



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO EMILIA
Dipartimento di Scienze Biomediche
Sezione di Chimica Biologica

**Modello matematico per la
quantificazione del contenuto
complessivo di miscele di
dinofisistossine mediante il
metodo del saggio di inibizione
della PP2A**

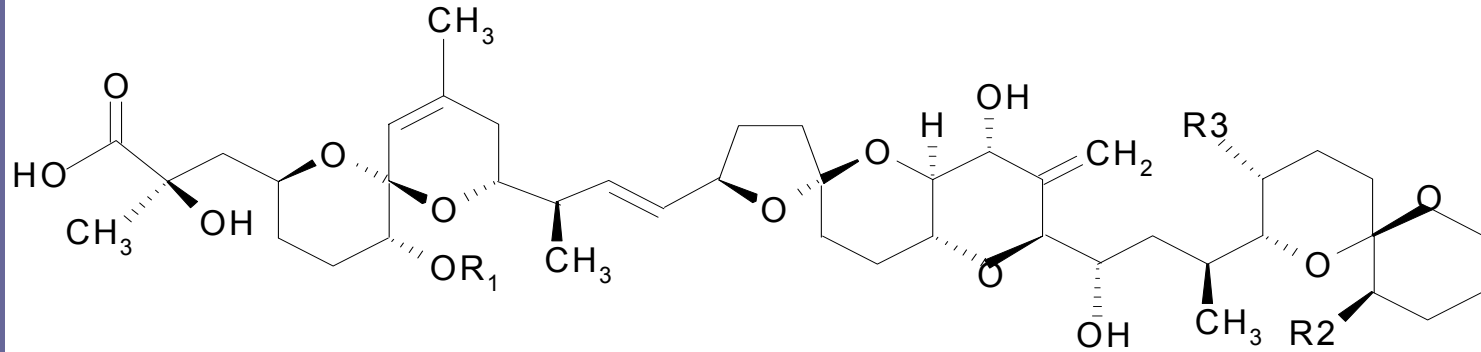
Alghe e Tossine associate

- In mare sono presenti alghe unicellulari capaci di produrre molecole ad attività tossica definite ficotossine.
- Tali alghe tossiche rappresentano il cibo per molti organismi che si nutrono filtrando l'acqua marina, come molluschi, crostacei ma anche pesci.
- Sia i molluschi lamellibranchi che i pesci contaminati possono, a loro volta, essere ingeriti dall'uomo e quindi si possono verificare episodi di intossicazione potenzialmente letali

Dinofisistossine

- Le tossine di questo gruppo sono responsabili della intossicazione a sintomatologia diarroica che ha un'ampia distribuzione nel mondo (DSP : Diarrhetic Shellfish Poisoning)
- Fino agli anni 80, le aree dove sono state registrate intossicazioni da tossine DTX erano circoscritte all'Oceano Atlantico, al mare del Nord, alle coste degli Stati Uniti (dell'Atlantico e del Pacifico), del Cile, del Sud Africa, della Thailandia e del Giappone
- Nel Mediterraneo, i primi casi di contaminazione sono stati rilevati in Francia nel 1987, mentre nei mari italiani, il primo episodio noto di intossicazione si è verificato in Adriatico nel giugno 1989

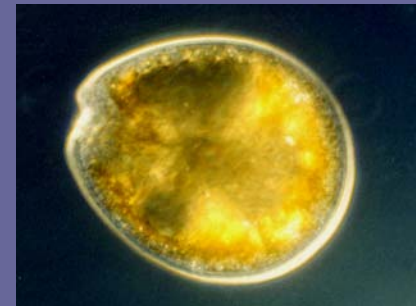
Dinofisistossine



	R1	R2	R3
okadaic acid (OA)	H	H	CH ₃
dinophysistoxin-1 (DTX1)	H	CH ₃	CH ₃
dinophysistoxin-2 (DTX2)	H	CH ₃	H
dinophysistoxin-3 (DTX3)	acyl	CH ₃	CH ₃



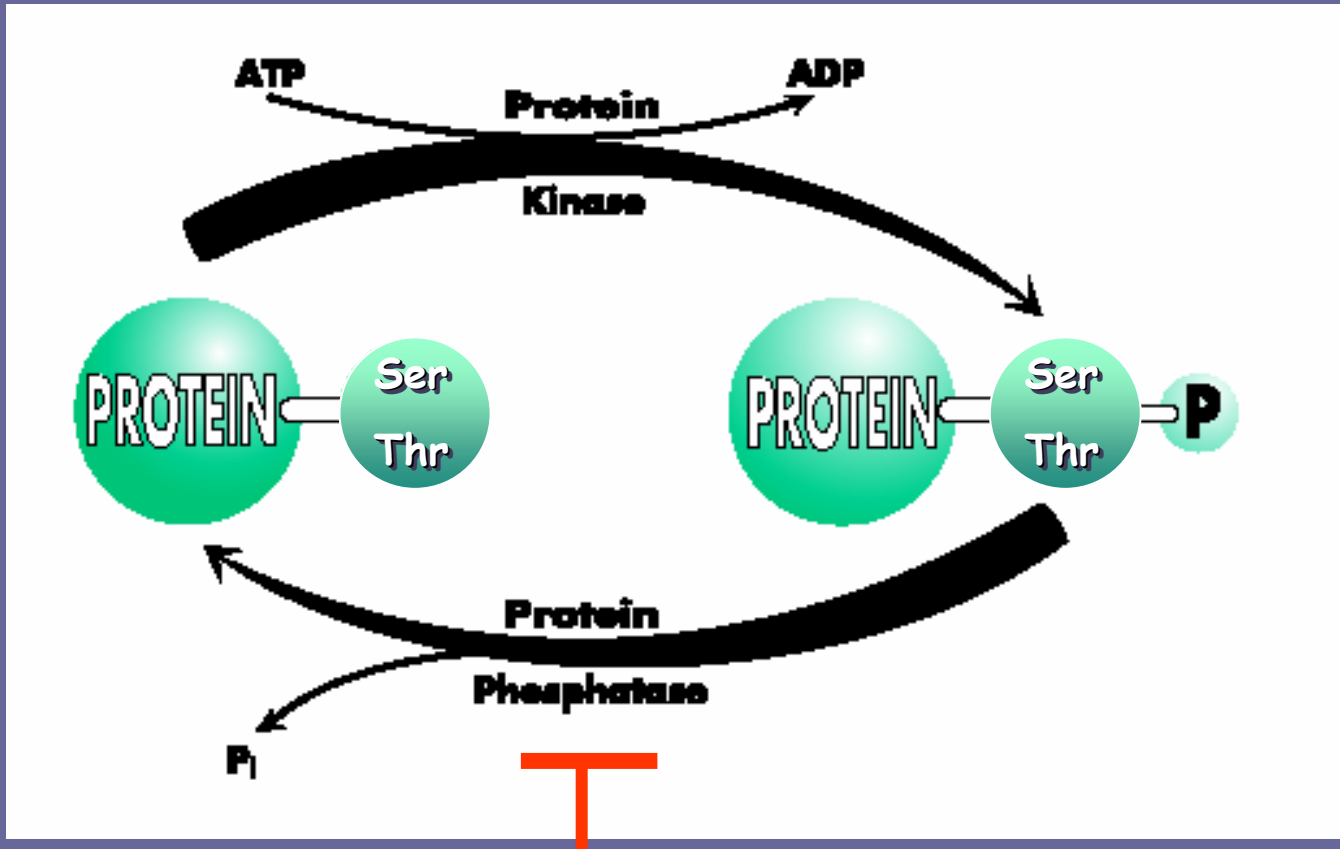
Dinophysis



Prorocentrum Lima

Meccanismo d'azione

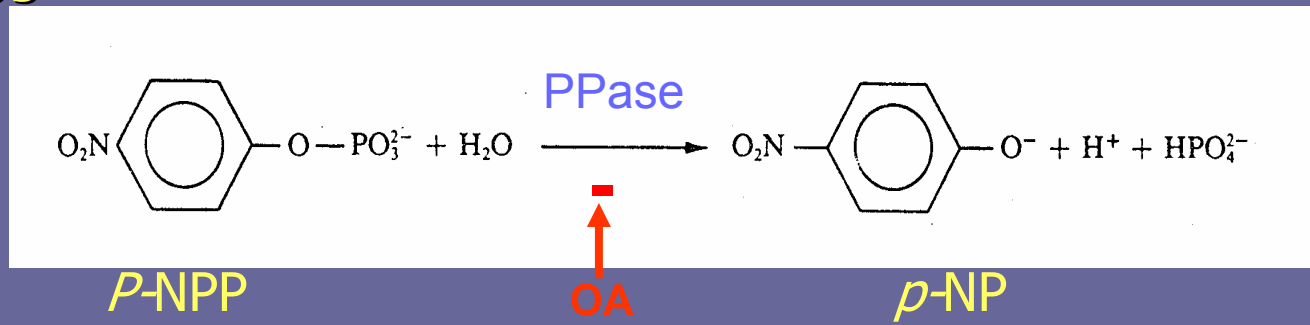
DTX → inibitori delle fosfoproteine fosfatasi (PPasi) ser/thr



**Acido Okadaico,
Composti correlati**

Saggio di inibizione della PP2A

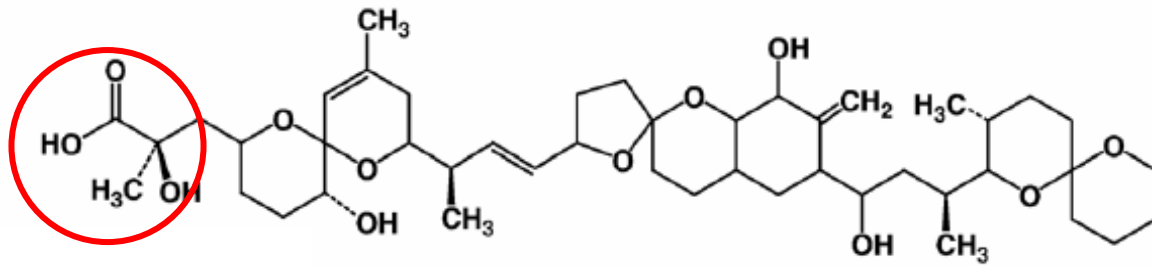
- Nel 1991 è stato sviluppato un primo saggio per le DTXs. In questa versione la presenza delle tossine era valutata dalla loro capacità di impedire il rilascio di fosfato radioattivo da proteine marcate con ^{32}P , mediante l'inibizione della fosfoprotein fosfatasi 2A
- Nel 1994 è stato proposto un saggio d'inibizione delle fosfatasi colorimetrico in cui si usava una preparazione semi-purificata delle protein fosfatasi, ottenuta dal muscolo di coniglio e contenente sia la PP1 che la PP2A
- Oggi



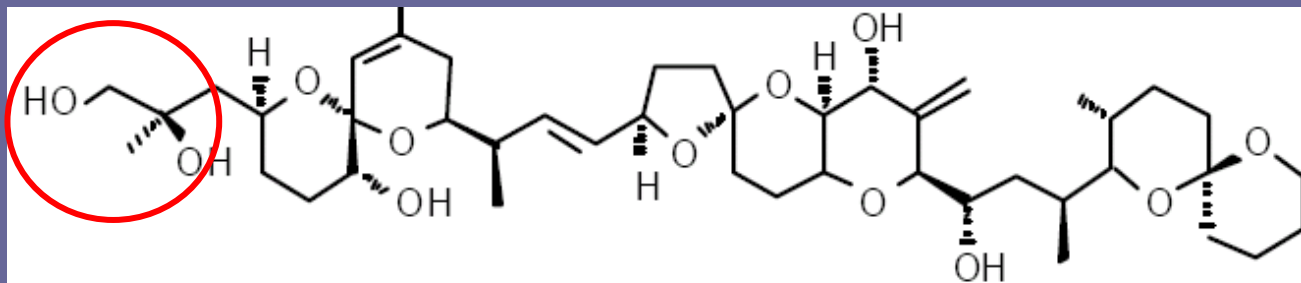
- Naturalmente, le contaminazioni sono miscele
- La normativa richiede che i livelli di DTX siano espressi in OA equivalenti
- I saggi funzionali danno misure in tossina-equivalenti
- E' opportuno avere strumenti di calcolo che possano essere usati per le interconversioni delle misure funzionali (biologiche) e strumentali (chimiche).

O.A. e derivati

Acido Okadaico (O.A.)



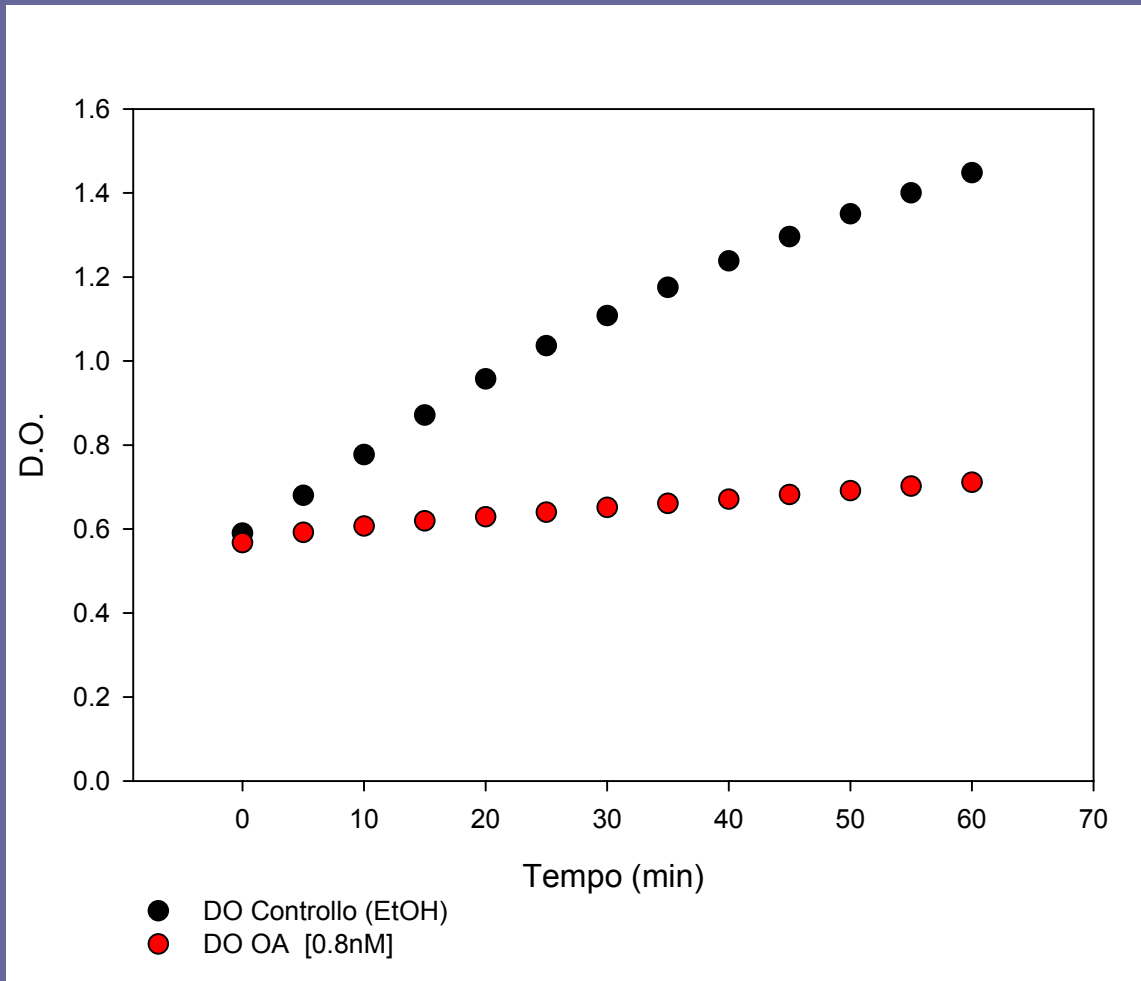
Okadaolo (OOH)



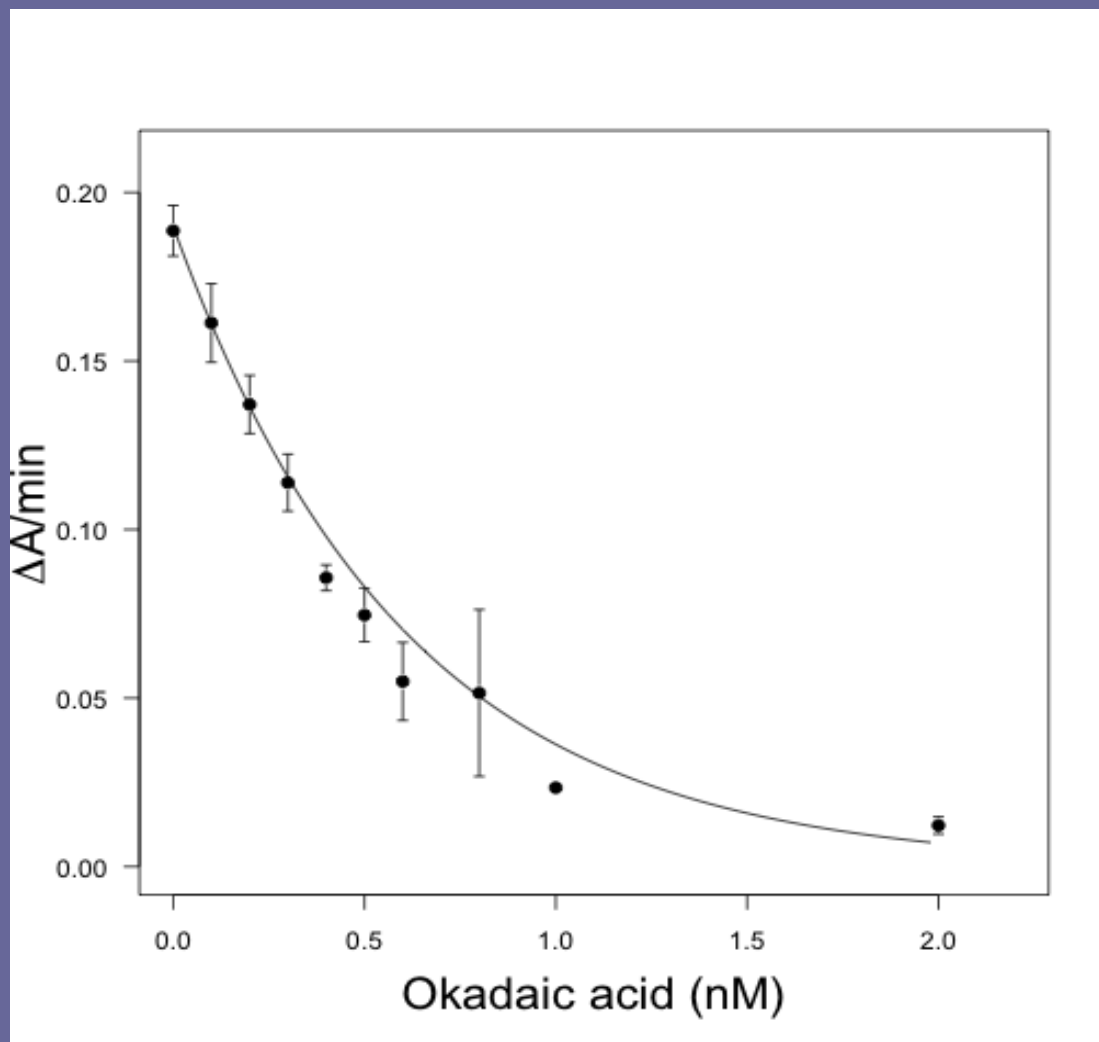
PP2A assay

- Vassoi da 96 pozzetti
- In ogni pozzetto erano presenti:
 - ✓ 170 μ l di Tampone di Reazione
 - ✓ 50 μ l di *p*-NPP (25mM concentrazione finale)
 - ✓ 2.5 μ l di etanolo assoluto al 2%/pozzetto
 - ✓ 2.5 μ l di OA (range 0.1 – 2nM concentrazioni finali)
 - ✓ 2.5 μ l di OOH (range 0.25 – 75nM concentrazioni finali)
- 25 μ l di enzima (0.025 unità finali)
- Lettura ad una lunghezza d'onda di 405nm tramite un lettore ELISA ogni 5 min, in un intervallo di tempo di 1 ora, a temperatura ambiente

Esempio dell'andamento della D.O. in assenza e presenza di tossina

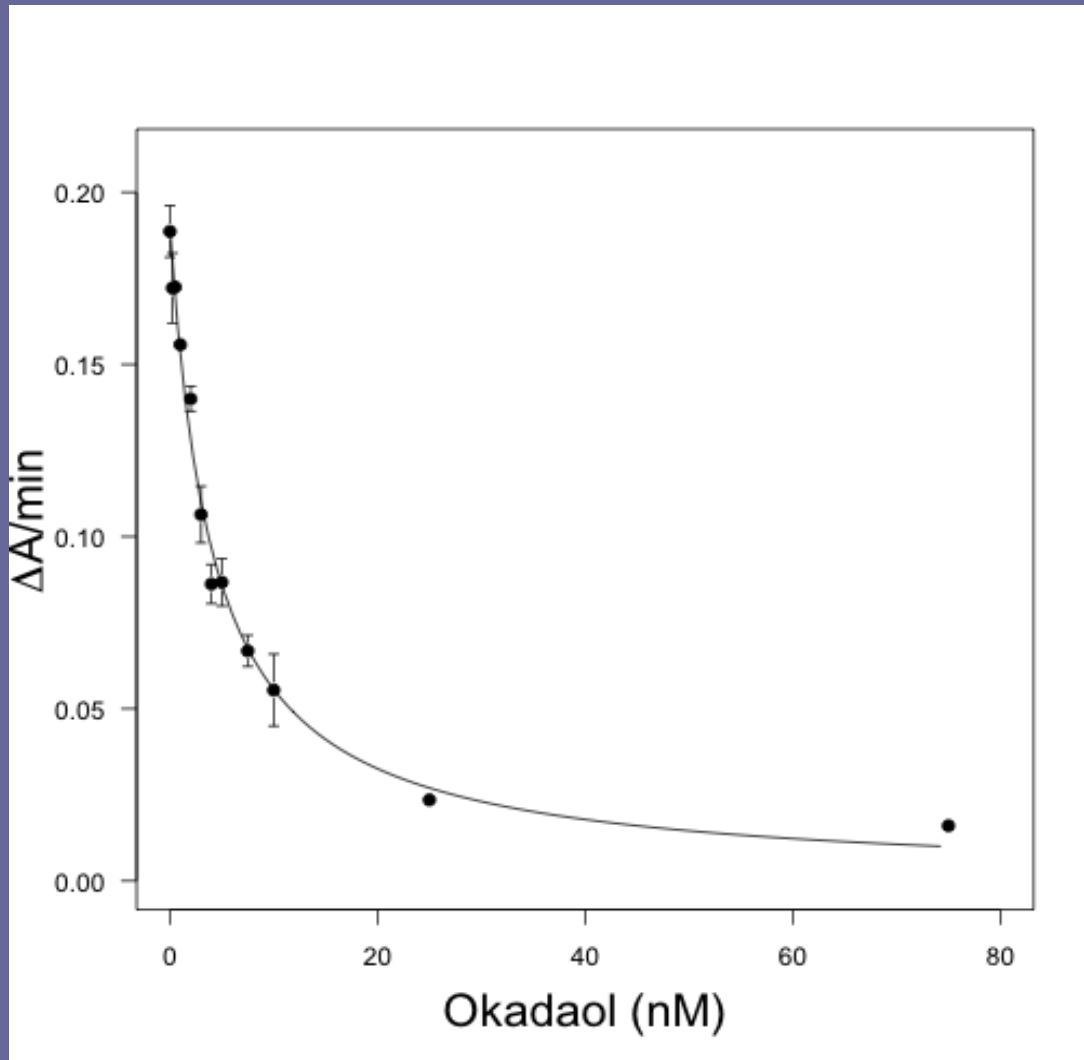


Andamento dell'attività della PP2A in presenza di O.A.



I.C.₅₀: $0.37 \pm 0.04 \text{ nM}$

Andamento dell'attività della PP2A in presenza di OOH



$I.C_{50}$: $4.3 \pm 0.8 \text{ nM}$

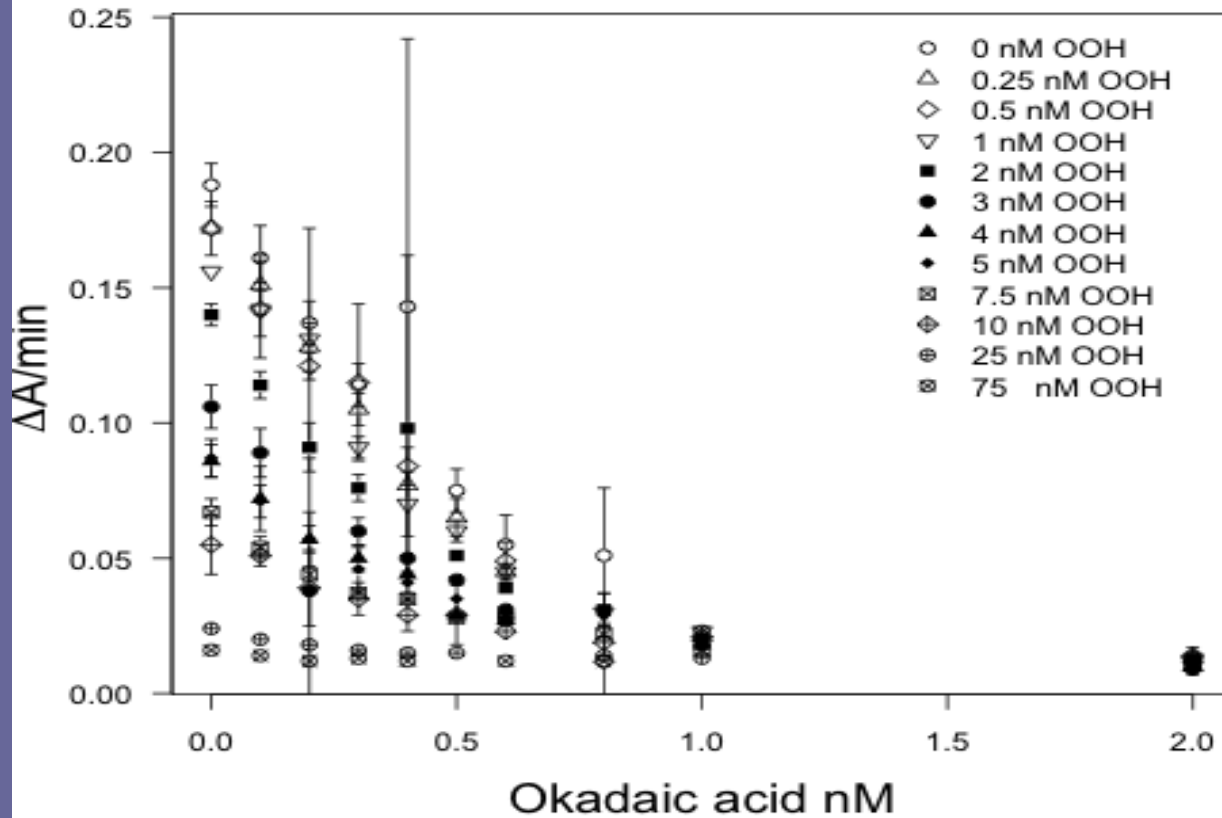
Es. di schema di caricamento dei pozzetti ELISA:

O.A. [nM/w] →

OOH [nM/w] ↓

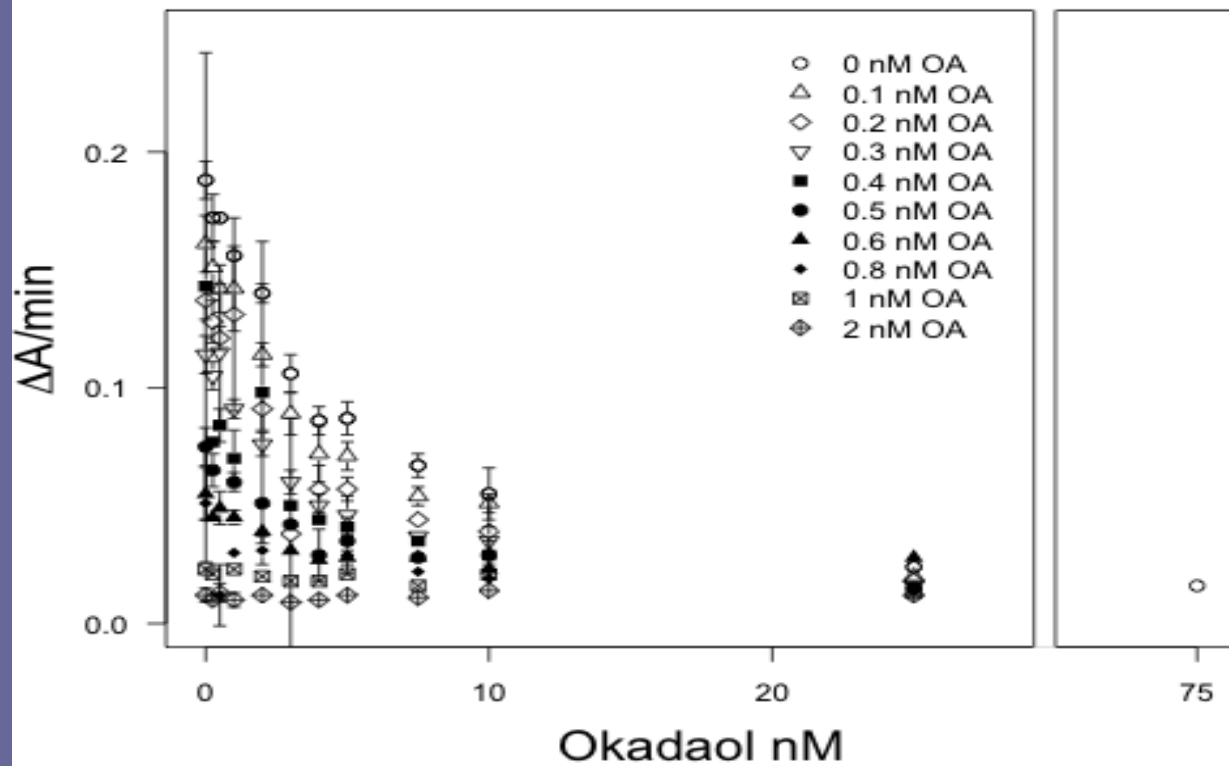
EtOH (2%/w)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8	2
0.5	0.1 0.5	0.2 0.5	0.3 0.5	0.4 0.5	0.6 0.5	0.8 0.5	2 0.5
1	0.1 1	0.2 1	0.3 1	0.4 1	0.6 1	0.8 1	2 1
2	0.1 2	0.2 2	0.3 2	0.4 2	0.6 2	0.8 2	2 2
5	0.1 5	0.2 5	0.3 5	0.4 5	0.6 5	0.8 5	2 5
10	0.1 10	0.2 10	0.3 10	0.4 10	0.6 10	0.8 10	2 10
25	0.1 25	0.2 25	0.3 25	0.4 25	0.6 25	0.8 25	2 25
75	0.1 75	0.2 75	0.3 75	0.4 75	0.6 75	0.8 75	2 75

Curve dose-risposta dell'O.A. in presenza di OOH



I.C.₅₀: 0.38 ± 0.08 nM

Curve dose-risposta dell'OOH in presenza di O.A.

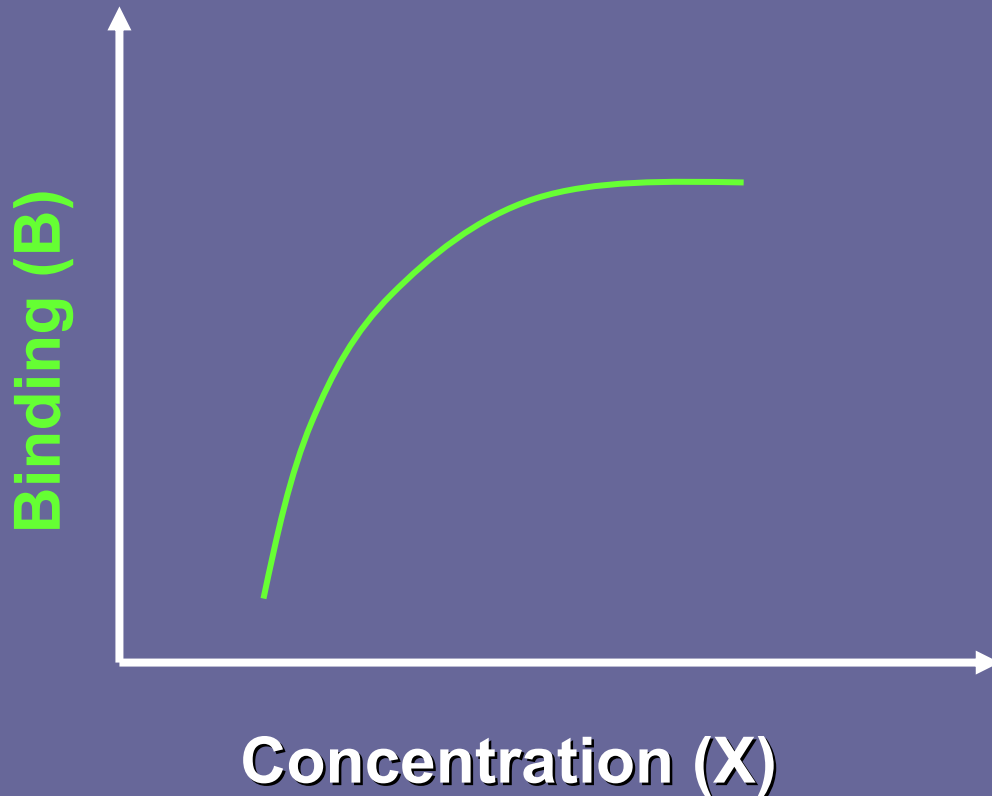


I.C.₅₀: 3.8 ± 0.3 nM

Modello matematico (I)



Effetto finale : inibizione dell'attività della PP2A



$$B = \frac{B_{\max} [X]}{K_D + [X]}$$

Isoterma di Langmuir

Modello matematico (II)

In generale:

$$E_T = \frac{E_{max} \sum \frac{A_i}{K_i}}{1 + \sum \frac{A_i}{K_i}} \quad [1]$$

$$E_T = \frac{E_{max} \cdot T_T}{K_{RC} + T_T} \quad [2]$$

Dove

E_T rappresenta l'effetto relativo esercitato dalle miscele di composti

E_{max} è l'effetto massimo rilevabile con il bersaglio molecolare delle tossine (PP2A)

A_i è la concentrazione di un qualsiasi singolo analogo

K_i è l' IC_{50} misurata per quell'analogo.

Modello matematico (III)

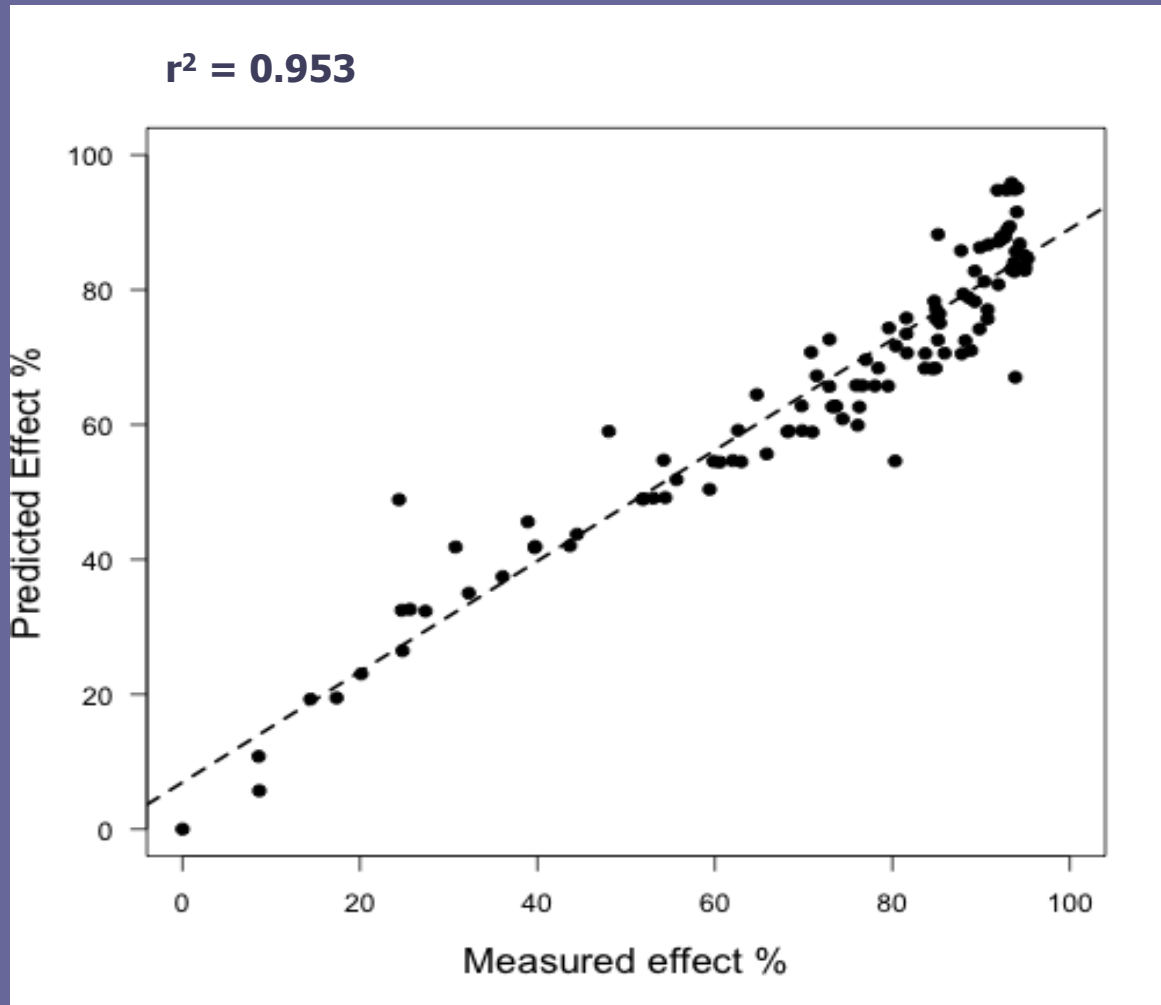
- Se per i calcoli si usa il Fattore di Tossicità Equivalente (TEF) definito come il rapporto K_{RC}/K_i , noi abbiamo:

$$T_T = T_{RC} + \sum A_i \cdot \frac{K_{RC}}{K_i} \quad [3]$$

dove

- T_T è la concentrazione totale degli analoghi espressa in equivalenti del composto di riferimento,
- T_{RC} è la concentrazione del composto di riferimento (OA),
- A_i è la concentrazione di qualsiasi singolo analogo,
- il rapporto K_{RC}/K_i è il Fattore di Tossicità Equivalente (TEF) dell'analogo, con K_i e K_{RC} che rappresentano le IC_{50} misurate per quell'analogo ed il composto di riferimento, rispettivamente.

Confronto effetto misurato – effetto predetto



Conclusioni

- La risposta complessiva indotta da una miscela di OA e uno dei suoi analoghi, espressa in OA equivalenti e determinata tramite il saggio d'inibizione della PP2A, corrisponde a quella ottenuta dalla semplice additività dei contributi dati dai due analoghi contenuti nella miscela, sulla base della loro relativa attività biologica (TEF).
- Il modello da noi sviluppato, per la sua forma matematica, consente la interconvertibilità dei risultati ottenibili con un metodo biologico funzionale, con quelli misurabili mediante procedure analitiche strumentali di quantificazione dei singoli componenti in una miscela di DTX, indipendentemente dal numero complessivo degli analoghi nei campioni d'interesse.
- Il modello consente una stima accurata del valore complessivo dei livelli degli analoghi bioattivi di una miscela di DTX presente in campioni incogniti, espresso in equivalenti di acido okadaico.

Grazie

per

l'attenzione