

PROTEOMICA

Introducing proteomics: From concepts to sample separation, mass spectrometry and data analysis (2011)

Introduction to proteomics. Principles, and applications (2010)

Le **scienze omiche** sono **le scienze che studiano tutte le molecole presente in un campione**.

Noi ci occuperemo di proteomica e peptidomica con alcune tecniche per la metabolomica.

Tra tutte le omiche le più conosciute sono genomica, trascrittomica e proteomica. La genomica è una scienza antica e ci permette lo studio di tutti i geni presenti nell'organismo (SONO SEMPRE GLI STESSI IN TUTTE LE CELLULE), ad esempio nell'uomo abbiamo circa 10^{13} cellule, circa 270 tipi di cellule e tutte hanno lo stesso genoma. Nell'uomo sono circa presenti 22333 geni, tutti quanti conosciuti. Queste informazioni sono presenti in banche dati di sequenze geniche.

La trascrittomica, si prende il gene e lo si trasforma in RNA messaggero. Esistono più RNA rispetto ai geni queste a causa delle varianti di SPLICING. Se si confronta però il numero di mRNA con il numero di proteine si vede che dal passaggio da RNA a proteina si aumenta ancora di più la complessità a cause delle diverse isoforme che le proteine possono assumere (modifiche post-traduzionali): 1 gene → 10 mRNA → proteine 50 volte gene.

La proteomica ha un ampio range dinamico in quanto all'interno di un organismo possono esistere forme e quantità diverse di proteine. Oltre ad un ampio range dinamico, il proteoma di una cellula cambia durante la vita della cellula e in base alle condizioni esterne della cellula.

La proteomica permette di andare ancora più in profondità rispetto alla genomica, ad esempio se prendo e guardo a livello di genoma una farfalla e un bruco sono identici, la differenza dei due sta proprio nel proteoma in quanto non tutti i geni vengono espressi nello stesso modo e nella stessa quantità.

Per quanto riguarda l'uomo sappiamo quanti sono i suoi geni ma non sappiamo ancora quante sono le proteine a causa delle loro differenti **ISOFORME** (varianti di splicing, modifiche post traduzionali, mutazioni puntiformi).

Fino ad adesso si è riusciti ad avere un quadro della proteomica di circa 85%.

Come posso studiare il proteoma?

- Immunoistochimica: è una tecnica che si basa sull'uso di anticorpi specifici per una determinata proteina. L'anticorpo (anche lui stesso una proteina) può essere modificato con un qualcosa che emetta colore o fluorescenza (immunofluorescenza) oppure utilizzo un anticorpo secondario che riconosce e lega l'anticorpo primario; in questo caso è l'anticorpo secondario che è marcato. **È un metodo immediato e molto sensibile ma devo avere almeno un'idea della proteina che vado a ricercare per utilizzare un anticorpo specifico per quella proteina.**

- **Spettrometria di massa:** vado ad effettuare un'analisi globale di tutte le proteine ma alcune volte può essere meno specifica e meno sensibile ma per adesso è **la tecnica d'elezione per la proteomica**. Si basa sul fatto che posso identificare una molecola andando a misurare la sua massa; quindi, si basa sul fatto che due molecole diverse hanno massa diversa. **L'obiettivo non è tanto quello di identificare le proteine housekeeping, ovvero le proteine sempre presenti nella cellula, ma quelle che vanno a distinguere le diverse cellule.**

BISOGNA RICORDARSI CHE IL PROTEOMA VARIA ANCHE IN BASE AL MOMENTO DELLA GIORNATA (RITMI CIRCADIANI).

Interatomica: le proteine non lavorano da sole ma insieme ad altre proteine, questo è un altro campo di studio della proteomica e che quindi la rende ancora più complessa.

COME SI PREPARANO I CAMPIONI DA STUDIARE CON LA SPETTROMETRIA?

Per avere tutte le proteine presenti posso usare due tipologie di proteomica:

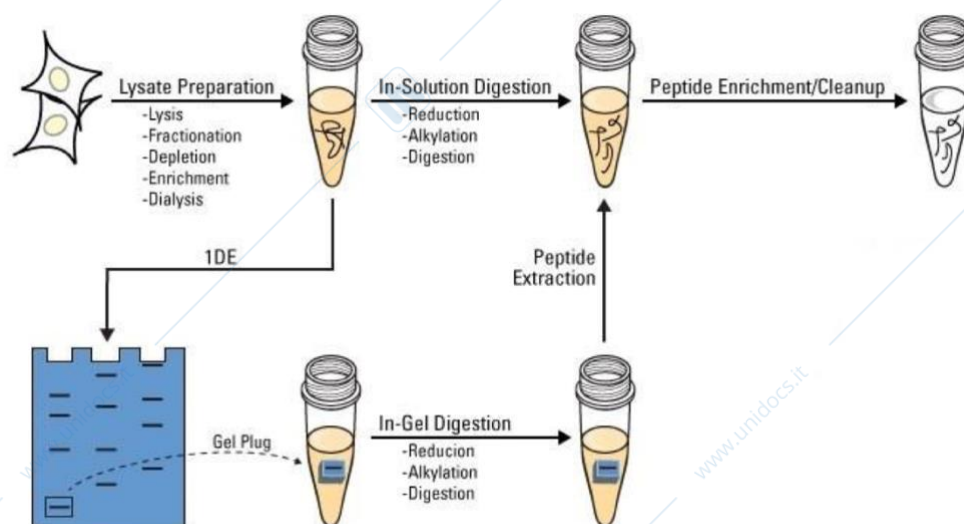
- **Discovery proteomics:** vado a vedere tutte le proteine.
- **Target proteomics:** vado a vedere una specifica proteina.

Le mie tecniche devono essere **Comprehensive** (cercare di non escludere nessuna proteina), **sensitive** (identificare anche piccole quantità), **scalable** (se adotto una tecnica per una piccola quantità devo essere in grado di utilizzarlo anche con quantità di campione maggiore).

Nella Discovery proteomics posso fare a sua volta due tipologie di proteomica:

- **BOTTOM UP** : devo prendere le mie proteine e tagliarle in peptidi grazie all'uso di enzimi digestivi. A partire dai peptidi sarò in grado di risalire alla proteina e identificarla. Questa tecnica può essere fatta in **gel** o in **gel-free**. Nella metodica in gel io parto da un campione che contiene migliaia di proteine e queste vengono separate tramite elettroforesi (monodimensionale o bidimensionale).

Nella tecnica gel-free le proteine non vengono separate ma vengono direttamente digerite in migliaia di peptidi che poi analizzo con lo spettrofotometro.



- **TOP DOWN:** si parte da un campione ricco di proteine, **queste NON vengono digerite** per identificarle, vengono separate sempre con elettroforesi/cromatografia, vengono purificate e le analizzo con lo spettrofotometro.
- **MIDDLE DOWN PROTEOMIC:** parto dalla miscela di proteine, non la separo, effettuo una digestione e ottengo peptidi più grossi. Questa tecnica non viene mai usata

Si utilizza l'approccio Bottom up perché:

- I peptidi si dissolvono e ionizzano (si caricano) più facilmente
- I peptidi che si ottengono sono da sette amminoacidi in su che quindi sono ben visibili
- Maggiore possibilità di identificazione: **dare nome e cognome a proteina**
- Una quantificazione più accurata: **sapere quanta proteina c'è.**

Per fare il bottom up devo partire dalla mia componente proteica. Se si prepara bene il campione si ottiene una analisi più accurata.

La preparazione del campione non ha una ricetta fissa, dipende dalla tipologia di campione che voglio andare a studiare; di volta in volta si agisce in maniera diversa. Si applicano molte tecniche di biochimica applicata per la preparazione dei diversi campioni.

Table 1. Recommended sample preparation tools based on sample type.

	Cultured cells	Serum, plasma, or biofluids	Tissues	Purified protein
Lysis/extraction	✓		✓	
Protein quantitation assays	✓	Optional	✓	Optional
Abundant protein depletion		✓	Optional	
Immunoprecipitation (IP)	✓	✓	✓	
Active site labeling and enrichment	✓	✓	✓	
Protein interaction/crosslinking	✓		✓	✓
Protein clean-up/concentration	Optional	Optional		✓
Gel separation	Optional		Optional	✓
Protein digestion	✓	✓	✓	Optional
Peptide enrichment/fractionation	✓	✓	✓	
Peptide clean-up	✓	✓	✓	Optional
Peptide quantitation assays	✓	✓	✓	Optional

1) TECNICHE PER OTTENERE LE PROTEINE E PER ARRICCHIRE LA COMPONENTE DI PROTEINE

- **PURIFICAZIONE PER AFFINITA':** tecnica che può essere o di **cromatografia** (ho una fase fissa e una fase mobile che può essere un gas o un liquido, generalmente la fase fissa è contenuta in una colonna. Il principio è che se si parte da una miscela del nostro campione che viene sciolta nella fase mobile, il liquido che viene caricato sopra la fase fissa potrà rilasciare alcuni componenti che si legano alla fase fissa. A questo punto raccolgo il mio

campione. A seconda del tipo di matrice si hanno diversi tipi di cromatografia; per staccare ciò che si è attaccato userò un eluente. Ad esempio la cromatografia per idrofobicità.

La mia matrice lega bene le molecole idrofobiche e di conseguenza i grassi si legano a questa fase. Per staccare le molecole che si sono attaccate eluisco un'altra fase mobile ancora più idrofobica della fase precedente in modo da separarla dal resto) o di **precipitazione** che utilizzano degli anticorpi specifici che riconoscono determinate proteine o gruppi di proteine nel campione. La purificazione può essere fatta anziché in colonna da delle palline in resina (beads) che si inseriscono nella soluzione e le proteine che mi servono si attaccano a queste palline magnetiche, si utilizza poi un sistema magnetico che attrae le palline. Non è la prima tecnica che uso in quanto raccogli gruppi di proteine precise e non tutte.

- **ULTRAFILTRAZIONE**

- **ELETTROFORESI**

- **CROMATOGRAFIA LIQUIDA**

- **SALT-OUT:** tecnica molto usata che permette di raccogliere tutte le proteine da una miscela e di liberarmi di tutto il resto. Si basa sul principio che generalmente le proteine sono molecole grosse e vengono tenute in soluzione dai legami (idrogeno) che si instaurano tra il solvente (acqua) e la proteina stessa (legame di solvatazione). Con il salt-out aggiungo una grande quantità di un sale (solfato di ammonio) che è super solubili in acqua e si legano loro alle molecole di acqua. Per l'acqua è molto più facile legarsi al sale rispetto alle proteine che a seguito precipitano. Quindi meno una proteina è solubili più è facile farla precipitare.

- **PRECIPITAZIONE IN AMBIENTE ACIDO:** con acido TFA (acido trifluoroacetico). SI basa su un principio simile al salt-out. Le proteine perdono la loro forma in ambiente acido e perdendo la loro forma diminuiscono la loro solubilità e di conseguenza precipitano.

- **PRECIPITAZIONE CON BOLLITURA:** stesso discorso dell'acido. Se le proteine vengono bollite si unfoldano e precipitano.

- **DEPLETION KIT:** sono dei kit che permettono in un campione generico di rimuovere le proteine più abbondanti. È importante rimuovere queste proteine troppo abbondanti per evitare che sopprimano l'analisi di quelle meno abbondanti.

A questo punto ho la mia componente proteica e posso procedere con la **BOTTOM-UP TECHNOLOGY**. Si ricorda che il bottom up può avvenire in gel o gel-free.

BOTTOM UP GEL-FREE

Le tecniche di digestione si in gel che in gel-free sono sempre le stesse.

- 1) **Denaturo le proteine (unfolding)**: se la proteina è già denaturata passo direttamente al passaggio successivo. La proteina deve essere denaturata perché sarà più facile separare i peptidi. Per denaturarla uso degli **AGENTI DENATURANTI** (urea 8M, guanidino cloruro, saponi, solventi organici);
- 2) **Riduzione**, quando uso i denaturanti la proteina si unfolda rompendo tutti i legami che la tengono insieme. Gli unici legami che non vengono rotti sono i legami covalenti e i ponti disolfuro, a livello dei ponti disolfuro le proteine mantengono la loro forma. Per evitare un refolding vado ad effettuare una riduzione per rompere i ponti disolfuro e far sì che tutta la proteina sia in forma lineare. Per rompere i ponti disolfuro uso il DTT/DTE o TCEP. Queste molecole contengono gruppi -SH che attaccano i ponti disolfuro per legarsi lui stesso al gruppo -S della proteina;
- 3) **Alchilazione**, adesso dopo la riduzione ho i due gruppi SH liberi e voglio evitare che formino nuovamente un legame disolfuro. Per fare questo uso un agente alchilante (iodoacetamide) che va ad alchilare i gruppi -SH evitando così che si formino nuovi ponti disolfuro.
- 4) **Digestione**, si effettua tramite proteasi per tagliare le proteine in peptidi. Devo essere certo che l'ambiente della provetta in cui sono contenute le mie proteine sia compatibile con le proteasi che voglio usare per digerire la proteina. Gli enzimi più comuni sono la **TRIPSINA** che taglia il legame peptidico (legame tra gruppo carbossile e gruppo amminico di due amminoacidi) dopo una arginina o dopo una lisina o la **CHIMOTRIPSINA**. Per fare questo ci sono delle tabelle per verificare se le sostanze che ho usato nei passaggi precedenti non vanno ad inattivare il mio enzima. Dopo queste verifiche aggiungo il mio enzima, lo aggiungo in piccole quantità perché sono dei catalizzatori, lascio agire il tutto per un certo tempo per far sì che l'enzima agisca sulle proteine di interesse (>15 ore a 37°C).
 - LYS-C taglia dopo lisina
 - LYS-N taglia prima lisina
 - Arg-C taglia prima di cisteina

Dopo il periodo di incubazione devo bloccare la tripsina perché se non continuerebbe ad agire, per fare questo inserisco un **ACIDO FORTE**. Quindi a questo punto ho i miei peptidi in soluzione acida.

BOTTOM UP IN GEL

Separo le proteine attraverso una elettroforesi su gel colorato, solitamente di blu. Dopo l'elettroforesi le proteine sono già denaturate, ridotte e alchilizzate. Devo però digerire e quindi far una digestione in gel. Per farlo divido il gel in frazioni e lavo via **SDS**, successivamente lo disidrato, in questo modo il gel diventa come un foglio di carta con all'interno la proteina. A questo punto il gel disidratato viene messo a contatto con una soluzione acquosa contenente la tripsina. In questo modo il gel si reidrata ed assorbe anche la tripsina che andrà poi a tagliare le mie proteine. Il gel è come una sorta di gabbia tridimensionale, la proteina è immobilizzata nel gel perché la proteina è più grande dei pori, quando la proteina è tagliata in peptidi questi sono più piccoli e di conseguenza escono dal gel e passano in soluzione.

NB: l'**SDS** è un **detergente anionico**, il che significa che conferisce ai campioni una carica negativa uniforme. Ciò è essenziale, dal momento che, applicando un campo elettrico, le molecole devono muoversi uniformemente da un polo verso un altro. Se si fa un'elettroforesi per acidi nucleici, essi hanno già una carica negativa intrinseca dovuta ai gruppi fosfato, per cui si muoveranno spontaneamente verso il polo positivo. Nel caso delle proteine, invece, sappiamo che queste non hanno una carica negativa uniforme, motivo per cui, se non aggiungessimo l'**SDS**, esse non migrerebbero tutte insieme da un polo verso l'altro.

<ul style="list-style-type: none"> ✓ Complete solubilization with SDS ✓ Protein-level size separation ✓ High purity ✓ Robustness 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Low yield ✗ Labor intensive ✗ High contamination level ✗ High in-vitro modification level
--	--

DIGESTIONE IN SOLUZIONE

Quando vogliamo fare bottom up gel free
 Il campione contiene tutte le proteine che ho raccolto
 Denaturante più utilizzato: urea/tiourea
 LysC: taglia solo dopo le cisteine

FASP: Filter Aided Sample Preparation (FASP)
 Tecnica molto miniaturizzata: campioni di biopsia per esempio

Cuvetta con all'interno membrana che fa da filtro
 Le proteine non passano questo filtro. → concentro il mio campione

Aggiungo urea e centrifugo. Ottengo proteine e SDS che passa la membrana

Ora posso aggiungere enzima (es. tripsina). 24h

Centrifugo e raccolgo sotto la membrana la miscela di peptidi

SINGLE-POT SOLID PHASE enhanced Sample preparation (SP3)

Dentro un singolo pot

Lego le proteine che voglio digerire con delle biglie (resina)

Aggiungo tutto

Aggiungo enzima digestivo (tripsina) che trova le proteine e comincia a digerire.

I peptidi si staccano (24h)

Centrifugo e fine

MS CONTAMINANTS

Bisogna evitare i Sali perché diminuiscono il segnale della massa

Non usare agenti stabilizzanti

Non usare solventi organici quali DMSO

(tutto questo per fare una spettrometria di massa)

Prima di fare spettrometria di massa devo essere sicuro che non ci siano contaminanti e quindi devo fare un altro ciclo per disinfettare

Utilizzo dei puntali con resina C18

Bisogna anche evitare cheratine e polimeri sintetici (Creme e Saponi)

Per fare massa usiamo eppendorf per massa, sono rivestite da film

ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE

Tecnica elettroforetica che mi permette di separare le proteine contenute in una soluzione

Separo in funzione di due proprietà: dimensione e carica

Non esistono due proteine che abbiano dimensione e carica uguali

Prima proprietà che uso è la carica: punto isoelettrico: valore di pH al quale una proteina ha carica elettrica uguale a 0

La carica dipende dal pH

Usando un gradiente stretto di pH è possibile separare anche proteine che differiscono di sole 0.01 unità di pI → altissimo potere risolutivo

Seconda proprietà: dimensione

Faccio SDS PAGE

Devo colorare il gel per colorare e trovare le proteine

3 tipi:

1. sistemi che colorano tutte le proteine (Blu Comassie, Silver e la fluorescenza)
2. colorazione specifica (es. coloro solo le lipoproteine, solo le glicoproteine); immunoblotting (tecnica specifica) WESTERN BLOTTING: trasferisco tutte le proteine su una membrana usando un campo elettrico
3. differential display: permette di confrontare tra di loro campioni per vedere se il loro proteoma è diverso. Posso fare confronto anche quantitativo. (DIGE, MP, ICAT)

WESTERN BLOTTING.

Membrane che posso usare: nitrocellulosa, PVDF

Metto la membrana a contatto con l'anticorpo primario (generalmente non lo vedo) e poi metto la membrana a contatto con un anticorpo secondario (che può essere colorato o si usa un enzima reporter che colora)

Difference gel electrophoresis (DIGE)

Due campioni da confrontare. Marco le loro proteine con 2 fluorescenti diversi, li mescolo in uguale quantità, faccio elettroforesi bidimensionale. Prendo il gel, lo metto sotto lo scanner a fluorescenza. Sovrappongo le due immagini mediante software

Confronto fino a 3/4 campioni

Standard interno: proteina ben precisa che aggiungo nei campioni in quantità nota

DIGE VANTAGGI vs SVANTAGGI

Vantaggi

Alta sensibilità

Linearità colorante sopra a 5 ordini di grandezza (ordine di grandezza multiplo di 10)

Pochi errori sperimentali

Sistema molto riproducibile

Svantaggi

Richiede una 2D

Non è ideale per proteine di membrana e campioni di tipo siero

Uno stesso spot contiene più di una proteina (molto raro!)

Tecnica laboriosa

MULTIPLEXED PROTEOMICS (MP)

Simile al DIGE

Differenza: se ho due campioni da confrontare non li faccio correre assieme

Svantaggi

Dati sperimentali spesso non sovrapponibili

Tecnica meno sensibile e precisa

Vantaggi

Non devo fare la marcatura → vantaggio economico e di tempo

Analisi di Immagine (2 parole)

Software: Imagemaster, Melanie III

Voglio avere un'idea sulla quantificazione, allineamento, confrontare, matching, permettono di avere un'immagine virtuale

Analisi

Scanner a laser, scanner orizzontali (fotocopiatrice), sistema fotografico digitale (CCD CAMERA)

Parametri di queste macchine:

1. numero di Bit (bit depth). Tanto maggiore è il numero di bits, tanto maggiore è la definizione dell'immagine
2. range dinamico: la scala di grigio che mi rappresenta la scala digitale
3. risoluzione: numero di pixel per unità di lunghezza di un'immagine digitale espressa in dpi
4. effetti di saturazione
5. sottrazione del background
6. spot detection

In-Gel Digestion

2 modi per prelevare il gel: modo manuale o macchinari per spot picking

Disidratiamo gli spot o le bande, digestione in gel ect.... (vedere tecnica digestione gel)

ANALISI DI MASSA

Per identificare le proteine posso usare la spettrometria di massa o se gel non colorato posso usare un secondo metodo. Due approcci per questo secondo metodo: prendo il gel e lo blocco su nitrocellulosa o PVDF e ora posso colorare le membrane

Partendo da una membrana di PVDF coloro per tutte le proteine, ritaglio il singolo spot e analizzo lo spot con altra tecnica che si chiama sequenza ammino terminale (degradazione di Edman) → tecnica che non è spettrometria di massa

SPETTROMETRIA DI MASSA

Metodo analitico per misurare una molecola se conosco la sua massa molecolare

Mi permette di misurare in maniera molto precisa molecole molto piccole → precisione 5 parti per milione, precisa fino all'0,0005%

Precisione non così alta se aumenta la dimensione delle molecole → 0,01%

Principi sono 3: ionizzazione, analisi di massa e detection

Per poter misurare un campione, il campione si deve trovare almeno con una carica cioè in forma ionica

Mass analyzer: analizzatore

Detector: colui che dà l'output

Per creare ioni usiamo due tecniche: sistemi di ionizzazione soft

Dalla detection otteniamo lo spettro di massa dove sull'asse delle Y avremo l'intensità del segnale e sull'asse delle X m/z (z = numero di cariche). Il picco che vedo è una misura di quantità relativa

Otengo picchi molto stretti e acuti

Risoluzione in massa: capacità di separare due picchi vicini; si misura in base alla larghezza del picco, si misura a metà dell'altezza totale del picco.

RISOLUZIONE E ACCURATEZZA

Accuratezza: quanto il nostro dato sperimentale è vicino al dato noto. Quanto sono capace di misurare realmente il peso di quella molecola rispetto al peso teorico.

MASS RANGE

Range di ioni che posso trovare

Ionizzazione

Sistemi di ionizzazione posso essere valutati in vario modo: quanto sono capaci, la sensibilità, quanto sono stabili e quanto sono capaci di ionizzare tutto il mio campione

Per ionizzare si usano sistemi di **ionizzazione soft** cioè che non rompono le molecole ma semplicemente le carica

Tecniche soft: MALDI ed ESI

Come si ionizza: trasformo in ione negativo: aggiungo elettroni o tolgo H^+

Ionizzazione positiva: sottraggo elettroni o aggiungo H^+

MALDI

Campione allo stato solido, cristallino mischiato con una matrice sempre allo stato solido. La matrice aiuta a trasferire l'energia di un laser al campione per ionizzarlo.

Laser UV 337 nm

Ionizzazione avviene in un ambiente con alto vuoto.

Matrici che uso hanno tutte un anello aromatico