

Un approccio proteomico alla diagnosi molecolare delle amiloidosi sistemiche

Francesca Lavatelli¹, Giovanni Palladini¹, Laura Obici¹, Gabriele Sarais¹, Vittorio Bellotti¹, Remigio Moratti², Riccardo Albertini², Giampaolo Merlini¹

¹Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche, Laboratori di Biotecnologie e ²Servizio Analisi Chimico-Cliniche, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Dipartimento di Biochimica, Università di Pavia, Pavia

ABSTRACT

A proteomic approach to the molecular diagnosis of systemic amyloidoses. Protein deposition as amyloid is the basis of a group of diseases that have an enormous social and medical impact. In systemic forms, amyloid deposition is associated with dysfunction of vital organs and molecular typing of the deposits is necessary for diagnosis and treatment. More than 10 different proteins are known to be causative agents of systemic amyloidosis. The traditional diagnostic approach is multidisciplinary, but sometimes fails to identify the correct type. A proteomic approach could help in diagnosis, through the direct molecular characterization of fibrillar proteins in tissues, and cast insights into the mechanisms of tissue damage. We designed a proteomic strategy based on two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) followed by matrix assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis and peptide mass fingerprinting to directly characterize amyloid deposits in abdominal subcutaneous fat obtained by fine needle aspiration from patients with different types of systemic amyloidosis. A rapid methodology to prepare samples for high-grade 2D-PAGE analysis from small amounts of fat tissue was developed. Significant differences in the proteome of adipose tissue were observed between controls and patients, consisting in novel spots in regions of patient gels compatible with the expected migration of amyloidogenic proteins, with a characteristic distinct appearance according to the amyloid type. In the AL and in the ATTR cases analyzed by MS, these spots proved to be formed by the predicted amyloidogenic proteins, thus confirming the diagnosis. This practical and feasible approach provides a reliable way to directly characterize protein deposits in patients with amyloid disease.

INTRODUZIONE

Le amiloidosi costituiscono un eterogeneo gruppo di malattie, il cui comune denominatore è la presenza di depositi extra- o intracellulari di amiloide, che causano tossicità a livello cellulare, alterazione dell'architettura anatomica e disfunzione d'organo (1). Nelle forme sistemiche, la deposizione diffusa di amiloide a livello extracellulare conduce ad una severa alterazione funzionale di organi, quali cuore, rene e fegato, che si traduce in una prognosi severa in quanto a sopravvivenza. A dispetto della mancanza di omologia nella sequenza aminoacidica, le proteine amiloidogeniche generano fibrille morfologicamente simili, dotate di birifrangenza verde-mela all'osservazione in luce polarizzata, dopo colorazione con rosso Congo.

La diagnosi e la tipizzazione delle amiloidosi sono basate sulla dimostrazione della presenza degli aggregati di amiloide e sulla determinazione di quale proteina è il principale costituente delle fibrille (2-4). Più di dieci tipi di amiloidosi sistemiche sono ad oggi conosciuti nell'uomo, che differiscono tra loro per modalità di acquisizione, decorso clinico e trattamento (3,4). Le forme sistemiche più comuni sono l'amiloidosi da catene leggere immunoglobuliniche (AL) e l'amiloidosi reattiva (AA), in cui le fibrille derivano, rispettivamente, da catene leggere immunoglobuliniche monoclonali e dalla proteina di fase acuta siero amiloide A (SAA). Le amiloidosi sistemiche ereditarie, peraltro, causate da mutazioni in geni che

codificano per proteine circolanti nel plasma, quali transtiretina (TTR), lisozima ed apolipoproteine A-I ed A-II, non sono infrequenti ed hanno una incidenza particolarmente elevata in alcune aree geografiche.

La definizione precisa del tipo di amiloidosi in ciascun paziente è un passaggio critico nel pianificare la strategia terapeutica e nel formulare la prognosi. Il tessuto di scelta per la documentazione di depositi fibrillari in pazienti con sospetta amiloidosi sistemica è il tessuto adiposo addominale sottocutaneo, in genere prelevato tramite agoaspirazione con ago sottile (5-7). In seguito alla documentazione della presenza delle fibrille, la tipizzazione è effettuata utilizzando una varietà di tecniche per identificare il precursore circolante o la proteina depositata. Questo processo è complesso e la possibilità di errori nella diagnosi rimane elevata (8,9). Il metodo conclusivo per la tipizzazione dell'amiloidosi è l'analisi diretta dei depositi. L'immunoistochimica tradizionale, tuttavia, non è completamente affidabile a questo scopo (10,11) e l'analisi biochimica delle fibrille richiede, tradizionalmente, il loro isolamento, approccio che spesso implica complesse procedure di estrazione e necessita di elevate quantità di materiale, aspetti che ne limitano l'utilizzo clinico.

In questo studio abbiamo sviluppato un approccio proteomico, basato sull'elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE) e sulla spettrometria di massa per identificare e caratterizzare le proteine depositate in campioni di tessu-

to addominale sottocutaneo del peso iniziale di alcuni mg, ottenuto per agoaspirazione da pazienti con differenti tipi di amiloidosi sistemica. Descriviamo differenze significative nel proteoma risolto mediante 2D-PAGE del tessuto adiposo di individui sani e di pazienti con amiloidosi, consistenti nella presenza, nei campioni affetti, di proteine amiloidogeniche depositate e di proteine note per associarsi ai depositi di amiloide, quali siero amiloide P (SAP) ed apolipoproteina E. Questo approccio può essere utilizzato come strumento diagnostico per la tipizzazione della malattia, in quanto prevede l'utilizzo di un tessuto che è correntemente prelevato come parte integrante della valutazione clinica.

MATERIALI E METODI

Campioni

Campioni di tessuto adiposo addominale sottocutaneo ($n = 7$) usati come controlli sono stati ottenuti, previa approvazione del Comitato Etico della Fondazione IRCCS Ospedale S. Matteo di Pavia ed acquisizione del consenso informato, da individui sottoposti a chirurgia addominale per cause indipendenti, nel corso della procedura chirurgica. I campioni di tessuto adiposo da pazienti con amiloidosi sistemica ($n = 16$) sono stati ottenuti per agoaspirazione nel corso del normale iter diagnostico.

La presenza di fibrille di amiloide è stata valutata istologicamente in base alla positività alla colorazione con rosso Congo e la quantità di amiloide è stata graduata con una scala da 0 (non depositi) a 4 (depositi costituenti più del 60% del volume del campione) (12). Tutti i campioni di controllo sono risultati negativi. Immediatamente dopo il prelievo, tutti i campioni sono stati congelati e conservati a -80 °C fino al momento dell'uso.

Estrazione delle proteine dal tessuto adiposo ed analisi 2D-PAGE

I campioni di tessuto adiposo sono stati lavati ripetutamente con PBS (phosphate buffered saline) contenente un cocktail di inibitori delle proteasi (Complete, Roche). Il lavaggio finale è stato effettuato con acqua bidistillata. È stata, quindi, aggiunta al campione la soluzione di lisi (IEF buffer: urea 7 mol, tiourea 2 mol, 4% 3-(3-colamidopropil)dimetilammonio-1-propanesulfonato (CHAPS), ditiotreitolo 65 mmol), nel rapporto di 200 μ L/100 mg tessuto o, nel caso di campioni di dimensioni limitate, nella quantità fissa di 100 μ L. Il tessuto è stato poi omogeneizzato con un pestello monouso e sonicato brevemente (alcuni secondi) per quattro volte ad intervalli di 15 min in acqua e ghiaccio e lasciato in agitazione a temperatura ambiente negli intervalli. I campioni sono stati quindi centrifugati a 25.000 g per 1,5 h a 19 °C. Lo strato acquoso compreso fra lo strato superficiale contenente i lipidi ed i detriti cellulari sul fondo della provetta è stato quindi prelevato e aliquotato a -80 °C (13). La concentrazione delle proteine è stata quantificata usando Bio-Rad Protein Assay.

Gli estratti proteici (10-30 μ g di proteine totali) sono stati diluiti fino ad un volume finale di 300 μ L con Destreak™ buffer (Amersham Biosciences), IEF buffer ed anfoliti con un intervallo di pI 3-10 (Bio-Rad) (concentrazione finale nel campione 0,02%). L'isoelettrofocalizzazione è stata condotta usando come supporto ReadyStrip™ IPG strips (Bio-Rad) della lunghezza di 17 cm su Protean™ IEF Cell (Bio-Rad), col seguente protocollo: reidratazione passiva per 1 h, reidratazione attiva a 50 V per 8 h, 120 V per 1 h, 300 V per 30 min, incremento lineare del voltaggio fino a 3500 V in 3 h, 5000 V per 10 min, 8000 V fino al raggiungimento di 65.000 Vh. Dopo riduzione ed alchilazione delle proteine, è stata quindi condotta la seconda dimensione usando gel di poliacrilamide con gradiente (ReadyGels™, Bio-Rad). I gel sono stati colorati con colorazione argentea, oppure con un kit per colorazione argentea compatibile con spettrometria di massa (ProteoSilver™ Plus, Sigma), o con blu di Coomassie colloidale. Le immagini dei gel sono state acquisite usando VersaDoc™ 3000 (Bio-Rad) ed i risultati sono stati analizzati col software PDQuest™ (Bio-Rad).

Digestione delle proteine e spettrometria di massa MALDI-TOF

Gli spot di interesse sono stati escissi usando puntali per pipette con orifizio largo e decolorati con una soluzione decolorante per blu di Coomassie (ammonio bicarbonato 100 mmol pH 9; 50% acetonitrile) o per colorazione argentea (ProteoSilver™ Plus kit). I pezzetti di gel sono stati quindi lavati tre volte con la soluzione di lavaggio 1 (ammonio bicarbonato 100 mmol pH 9), con la soluzione di lavaggio 2 (100 mmol ammonio bicarbonato, pH 9/50% acetonitrile) e con la soluzione di lavaggio 3 (100% acetonitrile). Le proteine sono state digerite con 20 ng di tripsina (Trypsin Gold, Promega) in 50 mmol ammonio bicarbonato, pH 9 e 5% acetonitrile, ed incubate per 12 h a 37 °C. I peptidi sono stati estratti con la soluzione di estrazione 1 (20 mmol ammonio bicarbonato, pH 9), con la soluzione di estrazione 2 (1% acido trifluoroacetico; 50% acetonitrile) e con la soluzione di estrazione 3 (100% acetonitrile), ogni volta per 20 min. L'intero processo di estrazione è stato effettuato in duplicato. I peptidi sono stati preparati per la spettrometria di massa usando ZipTips™ (Millipore). Gli spettri di massa sono stati ottenuti dopo co-cristallizzazione (14,15) dei peptidi con la matrice acido 2,5-diidrossibenzoico su piastre AnchorChip™ (Bruker-Daltonics), usando uno spettrometro MALDI-TOF Reflex IV™ (Bruker-Daltonics) in modalità reflectron. Alternativamente, i peptidi sono stati co-cristallizzati con la matrice acido α -ciano-4-idrossicinamico ed analizzati con uno spettrometro MALDI-TOF Micromass Micro-MX™ (Waters) con le stesse modalità. La calibrazione esterna degli spettri è stata ottenuta usando, rispettivamente, una miscela di peptidi standard fornita da Bruker ed una soluzione standard di ormone antidiuretico (ADH) fornita da Waters. La calibrazione interna è stata ottenuta usando le masse di peptidi conosciuti come riferimento o, nel caso di spettri ottenuti con lo strumento Micromass Micro-MX™, utilizzando come

riferimento interno la massa del glufibrinopeptide (Glu-Fib) (Lock Mass).

La lista dei picchi provenienti dagli spettri è stata generata usando ProteinLynx (Micromass) e sottoposta a ricerca in banca dati mediante MASCOT™ (Matrix Science) per analisi con "peptide mass fingerprinting" (PMF). La ricerca è stata effettuata nelle banche dati di proteine SwissProt o NCBIInr. La validazione dell'assegnazione dei picchi è stata condotta manualmente usando i valori derivati dalla digestione teorica delle proteine

ottenute dalla ricerca in banca dati, generata mediante il software on-line MS-Digest (Protein Prospector, UCSF) (16).

RISULTATI

Il metodo utilizzato ha consentito di ottenere la mappa proteomica del tessuto adiposo addominale sottocutaneo di riferimento da usare nella comparazione con quello prelevato dai pazienti con amiloidosi (Figura 1). I campioni di tessuto adiposo, negativi alla colorazione con rosso Congo e provenienti da individui senza evidenza clinica di amiloidosi sistemica, sono stati analizzati mediante 2D-PAGE seguita da colorazione con blu di coomassie o argentica. Un primo gruppo di circa 70 spot da campioni di controllo è stato identificato tramite spettrometria di massa MALDI-TOF e "peptide mass fingerprinting". Nonostante tracce di alcune proteine plasmatiche siano visibili nei gel, l'accurato lavaggio dei campioni si è rivelato in grado di minimizzare la contaminazione da parte di proteine provenienti dai globuli rossi o dal plasma, cosicché la maggioranza degli spot sono costituiti da proteine espresse dal tessuto adiposo.

Campioni di tessuto addominale sottocutaneo sono stati ottenuti da sedici pazienti con amiloidosi (4 ATTR, 10 AL λ , 2 AL κ) ed il grado di infiltrazione da amiloide è stato stimato sulla base della positività alla colorazione con rosso Congo. In tutti i pazienti, il tipo di amiloidosi è stato, parallelamente, stabilito mediante la dimostrazione della presenza di una discrasia plasmacellulare, nel caso dell'amiloidosi AL, o mediante sequenziamento genico, con rilievo di mutazioni nel gene codificante per la TTR, note per associarsi ad amiloidosi ATTR.

I campioni provenienti dai pazienti sono stati sottoposti ad analisi mediante elettroforesi bidimensionale ed a

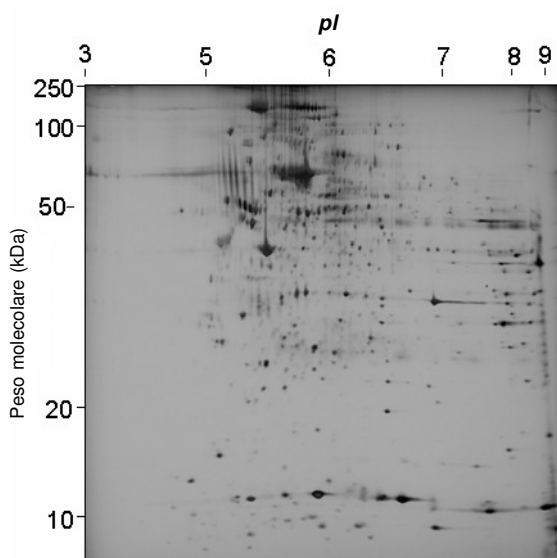


Figura 1
Proteoma risolto mediante 2D-PAGE del tessuto adiposo sottocutaneo da campioni di controllo. Proteine totali, 50 μ g; colorazione argentica.

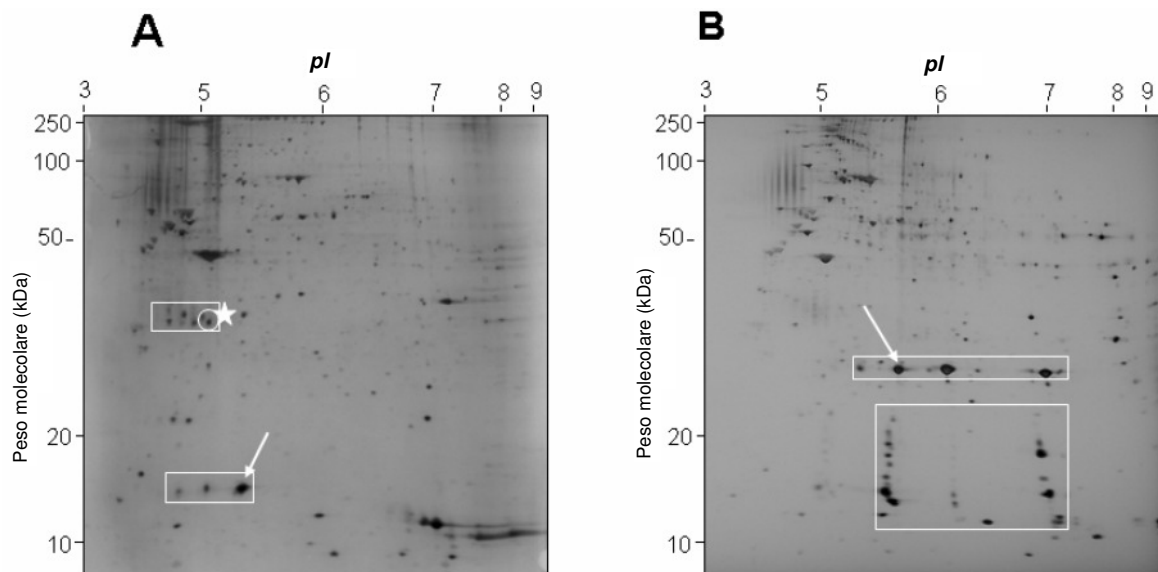


Figura 2
Proteoma del grasso addominale sottocutaneo in pazienti con A) amiloidosi da transtiretina (ATTR) Val30Met e B) amiloidosi da catene leggere immunoglobuliniche (AL) λ . Gli spot anomali, non visibili nei controlli, sono indicati nei riquadri. Gli spettri di massa MALDI-TOF degli spot indicati dalla freccia in A) sono mostrati nella Figura 3. Proteine totali, 50 μ g; colorazione argentica. L'asterisco indica uno spot costituito da Siero Amiloide P.

procedure di colorazione analoghe a quelle usate nel caso dei campioni di controllo (Figura 2). Spot di intensità marcata, non presenti nei controlli (nei riquadri in Figura 2), sono apparsi evidenti in tutti i campioni dei pazienti, in regioni corrispondenti al PM ed al pI previsti per i rispettivi precursori amiloidogenici circolanti (circa 14 kDa per la TTR e 25 kDa per le catene leggere immunoglobuliniche), suggerendo che questi precursori fossero presenti, come depositi, nel tessuto adiposo. Inoltre, "scale" e "treni" di spot (eterogenei in quanto a PM e/o a pI) erano visibili in associazione ai precedenti e sono stati pertanto ipotizzati essere frammenti, varianti o forme contenenti modificazioni post-traduzionali dei precursori amiloidogenici. In aggiunta, nell'amiloidosi ATTR, un "treno" di spot con un PM apparente di circa 35 kDa, verosimilmente corrispondente a polimeri di TTR, era in tutti i casi chiaramente visibile. L'intensità totale degli spot sopra descritti è apparsa correlare in modo qualitativo e semi-quantitativo col grado di infiltrazione di amiloide nel tessuto, valutato in base alla colorazione con rosso Congo.

In entrambi i tipi di amiloidosi studiati, numerosi spot tra quelli sopra descritti sono stati escissi dal gel, digeriti con tripsina ed analizzati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. Nel caso di amiloidosi ATTR rappresentato nella Figura 2 A (associato alla presenza della mutazione Val30Met), il risultato dell'analisi tramite "peptide mass fingerprinting" ha confermato, per tutti gli spot con un PM di 13-14 kDa e per quelli con PM di 35 kDa, l'ipotesi che fossero costituiti da TTR (SwissProt # P02766; MOWSE score significativi). Uno spettro rappresentativo, risultante dall'analisi del digerito triptico dello spot indicato con la freccia in Figura 2 A, è mostrato nella Figura 3. Nella maggior parte degli spot di TTR,

gli ioni triptici presenti nello spettro hanno fornito una copertura quasi completa della sequenza della proteina, ad eccezione di un breve frammento N-terminale di circa 22 amminoacidi, che non è risultato mai visibile. I peptidi triptici contenenti la sostituzione amminoacidica sono stati identificati, dimostrando che la proteina mutata e quella "wild type" sono co-depositate (Figura 3).

Nel caso di amiloidosi AL mostrato in Figura 2 B, gli spot con PM pari a 25 kDa sono stati identificati tramite "peptide mass fingerprinting" come catene leggere immunoglobuliniche λ (SwissProt #Q96JD0, MOWSE score significativi). Gli spot con PM inferiore, per la maggior parte dei quali la ricerca in banca dati non ha fornito un valore di probabilità di corretta identificazione significativo, sono stati ipotizzati contenere la stessa catena leggera immunoglobulinica sulla base della presenza di ioni triptici in comune con gli spettri ottenuti dagli spot identificati tramite "peptide mass fingerprinting".

Infine, spot anomali presenti in campioni di pazienti e non nei controlli sono stati identificati come proteine note per associarsi ai depositi di amiloide in vari tessuti, quali SAP (Figura 2 A), apolipoproteina E ed apolipoproteina A. Tuttavia, la presenza di tali proteine non è risultata costante e non è stata trovata una precisa correlazione quantitativa tra l'intensità delle stesse e l'entità dei depositi di amiloide.

DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo sviluppato un approccio proteomico, basato sull'elettroforesi bidimensionale, per l'analisi del tessuto adiposo sottocutaneo addominale in corso di amiloidosi sistemica. La metodica sviluppata per la preparazione dei campioni di tessuto adiposo di picco-

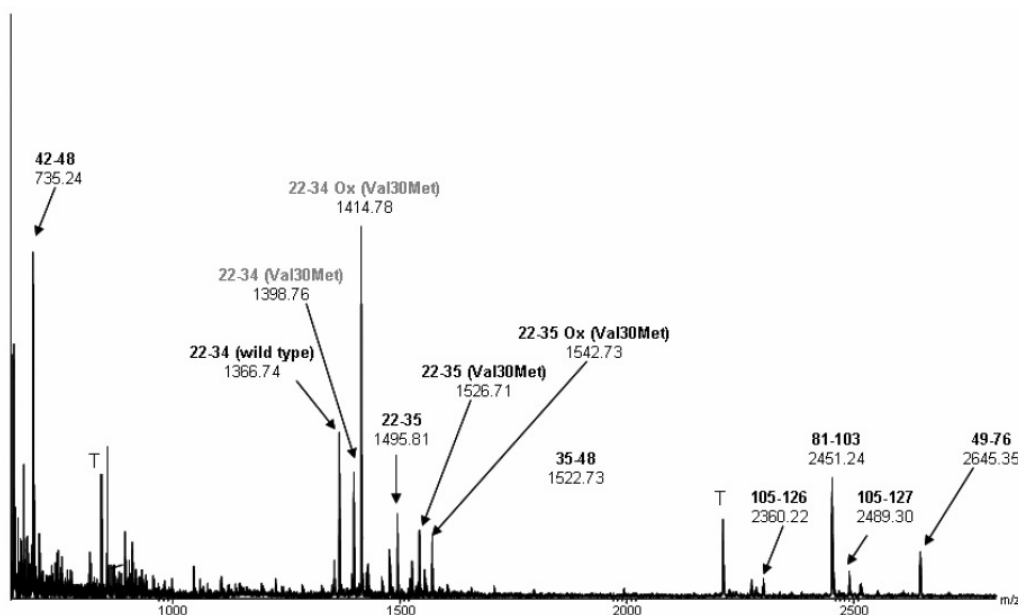


Figura 3

Spettro MALDI-TOF ottenuto dopo digestione triptica dello spot indicato con la freccia in Figura 2 A (amiloidosi ATTR). Sono indicati il valore m/z degli ioni peptidici maggiori ed il corrispondente intervallo amminoacidico nella transtiretina (grassetto).

le dimensioni, quali quelli ottenuti per agoaspirazione, si è rivelata rapida ed adatta per ottenere elettroforesi bidimensionali ad alta risoluzione. Considerando che l'acquisizione di agoaspirati di grasso periombelicale per l'analisi istologica è parte integrante della valutazione clinica dell'amiloidosi sistemica, l'approccio che abbiamo utilizzato è attuabile potenzialmente in tutti i pazienti con questa malattia. In tutti i campioni positivi al rosso Congo analizzati con 2D-PAGE, spot non normalmente presenti, con una migrazione elettroforetica compatibile con quella delle proteine amiloidogeniche note e/o dei loro frammenti, sono stati facilmente individuati mediante comparazione con i controlli. Inoltre, l'aspetto delle mappe dei pazienti è caratteristicamente distinto a seconda del tipo di amiloidosi. È quindi possibile ottenere l'identificazione di spot associati alla presenza della malattia tramite analisi con spettrometria di massa, "peptide mass fingerprinting" ed eventualmente immunoblotting, rivelando in tal modo inequivocabilmente quale proteina amiloidogenica sia presente in ciascuno dei depositi. È importante sottolineare il ruolo critico di un accurato lavaggio del campione iniziale, in quanto proteine potenzialmente amiloidogeniche circolanti, presenti nel plasma residuo, potrebbero falsare l'interpretazione dei risultati, se non efficientemente rimosse. Va notato, peraltro, come l'effettuazione di ripetuti lavaggi si sia dimostrata un metodo efficace per eliminare i precursori comuni, quali catene leggere immunoglobuliniche o TTR, che non sono risultati visibili nei nostri campioni di controllo.

Oltre all'utilità nella diagnosi, dal punto di vista dell'analisi biochimica delle proteine costituenti i depositi, la separazione in due dimensioni su gel è adatta per risolvere la complessità delle specie depositate, senza la necessità di pre-purificare le fibrille di amiloide.

L'ultima potenziale applicazione della nostra analisi proteomica dei tessuti affetti da amiloidosi è quella di individuare ed identificare cambiamenti nell'espressione di proteine costitutive del tessuto adiposo legate allo sviluppo della malattia, il cui studio è ancora in corso.

L'uso di un tessuto facilmente accessibile, quale il grasso periombelicale sottocutaneo ottenuto per agoaspirazione, permetterà l'estensione di questo studio pilota ad una coorte più ampia di pazienti e ci attendiamo che analisi successive permettano di gettare nuova luce sui meccanismi biochimici e biologici legati allo sviluppo di amiloidosi, inclusi il coinvolgimento di nuove proteine e la presenza di modificazioni post-traduzionali.

BIBLIOGRAFIA

1. Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med* 2003;349:583-96.
2. Westermark P, Benson MD, Buxbaum JN, et al. Amyloid: Toward terminology clarification - Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 2005;12:1-4.
3. Obici L, Perfetti V, Palladini G, et al. Clinical aspects of systemic amyloid diseases. *Biochim Biophys Acta* 2005;1753:11-22.
4. Falk RH, Comenzo RL, Skinner M. Medical progress - The systemic amyloidoses. *N Engl J Med* 1997;337:898-909.
5. Duston MA, Skinner M, Meenan RF, et al. Sensitivity, specificity, and predictive value of abdominal fat aspiration for the diagnosis of amyloidosis. *Arthritis Rheum* 1989;32:82-5.
6. van Gameren II, Hazenberg BP, Bijzet J, et al. Diagnostic accuracy of routine versus dedicated studied subcutaneous abdominal fat tissue for detection of systemic amyloidosis. *Arthritis Rheum* 2005;52:S247.
7. Westermark P, Davey E, Lindbom K, et al. Subcutaneous fat tissue for diagnosis and studies of systemic amyloidosis. *Acta Histochem* 2006;108:209-13.
8. Anesi E, Palladini G, Perfetti V, et al. Therapeutic advances demand accurate typing of amyloid deposits. *Am J Med* 2001;111:243-4.
9. Lachmann HJ, Booth DR, Booth SE, et al. Misdiagnosis of hereditary amyloidosis as AL (primary) amyloidosis. *N Engl J Med* 2002;346:1786-91.
10. Linke RP, Oos R, Wiegel NM, et al. Classification of amyloidosis: misdiagnosing by way of incomplete immunohistochemistry and how to prevent it. *Acta Histochem* 2006;108:197-208.
11. Kebbel A, Rocken C. Immunohistochemical classification of amyloid in surgical pathology revisited. *Am J Surg Pathol* 2006;30:673-83.
12. Hazenberg BP, Bijzet J, Limburg PC, et al. Diagnostic performance of amyloid A protein quantification in fat tissue of patients with clinical AA amyloidosis. *Amyloid* 2007;14:133-40.
13. Corton M, Villuendas G, Botella JI, et al. Improved resolution of the human adipose tissue proteome at alkaline and wide range pH by the addition of hydroxyethyl disulfide. *Proteomics* 2004;4:438-41.
14. Karas M, Bachmann D, Bahr U, et al. Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds. *Int J Mass Spectrom* 1987;78:53-68.
15. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Anal Chem* 1988;60:2299-301.
16. Clauser KR, Baker P, Burlingame AL. Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal Chem* 1999;71:2871-82.