



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**SVILUPPO DI UN METODO ANALITICO PER LA VALUTAZIONE
DEI CAMBIAMENTI A LIVELLO PROTEICO INDOTTI SUL
TESSUTO PLACENTARE DA DIABETE GESTAZIONALE**

RELATORE: DR. VALERIO DI MARCO

CORRELATORE: DR. PIETRO TRALDI

CONTRORELATORE: PROF. PIER LUIGI ZANONATO

LAUREANDO: MARCO ROVERSO

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

*“Se tu hai una mela, e io ho una mela, e ce le scambiamo,
allora tu ed io abbiamo sempre una mela ciascuno.
Ma se tu hai un'idea, ed io ho un'idea, e ce le scambiamo,
allora abbiamo entrambi due idee”*

George Bernard Shaw

Sommario

1 - Introduzione	1
1.1 - Metodologie analitiche in proteomica.....	2
1.1.1 - Tecniche di separazione e purificazione delle proteine.....	4
1.1.2 - La spettrometria di massa nello studio del proteoma.....	9
1.1.3 - Interpretazione dei dati e ricerca nei database.....	15
1.1.4 - Valutazione delle tecniche identificative in proteomica.....	16
1.2 - Diabete mellito e gravidanza.....	18
1.2.1 - Diabete mellito gestazionale (GDM).....	20
1.2.2 - Rischi e complicazioni per il feto/bambino.....	21
1.2.3 - Rischi e complicazioni per la madre.....	22
1.2.4 - GDM: epidemiologia, diagnosi, trattamento e prevenzione.....	23
1.3 - La placenta umana.....	24
1.3.1 - Funzioni della placenta umana.....	25
1.3.2 - Formazione e sviluppo della placenta.....	26
1.3.3 - Circolazione sanguigna nella placenta.....	27
1.3.4 - Secondamento.....	29
1.3.5 - La placenta diabetica.....	29
2 - Scopo della tesi	31
3 - Metodiche analitiche	33
3.1 - Metodologia estrattiva.....	33
3.1.1 - Preparazione del gel.....	33
3.1.2 - Preparazione del campione.....	35
3.1.3 - Caricamento del campione e rivelazione delle proteine.....	36
3.2 - Spettrometria di massa MALDI TOF-TOF.....	38
3.2.1 - Desorbimento e ionizzazione dell'analita.....	39
3.2.2 - Matrici e preparazione del campione.....	44

3.2.3 - <i>Analizzatore di massa a tempo di volo (TOF)</i>	46
3.2.4 - <i>Spettrometria di massa tandem</i>	50
3.2.5 - <i>MALDI Ion Imaging</i>	51
4 - Materiali e metodi	57
4.1 - Reagenti	57
4.2 - Campioni biologici.....	58
4.3 - Trattamento del campione	59
4.3.1 - <i>Preparazione dell'omogenato di placenta</i>	59
4.3.2 - <i>Sezionamento del tessuto e preparazione per l'analisi MALDI</i>	60
4.4 - Elettroforesi e digestione triptica.....	62
4.5 - MALDI-MS.....	64
5 - Risultati e discussione	67
5.1 - Analisi dell'omogenato	67
5.1.1 - <i>Lato materno</i>	67
5.1.2 - <i>Lato fetale</i>	78
5.2 - Analisi diretta del tessuto placentare.....	81
5.3 - MALDI Ion Imaging del tessuto placentare.....	91
6 - Conclusioni	95
Appendice	97
Bibliografia	103

1 - Introduzione

Lo stato fisiologico, patologico o di sviluppo definisce il tipo e la quantità di proteine espresse in una cellula o in un tessuto. Questo rende di vitale importanza la determinazione del relativo profilo di espressione proteica e la successiva valutazione di come questo possa variare in presenza di una determinata malattia rispetto ad una condizione non patologica. La comprensione di queste differenze può portare ad una visione più completa dei processi coinvolti nella malattia e all'identificazione di proteine che possono fungere da *biomarker*, permettendo quindi di sviluppare nuove metodologie per la diagnosi o la cura di un determinato stato patologico. Il rapido avanzamento della proteomica è reso possibile dal completamento del Progetto Genoma Umano, dai progressi ottenuti nel campo della bioinformatica e dalle nuove e perfezionate tecnologie per la separazione e il riconoscimento delle proteine. Uno dei punti chiave è rappresentato dal monitoraggio delle modificazioni post-traduzionali che avvengono in molte proteine e che possono essere cruciali per la regolazione della loro funzione all'interno del tessuto; in effetti, il Progetto Genoma Umano ha identificato circa 25000 geni, mentre è stato stimato che il numero delle proteine circolanti è maggiore di un milione [1].

La placenta umana è un organo fondamentale e complesso che media il trasporto selettivo di soluti e gas tra la madre e il feto; si occupa anche della produzione di ormoni e altri fattori che sostengono la gravidanza e provvedono a formare una barriera protettiva contro il sistema immunitario materno. La placenta sfrutta un sistema ramificato di villi, i quali forniscono un'area superficiale elevata che permette un efficace scambio di sostanze tra il sangue materno e fetale.

Il proteoma della placenta umana, sia sana che malata, è ancora scarsamente noto; la maggior parte dei lavori concentrano la propria attenzione non tanto sul tessuto placentare tal quale, ma piuttosto sfruttano delle particolari linee cellulari con il compito di sostituirlo. Pertanto, l'analisi proteomica della placenta umana risulta essere un campo di indagine sconosciuto, ma sicuramente con un elevato potenziale per quando riguarda la scoperta di nuove conoscenze relative alla gravidanza e ai processi biochimici coinvolti; può anche essere un punto di partenza per la comprensione e lo studio a livello molecolare delle patologie che coinvolgono la madre e il feto e delle possibili future conseguenze sulla loro salute [2].

1.1 - Metodologie analitiche in proteomica

Negli ultimi anni la costante ricerca e l'avanzamento della tecnologia hanno permesso di continuare a migliorare la qualità dei dati ottenuti nel campo della genomica; tutto ciò ha portato alla determinazione delle sequenze di molti geni che compongono il DNA degli esseri viventi e ad un aumento continuo dei dati reperibili nei vari database. Lo sviluppo della genomica, a sua volta, ha aperto la strada ad un altro ramo relativo alla ricerca biomedica, ovvero la proteomica [3].

Per proteomica si intende l'approccio sperimentale che permette di decodificare le informazioni derivanti dalla genomica, identificando la proteina codificata dalla sequenza di un particolare gene e determinandone struttura, funzione e possibili modificazioni post-trasduzionali¹. Le proteine sono macromolecole complesse e senza dubbio sono tra i più importanti composti biologici presenti nell'organismo; le loro funzioni sono altrettanto notevoli e uniche: possono fungere da enzimi, recettori, anticorpi, ormoni, sono coinvolte nel meccanismo di espressione dei geni, nel trasporto e nello stoccaggio di piccole molecole. Quando si prende in considerazione una cellula o un'unità sub-cellulare, un tessuto, od un organo, è possibile definirne il proteoma, ovvero l'insieme completo di tutte le proteine che sono espresse in quel particolare sito relativamente a specifiche condizioni fisiologiche e ambientali. La proteomica è fondamentale perché la genetica e la genomica sono insufficienti a descrivere in modo esauriente i vari processi biologici. La genomica, di fatto, è un sistema statico e risulta identico in ogni cellula o organismo, tenendo naturalmente in considerazione le possibili variazioni inter-specie; il proteoma, invece, è altamente dinamico poiché il tipo di proteina, la sua abbondanza, la sua localizzazione all'interno di un tessuto, il tipo e la quantità di modificazioni post-trasduzionali, dipendono fortemente dall'ambiente e dallo stato fisiologico in cui si vengono a trovare le cellule. Ad esempio, è giustificato supporre che il profilo proteico di una cellula sana non corrisponda esattamente con il proteoma di una cellula che si trova coinvolta in qualche stato patologico. Così, si può dire che mentre la genomica fornisce informazioni limitatamente alla sequenza di un gene, la proteomica è in grado di fornire un'immagine più dettagliata della realtà poiché considera non solo la proteina che deriva da un certo gene, ma anche le sue modificazioni dovute all'interazione con la matrice biologica in cui è espressa.

¹ Una modificazione post traduzionale è la modificazione chimica di una proteina in seguito alla sua traduzione; alcuni residui amminoacidici, infatti, possono essere modificati attraverso l'aggiunta di gruppi funzionali (acetile, fosfato, lipidici o glucidici), in modo da determinare la funzionalità complessiva della proteina stessa.

L'analisi proteomica è un campo molto vasto e solitamente viene suddiviso in tre sottoclassi: la proteomica di caratterizzazione che si occupa di definire le proteine presenti in una cellula, tessuto o fluido biologico; la proteomica differenziale che studia il tipo e la quantità di proteine che si trovano in uno stesso tessuto, ma in condizioni fisiologiche diverse; la proteomica funzionale il cui scopo è l'identificazione di un gruppo di proteine che svolgono la stessa funzione [4].

La spettrometria di massa ha un ruolo fondamentale nell'analisi del proteoma, e i recenti sviluppi ed innovazioni hanno permesso di ottenere dei dati migliori e più significativi; questa tecnica risulta molto veloce e sensibile, ed è possibile applicarla in campo biologico, dove le quantità di analita disponibili sono molto ridotte. Molto spesso l'analisi prevede anche un'iniziale fase di separazione e purificazione degli analiti con tecniche quali l'elettroforesi e la cromatografia liquida (HPLC), in alcuni casi interfacciate direttamente con lo spettrometro di massa. Anche l'elaborazione finale dei dati ottenuti è un punto essenziale in questo campo: vista la variabilità individuale che si presenta nei vari sistemi indagati (ad esempio quando si considera un gruppo di pazienti affetti da una certa patologia), un approccio statistico è fondamentale per interpretare l'enorme quantità di informazioni che sono fornite dall'analisi; queste ultime, inoltre, sono solitamente confrontate con i dati contenuti in vari database disponibili gratuitamente sul web, i quali permettono di identificare le proteine e semplificano la fase di interpretazione degli spettri.

L'analisi della sequenza amminoacidica di una proteina, che ne porta poi all'identificazione, osserva solitamente un protocollo ben determinato, di seguito riportato e schematizzato in Figura 1:

1. omogeneizzazione del campione biologico (che può essere un tessuto, un fluido biologico, un microrganismo oppure una coltura cellulare) con un opportuno buffer di lisi;
2. separazione della proteina (o delle proteine) target usando una tecnica HPLC oppure sfruttando l'SDS-PAGE (elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecil-solfato) mono o bidimensionale. Questo punto può essere preceduto o seguito da una fase di purificazione e arricchimento per concentrazione della proteina (es. utilizzando Zip-tip o membrane ad ultrafiltrazione);
3. determinazione, quando possibile, del peso molecolare della proteina tal quale;
4. digestione della proteina con enzimi specifici, in modo da ottenere i corrispondenti peptidi;
5. misurazione della massa di tutti i peptidi;

6. determinazione della sequenza amminoacidica dei peptidi ottenuti dalla digestione enzimatica attraverso esperimenti di spettrometria di massa tandem (MS/MS);
7. i punti 3, 5, 6 possono essere seguiti dal confronto dei dati ottenuti con dei database per l'identificazione della proteina.

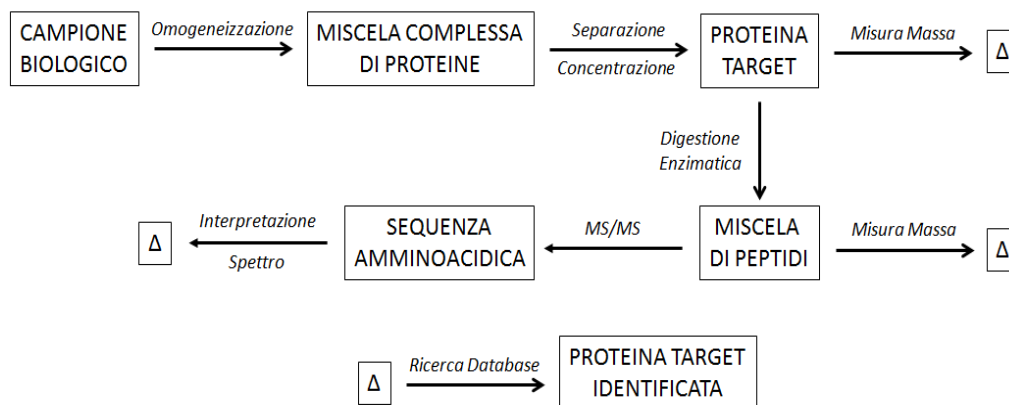


Figura 1: Protocollo generalizzato per l'identificazione delle proteine.

1.1.1 - Tecniche di separazione e purificazione delle proteine

Il processo che porta all'identificazione delle proteine inizia con la loro estrazione e separazione dal campione biologico di interesse. Il campione di tessuto è solitamente omogeneizzato in presenza di un buffer di lisi adeguato che contiene un agente denaturante e una sostanza riducente; a volte si possono utilizzare anche degli inibitori per gli enzimi proteolitici. Si deve considerare che il lisato derivante dall'omogeneizzazione di cellule intere può contenere delle proteine in bassa concentrazione, che non vengono rivelate. Può quindi essere necessario un arricchimento per concentrazione, oppure un frazionamento della cellula nei vari organelli di cui è composta (membrana nucleare, mitocondri, citoplasma, etc.); ciò è possibile attraverso una serie di centrifugazioni in gradiente di densità dell'omogenato cellulare, che permettono di separare gli organelli in funzione della loro massa e densità. Il frazionamento sub-cellulare è in grado di fornire maggiori informazioni sul proteoma di un tessuto rispetto a quelle che si possono ottenere dall'analisi dell'omogenato tal quale. Altrimenti, per massimizzare il numero delle proteine identificabili, si può ricorrere ad una fase di pre-frazionamento e concentrazione utilizzando, ad esempio, l'elettroforesi [5].

La separazione delle macromolecole, quali le proteine, ottenibile grazie ad un campo elettrico è detta elettroforesi. Uno dei metodi più usati per la separazione delle proteine è l'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecil-solfato (SDS-

PAGE); la procedura prevede l'uso di un gel di poliacrilammide come mezzo di supporto e di sodio dodecil-solfato (SDS) come agente denaturante; la configurazione più utilizzata è quella proposta da U. K. Laemmli, che per primo ha impiegato la SDS-PAGE in uno studio scientifico.

Il sodio dodecil-solfato è un detergente anionico che si lega alle proteine mediante la sua porzione idrofobica e ne degrada sia la struttura secondaria che quella terziaria, mentre non è in grado di rompere i legami disolfuro. Ogni molecola di SDS possiede una carica negativa; per ogni milligrammo di proteina si legano circa 1.4 mg di tensioattivo, ovvero una molecola di SDS ogni circa due amminoacidi. L'elevata forza di repulsione che le cariche negative esercitano tra loro fa sì che la catena polipeptidica diventi lineare; l'elevata carica conferita dall'SDS rende trascurabile la carica propria della proteina. Dato che l'SDS si lega con la stessa stechiometria a tutte le proteine, il rapporto massa/carica è costante per qualsiasi catena polipeptidica; questo fa sì che la mobilità elettroforetica della proteina denaturata in una matrice a porosità controllata (gel di poliacrilammide), a seguito dell'applicazione di una differenza di potenziale che genera un campo elettrico, sia maggiore per proteine con basso peso molecolare poiché il loro ingombro sterico è minore e possono muoversi più velocemente. Le molecole denaturate con sodio dodecil-solfato sono fortemente attratte verso l'anodo, ovvero verso l'elettrodo carico positivamente (Figura 2). La separazione finale ottenuta dipende essenzialmente dalle differenti masse molecolari relative; in un gel uniforme la migrazione relativa (R_f) di una proteina (distanza percorsa dalla molecola in funzione dell'intervallo di tempo e del potenziale applicato) è proporzionale al logaritmo decimale della sua massa. Se più proteine con massa nota sono fatte correre simultaneamente con proteine sconosciute, la massa di quest'ultime è ricavabile da un grafico R_f vs $\log(\text{massa})$ [6].

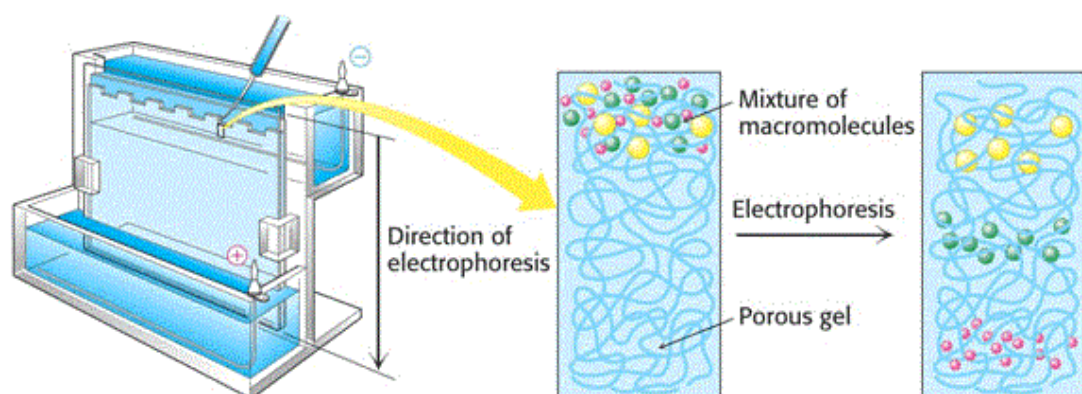


Figura 2: Separazione delle proteine mediante SDS-PAGE monodimensionale.

Per evidenziare le proteine immobilizzate sul gel elettroforetico si possono usare varie tecniche di colorazione. Altre procedure, come la *Western blotting* e l'elettroforesi bidimensionale, possono essere impiegate per rivelare proteine in bassa concentrazione, per separare le isoforme di una stessa proteina e per determinare alcune possibili modificazioni post-trasduzionali [7].

L'elettroforesi bidimensionale è una tecnica robusta per separare una miscela complessa di proteine, derivanti da un campione biologico. Il processo prevede due fasi distinte, ognuna della quali sfrutta delle proprietà caratteristiche della proteina per ottenere la separazione. La separazione relativa alla prima dimensione è eseguita in modalità di focalizzazione isoelettrica (IEF), per cui le proteine sono differenziate grazie ad un gradiente di pH e ad un campo elettrico opportuno, in base al valore del loro punto isoelettrico; la seconda dimensione, invece, separa le proteine in base al loro peso molecolare, ovvero usando un'SDS-PAGE. Questa serie di separazioni ortogonali è in grado di differenziare in un unico esperimento le centinaia di proteine contenute in una miscela complessa, per fornire come risultato un'immagine a due dimensioni (Figura 3).

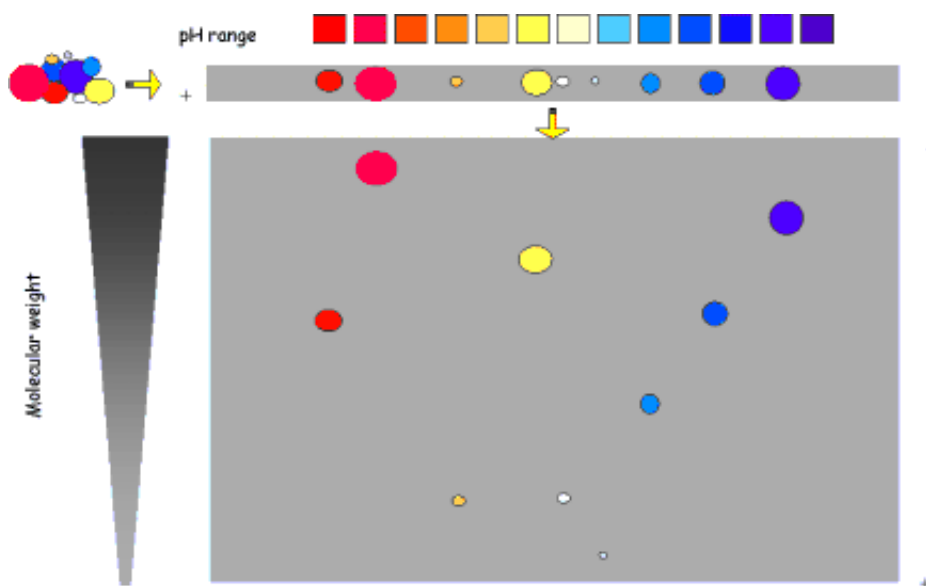


Figura 3: Elettroforesi 2D.

Per eseguire correttamente un'elettroforesi bidimensionale si devono seguire le seguenti operazioni:

1. per la separazione sulla prima dimensione, il campione contenente le proteine, addizionato con degli opportuni anfotoli che fungono da carrier, è caricato su un supporto con immobilizzato un gel a gradiente di pH. I supporti sono disponibili con vari gradienti di pH, anche piuttosto ristretti per migliorare la separazione.

- Applicando un opportuno potenziale elettrico al supporto si ha la separazione delle proteine in base al loro punto isoelettrico;
2. i supporti sono successivamente equilibrati con un tampone Tris-SDS contenente un agente riducente (ditiotreitolo o 2-mercaptoetanololo) e un agente alchilante (iodoacetamide);
 3. i supporti processati sono posti su una piastra di poliacrilammide contenente SDS; applicando un opportuno potenziale si esegue la seconda separazione in base al peso molecolare delle specie;
 4. se le proteine devono essere successivamente digerite e analizzate con uno spettrometro di massa, possono essere visualizzate colorando la lastra di gel con del *Brilliant Blue G* (Figura 4), altrimenti si può ricorrere a dei coloranti fluorescenti o alla tecnica *silver staining*;
 5. una volta effettuata la colorazione, gli spot evidenziati sul gel possono essere ritagliati, digeriti secondo un opportuno protocollo e analizzati con lo spettrometro di massa.

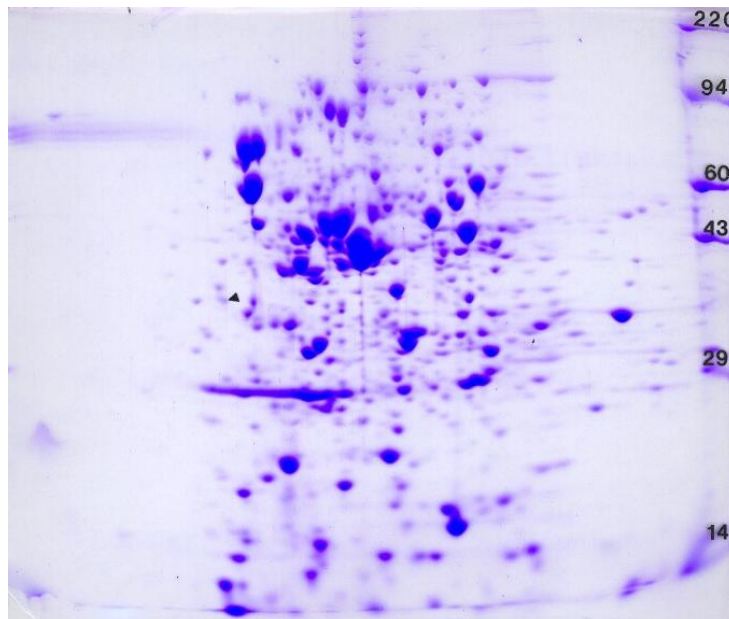


Figura 4: 2D-elettroforesi con colorazione al *Brilliant Blue G*.

L'elettroforesi bidimensionale, quindi, è utile per separare le molte proteine espresse in una cellula o in un tessuto, ma sebbene sia una tecnica molto usata, possiede molte limitazioni. Prima di tutto richiede un lavoro non indifferente (l'ottenimento di risultati validi, per un solo campione, può richiedere anche un'intera settimana per la messa a punto del metodo) e non può essere automatizzata. La tecnica, inoltre, non è adatta per processare contemporaneamente proteine molto piccole o

molto grandi, ed in modo analogo è difficile separare proteine troppo acide o troppo basiche; anche la solubilità limitata delle proteine idrofobiche è un problema. In aggiunta a tutto questo, la metodica risulta complicata ed è molto difficile ottenere dei dati riproducibili, anche operando con la massima cura e attenzione [8].

Per superare le limitazioni dell'elettroforesi sono stati sviluppati altri approcci che prevedono una separazione cromatografica in fase liquida. Questi metodi vedono la combinazione della cromatografia in fase inversa, a scambio ionico, ad esclusione dimensionale, del cromatofocusing (CF) o dell'elettroforesi capillare, al fine di ottenere una separazione bidimensionale di una miscela complessa di proteine o peptidi. Una delle applicazioni più usate prevede l'uso del CF per la separazione nella prima dimensione e una colonna a fase inversa per la seconda dimensione. Il CF è una tecnica di separazione in fase liquida, la quale permette di frazionare le proteine sulla base del loro punto isoelettrico: una colonna a scambio ionico, con adeguate proprietà tamponanti, è equilibrata con un tampone avente un pH elevato; successivamente, dopo l'introduzione del campione, la colonna è eluita con un tampone a pH più basso, che permette di generare un gradiente di pH all'interno della colonna. Le proteine con un alto valore di pI si muovono velocemente all'interno della colonna e quindi hanno un tempo di ritenzione minore delle proteine con un basso valore di pI, le quali sono mantenute all'interno della colonna per un intervallo di tempo maggiore. Le proteine, pertanto, sono eluite ad un valore di pH prossimo a quello del loro pI nella prima dimensione, e successivamente sono nuovamente frazionate in una colonna a fase inversa, in base alle loro caratteristiche idrofobiche.

Questi nuovi approcci, ed in particolare quello descritto, forniscono una separazione migliore, più veloce e più riproducibile rispetto a quella ottenibile con l'elettroforesi bidimensionale. Tuttavia, il costo della strumentazione necessaria è molto elevato e quindi queste metodologie risultano ancora poco diffuse ed utilizzate.

Per quando riguarda la purificazione e la concentrazione degli estratti proteici ottenuti, vi sono essenzialmente due possibili alternative: l'estrazione in fase solida con l'ausilio dei puntali Zip-Tip® e i dispositivi di ultra-filtrazione; è possibile usare anche altri metodi, come ad esempio la dialisi, che però non sono presi in considerazione in questa trattazione.

I puntali Zip-Tip® sono dei semplici puntali per micropipetta (Figura 5) contenenti sulla punta una piccola quantità di resina C-18 o C-4; essi permettono di desalinizzare, concentrare e purificare l'analita di interesse. La resina C-18 è adatta per trattare soluzioni acquose contenenti peptidi o proteine con peso molecolare inferiore

ai 50kDa, mentre la resina C-4 si presta ad essere impiegata per soluzioni acquose contenenti proteine con peso molecolare compreso tra i 3kDa e i 100kDa. Sono disponibili anche delle resine cationiche che permettono di concentrare e purificare i peptidi contenuti in un solvente organico o in una soluzione con tensioattivi. Il loro utilizzo è molto semplice e la procedura da eseguire è molto veloce.



Figura 5: Puntale Zip-Tip®.

I dispositivi di ultracentrifugazione (filtri di *cut-off* - Figura 6) sono costituiti da apposite membrane che permettono il passaggio di piccole molecole come l'acqua e i sali, e trattengono le specie con un peso molecolare maggiore ai 1000 Da; anche questi sistemi permettono di concentrare e purificare il campione in un solo passaggio. Nel particolare caso delle proteine, i filtri di *cut-off* rimuovono efficacemente i buffer utilizzati negli stadi precedenti permettendo di eseguire l'analisi allo spettrometro di massa e di ottenere degli spettri dove il rapporto segnale/rumore è maggiore rispetto a quello dello stesso analita non purificato.



Figura 6: Filtri di *cut-off*.

1.1.2 - La spettrometria di massa nello studio del proteoma

La spettrometria di massa ricopre un ruolo fondamentale nello studio delle proteine; questo è stato possibile grazie all'introduzione di due tecniche di ionizzazione molto sensibili che permettono di analizzare molecole ad alto peso molecolare, quali la ionizzazione elettro-spray (ESI) e la ionizzazione per desorbimento laser assistita da

matrice (MALDI). Oggi, grazie a queste tecniche, è possibile determinare in modo routinario la sequenza amminoacidica di peptidi, la massa di proteine intere, peptidi e complessi proteici, verificare se la struttura primaria di una proteina coincide con quella codificata nel DNA e identificare le possibili modificazioni post-trasduzionali [9].

Attualmente, la proteomica basata sulla spettrometria di massa ricorre a due principali approcci sperimentali: la *bottom-up proteomics* e la *top-down proteomics*. Entrambi i metodi permettono di riconoscere le proteine presenti in un campione biologico, percorrendo però, due strade diverse: il primo approccio prevede che la proteina tal quale sia digerita con degli enzimi specifici e identificata basandosi sull'insieme dei peptidi prodotti dalla digestione (*peptide mass fingerprint* - PMF), mentre il secondo approccio prevede il riconoscimento della proteina basandosi esclusivamente sul peso molecolare [10].

Bottom-up proteomics

Questa strategia permette l'identificazione proteica basandosi sulle informazioni derivanti dalla massa o dalla sequenza amminoacidica dei peptidi che si generano a seguito della digestione della proteina con un opportuno agente. La tecnica si basa sull'assunzione che proteine generanti la stessa mappa peptidica, sono caratterizzate dalla stessa struttura primaria e quindi coincidono; con questo approccio è possibile confrontare la sequenza di una proteina con quella di un particolare gene, verificare la sequenza di proteine costruite artificialmente, valutare le strutture proteiche di ordine superiore, chiarire le interazioni non covalenti tra proteine e riconoscere eventuali modificazioni post-trasduzionali.

Esistono essenzialmente due metodi per ottenere una mappa peptidica da una proteina tal quale. Il primo prevede l'utilizzo di reagenti chimici opportuni che idrolizzano i legami peptidici situati su residui amminoacidici specifici. Una delle procedure più frequenti è la reazione tra una proteina e bromuro di cianogeno (CNBr) in ambiente acido, che provoca la rottura del legame ammidico sul C-terminale di un residuo di metionina; il processo converte la metionina in omoserina, la quale a sua volta riarrangia per formare un lattone con un difetto di massa pari a 48.2 Da rispetto al residuo di metionina (Figura 7).

Altri reagenti che si possono usare sono l'N-cloro-succinimide e l'N-bromo succinimide, sempre in ambiente acido; queste due sostanze reagiscono specificamente con il legame ammidico sul C-terminale di un residuo di triptofano.

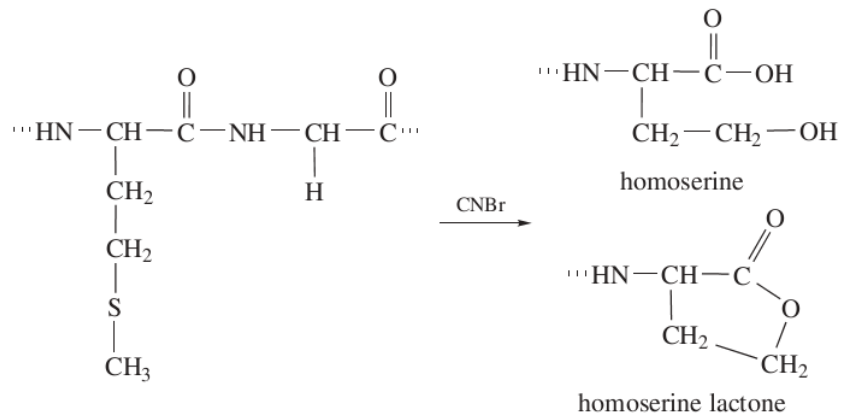


Figura 7: Idrolisi del legame peptidico con bromuro di cianogeno.

L'utilizzo di sostanze chimiche per provocare la rottura di un legame peptidico ha degli svantaggi, tra i quali la tossicità importante di questi reagenti e la produzione di pochi peptidi aventi massa elevata; solitamente, quindi, si ricorre ad un altro metodo, che prevede l'uso delle endoproteasi (Tabella 1), ovvero di enzimi in grado di degradare la proteina fornendo una mappa peptidica riproducibile. La tripsina è solitamente l'enzima più utilizzato perché è utile per la maggior parte delle applicazioni, è economico e genera peptidi composti mediamente da 8-10 amminoacidi; questa proteasi rompe il legame ammidico sul C-terminale di un residuo di lisina o arginina e produce dei peptidi che contengono un residuo basico sul C-terminale; ciò è utile quando si eseguono delle analisi in ESI, ed agevola il successivo eventuale sequenziamento con spettrometria di massa tandem. Si possono anche utilizzare altri enzimi come l'endoproteasi Lys-C, l'endoproteasi Arg-C e l'endoproteasi Glu-C, specifiche per la rottura del legame ammidico sul C-terminale rispettivamente di residui di lisina, arginina e acido glutammico; questi sono utilizzati nel caso sia necessario avere peptidi composti da un numero di amminoacidi maggiore, ma hanno lo svantaggio di produrre molti peptidi dovuti all'auto-proteolisi. L'endoproteasi Asp-N, invece, è specifica per la rottura del legame ammidico sull'N-terminale di un residuo di acido aspartico, ma è molto costosa e quindi è utilizzata solamente di rado. Un altro enzima che rompe il legame ammidico sull'N-terminale è la termolisina, la quale risulta specifica per uno spettro piuttosto ampio di residui, tra cui leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina e triptofano. La digestione enzimatica richiede che siano rispettate alcune condizioni sperimentali tali da simulare l'ambiente fisiologico nel quale solitamente queste endoproteasi svolgono il loro lavoro: è necessario mantenere un pH corretto e costante attraverso l'uso di tamponi specifici, si deve operare ad una temperatura di circa 37°C e l'ambiente deve essere denaturante, al fine di rompere i ponti disolfuro e permettere all'enzima di avere accesso a tutta la catena

amminoacidica. La scelta del giusto tampone è spesso di vitale importanza nella successiva analisi allo spettrometro di massa, in particolare per ottenere degli spettri con un rapporto segnale/rumore elevato. E' preferibile l'uso di tamponi "volatili" come il carbonato d'ammonio ed il bicarbonato d'ammonio, che permettono di mantenere un pH compreso tra 7.0 e 8.5 e che sono facilmente rimovibili per liofilizzazione; sono da evitare, invece, composti ionici non volatili, e se ciò non fosse possibile, essi devono essere necessariamente rimossi prima dell'analisi allo spettrometro di massa, ad esempio attraverso un'estrazione in fase solida usando microcolonne a fase inversa. Una digestione adeguata della proteina richiede solitamente dalle 10 alle 16 ore di incubazione ed è arrestata aggiungendo alla miscela di reazione una soluzione acquosa acida (solitamente si usa acido trifluoroacetico poiché tale reagente è poi utilizzato nella preparazione del campione per l'analisi MALDI). In letteratura si possono trovare anche dei protocolli per la digestione delle proteine separate con l'ausilio dell'elettroforesi e quindi immobilizzate nel gel di corsa (*in-gel digestion*); la procedura è molto simile a quella per la digestione delle proteine tal quali vista in precedenza, ed in più prevede la purificazione del gel elettroforetico da eventuali contaminanti che potrebbero anche in questo caso interagire negativamente con la successiva analisi spettrometrica [4].

Tabella 1: Enzimi e condizioni di digestione.

Cleaving Agent	Specificity	Digestion Conditions [buffer; pH; temperature (°C)]
Chemical agents		
Cyanogen bromide	Met-X	70% TFA
N-Chlorosuccinimide	Trp-X	50% acetic acid
N-Bromosuccinimide	Trp-X	50% acetic acid
Highly specific proteases		
Trypsin	Arg-X, Lys-X	50 mM NH ₄ HCO ₃ ; 8.5; 37
Endoproteinase Glu-C	Glu-X	50 mM NH ₄ HCO ₃ ; 7.6; 37
Endoproteinase Arg-C	Arg-X	50 mM NH ₄ HCO ₃ ; 8.0; 37
Endoproteinase Lys-C	Lys-X	50 mM NH ₄ HCO ₃ ; 8.5; 37
Endoproteinase Asp-N	X-Asp	50 mM NH ₄ HCO ₃ ; 7.6; 37
Nonspecific proteases		
Chymotrypsin	Phe-X, Tyr-X, Trp-X, Leu-X	50 mM NH ₄ HCO ₃ ; 8.5; 37
Thermolysin	X-Phe, X-Leu, X-Ile, X-Met, X-Val, X-Ala	50 mM NH ₄ HCO ₃ ; 8.5; 37
Pepsin	Phe-X, Tyr-X, Trp-X, Leu-X, Met-X	0.01 M HCl; 2.0; 37
Elastasase	Broad specificity	50 mM NH ₄ HCO ₃ ; -; 37

La determinazione del peso molecolare e della sequenza amminoacidica dei peptidi prodotti dalla digestione è effettuata mediante spettrometria di massa ESI o

MALDI. L'ESI è solitamente accoppiata ad un sistema HPLC, il quale permette la separazione dei peptidi prima che questi siano rivelati dallo spettrometro; ciò è particolarmente utile quando oltre al peso molecolare si è interessati anche alla sequenza amminoacidica: una volta che la tecnica cromatografica ha separato i vari peptidi, questi sono sequenziati grazie ad esperimenti di massa/massa. L'analisi con lo spettrometro MALDI consente di analizzare il peso molecolare di tutti i peptidi senza separarli precedentemente, ma richiede una fase di preparazione del campione, che deve essere solubilizzato in una matrice, depositato sul porta campioni e successivamente cristallizzato. La tecnica di deposizione più comunemente usata è la *dried-doplet*, mentre come matrice si possono utilizzare delle soluzioni sature di acido 2,5-didrossibenzoico oppure di acido α -ciano-4-idrossicinnammico; la cristallizzazione avviene direttamente sul porta campioni grazie all'evaporazione del solvente a temperatura ambiente. A seguito della ionizzazione MALDI è possibile eseguire degli esperimenti di massa/massa (*Collision-Induced Dissociation* - CID) per il sequenziamento dei peptidi, in questo caso senza ricorrere all'ausilio dell'HPLC. La possibilità di eseguire esperimenti MS/MS è molto utile qualora si vogliano studiare le modificazioni post-trasduzionali della struttura primaria di una proteina; in linea di principio è possibile capire qual è l'amminoacido modificato ed anche identificare il tipo di variazione [11].

La *bottom-up proteomics*, quindi, permette di identificare una proteina in modo semplice e veloce basandosi sulla mappa peptidica ottenuta a seguito di una digestione enzimatica. Tuttavia, un limite non trascurabile di questo approccio è la qualità dei risultati, che dipende molto dalla purezza della proteina trattata; inoltre, il metodo non è adeguato qualora si vogliano identificare più proteine contenute in un'unica miscela, se queste non vengono prima fisicamente separate le une dalle altre.

Top-down proteomics

Questo approccio sperimentale per la determinazione del proteoma consiste nell'analisi delle proteine intatte, ovvero senza ricorrere ad una digestione enzimatica. Il riconoscimento avviene misurando la massa della proteina attraverso uno spettrometro di massa ad alta risoluzione, e confrontando il valore ottenuto con i dati reperibili nei database; l'identità può anche essere confermata sfruttando la spettrometria di massa tandem in modo da ottenere dei frammenti specifici della proteina intatta o delle sequenze amminoacidiche, tali da poter essere comparate a loro volta con i dati di letteratura. Analogamente alla *bottom-up proteomics*, la ionizzazione delle proteine nello spettrometro di massa avviene con sorgenti ESI o MALDI, cioè con

tecniche “soft” che non degradano pesantemente la molecola di partenza. Nella *top-down proteomics*, però, risulta fondamentale l'aspetto della risoluzione strumentale, e quindi sono importanti i miglioramenti che si sono ottenuti nel campo degli analizzatori di massa. L'FTICR e l'*Orbitrap* sono al momento gli strumenti commerciali con risoluzione maggiore; sono stati sviluppati anche strumenti ibridi, più semplici da usare, ma comunque in grado di fornire risoluzione e accuratezza sufficiente. Uno di questi è il Q-TOF, che consiste in un ibrido tra un quadrupolo e un analizzatore di massa a tempo di volo; questa strumentazione permette di avere un potere risolvete di 30k, accuratezza di massa inferiore ai 3 ppm e una rapida velocità di scansione.

Con la *top-down proteomics* è possibile rivelare alcune modificazioni post-trasduzionali, ma solamente nel caso di molecole con un peso molecolare relativamente basso, dell'ordine di qualche decina di kDa.

Un'applicazione più interessante, invece, è lo studio dei complessi proteici, in particolare la determinazione della struttura e delle interazioni tra le proteine che li compongono. Le tecniche di ionizzazione MALDI ed ESI sono adatte a questo scopo, ma è necessario individuare un solvente che non interferisca con la struttura e le interazioni tra le molecole del complesso; ciò è rilevante soprattutto nello studio dei complessi proteici situati nella membrana cellulare, i quali a seguito dell'estrazione con un opportuno solvente (es. cloroformio/acqua in proporzione 2:1) tendono a precipitare, e non si ridisciolgono nei solventi più polari adatti all'analisi spettrometrica.

La *top-down proteomics*, pertanto, risulta una tecnica veloce e utile per la mappatura delle proteine contenute in un campione biologico; uno dei principali vantaggi è che attraverso un'unica analisi allo spettrometro di massa si possono rivelare tutte le specie di massa inferiore a circa 100 kDa. A volte è comunque necessaria una fase preliminare di concentrazione e purificazione dell'omogenato, al fine di identificare anche le proteine presenti in concentrazione molto bassa; per le specie con peso molecolare maggiore di 100 kDa, invece, si deve ricorrere ad una separazione iniziale seguita da digestione enzimatica, poiché gli spettrometri attualmente in commercio faticano a rivelare significativamente specie con peso molecolare elevato contenute in una matrice complessa; ad esempio, per quanto riguarda gli spettrometri MALDI-TOF, le proteine di un omogenato sono rivelate efficacemente fino a circa 60-70 kDa, dopodiché i segnali risultano poco intensi e con una risoluzione insufficiente per procedere al riconoscimento. Si sottolinea, inoltre, che l'analisi diretta al MALDI di miscele complesse di proteine, comporta due aspetti indesiderati: il primo riguarda i fenomeni di *ion suppression* dovuti alla diversa resa di

ionizzazione di proteine differenti; il secondo, invece, è relativo al limitato intervallo dinamico caratteristico della tecnica (dell'ordine di 10^3), che non permette di ottenere segnali validi per proteine presenti in basse concentrazioni [12].

Al fine di superare le limitazioni intrinseche dei due approcci appena descritti, negli ultimi anni è stata proposta la *middle-down proteomics*. Quest'ultima prevede una rottura limitata dei legami ammidici delle proteine al fine di ottenere peptidi con un numero maggiore di amminoacidi (>20) rispetto a quelli prodotti nella *bottom-up proteomics*. Si prosegue poi con la determinazione della sequenza amminoacidica, la quale può fornire informazioni sulle isoforme e sulle modificazioni post-trasduzionali. Inoltre, in contrasto con la *top-down proteomics*, che prevede esclusivamente l'analisi delle proteine intatte, i peptidi considerati nella *middle-down proteomics* sono più facili da maneggiare, ionizzare e frammentare. Questi peptidi, aventi un peso molecolare caratteristico di circa 5-10 kDa, possono essere generati attraverso una digestione enzimatica della proteina tal quale, oppure attraverso l'uso di reagenti chimici quali il bromuro di cianogeno. L'ultimo passo, come per tutti gli altri approcci visti finora, è il confronto dei dati sperimentali con quelli di letteratura, per l'identificazione delle proteine.

1.1.3 - Interpretazione dei dati e ricerca nei database

Il passo finale dell'analisi del proteoma consiste nel confrontare i dati ottenuti dagli spettri di massa e MS/MS con quelli contenuti nei database disponibili e accessibili via web. Le ricerche possono essere condotte su una serie piuttosto ampia di database, molti dei quali mettono in relazione i risultati derivanti dall'approccio proteomico con i dati relativi alla genomica. Le informazioni che si possono reperire vanno ben oltre la semplice sequenza amminoacidica e comprendono collegamenti con altri database, riferimenti bibliografici, indicazioni sulla funzione della proteina identificata, possibili modificazioni post-trasduzionali e mutazioni che si possono incontrare. In molti casi si può anche risalire ai tessuti dove la proteina è espressa e alle patologie associate. Le banche dati riassunte nella Tabella 2 sono curate da gruppi di ricerca indipendenti e sono accessibili gratuitamente attraverso Internet; esse contengono liste complete di proteine e nucleotidi e sono continuamente aggiornate. La scelta del database più opportuno dipende essenzialmente dalle caratteristiche della ricerca che si sta compiendo; sono in genere da preferire quelli contenenti un numero maggiore di sequenze, un numero esiguo di errori e ripetizioni, ed una quantità adeguata di riferimenti bibliografici [13].

In Appendice si può trovare una descrizione dettagliata delle caratteristiche dei principali database e una semplice guida per l'utilizzo dei software on-line.

Tabella 2: Database consultabili gratuitamente.

Database	Type	Internet Address	Institution ^a
GenBank	Nucleotide	www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html	NCBI
EMBL	Nucleotide	www.embl-heidelberg.de/services/index.html	EMBL
NCBI	Nucleotide	www.ncbi.nlm.nih.gov	NCBI
GenPept	Protein	www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html	NCBI
Swiss-Prot	Protein	www.ebi.ac.uk/swissprot/	EBI
TrEMBL	Protein	www.expasy.ch	
PIR	Protein	www.pir.georgetown.edu/pirwww/pirhome.html	NBRF
OWL	Protein	www.leeds.ac.uk/bmb/owl/owl.html	
IPI	Protein	www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html	EBI
dbEST	Expressed-sequence tag	www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html	NCBI

^a NCBI, National Center for Biotechnology Information; EMBL, European Molecular Biotechnology Laboratory; EBI, European Bioinformatics Institute; and NBRF, National Biomedical Research Foundation.

1.1.4 - Valutazione delle tecniche identificative in proteomica

Le tecniche di indagine e identificazione delle proteine descritte finora sono quelle utilizzate al giorno d'oggi nel campo della proteomica; in letteratura si possono reperire una vasta gamma di pubblicazioni che sfruttano questi metodi, ma molte volte la semplicità con cui sono descritte le varie procedure e l'importanza e l'eccezionalità dei risultati ottenuti celano la complessità nell'applicare in modo adeguato ed efficace queste tecniche e la difficoltà nel validare e interpretare le informazioni che se ne possono ricavare. Non meno rilevante, inoltre, è il fatto che queste metodologie presentano delle lacune difficilmente colmabili che possono limitare enormemente le ricerche in questo campo.

Prima di proseguire con la valutazione delle tecniche descritte è necessario sottolineare la complessità e la mediocre stabilità dei campioni che vengono trattati durante le analisi. Le matrici biologiche sono estremamente complesse in quanto contengono un numero elevatissimo di specie chimiche, molte delle quali sono presenti in concentrazione talmente bassa da non poter essere rivelate con la strumentazione attualmente disponibile, mentre altre interferiscono al momento dell'analisi portando a risultati poco soddisfacenti. I campioni biologici, inoltre, sono soggetti ad una veloce degradazione e richiedono di essere conservati in condizioni di bassa temperatura (solitamente i tessuti sono mantenuti a -80°C) e in contenitori o imballi adeguati che

permettano di mantenere la morfologia dell'organo o del tessuto e di isolarlo sufficientemente dall'aria (in condizioni di bassa temperatura i tessuti liofilizzano in breve tempo). Per superare questi problemi si può ricorrere alle tecniche di separazione, purificazione e concentrazione del campione, il quale deve comunque essere gestito adeguatamente, evitando di esporlo per lungo tempo a condizioni di temperatura troppo elevate. Inoltre, bisogna considerare la possibilità che il campione possa essere alterato in modo più o meno marcato dai reagenti usati o dai vari trattamenti eseguiti.

La *bottom-up proteomics* è un approccio valido e semplice quando si ha come unico scopo lo studio di un'unica proteina sufficientemente purificata e delle sue possibili modificazioni. I risultati iniziano ad essere scadenti quando si tenta di lavorare anche solo con due proteine non separate, mentre è del tutto impossibile ottenere risultati attendibili da miscele contenenti un numero maggiore di specie. Questa tecnica, quindi, richiede che il campione sia efficacemente purificato e che le proteine siano separate; ciò provoca inevitabilmente un aumento della complessità e del tempo necessario per eseguire l'analisi. Ad esempio, nel caso si decidesse di utilizzare l'elettroforesi, la preparazione del gel e la messa appunto delle condizioni ottimali di processo, quali la concentrazione del campione e i parametri strumentali, possono richiedere diversi giorni di lavoro anche per un operatore esperto.

La *top-down proteomics* sembrerebbe essere un approccio sostanzialmente più veloce e immediato per lo studio di un campione complesso, ma i risultati che si ottengono non sono altrettanto affidabili: basarsi esclusivamente sul peso molecolare di una proteina per effettuare il riconoscimento può essere una scelta alquanto contestabile, sebbene permetta di fare delle ipotesi. Inoltre, il peso molecolare di una proteina può variare di qualche decina di unità di m/z tra i vari soggetti considerati, perché ci può essere qualche mutazione della sequenza amminoacidica o la modificazione di qualche residuo, non necessariamente riconducibile ad un particolare stato patologico. Va anche notato che la determinazione delle modificazioni post-trasduzionali è alquanto difficoltosa poiché le variazioni di massa ricercate sono relativamente piccole rispetto alla massa della proteina. Pertanto sono sicuramente necessari ulteriori dati, come ad esempio spettri MS/MS, che comunque sono difficilmente ottenibili da proteine intere.

Anche la ricerca nei database presenta qualche difficoltà, in particolare il problema maggiore è che nella banca dati non sono sempre presenti informazioni sulla proteina che si sta cercando; i dati che oggi sono disponibili e ai quali è possibile accedere ricoprono solamente una parte del grande assortimento di proteine che si

possono trovare negli esseri viventi. Naturalmente i database si arricchiscono costantemente e con il tempo diventano sempre più completi e affidabili.

Per quanto riguarda i software per l'analisi degli spettri MS/MS e delle mappe peptidiche, il punto essenziale è essere in grado di gestire e interpretare correttamente i risultati che essi forniscono. Tecnicamente, i difetti più limitanti sono la mancanza di un'adeguata e semplice interfaccia grafica, e l'assenza di un formato unico per l'inserimento dei dati o dei file relativi agli spettri di massa. L'interfaccia grafica è un fattore limitante poiché gli utilizzatori finali di questi software non sono solitamente degli esperti informatici; molto spesso, inoltre, non sono nemmeno presenti delle guide chiare per il loro utilizzo. Ciò limita enormemente le potenzialità di queste applicazioni, oltre ad ostacolare l'interpretazione corretta dei dati e la reperibilità delle informazioni disponibili. Ultimamente in rete si possono trovare dei software commerciali con un'interfaccia più familiare per l'utente, ma sono venduti a prezzi molto elevati.

Pur con tutte le limitazioni viste finora, queste tecniche hanno permesso e tuttora permettono di ottenere dati sul proteoma. L'ideale sarebbe trovare un metodo che accomuni le caratteristiche positive della *bottom-up* e della *top-down proteomics*, che non richieda tempi lunghi di purificazione e concentrazione del campione o che perlomeno permetta di automatizzarli.

1.2 - Diabete mellito e gravidanza

Il diabete mellito è una grave patologia endocrina che colpisce in modo sempre più frequente la popolazione mondiale. Si stima che nella sola Europa ci siano più di 25 milioni di casi, che corrispondono a circa il 7.5% della popolazione, di età uguale o superiore ai 20 anni; in Italia, la percentuale di individui affetti da tale patologia è mediamente del 5% e circa il 90% di questi sono affetti da diabete mellito di tipo 2. L'aumento dei casi di diabete mellito di tipo 2 è generalmente attribuito a fattori quali l'obesità, lo stile di vita sedentario e una dieta poco salutare. In molti Paesi dell'Unione Europea si riscontra che più di metà della popolazione adulta è in sovrappeso e il 20-30% è obesa; l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stimato che nei prossimi 20 anni i casi di diabete aumenteranno di circa il 21% nella sola Europa, mentre nei Paesi in via di sviluppo la popolazione diabetica potrà aumentare anche dell'80% rispetto alla condizione attuale.

Il diabete mellito provoca una serie di disturbi metabolici accomunati dal fatto di presentare una persistente instabilità del livello glicemico del sangue, passando da condizioni di iperglicemia, più frequente, a condizioni di ipoglicemia. A livello bio-

molecolare, il primo effetto che si osserva a causa di un'alta concentrazione di glucosio nei fluidi biologici è la glicazione non enzimatica delle proteine, cioè la reazione tra il glucosio ed i gruppi amminici terminali della proteina o i gruppi amminici in posizione ϵ dei residui di lisina. La reazione, inizialmente studiata da Maillard, porta alla formazione di proteine glicate; lo zucchero legato può a sua volta subire dei processi di ossidazione o disidratazione, e i prodotti che si formano possono staccarsi dalla proteina portando alla formazione di specie molto reattive denominate AGE (prodotti avanzati di glicazione). A loro volta, gli AGE possono interagire con altre proteine portando alla formazione di specie altrettanto reattive, le quali sono in grado di attivare i processi di cross-linking. Queste molecole, inoltre, possono interagire con dei recettori specifici inducendo le cellule a rispondere con una reazione infiammatoria che a sua volta può causare un danneggiamento del tessuto. I processi finora descritti sono considerati la causa primaria degli effetti a lungo termine del diabete relativamente al peggioramento delle condizioni di salute dei pazienti, dovute appunto agli ingenti danni tissutali che si verificano. Inoltre, le proteine modificate chimicamente dagli AGE mostrano un'attività biologica alterata e pertanto provocano la reazione dei macrofagi, i quali le incorporano e le digeriscono; i peptidi che si generano dalla digestione sono a loro volta molto reattivi e possono interagire con le lipoproteine del plasma (LDL), portando alla formazione delle placche arteriosclerotiche, provocare il cross-linking del collagene e causare modificazioni tissutali tali da provocare danni cronici a livello renale, epatico e oculare [14]. Il processo è schematizzato in Figura 8.

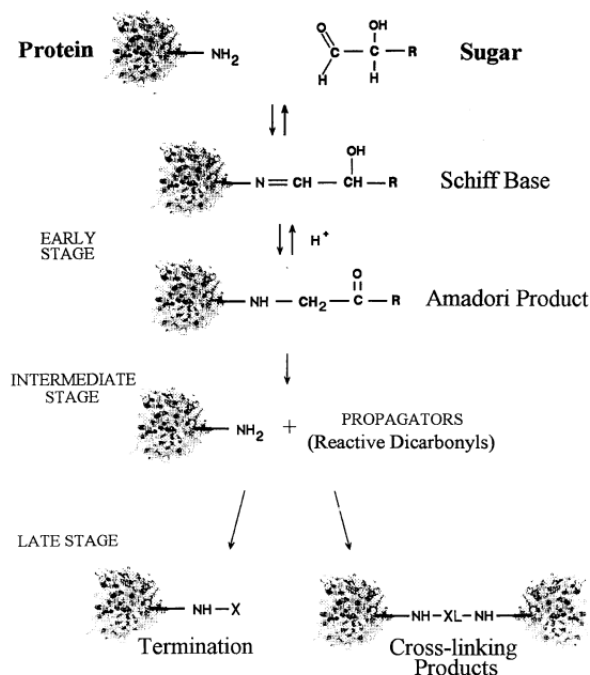


Figura 8: Schematizzazione del processo di glicazione proteica [15].

Sebbene nel corso degli anni siano state sviluppate varie procedure per monitorare i livelli di glucosio nel sangue e approcci terapeutici efficaci che hanno permesso di ridurre la mortalità e controllare gli effetti acuti della patologia (coma ipoglicemico, chetoacidosi, infezioni), le complicazioni a lungo termine (macroangiopatia, nefropatia, retinopatia, neuropatia) rimangono ancora molto diffuse e difficilmente trattabili. Oltre a causare una diminuzione della qualità di vita del malato, il diabete (e di conseguenza il trattamento della malattia e delle annesse possibili complicazioni) risulta essere un costo ingente per la sanità pubblica: nel 1998 si sono spesi, in solo otto paesi europei, ben 29 miliardi di Euro per il trattamento di 10 milioni di persone affette da diabete mellito di tipo 2, corrispondenti a più del 15% della spesa totale del piano sanitario.

1.2.1 - Diabete mellito gestazionale (GDM)

Le categorie di soggetti interessati al problema del diabete in gravidanza sono sostanzialmente due: le donne con diabete mellito preesistente, generalmente di tipo 1, e le pazienti alle quali il diabete è diagnosticato per la prima volta durante la maternità, denominato diabete mellito gestazionale (GDM).

Il diabete mellito gestazionale è definito come un'intolleranza ai carboidrati che causa iperglicemia di severità variabile e che viene identificato per la prima volta durante la gravidanza. La patologia è caratterizzata da una funzionalità ridotta delle cellule beta del pancreas, le quali non sono in grado di produrre l'insulina necessaria a soddisfare le necessità dell'organismo, spesso a causa di una resistenza dei tessuti all'insulina stessa [16].

Durante la gestazione, dopo ogni pasto, una complessa combinazione di ormoni (tra i quali l'insulina secreta dal pancreas, il glucagone e la somatomedina) assicura un apporto corretto di glucosio alla madre e al feto. La gravidanza, comunque, porta ad una modificazione del metabolismo della madre, in particolare:

- la madre tende ad avere dei periodi di ipoglicemia tra i pasti della giornata, in quanto il feto assorbe continuamente glucosio attraverso la placenta anche se l'organismo materno rimane a digiuno. La quantità di glucosio assorbita aumenta con l'avanzare della gravidanza;
- la quantità di ormoni steroidei e peptidici prodotti dalla placenta (estrogeni, progesterone, gonadotropina corionica) aumenta linearmente durante il secondo e terzo trimestre di gravidanza, causando una progressiva resistenza dei tessuti all'azione dell'insulina prodotta dalla madre;

- l'aumento progressivo della resistenza all'insulina da parte dell'organismo materno richiede un aumento della produzione di insulina da parte delle cellule pancreatiche (circa il doppio rispetto ad una condizione di normalità), in modo da mantenere l'euglicemia (livello normale di glucosio nel sangue). Se la quantità di insulina prodotta non è sufficiente, si incorre in una condizione di iperglicemia per la madre e per il feto, la cui gravità dipende dalla quantità di insulina in difetto non prodotta dal pancreas.

Nell'ultimo trimestre di gravidanza, inoltre, la richiesta di insulina da parte dei tessuti è particolarmente elevata poiché aumenta di molto la resistenza. Di conseguenza, le gestanti affette da GDM tendono a mostrare una resistenza all'insulina più marcata rispetto alle gravide sane; questo comporta un aumento dei livelli di glucosio nel sangue materno e fetale.

In alcuni casi, il GDM può derivare da una forma diabetica latente di origine monogenica o autoimmune. Altri pazienti, invece, presentano dei fattori di rischio che in caso di gravidanza possono aumentare le probabilità di sviluppare il GDM, come l'obesità (pazienti con indice di massa corporea $>30 \text{ kg/m}^2$), il diabete gestazionale nelle gravidanze precedenti, casi di diabete in famiglia, parti precedenti con nascita di bambini troppo grandi per l'età gestazionale (LGA), ovario policistico ed etnia (ci sono dei gruppi etnici che presentano una diffusione maggiore del diabete mellito, in particolare i sud asiatici e le popolazioni dell'America Centrale). Inoltre, una significativa percentuale di gestanti, compresa tra il 30% e il 50%, sviluppa il GDM pur non presentando nessun fattore di rischio [17].

1.2.2 - Rischi e complicazioni per il feto/bambino

La mortalità perinatale (ovvero dalla 29^a settimana di gestazione al 28° giorno dopo il parto) nelle gravidanze diabetiche è stata ridotta di trenta volte rispetto agli anni antecedenti il 1922, grazie alla scoperta dell'insulina e alle maggiori cure che vengono prestate alla madre e al feto durante la gestazione; inoltre, il miglioramento delle tecniche per mantenere l'euglicemia materna hanno portato alla riduzione delle nascite premature e dei casi di sindrome da distress respiratorio² (RDS). Nonostante ciò, la mortalità perinatale dei feti provenienti da madri diabetiche è doppia rispetto a quella osservata nei feti sani; le principali cause di morte sono ancora la nascita prematura, l'RDS e le malformazioni congenite.

² RDS: è un danno diffuso dei capillari alveolari, determinante grave insufficienza respiratoria con ipossiemia arteriosa, refrattaria alla somministrazione di ossigeno.

La macrosomia è uno dei maggiori problemi nelle gravidanze complicate da diabete, e si verifica con una frequenza compresa tra il 15 e il 45% dei casi; essa comporta che il feto al momento del parto abbia un peso superiore ai 4500 g, oppure che superi il 90° percentile del peso medio per l'età gestazionale. Un'eccessiva grandezza del feto può portare a lesioni importanti durante il parto, tra le quali la spalla distocica (difficoltà nel partorire il corpo del feto una volta espulsa la testa), asfissia e paralisi del plesso branchiale. La macrosomia, inoltre, aumenta la possibilità di parto cesareo.

Circa il 15-25% dei neonati partoriti da madri diabetiche, inoltre, si trovano in condizioni di ipoglicemia nei primi momenti di vita; questa complicazione, poco importante e meno comune nei bimbi le cui madri controllano il diabete con l'insulina, può causare al bambino attacchi epilettici, danni al cervello e coma.

Si nota anche un incremento dei casi di iperbilirubinemia (aumento eccessivo e non controllato della bilirubina³), di ipocalcemia (diminuzione del calcio ematico nell'individuo) e di policitemia (produzione abnorme di globuli rossi circolanti, risultante in un aumento di emoglobina e dell'ematocrito).

Le complicazioni a lungo termine per il bambino possono comprendere obesità, insorgenza di diabete mellito durante l'infanzia e di patologie cardiovascolari, funzionalità motoria ridotta, iperattività e disattenzione [18].

1.2.3 - Rischi e complicazioni per la madre

Le gravidanze complicate da diabete mellito sono soggette ad una serie di disturbi ostetrici che includono la chetoacidosi, preeclampsia, polidramnio (eccesso di liquido amniotico), disturbi nello sviluppo placentare e parti difficili.

La preeclampsia è un disturbo imprevedibile che causa un malfunzionamento precipitoso del sistema neurologico, renale e cardiovascolare della madre e che può avere come conseguenze l'ischemia placentare e il distacco parziale o totale della placenta. Questa patologia è dalle tre alle quattro volte più frequente nelle donne diabetiche non compensate, mentre le pazienti diabetiche che seguono una terapia adatta hanno le stesse probabilità di ammalarsi di un soggetto sano.

Le donne affette da GDM sono soggette a maggiori infezioni del tratto urinario, probabilmente a causa dell'aumento della quantità di glucosio nelle urine (glicosuria), la cui concentrazione è comunque elevata anche durante una gravidanza normale.

³ La bilirubina è un pigmento di colore giallo-rossastro, contenuto nella bile; si forma per l'80% dalla distruzione di globuli rossi senescenti e per il 20% dal catabolismo di emoproteine sieriche (mioglobina, citocromi, perossidasi, catalasi).

Anche al momento del parto si ha una maggiore probabilità che si verifichino dei problemi, in particolare nel caso di macrosomia del feto. Per evitare questo, il parto è solitamente programmato e indotto farmacologicamente al momento opportuno, ossia qualche settimana prima della data prevista per la nascita naturale; inoltre, per le pazienti diabetiche aumenta la probabilità di incorrere in un parto cesareo qualora il procedimento naturale risultasse pericoloso per la madre o per il feto.

Nel caso del GDM, la resistenza all'azione dell'insulina viene meno una volta avvenuto il parto, e quindi i livelli di glucosio nel sangue materno ritornano normali; per la paziente, tuttavia, la probabilità di sviluppare un diabete mellito di tipo 2 negli anni successivi al parto cresce del 10% rispetto ad una gestante sana [19].

1.2.4 - GDM: epidemiologia, diagnosi, trattamento e prevenzione

Negli Stati Uniti, le pazienti gestanti affette da GDM sono circa il 7% del totale delle donne in stato di gravidanza, mentre in Europa la percentuale dei casi varia dal 0.9 a 21%. Questo intervallo molto ampio conferma il fatto che nei vari Paesi europei si usano metodi e indici di riferimento differenti per la diagnosi del GDM, tantoché in alcuni Paesi tutte le donne gravide sono sottoposte al test, mentre in altri il test è eseguito solo sui soggetti che presentano un fattore di rischio. Pertanto, sebbene in Europa il diabete sia una delle maggiori minacce per la salute pubblica, non sono disponibili dei dati certi e confrontabili che permettano di stimare l'incidenza di questa patologia [20].

La diagnosi precoce del GDM è molto importante perché la terapia che ne consegue, se correttamente eseguita, riduce di molto le problematiche relative alla salute del feto e della madre. Se si adotta un approccio che prevede di esaminare tutte le donne in stato di gravidanza, sebbene non presentino i fattori di rischio, si ricorre al *glucose challenge test* (GCT) che deve essere eseguito tra la ventiquattresima e la ventottesima settimana di gestazione; se la paziente presenta uno dei fattori di rischio, invece, il GCT è eseguito già dopo le prime settimane di gestazione e nel caso fosse negativo è ripetuto all'inizio del terzo trimestre. Il GTC prevede la somministrazione per via orale di 50 g di glucosio, seguita dopo un'ora da un prelievo di sangue venoso e dalla determinazione del glucosio nel plasma. Un valore di glucosio superiore ai 130-140 mg/dL è considerato anomalo e pertanto si procede con un secondo test, il *glucose tolerance test* (GTT). La procedura prevede che alla paziente a digiuno siano somministrati per via orale 100 g di glucosio e che ne siano determinati i valori nel plasma ogni ora per tre ore; eventualmente si può eseguire un test della durata di due

ore somministrando 75 g di glucosio. I criteri diagnostici sono mostrati in Tabella 3; alla paziente è diagnosticato il GDM se due o più valori della concentrazione del glucosio nel sangue misurati in tempi diversi eccedono le soglie riportate. Secondo i nuovi suggerimenti diagnostici dell'ADA (*American Diabetes Association*), il GCT può essere evitato in tutti quei soggetti di età inferiore ai 25 anni e che non presentano nessuno dei fattori di rischio visti precedentemente [21].

Una volta avvenuta la diagnosi, è necessario controllare frequentemente i livelli glicemici al fine di ridurre la probabilità di complicanze durante la gravidanza. Il trattamento prevede una dieta equilibrata con pasti frequenti (almeno sei in 24 ore) e ricchi di fibre, possibilmente affiancata da un adeguato esercizio fisico; qualora questo non fosse sufficiente si deve ricorrere alla somministrazione dell'insulina.

Tabella 3: Valori limite del test GTT per la diagnosi del GDM.

	Venous Plasma Glucose Level*			
	100-g Glucose Load		75-g Glucose Load	
	mg/dL	mmol/L	mg/dL	mmol/L
Fasting value	95	5.3	95	5.3
1-hr value	180	10.0	180	10.0
2-hr value	155	8.6	155	8.6
3-hr value	140	7.8	—	—

*Test prerequisites: 1-hr, 50-g glucose challenge result >135 mg/dL; overnight fast of 8 to 14 hours; carbohydrate loading for 3 days, including >150 g carbohydrate; seated and not smoking during the test; two or more values must be met or exceeded; either a 2-hr (75-g glucose) or 3-hr (100-g glucose) test can be performed.

Visto il costante aumento dei casi e l'importanza del GDM, l'Unione Europea sta finanziando il progetto DALI (Vitamin D And Lifestyle Intervention for Gestational Diabetes Mellitus Prevention); si tratta di uno studio sull'epidemiologia della malattia con l'obbiettivo di migliorarne la pratica clinica per la diagnosi, il trattamento e la prevenzione.

1.3 - La placenta umana

La placenta è un vero e proprio organo che collega il feto in sviluppo con la parete uterina, al fine di permettere l'assorbimento dei nutrienti, l'eliminazione dei rifiuti e lo scambio di gas attraverso il sangue materno. Un'immagine schematizzata della placenta umana è riportata in Figura 9

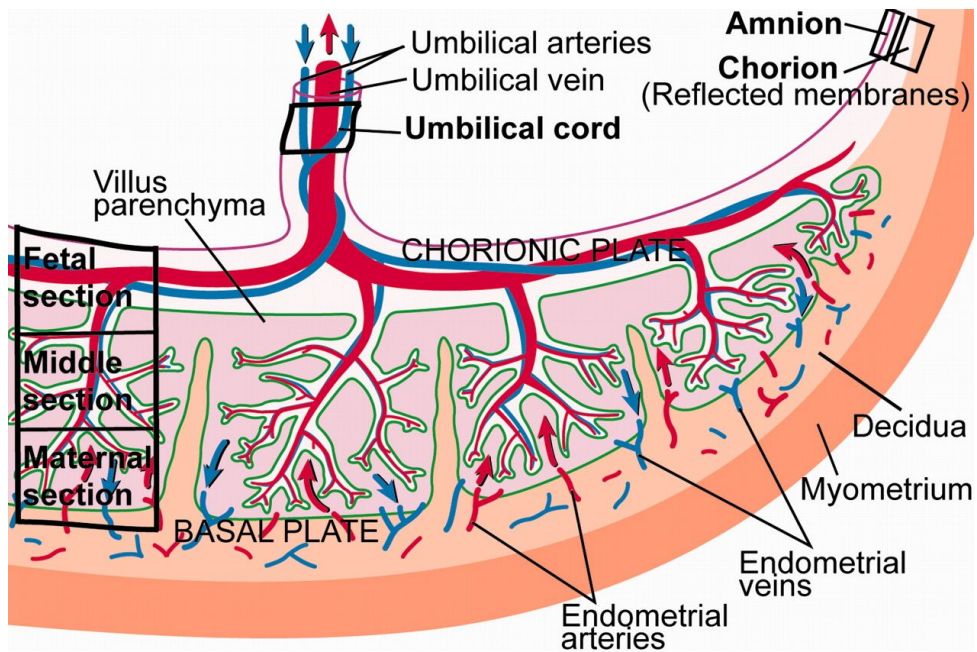


Figura 9: Schema anatomico della placenta umana.

Nella specie umana, la placenta misura mediamente 22 cm di diametro e 2-2.5 cm in spessore (lo spessore è massimo al centro e decresce nella zona periferica); il suo peso è approssimativamente di 500 g, ha una forma di disco ed è di colore rosso scuro. Il cordone ombelicale che collega il feto alla placenta misura 55-60 cm e contiene una vena e due arterie; questo si inserisce eccentricamente nella placenta a livello del piatto coriale. I vasi sanguigni si espandono su tutta la superficie della placenta e si dividono formando una fitta rete che termina con la formazione dei villi coriali; nella parte materna i villi sono raggruppati in lobi chiamati cotiledoni.

1.3.1 - Funzioni della placenta umana

La placenta permette lo scambio di sostanze per trasporto attivo o passivo tra la madre e il feto: l'ossigeno e i nutrienti sono portati dalla madre verso il feto, mentre l'anidride carbonica e i prodotti di rifiuto (urea, acido urico, creatinina) seguono il percorso inverso. Il trasporto attivo, inoltre, permette di mantenere concentrazioni molto diverse di alcune macromolecole tra la parte fetale e materna della barriera placentale. Quando si hanno delle gravidanze problematiche, ad esempio se la madre è diabetica o obesa, la quantità di nutrienti trasportati può aumentare portando ad una crescita eccessiva del feto, che comporta una serie di problemi non banali da affrontare sia durante la gestazione che al momento del parto [22].

La placenta umana permette anche lo scambio di anticorpi IgG e funge da barriera contro la trasmissione dei batteri, fornendo una protezione efficace al feto.

La placenta, inoltre, è in grado di secernere alcuni ormoni molto importanti durante la gravidanza. Il primo ormone prodotto è la gonadotropina corionica umana (hCG), che può essere trovato nel sangue e nelle urine materne già alcuni giorni dopo il concepimento (è tale ormone che viene rivelato nei test di gravidanza); l'hCG, inoltre, è responsabile della soppressione del sistema immunologico materno, il quale attaccherebbe la placenta e il feto in quanto corpi estranei. Un altro ormone prodotto in questo sito è l'ormone lattogeno placentare (hPL), coinvolto nella crescita delle ghiandole mammarie e nella regolazione dei livelli materni di glucosio, proteine e lipidi disponibili al feto. La placenta sintetizza anche estrogeno, che contribuisce allo sviluppo delle ghiandole mammarie in vista dell'allattamento e stimola l'allargamento dell'utero al fine di contenere il feto in crescita. Il progesterone, presente ad alti livelli durante la gravidanza, è necessario per il mantenimento dell'endometrio e per prevenire i parti prematuri, poiché riduce le contrazioni del miometrio [23].

Per ultimo, la placenta funge anche da riserva ematica per il feto, fornendo sangue in caso di ipotensione [24].

1.3.2 - Formazione e sviluppo della placenta

Il processo di formazione della placenta inizia già tre giorni dopo la fecondazione dell'ovulo, quando i trofoblasti (le cellule maggiormente presenti nella placenta) iniziano a produrre l'hCG. Dopo pochi giorni dal concepimento l'embrione si sviluppa in una blastocisti, ovvero una struttura sferica composta esternamente di trofoblasti e internamente da un gruppo di cellule denominate massa cellulare interna. Le cellule più interne si sviluppano per formare il feto, mentre lo strato più esterno porta alla formazione della placenta e delle membrane esterne. Nei giorni successivi i trofoblasti invadono la parete uterina dando inizio alla gravidanza. Nelle successive settimane, la placenta produce una serie di ormoni utili a controllare la fisiologia della madre, in modo che il feto sia rifornito con i nutrienti e l'ossigeno necessari per una corretta crescita.

L'impianto della blastocisti è regolato da una complessa interazione tra i trofoblasti e l'endometrio: i trofoblasti hanno una capacità invasiva notevole e se non fossero controllati potrebbero invadere tutto l'utero, mentre l'endometrio ha il compito di gestire e modulare la diffusione dei trofoblasti secernendo localmente delle sostanze regolatrici come le citochine e gli inibitori della proteasi. Una volta che la blastocisti si è attaccata con fermezza all'endometrio, il feto continua a crescere e ad espandersi, rimanendo però completamente separato dai tessuti e dal sangue materno grazie ad

uno strato di citotrofoblasti (trofoblasto mononucleato, precursore dei trofoblasti) e di sinciziotrofoblasti (trofoblasti polinucleati, responsabili dello scambio dei nutrienti e della produzione degli ormoni); questo è molto importante non solo per permettere un efficace scambio di nutrienti, ma in particolare per proteggere il feto dagli attacchi immunologici della madre.

Dopo due settimane di sviluppo, i trofoblasti sono in grado di penetrare i vasi sanguigni dell'endometrio, formando delle cavità riempite di sangue materno, che successivamente formano la parte materna della placenta in sviluppo [25]. Dopo tre settimane dal concepimento si notano le prime evidenze della circolazione fetale, ovvero i villi coriali in sviluppo. Alla quarta settimana di gestazione, sebbene il feto sia grande poco più di 2 cm, la struttura base della placenta matura è già stata delineata: si nota una circolazione sanguigna fetale, che termina in capillari ad anello, i villi coriali, i quali penetrano nello spazio intervilloso continuamente rifornito di sangue materno da arterie a forma di spirale e drenato dalle vene uterine. I villi coriali si sviluppano ulteriormente nelle successive settimane, formando una massa di tessuto coriale, ovvero la placenta; l'endometrio, invece, subisce la decidualizzazione, ossia si instaura un processo che vede l'aumento continuo del diametro delle arterie che trasportano il sangue materno alla placenta, permettendo di avere al termine della gravidanza un flusso di sangue arterioso pari a 600-700 mL/min.

Al raggiungimento della ventesima settimana gestazionale si ha la completa formazione della placenta, della membrana coriale o corion (è lo strato membranoso più esterno e in diretto contatto con l'utero, composto da trofoblasti e da matrice extracellulare), della membrana amniotica o amnion (è lo strato di membrana più interno, in diretto contatto con il liquido amniotico) e della decidua (identifica l'endometrio durante la gravidanza) [26].

1.3.3 - Circolazione sanguigna nella placenta

Uno schema della circolazione sanguigna nella placenta è riportato in Figura 10.

Il sangue fetale carico di anidride carbonica e prodotti di scarto raggiunge la placenta attraverso la vena contenuta nel cordone ombelicale; nella giunzione tra la placenta e il cordone ombelicale, i vasi sanguigni si diramano radialmente formando le vene coriali. Queste, a loro volta, si suddividono per originare i cotiledoni, che sono delle strutture a forma di albero rovesciato; ogni ramo di questo albero viene denominato villo coriale ed è caratterizzato da un'estesa rete di capillari arteriosi-venosi che permettono lo scambio direzionale di sostanze con la madre, senza

provocare il mescolamento tra il sangue materno e quello fetale. I villi coriali sono le vere e proprie unità funzionali della placenta poiché mediano l'assorbimento dei nutrienti, l'eliminazione dei rifiuti e generano quasi tutti gli ormoni necessari durante la gravidanza. La sezione trasversale di un villo coriale maturo è costituita centralmente di tessuto connettivo (mesenchima) che ingloba i capillari fetali circondati da uno strato di citotrofoblasti e sinciziotrofoblasti. Una volta che il sangue fetale è stato ossigenato e arricchito di sostanze nutritive, esso ritorna nel feto attraverso le arterie ombelicali.

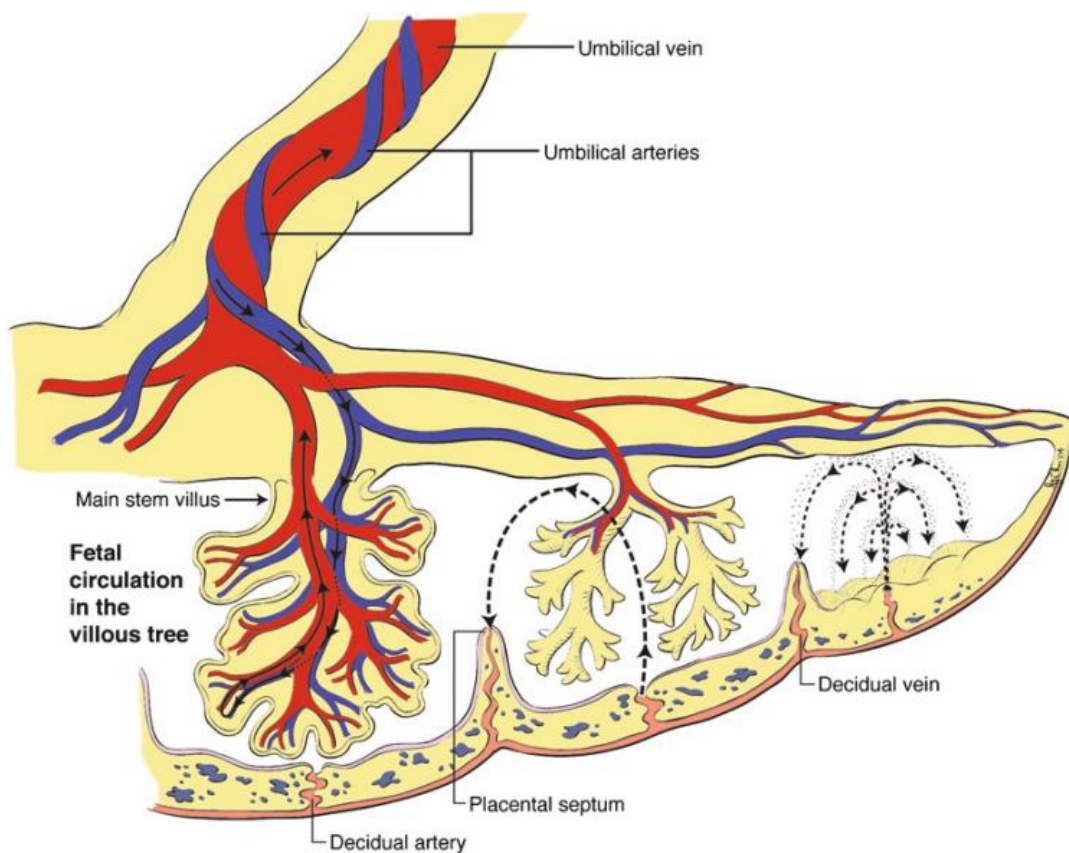


Figura 10: Circolazione del sangue nella placenta umana.

Il sangue materno, invece, è immesso nella placenta attraverso delle arterie a spirale presenti nell'utero; nel punto di contatto tra queste arterie e la placenta si nota un'apertura che consente di riversare copiosamente il sangue materno nello spazio intervilloso. Il sangue materno è successivamente drenato dalle vene uterine e reimpresso nella circolazione sanguigna materna. Verso il termine della gravidanza, per permettere un corretto sviluppo del feto e un efficace scambio di sostanze, circa il 35% del sangue materno si trova nello spazio intervilloso [27].

1.3.4 - Secondamento

Dopo la nascita del bambino, restano ancora nell'utero della donna i cosiddetti annessi fetali ossia placenta e sacco amniotico. La fase di espulsione è detta secondamento e può essere praticata con modalità attiva o passiva.

Attualmente è praticata la modalità attiva che comporta il taglio precoce del cordone, l'uso di farmaci per via endovenosa o intramuscolare (ossitocina) per favorire l'espulsione e manovre di trazione controllata del cordone e di "spremitura" dell'utero dall'esterno, in modo che premendo sulla pancia della madre e stimolando la contrazione dell'utero da una parte e tirando il cordone dall'altra, venga provocato il distacco e la fuoriuscita della placenta (detto anche parto della placenta). La pratica attiva accelera notevolmente i tempi del secondamento (circa 30 minuti), dato che per il processo naturale e spontaneo sono necessarie da una a due ore.

La modalità passiva comporta, invece, l'attesa del distacco fisiologico della placenta: il cordone ombelicale è lasciato integro, il bambino viene attaccato al seno o comunque posto accanto alla madre, non vengono somministrati farmaci e non si eseguono manovre di "spremitura", a meno che non sia necessario per la salute della madre o del bambino (ad esempio in caso di emorragia).

1.3.5 - La placenta diabetica

La placenta derivante da donne diabetiche può presentare delle anomalie; la gravità di quest'ultime dipende dal grado di controllo dei livelli glicemici durante la gravidanza.

La placenta di diabetiche poco controllate è allargata, più fine e presenta un eccesso di sangue ritenuto rispetto ad una placenta sana. Essa risulta anche più friabile, a causa di un decremento nel contenuto di collagene. Microscopicamente, la struttura dei villi può risultare immatura (con persistenza dello strato citotrofoblastico), allargata, presentare depositi di fibrina ed essere iper-vascularizzata.

Se il diabete è controllato e ben compensato, invece, il peso della placenta non è molto diverso da quello dell'organo sano e il tessuto villosa risulta microscopicamente inalterato [28].

2 - Scopo della tesi

Il presente lavoro di tesi ha lo scopo di identificare i possibili cambiamenti nel profilo proteico del tessuto placentare in funzione dello sviluppo del diabete gestazionale (GDM). Per questo scopo sono stati impiegati due approcci sperimentali, entrambi basati sulla spettrometria di massa.

Nel primo caso si è proceduto all'omogeneizzazione di placentate provenienti da madri diabetiche e da madri sane. È quindi seguita l'analisi diretta dell'omogenato con lo spettrometro MALDI, ed il riconoscimento dei segnali ottenuti grazie alla ricerca in database. Successivamente l'omogenato è stato analizzato con le tecniche tipiche della *bottom-up proteomics*. L'obiettivo di questa fase è la determinazione dell'effetto del GDM sul profilo proteico placentare

Nel secondo caso, invece, l'analisi delle proteine espresse nella placenta è avvenuta operando sul tessuto tal quale, al fine di determinare un metodo efficace e veloce che permetta il riconoscimento delle specie di interesse senza ricorrere a fasi di omogeneizzazione e separazione. In aggiunta, è stato messo a punto un protocollo di preparazione e analisi del campione tissutale per mezzo del MALDI *ion imaging*, per visualizzare la distribuzione spaziale delle proteine sul tessuto.

3 - Metodiche analitiche

Al fine di determinarne il profilo di espressione proteica, il tessuto placentare è stato analizzato per mezzo di uno spettrometro di massa MALDI-TOF/TOF; vista la complessità dei campioni biologici considerati, dovuta alle molte specie chimiche presenti, si è deciso di procedere alla separazione delle proteine utilizzando come approccio sperimentale l'elettroforesi monodimensionale verticale. Di seguito, si riporta una breve descrizione delle tecniche utilizzate.

3.1 - Metodologia estrattiva

L'elettroforesi monodimensionale verticale permette la separazione di proteine in un vasto intervallo di pesi molecolari, in modo efficace e riproducibile; tra le varie tecniche disponibili, in questo lavoro si è scelto di utilizzare l'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecil-solfato (SDS-PAGE), secondo la procedura descritta da Laemmli [29].

3.1.1 - Preparazione del gel

I gel di acrilammide utilizzati per l'SDS-PAGE sono composti di due strati distinti: lo strato inferiore, detto gel separatore o di risoluzione, ha il compito di separare le proteine in base al loro peso molecolare; lo strato superiore, invece, che contiene i pozzetti dove sarà depositato il campione, detto gel di impaccamento, è predisposto per comprimere e concentrare le molecole in uno spazio micrometrico prima del suo arrivo nel gel sottostante.

La concentrazione percentuale di acrilammide è una caratteristica fondamentale del gel e ne determina l'intervallo di pesi molecolari che possono essere separati efficacemente. Ad esempio, un gel con una composizione di acrilammide del 7% separa le proteine nell'intervallo di massa compreso tra i 45 e i 200 kDa; al crescere di tale percentuale è possibile risolvere efficacemente proteine con peso molecolare sempre minore, come ad esempio le varie catene di cui è composta l'emoglobina. Per analizzare l'intero profilo proteico di un tessuto, quindi, è necessario eseguire numerosi gel elettroforetici caratterizzati da una percentuale di acrilammide diversa.

La preparazione del gel inizia con l'assemblaggio dello stampo, caratterizzato da due pareti verticali di vetro distanziate di qualche millimetro per mezzo di uno spessore in teflon; la struttura deve essere montata accuratamente e fissata ad un supporto, che la mantiene in posizione verticale ed evita fuoriuscite di materiale. Il gel

inferiore è preparato per polimerizzazione *in situ* di una soluzione contenente acrilammide/bis-acrilammide, un tampone (solitamente Tris/HCl) e sodio dodecil-solfato (SDS); i reagenti vanno dosati in base alle caratteristiche del gel che si vuole ottenere. La polimerizzazione (Figura 11) è iniziata aggiungendo alla soluzione persolfato d'ammonio e TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenetilendiammina).

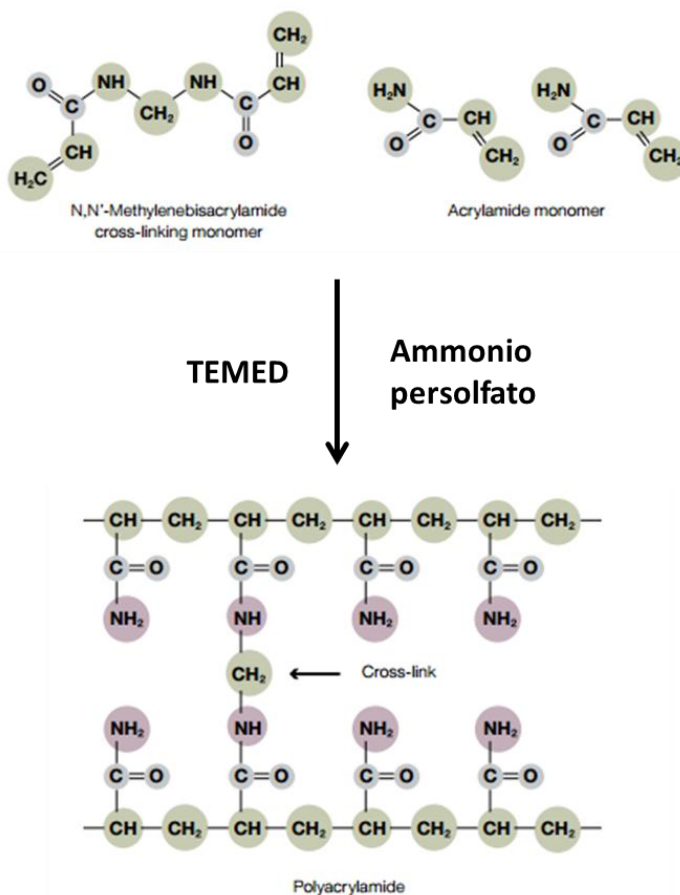


Figura 11: Polimerizzazione del gel.

La soluzione è quindi versata nello stampo e ricoperta con una soluzione di butanolo satura in acqua, usata per ottenere una superficie superiore liscia, livellata e idratata, che in seguito permette di ottenere bande perfettamente orizzontali e uniformi. La polimerizzazione deve avvenire in assenza di ossigeno e pertanto è necessario degassare la soluzione iniziale. Dopo circa 30 minuti si elimina la soluzione di butanolo/acqua e si procede con la costruzione dello strato superiore, modificando adeguatamente le quantità dei reagenti; una volta versata la soluzione si inserisce orizzontalmente un pettine per la formazione dei pozzetti dove poi sarà versato il campione [30]. Il set-up sperimentale e il gel a fine preparazione sono visualizzati in Figura 12.

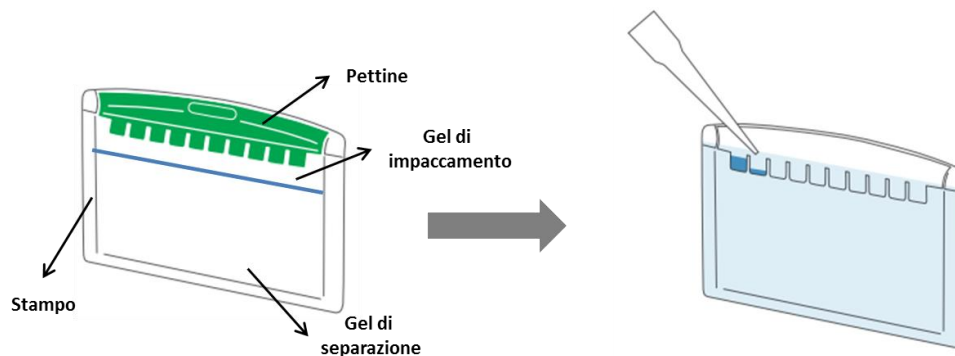


Figura 12: Preparazione del gel elettroforetico.

3.1.2 - Preparazione del campione

Le proteine in conformazione terziaria o quaternaria sono difficilmente separabili in modo riproducibile; per caratterizzare adeguatamente il campione è quindi indispensabile denaturarle completamente. L'entità della separazione dipende da molti fattori, tra i quali la temperatura, il tampone usato, il pH, la differenza di potenziale tra gli elettrodi, etc.

La denaturazione delle proteine si attua scaldando il campione e trattandolo con vari reagenti, tra cui l'SDS e il DTT. L'SDS è responsabile della degradazione della struttura secondaria e terziaria delle proteine: le molecole di SDS, cariche negativamente, si dispongono lungo la catena amminoacidica e la distendono grazie alla repulsione elettrostatica tra le cariche dello stesso segno (Figura 13).

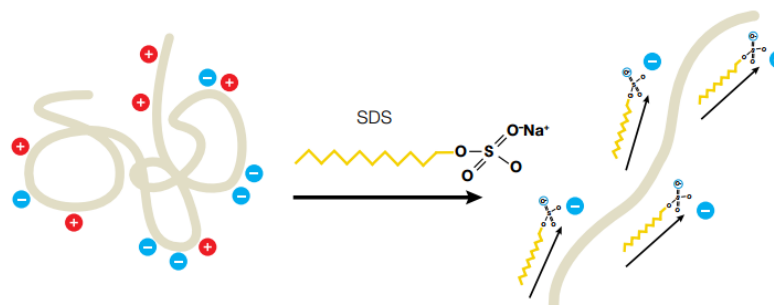


Figura 13: Denaturazione ad opera dell'SDS.

Il DTT è un forte agente riducente, necessario per la rottura dei ponti disolfuro che si formano tra i residui di cisteina (Figura 14). Per distruggere completamente la struttura terziaria e l'eventuale struttura quaternaria, la soluzione di campione è scaldata ad una temperatura superiore ai 60°C; il calore, inoltre, migliora l'azione delle molecole di SDS sulle porzioni più idrofobiche e nascoste della catena polipeptidica.

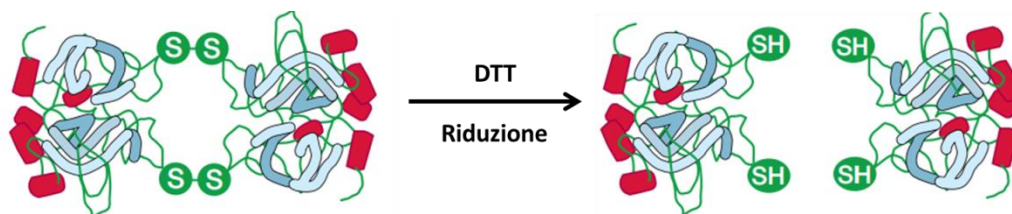


Figura 14: Riduzione con DTT.

Oltre ad SDS e DTT, sono normalmente aggiunti in questa fase altri composti chimici, quali l'EDTA, un tampone, il glicerolo ed un colorante. L'EDTA è usato come conservante, poiché chela i cationi bivalenti e riduce l'attività degli enzimi proteolitici, i quali richiedono ioni calcio e magnesio come cofattori. Il tampone, solitamente Tris/HCl, è necessario per mantenere un pH adeguato alla separazione e per rendere il processo maggiormente riproducibile. Il glicerolo aumenta la densità della soluzione di campione e favorisce l'impaccamento nel gel superiore. Infine, il colorante permette di determinare la fine della corsa elettroforetica; esso ha un basso peso molecolare, e solitamente è il blu di bromofenolo [31].

Il rapporto massa/carica e la mobilità relativa delle proteine possono essere influenzati anche da fattori diversi dal peso molecolare; in alcuni campioni, ad esempio, i reagenti usati non sono in grado di rimuovere dalla catena amminoacidica eventuali carboidrati o gruppi fosfato; a parità di peso molecolare, quindi, si ha un aumento del rapporto massa/carica. Oltre a questo, le proteine contengono amminoacidi basici o acidi che risultano carichi in funzione del pH e che, pur avendo la stessa affinità per le molecole di SDS, hanno pesi molecolari leggermente diversi. L'SDS-PAGE, quindi, fornisce dei risultati riproducibili, ma non permette di determinare accuratamente il peso molecolare delle proteine.

3.1.3 - Caricamento del campione e rivelazione delle proteine

Il gel di poliacrilammide è in grado di contenere una quantità limitata di proteine. All'inizio della corsa il campione deve essere caricato nei pozzetti nella giusta quantità, la quale è determinata per mezzo di prove sperimentali. Un eccesso di campione causa la precipitazione delle proteine, con conseguente produzione di macchie troppo allargate e sbavature; un difetto di campione, invece, consente di rilevare solamente le specie presenti in quantità maggiore. I risultati sono mostrati in Figura 15.

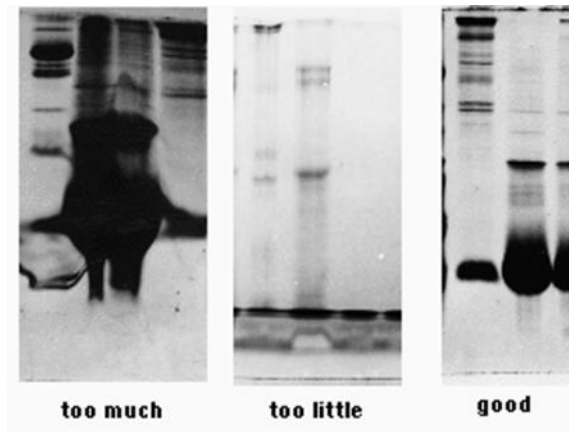


Figura 15: risultato della corsa elettroforetica in funzione della quantità iniziale di campione.

Una volta caricato il campione è possibile applicare il voltaggio agli elettrodi e iniziare la corsa elettroforetica. La differenza di potenziale utilizzata varia solitamente tra i 120 e i 160 V ed è scelta in modo da velocizzare al massimo la separazione delle specie senza provocare il surriscaldamento del gel. Si termina la corsa nel momento in cui il colorante (blu di bromofenolo) fuoriesce dalla parte inferiore del gel.

A questo punto si procede alla rimozione del gel dal supporto e alla rivelazione delle bande per colorazione (*staining*). Uno dei coloranti più utilizzati è il blu di Coomassie o *Brilliant Blue*, il quale si lega alle proteine formando un complesso dalla tipica colorazione blu [32].

Il Figura 16 si mostra schematicamente il risultato di un'elettroforesi sul gel di poliacrilammide.

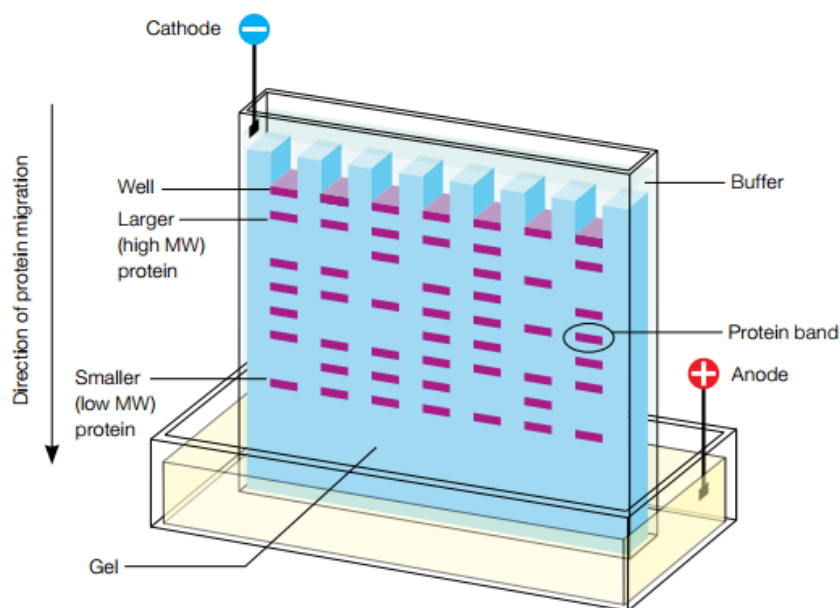


Figura 16: Schematizzazione di una separazione elettroforetica in gel di poliacrilammide.

3.2 - Spettrometria di massa MALDI TOF-TOF

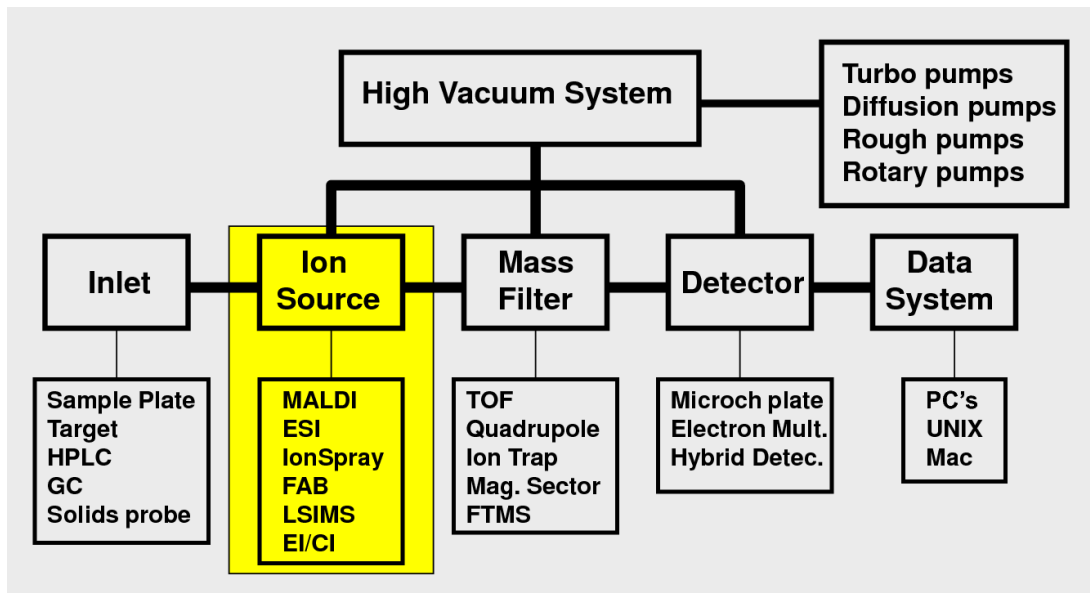


Figura 17: Schematizzazione di uno spettrometro di massa.

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che permette l'identificazione di sostanze sconosciute attraverso la misura del loro peso molecolare. Sebbene sul mercato siano presenti spettrometri di massa di vario tipo, lo schema base che li caratterizza è sempre lo stesso ed è rimasto inalterato nel tempo (Figura 17); esso prevede:

- un sistema di inserimento del campione in sorgente, il quale può essere immesso direttamente oppure provenire da un sistema di separazione quale un gas-cromatografo, HPLC, etc.;
- una sorgente di ionizzazione, che ha il compito di provvedere alla produzione degli ioni di analita in fase gassosa;
- un analizzatore di massa, il cui scopo è la separazione degli ioni prodotti in sorgente in base al loro rapporto m/z ;
- un rivelatore, che riceve la corrente ionica generata dagli ioni provenienti dall'analizzatore;
- un sistema di elaborazione e gestione dati, che si occupa della trasformazione del segnale analogico proveniente dall'analizzatore in un segnale digitale e della generazione e dell'immagazzinamento dello spettro di massa e dei dati relativi all'analisi. Questa parte, inoltre, è in grado di gestire tutte le parti dello strumento, permettendo il controllo e la modifica dei parametri di analisi.

- un sistema di pompaggio, che deve assicurare l'alto vuoto (10^{-5} - 10^{-8} torr) all'interno dello strumento al fine di permettere un'efficace trasmissione degli ioni.

Il sistema MALDI (Matrix-assisted laser desorption ionization) è una tecnica di ionizzazione introdotta intorno agli anni '80 da Tanaka (Nobel per la Chimica nel 2002 insieme a Fenn, inventore della ionizzazione elettro-spray) e a sua volta studiata da Karas e Hillenkamp. Essa permette la produzione di ioni integri (cioè non frammentati) in fase gas partendo da molecole grandi, non volatili e termicamente labili, come le proteine, gli oligonucleotidi, i polimeri e altri composti inorganici con peso molecolare elevato. Il metodo è caratterizzato da una preparazione semplice e veloce del campione e possiede una discreta tolleranza nei confronti della contaminazione da sali, tamponi e detergenti; con questo tipo di ionizzazione, inoltre, si ha la produzione di specie monocariche e quindi è possibile determinare direttamente la massa dell'analita. La ionizzazione si basa sul desorbimento, ad opera di un fascio laser, dell'analita incorporato in una matrice cristallizzata opportunamente; lo ione prodotto è inviato all'analizzatore a tempo di volo (TOF) che ne misura il rapporto massa su carica (m/z) in base al tempo impiegato per percorrere la distanza tra la sorgente e il rivelatore.

3.2.1 - Desorbimento e ionizzazione dell'analita

In una classica ionizzazione UV-MALDI, il campione è preparato mescolando una piccola quantità di soluzione di analita, solitamente circa 10^{-6} M, con una soluzione quasi satura di matrice (circa 0.1 M); una piccola quantità della soluzione ottenuta (circa 1 μ L) è depositata su un apposito supporto e lasciata cristallizzare per evaporazione del solvente prima di essere inserita nello spettrometro di massa. L'evaporazione del solvente provoca la formazione di cristalli di piccole dimensioni, da qualche micrometro fino a un centinaio di micrometri, la cui morfologia dipende essenzialmente dal tipo di matrice usata; il rapporto analita/matrice da preferire, invece, varia da 10^{-2} per le molecole di piccole dimensioni fino a 10^{-4} - 10^{-5} per proteine con peso molecolare elevato. Le matrici usate normalmente, a differenza di altri composti, hanno la proprietà di includere l'analita in modo omogeneo e quantitativo; inoltre, sembra che le molecole di analita incorporate nella matrice cristallina conservino la carica precedentemente posseduta in soluzione e pertanto mantengano intatta anche la loro sfera di solvatazione. Una volta che il campione è stato inserito nello strumento e si sono ottenute le adeguate condizioni di vuoto, esso è irradiato con

luce laser; a seguito dell'assorbimento della radiazione da parte del campione avvengono essenzialmente due processi, ovvero l'ablazione o desorbimento del cristallo e la ionizzazione dell'analita.

Una delle funzioni principali della matrice è l'assorbimento della radiazione laser al fine di trasferire energia all'analita; il processo è governato dalla legge di Beer, la quale afferma che si ha una diminuzione dell'intensità del fascio laser in modo esponenziale al prodotto tra il coefficiente di assorbimento della matrice (che deriva dal prodotto tra il coefficiente di assorbimento molare e la concentrazione molare della specie) e la profondità di penetrazione della radiazione elettromagnetica. Nel caso nell'UV-MALDI, al fine di avere un buon assorbimento della luce laser, si devono usare matrici che presentino un coefficiente di assorbimento molare elevato, ovvero molecole contenenti almeno un anello aromatico; anche la concentrazione della matrice è solitamente elevata in un campione MALDI, circa 10 M, grazie all'evaporazione del solvente per la formazione del cristallo. Come risultato si ottengono dei coefficienti di assorbimento molare nell'intervallo tra i $5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ e i $5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$. Pertanto, la profondità di penetrazione del fascio laser, cioè la distanza dalla superficie del cristallo alla quale si ha una diminuzione del 30% dell'intensità della radiazione elettromagnetica, varia tra i 20 e i 200 nm; grazie a questa piccola profondità di ablazione, un certo sito del cristallo contenente l'analita può essere irradiato più volte prima di essere consumato. La fluena della luce laser solitamente usata è dell'ordine dei 100 Jm^{-2} ; poiché la durata dell'impulso è circa pari a 2 ns, l'irradianza del laser sulla superficie del campione risulta solo di $10^7 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, insufficiente a far avvenire assorbimenti non lineari a due fotoni. In pratica, per un laser all'azoto che emette a 337 nm, ogni impulso provoca l'assorbimento da parte della matrice di circa 0.7 fotoni, che in fase solida corrispondono ad una densità di energia di eccitazione piuttosto elevata; questo fa sì che nel momento in cui avviene l'ablazione del campione, si abbia una vera e propria esplosione nella zona colpita dal laser. Sebbene non siano possibili assorbimenti non lineari, l'alta densità delle molecole eccitate può causare il fenomeno dell'*energy pooling*: due molecole eccitate e con orbitali sovrapposti, caratterizzate da uno stato elettronico S_1 , possono subire una redistribuzione di energia che porta una delle due molecole allo stato fondamentale S_0 e l'altra nello stato eccitato S_2 (Figura 18).

L'azione del laser sul cristallo, quindi, porta ad un trasferimento di energia, la quale può essere sfruttata per il desorbimento e la ionizzazione della matrice o dell'analita. Il rapido riscaldamento del campione ad opera del laser è anche in grado di dare origine ad un gradiente di pressione termoelastica, che provoca l'ablazione del volume di campione colpito e la formazione di una densa nube; quest'ultima si espande

alla velocità del suono, causando la dissipazione di una parte dell'energia trasferita dal laser.

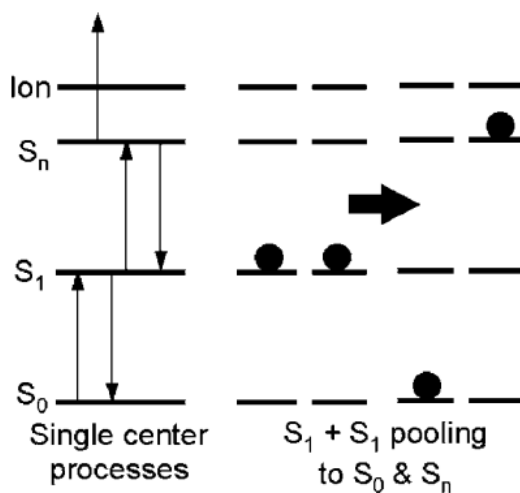


Figura 18: Schematizzazione del processo di *energy pooling*.

Il processo di ionizzazione relativo alla tecnica MALDI, che porta alla formazione di molecole cariche di analita e matrice, è molto complicato e non è ancora stato descritto completamente e in modo esaustivo. Uno dei fattori più importanti che intervengono è l'interazione tra la matrice e l'analita; su tale base sono stati proposti due modelli.

La prima teoria, proposta da Knochenmuss, assume che nel cristallo iniziale le molecole di analita e matrice siano neutre; a seguito dell'irraggiamento laser si ha la fotoionizzazione delle molecole di matrice, le quali a loro volta ionizzano l'analita attraverso delle reazioni ione-molecola in fase gas. Per un laser nell'UV, con una lunghezza d'onda di 337 nm e che quindi produce fotoni con un'energia pari a 3.6 eV, sono necessari almeno tre fotoni per la ionizzazione delle molecole di matrice, come mostrato in Tabella 4.

Tabella 4: Potenziali di ionizzazione delle matrici MALDI.

MATRICE	POTENZIALE DI IONIZZAZIONE [eV]
HCCA	8.50
DHB	9.43
Acido Sinapinico	7.72
Acido 3-idrossipicolinico	8.95
Acido Nicotinico	9.63

Come visto in precedenza, può avvenire il fenomeno dell'*energy pooling*: si può descrivere un meccanismo in cui una molecola di matrice, che si trova in uno stato elettronico eccitato S_n , interagisce con una a livello S_1 , al fine di ottenere una molecola di matrice con sufficiente energia per essere ionizzata a M^+ (Figura 19).

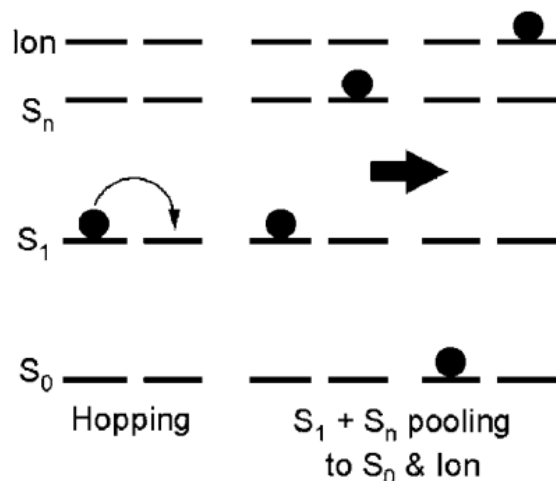
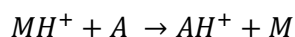


Figura 19: Processo di *energy pooling* per la ionizzazione della matrice.

Di fatto, usando una ionizzazione MALDI, è molto raro osservare la presenza di ioni M^+ , ma solitamente la matrice è rivelata in LDI (*Laser Desorption Ionization*) come ione MH^+ . Sebbene si possa pensare che questa specie si formi all'interno del reticolo cristallino, è più probabile che la sua origine sia dovuta a delle reazioni in fase gas a seguito del desorbimento del cristallo. Anche la ionizzazione dell'analita (A) avviene in fase gas, secondo la reazione:



La teoria più recente, denominata "*lucky survivor*" e proposta da Karas assume che l'analita sia incorporato nella matrice cristallina come una specie carica; questa ipotesi è supportata da uno studio che ha dimostrato come le molecole atte a fungere da indicatori di pH, conservino il colore e quindi la carica dopo la cocristallizzazione in matrici acide, neutre o basiche. A seguito del processo di ablazione, i cluster di cristallo che si formano subiscono la perdita di matrice neutra e di eventuale solvente di coordinazione, permettendo di liberare in fase gas l'analita ionizzato (Figura 20). La teoria è definita dei "sopravvissuti fortunati" poiché in fase gas possono avvenire dei processi che provocano la neutralizzazione di una parte degli ioni [33].

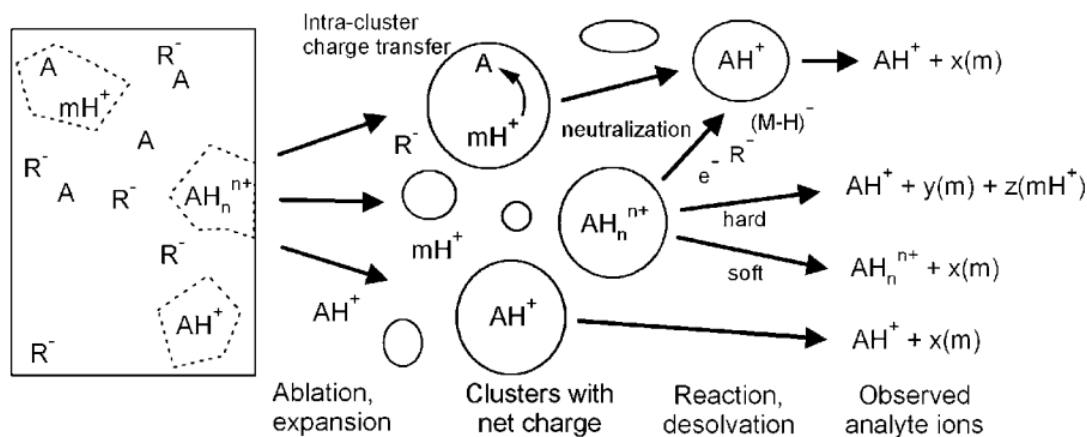


Figura 20: Processo di ionizzazione MALDI secondo la teoria di Karas.

Si sottolinea, comunque, che le due teorie esposte non sono del tutto soddisfacenti, poiché non sono in grado di spiegare correttamente tutti i dati sperimentali. La Figura 21, ad esempio, riporta schematicamente alcuni dati relativi alle popolazioni delle diverse specie che sono considerate dalla teoria di Knochenmuss: si nota che dopo circa 1 ns dall'irraggiamento laser si forma la popolazione di molecole di matrice eccitate S_1 , ma solo una piccola parte di esse porta alla formazione delle molecole nello stato S_n , le quali sono poi responsabili della formazione dello ione M^+ . Questo dato è in forte contrasto con i dati sperimentali, i quali mostrano come in un'analisi MALDI le rese ioniche siano piuttosto elevate.

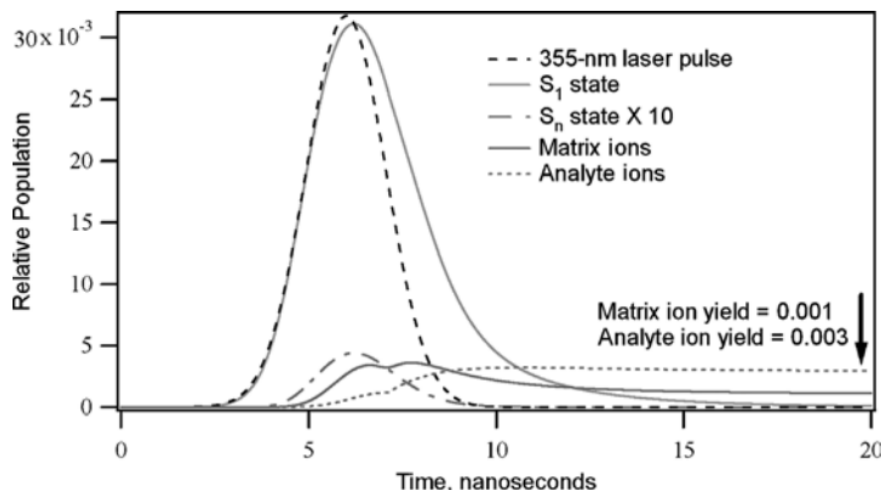
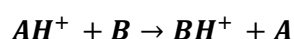
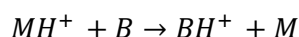
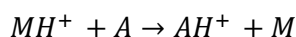


Figura 21: Eccitazione nel tempo delle molecole di matrice da parte del laser.

Oltre a considerare i processi di ionizzazione primaria visti finora, per descrivere completamente le vie di formazione degli ioni si devono studiare anche le reazioni di ionizzazione secondaria, che intervengono ad esempio se nei campioni analizzati al MALDI sono presenti più analiti; questa situazione si verifica molto frequentemente, ad esempio nell'analisi qualitativa di miscele di peptidi per il riconoscimento di una

proteina, oppure nella determinazione della concentrazione di una particolare specie in presenza di altre. In entrambi i casi, qualora siano presenti più specie ionizzabili, si deve valutare la competitività reciproca degli analiti nel reagire con la matrice carica, e la possibilità che una o più specie provochi la soppressione del segnale di altre. Può accadere, infatti, che oltre a reagire con la matrice, gli analiti reagiscano tra loro, provocando un trasferimento di carica:



Naturalmente, è favorita la formazione della specie ionica più stabile, la quale possiede anche un'intensità più elevata nello spettro. Il controllo dei processi secondari di reazione avviene attraverso la scelta dell'opportuna matrice, concentrazione del campione e intensità del laser; in ogni caso, se la reattività degli analiti è molto variabile, per avere una buona sensibilità per tutti è necessario cambiare di volta in volta le condizioni di ionizzazione, oppure pensare ad una fase di separazione delle specie prima dell'analisi al MALDI [34].

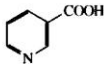
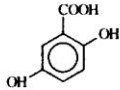
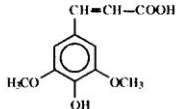
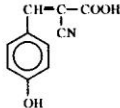
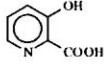
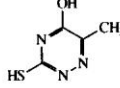
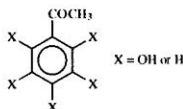
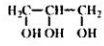
3.2.2 - Matrici e preparazione del campione

Sfortunatamente, non esiste un'unica matrice e un solo protocollo di preparazione del campione che sia adatto per tutti gli analiti e per tutte le analisi che si possono condurre con la tecnica MALDI. Una lista delle principali matrici che si possono usare e delle loro principali proprietà è riportata in Tabella 5. Si nota che per classi diverse di analiti sono disponibili varie matrici che permettono una buona ionizzazione del campione: ad esempio l'HCCA (acido α -ciano-4-idrossicinnammico) è usato coi peptidi, mentre l'acido sinapinico ed il DHB (acido 2,5-diidrossibenzoico) sono preferibili quando si lavora con proteine ad alto peso molecolare.

Le caratteristiche chimico fisiche di una matrice, che la rendono efficace in relazione al tipo di analita, non sono del tutto chiare; tuttavia, si conoscono delle proprietà che la matrice deve possedere:

- una banda di assorbimento in corrispondenza della frequenza del laser usato;
- inerzia chimica verso l'analita e capacità di agire da acido/base di Brønsted;
- solubilità nel solvente dell'analita e capacità di cocrystalizzarlo;
- bassa tensione di vapore per resistere all'alto vuoto della sorgente;
- capacità di non polimerizzare e di non formare addotti con le molecole di analita.

Tabella 5: Matrici MALDI usate più comunemente.

Matrix	Structure	Wavelength	Major applications
Nicotinic acid		UV 266 nm	Proteins, peptides, adduct formation
2,5-Dihydroxybenzoic acid (plus 10% 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid)		UV 337 nm, 353 nm	Proteins, peptides, carbohydrates, synthetic polymers
Sinapinic acid		UV 337 nm, 353 nm	Proteins, peptides
α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid		UV 337 nm, 353 nm	Peptides, fragmentation
3-Hydroxy-picolinic acid		UV 337 nm, 353 nm	Best for nucleic acids
6-Aza-2-thiothymine		UV 337 nm, 353 nm	Proteins, peptides, non-covalent complexes; near-neutral pH
k,m,n-Di(tri)hydroxy-acetophenone		UV 337 nm, 353 nm	Protein, peptides, non-covalent complexes; near-neutral pH
Succinic acid	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	IR 2.94 μm , 2.79 μm	Proteins, peptides
Glycerol		IR 2.94 μm , 2.79 μm	Proteins, peptides, liquid matrix

IR = infrared; UV = ultraviolet.

Come si nota dalla Tabella 5, le matrici più utilizzate nell'UV-MALDI sono degli acidi benzoici variamente sostituiti; la presenza nella struttura della molecola di un acido carbossilico legato ad un anello aromatico è ottimale in quanto:

- è in grado di donare protoni;
- assorbe la maggior parte dell'energia emessa dal laser, contribuendo al desorbimento degli analiti;
- ha una funzione fotoprotettrice dall'azione del laser.

La preparazione del campione per un'analisi MALDI è solitamente molto semplice e veloce ed è essenzialmente eseguita con le seguenti tre tecniche:

- *Dried droplet*: una soluzione satura di matrice (il solvente usato per la sua preparazione è di solito una soluzione 50:50 v/v di acqua/acetonitrile contenente lo 0.1% di TFA) è mescolata con una soluzione di analita a concentrazione nota. Una goccia della soluzione risultante è depositata sul supporto porta campioni e lasciata cristallizzare per evaporazione del solvente.

È la tecnica più semplice e maggiormente usata per robustezza e velocità di esecuzione;

- *Thin layer*: su un supporto è lasciata cristallizzare una goccia di soluzione satura di matrice solubilizzata in acetone, su cui successivamente è depositata una quantità di soluzione di analita a titolo noto contenente lo 0.1% di TFA;
- *Sandwich*: la preparazione è identica alla tecnica *thin layer* e prevede la successiva aggiunta di un quantitativo di matrice dopo la cristallizzazione.

Un punto critico dell'analisi MALDI è rappresentato dal fatto che il rapporto molare analita/matrice non è omogeneo nel cristallo di campione depositato sul supporto. Ad esempio, quando si studiano le proteine, il rapporto 1:10⁴ è quello della soluzione originaria, ma non è mantenuto nel campione allo stato solido a causa del diverso prodotto di solubilità della matrice e dell'analita nel solvente usato. I cristalli che si formano, pertanto, non possono essere considerati omogenei poiché sono caratterizzati da zone più favorevoli all'analisi (*hot spot*), e da zone meno interessanti. Negli *hot spot* il rapporto molare analita/matrice è costante ma ignoto, e lì è possibile ottenere dei buoni spettri caratterizzati da un elevato rapporto segnale/rumore. Nelle altre zone, al contrario, il rapporto analita/matrice è molto diverso e non permette di ottenere dei segnali validi. Ciò costringe l'operatore ad intervenire manualmente per scegliere il punto migliore su cui effettuare l'analisi [35].

3.2.3 - Analizzatore di massa a tempo di volo (TOF)

Gli ioni prodotti da una sorgente MALDI possono essere analizzati usando vari tipi di spettrometri di massa. L'analizzatore meno costoso è la trappola ionica (QIT-MS), ma genera spettri di bassa qualità e presenta un intervallo di massa molto limitato (≤ 4000); per migliorare le caratteristiche dei dati è possibile utilizzare uno spettrometro di massa a trasformata di Fourier (FT-MS), tenendo conto, però, del suo alto costo. L'analizzatore di massa più comunemente usato è quello a tempo di volo (TOF). La scelta dell'analizzatore dipende sia dalle caratteristiche della sorgente MALDI, ma anche dagli obiettivi dell'operatore e non per ultimo dalla sua disponibilità economica. Il MALDI è una tipica sorgente impulsata, che genera pacchetti di ioni in intervalli di tempo della durata di qualche nanosecondo e con una frequenza che va da 1 a 100 Hz; il MALDI, pertanto, risulta compatibile solo con analizzatori come il TOF, che lavorano con un flusso non continuo di ioni (Figura 22). Tale analizzatore, inoltre, è teoricamente in grado di operare in un intervallo infinito di massa e pertanto può

essere applicato alla sorgente MALDI, a sua volta capace di produrre ioni monocarica con massa molto elevata, anche superiore a 1 MDa.

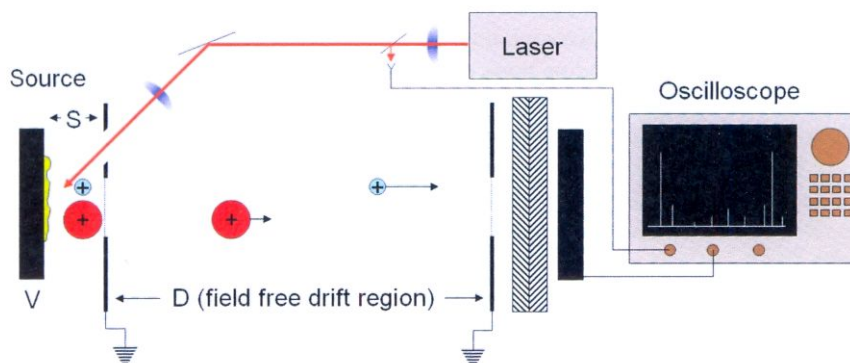


Figura 22: Schema di un analizzatore a tempo di volo.

Gli spettri di massa e gli analizzatori sono solitamente caratterizzati da alcuni parametri, tra cui i più importanti sono l'accuratezza di massa, la risoluzione, il limite di rivelabilità e il rapporto segnale/rumore. L'accuratezza di massa è uno dei parametri più importanti e viene riportata in parti per milione (per esempio, un'accuratezza di 20 ppm significa che la massa reale di uno ione che pesa 1000 Da è misurata con un margine di errore di ± 20 mDa); l'accuratezza di massa è limitata dalla qualità della calibrazione e dalla precisione con cui può essere determinato il centro del picco (dipende dal numero di punti che descrivono il picco e da quanto la forma del picco misurato sia simile alla forma teorica dello stesso). La risoluzione è definita come la differenza in unità di massa (Da) necessaria affinché due picchi possano essere separati; una bassa risoluzione, oltre a non permettere di riconoscere i segnali poco distanziati (come ad esempio i picchi isotopici), peggiora anche l'accuratezza poiché il centro di un picco (centroide) molto ampio è rilevato con difficoltà. È possibile anche definire il potere risolvete come il rapporto $m/\delta m$, dove m è la massa misurata al centro del picco e δm è la larghezza del picco a metà altezza (FWHM). Per rapporto segnale/rumore si intende l'intensità del segnale divisa per il valore medio del rumore, solitamente calcolato come radice quadrata della media dei quadrati delle intensità del rumore di fondo. Per ultimo si definisce il limite di rivelabilità, ovvero la più piccola quantità di campione che può essere rivelata e che fornisce un segnale significativamente distinguibile dal rumore (solitamente il picco deve essere maggiore del valore del rapporto segnale/rumore di un fattore 3).

In un analizzatore a tempo di volo, tutti gli ioni con carica z prodotti in sorgente sono inizialmente accelerati mediante l'applicazione di una differenza di potenziale V tra il supporto che contiene il campione e una vicina griglia o elettrodo cavo; questo permette di fornire alle specie cariche una certa energia cinetica E_k . Successivamente,

gli ioni sono fatti passare lungo una zona priva di campi della lunghezza di circa 1 m (tubo di volo), fino a raggiungere il rivelatore.

L'energia cinetica acquisita in seguito all'applicazione del potenziale V , solitamente fissato a 20 kV, è data dall'equazione:

$$E_k = zV$$

Quindi, ioni con la stessa energia cinetica presentano velocità v diverse in funzione della loro massa m , secondo l'equazione:

$$E_k = \frac{1}{2}mv^2 \Rightarrow v = \sqrt{\frac{2zV}{m}}$$

La velocità v è espressa dal rapporto tra lo spazio percorso L (lunghezza del tubo di volo dello strumento) e il tempo t impiegato a percorrerlo; pertanto:

$$v = \frac{L}{t} \Rightarrow t = L\sqrt{\frac{m}{2zV}} \Rightarrow \frac{m}{z} = 2V\left(\frac{t}{L}\right)^2$$

Da ciò si ricava che il rapporto massa su carica è direttamente proporzionale al quadrato del tempo di volo.

Uno dei problemi maggiori che si incontra utilizzando il tempo di volo è causato dalla distribuzione iniziale in energia cinetica degli ioni generati in sorgente; la conseguenza di questo è che gli ioni isobari arrivano al rivelatore in tempi leggermente diversi, causando un allargamento del picco e un peggioramento della risoluzione. Il problema può essere risolto attraverso due accorgimenti sperimentali, ovvero la *delayed extraction* (DE) e il *reflectron*.

La *delayed extraction* prevede di mantenere inizialmente il potenziale elettrico tra il campione e il primo elettrodo pari a zero; dopo un certo intervallo di tempo dall'azione del laser (solitamente di 10 ns), si applica un impulso di potenziale al fine di estrarre gli ioni e farli passare nel tempo di volo. Durante la fase iniziale a potenziale nullo, gli ioni più veloci si posizioneranno più vicini all'elettrodo cavo, mentre quelli più lenti resteranno più lontani; a seguito dell'applicazione del potenziale, gli ioni più veloci e quindi più vicini all'elettrodo cavo risentiranno meno dell'effetto del campo elettrico, mentre quelli più lontani saranno accelerati maggiormente, permettendo di compensare in parte la differenza in energia iniziale. Sfortunatamente, la focalizzazione attraverso DE dipende dalla massa degli ioni e pertanto il miglioramento della risoluzione avviene solamente per un intervallo ristretto di masse; l'operatore può aggiustare il valore del ritardo di estrazione e l'intensità del potenziale applicato in modo da avere la massima risoluzione nella zona di massa di interesse. La DE è molto utile quando si analizzano peptidi aventi massa di qualche migliaio di Dalton e

permette di ottenere un potere risolvete di 20000, mentre perde di importanza per masse superiori ai 30 kDa.

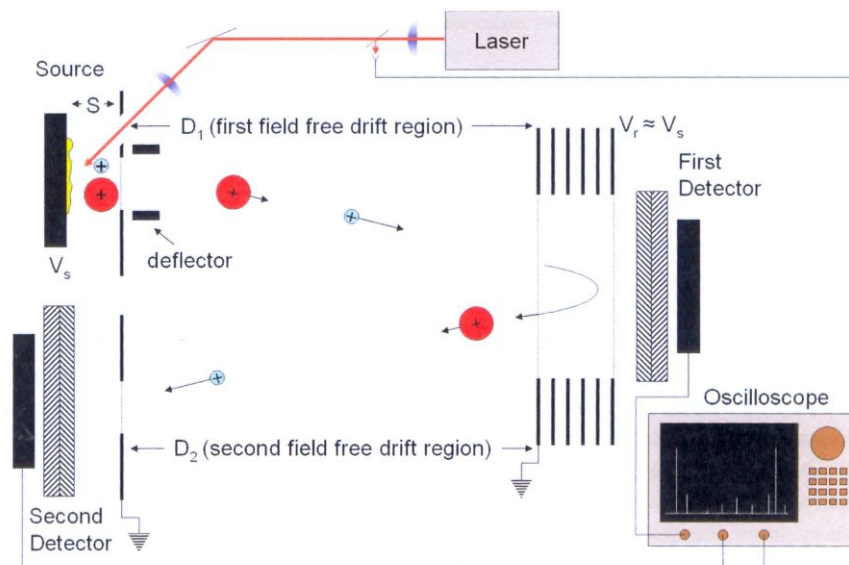


Figura 23: TOF con *reflectron*.

Anche il *reflectron* è stato disegnato per permettere di focalizzare in energia cinetica il fascio di elettroni in arrivo al rivelatore. Lo schema base di un analizzatore TOF con *reflectron* è mostrato in Figura 23. Questo dispositivo è costituito da una serie di lenti elettrostatiche che generano un gradiente lineare di potenziale, crescente nella direzione del moto, e in grado di far curvare la traiettoria degli ioni in modo da inviarli al rivelatore che si trova nella direzione opposta. Ioni isobari che presentano un dispersione in energia cinetica interagiscono con il *reflectron* in base alla loro velocità, penetrando la barriera elettrostatica in modo maggiore all'aumentare della loro energia cinetica. Gli ioni più energetici, quindi, percorrono uno spazio maggiore all'interno del dispositivo, mentre ioni meno veloci sono deviati prima; regolando opportunamente il potenziale delle lenti elettrostatiche è possibile focalizzare gli ioni isobari in modo che siano rilevati tutto nello stesso istante [36]. I miglioramenti dello spettro di massa che si possono ottenere sono mostrati in Figura 24.

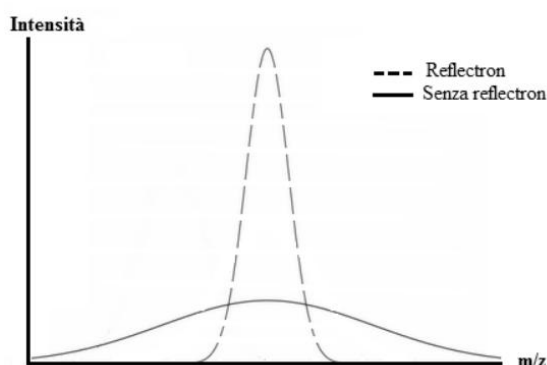


Figura 24: Miglioramento della risoluzione analitica grazie all'uso del *reflectron*.

Il rivelatore più utilizzato negli strumenti MALDI-TOF è il *multichannel plate* (Figura 25): si tratta di un insieme di moltiplicatori di elettroni disposti capillarmente (ad una distanza di circa 50 μm) per ottenere una maggiore superficie di cattura ionica. Tale rivelatore è in grado di amplificare la corrente ionica di un fattore 10^5 , permettendo la sua successiva elaborazione e l'ottenimento dello spettro di massa.

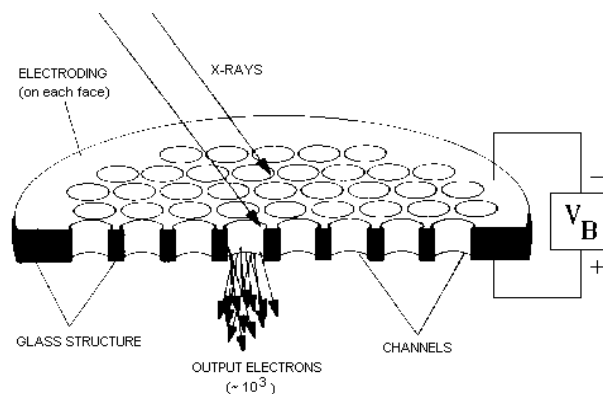


Figura 25: *Multichannel plate*.

3.2.4 - Spettrometria di massa tandem

La spettrometria di massa tandem è una metodica usata per l'analisi strutturale di specie ioniche di interesse. La procedura prevede che sia selezionato lo ione precursore, il quale successivamente viene frammentato al fine di ottenere lo spettro di massa dei frammenti prodotti. Ad esempio, un peptide di interesse può essere selezionato e frammentato per determinarne la sequenza e le possibili modificazioni dei residui amminoacidici.

Il metodo più utilizzato per la produzione di frammenti prevede che lo ione precursore sia fatto collidere con delle molecole di gas inerte all'interno di una cella di collisione; in Figura 26 è possibile osservare lo schema di uno spettrometro di massa tandem con analizzatore TOF. Il primo tubo di volo separa gli ioni in base al loro rapporto m/z ; lo ione precursore è selezionato grazie ad un *ion gate*, che si apre dopo un ben determinato intervallo di tempo dal momento della ionizzazione al fine di trasmettere solamente lo ione di interesse. Lo ione precursore, quindi, è fatto passare nella cella di collisione, dove avviene la frammentazione; l'energia cinetica degli ioni in entrata può essere controllata e regolata in modo da ottenere una frammentazione adeguata. La cella di collisione può essere vista come una sorgente di ionizzazione, che genera i frammenti ionici che sono successivamente separati da un secondo analizzatore a tempo di volo ad alta risoluzione. Da qui nasce la denominazione MALDI TOF/TOF.

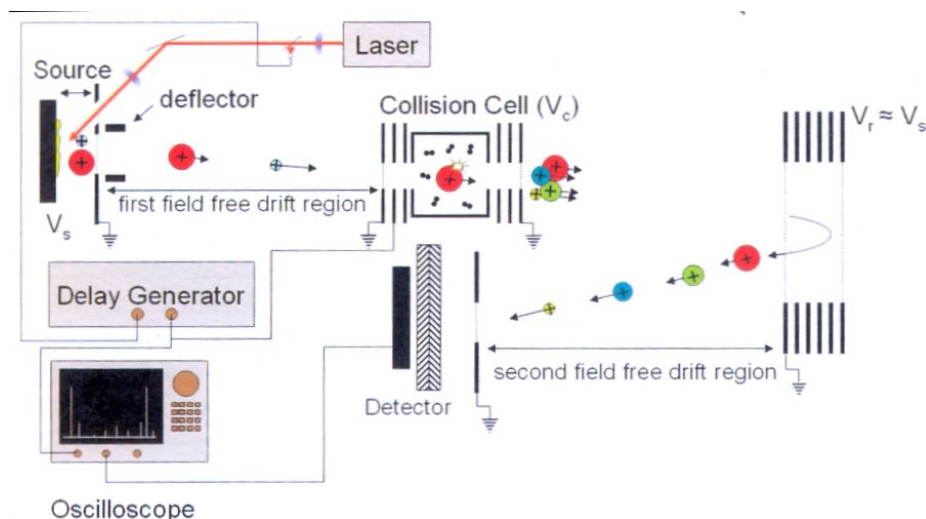


Figura 26: Schematizzazione di un MALDI TOF/TOF.

Anche la strumentazione TOF/TOF presenta delle limitazioni. Al fine di ottenere una quantità adeguata di ioni per l'esperimento di massa/massa, l'intensità del laser deve essere aumentata; questo permette di generare un numero maggiore di specie cariche, ma aventi una distribuzione iniziale in energia cinetica molto più ampia, influenzando negativamente la risoluzione sia in fase di isolamento sia al momento della rivelazione. Inoltre, all'interno della cella di collisione avvengono degli urti in numero diverso per ioni diversi; questo causa un ulteriore allargamento della curva di distribuzione dell'energia cinetica, provocando nuovamente un decremento della risoluzione dello spettro ottenuto [37].

3.2.5 - MALDI Ion Imaging

Una delle applicazioni più interessanti del MALDI è l'*ion imaging* (IMS), ossia una tecnica di indagine microscopica, introdotta nel 1997, che prevede l'analisi delle molecole di interesse direttamente su un tessuto biologico; in questo modo, è possibile determinare la distribuzione spaziale e l'abbondanza relativa di proteine, peptidi, glicoproteine, lipidi, metaboliti e farmaci su una porzione sottile di tessuto biologico. [38]

A seguito della ricopertura della sezione di tessuto con una matrice opportuna è possibile acquisire i dati di massa in vari punti del campione: il fascio laser della sorgente MALDI, infatti, può eseguire dei microcampionamenti seguendo un *raster* definito dall'utente. Il tessuto è suddiviso virtualmente in una griglia e ogni cella della griglia, avente coordinate x e y , corrisponde ad un punto sul quale è registrato uno spettro di massa. Successivamente, attraverso un software, è possibile richiamare il *raster* e selezionare una particolare specie con un certo valore di m/z dagli spettri acquisiti; così facendo si può ricostruire un'immagine del tessuto, dove attraverso una

scala cromatica si indica quali sono i punti dove la specie selezionata è presente con una certa intensità. Il processo è riassunto in Figura 27.

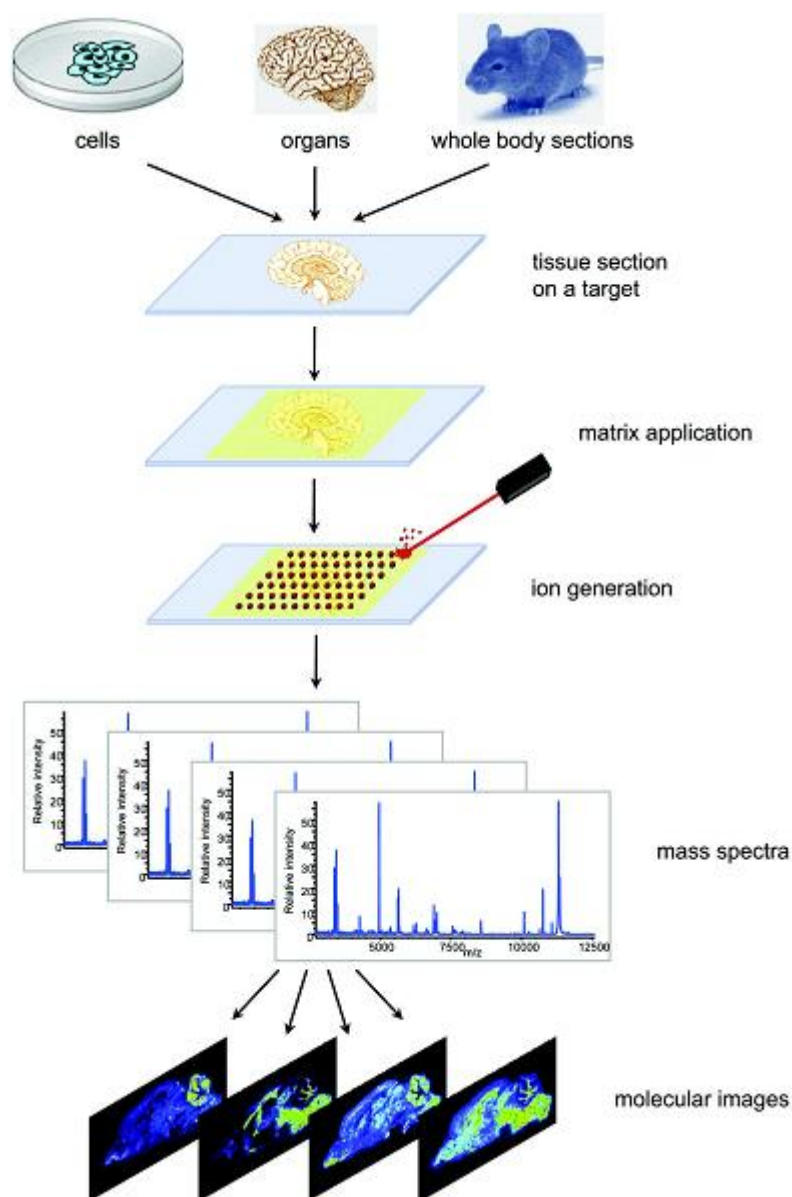


Figura 27: Schema di un esperimento di IMS [39].

L'utilità di un *ion imaging* tissutale è di estremo interesse per numerose ragioni, ad esempio può permettere:

- l'identificazione di *biomarker*, ovvero peptidi, metaboliti o piccole molecole diagnostiche di un certo stato biologico (malattia, intossicazione, metastasi, etc.) del tessuto e la loro distribuzione;
- l'analisi farmacocinetica, cioè la possibilità di monitorare sulla scala spazio-temporale il deposito, l'eliminazione e la degradazione di farmaci, tossine o molecole biologicamente attive nel tessuto o sulla sezione di un intero animale;

- lo studio di profili proteici e metabolici, e l'identificazione di zone sane o malate in relazione a patologie specifiche;
- più analisi qualitative e quantitative in parallelo sullo stesso campione;
- l'identificazione contemporanea di più proteine mediante digestione triptica *in loco*.

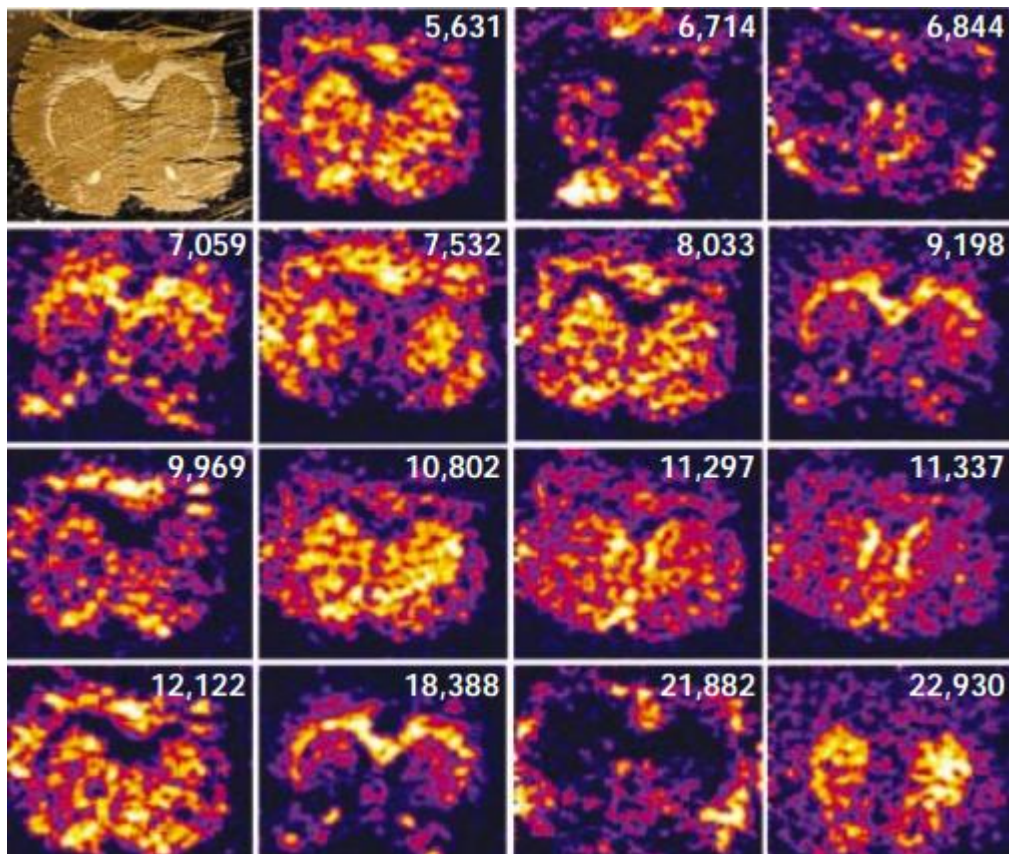


Figura 28: Risultato finale di un esperimento di IMS [40].

Gli esperimenti di IMS possono essere generalmente eseguiti in due modalità: *profiling* e *imaging*. Il *profiling* consiste nell'analizzare individualmente solo alcune aree di interesse del tessuto, come ad esempio un gruppo di cellule con particolari caratteristiche; questa modalità è usata quando si studiano tessuti molto eterogenei, dove solamente una piccola area risulta interessante all'analisi. Gli esperimenti in modalità di *imaging*, invece, analizzano tutta l'area superficiale della porzione di tessuto; in questo modo, la mappa di distribuzione ionica di ogni segnale dello spettro di massa potrà essere correlata con le caratteristiche istologiche. L'immagine ottenuta (un esempio è mostrato in Figura 28) è molto utile perché permette di visualizzare facilmente la composizione del tessuto e la distribuzione delle specie al suo interno: ad esempio in un campione contenente delle cellule tumorali, se queste presentano un particolare segnale dovuto ad un certo *biomarker*, è possibile stabilire qual è la

porzione di tessuto malato rispetto alla parte sana. Per poter elaborare i dati registrati e ottenere immagini ad alta risoluzione (utilizzando un laser nell'UV con lunghezza d'onda pari a 337 nm, è possibile ottenere una risoluzione spaziale di 10 μm) è necessario possedere computer potenti e software con algoritmi adatti a manipolare intelligentemente e velocemente la grande quantità di informazioni raccolte [41].

Nei protocolli di IMS il trattamento, la conservazione e la preparazione del campione, così pure l'applicazione della matrice, sono dei punti critici per la qualità e la riproducibilità dei dati spettrometrici. Il campione di tessuto, dopo la rimozione chirurgica, deve essere conservato adeguatamente a -80°C e in assenza di aria fino al momento dell'analisi, in modo da evitarne la degradazione. Le porzioni di campione devono essere tagliate in modo accurato con un micrometro criostatato; lo spessore non sembra essere importante per l'analisi poiché il laser è in grado di penetrare solo in parte il tessuto, ma in ogni caso è consigliabile non superare i 10-20 μm . La porzione di tessuto deve essere successivamente depositata su un supporto conduttivo, solitamente un vetrino drogato ITO (Indium tin oxide), e lasciata asciugare sottovuoto per circa un'ora; il tessuto, comunque, deve essere leggermente bagnato al fine promuovere la cocristallizzazione della matrice con il campione. In alcuni casi, ad esempio nell'analisi delle proteine o dei peptidi, il tessuto viene lavato con dei solventi (etanolo, isopropanolo, acetone, etc.) in modo da rimuovere eventuali specie contaminati come i sali, i lipidi e il sangue residuo [42].

Tipicamente, la matrice solida è sciolta con una soluzione di acqua/acetonitrile al 50:50 v/v e contenente lo 0.1% di TFA (in alcuni casi si consiglia di usare una soluzione più concentrata in TFA, fino al 2%, per favorire la ionizzazione). L'applicazione della matrice sul tessuto può essere effettuata manualmente, depositando delle gocce del volume di 250 nL (max 1 μL); sebbene con questo metodo si possano ottenere degli spettri di alta qualità, le macchie di matrice che si formano sono piuttosto larghe e non permettono di ottenere una risoluzione spaziale elevata (0.5-1 mm). La matrice può essere depositata anche con l'ausilio di un robot, in grado di posare volumi molto piccoli, dell'ordine di qualche decina di picolitro, e formare gocce con diametro di 100-180 μm . Altri metodi prevedono di spruzzare la soluzione di matrice sull'analita, ad esempio con l'ausilio di un aerografo; in questo caso, si devono eseguire dei cicli multipli di spruzzatura per ottenere un'applicazione adeguata della matrice. Benché in letteratura si trovino varie metodologie, la deposizione della matrice deve permettere di ricoprire il campione in modo omogeneo, evitando la traslocazione degli analiti. Infine, si deve ricordare che i cristalli che si formano devono avere dimensioni minori della risoluzione spaziale [43].

Attraverso l'uso di software specifici, inoltre, la qualità dello spettro può essere ulteriormente migliorata effettuando, ad esempio, la sottrazione della linea di base, la riduzione del rumore di fondo, la calibrazione e la normalizzazione rispetto alla corrente ionica totale (TIC) [44].

4 - Materiali e metodi

4.1 - Reagenti

In Tabella 6 sono riportati i vari reagenti e solventi necessari per eseguire gli esperimenti; tali sostanze sono state usate tal quali, senza essere state ulteriormente purificate.

Tabella 6: Lista dei reagenti.

Denominazione	Purezza/Composizione	Produttore
Acqua milliQ	Filtrata 0.1 µm	Fluka
EDTA	> 99%	Sigma
Hepes	99.5%	Sigma
1,4-ditiotreitolo (DTT)	> 99.9%	Fluka
Acido sinapinico	≥ 99%	Fluka
Tissue Tek OTC 4583	10.24% alcol polivinilico 4.26% glicole polietilenico 85.50% solventi non reattivi	Tissue Tek
DHB	> 99%	Fluka
Acrilamide/bis-acrilamide	Soluzione al 40%	Sigma
Tris/HCl pH 9.00	0.1 M	Sigma
Tris/HCl pH 7.40	0.1 M	Sigma
Tris/HCl pH 6.80	0.1 M	Sigma
Sodio dodecil-solfato	> 98.5%	Sigma
Ammonio persolfato	> 98%	Sigma
TEMED	~ 99%	Sigma
Glicerolo	99.5%	Aldrich
Blu di bromofenolo	-	Sigma
Blu di Coomassie	0.1% Brilliant Blue 25% metanolo 5% acido citrico	Sigma
Acido acetico	> 99.8%	Fluka
Metanolo	99.9% (HPLC grade)	Fluka
Acetonitrile	> 99.8% (HPLC grade)	Fluka
Acido trifluoroacetico	> 99%	Fluka
Ammonio bicarbonato	≥ 99.5%	Fluka
Iodoacetamide	≥ 99%	Sigma
Tripsina	-	Sigma

4.2 - Campioni biologici

I campioni di placenta umana provengono da donne gravide il cui parto è avvenuto al termine del periodo gestazionale (la durata della gravidanza deve essere superiore o uguale alle 37 settimane); non è stata fatta alcuna distinzione sulla modalità della nascita, per cui i campioni sono stati raccolti sia in caso di parto naturale, sia nell'eventualità di parto cesareo.

Tutte le pazienti che hanno partecipato allo studio non sono mai state precedentemente diagnosticate come diabetiche e sono state tutte sottoposte ad un test di intolleranza al glucosio tra la 24^a e la 28^a settimana di gestazione; l'oGTT è stato eseguito secondo le recenti direttive dell'*American Diabetes Association* (ADA). Il test prevede la somministrazione orale di 75 g di glucosio e la successiva determinazione nel plasma della glicemia, con un prelievo di sangue venoso ogni ora per le successive due ore; i valori di riferimento sono: 0' ≤ 92 mg/mL, 60' ≤ 182 mg/mL, 120' ≤ 153 mg/mL. A tutte le pazienti che presentano dei valori maggiori a quelli di riferimento è stato diagnosticato il GDM; come controlli, invece, sono stati prelevati campioni di placenta da donne gravide che presentano un oGTT negativo.

La raccolta dei campioni per la prima parte dello studio, ossia quella relativa all'omogeneizzazione del tessuto placentare, è stata effettuata su 40 donne gravide, delle quali 20 sane e 20 affette da GDM. In Tabella 7 sono riportate le caratteristiche cliniche e metaboliche dei soggetti analizzati; queste sono espresse come media e deviazione standard poiché non è stato possibile reperire i singoli dati.

Tabella 7: Dati clinici delle pazienti relative alla prima parte dello studio.

	GDM	Controlli
Età [anni]	33.7 ± 5.0	33.6 ± 4.9
BMI prima della gravidanza [kg/m²]	24.5 ± 4.0	23.0 ± 4.0
Settimana gestazionale nella quale è avvenuta la diagnosi per il GDM	24.5 ± 4.0	-
Settimana gestazionale del parto	37.9 ± 1.6	39.0 ± 1.0
Fasting plasma glucose (mmol/l)	4.90 ± 0.63	4.20 ± 0.18
HbA1c [%]	5.44 ± 0.32	5.00 ± 0.20
Peso del feto alla nascita [g]	3220 ± 61	3290 ± 50
BMI: indice di massa corporea		

La raccolta dei campioni per la seconda parte dello studio, relativa all'analisi diretta del tessuto placentare con spettrometria di massa MALDI, è stata effettuata su 10 gestanti, delle quali 5 sane e 5 affette da GDM. In Tabella 8 è riportata l'età della singola paziente e la terapia a cui è stata sottoposta per limitare gli effetti negativi della patologia; in questo caso non sono disponibili altri dati clinici.

Tabella 8: Dati clinici delle pazienti relative alla seconda parte dello studio.

Campione	Età della madre [anni]	GDM	Terapia
PL1	43	x	Dieta alimentare
PL2	34	x	Terapia insulinica
PL3	36		
PL4	35	x	Dieta alimentare
PL5	33		
PL6	31		
PL7	42		
PL8	41		
PL9	39	x	Nessuna cura
PL10	32	x	Dieta alimentare

4.3 - Trattamento del campione

I campioni di placenta sono stati raccolti subito dopo il secondamento e conservati ad una temperatura di -80°C fino al momento del loro utilizzo.

4.3.1 - Preparazione dell'omogenato di placenta

Per l'omogeneizzazione del tessuto placentare si è sviluppato il protocollo riportato di seguito e schematizzato in Figura 29; la metodica descritta permette di trattare sia il tessuto proveniente dal lato fetale dell'organo, sia quello appartenente al lato materno:

1. il campione di placenta è parzialmente scongelato, lasciandolo a temperatura ambiente (circa 25°C) per 30 minuti;
2. per estrarre il campione dal lato materno, ossia il tessuto villosa, si asporta una parte di cotiledone dalla regione centrale della placenta facendo attenzione a non includere parti di piatto coriale, ed eliminando eventuali depositi di tessuto connettivo e le calcificazioni. Il tessuto fetale, invece, si ottiene recidendo dal piatto coriale una porzione di campione di dimensione pari a 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm;

3. il campione è lavato con acqua milliQ per due volte in modo da eliminare il sangue residuo;
4. 1 g di campione è addizionato a 2 mL di buffer di lisi (10 mM Hepes, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, pH 7) e omogenato con un frullatore. La soluzione di lisi deve essere fredda (4°C) e l'omogeneizzazione è condotta in un bagno di ghiaccio;
5. l'omogenato è centrifugato per due volte a 15000 rpm per 10 minuti;
6. si recupera il surnatante, contenente le proteine idrosolubili;
7. i surnatanti derivanti dai vari campioni sono raggruppati nel pool dei "controlli" e in quello delle "diabetiche";
8. 5 µL della soluzione ottenuta sono mescolati con 5 µL di una soluzione di matrice (acido sinapinico 10 mg/mL, solubilizzato in acqua/acetonitrile 50:50 v/v e 0.1% di TFA). 1 µL della miscela è depositato sul supporto porta campioni, cristallizzato per vaporazione del solvente in aria e analizzato al MALDI-TOF;
9. una parte del surnatante è concentrata 10 volte con un puntale Zip-Tip C4, eluita con la soluzione di matrice, depositata sul porta campioni e analizzata al MALDI-TOF. Questo permette di concentrare le proteine ed eliminare gli interferenti, in modo da migliorare il segnale per valori elevati di m/z .

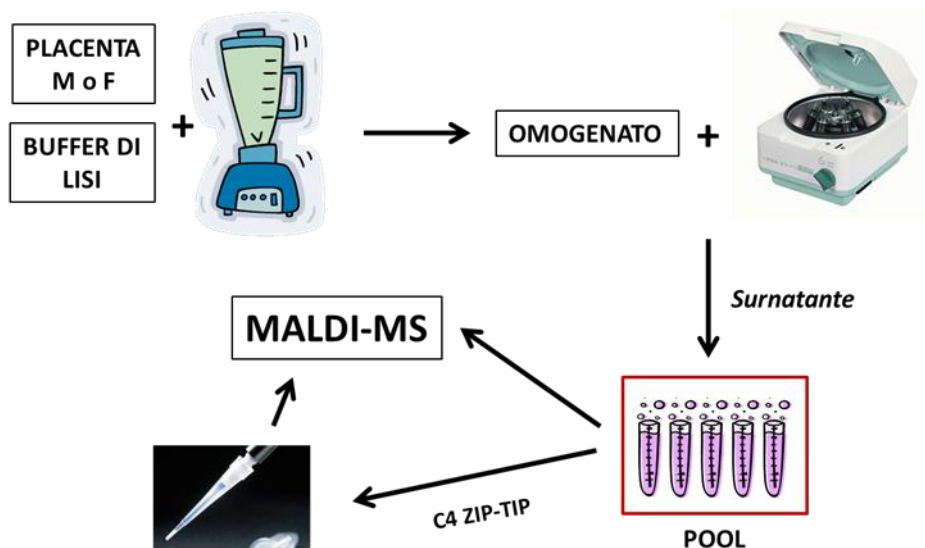


Figura 29: Schematizzazione del processo di omogeneizzazione della placenta.

4.3.2 - Sezionamento del tessuto e preparazione per l'analisi MALDI

Per la determinazione diretta del profilo proteico da tessuto si è eseguita la procedura schematizzata in Figura 30 e riportata di seguito:

1. si scongela parzialmente la placenta e si taglia un pezzo di campione di dimensioni 2 cm × 3 cm × 2 cm;
2. il pezzo di tessuto reciso è incollato ad un supporto per mezzo di un composto OTC e ambientato nel criostato per circa 60 minuti alla temperatura di -18°C;
3. il campione è montato sul microtomo (Ames Company, 4550 model) e sezionato, in modo da ottenere delle porzioni con spessore di 10 µm. Queste sono depositate a freddo (*thaw-mounted*) su un vetrino conduttivo drogato ITO [45];
4. il tessuto è fatto aderire al supporto per scongelamento e asciugato per 30 minuti sottovuoto;
5. si depositano sul tessuto delle gocce di matrice del volume di 0.5 µL, in modo da ricoprire tutta la superficie; si deve evitare di depositare le gocce troppo vicine perché non devono coalescere. Per l'analisi dei peptidi si usa come matrice una soluzione di DHB 20 mg/mL solubilizzato in acqua/acetonitrile 50:50 v/v e 0.1% di TFA, mentre per la rivelazione delle proteine si usa acido sinapico 10 mg/mL solubilizzato in acqua/acetonitrile 50:50 v/v e 0.1% di TFA;
6. una volta avvenuta la cristallizzazione, si depositano nuovamente delle gocce di matrice sopra le precedenti. Questa operazione si ripete per due volte;
7. si esegue l'analisi allo spettrometro MALDI.

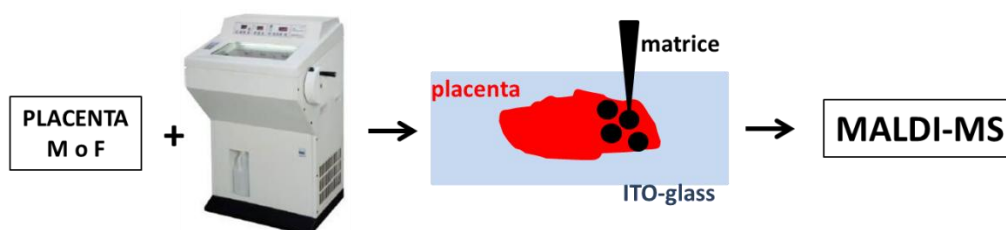


Figura 30: Schematizzazione del processo di preparazione del campione di tessuto.

In modo analogo si esegue la preparazione del tessuto per l'*ion imaging*; in questo caso si utilizza una sezione trasversale di tessuto placentare, virtualmente suddivisa in tre zone: fetale, centrale e materna (Figura 31). Ogni zona è ricoperta con delle gocce di una soluzione di matrice (acido sinapico 10 mg/mL solubilizzato in acqua/acetonitrile 50:50 v/v e 2% di TFA) del volume di 0.5 µL, che in questo caso devono coalescere per formare una superficie uniforme; l'applicazione è ripetuta per due volte a seguito della cristallizzazione della matrice per evaporazione del solvente in aria.

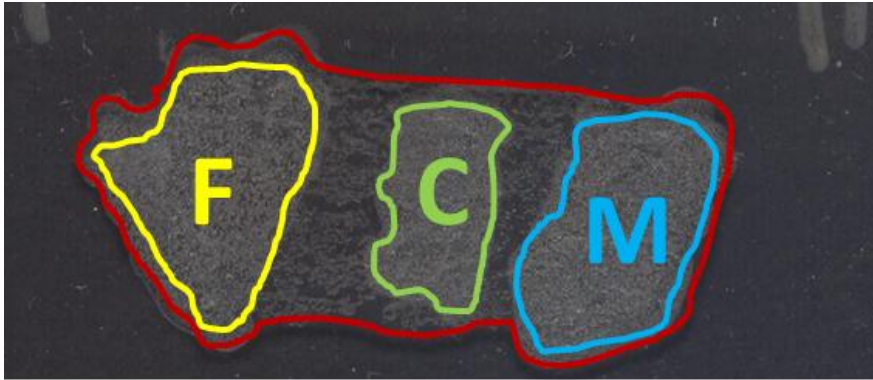


Figura 31: Suddivisione della sezione trasversale di tessuto placentare: feto (F), centro (C), madre (M).

4.4 - Elettroforesi e digestione triptica

In questo lavoro, l'elettroforesi è stata usata per la separazione delle proteine contenute nell'omogenato del tessuto placentare. Il gel preparato ha le caratteristiche adatte per ottenere una buona separazione delle specie comprese tra i 40 kDa e i 150 kDa ed è stato ottenuto nel seguente modo:

- il gel di separazione contiene una quantità di acrilammide del 18%. È stato preparato per polimerizzazione di una soluzione contenente 13.5 mL di una soluzione di acrilammide/bis-acrilammide al 40%, 8.7 mL di una soluzione 0.1 M di Tris/HCl a pH 9, 200 μ L di una soluzione di SDS al 20%, 200 μ L di una soluzione di ammonio persolfato al 10% e 30 μ L di TEMED;
- il gel di impaccamento contiene una quantità di acrilammide del 4%. È stato preparato per polimerizzazione di una soluzione contenente 502 μ L di una soluzione di acrilammide/bis-acrilammide al 40%, 4.49 mL di una soluzione 0.1 M di Tris/HCl a pH 7.4, 25 μ L di una soluzione di SDS al 20%, 25 μ L di una soluzione di ammonio persolfato al 10% e 5 μ L di TEMED.

Il campione da analizzare è stato preparato diluendo in proporzione di 2:1 la soluzione di omogenato con un tampone denaturante; 1 mL di quest'ultimo si ottiene solubilizzando in acqua milliQ, 0.1 g di SDS, 0.2 mL di glicerolo, 0.0015 g di ditiotreitolo, 0.0005 g di blu di bromofenolo e 0.0242 g di una soluzione di Tris/HCl a pH 6.8. La soluzione da analizzare è quindi fatta bollire per 5 minuti a bagnomaria.

In ciascun pozzetto del gel elettroforetico si caricano 7 μ L di campione denaturato; la quantità giusta da usare è stata determinata attraverso alcune prove sperimentali. In uno dei pozzetti, inoltre, si carica una soluzione standard (*ColorBurst Electrophoresis* 8-220 kDa, Sigma-Aldrich) che funziona da riferimento per la

determinazione del peso molecolare delle specie contenute nelle bande elettroforetiche.

La strumentazione usata per l'elettroforesi è un sistema verticale *Mini Protean III* della *Biorad*. La differenza di potenziale applicata agli elettrodi è di 120 V e il tempo necessario per completare la separazione è di circa un'ora. La colorazione del gel, per evidenziare le bande elettroforetiche, è stata eseguita con una soluzione di *Brilliant Blue G* fornita dalla Sigma.

L'analisi densitometrica per la determinazione della quantità di proteine presenti nelle bande elettroforetiche è stato eseguita con un densitometro *ChemiDoc* della Biorad; lo strumento misura la densità ottica in unità ODu.

Il peso molecolare delle bande elettroforetiche che non presentano il corrispettivo segnale nella soluzione di standard è stato determinato per estrapolazione da un grafico di calibrazione, ottenuto plottando il logaritmo decimale del peso molecolare delle specie note in funzione della loro mobilità relativa.

Completata la separazione, è possibile recidere dal gel le bande elettroforetiche e procedere alla digestione delle proteine ivi contenute; in questo modo si ottiene una mappa peptidica, che una volta confrontata con i dati presenti in un database opportuno, permette l'identificazione della specie incognita. Il protocollo di digestione seguito in questo lavoro è stato redatto dalla *Bruker Daltonik*; esso consente di ottenere un digerito triptico da un gel colorato con *Blue di Coomassie*, adatto per essere analizzato con uno spettrometro di massa MALDI. Il protocollo completo è riportato di seguito:

1. si asporta dal gel la banda di interesse, recidendola con un bisturi e suddividendola in pezzettini di 1 mm³. Si trasferisce il tutto in una provetta da 1000 µL;
2. si lavano le particelle di gel per 15 minuti con 500 µL di una soluzione 50 mM di bicarbonato d'ammonio sciolto in acqua/acetone 50:50;
3. si rimuove la soluzione di lavaggio e si ricoprono le particelle di gel con acetone;
4. una volta che il gel si è ristretto, si rimuove l'acetone e si reidrata con 60 µL di una soluzione 50 mM di bicarbonato d'ammonio;
5. dopo 5 minuti si aggiungono 60 µL di acetone;
6. dopo 15 minuti si rimuove tutto il liquido e si ricoprono nuovamente le particelle di gel con acetone;

7. una volta che le particelle di gel si sono ristrette, si rimuove completamente tutto il liquido e si lascia asciugare per qualche minuto sottovuoto;
8. si aggiungono alle particelle di gel 200 μL di una soluzione 10 mM di ditiotreitolo/25 mM di bicarbonato d'ammonio, preparata al momento, e si lascia incubare per 45 minuti a 56°C;
9. una volta raffreddata la provetta a temperatura ambiente, si elimina il liquido e si aggiungono 200 μL di una soluzione 55 mM di iodoacetammide/25 mM di bicarbonato d'ammonio, e si lascia incubare per 30 minuti in un luogo buio;
10. si rimuove il liquido e si lava per due volte, per 15 min, con 600 μL di una soluzione 50 mM di bicarbonato d'ammonio sciolto in acqua/acetonitrile 50:50;
11. dopo 15 minuti si rimuove tutto il liquido e si ricoprono le particelle di gel con acetonitrile;
12. una volta che le particelle di gel si sono ristrette, si rimuove completamente tutto il liquido e si lascia asciugare per qualche minuto sottovuoto;
13. si aggiungono 3 μL di una soluzione di enzima (25 mM di bicarbonato d'ammonio con 5 ng/ μL di tripsina) e si lascia incubare per 30 minuti alla temperatura di 37°C;
14. si aggiunge sufficiente soluzione di bicarbonato d'ammonio 25 mM affinché il gel rimanga bagnato, e si lascia incubare per una notte a 37°C;
15. il giorno seguente si sonifica per 10 minuti;
16. si aggiungono 3 μL di una soluzione di acqua/acetonitrile 50:50 v/v con lo 0.1% di TFA e si centrifuga per altri 10 minuti;
17. si recupera il surnatante, lo si addiziona alla matrice e si esegue l'analisi allo spettrometro di massa MALDI;
18. per identificare la proteina incognita, si confronta la mappa peptidica ottenuta con i dati contenuti in un database.

Durante l'esecuzione della procedura è essenziale indossare il camice, dei guanti puliti e una cuffia per i capelli, in modo da evitare la contaminazione del campione con la cheratina proveniente dalla pelle o dai peli; questo accorgimento è essenziale, poiché la cheratina, essendo digerita dalla tripsina, produce una serie di peptidi che possono interferire con l'interpretazione dei risultati.

4.5 - MALDI-MS

Lo spettrometro di massa MALDI-TOF/TOF usato in questo lavoro è un *UltrafleXtreme* prodotto dalla *Bruker Daltonik*. Gli ioni sono generati con un laser a

Nd:YAG ($\lambda = 335$ nm), analizzati con un tempo di volo della lunghezza di un metro e rivelati con un *multichannel plate*.

Le analisi per la determinazione delle proteine contenute nell'omogenato, nel tessuto placentare e con la tecnica di *ion imaging* sono state effettuate in modalità lineare con rivelazione di ioni positivi; i parametri strumentali adottati per l'analisi sono: *Ion Source 1*: 25.00 kV, *Ion Source 2*: 22.90 kV, *Lens*: 6.50 kV, *Pulsed Ion Extraction*: 350 ns. Prima di ogni misura si effettua una calibrazione esterna usando come standard il *Protein Calibration Standard 1 e 2* (Bruker Daltonics), la cui composizione è riportata in Tabella 9.

Tabella 9: Composizione del *Protein Calibration Standard 1 e 2*.

Specie	Ione rivelato	m/z medio
Insulina	[M+H] ⁺	5734.52
Citocromo C	[M+2H] ²⁺	6185.05
Mioglobina	[M+2H] ²⁺	8476.66
Ubiquitina I	[M+H] ⁺	8565.76
Citocromo C	[M+H] ⁺	12360.97
Mioglobina	[M+H] ⁺	16972.31
Proteina A	[M+2H] ²⁺	22307
Tripsinogeno	[M+H] ⁺	23082
Proteina A dell'albumina bovina	[M+2H] ²⁺	33216
Proteina A	[M+H] ⁺	44613
Proteina A dell'albumina bovina	[M+H] ⁺	66432

Tabella 10: Composizione del *Peptide Calibration Standard*.

Specie	Ione rivelato	m/z monoisotopico
Angiotensina II	[M+H] ⁺	1046.54
Angiotensina I	[M+H] ⁺	1296.68
Sostanza P	[M+H] ⁺	1347.73
Bombesina	[M+H] ⁺	1619.82
ACTH clip 1-17	[M+H] ⁺	2093.07
ACTH clip 18-39	[M+H] ⁺	2465.20
Somatostatina 28	[M+H] ⁺	3147.47

Le analisi per la determinazione dei peptidi presenti nel tessuto placentare sono state effettuate in modalità *reflectron* con rivelazione di ioni positivi; i parametri strumentali adottati per l'analisi sono: *Ion Source 1*: 25.00 kV, *Ion Source 2*: 22.40 kV, *Lens*: 8.00 kV, *Reflector*: 26.45 kV, *Reflector 2*: 13.45 kV, *Pulsed Ion Extraction*: 120 ns. Prima di ogni misura si effettua una calibrazione esterna basandosi sul valore del picco

monoisotopico delle specie contenute nel *Peptide Calibration Standard* (Bruker Daltonics), la cui composizione è riportata in Tabella 10.

Negli esperimenti di massa/massa la frammentazione dello ione precursore è stata indotta per collisione. Le analisi dei frammenti sono state eseguite sempre in modalità *reflectron* con rivelazione di ioni positivi; i parametri strumentali adottati per l'analisi sono: *Ion Source 1*: 7.50 kV, *Ion Source 2*: 6.75 kV, *Lens*: 3.50 kV, *Reflector*: 29.50 kV, *Reflector 2*: 13.95 kV, *Lift 1*: 19.00 kV, *Lift 2*: 3.00 kV, *Pulsed Ion Extraction*: 70 ns. La calibrazione del LIFT è eseguita periodicamente dalla casa produttrice.

5 - Risultati e discussione

5.1 - Analisi dell'omogenato

L'approccio impiegato solitamente negli studi di proteomica si basa sulla separazione elettroforetica delle proteine contenute nel campione, seguita dalla loro digestione e identificazione attraverso il confronto dei dati ottenuti dal digerito triptico con quelli presenti in un database. Questo porta ad ottenere una lista di possibili proteine che contengono nella loro struttura le catene peptidiche generate dalla digestione; nei risultati ottenuti, inoltre, è riportato il valore del "coverage", che risulta utile per capire qual è la percentuale della sequenza amminoacidica della proteina che corrisponde a quella dei peptidi ottenuti. Queste informazioni, naturalmente, devono essere valutate con attenzione considerando le caratteristiche molecolari e biochimiche del substrato studiato, disponibili in letteratura.

Questo approccio è stato utilizzato anche nel presente studio per effettuare l'analisi dei pool di tessuto placentare derivanti da pazienti con GDM e da gestanti sane. Per essere certi dei risultati ottenuti e per valutare altre possibili tecniche per lo studio del proteoma placentare, si è scelto di eseguire un'indagine preliminare analizzando direttamente con la tecnica MALDI i pool ottenuti dall'omogeneizzazione dei campioni di placenta.

5.1.1 - Lato materno

Lo spettro MALDI ottenuto dall'analisi dei pool contenenti le proteine idrosolubili derivanti dal tessuto placentare appartenente a soggetti sani e a pazienti affette da GDM è riportato in Figura 32.

Nello spettro si nota la presenza di specie ioniche comprese nell'intervallo di massa 4-50 kDa, ma le specie più abbondanti sono rivelate a masse inferiori di 32 kDa. Le abbondanze relative A_r dei vari picchi sono state calcolate ponendo la somma delle intensità di tutte le specie uguale a 100 e facendo la proporzione. A seguito di questa elaborazione si notano delle differenze importanti nelle abbondanze relative di alcune specie ioniche presenti nei due spettri; tali differenze sono ritenute significative quando $|A_{iS} - A_{iD}| \geq 5\%$ (dove A_{iS} rappresenta l'abbondanza relativa del picco i nello spettro riguardante il tessuto placentare derivante da soggetti sani e A_{iD} rappresenta l'abbondanza relativa dello stesso picco presente nello spettro appartenente al pool delle pazienti con GDM). Le differenze più significative, dovute alle specie con peso

molecolare compreso nell'intervallo 4-31 kDa, sono sintetizzate nell'istogramma riportato in Figura 33. I risultati evidenziano che nel caso di diabete gestazionale si verifica una sovra espressione di alcune specie e la sotto espressione di altre.

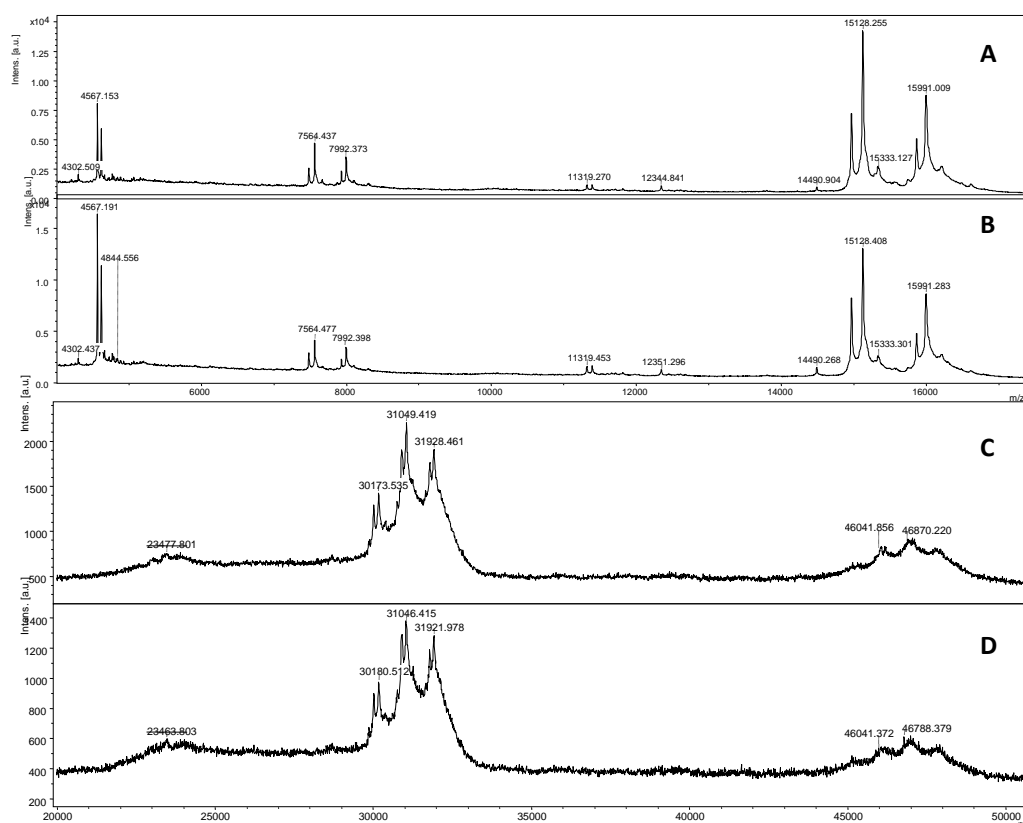


Figura 32: A: spettro MALDI del pool dei controlli, intervallo di m/z tra 4000-20000. B: spettro MALDI del pool delle pazienti GDM, intervallo di m/z tra 4000-20000. C: spettro MALDI del pool dei controlli trattato con Zip-Tip, intervallo di m/z tra 27000-41000. D: spettro MALDI del pool delle pazienti GDM trattato con Zip-Tip, intervallo di m/z tra 27000-41000.

L'identificazione proteica delle specie di interesse è stata ottenuta basandosi sul loro peso molecolare. Questo approccio può sembrare limitativo, ma tenendo conto del tipo di tessuto analizzato e della possibilità di reperire alcune informazioni in letteratura, relative allo studio del GDM, l'analisi dei dati per confronto con un database può essere considerata un metodo valido. Inoltre, è possibile giustificare il comportamento osservato sperimentalmente relazionandolo allo stato fisiopatologico del tessuto placentare. La possibile assegnazione strutturale delle specie ottenute dall'analisi MALDI è stata eseguita basandosi su due database di riferimento: l'*Human Protein Reference Database* (HPRD) [46] e il database della *PhosphoSitePlus* (PSP) [47]. Per alcune di esse è stato possibile ottenere l'identità della proteina, mentre per altre, come ci si aspettava, non è stata trovata nessuna corrispondenza nel database (per esempio per le specie ad m/z 4567 e 4623).

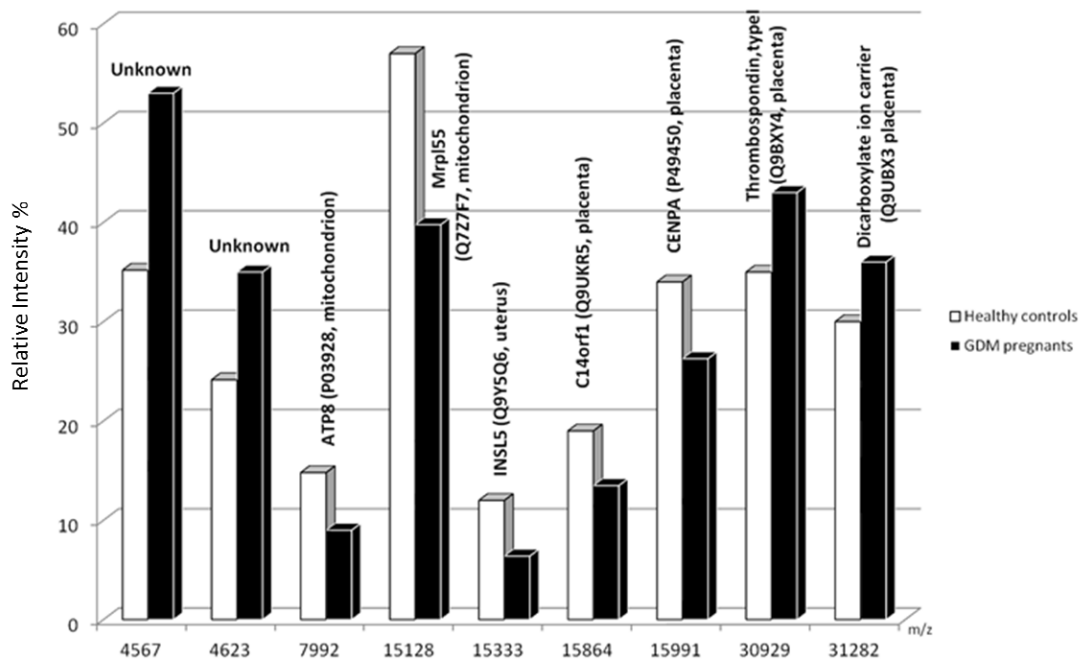


Figura 33: Istogramma riassuntivo delle differenze nell'espressione proteica tra il pool dei sani e il pool delle pazienti GDM.

Il picco ad m/z 7992 può essere attribuito all'ATP sintetasi 8 (ATP8); l'abbondanza relativa di questa specie è minore nel caso dei pazienti affetti da GDM rispetto ai controlli. È interessante osservare che questo risultato è in accordo con quello ottenuto da uno studio di Yu et al [48], nel quale si dimostra la relazione tra il polimorfismo del gene mitocondriale umano ATP8 DNA (G→T, Asp→Tyr in posizione 7778) e le patologie autoimmuni. Yu et al hanno infatti mostrato che la presenza del suddetto polimorfismo incrementa la suscettibilità dell'organismo a sviluppare varie malattie autoimmuni, incluso il diabete. Il polimorfismo D→Y altera la fisiologia del mitocondrio, principalmente a livello della produzione dei ROS⁴ (*reactive oxygen species*), e compromette l'ossidazione fosforilativa⁵ (OXPHOS). Sempre secondo questi autori, inoltre, il polimorfismo potrebbe interessare anche le cellule beta del pancreas, e pertanto l'incremento nella produzione dei ROS potrebbe favorire la morte cellulare e/o amplificare la risposta autoimmunologica contro gli antigeni espressi dalle suddette cellule. Altri studi riportano l'associazione tra la mutazione del gene *mtAtp6*, espresso nell'*mtDNA*⁶, con il diabete mellito di tipo 2 e con l'insufficiente secrezione di

⁴ Specie reattive dell'ossigeno: sono i radicali liberi più diffusi nel nostro organismo. I più importanti ROS sono l'anione superossido O_2^- , il perossido d'idrogeno H_2O_2 e il radicale ossidrilico $\bullet OH$.

⁵ L'ossidazione fosforilativa è un processo metabolico che sfrutta l'energia prodotta dall'ossidazione dei nutrienti per la produzione di ATP.

⁶ DNA mitocondriale.

insulina dovuta all'aumento della produzione dei ROS [49], [50]. Inoltre, essi descrivono come il polimorfismo del gene *mtAtp8* sia causa di una serie di disfunzioni riproduttive nel sesso femminile. Quindi, poiché la nostra indagine è stata condotta su soggetti diabetici, è ragionevole supporre che la diminuzione dell'intensità relativa della specie a *m/z* 7992 sia legata alla modificazione del gene *mtAtp8*.

Anche la specie a *m/z* 15128 mostra un decremento notevole nel caso dei soggetti interessati da GDM. Questa specie può essere giustificata dalla presenza nel tessuto di *Mrpl55*, un componente dell'unità grande (39S) dei ribosomi mitocondriali, espressa sia nelle cellule staminali degli embrioni umani, sia nelle linee cellulari HeLa.

Le proteine a *m/z* 15333, 15864 e 15991 sono a loro volta sotto espresse nel caso delle pazienti diabetici. La ricerca nel database suggerisce che la loro struttura sia attribuibile rispettivamente al peptide insulino-simile 5 (INSL5), alla proteina codificata dal gene *C14orf1* e alla proteina A del centromero (CENPA). L'INSL5 appartiene alla famiglia peptidica della relaxina/insulina e include l'insulina, i fattori di crescita⁷ insulino-simili 1 e 2 (IGF1 e IGF2), la relaxina e gli INSL dal 3 al 7. Essa è espressa nel cervello, rene, placenta, prostata, ovario, midollo osseo, polmone, cuore e colon; è un legante endogeno del recettore GPCR142, anch'esso espresso nel cervello, rene, placenta, prostata, timo e colon [51]. L'esatta funzione dell'INSL5 e del recettore GPCR142 non è ancora ben chiara, sebbene sia stato dimostrato che il legame dell'INSL5 con il GPCR142 inibisce l'accumulo dei cAMP⁸ [52]. Munro et al, inoltre, hanno trovato molte associazioni tra il polimorfismo del GPCR142 e vari disturbi metabolici, tra cui il diabete, l'ipercolesterolemia e l'obesità, suggerendo che in qualche modo sia coinvolta anche la famiglia di peptidi della relaxina/insulina [53].

La proteina codificata dal gene *C14orf1* è denominata proteina 28 per la probabile biosintesi dell'ergosterolo; è espressa in molti tessuti, inclusa la placenta. Appartiene alla famiglia ERG28 e si pensa sia coinvolta nel processo di biosintesi dell'ergosterolo [54].

La specie a *m/z* 30929 è sovra espressa nelle donne gravide con GDM, e potrebbe corrispondere alla trombospondina 1 (TPS-1), appartenente alla famiglia delle

⁷ Il termine fattore di crescita si riferisce a proteine capaci di stimolare la proliferazione e il differenziamento cellulare. Sono tipiche molecole segnale usate per la comunicazione tra le cellule di un organismo, un esempio sono le citochine (molecole infiammatorie) o gli ormoni, che si legano a specifici recettori sulla membrana cellulare dei loro target.

⁸ L'adenosina monofosfato ciclico (AMP ciclico o cAMP) è un metabolita delle cellule prodotto grazie all'enzima adenilato ciclasi a partire dall'ATP. È un importante "secondo messaggero" coinvolto nei meccanismi di trasduzione del segnale all'interno delle cellule viventi in risposta a vari stimoli.

glicoproteine extra-cellulari [55]. TPS-1 è un inibitore dell'angiogenesi⁹ [56] ed è stato identificato essere un attivatore endogeno del complesso TGF- β -procitochina, che a sua volta è considerata essere la citochina responsabile dello sviluppo di nefropatie legate al diabete [57]. Studi in vivo e in vitro, infatti, hanno dimostrato che la trombospondina-1 si lega alla forma latente del complesso TGF- β -procitochina, causando l'attivazione della citochina TGF- β , responsabile di molte malattie infiammatorie [58].

Anche la specie con peso molecolare 31282 Da risulta sovra espressa nella placenta diabetica; secondo il database, la proteina potrebbe essere un trasportatore dei dicarbossilati. Essa risulta presente in grande quantità nel fegato e nei reni, mentre è poco espressa nel cervello, cuore, polmone, pancreas, placenta e muscoli scheletrici. Questa proteina è coinvolta nel processo di gluconeogenesi¹⁰ poiché incentiva la traslocazione attraverso la membrana mitocondriale del malonato, malato e succinato in cambio di fosfato, solfato, solfito o tiosolfato [59].

Alternativamente all'analisi diretta dei due pool con lo spettrometro MALDI, è possibile usare un altro approccio sperimentale per l'identificazione delle proteine presenti nell'omogenato: esso prevede una fase di separazione delle specie con l'ausilio dell'elettroforesi monodimensionale, seguita dalla digestione triptica delle diverse bande ottenute al fine di ottenere una mappa peptidica utile per l'identificazione. L'elettroferogramma derivante dall'analisi dei due pool per mezzo di un' SDS-PAGE è mostrato in Figura 34: si può notare la presenza di molte proteine nell'intervallo di massa compreso tra i 15 e i 220 kDa. Le diverse bande, indicate per il pool dei controlli con lettere minuscole e per il pool dei diabetici con lettere maiuscole, sono state digerite con tripsina, e il prodotto ottenuto è stato analizzato con lo spettrometro MALDI. I dati acquisiti, quindi, sono stati confrontati con il database "*Protein Prospector*"; i risultati trovati sono riportati in Tabella 11 e Tabella 12.

Le bande elettroforetiche a 51 kDa (etichettate g e G) e le bande a 150 kDa (etichettate b e B) corrispondono rispettivamente al Bcl2 legato al fattore di trascrizione 1 e alla proteina SRRM1; l'analisi densitometrica del gel elettroforetico, Figura 35, indica che le bande G e B, appartenenti al pool delle gestanti diabetiche, presentano una densità ottica più elevata rispetto alle bande g e b dei controlli.

⁹ L'angiogenesi consiste nello sviluppo di nuovi vasi sanguigni a partire da altri già esistenti. È un processo di fondamentale importanza in molti processi fisiologici (quali la normale crescita del tessuto, lo sviluppo embrionale, la cicatrizzazione delle ferite, il ciclo mestruale) e patologici.

¹⁰ La gluconeogenesi è un processo metabolico mediante il quale, in caso di necessità dovuta ad una carenza di glucosio nel flusso ematico, un composto non glucidico viene convertito in glucosio, seguendo sostanzialmente le tappe inverse delle glicolisi.

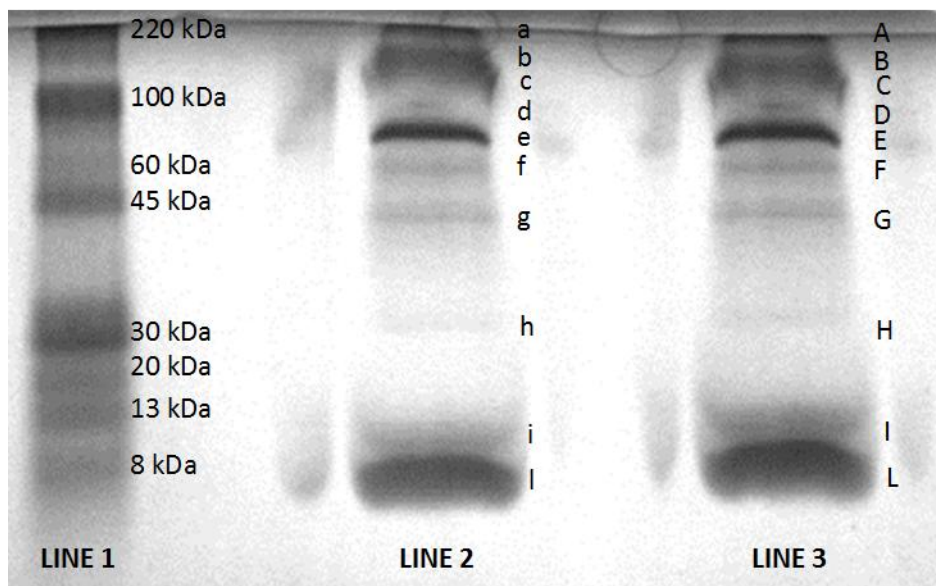


Figura 34: Line 1: soluzione standard di calibrante 220-8 kDa; line 2: pool dei controlli; line 3: pool delle diabetiche.

Tabella 11: Confronto tra i dati MALDI ottenuti dalla digestione triptica della bande elettroforetiche e il database Protein Prospector per il pool dei controlli.

POOL DEI CONTROLLI				
SDS PAGE	m/z	NOME	Coverage-Score	Access. number
BANDA a	120716	CLK4-associating serine/arginine rich protein	53%-72%	Q8N2M8
BANDA b	102336	Serine/arginine ripetitive matrix protein 1	66%-71%	Q8IYB3
BANDA c	93232	Caldesmon	63%-74%	Q05682
BANDA d	95583	Probable ATP-dep. RNA helicase DDX23	67%-76%	Q9BUQ8
BANDA e	88618	Peptidyl-propyl cis-trans isomerase G	65%-77%	Q14327
BANDA f	88618	Peptidyl-propyl cis-trans isomerase G	73%-74%	Q14327
BANDA g	106123	Bcl2-associated transcriptor Factor 1	62%-71%	Q9NYF8
BANDA h	95583	Probable ATP-dep. RNA helicase DDX23	72%-79%	Q9BUQ8
BANDA i	90726	Human topoisomerase1	81%-73%	P11387
BANDA l	116988	Serine/threonine protein kinase PRP4 homolog	70%-78%	Q13523

Tabella 12: Confronto tra i dati MALDI ottenuti dalla digestione triptica della bande elettroforetiche e il database Protein Prospector per il pool delle GDM.

POOL DELLE PAZIENTI GDM				
SDS PAGE	m/z	NOME	Coverage-Score	Access. number
BANDA A	120716	CLK4-associating serine/arginine rich protein	49%-67%	Q8N2M8
BANDA B	102336	Serine/arginine ripetitive matrix protein 1	45%-70%	Q8IYB3
BANDA C	90726	Human topoisomerase 1	46%-75%	P11387
BANDA D	95583	Probable ATP-dep. RNA helicase DDX23	51%-75%	Q9BUQ8
BANDA E	88618	Peptidyl-propyl cis-trans isomerase G	55%-69%	Q14327
BANDA F	66403	C2orf77	56%-69%	Q0VZF6
BANDA G	106123	Bcl2-associated transcriptor factor 1	34%-74%	Q9NYF8
BANDA H	95583	Probable ATP-dep. RNA helicase DDX23	50%-78%	Q9BUQ8
BANDA I	90726	Human topoisomerase 1	52%-74%	P11387
BANDA L	116988	Serine/threonine protein kinase PRP4 homolog	65%-77%	Q13523

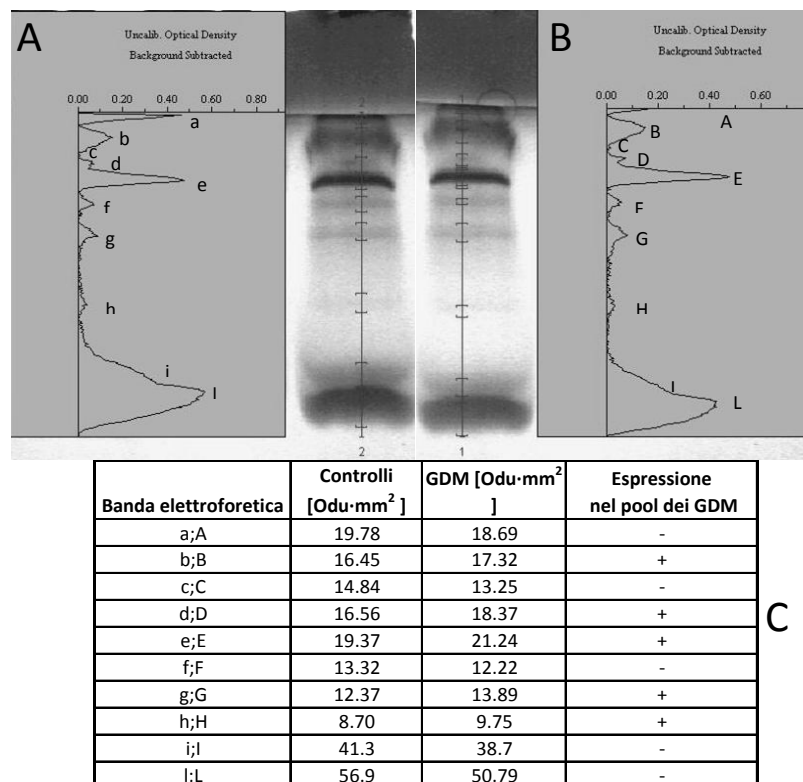


Figura 35: Analisi densitometrica. A: profilo di densità ottica delle bande elettroforetiche ottenute per il pool dei controlli. B: profilo di densità ottica delle bande elettroforetiche ottenute per il pool delle diabetiche. C: tabella riassuntiva.

Il Bcl2 legato al fattore di trascrizione 1 è un repressore trascrizionale che interagisce con molte proteine della famiglia BCL2; esso è espresso in molti tessuti, tra cui la placenta. La sovra espressione di questa proteina può causare apoptosi. In accordo con quanto riportato da Ortis et al [60], nelle cellule beta di ratto si può notare un incremento dell'espressione dei geni codificanti per il Bcl2 associato alla proteina X e per la SRRM1 (serine/arginine repetitive matrix protein 1) in seguito all'esposizione alle citochine. Si osserva, inoltre, che nei soggetti sofferenti di diabete mellito di tipo 1, i macrofagi e le cellule T attivate rilasciano citochine in prossimità delle cellule beta, causandone mal funzionamenti e apoptosi [61].

Le bande elettroforetiche etichettate come "a" e "A" corrispondono alla proteina CLASRP (CLK4-associating serine/arginine rich protein), che appartiene alla medesima famiglia della proteina SRRM1. L'analisi densitometrica mostra una densità ottica più bassa per la banda relativa al pool dei soggetti affetti da GDM rispetto al pool dei soggetti sani.

Per confermare l'identità delle proteine separate per mezzo dell'elettroforesi, in particolare per il Bcl2 legato al fattore di trascrizione 1, la SRRM1 e la CLASRP, si è simulata la digestione triptica utilizzando il software *MS-Digest*, accessibile dal portale di *Protein Prospector*. La lista dei peptidi ottenuta è quindi stata confrontata con quella derivante dall'analisi MALDI dei digeriti delle bande elettroforetiche a, A, b, B, g e G; come si può notare in Tabella 13, le analisi sperimentali sono in ottimo accordo con i dati teorici.

Tabella 13: esempi di confronto tra i picchi forniti da *MS-Digest* e quelli ottenuti dall'analisi MALDI dei digeriti triptici.

Proteina	Picco teorico fornito da MS-Digest	Picco ottenuto dall'analisi MALDI dei digeriti triptici	Banda
Serine/arginine repetitive matrix protein 1	1405.658	1405.616	b, B
	1706.952	1706.70	b, B
	1790.887	1790.703	b, B
	2045.369	2044.932	b, B
Bcl2-associated transcriptor factor 1	1198.313	1198.689	g, G
	1529.653	1529.714	g, G
CLK4-associating serine/arginine rich protein	1550.932	1550.712	a, A
	2545.316	2545.034	a, A
	2749.346	2749.122	a, A

Un'ulteriore conferma dei risultati riportati precedentemente è stata ottenuta attraverso degli esperimenti di massa/massa; la procedura consiste nel confrontare la sequenza di uno dei peptidi derivanti dalla digestione enzimatica della proteina di interesse con la sequenza dello stesso peptide determinata dal software per la digestione virtuale. Le specie selezionate per effettuare gli esperimenti di massa/massa non sono state scelte arbitrariamente; è essenziale, infatti, prendere in considerazione solamente i picchi più intensi e più distanziati dagli altri, al fine di isolare efficacemente lo ione di interesse e di ottenere un valido spettro di frammentazione ricco di informazioni.

Ad esempio, la frammentazione per collisione della specie a m/z 1406, ottenuta dalla digestione delle bande elettroforetiche b e B, ha permesso di determinare la sequenza amminoacidica del peptide; successivamente, si confronta quest'ultima con la sequenza amminoacidica del peptide avente massa 1406 Da derivante dalla digestione virtuale della proteina SRRM1. Come si può notare in Figura 36, c'è una stretta omologia tra la sequenza delle due specie; questo significa che i peptidi corrispondono e che l'identificazione della proteina è corretta.

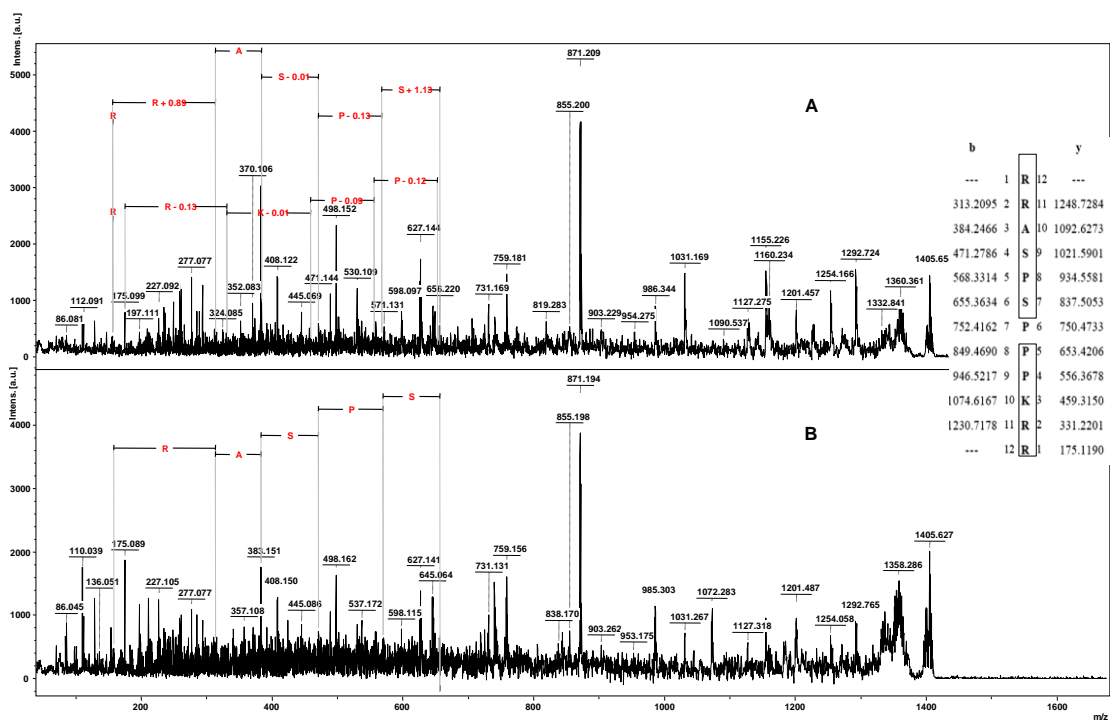


Figura 36: Spettro MS/MS del peptide con PM 1406 Da, ottenuto dalla digestione della banda b (spettro A) e B (spettro B).

Il peptide di massa 2045 Da è stato analizzato in modo analogo; i risultati sono riportati in Figura 37 e dimostrano che le bande elettroforetiche b e B, appartenenti rispettivamente al pool dei controlli e al pool delle gestanti con GDM, corrispondono effettivamente alla proteina SRRM1.

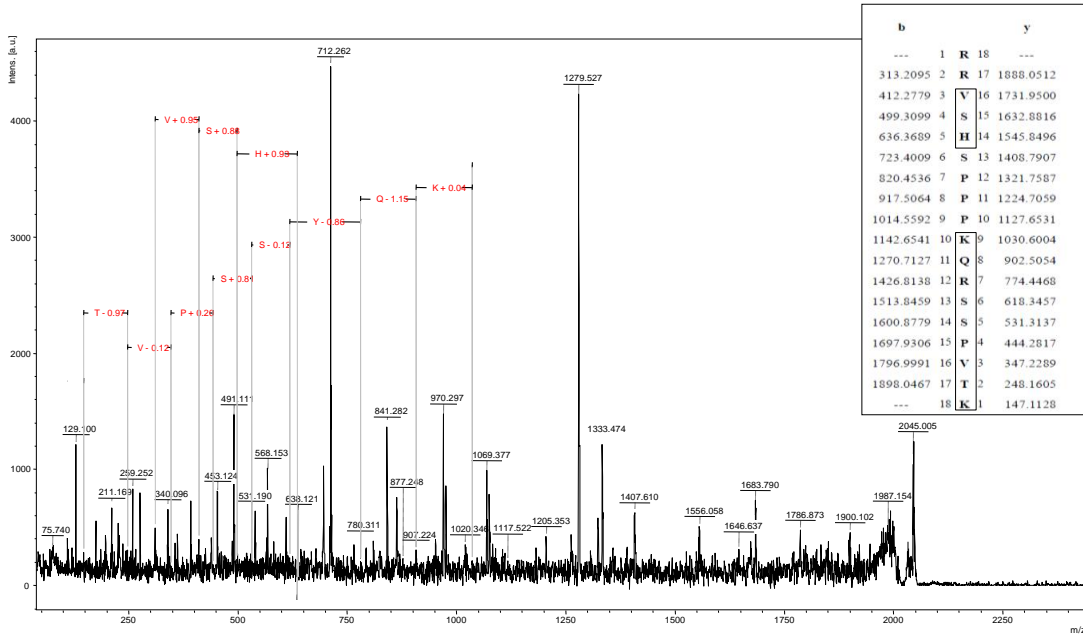


Figura 37: Spettro MS/MS del peptide con PM 2045 Da, ottenuto dalla digestione della banda b e B.

La stessa procedura è stata applicata per verificare l'identità delle proteine contenute nelle bande elettroforetiche g, G, a, e A. Per le bande g e G è stata analizzata la specie a m/z 1529 (Figura 38), mentre per le bande a e A si è determinata la sequenza del peptide di massa 2545 Da (Figura 39); in entrambi i casi è stata confermata la corretta identificazione della proteina.

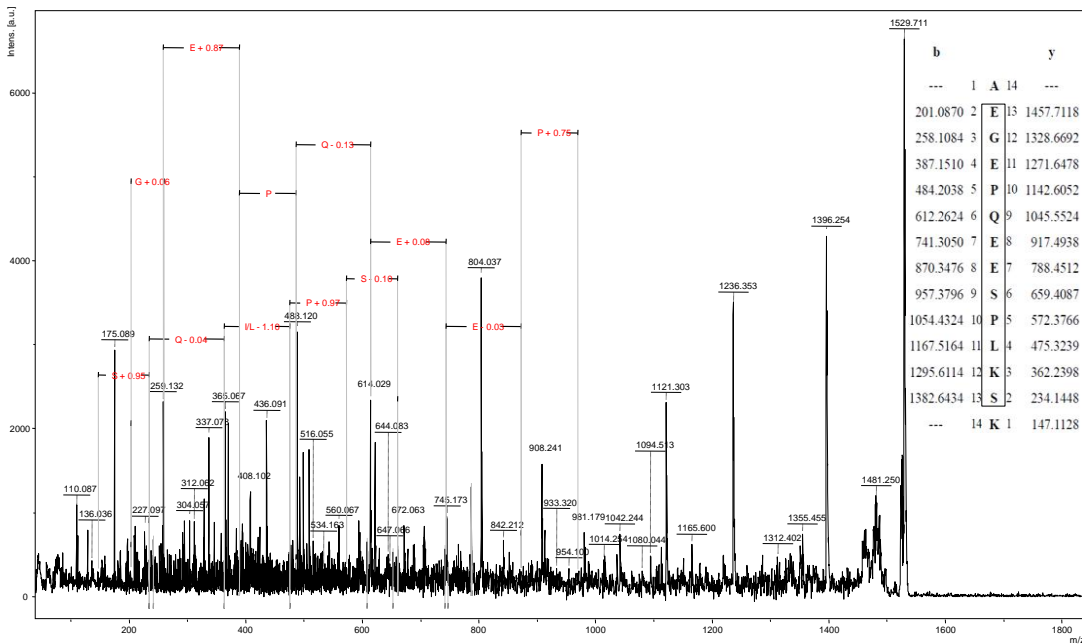


Figura 38: Spettro MS/MS del peptide con PM 1529 Da, ottenuto dalla digestione della banda g.

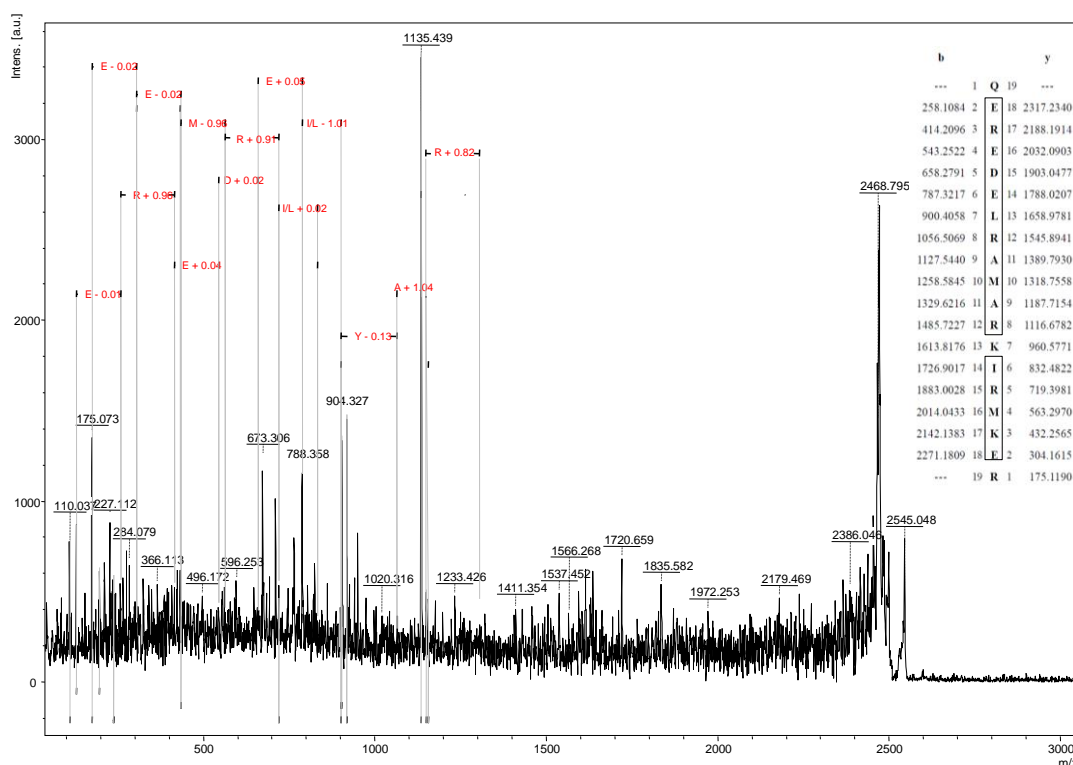


Figura 39: Spettro MS/MS del peptide con PM 2545 Da, ottenuto dalla digestione della banda a e A.

Gli spettri MALDI dei prodotti di digestione derivanti dal pool delle diabetiche sono stati ulteriormente analizzati per verificare la presenza di specie glicate derivanti dalla reazione tra un residuo amminoacidico contenente un gruppo amminico primario e un zucchero esoso (es. il glucosio). In Figura 40 è riportato un esempio, nel quale si confrontano gli spettri MALDI ottenuti dalla digestione della banda elettroforetica b (controlli) e della banda B (GDM). Lo spettro del pool delle gestanti affette da GDM mostra la comparsa di due segnali a m/z 1387 e 1430 e la diminuzione dell'intensità della specie a m/z 1226; questo comportamento è dovuto alla formazione di un'esosammina (+160 Da) nel primo caso e di una N-acetil-esosammina (+203 Da) nel secondo caso. Inoltre, nello stesso spettro si nota la diminuzione dell'intensità della specie a m/z 1566 e la comparsa del picco a m/z 1406, sempre dovuto alla condensazione di una molecola di glucosio ad un residuo di lisina. La diminuzione dell'intensità del picco a m/z 1698 e la presenza del picco a m/z 1845, invece, indicano dell'addizione di un fucosio (uno zucchero deossiesoso).

I risultati finora riportati, quindi, dimostrano una differente espressione proteica tra il tessuto placentare materno proveniente da soggetti sani e lo stesso substrato proveniente da pazienti affette da GDM; si attesta, inoltre, la presenza di alterazioni strutturali delle proteine placentari in presenza di diabete.

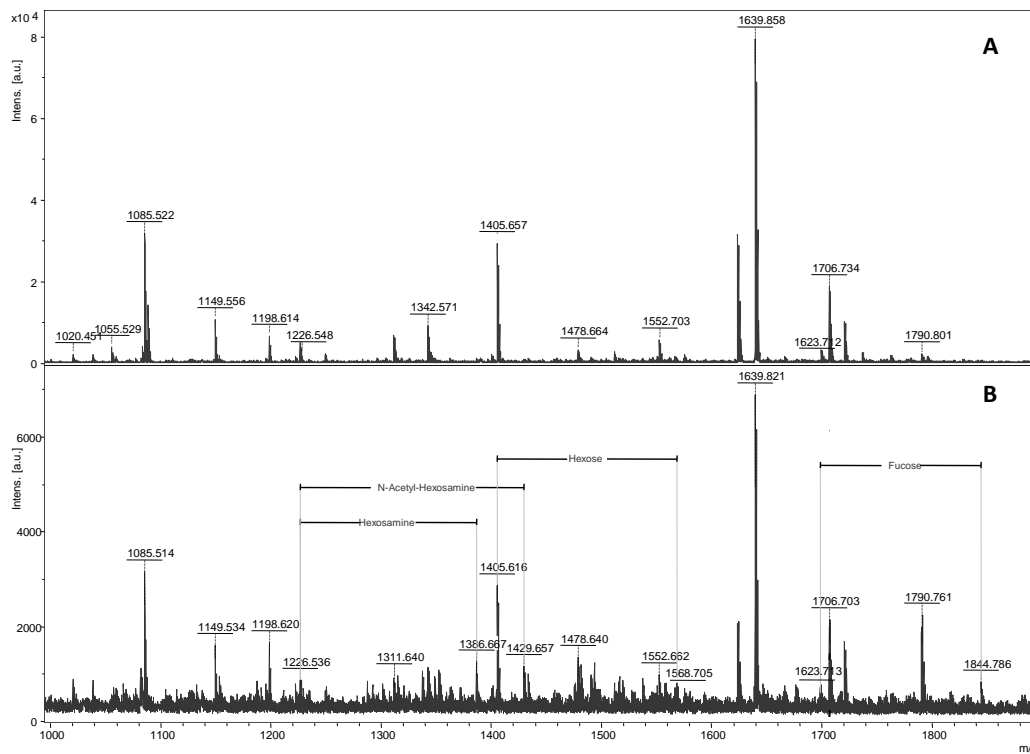


Figura 40: glicazione proteica di SRRM1. A: Analisi MALDI del digerito per il pool dei controlli; B: analisi MALDI del digerito per il pool delle pazienti GDM

5.1.2 - Lato fetale

Per investigare sulla presenza di possibili differenze tra il tessuto placentare dei soggetti sani e delle pazienti GDM è stata presa in considerazione anche la porzione fetale della placenta.

L'analisi diretta delle proteine idrosolubili contenute nei pool, ottenuti dall'omogeneizzazione del tessuto placentare fetale derivante da gestanti affette da GDM e soggetti sani, è riportato in Figura 41.

Così come operato per gli spettri del lato materno, anche in tal caso sono stati calcolati i valori di abbondanza relativa A_r dei vari picchi, e i valori ottenuti per le placente di gestanti sane e per quelle di gestanti affette da GDM sono stati confrontati tra loro.

Le differenze più significative, dovute alle specie con un peso molecolare compreso nell'intervallo 4-67 kDa, sono sintetizzate nell'istogramma riportato in Figura 42.

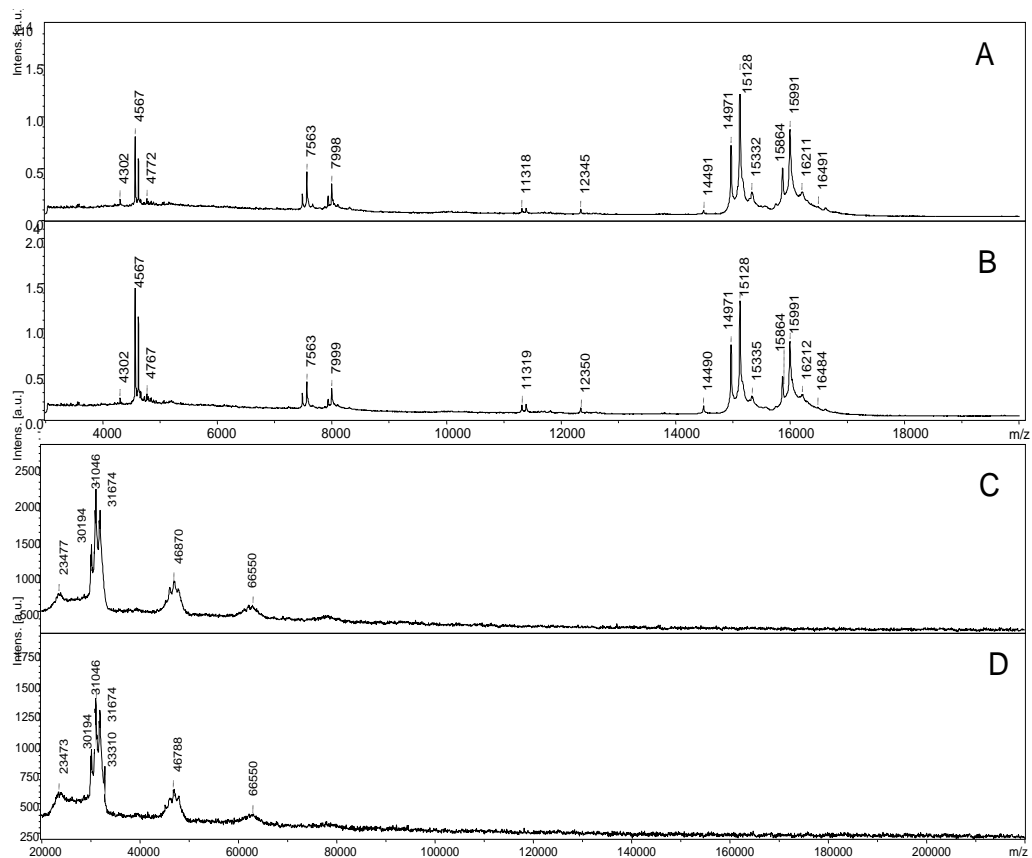


Figura 41: A: spettro MALDI del pool dei controlli, intervallo di m/z tra 4000-20000. B: spettro MALDI del pool delle pazienti GDM, intervallo di m/z tra 4000-20000. C: spettro MALDI del pool dei controlli trattato con Zip-Tip, intervallo di m/z tra 20000-100000. D: spettro MALDI del pool delle pazienti GDM trattato con Zip-Tip, intervallo di m/z tra 20000-100000.

Anche in questo caso si è proceduto ad un'identificazione preliminare delle proteine, ottenuta grazie al confronto del peso molecolare della specie incognita con i dati riportati nei database di riferimento [46], [47]. L'assegnazione non è stata possibile per le specie con peso molecolare 4567 Da, 4622 Da e 7563 Da.

Come mostrato nell'istogramma in Figura 42, le specie a m/z 7933 e 15864 sono sotto espresse nella parte fetale delle placente provenienti da madri affette da GDM rispetto al gruppo dei controlli. La prima specie può essere attribuita ad una subunità dell'ATP sintetasi (ATP5I), una proteina mitocondriale espressa in molti tessuti; il suo compito è la produzione di ATP da ADP in presenza di un gradiente protonico tra le membrane mitocondriali, generato grazie al trasporto elettronico che si instaura durante il processo di respirazione cellulare [62]. La seconda specie, invece, potrebbe corrispondere alla proteina C14orf1.

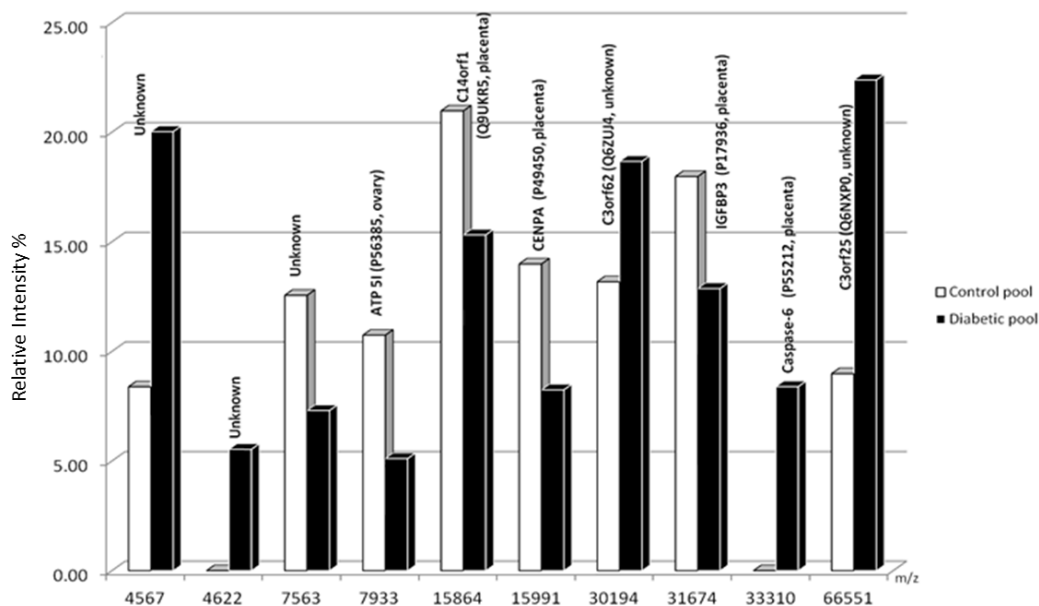


Figura 42: Istogramma riassuntivo delle differenze nell'espressione proteica tra il pool dei sani e il pool delle pazienti GDM.

Le proteine a m/z 15991 e 30194 sono sovra espresse in presenza di GDM; la ricerca nelle librerie le identifica rispettivamente come proteina A del centromero (CENPA) e proteina C3orf62; quest'ultima è una specie non classificata la cui funzione è ancora sconosciuta.

La specie a m/z 31674 potrebbe corrispondere alla struttura del fattore di crescita insulino-simile legato alla proteina 3 (IGF-BP3), un complesso proteico che regola l'azione del fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1): una volta che l'IGF-1 si è legato all'IGF-BP3, infatti, il complesso agisce come riserva di IGF-1 nel sangue [63]. Alcuni recenti studi hanno documentato che oltre ai fattori di crescita insulino-simili, sono presenti altre varietà di IGF, probabilmente coinvolti nella crescita del feto [64]; in particolare, si pensa che gli IGF siano responsabili della macrosomia riscontrata nei neonati provenienti da madri diabetiche [65]. Roth et al, inoltre, hanno documentato che questi soggetti mostrano un incremento dei livelli di IGF-I nel sangue prelevato dal cordone ombelicale [66]. Nell'istogramma in Figura 42 si nota la sotto espressione del presunto IGF-BP3 nel lato fetale delle gestanti diabetiche rispetto al gruppo dei controlli; questi dati sono in accordo con quelli ottenuti da Grissa et al. Il loro lavoro dimostra, infatti, che gli IGF-BP3 sono presenti in quantità maggiori nel siero delle madri con gravidanze complicate dal GDM e dei relativi neonati macrosomici, ma che la placenta non è coinvolta, poiché l'espressione dell'mRNA codificante per gli IGF-BP3 è sotto regolata nel suddetto tessuto [67].

Le specie a m/z 33310 e 66551 sono ampiamente sovra espresse nel lato fetale delle placente diabetiche; questi segnali possono essere attribuiti rispettivamente alla Caspase-6 e alla proteina C3orf25, la cui funzione è sconosciuta. La Caspase-6 è coinvolta nell'attivazione del meccanismo che porta all'apoptosi. La morte cellulare programmata è di vitale importanza per lo sviluppo del feto ed è stato ipotizzato che la funzionalità di questo processo sia legata alla rimozione di cellule difettose dai blastocisti prima della differenziazione delle cellule staminali fetali, durante la gastrulazione¹¹ [68]. È stato riconosciuto che le blastocisti esposte *in utero* al diabete o *in vivo* ad alte concentrazioni di glucosio, sono formate da un numero di cellule minore rispetto alle blastocisti che si sviluppano in un ambiente sano; inoltre, presentano un incremento dei marker legati all'apoptosi [69]. Oltre a questo, Hinck et al hanno dimostrato che la Caspase-6 ha un ruolo molto importante nell'indurre l'apoptosi, incrementando la frammentazione del DNA nucleare, quando le cellule sono sottoposte ad elevate concentrazioni di glucosio [70].

5.2 - Analisi diretta del tessuto placentare

La determinazione del profilo di espressione proteica direttamente da tessuto è un'opportunità interessante poiché permette di velocizzare la fase di preparazione del campione e quindi di ridurre i tempi di analisi.

In Figura 43 e in Figura 44 si mostrano, come esempio, gli ingrandimenti degli spettri MALDI ottenuti dall'analisi del lato materno di un campione di placenta sana e di un campione di tessuto derivante da una paziente affetta da GDM. Come si nota, le specie rilevate corrispondono con quelle presenti negli spettri MALDI dell'omogenato; questo è confermato dal confronto dei segnali ottenuti, riportato in Tabella 14.

In Figura 45 e in Figura 46 si mostrano, inoltre, gli ingrandimenti degli spettri MALDI ottenuti dall'analisi del lato fetale di un campione di placenta sana e di un campione di tessuto derivante da una paziente con GDM. Anche in questo caso, come si può osservare dalla Tabella 15, c'è un buon accordo tra i dati ottenuti dall'omogenato e quelli ottenuti dall'analisi diretta del tessuto.

¹¹ La gastrulazione è un tipico processo embrionale che comporta la differenziazione delle cellule staminali per la formazione del foglietto embrionale primario (ectoderma, endoderma) e di quello secondario (mesoderma).

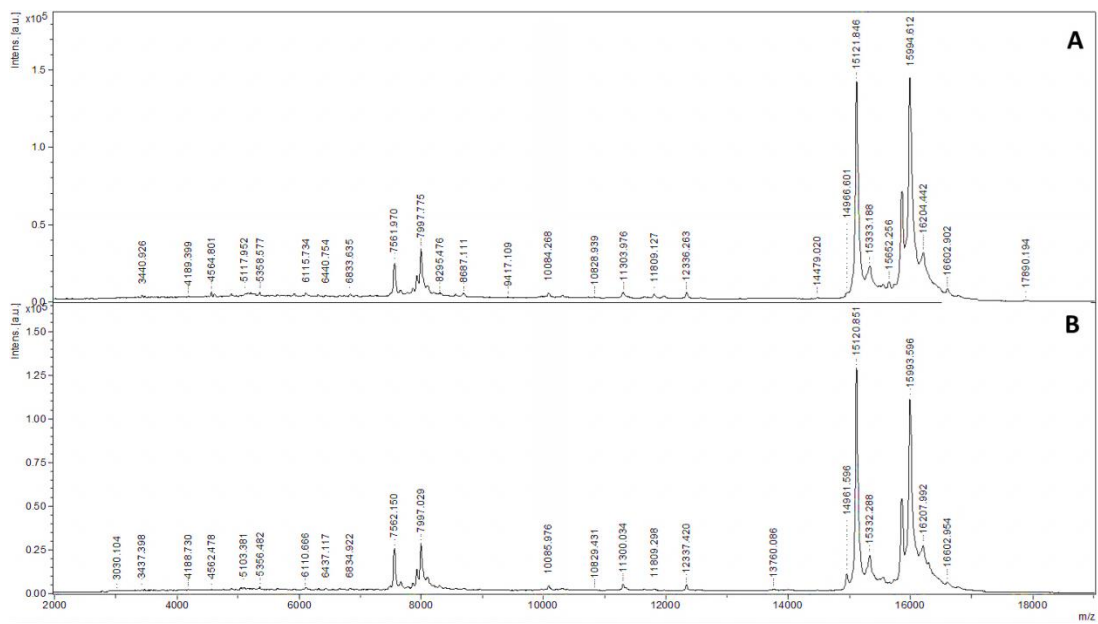


Figura 43: A: spettro MALDI del tessuto placentare sano (lato madre), intervallo di m/z tra 2000-18000. B: spettro MALDI del tessuto placentare GDM (lato madre), intervallo di m/z tra 2000-18000.

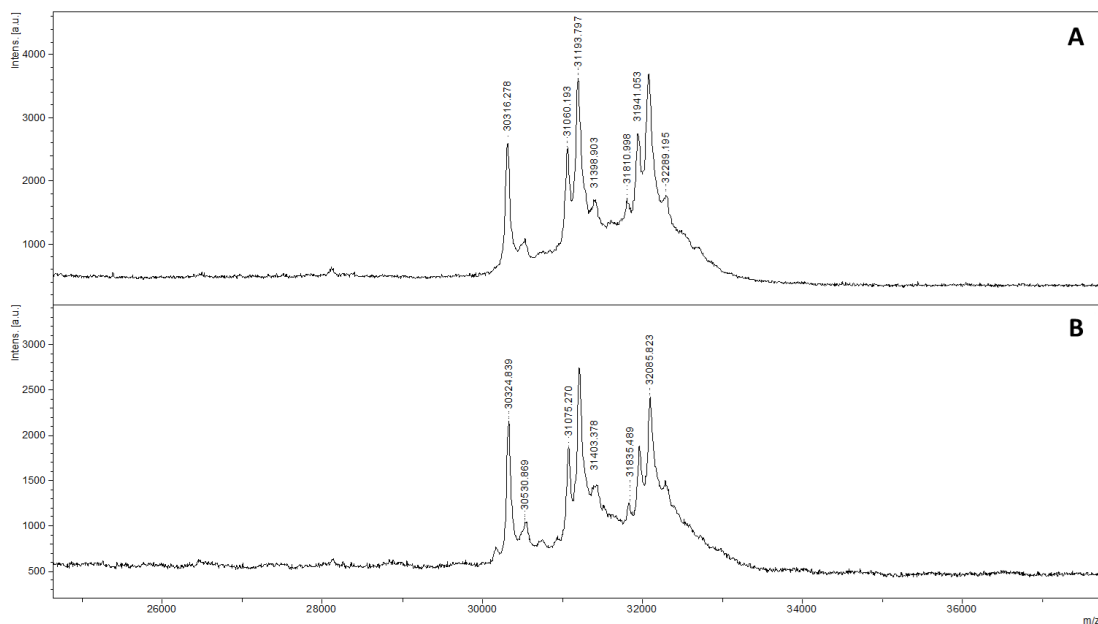


Figura 44: A: spettro MALDI del tessuto placentare sano (lato madre), intervallo di m/z tra 25000-36000. B: spettro MALDI del tessuto placentare GDM (lato madre), intervallo di m/z tra 25000-36000.

Tabella 14: Confronto tra i segnali MALDI ottenuti per il tessuto e per l'omogenato del lato materno della placenta.

m/z	Spettro MALDI del tessuto	Spettro MALDI dell'omogenato
4567	X (4564)	X
4623	X (4622)	X
7992	X (7997)	X
15128	X (15121)	X
15333	X	X
15864	X (15963)	X
15991	X (15994)	X
30929	-	X
31282	X (31829)	X

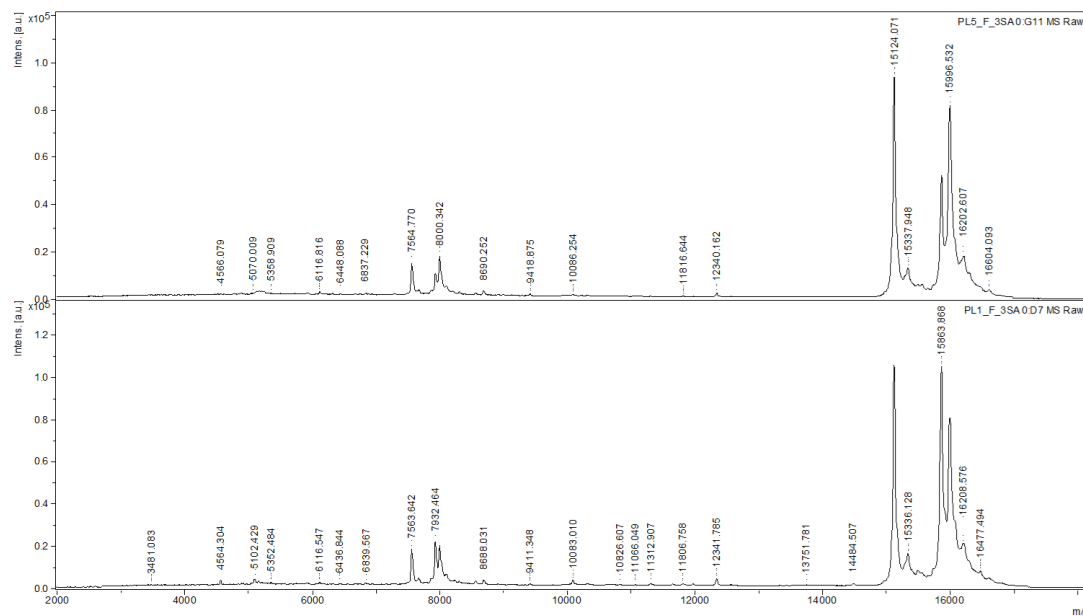


Figura 45: A: spettro MALDI del tessuto placentare sano (lato feto), intervallo di m/z tra 2000-18000. B: spettro MALDI del tessuto placentare GDM (lato feto), intervallo di m/z tra 2000-18000.

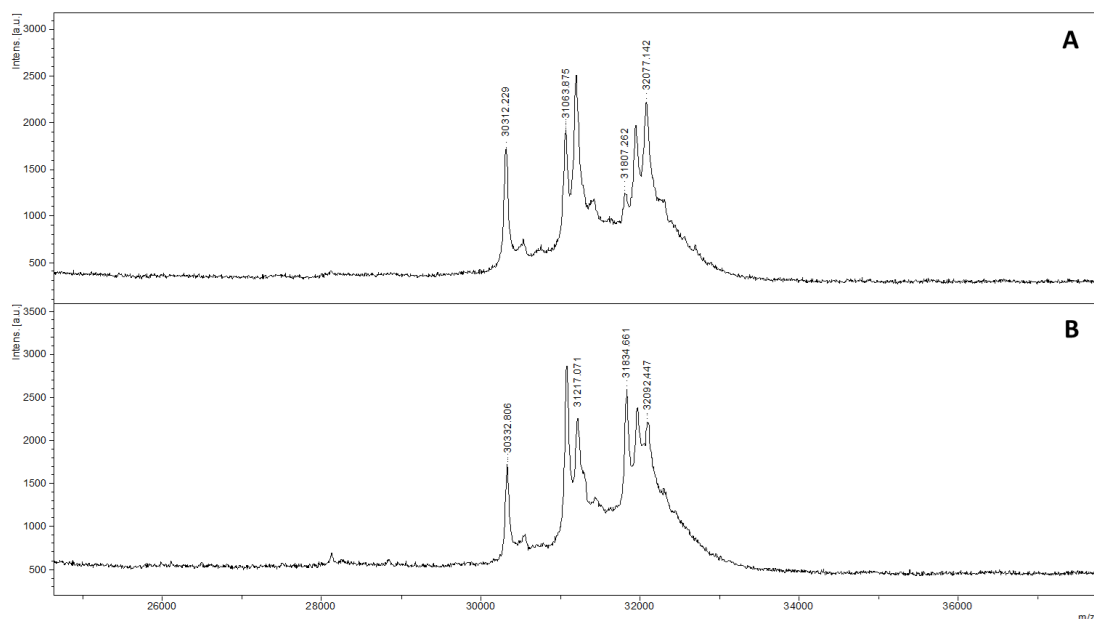


Figura 46: A: spettro MALDI del tessuto placentare sano (lato feto), intervallo di m/z tra 25000-36000. B: spettro MALDI del tessuto placentare GDM (lato feto), intervallo di m/z tra 25000-36000.

Tabella 15: Confronto tra i segnali MALDI ottenuti per il tessuto e per l'omogenato del lato fetale della placenta.

m/z	Spettro MALDI del tessuto	Spettro MALDI dell'omogenato
4567	X (4566)	X
4622	X	X
7563	X (7564)	X
7933	X (7932)	X
15864	X	X
15991	X (15996)	X
30194	-	X
31674	? (31752)	X
33310	-	X

A questo punto, si calcolano le abbondanze relative delle varie specie per tutti gli spettri (la somma delle intensità di tutte le specie in uno spettro è posta pari a 1000); i dati sono quindi interpretati per valutare la presenza di differenze significative nell'espressione proteica tra i tessuti placentari provenienti da madri sane, madri con GDM, feti sani e feti con GDM. Si riportano, in Figura 47, i risultati ottenuti per la specie ad m/z 15864: come si può notare, la variabilità individuale è molto elevata e non è possibile determinare con sicurezza la presenza di una variazione nell'espressione proteica.

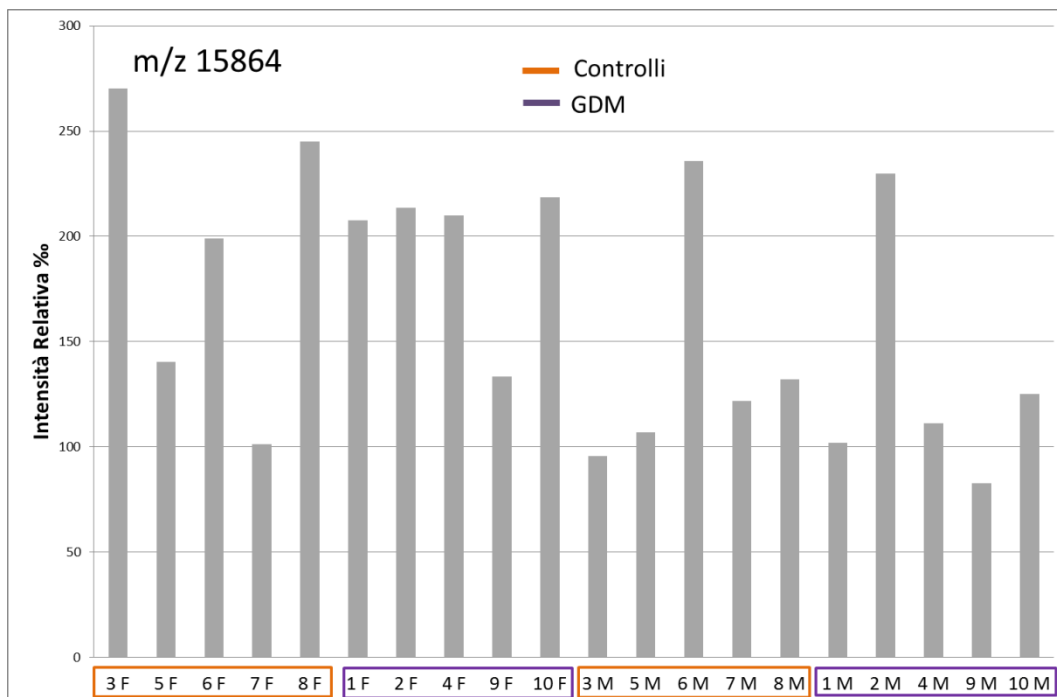


Figura 47: abbondanze relative (%) della specie a m/z 15864 nel tessuto materno e fetale delle placente analizzate.

Quindi, per ogni gruppo si determina la media, la deviazione standard e si esegue un test t di Student (a due code) per confrontare i risultati; la differenza tra le medie è considerata significativa per un $p < 0.05$. In Figura 48 si riportano i risultati per la specie ad m/z 15864.

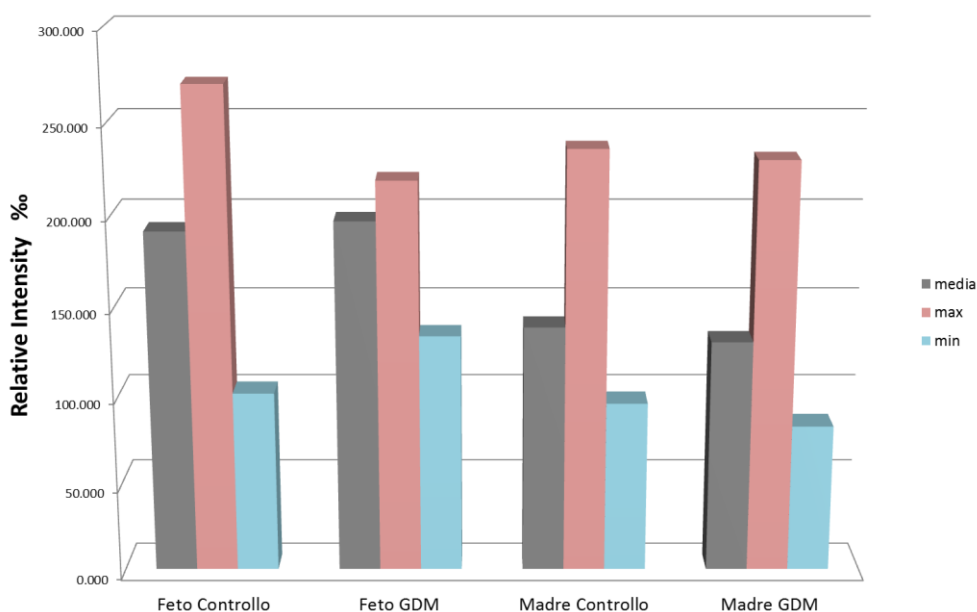


Figura 48: m/z 15864: media delle abbondanze relative, valore massimo e valore minimo.

In questo caso, il test di Student condotto tra la media delle specie relative ai feti sani e ai feti GDM, e tra la media dell'intensità delle specie relative alle madri sane e alle madri GDM fornisce un $p > 0.05$; le medie, quindi, non si possono considerare significativamente differenti. Inoltre, non si nota una sotto espressione della specie a m/z 15874 per le pazienti affette da GDM rispetto ai controlli, come invece era stato osservato nell'analisi degli omogenati.

La specie a m/z 31752 (Figura 49), considerando le medie delle intensità relative, sembrerebbe sotto espressa nelle pazienti affette da GDM, confermando i dati ottenuti per gli omogenati; inoltre, si evidenzia la sua presenza anche nel lato materno, con lo stesso andamento. Eseguendo il test di Student, però, le medie non risultano significativamente differenti e quindi non è possibile provare l'ipotesi precedente.

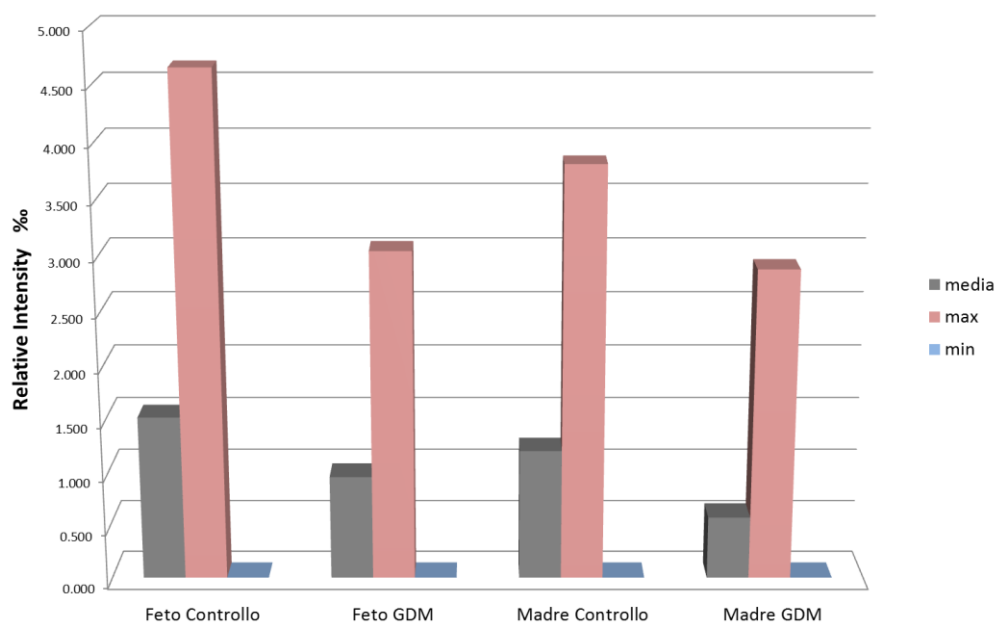


Figura 49: m/z 15864: media delle abbondanze relative, valore massimo e valore minimo.

Considerando il valore di intensità relativa massimo e il valore di intensità relativa minimo all'interno di uno stesso gruppo, si osserva come la differenza tra i due sia molto marcata (Figura 48 e Figura 49); questo dimostra che la variabilità individuale nell'espressione proteica del tessuto placentare è elevata. Il risultato del test di Student dipende dalla deviazione standard, la quale a sua volta è inversamente proporzionale alla radice quadrata del numero di campioni analizzati; visto l'esiguo numero di casi studiati e considerando l'elevata variabilità individuale tra di essi, le deviazioni standard calcolate risultano essere superiori al valore della media per la maggior parte delle specie presenti negli spettri MALDI. Pertanto, il valore di p calcolato per mezzo del test di Student è poco significativo e non consente

minimamente la valutazione corretta delle differenze nell'espressione proteica placentare. Per questo motivo, i risultati ottenuti dall'analisi diretta dei campioni di tessuto placentare non possono essere considerati affidabili e richiedono di essere confermati prendendo in esame un numero maggiore di pazienti e di controlli.

Tuttavia, è stato possibile verificare che per alcune specie l'espressione proteica non è influenzata unicamente dalla patologia, ma dipende anche dal lato (materno o fetale) dal quale si preleva il campione di tessuto.

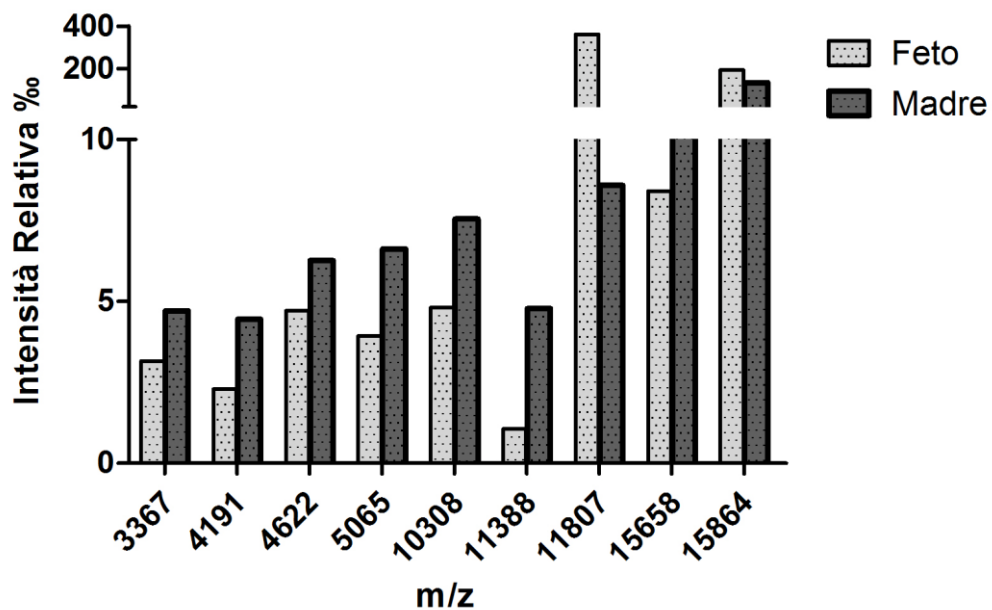


Figura 50: Differenze significative tra il tessuto placentare fetale e materno.

In Figura 50, si osserva come molte specie nell'intervallo di massa compreso tra i 3 kDa e i 16 kDa siano sotto espresse nel lato fetale della placenta rispetto alla parte materna. Un risultato interessante è stato ottenuto per la specie ad m/z 11388; la ricerca condotta su HPRF ha suggerito che questo segnale possa essere attribuito alla proteina codificata dal gene CXCL2 (denominata C-X-C motif chemokine 2), una chemochina appartenente alla famiglia delle citochine. La CXCL2, assieme a CXCL3, CXCL6 e CXCL8, è coinvolta nel meccanismo dell'angiogenesi e nella regolazione del GnRH (gonadotropin-releasing hormone) durante il processo di sviluppo della placenta. Quest'ultimo risulta attivo durante tutta la gravidanza, ma in particolar modo alla fine del primo trimestre gestazionale, quando si ha lo sviluppo dei villi e la rimodellazione dell'interfaccia tissutale tra la madre e il feto [71].

Le specie a m/z 11807 e 15864, invece, risultano sovra espresse nel tessuto placentare fetale rispetto a quello materno

L'analisi diretta de tessuto placentare ha permesso di registrare anche gli spettri MALDI relativi ai peptidi compresi nell'intervallo di massa 1500-5000 Da. Gli spettri ottenuti sono riportati in Figura 51 e in Figura 52.

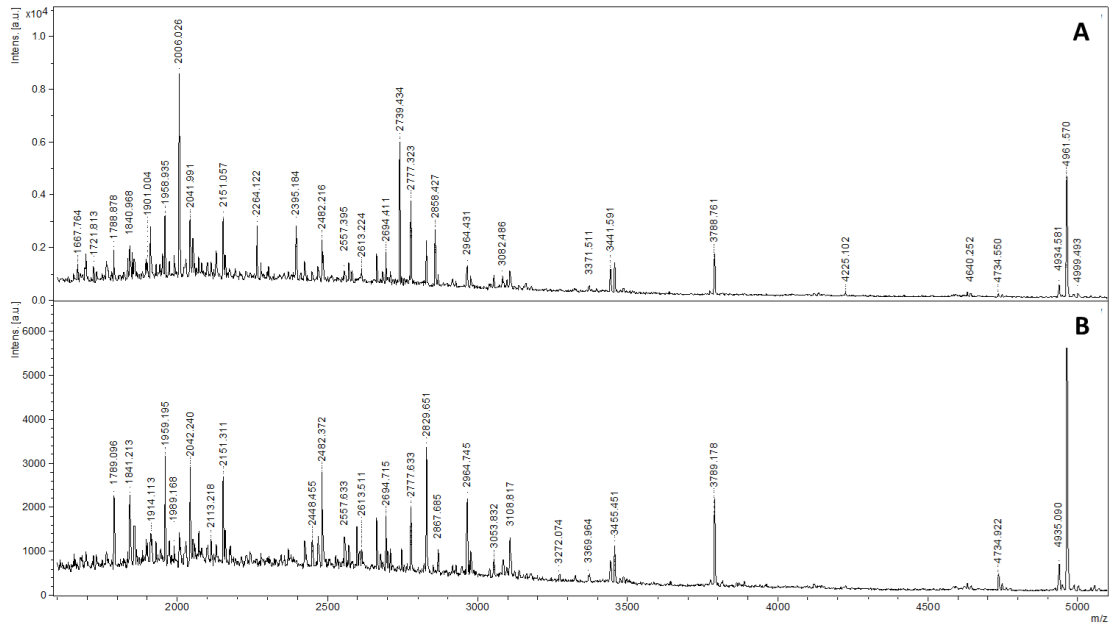


Figura 51: A: spettro MALDI del tessuto placentare sano (lato madre), intervallo di m/z tra 1600-5000. B: spettro MALDI del tessuto placentare GDM (lato madre), intervallo di m/z tra 1600-5000.

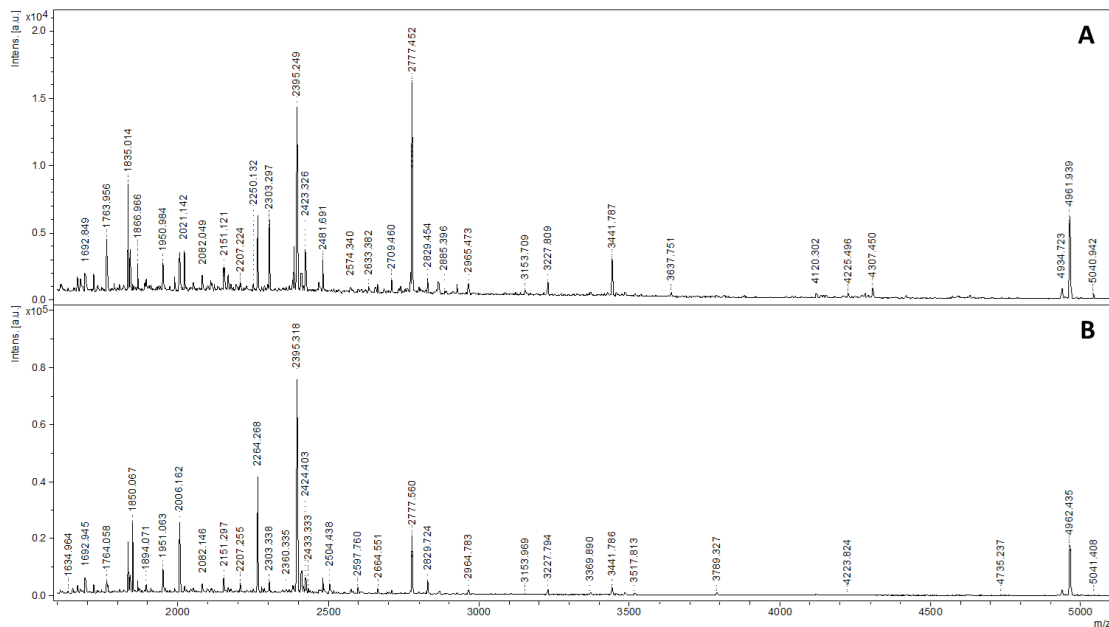


Figura 52: A: spettro MALDI del tessuto placentare sano (lato feto), intervallo di m/z tra 1600-5000. B: spettro MALDI del tessuto placentare GDM (lato feto), intervallo di m/z tra 1600-5000.

I peptidi presenti in un tessuto, solitamente, sono delle piccole catene amminoacidiche implicate nel *signalling* cellulare, ovvero svolgono la funzione di messaggeri chimici per il controllo e il coordinamento dell'attività cellulare. Alcuni di questi, inoltre, possono essere prodotti dalla proteolisi *in vivo* di proteine ad alto peso molecolare ad opera di enzimi specifici; teoricamente, eseguendo un esperimento MS/MS su queste specie è possibile determinarne la sequenza amminoacidica e risalire alla proteina di provenienza.

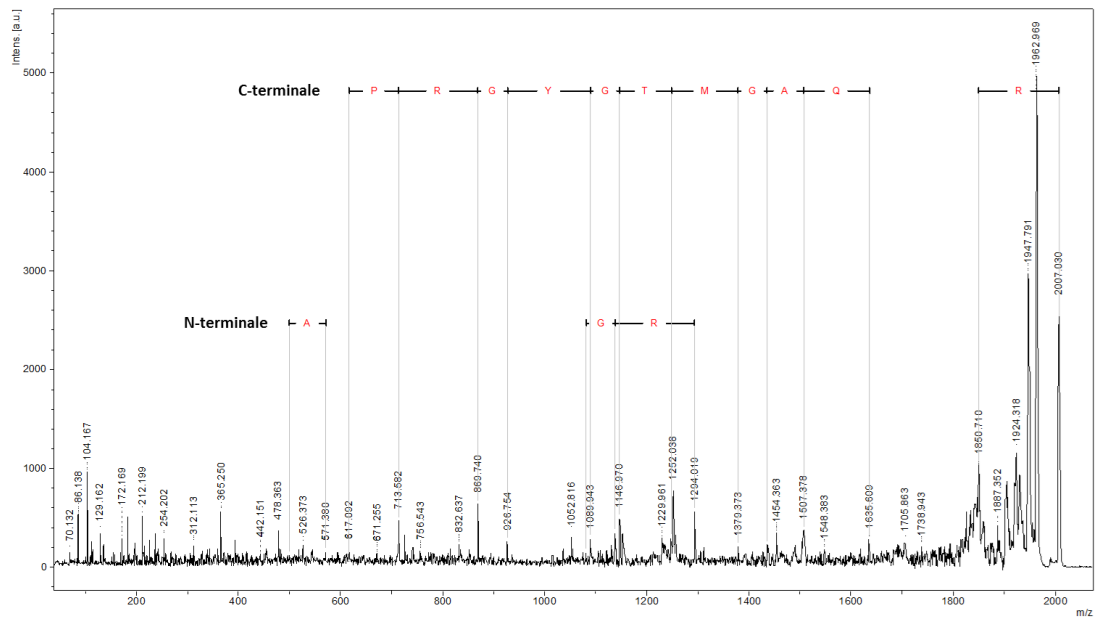


Figura 53: Spettro MS/MS del peptide ad m/z 2006.

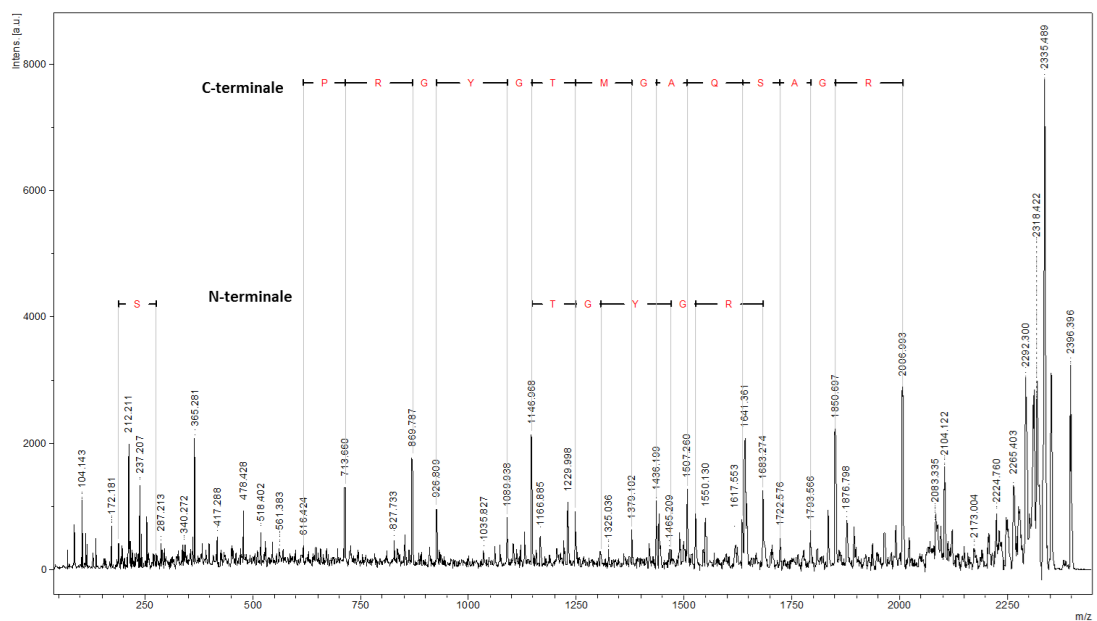


Figura 54: Spettro MS/MS del peptide ad m/z 2395.

In Figura 53, Figura 54 e Figura 55 sono riportati gli spettri MS/MS rispettivamente delle specie ad m/z 2006, 2395 e 2777; l'analisi degli spettri è stata eseguita tramite il software online *MS-Seq*, che in seguito si è anche occupato della ricerca della proteina contenente la sequenza amminoacidica ottenuta.

I peptidi con massa 2006 Da e 2395 Da derivano dalla transgelina, una proteina solitamente presente nel citoscheletro delle cellule costituenti la muscolatura liscia; in recenti studi è stata rivelata anche nel tessuto placentare [72].

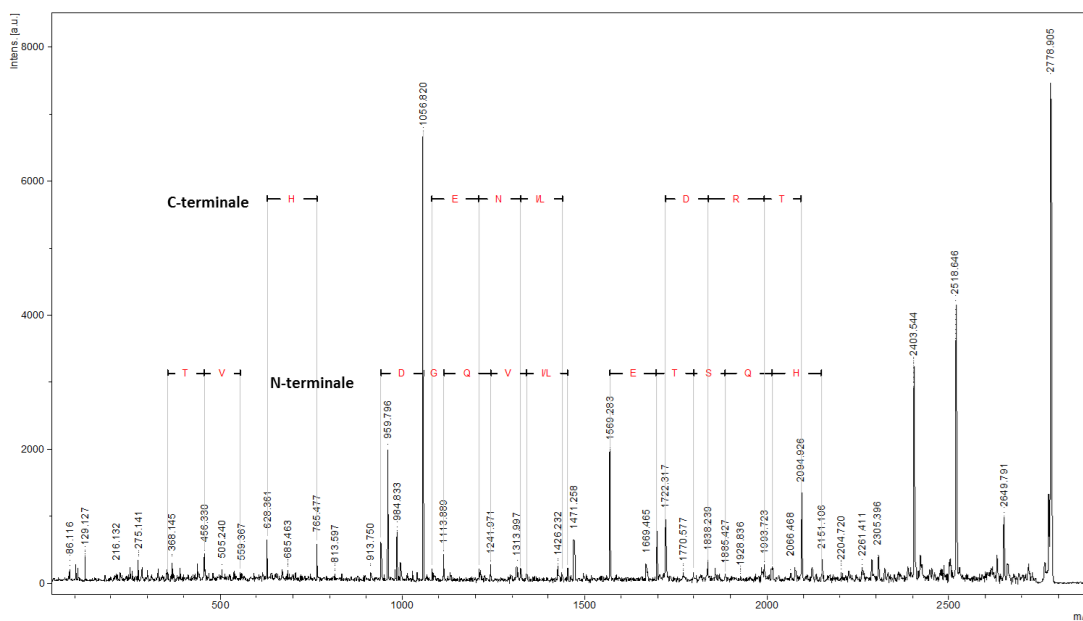


Figura 55: Spettro MS/MS del peptide ad m/z 2777.

Il peptide con massa 2777 Da, invece, deriva dalla vimentina (PM: 53652 Da), una proteina appartenente alla famiglia dei filamenti intermedi; quest'ultimi sono dei componenti strutturali importanti presenti nel citoscheletro delle cellule eucariote. La vimentina è implicata nella crescita e nel mantenimento della forma della cellula, oltre a svolgere la funzione di ancora per gli organelli del citoplasma. Questa proteina risulta espressa nelle cellule del mesenchima¹², nello stroma¹³ della decidua e in altri tessuti propri della madre o del feto; ciò ha permesso il suo uso come marker per un'analisi immunologica nelle cavie, avente lo scopo di identificare i vari tipi di cellule presenti nel tessuto placentare e negli annessi materni e fetali durante la gravidanza [73]. Un lavoro antecedente, invece, ha sfruttato lo stesso metodo per studiare lo sviluppo e la

¹² Col termine mesenchima si definisce il tessuto connettivo embrionale; è pluripotente, poiché si può differenziare in altri tessuti tra cui quello osseo, cartilagineo e sanguigno.

¹³ Tessuto che forma l'impalcatura di sostegno di un organo, entro la quale si dispongono le cellule proprie dell'organo stesso, che costituiscono il parenchima.

distribuzione delle cellule fetali nella placenta umana, localizzate nella zona di interfaccia con la madre [74].

5.3 - MALDI Ion Imaging del tessuto placentare

Le misure di ion imaging hanno permesso di determinare la distribuzione delle proteine nel tessuto placentare, in particolare nel lato fetale, materno e nella porzione centrale dell'organo; il risultato che si ottiene è un'immagine molecolare del campione. Il tessuto è stato campionato con un raster di 100 μm , ma la risoluzione ottenuta è sicuramente molto minore; la matrice, infatti, è stata depositata senza tener conto della possibile delocalizzazione degli analiti, ponendo sul tessuto gocce del diametro di circa 4 mm. Quest'ultime, inoltre, sono state fatte coalescere per formare uno strato continuo di matrice sul tessuto. I dati puntuali, pertanto, non hanno alcun significato e la scala cromatica usata dal software per l'elaborazione delle immagini potrebbe fornire delle informazioni non del tutto corrette. Il tessuto, comunque, è stato diviso fisicamente in tre zone non comunicanti (fetale, centrale e materna) e quindi è stato possibile determinare se la distribuzione delle varie specie sia uniforme oppure se sono presenti delle aree dove alcune proteine sono maggiormente espresse. I risultati mostrati riportano per una stessa porzione di tessuto, a partire da sinistra e spostandosi verso destra, le immagini ottenute per la parte fetale, centrale e materna del tessuto placentare.

Per le specie a m/z 7992 (Figura 56), 15864 (Figura 57) e 31282 (Figura 58) si nota una distribuzione uniforme in tutte le parti della sezione trasversale della placenta.

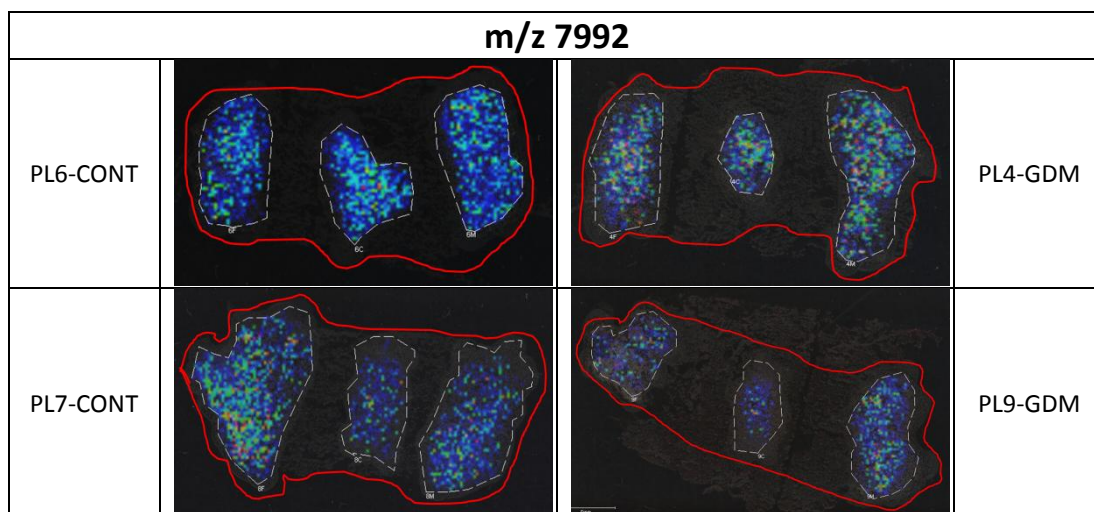


Figura 56: Risultati del MALDI Ion Imaging per la specie ad m/z 7992.

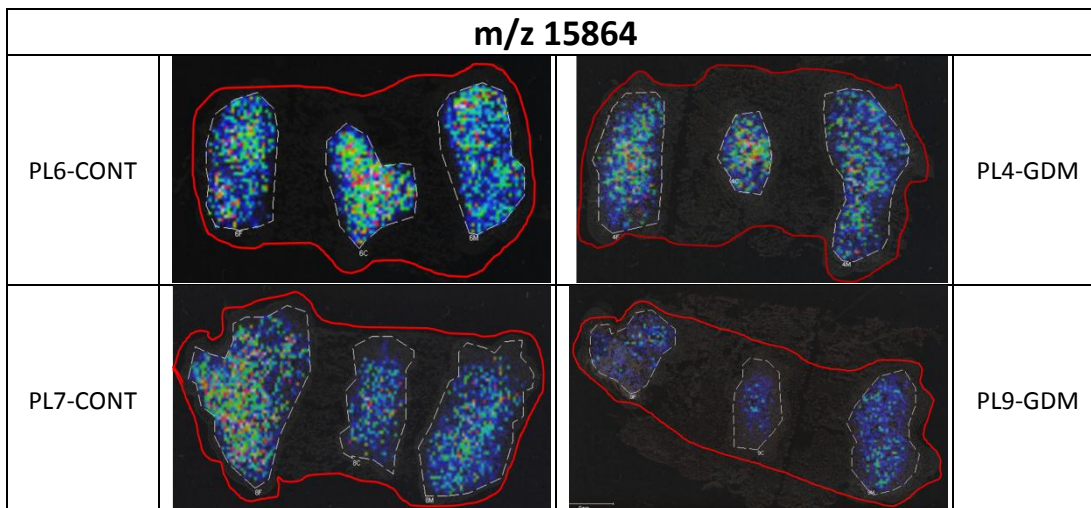


Figura 57: Risultati del MALDI *Ion Imaging* per la specie ad m/z 15864.

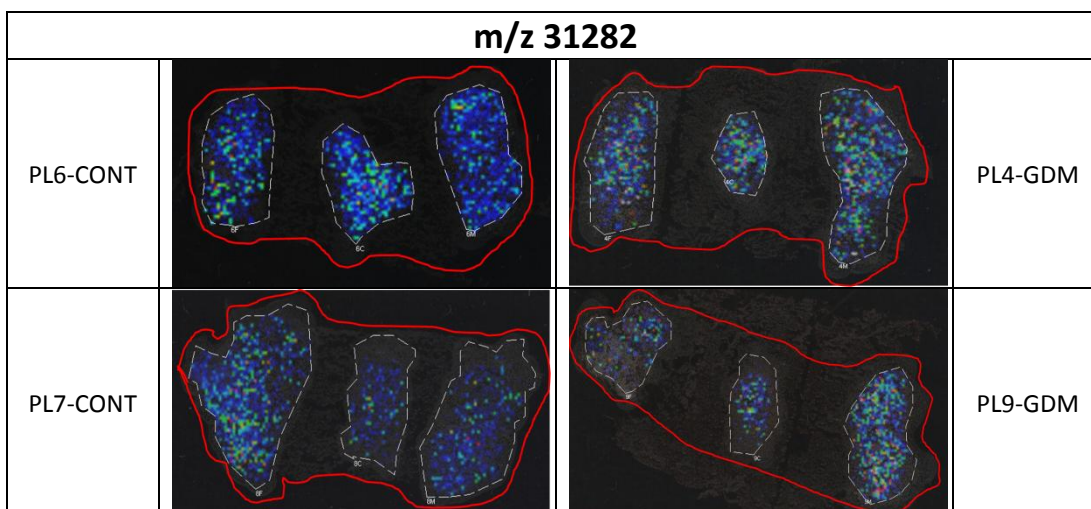


Figura 58: Risultati del MALDI *Ion Imaging* per la specie ad m/z 31282

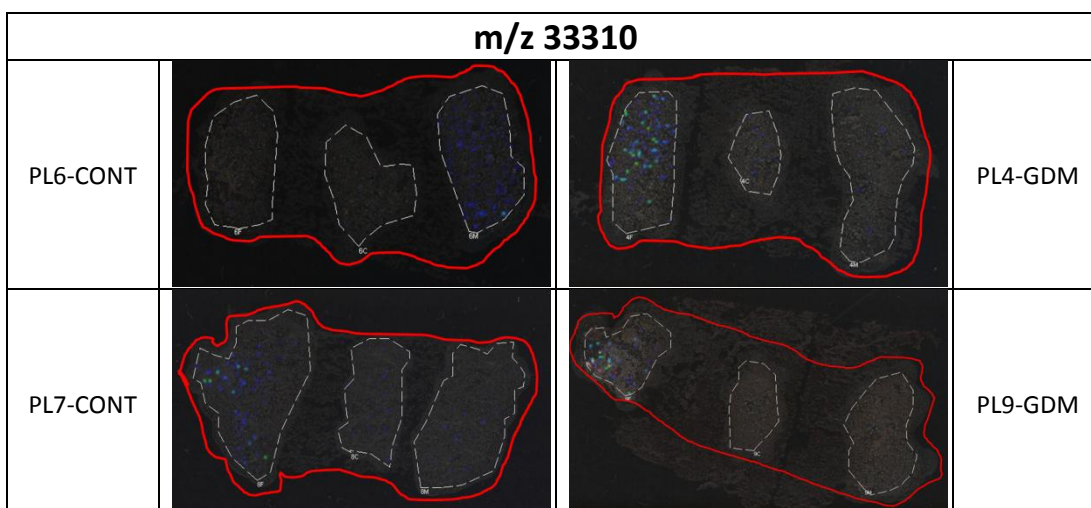


Figura 59: Risultati del MALDI *Ion Imaging* per la specie ad m/z 33310.

Per quanto riguarda la specie a m/z 33310, invece, si nota una sovra espressione nella parte fetale delle placente provenienti da pazienti affette da GDM; questo conferma i dati ottenuti precedentemente dall'analisi degli omogenati: la caspase-6, infatti, risultava essere espressa solamente nel lato fetale delle placente diabetiche.

Al fine di migliorare la qualità delle informazioni che si possono ottenere con un'analisi di ion imaging, si sta sviluppando un metodo per la distribuzione uniforme di cristalli di matrice aventi un diametro di circa 40 μm [75]. La deposizione avviene con l'ausilio di una sorgente ESI, che produce un aerosol di soluzione di matrice; quest'ultimo è filtrato attraverso una rete metallica, con mesh opportuno, al fine di depositare sul tessuto solamente le gocce di matrice della giusta grandezza. In questo modo è possibile aumentare la risoluzione spaziale dell'immagine e rendere significativa l'informazione puntuale, evitando la delocalizzazione degli analiti.

6 - Conclusioni

In questo lavoro di tesi si sono determinate le variazioni del profilo proteico del tessuto placentare indotte da GDM. I risultati conseguiti possono essere molto importanti a livello biomedico per la comprensione delle conseguenze a cui sono soggetti la madre e il feto a seguito dello sviluppo di questa patologia.

La prima parte dello studio ha riguardato l'analisi dell'omogenato del tessuto placentare, ottenuto da organi provenienti da gestanti sane e da pazienti affette da GDM. Attraverso uno spettrometro di massa MALDI-TOF si è proceduto alla determinazione diretta delle specie contenute nel campione; successivamente i segnali acquisiti sono stati confrontati con le informazioni contenute nel database HPRF per l'identificazione della specie proteica corrispondente. Le intensità relative delle specie sono quindi state confrontate al fine di determinare significative variazioni della loro espressione. Nella parte materna delle placentate provenienti da gestanti con GDM si nota la sovra espressione delle specie ad m/z 30929 (trombospondina) e 31282 (trasportatore dei dicarbossilati); una sotto espressione, invece, è stata osservata per le specie ad m/z 7992 (ATP8), 15128 (Mrpl55), 15333 (INSL5), 15864 (C14orf1) e 15991 (CENPA). Per la parte fetale delle placentate diabetiche si nota una sovra espressione delle specie a m/z 30194 (C3orf62), 33310 (Caspase-6) e 66551 (C3orf25); le specie a m/z 7933 (ATP 5I), 15864 (C14orf1), 15991 (CENPA) e 31674 (IGFBP3) sono invece sotto espresse. Per molte delle proteine di cui è conosciuta la funzione, inoltre, è stato possibile ricollegare la corrispondente variazione della concentrazione a una o più complicazioni mediche che si sviluppano a seguito dell'instaurarsi del GDM. Per altre proteine, es. m/z 4567, 7563, 4623, non è stato possibile procedere al riconoscimento poiché nel database non si sono trovate valide informazioni a riguardo. Al fine di confermare i dati ottenuti e per indagare sulle specie a peso molecolare maggiore, si è proceduto alla separazione delle proteine contenute nell'omogenato per mezzo di un'elettroforesi monodimensionale. Le bande ottenute sono state quindi digerite con tripsina e le corrispondenti mappe peptidiche sono state interpretate per mezzo di un software online per risalire alla proteina di appartenenza. Per alcuni dei peptidi ottenuti dalla digestione, inoltre, si sono eseguiti degli esperimenti di MS/MS per la determinazione della loro sequenza amminoacidica. Questa procedura ha permesso l'identificazione del Bcl2 legato al fattore di trascrizione 1 (51 kDa), di SRRM1 (150 kDa) e di CLASRP (220 kDa).

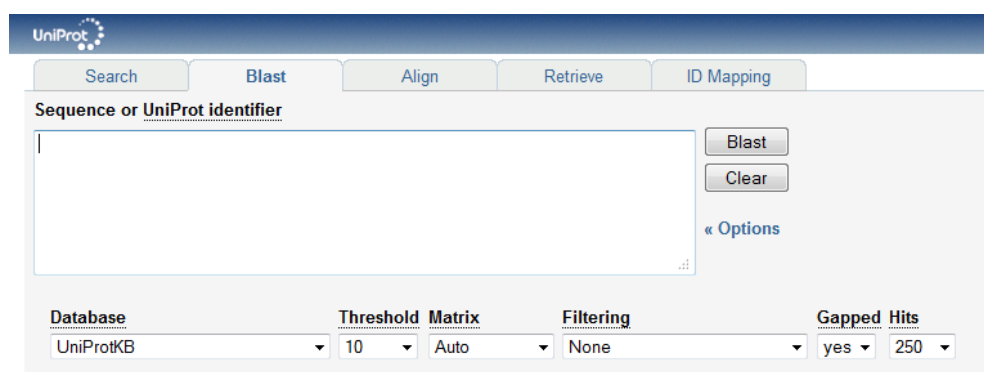
Con la seconda parte dello studio è stato possibile determinare un metodo efficace per la preparazione del campione di tessuto per l'analisi diretta allo spettrometro MALDI-TOF. Questo permette di ridurre i tempi di analisi, poiché si risparmiano le lunghe procedure di omogeneizzazione e di separazione degli analiti; le specie rivelate corrispondono con quelle presenti nell'omogenato e quindi certificano l'affidabilità del metodo. Comunque, è necessario compiere altri studi aumentando il numero di campioni analizzati, al fine di poter determinare statisticamente eventuali differenze nell'espressione proteica tra il tessuto sano e il tessuto malato; ciò non è stato possibile nel nostro caso perché il numero di campioni disponibili era piuttosto limitato. Tuttavia, è stato possibile osservare delle differenze significative nell'espressione proteica tra la parte fetale e materna del tessuto placentare. Si è anche proceduto all'analisi dei peptidi e, per qualcuno di questi, alla determinazione della sequenza amminoacidica; ciò ha permesso l'identificazione della transgelina e della vimentina.

L'ultima fase dello studio si è concentrata sullo sviluppo di un metodo per effettuare misure di *ion imaging*. Questo ha consentito di determinare la distribuzione spaziale delle proteine sul lato fetale, sul lato materno e nella porzione centrale della placenta umana. Si sono ottenuti alcuni dati interessanti; ad esempio si è confermata la sovra espressione della Caspase-6 (legata ai meccanismi dell'apoptosi) nel lato fetale delle placentate diabetiche.

Appendice

UniProt e HPRD (*Human Protein Reference Database*) sono database molto utili quando si vogliono delle informazioni veloci riguardanti una proteina nota. Inserendo il nome della proteina, oppure il simbolo del gene che la codifica è possibile recuperare la sequenza, le possibili isoforme e modificazioni post-trasduzionali, il sito biologico di espressione, il peso molecolare, nonché molte altre informazioni. Il portale di *UniProt*, oltre alla semplice ricerca indicando il nome della proteina, mette a disposizione la possibilità di compiere una “Ricerca Avanzata” (Figura 61): definendo alcuni parametri caratteristici è possibile risalire ad una proteina specifica, sebbene se non se ne conosce esattamente la denominazione. Dalla scheda “*Blast*” (Figura 60), inoltre, è possibile ricercare una proteina inserendo la sequenza amminoacidica o una parte di essa; anche in questo caso è possibile inserire altre informazioni che restringono il campo di ricerca, ad esempio dal menu a tendina “Database” si può scegliere la famiglia o la specie di appartenenza dell’organismo da cui è stata prelevata la proteina incognita.

HPRD è un database adatto per la ricerca di una proteina incognita quando si utilizza come mezzo di indagine la *top-down proteomics*; esso contiene informazioni relative solamente alla specie *Homo Sapiens*. La ricerca è possibile entrando nella sezione “*Query*” (Figura 62) e definendo i parametri da ricercare; in questo caso i più importanti sono “*Expression*”, dove è possibile inserire il sito di espressione della proteina che si sta studiando (ad es. un organo o un fluido biologico), e “*Molecular Weight*”, ovvero si deve definire l’intervallo di massa su cui effettuare la ricerca. Il risultato che si ottiene è solitamente una lista di proteine candidate, espresse nel sito scelto e aventi massa compresa nell’intervallo definito; dal peso molecolare della proteina incognita è possibile ipotizzare la sua identità scegliendo dalla lista la specie che possiede il peso molecolare più simile a quello misurato sperimentalmente.



The image shows the UniProt Blast search interface. At the top, there are navigation tabs: Search, Blast, Align, Retrieve, and ID Mapping. The main section is titled "Sequence or UniProt identifier" and contains a large text input field. To the right of the input field are buttons for "Blast" and "Clear", and a link for "Options". Below the input field, there are several dropdown menus: "Database" (set to UniProtKB), "Threshold" (set to 10), "Matrix" (set to Auto), "Filtering" (set to None), and "Gapped Hits" (set to yes/250).

Figura 60: *UniProt*, scheda di ricerca *Blast*.

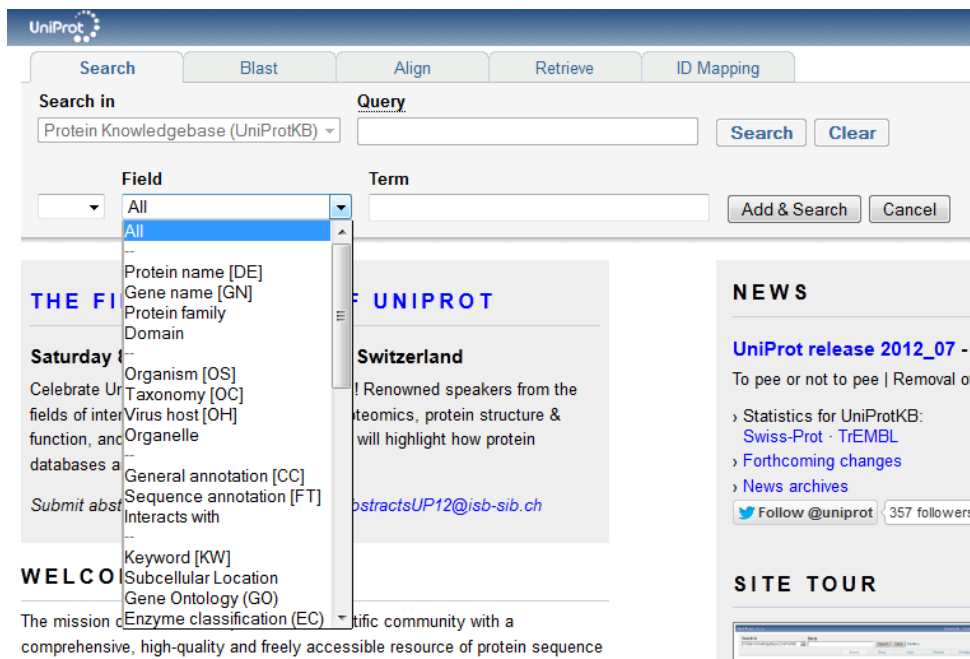


Figura 61: UniProt, Ricerca Avanzata.

Per quanto riguarda la *bottom-up proteomics*, il riconoscimento della proteina richiede il confronto tra la mappa peptidica prodotta sperimentalmente dalla digestione enzimatica con i dati dei database. *Mascot* (Figura 63), *MS-Fit*, *Prot-ID* e *PeptideSearch* sono i programmi di ricerca più utilizzati, sempre accessibili via web, che solitamente si appoggiano al database *UniProt* per l'identificazione della proteina. La ricerca è effettuata nel seguente modo: le masse molecolari dei peptidi ottenuti sperimentalmente sono confrontate con le masse teoriche di peptidi ottenuti da una digestione virtuale delle varie proteine contenute nel database; la digestione virtuale, detta *in silico*, è condotta simulando il comportamento dell'enzima usato sperimentalmente. Il software, per iniziare la ricerca, richiede l'inserimento di una lista contenente le masse molecolari dei peptidi rivelati a seguito della digestione; queste sono misurate previa calibrazione dello strumento con degli opportuni standard.

La disponibilità dei dati di massa esatta permette una ricerca più specifica e quindi garantisce l'ottenimento di risultati più attendibili. Il programma richiede anche di scegliere il database su cui condurre la ricerca, l'enzima utilizzato per la digestione e il numero di possibili "*missed cleavage*" (fornisce un'indicazione dei possibili errori commessi dall'enzima, ovvero dei tagli non effettuati in corrispondenza di una sequenza amminoacidica che invece dovrebbe essere riconosciuta e tagliata; solitamente i peptidi prodotti non presentano mai più di un errore). Le modificazioni fisse dei residui amminoacidi sono importanti da definire qualora la proteina abbia subito dei trattamenti preliminari alla digestione; ad esempio, se è stato usato iodoacetammide è corretto impostare una carbamidometilazione su tutti i residui di

cisteina; le modificazioni variabili, invece, vanno tenute in considerazione se si sospetta che la proteina abbia subito una qualche modifica post-trasduzionale: solitamente si imposta l'ossidazione dei residui di metionina, la fosforilazione della serina, treonina e tirosina, e la possibilità di trovare gruppi acetile se si lavora con cellule eucariote. Alcune volte è anche possibile impostare modello e casa produttrice dello strumento usato per misurare la massa e la carica delle specie rilevate.

Figura 62: Scheda di ricerca nel database HPRD.

Il risultato fornito dall'elaborazione dei dati inseriti consiste ancora una volta in una lista di proteine candidate, ad ognuna delle quali è associato un certo "score", ovvero un punteggio compreso tra lo 0% e il 100%, il quale indica la probabilità di corrispondenza tra la proteina indicata e la proteina incognita. La proteina con lo score maggiore identifica solitamente la proteina incognita; per evitare errori, comunque, è sempre consigliabile verificare nei database che la proteina identificata dal software sia effettivamente espressa nel sito biologico dal quale è stata estratta la proteina incognita.

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name	<input type="text"/>	Email	<input type="text"/>
Search title	<input type="text"/>		
Database(s)	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"><ul style="list-style-type: none">SwissProtNCBIInrcontaminantscRAP</div>	Enzyme	Trypsin
		Allow up to	1 missed cleavages
Taxonomy	All entries		
Fixed modifications	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">--- none selected ---</div>	> <	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"><ul style="list-style-type: none">Carboxymethyl (C)Cation:Na (C-term)Cation:Na (DE)cysTMT6plex (C)Deamidated (NQ)Dehydrated (N-term C)Dehydro (C)DiLeu4plex (K)DiLeu4plex (N-term)DiLeu4plex (Y)Dioxidation (M)</div>
Variable modifications	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">--- none selected ---</div>	> <	
Protein mass	<input type="text"/> kDa	Peptide tol. ±	1.2 Da
Mass values	<input checked="" type="radio"/> MH ⁺ <input type="radio"/> M _r <input type="radio"/> M-H ⁻	Monoisotopic	<input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/>
Data file	<input type="text"/>	Sfoggia...	
Query	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; min-height: 100px;">NB Contents of this field are ignored if a data file is specified.</div>		
Decoy	<input type="checkbox"/>	Report top	AUTO hits
Start Search ...		Reset Form	

Figura 63: Mascot: identificazione proteica tramite mappa peptidica.

L'identificazione delle proteine incognite può essere condotta anche utilizzando le informazioni che si ricavano dagli spettri ottenuti con esperimenti MS/MS, dai quali è possibile ottenere la sequenza amminoacidica di un peptide, derivante dalla proteina incognita, a seguito della sua frammentazione indotta da collisioni (*collision-induced dissociation*). Gli spettri ottenuti in questo modo, però, sono solitamente molto complicati e di difficile interpretazione a causa dei vari riarrangiamenti strutturali e delle perdite di massa a cui sono soggetti i residui amminoacidici a seguito della frammentazione; pertanto, al fine di velocizzare e semplificare il processo di determinazione della sequenza peptidica, sono stati sviluppati dei software specifici (es. *Mascot*, *SEQUEST*, *MS-Tag*, etc.) che attraverso degli algoritmi sono in grado di elaborare velocemente i dati e fornire risultati più attendibili. L'algoritmo prevede una fase iniziale di miglioramento dello spettro (aumento del rapporto segnale/rumore), seguita dalla determinazione della sequenza amminoacidica del peptide, che avviene valutando la differenza del valore di m/z per i vari segnali acquisiti. A questo punto si ottiene una breve sequenza di amminoacidi (*tag*), la quale è in genere sufficiente per riconoscere la proteina incognita; questa tecnica di identificazione è definita *peptide-*

tag. Uno dei software gratuiti più utilizzati è *MS-Tag* (Figura 64), il cui funzionamento è analogo a quello dei programmi visti in precedenza; nella fase iniziale è necessario fornire una serie di dati, tra cui l'elenco dei valori di m/z (derivanti dallo spettro massa/massa) che devono essere utilizzati per determinare la sequenza, la massa del peptide di partenza, le possibili modificazioni dei residui amminoacidici, lo strumento usato per l'acquisizione e la tolleranza sul valore di m/z . La ricerca genera una lista di proteine candidate alle quali è associato un certo *score*; i risultati devono essere validati, controllando in particolare che il software abbia utilizzato per l'interpretazione dello spettro i segnali di m/z più abbondanti e meglio risolti.

MS-Tag

The screenshot displays the MS-Tag web interface with the following configuration:

- Database:** SwissProt.2011.10.10, SwissProt.2011.10.10.random, SwissProt.2011.10.10.random.concat, SwissProt.2012.03.21
- Digest:** Trypsin, Non-Specific, at 0 termini
- Max. Missed Cleavages:** 1
- Constant Mods:** Phosphoserine (S), Phosphothreonine (T), Phosphotyrosine (Y), AMTzGalNAcGlcNAc (N), AMTzGalNAcGlcNAc (ST), APTA (C), Asn->Succinimide (N), Biotin (N-term), Carbamidomethyl (C)
- Taxonomy:** All, HUMAN MOUSE, HUMAN RODENT, MODEL PLANTS, RODENT, ROACH LOCUST BEETLE
- Output:** HTML, Hits to file, Name lastres
- Pre-Search Parameters:** Start Search button
- Sample ID (comment):** [Empty field]
- Maximum Reported Hits:** 5
- Expectation Calc Method:** None
- Variable Mods:** Acetohydrazide (C-term), Acetohydrazide (DE), Acetyl (K), Acetyl (Protein N-term), Acetyl (Uncleaved K), Acetyl+Oxidation (Protein N-term M)
- Max Mods:** 2
- Max Peptide Permutations:** [Empty field]
- Precursor Charge:** Automatic
- Masses are:** monoisotopic
- Parent Tol:** 200 ppm, Sys Err 0
- Frag Tol:** 300 ppm
- Instrument:** ESI-Q-TOF
- Data Format:** PP M/Z Charge
- Data Paste Area:** 1784.8375, 60.0260, 70.0468

Figura 64: Interpretazione di uno spettro MS/MS con *Ms-Tag*.

Bibliografia

- [1] J. M. Robinson, D. D. Vandr  and W. E. Ackerman, "Placental proteomics: a shortcut to biological insight," *Placenta*, vol. 23, no. 30, Supplement A, Trophoblast Research, pp. S83-S89, 2009.
- [2] J. Robinson, W. Ackerman, D. Kniss, T. Takizawa e D. Vandr , «Proteomics of the human placenta: promises and realities,» *Placenta*, vol. 29, pp. 135-143, 2008.
- [3] M. Wilkins, R. Appel, J. Van Eyk, M. Chung, A. Gorg, M. Hecker, L. Huber, H. Langen, A. Link, Y. Paik, S. Patterson, S. Pennington, T. Rabilloud, R. Simpson, W. Weiss e M. Dunn, «Guidelines for the next 10 years of proteomics,» *Proteomics*, vol. 6, pp. 4-8, 2006.
- [4] C. Dass, «Protein and peptides: structure determination,» in *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*, Wiley, 2007, pp. 289-332.
- [5] T. Zewert e M. Harrington, «Protein electrophoresis,» *Curr Opin Biotechnol*, vol. 4, pp. 3-8, 1993.
- [6] A. Andrews, *Electrophoresis: theory, techniques and biochemical and clinical applications*, Oxford University Press, 1986.
- [7] R. Westermerie e R. Marouga, «Protein detection methods in proteomics research,» *Biosci Rep*, vol. 25, pp. 19-32, 2005.
- [8] S. Ong e A. Pandey, «An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics,» *Biomol Eng*, vol. 18, pp. 195-205, 2001.
- [9] J. Reinders, U. Lewandrowski, J. Moebius, Y. Wagner e A. Sickmann, «Challenges in mass spectrometry-based proteomics,» *Proteomics*, vol. 4, pp. 3686-3703, 2004.
- [10] R. Aebersold e D. Goodlett, «Mass spectrometry in proteomics,» *Chem Rev*, vol. 101, pp. 269-295, 2001.
- [11] B. Thiede, W. Hobenwarter, A. Krah, J. Mattow, M. Schmid e P. Jungblut, «Peptide mass fingerprint,» *Methods*, vol. 35, pp. 237-247, 2005.
- [12] H. Zhou, Z. Ning, A. Starr, M. Abu-Farha e D. Figeys, «Advancements in Top-Down proteomics,» *Anal Chem*, vol. 84, pp. 720-734, 2012.
- [13] S. Peri, J. Navarro, T. Kristiansen e R. Amanchy, «Human protein reference database as a discovery resource for proteomics,» *Nuc Acids Res*, vol. 32, pp. D497-D501, 2004.
- [14] A. Lapolla, D. Fedele, R. Reitano, N. Aric , R. Seraglia, P. Traldi, E. Marotta e R.

- Tonani, «Enzymatic digestion and mass spectrometry in the study of advanced glycation end products/peptides,» *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 15, pp. 496-509, 2004.
- [15] A. Lapolla, D. Fedele e P. Traldi, «The role of mass spectrometry in the study of non-enzymatic protein glycation in diabetes,» *Mass Spectrom Rev*, vol. 19, pp. 279-304, 2000.
- [16] T. Buchanan, S. Kjos, A. Xiang e R. Watanabe, «What is gestational diabetes?,» *Diabetes Care*, vol. 30, pp. S105-108, 2007.
- [17] T. Buchanan e A. Xiang, «Gestational diabetes mellitus,» *J Clin Invest*, vol. 115, pp. 485-491, 2005.
- [18] A. Gladys e T. Moore, «Endocrine disorders in pregnancy,» in *Avery's diseases of the newborn*, Elsevier, 2012, pp. 75-91.
- [19] S. Chu, W. Callaghan, S. Kim, C. Schmid, J. Lau, L. England e P. Dietz, «Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus,» *Diabetes Care*, vol. 30, pp. 2070-76, 2007.
- [20] T. Setji, A. Brown e M. Feinglos, «Gestational diabetes mellitus,» *Clin Diabetes*, vol. 23, pp. 17-24, 2005.
- [21] A. Gilmartin, S. Ural e J. Repke, «Gestational diabetes mellitus,» *MedReviews*, vol. 3, pp. 129-134, 2008.
- [22] K. Benirschke e P. Kaufmann, *Pathology of the human placenta*. Third edition., Springer-Verlag, 1995.
- [23] A. Pasca e A. Penn, «The placenta: the lost neuroendocrine organe,» *NeoReviews*, vol. 11, pp. 64-77, 2010.
- [24] H. Kliman, «Placental hormones. Infertility and reproductive med,» *Infertility and reproductive medicine clinics of North America*, vol. 5, pp. 591-610, 1994.
- [25] H. Kliman, «Trophoblast infiltration,» *Reprod Med Rev*, vol. 3, pp. 137-157, 1994.
- [26] H. Kliman, «The placenta revealed,» *Amer J Pathol*, vol. 143, pp. 332-336, 1993.
- [27] K. Benirschke e P. Kaufmann, *The human placenta.*, Cambridge, 1970.
- [28] R. Baergen, *Manual of pathology of the human placenta.*, Springer, 2011.
- [29] U. Laemmli, «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,» *Nature*, vol. 227, pp. 680-685, 1970.
- [30] D. Caprette, «Introduction to SDS-PAGE,» [Online]. Available: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/gellab2.html>.

- [31] I. BioRad Laboratories, *A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection*, 2012.
- [32] M. Hamdan e P. Righetti, *Proteomics today*, Wiley, 2005.
- [33] R. Zenobi e R. Knochenmuss, «Ion formation in MALDI mass spectrometry.,» *Mass Spectrom Rev*, vol. 17, pp. 337-366, 1998.
- [34] B. Cole, *Electrospray and MALDI mass spectrometry.*, Wiley, 2010.
- [35] J. Lewis, J. Wei e G. Siuzdak, «Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis.,» *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 5880-94, 2000.
- [36] F. Hillenkamp e J. Katalinic, *MALDI MS - A practical guide to instrumentation, methods and applications*, Wiley, 2007.
- [37] A. Vertes, R. Gijbels e F. Adams, *Laser ionization mass analysis.*, Wiley, 1993.
- [38] M. Stoeckli, P. Chaurand, D. Hallahan e R. Caprioli, «Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissue.,» *Nature Medicine*, vol. 7, pp. 493-496, 2001.
- [39] K. Schwamborn e R. Caprioli, «MALDI imaging mass spectrometry - painting molecular pictures.,» *Mol Oncology*, vol. 4, pp. 529-538, 2010.
- [40] S. Hanash, «Disease proteomics.,» *Nature*, vol. 422, pp. 226-232, 2003.
- [41] L. McDonnell e R. Heeren, «Imaging mass spectrometry.,» *Mass Spectrom Rev*, vol. 26, pp. 606-643, 2007.
- [42] E. O. S. Seeley, D. Mi, P. Chaurand e E. Caprioli, «Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment to tissue sections.,» *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 19, pp. 1069-77, 2008.
- [43] N. Zaima, T. Hayasaka, G.-I. N. e M. Setou, «Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry.,» *Int J Mol Sci*, vol. 11, pp. 5040-55, 2010.
- [44] J. Norris, D. Cornett, J. Mobley, M. Andersson, E. Seeley, P. Chaurand e R. Caprioli, «Processing MALDI mass spectra to improve mass spectral direct tissue analysis.,» *Int J Mass Spectrom*, vol. 260, pp. 212-221, 2007.
- [45] S. Peters, *A practical guide to frozen section technique*, Springer, 2010.
- [46] «Human Protein Reference Database.,» [Online]. Available: http://www.hprd.org/index_html.
- [47] «PhosphoSitePlus.,» [Online]. Available: <http://www.phosphosite.org>.

- [48] X. Yu, L. Wester-Rosenlof, U. Gimsa, S. Holzhueter, A. Marques, L. Jonas, K. Hagenow, M. Kunz, H. Nizze, M. Tiedge, R. Holmdahl e S. Ibrahim, «The mtDNA nt7778 G/T polymorphism affects autoimmune diseases and reproductive performance in the mouse.,» *Hum Mol Genet*, vol. 18, n. 24, pp. 4689-98, 2009.
- [49] C. Mathews, R. McGraw, R. Dean e C. Berdanier, «Inheritance of a mitochondrial DNA defect and impaired glucose tolerance in BHE/Cdb rats.,» *Diabetologia*, vol. 42, pp. 35-40, 1999.
- [50] M. Saleh, Z. Fatehi-Hassanabad, R. Wang, R. Nino-Fong, D. Wadowska, G. Wright, M. Harper e C. Chan, «Mutated ATP synthase induces oxidative stress and impaired insulin secretion in beta-cells of female BHE/cdb rats.,» *Diabetes*, vol. 24, pp. 392-403, 2008.
- [51] C. Liu, J. Chen, C. Kuei, S. Sutton, D. Nepomuceno, P. Bonaventure e T. Lovenberg, «Relaxin-3/insulin-like peptide 5 chimeric peptide, a selective ligand for G protein-coupled receptor (GPCR)135 and GPCR142 over leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 7.,» *Mol Pharmacol.*, vol. 67, pp. 231-40, 2005.
- [52] E. van der Westhuizen, M. Halls, C. Samuel, R. Bathgate, E. Unemori, S. Sutton e R. Summers, «Relaxin family peptide receptor from orphans to therapeutic targets.,» *Drug Discov Today*, vol. 13, pp. 640-51, 2008.
- [53] J. Munro, O. Skrobot, M. Sanyoura, V. Kay, M. Susce, P. Glaser, d. L. J., A. Blakemore e M. Arranz, «Relaxin polymorphisms associated with metabolic disturbance in patients treated with antipsychotics.,» *J Psychopharmacol*, 2011.
- [54] R. Veitia, C. Ottolenghi, M. Bissery e A. Fellous, «A novel human gene, encoding a potential membrane protein conserved from yeast to man, is strongly expressed in testis and cancer cell lines.,» *Cytogenet*, vol. 85, pp. 217-220, 1999.
- [55] J. Murphy-Ullrich e M. Poczatek, «Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology.,» *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 11, pp. 59-59, 2000.
- [56] D. Good, P. Polverini, F. Rastinejad, M. Le Beau, R. Lemons, W. Frazier e N. Bouck, «A tumor suppressor dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin.,» *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 87, pp. 6624-28, 1990.
- [57] S. Ribeiro, M. Poczatek, S. Schultz-Cherry, M. Villain e J. Murphy-Ullrich, «The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta.,» *J Biol*

Chem, vol. 274, pp. 13586-93, 1999.

- [58] N. Wahab, L. Schaefer, B. Weston, O. Yiannikouris, A. Wright, A. S. R. Babelova e R. Mason, «Glomerular expression of thrombospondin-1, transforming growth factor beta and connective tissue growth factor at different stages of diabetic nephropathy and their interdependent roles in mesangial response to diabetic stimuli,» *Diabetologia*, vol. 48, pp. 2650-60, 2005.
- [59] G. Fiermonte, V. Dolce, R. Arrigoni, M. Runswick, W. J.E. e F. Palmieri, «Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dycarboxylate carrier: evolution the carrier family,» *Biochem J*, vol. 344, pp. 953-960, 1999.
- [60] F. Ortis, N. Naamane, D. Flamez, L. Ladrière, F. Moore, D. Cunha, M. Colli, T. Thykjaer, K. Thorsen, T. Orntoft e D. Eizirik, «Cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor-regulate different transcriptional and alternative splicing networks in primary cells,» *Diabetes*, vol. 59, pp. 358-74, 2010.
- [61] D. Eizirik e T. Mandrup-Poulsen, «A choice oh death - the signal transduction of immune-mediated beta cell apoptosis,» *Diabetologia*, vol. 44, pp. 2115-33, 2001.
- [62] R. Aggeler, J. Coons, S. Taylor, S. Ghosh, J. Garcia, R. Capaldi e M. Marusich, «A functionally active human F1F0 ATPase can be purified by immunocapture from heart tissue and fibroblast cell lines. Subunit structure and activity studies,» *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 33906-912, 2002.
- [63] P. Lee, C. Conover e P. D.R., «Regulation and function of insulin-like growth factor-binding protein 1,» *Proc Soc Exp*, vol. 204, pp. 4-29, 1993.
- [64] W. Zollers, B. J.S., G. Pepe e E. Albrecht, «Developmental regulation of placental insuline-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein-I and -2 messenger RNA expression during primate pregnancy,» *Biol Reprod*, vol. 4, pp. 1208-14, 2001.
- [65] R. Lindsay, J. Westgate, J. Beattie, N. Pattison, G. Gamble, L. Mildenhall, B. Breier e F. Johnstone, «Inverse changes in fetal insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 in association with higher birth weight in maternal diabetes,» *Clin Endocrinol*, vol. 66, pp. 322-328, 2007.
- [66] S. Roth, M. Abernathv, W. Lee, L. Pratt, S. Denne, A. Golichowski e O. Pescovitz, «Insulin-like growth factor I and II peptide and messenger RNA levels in macrosomic infants of diabetic pregnancies,» *J Soc Gynecol*, vol. 3, pp. 78-84, 1996.
- [67] O. Grissa, A. Yessoufou, I. Mrisak, A. Hichami, D. Amoussou-Guenou, A. Grissa, F.

- Djrolo, K. Moutairou, A. Miled, H. Khairi, M. Zaouali, I. Bougmiza, A. Zbidi, Z. Tabka e N. Khan, «Growth factor concentrations and their placental mRNA expression are modulated in gestational diabetes mellitus: possible interactions with macrosomia.,» *BMC Pregnancy Childbirth*, vol. 10, 2010.
- [68] S. Pampfer e I. Donnay, «Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat.,» *Cell Death Differ*, vol. 6, pp. 533-545, 1999.
- [69] S. Pampfer, I. Vanderheyden, J. McCracken, J. Vesela e R. De Hertogh, «Increased cell death in rat blastocysts exposed to maternal diabetes in utero and to high glucose or tumor necrosis factor- α in vivo.,» *Development*, vol. 124, pp. 4827-36, 1997.
- [70] L. Hinck, J. Thissen e R. De Hertogh, «Identification of caspase-6 in rat blastocysts and its implication in the induction of apoptosis by high glucose.,» *Biolog Reprod*, vol. 68, pp. 1808-12, 2003.
- [71] P. Craig Cavanagh, C. Dunk, M. Pampillo, J. Szeresrewski, T. J.E., C. Kahiri, V. Han, S. Lye, M. Bhattacharya e A. Babwah, «Gonadotropin-releasing hormone-regulated chemokine expression in human placentation.,» *Am J Physiol - Cell Ph*, vol. 66, 2009.
- [72] R. Hussain Butt, M. Lee, S. Ahmadi Pirshahid, P. Backlund, S. Wood e J. Coorssen, «An initial proteomic analysis of human preterm labor: placental membranes.,» *J Proteom Res*, vol. 5, pp. 3161-3172, 2006.
- [73] A. Carter, B. Tanswell, K. Thompson e H. V.K.M., «Immunohistochemical identification of epithelial and mesenchymal cell types in the chorioallantoic and Yolk sac placentae of the Guinea-pig.,» *Placenta*, vol. 19, pp. 489-500, 1998.
- [74] T. Khong, E. Lane e W. Robertson, «An immunocytochemical study of fetal cells at the maternal-placental interface using monoclonal antibodies to keratins, vimentin and desmin.,» *Cell Tissue Res*, vol. 246, pp. 189-195, 1986.
- [75] L. Molin, S. Cristoni, S. Crotti, L. Bernardi, R. Seraglia e P. Traldi, «Sieve-based device for MALDI sample preparation. I. Influence of sample deposition conditions in oligonucleotide analysis to achieve significant increases in both sensitivity and resolution.,» *J Mass Spectrom*, vol. 43, pp. 1512-20, 2008.