

Una osservazione elettroforetica poco frequente: lo sdoppiamento della transferrina

R. Cesati¹, S. Pastori²

¹ Laboratorio Analisi . Az. Ospedaliera "Ospedale Civile" di Vimercate, P.O. Carate Brianza

² Laboratorio Analisi chimico-cliniche e microbiologiche
Az. Ospedaliera "Ospedale Civile" di Vimercate, P.O. Vimercate

Riassunto. Come per tutte le sieroproteine esistono varianti genetiche della transferrina dotate di scarsa rilevanza clinica. Il medico di laboratorio può riscontrarle nella presenza di una banda accessoria nella regione beta del tracciato elettroforetico. Tale banda accessoria è visibile con tutti i sistemi elettroforetici usati nella routine di un laboratorio di analisi chimico cliniche. Nelle conclusioni si sottolinea la necessità della conoscenza del fenomeno e se ne riporta la prevalenza nel nostro ambito territoriale.

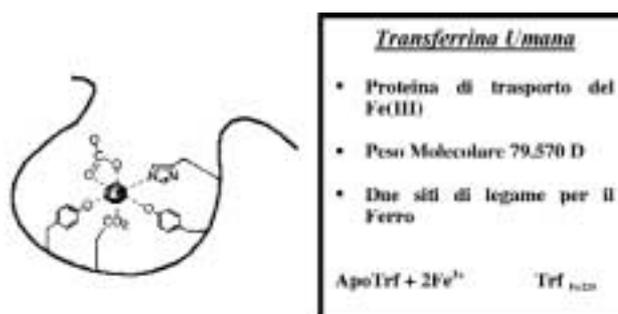
Introduzione

La transferrina è una b-globulina che ha la funzione di trasportare il ferro nel plasma. La sua localizzazione nella frazione delle b-globuline risale al 1933. La sua identificazione mediante elettroforesi al 1941, e la sua funzione fisiologica fu scoperta da studi indipendenti di Hulmberg e Laurell (1945) e di Shade e Caroline (1946). Nel 1957 vengono scoperte le prime varianti genetiche nella struttura di questa molecola (1).

La transferrina è una glicoproteina di peso molecolare di 79.570 Daltons, composta di una singola catena polipeptidica di 679 aminoacidi (2) che si sviluppa in due compatte regioni strutturali, o domini, ognuno dei quali accoglie in un sito specifico di legame un atomo di ferro ferrico (Fe^{+++}) (3); recenti analisi ai raggi X di un singolo cristallo di transferrina hanno rivelato che i siti di legame per il ferro sono costituiti da due gruppi fenolici (tirosina), uno azotato (istidina), ed un ossigeno carbossilato (aspartato) con carbonato (Figura 1) (4). Gli atomi di ferro si legano alla transferrina mediante un legame di tipo ionico, che è strettamente dipendente dal pH (1, 4).

La transferrina ha il compito di trasportare il ferro dall'intestino al sistema Reticolo-Endoteliale e dagli epatociti a tutte le cellule proliferanti dell'organismo. Il passaggio del ferro nelle cellule avviene mediante endocitosi, attivata mediante un legame con un recettore. Dopo la dissociazione del ferro nelle cellule, la transferrina ed il suo recettore ritornano, non degradati, rispettivamente nell'ambiente extra-

Figura 1. Sito di legame per il ferro della transferrina.



cellulare ed alla membrana cellulare. L'elettroforesi di routine, eseguita secondo i criteri SIBioC (5, 6), deve essere in grado di separare la regione beta in 2 bande ben distinte (beta1 più anodica beta2 più catodica). L'immunosottrazione ha chiaramente identificato che la banda beta1 è composta quasi esclusivamente dalla transferrina come singola frazione proteica, mentre la banda beta2 è composta dalla frazione C3 del complemento (7, 8).

L'ispezione visiva della banda beta1 può mostrare aumenti o diminuzioni di intensità che sono correlate alla concentrazione aumentata o diminuita della transferrina sierica. Viceversa l'elettroforesi non è in grado di visualizzare alcuna anomalia nel caso di presenza di "transferrina povera in carboidrati"; quest'ultima è una anomalia reversibile acquisita della transferrina, associata clinicamente alla assunzione recente di alcool e viene studiata mediante isoelettrofocusing e/o cromatografia.

L'ispezione visiva attenta è invece in grado di evidenziare la comparsa di bande accessorie attigue alle bande beta1 e beta2 che devono essere interpretate. La banda accessoria infatti può essere espressione di una componente monoclonale, di una proteina, normalmente poco visibile, aumentata in concentrazione (ad esempio l'emopessina o la beta lipoproteina), oppure di una variante genetica della frazione C3 del complemento o ancora di una variante genetica eterozigote (un gene normale/un gene modificato) della transferrina. In questo ultimo caso la banda accessoria (anodica o catodica rispetto alla banda beta1 normale) rappresenta una transferrina geneticamente modificata nella sequenza aminoacidica e nella carica superficiale.

Le osservazioni elettroforetiche di sdoppiamento della banda beta1 (transferrina) risalgono agli anni 1960. In tutte queste varianti genetiche non si sono evidenziate modificazioni importanti della affinità della molecola per il ferro né altre manifestazioni cliniche associate. (1, 3, 4, 5, 9). Una rassegna della letteratura mondiale è stata pubblicata nel 1988 (10). Scopo del nostro lavoro è quello di presentare i casi osservati di sdoppiamento della banda beta1 associato alla presenza di una eterozigosi della transferrina e di verificare il fenomeno mediante diversi sistemi per l'elettroforesi automatica di routine.

Materiali e Metodi

In circa dieci anni, eseguendo elettroforesi di routine, abbiamo identificato 27 portatori di varianti genetiche di transferrina. I sieri sono stati refrigerati a -20°C ed archiviati. I soggetti sono stati identificati mediante l'attenta ispezione visiva del tracciato che mostrava una "doppia banda" di transferrina, ripartita 50 a 50 come spesso si osserva nei casi della letteratura. Nei casi possibili sono stati eseguiti esami complementari quali emocromo, sideremia, capacità ferroleghante, bilirubina. Veniva esclusa la presenza di componenti monoclonali eseguendo un'immunofissazione. Dai 27 casi a nostra disposizione abbiamo selezionato il siero di 7 soggetti scegliendo varianti diverse e scartando i sieri troppo vecchi che mostravano presenza di flocculati proteici malgrado la refrigerazione, e li abbiamo testati su tutti i sistemi elettroforetici a nostra disposizione.

I sistemi elettroforetici, utilizzati secondo i criteri delle ditte produttrici, sono stati:

- CTE 150, Jokoo, Chemetron, Milano, con strisce in acetato misto, tampone barbiturato a pH 8,6, corsa 22 min. corrente 0,5 mA/cm, colorante rosso Ponceau S e decolorazione con acido acetico.
- Cliniphore 2001, Ampliclinical, Milano, con strisce in acetato supportato, tampone barbiturato a pH 9,1, corsa elettroforetica di 22 min. corrente 0,5 mA/cm, colorante Blue Lisander e decolorazione con acido citrico.

- Cosmofed 3200, Ciampolini, Firenze, con strisce in acetato misto, tampone barbiturato a pH 8,6, corsa 23 min. corrente 0,7 mA/cm, colorante rosso Ponceau S e decolorazione con acido acetico.
- Paragon HRE, elettroforesi ad alta risoluzione in agarosio 1%, tampone barbiturato a pH 8,6, corsa elettroforetica di 55 min. a voltaggio costante di 200V, colorante violetto acido e decolorazione con acido acetico.
- Hydrasis, Sebia Italia, Firenze, con strisce in agarosio, tampone barbiturato a pH 8,8, applicazione per infissione, utilizzando le normali procedure operative della elettroforesi di routine e della elettroforesi ad alta risoluzione.
- CZE Beckmann, Milano, secondo i normali criteri operativi della elettroforesi capillare.

L'ispezione visiva del tracciato è stata eseguita da due operatori esperti.

Risultati

I casi identificati di varianti genetiche di transferrina sono stati 27 in circa 10 anni, con la stima di un tasso di incidenza (nuovi casi /anno) di circa 0,3%. 15 casi hanno mostrato una variante più veloce rispetto alla transferrina normale, 12 casi una variante più lenta. In 19 casi la provenienza geografica risultava eterogenea (6 africani, 10 dal Centro-sud Italia, 2 dalla Lombardia, 1 dal Veneto), in tre casi è stata eseguita una indagine familiare (4 casi del sud Italia appartengono alla stessa famiglia). Tutti i 19 soggetti studiati non mostravano anomalie negli esami complementari eseguiti. In un caso vi è associazione con una doppia banda di albumina (alloalbumina fast di tipo Reading Tagliacozzo). Un caso è stato clinicamente associato a Sclerosi Multipla in un familiare di 1° grado senza doppia transferrina. I sistemi elettroforetici utilizzati a confronto hanno dimostrato una discreta validità. In particolare:

- I sistemi elettroforetici con strisce in acetato hanno mostrato buoni risultati risolutivi utilizzando i parametri consigliati dalle ditte produttrici. Nel caso dello strumento COSMOFED 3200 è stata eseguita una modifica di sistema diluendo il tampone ed allungando i tempi di migrazione. Tali modifiche hanno consentito un miglioramento del sistema in uso e sono state applicate anche alla attività di routine.
- Il sistema "Capillare" in tutti i campioni testati ha dimostrato la presenza di una doppia banda o comunque di un allargamento della banda di significativa entità rispetto al tracciato normale.
- I sistemi con agarosio impiegati secondo l'operatività della routine dimostrano qualche difficoltà interpretativa da riferirsi alla presenza della banda accessoria della beta-lipoproteina ed alla ridotta lunghezza della corsa elettroforetica.
- I sistemi con agarosio ad alta risoluzione hanno mostrato risultati sovrapponibili a quelli su acetato.

Conclusioni e commenti

Come già sottolineato da autorevoli studiosi, il tracciato elettroforetico di routine assume un significato nella medicina di laboratorio solo se correttamente interpretato. La segnalazione di una "banda anomala" ed il sospetto di una componente monoclonale, richiedono una conferma mediante immunofissazione. La mancata visualizzazione di una immunoglobulina corrispondente comporta una non risoluzione del quesito diagnostico. A nostro parere il medico di laboratorio dovrebbe avere quella conoscenza che gli consente comunque di interpretare tutte le possibili anomalie riscontrabili mediante una elettroforesi di routine. La presenza di una variante genetica eterozigote della transferrina è una di queste (non si trova quello che non si conosce).

La mancata modificazione del legame con il ferro e quindi la scarsa rilevanza clinica di questa anomalia genetica, ha comportato uno scarso interesse e una scarsa conoscenza di questo fenomeno. Un analogo destino è attribuito alle varianti genetiche dell'albumina, che tuttavia hanno un maggior numero di segnalazioni bibliografiche ed una classificazione internazionale delle varianti in base agli aminoacidi coinvolti facilmente consultabile in un sito internet (www.albumin.org). La transferrina inoltre non si presta facilmente allo studio delle sue varianti per l'elevata e variabile glicazione che comporta la difficoltà nell'ottenere frammenti "standard" fin dalle prime proteolisi con la conseguente difficoltà di riconoscere il frammento ove è presente la variazione aminoacidica.

Il nostro contributo vuole genericamente riportare conoscenza su di un fenomeno che è visibile su tutte le tecniche elettroforetiche utilizzate correntemente, e quindi riscontrabile in tutte le strutture di laboratorio. Per ultimo il dato di incidenza che abbiamo rilevato nella nostra popolazione è l'unico pubblicato nella letteratura italiana.

Bibliografia

1. Evans RW, Williams J, Moreton K. A variant of human transferrin with abnormal properties. *Biochem J* 1982; 201: 19-26.
2. Mac Gillivray RTA, Mendez E, Sinha SK, Sutton MR, Lineback-Zins J and Brew K. The complete amino acid sequence of human serum transferrin. *Proc Nat Acad Sci* 1982; 79: 2504-8.
3. Dayhoff MO. Atlas of protein sequence and structure. Transferrin. Vol 5, Washington: National Biomedical Research Foundation; 1972. Pp D310 and D317.
4. Ohkanda J, Katoh A. The influence of chirality of synthetic iron chelators bearing N-Hydroxy-2(1H)-pyrazones and amino acid residues upon iron removal from human transferrin. *J Org Chem* 1995; 60: 1583.
5. Aguzzi F, Fenili D, Montalbetti N Petrini C, Salvatore F, Tarantino M. L'elettroforesi delle sieroproteine 1°: raccomandazione provvisoria SIBioC. *Biochim Clin* 1985; 9: 1127-32.
6. Aguzzi F, Fenili D, Montalbetti N Petrini C, Salvatore F, Tarantino M. L'elettroforesi delle sieroproteine 2°: raccomandazione provvisoria SIBioC. *Biochim Clin* 1985; 9: 1133-4.
7. Aguzzi F, Poggi N. Immunosubtraction electrophoresis: a simple method for identifying specific proteins producing the cellulose acetate electrophoretogram. *Boll Ist Sieroter Milanese* 1977; 57: 212.
8. Merlini G, Pavesi F, Carini A, Zorzoli I, Valentini O, Aguzzi F. Identification of specific plasma proteins determining the agarose gel electrophoresis by the immunosubtraction technique. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 841.
9. Giari A, Weidinger J, Domenici R, Barbagna M. Transferrin variant in Tuscany (Italy): evidence for two "new" Tf alleles. *Hum Genet*, 1985; 69: 284-6.
10. Roychoudury A, Nei M. Human polymorphic genes: World Distribution. New York: Oxford University Press; 1988.