

## COMUNICAZIONI

### Comet assay and immunoblotting analysis in providing new insights for the comprehension of the molecular events involved in genomic instability

Renis M<sup>1</sup>., Grasso S<sup>1</sup>., Miano R.<sup>2</sup>, Tomaselli B.<sup>1</sup> and Mattina T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department Biological Chemistry, Medical Chemistry and Molecular Biology and <sup>2</sup> Department of Paediatrics, University of Catania, Cittadella Universitaria, Viale A. Doria, 6 - 95125 Catania (Italy)

Cellular DNA is subjected to continuous attack both by reactive oxygen species (ROS) inside the cell and by environmental agents. The genome encodes information to protect its own integrity utilising two systems: DNA repair and apoptosis. Cells defective in DNA repair tend to accumulate excess of DNA damage, whereas cells defective in apoptosis tend to survive accumulating mutations which lead to carcinogenesis (1). The major DNA repair pathways in human cells are: homologous recombinational repairs (HRR), nucleotide excision repair (NER), base excision repair (BER) and mismatch repair (MMR); each of these is characterised by a set of proteins with dual function: DNA sensing/repair and apoptosis (2). During the past years a variety of assays have been utilised to assess genetic instability and DNA repair capacity, in particular micronuclei test and chromosomal instability assay. However all the methods utilised, despite their efficacy, are laborious and time-consuming. In the last decade the COMET (single-cell gel electrophoresis) assay, a rapid, sensitive, versatile, and robust technique for the quantitative/qualitative assessment of DNA damage and its repair in eukaryotic cells, has been widely applied (3). We used this assay, both alkaline and neutral version, to examine DNA fragmentation, either in basal conditions or mutagen (bleomycin) induced, in cultured haematic cells of paediatrics patients compared with their parents. Among the tested patients, three were affected by ataxia telangiectasia (AT), an autosomal recessive disease characterised by genomic instability and marked susceptibility to cancer, defects in cell cycle checkpoints, variable immunodeficiency and progressive cerebellar degeneration (4).

Their parents were AT heterozygotes. Another patient was affected by 5-oxo-prolinuria, a rare metabolic condition characterised by glutathione synthetase deficiency with secondary neurological involvement, leading to genomic instability for the high level of radical species in the cells (5). The DNA repair capability was monitored for three hours after bleomycin exclusion from the medium. The results obtained by Comet assay were compared with the ones of the chromosomal instability assay, in order to evaluate the efficacy/efficiency of the two techniques. In addition we used immunoblotting to study the molecular events involved in genomic instability, both in basal condition and at different repair times. The expression level of some proteins exerting key roles in the four different above mentioned repair pathways: ATM and p53 for HRR, TFIIHp89 for NER, MSH-2 for MMR and OGG1 for BER, were evaluated.

Moreover we analysed the FACS DNA profile of the cells to evaluate the G1 checkpoint function; furthermore the level of Reactive Oxygen Species (ROS) by spectrofluorimetric method was estimated. The results of Comet assay let us evaluate not only the different extent of DNA damage present in the various samples, but also the AT heterozygotes, avoiding routine biopsy. Our data indicate this test as a useful tool to rapidly assess genetic instability. The AT patients expressed ATM protein at different levels after the various repair times, differently from AT heterozygotes. When TFIIHp89 level was low, the cells were particularly prone to bleomycin treatment in AT patients and in AT heterozygotes too, its expression increasing only 4-5 hours after the beginning of repair time in the first ones and after 1h in the second ones. Conversely p53 was highly expressed and OGG1 was only in part negatively affected.

The AT patients haematic cells, in presence of bleomycin, exhibited defective cell cycle checkpoints at G1/S transition, a phenomenon widely known to be mediated by p53 accumulation (4). The 5-oxo-prolinuria affected patient, showed high level of ROS, low level of ATM and OGG1 and average level of p53 and TFIIHp89 in presence of normal G1/S transition. Our preliminary results, evidencing the presence of a range of phenotypes associated with ATM mutations, encourage us to perform epidemiological studies with the same methodological approaches to correlate the level of DNA fragmentation with the expression of some cell cycle sentry proteins, able to regulate the cancer/apoptosis switch in the cells. A further validation of our preliminary findings could be useful in considering the clinical utility of Comet assay in cancer and/or in radiotherapy risk.

#### References

- 1) Berwick M. et al. J. Natl. Cancer Inst. 92, 874-897, 2000
- 2) Bernstein C. et al. Mut. Res.- Reviews, 511, 145-178, 2002
- 3) Collins A.R. Molec. Biotechnology, 26 249-261, 2004
- 4) Becker-Catania S. et al. Molec. Genetics and Metab. 70, 122-133, 2000
- 5) Webb G.C. et al. Genomics, 30, 617-619, 1995

### **Variazioni delle frequenze degli alleli di ApoE in soggetti anziani**

**Forte G.I., Mirabile M., Crivello A., scola L., Aquino A., Colonna-Romano G., Candore G., Caruso C., Lio D.**

Gruppo di Studio sull'Immunosenescenza, Dipartimento di Biopatologia e Metodologie Biomediche, Università di Palermo, Palermo

E' noto che la variante allelica  $\epsilon 4$  della apo-lipoproteina E (ApoE), codificata da un gene localizzato sulla regione 19q13.2 rappresenta un fattore di rischio legato all'insorgenza di numerose patologie età-correlate quali le malattie cardiovascolari (CAD) e la Malattia di Alzheimer (MA), e che, inoltre, essa gioca un ruolo chiave anche nella diminuzione delle performance cognitive associate all'invecchiamento, dal momento che nei carriers  $\epsilon 4$  si evidenziano le stesse alterazioni morfologiche cerebrali e cognitive rintracciabili in soggetti con MA. Di contro  $\epsilon 2$  sembra rivestire un ruolo protettivo che abbassa il rischio di insorgenza di queste malattie e innalza l'aspettativa di vita. L'influenza dei polimorfismi di ApoE sulla patogenesi di queste malattie è dovuta, prima di tutto, al ruolo chiave svolto da questa apolipoproteina nella regolazione dell'omeostasi lipidica. Infatti, la correlazione tra  $\epsilon 4$  e CAD risulta evidente dal momento che ad essa sono associati elevati livelli ematici di colesterolo ed LDL, principale fattore di rischio per malattie come l'aterosclerosi, l'ipertensione, l'infarto del miocardio. Per quanto concerne il suo coinvolgimento nelle normali funzioni cerebrali e cognitive e nella patogenesi della malattia di Alzheimer, il ruolo di ApoE è sicuramente molto più complesso, solo in parte legato al metabolismo del colesterolo, in quanto sebbene molti meccanismi non sono ancora del tutto chiari, è ormai noto il coinvolgimento di ApoE nella regolazione di molte funzioni della cellula neuronale, nonché nella formazione delle placche  $\beta$ -amiloidi e dei grovigli neurofibrillari, tipici della MA. Per tutte queste ragioni le varianti alleliche di ApoE sembrano influenzare pesantemente l'aspettativa di vita e la longevità. In questo lavoro sono state valutate le frequenze alleliche dei polimorfismi di ApoE in alcuni gruppi di individui della popolazione siciliana: 166 soggetti giovani (popolazione controllo), 79 soggetti anziani di età compresa tra 65 e 89 anni, 71 soggetti ultranovantenni, allo scopo di valutare, anche per la popolazione siciliana, se la riduzione della frequenza dell'allele  $\epsilon 4$  e l'aumento di quella dell'allele  $\epsilon 2$  siano associati al raggiungimento di un'età avanzata. I nostri dati evidenziano una riduzione significativa della frequenza della variante allelica  $\epsilon 4$  nel gruppo degli ultranovantenni (0.0211 vs 0.0693) rispetto a quelle delle popolazioni siciliane appartenenti alle altre fasce di età, e di contro, un significativo aumento della frequenza allelica di  $\epsilon 2$  che risulta circa il doppio rispetto alla popolazione controllo (0.0986 vs 0.0512), mentre non sono state riscontrate differenze significative nelle distribuzioni alleliche e genotipiche dei soggetti controllo e dei soggetti anziani di età inferiore ai 90 anni. Quanto da noi rilevato per la popolazione siciliana è in accordo con numerosi studi condotti su soggetti ultranovantenni di diverse popolazioni europee e conferma, inoltre, la presenza di un trend geografico significativo che vede l'incremento della frequenza dell'allele  $\epsilon 2$  e il decremento di quella di  $\epsilon 4$ , andando dal nord al sud Europa. In tutte le popolazioni studiate la frequenza della variante allelica  $\epsilon 4$  sembra decrescere con l'età, facendo supporre che l'ereditarietà di questo gene possa avere un effetto negativo sull'aspettativa di vita individuale e quindi sulla longevità. Inoltre, dati farmacologici, neuropsicologici, e di neuroimaging suggeriscono che la dose genetica dell'allele  $\epsilon 4$  è associata con la riduzione delle performance mnemoniche e cognitive legate alla senescenza, cosicché si può concludere che i polimorfismi di ApoE sembrano condizionare sia il rischio di insorgenza di alcune malattie tipiche dell'anziano, sia la qualità della vita, influenzando significativamente l'invecchiamento con successo.

#### **Bibliografia**

Candore G, Balistreri CR, Colonna-Romano G et al. Major histocompatibility complex and sporadic Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *Exp Gerontol.* 2004;39:645-652.

Candore G, Licastro F, Chiappelli M et al. Association between the HFE mutations and unsuccessful ageing: a study in Alzheimer's disease patients from Northern Italy. *Mech Ageing Dev.* 2003;124:525-528.

Lio D, Licastro F, scola L, et al. Interleukin-10 promoter polymorphism in sporadic Alzheimer's disease. *Genes Immun.* 2003;4:234-238.

Panza F, D'Introno A, Colacicco AM et al. Vascular genetic factors and human longevity. *Mech Ageing Dev.* 2004;125:169-178.

### **Polimorfismi dei geni che codificano per citochine pro- ed anti-infiammatorie e longevità**

**<sup>1</sup>Scola L., <sup>1</sup>Crivello A., <sup>1</sup>Giocalone A., <sup>1</sup>Forte G.I., <sup>1</sup>Candore G., <sup>1</sup>Colonna-Romano G., <sup>1,2</sup>Cavallone L., <sup>1,3</sup>Franceschi C., <sup>1</sup>Caruso C., <sup>1</sup>Lio D.**

Gruppo di Studio sull'Immunosenescenza, Dipartimento di Biopatologia e Metodologie Biomediche, Università di Palermo, Palermo; Istituto Nazionale di Riposo e Cura per Anziani, Ancona e IIDipartimento di Patologia Sperimentale e Centro Interdipartimentale "L. Galvani", Università di Bologna, Bologna

L'invecchiamento sembra essere caratterizzato dal progressivo incremento dello status infiammatorio e dal declino della risposta immune per il deterioramento di alcune funzioni linfocitarie come l'attività proliferativa in risposta agli stimoli antigenici che potrebbero avere un ruolo nella genesi e nell'evoluzione di patologie età-correlate.

D'altra parte l'entità e l'efficienza delle risposte immuni possono risentire del background genetico individuale ovvero della variabile espressione genica degli importanti fattori di regolazione del sistema immune (SI). I geni delle citochine,

modulatori chiave del SI, presentano siti polimorfici che nelle regioni regolatorie sono potenzialmente in grado di modificare l'espressione trascrizionale e quindi il dispiegarsi della risposta immune. Sono noti da tempo polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nelle regioni promoter ed introniche dei geni del TNF- $\alpha$  (-308 G/A) e dell'IFN- $\gamma$  (+874 T/A), citochine promotrici delle risposte infiammatorie ed cellule-mediate, dell'IL-10 (-1082 G/A) modulatore negativo dell'infiammazione e dell'IL-2 (-330 T/G) fattore di crescita autocrino linfocitario. Considerando che i centenari rappresentano il miglior esempio di invecchiamento con successo, abbiamo analizzato le frequenze alleliche e genotipiche relative a tali SNP in campioni di ultranovantenni del centro e sud Italia confrontandole con quella di una popolazione di controllo di età 60 anni e di analoga distribuzione geografica con la tecnica della PCR-ARMS.

Dall'analisi dell'SNP -308 del gene del TNF- $\alpha$  in cui la sostituzione G $\rightarrow$ A è sicuramente implicata nella promozione dell'espressione genica, non si notavano differenze significative nella distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche fra centenari e controlli in entrambi i sessi; l'allele +874T di IFN- $\gamma$  associato ad una maggiore attivazione trascrizionale, era invece meno presente nelle donne ultranovantenni rispetto a quelle del gruppo di controllo ( $p=0.020$ ), nessuna differenza apprezzabile invece fra i due sessi nei controlli. Per quanto riguarda il polimorfismo biallelico (-1082 G $\rightarrow$ A) del promoter del gene dell'IL-10, l'allele -1082G riconducibile ad un'"alta" produzione citochinica, sia in omozigosi che in eterozigoti era più frequente nei centenari maschi che nelle donne di pari età ed ai controlli ( $p=0.025$ ). Infine nel caso dell'SNP dell'IL-2 l'analisi statistica rilevava un aumento significativo della frequenza dell'allele -330T non associato ad un incremento trascrizionale, nei centenari rispetto ai controlli sia per il sesso femminile ( $p=0,036$ ) che per quello maschile ( $p=0,038$ ). I nostri dati sembrerebbero dunque suggerire che i genotipi citochinici associati ad uno scarso controllo o ad una esacerbazione della risposta infiammatoria non siano indicatori di un invecchiamento di successo e che comunque nei due sessi possano essere diverse le strategie per il raggiungimento della longevità.

#### **Bibliografia**

Lio D, Scola L, Crivello A et al. Allele frequencies of +874T $\rightarrow$ A single nucleotide polymorphism at the first intron of interferon-gamma gene in a group of Italian centenarians. *Exp Gerontol* 2002;37:315-319.

Lio D, Scola L, Crivello A et al. Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes Immun.* 2002;3:30-33.

Lio D, Scola L, Crivello A et al. Inflammation, genetics, and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10 -1082 promoter SNP and its interaction with TNF-alpha -308 promoter SNP. *J Med Genet.* 2003;40:296-299.

### **Frequenza dei polimorfismi dei geni che codificano per l'IL-10 ed il TGF- $\beta$ 1 in soggetti affetti da stenosi carotidea**

**'Crivello A., 'Scola L., 'Giacalone A., 'Forte G.I., 'Nuzzo D., 'Giacconi R., 'Cipriano C., 'Mocchegiani E., 'Malavolta M., 'Caruso C., 'Lio D.**

IGruppo di Studio sull'Immunosenescenza, Dipartimento di Biopatologia e Metodologie Biomediche, Università di Palermo, Palermo; IIstituto Nazionale di Riposo e Cura per Anziani, Ancona

Nelle placche ateromatose è stata dimostrata la presenza di diverse citochine pro e anti-infiammatorie, come TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF $\beta$ -1, che potrebbero avere un ruolo centrale nel processo infiammatorio che caratterizza la patologia aterosclerotica, contribuendo allo sviluppo e alla progressione verso le malattie vascolari ad essa correlate. IL-10 e TGF $\beta$ -1 sono due citochine immunoregolatrici ad azione prevalentemente antinfiammatoria. Un assetto genico che favorisca una maggiore produzione di queste citochine, quindi, potrebbe svolgere un ruolo protettivo contro l'aterosclerosi. Noi abbiamo studiato alcuni polimorfismi genici dell'IL10 e del TGF $\beta$ -1 in un gruppo di soggetti affetti da stenosi carotidea, con lo scopo di valutare se queste varianti geniche, che correlano con variazioni interindividuali dei livelli sierici di queste molecole, possano giocare un ruolo nella comparsa del processo aterosclerotico. Così abbiamo valutato, tramite PCR-SSP le frequenze geniche dei polimorfismi Leu10Pro e Arg25Pro del gene TGF $\beta$ -1 e il polimorfismo -1082G/A del promoter del gene IL-10 in 113 soggetti affetti da stenosi carotidea e in 189 soggetti controllo. I polimorfismi Leu10Pro e Arg25Pro modificano la sequenza del peptide segnale determinando, in presenza di una prolina in posizione 10 e/o di un'arginina in posizione 25 della sequenza aminoacidica, una maggior secrezione di TGF $\beta$ -1, invece il genotipo -1082GG dell'IL10 è associato con un'alta produzione di citochina. Non abbiamo trovato alcuna differenza significativa delle frequenze alleliche e genotipiche dei polimorfismi studiati fra i due gruppi di soggetti presi in esame. Questi risultati, sembrano suggerire la mancanza di un'associazione fra gli alleli dei polimorfismi studiati e la stenosi carotidea a patogenesi aterosclerotica. I dati qui riportati, sembrano in contrasto con altri risultati ottenuti dal nostro gruppo che recentemente ha dimostrato che una bassa produzione geneticamente determinata di IL-10 può favorire la comparsa dell'infarto del miocardio. D'altra parte occorre considerare che mentre i soggetti con stenosi carotidea, arruolati per il presente studio, erano asintomatici e non avevano alcuna patologia in atto, i pazienti infartuati erano stati reclutati durante il ricovero ospedaliero. Si potrebbe quindi ipotizzare che, la riduzione geneticamente determinata della produzione di IL-10, così come quella del TGF-beta possa essere importante per la progressione della patologia aterosclerotica verso le complicanze più gravi piuttosto che per la presenza delle placche aterosclerotiche. Lio D, Candore G, Crivello A, et al. Opposite effects of IL-10 common gene polymorphisms in cardiovascular diseases

and in successful ageing: genetic background of male centenarians is protective against coronary heart disease. *J Med Genet.* In press.

### **Deficit di alfa1-antitripsina, longevità ed infarto del miocardio: uno studio pilota nella popolazione siciliana**

**Listi F., Candore G., Lio D., Grimaldi M.P., Balistreri C.R., Vasto S., I, Cavallone L., Caruso M., Caimi G., Hoffmann E., Franceschi C., Caruso C.**

I Gruppo di Studio sull'Immunosenescenza, Dipartimento di Biopatologia e Metodologie Biomediche e II Dipartimento di Medicina Interna, Malattie Cardiovascolari e Nefrourologiche, Università di Palermo, Palermo; III Istituto Nazionale di Riposo e Cura per Anziani, Ancona and IV Dipartimento di Patologia Sperimentale e Centro Interdipartimentale "L. Galvani", Università di Bologna, Bologna

La principale caratteristica fenotipica dei figli di centenari è una riduzione della prevalenza delle malattie cardiovascolari; ciò suggerisce che nel raggiungimento della longevità gioca un ruolo fondamentale un background genetico protettivo verso le malattie cardiovascolari. L'alfa1-antitripsina (AAT) è una serina-proteasi inibitoria richiesta per la prevenzione del danno proteolitico tissutale, indotto dall'elastasi neutrofila. Si pensa che l'elastasi giochi un ruolo favorevole nelle malattie cardiovascolari in quanto digerendo il tessuto elastico delle pareti arteriose, ne modifica la distensione dei vasi e quindi la pressione sanguigna. Il locus (Pi locus) per l'AAT (14q32.1) mostra una grande variabilità genetica perché presenta più di 70 varianti alleliche. Pi\*M è l'allele più comune, e gli individui omozigoti MM producono livelli normali di AAT; l'allele Pi\*Z, è associato al deficit di alfa1-antitripsina in condizione di omozigosi, mentre in eterozigosi a livelli intermedi di AAT. Allo scopo di valutare se il genotipo AAT sia una componente del background genetico protettivo verso le malattie cardiovascolari e quindi favorente la longevità, abbiamo analizzato (tramite PCR-SSP e PCR-RFLP) la distribuzione delle varianti alleliche dell'AAT in tre coorti: 109 pazienti giovani (<46 anni) con infarto del miocardio (IMA), 185 controlli giovani (<50 anni) e 139 ultranonagenari (>95 anni) della Sicilia e del sud Italia.

I nostri risultati evidenziano una differenza significativa nelle frequenze alleliche dell'AAT tra i 3 gruppi ( $p=0,0000001$ ); in particolare il numero dei pazienti con IMA, positivi per l'allele Z (0,9%), è diminuito rispetto ai controlli (2,9%) e rispetto agli ultranonagenari (13,3%), ma le differenze erano significative solo tra pazienti e longevi ( $p = 7,5 \times 10^{-7}$ ) e controlli e longevi ( $p = 0,00004$ ). Così i bassi livelli di AAT associati con l'allele Z sono protettivi verso le malattie cardiovascolari, probabilmente perché la minore inibizione dell'elastasi neutrofila permetterebbe un migliore rimodellamento della parete arteriosa ed un miglior controllo della pressione sanguigna. Inoltre i nostri risultati dimostrano che l'allele Z gioca un ruolo positivo nel raggiungimento dell'invecchiamento con successo, rafforzando l'ipotesi che i fattori genetici protettivi verso le malattie cardiovascolari siano una componente del background genetico favorente la longevità.

#### **Bibliografia**

Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Sillesen H, et al. Blood Pressure, Risk of Ischemic Cerebrovascular and Ischemic Heart Disease, and Longevity in 1-Antitrypsin Deficiency. *Circulation* 2003;107:747-52.

Lam CWK, Pang CP, Poon PMK, et al. Rapid screening for  $\alpha$ 1-Antitrypsin Z and S Mutations. *Clinical Chemistry* 1997;43:403-404.

Lio D, Candore G, Crivello A, et al. Opposite effects of IL-10 common gene polymorphisms in cardiovascular diseases and in successful ageing: genetic background of male centenarians is protective against coronary heart disease. *J Med Genet.*

Listi F, Candore G, Lio D, et al. Association between C1019T polymorphism of connexin37 and acute myocardial infarction: a study in patients from Sicily. *Int J Cardiol*, in press

Terry DF, Wilcox M, McCormick MA, et al. Cardiovascular advantages among the offspring of centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003;58:M425-431.

### **Longevità e infarto del miocardio: ruolo della pirina**

**Grimaldi M.P., Candore G., Colonna-Romano G., Lio D., Piazza G, IOrlando V., Listi F, Caimi G, Caruso M, Hoffmann E, Caruso C**

I Gruppo di studio sull'immunosenescenza, Dipartimento di Biopatologia e Metodologie Biomediche e

II Dipartimento di Medicina Interna, Malattie Cardiovascolari e Nefrourologiche Università di Palermo, Palermo

La Febbre Mediterranea Familiare (FMF) è una malattia autosomica recessiva che colpisce prevalentemente le popolazioni del bacino mediterraneo, caratterizzata da ricorrenti attacchi di febbre associati a serositi, sinoviti e artriti. Il gene coinvolto nella FMF, MEFV (16p13.3) codifica per una proteina basica detta pirina o marenostrina, prevalentemente espressa nei granulociti e nei monociti attivati. La funzione biologica della proteina è probabilmente la regolazione della sintesi di mediatori dell'infiammazione e la stimolazione della apoptosi. La presenza di mutazioni in questo gene potrebbe causare la sopravvivenza di leucociti altrimenti destinati ad apoptosi, prolungando così la risposta infiammatoria. Per valutare se l'allele anti-infiammatorio della pirina sia un componente del background genetico protettivo contro

le malattie cardiovascolari e quindi favorente la longevità, abbiamo analizzato la frequenza allelica di tre mutazioni, Met694Val, Val726Ala e Met694Ile in tre coorti di soggetti: 94 pazienti giovani (<46 anni) affetti da infarto acuto del miocardio (IMA), 132 controlli della stessa età (<50 anni) e 35 soggetti ultranonagenari (>95 anni) della Sicilia. La tecnica utilizzata è l'ARMS PCR. Sono state osservate differenze significative nella frequenza dell'allele mutato pro-infiammatorio Met694Val tra le tre coorti ( $p=0,0027$  calcolato tramite test del  $\chi^2$ ); in particolare, il numero di pazienti IMA positivi per l'allele mutato (12,1%) è aumentato rispetto ai controlli giovani (7,2%;  $p=0,046$ ) e ai soggetti ultranonagenari (0%;  $p=0,001$ ). Inoltre è presente una differenza significativa nella frequenza allelica tra controlli giovani e soggetti ultranonagenari (7,2% vs. 0%;  $p=0,02$ ). Di contro, non è stata osservata alcuna differenza significativa nella frequenza allelica per le mutazioni Val726Ala e Met694Ile tra le tre coorti di soggetti. I nostri risultati dimostrano che l'allele pro-infiammatorio è assente negli ultranonagenari e significativamente aumentato nei pazienti IMA. Pertanto essi sono in accordo con l'ipotesi secondo la quale una buona regolazione della risposta infiammatoria gioca un ruolo chiave nella resistenza alle malattie cardiovascolari e nel raggiungimento dell'invecchiamento con successo.

#### **Bibliografia**

- 1) Lio D, Candore G, Crivello A, et al. Opposite effects of IL-10 common gene polymorphisms in cardiovascular diseases and in successful ageing: genetic background of male centenarians is protective against coronary heart disease. *J Med Genet*. In press.;
- 2) Stehlik C, Reed JC. The PYRIN Connection: Novel Players in Innate Immunity and Inflammation. *J Exp Med*. 2004;200:551-558.
- 3) Terry DF, Wilcox M, McCormick MA, et al. Cardiovascular advantages among the offspring of centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2003;58:M425-431.

### **Multiparameters flow cytometry immunophenotyping of multiple myeloma and monoclonal gammopathies of uncertain significance**

**Gervasi F., Bondi F., Cardinale G., Giambanco C., Lo Verso R. and Pagnucco G.**

U.O. Ematologia A.R.N.A.S. Civico-Benfratelli, G. Di Cristina e M. Ascoli, P.O. M. Ascoli, Via Carmelo Lazzaro 1, 90127 Palermo.  
Tel. 0916664286-FAX. 0916664222 e-mail: Francesco.Gervasi-h47d@poste.it

Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and multiple myeloma (MM) are the most frequent forms of monoclonal gammopathies. MGUS is the most common plasma cells dyscrasia occurring in up to 10% population over age 75. Multiple myeloma accounts for approximately 1 percent of all malignancies and 10 percent of haematological tumours. There are no findings at the time of recognition of MGUS that distinguish patients who will remain stable from those in whom a malignant plasma cell proliferative disorder will develop. It remains controversial whether all cases of myeloma evolve from a MGUS condition or not.

Flow cytometric parameters may help us to understand plasma cells biology and pathology. Immunophenotyping is an attractive technique for evaluating changes in the plasma cell (PC) compartment in patients with MM and MGUS because it allows discrimination between myelomatous PCs and normal PCs.

A combination of monoclonal antibodies allows a precise identification of plasma cells in bone marrow and peripheral blood. To sum up, in bone marrow plasma cells can be identified as CD38/CD138 positive cells, assays of concomitant expression of CD19 and CD56 allow to distinguish between normal and atypical cells and can detect malignant plasma cells even in MGUS or in pre-myeloma states. Normal PCs from healthy donors express a typical phenotype: CD19+ and CD56 negative whereas malignant plasma cells do not express CD19 and generally express CD56. Flow cytometric characteristics of plasma cells can be used for differentiating MGUS and MM cases with a low bone marrow infiltrate, low serum M-protein and without bone lesions. We have applied flow cytometric analysis to evaluate the bone marrow plasma cells in 28 patients with MGUS and 40 patients with multiple myeloma, of which 24 pts have been evaluated at diagnosis and after therapy, 6 after peripheral stem cell transplantation and 10 in progression disease.

A flow cytometric technique based on simultaneous triple labeling with CD38/CD19/CD56 and two-step acquisition procedure was used. In the first step 50.000 events corresponding to the total of BM MNC were acquired. In the second step only those events included in the "live-gate" drawn on SSC/CD38 bright fraction (where plasma cells are located) were acquired and studied for the relative expression of CD56 and CD19. In MGUS we found that the CD38 bright cells percentage was <5% of bone marrow nucleated cells and three distinct PC populations could be identified: CD56+/CD19- = 40%±32%, CD56-/CD19+ = 25%±15% and CD56+/CD19+ = 17%±14%. In 22 patients with MM at diagnosis we found a percentage of CD38 bright of 5%-60% of bone marrow nucleated cells with CD56+/CD19- cells = 67%±30%, normal PCs with CD56-/CD19+ phenotype were <2%±0.4% and CD56+/CD19+ = <1%. After therapy CD38 bright percentage was much lower (5%-10%) and the relative populations CD56+/CD19-, CD56-/CD19+ and CD56+/CD19+ were respectively 48%±32%, 18%±10% and 8%±3%. In the 8 MM patients in progression disease CD38 bright increased to 20-50% and the three fractions CD56+/CD19-, CD56-/CD19+ and CD56+/CD19+ were respectively 75%±20%, 5%±2% and 3%±2%. In 5 patients undergone PBPC autologous transplantation CD38 bright were about 5% and CD56+/CD19-

CD56-/CD19+ and CD56+/CD19+ were respectively 40%±35%, 33%±15% and 8%±4% .

So we observed an evident normal CD56-/CD19+ phenotype population growth in disease control phases that is to say after therapy and after PBPC autologous transplantation; we showed that the malignant phenotype CD56-/CD19+ remains the most representative even though inside a sensitively reduced CD38 bright fraction . Our data about MGUS and multiple myeloma at diagnosis agree with other studies: sure enough we found both the populations CD56+/CD19- and CD56-/CD19+ in CD38 bright cells' fraction in MGUS patients and the exclusive presence of CD56+/CD19- population in MM patients at diagnosis. Moreover our study gives original data about CD56+/CD19+ population which seems to spread in disease control phases but whose biological significance is up to now unknown; it could be correlated with reconstitution of normal bone marrow plasma cells. Our results, even if preliminary, show that cytometric analysis can be useful in qualitative and quantitative bone marrow plasma cells assay and it allows their monitoring in various disease's phases.

## **La creatininemia riferita alla massa muscolare svela modeste riduzioni della funzione renale nell'adulto e in eta' pediatrica**

**Amato F. , MD**

Laboratorio di Patologia clinica P.O. Casa del Sole - ASL n. 6 - Via UR3 n. 19 - Palermo

### **Introduzione e obiettivi**

La creatininemia è un parametro affidabile (bassa variabilità analitica), ma è ritenuta poco sensibile (elevata variabilità biologica interindividuale) per svelare modeste riduzioni della funzione renale. Scopo di questo lavoro è proporre una più corretta interpretazione dei valori della creatininemia, riferita alla creatinina attesa (CREa) per una data massa muscolare, ricavabile con una formula che utilizza il peso per il calcolo della massa muscolare e la statura per eventuale correzioni ove BMI > 29. Si può esprimere la creatininemia misurata (CREm), riferendola alla CREa, come volume di filtrato glomerulare calcolato (GFRc) in ml/min, oppure come percentuale di funzione renale, chiamata qui GFR function (GFRf). Questo aumenta la sensibilità della creatininemia per svelare modeste riduzioni di filtrato glomerulare, anche in presenza di concentrazioni di creatininemia che rientrano all'interno dei valori di riferimento in uso.

### **Materiali e metodi**

I risultati dei dosaggi della creatininemia sono stati ottenuti con INTEGRA 700 della Roche, con metodo Jaffé compensato.

### **Risultati**

Sono stati esaminati 80 campioni divisi in due gruppi: 50 patologici, con clearance inferiore a 80 ml/min e 30 normali, con valore di clearance della creatinina superiore a 80 ml/min . I valori di riferimento di creatininemia adottati, sono : uomini < 1.3 mg/dL (115 micromoli/L) fino a 50 anni, dopo tale età > a 1.4 mg/dL (124 micromoli/L). Donne <1,1 mg/dL (97 micromoli/L), bambini 0.8 mg/dL (71 micromoli/L). Dei soggetti con valori di clearance patologici il 34 % aveva valori normali di creatinina, il 100 % mostrava riduzione di GFRc calcolata con i medesimi valori di creatininemia ma riferiti alla creatinina attesa.

Formule per calcolare la frazione unitaria di massa muscolare (Mm):

$$Mm \text{ (maschi)} = 0,3 + (\text{peso}^2)^{1/3} * 0,007$$

$$Mm \text{ (femmine)} = 0,3 + (\text{peso}^2)^{1/3} * 0,006$$

Formula base per calcolare la CREa :

$$CREa \text{ (maschi)} = 0,2 + (\text{peso} * Mm * 0,019) \quad \text{cioè} \quad 0,2 + (\text{peso} * (0,3 + (\text{peso}^2)^{1/3} * 0,007) * 0,019)$$

$$CREa \text{ (femmine)} = 0,2 + (\text{peso} * Mm * 0,0185) \quad \text{cioè} \quad 0,2 + (\text{peso} * (0,3 + (\text{peso}^2)^{1/3} * 0,006) * 0,0185)$$

Calcolo della CREa con correzione per B.M.I. :

$$0,2 + (\text{peso} * (0,3 + (\text{peso}^2)^{1/3} * 0,007) * 0,019) * SE(\text{peso}/\text{statura}^2 < 29; 1; 29/\text{peso}/\text{statura}^2) \quad \text{(maschi)}$$

$$0,2 + (\text{peso} * (0,3 + (\text{peso}^2)^{1/3} * 0,006) * 0,0185) * SE(\text{peso}/\text{statura}^2 < 29; 1; 29/\text{peso}/\text{statura}^2) \quad \text{(femmine)}$$

La quantità di creatinina eliminata in un minuto Qcre, dipende da GFR e dalla creatininemia :

$Qcre = GFR \times CREm$ . Nella normale funzionalità renale, un equilibrio dinamico tende a ristabilire il valore omeostatico, tutta la creatinina prodotta viene eliminata e in tal modo  $CREm = CREa$ . In media, nell' adulto sano di sesso maschile  $GFR = 105$  , e quindi la creatinina escreta  $GFR \times CREm$  si può scrivere anche  $GFR \times CREa$  e quindi  $GFR \times CREm = 105 \times CREa$  da cui

$$GFRc = 105 \times CREa/CREm \text{ (maschi)} \quad GFRc = 95 \times CREa/CREm \text{ (femmine)}$$

Sensibilità e Specificità di CREm e GFRc sono state confrontati con le relative curve R.O.C., l'area sotto la curva è stata calcolata con il metodo di Marley W. Watkins (Pennsylvania State University). E' risultata una differenza statisticamente significativa al 95 percentile, con un rapporto critico  $z = 4,18$ .

### **DISCUSSIONE**

valori di riferimento della creatininemia non tengono conto del peso dei soggetti che compongono il campione e quindi i valori hanno un'ampia distribuzione da 0,5 a 1,4, che impedisce di svelare moderate riduzioni di GFR per soggetti di peso medio-basso. La sensibilità analitica della CREm (AUC = 0.82) può essere aumentata con l'applicazione GFRc (AUC=0.96) che raggiunge sensibilità analoga alla Cistatina C, pur mantenendo elevata specificità. Si può esprimere

la funzione renale come percentuale di funzione rispetto ad una funzione integra del 100 % cioè GFRf . Quando CREm =CREa significa che i reni sono al 100 % della loro possibilità funzionale ( $GFRf = 100 * CREa / CREm$ ) cioè GFRf = 100 %

Esprimendo la creatinemia come GFRf si ha immediata informazione della funzionalità renale , considerata alterata se inferiore a 80 % nei soggetti adulti e bambini senza dover consultare tabelle di range di riferimento in base a età e sesso.

## Valutazione della coconcentrazione eritrocitaria dell'aquaporina 1 in pazienti diabetici di tipo 1

Di Pasquale G., Lombardo F., Currò F., Di Pasquale L.

Dipartimento Di Scienze Pediatriche Mediche e Chirurgiche. A.O.U., Policlinico "Gaetano Martino", Messina

### Introduzione

Preston et al. Identificarono nel 1992, quale primo canale selettivo dell'acqua, una proteina espressa in grande quantità nei globuli rossi umani la quale, pertanto prese il nome di aquaporina 1 (AQP1). L'AQP1 è saldamente legata alla spectrina del citoscheletro e come altre strutture proteiche del globulo rosso, potrebbe subire, in pazienti diabetici, un processo di glicosilazione non enzimatica con conseguente alterazione della sua espressione e funzionalità sulla membrana eritrocitaria. Per tale motivo si è proceduto alla valutazione della concentrazione dell'AQP1 eritrocitaria mediante metodica ELISA, in un gruppo di 12 pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1 e in 12 controlli sani.

### Metodo

#### Estrazione dell'AQP1:

1 ml di sangue intero eparinato veniva lavato tre volte in una soluzione di lavaggio isotonica ( PBS, 0.15 M NaCl, glucosio 5mM) mediante centrifugazione a 500 x g. Un grammo di microsferule di vetro (Sigma Chemicals, G-4649) erano aggiunte a 250 µl di globuli rossi lavati , diluiti 1:2 in tampone di lavaggio e posti in 4ml di tampone di lisi ( Tris HCL 50mM. pH 5.5). I campioni venivano quindi lisati meccanicamente in un mixer per 3 minuti, centrifugati a 10.000 x g per 10' , ripresi con 750 µl di tampone di estrazione( Tris-HCL 50 mM , NDSB201 1M, digitonina 0.05%, pepstatina, leupeptina 5 µg/ml, EDTA 0.1M, PMSF 0.2mM) e ricentrifugati come prima. Infine 250 µl di estratto erano passati su microcolonna sephadex G25 e utilizzati per il dosaggio ELISA.

### Dosaggio

Una piastra MicroElisa (Nunc Covalink, Danimarca) veniva coattata per una notte a 4° C con 200 µl /pozzetto di estratto eritrocitario dei campioni in esame e con 200 µl di 5 punti della curva di calibrazione rappresentata da diluizioni scalari del control peptide AQP1 (Sigma) in Tris buffer pH 7.4 sino ad ottenere le seguenti concentrazioni : 10, 5, 2.5, 1, 0.5 ng/ml. Dopo tre successivi lavaggi in TBS , NaCl 0.15M, Tween 20-0.05%, veniva condotto un overcoating con 250 µl/pozzetto di tampone di bloccaggio( BSA 30g/l in TBS con NaCl 0.15 M pH 7.4) a 37° C per 2h . Dopo un'ulteriore fase di lavaggio, la piastra microtriter, veniva insemata con 200µl/pozzetto di anticorpo anti AQP1 (rabbit affinity pure, Sigma) diluito 1:1000 in tampone Tris con BSA 15g/l, NaCl 0.15M, Triton X100-0.002% e incubata a 37°C per 2h. Dopo ancora tre lavaggi venivano, quindi, aggiunti 200µl/pozzetto di anticorpo, diluito 1:2000, anti-rabbit IgG (goat) coniugato con fosfatasi alcalina (Sigma). Alla piastra, incubata a 37°C per 2h e lavata per l'ultima volta, venivano, infine, aggiunti 200µl/pozzetto di substrato pNitrofenilfosfato in tampone Dietanolamina, pH 9.6. Dopo un'ultima incubazione a ta. per 30', l'estinzione finale veniva determinata con un lettore per micropiastre (Bio-Rad 550) a 405 nm.

### Risultati

Le concentrazioni di AQP1 dei campioni, estrapolate dai valori di DO. ottenuti dalla curva di taratura ottenuta, venivano espresse in ng per ml di estratto eritrocitario. I dati così ottenuti, erano infine elaborati calcolando le medie ± SEM e valutata la significatività delle differenze tra il gruppo di controllo e quello rappresentato dai pazienti diabetici. per mezzo del test post-hoc di Scheffè per  $p < 0.05$  :

	CONTROLLI	DIABETICI	P<0.05
AQP-1 ng/ml	5.8±0.8	2.7±0.67	

Dai dati ottenuti appare evidente come l'espressione dell'AQP1 nelle membrane eritrocitarie dei pazienti diabetici sia significativamente ridotta rispetto ai controlli sani.

### Bibliografia

M. Buemi, F. Floccari, G. Di Pasquale, G. Cutroneo, A. Sturiale - AQP1 in red blood cells of uremic patients during hemodialytic treatment - Nephron 2002;92:846-852

## **Dangerous ratio modification of plasma and erythrocyte s-adenosylmethionine/s-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease**

**Gueli M.C., \*Novo S., \*Di Chiara S., \*\*Guglielmini E., \*\*Bellia C.**

Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Sezione di Biochimica; \*Cattedra di Malattie dell' Apparato Cardiovascolare U.O.C di Cardiologia; \*\*Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo.

### **Introduction**

An extensive number of studies over the past several years have reported that elevated plasma total homocysteine (tHcy) is a risk factor for cardiovascular disease in the general population (1-2). This association has been shown to be independent from other cardiovascular risk factors (3). Several mechanisms have been proposed for the homocysteine (Hcy) related vascular changes. However, it remains unclear whether Hcy itself is causal in the pathogenesis of cardiovascular disease. Alternatively or additionally, the association between Hcy and cardiovascular disease may result from its metabolic precursor: S-adenosylhomocysteine (SAH), or from the altered ratio of S-adenosylmethionine (SAM)/SAH. This competition is based on the known effects of these adenosylated metabolites on cellular methylation, disturbances of which may lead to endothelial dysfunction and/or cardiovascular disease. SAH, is the SAM demethylated product and the metabolic precursor of all Hcy produced in the body. SAH can be considered at cellular level, a major active unfavorable derivative of Hcy, since it is dramatically able to interfere with crucial SAM-dependent metabolic pathways competing for the binding site. In any event, the use of plasma tHcy as an indication of risk of vascular disease is widespread. The use of these Hcy measurements, however, as a prognostic indicator of an individual's risk of developing vascular disease is not possible unless the elevation in Hcy concentration is quite marked. This limitation results from the overlap in value for patients with vascular disease and control subjects; this overlap is so great that many individuals are needed for the differences between the 2 groups to be significant. Thus, it is of great significance to know how these adenosylated metabolites (SAM, SAH) and Hcy are interrelated, and how they relate to cardiovascular disease.

### **Patients and methods**

Patients with cardiovascular disease were recruited from U.O. Complessa di Cardiologia A.O.U. Policlinico "P. Giaccone" Università di Palermo. Control subjects were volunteers drawn from the Faculty of Medicine and staff of laboratory. In the present study we determined SAM, SAH, their molar ratio, and Hcy in plasma as well as SAM, SAH, and their molar ratio in red blood cells (RBCs) of 60 patients with cardiovascular disease (age  $75 \pm 1.8$ ; 29 men and 32 women) and 54 healthy controls (age  $63 \pm 2.4$ ; 23 men and 31 women). The method of Wise and Fullerton(4) was used for the HPLC analysis of SAM and SAH with several modifications. The analysis of tHcy in plasma and RBCs were performed by established HPLC procedure used in this laboratory (5). Folic acid and B12 were determined using an automatic analyser for the analysis of biological fluid (IMX System, Abbott S.p.A., Roma, Italia) which uses the FPIA (Fluorescence Polarization Immuno Assay) technology.

### **Results and conclusions**

Geometric mean values of plasma Hcy, SAM, and SAH were significantly increased in patients compared to the controls values (18.5 vs. 10.9 micromol/l\*\*; 139 vs. 65.5 nmol/l\*; 80.1 vs. 24.5 nmol/l\*\*, respectively; \*p 0.01, \*\*p 0.001), while the molar ratio of SAM/SAH was decreased in patients (1.73 vs. 2.67). In RBCs patients exhibited increased levels of SAH compared with controls (334 vs. 205 nmol/l\*\*) whereas SAM (3357 vs. 3735 nmol/l\*) and the molar ratio of SAM/SAH (10.5 vs. 18.21\*\*) were significantly decreased. Folic acid and vitamin B12 in plasma were similar in patients and controls. We suppose that what we noticed might be due to the lack of remethylation in RBCs additionally to the inhibition of transmethylation reactions by elevation of SAH. Since the ratio of SAM/SAH is strongly linked with the activity of numerous enzymatic methylation reactions, these results suggest that methylation may be impaired in these patients. While hyperhomocysteinemia in cardiovascular disease could be a result of increased release from ischemic tissue, the finding that high plasma Hcy can increased intra-cellular SAH levels in certain tissues are significant. This increased intracellular SAH, when occurs in endothelial cells, would lead to excessive endothelial apoptosis, which is both pro-atherogenic and pro-thrombotic. Nevertheless, further studies are needed to explore how elevated Hcy leads to cardiovascular disease, and to make sure that it is not a consequence of the disease.

### **References**

- 1) Refsum H. (1998) Annu. Rev. Med. 49, 31-62;
- 2) Wilcken DEL et al. (1976) J. Clin. Invest. 57, 1079-82;
- 3) Clarke R. et al. (1991) N. Engl. J. Med. 324, 1149-55.;
- 4) Wise et al.(1995) J. Chromatogr. 18, 2005-17;
- 5) Ubbink JB et al. (1991) J. Chromatogr. 565, 441-446.

SI Bioc 1° Regione Sicilia 7-8 Ottobre 2004

## **Genetic testing on dry blood spot card samples of sicilian people in aim to check out the $\Delta R$ 608 mutation causing Niemann-Pick disease type b**

**Vocca L.\* , Scazzone C.\* , Guglielmini E.\* , Bivona G.\* , Ferraro L.\* , Schuchman E.H.\*\* , Ciaccio M.\***

\*Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo, Italy - \*\*Department of Human Genetics, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA.

### **Introduction**

Niemann-Pick Types A and B (NP-A and NP-B) are both autosomal recessive diseases resulting in mutations in the acid sphingomyelinase (ASM) gene. The type A phenotype is the infantile, neurodegenerative disorder. It is the most severe form of the disease, characterized by massive hepatosplenomegaly, pulmonary complications and neurological damage: death usually occurs by about three years of age. Type B NPD is distinguished from the severe, neuronopathic type A phenotype by the absence of primary neurologic involvement, a later onset of hepatosplenomegaly and survival in adulthood, a milder nonneuronopathic form of the disease (1). NP-B should be considered when a patient presents with unexplained hepatosplenomegaly. Less is known about mutations causing NP-B, although a recurrent mutation,  $\Delta R$  608, has been found (2). Enzyme assay can be performed in affected individuals and this is generally followed up by DNA analysis to determine the mutation. DNA analysis is valuable for future screening of other family members, as well as for prenatal diagnosis via CVS or amniocentesis. If the mutations are known for a family, DNA analysis is surely the preferred method for prenatal diagnosis. Full DNA sequencing of the exonic DNA is performed and the above recurring mutation can be detected (3). Some recent studies show the  $\Delta R$  608 mutation frequently found in North African type B NPD patients originating from the Maghreb region (i.e., Tunisia, Algeria and Morocco), where it may account for almost 90% of the mutant alleles. Because of their neighbourhood to our country, especially to Sicily, many of these population live here because of the more and more frequent immigration. Although the exact frequency of type B NPD in these groups is not known, the present work is a first step of the molecular screening programs now undertaken also in aim to following up the presence and the frequency of these mutations in sicilian people (4).

### **Materials and methods**

For analysis of the ASM repeat polymorphism, genomic DNA is isolated from cultured cells (fibroblasts or lymphoblasts) or from mixed lymphocytes, obtained from either whole blood samples and dry blood spot cards and for PCR amplification of the repeat polymorphism, sense and antisense primers are constructed to amplify the genomic region containing the hexanucleotide sequence. It is notable that Type B patients carry out the same mutant allele, designed  $\Delta R$  608, which results from an in-frame three-base deletion and the removal of a single arginine residue from ASM at position 608. The  $\Delta R$  608 mutation can be readily detected by dot-blot hybridization of the PCR product (5). Particularly, we carried out a mutation analysis of the  $\Delta R$  608 mutation form 48 dry blood spot cards, from newborn patients. The procedure consists of a direct PCR amplification on Dry Blood Spot (DBS) cards, prepare membranes for hybridization and end-label oligonucleotides, then starting the hybridization of filters on the membranes and developing them using film and automated film developer.

### **Results**

All the tested samples resulted in a sure negative response for  $\Delta R$  608 mutation against a positive control, both after 2 hours and half incubation at  $-20^{\circ}\text{C}$  on MS FILM for short time exposure and overnight incubation at  $-20^{\circ}\text{C}$  either on MR FILM for long time exposure.

### **Conclusions**

In this current preliminary study we have not found any patient with type B of NPD. In addition to  $\Delta R$  608, 4 other mutations have been reported in type B NPD patients and numerous others have been identified, including several common mutations that might be useful for genetic screening in specific populations. Moreover, these new mutations have been recently identified in the ethnic groups (e.g., Turkish, Saudi Arabian), geografically and really close to our country. This is the reason because our study is an important first step of a molecular screening program that may be undertaken shortly.

### **References**

- 1) Schuchman EH et al. (2001) in *The Metabolic & Molecular Basis of Inherited Disease*, Mc Graw Hill (8<sup>o</sup> Ed.), Vol. 3, 3589-3610.
- 2) O'Brien JF in *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, Saunders (3<sup>o</sup> Ed.), 49, 1776-1787.
- 3) Schuchman EH et al. (1999) *Genomics* 12, 197-205.
- 4) Schuchman EH et al. (1997) *Niemann-Pick Disease: mutation update, genotype/phenotype correlations and prospects for genetic testing*. Genetic Testing. Vol.1, Num.1, Mary Ann Liebert, Inc..
- 5) Yaping Y (2002) *Mutation Analysis of the  $\Delta R$  608 Mutation in Neamann-Pick Type B from Dry Blood Spot (DBS) Cards*. Department of Human Genetics, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY.

## **Genetic analysis about the wellknown relationship between Alzheimer dementia outbreak and App gene overexpression in Down young patients**

**Ciaccio M. \*, Vocca L. \*, Scazzone C. \*, Ferraro L. \*, Bivona G. \*, Giuffrè M. \*\* and Corsello G. \*\***

\*Chair of Clinical Biochemistry and \*\*Chair of Pediatrics, Faculty of Medicine, University of Palermo, Italy

### **Introduction**

Down Syndrome (DS), first described in 1866 by John Landon Down is related to the trisomy of chromosome 21, as discovered in 1959 by Jerome Lejeune. DS is the most frequent cause of mental retardation, with an incidence of approximately 1/700 liveborns. In about 95 % of cases, DS depends on a free 21 trisomy; in the other cases robertsonian translocations as well as mosaic 21 trisomy may be observed (1). Today is wellknown the relationship between Down phenotype and overexpression of some gene in the long arm of 21 chromosome, wich enzymatic products exhibit an activity increase of about 50%. A specific region has been found on the 21 chromosome and called Down Syndrome Critical Region (DSCR). The latter has got different genetic "loci" whom replication is associated to mental delay, cardiac malformations and phenotypical features of DS. DSCR has been found on the long arm of 21 chromosome (21q) and the extension of the region inside the 21q, is between 11,21 and 22 bands, from D21S43 locus (band 22.3) (2). Particularly, one gene inside the DSCR is APPgene ( $\beta$ -amyloid precursor) on the 21 band. Today is wellknown that the overexpression of EST-2 oncogene in Down patients is a risk factor, 15-20 times more than in normal population, for megacarioblastic leukaemia and that the gene for interferon receiver, inside the 21 chromosome also, produces his protein with an increase of 50%. Similarly, the APP gene overexpression causes high alterations in the biochemical outline of Down patients: this is the cause of the toxic metabolic effects that may be clinically checked also after many years. It so happens that APP gene, codifying for  $\beta$ -amyloid precursor protein, that takes a big role in Alzheimer Dementia (AD) outbreak in Down young men (3,4). Besides the large literature and also scientific data, there is a strong evidence about the relationship between APP gene overexprssion and dementia in Down subjects, considering that APP gene is on the 21 chromosome and that the 100 % of DS patients over 40 catch AD.

The aim of our work was to evaluate the APP gene overexpression in Down subjects in order to establish the outbreak of a neurodegenerative course like AD, as a preclinical step.

### **Materials and methods**

DNA was isolated from cell lines derived from 5 DS patients (2 young men and 3 young women) and from 4 healthy subjects used as a control. Each DNA was digested with the restriction enzyme, than amplified by PCR techniques and size separated by 1% agarose gel electrophoresis; than, DNA sequences were transferred to nylon membranes and hybridized. Autoradiographs were generated by exposure of Kodak XAR film for the time required, then the results from each autoradiogram were analyzed separately and the data were averaged and statistically analyzed.

### **Results**

About the genetic analysis, in order to evaluate the expression pattern of D21S46 gene in our 5 young adults patients with DS by molecular biology techniques described above, we found a big increase in D21S46 gene expression.

### **Conclusions**

Genetic analysis about the expression pattern of D21S46 gene, which protein is in close relationship with the neurodegenerative outlines of AD, and the high increase in expression of just this gene is a really possibility in early finding, in Down subjects, of forecasting and specific markers of AD. Moreover, an early characterization of the same kind of markers in Down subjects genetic pattern, should allow a similar early therapeutic and nutritional treatment in order to prevent and contrast the neurodegenerative symptoms outbreak.

### **References**

- 1) Ciaccio M et al. (2003) *It J Biochem* 52, 72-79.
- 2) Ma H et al. (2004) *J Neurochem* 88, 1485-1496.
- 3) Ermak G et al. (2004) *FASEB J* 18, 62-69.
- 4) Margallo-Lana M et al. (2004) *Neurology* 62, 1996-1998.

## **Evaluation of patients with thrombotic stroke by methionine loading oral curve**

**Ciaccio M. \*, Bivona G. \*, Vocca L. \*, Ferraro L. \*, Guglielmini E. \*, Saia A. \*, Scazzone C. \*, Petrigli T. \*, Caruso A. \*, Labbozzetta M. \*, Lo Coco L. \*\*, Malato A. \*\*, Anastasio R. \*\*, Siragusa S. \*\***

\*Chair of Clinical Biochemistry and \*\*Chair of Hematology, Faculty of Medicine, University of Palermo, Italy

### **Introduction**

An increased plasma Homocysteine (Hcy) level is due to a failure in metabolic pathway of Methionine, both essential and important methyl-donor aminoacid, whose metabolic cycle is called S-adenosylmethionine cycle (SAM cycle). This alteration can be caused from a deficit of enzymatic activities or folate, B6 and B12 vitamins, all involved in SAM cycle (1,2,3). Several hypothetical pathways can explain how the hyperhomocysteinemia is a such strong and independent risk factor in the development of CAD and in thrombotic stroke pathogenesis. Hcy is an amino acid liable to autoxidation

producing Homocystine, Hcy-disulphate and Hcy-tiolactone, compounds with potential pro-oxidant activity among basal endothelium (4,5). The oxidation of the Hcy sulphidrilic radicle and the following yield of superoxide and hydrogen peroxide radicles may be the reason of the endothelial cytotoxicity when tHcy plasma level is higher than base-level. Reactive Oxygen Species (ROS) hyperproduction can promote the lipidic peroxidation both on the endothelium surface and plasma lipoproteins, enhancing the LDL oxidation (6,7). Moreover, hyperhomocysteinemia interferes with blood clotting resulting in prothrombotic effects (8,9). In the current study we examined thrombotic patients with normal Hcy fast values or at the high limit of the normal range values and we tested them by Methionine loading oral functional trial in aim to evaluate any faults in the aminoacid metabolism resulting in an increasing plasma Hcy level.

#### **Materials and methods**

Plasma tHcy levels were measured in 94 patients with thrombotic disease, 31 men and 63 women, age:30-60. Everybody was assayed by Methionine loading oral Test: this is carried out by taking of a fast blood sample and establishing Hcy, folate, B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> vitamins; then, 100 mg/Kg of L-Methionine in fruit juice were administered and Hcy plasma levels were determined at 30, 60, 120, 180 and 240 minutes. Plasma Hcy level were determined by two different methods: IMX System and IMMULITE Homocysteine assay. IMX System is an automatic analyzer for biological fluid assay (Abbott S.p.A., Roma, Italy) FPIA (Fluorescence Polarization Immuno Assay). IMX System uses a competitive link immunological assay, where the antigen in the patient sample is in competition with the markedout antigen in linking on antibody molecules specific sites. IMX System tests the change in polarized light caused by sample antigen-antibody complex. The change in polarized light intensity is reverse proportional to the sample antigen concentration. The relationship between tHcy levels and CAD risk was assessed by multiple regression. Then, mean values of tHcy plasma levels in healthy and CAD men and in healthy and CAD women were lead on graphic to point out the achieved values significance. The IMMULITE Homocysteine assay is a competitive immunoassay which involves a preliminary manual sample pretreatment step. Hcy in the patient plasma or serum sample is released from its binding proteins and converted to S-adenosyl-homocysteine (SAH) by an off-line 30 minutes incubation at 37°C in the presence of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and dithiothreitol (DTT). The treated sample and alkaline phosphatase-labeled anti-SAH antibody are simultaneously introduced into a test unit containing an SAH-coated polystyrene bead. During a 30 minutes incubation, the SAH from the patient sample competes with the immobilized SAH for binding the alkaline phosphatase labeled-anti-SAH antibody conjugate. Unbound enzyme conjugate is removed by centrifugal wash. In aim to quantify the bound conjugate, substrate (dioxetane) is added, which gives out light because of the enzyme (alkaline phosphatase) hydrolysis.

#### **Results**

In 94 patients tested, whose Hcy fast plasma level is at the high limit of the normal range values, with a mean value of  $15.66 \pm 4.4 \mu\text{mol/l}$  (men:  $15.79 \pm 5.39$  and women:  $13.44 \pm 4$ ), 30 of them showed a pathologic curve.

#### **CONCLUSIONS**

This kind of results let us consider that in thrombotic subjects or in those with thrombotic stroke risk, both with fast plasma levels of tHcy at the high limit of the normal range values, it is quite appropriate to carry out a methionine loading oral curve.

#### **References**

- 1) Finkelstein JD (1990) J Nutr Biochem 1, 228-237.
- 2) Malinow MR et al. (1994) J Lab Clin Med 123, 421-429.
- 3) Ueland PM et al. (1993) Clin Chem 39, 1764-1779.
- 4) van den Brandhof WE et al. (2001) Atherosclerosis 157, 403-409.
- 5) Nygard O et al. (1997) N Engl J Med 337, 230-236.
- 6) Mansoor MA et al. (1992) Anal Biochem 200, 218-229.
- 7) Heinecke JW et al. (1987) J Biol Chem 262, 10098-10103.
- 8) Selhub J et al. (1995) N Engl J Med 332, 286-291.
- 9) Choy PC et al. (2000) Mol Cell Biochem 207, 143-148.

### **Evaluations and new relationships between renal failure and homocysteine plasma levels in patients with chronic renal failure**

**Ciaccio M., Scazzone C., Bivona G., Ferraro L., Labbozzetta M., Vocca L., Petrigli T., Saia A., Guglielmini E.**

Chair of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Palermo, Italy

#### **Introduction**

Several epidemiological studies established the relationships between heart and cerebrovascular diseases with Homocysteine plasma levels. The discovery of a relationship between high plasma homocysteine levels and Coronary Artery Disease (CAD) goes back to 1969, when McCully observed a spreading atherosclerosis in two children with homocystinuria and then achieved that high homocysteine levels should be a risk factor for CAD in whole population (1, 2). From then on, several clinical obviousnesses, also epidemiological and experimental, established the relation

between hyperhomocysteinemia and various diseases, certainly including atherosclerosis and thrombosis, but also many other pathological conditions, as Alzheimer Disease (AD) and Vascular Dementia (3). Despite the evidence that hyperhomocysteinemia is related with all these conditions, it's still unknown the mechanism behind the decreased cognitive performance. Moreover, about a possible relationship between hyperhomocysteinemia and chronic renal failure seems to be interesting to establish a role of homocysteine plasma level in the end-stage chronic renal failure and the predominance of CVD in these patients (4). Homocysteine is an essential sulfur-containing amino acid, intermediate formed during the metabolism of methionine. The two main metabolic pathways responsible for plasma levels of homocysteine, proteins bounded for about 80%, are homocysteine/methionine conversion (remethylation cycle) and then the cysteine formation (transsulfuration pathway). In the remethylation cycle, homocysteine is recycled to methionine by two different reactions: the first requires the presence of methionine synthase, where vitamin B12 and methyltetrahydrofolate serve as cofactor and cosubstrate for this enzyme; a second pathway exists for homocysteine remethylation catalyzed by the enzyme betaine-homocysteine-methyltransferase. In the transsulfuration pathway, homocysteine is irreversibly combined with serine by the B6-dependent enzyme cystathionine- $\beta$ -synthase to form cystathionine, then metabolized to cysteine (5, 6).

Nowadays hyperhomocysteinemia is a wellknown independent risk factor for atherosclerosis and thrombosis such as plasma lipids, smoking, or obesity and diabetes. The prevalence of cardiovascular disease (CVD) is high in patients with chronic renal failure and CVD is the most common cause of death (about 50%) in these patients (7). The aim of the current study is to estimate tHcy seric levels in patients with chronic renal failure.

#### **Materials and methods**

Plasma homocysteine levels were measured in 41 patients (34 males, age range 30-84 years; 7 females, age range 56-66 years) with chronic renal failure and 40 healthy controls (20 males, age range 30-70 years; 20 females, age range 45-65 years) were involved in our study. These values were determined by automatic analyzer for biological fluid assay (IMX System, Abbott S.p.A., Roma, Italy) FPIA (Fluorescence Polarization Immuno Assay). IMX System uses a competitive link immunological assay, where the antigen in the patient sample is in competition with the markedout antigen in linking on antibody molecules specific sites. IMX System tests the change in polarized light caused by sample antigen-antibody complex. The change in polarized light intensity is reverse proportional to the sample antigen concentration. The relationship between tHcy levels and IRC was assessed by multiple regression. Then, mean values of tHcy plasma levels in healthy and IRC men and in healthy and IRC women were lead on graphic to point out the achieved values significancy.

#### **Results**

Mean value of tHcy plasma levels (n.v. 5-11  $\mu\text{mol/l}$ ) in patients with chronic renal failure was 30.9  $\mu\text{mol/l}$  (SD $\pm$ 12.7) among a mean value of 11.7  $\mu\text{mol/l}$  (SD $\pm$ 1.7) in healthy controls.

#### **Conclusions**

Current study in patients with end-stage renal disease established high plasma tHcy levels in more than 97% of them. Because of the evidence of high plasma tHcy level like strong and independent risk factor in the development of CVD, this relationship could explain how the most common cause of death in patients with chronic renal failure is CVD. Hcy is an amino acid liable to autoxidation producing Homocystine, Hcy-disulphate and Hcy-tiolactone, compounds with potential pro-oxidant activity among vasal endothelium. The oxidation of the Hcy sulphidrilic radicle and the following yield of superoxide and hydrogen peroxide radicles may be the reason of the endothelial cytotoxicity when tHcy plasma level is higher than base-level (8). Moreover, elevated tHcy plasma levels lead to a lower efficiency in endothelial antithrombotical pathways, V and XII coagulation factors increased, thrombomoduline expression inhibited and plasminogen starters riduced, all increasing thrombotical events (9).

#### **References**

- 1) van den Brandhof WE et al. (2001) 157, 403-409.
- 2) de Koning ABL et al. (2003) Clin Biochem 36, 431-441.
- 3) Andersson A et al. (2000) Atherosclerosis 151, 535-539.
- 4) Abdel- Raheem MM et al. (2002) Thromb Res 105, 299-302.
- 5) Finkelstein JD et al. (1990) J Nutr Biochem 1, 228-237.
- 6) Malinow MR et al. (1994) J Lab Clin Med 123, 421-429.
- 7) Hermann W (2001) Clin Chem Lab Med 39, 666-674.
- 8) Starkebaum G et al. (1986) J Clin Invest 77, 1370-1376.
- 9) Yu Fu W et al. (2002) Atherosclerosis 161, 169-176.

## Valutazione dei livelli ematici di omocisteina, acido folico, vitamine B6 e B12 in soggetti anziani con funzioni cognitive alterate in seguito a stroke

Guglielmini E., Bivona G., Ferraro L., Scazzone C., Altavilla P., Saia A. e Ciaccio M.

Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Palermo

### Introduzione

Il Sistema Nervoso Centrale richiede un costante apporto di glucosio e di nutrienti diversi per il mantenimento di una adeguata funzione cerebrale. La carenza di acido folico, di vitamine B6 e B12 possono causare delle severe alterazioni delle funzioni cognitive. Inoltre, la diminuzione di questi nutrienti possono causare un aumento delle concentrazioni plasmatiche di Omocisteina (1) che nell'anziano tendono ad essere più elevate. Diversi studi hanno dimostrato che le elevate concentrazioni plasmatiche di Omocisteina rappresentano un importante fattore di rischio indipendente per la malattia aterosclerotica cardiovascolare, stroke, arteriopatie occlusive periferiche e trombosi venose (2, 3). L'induzione del processo aterogenetico da aumento delle concentrazioni plasmatiche di Omocisteina sembra essere dovuto ad una alterazione endoteliale (con aumento di molecole da adesione) cui partecipano le Specie Radicaliche dell'Ossigeno che risultano aumentate con conseguente incremento di LDL ossidate. Inoltre, l'iperomocisteinemia interferisce con il processo di coagulazione con effetti protrombotici. In questo studio abbiamo preso in esame pazienti anziani con deficit delle funzioni cognitive in seguito ad episodi di stroke ed abbiamo valutato le concentrazioni plasmatiche di Omocisteina, acido folico, vitamine B6 e B12.

### Materiali e metodi

Il nostro studio ha preso in esame 31 pazienti con pregressi episodi di stroke di cui 17 uomini e 14 donne di età compresa tra i 64 ed i 77 anni. I livelli ematici di Omocisteina, acido folico e vitamina B12 sono stati valutati mediante il sistema IMMULITE con rilevazione in chemiluminescenza. L'omocisteina presente nel plasma o nel siero del paziente viene rilasciata dalle sue proteine leganti attraverso un'incubazione di 30 minuti a 37°C in presenza di idrolasi di S-adenosil-L-omocisteina e di ditiotreitolo (DTT). Il campione trattato e l'anticorpo SAH marcato con fosfatasi alcalina vengono introdotti simultaneamente in una *test unit* contenente una sferetta di polistirene coattata con SAH.

L'acido folico, dopo bollitura, prevede anch'esso un dosaggio competitivo in fase liquida, marcato con ligando con immobilizzazione *in situ* e con un sistema di rilevazione dell'anti-ligando. La sferetta di polistirene è coattata con un anticorpo monoclonale murino specifico per la proteina legante l'acido folico. La vitamina B12 nel campione è rilasciata dalle proteine carrier attraverso incubazione a 100°C in presenza di ditiotreitolo e cianuro di potassio. Quindi, il campione trattato ed il fattore intrinseco di suino vengono introdotti simultaneamente nelle *test units* in cui la sferetta di polistirene è coattata all'analogo B12 ed incubate per circa 30 minuti a 37°C con agitazione intermittente. Per tutte e tre le determinazioni sopra introdotte, per quantificare il coniugato legato, si procede aggiungendo il substrato (dioxetano) che emette luce in seguito ad idrolisi da parte dell'enzima (fosfatasi alcalina) che marca ogni coniugato anticorpale.

La determinazione della vitamina B6 prevede la trasformazione della molecola in un derivato fluorescente per l'analisi mediante HPLC in fase inversa, lavorando in isocratica a 25°C e calcolando la concentrazione dell'analita nel campione tramite integrazione dei picchi cromatografici.

### Risultati

La concentrazione plasmatica di Omocisteina risulta mediamente aumentata in tutti i soggetti in studio [valore medio 27.47±4.3 micromoli/L (uomini 25.79±5.39 micromoli/L e donne 19.44±4 micromoli/L)]. mentre l'acido folico è diminuito (< 3 ng/ml). Le vitamine B6 e B12 non hanno mostrato differenze significative rispetto al range di normalità.

### Conclusioni

Questi risultati inducono a confermare l'importanza dell'Omocisteina nella patogenesi del processo aterosclerotico e dei fattori vitaminici coinvolti nel suo ciclo metabolico. In particolare, il ruolo dell'acido folico nell'equilibrio del ciclo metabolico della S-adesonilmetionina, la cui supplementazione farmacologica può essere consigliata al fine di determinare una riduzione dei livelli ematici di Omocisteina.

### Bibliografia

- 1) Malinow MR et al. (1994) J Lab Clin Med 123, 421-429.
- 2) van den Brandhof WE et al. (2001) Atherosclerosis 157, 403-409.
- 3) Schwammenthal Y et al. (2004) Lancet Neurol 3, 493-495.

## Molecular epidemiology of HIV type 1 (HIV-1) non-B subtypes in Sicily

Tramuto F., Bonura F., Mancuso S., Valenti R., Vitale F.

Dept. Hygiene and Microbiology, University of Palermo - Italy

### Background

The initial AIDS epidemic in Europe was caused by the B subtype of the M group of HIV-1. This continues to be the predominant one at present, although there have been reports of the emergence of non-B subtypes in several European countries.

**Aim**

Provide a contribute to the knowledge of the evolving HIV epidemic in Europe, showing the presence of HIV-1 non-B subtypes in Sicily, the most Mediterranean island.

**Methods**

The study was performed with appropriate patient consent .Plasma samples were collected and submitted to RNA purification, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) of plasma-derived RNA. Finally, sequencing were performed using the Viroseq HIV Genotyping System (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions.

**Results**

Plasma of 169 HIV-1 infected adult patients were sequenced and submitted to genotypic analysis for HIV-1 PR and RT regions of the POL gene, in order to study the antiretroviral associated resistance mutations after a virologic failure during highly active antiretroviral therapy (HAART). 8 patients out of 169 (4,7%) showed a non-B HIV-1 subtype with high variability among subtypes including circulating recombinant forms (CRFs). All individuals harbouring a non-B HIV-1 subtype acquired the infection by heterosexual transmission.

**Conclusions**

HIV-1 non-B subtypes are circulating in Sicily, in patients who experienced a virologic failure during HAART. Because of the early treatment of HIV infected patients with HAART, this group, in the future, might be the core group for the spread of HIV-1 non-B subtypes. Remarkably, all the subjects harbouring a non-B subtype of HIV-1, have acquired HIV infection by heterosexual exposure. These findings highlight the need for implement a network of epidemiological surveillance on the circulation of HIV-1 subtypes.

Francesco Vitale, Dept Hygiene and Microbiology - University of Palermo - Italy, 133, via del Vespro, I-90127, Palermo, Italy, tel 0916553632, fax 0916553647, labaid@unipa.it