

M. Pieri¹, L. Soleo², N. Miraglia², A.G. Perrotta¹, P. Basilicata³, A. Acampora³, N. Sannolo¹

Incremento dei livelli di sensibilità nell'analisi di addotti emoglobinici mediante digestione selettiva con calpaina

¹ Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Medicina del Lavoro, Igiene e Tossicologia Industriale, Seconda Università di Napoli.

² Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Università di Bari

³ Dipartimento di Medicina Pubblica e Sicurezza Sociale - Sezione di Medicina Legale, Università di Napoli "Federico II"

RIASSUNTO. Nell'ambito del monitoraggio biologico di soggetti esposti ad agenti cancerogeni uno strumento di analisi molto efficace è rappresentato dalla quantificazione degli addotti emoglobinici, che richiede, al fine di ottenere risultati accurati, lo sviluppo di metodiche di purificazione selettiva della frazione emoglobinica alchilata. A tal fine, nel presente lavoro è stata realizzata una digestione con calpaina, i cui risultati preliminari hanno evidenziato una diversa reattività dell'enzima nei confronti di emoglobina nativa ed alchilata con epicloridrina in quanto viene digerita solo l'emoglobina normale, con un conseguente arricchimento della frazione alchilata.

Parole chiave: addotti all'emoglobina, emoglobina alchilata, purificazione selettiva, cromatografia liquida/spettrometria di massa.

ABSTRACT. HIGHER LEVELS OF SENSITIVITY FOR THE ANALYSIS OF Hb ADDUCTS BY CALPAIN DIGESTION. Biological monitoring of subjects exposed to carcinogenic agents can be efficiently carried out through the quantitative measurement of hemoglobin adducts. This procedure requires the development of selective purification methods of the alkylated hemoglobin fraction in order to achieve high levels of accuracy. Digestion with calpain was conducted for the purposes of the present paper. The preliminary results showed different reactivity of the enzyme with respect to normal and alkylated hemoglobin: only a normal fraction was digested, with consequent concentration of the alkylated one.

Key words: hemoglobin adducts, alkylated hemoglobin, selective purification, liquid chromatography/mass spectrometry.

Introduzione

L'interesse per i rischi connessi all'impiego di agenti alchilanti in diversi settori dell'attività umana è progressivamente aumentato negli ultimi anni. Particolarmente rilevante è il ruolo giocato dal monitoraggio biologico dei soggetti professionalmente esposti a tali agenti. Una procedura di monitoraggio biologico ideale prevederebbe lo studio e la determinazione degli addotti tra agenti alchilanti e DNA del tessuto bersaglio, ma una valida alternativa è costituita dalla quantificazione di addotti emoglobinici (1, 2). Recentemente è stata proposta una nuova metodologia basata sulla determinazione e quantificazione di peptidi interni modificati, ottenuti in seguito ad idrolisi triptica delle catene emoglobiniche, analizzati mediante Cromatografia Liquida/Spettrometria di Massa (3). La possibilità di utilizzare peptidi modificati, anziché singoli amminoacidi alchilati, quali appropriati biomarcatori per il monitoraggio biologico, è stata ampiamente dimostrata (4, 5). Una limitazione della procedura proposta deriva dal fatto che ai livelli espositivi attuali corrisponde un ammontare estremamente basso di peptidi modificati rispetto a quelli nativi. Di qui nasce la necessità di sviluppare tecniche di purificazione per arricchire selettivamente i campioni e consentire la rivelazione quantitativa degli addotti emoglobinici anche in presenza di bassi livelli di alchilazione.

Lo scopo del presente lavoro è volto alla messa a punto di una metodica di arricchimento selettivo degli addotti emoglobinici mediante idrolisi con calpaina I (una cisteina proteasi calcio dipendente) di campioni di emoglobina (Hb) alchilata con epicloridrina (ECH), un agente alchilante utilizzato nell'industria di sintesi.

Metodi

Campioni di Hb ed Hb-ECH sono stati ottenuti mediante procedura riportata in letteratura (6). L'idrolisi con calpaina (Calbiochem) è stata realizzata a 26° C, in tampone 100µM CaCl₂ e 100 mM H₃BO₄ (1:1, v:v), variando i rapporti di digestione ed i tempi di reazione. I campioni sono stati successivamente analizzati mediante LC/ESI-MS ed MS-MS secondo le procedure descritte in letteratura (6).

Risultati

L'idrolisi dei campioni di Hb è stata condotta con rapporti Hb:calpaina pari a 200:1 e 25:1. Mediante analisi LC/ESI-MS si è verificato che all'aumentare della quantità di enzima si ottengono peptidi dal peso molecolare decrescente, a testimonianza di un maggiore grado di digestione delle catene globiniche. Gli stessi rapporti di idrolisi sono stati usati su campioni di Hb-ECH contenenti anche globina non alchilata. L'analisi LC/ESI-MS ed MS-MS ha permesso di evidenziare la formazione degli stessi peptidi ottenuti digerendo Hb nativa (Figura 1), dimostrando che la calpaina agisce sulle sole catene globiniche non alchilate, con un complessivo arricchimento della frazione Hb-ECH. Risultati analoghi sono stati ottenuti variando il tempo di reazione (1, 5, 16 e 48 h): all'aumentare del tempo cresce il grado di idrolisi delle catene di Hb, mentre la frazione Hb-ECH non viene digerita. L'entità dell'arricchimento è stata valutata calcolando i rapporti α_{ECH}/α e β_{ECH}/β in un campione di Hb-ECH non digerito (A) e nei campioni di Hb-ECH:calpaina pari a 200:1 (B) ed a 25:1 (C). Il rapporto α_{ECH}/α è risultato pari a 0,860 per il campione A, a 0,759 per B ed a 1,056 per C, conducendo la reazione a 26° C per 18 h. Nelle stesse condizioni il rapporto β_{ECH}/β era pari a 0,606 per A, 0,496 per B e 0,446 per C.

Discussione

La ricerca dell'enzima più adatto all'idrolisi selettiva delle catene globiniche normali è scaturita dalla constatazione che la maggior parte degli agenti alchilanti reagisce con i residui istidinici e cisteinici interni, oltre che con i residui N-terminali, delle catene globiniche. È stata utilizzata calpaina, un enzima che presenta nel sito catalitico residui di cisteina ed istidina prossimi, il gruppo -SH della cisteina e quello imidazolico dell'istidina formano una diade tiolato-imidazolica, che interagisce con il substrato formando intermedi tetraedrici instabili prima della digestione. Se il substrato presenta i residui di cisteina e/o istidina alchilati, l'interazione con il sito catalitico dell'enzima dovrebbe in ipotesi essere più difficile rispetto a quanto accade per le globine non alchilate. Per valutare ciò le prime prove sono state condotte utilizzando campioni di Hb ed Hb-ECH a diversi rapporti e tempi di digestione. All'aumentare della quantità di enzima o del tempo di reazione si è registrato un aumento del grado di digestione dell'Hb, ottenendo peptidi via via più piccoli. Ripetendo gli esperimenti su campioni di Hb-ECH si è assi-

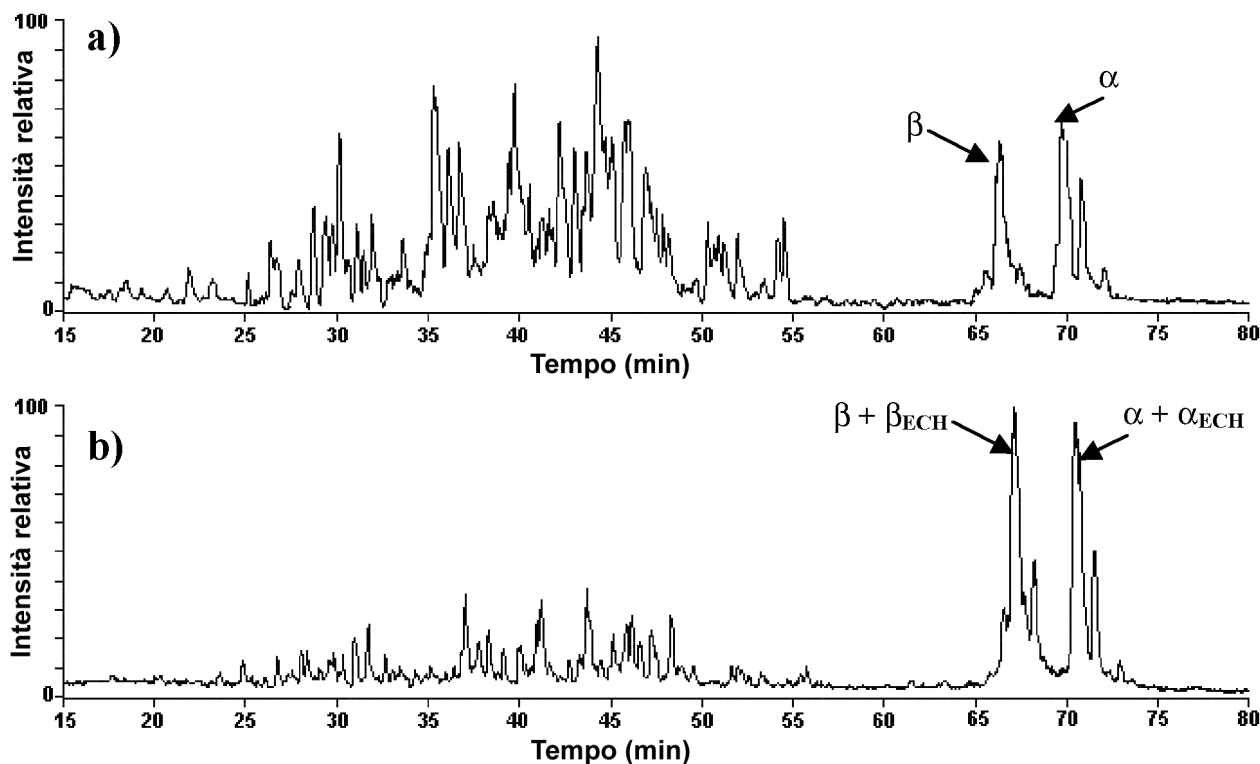


Figura 1. Cromatogramma LC/ESI-MS di un campione di emoglobina normale (pannello a) e di emoglobina alchilata con epicheloridrina (pannello b) digeriti con calpaina in rapporto 200:1 a 26° C per 18 h

stato alla formazione degli stessi peptidi ottenuti con l'Hb, confermando l'esistenza di una diversa reattività della calpaina nei confronti dei due substrati. L'arricchimento è stato molto marcato soprattutto per la catena α , in linea con i dati di letteratura, che indicano una forte reattività dell'epicheloridrina nei confronti delle istidine della catena α^5 .

Conclusioni

Alla luce dei risultati preliminari, si ritiene che la digestione selettiva con calpaina consenta un netto arricchimento della frazione di emoglobina alchilata. L'utilizzazione dei dati finora ottenuti prevederà:

- a) la purificazione del digerito con filtri ad esclusione di massa con cut-off di 10000 Da, in modo da allontanare l'intera la frazione digerita;
- b) la verifica il comportamento della calpaina rispetto alla catena β , ripetendo gli esperimenti su campioni di emoglobina alchilata con un agente reattivo soprattutto verso la catena β , ad esempio bromuro di metile.

Bibliografia

- 1) Neumann HG Analysis of hemoglobin as a dose monitor for alkylating and arylating agent. Arch Toxicol 1984; 56: 1-6.
- 2) Landin HH, Osterman-Golkar S, Zorcec V, Törnqvist M Biomonitoring of epichlorohydrin by hemoglobin adducts. Anal Biochem 1996; 240: 1-6.
- 3) Mamone G, Malorni A, Scaloni A, Sannolo N, Basile A, Pocsfalvi G, Ferranti P Structural analysis and quantitative evaluation of the modifications produced in human hemoglobin by methyl bromide using mass spectrometry and Edman degradation. Rapid. Commun Mass Spectrom 1998; 12(22): 1783-1792.
- 4) International Agency for Resear on Cancer IARC Monographs. Monogr Eval Carcinogen Risks Hum 1999; 71Pt.2: 603-628.
- 5) Miraglia N, Pieri M, Basile A, Malorni L, Acampora A, Soleo L, Sannolo N Exposure to genotoxic agents: modified peptides as suitable biomarkers, in: Recent Res Develop Peptides. Research Signpost 2002; 1: 49-63.
- 6) Miraglia N, Basile A, Pieri M, Acampora A, Malorni L, De Giulio B, Sannolo N Ion trap mass spectrometry in the structural analysis of haemoglobin peptides modified by epichlorohydrin and diepoxybutane. Rapid Commun Mass Spectrom 2002; 16: 840-847.