



Università degli Studi di Sassari

**Scuola di dottorato in
Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche
Ciclo XXVI
Coordinatore: Prof.ssa Claudia Crosio**

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

*Approcci analitici per la determinazione del grado di
metilazione globale del DNA*

*Tesi di dottorato:
Dott. Luciano Murgia*

Tutor: Prof. Luca Deiana

Co-Tutor: Dott. Angelo Zinellu

Coordinatore: Prof.ssa Claudia Crosio

INDICE

1	Introduzione	4
2	Principali modificazioni epigenetiche	6
2.1	Istoni e formazione del nucleosoma	6
2.1.1	Modificazioni istoniche	9
2.1.2	Fosforilazione degli istoni	10
2.1.3	Acetilazione dei residui di lisina	11
2.1.4	Metilazione degli istoni	12
2.1.4.1	Metilazione della lisina	13
2.1.4.2	Metilazione dell'arginina	13
2.1.4.3	Demetilasi istoniche	14
2.1.4.4	Ubiquitinazione e sumoilazione	15
2.2	Metilazione del DNA	16
2.3	SAM e metilazione del DNA	18
2.4	Ruolo dell'epigenetica nel cancro	21
2.4.1	La modificazione degli istoni e il cancro	22
2.4.2	La metilazione del DNA e il cancro	22
3	Metodiche di analisi della metilazione globale del DNA	26
4	Generalità sulla cromatografia ad interazione idrofilia	30
4.1	Particelle sub 2 µm	31
5	Generalità sull'elettroforesi capillare (CE)	34
5.1	Principi separativi e strumentazione	36
5.1.1	L'apparato per EC	37
5.1.2	Alimentatore	40
5.1.3	Capillare	40
5.1.4	Autosampler	42
5.1.5	Rivelatore	42
5.2	Tecniche in CE	43
5.2.1	Elettroforesi Capillare Zonale (CZE)	43
5.2.2	Isoelettrofocalizzazione (IEF)	44
5.2.3	Elettroforesi gel capillare (CGE)	45
5.2.4	Isotacoforesi (ITP)	45
5.2.5	Cromatografia capillare elettrocinetica micellare (MEKC)	46
5.2.6	Tecniche di concentrazione online	47
6	Scopo	50
7	Materiali e metodi	51
7.1	Reagenti	51
7.2	Estrazione del DNA	51
7.2.1	Estrazione da sangue intero	51
7.2.2	Estrazione da campioni paraffinati (FFPE)	51

7.3	Idrolisi acida del DNA mediante acido formico	52
7.4	Apparato e condizioni cromatografiche	53
7.5	Apparato e condizioni elettroforetiche	53
7.5.1	CE Reverse Injection	53
7.5.2	FASI-CE	54
7.6	Selezione degli individui	54
7.6.1	Soggetti affetti da degenerazione maculare senile	54
7.6.2	Soggetti colpiti da infarto acuto del miocardio	55
7.6.3	Soggetti sotto trattamento con farmaci anticoncezionali	56
7.6.4	Soggetti fumatori e non	56
8	Risultati e Discussione	58
8.1	Fase preanalitica	58
8.1.1	Ottimizzazione dell'idrolisi acida del DNA	58
8.2	Sviluppo della metodica HILIC-UPLC	59
8.3	Sviluppo della metodica CZE Reverse-Injection	65
8.3.1	Ottimizzazione del tampone di corsa	65
8.3.2	Ottimizzazione della temperatura della cartuccia	70
8.3.3	Ottimizzazione della lunghezza d'onda	72
8.3.4	Vantaggi nell'utilizzo della modalità ad iniezione inversa	73
8.3.5	Effetto matrice	74
8.3.6	Validazione del metodo	77
8.3.7	Selezione campioni per la validazione della metodica CZE Reverse-Injection	78
8.4	Sviluppo della metodica FASI-CE	80
8.4.1	Ottimizzazione del tampone di corsa	81
8.4.2	Ottimizzazione del plug di solvente	82
8.4.3	Validazione del metodo	85
8.4.4	Selezione dei campioni per la validazione della metodica FASI-CE	86
9	Applicativi delle metodiche	87
9.1	Valutazione del grado di metilazione globale del DNA su soggetti affetti da degenerazione maculare senile	87
9.2	Soggetti colpiti da infarto acuto del miocardio	88
9.3	Soggetti sotto terapia anticoncezionale	89
9.4	Soggetti fumatori e non	90
10	Conclusioni	91
	Bibliografia	94

1. Introduzione

Sebbene il termine epigenetica sia stato introdotto da Waddington fin dal 1942 per indicare *“quella branca della biologia che studia le interazioni casuali tra i geni e i loro prodotti che portano in essere il fenotipo”* [1], è solo in questi ultimi anni che è divenuto di stretta attualità e persino noto al di là della stretta cerchia degli addetti ai lavori. Il significato originale è stato tuttavia raffinato e oggi per epigenetica si intende lo studio di quei tratti ereditari ed entro certi limiti reversibili, che violano la convenzionale nozione di ereditarietà Mendeliana in quanto dovuti ad alterazioni dell'espressione genica non imputabili a cambiamenti a livello della sequenza nucleotidica del DNA. Per cambiamenti epigenetici si intendono perciò tutte quelle variazioni del fenotipo senza che si abbia contemporaneamente anche una modificazione genotipica e quindi dell'informazione genetica contenuta nelle sequenze del DNA. Unitamente alle interazioni casuali tra i geni e all'interazione di questi con l'ambiente, anche l'insieme delle modificazioni epigenetiche partecipano perciò attivamente alla determinazione del fenotipo di un individuo.

Le modificazioni epigenetiche sebbene siano eventi del tutto naturali, probabilmente fondamentali per l'evoluzione e l'adattamento della specie, in alcuni casi possono essere anche corresponsabili di alcune patologie. Tra queste, le neoplasie sono l'esempio meglio studiato e conosciuto ma la lista dei disordini cui i processi epigenetici possono contribuire è piuttosto lunga [2,3]. Da un punto di vista meccanicistico i fenomeni epigenetici agiscono alterando l'accessibilità al genoma da parte di tutta quella serie di complessi molecolari che intervengono e sono attivi durante il processo di trascrizione. Il risultato di questa perturbazione è un'anomala o del tutto assente espressione dei geni coinvolti.

A causa della loro potenziale rilevanza clinica, lo studio delle epimutazioni, sta ricevendo già da diversi anni una grande attenzione da parte della biologia e delle scienze mediche, allo scopo sia di comprendere in che modo queste modificazioni possono innescare e far progredire le patologie in cui sono coinvolte sia, soprattutto, per stabilire se possano essere target biologici terapeuticamente utili.

Nel presente lavoro abbiamo affrontato lo sviluppo di metodiche cromatografiche ed in elettroforesi capillare al fine della valutazione del grado di metilazione globale del DNA estratto da campioni di sangue intero e da tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina.

2. Le principali modificazioni epigenetiche

Le modificazioni epigenetiche possono essere di vario tipo e per lo più sono dovute ad alterazioni di natura chimica a carico del materiale genetico o delle proteine istoniche responsabili del compattamento del DNA all'interno del nucleo. Generalmente quasi tutte le modificazioni epigenetiche hanno un impatto sulla regolazione dell'attività dei genomi riducendo o rendendo più accessibile il codice genetico alle strutture molecolari deputate alla 'lettura' dei geni.

Tra i principali meccanismi di natura epigenetica ricordiamo:

- modificazioni delle proteine istoniche;
- metilazione del DNA;
- inattivazione del cromosoma X;
- silenziamento genico.

2.1. Istoni e formazione del nucleosoma

Il DNA nelle cellule non si trova in forma nuda, ma complessato con una serie di proteine, per formare una struttura più articolata e complessa detta cromatina. Due classi di proteine si possono associare con il DNA per formare la cromatina e sono gli istoni e le proteine non istoniche. Le proteine istoniche in una cellula eucariotica sono molto più abbondanti di quelle non istoniche e si calcola che una cellula umana contenga circa 60 milioni di tali proteine. Essi contribuiscono alla formazione dei nucleosomi che formano l'unità base della cromatina.

Gli istoni sono le proteine più abbondanti associate ai cromosomi [4] e rappresentano una delle famiglie di proteine maggiormente conservate dal punto di vista evolutivo. Sono proteine basiche cariche positivamente, poiché posseggono un gran numero di

amminoacidi con catena laterale basica, in particolare lisina e arginina. Gli istoni interagiscono con il DNA, che è carico negativamente a causa dell'abbondanza di gruppi fosfato, per formare strutture dette nucleosomi. Esistono cinque tipi di istoni comuni: H1, H2a, H2b, H3, H4.

Ogni nucleosoma è composto da due coppie degli istoni H2A, H2B, H3, H4 che formano un ottamero intorno al quale si avvolgono 146 basi di DNA per 1.7 giri. Ogni istone assume una struttura denominata "histone fold" caratterizzata dalla presenza di tre alfa eliche e di una lunga estensione N-terminale che non è strutturata. L'interazione tra il DNA e gli istoni nell'ottamero del nucleosoma avviene attraverso più di 100 legami idrogeno tra la catena principale degli istoni e i gruppi fosfato del DNA, interazioni idrofobiche e ponti salini ai quali contribuiscono le catene laterali di numerosi aminoacidi presenti nelle sequenze degli istoni. Anche se le interazioni tra gli istoni ed il DNA sono soprattutto a carico dei gruppi fosfato del DNA e non sono sequenza-specifiche lo spazio tra due nucleosomi può variare, infatti, sequenze ricche di AT si ripiegano facilmente intorno ai nucleosomi di sequenza ricche in GC. Questo spiega alcuni casi di posizionamento molto preciso di nucleosomi su determinate sequenze di DNA, alle quali contribuisce la presenza di proteine adiacenti. La maggior parte delle sequenze di DNA può però interagire in modo variabile con gli istoni senza che ci siano delle regioni preferenzialmente reclutate nel nucleosoma. Le interazioni DNA-istoni nel nucleosoma costituiscono una barriera all'accesso di altre proteine al DNA. Esistono enzimi che utilizzano l'idrolisi dell'ATP per alterare temporaneamente la struttura della cromatina consentendo così l'accesso ai fattori di trascrizione o ad enzimi di riparazione che difficilmente potrebbero raggiungere le sequenze bersaglio. Queste ATPasi appartengono a due famiglie dette SWI/SNF e ISW e sono attivamente coinvolte nella regolazione dell'espressione genica. La maggior parte

della cromatina si presenta sotto forma di un filamento di 30 nm. Alla formazione di questo filamento contribuisce l'istone H1, che è più grande e meno conservato rispetto a quelli che costituiscono il nucleosoma. Una molecola di H1 si lega ad ogni nucleosoma formando contatti con il DNA e anche con le proteine del nucleosoma stesso. La presenza di H1 altera la traiettoria con la quale il DNA fuoriesce dalla sua interazione con il nucleosoma facilitando la formazione di strutture cosiddette a zig-zag. La struttura a filamento di 30 nm viene ulteriormente condensato quando la cellula ha terminato la duplicazione del DNA nella fase S del ciclo cellulare e si appresta ad iniziare la mitosi. Dalla struttura cristallografica del nucleosoma si evince che le code N-terminali degli istoni sono accessibili e non strutturate. Queste regioni sono soggette ad una serie di possibili modifiche post-traduzionali, come:

- ◆ La fosforilazione su residui di serina o treonina.
- ◆ L'acetilazione di residui di lisina.
- ◆ La metilazione su arginine o lisine.
- ◆ L'ubiquitinazione e sumoilazione

Ci sono due meccanismi possibili attraverso i quali queste modificazioni possono influenzare la trascrizione:

- ◆ 1. Modulazione delle interazioni tra le code istoniche ed il DNA. La metilazione aumenta la basicità del gruppo ϵ -amminico della lisina favorendo interazioni elettrostatiche con i gruppi fosfato del DNA. Al contrario l'acetilazione diminuisce la basicità degli stessi residui sfavorendone in questo modo l'interazione con l'acido nucleico, e secondo questo modello, facilitando l'accesso all'apparato trascrizionale.

- ◆ 2. Riconoscimento delle modificazioni da parte di proteine che a loro volta modulano l'attività dell'apparato trascrizionale. Sono stati identificati domini che riconoscono modificazioni specifiche degli istoni.

L'ipotesi del codice istonico postula che lo schema di queste modificazioni multiple degli istoni, specifici i componenti e l'attività dell'apparato molecolare di regolazione della trascrizione. Gli enzimi coinvolti nelle modificazioni istoniche sono le istone-acetiltransferasi (Hystone actyltransferase; HAT), le istone-deacetilasi (Histone deacetylase; HDAC), le istone metil-transferasi e le demetilasi. Le HAT rilassano la struttura ripiegata della cromatina regolando il legame delle proteine non istoniche e questo correla con un aumento dell'attività trascrizionale da parte della RNA polimerasi II. L'enzima istone acetiltransferasi catalizza il trasferimento di un gruppo acetile dell'acetilCoA al gruppo ϵ -amminico di una lisina. Le circa 30 HAT sono classificate in 5 sottofamiglie che differiscono tra loro per quanto riguarda l'organizzazione strutturale e la funzione biologica. Anche il soppressore tumorale p53 è regolato attraverso acetilazione, che ne aumenta la sua attività trascrizionale e la capacità di indurre morte cellulare programmata. L'enzima istone deacetilasi ha un effetto inibitorio sulla trascrizione, catalizza la rimozione idrolitica del gruppo acetile dalle acetil lisine prodotte dall'azione dell'istone acetiltransferasi.

2.1.1. Modificazioni istoniche

Un altro possibile meccanismo epigenetico in grado di regolare l'espressione genetica modulando la transizione tra gli stati attivi o inattivi della cromatina si esplica attraverso le modificazioni post-traduzionali degli istoni. Si tratta di modificazioni covalenti

delle code ammino-terminali degli istoni che protrudono dal nucleosoma le quali sono soggette a fosforilazione, acetilazione, metilazione e ubiquitinazione.

2.1.2. La fosforilazione degli istoni

La fosforilazione degli istoni è un processo altamente dinamico che avviene a carico di residui serina, treonina e tirosina presenti prevalentemente ma non esclusivamente nei residui N-terminali delle code istoniche [5]. Tutte le reazioni di fosforilazione e defosforilazione sono controllate da chinasi e fosfatasi che aggiungono e rimuovono i gruppi fosfato [6].

Tutte le chinasi identificate trasferiscono un gruppo fosfato dall'ATP al gruppo ossidrilico della catena laterale dell'aminoacido bersaglio. Questa modificazione fa sì che l'aggiunta del gruppo fosfato determini un incremento della carica negativa in prossimità dell'istone fosforilato che a sua volta influenzerà la struttura cromatinica. Per la maggior parte delle chinasi non è chiara la modalità con cui l'enzima viene reclutato nel sito d'azione della cromatina. In alcuni casi come nel caso dell'enzima MAPK1 dei mammiferi, la chinasi possiede un dominio di legame intrinseco sulla molecola del DNA e questo legame può essere sufficiente per reclutare specificatamente i fattori di trascrizione che legano il DNA [7]. In alternativa affinché avvenga il legame delle chinasi è necessaria l'associazione di un fattore legante la cromatina prima che l'enzima entri in diretto contatto con la molecola di DNA. La maggior parte dei siti di fosforilazione dell'istone si trovano all'interno delle code N-terminali [8].

Molto meno si conosce riguardo alle fosfatasi degli istoni. È intuibile che dato l'estremo ricambio di fosforilazioni a livello istonico deve esserci un'elevata attività delle fosfatasi all'interno del nucleo [9,10].

2.1.3. Acetilazione dei residui di lisina

L'acetilazione degli istoni venne identificata per la prima volta nel 1964 da Allfrey et al [11]. Da allora è stato dimostrato che il processo di acetilazione delle lisine è un processo altamente dinamico e regolato dall'azione contrapposta di due famiglie di enzimi, istone acetiltransferasi (HTA) e istone deacetilasi (HDAC) [12]. Entrambi utilizzano come cofattore l'acetil CoA e catalizzano il trasferimento di un gruppo acetile al gruppo ϵ -amminico delle catene laterali dei residui di lisina. Il risultato di questo trasferimento è la neutralizzazione della carica positiva della lisina e un conseguente indebolimento delle interazioni tra gli istoni del DNA. In realtà, non sono enzimi altamente specifici, possono infatti modificare più di un residuo amminoacidico. Il DNA viene quindi disteso in quel punto permettendo ad altre proteine o enzimi di interagire con esso. L'acetilazione, quindi, interviene nel processo di attivazione della trascrizione. Per entrambi gli enzimi sono conosciute due principali classi: quelli di tipo A e quelli di tipo B. Quelli di tipo B hanno una localizzazione prevalentemente citoplasmatica e vanno ad acetilare per lo più gli istoni liberi e non quelli complessati nella struttura cromatinica. Gli enzimi di tipo A sono una famiglia più diversificata rispetto a quella di gruppo B e possono essere classificati in almeno tre gruppi differenti (GNAT, MYST e CBP) in base all'omologia di sequenza e alla struttura quaternaria [13]. Ciascuno di questi enzimi è in grado di modificare più siti all'interno delle code N-terminali degli istoni con conseguente destabilizzazione delle cariche positive e delle interazioni elettrostatiche che garantiscono l'interazione della molecola del DNA con numerosi cofattori e enzimi deputati alla trascrizione della stessa [14]. Tuttavia non solo le code istoniche sono coinvolte in questa regolazione, ma ci sono ulteriori siti di acetilazione presenti all'interno del nucleo dell'istone globulare, come H3K56 che è acetilato nell'uomo da hGCN5 [15]. Le H3K56 acetilano per lo più in

prossimità del solco maggiore del DNA suggerendo che l'acetilazione degli istoni interesserebbe il sito di interazione DNA/istoni, una situazione che ricorda gli effetti proposti dall'acetilazione dei residui di lisina N-terminali. Molti enzimi modificanti gli istoni hanno la caratteristica comune di trovarsi spesso associati a grossi complessi multi proteici [14]. Le proteine presenti all'interno di questi complessi giocano un ruolo importante nel controllo del reclutamento dell'enzima, nell'attività dello stesso e nel garantire la specificità del substrato. Le HDAC rimuovono invece i gruppi acetile e ripristinano una carica positiva sui residui di lisina delle degli istoni, che stabilizza il compattamento della cromatina e l'impacchettamento di questa a un livello superiore. Questa configurazione della cromatina limita l'accessibilità dei fattori di trascrizione e porta alla repressione della trascrizione.

Esistono 4 classi di HDAC [14]: le classi I e II contengono enzimi che sono strettamente legati al lievito scRpd3 e scHda1, la classe III, denominata "sirtuine", sono omologhi del lievito scSir2, mentre la classe IV, è rappresentata da un singolo membro denominato HDAC11. La classe III, a differenza delle altre tre classi, richiede un cofattore specifico per la sua attività, NAD⁺. Generalmente le HDAC hanno una bassa specificità di substrato e un singolo enzima è capace di deacetilare più siti all'interno dello stesso istone. Per ciò che riguarda il processo del reclutamento e specificità enzimatica la questione è complicata dal fatto che gli enzimi sono solitamente presenti in complessi multipli distinti, spesso con altri membri appartenenti alla famiglia delle HDAC [16].

2.1.4. Metilazione degli istoni

Le reazioni di metilazione avvengono per lo più sulle catene laterali dei residui di lisina e arginina. A differenza dell'acetilazione e fosforilazione, la metilazione dell'istone

non altera la carica della porzione modificata. Tuttavia la complessità della modificazione è maggiore in quanto i residui di lisina possono essere mono-di o trimetilati, mentre le arginine possono essere mono-metilate o di-metilate in maniera simmetrica o asimmetrica.

2.1.4.1. Metilazione della lisina

Il primo istone lisina metiltransferasi (HKMT) ad essere stato identificato è stato il SUV39H1 [17]. Attualmente si conoscono numerosi HKMTs che metilano per lo più i residui di lisina presenti nelle code N-terminali degli stessi residui amminoacidici. Questi enzimi sono caratterizzati dalla presenza di un dominio SET in cui si esplica l'attività enzimatica, cioè il trasferimento di un gruppo metile dall'S-adenosilmetionina (SAM) al gruppo ϵ -amminico di una lisina. Le HKMTs hanno la capacità di discriminare le lisine presenti sugli istoni metilando, dimetilando o trimetilando residui di lisina specifici. La capacità di discriminare le lisine specifiche in base al loro grado di metilazione è una proprietà intrinseca dell'enzima. La metilazione delle lisine aumenta la loro carica positiva e può avere effetti attivanti e repressivi sulla trascrizione a seconda del residuo coinvolto nella reazione. La metilazione della lisina 9 dell'istone H3 ad esempio è repressiva perché, è riconosciuta dalla proteina HP1 che è coinvolta nella formazione dell'eterocromatina. Al contrario, la metilazione della lisina 4 dello stesso istone è attivante nei confronti della trascrizione.

2.1.4.2. Metilazione dell'arginina

La metilazione dei residui di Arginina avviene ad opera di una particolare classe di enzimi denominati arginin-metil-transferasi di cui se ne conoscono due tipi, quelle di tipo I e quelle di tipo II. Entrambe le classi appartengono ad una famiglia di proteine costituita

da 12 elementi denominate PRMTs (Protein arginine methyltransferases). Tutti questi enzimi trasferiscono un gruppo metile dall'S-adenosilmetionina (SAM) ai gruppi ω -guanidici dei residui di arginina presenti su un'ampia varietà di substrati [18,19].

Le metiltransferasi, hanno un esteso sito attivo catalitico che contraddistingue questo ampio gruppo di metiltransferasi da altri enzimi SAM-dipendenti [20]. È interessante notare che la tasca di legame per la SAM è localizzata su una faccia dell'enzima, mentre il residuo peptidico si lega in un canale presente sulla faccia opposta dell'enzima. Ciò indica che sulla superficie dell'enzima la molecola di SAM donatrice dei gruppi metilici e i residui amminoacidici istonici si legano sui due lati opposti della molecola.

2.1.4.3. Demetilasi istoniche

Per molti anni, la metilazione dell'istone è stata considerata come una modifica di tipo statico e quindi irreversibile. Tuttavia, nel 2002, sono stati suggeriti dei differenti percorsi come potenziali meccanismi di demetilazione sia della lisina e sia dell'arginina [21]. Per quanto riguarda la metilazione dell'arginina, il primo meccanismo di demetilazione descritto riguardava in realtà una reazione di deiminazione che trasformava la metilarginina in citrullina la quale è catalizzata dall'enzima peptidil deaminasi PADI4. Solo successivamente è stato individuato l'enzima responsabile della conversione della metilarginina in arginina operata dalla proteina Jumonji, indicata con la sigla JMJD6, la quale è in grado di eseguire una reazione di demetilazione dell'arginina sugli istoni H3R2 e H4R3 [24]. Nel 2004, è stata identificata la prima demetilasi per le lisine, chiamata "Demetilasi Lisina-Specifica 1" che utilizza il FAD come cofattore [25]. La reazione di demetilazione richiede un azoto protonato ed è quindi compatibile solo con substrati lisina mono e di-metilati.

Nel 2006 è stata scoperta un'altra classe di lisina demetilasi. È importante sottolineare che alcuni enzimi di questa classe sono in grado di demetilare lisine tri-metilate [26]. Essi impiegano un meccanismo catalitico utilizzando Fe (II) e α -chetoglutarato come co-fattori, e un meccanismo di attacco radicale.

2.1.4.4. Ubiquitinazione e sumoilazione

Tutte le modificazioni degli istoni precedentemente descritte determinano piccoli cambiamenti molecolari a carico delle catene laterali amminoacidiche.

Al contrario, l'ubiquitinazione consiste in una più grande modificazione di tipo covalente e dinamica. L'ubiquitina è un polipeptide costituito da 76-aminoacidi che si lega alle lisine degli istoni attraverso l'azione sequenziale di tre enzimi indicati con le sigle E1 (attivante), E2 (coniugante) ed E3 (legante) [27]. Questo complesso enzimatico determina sia la specificità di substrato (cioè, a quale lisina legarsi), nonché il grado di ubiquitinazione (cioè, sia mono o poli-ubiquitinata). Per gli istoni, la mono-ubiquitinazione sembra più rilevante, anche se l'esatto sito di modifica non è stato ancora chiarito. Tuttavia, due siti ben caratterizzati si trovano all'interno H2A e H2B. H2AK119ub1 è coinvolto nel silenziamento genico [28], mentre H2BK123ub1 svolge un ruolo importante nell'inizio della trascrizione e nella fase di allungamento della stessa [29-30]. La modifica è rimossa mediante l'azione di una classe di enzimi isopeptidasici chiamati enzimi "de-ubiquitina" e questa attività è importante sia per l'attività genica sia per il silenziamento.

La sumoilazione (SUMO small ubiquitin-like modifier) è una modificazione legata alla ubiquitinazione [31] che prevede l'attacco covalente di piccole molecole ubiquitina-simili alle lisine istoniche tramite l'azione di E1, E2 e E3 enzimi. La sumoilazione è stata rilevata in tutti e quattro gli istoni e sembra funzionare da antagonista dell'acetilazione e ubiquitinazione che altrimenti potrebbero verificarsi sulla stessa catena laterale della lisina

[32,33]. È stata associata principalmente con funzioni repressive, ma ulteriori studi sono ancora necessari per chiarire il meccanismo molecolare attraverso cui la sumoilazione esercita il suo effetto sulla cromatina.

2.2. La metilazione del DNA

Uno dei meccanismi epigenetici maggiormente studiati è la metilazione del DNA, una modificazione covalente coinvolta nella regolazione di molti processi cellulari, inclusi l'espressione genica, l'imprinting, l'inattivazione del cromosoma X, il silenziamento di elementi trasponibili e retrovirali e l'organizzazione della cromatina. La metilazione del DNA è caratterizzata dall'aggiunta di un gruppo metilico derivato dal donatore di metili S-adenosilmetionina (SAM) sul carbonio in posizione 5 di una citosina che viene in questo modo convertita in 5-metilcitosina (Figura 1).

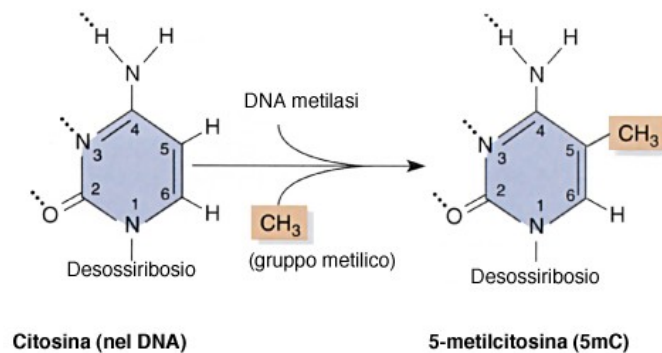


Figura 1. Reazione di Metilazione del DNA

La 5-metilcitosina, rappresenta circa il 2-5% di tutte le citosine presenti nel genoma dei mammiferi e sono localizzate principalmente nei dinucleotidi CpG. Le citosine metilate sono presenti nel DNA di tutti i vertebrati e nella maggior parte degli eucarioti in particolare nelle isole CpG dei promotori genici. La metilazione delle citosine è mediata da proteine chiamate DNA metiltrasferasi (DNMT) [34]. Più di trent'anni fa sono state predette due differenti classi di DNMT :

- DNMT di mantenimento: preservano il pattern di metilazione del DNA durante le divisioni cellulari, mediante l'azione specifica sul DNA emimetilato prodotto attraverso la replicazione semiconservativa;
- DNMT de novo: stabiliscono il pattern di metilazione di sequenze specifiche durante lo sviluppo.

Sono state identificate e caratterizzate 4 differenti DNMT: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b. La DNMT1 mostra una maggiore capacità di metilazione nei confronti del DNA emimetilato rispetto a quello non metilato, assegnandogli pertanto la funzione di metiltrasferasi di mantenimento, sebbene mostri anche proprietà di metilasi de novo. La DNMT2, sebbene sia altamente conservata e distribuita in maniera ubiquitaria nei tessuti, non mostra attività di metiltrasferasi rilevabile. Le DNMT3a e DNMT3b sono due enzimi molto simili con attività di metiltrasferasi de novo e presentano specifiche preferenze per differenti regioni del DNA [35]. Molte patologie nell'uomo sono correlate con un'aberrante metilazione del DNA o con mutazioni di geni coinvolti nella metilazione del DNA; tra queste patologie troviamo disordini neurologici e cardiovascolari, sindromi pediatriche e sindromi da imprinting. La dimostrazione più convincente di alterazione della metilazione del DNA nella patogenesi umana si osserva nei tumori. Le cellule maligne mostrano una maggiore alterazione del profilo di metilazione del DNA che si manifesta con l'ipermetilazione dei promotori di molti geni, ipometilazione globale del DNA e aumento del tasso di mutazioni dei dinucleotidi metilati CpG. Rispetto al resto del genoma umano, che è largamente privo di dinucleotidi CpG, approssimativamente la metà di tutti i promotori dei geni sono associati con regioni arricchite di CpG (0.5-5kb), chiamate isole CpG [36,37]. Nelle cellule normali, in cui la maggior parte delle isole CpG sono non metilate, permettono così la trascrizione dei geni a loro associati. Nelle cellule tumorali

l'ipermetilazione di queste regioni determina la perdita della loro espressione. Sono stati identificati molti geni che presentano un'aberrante ipermetilazione del promotore, tra i quali alcuni sono regolatori del ciclo cellulare (P16INK4a, P15INK4a, RB, P14ARF), geni di riparazione del DNA (BRCA1, MGMT, MLH1), geni associati all'apoptosi (DAPK, TMS1) e molti altri. La seconda forma di difetto nella metilazione del DNA in molti tipi di tumori è l'ipometilazione genomica. Essa è comune in molti tumori solidi come nel tumore della prostata, epatocarcinoma, così come in tumori ematologici. Si è ipotizzato che l'ipometilazione contribuisca alla progressione del tumore attraverso l'attivazione degli oncogeni H-RAS, FGFR1, c-MYC, o attraverso l'attivazione di retrotrasposomi, o attraverso l'aumento dell'instabilità cromosomica. Infine, la metilazione del DNA è correlata con la tumorigenesi anche attraverso l'inattivazione genica mutazionale. La deaminazione delle citosine metilate nei dinucleotidi CpG può causare mutazioni puntiformi (transizioni), in geni come ad es. P53.

2.3. SAM e metilazione del DNA

La S-adenosilmetionina, il principale donatore biologico di metili, è sintetizzato nel citosol di tutte le cellule, anche se il fegato gioca un ruolo centrale nella sua omeostasi poiché è l'organo in cui principalmente avviene la sua sintesi e degradazione [38]. Nel fegato, circa metà della produzione di metionina giornaliera viene convertita in SAM. La metionina adenosiltrasferasi (MAT) è l'enzima responsabile della formazione di SAM a partire da metionina e ATP. La SAM è correlata con tre importanti vie metaboliche: la sintesi delle poliamine, transmetilazione e transulfurazione. Nei mammiferi la SAM dona il suo gruppo metilico ad una grande varietà di molecole accettrici nelle reazioni catalizzate da metiltrasferasi. S-adenosilomocisteina (SAH) è generata come prodotto di transmetilazione e idrolizzata a omocisteina e adenosina attraverso una reazione reversibile

catalizzata dalla SAM idrolasi [39]. SAH è un potente inibitore competitivo delle reazioni di metilazione, pertanto è necessaria una pronta rimozione dell'adenosina e dell'omocisteina per prevenire l'accumulo di SAH. L'omocisteina può essere rimetilata per formare metionina; pertanto, quando il contenuto di SAM è ridotto l'omocisteina è utilizzata per rigenerare SAM, mentre quando i livelli di SAM sono alti, l'omocisteina può essere utilizzata nella via di transsulfurazione [40] (figura 2). Normalmente il DNA densamente metilato è associato all'eterocromatina condensata quindi trascrizionalmente inattiva, mentre quello scarsamente metilato è associato all'eucromatina più rilassata e trascrizionalmente attiva. L'ipermetilazione dell'eterocromatina in cellule normali assicura che il DNA venga mantenuto in uno stato quiescente di replicazione e che eventuali sequenze virali e trasposoni non si possano integrare nel genoma. L'inattivazione genica di geni oncosoppressori mediante aberrante metilazione è uno degli eventi mutazionali più comuni nello sviluppo di un tumore. Dagli studi condotti per identificare le isole CpG differenzialmente metilate nei tumori si stima che delle 45000 isole CpG presenti nel genoma umano, circa 600 esibiscono un'aberrante metilazione nelle cellule tumorali rispetto alle normali. Le modificazioni di metilazione delle isole CpG sembrano essere degli eventi coinvolti nella cancerogenesi. L'ipermetilazione di promotori può avere un ruolo determinante nello sviluppo di un tumore quando ha come conseguenza l'inattivazione trascrizionale di geni regolatori della crescita e geni oncosoppressori. Recenti studi hanno dimostrato che questo evento si verifica nei primi stadi del processo neoplastico, compresi quelli preneoplastici. Esiste una crescente lista di geni oncosoppressori la cui trascrizione è inibita dall'ipermetilazione del proprio promotore [41]. Questi geni risultano essere importanti nella tumorigenesi di alcuni tumori ma non di altri. L'ipermetilazione del gene APC risulta legato all'insorgenza del tumore al colon-retto [42]. L'ipermetilazione di BRCA1

è associata con determinati tipi di carcinoma alla mammella, ma non con leucemia, carcinoma epatico e intestinale dove non è presente un'anormale metilazione. Il gene O6-MGMT, che codifica un importante enzima coinvolto nella riparazione del DNA, risulta ipermetilato in molti tipi di tumori solidi [43]. Quindi la metilazione di geni coinvolti nella riparazione del DNA, quali MGMT, può portare alla loro inattivazione, con conseguente instabilità microsatellitare e aumento della frequenza di mutazioni. Il gene che codifica la proteina p16INK4A, implicata nel processo di regolazione del ciclo cellulare ed identificata come soppressore tumorale, risulta ipermetilato durante lo sviluppo del carcinoma epatocellulare, così come in altri tipi di tumore. Oltre l'ipermetilazione del gene p16INK4A, altri casi di ipermetilazione di promotori di geni oncosoppressori sono stati descritti nel carcinoma epatico umano. Tra questi abbiamo l'E-caderina, la proteina spectrina-simile associata con l'apoptosi (ASC), il gene deletato nel tumore epatico 1 (DLC1) e molti altri. Il significato biologico dell'ipermetilazione di alcuni di questi geni è stato valutato in linee cellulari di carcinoma epatico. In particolare, il trattamento di cellule di epatoma con agenti demetilanti aumenta l'espressione di p16INK4A, gene associato con l'inibizione della proliferazione cellulare. La metilazione può promuovere spontanea deaminazione, aumentare il legame di cancerogeni al DNA e favorire l'assorbimento delle radiazioni ultraviolette da parte del DNA. Tutti questi fattori incrementano la quantità di mutazioni e la formazione di addotti con conseguente inattivazione genica di oncosoppressori. Nonostante l'aberrante metilazione di alcune sequenze, il genoma delle cellule tumorali mostra contemporaneamente ipometilazione globale. I meccanismi di questo processo non risultano ancora chiari, ma l'ipometilazione del DNA contribuisce all'acquisizione di instabilità genomica, di variazioni strutturali nei cromosomi così come all'aumento dell'espressione genica. L'instabilità genomica è una caratteristica comune

delle cellule dei carcinomi epatici umani. Vari meccanismi possono contribuire alla sua acquisizione, inclusi l'accorciamento dei telomeri, difetti nella segregazione dei cromosomi e alterazioni nelle vie di risposta a danni nel DNA.

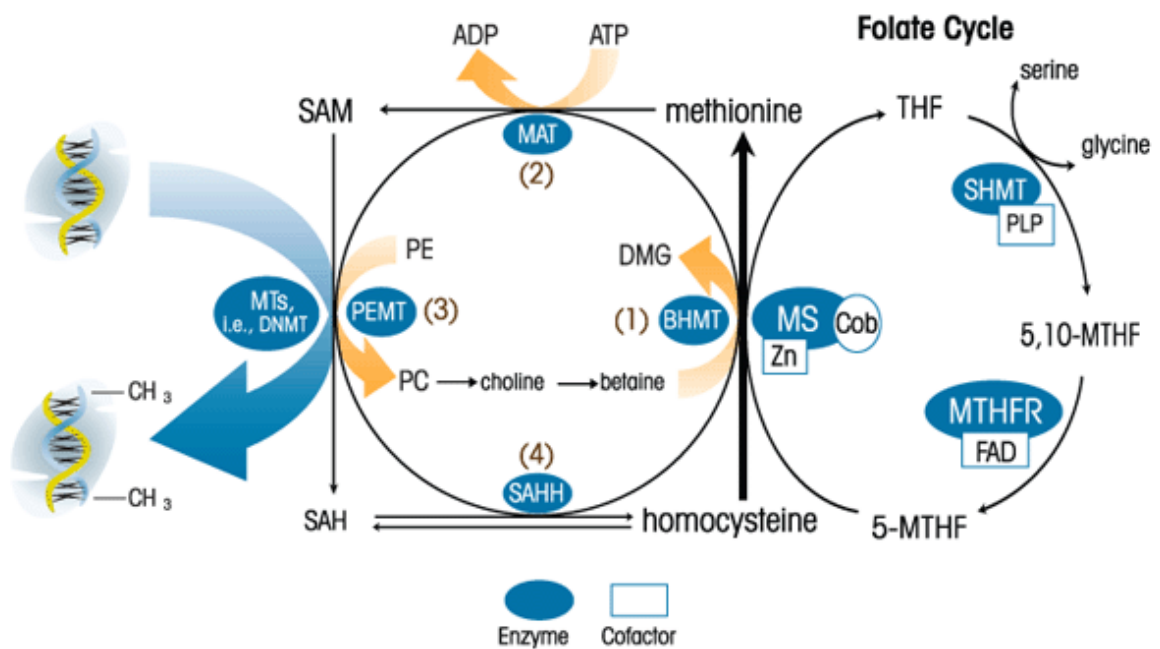


Figura 2. Ciclo della Metilazione. La metilazione delle citosine delle isole CpG è catalizzata dalle DNA metiltransferasi (DNMT), che trasferiscono un gruppo metile dalla S-adenosilmetionina (SAM) al carbonio 5' della citosina, formando 5-metilcitosina e S-adenosilomocisteina (SAO).

2.4. Ruolo dell'epigenetica nel cancro

Piuttosto recentemente è stata formulata l'ipotesi, ancora controversa, che nel processo di cancerogenesi l'inattivazione epigenetica dei geni sia importante tanto quanto l'inattivazione dei geni causata dalle mutazioni.

Il segno distintivo del cancro è la deregolazione del profilo di espressione genica e il sovvertimento delle vie di trasduzione. L'instabilità genomica e le mutazioni offrono alle cellule tumorali un vantaggio adattativo e proliferativo che consente la propagazione del danno al DNA favorendo l'insorgenza del tumore. E' ormai evidente che fattori epigenetici, in particolare la metilazione del DNA, possono conferire un addizionale vantaggio selettivo ai tumori. Mentre è abbastanza chiaro come modificazioni genetiche e epigenetiche possano influenzare l'espressione genica, è meno chiaro come questi meccanismi possano

influenzarsi tra loro e come una serie di queste modificazioni possano co-evolvere e influenzare l'espressione genica durante la tumorigenesi.

2.4.1. La modificazione degli istoni e il cancro

In parecchie forme di cancro è stata osservata un'attività alterata delle HAT e delle HDAC. È interessante notare che un gene, *EP300*, che codifica per una HAT è stato trovato mutato nei tumori epiteliali. Molte delle mutazioni fanno pensare alla produzione di una proteina troncata e, l'inattivazione del secondo allele osservata in cinque casi di cancro su sei, indica che il gene abbia la funzione di soppressore dei tumori.

La leucemia promielocitica acuta è caratterizzata da una traslocazione cromosomica che produce una proteina di fusione chiamata PML-RAR. Questa nuova proteina di fusione mantiene il dominio di legame al DNA e il dominio di legame al ligando del RAR oltre alle sequenze di PML. PML-RAR recluta le HDAC sul promotore dei geni bersaglio di RA e ne reprime l'espressione. La mancata attivazione dei geni bersaglio di RA provoca il differenziamento caratteristico della leucemia. Anche altri tumori sono stati associati al reclutamento aberrante delle HDAC.

2.4.2. La metilazione del DNA e il cancro

Nel cancro sono stati riconosciuti dei cambiamenti specifici della metilazione del DNA e molti studi si sono concentrati sull'ipermetilazione osservata nelle isole CpG, normalmente non metilate, presenti nei promotori dei geni. Il silenziamento genico dovuto a metilazione può essere un meccanismo importante di cancerogenesi attraverso il quale vengono inattivati dei geni cruciali, normalmente coinvolti nella soppressione dei tumori. L'inattivazione dell'espressione genica dovuta alla metilazione delle regioni dei promotori di geni di questo tipo è stata osservata in linee cellulari cancerose e in tumori umani [44]. Per esempio, la proteina recettore degli estrogeni è presente nelle cellule

epiteliali ovariche normali ma è spesso assente nel cancro ovarico. L'ipermetilazione del promotore nel gene del recettore α degli estrogeni è stata osservata in tre linee cellulari su quattro di cellule ovariche che erano prive del recettore degli estrogeni. Questo indica che l'ipermetilazione può essere responsabile di questo tipo di tumori ovarici. Un altro esempio è il gene della suscettibilità al tumore mammella, BRCA1, spesso mutato in maniera recessiva nella forma ereditaria di questo tipo di cancro; di conseguenza la perdita di funzione del prodotto del gene suggerisce che la forma normale di BRCA1 agisca sopprimendo il cancro della mammella [45]. Mutazioni di BRCA1 si osservano molto raramente nel cancro della mammella non ereditario. Tuttavia, è interessante notare che l'ipermetilazione è associata con l'inattivazione di BRCA1 nel cancro ereditario della mammella e questo può essere un altro modo attraverso il quale si arriva alla perdita di funzione. Queste scoperte sono a favore dell'ipotesi che l'epigenetica possa essere un meccanismo addizionale di cancerogenesi. Ulteriori esempi di alcuni importanti geni bersaglio interessati dalla metilazione comprendono il gene del retinoblastoma (Rb), l'inibitore del ciclo p16INK4a, la protein chinasi proapoptotica associata a morte (DAPK), il gene APC (Adenomatous Polyposis Coli), e il gene del recettore degli estrogeni. Alcune prove indicano anche che in una sottopopolazione di cellule premaligne si ha metilazione anormale, e si pensa che ciò possa indurre le cellule verso vie di segnalazione alterate e facilitare successive mutazioni che conferiscono alla cellula un vantaggio selettivo promuovendo la tumorigenesi.

I meccanismi molecolari alla base dei diversi tipi di metilazione sono in gran parte sconosciuti. La metilazione del DNA di per se non reprime direttamente la trascrizione ma richiede la presenza di proteine associate, come gli enzimi che modificano gli istoni, le proteine che legano la metilcitosina e la DNMT, le quali contribuiscono a definire la

struttura della cromatina. Oltre a reclutare le HDAC, è stato anche dimostrato che PML-RAR recluta le metiltransferasi che portano alla metilazione del DNA della regione del promotore di un gene specifico. Il gene RAR β 2 ha un RARE nel promotore ed è uno dei geni bersaglio di PML-RAR. E' stato dimostrato che PML-RAR forma complessi stabili con le DNMT sul promotore di RAR β 2 e che la risultante ipermetilazione contribuisce alla cancerogenesi. Si pensa che le DNMT, oltre a mediare la metilazione, possano agire da piattaforme per l'assemblaggio di fattori che modificano la cromatina.

Poiché non tutti i cancerogeni sono mutageni, è possibile che alcuni cancerogeni non genotossici (agenti che non causano mutazioni nei geni) siano dei cancerogeni epigenetici. L'ipermetilazione è stata osservata in topi sensibili ai tumori trattati con fenobarbital, un cancerogeno non genotossico nei roditori [46]. I dati suggeriscono che un'alterazione dei normali schemi di metilazione correli con la suscettibilità ai tumori e che i cancerogeni non genotossici possano agire tramite metilazione. Inoltre, le deficienze nutrizionali (di metionina o di colina) sembrano influenzare il livello cellulare di S-adenosilmetionina, un importante donatore di gruppi metilici. Questo dato suggerisce che una perturbazione della metilazione possa essere indotta dalla dieta. Si pensa anche che il silenziamento genico epigenetico, caratteristico delle cellule staminali e delle cellule progenitrici normali, possa essere "bloccato" in caso di lesioni e di stati di infiammazione cronica e possa contribuire alla cancerogenesi. Sono necessarie ulteriori prove dirette per collegare i fattori richiesti per indurre l'alterata regolazione della metilazione con quelli necessari per indurre la cancerogenesi. In diversi tipi di cancro è stato dimostrato che mutazioni a livello delle DNA metiltrasferasi, porterebbero direttamente ad una metilazione alterata. Al contrario, il ruolo della metilazione nella trasformazione può essere quello di promuovere le mutazioni. I residui di citosina metilati tendono a deaminare spontaneamente causando

transizioni C-T. Questo può spiegare l'aumentata frequenza di mutazioni osservata nelle isole metilate CpG.

Paradossalmente, il genoma di una cellula cancerosa può avere globalmente il 50-60% di metilazione in meno di una cellula normale. Questa ipometilazione globale, soprattutto nella regione codificante dei geni e nelle sequenze di DNA ripetitivo, si verifica nella cellula cancerosa contemporaneamente all'ipermetilazione di geni specifici descritta sopra e risulta nell'attivazione di geni normalmente non espressi. Sebbene questo fenomeno non sia stato studiato a fondo, il ruolo causale dell'ipometilazione del DNA nella formazione dei tumori [47]. Topi incrociati in modo da avere livelli ridotti di DNA metiltrasferasi-1 mostravano ipometilazione in tutto il genoma e sviluppavano linfomi a cellule T.

3. Metodiche di analisi della metilazione globale del DNA

Negli ultimi dieci anni, il campo della ricerca sulla metilazione del DNA è cresciuto notevolmente ed è diventato uno dei settori più dinamici e in rapido sviluppo della biologia molecolare. Come risultato, molte tecnologie sono state sviluppate, ma una quantificazione accurata e riproducibile della metilazione del DNA rimane una sfida.

Attualmente, il gold standard analitico è rappresentato dal pre-trattamento del DNA genomico isolato dal campione in esame con sodio bisolfito per la conversione selettiva dei residui di citosina in uracile, mentre i residui metilcitosina restano immutati. L'aggiunta di bisolfito rende, infatti, la citosina non metilata suscettibile alla deaminazione idrolitica e in ambiente alcalino è convertita in uracile. Gli uracili così prodotti durante una PCR si replicano come timine, così da poter essere evidenziati come normali mutazioni. In realtà, anche le 5-Metilcitosine legano le timine in presenza di sodio bisolfito, ma in tempi molto più lunghi. Questa differenza di comportamento permette di discriminare all'interno della reazione di PCR le citosine dalle metil-citosine. In seguito alla conversione e al cambio di sequenza, è possibile analizzare la percentuale di metilazione attraverso sequenziamento diretto, digestione con enzimi di restrizione specifici (COBRA), MS-SnuPE, PCR con primer specifici (MSP) o Pyrosequencing. La valutazione è sia qualitativa (sequenza metilata vs non metilata) con definizione dell'epigenotipo della/e sequenza/e indagata/e, che quantitativa (% sequenze metilate vs non metilate). Possono essere caratterizzate sia la metilazione specifica a carico di uno o più geni, che la metilazione complessiva, a livello genomico. In questo caso la caratterizzazione può essere sia indiretta, valutando come surrogato il grado di metilazione di sequenze ripetitive disperse nel genoma [sequenze Alu (circa il 10% del genoma umano) e LINE-1 (lunghi elementi nucleari disseminati-famiglia 1; circa 17% del genoma umano)], che di tipo diretta tramite

microarrays genomici. Il laboratorio di analisi deve disporre di attrezzature piuttosto avanzate di biologia molecolare, con personale dedicato e adeguatamente formato.

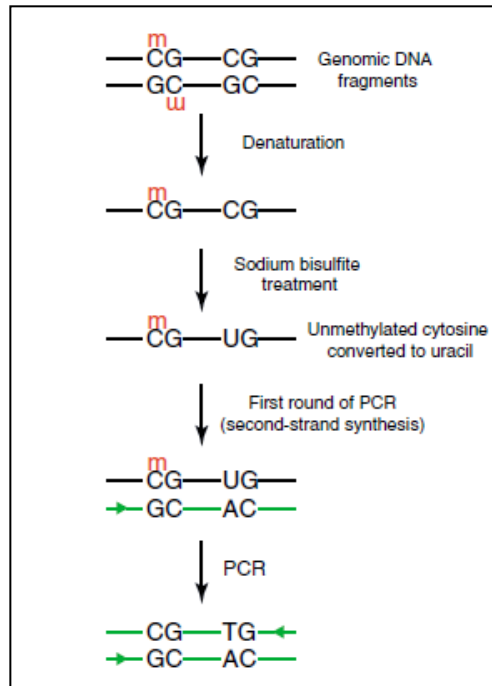


Figura 3. Trattamento con Bisolfito

Un altro approccio per la valutazione della metilazione globale del DNA è la quantificazione dell'incorporazione di gruppi metilici marcati nel DNA incubato con [³H]-metil-S-adenosilmetionina [48-51]. Lo svantaggio di questo approccio è che la quantità di DNA deve essere esattamente quantificata, essendo il risultato espresso in µg di DNA. Un secondo approccio è il saggio di estensione della citosina basato sull'uso di enzimi di restrizione metilazione-sensibili. Tale metodica si basa sull'utilizzo di endonucleasi di restrizione sensibili alla metilazione, seguita dall'analisi dei frammenti ottenuti. Solitamente, il DNA genomico è incubato con una coppia di endonucleasi (isoschizomeri) che riconoscono sequenze specifiche di DNA metilato o non metilato.

Un altro approccio è quello che prevede di idrolizzare il DNA enzimaticamente, con conseguente liberazione di nucleotidi o nucleosidi (cioè, metil-deossicitidina) [51, 54-61] o

per idrolisi acida [61-71], con conseguente formazione di basi libere (cioè, citosina, l'unica base che può essere metilata per formare 5-meticitosina). L'idrolisi acida producendo basi libere, C e mC, è sia più facile da eseguire che più rapida rispetto all'idrolisi enzimatica, in quanto quest'ultima è costituita da più fasi che coinvolgono diversi enzimi. La successiva individuazione e quantificazione dei prodotti di idrolisi del DNA è possibile con una grande varietà di tecniche. I nucleosidi possono essere analizzati mediante cromatografia su strato sottile TLC [54], elettroforesi capillare EC [55,56], thermospray, Fast Atom Bombardment (FAB) o spettrometria di massa ad impatto elettronico (EI)[61], HPLC [58], LC-ESI-MS [59,60] e la cromatografia LCESI-MS/MS [51-57].

L'utilizzo delle basi libere, tuttavia, richiede il trattamento con ribonucleasi A per produrre un campione di DNA privo di RNA. Tracce di RNA nel campione infatti oscurerebbero il contenuto di citosine metilate del DNA, perché le principali basi nel DNA sono identiche a quelle presenti nell'RNA [58]. Quando si utilizza la cromatografia, l'HPLC è preferita alla cromatografia gas-liquido (GLC) poiché tale tecnica non necessita di alcuna derivatizzazione delle basi, inoltre, l'uso di LC-ESI-MS/MS fornisce la necessaria precisione e sensibilità analitica. Tuttavia, le basi libere come citosina e 5-metilcitosina, note per essere dei composti idrofili mostrano una scarsa ritenzione su colonne cromatografiche a fase inversa. Ciò può portare ad una eluizione nel volume vuoto o co-eluizione con altri composti polari della matrice, con conseguente perdita di sensibilità dovuta agli effetti di soppressione degli ioni [74]. Questo problema può essere risolto aumentando la ritenzione delle nucleobasi libere usando un agente di accoppiamento ionico come l'acido nonafluoropentanoico (NFPA) [75-77]. Anche questa soluzione presenta alcune controindicazioni quali la scelta del pH e/o forza ionica idonee per l'eluizione, inoltre, in molti casi, la molecola eluita è contaminata dall'agente accoppiante portando ad una

scarsa separazione della molecola di interesse e ciò si riflette in un aumento dei tempi di analisi. Tutti questi svantaggi possono essere superati dall'impiego di una tecnica cromatografica chiamata HILIC la quale permette la separazione efficiente di composti polari e ionizzati, che è difficile da realizzare utilizzando la modalità RPLC. L'ordine di eluizione dei soluti polari in HILIC è l'opposto di quello che si realizza in separazioni RPLC. I meccanismi di separazione osservati in HILIC portano ad una diminuzione nei problemi di ritenzione irreversibile e di asimmetria del picco che si osservano spesso nelle separazioni di analiti polari utilizzando la modalità NPLC. Inoltre l'impiego di fasi mobili con solventi organici a bassa viscosità permette di effettuare la separazione a pressioni più basse rispetto alla RPLC consentendo al contempo separazioni con ridotti tempi di analisi.

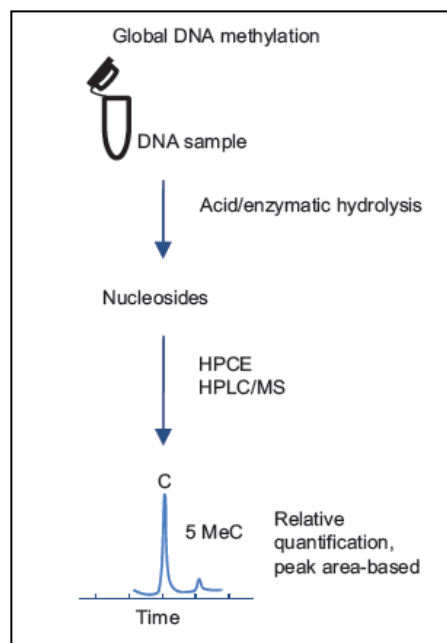


Figura 4: Idrolisi Acida/enzimatica del DNA

4. Generalità sulla cromatografia ad interazione idrofilica (HILIC)

Dagli anni '70 del secolo scorso l'introduzione della cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) come tecnica di separazione ha promosso un significativo progresso nelle scienze analitiche. Le separazioni cromatografiche in fase inversa (RP), usando fasi stazionarie idrofobiche con fasi mobili polari, hanno ampiamente incrementato l'applicazione di questa tecnica cromatografica. Oggi circa il 70% delle separazioni HPLC vengono eseguite nella modalità RP. La vasta applicabilità della cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC) è dovuta alla sua versatilità e al costante sviluppo della strumentazione per nuove fasi stazionarie. Tuttavia, le separazioni RP-HPLC usuali presentano ancora delle limitazioni. L'analisi di composti basici e altamente polari è stata problematica sin dall'inizio dell'HPLC. Alcuni componenti polari sono talmente difficili da analizzare che richiedono un'alta concentrazione di tamponi liquidi, persino sulle colonne di RP più inerti, e si presentano in picchi imperfetti. Un altro modo di separazione, in fase normale NP-HPLC, che coinvolge una fase polare stazionaria e eluenti organici, presenta separazioni a bassa efficacia con picchi cromatografici asimmetrici durante l'analisi di componenti polari. In questi ultimi anni, anche sotto la spinta dovuta alla larghissima diffusione che ormai hanno gli spettrometri di massa, si sta imponendo una variante della cromatografia liquida a fase normale [78,79] chiamata cromatografia ad interazione idrofilica o cromatografia a fase inversa-inversa o cromatografia a fase normale acquosa [80]. La cromatografia liquida ad interazione idrofila (HILIC) è un'alternativa interessante per l'analisi di sostanze polari. L'HILIC può essere definita come una modalità di separazione che combina fasi stazionarie utilizzate solitamente nel modo NP e fasi mobili usati nelle separazioni in RP. Le colonne utilizzate in questa tipologia cromatografica sono impaccate con barre di silice o di silice funzionalizzata con

vari gruppi polari quali il gruppo amminico, amidico, ciano e diolico [81,82]. Il meccanismo di ritenzione è di tipo misto e di difficile caratterizzazione. Si ritiene che la ripartizione dell'analita tra una fase mobile relativamente idrofobica [83,84] e uno strato ricco d'acqua immobilizzato sulla fase stazionaria [85], sia il principale meccanismo di ritenzione anche se, sulla base della composizione dell'eluente (pH, rapporto frazione organica/acqua ecc) e della natura dell'analita, anche altri meccanismi quali l'adsorbimento e lo scambio ionico [86] possono contribuire alla ritenzione. In queste condizioni i soluti polari sono fortemente trattenuti in colonna mentre quelli non polari non sono trattenuti ed eluiscono nel volume morto. L'ordine di eluizione è simile a quello della fase normale e i composti idrofilici sono trattenuti più a lungo rispetto a quelli non polari. Tuttavia, a causa della complessità e della molteplicità dei meccanismi di ritenzione coinvolti e per la loro simultanea azione, l'ordine di eluizione è spesso non prevedibile. Rispetto alla semplice fase normale, con l'HILIC non è necessario utilizzare solventi fortemente apolari quale, per esempio, l'esano ma sono assolutamente compatibili gli stessi solventi utilizzati per la fase inversa quali l'acetonitrile ed il metanolo. A differenza della fase inversa in cui si usano eluenti che contengono una piccola quantità di solvente organica, nell'HILIC avviene esattamente il contrario. Sono composizioni tipiche della cromatografia ad interazione idrofilica fasi mobili contenenti porzioni di fase organica sopra il 60%.

4.1. Particelle sub 2 μm

L'utile proprietà degli impaccamenti HILIC di rallentare, trattenendoli, i composti ionici, polari o idrofilici può essere ulteriormente esaltata legando la fase HILIC a particelle con un diametro inferiore ai 2 μm . L'utilizzo di questo tipo di particelle permette, infatti, di aumentare notevolmente l'efficienza della separazione cromatografica intesa, quest'ultima, come capacità del sistema cromatografico di mantenere compatta la banda

di eluizione. Fin dagli albori della cromatografia è sempre stato chiaro, infatti, che per aumentare l'efficienza di una separazione cromatografica si può intervenire sulle dimensioni delle particelle che compongono la fase fissa. Negli anni, con il progredire delle tecniche di produzione, vi è stata perciò una graduale diminuzione del diametro delle particelle. Si è passati così da resine con granulometria pari a 10 μm , negli anni '70, a granulometrie dell'ordine dei 3.5 μm , negli anni '90 [87], fino a 2.5 μm nei primi anni del 2000. L'efficienza della separazione cromatografica è cresciuta, entro certi limiti di velocità di flusso della fase mobile, di pari passo con la diminuzione del diametro delle particelle segnando tuttavia un vero e proprio salto in avanti nel 2004, grazie all'introduzione di resine con particelle di diametro pari a 1.7 μm . Con questo tipo di particelle l'efficienza della separazione, espressa come altezza equivalente del piatto teorico (HEPT), non diminuisce al crescere del flusso della fase mobile, ma rimane costante in un ampio range compreso tra 2.6 e 6 mm/s. Questo ha permesso di ottenere separazioni cromatografiche molto veloci attraverso l'utilizzo di colonne di piccole dimensioni e/o con velocità di flusso alte. Numericamente, l'efficienza ottenuta con questo tipo di particelle è cresciuta di circa 3 volte rispetto a quelle impaccate con fasi fisse con granulometrie comprese tra 3.5 e 5 μm mentre il guadagno in termini di risoluzione è aumentato di circa il 70% rispetto alle particelle da 5 μm e del 40% rispetto a quelle da 3.5 μm . La velocità di analisi si è anch'essa notevolmente ridotta attraverso una diminuzione di circa 3 volte la lunghezza delle colonne che, a parità di risoluzione rispetto a colonne impaccate con particelle da 5 μm , hanno permesso una diminuzione dei tempi di analisi di circa 9 volte. In altre parole si è passati da un tipo di cromatografia detta ad alta efficienza ad una ad ultra efficienza. Come per il passaggio dalle particelle utilizzate in cromatografia classica (>10 μm) a quelle da 10 a 2.5 μm dell'HPLC, a causa degli alti regimi di flusso della fase mobile, anche la

pressione esercitata dalla fase mobile mentre attraversa la colonna incrementa notevolmente (fino a 15000 psi) [88] per cui anche in questo caso all'evoluzione dei materiali di impaccamento è seguita anche una completa riprogettazione della strumentazione a supporto di queste colonne. Lo strumento nato da questa evoluzione è chiamato UPLC (Ultra-performance Liquid Chromatography) e si differenzia dall'HPLC principalmente per il fatto che può operare a pressioni oltre i 4000 psi che costituisce il limite superiore per l'HPLC.

5. Generalità sull'elettroforesi capillare

L'elettroforesi è una tecnica di analisi in cui specie cariche vengono separate sfruttando la loro migrazione differenziale in un campo elettrico. Il primo apparato per elettroforesi venne sviluppato da Tiselius negli anni '30 e per questo lavoro egli fu insignito del Premio Nobel nel 1948. Tiselius dimostrò la possibilità di separare le proteine del siero in zone (da qui il nome elettroforesi zonale) all'interno di un tubo di vetro riempito con una soluzione elettrolitica ad adatti valori di pH e forza ionica. Tuttavia, l'elevata diffusione delle proteine e i moti convettivi in soluzione non permettevano di osservare una risoluzione soddisfacente delle diverse componenti. Per queste ragioni, lo sviluppo dell'elettroforesi è avvenuto esclusivamente su supporti (dapprima carta o cellulosa fino ai moderni supporti a base di acetato di cellulosa, gel di agarosio e gel di poliacrilammide), dove è possibile separare soltanto macromolecole. L'elettroforesi su supporto è attualmente molto efficace per risolvere problemi separativi in ambito biochimico, mentre non è applicabile per piccole molecole. Inoltre, la rivelazione è realizzabile soltanto successivamente alla separazione. A metà degli anni '80 questa situazione è venuta a cambiare con la comparsa di apparecchiature in grado di effettuare l'elettroforesi in microscala, utilizzando colonne capillari. Questa nuova tecnica è detta elettroforesi capillare (Capillary Electrophoresis, CE). La CE si è potuta sviluppare quando sono stati disponibili capillari con ridotto diametro interno (decine o centinaia di micrometri), del tutto simili a quelli utilizzati in gascromatografia. La CE presenta elevata versatilità (comparabile con la cromatografia liquida) poiché consente la separazione di qualunque tipo di analita dalle macromolecole alle piccole molecole organiche fino a comprendere gli ioni inorganici e elevata efficienza (comparabile con la gascromatografia). La rivelazione può essere realizzata on-column durante la separazione, ricavando una

finestra ottica direttamente sul capillare. Principalmente, si utilizzano rivelatori UV-Vis, per misurare l'assorbimento della radiazione elettromagnetica, oppure sorgenti laser per misure di fluorescenza laser-indotta. Attualmente sono disponibili interfacce per l'accoppiamento della CE con spettrometri di massa dotati di sorgenti nanoelectrospray (nano-ESI), in analogia con le tecniche micro HPLC.

Sin dalle sue prime applicazioni, la CE è stata impiegata per l'analisi di farmaci, assumendo importanza gradualmente crescente nell'ambito della ricerca farmaceutica, particolarmente nell'ambito dei biofarmaci. Grazie alla sua versatilità, la CE può venir applicata ad un ampio spettro di sostanze, da ioni inorganici a biopolimeri di notevoli dimensioni quali proteine, DNA e persino particelle virali. Inoltre, in CE, servendosi dello stesso hardware strumentale è possibile eseguire separazioni basate su meccanismi chimico-fisici differenti (ad esempio il meccanismo elettroforetico e il cromatografico). Un'importante caratteristica della CE, oltre alla grande versatilità di applicazioni, riguarda l'elevata efficienza separativa (oltre un milione di piatti teorici), l'alta sensibilità (in termini di massa e, con specifiche procedure, anche di concentrazione), la richiesta di quantità di campione da caricare estremamente bassa (nL), tempi di analisi piuttosto brevi (in genere meno di 30 minuti), consumo minimo di solventi (pochi ml di buffer di corsa al giorno) e di altri consumabili (come i capillari), l'opportunità di accoppiamento con diversi sistemi di rivelazione, compresa la spettrometria di massa. Per quanto concerne quest'ultimo aspetto, proprio l'accoppiamento con la spettrometria di massa ha permesso all'elettroforesi capillare di rivestire una sempre più crescente importanza nella tossicologia analitica moderna, permettendo la non equivoca identificazione di composti in matrici biologiche complesse.

5.1. Principi separativi e strumentazione

Il termine elettroforesi indica un meccanismo di separazione molecolare basato sulla migrazione differenziale di molecole elettricamente cariche in un campo elettrico. Nell'elettroforesi capillare il potenziale è applicato appunto tra le due estremità di un capillare del diametro di poche decine di micrometri riempito di soluzione elettrolitica. Le cariche delle molecole derivano dai gruppi ionizzabili che le stesse contengono quando presenti in soluzione e che fanno di esse dei cationi (con carica positiva) o degli anioni (con carica negativa). La velocità di migrazione degli ioni in questione per effetto del campo elettrico varia in rapporto a due fattori:

- le forze di spinta generate dalla differenza di potenziale applicata;
- le forze frenanti tra ioni e mezzo circostante.

Uno ione in soluzione è quindi soggetto a due componenti:

→ una forza di spinta (F_s) ovvero $F_s = q \cdot E$

In cui:

q = carica elettrica della molecola o ione

E = campo elettrico (potenziale/distanza di applicazione)

→ una forza frenante $F_f = 6\pi\eta r \cdot v$

In cui:

$6\pi\eta r$ = legge di Stokes

r = raggio della particella

η = viscosità del mezzo

v = velocità di migrazione elettroforetica

In condizioni di equilibrio, eguagliandosi la F_s alla F_f si ha che:

$$q \cdot E = 6\pi\eta r \cdot v$$

Ricavando v (velocità di migrazione) dall'equazione si ottiene:

$$v = q \cdot E / 6\pi\eta r$$

da cui si deduce che la velocità di migrazione elettroforetica è direttamente proporzionale alla carica elettrica dello ione e al gradiente di potenziale, ma inversamente proporzionale al raggio r della molecola. Poiché, però, per in una specifica corsa elettroforetica, le molecole sono immerse nello stesso mezzo, e su di esse viene applicato lo stesso campo elettrico, alcuni dei parametri visti risultano costanti, ovvero

$$E, 6\pi\eta = K$$

si evince che la velocità di migrazione delle specie ioniche dipende dal rapporto carica/raggio:

$$v = q/R$$

Inoltre, dato che il raggio ionico di una molecola è correlato al suo peso molecolare, si dice, comunemente, che la migrazione dipende essenzialmente dal rapporto carica/massa.

5.1.1. L'apparato per elettroforesi capillare

La strumentazione base per l'elettroforesi capillare è composta da un sistema di iniezione, da un capillare di silice di lunghezza e diametro variabili ($L= 20-100$ cm, $D= 20-100$ μm), da una sorgente di potenziale elettrico (10-30 kV) e da un "rivelatore". La separazione avviene all'interno del capillare successivamente alla fase di iniezione (Fig.1). I capillari maggiormente impiegati nella pratica moderna sono in silice fusa, rivestiti esternamente da un polimero opaco in grado di conferire resistenza e flessibilità al capillare. Tale materiale va rimosso in corrispondenza della finestra di rilevazione al fine di

permettere una corretta rivelazione degli analiti. Per quanto riguarda le caratteristiche interne dei capillari, questi si possono suddividere in “uncoated” (ovvero non rivestiti) ed esporre la superficie interna di silice al buffer e ai soluti oppure in alternativa, “coated”, ovvero rivestiti internamente da un sottile strato di polimeri (adsorbiti o legati chimicamente), che proteggono la silice dalle interazioni con i soluti, cambiandone le caratteristiche superficiali. I capillari possono anche essere riempiti con gel, in modo da simulare la gel elettroforesi, o con particelle contenenti una fase stazionaria, riproducendo così un sistema cromatografico. Le tecniche di iniezione prevalentemente utilizzate in CE sono due: l'idrodinamica e l'elettrocinetica. La prima è condotta applicando una pressione positiva all'estremità di iniezione del capillare (oppure una pressione negativa all'estremità opposta) mentre l'iniezione elettrocinetica si esegue applicando una differenza di potenziale tra la vial del campione e quella dell'estremità opposta del capillare (pochi kV per pochi secondi), realizzando così una specie di mini-elettroforesi. La principale differenza tra queste due modalità di iniezione consiste nel fatto che nell'iniezione idrodinamica (pressione-guidata) ciò che viene iniettato è rappresentativo della composizione del campione, mentre nell'iniezione elettrocinetica (potenziale-guidata) le sostanze presenti nel campione entrano nel capillare in base alla loro mobilità elettroforetica. Affinché nel sistema venga mantenuta una elevata efficienza di separazione, il volume di iniezione non deve superare poche decine di nL (1-2% del volume totale), dal momento che il volume totale del capillare è minimo (dell'ordine del μL). All'interno del capillare si verifica un fenomeno cruciale al fine della separazione elettroforetica, ovvero la generazione di un flusso elettrosmotico (EOF). Esso si forma in presenza di tamponi di separazione a $\text{pH} > 2$. In tali condizioni, la parete interna (in silice fusa) del capillare espone gruppi silanolici ionizzati negativamente (SiO^-) in grado di

interagire elettrostaticamente con gli ioni positivi presenti in soluzione. I cationi, essendo attratti dalle cariche negative dei gruppi silanolicci, si concentrano all'interfaccia con la parete del capillare e al momento dell'applicazione di una differenza di potenziale, essi migrano verso il catodo (elettrodo negativo) richiamando acqua per osmosi. Tale fenomeno genera un flusso di liquido all'interno del capillare chiamato appunto flusso elettroendoosmotico (EOF). Una caratteristica di questo flusso è il suo profilo piatto (simile ad un pistone) in grado di limitare la diffusione delle bande di migrazione durante la separazione (Fig. 2). Tale flusso, in alcune speciali applicazioni, è propriamente responsabile della separazione. In conseguenza della sua natura, l'EOF è fortemente influenzato dal pH, dalla composizione del tampone e dalla forza ionica. Al fine di eliminare o di invertire l'EOF, la parete interna del capillare può essere rivestita di "agenti modificanti" che possono essere adsorbiti fisicamente alla parete stessa. I rivestimenti più comunemente usati sono in poliacrilammide, cellulosa, aminoacidi, surfattanti, polivinilacetato (PVA), ammine, composti aril-pentafluorurati, polietileneimine, poli(vinilpirrolidinone) ecc. L'elettroforesi capillare è stata accoppiata con successo a diverse modalità di rivelazione. La più comunemente impiegata con la moderna strumentazione è la rivelazione UV, la quale sfrutta la capacità dei vari composti di assorbire la radiazione luminosa. Per questo motivo, nella rivelazione "on-column", parte del rivestimento opaco viene rimossa in corrispondenza della finestra di rivelazione. Nel caso di analiti trasparenti alla radiazione luminosa, mediante l'aggiunta di un cromoforo al tampone di corsa, è possibile eseguire una rivelazione di tipo indiretto. In questo modo diventano rilevabili molti piccoli ioni inorganici, consentendo la loro determinazione in CE, anche senza un rivelatore specifico. Alla rivelazione UV si è recentemente affiancata la rivelazione con diodi array (DAD) in grado di registrare anche lo spettro di assorbimento

UV degli analiti. I limiti di sensibilità intrinseci alla CE (dovuti soprattutto alla minuscola quantità di campione iniettabile, dell'ordine dei nL) possono essere superati adottando tecniche di rivelazione più sensibili, ad esempio, la fluorescenza laser-indotta (sensibilità > 10⁻¹² M), la rivelazione elettrochimica (sensibilità >10⁻⁸ M), oppure più recentemente la spettrometria di massa. Al medesimo scopo possono essere impiegati anche metodi di pre-concentrazione del campione, come il field amplified sample stacking (FASS) che assicura miglioramenti nella sensibilità di 2-3 ordini di grandezza. In realtà, i principali avanzamenti tecnologici ottenuti di recente in CE, coinvolgono l'accoppiamento con la spettrometria di massa tradizionale (MS) e ad alta risoluzione (HRMS). Questo è stato possibile grazie soprattutto alla diffusione commerciale di interfacce robuste e affidabili principalmente elettrospray. L'elettroforesi capillare è stata così accoppiata a rivelatori di massa a trappola ionica (ITMS), a singolo e triplo quadrupolo, a settore magnetico, a trasformata di Fourier e a tempo di volo (TOF-MS).

5.1.2. Alimentatore

Costituisce una parte fondamentale della strumentazione poiché è responsabile, direttamente o indirettamente, del movimento all'interno del capillare, delle specie da separare; per assolvere a tale funzione il generatore deve essere in grado di generare campi elettrici abbastanza elevati da 200 a 1000 V/cm, voltaggi compresi tra 1 e 30 kV, correnti da 0 a 250 μ A e deve permettere lo scambio delle polarità ai capi degli elettrodi di platino immersi nei pozzetti (vials).

5.1.3. Capillare

Le sue dimensioni, per quanto riguarda il diametro interno e la lunghezza, sono variabili in un range compreso, rispettivamente, tra 25-100 μ m e 15-100 cm; il materiale di cui si compongono è generalmente la silice fusa o il teflon, anche se quest'ultimo trova scarsa

applicazione in quanto non ci sono in commercio capillari in teflon con un diametro interno ridotto.

I capillari in silice fusa invece, pur essendo molto fragili, sono molto diffusi e all'inconveniente della fragilità si ovvia rivestendo il capillare con uno strato di poliammide che viene poi rimosso, in corrispondenza del rivelatore, o con una fiamma o con acido solforico concentrato a una temperatura di 120°C; la rimozione dello strato di poliammide è necessaria per sfruttare la trasparenza agli UV della silice fusa.

Il volume dei capillari è relativamente basso per cui il volume di campione iniettabile è anch'esso basso; solitamente si iniettano volumi compresi tra 2.5 e 100 nL, vale a dire meno dell'1% del volume del capillare.

Il capillare risiede, solitamente, all'interno di una particolare cartuccia in cui circola liquido termostato, fondamentale per evitare l'innalzamento della temperatura e la conseguente degradazione di sostanze termolabili, nonché alterazioni delle condizioni analitiche di separazione.

Nella cartuccia, a una certa altezza, è presente una finestrella che permette, in senso trasversale, il passaggio della luce emessa da una opportuna sorgente; la radiazione viene quindi focalizzata ed inviata alla finestrella, a livello della quale investe il centro del capillare, preventivamente trattato in modo da rimuovere, almeno per tutta la lunghezza della finestrella, lo strato di poliammide.

Gli estremi del capillare sporgono dalla cartuccia per circa 5 cm (cartucce Beckman) e quando la cartuccia trova posto nella sua sede, all'interno dello strumento, si trovano allineati ai due elettrodi di platino, che li proteggono dalla rottura.

5.1.4. Autosampler

È stato detto che le estremità del capillare, una volta che la cartuccia che lo contiene viene collocata nella sua sede, pescano all'interno di due vials riempite di tampone; le due vials a loro volta sono sistemate all'interno dell'autosampler che, facendo riferimento ai sistemi per CE della Beckman Coulter, è costituito da due carrelli circolari e girevoli nei due sensi, nei quali sono presenti una serie di alloggiamenti ove è possibile posizionare un numero variabile di vials.

I due caroselli hanno un diametro differente: quello a diametro maggiore è detto inlet mentre quello a diametro minore è detto outlet. Per convenzione, quando nella vial alloggiata nell'inlet pesca l'elettrodo positivo (anodo) e nell'outlet l'elettrodo negativo (catodo), si parla di configurazione a polarità normale. Come è già stato detto, l'alimentatore è in grado di invertire i poli per cui quando, durante una separazione, non viene rispettata la convenzione si dice che lo strumento sta funzionando invece a polarità inversa. Indipendentemente dal tipo di polarità adottata per la separazione, il caricamento del campione avviene, generalmente, sempre all'inlet.

5.1.5. Rivelatore

Nonostante i piccoli volumi di campione iniettabili, la rivelazione in CE è comunque competitiva con altre tecniche analitiche quale, per esempio, l'HPLC, dalla quale sono stati spesso mutuati i principali sistemi di rivelazione.

Tra i metodi di rivelazione maggiormente utilizzati in CE vi è sicuramente la misura di assorbanza in UV, si hanno però anche rivelatori di fluorescenza, conducibilità elettrica, amperometrici ecc. In CE è possibile anche la rivelazione indiretta, attraverso la quale il campione viene individuato e quantificato, paradossalmente, sulla base della sua non rivelazione; in sostanza non si fa altro che utilizzare un tampone con particolari proprietà

chimico-fisiche a cui il rivelatore risponde con un segnale di fondo elevato. In queste condizioni quando la specie chimica analizzata raggiunge il rivelatore, scalza il BGE determinando un decremento del segnale, che risulta evidente attraverso la formazione di un picco negativo, cioè sotto la linea di base. La rivelazione indiretta si rende necessaria ed è particolarmente utile, quando il campione in esame non possiede nessuna caratteristica misurabile con i comuni rivelatori e quando non sia possibile neanche la sua derivatizzazione. La rivelazione indiretta è stata applicata con successo, per esempio, per la risoluzione di miscele complesse di cationi e con essa è possibile separare virtualmente qualunque tipo di sostanza.

5.2. Tecniche in CE

L'elettroforesi capillare comprende diverse tecniche che si differenziano nelle caratteristiche operative e di separazione; esse sono:

- elettroforesi capillare zonale (CZE);
- isoelettrofocalizzazione (IEF);
- elettroforesi gel capillare (CGE);
- isotacoforesi (ITP);
- cromatografia capillare elettrocinetica micellare (MECC);

5.2.1. Elettroforesi capillare zonale (CZE)

Conosciuta anche come elettroforesi capillare in soluzione libera, rappresenta la tecnica in CE più semplice e più utilizzata.

La separazione avviene all'interno di capillari con un diametro compreso tra 25-75 μm riempiti di tampone ed in assenza di supporto; dopo l'iniezione e l'applicazione del voltaggio gli analiti contenuti nel campione si dispongono, in funzione del rapporto carica/massa dell'analita, in zone discrete; in CZE è possibile lavorare sia senza sopprimere

l'EOF sia in assenza di EOF; l'effetto dell'EOF sarà più forte a pH nettamente alcalini mentre a pH bassi sarà la componente μ_j a prevalere; nel primo caso sarà possibile la separazione anche di composti neutri, senza però risoluzione giacché essi migreranno con la stessa velocità costituendo un unico picco. L'eccezionale diffusione della metodica free zone è dovuta alla sua versatilità e semplicità applicativa, che si manifesta attraverso la possibilità di modificare velocemente diversi parametri influenzanti la separazione quali il pH, l'intensità dell'EOF, la forza ionica e la temperatura.

5.2.2. Isoelettrofocalizzazione (IEF)

Viene utilizzata, solitamente, per la separazione di proteine e più in generale di sostanze anfotere; la separazione avviene all'interno di un capillare in cui è stato eliminato o è stato ridotto ai minimi termini il flusso elettroosmotico e si basa sulla migrazione indotta da un gradiente di pH, generato dalla presenza nel capillare di una miscela contenente, oltre al campione da analizzare, anche sostanze zwitterioniche dette anfolti carrier.

La procedura di caricamento del capillare prevede il riempimento dello stesso con una soluzione contenente gli anfolti carrier, la successiva iniezione del campione e quindi la reiniezione della miscela anfolitica. Dopo questa serie di passaggi si immergono le estremità del capillare nelle vials, l'anodo e il catodo, riempite rispettivamente con una soluzione di acido fosforico e di idrossido di sodio. Fatto ciò si applica un voltaggio relativamente alto e ha inizio la cosiddetta fase di focalizzazione, durante la quale le proteine migrano verso il punto di neutralità, vale a dire verso le zone del capillare in cui si realizza la condizione $pH=pI$. Terminata la fase di focalizzazione, solitamente dopo 3-5 minuti, è necessario far scorrere le zone separate verso il rivelatore. Ciò si ottiene sostituendo la soluzione catodica di NaOH con una costituita da NaOH+NaCl e applicando

nuovamente la tensione. L'aggiunta di cloruro di sodio determina l'alterazione del pH all'interno del capillare per cui le proteine si caricano nuovamente e migrano verso il catodo, passando per il rivelatore; negli strumenti più recenti, la mobilitazione può essere fatta sotto pressione.

5.2.3. Elettroforesi gel capillare (CGE)

Si tratta in pratica dell'elettroforesi classica adattata all'elettroforesi capillare; l'analisi viene svolta perciò all'interno di capillari riempiti di gel. In CZE la separazione si basa sulle differenze del rapporto carica/massa che mostrano i diversi analiti contenuti nel campione; esistono tuttavia molecole, per esempio il DNA, che non hanno nessuna differenza del rapporto, per cui per la loro separazione è necessaria l'introduzione nel sistema di un altro parametro discriminante: il setacciamento molecolare.

Ottimo setaccio molecolare è la poliacrilammide, per cui in CGE i capillari sono solitamente riempiti con tale sostanza, la quale però mostra poca stabilità sotto il campo elettrico per cui sono allo studio altri tipi di gel; per motivi legati all'effetto Joule, invece, non è possibile utilizzare l'agarosio.

La CGE viene eseguita di solito in capillari di 50-100 μm di diametro con lunghezze comprese tra 10 cm e 1 m; la preparazione del capillare è abbastanza laboriosa e prevede il degassamento delle soluzioni di riempimento per evitare che all'interno del capillare si formino bolle.

5.2.4. Isotacoforesi (ITP)

È caratterizzata dalla presenza all'interno del capillare di un sistema elettrolitico discontinuo, costituito da un "Leading Electrolyte (LE)" ad alta mobilità e da un "Terminating Electrolyte (TE)" a bassa mobilità; LE deve avere una mobilità elettroforetica superiore a qualsiasi altro ione mentre per TE è vero il discorso contrario; solitamente LE e

TE sono anioni e, in tali circostanze, il primo viene posto nelle vicinanze dell'anodo mentre si fa il contrario nel caso in cui gli elettroliti siano costituiti da cationi. Una volta realizzato il sistema elettrolitico discontinuo, il campione viene iniettato tra i due elettroliti e quindi viene applicata una corrente costante agli elettrodi. Dopo un certo periodo di tempo si verifica la completa separazione dei componenti del campione in zone, le quali contengono solo una determinata sostanza, in quanto ciascuna sostanza possiede una mobilità elettroforetica peculiare. Una volta formatesi le zone, esse migrano separate l'una dall'altra, anche se in stretto contatto, con una identica velocità.

Affinché ciò sia possibile, vale a dire che sostanze a mobilità elettroforetica diversa si muovano a velocità identica, è necessario che il campo elettrico all'interno del capillare sia discontinuo: spostandosi dal LE al TE è possibile appunto registrare un aumento del campo elettrico. Le zone pur viaggiando a diretto contatto le une con le altre, presentano proprietà fisiche completamente diverse (per esempio conducibilità elettrica, gradiente di potenziale, assorbimento della luce UV ecc), e tali differenze possono essere sfruttate per la rivelazione della sostanza che in definitiva è responsabile di tali proprietà. In isotacoforesi è necessario sopprimere il flusso elettroendosmotico, solitamente utilizzando idrossimetilcellulosa allo 0.25%. Il LE comunemente utilizzato è acido fosforico mentre il TE è la valina 100 mM portata ad un pH opportuno mediante l'aggiunta di un'ammina primaria.

5.2.5. Cromatografia capillare elettrocinetica micellare (MEKC)

È una tecnica che utilizza i principi separativi della cromatografia e anche se è stata usata per la separazione di composti carichi, trova la sua massima applicazione nella separazione di composti neutri.

La selettività della separazione è assicurata dalla diversa tendenza che hanno le

specie analizzate di ripartirsi tra una fase micellare ed il BGE; la fase micellare è costituita da aggregati di molecole, caratterizzate da una lunga coda idrofobica e da una testa idrofilica che, in soluzione acquosa, si organizzano con la catena idrofobica rivolta verso l'interno dell'aggregato e con la testa polare rivolta verso l'esterno. Le micelle si formano, dopo l'aggiunta al BGE di particolari detergenti quale l'SDS, nel momento in cui la concentrazione del detergente supera la concentrazione critica micellare (CMC). Una volta formatesi, il composto analizzato si ripartisce tra il BGE e la micella e se il coefficiente di ripartizione è diverso tra sostanza e sostanza sarà possibile la loro separazione.

5.2.6. Metodi di concentrazione on-line

L'elettroforesi capillare è una tecnica separativa molto potente per la sua elevata efficienza (comparabile con GC) e la sua versatilità. Infatti in CE è possibile separare miscele complesse, sia di macromolecole che di piccole molecole di diversa natura, utilizzando principi separativi differenti. La tecnica di rivelazione più semplice da realizzare è la rivelazione UV on-column, ricavando una finestra ottica direttamente sul capillare. Purtroppo, tale rivelazione ha una sensibilità piuttosto bassa a causa del limitato cammino ottico della radiazione (20-100 μm) e dei piccoli volumi iniettati (2-10 nI), e pertanto CE non risulta adatta per analisi al di sotto dei mg/l. Diverse tecniche sono state descritte per migliorare la sensibilità della CE per concentrazione del campione nel capillare durante o subito dopo l'iniezione del campione. Questi metodi di iniezione possono considerarsi funzionalmente equivalenti all'estrazione in fase solida (SPE) e alla fase solida per micro-estrazione (SPME) tecniche usate in HPLC. In elettroforesi capillare queste tecniche si basano su differenze di campo di forza tra la zona del campione e il tampone di corsa, e sono chiamati "metodi stacking". È stato dimostrato che quando la conducibilità della matrice in cui è disciolto il campione è superiore a quella del tampone della corsa (BGE), le

bande degli analiti all'interno del capillare tendono a slargarsi durante la migrazione. Tuttavia, può anche verificarsi il contrario. Le zone di campione vengono compresse quando la conducibilità della matrice del campione è significativamente inferiore a quella del tampone di corsa del BGE. Questo effetto di focalizzazione può essere utilizzato per aumentare la capacità di carico del sistema CE. Le tecniche di preconcentrazione in capillare possono ovviare al problema della sensibilità poichè si basano sul principio della focalizzazione del picco elettroforetico dell'analita, in modo da produrre un restringimento della zona del capillare occupata dall'analita. Questo conduce alla formazione di un picco elettroforetico a maggiore efficienza, con altezza più alta che permette di migliorare il rapporto segnale/rumore e quindi di abbassare il limite di rivelabilità. Comunemente si impiegano due tecniche per la preconcentrazione on-line che differiscono nella modalità di iniezione:

- Iniezione idrodinamica-LVSS (Large Volume Sample Stacking)

Il metodo ideato da Chien e Burgi viene eseguito sciogliendo il campione in acqua e iniettando all'interno del capillare in modo idrodinamico un volume che può superare anche il 50% del volume del capillare. Solitamente l'iniezione impiegata prevede l'applicazione di basse pressioni (0.5-1 psi) per tempi lunghi (tipicamente da 5 a 300 secondi). L'iniezione del campione viene solitamente seguita da un plug di acqua. Viene quindi applicata una polarità inversa all'estremità di rilevamento del capillare. Come risultato gli analiti migrano in direzione dell'inlet, allontanandosi dal detector, ed accumulandosi all'interfaccia tra il BGE e il plug di acqua. A questo punto la polarità viene invertita alla polarità normale, e la separazione avviene nel modo consueto.

- Iniezione elettrocinetica-FASI (Field Amplified Sample Injection)

Questa tecnica prevede un'iniezione elettrocinetica del campione per tempi che possono raggiungere anche i 10 minuti. Anche in questo caso è fondamentale che il campione venga disciolto in una matrice a bassa conduttività (acqua o miscela acqua/solvente organico). In generale, questo metodo si basa sull'idea che la migrazione elettroforetica degli ioni, che si spostano da una soluzione a bassa conduttività (acqua) verso una soluzione ad alta conduttività (BGE), rallentano drasticamente all'interfaccia tra i due accumulandosi dunque in una zona ristretta. In condizioni ideali l'amplificazione del segnale può raggiungere anche 4 ordini di grandezza.

6. Scopo della tesi

L'importanza della metilazione del DNA nel controllo dell'espressione genica ha spinto gli studiosi ad approfondire le conoscenze circa i meccanismi molecolari con cui tale modificazione epigenetica avviene. Tali studi hanno portato a scoprire come questo processo sia fondamentale per lo sviluppo di molti organismi e contribuisca allo sviluppo di alcune manifestazioni patologiche. Da qui la necessità di mettere a punto sistemi di determinazione del grado di metilazione del DNA al fine di stabilire effettive correlazioni con patologie, e quindi utilizzare tali determinazioni a scopo diagnostico e prognostico. Le metodiche attualmente a disposizione richiedono strumentazioni costose e complesse, con eccessivi tempi di analisi e quindi di produzione dei risultati.

Scopo della presente tesi è stato quello di mettere a punto una metodica per la misurazione del grado di metilazione globale del DNA a partire da campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina attraverso tecniche separative quali UPLC ed elettroforesi capillare zonale che fossero in grado di fornire dei risultati in breve tempo, ma che allo stesso tempo si rivelassero anche economiche, riproducibili e di facile utilizzo.

7. Materiali e Metodi

7.1. Reagenti

La citidina, la 5-metilcitidina, il tris-(idrossimetil)-amminometano (Tris), l'acido fosforico (H_3PO_4), l'acido cloridrico (HCl), l'acido formico (HCOOH), il tampone fosfato salino (PBS), il cloruro di sodio (NaCl), il cloruro di potassio (KCl), l'acetato di sodio (CH_3COONa), l'acetato d'ammonio (CH_3COONH_4), l'acetonitrile (C_2H_3N) e il DNA estratto da timo di vitello, sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich, (Milano, Italia). I nucleosidi sono stati preparati a partire da una soluzione madre 1 mM in acqua Milli-Q (Millipore, Milford, MA, USA) e conservati a $-80^\circ C$ fino al momento dell'uso. Le membrane filtranti da $0,22 \mu m$ sono stati acquistati dalla ditta Millipore.

7.2. Estrazione del DNA

7.2.1. Estrazione del DNA da sangue intero

L'estrazione del DNA genomico da sangue intero è stata eseguita utilizzando il kit "QIAamp DNA Blood Mini Kit" (Qiagen, Paesi Bassi) in base al protocollo fornito dal produttore. Dopo l'estrazione il DNA è stato quantificato mediante misura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 260 nm e attraverso il rapporto tra densità ottiche misurate a 260 e 280 è stato valutato il grado di purezza. Un rapporto di densità ottica 260/280 compreso tra 1.7 e 1.9 è stato considerato indicativo di purezza accettabile. Il DNA purificato è stato conservato nel buffer di eluizione del kit (Buffer AE) a $-20^\circ C$ fino alla successiva fase di idrolisi.

7.2.2. Estrazione del DNA da tessuti paraffinati FFPE

Il DNA genomico è stato ottenuto a partire da blocchi di tessuto di tumore colon-rettile e linfoma. Da ciascun blocco sono state ottenute dieci sezioni consecutive, dello

spessore di 5-10 μm . Da queste è stato estratto il DNA genomico attraverso l'utilizzo del kit "QIAamp[®]DNA FFPE Tissue" (QIAGEN, Paesi Bassi) secondo le istruzioni del produttore. In particolare, il kit utilizza RNasi A che consente di ottenere DNA privo di RNA. Pertanto, in seguito all'idrolisi acida del campione, la citosina liberata proviene dal solo DNA. Successivamente il DNA così ottenuto è stato ulteriormente purificato utilizzando una soluzione 3 M di acetato di sodio a pH 5.5 e precipitato con etanolo al 100%_{v/v}. Il DNA (3 μg) è stato mescolato con acetato di sodio, in modo che la concentrazione finale del sale fosse 0,3 M, e con 2 volumi di etanolo freddo al 100%. I campioni sono stati conservati a -20°C per una notte, poi centrifugati per 1 ora a 14.000 rpm a 4°C. Il supernatante è stato scartato e il pellet lavato con etanolo freddo al 70%_{v/v}. Dopo centrifugazione, il supernatante è stato eliminato, il pellet essiccato e disciolto in 11 μl di acqua priva di nucleasi. La concentrazione del DNA è stata valutata tramite lettura allo spettrofotometro (GeneQuantpro, Amersham, Pharmacia Biotech, Svezia) alla lunghezza d'onda di 260 nm.

7.3. *Idrolisi acida del DNA*

L'idrolisi acida è stata ottenuta disciogliendo il DNA (0,5-1 μg) con acido formico (volume finale 100 μl , concentrazione finale 90%p/p) ed incubato a 130°C per 80 min. Dopo l'idrolisi, i campioni sono stati essiccati alla temperatura di 60°C sotto vuoto e il residuo secco, contenente le basi libere, è stato disciolto in 100 μl di acetonitrile/acqua (50:50). Infine, le nucleobasi libere sono state conservate a -20°C o analizzate immediatamente. La percentuale di metilcitosina veniva calcolata dal rapporto tra la concentrazione della metilcitosina sul totale delle citosine (cit+5mCit).

7.4. Apparato e condizioni cromatografiche

Gli esperimenti sono stati eseguiti su un sistema per cromatografia liquida ad ultra efficienza Waters Acquity equipaggiato con detector UV/Vis Waters PDA eλ connesso al software di gestione Waters MassLynx v4.1. La separazione è stata ottenuta utilizzando una colonna Waters Ethylene Bridged Hybrid per cromatografia a interazione idrofilia (BEH-HILIC) della lunghezza di 100 mm e di diametro interno pari a 2.1 mm impaccata con particelle da 1.7 μm. La fase mobile era costituita da una miscela di acetonitrile e acetato d'ammonio 10 mM in rapporto di 97/3. Prima dell'utilizzo la fase mobile è stata filtrata con dei filtri da 0.22 μm al fine di rimuovere eventuali materiali in sospensione. L'eluente era pompato isocraticamente alla velocità di 0.8 ml min⁻¹ a temperatura ambiente. I campioni erano tenuti a temperatura ambiente nell'autocampionatore e la quantità di campione iniettato in colonna era pari a 1 μl. Citosina e metilcitosina erano monitorate mediante detector UV/Vis a 277 nm.

7.5. Apparato e condizioni elettroforetiche

7.5.1. CE Reverse-Injection

L'analisi in elettroforesi capillare è stata eseguita utilizzando un sistema PACE MDQ equipaggiato con un rivelatore a serie di diodi (Beckman Coulter, Milano, Italia), utilizzando un capillare "uncoated" in silice fusa con diametro interno di 50 μm ed una lunghezza totale di 60.2 cm, corrispondente ad una finestra di rilevazione di 50 o 10.2 centimetri, qualora la modalità di iniezione sia normale o inversa (short-end). Il rivelatore UV è stato impostato a 280 nm e la separazione è stata effettuata con una iniezione di 10 s del campione a 3,45 kPa a 25°C ed applicando un voltaggio di 30 kV (120 A). La separazione è stata effettuata a 25°C utilizzando come tampone della corsa una soluzione di Tris 100 mM portato a pH 3.75 con acido fosforico 1 M. Dopo ogni corsa, il

capillare è stato lavato per 1 minuto con una soluzione 0.1 mM di HCl ed equilibrato con il tampone della corsa per 1 minuto. Il monitoring delle corse veniva effettuato a 280 nm.

7.5.2. FASI-CE

L'analisi è stata eseguita utilizzando il sistema per elettroforesi capillare PACE MDQ equipaggiato con un rivelatore "diode-array" (Beckman Coulter, Milano, Italia), utilizzando un capillare "uncoated" in silice fusa con un diametro interno di 75 µm e una lunghezza totale di 40 cm (30 cm alla finestra di rilevazione), l'iniezione di un plug d'acqua di 2 mm (0.2 psi per 4 s), seguito da un iniezione elettrocinetica di 10 kV per 200 s. Il rivelatore UV è stato impostato a 280 nm e la separazione è stata effettuata a 25°C utilizzando come tampone della corsa una soluzione di Tris 300 mM portato a pH 3,75 con acido fosforico 1 M, e 12 kV con polarità normale. Dopo ogni corsa, il capillare è stato lavato per 1 minuto con una soluzione 0.1 mM di HCl ed equilibrato con il tampone di corsa per 1 minuto.

7.6. Selezione degli individui

7.6.1. Soggetti affetti da degenerazione maculare senile

Sono stati reclutati 39 pazienti affetti da degenerazione maculare (DMLE o AMD) precoce, 31 pazienti affetti da AMD neovascolare (WET AMD), e 140 soggetti di controllo, suddivisi per età e sesso, non affetti da AMD. La proporzione caso-controllo è stata 1:2. Tutti i pazienti con DMLE sono stati sottoposti a una completa valutazione oftalmologica, comprendente la misurazione della massima acuità visiva con correzione, l'osservazione alla lampada a fessura, la tonometria ad appianazione, la biomicroscopia del fundus, l'angiografia con fluoresceina e la tomografia a coerenza ottica. Sono state considerate le condizioni mediche generali: ipertensione arteriosa, diabete mellito, ipercolesterolemia,

funzionalità renale, stato cardio e cerebrovascolare (presenza di angina, infarto del miocardio, attacchi ischemici transitori, insufficienza renale), assunzione di cardioaspirina. Il criterio di esclusione per i casi è stato unicamente la concomitanza di altre patologie retiniche (retinopatia diabetica, ipertensiva, emorragica, miopica, esiti di OVR, ecc). Per ogni caso sono stati arruolati due controlli, selezionati per età e sesso, dal registro delle cataratte. Unico criterio di esclusione per i controlli è stato la presenza di patologie retiniche di qualsiasi grado o entità (DMLE, retinopatia diabetica, ipertensiva, esiti di OVR, miopia degenerativa, ecc). Tutti i controlli sono stati sottoposti a una completa valutazione oftalmologica, comprendente la misurazione della massima acuità visiva.

7.6.2. Soggetti colpiti da infarto acuto del miocardio

I pazienti con diagnosi confermata di sindrome coronarica acuta, ricoverati in ospedale entro le prime 12 ore dopo l'insorgenza dei sintomi, sono stati dichiarati eleggibili per la partecipazione allo studio. I criteri di inclusione sono stati un tipico dolore al petto e/o sintomi equivalenti associati a alterazioni elettrocardiografiche (innalzamento del tratto ST e/o di nuova insorgenza di blocco di branca sinistra, depressione del segmento ST, inversione dell'onda T) e/o elevazione degli enzimi cardiaci (principalmente, troponina I). I criteri di esclusione sono stati qualsiasi altra malattia acuta, shock cardiogeno al momento del ricovero, presenza di patologie tumorali, danni al fegato, definita come aumento di alanina aminotransferasi 1.5 volte al di sopra del limite superiore del range di riferimento, disfunzione tiroidea, e insufficienza renale cronica, con un tasso di filtrazione glomerulare inferiore a 60 ml/min. I soggetti di controllo sono stati reclutati simultaneamente durante il periodo di reclutamento dei pazienti. I criteri di esclusione per i soggetti del gruppo controllo sono stati presenza di patologie quali diabete, ipertensione sistemica, malattie cardiovascolari o cerebrovascolari, insufficienza

renale, discrasie ematiche, tumori, disturbi vascolari retinici, età inferiore ai 18 anni, assunzione di farmaci con vitamina B6, B12 o acido folico.

7.6.3. Soggetti sotto trattamento con farmaci anticoncezionali

Un totale di 162 donne adulte sane, 77 sottoposte a terapia contraccettiva orale (OC), indicate con la sigla FOC, ed 85 non sottoposte ad uso di contraccettivi orali (OC), indicate con la sigla FS, con cicli mestruali regolari di 28 giorni e con un'età compresa tra 18 e 39 anni (età media 27 anni), sono state arruolate nel periodo dal luglio 2007 al novembre 2010 presso il Servizio di Diagnosi e Cura di Endocrinologia, Azienda Ospedaliero -Universitaria di Sassari. Le donne non erano affette da patologie a carico del sistema renale, epatico, cardiaco e da malattie di tipo endocrino e infettive, inoltre per almeno 2 mesi prima dell'inizio dello studio non hanno utilizzato trattamenti farmaceutici per patologie croniche fatta eccezione per l'assunzione di contraccettivi orali. Le pazienti FOC sono state ulteriormente divise in due sottogruppi in funzione della proprietà androgenica (UFAC⁺) o non-androgenica (FOCA⁻) dei progestinici assunti.

7.6.4. Soggetti fumatori e non

Un totale di 83 uomini adulti sani e 85 donne adulte sane aventi cicli mestruali regolari (28 giorni), di età compresa tra 18 e 40 anni sono stati arruolati nel periodo dal luglio 2007 al novembre 2010 presso il Servizio di Diagnosi e Cura di Endocrinologia, dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Sassari, e il servizio di Diabetologia dell'Ospedale San Giovanni di Dio dell'ASL 2 di Olbia. I soggetti non erano affetti da patologie a carico del sistema renale, epatico, cardiaco e da malattie di tipo endocrino e infettive. Nessuno dei soggetti assumeva farmaci a lungo termine, tra cui terapia contraccettiva orale (OC) per le donne. Tutte le donne sono state analizzate durante la fase follicolare (1-10 giorni) e non assumevano OC da almeno tre mesi al fine di garantire un periodo di wash-out

appropriato. Un fumatore regolare è stato definito come un soggetto che ha fumato almeno una sigaretta al giorno.

8. Risultati e discussione

8.1. Fase Preanalitica

8.1.1. Ottimizzazione dell'idrolisi acida del DNA

Poiché in letteratura l'idrolisi del DNA in acido formico è stata descritta in diverse condizioni di tempo e temperatura, si è pensato di standardizzare queste variabili monitorando l'idrolisi di standard costituiti da dCMP e dmCMP a differenti temperature (tra 90 e 130°C) per 2 ore. Le Figure 6 e 7 mostrano la liberazione delle basi, rispettivamente citosina e metilcitosina (pannello A) e la scomparsa dei corrispettivi dNMP (pannello B) durante la reazione monitorata in elettroforesi capillare. Come evidenziano i grafici i dNMP scompaiono completamente solo a 130°C in circa 80 minuti. Sono state quindi adottate queste condizioni per il trattamento del DNA durante gli esperimenti successivi.

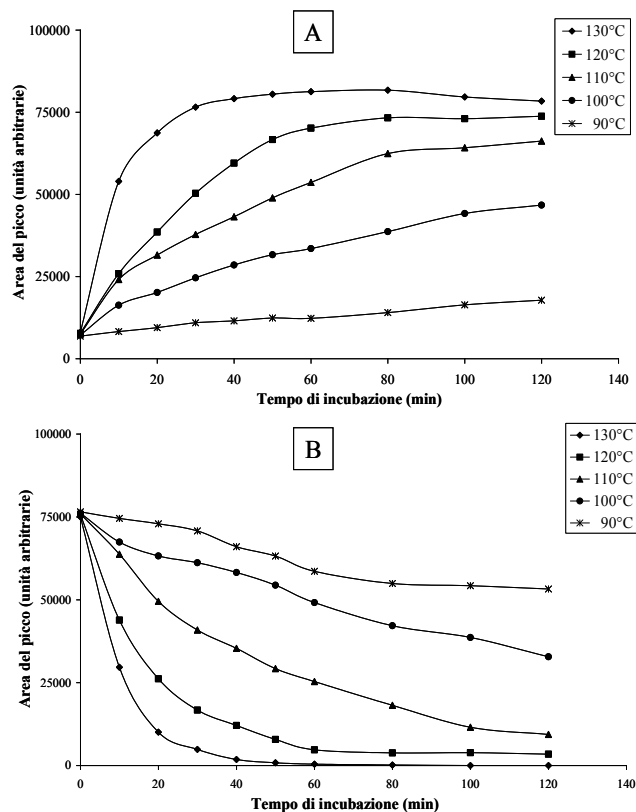


Figura 6. Liberazione della citosina (A) e scomparsa del rispettivo dNMP (B) a seguito dell'incubazione della desossicitosina in acido formico (90%). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato ed il CV dei dati ottenuti era inferiore al 6%.

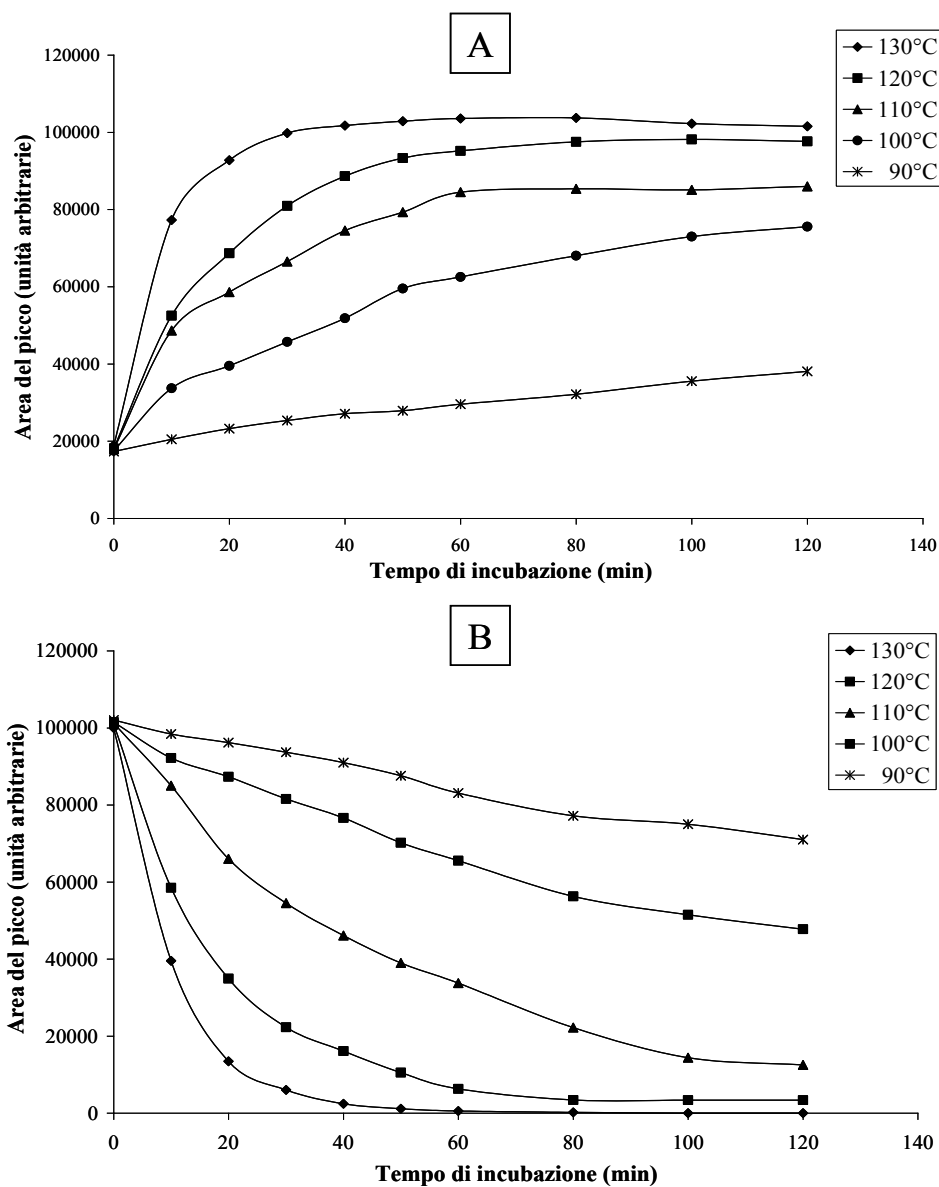


Figura 7. Liberazione della metilcitosina (A) e scomparsa del rispettivo dNMP (B) a seguito dell'incubazione della desossimetilcitosina in acido formico (90%). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato ed il CV dei dati ottenuti era inferiore al 6%.

8.2. Sviluppo della metodica HILIC-UPLC

Per la messa a punto di questa metodica sono state usate miscele di acetonitrile e acqua in diverse proporzioni, contenenti acetato d'ammonio come modificatore a concentrazione compresa tra 1 e 10 mmol per litro. Come mostrato nelle figure 8 e 9, rispettivamente un cromatogramma.

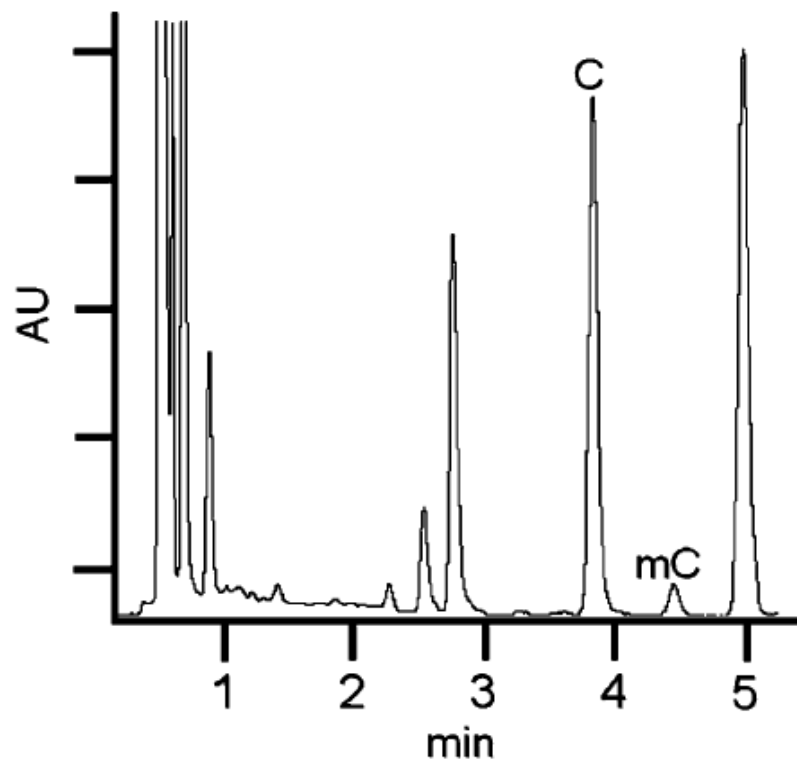


Figura 8. Analisi dei prodotti di idrolisi di 10 µg di DNA da timo bovino

ottenuto dall'analisi dei prodotti di idrolisi di 10 µg di DNA standard estratto da timo bovino e di una soluzione standard di citosina 500 µM e metilcitosina 25 µM, le basi azotate possono essere facilmente separate in circa 5.5 minuti utilizzando una miscela acetonitrile/acetato d'ammonio 10 mM in rapporto di 97/3.

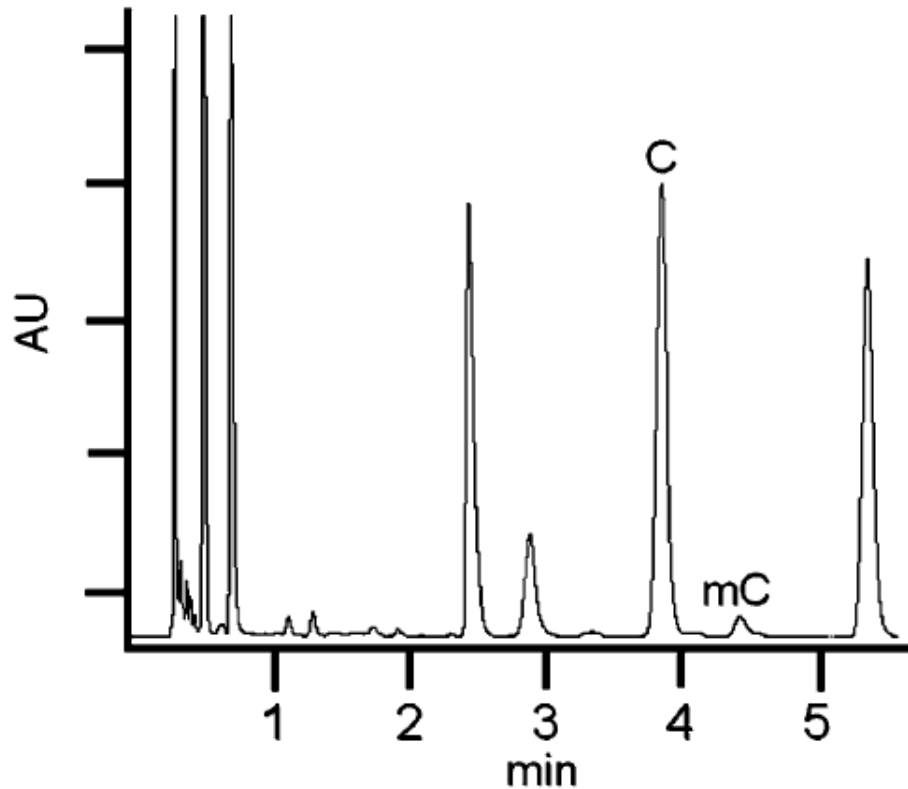


Figura 9. Cromatogramma di una soluzione standard contenente citosina e metilcitosina alla concentrazione, rispettivamente, di 500 e 25 μmol .

In particolare la citosina è risolta dalla metilcitosina e dalle altre basi in 3.8 minuti mentre la metilcitosina in 4.4 minuti. Una ulteriore diminuzione dei tempi di analisi può essere ottenuta portando la percentuale d'acqua al 5%. Tuttavia, come mostrato in figura 10, a una riduzione dei tempi di analisi corrisponde anche una drammatica perdita di risoluzione. Nessun miglioramento nella risoluzione è stato possibile osservare neanche mediante la variazione della concentrazione dell'acetato d'ammonio.

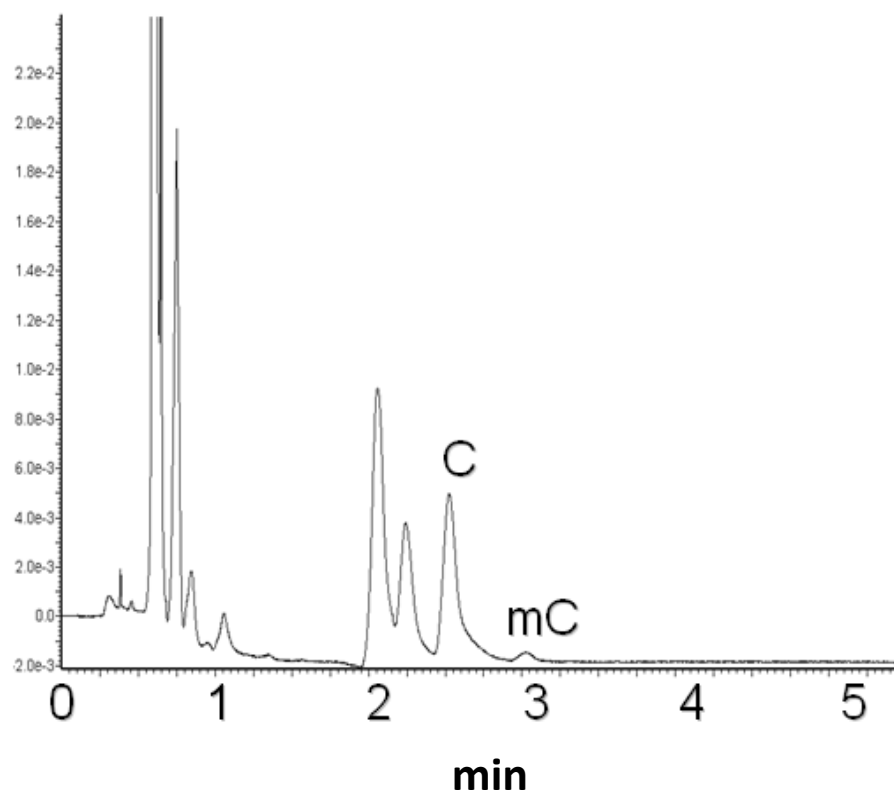


Figura 10. Cromatogramma ottenuto analizzando i prodotti di idrolisi di 10 µg di DNA da timo bovino utilizzando come fase mobile una miscela acetonitrile/acetato d'ammonio 10 mM 95:5

La linearità del metodo è stata valutata analizzando in triplo sei concentrazioni comprese tra 30 e 960 µmol/l per la citosina e tra 2 e 64 µmol/l per la metilcitosina. Le curve di calibrazione costruite plottando le aree dei picchi contro la concentrazione erano lineari ($R^2 > 0.999$) entro il range di concentrazioni testate. La precisione del metodo è stata valutata analizzando i prodotti di idrolisi derivanti da due soluzioni di DNA standard di timo bovino di concentrazione pari a 100 e 1000 µg/ml. Le analisi erano eseguite in triplo nell'arco di una giornata e per tre giorni consecutivi. La variabilità intra- ed inter-saggio, espressa come deviazione standard relativa, era inferiore al 4%. L'accuratezza della misurazione era compresa tra il 99.5 e il 101.3% ed era valutata calcolando il recupero percentuale tra la concentrazione trovata nel secondo e terzo giorno di validazione contro quella misurata durante il primo giorno. Il

limite di sensibilità (LOD) e di quantificazione (LOQ), determinati considerando un rapporto segnale-rumore pari a 3 e 10, erano rispettivamente 0.52 μM (0.52 fmol in colonna) e 1.72 μM (1.72 fmol in colonna). La più bassa quantità di DNA richiesta per la valutazione del grado di metilazione, misurata attraverso diluizioni scalari di DNA standard ottenuto da timo bovino, era 10 μg . Il grado di metilazione del DNA estratto da timo bovino era pari a 6.25% e tale valore era comparabile ai valori riportati da altri autori. Il grado di metilazione medio misurato in 24 individui apparentemente sani era intorno al 3.88%, mediamente questi valori erano sovrapponibili ai valori ottenuti da altri autori [89]. A causa dell'alto contenuto di solvente organico nella fase mobile, quando si esegue un'analisi cromatografica ad interazione idrofilica, la contropressione generata è relativamente bassa. Questo interessante aspetto dell'HILIC può fornire il modo per poter utilizzare le colonne tipiche per UPLC (con particelle sotto 2 μm) anche su convenzionali sistemi per HPLC. Studi preliminari confermano questa possibilità, e un cromatogramma ottenuto mediante HPLC, analizzando i prodotti di idrolisi di 10 μg di DNA ottenuto da timo bovino utilizzando la stessa fase mobile e colonna utilizzata per l'analisi con l'UPLC, è mostrato nella seguente figura 11.

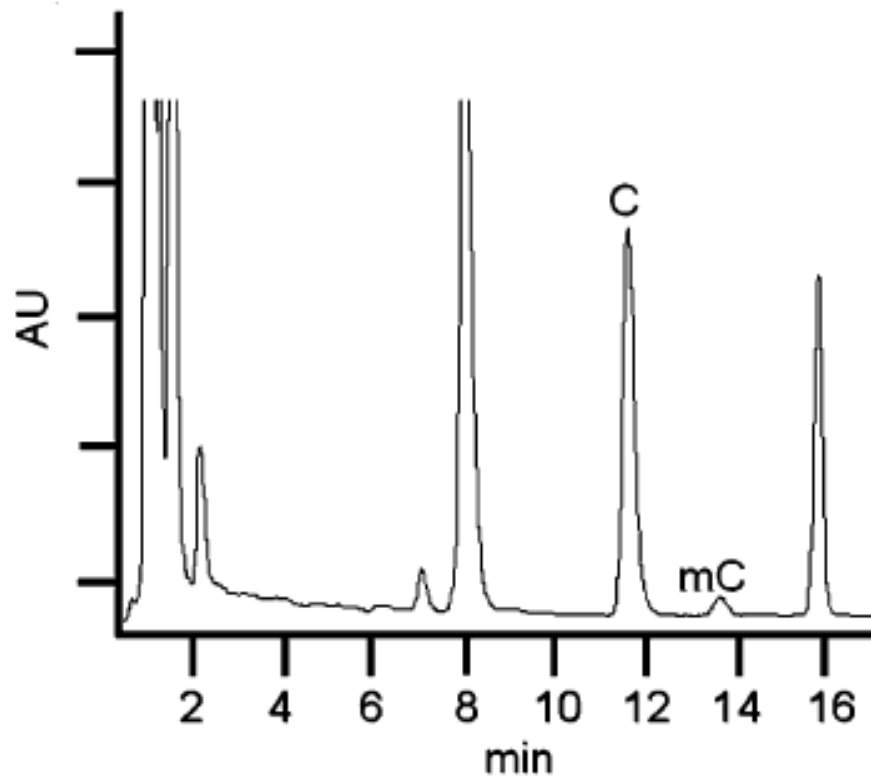


Figura 11. Cromatogramma ottenuto in un sistema per HPLC utilizzando una colonna per UPLC

Ovviamente, per evitare che la pressione aumenti eccessivamente, per l'analisi in HPLC il flusso è stato ridotto da 0.8 ml min^{-1} a $0.250 \text{ ml min}^{-1}$.

8.3. Sviluppo della metodica CZE Reverse-Injection

8.3.1. Ottimizzazione del tampone di corsa

È stato dimostrato che l'uso del Tris fosfato come tampone di corsa permette una buona efficienza dei picchi e una buona separazione di analiti basici a basso peso molecolare quando la corsa viene effettuata in condizioni acide e in modalità di iniezione normale [90,91]. Perciò abbiamo tentato di sviluppare una nuova metodica in CE per separare la citosina e la metilcitosina, utilizzando un buffer di corsa acido, il Tris fosfato, mediante l'impiego della configurazione ad iniezione inversa. A pH bassi (<4) citosina e metilcitosina sono cariche positivamente e mostrano mobilità elettroforetica più alta rispetto a composti acidi quando si utilizza una configurazione della CE in polarità normale (con l'anodo posizionato alla fine del capillare). In queste condizioni però, anche le altre basi del DNA hanno un'elevata mobilità elettroforetica. In particolare, le analisi preliminari dimostrano che l'adenina migra vicino alla citosina, il che suggerisce che per gli esperimenti di ottimizzazione delle condizioni elettroforetiche è necessario adoperare un mix di citosina, metilcitosina e adenina. Gli esperimenti preliminari sono stati effettuati usando un capillare completo della lunghezza di 60 cm e una temperatura di cartuccia del capillare di 15°C. Per studiare l'influenza che il pH e la concentrazione del buffer di corsa hanno sulla risoluzione, sull'area, sul tempo di migrazione e sull'efficienza dei picchi in analisi, lo stesso mix standard viene iniettato variando sia la concentrazione del buffer di corsa, il Tris fosfato (75, 100, 125 e 150 mmol/L), sia i valori di pH (da 2,5 a 4 unità di pH). Come mostra la Figura 12A il pH del buffer è un parametro cruciale per perfezionare la risoluzione dei picchi. In particolare attraverso l'incremento dei valori di pH del buffer di corsa, la risoluzione tra i picchi di citosina e metilcitosina aumenta, mentre quella tra metilcitosina e adenina decresce. Un buon compromesso si raggiunge a valori di pH

compresi tra 3.5 e 4. Inoltre, incrementando la concentrazione del buffer di corsa si ha un aumento della risoluzione ma anche dei tempi analitici (Figura 12B).

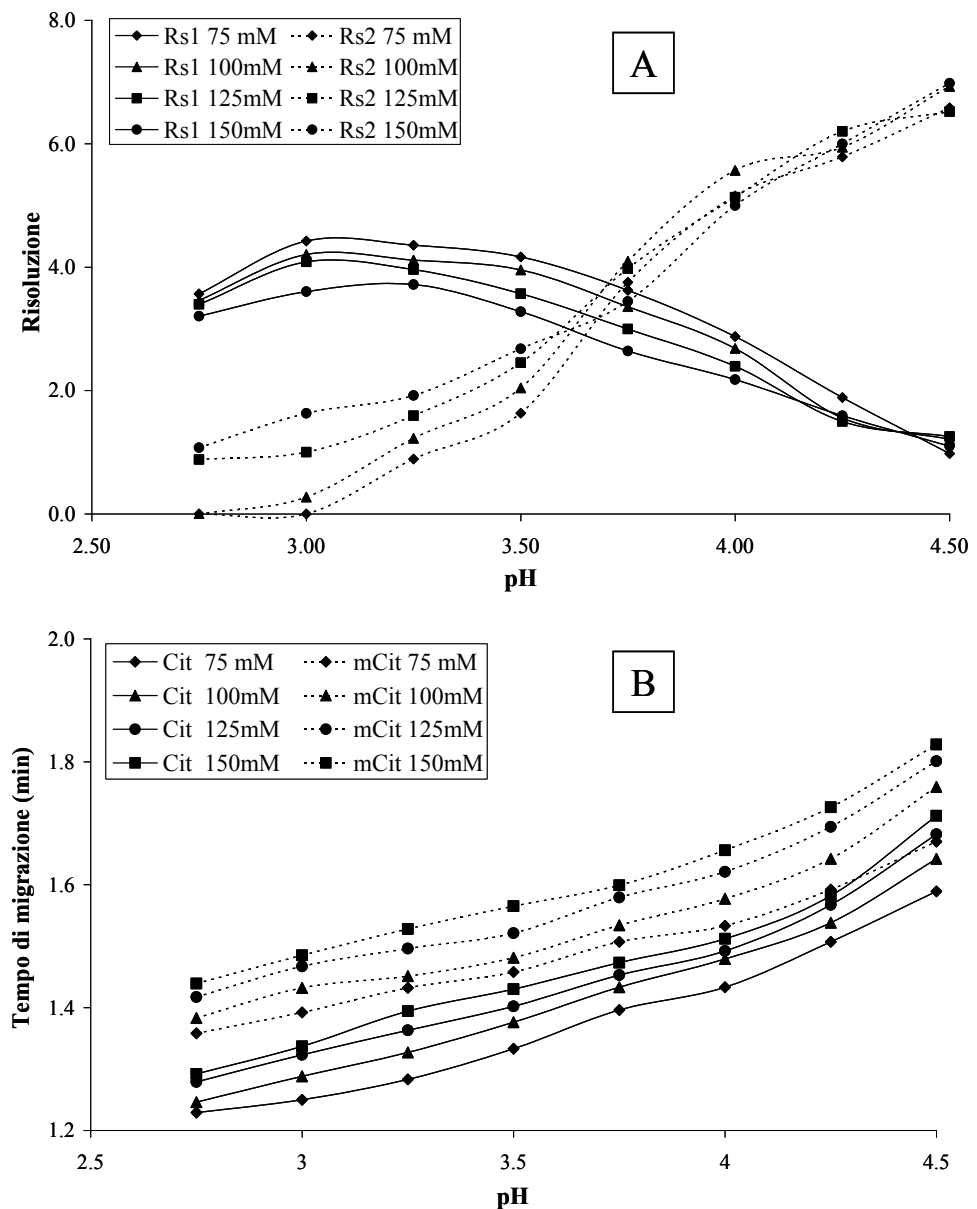


Figura 12. Variazione della risoluzione (A) e del tempo di migrazione (B) al variare del pH e della concentrazione del buffer di corsa. Rs1=risoluzione tra citosina e metilcitosina; Rs2=risoluzione tra metilcitosina e adenina. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato ed il CV dei dati ottenuti era inferiore al 7%.

Un'elevata efficienza si raggiunge a valori di pH che si aggirano tra 3.5 e 4 (Figura 13A e 13B) e in particolare l'efficienza del picco della 5-metilcitosina mostra valori ottimali usando Tris 100 mmol/L (figura 13B).

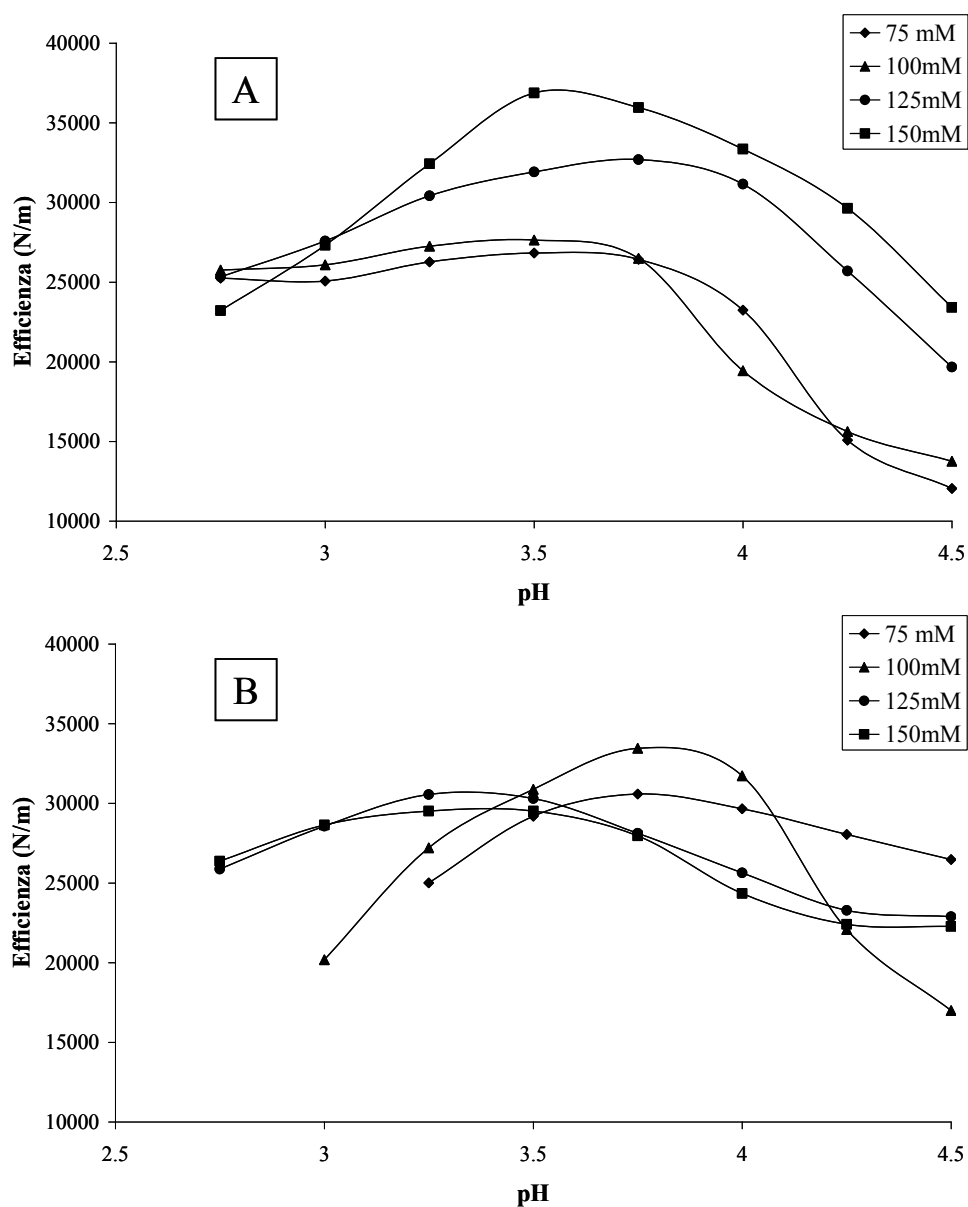


Figura 13: Variazione dell'efficienza al variare del pH e della concentrazione del buffer di corsa. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato ed il CV dei dati ottenuti era inferiore al 6%.

L'altezza del picco della 5-metilcitosina mostra piccole variazioni in relazione al pH e alla concentrazione del buffer di corsa, mentre per la citosina si ottengono valori molto elevati intorno a pH 3.5 (Figura 14).

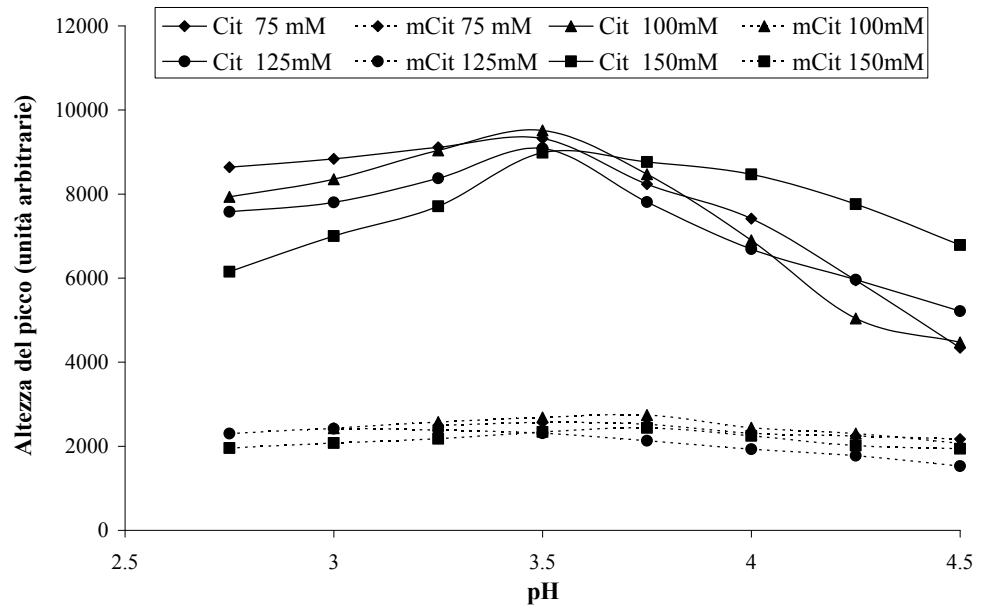


Figura 14. Variazione dell'altezza del picco al variare del pH e della concentrazione del buffer di corsa. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato ed il CV dei dati ottenuti era inferiore al 6%.

L'effetto della composizione del buffer di corsa sui valori di amperaggio riportato in Figura 15, mostra come questo diminuisce all'aumentare del pH o al decrescere della concentrazione del buffer di corsa. Così il Tris 100 mmol/L a pH 3.75 è stato selezionato come buffer elettrolitico di corsa per la quantificazione degli analiti in quanto permette di ottenere una buona risoluzione ($R_{s1}=3.4$ e $R_{s2}=4.1$) e una buona efficienza (Cit=26500 N/m e mCit=32700 N/m), tempi di migrazione rapidi (Cit=1.43 min e mCit=1.53 min) con accettabili valori di amperaggio (95 μ A).

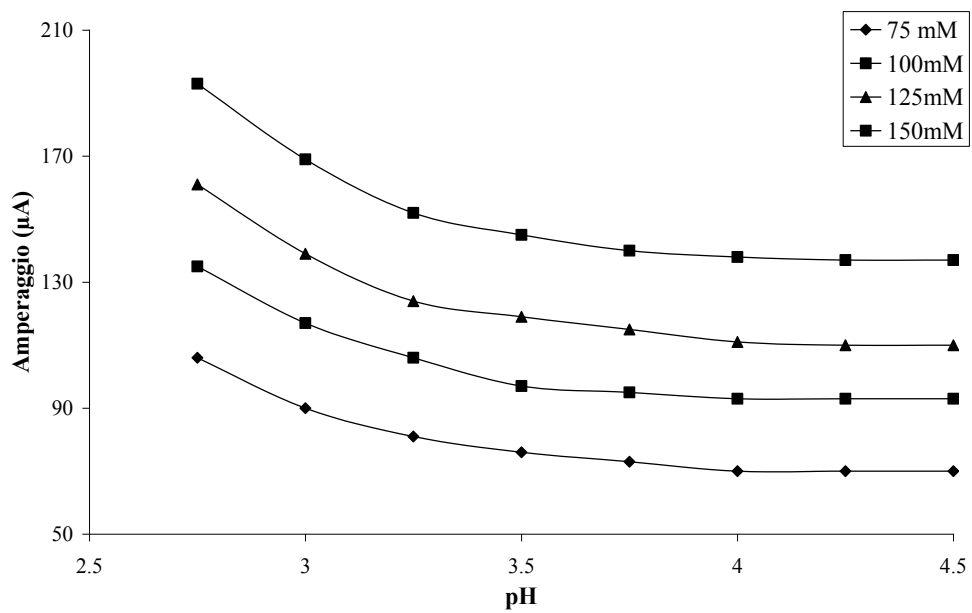


Figura 15. Variazione dell'amperaggio al variare del pH e della concentrazione del buffer di corsa. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato ed il CV dei dati ottenuti era inferiore al 4%.

8.3.2. Ottimizzazione della temperatura della cartuccia

Gli effetti della temperatura della cartuccia sui parametri elettroforetici sono stati valutati in un range di temperature compreso tra 15 e 40°C con incrementi di 5°C. Come ci si aspettava, con l'aumentare della temperatura, aumenta l'ampereggio e i tempi di migrazione si riducono (Figura 16A). Questo è principalmente dovuto alla viscosità del buffer di corsa che, a sua volta, è in relazione alla temperatura. Anche se l'aumento delle temperature permette di avere tempi brevi d'analisi, è stata osservata un calo nella risoluzione tra citosina e 5-metilcitosina, e per temperature oltre i 30°C tra 5-metilcitosina e adenina (Figura 16B).

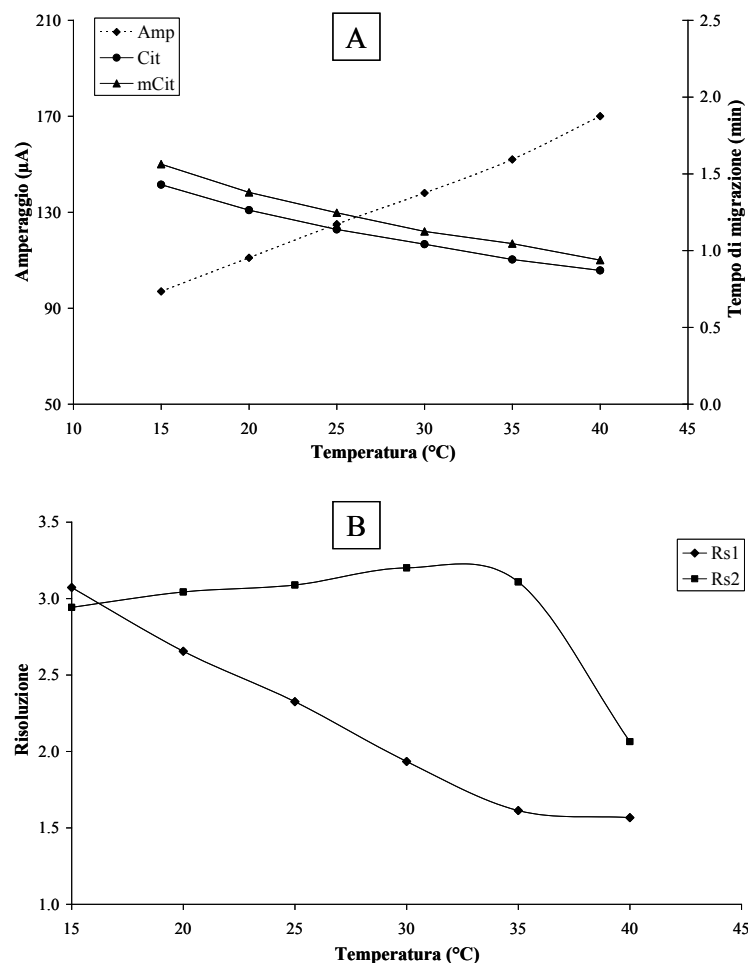


Figura 16. Variazione dell'ampereggio (A) e della risoluzione (B) al variare della temperatura. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato ed il CV dei dati ottenuti era inferiore al 5%.

Inoltre aumentando la temperatura della cartuccia si osserva una riduzione dell'efficienza (Figura 17A) mentre la sensibilità (altezza del picco) subisce un leggero aumento sia per la citosina che per le 5-metilcitosina (Figura 17B). Infine è stata selezionata la temperatura di 25°C in quanto permetteva tempi di migrazione più brevi e migliori livelli di risoluzione con valori di amperaggio accettabili.

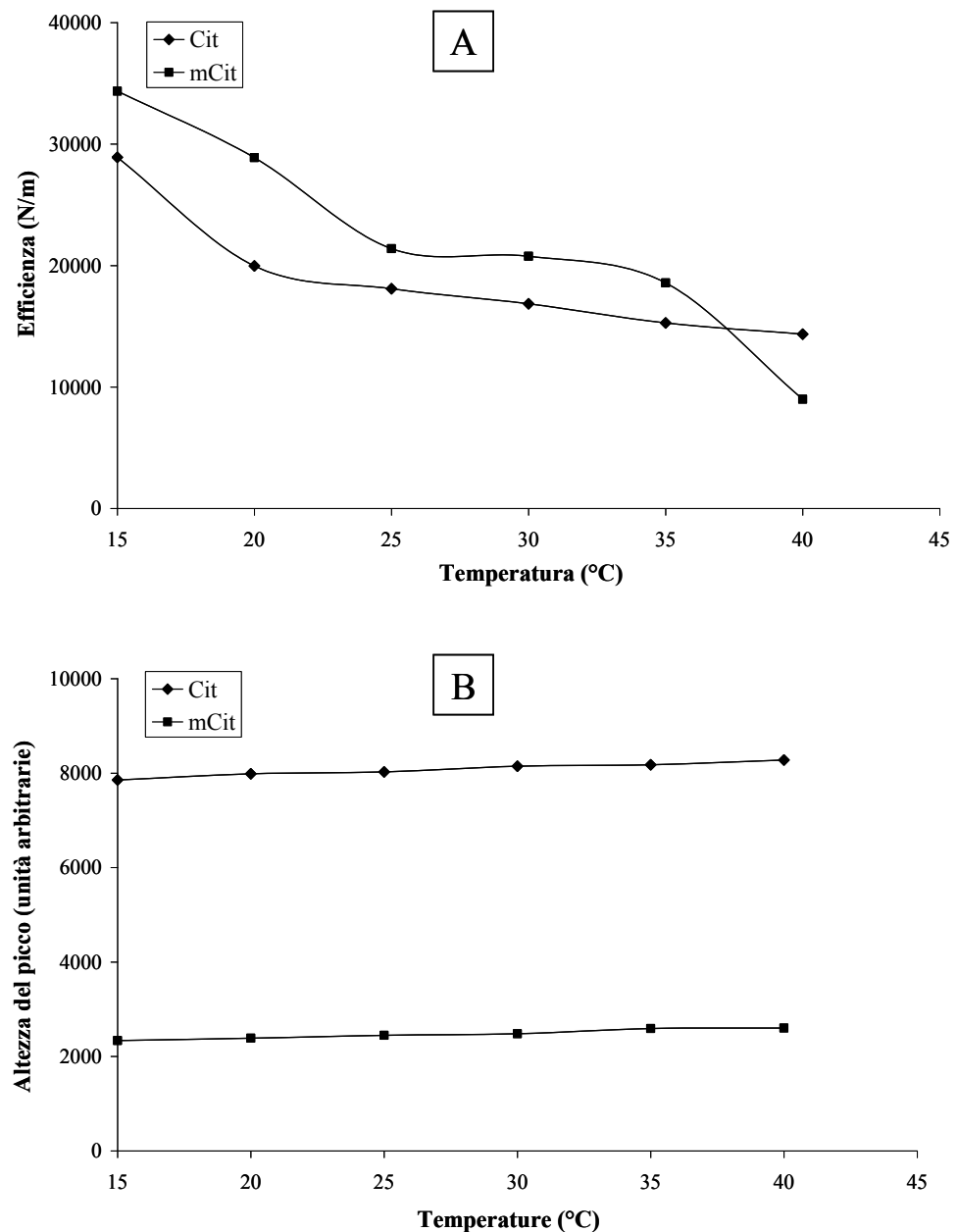


Figura 17. Variazione dell'efficienza (A) e dell'altezza del picco (B) al variare della temperatura. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato ed il CV dei dati ottenuti era inferiore al 6%.

8.3.3. Ottimizzazione della lunghezza d'onda

Per stabilire la lunghezza d'onda da utilizzare per la determinazione di citosina e 5-metilcitosina, è stato eseguito uno spettrogramma in un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 190 e 300 nm nel buffer di corsa. Come mostrato nella Figura 18A la citosina ha un elevato coefficiente di estinzione molare a 205 nm e 272 nm, mentre la 5-metilcitosina ha un massimo d'assorbanza a 206 nm e a 280 nm (figura 18B). Così, sulla base delle analisi, è stata selezionata una lunghezza d'onda a 280 nm che ha garantito la sensibilità maggiore per la 5-metilcitosina.

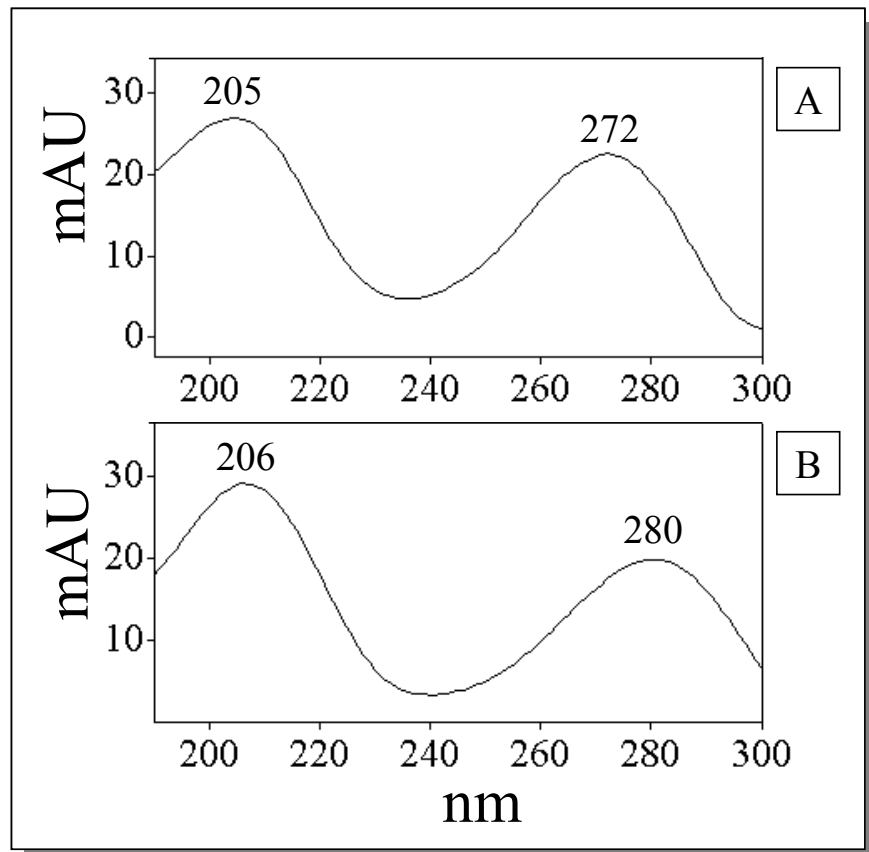


Figura 18. Spettrogramma effettuato sul tampone di corsa selezionato per valutare la lunghezza d'onda ideale da utilizzare nella determinazione della citosina (A) e della 5-metilcitosina (B).

8.3.4. Vantaggi nell'utilizzo della modalità ad iniezione inversa

La modalità d'iniezione inversa consente di ridurre a circa 10 cm la distanza di migrazione perciò gli analiti vengono separati in meno di 1.5 minuti (Figura 19A). Per contro, nelle stesse condizioni elettroforetiche ma in modalità d'iniezione normale, si ha un allungamento del percorso elettroforetico e una separazione di citosina e 5-metilcitosina in 6 minuti, come mostrato in Figura 19B.

Sono state comparate le risoluzioni, i tempi d'analisi, le aree e l'efficienza dei picchi delle due modalità d'iniezione (Tabella 1). La modalità di iniezione normale consente di ottenere un'elevata efficienza ed un'ottima risoluzione, tuttavia i tempi di migrazione aumentano da 1 a 5 minuti. L'area del picco ha un incremento del 63% per la citosina e del 28% per la 5-metilcitosina utilizzando la modalità d'iniezione inversa; in questo modo si ha anche un aumento della sensibilità del metodo, come già riportato in letteratura [91].

Tipo di iniezione	Tempo di migrazione (min)		Altezza del picco (au)		Efficienza (N/m)		Risoluzione
	C	mC	C	mC	C	mC	
Normale	5.0	5.5	5100	7100	220000	280000	8.2
Inversa	1.1	1.2	8300	9100	25000	19000	3.4

Tabella 1: Differenza nei parametri elettroforetici tra iniezione normale e inversa.

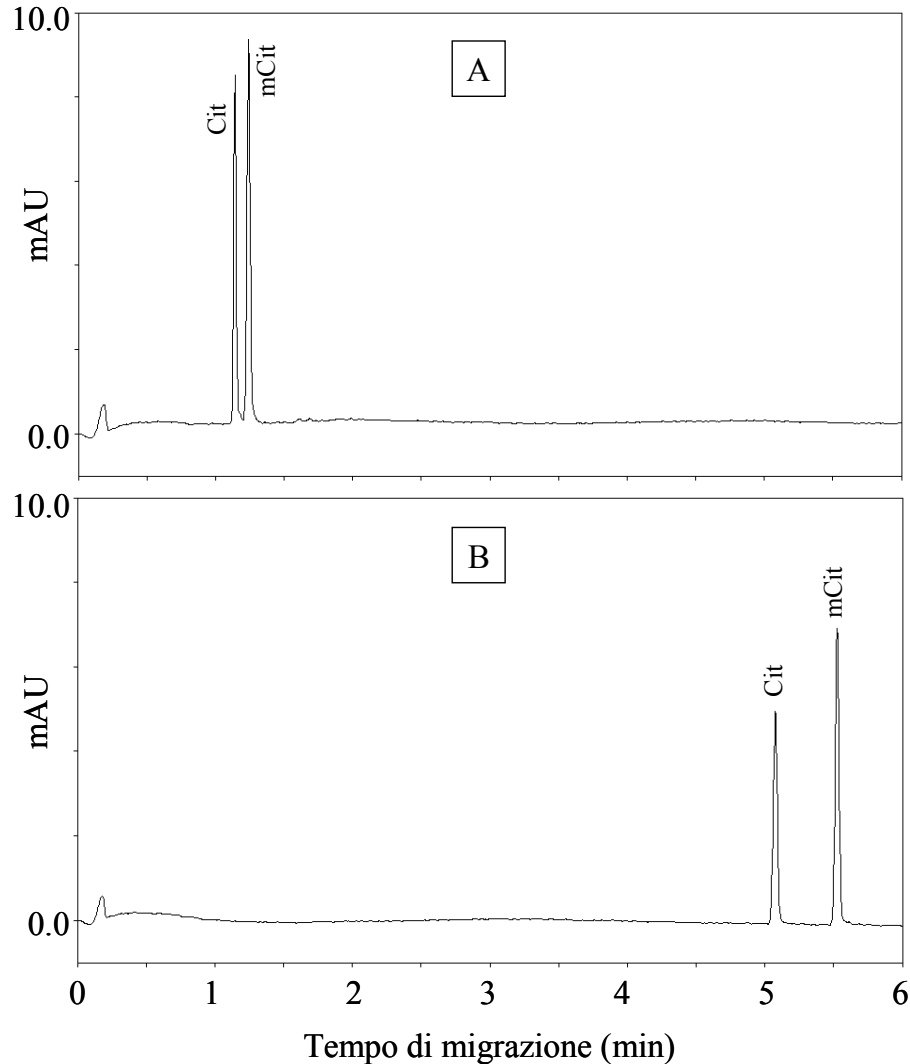


Figura 19. Variazione dei tempi di migrazione al variare della modalità d'iniezione (A=iniezione inversa; B=iniezione normale).

8.3.5. Effetto matrice

Dopo l'idrolisi acida del DNA con acido formico il campione viene essiccato e deve essere successivamente disciolto in una matrice più appropriata prima dell'analisi in CE. È abbastanza noto, infatti, che la matrice del campione influenza in maniera importante la separazione degli analiti in elettroforesi capillare. Per individuare la matrice più adatta, gli analiti essiccati sono stati risospesi in diversi tipi di matrice (i. e. acqua, NaOH 0.1 mmol/L, HCl 0.1 mmol/L, PBS, buffer di corsa Tris fosfato, NaCl 0.1 mmol/L, KCl 0.1 mmol/L) e sono state valutate le variazioni che esse provocano nei parametri elettroforetici. In particolare

abbiamo riscontrato una perdita di risoluzione, efficienza e sensibilità usando l'NaOH e il buffer di corsa Tris fosfato come matrice del campione (Figura 20 e 21).

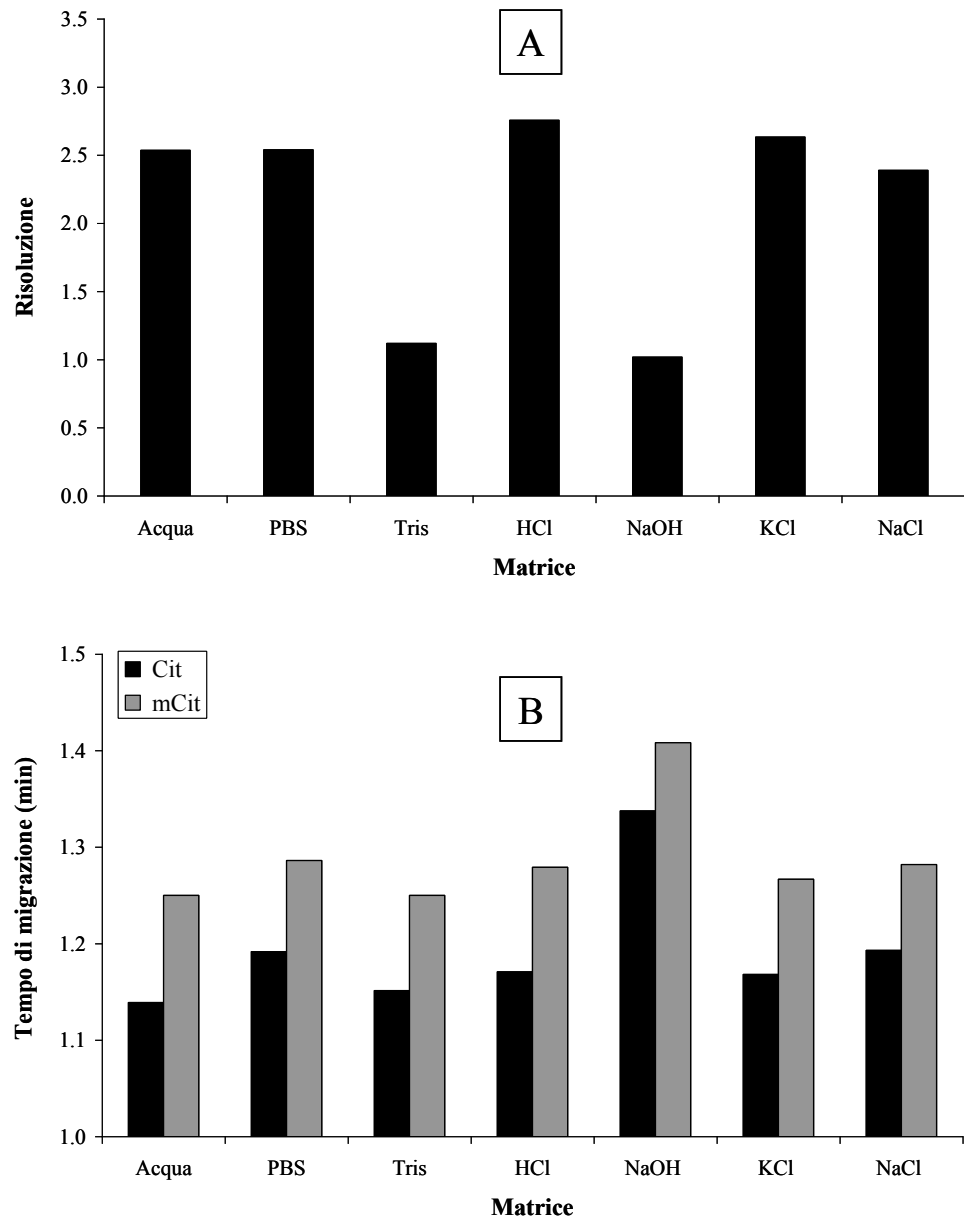


Figura 20. Variazione della risoluzione (A) e dei tempi di migrazione (B) al variare della tipologia della matrice.

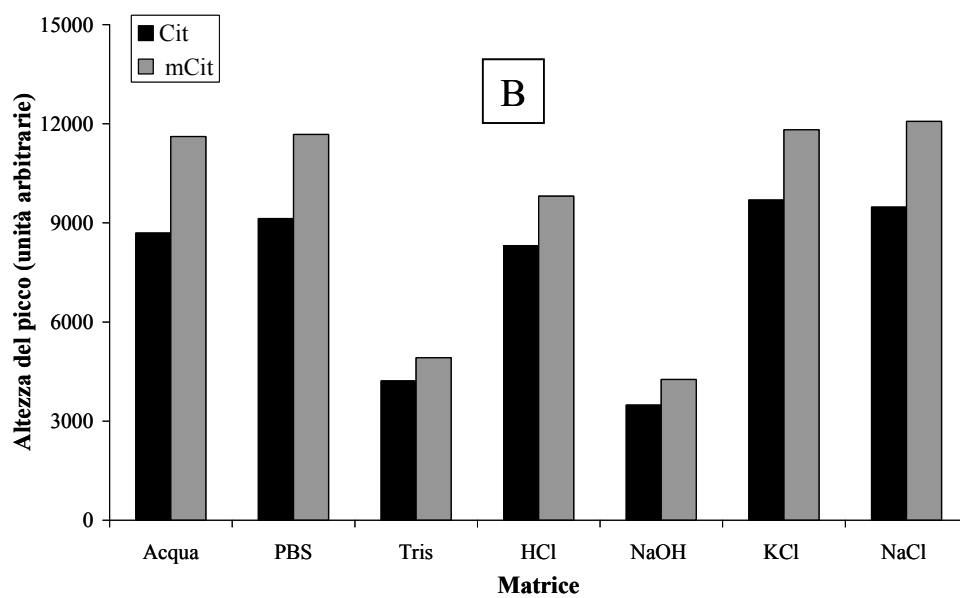
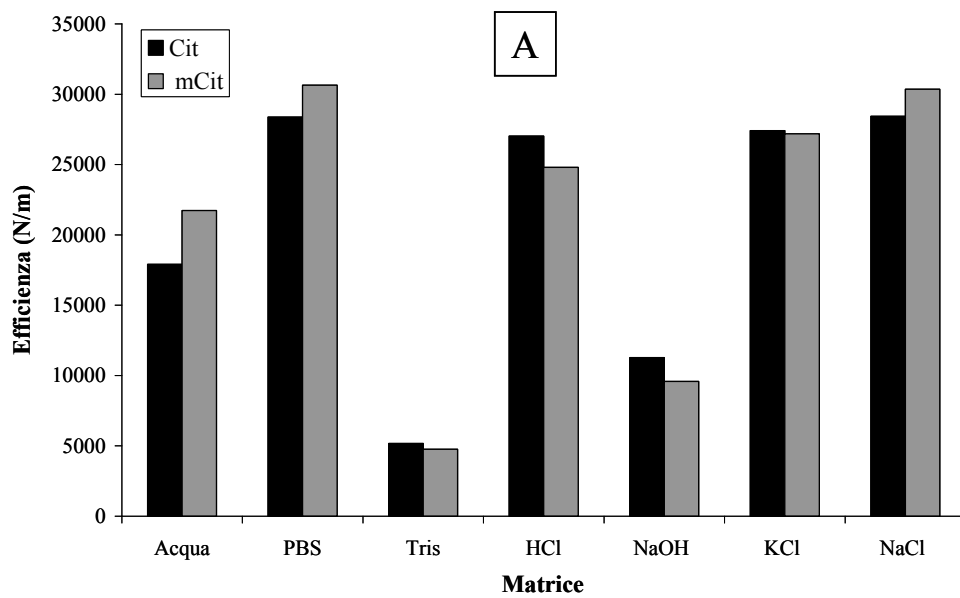


Figura 21. Variazione dell'efficienza (A) e dell'altezza del picco (B) al variare della tipologia della matrice.

Per contro, le altre matrici testate permettono di ottenere una buona risoluzione, una buona sensibilità e una rapida separazione. In modo particolare sono stati raggiunti risultati soddisfacenti dissolvendo il campione in acqua o in medium salino come NaCl o KCl. In conclusione è stato deciso di eseguire le successive analisi risospendendo i campioni essiccati in acqua.

8.3.6. Validazione del metodo

I sei punti della curva di calibrazione di citosina e 5-metilcitosina risultano lineari nel range di concentrazioni analizzate comprese tra 0.25 e 200 $\mu\text{mol/L}$ (coefficiente di correlazione: 0.9979, $\text{SD}=0.0014$, $n=5$ e 0.9986, $\text{SD}=0.0016$, $n=5$). I limiti di sensibilità e di quantificazione sono stati estrapolati dall'analisi di diluizioni scalari di standards di citosina e 5-metilcitosina. Il limite di sensibilità [rapporto segnale/rumore di fondo ($S/N=3$)] per citosina e 5-metilcitosina è di 0.04 $\mu\text{mol/L}$. Il limite di quantificazione ($S/N=10$) per citosina e 5-metilcitosina è di 0.15 $\mu\text{mol/L}$. La quantità minima di DNA richiesta per valutare la metilazione, misurata su diluizioni scalari di DNA di timo bovino, ammonta a 2 μg . Il coefficiente di variazione intra- e inter-saggio sul rapporto 5-metilcitosina/citosine totali, misurato su DNA estratto da leucociti umani è 2.3% ($n=10$) e 3.3% ($n=15$).

8.3.7. Selezione campioni per la validazione della metodica CZE Reverse- Injection

Sono stati selezionati 71 soggetti di entrambi i sessi (28 uomini e 43 donne, con un'età compresa tra 13 e 86 anni) i quali non presentavano al momento del prelievo, alterazioni clinicamente apprezzabili, provenienti dal Laboratorio Generale di Medicina di Base, ASL 1 di Sassari. Tutti i soggetti hanno dato consenso informato per la partecipazione allo studio e per la gestione dei dati personali secondo le leggi italiane. Come dimostrato attraverso indagini mediche, i partecipanti non stavano assumendo supplementi dietetici come vitamina B6, B12, folati, né terapia farmacologica.

La distribuzione del rapporto mCit/Cit è rappresentata nella figura 22. Tale rapporto è compreso tra 2.2% e 4.7% (intervallo interquartile 2.8-3.8%), con una mediana di 3.3% e media \pm SD di 3.3 ± 0.37 . La metilazione del DNA nei leucociti estratti dai soggetti compresi nella nostra casistica è leggermente inferiore rispetto a quella riportata da Kok e collaboratori (4%) [89] in soggetti di età inferiore a quelli della nostra casistica (36 anni contro 54), simili ai dati riportati da Stach e collaboratori [93] che riportano un valore mediano di 3,69% nella distribuzione di metilazione del DNA della loro casistica.

Il risultato sulla valutazione della metilazione del DNA di timo bovino, il quale è paragonabile al grado di metilazione del DNA umano [89], suggerisce l'assenza di errori sistematici del metodo (rapporto mCit/Cit di 6.66% misurato col nostro metodo paragonato con medie di 6.4 e 6.37% riportati in letteratura) [89, 92, 93,94, 95, 96,97].

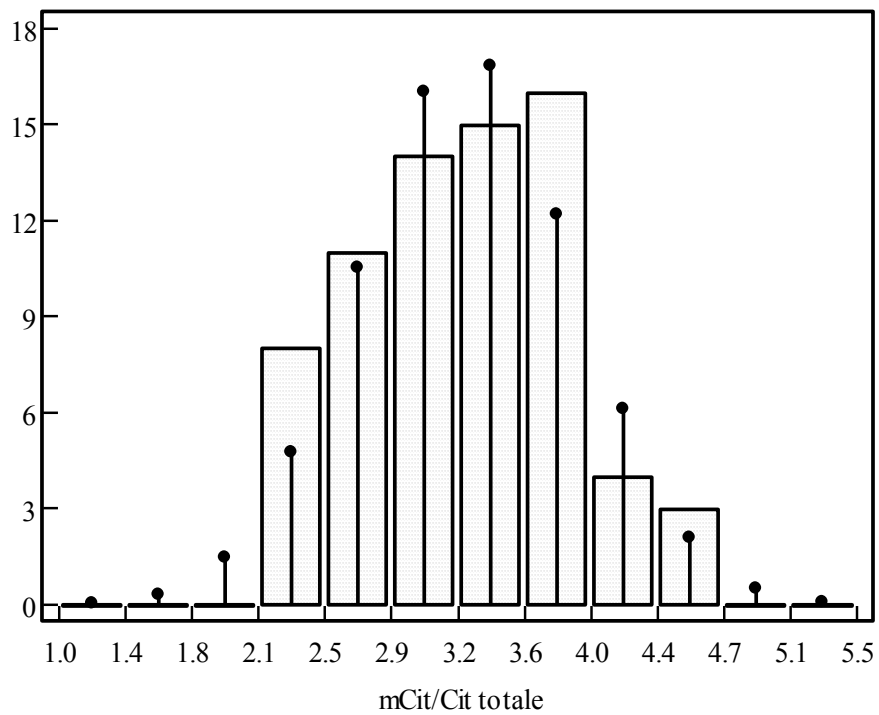


Figura 22. Distribuzione del rapporto mCit/Cit.

8.4. Sviluppo della metodica FASI-CE

Poiché le metodiche sopra descritte non permettevano una sufficiente sensibilità per la valutazione del grado di metilazione globale del DNA a partire da campioni paraffinati, abbiamo quindi cercato di migliorare la sensibilità del saggio di elettroforesi capillare attraverso l'uso di una variante analitica offerta dalla stessa CE denominato Field-Amplified Sample Injection-FASI). Considerando che la quantità di DNA estratta da ciascun tessuto FFPE era ampiamente variabile (tra 1 e 17 µg), era evidente che il nostro metodo precedente era inadatto per la valutazione del grado di metilazione da questi tipi di campione. Con l'impiego della tecnica FASI, gli analiti carichi possono essere efficacemente concentrati prima della loro separazione tramite CE. Prima dell'iniezione elettrocinetica degli analiti, un tappo (plug) di solvente a bassa conducibilità viene caricato idrodinamicamente all'inlet del capillare. Gli analiti presenti in un grande volume di campione vengono introdotti nel capillare mediante un'iniezione elettrocinetica e sottoposti ad un campo di arricchimento-amplificato e successivamente concentrati all'interfaccia tra solvente e tampone (BGE). Per ottimizzare la procedura FASI, abbiamo studiato diversi fattori che influenzano il processo di "stacking" del campione, quali la concentrazione del tampone di corsa BGE e la lunghezza e la composizione del "plug" di solvente. Non è stato possibile eseguire la procedura FASI utilizzando la reverse injection, in quanto in queste condizioni i picchi di citosina e metilcitosina si sovrapponevano. Per cui tutte le prove successive sono state eseguite in modalità di iniezione normale (iniezione all'inlet) ed un percorso elettroforetico di 30 cm (lunghezza totale 40 cm).

8.4.1. Ottimizzazione del tampone di corsa

È stato valutato l'effetto della concentrazione del tampone della corsa sulla sensibilità del metodo. Come atteso, all'aumentare della concentrazione di BGE, si otteneva un aumento nell'altezza del picco con una concentrazione ottimale di tampone di corsa Tris-fosfato 300 mM (Fig. 23). Questo ha permesso di quintuplicare la sensibilità del metodo se confrontato con lo stesso tampone ad una concentrazione di 100 mM.

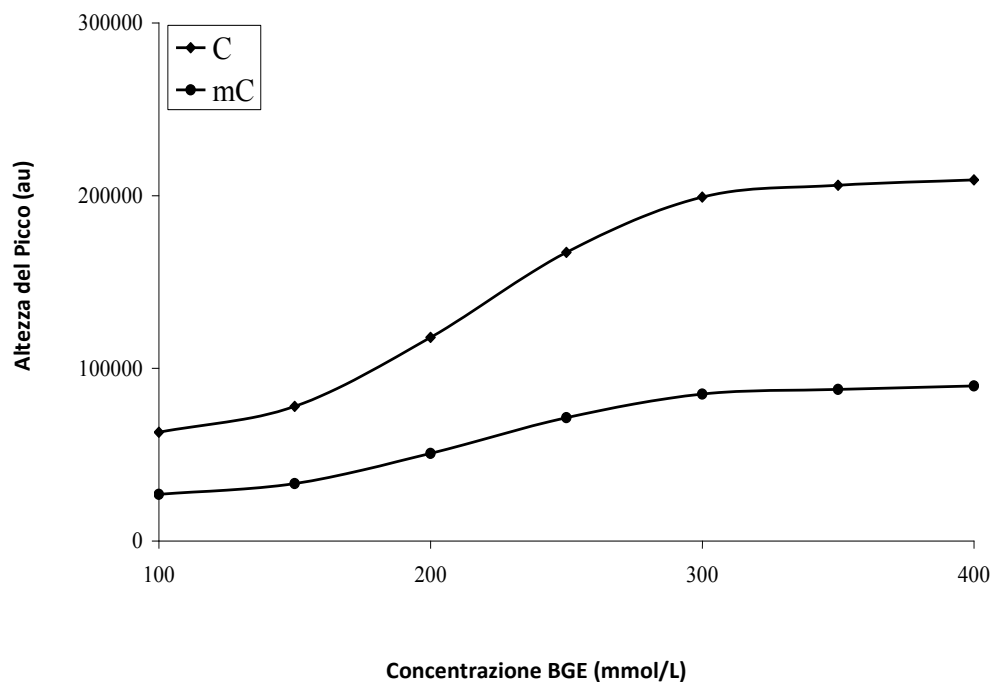


Figura 23. Effetto della concentrazione del BGE sulla sensibilità del metodo. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato ed il CV dei dati ottenuti era inferiore al 6%.

8.4.2. Ottimizzazione del “plug” di solvente

È stato riportato [98] che l'introduzione di una breve quantità di acqua prima dell'iniezione elettrocinetica del campione può fornire un aumento dell'intensità del campo elettrico fin dall'inizio dell'iniezione. Questa iniezione di pochi millimetri di acqua può prevenire disturbi che si potrebbero generare al confine tra il tampone e la fine del capillare e il campo elettrico nel punto di iniezione. Macià et al. [109] hanno dimostrato che la bassa conducibilità del solvente è un parametro chiave se si desidera migliorare la sensibilità. Wu et al. [100] hanno indicato che una migliore riproducibilità potrebbe essere ottenuta utilizzando un plug di acqua. Abbiamo così valutato gli effetti della lunghezza del plug di acqua sulla sensibilità analitica, ed abbiamo visto come essa aumenti all'aumentare delle dimensioni del plug. Per un plug di acqua di 2mm si otteneva un aumento in altezza del picco di circa il 40% per entrambi gli analiti (Figura 24). Inoltre l'uso di acetonitrile/acqua (50/50) come miscela per il plug ha permesso di aumentare ulteriormente la sensibilità fino al 160% rispetto all'impiego della sola acqua (Figura 25).

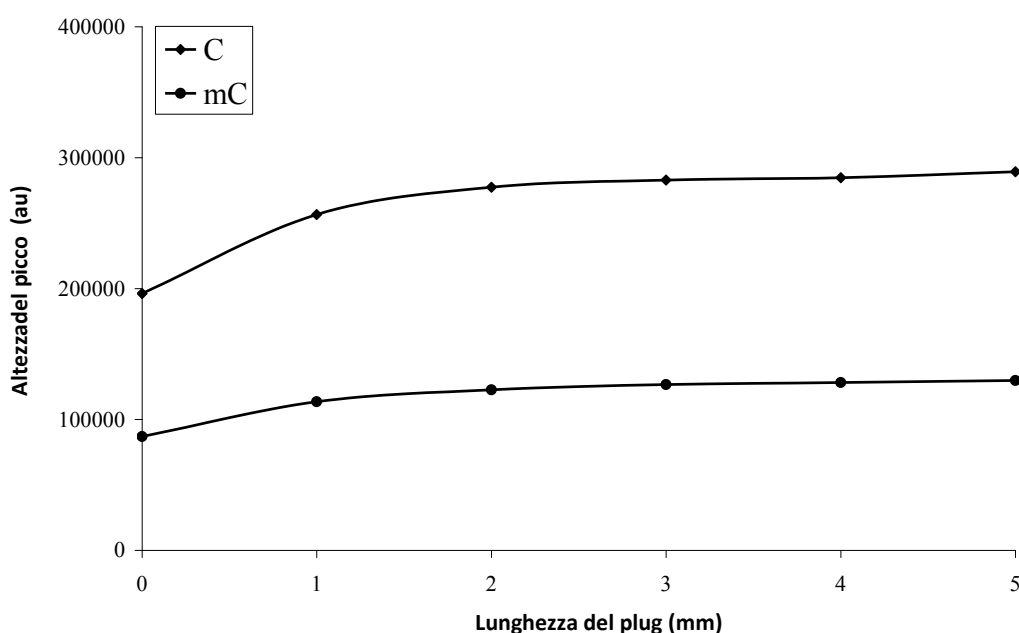


Figura 24. Effetto della lunghezza del plug sulla sensibilità analitica del metodo. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato ed il CV dei dati ottenuti era inferiore al 6%.

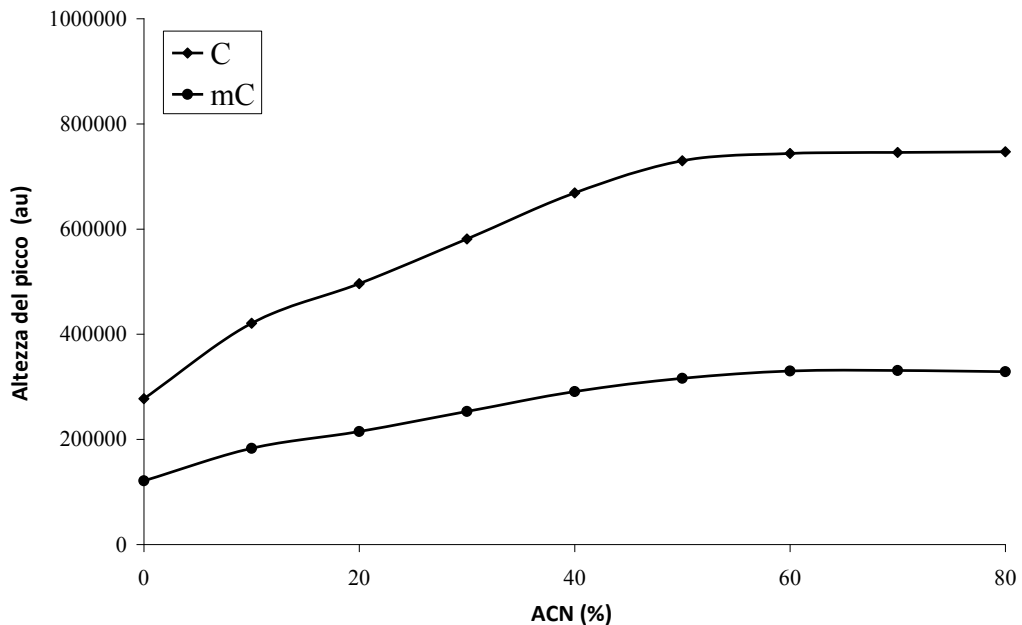


Figura 25. Effetto della composizione del plug sulla sensibilità analitica del metodo. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato ed il CV dei dati ottenuti era inferiore al 6%.

Per riassumere, l'ottimizzazione della procedura FASI ha permesso un guadagno di sensibilità di 1.000 volte rispetto ad una normale iniezione idrodinamica e un guadagno di 400 volte se confrontato con la nostra procedura CE precedente ad iniezione inversa.

Quando la procedura FASI è stata applicata ai campioni estratti di tessuto tumorale, il picco relativo alla 5-metilcitosina è risultato sovrapposto con un picco contaminante (Fig.26, traccia A). Pertanto, i campioni estratti sono stati ulteriormente purificati mediante acetato di sodio al 100% e precipitati con etanolo. Come riportato in figura 26 (traccia B), l'ulteriore procedura di purificazione ha permesso di ottenere un picco per la 5-metilcitosina pulito.

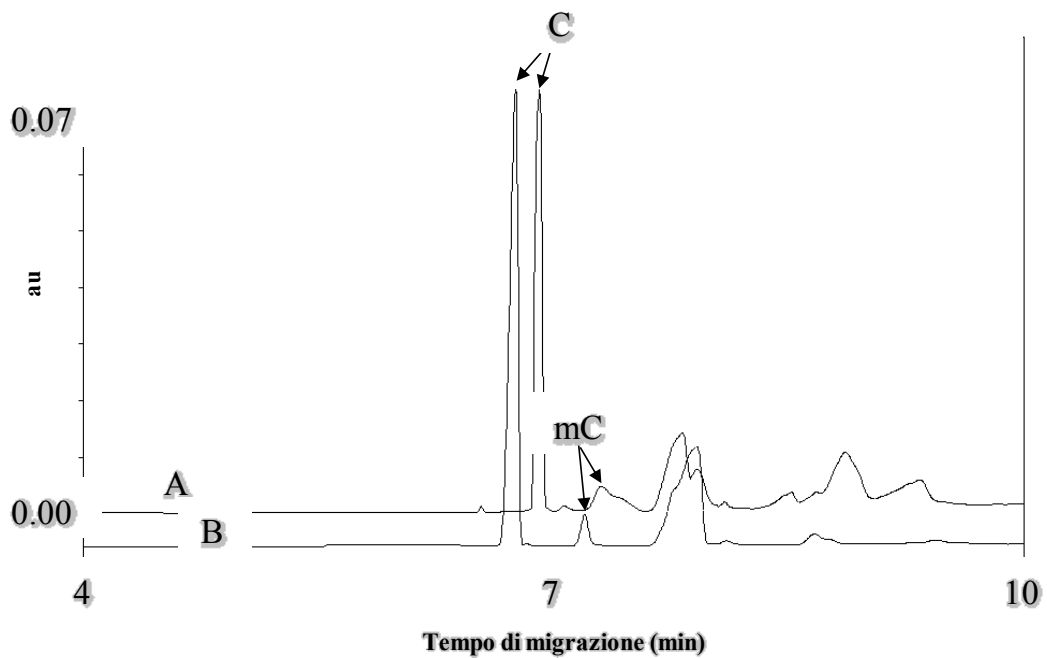


Figura 26. Effetto della purificazione del DNA con acetato di sodio e precipitazione in etanolo al100%. Traccia A: DNA estratto con uso di un kit commerciale e direttamente idrolizzato con acido formico; Traccia B: ulteriore purificazione con acetato di sodio e precipitazione in etanolo al100% del DNA prima dell'idrolisi con acido formico.

8.4.3. Validazione del metodo

La curva di calibrazione di un insieme di sei standard di citosina e 5-metilcitosina, in un range di concentrazione da 20 a 2000 nM, ottenuti mediante analisi di regressione lineare, ha mostrato un buon coefficiente di determinazione ($R^2 \geq 0.99$), assicurando una risposta lineare sopra le concentrazioni testate. I recuperi di citosina e 5-metilcitosina sono stati determinati con l'aggiunta di standard ai campioni prima dell'idrolisi acida. I recuperi analitici, valutati a tre diverse concentrazioni per ogni analita, erano tra il 96 e il 103%. Il limite di rilevazione [rapporto segnale/rumore di fondo (S/N)=3] per la citosina e 5-metilcitosina era 0.1 nM. La minore quantità di DNA richiesto per valutare la metilazione, misurata dalla diluizione scalare di tessuto tumorale FFPE era di circa 10 ng. Le deviazioni standard intra- ed inter-saggio relative al rapporto tra 5-metilcitosina e citosina totale misurate su 0.5 µg di DNA estratto erano pari al 2.1% (n=10) e 3.2% (n=10). Inoltre, i risultati sul DNA di riferimento timo di vitello, che ha un grado di metilazione simile a quella umana DNA [92,97], erano comparabili con quelli di altri test, con un rapporto di 6.46% per il nostro metodo rispetto ad una media di 6.66 e 6.37% per gli altri metodi [89, 94-98], il che suggerisce che non ci sono stati errori sistematici nel processo di misurazione.

8.4.4. Selezione campioni per la validazione della metodica FASI-CE

La metodica è stata applicata su una serie di campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina di carcinoma colon-rettale avanzato (n=17) e di linfoma (n=12), in cui abbiamo trovato rispettivamente un grado di metilazione di 4.23 ± 0.56 e $4.53 \pm 0.36\%$.

La figura 27 rappresenta gli elettroferogrammi ottenuti dopo l'idrolisi di 0.5 µg di DNA estratto da carcinoma colon-rettale (elettroferogramma A) e linfoma (elettroferogramma B).

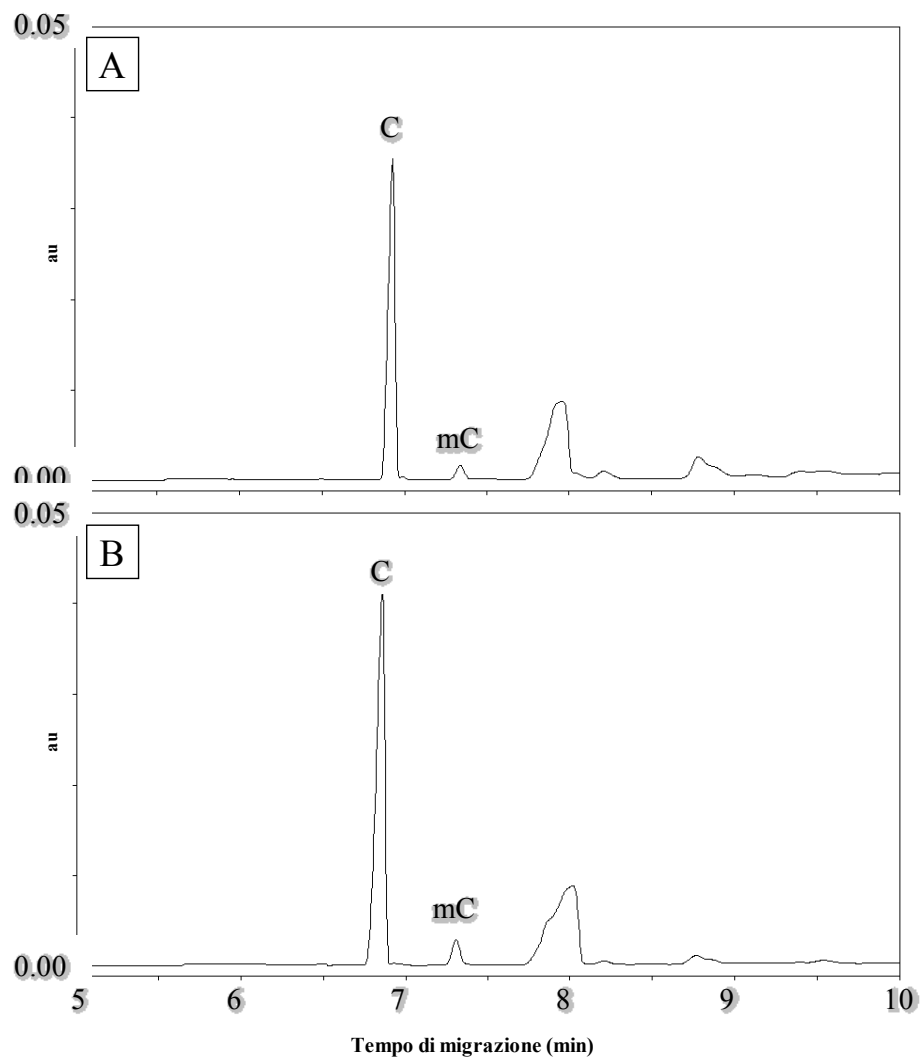


Figura 27. Elettroferogramma su campioni FFPE (A=carcinoma colon-rettale, B=Linfoma)

9. Applicativi delle metodiche

Sebbene le metodiche in UPLC e CZE reverse injection non sono risultate applicabili per la valutazione del grado di metilazione globale a partire da campioni FFPE, le stesse sono state applicate ad una serie di campioni analizzati nell'ambito dei seguenti studi.

9.1. Valutazione del grado di metilazione globale del DNA su soggetti affetti da AMD

È stato valutato il grado di metilazione globale del DNA nei soggetti reclutati in uno studio caso-controllo [101] affetti da AMD. Non sono state riscontrate differenze significative nel grado di metilazione globale del DNA valutato su sangue intero, tra i pazienti affetti da AMD precoce o con AMD neovascolare e i rispettivi controlli (Grafico 1).

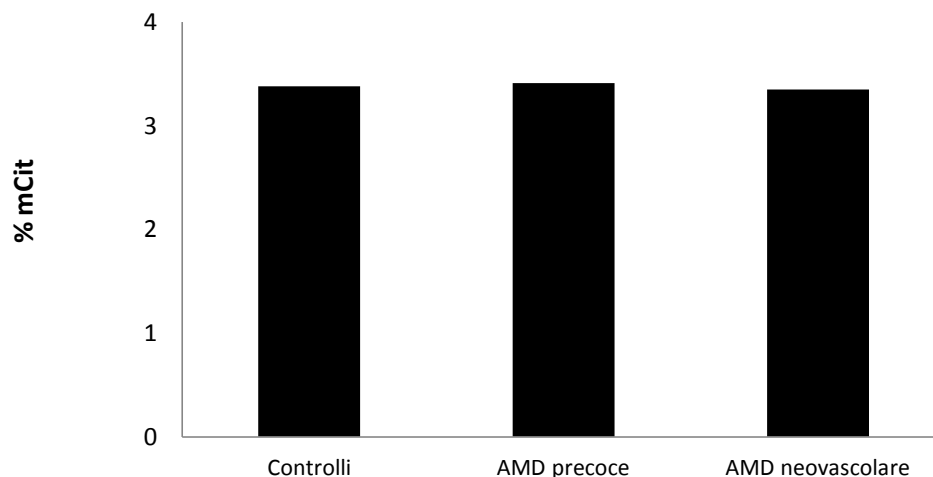


Grafico 1. Grado di metilazione tra pazienti con AMD (precoce e tardiva) e controlli. $p=0.21$ Controlli vs AMD precoce. $P=0.44$ Controlli vs AMD neovascolare. I dati sono espressi come mediana.

9.2. *Soggetti colpiti da infarto acuto del miocardio*

È stato valutato il grado di metilazione globale del DNA nei soggetti reclutati in uno studio [102] che considerava una popolazione sarda di soggetti affetti da infarto del miocardio acuto. Si è osservato una positiva interazione di genere sulla percentuale di metilazione della citosina totale, in particolare, i pazienti maschi con IMA hanno mostrato un valore significativamente più elevato della metilazione globale del DNA rispetto ai controlli.

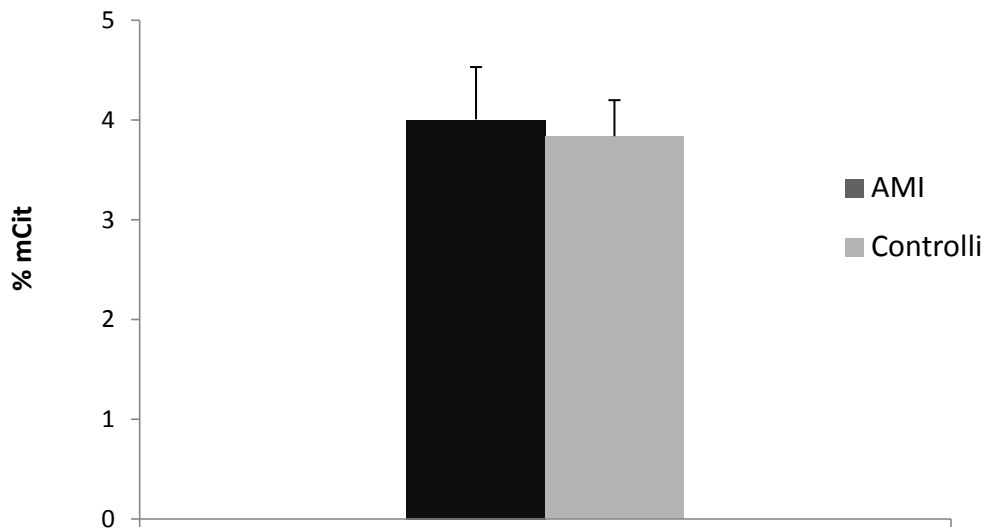


Grafico 2. Grado di metilazione tra pazienti con IMA e controlli. $p=0.043$

9.3. Valutazione del grado di metilazione globale del DNA su soggetti sotto trattamento con farmaci anticoncezionali

In questo lavoro è stata valutata l'influenza della somministrazione di farmaci anticoncezionali per via orale sul grado di metilazione globale del DNA e sulla funzione dei macrofagi.

Il grado di metilazione globale del DNA, osservato nei soggetti reclutati nello studio [103], indicava un livello significativamente più alto nei pazienti FOC rispetto a quelli FS (Grafico 3).

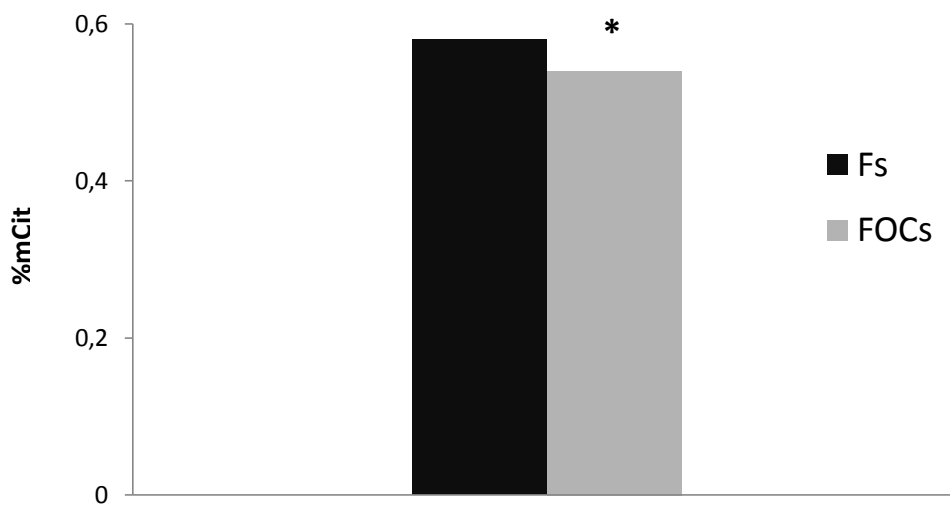


Grafico 3. Metilazione globale del DNA nelle due popolazioni femminili.

I dati sono espressi come mediane di 72 Fs (istogramma nero) e 67 FOC (istogramma grigio); *P=0,033. FOCs=donne trattate con contraccettivi orali per almeno 3 mesi; Fs=donne che non avevano usato OCs per almeno 3 mesi per garantire un periodo di washout sufficiente; OC= Contraccettivo orale. I dati sono espressi come mediana.

9.4. Valutazione della metilazione del DNA globale in soggetti fumatori e non

È stato valutato il grado di metilazione globale del DNA nei soggetti reclutati nell'ambito dello studio di genere sugli effetti del fumo di sigaretta sulla funzionalità endoteliale e sui biomarcatori di infiammazione [104]. Nei soggetti non fumatori, il livello di metilazione globale del DNA era significativamente più alto nelle donne rispetto agli uomini; nei soggetti fumatori è stata riscontrata una ridotta metilazione del DNA globale nei soggetti sottoposti ad analisi, tuttavia, tale riduzione è più marcata nelle donne rispetto uomini (Grafico 4).

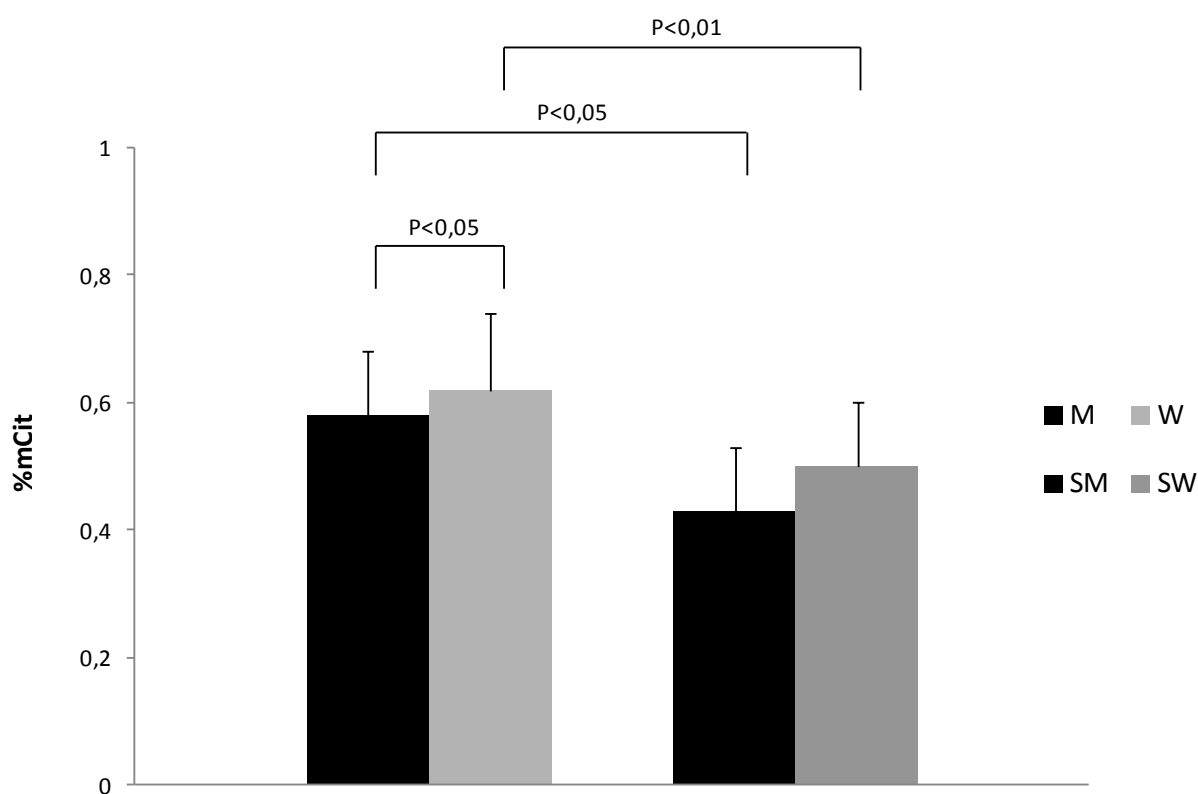


Grafico 4. Effetti del fumo sulla metilazione del DNA globale valutato su soggetti non-fumatori maschi (M, n=37), di sesso femminile non fumatrici (W, n=45), fumatori di sesso maschile (SM; n=21), e fumatrici di sesso femminile (SW; n=26). Tutte le donne sono state analizzate durante la fase follicolare. I dati sono espressi come media \pm std. dev.

10. Conclusioni

La metilazione del DNA è un fenomeno epigenetico ben noto che si verifica nelle cellule di mammifero. Circa il 4-5% delle citosine nel genoma vengono convertite dalla DNA metiltransferasi a 5-metilcitosina. La maggior parte delle 5-metilcitosine si trovano nelle isole CpG, e geni con abbondanti 5-metilcitosine nella regione del promotore sono solitamente trascrizionalmente silenti. Una perdita di gruppi metilici nel DNA è frequente nella carcinogenesi. Un tasso medio di ipometilazione globale del 8-10% è stato osservato negli adenomi del colon o carcinomi e una forte correlazione tra il fenotipo maligno e stato di metilazione del DNA è stata dimostrata nelle cellule di carcinoma colon-rettale. È noto che la 5-metilcitosina è coinvolta nel controllo dell'espressione genica, carcinogenesi, e la progressione tumorale. Così, l'ipometilazione del DNA globale potrebbe indurre l'espressione di proto-oncogeni, mentre un'ipermetilazione potrebbe portare a silenziamento dei geni onco-soppressori. Nel corso dell'ultimo decennio, l'interesse in rapida espansione nel coinvolgimento della metilazione del DNA in meccanismi di sviluppo e malattie umane ha evidenziato la necessità di una accurata analisi quantitativa per la misura della metilazione del DNA globale. Diverse tecniche per studiare il grado di metilazione dell'intero genoma si basano principalmente sulla incapacità degli enzimi di restrizione sensibili alla metilazione di tagliare sequenze contenenti uno o più citosine metilate, con ulteriori analisi dei frammenti ottenuti.

Pertanto, la quantificazione della metilazione del DNA è uno strumento importante nello studio della regolazione genica. In particolare, i tessuti fissati e inclusi in blocchi di paraffina sono una potenziale fonte di DNA per analisi genetiche ed epigenetiche di tipo retrospettivo. Sebbene l'architettura tissutale e le proteine siano conservate, l'estrazione degli acidi nucleici è resa difficoltosa anche a causa della presenza di basse quantità di

DNA degradato. Per questo motivo la valutazione del grado di metilazione da estratti di DNA fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE) richiede metodi ad alta sensibilità e selettività. A tal proposito abbiamo sviluppato un metodo cromatografico HILIC-UPLC il quale è stato validato su DNA estratto da sangue intero ma che non ha dimostrato sufficiente sensibilità sui campioni di DNA estratti da campioni FFPE.

Per tanto, sulla base dell'esperienza maturata nel nostro laboratorio nel campo delle applicazioni in elettroforesi capillare, si è pensato di sviluppare una metodica con questo strumento per la valutazione del grado di metilazione globale del DNA a partire da campioni FFPE. Abbiamo inizialmente sviluppato una saggio che prevedeva l'iniezione del campione all'outlet del capillare (Reverse Injection). Questo tipo di metodica si è rivelata efficace al fine della quantificazione del grado di metilazione globale sui campioni di DNA estratto da sangue intero, mentre è risultata non sufficientemente sensibile per l'applicazione su campioni FFPE. A tal fine abbiamo sviluppato un ulteriore metodica sfruttando una variante analitica offerta dalla CE, denominata FASI, la quale ci ha permesso di incrementare la sensibilità del metodo di circa 400 volte, anche se sono stati necessari tempi analitici più lunghi (8 min vs 2 minuti per ogni corsa). La metodica FASI-CE descritta in questo lavoro è la prima metodica in elettroforesi capillare in grado di quantificare il grado di metilazione del DNA estratto da FFPE. Inoltre, rispetto ad altre metodiche tuttora impiegate per questo tipo di determinazione, caratterizzate da lunghe procedure preanalitiche (derivanti dai tempi di incubazione per idrolisi enzimatica e derivatizzazione degli analiti) e da lunghi tempi di analisi, la metodica da noi sviluppata si è rivelata più rapida ed economica, pur garantendo una sensibilità analitica appropriata per questa tipologia di campioni.

Inoltre i metodi UPLC e CZE-reverse injection, sebbene non idonei allo studio di campioni FFPE, si sono dimostrati un ottimo strumento per l'analisi routinaria di DNA estratto da sangue intero in quanto più rapidi ed economici rispetto agli altri metodi descritti in letteratura e sono stati applicati con successo ad una serie di studi case-control in collaborazione con altri laboratori di ricerca [101,102, 103,104].

Bibliografia

1. Waddington CH. The epigenotype.
Endeavor 1942;1:18–20.
2. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer.
Nat Rev Genet. 2002 Jun;3(6):415-28.
3. Lieb JD, Beck S, Bulyk ML, Farnham P, Hattori N, Henikoff S, Liu XS, Okumura K, Shiota K, Ushijima T, Grealley JM. Applying whole-genome studies of epigenetic regulation to study human disease.
Cytogenet Genome Res. 2006;114(1):1-15.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Capitolo 4: DNA, cromosomi e genomi.
Biologia molecolare della cellula, 5a ed., Bologna, Zanichelli 2009.
5. Xhemalce B, Dawson MA, Bannister AJ. Histone modifications. Meyers R, ed. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine. John Wiley and Sons, 2011.
6. Oki M, Aihara H, Ito T. Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases.
Subcell Biochem 2007; 41:319-336.
7. Hu S, Xie Z, Onishi A, et al. Profiling the human protein-DNA interactome reveals ERK2 as a transcriptional repressor of interferon signaling.
Cell 2009; 139:610-622.
8. Dawson MA, Bannister AJ, Gottgens B, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin.
Nature 2009; 461:819-822.
9. Sugiyama K, Sugiura K, Hara T, et al. Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation.
Oncogene 2002; 21:3103-3111.
10. Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M. Aurora-B phosphorylates histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation.
Genes Cells 2002; 7:11-17.
11. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis.
Proc Natl Acad Sci USA 1964; 51:786-794.
12. Xhemalce B, Dawson MA, Bannister AJ. Histone modifications. In: Meyers R, ed. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine. John Wiley and Sons, 2011
13. Parthun MR. Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase.
Oncogene 2007; 26:5319-5328

14. Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention.
Oncogene 2007; 26:5310-5318.
15. Tjeertes JV, Miller KM, Jackson SP. Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells.
EMBO J 2009; 28:1878-1889.
16. Yang XJ, Seto E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men.
Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9:206-218.
17. Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases.
Nature 2000; 406:593-599.
18. Bedford MT, Clarke SG. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why.
Mol Cell 2009; 33:1-13.
19. Wolf SS. The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans.
Cell Mol Life Sci 2009; 66:2109-2121.
20. Copeland RA, Solomon ME, Richon VM. Protein methyltransferases as a target class for drug discovery.
Nat Rev Drug Discov 2009; 8:724-732.
21. Bannister AJ, Schneider R, Kouzarides T. Histone methylation: dynamic or static?
Cell 2002; 109:801-806.
22. Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, et al. Histone deimination antagonizes arginine methylation.
Cell 2004; 118:545-553.
23. Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, et al. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination.
Science 2004; 306:279-283.
24. Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK. JMJD6 is a histone arginine demethylase.
Science 2007; 318:444-447.
25. Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1.
Cell 2004; 119:941-953
26. Whetstine JR, Nottke A, Lan F, et al. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases.
Cell 2006; 125:467-481.
27. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system.
Annu Rev Biochem 1998; 67:425-479.

28. Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, et al. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing.
Nature 2004; 431:873-878.
29. Lee JS, Shukla A, Schneider J, et al. Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS.
Cell 2007; 131:1084-1096.
30. Kim J, Guermah M, McGinty RK, et al. RAD6-mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells.
Cell 2009; 137:459-471
31. Seeler JS, Dejean A. Nuclear and unclear functions of SUMO.
Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4:690-699.
32. Shiio Y, Eisenman RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression.
Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:13225-13230.
33. Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, et al. Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications.
Genes Dev 2006; 20:966-976.
34. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases.
Nat Genet. 1998 Jul;19(3):219-20
35. M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, E. Li. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.
Cell. 1999 Oct 29;99(3):247-57.
36. F. Larsen, G. Gundersen, R. Lopez, H. Prydz. CpG islands as gene markers in the human genome.
Genomics. 1992 Aug;13(4):1095-107.
37. M. Gardiner-Garden, M. Frommer. CpG islands in vertebrate genomes.
J Mol Biol. 1987 Jul 20;196(2):261-82.
38. Sibani S, Melnyk S, Pogribny IP, Wang W, Hiou-Tim F, Deng L, Trasler J, James SJ, Rozen R. Studies of methionine cycle intermediates (SAM, SAH), DNA methylation and the impact of folate deficiency on tumor numbers in Min mice.
Carcinogenesis. 2002 Jan;23(1):61-5.
39. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP. S-Adenosylmethionine and methylation.
FASEB J. 1996 Mar;10(4):471-80.
40. Krista S. Crider, Thomas P. Yang, Robert J Berry, Lynn B. Bailey. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role.
Adv Nutr vol. 3: 21-38, 2012
41. Partha M. Das, Rakesh Singal. DNA Methylation and Cancer.

42. Mikko O. Hiltunen, Leena Alhonen, Jari Koistinaho, Sanna Myöhänen, Matti Pääkkönen, Sinikka Marin, Veli-Matti Kosma, Juhani Jänne. Hypermethylation of the APC (adenomatous Polyposis Coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. *IJC* 1997 70 (6):644–648.
43. Sukhjeet Sidhu, Jagdeep S Deep, R C Sobti, V L Sharma, Hitender Thakur. Methylation Pattern Of MGMT Gene In Relation To Age, Smoking, Drinking And Dietary Habits As Epigenetic Biomarker In Prostate Cancer Patients. *GEBJ* 2010:8 1
44. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 2000;16(4):168-74.
45. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(7):564-9.
46. Rebecca E. Watson, Jay I. Goodman. Epigenetics and DNA Methylation Come of Age in Toxicology. *Toxicol. Sci.* (2002) 67 (1): 11-16.
47. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science.* 2003 Apr 18;300(5618):489-92
48. Rampersaud GC, Kauwel GP, Hutson AD, Cerda JJ, Bailey LB. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *Am J Clin Nutr* 2000;72:998–1003.
49. Balaghi M, Wagner C. DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:1184–90.
50. Kim BY, Kwon OS, Joo SA, Park JA, Heo KY, Kim MS, et al. A column method for determination of DNA cytosine-C5-methyltransferase activity. *Anal Biochem* 2004; 326:21–4.
51. Shelnutt KP, Kauwell GP, Gregory JF III, Maneval DR, Quinlivan EP, Theriaque DW, et al. Methylene tetrahydrofolate reductase 677C^T polymorphism affects DNA methylation in response to controlled folate intake in young women. *J Nutr Biochem* 2004;15:554–60.
52. Progridny I, Yi P, James SJ. A sensitive new method for rapid detection of abnormal methylation patterns in global DNA and within CpG islands. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:624–8.
53. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000;275:29318–23.

54. Gonzalgo ML, Jones PA. Quantitative methylation analysis using methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SnuPE).
Methods 2002;27:128–33.
55. Reddy MV, Gupta RC, Randarath K. 32P-base analysis of DNA.
Anal Biochem 1981;117:271–9.
56. Stach D, Schmitz OJ, Stilgenbauer S, Benner A, Dohner H, Wiessler M, et al. Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels.
Nucleic Acids Res 2003;31:e2.
57. Song L, James SR, Kazim L, Karpf AR. Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry.
Anal Chem 2005;77:504–10.
58. Ramsahoye BH. Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography.
Methods 2002;27:156–61.
59. Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GD, Bagley PJ, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status.
Proc Nat Acad Sci 2002;99:5606–11.
60. Friso S, Choi SW, Gregory G, Dolnikowski G, Selhub J. A method for the assess genomic DNA methylation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry.
Anal Chem 2002; 74:4526–31.
61. Crain PF. Preparation and enzymatic hydrolysis of DNA and RNA for mass spectrometry.
Methods Enzymol 1990;193:782–90.
62. Chen G, Han X, Zhang L, Ye J. Determination of purine and pyrimidine bases in DNA by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection.
J Chromatogr A 2002;954:267–76.
63. Razin A, Sedat J. Analysis of 5-methylcytosine in DNA: II. Gas chromatography.
Anal Biochem 1977;77:370–7.
64. Kok et al.: Global DNA methylation measured by LC-ESI-MS/MS 911.
Article in press - uncorrected proof
65. Fisher DH, Giese RW. Determination of 5-methylcytosine in DNA by gas chromatography-electron-capture detection.
J Chromatogr 1988;452:51–60.
66. Singer J, Schnute WC Jr, Shively JE, Todd CW, Riggs AD. Sensitive detection of 5-methylcytosine and quantitation of the 5-methylcytosine/cytosine ratio in DNA by gas chromatography-mass spectrometry using multiple specific ion monitoring.
Anal Biochem 1979;94:297–301.

67. Romerio AS, Fiorillo G, Terruzzi I, Senesi P, Testolin G, Battezzati A. Measurement of DNA methylation using stable isotope dilution and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 2005;336:158–63.
68. Crain PF, McCloskey JA. Analysis of modified bases in DNA by stable isotope dilution gas chromatography mass spectrometry: 5-methylcytosine. *Anal Biochem* 1983;132:124–31.
69. Eick D, Fritz HJ, Doerfler W. Quantitative determination of 5-methylcytosine in DNA by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1983;135:165–71.
70. Patel CV, Gopinathan KP. Determination of trace amounts of 5-methylcytosine in DNA by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1987;164:164–9.
71. Catania J, Keenan BC, Margison GP, Fairweather DS. Determination of 5-methylcytosine by acid hydrolysis of DNA with hydrofluoric acid. *Anal Biochem* 1987;167:347–51.
72. Crain PF. Analysis of 5-methylcytosine in DNA by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Enzymol* 1990;193:857–65.
73. Mohamed GB, Nazareth A, Hayes MJ, Giese RW, Vouros P. Gas-chromatography-mass spectrometry characteristics of methylated perfluoroacyl derivatives of cytosine and 5-methylcytosine. *J Chromatogr* 1984;314:211–7.
74. Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* 2003;49:1041–4.
75. Teerlink T, Barto R, ten Brink HJ, Schalkwijk CG. Measurement of N-(carboxymethyl)lysine and N-(carboxyethyl) lysine in human plasma protein by stable-isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2004;50: 1222–8.
76. Kwon JY, Moini M. Analysis of underivatized amino acid mixtures using high performance liquid chromatography/ dual oscillation nebulizer atmospheric pressure microwave induced plasma ionization-mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2001;12:117–22.
77. Petritis K, Brussaux S, Guenu S, Elfakire C, Dreux M. Ionpair reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of underivatized small peptides. *J Chromatogr A* 2002;957:173–85.
78. Guile GR, Rudd PM, Wing DR, Prime SB, Dwek RA. A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analysing oligosaccharide profiles. *Anal Biochem* 1996; 240:210–226.

79. Wuhrer M, de Boer AR, Deelder AM. structural glycomics using hydrophilic interaction chromatography (hilic) with mass spectrometry.
*Mass Spectrom Rev.*2009;28(2):192-206.
80. R&D Group, SeQuant AB. A Mini-Tutorial in HILIC.
LC-GC Europe; 2005;18:19-19
81. Hemström P, Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography.
J Sep Sci. 2006;29(12):1784-82.
82. Hao Z,Xiao B, Weng N. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC).
J. Sep. Sci. 2008;31:1449 –146
83. Alpert AJ, Andrews PC. Cation-exchange chromatography of peptides on poly(2-sulfoethyl aspartamide)-silica.
J Chromatogr. 1988;443:85-96.
84. Boersema PJ, Mohammed S, Heck AJR. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics.
Anal Bioanal Chem. 2008;391:151–159
85. Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds .
J.Chromatogr. 1990; 499:177-196
86. Appelblad P, Jonsson T, Pontén E, Viklund C, Jiang W. A Practical Guide to HILIC including ZIC®-HILIC applications.
World Wide Web edition, June 2009
87. J.Sherma, F.H.Larkin. UPLC: ultra performance liquid chromatography.
Journal of AOAC International 2005;88 (3) 46.
88. R. Plumb ,J. Castro-Perez, J. Granger, I. Beattie, K. Joncour, Wright A. Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry.
Rapid Commun Mass Spectrom. 2004;18(19):2331-7.
89. Kok RM, Smith DE, Barto R, Spijkerman AM, Teerlink T, Gellekink HJ, Jakobs C, Smulders YM. Global DNA methylation measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: analytical technique, reference values and determinants in healthy subjects.
Clin Chem Lab Med. 2007;45(7):903-11.
90. Zinellu A, Caria MA, Tavera C, Sotgia S, Chessa R, Deiana L, Carru C.
Plasma creatinine and creatine quantification by capillary electrophoresis diode array detector.
Anal Biochem. 2005 Jul 15;342(2):186-93.
91. Zinellu A, Carru C, Usai MF, Sotgia S, Deiana L.
Determination of creatinine in human serum by short-end injection capillary zone electrophoresis.

Electrophoresis. 2004 Apr;25(7-8):1096-101

92. Stach D, Schmitz OJ, Stilgenbauer S, Benner A, DoÈhner H, Wiessler M, Lyko F. Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels.
Nucleic Acids Research, 2003, 31(2)
93. Deutsch J, Razin A, Sedat J (1976) Analysis of 5-methylcytosine in DNA. I. Mass spectrometry.
Anal Biochem 72:586–592
94. Aharon Razin, John Sedat. Analysis of 5-methylcytosine in DNA: II. Gas chromatography.
Anal Biochem 1977; 77(2); 370–377
95. Catania J, Keenan BC, Margison GP, Fairweather DS. Determination of 5-methylcytosine by acid hydrolysis of DNA with hydrofluoric acid.
Anal. Biochem. 1987; 167:347-351.
96. Crain PF, McCloskey JA. Analysis of modified bases in DNA by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry: 5-methylcytosine.
Anal Biochem. 1983;132(1):124-31.
97. Kuo KC, McCune RA, Gehrke CW, Midgett R, Ehrlich M. Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA.
Nucleic Acids Res. 1980;8(20):4763-76.
98. Chien RL, Burgi DS. Field amplified sample injection in high-performance capillary electrophoresis.
J. Chromatogr. 1991; 559 (43); 141-152
99. Macià A, Borrull F, Aguilar C, Calull M. Application of capillary electrophoresis with different sample stacking strategies for the determination of a group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the low microg x L(-1) concentration range.
Electrophoresis. 2004 Feb;25(3):428-36
100. Wu S-M, Ho Y-H, Wu H-L, Chen S-H, Ko H-S. Head-column field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for the determination of cimetidine, famotidine, nizatidine, and ranitidine-HCl in plasma.
Electrophoresis. 2001;22(13):2717-22
101. Pinna A, Zinellu A, Tendas D, Zodda A, Blasetti F, Carru C, Castiglia P. Plasma homocysteine and asymmetrical dimethyl-L-arginine (ADMA) levels and whole blood DNA methylation in early and neovascular age-related macular degeneration.
Submitted Plos One
102. De Murtas V, Zinellu A, Pinna MA, Scanu B, Talanas G, Terrosu P, Carru C. Global and gene specific methylation profile in Sardinian patients with Acute Myocardial Infarction.
FEBS Journal 2012: 52-576

103. Campesi I, Sanna M, Zinellu A, Carru C, Rubattu L, Bulzomi, Seghieri G, Tonolo G, Palermo M, Rosano G, Marino M, Franconi F. Oral contraceptives modify DNA methylation and monocyte-derived macrophage function.
Biology of Sex Differences 2012, 3:4
104. Campesi I, Carru C, Zinellu A, Occhioni S, Sanna M, Palermo M, Tonolo G, Mercurio G, Franconi F. Regular cigarette smoking influences the transsulfuration pathway, endothelial function, and inflammation biomarkers in a sex-gender specific manner in healthy young humans
Am J Transl Res 2013;5(5):497-509