

MALDI-TOF e SELDI-TOF: due tecniche “tandem” per l’individuazione di potenziali biomarker nella fibromialgia*

MALDI-TOF and SELDI-TOF analysis: “tandem” techniques to identify potential biomarker in fibromyalgia

C. Giacomelli¹, L. Bazzichi¹, L. Giusti², F. Ciregia², C. Baldini¹, Y. Da Valle², F. De Feo¹, F. Sernissi², A. Rossi², S. Bombardieri¹, A. Lucacchini²

¹Unità Operativa di Reumatologia, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa;

²Dipartimento di Psichiatria, Neurobiologia, Farmacologia e Biotecnologia, Università di Pisa

SUMMARY

Objective: Fibromyalgia (FM) is characterized by the presence of chronic widespread pain throughout the musculoskeletal system and diffuse tenderness. Unfortunately, no laboratory tests have been appropriately validated for FM and correlated with the subsets and activity. The aim of this study was to apply a proteomic technique in saliva of FM patients: the Surface Enhance Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (SELDI-TOF).

Methods: For this study, 57 FM patients and 35 HC patients were enrolled. The proteomic analysis of saliva was carried out using SELDI-TOF. The analysis was performed using different chip arrays with different characteristics of binding. The statistical analysis was performed using cluster analysis and the difference between two groups was underlined using Student’s t-test.

Results: Spectra analysis highlighted the presence of several peaks differently expressed in FM patients compared with controls. The preliminary results obtained by SELDI-TOF analysis were compared with those obtained in our previous study performed on whole saliva of FM patients by using electrophoresis. The m/z of two peaks, increased in FM patients, seem to overlap well with the molecular weight of calgranulin A and C and Rho GDP-dissociation inhibitor 2, which we had found up-regulated in our previous study.

Conclusion: These preliminary results showed the possibility of identifying potential salivary biomarker through salivary proteomic analysis with MALDI-TOF and SELDI-TOF in FM patients. The peaks observed allow us to focus on some of the particular pathogenic aspects of FM, the oxidative stress which contradistinguishes this condition, the involvement of proteins related to the cytoskeletal arrangements, and central sensibilization.

*Lavoro premiato al XLVII Congresso SIR, Rimini 2010.

Reumatismo, 2011; 63 (3): 165-170

■ INTRODUZIONE

La fibromialgia (FM) è una malattia reumatica caratterizzata da dolore muscolo-scheletrico, tensione cronica diffusa e/o rigidità articolare e muscolare, facile affaticabilità, disturbi del sonno e dell’umore, dolore alla pressione di almeno 11 su 18 tender points (TP) (1, 2). Questa malattia ha un’incidenza del 2% nella popolazione generale, soprattutto nelle donne di mezza età (3,4%) (3). La diagnosi di questa patologia è di tipo clinico sulla base dei criteri dell’American College of Rheumatology

(ACR) del 1990 (1). Questi peraltro sono parametri clinici che mancano di specificità e non permettono di valutare l’attività o la severità di malattia.

Questi criteri diagnostici frequentemente si sovrappongono a quelli di altre malattie ed un assetto simil-fibromialgico potrebbe essere presente anche in malattie non reumatiche. La diagnosi di FM perciò è fondamentalmente una diagnosi di esclusione di altre patologie reumatiche (4). Dall’analisi della letteratura emerge una difficoltà nell’individuare biomarker specifici e sensibili di malattia (5). Partendo dai risultati incorag-

Indirizzo per la corrispondenza:
Dott. Camillo Giacomelli
Via Roma, 67 - 56126 Pisa
E-mail: Camillo.giacomelli@for.unipi.it

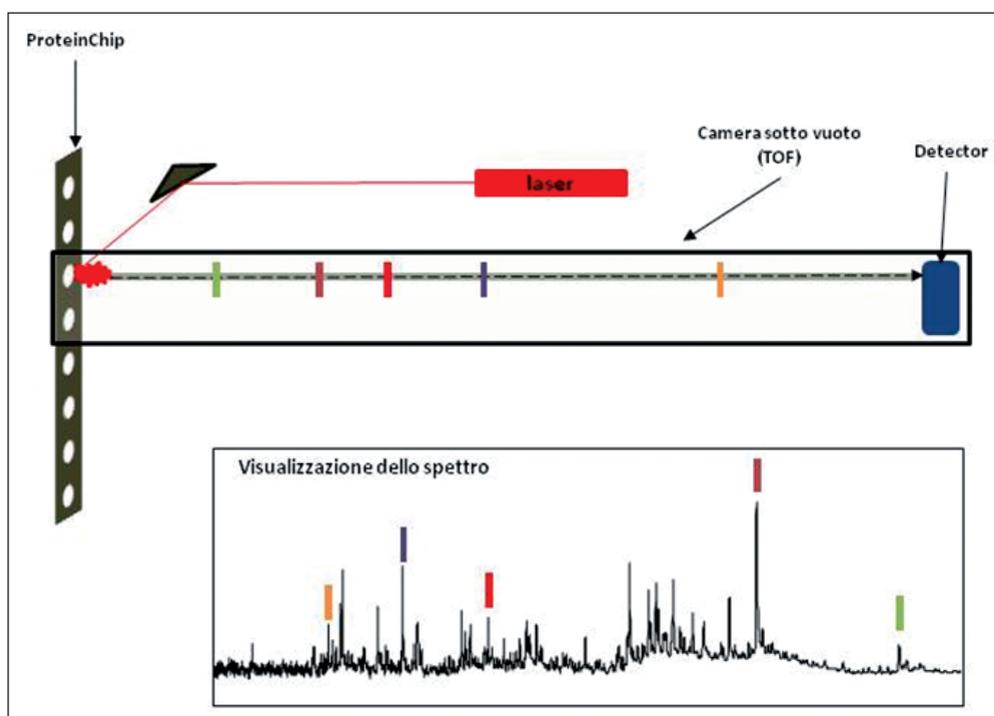


Figura 1 - Rappresentazione schematica del funzionamento del SELDI-TOF. Le proteine vengono caricate su un chip e ionizzate da un laser. In base al tempo di volo è possibile ottenere il rapporto m/z .

gianti ottenuti in altre patologie reumatiche mediante tecniche di proteomica salivare (6-10), abbiamo deciso di effettuare questo tipo di analisi anche sulla saliva dei pazienti affetti da FM (11). Il nostro gruppo (11) ha effettuato un'analisi proteomica salivare utilizzando la tecnica dell'elettroforesi bidimensionale (2DE) accoppiata alla spettrometria di massa (MALDI-TOF), che ha permesso di individuare una serie di proteine interessanti utilizzabili come potenziali biomarcatori. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare mediante un'altra tecnica proteomica, la Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF MS) lo spettro caratteristico dei pazienti FM, e confrontare la sovrapposibilità delle due tecniche. Il SELDI-TOF è una tecnica ad alto rendimento particolarmente indicata per lo studio di piccoli peptide e proteine ($PM \leq 25$ KDa) con una sensibilità nell'ordine delle femtomoli, che può fornire una analisi complementare all'elettroforesi bidimensionale (12). Questa consiste nel

legame delle proteine presenti in un fluido biologico su un chip (ProteinChip) funzionalizzato in modo da legare un certo tipo di proteine (IMAC-30: proteine che contengono metalli, Q10: utilizzato per proteine con carica negativa, CM10: utilizzato per proteine con carica positiva, H50: utilizzato per proteine idrofobiche). Dopo aver messo il campione e lavato con opportuni tamponi per eliminare il legame aspecifico, viene aggiunta una *Energy Adsorbing Molecules* (EAM) in grado di favorire la ionizzazione della proteina, la quale viene identificata da un detector posto in una colonna sotto vuoto. In base al tempo di volo (TOF), attraverso un algoritmo viene fornito il rapporto massa/carica (m/z) (Fig. 1).

■ MATERIALI E METODI

Pazienti

Per l'analisi mediante SELDI-TOF abbiamo utilizzato le salive di 57 pazienti affetti da FM (età media 43.6 ± 11.30 anni; 53 ♂ 4

Tabella I - Caratteristiche cliniche e sierologiche dei pazienti con FM.

Pazienti/sesso	53/F 4/M	
Età (anni)	43.60±11.30	(media ± SD)
Presenza di xerostomia	20/57	(35%)
Presenza di comorbidità psichiatriche	27/57	(47%)
Presenza di tiroidite autoimmune	26/57	(45%)
Terapie concomitanti con farmaci che possono provocare xerostomia	48/57	(85%)
FIQ	70.0±12.1	(media ± SD)
VAS dolore	7.5±1.2	(media ± SD)
Conta dei Tenders Points	13±2	(media ± SD)

♂) e 35 volontari sani comparabili per sesso ed età. Le salive di pazienti e controlli sono state raccolte al mattino dalle ore 8:00 alle ore 9:00. Ai pazienti ed ai controlli veniva fatto un breve screening per valutare la presenza di comorbidità odontoiatriche. Venivano inoltre esclusi i pazienti che avevano mangiato, fumato o effettuato igiene orale in un periodo inferiore alle due ore precedenti al prelievo. Ad ogni paziente è stato somministrata il Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ) per valutare la severità della FM (13) e sono stati valutati i TP. Nella tabella I sono riassunte le caratteristiche cliniche e sierologiche dei pazienti coinvolti nello studio.

Raccolta e preparazione del campione

Ai pazienti e controlli è stato chiesto di raccogliere la saliva priva di espettorato in un barattolo posto in ghiaccio. L'intervallo di raccolta variava tra un periodo di 10 min ad un massimo di 15 minuti, ottenendo un volume di fluido variabile tra 1.2 e 4.8 ml. Il campione di saliva viene quindi immediatamente centrifugato a 13000xg per 30 min a 4°C per rimuovere i detriti insolubili mentre il sovranatante viene conservato a -80°C fino all'utilizzo. Le proteine presenti nella saliva venivano quantificate mediante dosaggio Biorad-DC.

Analisi proteomica

L'analisi proteomica è stata effettuata utilizzando *proteinchip* con diverse caratteristiche di legame (CM10, Q10, IMAC30, H50) secondo i protocolli forniti dal produttore. Brevemente, una volta attivati i chip utilizzando gli opportuni tamponi, viene caricata una quantità di saliva corri-

spondente a 10 µg di proteine miscelata in rapporto 2:3 v/v con una soluzione denaturante (CHAPS 2%, Urea 9M). Una volta incubato il campione per 1 h, i chip venivano lavati per rimuovere il materiale non legato. Infine venivano aggiunti 2 µl di una soluzione satura di acido sinapico in 50% di acetonitrile (ACN) e 1% di acido trifluoroacetico (TFA) per facilitare la ionizzazione del campione. I ProteinChip sono stati analizzati utilizzando il SELDI-TOF reader (BioRad inc.) utilizzando protocolli di acquisizione standardizzati. La lettura del "tempo di volo" permette di estrapolare attraverso un algoritmo matematico il valore di m/z (rapporto massa/carica) che, per le proteine con una sola carica è approssimabile alla massa della proteina.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante analisi univariata di confronto tra i gruppi patologici vs controlli. È stato scelto un valore di P=0.05 come limite di significatività.

■ RISULTATI

L'analisi SELDI-TOF ha permesso di individuare alcuni picchi diversamente espressi tra sano e malato. In figura 2 sono presenti gli spettri caratteristici di un soggetto FM e di un controllo sano. Non sono state trovate correlazioni tra gli indici di malattia e l'intensità dei picchi.

Abbiamo poi confrontato i picchi trovati diversamente espressi nella FM con metodica SELDI-TOF con quelli che abbiamo trovato alterati nel lavoro ottenuto con le

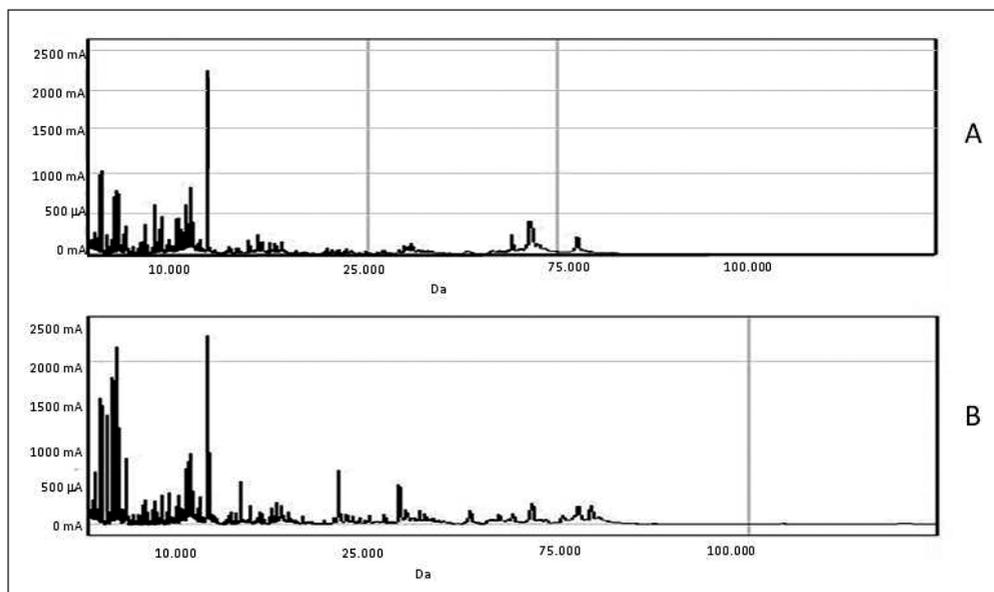


Figura 2 - Spettro caratteristico di un paziente FM (A) e di un controllo sano (B) ottenuti mediante lettura con SELDI-TOF.

tecniche proteomiche tradizionali (11). Dall'analisi dei dati sembra che alcune proteine a più alto peso molecolare individuate dall'analisi SELDI risultino complementari ad alcune proteine individuate nell'analisi 2-DE, in particolare la Rho GDP-dissociation inhibitor 2 e le calgranuline A e C.

■ DISCUSSIONE

In questo lavoro preliminare, abbiamo provato ad identificare uno spettro caratteristico di malattia. I risultati ottenuti pongono l'accento di come nel paziente affetto da FM, nonostante i parametri biomorali classici non diano risultati soddisfacenti, vi siano comunque delle alterazioni.

Un'osservazione interessante è, inoltre, l'aspetto legato alla scelta della saliva come mezzo di ricerca dei potenziali biomarcatori biologici (14, 15). Questo va ricercato nella semplicità e non invasività della raccolta, nella metodica analitica e sperimentale relativamente semplice (16), la possibilità di correlare le alterazioni salivari a quelle plasmatiche (17). L'utilizzo delle tecniche classiche elettroforetiche permette una identificazione certa delle proteine (18), tuttavia richiede notevole

dispendio di energie e non è applicabile a grosse casistiche. Al contrario, la metodica SELDI-TOF, permette una rapida analisi di grosse popolazioni di pazienti, è relativamente semplice e consente un rapido confronto tra i gruppi analizzati (19). La difficoltà maggiore riscontrabile utilizzando il SELDI-TOF è l'identificazione dei picchi osservati. Questo infatti richiede tecniche complementari di elettroforesi ed immunoprecipitazione, che presuppongono una notevole conoscenza della biochimica delle proteine. Un altro aspetto interessante che differenzia le due tecniche è quello del range di peso molecolare delle proteine separate. La metodica del gel di poliaccrilamide permette l'individuazione di proteine con peso molecolare tra 15 e 100 kDa il SELDI-TOF, a causa del funzionamento stesso dell'hardware, consente una buona capacità analitica per pesi molecolari che vanno da poche centinaia di Dalton fino a circa 25 kDa. Questo, se da una parte è un limite per il SELDI-TOF, offre la possibilità di avere due tecniche complementari che consentono di osservare un ampio range di pesi molecolari, incrementando così la possibilità di trovare dei biomarcatori.

Dall'analisi dei risultati emerge come le due metodiche analitiche presentano una

certa sovrapposibilità, che comunque deve essere confermata mediante l'identificazione dei picchi osservati.

Da una prima analisi possiamo individuare alcuni picchi che hanno un rapporto m/z simile a quello di alcune proteine individuate mediante metodica 2-DE. Infatti abbiamo trovato dei picchi con m/z simile alle calgranuline. Le calgranuline appartengono alla famiglia delle S100 e sono implicate in numerosi meccanismi cellulari nella proliferazione cellulare, nella migrazione cellulare, nell'omeostasi del calcio e nell'infiammazione e nella protezione della cellula dallo stress ossidativo (20-22). Le possibili implicazioni di queste proteine nella fibromialgia sembrano imputabili al meccanismo di protezione dallo stress ossidativo, che sembra uno delle possibili cause della FM (23). L'altro picco che abbiamo osservato è la Rho GDP-dissociation inhibitor 2.

Questa è coinvolta nell'attività della RhoG-

TP asi che controlla la morfologia e la motilità cellulare (24-26). Le implicazioni eziopatogenetiche di questa proteina nella FM non sono attualmente note.

In conclusione, i nostri risultati mettono in luce come la proteomica salivare sia un utile mezzo per la ricerca di biomarker nella FM e come la sovrapposizione di due tecniche analitiche permette di avere un largo spettro di ricerca. Questi sono tuttavia risultati preliminari, che richiedono ulteriori valutazioni e validazioni, in particolare per quanto riguarda l'identificazione dei picchi trovati utilizzando il SELDI-TOF.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato condotto nell'ambito di un progetto di ricerca finanziato dalla regione Toscana (Bando Salute 2009) dal titolo "Salivary proteomic analysis as a potential tool for the identification of biomarkers useful for diagnosis of fibromyalgic patients".

RIASSUNTO

La fibromialgia (FM) è un reumatismo non articolare per cui non esistono marker validati. Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare nella saliva la presenza di eventuali biomarkers. Per questo studio sono stati arruolati 57 pazienti FM e 35 controlli sani. L'analisi proteomica è stata condotta utilizzando SELDI-TOF.

L'analisi degli spettri ha sottolineato la presenza di alcuni picchi espressi in maniera differente nei pazienti FM rispetto ai controlli, questi sono stati confrontati con quelli ottenuti in un nostro precedente lavoro eseguito utilizzando elettroforesi bidimensionale, evidenziando tre proteine a comune (calgranuline A e C e Rho-GDP dissociation inhibitor II). Questi risultati consentono di individuare la saliva come un possibile mezzo di ricerca di biomarcatori nella FM.

Parole chiave: Fibromialgia, saliva, SELDI-TOF.

Key words: Fibromyalgia, Human Saliva, SELDI-TOF.

■ BIBLIOGRAFIA

1. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MD. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 160-172.
2. Magaldi M, Moltoni I, Biasi G, Marcolongo R. Changes in intracellular calcium and magnesium ions in the physiopathology of the fibromyalgia syndrome. *Minerva Med* 2000; 91: 137-140.
3. Wolfe F, K Ross, Russell AJ, Herbert L. The prevalence and characteristics of fibromyalgia in the general population. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 19-28.
4. Buskila D, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, S Stisi, Carrabba M. The fibromyalgia syndrome: recent acquisitions. *AISF* 2007.
5. Bazzichi L, Rossi A, Giacomelli C, Bombardieri S, Exploring the abyss of fibromyalgia biomarkers. *Clin Exp Rheumatol*. 2010; 28(6 Suppl. 63): S125-30.
6. Giusti L, Bazzichi L, Baldini C, Ciregia F et al. Specific proteins identified in human whole saliva from systemic sclerosis patients. *J. Rheumatol*. 2007, 34, 2063-9.
7. Baldini C, Giusti L, Bazzichi L, Ciregia F,

- Giannaccini G, Giacomelli C, Doveri M, et al. Association of psoriasin (S100A7) with clinical manifestations of systemic sclerosis: is its presence in whole saliva a potential predictor of pulmonary involvement? *J Rheumatol* 2008; 35: 1820-4.
8. Giusti L, Baldini C, Ciregia F, Giannaccini G, Giacomelli C, De Feo F, et al. Is GRP78/BiP a potential salivary biomarker in patients with rheumatoid arthritis? *Proteomics Clin Appl* 2010; 4: 315-24.
 9. Baldini C, Giusti L, Bazzichi L, Lucacchini A, Bombardieri S. Proteomic analysis of the saliva: a clue for understanding primary from secondary Sjögren's syndrome? *Autoimmun Rev* 2008; 7: 185-91.
 10. Giusti L, Baldini C, Bazzichi L, Bombardieri S, Lucacchini A. Proteomic diagnosis of Sjögren's syndrome. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4: 757-67.
 11. Bazzichi L, Ciregia F, Giusti L, Baldini C, Giannaccini G, Giacomelli C, et al. Detection of potential markers of primary fibromyalgia syndrome in human saliva. *Proteomics Clin Appl* 2009; 3: 1296-304.
 12. Al-Tarawneh SK, Bencharit S. Applications of Surface-Enhanced Laser Desorption /Ionization Time-Of-Flight (SELDI-TOF) Mass Spectrometry in Defining Salivary Proteomic Profiles. *The Open Dentistry Journal* 2009; 3: 74-79.
 13. Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Turiel M, Furlan R, Vulpio L, Carrabba M, Pace F. The Italian version of the Fibrofatigue Scale, a reliable tool for the evaluation of fibromyalgia symptoms. *J Psychosom Res* 2004; 56: 213-6.
 14. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human body fluid proteome analysis. *Proteomics* 2006; 6: 6326-53.
 15. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4: 531-8.
 16. Papale M, Pedicillo MC, Di Paolo S, Thatcher BJ, Lo Muzio L, Bufo P, et al. Analysis by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF/MS): from sample collection to data analysis. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 89-99.
 17. Loo JA, Yan W, Ramachandran P, Wong DT. Comparative human salivary and plasma proteomes. *J Dent Res* 2010; 89: 1016-23.
 18. Hochstrasser DF, Patchornik A, Merrill CR. Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. *Anal Biochem* 1988; 173: 412-3.
 19. Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D. The SELDI-TOF MS Approach to Proteomics: Protein Profiling and Biomarker Identification. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 292: 587-92.
 20. Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1450: 191-231.
 21. Yang Z, Tao T, Raftery MJ, Youssef P. Pro-inflammatory properties of the human S100 protein S100A12. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 986-94.
 22. Passey RJ, Xu K, Hume DA, Geczy CL. S100A8: emerging functions and regulation. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 549-56.
 23. Ozgocmen S, Ozyurt H, Sogut S, Akyol O. Current concepts in the pathophysiology of fibromyalgia: the potential role of oxidative stress and nitric oxide. *Rheumatol Int* 2006; 26: 585-97.
 24. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; 420: 629-35.
 25. Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000; 348: 241-55.
 26. Hall A, Rho GT. Pases and the Actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279: 509-14.