Single-tear proteomics for noninvasive biomarker discovery and precision medicine

Erika Ponzini, Dr rer nat
Dipartimento di Scienza dei Materiali, Università degli Studi di Milano-Bicocca
Optics and Optometry Research Center (COMiB), Università degli Studi di Milano-Bicocca

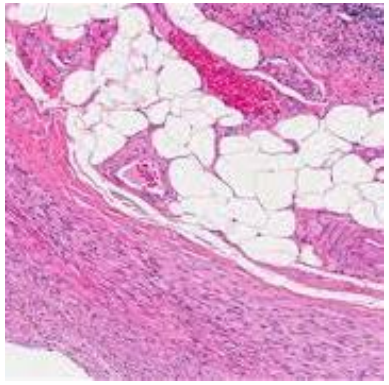


OPTICS AND OPTOMETRY RESEARCH CENTER
UNIVERSITY OF MILANO BICOCCA

Definizione di biomarcatore

Un biomarcatore è una caratteristica misurabile oggettivamente che si riferisce ad un normale processo biologico, a processi patogenici, oppure a risposte farmacologiche ad interventi terapeutici.

Fonti convenzionali di biomarcatori



Tessuto



Sangue
Plasma



Fluido cerebrospinale

Fluidi corporei periferici per la scoperta di nuovi biomarcatori



Urina



Saliva



Sudore



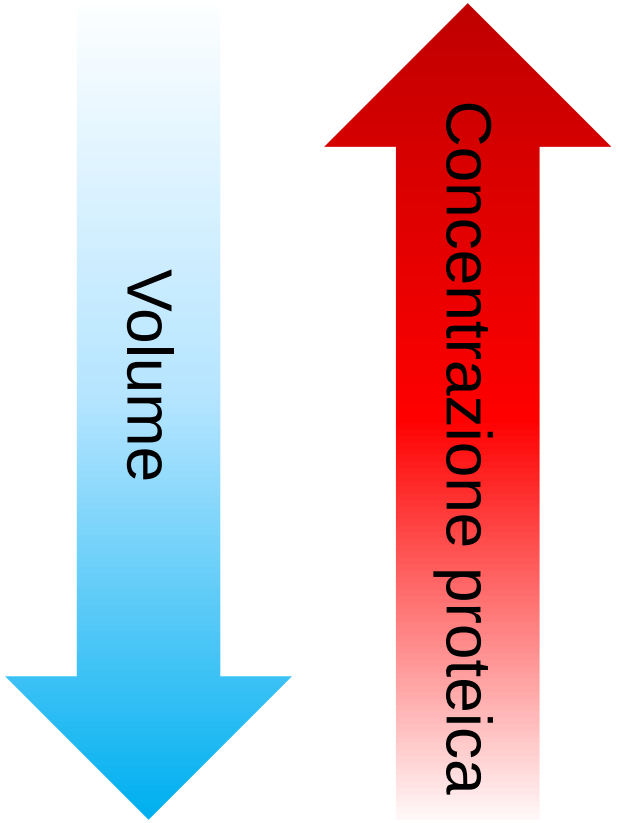
Aspirato di grasso



Lacrime

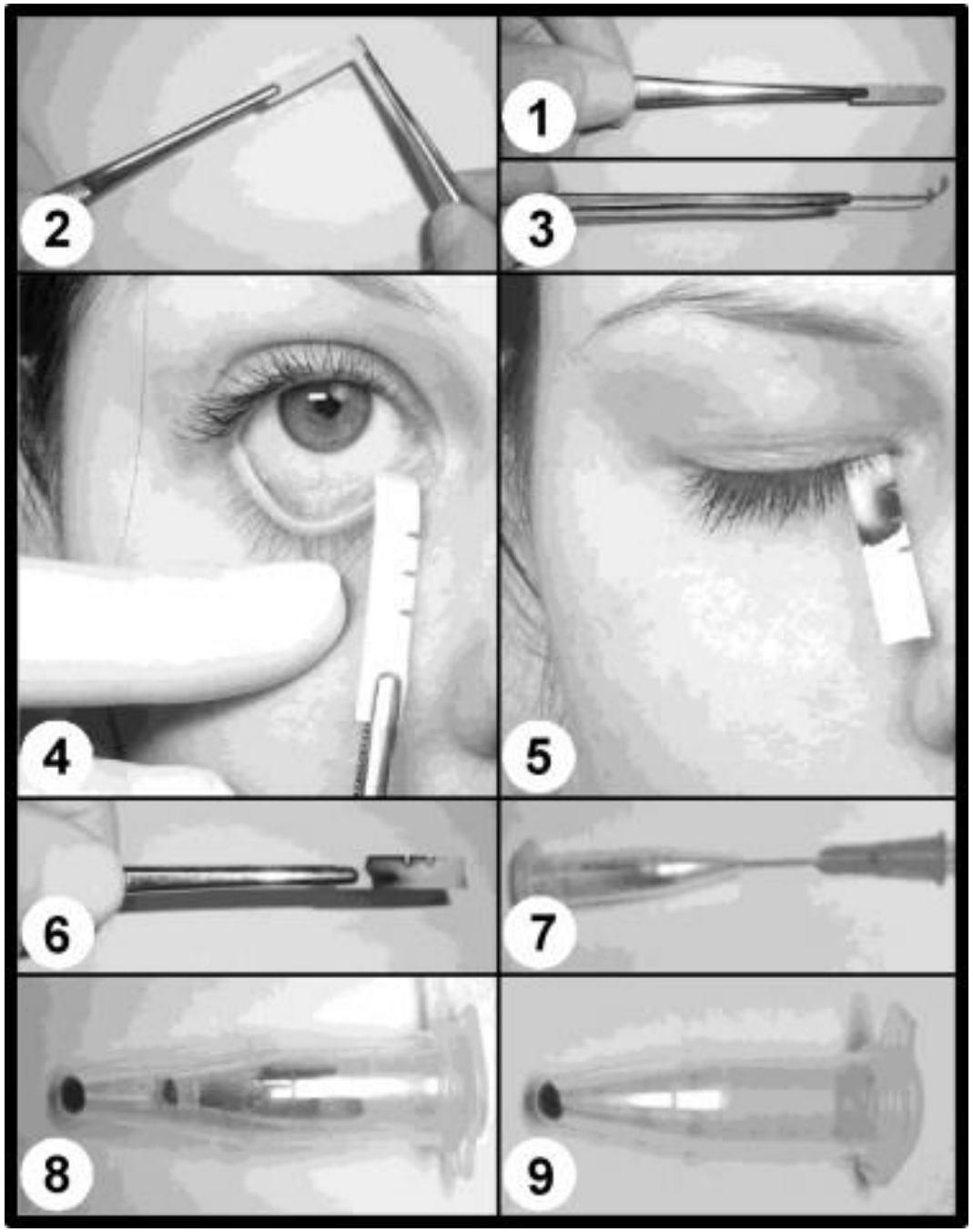
Tipi di lacrime

- Basali
- Riflesse
- Emozionali



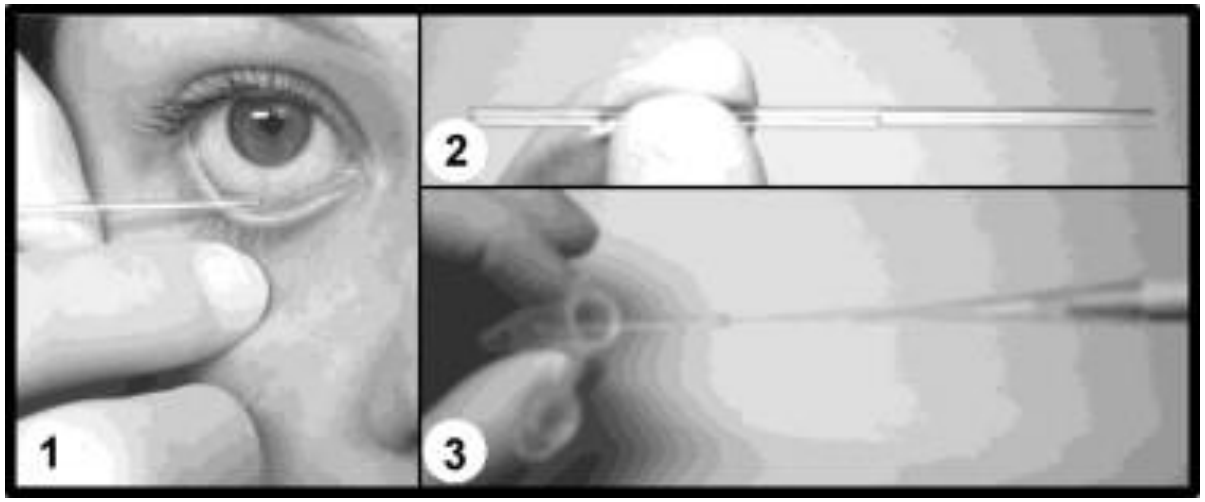
Metodo di prelievo: strisce di Schirmer

- ☑ Facile da utilizzare
- ☑ Piacevole per i volontari
- ☒ Lacrimazione riflessa
- ☒ Il legame e la ritenzione dipendono dal MW e dall'area superficiale idrofobica delle proteine
- ☒ Può danneggiare la superficie congiuntivale e la microvascolatura

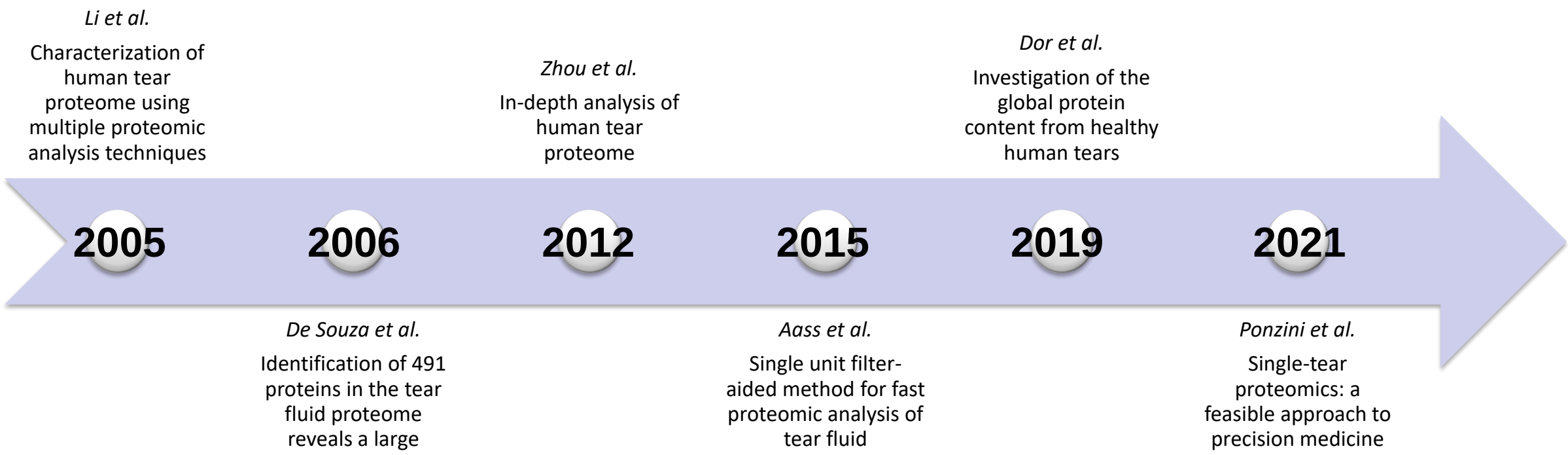


Metodo di prelievo: microcapillare

- ☑ Non invasivo
- ☑ Sicuro
- ☑ No lacrimazione riflessa
- ☒ Richiede uno specialista
- ☒ Il campionamento è interrotto dall'ammiccamento

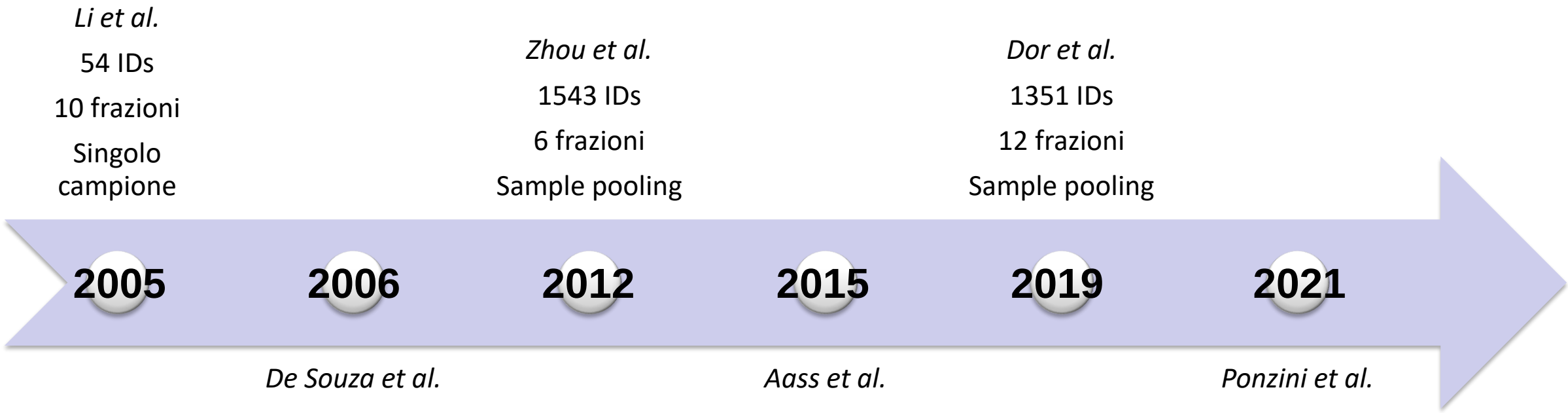


Proteomica delle lacrime in soggetti sani



Ponzini E, Santambrogio C, De Palma A, Mauri P, Tavazzi S, Grandori R. Mass spectrometry-based tear proteomics for noninvasive biomarker discovery. Mass Spectrom Rev. 2021 Mar 24. doi: 10.1002/mas.21691. Epub ahead of print. PMID: 33759206.

Proteomica delle lacrime in soggetti sani



Ponzini E, Santambrogio C, De Palma A, Mauri P, Tavazzi S, Grandori R. Mass spectrometry-based tear proteomics for noninvasive biomarker discovery. Mass Spectrom Rev. 2021 Mar 24. doi: 10.1002/mas.21691. Epub ahead of print. PMID: 33759206.

Sample pooling

Pooling di lacrime da diversi soggetti

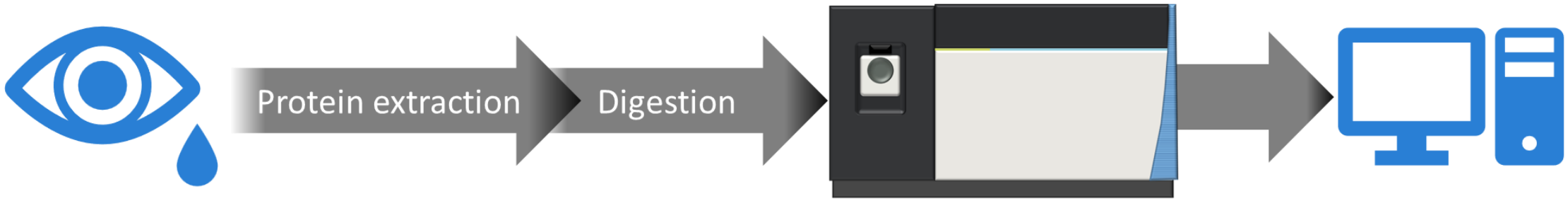
Assunzione: la composizione principale dei fluidi corporei dovrebbe avere forti somiglianze tra donatori sani

- ☑ Aumenta la quantità di campione
- ☑ Riduce il rumore di fondo inter-soggetto
- ☑ Riduce il numero di analisi
- ☒ Perde l'identità del campione

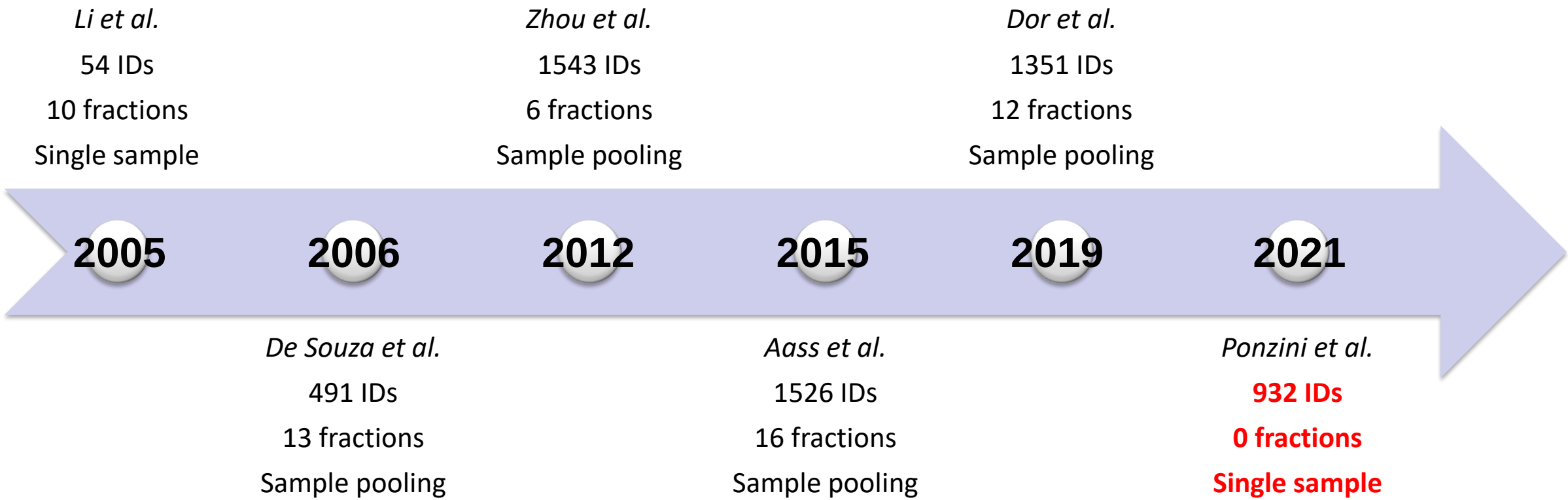
Pooling di prelievi sequenziali dallo stesso soggetto

- ☑ Aumenta la quantità di campione
- ☑ Riduce il rumore di fondo intra-soggetto
- ☑ Riduce il numero di analisi
- ☒ Perde l'identità del campione
- ☒ Media sul tempo
- ☒ Perde la variabilità intra- e inter-giornata

Il nostro protocollo



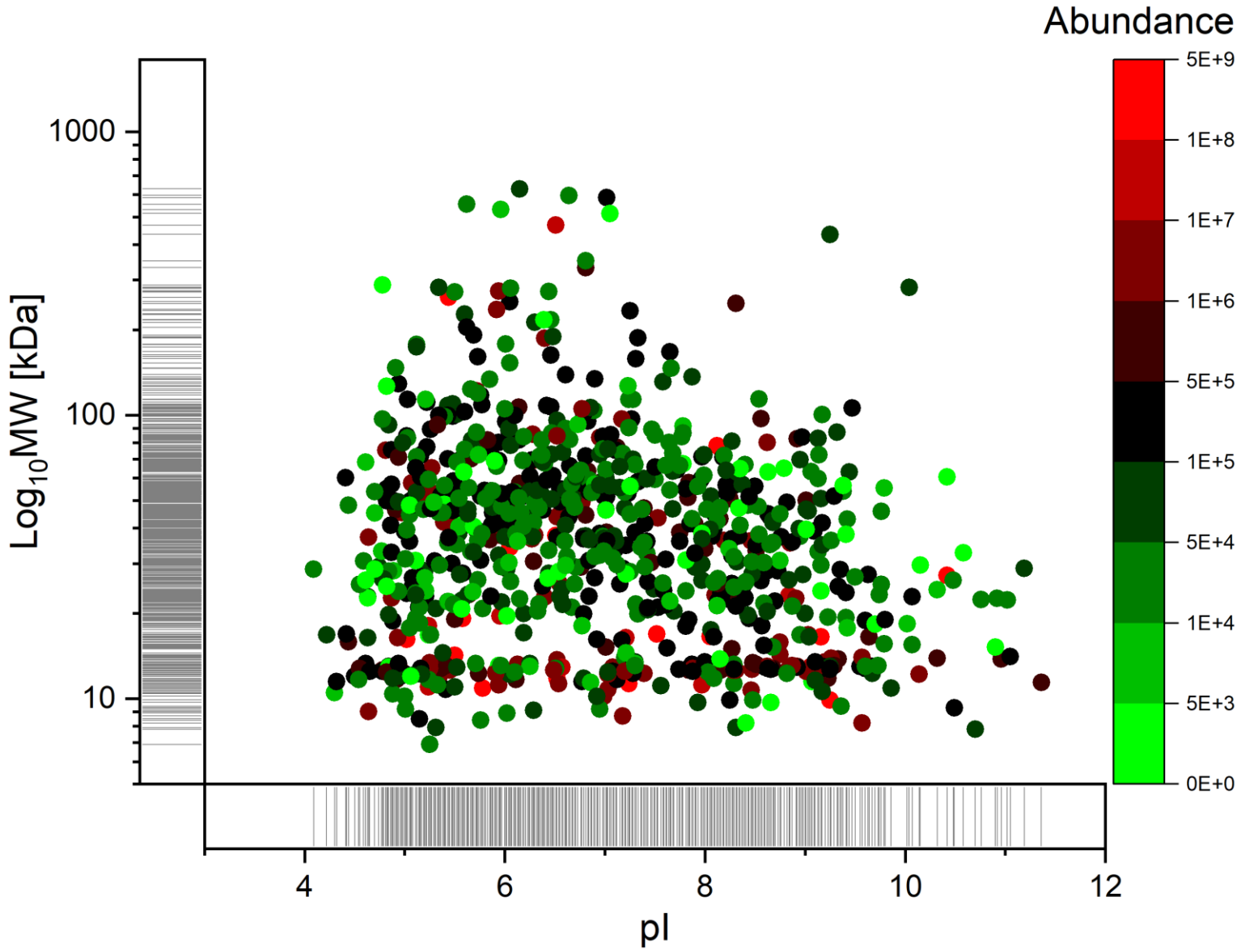
Tear proteome of healthy human subjects



Ponzini E, Santambrogio C, De Palma A, Mauri P, Tavazzi S, Grandori R. Mass spectrometry-based tear proteomics for noninvasive biomarker discovery. Mass Spectrom Rev. 2021 Mar 24. doi: 10.1002/mas.21691. Epub ahead of print. PMID: 33759206.

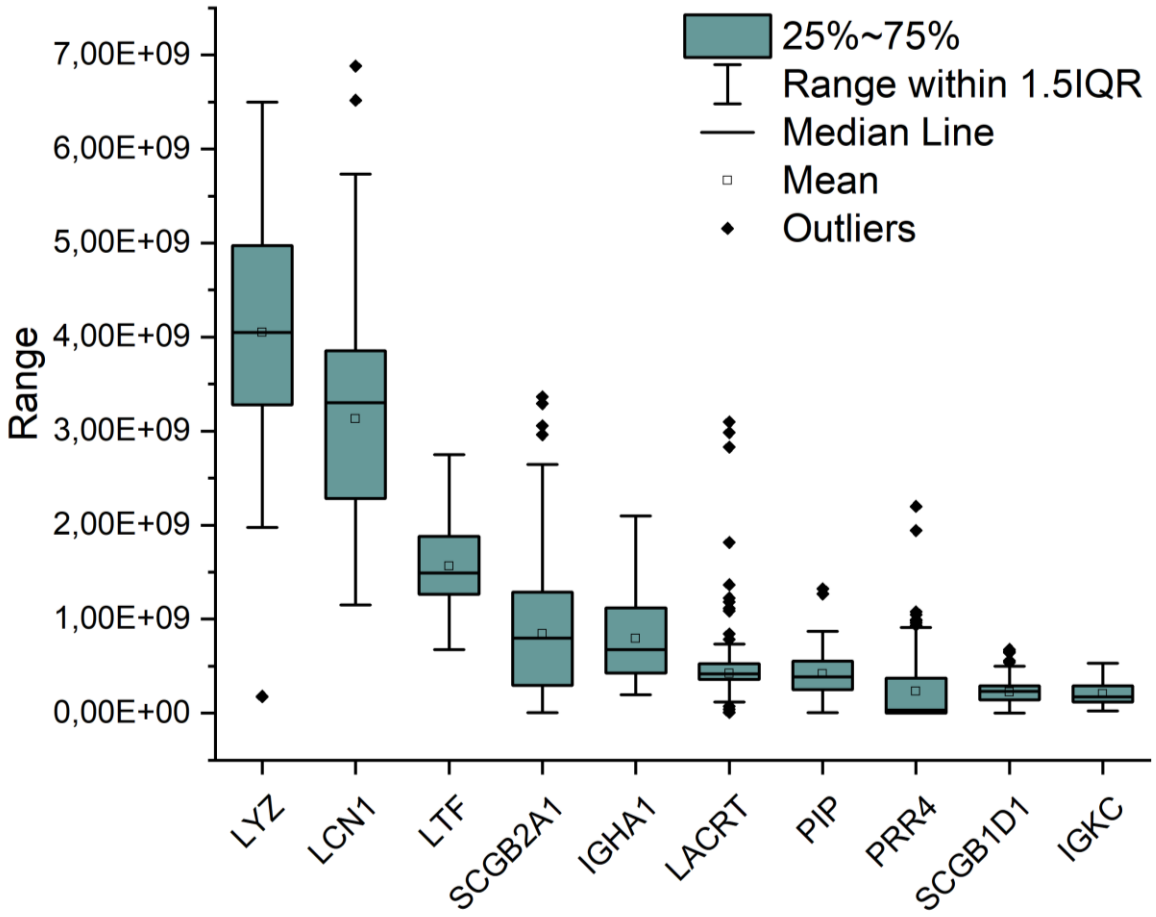
Valutazione del potere analitico

- Mappa 2D virtuale
- Proteine omogeneamente distribuite nel range di PI 4,5-10 e di MW 50-500 kDa
- Proteine ad alto MW: mucine
- Proteine ad alto PI: istoni



Lisozima, lattotransferrina e lipocalina-1 sono le proteine più abbondanti e frequenti → ghiandola lacrimale

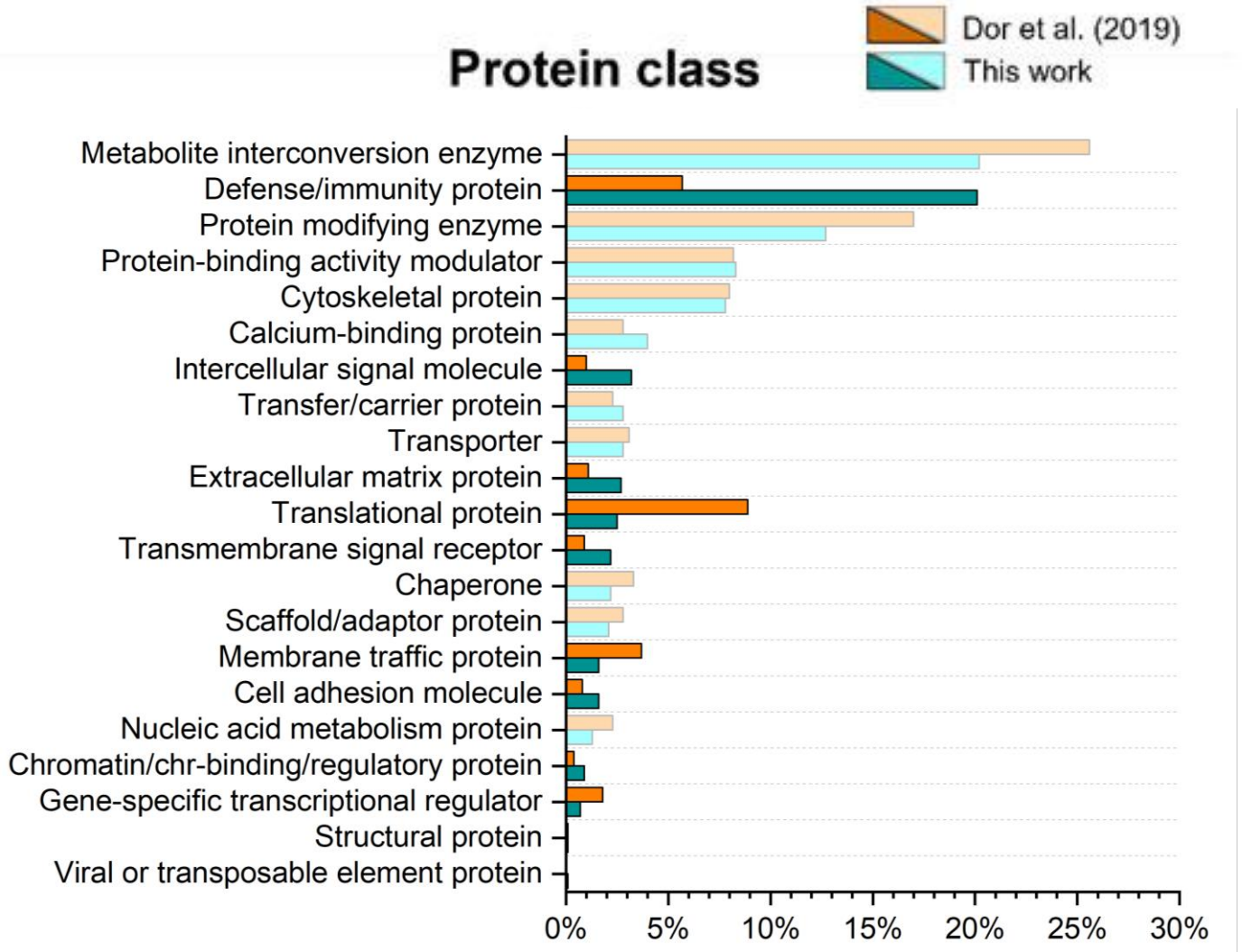
Lisozima e lipocalina-1: ampio range di intensità tra i campioni → ampia variabilità inter-soggetto



LYZ, lysozyme C; LCN1, lipocalin-1; LTF, lactotransferrin; SCGB2A1, mammaglobin-B; IGHA1, immunoglobulin heavy constant alpha 1; LACRT, extracellular glycoprotein lacritin; PIP, prolactin-inducible protein; PRR2, proline-rich protein 4; SCGB1D1, secretoglobin family 1D member 1; IGKC, immunoglobulin kappa constant.

Analisi Gene ontology

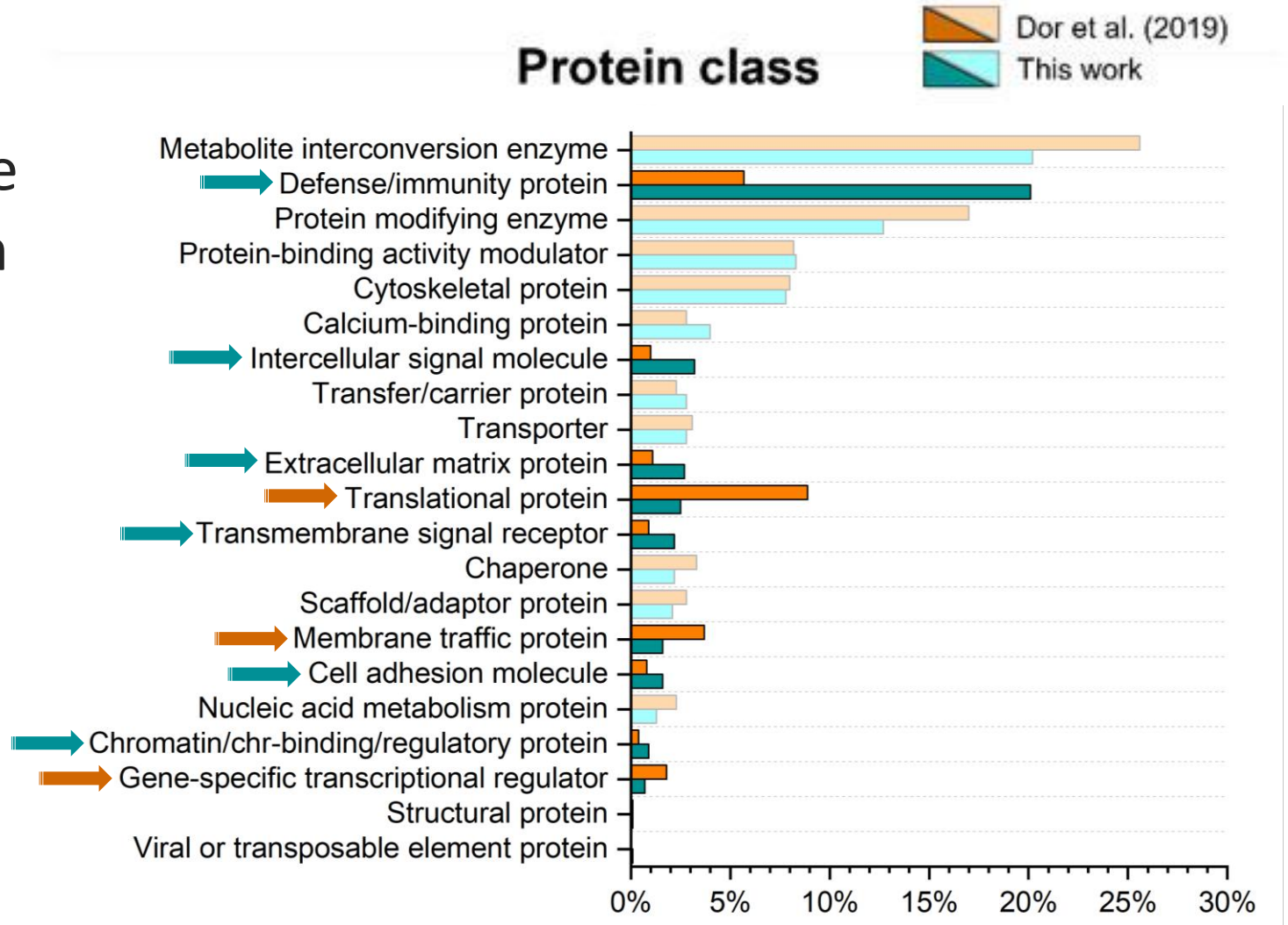
- Programma Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER)
- Confronto con la lista di proteine pubblicata da Dor et al.
- Le classi di proteine con un $\log_2$(fold change) $\geq |1|$ sono evidenziate



Analisi Gene ontology

- Le proteine legate alla trascrizione e alla traduzione sono meno rappresentate in questo lavoro, mentre le proteine extracellulari sono più rappresentate

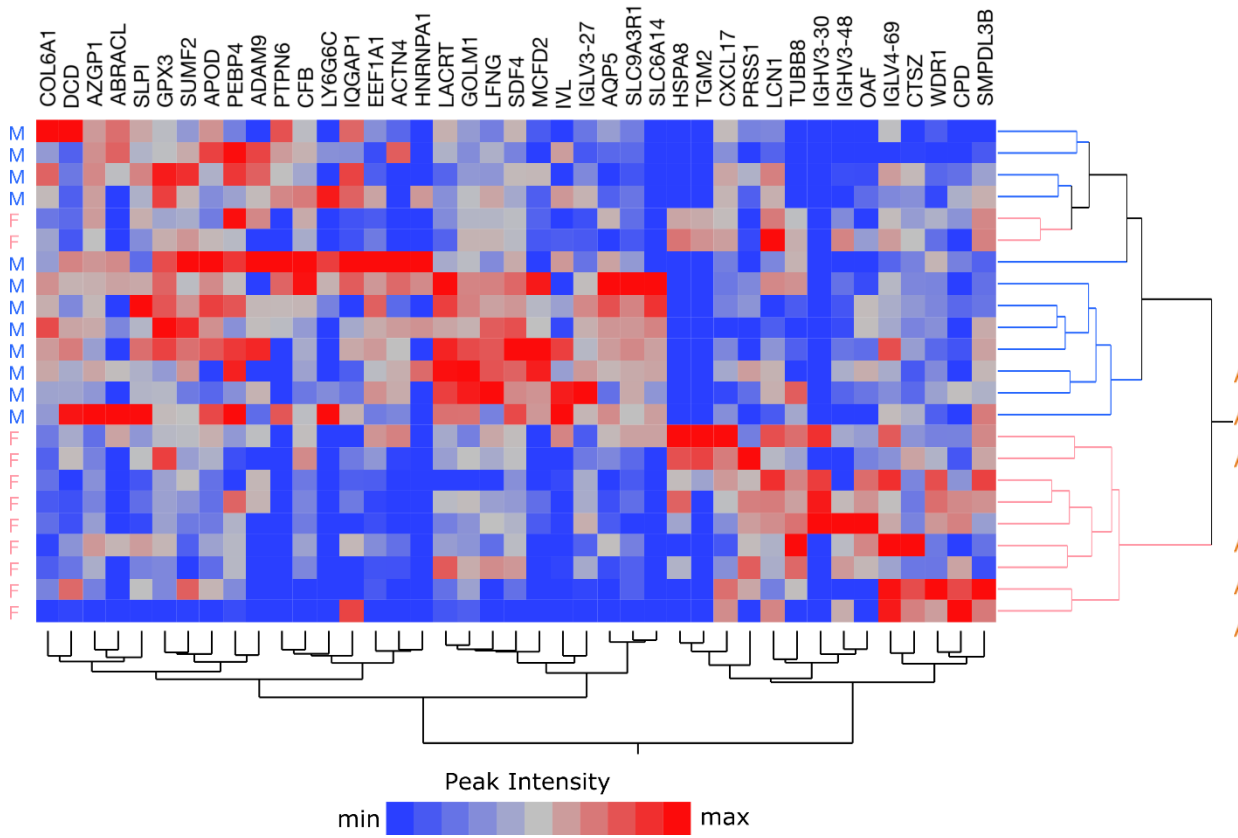
⚠ Diverso metodo di prelievo



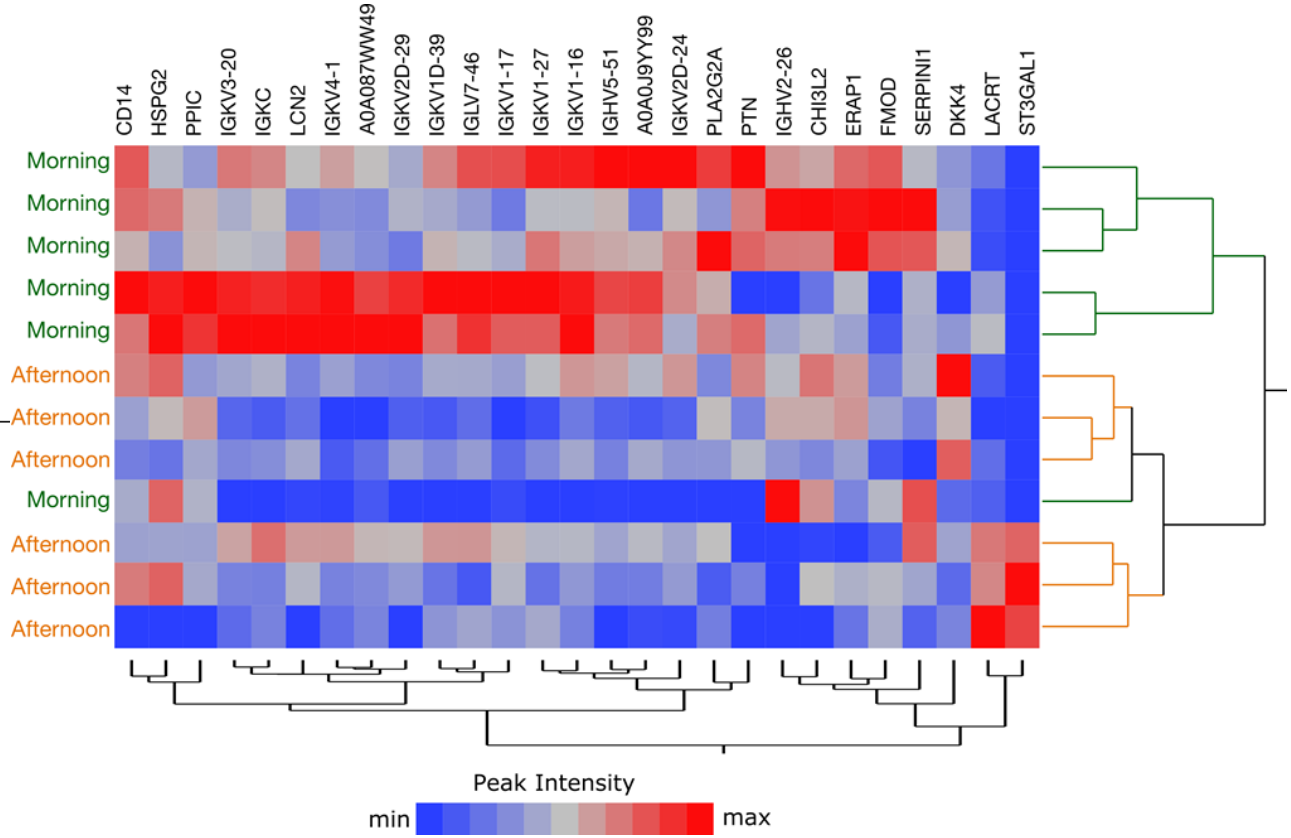
Dor M, Eperon S, Lalive PH, et al. Investigation of the global protein content from healthy human tears. Exp Eye Res. 2019;179:64-74. doi:10.1016/j.exer.2018.10.006

Esempi di analisi dei dati

Maschi *vs* femmine



Prelievi al mattino *vs* al pomeriggio



Prospettive future

- Approcci complementari per l'analisi di una singola lacrima
  - Spettroscopia FTIR
  - Spettroscopia Raman
  - Proteomica
- Applicazione dell'analisi di una singola lacrima in diversi campi di ricerca
  - Ricerca di biomarcatori
  - Porto di lenti a contatto

Ponzini E, Ami D, Duse A, Santambrogio C, De Palma A, Di Silvestre D, Mauri P, Pezzoli F, Natalello A, Tavazzi S, Grandori R. Single-Tear Proteomics: A Feasible Approach to Precision Medicine. Int J Mol Sci. 2021 Oct 4;22(19):10750. doi: 10.3390/ijms221910750. PMID: 34639092; PMCID: PMC8509675.

Ami D, Duse A, Mereghetti P, Cozza F, Ambrosio F, Ponzini E, Grandori R, Lunetta C, Tavazzi S, Pezzoli F, Natalello A. Tear-Based Vibrational Spectroscopy Applied to Amyotrophic Lateral Sclerosis. Anal Chem. 2021 Dec 28;93(51):16995-17002. doi: 10.1021/acs.analchem.1c02546. Epub 2021 Dec 14. PMID: 34905686; PMCID: PMC8717331.

Il nostro team



Alessandro Borghesi
Silvia Tavazzi
Fabrizio Zeri
Erika Ponzini
Alessandro Duse

I nostri collaboratori

Fabio Pezzoli
Emiliano Bonera
Antonino Natalello
Rita Grandori
Carlo Santambrogio
Diletta Ami

Pierluigi Mauri
Antonella De Palma
Dario Di Silvestre

Grazie per l’attenzione!