

Università degli Studi di Bologna

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Dipartimento di Chimica “G. Ciamician”

Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche XIX Ciclo

Coordinatore: Chiar.mo Prof. V. Balzani

Settore Scientifico Disciplinare: CHIM/01

***Sviluppo ed applicazione di
metodologie di spettrometria di massa
nello studio di macromolecole di
interesse biologico.***

Tesi di Dottorato di:

Daniela Parisi

Relatore:

Chiar.mo Prof. P. Reschiglian

Responsabile scientifico:

Chiar.mo Prof. A. Roda

Gennaio 2004 – Dicembre 2006

Indice

Introduzione pag. 6

Capitolo1

Approccio combinato per l'analisi di farmaci proteici ricombinanti mediante tecnica di frazionamento in campo flusso-flusso a fibra tubolare porosa, spettrometria di massa e rivelazione chemiluminescente.

1.1 Introduzionepag. 9

1.2 Materiali e metodipag. 13

1.2.1 Urato ossidasipag. 13

1.2.2 RP HPLC-ESI/Q-TOF MSpag. 14

1.2.3 MALDI/TOF MS.....pag. 14

1.2.4 SDS PAGE..... pag. 15

1.2.5 2D PAGEpag. 16

1.2.6 HF FIFFF.....pag. 16

1.2.7 Determinazione dell'attività enzimatica con un metodo CL ultrasensibilepag. 18

1.3 Risultati e discussione.....pag. 20

1.3.1 Analisi RP HPLC-UV/Vis ed RP HPLC ESI/Q-TOF MSpag. 20

1.3.2 MALDI/TOF MSpag. 22

1.3.3 Peptide mass fingerprintingpag. 24

1.3.4 HF FIFFF MALDI/TOF MSpag. 26

1.3.5 HF FIFFF con rivelazione CL ultrasensibilepag. 29

1.4 Conclusionipag. 30

Capitolo 2

Identificazione di batteri mediante spettrometria di massa MALDI/TOF ed analisi chemiometrica.

2.1 Introduzione	pag. 32
2.2 Materiali e metodi	pag. 36
2.2.1 Preparazione del campione per l'analisi MALDI/TOF MS.....	pag. 36
2.2.2 Immobilizzazione degli anticorpi sulla superficie d'oro	pag. 37
2.2.3 MALDI/TOF MS.....	pag. 38
2.2.4 Analisi chemiometrica degli spettri	pag. 39
2.3 Risultati e discussione	pag. 41
2.3.1 Effetto del tempo di crescita sulle variazioni spettrali	pag. 41
2.3.2 Effetto della composizione del terreno di coltura sulle variazioni spettrali.....	pag. 45
2.3.3 Confronto tra gli spettri ottenuti dall'analisi delle diverse specie batteriche.....	pag. 46
2.3.4 Verifica del processo di immobilizzazione degli anticorpi di cattura sulla superficie d'oro.....	pag. 47
2.3.5 Analisi di batteri in miscela mediante metodo immunometrico con rivelazione MALDI/TOF MS.....	pag. 49
2.4 Conclusioni	pag. 51

Capitolo 3

La tecnica di frazionamento in campo flusso-flusso a fibra tubolare porosa (HF FIFFF) accoppiata alla spettrometria di massa MALDI/TOF per l'analisi del siero intero

3.1 Introduzione	pag. 53
3.2 Materiali e metodi	pag. 56
3.2.1 Campioni	pag. 56
3.2.2 HF FIFFF	pag. 56
3.2.3 MALDI/TOF MS.....	pag. 57
3.2.4 SDS PAGE.....	pag. 58
3.2.5 Estrazione in fase solida (SPE).....	pag. 58
3.2.6 HF FIFFF- MALDI/TOF MS	pag. 58
3.3 Risultati e discussione	pag. 58
3.3.1 HF FIFFF di siero umano intero.....	pag. 58
3.3.2 HF FIFFF e MALDI/TOF MS di siero intero	pag. 60
3.3.3 HF FIFFF/microdialisi di LAP a basso peso molecolare	pag. 65
3.4 Conclusioni	pag. 70

Capitolo 4

Profilo proteico sierico in pazienti affetti da epatopatia cronica mediante spettrometria di massa MALDI/TOF biospecifica ed analisi chemiometrica.

4.1 Introduzione	pag. 71
-------------------------------	---------

4.2 Epatopatia cronica: eziologia, incidenza, e biomarcatori	pag. 74
4.3 Materiali e metodi	pag. 77
4.3.1 Studio di popolazione	pag. 77
4.3.2 Derivatizzazione della cellulosa con IDA-Cu ²⁺	pag. 78
4.3.3 Attivazione della cellulosa-IDA- Cu ²⁺	pag. 79
4.3.4 Preparazione del campione.....	pag. 80
4.3.5 MALDI/TOF MS.....	pag. 81
4.3.6 Analisi dei dati	
4.4. Risultati e discussione	pag 82
4.4.1 Riproducibilità dei profili sierici ottenuti dopo trattamento con la cellulosa derivatizzata.....	pag. 82
4.4.2 Analisi di classificazione dei profili proteici ottenuti da sieri di controllo e patologici	pag. 84
4.4.3 Analisi di classificazione dei profili proteici ottenuti da sieri di pazienti a diversi stadi di epatopatia	pag. 87
4.4.4 Confronto tra i gruppi precedenti e campioni di pazienti trapiantati per epatocarcinoma.....	pag. 88
4.4.5 Valutazione della specificità dei biomarcatori per l'epatopatia cronica.....	pag. 92
4.5 Conclusioni	pag. 96
Conclusioni generali	pag. 97
Bibliografia	pag. 98
Pubblicazioni	pag. 107

Introduzione

La spettrometria di massa (MS) è una tecnica analitica che viene impiegata per l'identificazione di composti incogniti, per determinazioni quantitative di composti noti e per chiarire le proprietà strutturali e chimiche delle molecole. Sebbene essa abbia trovato fin dagli inizi del secolo scorso un vasto impiego in diversi campi, la sua applicazione è stata estesa all'analisi di macromolecole biologiche solo alla fine degli anni ottanta quando vennero introdotti due metodi di ionizzazione soft: electrospray ionization (ESI) e matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) [Karas,1988; Hillenkamp, 1991]. Tali metodi di ionizzazione consentono di analizzare, con elevate sensibilità (dalle pico alle femto moli), analiti polari, poco volatili e termolabili come le macromolecole biologiche ad elevato peso molecolare (oltre 200 KDa), senza provocarne frammentazione in sorgente. Una delle più importanti applicazioni delle tecniche di MS con ionizzazione soft all'analisi di biomolecole riguarda gli studi di proteomica. Con il termine proteomica s'intende lo studio del patrimonio proteico espresso dal genoma di una cellula, organismo o tessuto. Il grande interesse nei confronti delle proteine è dovuto all'importanza che esse rivestono ai fini della comprensione dei processi cellulari. La conoscenza del solo genoma non è infatti sufficiente a comprendere il funzionamento della cellula in quanto esso rimane costante nel corso della vita di un organismo, mentre il proteoma cambia continuamente in risposta a stimoli interni o esterni. La MS consente non solo di determinare la massa accurata delle proteine, ma anche di quantificarle, di effettuarne una caratterizzazione strutturale, di rilevare la presenza di isoforme e di modifiche post traduzionali, oltre che di studiare interazioni proteina-proteina e complessi proteici non covalenti. Inoltre, lo sviluppo e la rapida espansione della bioinformatica e di banche dati genomiche e proteomiche ha notevolmente agevolato il processo di identificazione delle proteine.

Negli ultimi anni l'impiego della ESI MS e MALDI MS è stato esteso all'analisi di campioni biologici costituiti da sistemi complessi di macromolecole, che vanno da strutture sub-cellulari (organelli, compartimenti cellulari) alle cellule intere (cellule di mammifero e cellule batteriche).

L'applicazione della MS all'analisi di macromolecole biologiche trova oggi importanti applicazioni in diversi settori: biotecnologico (in cui è estremamente importante effettuare la caratterizzazione ed il controllo di qualità di proteine ricombinanti ed altre macromolecole), medico-clinico (in cui lo studio delle proteine è essenziale per la diagnosi di patologie e per lo sviluppo di nuovi trattamenti terapeutici mirati), alimentare ed ambientale.

La ESI MS e la MALDI MS per il diverso meccanismo di ionizzazione, consentono di ottenere informazioni complementari riguardo le biomolecole analizzate, pertanto vengono spesso impiegate alternativamente in proteomica a seconda dell'informazione che si vuole ottenere.

La ESI MS accoppiata a rivelatori ibridi Q-TOF è largamente utilizzata per la determinazione del peso molecolare esatto di proteine intere, per lo studio di complessi proteici, oltre che per determinare sequenze peptidiche mediante esperimenti di spettrometria di massa tandem, al fine di studiare la composizione aminoacidica e le modifiche post traduzionali delle proteine [Biemann, 1987; Hunt, 1987]. Tale tecnica di MS spesso necessita di essere accoppiata *on-line* o *off-line* ad opportune tecniche separative (HPLC, elettroforesi su gel), in quanto la formazione di ioni multicarica rende estremamente complessa l'interpretazione di spettri ottenuti dall'analisi simultanea di diverse specie.

La tecnica MALDI/TOF MS consente invece, di analizzare simultaneamente ed in tempi rapidi miscele complesse di proteine o peptidi senza la necessità di una preventiva separazione. Per tale motivo, una delle principali applicazioni, riguarda l'identificazione di proteine a partire dall'analisi dei peptidi generati mediante digestione enzimatica (*peptide mass fingerprinting*). Recenti ed interessanti applicazioni di questa tecnologia riguardano l'analisi diretta di cellule intere. E' possibile infatti analizzare cellule batteriche [Krishnamurthy, 1996a; Krishnamurthy, 2000; Warscheid, 2004; English, 2003; Krishnamurthy, 1996b], allo scopo di identificare i microrganismi sulla base del loro caratteristico profilo di espressione proteica, oltre che cellule di mammifero [Zhang, 2006], allo scopo di valutare differenze qualitative e quantitative nell'espressione proteica di due popolazioni di cellule, generare profili proteici diagnostici indice di stati patologici ed identificare proteine importanti in diversi processi cellulari (differenziazione, trascrizione, traduzione, proteine di

membrana). Recentemente è stata dimostrata la possibilità di generare mediante MALDI MS mappe proteiche di sottili sezioni di tessuto e di ricostruire la distribuzione spaziale delle proteine [Chaurand 2004]. Le potenzialità di questo tipo di analisi sono estremamente interessanti per lo studio di molte patologie, in quanto è possibile descrivere, oltre che la distribuzione delle proteine all'interno del tessuto, anche la distribuzione di composti a basso peso molecolare, come farmaci o metaboliti. Questo consente la valutazione di variazioni nell'espressione proteica in tessuti specifici dopo la somministrazione sistematica di farmaci.

Infine, la MALDI MS mostra ottime potenzialità nell'applicazione all'analisi di fluidi biologici (siero, urine), allo scopo di identificare proteine biomarkers indice di stati patologici. L'analisi di proteine in fluidi biologici mediante MS è però complicata dalla complessità della matrice biologica e dalla presenza di sali non volatili che possono sopprimere la ionizzazione degli analiti. La necessità di superare questi problemi ha portato allo sviluppo della tecnologia SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization), una variante della MALDI MS, che sfrutta superfici chimicamente o biologicamente modificate per la cattura selettiva delle proteine all'interno di fluidi biologici [Issaq 2002]. Tuttavia, la SELDI MS mostra limitazioni legate alla bassa risoluzione spettrale ed agli elevati costi d'analisi, pertanto, lo sviluppo di nuovi metodi rapidi, sensibili ed economici per l'analisi proteomica mediante MS dei fluidi biologici rappresenta ancora una importante sfida analitica.

In questo lavoro di tesi verrà descritto e discusso lo sviluppo di nuovi metodi basati su l'impiego di tecniche di MS con ionizzazione soft per la caratterizzazione di proteine funzionali ricombinanti e delle impurezze ad esse associate e per l'analisi di miscele proteiche complesse. Verranno affrontati gli aspetti relativi alla fase di preparazione del campione: in particolare verrà dimostrato come le prestazioni di tali tecniche di MS possono essere migliorate attraverso l'impiego di tecniche separative o estrattive in grado di ridurre la complessità del campione. Verrà infine discussa l'applicazione di tecniche chemiometriche all'analisi degli spettri di massa (Analisi delle Componenti Principali (PCA) e l'Analisi Discriminante Lineare (LDA)), al fine di estrarre l'informazione utile in essi contenuta.

Capitolo 1

Approccio combinato per l'analisi di farmaci proteici ricombinanti mediante tecnica di frazionamento in campo flusso-flusso a fibra tubolare porosa, spettrometria di massa e rivelazione chemiluminescente.

1.1 Introduzione

L'efficacia e la sicurezza di un farmaco, sia esso di origine sintetica o di origine biologica/biotecnologia, dipende non solo dalle proprietà tossicologiche del principio attivo, ma anche dalle impurezze che possono essere presenti.

La determinazione della purezza assoluta e relativa del farmaco può essere considerata una sfida analitica, in quanto i risultati ottenuti sono altamente dipendenti dal metodo di analisi scelto ed è spesso necessario disporre di metodi basati sull'impiego di diverse tecniche analitiche combinate, al fine di tracciare un profilo di purezza il più possibile completo.

Il problema diventa ancor più complesso quando il farmaco d'interesse è una proteina funzionale, come ad esempio un enzima. In tal caso la caratterizzazione del farmaco deve includere non solo la valutazione della purezza chimica, ma anche quella dell'attività funzionale. Questo implica una scelta accurata delle procedure di preparazione del campione e delle tecniche utilizzate per separare le eventuali impurezze dalla proteina di interesse, poiché la denaturazione o altri processi che possono influenzare l'attività enzimatica (come la formazione di aggregati, addotti metallici, o perdita di metalli o di gruppi prostetici) devono essere evitati.

La linea guida Q6B dell'ente ICH (International Conference on Harmonization) in accordo con EMEA (Agenzia Europea Medicinali) e FDA (Food & Drug Administration), fornisce i principi e le linee guida generali per lo sviluppo di un

profilo di caratterizzazione esauriente, fondamentale per poter effettuare il controllo qualità di prodotti di origine biologica e biotecnologica.

In questa linea guida le impurezze vengono classificate come:

- *process-related*: impurezze inerenti al processo di produzione del farmaco (proteine provenienti dalla cellula ospite, DNA della cellula ospite).
- *product-related*: varianti molecolari della proteina di interesse, quali ad esempio prodotti di degrado dovuti ad un cattivo processo di conservazione e che non hanno proprietà paragonabili a quelle della proteina di interesse in quanto ad attività, efficacia e sicurezza.

Infine, vengono definite come *product-related substances* tutte quelle varianti molecolari del prodotto di interesse che risultano essere attive, ma che non hanno effetti deleteri sulla sicurezza e l'efficacia del farmaco [Q6B Guideline].

Va inoltre sottolineata la necessità di definire la stabilità del farmaco proteico e di indicare le condizioni ottimali per una forma farmaceutica il più possibile compatibile con il principio attivo e con il rilascio e biodisponibilità del farmaco in esame.

Siamo di fronte quindi ad una problematica chimico analitica estremamente complessa, anche perché a tutt'oggi non esistono metodi di riferimento per tale caratterizzazione ed i limiti di purezza sono legati al limite di quantificazione del metodo più attuale disponibile e validato; inoltre molte impurezze eventualmente presenti possono essere trascurate o sottostimate.

Emerge quindi la necessità di effettuare un approccio analitico integrato ed "ortogonale", utilizzando in modo razionale il corredo di metodologie analitiche disponibili possibilmente basate su principi chimico - fisici differenti.

In questo lavoro viene proposto un approccio combinato per l'analisi di una proteina funzionale, l'urato ossidasi (uricasi, EC 1.7.3.3). L'enzima urato ossidasi ha una struttura tetrameric, in cui non è presente un gruppo prostetico, costituita da quattro subunità identiche con peso molecolare di circa 34000 Da, contenenti ciascuna un sito catalitico [Conley 1980]. L'enzima è stabile a pH 7.3-9.5 e a temperature al di sotto dei 50 °C [Bonnetè 2001].

Recentemente è stata messa in commercio, con il nome di Rasburicasi, una uricasi ricombinante da *Aspergillus flavus* espressa in *Saccharomyces cerevisiae*. La Rasburicasi viene utilizzata in pediatria per il trattamento

dell'iperuricemia in pazienti sottoposti a terapie anti cancro [Bosly, 2003; Lee, 2003; Yim, 2003; Liu, 2005]. E' riportato che tale Rasburicasi ha un elevato grado di purezza ed una elevata attività specifica [Bayol, 2002; Product Information. Rasburicasi (Fasturtec)].

Al fine di confrontare diverse preparazioni dell'enzima, sono stati analizzati un campione di Rasburicasi ed un campione di uricasi ricombinante da *Candida sphaerica* espressa in *Escherichia coli*, che verrà chiamata uricasi Sigma. Allo scopo di individuare ed identificare le eventuali impurezze contenute nei campioni, sono state inizialmente impiegate tecniche separative convenzionali come la cromatografia liquida in fase inversa (RP HPLC) accoppiata alla spettrometria di massa ESI/Q-TOF oltre che le tecniche SDS e 2D PAGE accoppiate alla spettrometria di massa MALDI /TOF.

Per poter effettuare una valutazione completa della purezza del farmaco e per la valutazione della sua attività enzimatica e di quella delle impurezze è necessario ottenere un buon recupero delle proteine a bassa abbondanza dopo la separazione cromatografica e riuscire mantenere inalterata la struttura nativa dell'enzima. Tuttavia, è possibile che interazioni indesiderate tra le proteine e la fase stazionaria della colonna in fase inversa riducano il recupero e la separazione delle proteine stesse [Nugent, 1991]. Le prestazioni separative possono essere migliorate utilizzando colonne impaccate con particelle di piccolo diametro o narrow-bore o ancora aumentando la lunghezza o la pressione della colonna [Tolley, 2001], ma queste condizioni drastiche o l'uso di modificatori organici nella fase mobile rendono comunque possibile la degradazione e la denaturazione delle proteine [Wilson, 2000].

Per l'analisi dell'uricasi in condizioni non denaturanti è stato impiegato, in questo lavoro, una metodo di separazione innovativo, che utilizza la tecnica di frazionamento in campo flusso-flusso a fibra tubolare porosa (hollow fiber flow-field flow fractionation- HF FIFFF) accoppiata sia alla spettrometria di massa MALDI/TOF, che ad un metodo di rivelazione chemiluminescente (CL) ultrasensibile per la valutazione dell'attività enzimatica dei campioni.

E' stata dimostrata l'applicabilità della tecnica FIFFF all'analisi di macromolecole biologiche, tra cui le proteine [Reschiglian, 2005]. Se confrontata con l'HPLC in fase inversa, a scambio ionico, ad esclusione dimensionale o con l'elettroforesi, la FIFFF mostra importanti vantaggi

nell'analisi di proteine intere in forma nativa. In FIFFF infatti, la separazione è strutturata sull'azione di un campo idrodinamico attraverso un capillare vuoto, piuttosto che sull'interazione con una fase stazionaria [Ratanathanawongs-Williams, 2000]. Questo consente di separare proteine ad alto peso molecolare e complessi proteici senza avere adsorbimento o interazioni con la fase stazionaria. Inoltre, la FIFFF è talmente versatile che quasi tutte le soluzioni possono essere impiegate come fase mobile, non sono necessari modificatori organici o tamponi ad alta forza ionica come nel caso dell'HPLC in fase inversa [Brenner-Weiss, 2003] o dell'elettroforesi capillare [Cao, 1999, Rochu, 2001] in cui, inoltre, l'alto voltaggio applicato può contribuire ad alterare la conformazione nativa delle proteine. Questo evita la degradazione delle proteine e fenomeni di soppressione del segnale in spettrometria di massa. Infine, nel caso di proteine ad alto peso molecolare la selettività della FIFFF è più elevata che in cromatografia ad esclusione dimensionale, con cui non è possibile analizzare aggregati proteici ad alto peso molecolare.

La ritenzione in FIFFF è in linea di principio proporzionale al coefficiente di diffusione degli analiti [Liu, 1993, Fuh, 1993]. Differenze nel tempo di ritenzione possono indicare non solo differenze nel peso molecolare, ma anche in conformazione. Per tali ragioni la FIFFF è una tecnica particolarmente adatta alla caratterizzazione di proteine ad alto peso molecolare e di oligomeri in condizioni non denaturanti [Silveira, 2005]. La HF FIFFF è una variante miniaturizzata della FIFFF ed i suoi fondamenti sono abbastanza recenti. La possibilità di scegliere tra diversi tipi di membrane HF rende questa tecnica in grado di frazionare micro e nano particelle di diversa natura [Lee, 1999; Moon, 1999; Min, 2002; Reschiglian, 2002; Reschiglian, 2003]. La HF FIFFF è stata accoppiata sia con la tecnica di spettrometria di massa MALDI/TOF che ESI/TOF per l'analisi di proteine [Reschiglian, 2004; Reschiglian, 2005]. Il recente sviluppo di canali HF microbore ha consentito di migliorare le prestazioni di questa tecnica nell'analisi delle proteine, rendendole confrontabili con le prestazioni dei sistemi FIFFF tradizionali [Kang, 2005]. La HF FIFFF possiede delle caratteristiche uniche per la separazione di proteine tra cui il basso volume del canale (nell'ordine dei 100 μ L o meno nel caso delle HF FIFFF microbore) [Kang, 2005], che consente di ridurre notevolmente la diluizione del campione, ed il possibile impiego usa e getta dell'elemento

separatore, che permette di evitare la cross-contaminazione nell'analisi dei campioni.

In questo lavoro, i campioni di uricasi sono stati frazionati in HF FIFFF e le frazioni raccolte in uscita dal canale sono state analizzate mediante spettrometria di massa MALDI/TOF allo scopo di valutare la purezza del campione e l'eventuale presenza in soluzione di aggregati proteici e di diverse forme strutturali dell'uricasi. Poiché il meccanismo di separazione in HF FIFFF non altera la struttura terziaria e quaternaria delle proteine, ci si aspetta che l'attività enzimatica dell'uricasi rimanga inalterata dopo il suo frazionamento. Le frazioni del campione sono state quindi analizzate per misurare l'attività enzimatica dei loro componenti. A tale scopo è stato sviluppato un nuovo metodo CL per la valutazione dell'attività enzimatica dell'uricasi nei due campioni [Guardigli, 2005]. La caratteristica più importante di tale metodo è l'elevata sensibilità (il limite di rivelazione è dell'ordine degli 0.01 ng di uricasi), che lo rende particolarmente adatto alla misura dell'attività enzimatica dei componenti presenti anche in tracce costituenti le frazioni di campione eluite dal sistema HF FIFFF.

1.2 Materiali e metodi.

1.2.1 Urato ossidasi.

La Rasburicasi ottenuta per via ricombinante da *Aspergillus flavus* in *Saccharomyces Cerevisiae* è stata ottenuta da Sanofi-Syntelabo (Milano, Italia). La formulazione dell'enzima per uso umano consiste in una polvere liofilizzata con attività specifica 18.2 unità/mg e contenente alcuni eccipienti quali alanina, mannitolo, NaH_2PO_4 , e NaHPO_4 . L'urato ossidasi ricombinante ottenuta da *Candida sp.* espressa in *E. coli* (attività specifica 4.5 unità/mg) è stata ottenuta da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Essa viene fornita come polvere liofilizzata contenente citrato (come attestato dal produttore).

1.2.2 RP HPLC- ESI/Q-TOF MS.

L'analisi mediante RP HPLC dell'enzima è stata effettuata utilizzando un sistema HPLC Gold (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Un'aliquota di campione pari a 20 µg è stata iniettata su una colonna cromatografica a fase inversa C₄ Jupiter (Phenomenex, Torrance, CA), 150 mm x 4,60 mm ed eluita utilizzando una miscela del solvente A (0,1% TFA in H₂O) e del solvente B (0,1% TFA in CH₃CN), effettuando un gradiente lineare dal 30% al 65% di B in 30 minuti, al flusso di 1 mL/min.

La rivelazione UV/Vis è stata effettuata utilizzando uno spettrofotometro a serie di diodi e guida ottica, con cella di cammino ottico pari a 5 cm, UV 6000P (ThermoQuest, Austin, TX). Il segnale UV è stato registrato nell'intervallo di lunghezza d'onda compreso tra 190 e 400 nm. E' stato utilizzato uno spettrometro di massa ESI/Q-TOF Micro (Micromass, Manchester, U.K.), equipaggiato con una sorgente di ionizzazione Z spray. Per poter effettuare l'analisi LC MS il flusso in uscita dalla colonna è stato ridotto a 200 µL/min utilizzando uno splitter, in modo da ottenere un valore di flusso compatibile con la sorgente elettrospray. Gli spettri di massa sono stati acquisiti in un intervallo di m/z compreso tra 500 e 3000 e la calibrazione è stata effettuata mediante infusione diretta di una miscela costituita da mioglobina estratta da cuore di cavallo e tripsinogeno bovino (entrambe ottenute da Sigma-Aldrich). Gli spettri sono stati elaborati mediante il software Mass Lynks (Waters, Milford, MA).

1.2.3 MALDI/TOFMS.

Gli spettri di massa MALDI/TOF sono stati eseguiti con uno spettrometro di massa Voyager DE Pro (Applied Biosystem, Foster City, CA), che utilizza un laser pulsato, ad azoto, con lunghezza d'onda di 337 nm.

L'analisi della proteina intera è stata condotta in modalità positiva, in lineare, acquisendo gli spettri in un intervallo di m/z compreso tra 10000 e 150000. L'acquisizione è stata effettuata mediando 120 colpi di laser per ciascuno spot.

Sono stati utilizzati un potenziale di accelerazione di 25 kV, un potenziale di griglia di 22.5 kV ed un tempo di estrazione di 150 ns.

Gli spettri di massa sono stati calibrati esternamente, utilizzando gli ioni monocarica e doppia carica dell' albumina di siero bovino (Sigma). L'analisi è stata eseguita depositando su ciascuno spot della piastra portacampione 1 μ L di campione, miscelato con un uguale volume della soluzione costituente la matrice: acido sinapinico (Sigma) 50 mg/mL in 50% acetonitrile (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), 50% acqua (Milli-Q Plus, Millipore, Bedford, MA) v/v; 0,1% acido trifluoroacetico (TFA) (Carlo Erba, Milano, Italia) ,v/v. L'analisi MALDI/TOF del digerito triptico è stata effettuata in modalità positiva, in reflector, acquisendo gli spettri in un intervallo di m/z compreso tra 500 e 5000. E' stato applicato un potenziale di accelerazione di 20 kV, un potenziale di griglia di 15 kV e un tempo di estrazione di 40 ns. Per l'analisi del digerito è stata impiegata come matrice una soluzione di acido α -ciano-4-idrossicinnamico (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 10 mg/mL in 50% acetonitrile e 50% acqua v/v; 0,1% TFA v/v. Gli spettri di massa sono stati calibrati esternamente utilizzando una miscela di peptidi costituita da angiotensina, neurotensina, glu – fibrinopeptide B, angiotensina I e des – arg – bradichinina (SequazymeTM peptide mass kit Applied Biosystem) alla concentrazione di 1 pmol/ μ L in matrice.

1.2.4 SDS PAGE.

I campioni di enzima (10 μ g in 20 μ L di acqua) sono stati analizzati mediante SDS PAGE su un gel di poliacrilammide al 12% (p/v). Per visualizzare le bande sul gel è stato utilizzato il colorante Blue Comassie (Biorad, Hercules, CA).

Le bande di interesse sono state tagliate, decolorate con acetonitrile, ridotte con ditionitrotolo (DTT) (Sigma) ed alchilate con iodoacetammide (Fukla). Successivamente le bande sono state incubate con tripsina (Gold Mass Spectrometry Grade Promega, Madison, WI) sciolta in tampone ammonio bicarbonato 50 mM a pH 7.5 a 37°C per tutta la notte.

1.2.5 2D PAGE.

Per l'analisi mediante 2D PAGE, 20 µg di campione sono stati sciolti in 100 µL di tampone di reidratazione (Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 65 mM, Anfoline 0,8%) e sottoposti ad isoelettrofocalizzazione con IPG strip pH 3 - 10 (Biorad) su protean IEF Cell (Biorad). Dopo 16 ore di reidratazione a 50 V, la strip è stata equilibrata per ridurre ed alchilare i ponti disolfuro utilizzando 2,5 mL di DTT 125 mM in tampone di reidratazione (tris - HCl 5mM pH 8.6, Urea 6M, glicerolo 30%, SDS 2%) per 15 minuti in agitazione e con 2,5 mL di iodoacetammide 250 mM in tampone di equilibratura, con in agitazione per 10 minuti. Il campione focalizzato è stato fatto correre su un minigel di poliacrilammide al 12% depositando la strip su uno strato di agarosio 0,5% in tampone di corsa per SDS PAGE.

La corsa elettroforetica è stata condotta applicando un voltaggio costante di 120 V. Il gel bidimensionale è stato colorato con Blue Comassie colloidale G-250 (Biorad) per 16 ore e decolorato con metanolo al 25%. L'immagine digitale è stata acquisita con densitometro GS-800 (Biorad) ed elaborata con software PDQuest (Biorad).

Gli spot da 2D PAGE sono stati tagliati, decolorati e digeriti con tripsina overnight a 37 °C, come precedentemente descritto per la digestione da SDS PAGE.

1.2.6 HF FIFFF.

Il sistema HF FIFFF impiegato è un sistema prototipo il cui assetto strumentale e funzionamento sono descritti in letteratura [[Reschiglian, 2002; Reschiglian, 2003; Reschiglian, 2004; Reschiglian, 2005]. L'assetto strumentale HF FIFFF impiegato in questo lavoro è mostrato in Figura 1.1a.

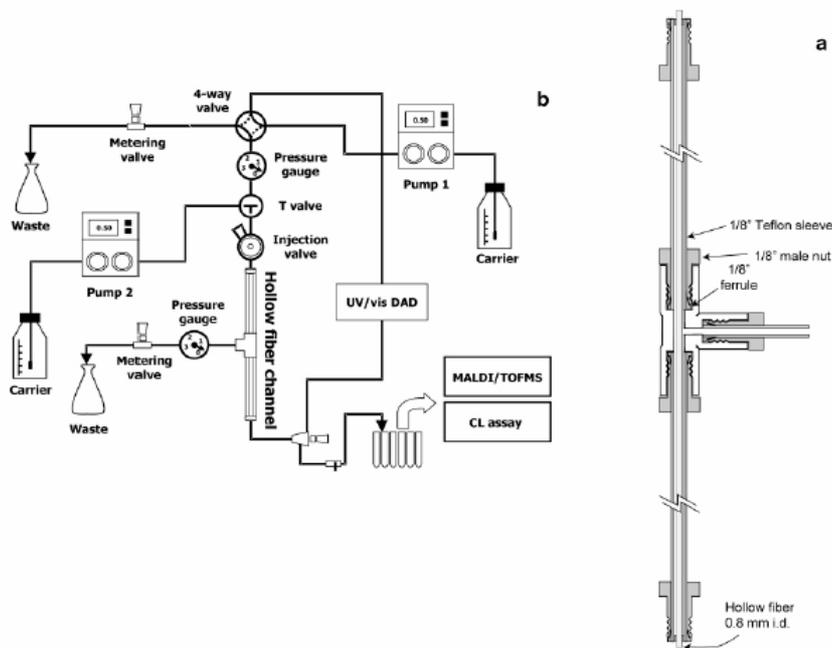


Figura 1.1: (a) Canale HF FIFFF. (b) Assetto strumentale HF FIFFF.

Il canale hollow fiber è interamente assemblato presso i nostri laboratori introducendo un pezzo di fibra in materiale polimerico (polisolfone) all'interno di due pezzi di tubo in teflon da 1/8", di uguale lunghezza, il cui diametro interno è di 3mm, raccordati attraverso una connessione a TEE che consente l'uscita del flusso radiale (Figura 1.1b). Le fibre utilizzate in questo lavoro di tesi (ottenute da Sambu SKU, Corea) hanno un cut-off in peso molecolare di 30 kDa, un raggio interno nominale di 0.040 cm ed una lunghezza di 24 cm.

La pompa HPLC utilizzata è una pompa modello LC-2000 Plus (Jasco, Tokyo, Japan), mentre la pompa a siringa è una Model Pump 11 (Harvard Bioscience, Holliston, MA). I campioni di Rasburicasi sciolti in acqua, alla concentrazione 1 mg/mL, sono stati iniettati all'interno del canale hollow fiber utilizzando di una valvola di iniezione modello 7125 (Rheodyne, Cotati, CA) dotata di un loop in PEEK da 20 μ L. La fase di iniezione/focalizzazione/rilassamento ha una durata di 3 min, al termine dei quali viene effettuata la commutazione dei flussi necessaria per poter passare dalla fase di rilassamento alla fase di focalizzazione.

Il valore del flusso in uscita dal canale (V_{out}) e del flusso radiale (V_{rad}), necessari per la fase di eluizione, sono stati regolati manualmente tramite una valvola a spillo SS-SS2-VH Nupro (Nupro, Willoughby, OH) posizionata all'uscita dello

scarico. Il valore di V_{rad} è stato 0.4 mL/min mentre il valore di V_{out} è stato di 0.3 mL/min. La rivelazione spettrofotometrica UV/Vis è stata effettuata utilizzando lo spettrofotometro UV 6000 LP operante alla lunghezza d'onda di 280 nm. E' stata utilizzata, come fase mobile per l'eluizione dei campioni, una soluzione 50 mM di acetato di ammonio in acqua ultrapura Milli Q a pH 7.0. La scelta di questa fase mobile è dettata dal fatto che essa non denatura le proteine a pH fisiologico, permettendo così di studiarle nella loro conformazione nativa, conformazione in cui esse svolgono il loro ruolo biologico, ed è inoltre compatibile con la spettrometria di massa in quanto costituita da un sale volatile. Abbiamo già dimostrato in altri lavori, che questa fase mobile non degrada le proteine e non ne sopprime la ionizzazione [Reschiglian, 2005].

1.2.7 Determinazione dell'attività enzimatica con il metodo CL ultrasensibile.

Il metodo chemiluminescente si basa sulla determinazione del perossido di idrogeno sviluppato nella reazione di ossidazione dell'acido urico, catalizzata dall'enzima urato ossidasi, attraverso la sua reazione (Figura 1.2) con il bis(2,4,6-triclorofenil)ossalato (TCPO) in presenza di dipiridamolo, un accettore di energia che emette fotoni tornando nel suo stato fondamentale.

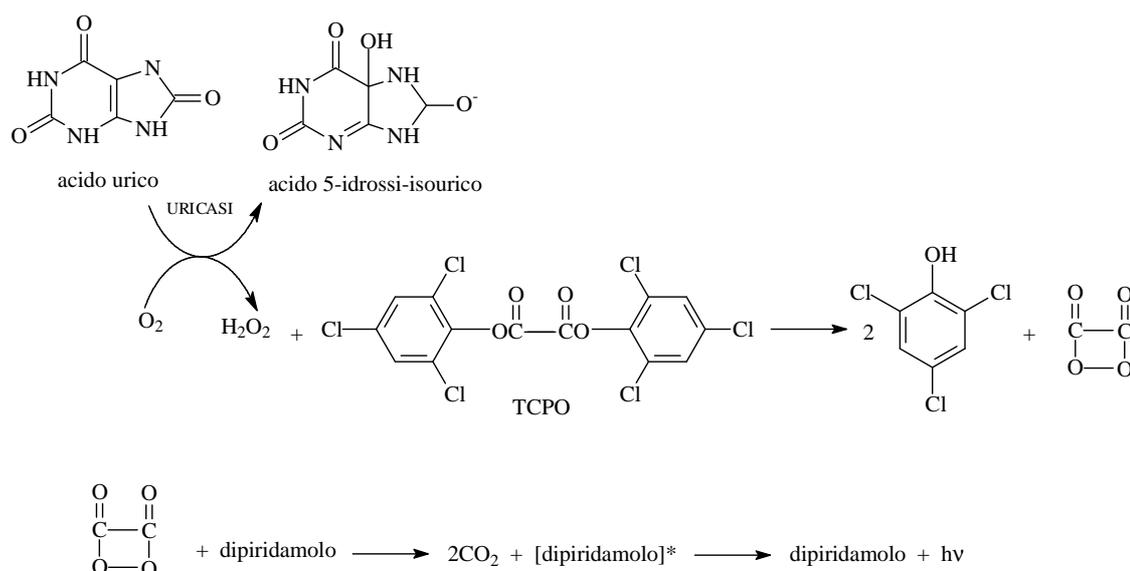


Figura 1.2 : Principio del metodo chemiluminescente per la determinazione dell'attività enzimatica della Rasburicasi.

L'analisi è stata eseguita su piastre microtiter a 96 pozzetti (Labsystem) introducendo in ciascun pozzetto 50 μ L di campione e 25 μ L di una soluzione di acido urico (Sigma) 1 mM in tampone imidazolo (Sigma-Aldrich) 0.1 M (pH = 7.5). Successivamente, la piastra è stata incubata a 37°C per 45 minuti. Trascorso questo tempo in ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ L di una soluzione 0.1 mM di dipiridamolo (Sigma) in acetonitrile. Infine, sono stati aggiunti 50 μ L per pozzetto di una sospensione di TCPO (Sigma) in acetone/acqua (preparata immediatamente prima dell'uso diluendo 10:1 v/v con acqua una soluzione di TCPO 5mM in acetone) ed il segnale chemiluminescente è stato misurato immediatamente dopo l'aggiunta di TCPO utilizzando un luminometro Luminoskan Ascent (Thermo Labsystem) ed impostando un tempo di integrazione del segnale chemiluminescente pari a 2 secondi.

L'attività dell'enzima è stata valutata interpolando il segnale chemiluminescente ottenuto (dopo sottrazione del bianco) su una curva di calibrazione preventivamente ottenuta analizzando soluzioni standard di urato ossidasi in un intervallo di concentrazione che va da 0 a 1.0 ng/pozzetto (corrispondente a circa $(0-2) \times 10^{-5}$ unità/pozzetto).

1.3 Risultati e discussione.

Allo scopo di caratterizzare l'enzima urato ossidasi e le eventuali impurezze presenti nei due campioni sono state utilizzate diverse tecniche analitiche combinate. Le analisi sono state condotte seguendo il seguente criterio:

- 1) Analisi preliminare mediante RP HPLC con rivelazione UV/vis DAD, ESI/Q-TOF MS e MALDI/TOF MS
- 2) Peptide mass fingerprinting
- 3) Caratterizzazione della proteina allo stato nativo mediante HF FIFFF accoppiata alla spettrometria di massa MALDI/TOF ed alla rivelazione CL.

1.3.1 Analisi RP HPLC -UV/Vis ed RP HPLC- ESI/Q-TOF MS.

L'analisi RP HPLC- UV/Vis DAD dei due campioni ha permesso di effettuare una valutazione preliminare della loro purezza.

Il campione di Rasburicasi è risultato estremamente puro mentre il campione di uricasi Sigma presenta un cromatogramma caratterizzato da una serie di picchi che possono essere attribuiti ad impurezze di natura proteica. Assumendo l'assorbività costante, è possibile stimare che tali picchi costituiscono il 30% (p/p) del contenuto proteico totale.

Il cromatogramma relativo all'analisi RP HPLC ESI/Q-TOF MS della Rasburicasi ottenuto mediante acquisizione in "*total ions*" è riportato in Figura 1.3 a. Lo spettro di massa relativo al picco (1) (Figura 1.3b), indica la presenza di una sola proteina con peso molecolare $MW = 34153.95 \pm 0.81$ Da, il cui valore di MW è in accordo con quello riportato in letteratura per il monomero della Rasburicasi, dedotto dalla sequenza N-acetilata della proteina ($MW = 34151.66$) [Bayol, 2002].

La presenza del solo monomero dell'enzima può essere dovuta al fatto che il sistema RP HPLC può alterare le interazioni non covalenti tra le subunità della proteina.

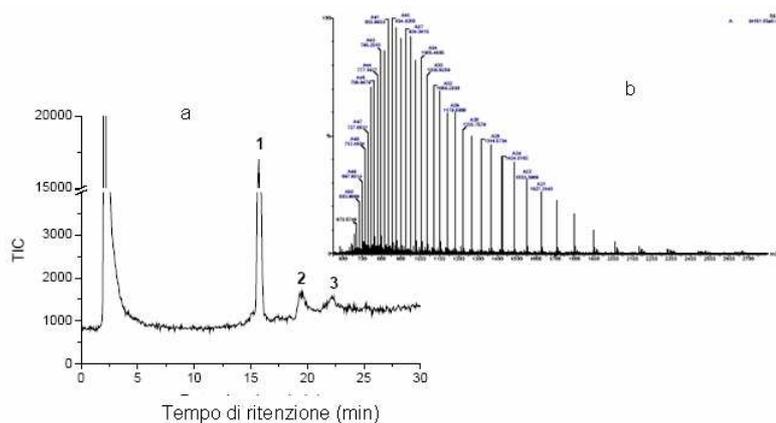


Figura 1.3: (a) Cromatogramma RP HPLC-ESI/Q-TOF MS in total ions della Rasburicasi. (b) Spettro di massa relativo al picco 1.

I picchi 2 e 3 indicano la presenza di impurezze il cui spettro di massa può essere attribuito ad un polimero, costituito da unità monomeriche di MW = 44. Tale valore di MW potrebbe corrispondere all'unità monomerica $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ del polietilenglicole (PEG) che è spesso utilizzato nei processi industriali di refolding proteico per proteggere la superficie delle proteine. Per stabilire la provenienza della specie polimerica è stata eseguita un'analisi del bianco che è risultata negativa, ciò ha permesso di escludere un'origine diversa dal campione di tale specie.

Il cromatogramma relativo all'analisi dell'uricasi Sigma ottenuto mediante acquisizione in "total ions" è riportato in Figura 1.4a.

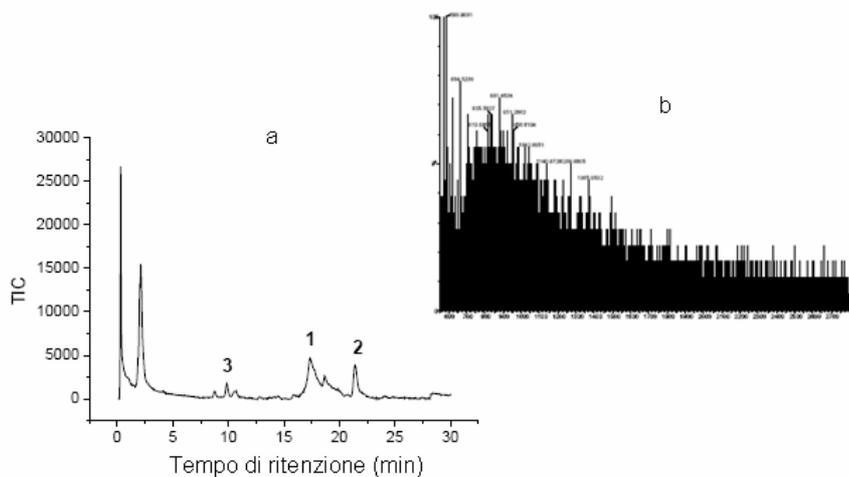


Figura 1.4: (a) Cromatogramma RP HPLC-ESI/Q-TOF MS in total ions dell'uricase Sigma. (1) Uricasi; (2) impurezza proteica da 28 KDa; (3) impurezze proteiche non identificate (b) Spettro di massa relativo al picco 1.

Il gruppo di picchi cromatografici contrassegnati come (3), presentano spettri di massa di debole intensità attribuibili a piccole proteine con peso molecolare compreso tra i 10 kDa e i 13 kDa.

Il picco (1), già attribuito nel corso dell'analisi HPLC UV/Vis DAD all'urato ossidasi, presenta uno spettro di massa di impossibile deconvoluzione per la presenza di un elevato numero isoforme dell'enzima che non possono essere risolte mediante RP HPLC.

Lo spettro di massa relativo al picco (2) rivela infine la presenza di una proteina con $MW = 28425.12 \pm 1.88$ Da.

1.3.2 MALDI/TOF MS.

L'analisi MALDI/TOF MS della Rasburicasi conferma la purezza di tale campione. In Figura 1.5a è riportato lo spettro registrato nell'intervallo di m/z compreso tra 10000 e 40000, in cui sono presenti tre segnali corrispondenti agli ioni monocarica ($m/z \sim 34000$), doppia carica ($m/z \sim 17000$) e tripla carica ($m/z \sim 11000$) del monomero dell'uricasi. Nello spettro registrato a più alti valori di m/z è possibile inoltre osservare la presenza di quattro segnali intensi a valori di m/z di ~ 34000 , ~ 68000 , ~ 99000 e ~ 132000 . Tali valori sono in accordo con il

peso molecolare dei diversi oligomeri costituenti la struttura supramolecolare dell'enzima (monomero, dimero, trimero e tetramero rispettivamente).

A causa dell'elevato quantitativo di campione caricato per valutare la possibile presenza di impurezze, è stato necessario investigare se la presenza degli oligomeri fosse dovuta a fenomeni indotti dalla sorgente MALDI o alla loro reale presenza nel campione. A tale scopo sono stati condotti esperimenti utilizzando due diverse matrici, variando il rapporto campione/matrice oltre che l'intensità del laser. In tutte le condizioni sperimentali utilizzate è stata comunque osservata la presenza degli oligomeri nello spettro.

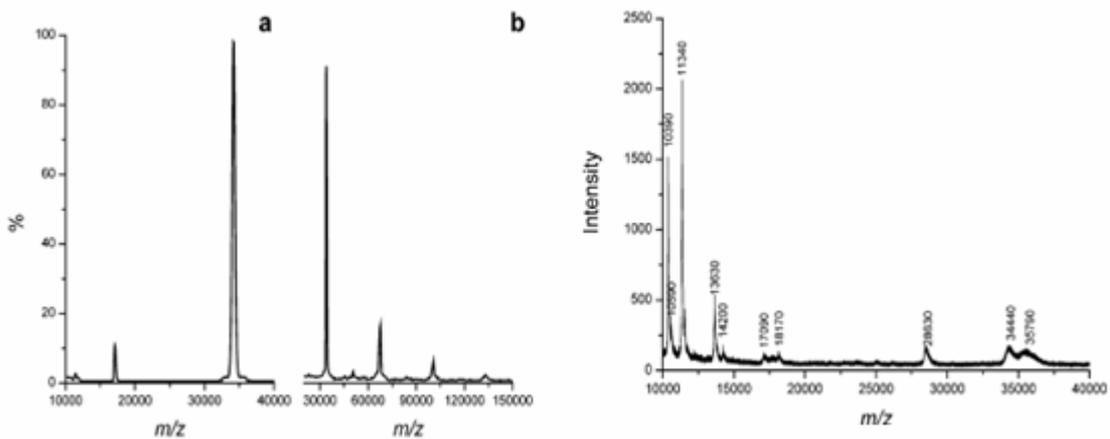


Figura 1.5: Spettri di massa MALDI/TOF della Rasburicasi e dell'uricasi Sigma (a) Rasburicasi segnali corrispondenti agli ioni monocarica ($m/z \sim 34000$), doppia carica ($m/z \sim 17000$) e tripla carica ($m/z \sim 11000$) del monomero dell'uricasi, ed oligomeri dell'enzima. (b) spettro dell'uricasi Sigma.

Lo spettro di massa dell'uricasi Sigma (Figura 1.5b) mostra un picco allargato di intensità relativamente bassa corrispondente ad una proteina con peso molecolare medio $MW = 35000$ Da. Tale peso molecolare corrisponde a quello del monomero dell'uricasi, e la sua elevata larghezza sarebbe indicativa della presenza di modifiche post-traduzionali che danno luogo ad una distribuzione continua di segnali. Nello spettro sono presenti, inoltre, altri segnali attribuibili ad impurezze proteiche con peso molecolare compreso tra 10000 e 28000 Da.

1.3.3 Peptide mass fingerprinting.

Al fine di identificare le proteine presenti come impurezze nel campione di uricasi Sigma e confermare la purezza della Rasburicasi è stata effettuata un'analisi mediante SDS PAGE. In Figura 1.6 è riportata l'immagine del gel ottenuto effettuando una corsa elettroforetica dei due campioni.

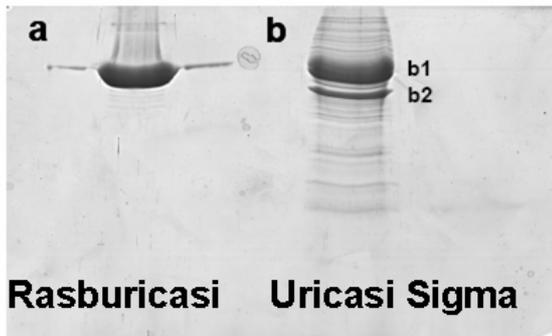


Figura 1.6: Immagine del gel ottenuto dall'analisi della Rasburicasi (a) e del campione di uricasi Sigma (b).

In entrambe i campioni è possibile notare la presenza di una banda intensa con MW compreso tra 25000 e 40000 Da. Il campione di uricasi Sigma mostra la presenza di altre bande meno intense a più basso peso molecolare, attribuibili ad impurezze proteiche. Le bande principali ottenute dall'analisi dell'uricasi Sigma sono state tagliate e digerite con tripsina, seguendo il protocollo di digestione descritto nel paragrafo 1.2.4. La miscela di peptidi ottenuta è stata poi analizzata mediante spettrometria di massa MALDI /TOF e la lista di pesi molecolari è stata inserita in banca dati utilizzando il motore di ricerca ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu>). La banda contrassegnata come b1 è stata identificata come urato ossidasi da *Candida sp.* mentre la banda b2 è stata identificata come 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase da *E. coli*, la cellula ospite in cui è stato clonato il DNA della *Candida sp.* Questa proteina potrebbe non essere stata eliminata durante il processo di purificazione dell'enzima. Nonostante non sia stato possibile identificare le altre impurezze proteiche con peso molecolare intorno a 10 kDa, a causa del basso quantitativo, è ragionevole supporre che anch'esse provengano dalla cellula ospite. Questo esempio dimostra quanto sia problematica la caratterizzazione

delle proteine ricombinanti quando non è possibile effettuare un'identificazione certa di tutte le impurezze presenti.

Infine, l'analisi del digerito triptico relativo alla banda della Rasburicasi ha confermato la presenza di un'unica proteina nel campione, identificata come uricasi da *Aspergillus flavus*.

Poiché la SDS PAGE è caratterizzata da una scarsa risoluzione nel separare proteine aventi pesi molecolari molto simili, i campioni sono stati analizzati mediante elettroforesi 2D, che consente di effettuare una separazione delle proteine sulla base del diverso punto isoelettrico. L'analisi dell'immagine del gel relativo al campione di uricasi Sigma (Figura 1.7a), ha rivelato la presenza di un elevato numero di modifiche post traduzionali sull'enzima: sono presenti infatti diversi spots, ad un peso molecolare di circa 34 kDa che differiscono tra loro per punto isoelettrico.

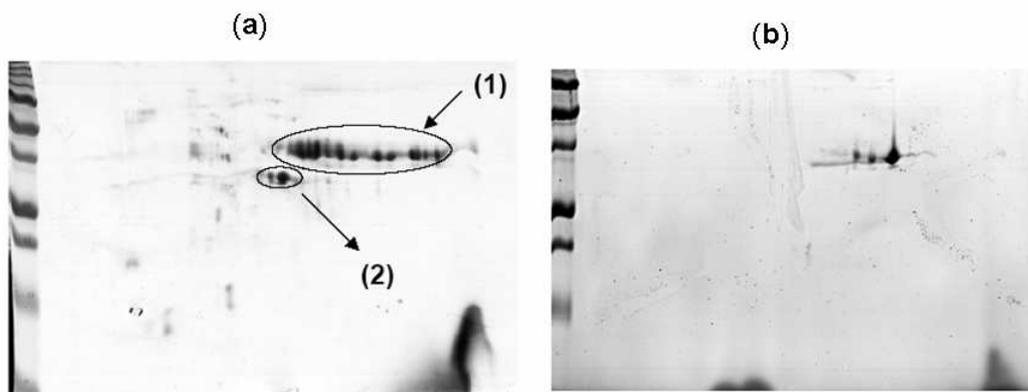


Figura 1.7: 2D PAGE del campione di uricasi Sigma (a) e di Rasburicasi (b). Il gruppo di spots contrassegnati con (1) e (2) indicano la presenza di isoforme rispettivamente dell'uricasi e dell'impurezza da 28 KDa.

La presenza di un numero così elevato di isoforme spiega non solo l'impossibilità di effettuare la deconvoluzione dello spettro ottenuto mediante analisi RP HPLC ESI/Q-TOF MS, ma anche l'ampia distribuzione in termini di m/z del segnale ottenuto mediante analisi MALDI/TOF MS.

Il gel ottenuto dall'analisi della Rasburicasi, la cui immagine è riportata in Figura 1.7b, presenta tre spots differenti per punto isoelettrico che indicano che l'enzima è presente in tre diverse isoforme.

1.3.4 HF FIFFF- MALDI/TOF MS.

L'approccio descritto nelle sezioni precedenti ha permesso di rilevare la presenza di impurezze nel campione di uricasi Sigma. Non è stato tuttavia possibile stabilire con certezza se gli oligomeri osservati nello spettro della Rasburicasi fossero realmente presenti all'interno del campione o generati nel processo di ionizzazione. Per dare una risposta a questo quesito si è ritenuto opportuno analizzare il campione mediante la tecnica non denaturante HF FIFFF. La ritenzione degli analiti in HF FIFFF è funzione del loro coefficiente di diffusione, che è legato al peso molecolare delle proteine [Li, 2000]. Pertanto, il valore di MW di una proteina, può essere ricavato dal suo tempo di ritenzione in HF FIFFF utilizzando una curva di calibrazione costruita analizzando una serie di proteine standard a diverso peso molecolare [Reschiglian, 2005]. Se i valori di MW misurati mediante HF FIFFF vengono confrontati con i valori di MW ottenuti in modo indipendente mediante analisi MALDI/TOF MS, è possibile confermare la reale presenza di complessi proteici in soluzione.

In Figura 1.8a sono riportati i frattogrammi ottenuti effettuando quattro analisi ripetute del campione di Rasburicasi mediante HF FIFFF UV/Vis DAD. E' possibile osservare nel frattogramma la presenza di un'unica banda riproducibile, il cui tempo di ritenzione è in accordo con il valore di MW del tetramero dell'uricasi. Il frattogramma relativo all'analisi dell'uricasi Sigma (Figura 1.9a) mostra invece un profilo bimodale con due massimi, il cui tempo di ritenzione è in accordo con i valori di MW rispettivamente del dimero e del tetramero dell'enzima.

Successivamente le frazioni eluite dal canale HF FIFFF sono state caratterizzate mediante MALDI/TOF MS. Le frazioni relative al campione di Rasburicasi mostrano spettri molto simili a quelli ottenuti dall'analisi del campione non frazionato. Gli spettri ottenuti dall'analisi delle frazioni dell'uricasi Sigma raccolte in corrispondenza dei tempi di ritenzione del dimero e del tetramero, contengono segnali a valori di m/z corrispondenti al monomero dell'enzima (Figure 1.10 a e b). I risultati ottenuti dimostrano la reale presenza in soluzione degli oligomeri dell'enzima nel campione dell'uricasi Sigma.

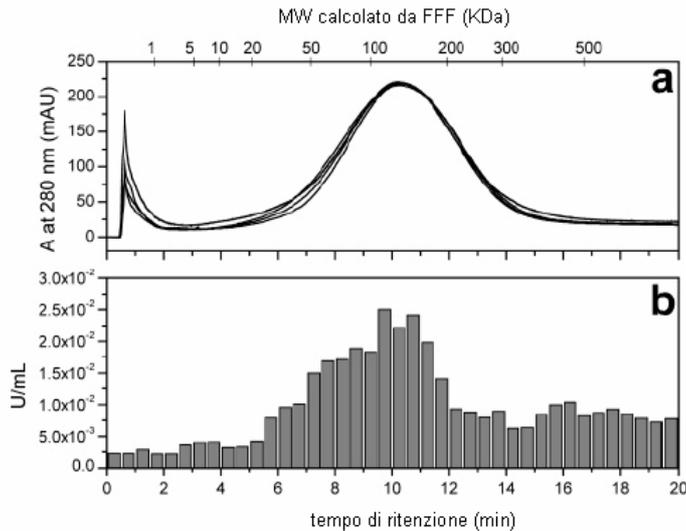


Figura 1.8: HF FIFFF del campione di Rasburicasi. (a) frattogrammi UV/visible di quattro corse ripetute registrati a 280 nm. (b) attività enzimatica determinata mediante il metodo CL delle frazioni raccolte.

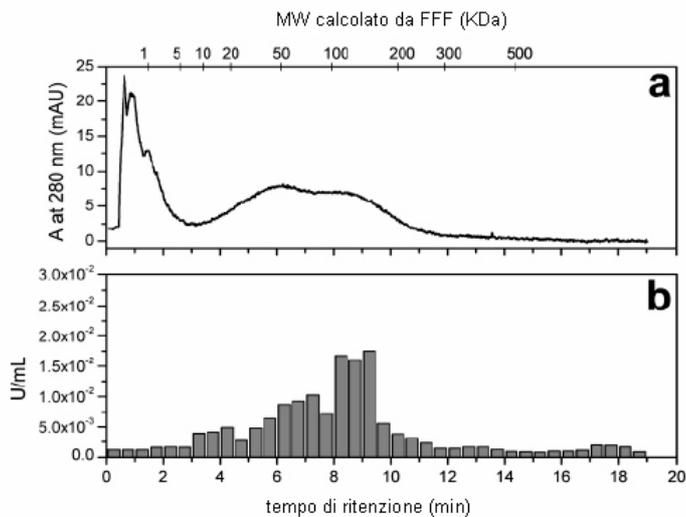


Figura 1.9: HF FIFFF del campione di uricasi Sigma. (a) frattogramma UV/visible registrato a 280 nm. (b) attività enzimatica determinata mediante il metodo CL delle frazioni raccolte.

Osservando lo spettro ottenuto dall'analisi delle frazioni dell'uricasi Sigma raccolte in corrispondenza del tempo di ritenzione del dimero (Figura 1.10b) è possibile notare la presenza di altri segnali a valori più bassi di m/z (10400; 12600; 13600; 14100; 28400) che possono essere attribuiti ad impurezze proteiche, come suggerito dall'analisi mediante SDS e 2D PAGE.

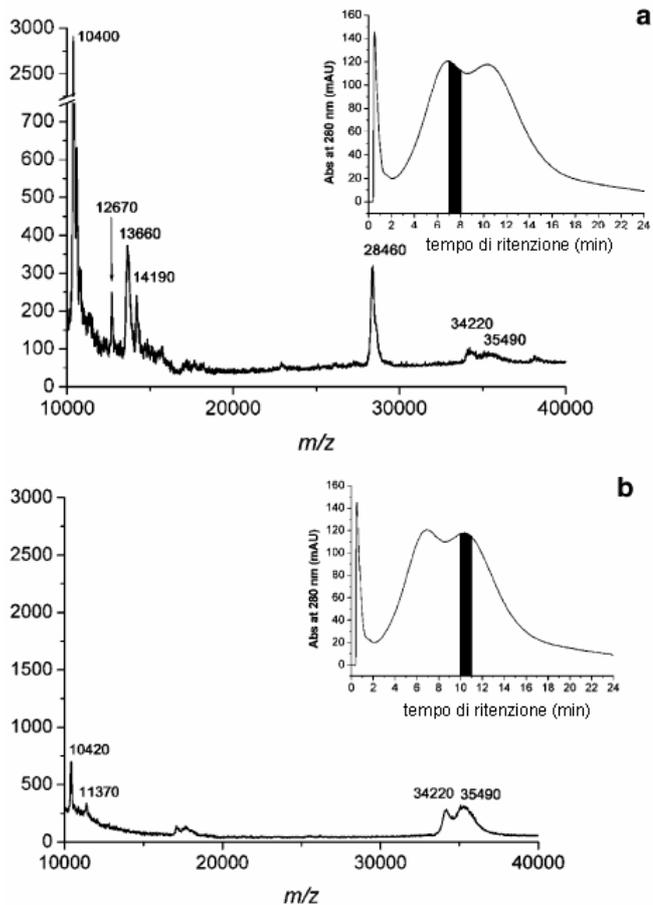


Figura 1.10: Spettri di massa MALDI/TOF delle frazioni raccolte in uscita dal sistema HF FIFFF per l'uricasi Sigma. **(a)** Frazione raccolta in corrispondenza del tempo di ritenzione del dimero dell'enzima. **(b)** Frazione raccolta in corrispondenza del tempo di ritenzione del tetramero.

Poiché il cut-off di peso molecolare della membrana HF è 30000 Da, le impurezze proteiche con MW inferiore al cut-off non dovrebbero essere ritenute e dunque non dovrebbero essere presenti all'interno delle frazioni raccolte. E' comunque noto che le membrane da ultrafiltrazione, e dunque anche le membrane HF, hanno spesso un cut-off reale inferiore a quello nominale. Di conseguenza, proteine con MW inferiore ai 30000 Da potrebbero essere ritenute ma a tempi di ritenzione più bassi rispetto a quello del dimero dell'uricasi. La presenza dei loro segnali nello spettro della frazione raccolta in corrispondenza del tempo di ritenzione del dimero dell'enzima (MW 70000 Da) potrebbe indicare la formazione di complessi dimero- impurezze proteiche.

Questi segnali non sono presenti invece nello spettro della frazione raccolta al tempo di ritenzione del tetramero dell'uricasi (Figura 1.10 b).

1.3.5 HF FIFFF con rivelazione CL ultrasensibile.

Secondo quanto riportato dal produttore, la Rasburicasi possiede un'attività specifica (18.2 unità/mg) significativamente più alta di quella dell'uricasi Sigma (4.5 unità/mg). La più bassa attività specifica dell'enzima nel campione di uricasi Sigma, potrebbe essere spiegata considerando la presenza di diverse isoforme ed oligomeri dell'enzima, la sua diversa origine biologica e la presenza di complessi enzima-impurezze proteiche. Al fine di comprendere la ragione di tale differenza, è stata misurata per entrambe i campioni l'attività enzimatica delle frazioni raccolte in uscita dal sistema HF FIFFF utilizzando il metodo CL sviluppato. Poiché la concentrazione di enzima nelle frazioni raccolte è compresa tra 1 e 10 µg/mL, ed il metodo chemiluminescente è applicabile a campioni con concentrazione inferiore ai 20 ng/mL, è stato necessario diluire le frazioni prima dell'analisi. Il campione di Rasburicasi ed il campione di uricasi Sigma sono stati diluiti rispettivamente 1:1000 v/v ed 1:100 v/v (poiché la concentrazione della Rasburicasi iniettata era 10 volte più alta rispetto a quella della dell'uricasi Sigma). Il segnale CL misurato per le frazioni ottenute dall'analisi HF FIFFF dei due campioni sono riportate in Figura 1.8b e 1.9b. In entrambe i casi il segnale CL ha un valore massimo in corrispondenza del tempo di ritenzione del tetramero dell'enzima. Nel caso del campione di uricasi Sigma il segnale CL presenta un secondo massimo in corrispondenza del tempo di ritenzione del dimero dell'enzima. Questo conferma la presenza del dimero in soluzione e dimostra che esso è attivo. Confrontando i risultati riportati in Figura 1.8b ed 1.9b si può notare che a parità di campione iniettato, i segnali chemiluminescenti ottenuti dall'analisi delle frazioni di uricasi Sigma, sono più bassi di quelli ottenuti dall'analisi delle frazioni della Rasburicasi, confermandone la più alta attività.

1.4 Conclusioni.

La combinazione della tecnica separativa non denaturante (HF FIFFF) con la tecnica di spettrometria di massa MALDI/TOF MS e con il metodo CL ultrasensibile per la misura dell'attività dell'uricasi, fornisce informazioni analitiche complementari a quelle ottenute con metodi convenzionali ad alta risoluzione (RP HPLC accoppiata alla ESI/Q-TOF MS e MALDI/TOF MS accoppiata alla SDS o 2D PAGE). I risultati ottenuti dimostrano che la combinazione di diverse tecniche analitiche è importante per l'analisi di proteine funzionali ricombinanti. L'approccio descritto può essere considerato un modello per lo sviluppo di un metodo razionale per la caratterizzazione di farmaci proteici ottenuti mediante processi biotecnologici.

L'analisi RP HPLC UV/Vis DAD consente di rilevare la presenza di impurezze e di stimarne la quantità in modo grossolano. In particolare è stato stimato che il campione di uricasi Sigma contiene una quantità di impurezze che costituiscono all'incirca il 30% in peso del campione. I valori di MW delle impurezze presenti è stato determinato mediante PAGE accoppiata alla spettrometria di massa MALDI/TOF MS, che ha consentito di identificare le impurezze a più alta abbondanza presenti nel campione di uricasi Sigma e di rilevare la presenza di le isoforme dell'enzima. Le impurezze presenti all'interno di questo campione sono state attribuite alla cellula ospite in cui è stato clonato il DNA della *Candida sp.* E' stata inoltre dimostrata la purezza della Rasburicasi e la presenza di tre diverse isoforme dell'enzima in questo campione.

I metodi RP HPLC-ESI/Q-TOF MS e MALDI/TOF MS non hanno consentito di stabilire quali oligomeri dell'enzima fossero realmente presenti nei campioni pertanto, al fine di mettere in relazione la struttura supramolecolare dell'enzima con la sua attività, è stata applicata la tecnica separativa non denaturante HF FIFFF accoppiata alla spettrometria di massa MALDI/TOF ed alla rivelazione chemiluminescente. I risultati hanno dimostrato che il campione di Rasburicasi contiene l'enzima in forma tetramerica, mentre il campione di uricasi Sigma contiene l'enzima sia in forma dimerica che tetramerica. E' stata infine

valutata la possibile formazione di complessi enzima-impurezze proteiche all'interno del campione di uricasi Sigma.

Capitolo 2

Identificazione di batteri mediante spettrometria di massa MALDI/TOF ed analisi chemiometrica.

2.1 Introduzione

L'identificazione rapida ed accurata di microrganismi responsabili di pericolose infezioni, è oggi un obiettivo prioritario non solo nel settore sanitario, ma per il controllo di tutta la filiera alimentare. Si stima che circa 1,5 miliardi di persone nel mondo siano colpite da infezioni di origine alimentare, causate da batteri o loro prodotti, virus, funghi e parassiti [Mead, 1999], che provocano circa tre milioni di morti in un anno. Molte delle tossinfezioni alimentari, sono causate da batteri e i principali microrganismi patogeni coinvolti sono: *Salmonella sp.* (carne, latte, uova), *Escherichia coli O157:H7* (carne), *Staphylococcus aureus* (crema, panna, carne), *Clostridium perfringens* (insaccati, cibi conservati), *Campylobacter jejuni* (pollame, uova), *Vibrio parahaemolyticus* (frutti di mare), *Yersinia enterocolitica* (carne, latte), *Listeria monocytogenes* (latticini) [Institute of food Technologists 2004].

La facilità con cui tali batteri patogeni possono diffondersi lungo la catena alimentare (già 10-100 cellule sono sufficienti a causare infezioni negli uomini [Tortorello, 1997]), contaminare gli ambienti e non ultima la possibilità che essi vengano utilizzati come arma di distruzione di massa in attacchi terroristici, sottolineano l'urgente necessità di metodologie analitiche rapide, sensibili ed affidabili che permettano non solo di identificare i microrganismi, ma anche di discriminare tra ceppi batterici patogeni e non patogeni così da garantire la sicurezza degli alimenti, degli ambienti e la protezione della popolazione. I metodi per l'analisi dei microrganismi più ampiamente utilizzati, oltre a quelli convenzionali, sono di tipo immunometrico o basati sulla biologia molecolare [Ellis, 2001]. I metodi immunometrici utilizzano un anticorpo specifico per un antigene, che solitamente è presente a livello della membrana esterna della

cellula. Tale anticorpo può essere coniugato con fluorescina, perossidasi o fosfatasi alcalina a seconda del sistema di rivelazione.

I metodi genici impiegano sonde oligonucleotidiche, chiamate *primers*, marcate con anticorpi o enzimi che riconoscono sequenze nucleotidiche complementari specifiche per il microrganismo, sfruttando la tecnica Polymerase Chain Reaction.(PCR).

Nonostante tali metodi siano più rapidi dei tradizionali metodi microbiologici presentano anch'essi delle limitazioni come la necessità di passaggi di prearricchimento per amplificare il numero di microrganismi presenti o la presenza di sequenze nucleotidiche intatte nel campione da analizzare. Inoltre un altro fattore limitante è il tempo di analisi che può variare dalle 18 alle 24 ore a seconda del microrganismo da determinare [Ellis, 2001].

Per questo motivo è intensa l'attività di ricerca rivolta alla messa a punto di metodi in grado di risolvere in maniera adeguata tali problemi. Tra i diversi approcci metodologici le tecniche di spettrometria di massa si sono rivelate estremamente utili per la caratterizzazione di microrganismi [Anhalt, 1975] ed in particolare la tecnica di spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight) si è dimostrata promettente per l'identificazione rapida, sensibile ed accurata di cellule batteriche intere [Holland, 1996; Jarman, 2000].

Uno dei motivi che rende la tecnica MALDI particolarmente adatta all'analisi di microrganismi, è la possibilità di analizzare un elevato numero di proteine caratteristiche di una cellula batterica (*biomarkers*), senza l'utilizzo di anticorpi o *primers* specifici, facilitando notevolmente il processo di identificazione del batterio. Le proteine biomarkers possono poi essere identificate mediante l'utilizzo dei database proteomici disponibili in rete [Demirev, 2001; Pineda, 2003]. Tuttavia i database sono disponibili solo per un numero limitato di specie batteriche, inoltre l'individuazione di segnali *m/z* caratteristici di un ceppo batterico è un'operazione che può non rivelarsi semplice a causa della complessità degli spettri di massa ed alla riproducibilità degli stessi, che può essere influenzata da diversi fattori sia strumentali che sperimentali [Saenz, 1999; Evason, 2001; Williams, 2003; Evason, 2000; Ramirez, 2001]. Per ovviare a questi problemi è possibile ricorrere ad un opportuno trattamento statistico degli spettri, al fine di costruire un modello che consenta di classificare

correttamente ciascuna specie batterica sulla base dei rapporti m/z caratteristici e sempre conservati. A tale scopo può risultare utile un approccio di tipo chemiometrico.

L'analisi chemiometrica si basa sull'uso di metodi matematici e statistici per la soluzione di problemi multivariati. Essa viene spesso usata non solo in chimica, ma anche in altre discipline per l'esplorazione dei dati, ossia per far luce sulla struttura dei dati, sulle relazioni e correlazioni tra essi esistenti, sulla ridondanza e sulla rilevanza con cui il problema è stato descritto. Essa dispone inoltre di strumenti in grado di costruire modelli quali-quantitativi per evidenziare la presenza di "raggruppamenti" di dati relativi a situazioni tra loro differenti. In altre parole effettuare un'analisi multivariata consente di estrarre l'informazione utile contenuta negli spettri di massa allo scopo di identificare i microrganismi.

In questo lavoro è stato sviluppato un nuovo metodo analitico per l'identificazione di batteri interi basato sulla tecnica di spettrometria di massa MALDI/TOF con trattamento chemiometrico dei dati. In particolare sono state impiegate tecniche di analisi multivariata quali l'analisi delle componenti principali (PCA) e l'analisi discriminante lineare (LDA) per confrontare gli spettri di massa ottenuti dall'analisi di due importanti batteri patogeni, *Escherichia coli* O157:H7 e *Yersinia enterocolitica*, e del ceppo non patogeno *E. coli* MC1061. Sono stati dapprima analizzate le diverse specie batteriche in diverse condizioni sperimentali (diversi tempi di coltura, diversi terreni di coltura) dimostrando come tali differenze influenzano il profilo di espressione proteica dei microrganismi e dunque il loro spettro di massa. Sono stati successivamente confrontati, utilizzando il metodo della LDA, gli spettri ottenuti per tutte le specie considerate nelle diverse condizioni sperimentali con l'obiettivo di dimostrare che l'analisi chemiometrica consente di discriminare tra le diverse specie batteriche indipendentemente dalle condizioni sperimentali scelte, superando il problema della riproducibilità spettrale.

Uno dei limiti dell'applicazione della spettrometria di massa MALDI/TOF all'identificazione dei microrganismi riguarda l'analisi di miscele batteriche complesse. In questo caso infatti, fenomeni di ionizzazione competitiva portano all'ottenimento di spettri di massa costituiti da segnali abbastanza diversi dalla combinazione lineare dei segnali caratteristici di ciascuna specie batterica. Di conseguenza, non è possibile ottenere informazioni riguardo la reale

composizione della miscela. Per ovviare a questo problema viene proposto in questo lavoro l'impiego di una piastra portacampione MALDI d'oro, i cui spot sono stati opportunamente funzionalizzati con anticorpi di cattura contro *Y. enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*. Dopo aver valutato l'efficienza del processo di derivatizzazione della piastra, sono state analizzate sospensioni contenenti rispettivamente *Y. enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*, al fine di registrare i profili proteici caratteristici di queste specie. Successivamente, sono stati analizzati campioni costituiti da miscele batteriche costituite da : *Y. enterocolitica*, *Listeria monocitogenes*, *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*.

2.2 Materiali e metodi

2.2.1 Preparazione del campione per l'analisi MALDI/TOF MS

Le colture batteriche utilizzate in questo lavoro sono: *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23716 dell'American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA), *E. coli* MC1061 pT0011 gentilmente fornito dal professor Marco Virta (Department of Biochemistry and Food Chemistry, University of Turku, Finland), *Listeria monocytogenes* 13M ATCC 7644, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Gli *E. coli* MC1061 sono un ceppo non patogeno di *E. coli* geneticamente modificato, resistente all'antibiotico Kanamicina. Per ciascun ceppo batterico, una colonia singola, cresciuta precedentemente su piastra di agar selettivo per i batteri gram-negativi (Herellea Agar; Biolife S. r. l.; Milano, Italia), è stata prelevata con un'ansa sterile e introdotta in un tubo da coltura contenente circa 5 mL di terreno liquido Luria-Bertani (LB) (Bacto[®] LB BROTH, LENNOX; DIFCO Laboratories; Detroit MI USA). I batteri sono stati cresciuti per 15-18 h a 37 °C. Successivamente è stata misurata la densità ottica a 600 nm della sospensione mediante spettrofotometria visibile. Un'aliquota di 50 µL della sospensione batterica di partenza, opportunamente diluita, è stata inoculata in beuta sterile contenente 50 mL di terreno di coltura. Le beute sono state mantenute sotto agitazione per 24 ore alla temperatura di 37 °C in un incubatore.

A 4, 6, 9, 15, 18 e 24 ore dall'inoculo è stata prelevata un'aliquota di sospensione batterica, lavata per tre volte con cloruro di ammonio al 2% (p/v) in acqua milliQ (Milli-Q Plus, Millipore, Bedford, MA) e centrifugata dopo ogni lavaggio a 3000 rpm per 15 min.

Prima di procedere con l'analisi MALDI/TOF MS, i batteri sono stati diluiti con cloruro di ammonio, fino ad ottenere una concentrazione di cellule di $\approx 10^6$ cellule/µL.

2.2.2 Immobilizzazione degli anticorpi sulla piastra d'oro.

In Figura 2.1 è riportato lo schema delle reazioni che portano alla derivatizzazione della superficie d'oro della piastra portacampione MALDI/TOF con gli anticorpi contro i batteri d'interesse.

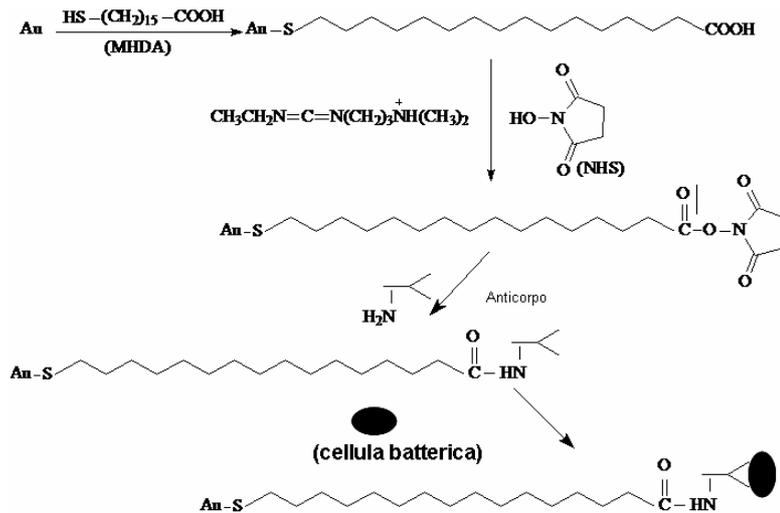


Figura 2.1: Schema di derivatizzazione della piastra d'oro con gli anticorpi contro i batteri.

La superficie d'oro è stata pulita utilizzando una soluzione di NaOH 1M per 20 min, seguita da una soluzione di HCl 1M per 5 min ed infine da una soluzione costituita da H₂SO₄:H₂O₂ in rapporto 3:2 (v/v). Successivamente è stato generato un monostrato (SAM) di acido 16-mercaptoesadecanoico (MHDA) (Sigma, St. Louis, MO) immergendo la piastra in una soluzione di MHDA 10 mM in etanolo a 4°C per circa 16 ore. Il gruppo carbossilico terminale del SAM è stato poi attivato facendolo reagire per 2 h con una soluzione costituita da 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide (Sigma) 15 mM e N-idrossisuccinimide (Sigma) 75 mM in PBS pH 7.4, in modo da legare covalentemente l'anticorpo al gruppo NHS attivo formatosi sulla superficie d'oro.

5 µL di una soluzione contenente gli anticorpi monoclonali anti-*Y. enterocolitica* ed anti-*Listeria monocytogenes* alla concentrazione di 100 µg/mL sono stati incubati per circa 16 h a 4 °C sui diversi spot della piastra. Dopo aver effettuato lavaggi con PBS a pH 7.4, per rimuovere l'anticorpo non legato, la piastra è stata saturata con una soluzione di BSA all'1% in PBS per 2h a 4°C. Dopo aver

effettuato dei lavaggi con PBS sono state incubate, sugli spot derivatizzati per 1h 30 min a temperatura ambiente, sospensioni contenenti *Y. Enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* a concentrazione nota, oltre che sospensioni costituite da miscele batteriche di *Y. enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* a concentrazione nota.

L'efficacia della reazione di immobilizzazione dell'anticorpo sulla superficie d'oro è stata verificata utilizzando un metodo ELISA sandwich, utilizzando un anticorpo secondario anti-*Y. enterocolitica* marcato con HRP, ed un substrato CL (SuperSignal ELISA Femto, Pierce, Rockford, IL). Le immagini chemiluminescenti sono state acquisite utilizzando un luminografo (LB 981 Night Owl, EG&G Berthold, Pforzheim, Germany). Gli anticorpi monoclonali e gli anticorpi policlonali marcati con HRP utilizzati in questo lavoro sono stati gentilmente forniti dall'Istituto Zooprofilattico of Teramo.

2.2.3 MALDI/TOF MS.

Gli spettri di massa MALDI/TOF sono stati eseguiti con uno spettrometro di massa Voyager DE Pro (Applied Biosystem, Foster City, CA). L'analisi delle cellule batteriche intere è stata condotta in modalità di ionizzazione positiva, in lineare, acquisendo gli spettri in un intervallo di m/z compreso tra 4000 e 17000. L'acquisizione è stata effettuata mediando 120 colpi di laser per ciascuno spot e impostando un potenziale di accelerazione di 25 kV, un potenziale di griglia del 94% ed un tempo di estrazione di 400 ns.

L'analisi è stata eseguita depositando su ciascuno spot della piastra portacampione 1 μ L di sospensione batterica, miscelato con un uguale volume della soluzione costituente la matrice: acido ferulico (Sigma) alla concentrazione di 20 mg/mL in 50% acetonitrile (Carlo Erba, Milano, Italia), 30% acqua MilliQ e 20% di acido formico (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Per l'analisi delle miscele batteriche sulla piastra derivatizzata con gli anticorpi di cattura è stata utilizzata come matrice una soluzione di acido sinapinico (Sigma) alla concentrazione di 30 mg/mL in 50% acetonitrile, 50% acqua milliQ; 0.1% TFA (Sigma). La calibrazione esterna degli spettri di massa è stata effettuata, utilizzando gli ioni monocarica (m/z 12338.90) e doppia carica (m/z

6178.43) del Citocromo C (Sigma) alla concentrazione di 3 µg/mL. Per ciascun campione analizzato sono stati registrati 16 spettri e successivamente essi sono stati sottoposti ad analisi multivariata.

2.2.4 Analisi chemiometrica degli spettri.

L'analisi degli spettri è stata eseguita utilizzando il software V-PARVUS. Poiché gli spettri di massa MALDI/TOF hanno un'alta risoluzione, il numero di variabili (m/z) nell'intervallo selezionato è estremamente elevato (più di 20000 variabili). Un così alto numero di variabili impedisce l'applicazione di molte tecniche chemiometriche in quanto, il tempo richiesto per i calcoli è proibitivo. Per poter risolvere questo problema è stato sviluppato un modulo di calcolo in grado di ridurre il numero di variabili e di eliminare alcune imperfezioni contenute nei dati originali (es. valori negativi delle intensità). Il modulo calcola uno spettro medio su :

1. un numero definito, scelto dall'utente, di variabili di ingresso
2. un intervallo definito di m/z (l'utente definisce l'intervallo di m/z);
3. un numero definito di m/z (l'utente definisce il numero di variabili in uscita).

In ogni caso il modulo calcola la media in modo da avere una ricopertura del 50% tra intervalli successivi. Con riferimento alla Figura 2.1 la prima variabile in uscita è la media dei valori nell'intervallo a-c, la seconda è la media nell'intervallo b – d, la terza è la media nell'intervallo c- e.

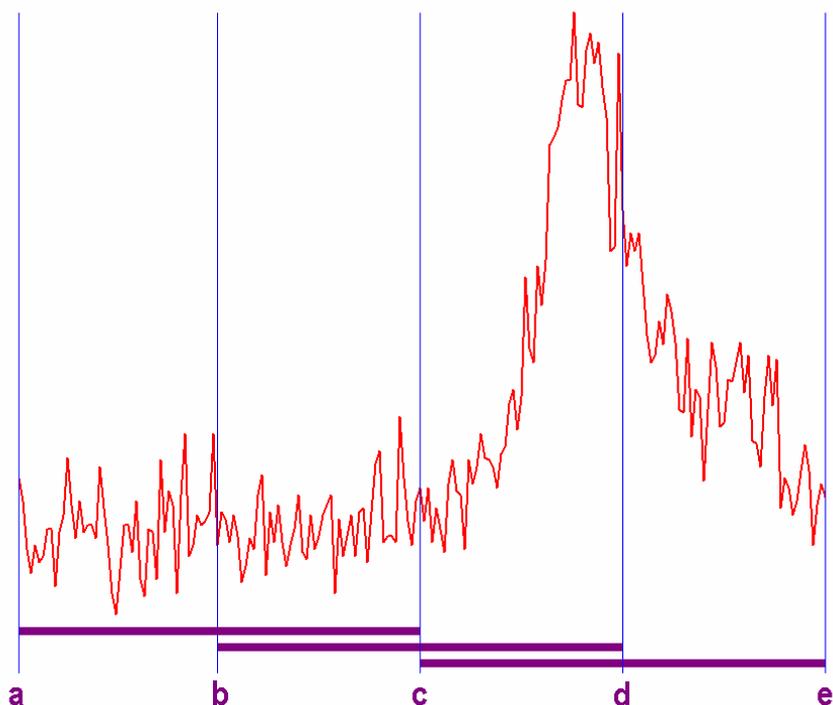


Figura 2.2 Esempio di uno spettro medio ottenuto utilizzando il modulo di calcolo sviluppato.

Il modulo può anche fornire, per ogni spettro, lo spettro modificato costituito dalle variabili in uscita .

Inoltre, il programma identifica delle “categorie” che in questo caso sono costituite dall'insieme di spettri ottenuti mantenendo fisso un parametro, per esempio il tempo di crescita dei microorganismi.

Tutti gli spettri sono stati sottoposti ad un pretrattamento utilizzando il profilo di riga centrato al fine di correggere la variabilità strumentale.

Il set di dati utilizzato nel lavoro (training set) è costituito da 96 oggetti (spettri di massa) per ciascuna specie batterica considerata, 206 variabili (m/z medio, intensità media). Il modello è stato validato utilizzando un set di dati non impiegato per la sua costruzione (evaluation set).

Sono implementati in PARVUS algoritmi che consentono di effettuare diverse elaborazioni chemiometriche dei dati. In particolare la scalatura dei dati è stata effettuata utilizzando gli algoritmi CHANGE e NIPALS.

Gli spettri sono stati inizialmente analizzati con la tecnica dell'Analisi delle Componenti Principali (PCA), una tecnica di visualizzazione dei dati. Dopo una

selezione delle variabili rilevanti mediante la funzione di PARVUS, SELECT, è stata effettuata un'analisi di classificazione con la tecnica dell'Analisi Discriminante Lineare (LDA).

E' stata infine calcolata la capacità di corretta classificazione e corretta predizione del modello utilizzando 5 gruppi di cross-validazione.

2.3 Risultati e discussione.

2.3.1 Effetto del tempo di crescita sulle variazioni spettrali.

Per valutare l'effetto del tempo di crescita sul profilo di espressione proteica dei batteri sono state analizzate mediante MALDI/TOF MS sospensioni di *E. Coli* O157: H7, *E.coli* MC 1061 e *Y. Enterocolitica*, prelevate dal brodo di coltura a, 4, 6, 9, 15, 18 e 24 ore dall'inoculo. Il confronto tra gli spettri di massa ottenuti, mostra differenze significative sia nel numero di picchi che nelle loro intensità per tutte le specie batteriche analizzate.

A titolo di esempio sono riportati in Figura 2.2 gli spettri MALDI ottenuti dall'analisi degli *E.coli* MC 1061 a diversi tempi di crescita. le variazioni spettrali osservate possono essere attribuite a variazioni nella composizione del terreno nel corso della crescita microbica (es: consumo di nutrienti ed ossigeno nel ciclo di crescita batterica) e sono in accordo con quanto già riportato in letteratura da studi effettuati su colture di *E.coli* [Arnold, 1999].

Per poter apprezzare meglio tali differenze è stato utilizzato un approccio chemiometrico. Il confronto tra gli spettri di massa registrati a diversi tempi di crescita è stato effettuato inizialmente applicando la PCA come tecnica di visualizzazione dei dati tuttavia, la PCA ha permesso di discriminare solo parzialmente tra i diversi spettri (Figura 2.3).

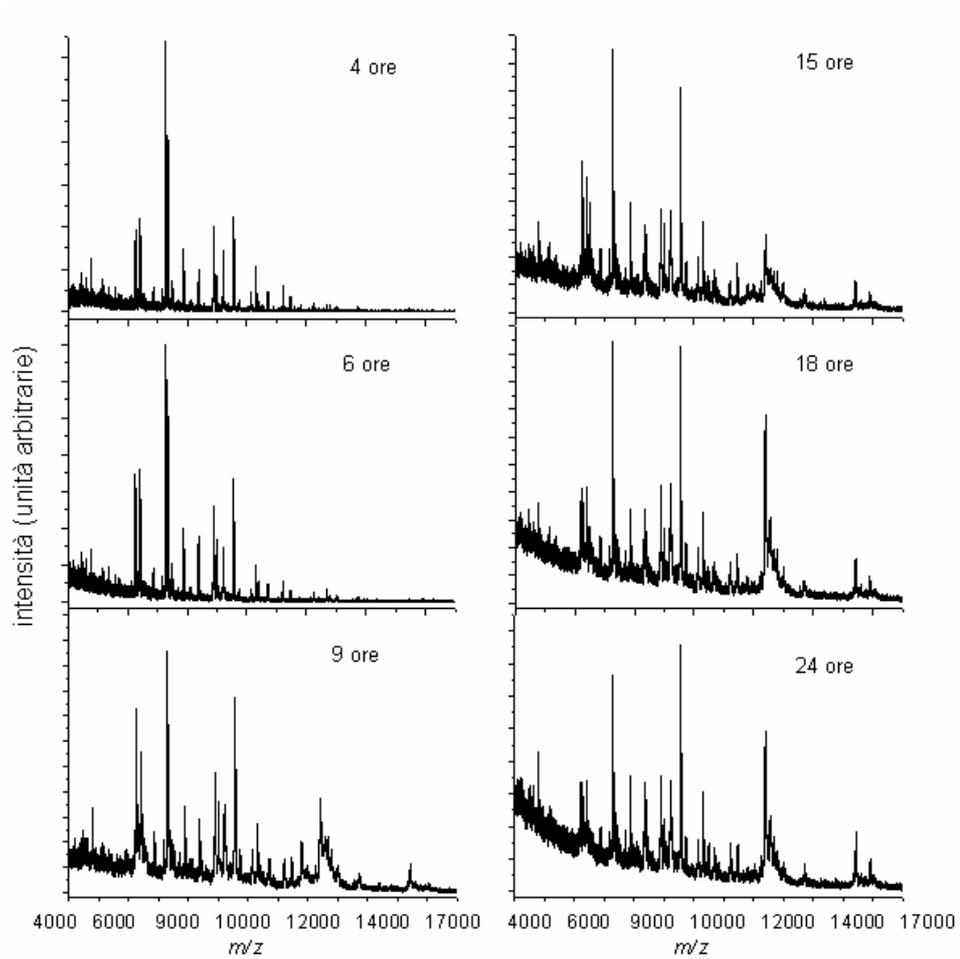


Figura 2.2 Spettri di massa ottenuti dall'analisi di *E. coli* MC1061 a diversi tempi di crescita suspensions (4, 6, 9, 15, 18, 24 ore).

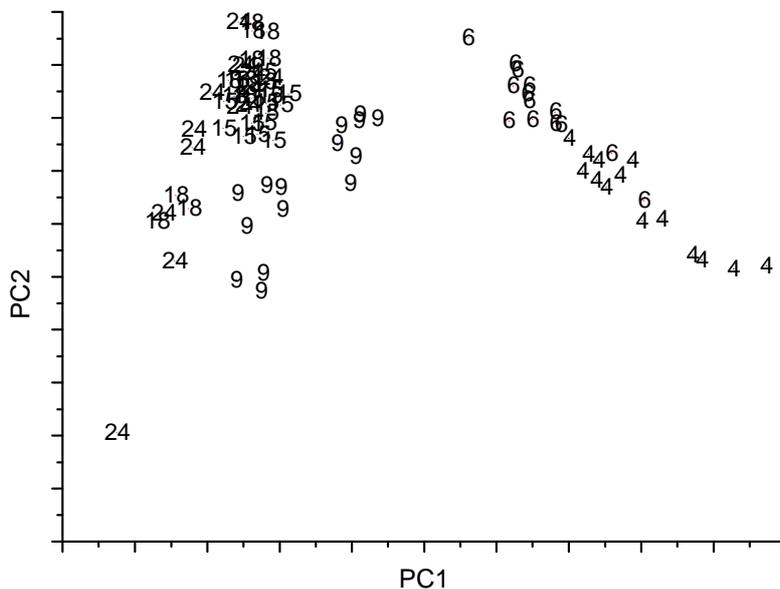


Figura 2.3: Score plot sul piano delle prime due componenti principali per l'analisi degli spettri di massa di *E. coli* MC1061 ottenuti a diversi tempi di crescita. Le prime due componenti principali spiegano 81.087% della varianza totale. I numeri rappresentano il tempo di crescita.

E' stato quindi applicato il metodo di classificazione della LDA dopo una selezione delle variabili rilevanti mediante l'algoritmo SELECT.

SELECT trattiene sempre le prime venti variabili con i più alti pesi di classificazione. Il metodo della LDA ha consentito di discriminare, con elevate percentuali di corretta classificazione e predizione, tra gli spettri di massa registrati a diversi tempi di crescita per tutte e tre le specie batteriche considerate .

Nelle figure 2.4 sono riportate le rappresentazioni grafiche dei risultati ottenuti mediante l'analisi di classificazione per gli *E. Coli* MC1061 (Fig. 2.4a) e per gli *E. coli* O 157:H7 (Fig. 2.4b) in cui gli oggetti sono rappresentati sul piano descritto dalla prima e della seconda variabile canonica (CAN1, CAN2). Una discriminazione particolarmente buona si osserva tra gli spettri registrati nelle prime fasi della crescita (4, 6, 9 h) mentre si ha una parziale sovrapposizione tra gli spettri ottenuti analizzando le sospensioni nelle ultime fasi della crescita. Risultati analoghi sono stati ottenuti dalla LDA di *Y. enterocolitica*.

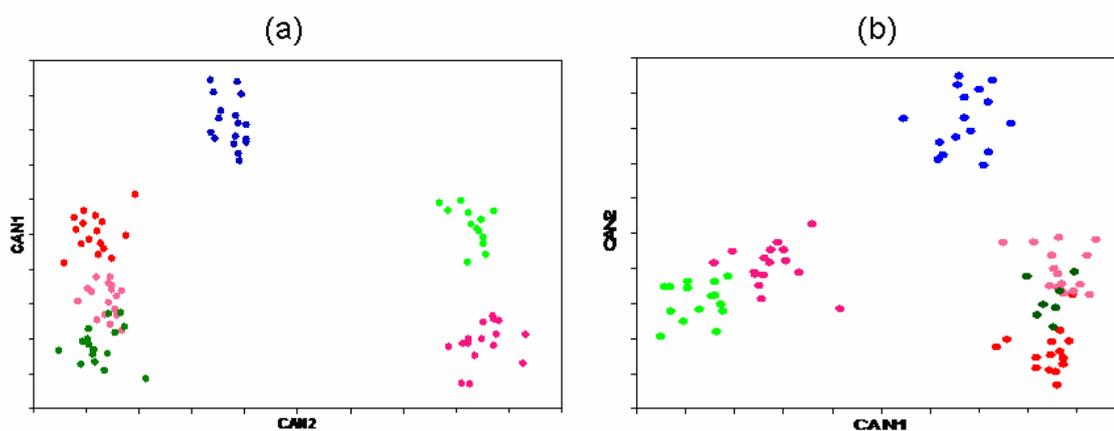


Figura 2.4: Grafico relativo all'analisi LDA degli spettri di (a) *E.coli* MC1061. Gli oggetti (4 ore in verde, 6 ore in viola, 9 ore in blu scuro, 15 ore in rosso, 18 ore in rosa e 24 ore in verde scuro) sono rappresentati sul piano delle prime due variabili canoniche. (b) *E. coli* O157:H7. Gli oggetti (4 ore in verde, 6 ore in viola, 9 ore in blu, 15 ore in rosso, 18 ore in rosa e 24 ore in verde scuro) sono rappresentati sul piano delle prime due variabili canoniche.

Le percentuali in corretta classificazione e predizione del modello per ciascuna specie batterica, calcolate utilizzando 5 gruppi di cross-validazione, sono riportate in (tabella 2.1).

Specie batteriche	% Corretta classificazione	% Corretta classificazione (5 CV)
<i>E. coli</i> MC1061	100%	96%
<i>E. coli</i> O157:H7	100%	97%
<i>Y. enterocolitica</i>	100%	100%

Tabella 2.1: percentuali di corretta predizione e classificazione per ciascuna specie batterica utilizzando 5 CV.

2.3.2 Effetto della composizione del terreno sulle variazioni spettrali.

Per poter valutare l'effetto della composizione del terreno sulle variazioni spettrali sono state analizzate sospensioni di *E. coli* O157:H7 ed *E.coli* MC1061 ottenute crescendo i batteri in diversi terreni di coltura. In particolare i batteri

sono stati cresciuti in terreno LB, in terreno selettivo mTSB (*E. coli* O157:H7) ed in terreno LB contenente Kanamicina (*E.coli* MC1061). In tutti i casi le sospensioni batteriche sono state sottoposte ad analisi MALDI MS e gli spettri ottenuti sono stati confrontati utilizzando il metodo della LDA. Tale metodo ha confermato le variazioni spettrali precedentemente osservate per le sospensioni batteriche analizzate a diversi tempi di crescita, permettendo inoltre di discriminare tra gli spettri di massa di *E. coli* O157:H7 ed *E. coli* MC1061 cresciuti in diversi terreni (Figura 2.5a e 2.5b).

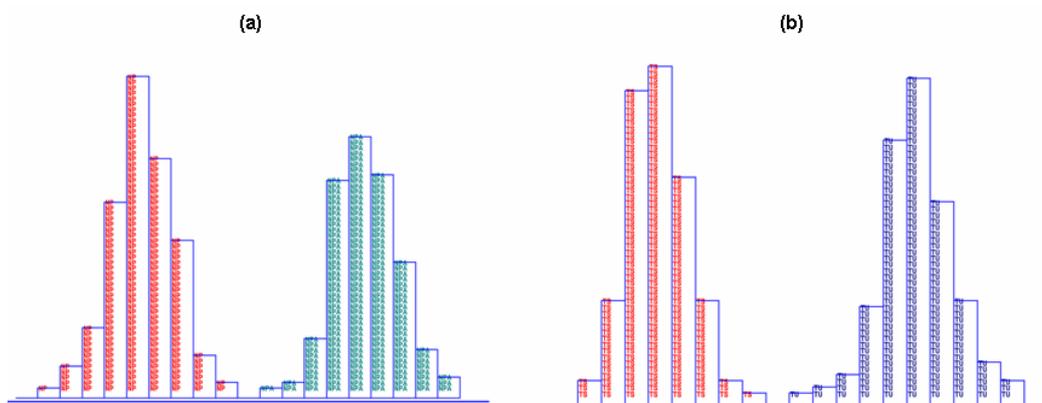


Figura 2.5: Rappresentazione grafica dei risultati ottenuti mediante il metodo della LDA: **(a)** L'istogramma rappresenta gli spettri ottenuti dall'analisi di *E.coli* MC1061 cresciuti in terreno LB in assenza (in rosso) ed in presenza (in verde) di Kanamicina in funzione della prima variabile canonica. **(b)** L'istogramma rappresenta gli spettri ottenuti dall'analisi di *E.coli* O157:H7 cresciuti in terreno LB (in rosso) ed in terreno mTSB (in blu) in funzione della prima variabile canonica.

Per entrambe le specie batteriche considerate sono state ottenute percentuali di corretta predizione e classificazione del 100%. I risultati ottenuti permettono di concludere che gli spettri di massa delle cellule batteriche subiscono variazioni legate sia al tempo di crescita che alla composizione del terreno. Sulla base di quanto osservato, è possibile supporre che anche variazioni di altre condizioni di crescita microbica, quali ad esempio la temperatura, possono causare variazioni nel profilo di espressione proteica dei microrganismi e dunque variazioni spettrali.

2.3.3 Confronto tra gli spettri ottenuti dall'analisi delle diverse specie batteriche.

Sono stati confrontati tutti gli spettri ottenuti dall'analisi dei diversi ceppi batterici utilizzati in questo studio. Nel grafico riportato in Figura 2.7 è illustrata la separazione tra le diverse specie ottenuta mediante analisi LDA degli spettri. Gli oggetti sono rappresentati sul piano delle prime due variabili canoniche.

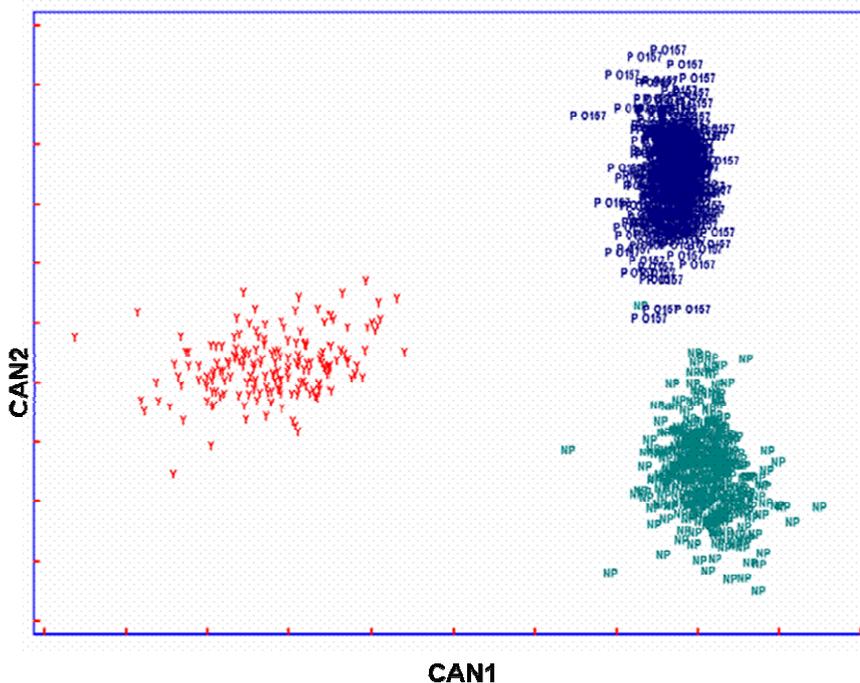


Figura 2.7 Grafico relativo all'analisi LDA degli spettri ottenuti per ogni ceppo batterico. Gli oggetti (spettri relativi a *Y. enterocolitica* in rosso, in verde quelli relativi agli *E. coli* MC1061, in blu quelli relativi agli *E. coli* O157:H7) sono rappresentati sul piano delle prime due variabili canoniche.

E' evidente una netta separazione tra le classi, corrispondenti a *E. coli* MC1061 (in verde), *E. coli* O157:H7 (in blu), e *Y. enterocolitica* (in rosso). La capacità in predizione del modello di classificazione è stata valutata utilizzando un training set costituito da 401 oggetti (spettri), mentre la valutazione della capacità predittiva è stata eseguita utilizzando un test set di 150 oggetti esterni al training set.

I risultati ottenuti indicano che è possibile distinguere i tre ceppi batterici con un'abilità in classificazione del 99.888% e in predizione del 99.888%.

E' interessante notare come le differenze legate al tempo di crescita ed alle diverse condizioni di coltura si annullano quando ciascun ceppo batterico viene confrontato con gli altri. Questo ci consente di affermare che un'analisi chemiometrica degli spettri consente di classificare correttamente ciascuna specie batterica, indipendentemente dalle condizioni di coltura, superando il problema della riproducibilità spettrale.

2.3.4 Verifica del processo d'Immobilizzazione degli anticorpi di cattura sulla superficie d'oro.

E' stata verificata l'efficienza del processo di immobilizzazione degli anticorpi sulla piastra d'oro. A tale scopo è stato impiegato un metodo ELISA sandwich con rivelazione chemiluminescente, utilizzando come modello l'anticorpo anti-*Y. enterocolitica*. Sono stati derivatizzati alcuni spot della piastra con l'anticorpo anti-*Y. enterocolitica* a diverse concentrazioni: 10 µg/mL e 100 µg/mL. Successivamente è stata depositata una sospensione di *Y. enterocolitica* a concentrazione di $\sim 9 \times 10^8$ cell/mL e dopo 1h e 30 min di incubazione a temperatura ambiente, il batterio non legato è stato eliminato mediante lavaggi con PBS. E' stata aggiunta una soluzione di anticorpo secondario marcato con HRP (conc. 1.5 µg/mL). Dopo un ulteriore lavaggio, è stato aggiunto il substrato chemiluminescente ed il segnale chemiluminescente risultante è stato acquisito mediante luminografo.

La localizzazione del segnale chemiluminescente in corrispondenza degli spot della piastra (Figura 2.8) ha permesso di confermare l'avvenuto legame anticorpo-superficie oltre che di scegliere la concentrazione di anticorpo migliore (100 µg/mL) per le successive analisi mediante MALDI/TOF MS.

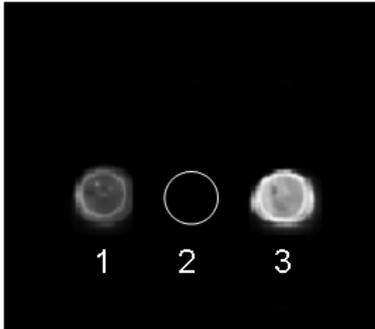


Figura 2.8: Segnale chemiluminescente registrato analizzando *Y. Enterocolitica* su spot della piastra d'oro derivatizzati con Mab anti-*Y. Enterocolitica* alla concentrazione di (1) 10 µg/mL e (2) 100 µg/mL. (2) Immagine di uno spot su cui non era stata depositata la sospensione batterica.

2.3.5 Analisi di batteri in miscela mediante metodo immunometrico con rivelazione MALDI/TOF MS.

Sugli spot derivatizzati con gli anticorpi anti-*Y. enterocolitica* ed anti-*Listeria monocytogenes* state aggiunte sospensioni di *Y. enterocolitica* e *Listeria monocytogenes* a concentrazione ciascuna di $\sim 9 \times 10^8$ cell/mL. Dopo incubazione, i batteri non legati sono stati eliminati mediante lavaggio con PBS ed è stata aggiunta una soluzione di matrice (acido sinapinico). Gli spettri MALDI/TOF registrati per ciascuna specie batterica sono riportati in Figura 2.9 e mostrano profili proteici caratteristici per ciascuna specie analizzata.

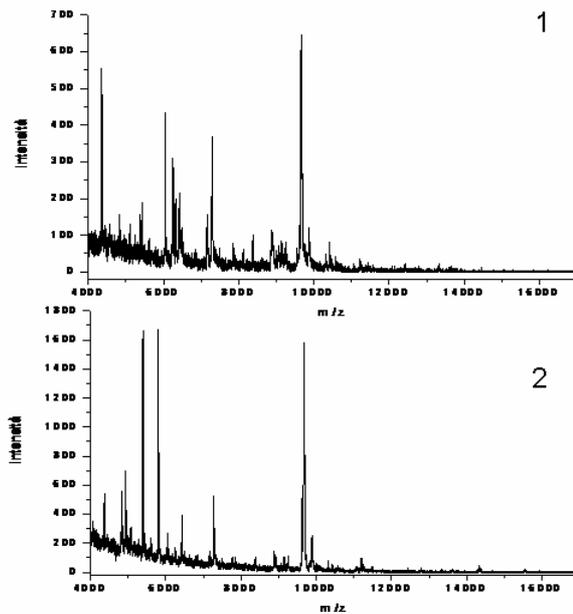


Figura 2.9: Spettri di massa di (1) *Listeria monocytogenes* e (2) *Y. enterocolitica* ottenuti mediante metodo immunometrico con rivelazione MALDI/TOF MS.

Si è quindi proceduto all'analisi di miscele batteriche mediante MALDI/TOF MS. A tale scopo sugli spot derivatizzati con gli anticorpi anti-*Y. enterocolitica* ed anti-*Listeria monocytogenes* sono state incubate sospensioni batteriche costituite da *Y. Enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium* in modo da avere ciascuna specie batterica alla concentrazione finale di $\sim 9 \times 10^8$ cell/mL. Gli spettri di massa ottenuti (Figura 2.10) sono caratteristici di *Y. Enterocolitica* e *Listeria monoyitogenes* e dimostrano che è possibile identificare una specie batterica presente all'interno di una miscela complessa sulla base del suo caratteristico spettro di massa.

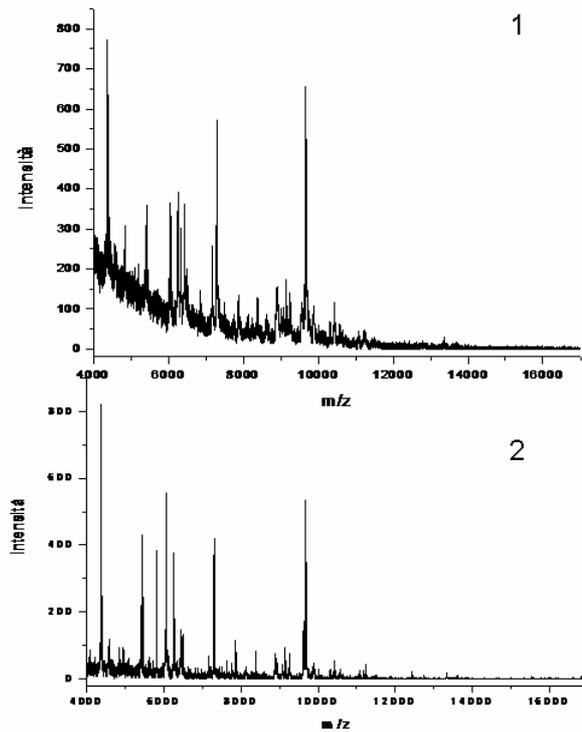


Figura 2.10: Spettri di massa di (1) *Listeria monocytogenes* e (2) *Y. enterocolitica* ottenuti mediante metodo immunometrico con rivelazione MALDI/TOF MS dall'analisi di miscele costituite da *Y. enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*.

E' inoltre possibile affermare che gli anticorpi utilizzati non danno reazioni crociate con le altre specie batteriche presenti nella miscela.

2.4 Conclusioni

E' stato sviluppato un metodo analitico per l'identificazione rapida e accurata dei microrganismi basato sulla tecnica di spettrometria MALDI-TOF ed analisi chemiometrica degli spettri, utilizzando le tecniche della PCA e della LDA.

Sono stati studiati due ceppi batterici patogeni d'interesse alimentare *E. coli* O157:H7 e *Y. Enterocolitica* ed un ceppo di *E. coli* non patogeno, *E. coli* MC1061. I risultati ottenuti, analizzando ciascun ceppo batterico a diversi tempi di crescita (4, 6, 9, 15, 18, 24 ore), hanno evidenziato differenze negli spettri che riflettono variazioni nel profilo di espressione proteica. Poiché il terreno di coltura si depaupera di nutrienti e si satura di prodotti di scarto man mano che le cellule aumentano nel tempo, si può ipotizzare che i batteri debbano adattarsi a queste nuove condizioni modificando il proprio metabolismo proteico. È stato inoltre osservato che anche variazioni del terreno di coltura causano variazioni spettrali che riflettono variazione nel profilo proteico dei microorganismi.

L'analisi multivariata è risultata uno strumento essenziale per estrarre l'informazione utile contenuta negli spettri, che non sempre sono di facile interpretazione, in quanto ricchi di segnali e la cui riproducibilità è stato dimostrato dipendere dalle condizioni sperimentali di coltura.

L'analisi LDA degli spettri ottenuti in tutte le diverse condizioni sperimentali per le tre specie batteriche ha dimostrato che è possibile discriminare tra i microrganismi indipendentemente dalle condizioni di crescita.

Sono state infine valutate la ripetibilità e la riproducibilità del metodo. Gli spettri ottenuti dall'analisi in replicato per ciascun microorganismo sono stati analizzati contemporaneamente con la tecnica della PCA e l'andamento delle repliche è risultato molto simile. Analogamente è stata valutata la ripetibilità analizzando insieme spettri ottenuti da analisi dei batteri condotte in giorni diversi. Anche in questo caso la sovrapposizione tra le serie di dati è risultata buona.

L'impiego della spettrometria di massa MALDI/TOF accoppiata al metodo immunometrico descritto ha consentito di effettuare una rivelazione specifica dei microrganismi patogeni, evitando il rischio di falsi positivi dovuti a fenomeni di cross reattività dell'anticorpo con altre specie batteriche. I risultati ottenuti

hanno dimostrato che il metodo sviluppato permette l'identificazione dei microrganismi target anche in presenza di altri batteri. Tale approccio presenta notevoli vantaggi rispetto ai metodi immunometrici convenzionali. Infatti, non è necessario sintetizzare un tracciante per la rivelazione degli antigeni ed, inoltre, è possibile effettuare analisi multianalita in formato microarray immobilizzando sugli spot della piastra anticorpi specifici per ciascun analita.

Capitolo 3

La tecnica di frazionamento in campo flusso-flusso a fibra tubolare porosa (HF FIFFF) accoppiata alla spettrometria di massa MALDI/TOF per l'analisi del siero intero.

3.1 Introduzione

Il siero del sangue umano è uno dei fluidi biologici di maggiore interesse in proteomica clinica, dal momento che si ritiene che esso contenga la maggior parte delle proteine che circolano all'interno del corpo. L'analisi del profilo proteico del siero umano si presenta quindi come un promettente strumento per la ricerca di indici diagnostici (*biomarker*) di patologie. Uno dei problemi relativi a questo tipo di approccio è legato alla presenza di proteine ad alta abbondanza (*high abundance protein*, HAP) che spesso impediscono la rivelazione di proteine a bassa abbondanza (*low abundance protein*, LAP). Infatti, benché il numero di proteine nel siero umano sia stimato nell'ordine dei milioni [Anderson, 2002], poche proteine ad alta abbondanza come albumina, immunoglobuline, transferrina, aptoglobina e antitripsina costituiscono da sole circa l'85% in peso delle proteine totali del siero, mentre le proteine a bassa abbondanza hanno concentrazioni estremamente variabili e fino a 10 ordini di grandezza inferiori rispetto alle HAP. Il siero contiene inoltre numerosi peptidi, originati probabilmente dalla frammentazione di proteine più grandi la cui natura rimane ancora in gran parte indeterminata e che sono spesso potenziali marcatori di stati patologici. Non è sorprendente che molti metodi analitici applicati all'analisi del proteoma del siero mostrino dei limiti legati prevalentemente alla presenza di proteine con livelli di espressione molto diversi tra loro [Garbis, 2005].

La spettrometria di massa (MS) con sorgenti ioniche soft ed analizzatori a tempo di volo (TOF) è l'odierno metodo di riferimento per la proteomica del

siero. È stato dimostrato, mediante metodi TOF MS, che i biomarkers sono solitamente LAP a basso peso molecolare [Adam, 2002; Petricoin, 2002; Rai, 2002; Yanagisawa, 2003]. Sebbene in molti di questi studi i profili proteici sierici ottenuti abbiano mostrato elevate sensibilità e specificità per la patologia studiata, sono state mosse delle critiche riguardo il significato analitico attribuito ai profili proteici. Infatti, il meccanismo di ionizzazione competitiva da parte delle HAP nella sorgente MALDI può sopprimere i segnali relativi alle LAP, riducendo notevolmente le informazioni analitiche ottenibili dai profili di massa. Molti metodi normalmente utilizzati prevedono quindi la deplezione delle HAP [Righetti, 2001]. Tra questi troviamo i metodi basati su tecniche di immunoaffinità [Pieper, 2003], che soffrono però di alcune limitazioni intrinseche: è necessario concentrare i campioni prima dell'analisi MS in quanto il pretrattamento ne causa un'eccessiva diluizione, inoltre è possibile che si verifichi la co-deplezione di proteine a bassa abbondanza (potenziali biomarkers) associate alle HAP compromettendo l'identificazione dei biomarkers stessi. Inoltre, nel caso della cromatografia di immunoaffinità, è possibile avere fenomeni di cross-contaminazione tra un'analisi e la successiva, che possono compromettere l'accuratezza e la riproducibilità profili proteici che si ottengono. Infine, dopo l'applicazione di un qualunque metodo di deplezione delle HAP, è necessaria l'eliminazione dei sali inorganici contenuti nel campione prima dell'analisi mediante MS, in quanto essi inficerebbero la resa in ionizzazione degli analiti. E' stato riportato l'impiego di sfere magnetiche funzionalizzate per estrarre e concentrare le proteine sieriche prima dell'analisi MALDI/TOF MS [Villanueva, 2004; Baumann, 2005; Yamanishi, 1997; De Noo, 2005]. Analogamente ai metodi di immunoaffinità, questo metodo può causare la parziale co-deplezione di proteine potenziali biomarkers, eventualmente complessati con le HAP del siero. Più recentemente sono state impiegate librerie di ligandi immobilizzati su sferette che hanno dimostrato di poter "equalizzare" il contenuto proteico dei fluidi biologici riducendo la concentrazione delle HAP ed allo stesso tempo aumentando la concentrazione delle LAP [Rigetti, 2006]. Tale tecnologia si è dimostrata estremamente promettente per l'identificazione e la quantificazione di quello che viene definito il "proteoma sommerso", tuttavia la sua applicazione richiede volumi elevati di campione per equalizzare significativamente il contenuto HAP/LAP. Ciò

ostacola applicazioni diagnostiche di questo metodo all'analisi del profilo di espressione proteica sierico, che richiede invece l'impiego di volumi ridotti di campione.

In questo lavoro viene proposto per la prima volta l'impiego della tecnica di frazionamento in campo flusso-flusso a fibra tubolare porosa (HF FIFFF) accoppiata alla spettrometria di massa MALDI/TOF per migliorare la qualità degli spettri di massa ottenuti dall'analisi di siero umano. Come già discusso nel Capitolo 1 la HF FIFFF è una tecnica particolarmente adatta al frazionamento di macromolecole biologiche in condizioni native e si presta inoltre all'accoppiamento *on-line* o *off-line* con tecniche di spettrometria di massa. La HF FIFFF consente di frazionare ed allo stesso tempo di purificare dai sali le proteine sieriche. Campioni di siero umano non trattati sono stati frazionati mediante HF FIFFF utilizzando una fase mobile compatibile con la successiva analisi MALDI/TOF MS. L'efficacia della HF FIFFF nel frazionare proteine, così come complessi proteici è stata inizialmente valutata mediante SDS PAGE delle frazioni raccolte a diversi tempi di eluizione, corrispondenti a diversi valori di peso molecolare delle proteine. Successivamente, le frazioni di siero sono state analizzate mediante MALDI/TOF MS. Per chiarire la ritenzione di proteine a basso peso molecolare è stata valutata l'ipotesi di un possibile meccanismo ibrido HF FIFFF/microdialisi. Tale meccanismo si basa sulla possibilità che le specie a basso peso molecolare, sotto l'azione del campo radiale, vengano in parte ritenute all'interno del canale ed in parte filtrate attraverso i pori della HF in direzione radiale. Questa ipotesi è stata verificata fortificando il siero umano con peptidi e piccole proteine standard, oltre che con albumina di siero bovino, a diverse concentrazioni. E' stato valutato il recupero delle specie aggiunte sia nelle frazioni ritenute in HF che in quelle raccolte dall'uscita radiale del canale. Per evitare la perdita di informazioni dovute all'eccessiva diluizione, le componenti presenti nel filtrato raccolto dall'uscita radiale della HF, sono state sottoposte ad estrazione in fase solida (SPE) prima dell'analisi MALDI/TOF MS.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Campioni

I campioni di siero utilizzati in questo lavoro sono stati ottenuti da donatori sani dopo consenso informato. Gli standard di proteine e peptidi utilizzati in questo lavoro sono descritti in tabella 3.1.

Standard	MW	Origine	Produttore
ACHT (18-39)	2466	Umana	AnaSpec
ACHT (7-38)	3660	Umana	AnaSpec
Insulina bovina	5734	Bovina	AnaSpec
Lisozima	14388	Pollo	Sigma-Aldrich
Citocromo	12327	Bovina	Sigma-Aldrich
Albumina	66589	Bovina	Sigma-Aldrich
IgG	150000	Umana	Sigma-Aldrich

Tabella 3.1: Composizione della miscela utilizzata per fortificare i campioni di siero

3.2.2 HF FIFFF.

L'assetto strumentale e le modalità operative del sistema HF FIFFF sono descritti in letteratura [Reschiglian, 2004, Reschiglian, 2005, Reschiglian 2006; Roda 2006]. Il canale HF è stato assemblato introducendo un pezzo di fibra in materiale polimerico (polisolfone) all'interno di due pezzi di tubo in teflon da 1/8", di uguale lunghezza, il cui diametro interno è di 3mm, raccordati attraverso una connessione a TEE che consente l'uscita del flusso radiale. Le fibre utilizzate in questo lavoro di tesi (ottenute da Sambu SKU, Corea) hanno un cut-off in peso molecolare di 30 kDa, un raggio interno nominale di 0.040 cm ed una lunghezza di 24 cm. La pompa HPLC utilizzata è una pompa modello LC-

2000 Plus (Jasco, Tokyo, Japan), mentre la pompa a siringa è una Model Pump 11 (Harvard Bioscience, Holliston, MA). L'iniezione del campione all'interno del canale hollow fiber utilizzando di una valvola di iniezione modello 7125 (Rheodyne, Cotati, CA) dotata di un loop in PEEK da 20 μ L. La fase di iniezione/focalizzazione/rilassamento ha una durata di 5 min, mentre il punto di focalizzazione è stato determinato come descritto in letteratura [Lee, 1999]. Il flusso radiale (V_{rad}) è stato impostato a 0.4 mL/min, mentre il flusso longitudinale in uscita dal canale (V_{out}) a 0.3 mL/min. La rivelazione spettrofotometrica UV /vis è stata eseguita utilizzando uno spettrofotometro UV6000LP (Thermo Finnigan, Austin, TX) che opera alla lunghezza d'onda di 280 nm. E' stata utilizzata come fase mobile una soluzione di ammonio acetato 5 mM in acqua ultrapura MilliQ (Millipore, mod. Simplicity 185. Molsheim, France). I campioni di siero sono stati analizzati diluiti 1:5 o 1:10 in fase mobile.

3.2.3 MALDI/TOF MS.

Le analisi dei campioni di siero frazionati in HF FIFFF sono state effettuate utilizzando un Voyager DE Pro (Applied Biosystems, Foster City, CA), provvisto di un laser pulsato operante a 337 nm. Sono stati acquisiti ioni positivi in modalità lineare su intervalli di massa/carica compresi tra 2000 e 200000 Da. Il potenziale di accelerazione è stato fissato a 20000 V, mentre il potenziale di griglia ed il tempo di delayed extraction sono stati regolati di volta in volta a seconda dell'intervallo di masse da esplorare. Lo spettro di ogni spot è stato ottenuto dalla media di 100 impulsi laser e sono stati considerati 5 spot per ogni analisi. La calibrazione è stata effettuata utilizzando uno standard esterno di albumina di siero bovino (BSA), considerando gli ioni a singola e doppia carica. La matrice impiegata è stata una soluzione di acido sinapinico (30 mg/mL) in acetonitrile (ACN) 50% / H₂O 50% / acido trifluoroacetico (TFA) 0,1%. La miscelazione del campione avviene direttamente sulla piastra portacampioni depositando 1 μ l di campione ed 1 μ l di matrice. Acido sinapinico, ACN e TFA sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, e l'acqua è stata ottenuta da un sistema di purificazione Milli-Q Plus (Millipore).

3.2.4 SDS PAGE.

I campioni sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 12% (m/v) (PAGE) in tampone sodio dodecilsolfato (SDS) composto da 25 mM Tris pH 6.8, 5% m/v glicerolo, 0.2% m/v SDS, 1% m/v mercaptoetanolo. Le bande sono state rivelate dopo la corsa utilizzando Blu Coomassie (Biorad, Hercules, CA).

3.2.5 Estrazione in fase solida (SPE).

Le frazioni di siero sono state caricate su cartucce Isolute C18 (International Sorbent Technology Ltd, Hengoed, UK). Le cartucce sono state attivate con 5 ml ACN e condizionate con 5 ml di acqua prima di essere caricate col campione. I campioni sono stati poi caricati sulla cartuccia condizionata, lavati con 10 ml di acqua, ed infine eluiti con 5 ml di ACN. L'eluato è stato portato a secco sotto vuoto e ripreso in 20 µl di tampone per le analisi successive.

3.2.6 HF FIFFF - MALDI/TOF MS.

L'accoppiamento Hf FIFFF- MALDI/TOF MS è stato realizzato in modalità *off-line*. Il campionamento è stato effettuato manualmente raccogliendo ad intervalli di tempo regolari (1 min) le frazioni all'uscita del sistema HF FIFFF. Le frazioni così ottenute sono state analizzate mediante MALDI/TOFMS.

3.3 Risultati e discussione.

3.3.1 HF FIFFF di siero umano intero.

In Figura 3.1 è riportato il frattogramma ottenuto dall'analisi di un campione di siero non trattato diluito 1:5 in fase mobile (NH₄Ac 5 mM). Secondo la teoria della ritenzione in HF FIFFF [Jönsson, 1989; Granger, 1992; Carlshaf, 1992; Lee, 1999] le proteine a maggior peso molecolare vengono eluite in tempi più lunghi rispetto alle proteine a basso peso molecolare. Di conseguenza

all'aumentare del tempo di ritenzione si hanno frazioni più ricche in proteine ad alto peso molecolare.

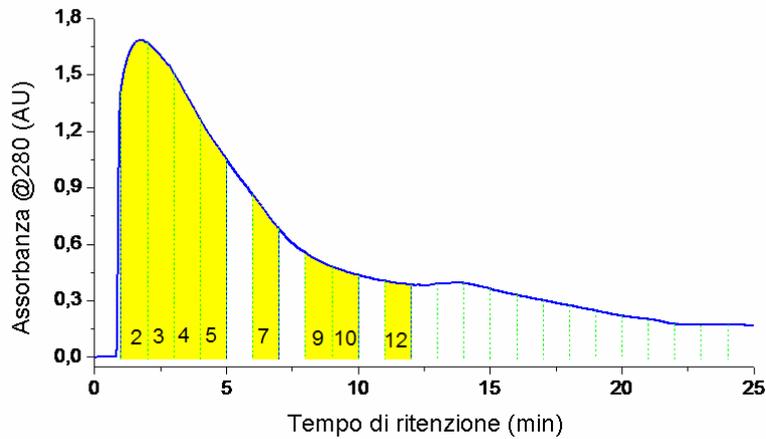


Figura 3.1: Frattogramma di siero umano intero diluito 1:5 in NH_4Ac 5 mM. Le bande in giallo indicano le frazioni raccolte per la successiva analisi mediante SDS PAGE e MALDI/TOFMS.

Sono state raccolte 12 frazioni ed analizzate mediante SDS PAGE. Osservando l'immagine del gel riportata in Figura 3.2 è possibile osservare profili di bande diverse (associabili a diversi profili proteici) corrispondenti alle diverse frazioni analizzate. Come previsto, nelle frazioni più ritenute si osserva una maggiore concentrazione relativa delle proteine ad alto peso molecolare.

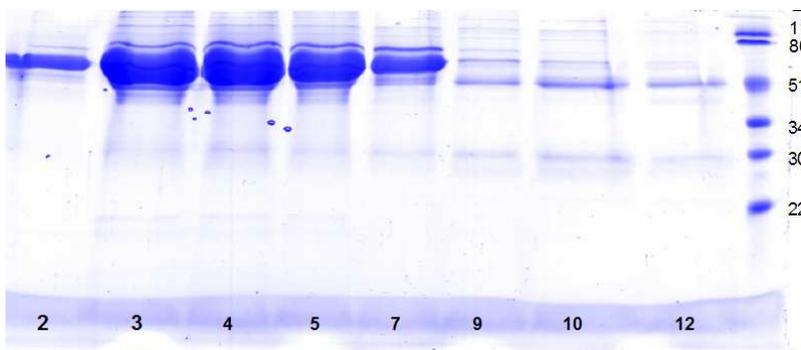


Figura 3.2: SDS PAGE delle frazioni raccolte. Il numero della corsia corrisponde al tempo di eluizione della frazione (min).

Le frazioni da 3 a 5, che corrispondono al massimo d'intensità nel frattogramma di Figura 3.1, contengono la più alta concentrazione relativa di HSA. Questo non è sorprendente dal momento che l'HSA è la proteina a più alta abbondanza contenuta nel siero. È interessante notare come nelle frazioni ottenute a tempi di ritenzione più alti (frazioni 7-12), il contenuto relativo di HSA decresce progressivamente a vantaggio di un progressivo aumento di concentrazione delle proteine a più bassa abbondanza. Inoltre, si può osservare una diminuzione significativa della concentrazione di HSA nella frazione a più bassa ritenzione (frazione 2), in cui ci si aspetta che siano presenti LAP a basso peso molecolare.

Questi risultati hanno suggerito la possibilità di utilizzare la HF FIFFF come processo micro-preparativo per campioni di siero da sottoporre all'analisi MALDI/TOF al fine di incrementare il numero di segnali corrispondenti alle LAP. La capacità della HF FIFFF di eliminare le componenti saline e/o a bassissimo peso molecolare durante il frazionamento (microdialisi) permette di evitare fenomeni di soppressione del segnale in spettrometria di massa, oltre che la formazione di addotti sali/proteine in sorgente di ionizzazione [Reschiglian, 2005], con un miglioramento dei segnali relativi alle LAP nel campione frazionato.

3.3.2 HF FIFFF e MALDI/TOF MS di siero intero

Le informazioni di potenziale interesse diagnostico ottenibili dallo spettro MALDI/TOF di siero intero non trattato sono pressoché nulle. Nelle figure 3.2a e 3.2b vengono mostrati gli spettri ottenuti da campioni di siero intero non trattato, tal quale o diluito 1:5 in ammonio acetato 5 mM.

Analizzando il siero non diluito non è possibile individuare alcun segnale caratteristico nei diversi intervalli di m/z considerati (figura 3.2 (a)). Effettuando una diluizione 1:5 è invece possibile osservare solo i segnali attribuibili a tre proteine ad alta abbondanza nell'intervallo di m/z compreso tra 20000 e 100000 (catena leggera delle IgG, HSA e transferrina; figura 3.2 (b-1)).

Quando i campioni di siero vengono sottoposti ad HF FIFFF e successivamente analizzati in MALDI/TOFMS, si osserva un notevole incremento nel numero di segnali.

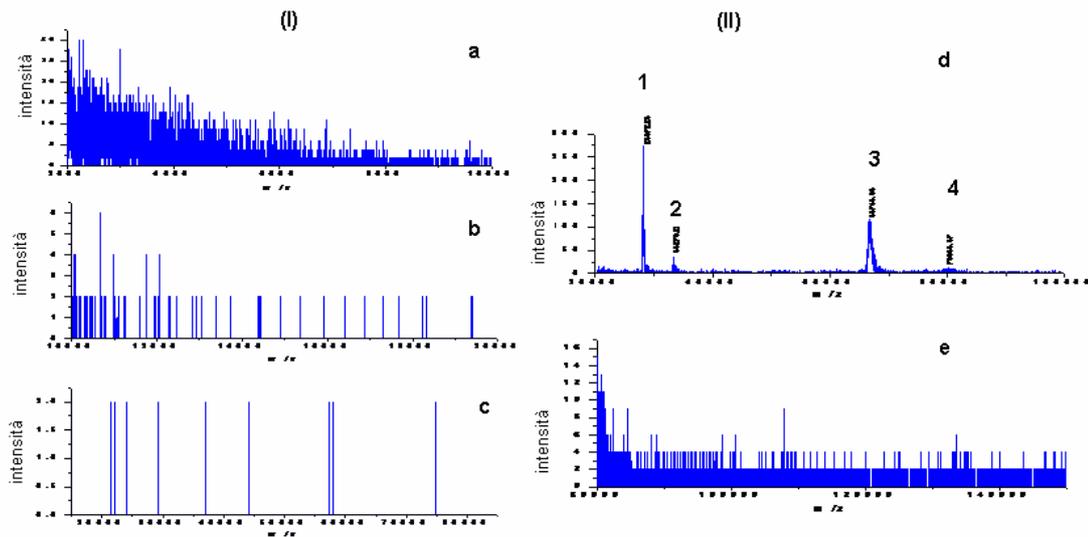


Figura 3.2: Spettri MALDI/TOF relativi all'analisi di siero intero-(I) Spettri ottenuti dall'analisi del siero non diluito in diversi intervalli di m/z: (a) m/z 2000-10000; (b) m/z 10000-20000; (c) m/z 20000-80000. (II) Spettri di siero diluito 1:5 in NH₄Ac 5 mM in diversi intervalli di m/z: (d) m/z 20000-100000 1: catena leggera delle IgG; 2: HSA²⁺; 3: HSA⁺; 4: transferrina; (e) m/z 80000-150000

Tale miglioramento è particolarmente evidente nel caso dei segnali relativi alle LAP a basso peso molecolare ottenuti dall'analisi delle frazioni eluite a più basso tempo di ritenzione.

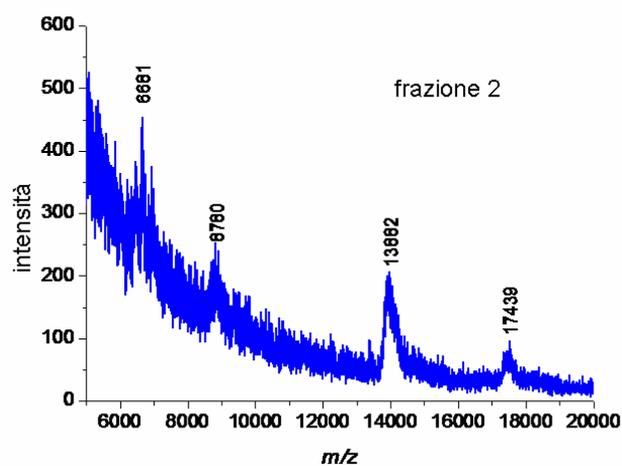


Figura 3.3: MALDI/TOFMS di siero umano frazionato mediante HF FIFFF (frazione 2).

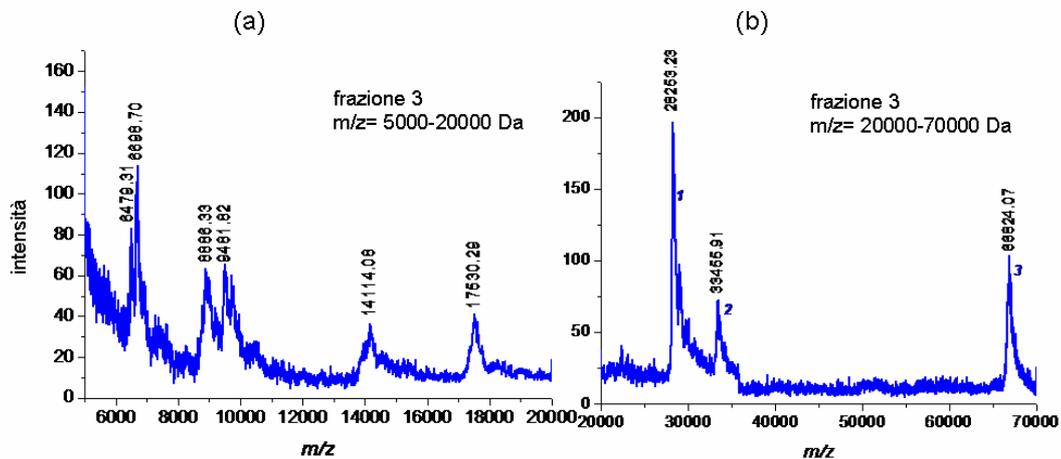


Figura 3.4 (a) (b) MALDI-TOF della frazione 3 del siero raccolta dal canale HF. (a) m/z 5000-20000; (b) m/z 20000-70000 . In questa frazione è possibile osservare segnali attribuibili alla 1: catena leggera delle IgG; 2: HSA²⁺; 3: HSA⁺.

In Figura 3.3 e 3.4 (a) e (b) sono riportati gli spettri ottenuti rispettivamente dall'analisi delle frazioni 2 e 3. Nello spettro relativo alla frazione 2 (Figura 3.3) è evidente la presenza di segnali a m/z inferiori a 20000 Da, che non erano stati osservati negli spettri del siero non frazionato. Nello spettro relativo alla frazione 3 registrato nell'intervallo di m/z compreso tra 20000 e 70000 è possibile osservare segnali attribuibili alla catena leggera delle IgG, all'HSA(H⁺) e HSA(2H⁺) (Figura 3.4b, rispettivamente segnali 1, 2, 3), che erano presenti anche nello spettro del siero non frazionato.

L'incremento di segnali a valori di m/z inferiori a 20000 osservati nelle frazioni precoci è interessante nella prospettiva di un impiego della HF FIFFF per il frazionamento del siero prima dell'analisi MALDI/TOFMS al fine di ottenere profili proteici diagnostici. In questa regione di m/z si concentrano infatti molti segnali d'interesse per l'individuazione di potenziali biomarkers di patologia. Tuttavia, essendo 30000 Da la porosità nominale della HF (*cut-off*), è possibile che proteine con peso molecolare inferiore al *cut-off* della membrana vengano, almeno parzialmente filtrate attraverso i pori, piuttosto che eluite lungo il canale. In effetti, gli spettri MALDI ottenuti dall'analisi delle frazioni precoci hanno

mostrato che alcune specie con peso molecolare inferiore a 30000 vengono ritenute all'interno della HF.

Proteine con un valore di peso molecolare inferiore al cut-off della fibra erano state identificate, in lavori precedenti, anche negli spettri ottenuti mediante un approccio "shot-gun" applicato all'analisi di campioni di urina frazionati in HF FIFFF, e non era stata data alcuna spiegazione di questo fenomeno [Kang, 2006]. Poichè la HF FIFFF non altera le interazioni non covalenti tra proteine, si può ipotizzare le componenti a basso peso molecolare vengano ritenute in seguito alla formazione di complessi proteici tra HAP e LAP. Un fenomeno di questo tipo era stato precedentemente osservato e descritto nel lavoro relativo all'analisi delle impurezze proteiche contenute in campioni di urato ossidasi mediante HF FFFF - MALDI/TOF MS [Roda, 2006]. Se questo fosse il caso si dovrebbero osservare segnali relativi a proteine a basso peso molecolare nelle frazioni raccolte al tempo di ritenzione di specie ad alto peso molecolare. La frazione 3, all'interno della quale si osservano segnali i cui valori di m/z sono addirittura un ordine di grandezza inferiore rispetto al valore di m/z dell' HSA, è stata raccolta proprio in corrispondenza al tempo di ritenzione previsto per il peso molecolare dell'HSA. Anche se in condizioni di bassa ritenzione la selettività in termini di peso molecolare è reattivamente bassa in HF FIFFF, la co-eluzione delle proteine a basso peso molecolare con l'HSA può essere spiegata proprio con la formazione di complessi proteici. Va comunque sottolineato che spesso il cut-off reale delle membrane da ultrafiltrazione, quali la HF, è inferiore a quello nominale, pertanto componenti a basso peso molecolare possono essere ritenuti all'interno del canale, piuttosto che filtrati attraverso i pori. In ogni caso alcune proteine a basso peso molecolare dovrebbero essere trovate, almeno parzialmente, anche nel flusso radiale. Il meccanismo con cui LAP a basso peso molecolare possono essere sia ritenute che filtrate attraverso i pori della fibra è stato oggetto di approfondimento, descritto nel paragrafo successivo.

3.3.3 HF FIFFF/microdialisi di LAP a basso peso molecolare

I campioni di siero sono stati fortificati utilizzando una miscela di due peptidi e tre proteine con pesi molecolari compresi tra 2000 e 14000 Da. La composizione della miscela e la concentrazione delle specie addizionate sono riportate in Tabella 3.2.

Proteina	MW	Concentrazione finale % (m/v)	Origine
ACTH (18-39)	2466	0.06	Umana
ACTH (7-38)	3,660	0.2	Umana
Insulina	5,734	0.3	Bovina
Citocromo C	12,327	0.1	Bovina
Lisozima	14,388	0.1	Pollo

Tabella 3.2 – Composizione della miscela utilizzata per fortificare i campioni di siero.

Quando i campioni di siero fortificati con questa miscela sono stati analizzati mediante MALDI/TOFMS senza frazionamento, sono stati ritrovati solo i segnali relativi ai due componenti aggiunti a più alto peso molecolare, mentre non sono stati osservati i segnali relativi ai peptidi (Figura 3.5).

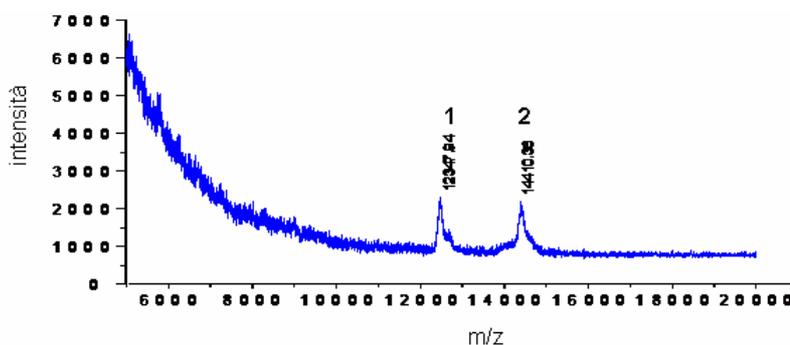


Figura 3.5 – MALDI/TOF MS di siero intero non frazionato rinforzato con la miscela di standard di Tabella 3.2; 1: Citocromo C; 2: Lisozima

L'assenza di tali segnali non può essere attribuita ad una perdita di campione, dal momento che è stata effettuata un'analisi diretta mediante MALDI MS, ma piuttosto ad effetti di concentrazione o legati alla ionizzazione competitiva. Quando il campione di siero fortificato è stato sottoposto ad HF FIFFF prima dell'analisi MALDI/TOFMS, i segnali attribuibili agli standard aggiunti sono stati tutti ritrovati nelle frazioni raccolte (frazione 1 e 2 di figura 3.6).

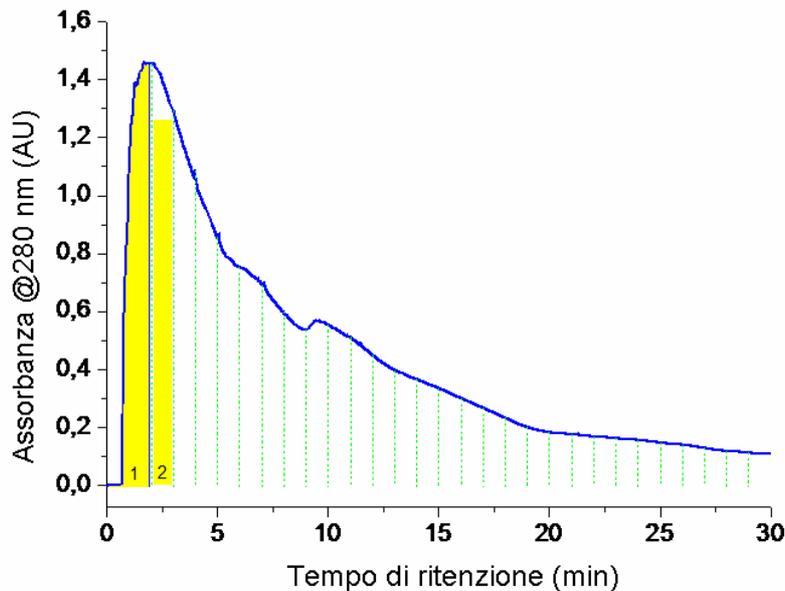


Figura 3.6: Frattogramma di siero umano intero diluito 1:5 in NH_4Ac 5 mM fortificato con la miscela di standard la cui composizione è riportata in Tabella 3.2. Le bande in giallo evidenziano le frazioni sottoposte ad analisi mediante MALDI MS.

Lo spettro ottenuto analizzando la frazione 1 rivela la presenza dei segnali dei peptidi e della proteina a più basso peso molecolare aggiunti (1: ACHT (18-39), $MW=2,466$; 2: ACHT (7-38), $MW=3,660$; 3: insulina bovina, $MW=5,734$) (Figura 3.7), mentre nello spettro della frazione 2 sono stati osservati i segnali dei componenti aggiunti a più alto peso molecolare (1: citocromo, $MW=12,384$; 2: lisozima, $MW=14,388$) (Figura 3.9).

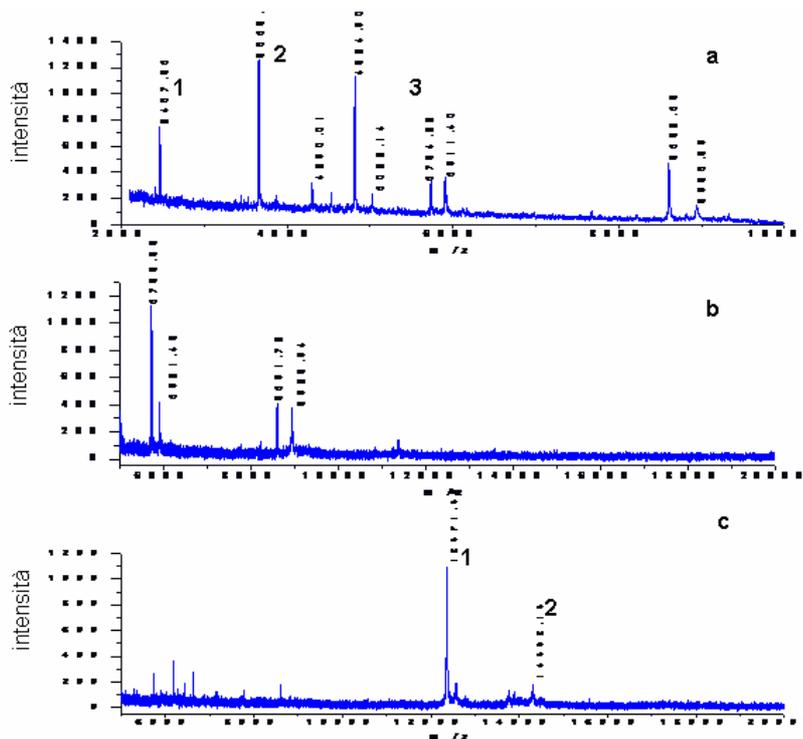


Figura 3.9: MALDI-TOF di frazioni di siero fortificato (a) Frazione 1, m/z 2000-10000, 1: ACHT (18-39); 2: ACHT (7-38); 3: insulina bovina; (b) Frazione 1, m/z 5000-20000; (c) Frazione 2, m/z 5000-20000, 1: Citocromo C; 2: Lisozima.

E' importante notare che nella frazione 2 non è stato osservato nessun segnale dei componenti aggiunti a più basso peso molecolare trovati invece nella frazione 1. Questo indica che i peptidi sono ritenuti selettivamente in base alla loro massa, come previsto dalla teoria della ritenzione, benché possiedano un peso molecolare inferiore al cut-off nominale della membrana usata per il canale. Se si ipotizza che tali specie vengano co-eluite con l'HSA, sottoforma di complessi, una progressiva diluizione del campione dovrebbe favorire la filtrazione dei componenti a basso peso molecolare aggiunti, spostandone l'equilibrio di complessazione con l'HSA e favorendone la migrazione attraverso i pori durante il processo di focalizzazione/rilassamento.

In Figura 3.10 è riportato il frattogramma ottenuto dall'analisi del campione di siero diluito 1:10 e fortificato con le 3 specie a più basso peso molecolare (ACHT (18-39), $MW=2,466$; ACHT (7-38), $MW=3,660$; insulina bovina, $MW=5,734$).

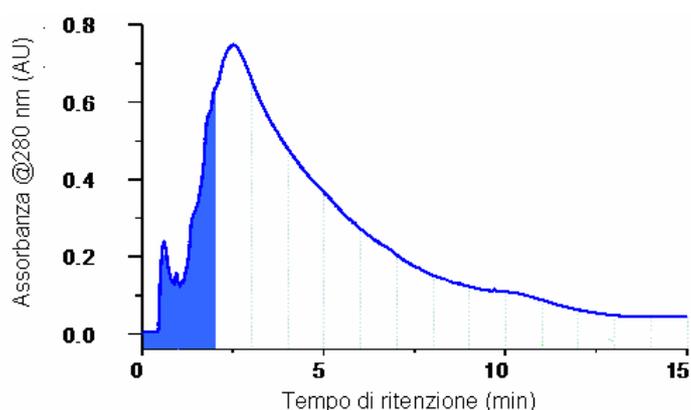


Figura 3.10: Frattogramma di siero umano intero diluito 1:10 in NH_4Ac e fortificato con la miscela di standard a basso peso molecolare riportata in Tabella 3.2.

Lo spettro della frazione meno ritenuta (frazione 1) mostra nuovamente la presenza dei componenti a basso peso molecolare (1: ACHT (18-39), $MW=2,466$; 2: ACHT (7-38), $MW=3,660$; 3: insulina bovina, $MW=5,734$; Fig. 3.11a). Contrariamente a quanto osservato nel caso del campione più concentrato, tali componenti sono stati trovati anche nel fluido raccolto dall'uscita del flusso radiale, previa concentrazione mediante estrazione in fase solida (*solid phase extraction*; SPE) (Figura 3.11b).

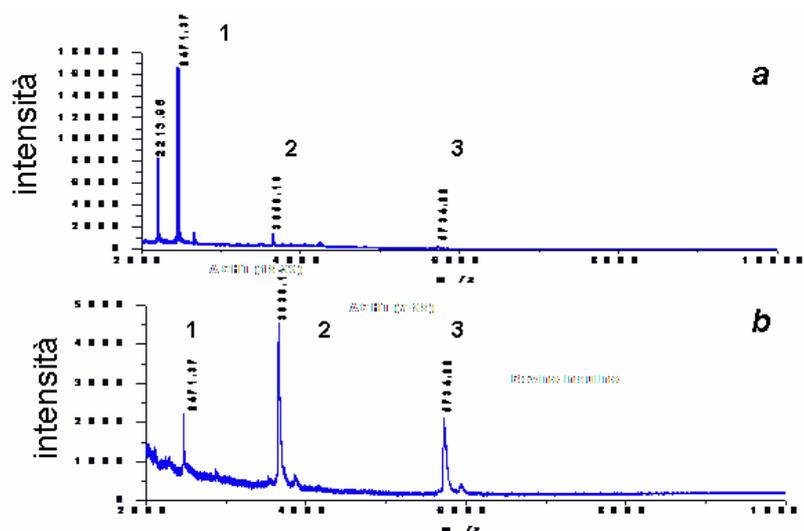


Figura 3.11 – MALDI-TOF di siero intero fortificato. (a) Frazione 1;(b) filtrato del flusso radiale dopo concentrazione tramite SPE. 1: ACHT (18-39); 2: ACHT (7-38); 3: insulina bovina.

I risultati ottenuti indicano che i componenti a basso peso molecolare sono stati in parte ritenuti all'interno del canale HF ed in parte filtrati. Si può ipotizzare che una riduzione della concentrazione di HAP (in questo caso HSA) riduca la possibilità di ritenere le LAP a più basso peso molecolare all'interno del canale. Tale ipotesi è stata verificata sperimentalmente fortificando un campione standard costituito da BSA allo 0.1%, che ben rappresentasse la proteina a più alta abbondanza presente nel siero, con le stesse quantità di componenti a basso peso molecolare utilizzati per fortificare i campioni di siero analizzati precedentemente. Come mostrato in Figura 3.12, in nessuna delle frazioni raccolte sono stati trovati segnali relativi ai componenti aggiunti, che sono invece stati ritrovati interamente nel filtrato.

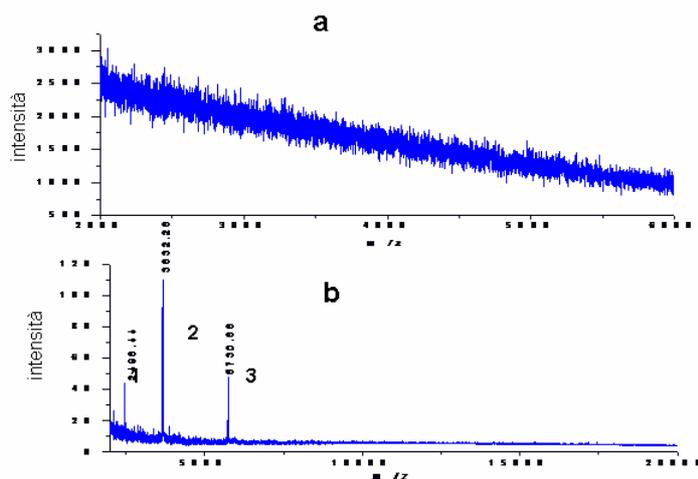


Figura 3.12: MALDI-TOF di BSA 0.1% fortificata con gli standard a basso peso molecolare (a) eluito in HF FIFFF (b)filtrato; 1: ACHT (18-39); 2: ACHT (7-38); 3: insulina bovina

3.4 Conclusioni

L'accoppiamento della HF FIFFF alla spettrometria di massa MALDI-TOF si è dimostrato un valido approccio analitico per la caratterizzazione di proteine intatte del siero nel loro stato nativo. Durante il processo di frazionamento in HF FIFFF gli analiti interagiscono debolmente con il sistema separativo, mantenendo inalterate le loro caratteristiche strutturali. Si è osservato che, grazie alla capacità della HF FIFFF di eliminare sali inorganici dal campione e di ridurre la complessità senza alterare la struttura nativa delle proteine, la qualità degli spettri migliora significativamente dopo il frazionamento. E' stato trovato nelle frazioni precoci un numero consistente di segnali a valori di m/z inferiori ai 20000 Da che non erano stati rilevati senza il frazionamento. Questi segnali possono essere attribuiti a LAP a basso peso molecolare, che sono note per avere un interessante valore diagnostico.

E' stato dimostrato che LAP con peso molecolare inferiore al cut-off dei pori della fibra possono essere ritenute mediante formazione di aggregati e di complessi non covalenti con le HAP, rendendo così possibili studi per l'identificazione di biomarkers trasportati dalle HAP.

Profilo proteico sierico in pazienti con epatopatia cronica mediante spettrometria di massa MALDI/TOF biospecifica ed analisi chemiometrica.

4.1 Introduzione

Si ritiene che molte gravi patologie umane siano dovute a mutazioni genetiche che possono essere ereditate attraverso la via germinale o acquisite somaticamente nel tempo [Calvo, 2005]. Quando i geni subiscono mutazioni codificano proteine alterate che perturbano la normale fisiologia cellulare causando malattie: per questo motivo l'attenzione dei ricercatori si è a lungo concentrata sullo studio del profilo di espressione genica della cellula. Lo studio dei soli geni non si è però rivelato sufficiente in quanto non fornisce alcuna informazione sulle interazioni complesse che ci possono essere tra proteine dopo la loro sintesi, sulla loro localizzazione all'interno di una cellula, ed ancora non consente di comprendere se tali proteine subiscono modifiche post-traduzionali, se sono espresse in maniera stabile e se sono "attive" dal punto di vista funzionale. Per molte malattie, come ad esempio il cancro, la funzione delle proteine è alterata nel contesto dei processi di trasduzione del segnale che regolano le funzioni critiche della cellula (apoptosi, differenziazione, sopravvivenza, immunità, metabolismo e metastasi). Studiare e comprendere quali meccanismi di regolazione proteica sono alterati e a che livello del circuito cellulare questo avviene è quindi estremamente importante in proteomica clinica. La proteomica clinica è quella branca della proteomica che si occupa di studiare e caratterizzare particolari proteine "segnale" prodotte dalla cellula e di correlarne l'espressione con l'insorgere o il progredire di uno stato patologico. Le proteine "segnale" hanno un ampio spettro di potenziali applicazioni, possono ad esempio essere biomarcatori di una data patologia, consentirne la diagnosi precoce, oltre che concorrere allo sviluppo di combinazioni efficaci di inibitori farmacologici [Petricoin, 2002].

La nuova frontiera in proteomica clinica riguarda lo studio dei profili di espressione proteica (protein profiling) associati a fluidi biologici di immediata disponibilità, quali siero, urine, saliva al fine di identificare proteine potenziali biomarkers che consentano una diagnosi precoce e non invasiva della patologia: variazioni dei livelli proteici all'interno dei fluidi biologici spesso infatti corrispondono a variazioni dello stato patologico di un individuo.

Le tecniche più ampiamente utilizzate in proteomica clinica per generare mappe proteiche a partire da fluidi biologici ed identificare le proteine segnale sono l'elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilammide (2D-PAGE) o la cromatografia liquida multidimensionale seguite da un'analisi mediante spettrometria di massa (MS) [Zhao, 1991; Rappsilber, 2003; Tamura, 2003; Sheffield, 2003; Hillenkamp, 1991]. Sebbene queste tecniche siano in grado di risolvere centinaia di proteine e di eliminare le specie che possono causare soppressione del segnale in spettrometria di massa, sono estremamente laboriose, richiedono operatori esperti in grado di garantire una buona riproducibilità ed inoltre non sono adatte per eseguire test diagnostici rapidi. Pertanto si cerca di sviluppare nuovi metodi rapidi e robusti per generare profili proteici allo scopo di individuare ed identificare proteine biomarkers a partire dai fluidi biologici. A tale scopo si è rivelata estremamente promettente è la tecnica di spettrometria di massa Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) [Banks, 2000]. Essa infatti, per il suo meccanismo di ionizzazione, consente l'analisi simultanea di miscele proteiche complesse a partire da piccole quantità di campione. Occorre però sottolineare che l'analisi di proteine all'interno dei fluidi biologici mediante spettrometria di massa richiede una fase di purificazione e prearricchimento del campione: sali non volatili possono influenzare negativamente la qualità e la riproducibilità degli spettri [Brochman, 1997], inoltre proteine ad alta abbondanza (es. albumina e immunoglobuline) sopprimono il segnale relativo alle proteine poco abbondanti, che sono solitamente i potenziali biomarkers. Negli ultimi anni questi problemi sono stati superati grazie all'introduzione della tecnica di spettrometria di massa Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (SELDI-TOF MS) [Fung, 2003; Issaq, 2002]. Il principio di funzionamento di una strumentazione SELDI è analogo a quello di una strumentazione MALDI: la tecnica SELDI MS utilizza però piastre portacampione (*chip array*) a cui sono legate molecole di

cattura aventi proprietà chimico-fisiche diverse (es. anticorpi, fase inversa, etc.) che consentono la purificazione e la preconcentrazione delle proteine a bassa abbondanza presenti all'interno del fluido biologico direttamente *on chip*.

Sebbene la strumentazione SELDI consenta di risparmiare tempo nella fase di preparazione del campione, presenta alcune limitazioni, quali una bassa capacità di legame degli analiti dovuta alla ridotta superficie del chip [Villanueva, 2004], costi elevati ed una bassa risoluzione spettrale se confrontata con una convenzionale strumentazione MALDI-TOF [Petricoin, 2004; Coombes, 2005; Diamandis, 2004]. Pertanto, in alternativa al SELDI, si cerca di sviluppare nuovi metodi rapidi ed economici per la preparazione del campione che precedano l'analisi mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

L'analisi ed il confronto dei profili proteici ottenuti mediante SELDI MS o MALDI MS non è semplice a causa della complessità degli spettri di massa, che presentano un elevato numero di segnali corrispondenti ad altrettante proteine. E' indispensabile pertanto disporre di strumenti bioinformatici adeguati che consentano di gestire ed analizzare dal punto di vista statistico l'elevato numero di dati generato e di estrarne l'informazione utile.

Per questo motivo la bioinformatica sta assumendo un ruolo sempre più centrale in proteomica, si stanno sviluppando nuovi algoritmi statistici per l'analisi univariata e multivariata dei dati (analisi di cluster, analisi delle componenti principali ed analisi di classificazione). La combinazione delle tecniche di spettrometria di massa SELDI o MALDI con opportuni software per la gestione dei dati consente di rivelare eventuali differenze nel profilo di espressione proteica tra soggetti sani e soggetti affetti da patologia, e quindi di individuare quali sono i segnali presenti nello spettro che maggiormente discriminano tra le diverse classi. Un volta individuati tali segnali, occorre isolare le proteine ad essi corrispondenti, identificarle e caratterizzarle al fine di comprendere quale ruolo esse svolgono nell'ambito della patologia e con che grado di sensibilità e specificità possono essere considerate biomarkers.

Obiettivo di questo lavoro di tesi è stato lo sviluppo e l'applicazione di un metodo per l'analisi di profili proteici in siero che combina una tecnica di estrazione selettiva delle proteine poco abbondanti con la spettrometria di massa MALDI-TOF. La tecnica di estrazione selettiva sviluppata impiega

particelle di cellulosa derivatizzate che consentono di ottenere in modo rapido ed economico l'arricchimento selettivo del campione in proteine poco abbondanti oltre che l'eliminazione di sali non volatili. Essa sfrutta il principio della cromatografia di affinità per il metallo IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography), in base al quale atomi elettrondonatori presenti nella sequenza proteica interagiscono mediante legami di coordinazione con uno ione metallico opportunamente immobilizzato su un supporto solido. In questo lavoro la cellulosa è stata derivatizzata con acido imminodiacetico (IDA) come chelante, e come metallo di coordinazione è stato scelto il Cu (II). A seguito di questo trattamento una piccola aliquota della sospensione siero-cellulosa derivatizzata è stata sottoposta ad analisi MALDI-TOF MS al fine di ottenere i profili proteici. In collaborazione con i medici del reparto di Gastroenterologia dell'Ospedale S. Orsola, il metodo è stato applicato allo studio del profilo proteico sierico di pazienti affetti da diverse forme di epatopatia cronica (epatite, cirrosi, epatocarcinoma) oltre che di pazienti trapiantati per epatocarcinoma. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di classificare i soggetti studiati, sulla base di differenze nel profilo di espressione proteica, in gruppi di appartenenza legati allo stato patologico. Infine allo scopo di valutare la specificità dei marcatori proteici per la patologia studiata sono stati analizzati un gruppo di campioni ottenuti da pazienti affetti da rettocolite ulcerosa, una malattia infiammatoria intestinale cronica. L'analisi di classificazione è stata effettuata utilizzando il metodo dell'analisi discriminante lineare (LDA) che consente di estrarre l'informazione utile contenuta negli spettri MALDI. Il metodo sviluppato consente di analizzare simultaneamente un elevato numero di campioni con una buona riproducibilità offrendo inoltre notevoli vantaggi in termini di costi e risoluzione spettrale rispetto alla tecnologia SELDI.

4.2 Epatopatia cronica: eziologia, incidenza e biomarcatori

L'epatocarcinoma (HCC) costituisce un importante problema sanitario nei paesi sviluppati [ICDO, 2000], nei quali si conta più dell'80% dei casi mondiali totali. I tassi di incidenza più alti si registrano nell'Asia sud-orientale (Cina, Giappone, Taiwan) e in alcune aree africane [Stewart, 2003]. Il tumore è, invece, raro in

Europa e negli Stati Uniti. L'incidenza europea è infatti di 7 per 100,000 individui all'anno negli uomini e 2 per 100,000 nelle donne, pari a circa il 2% di tutti i tipi di tumore [Ferlay, 1999]. Nel 2000 sono stati stimati circa 50,000 nuovi casi all'anno [Ferlay, 2001].

L'HCC vede tra i fattori eziopatogenetici più frequentemente associati il virus dell'epatite B (HBV) e il virus dell'epatite C (HCV) [Parkin, 2001].

E' stato stimato che più di 170 milioni di persone in tutto il mondo sono infettate dal virus dell'epatite C e, in concomitanza con la progressione della malattia, l'HCC rappresenta la maggiore causa di morte nei pazienti affetti da cirrosi, poichè nella maggior parte dei casi la neoplasia insorge su fegato cirrotico [Hu, 1999; Fattovich, 1997].

Altri fattori di rischio per l'epatocarcinoma sono l'abuso di alcool, sia in quanto agente eziologico di una discreta fetta delle cirrosi, sia come cofattore rilevante della carcinogenesi epatica anche in soggetti con infezione da HBV o HCV [Stuver, 1998; Seow, 2001].

La messa a punto di metodi affidabili, riproducibili e non invasivi per l'identificazione di marcatori per l'epatocarcinoma ha un significativo impatto sulla salute pubblica.

Il marcatore tumorale caratteristico per l'HCC è l'alfafetoproteina (AFP). L'AFP è prodotta anche durante il periodo fetale ma la sua concentrazione sierica diminuisce fino a diventare normale (inferiore a 10 ng/ml) tra i 6 ed i 12 mesi di età; questa proteina è prodotta dai pazienti affetti da epatocarcinoma.

La percentuale di pazienti con HCC che presenta valori elevati di AFP è estremamente variabile. Studi riportati in letteratura stimano variazioni nella concentrazione di AFP alterate tra il 30% ed il 90% rispetto ai valori normali [Johnson, 2001]. In altri casi può accadere che i pazienti affetti da epatocarcinoma abbiano livelli di AFP di poco superiori alla norma (>14 ng/ml) fino a raggiungere concentrazioni molto elevate (~1.000.000 ng/ml). L'AFP è il marcatore più estensivamente utilizzato nella diagnosi e nel monitoraggio dell'HCC, pur non essendo un marcatore ad elevata sensibilità e specificità: per sensibilità si intende la capacità di identificare correttamente i pazienti affetti dalla patologia, quindi la percentuale di pazienti malati che risultano positivi al test; per specificità si intende invece la capacità di identificare correttamente gli individui sani, cioè la probabilità che un paziente sano risulti negativo al test. I

livelli di AFP infatti possono essere normali nel 40% dei pazienti con epatocarcinoma, in particolare negli stadi iniziali (bassa sensibilità) [Sherman, 1995] ed elevati livelli di AFP possono essere riscontrati in pazienti cirrotici o con forme esacerbanti di epatiti croniche (bassa specificità) [Di Bisceglie, 1989].

Studi prospettici finalizzati a valutare le performance diagnostiche dell'AFP per il monitoraggio dell'HCC riportano una sensibilità variabile fra il 39% e il 64%, una specificità compresa fra il 76% e il 91% mentre il potere predittivo positivo è compreso fra il 9% e il 32% [Peteran, 1993; Oka, 1994].

La combinazione di AFP ed ecografia addominale aumenta la specificità della diagnosi. Attualmente questi esami rappresentano il principale approccio utilizzato per la diagnosi e lo screening dell'epatocarcinoma.

Dato che l'HCC nel 90% dei casi è associata a cirrosi, è altamente probabile che tutti i marcatori di danno epatico siano alterati. Per incrementare la specificità diagnostica dell'AFP sono stati proposti e studiati altri biomarcatori. Tra questi ha suscitato grande interesse la des-gamma-carbossi protrombina (DCP) definita anche protrombina indotta dall' assenza di vitamina K-II (PIVKA-II). La DCP è una protrombina anomala i cui valori risultano aumentati nel siero dei pazienti affetti da HCC [Weitz, 1993].

La sua produzione è probabilmente il risultato di un difetto acquisito nella carbossilazione post-translazionale del precursore della protrombina nella cellula tumorale [Ono, 1990].

La riduzione della produzione dell'attività gamma-carbossilasica in pazienti affetti da HCC sarebbe dovuta ad una anomala espressione del gene che codifica per l'enzima [Liebman, 1989].

Un limite intrinseco nell'impiego della DCP come marcatore sembrerebbe rappresentato dalla sua non specificità per il tessuto tumorale. Alcuni studi hanno dimostrato che la concentrazione sierica di DCP non è correlata con la concentrazione del marcatore nel tessuto tumorale [Tang, 2003], ma di contro in altri studi riportati in letteratura, [Marrero, 2003] è stata trovata una significativa correlazione fra i livelli serici di DCP e l'espressione della stessa nel tessuto epatico non tumorale. Integrando questi risultati è possibile concludere che valori elevati di DCP possono essere dovuti ad una sua produzione e

secrezione in parte dal tessuto neoplastico ed in parte del tessuto epatico normale che circonda la neoplasia.

E' stato valutato che la sensibilità della DCP come marcatore tumorale è compresa fra il 48% e il 62%, la specificità fra l'81% e il 98% mentre l'accuratezza nella diagnosi differenziale tra pazienti con HCC e con cirrosi è compresa tra il 59% e l'84% [Nakagawa, 1999; Tsai, 1990].

Sebbene ci siano differenze rilevanti per quanto riguarda la sensibilità di AFP e DCP come marcatori tumorali, è stato dimostrato che la loro combinazione ha una miglior sensibilità diagnostica rispetto a ciascuno dei due marcatori considerati singolarmente [Brunello, 1993; Grazi, 1995].

Attualmente si stanno effettuando nuovi studi per chiarire meglio il ruolo della DCP nella patologia dell'HCC, e si cerca di trovare nuovi marcatori proteici altamente sensibili e specifici per effettuare una diagnosi precoce di tale patologia.

4.3 Materiali e metodi

4.3.1 Studio di popolazione

I campioni di siero utilizzati in questo lavoro di tesi sono stati forniti dal Dipartimento di Gastroenterologia dell'Ospedale Sant'Orsola di Bologna. Sono stati studiati 4 gruppi di pazienti: (1) pazienti affetti da epatite C (HCV) ed epatite B (HBV) (n=19); (2) pazienti affetti da cirrosi epatica senza noduli sospetti o maligni (n=13); (3) pazienti con epatocarcinoma (HCC) diagnosticato nel corso di un'epatopatia cronica (n=12); (4) pazienti portatori di trapianto per epatocarcinoma (n=11). Sono stati utilizzati come campioni di controllo sieri ottenuti da donatori sani (n=17). Sono stati inoltre analizzati sieri ottenuti da pazienti affetti da rettocolite ulcerosa (n=18), al fine di valutare la specificità dei marcatori proteici per l'epatopatia cronica.

I sieri ottenuti sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'analisi.

Per ciascun paziente sono state raccolti dati clinici: informazioni riguardanti età, sesso, eziologia delle diverse forme di epatopatia sono riportate nella tabella 1.

I donatori sani scelti per lo studio avevano età paragonabili a quelle dei donatori affetti da epatopatia e presentavano inoltre parametri biologici nella norma.

Prove inter ed intra saggio sono state effettuate al fine di valutare la ripetibilità e la riproducibilità del metodo.

Occorre sottolineare che i risultati discussi in questo lavoro sono stati ottenuti utilizzando un numero di campioni non elevato, pertanto devono ritenersi preliminari.

	Gruppo 1 HCV-HBV	Gruppo 2 CIRROSI	Gruppo 3 HCC	Gruppo 4 OLT
Sesso (M/F)	12:7	8:5	8:4	7:4
Età (anni)	55 ± 6	58 ± 8	60 ± 5	54 ± 4
eziologia				
HCV	63	54	50	
HBV	37	15	17	
alcool		23	33	
autoimmune				
criptogenetica		8		

Nota : M = maschio F = femmina

Tabella 1 : informazioni demografiche ed eziologia delle diverse forme di epatopatia.

4.3.2 Derivatizzazione della cellulosa con IDA- Cu²⁺

10 g di cellulosa microgranulare (Sigma, St. Louis, MO) sono stati sospesi in 500 mL di una soluzione di NaOH 3 M (Carlo Erba, Milano, Italia). Dopo 2 minuti sono stati aggiunti 200 mL di epicloridrina (Sigma) e la sospensione è stata fatta reagire per due ore. Trascorso questo tempo il prodotto di reazione è stato lavato con acqua MilliQ (Milli-Q Plus, Millipore, Bedford, MA) fino ad ottenere un pH neutro e successivamente esso è stato immerso in una soluzione 0,7 M di Na₂CO₃ (Carlo Erba, Milano, Italia) contenente 24g di acido imminodiacetico (IDA) (Sigma). La reazione è stata condotta per tutta la notte a

temperatura ambiente. La cellulosa-IDA così ottenuta è stata lavata con acqua MilliQ fino a pH neutro e lasciata asciugare. In Figura 4.1 è riportato lo schema della reazione sopra descritta.

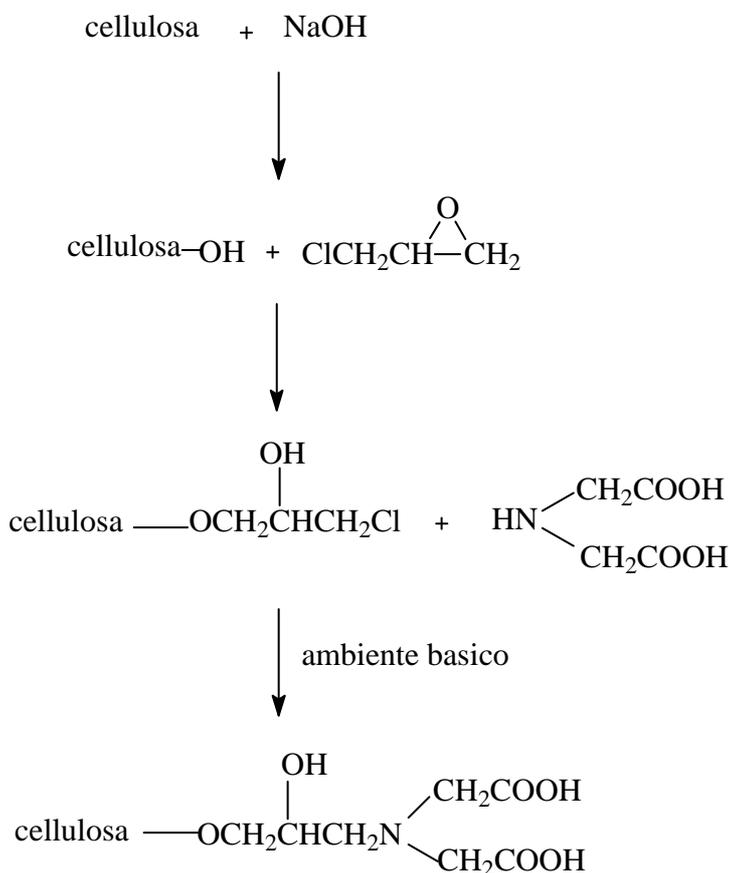


Figura 4.1: sintesi della cellulosa funzionalizzata con IDA.

La cellulosa-IDA è stata immersa in una soluzione di CuSO_4 50 mM per 1.5 h per formare il complessi IDA-Cu (II). Il prodotto di reazione è stato poi lavato con H_2O per eliminare il rame in eccesso, asciugato e conservato a temperatura ambiente.

4.3.3 Attivazione della cellulosa-IDA- Cu^{2+}

3 mg di cellulosa-IDA-Cu(II) sono stati introdotti in heppendorf, attivati con una soluzione di CH_3COONa 50 mM per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo

aver centrifugato per 1 minuto a 13000 rpm è stato eliminato il surnatante ed il materiale è stato equilibrato per 2 volte con 200 µL di PBS a pH 7.4.

4.3.4 Preparazione del campione

40 µL di siero sono stati trattati con 30 µL di urea 8M (Sigma-Aldrich) contenente 3-[(3-colamidopropil) dimetilammonio]-1-propansulfonato (CHAPS) all'1% (Sigma) in PBS pH 7.4 per qualche minuto sotto agitazione. Successivamente sono stati aggiunti 100 µL di urea 1M contenente 0.125% di CHAPS. La miscela così ottenuta è stata diluita in rapporto 1:5 in PBS e vortexata a 4°C per 10 minuti.

Un'aliquota di 400 µL del siero trattato come descritto sopra sono stati aggiunti alla cellulosa IDA-Cu²⁺ e la sospensione è stata incubata per 2h a 30°C sotto agitazione (1500 rpm in termomixer).

Per rimuovere la frazione proteica non legata alla cellulosa derivatizzata sono stati effettuati tre lavaggi utilizzando 200 µL di PBS. Un ultimo rapido lavaggio è stato effettuato con 200 µL di acqua MilliQ al fine di rimuovere i sali non volatili.

4.3.5 MALDI/TOF MS

Le analisi sono state effettuate utilizzando uno spettrometro di massa MALDI/TOF Voyager DE Pro (Applied Biosystem, Foster City, CA), che utilizza un laser pulsato, ad azoto, con lunghezza d'onda di 337 nm.

L'analisi dei campioni è stata condotta in modalità di ionizzazione positiva, in lineare, acquisendo gli spettri in un intervallo di m/z compreso tra 2000 e 10000. L'acquisizione è stata eseguita mediando 120 colpi di laser per ciascuno spot e impostando un potenziale di accelerazione di 25 KV, un potenziale di griglia del 93% ed un tempo di estrazione degli ioni di 200 ns.

L'analisi è stata eseguita depositando su ciascuno spot della piastra portacampione MALDI 1µL di sospensione di siero-cellulosa-IDA-Cu²⁺ miscelato con un ugual volume di una soluzione di matrice costituita da acido sinapico (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 30 mg/mL in 50% H₂O, 50%

acetonitrile (Carlo Erba, Milano, Italia), 0.1% di acido trifluoroacetico (TFA) (Sigma).

Gli spettri sono stati inizialmente calibrati utilizzando la miscela di calibrazione 2 (Applied Biosystems) costituita da Angiotensina 1 (2.0 pmol/ μ L), ACTH [1-17 clip] (2.0 pmol/ μ L), ACTH [18-39 clip] (1.5 pmol/ μ L), ACTH [7-38 clip] (3.0 pmol/ μ L), insulina bovina (3.5 pmol/ μ L).

Al fine di ridurre l'errore associato al calcolo del peso molecolare da parte dello spettrometro di massa gli spettri sono stati ricalibrati internamente utilizzando una serie di segnali opportunamente scelti.

4.3.6 Analisi dei dati

L'analisi multivariata degli spettri è stata effettuata utilizzando il programma PARVUS. I file contenenti gli spettri di massa sono stati esportati in formato ASCII, formato compatibile con PARVUS. Poiché il numero di variabili contenute all'interno di ciascuno spettro risultava troppo elevato per poter essere analizzato mediante PARVUS, è stato sviluppato un programma in grado di ridurre il numero di variabili e di mediare le informazioni ottenute acquisendo gli spettri relativi allo stesso campione su spot diversi della piastra portacampione. In particolare sono stati scelti 4 spettri per ciascun campione, ciascuno spettro è stato suddiviso in intervalli costituiti da 5 valori di m/z e su ciascun intervallo è stata calcolata la media delle intensità relative. E' stato così ottenuto uno spettro medio costituito dalle intensità medie dei quattro spettri originali. E' stata eseguita la scalatura utilizzando l'algoritmo CHANGE ed una selezione delle variabili rilevanti mediante l'opzione SELECT. Successivamente è stata effettuata l'Analisi Discriminante Lineare mediante l'algoritmo CLASS.

Le percentuali in corretta predizione e classificazione del modello di classificazione sono state calcolate utilizzando 5 gruppi di cross-validazione.

4.4 Risultati e discussione

4.4.1 Riproducibilità dei profili sierici ottenuti dopo trattamento con la cellulosa derivatizzata.

L'IMAC è una tecnica di cromatografia per affinità che trova un largo impiego nella purificazione delle proteine. Essa sfrutta le interazioni tra residui amminoacidici elettrondonatori esposti presenti nella sequenza proteica (es. l'anello imidazolico delle istidine, il gruppo tiolico delle cisteine, o il gruppo indolico del triptofano) e ioni metallici quali Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{2+} , Al^{3+} , chelati da un ligando tridentato immobilizzato su un supporto solido. Solitamente i materiali di supporto impiegati sono gel con caratteristiche idrofile come il Sepharose o il Sephadex, ma è stato visto che la cellulosa è un materiale che presenta delle ottime caratteristiche per poter essere sfruttato come supporto IMAC [Yang, 1998]. Per questo motivo in questo lavoro sono state usate particelle sferiche di cellulosa, comunemente utilizzate in cromatografia [Bonn, 1990; Yang, 1997]. Dopo aver derivatizzato la cellulosa con IDA-Cu (II), come descritto nel capitolo 4, sono state effettuate prove per verificare la sua capacità di interazione con le proteine sieriche. A tale scopo un'aliquota di siero è stata trattata con urea e CHAPS. Questa prima fase di preparazione del campione è estremamente importante: l'urea ed il detergente hanno la funzione di denaturare le proteine presenti nel siero. Poichè spesso le piccole proteine, potenziali biomarkers, sono veicolate nel siero da proteine abbondanti come l'albumina, il processo di denaturazione ne permette il rilascio ed il successivo arricchimento per interazione con la fase stazionaria. Il siero così trattato è stato aggiunto alla cellulosa attivata ed incubato per il tempo necessario a garantirne l'interazione. Dopo avere effettuato dei lavaggi per rimuovere le proteine non legate, la sospensione siero cellulosa-IDA-Cu(II) è stata analizzata mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. I tamponi di attivazione e di lavaggio della cellulosa derivatizzata sono stati scelti seguendo quanto riportato in letteratura [Feuerstein, 2005]. In Figura 4.2 viene mostrato lo spettro di massa ottenuto analizzando un campione di siero ottenuto da un donatore sano dopo trattamento con cellulosa-IDA-Cu(II).

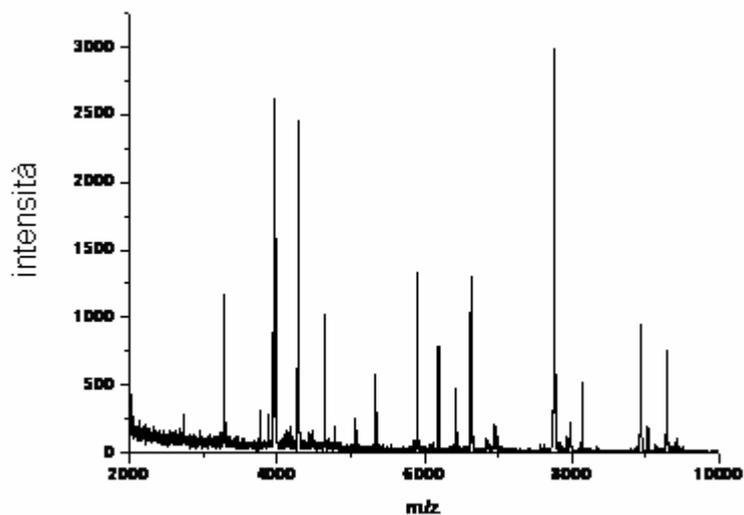


Figura 4.2: spettro di massa di un campione di siero dopo trattamento con cellulosa-IDA-Cu(II).

Lo spettro ottenuto presenta un buon rapporto segnale/rumore ed un elevato numero di segnali nell'intervallo di m/z scelto per l'analisi. Per poter valutare la ripetibilità e la riproducibilità del metodo analitico uno stesso campione di siero è stato trattato in duplicato ed a distanza di una settimana con la cellulosa derivatizzata e ne sono stati acquisiti gli spettri MALDI. E' stato osservato come in entrambe i casi gli spettri siano riproducibili e di buona qualità in termini di rapporto segnale/rumore (Figura 4.3). Risultati analoghi sono stati ottenuti ripetendo lo stesso esperimento con altri sieri ottenuti da diversi donatori.

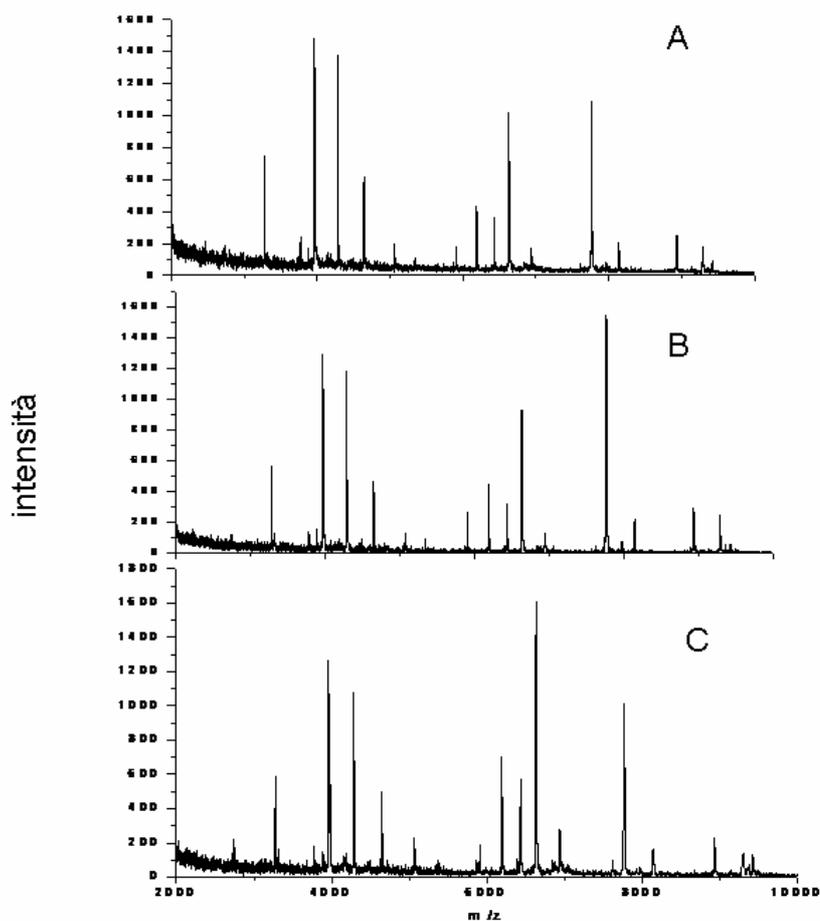


Figura 4.3: spettri ottenuti in duplicato (A, B) ed a distanza di una settimana (C) dall'analisi del siero di uno stesso donatore dopo trattamento con la cellulosa derivatizzata.

4.4.2 Analisi di classificazione dei profili proteici ottenuti da sieri di controllo e patologici.

Il metodo è stato applicato all'analisi di campioni patologici. Una serie di campioni di controllo e di campioni ottenuti da donatori affetti da diverse forme di epatopatia cronica sono stati trattati utilizzando la cellulosa-IDA-Cu(II) e ne sono stati acquisiti gli spettri di massa MALDI. In Figura 4.4 sono riportati gli spettri ottenuti per ciascun gruppo di campioni analizzato.

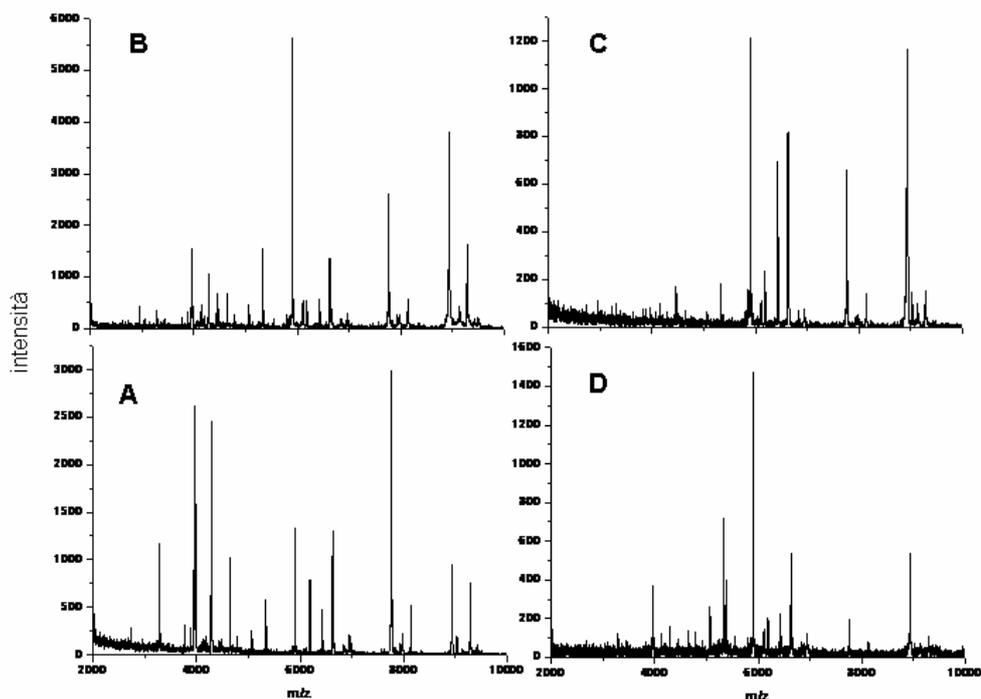


Figura 4.4: spettri MALDI ottenuti dopo trattamento con cellulosa derivatizzata del siero di un donatore sano (A), di un paziente affetto da epatite C (B), di paziente affetto da cirrosi (C) e ed uno affetto da epatocarcinoma (D).

Gli spettri sono stati esportati come file ASCII e pretrattati, per poter essere analizzati con il programma PARVUS.

Dopo una selezione di 10 variabili, tramite l'opzione SELECT, tutti gli oggetti considerati sono stati analizzati con il metodo dell'LDA ed i risultati ottenuti sono stati rappresentati graficamente sul piano della prima e della seconda variabile canonica. Per visualizzare meglio cosa accade alle diverse classi di spettri quando vengono analizzate insieme si è ritenuto opportuno riportare due rappresentazioni, una prima che include le classi dei donatori sani, affetti da epatite e da cirrosi (Figura 4.5) ed una seconda in cui viene considerata anche la classe dei donatori affetti da epatocarcinoma (Figura 4.6).

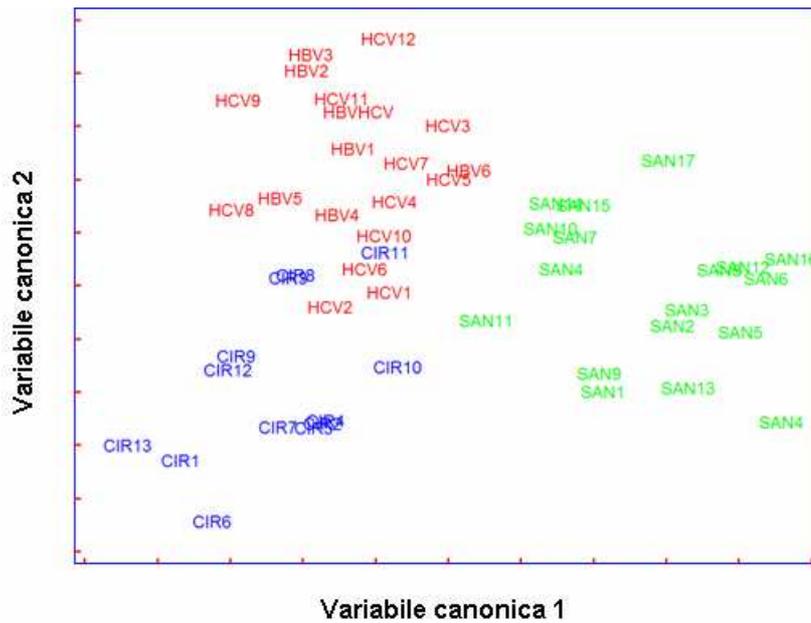


Figura 4.5: grafico LDA relativo all'analisi degli spettri sierici ottenuti da donatori sani (SAN), affetti da epatite (HCV/HBV), affetti da cirrosi (CIR). Gli oggetti sono rappresentati sul piano descritto dalla prima e dalla seconda variabile canonica.

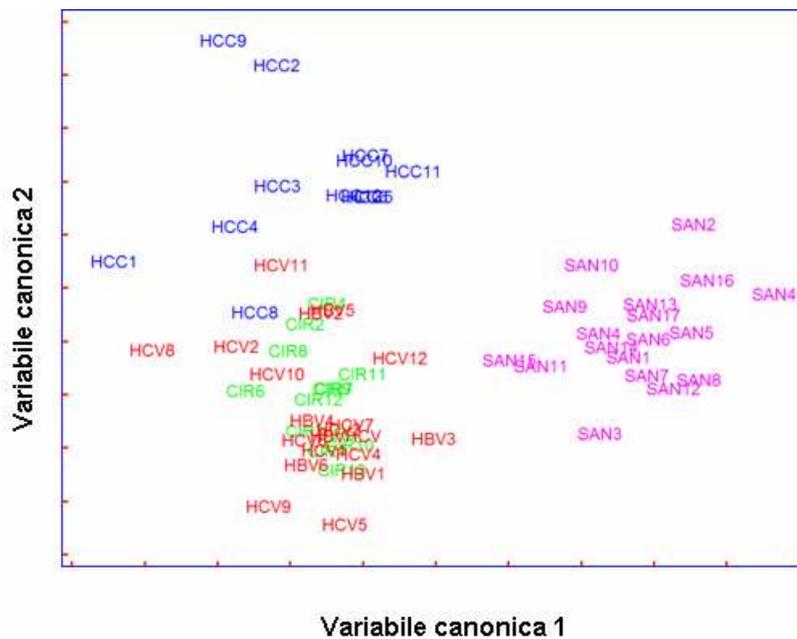


Figura 4.6: grafico LDA relativo all'analisi degli spettri sierici ottenuti da donatori sani (SAN), affetti da epatite (HCV/HBV), affetti da cirrosi (CIR) ed affetti da epatocarcinoma (HCC). Gli oggetti sono rappresentati sul piano descritto dalla prima e dalla seconda variabile canonica.

Il grafico di Figura 4.5 mostra una sovrapposizione tra alcuni degli oggetti appartenenti alla classe costituita da pazienti affetti da epatite e quelli appartenenti alla classe dei pazienti affetti da cirrosi. Essa risulta ancora più netta nella rappresentazione grafica di Figura 4.6, in cui viene inclusa la classe dei donatori sani. Tale sovrapposizione potrebbe derivare da un errore nella classificazione del modello matematico dovuto al numero limitato di oggetti costituenti il training set. Un'altra possibile ipotesi è che esista un'effettiva somiglianza tra profili proteici dei soggetti affetti da cirrosi ed epatite. Per la prima elaborazione l'abilità in corretta classificazione e in corretta predizione del modello sono risultate essere rispettivamente del 96% e del 86%, mentre nella seconda del 95,2% e del 80,7%. Tali percentuali possono essere considerate buone considerato il numero di campioni analizzati.

4.4.3 Analisi di classificazione dei profili proteici ottenuti da sieri di pazienti a diversi stadio di epatopatia.

Sono stati confrontati con il metodo dell'LDA gli spettri MALDI ottenuti dall'analisi del siero di pazienti ad un diverso stadio di epatopatia, al fine di classificarli sulla base del profilo di espressione proteica. Anche in questo caso gli spettri opportunamente pretrattati sono stati sottoposti ad una selezione di variabili prima dell'analisi chemiometrica. Per la costruzione del modello di classificazione sono stati utilizzati 44 oggetti e sono state selezionate 10 variabili. I risultati sono rappresentati graficamente sul piano descritto dalla prima e della seconda variabile canonica (Figura 4.7).

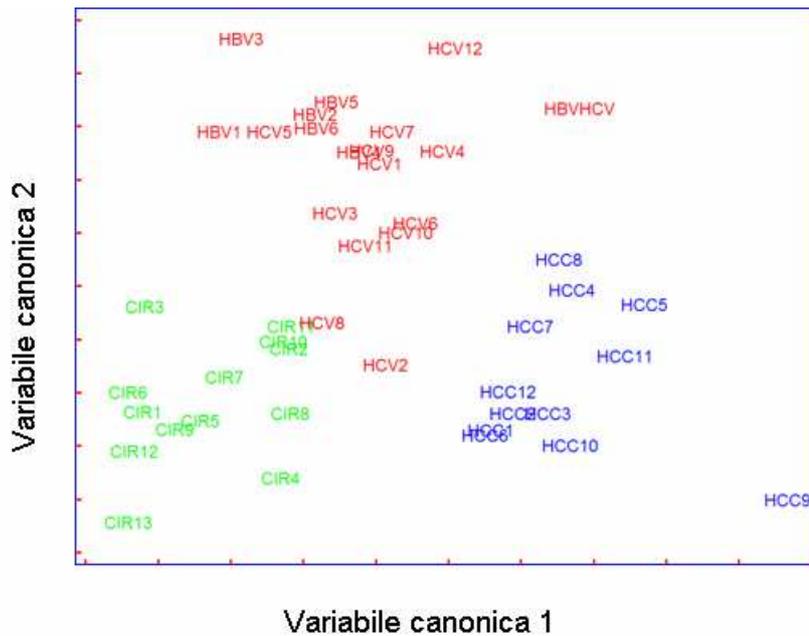


Figura 4.7: rappresentazione grafica dei risultati ottenuti dall'analisi LDA degli spettri MALDI di campioni patologici: HCC (epatocarcinoma), CIR (cirrosi), HCV, HBV (epatite). Gli oggetti sono rappresentati sul piano descritto dalla prima e dalla seconda variabile canonica.

Il grafico mostra una buona separazione tra le diverse classi patologiche. Solo due spettri appartenenti alla classe dei pazienti affetti da epatite non vengono correttamente classificati. L'abilità in corretta classificazione e in corretta predizione del modello sono risultate rispettivamente del 97,3% e del 88,6%,

4.4.4 Confronto tra i gruppi precedenti e i campioni dei pazienti trapiantati.

Nel nostro studio sono stati analizzati anche campioni ottenuti da pazienti trapiantati per epatocarcinoma (**Orthotopic Liver Transplantation – trapianto ortotopico di fegato**).

Il trapianto è consigliabile in tutte le malattie croniche che producono un malfunzionamento irreversibile del fegato, purché, naturalmente, il paziente non presenti altre patologie che precludano possibilità di successo al trapianto. La maggior parte dei trapianti vengono effettuati in caso di malattie che portano a lesioni permanenti del fegato: epatiti croniche o fulminanti, cirrosi, neoplasie

epatiche, malattie metaboliche. Attualmente la percentuale di sopravvivenza di un trapiantato di fegato dopo il primo anno è dell'80% e, dopo cinque anni del 70%. La qualità di vita è generalmente ottima e la maggior parte dei pazienti torna ad un'esistenza pressochè normale entro alcune settimane dall'intervento.

In Figura 4.8 sono mostrati gli spettri ottenuti dopo trattamento del siero di un soggetto portatore OLT (A) e di un soggetto sano (B) con la cellulosa derivatizzata.

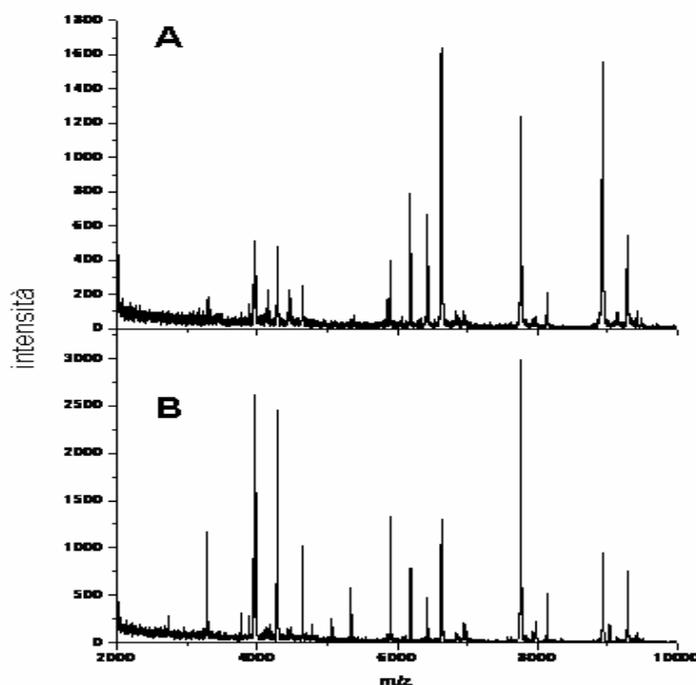


Figura 4.8: Spettri ottenuti dopo trattamento del siero di un portatore OLT (A) e di un donatore sano (B) con cellulosa derivatizzata.

Gli spettri sono stati sottoposti ad analisi di classificazione. E' stata effettuata una prima elaborazione dei dati confrontando gli spettri ottenuti dall'analisi del siero di donatori sani e di pazienti trapiantati. I risultati ottenuti sono rappresentati in funzione della prima variabile canonica mediante l'istogramma di Figura 4.9

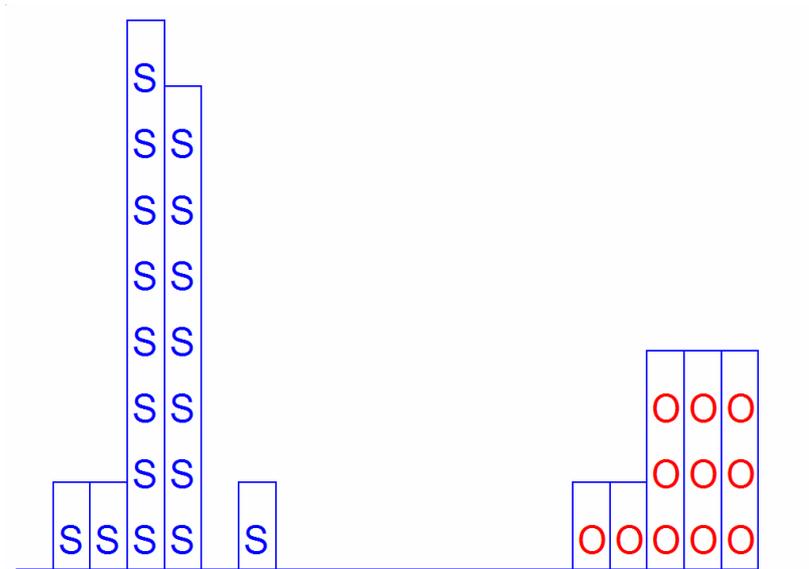


Figura 4.9: Rappresentazione grafica dell'LDA mediante istogramma. Gli spettri relativi ai campioni di controllo (S in blu) e ai campioni ottenuti da donatori portatori di trapianto (O in rosso) sono rappresentati in funzione della prima variabile canonica.

L'istogramma evidenzia una buona discriminazione tra le due classi con un'abilità in classificazione e predizione del 100%.

L'analisi discriminante lineare è stata ripetuta considerando tutte le classi di campioni analizzate. Anche in questo caso per ottenere una migliore visualizzazione dei dati sono state riportate due diverse rappresentazioni grafiche. In Figura 4.10 sono rappresentati sul piano delle prime due variabili canoniche i risultati dell'LDA ottenuti considerando 4 classi: donatori sani, affetti da cirrosi, affetti da epatocarcinoma e trapiantati per epatocarcinoma. Il grafico mostra una buona separazione tra le classi e la sovrapposizione di un oggetto appartenente alla classe dei sani con un oggetto appartenente alla classe dei trapiantati. Tuttavia è possibile discriminare tra soggetti sani e portatori di trapianto. E' possibile notare come questi ultimi costituiscano una classe a se stante e dunque non possano essere inquadrati tra i soggetti sani ma nemmeno tra i pazienti affetti da epatopatia.

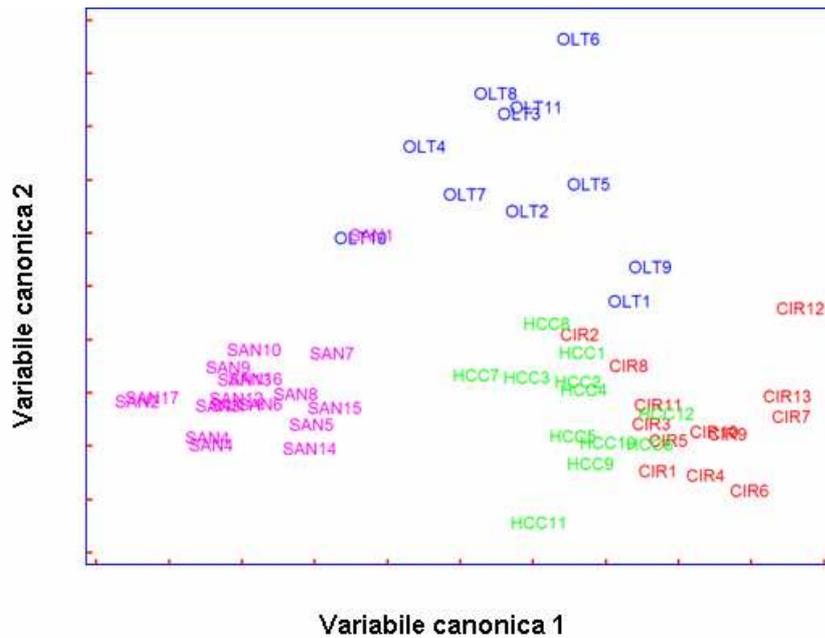


Figura 4.10: Grafico LDA relativo all'analisi degli spettri sierici ottenuti da donatori sani (SAN), affetti da cirrosi (CIR), affetti da epatocarcinoma (HCC) e portatori di trapianto (OLT). Gli oggetti sono rappresentati sul piano descritto dalla prima e dalla seconda variabile canonica.

L'abilità in classificazione del modello è risultata del 94%, mentre quella in corretta predizione del 78%. Nell'elaborazione riportata in Figura 4.11 sono invece rappresentate tutte le classi considerate in questo studio sul piano delle prime due variabili canoniche. Anche in questo caso i donatori trapiantati costituiscono una classe a se stante i cui oggetti sono ben discriminati da quelli appartenenti alla classe dei sani o a quelle relativa ai soggetti affetti da epatopatia cronica. E' possibile ipotizzare che nonostante i pazienti trapiantati tornino, in seguito all'intervento, a condurre una vita normale, un portatore di trapianto non sia un soggetto sano a tutti gli effetti, poiché nel corso della sua vita viene comunque sottoposto a terapia.

L'abilità in corretta classificazione e predizione sono risultate in questo caso del 93.7% e del 74% rispettivamente.

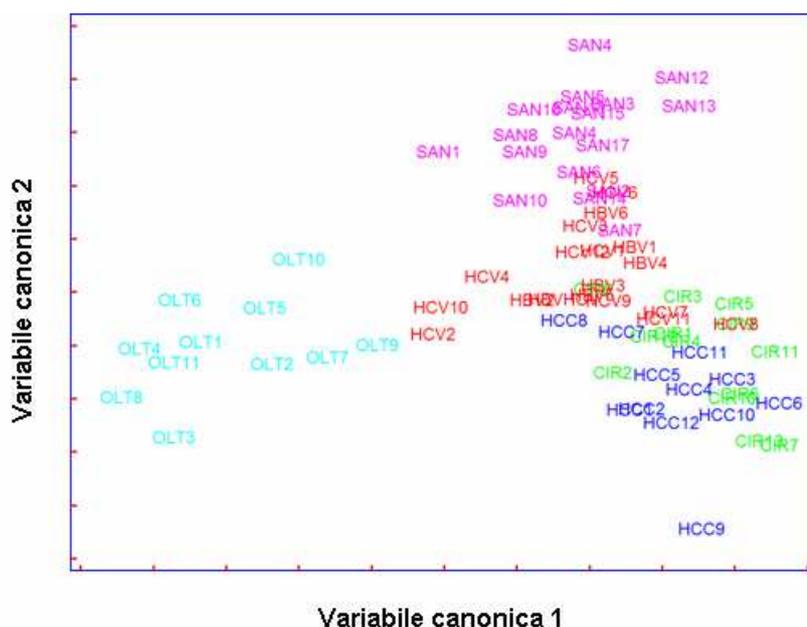


Figura 4.11: Grafico LDA relativo all'analisi degli spettri sierici ottenuti da donatori sani (SAN), affetti da epatite (HCV/HBV), affetti da cirrosi (CIR), affetti da epatocarcinoma (HCC) e portatori di trapianto (OLT). Gli oggetti sono rappresentati sul piano descritto dalla prima e dalla seconda variabile canonica.

4.4.5 Valutazione della specificità dei biomarkers per l'epatopatia cronica.

Allo scopo di valutare la specificità biomarcatori proteici per l'epatopatia cronica, sono stati analizzati campioni di siero ottenuti da pazienti affetti da rettocolite ulcerosa, una malattia infiammatoria intestinale cronica. Gli spettri sono stati poi sottoposti ad analisi di classificazione con il metodo dell'LDA.

In Figura 4.12 sono mostrati gli spettri ottenuti dall'analisi MALDI MS di sieri ottenuti da un donatore sano (A), un donatore affetto da epatocarcinoma (B) ed un donatore affetto da rettocolite ulcerosa (C).

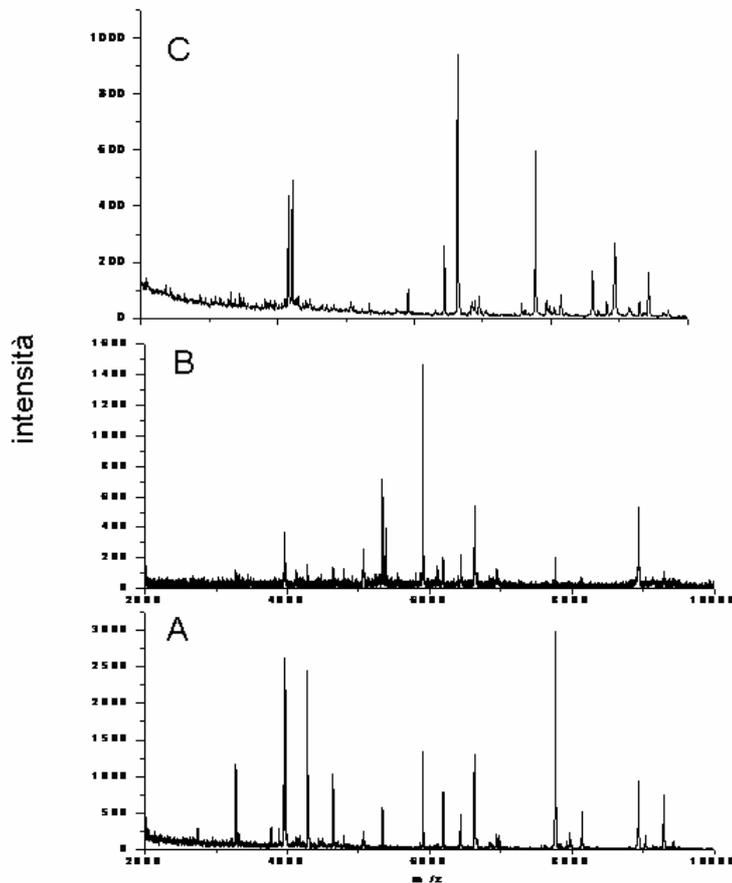


Figura 4.12: Spettri ottenuti dopo trattamento del siero di un donatore sano (A), di un donatore affetto da epatocarcinoma (C) e di uno affetto da rettocolite ulcerosa (C).

L'analisi di classificazione è stata eseguita in primo luogo sugli spettri ottenuti da donatori sani e affetti da rettocolite ulcerosa. I risultati sono riportati nell'istogramma di Figura 4.13, in funzione della prima variabile canonica.

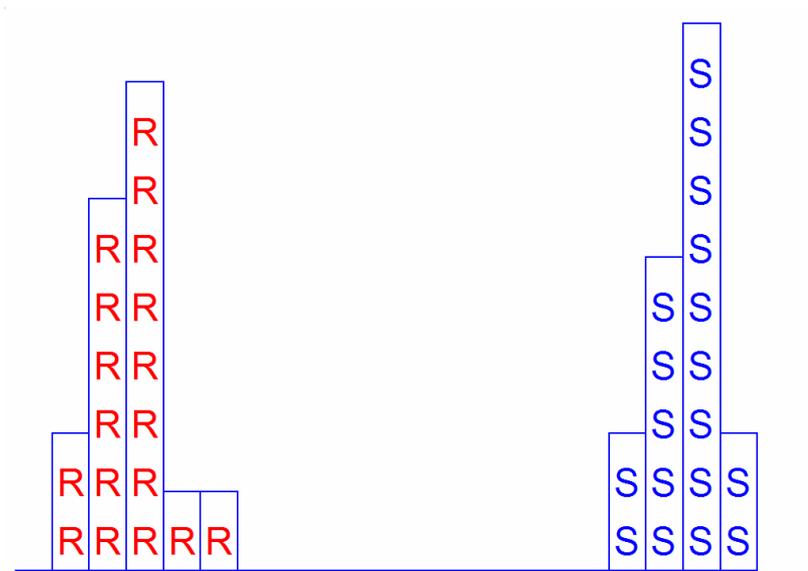


Figura 4.13 : Rappresentazione mediante istogramma della classe degli spettri relativi ai campioni di controllo (S in blu) e ai campioni ottenuti da donatori affetti da rettocolite ulcerosa (R in rosso). Gli spettri sono rappresentati in funzione della prima variabile canonica.

I risultati ottenuti evidenziano una buona separazione tra le classi con percentuali di corretta classificazione e di corretta predizione del 100%.

Verificata l'abilità di discriminazione del metodo tra queste due classi, è stata eseguita l'LDA su tutti i gruppi patologici considerati. I risultati sono riportati nel grafico di Figura 4.14, che mostra una buona discriminazione tra la classe dei pazienti affetti da rettocolite ulcerosa e quella dei pazienti affetti da epatopatia cronica. L'abilità in classificazione e predizione del metodo di classificazione sono risultate del 95.2% e 75.8% rispettivamente.

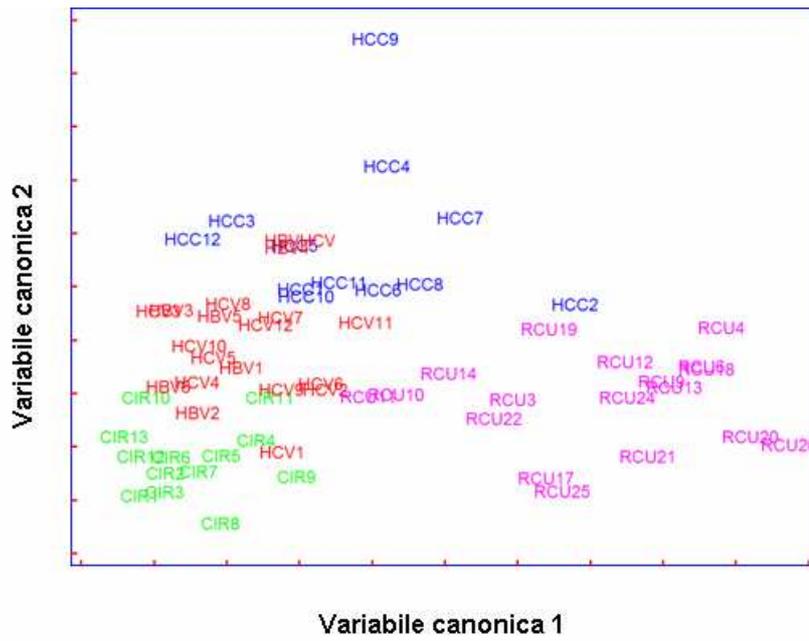


Figura 4.14: Grafico LDA relativo all'analisi degli spettri sieri ottenuti da donatori affetti da epatite (HCV/HBV), affetti da cirrosi (CIR), affetti da epatocarcinoma (HCC) e affetti da rettocolite ulcerosa. Gli oggetti sono rappresentati sul piano descritto dalla prima e dalla seconda variabile canonica.

4.5 Conclusioni

I risultati ottenuti hanno dimostrato che la tecnica di spettrometria di massa MALDI-TOF combinata con la cellulosa derivatizzata e l'analisi multivariata rappresenta un approccio rapido, riproducibile e poco costoso per l'analisi del profilo di espressione proteica sierica per l'identificazione di biomarkers. La cellulosa derivatizzata ha permesso l'arricchimento del campione in peptidi/proteine a bassa abbondanza, senza dover ricorrere ad operazioni aggiuntive per la deplezione di albumina, immunoglobuline e di sali non volatili, noti interferenti nell'analisi mediante spettrometria di massa. Le particelle di cellulosa derivatizzata possono essere sintetizzate in modo semplice e rapido, con bassi costi e possono essere utilizzate per l'analisi simultanea di un elevato numero di campioni. L'analisi multivariata si è rivelata uno strumento essenziale per il confronto tra profili proteici ottenuti da campioni di controllo e campioni patologici: gli spettri MALDI infatti, sono costituiti da un elevato numero di segnali che ne rendono complessa l'interpretazione ed il confronto con altri spettri.

L'approccio scelto ha permesso di discriminare correttamente tra i profili proteici sierici ottenuti da donatori sani e quelli ottenuti da donatori affetti da diverse forme di epatopatia cronica. E' stato inoltre possibile discriminare, con percentuali in corretta predizione e classificazione soddisfacenti, tra i diversi stadi di epatopatia. E' stata infine dimostrata la specificità dei biomarcatori per l'epatopatia cronica analizzando campioni di siero ottenuti da pazienti affetti da rettocolite ulcerosa e confrontando gli spettri con quelli ottenuti da donatori affetti da epatopatia cronica.

Conclusioni generali

Questo lavoro di tesi ha dimostrato la versatilità delle tecniche di spettrometria di massa ESI/TOF e MALDI/TOF per l'analisi di proteine e la loro applicabilità a diverse problematiche analitiche. In particolare queste tecniche di spettrometria di massa sono state utilizzate in combinazione con tecniche separative convenzionali (RP HPLC, SDS PAGE, 2D PAGE) o innovative (tecnica di frazionamento non denaturante HF FIFFF) per effettuare la completa caratterizzazione di proteine funzionali ricombinanti e delle impurezze ad esse associate. La spettrometria di massa MALDI/TOF si è poi dimostrata un valido strumento per lo studio di miscele proteiche complesse: essa ha infatti permesso di identificare microrganismi patogeni attraverso l'individuazione di loro proteine ribosomiali caratteristiche e di ottenere profili proteici sierici, allo scopo di identificare biomarkers proteici di stati patologici. E' stato poi possibile migliorare le prestazioni di questa tecnica attraverso l'uso di procedure di frazionamento o di estrazione in grado di ridurre la complessità del campione (frazionamento preliminare del campione mediante HF FIFFF, cattura selettiva dei batteri d'interesse mediante anticorpi specifici immobilizzati sulla piastra MALDI, estrazione di proteine sieriche a bassa abbondanza su una fase solida cellulosa-IDA-Cu(II)).

E' importante inoltre sottolineare il ruolo rivestito nell'ambito di questo lavoro dalle tecniche di analisi chemiometrica, che hanno permesso di elaborare i dati ottenuti in modo da estrarre l'informazione utile contenuta negli spettri di massa.

Bibliografia

- [Adam, 2002] Adam, B. L.; Qu, Y.; Davis, J. W.; Ward, M. D.; Clements, M. A.; Cazares, L. H.; Semmes, O. J.; Schellhammer, P. F.; Yasui, Y.; Feng, Z.; Wright, G. L., Jr. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 3609-14.
- [Anderson, 2002] Anderson, L.N.; Anderson, N.G. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 845-867.
- [Anhalt, 1975] Anhalt, J. P.; Fenselau, C. *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 219-225.
- [Arnold, 1999] Arnold, R. J.; Karty, J. A.; Ellington, A. D.; Reilly, J. P. *Anal Chemo.* **1999**, *71*, 1990-1996.
- [Banks, 2000] Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Blackstock W., Pappin DJ, et al. *Lancet* **2000**;356:1749-56.
- [Baumann, 2005] Baumann, S.; Ceglarek, U.; Fiedler, G. M.; Lembcke, J.; Leichtle, A.; Thiery, J. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 973-80.
- [Bayol, 2002] Bayol, A.; Capdevielle, J.; Malazzi, P.; Buzy, A.; Bonnet, M. C.; Colloc'h, N.; Moron, J. P.; Loyaux, D.; Ferrara, P. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2002**, *36*, 21-31.
- [Biemann, 1987] Biemann, K.; Scoble, H.A.. *Science* **1987**, *237*,:992–98.
- [Bonn, 1990] Bonn, G. K.; Kalghatgi, K.; Horne, W. C.; Horvath, C. *Chromatographia* **1990**, *30*, 484-488.
- [Bonnetè 2001] Bonnetè, F.; Vivarès, D.; Robert Ch.; Colloc'h, N; *J. Cryst. Growth* **2001**, *232*, 330-339.
- [Bosly, 2003] Bosly, A.; Sonet, A.; Pinkerton, C. R.; McCowage, G.; Bron, D.; Sanz, M. A.; Van den Berg, H. *Cancer* **2003**, *98*, 1048-1054.
- [Brenner-Weiss, 2003] Brenner-Weiss, G.; Kirschhofer, F.; Kuhl, B.; Nusser, M.; Obst, U. *J.Chromatogr., A* **2003**, *1009*, 147-153.

- [Brockman, 1997] Brockman, A. H.; Dodd, B. S.; Orlando, R. A. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4716–4720.
- [Brunello, 1993] Brunello, F.; Marcarino C.; Pasquero P.; Gastaldi P.; Gonella S.; Martini S.; Calcamuggi G.; et al. *Ital J Gastroenterol* **1993**, *25*, 9-12.
- [Calvo, 2005] Calvo, K. R.; Lotta, L. A.; Petricoin, E. F. *Bioscience reports*, **2005**, *25* (1-2),107-122.
- [Cao, 1999] Cao, P.; Moini, M. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 184-186.
- [Caprioli, 1997] Caprioli, R. M.; Frammer, T. B.; Gile, J. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4751-4760.
- [Chaurand 2004] Chaurand, P.; Schartz, S. A.; Billheimer, D.; Xu, B. J.; Caprioli R. M. *Anal. Chem* **2004**, *76*, 1145-1155.
- [Chaurand, 1999] Chaurand, P.; Stoeckli, M.; Caprioli, R. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5263-5270.
- [Conley 1980] Conley, T. G.; Priest, D. G. *Biochem J.* **1980**, *187*, 727-732.
- [Coombes, 2005] Coombes, K. R.; Morris, J. S.; Hu, L.; Edmonson, S. R.; Baggerly, K. A. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 291–292.
- [De Noo, 2005] De Noo, M. E.; Tollenaar, R. A. E. M.; Oumlautzalp, A.; Kuppen, P. J. K.; Bladergroen, M. R.; Eilers, P. H. C.; Deelder, A. M. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7232-7241.
- [Demirev, 2001] Demirev, P. A.; Lin, J. S.; Pineda, F. J.; Fenselau, C. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4566-4573.
- [Di Bisceglie, 1989] Di Bisceglie, A.M.; Hoofnagle, J.H.; *Cancer* **1989**, *64*, 2117-2120.
- [Diamandis, 2004]. Diamandis, E. P. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 353–356

- [Ellis, 2001] Ellis, D. I.; Goodacre, R. *Trends Food Sci. Technol.* **2001**, *12*, 414-424.
- [English, 2003] English, R. D.; Warscheid, B.; Fenselau, C.; Cotter, R.J.; *Anal. Chem* **2003**, *75*(24), 6886-6893.
- [Evason, 2000] Evason, D. J.; Claydon, M. A.; Gordon, D. B. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 669-672.
- [Evason, 2001] Evason, D. J.; Claydon, M. A.; Gordon, D. B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 49-54.
- [Fattovich, 1997] Fattovich G., Giustina G., Degos F. Tremolada F., Diodati G., Almasio P. et al. *Gastroenterology* **1997**, *11*, 2463-472.
- [Fearly, 1999] Ferlay J, Bray F, Sankila R, et al. Cancer incidence, mortality and prevalence in the European Union. Lyon: IARC Press. 1999
- [Fearly, 2001] Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. Lyon: IARC Press. IARC Cancer Base No. 5.2001
- [Fenselau, 2001] Fenselau, C.; Demirev, P. A. *Mass Spectrometry Reviews* **2001**, *20*, 157-171.
- [Feuerstein 2005] Feuerstein, I.; Rainer, M.; Bernardo, K; Stecher, G.; Huck, C. W.; Kofler, K.; Pelzer, A.; Horninger, W.; Klocker, H.; Bartsch, G.; Bonn, G. K. *Journal of Proteome Research* **2005**, *4*, 2320- 2326.
- [Forina, 1993] Forina M., *Introduzione alla Chimica Analitica con elementi di Chemiometria*, 1993, ECIG.
- [Fuh , 1993] Fuh, C. B.; Levin, S.; Giddings, J. C. *Anal. Biochem.* **1993**, *208*, 80-87.

- [Fung, 2003] Fung, E.; Diamond, D.; Simonsesn, A. H.; Weinberger, S. R. *Methods Mol. Med.* **2003**, *86*, 295–312.
- [Garbis, 2005] Garbis, S.; Lubec, G.; Fountoulakis, M. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1077*, 1-357.
- [Grazi, 1995] Grazi, G.L.; Mazziotti, A.; Legnani C.; Jovine E.; Miniero R.; Galluci A.; Palareti G.; Gozzetti G. *Liver Transplant Surg* **1995**, *4*, 249-255.
- [Guardigli, 2005] Guardigli, M.; Sestigiani, E.; Mandreoli, M.; Ramazzotti, E.; Santoro, A.; Roda, A. In V Mediterranean Basin Conference on Analytical Chemistry, Silvi Marina, Teramo, Italy, 24-28 May, 2005. Abstract Book, Caroli, S., Pino, D., Eds.; Istituto Superiore di Sanita`, Rome, Italy, 2005; p 147. ISSN 0393-5620.
- [Hillenkamp, 1991] Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R.C.; Chait, B. T. *Anal. Chem* **1991**, *23*, 1193A-1202A.
- [Holland, 1996] Holland, R. D.; Wilkes, J. G.; Rafii, F.; Sutherland, J. B.; Persons, C. C.; Voorhees, K. J.; Lay, J. O. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1227-1232.
- [Hu, 1999] Hu, K.Q.; Tong M. *Hepatology* **1999**, *29*, 1311-1316.
- [Hunt, 1987] Hunt, D.F.; Shabanowitz, J. III; Yates, J.R. 3rd; Zhu, N.Z., Russell D.H.. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1987**, *84*,620–23.
- [ICDO] International Classification of Diseases for Oncology. Fritz A, Percy C, Jack A, Shanmugaratnam K, Sobin L, Parkin DM, Whelan S, editors. 3rd ed. Geneva: World Health Organization. 2000.
- [Institute of food Technologists 2004] Institute of food Technologists 2004. Scientific Status Summary. Bacteria Associated with Foodborne Diseases.

- [Issaq 2002], Issaq, H.; Veenstra, T. D.; Conrads, T. P.; Felschow, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *292*, 587–592.
- [Jarman, 2000] Jarman, K. H. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1217-1223.
- [Johnson, 2001] Johnson, P.J. *Clin Liver Dis* **2001**, *5*, 145–59.
- [Kang, 2005] Kang, D.; Moon, M. H. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4207-4212.
- [Karas, 1988] Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal Chem* **1988**, *60*, 2299-2301.
- [Krishnamurthy, 1996a] Krishnamurthy, T.; Ross, P.L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10(15)*, 1992-1996.
- [Krishnamurthy, 1996b] Krishnamurthy, T.; Ross, P.L.; Rajamani, U. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10(8)*, 883-888.
- [Krishnamurthy, 2000] Krishnamurthy, T.; Rajamani, U.; Ross, P.L.; Janhour, R.; Nair, H.; Eng., J.; Yates, J.; Davis, M.T.; Stahl, D.C.; Lee, T.D. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **2000**, *19(1)*, 95-117.
- [Lee, 1999] Lee, W. J.; Min, B.-R.; Moon, M. H. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3446-3452.
- [Lee, 2003] Lee, A. C.; Li, C. H.; So, K. T.; Chan, R. *Ann. Pharmacother.* **2003**, *37*, 1614-1617.
- [Lewis, 2000] Lewis, J. K.; Wei, J.; Siuzdak, G. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* R.A. Meyers (Ed.) pp. 5880-5894 © John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000.
- [Li, 2000] Li, L.; Garden R. W.; Sweedler, J. V. *Trends. Biotechnol.* **2000**, *18*, 151-160
- [Li, 2000] Li, P.; Hansen, M. In *Field-Flow Fractionation Handbook*; Schimpf, M. E., Caldwell, K. D., Giddings J. C., Eds.; Wiley-Interscience: New York, 2000;
- [Liebman, 1989] Liebman, H.A.; *Cancer Res.* **1989**, *49*, 6493-6497.

- [Liu, 1993] Liu, M. K.; Li, P.; Giddings, J. C. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 1520-1531.
- [Liu, 2005] Liu, C. Y.; Sims-McCallum, R. P.; Schiffer, C. A. *Leuk. Res.* **2005**, *29*, 463-465.
- [Marrero, 2003] Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, FontanaRJ, Lok AS. *Hepatology* **2003**, *37(5)*, 1114-21.
- [Mead, 1999] Mead, P.; Slutsker, L.; Dietz, V.; McCaig, L.; Bresce, J.; Shapiro, C.; Griffin, P.; Taxue, R. *Food-related and death in the United States. Emerg. Infect. Dis.* **1999**, *5*, 607-625.
- [Min, 2002] Min, B.-R.; Kim, S. J.; Ahn, K.-H.; Moon, M. H. *J. Chromatogr., A* **2002**, *950*, 175-182.
- [Moon, 1999] Moon, M. H.; Lee, K. H.; Min, B.-R. *J. Microcolumn Sep.* **1999**, *11*, 676-681.
- [Nakagawa, 1999] Nakagawa T.; Seki T.; Shiro T.; Wakabayashi M.; Imamura M.; Itoh T.; Tamai .; et al. *Int. J. Oncol.* **1999**, *14*, 281-286.
- [Nugent, 1991] Nugent, K. D. In High-Performance Chromatography of Peptides and Proteins; Mant, C. T., Hodges, R. S., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1991; (1), 279-287.
- [Oka, 1994] Oka, H.; Tamori, A.; Kuroki, T.; Kobayashi, K.; Yamamoto, S. *Hepatology* **1994**, *19*, 61-66.
- [Ono, 1990] Ono, M.; Ohta, H.; Ohhira, M.; Sekiya, C.; Namiki, M. *Tumour Biol.* **1990**, *11*, 319-326.
- [Parkin, 2001] Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001;37(Suppl 8).
- [Pateron, 1994] Pateron, D.; Ganne, N.; Trinchet, J.C.; Aurousseau, M.H.; Mal, F.; Meicler, C.; Coderc, E.; et al. *J Hepatol* **1994**, *20*, 65-71.

[Petricoin, 2004]. Petricoin, E. F.; Liotta, L. A. *Curr. Opin. Biotech.* **2004**, *15*, 24–30.

[Petricoin, 2002] Petricoin, E. F. et al (2002) Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*(9):683-695.

[Petricoin, 2002] Petricoin, E. F., III; Ornstein, D. K.; Paweletz, C. P.; Ardekani, A.; Hackett, P. S.; Hitt, B. A.; Velasco, A.; Trucco, C.; Wiegand, L.; Wood, K.; Simone, C. B.; Levine, P. J.; Linehan, W. M.; Emmert-Buck, M. R.; Steinberg, S. M.; Kohn, E. C.; Liotta, L. A. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 1576-78.

[Pieper, 2003] Pieper, R.; Gatlin, C.L., Makusky, A.J.; Russo, P.S. et al. *Proteomics* **2003**, *3*, 1345-1364.

[Pineda, 2003] Pineda, F. J.; Antoine, M. D.; Demirev, P. A.; Feldman, A. B.; Jackman, J.; Longenecker, M.; Lin, J. S. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3817-3822.

[Product Information. Rasburicase (Fasturtec)] Product Information. Rasburicase (Fasturtec), New York, Sanofi-Synthelabo, October 2003.

[Q6B Guideline] Q6B Guideline. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1999; www.ich.org.

[Rai, 2002] Rai, A. J.; Zhang, Z.; Rosenzweig, J.; Shih, IeM.; Pham, T.; Fung, E. T.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W. *Arch. Pathol. Lab Med.* **2002**, *126*, 1518-26.

[Ramirez, 2001] Ramirez, J.; Fenselau, C. *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 929-936

[Rappsilber, 2003] Rappsilber, J.; Moniatte, M.; Nielsen, M. L.; Podtelejnikov, A. V.; Mann, M. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *226* (1), 223-237.

- [Ratanathanawongs-Williams, 2000] Ratanathanawongs-Williams, S. In *Field-Flow Fractionation Handbook*; Schimpf, M. E., Caldwell, K. D., Giddings, J. C., Eds.; Wiley-Interscience: New York, 2000; Chapter 17.
- [Reschiglian, 2002] Reschiglian, P.; Roda, B.; Zattoni, A.; Min, B.-R.; Moon, M. H. *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 490-498.
- [Reschiglian, 2003] Reschiglian, P.; Zattoni, A.; Roda, B.; Cinque, L.; Melucci, D.; Min, B.-R.; Moon, M. H. *J. Chromatogr., A* **2003**, *985*, 519-529.
- [Reschiglian, 2004] Reschiglian, P.; Zattoni, A.; Cinque, L.; Roda, B.; Dal Piaz, F.; Roda, A.; Moon, M. H.; Min, B.-R. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2103-2111.
- [Reschiglian, 2005] Reschiglian, P.; Zattoni, A.; Roda, B.; Cinque, L.; Parisi, D.; Roda, A.; Dal Piaz, F.; Moon, M. H.; Min, B.-R. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 47-56.
- [Reschiglian, 2005] Reschiglian, P.; Zattoni, A.; Roda, B.; Michelini, E.; Roda, A. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 475-483.
- [Rigetti, 2006] Rigetti, P.G.; Boschetti, E.; Lomas, L.; Citterio, A. *Proteomics* **2006**, *6*, 3980-3992.
- [Rigetti, 2001] Rigetti, P.G.; Castagna, A.; Herbert, B. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 320A-326A.
- [Rochu, 2001] Rochu, D.; Pernet, F.; Bon, C.; Masson, P. *J. Chromatogr., A* **2001**, *910*, 347-357.
- [Roda, 2006], A.; Parisi, D.; Guardigli, M.; Zattoni, A.; Reschiglian, P. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1085-1092.
- [Roepstorff, 2000] Roepstorff, P. *EXS.* **2000**, *88*, 81-97.
- [Saenz, 1999] Saenz, A. J.; Petersen, C. E.; valentine, N. B.; Gantt, S. L.; Jarman, K. H.; Kingsley, M. T.; Wahl, K. L. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 1580-1585.

- [Schwegler, 2005] Schwegler, E. E.; Cazares, L.; Steel, L. F.; Bao-Ling, A.; Jhonson, D.A.; Semmes, O. J.; Block, T.M.; Marrero, J.A.; Drake, R.R. *Hepatology* **2005**, *41*, 634-642.
- [Seow, 2001] Seow, T.K., Liang, R.C.; Leow, C.K.; Chung, M.C. *Proteomics* **2001**, *10*, 1249-1263.
- [Sheffield, 2003] Sheffield, L. G.; Gavinski, J. J. *J. Anim. Sci.* **2003**, *81* (3), 48-57.
- [Sherman, 1995] Sherman, M.; Peltekian, K.M.; Lee, C. *Hepatology* **1995**, *22*, 432-438.
- [Silveira, 2005] Silveira, J. R.; Raymond, G. J.; Hughson, A. G.; Race, R. E.; Sim, V. L.; Hayes, S. F.; Caughey, B. *Nature* **2005**, *437*, 257-261.
- [Stewart, 2003] Stewart BW, Kleihus P, Editors. World Cancer Report. Lyon: IARC Press. 2003
- [Stuver, 1998] Stuver, S.O. *Semin. Cancer Biol.* **1998**, *8*, 299-306.
- [Tamura] Tamura, J.; Kunihiro, F. *Reza Kenkyu* **2003**, *31* (1), 21-24.
- [Tang, 2003] Tang, W.; Miki, K.; Kokudo, N.; Sugawara, Y.; Imamura, H.; Minagawa, M.; Yuan, L.W.; Ohnishi, S.; Makuuchi, M. *Int J Oncol* **2003**; *22*(5): 969-75.
- [Tolley, 2001] Tolley, L.; Jorgenson, J. W.; Moseley, M. A. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2985-2991.
- [Tortorello, 1997] Tortorello, M.L.; Gendel, S. M. Food Microbiological Analysis: New Technologies; Marcel Dekker: New York, **1997**.
- [Tsai, 1990] Tsai SL, Huang GT, Yang PM, Sheu JC, Sung JL, Chen DS. *Hepatology* **1990**, *11*, 481-488. 128.

- [Villanueva, 2004] Villanueva, J.; Philip, J.; Entenberg, D.; Chaparro, C. A.; Tanwar, M. K.; Holland, E. C.; Tempst, P. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1560-70.
- [Villanueva, 2004] Villanueva, J.; Philip, J.; Entenberg, D.; Chaparro, C. A.; Tanwar, M. K.; Holland, E. C.; Tempst, P. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1560–1570.
- [Warscheid, 2004] Warscheid, B.; Fenselau, C.; *Proteomics* **2004**, *4*(10), 2877-2892.
- [Weitz, 1993] Weitz, I.C.; Liebman, H.A. *Hepatology* **1993**, *18*, 990-7.
- [Williams, 2003] Williams, T. L.; Andrzejewski, D.; Lay, J. O.; Musser S. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*,342-351.
- [Wilson, 2000] Wilson, K.; Walker, J. Principles and techniques of practical biochemistry, 5th ed.; Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 2000.
- [Yamanishi, 1997] Yamanishi, H.; Kimura, S.; Iyama, S.; Yamaguchi, Y.; Yanagihara, T *Clin. Chem.* **1997**, *43*, 2413-17.
- [Yanagisawa, 2003] Yanagisawa, K.; Shyr, Y.; Xu, B. J.; Massion, P. P.; Larsen, P. H.; White, B. C.; Roberts, J. R.; Edgerton, M.; Gonzalez, A.; Nadaf, S.; Moore, J. H.; Caprioli, R. M.; Carbone, D. P. *Lancet* **2003**, *362*, 433-39.
- [Yang, 1997] Yang, L.; Jia, L.; Zou, H.; Kong, L.; Zhang, Y. *Chin. J. Chrom.* **1997**, *15* (4), 292-295.
- [Yang, 1998] Li, Y.; Lingyun, J.I.A.; Hanfa,Z.; Dongmei, Z.; Yukui, Z. *Science in China* **1998**,*41*, 596-605.
- [Yim, 2003] Yim, B. T.; Sims-McCallum, R. P.; Chong, P. H. *Ann. Pharmacother.* **2003**, *37*, 1047-1054.
- [Zhang, 2006] Zhang, X.; Scalf, M.; Berggren, T. W.; Westphall, M.S.; Smith, L.M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **2006**, *17*, 490-499.

[Zhao, 1991] Zhao, S.; Somayajula, K. V.; Sharkey, A. G.; Hercules, D. M.; Hillenkamp, F.; Karas, M.; Ingendoh, A. *Anal. Chem.* **1991**, *63* (5), 450-453.

Chapter 28.

Pubblicazioni

Reschiglian, P., Zattoni, A., Roda, B., Cinque, L., Parisi, D., Roda, A., Dal Piaz F., Moon MH., Min BR.: On-line hollow-fiber flow field-flow fractionation-electrospray ionization/time-of-flight mass spectrometry of intact proteins. *Anal. Chem.*, **2005**, *77*(1), 47-56.

Bacigalupo, MA., Meroni, G., Mirasoli, M., Parisi, D., Longhi, R.: Ultrasensitive quantitative determination of paraquat: application to river, ground, and drinking water analysis in an agricultural area. *J Agric Food Chem* **2005**,*53*(2),216-9.

Zattoni, A., Roda, B., Reschiglian, P., Parisi, D., Dal Piaz, F., Roda, A.: FFF a fibra cava per la MS di proteine intatte e batteri interi *La Chimica e l'Industria*, **2004**, *10*, 58-61.

Roda, A., Parisi, D., Guardigli, M., Zattoni, A., Reschiglian, P.: Combined approach to the analysis of recombinant protein drugs using hollow-fiber flow field-flow fractionation, mass spectrometry, and chemiluminescence detection. *Anal. Chem.*, **2005**, *78*(4), 1085-1092.

Bavelloni, A., Faenza, I., Cioffi, G., Piazzini, M., Parisi D., Matic, I., Maraldi, N.M., Cocco, L.: Proteomic-based analysis of nuclear signaling: PLC β_1 affects the expression of the splicing factor SRp20 in Friend erythroleukemia cells. *Proteomics*, **2006**, *6*(21), 5725-34.