

Articolo Originale

Analisi proteomica di lacrime umane in pazienti affetti da occhio secco da iperevaporazione

P. Versura^a, P. Nanni^b, A. Bavelloni^c, C. Coslovi^a, G. Cioffi^c, M. Piazzini^d, A. Roda^b, E.C. Campos^a

^aU.O. Oftalmologia, Università di Bologna

^bDipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna

^cIRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

^dDipartimento di Anatomia Umana e Fisiopatologia dell'Apparato Locomotore, Università di Bologna

Riassunto

Premessa. L'occhio secco da iperevaporazione è causato da instabilità del film lacrimale: la superficie oculare non più protetta sviluppa difetti epiteliali a vario grado di severità. Abbiamo analizzato alcune proteine che nelle lacrime umane contribuiscono alla distribuzione e stabilità del film lacrimale.

Metodi. 5 µl di lacrime non stimolate sono stati raccolti da 50 pazienti affetti da occhio secco iperevaporativo (EDE) e 15 soggetti normali di controllo. Le proteine lacrimali lisozima, lactoferrina, albumina sierica, lipocalina e lipofilina sono state separate mediante elettroforesi SDS-PAGE, utilizzando Criterion 18% Bio-Rad gels e colorazione Brilliant Blu G (Sigma), analizzate mediante tecniche densitometriche vs standard di controllo. Le proteine sono state analizzate mediante separazione elettroforetica 2-DE, immunoblotting e identificate mediante LC ESI-Q-TOF MS/MS. I dati di spettrometria di massa sono stati processati e inseriti nel NCBI non-redundant protein database mediante software Mascot (Matrix Science, UK). I risultati sono stati statisticamente valutati mediante t-test per dati indipendenti e Mann-Whitney test per dati non appaiati (signifi-

catività $p < 0,05$).

Risultati. A parte il lisozima ($p=0,9$) per tutte le proteine analizzate si è osservata variazione significativa di espressione tra pazienti e controlli; rispettivamente (dati espressi come % media $\pm$ SD) Lactoferrina: $8,96 \pm 3,86$ vs $17,41 \pm 3,46$ $p=0,001$; Lipocalina: $7,35 \pm 1,95$ vs $10,55 \pm 1,01$ $p=0,002$; Lipofilina: $3,18 \pm 1,36$ vs $4,14 \pm 1,25$ $p=0,01$; Albumina sierica: $9,28 \pm 6,51$ vs $3,49 \pm 2,35$ $p=0,005$. L'analisi proteomica ha confermato un calo di espressione della lipocalina 1 e della lipofilina A nei pazienti ed ha inoltre evidenziato una diversa espressione delle isoforme di lipocalina 1 presenti nei campioni dei pazienti rispetto ai controlli sani.

Conclusioni. Nei pazienti il calo di lactoferrina è da riferirsi ad una compromissione funzionale della ghiandola lacrimale principale mentre l'aumento di albumina sierica è espressione di un fenomeno essudativo causato da infiammazione. Il calo nei pazienti delle proteine lipofile Lipocalina 1 e Lipofilina A e la diversa espressione delle isoforme presenti potrebbe rendere conto dell'alterata distribuzione della componente lipidica del film nella malattia.

Summary

Proteomic analysis in hyperevaporative dry eye patients

Background. The instability of the lachrymal film causes dryness of the eye because of hyperevaporation: the ocular surface is not protected and develops epithelial defects with different degree of severity.

Methods. Five microliters of non-stimulated tears from 50 patients suffering from hyperevaporative dry eye

(EDE) and from 15 healthy subjects used as control have been collected. Tear proteins such as lysozyme, lactoferrin, lipocalin and lipophilin have been separated by SDS-PAGE electrophoresis using Criterion 20% Bio-Rad gels and Brilliant Blu G (Sigma) staining. Afterwards proteins have been analysed with densitometric techniques vs standard control. The selected gel slides have been characterized by 2D electrophoresis, immunoblotting and enzymatic digestion into pepti-

des with trypsin. The tryptic digests have been analysed by liquid chromatography electrospray ionization Quadrupole-Time of Flight mass spectrometry (LC-ESI QTOF MS/MS) followed by search into NCBI non-redundant protein database using Mascot (Matrix Science, UK). The t-test for independent data and Mann-Whitney test for not-paired data (p-value less than 0,05) Statistical analyses have been performed on the results.

Results. For all the analysed proteins except lysozyme ($p=0,9$) a significant variation in the abundance between diseased patients and controls has been obtained. In particular (data expressed as mean % $\pm$ standard deviation): lactoferrin: $8,96 \pm 3,86$ vs $17,41 \pm 3,46$ ($p=0,001$); lipocalin: $7,35 \pm 1,95$ vs $10,55 \pm 1,01$ ($p=0,002$); lipophilin: $3,18 \pm 1,36$ vs $4,14 \pm 1,25$

($p=0,01$); serum albumin: $9,28 \pm 6,51$ vs $3,49 \pm 2,35$ ($p=0,005$).

The proteomic analysis allowed to identify the down-regulation of lipocalin 1 and lipophilin in the diseased patients, which is supposed to be associated with post-translational modifications.

Conclusions. The decrease in the abundance of lactoferrin is due to the functional damage of the main lachrymal gland while the increase of serum albumin is associated with the exudative phenomenon caused by inflammation. The decrease of the lipophilic proteins Lipocalin 1 and Lipophilin A and their modification in diseased patients could explain the altered distribution of the lipidic component of the lachrymal film.

Key-words: proteomic, human tears, dry eye.

Introduzione

La parte anteriore dell'occhio a contatto con l'esterno è chiamata superficie oculare. La superficie oculare è oggi considerata un'unità funzionale, le cui singole componenti (film lacrimale, cornea, limbus, congiuntiva, ghiandole lacrimali principali ed accessorie, ghiandole di Meibomio) agiscono insieme sotto lo stretto controllo di un arco riflesso che consente una risposta integrata a fattori esterni o endogeni¹.

Tra le affezioni più diffuse che colpiscono la superficie oculare vi è la sindrome dell'occhio secco, una condizione patologica prevalente nel sesso femminile e sopra i 50 anni di età, che si manifesta con sintomi (sensazione di corpo estraneo, bruciore, secchezza oculare, fotofobia, visione offuscata, prurito) che possono interferire, anche pesantemente, con la qualità della vita delle persone affette².

Secondo la più recente Consensus Conference sull'argomento (DEWS)³ l'occhio secco è "una malattia multifattoriale delle lacrime e della superficie oculare che porta a sintomi di discomfort, disturbi visivi, instabilità del film lacrimale, con potenziale danno alla superficie oculare. E' accompagnata da un aumento dell'osmolarità del film lacrimale e dall'infiammazione della superficie oculare".

Le principali cause eziologiche sono da ricondurre o a ridotta produzione delle lacrime, come nel caso dell'occhio secco associato a sindrome di Sjögren, o ad aumentata evaporazione lacrimale, come nel caso di disfunzione delle ghiandole di Meibomio.

Quest'ultima forma sta divenendo sempre più di frequente osservazione per l'incremento nella popolazione di fattori di rischio individuali, lavorativi o ambientali. La ridotta stabilità del film lacrimale, ad essa correlata, viene clinicamente rilevata mediante il test TFBUT (Tear Film Break Up Time, o tempo di rottura del film lacrimale) che pone in 10 secondi il tempo

di stabilità considerato come cut-off nella diagnosi di secchezza.

Il meccanismo di stabilità del film lacrimale sulla superficie oculare non è tuttavia ancora del tutto chiarificato, l'ipotesi più accreditata lo correla alla riduzione del tasso di ammiccamento che allunga il periodo durante il quale la superficie oculare rimane esposta e non lubrificata, mentre il ruolo giocato dalla variazione della composizione lacrimale è ancora tutto da investigare.

Scopo del presente lavoro è stato l'analisi dell'espressione di alcune proteine che nelle lacrime umane contribuiscono alla distribuzione e stabilità del film lacrimale, avvalendoci di analisi in immunoblotting con anticorpi specifici e tecniche di analisi proteomica per lo studio delle diverse isoforme.

Nello specifico, il lisozima è una glicosidasi (MW 14.4 kDa) presente in molte secrezioni ove svolge una fondamentale azione antimicrobica, grazie alla capacità di idrolizzare i peptidoglicani che costituiscono la parete batterica. Esso è presente nella concentrazione 1-3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ nelle lacrime umane normali ed è prodotto dagli acini della ghiandola lacrimale principale. La sua determinazione rappresenta un indice di funzionalità della ghiandola stessa. A causa della scarsità di campione disponibile, per la sua quantificazione nella pratica quotidiana sono state adattate alcune metodiche colorimetriche⁴ o elettroforesi monodimensionale su agarosio⁵ o di SDS-PAGE⁶, ottenendo dati disomogenei.

La lactoferrina è un polipeptide a catena singola (MW 76 kDa), rappresenta la proteina maggiormente espressa nelle lacrime (2-4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e svolge un'importante attività batteriostatica per la sua proprietà chelante il ferro⁷. Attualmente in disuso, la determinazione di lactoferrina nelle lacrime è stata condotta in passato con metodiche di immunodiffusione radiale^{8,9}. Anche la determinazione di lactoferrina, prodotta dalla ghianda-

dola lacrimale principale, rappresenta un indice di funzionalità della ghiandola stessa⁷.

La concentrazione di albumina sierica (MW 66 kDa) nelle lacrime è relativamente inferiore rispetto al siero, ma il suo valore aumenta rapidamente in varie circostanze fisiologiche¹⁰ o patologiche, indicando in questo caso un'essudazione passiva conseguente alla rottura della barriera emato-oculare. La determinazione di albumina può essere effettuata mediante tecnica ELISA¹¹ ma nonostante l'importanza della sua determinazione e la relativa semplicità del metodo non si è avuta una diffusione della procedura.

Le lipocaline presenti rappresentano il maggiore gruppo di proteine ad affinità lipidica nelle lacrime: esse possono legarsi ad un'ampia varietà di lipidi quali acidi grassi, colesterolo, fosfolipidi e glicolipidi¹². Il legame lipocaline-lipidi favorisce la solubilità dei lipidi stessi nel film lacrimale portando ad un rapido equilibrio tra le componenti del film stesso: questo evento può promuovere la formazione di uno strato lipidico all'esterno del film lacrimale¹³ omogeneo e compatto, che meglio risponde alle esigenze funzionali di contenimento dell'evaporazione degli strati sottostanti.

Anche le lipofilinae secretorie appartengono alla categoria delle proteine ad affinità lipidica, più specificamente alla superfamiglia delle uteroglobine, tipicamente molecole che legano steroidi e da questi regolate. Nelle lacrime, sono presenti con due isoforme denominate A e B, in combinazione eterodimerica¹⁴.

Materiali e metodi

Pazienti

Sono stati esaminati 50 pazienti (32 donne, 18 uomini, età media 62.6 ± 23.4 anni) affetti da secchezza oculare iperevaporativa, criteri di inclusione in questo gruppo sono stati considerati:

- Sintomatologia soggettiva di discomfort oculare da almeno 2 mesi
- TFBUT < 10 sec
- Schirmer test I > 10 mm/5 min

Criteri di esclusione sono stati considerati:

- presenza di cheratopatia puntata
- presenza di patologie autoimmuni
- posa di lenti a contatto
- chirurgia oculare recente (minimo 6 mesi)

Controlli

Quindici soggetti normali (10 donne, 5 uomini, età media 58.4 ± 15.7 anni) sono stati inseriti in un gruppo di controllo secondo i seguenti criteri di inclusione:

- Assenza di sintomatologia soggettiva di discomfort oculare
- TFBUT > 10 sec
- Schirmer test I > 10 mm/5 min

In entrambi i gruppi i tests clinici sono stati condotti secondo le linee guida del DEWS³

Elettroforesi 1-D (SDS-PAGE)

Campioni di lacrime sono stati raccolti mediante aspirazione con micropipetta (minimo 5 µl) ponendo attenzione a non provocare lacrimazione riflessa, centrifugati e congelati a -80 °C sino a determinazione. I campioni sono stati diluiti 1:2 con tampone contenente 0.125M Tris-Cl pH 6.8, 4% sodio-dodecil solfato (SDS), 20% glicerolo, 10% 2-mercaptoetanol e posti in ebollizione per 5 min.

Le proteine sono state separate utilizzando Pre-cast Ready-gels 18% acrilammide-TRIS-HCl (Bio-Rad, Laboratories Inc., CA, USA), applicando un voltaggio di 200 V per 1 ora a temperatura ambiente (TA). Uno standard pre-colorato a pesi molecolari noti (Bio-Rad) è stato utilizzato per monitorare la corsa. Il gel è stato colorato mediante Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) per 12 ore a TA, sottoposto a numerosi lavaggi con una soluzione di 25% metanolo in acqua distillata per rimuovere l'eccesso di colorante.

L'immagine del gel, acquisita mediante Scanner Densitometro Umax (Amersham Biosciences-GE Healthcare, Milano), è stata analizzata utilizzando il software Gel-Pro Analyzer (MediaCybernetics, MD, USA), ottenendo le percentuali relative alle proteine di interesse all'interno di ogni campione. In sintesi, la *lane* specifica per ogni proteina di interesse viene selezionata automaticamente dal software, che valuta ed assume a 100% l'intero profilo proteico della banda elettroforetica ed estrapola per ogni *lane* la percentuale relativa.

Immunoblotting

Un microlitro di lacrime è stato separato mediante elettroforesi su gel 18% di poliacrilammide denaturante (SDS-PAGE) a 200 V costanti utilizzando un apparato Mini-Protean III (Bio-Rad). Le proteine sono state trasferite dal gel di poliacrilammide alla membrana di nitrocellulosa applicando un voltaggio di 100 V per 1 h a 4°C in tampone di trasferimento contenente 0.3% Tris, 1.4% glicina e 20% metanolo, utilizzando un apparato Bio-Rad wet-blotting. L'avvenuto trasferimento delle proteine si evidenzia con colorazione reversibile Rosso Ponceau. La membrana di nitrocellulosa con le proteine trasferite è stata saturata con 3% albumina sierica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) in PBS + 0.1% Tween 20, per 1 ora a temperatura ambiente. Per l'immunoblotting sono stati utilizzati anticorpo anti-lactoferrina (sc-25622), policlonale sviluppato in coniglio, e anticorpi anti-lipocalina (sc-34680), anti-lisoizima (sc-27956), anti-lipofilina A (sc-48324), anti-lipofilina B (sc-48327), policlonali sviluppati in capra (tutti acquistati da Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA).

L'incubazione con anticorpo primario è stata effettuata per 12 ore a 4 °C. L'anticorpo secondario, coniugato con ossidasi di rafano (Pierce Biotechnology Corp., IL, USA), diluito 1:10.000 è stato incubato con la membrana per 20 minuti a temperatura ambiente.

Successivamente la nitrocellulosa è stata rivelata in chemiluminescenza (SuperSignal West Dura Extended Dureation Substrate, Pierce Biotechnology Corp.).

Elettroforesi bidimensionale 2-D

Un microlitro di lacrime è stato risospeso con tampone TSU (2M Thiourea, 7M Urea, 4% CHAPS, 0.8 % anfoline pH 3-10, benzonase e inibitori delle proteasi) ed è stato centrifugato a 21000 rpm per 30 minuti a 4 °C. La corsa elettroforetica di prima dimensione o isoelettrofocalizzazione (IEF) è stata effettuata utilizzando IPG strip di 7 cm con intervallo di pH 3-10 (Bio-Rad). Si effettua una reidratazione attiva della strip, con il campione risospeso in TSU, a 50 V per 16 ore, si applica quindi un voltaggio crescente: 1000 V per 1h, 2000V per 1h, 4000 V per 2 ore, e infine 4000 V per un totale di 20 kV-hr (prodotto del voltaggio erogato per il tempo di erogazione).

Prima di effettuare la separazione delle proteine in seconda dimensione (SDS-PAGE), si procede a ridurre ed alchilare le proteine. Le strip sono incubate con tampone di equilibratura (6M Urea, 2% SDS, 5 mM Tris-HCl pH 8.6, 30% glicerolo), contenente 125 mM ditiotreitolo (DTT, Sigma) per 15 minuti a temperatura ambiente seguita da una seconda incubazione con Tampone di equilibratura con 250 mM iodoacetamide (IAA) per 8 minuti.

Le strip sono applicate ad un gel di poliacrilammide al 15 % e la separazione elettroforetica avviene a 200 V costanti in apparato Mini-Protean III (Bio-Rad).

Le proteine presenti nel gel vengono infine colorate tramite colorazione con Blu Coomassie G-250 colloidale (Sigma-Aldrich). Si mette a bagno il gel nel colorante per 12 ore a temperatura ambiente e si procede alla rimozione dell'eccesso di colorante con lavaggi in 25% metanolo in acqua.

Digestione triptica "in-gel"

Le bande del gel contenenti le proteine di interesse sono state tagliate dai gel (campioni da 10 controlli e 22 pazienti) e decolorate con acetonitrile. Successivamente le proteine sono state ridotte con DTT 10 mM in ammonio bicarbonato (NH_4HCO_3) 50 mM a pH 7.5 per 45 minuti e alchilate con IAA 55 mM in 50 mM NH_4HCO_3 per 30 minuti a temperatura ambiente al buio. Dopo lavaggio con NH_4HCO_3 100mM e acetonitrile le bande del gel sono state incubate 18 ore a 37 °C con tripsina 12 ng/ μL (Gold Mass Spectrometry Grade, Promega, Madison, WI, USA) in rapporto proteina enzima 50:1 (p/p). I peptidi digeriti sono stati recuperati dal gel attraverso 3 estrazioni successive: la prima con 20 μL di acqua, le due successive con 20 μL ciascuna di una soluzione di 5% acido trifluoroacetico/50% acetonitrile.

I peptidi sono stati liofilizzati mediante centrifuga sotto vuoto (Speed vacuum, Eppendorf, Milano) e risospesi in 10 μL di una soluzione 0,1% di acido formi-

co per le successive analisi in spettrometria di massa.

Analisi in spettrometria di massa e ricerca in banca dati

I campioni sono stati analizzati in cromatografia liquida e spettrometria di massa (LC-MS) usando un CapLC (Waters, Manchester, U.K) connesso mediante sorgente elettrospray ad un QTOF micro (Micromass, Manchester, U.K.) usando per l'acquisizione il software Masslynx 4.1 (Micromass). I peptidi sono stati separati utilizzando una colonna Atlantis dC18 NanoEase column (150 $\times$ 0,3 mm, 3 μm) (Waters) con una pre-colonna Atlantis dC18 NanoEase (0.3 $\times$ 5 mm, 5 μm particle size) (Waters) utilizzando un flusso di 4 $\mu\text{L}/\text{min}$.

La fase mobile A per la separazione LC era $\text{H}_2\text{O}/\text{acetonitrile}$ (95:5) 0.1% acido formico (FA), mentre la fase mobile B era $\text{acetonitrile}/\text{H}_2\text{O}$ (95:5) 0.1% FA. Il gradiente cromatografico ha previsto un incremento lineare dopo 3 minuti dal 2% B all'80% B in 30 minuti, per un tempo totale di analisi di 45 minuti. Per gli esperimenti di identificazione il QTOF è stato impostato in modalità survey scan nel range m/z 400-1800, con scan time di 1 sec e inter-scan delay di 0.1 sec. Per ogni campione sono stati analizzati 5 μL .

Le liste di picchi (formato pkl) da utilizzare per l'identificazione dei peptidi con Mascot (version 2.02.03, www.matrixscience.com) sono state create mediante ProteinLynx Global Server 2.0 (Waters). E' stato usato il database Sprot-human (versione 52.2, 495929 sequenze in totale) utilizzando come parametri: tolleranza di 50 ppm per il precursore e 0.3Da per i frammenti, carbamidometilazione delle cisteine come modificazione fissa, ossidazione delle metionine come modificazione variabile e tripsina come enzima (permettendo il salto di un sito di taglio).

Risultati

Lo studio del proteoma lacrimale mediante tecniche combinate di separazione elettroforetica e spettrometria di massa ha permesso di individuare pattern di proteine associabili a specifici stati patologici -quali la sindrome dell'occhio secco^{15,16} e all'identificazione di 509 proteine tra cui proteasi, inibitori delle proteasi ed enzimi anti-ossidanti^{17,18}. Molte di tali proteine sembrano però essere state identificate soltanto in un singolo studio ed essere correlate con le metodologie analitiche utilizzate per la loro identificazione, mentre le principali proteine funzionalmente importanti nella fisiologia della superficie oculare sono state comunemente osservate in tutti gli studi proteomici finora effettuati: lisozima, lactoferrina, albumina serica, lipocalina, lipofilina A e B¹⁹.

Nella prima parte del presente lavoro sono state messe a punto le condizioni elettroforetiche per separare su gel monodimensionale tali proteine e permettere in modo univoco l'identificazione, caratterizza-

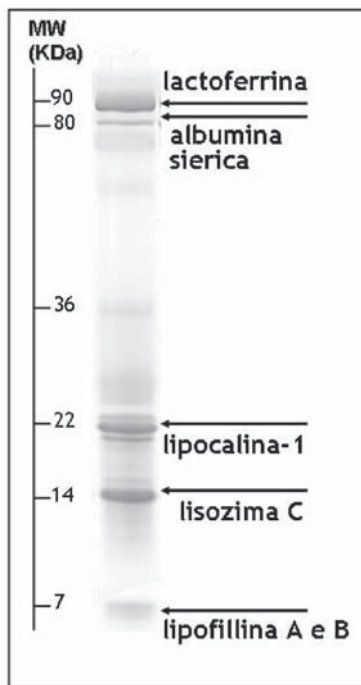


Figura 1. Elettroforesi monodimensionale di lacrime umane di soggetto sano. Vengono evidenziate le cinque principali proteine contenute nelle lacrime, separate sulla base del loro peso molecolare.

zione e quantificazione relativa.

Il proteoma lacrimale, come ogni fluido biologico, è dinamico e soggetto a molti fattori quali campionamento, età e stato fisiologico dei soggetti¹⁹. Sviluppare procedure analitiche che richiedano il minor numero possibile di passaggi e di volumi è quindi un obiettivo primario. Il nostro approccio prevede l'analisi di soli

1,5 µl di campione, un quantitativo ridotto che è possibile reperire anche in pazienti affetti da forme severe di secchezza oculare, e di gel al 18% che consentono una maggiore definizione e separazione delle proteine a basso peso molecolare.

Per la quantificazione delle proteine è stato sviluppato un metodo di analisi densitometrica elaborata con un software di analisi di immagine; per tutte le proteine di interesse il software elabora la percentuale relativa a ogni singola banda proteica rispetto all'intero campione. In Figura 1 sono evidenziate le bande del gel contenenti tali proteine colorate con Coomassie.

Per individuare le bande relative alle proteine di interesse e valutarne la corretta separazione sono state effettuate due tipologie di analisi descritte nella sezione materiali e metodi: (a) taglio delle bande del gel e identificazione mediante digestione con tripsina e analisi in spettrometria di massa (Tab. I); (b) analisi Western-blot.

Successivamente, nella seconda parte del lavoro, abbiamo analizzato campioni di lacrime prelevate da soggetti sani di controllo e da pazienti affetti da una forma di secchezza particolare, la forma iperevaporativa, che è considerata una patologia in forte espansione. Essa è caratterizzata dalla presenza delle lacrime sulla superficie oculare per un tempo ridotto rispetto alla norma: ciò espone gli epitelii di cornea e congiuntiva, che senza un'adeguata protezione da parte delle lacrime, vanno incontro a metaplasia squamosa progressiva.

Sono state effettuate corse elettroforetiche sui campioni di entrambi i gruppi in studio e su di esse è stata effettuata la quantificazione. Mediante analisi densitometrica delle bande proteiche colorate con Coomassie sono state calcolate le percentuali relative di abbondanza per ciascuna proteina analizzata (Tab. II). Nella

Tabella I. Risultati dell'identificazione proteica mediante Spettroscopia di Massa.

Nome		Score proteina	Peso molecolare proteina (Da)	Numero di peptidi	% sequenza identificata
TRFL_HUMAN	Lactotransferrin	735	80014	12	20
ALBU_HUMAN	Serum albumin	699	71317	17	38
LCN1_HUMAN	Lipocalin-1	243	19409	7	31
SG2A1_HUMAN	Lipophilin-C	167	11104	5	40
LYSC_HUMAN	Lysozyme C	107	16982	5	39
SG1D1_HUMAN	Lipophilin-A	86	10234	2	12

Tabella II. Risultati dell'analisi percentuale effettuata su gel di elettroforesi monodimensionale colorati con Coomassie.

Proteine	Controlli		Pazienti		P-Value
	%	Dev. Std.	%	Dev. Std.	
Lisozima	10.69	2.81	10.6	2.58	0.92
Lactoferrina	17.41	3.46	8.96	3.86	0.001
Albumina sierica	3.49	2.35	9.28	6.51	0.005
Lipocalina-1	10.55	1.01	7.35	1.95	0.002
Lipofilina A e B	4.14	1.25	3.18	1.36	0.01

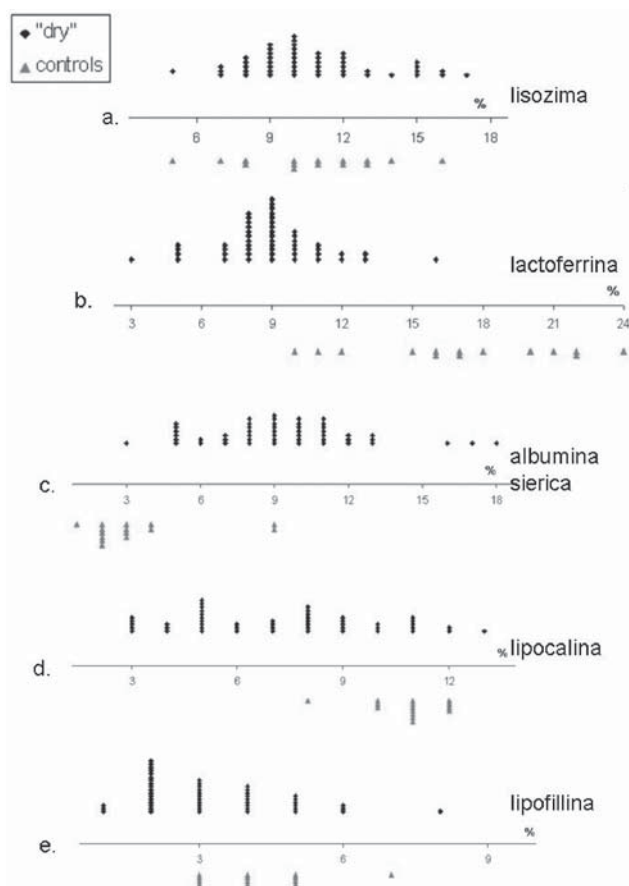


Figura 2. I risultati dei campioni analizzati sono graficati in dispersione, suddivisi per ogni proteina di interesse, rispettivamente lisozima (1a), lactoferrina (1b), albumina sierica (1c), lipocalina (1d), lipofillina (1e), ove si mostra la distribuzione delle variazioni proteiche tra il gruppo controlli (triangoli) e il gruppo pazienti (rombi).

Figura 2 sono rappresentati in dispersione a singoli punti i risultati dei campioni analizzati suddivisi per ogni proteina di interesse, rispettivamente lisozima (1a), lactoferrina (1b), albumina sierica (1c), lipocalina (1d), lipofillina (1e), ove si mostra la distribuzione delle variazioni proteiche tra il gruppo controlli e il gruppo pazienti.

In Figura 3 è riportato il risultato di un'analisi Western-blot che conferma i dati ottenuti mediante analisi densitometrica: l'espressione del lisozima C non varia tra i due gruppi mentre si ha un calo di espressione di lactoferrina (B), lipocalina 1 (C), lipofillina A (D) e lipofillina B (E) nelle lacrime di pazienti affetti da secchezza iperevaporativa rispetto ai controlli sani.

Nei soggetti affetti da secchezza iperevaporativa si osserva inoltre un incremento di albumina sierica che indicherebbe un fenomeno essudativo conseguente ad una condizione infiammatoria dei tessuti della superficie oculare, soprattutto epitelio congiuntivale, che determina una rottura della barriera emato-oculare¹¹. La minor presenza di lactoferrina nei soggetti malati può essere invece correlata a una riduzione della funzionalità secretiva della ghiandola lacrimale principale. Ciò è

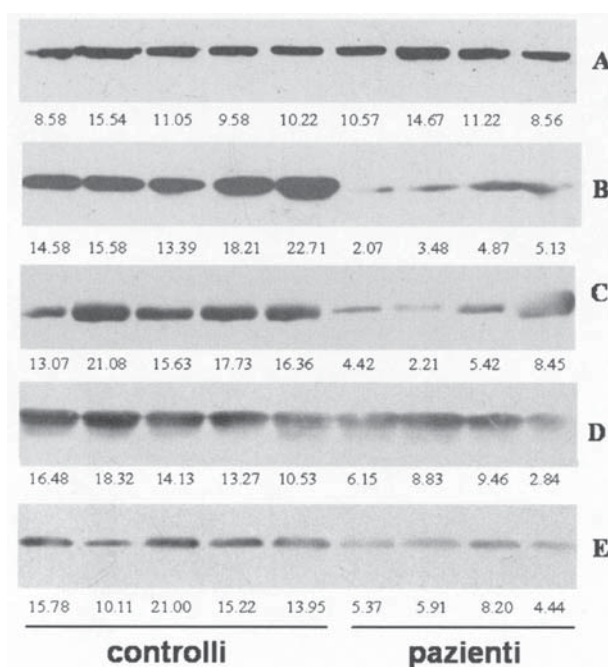


Figura 3. Elettroforesi monodimensionale di lacrime umane; soggetti sani di controllo a sinistra, pazienti a destra. Immunoblotting. Sotto ogni banda è riportata la lettura densitometrica espressa in Unità di Densità Ottica (OD). A: lisozima; B: lactoferrina; C: lipocalina 1, D: lipofillina A; E: lipofillina B.

in parte supportato dalla dimostrazione di un danno apoptotico presente nelle cellule acinari ghiandolari in caso di secchezza oculare²⁰.

Di particolare interesse per le considerazioni relative all'alterata stabilità del film lacrimale nella patologia considerata, è la dimostrazione della riduzione delle proteine lipocalina 1 e lipofillina A nelle lacrime dei pazienti. Come precedentemente ricordato, ambedue queste proteine lipofile contribuiscono in maniera significativa alla distribuzione omogenea dei lipidi dalla rima palpebrale, sede degli orifizi delle ghiandole che li producono (le ghiandole di Meibomio), a tutta la superficie oculare. Legando le molecole lipidiche con appositi ligandi li veicolano sull'intera superficie durante il meccanismo dell'ammiccamento e contestualmente esercitano una funzione di scavengers per la rimozione di detriti di molecole lipidiche non più funzionali, che contaminerebbero il sistema²¹.

La riduzione di lipocalina in lacrime di pazienti affetti da secchezza iperevaporativa è in accordo con precedenti lavori che l'hanno dimostrata in pazienti affetti da sindrome di Sjögren's²² e MGD (Meibomian Gland Dysfunction)²³.

Viceversa, a nostra conoscenza, la riduzione di lipofillina A che abbiamo dimostrato nelle lacrime del nostro gruppo di pazienti non era mai stato dimostrato e costituisce un ulteriore progresso nell'identificazione dei meccanismi responsabili della stabilità delle lacrime nell'uomo.

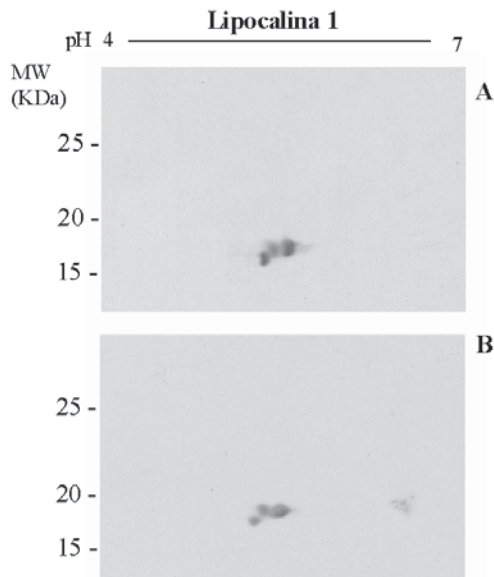


Figura 4. Elettroforesi bidimensionale e immunoblotting di 1 µl di lacrime controllo (A) e 1 µl di lacrime di paziente affetto da secchezza iperevaporativa (B). Si conferma il calo di espressione della lipocalina 1 in pazienti affetti da secchezza iperevaporativa.

Al fine di studiare possibili diverse isoforme delle proteine di interesse coinvolte interessate nella patologia sono state effettuate separazioni proteiche mediante elettroforesi bidimensionale ed analisi Western-blot su 10 campioni di controllo e 22 campioni di pazienti. L'indagine immunochimica con l'anticorpo anti-lipocalina1 ha evidenziato la presenza di 3 differenti spot associati alla lipocalina1, aventi leggere differenze di punto isolettico (Fig. 4). Essi non sono stati ancora identificati mediante spettrometria di massa ma si può speculare che siano dovute alla presenza di diverse isoforme proteiche o alla presenza della medesima isoforma che presenta diverse modificazioni post-traduzionali.

La quantificazione di tali isoforme, caratterizzate da una differente espressione relativa all'interno dei due diversi campioni, conferma la minor espressione di lipocalina 1 in soggetti affetti da occhio iperevaporativo e la sua correlazione con l'instabilità del film lacrimale.

Da ultimo, il calo di espressione di entrambe le isoforme di lipofillina evidenziate mediante immunoblotting con anticorpi specifici, correla con i dati di analisi densitometrica che valuta simultaneamente ambedue le isoforme.

Conclusioni

In condizioni normali la superficie oculare è protetta dal film lacrimale, un fluido biologico fondamentale per la superficie poiché contenente importanti sostanze metaboliche, lubrificanti, difensive, regolatorie dell'omeostasi del sistema. L'analisi composizionale delle

lacrime appare di grande interesse, soprattutto in relazione a patologie distrettuali, allo scopo di identificare marcatori biologici predittivi di malattia.

Lo studio delle proteine lacrimali funzionalmente più importanti nella fisiologia della superficie oculare (lisozima, lactoferrina, albumina serica, lipocalina 1, lipofillina A e B) ha permesso di identificarne variazioni che appaiono in relazione con una compromissione della ghiandola lacrimale principale (calo di lactoferrina), la presenza di un'infezione con essudazione (aumento di albumina sierica), l'alterata distribuzione della componente lipidica del film lacrimale (calo di lipocalina e lipofillina) nei pazienti affetti da secchezza iperevaporativa.

Le possibilità offerte dalle metodologie di analisi proteomica consentono oggi di superare la limitazione della scarsità del campione analitico, uno scoglio che ha di fatto, precluso in passato l'analisi delle lacrime nella quotidiana pratica clinica di Medicina di Laboratorio, nonostante l'utilità dei dati che possono essere forniti al clinico oftalmologo nel processo decisionale diagnostico e terapeutico.

Bibliografia

1. Tseng SC, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol* 1997; 124:825-35.
2. Miljanovic B, Reza Dana, Sullivan DA, Schaumberg DA. Impact of dry eye syndrome on vision related quality of life. *Am J Ophthalmol* 2007; 143:409-15.
3. No Authors listed. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop. *Ocul Surf* 2007; 5:75-92.
4. Klaeger AJ, Cevallos V, Sherman MD, Whitcher JP, Stephens RS. Clinical application of a homogeneous colorimetric assay for tear lysozyme. *Ocul Immunol Inflamm* 1999; 7:7-15.
5. Batellier L, Rea A, Chaumeil C, Scat Y. Protein evaluation of tears: different biological parameters and their respective value. *J Fr Ophthalmol* 1996; 19:520-6.
6. Kuizenga A, van Haeringen NJ, Kijlstra A. SDS-Minigel electrophoresis of human tears. Effect of sample treatment on protein patterns. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:381-6.
7. Flanagan JL, Willcox MD. Role of lactoferrin in the tear film. *Biochimie* 2009; 91:35-43.
8. Sen DK, Sarin GS. Immunoassay of tear lysozyme in conjunctival diseases. *Br J Ophthalmol* 1982; 66: 732-5.
9. Kruize AA, van Bijsterveld OP, Hené RJ, de Wilde PC, Feltkamp TE, Kater L, et al. Long-term course of tear gland function in patients with keratoconjunctivitis sicca and Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1997; 81: 435-8.
10. Fukuda M, Wang HF. Dry eye and closed eye tears. *Cornea* 2000; 19:44-8.
11. Fukuda M, Fullard RJ, Willcox MD, Baleriola-Lucas C, Bestawros F, Sweeney D, et al. Fibronectin in the tear film.

- Invest Ophthalmol Vis Sci 1996; 37:459-67.
12. Redl B. Human Tear Lipocalin. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482:241-8.
13. Breustedt DA, Schönfeld DL, Skerra A. Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764:161-73.
14. Lehrer RI, Xu G, Abduragimov A, Dinh NN, Qu XD, Martin D, et al. Lipophilin, a novel heterodimeric protein of human tears. *FEBS Lett* 1998; 432:163-7.
15. Grus FH, Podust VN, Bruns K, Lackner K, Fu S, Dalmasso EA, et al. SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:863-76.
16. Tomosugi N, Kitagawa K, Takahashi N, Sugai S, Ishikawa I. Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjögren's syndrome. *J Proteome Res* 2005; 4:820-5.
17. De Souza GA, Godoy LM, Mann M. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biol* 2006; 7:R72.
18. Li N, Wang N, Zheng J, Liu XM, Lever OW, Erickson PM, et al. Characterization of human tear proteome using multiple proteomic analysis techniques. *J Proteome Res* 2005; 4:2052-61.
19. Green-Church KB, Nichols KK, Kleinholz NM, Zhang L, Nichols JJ. Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Mol Vis* 2008; 14:456-70.
20. Zoukhri D. Effect of inflammation on lacrimal gland function. *Exp Eye Res* 2006; 82:885-98.
21. Gasymov OK, Abduragimov AR, Prasher P, Yusifov TN, Glasgow BJ. Tear lipocalin: evidence for a scavenging function to remove lipids from the human corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:3589-96.
22. Caffery B, Joyce E, Boone A, Slomovic A, Simpson T, Jones L, et al. Tear lipocalin and lysozyme in Sjögren and non-Sjögren dry eye. *Optom Vis Sci* 2008; 85:661-7.
23. Yamada M, Mochizuki H, Kawai M, Tsubota K, Bryce TJ. Decreased tear lipocalin concentration in patients with meibomian gland dysfunction. *Br J Ophthalmol* 2005; 89:803-5.