Classic vs. Shotgun PROTEOMICS

Approccio classico

Ottenimento proteine (A & B)

Separazione proteine (A & B)

Comparazione delle separazioni (2D gels A & B)

Differenze Quantificazione (spots A & B)

Digestione in gel ed Ottenimento peptidi (A o B)

MS & MS/MS (A o B)

Identificazione (A o B)

Quantificazione effettuata sulla base del "volume" dello SPOT.

NORMALIZZAZIONE

Differenziazione campione A da campione B mediante tecniche di derivatizzazione (labeling)

Digestione proteine (A + B) e Ottenimento peptidi (A + B)

Separazione peptidi (A + B)

Comparazione delle abbondanze dei peptidi derivanti dal campione A e dal campione B (stessa analisiMS)

MS/MS (A o B)

Identificazione (A o B)

Approccio shot-gun

Ottenimento proteine (A & B)

Label-free proteomic Campione A e B analizzati In modo separato (analisi distinte)

Digestione proteine (A, B) e Ottenimento peptidi (A, B)

Separazione peptidi (A, B)

Comparazione delle abbondanze dei peptidi derivanti dal campione A e dal campione B (analisi MS diverse)

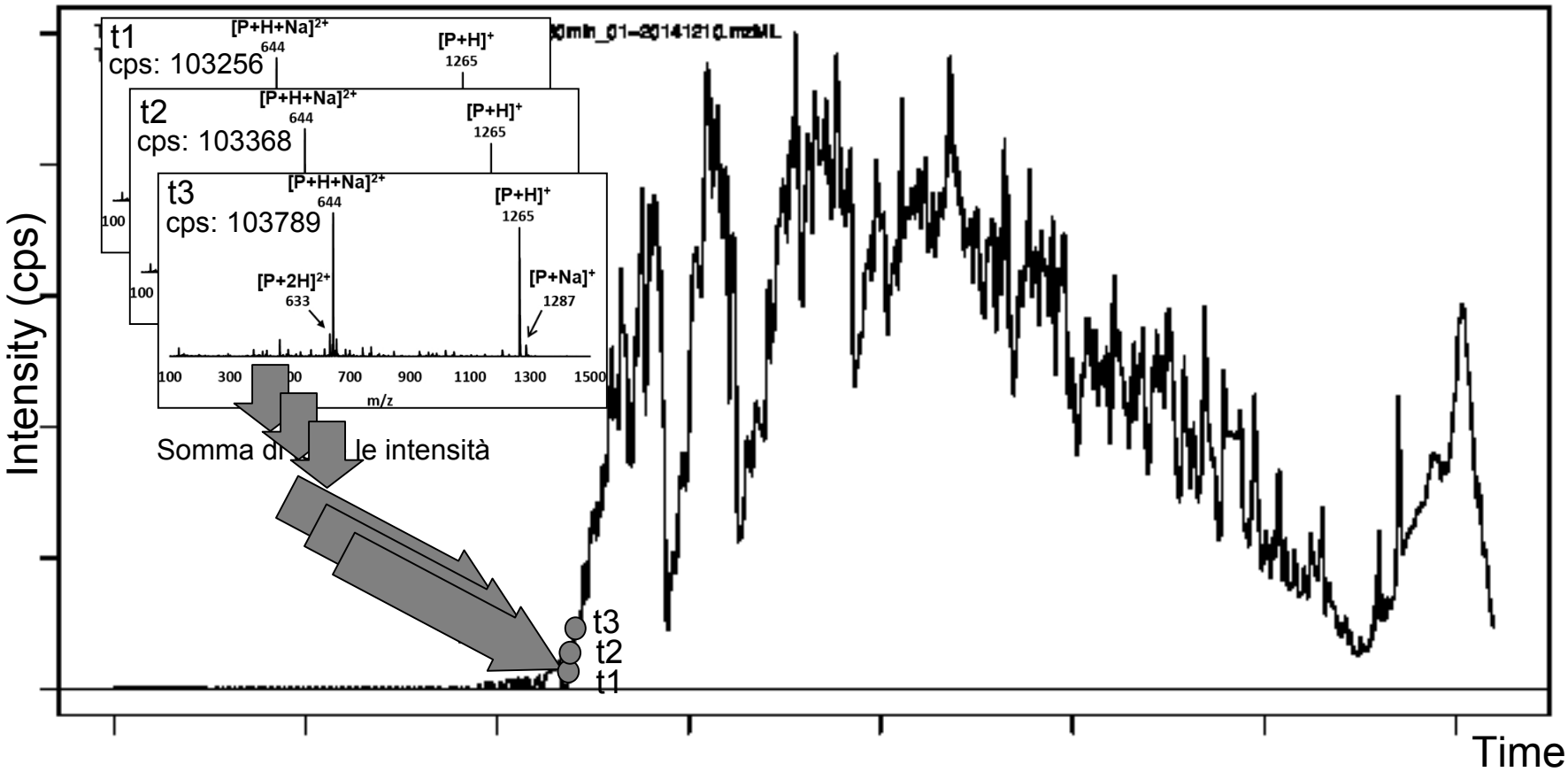
MS/MS (A e B)

Identificazione (A e B)

Quantificazione effettuata sulla base dei segnali MS (intensità).

LC-MS and LC-MS/MS
(TIC, BPC, XIC chromatograms)

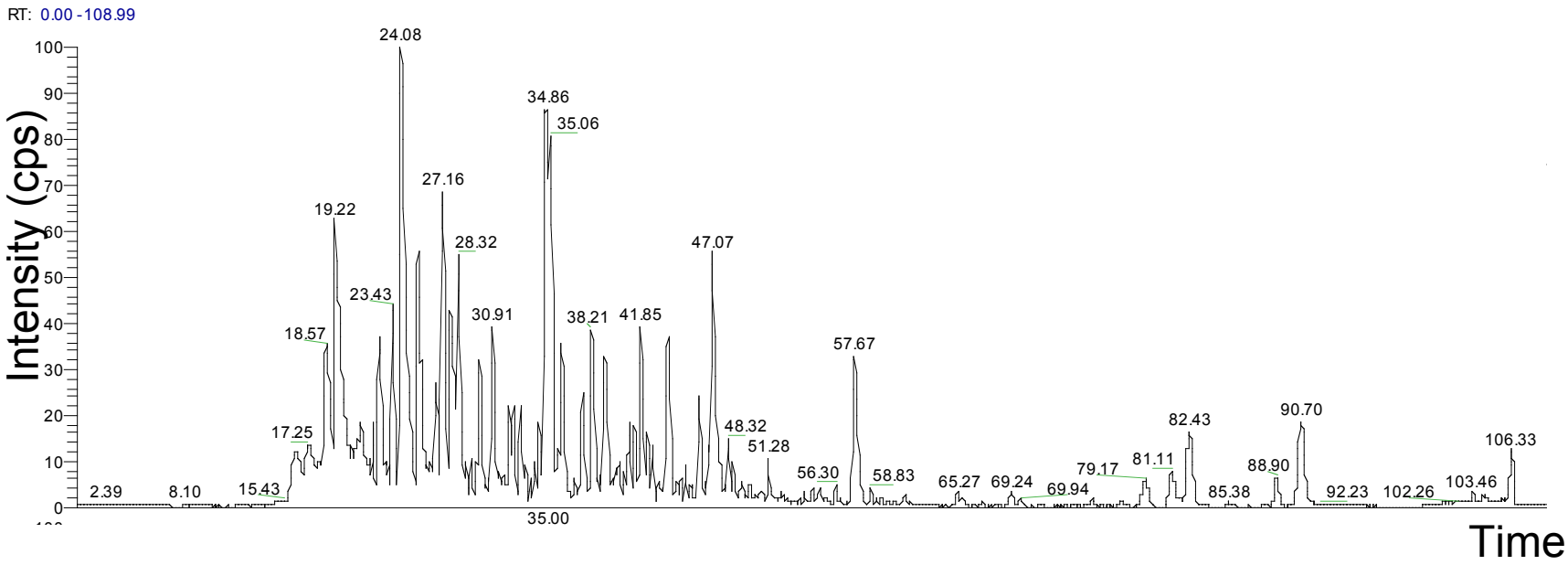
TIC: total ion chromatogram



Nelle analisi LC-MS e LC-MS/MS che vengono operate in modalità DDA (data dependent acquisition) lo spettrometro registra sempre una scansione su un determinato intervallo m/z prestabilito dall'operatore (MS). Di solito poi legge la scansione ed esegue le operazioni impostate sempre dall'operatore (di solito isolamento del precursore/frammentazione e scansione dei frammenti - MS/MS).

Il cromatogramma TIC viene ottenuto a partire dalle scansioni MS nel seguente modo: vengono sommate tutte le intensità di tutti gli ioni rilevati nella scansione MS e il valore ottenuto viene utilizzato come valore d'intensità e messo in grafico contro il tempo. Questa operazione viene ripetuta per ogni scansione effettuata e in tal modo si crea un cromatogramma.

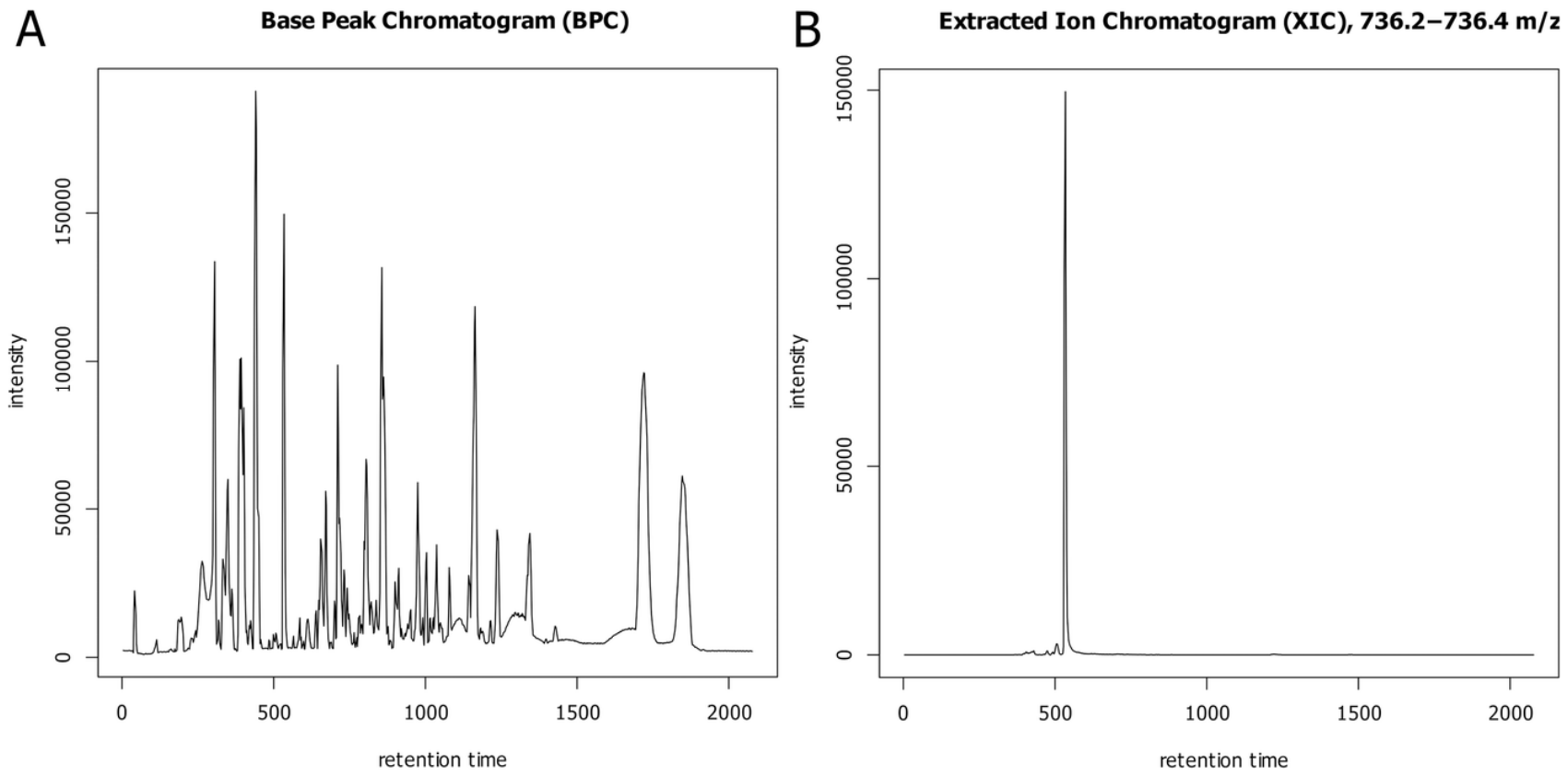
BPC: total ion chromatogram



Nelle analisi LC-MS e LC-MS/MS che vengono operate in modalità DDA (data dependent acquisition) lo spettrometro registra sempre una scansione su un determinato intervallo m/z prestabilito dall'operatore (MS). Di solito poi legge la scansione ed esegue le operazioni impostate sempre dall'operatore (di solito isolamento del precursore/frammentazione e scansione dei frammenti - MS/MS).
Il cromatogramma BPC viene ottenuto a partire dalle scansioni MS nel seguente modo: All'interno di ogni singola scansione ci sarà sempre uno ione (m/z) che ha un'intensità (cps - conte per secondo) più elevata. Questo singolo valore viene riportato contro il tempo. Questa operazione viene ripetuta per ogni scansione effettuata e in tal modo si crea un cromatogramma.

A cosa servono i TIC e BPC? Possono essere utilizzati per effettuare confronti fra campioni diversi. Se i due cromatogrammi sono confrontabili sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo significa che il campioni originali contenevano le stesse proteine, che le concentrazioni sono equilvalenti e che quindi tutti i passaggi che hanno portato all'acquisizione del dato di massa (compresa l'analisi di MS) sono avvenute in modo riproducibile. Possono essere utilizzati anche per identificare regioni del cromatogramma dove eluiscono molecole che danno un segnale molto intenso (Solo nel caso il campione sia relativamente semplice e il processo separativo offra una risoluzione adeguata. Nel caso di campioni con molti componenti e di una separazione cromatografica che non offre una sufficiente risoluzione (come spesso avviene nell'analisi di digeriti triptici) il cromatogramma di solito si presenta come una curva quasi continua senza che si possano individuare picchi (vedasi il caso mostrato relativamennte al TIC nella pagina precedente). Anche in quel caso però, intensità e forma ci danno indicazioni sulla riproducibilità delle analisi e sulla quantità di materiale analizzato.

XIC: extracted (or selected) ion chromatogram

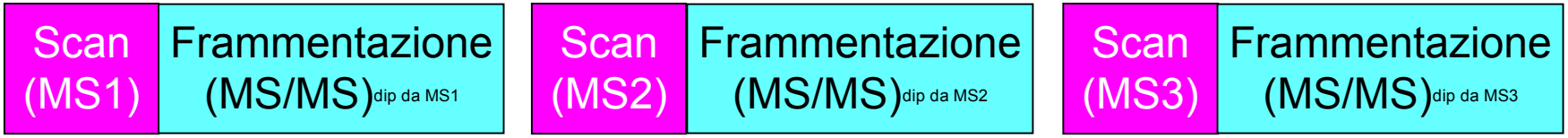


Nelle analisi LC-MS e LC-MS/MS che vengono operate in modalità DDA (data dependent acquisition) lo spettrometro registra sempre una scansione su un determinato intervallo m/z prestabilito dall'operatore (MS). Di solito poi legge la scansione ed esegue le operazioni impostate sempre dall'operatore (di solito isolamento del precursore/frammentazione e scansione dei frammenti - MS/MS). Come abbiamo visto si possono creare dei TIC e dei BPC. Dai dati accumulati però si può anche estrarre un'altra informazione che in questo caso è estremamente specifica: chiedere di visualizzare i dati relativamente ad un singolo segnale m/z (a cui solitamente è associatà una finestra, i.e intervallo di m/z).
Il cromatogramma che ne risulta è ovviamente molto più "pulito" dal momento che viene evidenziato uno specifico segnale m/z.
Questo picco può essere valutato quantitativamente (in base all'area o altezza) e questi dati sfruttati per analisi comparativi (vedasi oltre). Non dimentichiamoci che il segnale m/z corrisponde ad una specifica molecola.

Strategie analitiche DDA e DIA

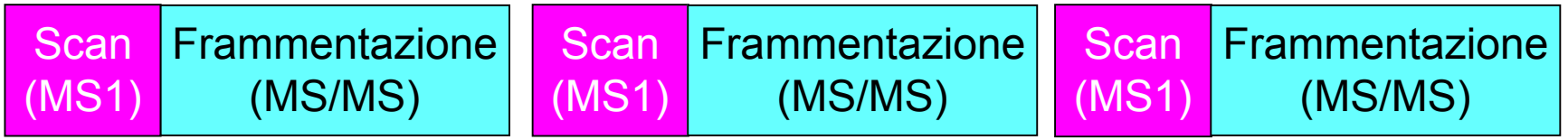
(Data-Dependent Acquisition & Data-Independent Acquisition)

Data-Dependent Acquisition: Lo spettrometro di massa effettua delle analisi di MS/MS sulla base dei segnali presenti nella scansione di MS. Le operazioni di MS/MS vengono stabilite dall'operatore e si reiterano nel tempo a seguito di ciascuna scansione e sono dipendenti dalle analisi MS (segnali m/z presenti nella prima scansione).



Con questa modalità non si ha un campionamento buono dei precursori, nel senso che non è possibile avere una traccia TIC ben definita sui singoli precursori (a causa del fatto che vengono persi tutti i quelle molecole/segnali che eluiscono quando lo strumento è impegnato a fare le analisi MS/MS). In questa modalità possono inoltre non essere considerati per l'analisi MS/MS alcuni segnali m/z per il semplice fatto che non vengono selezionati in base alle "istruzioni" date allo spettrometro - i.e. ad esempio potrebbero non essere mai tra i tre più abbondanti nello spettro MS per il semplice fatto che co-eluiscono con altre molecole che danno seganli m/z più intensi.

Data-Independent Acquisition: Lo spettrometro di massa effettua delle analisi di MS e MS/MS che non dipendono da ciò che eluisce in quel momento dalla colonna cromatografica. La modalità di scansione e frammentazione rimangono fisse nel tempo e si reiterano nel tempo. Le molecole che eluiscono dalla colonna non influiscono quindi in nessun modo sul processo di acquisizione (per questa ragione sono chiamati data-independent). Il campionamento sia in modalità MS che in modalità MS/MS è più completo a patto che la velocità strumentale sia elevata. In questa modalità sostanzialmente nessun segnale m/z viene perso, ne da un punto di vista della scansione MS ne di quelle MS/MS.

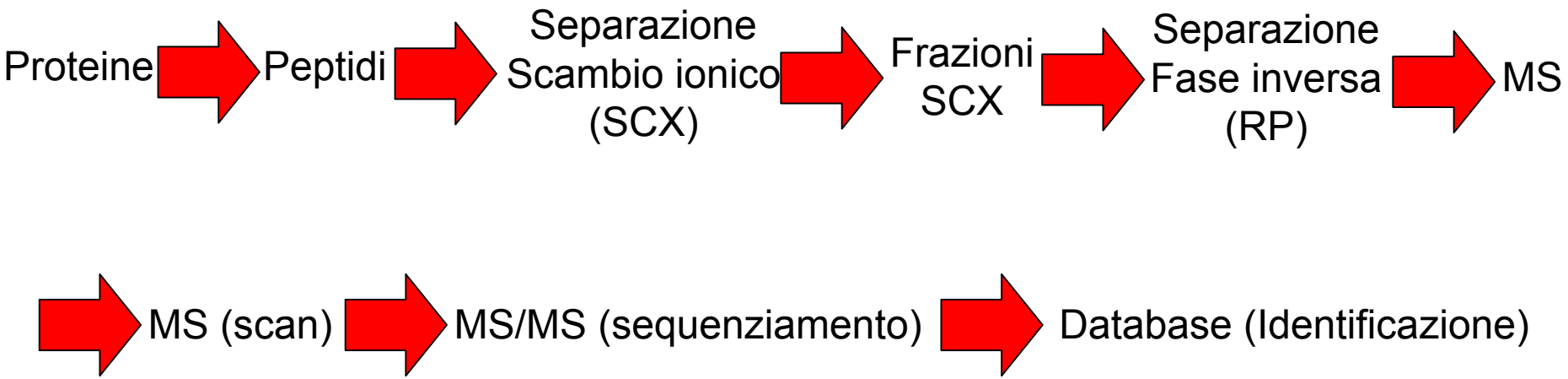


Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT)

Tecnologia per l'identificazione di proteine senza ricorrere alla loro separazione tramite 2D
- Shot-gun proteomics –

Si avvale della combinazione di separazioni cromatografiche che sfruttano principi separativi ortogonali

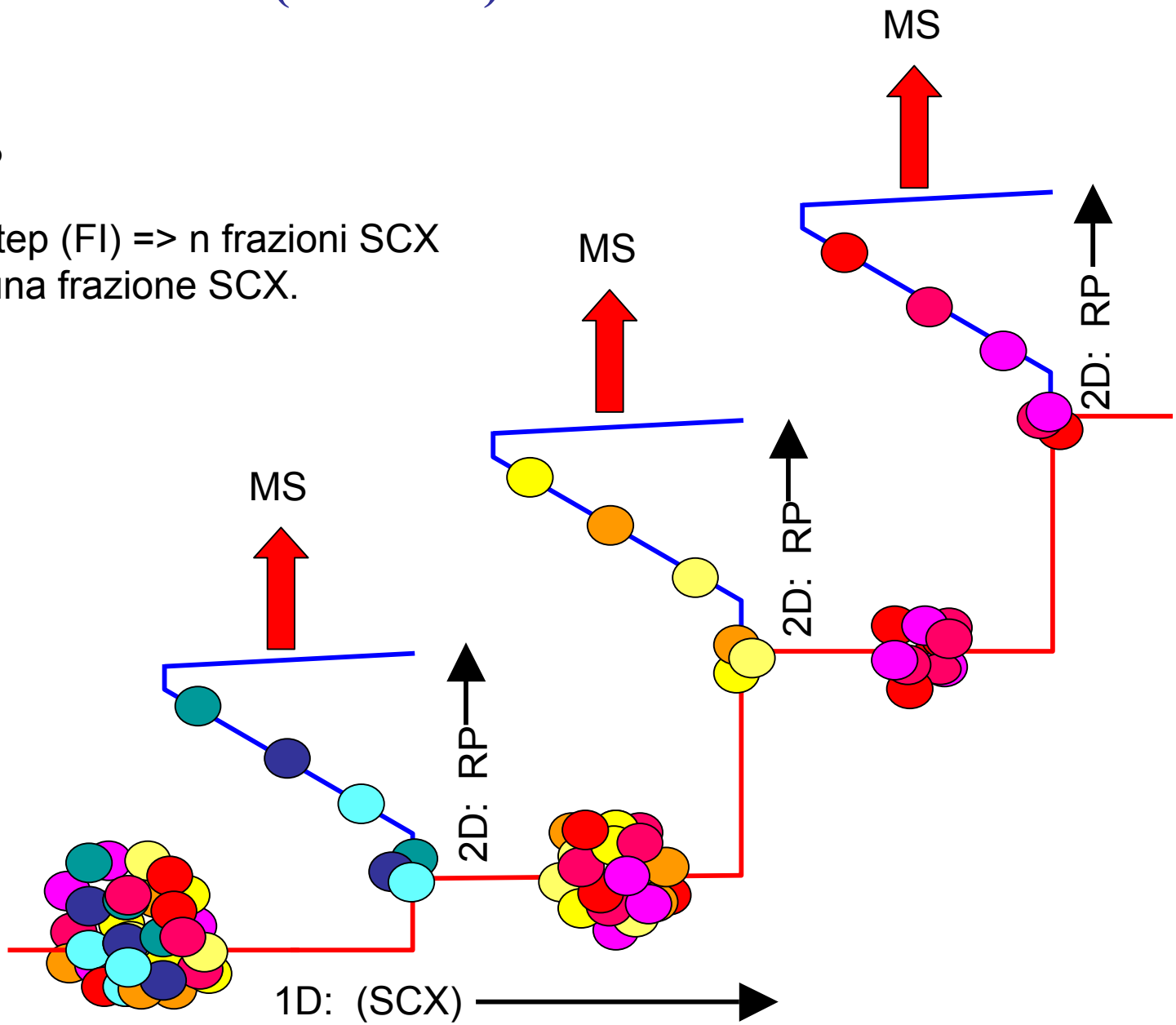
Cromatografia bidimensionale
(scambio ionico – fase inversa)



Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT)

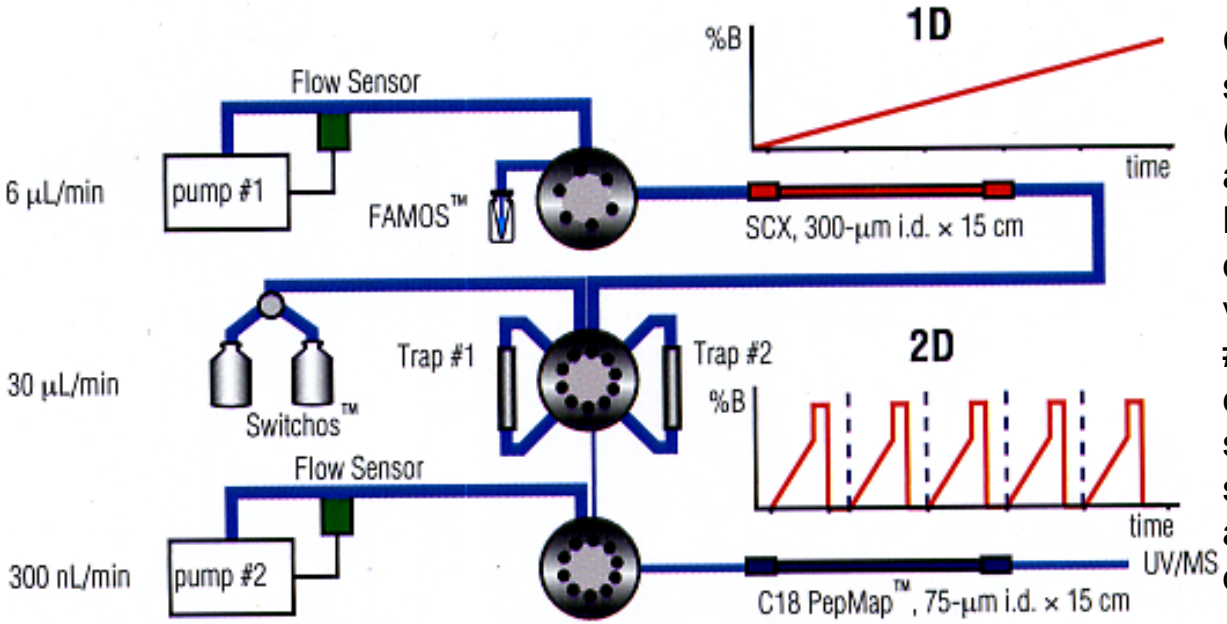
Sistema:
1 colonna SCX
1 colonna RP
Alternato SCX - RP

SCX: gradiente a step (FI) => n frazioni SCX
RP: n RP su ciascuna frazione SCX.



SCX-RP-nanoHPLC

La combinazione più sfruttata in MuDPIT è la cromatografia a scambio cationico SCX e la cromatografia a fase inversa RP-HPLC. La cromatografia SCX può essere fatta off-line creando un numero n di frazioni. Ciascuna frazione può poi essere caricata su una colonna a fase inversa e analizzata direttamente in modalità LC-MS/MS.
L'ordine con cui vengono eseguite queste operazioni è rigorosamente SCX/RP-HPLC in quanto i sali contenuti nelle frazione SCX non sarebbero compatibili con le interfacce ESI utilizzate in questo tipo di esperimenti LC-MS/MS.
Si può pensare anche di utilizzare sistemi del tutto automatizzati come quello riportato sotto. In questo caso vengono sfruttate due colonne trap RP (trappole #1 e #2) in parallelo per accumulare in modo alternato ciò che eluisce dalla colonna SCX. A turno poi, ciascuna colonna RP viene tolta dalla coda della colonna SCX e messa in testa ad una colonna analitica per RP-HPLC. Queste operazioni vengono fatte da un sistema complesso di elettro-valvole



Campione caricato nella SCX ed eluito secondo gradiente lineare di forza ionica (1D). Proteine eluite accumulate alternativamente su Trap # 1 & 2. Mentre Trap 2 accumula campione, quello che si è accumulato su Trap 1 viene separato mediante RP (2D). Trap # 1 quindi passa ad accumulare campione e ciò che si era accumulato su Trap # 2 viene separato in RP. Il sistema funziona secondo questa alternanza, mentre le proteine eluiscono dalla SCX

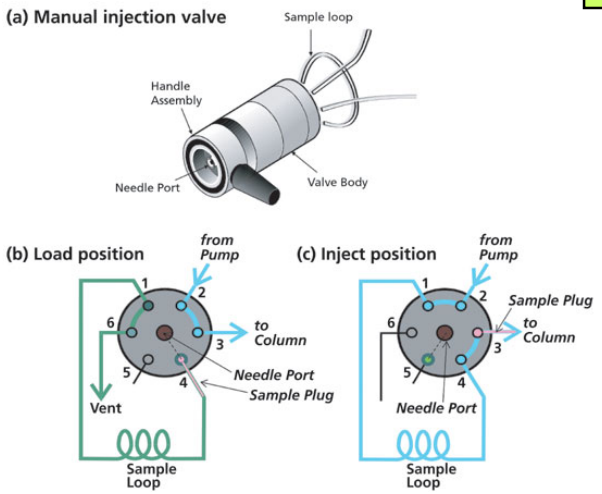
Iniezione del campione in modalità nano LC

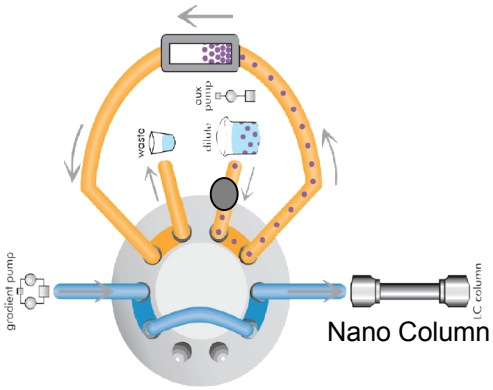
Trap column: i campioni che contengono i lisati triptici da analizzare in LC-MS/MS solitamente sono delle soluzioni i cui volumi si aggirano tra i **10 e i 20 microlitri**. In generale si cerca di iniettare la maggior quantità possibile per ovviare ai problemi di **sensibilità**. Il campione viene iniettato tramite dei **loop (A)** e poi portato in colonna grazie al flusso di fase mobile che arriva alla colonna stessa (**B**). Il flusso delle colonne cromatografiche di tipo nano che vengono utilizzate in shotgun proteomics è dell'ordine dei **100 / 200 nL/min**. Questo vorrebbe dire che solo per iniettare in colonna 10 microL di campione ci vorrebbero (ad un flusso di 100 nL/min) 100 minuti (NB: solo per portare in colonna il campione e farlo legare in testa). Per superare questa problematica si usano delle **trap column**. In un primo momento il campione viene portato in trap column ad un flusso elevato (circa 5 microL/min - durata circa 2-4 minuti - B), successivamente, una volta che il campione è legato alla trap column (che sostanzialmente non è null'altro che una piccola RP column con la stessa fase stazionaria della colonna nano) la trap column, attraverso un sistema di valvole, è messa **in serie** alla colonna analitica di tipo nano (**C)** e si fa avvenire l'eluizione dei componenti. Ci sono quindi due sistemi cromatografici distini: uno ad elevato flusso per il caricamento sulla trap e uno per le analisi nano-HPLC che vengono fatti operare in parallelo (caricamento) e in serie (analisi).

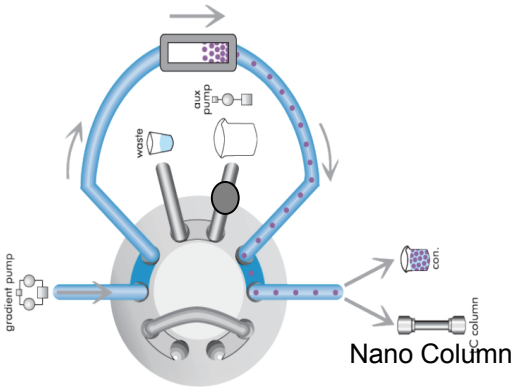
A: Il campione viene inserito nel sistema cromatografico grazie a una valvola d'iniezione che permette di iniettare il campione all'interno di un loop che successivamente verrà portato in linea con la trap column attraverso una valvola

B: Il campione, dopo esser stato caricato nel loop viene caricato sulla trap column e contestualmente c'è mantenimento del flusso sulla nano column. Sistema in modalità parallela (trap column e nano column lavorano separatamente in parallelo)

C: Quando la trap colum è stata caricata, attraverso un sistema di valvole (analogo a quello del sistema della valvola d'iniezione) viene messa in serie alla colonna analitica di tipo nano (in testa). In questo modo il gradiente arriverà prima alla trap column, stacchera via via i componenti da essa ed essi verrano ad essere separati nell nano column



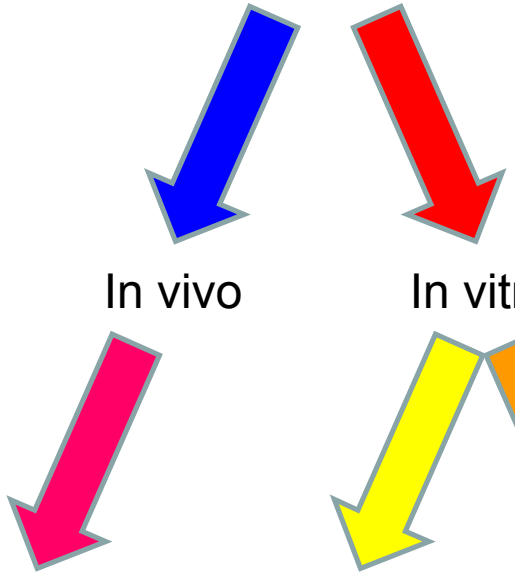




A: Chemical and metabolic labeling for quantitative MS

Shot Gun Proteomics
with protein/peptide labeling strategies
(only MS based)

Labeling with stable isotopes
(^{15}N, ^{13}C, and ^{2}H)

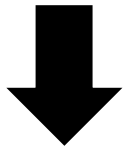


In vivo

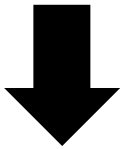
In vitro

Differences detected after:	SILAC	ICAT	iTRAQ
	(MS)	(MS)	(MS^2)
	(MS)		

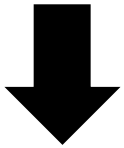
Mass difference
between peptides
(heavy and light)
Identity of signal



Relative Intensity (%) ratio
between two (or more samples)

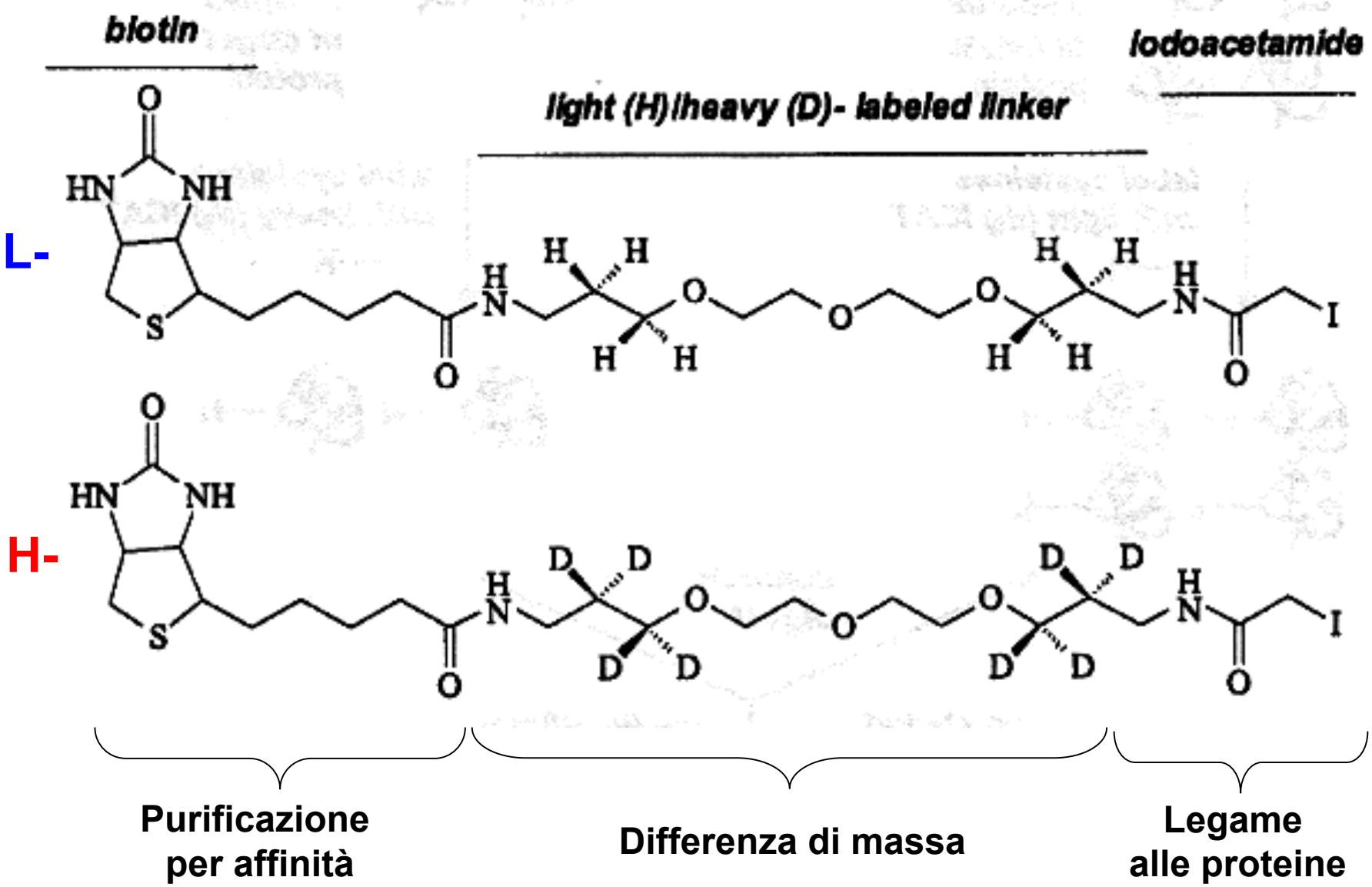


Expression level ratio

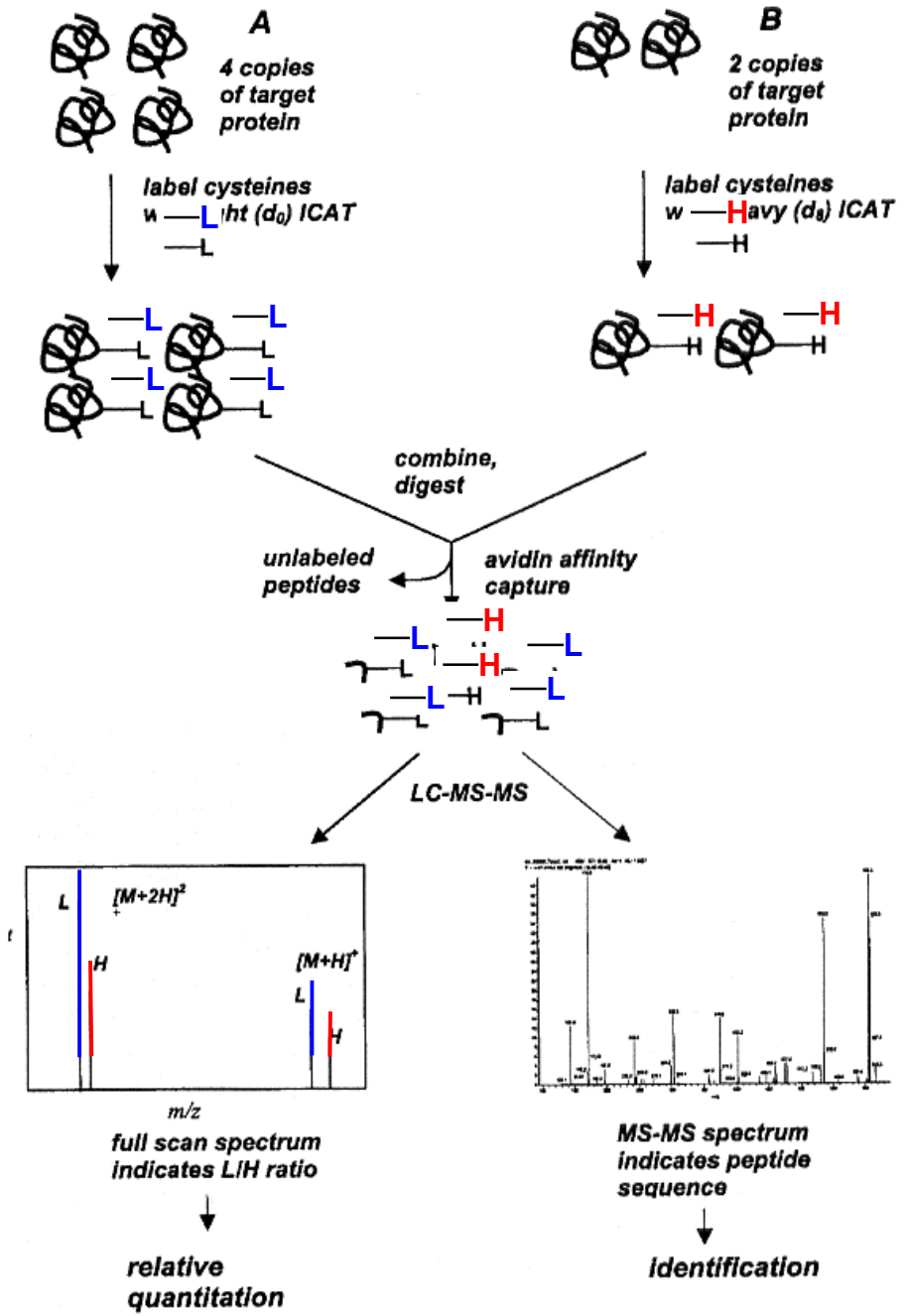


MS2 sequencing
triggered by expression
level ratio (threshold)
(identiy of proteins/peptides)

A: REAGENTI ICAT: Isotope coded affinity tag



A: REAGENTI ICAT: Isotope coded affinity tag



Campione A → Derivatizzato con reagenti ICAT leggeri (**L**)

Campione B → Derivatizzato con reagenti ICAT pesanti (**H**)

↓

Unione dei digeriti

↓

Digestione con enzimi proteolitici

↓

Purificazione mediante affinità dei peptidi recanti il gruppo derivatizzante

↓

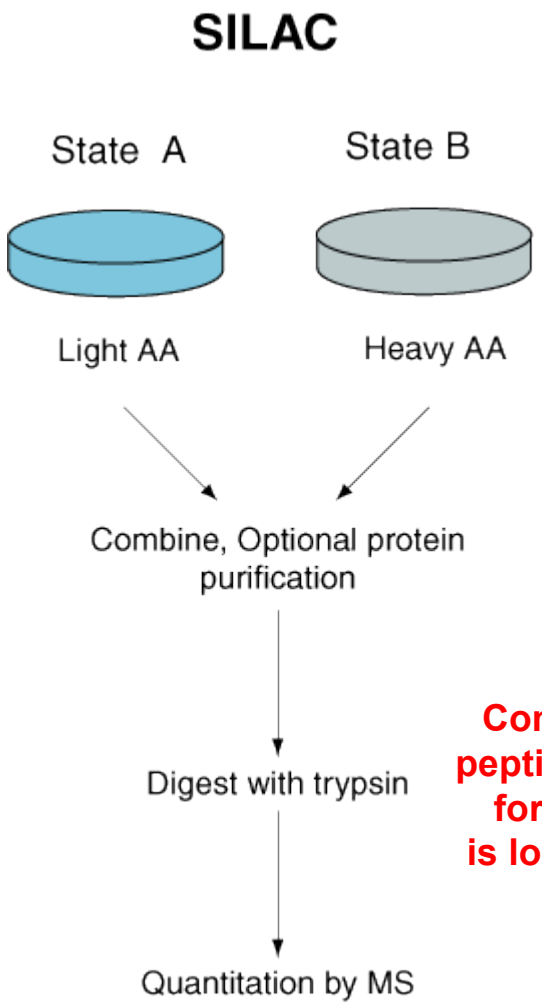
Analisi LC/MS (nano HPLC - MuDPIT)

↓

MS

Comparazione abbondanze peptidi (**L** & **H**) => dati quantitativi sui livelli d'espressione → MS/MS identificazione

B: Stable Isotope Labeling with Aminoacid in Cell Culture (SILAC)



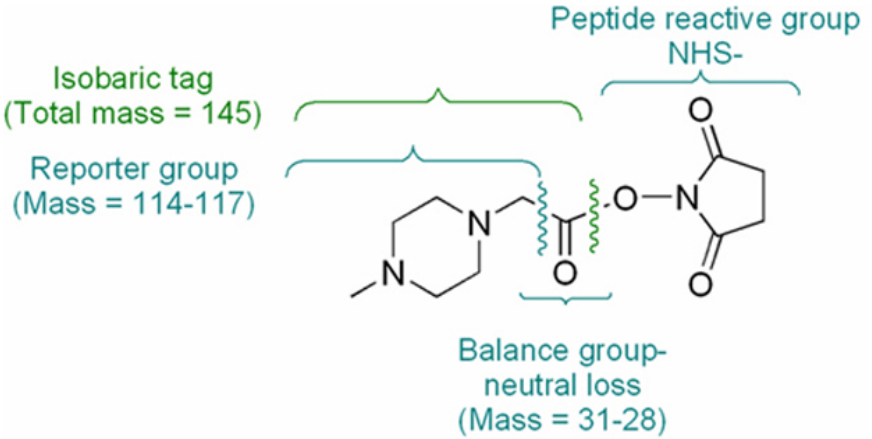
Complete digestion leaves peptides with only one K or R for each peptides (which is located at the C-terminus)

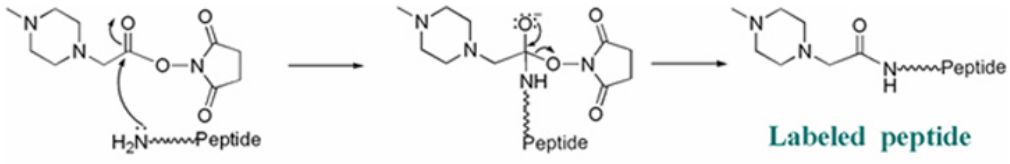
Stessi peptidi che differiscono per ΔM
Differenza di M data da incorporazione di aa con isotopi stabili – K, R (^{13}C, ^{15}N, e ^{2}H)

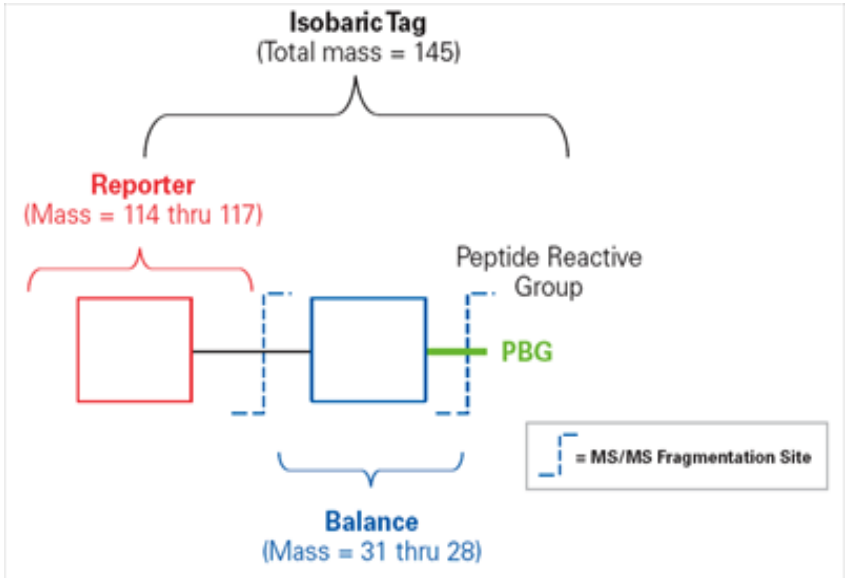
Dalle abbondanze relative si può risalire a variazioni nei livelli d'espressione di più proteine

NB: campione deve essere normalizzato in partenza => stesso numero di cellule dallo stato A e dallo stato B

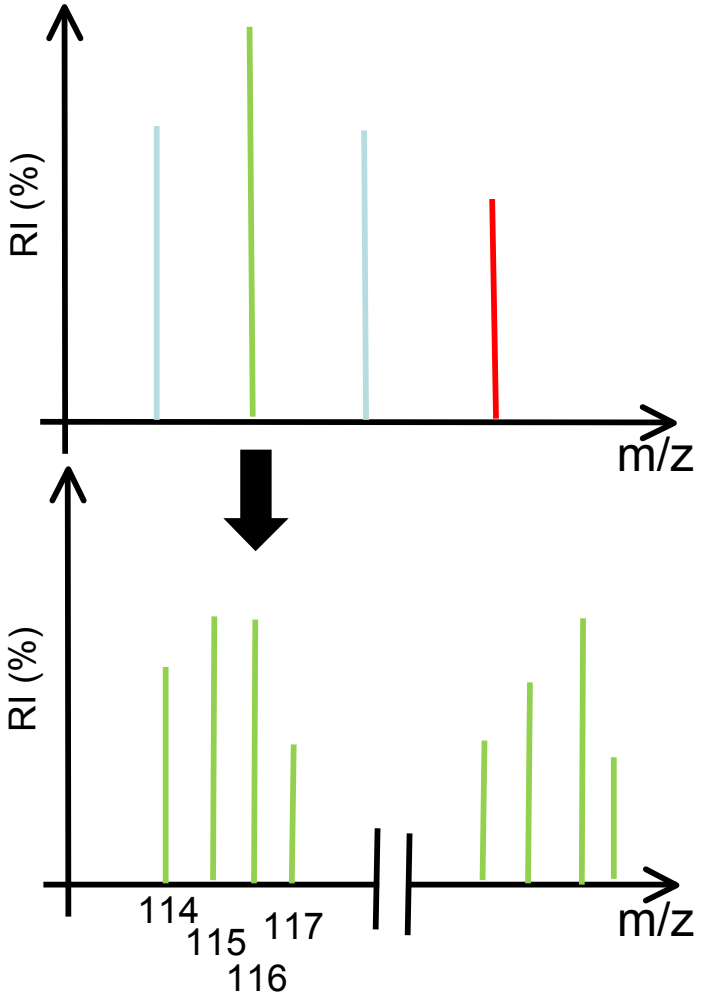
C: Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ)







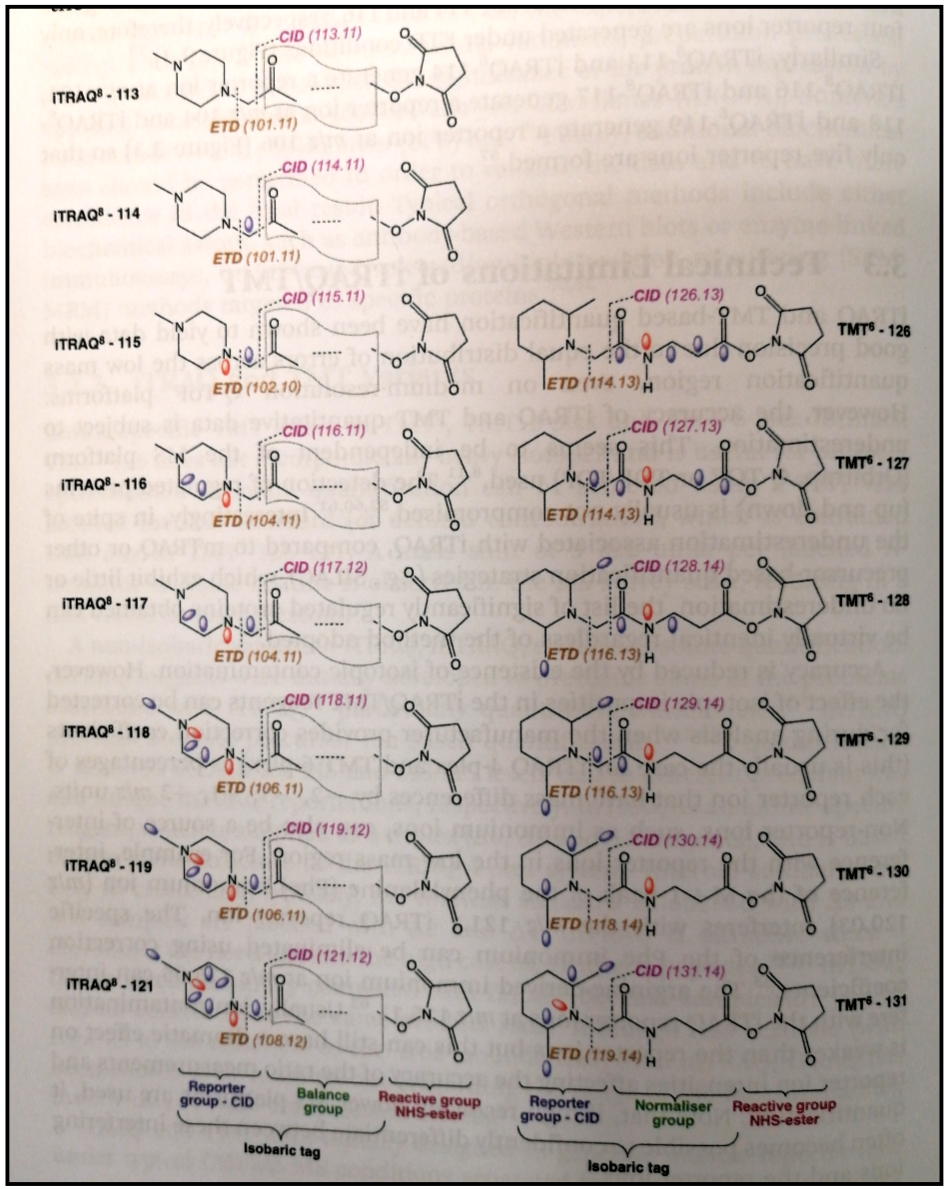
Sample Reporter
A: 114; B: 115; C: 116; D: 117

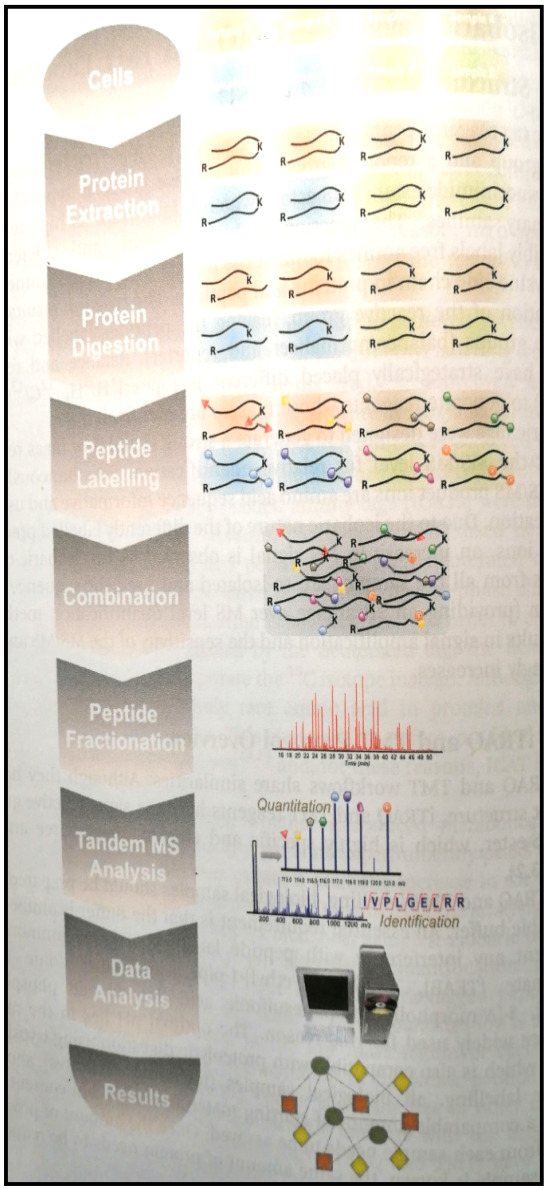


Reporter serie for abundance

b/y serie Identity

iTRAQ & TMT reagents





iTRAQ and TMT (Tandem mass tag) reagents

In questa figura sono mostrate le strutture dei reagenti iTRAQ e TMT che consentono di operare in un caso fino a analisi multiple di tipo 8-plex (iTRAQ) e 6-plex (TMT).

In entrambi i casi la strategia di labeling prevede l'uso della NHS che permette l'attacco di questi gruppi sui gruppi amminici primari delle proteine (N-terminale e catena laterale della lisina). Questo prevede la scelta di buffer che non contengano gruppi amminici primari come ad esempio TEAB, MOPS, HEPES, o tamponi a base di fosfato.

Da notare che i gruppi uscenti per le valutazioni quantitative possono essere generati sia tramite CID che tramite ETD (anche se in questa opzione si hanno meno analisi multiple possibili (5-plex iTRAQ e 4-plex TMT).

Sono evidenziati gli atomi marcati con isotopi stabili (^{13}C e ^{15}N) e la loro posizione.

Nei reagenti TMT è possibile vedere come avviene il bilanciamento di peso attraverso la collocazione specifica degli isotopi stabili.

In questa metodica è critica la quantificazione proteica/peptidica al fine di ottenere equivalenti quantità di peptidi da sottoporre al processo di derivatizzazione.

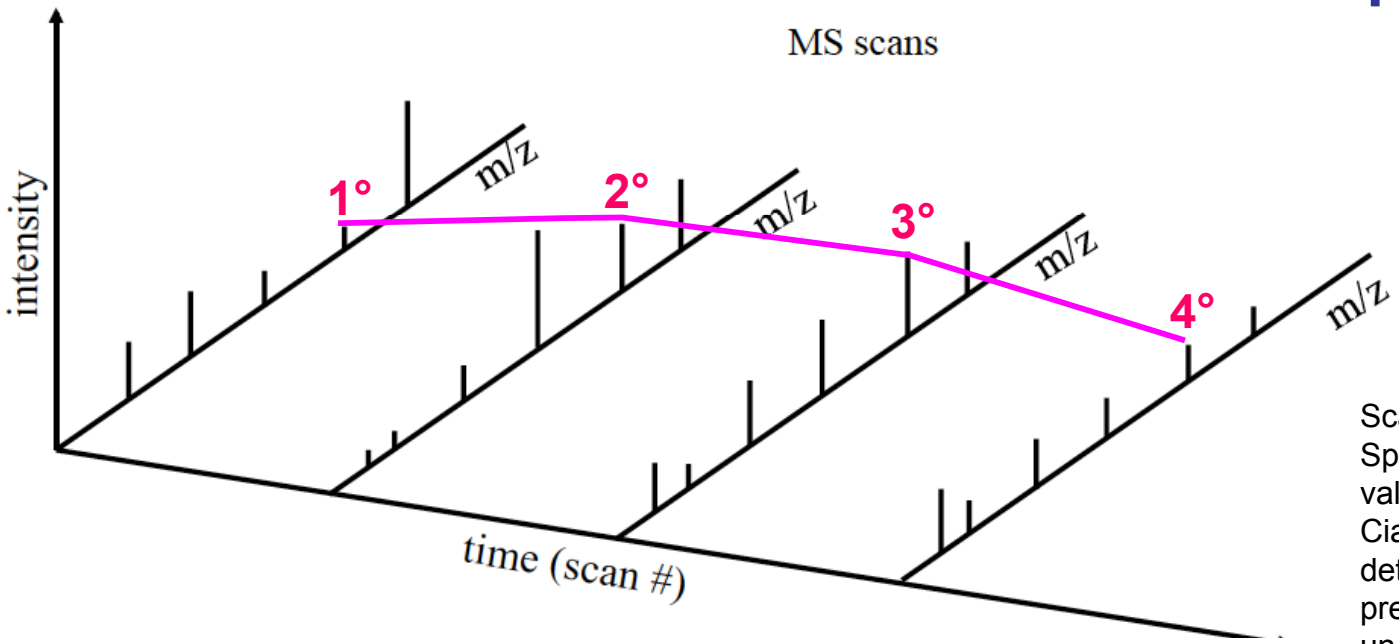
Label Free Proteomics

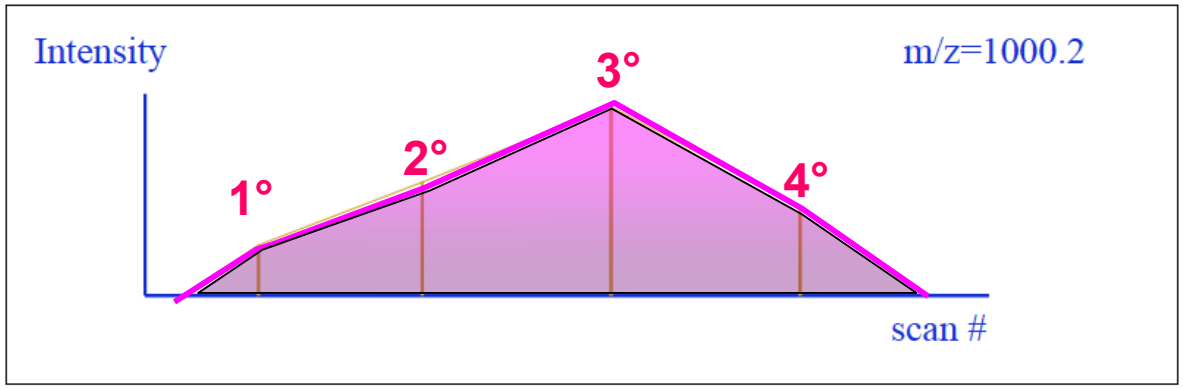
Esistono varie strategie per effettuare delle analisi quantitative sfruttando esclusivamente i valori delle intensità dei singoli segnali m/z, sia che essi siano dei segnali MS (ovvero relativi ai precursori) sia che essi siano dei segnali MS/MS, ovvero derivanti dal processo di frammentazione di precursori. L'idea alla base di questa strategia è che in pratica, se due campioni sono normalizzati e se vengono processati allo stesso modo (digestione, prefrazionamento, separazione, analisi MS, etc), i peptidi generati a partire dalla proteine presenti nei due campioni dovrebbero dare segnali le cui intensità relative negli spettri MS o MS/MS sono legate all'abbondanza delle proteine da cui essi derivano. Queste strategie sono:

- Spectral Counting
- MS^E
- Features-based Quantification
- MS/MS^{ALL} - SWATH Acquisition

NB: nelle sorgenti di tipo MALDI ed ESI gli ioni non si generano esclusivamente in modo proporzionale all'abbondanza delle varie molecole. Ci sono molecole che si ionizzano molto più facilmente rispetto ad altre e che quindi, pur essendo presenti in concentrazione minore, danno segnali più intensi e viceversa.
Gli approcci di Label free proteomics non comparano segnali derivanti da peptidi diversi, bensì i segnali dello stesso peptide in campioni diversi. Molto spesso i segnali vengono "normalizzati" sul totale, con una procedura che è del tutto analoga a quella descritta precedentemente parlando delle quantificazioni proteiche sfruttando i "volumi" delle proteine.

Label Free Proteomics - Feature-based quantification





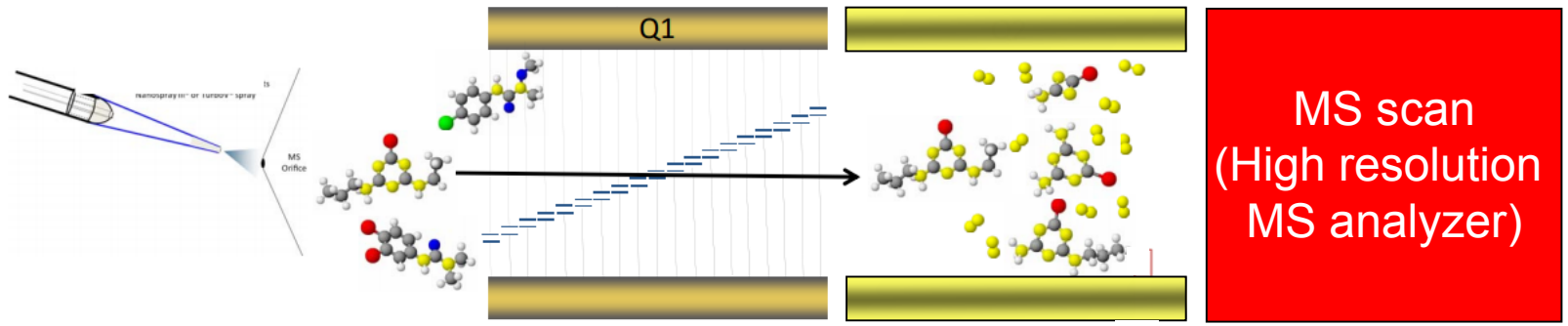
Qualità del picco: dipende dalla velocità di campionamento. Se il picco viene "campionato un numero elevato di volte allora non si rischia di perdere informazioni essenziali per "disegnare la sua forma e quindi per ottenere la sua area dalla quale si potranno avere informazioni quantitative.

Scansioni MS nel tempo =>
Spettri di massa con determinati valori m/z.
Ciascun m/z corrisponde a una determinato peptide. Se vengono presi i segnali di massa relativi ad un determinato peptide (i.e. 1000.2) ed essi vengono riportati in un grafico contro il tempo (i.e # scansione) si può ottenere un picco la cui area può essere presa come "abbondanza" dello ione 1000.2. La stessa operazione viene fatta per tutti i segnali m/z presenti in tutti gli spettri. Queste aree vengono sommate ed esse rappresentano il 100%. Ciascun peptide, avrà quindi un valore di percentuale rispetto al totale. Questa percentuale sarà quindi utilizzata per confrontarla con quella di un altro campione e valutare eventuali variazioni quantitative.

SWATH (MS/MS^{ALL})

Sequential **W**indow **A**cquisition of All **Th**eoretical Mass Spectra

Ciclo: about 3 sec



Direct infusion, flow injection, and lipid-class targeted LC techniques

Q1 MRM-like window

Window: i.e. 25 m/z

Example: from 400 to 1200

400-225

425-250

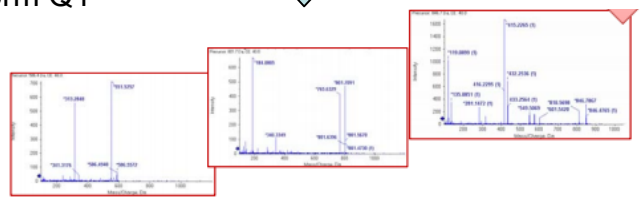
450-275

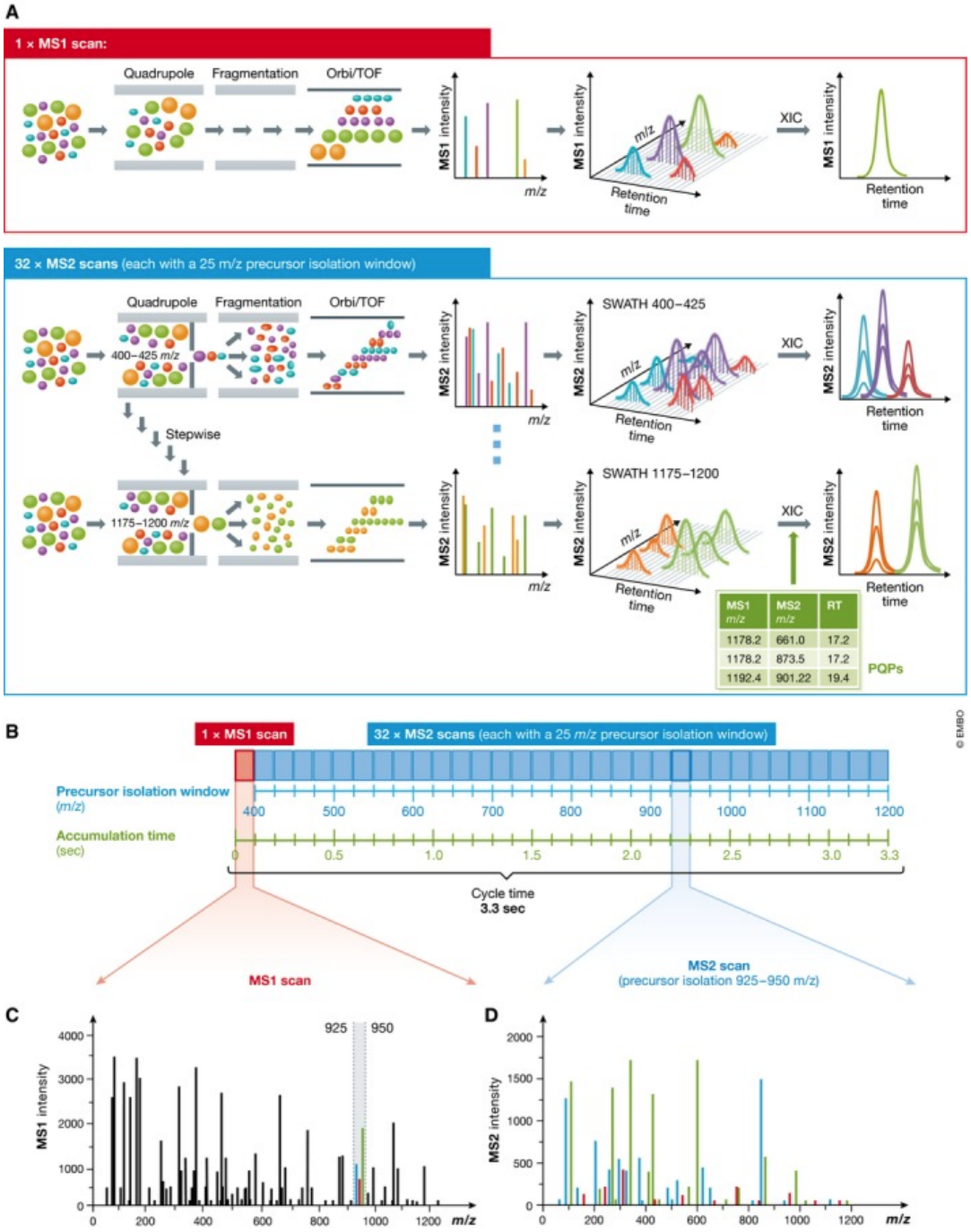
…

1175-1200

Fragmentation (CID)

All precursors form Q1



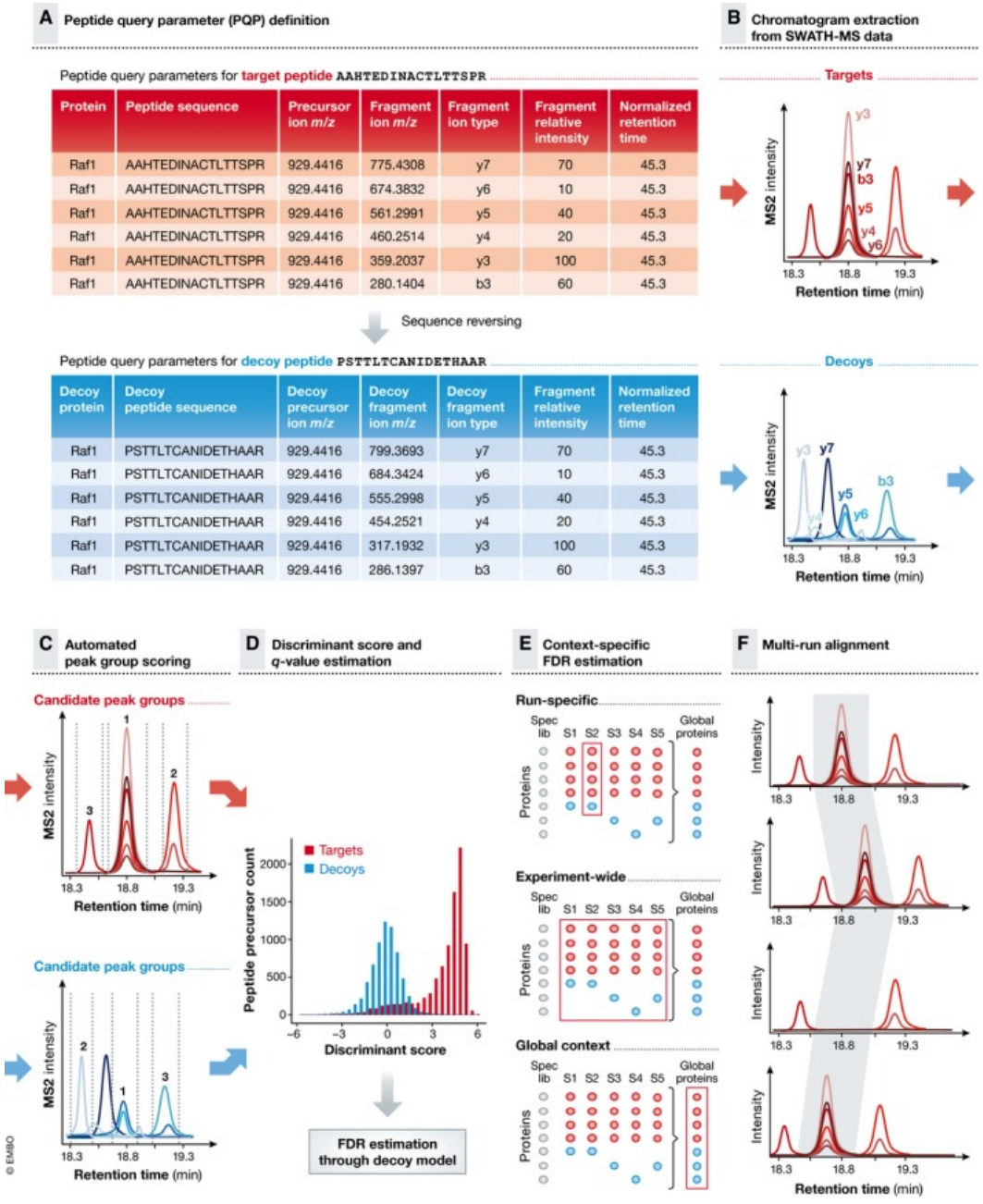


From: PMID: 30104418

Informazioni sui precursori interi:
Ogni 3.3 sec spettro MS sui precursori.
XIC permette di ottenere i profili di eluizione di ogni singolo segnale m/z.
Esempio: larghezza picco peptide alla base: 1minuto => picco campionato con circa 20 punti => ottima campionatura

Informazioni sui frammenti:
XIC permette di ottenere i profili di eluizione di ogni singolo segnale m/z
Tutti i frammenti che appartengono al medesimo precursore avranno lo stesso profilo di eluizione del precursore.

Data la rapidità con cui vengono eseguite le operazioni di scansione è possibile associare la finestra dei precursori (MS1) con la finestra dei loro frammenti MS2 (spettro data dalla somma dei frammenti di tutti i precursori presenti in MS1).

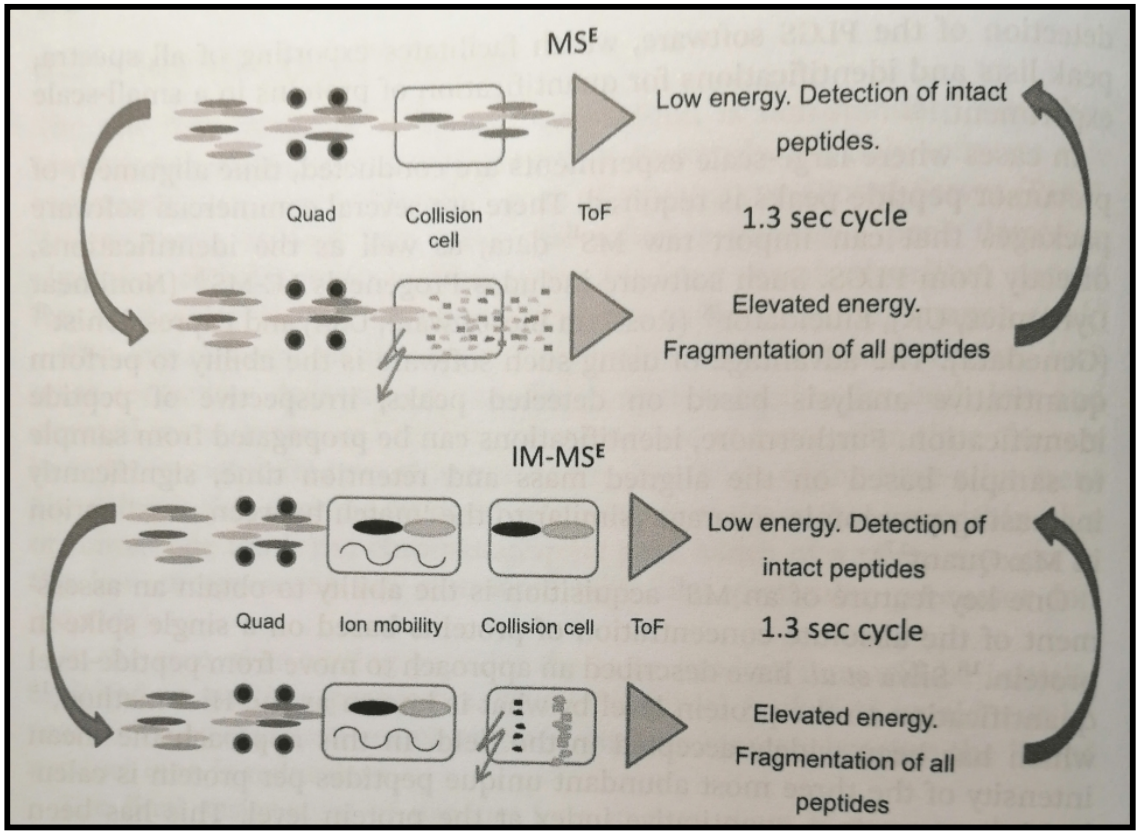


Sulla base di informazioni ottenute in analisi precedenti, anche di tipo DDA, è possibile andare ad estrarre da un'analisi SWATH informazioni specifiche su singoli peptidi (il che in pratica equivale a dire proteine) e da queste poter ottenre informazioni quantitative.
Per fare questa operazione sono essenziali i PQP (peptide query parameters) che associano sequenza del peptide, segnale m/z precursore e segnali m/z dei frammenti che da esso si generano.

La particolarità delle acquisizioni con la metodica SWATH e che possono essere ri-analizzate a posteriori con nuove library, sono quindi una fonte di dati che può essere "estratta" più volte.

Come si può fare valutazioni quntitative:
Ad esempio utilizzando un peptide di una proteina nota ed utilizzarla come normalizzatore (uno o più peptidi, il loro numero è potenzialmente pari a tutti i peptidi rilevati).

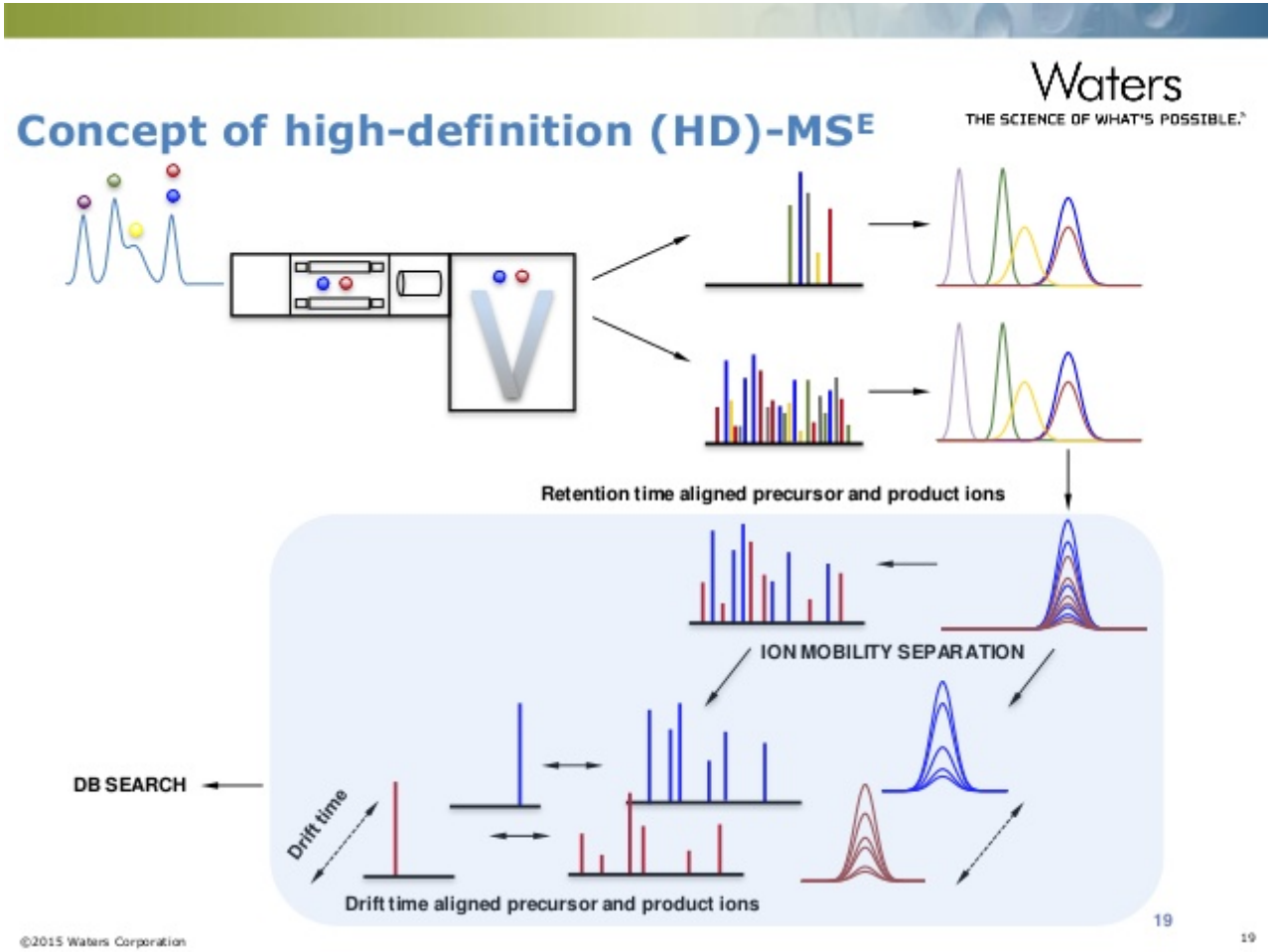
LC-MS^E e IM-MS^E



Metodica che si avvale della possibilità di far alternare il funzionamento della cella di collisione tra bassa ed alta energia ed in questo modo si consente di effettuare delle scansioni MS e MS/MS alternate nel tempo su tutte i segnali m/z che arrivano alla cella.
Il primo analizzatore è un quadrupolo che funziona in modlaita RF only lasciando passare tutti gli ioni, il secondo analizzatore è un analizzatore ad alta risoluzione cone ad esempio un TOF (strumento: Q-TOF).
I cicli sono molto rapisi (1.3) secondi il che consente un elevato campionamento dei picchi cromatografici con un ottima possibilità di ricostruire i picchi dei vari precursori e dei frammenti consentendo, tramite un match temporale di assegnare a ciascun precursore i propri frammenti (ricostruzione sull'aspetto temporale!).

Precursore + frammenti => database search => identity
XIC (area) => quantitative information

Da "quantitative Proteomics" - RSC)



La dimensione aggiuntiva fornita dalla ion mobility consente di risolvere anche quei casi in cui i due precursori coeluiscono perfettamente.
Infatti, se pure avranno lo stesso tempo di eluizione e lo stesso profilo cromatografico la loro struttura non sarà equivalente e pertanto la dimensione della ion mobility consentirà di assegnare in modo univoco i frammenti a ciascuno dei due (o più) precursori separandoli nel tempo.

Da sito Waters