

UNIVERSITÀ DI PISA



Facoltà di Farmacia

Corso di Laurea Specialistica in
Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Tesi di Laurea

**LA RESISTENZA ALLA TERAPIA ANTIAGGREGANTE:
SVILUPPO DI UNA METODOLOGIA “GEL-FREE” PER L’ANALISI
PROTEOMICA DELLE PIASTRINE**

Relatori:

Dott. Lorenzo Citti
Prof.ssa Paola Nieri

Candidata:

Sara Franceschi

Anno accademico 2008-2009

*Più faticosa è la salita
maggiore sarà la soddisfazione
nell'ammirare il panorama
una volta arrivati in vetta.*

*Alle mie nonne,
Adria e Rossana*

INDICE

RIASSUNTO	IV
1 INTRODUZIONE	1
1.1 Le malattie cardiovascolari.....	1
1.2 La Sindrome Coronarica acuta.....	2
1.3 Ischemia	4
1.4 Aterosclerosi	4
1.4.1 Cenni di anatomia.....	6
1.4.2 Patogenesi dell'aterosclerosi	6
1.4.3 Fattori di Rischio Aterosclerotico.....	7
1.5 Danno endoteliale	8
1.6 Le piastrine	10
1.6.1 Morfologia e ultrastruttura	11
1.6.2 Biochimica	12
1.6.3 Fisiologia	12
1.6.4 Piastrine e coagulazione.....	19
1.6.5 Piastrine e aterosclerosi	20
1.7 Trattamento della Sindrome Coronarica acuta	20
1.7.1 Terapia della doppia antiaggregazione	23
1.7.2 Fenomeno della resistenza farmacologica.....	25
1.7.3 Strumenti di laboratorio per lo screening dell'efficacia degli agenti antiplateletici.....	31
2 SCOPO DELLA TESI	34
3 PARTE SPERIMENTALE	36
3.1 Estrazione delle proteine.....	36
3.2 Determinazione proteica	36
3.3 Complessità del campione e differenze in abbondanza.....	37
3.3.1 Tentativo di semplificare il campione sulla base delle differenze di peso molecolare.....	37
3.3.2 Tentativo di ottenere sub-frazioni di proteine sulla base delle loro proprietà chimico-fisiche	38
3.4 Scelta della procedura sperimentale	42

3.5 Digestione dell'estratto proteico	44
3.6 Separazione HPLC	45
3.6.1 Ottimizzazione della separazione	46
3.6.2 Analisi quantitativa in HPLC.....	50
3.7 Analisi in spettrometria di massa.....	52
4 ANALISI DEI DATI E DISCUSSIONE DEI RISULTATI	57
4.1 Identificazione delle proteine.....	59
4.2 Principio della parsimonia	61
4.3 Confronto semi-quantitativo	64
4.3.1 Normalizzazione globale.....	65
4.3.2 Test dell'ANOVA.....	66
4.4 Proteine differenzialmente espresse	67
4.4.1 Proteine che presentano un aumento di espressione nel campione relativo al paziente resistente al Clopidogrel	68
4.4.2 Proteine che presentano un aumento di espressione nel campione relativo al paziente resistente all'ASA	70
4.4.3 Proteine che presentano un aumento di espressione nei campioni relativi ad entrambi i pazienti resistenti alla terapia	71
4.4.4 Proteine che presentano una riduzione di espressione nei campioni relativi ad entrambi i pazienti resistenti alla terapia	72
4.5 Discussione dei risultati.....	72
5 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	76
6 MATERIALI E METODI	78
6.1 Estrazione delle proteine.....	78
6.2 Determinazione proteica	78
6.3 "Cut off" di peso molecolare	79
6.4 Cromatografia "flash" a scambio anionico e cationico	80
6.5 Riduzione, alchilazione e digestione dell'estratto proteico	83
6.6 Cromatografia nano HPLC in fase inversa	83
6.7 Spettrometria di massa	85
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	86
RINGRAZIAMENTI	89

RIASSUNTO

Le Malattie Cardiovascolari rappresentano attualmente la principale causa di mortalità e morbilità nei paesi occidentali. In quest'ambito la maggiore incidenza è determinata dalle arteriopatie coronariche, responsabili di una serie di manifestazioni cliniche raggruppate nella denominazione di Sindrome Coronarica Acuta (ACS). Le linee guida europee e americane prevedono, per il trattamento della ACS, una terapia antiaggregante combinata di Acido Acetilsalicilico (ASA) e Clopidogrel. Tuttavia una percentuale che si aggira tra il 10 e il 20% dei pazienti trattati, definiti resistenti, sembra non ricevere alcuna protezione dalla terapia antiaggregante e incorre nuovamente in un evento ischemico.

Questo lavoro di Tesi è stato svolto all'interno del laboratorio di "Proteomica e Tecnologie Genomiche" dell'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa e fa parte di un progetto strategico della ricerca finalizzata del Ministero della Salute chiamato: "Activity of Platelets after Inhibition and Cardiovascular Events - APICE". Il progetto APICE si pone come obiettivo quello di valutare con un'indagine proteomica l'espressione di proteine piastriniche nelle diverse fasi cliniche della ACS, in particolare mira a definire i differenti profili proteici tra pazienti che rispondono e che non rispondono alla terapia farmacologica ASA/Clopidogrel.

Lo scopo principale di questa Tesi è stato quello di sviluppare una metodologia riproducibile, valida per il trattamento e la manipolazione dei campioni clinici, per la loro analisi strumentale e l'elaborazione finale dei dati, tale che in seguito possa essere adottata come metodo standard di analisi per tutti i campioni del progetto APICE. Questa Tesi sperimentale, perciò, ne rappresenta il punto di partenza.

I campioni, forniti dall'Azienda Ospedaliera Universitaria di Careggi, Firenze, contengono il sedimento delle piastrine isolate dal sangue periferico dei diversi pazienti affetti da ACS e reclutati appositamente.

La complessità del proteoma e il divario di concentrazione delle proteine piastriniche rendono difficile la rilevazione di quelle espresse a livelli molto bassi, riducendo la sensibilità dell'analisi. Abbiamo perciò cercato di ridurre la complessità del campione utilizzando metodi precedentemente convalidati sul plasma umano, che rappresenta un esempio emblematico di miscela complessa di proteine. Abbandonata una prima ipotesi di eseguire un "cut-off" di peso molecolare, sono state fatte prove di pre-

frazionamento applicando un metodo di cromatografia “flash” con diversi tipi di resine ma nessuna di queste tecniche ha prodotto un esito positivo. E’ stato ipotizzato che questo sorprendente risultato negativo fosse dovuto a caratteristiche specifiche delle proteine piastriniche, come per esempio particolari modificazioni post-traduzionali.

L’impossibilità di un pre-frazionamento unita alla consapevolezza dell’esistenza delle limitazioni della separazione elettroforetica bidimensionale (2D-GE), specie quando si intenda affrontare l’analisi di un gran numero di campioni complessi (high throughput analysis), ha portato alla scelta obbligata di un’analisi dell’estratto proteico intero e alla ricerca dello sviluppo di una metodica alternativa che non fosse basata sull’applicazione dell’elettroforesi bidimensionale, quindi “gel-free”. La metodologia sperimentale adottata, LC-MALDI-TOF/TOF, può essere schematizzata come segue:

- Preparazione dell’estratto grezzo totale e digestione enzimatica con tripsina;
- Quantificazione del contenuto peptidico mediante corsa in nano-HPLC;
- Separazione mediante cromatografia nano-HPLC in fase inversa dei peptidi, mescolamento con la matrice MALDI e raccolta robotizzata delle frazioni (spot) direttamente sul supporto dello spettrometro di massa;
- Analisi di ciascuno spot sia in condizioni di singola massa (MS) che tandem (MS/MS);
- Analisi bioinformatica dei dati di spettrometria di massa.

Per convalidare sia il sistema di trattamento e di analisi che l’elaborazione finale dei risultati ottenuti dalla spettrometria di massa, sono stati selezionati, tra tutti quelli forniti per questo studio, tre campioni: a fronte di un soggetto sensibile, gli altri due risultano resistenti rispettivamente all’ASA ed al Clopidogrel. Oltre ad ottenere un’ampia lista di proteine identificate, siamo riusciti a riscontrare, con l’utilizzo di un software che esegue un confronto semi-quantitativo, una serie di proteine differenzialmente espresse tra i tre campioni. Queste diversità, avendo preso in considerazione solo pochi campioni, non hanno un valore diagnostico generale in relazione al tipo di resistenza al trattamento farmacologico. Tuttavia hanno permesso di sottolineare interessanti osservazioni. Molte delle proteine differenzialmente espresse, infatti, sono coinvolte direttamente nell’adesione, nell’attivazione e nell’aggregazione piastrinica. Inoltre, la diversità nei livelli con cui le proteine sono più o meno espresse nei due tipi di resistenza confermerebbe la diversità dei meccanismi di resistenza all’azione di ASA e Clopidogrel.

INTRODUZIONE

1.1 Le Malattie Cardiovascolari^[1]

Le Malattie Cardiovascolari rappresentano attualmente la principale causa di mortalità e morbilità in tutto il mondo. In quest'ambito la maggiore incidenza è determinata dalle arteriopatie coronariche responsabili di una serie di manifestazioni cliniche che sono genericamente definite Sindromi Coronariche acute (ACS). Fra queste, l'Infarto acuto del Miocardio (AMI) rappresenta la forma più grave.

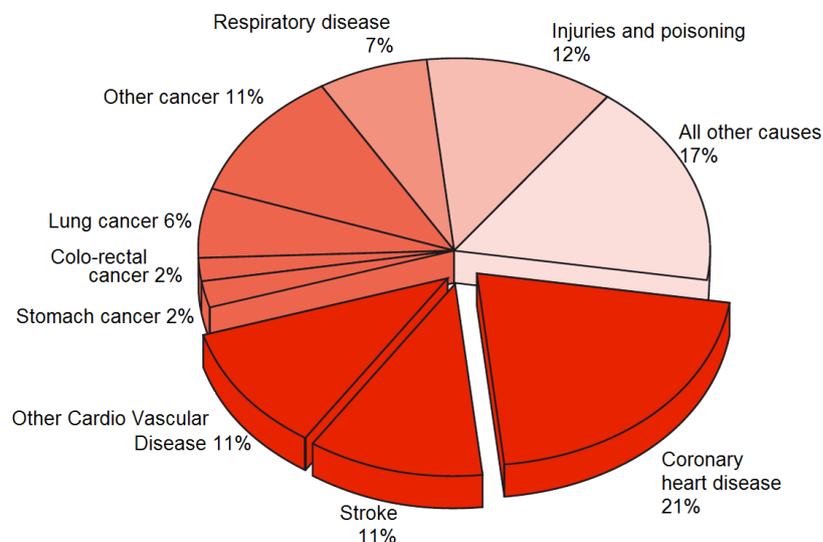


FIGURA 1.1: Cause di morte nel 2008^[2].

L'AMI è da solo la principale causa di morte nell'Unione Europea facendo contare più di 741mila morti ogni anno.

Le ACS costituiscono pertanto uno dei problemi socio-economici, clinici ed organizzativi più complessi con i quali la medicina odierna deve confrontarsi in termini di:

- Prevenzione primaria e secondaria con intervento sui classici fattori di rischio;
- Identificazione di nuovi fattori di rischio la cui esistenza è legittimamente ipotizzata sulla base dei numerosi pazienti per i quali la malattia sarebbe inspiegabile;

- Diagnosi precoce;
- Stratificazione prognostica per garantire una corretta assistenza.

Tutti questi rappresentano, al giorno d'oggi, progetti ambiziosi che implicano strategie di alleanza tra Clinica, Laboratorio ed Industria.

1.2 La Sindrome Coronarica acuta^[1]

La definizione di Sindrome Coronarica acuta si associa ad un insieme di quadri patologici ostruttivi acuti a carico delle arterie coronarie.

All'interno di tale definizione possiamo identificare tre stati clinici ben distinti:

- Infarto acuto del Miocardico con sopraslivellamento del tratto ST (STEMI). La lesione cardiaca è tale da causare una ripolarizzazione irregolare, dovuta all'incapacità delle aree necrotiche di ripolarizzarsi. Questo si traduce in un sopraslivellamento del tratto ST nel tracciato ECG, la registrazione elettrica del cuore;
- Infarto acuto del Miocardico in assenza di sopraslivellamento del tratto ST (NSTEMI);
- Angina Instabile.

Le diverse condizioni fisiopatologiche delle ACS definiscono diversi tracciati elettrocardiografici correlati ad un diverso esito clinico e una diversa prognosi a seconda della gravità del danno miocardico.

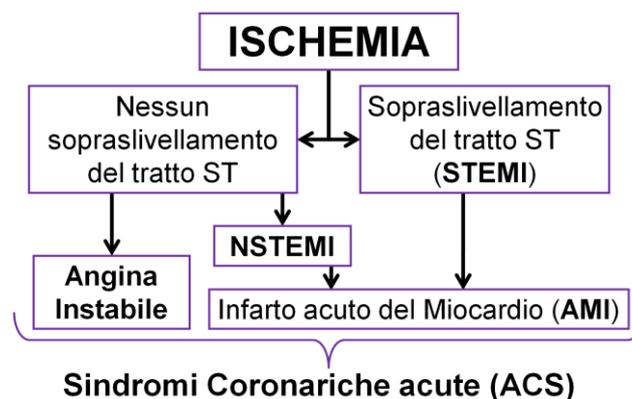


FIGURA 1.2: Definizione elettrocardiografica di Sindrome Coronarica acuta.

L'**Angina Instabile**, caratterizzata da un dolore intenso e improvviso, identifica uno stato di temporanea diminuzione del flusso di sangue al cuore (ischemia miocardica transitoria). La reversibilità di questa condizione differenzia l'angina dall'infarto,

evento ben più grave associato a necrosi (morte) di una parte più o meno estesa del cuore. L'angina pertanto risulta essere un quadro patologico assai meno grave dell'infarto vero e proprio, ma costituisce comunque un ostacolo al flusso sanguigno provocando sofferenza (ma non necrosi) dei tessuti a valle dell'ostruzione.

Circa il 10% dei pazienti con cardiopatia ischemica presenta Angina Instabile come prima manifestazione di malattia, ma la percentuale di pazienti con cardiopatia ischemica che presenta uno o più episodi d'instabilità nel corso della loro malattia è molto più alta. Da notare, inoltre, che circa il 50% dei pazienti ricoverati per Infarto riferiscono la presenza di episodi anginosi che configurano un quadro d'Angina Instabile nei giorni immediatamente precedenti.

L'Infarto acuto del Miocardio è una sindrome clinica caratterizzata dall'occlusione improvvisa e prolungata di un ramo arterioso coronarico che determina la necrosi ischemica delle cellule miocardiche correlate alla coronaria.

La necrosi ischemica ha inizio 20 minuti dopo l'occlusione improvvisa di un'arteria coronarica. L'estensione della zona infartuata è determinata dalle modalità di occlusione del vaso coronarico e dipende dal sito dell'occlusione e dalla presenza di eventuali circoli collaterali. Se la necrosi interessa il 25-40% del tessuto del miocardio, l'infarto può complicarsi con edema polmonare acuto e/o shock cardiogeno.

In rapporto ai segni elettrocardiografici di ischemia e di necrosi, le categorie menzionate che definiscono l'AMI rappresentano due condizioni:

- STEMI che sottintende un quadro di occlusione coronarica assai grave con danno miocardico.
- NSTEMI che riguarda solo aree microscopiche di necrosi cellulare.

Entrambi i quadri descritti sono caratterizzati da necrosi del tessuto miocardico a valle dell'ostruzione. La conseguenza immediata della necrosi cellulare è la liberazione di enzimi nel torrente circolatorio: troponina, isoforma CK-MB dell'enzima creatina-cinasi (CK), lattato-deidrogenasi (LDH), alanina-transaminasi (ALT) e aspartato-transaminasi (AST). La loro rilevazione nel sangue è indice di lesione del muscolo cardiaco.

1.3 Ischemia

La patogenesi ischemica accomuna tutte le condizioni cliniche comprese dalla Sindrome Coronarica acuta. Si tratta di una condizione in cui si verifica una discrepanza tra il fabbisogno e l'apporto di ossigeno al miocardio. Questo sbilanciamento può generarsi sia in dipendenza di un aumento della richiesta miocardica che di una riduzione del flusso coronarico o di entrambe le eventualità.

Condizioni che aumentano il fabbisogno di ossigeno	Condizioni che riducono l'apporto di ossigeno
Esercizio	Spasmo coronarico
Stress	Stenosi coronarica

Nella maggior parte dei casi l'eziopatogenesi dell'ischemia miocardica è l'aterosclerosi delle arterie coronarie con la formazione delle placche ateromatose.

Le placche riducono progressivamente il lume del vaso e quindi il flusso ematico.

La placca, inoltre, può generare ulteriori complicazioni con formazione di trombi e occlusione acuta, parziale o totale, del lume.

L'aterotrombosi è il risultato della rottura della placca che può risultare sia spontanea ed improvvisa, causata dalla sua instabilità intrinseca, sia traumatica in seguito a danno meccanico durante un intervento di angioplastica con o senza stent.

1.4 Aterosclerosi^[3]

La placca aterosclerotica (o ateroma) è il danno caratteristico generato dall'aterosclerosi sulle pareti dei vasi.

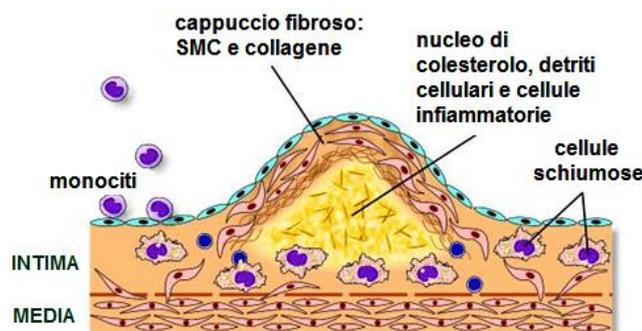


FIGURA 1.3: Ateroma.

È costituita da un accumulo di lipidi intra ed extracellulari, cellule muscolari lisce, tessuto connettivo e glicosamminoglicani. La lesione aterosclerotica che può essere

rilevata negli stadi precoci è la stria lipidica, costituita da cellule schiumose cariche di lipidi (monociti circolanti che si sono spostati giungendo fino allo strato sottoendoteliale dell'intima e si sono trasformati in macrofagi).

La stria può successivamente trasformarsi in placca fibrosa, composta da cellule muscolari lisce intimali circondate da tessuto connettivo e da lipidi intracellulari ed extracellulari.

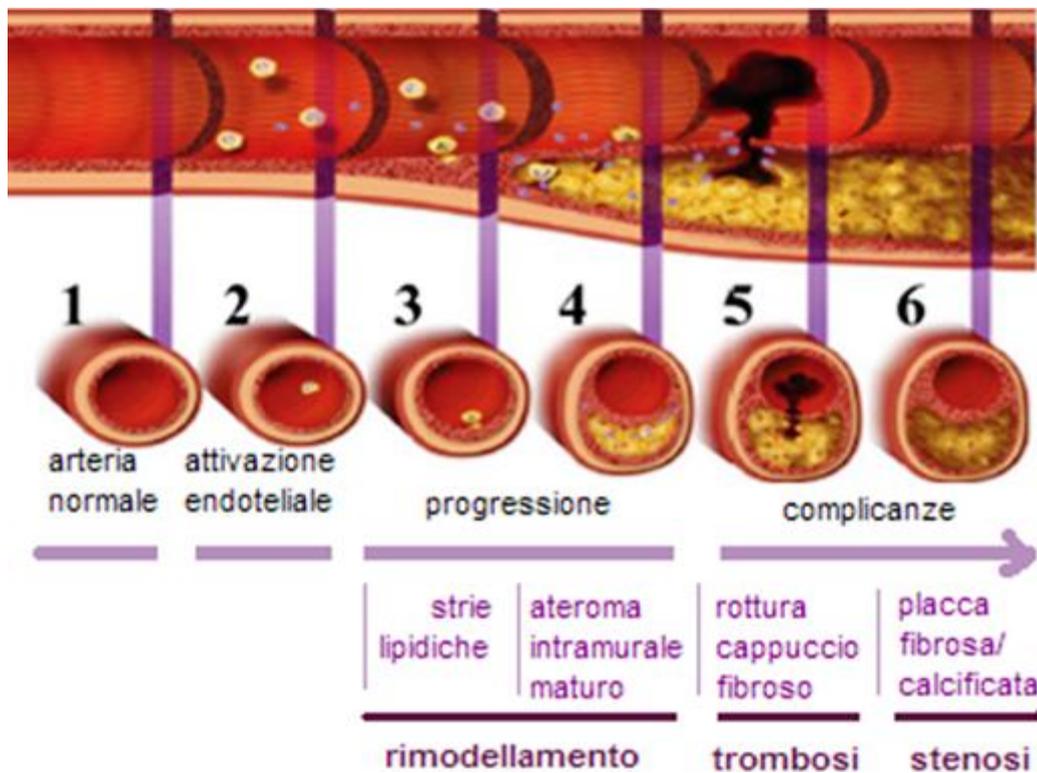


FIGURA 1.4: Progressione della lesione aterosclerotica.

Alcune placche sono stabili, ma altre, specialmente quelle ricche di lipidi, infiltrate da cellule infiammatorie e coperte da un sottile cappuccio fibroso, possono andare incontro a erosione o rottura spontanee, esponendo il contenuto della placca al flusso ematico.

Quando il cappuccio fibroso si fessura, il “core” lipidico (estremamente trombogenico) è esposto al circolo ematico: questo costituisce il punto di innesco del processo di emostasi localizzata, attraverso l’induzione coordinata delle varie attività proemostatiche. Le strutture, contenute in condizioni normali nel subendotelio, quando vengono esposte al torrente circolatorio, attivano sia le piastrine che la cascata della coagulazione, entrambe aventi come tappa comune terminale la formazione di un coagulo: il trombo.

1.4.1 Cenni di anatomia^[4]

Le arterie hanno una struttura a tuniche sovrapposte, si distinguono:

- Tunica intima. È composta da un rivestimento epiteliale interno costituito da un monostrato di cellule endoteliali che appoggia sopra un connettivo ricco di fibre elastiche;
- Tunica media. È formata da uno stroma connettivale di fibre di collagene che sostiene fibre elastiche e cellule muscolari lisce (VSMC);
- Tunica avventizia. È rappresentata da uno strato di connettivo fibroso con vasi e dispositivi nervosi che si estende senza limiti precisi con il connettivo perivascolare.

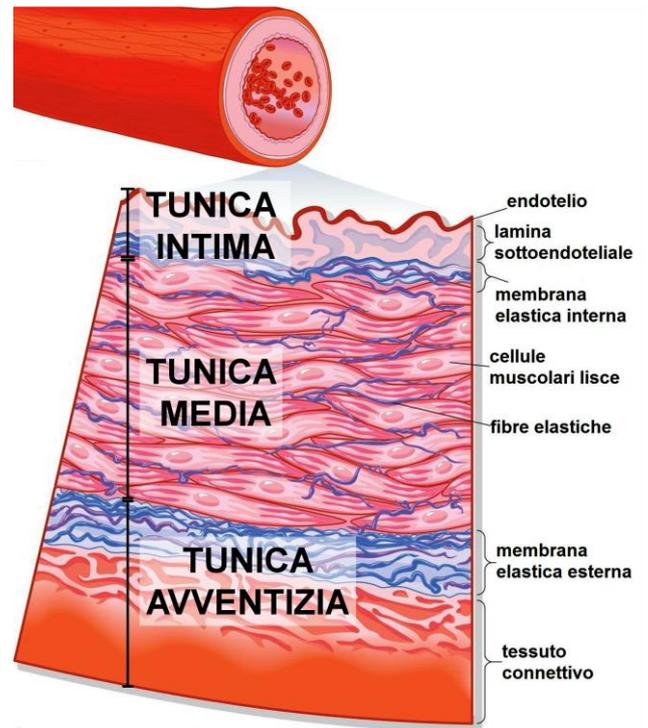


FIGURA 1.5: Struttura delle arterie.

1.4.2 Patogenesi dell'aterosclerosi^[3]

Sono state proposte due ipotesi principali, tra loro correlate, per descrivere la patogenesi dell'aterosclerosi.

- **Ipotesi lipidica:** Un aumento di “low density lipoproteins” (LDL) plasmatiche induce l'ingresso dei lipidi all'interno della parete arteriosa con conseguente accumulo nelle cellule muscolari lisce e nei macrofagi (cellule schiumose). Le LDL contribuiscono all'iperplasia delle VSMC favorendo la loro migrazione verso le regioni intimali e sotto-intimali. Le LDL in tale ambiente subiscono modificazioni ed ossidazioni che le rendono agenti chemiotattici per i monociti circolanti, i quali, a loro volta, migrano nel compartimento sotto-intimale trasformandosi e stabilizzandosi in macrofagi. Successivamente i macrofagi, attraverso i propri recettori di membrana, incorporano le LDL al loro interno, trasformandosi in cellule schiumose ricche di lipidi.

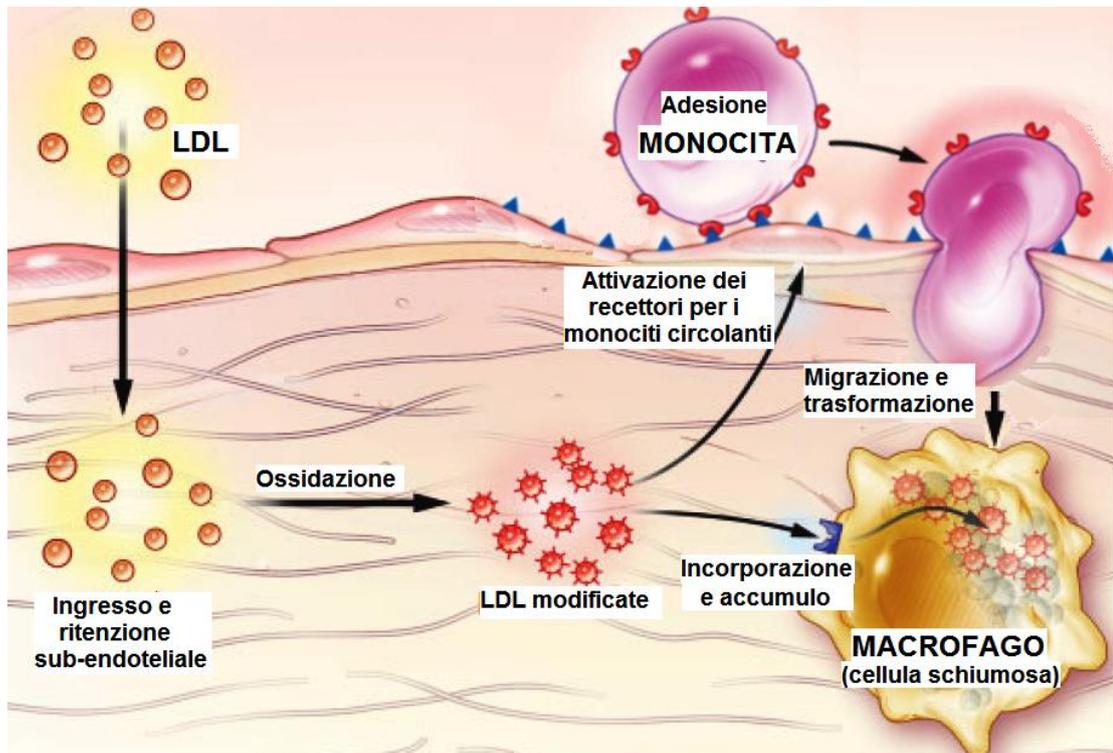


FIGURA 1.5: Rappresentazione dell'ipotesi lipidica nella patogenesi dell'aterosclerosi.

- **Ipotesi del danno endoteliale cronico:** È strettamente collegata con la precedente. Le LDL ossidate, essendo citotossiche, possono infatti danneggiare le cellule endoteliali, innescando il richiamo di monociti e macrofagi, stimolando l'accrescimento delle VSMC ed il rilascio di fattori di crescita. Questo evento induce la migrazione delle VSMC dalla tunica media verso la tunica intima, dove si replicano e sintetizzano tessuto connettivo e proteoglicani formando una placca fibrosa. Le LDL modificate inibiscono anche la mobilità dei macrofagi così che, una volta che questi si sono trasformati in cellule schiumose, restano intrappolati nella regione sottoendoteliale. Infine, le cellule endoteliali che si rigenerano dopo una lesione presentano un fenotipo patologico caratterizzato da un' aumentata incorporazione di LDL dal plasma.

1.4.3 Fattori di Rischio Aterosclerotico^[1]

La conoscenza dei diversi fattori di rischio, del peso relativo di ognuno di loro e del significato moltiplicativo di uno rispetto agli altri, è importante nella valutazione del rischio cardiovascolare globale perché permette di agire sulla malattia aterosclerotica in senso preventivo. I fattori di rischio includono elementi modificabili, quali lo stile di vita e le caratteristiche biochimiche ed elementi non modificabili come specifiche

caratteristiche individuali. In un individuo che manifesti sintomi di coronaropatia o di altra malattia aterosclerotica i fattori di rischio modificabili contribuiscono in maniera sostanziale alla progressione della malattia ed alla prognosi.

Fattori di rischio aterosclerotico		
Stili di vita	Caratteristiche biochimiche	Caratteristiche individuali
Fumo	Elevato colesterolo totale e colesterolo LDL	Età
Eccessivo consumo di alcool	Ridotto colesterolo HDL	Sesso
Dieta iperlipemica ed ipercalorica	Ipertrigliceridemia	
Inattività fisica	Ipertensione/ Diabete	Storia familiare di arteriopatie coronariche o periferiche
Stress	Obesità	Storia personale di malattie aterosclerotiche
	Fattori trombogenetici	

La donna viene protetta fino alla menopausa dalla presenza degli estrogeni. Una carenza di essi, spesso quando associata al diabete e al fumo, è un fattore che favorisce l'aterogenesi con effetti più gravi rispetto all'uomo. Per tale motivo l'Infarto acuto del Miocardio nella donna dopo la menopausa presenta caratteristiche di maggiore gravità sia in termini di mortalità che di invalidità.

1.5 Danno endoteliale^[6]

Da più di un secolo è stato stabilito che nella patogenesi dei trombi sono coinvolti tre principali fattori (Triade di Virchow, 1856):

- Alterazioni dell'endotelio vasale;
- Alterazioni dei componenti ematici dell'emostasi;
- Fattori meccanici legati ad alterazioni del flusso sanguigno.

Il danno endoteliale è il fattore dominante della triade e da solo può condurre alla trombosi. Non è indispensabile una lesione persistente, qualsiasi alterazione dell'equilibrio dinamico fra gli effetti pro e antitrombotici dell'endotelio può avere ripercussioni sugli eventi locali di coagulazione.

In seguito ad un danno endoteliale si instaura una fase iniziale, detta "vascolare", caratterizzata da una vasocostrizione riflessa seguita dall'attivazione delle piastrine e

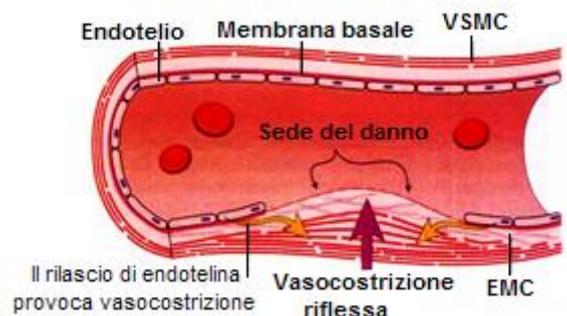
della cascata della coagulazione. L'attivazione di entrambe deriva dall'esposizione al flusso sanguigno delle strutture subendoteliali, altamente trombogeniche, che normalmente sono schermate dallo strato endoteliale.

Queste strutture vengono captate dai fattori della coagulazione e dai recettori di superficie delle piastrine, che a loro volta si attivano determinando l'innescò dell'intero sistema emostatico.

Componenti della parete vascolare che interagiscono con il sistema emostatico ^[7]		
Subendotelio	Media	Avventizia
Fattore von Willebrand Collagene (tipi IV, V e VI) Fibronectina Trombospondina Laminina Vitronectina Fibrinogeno (fibrina) Fattore tissutale (tracce)	Collagene (tipi I e III)	Collagene (tipi I e III) Fattore tissutale

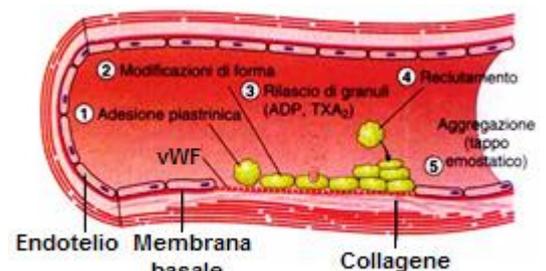
I principali eventi a livello di una lesione vascolare sono:

- **Fase vascolare:** Vasocostrizione. Un danno vascolare induce vasocostrizione (contrazione delle cellule della tunica media), dovuta a meccanismi neurogeni riflessi (stimolazione nerva vasorum) e potenziata dalla secrezione locale di endotelina da parte dell'endotelio.



L'effetto è transitorio e serve per ridurre momentaneamente la perdita di sangue. Il sanguinamento continuerebbe se non venisse attivato il sistema delle piastrine e della cascata coagulativa.

- **Fase piastrinica** o emostasi primaria: Formazione del tappo piastrinico. Il danno endoteliale espone la matrice extracellulare subendoteliale (superficie trombogena) a cui le piastrine aderiscono e si attivano (cambiamento di forma e rilascio di granuli).



I prodotti secreti contribuiscono alla vasocostrizione ed entro pochi minuti richiamano altre piastrine per formare il tappo emostatico primario (trombo piastrinico).

- **Fase plasmatica** o emostasi secondaria:

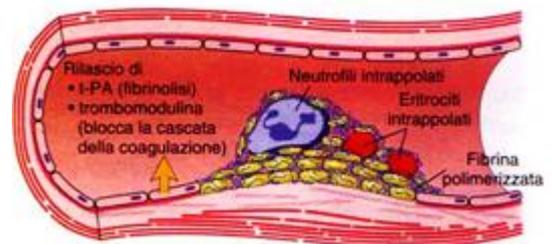
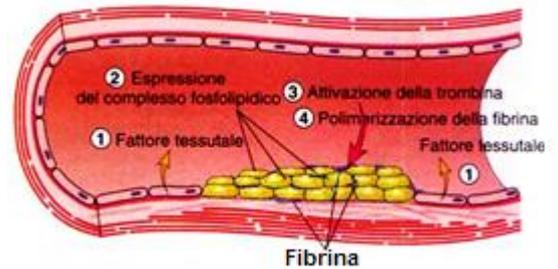
Formazione del trombo di fibrina. Le cellule endoteliali espongono collagene e fattore tissutale che attivano la cascata coagulativa.

Il consolidamento del tappo piastrinico è possibile grazie alla trasformazione di una

glicoproteina plasmatica, che circola allo stato di sol, il fibrinogeno, in una proteina polimerizzata a reticolo tridimensionale e quindi solido, la fibrina. I protagonisti della cascata della coagulazione sono i fattori della coagulazione, numerati con numeri romani sulla base dell'ordine con cui sono stati scoperti. Uno

dei momenti fondamentali nel processo coagulativo è l'attivazione del fattore X (F-X) in fattore X attivato (F-Xa) che può avvenire tramite due meccanismi interdipendenti l'uno rispetto all'altro: il sistema intrinseco ed il sistema estrinseco. In entrambi i sistemi si

verifica una cascata enzimatica ed amplificatrice secondo la quale un fattore attivato agisce su di un altro trasformandolo da proenzima in enzima proteolitico che, a sua volta, ripete la stessa azione sul fattore successivo della sequenza. La conversione da proenzima ad enzima attivo avviene tramite una proteolisi limitata e selettiva, ossia attraverso la scissione di pochi e ben definiti legami peptidici. La fibrina prodotta alla fine della cascata della coagulazione forma, con le piastrine attivate, un coagulo permanente: il tappo emostatico secondario.



1.6 Le piastrine^[6]

Le piastrine sono frammenti citoplasmatici dei megacariociti e sono presenti nell'organismo in un numero variabile da 130.000 a 400.000/mm³ di sangue. I 2/3 delle piastrine risultano circolanti mentre 1/3 è sequestrato in un "pool" splenico. Il tempo medio di sopravvivenza in circolo è di 7-10 giorni e il loro destino è la rimozione da parte del sistema del reticolo endoteliale della milza, del fegato e del

midollo osseo. La produzione delle piastrine è controllata da un ormone con caratteristiche biochimiche non ancora ben definite chiamato trombopoietina.

1.6.1 Morfologia e ultrastruttura^[8]

Le piastrine non attivate presentano forma discoidale (discociti). Quando vengono a contatto con stimoli adeguati esse modificano la loro forma divenendo sferoidali (sferociti) fino alla costituzione di un piccolo corpo cellulare da cui si diramano numerosi pseudopodi (echinociti). Si presentano come piccole spugne in quanto la loro superficie dispone di pori attraverso i quali fuoriescono i componenti biochimici prodotti internamente durante l'attivazione. La piastrina è racchiusa da una membrana plasmatica trilaminare formata da fosfolipidi e proteine. Detta membrana riveste una fondamentale importanza nella fisiologia dell'emostasi perché trattiene adsorbiti sulla superficie molti fattori della coagulazione (atmosfera peripiastrinica).

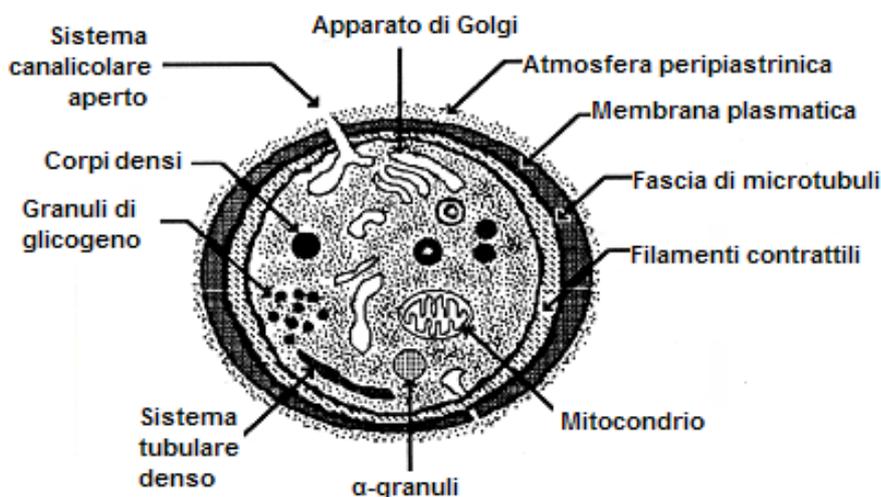


FIGURA 1.6: Morfologia ed ultrastruttura di una piastrina.

La membrana piastrinica si invagina profondamente all'interno costituendo un sistema canalicolare aperto la cui superficie di contatto con l'ambiente esterno è notevolmente aumentata. Il sistema canalicolare aperto presenta delle zone di stretta associazione con un altro complesso di membrane che formano dei canalicoli chiusi, isolati dall'esterno, originati dal reticolo plasmatico dei megacariociti: il sistema tubulare denso (DTS). A livello di questo sistema si svolgono alcuni importanti meccanismi biochimici quali il metabolismo dell'acido arachidonico, dell'AMP-ciclico e del trasporto del calcio. Al mantenimento della forma discoidale, tipica dello stato di riposo, così come alla sua modificazione in seguito a stimolazione, contribuiscono i

microtubuli ed i filamenti contrattili, sistemi proteici del citoscheletro altamente organizzati e finemente regolati. All'interno del citoplasma piastrinico si trovano: i corpi densi, gli α -granuli e i lisosomi, organuli morfologicamente omogenei, pressoché sferici e circondati da una membrana semplice. Sono distinguibili gli uni dagli altri per il loro contenuto che ne determina le caratteristiche chimico-fisiche. I corpi densi (δ -granuli) contengono ADP, ATP, serotonina, calcio e fosforo ed hanno un'attività proaggregante. Gli α -granuli contengono proteine piastriniche specifiche, fattori della coagulazione, fattori della fibriniformazione, proteine adesive e fattori di crescita cellulare. Questi svolgono numerose funzioni: antieparinica, stimolatrice della crescita cellulare, procoagulante, proaggregante, adesiva delle piastrine, regolatoria della fibrinolisi. Infine i lisosomi (λ -granuli) contengono idrolasi, proteasi e catepsine, con funzioni degradative. Il contenuto dei granuli è liberato nel plasma attraverso il sistema canalicolare, aperto durante il processo secretorio che segue l'attivazione.

1.6.2 Biochimica

La piastrina, pur essendo priva di nucleo, è in grado di sintetizzare proteine in misura limitata. Essa inoltre contiene un certo numero di organuli quali i mitocondri ed i granuli, che le consentono un metabolismo attivo. La piastrina possiede inoltre capacità adsorbenti, infatti contiene anche proteine di origine plasmatica. Essa è in grado di secernere le proteine che contiene tramite un meccanismo di contrazione actino-miosinico. Per quanto riguarda il metabolismo energetico, di primaria importanza sono i processi collegati alle funzioni contrattili. Gli enzimi della via glicolitica forniscono l'energia necessaria al metabolismo a riposo ed alla contrazione utilizzando come substrato il glicogeno. Nelle piastrine sono contenute anche notevoli quantità di nucleotidi pirimidinici (ATP, ADP, AMP) i quali sono distribuiti in due porzioni distinte localizzate in due compartimenti: la prima, circa 1/3 contenuta nel citoplasma, è funzionale al metabolismo a riposo della cellula e costituisce il "pool" metabolico, la seconda, circa 2/3 localizzata nei corpi densi, è funzionale alla fase di attivazione e di secrezione.

1.6.3 Fisiologia^[7]

La risposta piastrinica ad un determinato stimolo può essere suddivisa in varie fasi che tendono a sovrapporsi: adesione, attivazione, modificazione della forma,

secrezione e aggregazione. Principalmente il processo di adesione, ma anche quello di aggregazione, si basano sulla presenza di proteine di adesione sulla superficie delle piastrine. Queste proteine di membrana appartengono per la maggior parte alla superfamiglia delle integrine. Le integrine sono molecole composte da due catene peptidiche unite da un legame non covalente, denominate α e β . Esistono vari tipi sia di catene α che di catene β e la diversità fra le integrine è data dalle varie combinazioni delle differenti isoforme delle due catene.

Principali proteine della superficie piastrinica ^[5]		
Recettore		Ligando
Integrine	GPIa/IIa ($\alpha 2\beta 1$)	Collagene
	GPIc/IIa ($\alpha 6\beta 1$)	Laminina
	GPIc*/IIa ($\alpha 5\beta 1$)	Fibronectina
	GPIIb/IIIa ($\alpha 2b\beta 3$)	Fibrinogeno, fattore di Von Willebrand-vWF, fibronectina e vitronectina
Complesso GPIb-IX-V		vWF
GPVI		Trombospondina - TSP
GPVI		Collagene

Le proteine che compongono la membrana piastrinica presentano caratteristiche strutturali atte a mediare le interazioni da contatto di superficie, come quelle coinvolte nei processi di adesione fra piastrina e glicoproteine adesive subendoteliali e quelle coinvolte nei processi di aggregazione piastrina-piastrina.

L'adesione primaria delle piastrine in seguito a danno endoteliale inizia con il legame del recettore GPIb-IX-V al vWF, con conseguente traslocazione delle piastrine lungo l'endotelio. Nelle cellule endoteliali il vWF è contenuto in vescicole di deposito, i corpi di Weibel-Palade, e si attiva in condizioni di aumentato "shear-stress", ossia di stress meccanico dovuto ad un aumento del flusso.

Bisogna immaginare il vWF come un piccolo gomito proteico attaccato da un capo alla parete dell'endotelio: se aumenta il flusso nell'arteria (condizione questa che è un presupposto dei meccanismi di emostasi primaria con la vasocostrizione), il vWF ne risente e inizia a dispiegarsi. È proprio la forma srotolata di questa proteina ad avere il più alto valore emostatico. Il vWF, oltre a mediare l'adesione piastrinica, veicola nel sangue il fattore VIII della coagulazione.

L'adesione è assicurata da altri legami dei recettori piastrinici ai loro rispettivi ligandi esposti dall'endotelio:

- Il collagene viene legato dall'integrina GPIa/IIa ($\alpha 2\beta 1$) e dalla glicoproteina GPVI;
- La trombospondina (TSP) dalla glicoproteina GPIV;
- La laminina dall'integrina GPIc/IIa ($\alpha 6\beta 1$);
- La fibronectina dall'integrina GPIc*/IIa ($\alpha 5\beta 1$).

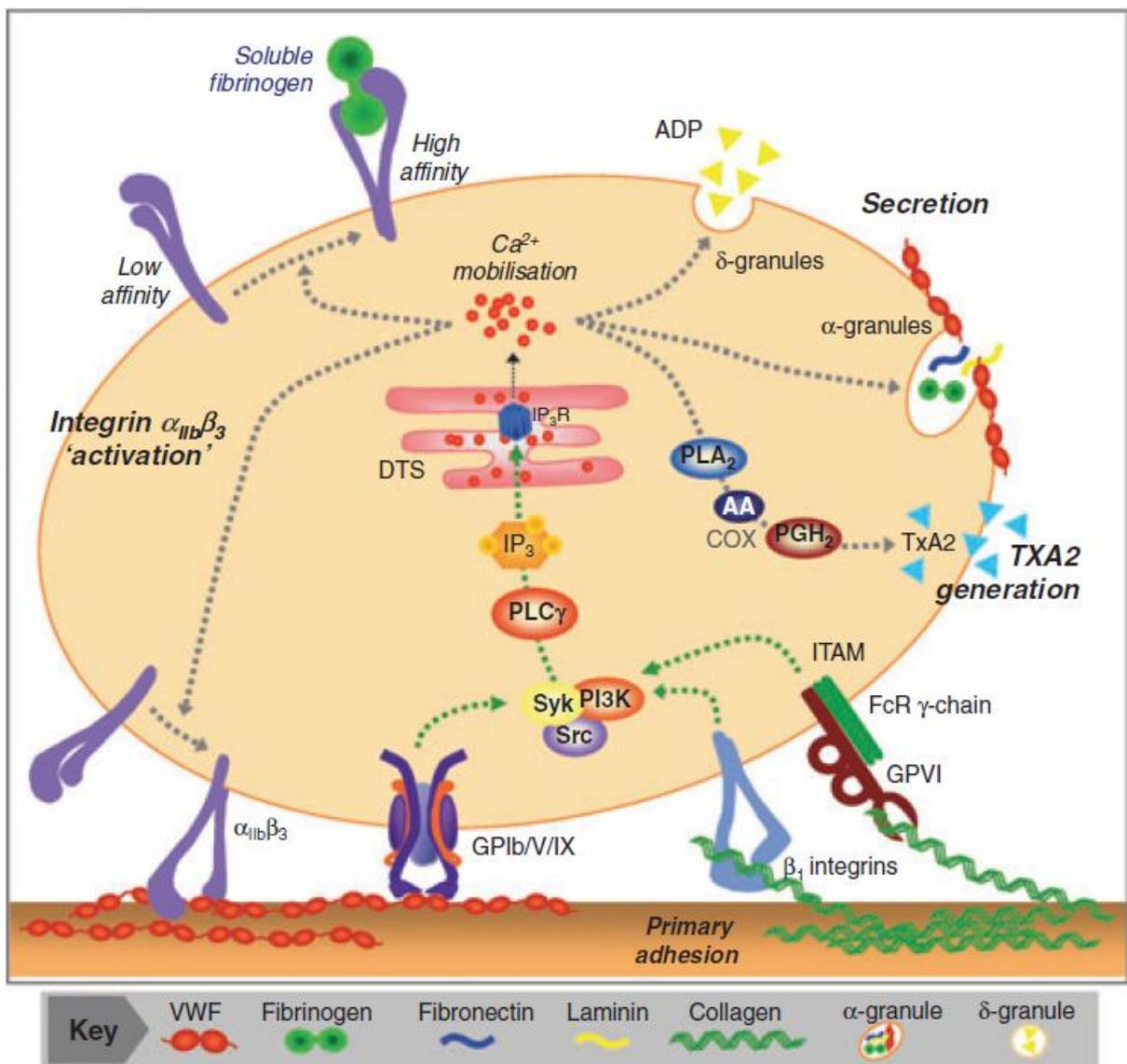


FIGURA 1.7: Adesione piastrinica primaria.

Questi recettori sono accoppiati a una proteina G trimerica. Hanno quindi il dominio extracellulare che lega il ligando, a sua volta collegato ad un dominio intracellulare di tipo enzimatico che attiva una cascata di reazioni.

Vengono attivate un gruppo di chinasi, Src, Syk e PI3K, che a loro volta attivano la fosfolipasi C (PLC). Questa idrolizza i fosfolipidi di membrana generando DAG (diacilglicerolo), attivatore della proteina chinasi C (PKC), e IP3 (inositolo 1,4,5 trifosfato), il quale va a legare i propri recettori sul sistema tubulare denso (DTS) causando la mobilitazione del calcio dai depositi intrapiastrinici. Questo aumento di [Ca⁺⁺] intracellulare promuove:

- Attivazione della fosfolipasi A2 (PLA2) che, idrolizzando i fosfolipidi di membrana, libera acido arachidonico (AA). L'AA, attraverso l'azione dell'enzima cicloossigenasi e perossidasi (COX), dà origine alla prostaglandina H2 (PGH2), a sua volta trasformata in trombossano 2 (TxA2), liberato in seguito.
- Trasporto dei granuli vicino al sistema canalicolare aperto (centralizzazione dei granuli), fusione della membrana del granulo con quella del canalicolo e quindi secrezione del contenuto. Nei granuli sono presenti in alta concentrazione molecole capaci di mantenere ed amplificare la risposta fin qui limitata a poche piastrine.

Granuli piastrinici^[8]		
Tipo	Contenuto	
α-granuli	Proteine piastriniche specifiche	Fattore piastrinico 4 -PF4, β-tromboglobulina (attività antieparinica)
	Fattori della coagulazione	Fibrinogeno, vWF, F-V F-III, chininogeno ad alto peso molecolare - HMWK (agisce come cofattore nella cascata della coagulazione)
	Fattori della fibrinogenoformazione	Subunità α del F-XIII, inibitore dell'attivatore del plasminogeno PAI-1, α1-antitripsina (inibitore di diverse proteasi tra cui F-XIa, plasmina e trombina)
	Proteine adesive	Vitronectina, fibronectina, trombospondina
	Fattori di crescita cellulare	PDGF "Platelet-Derived Growth Factor", PD-ECGF "Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor", TGF "Transforming Growth Factor", HGF "Hepatocyte Growth Factor", EGF "Epidermal Growth Factor-Like Protein", CTAP-III "Connective Tissue Activating Peptide III"

Corpi densi (δ -granuli)	Nucleotidi	ADP, ATP, GTP, GDP
	Amine biogene	Serotonina, istamina, adrenalina
	Ioni calcio e fosforo	
	Pirofosfato e ortofosfato	
Lisosomi (λ -granuli)	Fosfatasi acida, arilsolfatasi, catepsina D	
	β -glucuronidasi e galattosidasi	
Perossisomi	Catalasi	
Mitocondri	Enzimi del metabolismo energetico	
Granuli di glicogeno	Glicogeno (in ammassi)	

- Cambiamento conformazionale del recettore GPIIb/IIIa ($\alpha_2\beta_3$) che aumenta la sua affinità per il fibrinogeno e per il vWF. Il legame al vWF assicura un'adesione stabile alla parete endoteliale mentre il legame al fibrinogeno facilita l'aggregazione piastrinica. Questa prima onda di aggregazione è detta aggregazione primaria ed è reversibile.

In seguito all'adesione primaria, il TxA2 e l'ADP che sono stati rilasciati e la trombina, presente in circolo, vanno ad agire sui proprio recettori presenti sulla membrana delle altre piastrine.

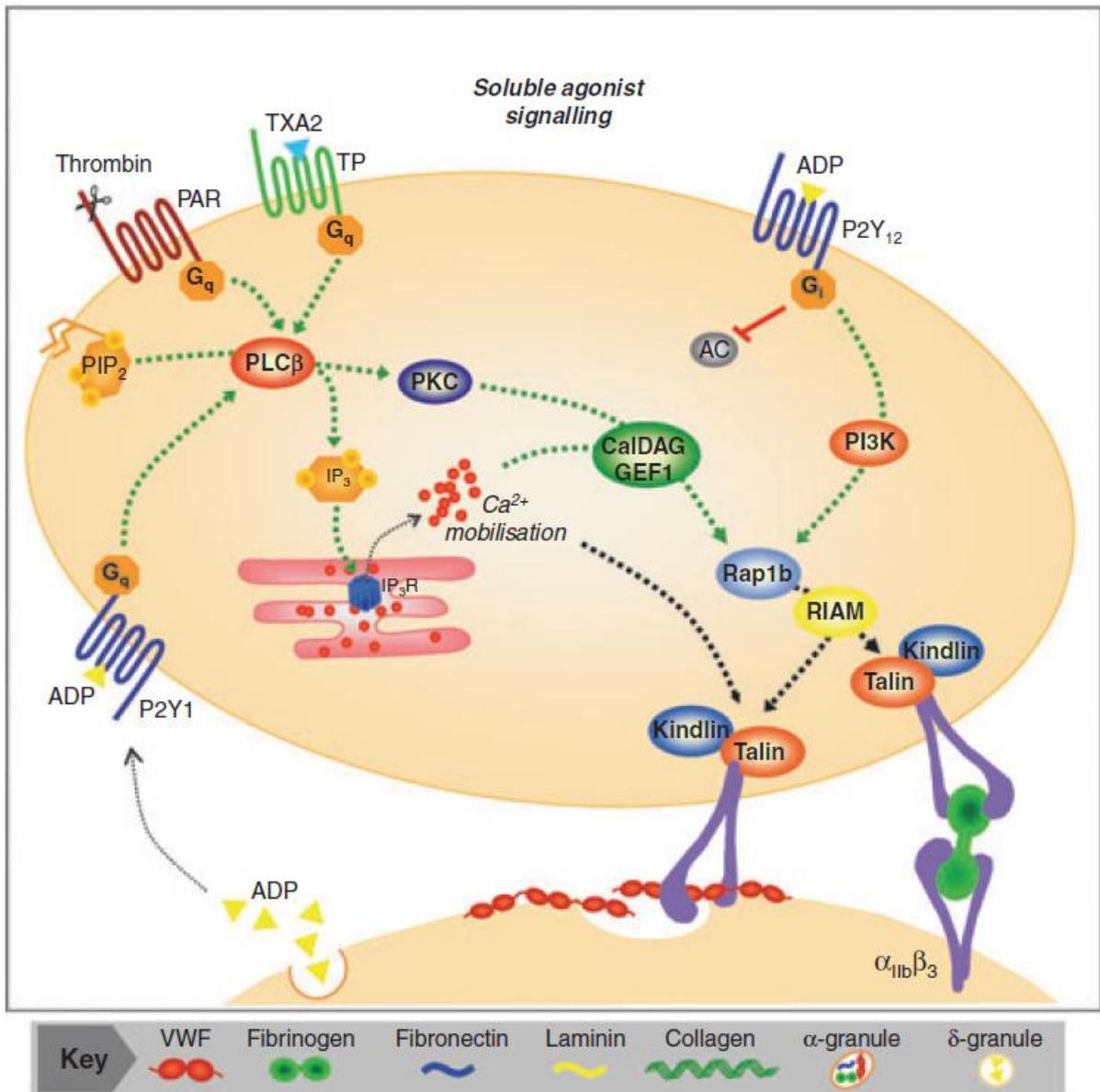


FIGURA 1.8: Adesione piastrina-piastrina.

I recettori “protease activated receptors” (PAR1; PAR 4), “tromboxane receptor” (TP) e “ADP receptor” (P2Y1) sono accoppiati ad una proteina G (Gq) che attiva la fosfolipasi C (PLC). Vengono idrolizzati i fosfolipidi di membrana per generare inositolo trifosfato (IP3), che causa la mobilitazione del calcio dai depositi intrapiastrinici, e diacilglicerolo (DAG), che attiva la proteina cinasi C (PKC).

L’altro recettore dell’ADP, il P2Y12, è accoppiato con una diversa proteina G (Gi), la quale inibisce l’adenilato ciclasi (AC) e attiva la fosfatidilinositolo-3-cinasi (PI3K).

Tutti questi eventi portano all’attivazione della piccola GTPasi (Rap1b) e all’interazione con RIAM, una molecola che funge da adattatore. Il complesso RIAM-Rap1b media il legame della Talina alla coda β3 del recettore GPIIb/IIIa (α2β3)^[9]. Il legame della Talina e del suo omologo Kindlina alla coda citoplasmatica dell’integrina

attiva il recettore e lo collega al sottostante citoscheletro di actina facendo aumentare la forza adesiva e la coesione piastrinica. La segnalazione integrinica del recettore GPIIb/IIIa è seguita da un'aggregazione potente ed irreversibile, chiamata secondaria. L'aggregazione porta alla formazione del trombo piastrinico, detto anche trombo bianco o trombo primario.

I segnali di attivazione piastrinica generati dall'adesione primaria o dagli agonisti solubili portano, attraverso la via dell'inositolo trifosfato, alla liberazione del calcio dal sistema tubulare denso che ne rappresenta la riserva intracellulare. La deplezione di calcio da questo deposito è percepita da una molecola d'interazione stromale (STIM1), la quale oligomerizza e attiva il canale del calcio controllato dalla proteina Orai1 localizzata sulla membrana citoplasmatica, consentendo un influsso di calcio extracellulare e amplificando ulteriormente l'attivazione delle piastrine:

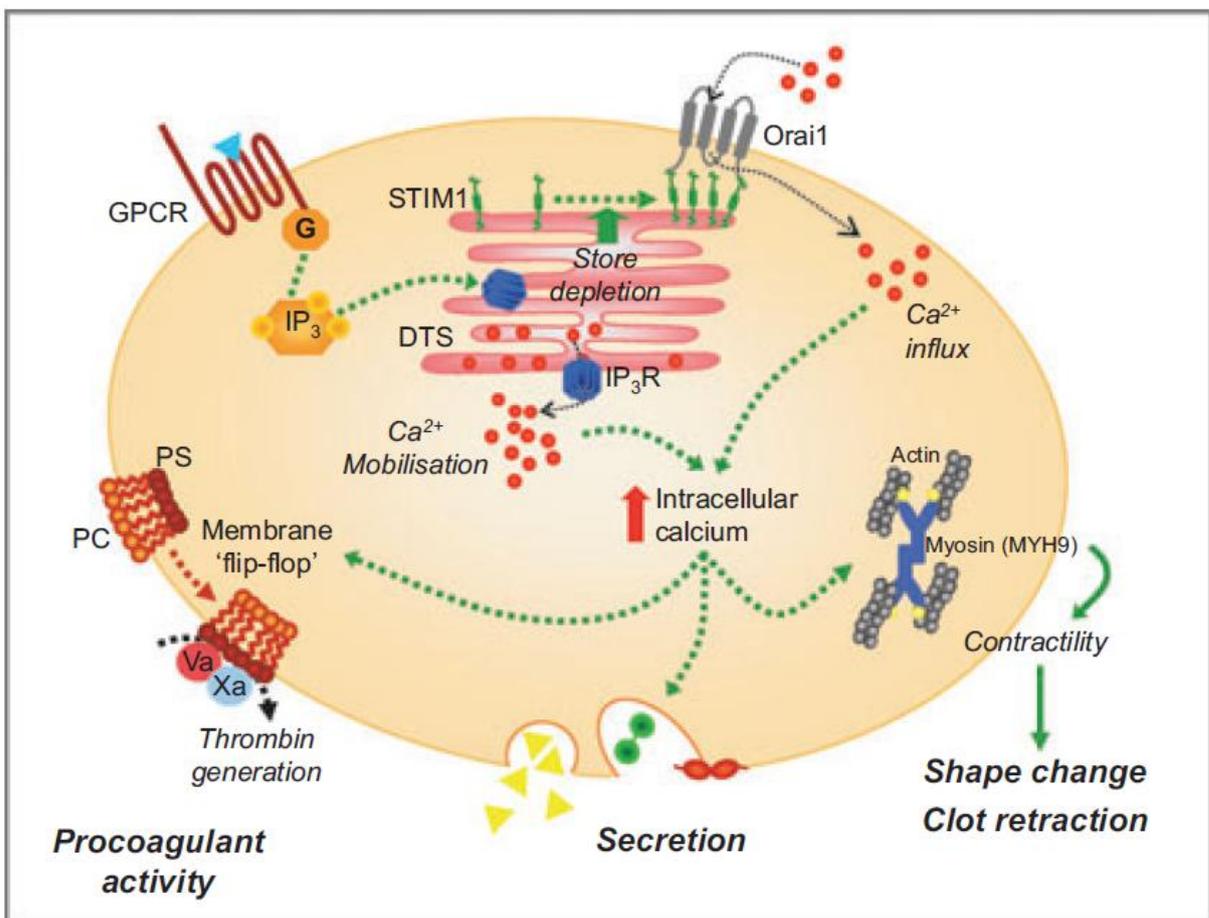


FIGURA 1.9: Segnalazione del calcio e funzione piastrinica.

- Continuano le funzioni piastriniche dovute all'attivazione, come la secrezione dei granuli;

- Viene reso “disponibile” a livello della membrana piastrinica il fattore Piastrinico 3 (F.P.3). Il F.P.3 è un fosfolipide (fosfatidilserina) che nella piastrina a riposo è situato principalmente sul versante interno della membrana plasmatica ed è quindi inaccessibile. Con il “flip-flop” delle fosfatidilserine si ha un riassetto della membrana plasmatica mediante il quale viene esposto all'esterno. Il F.P.3 è implicato in alcune reazioni della coagulazione: infatti la membrana piastrinica particolarmente arricchita di fosfatidil-serina costituisce la superficie negativa ottimale per l'assemblaggio dei complessi multimolecolari critici per l'avvio ed il mantenimento del processo di coagulazione.
- Si attiva la “myosin light chain kinase” (MLCK) la quale fosforila le catene leggere della miosina, facendole interagire con l'actina. Questa interazione provoca la modificazione della forma delle piastrine e la retrazione del coagulo. Il cambiamento di forma consiste in una veloce trasformazione dalla classica forma discoidale della piastrina circolante a riposo ad una forma irregolarmente sferica con pseudopodi, dapprima corti, poi sempre più lunghi, fino a rendere possibile il contatto tra piastrine vicine, che assumono un aspetto a sfera spinosa. In questo fenomeno è coinvolta la maggior parte delle molecole del citoscheletro. Si ha la destrutturazione del fascio equatoriale dei microtubuli e la loro parziale depolimerizzazione, seguita da polimerizzazione e contrazione dei filamenti di actina associati alle membrane. Sotto la membrana piastrinica e in connessione con l'estremità interna delle glicoproteine si trova il citoscheletro, costituito da microfilamenti, microtubuli e strutture contrattili del sistema actina-miosina, deputate sia al mantenimento della forma ellissoidale delle piastrine a riposo che alla formazione degli pseudopodi e della centralizzazione del granulomero nel corso dell'attivazione piastrinica. I singoli microfilamenti vengono generalmente organizzati e integrati dalle proteine leganti l'actina (ABP, Actine Binding Proteins). Questa famiglia di proteine si può suddividere in sottoclassi a seconda del tipo di interazione che intrattiene con l'actina:
 - Proteine che favoriscono la formazione dei filamenti: profilina (si lega ai singoli monomeri di actina e la sua importanza è dovuta alla funzione di controllo, sia spaziale che temporale, della crescita dei microfilamenti di actina, essenziale nel processo del movimento e delle variazioni della forma cellulare);
 - Proteine che ostacolano la formazione dei filamenti: severina e timosina (si legano anch'esse ai singoli monomeri di actina), gelsolina che taglia il

filamento e si lega all'estremità "+" appena formata, incappucciandola, katanina;

- Proteine che organizzano i microfilamenti in fasci paralleli: fimbrina, α -actinina, tropomiosina, fodrina, villina;
- Proteine che organizzano i microfilamenti in reticoli: filamina;
- Proteine che collegano i microfilamenti alla membrana plasmatica: spettrina, distrofina, vinculina, talina, tensina;
- Proteine che si muovono sui microfilamenti: miosina.

1.6.4 Piastrine e coagulazione

Tra le piastrine e la cascata della coagulazione c'è un importante "crosstalk". I fosfolipidi della membrana piastrinica costituiscono una superficie negativa ottimale per l'assemblaggio dei fattori di coagulazione: il complesso tenasi e complesso protrombinasi. Quest'ultimo complesso è deputato alla produzione di trombina che, agendo sui propri recettori presenti sulla membrana delle piastrine, contribuisce alla loro attivazione. Alla fine della cascata della coagulazione si ha produzione, polimerizzazione e stabilizzazione di fibrina. Questa, formando una vera e propria rete polimerica, va a stabilizzare e rinforzare il trombo piastrinico. Le molecole di fibrina si intrecciano fittamente tra di loro dando origine a una matrice fibrosa, una sorta di ragnatela proteica che immobilizza la porzione fluida del sangue, provocandone la solidificazione in una massa gelatinosa. Via via che nella ragnatela restano imprigionati i globuli rossi, la densità del coagulo aumenta. Anche i globuli bianchi vengono catturati. Le piastrine, inoltre, si attaccano al reticolo fibroso ed emanano estroflessioni appiccicose che si agganciano l'una con l'altra.

1.6.5 Piastrine e aterosclerosi

È stato dimostrato che le piastrine svolgono, oltre alla funzione emostatica, una funzione regolatrice in numerosi processi fisiologici e patologici, tra cui l'aterosclerosi. Esistono infatti prove rilevanti a favore di un possibile ruolo del "platelet derived growth factor" (PDGF), contenuto negli α -granuli e liberato dalle piastrine, nel modulare la proliferazione e la migrazione nell'intima delle cellule muscolari della tunica media di vasi danneggiati. Tali dati confermano il ruolo di rilievo del PDGF nella regolazione delle funzioni delle cellule muscolari lisce e del rimodellamento

vascolare. Altri fattori piastrinici implicati nella progressione della lesione aterosclerotica sono il “fattore di permeabilità vascolare”, responsabile dell’edema dell’intima, e l’enzima elastasi, responsabile dell’elastinlisi della parete vascolare.

1.7 Trattamento della Sindrome Coronarica acuta^[10]

La terapia della malattia coronarica si avvale di farmaci che mirano a ridurre il consumo di ossigeno del cuore, andando ad agire sui vasi sanguigni, sul numero dei battiti cardiaci e sulla fluidità del sangue. Se tali medicamenti non sono sufficienti a dominare l’ischemia, è necessario prendere in considerazione altri presidi terapeutici di tipo chirurgico, come per esempio l’angioplastica coronarica.

Gli obiettivi della terapia farmacologica sono:

- Preservare la pervietà dell’arteria coronarica;
- Migliorare il flusso sanguigno coronarico;
- Ridurre la domanda di ossigeno del miocardio.

Le linee guida europee e americane prevedono, per la cura della ACS, una terapia antiaggregante combinata di Acido Acetilsalicilico (ASA) e Clopidogrel. Questa associazione è indicata per il trattamento immediato delle maggior parti di ACS in quanto mantiene pervio il vaso e limita le complicazioni trombotiche, anche nei pazienti sottoposti a posizionamento di stent con un intervento percutaneo coronarico (PCI). La terapia della doppia antiaggregazione è utilizzata inoltre in tutti i tipi di ACS come trattamento a lungo termine per la prevenzione di un secondo attacco ischemico.

Le linee guida vanno intese come raccomandazioni di comportamento clinico, prodotte con lo scopo di fornire a medici e pazienti un supporto per scegliere le modalità di assistenza più appropriate in specifiche circostanze cliniche. La messa a punto di linee guida ha l’obiettivo di offrire la possibilità di una diagnosi e una terapia tempestive. Nella valutazione iniziale del paziente le indagini diagnostiche forniscono una stima della probabilità di cardiopatia ischemica in base alle caratteristiche cliniche (tipicità della sintomatologia, andamento clinico recente, esame fisico), ai dati anamnestici (storia di cardiopatia ischemica, fattori di rischio coronarico, altre localizzazioni della malattia aterosclerotica, età, sesso) ed alla presenza di segni elettrocardiografici di ischemia nell’ECG. Le indagini di tipo prognostico valutano invece il rischio di eventi ischemici maggiori a breve termine.

La scelta del trattamento da praticare, i tempi di intervento e la sede in cui iniziare il trattamento variano a seconda della presentazione clinica e del profilo prognostico del paziente. La terapia dei pazienti con coronopatia ischemica può fare affidamento su un'ampia gamma di farmaci, la cui scelta dipende dalle caratteristiche del paziente da trattare e dalla presenza di eventuali controindicazioni.



FIGURA 1.10: Varietà della terapia farmacologica nella ACS.

Il sollievo del dolore è di fondamentale importanza. La sintomatologia dolorosa è infatti associata all'attivazione del sistema simpatico che provoca vasocostrizione e aumenta il carico di lavoro del cuore. La somministrazione endovenosa di analgesici oppiacei è il trattamento più comunemente utilizzato in questo contesto.

La depressione delle vie respiratorie può richiedere supporto ventilatorio. Viene somministrato ossigeno in caso di ipossia, insufficienza cardiaca o shock.

Per risolvere la crisi in atto possono essere utilizzati i nitrati al fine di ridurre l'ischemia ed alleviare il dolore.

Una terapia aggiuntiva può prevedere l'utilizzo di β-bloccanti adrenergici come (Metoprololo, Esmololo) e di calcioantagonisti (Diltiazem, Verapamil) che nel complesso determinano un aumento del tempo di perfusione coronarica e una diminuzione della richiesta di ossigeno da parte del miocardio.

Gli ACE-inibitori vengono impiegati soprattutto nella terapia dell'ipertensione arteriosa e possono essere validi coadiuvanti nella terapia in quanto riducono il postcarico e diminuiscono la tensione parietale del muscolo cardiaco.

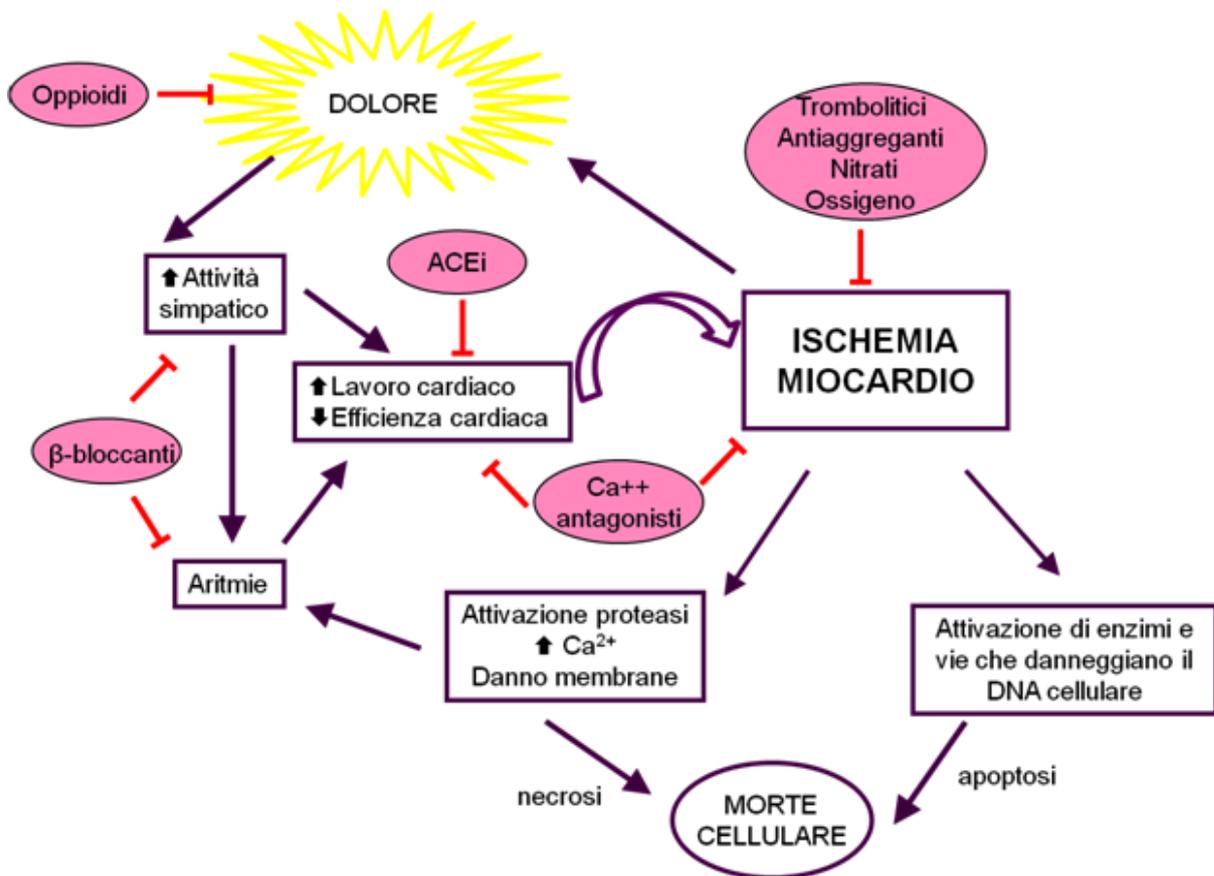


FIGURA 1.11: Effetti dell'ischemia del miocardio^[11].

Anche le Statine possono essere usate come terapia coadiuvante, in quanto l'associazione tra ipercolesterolemia e rischio di Sindrome Coronarica acuta si è ormai ben caratterizzata. Le statine inibiscono la sintesi di colesterolo endogeno ed hanno consentito di osservare, quasi costantemente, che al trattamento ipolipemizzante si accompagna una riduzione del rischio.

Altri farmaci ad azione antiplastrinica sono gli inibitori della glicoproteina GPIIb/IIIa, indispensabile nel processo di aggregazione piastrinica, mentre farmaci ad azione antitrombotica sono l'eparina e gli inibitori diretti della trombina (IDT). L'Eparina agisce legando e attivando la molecola dell' antitrombina-III che, in seguito a cambiamento conformazionale, aumenta la sua affinità per la trombina, la lega e ne blocca in modo irreversibile il sito catalitico. Inoltre il complesso eparina/antitrombina-III inibisce, sebbene con minore efficienza, anche altri fattori della coagulazione, tra cui, F-Xa, F-IXa, F-XIa e F-XIIa. Le eparine a basso peso molecolare (LMWH) derivano dall'eparina non frazionata (UFH) e rispetto ad essa presentano numerosi vantaggi farmacologici: inattivano principalmente il fattore Xa, hanno una minore azione sulla trombina e presentano un minor legame alle piastrine, riducendo

l'incidenza di trombocitopenia, sviluppata per aggregazione piastrinica indotta da eparina^[12].

Gli IDT rappresentano una nuova classe di farmaci anticoagulanti, capaci di interagire direttamente con la trombina inibendo il suo legame con il fibrinogeno e, a differenza dell'eparina, sono capaci di inibire anche la trombina attivata quando è legata alla fibrina. Gli IDT possiedono anche un'azione antiplastrinica poiché riducono l'attivazione piastrinica trombino-mediata^[13].

1.7.1 Terapia della doppia antiaggregazione

Le piastrine sono fondamentali nella genesi della trombosi e numerose ricerche dimostrano il loro ruolo nella patogenesi della malattia aterosclerotica e delle sue complicanze ischemiche: costituiscono perciò un bersaglio fondamentale della terapia farmacologica antitrombotica.

L'**Acido Acetilsalicilico** (ASA) esplica i suoi effetti antitrombotici attraverso l'inibizione irreversibile dell'enzima cicloossigenasi-1 (COX-1) mediante acetilazione a livello del gruppo idrossilico appartenente a un residuo di serina in posizione 529.

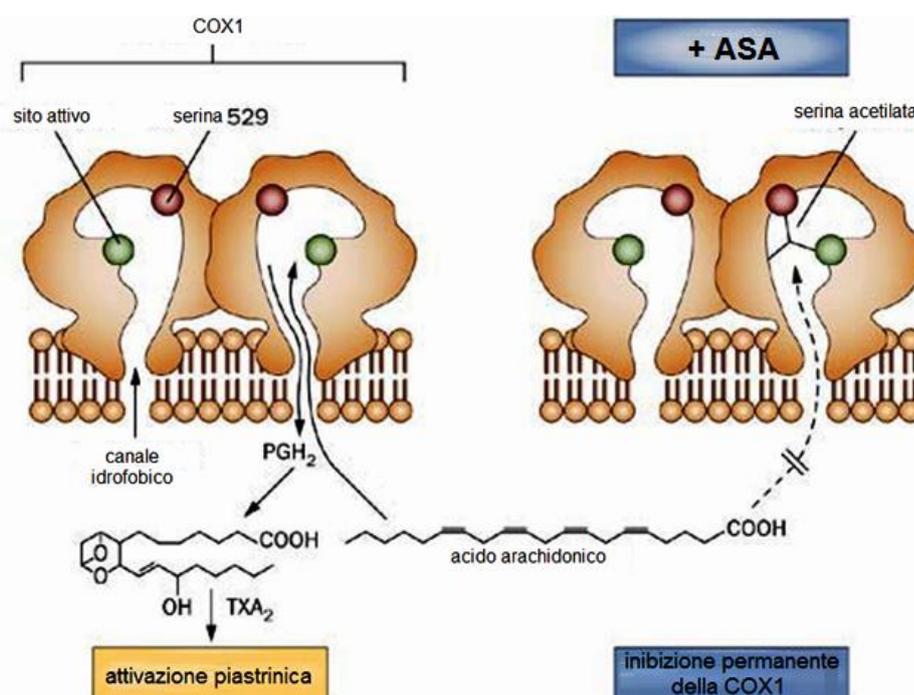


FIGURA 1.12: Meccanismo d'azione dell'ASA.

L'acetilazione di questo sito chiave dell'enzima provoca il blocco della sintesi di trombossano 2 (TxA₂), uno dei principali mediatori nell'amplificazione dell'attivazione

piastrinica. La serina acetilata non permette al substrato, l'acido arachidonico, di accedere al sito catalitico dell'enzima e la reazione enzimatica risulta bloccata.

In più le piastrine, essendo anucleate, non sono in grado di sintetizzare nuovo enzima e l'inibizione persiste per tutta la vita della piastrina (circa 7-10 giorni). Questo effetto è responsabile della lunga durata dell'azione terapeutica dell'ASA nonostante la sua emivita plasmatica di soli 20 minuti.

Il **Clopidogrel** è un profarmaco assorbito nell'intestino e attivato dagli isoenzimi epatici del citocromo P450. La conversione di Clopidogrel nel suo metabolita attivo richiede due fasi sequenziali di ossidazione. Il primo passo porta alla formazione di 2-oxo-Clopidogrel, seguita dalla conversione del 2-oxo-Clopidogrel nel metabolita attivo. Il metabolita attivo contiene un gruppo tiolo che si lega a una cisteina libera sul recettore P2RY12, bloccandone irreversibilmente l'attivazione da parte dell'ADP. Il blocco di questo recettore interrompe sia una delle vie importanti che porta all'aggregazione secondaria, sia il segnale inibitorio dell'ADP sulla funzione dell'adenilato ciclasi, che a sua volta media l'abbassamento dei livelli intracellulari di AMP-ciclico. Elevati livelli di AMP-ciclico sostengono eventi biochimici che innalzano la soglia di attivazione delle piastrine. Di conseguenza questo farmaco riduce in modo significativo la stimolazione delle piastrine indotta dai vari attivatori. La biotrasformazione del Clopidogrel da parte degli isoenzimi epatici del citocromo P450 è necessaria per la sua attivazione.

Anche la modifica irreversibile indotta dal Clopidogrel sul recettore piastrinico dell'ADP è persistente per tutta la durata della vita della piastrina ed il recupero della normale funzione avviene ad una velocità proporzionale al ricambio piastrinico.

1.7.2 Fenomeno della resistenza farmacologica^{[14][15]}

Nonostante la doppia antiaggregazione ASA/Clopidogrel costituisca la terapia standard per il trattamento delle Sindromi Coronariche acute, una percentuale che si aggira tra il 10 e il 20% dei pazienti trattati non risponde, definendosi perciò resistenti. Questi non sembrano ricevere alcuna protezione dalla terapia antiaggregante e incorrono nuovamente in un evento ischemico.

Molti studi clinici hanno infatti dimostrato come la ricorrenza di questi eventi sia direttamente correlata ad una persistente attivazione piastrinica nonostante la terapia antiaggregante.

In generale, la resistenza ai farmaci può essere definita come l'incapacità di un farmaco di agire sul proprio target.

Nel caso della combinazione ASA/Clopidogrel però, il termine resistenza può essere riferito a diversi punti di osservazione:

- In una visione farmacologica, essa è l'incapacità dell' ASA nell'inibire la COX-1 e nel prevenire la formazione di TxA2 e del Clopidogrel nell'inibire il recettore P2RY12;
- Dal punto di vista degli effetti biologici è l'incapacità di prevenire l'aggregazione piastrinica, misurata in termini di analisi della funzione piastrinica;
- Se ci basiamo infine sull'effetto epidemiologico è l'incapacità di prevenire gli eventi cardiovascolari acuti.

In alcuni pazienti l'apparente inefficacia della terapia della doppia antiaggregazione non è il risultato di una resistenza vera e propria, ma dell'incapacità del farmaco di raggiungere il target in quantità sufficiente. Si parla quindi di **pseudo resistenza**. Questa può essere dovuta alla "non compliance" alla terapia giornaliera oppure ad un dosaggio inadeguato. Un aumento del turnover piastrinico può far sì che la somministrazione giornaliera di ASA e Clopidogrel non sia sufficiente a bloccare in modo efficace la sintesi TxA2 e il recettore P2RY12. Inoltre una qualsiasi situazione che comporti la riduzione di assorbimento e biodisponibilità rientra nella categoria della pseudo resistenza.

La biodisponibilità dell'ASA può essere ridotta dalla somministrazione di formulazioni gastro-resistenti, oppure dalle interazioni con altri farmaci, per esempio Ibuprofene e Naprossene ne limitano l'accesso al sito di legame.

Durante la conversione del Clopidogrel nel suo metabolita attivo c'è una reazione metabolica concorrente per la quale circa l'85% del farmaco è idrolizzato dalle esterasi in un derivato inattivo. La bassa percentuale di metabolita attivo che si forma può essere insufficiente per esplicare la sua attività sul recettore dell'ADP piastrinico. Inoltre, la ridotta biodisponibilità del Clopidogrel può essere causata da variazioni del metabolismo del citocromo P-450, oppure da interazioni con altri farmaci che competono per il processo di metabolizzazione mediato dal sistema del citocromo P-450. Una compromissione del metabolismo del Clopidogrel è stata associata anche a polimorfismi a carico dei geni che codificano per:

- Gli enzimi del sistema del citocromo P-450, in particolare, sono stati studiati quelli delle isoforme 2C19, 3A4 e 3A5;
- Il recettore ABCB1, coinvolto nella assorbimento intestinale del profarmaco Clopidogrel;

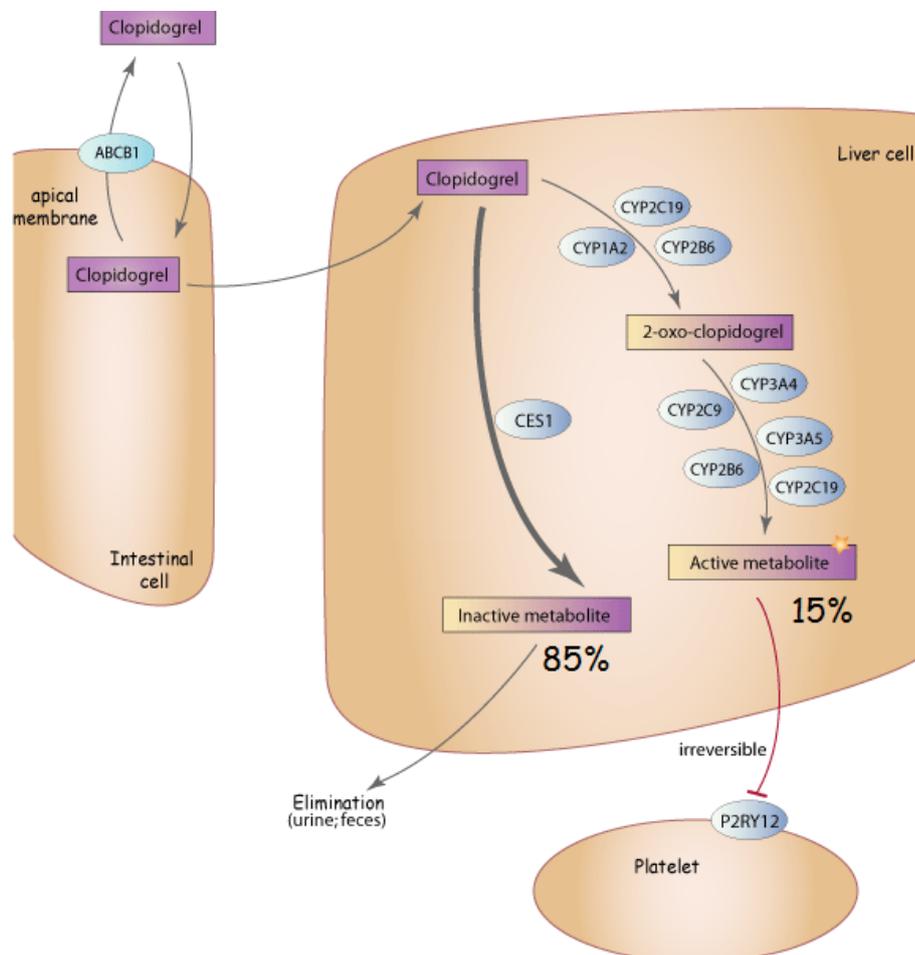


FIGURA 1.13: Assorbimento, metabolismo e attivazione del Clopidogrel.

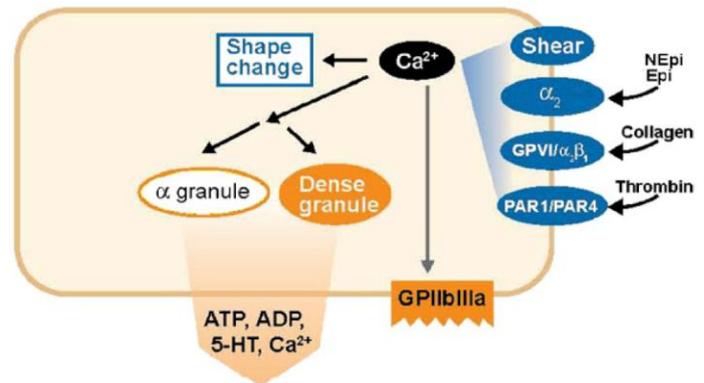
Le piastrine possono essere attivate attraverso vie alternative, indipendenti dal TxA2 e dall'ADP, perciò anche in questo caso non si può parlare di resistenza, perché l'attivazione non dipende dall'inefficacia dell'ASA e del Clopidogrel.

È più appropriato utilizzare il termine di **mancata inibizione della funzione piastrinica**.

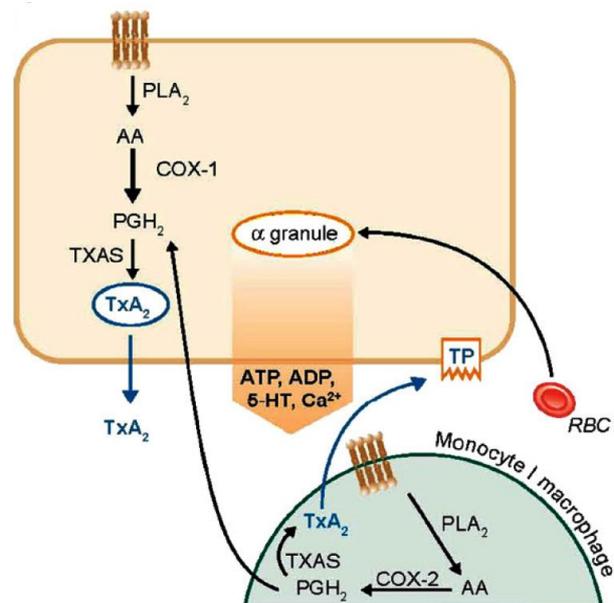
- Influenza delle catecolamine. L'esercizio fisico, lo stress e il fumo aumentano i livelli di adrenalina e noradrenalina circolanti. Queste agendo sui propri recettori

α_2 -adrenergici presenti sulla membrana piastrinica, aumentano la concentrazione di calcio intracellulare e favoriscono conseguentemente l'attivazione piastrinica.

- Ipersensibilità a collagene e trombina. La stimolazione dell'integrina GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$) e della glicoproteina GPVI da parte del collagene e dei recettori PAR1/PAR4 da parte della trombina portano all'attivazione delle piastrine. Un aumento della sensibilità ad uno solo di questi mediatori può attivare la piastrina nonostante la terapia con ASA/Clopidogrel.



- Interazioni con gli elementi del sangue intero. Gli eritrociti facilitano l'aggregazione piastrinica intensificando la sintesi di TxA₂, aumentando l'attività della fosfolipasi A₂ in modo da permettere l'accumulo di acido arachidonico e inducendo la degranulazione piastrinica.

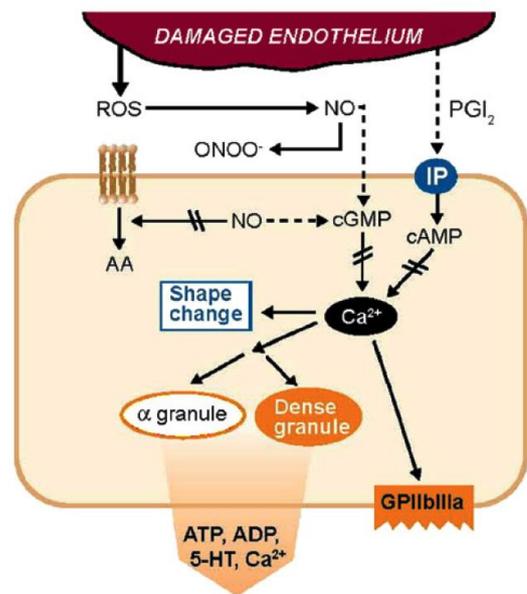


La presenza di monociti/macrofagi può indurre l'aggregazione piastrinica quando esprimono la COX-2, forma inducibile della COX. La COX-2 può essere sempre in grado di produrre i precursori del TxA₂, convertiti poi in TxA₂ dalle piastrine e dagli stessi monociti/macrofagi.

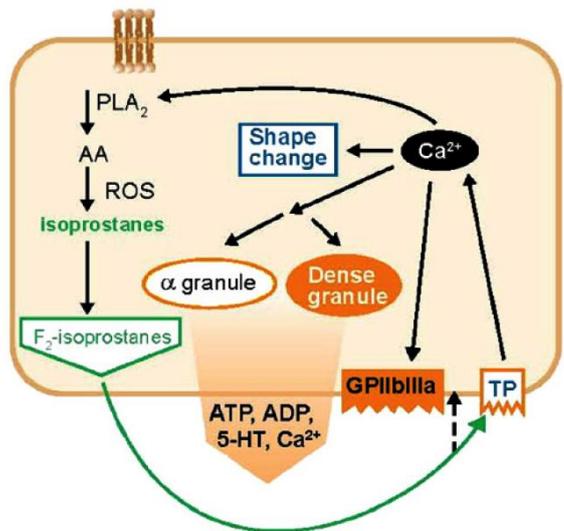
- Disfunzione endoteliale. L'ossido nitrico (NO) è un radicale libero prodotto principalmente dall'endotelio che gioca un ruolo importante nella regolazione dell'attività di inibizione piastrinica, riducendo la concentrazione di calcio intracellulare. NO attiva anche cinasi specifiche che inibiscono la liberazione di acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana, con conseguente riduzione della produzione di TxA₂. Diverse condizioni, come l'aterosclerosi ma anche il diabete mellito, l'ipercolesterolemia, l'ipertensione e il fumo, danneggiano l'endotelio, il

quale può perdere la capacità di rilasciare NO. Questa disfunzione endoteliale genera anche maggiore quantità di specie reattive dell'ossigeno che inattivano l'NO.

Le piastrine producono NO e, anche se il ruolo è minore rispetto all'NO prodotto dall'endotelio, il suo effetto inibisce il reclutamento delle piastrine in risposta ad attivazione piastrinica. Tuttavia, i fattori che inducono la disfunzione endoteliale possono anche compromettere la capacità delle piastrine di produrre e rilasciare NO. L'insufficienza dell'NO che ne risulta contribuisce all'attivazione piastrinica e la conseguente trombosi arteriosa, che concorrono al fenomeno della resistenza.



- Stress ossidativo e formazione di isoprostano. Uno stato di stress ossidativo è definito da uno squilibrio tra ossidanti e antiossidanti in favore di un eccesso di ossidanti, che possono danneggiare biomolecole. Danni all'acido arachidonico mediante perossidazione da parte di reazione catalitica non enzimatica di radicali liberi porta alla formazione di isoprostani, una famiglia di composti simili alle prostaglandine. Gli isoprostani, in particolare isoprostani-F2 come 8-iso-PGF2a, possono indurre vasocostrizione e attivazione piastrinica legandosi al recettore per il trombossano (TP). Questi composti hanno una maggior concentrazione in determinate condizioni associate con la resistenza alla terapia con ASA/Clopidogrel, tra cui il fumo, il diabete mellito e l'ipercolesterolemia.



- Variabilità genetica. I recettori piastrinici sono soggetti a variabilità genetica. Le piastrine attivate legano il fibrinogeno o il fattore di von Willebrand attraverso il cambiamento conformazionale dell'integrina GPIIb/IIIa ($\alpha 2\beta 3$). Si sospetta che

un dimorfismo (P1A1 e P1A2) sull'allele $\beta 3$ di questo recettore sia coinvolto nel fallimento della terapia nell'inibire la funzione piastrinica.

Nonostante le cause responsabili del fallimento della terapia con ASA e Clopidogrel nell'inibire l'aggregazione piastrinica siano generalmente sconosciute, nel singolo individuo alcune **condizioni dello stato del paziente** sono correlate positivamente con questo fenomeno. Queste includono sesso femminile, età avanzata, diabete, ipercolesterolemia e obesità (definita come indice di massa corporea superiore a 29 kg/m²).

La **vera resistenza** all'**ASA** riguarda la sua incapacità di interagire con il proprio bersaglio farmacologico, il residuo di serina della COX-1 e di bloccare in modo efficace la produzione TxA₂. In alcuni pazienti questo può essere dovuto ad un disturbo del metabolismo proteico, come per esempio la glicosilazione delle proteine osservato nei pazienti diabetici, che impedisce l'acetilazione della COX-1 piastrinica da parte dell'ASA. Un'altra causa di resistenza può essere la mutazione del gene che codifica per la COX-1. L'inefficienza dell'ASA può infine essere dovuta al tentativo delle piastrine nell'aggirare l'inibizione della COX-1 attraverso meccanismi di compensazione. Ad esempio, nei soggetti sani, la COX-2 è espressa solo da una piccola percentuale (meno del 10%) di piastrine. Tuttavia, l'espressione è notevolmente aumentata (fino al 60% delle piastrine) in condizioni cliniche associate ad un alta rigenerazione delle piastrine. Nonostante l'inibizione della COX-1, la presenza di COX-2 nelle piastrine consente la produzione TxA₂ e se in quantità sufficienti causa aggregazione piastrinica.

Le implicazioni cliniche della vera resistenza al **Clopidogrel** sono sconosciute. Una possibile causa è associata ad un polimorfismo genetico del recettore piastrinico dell'ADP, P2Y₁₂.

1.7.3 Strumenti di laboratorio per lo screening dell'efficacia degli agenti antiplastrinici^[16]

I metodi di laboratorio usati per misurare la risposta alla terapia antiaggregante si basano sull'analisi della funzionalità piastrinica. Questa in vivo viene solitamente misurata con il tempo di emorragia, mentre la misurazione in vitro può avvenire con diversi test di laboratorio.

- **L'aggregometria a trasmissione** di luce misura l'aumento della trasmissione luminosa attraverso una sospensione piastrinica quando le piastrine aggregano in risposta ad un agonista. Ha però molti limiti che non lo rendono un test ideale per misurare l'effetto dei farmaci antiplastrinici. L'aggregometria a trasmissione di luce è infatti una tecnica che richiede molto tempo e può essere effettuata solo in laboratori specializzati. Inoltre, i risultati che si ottengono possono essere influenzati da molte variabili sia pre-analitiche che analitiche che rendono questo test poco accurato e riproducibile. Un altro limite è dato dalla mancanza di standardizzazione, che rende i risultati difficilmente confrontabili con quelli ottenuti da un altro laboratorio.
- **L'aggregometria ad impedenza** misura la variazione di impedenza elettrica che avviene quando le piastrine aggregano attorno ad un elettrodo di platino, immerso in sangue intero anticoagulato, dopo aver aggiunto un agente agonista. Questo test ha gli stessi limiti dell'aggregometria a trasmissione di luce ed è stato scarsamente utilizzato nei pazienti in terapia antiaggregante.
- Il **PFA-100®** può essere considerato il corrispettivo in vitro del tempo di emorragia. Un campione di sangue anticoagulato viene aspirato attraverso un capillare (che mima la resistenza di una piccola arteria), dotato di una piccola apertura sulla parete (che mima il danno della parete vasale) ricoperta di collagene e ADP oppure di collagene ed adrenalina. L'aggregato piastrinico si forma a livello dell'apertura e gradatamente la chiude, in un tempo di chiusura (espresso in secondi) che viene registrato dallo strumento.
- **“Utegra Rapid Platelet Function Assay (RPFA)-Verify-Now”** è un test semplice che misura l'agglutinazione di biglie rivestite da fibrinogeno da parte di piastrine stimolate da un agonista in sangue anticoagulato. Inizialmente questo test era stato concepito per valutare l'effetto antiplastrinico degli inibitori della GP IIb/IIIa. Successivamente è stato modificato per aumentare la sensibilità e la specificità ai due principali farmaci antiplastrinici, l'ASA (RPFA-Verify-Now ASA) e il Clopidogrel (RPFA-Verify-Now P2Y12). Quest'ultimo è probabilmente più specifico dell'aggregazione piastrinica indotta da ADP, misurata con l'aggregometro a trasmissione di luce, nel monitorare il trattamento con Clopidogrel.

- “**Cone-and Plate(let) Analyzer**” (**CPA**) è un viscosimetro che misura l’adesione e l’aggregazione piastrinica in un flusso laminare sottoposto ad uno “shear” costantemente elevato.
- La **citometria a flusso (CFM)** è una tecnica che consente la misurazione delle caratteristiche chimico-fisiche individuali di un elevato numero di cellule in sospensione. Le cellule sono forzate ad allinearsi mediante un flusso laminare e ad attraversare individualmente un punto di misura dove interagiscono con il fascio di luce del sistema di eccitazione. Da questa interazione vengono generati dei segnali dipendenti dalle caratteristiche fisiche delle cellule (diametro, volume, rapporto nucleo/citoplasma, granulosità interna, rugosità di superficie) e dalla presenza di marcatori fluorescenti sulla loro superficie, nel citoplasma o nel loro nucleo. Nonostante richieda uno strumento sofisticato e costoso, il vantaggio è che consente di ottenere molte informazioni in breve tempo e con una quantità di sangue minima (5-10 µL di sangue intero o PRP per campione).
- “**Platelet VASP®**” è un test citofluorimetrico che misura il grado di inibizione della fosforilazione di VASP da parte dell’ADP, mediata dal P2Y12 attraverso l’inibizione dell’adenilato ciclasi. Esso rappresenta un test altamente specifico per la misurazione dell’effetto dei farmaci che inibiscono il recettore P2Y12. Esiste una buona correlazione tra lo studio della fosforilazione della VASP e l’aggregazione piastrinica indotta da ADP nell’individuare l’inibizione del P2Y12. La fosforilazione della VASP correla con l’inibizione dei recettori, mentre lo stato non fosforilato correla con la forma attiva dei recettori. VASP è una proteina piastrinica non fosforilata allo stato basale. La fosforilazione di VASP è regolata dalla cascata dell’AMP-ciclico.
- La **tromboelastografia (TEG)** misura il cambiamento della viscosità elastica che avviene durante la formazione del coagulo nel sangue intero. Essa è dunque influenzata dalla funzionalità piastrinica, dai fattori della coagulazione, dagli inibitori naturali della coagulazione e dalla fibrinolisi.
- La **misurazione nel siero** del metabolita stabile trombossano B2 (**TxB2**) riflette la capacità complessiva delle piastrine di sintetizzare TxA2. Questo è il test più specifico per misurare l’effetto farmacologico dell’ASA.
- La misurazione del metabolita del TxB2, **11-deidro-trombossano B2 urinario**, è un altro test che permette di determinare la sintesi in vivo del trombossano A2. Tuttavia, la determinazione di questo metabolita riflette la produzione sistemica

del TxA2, che non avviene esclusivamente a livello delle piastrine. È stato calcolato, infatti, che circa il 30% dell'11-deidro-trombossano B2 deriva da fonti extra-piastriniche.

Nonostante la varietà di prove disponibili, non esiste un test standard di riferimento per misurare l'attivazione piastrinica. Le definizioni di resistenza all'ASA e al Clopidogrel variano a seconda di quale test è utilizzato e studi mirati a valutare l'efficacia clinica di questi farmaci hanno scoperto che alcuni pazienti venivano identificati come "non responder" da un metodo di analisi, mentre risultavano "responder" con altri.

SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di Tesi è stato svolto all'interno del laboratorio di "Proteomica e Tecnologie Genomiche" dell' Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa e fa parte di un progetto strategico della ricerca finalizzata del Ministero della Salute chiamato: "Activity of Platelets after Inhibition and Cardiovascular Events - APICE". Il progetto APICE si pone come obiettivo quello di valutare con un'indagine proteomica l'espressione di proteine piastriniche nelle diverse fasi cliniche della Sindrome Coronarica acuta (ACS), in particolare mira a definire i differenti profili proteici tra pazienti che rispondono e che non rispondono alla terapia farmacologica.

Lo scopo principale di questa Tesi è stato quello di sviluppare una metodologia riproducibile, valida per il trattamento e la manipolazione dei campioni clinici, per la loro analisi strumentale e l'elaborazione finale dei dati, tale che in seguito possa essere adottata come metodo standard di analisi per tutti i campioni del progetto APICE. Questa Tesi sperimentale, perciò, ne rappresenta il punto di partenza.

I campioni, forniti dall'Azienda Ospedaliera Universitaria di Careggi, Firenze, contengono il sedimento delle piastrine isolate dal sangue periferico dei diversi pazienti affetti da ACS e reclutati appositamente. Per ogni paziente sono stati effettuati tre prelievi, il primo al momento del ricovero (fase acuta della ACS), il secondo ed il terzo rispettivamente dopo una settimana e un mese di terapia antiaggregante con ASA/Clopidogrel.

Le piastrine sono di facile ottenimento con prelievi scarsamente invasivi, risultando perciò un ottimo campione per la caratterizzazione della patologia coronarica.

Mancando di nucleo e quindi di DNA genomico e avendo livelli molto bassi di mRNA, non possono essere analizzate utilizzando gli strumenti convenzionali della biologia molecolare (genoma e trascrittoma). Sebbene l' mRNA piastrinico sia ben correlato con fattori costitutivamente espressi, l'analisi molecolare del trascrittoma piastrinico potrebbe essere inficiata dal costante di decadimento di mRNA in assenza di nuova trascrizione^[17].

La proteomica, al contrario, si rivela la tecnica di elezione per lo studio delle piastrine. Infatti, i fenomeni che accompagnano l'adesione, l'attivazione e l'aggregazione piastrinica avvengono grazie al susseguirsi di tappe di propagazione di segnali molecolari che vanno dall'interno della cellula verso l'esterno e viceversa. Questi processi di comunicazione cellulare coinvolgono direttamente le proteine. La proteomica permette sia l'identificazione delle proteine espresse che il riconoscimento delle eventuali modificazioni post-traduzionali.

L'analisi proteomica è resa possibile dalla combinazione di tecniche ad alta risoluzione quali la spettrometria di massa e la separazione con cromatografia liquida HPLC, collegate a moderni strumenti di bioinformatica quali "sequence database", "data mining", "sequence annotation", "gene ontology", che consentono l'identificazione di centinaia di proteine in un singolo esperimento, la loro classificazione e l'interpretazione del loro significato biologico.

PARTE SPERIMENTALE

3.1 Estrazione delle proteine

La procedura per ottenere l'estratto proteico richiede la rottura delle cellule in uno specifico tampone, seguita da centrifugazione per rimuovere i residui insolubili. Il tampone di estrazione deve assicurare un'estrazione completa di tutte le proteine solubili e mantenere un pH leggermente basico (8,5). Affinché l'estratto comprenda anche le proteine integrali di membrana abbiamo utilizzato un tensioattivo non ionico capace di disgregare le strutture lipidiche delle membrane e di liberare il contenuto proteico. Inoltre, è importante la presenza di un anticoagulante come l'acido etilendiaminotetracetico (EDTA), che previene la formazione del coagulo piastrinico^[18].

La rottura delle cellule è stata realizzata mediante l'utilizzo di un sonicatore. Nella sospensione cellulare viene immersa la sonda metallica in grado di emettere onde sonore ad altissima frequenza (ultrasuoni). Le elevate sollecitazioni locali indotte da queste onde (di compressione e rarefazione) causano la lisi rapida e completa delle membrane piastriniche.

3.2 Determinazione proteica

Per determinare il contenuto proteico sono stati utilizzati saggi colorimetrici di due tipi. Per entrambi abbiamo utilizzato piastre da 96 pozzetti dotati di fondo piano trasparente alla luce nelle lunghezze d'onda della regione UV-VIS. La lettura dell'assorbimento è stata effettuata introducendo la piastra in un apposito lettore. Lo strumento permette di selezionare filtri di lunghezze d'onda fissa, a seconda del tipo di colorazione sviluppata nel saggio analitico di cui si debba effettuare la misura. Entrambi i saggi colorimetrici, pur offrendo colorazioni diverse, impongono l'uso del medesimo filtro che lascia passare luce con lunghezza d'onda di 590 nm. I valori di assorbanza ottenuti vengono convertiti in concentrazione facendo riferimento ad una curva di taratura. Questa curva viene ripetuta ad ogni saggio utilizzando soluzioni

diverse a concentrazione nota di una proteina commercialmente disponibile come l'albumina bovina (BSA).

Il primo metodo, saggio del **BCA**, abbina la riduzione del rame rameico (Cu^{++}) a rame rameoso (Cu^{+}) da parte delle proteine (reazione del biureto) allo sviluppo di una colorazione viola, dovuta alla formazione di un chelato tra una molecola di Cu^{+} e due molecole di acido bicinconinico contenuto nel reagente utilizzato. La colorazione viola è responsabile dell'assorbimento a 950 nm.

Il secondo metodo, detto di **Bradford**, sfrutta il legame del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 alle proteine. Detto legame determina un cambiamento di colore della soluzione da rosso a blu con conseguente spostamento dell'assorbimento del colorante a 590 nm.

In entrambi i metodi la quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteina presente in soluzione, perciò l'intensità del colore (e dunque l'assorbimento) è proporzionale alla concentrazione proteica.

3.3 Complessità del campione e differenze in abbondanza

La complessità del proteoma e il divario di concentrazione delle proteine piastriniche, che spazia in modo dinamico fino a 5 ordini di grandezza^[19], rendono difficile la rilevazione di quelle espresse a livelli molto bassi. Questo si traduce in una diminuzione della sensibilità dell'analisi e nella mancata identificazione di quelle proteine che, pur essendo presenti in scarsa quantità, potrebbero avere un'importanza biologica rilevante. A questo problema abbiamo cercato di rispondere frazionando le proteine contenute nella miscela iniziale di estrazione in sotto frazioni più semplici. Una miscela più semplice, infatti, consente di aumentare molto la sensibilità delle singole analisi. Alla fine delle analisi, in genere, se sommiamo assieme i risultati delle sottopopolazioni, le proteine identificate risultano molto più numerose di quelle ottenute analizzando la miscela proteica iniziale.

3.3.1 Tentativo di semplificare il campione sulla base delle differenze di peso molecolare

Le proteine più abbondanti sono state rivelate essere quelle del citoscheletro, come per esempio l'actina^[20]. Poiché il peso molecolare dell'actina è di 42000 Dalton (42 KDa), abbiamo pensato inizialmente di effettuare un "cut-off" di peso molecolare utilizzando due tipi di elementi filtranti in grado di escludere molecole di taglia

approssimativamente superiore o uguale a 30 KDa. Questo genere di semplificazione del campione non permette di ottenere un profilo completo delle proteine espresse, essendo possibile recuperare solo il filtrato (frazione leggera) mentre le proteine trattenute dal filtro vengono scartate. Questa strategia pertanto è stata progettata allo scopo di ottenere una sottopopolazione di proteine arricchita degli elementi a più basso peso molecolare e comprendente, presumibilmente, le specie meno rappresentate. Ai fini del progetto, tuttavia, questa procedura non può prescindere dallo studio concomitante del campione totale perché anche le proteine più abbondanti, appartenenti al citoscheletro, hanno una importanza di rilievo in quanto coinvolte nell'attivazione piastrinica e non possono essere escluse dall'analisi. I kit di ultrafiltrazione Microcon e Vivaspin500 ("cut off" 30 KDa) sono stati sperimentati per l'ottenimento della frazione leggera. Le proteine recuperate in condizioni denaturanti con il dispositivo Microcon erano irrilevanti e pertanto l'uso di questo kit è stato scartato. Il kit Vivaspin500 non era compatibile con la soluzione denaturante utilizzata con il kit Microcon. L'uso dell'acido trifluoroacetico, come alternativa, generava condizioni di pH estremo, impedendo il corretto utilizzo del campione per le fasi successive. L'impossibilità di alcalinizzare il campione liofilizzato con ammonio bicarbonato fino al pH 8,5 rendeva il campione incompatibile per la digestione con tripsina. Per queste ragioni l'opzione di adottare il "cut off" di peso molecolare per la semplificazione del campione è stata giudicata inapplicabile e quindi scartata.



3.3.2 Tentativo di ottenere sub-frazioni di proteine sulla base delle loro proprietà chimico-fisiche

Con l'intento descritto all'inizio del paragrafo di ridurre la complessità del campione sono state effettuate prove di pre-frazionamento proteico applicando un metodo di cromatografia "flash" con diversi tipi di resina. Detto metodo era stato precedentemente convalidato sul plasma umano, che rappresenta un esempio emblematico di miscela complessa di proteine^[21]. Questa tecnica utilizza colonnine riempite con diverse fasi stazionarie ed eluite in un solo stadio, per centrifugazione, con soluzioni opportunamente definite. Il campione in questo modo viene separato in

due frazioni, proteine legate e proteine non legate, sulla base delle diverse caratteristiche della resina usata come fase stazionaria. La sperimentazione è stata effettuata su tre tipi di fasi solide cromatografiche: a scambio cationico, a scambio anionico e con resina lipofila.

La messa a punto dei metodi è stata effettuata con albumina bovina commerciale disciolta nel tampone usato per l'estrazione delle proteine piastriniche ed aggiustato al pH ottimale preventivamente sperimentato.

Un primo insuccesso è stato riscontrato utilizzando la resina OASIS, che discrimina le proteine lipofile da quelle idrofile. Questa si è dimostrata inefficace perché la presenza del detergente Triton X100, contenuto nel tampone di estrazione, causava competizione fra fase mobile e fase stazionaria impedendo qualunque legame alla resina. Tale osservazione è stata confermata utilizzando la resina OASIS per separare una soluzione preparata disciogliendo la BSA nel tampone di estrazione e contenente Triton X100.

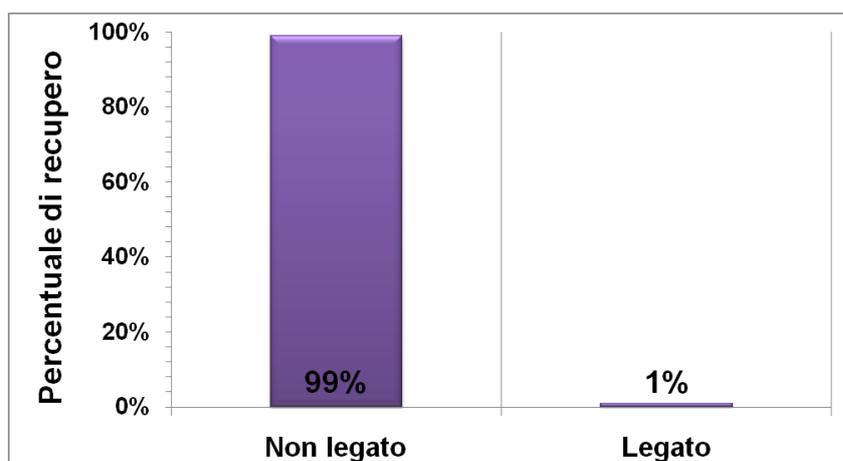


FIGURA 3.1: Separazione cromatografica con resina OASIS di una soluzione di BSA nelle condizioni di estrazione (contenente Triton X100).

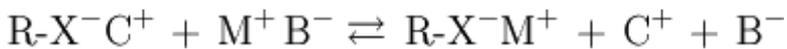
Come possiamo osservare nella figura 3.1, la presenza del Triton X100 non permette il legame della BSA alla resina.

Sono state provate, di conseguenza, le resine a scambio anionico e cationico.

La cromatografia a scambio ionico è un processo che permette la separazione della proteine in base alla loro interazione elettrostatica con la fase stazionaria della colonna. Le proteine sono molecole anfotere contenenti gruppi acidi e basici: in ambiente basico i gruppi acidi si caricano negativamente, mentre in ambiente acido i gruppi basici si caricano positivamente. Semplificando molto la teoria si può dire che la cromatografia a scambio ionico separa le proteine in base alla loro carica netta,

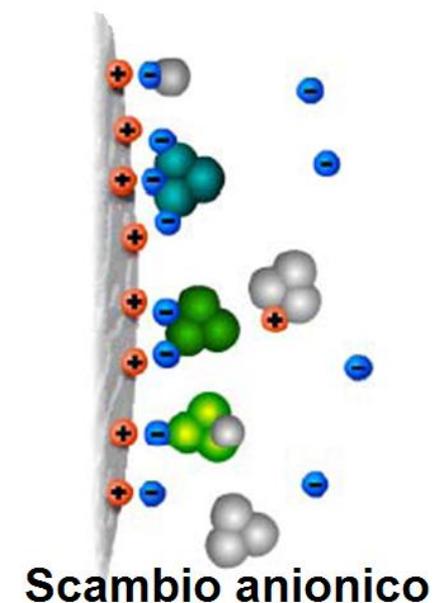
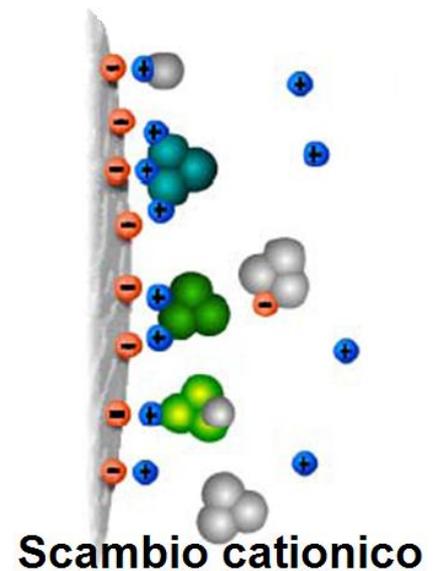
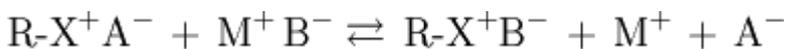
che dipende quindi dal pH della fase mobile. I gruppi ionici della resina trattengono, per mezzo di interazioni elettrostatiche, ioni di carica opposta presenti sulle proteine le quali, a loro volta, possono essere recuperate per competizione con concentrazioni crescenti di ioni di uguale carica immessi con la fase mobile.

Nella cromatografia a **scambio cationico** la fase stazionaria è caratterizzata dalla presenza di gruppi funzionali carichi negativamente che quindi trattengono le proteine con una carica netta positiva:



Il condizionamento della colonna prevede l'utilizzo di un tampone a pH acido (eccesso di ioni H^{+}) che assicura l'assenza di contro-ioni positivi stabilmente legati alla superficie di scambio della fase stazionaria. Successivamente viene caricato il campione proteico che, esibendo a pH acido cariche positive sugli amminoacidi basici, diviene preda della fase stazionaria. Un lavaggio a pH acido consente di allontanare e raccogliere la parte di proteine che non si sono legate alla resina (frazione non legata). Le proteine invece che si sono legate sono quelle aventi un punto isoelettrico (pH al quale la carica netta è uguale a zero) maggiore del pH utilizzato nel tampone di legame. Alla fine, con l'utilizzo di un tampone a pH basico, si ottiene l'eluizione di queste proteine, recuperate nella frazione legata.

Viceversa succede con la resina a **scambio anionico**, per la quale si useranno condizioni opposte di pH.



Per entrambe le separazioni a scambio ionico sono state messe a punto le condizioni ottimali per ottenere un salto di pH che permetta di ottenere le due frazioni, legata e non legata, in volumi limitati e riproducibili. I diversi valori di pH, il volume e le concentrazioni dei tamponi sia di legame che di eluizione, il tempo ed il grado di

vuoto e il tempo di agitazione “up-down” a 4°C sono stati accuratamente sperimentati e definiti.

Con tali condizioni abbiamo operato sugli estratti dei campioni di piastrine. Al termine, le frazioni ottenute sono state liofilizzate e risospese in appositi tamponi in grado di neutralizzare i valori estremi di pH, aggiustato al valore di 8,5.

Nella valutazione dei risultati abbiamo fatto uso dei i metodi colorimetrici precedentemente descritti per la misura delle concentrazioni proteiche. I risultati ottenuti sono illustrati nei grafici seguenti.

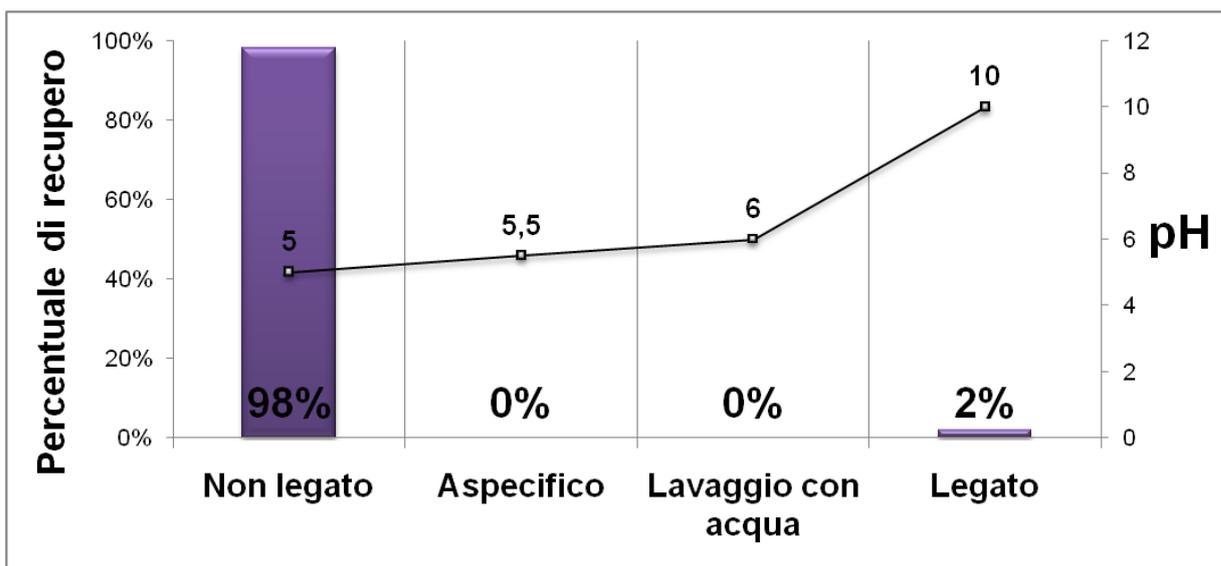


FIGURA 3.2: Separazione cromatografica con resina cationica dell'estratto proteico di piastrine.

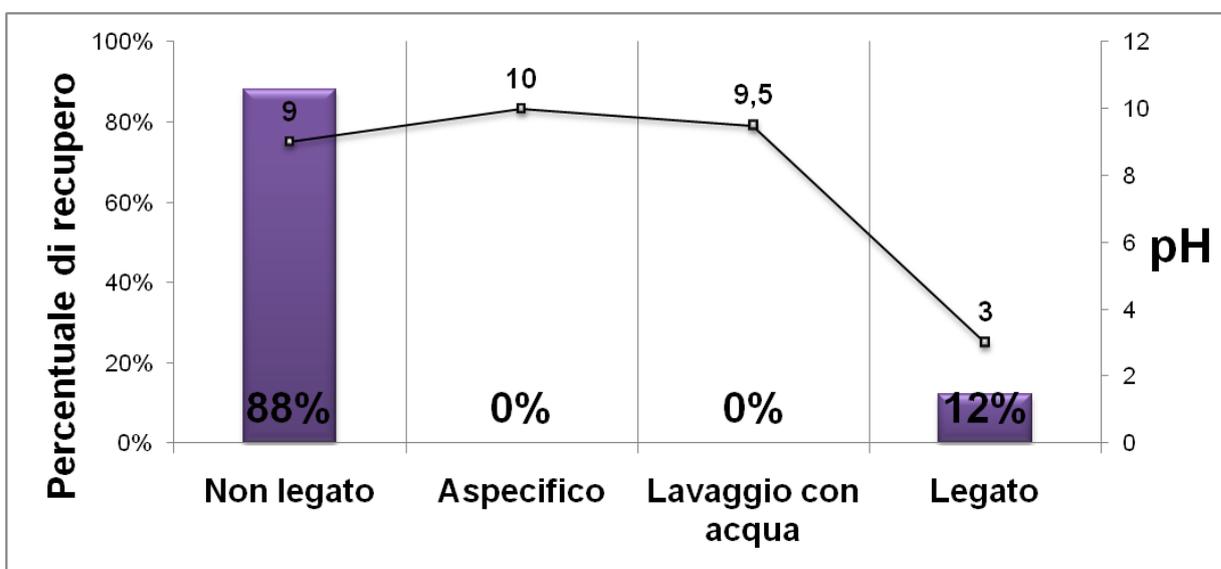


FIGURA 3.3: Separazione cromatografica con resina anionica dell'estratto proteico di piastrine.

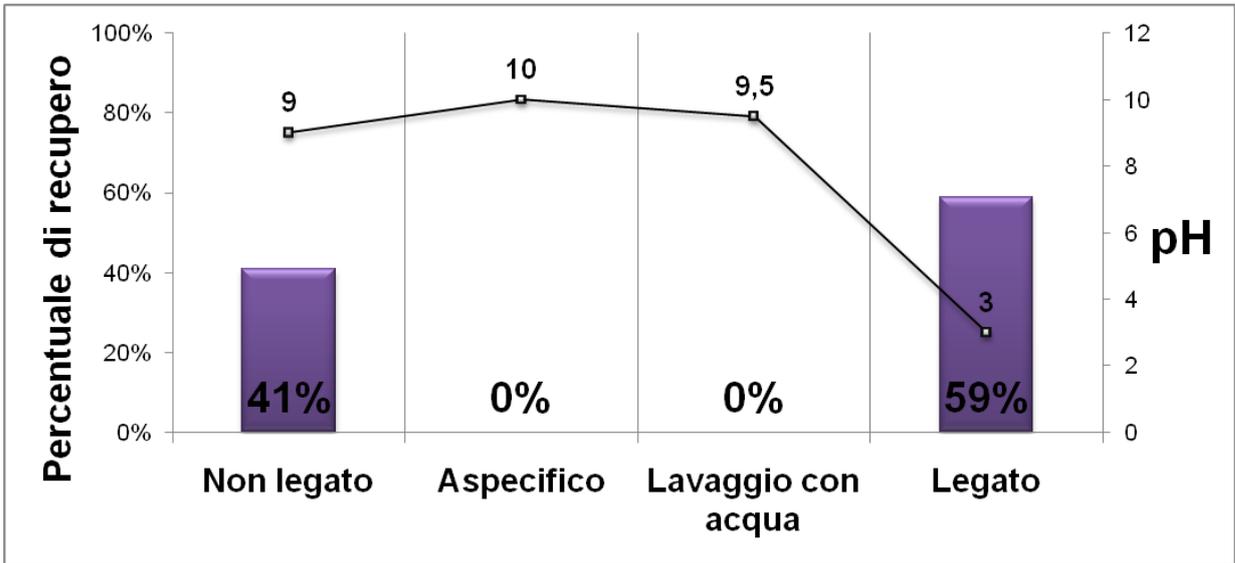


FIGURA 3.4: Separazione cromatografica con resina anionica di una soluzione di BSA nelle condizioni di estrazione (contenente Triton X100).

SCAMBIO	FRAZIONE	
Cationico	Non legato	98%
	Legato	2%
Anionico	Non legato	88%
	Legato	12%

FIGURA 3.5: Risultati della separazione cromatografica a scambio cationico e anionico per l'estratto piastrinico.

Sorprendentemente, mentre la BSA riesce a legarsi alla resina, entrambe le tecniche applicate all'estratto proteico di piastrine hanno dato un esito scarso. Per considerare accettabile il frazionamento, in relazione con i nostri scopi, avremmo dovuto ottenere una ripartizione ideale delle proteine attorno al 50% fra le due frazioni, legata e non legata. Invece, le proteine estratte dalle piastrine, in entrambi i casi, sembrano non legarsi sufficientemente alle due resine cationica e anionica. Abbiamo ipotizzato che questo risultato inatteso fosse dovuto a caratteristiche specifiche delle proteine piastriniche, come per esempio particolari modificazioni post-traduzionali.

3.4 Scelta della procedura sperimentale

Lo strumento standard per lo studio proteomico di un campione è la separazione elettroforetica bidimensionale (2D-GE). Questa tecnica storica consta, come anticipa

il nome, di due separazioni ortogonali della miscela proteica che si basano su due diversi principi: il punto isoelettrico e il peso molecolare. Utilizzando una strisciolina di gel di poliacrilammide, la prima dimensione sfrutta l'applicazione di un gradiente di pH posto in un campo elettrico. In queste condizioni, le proteine presenti in forma ionica si muovono fino a raggiungere il proprio punto isoelettrico al quale ogni molecola si trova sotto forma di zwitterione con una carica complessiva pari a zero. Il processo descritto prende il nome di isoelettrofocalizzazione (IEF o isoelectrofocusing). La striscia di gel che contiene le proteine "focalizzate" in base al pH diviene il campione da applicare alla lastra di gel della seconda dimensione. Per ottenere questa ulteriore separazione, il campione viene trattato con sodio dodecilsolfato (SDS), un detergente in grado di denaturare le proteine in forma lineare e di conferire a tutte una carica elettrica negativa. Con l'applicazione del campo elettrico le specie proteiche migrano nel gel di poliacrilammide e si separano in funzione della loro dimensione molecolare. Al termine le proteine vengono evidenziate mediante colorazione e si presentano sotto forma di macchie (spot). Gli spot che dimostrano differenze significative di espressione vengono ritagliati dal gel, digeriti e sottoposti ad identificazione in spettrometria di massa.

Questa strategia ha molti meriti ed ha fornito dati fondamentali facendo crescere molto il peso della proteomica nel panorama scientifico internazionale. Tuttavia presenta limitazioni analitiche significative^[22], specie quando si intenda affrontare l'analisi di un gran numero di campioni complessi (high throughput analysis). Queste includono:

- Possibilità di visualizzare solo le proteine con peso molecolare compreso tra 8 e 200mila Dalton e con punto isoelettrico compreso tra circa pH 3 e pH 11;
- Bassa sensibilità che permette l'individuazione solo delle proteine relativamente abbondanti;
- Impossibilità di rivelazione di molecole proteiche scarsamente solubili come le proteine integrali di membrana;
- Complicazione della visualizzazione degli spot per la co-migrazione di proteine diverse e diversa migrazione delle stesse proteine con modificazioni diverse;
- Nessuna automazione, lunghi tempi di lavorazione e bassa riproducibilità.

La consapevolezza dell'esistenza di tali limitazioni, unite all'impossibilità di un pre-frazionamento e quindi della scelta obbligata di un'analisi dell'estratto proteico intero,

ha spinto a cercare di sviluppare una metodica alternativa che non fosse basata sull'applicazione dell'elettroforesi bidimensionale, quindi, "gel-free".

La metodologia sperimentale adottata, LC-MALDI-TOF/TOF, può essere schematizzata come segue:

- Preparazione dell'estratto grezzo totale e digestione enzimatica con tripsina;
- Quantificazione del contenuto peptidico mediante corsa in nano-HPLC;
- Separazione mediante cromatografia nano-HPLC in fase inversa dei peptidi, mescolamento con la matrice MALDI e raccolta robotizzata delle frazioni (spot) direttamente sul supporto dello spettrometro di massa;
- Analisi di ciascuno spot sia in condizioni di singola massa (MS) che tandem (MS/MS);
- Analisi bioinformatica dei dati di spettrometria di massa.

3.5 Digestione dell'estratto proteico

La riduzione e l'alchilazione dei ponti di solfuro serve per demolire la conformazione nativa della proteina che può ostacolare l'accesso e l'azione degli agenti proteolitici.

Il ditioneitrato (DTT) consente di realizzare il primo stadio ovvero la riduzione dei ponti a disolfuro (R-S-S-R). Questi, presenti fra i residui di cisteina in punti diversi della catena proteica, vengono aperti e mantenuti nella forma tiolica (R-SH). Successivamente l'utilizzo di iodoacetammide (IA) provoca una denaturazione irreversibile di tipo chimico bloccando definitivamente i gruppi sulfidrilici con una reazione di alchilazione.

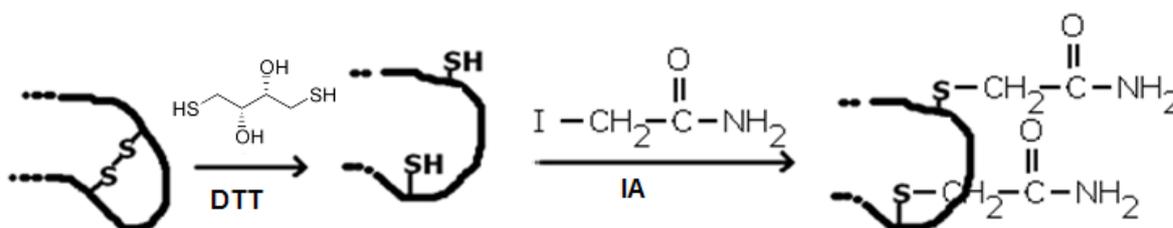


FIGURA 3.6: Reazioni di riduzione con DTT e alchilazione con IA.

A questo punto la tripsina può agire catalizzando il taglio proteolitico con specificità per l'arginina e la lisina. Il pH ottimale per l'attività catalitica della tripsina è 8,5.

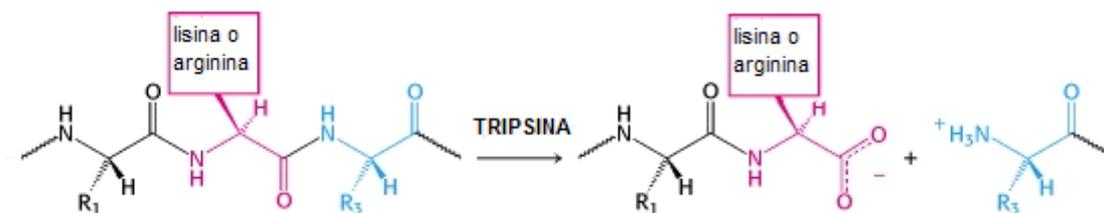


FIGURA 3.7: Reazione della digestione con tripsina.

3.6 Separazione HPLC

La miscela peptidica viene separata mediante una cromatografia di ripartizione. In questo tipo di cromatografia la fase stazionaria e quella mobile hanno diversa polarità ed i composti vengono più o meno trattenuti in funzione dei loro diversi coefficienti di distribuzione nelle due fasi. Sia la colonna capillare che la precolonna, posta a monte con il compito di proteggerla da impurità presenti nel campione e nei solventi, hanno una fase stazionaria apolare composta da catene idrocarburiche sature di lunghezza C18 (anche indicata con ODS, Octadecilsilil =Si-(CH₂)₁₇-CH₃).

La fase mobile viene fatta fluire applicando un gradiente di concentrazione, di modo che la sua composizione vari continuamente durante la corsa cromatografica. Questo si realizza mediante l'utilizzo di un dispositivo automatico che, attraverso un sistema di pompe, riesce a combinare percentuali diverse di due diversi eluenti, A e B, più polare e meno polare rispettivamente.

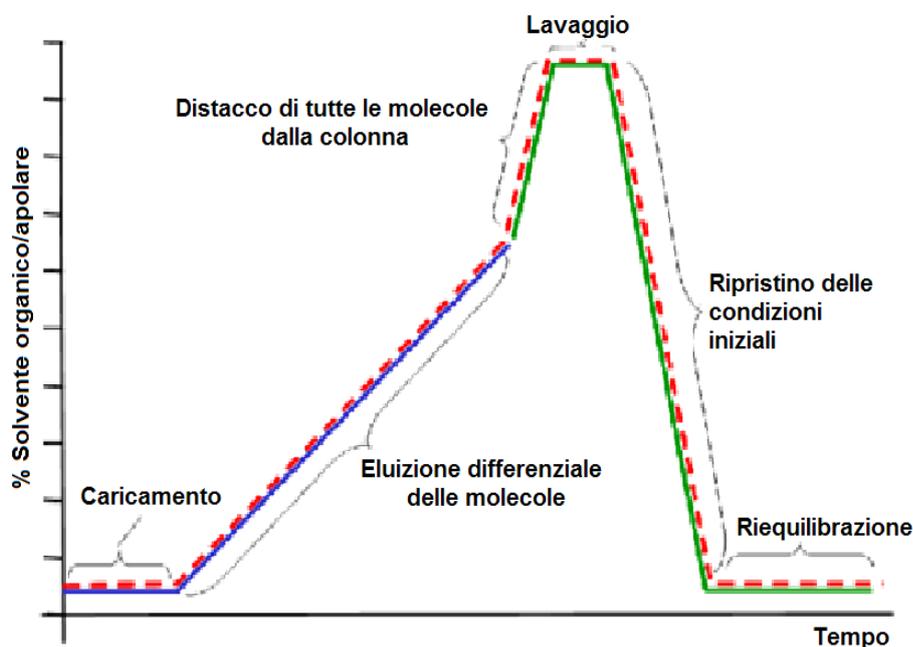


FIGURA 3.8: Fasi del gradiente di eluizione.

Il sistema separa i peptidi in base alle loro caratteristiche idrofile/lipofile.

I peptidi meno lipofili saranno i primi ad essere eluiti perché più affini alla fase mobile con un'alta percentuale di A. L'aumento della percentuale di B durante la corsa cromatografica rende la fase mobile sempre più competitiva rispetto alla fase stazionaria lipofila. Cresce così la forza eluente necessaria per estrarre i soluti più fortemente trattenuti dalla fase stazionaria perché lipofili.

3.6.1 Ottimizzazione della separazione

L'ottimizzazione della separazione nano-HPLC in fase inversa è stata effettuata agendo sulla durata della corsa cromatografica e sul gradiente di eluizione.

Abbiamo analizzato l'effetto della **durata della corsa cromatografica** confrontando i dati ottenuti dall'analisi LC-MALDI-TOF/TOF di uno stesso campione sottoposto al frazionamento utilizzando tempi diversi di corsa cromatografica.

Tempo di corsa (minuti)	N° di proteine identificate	N° di spettri identificativi	N° totale di spettri	Efficienza
30	203	1059	2400	44%
60	214	1294	4534	29%
120	284	1346	10775	12%

FIGURA 3.9: Effetto della durata della corsa cromatografica sul numero di proteine identificate e sull'efficienza dello spettrometro di massa.

Dai dati ottenuti da questa analisi (mostrati in figura 3.9) abbiamo potuto riscontrare come, aumentando il tempo, aumenti la separazione e cresca il numero di proteine identificate. A scapito di questo però aumentano anche il tempo dell'analisi e di utilizzo dello strumento. Questo riguarda specialmente lo spettrometro di massa che deve analizzare un più elevato numero di spot. Lunghi tempi di corsa cromatografica, inoltre, causano una diminuzione dell'efficienza dello spettrometro di massa, calcolata confrontando il numero degli spettri identificativi e quindi in grado di fornire un'identificazione rispetto agli spettri totali. Infine, in relazione ai compiti imposti dal Progetto APICE, che prevede l'analisi di centinaia di campioni clinici, la variabile tempo gioca un ruolo importante ai fini del conseguimento dei risultati attesi.

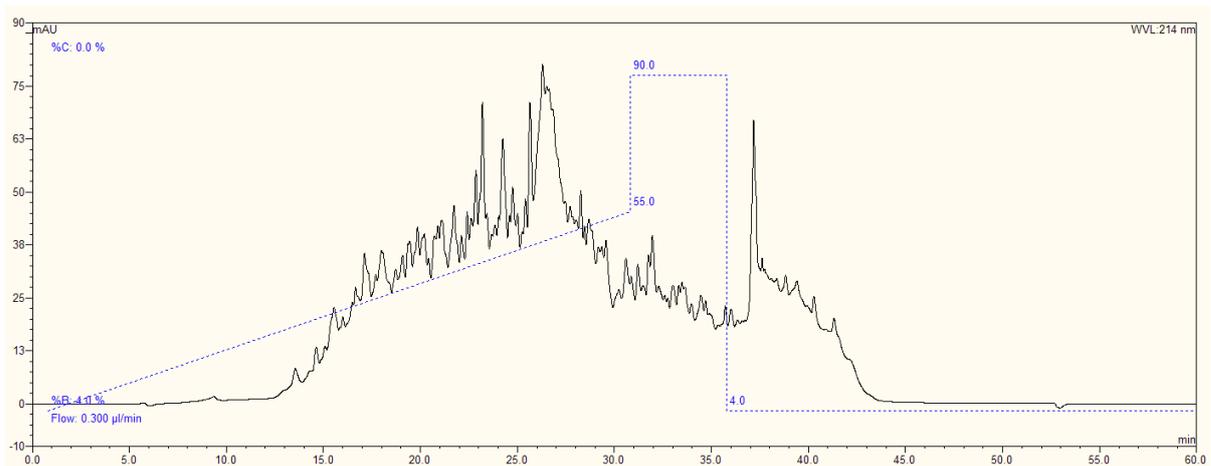


FIGURA 3.10: Profilo UV della separazione cromatografica con tempo di corsa di 30 minuti.

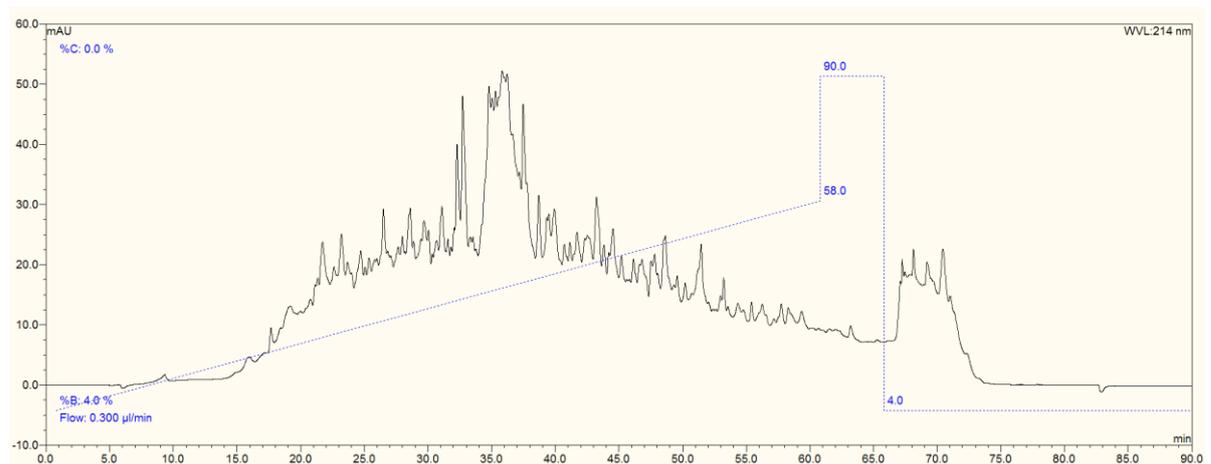


FIGURA 3.11: Profilo UV della separazione cromatografica con tempo di corsa di 60 minuti.

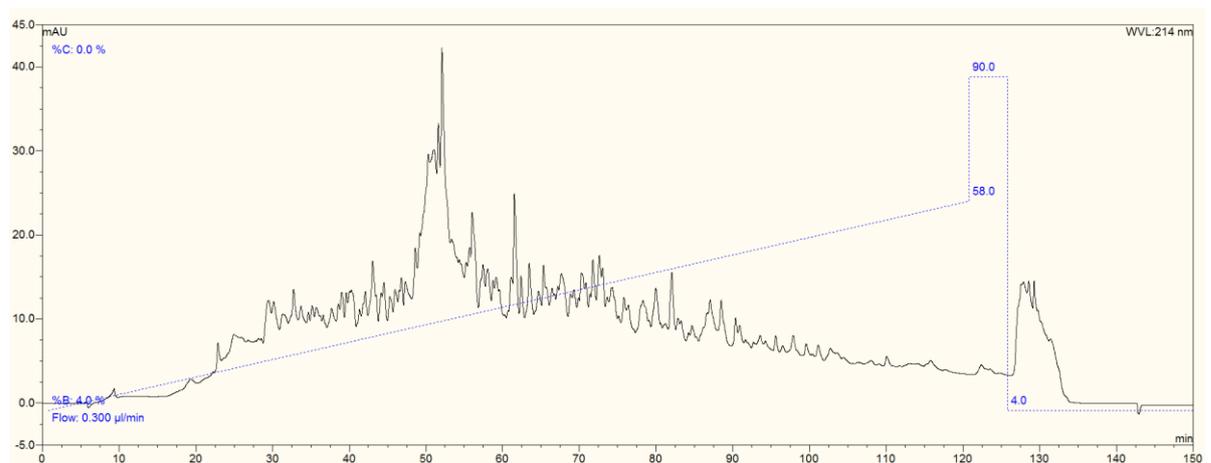


FIGURA 3.12: Profilo UV della separazione cromatografica con tempo di corsa di 120 minuti.

In base a queste considerazioni abbiamo ritenuto che la corsa a 60 minuti fosse la condizione di compromesso migliore, perché in grado di conciliare una buona separazione che consente un'alta identificazione proteica con un'efficienza di spettri utili che sfiora il 30%.

Abbiamo inoltre verificato la possibilità di migliorare ulteriormente questi aspetti modificando il tipo di gradiente applicato. La precedente valutazione, infatti, è stata eseguita utilizzando un gradiente messo a punto per la corsa di 30 minuti. Aumentando il tempo della separazione cromatografica anche il gradiente di eluizione deve essere modificato in maniera compatibile. Questo è necessario per ottenere una miglior risoluzione dei picchi che altrimenti tendono ad assumere distribuzioni gaussiane più appiattite (picchi più larghi che in definitiva non migliorano la risoluzione della separazione).

Con il programma di gestione dell'HPLC, Chromeleon, è stato possibile osservare, sovrapporre e valutare la risoluzione dei picchi ottenuta variando il **gradiente di eluizione**. Di seguito viene illustrato il confronto di quattro corse HPLC da 60 minuti, ottenute programmando quattro diverse composizioni finali di gradienti lineari di eluizione.

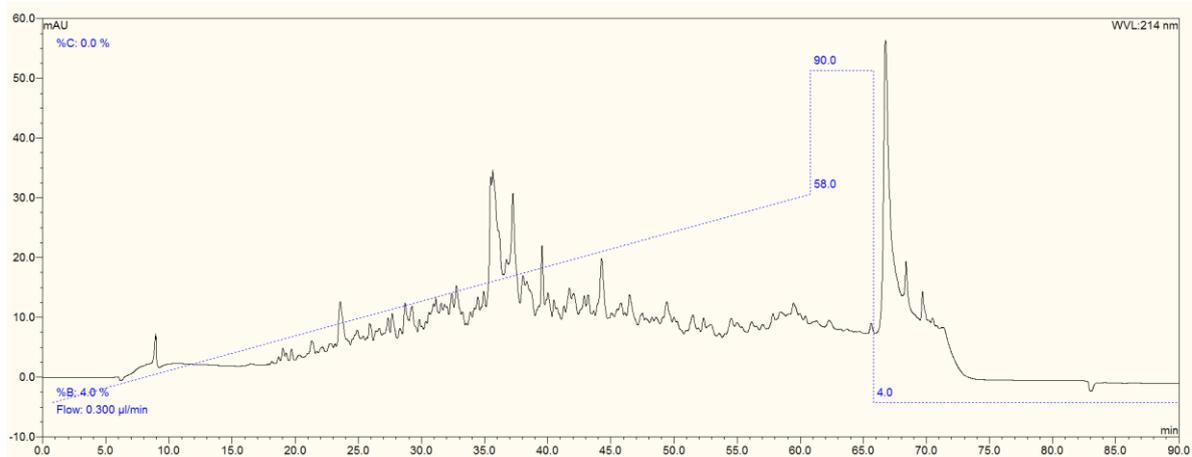


FIGURA 3.13: Profilo UV della separazione cromatografica con gradiente finale 58% di eluente B.

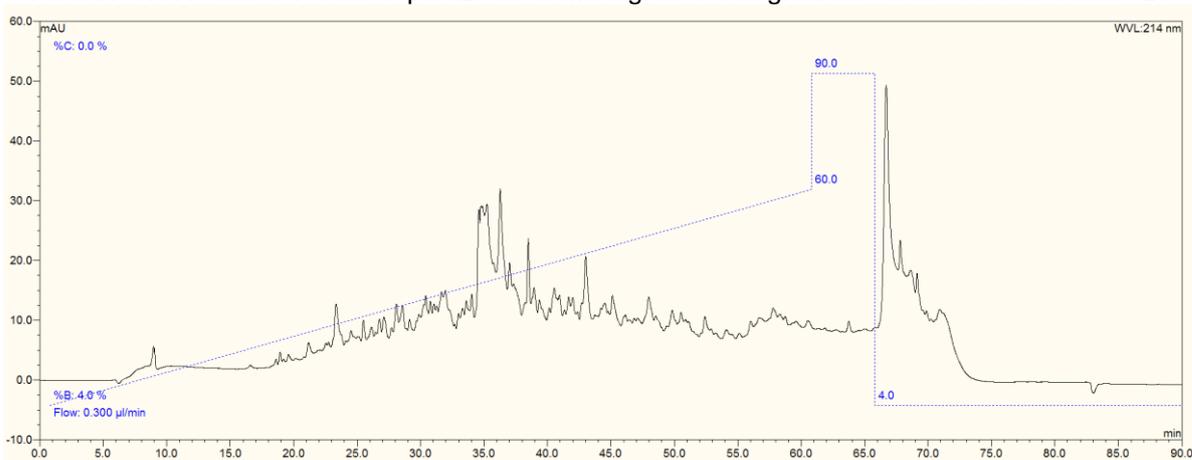


FIGURA 3.14: Profilo UV della separazione cromatografica con gradiente finale 60% di eluente B.



FIGURA 3.15: Profilo UV della separazione cromatografica con gradiente finale 65% di eluente B.



FIGURA 3.15: Profilo UV della separazione cromatografica con gradiente finale 65% di eluente B.

I risultati ottenuti nelle diverse corse cromatografiche sono riportati nella tabella seguente (figura 3.16).

58% finale di B	60% finale di B	65% finale di B	68% finale di B
28% risoluzione	35% risoluzione	35% risoluzione	37% risoluzione
54 picchi risolti su 196 picchi totali	77 picchi risolti su 218 picchi totali	84 picchi risolti su 237 picchi totali	81 picchi risolti su 218 picchi totali

FIGURA 3.16: Effetto del gradiente di eluzione sulla risoluzione dei picchi del profilo UV della corsa cromatografica.

Il gradiente lineare che si conclude con una composizione del 68% di tampone B è stato adottato perché fornisce la migliore risoluzione dei picchi.

3.6.2 Analisi quantitativa in HPLC

All'uscita della colonna è presente un sistema di rivelazione e di registrazione dei dati di assorbimento UV relativi ai soluti eluiti. Il grafico prodotto dal registratore, cromatogramma, mette in relazione l'intensità del segnale del rivelatore con il tempo d'analisi. Si ha in questo modo un profilo di uscita dei vari composti nel tempo. Il cromatogramma consiste in una serie di picchi di assorbimento che rappresentano i peptidi separati dal processo cromatografico. I valori dei tempi d'uscita permettono l'analisi qualitativa: i picchi escono a seconda del loro tempo di ritenzione in base alle interazioni con le fasi mobile e stazionaria. Le aree dei picchi invece permettono l'analisi quantitativa. Il segnale generato dal rivelatore UV all'uscita della colonna è infatti proporzionale all'assorbimento della radiazione da parte dei peptidi e quindi alla concentrazione. L'assorbimento fornito da un rivelatore UV obbedisce alla legge di Lambert-Beer.

A seconda dell'assorbività o coefficiente di estinzione molare (ϵ) della sostanza, il fascio di luce che attraversa la cella contenente il campione risulta più o meno attenuato all'uscita. Per l'assorbimento (E), vale la seguente formula

$$E = \epsilon c d$$

dove d è lunghezza della cella ed ϵ dipende dalla sostanza stessa. C'è una proporzionalità diretta tra la concentrazione della sostanza (c) e l'assorbimento (E). L'assorbimento misurato in "unità di assorbanza" (AU) è quindi proporzionale al numero di molecole incontrate (concentrazione) dal fascio luminoso nel suo percorso. Il processo di conversione dell'area sottesa al picco cromatografico in una misura quantitativa e/o in un valore di concentrazione viene indicato come integrazione.

La quantificazione in termini di concentrazione richiede una calibrazione preventiva da effettuare con campioni standard a concentrazione nota. Il programma di gestione dell'HPLC, Chromeleon, permette di eseguire tale calibrazione.

Mettendo in relazione la concentrazione con l'area individuata sotto un singolo picco (o gruppo di picchi) si ottiene il fattore di conversione. Questo fattore di conversione può essere utilizzato per moltiplicare l'area del picco individuato con l'analisi cromatografica e UV di un campione sconosciuto ed ottenere come risultato la concentrazione della sostanza. Abbiamo pertanto deciso di applicare questo metodo HPLC alla quantificazione dei campioni sperimentali in oggetto. A tal fine abbiamo proceduto alla realizzazione di una retta di calibrazione (figura 3.17).

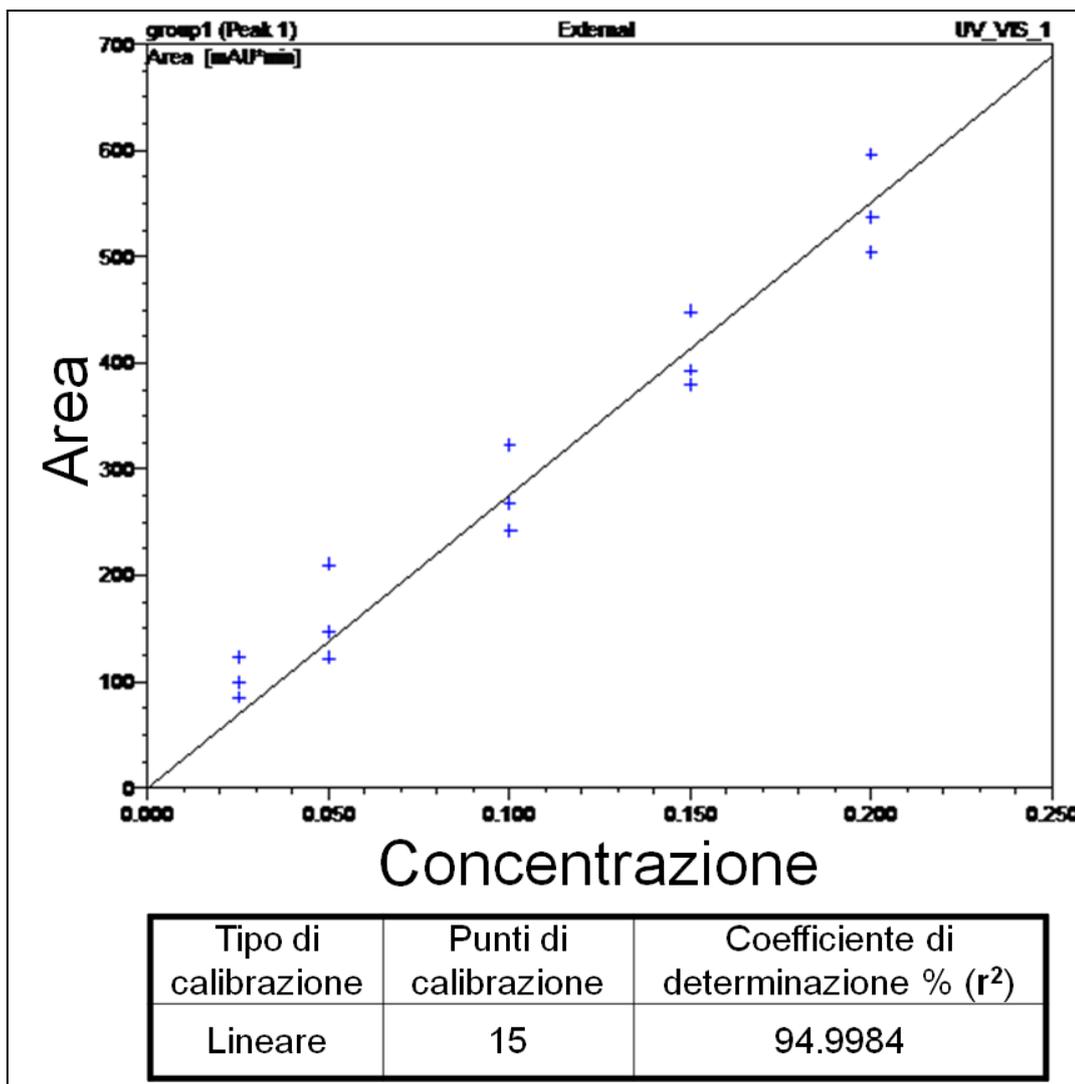


FIGURA 3.17: Curva di calibrazione costruita con cinque diluizioni standard di estratto proteico intero di piastrine, ognuna replicata tre volte.

La retta di calibrazione è data da un insieme di punti corrispondenti ad una determinata coppia di parametri concentrazione/area. Ogni soluzione standard, corrispondente ad una determinata concentrazione, costituisce un punto sulla retta. Maggiore è il numero di soluzioni diverse a concentrazione nota del medesimo standard e più numerosi saranno i punti per la costruzione della curva di taratura. Inoltre, aumentando il numero dei replicati corrispondenti ad una medesima concentrazione, otterremo una serie di punti che meglio descrivono la variabilità del dato sperimentale, aumentando la confidenza statistica del risultato. Per la costruzione della retta di taratura abbiamo preparato cinque diluizioni standard di estratto proteico intero di piastrine e per ciascuna diluizione abbiamo fatto tre repliche. I risultati ottenuti, riportati nella figura 3.17, dimostrano la possibilità di usare questo sistema di taratura che conferma la validità di una relazione lineare tra area e concentrazione anche nel caso di un campione proteico complesso come il nostro.

Con l'utilizzo dei metodi colorimetrici precedentemente descritti avevamo riscontrato molte fluttuazioni e scarsa riproducibilità dei valori anche a causa di interferenze con alcune sostanze contenute nei tamponi di estrazione.

Questa metodica aggiuntiva di quantificazione ci consente di misurare il contenuto proteico di ogni campione con una misura molto precisa e sensibile come quella dell'UV, sulla base della corsa cromatografica in HPLC. Ogni campione analizzato farà sempre riferimento ad una medesima curva di calibrazione standard, permettendo una normalizzazione dei dati.

Tuttavia, i metodi colorimetrici applicati al campione dopo l'estrazione sono stati mantenuti per avere una stima approssimativa della concentrazione proteica necessaria per definire le condizioni della digestione e della successiva iniezione in HPLC.

3.7 Analisi in spettrometria di massa

Un importante vantaggio della cromatografia liquida capillare, oltre all'elevata efficienza e sensibilità della metodica, è dato dalla assoluta compatibilità dei flussi in uscita con le necessità del supporto dello spettrometro di massa, una piastra metallica che deve accogliere la deposizione di volumi nell'ordine dei nanolitri.

Raccogliere questi piccoli volumi è indispensabile per evitare di mischiare composti già separati e quindi di vanificare la separazione cromatografica. L'utilizzo di un sistema robotico ad alta precisione, il Probot (DIONEX), consente di raccogliere dal capillare direttamente sulla piastra metallica dello spettrometro MALDI l'eluato della colonna all'uscita dall'HPLC con una dispersione cromatografica minima. L'effluente viene deposto sotto forma di spot sulla piastra come in una sorta di micro-collettore di frazioni. Il software di gestione del Probot, μ Carrier V2.0 permette di impostare i

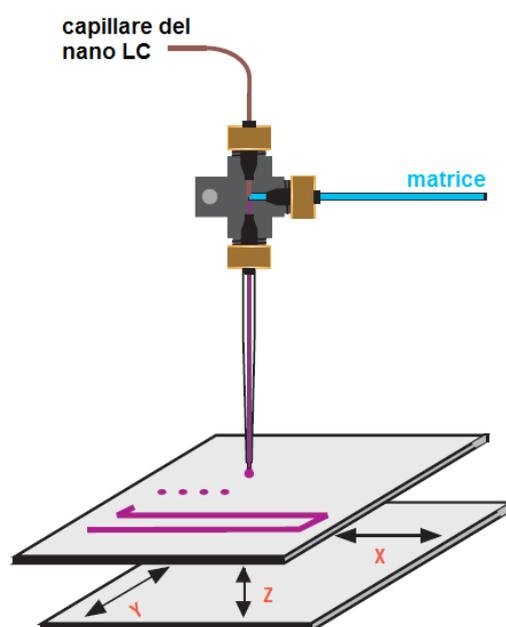


FIGURA 3.18: Deposizione degli spot.

tempi di inizio e fine della raccolta degli spot e il tempo che intercorre tra la deposizione di uno spot e l'altro, quindi il loro volume. Inoltre il software consente di progettare il numero e la geometria della deposizione degli spot sulla piastra relativi

ad ogni corsa. La geometria viene creata facendo riferimento a spostamenti nelle direzioni X/Y/Z del piano cartesiano e consente di raggiungere qualsiasi punto della piastra metallica con la massima precisione. Per una cristallizzazione ottimale, la geometria coassiale dell'ago, deputato anche alla miscelazione dell'eluato con la matrice per la spettrometria MALDI (mostrato in figura 3.18), consente una deposizione strettamente controllata e riproducibile generando spot perfettamente uniformi.

Il software di gestione dello spettrometro di massa, 4000 Series Explorer (Applied Biosystems), è in grado di acquisire la geometria della piastra in modo da riconoscere le corse cromatografiche. Questo permette di disegnare la disposizione degli spot e quindi ricostruire la geometria con la quale il Probot ha depositato l'eluato dell'HPLC sulla piastra.

Abbiamo progettato la geometria della deposizione degli spot su di ogni piastra tenendo conto che il numero massimo di spot depositabili su ognuna è di 1664 spot, suddivisi in 32 righe e 52 colonne (figura 1.19).

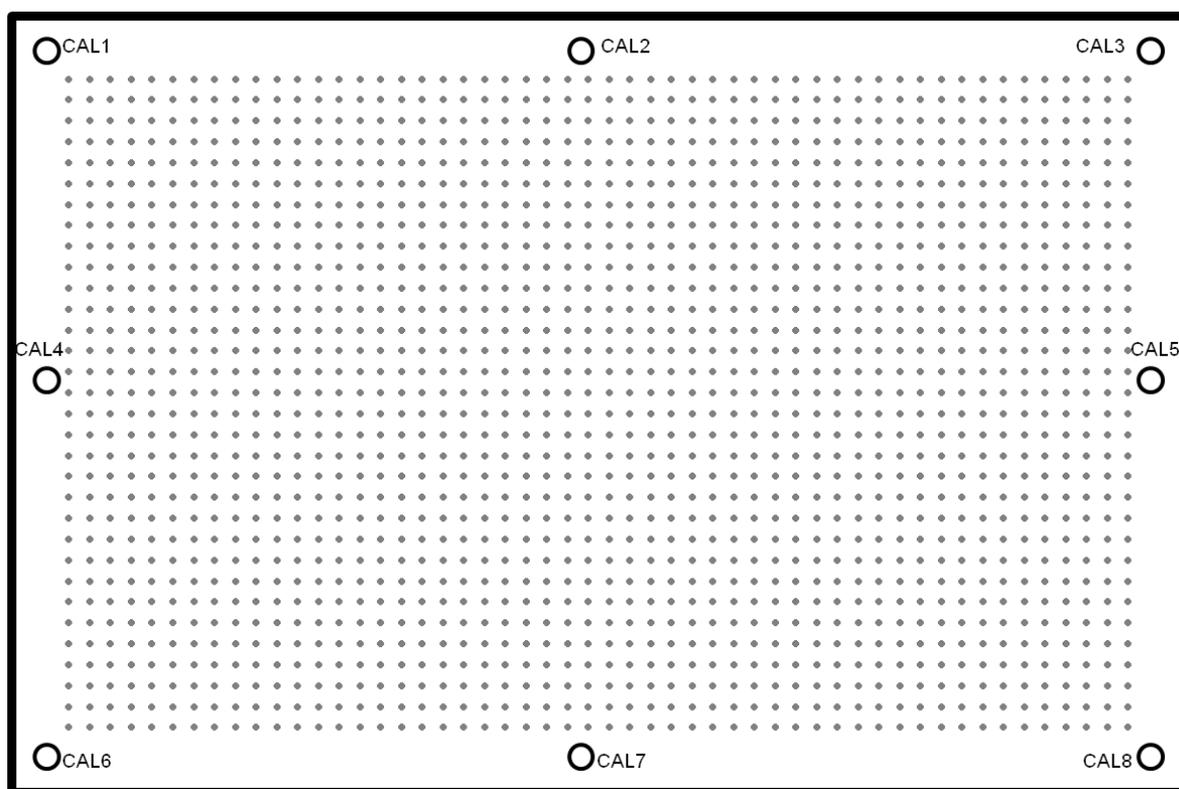


FIGURA 3.19: Piastra MALDI.

La spettroscopia di massa di tipo MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) è una tecnica basata sulla ionizzazione blanda delle molecole da

analizzare. Questa tecnologia utilizza una matrice a base di acidi organici insaturi facilmente ionizzabili da fonti laser di radiazioni ultraviolette in condizioni di alto vuoto. I principali requisiti della matrice sono: la capacità di assorbire la luce e quindi l'energia laser, la capacità di dar luogo a ionizzazioni con scarsa frammentazione e le buone proprietà di miscelazione con le molecole di analita in modo da evitarne l'aggregazione.

Quando un impulso di pochi nanosecondi del raggio laser colpisce la matrice la sua energia viene trasferita a quest'ultima che si ionizza e, nelle particolari condizioni di alto vuoto, vaporizza trasportando nella fase di vapore l'analita intatto (processo di desorbimento). Allo stato gassoso la matrice trasferisce protoni all'analita dando luogo alla formazione di ioni molecolari del campione (processo di ionizzazione).

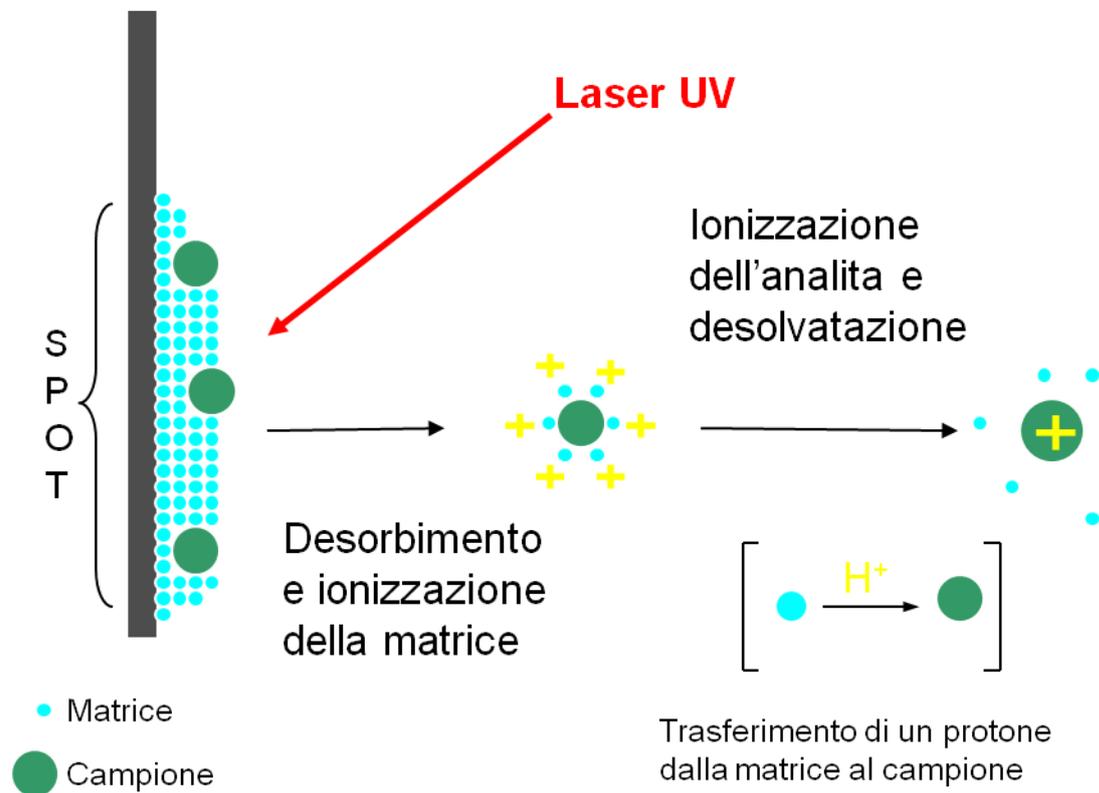


FIGURA 3.12: Desorbimento e ionizzazione dell'analita nella spettrometria MALDI.

Gli ioni generati si separano all'interno dell'analizzatore in base al loro rapporto massa/carica (m/z). L'analizzatore a tempo di volo (time of flight, TOF) è costituito da una camera sotto vuoto spinto e presenta all'estremità un campo elettrico che accelera gli ioni provenienti dalla sorgente. All'uscita dal campo elettrico gli ioni possiedono la stessa energia cinetica ma una diversa velocità a seconda del rapporto m/z . Lasciandoli correre perciò in una regione libera da campi essi

raggiungeranno il rivelatore (detector) in tempi diversi. Il tempo di volo è proporzionale al rapporto massa/carica. A parità di energia cinetica gli ioni con rapporto m/z maggiore (più pesanti) hanno velocità minore rispetto agli ioni con rapporto m/z minore (più leggeri) e quindi impiegano più tempo ad arrivare al detector.

Il detector rivela gli ioni che arrivano dall'analizzatore e genera segnali proporzionali all'abbondanza ionica relativa: più alto e intenso è il picco, più abbondante è la quantità dello ione che si forma. Il diagramma che riporta l'abbondanza di ogni ione in funzione del rapporto m/z è il cosiddetto spettro di massa.

Lo spettrometro di massa che abbiamo utilizzato è dotato di due analizzatori separati da una camera di collisione (analizzatore TOF/TOF). Questo tipo di strumento permette di selezionare e frammentare un determinato peptide di interesse. Il primo analizzatore consente di selezionare, in una moltitudine di ioni, un determinato ione molecolare (precursore) che può essere selettivamente indirizzato nella camera di collisione dove, per l'impatto con le molecole di un gas inerte rarefatto, viene frammentato. Il secondo analizzatore rileva i frammenti secondari prodotti dalle collisioni ottenendo da questi informazioni più specifiche sulla sequenza aminoacidica (ma non solo) del precursore.

Inizialmente abbiamo eseguito una generale acquisizione di tutti gli spot presenti sulla piastra in condizioni di singola massa (single MS). Dopo l'elaborazione degli spettri di massa ottenuti abbiamo programmato lo strumento in modo che questi prendesse in considerazione solo i picchi con un rapporto segnale/disturbo ≥ 25 . Sotto questo valore infatti i picchi non riescono a distinguersi dal rumore di fondo. Dei picchi di massa selezionati vengono scelti, per ogni spot, i 15 più intensi che vengono di nuovo singolarmente analizzati in condizioni di doppia massa (tandem MS/MS) nella camera di collisione a partire dal picco meno intenso.

Sulla piastra di analisi sono presenti 8 posizioni pre-assegnate per la deposizione del **calibrante esterno**. Questo è composto da una miscela di peptidi noti, dei quali lo strumento, durante la fase iniziale di calibrazione, analizza la massa e, riconoscendone i picchi e acquisendone i rapporti massa/carica, sarà in grado di parametrare le assegnazioni dei valori di massa dei campioni incogniti. Le posizioni per il calibrante si trovano all'esterno, lungo il perimetro, in modo da assicurare una calibrazione su tutta la superficie della piastra. Nel caso che la piastra presenti disomogeneità ogni zona può essere calibrata facendo riferimento al calibrante più

vicino.

Nella matrice, inoltre, abbiamo introdotto un **calibrante interno**, composto da un peptide noto, necessario per mantenere stabile la calibrazione in massa. Ogni spot riceve in questo modo una calibrazione interna che si aggiorna ogni volta che uno spot viene analizzato. Ne segue che variazioni nelle condizioni di risposta del sistema potranno essere continuamente corrette di modo che la calibrazione iniziale possa essere conservata nella sua validità durante tutto il tempo necessario per l'analisi.

Per ottenere un segnale accurato e riproducibile il laser deve colpire lo spot cercando di coprirne al massimo tutta la superficie. Il punto in cui il laser va a colpire lo spot è impostato in modalità "random" dallo strumento che così può mediare il segnale su più punti della superficie superando eventuali disomogeneità del campione cristallizzato. Inoltre è possibile scegliere il numero di impulsi a cui sottoporre ciascuno spot (shots/spot). Aumentando il numero di shots il rapporto concentrazione/segnale diventa più lineare perché si riduce il rapporto fra segnale e disturbo (signal/noise), mentre diminuendolo si riscontrano molte fluttuazioni^[23]. 5000 shots è risultato il compromesso migliore che concilia vari aspetti divergenti: linearità di risposta, tempo di analisi e soprattutto consumo del campione, un parametro critico per la successiva analisi in condizioni MS/MS.

ANALISI DEI DATI E DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Una volta sviluppata la metodologia analitica per il trattamento, la manipolazione e l'analisi strumentale dei campioni clinici, sono stati selezionati, tra tutti quelli forniti per questo studio, tre campioni emblematici utili per convalidare sia il sistema di trattamento e di analisi che l'elaborazione finale dei risultati ottenuti dalla spettrometria di massa. I campioni scelti appartengono a pazienti che sono rappresentativi di differenti sensibilità al trattamento terapeutico antiaggregante, prelevati nel momento della fase acuta della ACS: a fronte di un soggetto sensibile, gli altri risultano resistenti rispettivamente all'ASA ed al Clopidogrel. Inoltre, per avere un insieme meglio confrontabile dei campioni, i pazienti sono stati scelti in modo che fossero dello stesso sesso e avessero la stessa età.

I campioni sono stati processati contemporaneamente e di ciascuno sono stati eseguiti 4 replicati indipendenti necessari per una valutazione statistica dei risultati.

La geometria di deposizione degli spot sulle piastre metalliche dello spettrometro di massa è stata progettata in modo che i replicati di ogni campioni risultassero alternati (figure 4.1, 4.2 e 4.3). Con questo accorgimento, qualsiasi errore o deriva strumentale del sistema si riflette allo stesso modo su i tre diversi campioni.

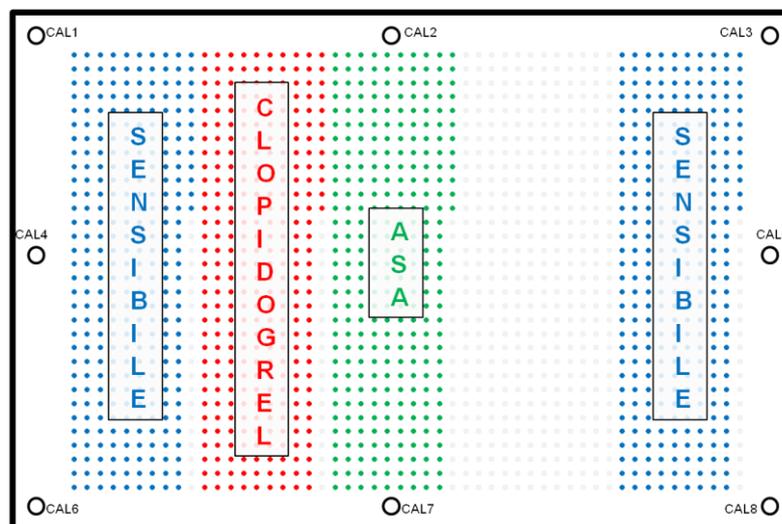


FIGURA 4.1: Geometria della deposizione dell'eluato della separazione cromatografica, dei tre campioni sulla piastra "A" dello spettrometro di massa.

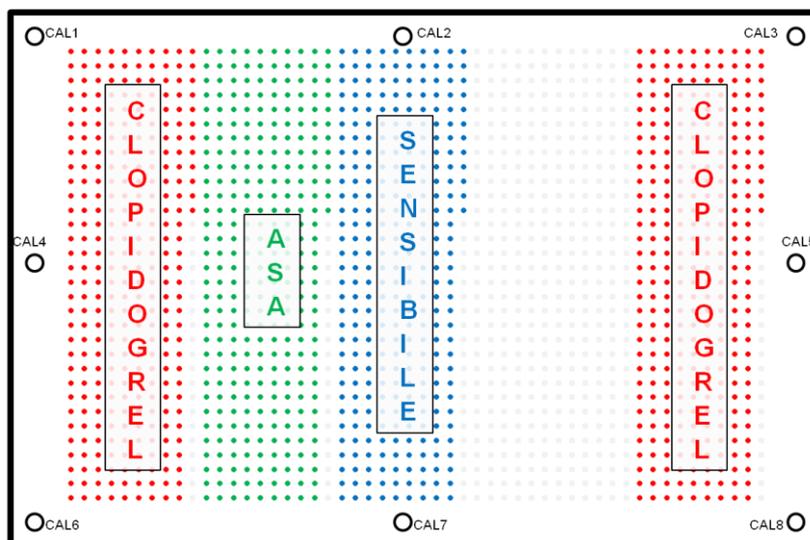


FIGURA 4.2: Geometria della deposizione dell'eluato della separazione cromatografica, dei tre campioni sulla piastra "B" dello spettrometro di massa.

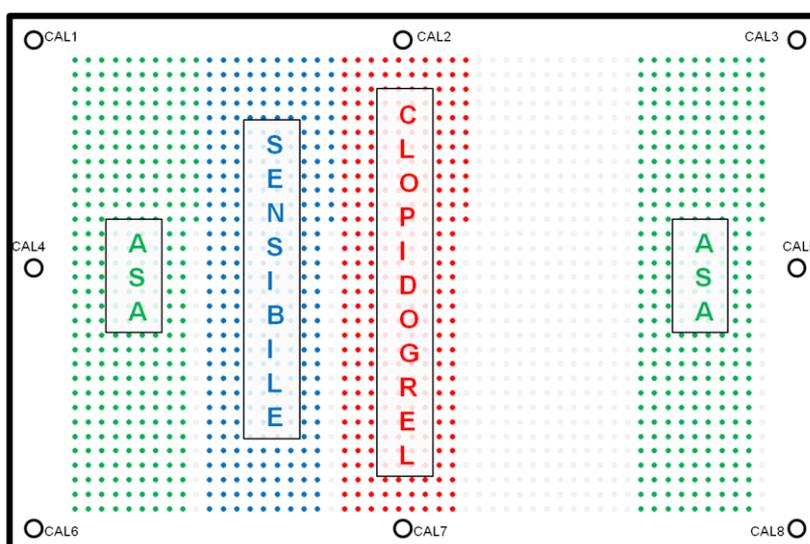


FIGURA 4.3: Geometria della deposizione dell'eluato della separazione cromatografica, dei tre campioni sulla piastra "C" dello spettrometro di massa.

Al termine delle analisi allo spettrometro di massa, gli spettri risultanti sono stati interpretati e confrontati con le banche di dati internazionali per identificare le proteine con la tecnica del "Peptide Mass Fingerprinting". Dal grado di sovrapposizione tra il "set" dei dati sperimentali e quelli presenti all'interno delle banche di dati, è stato ricavato, mediante procedimenti matematici e statistici, un punteggio (score) che definisce la probabilità che l'identificazione della proteina sia corretta.

I motori di ricerca delle banche di dati generalmente riescono ad identificare solo una frazione degli spettri acquisiti con procedure LC/MS/MS di un digerito proteico. Sottili variazioni negli algoritmi utilizzati per la ricerca nelle banche di dati e la

modalità di acquisizione gli spettri MS/MS possono fornire risultati considerevolmente diversi. I dati ottenuti debbono pertanto essere successivamente rielaborati e organizzati da appositi programmi di analisi.

4.1 Identificazione delle proteine

“Scaffold”, il programma scelto per questa analisi, combina in modo probabilistico i risultati effettuati con diversi motori di ricerca, tra cui “Sequest”, “Mascot” e “X!tandem”. In questo modo il programma di elaborazione è in grado di realizzare una maggiore confidenza (>95%) nell’interpretazione degli spettri MS/MS.

Per confrontare tra loro i risultati dei motori di ricerca nelle banche di dati, in primo luogo abbiamo normalizzato ciascun risultato in modo indipendente utilizzando l’algoritmo “Peptide Prophet”.

I diversi “score”, che rappresentano per ciascuno spettro una stima della probabilità e che sono stati ottenuti con i diversi motori di ricerca (“Sequest”, “Mascot” e “X!Tandem”), sono stati combinati assieme dal programma “Scaffold” e tradotti in un **punteggio discriminante** (discriminant score).

Come mostrato in figura 4.4, utilizzando questo criterio di analisi del programma “Scaffold”, in grado di mediare i valori derivanti da tre diversi motori di ricerca, la probabilità di identificazione delle proteine calcolata rispetto a quella teorica si avvicina molto alle condizioni di idealità (retta tratteggiata).

Una volta che l’algoritmo “Peptide Prophet” calcola il punteggio discriminante per tutti gli spettri di un campione, il programma crea un istogramma (figura 4.5) che mette in relazione il numero di spettri con un determinato “score” discriminante calcolato.

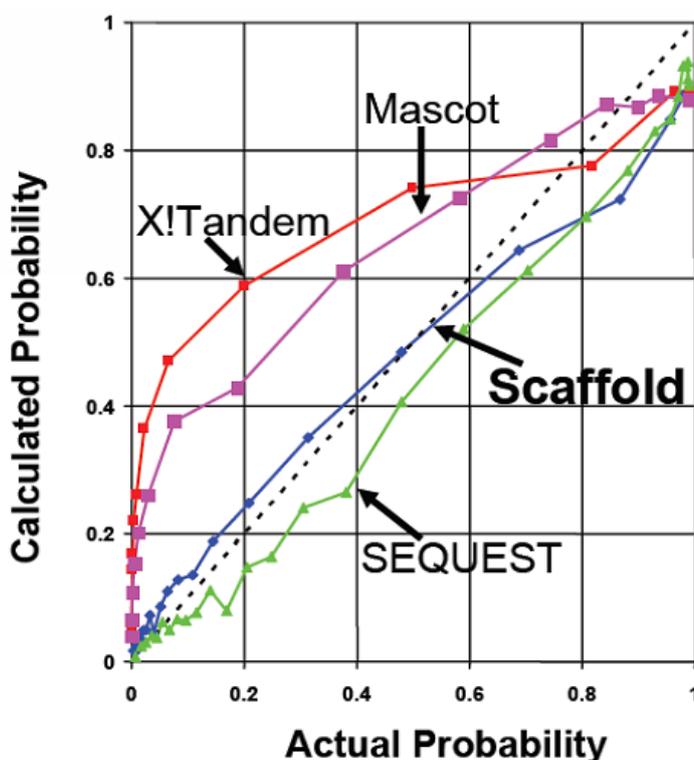


FIGURA 4.4: Probabilità di identificazione calcolata (dai vari motori di ricerca) e teorica (linea tratteggiata).

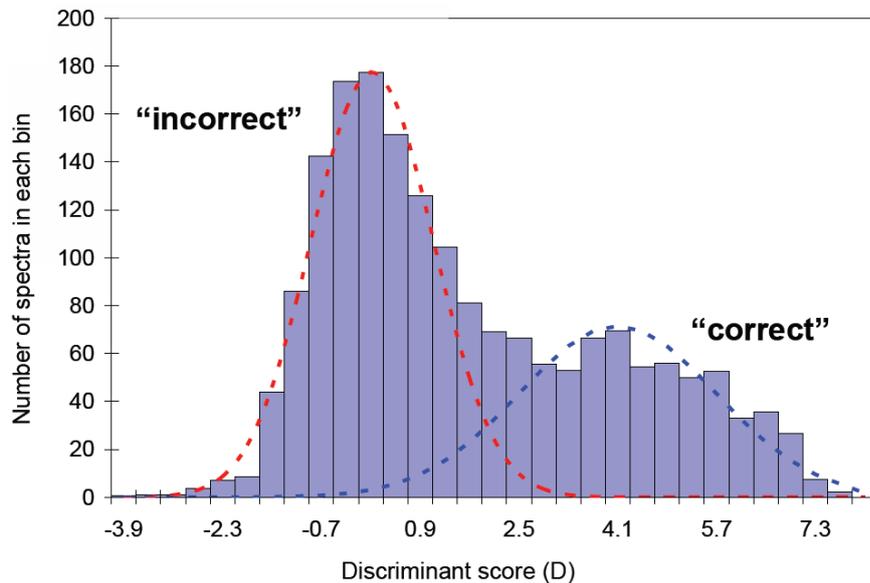


FIGURA 4.5: Rappresentazione grafica dell'applicazione dell'algoritmo "Peptide Prophet" a tutti gli spettri di un campione.

Secondo una distribuzione statistica standard di tipo gaussiano è possibile individuare nell'istogramma una distribuzione corretta e una distribuzione non corretta. Una volta individuate le due distribuzioni, "Peptide Prophet" usa la statistica Bayesiana per calcolare se un dato valore sia corretto, una volta fissato un punteggio discriminante D.

La probabilità di un peptide associata al suo punteggio discriminante è l'altezza della distribuzione corretta diviso l'altezza della somma delle altezze tutte le distribuzioni corrette e non corrette.

Con questi algoritmi statistici vengono calcolate la probabilità di identificazione delle proteine.

Il programma permette inoltre di impostare un ulteriore filtro, sia sulle proteine^[24] che sui peptidi^[25], a seconda del limite di probabilità minima di identificazione, sul quale vogliamo basare l'analisi. In questo modo si definiscono i margini delle due distribuzioni corretta e non corretta. Nella nostra analisi, per esempio, abbiamo impostato questi parametri in modo che le probabilità dell'identificazione della proteina e del peptide fossero maggiori o uguali al 95%. Questo significa che nell'analisi vengono prese in considerazione solo quelle proteine e quei peptidi che hanno una probabilità di identificazione $\geq 95\%$.

Nel seguente grafico (figura 4.6) sono illustrati i criteri con cui viene assegnato il valore della probabilità ad una proteina.

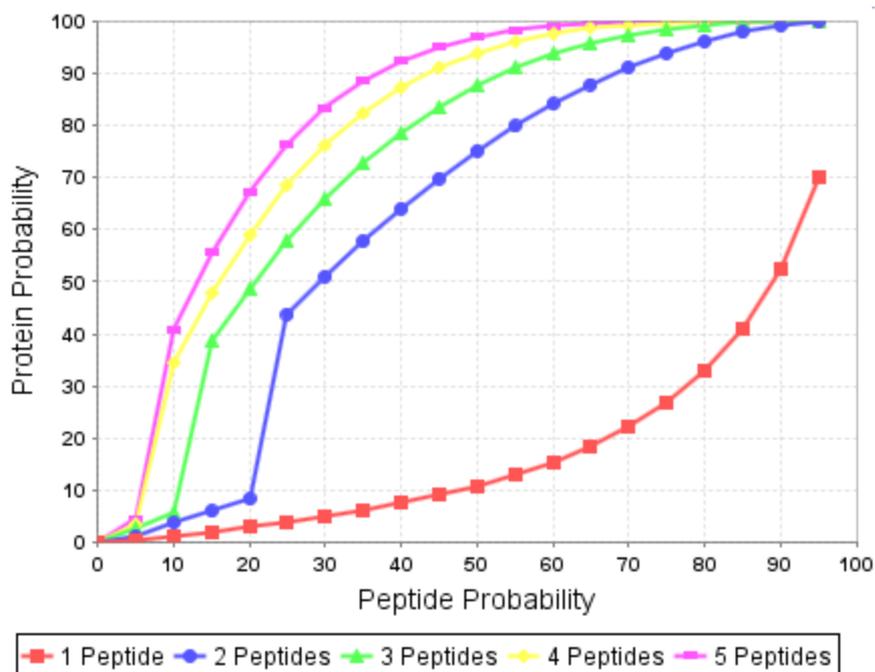


FIGURA 4.6: Rappresentazione grafica della probabilità di identificazione di una proteina in relazione alla probabilità di identificazione ed al numero dei peptidi ad essa associata.

Le proteine identificate da un solo peptide, per quanto l'identificazione del peptide possa essere buona, non potranno mai avere una probabilità del 95%. Impostando quindi il filtro di probabilità della proteina al 95% noi abbiamo di fatto escluso tutte le proteine identificate da un solo peptide. Inoltre, le proteine identificate con un numero maggiore di peptidi sono state comprese nell'identificazione solo se la probabilità complessiva di identificazione dei peptidi che le compongono era maggiore od uguale al valore richiesto per raggiungere la soglia del 95%, come indicato nel grafico e riportato nella seguente tabella.

Numero di peptidi per l'identificazione di una proteina	Probabilità minima richiesta nell'identificazione dei peptidi
2	75%
3	65%
4	55%
5	45%

4.2 Principio della parsimonia

Nell'elaborazione dei dati e nell'identificazione delle proteine "Scaffold" applica un ulteriore elemento di restrizione definito "principio della parsimonia"^[26]. Secondo

questo riassortimento dei dati, i peptidi vengono classificati in due categorie: discreti e degenerati. Sulla base di questa suddivisione le proteine si ripartiscono in sei categorie gerarchiche:

- **Distinte;**
- **Differenziabili;**
- **Sottomettibili;**
- **Gruppi-madre;**
- **Sottogruppi;**
- **Equivalenti.**

La figura 4.7 illustra schematicamente i peptidi discreti (in blu) A, B, C, D, E, G e H, che sono assegnati esattamente ad una sola proteina e peptidi degenerati F, I, J, K, L, M, e N, i quali sono assegnati a più di una proteina.

Protein	Peptide Sequences													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Protein 1	---	---	---	---										
Protein 2					---	---	---	---	---	---				
Protein 3						---	---	---	---	---	---			
Protein 4									---	---	---			
Protein 5											---	---	---	
Protein 6													---	---
Protein 7													---	---

FIGURA 4.7: Applicazione del principio della parsimonia ad un ipotetico gruppo di 7 proteine identificate.

Utilizzando le classificazioni indicate in precedenza si possono distinguere le proteine **equivalenti**, caratterizzate dallo stesso insieme di peptidi degeneri, corrispondenti alle proteine 6 e 7 riportate nell'esempio.

Le proteine definite **sottogruppi** contengono peptidi comuni ad un'altra proteina che però è caratterizzata da un numero maggiore di peptidi. Nella figura la proteina 4 è un sottogruppo della proteina 3 che, a sua volta, è un **gruppo-madre**. Una proteina è

classificata come gruppo-madre quando contiene i peptidi degenerati di almeno un'altra proteina, che verrà definita sottogruppo. Nella figura, la proteina 3 è un gruppo-madre in quanto include tutti i peptidi che identificano la proteina 4.

Una proteina definita **sottomettibile** contiene peptidi degenerati che possono essere distribuiti come sottogruppi di altre due o più proteine. Nella figura i peptidi J e K della proteina 5 la rendono sottomettibile alla proteina 3, mentre i peptidi L e M alle proteine 6 e 7. Le proteine sottomettibili sono quindi un caso particolare di proteine sottogruppo.

Le proteine definite **differenziabili** sono quelle che possono essere distinte da altre proteine in quanto hanno almeno un peptide discreto. Sono proteine differenziabili la proteina 2 e la proteina 3.

Una proteina viene definita **distinta**, come nel caso della proteina 1, quando i peptidi che la identificano sono tutti discreti.

Applicando l'analisi della parsimonia a queste sette proteine identificate, l'elenco si riduce a quattro specie. Le proteine non ridondanti identificate sono: 1, 2, 3, e 6.

Il principio della parsimonia viene utilizzato per raggruppare le proteine ridondanti ricavando, alla fine, un insieme di proteine più conciso derivante dalla massima assegnazione di tutte le sequenze peptidiche.

Per meglio comprendere l'effetto dell'applicazione del principio della parsimonia applicata ai risultati ottenuti dal nostro lavoro sperimentale, abbiamo riassunto i dati ottenuti di volta in volta nel corso dell'elaborazione statistica. Nella tabella seguente (figura 4.8) è illustrato come varia il numero di proteine identificate utilizzando, per ogni campione, i dati forniti da tre diverse banche di dati: **IPI**, **SwissProt** e **NCBI**.

	<u>Sensibile</u>			<u>Resistente al Clopidogrel</u>			<u>Resistente all'ASA</u>		
	IPI	sProt	NCBI	IPI	sProt	NCBI	IPI	sProt	NCBI
Banca dati									
Proteine Identificate	960	290	2979	1556	424	5160	889	325	3066
Proteine raggruppate con il principio della parsimonia:									
Parsimonia	125	151	117	205	253	209	180	220	174

Ripartizione delle proteine nelle 6 categorie gerarchiche:									
Discrete	34	113	8	51	196	18	49	196	18
Differenziabili	11	20	8	24	38	22	20	11	14
Gruppo-Madre	32	5	45	52	7	85	35	7	62
Sottomettibili	0	1	2	9	7	7	0	0	4
Sottogruppo	109	29	222	224	65	436	95	19	209
Equivalenti	48	13	56	78	12	84	76	6	80

FIGURA 4.8: Variazione del numero di proteine identificate utilizzando, per ogni campione, i dati forniti dalle banche di dati IPI, SwissProt e NCBI, prima e dopo l'applicazione del principio della parsimonia.

Come si può facilmente riscontrare, le tre banche di dati forniscono in prima battuta, come dato grezzo, sostanziali differenze che in termini quantitativi sul numero di proteine identificate spaziano addirittura entro un ordine di grandezza. Indipendentemente dalla banca dati di partenza, applicando il principio della parsimonia si ottengono valori molto più omogenei. Questo risultato conferma l'utilità dell'elaborazione scelta per eliminare la ridondanza.

La banca dati **NCBI** ha un'elevata ridondanza, mentre la banca dati **SwissProt** ha un'identificazione più restrittiva. La banca dati **IPI** mostra caratteristiche intermedie perciò è stata scelta per effettuare l'elaborazione analitica finale dei nostri risultati.

4.3 Confronto semi-quantitativo

Il programma "Scaffold", oltre ad assicurare un alta confidenza di identificazione, ha permesso di eseguire un confronto semi-quantitativo.

"Scaffold" utilizza la conta spettrale come metodo di comparazione quantitativa. È stato infatti dimostrato che esiste una linearità tra il numero di spettri che identificano un peptide relativo ad una proteina e l'abbondanza di quella proteina nel campione analizzato^[27].

4.3.1 Normalizzazione globale

"Scaffold" esegue una **normalizzazione globale** per poter paragonare tra loro i tre campioni sulla base del **conteggio spettrale**. Questo parametro, relativo ad ogni proteina identificata e calcolato per ogni replica di ciascun campione, rappresenta il numero di volte che tutti i peptidi associati a quella proteina sono stati identificati.

Con questo tipo di normalizzazione, ogni proteina identificata in ciascuna replica, e in particolar modo il suo corrispondente conteggio spettrale, viene normalizzata moltiplicandola per il **coefficiente di normalizzazione**. Questo coefficiente, che una volta adottato rimane sempre lo stesso per normalizzare tutte le proteine di uno stesso replicato, è calcolato facendo il rapporto fra il valore medio della conta spettrale totale (di tutti e quattro i replicati dei tre campioni) e la conta spettrale totale di quel preciso replicato.

Applicando la normalizzazione globale è come se il numero totale degli spettri fosse lo stesso in ogni replica di ciascun campione, in modo da poter paragonare tra loro le singole conte spettrali relative ad ogni replica.

La riproducibilità dell'analisi in spettrometria di massa è fondamentale per l'applicazione di una normalizzazione di tipo globale. Nel grafico seguente (figura 4.9) riportiamo come esempio il profilo della risposta in spettrometria di massa del campione di piastrine relativo al paziente "sensibile".

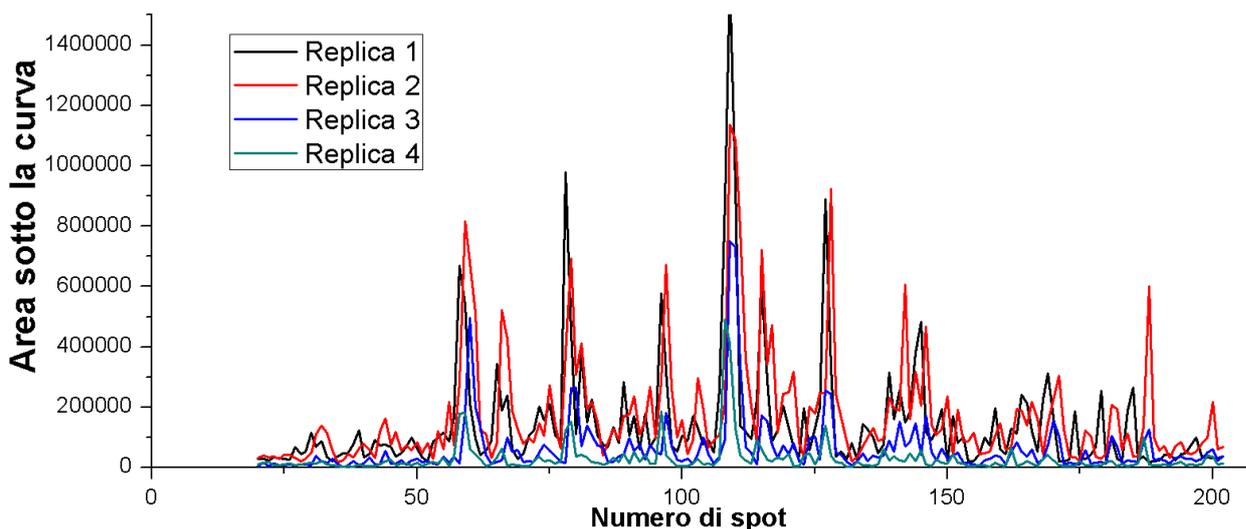


FIGURA 4.9: Riproducibilità del profilo spettrale nell'analisi in spettrometria di massa (esempio del campione "sensibile")

Questo grafico è stato ricostruito con i dati che abbiamo ricavato dall'analisi in spettrometria di massa dei 4 replicati del campione "sensibile". La figura mostra come varia l'area sotto la curva di ciascuno spot ed è disposta secondo l'ordine di deposizione e quindi di eluizione dall'HPLC. L'area sotto la curva è stata calcolata, per ogni spot, sommando le aree dei picchi del rispettivo spettro di massa. Il grafico è una sorta di cromatogramma in cui il segnale registrato è l'intensità dello spettro di

massa ed il numero degli spot corrisponde ai tempi di ritenzione della separazione, considerando che ciascuno spot copre un intervallo di 12 secondi.

La sovrapposizione delle quattro repliche indipendenti del medesimo campione iniziale mostra una ottima riproducibilità del dato.

4.3.2 Test dell'ANOVA

Il test statistico per l'analisi semi-quantitativa che abbiamo utilizzato, test dell'ANOVA, permette di confrontare contemporaneamente più di due campioni.

Abbiamo paragonato i tre campioni clinici di piastrine considerandoli come tre gruppi di dati costituiti da 4 repliche. Abbiamo confrontato la variabilità interna a questi gruppi (tra le 4 repliche) con la variabilità tra i gruppi. Teoricamente, l'oscillazione all'interno di un campione, nei suoi replicati, deve essere minore dell'oscillazione tra quel campione rispetto ad un altro e solo questa condizione può consentire di ricavare una differenza quantitativa valida statisticamente.

Applicando questo criterio di confronto, "Scaffold" genera automaticamente una lista di proteine per le quali la differenza quantitativa tra i tre diversi campioni è ritenuta valida sulla base del test statistico ANOVA.

Per una maggiore accuratezza dell'analisi, abbiamo fatto un'ulteriore selezione andando a verificare per ogni proteina la qualità degli spettri di ogni singola replica.

Abbiamo considerato validi i valori statistici solo nei casi in cui, per ogni campione, la proteina fosse stata identificata con una probabilità del 95% in almeno tre repliche su quattro.

Per avere un'idea della diversità dei campioni provenienti dai tre diversi pazienti abbiamo confrontato le variazioni dei profili delle aree sotto la curva di spettrometria di massa riportate nel grafico seguente (figura 4.9).

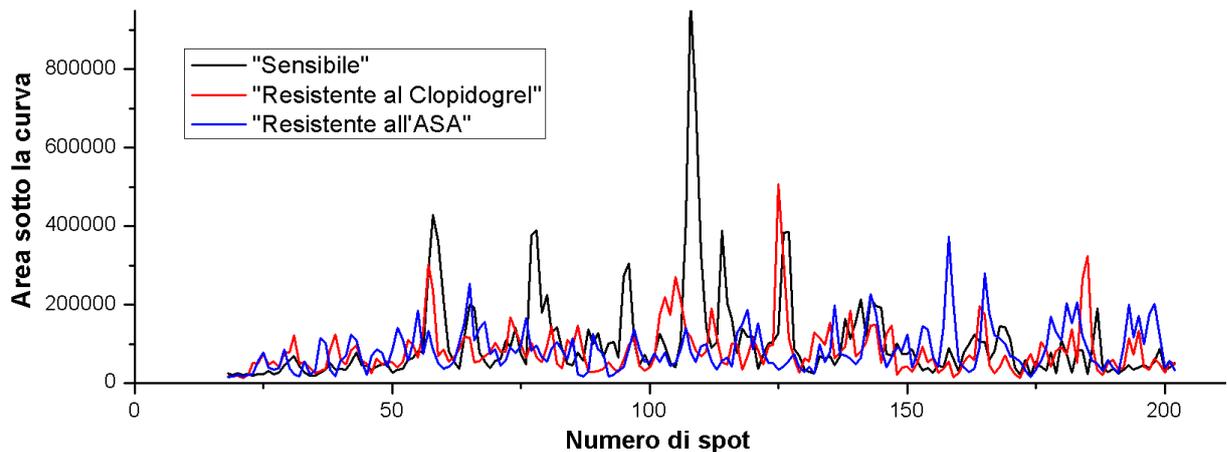


FIGURA 4.10: Confronto dei profili spettrale nell'analisi in spettrometria di massa dei tre campioni: "sensibile", "Resistente al Clopidogrel" e "Resistente all'ASA"

Il grafico è stato costruito mediando, per ogni campione, i valori dei dati ricavati dall'analisi di massa dei 4 replicati. Da un'osservazione grossolana della figura che compara i tre risultati possiamo affermare che i profili sono molto diversi tra loro e in particolare le divergenze maggiori sembrano sussistere tra il profilo del campione "sensibile" rispetto a quelli dei campioni dei pazienti "resistenti".

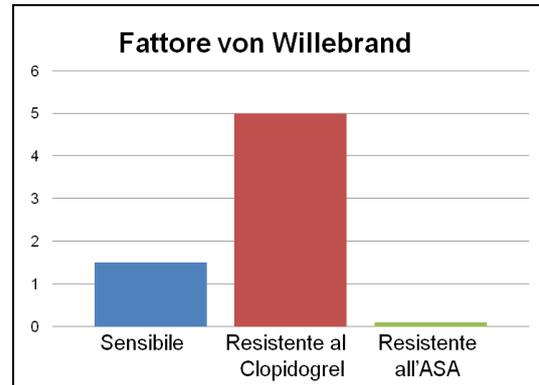
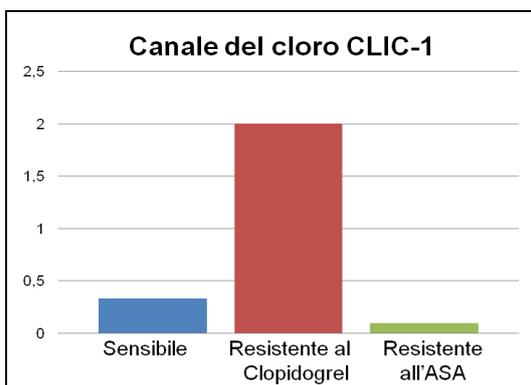
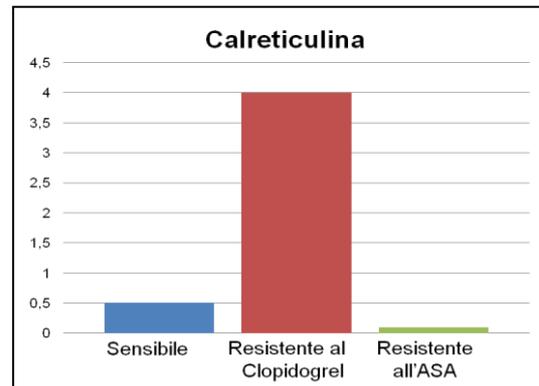
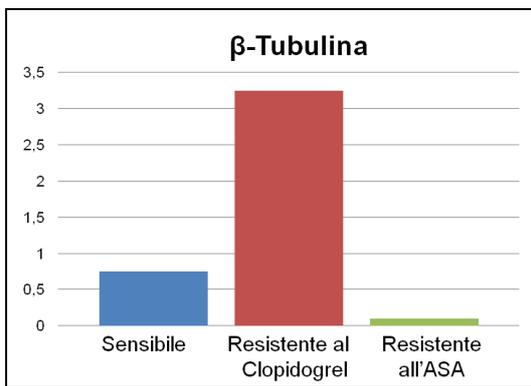
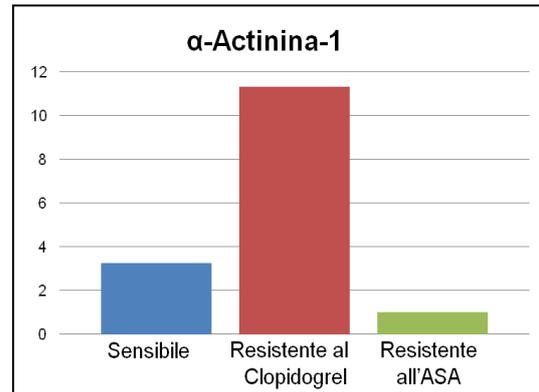
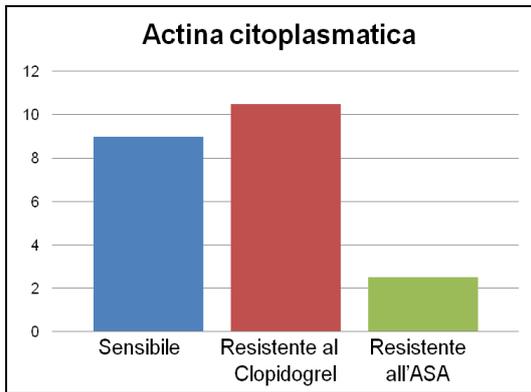
4.4 Proteine differenzialmente espresse

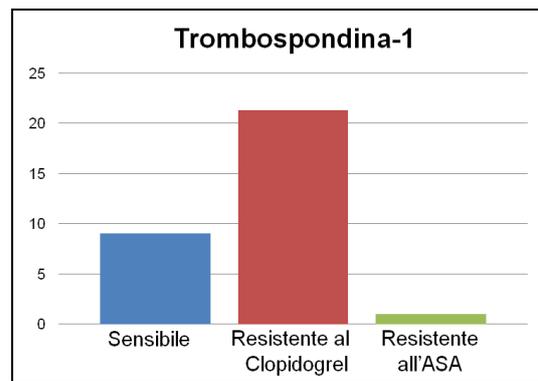
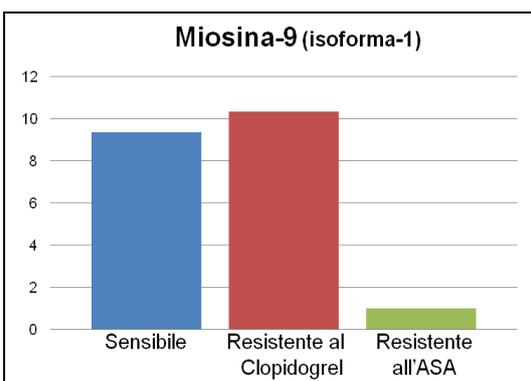
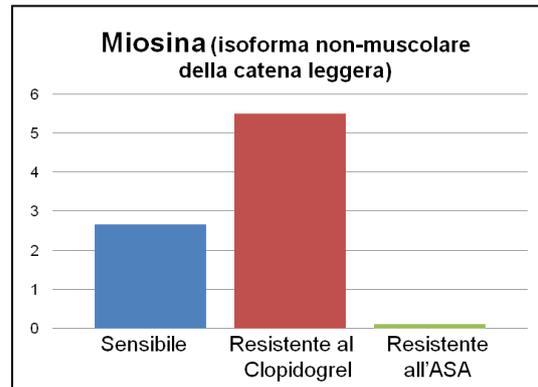
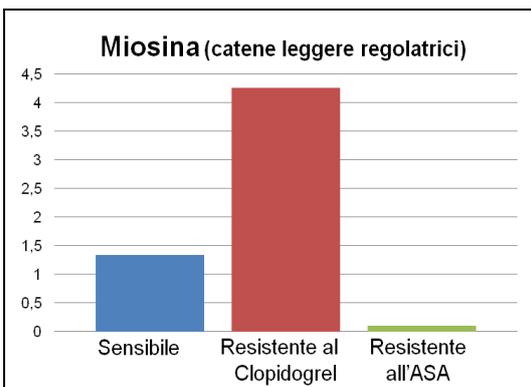
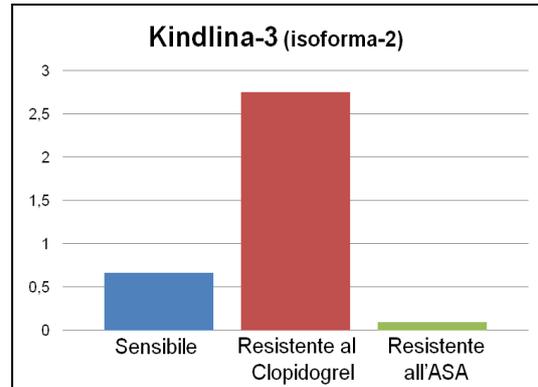
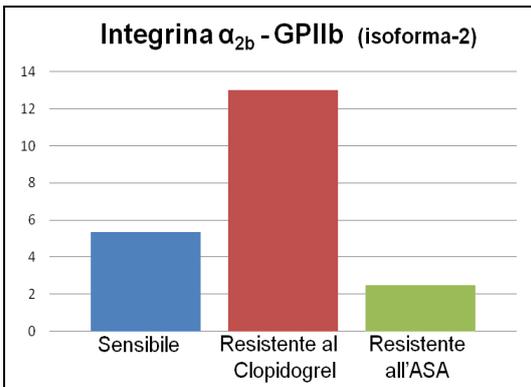
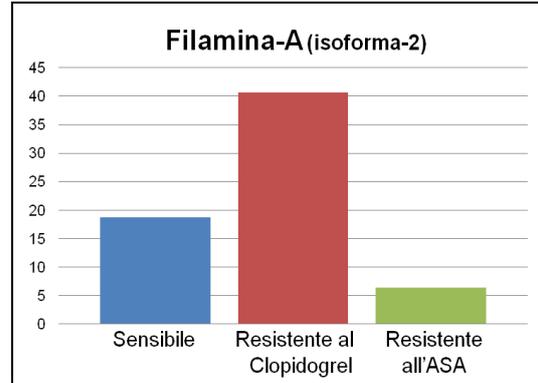
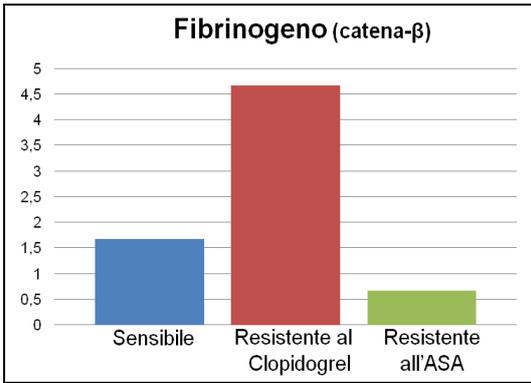
Ad ogni proteina ritenuta differenzialmente espressa dal test statistico ANOVA è stato associato un istogramma costruito recuperando i dati dei conteggi spettrali.

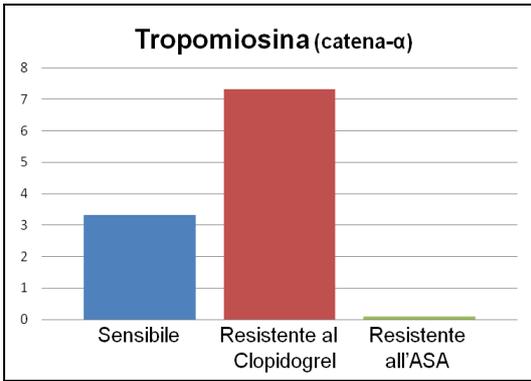
Questo grafico a barre fornisce una conferma visiva di una espressione differenziale tra i tre campioni segnalata dall'analisi quantitativa.

Il valore del conteggio spettrale per ogni campione è stato calcolato mediando i conteggi spettrali delle singole repliche, prendendo in considerazione solo quelle che risultano avere una probabilità di identificazione superiore al 95% in almeno 3 repliche su 4.

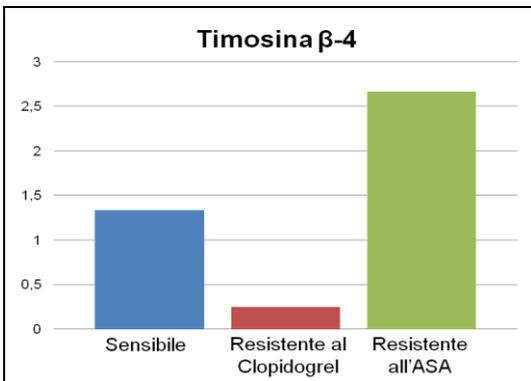
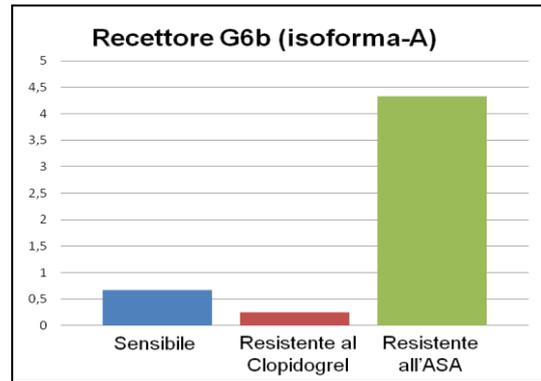
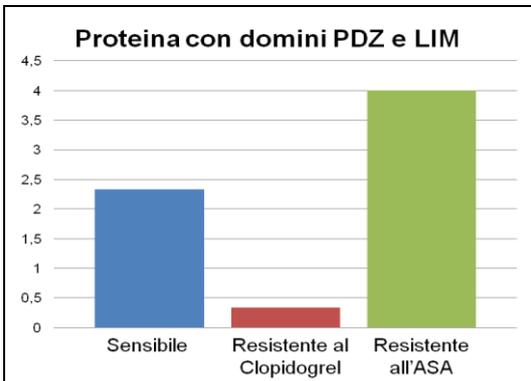
4.4.1 Proteine che presentano un aumento di espressione nel campione relativo al paziente resistente al Clopidogrel



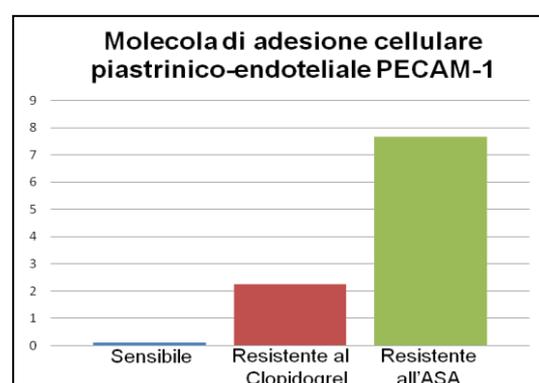
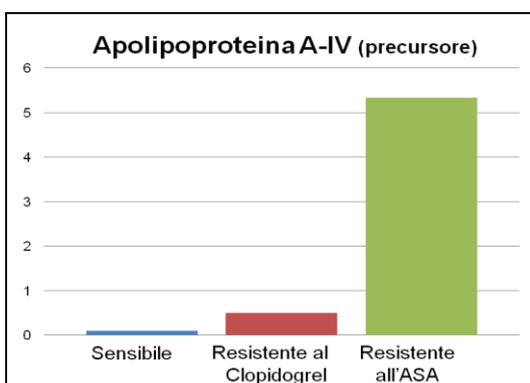
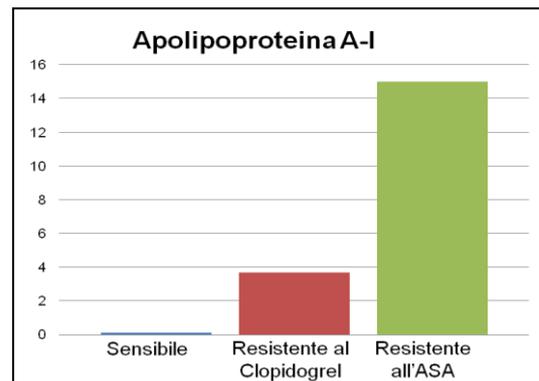
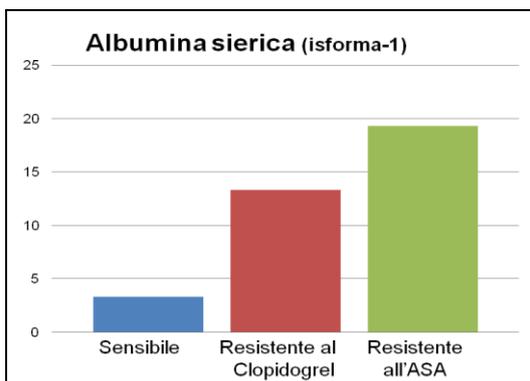
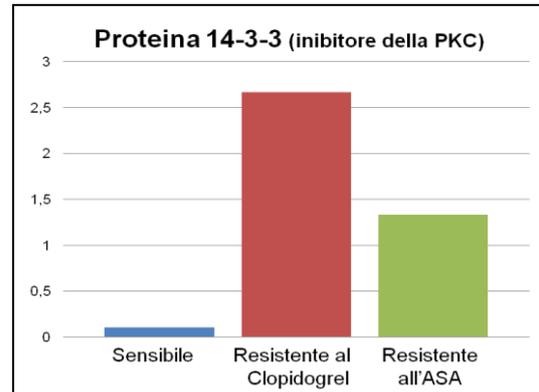
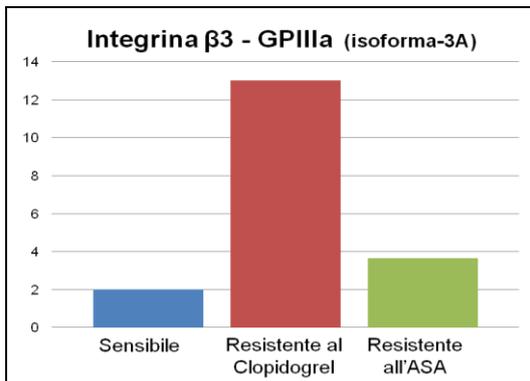


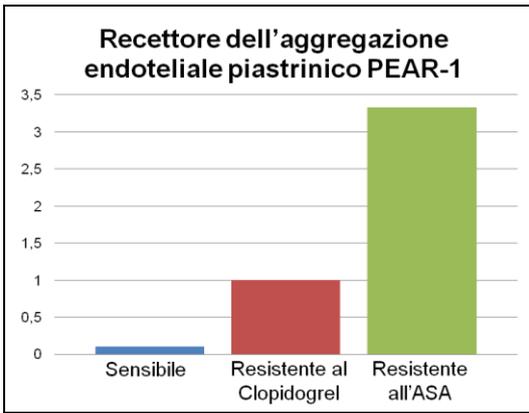


4.4.2 Proteine che presentano un aumento di espressione nel campione relativo al paziente resistente all'ASA

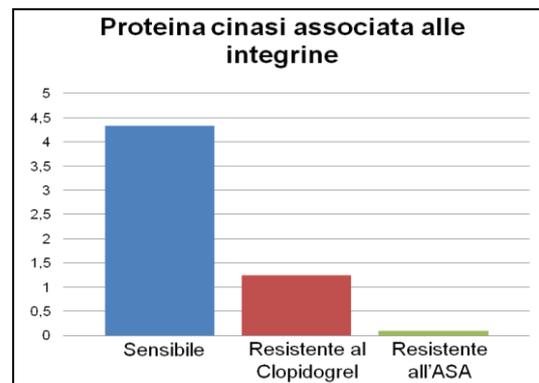
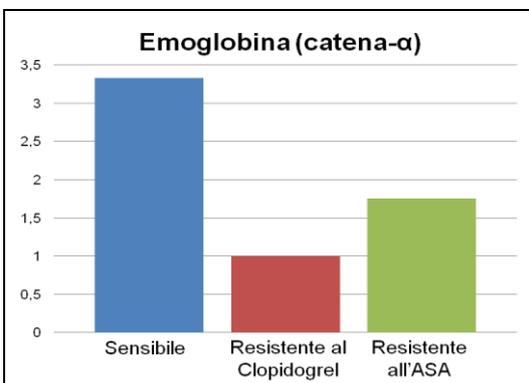


4.4.3 Proteine che presentano un aumento di espressione nei campioni relativi ad entrambi i pazienti resistenti alla terapia





4.4.4 Proteine che presentano una riduzione di espressione nei campioni relativi ad entrambi i pazienti resistenti alla terapia



4.5 Discussione dei risultati

L'analisi che è stata eseguita nel corso di questa Tesi ha preso in considerazione solo tre campioni da tre diversi tipi di pazienti. Per questo motivo non possiamo essere in grado di elaborare alcuna ipotesi sui marcatori coinvolti nel meccanismo della resistenza. I dati ottenuti, per quanto solidi statisticamente, si limitano al confronto di tre soli campioni e non possono essere utilizzati per generalizzare.

Le differenze osservate, infatti, potrebbero rientrare semplicemente nelle fluttuazioni della variabilità individuale senza alcun rapporto con la diversa risposta al trattamento terapeutico antiaggregante.

Possiamo, tuttavia, "curiosare" fra le proteine differenzialmente espresse che emergono da questa analisi, focalizzandoci su quelle ritenute più interessanti e collegabili in qualche modo ai meccanismi dell'attivazione piastrinica.

Buona parte delle proteine identificate e valutate essere differenzialmente espresse dal test statistico ANOVA sono proteine del citoscheletro. Queste contribuiscono sia al mantenimento della forma discoidale, tipica dello stato di riposo, che alla sua modificazione, in seguito a stimolazione.

Sono state individuate sia proteine costitutive del citoscheletro, come quelle dei microfilamenti (**actina**) e dei microtubuli (**tubulina**), sia molteplici proteine regolatrici, tra cui:

- **Actinina e tropomiosina**, che organizzano i microfilamenti in fasci paralleli;
- **Filamina**, che organizza i microfilamenti in reticoli;
- **Timosina β -4**, che ostacola la formazione dei filamenti legandosi ai singoli monomeri di actina;
- **Miosina**, che si muove sui microfilamenti;
- I **domini PDZ e LIM** fanno parte di proteine adattatrici che modulano interazioni funzionali fra il citoscheletro e proteine effettrici coinvolte nella trasduzione del segnale. Il dominio PDZ, infatti, lega l'actina mentre il dominio LIM riconosce proteine del "signalling pathway"^[28].

Abbiamo potuto osservare anche un'espressione differenziale delle proteine costitutive dei recettori di membrana tipici delle piastrine.

Il recettore integrinico GPIIb/IIIa (α 2b β 3) è formato da due subunità: **GPIIb** e **GPIIIa**. Il suo ruolo nell'attivazione piastrinica è di primaria importanza. Legando il **fattore von Willebrand** assicura un'adesione stabile della piastrina alla parete endoteliale mentre il legame con il **Fibrinogeno** innesca il processo di aggregazione piastrinica. Nell'attivazione di questo recettore è coinvolta la **Kindlina**, anch'essa differenzialmente espressa. Questa proteina legandosi alla coda citoplasmatica dell'integrina la collega al sottostante citoscheletro di actina contribuendo ad aumentare la forza adesiva e la coesione piastrinica.

Altri fattori differenzialmente espressi sono in qualche modo collegabili all'aggregazione piastrinica. Ad esempio, studi supportano l'ipotesi che l'interazione del Fibrinogeno con la **Trombospondina** sulla superficie delle piastrine attivate possa rappresentare uno "step" importante nel processo di aggregazione^[29].

Anche il recettore dell'aggregazione endoteliale piastrinico **PEAR-1**^[30] e la molecola di adesione cellulare piastrinico-endoteliale **PECAM-1**^[31] sono coinvolti entrambi sia nell'adesione cellulare che nella trasduzione del segnale.

Al recettore G6b e in particolare alla sua isoforma G6b-B è stata attribuita l'inibizione dell'aggregazione piastrinica e l'attivazione da parte agonisti come ADP e collagene. All'isoforma **G6b-A** è stato riconosciuto un ruolo di controparte attivatrice, con un'azione inibitoria su G6b-B^[32].

Alcune proteine differenzialmente espresse emerse da questa analisi sono coinvolte nel metabolismo cellulare delle piastrine, specialmente nelle segnalazioni intracellulari che interessano l'attivazione piastrinica. La **proteina cinasi associata alle integrine** svolge un doppio ruolo nelle piastrine: si lega ai recettori integrinici e ne regola le funzioni ed è coinvolta nella secrezione degli α -granuli^[33].

La **proteina 14-3-3** è in grado di inibire la proteina cinasi C (PKC), coinvolta nella cascata delle reazioni intracellulari che comprendono l'attivazione dell'integrina GPIIb/IIIa ($\alpha 2b\beta 3$) e portano all'aggregazione piastrinica^[34].

La **calreticulina**^[35] e il canale del cloro **CLIC-1**^[36] sono due proteine associate al controllo dei movimenti intracellulari degli ioni calcio, responsabili, quando presenti in grandi quantità nel citoplasma piastrinico, dell'attivazione di varie vie di segnalazione tutte finalizzate all'attivazione piastrinica.

La tabella seguente (figura 4.11) è stata ricostruita con i dati ottenuti da questa analisi e riporta, per ogni proteina identificata e differenzialmente espressa in tutti e tre i campioni, la localizzazione cellulare e la funzione biologica sulla base delle informazioni derivate dalla letteratura.

Localizzazione e funzione biologica		Proteina differenzialmente espressa nei tre campioni
Citoscheletro	Costituzione	Actina citoplasmatica
		α -Actinina
		β -Tubulina
	Regolazione	Filamina-A (isoforma-2)
		Miosina (catene leggere regolatrici)
		Miosina (isoforma non muscolare della catena leggera)
		Miosina-9 (isoforma-1)
		Proteina con domini PDZ e LIM
		Timosina β -4
		Tropomiosina

Recettori di membrana		Integrina $\alpha 2b$ - GPIIb (isoforma-2)
		Integrina $\beta 3$ - GPIIIa (isoforma-3A)
		Molecola di adesione cellulare piastrinico-endoteliale PECAM-1
		Recettore dell'aggregazione endoteliale piastrinico PEAR-1
		Recettore G6b (isoforma-A)
Atmosfera peripiastrinica		Albumina sierica (isoforma-1)
		Apolipoproteina A-I
		Apolipoproteina A-IV (precursore)
		Emoglobina (catena- α)
		Fattore von Willebrand
		Fibrinogeno (catena- β)
		Trombospondina-1
Trasduzione del segnale intracellulare	Mobilizzazione degli ioni calcio	Calreticulina
		Canale del cloro CLIC-1
	Interazione integrinica	Kindlina-3 (isoforma-2)
		Proteina cinasi associata alle integrine
	Inibizione della PKC	Proteina 14-3-3

FIGURA 4.11: Localizzazione cellulare e funzione biologica delle proteine identificate e differenzialmente espresse in tutti e tre i campioni.

Anche se, come detto precedentemente, l'analisi fatta su tre campioni non ha un valore predittivo utile per poter avanzare ipotesi sui marcatori della resistenza farmacologica, è interessante osservare che:

- Molte delle proteine differenzialmente espresse sono coinvolte direttamente nell'adesione, nell'attivazione e nell'aggregazione piastrinica. Questo potrebbe far pensare ad una maggior predisposizione all'attivazione piastrinica dei pazienti resistenti al trattamento farmacologico antiaggregante.
- La diversità con cui le proteine sono più o meno espresse dai due tipi di resistenza conferma la diversità dei meccanismi d'azione di ASA e Clopidogrel.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Questa di Tesi di Laurea si è inserita nelle fasi iniziali di messa a punto del progetto strategico della ricerca finalizzata del Ministero della Salute "APICE". L'obiettivo di tale progetto è una valutazione delle proteine piastriniche, attraverso un'indagine proteomica, espresse nelle diverse fasi cliniche della Sindrome Coronarica acuta (ACS). In particolare, il progetto si prefigge di definire possibili differenze dei profili proteici esibiti dai pazienti che rispondono oppure che non rispondono alla terapia farmacologica.

Le particolari caratteristiche del campione piastrinico non hanno permesso l'utilizzo di protocolli di analisi proteomica già precedentemente convalidati su miscele complesse. Lo sviluppo e la sperimentazione di una metodica alternativa di analisi sono stati i risultati più promettenti di questo lavoro di Tesi.

La metodologia sperimentale messa a punto per il trattamento e la manipolazione dei campioni clinici, la loro analisi strumentale e l'elaborazione finale dei dati, è stata attuata su tre campioni contenenti il sedimento delle piastrine isolate dal sangue periferico di pazienti affetti da ACS e reclutati appositamente nell'ambito del progetto APICE. I tre pazienti analizzati sono rappresentativi di differenti sensibilità al trattamento terapeutico antiaggregante: a fronte di un soggetto sensibile, gli altri risultano resistenti rispettivamente all'ASA ed al Clopidogrel.

L'esecuzione completa di tutta la "filiera", a partire dal campione clinico fino alla elaborazione finale del dato corredato della relativa validità statistica, ha permesso di sperimentare tutte le sfaccettature multidisciplinari della tecnologia proteomica.

Alla fine, oltre ad ottenere un'ampia lista di proteine identificate, siamo riusciti a riscontrare, con l'utilizzo di un software che esegue un confronto semi-quantitativo, una serie di proteine differenzialmente espresse tra i tre campioni.

Queste diversità fra i tre campioni analizzati, pur non avendo un valore diagnostico generale in relazione al tipo di resistenza al trattamento farmacologico, hanno permesso tuttavia di sottolineare interessanti osservazioni.

Molte delle proteine differenzialmente espresse, infatti, sono coinvolte direttamente nell'adesione, nell'attivazione e nell'aggregazione piastrinica. Questo sembrerebbe suggerire una situazione fenotipica diversa fra i tre campioni analizzati. Infatti, le piastrine relative ai due pazienti resistenti al trattamento farmacologico antiaggregante esibirebbero profili di espressione proteica coerenti con un certo grado di attivazione verso l'aggregazione.

Inoltre, la diversità nei livelli con cui le proteine sono più o meno espresse nei due tipi di resistenza confermerebbe la diversità dei meccanismi di resistenza all'azione di ASA e Clopidogrel.

E' tuttavia evidente che qualsiasi ipotesi di spiegazione degli eventuali meccanismi di resistenza, sulla base dei risultati della presente Tesi di Laurea, più che inopportuna è indebita. Questo lavoro di Tesi, infatti, rappresenta la messa a punto del protocollo sperimentale che in seguito verrà adottato come metodo di analisi per tutti i campioni del progetto APICE e pertanto ne rappresenta semplicemente il punto di partenza.

Al termine del progetto, quando i campioni analizzati avranno raggiunto un numero significativo, sarà possibile fare indagini statistiche multivariate sulle proteine ricorrenti nelle tre popolazioni di pazienti, individuando quali siano gli elementi distintivi che potranno essere indicati come marcatori. Questo riguarda il prossimo futuro del Progetto APICE. L'ambizione finale sarà, oltre alla definizione di nuovi marcatori diagnostici di resistenza alla terapia, la definizione dei meccanismi fisiopatologici di tale resistenza.

Dalla comprensione dei meccanismi del fallimento terapeutico e dal perfezionamento di una diagnosi clinica potrà sorgere una nuova era nella terapia antiaggregante per il trattamento della ACS. Sarà possibile la diagnosi rapida e accurata della resistenza ai farmaci antiplastrinici, eseguita con una misurazione di routine dell'attività piastrinica nello stesso modo cui avviene il monitoraggio del colesterolo, la pressione arteriosa e la glicemia. In questo modo sarà possibile decidere tempestivamente la modalità del trattamento antiaggregante di urgenza in pazienti colpiti da ACS, con la speranza di rendere meno infausta la prognosi che ad oggi, purtroppo, risulta mortale in circa cinque casi su cento.

MATERIALI E METODI

6.1 Estrazione delle proteine

I campioni, forniti dall'Azienda Opedaliera Universitaria di Careggi, Firenze, contengono il sedimento (pellet) delle piastrine isolate dal sangue periferico dei pazienti affetti da ACS appositamente reclutati nell'ambito del Progetto APICE.

I campioni sono stati classificati all'origine in base alle caratteristiche di resistenza/sensibilità alla terapia antiaggregante. Trasferiti da Firenze in ghiaccio secco, sono stati conservati a -80°C.

Una volta scongelato il pellet e tolta con cura la soluzione di lavaggio, sono stati aggiunti 500µl del tampone di estrazione 50mM Tris HCl pH 9, 1% Triton X100, 0,25 mM EDTA. La sospensione, lasciata in ghiaccio per 30', è stata sonicata, sempre in ghiaccio, con 5 cicli di 20" ciascuno alternati ad altrettante pause di 40" utilizzando lo strumento Soniprep 150 (MSE).

La miscela risultante è stata, infine, centrifugata a 4°C per 30' a 13000 rpm ed è stato raccolto il sovrinatante.

6.2 Determinazione proteica

All'interno dei pozzetti di una piastra "multi well" sono stati depositi, alternativamente, 10 µl di soluzione proteica di concentrazione incognita oppure 10 µl di una delle diverse soluzioni a concentrazione nota (curva standard di taratura).

Ad ogni pozzetto vengono aggiunti 200 µl di reagente con cui si svilupperà la colorazione. Per determinare il volume totale (in µl) del reagente si utilizza la seguente formula:

$(\#di\ standard + \#campioni\ incogniti) \times (2\ replicati) \times (200\ \mu l\ di\ reagente\ per\ pozzetto).$

Nel metodo **BCA** il reagente si prepara miscelando i reagenti A e B (Pierce) in parti rispettivamente 50 : 1. La piastra deve essere agitata per 30 secondi, coperta e

incubata a 37°C per 2 ore, dopodiché può essere effettuata la lettura colorimetrica a 590nm con il lettore di piastre Spectra Count (Packard).

Nel metodo **Bradford** il reagente viene preparato diluendo 1 parte di reagente concentrato (BioRad) con 4 parti di acqua distillata e deionizzata. Quando si aggiunge il reagente bisogna fare attenzione a miscelare bene.

Dopo aver lasciato 5 minuti a temperatura ambiente la piastra è pronta per la lettura colorimetrica a 590nm con il lettore di piastre Spectra Count (Packard).

Per la curva di taratura abbiamo utilizzato 5 soluzioni standard a diverse concentrazioni preparate disciogliendo la BSA nel tampone di estrazione. Come “bianco” (valore dell’assorbimento del reagente da solo) abbiamo utilizzato un pozzetto contenente 10 µl di tampone di estrazione indicato come BSA 0 µg/ml. Per ogni concentrazione abbiamo fatto 2 replicati.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	BSA 2 µg/µl	BSA 2 µg/µl	BSA 1 µg/µl	BSA 1 µg/µl								
C	BSA 1 µg/µl	BSA 1 µg/µl	BSA 0,5 µg/µl	BSA 0,5 µg/µl								
D	BSA 0,5 µg/µl	BSA 0,5 µg/µl	BSA 0,25 µg/µl	BSA 0,25 µg/µl								
E	BSA 0,25 µg/µl	BSA 0,25 µg/µl	BSA 0,125 µg/µl	BSA 0,125 µg/µl								
F	BSA 0,125 µg/µl	BSA 0,125 µg/µl	BSA 0,065 µg/µl	BSA 0,065 µg/µl								
G	BSA 0 µg/µl	BSA 0 µg/µl	BSA 0 µg/µl	BSA 0 µg/µl								
H	Retta di taratura per il metodo BCA				Retta di taratura per il metodo Bradford							

FIGURA 6.1: Concentrazioni delle soluzioni standard di BSA per la costruzione della retta di taratura.

6.3 “Cut off” di peso molecolare

Il “cut-off” è stato realizzato mediante l’utilizzo dei dispositivi di ultrafiltrazione Microcon Ultracel (Millipore) e Vivaspin500 (Sartorius). Per entrambi il procedimento è lo stesso, cambiano solo le condizioni di denaturazione. Nel kit Microcon abbiamo utilizzato una soluzione di acetonitrile (ACN) 10% come denaturante. La

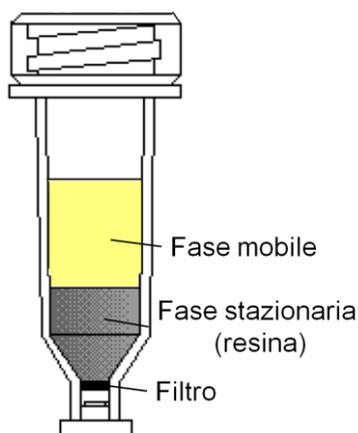
denaturazione del campione da sottoporre a filtrazione sul kit Vivaspin500, incompatibile con l'ACN, è stata effettuata con una soluzione di acido trifluoroacetico (TFA) 0,5%. Il procedimento e le soluzioni utilizzate sono schematizzate nella seguente tabella (figura 6.2).

MICROCON	VIVASPIN500
1) Denaturazione del Campione	
100 µl di estratto + 400 µl ACN 10%	100 µl di estratto + 400 µl TFA 0,5%
Si miscela utilizzando il vortex si mette a 4°C per un ora.	
2) Lavaggio del filtro	
100 µl ACN 10%	100 µl TFA 0,1%
Si centrifuga a 10000 rpm per 10' e si scarta il filtrato.	
3) "Cut Off"	
Si depongono 500 µl di campione denaturato su ciascun filtro e si centrifuga a 11000 rpm per 30'	
Si lava il filtro deponendo 300 µl della rispettiva soluzione	
ACN 10%	TFA 0,5%
e si centrifuga a 11000 rpm per 30'	

FIGURA 6.2: Procedimento del "cut-off" di peso molecolare con i dispositivi Micorcon e Vivaspin500.

Il filtrato è stato liofilizzato "overnight" (o.n.) e la risospensione è stata effettuata utilizzando 100 µl di 20 mM ammonio bicarbonato.

6.4 Cromatografia "flash" a scambio anionico e cationico



Sono state utilizzate colonnine Mobicols (MoBiTec) con setti porosi da 35 µm (filtro).

Preparazione delle colonnine:

Le resine utilizzate per lo scambio cationico e anionico sono rispettivamente "UNOsphere Q Strong Cation Exchange" (BioRad) e "UNO sphere Q Strong Anion Exchange Support" (BioRad). Di entrambe sono stati

prelevati 250 µl della sospensione commerciale, che corrispondono a 125 µl di resina effettiva e lasciate impaccare con le rispettive soluzioni di legame (mostrate nella figura 6.3).

SOLUZIONI		
Scambio cationico	Legame	Ac.Formico / NH ₃ (pH 5,5)
	Eluizione	5% NH ₄ OH, 1M NaCl
Scambio anionico	Legame	200 mM Tris pH 10
	Eluizione	Ac. Formico / NH ₃ pH 2,5

FIGURA 6.3: Soluzioni di legame ed eluizione le due fasi solide cromatografiche.

Il procedimento per la separazione con i tre tipi di resine è lo stesso e prevede una serie di passaggi caratterizzati dalla deposizione di una soluzione sulla resina e l'eluizione per centrifugazione in un solo stadio. Ad ogni passaggio l'eluato viene raccolto e mantenuto separato dagli altri.

Inizialmente le resine vengono condizionate con le rispettive soluzioni di legame. La raccolta delle frazioni eluite comincia quando in colonna viene caricato il campione (estratto piastrinico).

L'utilizzo della fase solida a scambio cationico prevede un'iniziale estrazione delle proteine piastriniche con un tampone a pH più basso. La procedura per prepararlo è la stessa di quella descritto nel primo paragrafo, cambia solo la quantità di HCl necessaria per aggiustare il pH a 7. Il diverso pH in fase di estrazione è giustificato dal fatto che può essere meglio portato verso il valore di pH 5,5 rappresentato dal tampone di legame alla resina a scambio cationico.

Per ottimizzare la separazione, aumentando il contatto e quindi l'interazione tra le proteine e le fasi solide, sono stati introdotti due "step" di agitazione "up-down" a 4°C. La tabella seguente (figura 6.4) mostra in modo schematico la procedura di separazione, illustrando, per ogni passaggio di caricamento ed eluizione dalla colonna, la soluzione ed il volume corrispondente da deporre sulla resina, il tempo e la velocità di centrifuga. Dov'è indicata l'agitazione "up-down", significa che questa andrà effettuata dopo l'aggiunta della soluzione e prima dell'eluizione con la centrifuga.

Campione n°	Tampone	Volume deposto μ l	Tempo di agitazione up-down 4°C	Tempo di centrifuga a 5000 rpm	Frazione
	Legame	500x2		15"	L'eluato si scarta
1	Campione + Legame	200 + 50	15'	10"	Non legato
2	Legame	150		7"	
3	Legame	250x2		7"	Aspecifico
4	H₂O	250x2		7"	Lavaggio
5	Eluizione	250	15'	7"	Legato
6	Eluizione	150		15"	

FIGURA 6.4: Procedimento della separazione cromatografica "flash" per le colonnine impaccate con resina a scambio anionico e a scambio cationico.

Alla fine sono state raccolte 8 frazioni, le quali possono essere unite due a due (come indicato in figura 6.4). Le frazioni sono state liofilizzate e risospese. L'ottimizzazione del pH e della concentrazione dei tamponi di risospensione è stata fatta preventivamente. In questo modo ogni frazione, risospesa nel tampone corrispondente (mostrato in figura 6.5), avrà un pH opportuno per l'analisi nelle fasi successive.

Tampone di risospensione		
Cationica	Non legato	50 μ L di 100 mM Tris HCl pH 8,5
	Legato	50 μ L di 200 mM Tris HCl pH 7
Anionica	Non legato	50 μ L di 200 mM Tris HCl pH 7
	Legato	50 μ L di 100 mM Tris HCl pH 8,5

FIGURA 6.5: Composizione dei tamponi di risospensione per le frazioni liofilizzate derivanti dalla separazione cromatografica "flash".

6.5 Riduzione, alchilazione e digestione dell'estratto proteico

Sono stati digeriti 100 µg di proteine in 400 µl di soluzione.

Per ogni campione è stata prelevata un aliquota corrispondente a ~100 µg di proteine. Il volume corrispondente a questa quantità è stato calcolato conoscendo la concentrazione proteica, valutata in precedenza con i metodi colorimetrici. Alla soluzione di estratto contenente ~100 µg di proteine è stato aggiunto 20 mM ammonio bicarbonato (pH8) preparato di fresco, arrivando ad un volume finale di 400 µL.

I tre passaggi necessari per la digestione dell'estratto proteico sono:

- Riduzione con DTT: 2 µl di una soluzione madre 1 M DTT sono stati aggiunti ai 400 µl della soluzione di proteine descritta in precedenza in modo da avere una concentrazione finale circa 5 mM DTT.

La riduzione è stata condotta a 80°C per 20 minuti.

- Alchilazione con iodoacetammide (IA): 40 µl di una soluzione 100 mM di IA (92 mg in 5 ml di una soluzione 20 mM ammonio bicarbonato) sono stati aggiunti alla miscela precedente così da ottenere una concentrazione finale circa 10 mM IA.

La reazione è stata condotta a 37°C per 30 minuti.

- Digestione con tripsina: 4 µl di una soluzione madre 0,25 µg/µL di Tripsina sono stati aggiunti alla miscela derivante dalle due operazioni precedenti in modo da ottenere un rapporto approssimativo di 1 µg di tripsina su 100 µg di proteine.

La digestione enzimatica è stata condotta a 37°C per una notte.

6.6 Cromatografia nano HPLC in fase inversa

Preparazione del campione: ogni campione da sottoporre al frazionamento in HPLC viene opportunamente diluito e adattato alle condizioni cromatografiche come segue: si mescolano 100 µL di soluzione di digestione (~25 µg di proteine), 80 µL H₂O e 20 µL TFA 0,5%. La miscela risultante avrà una concentrazione proteica di 0,125 µg/µl e conterrà lo 0,05% di TFA.

I campioni vengono caricati nell'auto-campionatore del nano-HPLC Ultimate 3000 (Dionex). Il sistema cromatografico è costituito da una precolonna (C18 PepMap 100, DIONEX, di dimensioni 300 µm id x 5 mm riempita con particelle di 5 µm, e porosità

100 Å) e da una colonna analitica (C18 PepMap 100, DIONEX, di dimensioni 75 µm id x 150 mm riempita con particelle di 3 µm e di porosità 100 Å). L'equilibratura è stata effettuata con una soluzione composta dal 4% di eluente B (80% acetonitrile, 0.04% TFA) e 96% di eluente A (2% acetonitrile, 0.05% TFA). Il processo di separazione cromatografica prevede due stadi:

- 5 µl di campione vengono caricati, concentrati e desalificati nella precolonna con un flusso di 20 µl/min;
- Successivamente un'inversione di flussi, comandati da valvole automatiche, indirizza il campione nella colonna analitica. Il flusso è ridotto a 300 nl/min e la colonna analitica viene eluita applicando un gradiente lineare dal 4% fino al 68% dell'eluente B della durata di 60 minuti.

L'eluato è monitorato da un costante assorbimento a 214 nm registrato utilizzando una cella di flusso da 3 nl.

L'HPLC è collegato con un capillare al sistema robotico di campionamento Probot (Dionex). Con un meccanismo automatizzato il Probot depone l'eluato sulla piastra dello spettrometro di massa miscelando contemporaneamente la matrice MALDI.

La soluzione di matrice è composta da acido α-ciano-4-idrossicinnamico (α-CHCA) (SIGMA) ed ha una concentrazione di 2 mg/ml in 75% ACN/ 0.1% TFA. Questa soluzione contiene anche il peptide ACTH, frammento 18-39 (10 fmol/µl), come standard interno per la spettrometria di massa, m/z 2465,199. La soluzione del calibrante interno viene aggiunta in rapporto 1:2 v/v con la matrice. La deposizione degli spot comincia 12 minuti dopo l'inizio della separazione cromatografica, considerando il volume vuoto dello strumento. Le singole frazioni vengono deposte sulla piastra dello spettrometro di massa con un intervallo di 12 secondi per ogni spot. Ciascuno spot ha un volume di 60nl e vengono deposti dal capillare con un flusso di 1,923 µl/min. Per ogni corsa cromatografica vengono deposti 300 spot, per cui in ogni piastra è possibile raccogliere 4 diverse corse.

La miscela di peptidi noti utilizzata come calibrante esterno è stata preparata unendo due tipi di miscele peptidiche già pronte: "Peptide calibration Mix4 (Proteomix) 500-3500 Da" (LaserBio Labs) e "Peptide calibration Mix1 1000-2500 Da" (LaserBio Labs) in rapporto 1 : 1. Nella tabella seguente (figura 6.6) sono riportati i peptidi presenti con le relative concentrazioni nella soluzione finale e i loro valori massa/carica.

Standard	Concentrazione finale nella soluzione della matrice pmoli/ μ l	$[M+nH]^{n+}$ monoisotopico
ACTH (frammento 1-17)	0,75	2093,0868
ACTH (frammento 18-39)	1,25	2465,1989
Angiotensina I	0,6	1296,6854
Angiotensina II	1,2	1046,5424
Bradichinina (frammento 1-5)	1	573,3150
Insulina bovina (catena- β) ossidata	2,5	3494,6514
Neurotensina	0,8	1672,9176

FIGURA 6.5: Composizione della miscela di peptidi noti utilizzata per la preparazione del calibrante esterno.

La miscela "Mix1 + Mix4" è stata diluita 1 : 20 in una soluzione di matrice composta da 5 mg/ml α -CHCA (SIGMA) in 75% ACN/ 0.1% TFA.

6.7 Spettrometria di massa

L'analisi in massa (MS) è stata eseguita utilizzando l'analizzatore 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems) e i dati analitici sono stati elaborati e analizzati dalla Global Protein Server Workstation (Applied Biosystems), utilizzando come programma interno Mascot (Matrix Science) per identificare le proteine con la tecnica del "Peptide Mass Fingerprinting". L'intervallo di massa per la selezione dei picchi è stato impostato da 900 a 4000 Da. I 15 migliori precursori analizzati in massa sono stati selezionati per l'analisi massa/massa (MS/MS). Un totale di 5000 impulsi laser sono stati mediati da 50 posizioni diverse sulla superficie di ogni spot. Il laser ha una velocità di ripetizione di 200 Hz.

La ricerca è stata eseguita utilizzando la banca dati proteica IPI impostando la specie "Homo Sapiens". I parametri di ricerca sono stati i seguenti: tolleranza di massa a 50 ppm per gli ioni precursori e 0,3 Da per il valore in massa dei frammenti; digestione con tripsina con due tagli mancanti concessi per ciascun peptide; modificazione fissa lo iodoacetammide-derivato della cisteina e modificazioni variabili la deammidazione dell'asparagina, l'ossidazione della metionina e l'acetilazione N-terminale.

Le identificazioni dei peptidi e delle proteine sono state accettate solo se maggiori del 95% di probabilità, come specificato dall'algoritmo Peptide Prophet. Le proteine che contenevano peptidi simili e non potevano essere differenziate solamente sulla base dell'analisi MS/MS sono state raggruppate in modo da soddisfare i principi di parsimonia.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1] Francesca Di Serio. **Sindromi coronariche acute. Percorsi di Prevenzione e Diagnosi.** *U.O. Patologia Clinica I Azienda Ospedaliera Policlinico – Bari.*
- [2] **Deaths by cause, men, latest available year, Europe.** *European cardiovascular disease statistics 2008.*
- [4] Glauco Ambrosi et al. **Anatomia dell'uomo.** *Edi.Ermes, 2006.*
- [3] Göran K. Hansson et al. **Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease.** *N Engl J Med 352;16 April 21, 2005.*
- [5] Marisa Carluccio et al. **Recettori piastrinici di membrana e rischio cardiovascolare: dalla struttura alle possibili implicazioni cliniche.** *Ital Heart J Suppl Vol 2 Luglio 2001.*
- [6] Giuseppe Fanetti. **Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.** *Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale Ospedale “Le Scotte” Siena.*
- [7] Andrew H. et al. **New insights into the haemostatic function of platelets.** *British Journal of Haematology 2009.*
- [8] G.L. Castoldi et al. **Fisiopatologia piastrinica.** *Malattie del sangue e degli organi ematopoietici.*
- [9] Ho-Sup Lee et al. **RIAM Activates Integrins by Linking Talin to Ras GTPase Membrane-targeting Sequences.** *Journal Of Biological Chemistry Volume 284, Number 8, February 20, 2009.*
- [10] Filippo Crea et al. **Linee guida per la diagnosi e terapia dell'angina instabile.** *Ital Heart J Suppl 2000; 1 (12): 1597-1631.*
- [11] H.P. Rang. **Effetti dell'ischemia del miocardio.** *Farmacologia, Casa Editrice Ambrosiana, 2005.*
- [12] Filippo Ottani et al. **Eparine a basso peso molecolare e sindromi coronariche acute: rationale teorico ed uso nella pratica clinica.** *Ital Heart J Suppl Vol 2 Settembre 2001.*
- [13] Virgilio Evangelista et al. **Farmaci anti-trombotici. Bersagli molecolari e uso clinico.** *Giornale italiano di Farmacia clinica, 19, 4, 2005.*
- [14] Erin D. Michos et al. **Aspirin and Clopidogrel Resistance.** *Mayo Clin Proc. April 2006;81(4):518-526.*

- [15] Marie Lordkipanidzé et al. **Aspirin resistance: Truth or dare.** *Pharmacology & Therapeutics* 112 (2006) 733–743.
- [16] M. Pugliano et al. **Il problema della resistenza ai farmaci antiplastrinici: meccanismi molecolari e test di laboratorio.** *RIMeL / IJLaM* 2009; 5.
- [17] Angel Garcia et al. **Applying proteomics technology to platelet research.** *Mass Spectrometry Reviews*, 2005, 24, 918– 930.
- [18] Clark M. Smith II et al. **Detergent-Resistant Cytoskeleton of the Surface-Activated Platelet Differs From the Suspension - Activated Platelet Cytoskeleton.** *Blood*, vol 80, No 11 (dic 1), 1992: pp 2774-2780.
- [19] Dmitri V. Gnatenko et al. **Proteomic approaches to dissect platelet function: half the story.** *Blood* 15 December 2006, Volume 108, Number 13.
- [20] Jan Moebius et al. **The Human Platelet Membrane Proteome Reveals Several New Potential Membrane Proteins.** *Molecular & Cellular Proteomics* 4:1754–1761, 2005.
- [21] Callesen, A. K. et al. **Serum protein profiling by solid phase extraction and mass spectrometry: A future diagnostics tool?** *Proteomics* 2009, 9, 1428–1441.
- [22] Mikel R. Roe et al. **Gel-free mass spectrometry-based high throughput proteomics: Tools for studying biological response of proteins and proteomes.** *Proteomics* 2006, 6, 4678–4687.
- [23] Hattan, S. J. et al. **Methodology utilizing MS signal intensity and LC retention time for quantitative analysis and precursor ion selection in proteomic LC-MALDI analyses.** *Anal. Chem.* 2006, 78, 7986-7996.
- [24] Nesvizhskii A.I. et al. **A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry.** *Anal Chem.* 2003 Sep 1;75(17):4646-58.
- [25] Keller A et al. **Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search.** *Anal Chem.* 2002 Oct 15;74(20):5383-92.
- [26] Xiaoyu Yang et al. **DBParser: Web-Based Software for Shotgun Proteomic Data Analyses.** *Journal of Proteome Research* 2004, 3, 1002-1008.
- [27] Hongbin Liu et al. **A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics.** *Anal. Chem.* 2004 76, 4193-4201.
- [28] Kristin Bauer et al. **Human CLP36, a PDZ-domain and LIM-domain protein, binds to α -actinin-1 and associates with actin filaments and stress fibers in**

activated platelets and endothelial cells. *Blood*, 15 December 2000 Z Volume 96, Number 13.

[29] Lawrence L. K. **Complex Formation of Platelet Thrombospondin with Fibrinogen.** *J. Clin. Invest.* 70:3 doi:10.1172/JCI110646.

[30] Nisha Nanda. **Platelet Endothelial Aggregation Receptor 1 (PEAR1), a Novel Epidermal Growth Factor Repeat-containing Transmembrane Receptor, Participates in Platelet Contact-induced Activation.** *J Biol Chem.* 2005 Jul 1;280(26):24680-9.

[31] Hartmut Kroll et al. **Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) is a target glycoprotein in drug-induced thrombocytopenia.** *Blood*, 15 August 2000, Volume 96, Number 4.

[32] Edwin C. J. M. de Vet et al. **G6b, a Novel Immunoglobulin Superfamily Member Encoded in the Human Major Histocompatibility Complex, Interacts with SHP-1 and SHP-2.** *Vol. 276, No. 45, Issue of November 9, pp. 42070–42076, 2001*

[33] Tucker KL. **A dual role for integrin-linked kinase in platelets: regulating integrin function and alpha-granule secretion.** *Blood*, 2008 Dec 1;112(12):4523-31.

[34] Caroline P. D. WHEELER-JONES. **Identification of 14-3-3 proteins in human platelets: effects of synthetic peptides on protein kinase C activation.** *Biochem. J.* (1996) 315, 41-47.

[35] Min Seong Kwon. **Calreticulin Couples Calcium Release and Calcium Influx in Integrin-mediated Calcium Signaling.** *Molecular Biology of the Cell*, Vol 11, 1433–1443, April 2000.

[36] Songmei Yin. **The Effects of Chloride Channel Blockers on Platelet Cytoplasmic Free Calcium Concentration and Platelet Aggregation.** *ASH Annual Meeting Abstracts 2004 104: 3879.*

RINGRAZIAMENTI

Giunta al termine di questo lavoro vorrei ringraziare ed esprimere la mia riconoscenza nei confronti di tutte le persone che, in modi diversi, mi sono state vicine e hanno permesso ed incoraggiato i miei studi.

***Grazie** al dott. Citti per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro di tesi, per il grande aiuto fornito durante la stesura e per avermi dato l'opportunità di lavorare nel mondo della ricerca, trasmettendomi passione e curiosità.*

***Grazie** all'intero gruppo di "Proteomica e Tecnologie Genomiche" per la vostra disponibilità.*

Grazie a Silvia per avere aver sempre risposto a tutte le mie domande con grande dedizione e competenza.

Grazie a Claudia per essere stata il mio punto di riferimento all'interno del laboratorio, per avermi saputo guidare e consigliare.

***Grazie** a tutta la mia famiglia, per i vostri incoraggiamenti e il vostro amore incondizionato e continuo.*

Grazie ai miei genitori per il vostro incrollabile sostegno morale ed economico che mi ha permesso di raggiungere questo traguardo.

Grazie a Elena, per tutto quello che imparo da te nonostante tu sia la sorella minore, per tenere sempre il tuo cuore vicino al mio anche se le nostre strade si sono un po' allontanate, per farmi sentire così orgogliosa ogni volta che ti vedo in divisa.

***Grazie** a Larry per avermi sopportata ed aiutata a superare tutte le mie paure e ansie preesami, per aver sempre creduto in me, per avermi regalato preziosi momenti di serenità, ma più di ogni altra cosa, per riuscire a dare un senso a tutto ciò che faccio.*

***Grazie** ai miei compagni di studi per aver condiviso con me le interminabili*

giornate di biblioteca, la fatica nel preparare gli esami e la gioia nel festeggiare ogni successo.

Grazie a David per aver vissuto insieme a me questa esperienza fino in fondo e per avermi sempre incoraggiata.

Grazie ad Ilaria per essere sempre dalla mia parte, per avermi ricordato nei momenti più bui di allungare le braccia e allungare la fede, per essere stata semplicemente la persona che mi ha cambiato la vita.

***Grazie** a TUTTI i miei amici per le risate, le chiacchierate, le "rochate", le scazzottate e le pedalate in palestra, le belle serate e le vacanze che mi hanno accompagnato in questo cammino e che mi hanno permesso di "staccare" dallo studio, ma soprattutto per la sicurezza che mi date ogni giorno di poter sempre contare su di voi.*

*Con affetto,
Sara*