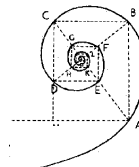




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXVI
Anno Accademico 2012/2013

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
Settore scientifico disciplinare
BIO12

**SVILUPPO DI METODI IFENATI ASSOCIATI ALLA
SPETTROMETRIA DI MASSA MALDI: APPLICAZIONI
PROTEOMICHE E GLICOSFINGOLIPIDOMICHE**

Dottorando: Enrica TORRETTA
Matricola N° R09192

TUTORE: Prof.ssa Cecilia Gelfi

DIRETTORE DEL DOTTORATO: Ch.mo Prof. Mario Salvatore Clerici

SOMMARIO

L'interesse per lo sviluppo di nuovi metodi e per l'applicazione di tecniche ifenate è generato dalla necessità di caratterizzare campioni biologici complessi. Questo lavoro affronta l'applicazione e la messa a punto di tecniche ifenate allo scopo di: a) identificare un nuovo biomarcatore da associare al PSA (Prostate Specific Antigen) per la diagnostica del cancro prostatico, b) sviluppare una nuova tecnica ifenata per l'analisi di glicosfingolipidi.

Negli studi di proteomica clinica, destinati all'identificazione di nuovi biomarcatori, i maggiori problemi sono legati all'incompatibilità dell'intervallo di sensibilità degli strumenti di rivelazione con l'intervallo di concentrazione delle specie proteiche e peptidiche presenti nei fluidi biologici. Pertanto, poiché l'intervallo di sensibilità degli strumenti di rivelazione non può essere variato, il passaggio cruciale è rappresentato dalla riduzione dell'intervallo di concentrazione tra le specie più abbondanti e le specie meno abbondanti nei fluidi biologici in esame. Nel caso del siero ciò è stato ottenuto grazie all'eliminazione della frazione contenente le proteine a maggior abbondanza mediante immunodeplezione selettiva. Le frazioni seriche a bassa abbondanza preparate da 30 pazienti affetti da cancro alla prostata (ADK) e da 30 soggetti controllo sono state analizzate tramite MALDI profiling. La metodica applicata ha permesso di individuare delle differenze statisticamente significative nell'espressione di alcune componenti proteiche, rivelate dalla presenza di picchi differenzialmente espressi negli spettri di massa ottenuti. Tuttavia, il punto fondamentale per il trasferimento dei risultati ottenuti in diagnostica clinica è rappresentato dall'identificazione delle specie proteiche contenute nel profilo di massa MALDI al fine di poter utilizzare tecniche immunometriche per la validazione dei dati e sviluppare metodi di dosaggio su larga scala applicabili in diagnostica clinica. Grazie all'ifenzione tra tecniche cromatografiche, quali la cromatografia per gel filtrazione e la cromatografia a fase inversa, condotte rispettivamente su uno strumento HPLC e su uno strumento nano LC, e tecniche di spettrometria di massa MALDI, è stato possibile identificare il picco 2021 m/z, statisticamente variato, che corrisponde al peptide C3f, derivato dalla proteolisi del fattore del complemento C3, e la sua aumentata espressione in pazienti ADK+ a bassi valori di PSA, è stata confermata attraverso un esperimento di immunoblotting. I risultati sono stati validati su un secondo gruppo di pazienti e controlli. L'aumento di tale peptide indica una deregolazione del fattore del complemento C3 che viene inattivato a iC3b, il quale inibisce il ciclo della via alternativa del sistema del complemento impedendo l'associazione del fattore C3b al fattore B. Il peptide C3f potrebbe pertanto essere usato in associazione con il valore serico di PSA per ridurre il numero di pazienti "falsi negativi".

Un altro aspetto importante della ricerca biomedica e indirettamente della diagnostica clinica è rappresentato da una classe di molecole di segnale che si sono rivelate importanti in numerose patologie quali malattie cardiovascolari e neurodegenerative, tumori, malattie d'accumulo lisosomiale e sindrome metabolica. Nonostante il crescente interesse clinico, l'analisi dei glicosfingolipidi non gode di tecnologie ad alta automazione che permettano una facile identificazione e quantizzazione di specie con pesi molecolari spesso molto simili. Attualmente tale caratterizzazione avviene tramite l'utilizzo di precursori radioattivi, oppure di coloranti che non permettono una quantizzazione precisa, o di metodi

LC-MS di grande precisione ma dispendiosi in termini di tempo e di coinvolgimento dell'operatore.

Attraverso l'ifenzione diretta HPTLC-MALDI, è stato possibile effettuare una fine analisi qualitativa e quantitativa del profilo glicosfingolipidomico estratto da mioblasti murini, distinguendo per ogni glicosfingolipide tutte le varianti a diversa catena di acido grasso presenti. Un aspetto importante è che lo sviluppo metodologico è stato accoppiato ad una analisi di campioni biologici i cui risultati sono stati confrontati con quelli precedentemente ottenuti attraverso l'utilizzo di precursori radioattivi e successiva analisi densitometrica su glicosfingolipidi estratti da mioblasti wild-type e overesprimenti la sialidasi NEU3. Pertanto, l'ifenzione proposta si è rivelata di grande applicabilità alla caratterizzazione dei glicosfingolipidi in quanto riduce i passaggi analitici necessari evitando l'uso di precursori radioattivi e di procedure di estrazione della banda dal gel di silice, e potrà essere applicata allo studio di diverse condizioni fisiologiche e patologiche per identificare potenziali biomarcatori.

ABSTRACT

The interest for the development of new methods and the application of hyphenated techniques for complex biological samples characterization is growing, nowadays, more and more. This work faces the application and setup of hyphenated techniques with two aims: a) to identify a new biomarker that can be associated to PSA (Prostate Specific Antigen) for prostate cancer (ADK) diagnosis, b) to develop a hyphenated technique for glycosphingolipids analysis.

In clinical proteomics, the identification of new biomarkers is hampered by the discrepancy between the quantitative range of detection of instruments and the concentration range of proteins and peptides in biological fluids. Since the quantitative range of detection of instruments cannot be changed, the critical point is to reduce the dynamic range in examined biological fluids. In serum, this can be obtained by the elimination of high abundant proteins thanks to a selective immunodepletion. The serum low abundant protein fraction from 30 ADK patients and 30 controls was analyzed by MALDI profiling. The applied methodology was able to detect differentially abundant peaks in spectra of ADK vs no ADK controls. To transfer the obtained results in clinical diagnostic, the identification of species revealed by MALDI profiles is mandatory for two main reasons: data validation through the use of immunometric techniques and methodological development for a large scale test. Thanks to the hyphenation between chromatographic techniques, such as gel filtration on a HPLC and reverse phase on a nanoLC, and MALDI mass spectrometry, we were able to identify the highly changed 2021 m/z peak, that corresponds to C3f peptide and that derives from the proteolyses of Complement C3b. To confirm its increment in ADK patients with low PSA values an immunoblotting experiment was conducted. The results were validated on a second group of patients and controls. The increase of C3f expression could be related to a deregulation of C3 complement, cleft to iC3b, that inhibits the self-feeding cycle of the alternative pathway hampering the association of C3b to factor B. Therefore C3f peptide could be used in association to PSA serum value to decrease the number of "false negative".

An important aspect of the biomedical research and, indirectly, of clinical diagnostic is represented by a class of signal molecules that are important in a number of diseases, including neurological and cardiovascular disorders, cancer, lipid storage diseases, and the metabolic syndrome. Despite the increasing clinical interest, glycosphingolipids (GSLs) analysis cannot benefit by high-throughput techniques that allow an easy identification and quantitation of these species, characterized by similar molecular weights. Actually, their characterization is based on radioactive counts after metabolic radiolabeling, or on staining with proper dyes that doesn't allow a precise quantitation. New approaches including LC-MS are largely used but they are time consuming and operator dependent.

We develop the direct hyphenation HPTLC-MALDI, to obtain a precise qualitative and quantitative analysis of the glycosphingolipids profile from murine myoblasts, and to distinguish every fatty acid chain variant for each GSL. An important aspect is that the methodological setup was coupled to biological samples analysis and results were compared to those obtained through the use of radioactive precursors and densitometric analysis on GSLs extracted from wild type and NEU3 overexpressing murine myoblasts. The proposed hyphenation is of great applicability to the glycosphingolipids characterization because it reduces the

analytical steps, it avoids the use of radioactive precursors and silica scraping, and it could be applied to the study of different physiological and pathological conditions to identify potential biomarkers.

INDICE

SOMMARIO.....	II
ABSTRACT	IV
LISTA SIMBOLI.....	VIII
1 INTRODUZIONE.....	2
1.1 <i>Le tecniche ifenate</i>	2
1.2 <i>Ruolo delle tecniche ifenate in proteomica</i>	3
1.3 <i>I fluidi biologici</i>	6
1.4 <i>Il range dinamico</i>	7
1.5 <i>Il profilo serologico</i>	11
1.6 <i>La diagnostica del cancro prostatico</i>	14
1.7 <i>Il profilo glicosfingolipidomico</i>	15
2 SCOPO DELLA TESI	18
3 MATERIALI E METODI	19
3.1 <i>Materiali</i>	19
3.2 <i>Profilo di proteine seriche a scarsa abbondanza</i>	19
3.2.1 <i>Sieri da Adenocarcinoma prostatico (ADK)</i>	19
3.2.2 <i>Immunodeplezione</i>	19
3.2.3 <i>Preparazione della matrice</i>	19
3.2.4 <i>MALDI profiling</i>	20
3.2.5 <i>Identificazione dei picchi</i>	20
3.2.6 <i>Immunoblotting</i>	21
3.3 <i>Profilo glicosfingolipidomico</i>	21
3.3.1 <i>Colture cellulari</i>	21
3.3.2 <i>Marcatura metabolica dei glicosfingolipidi cellulari</i>	21
3.3.3 <i>Estrazione e separazione cromatografica degli sfingolipidi radioattivi</i>	22
3.3.4 <i>Separazione cromatografica degli sfingolipidi estratti da cellule non sottoposte a marcatura metabolica</i>	22
3.3.5 <i>Procedure di deposizione della matrice per l'analisi HPTLC-MALDI</i>	22
3.3.6 <i>MS/MS</i>	23
3.3.7 <i>HPTLC-MALDI dei mioblasti murini C2C12 wild-type e overesprimenti la sialidasi NEU3</i>	23
3.3.8 <i>Spettrometria di massa MALDI</i>	24
3.3.9 <i>Curve di calibrazione</i>	24
3.3.10 <i>Analisi dei dati</i>	24
4 RISULTATI E DISCUSSIONE	26
4.1 <i>Profilo di proteine seriche a scarsa abbondanza</i>	26
4.1.1 <i>Analisi MALDI profiling</i>	26

4.1.2 Identificazione dei picchi	31
4.1.3 Immunoblotting	32
4.2 Profilo glicosfingolipidomico.....	34
4.2.1 Ottimizzazione del metodo di deposito della matrice	34
4.2.2 Curve di calibrazione.....	35
4.2.3 HPTLC-MALDI dei mioblasti murini C2C12.....	37
4.2.4 Analisi semi-quantitativa di GM3 e degli altri GSLs in mioblasti murini wild-type e overesprimenti la sialidasi NEU3	42
5 CONCLUSIONI.....	45
6 BIBLIOGRAFIA.....	47
7 APPENDICI	54
8 PRODUZIONE SCIENTIFICA.....	55

LISTA SIMBOLI

ACN: Acetonitrile
ADK: Adenocarcinoma
APCI: Ionizzazione Chimica a Pressione Atmosferica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)
APPI: Fotoionizzazione a Pressione Atmosferica (*Atmospheric pressure photoionization*)
BPH: Iperplasia Prostatica Benigna (*Begnin Prostatic Hyperplasia*)
CHCA: Acido alfa-ciano idrossicinammico (*alpha-Ciano Hydroxycinammic Acid*)
DHB: Acido di-idrossibenzoico (*Di-Hydroxy Benzoic acid*)
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DRE: Endoscopia Digitale Rettale
DTT: Di-TioTreitololo
ESI: Ionizzazione *ElectroSpray*
FBS: Siero Fetale Bovino (*Fetal bovine serum*)
freePSA: Frazione di PSA non legata a proteine di trasporto
Gb3Cer: Globotriaosilceramide (*Ceramide trihexosides*)
Gb4Cer: Globotetraosilceramide (*GlobotetrahexosylCeramide*)
GlcCer: Glucosilceramide (*GlucosylCeramide*)
GSL: Glicosfingolipide
GD: Ganglioside Disialico (*Disialoganglioside*)
GM: Ganglioside Monosialico (*Monosialoganglioside*)
HPLC: Cromatografia in fase liquida ad alta pressione (*High Pressure Liquid Chromatography*)
HPTLC: High Performance Thin Layer Chromatography
IT: Trappola Ionica
LacCer: Lattosilceramide (*LactosylCeramide*)
LC: Cromatografia in fase Liquida
MALDI: Ionizzazione a desorbimento laser assistito da matrice (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*)
MARS: Sistema di rimozione ad affinità multipla (*Multiple Affinity Removal System*)
MS: Spettrometria di Massa
NEU3: Sialidasi NEU3
NMR: Risonanza Magnetica Nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*)
PAGE: Elettroforesi su gel di poliacrilammide (*PolyAcrilamide Gel Electrophoresis*)
PBS: Tampone Fosfato Salino (*Phosphate buffered saline*)
PSA : Antigene Prostata-Specifico (*Prostate Specific Antigen*)
PVDF: Polivinilidenefluoruro (*Polyvinylidene fluoride*)
Q: Quadrupolo
SELDI: Surface Enhanced Laser Desorption Ionization
SM: Sfingomieline (*Sphingomyelin*)
SPE: Estrazione in fase solida (*Solid Phase Extraction*)
TFA: Acido TriFluoroacetico
TLC: Thin Layer Chromatography
ToF: Tempo di volo (*Time of Flight*)
Rf: Rapporto fra la distanza percorsa dall'analita e quella percorsa dal solvente in esperimenti di cromatografia su strato sottile

LISTA FIGURE

Figura 1: Schema generale degli approcci proteomici bottom-up e top-down.....	5
Figura 2: Range dinamico delle concentrazioni proteiche nel siero umano.....	8
Figura 3: Range dinamico e spettrometria di massa.	9
Figura 4: Complessità del siero.....	10
Figura 5: Comparazione di profili serologici.....	12
Figura 6: Procedura adottata per l'analisi dei profili glicosfingolipidomici.....	25
Figura 7: Analisi PCA relative al confronto tra i profili dei sieri dei soggetti ADK+ e dei soggetti controllo e dei sieri ad alti valori e a bassi valori di PSA.....	27
Figura 8: Analisi MALDI Profiling ADK vs controlli (alto PSA).....	28
Figura 9: Analisi MALDI Profiling ADK vs controlli (basso PSA).....	29
Figura 10: MALDI-MS/MS del picco 2021 m/z.	32
Figura 11: Proteolisi del fattore del complemento C3 e immunoblotting.....	33
Figura 12: Curva di calibrazione del glicosfingolipide Gb3Cer.....	36
Figura 13: Curva di calibrazione del ganglioside GM3.....	37
Figura 14: Autoradiografia e spettri di massa rappresentativi dei glicosfingolipidi neutri identificati nei mioblasti C2C12 <i>wild-type</i>	40
Figura 15: Autoradiografia e spettri di massa rappresentativi dei glicosfingolipidi acidi identificati nei mioblasti C2C12 <i>wild-type</i>	41
Figura 16: Analisi semi-quantitativa condotta sul ganglioside GM3 in mioblasti C2C12 (wt) e overesprimenti la sialidasi NEU3.....	43
Figura 17: Analisi semi-quantitativa condotta su LacCer nei mioblasti C2C12 (wt) e overesprimenti la sialidasi NEU3.....	44

1 INTRODUZIONE

1.1 Le tecniche ifenate

Il termine "ifenzazione", derivante dall'inglese *hyphenation*, è stato introdotto per la prima volta da Hirschfeld nel 1980 [1], e si riferisce all'accoppiamento in serie di due o più strumentazioni, direttamente interfacciate (*on-line*), delle quali la prima è basata su una tecnica cromatografica, atta a separare i vari componenti presenti nel campione da analizzare, mentre la seconda prevede l'utilizzo di un detector altamente informativo, come ad esempio lqNMR o lo spettrometro di massa, per caratterizzare e identificare le varie frazioni. La definizione di ifenzazione non si applica solo a tecniche sviluppate su macchinari direttamente connessi tra loro, ma anche a tecniche effettuate in serie, senza passaggi intermedi che coinvolgono il rimaneggiamento del campione.

Recentemente, l'attenzione verso tali approcci è aumentata poiché finalizzata all'identificazione di analiti presenti in concentrazioni minime (ad esempio per l'identificazione di impurità o per la conferma della loro presenza in composti di varia natura) e per lo sviluppo di metodologie che permettessero l'analisi di un gran numero di campioni in tempi brevi, evitando tutti gli svantaggi connessi alla variabilità introdotta dall'operatore e dall'elevato numero di passaggi necessari per processare il campione.

L'ifenzazione più conosciuta è l'accoppiamento HPLC-MS [2], in cui la cromatografia liquida viene associata ad una spettrometria di massa ESI (ionizzazione electrospray), sorgente che facilita il passaggio delle molecole di analita non cariche dalla fase liquida alla fase gassosa, sotto forma di ioni. La sorgente ESI può essere accoppiata a molti tipi di analizzatore: a triplo quadrupolo (QqQ), a trappola ionica (IT-MS), a trasformata di Fourier (FT-MS), o ibridi come il QqTOF, costituito da un quadrupolo a cui segue una camera di collisione e un analizzatore a tempo di volo, il cui utilizzo dipende dall'applicazione richiesta. Accanto all'ifenzazione HPLC-MS, l'ifenzazione HPLC-NMR [3] ha il vantaggio di fornire informazioni di tipo strutturale, ma richiede un grado di purezza tale da non essere sempre facilmente applicabile [4].

Un incremento di sensibilità, in cromatografia liquida, è stato raggiunto con l'introduzione della nano cromatografia liquida (nano LC) [5] che riduce i volumi di flusso e il diametro della colonna utilizzata, dell'ordine dei micrometri (μm). In campo proteomico l'ifenzazione nanoLC-ESI-MS [6] è diventata la strategia analitica più utilizzata per la caratterizzazione e l'identificazione proteica. Essa permette un'analisi riproducibile e molto sensibile, vantaggio derivante dall'alta capacità separativa dello strumento nano LC.

L'elettroforesi capillare (CE), nota per la sua alte capacità separativa e per i veloci tempi di analisi, è stata frequentemente utilizzata per l'analisi peptidica [7], ma non è mai diventata una tecnica di *routine* in campo proteomico [8]. Un motivo è costituito dalla difficoltà di accoppiare l'elettroforesi capillare alla spettrometria di massa: la prima richiede infatti l'applicazione di una corrente dell'ordine di decine di microampere (μA) contrariamente alle basse correnti (nA) tipiche della sorgente ESI, e manca inoltre un flusso costante che convogli le proteine nello spettrometro, a differenza di quanto si verifica nella cromatografia liquida. L'unico modo è accoppiare le due tecniche tramite delle interfacce, di cui quella a giunzione liquida

è l'unica commercialmente disponibile [9]. In aggiunta, la ridotta capacità di carico dell'elettroforesi capillare (nell'ordine dei nanolitri, contrariamente alla cromatografia liquida con valori nell'ordine dei microlitri) ne riduce la sensibilità. Per aumentare la capacità di carico, sono stati sviluppati metodi on-line basati sull'estrazione in fase solida (SPE) che concentrano il campione prima dell'analisi CE [10]. La conseguente ibridazione SPE-CE permette l'analisi di analiti in campioni biologici ma richiede un attento set-up sperimentale. Un altro problema che riduce di molto il campo applicativo dell'ibridazione CE-MS è la presenza di sali e surfattanti spesso richiesti per aumentare la selettività di un'analisi CE, ma a cui la sorgente ESI è molto sensibile [11]. Si è pensato perciò ad accoppiare l'elettroforesi capillare con la sorgente MALDI (acronimo di Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) [12] tramite un meccanismo offline [13] data la maggior tolleranza di questa sorgente alla presenza di sali e tensioattivi. Un approccio promettente deriva anche dall'utilizzo delle sorgenti APCI (ionizzazione chimica a pressione atmosferica) [14] o APPI (fotoionizzazione a pressione atmosferica) [15] ma tali ibridazioni sono ancora in fase di sviluppo.

1.2 Ruolo delle tecniche ibridate in proteomica

Lo studio del proteoma ha tratto enorme vantaggio dal concetto di ibridazione in quanto l'accoppiamento in linea di tecniche diverse ha permesso da un lato l'aumento delle capacità separative ed identificative del proteoma stesso e dall'altro ha migliorato l'automazione e la capacità di processamento di un gran numero di campioni. Inoltre, l'introduzione di nuove tecniche separative unite al miglioramento delle prestazioni degli spettrometri di massa e ai progressi della bioinformatica ha permesso continui miglioramenti nell'analisi proteica qualitativa e quantitativa.

L'approccio *bottom-up* (Figura 1) prevede l'idrolisi enzimatica delle proteine, tramite enzimi proteolitici, direttamente sulle bande escisse da gel SDS-PAGE mono o bidimensionali e la successiva analisi in spettrometria di massa dei peptidi rilasciati. Il *pattern* proteolitico di ogni proteina è determinato in modo univoco dalla sua caratteristica sequenza amminoacidica, che è identificativa della proteina in esame [16]. Il confronto tra la sequenza amminoacidica della proteina e le sequenze amminoacidiche di proteine virtualmente digerite presenti nelle banche dati [17] permette un'identificazione univoca, ma solo se i pesi molecolari vengono determinati con sufficiente accuratezza. Se, al contrario, l'identificazione non è univoca o non è ottenibile, si ricorre a tecniche di spettrometria di massa *tandem* (ESI-MS/MS o MALDI-MS/MS). Utilizzando strumenti a ionizzazione MALDI si prevede l'isolamento di una particolare specie ionica, ione *parente*, e la successiva analisi degli ioni frammento generati nel tubo di volo mediante la presenza di opportune celle che permettono l'invio degli ioni al rivelatore. Le frammentazioni caratteristiche dello ione *parente*, ottenute mediante intensità del laser molto elevate, permettono di risalire alla struttura primaria. Nel caso di strumenti ESI, invece, le specie ioniche vengono isolate in un primo analizzatore e quindi inviate in una camera di collisione dove vengono prodotti degli ioni frammento che, successivamente vengono selezionati da un secondo analizzatore (alternativamente può essere utilizzato uno strumento IT). I frammenti carichi prodotti danno informazioni sulla struttura primaria del peptide selezionato.

Anche nel caso della spettrometria di massa tandem si utilizzano banche dati cui vengono sottoposti dati relativi non solo alle masse peptidiche, ma anche alla sequenza. Grazie a questo approccio è stato dimostrato che due soli peptidi sono sufficienti per identificare una proteina in modo univoco [18].

Alternativamente alla tecnologia *in-gel*, scarsamente automatizzabile e che non permette di separare proteine con punti isoelettrici o pesi molecolari estremi, l'estratto proteico può essere direttamente digerito e in seguito sottoposto a una combinazione di una o più tecniche di cromatografia liquida e spettrometria di massa tandem, strategia nota con il nome di *shotgun proteomics* [19], il cui nome si riferisce al sequenziamento shotgun del DNA [20]. Un approccio di questo tipo è rappresentato dalla strategia *MUltiDimensional Protein Identification* (MudPIT) [21] che combina il potere risolutivo dell'HPLC con la spettrometria di massa tandem e con algoritmi per la ricerca in *database*. La miscela proteica viene digerita con proteasi, e i peptidi risultanti vengono caricati in colonne con fasi stazionarie a fase inversa (RP) e a scambio cationico (SCX) [22]. La separazione avviene secondo idrofobicità e carica. Dopo eluizione dalla colonna, i peptidi vengono ionizzati, isolati in base al loro rapporto massa/carica e frammentati dallo spettrometro. Gli spettri di frammentazione vengono utilizzati per l'identificazione tramite software per la ricerca in database (ad es. SEQUEST o MASCOT). La shotgun proteomics permette di studiare l'espressione proteica su larga scala e in sistemi biologici complessi. Informazioni di sequenza colte anche da un solo peptide ci permettono di identificare proteine in quantità sub-stoichiometrica, o con punto isoelettrico e masse estreme.

Il maggior vantaggio dell'approccio *bottom-up* è la capacità di ottenere separazioni ad alta risoluzione, anche se dato l'alto numero di peptidi generato consente di indagare pochi campioni per volta. Inoltre le proteine più piccole spesso possiedono pochi siti di restrizione e non generano abbastanza peptidi per un'identificazione univoca. Un ulteriore svantaggio è dato dal fatto che analizzando proteine digerite si perdono tutte le informazioni relative al processamento della proteina nativa, incluse le modificazioni post-traduzionali.

Non tutte le tecniche proteomiche prevedono l'identificazione, ad esempio l'approccio definito *top-down* (Figura 1), prevede la separazione in 2 passaggi distinti, delle proteine intatte tramite tecniche *in-gel* SDS o basate sulla cromatografia liquida, e la successiva analisi delle proteine differenzialmente espresse, che verranno in seguito identificate tramite MS [23]. La forza di questo approccio risiede nell'ottenimento del peso molecolare della proteina così come si presenta nel campione, il che permette di individuare modificazioni post-traduzionali o forme troncate, entrambe di grande rilevanza in molte malattie e processi biologici. Questo tipo di metodologie si prestano bene quindi alla ricerca di possibili biomarcatori, definiti come indicatori di processi biologici, patologici o di risposte farmacologiche a un intervento terapeutico [24]. Nella moltitudine di dati derivanti è però necessario riuscire a distinguere tra le proteine che potrebbero essere buoni biomarcatori e quelle invece la cui espressione viene alterata a causa della variabilità intrinseca (dovuta alla strumentazione utilizzata) o della variabilità biologica [25]. Quest'ultima è intesa sia come variazione inter-soggetto, derivante dalla somma di tutte le differenze nell'espressione proteica associabili a fattori come età, sesso o gruppo etnico, sia come variazione intra-soggetto derivante

dalle fluttuazioni fisiologiche a cui l'organismo va incontro nelle diverse fasi della giornata.

Contrariamente all'approccio bottom up, le tecniche top-down rendono infatti possibile il processamento di un gran numero di campioni, soprattutto utilizzando materiali di partenza ottenuti in maniera non invasiva, come i fluidi biologici.

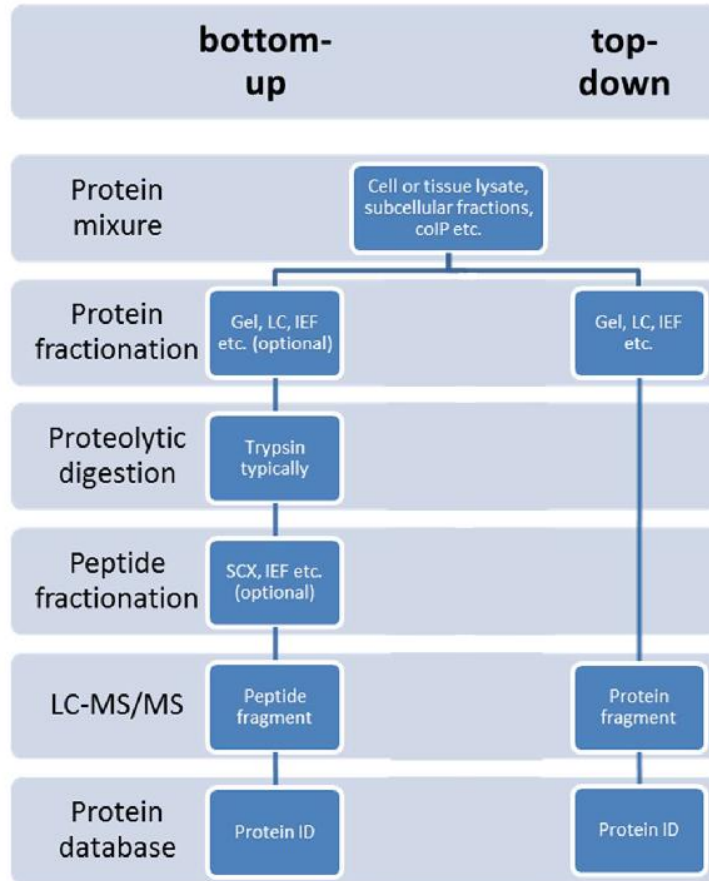


Figura 1: Schema generale degli approcci proteomici bottom-up (a sinistra) e top-down (a destra).

1.3 I fluidi biologici

I fluidi biologici sono il materiale di partenza ideale in campo diagnostico in quanto si trovano a diretto contatto coi tessuti e contengono il materiale proteico rilasciato dagli stessi, e inoltre possono spesso essere prelevati in modo semplice e poco invasivo, al contrario del prelievo biotico. Alterazioni nello stato fisiopatologico del paziente portano a cambiamenti nel numero e nel tipo di proteine rilasciate, dando spettri di massa differenti [26], e per questo l'analisi del proteoma dei fluidi biologici umani si è rivelata uno degli approcci più promettenti per la scoperta di possibili indicatori di patologia [27]. Fluidi come il liquido cerebrospinale, riconducibili a un singolo organo, possono aumentare la probabilità di identificare biomarcatori per patologie correlate grazie alla loro vicinanza col tessuto di interesse [28]. Purtroppo prevedono un prelievo piuttosto invasivo, che deve essere clinicamente giustificato. Al contrario, fluidi di escrezione come l'urina sono di facile raccolta ma la loro composizione non è sempre omogenea [26, 29].

Il sangue, in qualità di plasma/siero, sembra apportare diversi vantaggi: è considerato lo specchio della condizione fisiopatologica del paziente in quanto scorre attraverso l'intero organismo e con la sua rete di arterie, vene e capillari è a stretto contatto con ogni singolo distretto corporeo [30]. Campioni di plasma o siero possono potenzialmente contenere ogni porzione di mRNA che sia stata trascritta in una cellula qualsiasi del corpo [31, 32] perciò il proteoma del sangue potrebbe contenere porzioni di qualsiasi proteina di una qualsiasi cellula [33], contenendo molte informazioni sulla condizione del paziente che possono essere utilizzate in ambito clinico [34]. A questo si aggiungono la facilità di prelievo e di conservazione. Negli studi di proteomica non si analizza il sangue tal quale, bensì una delle sue componenti, il plasma o il siero. Il plasma corrisponde alla componente liquida del sangue, in cui normalmente sono sospesi gli elementi corpuscolati (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine). Viene ottenuto aggiungendo un anticoagulante, come eparina, EDTA o sodio citrato, subito dopo il prelievo. Il campione viene in seguito centrifugato per separare il plasma dalle frazioni cellulari. Il siero è ottenuto allo stesso modo ma senza l'utilizzo di anticoagulanti: si permette infatti la formazione del coagulo di fibrina che verrà poi allontanato tramite centrifugazione. Il siero, a differenza del plasma, non contiene quindi i fattori della coagulazione. Nonostante queste due componenti vengano utilizzate più o meno indifferentemente per molti esami di laboratorio, la loro composizione non è identica [35] e diversi studi hanno dimostrato che i loro profili proteici sono differenti [36, 37]. Ovviamente l'utilizzo di entrambi risulta impensabile e complesso sia in termini di tempo che di costi, ma, sia che si propenda per l'urina o l'altra componente, è della massima importanza utilizzare sempre procedure standardizzate sia per la preparazione dei campioni, che per la conservazione e le tecniche di raccolta al fine di ottenere risultati comparabili e riproducibili.

1.4 Il range dinamico

Il siero possiede molte caratteristiche che lo rendono idoneo per analisi proteomiche. Oltre ad essere raccolto in modo semplice e a essere ottenibile in grandi quantità ha anche una concentrazione proteica molto alta (60-80 mg/mL) [38]. Il suo proteoma è tuttavia molto complesso, in quanto è caratterizzato da decine di migliaia di specie proteiche differenti presenti in quantità molto diverse tra loro. Tali differenze a livello di abbondanza proteica vengono definite *range* dinamico del siero. In proteomica il *range* dinamico va inteso come il rapporto tra la concentrazione delle proteine più abbondanti e quella delle proteine meno espresse in un tessuto o fluido. Nel caso specifico del siero, il *range* dinamico si estende per più di 10 ordini di grandezza (dai 35-50 mg/mL dell'albumina ai 0-5 pg/mL dell'interleuchina 6) [39]. Le proteine più abbondanti (albumina, IgG, IgA, transferrina, alfa 2 macroglobulina, IgM, alfa 1 antitripsina, complemento C3 e aptoglobina) costituiscono il 90% del contenuto proteico. Una ulteriore porzione pari al 9% è costituita da altre 12 proteine (apolipoproteina A1, apolipoproteina B, glicoproteina alfa 1 acida, lipoproteina a, fattore H, ceruloplasmina, complemento C4, fattore del complemento B, prealbumina, complemento C9, complemento C1q, complemento C8) la cui abbondanza è minore rispetto a quelle citate precedentemente ma superiore rispetto al rimanente 1% [40].

Questa ultima frazione è costituita da proteine circolanti poco abbondanti e da frammenti proteici rilasciati o escreti nel sangue, che possono essere il risultato di eventi fisiologici o patologici che avvengono in tutti i tessuti perfusi [41] e comprendono proteine come le citochine, le chemochine e gli ormoni peptidici [40] (Figura 2). Si è ipotizzato che tale porzione (definita LAP, low abundant proteins) possa essere più interessante rispetto alla componente abbondante (HAP, high abundant proteins) per la possibile presenza di biomarcatori. Diversi studi proteomici di *profiling* hanno identificato frammenti proteici nel siero dei pazienti che si sono rilevati utili per la diagnosi del cancro alle ovaie [42, 43] e del carcinoma epatocellulare [44].

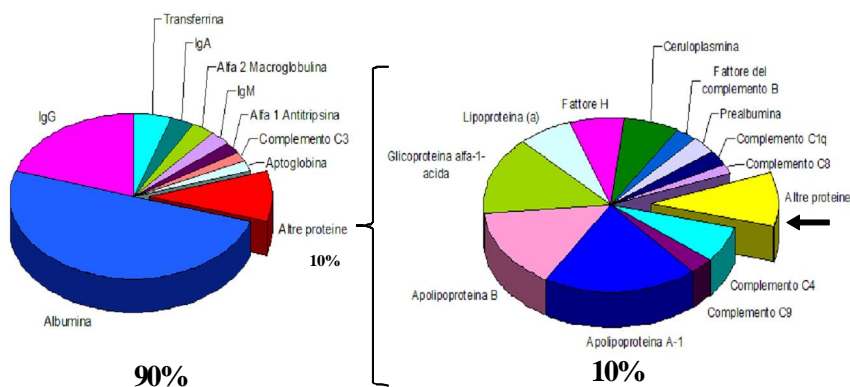
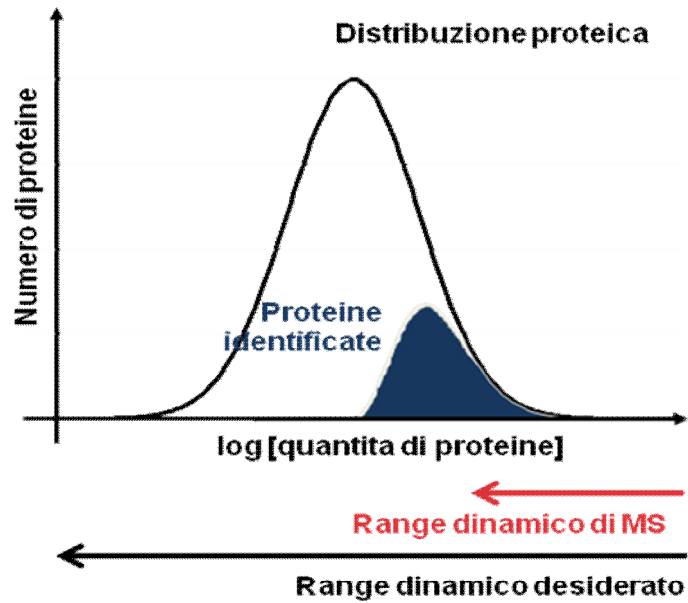


Figura 2: Range dinamico delle concentrazioni proteiche nel siero umano. 22 proteine costituiscono il 99% del totale proteico. L'albumina da sola costituisce il 50%.

La complessità del siero e l'elevato *range* dinamico costituiscono un problema non indifferente per l'analisi. Il successo di uno studio proteomico è influenzato infatti dal numero di proteine presenti in miscela (idealmente se ne dovrebbero avere un numero non superiore a 30 per riuscire a identificarle in spettrometria di massa), nonché dalla capacità dello strumento di analizzare soluzioni contenenti analiti a concentrazioni differenti (per uno spettrometro di massa tale capacità è di 2 ordini di grandezza) [45] (Figura 3).



From: Eriksson & Fenyő, HUPO 2005

Figura 3: Differenze tra la capacità della spettrometria di massa di analizzare proteine e peptidi a diverso range dinamico e l'effettivo intervallo di concentrazione delle specie proteiche e peptidiche presenti nei fluidi biologici.

Ciò significa che è necessario ricorrere a tecniche di frazionamento per ridurre la complessità della miscela. Se si opera sul siero non frazionato si vedranno solo le proteine maggiormente espresse (Figura 4). La rimozione di queste proteine consente quindi di visualizzare anche le specie meno abbondanti, ed eventualmente riuscire a identificarle.

Range Dinamico nel siero

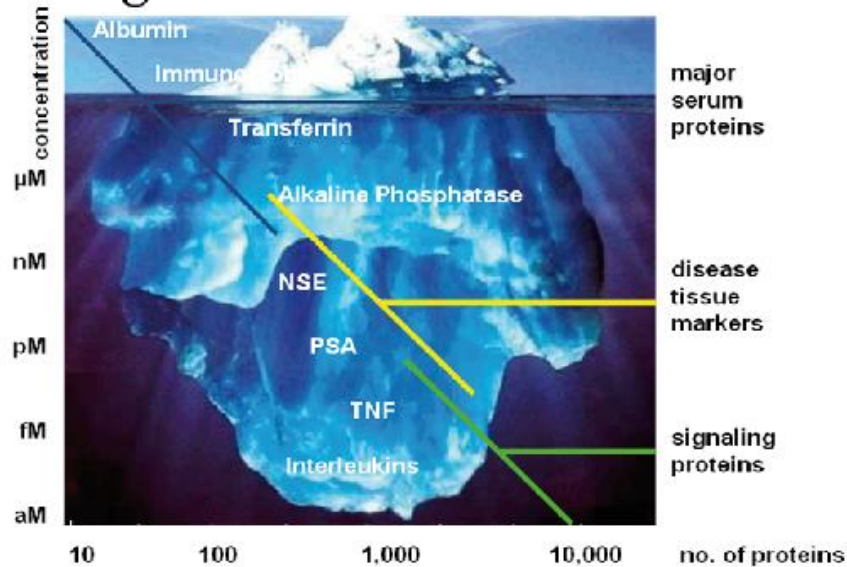


Figura 4: Anche con le più moderne tecniche proteomiche, operando sul siero non frazionato non sarà possibile visualizzare tutte le proteine in esso presenti. Proprio come in un iceberg la parte visibile corrisponde a una minima parte di quella totale.

Attualmente le tecniche atte all'eliminazione delle proteine più abbondanti possono essere suddivise in metodiche che riducono il *range* dinamico tramite delle librerie di ligandi combinatoriali [46] e in strategie che allontanano selettivamente alcune proteine ad alta abbondanza. Nel primo caso si tratta di una tecnica economica basata sull'utilizzo di biglie derivatizzate con diversi ligandi esapeptidici, ognuno dei quali ha affinità per una specifica proteina. Le proteine in eccesso sono lavate via ma, essendo i ligandi in proporzioni equimolari, le concentrazioni proteiche vengono normalizzate, e vengono quindi abbattute le differenze nell'espressione proteica tra un campione e l'altro [47].

Nel secondo caso la precipitazione selettiva di alcune proteine, come ad esempio l'albumina, è stata realizzata tramite cloruro di sodio, etanolo [48], acetonitrile [49], agenti riducenti quali DTT (ditiotreitolo) e TCEP (Tris (2-carbossietil) fosfina) [50], e ammonio solfato [51].

Un metodo ideale di frazionamento/deplezione dovrebbe permettere di rimuovere le proteine abbondanti minimizzando la perdita dei peptidi e proteine che potrebbero esservi legate [40]. L'albumina agisce infatti come un trasportatore e lega specie importanti come ormoni, citochine e lipoproteine [38]. Ad esempio l'ultracentrifugazione, in cui la forza centrifuga spinge il liquido contro una membrana semipermeabile, lasciando passare le molecole inferiori al *cut-off* (MWCO), se operata in presenza di acetonitrile al 20% [52] o al 25% [53] può permettere la rottura delle interazioni proteina-proteina e lasciare che i componenti a bassa abbondanza passino attraverso il *cut-off* della membrana (MWCO). L'acetonitrile non ha alcuna abilità nell'allontanare l'albumina quindi la sua presenza è richiesta univocamente per rompere i legami e arricchire la componente LAP [40]. L'ultracentrifugazione è un metodo veloce ed economico, ma non specifico in quanto si basa sul peso molecolare e non sulla rimozione selettiva di determinate proteine, e alcuni studi hanno dimostrato l'inattendibilità della tecnica [54]. Altra tecnica utilizzata è il trattamento termico con conseguente analisi della frazione termostabile [55]. È stato visto infatti che le spot di albumina e IgG sono meno intense nella frazione termostabile piuttosto che nel siero non sottoposto a calore, mentre le macchie proteiche delle proteine meno abbondanti sono più numerose ed evidenti.

L'utilizzo di anticorpi [56] permette una deplezione più selettiva. Si tratta di una procedura più costosa ma anche più riproducibile. Sebbene inizialmente i metodi per la deplezione delle proteine più abbondanti che impiegavano adsorbenti cromatografici come anticorpi anti HSA e Cibacron Blue, depletavano anche le proteine a bassa abbondanza legate all'albumina, con l'introduzione di metodologie basate sull'estrazione in fase solida, la riproducibilità ha raggiunto livelli ottimali. Esistono vari tipi di colonne SPE, quali a scambio ionico [57, 58] metallo chelante [58], di affinità [59] e soprattutto derivatizzate con anticorpi. Queste ultime (chiamate anche colonne di immunodeplezione) sono un ottimo strumento per la rimozione delle proteine ad alta abbondanza per la loro efficienza e selettività [57, 59].

Un'ulteriore ottimizzazione in termini di riduzione di costi e tempi è stata data dallo sviluppo di sistemi di rimozione per affinità multipla (MARS) [60] nei quali la colonna è derivatizzata con miscele di anticorpi policlonali per eliminare le proteine più espresse [56], inclusi i relativi prodotti proteolitici e forme molecolari [59]. Questo approccio è in grado di depletare il 90-95% delle proteine totali del siero [61], in maniera completa, specifica e riproducibile [62, 63] facendo uso di colonne a maggiore capacità e che resistono a molti cicli di utilizzo.

Più recentemente è stata applicata alla riduzione del *range* dinamico anche la cinetica enzimatica di Michaelis-Menten tramite l'utilizzo di una proteasi che digerisce selettivamente e poi rimuove i peptidi più abbondanti [64].

1.5 Il profilo serologico

L'applicazione della spettrometria di massa alla ricerca di biomarcatori in maniera indipendente dalle tecnologie in-gel si concretizza nel *Serum Profiling*, ossia nel confronto dei profili proteomici ottenuti da campioni in stato fisiologico e non. Alcune malattie, come ad esempio il cancro, modificano il contenuto proteomico del sangue e queste differenze possono definire un *fingerprint* diagnostico, il quale potrebbe funzionare come un indicatore terapeutico anche senza l'identificazione

delle specie che lo compongono [42, 65]. Questo metodo potrebbe essere trasformato in applicazione clinica per predire la suscettibilità a determinate malattie, ottenere una diagnosi precoce prima dell'insorgenza dei sintomi, e monitorare la progressione della malattia. Ciò è facilitato dal fatto che il *Serum profiling* è una tecnica *high throughput*, che permette l'analisi e la validazione di un numero elevato di campioni in modo simultaneo, rapido e di facile processamento (Figura 5).

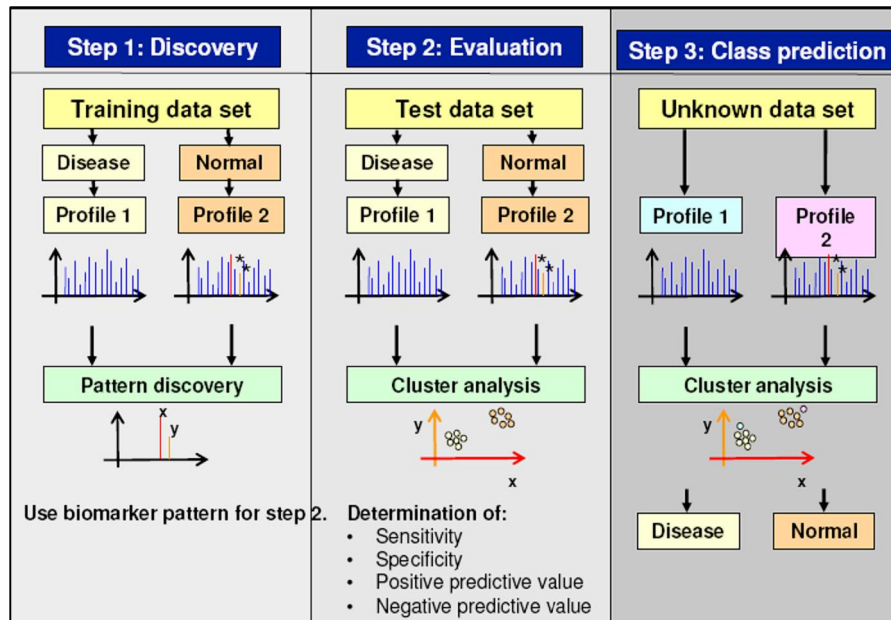


Figura 5: Comparazione di profili serologici per la determinazione di pattern caratteristici da utilizzare in diagnostica.

La prima tecnologia utilizzata per ottenere *pattern* proteomici di campioni di siero è stata la tecnologia SELDI (surface-enhanced laser desorption ionization) [66]. Essa utilizza un supporto funzionalizzato in modo da legare una determinata proteina o un gruppo di esse. Possono essere utilizzate diversi tipi di superfici, con caratteristiche idrofobiche, anioniche, cationiche o di affinità. Dopo l'aggiunta del campione il supporto viene lavato per eliminare ciò che si è aspecificamente legato. Il target è sottoposto ad una analisi tramite ionizzazione MALDI, che comprende l'applicazione della matrice adeguata, introduzione del target nello spettrometro di massa e acquisizione degli spettri [67]. La misurazione del tempo di volo delle molecole ionizzate in un tubo lineare permette di determinare il loro rapporto massa/carica. Questo sistema è quindi composto da tre componenti: il chip proteico, l'analizzatore di massa e il software di analisi.

Il vantaggio di questa tecnica consiste nell'analisi simultanea di un gran numero di campioni su una unica piattaforma, in maniera semplice, veloce e automatizzata [68]. Nonostante ciò la tecnologia SELDI non ha trovato applicazione in campo diagnostico a causa della scarsa riproducibilità degli esperimenti [69-71]. Questa ultima è probabilmente dovuta alla variabilità presente tra i diversi lotti di chip o di reagenti utilizzati. Utilizzando le stesse piattaforme per investigare le stesse condizioni, i risultati delle analisi producevano differenti picchi diagnostici, oppure si ottenevano variazioni al cambiamento dell'algoritmo selezionato. Ciò ha impedito di standardizzare le metodiche di analisi [72].

Grandi vantaggi sono stati ottenuti con l'applicazione della tecnologia MALDI per ottenere profili caratteristici degli stati fisiologici. Si parla pertanto di MALDI Profiling. Il campione deve essere co-cristallizzato con la matrice opportuna, depositato su supporto metallico e sottoposto a raggio laser.

Questa tecnologia risulta essere più flessibile e riproducibile rispetto a SELDI, e inoltre ne conserva le caratteristiche di rapidità, semplicità e di tecnologia *high throughput*.

Il confronto dei profili proteomici relativi a soggetti patologici rispetto a soggetti di controllo può essere utilizzato per due finalità differenti.

La prima, come già detto precedentemente, consiste nell'impiegare il pattern proteomico come un vero e proprio strumento di diagnosi, senza l'acquisizione e l'identificazione di una lista di potenziali biomarcatori, ma piuttosto usando come marcatore l'intero spettro. Al confronto tra i vari spettri segue una valutazione di tipo statistico e la *predizione* della classe di appartenenza sulla base della presenza di picchi discriminanti.

Un secondo approccio consiste invece nell'identificare le molecole corrispondenti ai picchi variati nel confronto tra gli spettri dei soggetti controlli e dei soggetti malati/trattati, ovvero le proteine la cui espressione risulta essere aumentata o diminuita o le varianti proteiche indotte dalla malattia e poi rilasciate e rilevate in circolo. Le informazioni sulla sequenza possono essere ottenute in modo diretto immediatamente dopo l'acquisizione dei profili per molecole con valori di m/z inferiori a 4000 Da. Il picco di interesse viene frammentato mediante esperimenti di massa tandem dando origine a una serie di peptidi che forniscono l'identificazione mediante esperimenti bottom-up [16].

Se il picco di interesse possiede valori di m/z superiori a 4000 Da, il suo alto peso molecolare sarà causa di una scarsa ionizzazione. In questo caso, o nel caso di picchi <4000 Da non identificabili, la miscela proteica dovrà quindi essere

ulteriormente frazionata mediante cromatografia liquida per individuare la frazione contenente la specie di interesse che dovrà poi essere identificata in MS o MS/MS.

1.6 La diagnostica del cancro prostatico

Il tumore prostatico, purtroppo molto diffuso, è il secondo tipo di tumore negli Stati Uniti, che colpisce il sesso maschile, dopo il carcinoma polmonare. Il carcinoma della prostata è caratterizzato da una crescita lenta e da una fase iniziale spesso asintomatica: esso richiede quindi una diagnosi precoce tramite tecniche efficaci e non invasive, come il dosaggio di un biomarcatore. Attualmente la diagnosi di tumore alla prostata avviene tramite esame rettale -DRE (*Digital Rectal Endoscopy*)- dosaggio del PSA (Prostate Specific Antigen), introdotto da Ablin nel 1970 [73, 74], e successiva conferma diagnostica con esami biotici o ecografici. Il PSA è una serin-proteasi callicreino-simile (è anche conosciuto con il nome di callicreina 3)[75] prodotta principalmente dal tessuto prostatico e secreta per la maggior parte nel liquido seminale dove raggiunge una concentrazione di 0,5-2 mg/mL [76]. Esso viene prodotto anche da altri distretti corporei (quantità molto basse di PSA vengono prodotte nelle ghiandole apocrine, seno, tiroide e placenta [77]), tuttavia solo il PSA prodotto dalla prostata raggiunge livelli ematici quantitativamente significativi e come tali di rilevanza clinica.

Dagli anni 90 il dosaggio del PSA totale (ossia del PSA complessato aggiunto al freePSA) nel sangue è stato approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) americana ed è stato definito che i soggetti con valori serici di PSA totale superiori alla soglia di 4 ng/mL fossero sottoposti ad ulteriori valutazioni [78]. In particolare, prima di procedere con l'esame biotico, per i pazienti con valori compresi fra 4 e 10ng/mL viene indagata la percentuale di freePSA che può dipendere dall'insorgenza di BPH (ipertrofia prostatica benigna) e non dalla presenza di cancro. Per valori superiori a 10 ng/mL, invece, la biopsia è necessaria e nel 60% dei casi indica la presenza di tumore [79]. L'utilizzo di intervalli di valori compresi rispettivamente fra 0 e 4 ng/ml, 4 e 10 ng/ml e superiori a 10 ng/ml in relazione all'età si presta però meglio alla valutazione delle patologie prostatiche in generale [80] e non solo di carcinoma prostatico, in quanto la sensibilità e specificità di questo marcatore non sono ottimali (rispettivamente circa l'85% e il 30%) [81]. Esistono infatti casi (circa 20% del totale) in cui il dosaggio di tale biomarcatore non permette l'individuazione del tumore (falsi negativi) [80] perché la lenta progressione e la specifica localizzazione di quest'ultimo non influenzano i livelli di PSA. Inoltre, il valore serico del marcatore può essere influenzato da altre variabili, quali BPH, prostatiti, infezioni del tratto urinario ed eventi ischemici, che sono cause di falsi positivi (solo un terzo dei pazienti con valori di PSA maggiori di 4ng/mL è affetto da tumore) [82, 83]. In alcuni casi i livelli del PSA sono maggiori in pazienti non affetti da tumore che in pazienti che lo sono. Ciò è riconducibile al fatto che anche BPH e prostatiti danno luogo a riorganizzazioni cellulari che hanno effetto sul giusto processamento del PSA e del proPSA [84].

Studi di biologia molecolare hanno proposto un gran numero di potenziali biomarcatori alternativi di tipo proteico (come l'antigene di membrana prostata-specifico) e marcatori genici (PCA3, ipermetilazione, ERTV1 e prodotti di fusione genica di TMPRSS2 ed ERG) [85], con lo scopo di superare le lacune del test del PSA ma purtroppo, anche in questo caso, la poca specificità e sensibilità, hanno rappresentato un problema alla loro applicabilità come strumento di *screening*. Si è

cercato quindi di aumentare la specificità del test del PSA introducendo la valutazione aggiuntiva di altri parametri come la PSA *density* (normalizzazione del PSA rispetto al volume della ghiandola prostatica) [86], la PSA *velocity* (monitoraggio dei livelli di PSA nel tempo) [86], la valutazione dell'architettura della ghiandola prostatica mediante un Gleason score modificato per stimare l'avanzamento del tumore [87] e il dosaggio del *free*PSA, quest'ultimo in grado di discernere tra BPH e tumore per valori di PSA totale compresi fra 4 e 10 ng/mL [88, 89].

A causa delle limitazioni sopra descritte quindi il PSA non può essere utilizzato come strumento di routine per ridurre effettivamente il rischio di mortalità, ma deve essere inteso come un elemento atto a separare coloro che hanno meno probabilità di avere un cancro da coloro che necessitano di ulteriori indagini. Per queste ragioni sono in corso numerosi studi atti all'identificazione di nuovi biomarcatori associabili al PSA per meglio indirizzare i pazienti ad ulteriori indagini diagnostiche.

1.7 Il profilo glicosfingolipidomico

Un altro aspetto importante della ricerca biomedica e indirettamente della diagnostica clinica è rappresentato da una classe di molecole di segnale che si sono rivelate importanti in numerose patologie quali malattie cardiovascolari e neurodegenerative [90, 91], tumori [92, 93], malattie da accumulo lisosomiale [94, 95] e sindrome metabolica [96]. I glicosfingolipidi (GSLs) sono presenti a livello della membrana dove promuovono la formazione di *lipid rafts* o *caveolae* [97, 98], microdomini dinamici coinvolti nella trasduzione del segnale e capaci di interagire con recettori, modificando la loro conformazione e regolando il legame con i neurotrasmettitori. Queste strutture lipidiche possono inoltre mediare l'internalizzazione di batteri o virus [99, 100], e la adesione cellula-matrice, così come la crescita cellulare e la differenziazione. I GSLs abbondano nelle cellule neuronali e hanno un ruolo primario nello sviluppo neuronale, nel mantenimento dell'integrità degli assoni e della mielina [101, 102], e nella trasmissione degli impulsi nervosi. Essi sono glicolipidi anfipatici composti da una catena oligosaccaridica idrofilica e da uno scheletro idrofobico, il ceramide, costituito da una base sfingoide acilata con un acido grasso.

Un limite allo studio di questa classe di composti è rappresentato dalle difficoltà analitiche degli stessi in quanto l'utilizzo di anticorpi diretti contro la componente saccaridica dei glicosfingolipidi è incapace di discriminare GSLs che si differenziano per un singolo monosaccaride, non garantendo quindi riproducibilità di identificazione e di quantizzazione, mentre l'utilizzo di precursori radioattivi come la [$^3\text{-H}$] sfingosina risulta complicato e pericoloso per l'operatore.

La separazione dei GSLs può essere effettuata tramite l'utilizzo della cromatografia su strato sottile TLC (Thin Layer Chromatography) utilizzando lastre HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) [103] e colorando le singole specie con coloranti opportuni quali ad esempio il resorcinolo, che rileva i carboidrati che legano lipidi [104], il resorcinolo, specifico per l'acido sialico [105], il reagente di Ehrlich [106] e la primulina [107]. L'identificazione avviene confrontando il loro valore di R_f con quello di standard noti, molti dei quali commercialmente disponibili. Usando gli opportuni solventi, è possibile distinguere i vari GSLs in base alla componente saccaridica, e anche più specificatamente in base al numero di residui nella catena

acilica, sebbene l'identificazione di queste sub-specie richieda standard appropriati, non sempre disponibili.

Una quantificazione approssimativa dei singoli GSL separati tramite HPTLC può essere effettuata tramite densitometria dopo la colorazione o tramite conte radioattive in seguito a radiomarcatura dei precursori metabolici. Un'analisi quantitativa più accurata può essere ottenuta trasferendo i GSLs, separati tramite cromatografia su strato sottile, su una membrana PVDF, e analizzandoli tramite l'utilizzo di proteine che legano i carboidrati come anticorpi o tossine batteriche [108], prestando attenzione al possibile mimetismo molecolare (*molecular mimicry*) [109], in quanto gli anticorpi potrebbero reagire non solo con il loro antigene ma anche con quelli simili, errore dovuto anche alla somiglianza tra i diversi carboidrati che compongono i GSLs.

Un altro metodo tradizionale è costituito dalla cromatografia liquida [110]. La cromatografia a fase normale distingue i diversi glicosfingolipidi in base alla catena di zuccheri mentre la cromatografia a fase inversa separa sulla base della lunghezza e del numero di insaturazioni della catena N-acilica (o della base sfingoide) [111, 112].

Grandi progressi nella caratterizzazione e nell'identificazione di questi composti sono stati ottenuti con l'introduzione della spettrometria di massa con sorgenti ESI [113] e MALDI [114], in grado di fornire l'esatta massa per ogni GSL. Se utilizzate singolarmente, queste tecniche non sono tuttavia in grado di distinguere tra specie isomeriche richiedendo un passaggio preliminare di separazione [115]. Le risultanti ifenazioni LC-ESI-MS [116] e nano LC-ESI-MS [117] sono oggi le più utilizzate nell'analisi dei GSLs perché sono altamente sensibili e sono in grado di distinguere GSLs con tempi di eluizione simili evitando un'analisi quantitativa erronea. Per contro, questi metodi sono laboriosi e richiedono molto tempo, dipendono dal buon funzionamento della colonna e devono tenere conto della resa effettiva e degli effetti di *carry-over*, e quindi della necessità di pulire la colonna tra un campione e l'altro con corse condotte solo con i tamponi. Anche la spettrometria MALDI è stata indirettamente accoppiata alla cromatografia liquida (HPLC e nano LC), frazionando i campioni sulla piastra MALDI tramite robot specifici [118]. Anche in questo caso però, l'acquisizione dei dati richiede molto tempo e non è così ben standardizzata come nell'LC-ESI, sebbene possa fornire risultati quantitativi. Pertanto nuove tecniche ifenabili sono allo studio per la separazione e l'identificazione di una classe di composti di grande interesse biologico, che consentano l'analisi diretta dei glicosfingolipidi sfruttando le capacità separative spaziali della cromatografia su strato sottile, essenziali per lo studio delle specie isomeriche.

L'ifenazione della spettrometria di massa con un sistema cromatografico planare come la lastra HPTLC richiede sforzi maggiori rispetto all'ifenazione con la cromatografia su colonna per l'incompatibilità tra la superficie in cui i vari analiti sono separati e l'introduzione del campione nello spettrometro di massa. Tuttavia i vantaggi di questa analisi, tra cui la possibilità di analizzare molti campioni in parallelo con una singola fase di preparazione del campione e con l'utilizzo di un'unica fase mobile, dà l'idea dell'importanza dello sviluppo di una tecnica diretta.

I vari approcci TLC/HPTLC-MS possono essere classificati, in base alla tecnica utilizzata, in quelli basati sull'eluizione, ed introduzione in spettrometri ESI (electrospray ionization) [119], APCI (ionizzazione chimica a pressione atmosferica) [120] o APPI (fotoionizzazione a pressione atmosferica)[121]

(approcci indiretti), o sul *desorbimento*, con accoppiamento con MALDI [122] o FAB (bombardamento con atomi veloci) [123] (approcci diretti). Nel primo caso, sono richieste delle procedure di pre-trattamento del campione prima dell'analisi MS. Questo vuol dire identificare la posizione delle bande tramite colorazione con coloranti non distruttivi, grattare il gel di silice dalla lastra, estrarre l'analita dal gel tramite cloroformio, metanolo ed acqua, purificare la soluzione estratta e concentrarla prima di introdurla nello spettrometro di massa, per lo più con sorgente ESI, tramite infusione diretta [124]. Il vantaggio è quello di poter analizzare campioni puliti, concentrati e privi di particelle di gel, proteggendo lo spettrometro da inquinanti e facilitando la sua manutenzione. Ma si tratta anche di una procedura lenta e difficoltosa e che richiede molto campione. Inoltre, analiti con valori simili di Rf non vengono eluiti accuratamente, richiedendo ulteriori analisi con GC-MS o LC-MS, e inoltre analiti che non sono stati rilevati dalle tecniche di colorazione non verranno analizzati a meno che non si decida di analizzare tutta la lastra HPTLC. Recentemente la separazione su lastra HPTLC è stata indirettamente associata anche alla spettrometria di massa MALDI tramite un approccio di preparazione del campione definito *PrimaDrop* che ha consentito di ottenere dati quantitativi sul glicosfingolipide globotetraosilceramide Gb4Cer [125]. Le lastre HPTLC sono state spruzzate con la primulina, le bande relative a Gb4Cer sono state estratte, eluite e caricate sulla piastra metallica per l'analisi MS. Una volta asciugate, è stata applicata una soluzione di matrice saturata risospesa in un solvente altamente volatile.

Tra le procedure dirette invece vi è il trasferimento degli analiti separati su TLC su una membrana di polivinilidenefluoruro (PVDF), e l'analisi diretta tramite spettrometro di massa MALDI [126].

Grande interesse è sempre stato rivolto allo sviluppo di metodi che prevedessero il minor numero di passaggi possibile, per migliorare l'identificazione e la caratterizzazione dei GSLs. L'approccio diretto TLC-MALDI è stato introdotto per la prima volta nel 2007 [127] con l'invenzione di una specifica piastra per l'introduzione diretta della lastra TLC nello spettrometro di massa MALDI.

2 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del lavoro è stato quello di contribuire allo sviluppo di tecniche ifenate ad alta risoluzione da associare alla spettrometria di massa MALDI allo scopo di:

1) risolvere problemi di natura qualitativa e quantitativa nello studio di proteine scarsamente abbondanti nel siero prelevato da pazienti con cancro alla prostata, ottimizzando i parametri per l'arricchimento delle specie poco abbondanti con la finalità di identificare nuovi biomarcatori da associare a quelli già disponibili in laboratorio clinico migliorando la diagnostica del cancro alla prostata.

2) semplificare e velocizzare la caratterizzazione qualitativa e quantitativa dei profili glicosfingolipidomici tramite la messa a punto di una tecnica semplice e high-throughput che permetta una facile identificazione e quantizzazione delle specie glicosfingolipidiche, effettuata su campioni già caratterizzati tramite l'utilizzo di precursori radioattivi e successiva analisi densitometrica, tecnica universalmente riconosciuta per l'analisi qualitativa e quantitativa dei glicosfingolipidi.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

La matrice DHB (acido 2,5- diidrossibenzoico), il colorante primulina, ammonioidrogenofosfato (monobasico) e il cloroformio (CHCl₃) sono stati acquistati dalla ditta Sigma Aldrich (Milano, Italia). Etanolo, metanolo, acetonitrile (ACN), acido trifluoroacetico, acqua, acetone e acido citrico sono della massima purezza disponibile e sono della ditta Fluka (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA); i tamponi per immunodeplezione A e B sono della ditta Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Le matrici CHCA (acido alfa-ciano-4-idrossicinnamico) e gli standard peptidici per la calibrazione Peptide Mix sono della ditta Bruker Daltonics (Brema, Germania); la tripsina è stata acquistata da Promega Corporation (Madison, WI, USA). Lo standard Gb3Cer (ceramide trihexosides) e Gb4Cer (globotetrahexosylceramide) sono della ditta Matreya LLC (PleasantGap, PA), mentre lo standard del gangliodide GM3 è della ditta Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama).

3.2 Profilo di proteine seriche a scarsa abbondanza

3.2.1 Sieri da Adenocarcinoma prostatico (ADK)

I sieri sono stati prelevati da 20 pazienti ADK+ e 18 soggetti controllo con valori di PSA maggiori di 4 ng/mL, e da 12 pazienti ADK+ e 10 soggetti controllo con PSA ≤ 4 ng/mL. L'età media dei soggetti era di 64 e di 62 anni per pazienti e controlli rispettivamente. Tutti i campioni sono stati raccolti dopo consenso informato da IRCCS Multimedica. Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale.

I campioni di sangue sono stati fatti coagulare a +4°C per 15 minuti, centrifugati per 10 minuti a 3500 g a 15°C e i sieri conservati a -80°C dopo averli valutati visivamente per emolisi, ittero e lipidemia.

3.2.2 Immunodeplezione

I sieri sono stati scongelati in ghiaccio e sottoposti a immunodeplezione per mezzo della colonna Human 7 Agilent multiple affinity removal system (MARS) (Agilent Technologies) montata su uno strumento HPLC 1200 series (Agilent Technologies). In breve, 40 µL di ogni campione sono stati diluiti 4 volte nel tampone A e centrifugati con filtri da 0,22 µm (Cellulose acetate Spin-X, Corning Inc., NY, USA) dopodichè i sieri sono stati sottoposti a immunodeplezione con la colonna MARS 4.6x50 mm Hu7 secondo la procedura indicata dalla ditta produttrice. Le frazioni proteiche a bassa abbondanza (LAP) e ad alta abbondanza (HAP) sono state eluite nei tamponi A e B (Agilent Technologies), rispettivamente, quantificate tramite saggio BCA (Acido Bicinconico) (Pierce Chemical), desalificate tramite colonna mRP-C18 (Agilent Technologies) montata su strumento HPLC 1200 series, ed eluite in 0.1%TFA in ACN. I campioni sono stati in seguito liofilizzati e risospesi in 0.1%TFA in modo da ottenere una concentrazione finale di 1 mg/mL.

3.2.3 Preparazione della matrice

La matrice CHCA (0,3 mg/mL) è stata dissolta in etanolo/acetone 2:1 e sonicata per 15 minuti. Ogni campione è stato miscelato con la matrice, depositato in

quattro replicati (per diminuire la variabilità analitica) sulla piastra AnchorChip (600-384 target, Bruker Daltonics), e lasciato asciugare a temperatura ambiente prima dell'acquisizione automatica.

3.2.4 MALDI profiling

Gli spettri sono stati acquisiti in modalità lineare positiva usando uno spettrometro di massa Ultraflex III equipaggiato con laser Smartbeam, frequenza di 100 Hz, e i software Flex Control v. 3.3 e Flex Analysis v.3.3 (Bruker Daltonics).

I parametri impostati sono i seguenti: sorgente ionica 1, 25kV; sorgente ionica 2, 23.5 kV; lenti, 6.3 kV; soppressione dei segnali relativi alla matrice al di sotto di 800 m/z; tempo di estrazione ionica, 100 ns.

Gli spettri sono stati acquisiti con un software completamente automatico, AutoXecute (Bruker Daltonics), i cui parametri sono: potenza del laser, 60%; spari laser totali, 1000; movimento random (25 spari per spot). Gli spettri di massa sono stati analizzati tramite il software ClinProTools v. 2.2 (Bruker Daltonics) utilizzando una risoluzione di 800. Il software ClinProTools normalizza gli spettri, sottoponendoli a calibrazione e sottrazione del rumore di fondo, e li valuta in base all'intensità e all'area di ogni singolo segnale di massa, generando uno spettro totale medio per ogni categoria. La statistica è stata effettuata sempre tramite il software ClinProTools applicando il t-test di Wilcoxon (statisticamente significativo per valori p-value <0.05), e i picchi che sono risultati variati in modo statisticamente significativo nel confronto tra le diverse classi sono stati nominati "picchi migliori separatori". Il tipo di statistica adottato è di tipo non parametrico, in quanto i picchi sono distribuiti in maniera non normale e per la riproducibilità dell'analisi è stato valutato il coefficiente di varianza percentuale (CV%), relativo all'area/intensità dei picchi, per ogni valore di m/z fornito dal programma.

L'analisi dei dati derivanti dall'acquisizione degli spettri è condotta utilizzando la *Principal Component Analysis* (PCA), mentre l'analisi delle differenze tra i pattern appartenenti a spettri di categorie differenti è basata su algoritmi genetici sia di tipo multivariato (Genetic Algorithm e Support Vector Machine) che univariato (Quick Classifier).

3.2.5 Identificazione dei picchi

Cromatografia per gel filtrazione: 80 g delle frazioni LAP liofilizzate dopo la cromatografia a fase inversa (1°pool: ADK+, PSA \leq 4 ng/mL; 2°pool: ADK+, PSA>4 ng/mL; 3° pool: ADK-, PSA \leq 4 ng/mL; 4°pool: ADK-, PSA> 4 ng/mL) sono stati dissolti in acetonitrile in modo da ottenere una concentrazione finale di 6 mg/mL, caricati su una colonna BioSep SEC-S2000 (Phenomenex Inc.) e sottoposti a separazione cromatografica con un flusso isocratico di 30 minuti (0.1%TFA e 40% ACN in acqua) a 1 ml/min. Le frazioni sono state raccolte ogni 30 secondi per un totale di 60 frazioni e ognuna di esse è stata controllata tramite MALDI-MS al fine di verificare la presenza delle masse dei "picchi migliori separatori".

Analisi in spettrometria di massa: Le frazioni contenenti i picchi di interesse sono state ulteriormente separate tramite cromatografia in fase inversa (colonna RP-18) con lo strumento nLC system (Proxeon) accoppiato al raccogliatore di frazioni Proteineer FCII (Bruker Daltonics). I campioni sono stati iniettati in una colonna nanoC18 0,075x150mm (Proxeon) ed eluiti con un gradiente di acetonitrile/ 0,1%

acido formico. Ogni campione è stato separato in ulteriori 15 frazioni, depositate automaticamente su una piastra MALDI PAC (Prespotted AnchorChip, Bruker Daltonics) e analizzate con spettrometro di massa ULTRAFLEX III e software Warp-LC, e gli spettri sono stati calibrati esternamente usando il mix di calibrazione Peptide Mix (Bruker Daltonics). Gli spettri sono stati processati con il software FlexAnalysis v. 3.3 (Bruker Daltonics) impostando il valore soglia del rapporto segnale/rumore a 6 e la ricerca è stata condotta correlando gli spettri con le entries relative all' Homo Sapiens nel database NCBI nr 20100918 tramite il software BioTools v. 3.2 (Bruker Daltonics) interfacciato al software MASCOT on-line. Sono stati definiti statisticamente significativi i valori di $p < 0,05$ e l'ossidazione della metionina è stata impostata come modificazione variabile. La tolleranza di massa è stata fissata a 80 ppm e 0.5 Da per i peptidi e i frammenti ionici rispettivamente.

3.2.6 Immunoblotting

Al fine di validare l'alterata espressione del C3f indicata dall'analisi MALDI-Proteomic Profiling, sono stati condotti degli esperimenti di immunoblotting. Dopo la diluizione in 2X loading buffer (125mM Tris, 4% SDS, 10% glicerolo, 130mM DTT, BBF in tracce) 100 μ g di siero immunodepleto di pazienti ADK (n=10) e di soggetti controllo (n=10) sono stati separati in triplicato tramite SDS-PAGE (10% T, pH 8.8 running gel), e le bande sono state trasferite e bloccate su una membrana PVDF (300 mA; 180 min) utilizzando un Transblot Cell (GE Healthcare). Le membrane sono state bloccate per tutta la notte in TBS (20mM Tris, 137mM NaCl, 0.1% Tween, pH 7.5) contenente 5% di albumina serica bovina (GE Healthcare). In seguito le membrane sono state incubate con l'anticorpo monoclonale anti-C3b (1:250 diluizione anticorpo primario; Thermo Scientific) e il coniugato HRP anti-mouse (1:2500 diluizione anticorpo secondario; GE Healthcare). Le proteine sono state visualizzate tramite chemiluminescenza usando lo strumento ECL Plus kit (GE Healthcare). Le immagini sono state scansionate e ogni banda è stata quantizzata usando il software ImageQuant (GE Healthcare). I dati sono stati normalizzati considerando il totale di proteine colorate con Sypro Ruby e sottoposte al t-test di Student paragonando ADK e controlli. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per valori di $p < 0.05$.

3.3 Profilo glicosfingolipidomico

3.3.1 Colture cellulari

I mioblasti murini C2C12 sono stati ottenuti dall'American Type Culture Collection (ATCC) e coltivati in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma Aldrich) alto glucosio (4,5 g/L) con aggiunta di siero bovino fetale (FBS; Sigma Aldrich) 10% (v/v), 4mM L-glutamina, 100U/ml penicillina, and 100mg/ml streptomina (Sigma Aldrich) in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ e 95% di aria a 37°C. I mioblasti murini C2C12 che overesprimono la sialidasi NEU3 sono stati preparati secondo il protocollo descritto da Papini *et al.* [128]. Il contenuto proteico è stato determinato con il metodo descritto da Lowry *et al.* [129].

3.3.2 Marcatura metabolica dei glicosfingolipidi cellulari

La marcatura metabolica dei glicosfingolipidi cellulari è stata realizzata secondo il metodo descritto da Riboni *et al.* [130]. Brevemente, le cellule sono state piastrate in una petri (10x100 cm²) alla concentrazione di 3600 cellule/cm². Dopo 24 ore, la

[3-³H]sfingosina (D-erythro >97%, 50 µCi, 1.85MBq, Perkin Elmer) è stata dissolta in etanolo, trasferita in una provetta di vetro sterile e portata a secco sotto flusso di azoto; il contenuto è stato risospeso in 5 mL of DMEM-basso glucosio con 10 % FBS per ottenere una concentrazione finale di 2,4 nM di sfingosina e una quantità di radioattività di 110.000 dpm/mL. Il medium è stato aggiunto alle cellule e dopo 2 ore di incubazione (*pulse*) è stato sostituito da DMEM basso glucosio con 10% FBS non contenente la sfingosina radioattiva per 48 ore (*chase*) per raggiungere uno stato stazionario dal punto di vista metabolico. Queste condizioni sono risultate essere ottimali dopo aver testato il *chase time* dalle 24 alle 72 ore. Alla fine del *chase*, le cellule sono state lavate e raccolte in PBS freddo tramite raschiamento. Le sospensioni cellulari sono state in seguito congelate e liofilizzate.

3.3.3 Estrazione e separazione cromatografica degli sfingolipidi radioattivi

I lipidi totali delle cellule liofilizzate, marcate metabolicamente come descritto, sono stati estratti [103]. I lipidi radioattivi delle fasi acquose e organiche sono stati separati e analizzati tramite HPTLC usando lastre HPTLC di silice con il supporto in alluminio (75x50 mm, Merck, Darmstadt, Germany) e la miscela di solventi cloroformio/ metanolo/ acqua 110:40:6 (v/v/v) e cloroformio/ metanolo/ 0,2% CaCl₂ acquoso 60:40:9 (v/v/v) per la fase organica e acquosa, rispettivamente [103].

I lipidi radioattivi sono stati visualizzati con Beta-Imager 2000 (Biospace) e identificati tramite confronto con standard triziati [131]. La radioattività associata ai singoli lipidi è stata determinata con il software . Vision (Biospace).

3.3.4 Separazione cromatografica degli sfingolipidi estratti da cellule non sottoposte a marcatura metabolica

6,5 milioni di cellule C2C12 sono state piastrate in petri da 10x150 cm² (BD Falcon) e messe in coltura per 3 giorni, raggiungendo circa l'80% di confluenza. Le cellule sono state in seguito lavate e raccolte in PBS freddo tramite raschiamento. Le sospensioni cellulari sono state congelate e liofilizzate. I lipidi totali sono stati estratti due volte con 20:10:1 (v/v/v) cloroformio/ metanolo/ acqua, portati a secco sotto flusso di azoto, risospesi in cloroformio/metanolo 2:1 (v/v) e separati in due fasi in cloroformio/metanolo 2:1 (v/v) e 20% (v/v) di acqua per separare la fase organica dalla fase acquosa. I lipidi della fase organica sono stati sottoposti a trattamento alcalino per rimuovere i glicosfingolipidi. In breve, la fase organica è stata risospesa in 100 µL di CHCl₃ e in 100 µL di NaOH 0.6 N in metanolo e incubate a 37°C per un'ora. La reazione è stata bloccata aggiungendo 120 µL di HCl 0.5 M in metanolo. Il campione è stato sottoposto a un'altra separazione di fase e la nuova fase organica è stata usata per l'analisi HPTLC-MALDI.

3.3.5 Procedure di deposizione della matrice per l'analisi HPTLC-MALDI

Per ottimizzare le procedure di deposito della matrice, due lastre HPTLC di silice con retro in alluminio (75x50 mm) sono state sviluppate sia con uno standard glicosfingolipidico neutro che con uno acido. Lo standard Gb4Cer (4µg) è stato caricato sulla lastra e separato in cloroformio/metanolo/acqua 110:40:6 (v/v/v), mentre lo standard GM3 (4µg) è stato separato in cloroformio/metanolo/0,2% CaCl₂ acquoso 60:40:9 (v/v/v). Le lastre sono state fatte asciugare molto accuratamente, inserite nello strumento ImagePrep (Bruker Daltonics) e lo strato di

matrice è stato depositato ripetendo 3 cicli (per i GSLs acidi) o 4 cicli (per i GSLs neutri) identici del metodo da noi impostato che prevede 8 cicli di spray, seguiti da 30 secondi di incubazione e da 30 secondi di essiccazione. I parametri impostati tramite l'interfaccia dell'ImagePrep sono stati i seguenti: potenza dello spray 30%, modulazione 20%, tempo di spray 1,5 secondi. È stata utilizzata la matrice DHB in 50% acetonitrile alla concentrazione di 50 mg/mL (per Gb4Cer) e 100 mg/mL (per GM3). In seguito, le lastre HPTLC sono state montate sull'adattatore MTP TLC (Bruker Daltonics) e inserite nello spettrometro di massa MALDI.

Per quanto riguarda la matrice DHB a 200 mg/mL in 90% acetonitrile con 10 mM ammoniodiidrogenofosfato e 0.1% TFA, altri tipi di deposizione della matrice sono stati testati. In una procedura, le lastre HPTLC sono state immerse in un contenitore contenente la matrice, asciugate tramite un getto d'aria calda e sottoposte a una seconda immersione. Questo metodo assicura che la matrice abbia una densità di circa 5 mg/cm². Un secondo metodo consiste nello spruzzare la soluzione di matrice con uno spruzzatore per TLC, mentre nel terzo molte gocce di matrice di 0,5-1 µL sono state depositate usando una pipetta e asciugate sotto un getto d'aria calda.

Gli spettri di Gb4Cer sono stati acquisiti in modalità reflectron positiva mentre gli spettri di GM3 in modalità reflectron negativa utilizzando uno spettrometro di massa Ultraflex III ToF/ToF equipaggiato con laser Smartbeam (frequenza 100 Hz, Bruker Daltonics) e software FlexControl v. 3.3 (Bruker Daltonics).

3.3.6 MS/MS

Per l'esperimento MS/MS, la massa dello ione precursore è stata isolata e frammentata in LIFT. La nomenclatura introdotta da Domon e Costello [132] e da Adams e Ann [133] è stata utilizzata per la distribuzione degli ioni frammento.

3.3.7 HPTLC-MALDI dei mioblasti murini C2C12 wild-type e overesprimenti la sialidasi NEU3

I glicosfingolipidi estratti dai mioblasti murini C2C12 wild-type e overesprimenti la sialidasi NEU3 sono stati caricati su lastre HPTLC (75x50 mm) per la separazione cromatografica. A questo proposito, la fase acquosa e la fase organica (corrispondenti a 4 e 2 mg di proteine totali, rispettivamente) sono state separate e caricate su due diverse HPTLC, una delle quali sviluppata in cloroformio/ metanolo/ 0.2% CaCl₂ acquoso 60:40:9 (v/v/v) per l'analisi dei GSL della fase acquosa (i GSLs acidi- ovvero i gangliosidi) e l'altra in cloroformio/metanolo/acqua 110:40:6 (v/v/v) [134] per l'analisi dei GSL neutri, estratti dalla fase organica. Le lastre sono state accuratamente essiccate, inserite nell'ImagePrep (Bruker Daltonics) e lo strato di matrice è stato depositato come precedentemente descritto, utilizzando DHB 50 mg/mL per i GSL neutri e DHB 100 mg/mL per i GSL acidi.

Gli spettri relativi all'HPTLC contenente la fase organica sono stati acquisiti in modalità reflectron positiva mentre gli spettri dei gangliosidi sono stati acquisiti in modalità reflectron negativa. Per l'acquisizione automatica dei dati è stato utilizzato il software TLC MALDI con i seguenti parametri: intervallo di distanza sulla TLC per acquisizione spettri, 0.5 mm; numeri di spettri acquisiti nella stessa posizione X variando il parametro Y, 3; larghezza della linea, 5 mm; spari laser totali, 600 (200 spari per posizione).

3.3.8 Spettrometria di massa MALDI

Gli spettri sono stati acquisiti usando lo spettrometro Ultraflex III ToF/ToF con laser Smartbeam (frequenza 100 Hz, Bruker Daltonics) e software FlexControl v. 3.3 (Bruker Daltonics). Per l'analisi dei GSL neutri è stata adottata una polarità positiva con i seguenti parametri: sorgente ionica 1, 25 kV; sorgente ionica 2, 21,67 kV; lenti, 9,3 kV; reflector 26,3 kV; reflector 2, 13,7 kV; soppressione dei segnali relativi alla matrice al di sotto di 500 m/z; 100 mV/full scale.

Gli spettri dei GSL acidi sono stati acquisiti in modalità reflectron negativa. Parametri impostati: sorgente ionica 1, 20 kV; sorgente ionica 2, 17,2 kV; lenti, 7,4 kV; reflector 21 kV; reflector 2, 11 kV; soppressione per le masse al di sopra di 800 m/z; estrazione ionica pulsata 200 ns.

Gli spettri sono stati calibrati esternamente usando i picchi dei glicosfingolipidi standard, precedentemente caricati vicino al campione sulla HPTLC e sottoposti anch'essi ad analisi HPTLC-MALDI.

3.3.9 Curve di calibrazione

Gli standard Gb3Cer e GM3 sono stati diluiti in $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 con concentrazioni comprese tra 0.125 e 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e le diverse diluizioni sono state depositate su lastre HPTLC (200x100 mm, Merck), sviluppate come descritto in precedenza e tagliate a dare delle lastre HPTLC della dimensione di 75x50 mm, per condurre l'analisi HPTLC-MALDI come precedentemente descritto. In parallelo, ulteriori lastre HPTLC sono state caricate con le stesse diluizioni di standard, sviluppate e spruzzate con il colorante fluorescente primulina (5% p/v in acetone:acqua (80:20, v/v). Le bande degli standard sono state rilevate con uno scanner a fluorescenza, Ettan Dige Imager (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) a una lunghezza d'onda di 410 nm (eccitazione) e 550 nm (emissione).

3.3.10 Analisi dei dati

Attraverso il software SurveyViewer v.1.1 (Bruker Daltonics) gli spettri acquisiti sono stati visualizzati in un grafico 2D in cui in ascissa è rappresentato il valore m/z mentre in ordinata la posizione sulla HPTLC. Gli spettri di interesse sono stati poi analizzati tramite il software FlexAnalysis v. 3.3 (Bruker Daltonics). La massa dei vari glicosfingolipidi è stata attribuita tramite il database *LIPID MAPS structure* [135] inserendo il valore di massa dello ione precursore [136].

La curva di calibrazione del GM3 è stata ottenuta considerando il rapporto segnale-rumore del picco C16:0 [M-H]⁻ negli spettri acquisiti nell'area della HPTLC in cui si posiziona il GM3, e l'area sotto la curva del GSL è stata calcolata attraverso il metodo dei trapezi per le concentrazioni crescenti di GM3. La stessa procedura è stata usata per la curva di calibrazione di Gb3Cer considerando il picco C16:0 [M+Na]⁺, e per l'analisi semi-quantitativa degli sfingolipidi estratti dai mioblasti murini, paragonando l'area sotto la curva di GM3 e LacCer tra le cellule C2C12 wild-type e overesprimenti NEU3. Nel caso di LacCer, solo gli addotti sodici sono stati tenuti in considerazione per il calcolo dell'AUC, in quanto sono risultati essere quelli a maggiore intensità. La procedura utilizzata per la costruzione delle curve di calibrazione e per l'analisi semi-quantitativa è descritta in maggior dettaglio in Figura 6.

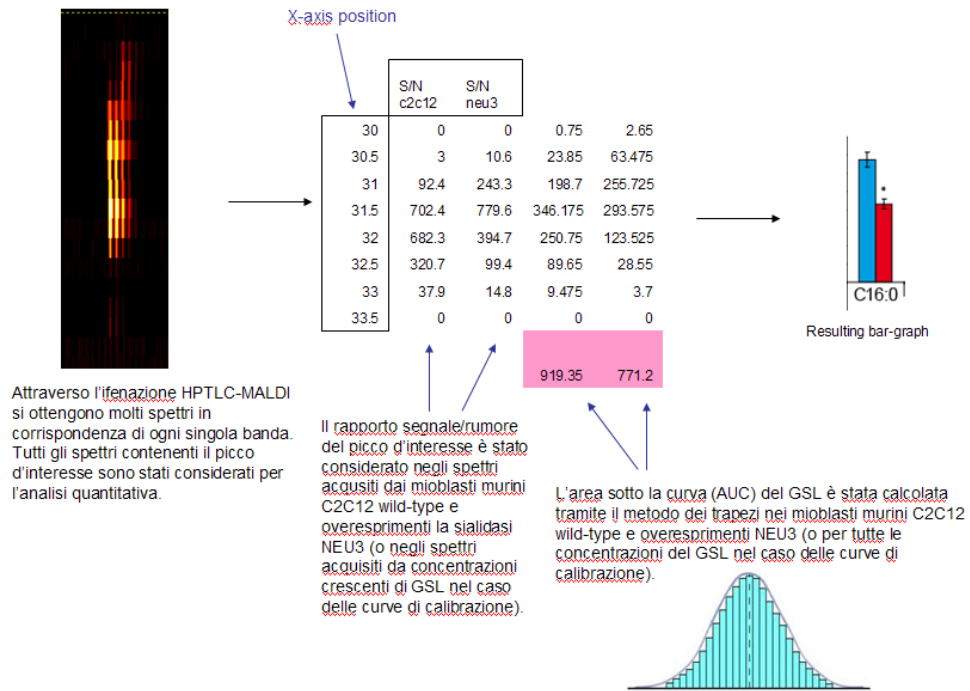


Figura 6: Procedura adottata per la costruzione delle curve di calibrazione e per l'analisi dei profili glicosfingolipidomici.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Profilo di proteine seriche a scarsa abbondanza

4.1.1 Analisi MALDI profiling

L'analisi MALDI profiling è sempre più utilizzata in studi di tipo patologico o farmacologico [137,138] e risulta essere particolarmente adatta per la classificazione dei pazienti, per la scoperta di possibili indicatori con valore diagnostico e prognostico e di target biochimici per lo sviluppo di nuovi farmaci. È una delle tecniche più promettenti che consente di ridurre il divario tra studi di tipo proteomico e di tipo clinico, permettendo di adottare per tempo una determinata strategia terapeutica mirata al paziente e consentendo una sorta di "medicina personalizzata" [139], utilizzando analisi a basso costo. Ovviamente la raccolta dei dati clinici dei pazienti e dei campioni devono essere eseguiti con molta cura così come molto attentamente bisogna definire la questione clinica e interpretare i dati.

L'analisi dei sieri tramite MALDI profiling è stata accoppiata al frazionamento per immunodeplezione secondo una messa a punto compiuta nel nostro laboratorio [140], che intende ridurre il range dinamico del siero, caratterizzato da 10 ordini di grandezza, per rapportarlo alle capacità degli spettrometri di massa attuali di analizzare soluzioni contenenti analiti a concentrazioni differenti e permettere quindi l'analisi delle frazioni proteiche a scarsa abbondanza. L'immunodeplezione con la colonna MARS Hu7 è stata favorita ad altri metodi di deplezione in quanto si tratta di una tecnica molto riproducibile. Il primo picco cromatografico, che viene eluito intorno ai 3 minuti, è quello relativo alla frazione del siero contenente le proteine e i peptidi a scarsa abbondanza che verrà successivamente sottoposta all'analisi MALDI Profiling, mentre il secondo picco, eluito intorno ai 12 minuti, contiene le sei proteine più abbondanti del siero.

Questa strategia è stata utilizzata per l'analisi delle proteine seriche a scarsa abbondanza in pazienti affetti da cancro alla prostata (ADK+). Nello studio è stato scelto di sottoclassificare 30 sieri dei pazienti ADK+ e 30 sieri dei soggetti controllo in base al valore soglia di PSA (4 ng/mL) in quanto un'analisi MALDI profiling preliminare condotta confrontando i profili proteici dei sieri con alti e bassi valori di PSA ha indicato la presenza di 15 picchi "migliori separatori" ($p < 0.05$), mentre nessun picco risulta essere variato nel confronto tra sieri ADK+ e ADK- (Figura 7), suggerendo l'importanza di questo valore per la corretta classificazione dei campioni, al fine di evitare l'insorgenza di risultati falsi negativi o falsi positivi.

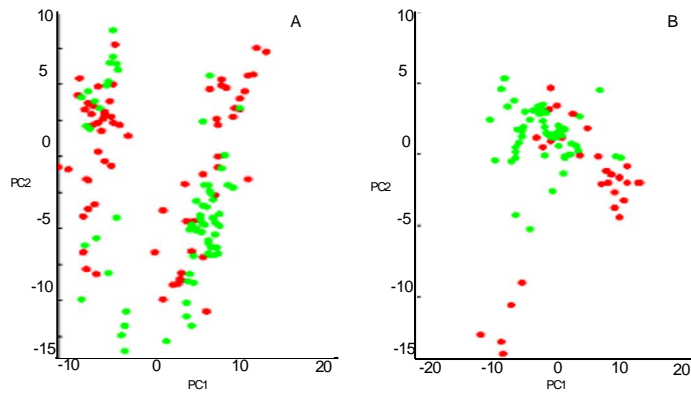


Figura 7: Analisi PCA relative al confronto tra i profili proteomici dei sieri dei soggetti ADK+ e dei soggetti controllo (A) e tra i profili dei sieri ad alti valori e a bassi valori di PSA (B). L'analisi statistica è stata effettuata tramite l'utilizzo del software ClinProTools.

L'analisi MALDI Profiling condotta sulle frazioni LAP dei sieri di pazienti ADK+ e di soggetti controllo (con valori di PSA superiori a 4 ng/mL) ha rilevato la presenza di 62 picchi totali nell'intervallo 1000-10000 m/z. Tramite il software ClinProTools sono stati generati gli spettri medi per i pazienti ADK (in rosso) e per i controlli (in verde) (Figura 8) ed è stato applicato un test statistico di tipo non parametrico (t-test di Wilcoxon). L'analisi statistica ha indicato 24 picchi migliori separatori ($p < 0,05$, Tabella 1). Tra questi, 11 picchi possiedono un *p-value* minore di 0,01. Sono state in seguito confrontate le frazioni LAP di pazienti ADK+ e di soggetti sani con valori di PSA inferiori o uguali a 4ng/ml (Figura 9). L'analisi statistica ha rivelato la presenza di 89 picchi totali nell'intervallo 1000-10000 m/z con 13 picchi migliori separatori ($p < 0,05$) e 4 picchi con un *p-value* inferiore a 0,01 (Tabella 1).

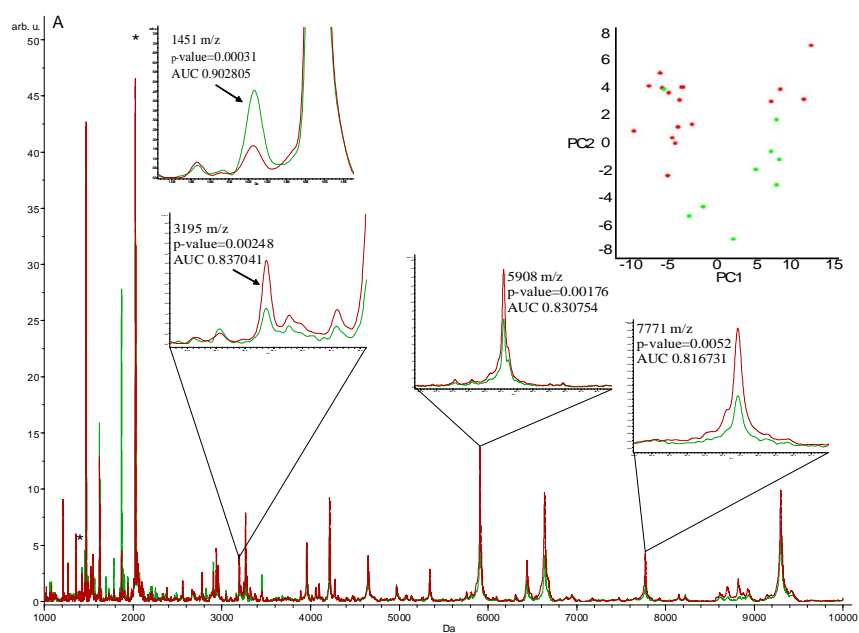


Figura 8: Le frazioni proteiche scarsamente abbondanti (Low Abundant Proteins-LAP) di sieri prelevati da pazienti ADK+ e da soggetti sani, con valori di PSA alto (>4 ng/mL), sono state sottoposte ad analisi MALDI profiling su piastra Anchorchip utilizzando la matrice CHCA. Sono stati rilevati 62 picchi totali: tra questi 24 picchi risultano variati con un p-value inferiore a 0,05 mentre 11 picchi risultano differenzialmente espressi con $p < 0,01$. Sono mostrati gli spettri medi dei profili serici ADK+ (in rosso) e dei profili serici controllo (in verde) insieme agli ingrandimenti di alcuni tra i picchi migliori separatori (1451, 3195, 5908 e 7771 m/z) e alla analisi PCA.

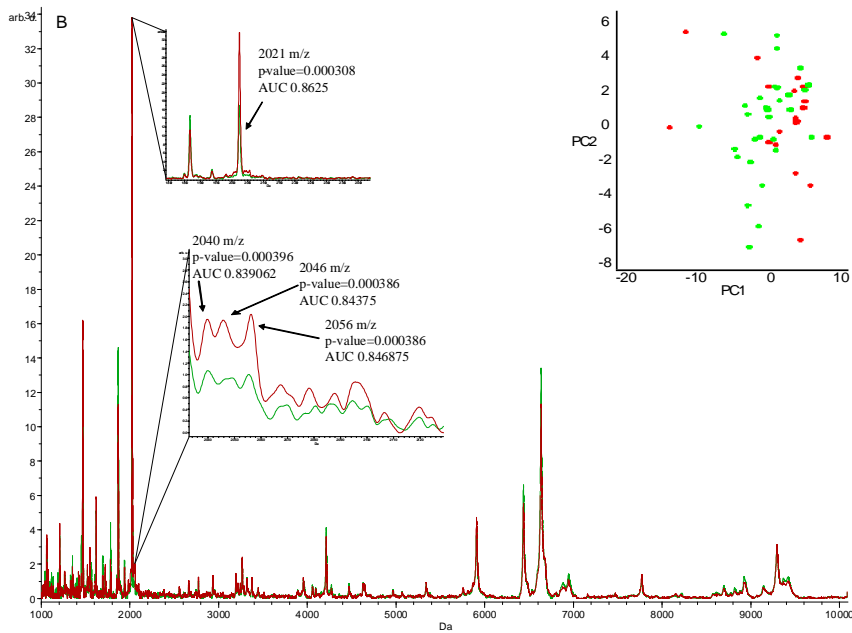


Figura 9: Spettri medi dei profili LAP serici di pazienti ADK+ (in rosso) e di soggetti controllo (in verde), con valori di PSA bassi ($\leq 4\text{ng/mL}$). Sono stati rilevati 89 picchi totali: tra questi 13 picchi risultano variati con un p -value inferiore a 0,05 mentre 4 picchi risultano differenzialmente espressi con $p < 0,01$. Sono mostrati gli ingrandimenti dei picchi migliori separatori con $p < 0,01$ (2021, 2040, 2046 e 2056 m/z) e alla analisi PCA.



Tabella 1: Picchi (indicati come rapporto m/z) differenzialmente espressi ($p < 0.05$) nel confronto tra i profili proteici dei sieri prelevati da pazienti ADK positivi e da soggetti controllo. Per ogni picco sono indicati il p -value e le intensità medie per ciascuna classe. I picchi con p -value minori di 0.01 sono evidenziati in grigio.

m/z	p-value, Wilcoxon test	Intensità medie, ADK	Intensità medie, Controlli	
1451.7	0.000708	16.43	32.67	Gruppo ad alto PSA (PSA > 4 ng/mL), ADK vs Controlli
3243.4	0.000708	23.06	15.47	
5908.4	0.00225	194.71	101.74	
3265.8	0.00225	81.4	40.2	
5808.5	0.00225	15.74	11.88	
3194.8	0.0029	44.34	25.16	
5340.4	0.0029	40.94	26.27	
7771.5	0.00592	71.93	34.39	
9297.1	0.0084	191.62	113.62	
8818.9	0.0084	34.05	13.08	
8695.2	0.0084	27.33	13.01	
2772.3	0.0113	26.22	18.3	
1868	0.0159	32.63	136.64	
4212.9	0.0159	108.74	73.72	
2955.8	0.0168	35.86	23.82	
5758.1	0.0177	14.81	11.14	
3210.7	0.0187	19.18	15.2	
4646.8	0.0223	51.6	33.53	
2935.2	0.0229	47.79	29.92	
1780.8	0.0229	13.24	28.06	
3885.5	0.0229	15.28	10.95	
6093.3	0.0229	11.25	9.26	
3281.3	0.0377	26.81	18.83	
4271.3	0.0492	27.21	22.63	
2021.1	0.000308	258.65	145.25	Gruppo a basso PSA (PSA < 4 ng/mL), ADK vs Controlli
2046.1	0.000386	23.51	15.11	
2055.9	0.000386	24.47	16.17	
2040	0.000396	18.51	12.14	
6943.7	0.0119	97.49	117.8	
1780.7	0.0119	37.32	51.51	
1981.8	0.0197	27.79	22.99	
1565.1	0.0198	28.92	36.89	
5379.2	0.0248	11.85	14.71	
2095.3	0.0291	20.53	16.07	
1451.6	0.038	28	42.45	
1692.8	0.038	31.18	40.03	
8696	0.0477	55.08	60.73	

4.1.2 Identificazione dei picchi

L'identificazione dei picchi altamente variati ($p < 0.01$) è stata effettuata utilizzando come materiale di partenza per la separazione cromatografica quattro *pool* costituiti dalla frazione LAP dei pazienti ADK+ e dei soggetti controllo in condizioni di alto e basso PSA. Come tecnica cromatografica è stata utilizzata la gel-filtrazione, che discrimina le diverse specie proteiche attraverso la loro massa, lo stesso tipo di informazione fornita dagli esperimenti di MALDI profiling.

Ogni campione è stato suddiviso in frazioni da 30 secondi e analizzato tramite spettrometria di massa MALDI per verificare in quali di queste frazioni fossero presenti le masse relative ai picchi migliori separatori. Queste ultime sono state ulteriormente analizzate tramite nLC-MALDI con colonna a fase inversa. Questo approccio ha permesso di identificare il picco a 2021 m/z nel gruppo ADK+ a basso PSA con un punteggio MASCOT di 65. Questo picco corrisponde al frammento C3f del fattore del complemento C3 (Figura 10). Quest'ultimo è la proteina del complemento più abbondante nel siero umano ed è spesso utilizzata in test di screening per il suo ruolo chiave nella cascata del complemento. Il fattore C3 viene tagliato dalla C3 convertasi liberando l'anafilotossina C3a e il frammento C3b, che rappresenta la forma attiva del fattore del complemento C3. Il taglio di C3b in iC3b inattiva quasi tutti i siti di legame rendendo impossibile l'associazione di C3b al fattore B e quindi l'attivazione del complemento. Il taglio da parte del fattore I del complemento, insieme al fattore H e ad altri cofattori, può avvenire in due punti della catena alfa di C3b, e se avviene in entrambi i siti viene rilasciato un piccolo frammento (C3f).

Nell'analisi MALDI profiling questo frammento risulta essere maggiormente espresso nei pazienti ADK a basso PSA rispetto ai controlli, suggerendo un possibile aumento nella formazione di iC3b e quindi nell'attivazione del fattore del complemento C3b.

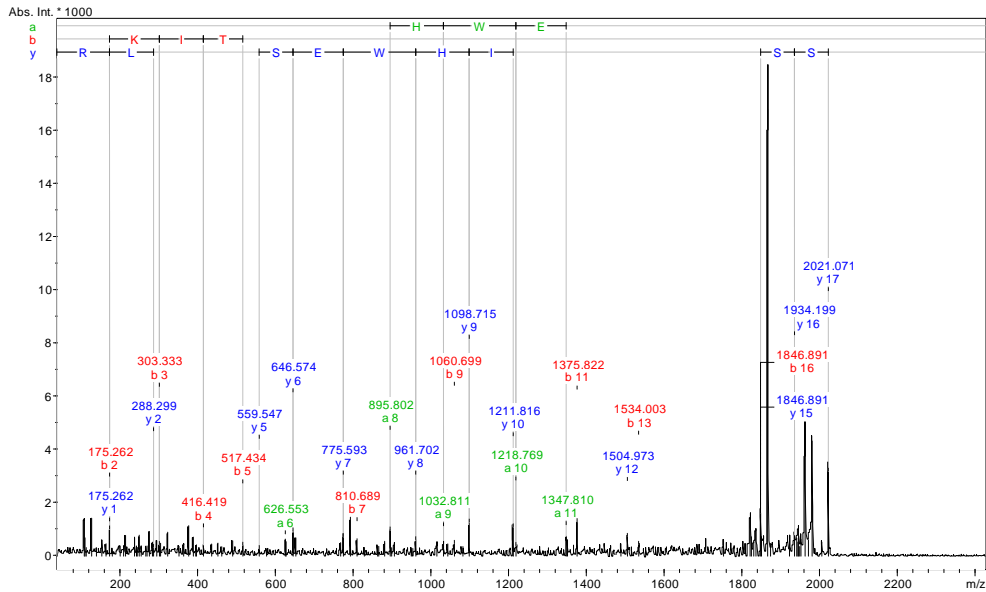


Figura 10: Il picco 2021 è stato frammentato tramite MALDI-MS/MS e identificato: esso corrisponde al peptide C3f del fattore del complemento C3.

4.1.3 Immunoblotting

Per confermare l'aumentata espressione del peptide C3f nei sieri dei pazienti ADK a basso PSA rispetto ai soggetti controllo è stato utilizzato un metodo indiretto, reso necessario a causa del basso peso molecolare del frammento C3f. Tale metodo consiste nel valutare tramite immunoblotting l'espressione degli altri frammenti che si formano dalla proteolisi del complemento C3b. Insieme al C3f si forma infatti anche un frammento di 182 kDa, che in condizioni denaturanti dà origine a tre frammenti di 67, 40 e 75 kDa. Il frammento di 67 kDa può in seguito essere tagliato rilasciando un frammento di 38 kDa e uno di 29 kDa che in condizioni non denaturanti forma, insieme ai frammenti di 40 e 75 kDa, il fattore del complemento C3c. La presenza di questi frammenti è stata verificata tramite riconoscimento antigene-anticorpo utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-C3b. La Figura 11 mostra aumentati livelli di espressione delle bande a 67 kDa e 29 kDa nei sieri ADK+, che suggeriscono un'elevata proteolisi del fattore del complemento nei sieri dei pazienti ADK+, con un conseguente aumento del frammento C3f, e quindi del peptide 2021 m/z corrispondente al picco migliore separatore.

In questo studio è stata indirettamente provata la relazione tra l'espressione del peptide C3f e la deregolazione del fattore del complemento C3. Quest'ultimo viene inattivato dall'azione proteolitica del fattore I e di molti altri cofattori, con formazione di iC3b che inibisce il ciclo della via alternativa del sistema del complemento (impedendo l'associazione del C3b al fattore B), e induce la degradazione delle specie che partecipano a tutta una varietà di interazioni ligando-recettore

(citotossicità cellulare mediata da anticorpi .ADCC-, adesione leucocitaria, fagocitosi, presentazione dell'antigene, rilascio di citochine).

Questo studio ha dimostrato che utilizzando il PSA come valore di riferimento è possibile sottoclassificare i pazienti grazie a profili proteici caratteristici, inoltre ha dimostrato che grazie all'identificazione dei picchi è possibile selezionare nuovi marcatori da associare in diagnostica a marcatori già presenti sul mercato, e ha identificato una molecola facilmente associabile nella diagnosi al test del PSA, evitando, nelle persone a rischio, i falsi negativi.

Molto rimane ancora da fare, in particolare vanno utilizzate ulteriori tecniche di frazionamento per favorire l'identificazione degli altri picchi associabili ai vari valori di PSA.

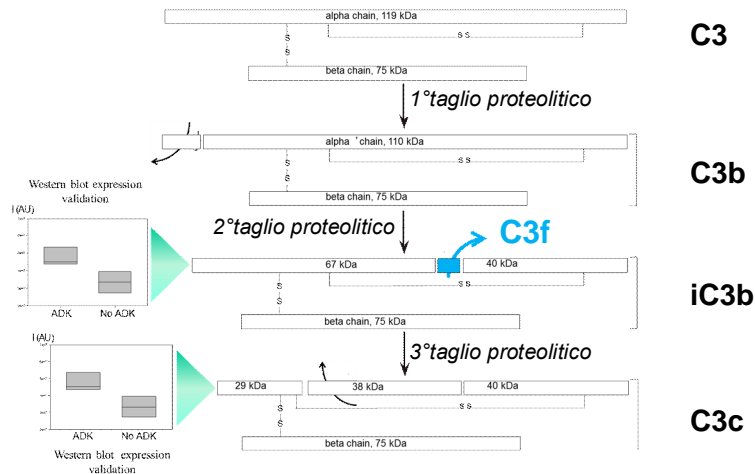


Figura 11: Il fattore del complemento C3 è attivato da una serie di tagli proteolitici a causa dei quali alcuni peptidi (indicati dalle frecce) vengono rilasciati, mentre il resto della struttura del complemento, in condizioni native, rimane legata attraverso ponti disolfuro. In condizioni riducenti possono essere invece rilevati tramite riconoscimento antigene-anticorpo frammenti di 67 kDa e di 29 kDa. 100µg di siero immunodepleto di pazienti ADK+ e di soggetti controllo sono stati separati in triplicato tramite SDS-PAGE (10% T, pH 8.8 running gel), e le bande sono state trasferite e bloccate su una membrana PVDF, incubata con l'anticorpo anti-C3b 1:250 per tutta la notte.

4.2 Profilo glicosfingolipidomico

Lo sviluppo di una tecnica ad alta risoluzione ed ad alta efficienza per l'analisi dei glicosfingolipidi, ha richiesto una serie di messe a punto metodologiche che hanno riguardato principalmente la fase di accoppiamento TLC/MALDI.

Il tipo di matrice e la sua deposizione sulla lastra HPTLC sono passaggi cruciali per un'analisi diretta tramite ionizzazione HPTLC-MALDI. A causa della sua composizione, la superficie in silice della lastra HPTLC richiede una grande quantità di matrice ad alta saturazione, che deve essere depositata tramite passaggi ripetuti, ognuno dei quali seguito da un'attenta asciugatura. Quest'ultimo passaggio è critico sia per la cristallizzazione della matrice sia per le possibili rotture che possono verificarsi sulla lastra, a causa del contenuto di acqua del solvente in cui è risospesa la matrice. Ciò comporta anche la diffusione laterale del campione, che insieme all'assorbimento dell'analita nella superficie di silice, determinano un crollo nelle capacità di rilevazione dello spettrometro MALDI, diminuendo la sua sensibilità, con una più bassa intensità dei picchi. In più, è assolutamente necessario evitare concentrazioni troppo alte o troppo basse di matrice, in quanto nel primo caso possono produrre cluster di segnali che rendono difficoltosa l'analisi, mentre nel secondo non permettono di rilevare alcun tipo di segnale. Inoltre, quando lo strato di matrice è troppo spesso si può verificare uno *shift* di masse (1-2 Da) e diventa quindi necessario un attento set-up sperimentale per definire le condizioni di deposito della matrice sulla lastra HPTLC.

Attraverso l'utilizzo dello strumento ImagePrep, lo spessore dello strato di matrice depositato è stato attentamente controllato impostando un metodo, di durata minore per i glicosfingolipidi neutri e maggiore per quelli acidi (gangliosidi), che alterna fasi di spray molto corte, della durata di 1,5 secondi, a lunghe fasi di incubazione ed essiccamento (30 secondi). Questa procedura permette la formazione di cristalli di matrice piccoli e regolari sulla superficie della lastra.

Studi recenti hanno indicato la matrice DHB (acido 2,5-diidrossibenzoico) come quella di elezione per l'analisi dei glicolipidi [127, 141, 142] e in particolare questa matrice è stata selezionata per la sua efficacia nella visualizzazione dei GSLs neutri [143, 144] e per la sua capacità di rilevare anche i GSLs acidi.

4.2.1 Ottimizzazione del metodo di deposito della matrice

La matrice DHB è stata testata a 50 mg/mL, 100 mg/mL, e 200 mg/mL. Quest'ultima concentrazione, molto alta, non è stata depositata tramite lo strumento ImagePrep per evitare l'otturazione del sistema di spray. In un primo approccio la soluzione è stata perciò raccolta in un reservoir e la lastra è stata immersa molto velocemente per due volte. In questo modo lo strato di matrice era omogeneamente distribuito sulla lastra, ma la quantità depositata non era sufficiente a permettere il rilevamento di segnali.

Si è tentato di depositare la matrice per mezzo di una pipetta, il metodo ha fornito spettri di buona qualità ma si tratta di una procedura dispendiosa in termini di tempo e operatore-dipendente. La riproducibilità degli spettri infatti è bassa a causa di una non-omogenea distribuzione della matrice.

Metodo di deposizione della matrice	Concentrazione DHB	Distribuzione della matrice	Rilevamento picchi	Riproducibilità degli spettri
Immersione	200 mg/mL in 90% ACN con 10 mM (NH ₄)H ₂ PO ₄ e 0.1% TFA	omogenea	molto basso	-
TLC sprayer	200 mg/mL in 90% ACN con 10 mM (NH ₄)H ₂ PO ₄ e 0.1% TFA	omogenea	basso	basso
Pipetta	200 mg/mL in 90% ACN con 10 mM (NH ₄)H ₂ PO ₄ e 0.1% TFA	non-omogenea	alto	basso
ImagePrep	50 or 100 mg/mL in ACN:H ₂ O/1:1	omogenea	alto	alto

Si è quindi deciso di utilizzare lo strumento ImagePrep ma con concentrazioni di DHB leggermente inferiori (50 e 100 mg/mL). Questo apparecchio utilizza un sistema di vaporizzazione vibrazionale automatico per creare un aerosol di matrice, costituito da gocce di circa 20 µm, che copre omogeneamente l'intera superficie dell'HPTLC con una densità di 1-5 mg di matrice per cm².

Come affermato precedentemente [141, 143], buoni risultati sono stati ottenuti utilizzando la matrice DHB in acetonitrile:acqua/1:1, che è stata quindi testata sia su uno standard gangliosidico (GM3) che su un GSL neutro (Gb4Cer). Dai risultati è emerso che l'utilizzo di DHB a 100 mg/mL accoppiato all'acquisizione degli spettri in negativo è la condizione più appropriata per rilevare i picchi relativi ai gangliosidi tramite HPTLC-MALDI, ed è stata utilizzata per esperimenti e confronti sui glicosfingolipidi acidi estratti dai mioblasti murini, mentre la concentrazione più bassa (50mg/ml) è stata adottata per esperimenti su GSLs neutri.

In più lo spettro MS/MS dello standard Gb4Cer acquisito tramite DHB 50mg/mL ha indicato che gli spettri MS² possano essere acquisiti direttamente dalle lastre HPTLC (Appendice A).

4.2.2 Curve di calibrazione

Un numero crescente di articoli dimostra che le informazioni quantitative possono essere ottenute da spettri di massa MALDI con un'accurata deposizione della matrice, unita all'utilizzo di standard e di curve di calibrazione. Per dimostrare l'applicabilità della tecnica HPTLC-MALDI all'analisi quantitativa, sono state costruite curve di calibrazione in triplicato sia per un GSL neutro (Gb3Cer) che per uno acido (GM3). La Figura 12 mostra la curva di calibrazione del glicosfingolipide neutro Gb3Cer nelle concentrazioni comprese tra 0.3-7 µg/µL, intervallo in cui è possibile osservare correlazione lineare. Il limite di rilevabilità è stato stimato a 0,1 µg, mentre una HPTLC caricata con le stesse concentrazioni di standard e

spruzzata con il colorante fluorescente primulina mostra un limite di rilevabilità intorno a 0,75 µg.

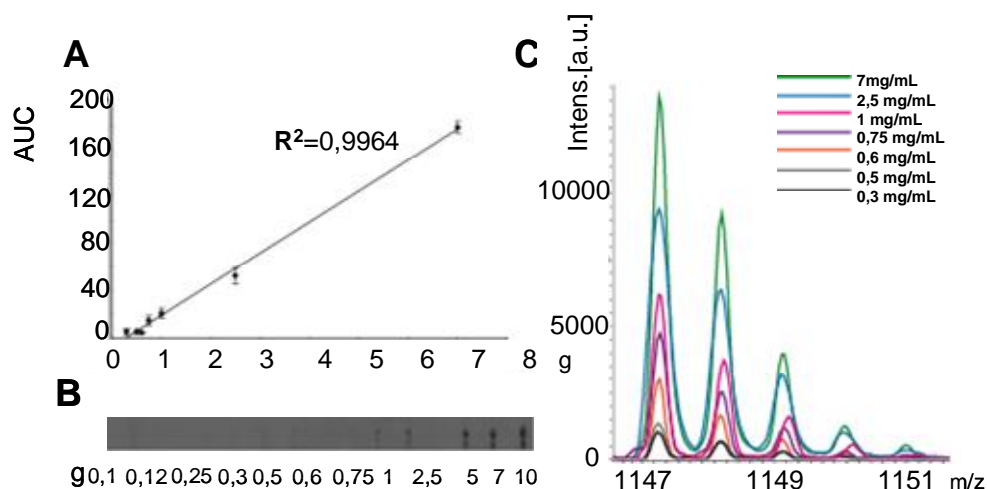


Figura 12: Curva di calibrazione del glicosfingolipide (GSL) globotriaosilceramide (Gb3Cer): A) costruita in triplicato considerando il rapporto segnale/ rumore del picco C16:0 [M+Na]⁺ negli spettri acquisiti nell'area della lastra HPTLC corrispondente alla posizione di Gb3Cer e calcolando l'area sotto la curva del GSL attraverso il metodo dei trapezi per tutte le concentrazioni crescenti di Gb3Cer (0,1, 0,125, 0,25, 0,3, 0,5, 0,6, 0,75, 1, 2,5, 5, 7, 10 µg/µL). B) costruita attraverso la colorazione con primulina. Le bande Gb3Cer sono state rilevate su una lastra HPTLC caricata con le stesse quantità di standard utilizzate per l'analisi HPTLC. Il limite di rilevabilità è in questo caso di 0,75 µg. C) Intensità del picco C16:0 [M+Na]⁺ di Gb3Cer alle varie diluizioni utilizzate per la curva di calibrazione.

Nella Figura 13 è mostrata la curva di calibrazione del ganglioside GM3 nell'intervallo compreso tra 0,4 e 6 µg/µL. Il limite di rilevabilità è stato stimato a 0,4 µg. Il valore R² è risultato maggiore di 0,95 per ogni curva di calibrazione.

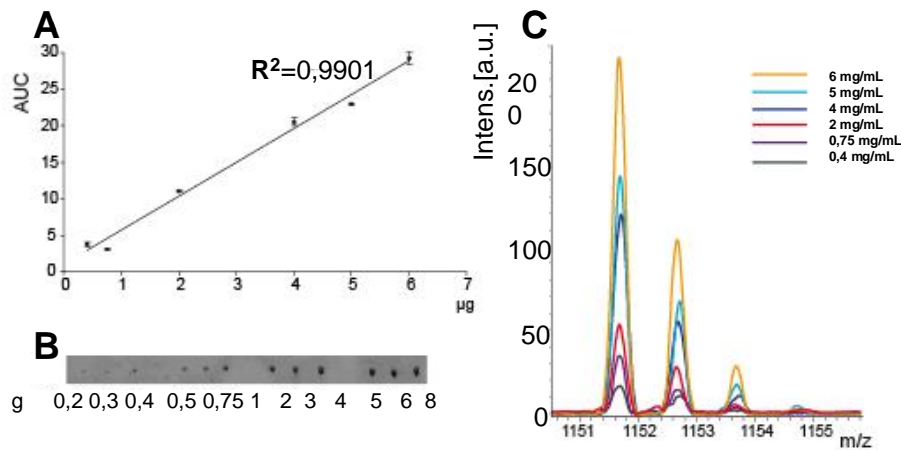


Figura 13: Curva di calibrazione del ganglioside GM3 standard: A) costruita in triplicato considerando il rapporto segnale/ rumore del picco C16:0 [M-H] negli spettri acquisiti nell'area della lastra HPTLC corrispondente alla posizione di GM3 e calcolando l'area sotto la curva del ganglioside attraverso il metodo dei trapezi per tutte le concentrazioni crescenti di GM3 (0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 µg/µL). B) costruita attraverso la colorazione con primulina. Le bande GM3 sono state rilevate su una lastra HPTLC caricata con le stesse quantità di standard utilizzate per l'analisi HPTLC. C) Intensità del picco C16:0 [M-H] di GM3 alle varie diluizioni utilizzate per la curva di calibrazione.

4.2.3 HPTLC-MALDI dei mioblasti murini C2C12

La linea cellulare di mioblasti murini C2C12, derivata da cellule satelliti isolate da muscolo rigenerante di topo adulto [145], rappresenta una delle linee cellulari più utilizzate per lo studio della biologia del muscolo scheletrico in vitro e per tale ragione è stata utilizzata per verificare l'applicabilità della metodologia proposta a sistemi biologici complessi. Le cellule muscolari in coltura forniscono infatti un eccellente modello per lo studio del differenziamento miogenico poichè tale processo risulta facilmente inducibile attraverso la composizione del mezzo di coltura e controllabile attraverso il monitoraggio dei parametri legati al differenziamento. Notevole è il ruolo dei glicosfingolipidi come biomarcatori di specifiche popolazioni cellulari, inclusi i mioblasti [146]. Recentemente è stato riportato che le sialidasi, enzimi glicoidrolitici che rimuovono residui di acido sialico dalle sialo-glicoproteine e dai gangliosidi, sono coinvolti nella differenziazione del muscolo scheletrico [147]. In particolare, la sialidasi NEU3 modula il contenuto gangliosidico [148, 149] e la sua overespressione nei mioblasti C2C12 induce un

calo marcato del ganglioside GM3, attivando la cascata MAPK/ERK, promuovendo la proliferazione cellulare e ritardando l'inizio della differenziazione [128, 148, 149]. Tale modello cellulare rappresenta quindi un ottimo sistema per la verifica del nuovo approccio analitico proposto.

I profili glicosfingolipidomici della fase organica e acquosa, estratte dai mioblasti murini C2C12, sono stati analizzati tramite HPTLC-MALDI e paragonati a quelli ottenuti tramite un metodo universalmente accettato, che consiste nell'aggiungere il terreno di coltura con il precursore radiomarcato delle specie sfingolipidiche, la [^3H]sfingosina, separare i GSLs radioattivi generati tramite HPTLC e identificarli mediante confronto con GSLs radioattivi standard. Le HPTLC radioattive mostrano una doppia banda per ogni GSL: la superiore contiene tutte le varianti a lunga catena di acidi grassi mentre quella inferiore le isoforme a catena corta, ma da questi dati non si riescono a ricavare informazioni sulla lunghezza della catena. Anche tramite HPTLC-MALDI è possibile discriminare tra catene corte e lunghe, ma in aggiunta gli spettri relativi alla fase organica (Figura 14) e alla fase acquosa (Figura 15) mostrano che in ogni singola banda è presente più di un picco, indicando quindi la presenza di più varianti e fornendo un'analisi più dettagliata e una maggior caratterizzazione dei GSLs.

I picchi $[\text{M}+\text{Na}]^+$ relativi alle bande superiori del glucosilceramide (GlcCer) (807 m/z, 832.7 m/z e 834.7 m/z) (Figura 14B), lactosilceramide (LacCer) (968.9 m/z, 995 m/z e 997 m/z) (Figura 14C), globotriaosilceramide (Gb3Cer) (1131 m/z, 1157 m/z e 1158.9 m/z) (Figura 14D), e sfingomieline (SM) (809.7 m/z, 835.9 m/z e 837.9 m/z) (Figura 14E), corrispondono alle isoforme C22:0, C24:1 e C24:0 rispettivamente, mentre i picchi rilevati nelle bande inferiori corrispondono solo alla variante C16:0. I picchi $[\text{M}-\text{H}]^-$ relativi alle bande superiori di GM3 (1235.9 m/z, 1262.1 e 1263.8 m/z) (Figura 15B), GM2 (1439 m/z, 1464 m/z e 1467.3 m/z) (Figura 15C), e GM1 (1602 m/z, 1626.9 m/z e 1628.8 m/z) (Figura 15D), corrispondono alle varianti C22:0, C24:1 e C24:0, mentre i picchi relativi alle bande inferiori corrispondono a C16:0. Il picco (1939.3 m/z $[\text{M}+\text{Na}^+-2\text{H}]^-$) relativo a GD1a e trovato nella banda superiore corrisponde all'isoforma C24:0, mentre il segnale 1829.7 m/z $[\text{M}+\text{Na}^+-2\text{H}]^-$, relativo alla banda inferiore, corrisponde a C16:0 (Figura 15E). La risoluzione dei picchi al di sopra di 3000 e di 8000 per gli spettri acquisiti in modalità negativa e positiva, rispettivamente, e la separazione spaziale data dal valore R_f , permettono un'analisi precisa della composizione glicosfingolipidomica del campione. L'utilizzo di una matrice acida causa la perdita di acido sialico, come già descritto in precedenza [150], sia nei disialo- che nei monogangliosidi e il picco $[-\text{NeuAc}+\text{Na}^+]$ è altresì presente. Questa perdita può essere considerata omogenea in tutti i campioni analizzati e non ha influenzato i successivi confronti tra mioblasti wild-type e overesprimenti NEU3.

Questi risultati indicano che la tecnica HPTLC-MALDI fornisce la esatta massa isotopica sorpassando i limiti di risoluzione dell'HPTLC. In più, trattandosi di un'analisi di tipo diretto, evita i limiti di altre tecniche che prevedono passaggi di trasferimento (come TLC-Blot-MALDI [126, 151]) o l'estrazione dell'analita dalla silice e successiva purificazione [125], e by-passa i metodi radioattivi riducendo i passaggi analitici, la variabilità e possibilmente implementando il numero di specie identificate. Infatti tra i vantaggi dell'analisi diretta HPTLC-MALDI c'è la possibilità di analizzare tramite MS ogni singolo punto della lastra, che se paragonato a un esperimento LC, corrisponderebbe all'analisi dei picchi

cromatografici raccolti in ogni singolo minuto o addirittura secondo, aumentando in questo modo il numero di piatti teorici.

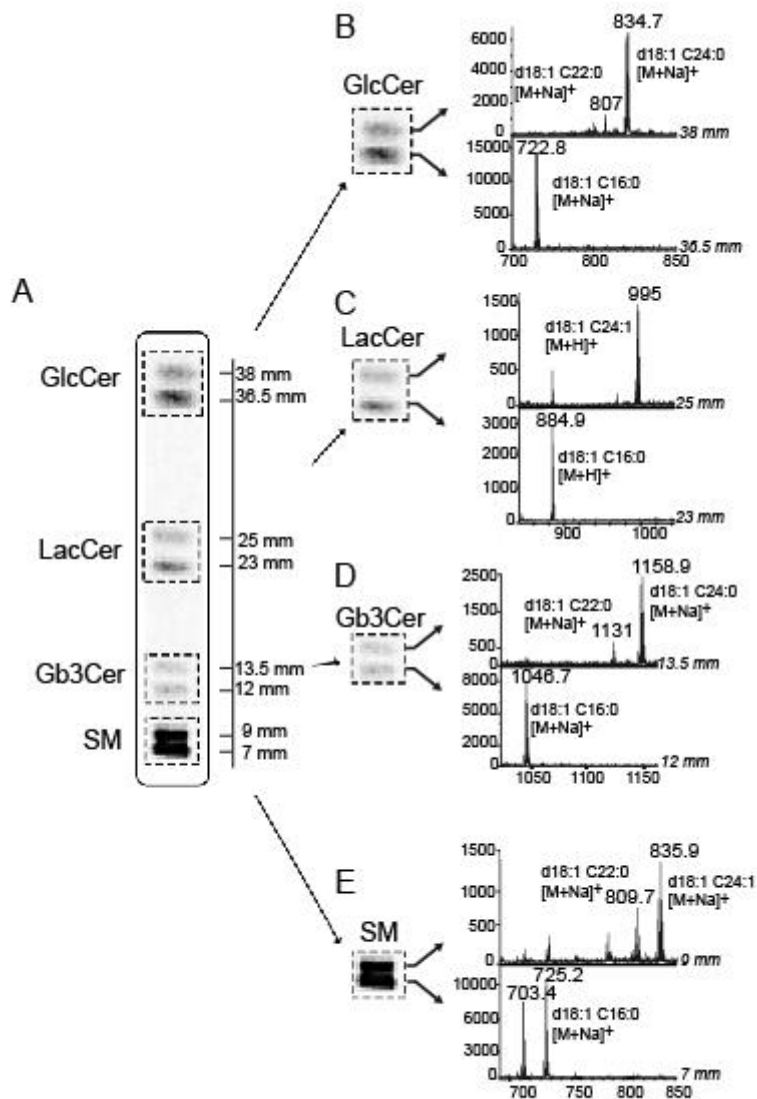


Figura 14: (A) Autoradiografia delle bande relative ai GSLs neutri estratti da mioblasti C2C12 wild-type e separati tramite HPTLC. Vengono identificate quattro specie principali: il glucosilceramide (GlcCer) a 36,5 e a 38 mm, il lattosilceramide a 23 e a 25 mm, Gb3Cer a 12 e a 13,5 mm e la sfingomieline (SM) a 7 e a 9 mm. (B-E) Spettri di massa rappresentativi dei glicosfingolipidi neutri identificati, acquisiti in modalità reflectron positiva. La base sfingoide è la sfingosina (d18:1) in quanto le cellule analizzate sono mioblasti.

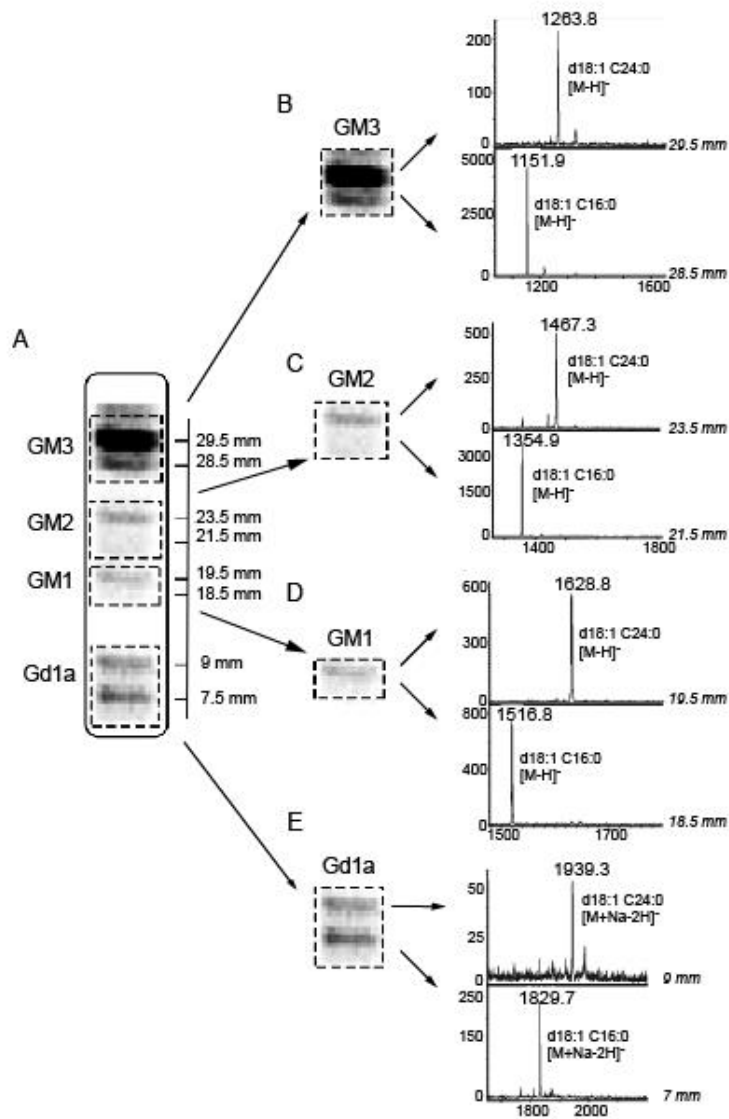


Figura 15:(A) Autoradiografia delle bande relative ai GSLs acidi estratti da mioblasti C2C12 wild-type e separati tramite HPTLC. Vengono identificate quattro specie principali: i monogangliosidi GM3 a 28.5 e a 29.5 mm, GM2 a 21.5 e a 23.5 mm, GM1 a 18.5 e a 19.5 mm e il disialoganglioside GD1a a 7.5 e a 9 mm. (B-E) Spettri di massa rappresentativi dei glicosfingolipidi acidi identificati, acquisiti in modalità reflectron negativa.

4.2.4 Analisi semi-quantitativa di GM3 e degli altri GSLs in mioblasti murini wild-type e overesprimenti la sialidasi NEU3

La sialidasi NEU3 modula il contenuto gangliosidico [148, 149] e la sua overespressione nei mioblasti C2C12 induce un calo marcato del ganglioside GM3, che viene desialilato a lactosilceramide (LacCer). Questo esempio biologico, molto ben caratterizzato, è stato scelto per valutare l'affidabilità dell'analisi HPTLC-MALDI per una caratterizzazione qualitativa e quantitativa dei glicosfingolipidi.

I profili HPTLC-MALDI di GM3 e di LacCer, estratti dai mioblasti murini wild-type e da quelli overesprimenti la sialidasi NEU3, sono stati paragonati a quelli ottenuti tramite densitometria su HPTLC radioattive.

È interessante notare come l'analisi HPTLC-MALDI permetta di effettuare un'analisi semi-quantitativa più specifica, in quanto questa tecnica consente di distinguere le singole varianti per ogni glicosfingolipide, comprese quelle aventi un valore Rf molto simile. È noto che tramite spettrometria di massa MALDI non è possibile effettuare un'analisi quantitativa dei picchi appartenenti a specie diverse a causa del differente grado di ionizzazione di ogni specie, ciò nonostante è possibile paragonare lo stesso picco in spettri diversi. Gli spettri acquisiti hanno indicato che due isoforme di GM3 (d18:1 C16:0 e d18:1 C22:0) diminuiscono nei mioblasti overesprimenti NEU3 mentre l'isoforma d18:1 C24:1 aumenta (Figura 16). Questi risultati suggeriscono che la sialidasi NEU3 possa agire in maniera preponderante sulla catena C16:0 del ganglioside GM3, rendendo plausibile l'ipotesi che un enzima possa agire solo su uno specifico gruppo o su una singola variante di glicosfingolipidi. Risultati simili a quelli ottenuti con il precursore radioattivo sono stati ottenuti tramite gli spettri HPTLC-MALDI addizionando le aree sotto la curva delle isoforme del GM3, supportando l'affidabilità di tale metodica nel fornire risultati quantitativi molto sensibili.

Gli spettri di LacCer hanno indicato un leggero aumento di questo glicosfingolipide nei mioblasti overesprimenti NEU3, risultato paragonabile a quello ottenuto con l'analisi radioattiva (Figura 17). In più le singole varianti di LacCer aumentano indistintamente e in maniera modesta se confrontate con la notevole diminuzione del GM3, fenomeno spiegabile se si pensa al possibile coinvolgimento di LacCer in altri processi e vie.

Le capacità di questo metodo, di discriminare e quantizzare le diverse isoforme, apre nuove prospettive nella comprensione del ruolo della sialidasi NEU3 e dei GSLs nella fusione dei mioblasti e nella differenziazione e, più in generale, nei processi biologici, oltre ad essere un futuro strumento ideale per la diagnosi e il monitoraggio di malattie o per l'identificazione di potenziali target utili per lo sviluppo di farmaci.

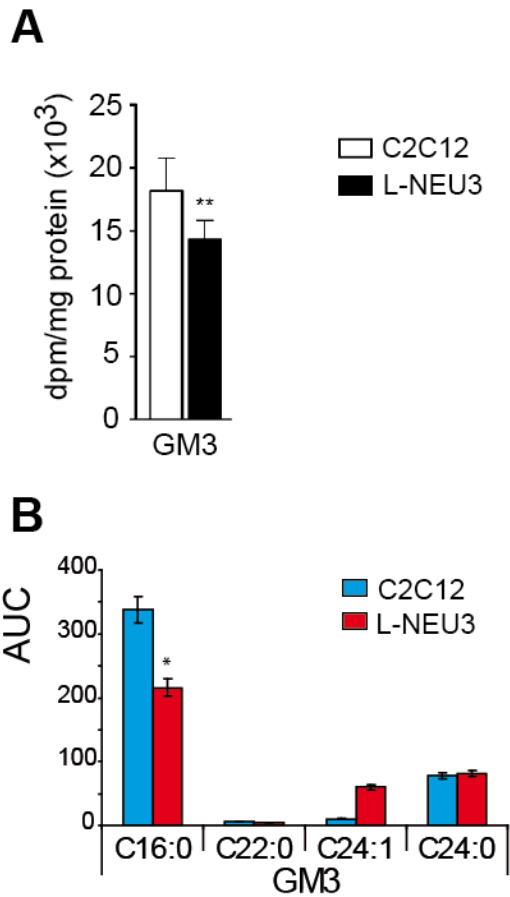


Figura 16: Analisi semi-quantitativa condotta sul ganglioside GM3 in mioblasti C2C12 (wt) e overesprimenti la sialidasi NEU3. (A) Analisi densitometrica delle bande relative al ganglioside GM3 marcato in mioblasti trattati con [3-³H]sfingosina. **P-value<0,001 (t-test di Student). (B) Profiling di GM3 tramite HPTLC-MALDI. Gli spettri acquisiti hanno indicato che due isoforme di GM3 (d18:1 C16:0 e d18:1 C22:0) diminuiscono nei mioblasti overesprimenti NEU3 mentre l'isoforma d18:1 C24:1 aumenta. *P-value<0,05 (t-test di Student).

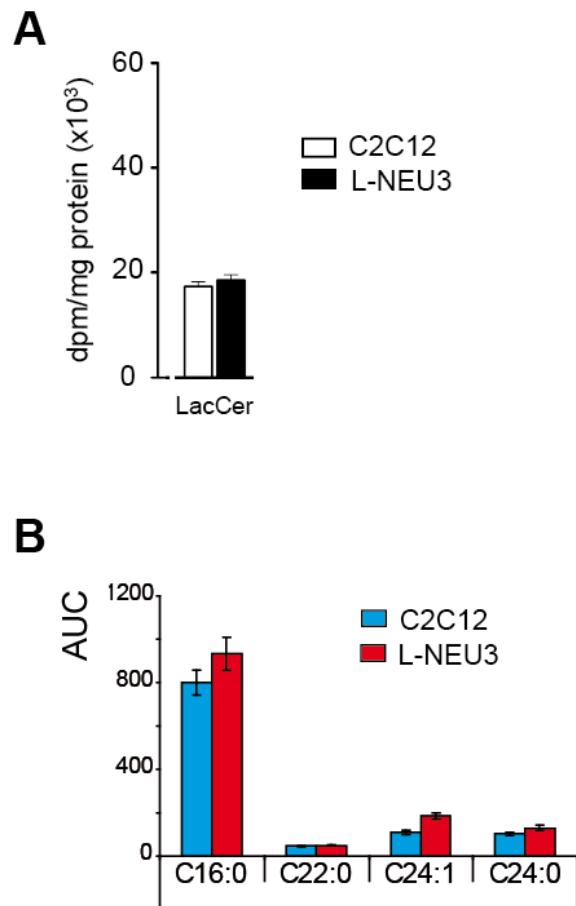


Figura 17: Analisi semi-quantitativa condotta sul GSL neutro LacCer nei mioblasti C2C12 (wt) e overesprimenti la sialidasi NEU3(L-NEU3). (A) Analisi densitometrica delle bande relative al LacCer marcato in mioblasti trattati con [3-³H]sfingosina. (B) Profiling di LacCer tramite HPTLC-MALDI. Gli spettri acquisiti hanno indicato un leggero incremento così come nell'analisi densitometrica, con un aumento di tutte le varianti.

5 CONCLUSIONI

La capacità delle tecniche ifenate di analizzare frazioni complesse in campioni ad alto range dinamico è alla base del grande interesse per lo sviluppo di nuovi accoppiamenti tra metodi separativi e identificativi degli analiti biologici. In questo lavoro si è cercato di contribuire allo sviluppo di nuove tecnologie ifenate ad alta risoluzione associate alla spettrometria di massa MALDI, che, per le sue caratteristiche, è particolarmente adatta ad una applicazione diagnostica. Un esperimento di MALDI profiling, eseguito confrontando le frazioni proteiche a bassa abbondanza di 30 sieri prelevati da pazienti affetti da cancro alla prostata e 30 sieri da soggetti controllo, ha infatti rilevato la presenza di 24 picchi differenzialmente espressi nel gruppo ad alto PSA e di 13 picchi variati ($p < 0,05$) (4 picchi con $p < 0,01$) nel gruppo ad alto PSA, che sono stati ulteriormente indagati in quanto possibili marcatori per la presenza del tumore.

La cromatografia per gel filtrazione ha permesso di arricchire ulteriormente le frazioni proteiche e la ifenazione tra la cromatografia a fase inversa eseguita su uno strumento nano LC e la spettrometria di massa MALDI ha permesso di identificare il picco 2021 m/z, differenzialmente espresso. Esso corrisponde al frammento C3f del fattore del complemento C3, e risulta essere maggiormente espresso nel siero di pazienti ADK+ con bassi valori di PSA. Ciò è stato confermato tramite un esperimento di Immunoblotting *in diretto* che ha rivelato la aumentata espressione nei sieri dei pazienti ADK+ di frammenti di 67 kDa e 29 kDa, che si formano, così come il C3f, in seguito agli eventi proteolitici che coinvolgono il fattore C3b. Il peptide C3f potrebbe pertanto essere usato in associazione con il valore serico di PSA per individuare i soggetti da sottoporre ad ulteriori approfondimenti e ridurre il numero di pazienti *falsi negativi* che presentano o che svilupperanno la malattia ma che non sono sottoposti ad ulteriori indagini a causa dei loro bassi livelli di PSA.

Ulteriori tecniche ifenate sono in fase di studio per la ifenazione degli altri picchi differenzialmente espressi nel confronto tra sieri ADK+ e controllo. Tecniche cromatografiche saranno direttamente accoppiate alla spettrometria di massa ESI (LC-ESI-MS/MS) per migliorare il processo identificativo mentre la ifenazione *on-line* tra un supporto IPG-CHIP, basato sul principio dell'isoelettrofocalizzazione, e lo spettrometro di massa MALDI, verrà sviluppata per effettuare il profiling sulle frazioni proteiche seriche già arricchite, al fine di ottenere informazioni aggiuntive rispetto alla classica analisi MALDI profiling.

Inoltre, la ifenazione diretta tra cromatografia su strato sottile e spettrometria di massa MALDI (HPTLC-MALDI), si è rivelata la tecnica migliore per una semplice e veloce caratterizzazione qualitativa e quantitativa dei profili glicosfingolipidici.

Dopo aver ottimizzato le procedure di deposito della matrice per mezzo dello strumento ImagePrep, la ifenazione HPTLC-MALDI condotta su glicosfingolipidi estratti da mioblasti murini C2C12, già caratterizzati mediante l'utilizzo di una tecnica radioattiva universalmente riconosciuta per l'analisi glicosfingolipidica, ha evidenziato come gli spettri siano in grado di rilevare la presenza, per ogni

glicosfingolipide, di tutte le varianti a diverse catene di acido grasso (d18:1 C16:0, C22:0, C24:1, C24:0), mentre le tecniche colorimetriche e radioattive sono in grado di discriminare solo tra varianti a corta e a lunga catena. Inoltre il confronto tra i profili glicosfingolipidomici ottenuti tramite HPTLC MALDI e tramite l'analisi densitometrica dei glicosfingolipidi radioattivi, sottolinea la capacità dell'analisi HPTLC-MALDI di fornire risultati quantitativi maggiormente dettagliati. A tal proposito, esperimenti condotti su mioblasti murini overesprimenti NEU3 hanno indicato una diminuzione nei livelli di due isoforme di GM3 (d18:1 C16:0 e d18:1 C22:0) e un aumento dell'isoforma d18:1 C24:1, mentre l'autoradiografia indica solo una diminuzione totale del GM3.

L'analisi proposta, a differenza dell'analisi LC-MS, utilizza un tipo di cromatografia semplice e veloce che la rende ideale per analisi di routine atte a verificare la presenza/assenza di un determinato GSL o la sua sovra/sottoespressione. Inoltre, essa riduce i passaggi analitici necessari in quanto non prevede né l'uso di radioattivo, né l'utilizzo di procedure di estrazione della banda dal gel di silice.

L'analisi HPTLC-MALDI verrà quindi applicata allo studio di diverse condizioni fisiologiche e patologiche allo scopo di comprendere i vari ruoli giocati dai diversi sfingolipidi e in particolare dalle loro isoforme al fine di identificare potenziali biomarcatori o target utili per lo sviluppo di farmaci.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] Hirschfeld, T., *Analytical chemistry* 1980, 52.
- [2] Mock, K., *Peptide research* 1993, 6, 100-104.
- [3] Bobzin, S. C., Yang, S., Kasten, T. P., *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* 2000, 748, 259-267.
- [4] Keifer, P. A., *J Magn Reson* 2010, 205, 130-140.
- [5] Chervet, J. P., Ursem, M., Salzmann, J. P., *Analytical chemistry* 1996, 68, 1507-1512.
- [6] Oosterkamp, A. J., Gelpi, E., Abian, J., *Journal of mass spectrometry : JMS* 1998, 33, 976-983.
- [7] Fonslow, B. R., Yates, J. R., 3rd, *Journal of separation science* 2009, 32, 1175-1188.
- [8] Pelzing, M., Neussus, C., *Electrophoresis* 2005, 26, 2717-2728.
- [9] Neussus, C., Pelzing, M., Macht, M., *Electrophoresis* 2002, 23, 3149-3159.
- [10] Waterval, J. C., Hommels, G., Bestebreurtje, P., Versluis, C., Heck, A. J., Bult, A., Lingeman, H., Underberg, W. J., *Electrophoresis* 2001, 22, 2709-2716.
- [11] Seger, C., Sturm, S., Stuppner, H., *Natural product reports* 2013, 30, 970-987.
- [12] Preisler, J., Hu, P., Rejtar, T., Karger, B. L., *Analytical chemistry* 2000, 72, 4785-4795.
- [13] Rejtar, T., Hu, P., Juhasz, P., Campbell, J. M., Vestal, M. L., Preisler, J., Karger, B. L., *Journal of proteome research* 2002, 1, 171-179.
- [14] Hommerson, P., Khan, A. M., de Jong, G. J., Somsen, G. W., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2009, 20, 1311-1318.
- [15] Axen, J., Malmstrom, D., Axelsson, B. O., Petersson, P., Sjoberg, P. J., *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2010, 24, 1260-1264.
- [16] Cottrell, J. S., *Peptide research* 1994, 7, 115-124.
- [17] Yates, J. R., 3rd, *Electrophoresis* 1998, 19, 893-900.
- [18] Godovac-Zimmermann, J., Brown, L. R., *Mass spectrometry reviews* 2001, 20, 1-57.
- [19] Wolters, D. A., Washburn, M. P., Yates, J. R., 3rd, *Analytical chemistry* 2001, 73, 5683-5690.
- [20] Messing, J., Crea, R., Seeburg, P. H., *Nucleic acids research* 1981, 9, 309-321.
- [21] Motoyama, A., Yates, J. R., 3rd, *Analytical chemistry* 2008, 80, 7187-7193.
- [22] Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D. M., Carmack, E., Mize, G. J., Morris, D. R., Garvik, B. M., Yates, J. R., 3rd, *Nature biotechnology* 1999, 17, 676-682.
- [23] Nemeth-Cawley, J. F., Tangarone, B. S., Rouse, J. C., *Journal of proteome research* 2003, 2, 495-505.
- [24] Zhang, X., Li, L., Wei, D., Yap, Y., Chen, F., *Trends in biotechnology* 2007, 25, 166-173.
- [25] Good, D. M., Thongboonkerd, V., Novak, J., Bascands, J. L., Schanstra, J. P., Coon, J. J., Dominiczak, A., Mischak, H., *J Proteome Res* 2007, 6, 4549-4555.
- [26] Lescuyer, P., Hochstrasser, D., Rabilloud, T., *J Proteome Res* 2007, 6, 3371-3376.
- [27] Hu, S., Loo, J. A., Wong, D. T., *Proteomics* 2006, 6, 6326-6353.
- [28] Tumani, H., Pfeifle, M., Lehmsiek, V., Rau, D., Mogel, H., Ludolph, A. C., Bretschneider, J., *Journal of neuroimmunology* 2009, 214, 109-112.

- [29] Decramer, S., Gonzalez de Peredo, A., Breuil, B., Mischak, H., Monsarrat, B., Bascands, J. L., Schanstra, J. P., *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2008, 7, 1850-1862.
- [30] Zhang, H., Liu, A. Y., Loriaux, P., Wollscheid, B., Zhou, Y., Watts, J. D., Aebersold, R., *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2007, 6, 64-71.
- [31] Anderson, L., Seilhamer, J., *Electrophoresis* 1997, 18, 533-537.
- [32] Kawamoto, S., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Okubo, K., Matsubara, K., *Gene* 1996, 174, 151-158.
- [33] Lathrop, J. T., Hayes, T. K., Carrick, K., Hammond, D. J., *Expert Rev Proteomics* 2005, 2, 393-406.
- [34] Issaq, H. J., Xiao, Z., Veenstra, T. D., *Chemical reviews* 2007, 107, 3601-3620.
- [35] Lundblad, R., *The Internet Journal of Gastroenterology* 2005, 1.
- [36] Banks, R. E., Stanley, A. J., Cairns, D. A., Barrett, J. H., Clarke, P., Thompson, D., Selby, P. J., *Clin Chem* 2005, 51, 1637-1649.
- [37] Hsieh, S. Y., Chen, R. K., Pan, Y. H., Lee, H. L., *Proteomics* 2006, 6, 3189-3198.
- [38] Burtis, C., *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, W B Saunders Company 2001.
- [39] Anderson, N. L., Anderson, N. G., *Mol Cell Proteomics* 2002, 1, 845-867.
- [40] Tirumalai, R. S., Chan, K. C., Prieto, D. A., Issaq, H. J., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., *Mol Cell Proteomics* 2003, 2, 1096-1103.
- [41] Geho, D. H., Liotta, L. A., Petricoin, E. F., Zhao, W., Araujo, R. P., *Curr Opin Chem Biol* 2006, 10, 50-55.
- [42] Petricoin, E. F., Ardekani, A. M., Hitt, B. A., Levine, P. J., Fusaro, V. A., Steinberg, S. M., Mills, G. B., Simone, C., Fishman, D. A., Kohn, E. C., Liotta, L. A., *Lancet* 2002, 359, 572-577.
- [43] Zhang, Z., Bast, R. C., Jr., Yu, Y., Li, J., Sokoll, L. J., Rai, A. J., Rosenzweig, J. M., Cameron, B., Wang, Y. Y., Meng, X. Y., Berchuck, A., Van Haaften-Day, C., Hacker, N. F., de Bruijn, H. W., van der Zee, A. G., Jacobs, I. J., Fung, E. T., Chan, D. W., *Cancer Res* 2004, 64, 5882-5890.
- [44] Paradis, V., *Hepatology* 2004, 41, 40-47.
- [45] Anderson, L., *J Physiol* 2005, 563, 23-60.
- [46] Fonslow, B. R., Carvalho, P. C., Academia, K., Freeby, S., Xu, T., Nakorchevsky, A., Paulus, A., Yates, J. R., 3rd, *Journal of proteome research* 2011, 10, 3690-3700.
- [47] Jiang, J., Opanubi, K. J., Coombs, K. M., *Frontiers in microbiology* 2012, 3, 310.
- [48] Colantonio, D. A., Dunkinson, C., Bovenkamp, D. E., Van Eyk, J. E., *Proteomics* 2005, 5, 3831-3835.
- [49] Kay, R., Barton, C., Ratcliffe, L., Matharoo-Ball, B., Brown, P., Roberts, J., Teale, P., Creaser, C., *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2008, 22, 3255-3260.
- [50] Warder, S. E., Tucker, L. A., Strelitzer, T. J., McKeegan, E. M., Meuth, J. L., Jung, P. M., Saraf, A., Singh, B., Lai-Zhang, J., Gagne, G., Rogers, J. C., *Analytical biochemistry* 2009, 387, 184-193.
- [51] Mahn, A., Ismail, M., *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2011, 879, 3645-3648.

- [52] Hood, B. L., Lucas, D. A., Kim, G., Chan, K. C., Blonder, J., Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Conrads, T. P., Pollet, I., Karsan, A., *J Am Soc Mass Spectrom* 2005, **16**, 1221-1230.
- [53] Orvisky, E., Drake, S. K., Martin, B. M., Abdel-Hamid, M., Resson, H. W., Varghese, R. S., An, Y., Saha, D., Hortin, G. L., Loffredo, C. A., Goldman, R., *Proteomics* 2006, **6**, 2895-2902.
- [54] Georgiou, H. M., Rice, G. E., Baker, M. S., *Proteomics* 2001, **1**, 1503-1506.
- [55] Goufman, E. I., Moshkovskii, S. A., Tikhonova, O. V., Lokhov, P. G., Zgoda, V. G., Serebryakova, M. V., Toropygin, I. Y., Vlasova, M. A., Safarova, M. R., Makarov, O. V., Archakov, A. I., *Biochemistry (Mosc)* 2006, **71**, 354-360.
- [56] Pieper, R., Su, Q., Gatlin, C. L., Huang, S. T., Anderson, N. L., Steiner, S., *Proteomics* 2003, **3**, 422-432.
- [57] Chromy, B. A., Gonzales, A. D., Perkins, J., Choi, M. W., Corzett, M. H., Chang, B. C., Corzett, C. H., McCutchen-Maloney, S. L., *J Proteome Res* 2004, **3**, 1120-1127.
- [58] Zhang, R., Barker, L., Pinchev, D., Marshall, J., Rasamoelisololo, M., Smith, C., Kupchak, P., Kireeva, I., Ingratta, L., Jackowski, G., *Proteomics* 2004, **4**, 244-256.
- [59] Bjorhall, K., Miliotis, T., Davidsson, P., *Proteomics* 2005, **5**, 307-317.
- [60] Echan, L. A., Tang, H. Y., Ali-Khan, N., Lee, K., Speicher, D. W., *Proteomics* 2005, **5**, 3292-3303.
- [61] Govorukhina, N. I., Reijmers, T. H., Nyangoma, S. O., van der Zee, A. G., Jansen, R. C., Bischoff, R., *J Chromatogr A* 2006, **1120**, 142-150.
- [62] Whiteaker, J. R., Zhang, H., Eng, J. K., Fang, R., Piening, B. D., Feng, L. C., Lorentzen, T. D., Schoenherr, R. M., Keane, J. F., Holzman, T., Fitzgibbon, M., Lin, C., Zhang, H., Cooke, K., Liu, T., Camp, D. G., 2nd, Anderson, L., Watts, J., Smith, R. D., McIntosh, M. W., Paulovich, A. G., *J Proteome Res* 2007, **6**, 828-836.
- [63] Darde, V. M., Barderas, M. G., Vivanco, F., *Methods Mol Biol* 2007, **357**, 351-364.
- [64] Fonslow, B. R., Stein, B. D., Webb, K. J., Xu, T., Choi, J., Park, S. K., Yates, J. R., 3rd, *Nature methods* 2013, **10**, 54-56.
- [65] Qu, Y., Adam, B. L., Yasui, Y., Ward, M. D., Cazares, L. H., Schellhammer, P. F., Feng, Z., Semmes, O. J., Wright, G. L., Jr., *Clin Chem* 2002, **48**, 1835-1843.
- [66] Kuwata, H., Yip, T. T., Yip, C. L., Tomita, M., Hutchens, T. W., *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **245**, 764-773.
- [67] Simpkins, F., Czechowicz, J. A., Liotta, L., Kohn, E. C., *Pharmacogenomics* 2005, **6**, 647-653.
- [68] Petricoin, E. F., Liotta, L. A., *Curr Opin Biotechnol* 2004, **15**, 24-30.
- [69] Baggerly, K. A., Morris, J. S., Coombes, K. R., *Bioinformatics* 2004, **20**, 777-785.
- [70] Kozak, K. R., Su, F., Whitelegge, J. P., Faull, K., Reddy, S., Farias-Eisner, R., *Proteomics* 2005, **5**, 4589-4596.
- [71] Vlahou, A., Schorge, J. O., Gregory, B. W., Coleman, R. L., *J Biomed Biotechnol* 2003, **2003**, 308-314.
- [72] Henderson, N. A., Steele, R. J., *Surgeon* 2005, **3**, 383-390, 422.
- [73] Ablin, R. J., Bronson, P., Soanes, W. A., Witebsky, E., *J Immunol* 1970, **104**, 1329-1339.
- [74] Ablin, R. J., Soanes, W. A., Bronson, P., Witebsky, E., *J Reprod Fertil* 1970, **22**, 573-574.
- [75] Yousef, G. M., Diamandis, E. P., *Endocr Rev* 2001, **22**, 184-204.

- [76] Lilja, H., *Urology* 2003, 62, 27-33.
- [77] Balk, S. P., Ko, Y. J., Bubley, G. J., *J Clin Oncol* 2003, 21, 383-391.
- [78] Catalona, W. J., Richie, J. P., Ahmann, F. R., Hudson, M. A., Scardino, P. T., Flanigan, R. C., deKernion, J. B., Ratliff, T. L., Kavoussi, L. R., Dalkin, B. L., et al., *J Urol* 1994, 151, 1283-1290.
- [79] Catalona, W. J., Smith, D. S., Ratliff, T. L., Dodds, K. M., Coplen, D. E., Yuan, J. J., Petros, J. A., Andriole, G. L., *N Engl J Med* 1991, 324, 1156-1161.
- [80] Kirby, r., Fitzpatrick, J., Kirby, M., Fitzpatrick, A., *Share care forprostatic diseases*, 2000.
- [81] Hoffman, R. M., Gilliland, F. D., Adams-Cameron, M., Hunt, W. C., Key, C. R., *BMC Fam Pract* 2002, 3, 19.
- [82] Morote, J., Lopez, M., Encabo, G., de Torres, I. M., *Eur Urol* 2000, 37, 537-540.
- [83] Stancik, I., Luftenegger, W., Klimpfinger, M., Muller, M. M., Hoeltl, W., *Eur Urol* 2004, 46, 760-764.
- [84] Matharoo-Ball, B., Ball, G., Rees, R., *Vaccine* 2007, 25 Suppl 2, B110-121.
- [85] Bradford, T. J., Tomlins, S. A., Wang, X., Chinnaiyan, A. M., *Urol Oncol* 2006, 24, 538-551.
- [86] Benson, M. C., Whang, I. S., Olsson, C. A., McMahan, D. J., Cooner, W. H., *J Urol* 1992, 147, 817-821.
- [87] Helpap, B., Egevad, L., *Histol Histopathol* 2009, 24, 661-666.
- [88] De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Gronberg, H., Drake, C. G., Nakai, Y., Isaacs, W. B., Nelson, W. G., *Nature reviews. Cancer* 2007, 7, 256-269.
- [89] Morgan, T. O., McLeod, D. G., Leifer, E. S., Moul, J. W., Murphy, G. P., *Prostate Suppl* 1996, 7, 58-63.
- [90] Barbey, F., Brakch, N., Linhart, A., Rosenblatt-Velin, N., Jeanrenaud, X., Qanadli, S., Steinmann, B., Burnier, M., Palecek, T., Bultas, J., Hayoz, D., *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006, 26, 839-844.
- [91] Ariga, T., McDonald, M. P., Yu, R. K., *Journal of lipid research* 2008, 49, 1157-1175.
- [92] Kovbasnjuk, O., Mourtazina, R., Baibakov, B., Wang, T., Elowsky, C., Choti, M. A., Kane, A., Donowitz, M., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102, 19087-19092.
- [93] Zamfir, A. D., Serb, A., Vukeli, Z., Flangea, C., Schiopu, C., Fabris, D., Kalanj-Bognar, S., Capitan, F., Sisu, E., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2011, 22, 2145-2159.
- [94] Huang, J. Q., Trasler, J. M., Igdoura, S., Michaud, J., Hanal, N., Gravel, R. A., *Human molecular genetics* 1997, 6, 1879-1885.
- [95] Fujiwaki, T., Yamaguchi, S., Tasaka, M., Sakura, N., Taketomi, T., *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2002, 776, 115-123.
- [96] Aerts, J. M., Boot, R. G., van Eijk, M., Groener, J., Bijl, N., Lombardo, E., Bietrix, F. M., Dekker, N., Groen, A. K., Ottenhoff, R., van Roomen, C., Aten, J., Serlie, M., Langeveld, M., Wennekes, T., Overkleeft, H. S., *Advances in experimental medicine and biology* 2011, 721, 99-119.
- [97] Hakomori, S., Handa, K., Iwabuchi, K., Yamamura, S., Prinetti, A., *Glycobiology* 1998, 8, xi-xix.
- [98] Sonnino, S., Prinetti, A., Mauri, L., Chigorno, V., Tettamanti, G., *Chemical reviews* 2006, 106, 2111-2125.

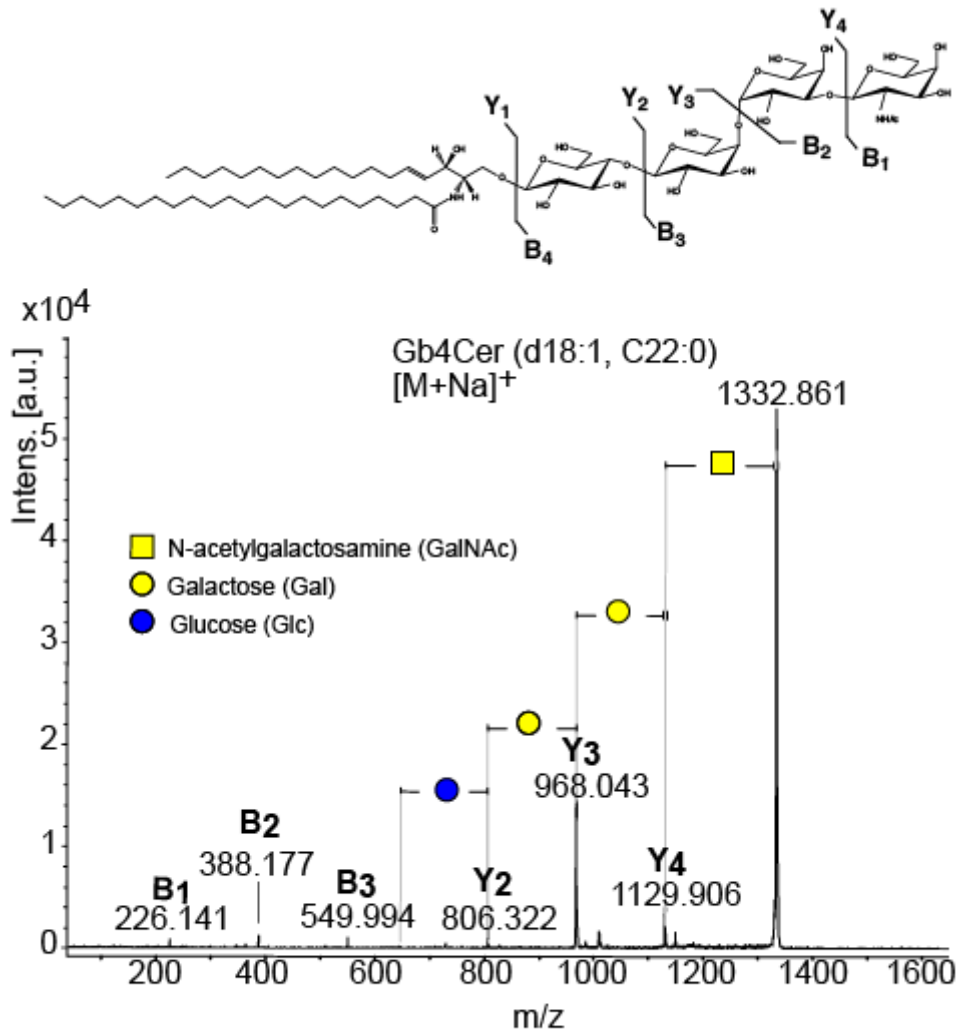
- [99] Karlsson, K. A., *Annual review of biochemistry* 1989, 58, 309-350.
- [100] Suzuki, T., Suzuki, Y., *Biological & pharmaceutical bulletin* 2006, 29, 1538-1541.
- [101] Svennerholm, L., Bostrom, K., Fredman, P., Mansson, J. E., Rosengren, B., Rynmark, B. M., *Biochimica et biophysica acta* 1989, 1005, 109-117.
- [102] Boldin, S., Futerman, A. H., *Journal of neurochemistry* 1997, 68, 882-885.
- [103] Yu, R. K., Ariga, T., *Methods in enzymology* 2000, 312, 115-134.
- [104] Svennerholm, L., *Journal of neurochemistry* 1956, 1, 42-53.
- [105] Svennerholm, L., *Biochimica et biophysica acta* 1957, 24, 604-611.
- [106] Partridge, S. M., Westall, R. G., *The Biochemical journal* 1948, 42, 238-250.
- [107] Skipski, V. P., *Methods in enzymology* 1975, 35, 396-425.
- [108] Tonegawa, Y., Hakomori, S. I., *Biochemical and biophysical research communications* 1977, 76, 9-17.
- [109] Wucherpfennig, K. W., *Journal of autoimmunity* 2001, 16, 293-302.
- [110] Watanabe, K., Arao, Y., *Journal of lipid research* 1981, 22, 1020-1024.
- [111] Kaga, N., Kazuno, S., Taka, H., Iwabuchi, K., Murayama, K., *Analytical biochemistry* 2005, 337, 316-324.
- [112] Pettus, B. J., Kroesen, B. J., Szulc, Z. M., Bielawska, A., Bielawski, J., Hannun, Y. A., Busman, M., *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2004, 18, 577-583.
- [113] Metelmann, W., Vukelic, Z., Peter-Katalinic, J., *Journal of mass spectrometry : JMS* 2001, 36, 21-29.
- [114] Suzuki, Y., Suzuki, M., Ito, E., Goto-Inoue, N., Miseki, K., Iida, J., Yamazaki, Y., Yamada, M., Suzuki, A., *Journal of biochemistry* 2006, 139, 771-777.
- [115] Sullards, M. C., Liu, Y., Chen, Y., Merrill, A. H., Jr., *Biochimica et biophysica acta* 2011, 1811, 838-853.
- [116] Sorensen, L. K., *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2006, 20, 3625-3633.
- [117] Kirsch, S., Zarei, M., Cindric, M., Muthing, J., Bindila, L., Peter-Katalinic, J., *Analytical chemistry* 2008, 80, 4711-4722.
- [118] Zarei, M., Kirsch, S., Muthing, J., Bindila, L., Peter-Katalinic, J., *Analytical and bioanalytical chemistry* 2008, 391, 289-297.
- [119] Luftmann, H., *Analytical and bioanalytical chemistry* 2004, 378, 964-968.
- [120] Peng, S., Edler, M., Ahlmann, N., Hoffmann, T., Franzke, J., *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2005, 19, 2789-2793.
- [121] Munoz-Garcia, A., Ro, J., Brown, J. C., Williams, J. B., *The Journal of experimental biology* 2008, 211, 447-458.
- [122] Salo, P. K., Salomies, H., Harju, K., Ketola, R. A., Kotiaho, T., Yli-Kauhaluoma, J., Kostianen, R., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2005, 16, 906-915.
- [123] Tames, F., Watson, I. D., Morden, W., Wilson, I. D., *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* 1999, 729, 341-346.
- [124] Meisen, I., Friedrich, A. W., Karch, H., Witting, U., Peter-Katalinic, J., Muthing, J., *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2005, 19, 3659-3665.
- [125] Ruh, H., Sandhoff, R., Meyer, B., Gretz, N., Hopf, C., *Analytical chemistry* 2013, 85, 6233-6240.
- [126] Valdes-Gonzalez, T., Goto-Inoue, N., Hirano, W., Ishiyama, H., Hayasaka, T., Setou, M., Taki, T., *Journal of neurochemistry* 2011, 116, 678-683.

- [127] Fuchs, B., Schiller, J., Suss, R., Schurenberg, M., Suckau, D., *Analytical and bioanalytical chemistry* 2007, 389, 827-834.
- [128] Papini, N., Anastasia, L., Tringali, C., Dileo, L., Carubelli, I., Sampaolesi, M., Monti, E., Tettamanti, G., Venerando, B., *Journal of cellular biochemistry* 2012, 113, 2967-2978.
- [129] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., *The Journal of biological chemistry* 1951, 193, 265-275.
- [130] Riboni, L., Viani, P., Tettamanti, G., *Methods in enzymology* 2000, 311, 656-682.
- [131] Sonnino, S., Chigorno, V., Tettamanti, G., *Methods in enzymology* 2000, 311, 639-656.
- [132] Domon, B., Costello, C. E., *Glycoconjugate journal* 1988, 5, 397-409.
- [133] Adams, J., Ann, Q., *Mass spectrometry reviews* 1993, 12, 51-85.
- [134] Scandroglio, F., Loberto, N., Valsecchi, M., Chigorno, V., Prinetti, A., Sonnino, S., *Glycoconjugate journal* 2009, 26, 961-973.
- [135] Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Brown, A., Dennis, E. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Jr., Murphy, R. C., Raetz, C. R., Russell, D. W., Subramaniam, S., *Nucleic acids research* 2007, 35, D527-532.
- [136] Fahy, E., Sud, M., Cotter, D., Subramaniam, S., *Nucleic acids research* 2007, 35, W606-612.
- [137] Conraux, L., Pech, C., Guerraoui, H., Loyaux, D., Ferrara, P., Guillemot, J. C., Meininger, V., Pradat, P. F., Salachas, F., Bruneteau, G., Le Forestier, N., Lacomblez, L., *PLoS one* 2013, 8, e79733.
- [138] Zhou, N., Wang, J., Yu, Y., Shi, J., Li, X., Xu, B., Yu, Q., *Biomedical chromatography : BMC* 2013.
- [139] Aebersold, R., Mann, M., *Nature* 2003, 422, 198-207.
- [140] Fania, C., Vasso, M., Torretta, E., Robach, P., Cairo, G., Lundby, C., Gelfi, C., *Electrophoresis* 2011, 32, 1715-1727.
- [141] Fuchs, B., Schiller, J., Suss, R., Zscharnack, M., Bader, A., Muller, P., Schurenberg, M., Becker, M., Suckau, D., *Analytical and bioanalytical chemistry* 2008, 392, 849-860.
- [142] Guerrero, I. C., Astarita, G., Jais, J. P., Sands, D., Nowakowska, A., Colas, J., Sermet-Gaudelus, I., Schuerenberg, M., Piomelli, D., Edelman, A., Ollero, M., *PLoS one* 2009, 4, e7735.
- [143] Nakamura, K., Suzuki, Y., Goto-Inoue, N., Yoshida-Noro, C., Suzuki, A., *Analytical chemistry* 2006, 78, 5736-5743.
- [144] Guittard, J., Hronowski, X. L., Costello, C. E., *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 1999, 13, 1838-1849.
- [145] Yaffe, D., Saxel, O., *Nature* 1977, 270, 725-727.
- [146] Yanagisawa, M., *Neurochemical research* 2011, 36, 1623-1635.
- [147] Sato, K., Miyagi, T., *Biochemical and biophysical research communications* 1996, 221, 826-830.
- [148] Papini, N., Anastasia, L., Tringali, C., Croci, G., Bresciani, R., Yamaguchi, K., Miyagi, T., Preti, A., Prinetti, A., Prioni, S., Sonnino, S., Tettamanti, G., Venerando, B., Monti, E., *The Journal of biological chemistry* 2004, 279, 16989-16995.
- [149] Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Hata, K., Shiozaki, K., *Journal of biochemistry* 2008, 144, 279-285.
- [150] Huberty, M. C., Vath, J. E., Yu, W., Martin, S. A., *Analytical chemistry* 1993, 65, 2791-2800.

[151] Goto-Inoue, N., Hayasaka, T., Taki, T., Gonzalez, T. V., Setou, M., *Journal of chromatography. A* 2009, 1216, 7096-7101.

7 APPENDICI

A



Spettro MS/MS dello standard Gb4Cer (d18:1, C22:0), mostrato insieme alla struttura molecolare e allo schema di frammentazione dello standard.

8 PRODUZIONE SCIENTIFICA

Articoli:

- √ Fania C, Vasso M, **Torretta E**, Robach P, Cairo G, Lundby C, Gelfi C. %Setup for human sera MALDI profiling: the case of rhEPO treatment+ Electrophoresis. 2011 Jun;32(13):1715-27
- √ **Torretta E.**, Vasso M., Fania C., Capitanio D., Bergante S., Piccoli M., Tettamanti G., Anastasia L., Gelfi C. %On line HPTLC-MALDI for the qualitative and quantitative analysis of neutral and acidic glycosphingolipids.+Electrophoresis (*accepted-in press*)
- √ Fania C., Sogno I., **Torretta E.**, Albini A. , Gelfi C. %A novel PSA guided approach for a better diagnosis of prostatic adenocarcinoma based on MALDI profiling+(*submitted*)

Poster:

- √ Set-up for human sera MALDI profiling: the case of rhEPO treatment **Torretta E.**, Fania C., Vasso M., Lundby C., Gelfi C. ItPA (Italian Proteomics Association) 6° Congresso Annuale, 21-24 Giugno 2011, Torino.
- √ On line TLC-MALDI for the characterization of neutral and acidic glycosphingolipids: qualitative and quantitative analysis. **Torretta E.**, Vasso M., Fania C., Bergante S., Piccoli M., Anastasia L., Gelfi C. EuPA (European Proteomics Association) Scientific Congress, 9-12 Luglio 2012, Glasgow, Scozia.
- √ A novel PSA guided approach for a better diagnosis of prostatic adenocarcinoma based on MALDI profiling Fania C., Sogno I., Torretta E., Albini A. , Gelfi C. EuroMedLab, 19-23 Maggio 2013, Milano.
- √ Hyphenated HPTLC-MALDI for the qualitative and quantitative analysis of neutral and acidic glycosphingolipids. **Torretta E.**, Vasso M., Fania C., Capitanio D., Bergante S., Piccoli M., Anastasia L., Gelfi C. GEM/GERLI Lipidomics Meeting, 10-14 Novembre 2013, Saint-Jean-Cap-Ferrat, Francia.

Presentazioni Orali:

- √ On-line HPTLC-MALDI for the characterization of neutral and acidic glycosphingolipids: qualitative and quantitative analysis . 21/5/2013 *EuroMedLab, Milano.*
- √ On-line HPTLC-MALDI for the characterization of neutral and acidic glycosphingolipids: qualitative and quantitative analysis . 28/6/2013 X° *Sphingolipid Club Meeting, Assisi.*

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Professoressa Cecilia Gelfi per aver fatto sì che potessi dedicarmi a un progetto così interessante, per gli insegnamenti e per il tempo dedicatomi durante questi tre anni e durante la scrittura della tesi.

Ringrazio i miei colleghi Chiara Fania, Michele Vasso, Agnese Viganò, Sara De Palma, Manuela Moriggi, Daniele Capitanio, Roberta Leone e Laura Barbalini per i numerosi consigli, le chiacchierate e il supporto morale.

E naturalmente ringrazio la mia famiglia e Andrea per essermi stati sempre vicini in questi anni.

Questo lavoro è stato realizzato grazie al supporto finanziario dell'Istituto Italiano di Tecnologia (IIT) (SEED-IPG-CHIP 21531), del Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica (FIRB RBRN07BMCT) e di Telethon (GGP11082).