

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.
LAUREA DI PRIMO LIVELLO IN BIOTECNOLOGIE

**APPLICAZIONE DEL DNA MICROARRAY PER L'ANALISI
DELL' ESPRESSIONE GENICA IN CELLULE RBL-2H3
TRATTATE
CON PALMITOIL-ETANOLAMIDE**

**RELATORE: PROF. GEROLAMO LANFRANCHI
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**CORRELATORI : DOTT. ANTONELLO D'ARRIGO
DOTT.SSA ELDA DEL GIUDICE
RESEARCH & INNOVATION**

LAUREANDA : SARA ZAINA

ANNO ACCADEMICO 2005-2006

ABSTRACT	1
INTRODUZIONE	2
MATERIALI E METODI	5
<i>Materiali</i>	5
<i>Colture cellulari</i>	5
<i>Supporti utilizzati per colture cellulari</i>	5
<i>Linea cellulare</i>	5
<i>Splitting cellulare</i>	6
<i>Conta e valutazione della vitalità cellulare</i>	6
<i>Trattamenti delle cellule</i>	6
<i>DNA microarray</i>	7
<i>Preparazione degli arrays</i>	7
<i>Estrazione dell'RNA, eliminazione del DNA genomico e quantificazione</i>	7
<i>Marcatura e ibridizzazione dei campioni</i>	9
<i>Scansione laser</i>	10
<i>Analisi dati</i>	11
<i>Quantificazione del segnale</i>	11
<i>Filtraggio ed analisi dei dati</i>	11
RISULTATI	13
<i>Disegno sperimentale</i>	13
<i>Analisi dell'espressione genica</i>	14
DISCUSSIONE	17
BIBLIOGRAFIA	20

ABSTRACT

I mastociti sono cellule immunocompetenti che giocano un ruolo importante nelle infiammazioni tissutale mediante il rilascio di mediatori chimici. La degranulazione dei mastociti provoca fenomeni di ipersensibilità immediata che se diffusa mostra effetti tanto imponenti che possono portare al collasso circolatorio e allo shock anafilattico. Pertanto individuare molecole in grado di controllare la degranulazione mastocitaria risulta di estrema utilità per la risoluzione della reazione infiammatorie di tipo allergica.

Poichè la letteratura scientifica suggerisce come potenziali candidati i cannabinoidi, in quanto mostrano proprietà immunomodulatorie, in questo studio l'attenzione è stata rivolta alla palmitoil-etanolammide (PEA) un endocannabinoide, descritto come una molecola in grado di modulare l'attivazione mastocitaria. Lo studio è stato condotto su un modello cellulare di tipo mastocitario, le cellule RBL-2H3, avvalendosi della tecnologia del DNA microarray. I risultati ottenuti hanno permesso di identificare una serie di variazioni di espressione genica in associazione al trattamento di colture mastocitarie con la PEA, fornendo dei potenziali bersagli farmacologici per patologie di tipo infiammatorio.

INTRODUZIONE

I mastociti sono cellule immunocompetenti di derivazione connettivale presenti in tutto l'organismo, ma soprattutto nelle mucose epiteliali, nei tessuti connettivali e in prossimità dei vasi e dei nervi. I mastociti giocano un ruolo nelle infiammazioni tissutale e nelle interazioni neuroimmuni mediante il rilascio, dai granuli citoplasmatici, di mediatori chimici e sostanze neuroattive come istamina, serotonina, chemiochine, citochine, enzimi proteolitici, derivati dell'acido arachidonico. La degranolazione dei mastociti provoca fenomeni di ipersensibilità immediata che se diffusa mostra effetti tanto imponenti che possono portare al collasso circolatorio e allo shock anafilattico. Pertanto individuare molecole in grado di controllare la degranolazione mastocitaria risulta di estrema utilità per la risoluzione della reazione infiammatoria di tipo allergico.

Dati in letteratura suggeriscono come potenziali candidati i cannabinoidi, sostanze estratte dalla cannabis sativa che mostrano proprietà terapeutiche di tipo antinfiammatorio. Fondamentalmente 3 tappe segnano la storia moderna dell'uso terapeutico della cannabis:

1) Nel 1964, un gruppo di ricercatori israeliani è riuscito ad isolare e sintetizzare il delta-9-tetraidrocannabinolo (delta-9-THC), il più potente tra gli oltre 60 principi attivi presenti nella cannabis.

2) Successivamente, 1990, alcuni ricercatori del National Institute of Health di Bethesda, USA, scoprirono la presenza nel corpo umano di un recettore capace di legarsi con il THC.

3) Nel 1992 infine la scoperta che le nostre cellule cerebrali sono in grado di produrre una sostanza, chimicamente diversa dal THC, ma dagli effetti sorprendentemente simili, l'arachidonil-etanolamide, che venne battezzata anandamide (dal sanscrito "ananda", estasi).

Tali scoperte hanno fatto intuire l'esistenza di un vero e proprio "sistema cannabinoide endogeno", il cui ruolo all'interno dell'organismo non è ancora del tutto chiaro, ma il cui studio consentirà di capire sempre meglio i meccanismi che sono alla base delle proprietà curative dei cannabinoidi. In particolare i cannabinoidi sembrano perturbare il sistema immunitario, infatti studi su animali hanno mostrato una riduzione della resistenza alle infezioni microbiche e virali dopo trattamento con il THC, che si comporta probabilmente come un immunomodulatori interagendo con i recettori dei cannabinoidi il CB1, prevalentemente espresso nel sistema nervoso, identificato e clonato nel 1990 e il

CB2, prevalentemente espresso sulle cellule del sistema immunitario, individuato e clonato nel 1993.

Queste premesse hanno portato a pensare a un possibile studio dell'applicazione dei cannabinoidi per quelle patologie che interessano il sistema immunitario e che restano tutt'ora poco sensibili ai normali trattamenti farmacologici. In particolare in questo studio l'attenzione è stata rivolta alla, palmitoil-etanolammide (PEA) un endocannabinoide, descritto in letteratura come una molecola in grado di modulare l'attivazione mastocitaria.

La PEA, fu trovata nei tessuti dei mammiferi nel 1964, inizialmente questa molecola riscosse un certo interesse, ma poi, per motivi sconosciuti, la ricerca rimase ferma per oltre 20 anni. In seguito alla scoperta dell'anandamide, nei primi anni '90 ritornò l'interesse anche per la PEA, che ha così portato alla caratterizzazione ed identificazioni delle vie metaboliche di questo endocannabinoide.

Dati sperimentali sulla PEA documentano i suoi effetti immunomodulatori sia in vivo e anche se contrastanti anche in vitro, ma tutt'ora non ci sono informazioni chiare sul meccanismo d'azione innescato da questo endocannabinoide e degli eventuali recettori coinvolti. Al fine di comprendere e di identificare dei meccanismi d'azione, in questo studio, è stato valutato l'effetto della PEA su una linea cellulare di tipo mastocitario originata dal ratto, le RBL-2H3. La caratteristica di queste cellule è che esprimono sia il recettore CB1 che il recettore CB2 per tanto sono un buon modello per valutare gli effetti dei cannabinoidi oltre ad essere un ottimo modello per studiare la modulazione della degranulazione mastocitaria che come già detto risulta essere un fenomeno alla base della risposta infiammatoria di tipo allergico.

Lo studio è stato condotto impiegando la tecnologia del DNA microarray. Il DNAmicroarray è una tecnologia ad alta capacità di analisi sviluppata per consentire la valutazione dell'espressione di migliaia di geni in un singolo esperimento. Questo approccio può fornire moltissime informazioni sullo stato pato-fisiologico di una determinata coltura cellulare o tessuto. Una delle sue molteplici applicazioni si basa sulla sua capacità di evidenziare gli effetti che ha un determinato trattamento sul profilo trascrizionale di popolazioni di cellule in coltura. Tale proprietà è cruciale per chiarire il meccanismo di azione, a livello molecolare, di una particolare condizione sperimentale. Nel caso del presente studio, il DNA microarray, ha permesso di identificare una serie di variazioni di

espressione genica in associazione al trattamento di colture mastocitarie con la PEA .

MATERIALI E METODI.

Materiali

Terreno Dulbecco modificato (DMEM), Fetal Calf Serum (FCS), tampone fosfato (PBS), penicillina, streptomina, tripsina, palmitoiletanolamide (PEA), dimetilsofossido (DMSO), Fiasche da 75cm² e piastre Petri.

Colture cellulari

Le colture cellulari attualmente trovano largo impiego nel campo della ricerca poiché rendono possibile l'osservazione di molti fenomeni biologici che avvengono normalmente in vivo.

Supporti utilizzati per colture cellulari

Le cellule che in vivo fanno parte di tessuti solidi devono necessariamente aderire ad un supporto per poter crescere in vitro. L'adesione è un fenomeno attivo che richiede l'interazione di una classe di recettori di membrana delle cellule, le integrine, con la superficie delle piastre in polistirene trattata chimicamente in modo da renderla idrofila e carica negativamente.

Il polistirene è un materiale rigido, con superficie lucida, che presenta una buona resistenza chimica a soluzioni acquose ma limitata resistenza ai solventi; la caratteristica che lo ha reso ideale per l'allestimento di colture cellulari è la totale mancanza di tossicità e la sua notevole trasparenza che permette un'ottima osservazione delle cellule con il microscopio. I supporti utilizzati sono:

- le fiasche da 75cm²
- le piastre petri 10cm²

Linea cellulare

Le cellule RBL-2H3 (rat basofilic leukemia) sono una linea mastocitaria ottenuta dal ratto, hanno una morfologia fibroblastica e vengono tenute in coltura con il terreno DMEM addizionato con FBS al 10%, glutammina 200mM, penicillina 100U/ml e streptomina 100µg/ml e mantenute in incubatore a 37°C e con il 5% di CO₂.

Splitting cellulare

Dopo tre giorni di coltura le cellule RBL-2H3 occupano quasi completamente la superficie della fiasca, raggiungendo una confluenza del 1'80-100%, per permettere alle cellule di continuare a crescere è necessario dividerle e trasferirle in altre fiasche o piastre petri.

Lo "splitting" viene eseguito nel seguente modo: si allontana il terreno e si esegue un lavaggio con 10ml di PBS; per staccare le cellule dalla superficie della piastra si aggiungono 3ml di tripsina/EDTA, dopo 5 min a 37°C, viene neutralizzato l'effetto della tripsina mediante aggiunta di 10 ml di terreno e la sospensione cellulare viene raccolta e trasferita in tubi Falcon e centrifugata a 1100rpm per 5 min. Alla fine della centrifugazione viene rimosso il supernatante, le cellule precipitate sotto forma di pellet vengono risospese con un volume noto di terreno, si preleva un'aliquota e si procede con la conta cellulare.

Conta e valutazione della vitalità cellulare

Per valutare la vitalità cellulare, le cellule vengono colorate con il Tripan blu, un colorante che penetra solo nelle cellule morte che così assumono un colore blu e si distinguono da quelle vive che rimangono trasparenti e traslucide all'osservazione al microscopio. La conta cellulare viene eseguita usando la camera di Burker, o camera contaglobuli, utilizzando la seguente formula:

n.cellule contate x diluizione x volume tot. x 10000 (fattore della camera di Burker)=n° di cellule/ml di sospensione.

Una volta determinato il numero di cellule contenuto nella sospensione si utilizzeranno 2×10^6 cellule per allestire una nuova coltura in una fiasca T75 che verrà incubata a 37°C e CO₂ al 5%.

Trattamenti delle cellule

Le cellule RBL-2H3, vengono distribuite in piastre petri, alla concentrazione di 5×10^6 in 10ml di terreno completo, ed incubate per almeno 2 ore a 37°C e al 5% di CO₂. Le cellule non adese vengono rimosse mediante un lavaggio con PBS, e poi viene aggiunto terreno fresco in presenza della PEA alla concentrazione 10µM o del veicolo DMSO 0.1%. Dopo due ore di trattamento a 37°C e al 5% CO₂ e cellule vengono distaccate dalla superficie della piastra e da esse viene estratto l'RNA totale.

DNA microarray

Il sistema utilizzato in questo lavoro si basa sulle seguenti fasi, descritte più avanti con maggiore dettaglio:

- a) preparazione di arrays di DNA murini su vetrino;
- b) estrazione dell' RNA totale dalle cellule trattate e dai controlli;
- c) utilizzo dell' RNA messaggero come stampo per la preparazione di *sonde* a cDNA fluorescente;
- d) ibridizzazione delle sonde agli arrays;
- e) scansione laser dei vetrini;
- f) visualizzazione delle immagini ed analisi dei dati.

Preparazione degli arrays

Arrays di 4000 DNA murini sono stati preparati utilizzando uno spotter Lucidea (Amersham). Il repertorio genico selezionato, comprende geni coinvolti nella regolazione dei processi infiammatori, del ciclo cellulare, dell'apoptosi, del trasporto intracellulare e della trasduzione del segnale. I geni sono stati acquisiti dalla RZPD (Berlin) in forma di prodotti di PCR. Dopo deposizione di circa 1 nanolitro di ciascun prodotto su vetrino, l'interazione tra DNA e superficie del vetrino, che avviene mediante legami ionici tra lo scheletro fosfato del DNA (carico negativamente) e i gruppi amminici di cui è rivestito il vetrino stesso (cariche positive), viene stabilizzato da una breve esposizione agli UVC. Ciascun DNA è disciolto in 50% DMSO, un composto che favorisce la separazione dei due filamenti della molecola (*denaturazione*) e, allo stesso tempo, rende rapida l'evaporazione, consentendo una diffusione regolare del materiale ed impedendo la sovrapposizione tra *spots* diversi. Il prelievo dei DNA da parte dello spotter avviene da piastre multi-pozzetto in cui essi si trovano secondo una disposizione prestabilita, per cui sarà nota anche la posizione di ciascun DNA sul vetrino.

Estrazione dell'RNA, eliminazione del DNA genomico e quantificazione

L'estrazione dell'RNA viene eseguita utilizzando il metodo Trizol :

- le cellule vengono staccate dalla superficie della piastra con uno scraper, vengono raccolte in un tubo da 15 ml e centrifugate a 1100rpm per 5 min;
- al pellet viene aggiunto 1 ml di Trizol Reagent, e poi trasferito in Eppendorf da 1,5ml;

- dopo 5 min d'incubazione a T.A. si aggiungono 200µl di cloroformio, si agita vorticosamente per 15sec e si incuba 2-3 min a T.A.;
- si esegue una centrifugata a 12000 rpm per 15 min a 4°C, e si trasferisce la fase acquosa in una nuova provetta;
- si aggiungono 500µl di isopropil alcool e si incuba per 10 min a T.A. si esegue una centrifugata a 12000 rpm per 10min a 4°C.

A questo punto l'RNA precipita formando un pellet gelatinoso.

- si rimuove il sovrnatante e il pellet viene lavato con etanolo al 75%;
- si centrifuga a 7500 rpm a 4°C per 5 min; una volta eliminato il sovrnatante, il pellet di RNA viene lasciato ad asciugare;
- l'RNA viene dopo risospeso in 50µl di H₂O RNasi-free ed incubato a 55°-60°C per 10 min.

Prima di eseguire la quantificazione dell'RNA è necessario allontanare il DNA contaminante utilizzando il kit DNA-free della AMBION.

- All'RNA estratto viene aggiunto il Buffer 10x (5µl in 45µl di RNA) e 1µl di DNasi e si lascia incubare a 37°C per 30 min;
- successivamente vengono aggiunti 5µl/campione del reagente per l'inattivazione della DNasi e si lascia agire per 2 min a T.A.;
- trascorsi i 2 min si centrifugano le provette e il sovrnatante viene recuperato e conservato in provette RNasi free.

L'RNA estratto e purificato può essere quantificato mediante lettura spettrofotometrica. La lettura spettrofotometrica viene eseguita su un aliquota dell'RNA estratto, cioè 1µl di RNA+19µl di H₂O (diluizione 1:20) e caricato in microcuvette di 0.5mm.

I valori che si ottengono dallo strumento sono:

$$\begin{array}{l} \text{abs 260nm} \\ \text{abs 280nm} \\ \text{abs 320nm} \end{array} \quad \text{Ratio } \frac{\text{abs 260- abs 320}}{\text{abs 280- abs 320}}$$

il rapporto tra le assorbanze è necessario per conoscere il grado di purezza dell'RNA (un rapporto compreso tra 1,9 e 2 è indice di buona purificazione) e la concentrazione dell'RNA. La quantità dell'RNA ottenuta direttamente dallo spettrofotometro va poi moltiplicata per la diluizione effettuata e per il cammino ottico (che dipende dalla cuvetta usata), quindi:

$$[\text{RNA}] \times 20 \text{ (diluizione)} \times 2 \text{ (cammino ottico)} = \text{conc. dell'RNA espresso in } \mu\text{g/ml}$$

Marcatura e ibridizzazione dei campioni

La marcatura dei campioni è stata effettuata utilizzando il sistema Genisphere Array kit (Genisphere Inc. Canada), basato su dendrimeri.

Il principio si può così riassumere:

- a) trascrizione inversa di cDNA a partire da RNA utilizzando un primer poli (dT) recante anche una sequenza-etichetta (*capture sequence*) al 5';
- b) 1° step di ibridizzazione del cDNA all' array su vetrino;
- c) 2° step di ibridizzazione di dendrimeri contenenti sia i traccianti fluorescenti che una sequenza nucleotidica complementare alla *capture sequence* detta *capture reagent*.

Il procedimento completo è il seguente:

- 15 µg di RNA totale sono utilizzati per la preparazione di ciascuna sonda
- vengono aggiunti 1 µl di RT-primers poli-dT con capture sequence specifica per Cy3 (per il campione) e per Cy5 (per il *reference*) a 5 µg di RNA disciolti in 25 µl di acqua RNase free e 0.5 µl di Score RNA;
- dopo un'incubazione di 10 min a 80°C e un'incubazione di 1 min a 4°C, si aggiunge 1 µl di inibitore per l'RNase;
- per ogni campione e reference viene preparata una soluzione composta da: 8 µl 5X MLV RT Buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3 at 25°C, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, 50mM DTT fornito da Promega), 3 µl H₂O, 2 µl 10mM dNTPs e 1 µl MLV-RT 200U/µl (Promega) ed aggiunta a tutti i campioni e reference;
- dopo un'incubazione di 2 ore a 42°C, la reazione di retrotrascrizione viene bloccata mediante aggiunta di 7 µl 0.5 mM NaOH/50mM EDTA e incubazione di 10 min a 65°C;
- dopo aver neutralizzato il pH con 10 µl Tris/HCl 1 M pH 7.5, i campioni e reference vengono riuniti in una unica eppendorf e concentrati in speed vacuum (40 min a 45°C) fino ad ottenere un volume totale di circa 13 µl;
- ai 13 µl di cDNA sia del campione che del reference vengono aggiunti 15 µl di buffer di formamide e 2 µl di dT blocker e vengono incubati per 10 min a 80°C e, successivamente, 15 min a 55°C;
- 30 µl della mix precedentemente preparata vengono caricati sui vetrini preriscaldati ed incubati 14 ore a 50°C in camera umida per evitare l'evaporazione della soluzione di cDNA;

- terminata l'incubazione si eseguono una serie di lavaggi di 15 min, con una soluzione di Sodio citrato a concentrazioni decrescenti (0.03M-0.003M);
- dopo un rapido lavaggio finale in etanolo al 96%, i vetrini vengono fatti asciugare mediante centrifugazione di 3 min a 1100 rpm a 4°C.
- viene preparata la mix di marcatura contenente per ogni campione 14µl di buffer di formamide, 1µl di anti-fade, 10µl di acqua, 5µl di sonde marcate con Cy3 e con Cy5 (1:1) e incubata per 10 min a 80°C e successivamente a 50°C fino all'ibridazione;
- la soluzione viene poi distribuita sui vetrini e lasciata ad incubare 4 ore a 50°C in camera umida;
- dopo una serie di lavaggi con Sodio citrato a concentrazioni decrescenti (0.03M-0.003M), gli arrays sono pronti per la scansione.

Scansione laser

La rilevazione tramite scansione è possibile grazie alla presenza delle cianine che sono molecole fluorescenti coniugate all' N-idrossi succinimide che gli permette di legarsi covalentemente al DNA. Le cianine usate in questo studio sono Cy3 e Cy5:

- Cy3 ha il picco di emissione massima a 570nm ed il picco di assorbimento massimo è a 550nm
- Cy5 ha il picco di emissione massima a 670nm ed il picco di assorbimento massimo è a 649nm

L'array scanner (Amersham Biosciences) è uno strumento che effettua una scansione della superficie del vetrino irradiandolo con una luce laser specifica per il fluoroforo Cy5 ed una specifica per l'eccitazione del fluoroforo Cy3.

Grazie ad appositi filtri viene registrata l'emissione di fluorescenza specifica per i due fluorofori ed un computer collegato allo scanner acquisisce le immagini risultanti dalla scansione dei due fluorofori.

Analisi dati

Effettuata la scansione di fluorescenza degli arrays è necessario effettuare principalmente due operazioni:

- quantificare il segnale di fluorescenza per i due fluorofori per ogni singolo spot e per il rumore di fondo;
- effettuare un'analisi statistica dei dati ottenuti dalla quantificazione.

Per eseguire la quantificazione è stato utilizzato il software Arrayvision (distribuito dalla Imaging research inc.), mentre per effettuare l'analisi statistica dei dati ottenuti dall'arrayvision è stato utilizzato il software Genespring (distribuito da Agilent Technologies).

Quantificazione del segnale

Arrayvision è un programma che permette di valutare l'intensità della fluorescenza di ogni singolo spot e fornisce una serie di informazioni sulla qualità e l'omogeneità del segnale, tra cui:

- numero identificativo dello spot che permette l'associazione del valore dell'intensità di fluorescenza all'ordine di spottaggio dei geni;
- il valore medio dell'intensità di fluorescenza di ogni spot per i due fluorocromi;
- il valore del rumore di fondo calcolato per ogni spot.

Filtraggio ed analisi dei dati

Ottenuti i valori dell'intensità del segnale di ogni spot e del relativo background si deve eseguire un'adeguata analisi statistica. Per fare ciò, in questo lavoro, è stato usato il software Genespring. Questo programma permette di normalizzare i dati e poi di filtrarli secondo una serie di criteri, tra cui il livello di espressione, l'ampiezza delle variazioni (*fold-change*) e la deviazione standard. Sui dati che superano i vari filtri si eseguono poi i test statistici. Vista l'omogeneità nella distribuzione dei dati, si è deciso di applicare un test t di Student.

RISULTATI

La tecnologia del microarray consente di analizzare il profilo di espressione di numerosi geni in modo simultaneo. Questa proprietà permette di ottenere una visione globale sullo stato patofisiologico delle cellule che vengono analizzate, fornendo quantità di informazioni difficilmente ricavabili con altri sistemi.

Esistono diverse piattaforme tecnologiche per DNA microarray, tutte basate sulla possibilità di disporre in modo ordinato (*arrays*) molecole di DNA ad altissima densità ed in grande numero su supporti solidi. Le differenze riguardano prevalentemente i metodi impiegati per la creazione degli arrays e i sistemi di preparazione delle sonde dai campioni da analizzare.

Lo studio condotto sulle cellule RBL-2H3 si è articolato fondamentalmente in tre fasi:

- stimolazione delle cellule con la PEA
- estrazione del RNA dopo stimolazione
- analisi dell'espressione genica con il microarray

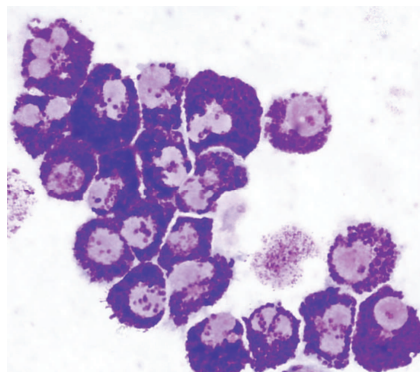
Disegno sperimentale

Tre colture indipendenti, allestite in piastre Petri da 10 cm², sono state stimulate con la PEA, mentre altrettante sono state incubate con il veicolo, DMSO 0.1%, secondo lo schema: 1-2-3 CTR

4-5-6 PEA 10μM.

Dopo 2 ore di trattamento si è proceduto all'estrazione dell'RNA e alla lettura allo spettrofotometro

Coltura di cellule RBL-2H3 osservate al microscopio dopo colorazione May-Grunwald-Giemsa



Lettura allo spettrofotometro e quantificazione dell'RNA estratto (1μl RNA+19μl di acqua in microcuvette):

	<i>Letture spettrofotometro</i>	<i>RNA totale</i>
CTR	Abs 260= 1.253 Ratio=2.07 Abs 280= 0.609 C= 49.70 Abs 320= 0.010	1988µg/ml
CTR	Abs 260= 0.604 Ratio=2.07 Abs 280= 0.292 C= 24.10 Abs 320= 0.001	964µg/ml
CTR	Abs 260= 1.184 Ratio=2.06 Abs 280= 0.575 C= 47.20 Abs 320= 0.005	1888µg/ml
PEA 10µM	Abs 260= 1.151 Ratio=2.04 Abs 280= 0.565 C= 45.90 Abs 320= 0.003	1836µg/ml
PEA 10µM	Abs 260= 1.364 Ratio=2.07 Abs 280= 0.664 C= 54.20 Abs 320= 0.009	2168µg/ml
PEA 10µM	Abs 260= 1.025 Ratio=2.07 Abs 280= 0.497 C= 40.80 Abs 320= 0.005	1632µg/ml

Dopo aver quantificato l'RNA, sono stati calcolati i volumi (x) richiesti per ottenere la quantità di 15 µg di RNA totale:

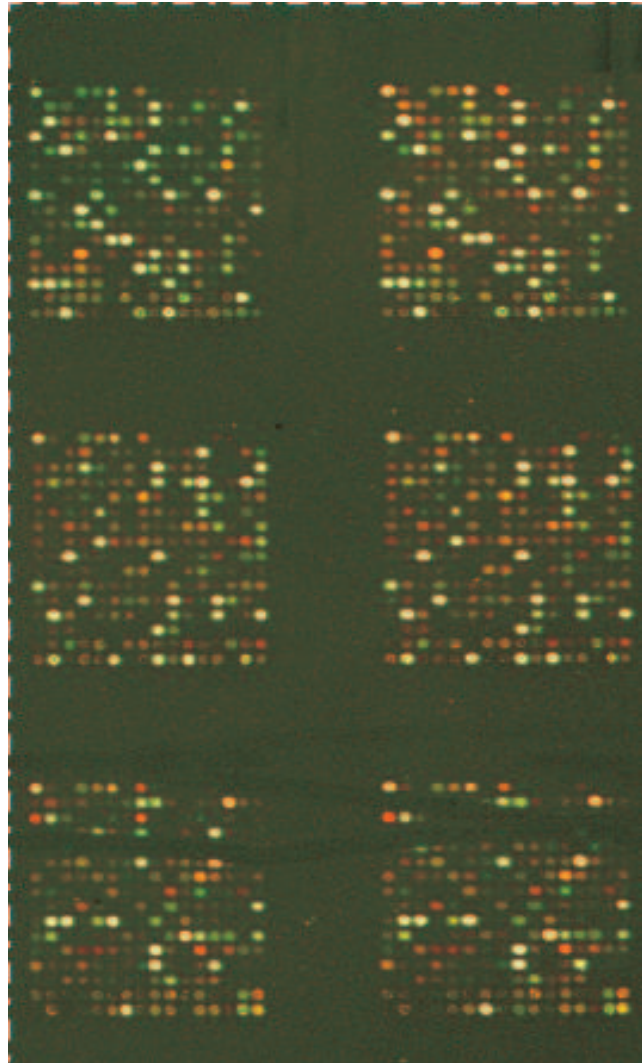
CTR. 1988:1000 = 15:x	$x = (1000 \times 15) / 1988 = 7,55 \mu\text{l}$
CTR. 964:1000 = 15:x	$x = (1000 \times 15) / 964 = 15,56 \mu\text{l}$
CTR. 1888:1000 = 15:x	$x = (1000 \times 15) / 1888 = 7,94 \mu\text{l}$
PEA. 1836:1000 = 15:x	$x = (1000 \times 15) / 1836 = 8,17 \mu\text{l}$
PEA. 2168:1000 = 15:x	$x = (1000 \times 15) / 2168 = 6,92 \mu\text{l}$
PEA. 1632:1000 = 15:x	$x = (1000 \times 15) / 1632 = 9,20 \mu\text{l}$

Analisi dell' espressione genica

Ciascuno degli RNA delle cellule trattate è stato convertito in sonda di cDNA marcata con cianina Cy3, mentre da ciascun RNA di controllo è stata preparata una sonda marcata con Cy5. Dei 4608 spot presenti su ciascun vetrino, il 50% dava un segnale misurabile (superiore al background) in tutti e sei i campioni analizzati. Solo questa frazione è stata considerata per l'analisi e quindi sottoposta a filtraggio in base alla deviazione standard. L' analisi statistica è stata effettuata

tramite test T di Student. Delle 169 variazioni osservate, sono state considerate come *informative* soltanto quelle con valore p inferiore a 0,005 e con un *fold change* di almeno 1,5. Le variazioni con questi requisiti sono rappresentate da un pannello di 42 geni (vedere Tabella più avanti). Di questi geni, 11 sono sovra-espresi e 31 sotto-espresi rispetto alle cellule di controllo.

Dettaglio di un vetrino dopo ibridizzazione e scansione laser



Variazioni riscontrate in seguito al trattamento delle cellule RBL-2H3 con PEA
10 μ M.

#	GENE	p	PEA/Contr.
1	transcription factor 3*	0.003	2.5
2	CACCC Box	0.000	2.2
3	Survivor of motor	0.001	2.0
4	Grik4	0.001	1.9
5	zeta-chain (TCR) associated protein kinase (ZAP-70-Syk)*	0.005	1.7
6	carnitine palmitoyltransferase 1*	0.002	1.6
7	ngfi-A	0.003	1.6
8	Small conductance calcium-activated potassium channel (SK1)	0.000	1.5
9	Neuronatin.	0.005	1.5
10	Spastin	0.003	1.5
11	synaptotagmin 3*	0.000	1.5
12	chemokine-like factor 4 (Cklf)	0.002	0.6
13	Tropomodulin.	0.002	0.6
14	Ras-related protein Rab-3C.	0.001	0.6
15	SAM-domain protein SAMSN-1	0.003	0.6
16	PI3-kinase p85-beta subunit*	0.002	0.6
17	muscarinic reeceptor 1	0.000	0.6
18	inositol polyphosphate multikinase	0.005	0.6
19	adenylate kinasebiological_unit: monomer	0.004	0.5
20	Protein kinase CLK4	0.002	0.5
21	CAMP metalloproteinase	0.003	0.5
22	Galactosyltransferase associated protein kinase p58/GTA	0.001	0.5
23	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 5	0.000	0.5
24	SAM-domain protein SAMSN-1	0.001	0.5
25	Similar to downregulated in ovarian cancer 1	0.003	0.5
26	NAD(P)-dependent steroid dehydrogenase	0.002	0.5
27	Extracellular matrix protein 1 precursor (Secretory component p	0.002	0.5
28	Transforming growth factor beta 4 precursor	0.005	0.5
29	Glutathione S- transferase zeta 1	0.005	0.5
30	GC-rich sequence DNA-binding factor	0.001	0.5
31	CBF1 interacting corepressor CIR	0.002	0.4
32	ATP-binding cassette, sub-family B, member 11	0.001	0.4
33	Fractalkine precursor (CX3CL1)	0.003	0.4
34	HSPC233	0.005	0.4
35	"Slack" potassium channel subunit	0.004	0.4
36	Histone H4.	0.004	0.4
37	Epidermal growth factor receptor GRB-7	0.002	0.3
38	Group XII secretory phospholipase A2 precursor	0.002	0.3
39	Adenylate kinase isoenzyme 4	0.000	0.3
40	Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1	0.001	0.3
41	Glutathione synthetase	0.001	0.2
42	Zinc transporter 1 (ZnT-1)*	0.002	0.2

DISCUSSIONE

Lo scopo principale di questa analisi è stato quello di valutare se il trattamento con la PEA sulle cellule RBL-2H3 fosse in grado di modificare l'espressione genica in questo modello cellulare.

Il DNA array ha consentito di monitorare simultaneamente i livelli di espressione di circa 4000 geni e di identificare un pannello di variazioni, confrontando il profilo trascrizionale di RBL-2H3 di controllo e RBL-2H3 trattate con PEA 10 μ M.

I risultati ottenuti in questo studio hanno evidenziato una serie di geni modificati dal trattamento con la PEA alcuni risultano up-regolati ed altri down-regolati rispetto al controllo.

Si è osservata una maggior espressione del gene del **fattore di trascrizione 3**, che è un elemento direttamente coinvolto nella sintesi delle citochine da parte delle cellule RBL-2H3; le citochine sono dei messaggeri, che in vivo consentono ai mastociti di comunicare tra loro nonché di richiamare l'intervento di altre cellule immunocompetenti nei siti infiammatori.

Tra i geni up-regolati interessante è anche quello **zeta-chain associated protein kinase** codificante per la proteina, nominata a seconda dell'organismo in cui si trova Sik (ratto) o ZAP70 (uomo). L'attivazione mastocitaria come descritto in letteratura, richiede l'intervento di questa proteina che è responsabile di tutti i processi che portano alla produzione di composti necessari per la risposta immunitaria o allergica del mastocita, nonché al loro rilascio tramite esocitosi.

Un altro gene sovra-espresso è quello per la **sinaptotagmina 3** (Syt III), che è il prodotto di una famiglia di geni implicati nel controllo dell'esocitosi Ca²⁺-dipendente. I mastociti che sono cellule secretorie specializzate che rilasciano mediatori infiammatori mediante un processo esocitotico, esprimono omologhi di Syt e SNAREs (Soluble NSF Attachment proteins Receptors), le quali insieme alla proteina Syt costituiscono il cuore del complesso che regola il traffico e la fusione delle vescicole nel fenomeno dell'esocitosi. Nelle RBL-2H3, cellule tumorali analoghe ai mastociti mucosali, la Syt III regola le dimensioni dei granuli prodotti, tramite eliminazione e riciclaggio di alcuni componenti; cellule infatti senza Syt III presentano granuli di dimensioni notevolmente superiori rispetto a cellule che esprimono la proteina.

Interessante anche l'up-regolazione del gene della **carnitina palmitoil-transferasi** che è un enzima direttamente coinvolto nel meccanismo di trasporto degli acidi

grassi a lunghe catene attraverso la membrana del mitocondrio, e che permette a questi acidi grassi di essere decomposti e metabolizzati. Da dati riportati in letteratura, è noto che l' up-regolazione di questo gene è associato all'attivazione dei recettori PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor). I recettori PPAR sono direttamente coinvolti nella regolazione del metabolismo lipidico e nell'infiammazione, infatti un calo dell'attività della carnitina palmitoil-tranferasi è associato a stati infiammatori e alla presenza di agenti patogeni. Pertanto, l'induzione della sua trascrizione da parte della PEA suggerisce, come già riportato per altri endocannabinoidi strutturalmente simili, un' interazione con i recettori PPAR.

I risultati ottenuti in questo studio hanno evidenziato anche diversi geni la cui espressione in presenza della PEA diminuisce rispetto al controllo. Tra questi, il gene **Zinc transporter1(ZnT-1)**, codificante per un fattore con un possibile ruolo in fenomeni quali l'ipozincemia e l'ipoferrimia presenti nel contesto di infezioni ed infiammazioni.

E' noto che i prodotti dei geni ZnT e Zip risultano over espressi nei topi trattati con LPS. Inoltre, sia studi *in vivo* che *in vitro* dimostrano che l'espressione di Zip è up-regolata da citochine pro-infiammatorie e che questi trasportatori dello zinco giocano un ruolo importante nei meccanismi responsabili dell'ipozincemia che accompagna la risposta nella fase acuta dell'infiammazione ed dell'infezioni

Molti studi genetici ed inibitori hanno mostrato che la proteina **phosphoinositide 3-kinase gamma (PI3Kgamma)** gioca un ruolo essenziale in una serie di risposte fisiologiche quali quelle della chemiotassi dei neutrofilo e quella della degranulazione mastocitaria (Suire S et al 2005). PI3Kgamma, inizialmente descritta come un complesso costituito da una subunità catalitica p110gamma e una subunità regolatoria p101. Recentemente è stata descritta un'altra subunità, la p84, che è espressa nelle cellule del sistema immunitario murino. Il presente studio ha messo in evidenza una *down*-regolazione di p84 nelle cellule RBL-2H3 in seguito al trattamento con la PEA. E' noto che il legame di questa nuova subunità p84 alla subunità p110gamma aumenta la produzione del fosfatidil-inositolo (3,4,5)-trifosfato, che è un noto secondo messaggero coinvolto nel rilascio di Ca²⁺ dagli *store* intracellulari e nel processo di degranulazione delle RBL-2H3.

I risultati di questo studio, sebbene preliminari, hanno evidenziato un pannello di variazioni trascrizionali associate al trattamento di colture di tipo mastocitario con la PEA.

I dati presentati, oltre a rafforzare evidenze riportate in letteratura che suggeriscono i recettori PPAR come siti di *binding* per molecole cannabinomimetiche, forniscono un contributo alla comprensione dei meccanismi attraverso i quali la PEA agisce *in vivo* da immunomodulatore, individuando dei potenziale bersagli farmacologici per patologie di tipo infiammatorio.

BIBLIOGRAFIA

- Baram D. et al., (2004). Synaptotagmin regulates mast cell functions. *Immunol Rev.* **179**: 25-34
- Blohm DH et al., (2001). New developments in microarray technology. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**: 41-7
- Demuth D.G. et al., (2005). Cannabinoid signaling. *Life Sciences*.
- Facci L. et al., (1995). Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3376-3380. *Pharmacology*.
- Grimberg E. et al., (2003). Synaptotagmin III is a critical factor for the formation of the perinuclear endocytic recycling compartment and determination of secretory granules size. *Journal of Cell Sciences* **116**: 145-154.
- Kurian KM et al., (1999). DNA chip technology. *J. pathos.* **187**: 267-71
- Liuzzi JP et al., (2005). Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 6843-8.
- Lo Verme J. et al., (2005). The search of palmitoylethanolamide receptor. *Life Sciences* **77**: 1685-1698.
- Luskova P.& Draber P. (2004). Modulation of the Fcepsilon receptor I signaling by tyrosine kinase inhibitors: search for therapeutic targets of inflammatory and allergy diseases. *Curr Pharm Des.* **10**:1727-37.
- Mazzari S. et al., (1996). N-(2-Hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *European Journal of Pharmacology* **300**: 227-236.
- Schena M, et al., (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* **270**: 467-70.
- Skaper S.D. et al., (1996). The ALIAMide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 3984-3989.
- Zhang J. et al., (2002). Phosphorylation of Tyr342 in the linker region of Syk is critical for FcεRI signaling in mast cells. *Molecular and cellular biology* 8144-8154.

