



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

.....

Scuola di dottorato in

Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e
Biologia Molecolare Clinica

Direttore: Prof. **Bruno Masala**

La transtiretina come proteina favorente l'invecchiamento o
come proteina amiloidogena in una popolazione anziana
sarda

Tutor:
Prof. **Luca Deiana**

Dottoranda:
Dr.ssa **Sara Pasella**

Anno Accademico 2009/10

1.INTRODUZIONE	3
1.1 Longevità in Sardegna e Progetto AKeA	3
1.2 Proteine plasmatiche	4
1.3 Cenni di proteomica	6
2 ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE E MS	9
2.1 Principali steps dell'elettroforesi bidimensionale	9
2.2 Analisi di immagine	14
2.3 Spettrometria di massa	16
2.4 MALDI TOF	19
3 SEQUENZIAMENTO DEL DNA	24
3.1 Storia del sequenziamento del DNA	24
3.2 Fasi preanalitiche della tecnica di sequenziamento	26
3.3 Sequenziatore automatico ABI PRISM 310	29
4. TRANSTIRETINA (TTR)	32
4.1 Struttura, metabolismo e funzioni	32
4.2 Cenni sull'implicazione delle varianti geniche della TTR nelle Amiloidosi	35
4.3 Stress ossidativo e forme coniugate della TTR	38
5.SCOPO DELLA TESI	42
6.MATERIALI E METODI	44
6.1 Materiali	44
6.2 Popolazione investigata	44
6.3 Preparazione dei campioni di plasma	45
6.3.1 Elettroforesi bidimensionale delle proteine plasmatiche	45
6.3.2 Analisi d'immagine: software PDQUEST BASIC	47
6.3.3 Identificazione della TTR: MALDI TOF	49
6.3.4 Identificazione della TTR: Western Blot	51
6.4 Preparazione dei campioni di DNA	52
6.4.1 PCR (Polimerase Chain Reaction)	52
6.4.2 Estrazione di DNA dal gel d'agarosio e reazione di sequenza	53
6.4.3 Sequenziamento del DNA: ABI PRISM 310	54
7.RISULTATI E DISCUSSIONE	55
7.1 Identificazione delle isoforme di TTR con MALDI TOF	55
7.2 Differenze quali-quantitative delle isoforme di TTR	56
7.3 Identificazione delle mutazioni puntiformi mediante sequenziamento	59
8. CONCLUSIONI	64
BIBLIOGRAFIA	66

1.INTRODUZIONE

1.1 Longevità in Sardegna e Progetto AKeA

Negli ultimi decenni, nella maggior parte dei paesi sviluppati, è stata osservata una crescita stabile nell'aspettativa di vita media, che viene attribuita, principalmente, alla diminuzione della mortalità in età avanzata (1,2). Diversi studi, hanno dimostrato che la Sardegna, rispetto alle altre regioni italiane, possiede un numero di centenari e ultracentenari decisamente superiore; è emerso, inoltre, che il 60% della più alta proporzione di centenari, nati tra il 1880 e il 1902, è dovuta alla più bassa mortalità degli uomini sardi tra gli 80 e i 99 anni (3). Una più bassa mortalità a queste età implica che un maggior numero di persone potrebbe raggiungere e superare la soglia dei 100 anni. Il Progetto AKeA, elaborato dal prof. Luca Deiana nel 1996, verte allo studio e alla comprensione dei fattori genetici e ambientali che favoriscono in Sardegna la longevità "con successo". Questo tipo di lavoro viene svolto da un'equipe di demografi, medici, biologi e ricercatori. In particolare, un accurato studio demografico ha reso possibile la raccolta e la catalogazione in database elettronici delle informazioni relative ai dati anagrafici di tutte le persone viventi d'età superiore ai 95 anni, nei 377 comuni della Sardegna; questo tipo di studio è stato effettuato mediante la consultazione dei registri degli atti di nascita, matrimonio e morte e mediante la costruzione di un albero genealogico per ciascun centenario censito. L'equipe di medici si occupa della raccolta delle informazioni relative allo stato di salute, mediante la compilazione delle cartelle cliniche, e del prelievo di sangue, previo consenso.

I biologi e i ricercatori si occupano dell'analisi e dello studio dei meccanismi biochimici e genetici coinvolti nell'invecchiamento. Alcuni studi, condotti all'interno del Progetto AKeA (4;5), hanno messo in evidenza le differenti cause di mortalità ad età avanzate tra la Sardegna e le altre regioni italiane e all'interno dell'isola. Da questi studi è emerso che il tasso di mortalità per malattie cardiovascolari sia più basso in Sardegna rispetto al resto d'Italia; all'interno dell'isola, sebbene sia stata individuata un'area interna, in provincia di Nuoro, con una più alta concentrazione di centenari (6), l'individuazione delle cause di mortalità è più complessa: il livello di urbanizzazione, industrializzazione e inquinamento di particolari aree geografiche possono determinare un aumento di mortalità. I risultati di tali studi hanno suggerito l'esistenza di specifici fattori genici, ambientali (condizioni nei primi anni dell'esistenza, stili di vita, istruzione, occupazione, luogo di residenza, abitudini alimentari, inquinamento, ecc) o entrambi che favoriscono un'aumentata aspettativa di vita negli uomini sardi. Lo studio dei fattori e dei prodotti genici così come la conoscenza delle loro specifiche funzioni è determinante per la comprensione dei meccanismi alla base del processo dell'invecchiamento.

1.2 Le proteine plasmatiche

Le proteine plasmatiche rappresentano un gruppo notevolmente eterogeneo di proteine, sia per composizione che per dimensioni e concentrazione. Ognuna di esse possiede una precisa funzione o diverse funzioni ed è soggetta a specifiche variazioni di concentrazione e di espressione in svariate

condizioni fisiologiche e patologiche; ogni proteina possiede un tempo di emivita ($t_{1/2}$) caratteristico (7). La proteina più abbondante del plasma è l'albumina (60%), maggior responsabile della pressione oncotica (80%); altre categorie di proteine plasmatiche comprendono immunoglobuline, proteine della coagulazione, proteine di trasporto, inibitori di proteasi, proteine della fase acuta, ormoni peptidici o proteici, proteine non ormonali che attraversano temporaneamente il plasma durante il loro percorso verso un determinato compartimento (es. proteine lisosomiali). Possono essere presenti nel plasma anche proteine derivanti da un danno cellulare (ad es. la creatina chinasi, la troponina cardiaca o la mioglobina, usate nella diagnosi dell'infarto del miocardio), proteine rilasciate da tessuti tumorali o danneggiati e proteine di organismi infettivi o parassiti immesse in circolazione. Le proteine totali nel sangue si possono dosare sia su plasma che su siero. Per problemi di strumentazione automatica e per evitare l'interferenza con il fibrinogeno, il dosaggio si effettua quasi esclusivamente su campioni di siero. Gli intervalli di riferimento normali per le proteine del siero sono tra 60 e 84g/L. Nel plasma, rispetto al siero, la proteinemia totale è più alta del 3-5% per la presenza del fibrinogeno. I valori sierici non sono costanti in tutta la vita: alla nascita le proteine del siero ammontano a 55,2 g/L ed il rapporto albumina/globuline è alto [2,10]. Le concentrazioni sieriche dei bambini si mantengono più basse rispetto all'adulto e nelle donne sono leggermente inferiori rispetto a quelle dell'uomo. I livelli plasmatici fisiologici dipendono dalla sintesi, dal catabolismo, dalla diminuzione delle proteine nei vari compartimenti corporei e

da perdite esterne. Le maggior parte delle proteine plasmatiche vengono sintetizzate dal fegato come pre-proteine e convertite in proteine attive dagli enzimi proteolitici del plasma; rappresentano un'eccezione le immunoglobuline che vengono prodotte esclusivamente dalle cellule B del sistema immunitario e gli ormoni che sono secreti dalle cellule endocrine. Contribuiscono alla sintesi anche l'intestino per le lipoproteine ed il sistema monocito/macrofagico per alcuni fattori del complemento. Il metabolismo delle proteine è rapido ed intenso: viene giornalmente rinnovato, in condizioni fisiologiche, il 9% di tutte le proteine sintetizzate dal fegato ed il 10-25% di quelle circolanti. Anche nel catabolismo gioca un ruolo fondamentale il fegato. In condizioni fisiologiche le perdite (esterne) avvengono attraverso l'apparato gastroenterico (non selettivo), il rene (selettivo), le ghiandole esocrine, l'apparato respiratorio e gli organi genitali.

1.3 Cenni di proteomica

La conoscenza delle sequenze geniche, da sola, non è in grado di chiarire tutti i meccanismi biologici e molecolari dell'organismo umano; il sequenziamento completo del genoma umano, infatti, ha messo in evidenza circa 30000 geni, un numero veramente esiguo se si considera che possono esserci circa un milione di proteine differientemente espresse, dovute alla diversa trascrizione di ciascun gene. Lo studio del proteoma, cioè dell'insieme delle proteine espresse da un genoma in un determinato momento nella cellula, fornisce informazioni sui livelli di espressione delle proteine e sulle modificazioni post-traduzionali. Le proteine e le loro modificazioni definiscono l'organismo e

possono essere indicatori di salute o di malattia, come pure dei marcatori clinicamente utili per gli studi sull'invecchiamento. L'approccio proteomico prevede due aspetti tecnici: la separazione delle proteine e la loro identificazione. Le tecnologie utilizzate per la separazione delle proteine possono essere diverse: elettroforesi monodimensionale e focalizzazione isoelettrica (IEF), elettroforesi bidimensionale, size-exclusion accoppiata a RP-HPLC (reverse phase - high-performance liquid chromatography), scambio ionico accoppiato a RP-HPLC, RP-HPLC accoppiata a elettroforesi capillare. Altrettanto diverse possono essere le tecnologie utilizzate per l'identificazione delle proteine: sequenziamento di Edman, spettrometria di massa seguita da peptide mass fingerprint, spettrometria di massa tandem seguita da sequenziamento dei peptidi (8). L'approccio più ampiamente seguito prevede elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa (MS). L'elettroforesi bidimensionale consente di separare migliaia di proteine contemporaneamente su di un unico gel con un'ottima risoluzione e riproducibilità. L'analisi delle immagini digitali dei gel bidimensionali viene effettuata mediante l'uso di appositi software, che identificano differenze di intensità tra lo stesso spot in diversi gels. Per esempio possono essere comparati un gruppo di centenari con un gruppo di controllo. Gli spot proteici ritenuti interessanti vengono identificati mediante tecniche di spettrometria di massa. Uno degli strumenti più sensibili e robusti è il MALDI TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight). Per ottenere informazioni sulla sequenza delle proteine e sulle modificazioni post-traduzionali,

generalmente viene utilizzato un tandem massa. Software specifici consentono poi l'identificazione delle proteine mediante il confronto dei dati sperimentali ottenuti con quelli presenti in banca dati. Oggigiorno, l'approccio proteomico viene seguito in molti campi della biologia per capire i meccanismi di regolazione alla base dei vari fenomeni molecolari. Il confronto tra situazioni patologiche e non, (proteomica differenziale) effettuato su cellule, plasmi, tessuti, oppure tra cellule stimulate e non, consente, inoltre, di individuare marcatori di patologie a fini diagnostici, o targets di molecole a fini terapeutici.

2. ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE E MS

2.1 Principali steps dell'elettroforesi bidimensionale

L'elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE) prevede due tecniche di separazione consecutive e ortogonali tra loro: in prima dimensione, le proteine vengono separate, in base al loro punto isoelettrico, mediante focalizzazione isoelettrica (IEF) su gels di poliacrilammide con gradienti di pH immobilizzati (IPG); in seconda dimensione, le proteine vengono separate esclusivamente in funzione del loro peso molecolare, mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE).

Preparazione del campione: le proteine per essere analizzate devono essere solubilizzate ovvero estratte dal campione biologico, liberate da sostanze interferenti con la tecnica analitica e mantenute in soluzione durante l'intero processo di separazione. La scelta di un'adeguata soluzione di solubilizzazione, ed eventualmente un mezzo di purificazione per analizzare solo la parte d'interesse, sono due requisiti determinanti nella qualità del risultato finale di tutta la tecnica. L'estrazione delle proteine provenienti da diverse matrici (siero, plasma, latte, alimenti, microrganismi, cellule, tessuti, ecc) prevede la definizione di un protocollo diverso e specifico per ogni tipologia di matrice, partendo da linee guida generali. La soluzione di solubilizzazione consiste di una combinazione di agenti denaturanti, detergenti, riducenti e anfoliti, la cui funzione è quella di rompere qualsiasi tipo di interazione non covalente, rimuovere componenti non proteiche come gli acidi nucleici e prevenire una secondaria riagggregazione degli analiti durante

la corsa elettroforetica. Nel dettaglio, gli agenti denaturanti dispiegano e rendono lineari le proteine, impedendo l'aggregazione e la formazione di strutture secondarie, che ne modificherebbero la mobilità. Tra gli agenti denaturanti normalmente l'urea e la tiourea sono quelli più utilizzati. I detergenti distruggono le interazioni idrofobiche, aumentando la solubilità delle proteine in corrispondenza del proprio punto isoelettrico. La caratteristica comune a tutti i detergenti usati per la 2D, è la non ionicità; molecole cariche (come il sodiododecilsolfato, SDS) modificherebbero l'effettiva carica della proteina alterandone la corretta migrazione e separazione durante la IEF. In origine venivano usati detergenti non ionici come il Triton x-100, attualmente i più utilizzati sono il CHAPS e il CHAPSO. Gli agenti riducenti rompono i ponti disolfuro intracatena e con residui tiolici liberi; viene comunemente utilizzato il Ditiotreitolo (DTT). Gli anfiliti, molecole anfotere a basso peso molecolare, migliorano la solubilità del campione stabilizzandola durante l'IEF. Ulteriori accorgimenti che possono essere adottati per una migliore solubilizzazione del campione sono l'utilizzo di inibitori di proteasi, per evitare la degradazione proteolitica e l'utilizzo di Rnasi e Dnasi per contenere la viscosità del campione causata dagli acidi nucleici.

Il passaggio successivo consiste nella quantificazione delle proteine del campione; la misurazione della concentrazione proteica assume una rilevanza più marcata in alcuni campioni, come ad esempio il siero e il plasma, in cui l'alta abbondanza relativa di due classi di proteine, l'albumina e le immunoglobuline, spesso mascherano le componenti minori, proteine che si

trovano nelle immediate vicinanze del medesimo intervallo di separazione della mappa bidimensionale.

La separazione delle proteine mediante elettroforesi bidimensionale prevede tre tappe principali che si svolgono nell'arco di tre giorni:

- Reidratazione delle strips;
- IEF
- Equilibratura delle strips ed elettroforesi con SDS-PAGE

Reidratazione delle strips: le strips vengono acquistate disidratate, pertanto, prima dell'utilizzo, devono essere reidratate in apposito tampone, al fine di riacquisire le proprietà originali. Il volume di soluzione di reidratazione necessario, dipende dalla lunghezza della strip utilizzata. Il caricamento del campione sulla strip può essere effettuato in due modi: caricamento per reidratazione, dove una determinata quantità di campione pretrattato viene miscelata con il tampone di reidratazione e caricamento attraverso un sample cup, dove il campione viene applicato sopra la strip già reidratata, mediante un apposito pozzetto posizionato sopra la strip. Il caricamento per reidratazione permette la distribuzione uniforme delle proteine all'interno della strip prima della corsa ed è consigliato soprattutto per proteine ad alto peso molecolare. Il caricamento per sample cup permette di caricare una maggiore quantità di campione, tuttavia, può causare la precipitazione delle proteine nel punto di applicazione. I tempi di reidratazione delle strips dipendono dalla metodologia utilizzata per il caricamento del campione (>12 ore caricamento

per reidratazione; >6 ore caricamento per sample cup). La quantità di campione da caricare sulla strip dipende fondamentalmente da due fattori: la dimensione della strip e la metodica di colorazione del gel. La reidratazione avviene in appositi vassoi a 12 canali (“reswelling cassette”).

Focalizzazione isoelettrica (IEF): dopo aver applicato il campione, le strips vengono trasferite in un altro vassoio a 12 canali dotato di elettrodi (electrod tray). Due pezzi di carta bibula imbevuti d’acqua vengono messi tra gli elettrodi e il gel, per assorbire gli ioni che si accumulano alle estremità, e che potrebbero influire sulla separazione delle proteine. Le strips devono essere rigorosamente coperte d’olio minerale per impedire l’assorbimento di anidride carbonica che modificherebbe il pH del mezzo, alterando la lettura dei punti isoelettrici. Questa tecnica separa le proteine in base al loro punto isoelettrico, in un gel in cui sia stato creato un gradiente di pH stabile. Le più recenti applicazioni di IEF prevedono l’utilizzo di strips con gradienti di pH immobilizzati (IPG Strips). I gradienti di pH vengono immobilizzati attraverso legami covalenti delle immobiline all’acrilammide; in questo caso le immobiline sono derivati dell’acrilammide, contenenti catene laterali cariche con capacità tamponante, che vengono polimerizzati nel gel insieme all’acrilammide. Il pH in ogni punto è dovuto alla mistura di immobiline presenti. In commercio esistono strips di diverse dimensioni (7cm, 11cm, 17cm, 18cm, 24cm) e range di pH (3-10, 5-8, 4-7 ecc); i gradienti di pH possono essere lineari o non lineari, questi ultimi offrono una migliore

risoluzione nella zona centrale dell'intervallo di pH. La qualità della IEF dipende soprattutto dalle condizioni di voltaggio applicate; pertanto, è necessario creare e mettere a punto un gradiente di campo elettrico ottimale per la focalizzazione. Una volta effettuata la focalizzazione, con un tempo che varia in media dalle 13 alle 20 ore, ad una temperatura di 20°C, si passa alla seconda dimensione, previo opportuni passaggi di equilibratura.

Equilibratura delle strips e SDS PAGE: tra la prima e la seconda dimensione le strips vengono immerse in un apposito tampone di equilibratura, allo scopo di ridurre completamente le proteine mantenendole il più lineari possibile (9). I componenti base di un tampone di equilibratura sono urea, tris-HCl, SDS e glicerolo, a questi vanno aggiunti, al momento dell'uso, un'agente riducente (DTT) e uno alchilante (Iodoacetammide) in due passaggi consecutivi. Le strips così equilibrate possono essere applicate sul gel di seconda dimensione, previo risciacquo nel tampone di corsa (SDS tris-glicina). Nella seconda dimensione, le proteine vengono fatte correre ortogonalmente su di un gel di poliacrilammide in presenza di sodiododecilsolfato (SDS) e la separazione avviene solo in base alla loro diversa massa molecolare, tramite l'effetto setaccio creato dai pori del gel di poliacrilammide. L'unica differenza con una classica SDS-PAGE è l'assenza dello stacking gel; la strip di prima dimensione è posizionata direttamente sul gel di corsa; sulla strip, a sua volta, viene colata una soluzione bollente di

agaroso (low melting point) che gelificando, stabilizza la posizione della strip sul gel di seconda dimensione.

Colorazione dei gels: l'analisi comparativa e differenziale dei pattern proteici è notevolmente influenzata dalla metodica seguita per la visualizzazione degli spots sul gel di poliacrilammide. La scelta della metodica di colorazione dipende dalla quantità di campione di partenza e dai livelli di sensibilità, riproducibilità e accuratezza richieste per le successive analisi. La colorazione al nitrato d'argento possiede una sensibilità circa 5 volte maggiore rispetto a quella in coomassie colloidale brilliant blue (CBB) G-250 e 50 volte maggiore rispetto quella in coomassie brilliant blue (CBB) R-250. La colorazione argentea, pertanto, permette una buona visualizzazione anche in condizioni di quantità molto esigue di campione. Normalmente, i gel preparativi vengono colorati con coomassie, mentre quelli analitici con nitrato d'argento. Il grande inconveniente della colorazione al nitrato d'argento è che, seguendo i protocolli classici, non è compatibile con le successive analisi in spettrometria di massa; per renderla tale è necessario ridurre la sensibilità evitando l'incubazione dei gel con glutaraldeide e la colorazione con aldeide formica (50).

2.2 Analisi di immagine

L'analisi delle immagini dei gels scansiti è indispensabile per individuare gli spot d'interesse in un determinato esperimento, mediante il confronto dei loro profili bidimensionali; tale confronto permette di rivelare proteine nuove, mancanti o modificate, proteine up e down regulate. Questo tipo di analisi

richiede un lavoro meticoloso, lungo e preciso da parte dell'operatore e ovviamente l'ausilio di adeguati softwares. Le fasi dell'analisi d'immagine sono le seguenti:

“Cropping” delle immagini: viene selezionata l'area del gel d'interesse che deve essere comune a tutti i gel membri di un esperimento; le immagini “crociate” vengono quindi sistemate in una cartella comune.

Spot detection: consiste nell'individuazione di tutti gli spot presenti nei vari gel membri; in questo step vengono ottimizzati i seguenti parametri: la taglia dei pixel per la detection intorno ad ogni pixel nell'immagine, la sensitività nell'includere tutti gli spots, anche quelli piccoli e il livello di rumore di fondo.

Spot filtering: viene applicato per rimuovere le strisciate e altri segnali di non spot, le righe causate dalla colorazione e per escludere gli spots deboli al limite della detection. Tutto ciò riduce il tempo di editing stesso.

Spot editing : in questa modalità gli spots possono essere slittati, cancellati o disegnati per l'analisi. In relazione alla complessità del gel e alla bravura dell'operatore, questo step può richiedere diverse ore per gel.

Confronto di due o più mappe bidimensionali: per confrontare i gels è necessario creare un gel di riferimento o un gel virtuale che contenga tutti gli spots rilevabili di un dato esperimento. Un gel di riferimento viene creato a partire dall'immagine di un gel appartenente all'esperimento, al quale possono essere aggiunti tutti gli spots addizionali degli altri gels.

Gel matching: ora tutti i profili bidimensionali possono essere matchati con il gel di riferimento. Questo step è necessario, perché le immagini dei gel

differenti sono solitamente distorte per vari motivi, tra cui il rigonfiamento o la disidratazione dei gels. I gels possono essere matchati automaticamente, o con l'aiuto di seed matches (proteine uguali in tutti i gels) che sono stabiliti dall'operatore. Il software conettera' gli spots di riferimento e lo spot 'schiavo' con un vettore. La lunghezza del vettore consente di annullare eventuali differenze di migrazione che si sono avute durante la corsa e in questo modo consente una buona sovrapposizione dei gels.

Analisi statistica: i softwares consentono di attribuire dei numeri e quindi fare un'analisi statistica utilizzando i volumi cosiddetti normalizzati, e calibrando anche per punto isolettrico e peso molecolare. E' possibile quindi costruire un database ed esportare i dati in genere sotto forma di tabelle Excel.

2.3 Spettrometria di massa

In seguito all'analisi d'immagine, vengono individuati gli spots di interesse, che dovranno essere identificati mediante spettrometria di massa (MS). Gli spots vengono tagliati dal gel e digeriti con proteasi specifiche. Il digerito proteico, caratterizzato da un pattern specifico di peptidi, costituisce "l'impronta digitale" della proteina. L'analisi del digerito, mediante il microsequenziamento dei peptidi, consente di identificare la proteina e, inoltre, di verificare la presenza di modificazioni post-traduzionali. La proteasi più utilizzata per studi di spettrometria di massa è la tripsina; quest'ultima taglia il legame peptidico, liberando peptidi che al C-ter hanno lisina o arginina, eccetto quando questi amminoacidi sono seguiti da prolina (K-P e R-P). Lisina ed arginina sono due amminoacidi abbastanza frequenti, rappresentando rispettivamente il 5% e

6% degli amminoacidi presenti nelle proteine dei mammiferi (basandosi sulla presenza dei codoni). Complessivamente rappresentano l'11% del totale degli amminoacidi e generano peptidi con una lunghezza media di 9 aa e massa intorno ai 1000 Da. Questa massa è ideale per essere rilevata al MALDI-TOF (800-4000Da). La tripsina è relativamente poco costosa da produrre, ha un'alta attività ed è facilmente modificabile al fine di evitare l'autodigestione; pertanto, è indicata per gli studi di spettrometria di massa al fine di identificare le proteine, mentre altre proteasi possono essere utilizzate per caratterizzarne la struttura, per esempio per valutare la presenza di modificazioni post-traduzionali. La spettrometria di massa è una tecnica che possiede una sensibilità 100 volte superiore rispetto al sequenziamento proteico automatico di Edman; infatti, mentre con quest'ultima tecnica sono necessarie centinaia di femtomoli di materiale di partenza per ottenere una misura di massa peptidica, con la MS bastano solo alcune femtomoli (10). Lo spettro di una miscela di peptidi ottenuto mediante MALDI TOF produce una distribuzione dei peptidi in base al tempo di volo (TOF). Queste masse MALDI sono confrontate con quelle predette sulla base delle sequenze proteiche presenti in un database; la proteina è identificata con certezza se c'è un numero sufficiente di peptidi sovrapponibili a quelli della proteina nel database. La ricerca in database permette di usufruire delle informazioni strutturali raccolte tramite sequenziamento di Edman o MS e di individuare rapidamente una buona quantità di proteine. L'esito positivo dipende, tuttavia, dalla natura della proteina, dai dati ottenuti in MS e dal metodo usato per effettuare la ricerca.

Mediante il metodo Peptide Mass Fingerprint (PMF), le masse dei peptidi ottenuti da digestione proteolitica della proteina sconosciuta sono paragonate alle masse predette da una digestione teorica (in silico) di proteine in un database. Le masse dei peptidi, ottenute mediante spettrometria Maldi-Tof o ESI, vanno a costituire il fingerprint; se esiste una rilevante “sovrapposizione” con quelle teoriche, l’identificazione delle proteine può essere ritenuta affidabile. Il problema dell’identificazione mediante MALDI per il mappaggio o fingerprinting dei peptidi è che l’intera sequenza genica codificante per una data proteina deve essere già presente in database. Il software genera una lista di proteine che sono compatibili con il pattern sperimentale usando una tolleranza che dipende sia dalla scelta dell’operatore sia dalla natura dell’algoritmo. Il vantaggio principale del metodo è la velocità e la completa automatizzazione della ricerca. Lo svantaggio più grosso del PMF è l’ambiguità del risultato a causa della ridondanza della massa peptidica; per esempio, un peptide di 5 aminoacidi può avere la stessa massa semplicemente disponendo in sequenza differente i suoi aminoacidi. Per avere dei buoni risultati occorre ottenere le masse di un enorme numero di peptidi in modo di avere sufficiente specificità nella ricerca e questo non sempre è possibile. La ridondanza della massa accade frequentemente nei genomi più grandi. Quindi il PMF è efficiente per lo più nell’analisi di proteine da organismi che hanno un genoma piccolo, completamente sequenziato e con variazioni note. Altri fattori che si sommano alla ridondanza della massa sono errori di sequenza, sostituzioni conservative, polimorfismi e modificazioni

post-traduzionali. Sul Web è disponibile una vasta serie di siti con algoritmi dedicati nei quali è possibile inserire la serie di masse provenienti dal PMF (Profound, Mascot, PeptideSearch, ExPASy tools.).

2.4 MALDI TOF

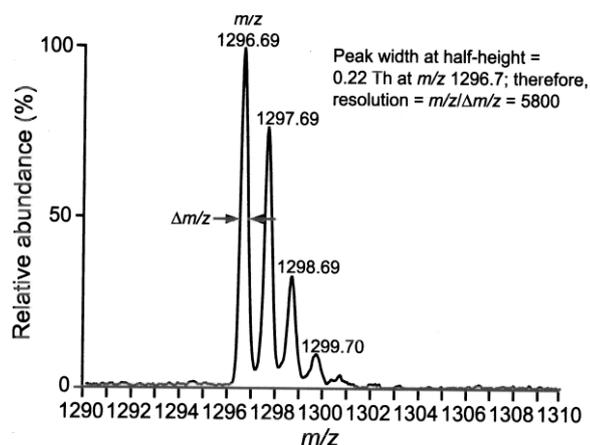
In generale uno spettrometro di massa è composto dalle seguenti unità:

- Sistema di introduzione per trasferire il campione nella sorgente ionica
- Sistema di vuoto per garantire pressioni molto basse all'interno dello spettrometro
- Sorgente ionica per convertire le molecole neutre del campione in ioni allo stato gassoso
- Analizzatore di massa per separare e discriminare le specie ioniche
- Rivelatore per misurare l'abbondanza relativa degli ioni che lo colpiscono
- P.C. per il controllo dello strumento e la gestione dei dati

Il MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight) (fig.1) è uno spettrometro di massa in cui gli ioni generati da un raggio laser UV (337nm) vengono discriminati in base al loro rapporto massa/carica nell'analizzatore. Prima dell'introduzione nella sorgente MALDI, il campione viene miscelato con una matrice organica e depositato su di una piastra in acciaio (target plate). Dopo aver fatto cristallizzare la miscela campione-matrice, il target plate viene introdotto nello strumento. Il raggio laser, con funzione di vettore energetico, causa l'istantaneo assorbimento d'energia e l'immediato trasferimento della carica in fase gassosa dalla matrice all'analita,

generando gli ioni; le sorgenti MALDI producono principalmente ioni monocarica con una notevole semplificazione dello spettro. Gli analizzatori di massa a tempo di volo discriminano, come si intuisce dal nome, gli analiti in base al tempo che impiegano a percorrere una regione ad alto vuoto. La capacità di differenziare misure di massa in analizzatori tipo TOF è espressa mediante la risoluzione:

$$R = \frac{m/z}{\Delta m/z} = \frac{m}{\Delta m}$$



dove m è la massa relativa al picco in esame, z è la carica con cui lo ione raggiunge il rivelatore e Δm è solitamente definita come la larghezza del picco a mezza altezza. Uno ione di massa m formatosi nella regione della sorgente s (s = lunghezza della sorgente) è soggetto ad un campo elettrico $E = V/s$ dovuto al potenziale elettrico V applicato alla griglia di estrazione. Conseguentemente l'energia cinetica acquistata dallo ione è data da:

$$(1) \quad \frac{1}{2}mv^2 = zeV$$

dove e = carica elettrica elettrone; z = numero di cariche (solitamente 1); V = $E s$ = potenziale. Elaborando l'equazione (1) si ottiene che la velocità dello ione di massa m è data da:

$$(2) \quad v = \sqrt{2eV / m}$$

Da questa relazione vediamo che la velocità di uno ione accelerato attraverso la griglia di estrazione è inversamente proporzionale alla radice della sua massa. Il volo continua poi attraverso la cosiddetta FFR, (Free Field Region) che è praticamente la lunghezza del tubo di volo D , fino a colpire il detector. In assenza di collisioni le velocità rimangono costanti durante il volo così che, ricordando che $t = s/v$, il tempo misurato dal detector è dato da:

$$(3) \quad t = D\sqrt{m / 2zV}$$

Conseguentemente il tempo di volo di uno ione di massa m in uno spazio fisso è direttamente proporzionale alla radice della massa. Tenendo fissi i valori di D , s , V , è possibile convertire i dati del TOF dal dominio del tempo a quello delle masse. Il rapporto massa/carica è dato da

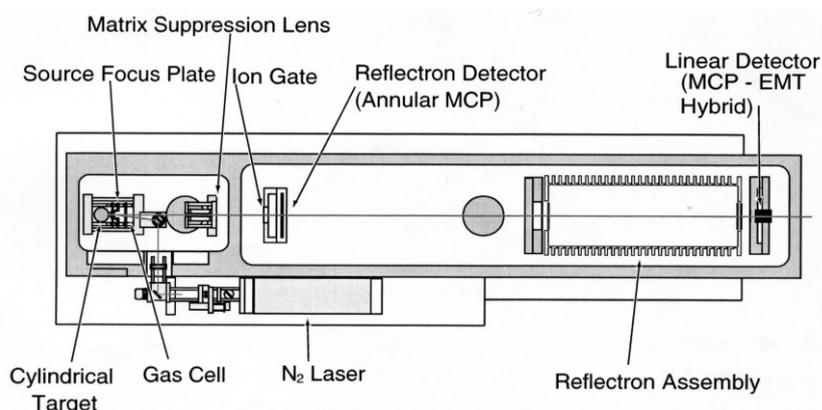
$$m / z = 2eV(t / D)^2$$

che espressa in forma canonica diventa:

$$(4) \quad m / z = at^2 + b$$

dove a e b sono determinate misurando i tempi di volo di sostanze standard di massa conosciuta. In effetti queste equazioni non descrivono completamente il sistema e le condizioni iniziali che coinvolgono tempo e spazio: la distribuzione gaussiana delle energie cinetiche contribuisce alla perdita di risoluzione nella determinazione del tempo, che si ripercuote in un

allargamento del picco di massa. Per aumentare la risoluzione ed avere una migliore accuratezza nella determinazione della massa viene utilizzato il reflectron, un dispositivo che principalmente aumenta la lunghezza del tubo di volo ed, inoltre, focalizza distribuzioni di posizione e velocità iniziali (principali cause dell'allargamento dei picchi nello spettro). Il reflectron è una sorta di "specchio" elettrostatico che, mediante potenziali elettrici progressivamente sempre più alti, respinge gli ioni. Considerando due ioni di massa uguale ma velocità iniziali differenti, quello più veloce penetra maggiormente nel reflectron aumentando così il suo tempo di permanenza all'interno. Con opportuni "aggiustamenti" della geometria dello strumento lo ione più lento raggiungerà quello più veloce in uscita dal reflectron giungendo contemporaneamente al detector.



Gli ioni, dopo esser passati attraverso l'analizzatore, arrivano al detector che consente di rivelarne la massa e l'abbondanza relativa quantificando una variazione di corrente elettrica proporzionale al numero di cariche che

colpiscono il rivelatore. Il principio alla base del funzionamento di un moltiplicatore di ioni (EM) sfrutta l'emissione di elettroni che si verifica in seguito all'impatto di uno ione ad alta velocità con una superficie metallica (dinodo di conversione). Gli elettroni secondari emessi sono proporzionali al numero di elettroni incidenti, questi sono a loro volta accelerati e urtano un secondo dinodo. Il processo è così ripetuto ed ad ogni stadio comporta un incremento del segnale fino ad ottenere amplificazioni di 10⁷ volte. Il detector posto alla fine del TOF è solitamente un MCPs (micro channel plates) composto da una serie di cavi in microfibra ottica di vetro dopato con metallo, ognuno dei quali agisce come una versione multicanale di un singolo elettromoltiplicatore (EM). La rappresentazione di uno spettro di massa consiste in un grafico dei valori massa/carica contro le abbondanze relative (fig.2).



Figura 1 MALDI TOF

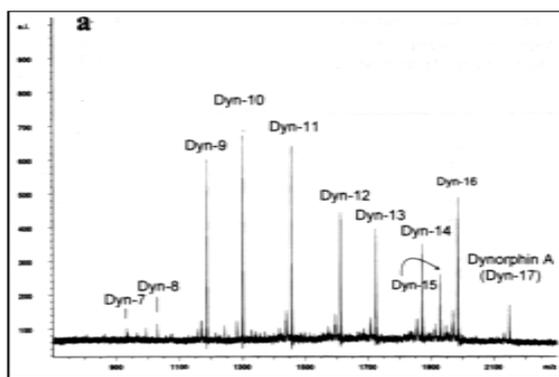


Figura 2 Spettro di massa al MALDI TOF

3. SEQUENZIAMENTO DEL DNA

3.1 Storia del sequenziamento del DNA

Il sequenziamento del DNA è una tecnica che permette l'identificazione di sequenze geniche e di sequenze di controllo all'interno di un frammento; inoltre, è utile per confrontare le sequenze di geni analoghi di organismi diversi. La storia del sequenziamento del DNA ebbe inizio negli anni '70 con Maxam e Gilbert ("metodo della degradazione chimica del DNA") e Sanger ("metodo a terminazione di catena"), che sono stati i suoi precursori. Il metodo di Maxam e Gilbert, basato sulla degradazione chimica del frammento di DNA da sequenziare, è ormai poco utilizzato perché utilizza composti chimici dannosi per la salute. Si differenzia dal metodo di Sanger perché non utilizza sintesi enzimatica ma trattamenti chimici che agiscono a livello di singoli nucleotidi; è basato, infatti, sull'abilità di alcuni composti chimici, quali l'idrazina e il dimetilsolfato (DMS) di modificare in modo specifico le basi all'interno del DNA, rispettivamente le pirimidine e le purine, e su quella della piperidina di catalizzare la rottura del filamento di DNA a livello dei nucleotidi modificati. Tale metodo prevede la marcatura terminale con ^{32}P al 5' o al 3' del DNA a doppio filamento e la successiva denaturazione e separazione dei due filamenti di DNA. Il DNA marcato a singola elica viene suddiviso in quattro aliquote, ognuna delle quali viene sottoposta a trattamento con DMS o idrazina, in presenza di piperidina. Le reazioni sono condotte in modo controllato in modo tale che in ogni reazione ogni filamento marcato sia tagliato una sola volta: statisticamente tutti le basi saranno degradate

producendo una serie di frammenti, la cui lunghezza dipenderà dalla distanza tra l'estremità marcata e il sito di taglio. I filamenti marcati vengono separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide e, quindi, visualizzati, mediante autoradiografia, come bande radioattive corrispondenti a ciascun nucleotide presente nel frammento originale. Il metodo di Sanger originale consisteva nella sintesi di nuovi filamenti di DNA complementari ad uno stampo a singolo filamento, in presenza di didesossinucleotidi trifosfati (ddNTP). Lo stampo di DNA a singolo filamento è ottenibile mediante il clonaggio del frammento da sequenziare in un vettore derivante dal fago M13 o mediante il clonaggio del frammento da sequenziare in un vettore plasmidico, poi convertito a singolo filamento mediante trattamento con alcali o denaturazione termica. La sintesi del DNA richiede un innesco specifico (primer) complementare al filamento da sequenziare, la DNA polimerasi e una miscela dei quattro desossinucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) con 1 didesossinucleotide marcato (con ³⁵S, ³²P) per ogni reazione di sequenza; un ddNTP è un nucleotide modificato (presenta un 3'-H sul desossiribosio invece di un 3'-OH) che determina l'arresto della sintesi della catena di DNA. La reazione di sequenza era suddivisa in quattro provette di sintesi, ciascuna delle quali conteneva il DNA stampo, il primer, la DNA polimerasi e la miscela dei 4 dNTP (di cui uno radioattivo) e un ddNTP (a concentrazione 1:100 rispetto al corrispondente dNTP). Al termine della reazione, ogni miscela contiene una popolazione di filamenti di nuova sintesi, che hanno in comune l'estremità 5' ma che differiscono in lunghezza perché la loro sintesi è stata

bloccata in diverse posizioni al 3'. I filamenti marcati sono separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide-urea (5-7M) ad elevato voltaggio; la localizzazione delle bande avviene per autoradiografia in direzione 5'-3', interpretando il gel dal basso verso l'alto. L'evoluzione è avvenuta negli anni '80 con i sequenziatori automatici, in particolare con il nuovo apparecchio della PE Applied Biosystems (ABI). Tale sistema si basava sugli stessi principi chimici di Sanger, tuttavia prevedeva l'utilizzo di coloranti fluorescenti, al posto di composti radioattivi, per marcare ogni nucleotide con un colore diverso; poiché i quattro colori per le quattro basi azotate (A,C,G,T) si distinguevano facilmente, le reazioni potevano essere accorpate in un'unica provetta e fatte correre insieme su una corsia del sequenziatore, mentre un raggio laser leggeva la base del gel ovvero la fluorescenza caratteristica di ogni colorante. Un'ulteriore passo è stato compiuto con l'introduzione di sequenziatori automatici con elettroforesi capillare, che, rispetto a quelli con elettroforesi su gel di poliacrilammide, semplifica notevolmente il lavoro dell'operatore; infatti, con un'unica iniezione, è possibile ottenere l'elettroferogramma della sequenza.

3.2 Fasi preanalitiche della tecnica di sequenziamento

Il sequenziamento del DNA prevede le seguenti fasi:

- Estrazione del DNA
- Amplificazione del segmento di DNA target mediante PCR
- Reazione di sequenza
- Purificazione del prodotto di sequenza

Estrazione del DNA: il DNA può essere estratto con kit di estrazione presenti in commercio o con la classica procedura che segue il metodo del fenolo-cloroformio. L'utilizzo di kit, riduce notevolmente i tempi di estrazione, tuttavia la resa, in termini di quantità di DNA estratto, è, generalmente, minore rispetto al metodo del fenolo-cloroformio. In ogni caso, la metodica di estrazione del DNA genomico prevede la lisi delle cellule del sangue mediante un'adeguata soluzione di estrazione, quindi un trattamento proteolitico con proteinasi K e, infine, l'utilizzo di solventi organici, per allontanare tutte le sostanze interferenti, come proteine, acidi grassi ecc. Il DNA genomico estratto da qualsiasi cellula nucleata deve essere puro e intatto, con un alto peso molecolare (almeno 50-100kb); questi sono dei requisiti essenziali per le successive analisi del DNA.

Amplificazione del segmento di DNA target mediante PCR: l'amplificazione del DNA mediante PCR permette di ottenere un numero estremamente grande di copie di una specifica sequenza di DNA partendo da minime quantità iniziali di una miscela dell'acido nucleico. La reazione è caratterizzata da una sintesi enzimatica in vitro di sequenze specifiche di DNA e a questo scopo vengono utilizzati due primers oligonucleotidici che si legano alle regioni fiancheggianti la sequenza da amplificare sui filamenti opposti che costituiscono la doppia elica. Vengono quindi compiuti una serie di cicli a varie temperature programmate nel termociclatore che comprendono le fasi di denaturazione, dove l'elevata temperatura causa la denaturazione della doppia elica del DNA, ibridazione dove l'abbassamento della temperatura permette l'appaiamento

dei primers con le sequenze complementari del DNA ed estensione dei primers dove la DNA polimerasi inizia la sintesi di filamenti di DNA in direzione 5'-3'. Per verificare la qualità dell'amplificazione, il DNA amplificato viene separato mediante elettroforesi su gel d'agaroso e le bande vengono visualizzate al transilluminatore UV. Il campione di DNA da analizzare nel sequenziatore può essere rappresentato sia dall'amplificato che dall'eluato delle bande tagliate dal gel. In entrambi i casi i frammenti di DNA purificati devono essere sottoposti a reazione di sequenza.

La reazione di sequenza è un metodo relativamente semplice in cui cicli successivi di denaturazione, appaiamento, estensione in un termociclatore producono piccoli frammenti lineari terminanti con un didesossinucleotide. La miscela di reazione è composta dal DNA da sequenziare, dal primer specifico per la regione target, dalla miscela di nucleotidi, dai didesossinucleotidi marcati in fluorescenza (big dye terminators), dall'enzima di sequenziamento (ampliTaq DNA polimerasi, FS) e dal buffer di reazione; le concentrazioni dei vari componenti dipende dal DNA di partenza. L'enzima di sequenziamento utilizzato in "ABI prism cycle sequencing kit" è una forma mutante di *thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerasi che contiene una mutazione puntiforme nella parte attiva (Phe667Tyr); questa mutazione risulta la meno discriminante nei confronti dei didesossinucleotidi ed è quella che conduce ad un picco d'intensità più alto. Con questa tecnica possono essere lette sequenze di frammenti lunghi fino a 600-800bp. Secondo convenzioni internazionali all'adenina corrisponde il colore verde, alla guanina il blu, alla timina il rosso,

alla citosina in giallo. I prodotti della reazione, al fine di rimuovere i nucleotidi non incorporati, vengono purificati mediante apposite colonnine o per precipitazione con etanolo assoluto e sodio acetato. Il prodotto purificato deve essere miscelato con formammide modificata, che mantiene separati i filamenti sottoposti al successivo step di denaturazione e denaturato a circa 95°C per qualche minuto. Subito dopo i campioni vengono posti in ghiaccio per impedire ai singoli filamenti di DNA di riappaiarsi e possono essere analizzati al sequenziatore.

3.3 Sequenziatore automatico ABI PRISM 310

Il sequenziatore automatico ABI PRISM 310 (fig.3) è composto da un'unità elettroforetica dotata di un raggio laser fisso e da un computer esterno collegato alla camera, corredato di un software in grado di analizzare l'emissione della fluorescenza. La camera elettroforetica è costituita da una zona contenente un carrello removibile sul quale vengono posizionati i tubi con la miscela da sottoporre al sequenziamento, i contenitori del tampone e dell'acqua deionizzata, il catodo ed un'estremità del capillare in cui avviene l'elettroforesi; un'altra zona della camera presenta un contenitore per il tampone di corsa in cui è posto l'anodo ed un sistema costituito da una siringa che inietta il polimero nel capillare. Infine, vi è una zona di rilevazione, dove il capillare giunge in prossimità del raggio laser, per cui i fluorocromi dei campioni che migrano verso l'anodo si eccitano ed emettono fluorescenza. Per generare la differenza di potenziale necessaria per la corsa elettroforetica, il tampone di corsa (Genetic Analyzer Buffer) deve essere a contatto con il

capillare e con gli elettrodi. Il polimero utilizzato (Performancer Optimizer Polymer 6%, POP-6 o 4%, POP-4) deve riempire completamente il capillare, e rappresenta il supporto attraverso il quale i frammenti di DNA vengono separati in base alle loro dimensioni. Il capillare è costituito da un sottilissimo tubo in vetro di 50 μ m di diametro ed una lunghezza variabile in base alla corsa da effettuare; inoltre presenta un rivestimento opaco per tutta la sua lunghezza, tranne in corrispondenza della zona di rivelazione dello strumento che è a contatto con il raggio laser ("finestra"). Il campione viene iniettato all'interno del capillare per via elettrocinetica ovvero in seguito al flusso di corrente che si genera dal catodo verso l'anodo. Terminata la corsa del primo campione, il catodo e il capillare sono nuovamente immersi nel tampone generando la differenza di potenziale necessaria per la separazione elettroforetica del campione successivo; pertanto i frammenti di DNA, una volta separati, vengono a contatto con il laser in tempi diversi. Il raggio laser dopo aver attraversato una serie di lenti incide su di uno spettrografo, che separa le lunghezze d'onda e le indirizza ad una camera CCD (Charge-Coupled-Device) dotata di filtri virtuali diversi a seconda dei fluorocromi da analizzare. Tale camera analizza lo spettro di emissione e converte il segnale luminoso in segnale digitale che viene memorizzato su un computer per il successivo processamento; il programma utilizzato è ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software. Alla fine della corsa la sequenza delle bande di DNA marcato viene visualizzata in un unico grafico chiamato elettroferogramma, (fig.4) caratterizzato da una successione di picchi di 4

colori diversi, che corrispondono alle emissioni fluorescenti dei diversi fluorocromi.

Le sequenze geniche ottenute possono essere confrontate con quelle presenti in banche dati, come ad esempio Blast che è una banca dati pubblica messa a disposizione dall'NCBI (National Center for Biotechnology Information). L'NCBI, inoltre, mediante studi sulla biologia computerizzata e lo sviluppo di softwares continuamente aggiornati per l'analisi ed elaborazione delle sequenze geniche, fornisce utili informazioni biomediche per la comprensione dei processi molecolari alla base delle numerose patologie presenti nell'uomo. Soprattutto nel campo dei disordini monofattoriali, cioè delle sindromi causate dall'alterazione di un singolo gene, come le talassemie, la fibrosi cistica, la distrofia muscolare e le emoglobinopatie, l'analisi del DNA mediante polymerase chain reaction (PCR) e sequenziamento, ha quasi sostituito le classiche metodiche di screening, certamente più rapide ma poco precise.



Figura 3 Sequenziatore automatico

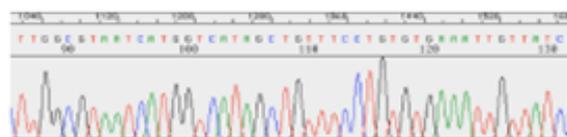


Figura 4 Rappresentazione di un elettroferogramma

4. TRANSTIRETINA (TTR)

4.1 Struttura, metabolismo e funzioni

La Transtiretina (TTR) è una proteina globulare plasmatica. La sua struttura quaternaria è rappresentata da un omotetramero, precisamente un dimero di dimeri, le cui subunità si assemblano attorno ad un canale centrale che può ospitare due molecole di ligando. Ciascun monomero, dalla forma di ellissoide prolata, è composto di due foglietti β antiparalleli e un' α elica. Le interazioni dei foglietti beta permettono il legame dei monomeri in dimeri e il corto loop di ciascun monomero rappresenta l'interazione principale dimero-dimero; questi due paia di loop separano i foglietti beta opposti e convessi dei dimeri formando un canale interno (fig. 5).



Fig.5 Struttura tridimensionale della TTR.
Le lettere A-H indicano i foglietti β di ogni monomero

La TTR possiede una massa molecolare di circa 55KDa; ciascun monomero è costituito da 147 amminoacidi, dove i primi 20 costituiscono il peptide segnale, gli altri 127 la catena peptidica (fig.6).

```
      10      20      30      40      50      60
MASHRLLLLC LAGLVFVSEA GPTGTGESKC PLMVKVLDAV RGSFAINVAV HVFRKAADDT
      70      80      90     100     110     120
WEPFASGKTS ESGELHGLTT EEEFVEGIYK VEIDTKSYWK ALGISPFHEH AEWVFTANDS
      130     140
GPRRYTIAAL LSPYSYSTTA VVTNPKE
```

Figura 1 Sequenza amminoacidica della Transtiretina.

Il gene codificante la TTR (7257paia di basi) è situato sul cromosoma 18q ed è composto di 4 regioni esoniche e 3 introniche; la sequenza codificante (CDS) consiste di 443 paia di basi. Il sito di inizio della trascrizione è rappresentato da un adenina in posizione +1 (11;12), la regione a monte del sito di inizio presenta gli elementi promotori TATAAAA e GTCAAT rispettivamente in posizione -30 e -101. In letteratura viene riportato un ulteriore elemento promotore, la cui sequenza è caratterizzata da un pentanucleotide TTTTG ripetuto otto volte, in posizione -270; inoltre, è stata osservata una sequenza segnale di poliadenilazione AATAAA 23 basi a monte dal sito di poliadenilazione (13,51).

Tutte le TTR plasmatiche sono sintetizzate nelle cellule parenchimatiche epatiche (14). La sua sintesi avviene anche nel plesso coroideo, nel pancreas e nell'epitelio del pigmento retinale. E' una proteina extracellulare, presente sia nel sangue sia nel liquido cerebro-spinale. La TTR è catabolizzata principalmente nel fegato, mediante escrezione renale e attraverso il tratto

gastrointestinale. La sua emivita è di circa 2,5 giorni e non viene alterata in condizioni di stress e di infiammazione acuta (15). Le Transtiretine, conosciute anche come prealbumine, sono state denominate inizialmente “thyroxin-binding prealbumin” (TBPA) in virtù del loro legame con la tiroxina (T4); successivamente è stato dimostrato che si legano anche alla triiodotironina (T3) e alla holo-retinol-binding protein (RBP con retinolo), da cui il nome di “transti(roxin)retin(ol)” che denota la duplice funzione di trasporto (16). La TTR è coinvolta nel trasporto degli ormoni tiroidei e del retinolo (vitamina A), entrambi ormoni essenziali per la normale crescita e sviluppo di tutti gli organi dell'organismo umano, in particolare del cervello. Circa il 40% della TTR plasmatica circolante si presenta legata al RBP come un complesso proteina-proteina molto stabile (53); la forza di tale interazione è determinante nel prevenire la perdita eccessiva del RBP per filtrazione glomerulare. Nonostante ciascuno dei quattro monomeri della TTR abbia un sito di legame per il RBP, il tetramero possiede un'alta affinità di legame solo per una di queste molecole. Sebbene i meccanismi molecolari non siano ancora del tutto chiari, è stato ipotizzato che l'alterazione del legame TTR-RBP contribuisca allo sviluppo della resistenza all'insulina in casi di obesità e di diabete mellito di tipo 2 (T2DM) (17,54). Il complesso TTR-RBP normalmente trasporta il 90%–95% di retinolo e circa il 20% degli ormoni tiroidei circolanti; il 70% viene trasportato dalle globuline che legano le tiroxine o TBG, la rimanente parte dall'albumina. Ogni monomero della TTR possiede due siti di legame per gli ormoni della tiroide sebbene l'affinità di legame per la T3 sia minore rispetto a quella per la

T4. Nel fluido cerebro-spinale la TTR è il principale trasportatore di T4, in quanto l'albumina è assente (58). Studi condotti sui cambiamenti conformazionali della TTR, hanno dimostrato che l'alterazione dell'affinità di legame con la tiroxina può causare condizioni di ipertiroxinemia (18,61). La TTR lega anche le pterine (59) e l'apolipoproteina ApoA1 (60), tuttavia, ad oggi, non è noto il suo ruolo nel metabolismo di questi ligandi. In condizioni normali la concentrazione plasmatica della TTR è di 100-400 mg/l; si osserva una cospicua diminuzione in casi di deficit nutrizionali proteici, di lesioni delle cellule epatiche, di diabete; inoltre, è una proteina negativa della fase acuta.

4.2 Cenni sull'implicazione delle varianti geniche della TTR nelle Amiloidosi

Ad oggi, nel gene della TTR sono state identificate circa 80 diverse mutazioni, perlopiù di natura amiloidogena. Le amiloidosi vengono classificate in base alla caratterizzazione del precursore amiloide (19), (catene immunoglobuliniche leggere monoclonali, AL; varianti della transtiretina, ATTR; proteina amiloide A del siero, SAA; β 2 microglobulina, A β 2M) e vengono tradizionalmente distinte in primitive, secondarie, ereditarie ed età-correlate (20). Le amiloidosi primitive, le forme sistemiche più frequenti nel mondo occidentale, sono caratterizzate dalla deposizione di fibrille di catene leggere monoclonali delle immunoglobuline. Gli organi e i tessuti maggiormente interessati sono il rene, il cuore, il fegato, il sistema nervoso periferico e il sistema nervoso autonomo. Altre possibili localizzazioni sono il tratto gastro-enterico e il tessuto muscolare (21). Le amiloidosi secondarie

sono caratterizzate dalla deposizione di fibrille di SAA che tendono a localizzarsi negli organi parenchimatosi, come il fegato, la milza e i reni, raramente nel cuore e sono associate a patologie infiammatorie croniche. Nelle forme ereditarie, che si trasmettono solitamente con modalità autosomica dominante, il deposito di ATTR colpisce principalmente il sistema nervoso periferico, da cui ne deriva la precedente denominazione di Polineuropatia Amiloidotica Familiare; alcuni sottotipi sono comunque caratterizzati anche dal coinvolgimento del cuore. Le amiloidosi correlate all'età comprendono sia la forma atriale isolata che la forma sistemica senile (SSA), che non sono associate ad altre patologie concomitanti. L'amiloidosi atriale isolata si ritrova in circa il 90% degli ultranovantenni, sebbene possa comparire fin dalla terza decade di età. In questa forma, le fibrille amiloidi sono composte prevalentemente da peptide natriuretico atriale. Nella SSA, le fibrille sono costituite da transtiretina nativa, priva cioè delle mutazioni che distinguono le forme eredo-familiari. La SSA può comparire a partire dall'età di 60 anni e la sua prevalenza aumenta ad ogni decade (22;23). In questa forma, il cuore e i polmoni rappresentano gli organi maggiormente interessati; si ritiene possibile, tuttavia, anche il coinvolgimento renale e la sindrome del tunnel carpale. L'amiloidosi A β 2M si riscontra in pazienti sottoposti ad emodialisi cronica, che dal punto di vista clinico presentano spesso artropatie e sindrome del tunnel carpale; tipico è il riscontro di elevati livelli di β 2 microglobulina nel siero. Nelle ATTR e nelle SSA, i principali meccanismi coinvolti nella formazione di fibrille amiloidogeniche sembrano essere

modifiche posttraduzionali, cambiamenti conformazionali ed errori nel clivaggio proteolitico della TTR (24,25); tuttavia, il ruolo di questi cambiamenti nell'auto-assemblamento delle fibrille non è ancora chiaro. Nelle forme eredo-familiari le mutazioni della transtiretina, destabilizzando il tetramero, causano la sua dissociazione nei monomeri che avviano la fibrillogenes (26). Nelle forme di SSA è il tetramero nativo, relativamente stabile in condizioni normali, che diviene insolubile e precipita come amiloide. La presenza di mutazioni, pertanto, non è un prerequisito indispensabile perché la proteina possa precipitare in forma fibrillare. In uno studio condotto su 25 pazienti, di cui 14 con SSA e 11 con una forma familiare, le fibrille risultavano prevalentemente costituite da monomeri integri di transtiretina nella forma eredo-familiare e da frammenti C-terminali nella SSA (27). Poiché è stato osservato che tali frammenti derivavano dal clivaggio del monomero in posizioni ben precise (posizione 46-49-52) è stato ipotizzato che la frammentazione in tali punti esponga delle sequenze nascoste, responsabili dell'aggregazione e, quindi, della precipitazione di subunità amiloidogeniche (23,28). Studi su siti antigenici, hanno dimostrato che la transtiretina depositata nell'amiloide, rispetto a quella circolante, possiede una configurazione alterata, sebbene la sua struttura primaria rimanga inalterata (29). Inoltre, lo stress ossidativo risulta essere un fattore che può contribuire allo sviluppo di depositi di fibrille amiloidi; è noto, ad esempio, che lo stress ossidativo indotto dall'ossido nitrico, in vitro, modifica la conformazione e riduce la stabilità del tetramero di transtiretina, mutato o nativo (30).

Tra le forme di ATTR più gravi e conosciute ricordiamo:

- Le amiloidosi di tipo 1 (AMYL1), dove le fibrille amiloidi, con diversa localizzazione tissutale, sono responsabili di vari tipi di patologie come polineuropatie e cardiomiopatie amiloidi, sindrome del tunnel carpale, senil systemic amyloidosi.
- Le amiloidosi di tipo 7 (AMYL7), note anche come amiloidosi leptomeningee o meningocerebrovascolari, dove le fibrille amiloidi, localizzate nel sistema nervoso centrale (principalmente nelle pareti dei vasi leptomeningei, nella pia e subpia aracnoide), possono causare gravi danni alla vista (amiloidosi oculoleptomeningea), demenza, deterioramento psicomotorio.

4.3 Stress ossidativo e forme coniugate della TTR

Lo stress ossidativo si verifica quando le specie reattive dell'ossigeno (ROS), che vengono costantemente prodotte in tutti i tessuti, raggiungono concentrazioni troppo elevate; in queste condizioni, i radicali liberi derivati dall'ossigeno e i perossidi sono in grado di danneggiare lipidi, proteine e acidi nucleici. I bersagli principali dei radicali liberi sono i doppi legami dei lipidi di membrana; la perossidazione di questi residui di acidi grassi provoca una riduzione della fluidità di membrana, che può causare la lisi cellulare. Anche i gruppi tiolici delle catene laterali dei residui di cisteina possono essere ossidati con formazione di legami crociati e conseguente inattivazione delle proteine. Il danno ossidativo sul DNA può indurre mutazioni. E' stato ipotizzato che il danno molecolare causato dai derivati tossici dell'ossigeno possa

rappresentare un fattore determinante oltre che nel processo di invecchiamento, in molte malattie come ad esempio artrite, enfisema, certe neoplasie, malattie neurodegenerative. Enzimi come la superossido dismutasi, la catalasi e la glutazione perossidasi proteggono le cellule dal danno ossidativo. In diversi studi condotti sulle forme ereditarie di amiloidosi è stato dimostrato che lo stress ossidativo causa modificazioni postraduzionali della TTR, che possono alterarne la struttura quaternaria (31,32). E' interessante notare che circa l'85-95% della TTR plasmatica circolante è sulfonata e tiolata (S-cisteinilata, S- cisteinglicinata, e S-glutationata) in corrispondenza dell' unico residuo di cisteina in posizione 10 lungo la sequenza peptidica dei 127 amminoacidi della TTR wild type; la restante parte, 5-14%, non risulta essere modificata (33,34,35). Dai cristalli della TTR wild type (36) si osserva che, in ogni monomero, il residuo di cisteina in posizione 10 si trova sull'elica A del foglietto beta e che il suo atomo di zolfo può formare un legame (NH-S) con l'idrogeno amminico della catena principale del residuo di gly57 nell'elica D del foglietto β . La rottura del legame idrogeno può alterare la struttura della TTR, costringendola ad adottare una diversa conformazione (37,57). Le interazioni tra le forme di omocisteina, cisteina, cisteinglicina e glutazione (ridotte, ossidate, e coniugate con proteine) possono giocare un ruolo importante nel sistema di difesa antiossidante extracellulare (38,39,40). Poiché la TTR è una proteina extracellulare, la formazione di TTR S-tiolate può essere dovuta a reazioni di scambio di disolfuri, mentre la formazione di TTR S-sulfonate richiede la sulfitolisi delle TTR S-tiolate. La sulfonatazione della TTR prevede

la rottura dei legami disolfuro nelle specie di TTR S-tiolate mediante sia bisolfiti sia ioni solfiti, rilasciando cisteina, cisteinglicina, e glutatione. Poiché il pK_{a2} degli acidi solforici è 7,2 a pH fisiologico (7.4), gli ioni bisolfito dissociano e la loro concentrazione diminuisce rispetto a quella degli ioni solfito. Studi di cinetica hanno dimostrato, inoltre, che la velocità di reazione di disolfuri a basso peso molecolare con ioni bisolfiti è trascurabile rispetto a quella con ioni solfiti (41); così la formazione di TTR S-sulfonata è dovuta principalmente alla reazione tra TTR S-tiolata e ioni solfiti. La formazione di proteine S-Sulfonate può distruggere lo stato redox dei tioli nel plasma, causando un eccessivo rilascio di ROS che ossidano le proteine. In uno studio condotto su pazienti affetti di ATTR è stata identificata una variante Phe33Cys (41) in cui il residuo di cisteina, situato all'interno di una regione strutturata della TTR, era S-sulfonato e S-tiolato similmente a quanto si può osservare nel residuo Cys10. Studi in vitro hanno dimostrato che la variante S-cisteinilata Val30Met della TTR possiede una maggiore propensione a formare fibrille amiloidi rispetto sia alla variante Val30Met non modificata, sia alla TTR wild-type non modificata sia alla TTR wild-type S-cisteinilata (42). Ad oggi, non esiste un giudizio univoco riguardo il ruolo delle TTR S-sulfonate nella fibrillogenesi. Alcuni studi indicano un probabile effetto stabilizzante delle forme S-sulfonate di TTR sul tetramero (43,56). Studi in vivo e in vitro sulla variante Y114C della TTR, associata ad una particolare forma di polineuropatia amiloidotica familiare, suggeriscono che la presenza di legami disolfuro impedisce la regolare aggregazione dei monomeri di TTR in fibrille amiloidi (44,45,52). Al contrario,

altri studi in vitro indicano che le forme S-sulfonate di TTR sono quelle più dannose e che influiscono maggiormente sulla fibrillogenesi (46). Sebbene il meccanismo non sia ben chiaro, si ritiene che i gruppi S-sulfonati modifichino la carica netta della molecola, mediante l'aggiunta di una carica negativa a ciascun monomero di TTR o di quattro cariche negative al tetramero, cambiando lo stato conformazionale della molecola (47,55).

5. SCOPO DELLA TESI

Dalla letteratura è noto che, tra le numerose varianti della transtiretina wild tipe, una buona parte sia caratterizzata da sostituzioni amminoacidiche con residui di cisteina e dalla presenza di addotti tiolici in corrispondenza di tali residui, entrambe condizioni associate ad un aumento dello stress ossidativo e che tendono a destabilizzare la struttura tetrameric quaternaria della proteina. La maggior parte degli studi condotti sulla transtiretina riguardano il suo coinvolgimento nelle amiloidosi. Nel presente lavoro è stato indagato, per la prima volta, il ruolo della transtiretina nella longevità in Sardegna. Da studi preliminari condotti dal nostro gruppo di ricerca è emersa una riduzione statisticamente significativa sia della presenza sia dell'intensità degli spots proteici di transtiretina in soggetti con un età superiore ai 90 anni; tale riduzione non è stata osservata, invece, in soggetti di età compresa tra i 20 e gli 89 anni. Il primo obiettivo del lavoro è stato quello di confermare i dati preliminari sopra citati mediante le stesse tecniche di biologia molecolare (elettroforesi bidimensionale, western blot, spettrometria di massa), considerando, tuttavia, campioni diversi da quelli già studiati. Un ulteriore obiettivo è stato quello di vedere come variassero le sequenze geniche della stessa proteina al variare dell'età e all'interno di ogni fascia d'età. I principali quesiti che ci si è posti sono stati se esistessero delle varianti geniche della proteina più frequenti in alcune fasce d'età piuttosto che in altre e se queste varianti fossero correlate o meno ad una variazione dell'intensità degli spot di transtiretina. In particolare, dato il suo coinvolgimento in varie forme di

amiloidosi, si è voluto vedere se con l'avanzare dell'età fossero presenti mutazioni amiloidogeniche, e in caso positivo valutare in che misura queste incidessero sul raggiungimento dell'“invecchiamento con successo”.

6. MATERIALI E METODI

6.1 Materiali

I reagenti urea, tiourea, CHAPS, ditiotreitolo, acrilammide, trizma, glicina, SDS, tripsina, bicarbonato d'ammonio, acetonitrile, acido trifluoroacetico, metanolo, acido acetico glaciale, coomassie brilliant blue R250, siler nitrate, ammonio persolfato, TEMED, fenolo, cloroformio, isoaminoalcol, Angiotensina II, [Val⁵]Ang I, [Glu¹]-Fibrinopeptide B human, ACTH [1-17], ACTH [18-39], ACTH [7-38], alpha cyano-4-hydroxycinammico provengono dalla ditta Sigma. I reagenti anfoline, reagente Destreak, iodoacetammide, agarosio low melting point provengono dalla ditta biorad. I reagenti modified tris-acetate buffer, performance optimizer polymer 4% sono stati acquistati dalla ditta Applied Biosystem.

6.2 Popolazione investigata

Nel presente lavoro è stato studiato un campione rappresentativo della popolazione sarda composto di 40 individui, di cui 10 centenari, 10 novantenni, 10 ottantenni e 10 controlli con un età compresa tra i 20 e i 50 anni; tutta la popolazione presa in esame ha aderito, tramite consenso scritto, al Progetto AkeA.

6.3 Preparazione dei campioni di plasma

Il sangue è stato raccolto mediante prelievo venoso in apposite vacutainer contenenti EDTA come anticoagulante; quindi si è proceduto alla separazione del plasma tramite centrifugazione a 2500g per 15 minuti a 10°C. Le proteine plasmatiche, per garantire una maggiore efficienza nella rimozione dell'albumina, sono state solubilizzate mediante precipitazione con acido tricarbossilico (TCA) al 10% in acetone freddo (rapporto 4:1) (48). A 20µl di plasma sono stati aggiunti 80 µl di TCA al 10% in acetone freddo; il campione, quindi, è stato incubato per 90 minuti a -20°C. In seguito al primo step di centrifugazione (1500g, 4°C, 20 minuti), il precipitato è stato lavato con 1 ml di acetone freddo e incubato per 15 minuti in ghiaccio; dopo un ulteriore step di centrifugazione (1500g, 4°C, 20 minuti) il precipitato è stato risospeso in una soluzione Urea 8M, CHAPS 4% e quindi quantificato col metodo di Lowry modificato (DC Protein Assay Kit, Biorad).

6.3.1 Elettroforesi bidimensionale delle proteine plasmatiche

La separazione delle proteine è stata effettuata mediante elettroforesi bidimensionale. Sono state utilizzate strips da 17cm, pH 4-7 (Biorad) per la prima dimensione e gels in gradiente di poliacrilammide al 5-15% per la seconda dimensione. Ogni campione (1000µg totali) è stato miscelato con un volume di soluzione di reidratazione (Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4%, reagente Destreak 1:100, Anfoline 1%, Blu di Bromofenolo, DTT10mM) di 300 µl; le strips sono state reidratate per circa 22 ore a 20°C, senza l'applicazione di un campo elettrico, mediante l'apparecchio Protean IEF Cell (Biorad). Per la

focalizzazione isoelettrica, effettuata nel medesimo apparecchio, è stato messo a punto un gradiente di voltaggio suddiviso in otto steps che prevedeva una durata di 22-24 ore per il raggiungimento di circa 70000 volt-ore totali. Prima di procedere con la seconda dimensione, le strips sono state equilibrate in due passaggi successivi, di 15 minuti ciascuno, con un'opportuna soluzione di equilibratura (6M Urea, Glicerolo 20%, Tris HCl 1.5M pH8.8 3.3%, SDS 2%). Nel primo passaggio è stato aggiunto al tampone di equilibratura ditiotreitolo (DTT) al 2%, mentre nel secondo passaggio iodoacetammide (IAA) al 2,5%; il volume di tampone di equilibratura necessario per ricoprire ogni strip è di 1ml. Le strips equilibrate, previo breve risciacquo nel tampone di corsa di seconda dimensione (SDS Tris Glicina), sono state applicate sul gel di poliacrilammide (SDS PAGE). Sulle strips è stata colata una soluzione non bollente di agaroso low melting point allo 0,5% in TrisHCl pH 8.8 per stabilizzarle nella loro posizione. I gels in gradiente sono stati preparati nella Multi-gel Casting Chamber (Biorad) mediante un formatore di gradiente (modello 495 della Biorad); la corsa elettroforetica è stata compiuta nell'apparecchio Multicell Protean (Biorad). I gels sono stati fatti correre ad amperaggio costante in due steps consecutivi, nel primo a 25 mA/gel per 15 minuti e nel secondo a 50 mA/gel per un tempo variabile dalle 5 alle 6 ore. Per una migliore risoluzione degli spots è stato scelto di utilizzare un tampone di corsa 1X contenente SDS al 2% nella camera superiore della Multicell e un tampone di corsa contenente SDS all'1% nella camera inferiore (49). I gel sono stati colorati con Coomassie Brilliant Blue R250 (fig.7) e le immagini dei

gels colorati sono state acquisite mediante il densitometro GS800 della ditta Biorad.

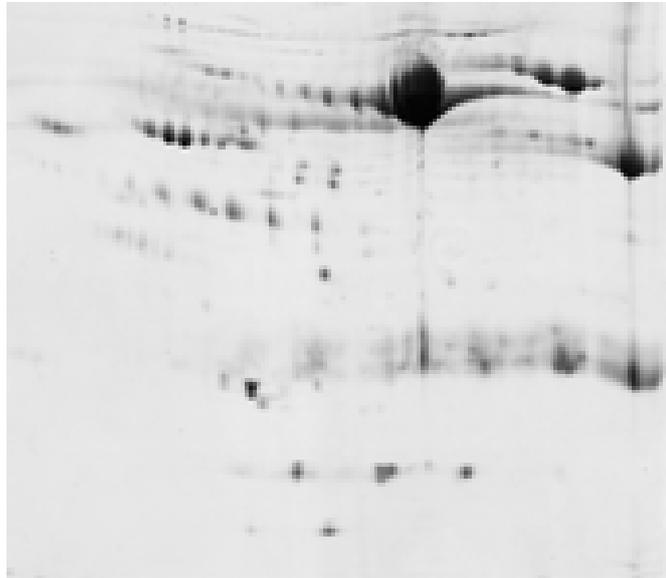


Figura 7: 2D gel colorato in Coomassie R250;

6.3.2 Analisi d'immagine: software PDQUEST BASIC

L'analisi delle immagini dei 2D gels è stata compiuta grazie all'ausilio del software PD QUEST BASIC (Biorad). La versione basic di tale software permette di creare esperimenti contenenti un numero massimo di 15 gels membri per esperimento. Nel presente lavoro sono stati creati 3 esperimenti dove ognuno comprendeva un gruppo controllo (7gel membri) e un gruppo corrispondente ad ogni diversa fascia d'età esaminata (7 centenari, 7 novantenni, 7 ottantenni). Mediante la consultazione delle banche dati contenenti le immagini più aggiornate di 2D gels di plasma umano (Swiss Prot- Swiss 2DPAGE) sono stati ricercati tutti gli spot di transtiretina identificati e l'intervallo di pH in cui sono presenti. Da questo tipo di studio è emerso che in campioni di plasma umano sono presenti 4 spot di transtiretina: una forma

multimerica di 35391 Da con pI 5.52, due spot di 13800 Da con pI rispettivamente di 5.52 e 5.02 e uno spot di 13838 Da con pI di 5.23. Facendo riferimento alla letteratura citata, si è proceduto, quindi, mediante la selezione dell'area contenente i presunti spot di TTR, facendo in modo che venisse selezionata la stessa area in tutti i gel membri di ogni esperimento. Sono state utilizzate le stesse condizioni di colorazione e di corsa per tutti i gels; ciò ha permesso di applicare gli stessi parametri per il rilevamento degli spot, "spot detection". In seguito al processamento di tutti i gels, vengono elaborate tre immagini distinte dello stesso gel: la scansione originale, quella filtrata e quella gaussiana (fig.8). Il software compie tutte le analisi successive solo sull'immagine gaussiana, perchè è l'unica che permette di quantificare ed identificare accuratamente spots sovrapposti, spots in gels con strisciate e spots multipli presenti in densi clusters.

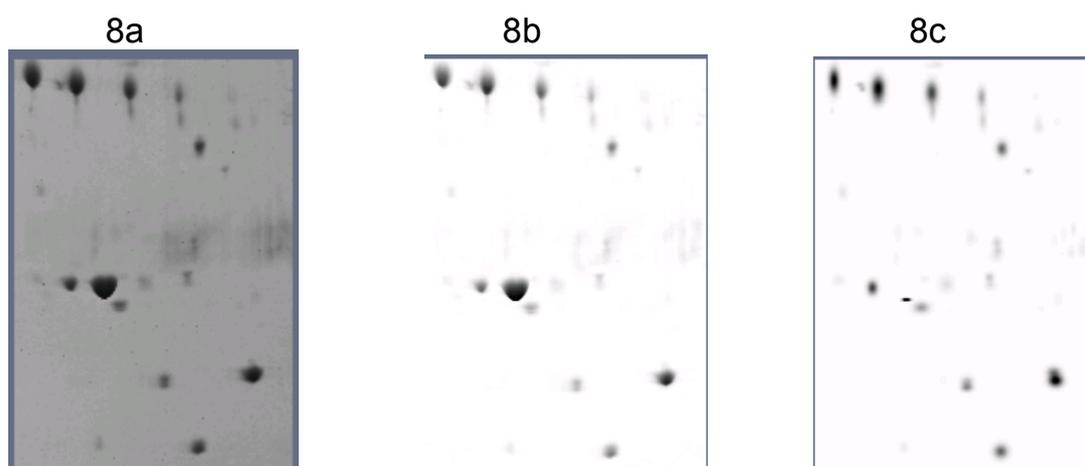


Figura 8: Le figure 8a-b-c rappresentano rispettivamente la scansione originale, filtrata e gaussiana di una 2D immagine.

Il passaggio successivo “spot editing” permette di aggiungere spots non rilevati dal software o rimuovere spots aggiunti erroneamente dall’immagine gaussiana. Dopo aver scelto un gel di riferimento, “gel master”, tra quelli presenti all’interno di ogni esperimento si è proceduto mediante il “matching” di tutti i profili bidimensionali, ovvero la sovrapposizione di tutte le proteine uguali presenti in tutti i gels di un dato esperimento. A tutti gli spots rilevati e matchati, viene attribuito un valore di intensità, espressa come OD per l’area di ogni spot quantificato; tutti i gels sono stati normalizzati con il “Local Regression Model” (LOESS). Il software PD QUEST BASIC permette, a questo punto, di attribuire una significatività statistica e scientifica ai sets di proteine presenti nei gels di ogni esperimento. Nel presente studio abbiamo effettuato un’analisi qualitativa, che ci ha permesso di vedere in quali gels la TTR fosse presente e in quali fosse, invece, assente, un’ analisi quantitativa, dove gli spots di TTR sono stati quantificati, e un’analisi statistica per valutare la significatività della variazione della TTR tra le fasce d’età esaminate. Nell’analisi quantitativa abbiamo considerato i valori di OD che aumentavano o diminuivano di un fattore 2 rispetto ad un valore limite fissato da noi; per l’analisi statistica abbiamo utilizzato il Student’s t-test.

6.3.3 Identificazione della TTR: MALDI TOF

I presunti spot proteici di TTR sono stati identificati al MALDI TOF, previa digestione con tripsina. Gli spot interessati, dopo esser stati tagliati dal gel con bisturi sterili e sotto cappa a flusso laminare, sono stati sottoposti ad una serie di lavaggi in acetonitrile e bicarbonato d’ammonio 50mM pH 8, per rimuovere

l'eccesso di colorante, Coomassie Brilliant Blue R250; ogni spot, quindi, è stato idrolizzato con 10 µl di una soluzione 50mM di bicarbonato d'ammonio pH 8 contenente tripsina ad una concentrazione di 10 ng/µl. Dopo circa due ore di incubazione in ghiaccio, il surnatante è stato rimosso e le bande del gel, risospese in un piccolo volume della soluzione 50mM di bicarbonato d'ammonio pH 8, sono state incubate tutta la notte a 37°C. Infine, gli estratti peptidici, acidificati con acido trifluoroacetico (TFA) al 20%, sono stati liofilizzati e risospesi in TFA al 2%.

Gli spot proteici sono stati analizzati mediante lo spettrometro di massa MALDI TOF micro MX™ della ditta Waters. I principali parametri utilizzati sono: modalità reflectron, polarità positive, range di massa 800-4000 Da. Gli spettri di massa sono stati calcolati utilizzando una calibrazione esterna; la miscela di peptidi utilizzata per la calibrazione comprende Angiotensina II (m/z 1046,5423), [Val⁵]Ang I (m/z 1282,662), [Glu¹]-Fibrinopeptide B human (m/z1570,67), ACTH [1-17] (m/z 2093,09), ACTH [18-39] (m/z 2465,2), ACTH [7-38] (m/z 3657,93). In tali modalità è stato scelto di utilizzare la matrice alpha cyano-4-hydroxycinammico (10mg/ml in acetonitrile/0,2%TFA_{aq}, 70:30), che è stata miscelata in rapporto 1:1 con l'estratto peptidico. Le proteine sono state identificate con il metodo PMF tramite il software Mascot utilizzando i seguenti parametri: mass tolerance 120PPM, un massimo di un taglio saltato per peptide, Carbamidometilazione (C) come modificazione fissa, Gln->pyro-Glu (N-term Q) e Ossidazione (M) come modificazioni variabili.

6.3.4 Identificazione della TTR: Western Blot

L'identificazione delle TTR mediante immunoblot è stata preceduta dalla separazione delle proteine plasmatiche (50µg totali) mediante elettroforesi monodimensionale. In questo caso, è stata esaminata l'intera popolazione, composta di 40 individui. Sono stati preparati running e stacking gels rispettivamente al 14,5% e al 5% di poliacrilammide. La corsa elettroforetica è avvenuta, nelle camerette della Biorad, a voltaggio costante in due steps consecutivi, nel primo a 50 V/gel per 15 minuti e nel secondo a 150 V/gel per circa 2 ore.; Il trasferimento delle proteine è avvenuto su membrane di nitrocellulosa, 0,45 µm di diametro dei pori (Hybond™-c extra, Amersham), in condizioni di amperaggio costante (350mA) per 1 ora a 4°C. Le membrane sono state incubate nella soluzione di bloccaggio (3% BSA in PBS-T) per 1 ora a temperatura ambiente in lenta agitazione. L'anticorpo primario scelto (Prealbumin C-20, goat polyclonal antibody; Santa Cruz) è stato utilizzato ad una diluizione 1:1000 in una soluzione all'1% di BSA in PBS-T; per l'anticorpo secondario (Bovine anti goat IgG-HRP, Santa Cruz) è stata scelta una diluizione 1:2000 sempre nella soluzione all'1% di BSA in PBS-T. L' anticorpo primario è stato incubato tutta la notte a 4°C, quello secondario per circa 1 ora a temperatura ambiente in lenta agitazione. Le membrane sono state sviluppate in chemiluminescenza con il substrato ECL (Amersham) e le bande visualizzate tramite lo strumento VersaDoc Model 1000 (Biorad). L'intensità delle bande, espressa come intensità per mm², è stata letta tramite il software Quantity One (Biorad).

6.4 Preparazione dei campioni di DNA

L'estrazione del Dna è stata effettuata a partire da 2 ml di sangue intero mediante il metodo del fenolo-cloroformio. I campioni di sangue sono stati sottoposti ad una serie di risciacqui con una soluzione emolisante (NH_4Cl 131mM, NH_4HCO_3 , pH 6.5) sino all'ottenimento di un pellet pulito, quindi sono stati aggiunti 3ml di buffer di estrazione (TRIS-HCl 0.01M Ph 8, Na_2EDTA 0.1M pH 8, SDS 0.5%) e 60 μl di proteinasi k (50 γ /ml). I campioni sono stati incubati a 37°C tutta la notte. La separazione delle fasi organica ed inorganica è stata effettuata mediante una serie di passaggi in fenolo saturato e cloroformio isoaminoalcol. Il DNA è stato precipitato con etanolo freddo al 95% e risospeso nel tampone LOW TE 1mM pH8.8 (150-200 μl).

6.4.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Nel presente studio sono state amplificate 2 regioni esoniche del gene della transtiretina; tali regioni coprono la sequenza genica rispettivamente nella posizione 6130-6260 per un totale di 131 paia di basi (esone2) e nella posizione 8354-8489 per un totale di 136 paia di basi (esone3) (tabella 1).

Tabella 1 Primers utilizzati per le 2 regioni esoniche studiate della TTR.

Esoni	Forward primer	Reverse primer
Esone2	ACGTGTCTTCTCTACACCCA	AGGGGCAAACGGGAAGATAA
Esone3	ACAGTGAGCTTTTCAAAAAGTTT	AGGGAACCTTTGGTCATTCA

I primers (Invitrogen), sono stati utilizzati ad una concentrazione 0.2 μM . Il programma di PCR impostato nel termociclatore ha previsto un numero totale

di 30 cicli, con una temperatura di denaturazione di 94°C per 30 secondi e una temperatura di estensione di 72°C per 30 secondi; la temperatura di appaiamento è stata variata a seconda dell'esone da amplificare (62°C, 54°C rispettivamente per l'esone 2 e l'esone 3). Il DNA amplificato è stato separato su gel d'agarosio all'1% in buffer 0,5X tris-acetato EDTA (TAE) e le bande sono state visualizzate al transilluminatore UV.

6.4.2 Estrazione di DNA dal gel d'agarosio e reazione di sequenza

Le bande di DNA, tagliate dal gel d'agarosio, sono state trasferite nelle provette "Montage DNA Gel Extraction Device" (Millipore), quindi purificate mediante centrifugazione a 8000 RPM per 15 minuti a temperatura ambiente. Per la reazione di sequenza è stato utilizzato il Byg Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit dell'Applied Biosystem; il programma seguito ha previsto un numero totale di 30 cicli, con una temperatura di denaturazione di 96°C per 30 secondi, una temperatura di appaiamento di 50°C per 15 secondi e una temperatura di estensione di 72°C per 4 minuti. Il campione è stato purificato con le colonnine "Centrisep Spin Columns" (Applied Biosystem) mediante centrifugazione a 3000RPM per 2 minuti a temperatura ambiente. I campioni, prima di essere analizzati al sequenziatore, sono stati miscelati con formammide modificata (10µl di formammide per 5µl di DNA), denaturati per 5 minuti a 95°C e collocati immediatamente in ghiaccio.

6.4.3 Sequenziamento del DNA: ABI PRISM 310

Le sequenze delle regioni esoniche del gene della TTR sono state analizzate con il sequenziatore automatico ABI PRISM 310 (Applied Biosystem), con l'ausilio del software 310 Data Collection (Applied Biosystem). I principali parametri utilizzati sono: temperatura 60°C, modulo GSPOP4 (1ml) E.md4, matrice ABIE. Per ciascun campione è stato impostato un tempo di corsa di 24 minuti.

7. RISULTATI E DISCUSSIONE

7.1 Identificazione degli spot di TTR con MALDI TOF

L'analisi degli spettri MALDI ha permesso l'identificazione di 3 spot di TTR che, nel presente lavoro, sono stati indicati con i codici 00056V, 0005HD, 0005HB (fig.9), ovvero i codici disponibili e consultabili sulla banca dati Swiss Prot- Swiss 2DPAGE.

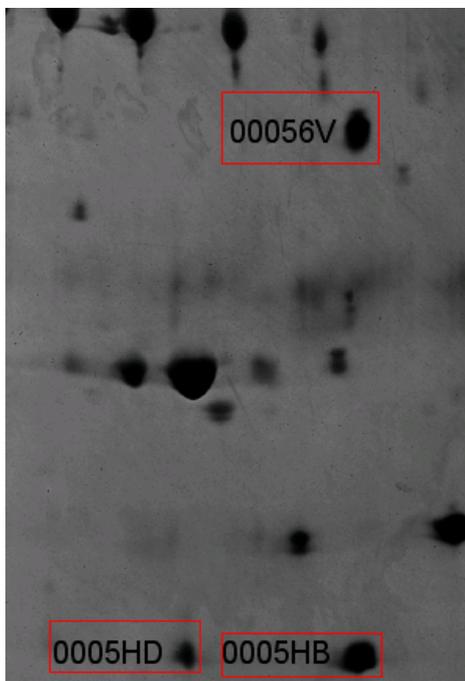


Fig. 9a

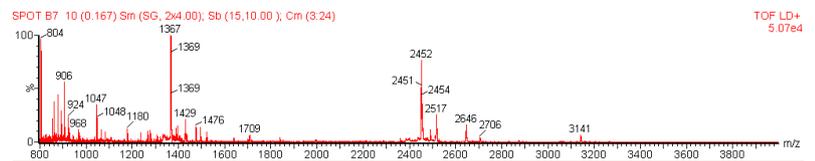


Fig. 9b

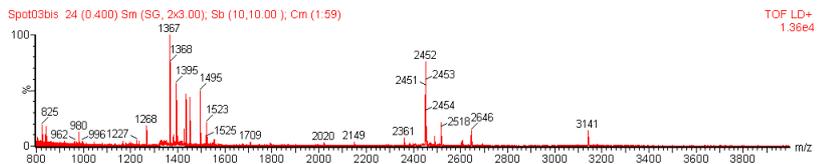


Fig. 9c

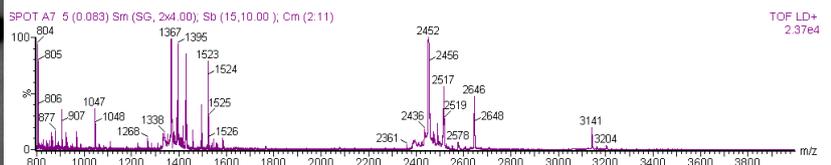


Fig. 9d

Fig.9 : A. Immagine 2D di plasma umano; gli spots di TTR sono indicati dai rettangoli rossi. Spettri MALDI dei 3 spot di TTR identificati: B. spot 0005HD; C. spot 00056V; D. spot 0005HB

7.2 Differenze quali-quantitative della TTR

In fig.10 vengono rappresentati i 3 esperimenti creati col PD QUEST BASIC e i rispettivi scatter plot, dove la “spot count” indica il numero di spot matchati tra i gel membri e il gel master e i coefficienti di correlazione si riferiscono al gel master considerato per ogni esperimento.

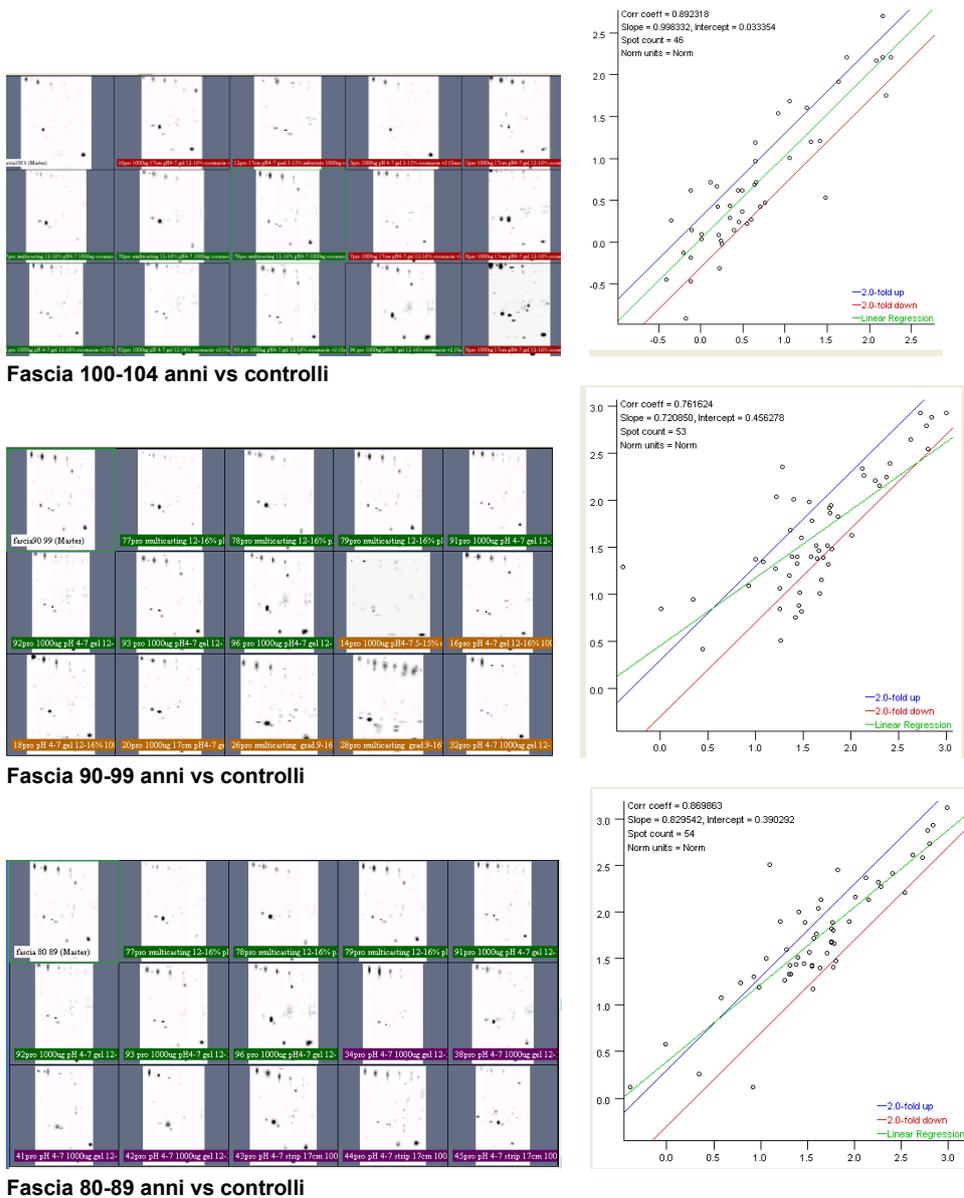


Figura 10: esperimenti creati al PD QUEST BASIC e a fianco i relativi scatter plot.

L'analisi qualitativa degli spots di TTR, effettuata per ogni esperimento, ha messo in evidenza l'assenza dello spot 00056V in circa il 60% dei soggetti appartenenti alle fasce d'età 90-99 anni e 100-104 anni e la presenza degli spots 0005HB e 0005HD nel 100% dei soggetti di ogni fascia d'età esaminata (tab.2).

Tabella 2: risultati dell'analisi qualitativa

Presenza (% sul numero tot. di individui)	Spot 0005HD	Spot 0005HB	Spot 00056V
Fascia 100-104 anni	100%	100%	40%
Fascia 90-99 anni	100%	100%	40%
Fascia 80-89 anni	100%	100%	100%
Fascia 20-79 anni	100%	100%	100%

Dall'analisi quantitativa è emersa una diminuzione dell'intensità (OD) di un fattore 2, rispetto al valore limite stabilito dall'operatore (0,50), degli spots 0005HB e 00056V nella fascia 100-104 anni. Negli altri gruppi investigati non è stata osservata nessuna diminuzione di tale intensità; inoltre, in nessuno degli spots di TTR esaminati nei tre esperimenti è risultato un aumento dell'intensità di un fattore 2 rispetto al valore limite stabilito (2) (fig.11).

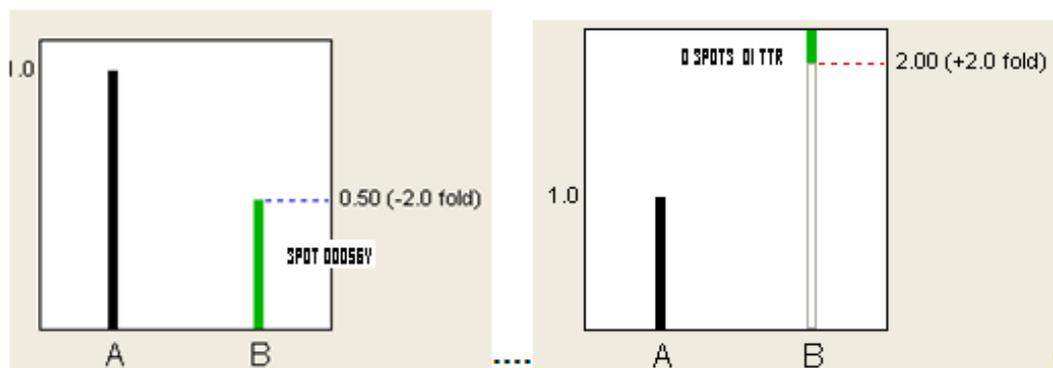


Figura 11: rappresentazione mediante istogrammi dei risultati dell'analisi quantitativa.

Lo student's t-test ha attribuito una significativà statistica ($pvalue < 0,05$) alle differenze di intensità osservate solo per lo spot 00056V negli esperimenti "fascia 100-104 anni vs controlli" e "fascia 90-99 anni vs controlli". Per una migliore comprensione ed elaborazione dei risultati ottenuti, è stato scelto di utilizzare il sistema logistico di Boolean. Nella fattispecie, è stato creato, per gli esperimenti "fascia 100-104 anni vs controlli" e "fascia 90-99 anni vs controlli", un set di analisi, considerando l'intersezione tra due set di spots: gli spot significativi al student's t-test e quelli la cui intensità diminuiva di un fattore 2 rispetto al valore limite stabilito. Riassumendo, nella fascia 100-104 anni è stata osservata una diminuzione significativa dell'intensità dello spot 00056V sia rispetto al gruppo controllo ($pvalue < 0,05$; student's t-test) sia rispetto al valore limite fissato (0,50). Nella fascia 90-99 anni è stata osservata una diminuzione significativa dell'intensità dello spot 00056V solo rispetto al gruppo controllo ($pvalue < 0,05$; student's t-test). Nella fascia 80-89 anni non sono state osservate né diminuzioni né aumenti significativi dei valori di intensità degli spots, rispetto a quelli del gruppo controllo e/o a quelli limite stabiliti dall'operatore, di nessuno degli spot di TTR esaminati. Tali risultati sono stati ulteriormente confermati dagli esperimenti di western blot; anche in questo caso è stata osservata, infatti, una diminuzione significativa ($pvalue < 0,05$, student's t-test) dei valori di intensità delle bande di TTR nelle fasce d'età 100-104 anni e 90-99 anni rispetto al gruppo controllo (tab.3 e fig.12), mentre non è stata osservata alcuna variazione statisticamente significativa nella fascia 80-89 anni.

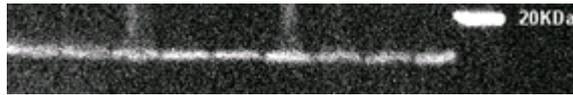


Figura 12: bande di TTR visualizzate al Versadoc.

Tabella 3: risultati del Western Blot

Fasce d'età investigate	Pvalue
fascia 100-104 anni vs fascia 20-50 anni	0,009
fascia 90-99 anni vs fascia 20-50 anni	0,010
fascia 80-89 anni vs fascia 20-50 anni	0,740

I risultati dell'analisi quali-quantitativa indicano, dunque, valori simili di intensità degli spot e di presenza/assenza, rispetto al gruppo dei controlli, solo nella fascia "80-89 anni"; i risultati ottenuti relativi alle fasce "90-99anni" e "100-104 anni" sembrano suggerire che l'assenza o la diminuita intensità osservata degli spots di TTR non incidano sull'aspettativa di vita.

7.3 Identificazione delle mutazioni puntiformi mediante sequenziamento

L'analisi delle sequenze geniche degli esoni 2 e 3 (fig.13) della TTR ci ha permesso di individuare tutte le mutazioni puntiformi eventualmente presenti in ogni fascia d'età della popolazione investigata (n=40) e di vedere come varia la loro distribuzione tra le diverse fasce d'età. In particolare, si è voluto vedere se esistono delle variazioni di sequenza caratteristiche ed esclusive della porzione più longeva della popolazione investigata.



Figura 13: bande di DNA visualizzate al transilluminatore; a-esone 2, b-esone 3

Dai risultati del sequenziamento dell'esone 2 è emerso che il gruppo dei novantenni (fascia 90-99 anni) è quello in cui determinate mutazioni puntiformi si ripetono con una frequenza maggiore rispetto agli altri gruppi. Nel gruppo 90-99 anni, infatti, è stata osservata in particolare una sostituzione di una guanina con una adenina (AGA→AAA) corrispondente alla posizione 54 della sequenza amminoacidica (R54K), che è presente in circa il 60% dei soggetti esaminati. Indagando oltre, è stato osservato che 2 delle mutazioni puntiformi individuate nella fascia "90-99 anni" (M33L e L37I), erano presenti anche nella fascia "100-104 anni", mentre una sola mutazione (M34V) era condivisa dal gruppo dei controlli e dalla fascia d'età "80-89" anni (tab.4).

Tabella 4: mutazioni individuate nell'esone 2 dellaTTR.

Mutazioni puntiformi della TTR	100-104 y n=10 (%)	90-99y n=10 (%)	80-89y n=10 (%)	20-50y n=10 (%)
ATG→TTG (M33L)	10%	30%	-	-
CTA→ATA (L37I)	10%	10%	-	-
AGA→AAA (R54K)	-	60%	-	-
GTC→GTT (M34V)	-	-	10%	30%

Inoltre, è stato notato con interesse che, la fascia d'età "90-99 anni" era l'unica in cui fossero presenti mutazioni di natura amiloidogena: GAT→GGT corrispondente alla variante D38G presente nelle AMYL7, TTC→TTA e GCC→ACC corrispondenti rispettivamente alle varianti F53L e A65T presenti nelle AMYL1. Ognuna di queste mutazioni, sebbene presente in una modesta porzione (il 10%) della suddetta fascia, non è stata osservata in nessuno degli altri gruppi (tab. 5).

Tabella 5: mutazioni amiloidogeniche presenti nell'esone 2 della TTR.

Mutazioni amiloidigeniche della TTR	100-104y n=10 (%)	90-99y n=10 (%)	80-89y n=10 (%)	20-50y n=10 (%)
GAT→GGT (D38G)	-	10%	-	-
TTC→TTA (F53L)	-	10%	-	-
GCC→ACC (A65T)	-	10%	-	-

L'analisi di sequenza dell'esone 3 della TTR ha messo in evidenza l'assenza totale di mutazioni puntiformi nella fascia d'età "80-89 anni" e nel gruppo dei controlli; nella fascia "90-99 anni" è stata osservata, invece, una sostituzione di una guanina con una citosina (GAG→GAC) corrispondente alla posizione 109 nella sequenza amminoacidica (E109D), in circa il 30% dei soggetti esaminati. Nella fascia "100-104 anni" erano presenti, entrambe in una proporzione del 10%, due mutazioni puntiformi: una mutazione di natura amiloidogenica, causata dalla sostituzione di una timina con una citosina (ATC→ACC), corrispondente alla variante I104T, presente nelle AMYL1 e una sostituzione di una guanina con una citosina (TGG→TGC) in posizione 99, corrispondente alla variante W99C (Tab.6 e 7). E' interessante notare che le due mutazioni osservate nella fascia 100-104 anni erano presenti nello stesso individuo; ciò potrebbe significare che il residuo di cisteina aggiuntivo nella sequenza amminoacidica della TTR contribuisca alla fibrillogenesi, come spiegato nel capitolo 4 del presente lavoro. Tuttavia, poiché tali mutazioni sono state osservate solo in un campione tra tutti quelli analizzati, non è stato possibile, al momento, attribuire una significatività statistica a questo singolo risultato.

Tabella 6: mutazioni individuate nell'esone 3 dellaTTR.

Mutazioni puntiformi della TTR	100-104 y n=10 (%)	90-99y n=10 (%)	80-89y n=10 (%)	20-50y n=10 (%)
GAG→GAC (E109D)	-	30%	-	-
TGG→TGC (W99C)	10%			

Tabella 7: mutazioni amiloidogeniche presenti nell'esone 3 dellaTTR.

Mutazioni amiloidogeniche della TTR	100-104 y n=10 (%)	90-99y n=10 (%)	80-89y n=10 (%)	20-50y n=10 (%)
ATC→ACC (I104T)	10%	-	-	-

I risultati del sequenziamento di entrambe le regioni esoniche analizzate indicano, dunque, una similarità di sequenza tra il gruppo dei controlli e quello degli ottantenni; le variazioni di sequenza individuate nelle fasce “90-99 anni” e “100-104 anni”, sebbene, al momento, non possano essere considerate statisticamente significative, a causa della modesta casistica disponibile, mostrano una corrispondenza con i risultati dell’analisi quali-quantitativa degli spot proteici di TTR. Infatti, tali variazioni di sequenza sono state osservate solo in quei soggetti che presentavano una diminuzione dell’intensità o un’assenza dello spot 00056V. I risultati del presente lavoro, sebbene siano preliminari, indicano che la fascia 90-99 anni sia quella più interessata dalla presenza di mutazioni puntiformi lungo le sequenze geniche degli esoni 2 e 3 (AGA→AAA (R54K), esone 2; GAG→GAC (E109D), esone 3). I risultati, inoltre, suggeriscono che la presenza delle mutazioni amiloidogeniche individuate sia nella fascia 90-99 anni (esone 2) sia in quella 100-104 anni

(esone 3) non comportino una diminuzione dell'aspettativa di vita. Basandoci su questi dati preliminari, si può ipotizzare che la TTR giochi un ruolo, tuttavia ancora sconosciuto, nell'invecchiamento in relazione alla sola fascia d'età 90-99 anni.

8. CONCLUSIONI

Essendo molteplici i fattori che contribuiscono alla longevità, nel presente lavoro è stato scelto di utilizzare un approccio sia proteomico sia genomico. Mediante lo studio proteomico delle proteine plasmatiche della popolazione investigata è stato possibile individuare un potenziale biomarker dell' "invecchiamento con successo", la transtiretina. L'analisi delle sequenze geniche della TTR, quindi, ha fornito informazioni aggiuntive su quale sia il suo ruolo nella longevità, mediante la conoscenza della natura e dell'importanza delle mutazioni puntiformi presenti. Dai risultati del presente lavoro ci aspettavamo di osservare delle varianti geniche che fossero caratteristiche della porzione più longeva della popolazione esaminata e pertanto assenti nella restante parte della popolazione. Tuttavia è emerso che la "fascia 100-104 anni" presenta due mutazioni nell'esone 2 che sono condivise con la "fascia 90-99 anni" e una mutazione nell'esone 3 che, essendo presente solo in un campione, non può essere considerata significativa. I risultati ottenuti, sebbene abbiano permesso l'identificazione di un profilo generale proteico e genico della proteina durante le varie fasi dell'invecchiamento, al momento sono da considerare preliminari. Il progetto iniziale del mio dottorato di ricerca prevedeva il sequenziamento di tutti e 4 gli esoni del gene della TTR e l'investigazione di una popolazione più ampia; tuttavia a causa di problemi tecnici dello strumento utilizzato e di un cospicuo ritardo nella spedizione del materiale necessario per il completamento del lavoro, la dimensione del campione è stata ridotta. Progetti futuri

comprendono, innanzitutto un ampliamento della casistica, in secondo luogo la spedizione dei campioni di DNA presso altri laboratori per confermare o confutare i dati ottenuti. Inoltre sarebbe interessante studiare le modificazioni posttraduzionali presenti e la loro variazione tra diverse fasce d'età, mediante spettrometria di massa tandem seguita da sequenziamento dei peptidi. Ulteriori lavori previsti per il futuro sono la quantificazione della TTR totale plasmatica mediante la tecnica ELISA e la quantificazione dell'mRNA della TTR mediante RT-PCR (Real Time PCR), per valutare la variazione dei livelli di concentrazione plasmatica e dell'espressione proteica durante l'invecchiamento. L'insieme di queste informazioni è indispensabile per poter attribuire o meno alla TTR un ruolo importante nella longevità dei Sardi.

BIBLIOGRAFIA

1. Oeppen J, Vaupel J.W. Broken Limits to Life Expectancy. *Science* 2002; 296:1029-1031.
2. Christensen K., Jhonson T.E. and Vaupel J.W. The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights; *Nature* 2006, volume 7.
3. Caselli G. and Rasulo D. Centenarians in Sardinia: the underlying causes of low sex ratio. Paper presented at XXV IUSSP Conference, Session 149 on “Mathematical and Formal Demography” Tours, 18-23 July 2005.
4. Lio D. et al.. Association between the HLA-DR alleles and longevity: a study in Sardinian population; *Experimental Gerontology*, 2003; 38.
5. Lio D. et al.. Inflammation, genetics and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10-1082 promoter SNP and its interaction with TNF-308 promoter SNP, *Journal of Medical Genetics*, 2003;40.
6. Deiana et al.. AKEntAnnos. The Sardinian study of extreme longevity. *Aging Clinical and Experimental Research*, 1999; pp. 142-149.
7. Nedelkov D., Kiernan U.A., Niederkofler E.E., Tubbs K.A. and Nelson R.W. Investigating diversity in human plasma proteins; *PNAS* August 2, 2005 vol. 102 no. 31: 10852–10857
8. Gevaert K, Vandekerckhove J.. Proteins identification methods in proteomics, *Electrophoresis* 2000, 21, 1145-1154.
9. Görg et al.. Approach to stationary two-dimensional pattern: influence of focusing time and immobiline/carrier ampholytes. *Electrophoresis* 1988, 9(1): 37-46.

10. Köcher T.& Superti-Furga G.. Mass spectrometry–based functional proteomics: from molecular machines to protein networks; NATURE METHODS | VOL.4 NO.10 |:807-815.
11. Sasaki H., Yoshioka N., Takagi Y., Sakaki Y. Structure of the chromosomal gene for human serum prealbumin. Gene, 1985, 37:191-197.
12. Mita S., Maeda S., Shimada K. and Araki S.. Cloning and sequence analysis of cDNA for human prealbumin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984; 124: 558-564.
13. Teruhisa T., Shuji M., Suichiro M., Shukuro A. and Kazunori S.. Structure of the Human Prealbumin Gene. The Journal of Biological Chemistry, 1985; 260: 12224-12227.
14. Gitlin D, Pericelli A. Synthesis of serum albumin, prealbumin, alpha-fetoprotein, alpha-1-antitrypsin and transferrin by the human yolk sac. Nature 1970;228:995–7.
15. Ong DE, Davis JT, O’Day WT, Bok D. Synthesis and secretion of retinol-binding protein and transthyretin by cultured retinal pigment epithelium. Biochemistry 1994; 33:1835–42.
16. Johnson M., Merlini G., Sheldon J. and Ichihara K.. Clinical indications for plasma protein assays: transthyretin (prealbumin) in inflammation and malnutrition; Clin Chem Lab Med 2007;45(3): 419–426.
17. Freya S.K., Sprangerb J., Henzea A., Pfeifferb A.F.H., Schweigerta F.J., Railaa J.. Factors that influence retinol-binding protein 4–transthyretin interaction are not altered in overweight subjects and overweight subjects with type 2 diabetes mellitus, Metabolism Clinical and Experimental 58 (2009) 1386–1392.
18. Moses A.C., Rosen H.N., Moller D.E., Tsuzaki S., Haddow J.E., Lawlor J., Liepnieks J.J., Nichols W.C., Benson M.D. A point mutation

- in transthyretin increases affinity for thyroxine and produces euthyroid hyperthyroxinemia. *J. Clin. Invest.*, 1990; 86:2025-2033.
19. Ikeda S. Cardiac amyloidosis: heterogenous pathogenic backgrounds. *Intern Med* 2004;43:1107-14.
 20. Kholova I, Niessen HW. Amyloid in the cardiovascular system: a review. *J Clin Pathol* 2005;58:125-33.
 21. Di Bari M., Chiarantini D., Bergesio F., Ciaccheri M., Nozzoli C., Inzitari M. I, Pozzi C., Masotti G., Marchionni N.. Aging and cardiac amyloidosis *G GERONTOL* 2005;53:304-310
 22. Cornwell GG III, Murdoch WL, Kyle RA, Westermark P, Pitkanen P. Frequency and distribution of senile cardiovascular amyloid. A clinicopathologic correlation. *Am J Med* 1983;75:618-23.
 23. Westermark P, Johansson B, Natvig JB. Senile cardiac amyloidosis: evidence of two different amyloid substances in the ageing heart. *Scand J Immunol* 1979;10:303-8
 24. Cohen, A. S. & Jones, L. A. (1993) *Curr. Opin. Rheumatol.* 5, 62–76.
 25. Stoppini M., Obici L., Lavatelli F., Giorgetti S., Marchese L., Moratti R., Bellotti V., Merlini G.. Proteomics in protein misfolding diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2009; 47(6): 627-635.
 26. Jiali Du and Regina M. Murphy, 2010. Characterization of the interaction of β -Amyloid with Transthyretin Monomers and Tetramers. *Biochemistry*, 30: 20-40.
 27. Bergstrom J, Gustavsson A, Hellman U, Sletten K, Murphy CL, Weiss DT, et al. Amyloid deposits in transthyretin-derived amyloidosis: cleaved transthyretin is associated with distinct amyloid morphology. *J Pathol* 2005;206:224-32.
 28. Sawabe M, Hamamatsu A, Ito T, Arai T, Ishikawa K, Chida K, et al. Early pathogenesis of cardiac amyloid deposition in senile systemic

amyloidosis: close relationship between amyloid deposits and the basement membranes of myocardial cells. *Virchows Arch* 2003;442:252-7.

29. Gustavsson A, Engstrom U, Westermark P. Mechanisms of transthyretin amyloidogenesis. Antigenic mapping of transthyretin purified from plasma and amyloid fibrils and within in situ tissue localizations. *Am J Pathol* 1994;144:1301-11.
30. Saito S, Ando Y, Nakamura M, Ueda M, Kim J, Ishima Y et al. Effect of Nitric Oxide in Amyloid Fibril Formation on Transthyretin-Related Amyloidosis. *Biochemistry* 2005;44:11122-9.
31. Gericke B, Raila J, Deja M, Rohn S, Donaubaueer B, Nagl B, Haebel S, Schweigert F.J., Kaisers U.. Alteration of Transthyretin microheterogeneity in Serum of Multiple Trauma Patients. *Biomarkers Insights*, 2007; 2:299-306.
32. Noboru H., Toshio S., Kazuyoshi Y., Nobuo o., Hiroya H.. characterization of Cysteine and Homocysteine bound to human serum transthyretin; *Clinica Chimica Acta*, 2009, 403. 70-75.
33. Kishikawa M., Nakanishi T., Miyazaki A., Shimuzu A., Nakazato M., Kangawa K. and Matsuo H.. Simple detection of abnormal serum transthyretin from patients with familial amyloidotic polyneuropathy by high-performance liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry using material precipitated with specific antiserum. *J. Mass Spectrom.*, 1996, 31: 112-114.
34. Théberge R., Connors L., Skinner M. Scare J., and Costello C.E.,. Characterization of transthyretin mutants from serum using immunoprecipitation, HPLC/electrospray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 1999, 71:452-459.

35. Atland K., Winter P. and Sauernborn M.K.,. Elettrically neutral microheterogeneity of human plasma transthyretin (prealbumin) detected by isoelectric focusing in urea gradients. *Electrophoresis*, 1999, 20:1349-1364.
36. Terry C.J., Damas A.M., Oliveira P., Saraiva M.J., Alves I.L., Costa P.P., Matias P.M., Sakaki Y. and Blake C.C. 1993. structure of Met30 variant of transthyretin and its amyloidogenic implications. *EMBO J.* 12: 735-741.
37. Palaninathan S., K., Mohamedmohaideen N.N., Snee W.C., Kelly J.W., Sacchettini J.C.. Structural Insight into pH-Induced Conformational Changes within the native human Transthyretin tetramer. *Journal of molecular biology*, 2008, 382: 1157-1167.
38. Halliwell B. and Gutteridge J.M.. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch.Biochem. Biophys.*, 1990, 280:1-8
39. Ueland P.M., Mansoor M.A., Guttormsen A.B., Mulle F., Aukrust P., Refsum H. and Svardal A.M.. Reduced, oxidized and protein-bound form of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status – a possible element of the extracellular antioxidants defense system. *J. Nutr.* 126 (suppl.4), 1996, 1281S-1284S.
40. Pettersson T.M., Carlstrom A, Ehrengerg A. and Jornvall H. 1989. Transthyretin microheterogeneity and thyroxine binding are influenced by non amino acid components and glutathione constituents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158: 341-347.
41. Lim A., Prokaeva T., McComb M., Connors L. H., Skinner M., Costello C.. Identification of S-sulfonation and S-thiolation of a novel transthyretin Phe33Cys variant from a patient diagnosed with familial transthyretin amyloidosis. *Protein Science*, 2003, 12:1775-1786.

42. Ando Y., Gustavsson A., Suhr O., Ohlsson P.I., Terazaki H., Obayashi K., Yamashita T., Ando E., Negi A., Ando M., et al.. Impact of cysteine (Cys)-conjugation and pH on amyloid formation of wild type and Met30 transthyretin (TTR). In *Amyloid and amyloidosis* (eds. R.A. Kyle and M.A. Gertz), 1999, pp.44-46. Parthenon Publishing, New York, NY.
43. Atland K, Winter P.. Potential treatment of transthyretin-type amyloidoses by sulfite. *Neurogenetics*, 1999, 2:183-188.
44. Eneqvist T., Olofsson A., Ando Y., Miyakawa T., Katsuragi S., Jass J., Lundgren E., Suer-Eriksson A.E.. Disulfide- Bond Formation in the Transthyretin Mutant Y114C Prevents Amyloid Fibril Formation in Vivo and in Vitro. *Biochemistry*, 2002, 41: 13143-13151.
45. Ueno S., Uemichi T., Yoruji S and tarui S.. A novel variant of transthyretin (Tyr114 to Cys) deduced from the nucleotide sequences of gene fragments from familial amyloidotic polyneuropathy in Japanese sibling cases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 169: 143-147.
46. Kishikawa M., Nakanishi t., Miyazaki A, Shimizu A.. Enhanced amyloidogenicity of sulfonated transthyretin in vitro, a hypothetical etiology of senile amyloidosis. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.*, 1999, 183-186.
47. Lopez De La Paz M., Goldie K., Zurdo J., Lacroix E., Dobson C.M., Hoenger A., Serrano L.. De novo designed peptide-based amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad., Sci.*, 2002, 99: 16052-16057.
48. Yi-Yun Chen e altri. A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum; *Electrophoresis*, 2005, 26, 2117-2127
49. William E. Werner, "Run parameters affecting protein patterns from second dimension electrophoresis gels", *Analytical Biochemistry*, 2003, 317, 280-283.

50. Gromova and J.E. Celis, Protein Detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass Spectrometry. Cell Biology, 2006; vol. 4.
51. Wallace M.R., Naylor S.L., Kluve-Beckerman B., Long G.L., McDonald L., Shows T.B., Benson M.D. Localization of the human prealbumin gene to chromosome 18. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1985, 129:753-758.
52. Karlsson A., Olofsson A., Eneqvist T., Sauer-Eriksson A.E. Cys114-linked dimers of transthyretin are compatible with amyloid formation. Biochemistry, 2005, 44:13063-13070.
53. Monaco H.L., Rizzi M., Coda A. Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. Science, 1995, 268:1039-1041.
54. Zanotti G., Folli C., Cendron L., Alfieri B., Nishida S.K., Gliubich F., Pasquato N., Negro A., Berni R. Structural and mutational analyses of protein-protein interactions between transthyretin and retinol-binding protein. FEBS J., 2008, 275:5841-5854.
55. Peterson S.A., Klabunde T., Lashuel H.A., Purkey H., Sacchettini J.C., Kelly J.W. "Inhibiting transthyretin conformational changes that lead to amyloid fibril formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1998, 95:12956-12960.
56. Gales L., Saraiva M.J., Damas A.M. Structural basis for the protective role of sulfite against transthyretin amyloid formation. Biochim. Biophys. Acta, 2007, 1774:59-64.
57. Pasquato N., Berni R., Folli C., Alfieri B., Cendron L., Zanotti G.J. Acidic pH-induced conformational changes in amyloidogenic mutant transthyretin. Mol. Biol., 2007, 366:711-719.

58. Schreiber G, Aldred AR, Jaworowski A, Nilsson C, Achen MG, Segal MB.. Thyroxine transport from blood to brain via transthyretin synthesis in choroid plexus. *Am J Physiol*, 1990, 258:R338–R345.
59. Ernstrom U, Petterson T, Jornvall H.. A yellow component associated with human transthyretin has properties like a pterin derivative, 7, 8-dihydropterin-6-carboxaldehyde. *FEBS Lett*, 1995, 360:177–182.
60. Sousa MM, Berglund L, Saraiva MJ. 2000. Transthyretin in high density lipoproteins—association via apolipoprotein AI. *J Lipid Res* 41:58–65.
61. Maria João Mascarenhas Saraiva. Transthyretin Mutations in Hyperthyroxinemia and Amyloid Diseases. *HUMAN MUTATION*, 2001, 17:493.503