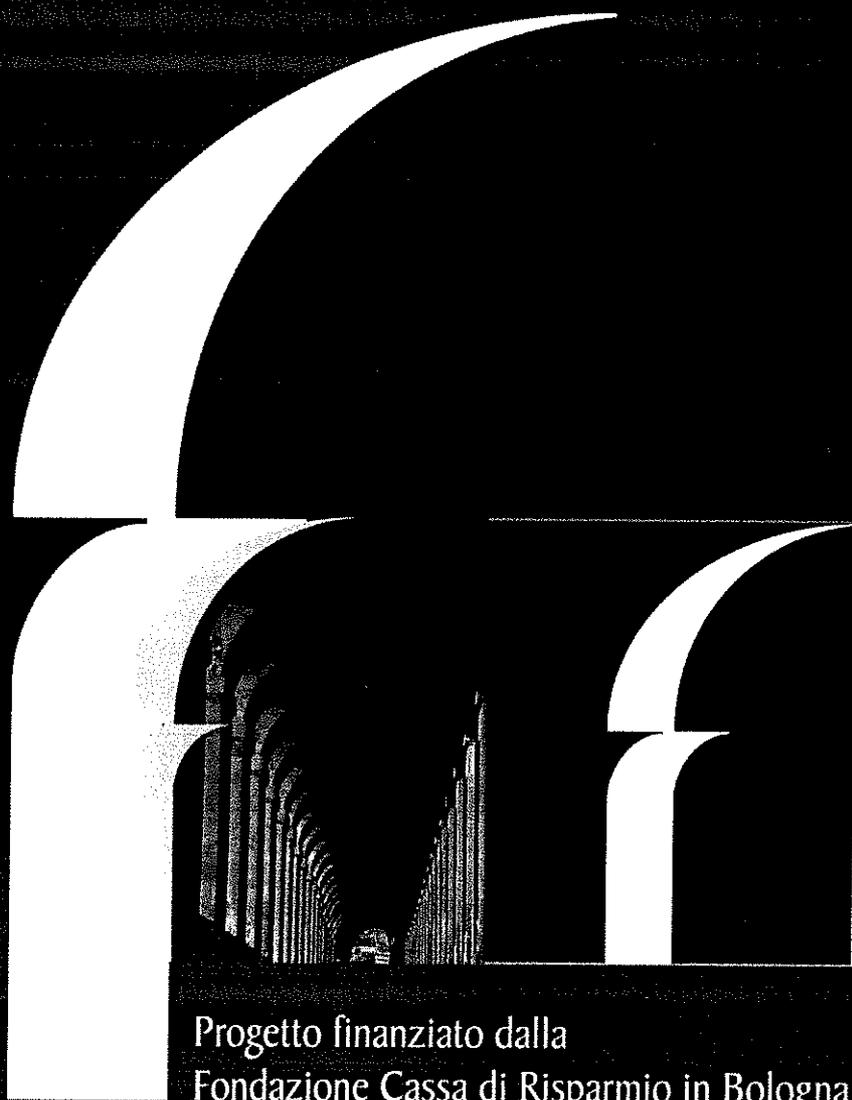


Clinica e biologia
delle gravi
insufficienze d'organo



Progetto finanziato dalla
Fondazione Cassa di Risparmio in Bologna

© 2002 by CLUEB
Cooperativa Libreria Universitaria Editrice Bologna

Fotocopie per uso personale del lettore possono essere effettuate nei limiti del 15% di ciascun volume dietro pagamento alla SIAE del compenso previsto dall'art. 68, comma 4, della legge 22 aprile 1941 n. 633 ovvero dall'accordo stipulato tra SIAE, AIE, SNS e CNA, CONFARTIGIANATO, CASA, CLAAI, CONFCOMMERCIO, CONFESERCENTI il 18 dicembre 2000.

Le riproduzioni per uso differente da quello personale potranno avvenire solo a seguito di specifica autorizzazione rilasciata dall'editore.

Clinica e biologia delle gravi insufficienze d'organo – Bologna : CLUEB, 2002
223 p. ; 27 cm.
ISBN 88-491-1938-0
CB 3198



Cooperativa Libreria Universitaria Editrice Bologna
40126 Bologna - Via Marsala 31
Tel. 051 220736 - Fax 237758
www.clueb.com

Finito di stampare nel mese di luglio 2002
da Studio Rabbi, Bologna

Indice

Presentazione	7
Prof. Roversi Monaco	
Lista referenti	9
Introduzione	11
Prof. Vittorio Bonomini	
Stato attuale della sostituzione d'organo nella Regione Emilia-Romagna	17
Dott.ssa Lorenza Ridolfi	
Insufficienza renale cronica e la sua sostituzione con metodiche artificiali (dialisi) e/o naturali (trapianto)	19
S. Stefoni et al	
Analisi di sequenza e di espressione del gene della beta-2 microglobulina in pazienti dializzati	35
P. Carinci et al	
Mortalità, morbilità e fattori di rischio di malattia cardio vascolare nel trapianto renale	45
A. Faenza et al	
Qualità di vita ed integrazione sociale delle persone sottoposte a trapianto dell'organo salvavita: fegato	61
L. Ridolfi et al	
Studio del metabolismo cerebrale pre-trapianto di fegato con la spettroscopia di risonanza magnetica	81
B. Barbiroli et al	
Impatto del trattamento antivirale sulla storia naturale della malattia e sui risultati del trapianto di fegato	101
M. Bernardi et al	
Valutazione della funzionalità epatica con il test alla Lidocaina	113
A. Mazziotti, A. Cavallari et al	
La malattia coronarica cronica del cuore trapiantato	121
A. Branzi et al	

Analisi di sequenza e di espressione del gene della beta-2 microglobulina in pazienti dializzati

S. Canaider¹⁾²⁾, G. La Manna³⁾, P. Strippoli¹⁾²⁾, D. Rondelli⁴⁾, G. Cianciolo³⁾, G. Donati³⁾, R. Casadei¹⁾, M. Arpinati⁴⁾, S. Stefoni³⁾, P. Carinci¹⁾²⁾

1) Centro di Ricerca Genetica Molecolare Fondazione Carisbo

2) Istituto di Istologia ed Embriologia Generale

3) Dipartimento di Medicina Clinica e Biotecnologia Applicata "D. Campanacci"

4) Istituto di Ematologia e Oncologia Medica "L. e A. Seràgnoli"

Università degli Studi di Bologna

La sostituzione renale artificiale (Dialisi) consente una sopravvivenza spettacolare (anche oltre 30 anni di vita): ma la qualità della vita dei pazienti senza rene non è, a distanza, altrettanto soddisfacente. Una serie complessa di complicanze si instaura, la cui natura risulta oggi meglio dimostrabile e quantizzabile. Si tratta di complicanze in parte dovute alla pre-esistente uremia; in parte dovute alla dialisi stessa. Fra queste un ruolo particolare spetta alla biocompatibilità dei materiali-dialisi; che, entro certi limiti, viene monitorizzata dal dosaggio della b2 Microglobulina nel sangue. La b2M sarebbe correlabile (o responsabile?) alla entità della amiloidosi in corso di dialisi. Trattasi anche di predisposizione genetica? Questo problema, mai in precedenza prospettato, viene analizzato e discusso nel presente ottimo studio. Viene in modo preciso dimostrato che i fattori intrinseci correlati alla sequenza nucleotidica o quella amminoacidica della b2M non sono da ritenersi causa comune di predisposizione alla amiloidosi da b2 Microglobulina. È una precisazione mai dimostrata in precedenza. (V. B.)

Introduzione

La amiloidosi da beta-2-microglobulina (B2M) è una forma di amiloidosi correlata alla emodialisi (Hemodialysis-Related Amyloidosis o HRA), e rappresenta una delle principali patologie correlate alla dialisi. Le caratteristiche cliniche della HRA comprendono la sindrome del tunnel carpale (CTS), la artropatia erosiva, la spondilartrosi, lesioni litiche dell'osso, e fratture patologiche. La HRA può essere clinicamente manifesta o silente. La diagnosi può essere fatta mediante radiografia, tomografia compu-

terizzata, risonanza magnetica, e più recentemente scintigrafia¹.

L'epoca di esordio della HRA può variare considerevolmente. Mentre questa condizione può essere diagnosticata anche a due anni di distanza dall'inizio del trattamento dialitico regolare (RDT), più del 90% dei pazienti sviluppa la HRA entro 7 anni².

Sebbene la amiloidosi da B2M sembri quasi invariabilmente associata con la dialisi cronica, nel 1990 Zingraf e coll.³ hanno descritto un paziente con insufficienza renale grave che ha sviluppato la sindrome senza essere mai stato sottoposto a dialisi.

La suscettibilità individuale dei pazienti allo sviluppo di HRA varia considerevolmente. Si pensa che l'esordio e/o la gravità della malattia possano essere influenzati da una ampia gamma di fattori correlati al paziente (età, tipo di nefropatia, funzione renale residua, etc) e di fattori dipendenti dal trattamento (dose dialitica, tecnica, biocompatibilità dei materiali etc)⁴, ma non si può escludere il coinvolgimento di una predisposizione genetica. Per migliorare la percentuale di sopravvivenza e la qualità della vita, è importante capire l'influenza di questi fattori in relazione a morbidità/comorbidità.

Il coinvolgimento della B2M nella HRA è noto sin dal 1985, quando Gejyo e coll.⁵ hanno descritto per la prima volta la identità tra la proteina depositata in un paziente con CTS e la B2M, una catena polipeptidica singola del peso molecolare di 11,600 kD. La sequenza amminoacidica della subunità della proteina della HRA fu in seguito identificata con quella della B2M⁶. Sebbene la funzione della B2M non sia conosciuta con precisione, la stretta somiglianza nella sequenza con le immunoglobuline suggerisce una comune origine evolutiva⁷. La B2M presenta relazioni strutturali con il complesso maggiore di istocompatibilità (HLA), in quanto è la componente a basso peso molecolare degli antigeni HLA. Lo studio mediante ibridi di cellule somatiche ha rivelato che il gene strutturale per questa proteina si trova sul cromosoma 15^{8,9}.

È stata suggerita la possibilità che possano esistere alcune varianti della B2M più amiloidogeniche di altre¹⁰. Diversi studi sulla dinamica di precipitazione della proteina B2M in vari tessuti hanno considerato il ruolo degli "advanced glycation end products" (prodotti proteici modificati da aggiunta di glucidi, AGEs)¹¹, ma l'ipotesi che soggetti con una alterazione genetica potrebbero essere a rischio di HRA deve ancora essere verificata. Una modificazione genetica potrebbe essere collegata alla aumentata formazione di amiloide a causa di sostituzioni amminoacidiche che modifichino la proteina, o attraverso alterazioni quantitative della espressione dell'mRNA di B2M e della relativa proteina.

Per saggiare questa ipotesi, abbiamo selezionato un gruppo di pazienti sottoposti a trattamento dialitico cronico, e abbiamo clonato e sequenziato il cDNA della B2M in 19 di loro, analizzando in dettaglio la sequenza nucleotidica nella regione corrispondente alla

porzione codificante dell'mRNA. Inoltre, allo scopo di stabilire se le cellule monocitarie, la cui presenza è stata descritta in prossimità dei depositi di amiloide con un eventuale ruolo nella patogenesi della HRA^{12,13}, possano in effetti contribuire alla formazione dei depositi, abbiamo anche confrontato le quantità di mRNA in monociti ottenuti dal sangue periferico di 7 pazienti e 7 soggetti normali. L'indagine è stata eseguita mediante reazione a catena della polimerasi dopo retrotrascrizione (RT-PCR) in modalità "Real-time", un metodo che analizza ogni ciclo di amplificazione del cDNA per una quantificazione accurata.

Per studiare se il trattamento dialitico cronico influenza la capacità delle cellule monocitarie di esprimere l'mRNA della B2M, i campioni sono stati ottenuti dai pazienti sia immediatamente prima che dopo la dialisi, allo scopo di studiare anche cellule attivate dal contatto con la membrana dialitica. Questo studio rappresenta la prima analisi effettuata sul gene della B2M in pazienti dializzati.

Metodi

Pazienti

Sono stati selezionati per il presente studio venti pazienti sottoposti a trattamento dialitico cronico nella Unità di Dialisi dell'ospedale S.Orsola-Malpighi, Università di Bologna, dopo ottenimento del consenso informato scritto. Alcune caratteristiche cliniche dei pazienti sono mostrate nella Tab. 1. Tutti i pazienti erano sopra i 60 anni di età e in buone condizioni cliniche. Inoltre, tutti avevano un valore Kt/V >1,5 (una settimana prima dello studio), assenza di epatite virale (negatività per il virus dell'epatite C e per HBsAg), accesso vascolare ben funzionante (ricircolazione <10%), storia clinica negativa per neoplasie maligne, diabete o insufficienza cardiaca (escluso un valore NIYA >2), anemia trattata con eritropoietina umana ricombinante (emoglobina tra 10,5 e 12,5 g/dL), assenza di segni radiologici di ipertiroidismo e ormone paratiroideo (PTH) inferiore a 400 pg/mL. Per quanto riguarda la modalità del trattamento dialitico cronico, tutti i pazienti hanno ricevuto trattamenti di 4 ore effettuati con QB di 300 mL/min e QD di 500 mL/min. Come anticoagulante si è somministrata

Tabella 1. Dati clinici dei pazienti

Pz. n. ^a	Sesso	Età (anni)	Tempo di dialisi (mesi)	B2M (mcg/dL)	PTH (pg/mL)	Membrana di dialisi ^b	CTS chir. ^c	CTS clin. ^d	B2M-MRI ^e
#1	M	73	21	25.00	72	CU			-
#2	M	73	9	9.75	44	CU			-
#3	F	76	6	35.17	97	CU			-
#4	F	76	12	22.2	157	CU			-
#5	F	86	7	21.7	32	CU			-
#6	F	69	11	24,1	275	CU			-
#7	M	79	19	26,1	47	CU			-
#8	M	77	18	11,78	156	PS			-
#9	M	71	8	27,16	139	PS			-
#10	F	85	11	54,01	313	PS			-
#11	F	79	20	29,7	90	PS			+
#12	M	61	9	25,1	203	PS			-
#13	M	62	21	22,6	234	PS			-
#14	M	73	59	14	89	CU			-
#15	M	77	63	36,4	191	CU		+	-
#16	F	71	80	30,6	113	CU	1	+	+
#17	F	71	55	26,8	165	PS			-
#18	F	70	216	19,9	10	PS	2	+	+
#19	F	62	122	20,7	375	PS		+	+
#20	F	79	108	43,03	124	PS	1		+
20	M9/F11	73.5±6.8	43.7±53.5	26.3±10.3	146±96.8	CU10/PS10	4	4	6

^a Numero attribuito al paziente. - ^b Membrane di dialisi: CU, Cuprophane; PS, Polysulphon. - ^c CTS chir.: numero di operazioni eseguite per la sindrome del tunnel carpale (CTS). - ^d CTS clin.: pazienti con CTS clinicamente documentata (elettromiografia). - ^e B2M-MRI: osservazione mediante risonanza magnetica di lesioni ossee riferibili ad amiloidosi da B2M.

eparina a basso peso molecolare all'inizio della dialisi. Il materiale della membrana di dialisi era il cuprophan per 10 pazienti e il polisulfone per gli altri 10. Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati valutati per la presenza di sintomi clinici della CTS e per l'effettuazione di precedenti interventi chirurgici per il trattamento della CTS. Sei dei 20 pazienti presentavano depositi ossei di amiloide da B2M come valutato mediante risonanza magnetica (MRI);

tutte queste lesioni mostravano un segnale di bassa intensità¹⁴. La diagnosi per immagini di amiloidosi da B2M è stata effettuata in base alla osservazione di aree litiche, lesioni sub-condrali, geoidi intraspongiosi e sclerosi reattiva in assenza di concentrazioni extraosseo-paraspinali, lesioni odontoidi con depositi extraossei ed extradurali di masse di tessuto molle (pseudotumori amiloidi),

sublussazione, invaginazione odontoide o compressione del midollo spinale. Il protocollo di studio era stato precedentemente approvato dal comitato etico locale. I dati relativi ai soggetti normali di controllo sono mostrati nella Tab. 2.

Separazione cellulare

I campioni di sangue periferico sono stati ottenuti da

Tabella 2. Dati dei soggetti normali

Soggetti normali	Sesso	Età	B2M (mcg/dL)	PTH (pg/mL)
N#1	F	84	0,94	38
N#2	M	75	1,02	29
N#3	F	62	0,85	47
N#4	F	77	1,04	52
N#5	M	74	0,67	47
N#6	F	79	0,95	54
N#7	M	69	0,71	42
		74,3 ± 7,1	0,9 ± 0,1	44,1 ± 8,6

20 pazienti e da 7 soggetti normali di controllo. Le cellule mononucleate del sangue periferico (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) sono state isolate mediante centrifugazione su Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svezia) a 800 g per 25 minuti, quindi lavate due volte in soluzione salina con tampone fosfato (PBS). I monociti CD14+ sono stati purificati a partire dai PBMC mediante separazione immunomagnetica, usando un anticorpo monoclonale anti-CD14 coniugato a bilie magnetiche (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germania), seguendo le istruzioni del fabbricante. In breve, i PBMC sono stati prima marcati con anticorpi anti-CD14 coniugati con microbilie, quindi i monociti CD14+ sono stati selezionati positivamente su una colonna di separazione (tipo MS/RS+, Miltenyi Biotech) posta in un campo magnetico (Mini MACSTM, Miltenyi Biotech). Dopo la purificazione, aliquote della popolazione ottenuta sono state utilizzate per saggiare la purezza dei monociti, mediante doppia colorazione con anticorpi anti-CD3 coniugato a FITC e anti-CD14 coniugato a ficoeritrina (Becton Dickinson, San Jose, California, USA). L'analisi è stata effettuata su un citometro a flusso FACSCaliburTM (Becton Dickinson), usando il programma Cell QuestTM.

Amplificazione mediante RT-PCR

Per ottenere i dati di sequenza nucleotidica necessari per il confronto delle sequenze, si è progettata la amplificazione mediante retrotrascrizione e reazione a catena della polimerasi (RT-PCR) di prodotti che comprendessero la sequenza codificante completa dell'mRNA del gene della B2M umana. L'RNA umano totale è stato estratto dalle cellule ottenute come sopra descritto mediante il metodo di Chomczynski e Sacchi¹⁵.

Tutti i campioni di RNA sono stati analizzati mediante elettroforesi standard su gel¹⁶ per saggiare la loro integrità.

Per la RT-PCR, 1 µg di RNA totale è stato retrotrascritto a 42°C per 60 minuti in un volume finale di 25 µL mediante 200 U di trascrittasi inversa del virus della leucemia murina di Moloney (Promega, Madison, WI; usata con il tampone fornito), oligo dT-15 5 µM e i 4 desossinucleotidi, ciascuno a 500 µM. I primers per la amplificazione sono stati progettati usando il programma Amplify¹⁷, seguendo i criteri stan-

dard descritti¹⁸. Le sequenze dei primers erano, in direzione 5'-3': #1-GCGGGCATTCTGAAGCTGACAGCA (senso), usato con #2-TACATCAAA-CATGGAGACAGCACTC (antisenso). La dimensione del prodotto atteso era di 586 bp, comprendente la intera sequenza codificante di B2M, e parte delle adiacenti sequenze non tradotte in 5' e 3'.

Gli esperimenti di PCR sono stati eseguiti in un volume finale di 50 µL, contenente 5 µL della miscela di retrotrascrizione, 1,25 U di Taq Polimerasi (TaKaRa, Shiga, Japan) con i relativi reagenti (0,2 mM per ciascun dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1× tampone di PCR), e 0,3 µM per ciascun primer. A un ciclo di denaturazione iniziale di 2 min a 94°C sono seguiti 40 cicli di amplificazione (30 secondi a 94°C, 30 secondi a 61°C, 30 secondi a 72°C) e un ciclo di estensione finale protratto per 7 minuti a 72°C.

Sequenziamento del cDNA

Tutti i prodotti di RT-PCR ottenuti come sopra sono stati analizzati su gel secondo metodi standard¹⁶, purificati usando il kit QIAquick (QIAGEN, Hilden, Germany), e quindi sottoposti ad analisi con sequenziamento automatico di entrambi i filamenti di DNA per ciascun frammento, usando gli stessi primers impiegati nelle rispettive reazioni di PCR. Il metodo di terminazione della catena con nucleotidi BigDye è stato usato per ottenere prodotti della reazione di sequenziamento poi analizzati su sequenziatore automatico di DNA ABI 310 (Perkin-Elmer, Foster City, California, USA). I files con i dati degli elettroforetogrammi originali sono stati analizzati con il programma Navigator (Perkin-Elmer). Inoltre, tutti gli elettroforetogrammi sono stati ispezionati visivamente per rilevare polimorfismi eventualmente presenti in eterozigosi, in entrambi i filamenti senso e antisenso.

RT-PCR "Real-time"

Per valutare quantitativamente l'espressione dell'mRNA di B2M in pazienti sottoposti a RDT, abbiamo usato la RT-PCR "Real time" a partire da cellule monocitarie di 7 pazienti i cui campioni avevano la più alta percentuale di cellule CD 14+ (pazienti nn. 4, 11, 12, 13, 14, 15, 18). I risultati sono stati paragonati con quelli ottenuti da un gruppo di controllo di

7 soggetti normali confrontabili. Si sono anche confrontati i livelli di espressione dell'mRNA di B2M prima e dopo una sessione di dialisi (valori basali e post-trattamento, rispettivamente). Questi valori sono stati anche confrontati con i livelli registrati nei soggetti normali. La RT-PCR "real time" è stata eseguita con il sistema ABI-PRISM 5700, come precedentemente descritto¹⁹. Il gene espresso costitutivamente ("housekeeping") Gliceraldeide-3-Fosfato-Deidrogenasi (GA3PDH) è stato usato come RNA di riferimento. I kit "GAPDH Control Reagents" e "PCR Master Mix" (Perkin-Elmer, Foster City, CA) sono stati usati seguendo le istruzioni del fabbricante. I risultati sono stati normalizzati usando l'mRNA del gene GA3PDH come riferimento.

Risultati

Separazione cellulare

Le cellule CD14⁺, arricchite mediante selezione con bilie immunomagnetiche, sono state ottenute da tutti i pazienti studiati. Il recupero effettivo è stato misurato mediante analisi citofluorimetrica. Nei campioni nei quali è stato misurato il livello di espressione dell'mRNA di B2M mediante RT-PCR "Real-time", la percentuale dei monociti (cellule CD14⁺ CD3⁻) dopo la separazione era di $79 \pm 13\%$ (media \pm deviazione standard).

Amplificazione RT-PCR

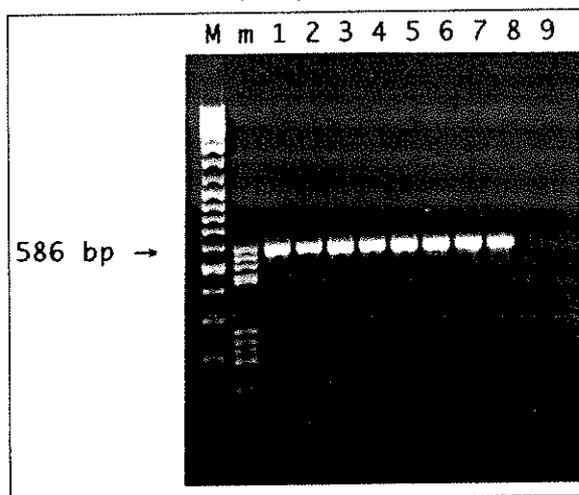
I prodotti dell'amplificazione RT-PCR, comprendenti la sequenza codificante completa dell'mRNA di B2M, sono stati ottenuti con successo da 19 dei 20 pazienti. In tutti i casi, l'analisi mediante elettroforesi su gel ha rivelato la presenza di bande singole delle dimensioni attese (Fig. 1). Questo risultato implica che nessuna alterazione grossolana nella struttura e nella capacità di espressione dei geni per B2M era presente in tutti i 19 pazienti studiati.

Sequenziamento del cDNA

La sequenza nucleotidica del cDNA della regione codificante di B2M è stata accuratamente studiata

Figura 1. Risultati della RT-PCR.

Esempi rappresentativi della espressione dell'mRNA del gene di B2M. I prodotti di cDNA sono stati ottenuti mediante RT-PCR da campioni di RNA di cellule mononucleate del sangue periferico e separati su gel di agarosio all'1,5% colorato con bromuro di etidio. Corsie 1-8: pazienti dal n. 1 al n. 8, rispettivamente; corsia 9: controllo negativo della reazione di amplificazione (acqua). Corsie M e m, standard di riferimento per le dimensioni del DNA a doppio filamento: GeneRuler (Genenco), 1 μ L e MBI 5 - pBR322 DNA/BsuRI (Genenco), 1 μ L, rispettivamente.



mediante sequenziamento automatico nei 19 pazienti dai quali sono stati ottenuti prodotti di amplificazione di RT-PCR.

Il protocollo impiegato ha fornito files di dati degli elettroforetogrammi di alta qualità per ciascuno dei pazienti, sia per il filamento senso del cDNA sia per quello antisense (Fig. 2).

La sequenza di riferimento era la sequenza GenBank #AB021288, contenente l'unica sequenza normale descritta per l'mRNA della B2M umana. L'analisi degli elettroforetogrammi, condotta sia con metodo semi-automatico mediante il programma Navigator, sia mediante ispezione visiva, ha permesso di escludere la presenza di qualsiasi cambiamento nucleotidico, sia in omozigosi sia in eterozigosi, nelle sequenze codificanti dell'mRNA della B2M in tutti i 19 pazienti studiati.

RT-PCR "Real-time"

In 7 dei 20 pazienti sottoposti a RDT e in 7 soggetti in salute, l'espressione dell'mRNA per B2M è stata quantificata mediante RT-PCR "Real-time" nei mo-

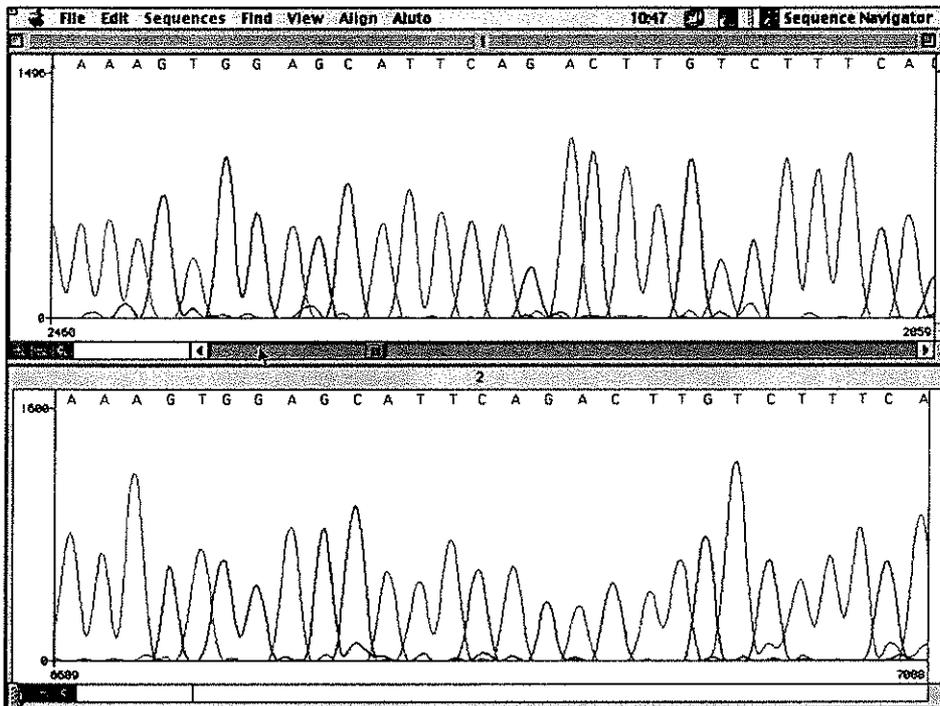


Figura 2. Analisi di sequenza.

Elettroforetogramma rappresentativo della sequenza di una regione del cDNA di B2M del paziente n. 1. Il gruppo di picchi superiore e inferiore, ottenuti rispettivamente del filamento senso e antisense, corrispondono entrambi alle posizioni da 365 a 392 della sequenza Genbank #AB021288. L'analisi parallela dei due filamenti è stata effettuata mediante il programma Navigator.

nociti del sangue periferico prelevato immediatamente prima e dopo una sessione di trattamento. I risultati sono mostrati nella Fig. 3.

Il gene della B2M era espresso in tutti i campioni saggiati. Livelli di espressione ampiamente variabili sono stati osservati sia tra i pazienti sia all'interno del gruppo di controllo. L'analisi della varianza e il t-test per misure ripetute non hanno permesso di rilevare differenze significative sia tra i campioni pre- e post-dialisi, sia tra i campioni dei pazienti e quelli dei soggetti sani.

Discussione

La HRA è una delle più comuni complicanze insorgenti nei pazienti sottoposti a trattamento dialitico cronico. Studi eseguiti negli ultimi anni per identificare i possibili meccanismi della formazione di amiloide hanno postulato una alterazione nella elaborazione della proteina B2M, con conseguente deposizione anomala della proteina nei tessuti connettivi.

Gli AGEs, proteine modificate da un legame alte-

rato di glucidi, si accumulano nella insufficienza renale in seguito alla diminuita escrezione e alla aumentata generazione causata dallo stress ossidativo e carbonilico dell'uremia. La B2M modificata dagli zuccheri è considerata uno dei principali componenti patogenetici della amiloidosi correlata alla dialisi. Gli AGEs si formano quando un carbonile di uno zucchero riducente si condensa con un amino gruppo reattivo nella proteina bersaglio (per una rassegna, si veda il riferimento 11). Le azioni specifiche di mediatori infiammatori, rilasciati dai fibroblasti sinoviali sulla cartilagine articolare in seguito alla azione inducente da parte della B2M, possono ulteriormente contribuire alla deposizione di fibrille di B2M²⁰.

Sebbene l'mRNA della B2M e il suo gene siano ben conosciuti sin dal 1985, nessuno studio sinora ha saggiato l'ipotesi che una alterazione genetica possa eventualmente essere associata con un aumentato rischio di HRA. Una modificazione genetica potrebbe essere legata alla aumentata formazione di amiloide in differenti modi. Ad esempio, sostituzioni amminoacidiche nella proteina B2M potrebbero generare

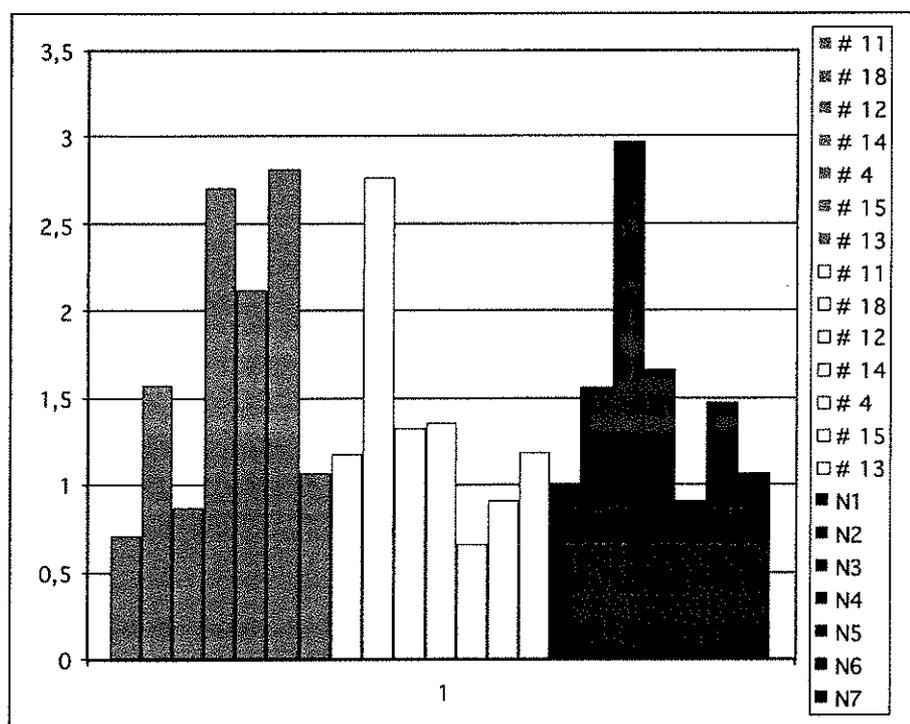


Figura 3. RT-PCR "Real time".

Istogramma che rappresenta la media, derivata da due esperimenti in duplicato, del livello di espressione dell'mRNA di B2M - normalizzato rispetto al livello dell'mRNA di GA3PDH - in monociti ottenuti dal sangue periferico di pazienti sottoposti a RDT (prima e dopo la dialisi) e soggetti in salute.

I risultati sono espressi come incremento relativo della quantità di mRNA di B2M rispetto al soggetto normale N1. Le barre si riferiscono ai risultati ottenuti dai campioni prelevati in pre-dialisi (in grigio), in post-dialisi (in bianco) e da soggetti normali (in grigio scuro).

una isoforma polipeptidica con maggiore tendenza alla precipitazione, intrinseca oppure mediata da una modificazione della modalità di glicosilazione, in quanto un cambiamento di residui amminoacidici critici per la glicosilazione potrebbe modificare le proprietà biochimiche della B2M. Una alterazione genetica che causi alterazioni nella regolazione della espressione del gene potrebbe anche portare a una anomala elaborazione della B2M.

A nostra conoscenza, il presente studio è il primo ad analizzare il gene B2M nei pazienti con HRA. In una prima fase sono stati selezionati 19 pazienti con HRA con differenti gradi di gravità clinica, e in ciascun caso è stata clonata mediante RT-PCR la regione del cDNA per B2M comprendente la sequenza codificante completa per la proteina B2M, a partire da RNA estratto da cellule mononucleate isolate da un campione di sangue periferico di ciascun paziente. Il sequenziamento automatico accurato di tale regione ha permesso una dettagliata analisi della sequenza nucleotidica. I risultati consentono di escludere la presenza di qualsiasi alterazione nella sequenza dell'mRNA che possa avere come conseguenza la

sintesi di una proteina B2M anomala, in tutti i pazienti studiati.

Dal momento che la B2M è associata con gli antigeni HLA di classe II altamente polimorfici, sembra necessaria per il corretto funzionamento del sistema HLA. Nel contesto della alta frequenza di polimorfismi del singolo nucleotide descritta nel genoma umano²¹, la sequenza codificante di B2M appare particolarmente stabile. A tutt'oggi non è stato descritto nessun polimorfismo del gene B2M nella popolazione umana normale. I soli tre tipi di mutazione riportati si sono verificati in cellule neoplastiche, con un possibile ruolo nel causare la alterazione della risposta immune diretta contro le cellule stesse²²⁻²⁴. I nostri dati confermano l'alto livello di conservazione della sequenza codificante per il gene B2M all'interno del genoma umano, che può essere necessaria per la funzione della proteina. Inoltre, gli stessi dati permettono di escludere l'ipotesi che una alterata sequenza amminoacidica sia un fattore predisponente comune per la amiloidosi da B2M, e per la HRA in particolare.

Il secondo aspetto indagato nella presente ricerca

- *109700), 12th ed., Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1998.
11. Raj DS, Choudhury D, Welbourne TC, Levi M: Advanced glycation end products: a Nephrologist's perspective. *Am J Kidney Dis* 35(3):365-80, 2000.
 12. Argiles A, *et al*: Cells surrounding haemodialysis-associated amyloid deposits are mainly macrophages. *Nephrol Dial Transplant* 9(6):662-667, 1994.
 13. Garbar C, Jadoul M, Noël H, De Strhou Charles van Ypersele: Histological characteristics of sternoclavicular 2-microglobulin amyloidosis and clues for its histogenesis. *Kidney International* Vol. 55 : 1990-1993, 1999.
 14. Hayes C, Jensen M, Conway W: Non-neoplastic lesions of vertebral bodies. Findings in MRI. *Radiographics* 1989; 838-903, 1989.
 15. Chomczynski, P, and Sacchi, N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
 16. Davis, LG, Kuehl, WM, and Battey JF : *Basic methods in molecular Biology*, 2nd ed., edited by Appleton & Lange, Norwalk, 1994.
 17. Engels, WR: Contributing software to the internet: the Amplify program. *Trends Biochem Sci* 18: 448-450, 1993.
 18. Sharrocks, AD: The design of primer for PCR. In: Griffin HG, Griffin AM *PCR Technology - Current Innovations*, Chapter 2, CRC Press, Boca Raton, 1994.
 19. Gibson UE, Heid CA, Williams PM: A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6(10):995-1001, 1996.
 20. Moe SM, Chen NX: The role of the synovium and cartilage in the pathogenesis of beta(2)-microglobulin amyloidosis. *Semin Dial* 14(2):127-30, 2001.
 21. Stoneking, M: Single nucleotide polymorphism: From the evolutionary past... *Nature* 409: 821-822, 2001.
 22. Rosa, F, *et al* : The B2M mRNA in human Daudi cells has a mutated initiation codon but is still inducible by interferon. *EMBO J* 2: 239-243, 1983.
 23. Wang Z, *et al*: Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in beta 2-microglobulin messenger RNA. *J Clin Invest* 91(2):684-92, 1993.
 24. Bicknell, DC; Rowan, A; Bodmer, WF: B2M gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc Nat Acad Sci* 91: 4751-4755, 1994.
 25. Song J, *et al*: Independent Repression of a GC-rich Housekeeping Gene by Sp1 and MAZ involves the same cis-elements. *J Biol Chem* 276(23):19897-904, 2001.
 26. Garcia-Garcia M, Argiles , *et al*: Impaired lysosomal processing of beta2-microglobulin by infiltrating macrophages in dialysis amyloidosis. *Kidney Int* 55(3):899-906, 1999.

Riassunto

Analisi di sequenza e di espressione del gene della beta-2 microglobulina in pazienti dializzati

Basi razionali. Sebbene la amiloidosi da β -2-microglobulina (B2M) sia una delle principali patologie correlate alla dialisi (*Hemodialysis-Related Amyloidosis*, o HRA), il gene della B2M non è stato sin qui studiato nei pazienti in dialisi. Per verificare l'ipotesi che la suscettibilità individuale di singoli pazienti alla HRA possa essere legata ad alterazioni del gene della B2M, abbiamo clonato il cDNA per la B2M di 19 pazienti sottoposti a trattamento dialitico cronico (RDT), e abbiamo eseguito uno studio dettagliato della sequenza codificante del gene. Inoltre, allo scopo di studiare se le cellule monocitarie, spesso abbondanti in prossimità dei depositi amiloidi, possano contribuire alla formazione dei depositi di sostanza amiloide, abbiamo confrontato le quantità di mRNA di B2M presenti nei monociti del sangue periferico di 7 pazienti sottoposti a RDT (ottenuti sia subito prima sia subito dopo la dialisi, per saggiare l'effetto della attivazione cellulare dovuta al contatto con la membrana di dialisi), e di 7 soggetti normali.

Metodi. Separazione cellulare, amplificazione dell'mRNA mediante retrotrascrizione e reazione a catena della polimerasi (RT-PCR), sequenziamento del cDNA, RT-PCR quantitativa in modalità "Real-time".

Risultati. Il sequenziamento del cDNA ha escluso la presenza di qualsiasi variazione della sequenza nucleotidica, sia in omozigosi sia in eterozigosi, nella regione codificante dell'mRNA di B2M, in tutti i 19 pazienti studiati. L'analisi statistica dei risultati della RT-PCR "Real time" non ha evidenziato differenze significative sia tra i campioni pre- e quelli post-dialisi, né tra i campioni dei pazienti e quelli dei soggetti in salute.

Conclusioni. Questi dati indicano che la predisposizione alla HRA non dipende da fattori correlabili alla sequenza del gene B2M. Inoltre, variazioni funzionali nella espressione dell'mRNA di B2M nei monociti sembrano esistere indipendentemente dalla emodialisi.

Summary

Sequence and expression analysis of the β -2-microglobulin gene in dialysis patients

Background. Although β -2-microglobulin (B2M) amyloidosis is one of the main dialysis-related pathologies (*Hemodialysis-Related Amyloidosis*, HRA), the B2M gene has not hitherto been studied in dialysis patients. To test the hypothesis that individual patient sensitivity to HRA might be linked to modification of the B2M gene, we cloned the B2M cDNA of 19 selected regular dialysis treatment (RDT) patients, and performed a detailed investigation of the gene nucleotide sequence in the open reading frame. Moreover, to investigate whether monocytic cells, which are usually abundant in proximity of amyloid deposits, may contribute to deposit formation, we compared the amounts of B2M mRNA in peripheral blood monocytes of 7 RDT patients (taken immediately before and after dialysis, to test also cells activated by dialysis membrane contact) and 7 normal subjects.

Methods. Cell separation, RT-PCR Amplification, cDNA Sequencing and quantitative "Real-time" RT-PCR.

Results. Sequencing of cDNA excluded the presence of any homozygotic/heterozygotic nucleotidic change in any of the B2M mRNA coding sequences of any of the 19 patients. Statistical analysis for repeated measurements of "Real-time" RT-PCR results revealed no significant differences either between pre- and post-dialysis samples, or between the samples of patients and healthy subjects.

Conclusions. These data indicate that predisposition to HRA does not depend on factors related to the B2M gene sequence. Furthermore, functional variations in B2M mRNA expression in monocytes seem to exist independently of hemodialysis.