

PROTEOMA

Si definisce proteoma il complemento
tempo- e **cellulo-** specifico del genoma.

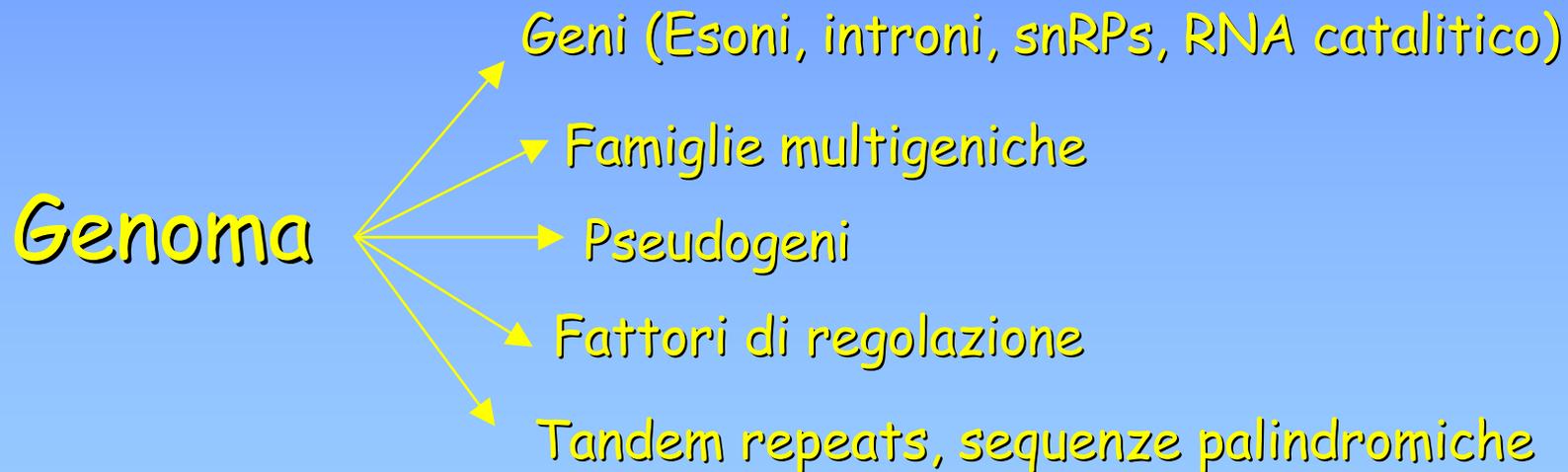
Proteome = Proteins encoded by the genome

Il proteoma comprende **tutte le proteine espresse nello stesso momento** in una cellula allo **stesso tempo**, incluse tutte le isoforme e le forme portanti modificazioni post-traduzionali.

Mentre il **genoma è costante** per una data cellula ed identico per tutte le cellule di un organismo (e non cambia molto all'interno della specie) il **proteoma è dinamico** nel tempo, si modifica in risposta a fattori esterni e differisce in maniera sostanziale tra i diversi tipi cellulari.

L'ANALISI DEL GENOMA E L'ANALISI DEL PROTEOMA NON DANNO LE STESSA INFORMAZIONI!!!

Se tutto il DNA umano codificasse la sintesi di proteine, ci sarebbero 10 milioni di proteine, contro le ~3000 note



Multigenicità

L'espressione di una singola proteina dipende da più geni

- Fattori di trascrizione
- Enhancers
- Sequenze di controllo
- Cromatina
- Metilazione del DNA
- Proteine regolatrici
- Modificazioni post-traduzionali
- Chaperonine
- Trasporto e secrezione
- Degradazione

Pleiotropia

Un singolo gene influenza il destino di più proteine

La trascrizione e la traduzione del gene avvengono attraverso il coinvolgimento di proteine che a loro volta influenzano la trascrizione e la traduzione di altri geni

Perché identificare il "proteoma" ?

- Non c'è correlazione tra quantità di mRNA e quantità di proteina (Gygi et al., 1999)
- Il proteoma è un'istantanea del fenotipo a livello biochimico
- Il proteoma tiene conto del *processing* delle proteine

S.P.Gygi et al., *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1720 (1999)

Modificazioni post-traduzionali

- Acetilazione, metilazione
- Fosforilazione
- Glicosilazione (enzimatica)
- Glicazione (non enzimatica)
- Nitrazione/denitrazione
- Cleavage
- Protein splicing
- Tagging
-

PROTEOMICA

Per "PROTEOMICA" si intende l'analisi sistematica e funzionale delle proteine presenti in un campione biologico.

Obbiettivi:

- ✓ Individuare proteine di interesse;*
- ✓ Identificare proteine;*
- ✓ Caratterizzare strutturalmente le proteine;*
- ✓ Caratterizzare funzionalmente le proteine;*
- ✓*

PROTEOMICA CLASSICA:

PROTEOMICA STRUTTURALE (O SISTEMATICA):

- Identificazione e caratterizzazione strutturale di proteine

PROTEOMICA DIFFERENZIALE:

- Identificare proteine differenzialmente espresse in determinate condizioni
(es.crescita, differenziamento, invecchiamento, malattia.....)
- Identificare *targets* molecolari responsabili delle variazioni di espressione.
- Quantificare proteine differenzialmente espresse
(es. durante stati patologici o trattamenti farmacologici)

PROTEOMICA FUNZIONALE:

- Analisi modificazioni post-traduzionali
- Analisi di funzione e funzionalità
- Interazioni proteina-proteina

Approccio "classico" allo studio PROTEOMICO

- ✓ Elettroforesi bidimensionale e/o cromatografia multidimensionale
- ✓ Rilevazione degli "spot" proteici
- ✓ Analisi di immagine
- ✓ Isolamento degli "spot" proteici
- ✓ Digestione enzimatica
- ✓ Spettrometria di massa
- ✓ Bioinformatica

Cosa si intende per
"ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE" ?

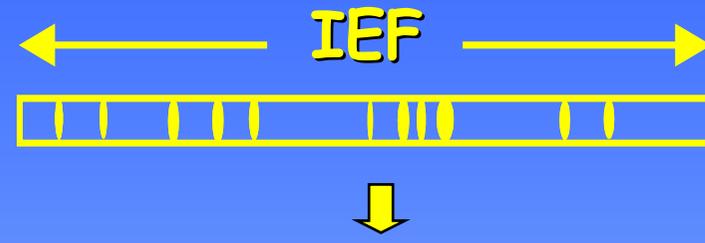
Le proteine hanno due valori intrinseci che ne determinano caratteristiche specifiche:

1. Punto isoelettrico (pI)
2. Peso molecolare (P.M.)

ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE (2D-E)

PRIMA DIMENSIONE (IEF)

Le proteine si separano in funzione del loro punto isoelettrico



SECONDA DIMENSIONE (SDS-PAGE)

Le proteine (già separate e distribuite sulla strip in base al proprio PI) si separano in funzione del loro PESO MOLECOLARE.

SDS-PAGE

pH 3

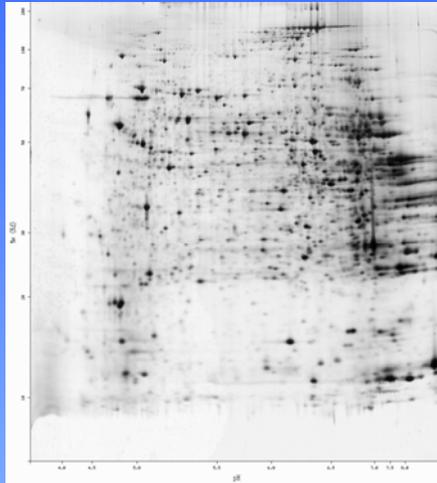
10 P.M.

Alto

Basso

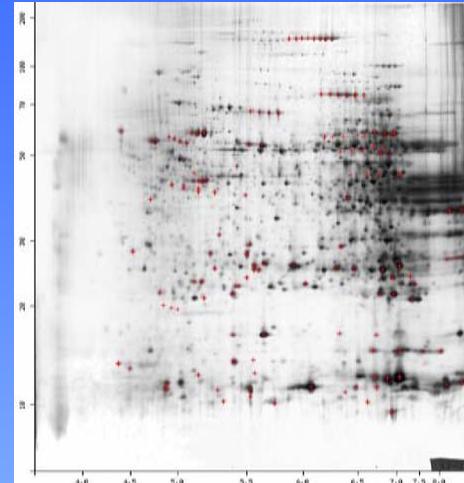


Approccio generale allo studio PROTEOMICO:



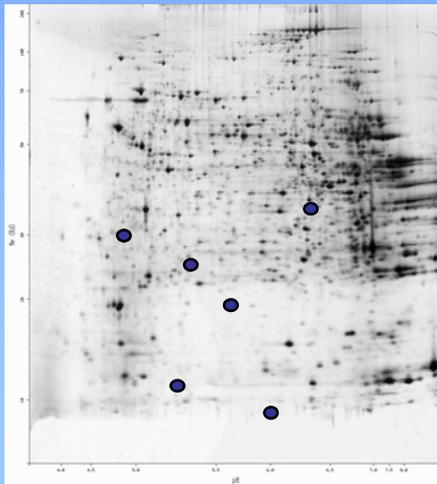
A

- ❖ Elettroforesi 2-D
- Colorazione gel



B

- ❖ Analisi dell'immagine



C

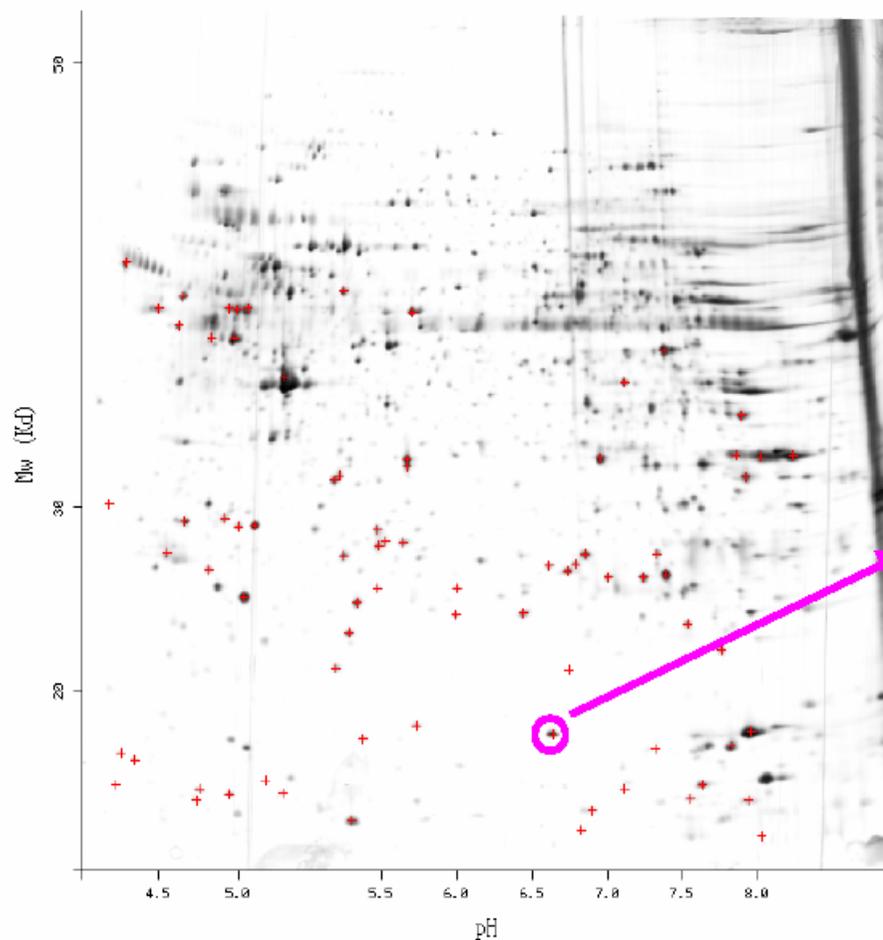


- ❖ Taglio e prelievo di spot selezionati
- ❖ Digestione "in gel"
- ❖ Estrazione dei peptidi
- ❖ Analisi mediante SPETTROMETRIA DI MASSA
- ❖ Altro (es. Degradazione di Edman)
- ❖ IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE

COLLEGAMENTO A BANCHE DATI



Map Selection: LYMPHOCYTE_HUMAN



swiss2Dpage : P23528

1 protein has been found in the clicked spot (2D-001YF6):

General information about the entry

[View entry in original SWISS-2DPAGE format](#)

Entry name **COF1_HUMAN**

Primary accession number **P23528**

Entered in SWISS-2DPAGE in Release 17, March 2004

Last modified in Release 17, March 2004

Name and origin of the protein

Description Cofilin, non-muscle isoform (18 kDa phosphoprotein) (P18)

Gene name(s) CFL1 OR CFL

From Homo sapiens (Human). [TaxID: 9606]

Taxonomy Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

References

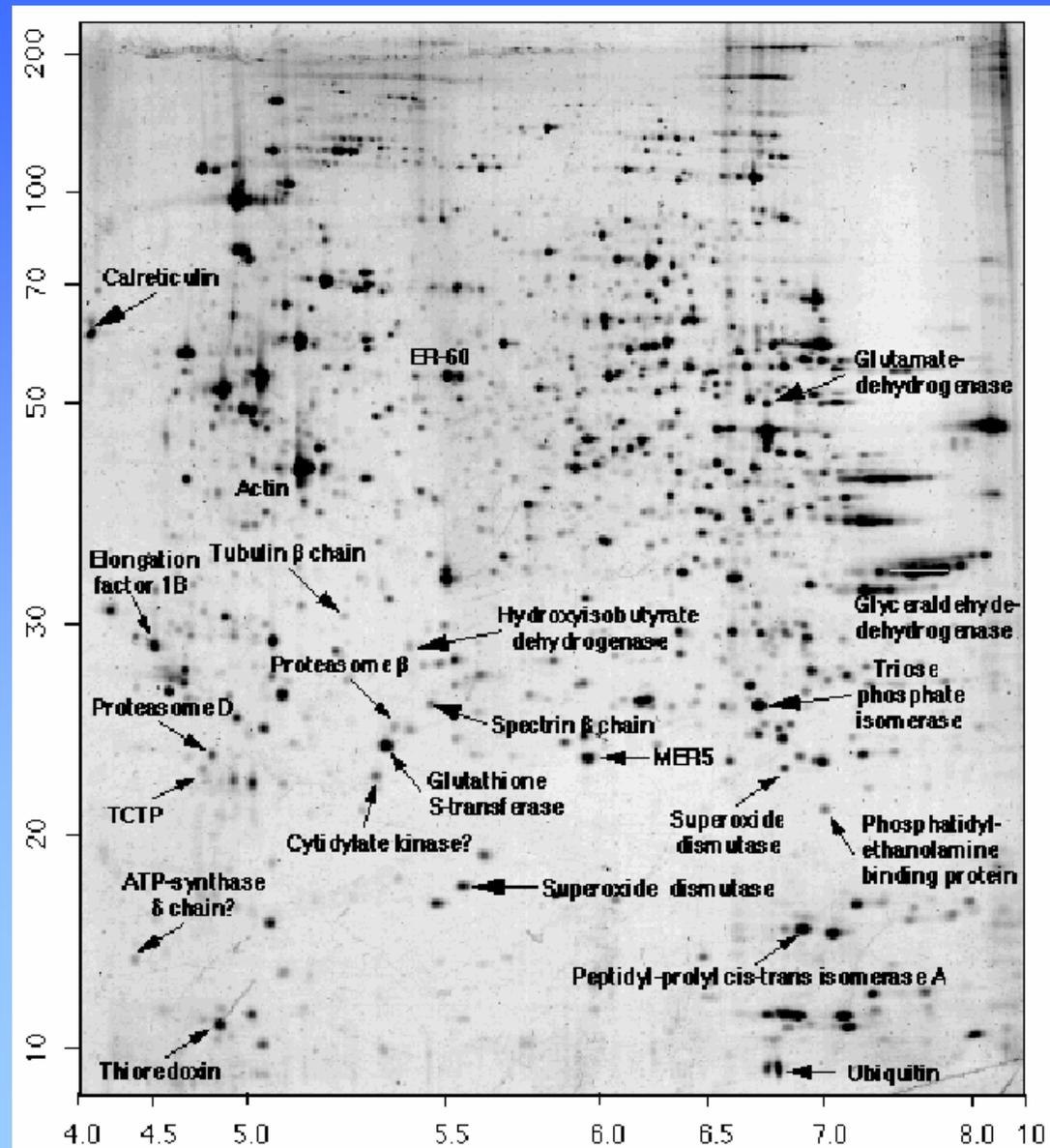
- [1] MAPPING ON GEL:
Vuadens F., Cretaz D., Teleni A., Quadroni M., Duchosal M.A., Schneider P., Tissot J.-D.;
"New insights into HIV lymphocyte infection".
(In) Sanchez J.-C., Corthals G.L., Hochstrasser D.F. (eds).
Biomedical Application of Proteomics, pp. 245-262, Wiley-VCH, Weinheim (2004).

2D PAGE maps for identified proteins

[Compute the theoretical pI/Mw](#)

[How to interpret a protein map](#)

COMPARAZIONE CON 2D-E DI BANCHE DATI



2-D PAGE:

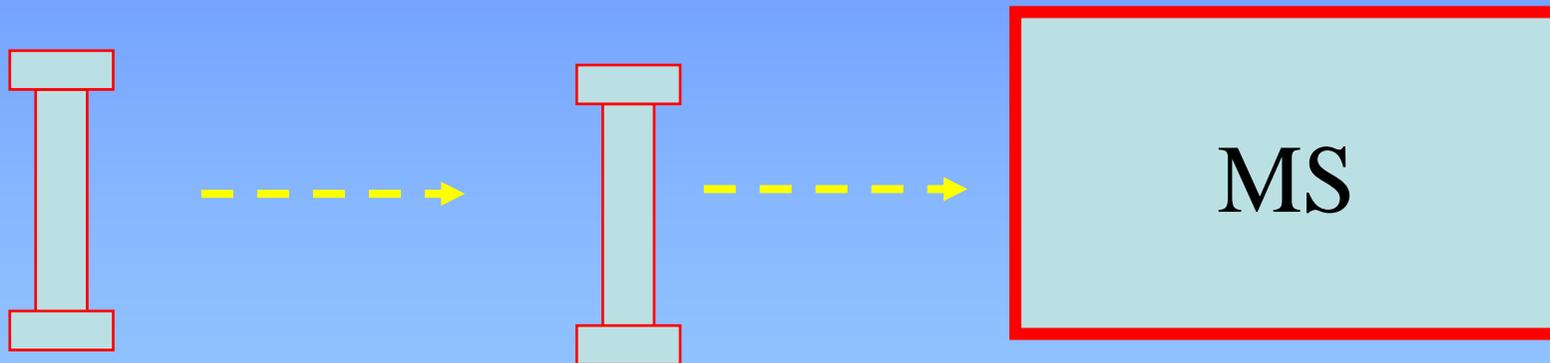
... non necessariamente è la migliore tecnica per l'analisi proteomica

Svantaggi della 2-D PAGE:

- Limitata all'analisi di proteine con: $10^4 \text{ Da} < P.M. < 10^6 \text{ Da}$
- Non adatta alla separazione di proteine idrofobiche (es. di membrana)
- Scarsa risoluzione per proteine con: $4 < p.I. < 10$
- Non si rilevano proteine espresse a bassi livelli
- Buona separazione solo per un max di 600-800 spots
- Scarsa riproducibilità fra gel
- Quantificazione "difettosa" (dipende dal sistema di rivelazione)
- L'analisi non è accoppiata direttamente alla separazione

SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA MULTIDIMENSIONALE: UN'ALTERNATIVA ALLA 2-DE

Nella cromatografia multidimensionale due (o più) tecniche con proprietà "ortogonali" vengono combinate in modo da incrementare il potere di separazione.



PRIMA DIMENSIONE:

es. Esclusione molecolare,
Scambio ionico,
elettroforesi capillare,

SECONDA DIMENSIONE:

es. Fase inversa, Scambio
ionico, Esclusione
molecolare,...

COME IDENTIFICARE NUOVE PROTEINE?

Spettrometria di massa

"Peptide Mass Finger Print" e/o sequenza ex novo.
Metodo veloce che necessita di piccole quantità proteiche.

Classica degradazione di Edman

Rimozione chimica di un residuo aminoacidico alla volta e analisi dello stesso. Metodo lento che necessita di "elevate" quantità proteiche.

Databases disponibili per l'identificazione di proteine

SWISS-PROT is a database of annotated protein sequences; it also contains additional information on function of the protein, its domain structure, posttranslational modification(s), etc.:

- **TrEMBL** is a supplement to SWISS-PROT, which contains all protein sequences, translated from nucleotide sequences of the EMBL database;
- **PIR-International** (Protein Identification Resource, National Biomedical Research Foundation, Washington, USA) is also an annotated database of protein sequences;
- **NCBI nr** (National Center of Biotechnological Information) is a database containing sequences translated from DNA sequences of GenBank and also sequences from PDB, SWISS-PROT, and PIR databases;
- **ESTdb** (Expressed Sequence Tags database, NCBI, NIH).
- programs operating with MS/MS only (SEQUEST, PepFrag, MS-Tag, Sherpa).

Identificazione di proteine attraverso "peptide mass finger print" o sequenziamento MS/MS

Algoritmi e Programmi

Three main groups:

- programs using proteolytic peptide fingerprint for protein identification (PeptIdent, MultiIdent, ProFound);
- programs additionally operating with MS/MS spectra (PepSea, MASCOT, MS-Fit, MOWSE) or with MS/MS only;
- programs operating with MS/MS only (SEQUEST, PepFrag, MS-Tag, Sherpa).

La **PROTEOMICA** studia tutti i complementi proteici (proteomi) che derivano dai vari tessuti o tipi cellulari.

La **Proteomica Classica** concentra il suo interesse sullo studio dei proteomi completi o sull'identificazione di proteine differenzialmente espresse:

Quali proteine sono presenti in una cellula o in un tessuto?

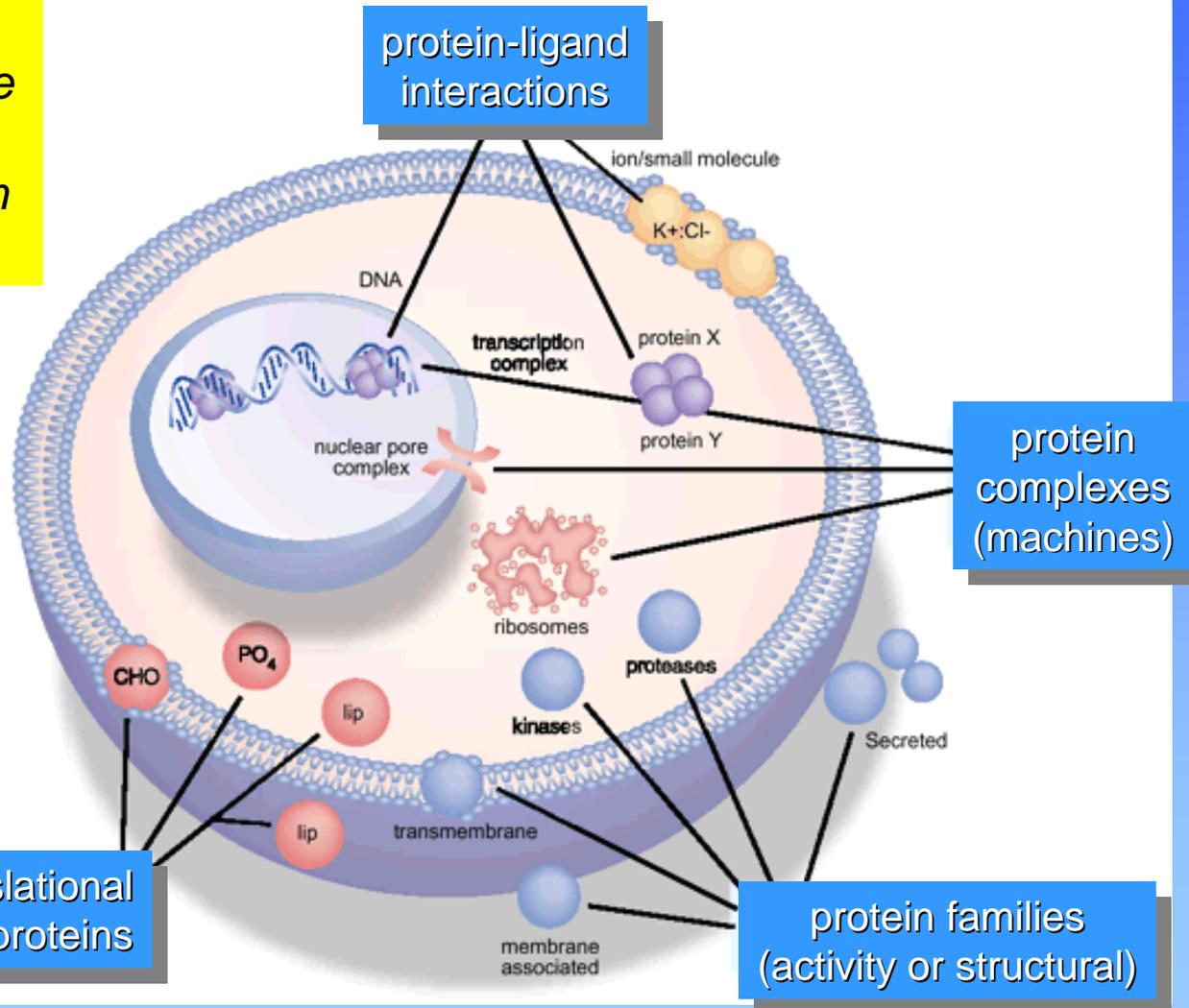
Quali proteine hanno un'espressione variata in situazioni "particolari"?

mentre la **PROTEOMICA FUNZIONALE** studia gruppi più limitati di proteine :

Come appare una particolare proteina?
(struttura, modificazioni...)

Con quali altre proteine interagisce la proteina di interesse?
(network, interazioni...)

*Eukaryotic cell.
Examples of protein
properties are
shown, including the
interaction of
proteins and protein
modifications.*



Patterson and Aebersold, *Nature Genetics* (supp.), 33, 311 (2003)

IL PROTEOMA è "DINAMICO"

Vari elementi possono caratterizzare (anche transitoriamente) le proteine in un sistema biologico:

1. Modificazioni covalenti
2. Localizzazione subcellulare
3. Interazione con altre proteine
4. Presenza di ligandi
5. Stato oligomero
6. Conformazione delle proteine
7.

Esempi di modificazioni covalenti:

- a) **Fosforilazione**, spesso coinvolta in processi regolatori
- b) **Glicosilazione**, tipica di proteine extracellulari
- c) **Lipidazione**, garantisce l'ancoraggio alla membrana
- d) **Nitrosilazione**, spesso coinvolta in processi regolatori
- e) **Acetilazione**, favorisce stabilizzazione. Comune sul primo aa.
- f) **Ubiquitinazione**, per la degradazione delle proteine

Lo studio delle modificazioni delle proteine è più complesso dell'analisi di sequenza perchè:

- E' richiesto l'isolamento dei peptidi modificati
- Le modificazioni sono frequentemente "labili"
- Alcune modificazioni (es. fosforilazioni...) in natura sono spesso transitorie
-

IPOSTESI sulla presenza e sul tipo di modificazioni si possono fare dall'analisi dell'immagine di 2D-E ("*treni di spot*").
L'analisi dettagliata richiede l'uso di tecniche di MS.

IDENTIFICAZIONE DELLA PRESENZA E DEL TIPO DI MODIFICAZIONE

L'analisi delle modificazioni covalenti delle proteine viene fatta per gradi:

- ✓ Si individuano le proteine modificate e il tipo di modifica (analisi dell'immagine; colorazioni o western blot/sistemi di immunorivelazione specifica)
- ✓ Arricchimento del campione riguardo a specifici gruppi di proteine (cromatografia di affinità; immunoprecipitazione)
- ✓ Mappatura delle modificazioni
- ✓ Ulteriore caratterizzazione.....

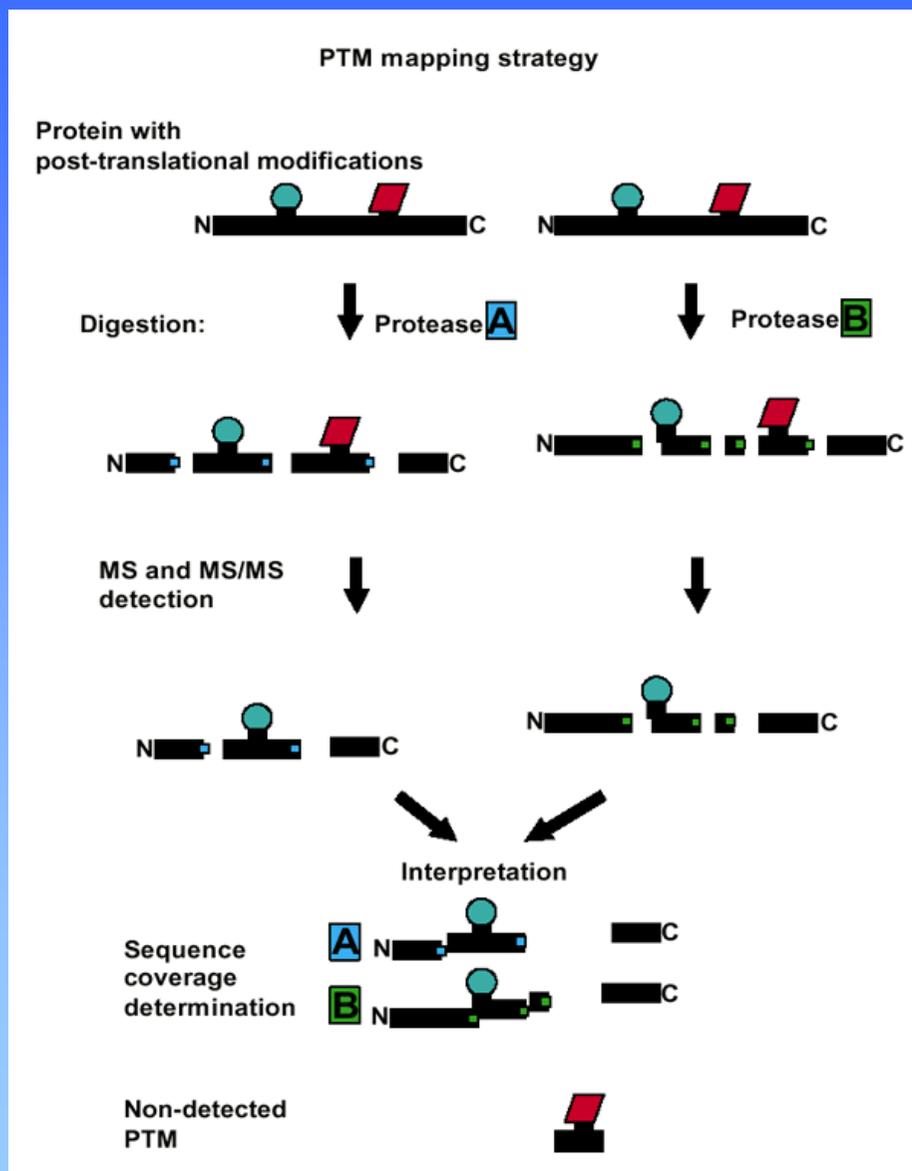
Tecniche usate per lo studio della modificazioni covalenti:

- ✓ 2D SDS-PAGE
- ✓ 2nd D MS
- ✓ MSⁿ
- ✓

Strategie di analisi:

- ✓ Rivelazione specifica
- ✓ Eliminazione della PTM
(eventualmente seguita da *labeling* specifico)
- ✓ Analisi MS

Mappaggio delle PTM



Mediante analisi MS è possibile individuare la presenza di PTM in proteine isolate :

- Degradazione chimica o enzimatica delle proteine modificate
- Separazione HPLC dei peptidi e analisi MALDI e/o ESI
- MS/MS per determinare la localizzazione delle PTM(s)

La **PROTEOMICA** studia tutti i complementi proteici, i proteomi, che derivano dai vari tessuti o tipi cellulari.

La **Proteomica classica** concentra il suo interesse sullo studio dei proteomi completi

Quali proteine sono presenti in una cellula o in un tessuto?

Quali proteine hanno un'espressione variata in situazioni "particolari"?

La **proteomica funzionale** studia gruppi più limitati di proteine

Come appare una particolare proteina (struttura, modificazioni...)?

**Con quali altre proteine interagisce la "proteina di interesse"?
(network, interazioni...)**

"INTERACTOMA"

Caratterizzazione dei complessi :

- Natura delle molecole presenti nei complessi
- Stabilità, cinetica di formazione-dissociazione dei complessi,
variazione della loro composizione
- Proprietà funzionali dei complessi
- Interazioni proteiche dirette e indirette all'interno dei complessi

Lo studio dell' INTERACTOMA

Conoscere i **DETTAGLI** delle interazioni all'interno di network e della loro **DINAMICA**:

- Stabilire **QUALI** proteine interagiscono
- Stabilire **COME** varia la composizione dei complessi proteici in funzione delle condizioni (Es. risposta a specifici segnali cellulari)
- Confermare l'esistenza di proteine che non sono state predette e attribuire loro un "ruolo potenziale".
- Stabilire i **siti molecolari** di interazione
- Determinare i **parametri cinetici** di interazione

ANALISI DELLE INTERAZIONI PROTEINA-PROTEINA

Tecniche di determinazione diretta delle interazioni:

- analisi *in vitro* : es. co-purificazione / spettrometria di massa (gel-filtrazione, ultracentrifugazione, coimmunprecipitazione...)
- analisi *in vivo* : es. Two Hybrid System, FRET...

Tecniche per la caratterizzazione delle interazioni:

- *protein-array*
- *spettrofluorimetria*
- *spettrofotometria*
-