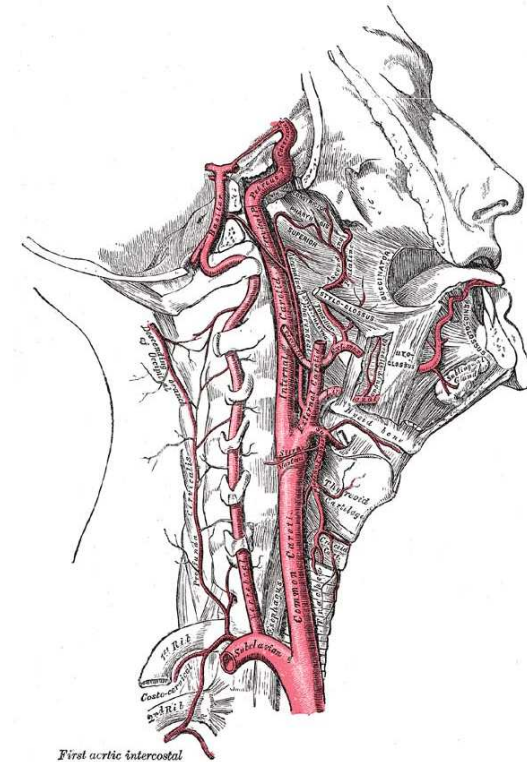
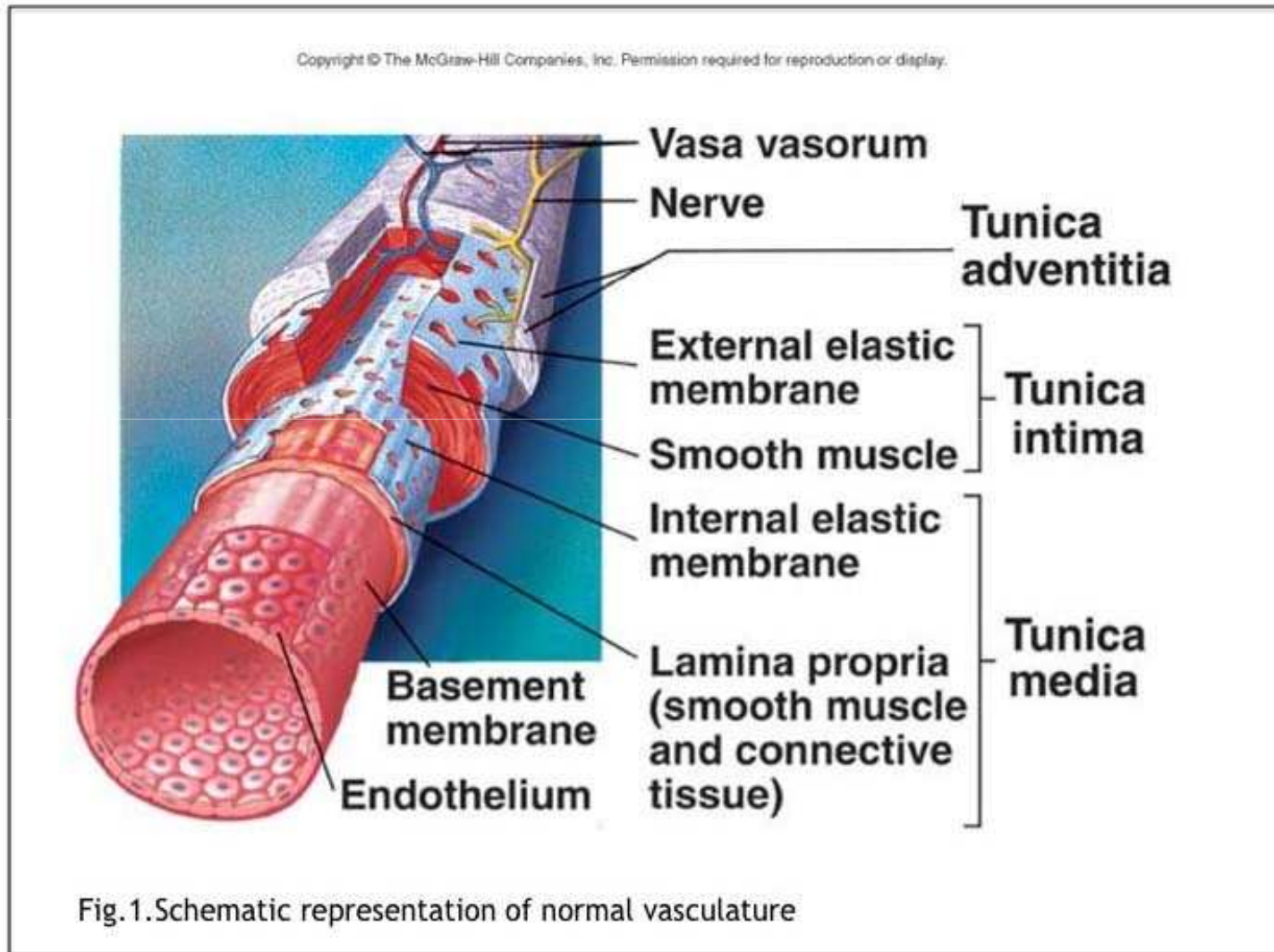




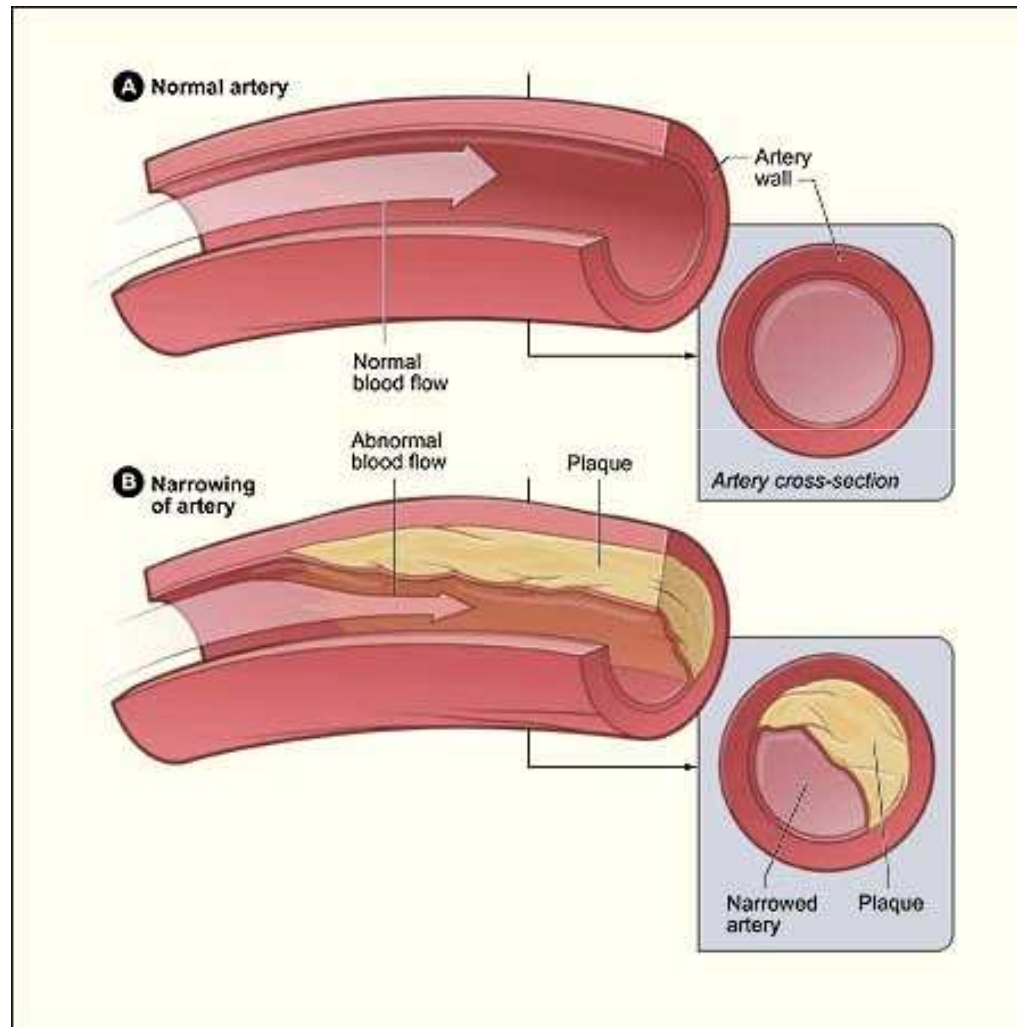
**Componenti cellulari e molecolari del
processo aterosclerotico:
Colture primarie e caratterizzazione delle
cellule muscolari lisce vascolari (VSMC)
umane da lesioni aterosclerotiche
carotidee**



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



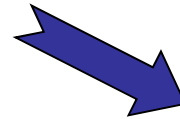
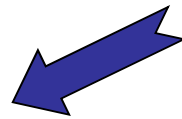
- Diminuità elasticità
- Stenosi

Il processo Aterosclerotico



Malattia multifattoriale

Fattori di rischio cardiovascolare



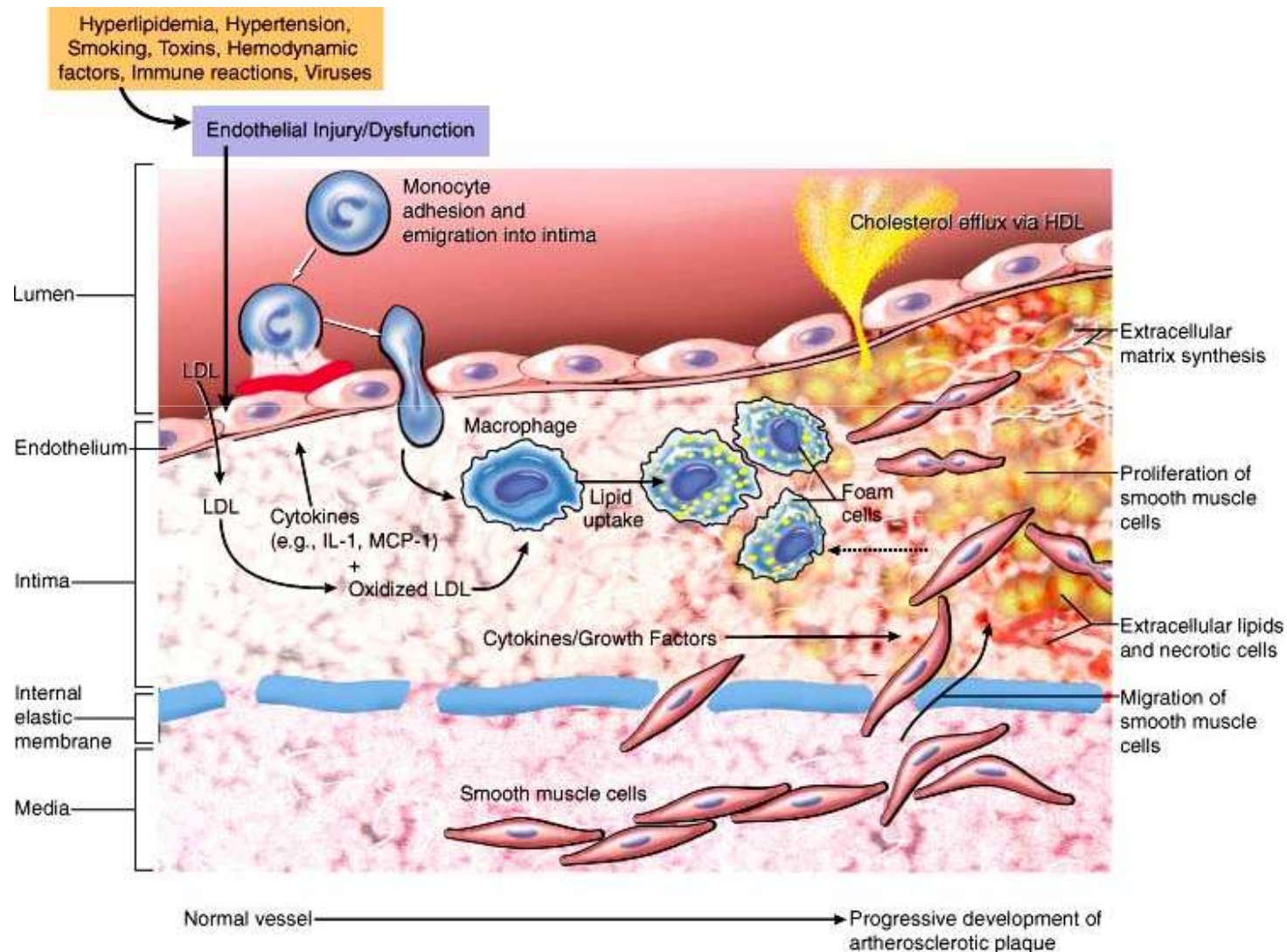
Modificabili

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

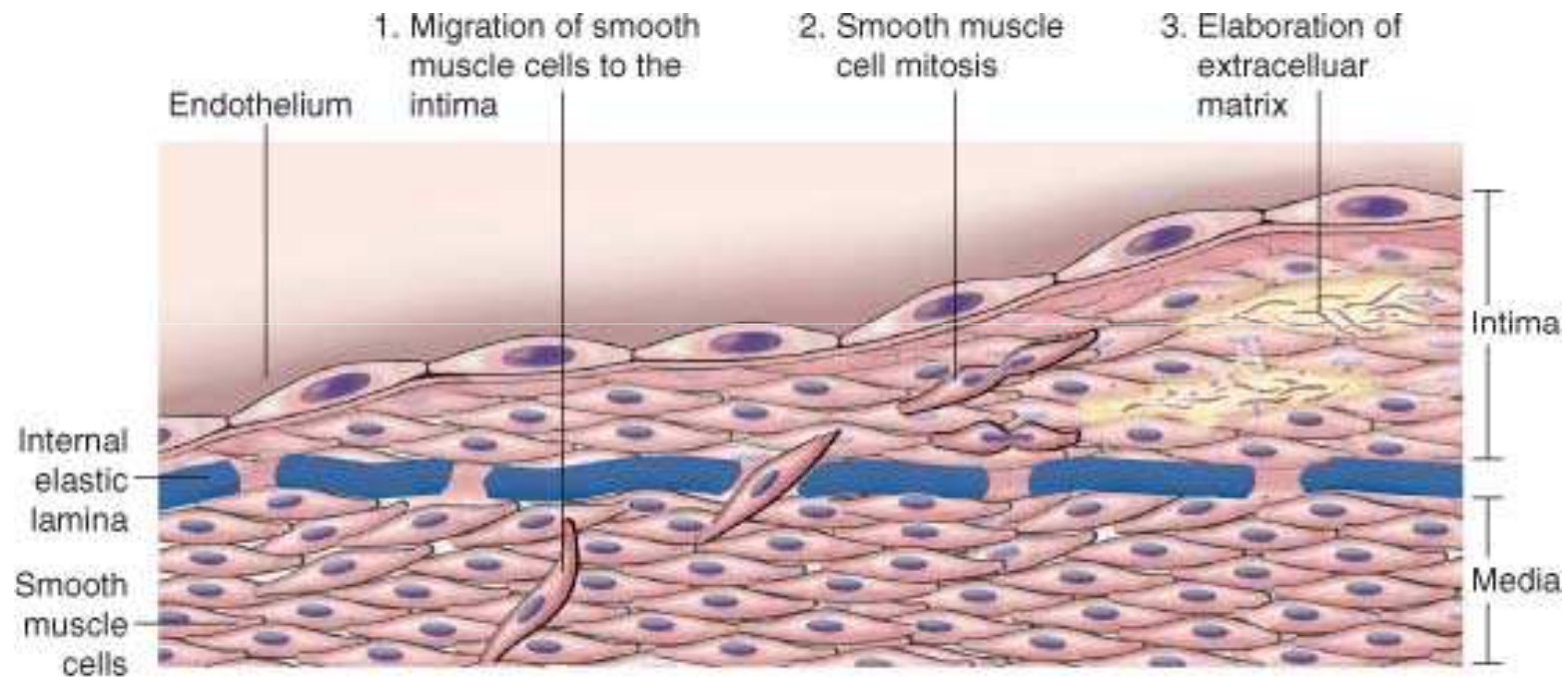
Non modificabili

- Età
- Sesso
- Familiarità

Sviluppo e progressione della Placca Aterosclerotica



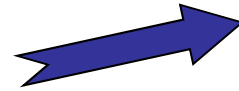
Ruolo delle cellule muscolari lisce vascolari nella placca aterosclerotica



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

Terapia dell'aterosclerosi

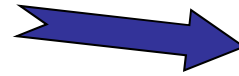
Farmaci



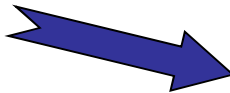
Statine



Fibrati

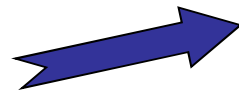


Resine



Acido acetilsalicilico
(potere antiaggregante)

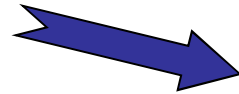
Intervento chirurgico



Angioplastica

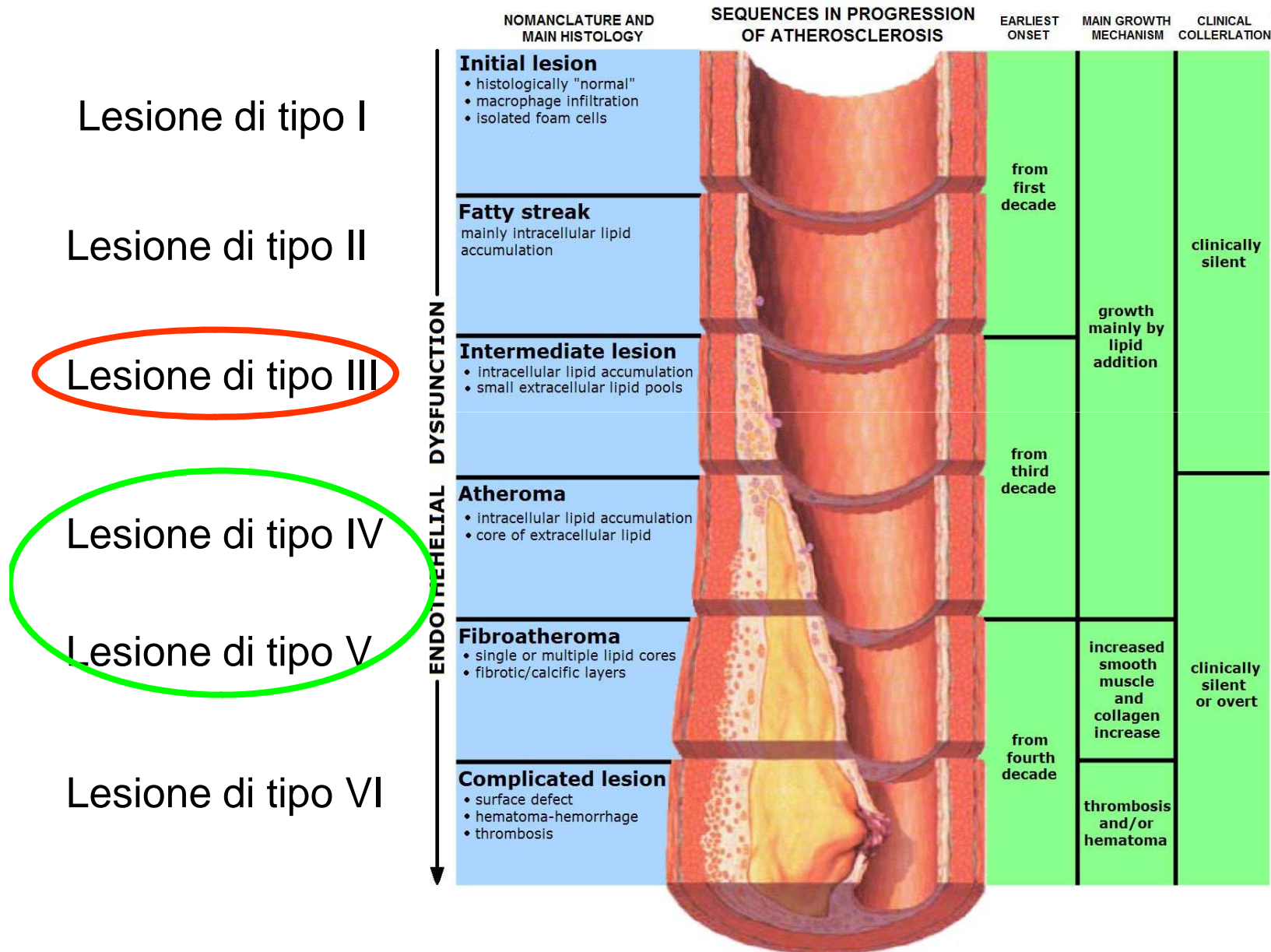


Bypass

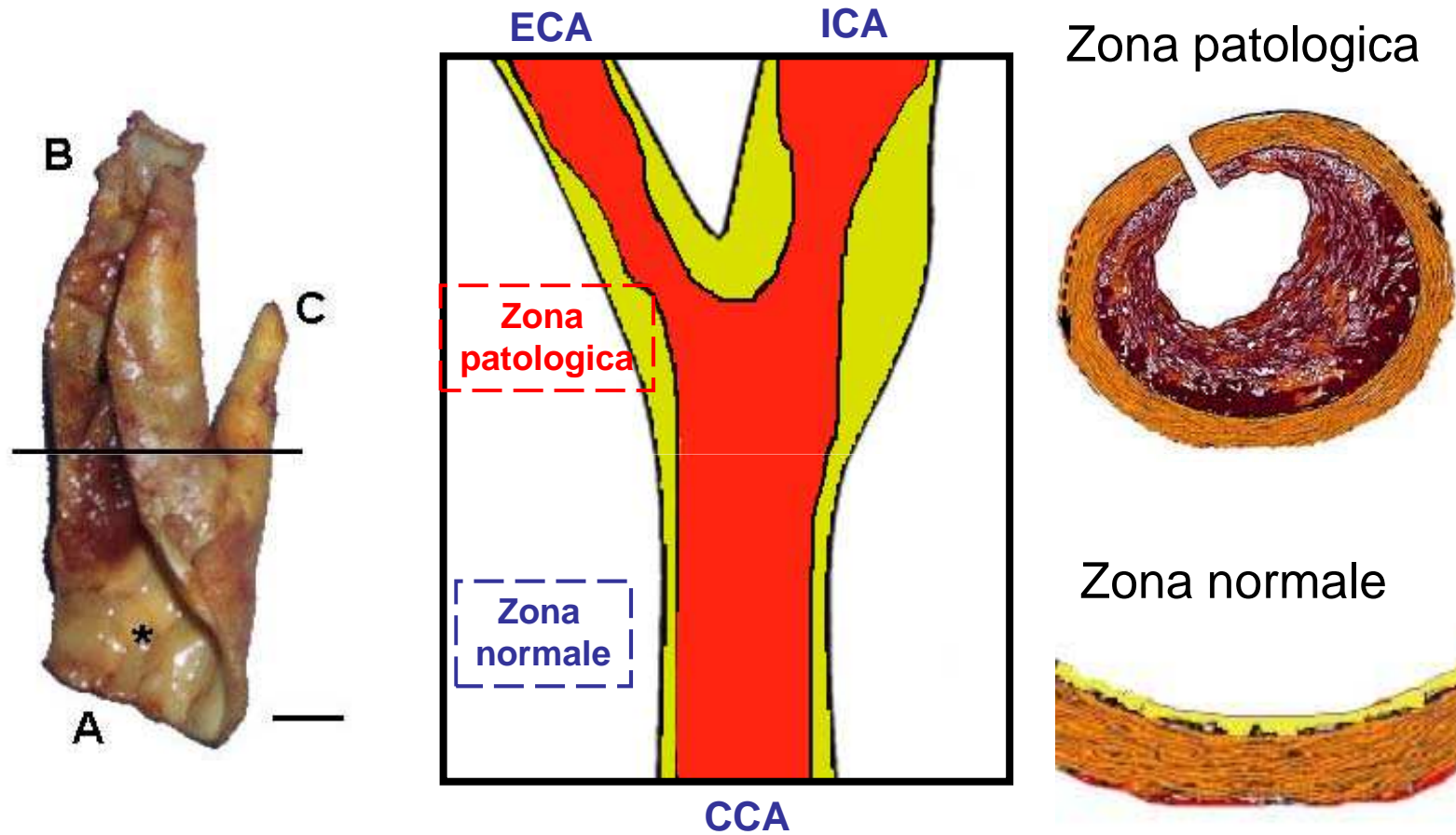


TEA
(Tromboendarteriectomia)

Classificazione dei tipi delle lesioni



Espianti tissutali derivanti da Tromboendarterectomia carotidea (TEA)

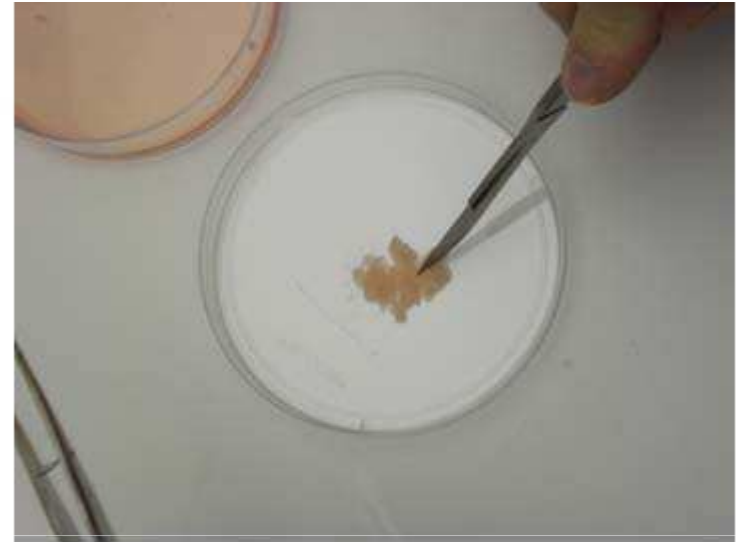


C = Arteria carotidea esterna (ECA))

B = Arteria carotidea interna (ICA)

A= Arteria carotidea comune (CCA)

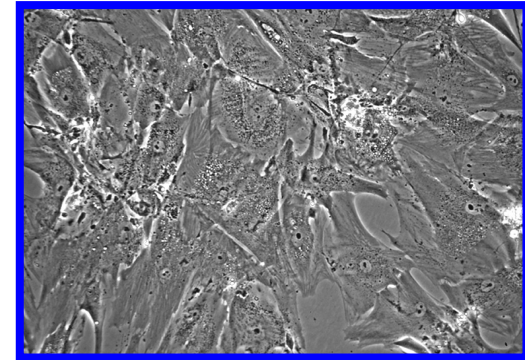
Espianto tissutale



Espianto tissutale dalla zona normale

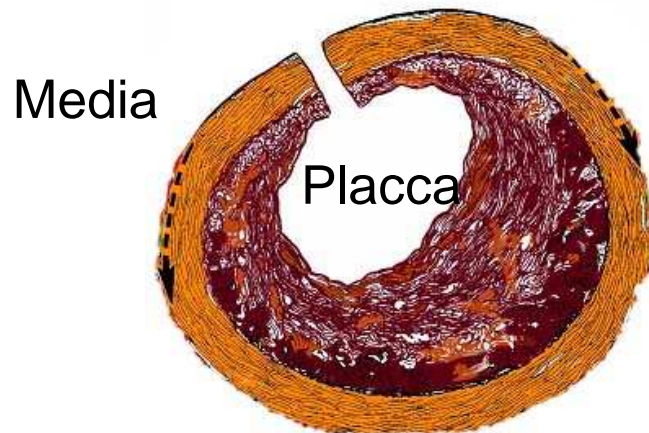


Crescita a monostrato

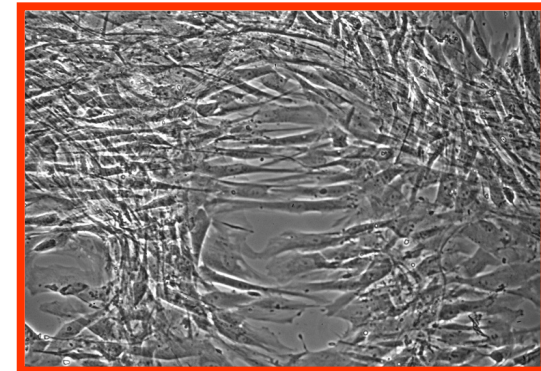


LARGE (L-SMC)

Espianto tissutale dalla zona patologica

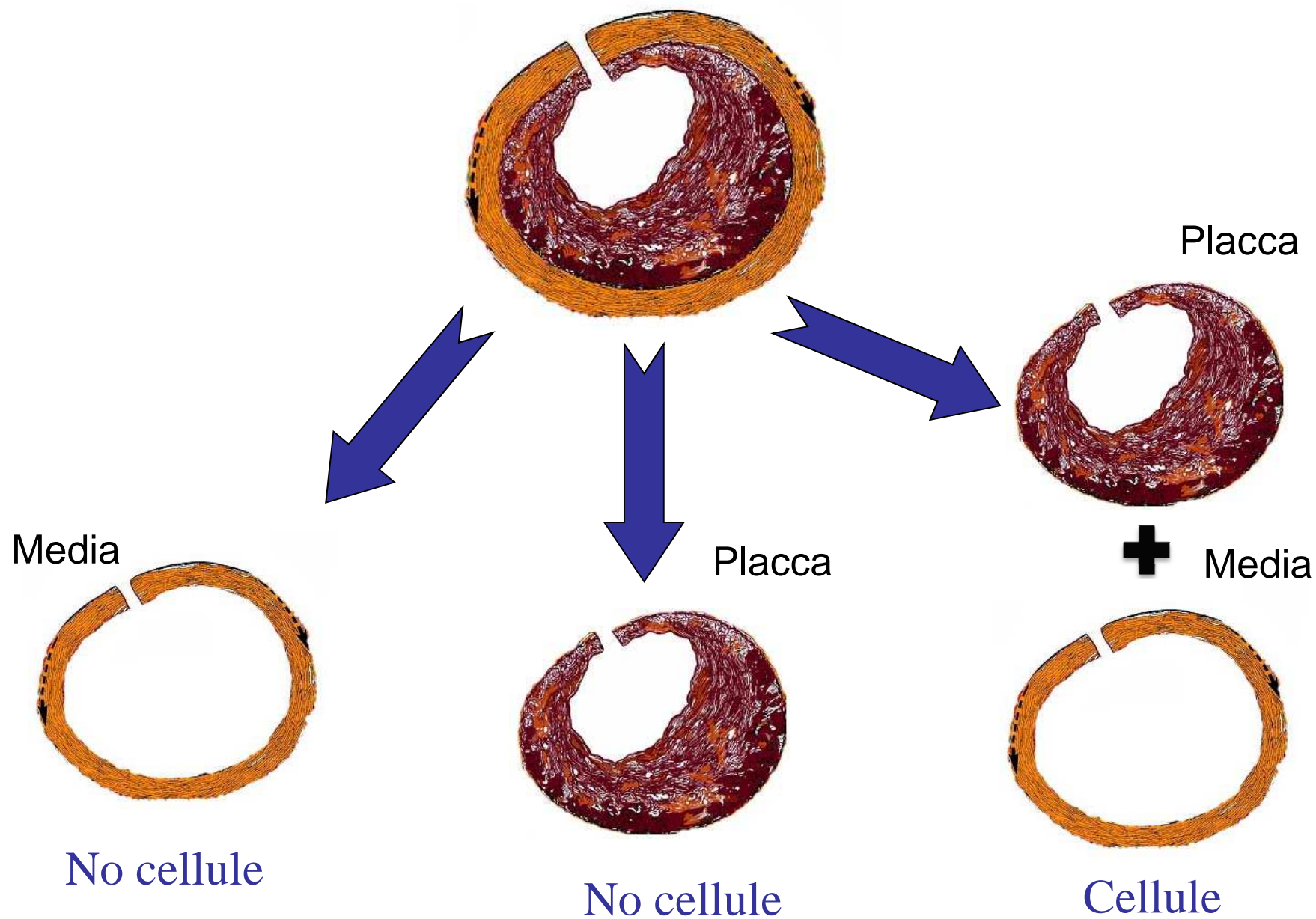


Crescita a multistrato



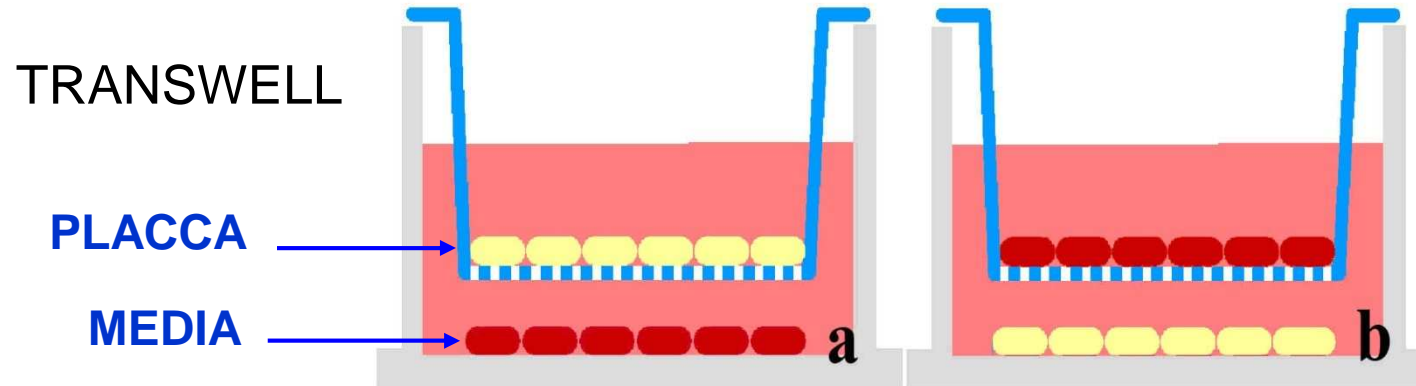
SMALL (S-SMC)

Crescita cellulare dalla zona patologica



Co-cultura

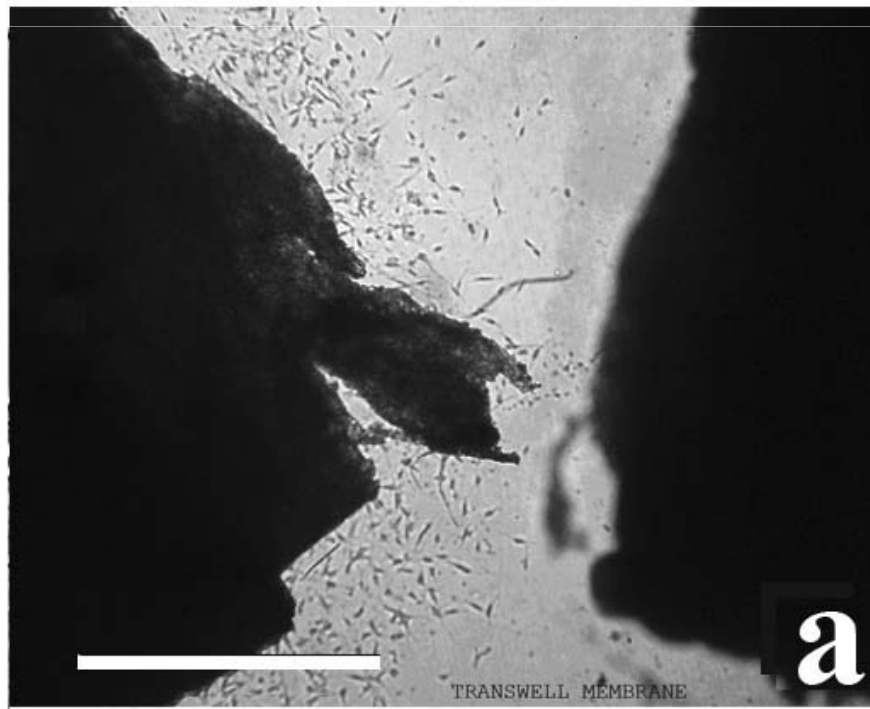
Da dove proliferano le cellule?



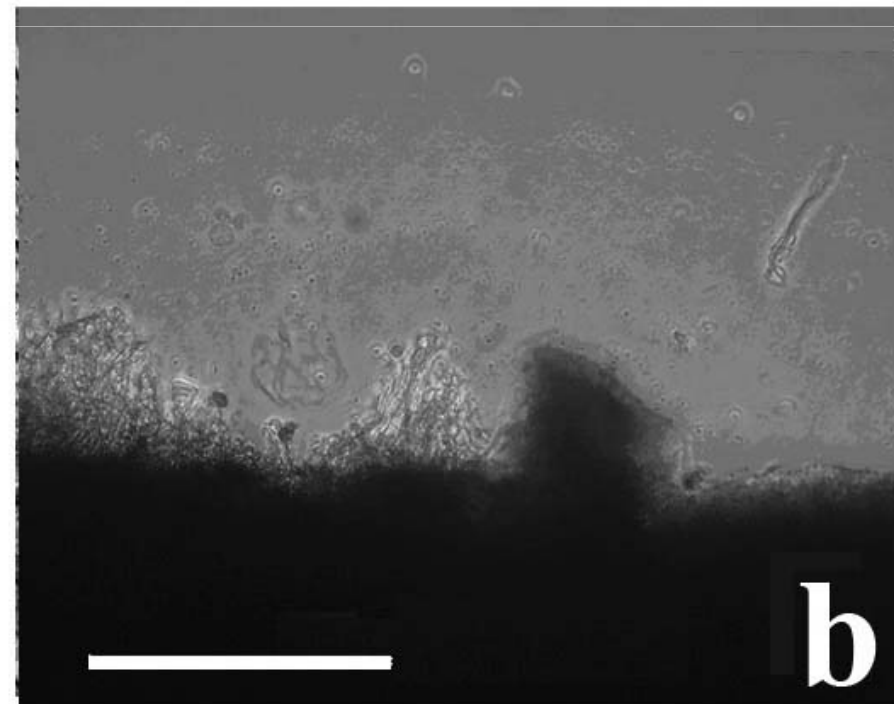
Numero di casi	orientamento rispetto alla membrana	Numero di esperimenti	strato	outgrowth ratio
7	<i>M up - P down</i>	11	M	6/11
			P	0/11
	<i>P up - M down</i>	9	M	4/9
			P	0/9

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

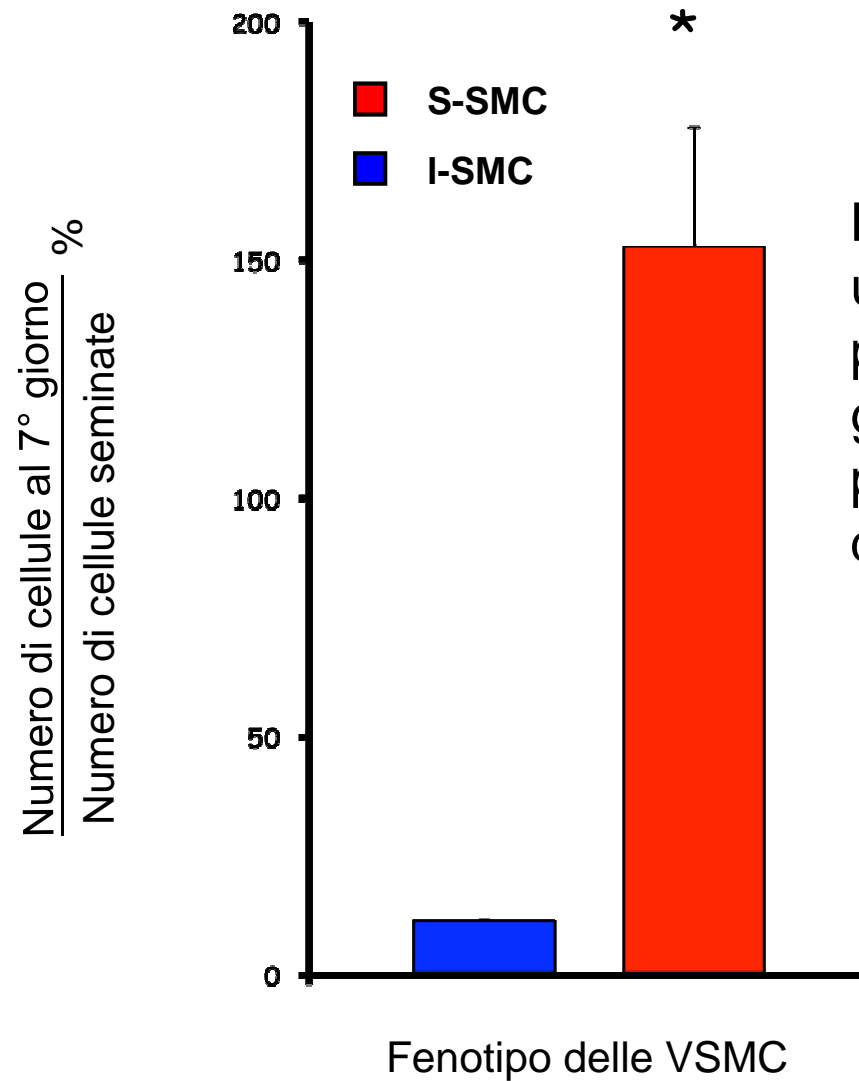
**FUORIUSCITA DI CELLULE
DALLA TONACA MEDIA**



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

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

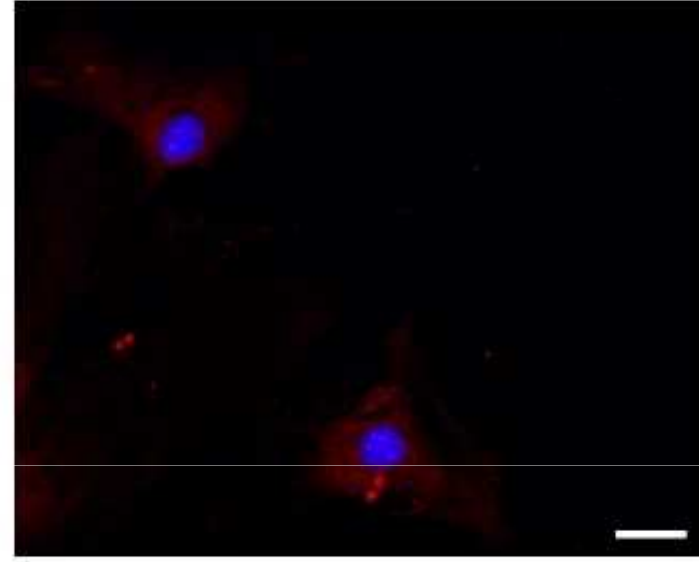
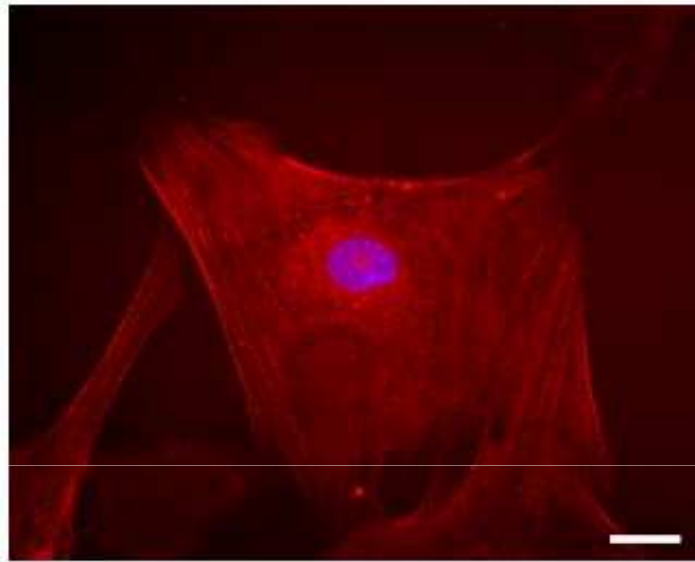
Miosina → È un esamero composto da 2 catene pesanti (**SMMHC**), da 2 catene leggere (SMMLC) e da 2 catene fosforilabili, compare più tardivamente nello sviluppo delle SMC

Marcatori di espressione delle VSMC

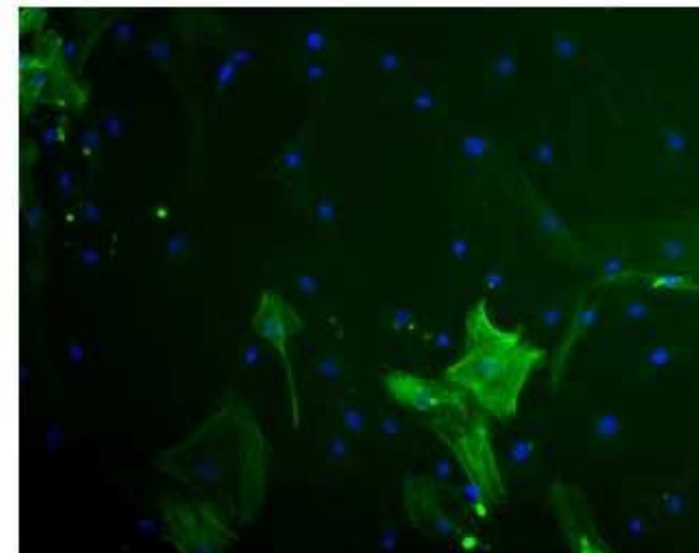
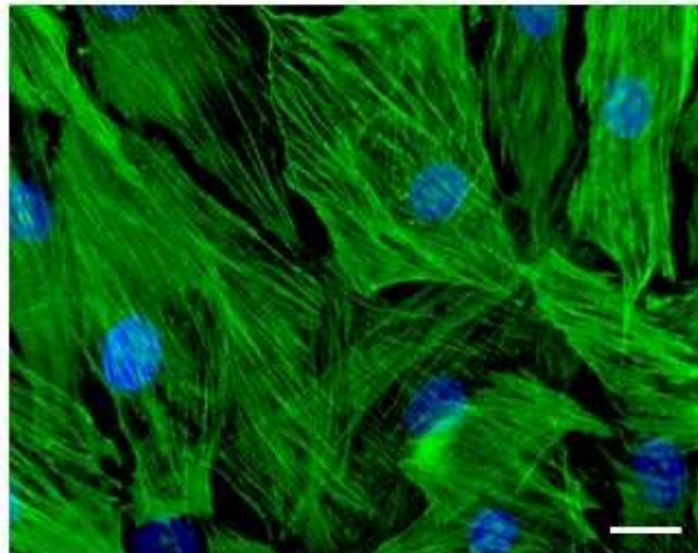
L-SMC

S-SMC

SMMHC



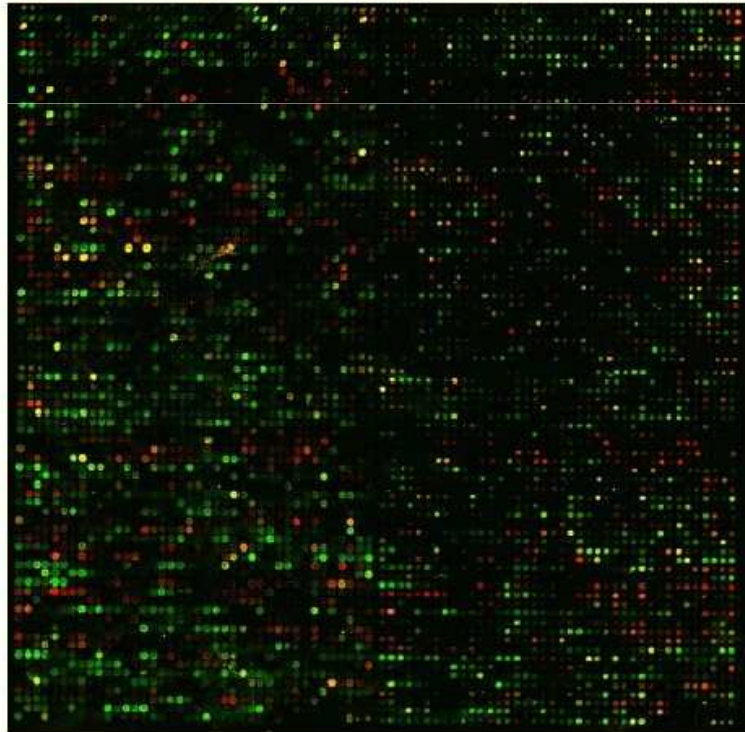
α -SMA



Esperimenti di Microarray

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

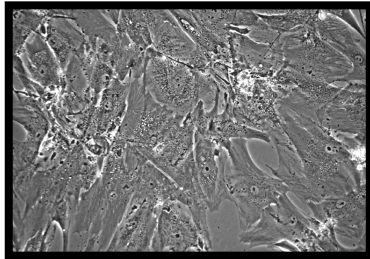
Matrice solida di vetro, plastica o silicio su cui sono immobilizzare, in posizione ben definita, migliaia di molecole di DNA (probe)



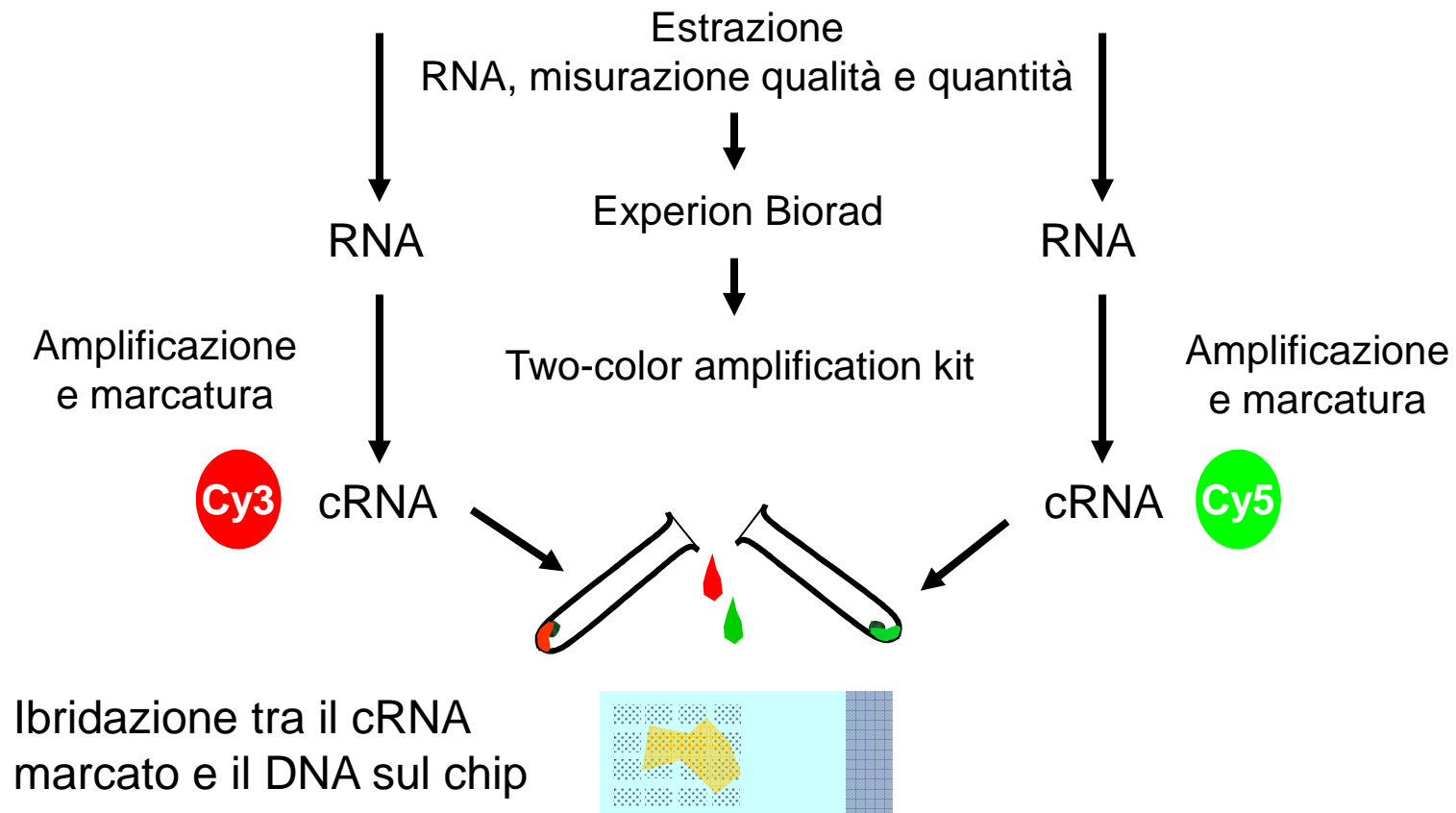
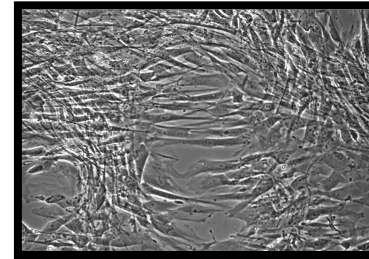
- Permettono l'analisi dell'espressione genica di migliaia di geni simultaneamente
- Sfruttano una tecnica di ibridazione inversa
- Il campione da analizzare viene marcato con delle cianine

Preparazione dei campioni per Microarray

LARGE(L)-SMCs



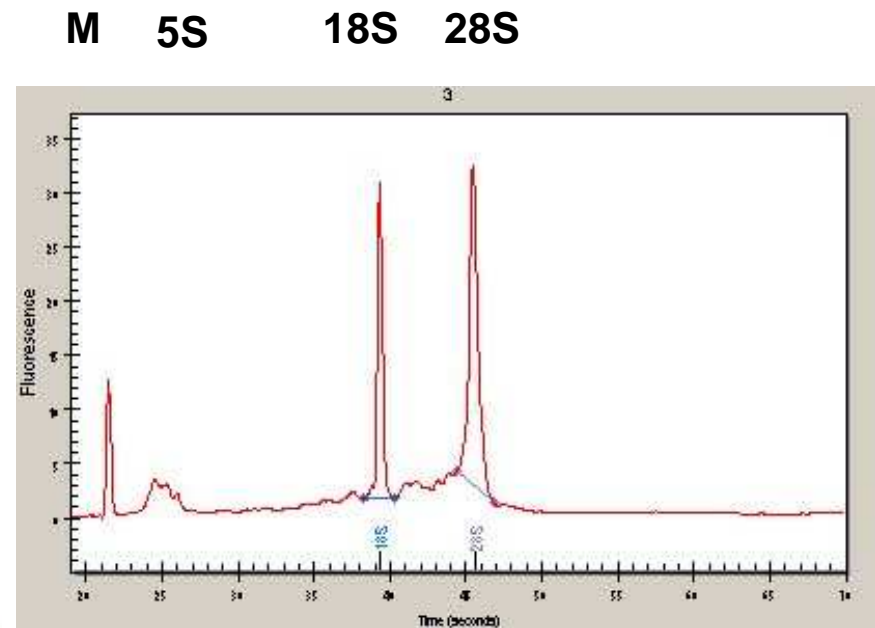
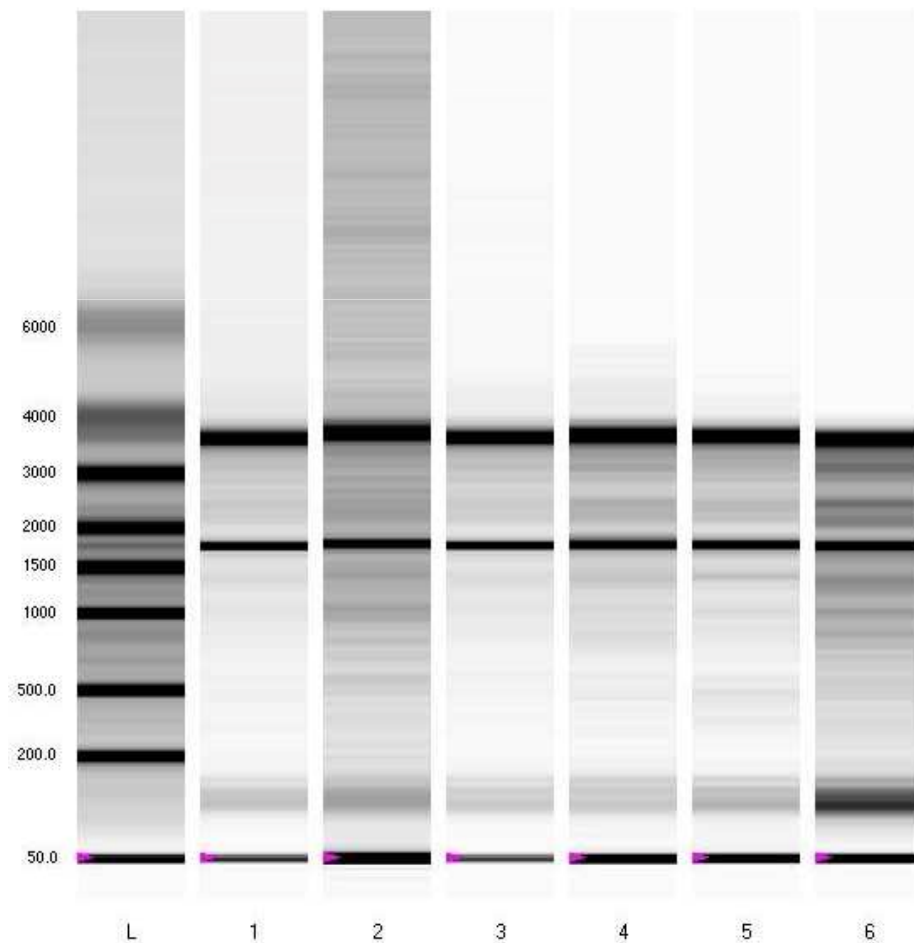
SMALL(S)-SMCs



Qualità dell'RNA

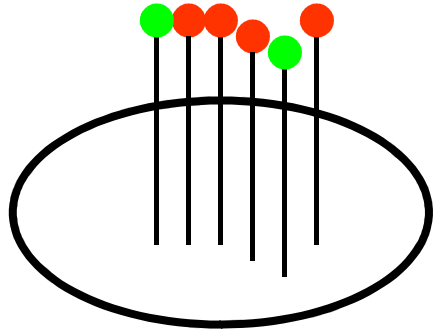
Experion Biorad

M Pt1 Pt2 Pt3



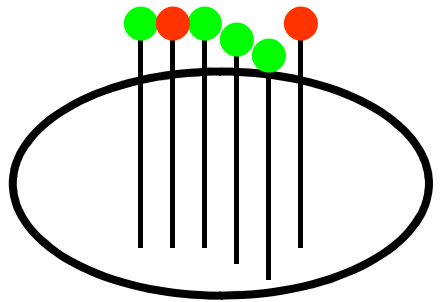
$1,3 < R (28S/18S) > 1,5$
 $8,8 < RQI > 9,8$

Misure di Intensità



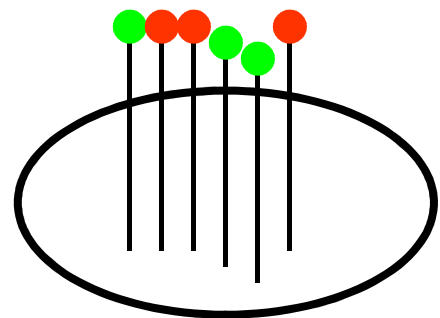
$$\text{Cy3} > \text{Cy5}$$

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 ≥ 2 e $P < 0,05$

Analisi gene ontology (GO)

Geni up-regolati nelle L-SMC

Fig.25

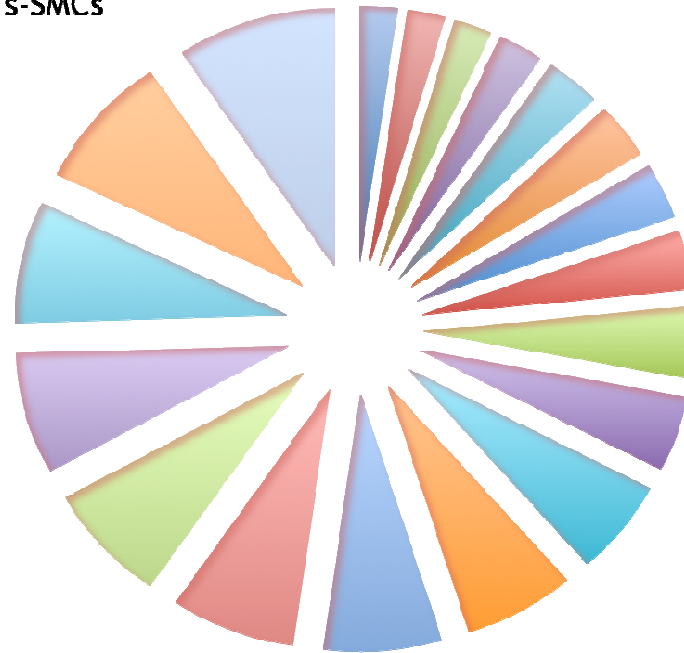
GO analysis obtained from genes upregulated in l-SMCs



- 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	Δ 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

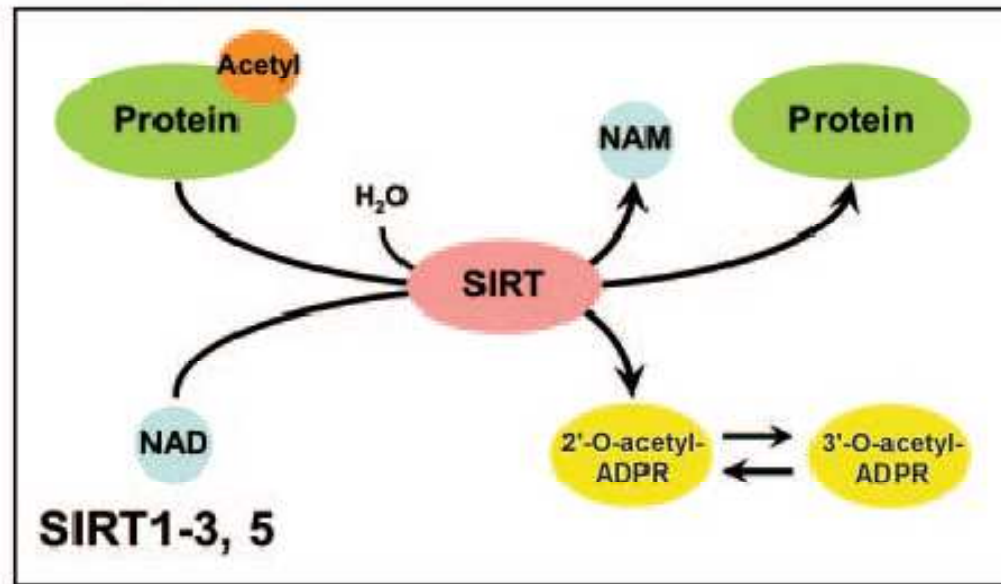
- Aging-related changes in gene expression in mouse gastrocnemius muscle. The extent to which caloric restriction prevented age-associated alterations in gene expression is denoted as either C (complete, .90%), N (none), or partial (20 to 90%, percentage effect indicated). The fold increase shown represents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

Gene Expression Profile of Aging and Its Retardation by Caloric Restriction

Δ 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	

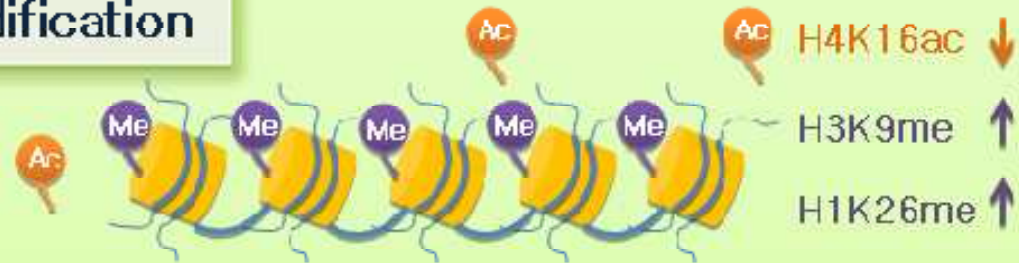
 Stress Response

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

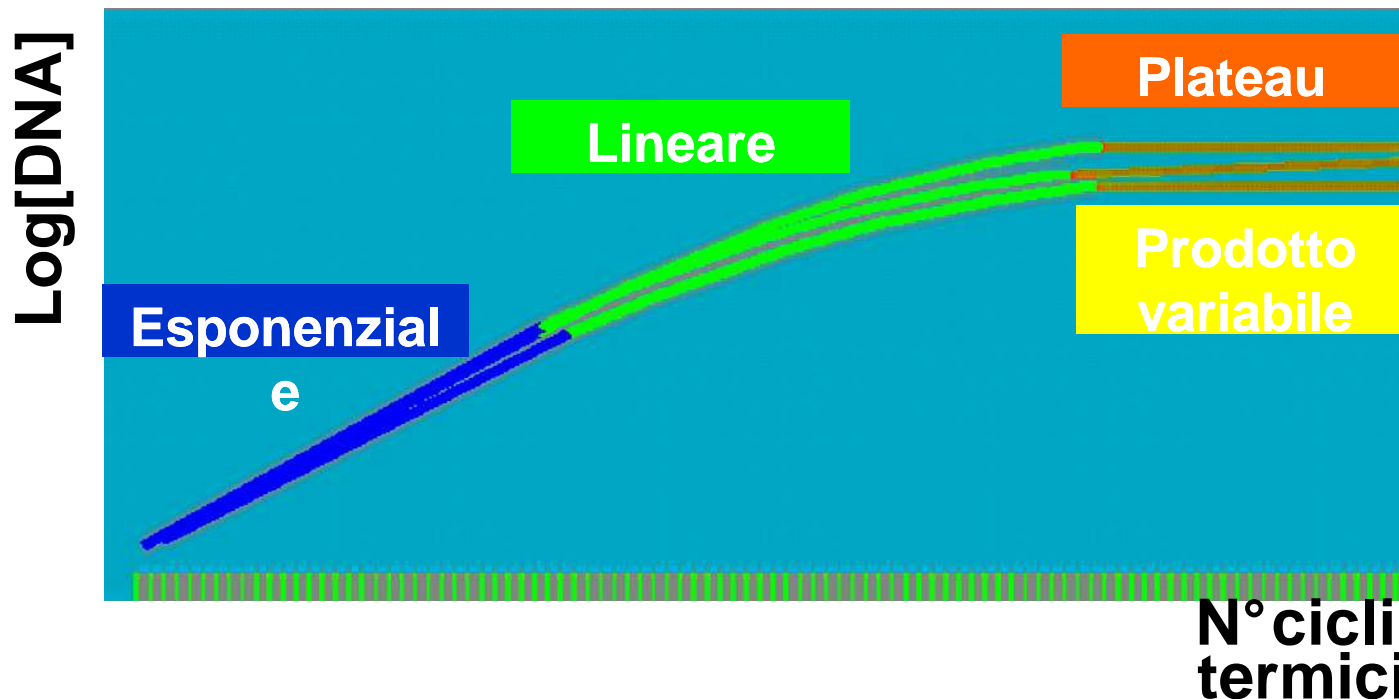
Polymerase Chain Reaction: resa

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

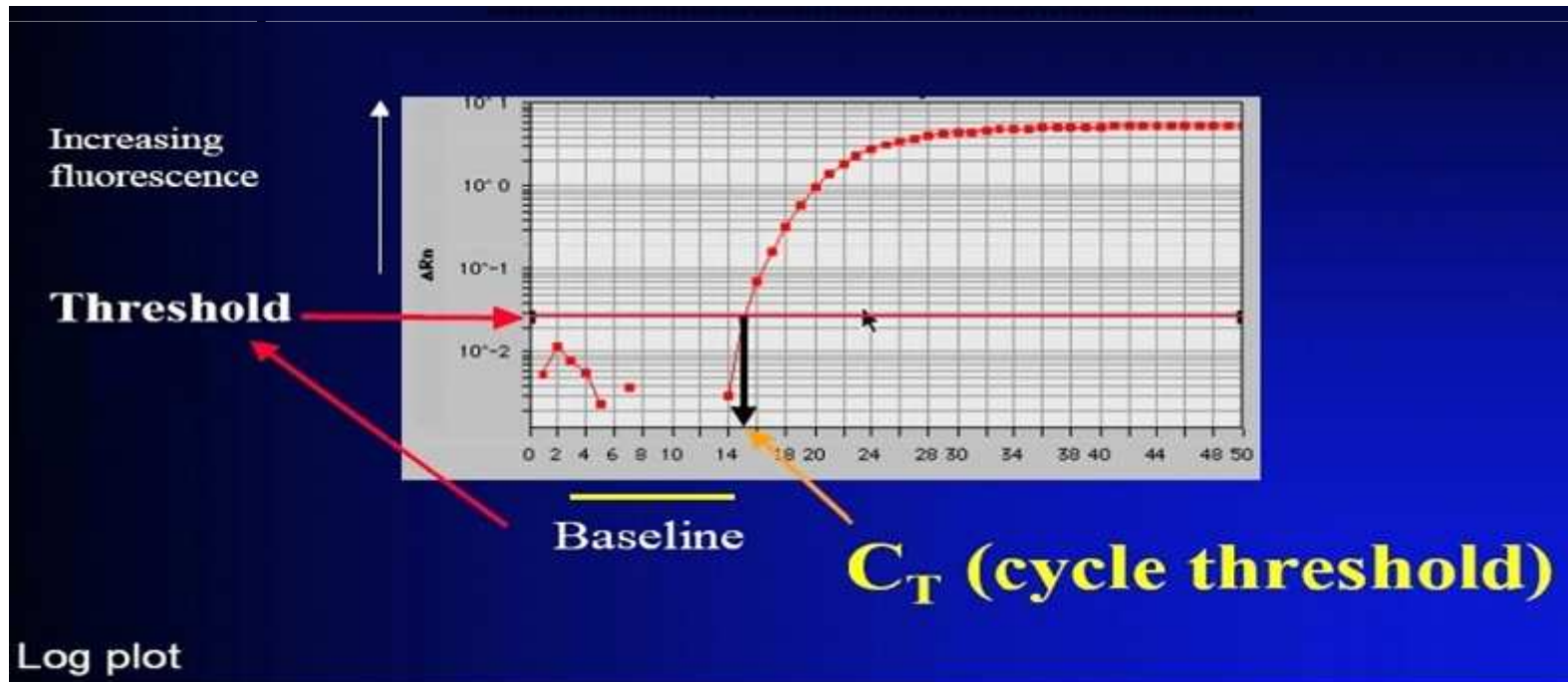
- Resa effettiva: **effetto plateau**
- Il processo di duplicazione non procede “all’infinito”, esso è limitato da:
 - Quantità dei primers
 - Attività della Taq polimerasi
 - Reannealing dei filamenti
- Raggiunto il plateau non si osserva più un incremento nei prodotti

Perché Real-Time?

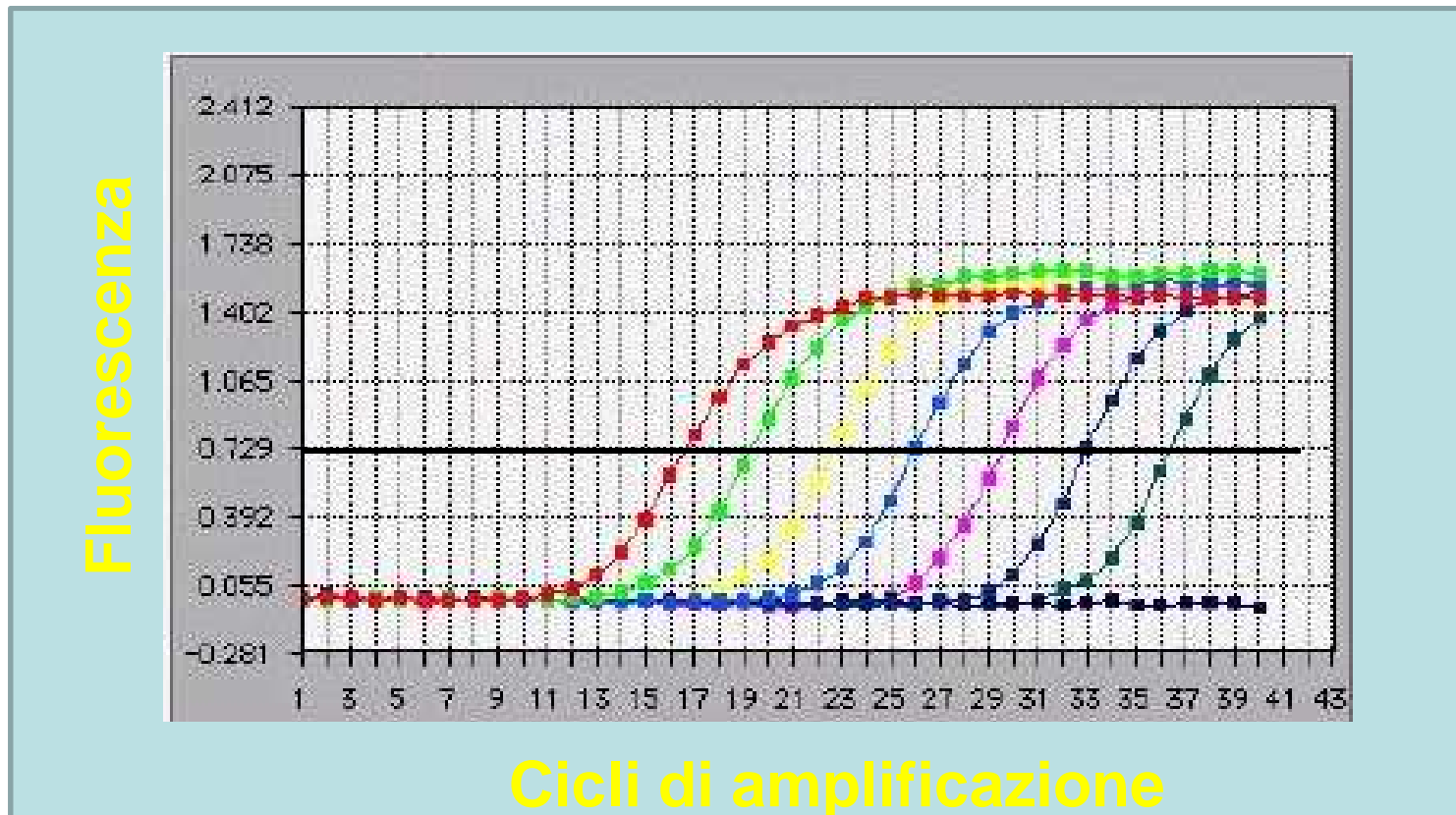
Misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale

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.**

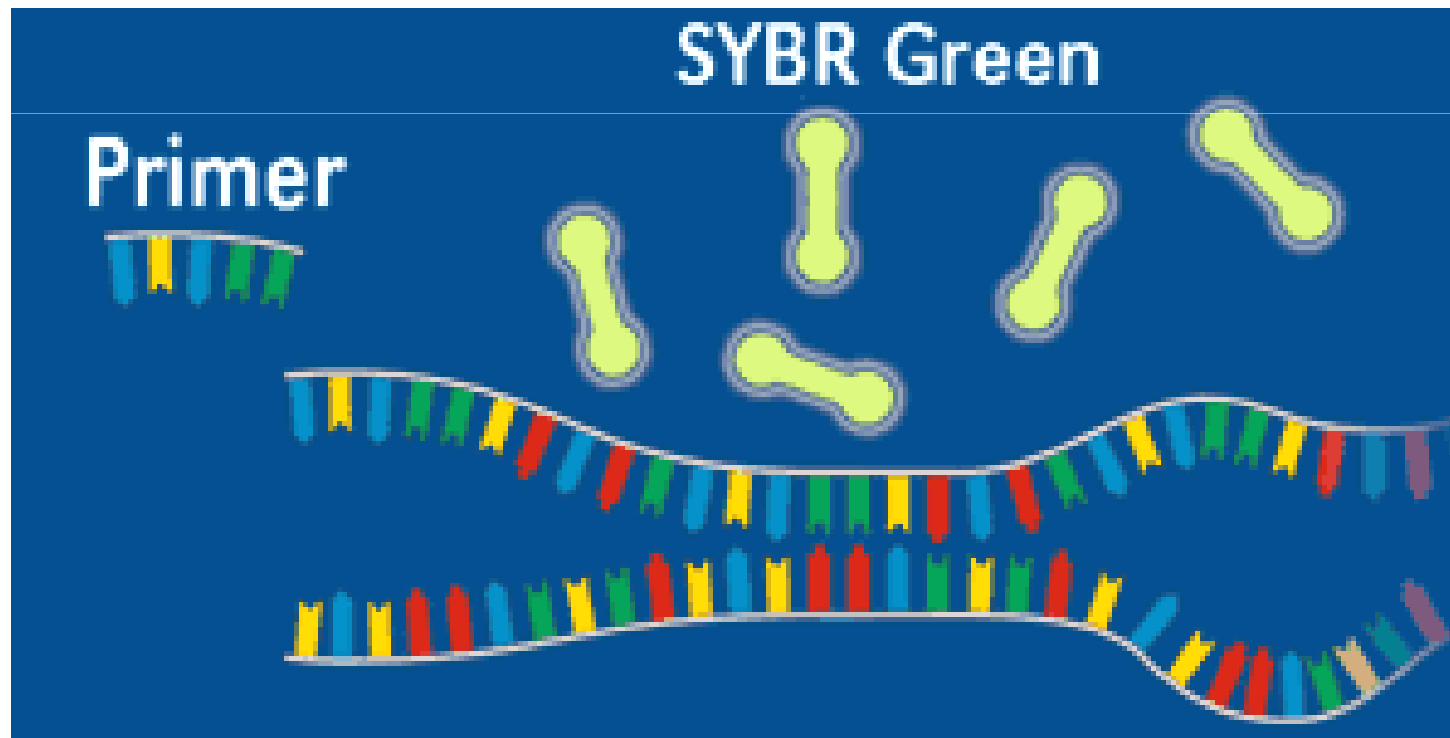
SYBR Green: principio

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



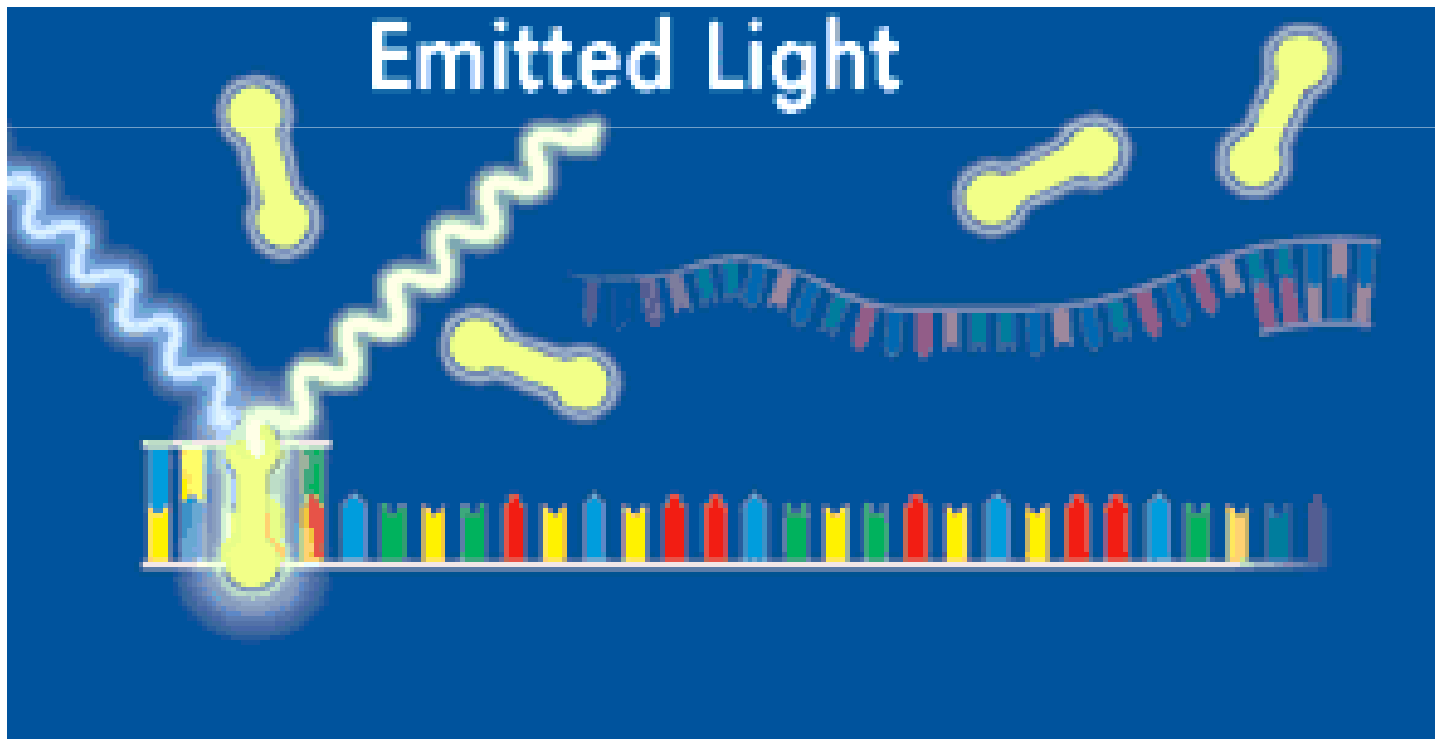
SYBR Green

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



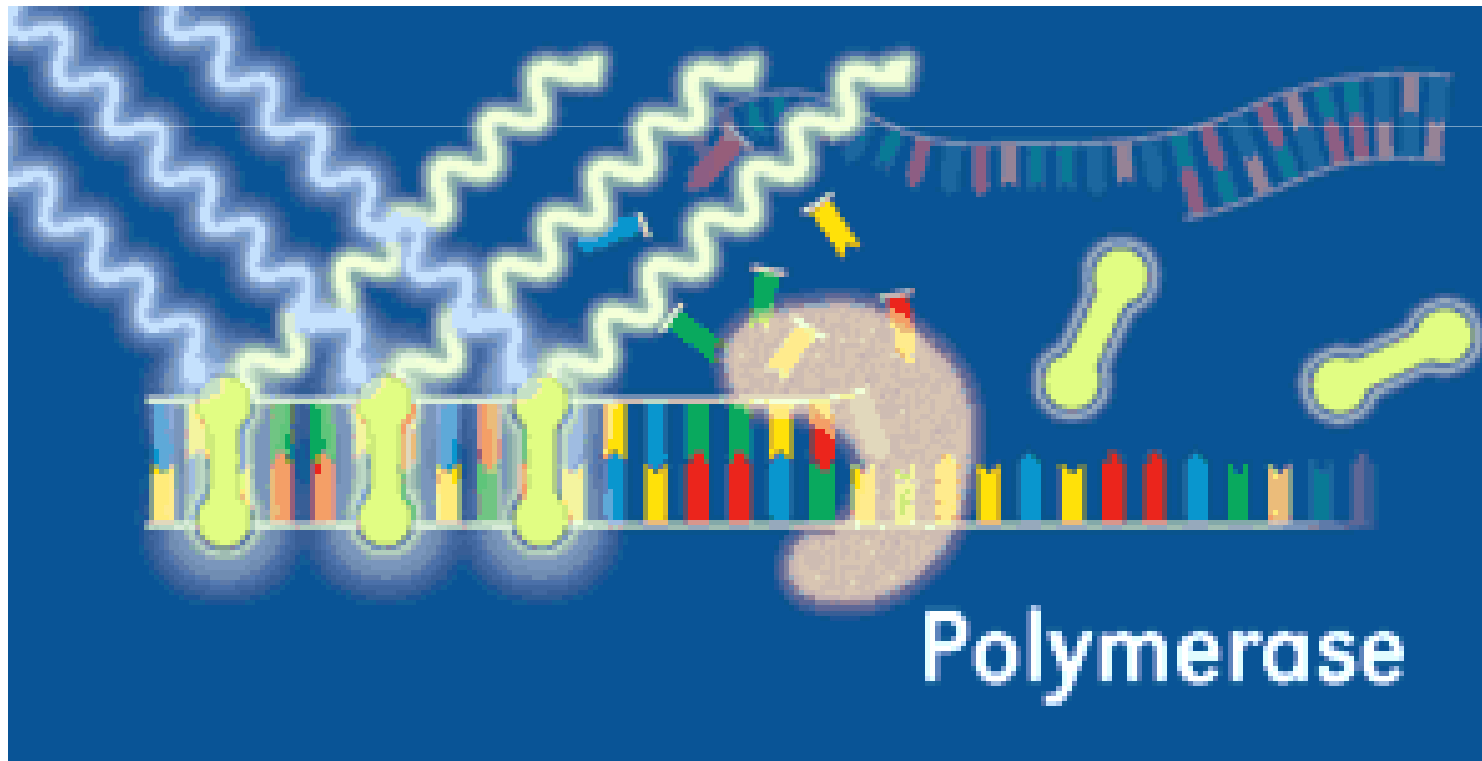
SYBR Green

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



SYBR Green

Durante l'elongazione si verifica un aumento di fluorescenza che corrisponde all' aumento del numero di copie dell'amplicone



SYBR Green

- **Metodica semplice : Possono essere utilizzati primers in uso in qualitativa**
- **Non costosa**

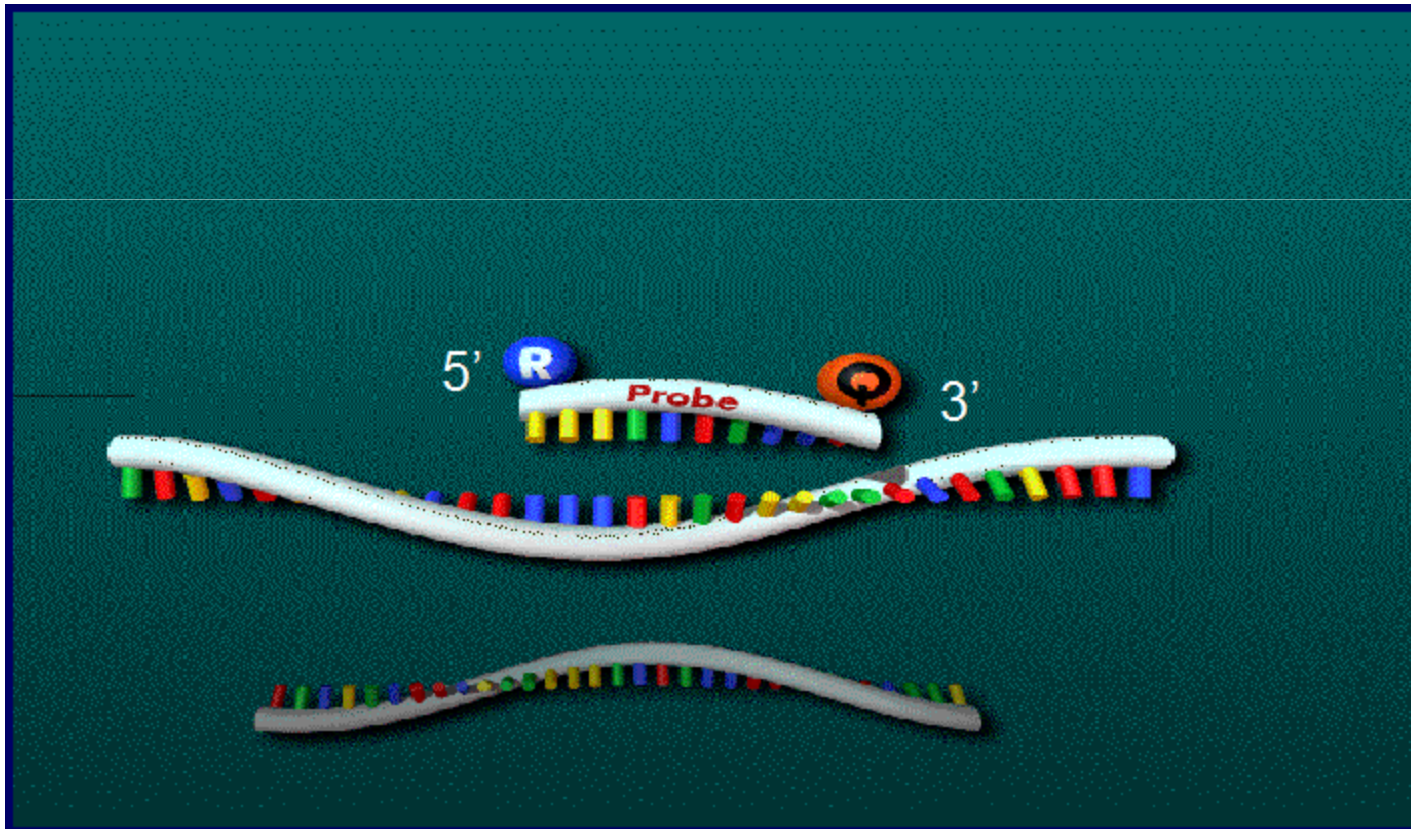
- **Non-specifica**
- **La molecola fluorescente si lega random a tutte le doppie eliche, includendo i dimeri di primers**
- **È necessario ottimizzare la metodica per evitare la formazione di prodotti aspecifici**

Esistono diversi tipi di sonde:

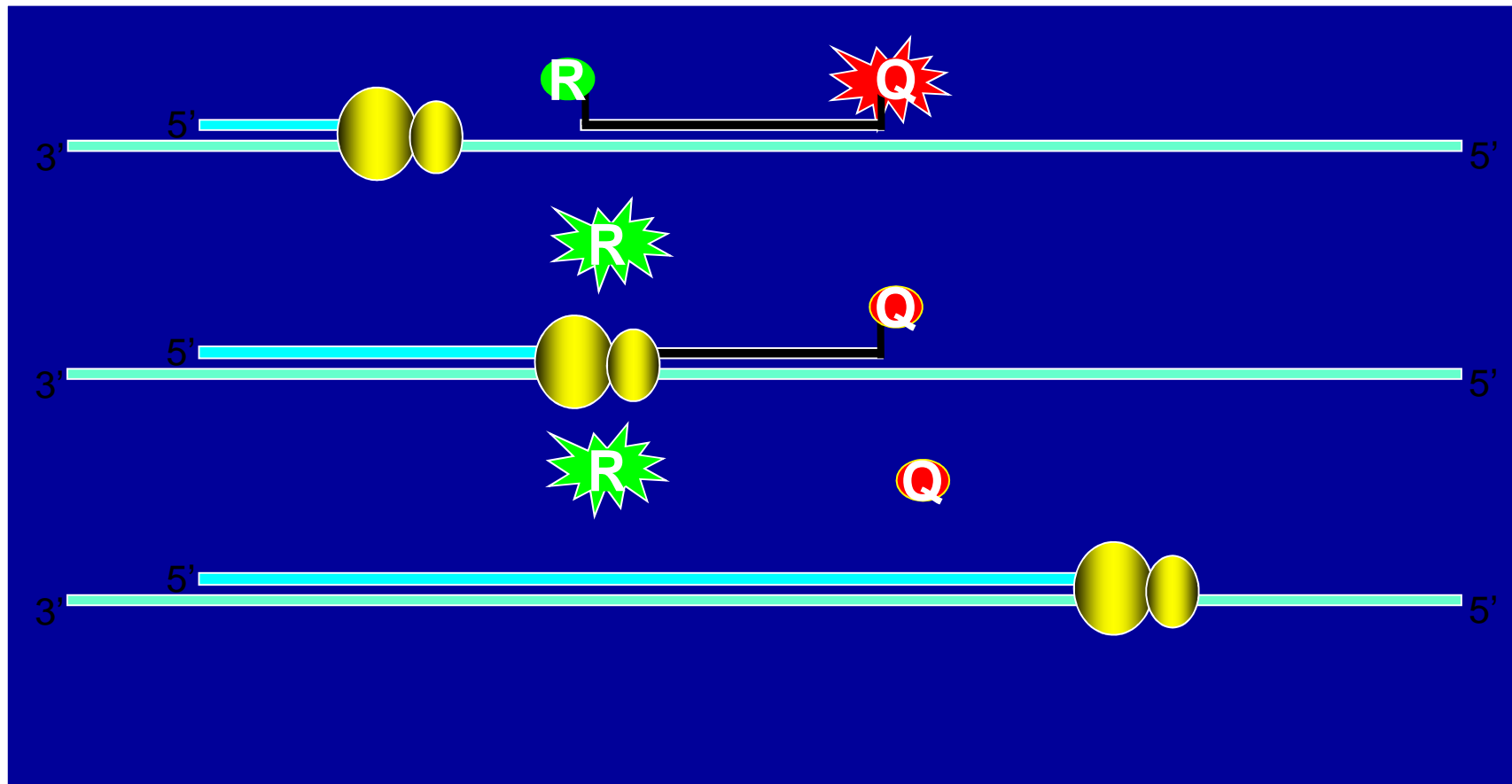
- **Dual-labeled (come le sonde TaqMan)**
- **Molecular beacons**
- **Scorpion**
- **Sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)**

Sonda TaqMan

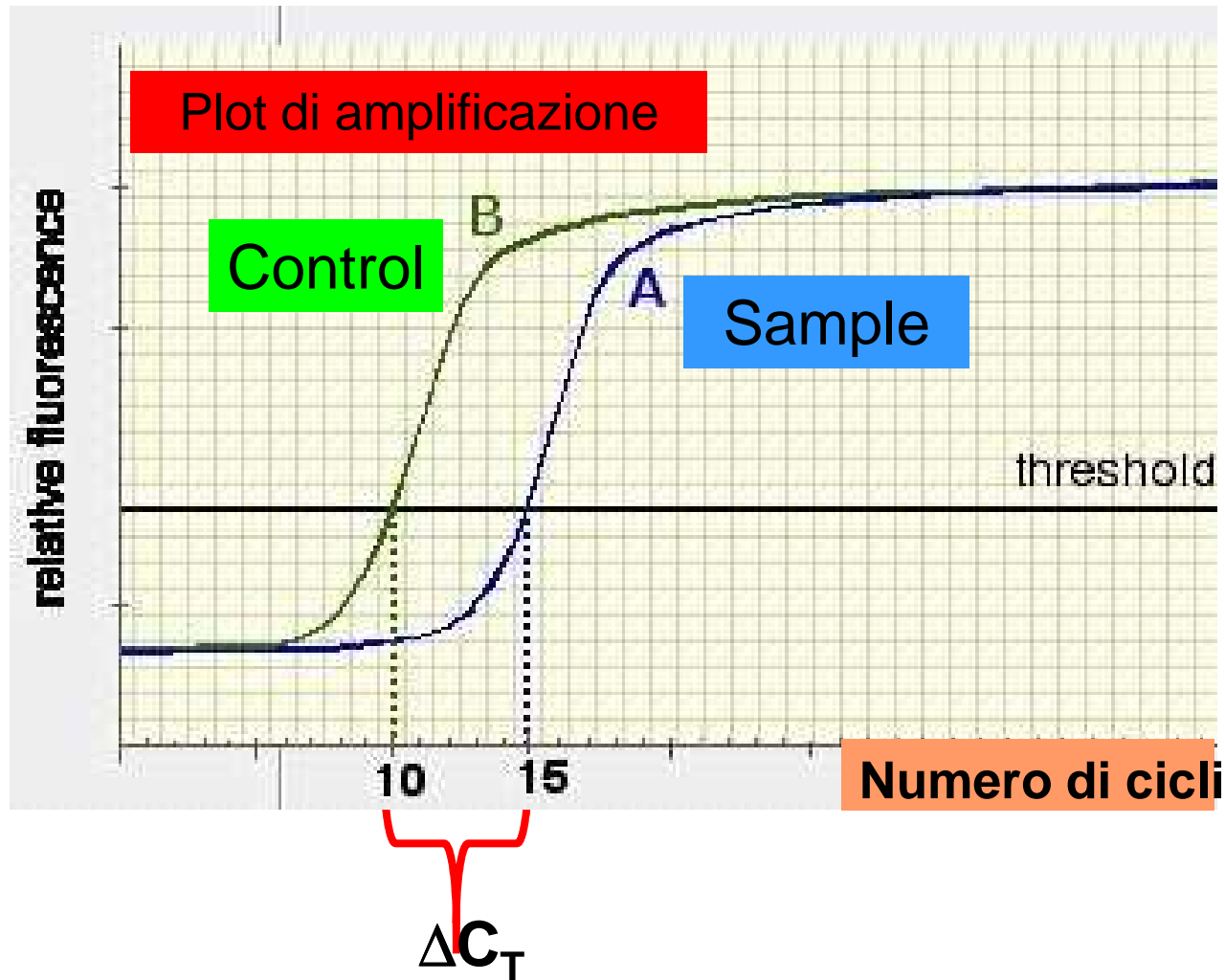
Presenta all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter" ed all'estremità 3' una molecola "Quencher"



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



Quantitativa relativa



Quantitativa relativa: analisi dei dati

- **Normalizzare il target con un controllo endogeno (r) espresso costitutivamente (ΔC_T)**
- **Comparare ciascun ΔC_T così ottenuto con il ΔC_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

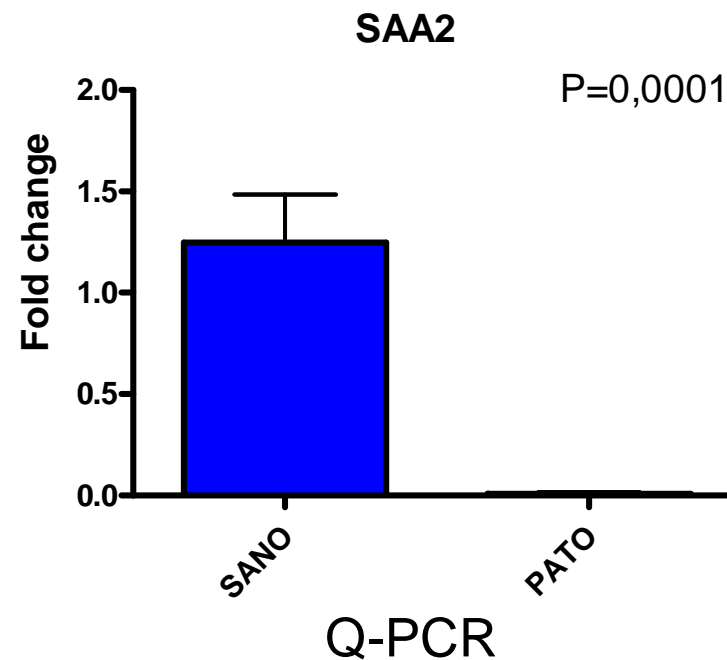
	Ct	Ct 18s	Media Ct	Media Ct 18s	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Potenza $2^{-\Delta\Delta Ct}$
SANO	31,24	21,44					
	31,16	20,86					
	31,33	21,12	31,24	21,14	10,10	0,00	1,0
PATOLOGICO	36,11	27,21					
	36,1	27,41					
	36,54	27,63	36,25	27,42	8,83	-1,27	2,4

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

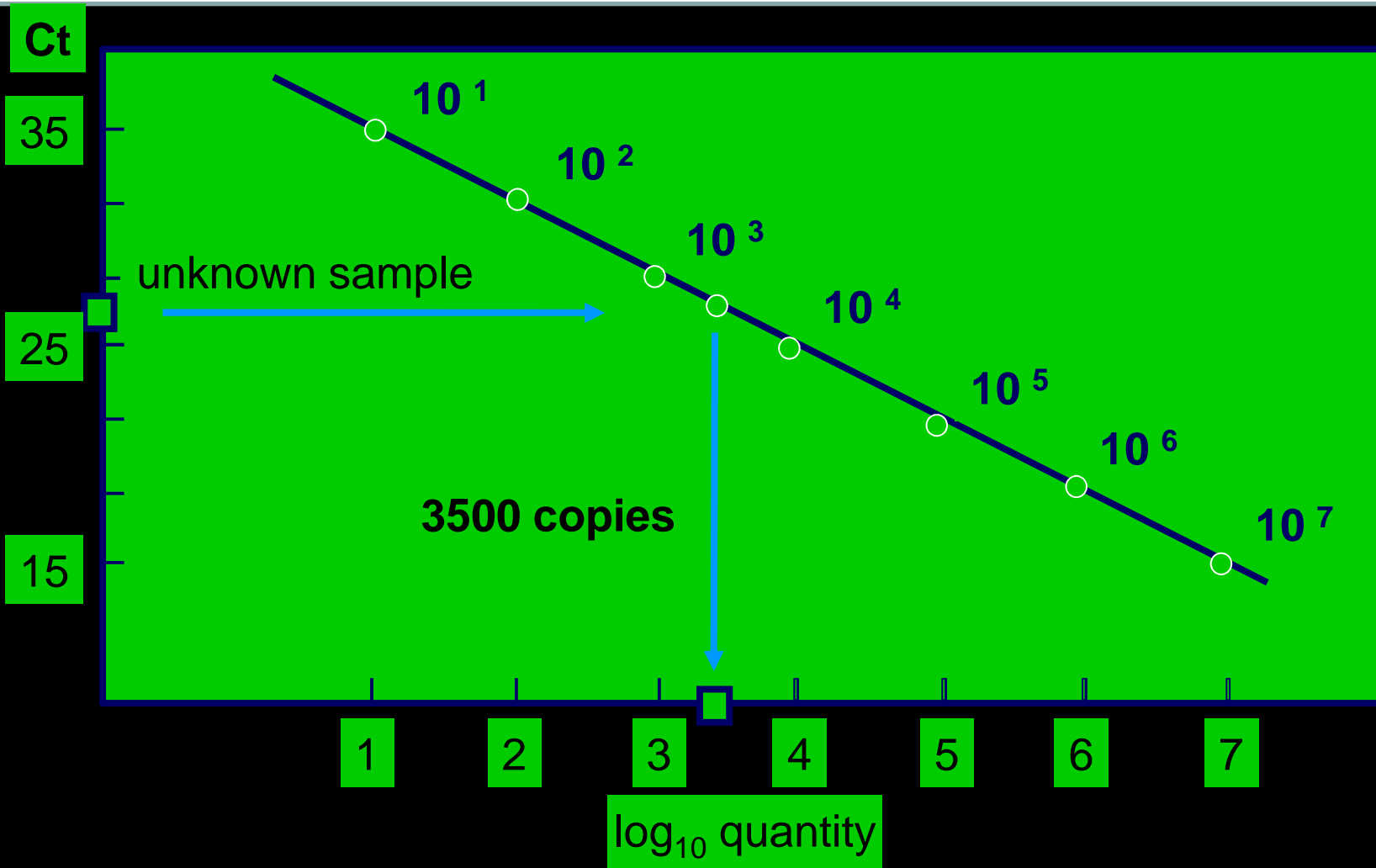
Gene SAA2, famiglia di apolipoproteine associate a HDL nel plasma, coinvolto nella risposta infiammatoria

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 (β -actina, GAPDH, ATPs, β_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	Δ 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

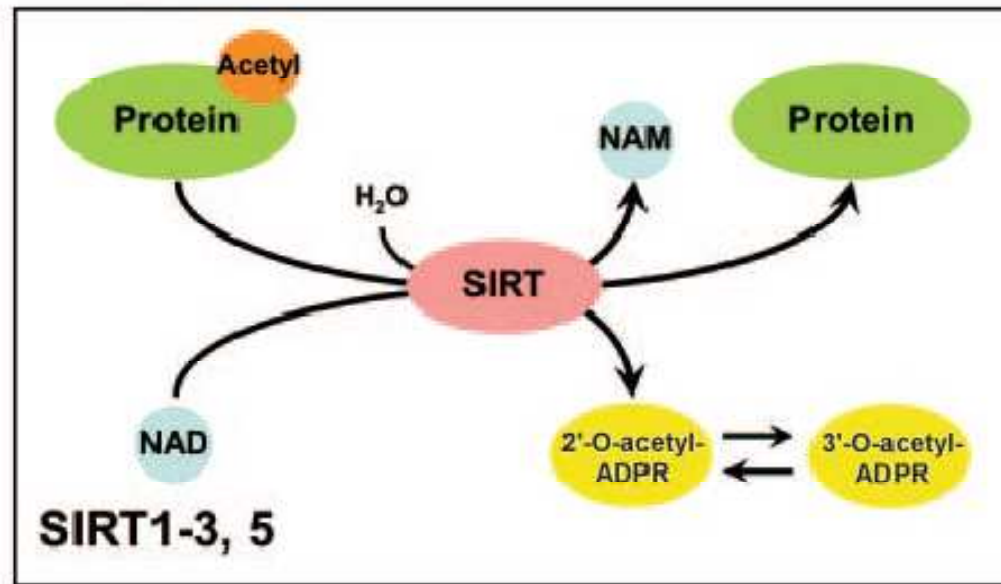
 Neuronal Factors

 Stress Response

 Calcium Metabolism

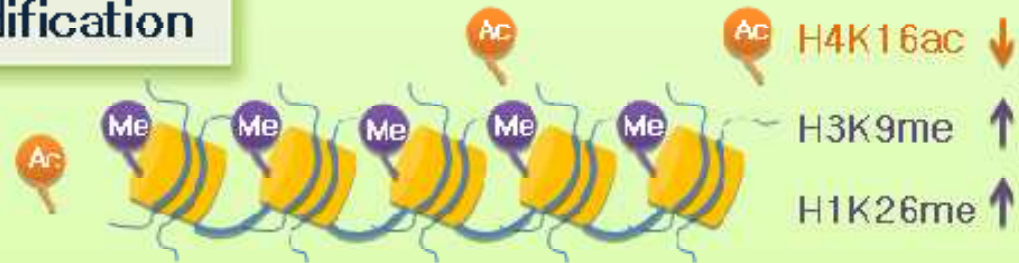
- Aging-related changes in gene expression in mouse gastrocnemius muscle. The extent to which caloric restriction prevented age-associated alterations in gene expression is denoted as either C (complete, .90%), N (none), or partial (20 to 90%, percentage effect indicated). The fold increase shown represents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