

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI FARMACIA

Dottorato di ricerca in Scienze Farmaceutiche

XXIV ciclo

---

Dott.ssa Enza Maria Serena Milazzo

**Analisi proteomica quantitativa del fluido lacrimale per  
la diagnosi e la terapia farmacologica della  
Vernal Keratoconjunctivitis**

Coordinatore:

Prof. Giuseppe Ronsisvalle

Tutor:

Prof. Alberto Ballistreri

Prof. Domenico Garozzo

---

2008-2011

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	pag. 2
1.1. Il film lacrimale	pag. 2
1.2. Proteomica	pag. 14
1.3. La Vernal Keratoconjunctivitis (VKC)	pag. 25
1.4. La tecnologia iTRAQ	pag. 37
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	pag. 42
2.1. Frazionamento della componente proteica mediante HPLC in fase inversa	pag. 42
2.2. Collettore di microfrazioni probot	pag. 53
2.3. Analisi tramite spettrometria di massa	pag. 56
<b>3. SCOPO DELLA TESI</b>	pag. 67
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	pag. 74
4.1. Identificazione di nuovi biomarker	pag. 74
4.2. Terapia Farmacologica	pag. 92
<b>5. CONCLUSIONI</b>	pag. 106
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 108

# INTRODUZIONE

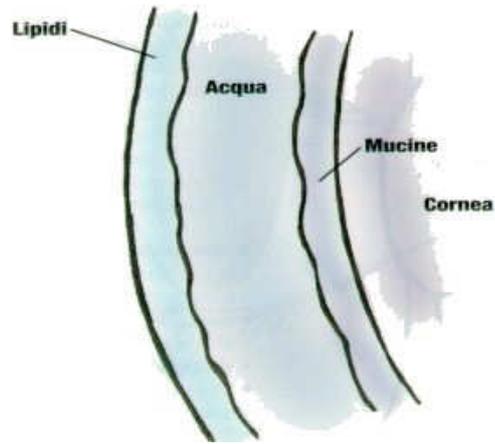
## 1.1. Il film lacrimale

Il film lacrimale è una sottile pellicola liquida dalla struttura relativamente complessa e dalle funzioni altamente specializzate. Tale strato liquido, composto per il 98% da acqua e per il restante 2% da proteine e lipidi, svolge funzioni insostituibili per la nostra vista.

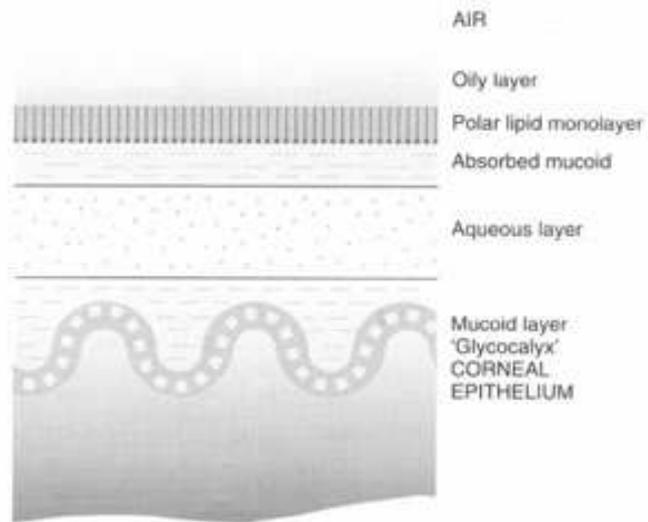
Il film lacrimale può essere suddiviso in esposto, che si trova tra le palpebre, e non esposto, che si trova sotto le palpebre. Quello esposto può essere a sua volta suddiviso in tre parti: film della congiuntiva bulbare, film precorneale, menischi lacrimali marginali.

All'interno del film lacrimale è possibile distinguere uno strato solido e uno fluido. Il primo (50.000 nm) è costituito dal glicocalice prodotto dalle secrezioni glicoproteiche dei microvilli epiteliali e può pertanto essere considerato in continuità anatomico-funzionale con tali cellule. Esso è importante per la stabilità della sovrastante struttura in quanto abbassa la tensione superficiale dell'interfaccia lacrima-epitelio e consente l'adesione della fase fluida alla superficie oculare. Lo strato fluido, secondo il classico modello che fu proposto da Wolff [1] e McDonald [2], è caratterizzato da tre strati: uno strato mucoso a contatto con la cornea, uno acquoso intermedio ed uno lipidico esterno (figura 1). Ogni strato risulta essere fondamentale affinché il film stesso possa svolgere la propria funzione. Lo spessore del film lacrimale fluido è intorno a 7000-9000 nm.

Una rappresentazione meglio differenziata del film lacrimale, proposta da Tiffany [3], prevede una stratificazione a sei livelli (figura 2).



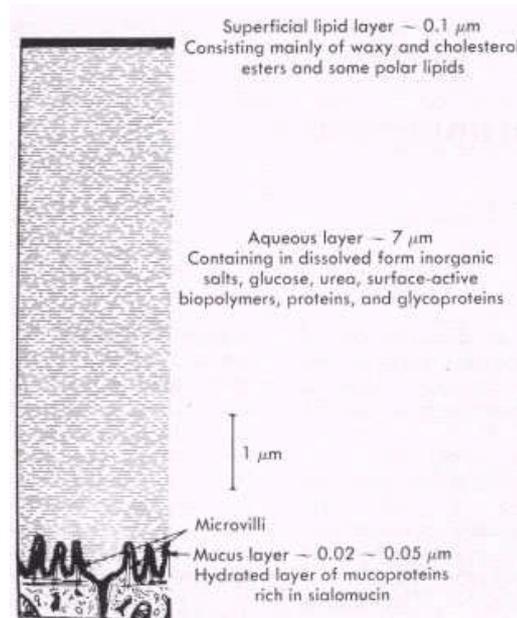
**Figura 1:** i tre strati del film lacrimale



**Figura 2:** modello esalaminare

In tempi recenti Hodson e Herlam [4] hanno suggerito che il film lacrimale possa essere composto da un gel a base di fibronectina in cui il muco, i lipidi e la fase acquosa sono mescolati. In effetti oggi si tende a considerare lo strato fluido del film lacrimale disposto sullo strato solido come una struttura a due strati: uno

molto ampio composto di acqua e muco, l'altro lipidico. Nel presente lavoro di tesi si fa riferimento alla tradizionale suddivisione in tre strati in modo da descrivere in modo più completo le funzioni delle varie componenti del film lacrimale (figura 3).



**Figura 3:** i tre strati del film lacrimale

Come precedentemente accennato, la parte principale del film è lo strato intermedio acquoso che si compone di acqua, elettroliti, amminoacidi, proteine e gas. Esso è un fluido isotonico che si origina principalmente dalla secrezione della ghiandola lacrimale principale e secondariamente dalle ghiandole lacrimali accessorie di Krause e di Ciaccio-Wolfring. La fase acquosa del film contiene acqua in una percentuale che varia dal 96 al 99%.

Secondo Mircheef la fisiologia del film lacrimale e del trasporto di elettroliti si basa su due premesse fondamentali [5]:

1. la secrezione di acqua è la conseguenza osmotica passiva della secrezione attiva di elettroliti;
2. i meccanismi cellulari della secrezione di elettroliti sono quelli tipici della maggior parte delle ghiandole esocrine.

Tra gli elementi inorganici presenti nello strato acquoso è da ricordare lo ione bicarbonato che è stato dosato a 26 mEq/L e svolge un ruolo di protezione della superficie oculare. Esso inoltre fornisce il recupero delle funzioni di barriera dell'epitelio corneale in occhi con alterazioni lacrimali.

Il film lacrimale in confronto con il siero risulta arricchito di alcuni elementi quali potassio, manganese, cromo, zinco mentre risulta depauperato di altri come calcio, ferro e rame. La percentuale di sodio rimane invece praticamente invariata.

Gli elettroliti sodio (4,45 g/l), potassio (1,2 g/l) e cloruro (3,90 g/l), sono responsabili dell'osmolarità lacrimale. Il liquido lacrimale appena secreto è isotonico o lievemente ipotonico. Ad occhi aperti tende a divenire ipertonico per effetto di una costante evaporazione della fase acquosa. L'osmolarità delle lacrime che si trovano nei menischi marginali è di 302 mOsm/L [6]. Le lacrime che si trovano nel fornice inferiore sono caratterizzate da un'osmolarità inferiore del 5.2% rispetto a quelle del menisco. Quando l'osmolarità s'innalza al di sopra dei valori normali, come avviene nel caso di alcune patologie oculari, può determinare danni all'epitelio della superficie oculare.

Le sostanze organiche presenti nel film sono numerose. Tra esse si ricordano: l'acido citrico, l'acido ascorbico, l'acido lattico, l'urea, il glucosio, peptidi e proteine.

Lo strato più esterno è uno strato lipidico composto da lipidi sia polari che apolari. I lipidi originano da tre tipi di ghiandole: le ghiandole di Meibomio, quelle di Moll e quelle di Zeis. I costituenti primari sono: idrocarburi, esteri sterolici, esteri delle cere, trigliceridi mono e diinsaturi, colesterolo libero e acidi grassi liberi. Inoltre sono presenti fosfolipidi (come fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, sfingomieline) e cerebrosidi.

Nel film lacrimale si stabilisce una forte interazione tra i lipidi e la fase acquosa, fondamentale per la diminuzione della tensione superficiale del film [7]. La funzione principale dello strato lipidico è quella di prevenire e ritardare l'evaporazione della fase acquosa del film lacrimale. Infine esso impedisce alle lacrime di debordare oltre le palpebre ed è fondamentale nel prevenire la contaminazione con i lipidi della pelle, che avendo una composizione diversa destabilizzerebbero il film.

Lo strato interno del film lacrimale, come precedentemente accennato, è lo strato mucoso. Esso origina dalle cellule caliciformi congiuntivali, dalle ghiandole di Manz, dalle cripte di Henle e dalle cellule del Secondo Sistema Mucoso dell'epitelio squamoso di cornea e congiuntiva. Il muco ricopre per intero la superficie esterna della congiuntiva e della cornea caratterizzata da microvilli e micropliche. Queste strutture sono ricoperte da un rivestimento cellulare filamentoso, ricco di proteine glicosilate, denominato glicocalice. Quest'ultimo è una struttura fondamentale poiché rappresenta un vero e proprio sistema di ancoraggio per il muco.

Lo strato mucoso è composto principalmente da glicoproteine e in misura minore da glicosaminoglicani. Le glicoproteine del muco sono molecole molto

grandi, con un peso molecolare di 50 milioni di Dalton. Alcune sono neutre mentre altre contengono gruppi anionici. Queste ultime sono note come glicoproteine acide e sono ulteriormente suddivise in sialomucine e solfomucine. Le glicoproteine sono legate tra loro da ponti disolfuro, legami molto deboli che possono rompersi e facilmente ricomporsi.

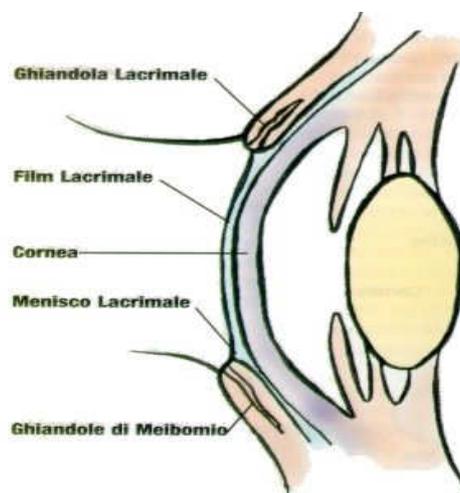
La componente mucosa delle lacrime è divisa in due parti: una profonda adesa alle cellule (fase solida) ed una in soluzione (fase fluida). La parte fluida del muco è responsabile delle caratteristiche visco-elastiche e delle proprietà di tensione superficiale proprie delle lacrime. Queste mucine rendono stabile il film lacrimale ed abbassano la tensione superficiale dell'interfaccia strato acquoso-lipidico permettendo a quest'ultimo di distribuirsi sulla superficie del film lacrimale mantenendo così l'occhio idratato.

Il film lacrimale costituisce l'interfaccia multifunzionale tra l'ambiente esterno e la superficie oculare. Esso potrebbe essere considerato come una matrice extracellulare, giocando un ruolo attivo nella regolazione delle funzioni epiteliali e agendo a stretto contatto con i tessuti circostanti. La produzione e il turn-over del film è essenziale per il mantenimento della salute della superficie oculare continuamente minacciata da corpi estranei, attacco di microrganismi o condizioni ambientali sfavorevoli [8].

La superficie oculare è la parte anteriore dell'occhio a contatto con l'ambiente esterno. L'occhio è l'organo di senso che consente l'acquisizione delle informazioni visive provenienti dall'ambiente circostante. Esso raccoglie i raggi luminosi che provengono dall'ambiente esterno; ne regola l'intensità attraverso l'iride che agisce quale diaframma muscolare; li focalizza attraverso il cristallino,

la lente dell'occhio, sulla retina dove formano immagini nitide ma rimpicciolite e capovolte. Le cellule nervose della retina tramite il nervo ottico trasmettono gli impulsi al cervello che li trasforma in sensazioni visive e raddrizza l'immagine.

La superficie oculare è un sistema costituito da diverse strutture che collaborano in modo che l'occhio possa svolgere al meglio le sue funzioni. Queste strutture sono: congiuntiva, giunzione muco-epiteliale, cornea e una varietà di ghiandole che producono il film lacrimale (figura 4).



**Figura 4:** la superficie oculare

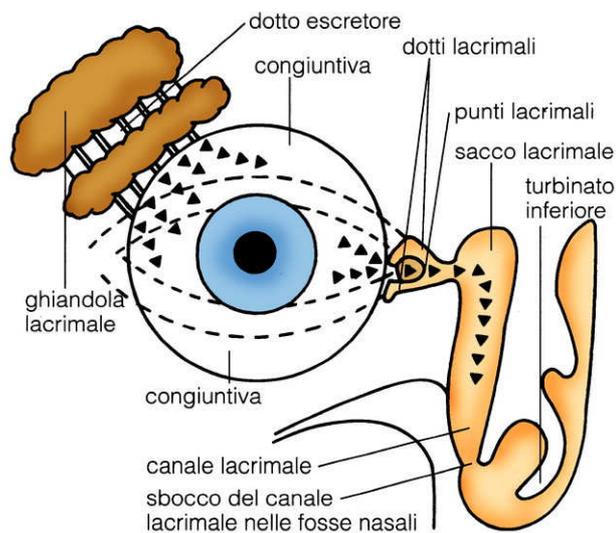
La cornea è una struttura trasparente pluristratificata. Il suo rivestimento esterno è costituito dall'epitelio corneale, che a sua volta si compone di 6 strati di cellule. L'epitelio è separato dalla porzione più interna di tessuto corneale grazie ad una sottile membrana detta capsula di Bowmann. Al di sotto della Bowmann si trova lo stroma che è lo strato più spesso di tutta la cornea ed è composto principalmente da fibre di collagene. Il quarto strato è la membrana di Descemet

nota anche come membrana elastica posteriore. L'ultimo e più profondo strato della cornea è l'endotelio corneale.

La congiuntiva è formata da una membrana mucosa molto sottile e delicata che riveste la superficie anteriore dell'occhio, ad eccezione della cornea, e quella interna delle palpebre.

La giunzione muco-epiteliale è la zona di unione tra la cute delle palpebre e la congiuntiva.

Congiuntiva, cornea e ghiandole lacrimali agiscono stimolando le terminazioni nervose presenti sulla superficie oculare. Tali terminazioni inviano impulsi al cervello il quale a sua volta invia stimoli alla ghiandola lacrimale principale ed accessorie regolando così la produzione delle lacrime necessarie al mantenimento dell'omeostasi della superficie oculare [8] (figura 5).



**Figura 5:** struttura dell'apparato lacrimale

La formazione del film lacrimale dipende dall'equilibrio tra tre sistemi

distinti: di secrezione, di distribuzione e di escrezione.

Il *sistema di secrezione* comprende la ghiandola lacrimale principale e diverse ghiandole lacrimali accessorie.

La ghiandola lacrimale principale è una ghiandola sierosa multilobata situata nella parte dell'angolo superiore esterno del tetto dell'orbita. Ogni lobo contiene molti tubuli ramificati che in sezione formano gli acini. L'elemento più caratteristico delle cellule secernenti disposte intorno al lume centrale sono i granuli di secreto localizzati generalmente nei due terzi superiori della cellula.

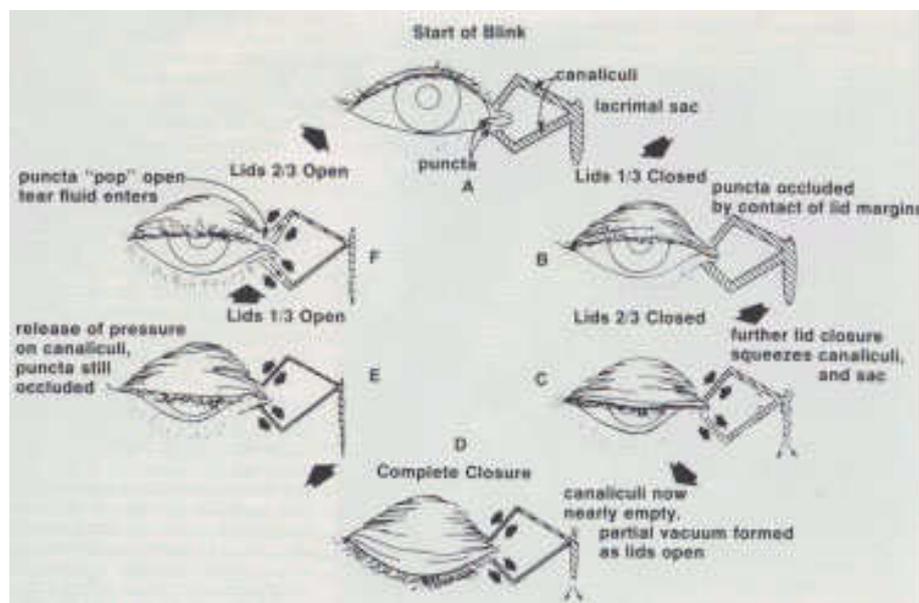
La ghiandola lacrimale principale funge da tessuto principale del sistema immuno-secretorio dell'occhio. In questa ghiandola è presente un'elevata densità di plasmacellule che secernono IgA: tale immunoglobulina si accoppia ad un'altra omonima mediante la catena polipeptidica J e alla componente secretoria (SC) per formare l'anticorpo sIgA, anticorpo predominante nelle secrezioni esterne.

Le ghiandole lacrimali accessorie sono:

- le ghiandole di Krause: sono circa venti nella palpebra superiore ed otto in quella inferiore, hanno struttura di tipo acino-tubulare con secrezione di tipo sieroso ed il meccanismo di secrezione sembra essere quello tipico dell'esocitosi;
- le ghiandole di Ciaccio-Wolfring: hanno struttura di tipo tubulo-alveolare, la secrezione è di tipo sieroso e il loro meccanismo di secrezione è apocrino;
- le ghiandole di Meibomio: sono ghiandole sebacee con struttura tubulo-alveolare semplice o ramificata. La secrezione è di tipo olocrino e cioè il loro secreto è formato dalle porzioni terminali degenerate delle cellule secernenti (meibociti) che si riversano nel lume;

- le ghiandole di Moll: sono ghiandole sudoripare apocrine con una funzione non esattamente nota. Oltre alla secrezione apocrina presentano anche una secrezione esocrina.

Il secondo sistema di formazione delle lacrime è il *sistema di distribuzione*: le lacrime vengono sparse sulla cornea e sulla congiuntiva per mezzo degli ammiccamenti palpebrali formando il film lacrimale (figura 6).



**Figura 6:** ammiccamento

I tipi di ammiccamento sono tre: spontaneo o involontario, riflesso, volontario o forzato. Il primo tipo ha ruolo fondamentale nel mantenere efficiente la distribuzione del film lacrimale e può essere completo, incompleto o solo accennato.

Il *sistema di escrezione* rappresenta il terzo ed ultimo meccanismo di formazione delle lacrime. Esso è composto dai puntini lacrimali, i canalini lacrimali, il sacco

lacrimale e il dotto naso-lacrimale. La maggior parte delle lacrime scorre sul bordo palpebrale inferiore e passa attraverso i puntini lacrimali, in particolare quello inferiore. Successivamente è l'ammiccamento a favorire il flusso dai canalini verso il sacco lacrimale. Con la contrazione dei canalini e del sacco lacrimale, poi, si realizza la completa espulsione del liquido lacrimale. Mentre i puntini lacrimali sono ancora occlusi si verifica il rilascio di pressione sui canalini lacrimali. A questo punto i puntini lacrimali si aprono nuovamente e sono pronti per convogliare le lacrime verso i canalini.

Bisogna ricordare infine che parte del film lacrimale viene perduto passivamente mediante evaporazione e che probabilmente 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  sono perduti per assorbimento attraverso la mucosa congiuntivale e il dotto naso lacrimale.

Il film lacrimale svolge principalmente cinque funzioni: difesa, lubrificazione, nutrizione, trasparenza ottica, pulizia della superficie oculare.

1. Le lacrime rappresentano il principale meccanismo di difesa alle infezioni batteriche corneali e congiuntivali. Esse, diffondendosi uniformemente sull'epitelio corneale, fungono da barriera protettiva agli agenti batterici esterni. Infatti la superficie oculare è costantemente esposta all'attacco di organismi patogeni presenti nell'ambiente che destano più preoccupazione nel caso in cui l'occhio abbia subito un intervento chirurgico o presenti delle lesioni. La funzione di protezione antibatterica è svolta tramite le riserve di immunoglobuline presenti nella struttura micellare del muco, che vengono rilasciate lentamente quando gli occhi sono aperti ma anche tramite l'azione di proteine e cellule fagocitotiche disperse nel film lacrimale stesso. Il muco inoltre svolge un'azione di protezione da traumi dell'epitelio corneo-

congiuntivale che possono essere provocati da corpi estranei presenti nel sacco congiuntivale. Tali corpi estranei vengono avvolti dal muco che ne riduce così l'effetto abrasivo.

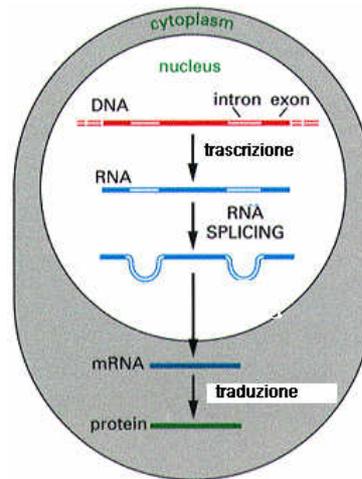
2. Lo strato mucoso del film lacrimale permette ai margini palpebrali e alla congiuntiva di scivolare con il minimo attrito sulla superficie esterna del bulbo sia durante l'ammiccamento che nelle rotazioni oculari svolgendo dunque un'efficace azione lubrificante.
3. Lo strato acquoso grazie alla sua trasparenza ed indice di rifrazione fornisce al diottrio aria-cornea una superficie ottica ineccepibile. La qualità ottica dell'immagine è inoltre assicurata dalla distribuzione istantanea e regolare del film per effetto della natura visco-elastica dello strato mucoso.
4. La componente acquosa del film funge da veicolo per numerose sostanze disciolte nella lacrima (ossigeno, ioni, anidride carbonica, mucine, lipidi) che raggiungono in maniera uniforme tutte le cellule della superficie oculare. Tali sostanze sono indispensabili per l'eutrofismo della superficie oculare e la sua nutrizione. In particolare la presenza di ioni è regolata dal film lacrimale in modo da assicurare un ambiente fisico adeguato per l'epitelio corneo-congiuntivale.
5. Il costante ricambio della componente liquida del film favorisce la rimozione di elementi che non fanno usualmente parte del film lacrimale come detriti cellulari, scorie metaboliche ed eventuali contaminanti delle cellule dell'epitelio corneo-congiuntivale provenienti dall'ambiente esterno.

## 1.2. Proteomica

La proteomica è lo studio su larga scala del proteoma, termine introdotto per la prima volta nel 1995 per indicare le molecole proteiche espresse in una cellula, in un tessuto o in un fluido biologico. L'analisi proteomica è stata utilizzata in diversi campi medici per valutare i meccanismi fisiologici e differenziarli da quelli che si innescano durante una patologia; per sviluppare nuove strategie di diagnosi precoce; identificare bersagli terapeutici, con conseguente implemento, sia nella ricerca di farmaci innovativi sia nelle successive applicazioni, volte a valutarne gli effetti terapeutici e tossici [9].

Gli studi genetici hanno prodotto innumerevoli informazioni in merito a molte patologie. Tuttavia con l'accumulo di un'ampia quantità di sequenze di DNA nei database, i ricercatori si sono resi conto che possedere la completa sequenza del genoma non era sufficiente per elucidare le funzioni biologiche di una cellula. La sopravvivenza cellulare, infatti, dipende da una moltitudine di pathways metabolici e regolatori. La proteomica è complementare alla genomica poiché focalizza l'attenzione sui prodotti finali dei geni, le proteine, che sono gli agenti attivi delle cellule e ne dettano lo stato biologico [10]. Tuttavia c'è la consapevolezza che circa un milione di proteine umane sono codificate da venticinquemila geni. Infatti il livello di espressione di un gene, di traduzione di un trascritto, e il conseguente numero di prodotti proteici per gene o trascritto può variare in un intervallo molto ampio di ordini di grandezza in dipendenza dalle condizioni cellulari e dall'ambiente esterno. Dunque il livello di espressione di una proteina non può essere semplicemente dedotto dal livello di espressione dell'm-RNA.

Il processo di modificazione post-trascrizionale (splicing) del trascritto primario (pre-mRNA) determina la produzione di più trascritti maturi (mRNA) ed è pertanto alla base della corrispondenza non biunivoca tra gene e proteina (figura 7).



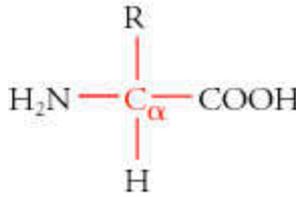
**Figura 7:** Il proteoma ha un ordine di complessità maggiore rispetto al genoma

Inoltre una proteina durante le fasi di secrezione e di localizzazione nel suo sito target specifico può andare incontro a modificazioni post-traduzionali (PTM), in particolare reazioni di fosforilazione, acetilazione o glicosilazione, che possono alterare significativamente le sue funzioni.

E' necessario evidenziare che il proteoma è sensibile a diversi fattori come l'età del soggetto, lo stress, la presenza di una patologia o l'azione di farmaci. Le cellule presenti in diversi tessuti, infine, hanno un genoma relativamente costante ma un differente profilo proteomico. Dunque il proteoma presenta maggiore ordine di complessità rispetto al genoma ed oppone alla natura essenzialmente statica di quest'ultimo una forte variabilità. L'analisi di un sistema così complesso

rappresenta pertanto un'importante sfida per i ricercatori del settore.

Le proteine sono biopolimeri costituiti da 20 amminoacidi; ciascuno di essi presenta un carbonio centrale, detto *carbonio alpha* a cui sono legati un gruppo amminico (NH<sub>2</sub>), un gruppo carbossilico (COOH) e un gruppo laterale (R) che conferisce a ciascun amminoacido le sue peculiarità chimiche (figura 8).



**Figura 8:** Struttura chimica di un amminoacido

In funzione delle proprietà chimiche di tale gruppo, un amminoacido viene classificato come acido, basico, idrofilo (polare) e idrofobo (*apolare*). Gli amminoacidi si legano tra loro formando una catena polipeptidica non ramificata (*struttura primaria*). Il legame tra due amminoacidi è detto legame peptidico e viene ottenuto tramite la reazione di condensazione tra il gruppo amminico di un amminoacido e il gruppo carbossilico di un altro con eliminazione di una molecola di acqua.

Il ripiegamento localizzato della catena polipeptidica per effetto di legami idrogeno determina la cosiddetta *struttura secondaria* delle proteine. Essa comprende due tipi di struttura: l' $\alpha$  elica e il foglietto  $\beta$  sheet.

La *struttura terziaria* definisce il ripiegamento nelle tre dimensioni della catena polipeptidica ed è stabilizzata da forze di Van der Waals, legami a

idrogeno, interazioni idrofobiche e ponti disolfuro.

La *struttura quaternaria* è data dal legame di più catene polipeptidiche tenute insieme da forze elettrostatiche, legami di Van der Waals e ponti disolfuro.

Gli esperimenti proteomici constano di tre step:

- preparazione del campione
- separazione delle proteine o dei peptidi
- identificazione delle proteine o dei peptidi

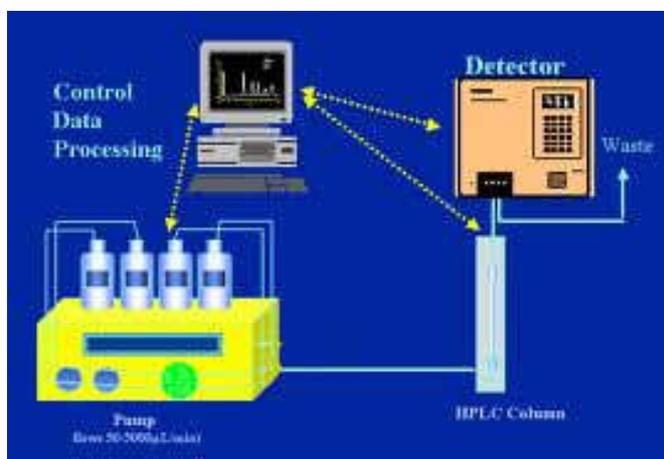
In particolare i ricercatori si avvalgono della tecnologie di elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilammide (2D-PAGE) o della cromatografia liquida ad alta performance (HPLC) per la separazione delle proteine, ed utilizzano la spettrometria di massa, che si avvale di numerose e differenti strumentazioni, per la loro identificazione.

La 2D-PAGE è una tecnica che consente di separare proteine di miscele complesse sfruttando due proprietà intrinseche delle proteine stesse: nella prima dimensione del gel la separazione avviene in base alla carica della molecola, nella seconda le proteine vengono separate in base alla loro massa molecolare.

La 2D-PAGE, pur essendo un metodo molto usato in proteomica, presenta una limitazione: proteine a valori estremi di punto isoelettrico e peso molecolare, proteine a bassa abbondanza o associate alla membrana cellulare, raramente possono essere identificate tramite tale strategia.

Per analizzare questo tipo di campioni i ricercatori hanno fatto ricorso in questi anni a diverse tecniche di cromatografia liquida ad alta performance che presentano diversi vantaggi, primo tra tutti l'efficienza nella separazione delle proteine. Si tratta di uno strumento di analisi rapido e di facile impiego, efficace e

versatile. Questo tipo di cromatografia impiega una fase stazionaria solida (generalmente gel di silice) e una fase mobile liquida. Tra le tecniche impiegate si ricorda la size exclusion high performance liquid chromatography (HPLC), la reversed-phase HPLC e la ion-exchange HPLC. Un campione complesso di proteine viene sottoposto a digestione enzimatica; i peptidi che derivano dalla digestione vengono poi separati tramite l'HPLC. La soluzione contenente i peptidi viene posta sulla superficie della colonna ed eluita tramite il flusso della fase liquida creato da una pompa ad alta pressione. I peptidi, in particolare, si distribuiscono tra le due fasi lungo la colonna, secondo le varie proprietà e capacità di agire con la fase stazionaria. Alla fine della colonna, viene posto un rivelatore (*detector*), in grado di indicare in funzione del tempo, i vari stadi di fuoriuscita del soluto (figura 9).



**Figura 9:** schema di flusso di un'HPLC

Una volta separate, le proteine possono essere raccolte e successivamente analizzate, oppure, nel caso in cui si utilizzi uno spettrometro di massa con

sorgente ESI, possono essere inviate direttamente allo spettrometro ed analizzate on-line.

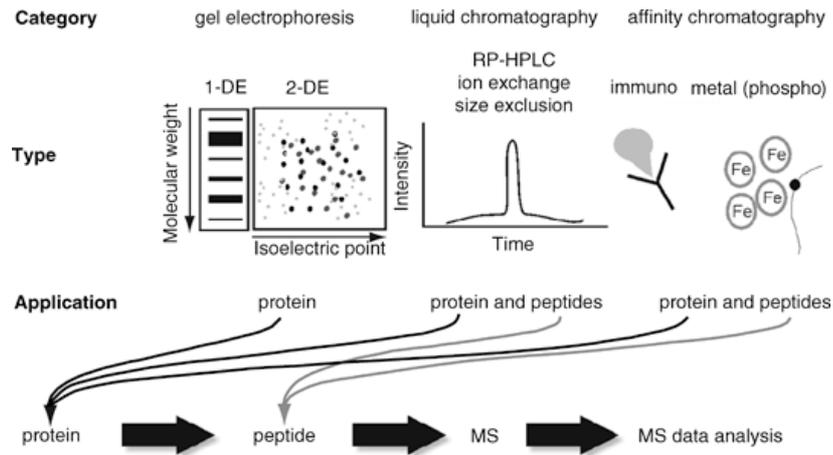
Con lo sviluppo di tecniche di cromatografia bidimensionale, che in questi anni sono sempre più utilizzate all'interno dei centri di ricerca, è stato possibile semplificare ulteriormente il pattern di separazione aumentando quindi la probabilità di individuare specie proteiche poco abbondanti nel campione biologico analizzato.

La separazione multidimensionale dei peptidi avviene, nella maggior parte dei casi, tramite l'uso di una colonna a scambio cationico SCX per lo step di separazione nella prima dimensione e di una colonna RP (reversed phase) per lo step di separazione nella seconda dimensione. Nel primo step la separazione avviene sfruttando le differenze nella carica netta dei peptidi ad un determinato valore di pH; durante il secondo step i peptidi vengono eluiti in base alla loro polarità (in ordine di polarità decrescente).

La spettrometria di massa è alla base di numerose strategie per la caratterizzazione di proteine e peptidi. Tale tecnica analitica è stata applicata all'analisi di macromolecole biologiche alla fine degli anni ottanta quando vennero introdotti due metodi di ionizzazione soft: electrospray ionization (ESI) e matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI). Tali metodi di ionizzazione consentono di analizzare, con elevate sensibilità (dalle picomoli alle femtomoli), analiti polari, poco volatili e termolabili come le macromolecole biologiche ad elevato peso molecolare (oltre 200 KDa), senza provocarne frammentazione in sorgente.

La ESI MS e la MALDI MS per il diverso meccanismo di ionizzazione,

consentono di ottenere informazioni complementari riguardo le biomolecole analizzate, pertanto vengono spesso impiegate alternativamente in proteomica a seconda dell'informazione che si vuole ottenere (figura 10).



**Figura 10:** tecniche analitiche utilizzate in studi di proteomica

Esistono ad oggi due principali tipi di approcci impiegati in proteomica: la Bottom-up Proteomics e la Top-down Proteomics (figura 11). La prima tecnica consiste nell'analisi di miscele di peptidi ottenuti tramite digestione diretta di una miscela di proteine usando un enzima proteolitico come la tripsina. I peptidi digeriti vengono separati tramite 2DE o HPLC ed identificati tramite spettrometria di massa tandem. I campioni, nella bottom-up proteomics, vengono spesso marcati tramite tag isobarico prima della digestione in modo da poter valutare l'espressione differenziale delle proteine nei diversi campioni analizzati. Tutti i metodi impiegati nell'approccio bottom-up richiedono l'uso di strumenti ad alta risoluzione ed alta performance.

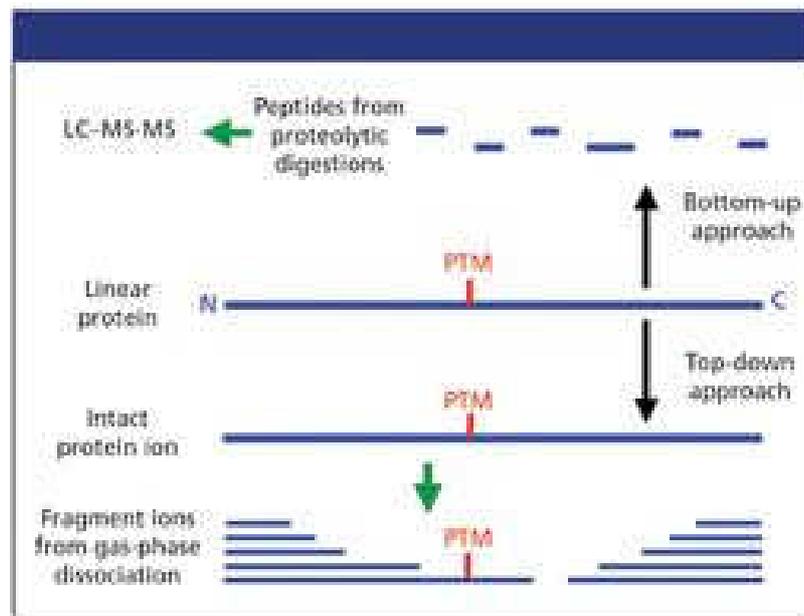
La bottom-up proteomics, conosciuta anche come shot-gun proteomics, è la tecnica più utilizzata nelle moderne ricerche di proteomica in quanto permette di ottenere una separazione ad alta risoluzione. Altro punto di forza, che rende tale tecnica la più accettata dalla comunità scientifica, è quello di consentire un'analisi esaustiva delle proteine sia per quanto riguarda la loro identificazione che per la loro analisi quantitativa di campioni biologici complessi pur avendo a disposizione un basso numero di campioni.

Tuttavia tale tecnica sconta il limite di non consentire l'identificazione certa di proteine a basso peso molecolare. Infatti le proteine più piccole (con massa minore di 30KDa) hanno pochi siti a disposizione per il cleavage proteolitico e spesso non generano abbastanza peptidi per l'identificazione certa di una proteina. Inoltre tale strategia consente di identificare solo una frazione della popolazione totale dei peptidi di una data proteina. Pertanto, le informazioni ottenute riguardano solo una parte della sequenza della proteina stessa. Tale limite impedisce l'analisi completa delle modificazioni post-traduzionali che interessano le proteine.

La strategia nota come top-down proteomics, viceversa, coinvolge la separazione di molecole proteiche intatte da campioni biologici complessi usando le usuali tecniche di 2DE o HPLC seguita da spettrometria di massa.

I punti di forza di questa tecnica sono la semplicità della preparazione del campione e l'eliminazione della fase di digestione delle proteine che richiede notevole dispendio di tempo. Inoltre tale tecnica consente l'accesso potenziale alla sequenza completa delle proteine ed è utile per l'individuazione delle modificazioni post-traduzionali. Tuttavia la top-down proteomics, relativamente

giovane rispetto alla bottom-up proteomics, ad oggi non risulta ancora sufficientemente sviluppata ed è pertanto considerata una tecnica di seconda scelta rispetto alla bottom-up Proteomics.



**Figura 11:** bottom up & top down Proteomics

Altre tecniche spesso usate negli studi clinici e come metodi di conferma negli studi di proteomica sono il Western Blot, il metodo ELISA, i microarray di proteine. A causa della complessità del proteoma comunque non esiste una tecnica individuale in grado di fornire il completo coverage delle sequenze peptidiche di un dato campione.

Gli studi di proteomica riguardano la caratterizzazione del profilo proteico di un determinato campione, l'analisi dei livelli di espressione delle proteine e delle interazioni proteina-proteina, la valutazione delle modificazioni post-traduzionali che incidono sulle loro funzioni.

E' possibile pertanto distinguere due principali aree di studio: la proteomica funzionale e la proteomica di espressione.

La proteomica funzionale si occupa di definire le funzioni di una proteina, associando ad essa una posizione definita all'interno di una cascata di eventi cellulari. La maggior parte dei processi cellulari non dipendono soltanto dall'abbondanza relativa delle varie proteine, ma anche dalla regolazione transiente della loro attività, dalla loro localizzazione cellulare e soprattutto dall'associazione con altri componenti.

E' oggi chiaro che un gran numero di proteine è presente nella cellula sotto forma di complessi multiproteici; ne consegue che la comprensione delle funzioni biologiche di queste proteine è legata all'identificazione dei loro partners molecolari [11]. Procedure basate sull'analisi proteomica possono fornire un contributo basilare all'identificazione dei componenti dei complessi multiproteici.

Inoltre tale tecnologia permette di definire le interazioni che le proteine stabiliscono all'interno della cellula ed è dunque fondamentale per la descrizione dettagliata delle vie di trasduzione del segnale.

Gli studi di proteomica di espressione sono indirizzati all'analisi qualitativa e quantitativa delle proteine presenti in un dato campione. In particolare le ricerche mirano a stabilire differenze del pattern di espressione tra un sistema biologico in condizioni normali e uno in condizioni patologiche. Nelle applicazioni biomediche, tale approccio comparativo viene di solito utilizzato per identificare proteine il cui livello di espressione aumenta o diminuisce in seguito all'insorgere di una patologia, queste proteine potranno dunque essere utilizzate come marker diagnostici o a scopo terapeutico.

Negli ultimi cinque anni la proteomica è stata ampiamente applicata alla ricerca nel settore delle patologie oculari. Il fluido lacrimale, come elucidato precedentemente, è stato il materiale di partenza per un gran numero di studi proteomici di patologie della superficie oculare. Gli studi proteomica d'espressione si sono rivelati particolarmente informativi. Infatti, studi effettuati su pazienti affetti da malattie oculari come la sindrome da occhio secco, lesioni superficiali della cornea, sindrome di Sjögren e patologie oculari infiammatorie hanno rivelato che questi individui presentano un diverso profilo proteomico o differenze nei livelli di specifiche proteine rispetto a soggetti sani.

Il confronto del profilo proteomico qualitativo e quantitativo di soggetti sani con quello di soggetti affetti da patologie oculari di origine infiammatoria dunque è uno strumento molto importante in quanto può permettere ai ricercatori di identificare biomarker della patologia oggetto di studio o nuovi target terapeutici. La ricerca in ambito della proteomica oftalmica è fondamentale poichè i dati ottenuti potranno consentire in futuro di migliorare la gestione di molte patologie oculari debilitanti e si spera porteranno alla scoperta di nuove terapie per la completa guarigione da queste patologie.

### 1.3. La Vernal Keratoconjunctivitis (VKC)

La Vernal Keratoconjunctivitis (VKC) è una patologia cronica del tratto anteriore oculare bilaterale, in particolare della cornea e della congiuntiva, che determina nei soggetti che ne soffrono un quadro infiammatorio severo. Si tratta di una condizione clinica importante che può comportare, se pur raramente, esiti sfavorevoli permanenti a livello oculare. La patologia si manifesta nello 0,1-0,5% dei soggetti che presentano problemi oculari ma il numero di pazienti che ne sono affetti è in continua crescita.

La VKC si manifesta con ricorrenza stagionale o meno frequentemente come patologia persistente. Il termine "Vernal" indica la stagione nella quale più comunemente compaiono i primi sintomi, la primavera, senza fornire pertanto definizioni temporali della malattia stessa.

Nel 1846 Artl descrisse [12] per la prima volta la VKC, segnalando quella che sarebbe una delle classiche presentazioni: l'edema perilimbare. Il termine Vernal Keratoconjunctivitis, noto anche come "catarro primaverile", venne poi coniato nel 1872 da Saemisch [13] il quale segnalò anche le riacutizzazioni stagionali della malattia in 182 pazienti. Nel 1888, Emmert [13-14] classificò la VKC in tre tipi:

- Palpebrale, con papille che coinvolgono principalmente la congiuntiva tarsale superiore;
- Limbare, con papille localizzate al limbus;
- Mista, con componenti sia alle palpebre sia al limbus.

Sebbene la VKC sia considerata un disordine allergico, eziologia ed immunopatogenesi rimangono poco chiare. Recenti studi hanno suggerito il contributo di

fattori genetici alla patogenesi di questa malattia, ma la caratterizzazione da questo punto di vista è ancora in corso.

La Vernal Keratoconjunctivitis è una patologia presente in tutto il mondo ma si manifesta maggiormente su soggetti che vivono in ambienti caldi e temperati, come il bacino del Mediterraneo, nord e ovest dell'Africa, il Medio Oriente, la penisola dell'Anatolia, la penisola arabica, parti dell'India, il Pakistan, il Giappone, l'America centrale e meridionale [15]. La maggiore prevalenza nelle regioni calde potrebbe essere dovuto a un più elevato livello d'inquinamento atmosferico da pollini e da altri allergeni [14]. Variazioni stagionali, associazione con patologie atopiche e regressione della malattia sono meno comuni in queste regioni.

Uno studio trasversale condotto in Africa orientale ha rilevato che la VKC colpisce più del 5% dei bambini in età scolare [13].

All'interno dell'Unione Europea 38.500 persone circa sono affette da Vernal Keratoconjunctivitis . Si tratta di meno di 1 caso/10.000 persone, pertanto tale patologia è considerata una malattia rara. La presenza della VKC in zone temperate, come il Nord Europa, è correlata con l'immigrazione di bambini africani e asiatici: la prevalenza di VKC, infatti, è dieci volte superiore nella popolazione di origine africana che in quella svedese (rispettivamente 0,1% e 0,01%). Tutto ciò avvalorerebbe l'ipotesi di una base genetica della patologia.

Al fine di ottenere maggiori informazioni sulla presenza di tale patologia in Italia nel 2009 è stata condotta un'indagine conoscitiva dai centri SIPPS-SIAIP tramite questionari compilati da 182 pediatri. Il 75% degli specialisti intervistati aveva avuto in cura almeno una volta pazienti affetti da congiuntivite cronica e

l'85% di questi pazienti era affetto da VKC. Nel nostro Paese la Vernal Keratoconjunctivitis è considerata dai ricercatori una patologia emergente: si calcola, infatti, che in Italia vi siano circa 5000 pazienti affetti, con una maggiore prevalenza nei soggetti di sesso maschile. Gli studi effettuati hanno indicato una storia familiare di atopia nel 35-40% di questi soggetti [16].

La VKC è una malattia principalmente dell'infanzia e delle successive età pediatriche fino all'adolescenza, tuttavia essa è stata segnalata anche in neonati e in pazienti di età superiore a 70 anni. Gli studi effettuati hanno rivelato che circa il 60% dei pazienti ha un'età compresa tra gli 11 e i 20 anni, il 17% tra i 21 e i 30, mentre solo il 6% ha oltre i 30 anni di età [13-17]. Episodi ricorrenti di solito si verificano nel periodo tra i 2 e i 10 anni e spesso si risolvono spontaneamente intorno alla pubertà o comunque entro la seconda decade della vita.

Gli individui di sesso maschile sono colpiti più frequentemente rispetto a quelli di sesso femminile, con un rapporto che va da 4:1 a 2:1 fino alla pubertà, mentre aumenta avvicinandosi a 111:1 dai 20 anni in su [16].

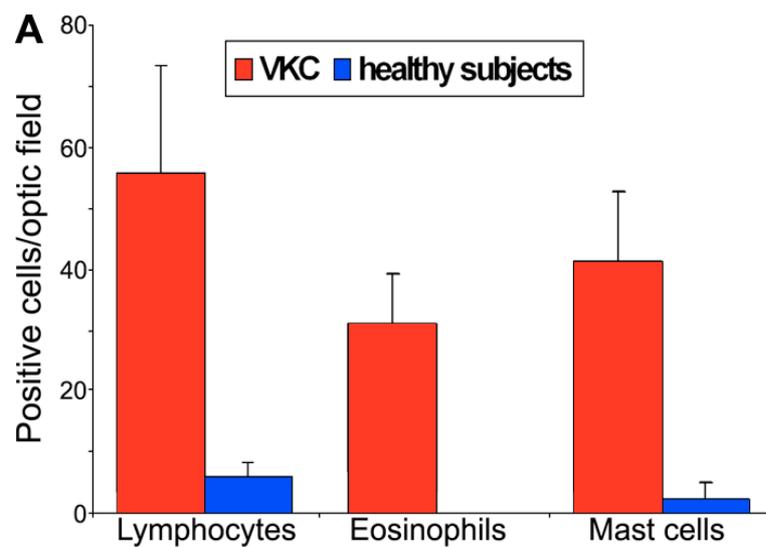
Il meccanismo immunopatogenetico della VKC, come detto precedentemente, è ad oggi poco chiaro sebbene le ricerche effettuate abbiano consentito di fare scoperte che possano portare in futuro ad una comprensione più completa dei meccanismi molecolari di tale patologia.

Ad oggi è noto che l'organismo di pazienti affetti da VKC reagisce attivando meccanismi di difesa immunitaria: in particolare si tratta di una risposta immunitaria specifica nella quale svolgono un ruolo fondamentale i linfociti di tipo Th2. Gli studi effettuati hanno rivelato che linfociti T-helper Th2 sono presenti sia nelle lacrime sia in biopsie congiuntivali dei pazienti affetti dalla

patologia.

Nei pazienti affetti da VKC sono state rilevate molte chemochine, molecole di adesione, citochine e neuropeptidi. Interleukina-5 ed Eosinophil Cationic Protein (ECP) così come i fattori di crescita, in particolar modo il Nerve Growth Factor (NGF) e il Transforming Growth Factor b1 (TGF-b1) sono state individuate nel secreto lacrimale di tali soggetti.

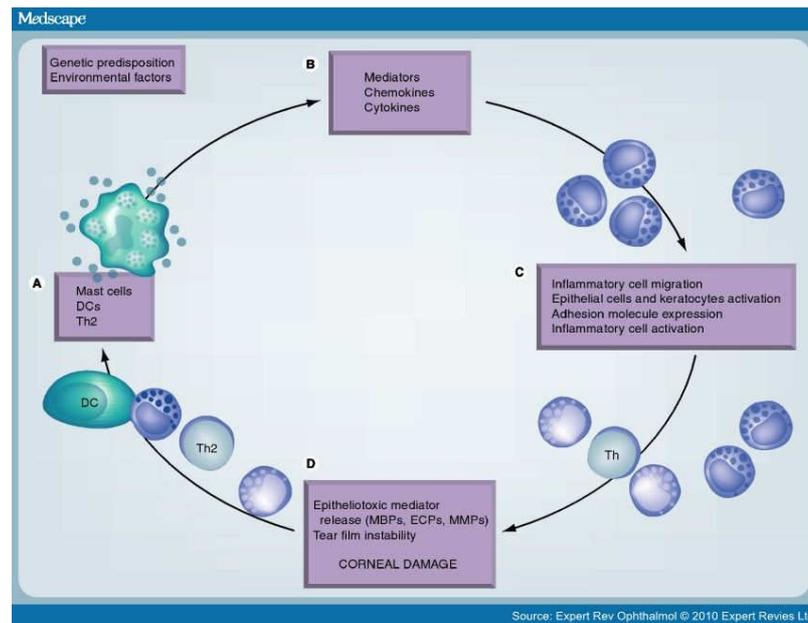
E' stato inoltre dimostrata l'esistenza di una correlazione significativa tra i livelli plasmatici di NGF e il numero aumentato di mastocellule ed eosinofili nella congiuntiva tarsale e bulbare dei soggetti affetti da VKC [16-18].



**Figura 12:** confronto livelli di Linfociti, Eosinofili e Mastocellule tra soggetti sani e soggetti affetti da VKC

La figura 12 mostra come i livelli di linfociti, eosinofili e mastocellule siano molto elevati nella congiuntiva di soggetti che soffrono di Vernal Keratoconjunctivitis mentre bassi, o addirittura assenti nel caso degli eosinofili, nella congiuntiva di soggetti sani. Le ricerche effettuate hanno infine indicato i

probabili steps del meccanismo infiammatorio che sta alla base del tentativo di riparazione tissutale che culmina con i sintomi e i segni della VKC: mastocellule, cellule dendritiche e linfociti Th2 attivati da fattori ambientali, rilasciano mediatori pro-infiammatori ed in particolare citochine e chemochine (figura 13).



**Figura 13:** steps del meccanismo infiammatorio alla base della VKC

Tali mediatori determinano:

- reclutamento di cellule infiammatorie, in particolare di eosinofili
- attivazione di cellule epiteliali e stromali della cornea
- aumento nell'espressione di molecole di adesione
- rilascio di mediatori epitelio-tossici prodotti dagli eosinofili come MBP (major basic protein), ECP (eosinophil cationic protein) ed MMPs (matrix metalloproteinases).

Il rimaneggiamento tissutale, inoltre, sembrerebbe determinato da uno squilibrio

tra le matrix metalloproteinases (MMPs) e i loro inibitori fisiologici, con iperproduzione e successivo deposito di vari tipi di collagene [19].

Il rapporto con l'atopia e la sensibilizzazione IgE è controverso. Secondo una casistica recentemente pubblicata da Ricercatori del Dipartimento di Biomedicina dell'Università di Bari, infatti, solo il 50% dei soggetti affetti da VKC analizzati presentava IgE specifici che per i comuni allergeni [20]. Pucci e collaboratori, inoltre, hanno documentato un diverso livello di sensibilizzazione IgE specifica nelle forme a localizzazione limbare piuttosto che tarsale [21].

Il meccanismo IgE-mediato non spiegherebbe completamente la severità e il decorso clinico della patologia che sembrerebbe essere condizionato anche da risposte cellulo-mediate. Nel 2006 la Società Internazionale delle Malattie Infiammatorie Oculari, alla luce di queste considerazioni, ha proposto la suddivisione delle VKC in forme IgE mediate e non-IgE-mediate [20].

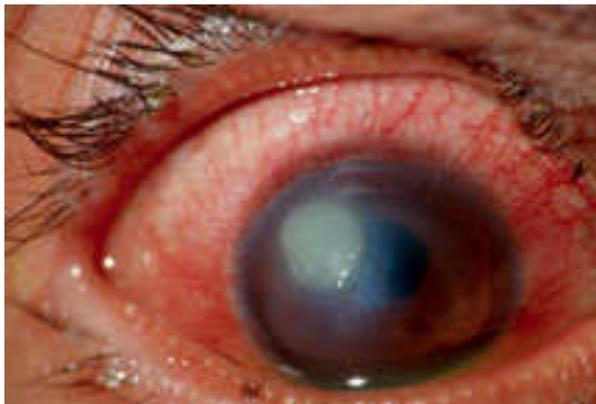
Recentemente Leonardi e collaboratori [22] hanno suggerito un ruolo delle cellule dendritiche in questa malattia, proponendo l'attivazione diretta di cellule dendritiche, dotate di recettori ad alta affinità per le IgE, come meccanismo alternativo capace di innescare la flogosi allergica in pazienti con o senza evidenza di sensibilizzazione IgE-mediata.

La diagnosi differenziale va fatta principalmente con la congiuntivite allergica, stagionale o perenne: tale patologia è generalmente associata a ipersensibilità IgE-mediata ad aeroallergeni, elevati livelli sierici di IgE, e altre malattie allergiche, quali asma e rinite [23]. Bisogna inoltre sottolineare che questa malattia difficilmente porta a complicanze oculari e si giova delle terapie anti-allergiche generali e topiche. La positività ai test cutanei e serici, i test di

provocazione congiuntivali, la correlazione delle conte polliniche con il periodo e l'intensità dei sintomi, infine, ne rendono agevole la diagnosi.

I **sintomi** della VKC sono simili a quelli della congiuntivite allergica, ma molto amplificati. La sintomatologia soggettiva è caratterizzata da:

- prurito e infiammazione provocati dalla degranolazione dei mastociti. Questo fenomeno è a sua volta favorito dal continuo sfregamento delle palpebre dei bambini che avvertono notevole fastidio e bruciore. Tutto ciò spesso porta allo sviluppo di sovra-infezioni batteriche.
- arrossamento (iperemia) e lacrimazione (figura 14)



**Figura 14:** arrossamento (iperemia)

- dolore, che è indice di compromissione corneale
- sensazione di corpo estraneo dovuta all'irregolarità della superficie congiuntivale ed alla secrezione mucosa
- fotofobia, ovvero, difficoltà di adattamento alla luce. Si tratta di un sintomo importante che tende a peggiorare in presenza di vento e

polvere. Quando la fotofobia è molto intensa, è ovviamente necessario escludere una lesione della cornea. Gli occhiali scuri sono indispensabili all'aperto e possono rendersi necessari anche al chiuso. Nei casi più gravi i bambini affetti da VKC sono costretti a vivere praticamente al buio, senza poter svolgere le normali attività dei loro coetanei.

- secrezione mucoide spessa e filamentosa
- lunghezza delle ciglia palpebrali superiori maggiore rispetto a quella della popolazione sana, con modificazione in corso di terapia. Da uno studio effettuato da Pucci e coll. nel 2005 [24] risulta che bambini affetti da tale patologia hanno le ciglia superiori significativamente più lunghe di controlli appaiati per sesso ed età.

I principali **segni oculari** che devono indurre a pensare alla VKC sono:

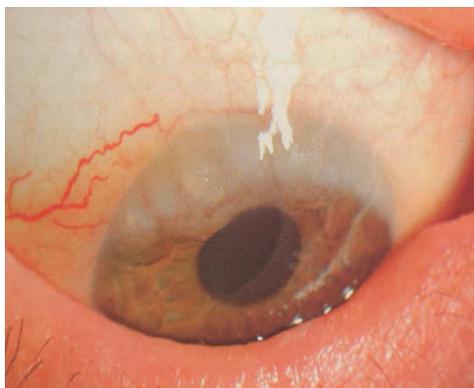
- interessamento bilaterale, generalmente con maggiore coinvolgimento di un occhio;
- intensa iperemia congiuntivale e pericheratica;
- papille giganti sulla congiuntiva tarsale (figura 15);
- ipertrofia papillare
- papille al limbus (figura 16)
- congiuntivite limbare superiore
- ulcere corneali “a scudo”

La diagnosi della VKC viene effettuata in base alla valutazione di un diario-score sintomatologico (SS) compilato dai genitori dei piccoli, ed un diario-score obiettivo (SO) compilato dall'oculista, ciascuno con un punteggio da 0 “assente” a 2 “severo”, in base alla presenza ed alla gravità dei sintomi e segni soggettivi ed

oggettivi precedentemente elencati. I bambini vengono considerati affetti da una forma grave di VKC se lo score, valutato dallo specialista immuno-allergologo e dal pediatra, è uguale a 3 punti per occhio o maggiore, in ciascun diario.



**Figura 15:** Papille giganti sulla congiuntiva tarsale superiore (VKC tarsale o palpebrale)



**Figura 16:** Papille al limbus (VKC bulbare o limbare)

Gli **elementi anamnestici e clinici**, infine, che devono indurre alla diagnosi di VKC sono:

- l'età all'esordio (3-8 anni nel 70-80% dei casi);

- l'andamento tipicamente stagionale primaverile-estivo, ma soprattutto il perdurare e l'aggravarsi dei sintomi in estate, aspetto assente nella congiuntivite allergica da pollini, che è invece caratterizzata da una risoluzione rapida della sintomatologia alla fine della primavera;
- l'inefficacia dei comuni trattamenti antiallergici, somministrati sia per via oculare che per via generale, nelle forme più gravi della patologia;
- la dipendenza dai corticosteroidi, unici farmaci in grado di controllare la malattia efficacemente. Esistono terapie per prevenire le ricadute e controllare le fasi attive della malattia la cui sicurezza ed efficacia deve essere migliorata.

Nelle forme lievi o moderate può essere sufficiente il **trattamento antistaminico topico** (ketotifene, olopatadina, azelastina) prima del previsto esordio dei sintomi, associato a brevi cicli di corticosteroidi.

Oltre agli antistaminici, sono stati utilizzati anche inibitori della degranulazione mastocitaria (disodiocromoglicato, nedocromile) e farmaci antinfiammatori non-steroidi. Questi trattamenti sono utili soprattutto nelle fasi iniziali e finali della malattia. È opportuno valutare l'efficacia di tali farmaci nei singoli pazienti, prendendo successivamente in considerazione l'impiego di immunosoppressori per via topica.

I **preparati cortisonici** per uso topico (clobetasone, rimexolone, desonide, fluorometolone, loteprednol, desametasone) sono certamente efficaci, ma per gli effetti collaterali nell'impiego a lungo termine sono da utilizzare per cicli brevi (7-15 giorni), ripetibili 3-4 volte l'anno.

I cortisonici locali sono utili, in associazione con la ciclosporina topica, in caso di

lesioni corneali acute, in cui è necessario evitare rischi di esiti cicatriziali corneali permanenti. Poiché la fase acuta della VKC si svolge generalmente nell'arco di 5-6 mesi l'anno, la terapia con soli cortisonici topici è improponibile, se non correndo il rischio di gravi effetti collaterali (cheratite erpetica sovrapposta, infezioni batteriche, ipertensione oculare, glaucoma, cataratta).

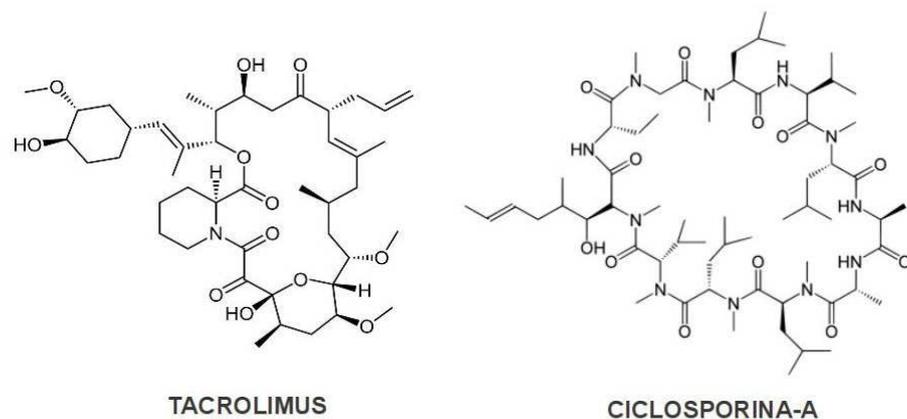
La **ciclosporina A** (figura 17) in concentrazione dall'1% al 2% per via oculare è stata utilizzata in vari trials in doppio cieco contro placebo, dimostrandosi molto efficace nei casi di VKC moderata e severa senza reazioni avverse significative dalla fine degli anni Ottanta e nelle ultime due decadi [16-25-26]. La firma di un consenso informato scritto, è indispensabile in quanto il farmaco non è registrato per il trattamento della VKC, tanto meno in formulazione per via oculare.

Un'importante ricerca è stata condotta dai ricercatori dell'Università di Bari su 197 bambini affetti da VKC severa, i quali hanno ricevuto ciclosporina topica all'1% per 4 mesi. Dai risultati ottenuti i ricercatori sono arrivati alla conclusione che la terapia della VKC severa con tale farmaco può essere considerata la più efficace e sicura in età pediatrica, sicuramente preferibile al trattamento con colliri cortisonici per i noti effetti indesiderati, e in grado di diminuire per frequenza e gravità le recidive negli anni successivi. Una concentrazione di ciclosporina superiore fino al 2%, inoltre, può essere riservata ai casi particolarmente gravi e complicati.

Tale farmaco inibisce l'attivazione dei linfociti T, con interferenza sui meccanismi di ipersensibilità cellulo-mediata [27], può interferire con le reazioni di ipersensibilità legate alla degranolazione delle mastcellule, con conseguente

effetto anti-pruriginoso; inibisce la produzione di IL-2 e dei suoi recettori; riduce il livello di ECP e di eosinofili nelle lacrime, responsabili della formazione delle papille giganti e delle lesioni corneali nella VKC; controlla rapidamente la flogosi e consente una riduzione dell'utilizzo di steroidi in oltre il 75% dei pazienti trattati fin dal settimo giorno di terapia. Il ciclo di cure ha una durata che va dai 4 ai 6 mesi, in modo da evitare possibili recidive.

Esiste una percentuale di pazienti variabile dall'8 al 15% che è sostanzialmente resistente al trattamento con ciclosporina, almeno per i 3-4 mesi centrali del periodo primaverile-estivo. Nei casi più gravi, resistenti alla ciclosporina sono in corso studi di efficacia e sicurezza di un trattamento con **tacrolimus** (o FK506) (figura 17) per via oculare, che finora hanno dato esiti favorevoli [25], tanto che il tacrolimus è stato dichiarato farmaco orfano per la VKC dall'EMA (European Medicines Agency).



**Figura 17:** strutture di tacrolimus e ciclosporina A

La **terapia sistemica** con antistaminici per via orale e con Immunoterapia Specifica (ITS), infine, possono essere utili nel trattare i sintomi sistemici, mentre sono poco efficaci sui sintomi locali.

## 1.4. La Tecnologia iTRAQ

Nell'arco degli ultimi anni all'interno della comunità scientifica è nato un crescente interesse verso lo sviluppo di tecnologie che consentissero l'analisi dell'espressione differenziale delle proteine. A tal scopo sono state brevettate diverse metodiche ma le tecniche più precise sono quelle basate sul così detto Isotopic Labeling (marcatura isotopica). Le metodiche di Isotopic Labeling che hanno destato maggiore interesse sono la tecnologia iTRAQ, la procedura SILAC (Stable Isotope Labelling by Amino acid in cell culture) ed il metodo iCAT (Isotope-Coded Affinity Tagging).

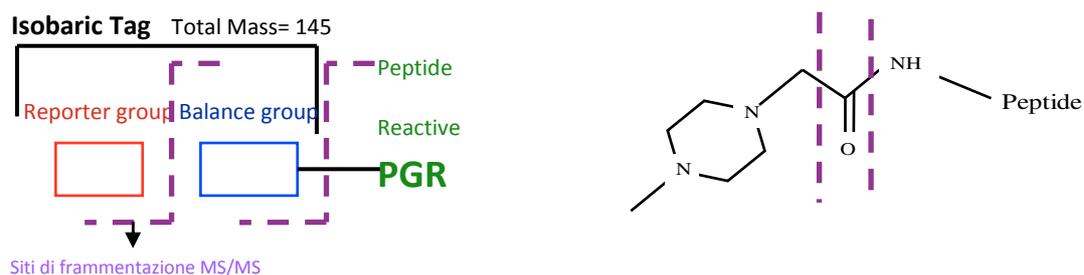
In particolare per il mio lavoro di tesi è stata impiegata la tecnologia iTRAQ (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation), che ha guadagnato notevole popolarità negli ultimi anni in parte dovuta al fatto che questa tecnica può essere utilizzata per tutte le fonti di proteine [28]. La tecnologia iTRAQ è l'unico metodo quantitativo che ha la proprietà di consentire la marcatura di quattro campioni simultaneamente, due campioni di controllo e due campioni patologici, rendendo dunque più veloci le analisi. La procedura iTRAQ è stata eseguita secondo il protocollo fornito dalla Applied Biosystems: *iTRAQ Reagents Methods Development Kit*.

L'iTRAQ è un reagente non-polimerico costituito da un Reporter group, un Balance Group e un gruppo peptidico reattivo (PGR):

- il Reporter group è arricchito con  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  (al fine di ottenere un reporter group con massa variabile fra 114 e 117);
- Il Balance Group è un gruppo carbonilico arricchito con  $^{13}\text{C}$  e  $^{18}\text{O}$ . La sua massa varia tra 31 e 28 in modo da assicurare che la combinazione tra le

masse del Reporter Group e del Balance Group stesso rimangano costanti a 145 Da. Si parla pertanto di tag isobarico;

- Il gruppo peptidico reattivo (PGR) lega il reagente iTRAQ così composto ad ogni catena laterale di lisina ed ogni gruppo N-terminale dei peptidi triptici (figura 18).



<b>m/z = 114 (<sup>13</sup>C)</b>	<b>m/z = 31 (<sup>13</sup>C, <sup>18</sup>O)</b>	<b>Tot.Mass= 145</b>
<b>m/z = 115 (<sup>13</sup>C<sub>2</sub>)</b>	<b>m/z = 30 (<sup>18</sup>O)</b>	<b>Tot.Mass= 145</b>
<b>m/z = 116 (<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N)</b>	<b>m/z = 29(<sup>13</sup>C)</b>	<b>Tot.Mass= 145</b>
<b>m/z = 117 (<sup>13</sup>C<sub>3</sub>, <sup>15</sup>N)</b>	<b>m/z = 28</b>	<b>Tot.Mass= 145</b>

**Figura 18:** reagenti iTRAQ legati ad un generico peptide

Due campioni di controllo e due campioni incogniti sono stati sottoposti parallelamente al trattamento iTRAQ. E' importante utilizzare due controlli per accertarsi che non ci siano variazioni sostanziali nel profilo proteomico dei pazienti non affetti da patologia.

Il trattamento delle lacrime è stato articolato in diverse fasi.

- Denaturazione delle proteine con sodio dodecilsolfato (SDS) al 2%;
- Riduzione dei loro legami sulfidrilici con ditiotreitolo (DTT);

- Blocco cisteine con Metilmetantiosolfonato (MMTS) in modo da evitare che si riformino i ponti disolfuro;
- Digestione delle proteine con tripsina per spettrometria di massa Gold

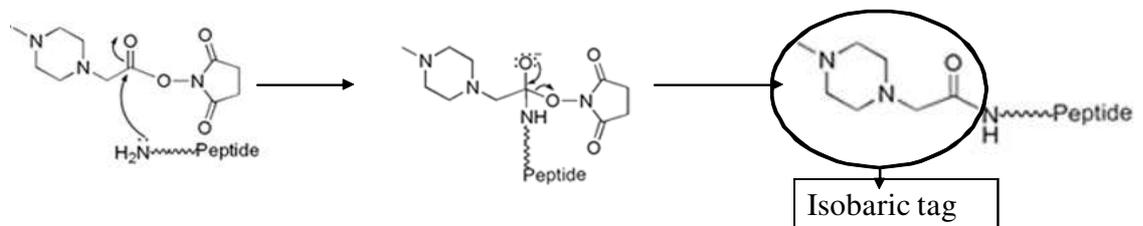
La tripsina è l'enzima più usato in proteomica per due fondamentali ragioni:

1. idrolizza specificamente il legame peptidico degli amminoacidi arginina-lisina
2. i frammenti peptidici ottenuti hanno un range di  $m/z$  che varia tra 800 e 3000 per cui gli spettri ottenuti con il MALDI avranno dei picchi intensi e ben risolti.

Dal momento che la tripsina presenta legami Arg-Lys ed è in eccesso rispetto al campione, durante la reazione di idrolisi prevarrebbe l'autodigestione della tripsina stessa. Per tale ragione si è preferito utilizzare la tripsina Gold in quanto è una tripsina trattata: tutti i residui di lisina presenti nella sequenza aminoacidica, infatti, sono acetilati in modo da evitare l'autolisi a livello dei legami Arg-Lys dell'enzima stesso.

- Marcatura dei peptidi derivanti dalla digestione triptica con reagenti iTRAQ diversi (114, 115, 116 e 117);

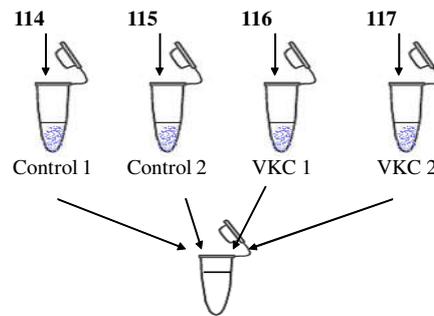
In figura 19 è schematizzata la reazione di marcatura isotopica con iTRAQ dei peptidi triptici.



**Figura 19:** marcatura dei peptidi triptici con reagente iTRAQ

Si tratta di una sostituzione nucleofila al carbonile in cui il gruppo amminico del peptide rimpiazza il gruppo ossisuccinimmidico che è un ottimo gruppo uscente.

- Ricombinazione dei quattro campioni in un'unica miscela (figura 20).



**Figura 20:** ricombinazione dei campioni in un'unica sample mixture

I frammenti peptidici sono stati separati tramite un sistema  $\mu$ HPLC DIONEX (LC Packings) e successivamente analizzati mediante lo spettrometro di massa MALDI TOF/TOF 4800. La marcatura degli stessi peptidi con i 4 reagenti iTRAQ, grazie all'Isobaric tag, determina la formazione di peptidi isobari che sono raccolti nella stessa frazione del MALDI plate. Sullo spettro MS si registreranno pertanto segnali intensi dati dalla somma dei segnali di 4 peptidi isobari determinando dunque un importante vantaggio per il ricercatore. Quando i peptidi marcati vanno incontro a frammentazione MS/MS, i gruppi di reporter di massa differente (114-115-116-117 m/z) saranno visibili nella zona dello spettro a basso mass range che è una regione pulita, priva di altri segnali derivanti dalla frammentazione dei peptidi per cui il riconoscimento è più semplice. Ciò è dovuto al fatto che nessun amminoacido presenta massa tra 114 e 117.

Tramite la tecnologia iTRAQ sarà possibile effettuare un'analisi

quantitativa delle proteine: la concentrazione relativa dei peptidi di interesse sarà ricavata dal rapporto tra area del picco dello ione reporter di un campione patologico e quella di un campione di controllo. Sarà dunque possibile evidenziare le differenze nei livelli di specifiche proteine in termini di up o down-regulation.

Un importante vantaggio della tecnologia iTRAQ rispetto a tecniche che non utilizzano l'Isobaric Tag, è l'incremento di "precisione". Con tale termine si fa riferimento alla riproducibilità delle misure di abbondanza relativa dei peptidi dovuta al fatto che l'analisi quantitativa è eseguita a livello degli spettri di frammentazione (MS/MS scans). L'utilizzo di tale strategia consente inoltre di ridurre le impurezze introdotte durante la preparazione del campione [29] che possono essere comunque corrette grazie all'ausilio di programmi per l'analisi dei risultati come Protein Pilot;

Bisogna ricordare che la tecnologia iTRAQ ha anche destato interesse rispetto alla sua accuratezza nella stima dell'espressione differenziale delle proteine presenti in miscele complesse. Il termine "accuratezza" si riferisce alla vicinanza del valore registrato al valore reale. L'iTRAQ permette di misurare differenze in espressione che abbracciano due ordini di grandezza [29]. Tuttavia l'utilizzo di un'altra tecnologia, quella dei microarray consente di abbracciare differenze in espressione di tre o addirittura quattro ordini di grandezza [30]. Dal punto di vista tecnico dunque questa può essere vista come una limitazione della procedura iTRAQ nell'ambito della proteomica quantitativa [31-32]. Infine bisogna dire che la tecnologia iTRAQ sconta un ulteriore limite dato dalla presenza di interferenze che si verificano durante la selezione precursore, un problema che attualmente è molto difficile da ridurre al minimo [29].

## **2. MATERIALI E METODI**

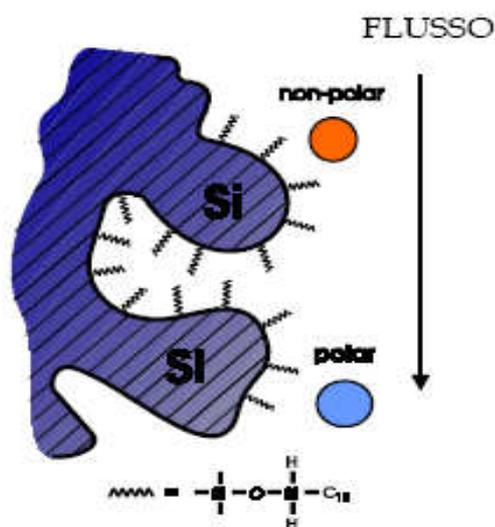
### **2.1. Frazionamento della componente proteica mediante HPLC in fase inversa**

L'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) è una tecnica analitica di separazione ampiamente utilizzata per scopi qualitativi e quantitativi. Si tratta di uno strumento di analisi rapido, di facile impiego e soprattutto versatile. Tale tecnica consente la separazione delle proteine presenti nei fluidi biologici in pochi minuti.

Durante il presente lavoro di tesi, per la separazione dei peptidi del film lacrimale di soggetti sani e soggetti affetti da VKC, è stata impiegata la cromatografia di ripartizione a fase inversa. Tale procedura, infatti, rappresenta il metodo migliore per l'analisi di miscele di peptidi molto complesse grazie al gran numero di parametri su cui è possibile operare. Tale tecnica si basa sulla differenza dei coefficienti di ripartizione,  $K_d$ , degli analiti.

Nella *cromatografia a fase inversa* la fase stazionaria è non polare mentre la fase mobile è relativamente polare. I peptidi vengono più o meno trattenuti in funzione dei loro diversi coefficienti di distribuzione tra le due fasi. L'eluizione in particolare avviene in ordine di polarità decrescente: i peptidi più polari pertanto saranno i primi ad apparire sul cromatogramma (figura 21).

In particolare è stata impiegata una colonna Atlantis C18 fornita dalla Waters. La fase stazionaria presente in colonna è costituita da catene alchiliche idrofobiche di tipo octadecile legate in modo covalente ai gruppi silanolici della fase silicea che funge da supporto.

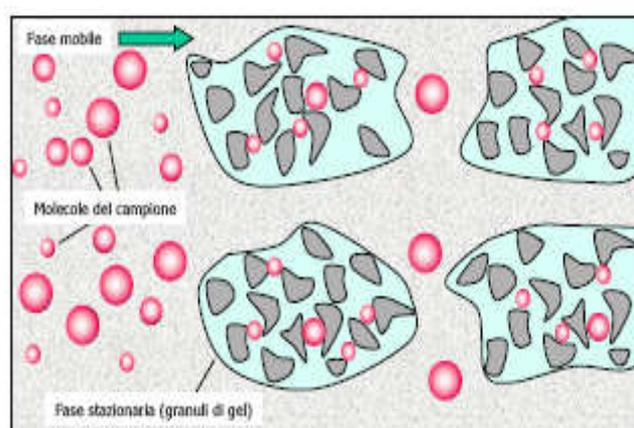


**Figura 21:** eluizione dei peptidi tramite cromatografia a fase inversa

Il meccanismo di separazione in RP-HPLC è basato sull'instaurarsi di interazioni idrofobiche tra i peptidi e la fase stazionaria apolare (figura 22). La separazione è stata realizzata tramite *eluizione a gradiente* impiegando come solventi acqua+ 0.05% TFA (solvente A) e Acetonitrile + 0.05% TFA (solvente B) che differiscono in maniera significativa nella loro polarità. La proporzione in cui sono miscelati i due eluenti varia durante la corsa cromatografica secondo un particolare gradiente di concentrazione.

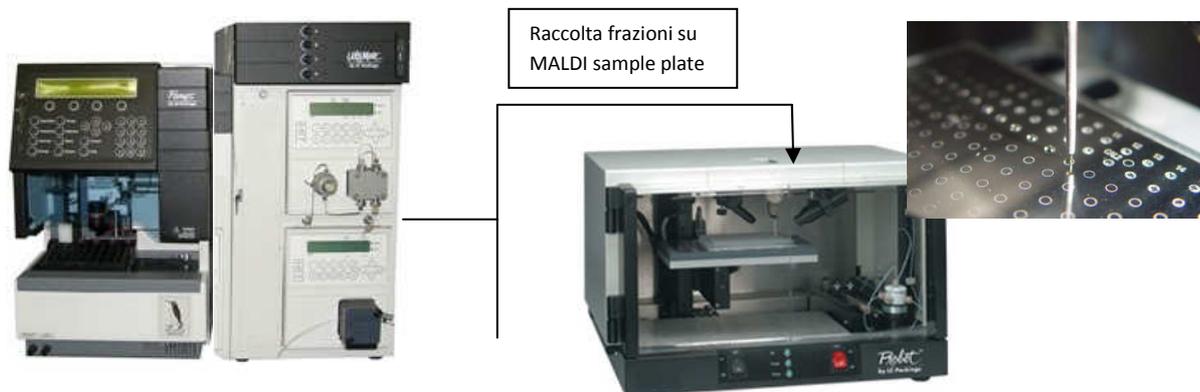
Il sistema separa i peptidi in base alle loro caratteristiche idrofile/lipofile. I peptidi meno lipofili saranno i primi ad essere eluiti perché più affini alla fase mobile con un'alta percentuale di acqua. L'aumento della percentuale di Acetonitrile durante la corsa cromatografica rende la fase mobile sempre più competitiva rispetto alla fase stazionaria lipofila. Cresce così la forza eluente necessaria per estrarre i soluti più fortemente trattenuti dalla fase stazionaria perché lipofili. La presenza di TFA è fondamentale in quanto tale acido aumenta

l'efficienza di separazione dei peptidi: in particolare consente di mantenere i peptidi in una forma ionica ben definita e di tenere protonati i gruppi silanolicci liberi della silice, evitando così interazioni ioniche tra gli analiti e la fase stazionaria. L'acido trifluoroacetico, inoltre, non assorbe all'UV ed è un solvente eccellente per i polipeptidi.



**Figura 22:** separazione mediante HPLC in fase inversa

Lo strumento impiegato per la realizzazione delle ricerche è un sistema nano-HPLC- ( $\mu$ HPLC) LC Packings fornito dalla DIONEX. Tale strumento è designato per l'uso di micro e nano colonne per HPLC e consente di ottenere velocità di flusso che vanno dall'ordine dei nL/min a quello dei  $\mu$ L/min. Esso fornisce eccellente sensibilità, riproducibilità, efficienza di separazione ed è inoltre molto semplice da utilizzare. Il sistema comprende: un Autocampionatore *Famos*, un  $\mu$ HPLC system *Ultimate* collegato ad un micro rivelatore UV ed equipaggiato con un collettore di microfrazioni *Probot*. Il sistema viene gestito tramite l'ausilio del software *Chromeleon*<sup>TM</sup> Chromatography Management System che è un'applicazione di Windows (figura 23).



**Figura 23:**  $\mu$ HPLC DIONEX e Probot

Per ogni analisi è stato impiegato un volume di 20  $\mu$ L di analita. Tale volume di campione, depositato su una posizione definita del well plate del Famos, viene caricato in testa alla colonna tramite l'ausilio dell'autocampionatore.

Il *Famos* possiede una valvola dotata di un capillare anulare (loop) e un dispenser a siringa che controllano il prelievo di campione. A seconda del loop montato varia il volume del campione iniettato in colonna. Inoltre è possibile selezionare due differenti modalità di iniezione:

- Full loop: Il sample loop viene riempito per intero con il campione; tale modalità di lavoro consente di ottenere un'ottima riproducibilità.
- Partial loop: Il sample loop viene parzialmente riempito con il campione; tale modalità consente una perdita minima di campione e permette di utilizzare un volume programmabile di campione;

In particolare durante il mio lavoro di tesi è stato impiegato un loop da 1  $\mu$ l ed è

stata scelta la modalità di iniezione Full loop.

L'autocampionatore *Famos* utilizza una siringa per aspirare il campione (circa 10  $\mu$ l impiegando le condizioni sperimentali appena descritte) che viene immesso nel sample loop e da qui caricato in testa alla colonna analitica. Il dispositivo è inoltre equipaggiato con un buffer tubing che si trova tra la siringa e la valvola di iniezione che consente di eliminare i contaminanti. Per rimuovere il campione dal buffer tubing e dal sample needle e per il successivo lavaggio di tali dispositivi viene effettuata una fase di Wash tramite l'impiego di MeOH al 100%.

Il  $\mu$ HPLC System *Ultimate* è un sistema integrato che consta dei seguenti moduli:

1. UltiMate Solvent Organizer
2. UltiMate Micropump con la testa della  $\mu$ -pompa
3. UltiMate UV Detector

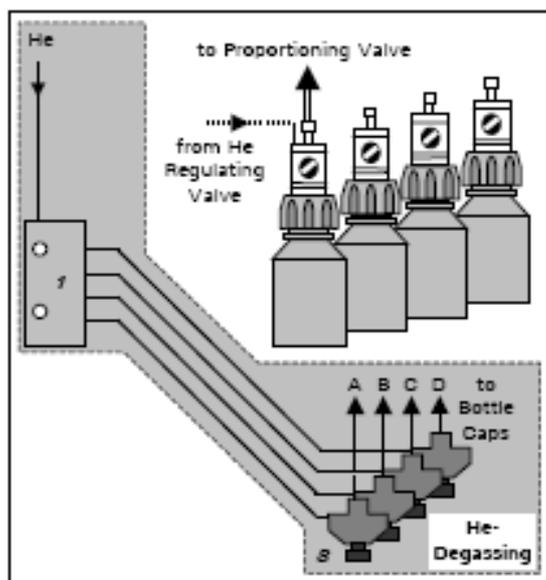
L'Ultimate Solvent Organizer è equipaggiato con quattro contenitori in vetro contenenti 500 ml o più di solvente. La macchina è provvista di un sistema per degassare i solventi, in cui un gas non solubile nel solvente da degassare (elio) viene fatto gorgogliare all'interno del contenitore per portare via i gas disciolti (figura 24).

Questa operazione è fondamentale in quanto la preparazione della soluzione e la sostituzione di un contenitore di solvente producono bolle e scorie che se entrassero in colonna potrebbero causare uno slargamento dei picchi cromatografici alterando così il potere di risoluzione della colonna; ma soprattutto si determinerebbe una compromissione dell'efficienza del sistema di pompaggio.

Ogni contenitore viene degassato indipendentemente tramite l'apertura di

un'apposita valvola.

La Micropompa UltiMate è una moderna pompa ad alta pressione progettata in modo da rilasciare un flusso costante e lineare di fase mobile producendo una bassissima pulsazione residua. Il flusso di fase mobile può variare in un range compreso tra 0.001 e 0.500 mL/min. Si tratta in particolare di una pompa a pistone costituita, cioè, da una piccola camera cilindrica che è riempita e vuotata dal movimento di un pistone. All'interno del  $\mu$ HPLC system *Ultimate* è presente un alloggiamento per la colonna analitica.



**Figura 24:** Ultimate Solvent Organiser

Come precedentemente accennato il frazionamento dei peptidi è stato realizzato tramite l'ausilio di una colonna Atlantis C18 fornita dalla Waters. Si tratta di una colonna in acciaio inossidabile capace di sopportare pressioni fino a 500 atmosfere. La lunghezza della colonna è di 15 cm ed il suo diametro interno è

pari a 300  $\mu\text{m}$ . Si tratta di colonne costose e che possono essere facilmente degradate da impurità presenti nel campione e nei solventi. Pertanto è molto importante assicurare l'eliminazione di eventuali impurezze degassando i solventi con elio. L'impiego di una colonna per Micro HPLC è indispensabile in quanto essa permette di ottenere un aumento notevole nella sensibilità delle analisi rispetto ad una colonna standard per HPLC e dunque di superare la limitazione legata al quantitativo di campione a disposizione. Dimezzando il diametro interno della colonna analitica, infatti, la sensibilità del sistema aumenta di quattro volte (aumento quadratico della sensibilità): una colonna con diametro interno pari a 300  $\mu\text{m}$  ha dunque una sensibilità trecentoventicinque volte maggiore rispetto ad una colonna classica per HPLC con diametro interno pari a 4.6 mm. L'impiego di colonne per nano-HPLC con diametro interno pari a 75  $\mu\text{m}$  consentirebbe di ottenere una sensibilità tremilaottocentovolte volte maggiore di una colonna tradizionale (figura 25).

Ulteriori vantaggi dell'impiego di una colonna per Micro HPLC sono:

- riduzione considerevole dell'impiego di solventi organici rispetto alle colonne tradizionali,
- maggiore efficienza di separazione e dunque una migliore risoluzione dei picchi.

Il materiale usato per impaccare la colonna è la silice preparata per agglomerazione di particelle di diametro inferiore al micron sotto condizioni che portano a particelle più grandi con diametri altamente uniformi.

Le particelle risultanti, che hanno una distribuzione particellare di 3  $\mu\text{m}$  ed un diametro di 100 Å, sono rivestite da un sottile film di composti organici (gruppi

alchil-silanici a 18 atomi di carbonio) legati alla superficie tramite legami chimico-fisici.

Concentration Factor	
Concentration:	$(d \text{ standard} / d \text{ micro})^2$
Capillary:	$(4.6/0.3)^2 = 235 \text{ x}$
Nano LC	$(4.6/0.075)^2 = 3800 \text{ x}$

**Figura 25:** legame tra diametro della colonna impiegata e sensibilità

La reazione di derivatizzazione è una sostituzione nucleofila che avviene tra i gruppi OH della silice e l'atomo di Silice del tricloroalchilsilano (figura 26).

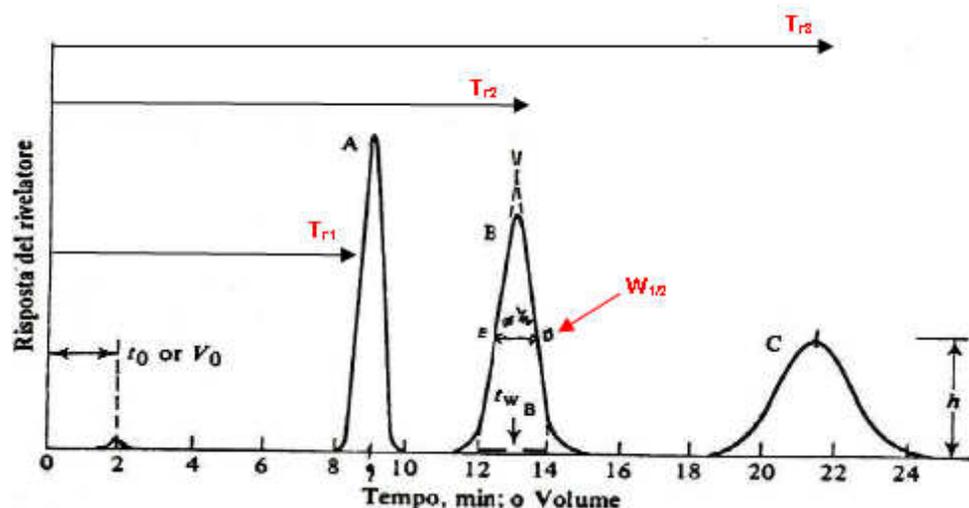
L'impiego di tale colonna consente di ottenere una velocità di flusso della fase mobile di 2-4  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

La separazione cromatografica, come già elucidato, avviene secondo eluizione a gradiente impiegando  $\text{H}_2\text{O} + 0,05\% \text{ TFA}$  (solvente A) e  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,05\% \text{ TFA}$  (solvente B) (figura 27). Durante il mio lavoro di tesi sono state effettuate corse cromatografiche dei medesimi campioni impiegando diversi gradienti di eluizione. Dai risultati ottenuti si è rilevato che il migliore profilo di separazione era ottenuto impiegando le seguenti condizioni: il solvente B al tempo iniziale è al 2%, durante l'analisi aumenta gradualmente fino al 60% per poi



della luce ultravioletta o della luce visibile da parte del campione. Si tratta di uno spettrofotometro a scanning rapido che può monitorare quattro differenti lunghezze d'onda allo stesso tempo. La sorgente impiegata è costituita da filamenti in tungsteno equipaggiati con filtri di interferenza che eliminano le radiazioni indesiderate. L'analisi degli spettri di assorbimento UV, che va dai 200 ai 280 nm, è molto utile in quanto molti dei gruppi funzionali dei composti organici assorbono in questa zona. In particolare, nel mio lavoro di tesi, la lunghezza d'onda del rivelatore UV è stata impostata a 214 nm.

Il grafico prodotto dal registratore, detto cromatogramma, mette in relazione l'intensità del segnale del rivelatore con il tempo d'analisi (figura 28).



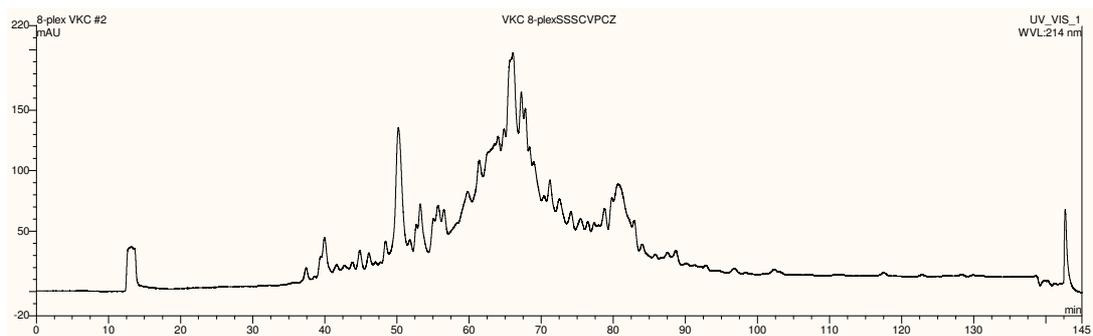
**Figura 28:** parametri valutabili dal cromatogramma

Il cromatogramma consiste in una serie di picchi di assorbimento che rappresentano i peptidi separati dal processo cromatografico. Il tempo che ogni peptide della miscela impiega per uscire dalla colonna (tempo di ritenzione  $t_r$ ) può

fornire una prima indicazione per facilitare l'analisi qualitativa dei campioni: esso infatti dipende dalle interazioni che i peptidi instaurano con le fasi mobile e stazionaria.

Le aree dei picchi infine permettono di ottenere qualche informazione in merito all'analisi quantitativa dei campioni. Il segnale generato dal rivelatore UV all'uscita della colonna è, infatti, proporzionale all'assorbimento della radiazione da parte dei peptidi.

In figura 29 è mostrato un tipico cromatogramma di un campione di fluido lacrimale di due soggetti sani e due soggetti affetti da VKC che sono stati sottoposti a trattamento iTRAQ. Il cromatogramma è molto complesso in quanto il fluido lacrimale è composto da migliaia di peptidi triptici. Pertanto dalla sua analisi è possibile ottenere solo una prima indicazione relativa al tempo di eluizione dei vari peptidi ma per la loro caratterizzazione è necessario effettuare l'analisi dei campioni mediante spettrometria di massa.



**Figura 29:** cromatogramma di una miscela di peptidi ottenuti tramite procedura iTRAQ

## 2.2. Collettore di microfrazioni probot

Il collettore di microfrazioni *Probot* è un dispositivo progettato per la raccolta ad alta precisione delle microfrazioni di campione che eluiscono dal sistema di cromatografia liquida nanocapillare (figura 30). Le microfrazioni che eluiscono dalla colonna analitica vengono perfettamente miscelate all'interno del dispositivo con una soluzione di matrice che gioca un ruolo chiave nel processo di ionizzazione del campione. In particolare per l'analisi dei campioni oggetto del mio lavoro di tesi è stata impiegato l'acido  $\alpha$ -ciano-4 idrossicinnamico (CHCA) che è la matrice più utilizzata nell'ambito degli studi di proteomica in quanto consente un'efficiente ionizzazione di proteine e peptidi con peso molecolare minore di 10.000 Da. Tale miscela viene depositata per contatto tramite un ago su una piastrina metallica MALDI sotto forma di spot di volume nell'ordine di pochi microlitri depositando uno spot ogni quattro secondi.



**Figura 30:** collettore di microfrazioni Probot

Tale processo determina una dispersione cromatografica minima (dead time pari a

zero) consentendo di mantenere l'alta risoluzione del sistema di separazione microLC. Raccogliere questi piccoli volumi è indispensabile per evitare di miscelare nuovamente peptidi già separati e quindi di vanificare la separazione cromatografica. Inoltre creare spot di tale volume rende più agevole il processo di ionizzazione, aumentando la sensibilità nella registrazione degli spettri.

Il collettore di microfrazioni *Probot* LC Packings è un sistema robotico ad alta precisione. Tale strumento, grazie alla sua accuratezza e flessibilità, rappresenta l'interfaccia ideale per le analisi LC/MALDI-MS/MS permettendo di integrare l'elevato potere separativo della  $\mu$ HPLC e l'eccellente risoluzione dello spettrometro di massa.

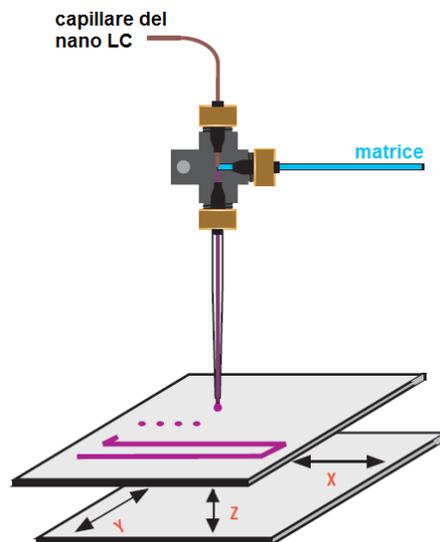
Il Probot viene gestito tramite l'ausilio del software  $\mu$ Carrier che consente di programmare efficientemente il processo di microfrazionamento. Un'interfaccia grafica, chiara e semplice da usare, mostra tutte le informazioni necessarie su una finestra.

In particolare tale software consente di impostare i tempi di inizio e di fine della raccolta degli spot ed il tempo che intercorre tra la deposizione di uno spot e l'altro, controllando così il loro volume. Scegliere la frequenza di spotting è molto importante: nell'analisi di campioni molto complessi come il fluido lacrimale, infatti, è consigliabile ridurre il tempo di permanenza dell'ago sulla piastrina creando spot di piccolo volume in modo che i peptidi siano distribuiti in più spot adiacenti e l'analisi dei picchi allo spettrometro di massa sia più agevole. Inoltre il  $\mu$ Carrier consente di progettare il numero e la geometria della deposizione degli spot sulla piastra relativi ad ogni corsa cromatografica.

La geometria di deposizione viene realizzata creando un percorso definito

dall'utente, tramite spostamenti molto precisi del tray, cioè una piastra livellata collegata ad un braccio meccanico, su cui viene allocata la piastrina MALDI. Il needle, invece, rimane in posizione fissa al fine di limitare l'azione di forze capillari e di minimizzare il volume morto (dead-volume) evitando il rimescolamento delle frazioni all'uscita della colonna.

Il tray effettua movimenti di  $\pm 2.5 \mu\text{m}$  sulle tre coordinate del piano cartesiano con dimensioni  $X = 195 \text{ mm}$ ,  $Y = 130 \text{ mm}$ ,  $Z = 95 \text{ mm}$  (figura 31). Tramite tale strumento è possibile raggiungere qualsiasi punto della piastra metallica ed ottenere, come accennato precedentemente, uno spotting ad alta precisione di pochi microlitri della miscela campione-matrice. Grazie a tale eccellente precisione sulla piastrina MALDI possono essere caricati centinaia di spot adiacenti facilitando così l'analisi mediante spettrometria di massa.



**Figura 31:** Deposizione degli spot sul Maldi plate

### 2.3. Analisi tramite spettrometria di massa

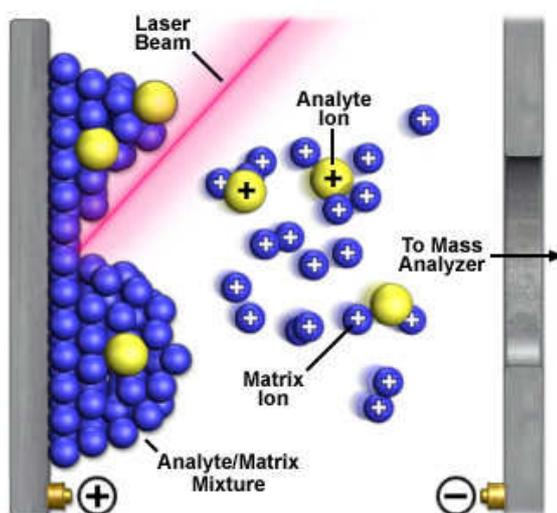
Le frazioni peptidiche depositate sulla piastrina MALDI tramite il collettore di microfrazioni *Probot* sono state successivamente analizzate mediante lo spettrometro di massa *MALDI TOF/TOF 4800* fornito dalla *Applied Biosystem*.

La spettrometria di massa MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) è una tecnica sviluppata alla fine degli anni 80 che si basa su desorbimento e ionizzazione mediante un laser ad impulsi ed appartiene alle cosiddette tecniche di ionizzazione “*soft*”. Lo sviluppo della tecnologia MALDI ha portato una rivoluzione nelle applicazioni della spettrometria di massa in quanto ha permesso di effettuare analisi di molecole non volatili e con bassa stabilità termica quali sono le biomolecole determinando così l’inizio dell’era della cosiddetta spettrometria di massa biologica. Tali tecniche si basano sul desorbimento, cioè sull’evaporazione del campione da una superficie e sulla sua successiva ionizzazione.

La piastrina MALDI su cui sono depositati gli spot costituiti dalla miscela campione-matrice viene inserita nella camera di ionizzazione tramite un sistema di introduzione del campione (*sample inlet*). All’interno della camera di ionizzazione i singoli spot sono sottoposti ad irradiazione con luce laser YAG. Il campione si trova immerso in una matrice di acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico che ha un elevato coefficiente di estinzione molare alla frequenza di 355 nm a cui opera il laser impiegato. La matrice permette il desorbimento e la ionizzazione del campione intatto. La matrice di acido  $\alpha$ -ciano-4 idrossicinnamico per l’analisi dei campioni è stata preparata ad una concentrazione di 2 mg/ml solubilizzando il CHCA in una soluzione costituita da Acqua + 0.1% TFA e Acetonitrile + 0.1%

TFA in rapporto 50:50. Alla soluzione di matrice è stato inoltre aggiunto ammonio citrato dibasico (0.15 mg/ml). La presenza di ammonio citrato bibasico nella soluzione di matrice consente di ridurre le interferenze nello spettro di massa dovute ad addotti della matrice con  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ .

Il MALDI TOF/TOF 4800, come accennato precedentemente, è equipaggiato con un laser YAG che opera a 355 nm, che appartiene ai laser UV pulsati. Il laser YAG è un laser a stato solido che sfrutta come mezzo laser Ittrio e Alluminio drogato con Neodimio. Esso invia una luce pulsata di 200 Hz che colpisce la superficie di campione e matrice perpendicolarmente. In figura 32 viene mostrato il processo di ionizzazione dei campioni all'interno della sorgente ionica.



**Figura 32:** ionizzazione del campione

La matrice di acido  $\alpha$ -ciano-4 idrossicinnamico è più volatile rispetto agli analiti per cui il primo evento è la formazione degli ioni protonati della matrice  $(\text{M}+\text{H})^+$ ;

vengono inoltre prodotte molecole neutre di campione (A) e di matrice (M).

La collisione tra ioni di matrice e molecole neutre del campione determina la ionizzazione del campione secondo la seguente reazione:



Gli ioni, accelerati con lo stesso potenziale pari a 20 KV, ad un determinato punto ed ad un certo tempo iniziale, giungono all'analizzatore a tempo di volo TOF (*time of flight*) dove vengono separati in base al loro rapporto  $m/z$ ; gli ioni più leggeri, essendo più veloci, giungono prima al rivelatore mentre gli ioni più pesanti essendo più lenti impiegano un tempo maggiore.

Il tempo di volo è proporzionale alla radice quadrata della massa dello ione secondo la seguente equazione

$$T = s \sqrt{(m/(2KE)z)}$$

dove:

t = tempo di volo            KE = energia cinetica

s = distanza                z = numero di cariche dello ione

m = massa

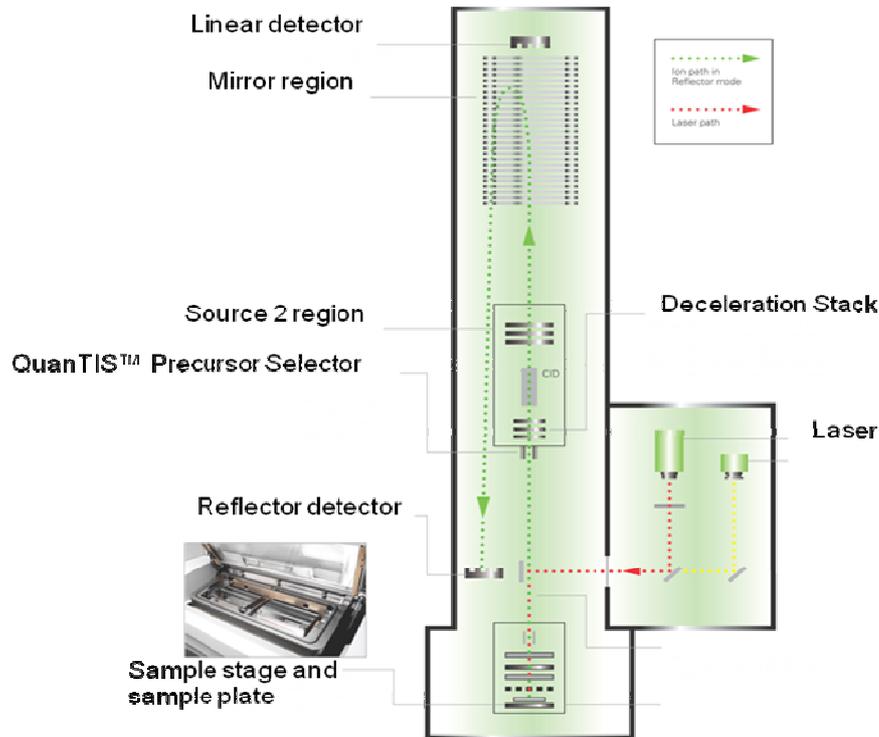
E' importante sottolineare che gli ioni che si formano all'interno della sorgente possiedono un range di energia cinetica traslazionale dovuta al processo di ionizzazione. Le differenze in energia cinetica traslazionale tra ioni della stessa massa fanno sì che essi abbiano una diversa velocità iniziale. L'effetto di questa dispersione di energia, se non corretto, determinerebbe una diminuzione nella

risoluzione dei segnali presenti sugli spettri in quanto ioni di stessa massa non arriverebbero contemporaneamente al detector. Tale fenomeno, comunque, viene minimizzato facendo avvenire la produzione di specie ioniche in un debole campo elettrico. Successivamente, dopo un appropriato intervallo temporale chiamato delay time, gli ioni vengono estratti applicando un potenziale di estrazione ad alto voltaggio determinando così un appropriato gradiente di potenziale. Il gradiente ed il delay time vengono impostati in modo da ottenere la migliore risoluzione per un dato mass range. Tale processo, grazie al quale ioni di stessa massa ma diversa velocità iniziale giungono contemporaneamente al detector, viene definito Delayed Extraction degli ioni. Il TOF può lavorare secondo due diverse modalità che differiscono per la traiettoria e la lunghezza del cammino ionico: la modalità Lineare e quella Reflectron (figura 33).

In modalità Lineare gli ioni seguono un percorso lineare di 150 cm che va dalla sorgente al Linear Detector; in modalità Reflectron gli ioni, attraverso dei deflettori a specchio, compiono una traiettoria curvilinea di 300 cm fino al Reflectron Detector.

Per l'analisi dei campioni oggetto del mio lavoro di tesi è stata impiegata la modalità Reflectron. Tale modalità è stata scelta in quanto consente di ottenere migliori performance sia in termini di risoluzione degli spettri sia in accuratezza in massa. Lavorando in Reflectron, infatti, è possibile correggere ulteriormente la dispersione di tempo legata alle differenze nella velocità iniziale di ioni di stessa massa determinando una seconda focalizzazione degli ioni stessi. Ciò è possibile in quanto gli ioni più veloci penetrano maggiormente all'interno degli specchi elettrostatici e compiono dunque un percorso più lungo rispetto agli ioni più lenti.

L'accuratezza in massa in queste condizioni è migliore di 50 ppm. Per poter effettuare un lavoro di proteomica bisogna avere un'accuratezza maggiore di 150 ppm per cui non sarebbe possibile lavorare in lineare.

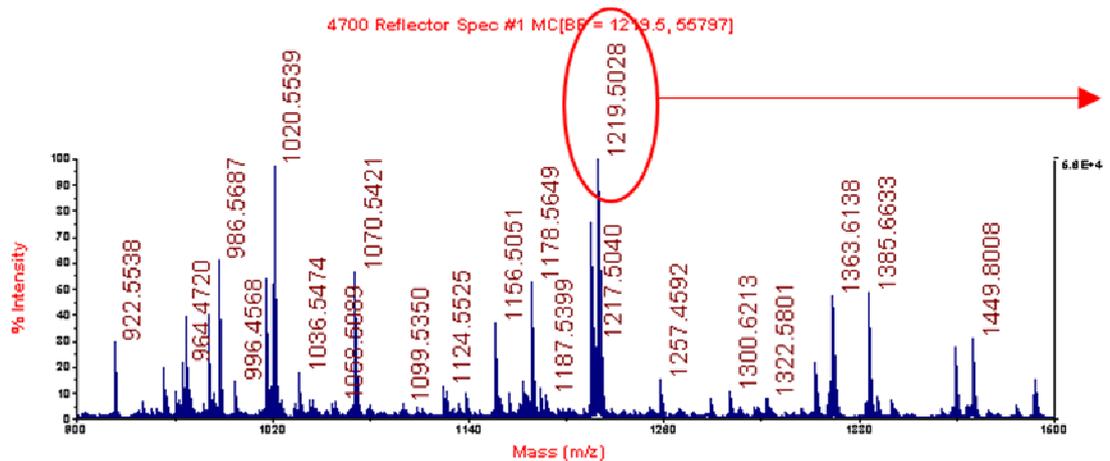


**Figura 33:** Schema MALDI TOF/TOF 4800 Applied Biosystem

Il sistema di rivelazione degli ioni è il *dual microchannel plate detector (MCP)*. Esso è collegato ad un computer che elabora i segnali inviati dal detector in modo da ottenere la visualizzazione degli spettri di massa dei peptidi.

Il primo step di analisi tramite MALDI TOF/TOF 4800 è stato quello di acquisire gli spettri di massa (MS) delle diverse microfrazioni presenti sulla piastrina MALDI visualizzando i segnali relativi ai peptidi derivanti dalla digestione triptica (figura 34).

A causa della complessità della matrice biologica in analisi, tuttavia, per identificare i peptidi non è sufficiente analizzare i semplici spettri di massa MS ma si rende necessario ricorrere all'accoppiamento di due stadi di analisi di massa (MS/MS).



**Figura 34:** spettro MS di uno spot contenente i segnali dei peptidi triptici

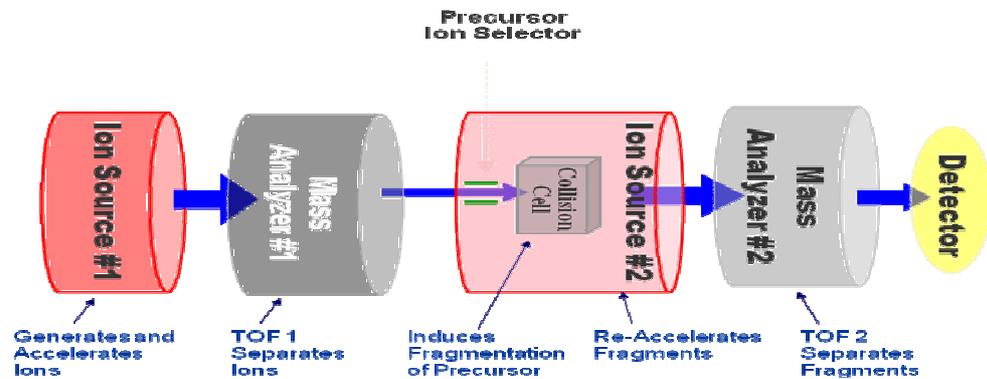
Nell'analisi MS/MS è possibile ottenere lo spettro di ioni frammento derivanti da uno qualsiasi degli ioni (precursori) presenti nello spettro di massa convenzionale.

La spettrometria di massa *Tandem TOF* (figura 35) consiste di due step:

- selezione di uno ione precursore d'interesse che viene trasmesso alla collision cell e frammentato tramite un "collision gas" che generalmente è aria ma può anche essere He, N<sub>2</sub> o Ar;
- riaccelerazione del precursore e dei frammenti che vengono separati nel secondo analizzatore e rivelati al detector.

Impostando opportunamente il software per la gestione del sistema, per ogni spot presente sulla piastrina MALDI sono stati selezionati i quindici picchi più

intensi presenti sugli spettri MS, ad esempio quelli dei peptidi presenti nello spot in figura 34, e sono stati acquisiti i loro spettri MS/MS.



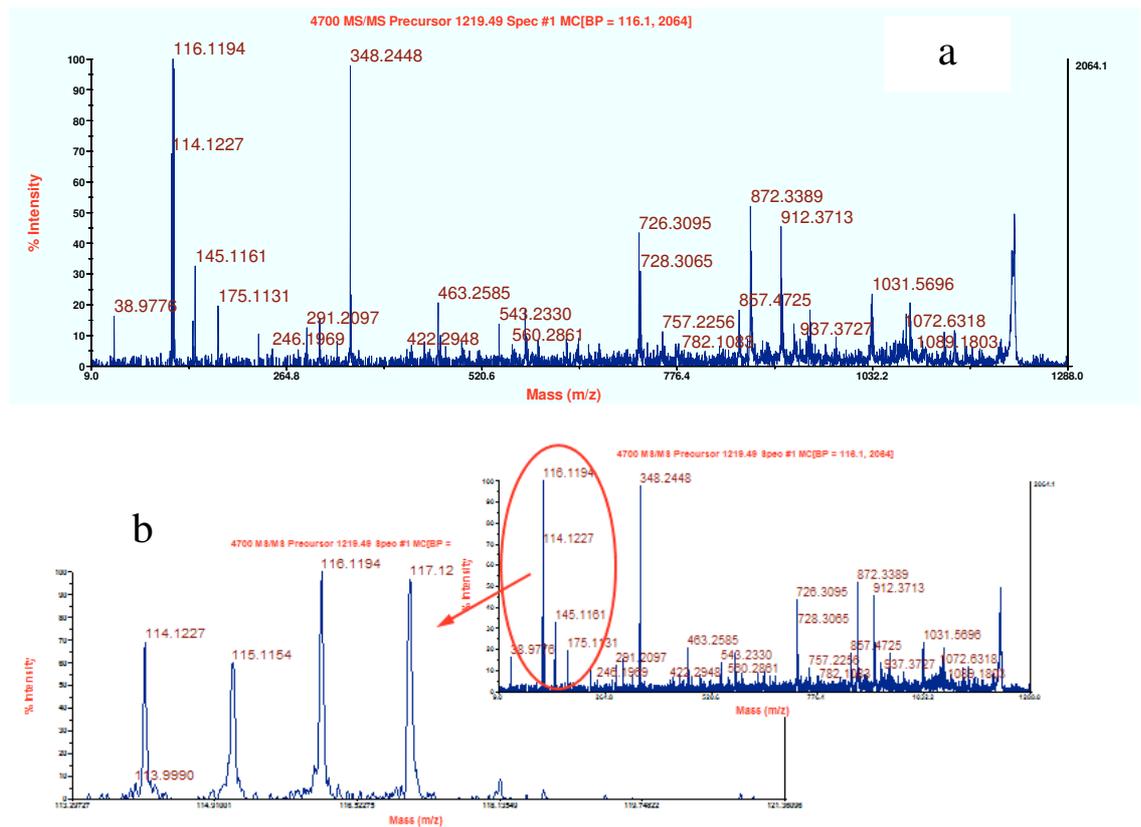
**Figura 35:** Spettrometria di massa Tandem

I frammenti visualizzati sugli spettri MS/MS corrispondono ai frammenti del peptide scelto come precursore (figura 36 a). Ciò è dovuto al fatto che la frammentazione dei peptidi avviene principalmente a livello del legame ammidico. Nel nostro studio, che si avvale della tecnologia iTRAQ, nella zona dello spettro a basso mass range è possibile, inoltre, visualizzare gli ioni frammento derivanti dai Reporter group del reagente iTRAQ (114-115-116-117) ed effettuare dunque anche un'analisi quantitativa dei campioni (figura 36 b).

La caratterizzazione dei frammenti presenti sugli spettri MS/MS, in una prima fase, è stata effettuata processando i dati tramite il motore di ricerca MASCOT, impiegando il database SwissProt per l'identificazione dei peptidi digeriti. Successivamente le analisi sono state ripetute impiegando il software Protein Pilot.

Sia Mascot che Protein Pilot effettuano una ricerca all'interno delle banche dati a disposizione, come SwissProt e IPI Human, partendo dal valore di massa di

un peptide presente in un dato spettro MALDI MS. Il valore di massa presente sullo spettro ha una tolerance di 50 ppm rispetto al valore della massa esatta del peptide stesso.



sequenza primaria. Usando un appropriato algoritmo di scoring MASCOT ci indica la probabilità che il peptide in analisi appartenga ad una data proteina. In particolare il programma stila un report su cui sono indicate le proteine cui potrebbe appartenere il peptide stesso in base all'omologia di sequenza in ordine di score decrescente (figura 37). E' stata infine effettuata un'analisi manuale per minimizzare la presenza di falsi positivi.

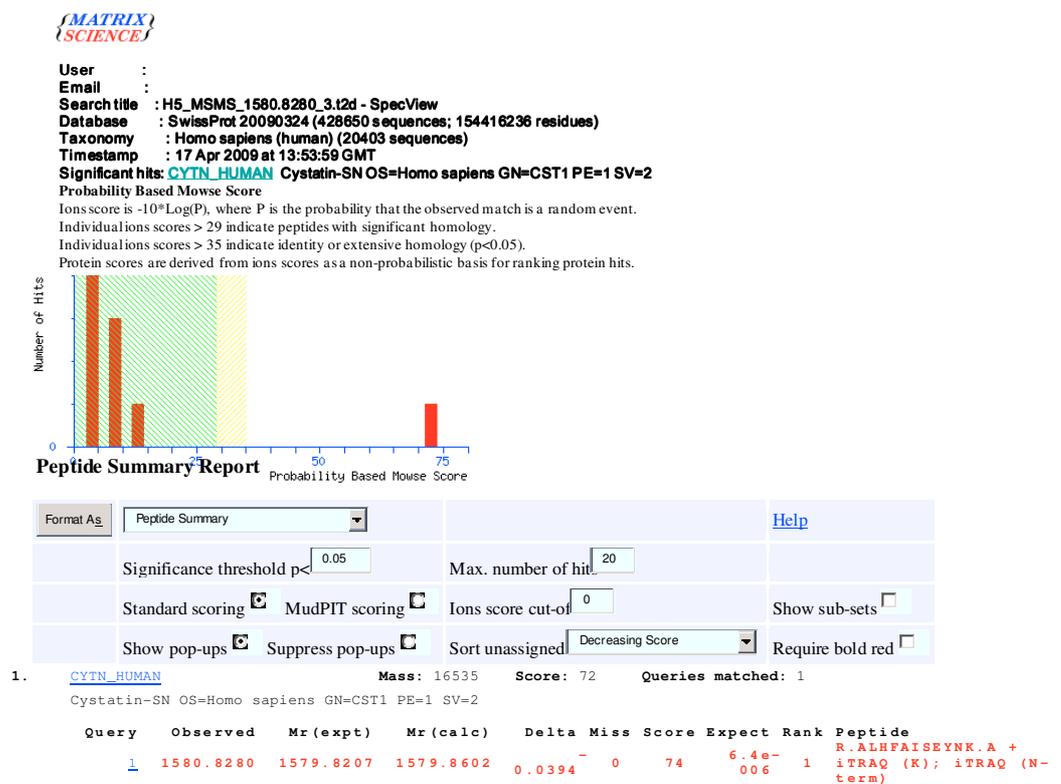
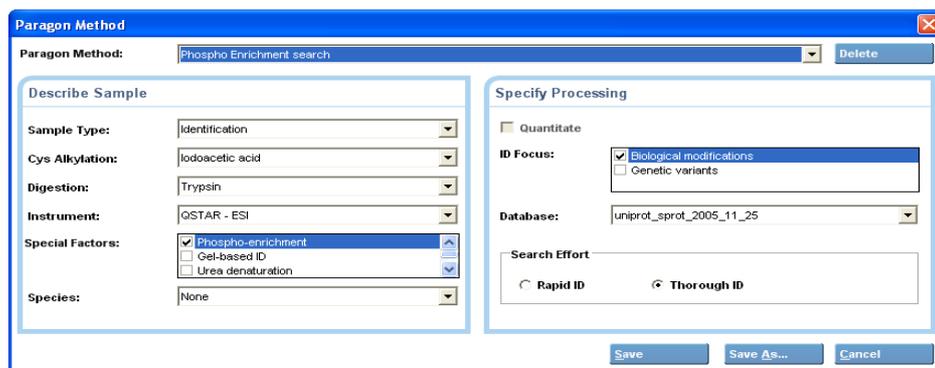


Figura 37: risultato della ricerca su MASCOT

Il software Protein Pilot analizza gli spettri combinando il motore di ricerca MASCOT ed il rivoluzionario Paragon Search Algorithm con il Progroup Algorithm.

Il Paragon Search Algorithm è una tecnologia unica che consente l'analisi simultanea di oltre 150 modificazioni biologiche evitando la tipica esplosione di falsi positivi che rappresenta un vero problema quando si fa uso degli algoritmi tradizionali. Tramite l'interfaccia grafica del Paragon™ Algorithm sono stati specificati l'agente impiegato per la digestione (tripsina) e il reagente usato per l'alchilazione delle cisteine (MMTS) dei peptidi digeriti (figura 38).



**Figura 38:** interfaccia grafica del Paragon™ Algorithm

Il Pro Group™ Algorithm assembla i risultati ottenuti creando un report che contiene tutti i peptidi di una data proteina identificati con sicurezza.

Tramite il software Protein Pilot, che consente di analizzare campioni marcati tramite la tecnologia iTRAQ, è stata inoltre effettuata l'analisi quantitativa dei campioni in esame. Il software ottiene le informazioni che riguardano l'analisi quantitativa dei peptidi tramite il calcolo dei rapporti tra area del picco dello ione reporter di un campione patologico e quella di un campione di controllo 116/114 e 117/114. Il software calcola, inoltre, il rapporto tra le aree dei picchi dei due campioni di controllo 115/114 in modo da stabilire se i due

campioni di controllo manifestano gli stessi trend. Differenze di colore nei rapporti dei peptide mettono in luce le differenze nell'espressione delle proteine tra soggetti sani e soggetti patologici (figura 39).

Protein Quant				Protein ID	Spectra	Summary Statistics							
Proteins Detected										Results are bias corrected		Denominator: IT114	
N	Unused	Total	% Cov	Accession#	Name	116:114	PVal 116:114	116:114	PVal 116:114	117:114	PVal 117:114	Biological Processes	Molecular Functions
13	13.36	16.00	62.7	sptP11021	78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78) (I...	0.3925	0.8586	0.5510	0.0000	0.6366	0.0000	Protein metabolism and...	Chaperone-Hsp 70 fa...
14	13.25	13.25	84.3	crphCP190...	NRAA Best HE_AHNAAK-related protein	0.9490	0.1477	1.1125	0.0280	1.1341	0.1106		
15	13.17	13.59	60.8	hmjCBM1C9	Heat shock 70kD protein B8 (Mortalin-2) (Fragment)	1.0076	0.8934	1.0025	0.9653	1.1680	0.0430	Protein metabolism and...	Chaperone-Hsp 70 fa...
16	13.03	13.04	65.9	crphCP188...	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	1.0253	0.5625	1.0954	0.1317	1.1752	0.0795	Protein metabolism and...	Isomerase->Other isom...
17	12.70	12.70	71.2	gblAAH391...	VCL protein	1.0594	0.1404	1.1689	0.0010	1.3713	0.0000	Oncogenesis->Tumor su...	Cell adhesion molecu...
18	12.56	12.56	44.4	sptP21333	Filamin A (Alpha-filinin) (Filamin 1) (Endothelial actin-b...	0.8345	0.0672	6.0251	0.0000	5.3477	0.0000	Cell structure and motil...	Cytoskeletal protein->A...
19	12.46	12.47	67.6	gblAAH128...	Unknown (protein for IMAGE2958817)	0.9772	0.6248	1.1021	0.0107	1.1073	0.2995	Carbohydrate metaboli...	Kinase->Carbohydrate...
20	12.37	12.37	57.2	emjCA458...	unnamed protein product	1.0110	0.8799	0.5753	0.0248	0.5237	0.0052	Lipid, fatty acid and ster...	Select calcium binding...
21	11.99	11.99	54.1	sptP22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (hnR...	0.9546	0.5593	0.6400	0.0894	0.8352	0.1397	Nucleoside, nucleotide a...	Nucleic acid binding->R...
22	11.68	11.68	46.1	sptF68363	Tubulin alpha-ubiquitous chain (Alpha-tubulin ubiquitou...	1.0012	0.9520	0.9658	0.9480	1.0078	0.9528	Intracellular protein traff...	Cytoskeletal protein->M...
23	11.64	11.64	60.0	emjCAA25...	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.8610	0.5800	0.9009	0.0758	0.8699	0.0569	Carbohydrate metaboli...	Oxidoreductase->Dehy...
24	11.41	11.41	49.1	sptQ9Y265	RuvB-like 1 (EC 3.6.1.-) (49.4Da TATA box-binding prot...	1.0470	0.4992	1.3775	0.0017	1.2770	0.0589	Nucleoside, nucleotide a...	Hydrolase/Nucleic acid...
25	10.89	10.89	73.0	crphCP185...	lamin A/C	1.0095	0.8274	1.7810	0.0000	1.6990	0.0000	Cell structure and motil...	Cytoskeletal protein->sh...

Figura 39: analisi quantitativa dei campioni

Il software Protein Pilot è molto semplice da usare e consente di ottenere risultati affidabili, precisi e riproducibili. Le funzionalità fornite dall'impiego di tale software, infine, hanno consentito di dare un nuovo impulso alla ricerca scientifica in quanto pongono in una nuova prospettiva la scoperta di biomarker per la diagnosi e la cura di patologie debilitanti che diano la speranza ai pazienti che ne sono affetti di ottenere la guarigione.

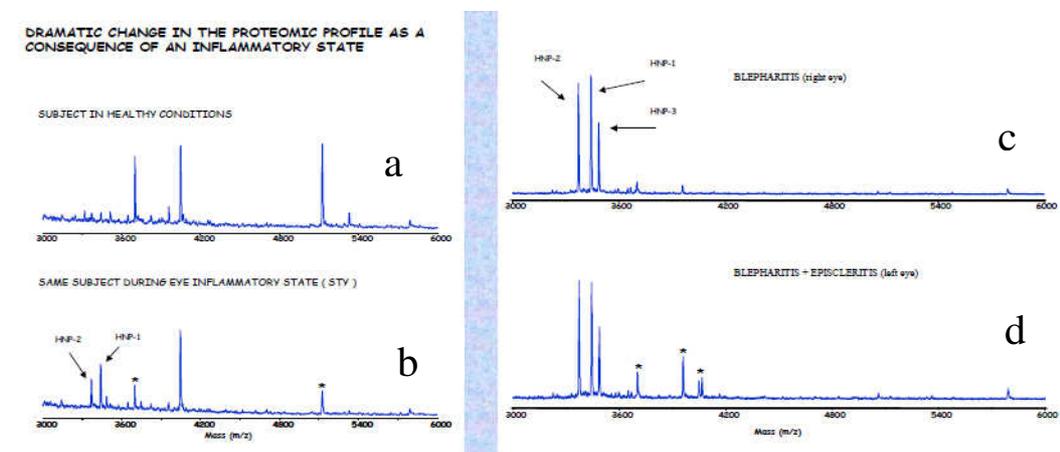
### 3. SCOPO DELLA TESI

Il fluido lacrimale è stato impiegato come materiale di partenza per un gran numero di ricerche riguardanti patologie della superficie oculare ed altre patologie dell'occhio. La ragione di tale scelta è legata principalmente alla sua composizione: il fluido lacrimale, infatti, contiene proteine, in alta concentrazione circa pari ad 8 $\mu$ g/ $\mu$ l.

L'analisi delle proteine presenti nel film lacrimale ha determinato un notevole miglioramento delle conoscenze inerenti le patologie oculari, portando alla definizione di biomarker per la diagnosi precoce della patologia e di nuovi target terapeutici. In particolare gli studi presenti in letteratura riguardano l'analisi qualitativa delle proteine presenti nel film lacrimale, l'analisi dei livelli di espressione di tali proteine, le modificazioni post-traduzionali che influenzano le loro funzioni e lo studio delle interazioni che le proteine stabiliscono tra loro. Gli studi effettuati sono focalizzati sul confronto tra film lacrimale di soggetti sani rispetto a quello di soggetti affetti da una data patologia. Il profilo proteico del film lacrimale, infatti, viene alterato quando la superficie oculare è affetta da patologie, in seguito ad interventi chirurgici ma anche nel caso di presenza di alcune patologie sistemiche come il diabete mellito e la fibrosi cistica.

Studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio e non ancora pubblicati hanno rivelato che il profilo proteico del film lacrimale di un soggetto sano (figura 40 a) in condizioni normali non subisce cambiamenti apprezzabili: l'analisi di prelievi di fluido lacrimale raccolti da uno stesso soggetto in giorni successivi, infatti, hanno rivelato che i profili proteici ottenuti sono sovrapponibili. Lo stesso soggetto è stato poi analizzato dopo un'infezione batterica (figura 40 b): i dati

ottenuti hanno indicato che l'instaurarsi di un quadro di tipo infiammatorio determina una notevole variazione della composizione qualitativa delle proteine presenti nel film. In particolare nella zona a basso mass range dello spettro sono state identificate le defensine, proteine coinvolte nella risposta di difesa dell'occhio alle infezioni. E' stato infine analizzato il profilo proteico del film lacrimale di un soggetto che presentava una diversa diagnosi nei due occhi: l'occhio destro affetto da blefarite (figura 40 c), l'occhio sinistro affetto da blefarite ed episclerite (figura 40 d). I risultati hanno indicato la presenza di defensine nel film lacrimale dell'occhio destro affetto da blefarite, visualizzate nella zona dello spettro a basso mass range; l'analisi delle proteine del film lacrimale dell'occhio sinistro dello stesso soggetto ha rivelato la presenza di defensine ma anche di proteine tipiche dell'Episclerite.



**Figura 40:** spettri del profilo proteomico di diversi soggetti

Solitamente le lacrime vengono collezionate tramite un tubicino capillare evitando il contatto con il globo oculare e la palpebra. Il principale ostacolo che i

ricercatori hanno riscontrato nell'impiego dei campioni di film lacrimale è il volume di campione a disposizione per le analisi che è limitato solitamente a soli cinque-sei microlitri.

Negli ultimi anni il notevole miglioramento nelle tecnologie di separazione e di frazionamento, accompagnato dall'aumento di sensibilità degli spettrometri di massa e dallo sviluppo di piattaforme informatiche per l'analisi di ampi set di dati ha reso possibile l'analisi e l'identificazione di un largo numero di proteine simultaneamente nonostante i quantitativi limitati di materiale iniziale.

Diversi studi condotti su lacrime umane di soggetti sani hanno rivelato la presenza di centinaia di proteine o peptidi. Degna di nota una recente ricerca, condotta da Matthias Mann & Coworkers sul proteoma lacrimale di soggetti sani per mezzo degli spettrometri di massa LTQ-FT e LTQ-Orbitrap, che ha portato all'individuazione di un totale di 491 proteine [33] tra le quali erano presenti proteine correlate alla risposta immunitaria, proteine coinvolte nella coagulazione e nella guarigione delle ferite, proteasi e inibitori di proteasi.

Il contenuto totale di proteine nelle lacrime può andare da 0,136 a 4,500 g/100 ml ma esso può variare in presenza di patologie dell'occhio esterno [34]. Inoltre diverse ricerche hanno dimostrato che fattori fisiologici alterano l'equilibrio delle proteine presenti nel film lacrimale. Questa scoperta ha dunque innescato un crescente interesse per lo studio delle relazioni tra composizione proteica e variazioni fisiologiche [35].

In letteratura sono riportate diversi studi riguardanti il confronto tra il profilo proteico di campioni di fluido lacrimale di soggetti sani e quello di soggetti affetti da patologie della superficie oculare. Le malattie della superficie

oculare comprendono un ampio numero di condizioni patologiche acute e croniche come la sindrome da occhio secco, lesioni superficiali della cornea, sindrome di Sjögren, problemi di origine allergica ed altre patologie oculari infiammatorie. Lo sviluppo di un quadro di tipo infiammatorio determina un drammatico incremento nei livelli di alcune proteine: in particolare è stato documentato un alterato profilo di citochine e chemochine [36].

Un recente studio sulla sindrome di Sjögren basato sul confronto del profilo proteico di soggetti affetti da tale patologia rispetto a quello di soggetti sani ha portato all'individuazione di dieci biomarkers [37] che potranno in futuro essere usati come test diagnostici della patologia.

Uno studio sulla sindrome dell'occhio secco [38] ha rivelato l'aumento nel film lacrimale di proteine derivanti dal siero come l'albumina e la ceruloplasmina e la riduzione dei livelli di proteine tipiche del film lacrimale come lisozima e lipocalina, lattoferrina che potrebbe essere legato alla compromissione funzionale della ghiandola lacrimale principale.

Tali risultati sono concordi nell'indicare la variazione del profilo proteico del film lacrimale di soggetti affetti da patologie oculari infiammatorie se confrontato a quello di soggetti sani sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo. Pertanto il film lacrimale può essere considerato un ottimo materiale di partenza per lo studio di patologie della superficie oculare.

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di analizzare il profilo proteomico qualitativo e quantitativo del fluido lacrimale appartenente a soggetti affetti da Vernal Keratoconjunctivitis e di confrontarlo con quello di soggetti sani, in modo da stabilire differenze presenti nel loro pattern di espressione proteico.

I campioni sono stati trattati tramite la tecnologia iTRAQ seguita dall'analisi dei campioni tramite 1D-LC-MALDI MS/MS. E' importante sottolineare che l'approccio impiegato durante il presente lavoro è differente da quello condotto dagli autori sopracitati in quanto le analisi non sono state effettuate impiegando pool di più prelievi di film lacrimale dello stesso soggetto in tempi diversi o pool di film di diversi soggetti bensì facendo uso di singoli prelievi di fluido lacrimale, pari a tre quattro microlitri di campione. Ciò è possibile poiché, rispetto ad altre patologie, uno dei sintomi della VKC è l'eccesso di lacrimazione per cui è possibile raccogliere un quantitativo maggiore di film.

Tale approccio ha consentito di valutare la presenza di correlazioni tra i livelli di alcune proteine presenti nel film lacrimale di un singolo paziente e poter inoltre stabilire come variano i livelli di una data proteina tra un paziente affetto da VKC e un altro.

La definizione del profilo proteomico presente nel film lacrimale dei soggetti affetti da VKC è uno strumento di fondamentale importanza in quanto può fornire molte informazioni in merito alla patologia.

La prima fase della ricerca ha avuto come obiettivo l'identificazione di biomarkers per la Vernal Keratoconjunctivitis. La fase di biomarker discovery è molto utile in quanto le proteine individuate possono permettere di discriminare i soggetti sani dai soggetti affetti dalla patologia. A tal scopo si è deciso di valutare l'accuratezza di particolari proteine nell'identificare i soggetti affetti dalla VKC tramite un test diagnostico noto come ROC (Receiver Operating Characteristic) curve analysis. L'impiego della metodologia iTRAQ è molto importante poiché potrebbe garantire in futuro la possibilità di ottenere la diagnosi della patologia

impiegando una strategia analitica non invasiva. Tale vantaggio sarebbe particolarmente importante in quanto consentirebbe di migliorare notevolmente la compliance del paziente.

I risultati ottenuti potranno, inoltre, essere impiegati come punto di partenza non solo per la diagnosi precoce della patologia ma anche per l'individuazione dei meccanismi che determinano lo sviluppo della VKC e delle risposte infiammatorie messe in atto dall'organismo per difendersi da essa.

Un secondo obiettivo prefisso dal presente lavoro è stato quello di confrontare i risultati quantitativi relativi ai biomarkers individuati, in soggetti che presentavano un diverso grado di severità della patologia (lieve, moderato, grave o molto grave) secondo le indicazioni fornite dall'Unità Oftalmologica del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università degli studi di Padova tramite l'analisi dei segni obiettivi della VKC. Tale confronto è fondamentale poiché permette di stabilire se sia possibile impiegare i risultati ottenuti per valutare in maniera obiettiva il grado di severità della patologia.

La tecnologia iTRAQ è stata infine impiegata allo scopo di monitorare l'attività della patologia ed il suo decorso ma soprattutto per valutare l'efficacia di due trattamenti farmacologici per la prevenzione delle ricadute ed il controllo delle fasi attive della Vernal Keratoconjunctivitis: uno basato sull'impiego di ciclosporina A all'1% e l'altro basata sull'impiego di clobetasone confrontando i profili proteomici dei soggetti sottoposti a tali trattamenti con quello di un soggetto affetto da una forma lieve della patologia trattato con un semplice antistaminico. Tale ricerca ha cercato di introdurre un elemento di novità rispetto al passato: gli studi riportati in letteratura in merito alla diagnosi della patologia

ed il monitoring dell'efficacia dei trattamenti farmacologici effettuati su pazienti affetti da Vernal Keratoconjunctivitis, infatti, sono stati finora basati sull'analisi di elementi anamnestici e clinici della VKC. L'osservazione dei profili proteomici del fluido lacrimale secondo un profilo qualitativo e quantitativo può dunque essere molto utile a tal scopo in quanto fornisce dati obiettivi, precisi ed inconfutabili .

## **4. RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **4.1. Identificazione di nuovi biomarker**

Le proteine presenti nel film lacrimale sono state il materiale di partenza per un gran numero di ricerche riguardanti patologie della superficie oculare ed altre patologie dell'occhio interno. La composizione del fluido lacrimale è complessa sia per la varietà delle proteine presenti che per la loro quantità che abbraccia dieci ordini di grandezza. Quando la superficie oculare è affetta da patologie infiammatorie l'equilibrio delle proteine presenti nel film viene alterato sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo. La procedura iTRAQ è stata impiegata con successo per studi di proteomica quantitativa del fluido lacrimale ed ha permesso l'identificazione di biomarkers di diverse patologie oculari umane quali la dry eye syndrome [39-40], la climatic keratopathy droplet (CDK) [41] ed il glaucoma [42]. Tale tecnica è stata inoltre impiegata per valutare alterazioni nel livello di espressione di proteine presenti nel fluido lacrimale dei conigli [43].

Durante il presente lavoro di tesi il profilo proteomico qualitativo e quantitativo del fluido lacrimale appartenente a soggetti affetti da Vernal Keratoconjunctivitis è stato analizzato e confrontato con quello di soggetti sani, raccogliendo i campioni tramite un tubo capillare da raccolta del volume di dieci microlitri con l'obiettivo di stabilire le differenze presenti nel loro pattern di espressione proteico e di identificare in tal modo marcatori biologici predittivi della patologia.

I campioni sono stati trattati tramite la tecnologia iTRAQ 4-plex (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) che ha il vantaggio di consentire la

marcatura di quattro campioni simultaneamente (114-115-116-117) rendendo più veloci le analisi.

In particolare sono stati realizzati cinque esperimenti iTRAQ ognuno dei quali conteneva il fluido lacrimale di due campioni di controllo e due campioni patologici per un totale di dieci soggetti sani e dieci soggetti affetti da VKC.

Tale procedura, come spiegato precedentemente, è stata eseguita secondo il protocollo fornito da Nature Protocol Exchange (2008) doi: 10.1038/nprot.2008.89. Molto brevemente la miscela delle proteine contenute in ognuno dei quattro campioni di film lacrimale è stata sottoposta a denaturazione; a questa fase è seguita una fase di riduzione dei legami sulfidrilici con DTT ed una di blocco delle cisteine con MMTS; le proteine sono state idrolizzate mediante tripsina Gold ed i peptidi ottenuti sono stati poi marcati con isotopi non radioattivi. I peptidi triptici dei quattro campioni sono stati infine ricombinati in un'unica miscela e sottoposti a separazione tramite un sistema  $\mu$ HPLC DIONEX (LC Packings) e a successiva analisi mediante lo spettrometro di massa MALDI TOF/TOF 4800 (*Applied Biosystem*).

La separazione cromatografica è stata effettuata secondo eluizione a gradiente impiegando un solvente A costituito da  $H_2O + 0,05\%$  TFA e un solvente B costituito da  $CH_3CN + 0,05\%$  TFA. Per l'eluizione a gradiente sono state impiegate le seguenti condizioni: il solvente B al tempo iniziale è al 2%, durante l'analisi aumenta gradualmente fino al 60% per poi tornare al 2% dopo 120 min. Il tempo totale di analisi è di 160 minuti.

Le frazioni peptidiche che eluiscono dalla colonna sono state miscelate con una soluzione 2 g/l di acido  $\alpha$ -ciano-4 idrossicinnamico in  $H_2O:CH_3CN$ : 3:2,

contenente 0.15 mg/ml di ammonio citrato dibasico e depositate su sample plate attraverso un collettore di microfrazioni Probot.

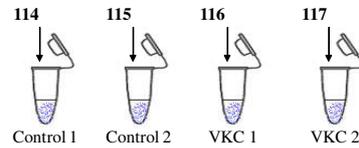
Le frazioni peptidiche depositate sul *MALDI plate* sono state successivamente analizzate mediante lo spettrometro di massa *MALDI TOF/TOF 4800*.

Nello schema 1 sono riepilogate le diverse fasi del lavoro di ricerca che hanno permesso l'analisi proteomica qualitativa e quantitativa dei campioni di fluido lacrimale.

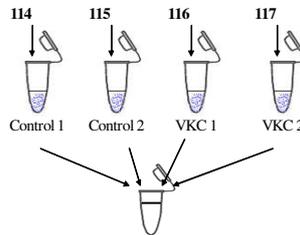
Le possibilità offerte dalle metodologie di analisi impiegate per la realizzazione del presente lavoro di tesi hanno consentito di superare la limitazione della bassa quantità di campione impiegata che in passato precludeva l'analisi delle lacrime nella quotidiana pratica clinica. Le analisi, inoltre, non sono state effettuate impiegando pool di più prelievi di film lacrimale bensì facendo uso di prelievi singoli, pari a tre quattro microlitri di campione. Nel caso di pazienti affetti da dry eye syndrome è necessario ricorrere a pool di più prelievi di campione in quanto i soggetti che soffrono di tale patologia presentano una notevole riduzione della produzione di film lacrimale tanto che persino la raccolta di un microlitro di fluido lacrimale risulta difficoltosa. Uno dei sintomi della VKC, come spiegato precedentemente, è la presenza di un eccesso di lacrimazione per cui la raccolta del film lacrimale risulta più agevole. Grazie all'impiego dell'iTRAQ technology seguita da analisi 1D-LC-MALDI MS/MS è stato analizzato un numero significativo di peptidi: tale analisi ha permesso di identificare con certezza circa 100 proteine.

## Schema 1

Raccolta del fluido lacrimale di due campioni di controllo e due campioni appartenenti a soggetti affetti da VKC.



Digestione delle proteine con tripsina per spettrometria di massa Gold e marcatura dei peptidi ottenuti con 4 reagenti iTRAQ diversi (Reporter group: 114, 115, 116 e 117). Ricombinazione dei quattro campioni in un'unica miscela.



Separazione dei peptidi tramite cromatografia liquida C18

Raccolta dei peptidi ottenuti su una piastrina metallica MALDI tramite un collettore di microfrazioni Probot.

Acquisizione degli spettri di massa (MS) delle diverse frazioni su sample plate.

Acquisizione degli spettri MS/MS dei segnali peptidici più intensi di ogni spot.

Analisi bioinformatica tramite il motore di ricerca MASCOT e il software Protein Pilot.

Caratterizzazione del profilo proteomico qualitativo e quantitativo di soggetti affetti da VKC e soggetti sani.

In tabella 1 è mostrata la lista di proteine identificate nel fluido lacrimale dei soggetti analizzati. Tale numero potrebbe sembrare apparentemente basso se confrontato con le 491 proteine identificate nel fluido lacrimale da Mann & Coworkers [33]. In realtà, come spiegato precedentemente, se si considera che le analisi non sono state effettuate impiegando pool di più prelievi di campione bensì un prelievo singolo di fluido lacrimale, pari a tre quattro microlitri di campione, si tratta di un ottimo risultato.

L'analisi quantitativa è stata effettuata su un numero più ristretto di proteine poiché solo di alcune tra quelle identificate abbiamo ottenuto dati quantitativi. Anche restringendo il campo di analisi, comunque, il numero di proteine sottoposto ad analisi quantitativa rimane ragguardevole.

Per ogni esperimento iTRAQ 4-plex sono stati analizzati quattro campioni simultaneamente: due campioni di fluido lacrimale di soggetti sani e due di soggetti affetti da VKC (per un totale di 10 campioni di controllo e 10 campioni patologici).

I peptidi presenti nelle secrezioni lacrimali dei soggetti sani sono stati marcati con i reporter group 114 e 115 mentre quelli presenti nelle secrezioni lacrimale dei soggetti affetti da VKC sono stati marcati con i reporter group 116 e 117. L'analisi quantitativa dei peptidi di interesse è stata dunque realizzata tramite il confronto dei rapporti dei reporter group: 115/114 che è il rapporto quantitativo di un dato peptide nei due campioni di controllo; 116/114 e 117/114 che sono i rapporti quantitativi del peptide di interesse in un soggetto affetto da VKC rispetto ad un soggetto sano.

**Tabella 1:** lista delle proteine identificate

Accession (IPI)	Gene Symbol	Protein name
IPI00298860	LTF	Lactotransferrin precursor
IPI00216773	ALB	Serum Albumin
IPI00019038	LYZ	Lysozyme C precursor
IPI00009650	LCN1	Von Ebner gland protein
IPI00022463	TF	Serotransferrin precursor
IPI00166729	AZGP1	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc
IPI00020487	LACRT	Extracellular glycoprotein lacritin precursor
IPI00027019	PRR4	Proline-rich protein 4
IPI00022974	PIP	Prolactin-inducible protein
IPI00305477	CST1	Cystatin SN precursor
IPI0001468	SCGB1D1	Secretoglobin family 1D member 1 (Lipophilin-A)
IPI00026126	SCGB2A1	Mammaglobin B precursor
IPI00641229	IGHA2	Ig alpha-2 chain C region
IPI00553177	SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin
IPI00032294	CST4	Cystatin S precursor
IPI00807531	IGHG1	Ig gamma-1 chain C region
IPI00021841	APOA1	Apolipoprotein A-1
IPI00478003	A2M	Alpha-2-macroglobulin
IPI00009682	PROL1	Proline-rich protein 1
IPI00909649	IGKC	Ig kappa chain C region
IPI00783987	C3	Complement C3
IPI0002249	ORM1	Alpha-1-acid glycoprotein 1 precursor
IPI00004656	B2M	Beta-2-microglobulin
IPI00009792		Ig heavy chain V-I region V35
IPI00154742	IGLC	Ig lambda chain C region
IPI00387026		Ig kappa chain V-I region

IPI00299729	TCN1	Transcobalamin I precursor
IPI00004573	PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor
IPI00022431	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein precursor
IPI00015180	SHROOM2	Protein Shroom 2
IPI00027846	MMP8	Neutrophil Collagenase precursor
IPI00006721	OPA1	Dynamin-like 120kDa protein, mitochondrial
IPI00008580	SLPI	Antileukoproteinase
IPI00022432	TTR	Transthyretin precursor
IPI00298497	FGB	Fibrinogen beta chain precursor
IPI00182304	TYW1	tRNA wybutosine-synthesizing protein 1
IPI00554793	MYCBP	C-Myc-binding protein
IPI00332633	RASSF5	Ras association domain-containing protein 5
IPI00796450	LYST	Lysosomal-trafficking regulator
IPI00299037	CACNA1G	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G
IPI00007834	ANK2	Ankyrin-2
IPI00335589	RNMTL1	RNA methyltransferase-like protein 1
IPI00745556	NCAPH2	Condensin-2 complex subunit H2
IPI00788188	DYNC2H1	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1
IPI00868980	CES4	Inactive carboxylesterase 4
IPI00010317	RRAGB	Ras-related GTP-binding protein B
IPI00156282	GPS1	COP9 signalosome complex subunit 1
IPI00514234	LAD1	Ladinin-1
IPI00329132	C6orf134	UPF0635 protein C6orf134
IPI00102313	SRA1	Steroid receptor RNA activator
IPI00002469	HCFC2	Host cell factor 2
IPI00026962	PLA2G2A	Phospholipase A2, membrane associated
IPI00418234	MECP2	Methyl-CpG-binding protein 2
IPI00790870	CLEC3A	C-type lectin domain family 3 member A

IPI00014845	DNAH8	Dynein heavy chain 8, axonemal
IPI00552279	ESCO1	N-acetyltransferase ESCO1
IPI00181824	VPS53	Vacuolar protein sorting-associated protein 53 homolog
IPI00007800	ANGPTL2	Angiotensin-converting enzyme 2
IPI00006433	DNAJC16	DnaJ homolog subfamily C member 16
IPI00884996	DNAH6	Dynein heavy chain 6, axonemal
IPI00017696	C1S	Complement C1s subcomponent
IPI00009207	NFE2L3	Nuclear factor erythroid 2-related factor 3
IPI00794207	SCHIP1	Schwannomin-interacting protein 1
IPI00550181	CHMP2B	Charged multivesicular body protein 2b
IPI00021987	RGP1	Retrograde Golgi transport protein RGP1 homolog
IPI00017617	DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5
IPI00010180	CES1	Liver carboxylesterase 1
IPI00164528	SNTA1	Alpha-1-syntrophin
IPI00294556	APBA1	Amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member1
IPI00071360	A1CF	APOBEC1 complementation factor
IPI00023073	XRCC3	DNA repair protein XRCC3
IPI00218137	KLK11	Kallikrein-11
IPI00000203	LRP6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 6
IPI00032187	NISCH	Nischarin
IPI00063408	DHTKD1	Probable 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component DHTKD1, mitochondrial
IPI00030285	SPINK4	Serine protease inhibitor Kazal-type 4
IPI00166296		Transmembrane protein FLJ37396
IPI00470596	ZNF638	Zinc finger protein 638

Durante la fase successiva di monitoring farmacologico è stata invece impiegata la tecnologia 8-plex analizzando simultaneamente otto campioni ed in particolare un soggetto sano, due soggetti affetti da Vernal Keratoconjunctivitis appena diagnosticata, quattro soggetti affetti VKC sottoposti a trattamento farmacologico con ciclosporina A ad una concentrazione pari all'1% ed infine un soggetto affetto da VKC sottoposto a trattamento farmacologico con clobetasone.

In tabella 2 è riportato il report che contiene le informazioni relative all'analisi quantitativa di undici proteine presenti nell'esperimento iTRAQ 4-plex CTSSVKCMN: tali proteine sono comuni ai cinque esperimenti iTRAQ effettuati. Per l'analisi quantitativa, inoltre, sono state prese in considerazione solo proteine di cui sono stati identificati con certezza almeno tre peptidi che mostravano dati quantitativi concordi tra loro.

L'esperimento CTSSVKCMN ha fornito i seguenti risultati: il rapporto 115/114 è un numero vicino ad uno per quasi tutte le proteine espresse in tabella. Ciò significa che la quantità relativa di proteina identificata non varia tra i due campioni di controllo (soggetti sani) impiegati e non è possibile dunque osservare varianza statistica tra i controlli. Nelle secrezioni lacrimali dei campioni affetti da VKC si registra un incremento considerevole nei livelli di tutte le proteine tipiche del film lacrimale (lacritina, lisozima, secretoglobina, lipocalina). Ancor più sorprendente è la sovraespressione di proteine quali siero albumina, sierotrasferrina ed emopexina che non sono proteine tipiche del film. Tale esperimento è stato ripetuto tre volte: i valori riportati in tabella, dunque, sono stati ottenuti calcolando la media di tre diverse misure.

**Tabella 2:** analisi quantitativa delle proteine più importanti esperimento CTSSVKCMN

CTSSVKCMN			
	115/114	116/114	117/114
<b>Serum albumin</b>	1,5	49,0	38,6
<b>Lactotransferrin</b>	1,2	11,0	13,1
<b>Lysozyme C</b>	1,1	3,7	4,2
<b>Lacritin</b>	1,3	7,7	6,7
<b>Secretoglobin family 1D</b>	1,2	20,1	12,4
<b>Mammaglobin B</b>	1,0	13,0	7,0
<b>Lipocalin-1</b>	1,2	8,4	12,6
<b>Proline-rich protein 4</b>	1,0	2,7	7,8
<b>Hemopexin</b>	1,1	50,0	35,1
<b>Serotransferrin</b>	1,5	49,0	30,7
<b>Ig alpha-1 chain C region</b>	6,0	3,6	2,4

Allo scopo di confutare o confermare i risultati ottenuti nell'esperimento CTSSVKCMN, la stessa analisi è stata ripetuta quattro volte impiegando per ogni esperimento campioni appartenenti a quattro soggetti diversi: due sani e due affetti da VKC. I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle 3, 4, 5 e 6.

L'esperimento in tabella 3 (CT28MVKCCS) ha confermato la sovraespressione nei soggetti patologici di tutte le proteine identificate. I risultati ottenuti hanno inoltre indicato che i livelli delle proteine siero albumina, serotrasferrina ed emopexina sono dello stesso ordine di grandezza nello stesso prelievo.

Gli esperimenti CT33BVKCQF (tabella 4), CTBSVKCFV (tabella 5) e CTBVKCPPT (tabella 6) hanno fornito risultati concordi tra loro ma discordanti con i precedenti risultati rispetto ai dati relativi alle proteine tipiche del film lacrimale. Per tali proteine non è stato possibile definire un andamento univoco:

esse sono infatti sovraespresse in alcuni campioni, normal espresse e sottoespresse in altri. Pertanto le proteine tipiche del film non possono essere prese in considerazione come biomarkers della patologia.

I risultati ottenuti nei tre esperimenti sono concordi con i precedenti nell'indicare una sovraespressione, in tutti i soggetti patologici, delle proteine siero albumina, serotransferrina ed emopexina. I dati ottenuti hanno inoltre confermato che i livelli di tali proteine sono dello stesso ordine di grandezza nello stesso prelievo. Pertanto le proteine siero albumina, serotransferrina ed emopexina sono biomarkers diagnostici della Vernal Keratoconjunctivitis .

**Tabella 3:** analisi quantitativa delle proteine più importanti esperimento CT28MVKCCS

<b>CT28MVKCCS</b>			
	<b>115/114</b>	<b>116/114</b>	<b>117/114</b>
<b>Serum Albumin</b>	0.9	<b>90.0</b>	<b>6,3</b>
<b>Lactotransferrin</b>	0.7	3.0	7.0
<b>Lysozyme C</b>	1.0	2.0	6.2
<b>Lacritin</b>	0.9	4.5	8.4
<b>Secretoglobin family 1D</b>	0.8	6.1	10,4
<b>Mammaglobin B</b>	0.8	7.8	7.4
<b>Lipocalin-1</b>	1.0	2.5	15.5
<b>Proline-rich protein 4</b>	0.7	1.4	5.6
<b>Hemopexin</b>	1.0	<b>85.0</b>	<b>6.6</b>
<b>Serotransferrin</b>	1.1	<b>80.0</b>	<b>7.0</b>
<b>Ig alpha-1 chain C region</b>	0.8	2.8	0.4

**Tabella 4:** analisi quantitativa delle proteine più importanti esperimento CT33BVKCQF

CT33BVKCQF			
	115/114	116/114	117/114
<b>Serum albumin</b>	0,9	57,8	7,0
<b>Lactotransferrin</b>	0,7	1,0	0,9
<b>Lysozyme C</b>	0,8	0,8	0,9
<b>Lacritin</b>	0,8	1,0	3,8
<b>Secretoglobin family 1D</b>	0,5	0,6	2,1
<b>Mammaglobin B</b>	0,6	0,6	2,5
<b>Lipocalin-1</b>	0,4	0,4	1,7
<b>Proline-rich protein 4</b>	0,4	0,3	1,2
<b>Hemopexin</b>	0,9	61,0	9,0
<b>Serotransferrin</b>	0,9	45,7	6,0
<b>Ig alpha-1 chain C region</b>	0,8	0,9	0,8

**Tabella 5:** analisi quantitativa delle proteine più importanti esperimento CTBSVKCFV

CTBSVKCFV			
	115/114	116/114	117/114
<b>Serum albumin</b>	1,9	5,1	62,3
<b>Lactotransferrin</b>	1,0	0,9	1,3
<b>Lysozyme C</b>	1,2	1,2	1,3
<b>Lacritin</b>	1,5	0,9	1,7
<b>Secretoglobin family 1D</b>	1,4	1,6	2,7
<b>Mammaglobin B</b>	1,7	1,6	3,5
<b>Lipocalin-1</b>	1,8	2,0	1,7
<b>Proline-rich protein 4</b>	1,6	0,8	0,7
<b>Hemopexin</b>	0,9	6,1	69,0
<b>Serotransferrin</b>	0,9	5,7	56,0
<b>Ig alpha-1 chain C region</b>	0,8	0,9	0,8

**Tabella 6:** analisi quantitativa delle proteine più importanti esperimento CTBVKCPPT

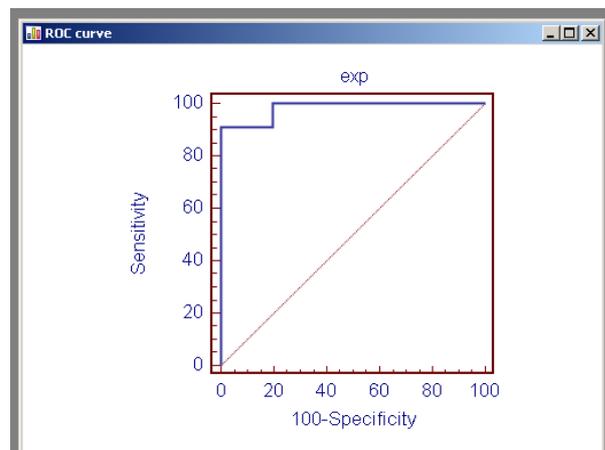
CTBVKCPPT			
	<b>115/114</b>	<b>116/114</b>	<b>117/114</b>
<b>Serum albumin</b>	1,6	3.0	6.5
<b>Lactotransferrin</b>	1.2	1.4	0.9
<b>Lysozyme C</b>	1.1	1.0	0.7
<b>Lacritin</b>	0.9	2.9	0.7
<b>Secretoglobin family 1D</b>	1.1	8.9	1.0
<b>Mammaglobin B</b>	1.1	7.0	0.8
<b>Lipocalin-1</b>	1.4	1.6	0.6
<b>Proline-rich protein 4</b>	1.1	1.0	0.7
<b>Hemopexin</b>	1.1	5.1	7.0
<b>Serotransferrin</b>	0.9	5.7	6.0
<b>Ig alpha-1 chain C region</b>	0,8	0,9	0,8

L'abilità della siero albumina di discriminare i soggetti sani dai soggetti affetti da patologia è stata inoltre valutata tramite la ROC (Receiver Operating Characteristic) curve analysis. Si tratta di un test diagnostico che permette di valutare l'accuratezza di una data proteina nell'identificare i soggetti affetti dalla patologia oggetto di studio. I dati relativi all'analisi qualitativa della proteina siero albumina sono stati inseriti in un foglio di lavoro assegnando ai soggetti sani il codice 0 e ai soggetti affetti da VKC il codice 1. Nella colonna adiacente per ognuno dei soggetti è stato indicato il valore del rapporto quantitativo della proteina siero albumina (figura 41). La ROC curve è stata elaborata dal programma Med calc.

Sull'asse delle X del grafico è riportato il valore relativo ai falsi positivi che viene ottenuto dal programma sottraendo al 100% dei risultati l'insieme dei veri

negativi (Specificità); sull'asse delle Y è riportato il valore relativo ai veri positivi (Sensibilità). La siero albumina ha un ROC plot che si avvicina all'angolo superiore sinistro del grafico indicando dunque che tale proteina ha un elevato potere diagnostico per la VKC: il numero dei veri positivi è infatti molto elevato mentre il numero dei falsi positivi è vicino a zero.

	A	B
	diagnosi	exp
1	1	3.43
2	1	4.27
3	1	19.51
4	0	1
5	0	0.94
6	1	14.91
7	1	10.07
8	0	1.96
9	1	4.97
10	1	50.02
11	0	0.37
12	1	31.34
13	1	2.16
14	0	0.24
15	1	26.55
16	1	1.54

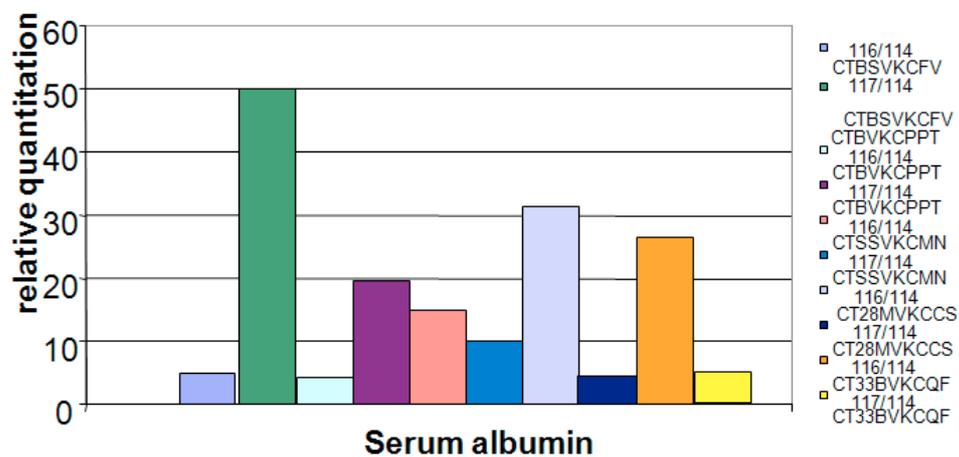


**Figura 41:** ROC curve analysis

L'analisi di singoli prelievi di fluido lacrimale tramite la tecnologia iTRAQ 4-plex ha permesso, come elucidato precedentemente, di rilevare i livelli delle proteine siero albumina, emopexina e serotransferrina nei singoli pazienti. In particolare i risultati ottenuti hanno indicato che i livelli di siero albumina nei pazienti affetti da VKC possono essere da 5 a 50 volte maggiori dei campioni impiegati come controllo (figura 42). Pertanto è stato ritenuto opportuno valutare l'esistenza di una correlazione tra il grado di severità della patologia ed il livello di tale proteina nel fluido lacrimale.

Le analisi sui dieci pazienti affetti da VKC hanno evidenziato un incremento

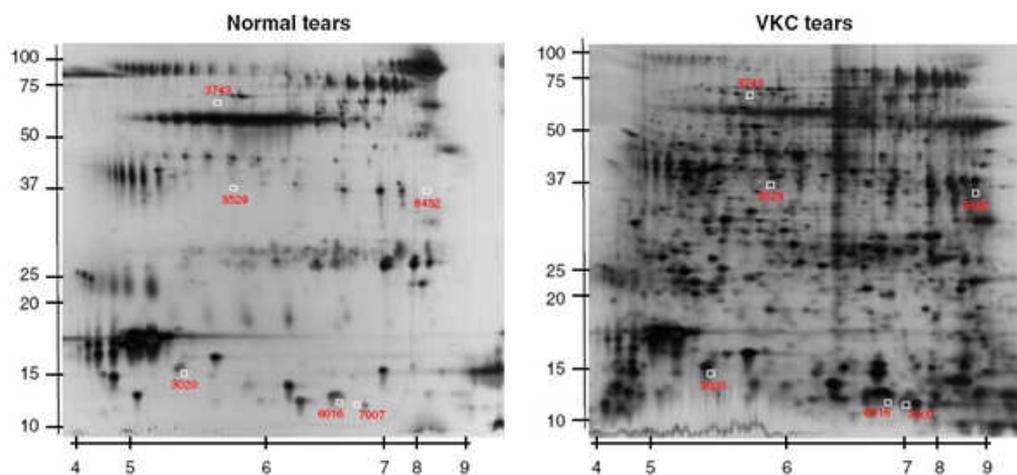
lineare del livello di siero albumina passando dall'analisi di soggetti che presentavano la patologia ad un grado lieve o moderato a soggetti con grado di severità molto grave secondo le indicazioni sul grado di severità della patologia che ci erano state fornite dalla clinica oculistica tramite la valutazione dei segni obiettivi della VKC. Per cui i risultati ottenuti possono essere utilizzati non solo per la ricerca di biomarkers della VKC, ma anche per individuare in maniera obiettiva il grado di severità della patologia.



**Figura 42:** livelli della proteina siero albumina nei dieci pazienti affetti da VKC

I risultati positivi ottenuti dal monitoraggio del profilo proteomico di pazienti con diverso grado di severità della patologia costituiscono un punto di partenza verso la ricerca dei meccanismi molecolari che innescano la patologia e delle risposte infiammatorie messe in atto dall'organismo per difendersi da essa.

In un lavoro di proteomica comparativa del fluido lacrimale [44] il proteoma di sette soggetti di controllo (pool) è stato confrontato con quello di sette soggetti affetti da VKC (pool) separando le proteine tramite 2 D- PAGE e identificando le proteine candidate tramite MALDI-TOF MS (figura 43).



**Table 2**  
Identification of differential tear proteome in VKC.

Differential proteome by 2D-PAGE				Protein identification by MALDI-TOF MS					
Spot ID	Control (mean intensity)	VKC (mean intensity)	P value (intensity)	p <sup>a</sup>	MW (kDa) <sup>b</sup>	Mascot database	Probability	Protein score (CI%) <sup>c</sup>	Accession number
3020	1.689	26.1159	0.00233	5.5/9.3	10/13.2	IL-4	1.0e+000	18	gi 2905624
7007	5.3614	42.1496	0.000583	6.8/6.5	11/10.8	phospholipase A2	1.0e+000	100	gi 21514544
3529	0.9886	34.2359	0.000583	5.9/5.6	36.5/65.2	Albumin	1.0e+000	100	gi 27692693
8432	0.0585	6.7277	0.000583	8.2/8.8	35.5/30.6	Lactoferrin	1.0e+000	85.6	gi 1943570
3743	0.1405	13.4158	0.000583	5.8/6.6	58/51.6	Hemopexin	1.0e+000	94.5	gi 13529281
6016	3.9956	20.5935	0.00233	6.5/5.3	12/17.9	Lipocalin	1.0e+000	99.9	gi 4504963

<sup>a</sup> Observed/theoretical pI value.

**Figura 43:** Proteomica comparativa del fluido lacrimale tramite top-down proteomics. Da Pong J. et al., *Anal. Biochem.*, **2010**; 404: 82-85. Riprodotto con il permesso dell'editore.

E' stato impiegato un approccio di tipo quantitativo: in particolare la presenza di espressione differenziale delle proteine identificate tra campioni di controllo e campioni dei soggetti affetti da patologia è stata valutata confrontando le intensità degli spot presenti nei due gel.

Il rapporto tra l'intensità dello spot della proteina Hemopexina nel pool dei campioni affetti da VKC e quella dello spot presente nel pool dei soggetti sani ha indicato la presenza di livelli 95,5 volte maggiori di tale proteina nei soggetti patologici analizzati. Anche i risultati ottenuti da Pong e collaboratori, inoltre, evidenziano la presenza di elevati livelli di siero albumina (34,6x) nel fluido lacrimale dei soggetti affetti da VKC.

L'ipotesi espressa dagli autori è che l'Emopexina sia secreta dalla ghiandola

lacrimale principale nei soggetti affetti d VKC, mentre la siero albumina provenga dai capillari sanguigni e che la sua presenza sia una prova indiretta della perdita di integrità della superficie oculare.

Al momento sembra più semplice ipotizzare il passaggio di tali proteine dal siero al fluido lacrimale e dunque una loro comune origine. I dati acquisiti, infatti, hanno indicato la sovraespressione di un'altra proteina serica, la serotransferrina nei dieci campioni appartenenti a soggetti affetti da VKC. Inoltre nello stesso paziente l'incremento delle tre proteine è dello stesso ordine di grandezza. L'essudazione passiva di tali proteine dai capillari che irrorano la congiuntiva è legata al processo di infiammazione cronico che si instaura durante la patologia.

La figura 44 a, esplicitativa della metodologia con cui è stata eseguita l'analisi quantitativa dei campioni, mostra uno spettro rappresentativo MS/MS del precursore con massa 1928.14 corrispondente ad un peptide triptico della siero albumina.

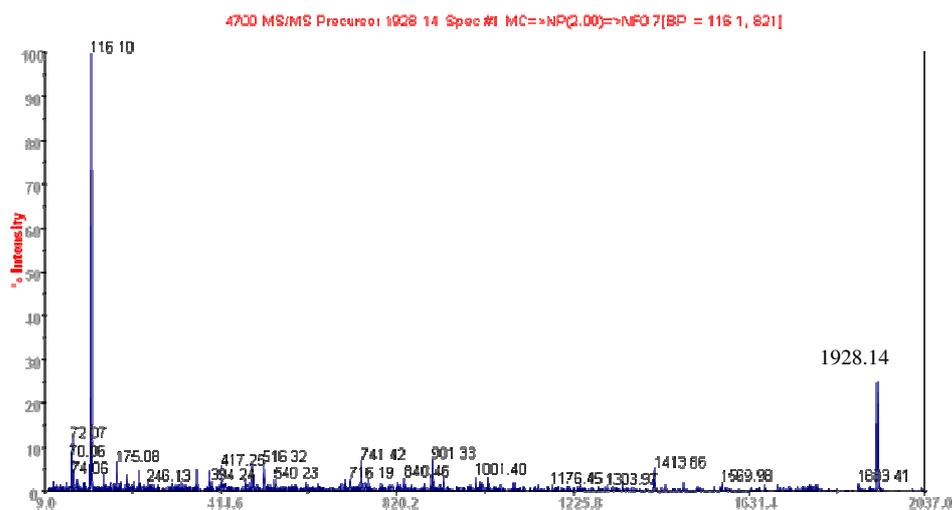
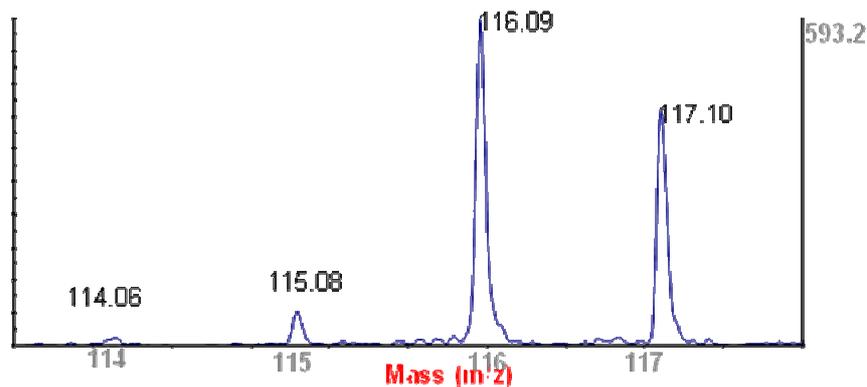


Figura 44 a: spettro MS/MS del peptide della siero albumina

La figura 44 b rappresenta invece un particolare del mass range che evidenzia la differenza tra area dei picchi del reporter group 116 e soprattutto 117 impiegati per marcare i peptidi del fluido lacrimale dei campioni patologici e area dei picchi dei reporter group 114 e 115 utilizzati per marcare i peptidi del fluido lacrimale dei campioni di controllo. Tale spettro indica chiaramente che nelle lacrime di soggetti affetti da Vernal Keratoconjunctivitis si verifica un drammatico incremento nei livelli di tale proteina.

4700 MS/MS Precursor 1928.14 Spec #1 MC=>NR(2.00)=>NF0.7=>SM5[BP = 116.1, 593]



**Figura 44 b:** particolare dello spettro MS/MS del peptide 1928.14 della siero albumina

In ogni caso, i nostri dati, ottenuti mediante tecniche di bottom-up proteomics, e i dati di Pong et al., ottenuti mediante tecniche di top-down proteomics, sono concordi nell'indicare la sovraespressione sia della proteina Emopexina che della siero albumina.

## 4.2. Terapia farmacologica

Ad oggi esistono diverse terapie impiegate per la prevenzione delle ricadute ed il controllo delle fasi attive della Vernal Keratoconjunctivitis la cui sicurezza ed efficacia deve ancora essere migliorata; non esistono tuttavia in commercio farmaci in grado di assicurare la completa guarigione dalla patologia che presenta riacutizzazioni ingravescenti nel periodo primaverile-estivo [16]. La tipologia di trattamento seguita varia in funzione della durata e della frequenza dei sintomi, severità del quadro infiammatorio e del coinvolgimento corneale [45].

In letteratura sono presenti diverse ricerche relative alla valutazione dell'efficacia di diverse terapie farmacologiche impiegate per il trattamento della Vernal Keratoconjunctivitis in cui il monitoraggio della terapia è stato realizzato tramite la valutazione degli score oculistici sintomatologico (SS) ed obiettivo (SO) dei pazienti valutando le differenze esistenti tra pazienti affetti da VKC non sottoposti ad alcun trattamento farmacologico e pazienti sottoposti a specifiche terapie. Nessun trattamento farmacologico ad oggi in commercio è privo di effetti collaterali o è in grado di eliminare i segni e i sintomi completamente. Pertanto è necessario ancora sviluppare nuove strategie terapeutiche per rispondere alla complessa patogenesi delle forme severe della VKC [46].

Diversi studi hanno rivelato che nelle forme lievi o moderate può essere sufficiente il trattamento con colliri antistaminici come ketotifene, olopatadina ed azelastina prima del previsto esordio dei sintomi, associato a brevi cicli di corticosteroidi.

Oltre agli antistaminici, sono stati utilizzati anche inibitori della degranolazione mastocitaria (disodiocromoglicato, nedocromile) e farmaci antinfiammatori non-

steroidi come la lodoxamide. Tali farmaci si sono rivelati utili soprattutto nelle fasi iniziali e finali della patologia anche se è opportuno valutarne l'efficacia nei singoli pazienti.

E' ampiamente descritto in letteratura l'impiego di preparati cortisonici per uso topico (clobetasone, rimexolone, desonide, fluorometolone, loteprednololo, desametasone) per il controllo delle fasi attive della patologia. Tali farmaci sono certamente efficaci, ma per i loro effetti collaterali nell'impiego a lungo termine sono da utilizzare per cicli brevi (tra sette e quindici giorni), ripetibili tre-quattro volte l'anno. Poiché la fase acuta della Vernal Keratoconjunctivitis si svolge generalmente nell'arco di cinque-sei mesi l'anno, la terapia con soli cortisonici topici è improponibile, se non correndo il rischio di gravi effetti collaterali come la cheratite erpetica sovrapposta, infezioni batteriche, ipertensione oculare, glaucoma, cataratta [47-48].

La ciclosporina A per via oculare è stata utilizzata in vari trials in doppio cieco contro placebo. I risultati, basati sulla valutazione delle medie degli score oculari sintomatologico ed obiettivo, hanno rivelato l'efficacia di tale farmaco nel trattamento di pazienti affetti da forme di Vernal Keratoconjunctivitis con diverso grado di severità della patologia da moderato a grave senza reazioni avverse significative [16-25]. Le concentrazioni di ciclosporina A dimostrate efficaci per uso topico negli studi citati variano dall'1% al 2% (figura 45). Sono trascorse più di due decenni dal primo report che ha descritto gli effetti benefici della ciclosporina nella VKC. Tale farmaco è stato finora veicolato in soluzione oleosa, si attende ancora una preparazione commerciale della ciclosporina in un veicolo migliore dell'olio per trattare la patologia [45].

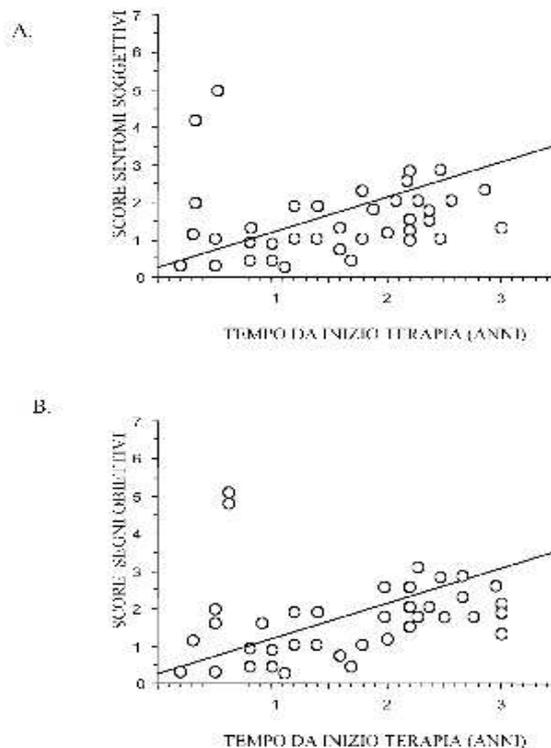
R. Tesse e L. Spadavecchia, ricercatori presso l'Università degli studi di Bari, hanno condotto uno studio su un'ampia casistica di bambini che presentavano segni e sintomi della Verna Keratoconjunctivitis grave con l'obiettivo di verificare l'efficacia del trattamento con ciclosporina A ad una concentrazione pari all'1% e di identificare eventuali fattori condizionanti la risposta alla terapia [20]. E' stato arruolato un trial aperto su 197 bambini non trattati con medicamenti topici da almeno otto settimane i quali hanno ricevuto il collirio a base ciclosporina A all'1% per quattro mesi. Gli score oculistici sintomatologico ed obiettivo sono stati determinati all'ingresso dello studio, dopo due settimane e dopo quattro mesi dall'inizio della terapia.



**Figura 45:** colliri a base di ciclosporina A

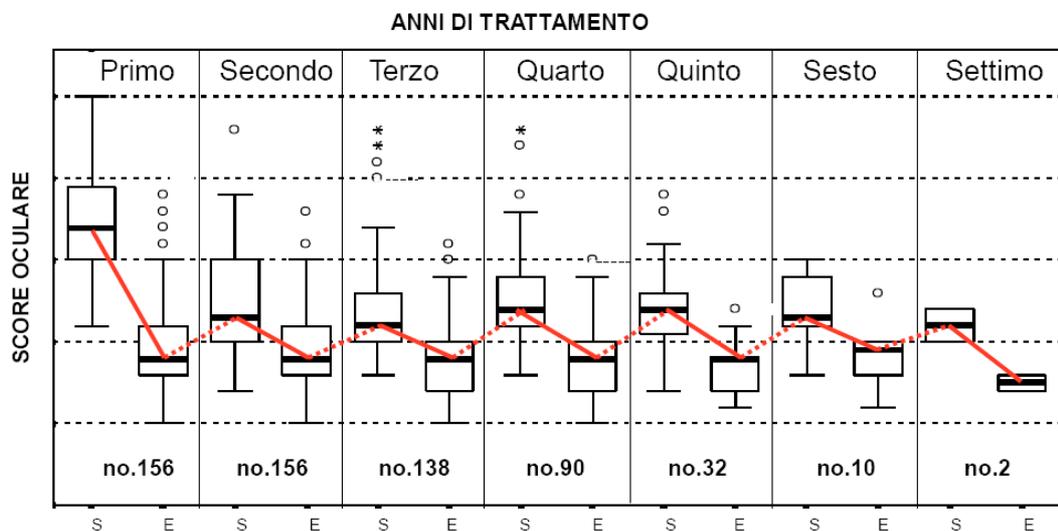
Dall'analisi degli scores sintomatologico (SS) ed obiettivo (SO) è stato osservato un netto miglioramento della situazione oculare dei bambini rispetto all'epoca dell'arruolamento già nelle prime due settimane dall'inizio della terapia. Si passava infatti da un valore iniziale di Score Sintomatologico pari a  $5,0 \pm 2,1$  (media  $\pm$  DS) ad un valore, dopo due settimane di terapia, pari a  $2,5 \pm 1,7$ . I

valori dello Score Obiettivo scendevano inoltre da  $4,1 \pm 1,6$ , a  $1,7 \pm 1,6$ . E' stata osservata la quasi completa remissione clinica della malattia a quattro mesi dall'inizio della terapia con valori di SS pari a  $0,4 \pm 0,7$  e di SO pari a  $0,2 \pm 0,5$ . Infine è stato verificato che il miglioramento clinico era più rapido nei bambini che avevano iniziato precocemente la terapia, rispetto all'esordio della malattia e/o che avevano eseguito più cicli terapeutici. La figura 46 mostra la correlazione positiva tra score oculistico sintomatologico ed obiettivo dei pazienti e tempo tra l'inizio dei sintomi e l'impiego della ciclosporina A all'1%. Lo stesso studio ha dimostrato, inoltre, che una concentrazione di ciclosporina A fino al 2% può essere riservata ai casi particolarmente gravi e complicati.



**Figura 46:** relazione tra SS e SO dei pazienti e tempo di inizio terapia  
 Da Tesse R. e Spadavecchia L., *Riv. di Immunol. e Allergol. Pediatr.*, **2009**, 02: 22-27.

Nel 2010 Pucci e Collaboratori hanno pubblicato uno studio riguardante la valutazione della sicurezza ed efficacia della ciclosporina topica a lungo termine su bambini affetti da VKC severa. In particolare i bambini sono stati seguiti per un periodo dai due ai sette anni impiegando due tipologie di formulazioni: ciclosporina A all'1% e al 2% comparando gli score obiettivi oculari all'inizio e al termine di ogni anno di trattamento. I primi due anni sono stati monitorati 156 pazienti; il terzo 138 pazienti (88.5%); il quarto 90 pazienti (57.7%); il quinto 32 (20.5%); il sesto 10 (6.4%), il settimo 2 (1.3%). I risultati (figura 47) sono stati concordi nell'indicare un significativo miglioramento dello score obiettivo oculare alla fine di ogni anno di trattamento dimostrando l'efficacia di tale terapia farmacologica a lungo termine con ciclosporina topica [49].



**Figura 47:** medie degli score oculari annuali in 156 pazienti affetti da VKC trattati con Csa  
 Da Pucci N. et al., *Int. J. Immunopath. Pharm.*, **2010**, Jul-Sep; 23(3):865-71. Riprodotto da diapositiva.

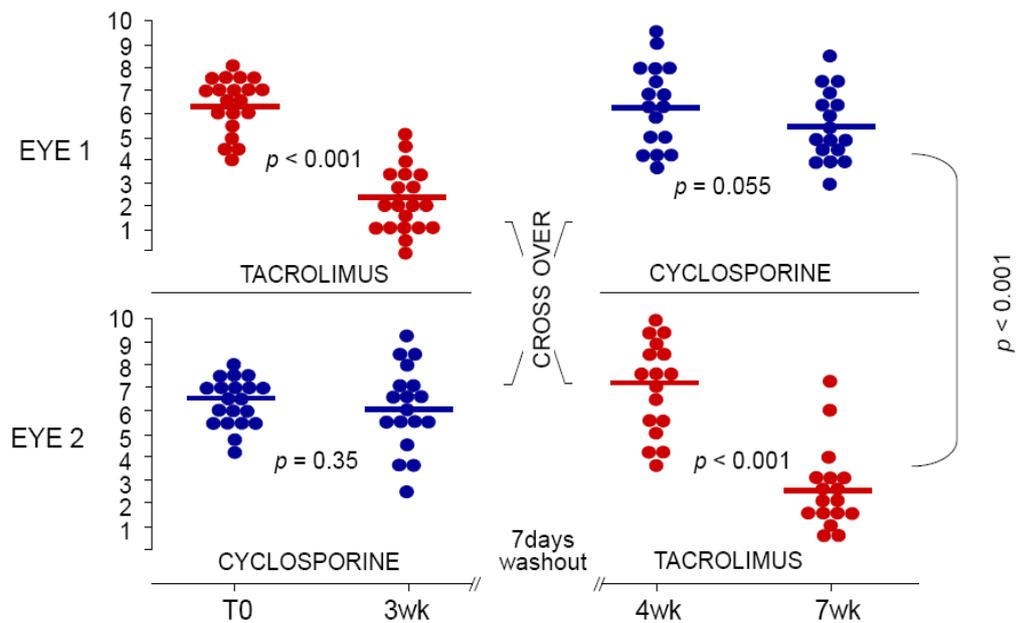
Nei centri specializzati vengono utilizzati colliri galenici a base di ciclosporina A, proveniente dalla forma farmaceutica endovenosa diluita a varie concentrazioni

(2% - 1% - 0,5% - 0,25%) in base alla gravità dei sintomi e dei segni e alla risposta clinica, con possibilità di diluizione in olio di oliva o di girasole sterile, in lacrime artificiali o in soluzione bilanciata (proveniente dalla soluzione usata nella chirurgia della cataratta per l'irrigazione endo-oculare) [25-50]. Il trattamento viene proposto dopo aver verificato il fallimento o l'insufficienza delle terapie tradizionali. La firma di un consenso informato scritto, contenente esaurienti spiegazioni circa i benefici e i rischi reali e potenziali, è indispensabile in quanto la ciclosporina A non è registrata per il trattamento della Vernal Keratoconjunctivitis, tanto meno in formulazione per via oculare.

Nel 2006 la Novagali Pharma ha sviluppato **Vekacia®**, un prodotto a base di ciclosporina A, che ha ricevuto la Designazione di Farmaco Orfano dall'EMEA (European Medicines Agency) 2006 e dall'FDA nel 2007 per il trattamento della Vernal Keratoconjunctivitis che garantisce ai pazienti qualità, sicurezza ed efficacia. I ricercatori hanno concluso la fase di sperimentazione clinica III, pertanto Vekacia potrebbe diventare il primo farmaco fornito in Europa specifico per il trattamento di tale patologia.

Esiste una percentuale di pazienti variabile dall'8% al 15% che è sostanzialmente resistente al trattamento con ciclosporina A, almeno per i 3-4 mesi centrali del periodo primaverile-estivo. Nei casi più gravi, resistenti a tale farmaco sono in corso studi di efficacia e sicurezza di un trattamento con tacrolimus (o FK506) per via oculare, preparato con modalità analoghe a quelle utilizzate per la ciclosporina che finora hanno dato esiti favorevoli [25] tanto che il tacrolimus è stato dichiarato farmaco orfano per la VKC dall'EMEA (European Medicines Agency).

Pucci e collaboratori hanno condotto uno studio comparativo randomizzato in doppio cieco con tacrolimus soluzione oculare 0.1% e ciclosporina A soluzione oculare 1% in bambini affetti da VKC grave in fase attiva per sette settimane seguito da un trial aperto per 24 mesi per la valutazione dell'efficacia a lungo termine e della sicurezza del trattamento [51]. La valutazione dello score obiettivo oculare (figura 48) ha indicato che entrambe le terapie sono efficaci per il trattamento della VKC ma che il tacrolimus determina una diminuzione più netta dello Score Obiettivo Oculare rispetto alla ciclosporina A.



**Figura 48:** SO in 20 bambini con VKC grave trattati con tacrolimus e Csa per via oculare. Da Pucci N. et al., XV° convegno pediatrico, Firenze 12-13 Novembre 2010. Riprodotto da diapositiva.

Gli studi riportati in letteratura in merito alla diagnosi della patologia ed il monitoring dell'efficacia dei trattamenti farmacologici effettuati su pazienti affetti da Vernal Keratoconjunctivitis, dunque, si basano sull'analisi di elementi

anamnestici e clinici mentre i test di laboratorio non sono ad oggi ancora ampiamente sviluppati.

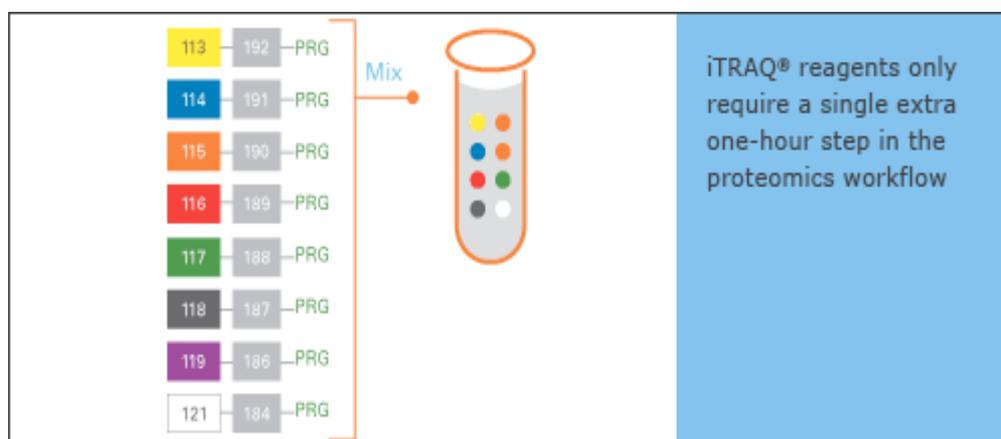
Il presente lavoro di tesi, dunque, introduce un forte elemento di novità rispetto al passato: a differenza degli studi finora riportati in letteratura, infatti, la fase di monitoring farmacologico è stata effettuata tramite l'osservazione dei profili proteomici del fluido lacrimale di otto soggetti sia secondo un profilo qualitativo che quantitativo fornendo dunque dati obiettivi, precisi ed inconfutabili.

In particolare sono stati analizzati: un soggetto affetto da una forma lieve della patologia, due soggetti affetti da Vernal Keratoconjunctivitis appena diagnosticata, quattro soggetti affetti VKC sottoposti a trattamento farmacologico con ciclosporina A ad una concentrazione pari all'1% ed infine un soggetto affetti da VKC sottoposto a trattamento farmacologico con clobetasone, un derivato del cortisone.

Tali campioni sono stati trattati seguendo la procedura iTRAQ 8-plex secondo il protocollo fornito dalla Applied Biosystems: *iTRAQ Reagents Methods Development Kit*. Tale procedura è l'unico metodo quantitativo che ha la proprietà di consentire la marcatura di otto campioni simultaneamente rendendo dunque più veloci le analisi. L'abilità di marcare otto campioni simultaneamente consente, inoltre, di raggiungere maggiore flessibilità nel disegno sperimentale. Infine la procedura iTRAQ 8-plex consente di ottenere risultati affidabili in quanto il livello di confidence che si raggiunge nell'identificazione dei peptidi appartenenti ad una data proteina è elevato.

Nella procedura iTRAQ 8-plex, come nella 4-plex, il reagente iTRAQ è un

reagente non-polimerico costituito da un Reporter group, un Balance Group e un gruppo peptidico reattivo (PGR) la cui composizione è ancora segreta. Il Reporter group ha valori di massa pari a 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 e 121; il Balance Group ha valori di massa pari a 184 o tra 186 e 192 in modo tale da assicurare che la combinazione tra le masse del Reporter Group e del Balance Group stesso rimangano costanti a 305. Da ed ottenere così l'isobaric tag dei peptidi presenti nei diversi campioni (figura 49).



**Figura 49:** marcatura differenziale dei campioni con reagenti iTRAQ 8-plex

La procedura 8-plex è in tutto simile alla procedura 4-plex: essa prevede, infatti, una fase di denaturazione delle proteine presenti nel film lacrimale dei campioni analizzati; la riduzione dei legami sulfidrilici con DTT; il blocco delle cisteine con MMTS; l'idrolisi delle proteine mediante tripsina porcina; una fase di marcatura dei peptidi ottenuti con isotopi non radioattivi con valori delle masse dei Reporter group pari a 113-114-115-116-117-118-119-121; una fase finale di ricombinazione dei peptidi triptici ottenuti in un'unica miscela.

Per la realizzazione di tale esperimento, come accennato precedentemente, sono state impiegate le secrezioni lacrimali di otto soggetti affetti da VKC: un soggetto, impiegato come controllo, affetto da una forma lieve della patologia e sottoposto pertanto a trattamento con un semplice antistaminico, i cui peptidi sono stati marcati con il Reporter group 113; due soggetti affetti da Vernal Keratoconjunctivitis appena diagnosticata (marcando i peptidi con i reporter group 118 e 119); quattro soggetti affetti VKC sottoposti a trattamento farmacologico con ciclosporina A ad una concentrazione pari all'1% (peptidi marcati con i reporter group 114 115 117 e 121); ed infine un soggetto affetto da VKC sottoposto a trattamento farmacologico con clobetasone (peptidi marcati con il reporter group 116).

Tale miscela è stata sottoposta a separazione tramite un sistema  $\mu$ HPLC DIONEX (LC Packings) e a successiva analisi mediante lo spettrometro di massa MALDI TOF/TOF 4800 (*Applied Biosystem*).

La frammentazione MS/MS dei peptidi di interesse marcati con il reagente iTRAQ 8-plex consente di ottenere spettri puliti, un incremento del numero di segnali e dunque un'elevata confidence nell'identificazione dei peptidi.

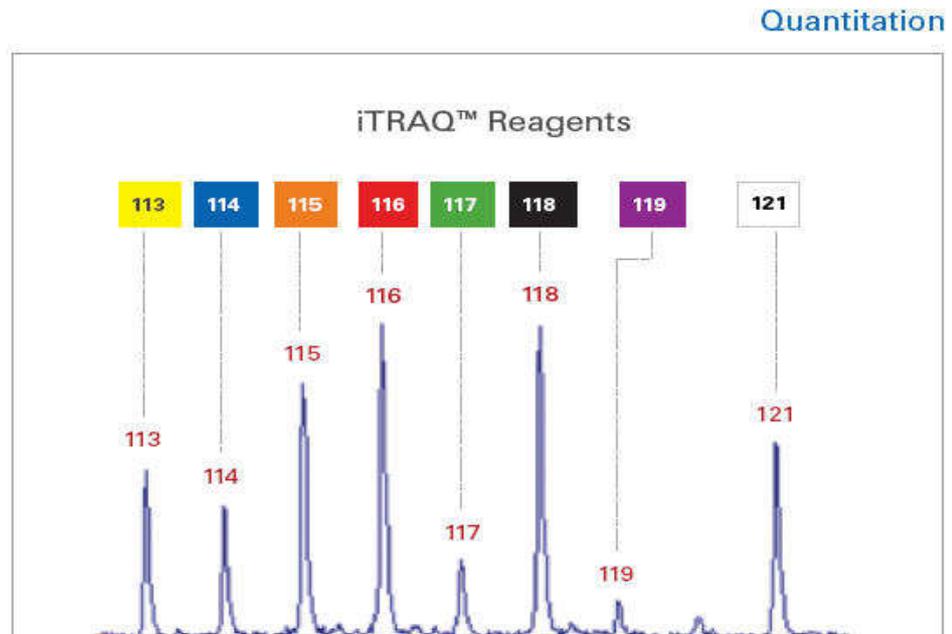
In figura 50 è riportato un particolare del mass range di un generico spettro MS/MS di un peptide.

L'analisi quantitativa dei peptidi di interesse è stata realizzata calcolando i rapporti dei reporter group: 114/113 (Csa 1%); 115/113 (Csa 1%); 116/113 (clobh); 117/113 (Csa 1%); 118/113 (VKC<sub>1</sub>); 119/113 (VKC<sub>2</sub>); 121/113 (Csa 1%).

In Tabella 7 è riportato un report che contiene le informazioni relative all'analisi quantitativa di undici importanti proteine presenti nell'esperimento

iTRAQ 8-plex effettuato.

Osservando i risultati ottenuti si nota l'esistenza di differenze significative tra soggetti affetti da Vernal Keratoconjunctivitis, soggetti sottoposti alla terapia farmacologica con ciclosporina A e soggetti trattati con clobetasone.



**Figura 50:** particolare del masse range di un generico spettro MS/MS di un peptide

E' stato dunque possibile trarre diverse importanti considerazioni:

- le lacrime di tutti i soggetti affetti da Vernal Keratoconjunctivitis non sottoposti ad alcun tipo di trattamento farmacologico presentano elevati livelli delle proteine siero albumina, serotransferrina, ed emopexina. Inoltre i livelli di tali proteine nei singoli prelievi sono dello stesso ordine di grandezza. Tale esperimento ha permesso infine di identificare altre due proteine tipicamente sieriche quali apolipoprotein A-I e alpha 1-acid glycoprotein;

- le lacrime dell'unico soggetto analizzato che aveva seguito una terapia farmacologica a base di clobetasone contengono livelli più bassi di tali proteine;
- le lacrime di tutti i soggetti sottoposti a terapia farmacologica con ciclosporina A ad una concentrazione pari all'1%, infine, presentano una drastica diminuzione nei livelli delle stesse proteine.

**Tabella 7:** analisi quantitativa di undici importanti proteine identificate nell'esperimento iTRAQ 8-plex

	VKC Nontrattata	VKC Nontrattata	Csa 1%	Csa 1%	Csa 1%	Csa 1%	clobetasone
Serum albumin	9.1	7.3	2.5	2.7	1.6	1.5	3.8
Lactotransferrin	1.5	1.1	0.6	0.8	1.1	0.4	1.1
Lysozyme C	0.7	1.0	0.6	0.7	0.8	0.9	0.9
Lacritin	1.9	1.6	1.1	1.2	2.3	1.2	1.2
Mammaglobin B	1.5	1.2	0.8	1.1	1.6	0.8	0.9
Lipocalin-1	1.3	0.6	0.6	0.6	1.1	0.7	0.7
Proline-rich protein 4	1.2	1.4	0.5	0.7	1.6	1.3	1.1
Hemopexin	9.0	6.9	1.9	2.8	1.7	1.1	5.1
Serotransferrin	8.1	6.0	1.6	2.0	1.5	0.9	5.7
Alpha 1 acid glycoprotein	9.7	16.1	1.9	2.9	2.2	1.4	2.5
Apolipoprotein a-1	3.0	2.9	1.6	1.1	0.8	0.9	1.1

La figura 51 a mostra uno spettro rappresentativo MS/MS del precursore con massa 1226.71 corrispondente a un peptide triptico della siero albumina. La figura 51 b rappresenta invece un particolare del mass range che evidenzia la differenza tra area dei picchi dei vari reporter group: 118 e 119 appartenenti ai due soggetti affetti da VKC appena diagnosticata; 114 115 117 e 121 appartenenti ai quattro soggetti affetti VKC sottoposti a trattamento farmacologico con ciclosporina

all'1%; 116 appartenente all'unico soggetto affetto da VKC sottoposto a trattamento farmacologico con clobetasone, 113 appartenente al soggetto sano impiegato come controllo.

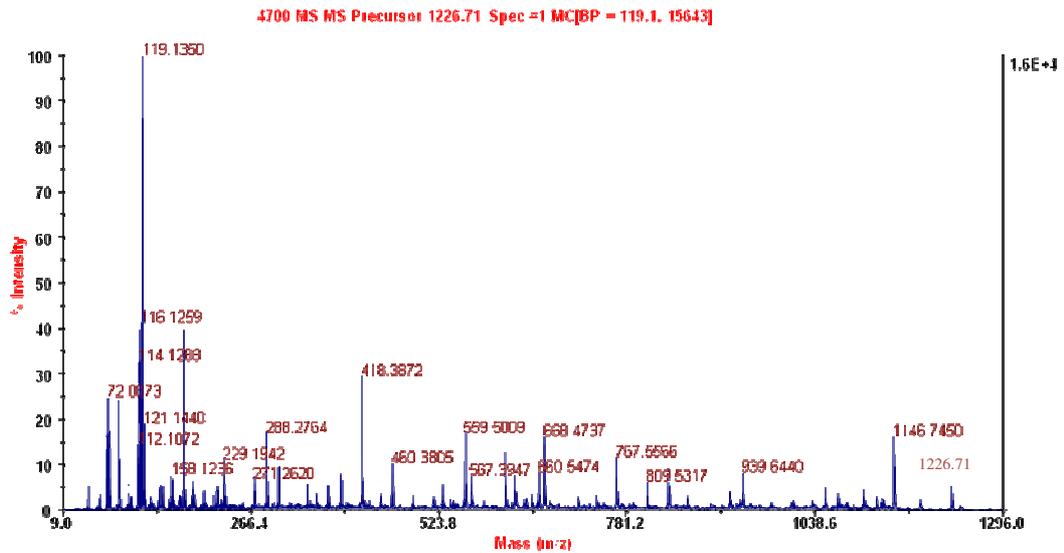


Figura 51 a: spettro MS/MS del peptide 1226.71 della siero albumina

Osservando i picchi relativi ai Reporter group presenti nello spettro in figura 51 b è possibile notare che nei soggetti affetti VKC non trattata i picchi sono molto intensi, nei soggetti sottoposti a tutti i tipi di trattamento farmacologico considerati i valori di intensità subiscono una notevole diminuzione. Non deve meravigliare il fatto che il picco 113 relativo al soggetto trattato con Anti H1 sia il meno intenso poiché tale risultato è dovuto al fatto che il soggetto che ha ricevuto l'antistaminico è affetto da una forma lieve della patologia per cui presenta livelli più bassi dei biomarkers della VKC.

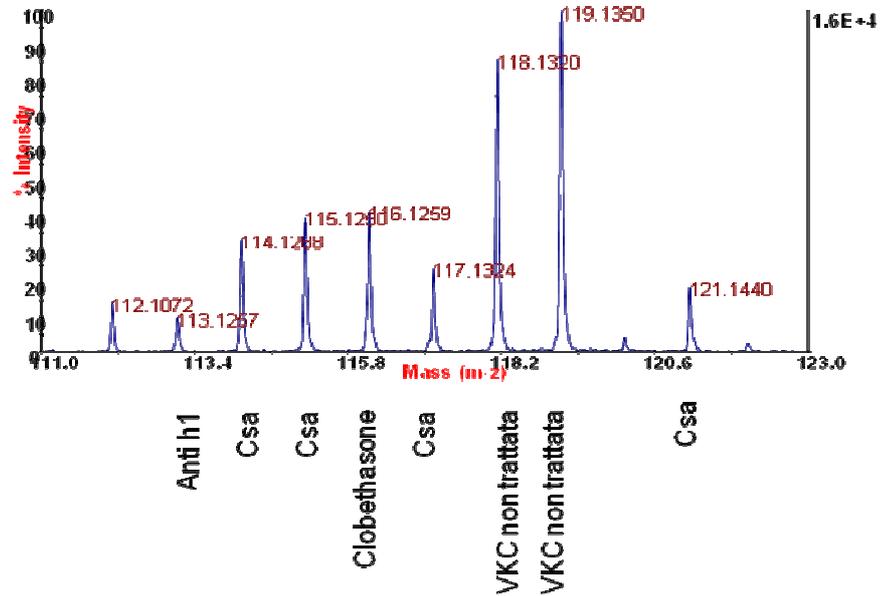


Figura 51 b: zona a basso mass range dello spettro MS/MS del peptide 1226.71

Riassumendo in questi campioni è stato possibile osservare una notevole diminuzione nei livelli delle proteine tipicamente sieriche nel fluido lacrimale dei soggetti sottoposti a trattamento farmacologico con clobetasone e ciclosporina A all'1%. I valori relativi ai livelli di tali proteine, inoltre, sono molto simili a quelli relativi al soggetto trattato con antistaminico impiegato come controllo. Tali risultati possono essere considerati, dunque, come un segno evidente della regressione della patologia dovuta al trattamento farmacologico.

I risultati ottenuti hanno permesso infine di concludere che entrambe le terapie farmacologiche, sia a base di clobetasone che di ciclosporina A all'1% sono efficaci sia per la prevenzione delle ricadute che per la fase di controllo delle fasi attive della Vernal Keratoconjunctivitis.

## 5. CONCLUSIONI

L'analisi proteomica quantitativa del fluido lacrimale si è rivelata molto informativa nello studio della Vernal Keratoconjunctivitis. La procedura iTRAQ costituisce un mezzo d'indagine obiettivo per la fase di diagnosi della Vernal Keratoconjunctivitis e dunque per la ricerca di biomarkers della patologia; per la misura del grado di severità della VKC ed infine per monitorare l'efficacia di trattamenti farmacologici per il controllo dei sintomi della VKC.

Il confronto del profilo proteomico qualitativo e quantitativo di soggetti sani con quello di soggetti affetti da Vernal Keratoconjunctivitis si è rivelato uno strumento utile per l'identificazione di biomarker predittivi della patologia oggetto di studio quali siero albumina, emopexina e serotransferrina. L'impiego di tale metodologia, dunque, potrebbe garantire in futuro la possibilità di ottenere la diagnosi della patologia impiegando una strategia non invasiva. Tale vantaggio sarebbe particolarmente importante in quanto consentirebbe di migliorare notevolmente la compliance del paziente.

La tecnologia iTRAQ ha consentito inoltre di monitorare l'attività della patologia ed il suo decorso. In particolare i risultati sono stati concordi nell'indicare che i livelli di siero albumina nel fluido lacrimale siano predittivi del grado di severità della patologia. Infatti i livelli di tale proteina nel fluido lacrimale, come già detto, aumentano in maniera lineare se si passa dall'analisi di soggetti affetti da una forma lieve della patologia a soggetti che presentano grado di severità grave. Il traguardo raggiunto è significativo in quanto potrà essere impiegato come punto di partenza verso la ricerca dei meccanismi molecolari che innescano la patologia e delle risposte infiammatorie messe in atto dall'organismo

per difendersi da essa.

Infine l'impiego della procedura iTRAQ ha permesso, di monitorare l'efficacia della terapia basata sull'impiego di ciclosporina A all'1% e della terapia basata sull'impiego di Clobetasone non basandosi semplicemente sull'analisi di elementi anamnestici e clinici come è stato fatto in passato, bensì, come già spiegato, tramite l'analisi del profilo proteomico qualitativo e quantitativo di pazienti affetti da Vernal Keratoconjunctivitis sottoposti a tali terapie ed il loro confronto con quello di un soggetto affetto da una forma lieve della patologia trattato con un semplice antistaminico.

I risultati sono stati positivi per entrambi i trattamenti ed hanno confermato l'efficacia di tali farmaci per la gestione delle fasi attive della patologia in quanto essi consentono un buon controllo dei sintomi ed in particolare del quadro infiammatorio.

Tali risultati sono incoraggianti ma rappresentano ad oggi solo un punto di partenza; la ricerca pertanto deve andare avanti poiché i dati ottenuti potranno consentire in futuro di migliorare la gestione di tale patologia oculare debilitante e si spera porteranno alla scoperta di terapie che consentano la completa guarigione da questa patologia.

A tal fine si pensa per il futuro, in virtù dell'elevata complessità degli spettri di massa delle proteine dei fluidi biologici, di ampliare il progetto con un'analisi statistica multivariata estesa ad un più elevato numero di campioni, in modo da poter ottenere risultati ancor più significativi su quanto osservato.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Wolff E., The muco-cutaneous junction of the lid margin and distribution of tear fluid. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK*, **1946**; 66:291-308.
- [2] McDonald J.E., Surface phenomena of the tear film. *Am. J. ophthalmol.*, **1969**; 67:56-64.
- [3] Tiffany J.M., Tear film stability and contact lens wear. *J. Br. Contact Lend Assoc.*, **1988**; 11:35-38.
- [4] Hodson S., Herlam R., Of an extracellular matrix in human precorneal tear film. *J. theor. Biol.*, **1994**; 168:395.
- [5] Mircheef A.K., Secrezione di elettroliti ed acqua nella fluidificazione del fluido. In: Albert D.M., Jakobiec F.A., *Principi e pratica di oftalmologia. Scienze di base*. Verduci Editore, **2000**; 1:495-502.
- [6] Gibard J.P., Farris R.L., Tear osmolarity and ocular surface disease in Keratoconjunctivitis sicca. *Arch. Ophthalmol.*, **1979**; 97:1642-1646.
- [7] Brown S.I. et Derwichan D.G., The oils of Meibomian glands. Physical and surface characteristics. *Arch. Ophthalmol.*, **1969**; 82: 537-540.
- [8] Rolando M., Zierhut M., The Ocular Surface and Tear Film and Their Dysfunction in Dry Eye Disease. *Survey of Ophthalmology*, **2001**; 45: 203-10.
- [9] Csete M.E., Doyle J.C., Reverse engineering of biological complexity. *Science*, **2002**; 295 (5560): 1664-9.

- [10] Pandey A., Mann M., Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, **2000**; 405: 837-846.
- [11] Pawson T., Scott J.D., Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, **1997**; 278:2075-80.
- [12] Hussain M., Spring cataract. *Pak. J. Ophthalmol.*, **1990**; 6: 8-12.
- [13] Jun J., Bielory L., Raizman M.B., Vernal Conjunctivitis. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.*, **2008**; 28: 59–1903.
- [14] Buckley R.J., Vernal Keratoconjunctivitis. *Int. Ophthalmol. Clin.*, **1988**; 28(4): 303-8.
- [15] Leonardi A., Busca F., Motterle L., Cavarzeran F., Fregona I.A., Plebani M., Secchi A.G, Case series of 406 Vernal Keratoconjunctivitis patients: a demographic and epidemiological study. *Acta Ophthalmol. Scand.*, **2006**; 84:406–10.
- [16] Leonardi A., Vernal Keratoconjunctivitis: pathogenesis and treatment. *Progress in Retinal and Eye Research*, **2002**; 21: 319–339.
- [17] Smolin G., O'Connor C.R., Atopic diseases affecting the eye. In: Smolin G., editor. *Ocular immunology*, Philadelphia: Lea and Febiger, **1981**; 137.
- [18] Montan P.G., Immunological and inflammatory mechanisms in ocular allergy with special reference to Vernal Keratoconjunctivitis. Clinical and experimental studies. *Acta Ophthalmol. Scand.*, **2001**; 79:212.
- [19] Leonardi A., Sathe S., Bortolotti M., Beaton A., Sack R., Cytokines, matrix metalloproteases, angiogenic and growth factors in tears of normal subjects and Vernal Keratoconjunctivitis patients. *Allergy*, **2009**; 64:710-7.

- [20] Tesse R., Spadavecchia L., Trattamento con ciclosporina collirio e follow-up della cheratocongiuntivite vernal in età pediatrica. *Riv. di Immunol. e Allergol. Pediatr.*, **2009**; 22-27.
- [21] Pucci N., Novembre E., Lombardi E., Cianferoni A., Bernardini R., Massai C. et al., Atopy and serum eosinophil cationic protein in 110 white children with Vernal Keratoconjunctivitis: differences between tarsal and limbal forms. *Clinical and Experimental Allergy*, **2003**; 33:325-30.
- [22] Leonardi A., De Dominicis C., Motterle L., Immunopathogenesis of ocular allergy: a schematic approach to different clinical entities. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, **2007**; 7:429-35.
- [23] Bonini S., Atopic keratoconjunctivitis. *Allergy*, **2004**; 59:71-3.
- [24] Pucci N., Novembre E., Lombardi E., Massai C., Bernardini R., Caputo R., Campa L., De Libero C., Vierucci A., Long eyelashes in a case series of 93 children with Vernal Keratoconjunctivitis. *Pediatrics*, **2005**; 115: e 86-91.
- [25] Napoli G., Allegri P., Pucci N., La cherato-congiuntivite primaverile (vernal). *Area Pediatrica*, **2008**; 7:51-8.
- [26] Fukushima A., Yamaguchi T., Ishida W., Fukata K., Liu F.T., Ueno H., Cyclosporin A inhibits eosinophilic infiltration into the conjunctiva mediated by type IV allergic reactions. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, **2006**; 34: 347–353.
- [27] Lambiase A., Minchiotti S., Leonardi A., Secchi A.G., Rolando M., Calabria G., Orsoni J., Zola E., Ferreri G., Aragona P., Reibaldi A., Chisari G., Bonini S., Prospective, multicenter demographic and epidemiological study on Vernal Keratoconjunctivitis: a glimpse of ocular surface in Italian population. *Ophthalmic epidemiology*, **2009**; 16:38-41.

- [28] Köcher T., Pichler P., Schutzbier M., Stingl C., Kaul A., Teucher N., Hasenfuss G., Penninger J.M., Mechtler K., High Precision Quantitative Proteomics Using iTRAQ on an LTQ Orbitrap: A New Mass Spectrometric Method Combining the Benefits of All. *Journal of Proteome research*, **2009**; 8: 4743–4752.
- [29] Yen Ow S., Salim M., Noirel J., Evans C., Rehman I., Wright P.C., iTRAQ Underestimation in Simple and Complex Mixtures: “The Good, the Bad and the Ugly”. *Journal of Proteome research*, **2009**; 8: 5347–5355.
- [30] Hesse J., Jacak J., Kasper M., Regl G., Eichberger T., Winklmayr M., Aberger F., Sonnleitner M., Schlapak R., Howorka S., Muresan L., Frischauf A.M., Schutz G.J., RNA expression profiling at the single molecule level. *Genome Res.*, **2006**; 16 (8): 1041–1045.
- [31] DeSouza L.V., Taylor A.M., Li W., Minkoff M.S., Romaschin A.D., Colgan T.J., Siu K.W., Multiple reaction monitoring of mTRAQ-labeled peptides enables absolute quantification of endogenous levels of a potential cancer marker in cancerous and normal endometrial tissues. *Journal of Proteome research*, **2008**; 7 (8): 3525–3534.
- [32] DeSouza L.V., Romaschin A.D., Colgan T.J., Siu K.W., Absolute quantification of potential cancer markers in clinical tissue homogenates using multiple reaction monitoring on a hybrid triple quadrupole/linear ion trap tandem mass spectrometer. *Anal. Chem.*, **2009**; 81 (9): 3462–3470.
- [33] De Souza G.A., De Godoy L.M.F., Mann M., Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biology*, **2006**, 7: R72.

- [34] Josephson A.S., Lokwood D.W., Immunoelectrophoretic studies of the protein components of normal tears. *J.Immunol.*, **1964**; 93: 532-539.
- [35] Kijlstra A., Polak B.C., Luyendijk L., Transient decrease of secretory IgA in tears during rigid gas permeable contact lens wear. *Curr. Eye Res.*, **1992**; 11(2): 123-126.
- [36] Leonardi A., Curnow S.J., Zhan H., Calder V.L., Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clinical and Experimental Allergy*, **2006**; 36(6): 777-784.
- [37] Tomosugi N., Kitagawa K., Takahashi N., Sugai S., Ishikawa I., Diagnostic Potential of Tear Proteomic Patterns in Sjogren's Syndrome. *Journal of Proteome Research*, **2005**; 4(3): 820-825.
- [38] Versura P., Nanni P., Bavelloni A., Coslovi C., Cioffi G., Piazzini M., Roda A., Campos E.C., Analisi proteomica di lacrime umane in pazienti affetti da occhio secco da ipervaporazione. *Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio*, **2009**; 5(4), 290-297.
- [39] Zhou L., Beuerman R.W., Chan C.M., Zhao S.Z., Li X.R., Yang H., Tong L., Liu S., Stern M.E., Tan D., Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics. *Journal of Proteome Research*, **2009**; 8(11):4889-905.
- [40] Tong L., Zhou L., Beuerman R.W., Zhao S.Z., Li X.R. Association of tear proteins with Meibomian gland disease and dry eye symptoms. *Br. J. Ophthalmol.*, **2011**; 95(6):848-52.
- [41] Lei Z., Beuerman R.W., Chew A.P., Koh S.K., Cafaro T.A., Urrets-Zavalía E.A., Urrets-Zavalía J.A., Li S.F., Serra H.M., Quantitative analysis of N-

linked glycoproteins in tear fluid of climatic droplet keratopathy by glycopeptide capture and iTRAQ. *Journal of Proteome Research*, **2009**; 8(4):1992-2003.

- [42] Wong T.T., Zhou L., Li J., Tong L., Zhao S.Z., Li X.R., Yu S.J., Koh S.K., Beuerman R.W., Proteomic profiling of inflammatory signaling molecules in the tears of patients on chronic glaucoma medication. *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.*, **2011**; 52(10):7385-91.
- [43] Qiu X., Gong L., Sun X., Guo J., Chodara A.M., Efficacy of Acupuncture and Identification of Tear Protein Expression Changes Using iTRAQ Quantitative Proteomics in Rabbits. *Curr. Eye Res.*, **2011**; 36(10):886-94.
- [44] Pong J.C.F., Chu C.Y., Chu K.O., Poon T.C.W., Ngai S.M., Pang C.P., Wang C.C., Identification of hemopexin in tear film. *Analytical Biochem.*, **2010**; 404:82–85.
- [45] Kumar S., Gupta N., Vivian A.J., Modern Approach to Managing Vernal Keratoconjunctivitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, **2010**; 10:155-162.
- [46] Leonardi A., Motterle L., Bortolotti M., Allergy and the eye, *Clin. And exper.Immunol.*, **2008**; 153 (suppl. 1) 17-21.
- [47] Bonini S., Sacchetti M., Mantelli F., Lambiase A., Clinical grading of Vernal Keratoconjunctivitis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, **2007**; 7(5):436-41.
- [48] Berdy G.J., The effects of systemic medication on ocular allergic disease. *Acta Ophthalmol. Scand. Suppl.*, **2000**; (230):26-31.
- [49] Pucci N., Caputo R., Mori F., De Libero C., Di Grande L., Massai C., Bernardini R., Novembre E., Long-term safety and efficacy of topical

cyclosporine in 156 children with Vernal Keratoconjunctivitis. *Int. J. Immunopath. Pharm.*, **2010**; 23(3):865-71.

[50] Kiliç A., Gürler B., Topical 2% cyclosporine A in preservative-free artificial tears for the treatment of Vernal Keratoconjunctivitis. *Can. J. Ophthalmol.*, **2006**; 41:693-8.

[51] Pucci N., Di Grande L., De Libero C., Caputo R., Calvani A.M., Di Simone L., Rusconi F., Mori F., Azzari C., Novembre E., XV° convegno pediatrico, Firenze 12-13 Novembre 2010.

