

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Fisiopatologia Sistemica

Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Biomediche

Ciclo XXII

**RUOLO DEI MACROFAGI NELLA PATOLOGIA
ATEROSCLEROTICA: ANALISI TRASCRIPTOMICA DELLE
DIVERSE TIPOLOGIE DI ATTIVAZIONE MACROFAGICA**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Ezio Musso

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Ivana Zavaroni

Dottorando: Eleonora Derlindati

RIASSUNTO

L'aterosclerosi rappresenta la principale causa di mortalità nei paesi occidentali. E' una patologia caratterizzata da lesioni intimali che protrudono nel lume e le conseguenze più gravi sono l'infarto del miocardio, l'infarto cerebrale e l'aneurisma aortico. L'aterosclerosi viene considerata come una patologia infiammatoria in quanto i diversi processi che concorrono alla formazione della placca provocano una serie di risposte cellulari e molecolari che sono riconducibili a quelle infiammatorie. Lo scopo di questa tesi, è quello di studiare le diverse tipologie di attivazione dei macrofagi, essendo le principali cellule coinvolte nello sviluppo dell'aterogenesi. All'interno delle arterie infatti, i macrofagi contribuiscono alla crescita della lesione e alla rottura della placca aterosclerotica, attraverso la secrezione di citochine, fattori di crescita ed enzimi proteolitici.

Per tale studio abbiamo condotto esperimenti in vitro stimolando colture primarie di monociti-macrofagi con diversi tipi di citochine, sia proinfiammatorie che antinfiammatorie, generando così tre diversi fenotipi di macrofagi attivati: quello classico (M1) coinvolto nella progressione infiammatoria, quello alternativo (M2a) con caratteristiche immunoregolatrici, e quello deattivato (M2c) con proprietà immunosoppressive. Al fine di indagare il ruolo dei recettori nucleari "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma" (PPAR γ) nella differenziazione macrofagica alternativa, abbiamo analizzato l'effetto di agonisti di tali recettori sul trascrittoma di tali cellule.

Il profilo di espressione genica è stato valutato su tutte le tipologie di attivazione macrofagica utilizzando la tecnologia microarray a genoma intero, mettendo in evidenza i pattern di geni espressi nei macrofagi in base al fenotipo acquisito. I risultati sono stati validati mediante PCR quantitativa.

L'analisi genomica rileva differenze trascrizionali fra le varie tipologie di attivazione macrofagica. In particolare i macrofagi M1 evidenziano una marcata attività infiammatoria, al contrario dei

macrofagi M2a ed M2c che invece dal punto di vista trascrittomico assomigliano ai macrofagi residenti ma non attivati. L'effetto dato dalla presenza di PPAR γ agonisti conferisce alle cellule un fenotipo diverso da quello alternativo, stimolando l'attività proliferativa delle cellule e diminuendo l'espressione di geni partecipanti al processo immunitario.

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	5
1.1 Aterosclerosi	5
1.1.2 <i>Formazione e sviluppo della placca aterosclerotica</i>	8
1.2 Fagociti mononucleati.....	15
1.2.1 <i>Monociti/Macrofagi</i>	16
1.2.2 <i>Macrofagi nell'aterosclerosi e sviluppo della placca</i>	19
1.2.3 <i>Ruolo dei macrofagi in altre patologie infiammatorie</i>	23
1.3 Attivazione macrofagica.....	25
1.3.1 <i>Attivazione classica (M1)</i>	27
1.3.2 <i>Attivazione alternativa (M2)</i>	28
1.4. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs)	32
1.5 Espressione genica e microarray	36
1.5.1 <i>Ibridazione</i>	36
1.5.2 <i>Discriminazione spaziale</i>	37
1.5.3 <i>Selezione delle sonde</i>	37
1.5.4 <i>Tipo di marcatura e di ibridazione</i>	38
2. SCOPO	40
3. MATERIAL E METODI.....	41
3.1 Colture cellulari	43
3.1.1 <i>Purificazione di cellule mononucleate da buffy coat</i>	43
3.1.2 <i>Isolamento di monociti</i>	45
3.1.3 <i>Colture cellulari di monociti</i>	47
3.2 Espressione genica	50
3.2.1 <i>Estrazione RNA</i>	50
3.2.2 <i>Controllo qualità RNA</i>	51
3.2.3 <i>Nanodrop</i>	51
3.2.4 <i>Bioanalyzer</i>	52
3.2.5 <i>Microarray dual color</i>	54
3.2.6 <i>Real Time PCR</i>	61
3.3 Analisi statistica.....	68
4. RISULTATI	70
4.1 Valutazione della purezza della popolazione cellulare mediante citofluorimetro.....	70
4.2 Controllo qualità RNA	72
4.3 Analisi trascrittomica	76
4.3.1 <i>Analisi trascrittomica: differenze di espressione fra i macrofagi classici (M1) e i Resting Macrophages (RM)</i>	80
4.3.2 <i>Analisi trascrittomica: differenze di espressione fra i macrofagi alternativi (M2a) e i Resting Macrophages (RM)</i>	83
4.3.3 <i>Analisi trascrittomica: differenze di espressione fra i macrofagi deattivati (M2c) e i Resting Macrophages (RM)</i>	85
4.3.4 <i>Analisi trascrittomica dei macrofagi addizionati con PPARγ agonisti.</i>	86
4.4 Validazione dei risultati con Real Time PCR.....	92
5. CONCLUSIONI	96
6. RICERCHE IN CORSO	100
7. BIBLIOGRAFIA	102

1. INTRODUZIONE

1.1 Aterosclerosi

L'aterosclerosi rappresenta la principale causa di mortalità nei paesi occidentali. Alla fine del 1800, questa affermazione era valida per le malattie infettive acute ma, con la loro scomparsa e la conseguente longevità della popolazione, le malattie cardiovascolari sono divenute uno dei più importanti fattori di mortalità umana. Oggi circa il 50% dei decessi in Inghilterra è da attribuirsi a malattie cardiovascolari, contro il 16% dovuto al cancro, che rappresenta la seconda causa di mortalità. L'aterosclerosi è una condizione patologica caratterizzata da lesioni intimali chiamate ateromi che protrudono nel lume indebolendo la sottostante tonaca media. La malattia colpisce principalmente le arterie elastiche e muscolari e le conseguenze più gravi sono l'infarto del miocardio e l'infarto cerebrale; contribuisce inoltre in modo preponderante alla gangrena e alla perdita di funzionalità degli arti. Le sedi maggiormente colpite sono rappresentate dall'aorta e dai suoi rami principali, ma soprattutto dalle coronarie, dove può provocare ischemia cardiaca a causa della mancanza di ossigeno determinata dal ridotto flusso sanguigno nei vasi aterosclerotici. In ogni distretto circolatorio vi sono poi localizzazioni preferenziali delle placche aterosclerotiche in gran parte dovute alle condizioni emodinamiche di flusso. La placca infatti, si forma più facilmente nelle zone dove il flusso non è laminare, ma vorticoso, come nei siti di diramazione, nelle biforcazioni e nelle curvature dei vasi¹.

L'aterosclerosi viene considerata una patologia infiammatoria in quanto i diversi processi che concorrono alla formazione della placca provocano una serie di risposte cellulari e molecolari che sono riconducibili a quelle infiammatorie. L'attuale ipotesi patogenetica considera l'aterosclerosi come una risposta flogistica della parete vascolare a un danno cronico dell'endotelio che ne causa la disfunzione.

Principali cause di disfunzione endoteliale:

- Ipercolesterolemia cronica: questo fattore da solo può alterare la funzione endoteliale a causa della produzione di radicali liberi dell'ossigeno che disattivano l'ossido nitrico. Lo stress ossidativo indotto attiva il Nuclear Factor kB (NF-kB) e quindi l'espressione di geni infiammatori. In queste condizioni l'aumentata permeabilità delle cellule endoteliali, dovuta all'attivazione cellulare, permette l'accumulo di lipidi nella parete vasale. Un ruolo rilevante è dato dal colesterolo-LDL (Low Density Lipoprotein), che accumulandosi nella parete endoteliale subisce modificazioni ossidative indotte dai radicali liberi dell'ossigeno prodotti dai macrofagi. L'accumulo e la deposizione di colesterolo e lipidi sull'intima contribuisce alla formazione della stria lipidica, la prima tappa verso lo sviluppo dell'ateroma (figura 1).

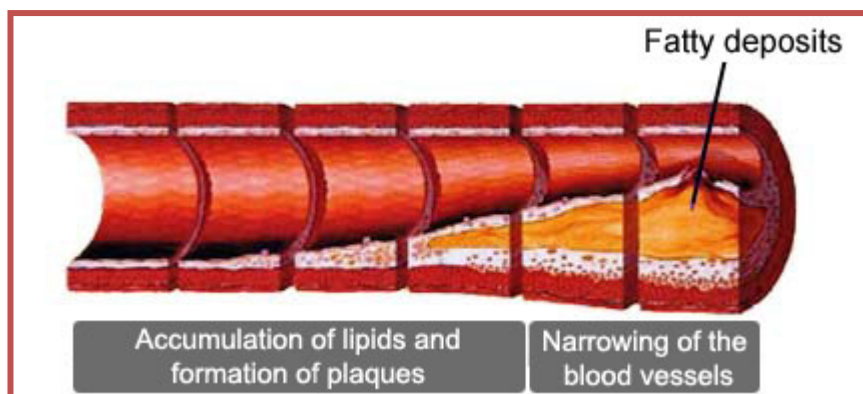


Figura 1. Accumulo di lipidi e sviluppo della placca. Koenig W, Khuseyinova N. *Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:15-26

- Ipertensione: è uno dei principali fattori di rischio per l'aterosclerosi. I pazienti ipertesi presentano un'elevata concentrazione di angiotensina II, un potente vasocostrittore che contribuisce al processo aterogenetico stimolando la sintesi e l'ipertrofia delle cellule

muscolari lisce. Questa molecola induce in tali cellule un aumento dell'attività lipossigenasica che contribuisce all'ossidazione delle LDL e quindi anche all'infiammazione.

- Alti livelli di omocisteina plasmatica: l'omocisteina è un intermedio della sintesi della metionina, pazienti che presentano difetti metabolici accumulano omocisteina nel sangue sviluppando aterosclerosi precoce. Questo aminoacido ha effetti tossici sull'endotelio, in quanto la sua attività protrombotica aumenta la sintesi di collagene e diminuisce la disponibilità di ossido nitrico promuovendo la formazione di radicali liberi dell'ossigeno².
- Diabete: il diabete mellito aumenta il rischio di sviluppare l'aterosclerosi³. Per i diabetici l'incidenza di infarto del miocardio è di due-quattro volte superiore rispetto ai non diabetici. Tali soggetti presentano inoltre un aumentato rischio di ictus e una probabilità elevata di sviluppare ateropatia periferica.
- Fumo di sigaretta: è stato dimostrato che per entrambi i sessi il fumo di sigaretta rappresenta un fattore di rischio. Le sigarette infatti contengono sostanze che causano danno cellulare in seguito a produzione di radicali liberi. La conseguenza è l'attivazione di una risposta infiammatoria che modifica il normale profilo di espressione genica⁴.
- Infezioni: alcuni studi hanno mostrato correlazioni fra l'incidenza dell'aterosclerosi e la presenza di due microrganismi: herpes virus e Chlamydia pneumoniae⁵. Entrambi sono stati trovati all'interno di placche ateromatose, e si pensa che possano indurre un processo flogistico cronico che causa danno endoteliale. Tuttavia l'associazione fra la patologia e i microrganismi in questione deve ancora essere chiarita.

Tutti questi fattori possono causare disfunzione endoteliale, che si manifesta in un aumento della permeabilità, dell'adesione leucocitaria e dell'espressione di geni proinfiammatori e procoagulanti.

1.2 Formazione e sviluppo della placca aterosclerotica

Numerose e controverse sono le ipotesi formulate nel tentativo di identificare meccanismi responsabili di comparsa e progressione della malattia aterosclerotica. Al momento la teoria più accreditata rimane quella infiammatoria di Russell Ross ⁶, *“The response to injury”*, che ipotizza nell’infiammazione il meccanismo mediante il quale i fattori di rischio cardiovascolare evocano una risposta riparativa da parte della parete vascolare; risposta che inizia con la disfunzione endoteliale, alterazione meramente funzionale, per poi progredire e stabilizzarsi con la formazione della placca aterosclerotica, una vera e propria alterazione morfologica (figura 2).

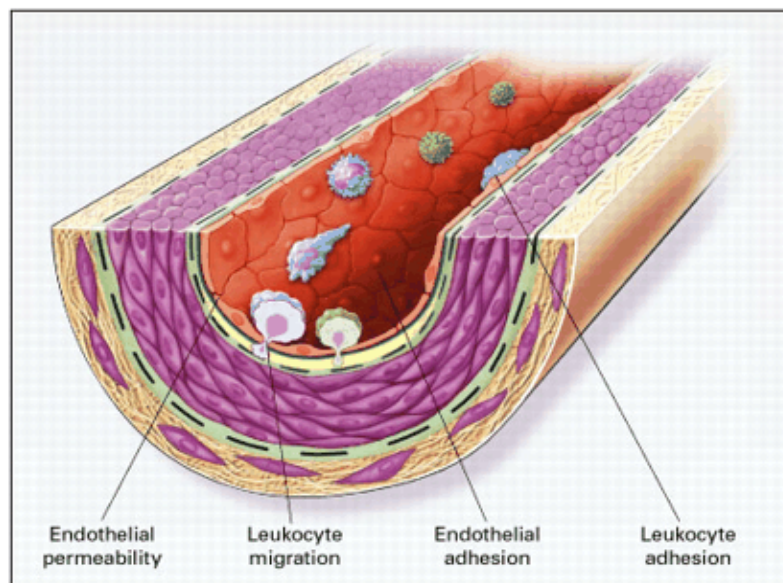


Figura 2 Disfunzione endoteliale nell'aterosclerosi. Ross R. *Atherosclerosis an inflammatory disease. N Engl Med* 1999; 340:115-26

Numerosi studi hanno messo in evidenza che il primo passo nella comparsa dell'aterosclerosi è costituito da un danno a carico dell' endotelio. L'endotelio può essere considerato un vero e proprio organo che risponde in modo autocrino e paracrino ad una serie di stimoli nocivi che ne causano l'alterazione dell'omeostasi. L'omeostasi vascolare è definita come la capacità del sistema

vascolare di preservare condizioni emoreologiche normali mantenendo l'equilibrio tra il rilascio di potenti vasodilatatori come l'ossido nitrico (NO), e vasocostrittori come l'endotelina-1, mediatori che regolano il tono e la struttura vascolare. La disfunzione endoteliale provoca risposte di tipo compensatorio che si estrinsecano nella diminuzione della biodisponibilità dell'ossido nitrico, nell'aumentata produzione di endotelina-1 e nell'attivazione delle vie di trasduzione che convergono nella regolazione dell'NF- κ B, responsabile della modulazione di un gran numero di geni ad azione proinfiammatoria, come quelli che codificano per chemochine, enzimi e molecole di adesione (selettine, VCAM-1, ICAM-1). Tra queste ultime, precocemente espresse nell'endotelio attivato, troviamo: ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule-1) che si lega alle integrine LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1) e VCAM-1 (Vascular-Cell-Adhesion-Molecule-1) che si lega alle integrine VLA-4 (Very-Late-Antigen 4); le stesse integrine (nonché ligandi delle molecole di adesione) sono anch'esse espresse nelle fasi precoci dell'aterogenesi. La disfunzione endoteliale porta una maggiore permeabilità ed adesività leucocitaria. Come conseguenza, le lipoproteine circolanti, in particolare le LDL, si depositano nella parete del vaso maggiormente permeabile e subiscono processi enzimatici di ossidazione; i leucociti circolanti aderiscono alle molecole di adesione, dopodiché migrano per diapedesi nello spazio subendoteliale sotto la guida dei segnali di trasduzione prodotti dalle chemochine. I monociti, raggiunta l'intima, acquisiscono le caratteristiche dei macrofagi tissutali. Il processo di differenziazione include la sovraregolazione di vari recettori, tra i quali il recettore CD36 ed i recettori scavenger per le lipoproteine modificate. Attraverso questi ultimi, i macrofagi internalizzano le lipoproteine ossidate a bassa densità (oxLDL) per trasformarsi in foam cells, ovvero "cellule schiumose" (figura 3).

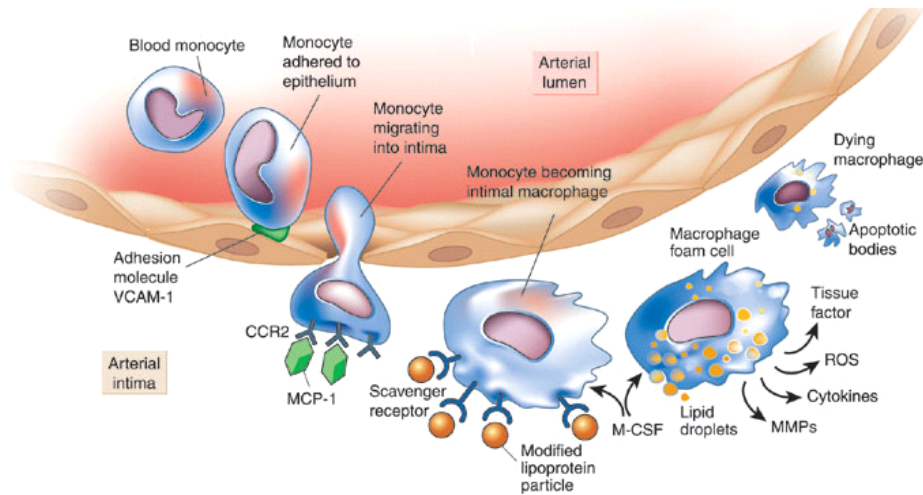


Figura 3: Processo di reclutamento dei monociti fino alla formazione delle cellule schiumose. Libby P. *Inflammation in atherosclerosis*. Nature. 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74.

Contestualmente avviene anche l'adesione delle piastrine all'endotelio denudato dall'insulto infiammatorio, con conseguente attivazione delle stesse. Piastrine attivate, monociti e linfociti sono responsabili della produzione di citochine, molecole proinfiammatorie e fattori di crescita che inducono la migrazione delle cellule muscolari lisce (*smooth muscle cells*, SMC) dalla media all'intima, acquisendo anch'esse la capacità di fagocitare cellule lipidiche. Piastrine e leucociti attivati, "cellule schiumose" e cellule muscolari lisce migrate costituiscono le strie lipidiche o *fatty streaks*, considerate lesioni precoci ma anche reversibili se si eliminano i fattori di rischio (figura 4).

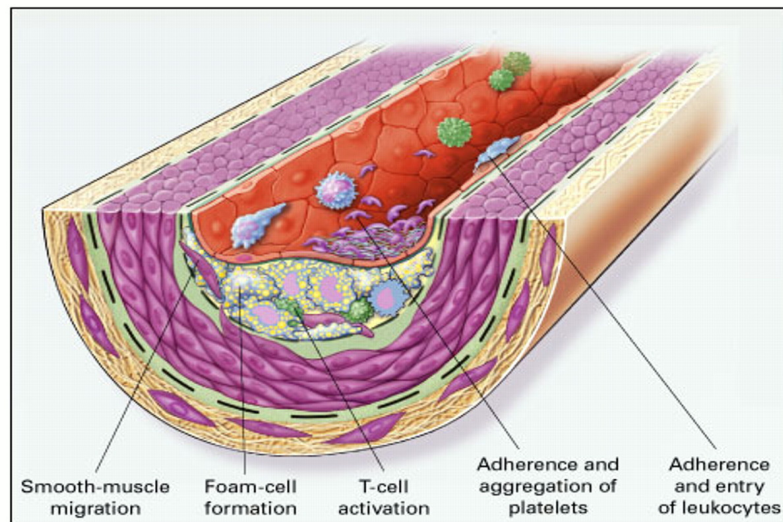


Figura 4. Illustrazione dei meccanismi di formazione della stria lipidica durante il processo aterosclerotico. Ross R. *Atherosclerosis an inflammatory disease. N Engl Med 1999; 340:115-26.*

Nel caso in cui il processo infiammatorio non si arresti, le cellule muscolari lisce passano dallo stato di riposo a quello proliferativo sotto l'azione di alcuni fattori di crescita, tra cui il PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), rilasciato dalle piastrine interagenti con le pareti vasali già nelle fasi iniziali dell'aterogenesi. Inoltre, le cellule muscolari lisce, sotto l'azione del Transforming Growth Factor β (TGF β), si differenziano nel fenotipo "sintetico" in grado di sintetizzare matrice extracellulare (collagene, elastina, proteoglicani) portando allo sviluppo di un "cappuccio fibroso" che circonda le lesioni in una fase ormai irreversibile. Il processo continua verso la formazione di lesioni sempre più complesse che evolvono portando alla formazione del *core* lipidico all'interno del quale si verificano fenomeni necrotici ed apoptotici che portano alla deposizione del fattore tissutale (TF), elemento altamente trombogenico della placca, di cui i macrofagi sembrano rappresentare la fonte principale. Inoltre, nel core lipidico sono stati ritrovati anche calcio e lipidi a localizzazione extracellulare i quali potrebbero contribuire ai processi di morte cellulare. Le lipoproteine presenti nello spazio extracellulare dell'intima, interagendo con essa, vanno incontro ad alterazioni chimiche quali l'ossidazione e la glicazione non enzimatica coinvolgendo sia la porzione lipidica sia quella proteica. E' stato dimostrato come queste reazioni accelerino

l'evoluzione dell'ateroma^{7,8,9,10}. Nei soggetti diabetici, la glicemia elevata favorisce i processi di glicazione non enzimatica delle apoproteine ma anche delle proteine costituenti il vaso, accelerando l'evoluzione della placca (figura 5).

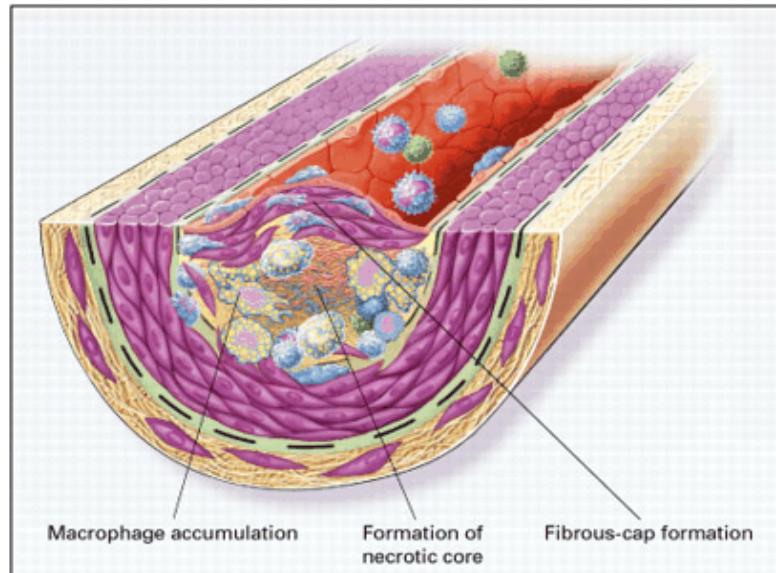


Figura 5. Immagine della placca aterosclerotica avanzata e complicata. Ross R. *Atherosclerosis an inflammatory disease*. *N Engl Med* 1999; 340:115-26

L'accrescimento della lesione può provocare l'ispessimento della parete arteriosa, determinando un'ulteriore riduzione del lume del vaso. Man mano che altri leucociti vengono reclutati attraverso un meccanismo di amplificazione della risposta infiammatoria, la lesione va incontro ad una progressione. E' stata evidenziata, inoltre, un'elevata neoangiogenesi all'interno della lesione, sotto lo stimolo di fattori di crescita prodotti localmente. La neovascolarizzazione dell'intima e dell'avventizia contribuisce ad incrementare la vulnerabilità della placca aterosclerotica permettendo l'ulteriore reclutamento di cellule infiammatorie. Al tempo stesso, poiché i capillari neoformati sono molto fragili possono andare facilmente incontro alla rottura: la conseguente emorragia favorisce la rapida progressione della placca e l'evoluzione verso le sue complicanze.

La principale complicanza dell'ateroma è la trombosi. L'erosione superficiale dell'endotelio e la rottura o fissurazione dell'involucro della placca sono il fattore scatenante la formazione di trombi.

La rottura della lamina fibromuscolare della placca consente il contatto tra i fattori della coagulazione ed il fattore tissutale espresso dalle “cellule schiumose”, innescando il processo coagulativo.

Dal punto di vista clinico, a livello coronarico, il trombo può essere occlusivo e relativamente persistente, scatenando un infarto acuto in assenza di sufficienti circoli collaterali, oppure può occludere solo parzialmente il lume del vaso come nell’angina instabile.

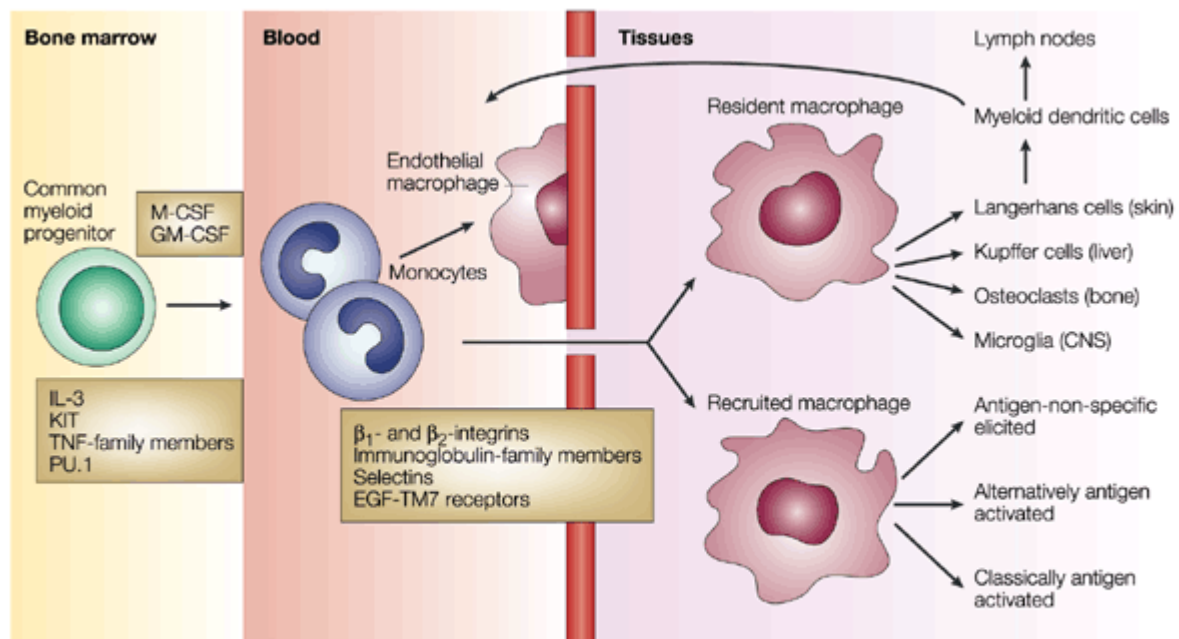
A livello carotideo trombi piastrinici possono embolizzare causando attacchi ischemici transitori (TIA). Episodi ripetuti di rottura e cicatrizzazione della placca contribuiscono all’evoluzione della lesione, anche se non tutti gli ateromi hanno la stessa predisposizione alla rottura. Quelli maggiormente a rischio presentano una sottile lamina fibromuscolare e un nucleo lipidico relativamente ampio ad elevato contenuto di macrofagi, le cosiddette “placche soft”. Il sito di rottura della placca è una zona in cui prevalgono i macrofagi e i linfociti T mentre scarseggiano le cellule muscolari lisce. I leucociti presenti nel sito di rottura esprimono marcatori dell’attivazione infiammatoria, come l’antigene leucocitario umano HLA-DR considerato un marker attendibile di infiammazione in quanto non viene espresso nelle arterie normali ma solo in corrispondenza dei siti di rottura della placca. Anche nel processo di rottura della placca intervengono diverse citochine prodotte dai linfociti T, come l’interferone gamma (IFN γ), e dai macrofagi, quali il *Tumor necrosis factor alfa* (TNF α) e l’interleuchina 1 (IL-1); tali proteine, da un lato, riducono la sintesi di collagene richiesta per la riparazione della lamina fibromuscolare e dall’altro, innescano la degradazione di macromolecole della matrice extracellulare favorendo la rottura della placca.

Al contrario, si è visto come placche con una densa matrice fibromuscolare e prive di un nucleo lipidico siano resistenti alla rottura e raramente sono coinvolte nella trombosi. Questo dimostra che per determinare le manifestazioni cliniche non è importante solo il grado di protrusione della placca nel lume del vaso ma anche le caratteristiche biologiche della placca stessa .

Proprio nelle differenze qualitative tra i vari tipi di placca si cela la spiegazione del perché alcune placche rimangano silenti per tutta la vita mentre altre vadano incontro a complicazioni acute con conseguenze cliniche gravissime.

1.2 Fagociti mononucleati

Il sistema dei fagociti mononucleati è composto da cellule appartenenti ad uno stipite differenziativo unico e svolgono la funzione di cellule accessorie nelle fasi di riconoscimento e di attivazione nelle risposte immunitarie specifiche. I monociti si originano dal midollo seguendo la linea differenziativa mieloide ed entrano nel torrente circolatorio in uno stato non completamente differenziato, per poi migrare nei vari tessuti, dove maturano trasformandosi in macrofagi. Queste cellule si trovano in tutti gli organi e tessuti connettivi e sono stati variamente nominati a seconda della loro localizzazione. Ad esempio nel sistema nervoso centrale i macrofagi sono definiti cellule microgliali, nel fegato prendono il nome di cellule Kupffer, nelle vie respiratorie sono denominati macrofagi alveolari e nell'osso sono chiamati osteoclasti. Studi recenti hanno anche dimostrato la presenza di macrofagi nel tessuto adiposo viscerale^{11,12}. I segnali responsabili della tessuto-specificità dei diversi fenotipi macrofagici includono antigeni di superficie, proteine secrete dalle cellule circostanti e matrice extracellulare (figura 6).



Nature Reviews | Immunology

Figura 6. Il sistema dei fagociti mononucleati. *Gordon S. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol. 2003 Jan;3(1):23-35.*

1.2.1 Monociti/Macrofagi

Nel sangue periferico i monociti possono mostrare differenze morfologiche per ciò che concerne dimensioni, granulosità e aspetto nucleare. Tali cellule sono state inizialmente identificate in quanto esprimenti il marcatore di superficie CD14, un antigene di superficie che partecipa al legame con il lipopolisaccaride (LPS). La successiva identificazione della differente espressione di marker antigenici ha dimostrato l'eterogeneità dei monociti circolanti. Il diverso grado di espressione di CD14 e CD16 (conosciuto anche come FcγRIII) permise di dividere i monociti in due sottocategorie: le cellule CD14⁺ e CD16⁻ (fenotipo "classico" in quanto è stato il primo ad essere descritto) e le cellule CD14⁺ e CD16⁺. Fu successivamente dimostrato che i monociti CD14⁺ CD16⁺ esprimevano una più alta quantità di molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II) e CD32 (conosciuto come FcγRII), similmente ai macrofagi tissutali maturi¹³.

Recentemente è stata identificata una nuova sottocategoria di monociti, definita dall'espressione di CD14, CD16 e CD64 (riconosciuto come FcγRI). Queste cellule sembrano combinare le caratteristiche dei monociti e delle cellule dendritiche (DCs), in quanto esprimono il CD86 ed antigeni leucocitari umani (HLA-DR) ed hanno un'alta attività stimolatoria della cellula T. Se paragonati con monociti CD14⁺ CD16⁻ queste cellule hanno uguale attività fagocitaria e producono una grande quantità di citochine, come il Tumor Necrosis Factor α (TNFα) e l'interleuchina-6 (IL-6); queste caratteristiche non sono condivise con i monociti CD14⁺ CD16⁺ e CD64⁺ ¹⁴.

Come detto nei paragrafi precedenti, In caso di danno i monociti entrano nel vaso danneggiato attraverso l'endotelio dei vasi sanguigni e subiscono una serie di cambiamenti promuovendo la differenziazione in macrofagi. I monociti sono attratti nel sito danneggiato da diversi stimoli quali cellule danneggiate, patogeni e citochine rilasciate da macrofagi già presenti nel sito. La crescita e la differenziazione dei macrofagi dipende da citochine come il *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) e il *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) e dall'interazione con le sostanze presenti nell'ambiente circostante.

I macrofagi partecipano sia alla risposta immunitaria innata che specifica. Nell'immunità innata svolgono il loro ruolo principale attraverso la fagocitosi: tale meccanismo prevede l'ingestione di cellule necrotiche, ma soprattutto di materiale estraneo all'organismo come patogeni. Per legare e fagocitare i microrganismi i macrofagi utilizzano recettori per i prodotti microbici e per le opsonine. I recettori in grado di legare direttamente patogeni sono il recettore per il mannosio, i recettori *scavenger*, il CD14 che lega l'LPS e le integrine macrofagiche. L'efficienza della fagocitosi aumenta se il microbo è rivestito da opsonine, che possono essere riconosciute da componenti del complemento (frammenti di C3) o dai recettori Fc. Una volta riconosciuti i patogeni vengono inglobati nel fagosoma che si fonde con il lisosoma formando il fagolisosoma. Il materiale

fagocitato viene così a contatto con vari enzimi contenuti nei lisosomi e quindi digerito. Tra questi enzimi ricordiamo:

- La ossidasi fagocitica: converte l'ossigeno molecolare in prodotti intermedi reattivi dell'ossigeno che esplicano una azione tossica sui microrganismi. Una carenza genetica di tale enzima caratterizza la malattia granulomatosa cronica: in questa immunodeficienza i fagociti non riescono a eliminare i microbi e quindi l'organismo tenta di arginare l'infezione richiamando un numero sempre più grande di linfociti e macrofagi con formazione di granulomi.
- La sintetasi inducibile dell'ossido nitrico: converte l'arginina in ossido nitrico dotato di attività microbica.
- Le proteasi lisosomiali: digeriscono le proteine batteriche, ad esempio lisozima, proteine cationiche, defensine a pH acido e lattoferrine.

I macrofagi hanno inoltre un ruolo fondamentale nell'immunità specifica attraverso la presentazione dell'antigene ai linfociti T e nel dare inizio alla risposta immunitaria, producendo chemochine, enzimi, proteine del complemento, fattori di regolazione e recettori per linfocine. Il processo di presentazione dell'antigene prevede una fase di processazione degli antigeni fagocitati durante la quale gli antigeni proteici vengono degradati per via enzimatica endocellulare e trasformati in peptidi. Successivamente i peptidi vengono espressi in superficie e inseriti in particolari tasche all'interno delle molecole MHC formando un unico complesso che viene esposto sulla superficie cellulare. In questo modo i linfociti T helper sono in grado di riconoscere gli antigeni estranei e di dare l'avvio al proseguimento della risposta immunitaria fornendo gli stimoli per la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B e dei linfociti citotossici (CTL).

Le cellule macrofagiche svolgono un ruolo anche nel mantenimento dell'omeostasi tissutale attraverso la clearance di cellule senescenti, il rimodellamento e la riparazione dei tessuti dopo l'infiammazione^{15,16}.

I macrofagi mostrano un alto grado di eterogeneità, la quale è stata indagata attraverso studi con anticorpi monoclonali per verificare l'espressione di specifici marcatori^{17,18}. Le diverse caratteristiche fenotipiche rispecchiano la diversa funzione svolta dai macrofagi, come ad esempio l'abilità degli osteoclasti a rimodellare l'osso, l'elevata espressione di *pattern-recognition receptors* e dei recettori *scavengers* dei macrofagi alveolari, implicati nella rimozione di microrganismi, virus e particelle esogene nei polmoni.

L'alta versatilità funzionale e la loro rilevanza nel sistema immunitario rendono queste cellule importanti oggetto di studio per le patologie cardiovascolari e infiammatorie.

1.2.2 Macrofagi nell'aterosclerosi e sviluppo della placca

E' noto che la placca aterosclerotica tende a formarsi nelle arterie in cui vi è un flusso sanguigno turbolento¹⁹, dove la disfunzione endoteliale⁶ e l'accumulo e la successiva modificazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) nell'intima delle arterie promuovono l'infiammazione locale e il reclutamento dei monociti²⁰. I monociti/macrofagi sono coinvolti in tutte le tappe dello sviluppo della patologia aterosclerotica ed è stato dimostrato che le cellule schiumose in modo particolare possono essere presenti anche in lesioni precoci, contribuendo allo sviluppo e alla progressione della placca²¹. L'accumulo delle LDL è dovuto non solo all'aumento della permeabilità dell'endotelio funzionalmente o anatomicamente danneggiato, ma anche al loro legarsi ai costituenti della matrice extracellulare dell'intima, legame che aumenta il tempo di residenza in loco delle lipoproteine. Un fattore importante che causa l'ispessimento dell'intima è rappresentato dall'attrito della corrente sanguigna sulla superficie vasale (stress emodinamico),

che è particolarmente accentuato in corrispondenza delle ramificazioni e delle curvature dei vasi, sedi che risultano particolarmente predisposte allo sviluppo delle lesioni aterosclerotiche.

Il ruolo fondamentale nello sviluppo della reazione infiammatoria cronica dell'intima è svolto dalla ossidazione delle LDL che restano intrappolate nella matrice extracellulare dello spazio subendoteliale. Infatti le LDL sono trasportate all'interno della parete vasale tramite diffusione passiva; questo processo è dipendente dall'interazione tra l'apolipoproteina B e i proteoglicani presenti nella matrice extracellulare. In questo modo si trovano intrappolate nello spazio subendoteliale e vengono ossidate da specie reattive dell'ossigeno prodotte da una eccessiva presenza di cellule, inclusi i macrofagi. Le LDL ossidate stimolano le cellule endoteliali ad esprimere citochine infiammatorie, attirando così i monociti nell'area di disfunzione, nonché molecole di adesione (E-Selectine, P-Selectine, VCAM-1 e ICAM-1) al fine di promuovere il legame dei monociti all'endotelio danneggiato (figura 7).

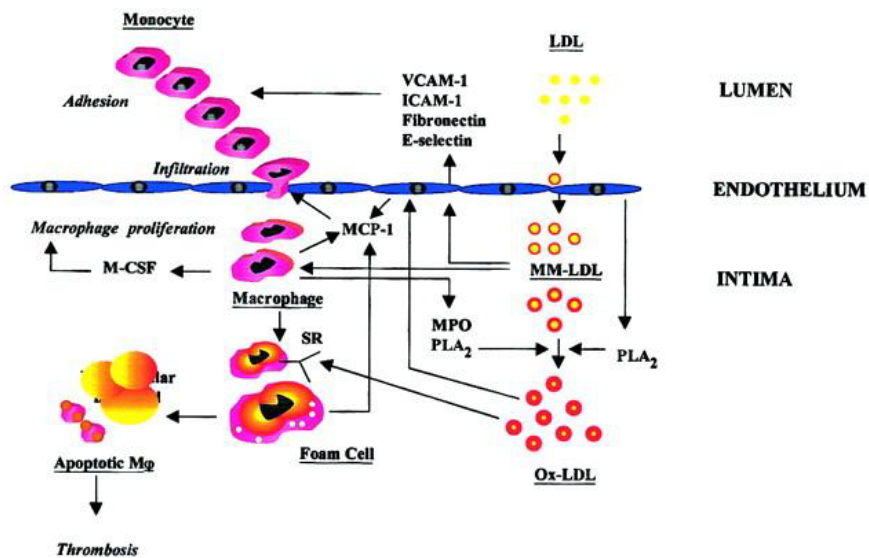


Figura 7. Ruolo dell'ossidazione delle LDL nello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche.

I monociti una volta entrati all'interno dello spazio subendoteliale si differenziano in macrofagi sotto l'influenza di citochine, M-CSF e lipoproteine ossidate. L'assorbimento di queste ultime da

parte di recettori scavengers dei macrofagi (CD36, SRA, SRB) porta alla formazione di cellule schiumose, con conseguente espressione di citochine (TNF, interleuchine e interferoni), enzimi (cisteina proteinasi, serina proteinasi e metalloproteasi) e fattori di crescita (PDGF, VEGF, IGF) che insieme al rilascio di citochine da cellule T attivate, promuovono il processo infiammatorio, la proliferazione e la migrazione di cellule muscolari lisce e cellule endoteliali all'interno dell'intima (figura 8).

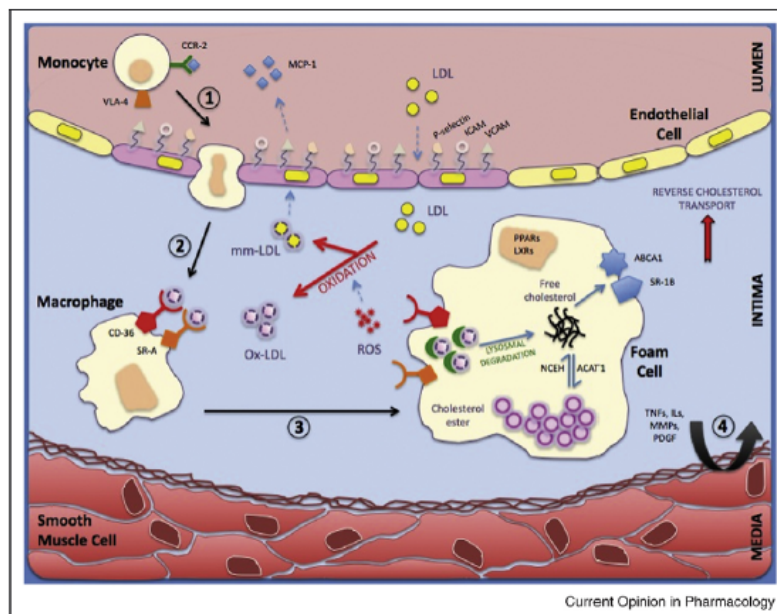


Figura 8. Monociti/macrofagi nella placca aterosclerotica.

1) Disfunzione endoteliale, attivazione dei monociti e adesione all'endotelio. 2) trasporto e modificazione delle LDL. 3) I macrofagi accumulano ox-LDL attraverso recettori scavenger (CD36 e SR-A) diventando "cellule schiumose". 4) Interazione di "cellule schiumose" con cellule T e migrazione di cellule muscolari lisce all'interno dell'intima. Saha P, Modarai B, Humphries J, Mattock K, Waltham M, Burnand KG, Smith A. *The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis. Curr Opin Pharmacol. 2009 Apr;9(2):109-18.*

Le cellule schiumose producono elevati livelli di prostaglandine (come ad esempio il trombossano A₂, TXA₂), in seguito ad attivazione dalle ciclossigenasi (COX1 e 2)²². Ciò promuove il legame fra TXA₂ e il trombossano prostanoidico (TP), inducendo vasocostrizione e aggregazione piastrinica. In risposta allo stress ossidativo sia i monociti che i macrofagi producono altri ligandi, oltre il TXA₂,

che legano il recettore TP, favorendo quindi l'aggregazione piastrinica e il progredire della placca aterosclerotica.

Lo stress ossidativo è una condizione patologica causata dalla rottura dell'equilibrio fisiologico fra la produzione e l'eliminazione da parte dei sistemi di difesa antiossidanti, di specie chimiche ossidanti, tra cui i radicali liberi dell'ossigeno. Questi possono essere generati da reazioni che coinvolgono i seguenti enzimi: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Fosfato-ossidasi (NADPH), lipossigenasi e Ossido Nitrico Sintasi (NOS), svolgendo un importante ruolo nello sviluppo dell'aterosclerosi (figura 9).

Il NADPH è il principale responsabile della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e i macrofagi nella parete vascolare sono una risorsa significativa di NADPH anione-superoossido ossidasi derivato²³.

Nei macrofagi sono stati riscontrati alti livelli di NOS inducibile (iNOS) in quanto la formazione di ossido nitrico è uno dei passaggi coinvolti nella degradazione dei patogeni²⁴.

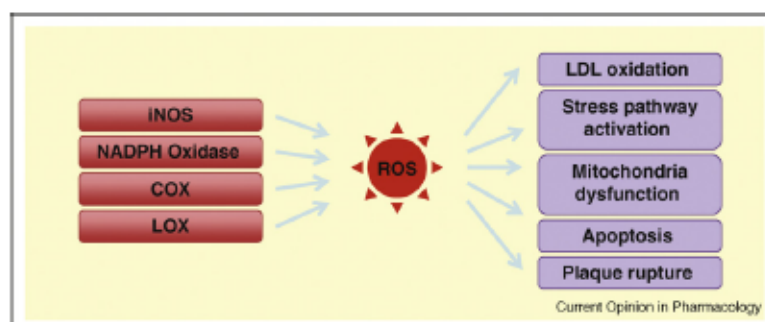


Figura 9. Specie reattive dell'ossigeno nell'aterosclerosi. Maggiori produttori di ROS nei macrofagi e loro potenziale attività nell'aterosclerosi. Saha P, Modarai B, Humphries J, Mattock K, Waltham M, Burnand KG, Smith A. The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis. Curr Opin Pharmacol. 2009 Apr;9(2):109-18.

Oltre alle chemochine i macrofagi producono proteasi (metalloproteasi della matrice MMPs, cisteina proteinasi e serina proteinasi) capaci di degradare la matrice extracellulare promuovendo così la migrazione delle cellule. Studi istologici mostrano che la maggior parte dell'attività delle MMPs nella placca deriva da macrofagi e cellule schiumose, rendendo queste cellule responsabili

della rottura del cappuccio fibroso della placca²⁵. Per questo motivo lo studio delle MMPs e dei relativi inibitori (TIMP) è largamente applicato alle patologie vascolari.

1.2.3 Ruolo dei macrofagi in altre patologie infiammatorie

Come spiegato nei paragrafi precedenti, i macrofagi sono cellule che hanno un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'aterosclerosi e in patologie con base infiammatoria. Essendo l'infiammazione una componente chiave nell'insorgenza dell'obesità legata all'insulino resistenza, i macrofagi sono cellule che svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo di questa patologia^{26,27}. L'insulino resistenza colpisce diversi tipi di tessuti, tra cui principalmente il muscolo scheletrico, il tessuto adiposo e il fegato. Una componente cellulare di tutti questi tessuti è rappresentata dai macrofagi, i quali sono i maggiori produttori di citochine infiammatorie. Diversi studi hanno evidenziato che l'attivazione cronica dei pathway pro-infiammatori da parte delle cellule target dell'insulina possono portare ad obesità legata ad uno stato di insulino resistenza^{28,29}. Il tessuto adiposo in particolare svolge una funzione chiave nell'insorgenza dello stato infiammatorio in risposta all'obesità, in quanto oltre a ad avere una funzione di stoccaggio secerne attivamente acidi grassi, ormoni, citochine e chemochine. I macrofagi che formano il tessuto adiposo (ATM, *Adipose Tissue Macrophage*) sono la fonte principale di citochine pro-infiammatorie che possono agire sia in modalità paracrina che endocrina causando una diminuzione della sensibilità all'insulina. L'attivazione degli ATM porta al rilascio di chemochine, tra cui TNF- α , IL-6 e IL-1 β che a loro volta richiamano altri macrofagi, innescando così un processo che oltre ad aumentare il contenuto di ATM propaga l'infiammazione (figura 10).

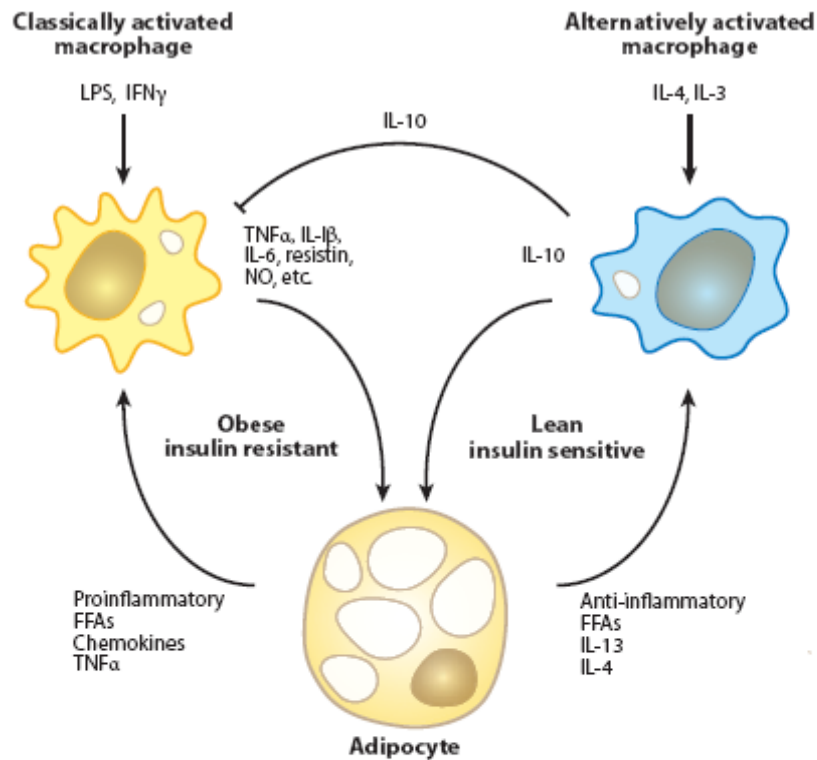


Figura 10: Fattori che regolano la polarizzazione macrofagica e l'insulino-resistenza nel tessuto adiposo. In condizioni dietetiche gli adipociti secernono IL-13 promuovendo l'attivazione macrofagica alternativa. Questi producono citochine anti-infiammatorie (IL-10) altri fattori insulino-sensibilizzanti. L'obesità induce cambiamenti nel metabolismo degli adipociti che rilasciano acidi grassi liberi (FFA), citochine pro-infiammatorie e fattori chemotattici come MCP-1. Questi stimolano l'attivazione macrofagica classica con conseguente produzione di citochine pro-infiammatorie, inducendo uno stato di insulino resistenza. J.M. Olefsky, C.K. Glass. *Macrophages, inflammation and insuline resi stance. J Atheroscler Thromb. 2010 Apr 30;17(4):332-41.*

Per ciò che concerne il ruolo delle cellule Kupffer, anche queste contribuiscono alla produzione di citochine pro-infiammatorie che promuovono l'insulino resistenza negli epatociti. Infatti modelli di topi knock out che presentano una diminuita risposta infiammatoria mostrano un'attenuazione dell'insulino resistenza epatica in presenza di una dieta ad alto contenuto di grassi (HFD, *High-Fat Diet*)^{30,31}.

È stato inoltre dimostrato che una dieta ad alto contenuto di grassi porta ad un aumento del numero di macrofagi all'interno del muscolo scheletrico.

1.3 Attivazione macrofagica

I macrofagi sono una popolazione cellulare che presenta una marcata eterogeneità, dovuta sia alla loro diffusa distribuzione tissutale che alla capacità di rispondere a diversi stimoli, sia endogeni che esogeni. Infatti l'interazione con le cellule circostanti o con molecole alterate ed agenti esogeni influisce sulla funzionalità di queste cellule.

I ligandi vengono riconosciuti da diversi tipi di recettori, innescando così diverse risposte cellulari, tra cui fagocitosi o endocitosi, attivazione o repressione di geni. Le funzioni cellulari indotte includono i processi di adesione e migrazione cellulare, secrezione di citochine, processazione e presentazione dell'antigene e attivazione delle funzioni effettrici nella risposta immunitaria. La figura 13 illustra i tipi di attivazione che possono essere indotti da vari stimoli endogeni ed esogeni. I recettori scavenger³² riconoscono ligandi o cellule alterate (necrotiche o apoptotiche) inducendo così una modificazione nella trascrizione di geni proinfiammatori³³. I ligandi esogeni vengono identificati da recettori che utilizzano il riconoscimento di opsonine (in particolare anticorpi³⁴), prodotti derivati dall'attivazione del complemento³⁵ e collectine³⁶, oppure attraverso il riconoscimento diretto di carboidrati, proteine, lipidi e acidi nucleici. In particolare lo studio dei TLR (*Toll Like Receptor*)³⁷ e delle lectine³⁸ ha dimostrato il loro impatto sull'attivazione del fattore di trascrizione nucleare KB (Nf-KB) che induce la trascrizione di geni pro infiammatori. Meno noto è il fatto che questi recettori interagiscono non solo con le strutture conservate dei batteri, ma anche con molecole endogene alterate, quali lipoproteine modificate, *heat shock protein* e complessi proteinasici. Questi *pattern-recognition receptors* contribuiscono alla *clearence* e all'omeostasi tissutale, come parte attiva nella difesa dell'organismo.

In particolare all'interno del processo aterosclerotico e infiammatorio, in risposta ai segnali molecolari associati alla presenza della placca, i macrofagi possono assumere una funzione pro

oppure anti-aterogena, influenzando così il metabolismo dei lipidi, la risposta infiammatoria e la stabilità della placca. In questo contesto risultano estremamente rilevanti tre tipi di attivazione macrofagica:

1. classica (o M1)
2. alternativa (o M2a)
3. deattivazione (o M2c)

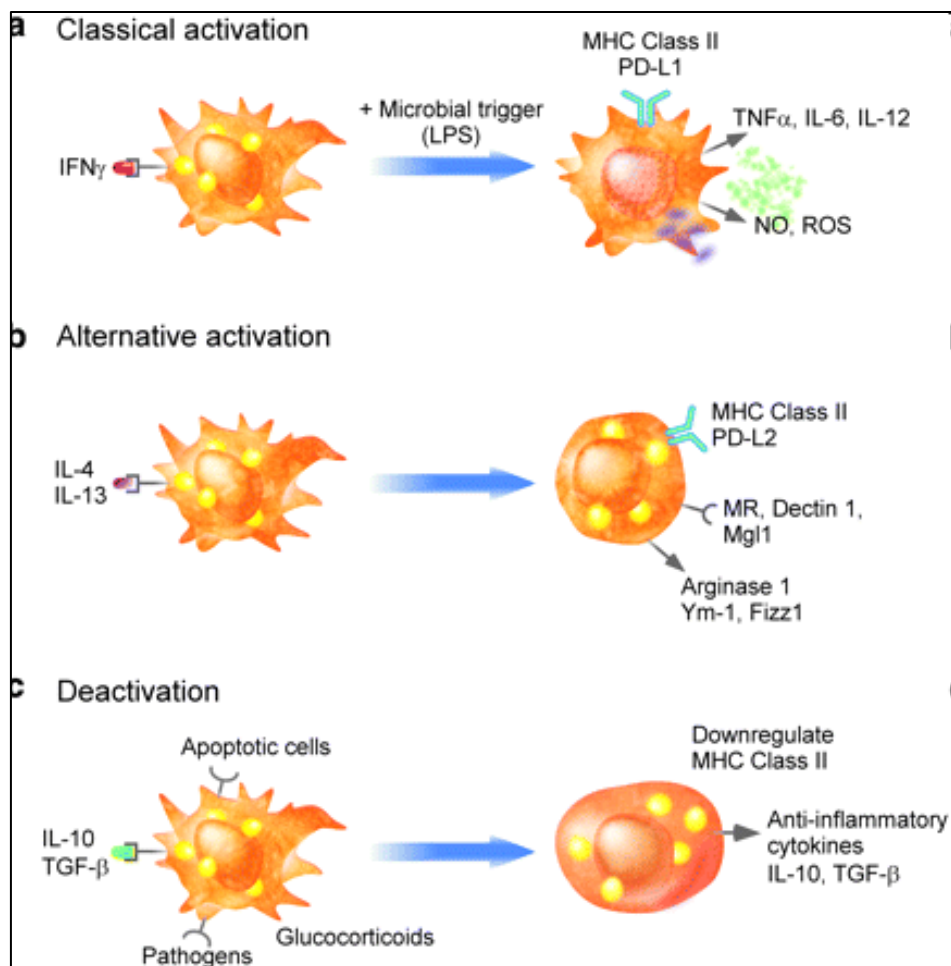


Figura 11: a) attivazione macrofagica classica o M1; b) attivazione macrofagica alternativa o M2a; c) attivazione macrofagica M2c o de attivazione. *Chawla A., Control of macrophage activation and function by PPARs. Circ Res. 2010 May 28;106(10):1559-69*

1.3.1 Attivazione classica (M1)

In presenza di linfociti Th1 e delle citochine da esse secrete, i macrofagi subiscono un processo di attivazione in senso pro-infiammatorio, aumentando la loro capacità di uccidere patogeni intracellulari e contribuendo alla progressione del processo flogistico.

I macrofagi della via classica si sviluppano in risposta a IFN γ (interferone gamma), ad una lunga esposizione a microrganismi o prodotti microbici come LPS e a citochine come TNF- α (Tumor Necrosis Factor alfa). Le cellule così attivate secernono bassi livelli di IL-10 e alti livelli di citochine infiammatorie come IL-12, IL-23, IL-1 β , IL6 e il TNF α , con conseguente attivazione delle cellule effettrici Th1³⁹.

Il fenotipo M1 può essere identificato da una varietà di principi funzionali e biochimici, tra cui la sovraespressione di molecole di superficie come MHC di classe II e CD86, una aumentata abilità a presentare l'antigene e a uccidere i patogeni intracellulari. La rimozione dei patogeni è portata a termine dall'incremento della produzione di specie tossiche dell'ossigeno e da un'induzione del gene dell'ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS). In vitro, l'attivazione classica può essere indotta stimolando i macrofagi con IFN γ e LPS, causando la produzione di TNF α , associata ad attività microbica, produzione di citochine proinfiammatorie e immunità cellulare⁴⁰.

L'attività dei macrofagi M1 può essere rapidamente regolata per prevenire la distruzione incontrollata dei tessuti. Il segnale di attivazione dei macrofagi può provenire da essi stessi, o dalle cellule che li circondano.

1.3.2 Attivazione alternativa (M2)

L'esposizione a citochine antinfiammatorie genera un'attivazione dei macrofagi diversa da quella precedentemente descritta. La funzionalità di queste cellule infatti si differenzia da quelle classicamente attivate in quanto invece di contribuire al processo flogistico promuovono l'angiogenesi e partecipano al rimodellamento e alla riparazione dei tessuti⁴⁰. Per questo motivo i macrofagi che presentano questo profilo vengono generalmente identificati con il nome M2, sono caratterizzati da un'attività immunoregolatoria e a loro volta possono essere divisi nei seguenti sottogruppi: M2a, M2b, M2c⁴¹ (figura 12).

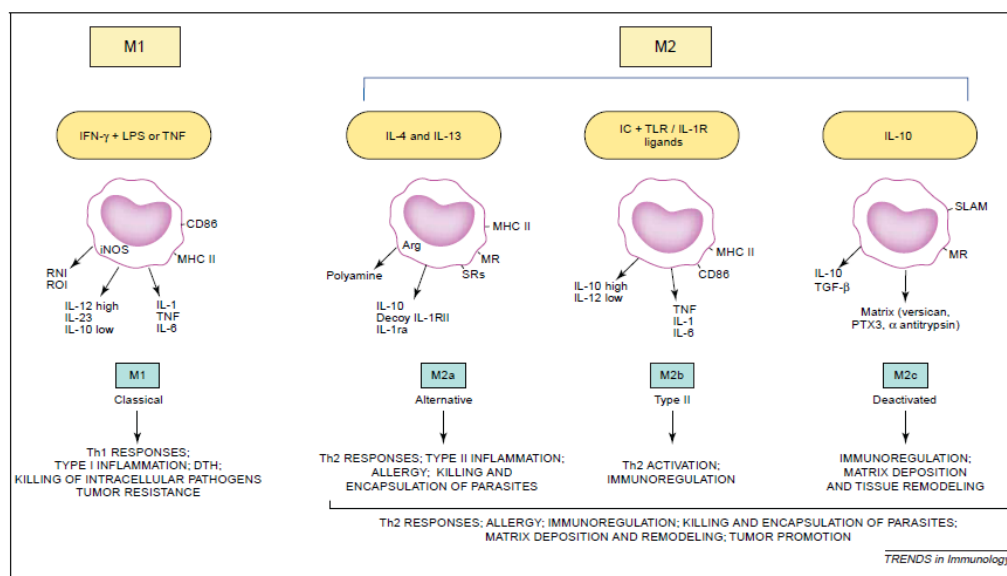


Figura 12. Rappresentazione schematica degli induttori e proprietà funzionali di differenti popolazioni macrofagiche. *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.* Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. *Trends Immunol.* 2004 Dec;25(12):677-86

Attivazione alternativa M2a

L'attivazione macrofagica M2a è quella che in generale viene intesa come attivazione alternativa. I macrofagi M2a differiscono in termini di espressione recettoriale, produzione di citochine e

funzione effettrice rispetto ai macrofagi attivati classicamente. L'attivazione alternativa macrofagica indotta in coltura dall'esposizione di interleuchina-4 o 13 (IL-4 o IL-13) è associata alla riparazione del tessuto e all'immunità umorale.

Nei primi anni '90 esaminando la regolazione dell'espressione del recettore per il mannosio, che risulta inversamente correlata alla presenza di molecole MHC di classe II, è stato documentato che questo recettore poteva essere utilizzato come marcatore per distinguere i macrofagi classici da quelli alternativi⁴². Successivamente venne dimostrato che un modo particolarmente efficiente per indurre l'espressione del recettore era di trattare queste cellule con IL-4 o IL-13, citochine prodotte dai linfociti Th2. In particolare la presenza di IL-4 induce l'attivazione del pathway JAK/STAT-6, con la conseguente trascrizione di alcuni geni marker quali ALOX15, FN1, CD23a, MAO-A, CCL26, CCL22 e SOCS. L'IL-4 inoltre stimola la produzione di citochine antiinfiammatorie, come IL-10 e IL-1R antagonista, ed inibisce l'espressione di citochine pro-infiammatorie come IL-1, TNFalfa, IL-6, IL-12 a MIP-alfa, riducendo quindi l'infiammazione⁴³. Parallelamente all'inibizione dell'infiammazione i macrofagi M2a intervengono anche nella riparazione tissutale. Studi recenti si sono focalizzati sul ruolo svolto nell'angiogenesi e nel rimodellamento della matrice extracellulare. I macrofagi attivati alternativamente infatti producono alti livelli di fibronectina e una proteina associata alla matrice, la β IG-H3⁴⁴. L'induzione di arginasi in queste cellule può condurre alla biosintesi di poliammina e prolina promuovendo la crescita della cellula, la formazione del collagene e la riparazione del tessuto⁴⁵. L'attivazione alternativa non produce ossido nitrico e conseguentemente risulta compromessa la capacità di uccidere i microbi intracellulari rispetto al fenotipo classico. Nonostante queste cellule sovraesprimano molecole MHC classe II, sono meno efficienti nella presentazione dell'antigene. In molti casi esse inibiscono la proliferazione delle cellule T, partecipano alla risposta immunitaria umorale regolando la risposta effettrice di tipo Th2 e stimolano la cellula B alla produzione di immunoglobuline. Le citochine maggiormente prodotte

da queste cellule alternativamente attivate sono IL-10 e l'antagonista del recettore per l'IL-1. Sulla base di questi dati il fenotipo M2a viene considerato antinfiammatorio e immuno-regolatorio.

Attivazione M2c o deattivazione

Il processo di "spegnimento" dell'attività infiammatoria ed immunitaria dei macrofagi attivati può essere avviato tramite la presenza di citochine anti-infiammatorie, come IL-10, oppure glucocorticoidi. Queste molecole infatti legano un recettore citosolico per ormoni steroidei che provoca una repressione della trascrizione di geni quali iNOS, COX-2 e TNF. In alte concentrazioni i glucocorticosteroidi hanno un effetto immunosoppressivo inibendo le molecole MHC I e II e quindi la processazione dell'antigene. Alcuni effetti delle suddette molecole anti-infiammatorie sono mediati dall'attivazione nella trascrizione di geni anti-infiammatori quali ad esempio l'annassina1 (o lipocortina1). Questa proteina lega substrati della fosfolipasiA2 che si trovano sulla membrana cellulare, down-regolando la formazione di acido arachidonico, substrato fondamentale per la sintesi di prostaglandine (PG) e leucotrieni (LT). Durante la risoluzione di un processo infiammatorio, la produzione di PG ed LT diminuisce a favore di prodotti anti-infiammatori, quali 15dPGJ2 e lipossine. Il primo inibisce i pathway pro-infiammatori mediati da NFkB, AP-1 e STAT, mentre il secondo partecipa maggiormente alla deattivazione dei neutrofili. 15dPGJ2 è in grado di aumentare l'apoptosi nei macrofagi e di ridurre la produzione di radicali liberi dell'ossigeno, ed inoltre è stato visto essere un agonista dei PPAR γ . È risultato inoltre come l'inibizione del recettore CD200 sia in grado di arrestare la trasduzione del segnale attraverso la via delle MAPK, ERK e JNK⁴⁶. Per questi motivi la deattivazione macrofagica si associa a processi di immunosoppressione attivando le cellule della risposta effettrice Th2, al deposito della matrice e al rimodellamento tissutale⁴⁷.

Attivazione alternativa M2b

In letteratura sono presenti studi in cui si valuta la risposta dei macrofagi a immunocomplessi, in quanto questo sembra che porti alla formazione di un fenotipo intermedio tra la via classica e quella alternativa⁴⁰. Tale tipo di attivazione viene definita M2b, e la differenziazione macrofagica in questo sottotipo si verifica in seguito ad esposizione ad immunocomplessi (IC), ad agonisti dei TLRs (Toll Like Receptor) e al recettore per l'IL1. Le cellule così attivate secernono alti livelli di citochine antinfiammatorie come IL-10 e bassi livelli di IL-12. Producono, inoltre, citochine proinfiammatorie come IL-1, IL-6 e TNF α , partecipando preferenzialmente alle risposte effettrici Th2 e alla immunoregolazione; inoltre, sono coinvolti sia nell'attivazione della risposta immunitaria innata, determinata da ligandi del TLR, sia all'aumento della produzione di citochine proinfiammatorie, che alla sintesi di ossido nitrico sintetasi inducibile e di specie reattive dell'ossigeno (iNOS e ROS)⁴⁸. Dal momento che questo tipo di attivazione presenta caratteristiche ibride fra l'attivazione classica e alternativa, per il momento ci siamo focalizzati su quelle popolazioni con proprietà ben marcate e nettamente distinte, cioè i macrofagi M1, M2a ed M2c..

1.4. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs)

I PPARs sono membri della super-famiglia dei recettori nucleari che regolano l'espressione genica in seguito ad interazione con il ligando. Ad oggi sono stati identificati tre PPARs, denominati PPAR α , PPAR δ (noti anche come PPAR β) e PPAR γ . In seguito al legame con il ligando, i PPARs subiscono specifiche modificazioni conformazionali che consentono il reclutamento di una o più proteine coattivatrici⁴⁹. I ligandi differiscono per la loro tendenza ad interagire con i coattivatori, il che spiega le varie risposte biologiche osservate. I PPARs regolano la trascrizione genica attraverso due meccanismi (Figura 13): la transattivazione e la transrepressione.

La transattivazione è DNA-dipendente e prevede la formazione di un eterodimero da parte del PPAR con il recettore del retinoide-X (retinoid X receptor) (RXR). Questo complesso riconosce e lega specifiche sequenze del DNA note come PPAR response elements (PPRE), situate nella regione promotrice dei geni target, regolando l'attività trascrizionale di geni codificanti proteine che modulano il metabolismo del glucosio e dei lipidi. La transrepressione consiste nella repressione della trascrizione genica attraverso un meccanismo indipendente dal legame con il DNA: si crea un'interferenza nei confronti di altre vie di trasduzione intracellulare come quella del Nuclear Factor- κ B (NF κ B), spiegando in parte l'azione antinfiammatoria dei PPARs.

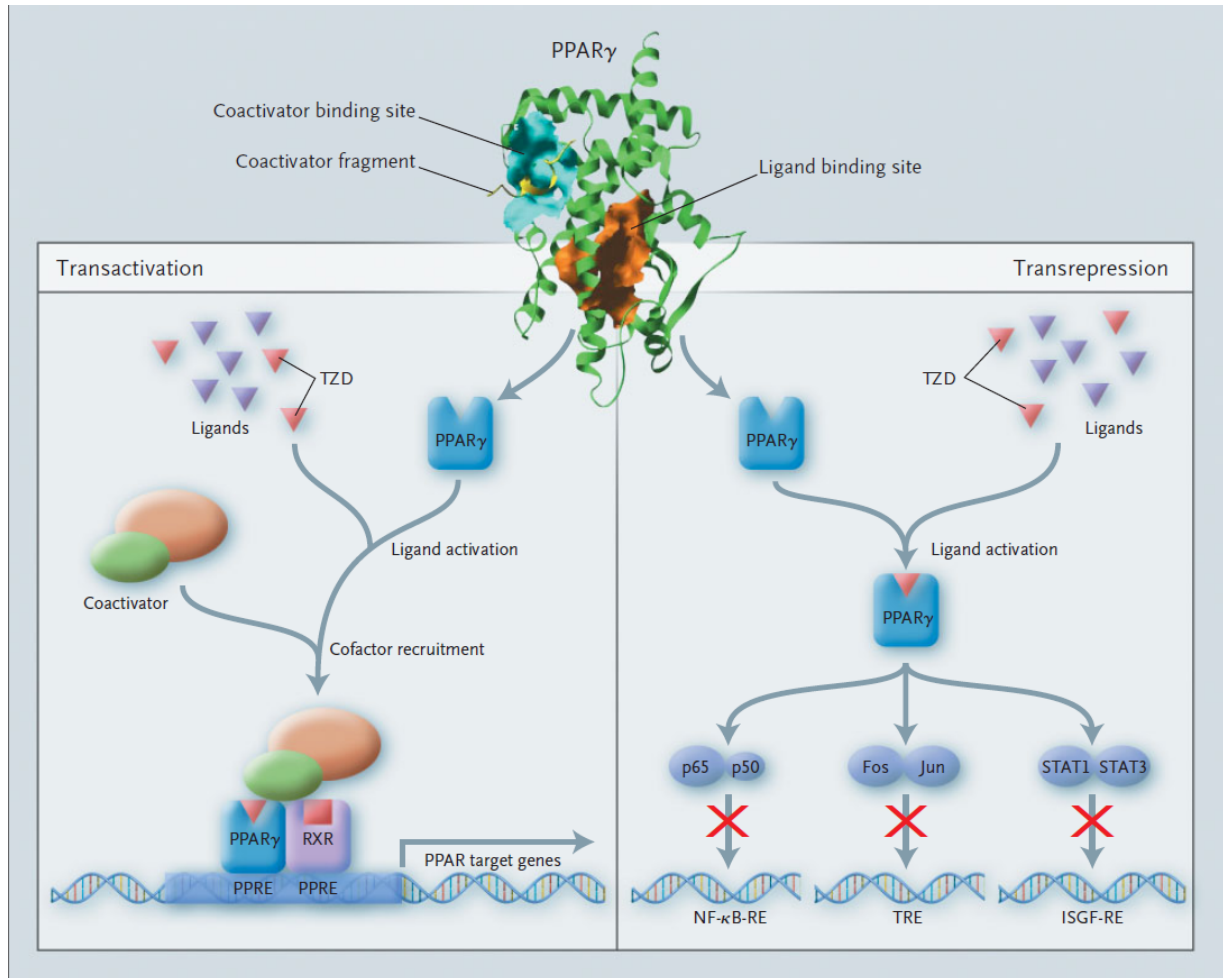


Figura 13. Meccanismi molecolari dell'azione biologica dei Tiazolidinedioni. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. N Engl J Med. 2004; 351: 1106-1118

I PPAR γ sono espressi prevalentemente nel tessuto adiposo ma anche in cellule β pancreatiche, monociti ed endotelio vascolare⁵⁰. La loro espressione è bassa nei tessuti che esprimono per lo più i PPAR α quali fegato, cuore e muscolo scheletrico. Tuttavia attualmente il pioglitazone rimane l'unico utilizzato di questa classe di farmaci poiché il rosiglitazone è stato ritirato dal commercio in quanto causa un aumento degli eventi cardiovascolari⁵¹.

I PPAR γ sono coinvolti nella modulazione sia dei geni necessari alla differenziazione dei fibroblasti in adipociti, sia dei geni che codificano le proteine coinvolte nella sintesi dei lipidi e nel loro immagazzinamento negli adipociti. I PPAR γ , oltre ad essere coinvolti nel mantenimento

dell'omeostasi dei lipidi, svolgono un importante ruolo nella regolazione del processo flogistico in quanto la loro attivazione inibisce NFκB e quindi la trascrizione di geni infiammatori. Per questo motivo agonisti dei PPARγ sembrano intervenire nell'attivazione macrofagica alternativa⁵².

I PPARγ una volta attivati inibiscono le molecole di adesione proinfiammatorie (VCAM-1, ICAM-1, E-selectine), compromettendo il processo di diapedesi dei monociti attivati alle cellule endoteliali⁵³ (figura 14).

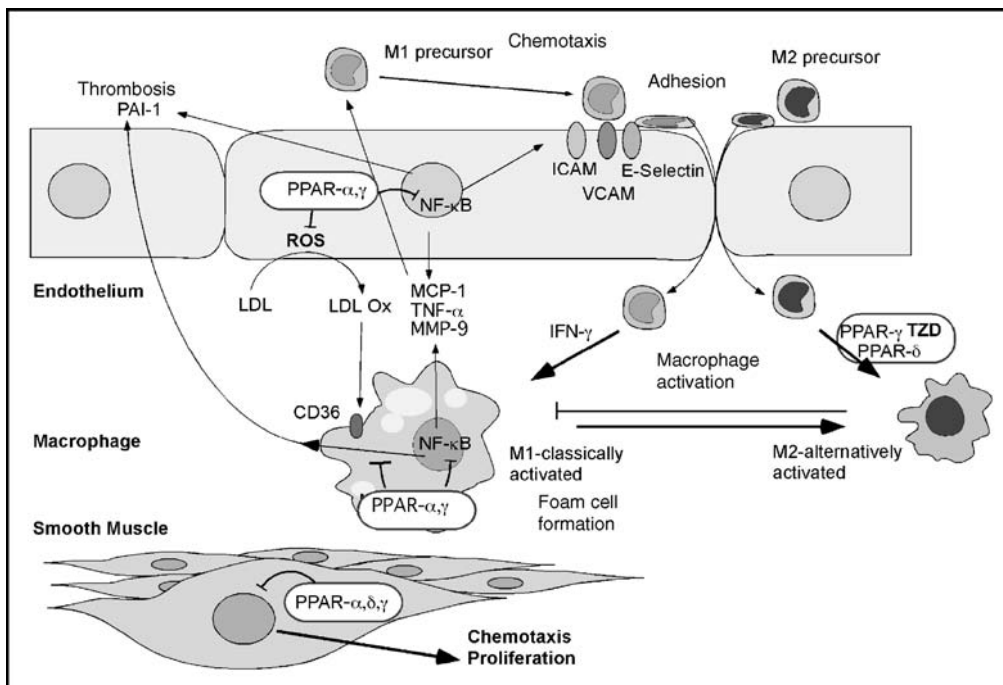


Figura 14. PPARs alterano la funzione vascolare e infiammatoria a diversi livelli

I tiazolidinedioni (pioglitazone e rosiglitazone) sono farmaci antidiabetici di nuova generazione che si legano con alta affinità al PPAR-γ, aumentando la sensibilità all'insulina nel fegato, nel tessuto adiposo e nei muscoli (figura 16).

Studi precedenti di immunostochimica hanno evidenziato la presenza di macrofagi M2a nelle placche aterosclerotiche⁵² attraverso la presenza di marker di superficie quali CD163 e CD206,

suggerendo quindi che vi sia una sorta di bilanciamento fra i macrofagi classici ed alternativi anche in presenza di uno stadio avanzato della patologia.

1.5 Espressione genica e microarray

Il profilo di analisi dell'espressione genica dei macrofagi è stata valutato attraverso la tecnologia *microarray dual color*.

I *microarray* rappresentano una delle tecnologie più utilizzate per lo studio del profilo dell'espressione genica e proprio per le sue peculiari caratteristiche ha trovato larga applicazione nello studio del genoma. Un chip di *microarray* consiste in migliaia di sequenze nucleotidiche altamente specifiche per trascritti di mRNA, spottate sulla superficie di un vetrino.

I principi su cui si basano gli esperimenti di *microarray* sono:

- Ibridazione di sequenze nucleotidiche complementari
- Discriminazione spaziale
- Selezione delle sonde
- Tipo di marcatura e di ibridazione

1.5.1 Ibridazione

L'ibridazione si basa sulla proprietà che hanno le catene a singolo filamento di acidi nucleici di riformare una doppia elica in presenza di una sequenza nucleotidica complementare. Questo principio si basa sulla formazione di legami idrogeno che legano specifiche basi di nucleotidi con la catena di DNA opposta. Un aumento di temperatura (95 °C), può provocare la separazione della doppia elica del DNA, un processo chiamato denaturazione. Se la doppia elica del DNA viene esposta ad una temperatura sufficiente da rompere i legami idrogeno senza coinvolgere i legami covalenti fosfodiesterici che uniscono le basi nucleotidiche, la sequenza del DNA non viene alterata e si formano due singoli filamenti di DNA complementari. Abbassando lentamente la

temperatura le sequenze complementari tendono ad appaiarsi formando così una doppia elica. Per questo motivo l'ibridazione è un processo altamente specifico che richiede precise condizioni chimico-fisiche. Sfruttando questo principio avviene l'appaiamento fra le sonde spottate sul vetrino e le sequenze nucleotidiche marcate provenienti dal campione che vogliamo analizzare.

1.5.2 Discriminazione spaziale

La posizione di ogni spot sugli *array* è pre-determinata in modo da fornire la corrispondenza tra il segnale di fluorescenza locale e l'annotazione della sequenza spottata in quel punto. E' assolutamente necessario che le sonde siano disposte in maniera ordinata, sia su linee orizzontali che verticali; ogni elemento deve avere una collocazione ben precisa, in base alle sequenze desiderate, in modo che, automaticamente, il dato letto dalla macchina corrisponda ad un unico e ben preciso spot. Utilizzando uno scanner con il laser ad una determinata lunghezza d'onda, è possibile eccitare il fluoroforo con cui si è marcato il campione che si è ibridato sulla superficie dell'*array*. Un particolare *software* è in grado di identificare per ogni singolo spot il segnale di fluorescenza e correggerlo per il *background*. La quantità di mRNA associato ad un campione si può determinare attraverso l'intensità della fluorescenza emessa.

1.5.3 Selezione delle sonde

Ci sono due tecniche per la selezione delle sonde usate per l'espressione genica con *microarray*: *cDNA arrays* e *oligo-arrays*; tutte e due possono essere usate per *array dual color*.

La base per la selezione delle sonde è di identificare piccole sequenze che possono essere considerate come uniche rappresentanti per il trascritto target.

Si possono utilizzare sequenze di cDNA a singolo filamento target di mRNA, oppure si sintetizzano direttamente sugli *array* sequenze di 60 basi che sono specifiche per il target mRNA. Il primo

metodo richiede la costruzione di librerie di cloni di cDNA, mentre il secondo richiede l'identificazione di sequenze univoche. Gli *array* di oligonucleotidi vengono preparati tramite la sintesi in situ di sequenze oligonucleotidiche di circa 60 basi tramite fotolitografia. A differenza di quelle a cDNA, le sonde oligonucleotidiche possono essere sintetizzate separatamente e senza utilizzare cloni batterici. In questo modo c'è la possibilità di cambiare le sequenze e di includere nell'*array* geni per cui non sono presenti i cDNA nelle librerie. Un'altra caratteristica degli *array* di oligonucleotidi è che possono essere ad alta densità: si può rappresentare un elevato numero di geni su un singolo chip, ciò permette di includere in un singolo *array* le sonde per l'intero genoma umano.

1.5.4 Tipo di marcatura e di ibridazione

I *microarray dual color* misurano l'espressione genica confrontando il campione con una *reference* di controllo. Nel nostro caso l'RNA totale viene estratto da macrofagi in coltura mentre la *reference* è rappresentata da un pool commerciale di RNA totale estratto da leucociti umani. Dopo una prima fase di retrotrascrizione in cDNA, si procede con un'amplificazione lineare la quale avviene contemporaneamente alla trascrizione in cRNA e l'incorporazione del fluoroforo. In genere si marca l'RNA *reference* con Cy3 (verde) e il campione con Cy5 (rosso). Successivamente la stessa quantità di ciascun amplificato viene unita in una singola soluzione, che viene denaturata e ibridizzata su un singolo chip. In questo modo un singolo *array* contiene la stessa concentrazione di cRNA del campione e della *reference*, ed entrambi competono per i target comuni, fenomeno conosciuto come ibridazione competitiva. Ad ogni coordinata sulla slide corrisponderà un'intensità di fluorescenza verde o rossa proporzionale alla quantità di target presente nel campione rispetto alla *reference*. Il campione che esprimerà una maggiore quantità di un determinato gene inibirà

l'ibridazione dell'altro; in questo modo si ha l'identificazione dei geni peculiarmente espressi o non espressi del campione rispetto alla relativa *reference*.

Dopo l'ibridazione, le slide vengono lavate e lette da uno scanner dotato di due laser con lunghezze d'onda specifiche per i due fluorofori. Questo strumento è in grado di rilevare il segnale di fluorescenza emesso dai singoli spot, l'espressione di un singolo gene viene quantificata come valore relativo, misurando il rapporto fra le intensità dei segnali verde/rosso.

Per questo studio si è scelto di utilizzare array Agilent Whole Human Genome 4x44k con tecnologia dual color in modo da potere quantificare e analizzare il trascrittoma completo del genoma umano. Questa metodica è stata utilizzata per analizzare il profilo di espressione genica di monociti isolati da sangue periferico e successivamente differenziati in macrofagi, dai quali è avvenuta l'estrazione dell'RNA. La reference utilizzata per il controllo è rappresentata da un pool commerciale di RNA estratto da leucociti umani (Clontech, USA).

2. SCOPO

L'aterosclerosi è una patologia infiammatoria in cui i macrofagi svolgono un ruolo fondamentale, in quanto la loro capacità di produrre vari tipi di citochine fa sì che queste cellule influenzino l'andamento della patologia. Lo scopo generale di questo lavoro è quindi quello di studiare il comportamento dei macrofagi in risposta a diversi tipi di stimoli per meglio comprendere i processi biologici che regolano la trascrizione di geni che partecipano all'infiammazione al fine di modularne l'espressione.

Possiamo quindi identificare tre obiettivi principali all'interno di questo lavoro:

- analizzare il trascrittoma dei diversi tipi di attivazione macrofagica (M1, M2a, M2c) per indagare le differenze di espressione genica presenti fra un fenotipo e l'altro e per avere un quadro completo del comportamento cellulare e non solo relativo ad un limitato set di geni;
- valutare allo stesso modo il ruolo dei PPAR γ nello sviluppo del fenotipo antinfiammatorio M2a ed M2c;
- verificare l'andamento di espressione genica nel tempo per ogni suddetta condizione facendo esperimenti di *time course*, al fine di valutare l'evoluzione della regolazione della trascrizione genica nel tempo.

3. MATERIAL E METODI

Lo studio e l'attività di laboratorio sono composti da diverse fasi:

- Purificazione di cellule mononucleate da "buffy coat".
- Isolamento di monociti.
- Colture cellulari di monociti-macrofagi.
- Estrazione di RNA.
- Analisi del profilo di espressione genica (microarray).
- Validazione dei risultati ottenuti tramite Real Time PCR

Disegno dello studio

Come detto precedentemente, questo studio si propone di analizzare il trascrittoma delle differenti tipologie di attivazione macrofagica in tre tempi diversi attraverso la tecnologia microarray dual color.

Sono quindi state allestite colture primarie di monociti isolati da sacche di buffy coat di donatori sani provenienti da un pool di donatori di sangue del locale centro trasfusionale. Accanto ai vari tipi di attivazione in ogni esperimento abbiamo mantenuto una popolazione di macrofagi differenziati e maturi ma non attivi, in quanto non abbiamo aggiunto stimoli, denominati *Resting Macrophages* (RM). Questo ci permette di avere un confronto di base che consenta di scartare tutti quei geni che vengono normalmente espressi nei macrofagi, in modo da poterci concentrare solo sulle alterazioni dovute alla presenza di particolari stimoli. Ogni condizione è stata eseguita in triplo.

Al fine di analizzare il *time course* è stato scelto di lisare le cellule dopo 6, 12 e 24 ore dall'aggiunta degli stimoli, tranne per i macrofagi addizionati con agonista di PPAR γ che sono stati lisati dopo 24, 48 e 72 ore dall'aggiunta della molecola.

Di seguito lo schema riassuntivo del disegno dello studio.

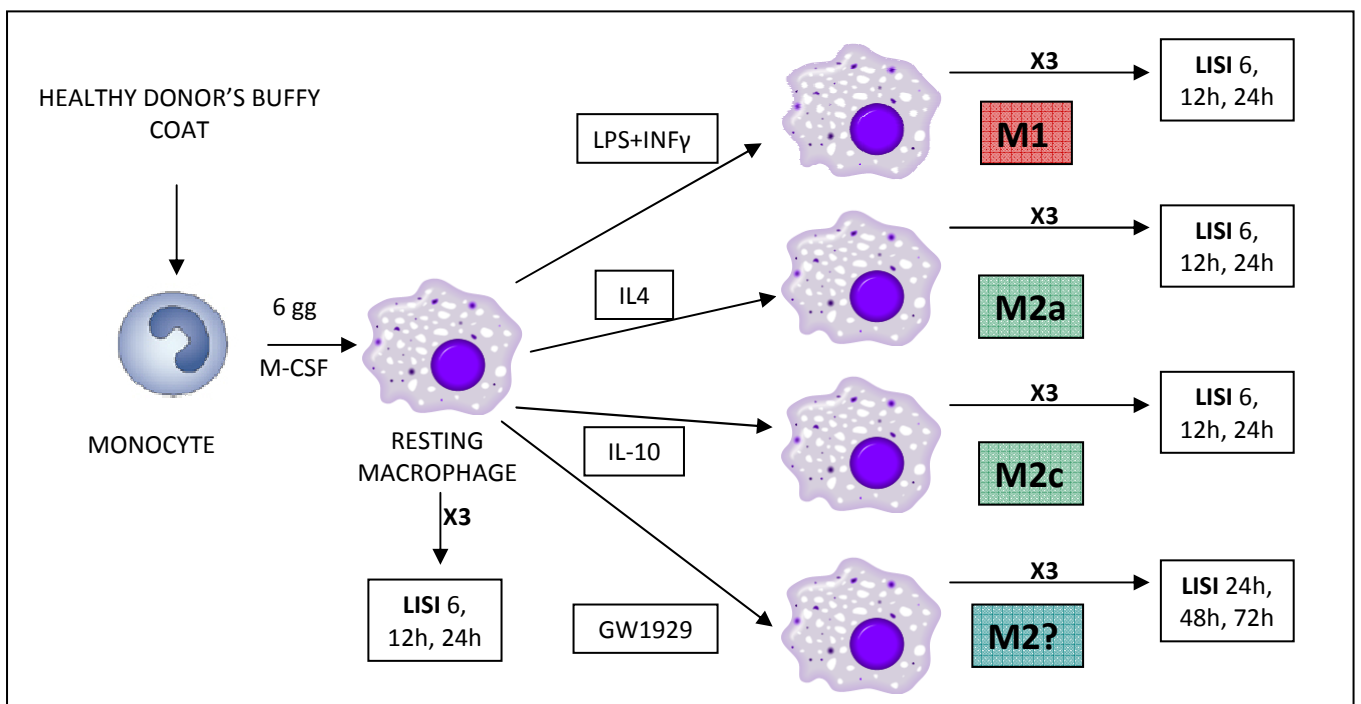


Figura 15: disegno sperimentale

3.1 Colture cellulari

3.1.1 Purificazione di cellule mononucleate da buffy coat

Al fine di potere ottenere una quantità sufficiente di cellule abbiamo utilizzato per i nostri esperimenti *buffy coat* provenienti dal centro trasfusionale prelevato da donatori sani. L'esperimento deve iniziare entro poche ore dal prelievo e il sangue viene diluito con PBS in rapporto di 1:2. La purificazione dei PBMCs (Peripheral blood mononuclear cell) viene eseguita sotto cappa a flusso laminare per ottenere la massima sterilità. I PBMCs vengono isolati mediante centrifugazione in gradiente di densità su Lymphoprep® (Sentinel, Milan, Italy). La soluzione Lymphoprep è costituita da polisaccarosio e sodiodiatrizoto. Quando il sangue viene depositato sulla soluzione e sottoposto a centrifugazione, le cellule mononucleate vengono trattenute in corrispondenza dell'interfaccia tra la soluzione e il plasma, mentre gli eritrociti precipitano sul fondo della provetta. La popolazione cellulare dei linfomonociti appare quindi come un "anello" facilmente distinguibile nella sottostante figura.

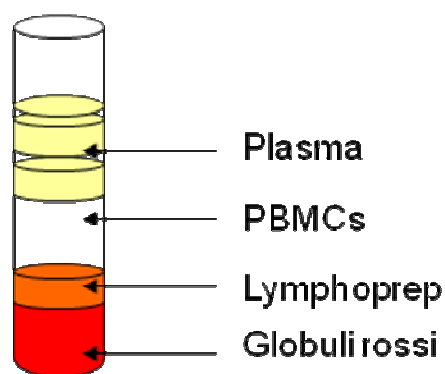


Figura 16. Stratificazione del sangue in seguito a centrifugazione in gradiente di densità su Lymphoprep.

Nello specifico il protocollo prevede:

- aggiunta di 5 ml di soluzione Lymphoprep, precedentemente portata a temperatura ambiente;
- stratificazione di 6-7 ml di sangue in ogni tubo avendo cura di far scorrere lo stesso lungo la parete della provetta con un flusso continuo, in modo tale da ottenere due fasi ben distinte;
- centrifugazione per 20 minuti a 1800 rpm (800g) (senza utilizzare il sistema frenatura della centrifuga per non alterare le fasi che si vengono a creare);
- prelievo di 2-3 ml di plasma da ciascun tubo per successivo stoccaggio a -80°C;
- prelievo dell'anello dei linfomonociti e raccolta nel tubo da 50ml;
- lavaggio delle cellule mediante l'aggiunta di HBSS (Hanks balance salt solutions, GIBCO® Invitrogen Corp.) a 4 °C per un volume finale di 50 ml centrifugando a 1500 rpm per 10 minuti;
- ripetizione del lavaggio per due volte; risospensione finale in 10ml di PBS;
- conta delle cellule mediante camera di Burker. Dopo aver agitato bene la sospensione, si posizionano 7,5 µl sul bordo del vetrino che copre la camera di conta. Il numero totale di cellule per ml si calcola mediante la conta al microscopio come media dei valori ottenuti nei quattro quadranti moltiplicato per 10^4 e per il volume di PBS utilizzato per la sospensione;
- risospensione del pellet in PBS (Phosphate-buffered salines) + 0.1% di BSA (Bovine serum albumin) in modo da ottenere una concentrazione finale 10×10^6 cellule per 100 µl.

3.1.2 Isolamento di monociti

I monociti vengono isolati dai PBMCs utilizzando una metodica che prevede l'utilizzo di biglie ricoperte di anticorpi che riconoscono specifici antigeni di superficie. Nel nostro caso impieghiamo una metodica di selezione negativa, che prevede l'eliminazione di tutte le cellule che non siano monociti. Al campione viene quindi aggiunta una miscela di anticorpi monoclonali diretti verso tutta la popolazione leucocitaria tranne per i monociti.

Per questa fase abbiamo usato delle biglie di polistirene superparamagnetiche uniformi, ricoperte da anticorpi monoclonali umani e anticorpi IgG anti-topo (Dynabeads, Invitrogen). La miscela di anticorpi è formata da IgG di topo per CD2,CD7, CD16 (specifico per CD16a e CD16b), CD19, CD56 e CD235a (Glicoforina A). I monociti caratterizzati dall'espressione di CD14 non verranno riconosciuti dalle biglie e quindi verranno separati dal resto della soluzione. Questa metodica permette di isolare monociti con una purezza del 90%.

Il protocollo sperimentale prevede:

- aggiunta di 20 μ l di Blocking Reagent ogni 10^7 cellule al pellet precedentemente risospeso (Dyna^l® Monocyte Negative Isolation Kit);
- aggiunta di 20 μ l di Antibody Mix per 10^7 cellule;
- incubazione a 4°C per 10 minuti;
- lavaggio delle cellule aggiungendo 1 ml di PBS + 0.1% BSA per $10-50 \times 10^6$;
- risospensione delle cellule in 400 μ l di PBS + 0.1% BSA;
- lavaggio delle Dynabeads prima dell'utilizzo per rimuovere il sodium azide;
- risospensione delle biglie, aggiunta in un tubo di 100 μ l per 10^7 ;
- aggiunta di 1-2 ml PBS + 0.1% BSA (buffer 1) e risospensione;

- inserimento del tubo nel Magnetic Particle Device per 1 minuto e rimozione del buffer 1;
- esecuzione della precedente operazione per 3 volte;
- risospensione delle biglie lavate nel volume iniziale di buffer 1;
- aggiunta delle biglie alle cellule, ottenendo un volume finale 1 ml per 10^7 cellule;
- incubazione 15 minuti a 4°C mantenendo il tubo in rotazione tramite l'utilizzo di un apposito rotore;
- aggiunta alla soluzione di 1-2 ml di PBS + 0.1% BSA per 10^7 cellule;
- inserimento del tubo nel magnete per 3 minuti;
- prelievo del surnatante contenente i monociti e trasferimento per lavaggio in un nuovo tubo; inserimento nel magnete ed esecuzione del lavaggio per 3 volte;
- trasferimento in un tubo da 50 ml e lavaggio con 50 ml di HBSS a 300g per 10 minuti;
- risospensione del pellet in 5 ml di RPMI completo e conta dei monociti isolati (10-20% delle cellule iniziali).

Per verificare la purezza della popolazione cellulare selezionata abbiamo valutato l'espressione di antigeni di superficie tramite tecnica citofluorimetrica. In particolare è stata valutata la presenza di marcatori monocitari quali il CD14, CD45, CD105, CD33 e CD71 e di marcatori linfocitari come CD3 e CD19. Sono stati utilizzati 10 μ l di ciascun anticorpo monoclonale per 500.000- 1.000.000 di cellule totali. Dopo incubazione a 4 °C al buio per 30 minuti, le cellule sono state lavate con PBS + BSA (Bovine Serum Albumin) e quindi acquisite con citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson), calibrato con CALIBRITE 3 beads (Becton Dickinson) e FACSComp Software (Becton Dickinson). Per le procedure di acquisizione e analisi è stato utilizzato il Software Cell Quest (Becton Dickinson).

3.1.3 Colture cellulari di monociti

Le colture cellulari sono state allestite in apposite piastre sterili da 24 pozzetti. Come medium abbiamo utilizzato il terreno RPMI 1640 (Gibco) con aggiunta di FBS (10%), Penicillina/Streptomicina (1%), amfotericinaB (1%), L-glutamina (1%) ed M-CSF (50ng/ml). In ogni pozzetto sono state seminate circa 10^6 cellule/1.5ml, mantenute in incubatore (Heracell, Ahsi, Milano) a 37 °C e CO₂ al 5% per 6 giorni.

Al sesto giorno viene fatto un nuovo controllo al citofluorimetro per verificare l'avvenuta differenziazione in macrofagi, valutando l'espressione degli antigeni di superficie CD14, CD1a, CD86, CD38 e CD25 (per le procedure sperimentali vedi sopra). Lo stesso giorno inizia la stimolazione delle cellule con i diversi fattori per favorire la differenziazione dei macrofagi nei vari sottotipi (M1, M2a, M2c). Le cellule sono state raccolte in diversi tempi (dopo 6, 12 e 24 ore) per poi estrarne l'RNA. Per quanto riguarda l'attivazione dei PPAR γ abbiamo utilizzato un agonista sintetico, il GW1929 (Sigma Aldrich) e abbiamo lisato le cellule dopo 24, 48 e 72 ore, in quanto nei tempi precedenti non si ottengono ancora cambiamenti nella trascrizione.

Ogni condizione sperimentale è stata condotta in triplo.

Il protocollo prevede quanto segue:

- dopo avere contato i monociti isolati si procede con la semina per ogni pozzetto di 1.5 ml di terreno contenente 5×10^5 monociti/ml;
- incubazione per 6 giorni a 37 °C e al 5% di CO₂;
- giorno 3: sostituzione di metà del terreno con lo stesso fresco;
- giorno 6: eliminazione di tutto il terreno e aggiunta di terreno fresco arricchito con i diversi stimoli, vedi tabella 1.

Macrofagi	Concentrazioni
M1	IFN γ 20 ng/ml e LPS 100 ng/ml
M2a	IL-4 20 ng/ml
M2c	IL-10 20 ng/ml
Agonista del PPAR γ GW1929	1 μ M
Resting Macrophages	Solo terreno

Tabella 1. Concentrazioni di citochine per stimolare i macrofagi e i suoi sottotipi.

- Dopo 6, 12, 24, 48 e 72 ore dall'aggiunta degli stimoli: prelievo di tutto il surnatante per successivo stoccaggio;
- aggiunta di 1ml di TRIreagent (Sigma Aldrich) in ogni pozzetto in cui è stato tolto il surnatante;
- trasferimento del contenuto del pozzetto in provette per la conservazione a -80 °C.

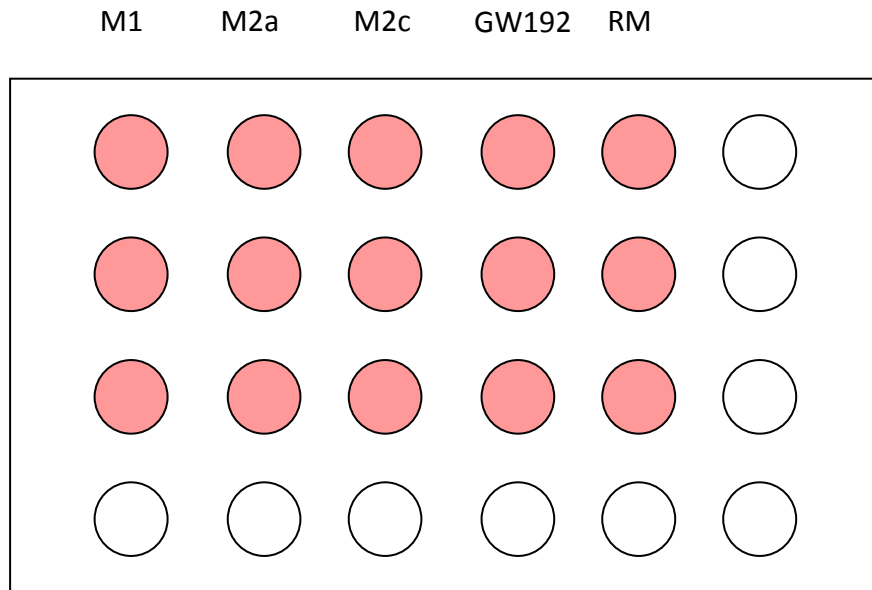


Figura17.Rappresentazione di una piastra per colture cellulari del nostro esperimento. M1: Macrofagi classici; M2a, M2c; RM, Macrofagi residenti, cioè macrofagi non attivati; una piastra corrisponde a un tempo di lisi, in totale vengono utilizzate 3 piastre.

3.2 Espressione genica

3.2.1 Estrazione RNA

Per l'estrazione dell'RNA abbiamo utilizzato un kit commerciale (Qiagen, Valencia, CA). Questo metodo di estrazione si basa sull'utilizzo di colonnine che contengono all'interno una membrana di silica-gel in grado di trattenere l'RNA durante le fasi di purificazione. Come detto precedentemente, i campioni biologici vengono inizialmente lisati e omogeneizzati in presenza di un buffer di lisi a base di fenolo e guanidinio tiocinato (TRIreagent). Successivamente viene aggiunto cloroformio che formerà una fase acquosa nella quale sono contenuti gli acidi nucleici e un anello bianco dove sono presenti le proteine. Viene aggiunto etanolo per migliorare le condizioni di legame tra RNA e membrana. Il campione viene trasferito nella colonnina e si procede con lavaggi utilizzando appositi buffer.

Di seguito viene riportata una descrizione più dettagliata del protocollo.

- scongelare i campioni a temperatura ambiente per 5 minuti;
- aggiungere 200 µl di cloroformio, agitare vigorosamente per 15 secondi;
- lasciare il campione a temperatura ambiente per 2-3 minuti e successivamente centrifugare per 15 minuti a 4 °C e a 13.000 rpm;
- trasferire la fase acquosa in una nuova provetta e aggiungere 1.5 volumi di etanolo 100%, mescolare;
- prelevare dalla provetta 700 µl della soluzione e trasferirlo nell'apposita colonnina, centrifugare per 15 secondi a 10.000 rpm a temperatura ambiente, eliminare il contenuto dalla provetta di raccolta;
- ripetere il passaggio precedente con il restante contenuto della provetta;

- aggiungere 700 µl di buffer RWT (Qiagen) alla colonnina e centrifugare per 15 secondi a 10.000 rpm, eliminare il contenuto dalla provetta di raccolta;
- aggiungere 500 µl di buffer RPE (Qiagen) e centrifugare per 15 secondi a 10.000 rpm, eliminare il contenuto dalla provetta di raccolta;
- aggiungere altri 500 µl di buffer RPE (Qiagen) per un ulteriore lavaggio e centrifugare per 2 minuti a 10.000 rpm, eliminare il contenuto dalla provetta di raccolta;
- centrifugare per 1 minuto a 13.000 rpm in modo da asciugare la membrana;
- trasferire la colonnina in una nuova provetta di 1,5 ml sterile e aggiungere dai 30 µl di acqua Rnase free per eluire l'RNA;
- Conservare l'RNA estratto a -80 °C.

3.2.2 Controllo qualità RNA

Per potere effettuare microarray di espressione genica è fondamentale che l'RNA presenti ottime caratteristiche di qualità. A tal fine abbiamo valutato la purezza e l'integrità dell'RNA con due diverse metodiche:

- Controllo spettrofotometrico (Nanodrop)
- Controllo dell'integrità tramite Bioanalyzer 2100

3.2.3 Nanodrop

La quantificazione dell'RNA è stata effettuata misurando l'assorbanza del campione utilizzando lo spettrofotometro Nanodrop (ND-1000 della Nanodrop Technology). Il NanoDrop sfrutta una

tecnologia basata sulla tensione superficiale che viene utilizzata per mantenere sulla colonna il campione liquido durante la misurazione. Il campione viene dispensato direttamente sul basamento di misura. La misurazione viene eseguita attraverso due fibre ottiche in meno di 10 secondi; lo spettro e la relativa analisi vengono visualizzati sullo schermo del PC ed archiviati in esso. Con questo strumento siamo in grado di misurare la quantità dell'RNA estratto e i rapporti delle assorbanze 260/280 (indice di contaminazione con proteine) e 260/230 (indice di contaminazione con carboidrati o altre sostanze organiche) indicatori della purezza dell'RNA. Per potere effettuare tale valutazione sono sufficienti 1.5µl di campione.

3.2.4 Bioanalyzer

L'integrità dell'RNA è stata valutata mediante lo strumento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Questo strumento si basa su principi di microfluidica, per cui le analisi vengono condotte all'interno di canali di dimensioni micrometriche, in cui la pressione e le forze elettrocinetiche muovono quantità di campione dell'ordine di picolitri. I campioni e i reagenti vengono dosati su un chip che dispone di microcanali. Il Bioanalyzer sostituisce il tradizionale gel di agarosio e dà una valutazione molto più precisa, in quanto esprime la qualità dell'RNA sotto forma di una valutazione numerica, il RIN (RNA Integrity Number) che può assumere valori da 1 a 10 a seconda dello stato di integrità.

L'analisi viene effettuata valutando le subunità ribosomiali 18s e 28s, utilizzando un laser che eccitando un fluoroforo permette di misurare l'intensità della fluorescenza. L'analisi richiede la preparazione di una matrice la quale all'interno del chip permette la corsa dei campioni dentro ai microcanali. Il chip è dotato di 13 pozzetti per l'RNA, di cui uno dedicato all'RNA marker.

Di seguito è illustrato il protocollo per la preparazione del chip:

- inserire 550 μ l di gel-matrice nella provetta dotata di filtro;
- centrifugare a temperatura ambiente per 10 minuti a 1500g;
- preparare aliquote da 65 μ l di gel filtrato in provette da 0.5 μ l, utilizzarne 1 per il chip e le altre conservarle a 4 °C;
- aggiungere 1 μ l di dye all' aliquota da 65 μ l del gel filtrato;
- centrifugare per 10 minuti a 13000 rpm;
- inserire il chip nella *chip priming station* (piattaforma necessaria per l'espansione del gel-matrice all'interno del chip tramite l'applicazione di una pressione);
- aggiungere 9 μ l di gel-dye mix nel pozzetto appositamente marcato;
- controllare che la siringa sia posizionata a 1ml e chiudere la priming station;
- spingere la siringa fino a quando non scatta la clip;
- aspettare esattamente 30 secondi poi fare rilasciare la siringa;
- aprire e aggiungere 9 μ l di gel-dye mix negli altri 2 pozzetti marcati;
- immettere 5 μ l di marker in tutti e 13 i pozzetti;
- inserire 1 μ l di ladder nel pozzetto appositamente marcato;
- inserire 1 μ l di ciascun campione nei 12 pozzetti;
- aggiungere 1 μ l di marker nei pozzetti inutilizzati;
- inserire il chip orizzontalmente nell'apposito agitatore e azionare per 1 minuto a 2400 rpm.
- leggere il chip al bioanalyzer entro 5 minuti.

3.2.5 Microarray dual color

Il profilo di analisi dell'espressione genica dei macrofagi è stata valutata attraverso la tecnologia microarray dual color confrontando i campioni in questione con un campione di riferimento rappresentato da una reference commerciale di RNA estratto da un pool di leucociti umani. I microarray rappresentano una delle tecnologie più utilizzate per lo studio del profilo dell'espressione genica e proprio per le sue peculiari caratteristiche ha trovato larga applicazione nello studio del genoma. Un chip di microarray consiste in migliaia di sequenze oligonucleotidiche di 60 pb altamente specifiche per trascritti di mRNA, spottate sulla superficie di un vetrino.

Il protocollo prevede una prima fase di retrotrascrizione dell'RNA in cDNA, seguita da un'amplificazione lineare la quale avviene contemporaneamente alla trascrizione in cRNA e l'incorporazione del fluoroforo. L'RNA reference viene marcato con Cy3 (verde) e il campione con Cy5 (rosso). Successivamente la stessa quantità di ciascun amplificato viene unita in una singola soluzione, la quale viene denaturata e ibridata su un singolo array. In questo modo si avrà un'ibridazione competitiva dei due campioni di RNA e il campione presente in maggiore quantità avrà un'intensità di segnale maggiore rispetto all'altro.

Di seguito la procedura sperimentale nel dettaglio:

Preparazione Spike-In control (controlli interni all'array):

- centrifugare le stock solution dei 2 controlli Spike A (che verrà aggiunto alla reference) e B (aggiunto al campione);
- riscaldare alla temperatura di 37 °C per 5 minuti.
- *First dilution* (diluizione 1:20): 38 µl di dilution buffer + 2 µl di Spike A o B
- *Second dilution* (diluizione 1:40): 78 µl di dilution buffer + 2 µl della first dilution

- *Third dilution* (diluizione 1:4): 12 μ l di dilution buffer + 4 μ l della second dilution

Trascrizione inversa

- Aggiungere ad ogni provetta di 1.5 ml, 500 ng di RNA e H₂O fino ad arrivare a 8.3 μ l;
- Aggiungere in una provetta 2 μ l della *third dilution* Spike A e in un'altra provetta 2 μ l della *third dilution* Spike B;
- Aggiungere a ciascuna provetta 1.2 μ l di T7 *Promoter Primer*;
- Denaturare a 65 °C per 10 minuti;
- Trasferire i campioni in ghiaccio per 5 minuti;
- Centrifugare per 20 secondi a 10.000g a 4 °C e mettere in ghiaccio;
- Immediatamente prima dell'uso scongelare e agitare i componenti per la cDNA Master Mix;
- Scaldare il *5X first strand buffer* alla temperatura di 65 °C per 3-4 minuti, centrifugare e lascia a temperatura ambiente;
- Preparare una provetta per la Master Mix e aggiungere i componenti nell'ordine indicato nella sottostante tabella 2:

Componenti cDNA mix	Quantità
Buffer 5x	4 μ l
DTT 0,1	2 μ l
dNTP 10 mM	1 μ l
MMLV RT	1 μ l
RNase out	0,5 μ l

Tabella 2. Concentrazione per ogni singolo componente per preparare la cDNA Mix.

- Aggiungere 8.5 μ l di Master Mix in ciascuna provetta e mettere le provette per 2 ore a 40 °C ;
- scaldare i campioni nell'heat block alla temperatura di 65 °C per 10 minuti per inattivare l'enzima;
- Mettere in ghiaccio per 5 minuti.

Trascrizione in vitro

- Preparare due provette per la mix aggiungendo i componenti nell'ordine indicato dalla tabella

3:

Componenti RT mix	Quantità
H ₂ O	15,3 µl
Buffer 4x	20 µl
DTT 0,1 M	6 µl
NTP 10mM	8 µl
PEG 50%	6,4 µl
RNAse out	0,5 µl
IPP	0.6 µl
T7 Polymerase	0.8 µl
dCTP Cy-5/3	2,4 µl

Tabella 3. Concentrazione per ogni singolo componente per preparare la Mix Trascrizione.

- Aggiungere 60 µl della *Transcription Master Mix* e lasciare i campioni per 2 ore a 40 °C .

Purificazione con colonnine Qiagen

- Aggiungere a ciascuna provetta 20 µl di H₂O;
- aggiungere 350 µl di RLT;
- aggiungere 250 µl di etanolo (96% o 100%);
- trasferire i 700 µl in una colonnina;
- centrifugare alla temperatura di 4°C per 30 secondi a 13.000 rpm, cambiare il tubo di raccolta e aggiungere 500 µl di RPE;

- centrifugare per 30 secondi a 13.000 rpm, eliminare lo scarto e aggiungere altri 500 μ l di RPE;
- centrifugare per 60 secondi a 13.000 rpm, eliminare il collection tube;
- trasferire la colonnina in una nuova provetta da 1.5 ml;
- aggiungere 30 μ l di H₂O e aspettare 1 minuto;
- centrifugare per 30 secondi a 13.000 rpm e trasferire le provette contenenti l'eluato in ghiaccio o in freezer.

Controllo cRNA

- Controllare al Nanodrop la concentrazione dell'amplificato e l'incorporazione del fluoro foro;
- verificare l'integrità al Bioanalyzer, controllare il RIN e l'andamento dell'intensità della fluorescenza. Il fluoro foro Cy5 ha un segnale più intenso del Cy3, ma devono avere lo stesso andamento.
- Diluire i campioni in modo da avere una concentrazione di RNA di 300 ng/ μ l.

Ibridazione

- Preparare il 10X *Blocking Agent* aggiungendo 500 μ l di acqua al prodotto liofilizzato;
- Preparare la *Fragmentation Mix* per ogni array come da tabella:

Componenti Fragmentatio mix	Quantità
Cy3-cRNA	825 ng
Cy5-cRNA	825 ng
10x Blocking Agent	11 μ l
H ₂ O	41,8 μ l
25x Fragmentation buffer	2,2 μ l

Tabella 4. Concentrazione dei singoli componenti per la preparazione della Fragmentation Mix.

- Incubare i campioni a 60°C per 30 minuti per la frammentazione;
- aggiungere 55 μ l di 2X GEx Hybridization Buffer HI-RPM per fermare la reazione;
- Miscelare, evitare il più possibile le bolle.

Assemblamento della camera di ibridazione

- Scaldare il fornello alla temperatura 65°C e posizionare il rotore a 10 rpm;
- prendere una *gasket slide* (vetrino di supporto su cui caricare i campioni);
- posizionare la *gasket slide* nella camera di ibridazione con la scritta *agilent* rivolta verso l'alto;
- dispensare lentamente e uniformemente 100 μ l del campione per ciascun riquadro;
- prendere l'*active slide* (vetrino su cui sono spottate le sonde) e posizionarla sopra alla *gasket slide* appena caricata in modo che la scritta *agilent* sia dalla stessa parte rispetto alla *gasket slide* ma rivolta verso il basso;
- chiudere la camera di ibridazione e posizionarla nel rotore del fornello;

- Lasciare alla temperatura di 65 °C per 17 ore a 10 rpm;
- Scaldare 300 ml di *wash buffer 2* a 37°C per tutta la notte.

Lavaggio dei vetrini

- le vaschette per il lavaggio devono essere sempre posizionate su un agitatore magnetico;
- prendere la camera di ibridazione dal fornello;
- rimuovere il *sandwich* dalla camera prendendolo per gli estremi e immergerlo nella vaschetta 1 col wash buffer 1;
- tenere con le dita dalla parte del *barcode*, cercare con le pinzette di separare le 2 slide;
- inserire *l'active slide* nel rack e immergerlo nella seconda vaschetta di wash buffer 1 sull'agitatore magnetico;
- lasciare la slide per 1 minuto nel wash buffer 1 sempre in agitazione, nel frattempo riempire la vaschetta col wash buffer 2;
- lentamente rimuovere il rack e metterlo nella vaschetta 2 contenente il wash buffer 2 e lasciarlo per 1 minuto sempre in agitazione;
- lentamente rimuovere il rack cercando di eliminare più buffer possibile e metterlo nella vaschetta 2 per 1 minuto;
- al termine dei lavaggi rimuovere la slide con le pinzette;
- il vetrino va immediatamente posizionato nella *slide holder* con la scritta Agilent rivolta verso l'alto, mantenere al buio e poi caricarla nello scanner per la lettura.

3.2.6 Real Time PCR

Come descritto nell'introduzione la tecnologia microarray è una tecnologia "high-throughput", ossia ad alta densità di dati. Per questo motivo è necessario validare i risultati di espressione genica derivanti da microarray con altri sistemi che permettono un'analisi di un set di geni molto più limitato ma più preciso. A tal fine abbiamo deciso di utilizzare la tecnologia della PCR quantitativa, Real Time PCR, su di un limitato set di geni. Nel nostro caso abbiamo deciso di validare alcuni geni che avevano le maggiori differenze di espressione fra i vari fenotipi cellulari.

I geni che abbiamo scelto di validare sono i seguenti:

IL8: interleuchina 8;

IL 6: interleuchina 6;

PTGS2: prostaglandina sintetasi 2;

SOD2: superossido dismutasi 2;

SOCS1: soppressore del *signaling* citochinico;

WNT5A: MMTV *wingless-type*;

ALOX15: lipossigenasi dell'arachidonato 15.

GAPDH (housekeeping): gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi.

La procedura di Real-Time PCR (*Polymerase Chain Reaction*) viene utilizzata per la rivelazione di specifici prodotti di PCR tramite l'impiego di sonde (*probes*) fluorogeniche disegnate per ibridizzare sequenze targets e generare un segnale che si accumula durante i cicli di PCR in modo proporzionale alla concentrazione iniziale del target. Si ottiene in questo modo un segnale fluorescente per ogni campione che è associato in modo specifico al target studiato. Esistono diversi tipi di chimica di base per la Real Time. Quella più comunemente utilizzata, e che è stata

utilizzata anche per questo lavoro, è quella Taq-Man basata sull'attività esonucleasica 5'-3' della Taq polimerasi in combinazione con un probe marcato con molecole fluorescenti. I probes Taq-Man contengono un fluorocromo chiamato reporter FAM, (6-carbossi fluorescina) legato covalentemente all'estremità 5' dell'oligonucleotide e un quencher non fluorescent (NFQ) legato all'estremità 3'. Quando il probe è intatto il quencher inibisce l'emissione fluorescente del reporter. Durante la fase d'estensione della PCR, se il target è presente, il probe marcato si ibridizza ad esso e la Taq polimerasi idrolizza il probe generando un segnale fluorescente (reporter) che è direttamente proporzionale alla concentrazione del target presente nel campione iniziale.

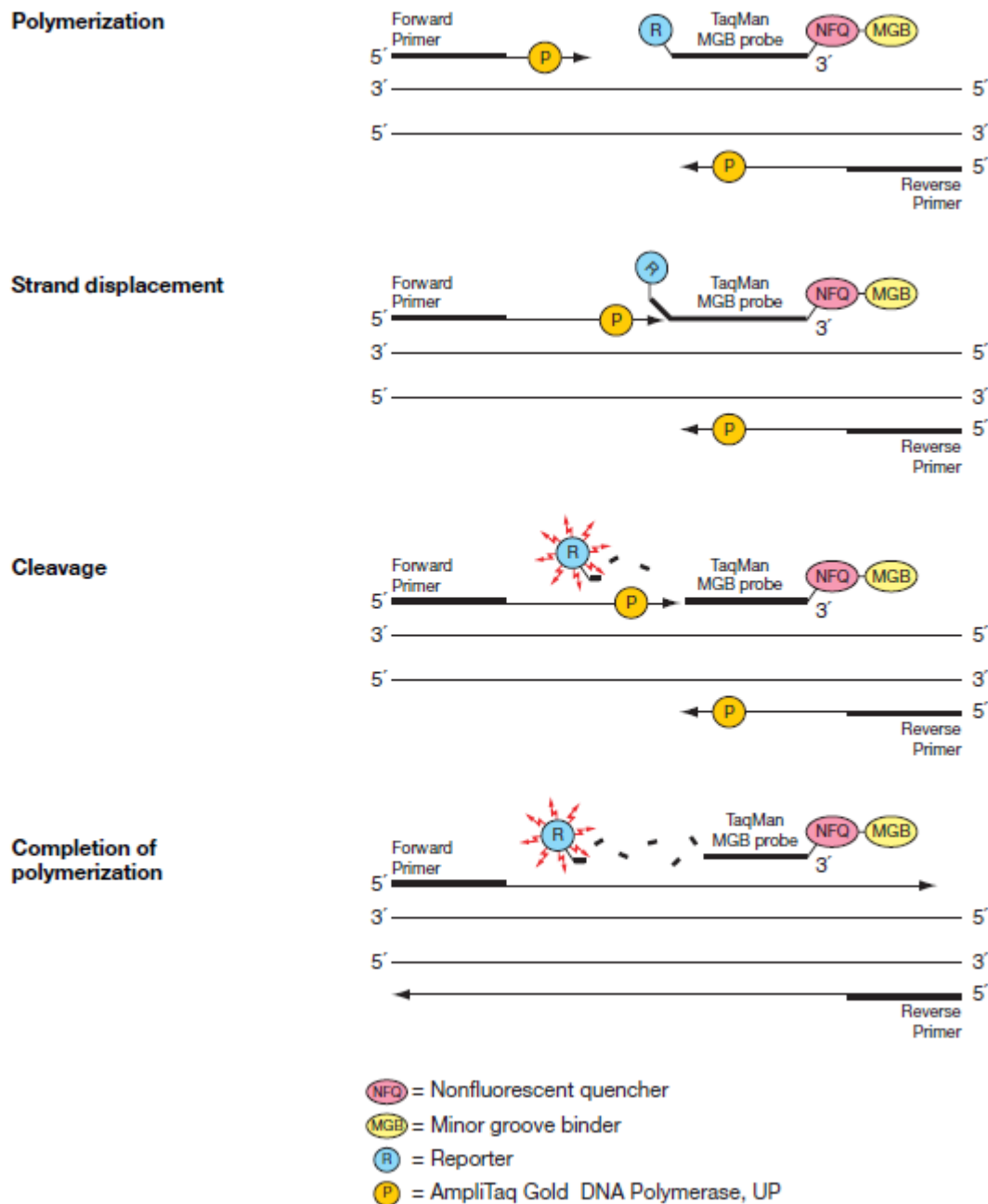


Figura 18: principi di funzionamento della real time PCR

La PCR Real-Time è stata eseguita utilizzando lo strumento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem, PE). Il dispositivo combina un *thermal cycler* contenente una piastra a 48 pozzetti, un laser per l'eccitazione della fluorescenza e la rivelazione del segnale; è dotato di un software che acquisisce automaticamente il segnale e calcola la specifica fluorescenza rilasciata durante la reazione 5'-3'esonucleasica. L'emissione della fluorescenza (compresa tra 520nm e

620nm) è monitorata da una CCD camera (Charge Coupled Device) ogni 7 secondi durante l'intero processo di PCR. Le variazioni di emissione fluorescente del reporter non imputabili alla reazione di amplificazione, vengono normalizzate utilizzando un fluorocromo di riferimento sempre presente nella miscela di reazione (per esempio il ROX). Il segnale attribuibile alla reazione 5'-3'esonucleasica è espresso come valore ΔR_n , che riflette sia la quantità di probe fluorescente degradato che la funzione esponenziale originata durante l'amplificazione. Il segnale di fluorescenza aumenta durante la PCR all'aumentare del numero di copie dell'amplicone fino a quando la reazione raggiunge un plateau. Il programma determina il ciclo soglia (CT) sperimentale, che rappresenta il ciclo di PCR in cui viene rilevato per la prima volta l'aumento del segnale fluorescente del reporter sopra la linea di base. Per un dato campione il valore del CT dipende dal numero delle molecole bersaglio presenti inizialmente. Fra la quantità iniziale della sequenza bersaglio e il CT esiste una relazione lineare inversa: maggiore è la quantità iniziale della sequenza bersaglio minore è il valore del ciclo soglia.

La PCR quantitativa prevede si divide in due fasi: la retrotrascrizione e la quantificazione.

Per la reazione di retrotrascrizione è stato impiegato il kit apposito "High Capacity RNA-to-cDNA Kit" (Applied Biosystem, PE) ed è stato utilizzato 1 μ g di RNA per ogni campione. La tabella di seguito elenca i reagenti necessari per la reazione e le rispettive quantità.

Componenti	Quantità
2X RT Buffer	10.0µl
20X RT Enzyme Mix	1.0µl
H ₂ O Nuclease free	Fino a 20.0µl
Campione	Fino a 9.0µl
Volume totale per reazione	20.0µ

Tabella 5. Concentrazione dei singoli componenti per la preparazione della Retrotrascrizione.

I campioni vengono successivamente incubati per 1 ora a 37°C e poi per 5 minuti a 95°C per la denaturazione. Una volta ottenuto il cDNA lo si può conservare a -20°C prima di continuare con la reazione successiva.

L'espressione dei geni che abbiamo scelto di validare è stata normalizzata all'espressione del gene *housekeeping* GAPDH . Per l'amplificazione delle sequenze bersaglio sono stati utilizzati dei prodotti specifici per l'analisi quantitativa chiamati *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystem, PE). Il prodotto consiste in una miscela per la PCR contenente i primer ed una sonda del tipo TaqMan, specifici per la sequenza di interesse (gene bersaglio o gene riferimento endogeno) e presenti alla concentrazione ottimale per ottenere la massima efficienza di reazione. Le sonde TaqMan presenti in tutti i prodotti TaqMan Gene Expression Assays sono marcate al 5' con un fluorocromo reporter del tipo 6-FAM e al 3' con un quencher non fluorescente (NFQ). Quest'ultimo è legato covalentemente ad una molecola chiamata MGB (minor groove binder), che ha la funzione di aumentare la temperatura di fusione consentendo l'impiego di sonde molto brevi (59). I TaqMan Gene Expression Assays⁵⁴ utilizzati sono stati i seguenti:

IL8 Assay ID Hs00174103_m1
IL6 Assay ID Hs00985639_m1
SOD2 Assay ID Hs00167309_m1
SOCS1 Assay ID Hs00705164_s1
WNT5A Assay ID Hs00998537_m1
ALOX15 Assay ID Hs00609608_m1
GAPDH Assay ID Hs03929097_g1
PTGS2 Assay ID Hs00153133_m1.

Le tabelle di seguito illustrano i reagenti e le quantità necessarie per la reazione e le condizioni sperimentali della PCR.

Componenti	Quantità
TaqMan Gene Expression Master Mix (2x)	10.0µl
TaqMan Gene Expression Assay (2x)	1.0µl
cDNA + H ₂ O	9.0µl
Volume totale per reazione	20.0µ

Tabella 6. Concentrazione dei singoli componenti per la preparazione della PCR quantitativa

Temperatura	Durata	Cicli
50 °C	2 min	HOLD
95 °C	10 min	HOLD
95 °C	15 sec	40
60 °C	1 min	

Tabella 7. Cicli della PCR quantitativa

I risultati di Real-Time PCR, espressi in valori di CT vengono poi elaborati dal programma per fornire una quantificazione assoluta. Questa determina l'esatto numero di copie della sequenza bersaglio confrontando con un gene housekeeping, nel nostro caso il GAPDH. Lo strumento fornisce il risultato applicando il metodo comparativo del $-\Delta\Delta Ct$, un algoritmo che fornisce una stima della quantità del bersaglio normalizzata su un gene di riferimento ed un campione calibratore^{55,56}. Ogni campione è stato analizzato in quadruplicato nel seguente modo: l'RNA estratto da due identici pozzetti è stato eseguito in doppio, al fine correggere la variabilità sperimentale e di reazione

3.3 Analisi statistica

Dopo la lettura con scanner Agilent i dati grezzi sono stati elaborati utilizzando il software *Feature Extraction 9.5* (FE), (Agilent, Palo Alto, CA). Questo programma calcola le intensità di segnale di ciascuna sonda oligonucleotidica e fornisce come risultato un file contenente tutti i valori di espressione di ogni singolo gene e i relativi valori di Log Ratio fra il segnale relativo al campione di riferimento (verde) e il segnale relativo al campione in analisi (rosso). Il valore di log ratio è il dato che verrà utilizzato per l'analisi statistica. Il software fornisce inoltre come risultato anche il "Rapporto di Qualità", un file che fornisce un'indicazione sulla correttezza dell'array e quindi sull'utilizzabilità dei dati risultanti.

Gli array che presentavano buone caratteristiche di qualità sono stati sottoposti a un processo di "pulitura", cioè sono stati eliminati tutti i valori degli RNA di controllo ed è stata calcolata una media di espressione per le sonde che rappresentano il medesimo gene. Questo procedimento è importante al fine di snellire il contenuto del file. Per potere analizzare i dati di espressione è stato creato un unico file excel contenente tutti i valori di Log Ratio relativo ad ogni singolo gene per tutti i campioni di RNA di cui abbiamo effettuato l'array. La realizzazione di questa matrice di dati permette di effettuare confronti diretti fra le diverse tipologie di campioni effettuando le differenze dei valori di Log Ratio. Dal momento che l'FE software assegna un valore di "0" alle sonde la cui intensità di fluorescenza è satura e quindi di cui non possiamo valutare l'espressione, prima di effettuare l'analisi statistica dell'espressione dei geni abbiamo considerato come rilevanti i geni la cui espressione risultava diversa da zero in almeno nel 75% delle condizioni. Dopo ciò, nei geni in cui in alcuni casi l'espressione risultava "0" vi abbiamo imputato un valore di espressione utilizzando il test *k-nearest-neighbors class prediction* (KNN), tale metodo prevede per l'imputazione dei valori l'utilizzo dei geni che più somigliano a quello con il valore mancante. Al fine di valutare

globalmente il tipo di risposta in termini di trascrizione dei diversi tipi di attivazione macrofagica abbiamo condotto un'analisi di ontologia genica. Questo tipo di indagine permette di verificare a quali gruppi ontologici appartengono i geni che risultano differenzialmente espressi, e fornisce un'indicazione generale sul profilo trascrittomico cellulare. A tal fine abbiamo utilizzato un programma on-line, "Gorilla" basato sul database di ontologia genica di David.

Per ciò che concerne l'analisi dei pathway biologici essa è stata effettuata utilizzando dei programmi presenti on-line (David Bioinformatics Resources) che utilizzano il database di pathway KEGG.

4.RISULTATI

4.1 Valutazione della purezza della popolazione cellulare mediante citofluorimetro

In seguito alla procedura di selezione negativa tramite le biglie la purezza della popolazione monocitaria risultava del 95%.

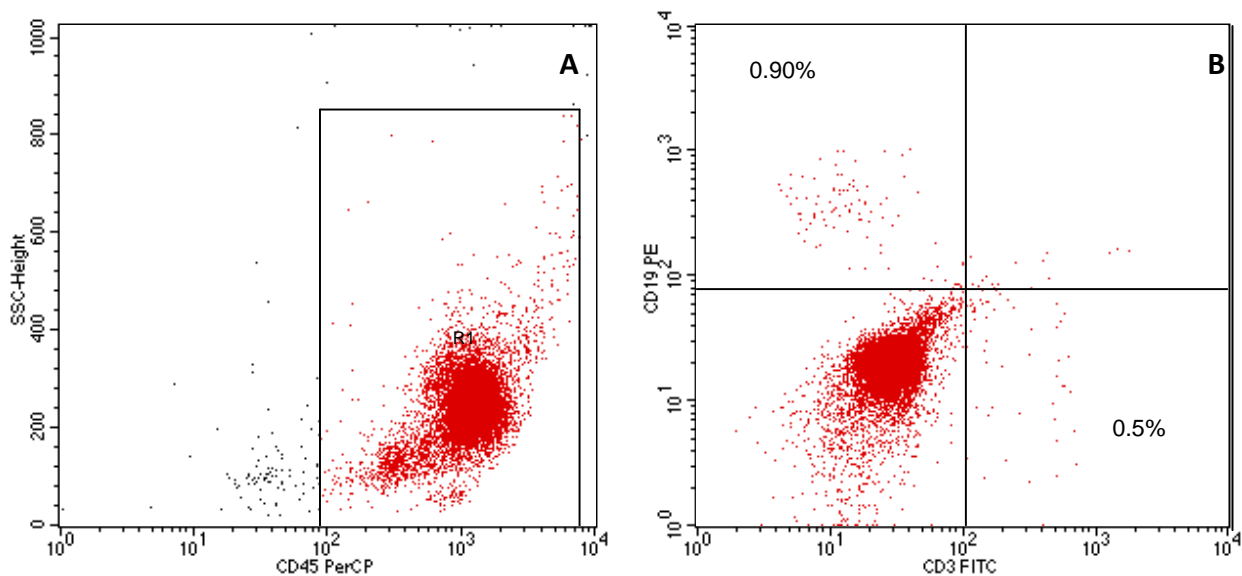


Figura19: analisi al citofluorimetro della popolazione monocitaria. Plot A mostra il gate sulle cellule positive al CD45; plot B mostra l'assenza di linfociti B (CD19) e linfociti T (CD3).

L'analisi è stata eseguita selezionando inizialmente le cellule positive al CD45, antigene comune alla popolazione leucocitaria (Fig. 19 A). Per escludere la contaminazione con linfociti abbiamo utilizzato anticorpi contro CD3 e CD19, rispettivamente per linfociti T e B. Come si può vedere dal plot (Fig. 19 B) la presenza di tali cellule è minima, 0.9% di linfociti B e 0.5% di linfociti T.

La figura 20 mostra le positività per gli antigeni caratteristici della popolazione monocitaria.

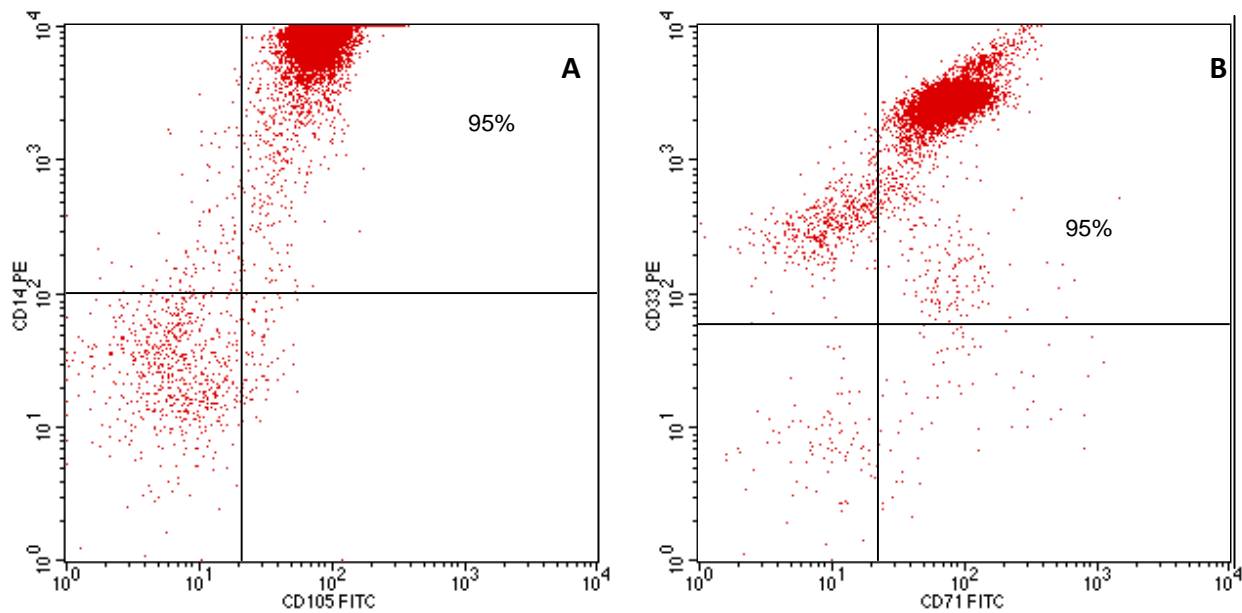


Figura20: analisi al citofluorimetro della popolazione monocitaria. Entrambi i plot presentano la positività a marcatori specifici per la popolazione monocitaria.

Come evidenzia la figura 20 la positività al CD14 e al CD105 (endogлина, molecola di adesione espressa principalmente dai monociti) è del 95%. Come ulteriore prova abbiamo valutato anche la presenza contemporanea di CD33 (marker di progenitori mieloidi) e CD71 (marker di attivazione leucocitario), e anche in questo caso viene confermata la purezza della popolazione.

Al fine di verificare l'avvenuto differenziamento in macrofagi abbiamo eseguito un confronto fra alcuni marcatori al giorno zero e al giorno sei. Dalla figura 21 si può notare come l'espressione degli antigeni CD1a, CD25 e CD86 siano tutti aumentati, mentre il Cd è l'unico che risulta diminuito nel differenziamento. I primi tre sono antigeni che denotano uno stato di attivazione, partecipando alla presentazione degli antigeni ai linfociti T e alla loro stimolazione. Il CD14 invece tende a diminuire durante la maturazione delle cellule.

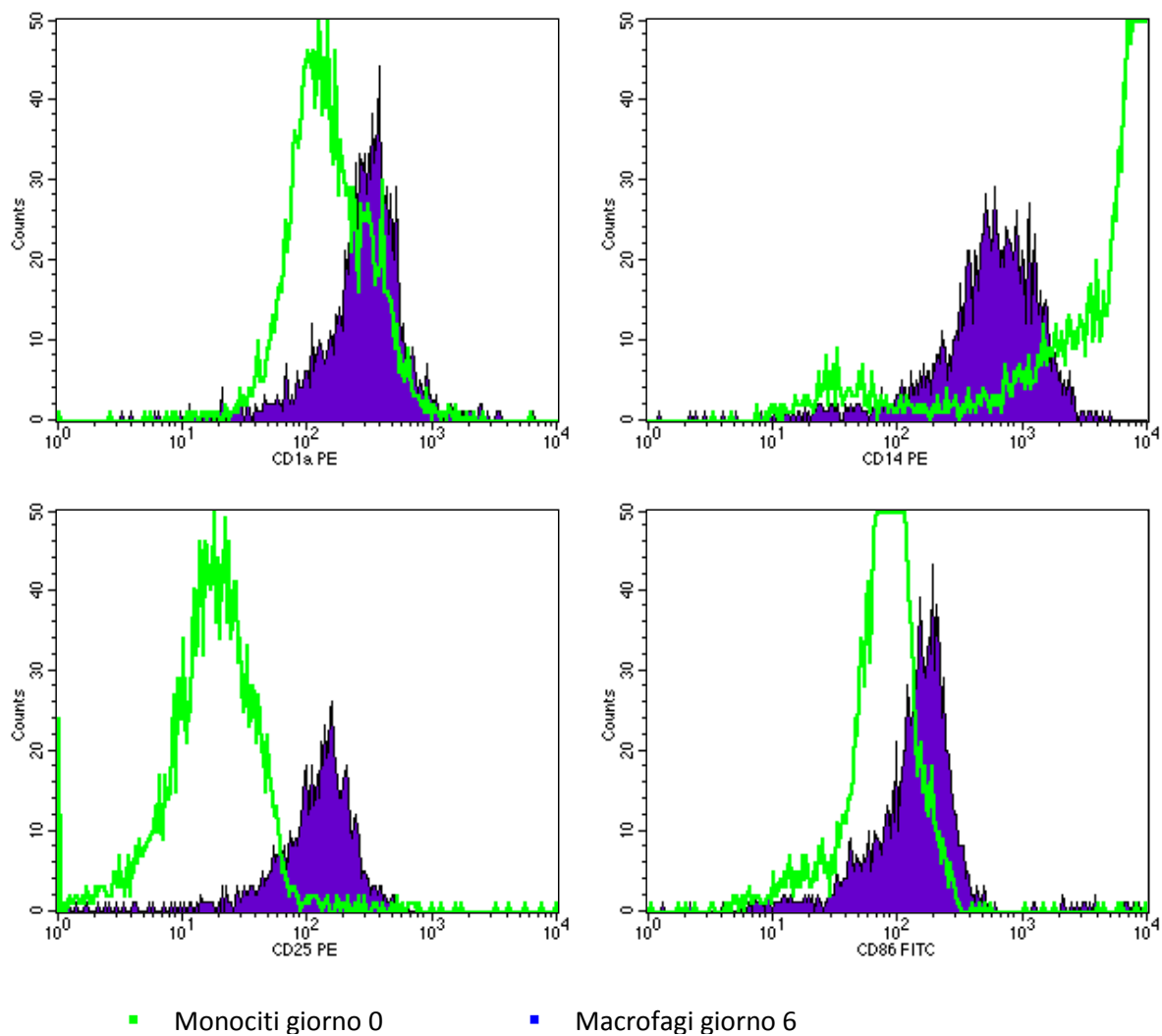


Figura21: analisi al citofluorimetro della differenziazione monociti-macrofagi.

4.2 Controllo qualità RNA

Analisi spettrofotometrica

L'analisi trascrittomica è stata eseguita su tutte le popolazione macrofagiche ottenute in vitro.

Prima però di potere effettuare le procedure per lo svolgimento dei microarray è stato necessario valutare la qualità dell'RNA estratto da ciascun pozzetto.

L'analisi spettrofotometrica al Nanodrop permette di valutare sia la concentrazione del campione sia la sua purezza attraverso i rapporti fra i valori di assorbanza a 230, 260 e 280nm.

Il valore del rapporto fra le assorbanze 260/280 deve essere compreso tra 1.8-2, un valore inferiore indica che vi è una contaminazione da proteine; il valore del rapporto fra le assorbanze 260/230 devono essere maggiori di 1,5 e se inferiori significa che vi è una contaminazione con sostanze organiche o residui del processo di estrazione dell'acido nucleico. La figura qui sotto riportata mostra un esempio di RNA idoneo per l'analisi con microarray per ciò che concerne la purezza.

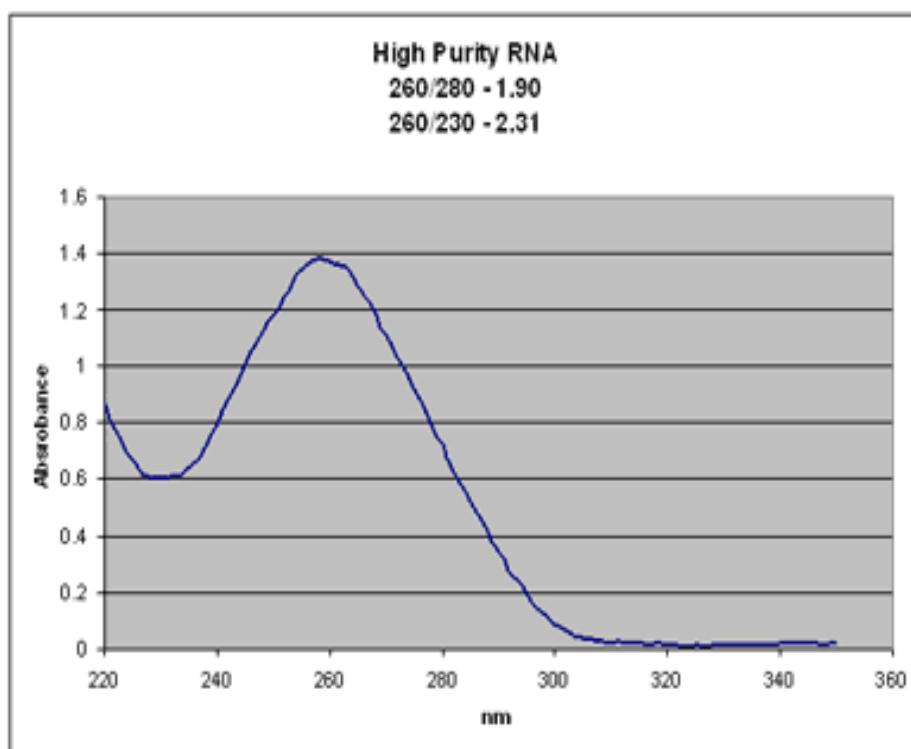


Figura 22. I valori di assorbanza dimostrano un RNA idoneo per microarray.

L'integrità dell'RNA estratto viene valutata tramite Bioanalyzer 2100. Il software di questo strumento fornisce come risultato finale l'immagine di un elettroferogramma che rappresenta le unità ribosomali dell'RNA, per cui in presenza di un campione integro sono presenti due picchi che rappresentano l'RNA ribosomiale 18s e 28s. Il valore del RIN (RNA Integrity Number) indica l'integrità dell'RNA e deve essere compreso tra 8 e 10. Le figure qui sotto riportate rappresentano alcuni esempi di RNA di diversa qualità.

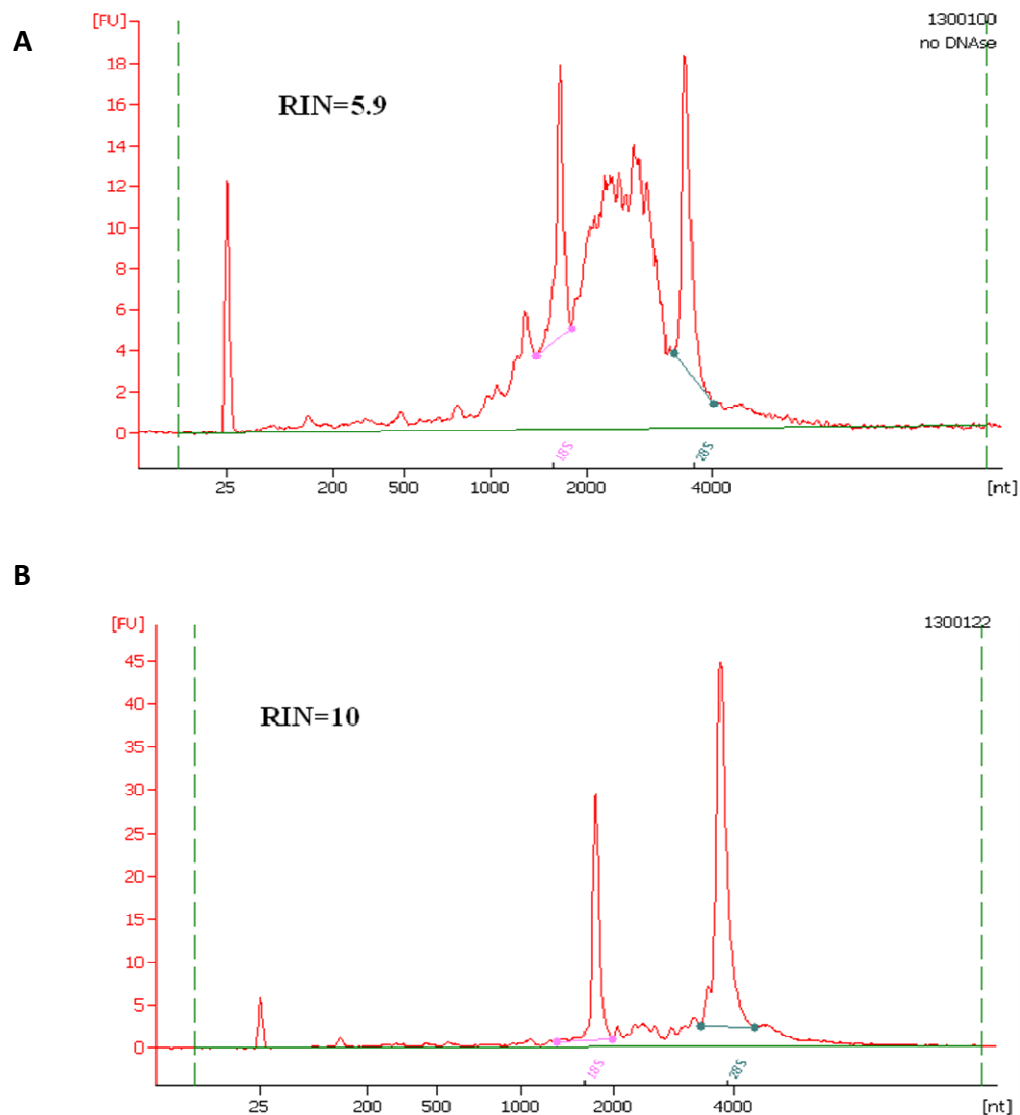


Figura 23. L'elettroferogramma A mostra un RNA parzialmente degradato mentre l'elettroferogramma B mostra un RNA di buona qualità, i due picchi 18s e 28s sono ben distinguibili

Ogni campione di RNA che è stato utilizzato per l'analisi microarray aveva i parametri di qualità richiesti dal protocollo ed il profilo di espressione genica con tecnica microarray è stato valutato sull'RNA estratto dai diversi profili di attivazione macrofagica.

4.3 Analisi trascrittomic

Gene ontology. Un primo approccio per l'analisi trascrittomic è quello di indagare l'espressione di gruppi geni accomunati per processo biologico, funzione molecolare e per tipo di componente cellulare. Questo tipo di raggruppamento viene definito Ontologia Genica (*Gene Ontology*). Il database Gene Ontology (GO) fornisce una definizione precisa del ruolo svolto dalle singole proteine tramite un vocabolario (delle ontologie) che consenta di definire in modo corretto e non arbitrario il o i processi biologici cui una proteina partecipa, la/e sue funzioni molecolari e la sua localizzazione/i cellulare.

Per questo Gene Ontology è un vocabolario strutturato in continua crescita che permette un'assegnazione dinamica del significato funzionale delle proteine della cellula. Questo vocabolario si definisce controllato e dinamico perché viene scritto e mantenuto aggiornato da un gruppo di persone preposte, i curatori. L'obiettivo è quello di creare un vocabolario che possa essere applicato a tutti gli eucarioti man mano che si accumulano informazioni su geni, proteine e loro ruolo nella cellula.

Un prodotto genico può avere una o più funzioni cellulari, può essere coinvolto in diversi processi biologici e potrebbe essere associato a diversi compartimenti cellulari. Per questo motivo l'ontologia genica è divisa in tre categorie: 1) processi biologici; 2) funzioni molecolari; 3) componenti cellulari. Di seguito verranno brevemente descritte le categorie citate

COMPONENTE CELLULARE: si riferisce alla zona specifica della cellula dove un prodotto genico è attivo.

PROCESSO BIOLOGICO: questa categoria permette di classificare un meccanismo controllato da più prodotti genici con diverse funzioni molecolari e che porta ad un particolare risultato. Un

processo biologico viene portato a termine e completato attraverso un insieme ordinato di funzioni molecolari e spesso coinvolge una trasformazione chimica o fisica.

FUNZIONE MOLECOLARE: si riferisce all'attività biochimica di un prodotto genico. Molto spesso questa definizione si riferisce alla capacità di un prodotto genico (o di un complesso proteico) di esprimersi in un determinato contesto metabolico.

Il grafico Acilico Diretto (DAG) è la forma rappresentativa usata in Gene Ontology. Il DAG è una forma di grafico che differisce da una normale gerarchia poiché ogni termine può avere più padri e in cui possono esistere molteplici percorsi da un termine qualsiasi al termine radice. Ciascun vocabolo della GO rappresenta un nodo del DAG al quale è associato un identificativo (GO ID).

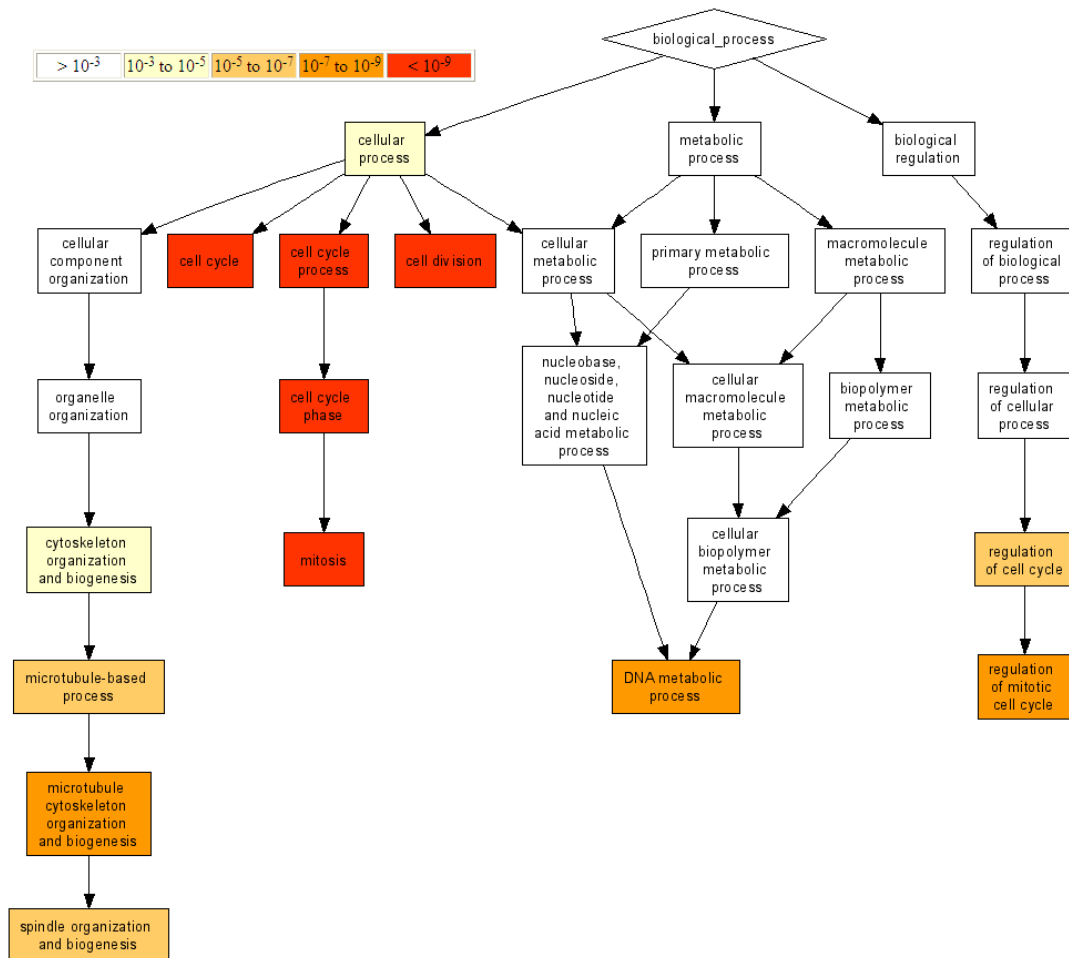


Figura 24: esempio di un grafico DAG di gene ontology. BMC Bioinformatics. 2009 Gorilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z.

E' facilmente osservabile che un termine di gene ontology molto "generico" contiene al suo "interno" più termini di gene ontology via via più specifici. Questo fa sì che man mano che si va "verso il basso" le definizioni diventino sempre più precise ed i geni che soddisfano a quella descrizione sempre meno. Questo albero può quindi essere "letto" a più livelli, da quelli più generali, che stanno alla radice, a quelli via via sempre più specifici che stanno sulle foglie.

In questo studio l'analisi di ontologia genica è stata eseguita utilizzando il software Gorilla⁵⁷ che esegue una "enrichment analysis" e cioè un' analisi mirata alla rivelazione di particolari gruppi ontologici dei quali è "arricchita" la lista dei geni differenzialmente espressi, che potrebbero suggerire la formulazione di ipotesi biologiche a giustificazione della variazione di espressione

genica osservata fra i campioni. Al fine di cercare quali fossero i gruppi di geni differenzialmente espressi in una tipologia di attivazione macrofagica rispetto ad un'altra, abbiamo impostato tutte le analisi sulla differenza di espressione esistente fra una condizione sperimentale e i Resting Macrophage che abbiamo utilizzato come base di confronto. È stata quindi calcolata la differenza fra i valori di espressione delle varie tipologie di attivazione macrofagica e i macrofagi differenziati ma non attivi e la lista dei geni è stata caricata sul programma in ordine di espressione.

Analisi di pathway. Oltre all'analisi ontologica un altro tipo di approccio per lo studio del trascrittoma è quello di osservare l'andamento di espressione dei pathway genici. I pathway mostrano le interazioni fra i geni che partecipano allo stesso processo biologico, come ad esempio il "Toll like receptor signaling pathway" (figura 25)

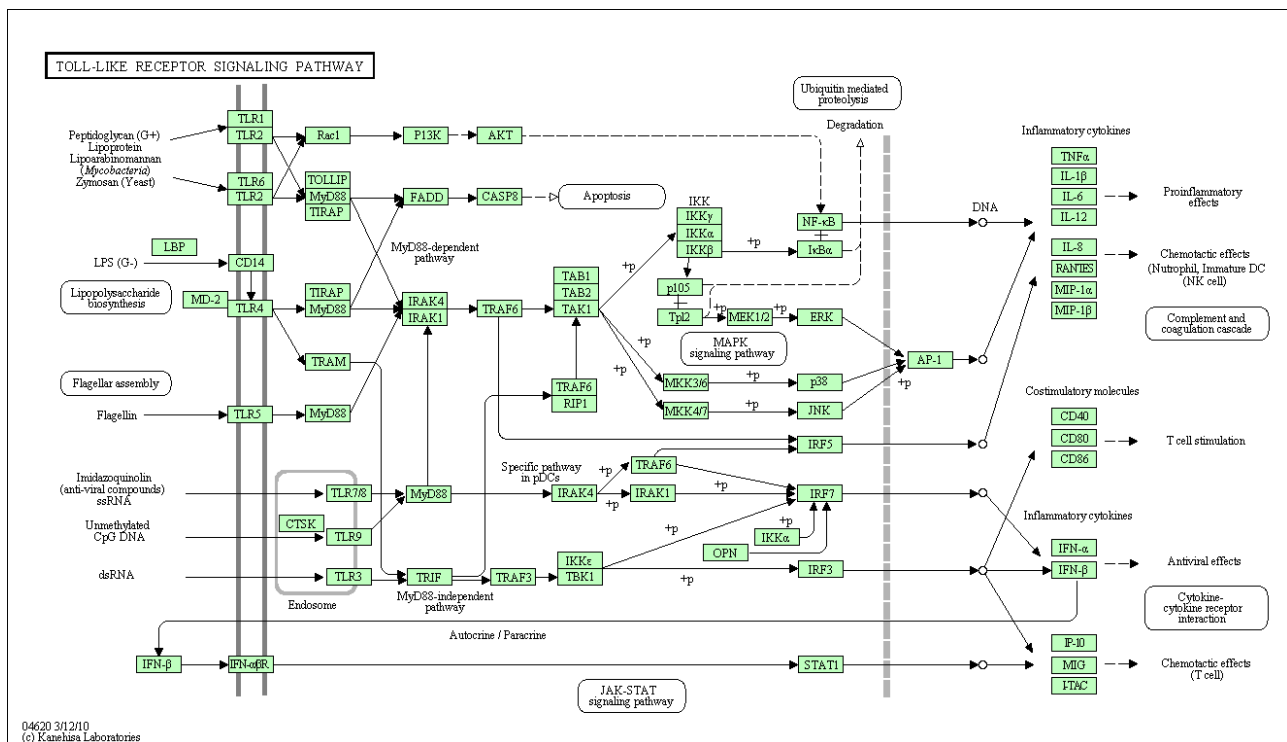


Figura 25: Toll like receptor signaling patta, KEGG database.

A tale scopo il database online DAVID⁵⁸ (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), permette di immettere una lista di geni o proteine

derivanti da procedure analitiche *high-throughput* (quali microarray e proteomica), secondo numerose tipologie di codici di accesso di sequenze quali, ad esempio, UniProt, GeneBank ed anche Agilent ID. La lista immessa può in seguito essere analizzata con diversi *tool* disponibili, sia grafici che testuali, che permettono di raggruppare le proteine o i geni secondo diversi criteri, tra cui i pathway nei quali sono coinvolti, al fine di avere un'idea immediata e facilmente interpretabile del loro ruolo biologico. I database di pathway ai quali afferisce il programmi sono principalmente KEGG e BIOCARTA⁵⁹. Anche in questo caso per l'analisi è stata fatta una differenza fra i valori di espressione fra i vari modelli sperimentali ed i resting macrophages, così da evidenziare le differenze maggiori, sia in positivo (UP-regolazione) che in negativo (DOWN-regolazione).

4.3.1 Analisi trascrittomica: differenze di espressione fra i macrofagi classici (M1) e i Resting Macrophages (RM)

Come già anticipato, per l'analisi ontologica abbiamo utilizzato il software on-line Gorilla, in cui sono stati inseriti le differenze di espressione fra i macrofagi classici e i resting macrophages in ordine decrescente per osservare quali gruppi ontologici risultano maggiormente espressi negli M1. Di seguito è riportata la tabella con l'elenco dei gruppi ontologici up-regolati nei macrofagi M1 nei tre tempi sperimentali (6h, 1h2, 24h).

GO Term	Description	Pv.M1-RM6h	Pv.M1-RM12h	Pv.M1-RM24h
GO:0002376	immune system process	1.15E-32	5.97E-33	1.06E-30
GO:0006952	defense response	8.73E-25	2.53E-27	5.65E-25
GO:0009615	response to virus	7.49E-24	8.96E-27	2.74E-20
GO:0006955	immune response	1.23E-24	1.82E-25	1.63E-23
GO:0051707	response to other organism	1.58E-22	6.62E-24	8.84E-18
GO:0009607	response to biotic stimulus	1.32E-22	1.29E-21	5.56E-18
GO:0050776	regulation of immune response	4.39E-21	2.29E-19	1.66E-13
GO:0002684	positive regulation of immune system process	7.00E-18	7.76E-19	1.76E-13
GO:0002682	regulation of immune system process	1.03E-20	1.46E-18	3.17E-13
GO:0050896	response to stimulus	1.89E-18	3.1E-18	4.02E-13
GO:0048518	positive regulation of biological process	1.85E-17	1.72E-17	8.54E-13
GO:0051704	multi-organism process	2.64E-16	1.93E-16	2.93E-12
GO:0031347	regulation of defense response	1.36E-17	8.88E-16	2.15E-11
GO:0050778	positive regulation of immune response	1.42E-14	2.72E-15	9.67E-11
GO:0006954	inflammatory response	2.26E-13	5.15E-15	2.71E-13
GO:0048584	positive regulation of response to stimulus	7.79E-15	1.11E-14	7.97E-10
GO:0048522	positive regulation of cellular process	9.85E-15	1.48E-14	5.3E-11
GO:0023056	positive regulation of signaling process	4.00E-10	2.19E-14	1.11E-08
GO:0009967	positive regulation of signal transduction	2.05E-10	3.47E-14	7.34E-09
GO:0010647	positive regulation of cell communication	2.75E-13	3.76E-14	2.98E-09
GO:0010740	positive regulation of intracellular protein kinase	6.82E-11	4.26E-14	9.12E-11
GO:0048583	regulation of response to stimulus	5.39E-16	5.13E-14	1.42E-13
GO:0031349	positive regulation of defense response	6.43E-14	6.08E-14	3.12E-10
GO:0002697	regulation of immune effector process	3.59E-13	7.38E-14	1.17E-09
GO:0035468	positive regulation of signaling pathway	1.06E-12	1.23E-13	1.42E-08
GO:0042981	regulation of apoptosis	7.42E-13	1.36E-13	2.99E-11
GO:0023052	signaling	3.06E-12	1.63E-13	4.45E-09
GO:0006950	response to stress	1.55E-13	2.68E-13	2.58E-14
GO:0009611	response to wounding	2.49E-15	2.79E-13	2.62E-14
GO:0043065	positive regulation of apoptosis	6.73E-11	2.93E-13	5.58E-08

Tabella 8: GO up-regolati nei macrofagi classici (M1) rispetto a RM (resting macrophages). Pv:p-value

Per completare l'analisi trascrittomico abbiamo effettuato anche un'analisi di pathway. Questa è stata condotta utilizzando un programma differente, DAVID, in cui abbiamo inserito sempre le differenze di espressione in ordine decrescente. L'unica differenza si riscontra nel fatto che questa analisi non è in grado di supportare tutti i geni dell'array, per cui abbiamo selezionato le differenze di espressione che superavano di valore la media più il doppio della deviazione standard. L'analisi di pathway conferma i risultati dell'analisi ontologica.

Essendo il database di pathway meno ricco rispetto a quello di ontologia genica l'elenco dei risultati è più limitato.

Pathway	P-val. M1-RM6h	P-val.M1-RM12h	P-val.M1-RM24h
Cytokine-cytokine receptor interaction	2.04E-14	2.10E-15	1.90E-09
Toll-like receptor signaling pathway	1.40E-09	2.10E-11	1.90E-07
Jak-STAT signaling pathway	7.80E-10	2.60E-12	7.30E-05
RIG-I-like receptor signaling pathway	6.40E-09	4.20E-08	6.10E-05
NOD-like receptor signaling pathway	2.00E-08	1.60E-08	4.20E-06
Apoptosis	8.20E-05	7.10E-05	2.90E-03

Tabella 9: pathways up-regolati nei macrofagi classici (M1) rispetto a RM (resting macrophages). Pv:p-value

Al contrario, per vedere quali sono i gruppi ontologici down-regolati dai macrofagi classici rispetto ai resting macrophages (e quindi up-regolati in questi ultimi rispetto ai primi) abbiamo inserito le differenze di espressione in ordine crescente e caricate nel programma Gorilla. Di seguito è riportata la tabella con l'elenco dei gruppi ontologici down-regolati nei macrofagi M1 nei tre tempi sperimentali (6h, 1h2, 24h).

GO Term	Description	Pv RM-M1_6h	Pv RM-M1_12	Pv RM-M1_24h
GO:0007049	cell cycle	8,02E-04	9.07E-07	1,58E-15
GO:0010564	regulation of cell cycle process		1,08E-04	4.07E-14
GO:0022402	cell cycle process		3.72E-08	7.21E-14
GO:0022403	cell cycle phase	6.02E-04	5.38E-09	1.08E-13
GO:0007067	mitosis		2.77E-06	1,81E-12
GO:0048285	organelle fission		4.16E-06	5.99E-12
GO:0051301	cell division		4.98E-06	1.95E-11
GO:0006260	DNA replication		1.52E-08	9.89E-11
GO:0006259	DNA metabolic process		1.29E-08	8.40E-08
GO:0006270	DNA-dependent DNA replication initiation		8.10E-05	1.22E-07
GO:0009058	biosynthetic process		5.26E-12	1.27E-07
GO:0044249	cellular biosynthetic process		2.10E-11	1.27E-07
GO:0071156	regulation of cell cycle arrest		1.08E-04	4.10E-07
GO:0044281	small molecule metabolic process		4.17E-05	7.03E-07
GO:0000087	M phase of mitotic cell cycle		9.94E-04	1.83E-06
GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic process		1.32E-07	3.04E-06
GO:0009059	macromolecule biosynthetic process		3.42E-07	3.66E-06
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process		2.25E-06	4.62E-06
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process		6.40E-10	1.01E-05
GO:0043436	oxoacid metabolic process		9.32E-05	1.13E-05
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process		1.92E-04	1.13E-05
GO:0031577	spindle checkpoint		8.97E-04	1.62E-05
GO:0006082	organic acid metabolic process		7.25E-05	1.66E-05
GO:0044283	small molecule biosynthetic process		4.17E-05	1.67E-05
GO:0000279	M phase		6.56E-04	1.84E-05

Tabella 10: GO down-regolati nei macrofagi classici (M1) rispetto a RM (resting macrophages). Pv:p-value

Per l'analisi di pathway down-regolati abbiamo inserito i geni la cui differenze di espressione fra M1 ed RM risultasse inferiore del valore medio sottratto due volte la deviazione standard.

Pathway	P-val. RM-M1-6h	P-val.RM-M1-12h	P-val.RM-M1-24h
Cell Cycle			3.10E-07
DNA-replication		2.20E-02	6.30E-02
Mismatch repair		5.70E-02	

Tabella 11: pathways down-regolati nei macrofagi classici (M1) rispetto a RM (resting macrophages). Pv:p-value

4.3.2 Analisi trascrittomica: differenze di espressione fra i macrofagi alternativi (M2a) e i Resting Macrophages (RM)

Per questa condizione sperimentale l'analisi è stata condotta esattamente come la precedente, confrontando i macrofagi attivati in modo alternativo (M2a) e i resting macrophages (RM). Di seguito è riportata la tabella con l'elenco dei gruppi ontologici up-regolati nei macrofagi M2a nei tre tempi sperimentali (6h, 12h, 24h). Le caselle vuote indicano che la significatività non era rilevante perché al di sopra di 0.0001.

GO Term	Description	Pv.M2a 6h	Pv.M2a 12h	Pv.M2a 24h
GO:0007267	cell-cell signaling	2.10E-04	9.72E-04	8.02E-09
GO:0032501	multicellular organismal process	9.94E-06	2.11E-05	7.85E-08
GO:0032502	developmental process	9.32E-04	6.42E-04	8.83E-08
GO:0007154	cell communication	5.89E-06	2.38E-04	1.05E-07
GO:0007610	behavior	7.14E-04		2.92E-05
GO:0071299	cellular response to vitamin A	3.08E-05	8.58E-04	3.07E-05
GO:0009605	response to external stimulus		5.57E-04	3.34E-05
GO:0030808	regulation of nucleotide biosynthetic process	1.53E-04	1.00E+00	3.91E-05
GO:0030802	regulation of cyclic nucleotide biosynthetic process	1.53E-04	1.00E+00	3.91E-05
GO:0045981	positive regulation of nucleotide metabolic process	5.46E-04	9.41E-04	4.95E-05
GO:0030801	positive regulation of cyclic nucleotide metabolic process	5.46E-04	9.41E-04	4.95E-05
GO:0007223	Wnt receptor signaling pathway, calcium modulating path.	7.64E-07	6.36E-05	7.15E-05
GO:0035567	non-canonical Wnt receptor signaling pathway	9.66E-07	1.87E-04	

Tabella 12: GO up-regolati nei macrofagi alternativi (M2a) rispetto a RM (resting macrophages). Pv:p-value

L'analisi di pathway non rivela alcuna significatività, né biologica né statistica.

Di seguito viene riportata la tabella con i risultati dei gruppi ontologici down-regolati nei macrofagi M2a rispetto ad RM.

GO Term	Description	Pv M2a-RM_6h	Pv M2a-RM_12h	P M2a-RM_24h
GO:0009611	response to wounding	5,82E-06	9,69E-09	4,92E-04
GO:0032501	multicellular organismal process	1,19E-13	3,87E-08	
GO:0003008	system process	4,20E-08	5,41E-08	
GO:0006954	inflammatory response	1,43E-05	1,82E-07	4,78E-05
GO:0006935	chemotaxis	2,11E-06	9,57E-07	8,74E-04
GO:0042330	taxis	2,11E-06	9,57E-07	8,74E-04
GO:0007154	cell communication	2,30E-07	1,17E-06	3,05E-04
GO:0050877	neurological system process	2,84E-05	1,53E-06	
GO:0007267	cell-cell signaling	1,10E-06	5,90E-06	3,07E-04
GO:0032502	developmental process	5,71E-10	1,15E-05	
GO:0032675	regulation of interleukin-6 production	9,32E-05	1,11E-04	
GO:0007346	regulation of mitotic cell cycle		1,35E-04	2,09E-04
GO:0030595	leukocyte chemotaxis	9,22E-05	1,68E-04	
GO:0040011	locomotion	3,12E-06	1,82E-04	
GO:0030154	cell differentiation	1,68E-04	2,16E-04	
GO:0007610	behavior	5,44E-07	4,91E-04	
GO:0010574	regulation of VEGF production	2,13E-05	5,48E-04	
GO:0007626	locomotory behavior	2,04E-06	5,89E-04	
GO:0007606	sensory perception of chemical stimulus	4,36E-07	5,92E-04	
GO:0007155	cell adhesion	5,56E-08	7,30E-04	
GO:0048856	anatomical structure development	7,13E-08	7,61E-04	
GO:0022610	biological adhesion	6,03E-08	7,69E-04	
GO:0016477	cell migration	1,30E-04	7,71E-04	

Tabella 13: GO down-regolati nei macrofagi alternativi (M2a) rispetto a RM (resting macrophages). Pv:p-value

L'analisi di pathway mostra i seguenti risultati:

Pathway	P-val. RM-M2a-6h	P-val. RM-M2a-12h	P-val. RM-M2a-24h
Cytokine-cytokine receptor interaction	2,0E-2	2,4E-4	8,0E-4
Toll-like receptor signaling pathway		5,5E-3	7,1E-2
Chemokine signaling pathway		5,9E-3	3,1E-4

Tabella 14: pathways down-regolati nei macrofagi alternativi (M2a) rispetto a RM (resting macrophages). Pv:p-value

4.3.3 Analisi trascrittomiche: differenze di espressione fra i macrofagi deattivati (M2c) e i Resting Macrophages (RM)

Anche in questo caso l'analisi ontologica e di pathway è stata condotta come nelle precedenti condizioni sperimentali. Il gruppi ontologici che risultano up-regolati nei macrofagi deattivati rispetto ai resting macrophages sono sotto riportati.

GO Term	Description	P-val M2c 6h	P-val M2c 12h	P-val M2c 24h
GO:0032501	multicellular organismal process	7,39E-04		2,58E-05
GO:0032502	developmental process		6,94E-05	1,43E-04
GO:0048869	cellular developmental process		1,60E-05	2,01E-04
GO:0046717	acid secretion	2,60E-05		2,79E-04
GO:0003014	renal system process	9,16E-04		9,16E-04
GO:0051239	regulation of multicellular organismal process	8,93E-05		7,03E-04
GO:0048731	system development	5,25E-05	2,14E-06	
GO:0048856	anatomical structure development	7,87E-04	2,35E-04	

Tabella 15: GO up-regolati nei macrofagi deattivati (M2c) rispetto a RM (resting macrophages). Pv:p-value

Di seguito viene riportata la tabella con i risultati dei gruppi ontologici down-regolati nei macrofagi M2c rispetto ad RM.

GO Term	Description	Pv M2c-RM 6h	Pv M2c-RM 12h	Pv M2c-RM 24h
GO:0007606	sensory perception of chemical stimulus	3,08E-05	7,11E-06	3,14E-08
GO:0007600	sensory perception		2,69E-05	3,36E-08
GO:0032501	multicellular organismal process	1,97E-07	1,21E-06	9,18E-08
GO:0003008	system process	3,07E-04	2,91E-08	1,51E-07
GO:0050877	neurological system process		4,19E-07	1,63E-06
GO:0007608	sensory perception of smell	1,62E-04	2,95E-06	1,74E-05
GO:0030001	metal ion transport	2,01E-04	9,35E-06	1,26E-04
GO:0015674	di-, tri-valent inorganic cation transport		3,31E-05	3,52E-04
GO:0006816	calcium ion transport		5,93E-05	3,68E-04
GO:0006811	ion transport		3,50E-06	4,50E-04
GO:0070838	divalent metal ion transport		1,03E-04	5,33E-04
GO:0006812	cation transport		2,64E-04	6,66E-04

Tabella 16: GO down-regolati nei macrofagi deattivati (M2c) rispetto a RM (resting macrophages). Pv:p-value

L'analisi di pathway non mostra alcuna differenza significativa né sulla up-regolazione né sulla down-regolazione di processi biologici.

4.3.4 Analisi trascrittomiche dei macrofagi addizionati con PPAR γ agonisti.

Dopo avere caratterizzato il profilo trascrittomico delle tre diverse tipologie di attivazione macrofagica abbiamo eseguito un confronto fra queste e l'effetto indotto da molecole agonisti di PPAR γ , nel nostro caso il GW1929 (Sigma). Dal momento che per questa particolare condizione sperimentale abbiamo lisato le cellule non ai tempi 6, 12, e 24 ore ma bensì dopo 24, 48 e 72 ore (come suggerito dalla letteratura⁵²) i confronti sono stati eseguiti fra i tempi in ordine crescente (cioè 6 vs 24, 12 vs 48, 24 vs 72 ore). Verranno presentati prima i risultati sulla up-regolazione e successivamente quelli sulla down-regolazione.

Di seguito sono elencate le tabelle che rappresentano i gruppi ontologici up-regolati nei macrofagi addizionati con agonisti di PPAR γ rispetto alle popolazioni macrofagiche classiche (tabella 17), resting macrophages (tabella 18), alternativi (tabella 19) e deattivati (tabella 20).

GO Term	Description	Pv.GW-M1 1 ^T	Pv.GW-M1 2 ^T	Pv.GW-M1 3 ^T
GO:0006259	DNA metabolic process		2.26E-14	3.88E-14
GO:0006260	DNA replication		9.59E-14	1.29E-14
GO:0007049	cell cycle		9.00E-09	1.51E-35
GO:0022402	cell cycle process		4.09E-07	8.04E-38
GO:0006281	DNA repair		1.78E-06	1.91E-07
GO:0022403	cell cycle phase		2.47E-06	6.78E-36
GO:0051301	cell division		2.30E-05	3.92E-25
GO:0000280	nuclear division		7.86E-05	1.45E-28
GO:0007067	mitosis		7.86E-05	1.45E-28
GO:0048285	organelle fission		1.45E-04	8.04E-28
GO:0051301	cell division			3.92E-25
GO:0010564	regulation of cell cycle process			7.87E-18
GO:0051726	regulation of cell cycle			1.11E-14
GO:0071156	regulation of mitotic cell cycle			3.76E-14
GO:0007346	cell cycle checkpoint			1.21E-13
GO:0000075	chromosome segregation			9.50E-11
GO:0006399	tRNA metabolic process	6.84E-7		
GO:0006631	fatty acid metabolic process		1.97E-6	1.64E-5
GO:0006629	lipid metabolic process		1.11E-5	

Tabella 17: GO up-regolati nei macrofagi addizionati con GW1929 rispetto a M1. Pv:p-value; GW: PPAR γ agonista GW1929; 1^T: primo tempo di lisi (6 e 24 ore), 2^T: secondo tempo di lisi (12 e 48 ore); 3^T: terzo tempo di lisi.

GO Term	Description	Pv GW-RM 1 ^T	Pv GW-RM2 ^T	Pv GW-RM 3 ^T
GO:0000076	DNA replication checkpoint		7,48E-04	
GO:0006631	fatty acid metabolic process		3,78E-04	5,39E-04
GO:0000724	double-strand break repair via homologous rec.		3,26E-04	
GO:0000725	recombinational repair		3,26E-04	
GO:0006259	DNA metabolic process		6,00E-05	
GO:0006260	DNA replication		5,65E-08	
GO:0021869	forebrain ventricular zone progenitor cell division			8,80E-05
GO:0007076	mitotic chromosome condensation			8,47E-05
GO:0031536	positive regulation of exit from mitosis			2,23E-05
GO:0000280	nuclear division			2,95E-06
GO:0007067	mitosis			2,95E-06
GO:0048285	organelle fission			7,00E-07
GO:0051301	cell division			3,75E-08
GO:0007049	cell cycle			1,64E-08
GO:0022402	cell cycle process			7,46E-09
GO:0022403	cell cycle phase			8,44E-10
GO:0000115	regulation of transcription involved in S phase	2,49E-04		

Tabella 18: GO up-regolati nei macrofagi addizionati con GW1929 rispetto a RM. Pv:p-value; GW: PPAR γ agonista GW1929; 1^T: primo tempo di lisi (6 e 24 ore), 2^T: secondo tempo di lisi (12 e 48 ore); 3^T: terzo tempo di lisi.

GO Term	Description	Pv GW-M2a 6h	PvGW-M2a 12h	PvGW-M2a 24h
GO:0006259	DNA metabolic process		9.64E-09	1.17E-12
GO:0006260	DNA replication		3.19E-11	4.13E-14
GO:0007049	cell cycle		1.10E-04	1.14E-20
GO:0022402	cell cycle process			7.85E-15
GO:0006281	DNA repair		5.33E-05	2.40E-08
GO:0022403	cell cycle phase			2.57E-15
GO:0051301	cell division			8.94E-13
GO:0000280	nuclear division			1.69E-11
GO:0007067	mitosis			1.69E-11
GO:0048285	organelle fission			9.50E-11
GO:0051301	cell division			8.94E-13
GO:0010564	regulation of cell cycle process		7.97E-05	1.43E-10
GO:0051726	regulation of cell cycle			8.07E-08
GO:0071156	regulation of cell cycle arrest			1.29E-09
GO:0007346	regulation of mitotic cell cycle			4.45E-07
GO:0000075	cell cycle checkpoint			2.65E-09
GO:0007059	chromosome segregation			1.14E-07
GO:0033043	regulation of organelle organization			
GO:0007088	regulation of mitosis			8.16E-04
GO:0008283	cell proliferation			
GO:0000076	DNA replication checkpoint		8.15E-06	6.31E-06

Tabella 19: GO up-regolati nei macrofagi addizionati con GW1929 rispetto a M2a. Pv:p-value; GW: PPAR γ agonista GW1929; 1^T: primo tempo di lisi (6 e 24 ore), 2^T: secondo tempo di lisi (12 e 48 ore); 3^T: terzo tempo di lisi.

GO Term	Description	Pv. GW-M2c 1 ^T	Pv. GW-M2c 2 ^T	P v. GW-M2c 3 ^T
GO:0006259	DNA metabolic process		3.01E-04	
GO:0006260	DNA replication		2.82E-10	
GO:0007049	cell cycle			1.32E-12
GO:0022402	cell cycle process			5.36E-15
GO:0006281	DNA repair			
GO:0022403	cell cycle phase			3.13E-14
GO:0051301	cell division			1.87E-11
GO:0000280	nuclear division			2.54E-10
GO:0007067	mitosis			2.54E-10
GO:0048285	organelle fission			3.87E-10
GO:0051301	cell division			1.87E-11
GO:0010564	regulation of cell cycle process			5.99E-06
GO:0051726	regulation of cell cycle			7.44E-07
GO:0071156	regulation of cell cycle arrest			3.85E-04
GO:0007346	regulation of mitotic cell cycle			3.91E-07
GO:0000075	cell cycle checkpoint		6.91E-04	5.61E-04
GO:0007059	chromosome segregation			1.20E-07
GO:0033043	regulation of organelle organization			
GO:0007088	regulation of mitosis			
GO:0008283	cell proliferation			
GO:0000076	DNA replication checkpoint		4.43E-04	

Tabella 20: GO up-regolati nei macrofagi addizionati con GW1929 rispetto a M2c. Pv:p-value; GW: PPAR γ agonista GW1929; 1^T: primo tempo di lisi (6 e 24 ore), 2^T: secondo tempo di lisi (12 e 48 ore); 3^T: terzo tempo di lisi.

L'analisi di pathway conferma l'andamento dell'analisi ontologica. La tabella sotto riassume i pathway comunemente iper-espresi nei macrofagi addizionati con GW1929 (PPAR γ agonista) rispetto alle altre popolazioni. Nella tabella mancano i resting macrophages e i valori del primo tempo di lisi perché non risultava alcuna significatività in merito.

Pathway	Pv.GW-M1 2 ^T	Pv.GW-M1 3 ^T	Pv.GW-M2a 2 ^T	Pv.GW-M2a 3 ^T	Pv.GW-M2c 2 ^T	Pv.GW-M2c 3 ^T
Cell Cycle	3.7E-02	6.0E-12	6.02E-02	4.5E-08	3.6E-02	4.1E-03
DNA-replication	1.9E-07	2.3E-02	4.8E-04	3.4E-6	4.8E-03	
Mismatch repair	2.5E-03					
p53 signaling pathway		5.4E-02			6.0E-02	3.1E-02

Tabella 21: Pathway up-regolati nei macrofagi addizionati con GW1929 rispetto a M1, M2a ed M2c. Pv:p-value; GW: PPAR γ agonista GW1929; 2^T: secondo tempo di lisi (12 e 48 ore); 3^T: terzo tempo di lisi.

Le tabelle successive riassumono i gruppi ontologici down-regolati nei macrofagi addizionati con agonisti di PPAR γ rispetto alle popolazione macrofagiche classiche (tabella 22), resting macrophages (tabella 23), alternativi (tabella 24) e deattivati (tabella 25).

GO Term	Description	Pv. GW1-M1 1 ^T	Pv. GW-M1 2 ^T	Pv . GW-RM1 3 ^T
GO:0006935	chemotaxis	3.48E-09	8.04E-13	1.97E-13
GO:0042330	taxis	3.48E-09	8.04E-13	1.97E-13
GO:0009611	response to wounding	6.97E-18	1.12E-22	9.52E-20
GO:0006954	inflammatory response	5.14E-16	1.20E-20	7.63E-19
GO:0040011	locomotion	3.74E-08	4.80E-12	1.07E-10
GO:0002376	immune system process	9.18E-37	5.89E-46	5.64E-41
GO:0006955	immune response	1.26E-31	2.00E-35	2.97E-29
GO:0007267	cell-cell signaling	4.05E-08	3.24E-10	3.27E-09
GO:0007154	cell communication	2.84E-08	6.72E-09	3.22E-08
GO:0042981	Regulation of apoptosis	3.08E-14	4.93E-15	5.24E-16

Tabella 22: GO down-regolati nei macrofagi addizionati con GW1929 rispetto a M1. Pv:p-value; GW: PPAR γ agonista GW1929; 1^T: primo tempo di lisi (6 e 24 ore), 2^T: secondo tempo di lisi (12 e 48 ore); 3^T: terzo tempo di lisi.

GO Term	Description	Pv. GW1-RM 1 ^T	Pv. GW-RM 2 ^T	Pv . GW-RM 3 ^T
GO:0006935	chemotaxis	2.27E-11	1.74E-09	3.46E-05
GO:0042330	taxis	2.27E-11	1.74E-09	3.46E-05
GO:0009611	response to wounding	6.49E-11	8.81E-10	4.93E-05
GO:0006954	inflammatory response	2.01E-09	4.38E-08	1.75E-04
GO:0040011	locomotion	2.54E-08	1.02E-05	2.85E-04
GO:0002376	immune system process	1.68E-07	1.60E-07	4.67E-05
GO:0006955	immune response	4.09E-07	2.29E-09	3.14E-04
GO:0007267	cell-cell signaling	1.62E-06	5.63E-06	3.93E-04
GO:0007154	cell communication	1.02E-05	3.75E-05	3.10E-05

Tabella 23: GO down-regolati nei macrofagi addizionati con GW1929 rispetto a RM. Pv:p-value; GW: PPAR γ agonista GW1929; 1^T: primo tempo di lisi (6 e 24 ore), 2^T: secondo tempo di lisi (12 e 48 ore); 3^T: terzo tempo di lisi.

GO Term	Description	P-value M2a-GW 1T	P-value M2a-GW 2T	P-value M2a-GW 3T
GO:0009611	response to wounding	2,81E-08	4,58E-08	3,14E-07
GO:0006935	chemotaxis	1,19E-06	1,33E-07	1,64E-06
GO:0042330	taxis	1,19E-06	1,33E-07	1,64E-06
GO:0048521	negative regulation of behavior	2,86E-05	1,93E-07	1,55E-04
GO:0007267	cell-cell signaling	1,51E-05	1,24E-06	9,65E-07
GO:0002376	immune system process	4,86E-07	1,68E-06	1,70E-06
GO:0030334	regulation of cell migration	1,12E-07	2,03E-06	1,31E-05
GO:2000145	regulation of cell motility	1,26E-07	2,19E-06	1,44E-05
GO:0006954	inflammatory response	2,89E-06	2,93E-06	6,20E-04
GO:0051270	regulation of cellular component movement	5,08E-08	4,32E-06	4,86E-05
GO:0040012	regulation of locomotion	7,08E-09	5,09E-06	1,26E-05
GO:0007154	cell communication	1,70E-05	5,28E-06	1,17E-05
GO:0030335	positive regulation of cell migration	1,11E-06	1,28E-05	3,02E-05
GO:2000147	positive regulation of cell motility	1,11E-06	1,28E-05	3,02E-05
GO:0040011	locomotion	2,23E-05	1,38E-05	4,63E-07
GO:0051272	positive regulation of cellular component movement	2,19E-06	1,83E-05	5,16E-05
GO:0040017	positive regulation of locomotion	2,46E-07	1,99E-05	5,60E-05
GO:0009605	response to external stimulus	2,25E-05	2,04E-05	1,16E-07
GO:0006955	immune response	4,97E-06	8,25E-05	1,71E-06

Tabella 24: GO down-regolati nei macrofagi addizionati con GW1929 rispetto a M2a. Pv:p-value; GW: PPAR γ agonista GW1929; 1^oT: primo tempo di lisi (6 e 24 ore), 2^oT: secondo tempo di lisi (12 e 48 ore); 3^oT: terzo tempo di lisi.

GO Term	Description	Pv M2c-GW 1t	Pv M2c-GW 2t	Pv M2c-GW 3t
GO:0006935	chemotaxis	1.93E-12	2.21E-10	3.53E-12
GO:0042330	taxis	1.93E-12	2.21E-10	3.53E-12
GO:0002376	immune system process	2.75E-11	2.86E-08	1.70E-11
GO:0006955	immune response	3.84E-10	4.73E-08	6.97E-10
GO:0009605	response to external stimulus	1.40E-10	6.15E-09	6.40E-09
GO:0040011	locomotion	1.13E-09	1.10E-06	1.67E-08
GO:0040012	regulation of locomotion	1.83E-05	6.06E-04	1.29E-06
GO:0051239	regulation of multicellular organismal process	7.26E-04	5.06E-04	1.70E-06
GO:0006952	defense response	3.03E-11	1.50E-04	2.36E-06
GO:0032879	regulation of localization	2.47E-04	7.29E-04	7.30E-06
GO:0009611	response to wounding	2.49E-14	3.34E-09	9.32E-06
GO:0051050	positive regulation of transport	1.24E-05	8.07E-05	1.00E-05
GO:0055066	di-, tri-valent inorganic cation homeostasis	2.73E-04	4.41E-04	2.55E-05
GO:0040017	positive regulation of locomotion	4.66E-06	1.98E-04	4.20E-05
GO:0042221	response to chemical stimulus	7.34E-08	1.29E-05	4.50E-05
GO:0030335	positive regulation of cell migration	9.96E-06	6.52E-04	1.51E-04
GO:2000147	positive regulation of cell motility	9.96E-06	6.52E-04	1.51E-04
GO:0007267	cell-cell signaling	2.60E-07	4.20E-06	1.57E-04
GO:0006954	inflammatory response	5.74E-13	3.52E-07	2.24E-04

Tabella 25: GO down-regolati nei macrofagi addizionati con GW1929 rispetto a M2c. Pv:p-value; GW: PPAR γ agonista GW1929; 1^oT: primo tempo di lisi (6 e 24 ore), 2^oT: secondo tempo di lisi (12 e 48 ore); 3^oT: terzo tempo di lisi.

Anche in questo caso l'analisi di pathway rispecchia l'andamento dell'analisi ontologica. La tabella sotto riportata riassume i pathway comunemente sotto-espressi nei macrofagi addizionati con GW1929 (PPAR γ agonista) rispetto alle altre popolazioni. Nella tabella mancano i valori del primo tempo di lisi perché non risultava alcuna significatività in merito.

Pathway	Pv. M1-GW2 ^T	Pv.M1-GW 3 ^T	Pv. RM-GW 2 ^T	Pv. RM-GW 3 ^T	Pv. M2a-GW 2 ^T	Pv. M2a-GW 3 ^T	Pv.M2c-GW 2 ^T	Pv.M2c-GW 3 ^T
Cytokine-cytokine receptor interaction	2.5E-24	2.9E-21	4,2E-08	3,2E-02	3,1E-4	9,7E-5	7,4E-10	2,5E-7
Jak-STAT signaling pathway	1.7E-11	2.4E-07						
Toll-like receptor signaling pathway	8.4E-10	3.1E-08	6,2E-03				2,0E-3	
Chemokine signaling pathway	1.5E-09	1.9E-08	1,2E-02		8,6E-3	9,6E-2	2,2E-5	2,1E-2
NOD-like receptor signaling pathway	1,1E-05	2,2E-07	2,1E-02				6,0E-3	5,7E-2
Cell adhesion molecules (CAMs)			8,6E-2	5,1E-2	3,0E-2			7,1E-2

Tabella 26: Pathway down-regolati nei macrofagi addizionati con GW1929 rispetto a M1, RM, M2a ed M2c. Pv:p-value; GW: PPAR γ agonista GW1929; 2^T: secondo tempo di lisi (12 e 48 ore); 3^T: terzo tempo di lisi.

4.4 Validazione dei risultati con Real Time PCR

Per confermare i dati di espressione genica derivati dagli esperimenti di microarray abbiamo validato alcuni geni che presentavano le maggiori differenze di espressione fra un fenotipo e l'altro, rappresentati quindi da citochine (IL-6 ed IL-8), enzimi (SOD2, ALOX15, SOCS1, PTGS2) e protooncogeni (WNT5a).

La tabella sotto riassume i valori di log ratio risultanti dal confronto con i RM per i geni selezionati.

	IL8	IL6	PTGS2	SOD2	SOCS1	WNT5A	ALOX15
M1-RM 6h	1.005	1.006	2.173	1.211	1.244	0.648	0.144
M1-RM 12h	1.844	1.608	2.239	1.207	1.283	0.631	-0.046
M1-RM 24h	1.887	1.413	2.010	1.695	1.265	1.923	-0.381
M2a-RM 6h	-0.971	-0.446	-0.438	-0.312	0.857	0.486	0.813
M2a-RM 12h	-1.122	-0.429	-0.457	-1.504	0.776	1.030	0.965
M2a-RM 24h	-0.347	-0.687	-0.411	-0.242	0.906	1.448	0.788
M2c-RM 6h	-0.009	-0.029	0.077	0.299	0.063	-0.364	0.068
M2c-RM 12h	-0.306	-0.139	-0.100	-0.129	-0.061	0.092	-0.468
M2c-RM 24h	-0.297	-0.397	-0.109	0.403	-0.028	-0.259	-0.306
GW1929-RM 24h	-1.808	-1.291	-0.488	-0.237	0.045	-1.336	0.243
GW1929 -RM48h	-1.069	-0.697	-0.256	-1.087	-0.064	-0.881	-0.378
GW1929-RM 72h	-0.063	-0.838	-0.225	0.348	-0.065	-0.008	-0.358

Tabella 27: valori di log ratio dei geni scelti per la validazione.

L'immagine sotto riporta la rappresentazione *heat map* che abitualmente si utilizza per rappresentare visivamente i risultati dei microarray. In verde sono rappresentati i geni down-regolati ($\log \text{ratio} < 0$) mentre in rosso sono rappresentati i geni up-regolati ($\log \text{ratio} > 0$). Le varie sfumature corrispondono ai valori intermedi di log ratio.

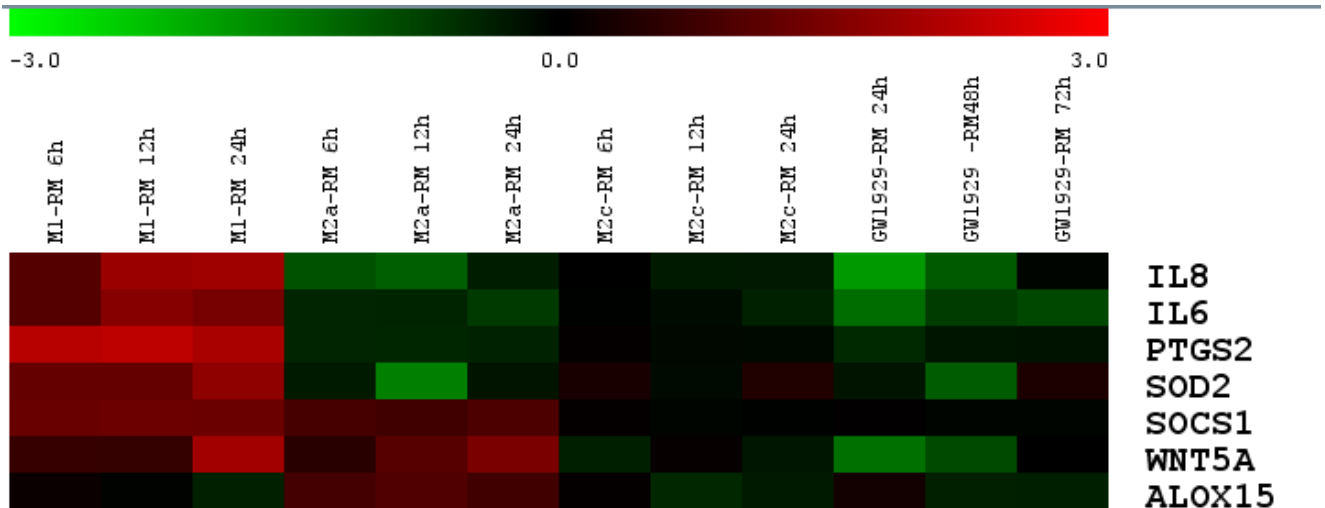


Figura 26: rappresentazione heat map della tabella sopra

Il metodo comparativo delta Ct utilizzato per i dati di PCR quantitativa, usa una formula aritmetica per calcolare la relativa quantità dell'espressione genica del target individuato. La quantità del gene target espresso è normalizzato contro un riferimento endogeno ed un calibratore. Il riferimento endogeno usato in tutti gli esperimenti è il GAPDH mentre il calibratore è rappresentato dall'RNA estratto dai Resting Macrophages nei vari tempi. Il valore Ct del target e del controllo endogeno sono stati calcolati per ogni campione (analizzato in quadruplicato e quindi utilizzando un valore medio). Il valore Ct del controllo endogeno è stato sottratto al valore Ct del gene target. Questo valore è conosciuto come delta Ct. Il delta Ct è quindi sottratto dal delta Ct del calibratore e quest'ultimo valore è denominato delta-delta Ct.

	<i>WNT5a</i>	<i>ALOX15</i>	<i>IL 6</i>	<i>IL 8</i>	<i>PTGS2</i>	<i>SOCS1</i>	<i>SOD2</i>
M1 6h	2.067	-1.421	11.01	3.279	7.1425	6.34825	3.20575
M1 12h	6.388	-1.94675	13.4965	6.05675	7.81925	6.9795	3.3735
M1 24h	6.85075	-0.2935	10.937	7.31275	8.046	9.20625	6.48475
M2a 6h	2.02275	7.504	-1.604	-2.33825	-1.1	4.42675	-1.932
M2a 12h	5.3995	10.2895	-3.122	-3.38325	-1.1685	4.95	-2.47375
M2a 24h	4.73025	12.05475	-3.4805	-1.5025	-1.22275	5.34475	-0.25025
M2c 6h	-0.63375	0.15625	-0.251	-0.122	0.327	0.104	-0.6085
M2c 12h	2.24225	1.12375	-0.11775	-0.2705	0.1425	0.78	-0.691
M2c 24h	-1.71925	-0.017	-1.30875	-1.0985	-0.1445	0.08675	-0.521
GW1929 24h	-5.02749	-4.3085	-9.4205	-9.90875	-5.559	-4.29922	-6.95925
GW1929 48h	-2.17306	-2.9005	-7.32375	-6.973	-3.548	-2.57207	-6.36725
GW1929 72h	-3.71994	-5.52675	-6.65175	-3.586	-3.51625	-2.52581	-2.606

Tabella 28: quantificazione dei geni tramite PCR Real Time; i valori rappresentano i risultati del $-\Delta\Delta Ct$ per ogni gene.

La quantità del gene target espresso normalizzato al controllo endogeno ed al relativo calibratore è calcolata usando la formula $-\Delta\Delta Ct$.

Per i resting macrophages il valore risulta sempre 1 perché essendo il controllo endogeno viene normalizzato verso se stesso.

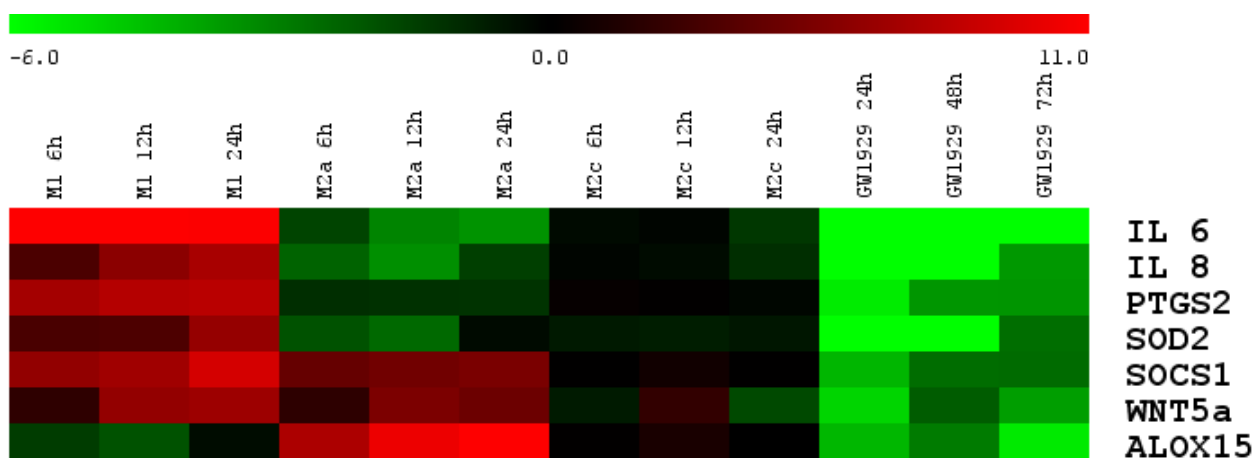


Figura 27: rappresentazione heat map della tabella sopra

Le heat map rappresentanti i valori di espressione dei geni valutati con array (figura 26) e con PCR quantitativa (figura 27) ci permettono di avere una rappresentazione grafica ed immediata della validazione dei geni. Al fine di avere una valutazione precisa del grado di riproducibilità e di bontà dei microarray, abbiamo effettuato un'analisi di regressione lineare per verificare la correlazione fra questi risultati e quelli ottenuti tramite PCR quantitativa.

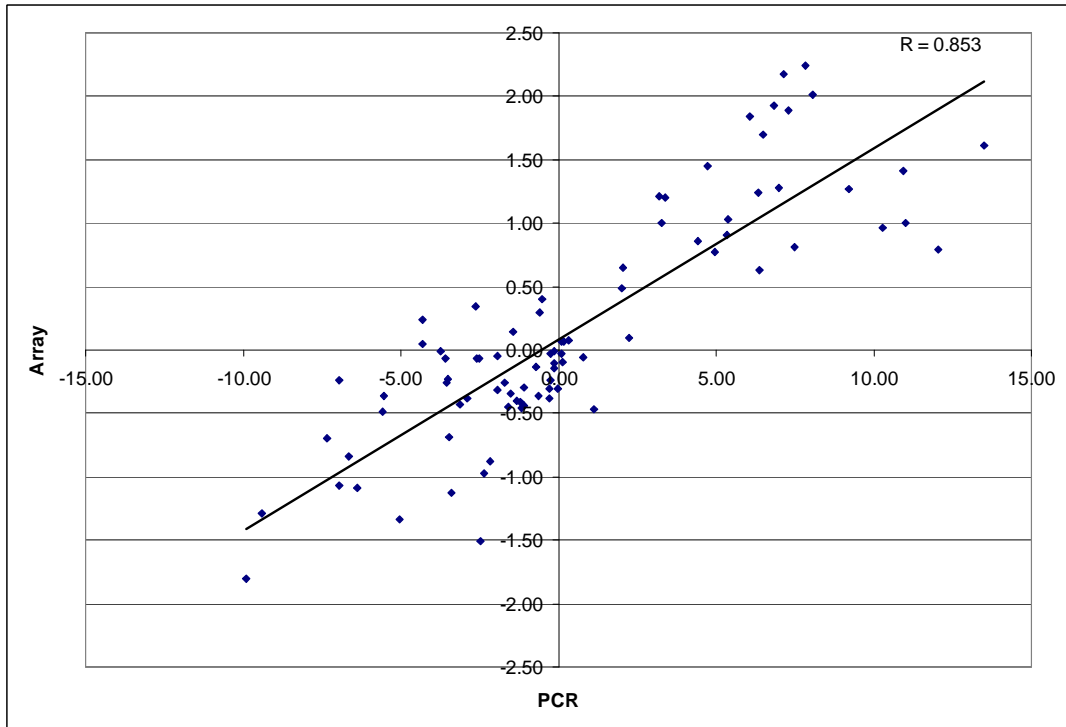


Figura 28: analisi di regressione lineare fra i risultati dei microarray e quelli di PCR quantitativa.

Come si può vedere dall'immagine sopra riportata (figura 28) vi è una buona correlazione fra i risultati, confermata dal coefficiente di Pearson (R) che risulta 0.85.

5.CONCLUSIONI

I macrofagi sono cellule che presentano un'estrema versatilità, in quanto sono in grado di rispondere alla maggior parte degli stimoli chimici e biologici ai quali vengono sottoposti. Proprio per questa loro particolare caratteristica è importante conoscere quali siano i meccanismi che regolano la risposta trascrizionale di queste cellule, al fine di potere mantenere un equilibrio costante fra le diverse popolazioni macrofagiche anche quando tale equilibrio sembra sbilanciarsi in senso pro-infiammatorio, come ad esempio in presenza di aterosclerosi.

Per questo motivo abbiamo voluto vedere in questo lavoro quale fosse la reazione globale della cellula ad un determinato stimolo in grado di indurre tre specifici tipi di attivazione macrofagica: classica (M1), alternativa (M2a) e deattivazione (M2c). Il confronto con i resting macrophage ci ha permesso di eliminare tutti quei geni espressi normalmente da queste cellule, evidenziando solo le differenze dovute alla presenza delle varie molecole.

Dai risultati si evince che il tipo di attivazione che presenta maggiori differenze trascrizionali rispetto ai resting macrophage sono i macrofagi M1. Infatti in questo caso l'analisi ontologica e di pathway è quella che presenta le maggiori significatività (vedi paragrafo 4.3.1) . Tutti i gruppi di geni che risultano up-regolati fanno parte della risposta immunitaria e infiammatoria, a conferma dei dati presenti in letteratura⁴⁰. Il picco massimo della risposta cellulare all'LPS e all'IFN γ avviene fra le 12 e le 24 ore dall'aggiunta dello stimolo ma già dopo 6 ore sono evidenti i primi cambiamenti nella trascrizione. E' interessante notare come in questo caso anche l'analisi dei gruppi ontologici down-regolati abbia delle differenze significative rispetto ai resting macrophages. Questi ultimi infatti risultano essere più attivi nel ciclo cellulare, indicando quindi che i macrofagi M1 sono cellule che presentano un alto grado di differenziazione. Queste

differenze non si apprezzano nel confronto con le altre popolazioni macrofagiche M2a ed M2c, che infatti risultano essere più simili ai macrofagi residenti.

Lo stesso tipo di analisi condotta sui macrofagi M2a ed M2c invece rivela molte meno differenze rispetto ai resting macrophages. Nel paragrafo 4.3.2 si può vedere come i macrofagi alternativi non partecipino al processo flogistico (vi è infatti una evidente down-regolazione dei gruppi ontologici correlati) e limitino l'up-regolazione ad alcuni processi biologici generici, quali la comunicazione cellulare (che comprende geni che codificano per chemochine) e la risposta agli stimoli. Interessante notare come risultino up-regolati due gruppi ontologici particolari: *Wnt receptor signaling pathway*, *calcium modulating pathway* e *non-canonical Wnt receptor signaling pathway*. Da letteratura si evince che il gene *wnt5a* promuove l'infiammazione nel tessuto adiposo e che questo può avere effetti pleiotropici su altri tessuti causando adesione cellulare, migrazione e flogosi⁶⁰. Questo dato contrasta con le caratteristiche anti-infiammatorie note per questo tipo di attivazione. Anche l'espressione della 15-lipossigenasi (*alox15*), di cui è noto l'effetto pro-aterogeno⁶¹, sembra contrastare con le caratteristiche fino ad ora attribuite all'attivazione alternativa. Tuttavia in merito al gene *wnt5a* sono presenti ancora pochi studi, per ora lo stato flogistico associato alla trascrizione del gene sembra comunque essere un effetto indiretto che nei nostri modelli sperimentali in vitro non viene evidenziata. Inoltre la validazione degli altri geni (*IL-6* e *8*, *SOCS1*, *SOD2* e *PTGS2*) sono tutte coerenti con il profilo funzionale osservato in queste cellule, sia nella letteratura che in questo lavoro. In questa condizione sperimentale non vi è molta differenza nel *time course*, essendo le significatività meno spiccate rispetto ai macrofagi M1.

La deattivazione macrofagica (M2c, capitolo 4.3.3) risulta essere quella in assoluto più simile ai resting macrophage, sia per ciò che concerne l'up-regolazione che la down-regolazione, per cui ad un'analisi globale sembra che l'IL 10 non provochi nella cellula un cambiamento importante a livello trascrizionale, suggerendo quindi che un possibile effetto lo si potrebbe osservare nella

regressione di uno stato già infiammatorio e non nel cambiamento di cellule che non sono attive da questo punto di vista.

Per quanto concerne invece l'effetto dei PPAR γ agonisti questo è stato valutato eseguendo il confronto con tutte le tipologie di attivazione (vedi capitolo 4.3.4). Osservando quello che risulta up-regolato emerge una significativa espressione di geni che partecipano al ciclo cellulare. È interessante notare come questo dato sia costante verso tutti i confronti e come in questo caso l'effetto di questi agonisti non si manifesti prima delle 12 ore dall'aggiunta della molecola. Le significatività più alte derivano dal confronto con M1, e questo è conforme con la letteratura e con i nostri risultati. L'aumento del potenziale proliferativo di agonisti dei PPAR γ è stato precedentemente visto su cellule progenitrici endoteliali in vitro⁶² ma non sono presenti dati su colture primarie di macrofagi umani. Al contrario la down regolazione evidenzia una importante sotto espressione dei geni che partecipano alla risposta immunitaria e all'infiammazione. Anche in questo caso le differenze più significative si hanno nel confronto con i macrofagi M1, ma seppur con significatività minori sussistono anche nel confronto verso le altre tipologie di attivazione. Questo risultato è in linea con la letteratura a proposito dell'effetto pleiotropico dei tiazolidinedioni^{63,64}, farmaci PPAR γ agonisti. Tuttavia la forte espressione di geni che partecipano al ciclo cellulare e la significativa deattivazione dal punto di vista immunitario e infiammatorio evidenzia la presenza di differenze anche dal tipo di attivazione alternativa, suggerendo quindi che queste molecole agiscono in modo differente rispetto all'IL-4 e IL-10. Concludendo possiamo dire che la presenza di agonisti dei PPAR γ induce nei macrofagi un tipo di attivazione che si distingue da quelli descritti in letteratura, e che quindi l'effetto indotto dall'IL-4 probabilmente non agisce attraverso l'attivazione di questi recettori, anche se per questa deduzione bisognerebbe effettuare ulteriori prove sperimentali.

La validazione dei risultati dei microarray con real time PCR ha confermato la validità della tecnologia microarray, che quindi nonostante sia una metodica *high throughput*, risulta affidabile anche per l'analisi sui singoli geni. Sono in corso inoltre analisi di quantificazione delle citochine i cui geni risultano essere maggiormente trascritti, al fine di confermare l'effettiva attivazione macrofagica in termini di produzione proteica.

6. RICERCHE IN CORSO

Lo scopo di questo lavoro è quello di identificare i processi biologici coinvolti nella differenziazione macrofagica e quindi cercare di capire in che modo potere intervenire sulla regolazione degli stessi a favore di uno stato che regoli il processo infiammatorio invece di promuoverlo. A tale fine sono in fase di sperimentazione l'utilizzo di alcune sostanze antiossidanti, quali N-acetilcisteina (NAC) e metaboliti intermedi di polifenoli sull'attivazione macrofagica, per verificare quale sia l'effetto di questi antiossidanti e quale sia il loro meccanismo di azione. Un altro obiettivo è verificare se tali sostanze possono avere un'influenza in senso negativo sul processo flogistico di macrofagi classici e quindi già marcatamente differenziati in senso pro-infiammatorio. Allo stesso modo per valutare se è possibile che macrofagi M1 siano in grado di regredire il loro stato infiammatorio sono stati eseguiti esperimenti di co-culture indirette utilizzando un medium condizionato. Ciò prevede l'aggiunta di surnatante derivato da macrofagi alternativi o da macrofagi deattivati a macrofagi già differenziati in modo classico. Risultati preliminari suggeriscono che vi sia una possibilità di regressione del profilo infiammatorio, in quanto diminuisce in modo significativo l'espressione di geni legati all'infiammazione e all'immunità. Tuttavia questi sono ancora risultati preliminari in quanto non sono ancora state condotte le necessarie validazioni e approfondimenti.

Lo stesso disegno sperimentale è stato applicato anche a colture primarie di monociti, prima quindi della differenziazione in macrofagi. Anche in questo caso sono state aggiunte le varie citochine per verificare se avvenisse lo stesso l'attivazione come nei macrofagi. I risultati sono in fase di analisi.

Ultimamente sta crescendo l'interesse verso i macrofagi presenti nel tessuto adiposo (TAM). Questi sembrano regolare in modo paracrino lo stato infiammatorio di tale tessuto che è coinvolto nei processi di insulino resistenza legata all'obesità (vedi paragrafo 1.2.3). Essendo il tessuto

adiposo diverso a seconda dei distretti in cui si localizza (viscerale o sottocutaneo) può cambiare la percentuale di macrofagi in esso contenuto e quindi la sua funzionalità nell'insorgenza di uno stato infiammatorio. Per questo motivo l'isolamento e l'analisi dei macrofagi da tessuto adiposo sta aprendo nuove porte nello studio dell'insulino resistenza legata all'obesità.

7. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Gimbrone MA Jr. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1999 Aug;82(2):722-6.
- ² Van Guldener C, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia, vascular pathology, and endothelial dysfunction. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26(3):281-9
- ³ Tomkin GH. Atherosclerosis, diabetes and lipoproteins. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2010 Jul;8(7):1015-29.
- ⁴ Winkelmann BR, von Holt K, Unverdorben M. Smoking and atherosclerotic cardiovascular disease: part IV: genetic markers associated with smoking. *Biomark Med.* 2010 Apr;4(2):321-33.
- ⁵ Sessa R, Nicoletti M, Di Pietro M, Schiavoni G, Santino I, Zagaglia C, Del Piano M, Cipriani P. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: current state and future perspectives. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2009 Jan-Mar;22(1):9-14.
- ⁶ Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl Med* 1999; 340:115-26
- ⁷ Fuller CJ, Agil A, Lender D, Jialal I. Superoxide production and LDL oxidation by diabetic neutrophils. *J Diabetes Complications.* 1996 Jul-Aug; 10(4): 206-10.
- ⁸ Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM, Wong H, Peters AL. Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia.* 2000 Mar; 43 (3): 312-20.
- ⁹ Ferretti G, Bacchetti T, Nègre-Salvayre A, Salvayre R, Dousset N, Curatola G. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis.* 2006 Jan; 184(1):1-7.
- ¹⁰ Sima AV, Stancu CS, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell Tissue Res.* 2009 Jan; 335 (1): 191-203.
- ¹¹ Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, Doyle L, Phipson B, Smyth GK, Wabitsch M, O'Brien PE, Harrison LC. Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes.* 2010 Jul;59(7):1648-56
- ¹² Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol.* 2010 Jul;88(1):33-9.
- ¹³ Ziegler-Heitbrock, H.W. et al. The novel subset of CD14⁺/ CD16⁺ blood monocyte exhibits features of tissue macrophages. *Eur. J. Immunol.* 23, 2053-2058 (1993).
- ¹⁴ Simon Gordon and Philip R. Taylor. Monocyte and Macrophage heterogeneity. *Nature* 5, Dec 2005, 953-964.

-
- ¹⁵ Gordon, S. Biology of the macrophage. *J. Cell Sci. Suppl.* 1986, 4: 267-286.
- ¹⁶ Gorodon, S. The role of the macrophage in immune regulation. *Res. Immunol.* 149, 685-688 (1998).
- ¹⁷ Austyn, J. M. and Gordon, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against in the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* 11, 805-815 (1981).
- ¹⁸ Kraal, G. and Janse, M. Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody. *Immunology* 58, 665-669 (1986).
- ¹⁹ Papaioannou TG, Karatzis EN, Vavuranakis M, Lekakis JP, Stefanadis C: Assessment of vascular wall shear stress and implications for atherosclerotic disease. *Int J Cardiol* 2006, 113:12-18.
- ²⁰ Gerszten RE, Friedrich EB, Matsui T, Hung RR, Li L, Force T, Rosenzweig A: Role of phosphoinositide 3-kinase in monocyte recruitment under flow conditions. *J Biol Chem* 2001, 276:26846-26851.
- ²¹ Choudhury RP, Lee JM, Greaves DR: Mechanisms of disease: macrophage-derived foam cells emerging as therapeutic targets in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005, 2:309-315.
- ²² Tiwari RL, Singh V, Barthwal Mk: Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target in atherosclerosis. *Med Res Rev* 2008, 28:483-544.
- ²³ Cathcart MK: Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocyte/macrophage: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24:23-28.
- ²⁴ Prakash Saha, Bujan Modarai, Julia Humphries, Katherine Mattock , Mattew Waltham, Kevin G Burnard and Alberto Smith. The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis. *Current Opinion in Pharmacology* 2009, 9:109-118.
- ²⁵ Robertson L, Grip L, Mattsson HL, Hulthe J, Wiklund O: Release of proteina s well as activity of MMP-9 from unstable atherosclerotic plaques during percutaneous coronary intervention. *J Intern Med* 2007, 262:659-667.
- ²⁶ Heilbronn LK, Campbell LV. 2008. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr. Pharm. Des.* 14:1225–30
- ²⁷ Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, et al. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Investig.* 112:1821–30
- ²⁸ Fuentes L, Roszer T, Ricote M. Inflammatory mediators and insulin resistance in obesity: role of nuclear receptor signaling in macrophages. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:219583.
- ²⁹ Ndisang JF. Role of heme oxygenase in inflammation, insulin-signalling, diabetes and obesity. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:359732

-
- ³⁰ Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. 2008. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Investig.* 118:2992–3002
- ³¹ Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Investig.* 116:1793–801
- ³² Peiser, L., Mukhopadhyay, S. & Gordon, S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2002, 14, 123–128.
- ³³ Fadok, V. A. et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2 and PAF. *J. Clin. Invest.* 1998, 101, 890–898.
- ³⁴ Ravetch, J. V. & Bolland, S. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2001, 19, 275–290.
- ³⁵ Barrington, R., Zhang, M., Fischer, M. & Carroll, M. C. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 2001, 180, 5–15.
- ³⁶ Crouch, E. C. & Whitsett, J. A. in *Innate Immunity* (eds Ezekowitz, R. A. B. & Hoffman, J. A.) 205–229 (Humana, Totowa, New Jersey, 2002).
- ³⁷ Kaisho, T. & Akira, S. in *Innate Immunity* (eds Ezekowitz, R. A. B. & Hoffman, J. A.) 177–189 (Humana, Totowa, New Jersey, 2002).
- ³⁸ Linehan, S. A., Martinez-Pomares, L. & Gordon, S. Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect.* 2000, 2, 279–288.
- ³⁹ Takeshige K, Yamazaki S, Eto A, Kataoka K, Muta T, Masui. Mechanism of macrophage activation by LPS. 2002 Dec;51 Suppl:S50-62
- ⁴⁰ Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2003 Feb;73(2):209-12.
- ⁴¹ The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. *Trends Immunol.* 2004 Dec;25(12):677-86
- ⁴² Michael Stein, Satish Keshav, Neil Harris, and Siamon Gordon. Interleukin 4 Potently Enhances Murine Macrophage Mannose Receptor Activity: A Marker of Alternative Immunologic Macrophage Activation; July 1992, *J. Exp. Med.* 176: 287-292.
- ⁴³ Bonder CS, Dickensheets HL, Finlay-Jones JJ, Donnelly RP, Hart PH. Involvement of the IL-2 receptor gamma-chain (gammac) in the control by IL-4 of human monocyte and macrophage proinflammatory mediator production. *J Immunol.* 1998 Apr 15;160(8):4048-56.
- ⁴⁴ Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Politz O., Orfanos, C. E., Schledzewski, K., Goerdts, S. 2001 Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and splice variants and extracellular matrix protein beta IG-H3. *Scand J. Immunolog.* 53: 386-392.

-
- ⁴⁵ David M. Mosser. The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*, Feb 2003; 73:209-212.
- ⁴⁶ Nathalie Koning, Marco van Eijk, Walter Pouwels, Michael S. M. Brouwer, David Voehringer, Inge Huitinga, Robert M. Hoek, Geert Raes, Jörg Hamann. Expression of the Inhibitory CD200 Receptor Is Associated with Alternative Macrophage Activation. *J. of Innate Immunity*, March 2009.
- ⁴⁷ Alberto Mantovani, Antonio Sica, Silvano Sozzani, Paola Allavena, Annunziata Vecchi e Massimo Locati. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 2004 Dec; (25):677-86.
- ⁴⁸ Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, Ma GF, Konttinen YT. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Nov;60(11):2334-46
- ⁴⁹ Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu Rev Biochem* 2001;70:341-67.
- ⁵⁰ Dubois M, Pattou F, Kerr-Conte J, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells. *Diabetologia* 2000;43:1165-9.
- ⁵¹ http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2010/09/news_detail_001119.jsp&murl=menus/news_and_events/news_and_events.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1&jsenabled=false.
- ⁵² Bohuel, M. (2007). PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory properties; *Cell Metabolism* 6, 137-143.
- ⁵³ Sasaki M, Jordan P, Welbourne T, et al. Troglitazone, a PPAR-gamma activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF-alpha. *BMC Physiol* 2005; 5:3.
- ⁵⁴ www.appliedbiosystem.com
- ⁵⁵ Winer J, Jung C.K, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem*. 1999; 15;270(1):41-49.
- ⁵⁶ Schmittgen T.D., Zakrajsek B.A et al. Quantitative reverse transcriptionpolymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and Real-Time methods. *Anal Biochem*. 2000;15:285(2):194-204.
- ⁵⁷ Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*. 2009 Feb 3;10:48.
- ⁵⁸ Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biology* 2003;4(5):3.
- ⁵⁹ <http://www.genome.jp/kegg/>, <http://www.biocarta.com/>.

- ⁶⁰ Oh DY, Olefsky JM. Medicine. Wnt fans the flames in obesity. *Science*. 2010 Jul 23;329(5990):397-8.
- ⁶¹ Hultén LM, Olson FJ, Aberg H, Carlsson J, Karlström L, Borén J, Fagerberg B, Wiklund O. 15-Lipoxygenase-2 is expressed in macrophages in human carotid plaques and regulated by hypoxia-inducible factor-1alpha. *Eur J Clin Invest*. 2010 Jan;40(1):11-7. Epub 2009 Nov 12.
- ⁶² Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, Richter S, Passauer J, Fischer S, Gross P. PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*. 2005 Nov;183(1):163-7.
- ⁶³ Pleiotropic effects of thiazolidinediones. Rizos CV, Liberopoulos EN, Mikhailidis DP, Elisaf MS. *Expert Opin Pharmacother*. 2008 May;9(7):1087-108.
- ⁶⁴ Wada K, Kamisaki Y. Anti-inflammatory effect of PPARgamma agonists: basics and clinical applications. *Nippon Rinsho*. 2010 Feb;68(2):278-83.