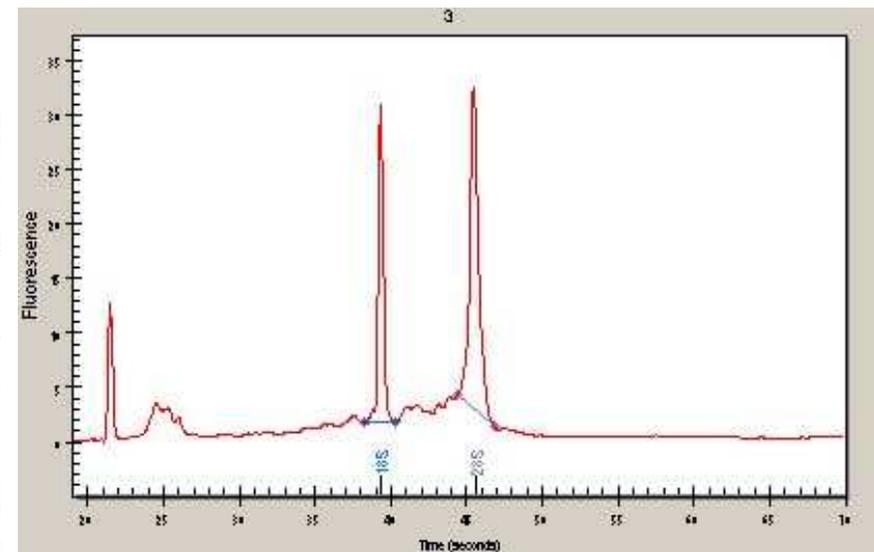
# Qualità dell'RNA

Experion Biorad

M Pt1 Pt2 Pt3

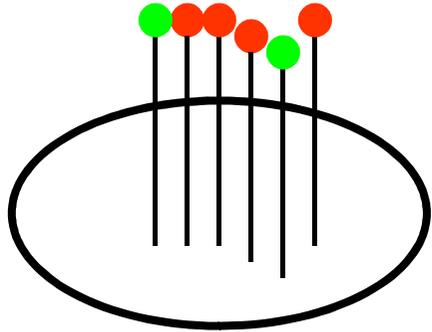


M 5S 18S 28S



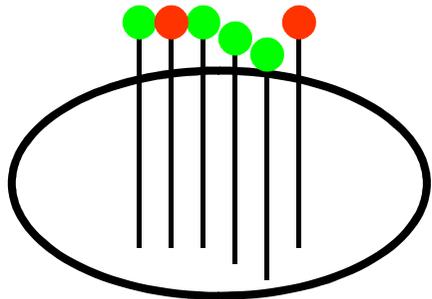
$1,3 < R (28S/18S) > 1,5$   
 $8,8 < RQI > 9,8$

# Misure di Intensità



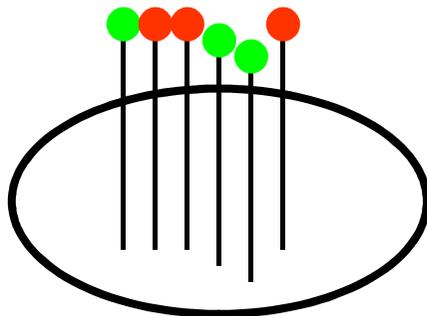
$$\text{Cy3} > \text{Cy5}$$

Il gene è espresso a livelli più alti nelle **LARGE** (più copie di mRNA prodotte)



$$\text{Cy5} > \text{Cy3}$$

Il gene è espresso a livelli più alti nelle **SMALL**



$$\text{Cy5} = \text{Cy3}$$

Non prevale nessuna delle 2 fluorescenze → il gene è espresso a livelli simili nei 2 campioni

# Analisi dei dati dei Microarray

Risultati degli array sono stati analizzati mediante il software GeneSpring GX (Agilent Technologies)

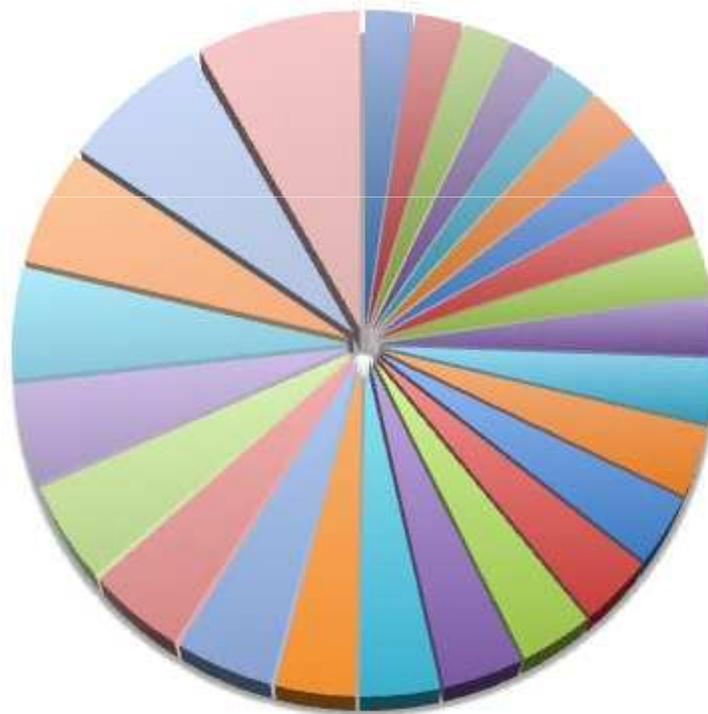
Geni differenzialmente espressi con un fold-change  $\geq 2$  e  $P < 0,05$

Analisi gene ontology (GO)

# Geni up-regolati nelle L-SMC

Fig.25

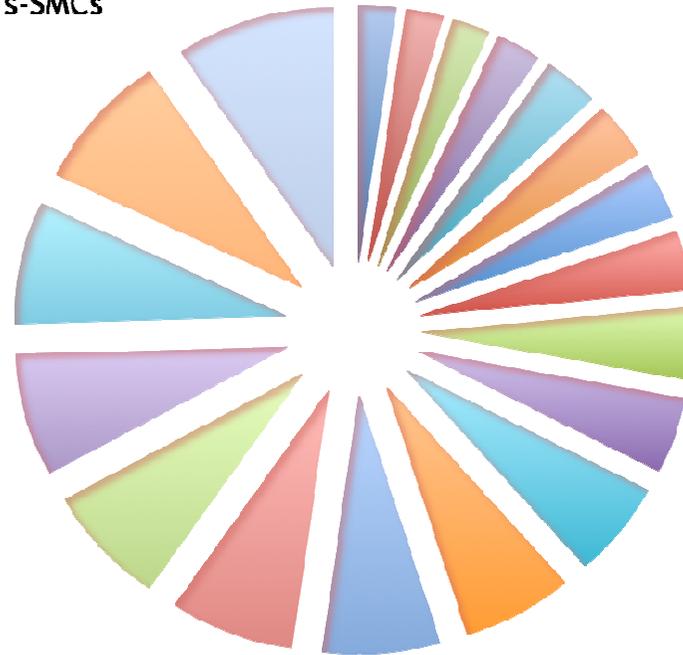
GO analysis obtained from genes upregulated in l-SMCs



- GO:6954: inflammatory response
- GO:6066: alcohol metabolism
- GO:9057: macromolecule catabolism
- GO:42221: response to chemical stimulus
- GO:9628: response to abiotic stimulus
- GO:44262: cellular carbohydrate metabolism
- GO:44255: cellular lipid metabolism
- GO:4857: enzyme inhibitor activity
- GO:5975: carbohydrate metabolism
- GO:6629: lipid metabolism
- GO:30154: cell differentiation
- GO:5102: receptor binding
- GO:16491: oxidoreductase activity
- GO:9611: response to wounding
- GO:6091: generation of precursor metabolites and energy
- GO:9613: response to pest, pathogen or parasite
- GO:43207: response to external biotic stimulus
- GO:5615: extracellular space
- GO:6955: immune response
- GO:6952: defense response
- GO:9605: response to external stimulus
- GO:9607: response to biotic stimulus
- GO:6950: response to stress
- GO:5576: extracellular region
- GO:50874: organismal physiological process
- GO:50896: response to stimulus

# Geni up-regolati nelle S-SMC

**Fig.26**  
GO analysis obtained from genes upregulated in s-SMCs



- GO:30154: cell differentiation
- GO:5615: extracellular space
- GO:5102: receptor binding
- GO:3700: transcription factor activity
- GO:8283: cell proliferation
- GO:9653: morphogenesis
- GO:30528: transcription regulator activity
- GO:48513: organ development
- GO:5576: extracellular region
- GO:50874: organismal physiological process
- GO:7165: signal transduction
- GO:4871: signal transducer activity
- GO:51244: regulation of cellular physiological process
- GO:50794: regulation of cellular process
- GO:7154: cell communication
- GO:50791: regulation of physiological process
- GO:5515: protein binding
- GO:50789: regulation of biological process
- GO:7275: development

## Risultati ottenuti

SMC isolate dalla carotide umana mostrano 2 distinti fenotipi

L-SMC sono ottenute dalla porzione sana della media,  
S-SMC dalla placca ateromatosa con la sottostante media

S-SMC fuoriescono dalla media solo in presenza della placca

S-SMC mostrano una maggiore attività proliferativa e uno stato meno differenziato rispetto alle L-SMC

# Functional Genomics *Levels*

- ✓ Genome to transcriptome
- ✓ Transcriptome to proteome
- ✓ Proteome to dynamic system
- ❑ Dynamic systems to phenotype

# Gene Expression Profile of Aging and Its Retardation by Caloric Restriction

ORF	$\Delta$ Age (fold)	Gene	Function	CR Prevention
W08057	↑ 3.5	Heat Shock 27 kDa Protein	Chaperone	C
M17790	↑ 3.5	Serum Amyloid A Isoform 4	Unknown	N
AA114576	↑ 3.4	Heat Shock 71 kDa Protein	Chaperone	C
L28177	↑ 2.6	GADD45	DNA damage response	77%
M74570	↑ 2.4	Aldehyde Dehydrogenase II	Aldehyde detoxification	29%
AA059662	↑ 2.2	Protease Do Precursor	Protease	C
L22482	↑ 2.2	HIC-5	Senescence and differentiation	C
X99963	↑ 2.2	rhoB	Unknown	87%
X65627	↑ 2.1	TNZ2	RNA metabolism	64%
X57277	↑ 1.8	Rac1	JNK activator	C
AA071777	↑ 3.8	Synaptic Vesicle Protein 2	Neurite extension	51%
X53257	↑ 2.5	Neurotrophin-3	Reinnervation of muscle	50%
X78197	↑ 2.2	AP-2 Beta	Neurogenesis	N
X89749	↑ 2.1	mTGIF	Differentiation	C
AA014024	↑ 2.1	Dynactin	Transport	55%
X63190	↑ 2.1	PEA3	Response to muscle injury	C
AA106112	↑ 3.8	Mitochondrial Sarcomeric Creatine Kinase	ATP generation	C
AA061886	↑ 2.0	Dihydropyridine-sensitive L-type Calcium Channel	Calcium channel	67%

 Energy Metabolism

 Protein Metabolism

 Biosynthesis

 Neuronal Factors

 Stress Response

 Calcium Metabolism

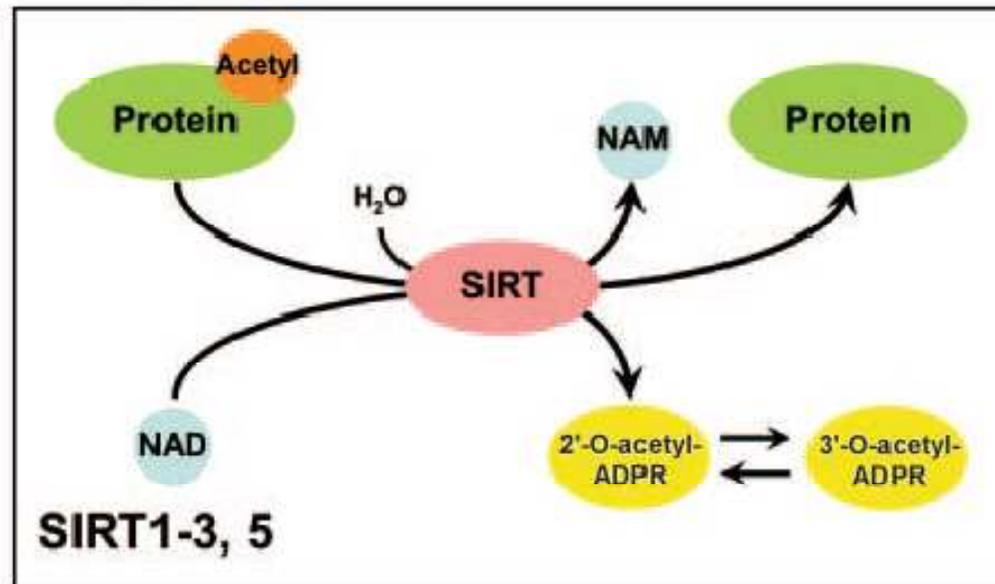
- Aging-related changes in gene expression in mouse gastrocnemius muscle. The extent to which caloric restriction prevented age-associated alterations in gene expression is denoted as either C (complete, .90%), N (none), or partial (20 to 90%, percentage effect indicated). The fold increase shown represents the average of all nine possible pairwise comparisons among individual mice

# Gene Expression Profile of Aging and Its Retardation by Caloric Restriction

$\Delta$ Age (fold)	Gene	Function	CR Prevention
↑ 3.5	Heat Shock 27 kDa Protein	Chaperone	Yes
↑ 3.5	Serum Amyloid A Isoform 4	Unknown	Yes
↑ 3.4	Heat Shock 71 kDa Protein	Chaperone	Yes
↑ 2.6	GADD45	DNA damage response	Yes
↑ 2.4	Aldehyde Dehydrogenase II	Aldehyde detoxification	Yes
↑ 2.2	Protease Do Precursor	Protease	Yes
↑ 2.2	HIC-5	Senescence and differentiation	Yes
↑ 2.2	rhoB	Unknown	
↑ 2.1	TNZZ2	RNA metabolism	
↑ 1.8	Rac1	JNK activator	

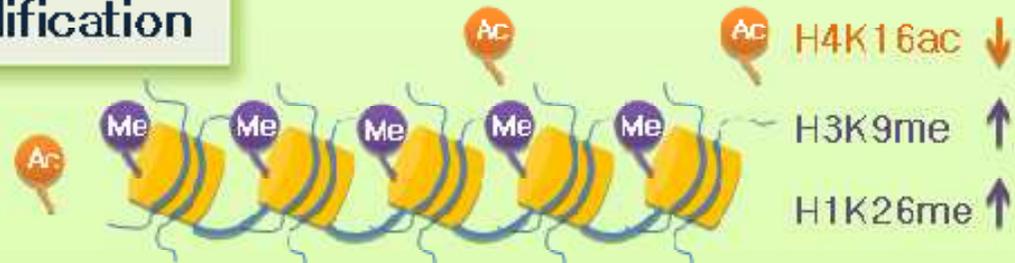
 Stress Response

## Deacetylation



Sirtuins (SIRT1–SIRT3, SIRT5) catalyze a deacetylation reaction in which an acetyl group is transferred to the ADPribose (ADPR) moiety of NAD and 2-*O*-acetyl-ADPR is produced. 3-*O*-acetyl-ADPR is formed nonenzymatically from 2-*O*-acetyl-ADPR.

## Histone modification



Gene silencing / Heterochromatin formation

**Validazione dei dati  
del Microarray mediante  
Real Time (Q-PCR)**

# RT-PCR convenzionale

Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA

- Oligo d(T)
- **Random esameri (VLO Superscript)**
- Primer specifico per il gene

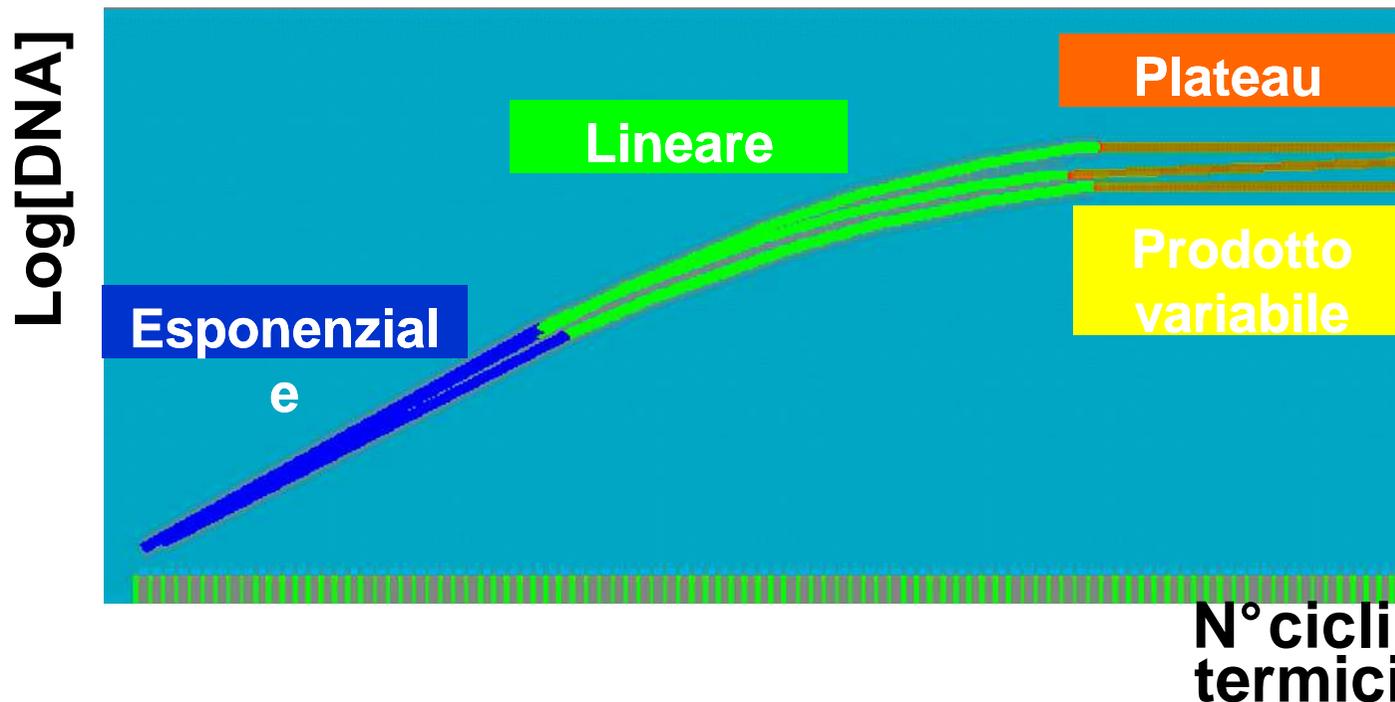
# Polymerase Chain Reaction: resa

Resa teorica:  $2^n$

$$P=(2)^n T$$

Il prodotto (P) incrementa esponenzialmente con il numero di cicli di PCR (n)

Il prodotto di PCR dipende da T,  
numero di copie di templatato di partenza



# Polymerase Chain Reaction: plateau

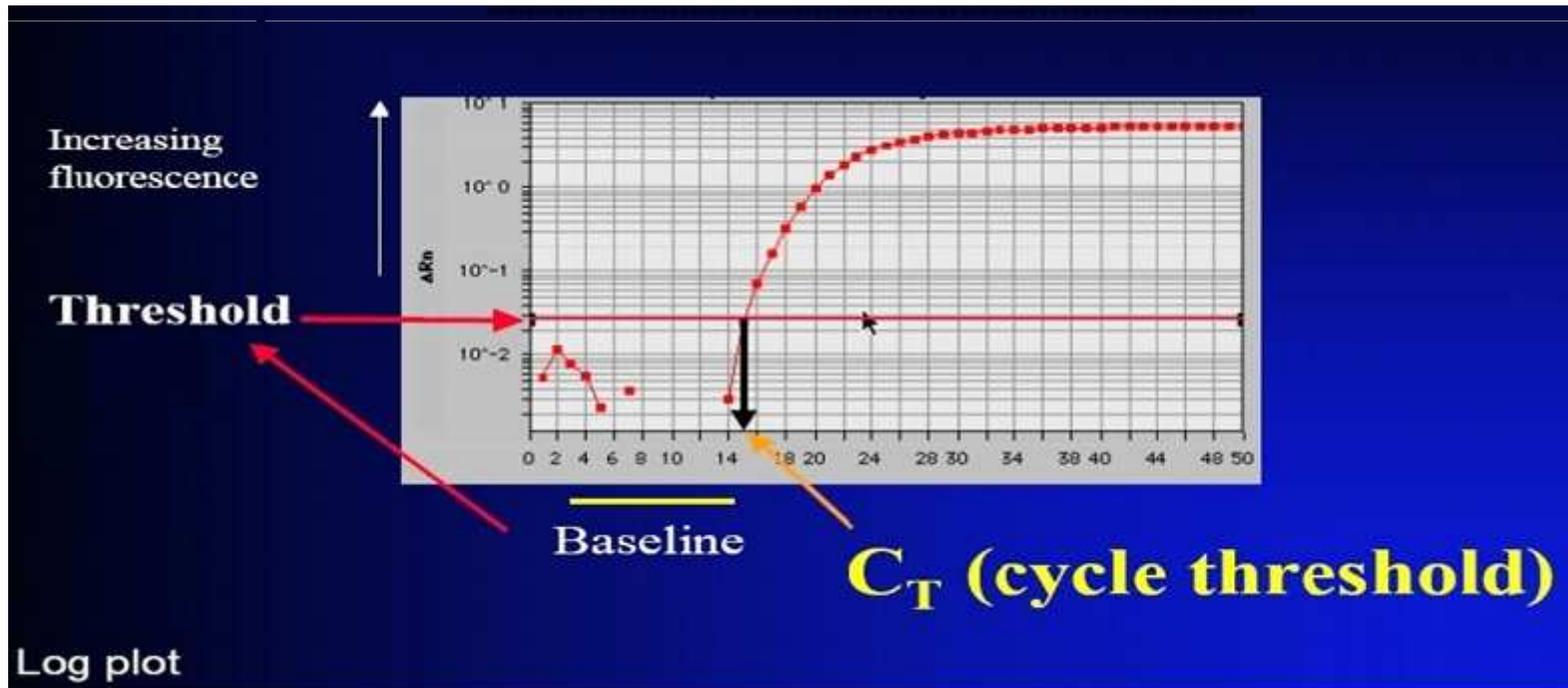
- Resa effettiva: **effetto plateau**
- Il processo di duplicazione non procede “all’infinito”, esso è limitato da:
  - Quantità dei primers
  - Attività della Taq polimerasi
  - Reannealing dei filamenti
- Raggiunto il plateau non si osserva più un incremento nei prodotti

# **Perché Real-Time?**

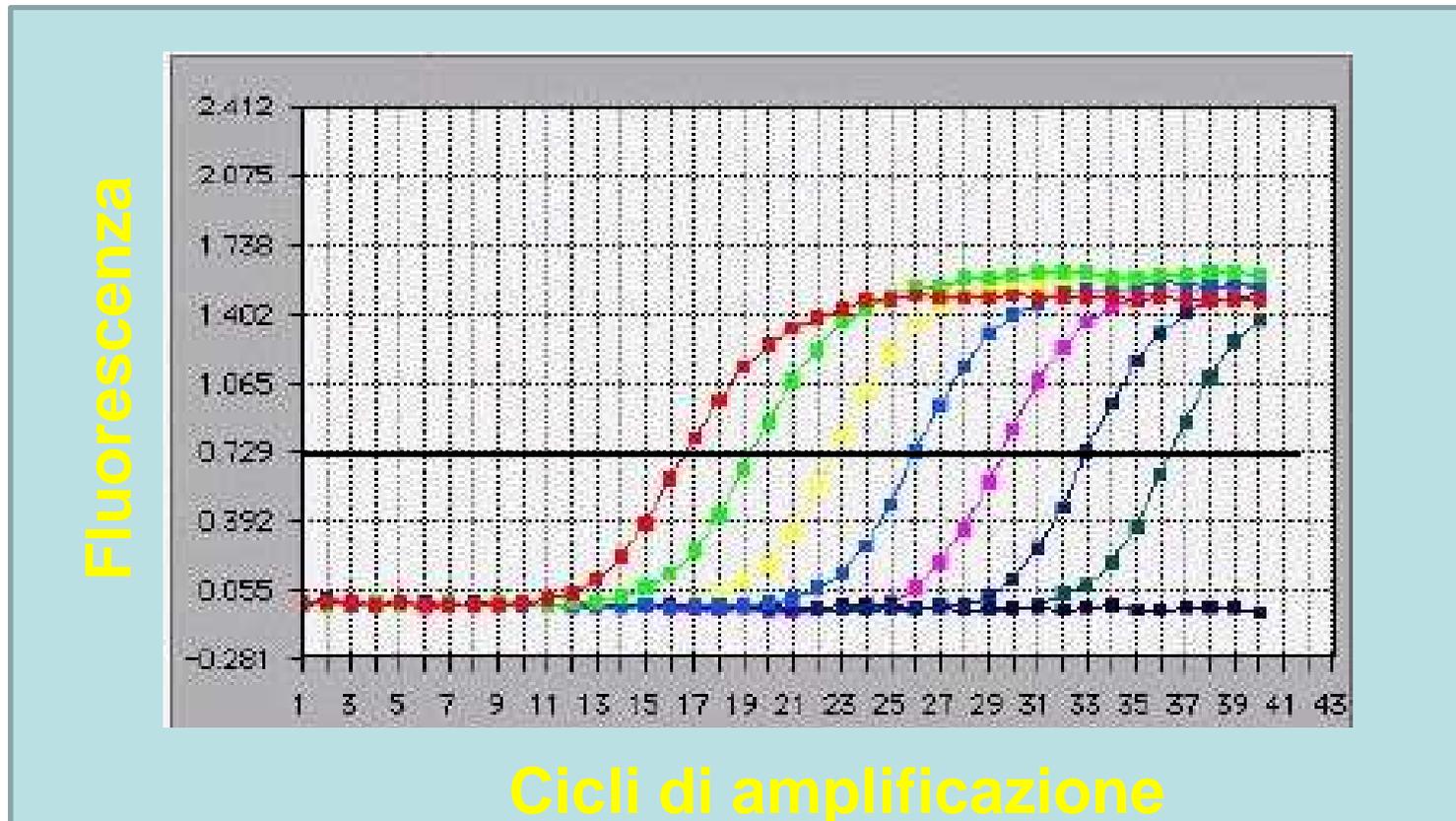
**Misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale**

# Real Time-PCR quantitativa

- Rilevamento della fluorescenza associata all'amplificazione
- Il prodotto di PCR non viene analizzato su gel di agarosio
- Analisi del prodotto di fluorescenza tramite



# Curve di amplificazione



Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione il cui  $C_T$  (=Threshold Cycle) è inversamente proporzionale alla quantità di template iniziale

# **Chimiche fluorescenti per PCR Real-Time**

- **La fluorescenza si genera durante la PCR per effetto di diverse possibili reazioni chimiche**
- **Le chimiche principali sono basate sia sul legame di coloranti fluorescenti che si intercalano nella doppia elica di DNA, come il SYBR Green, sia sull'ibridazione di sonde specifiche.**

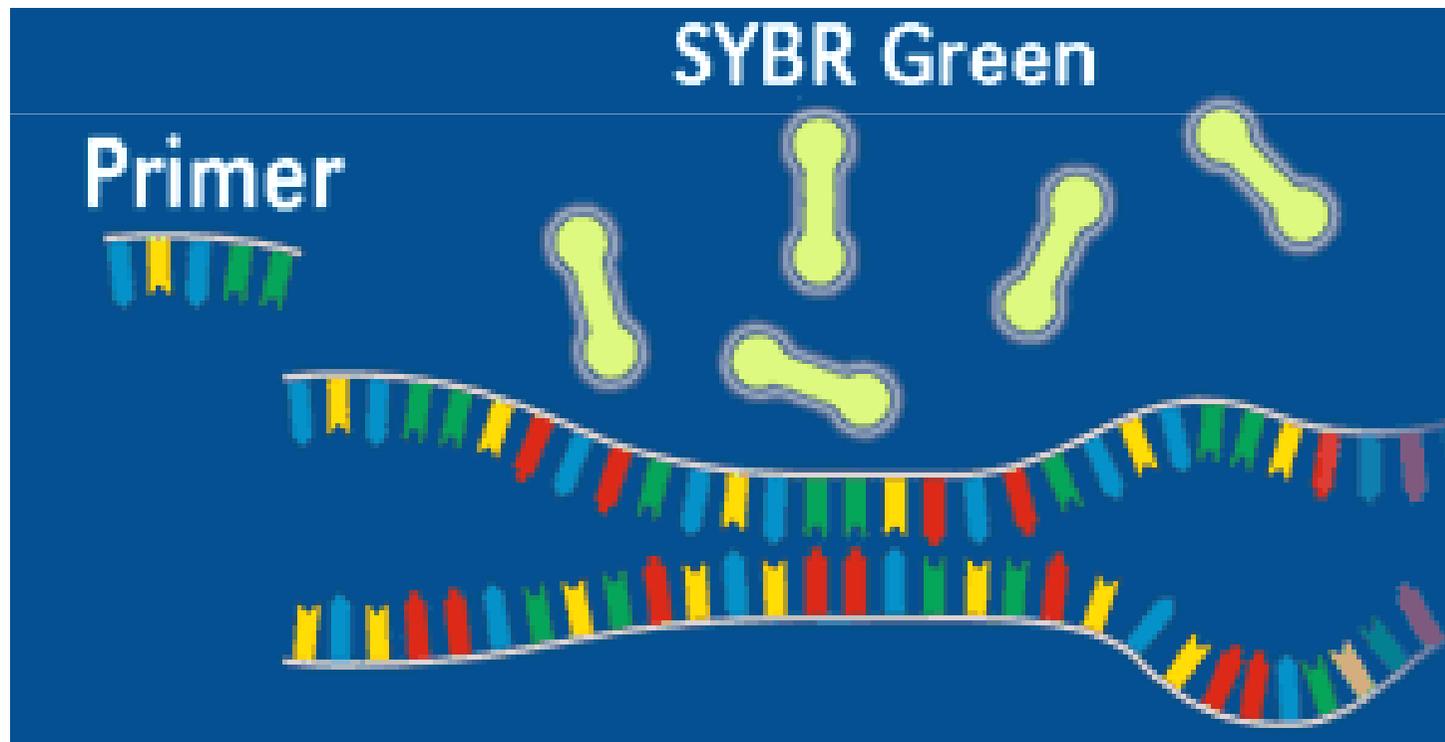
# SYBR Green: principio

Utilizza una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA



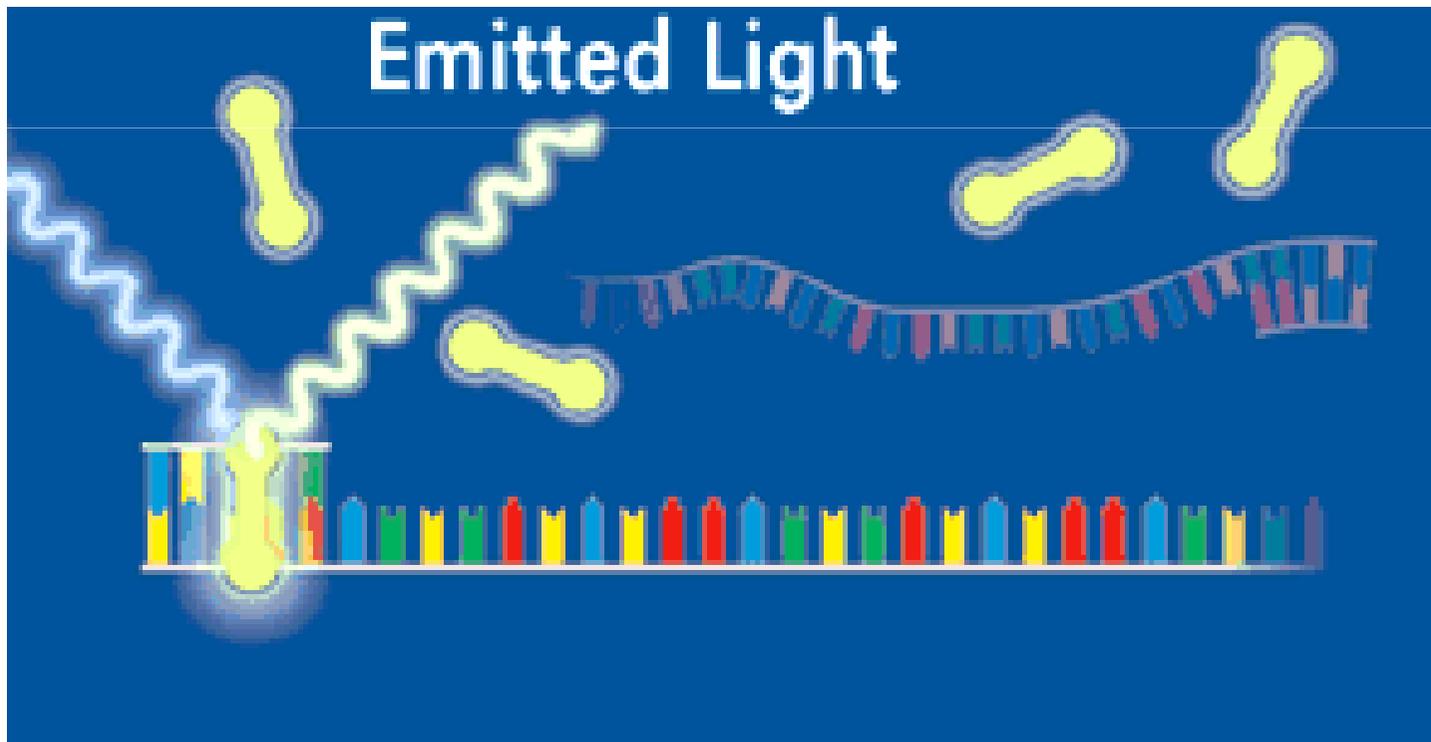
# SYBR Green

All'inizio del processo di amplificazione, la miscela di reazione contiene DNA denaturato, primers e la molecola fluorescente



# SYBR Green

Dopo l'annealing dei primers, si legano poche molecole fluorescenti alla doppia elica.





# SYBR Green

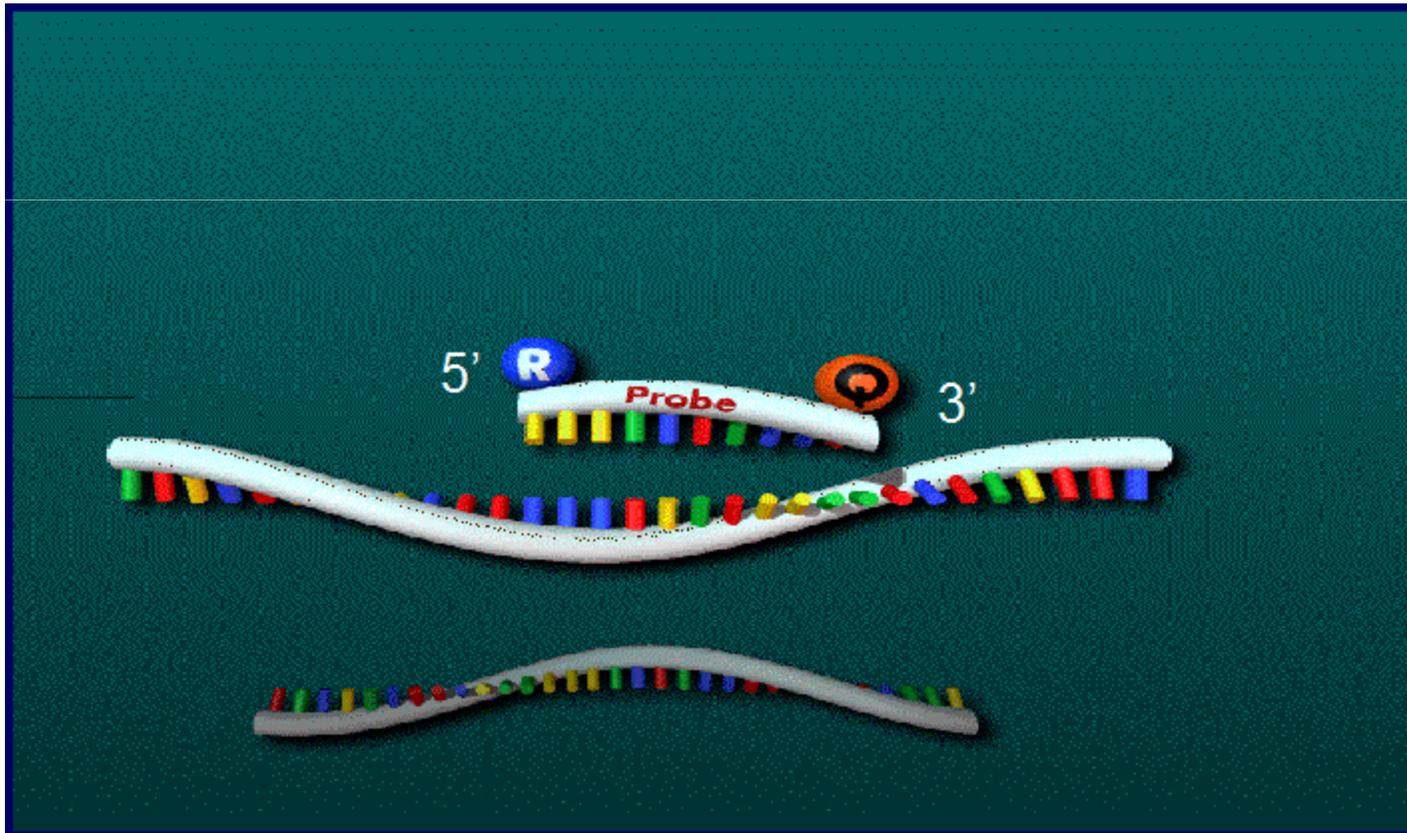
- **Metodica semplice : Possono essere utilizzati primers in uso in qualitativa**
- **Non costosa**
  
- **Non-specifica**
- **La molecola fluorescente si lega random a tutte le doppie eliche, includendo i dimeri di primers**
- **È necessario ottimizzare la metodica per evitare la formazione di prodotti aspecifici**

## **Esistono diversi tipi di sonde:**

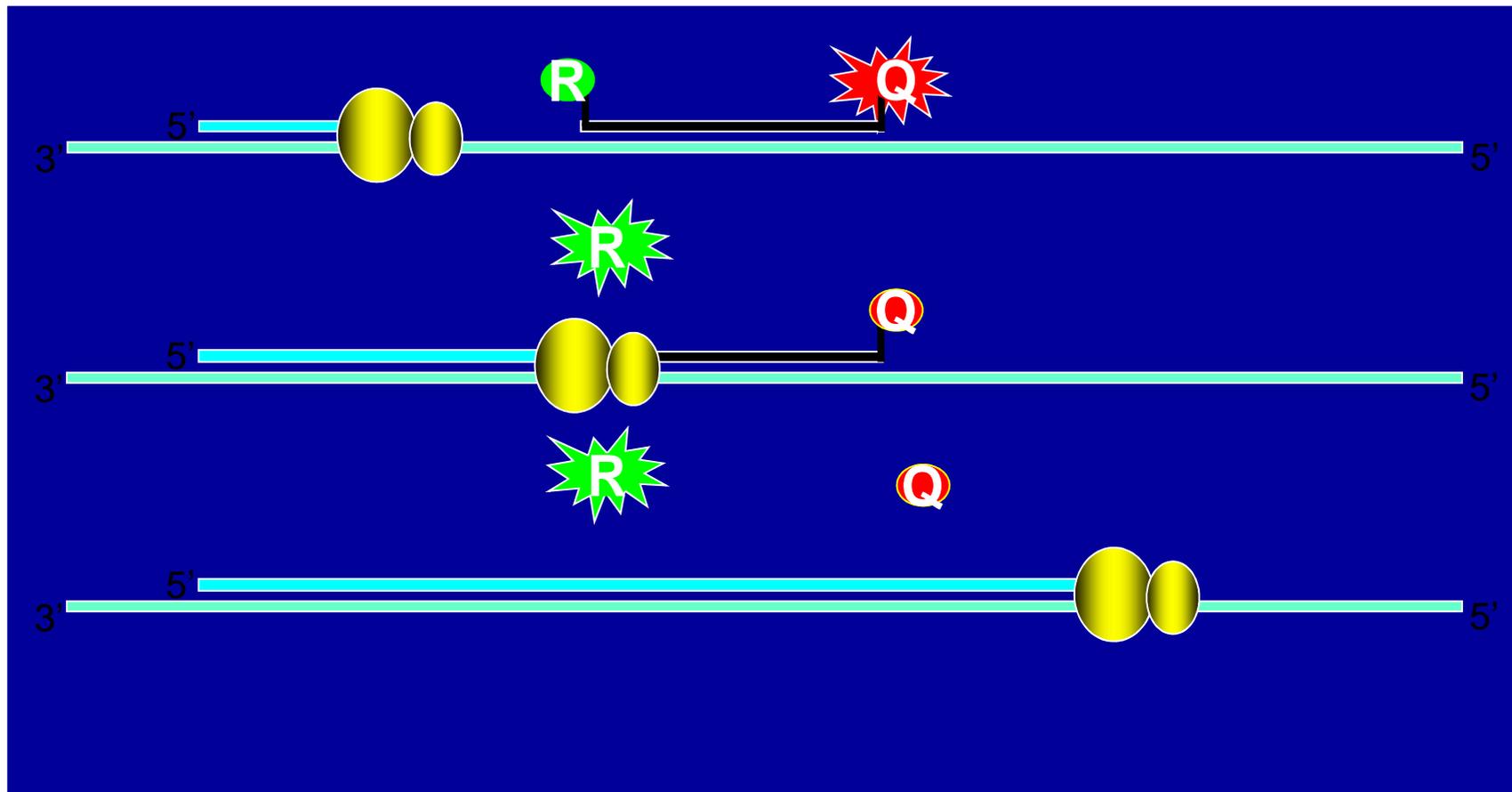
- **Dual-labeled (come le sonde TaqMan)**
- **Molecular beacons**
- **Scorpion**
- **Sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)**

# Sonda TaqMan

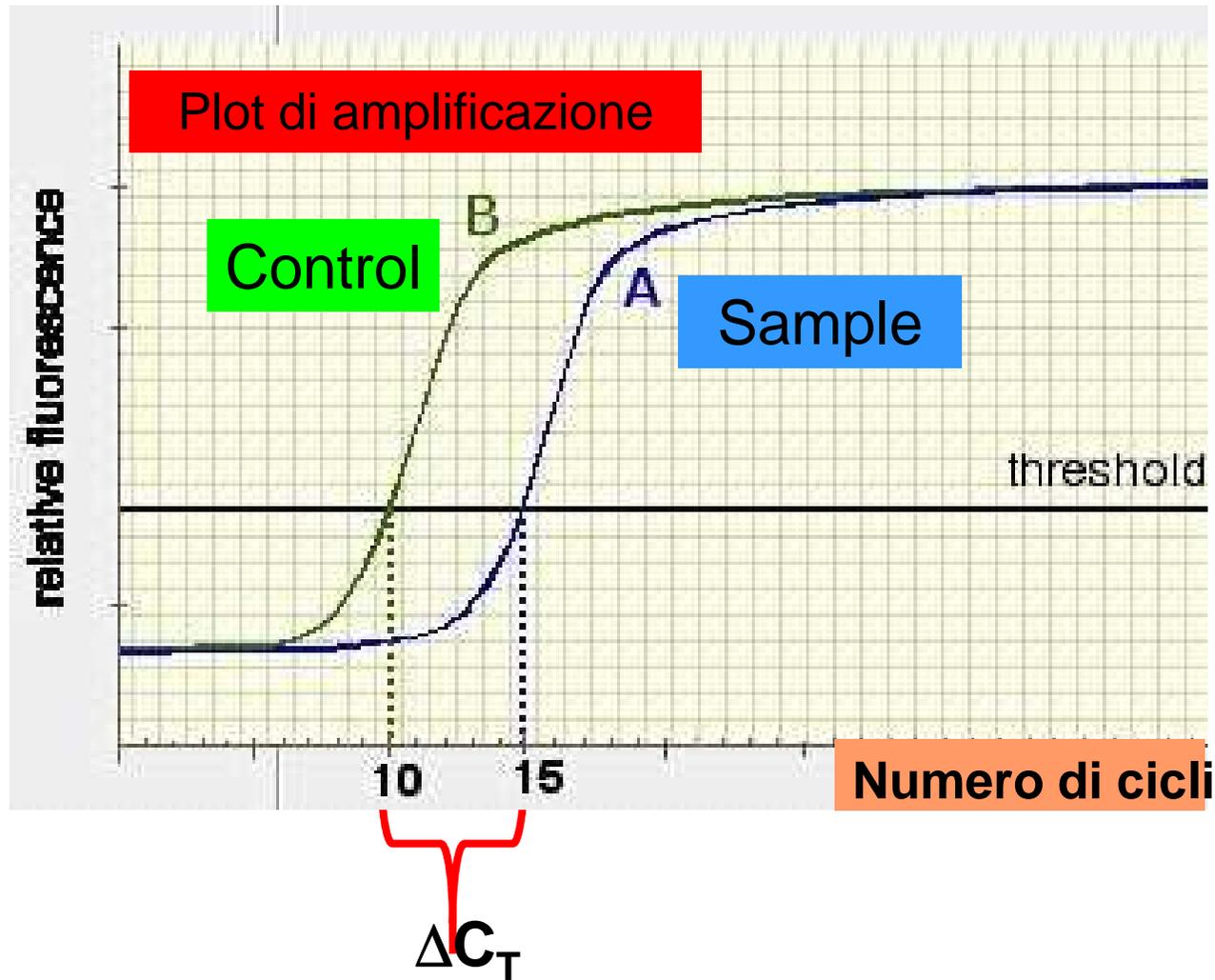
Presenta all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter" ed all'estremità 3' una molecola "Quencher"



# Real-Time PCR: attività 5'>3' esonucleasica



# Quantitativa relativa



# Quantitativa relativa: analisi dei dati

- **Normalizzare il target con un controllo endogeno (r) espresso costitutivamente ( $\Delta C_T$ )**
- **Comparare ciascun  $\Delta C_T$  così ottenuto con il  $\Delta C_T$  di un trattamento di controllo anche detto “calibratore” ( $\Delta\Delta C_T$ )**

$$2^{- (\Delta C_{T,r} - \Delta C_{T,cb})} = 2^{- \Delta\Delta C_T}$$

- **Il valore così ottenuto permette di determinare la concentrazione relativa del target**

# ESEMPIO DI ANALISI

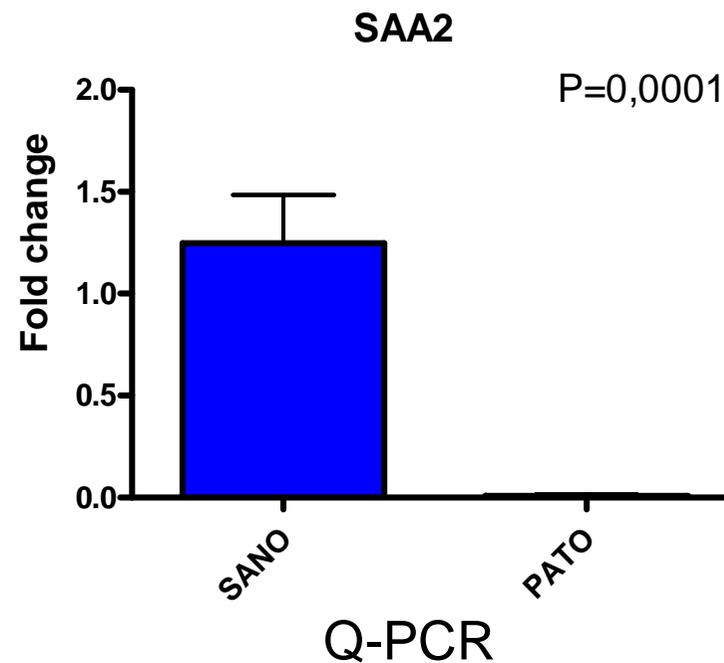
	Ct	Ct 18s	Media Ct	Media Ct 18s	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	Potenza $2^{-\Delta\Delta Ct}$
SANO	31,24	21,44					
	31,16	20,86					
	31,33	21,12	31,24	21,14	10,10	0,00	1,0
PATOLOGICO	36,11	27,21					
	36,1	27,41					
	36,54	27,63	36,25	27,42	8,83	-1,27	2,4

# Validazione dei dati del Microarray mediante Real Time (Q-PCR)

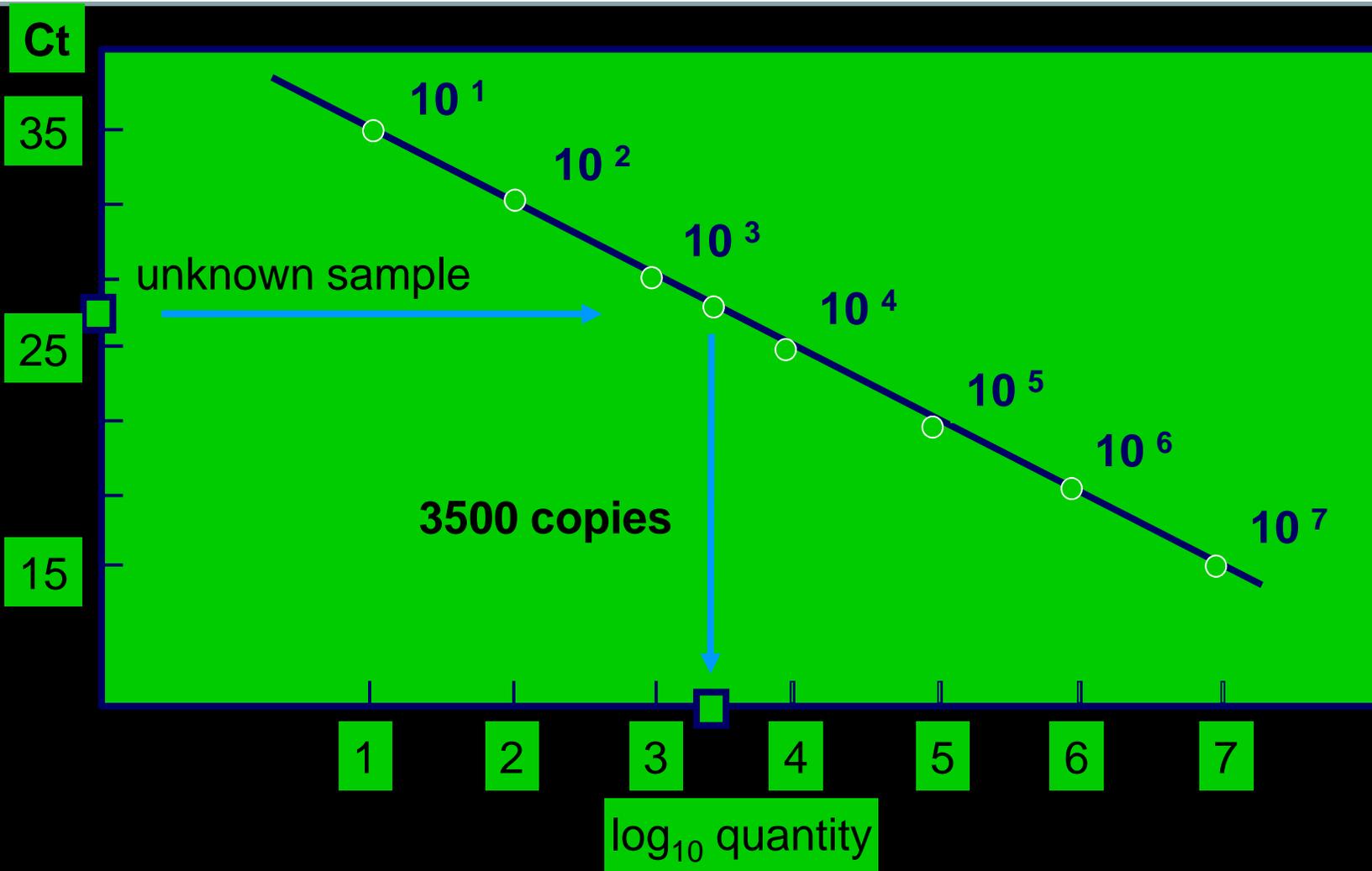
Gene SAA2, famiglia di apolipoproteine associate a HDL nel plasma, coinvolto nella risposta infiammatoria

Microarray : diversità di espressione tra NAA e AA di 100:1,  $p=0,0026$

Q-PCR :



# Quantitativa assoluta



Il valore così ottenuto viene normalizzato rispetto a quello di un gene espresso costitutivamente ( $\beta$ -actina, GAPDH, ATPs,  $\beta_2$  etc)

# Functional Genomics *Levels*

- ✓ Genome to transcriptome
- ✓ Transcriptome to proteome
- ✓ Proteome to dynamic system
- ❑ Dynamic systems to phenotype

# Gene Expression Profile of Aging and Its Retardation by Caloric Restriction

ORF	$\Delta$ Age (fold)	Gene	Function	CR Prevention
W08057	↑ 3.5	Heat Shock 27 kDa Protein	Chaperone	C
M17790	↑ 3.5	Serum Amyloid A Isoform 4	Unknown	N
AA114576	↑ 3.4	Heat Shock 71 kDa Protein	Chaperone	C
L28177	↑ 2.6	GADD45	DNA damage response	77%
M74570	↑ 2.4	Aldehyde Dehydrogenase II	Aldehyde detoxification	29%
AA059662	↑ 2.2	Protease Do Precursor	Protease	C
L22482	↑ 2.2	HIC-5	Senescence and differentiation	C
X99963	↑ 2.2	rhoB	Unknown	87%
X65627	↑ 2.1	TNZ2	RNA metabolism	64%
X57277	↑ 1.8	Rac1	JNK activator	C
AA071777	↑ 3.8	Synaptic Vesicle Protein 2	Neurite extension	51%
X53257	↑ 2.5	Neurotrophin-3	Reinnervation of muscle	50%
X78197	↑ 2.2	AP-2 Beta	Neurogenesis	N
X89749	↑ 2.1	mTGIF	Differentiation	C
AA014024	↑ 2.1	Dynactin	Transport	55%
X63190	↑ 2.1	PEA3	Response to muscle injury	C
AA106112	↑ 3.8	Mitochondrial Sarcomeric Creatine Kinase	ATP generation	C
AA061886	↑ 2.0	Dihydropyridine-sensitive L-type Calcium Channel	Calcium channel	67%

 Energy Metabolism

 Protein Metabolism

 Biosynthesis

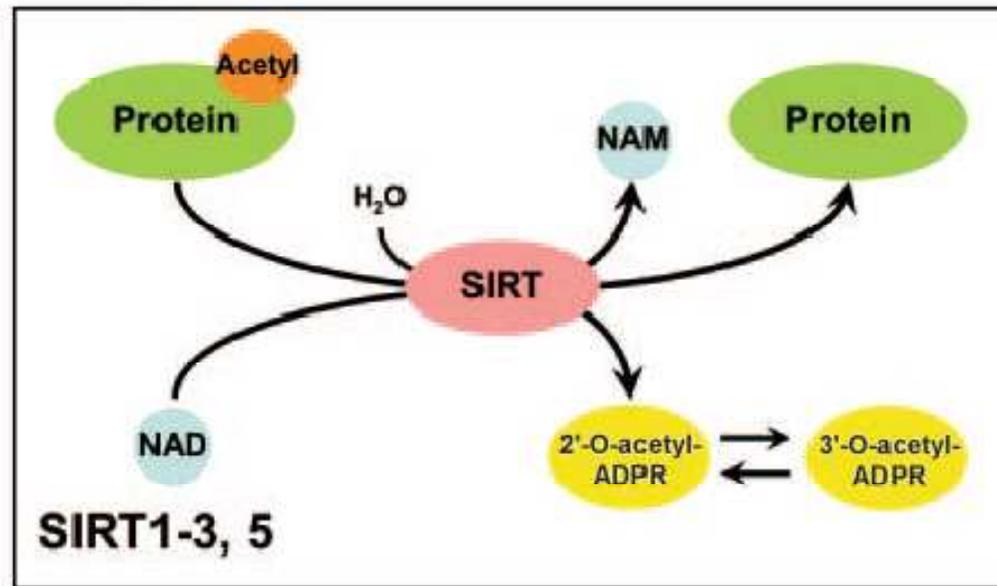
 Neuronal Factors

 Stress Response

 Calcium Metabolism

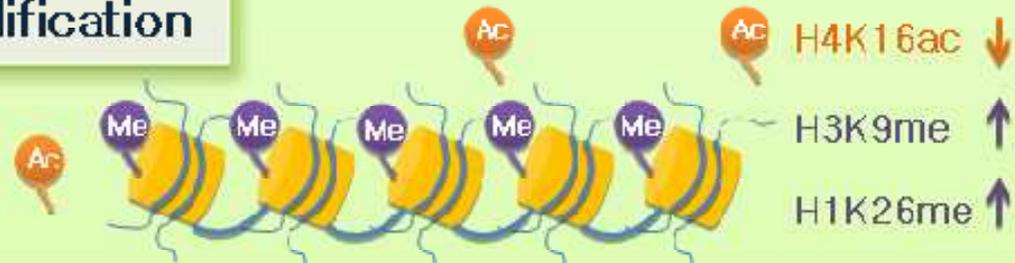
- Aging-related changes in gene expression in mouse gastrocnemius muscle. The extent to which caloric restriction prevented age-associated alterations in gene expression is denoted as either C (complete, .90%), N (none), or partial (20 to 90%, percentage effect indicated). The fold increase shown represents the average of all nine possible pairwise comparisons among individual mice

## Deacetylation



Sirtuins (SIRT1–SIRT3, SIRT5) catalyze a deacetylation reaction in which an acetyl group is transferred to the ADPribose (ADPR) moiety of NAD and 2-*O*-acetyl-ADPR is produced. 3-*O*-acetyl-ADPR is formed nonenzymatically from 2-*O*-acetyl-ADPR.

## Histone modification



Gene silencing / Heterochromatin formation