

Approccio proteomico – GENERALE

(i quattro step principali per lo sviluppo di un approccio proteomico)

1

Ottimizzazione
Estrazione proteine
-
(Preparazione del Campione)

Riuscire a **recuperare** le
proteine dalla matrice biologica
d'interesse

2

Selezione – Ottimizzazione
metodo separativo

Utilizzare dei metodi separativi
per cercare di **separare** una
dall'altra le proteine oggetto
d'indagine

3

Scelta metodo
Rilevazione

Utilizzare dei metodi che mi
permettano di “**vedere**” le
proteine oggetto d'indagine

4

Scelta metodo
Identificazione

Utilizzare dei metodi che mi
permettano di ottenere **l'identità**
delle proteine oggetto d'indagine

Preparazione del Campione

Requisiti fondamentali di un metodo per l'estrazione/preparazione del campione:

⇒ 1) Efficienza

L'efficienza del metodo per estrarre le proteine dal materiale di partenza deve essere la più elevata possibile, ovvero devo poter ottenere il maggior numero di proteine.

⇒ 2) Evitare contaminazioni (= Specificità)

L'omogeneità del campione è importante per non avere nelle proprie analisi proteine che non derivano dal campione d'interesse - problema che si riscontra soprattutto con tessuti (popolazioni cellulari eterogenee)

=> **necessaria procedura altamente selettiva per il campionamento (elevata specificità)**

=> 3) Evitare modificazioni

Processamento del campione lungo (più passaggi) equivale a dire perdita di campione e modificazioni a carico delle proteine => preferibile adottare **metodi estrattivi con pochi passaggi, rapidi e mantenere il campione a temperature ragionevolmente basse** (attorno a 0 °C) - compatibilmente con i reagenti utilizzati per l'estrazione (alcune sostanze hanno una bassa solubilità a basse temperature).

ATTENZIONE: Adottare **mezzi estrattivi compatibili con le analisi che seguiranno** (presenza di sali, detergenti, solventi organici etc. deve essere valutata in funzione del tipo di metodica analitica che si andrà ad adottare). Questo è un punto da tenere in considerazione sempre quando si eseguono determinate operazioni nel contesto di un protocollo scientifico.

Sistemi biologici

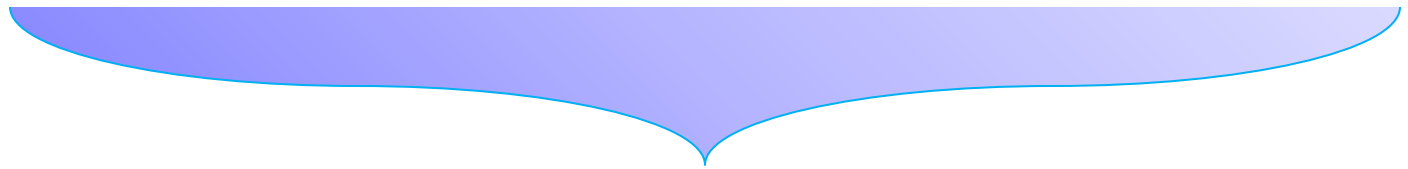
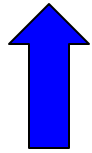
Proteine

Lipidi

Carboidrati

Acidi nucleici

Co-fattori



VISTI COME INTERFERENTI NELLE ANALISI DI TIPO PROTEOMICO
I metodi d'estrazione delle proteine devono tener conto di questo aspetto

Estrazione delle proteine

Isolare le proteine

– distruggere le cellule/tessuti in cui esse sono contenute e contemporaneamente fare in modo che esse rimangano in soluzione e non aggregino -

Tamponi di estrazione

- Tampone (pH)
- Inibitori di proteasi/altri enzimi
- Detergenti
- Agenti/solventi solubilizzanti



Metodi di lisi

Tamponi d'estrazione

Prima considerazione: Condizioni Native vs. Denaturanti

Condizioni native: preservare struttura/attività delle proteine d'interesse

NB: esempio nel caso di isolamento di complessi macromolecolari, o qualora si vogliano ottenere informazioni strutturali, etc...

Condizioni denaturanti: non è necessario preservare struttura/attività delle proteine d'interesse

NB: esempio nel caso di isolamento di proteine per effettuare analisi differenziali.

Buffer (controllo pH dell'estratto) – estremamente importante la dove si voglia preservare l'attività di una determinata proteina.

(Non volatili: Glicina [2.6-3.6], Citrato [3-6.2], Acetato [3.6-5.6], Tris [7.2-9.0], Phosphato [5.7-8], Borato [7.6-9.2], etc... – eventualmente a pH con HCl e NaOH). Volatili: Acido Acetico/Acido Formico, Ammonio Carbonato, Ammonio Bicarbonato, etc... – tutti i composti con i quali vengono formati questi tamponi sono volatili. NB: attenzione ad eventuali sali introdotti nella soluzione portando a pH il tampone.

Inibitori di proteasi: controllo dell'attività proteolitica naturalmente presente nei campioni

Esistono diversi tipi di proteasi (Serin-, cistein-, aspartico-, e metallo-proteasi), ciascuna delle quali viene inibita da specifici inibitori => cocktail preformati – commercializzati da diverse ditte di prodotti biotecnologici.

Inibitori di altre attività enzimatiche (chinasi, fosfatasi, etc).

Detergenti: La maggior parte delle proteine sono solitamente solubili in acqua. Ci sono però casi dove questo non si verifica, come ad esempio le proteine di membrana. In altri casi le proteine sono presenti sotto forma di complessi macromolecolari ed è necessario andare ad indagare i singoli costituenti dei vari complessi. I detergenti, avendo una struttura anfipatica (porzione idrofobica e porzione idrofilica) aiutano la solubilizzazione delle proteine. Inoltre possono disturbare i doppi strati lipidici andando a favorire il rilascio delle proteine.

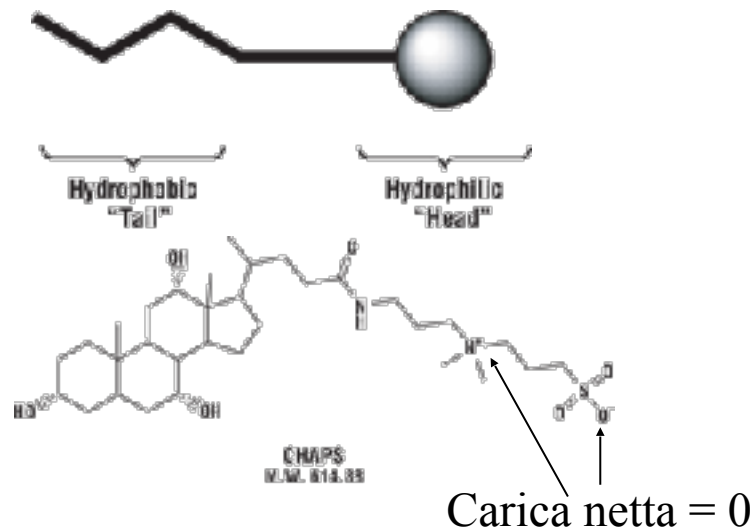
=> detergenti ionici – anionici o cationici – solitamente sono denaturanti

=> Neutri

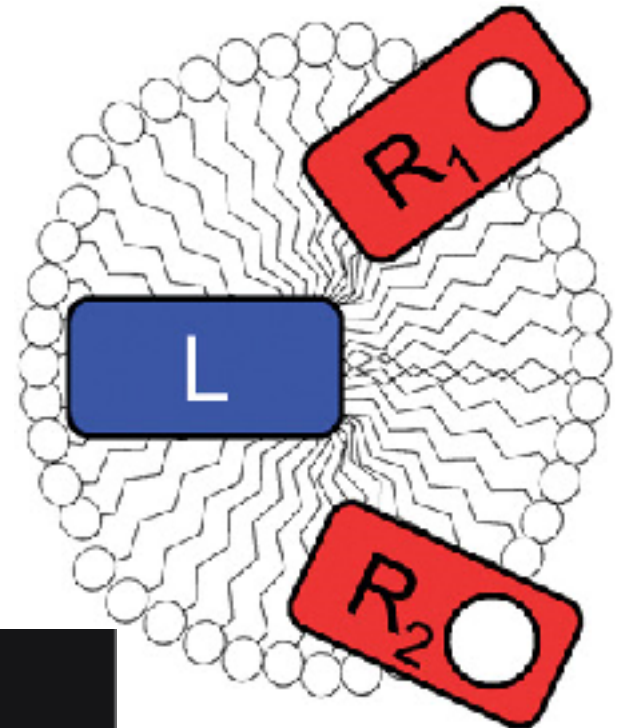
=> zwitterionici (doppia carica, sia positiva che negativa)

Altri agenti solubilizzanti: Urea, tiourea, etc - agenti caotropici che aiutano il mantenimento in soluzione di proteine idrofobiche

Struttura detergenti



Formazione micelle



Elenco dei Detergenti Comuni con Loro CMC

Detergente	Tipo	CMC (mM)	Peso Micellare (kDa)	Applicazioni Tipiche
SDS	Ionico (anionico)	6-8	~18	Denaturazione totale, SDS-PAGE
CHAPS	Zwitterionico	6-12	~6-7	Estrazioni delicate, mantenimento attività
Triton X-100	Non-ionico	0.2-0.3	~90	Estrazioni di membrane, solubilizzazione
NP-40	Non-ionico	0.05-0.3	~90	Simile a Triton, più puro
Tween 20	Non-ionico	0.03	~78	ELISA, western blot
Octyl glucoside	Non-ionico	20-25	~8	Cristallografia, ricostituzioni
Digitonin	Non-ionico	~0.5	Complesso	Lis. delicata, mantenimento complessi
DDM (n-Dodecyl 3- β -D-maltoside)	Non-ionico	0.17	~50-70	Proteine di membrana native
LCAC (Lauryldimethylamine oxide)	Zwitterionico	1-2	~20	Proteine di membrana

NB: la formazione di micelle può comportare il fatto che le molecole siano inserite in strutture di dimensioni specifiche (micelle hanno una dimensione specifica). Questo fatto è da tenere in considerazione quando si effettuano dei trattamenti con sistemi che prevedono un qualche processamento con sistemi che si basano sulla dimensione molecolare (i.e. vedasi gel filtration, ultrafiltrazione, etc)

Metodi di lisi – come portare in soluzione le proteine facendole “uscire” dal loro contesto cellulare

Cosa bisogna considerare: procarioti, lieviti, cellule animali e cellule vegetali hanno tutti pareti/membrane cellulari diverse e che sono quindi diversamente resistenti all’azione di detergenti/sistemi meccanici per la rottura di queste “strutture contenitive”.

Metodi di lisi “SOFT”:

1) Lisi osmotica: utilizzo di soluzioni ipotoniche che causano rigonfiamento ed esplosione della cellula con conseguente rilascio delle proteine – non adatto a procarioti con parete cellulare.

2) Congelamento/scongelamento: formazioni di cristalli provoca la rottura della parete e della membrana cellulare.

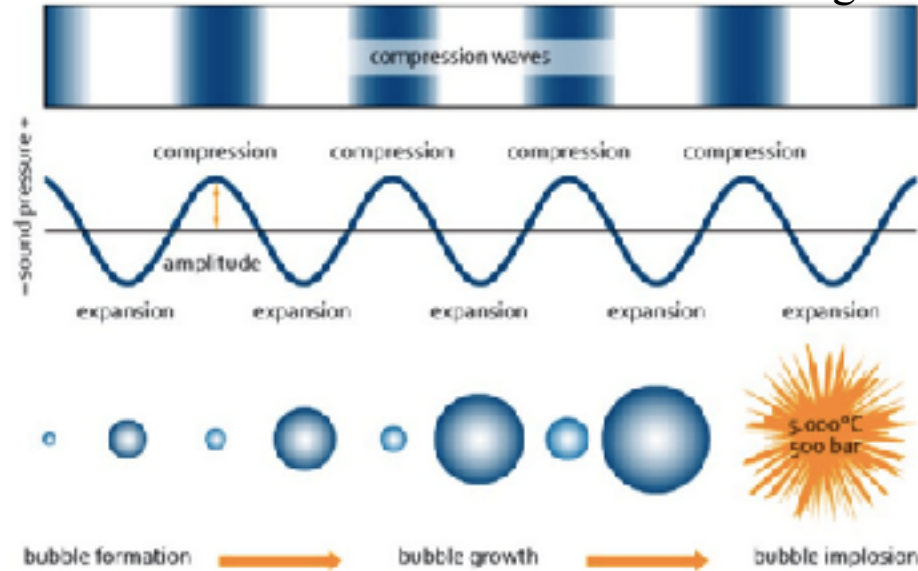
3) Lisi con detergenti: detergenti sono in grado di rompere la struttura delle membrana plasmatica facendo uscire le proteine. Attenzione al tipo di detergenti utilizzati. - **Tamponi di lisi**

4) Lisi enzimatica: cellule con pareti cellulari possono essere lisate grazie all’utilizzo di enzimi in grado di degradare la parete cellulare stessa. Classico esempio è la parete cellulare (composta da peptidoglicano) dei batteri che può essere degradata ad opera dell’enzima **lisozima** e quella delle cellule vegetali che può essere degradata dalla **cellulasi**

Nota bene: anche se la composizione del mezzo estrattivo non è indicata – essa deve essere compatibile con successivi passaggi!

Metodi di lisi “più forti”:

- 1) **Sonicazione**: onde ultrasoniche PROVOCANO IL FENOMENO DELLA CAVITAZIONE (formazione di bolle che poi implodono portando a repentini cambiamenti nella temperatura e pressione). Questo favorisce la rottura di interazioni intermolecolari e soprattutto la rottura delle membrane cellulari. Attenzione alla generazione di calore.



- 2) **Rottura meccanica** tramite pestello

- 3) Rottura attraverso il **passaggio forzato per un orifizio** molto piccolo

- 4) **Utilizzo di omogeneizzatore** (attenzione al calore)

- 5) **Utilizzo di forze abrasive** – sfere di vetro sottoposte a forte agitazione (metodo utilizzato per lieviti)

Nota bene: anche se la composizione del mezzo estrattivo non è indicata – essa deve essere compatibile con successivi passaggi!

Metodi di estrazione differenti sono spesso **combinati assieme**

Esempio 1: Estrazione di proteine da cellule eucariotiche

Cellule lavate in PBS e congelate a -80°C (**lisi attraverso congelamento - 1° metodo**).

Cellule scongelate e risospese in Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4%, etc (**Estrazione attraverso utilizzo di agenti caotropici e detergenti – 2° metodo**).

Cellule sonicate 3x10'' (**Estrazione tramite sonicazione – 3° metodo**).

Esempio 2: Estrazione di proteine nucleari non isteriche

Cellule lavate in PBS e sottoposte a lisi in ambiente iopototonico (Lisi membrana cellulare ma nuclei recuperabili dopo centrifugazione – **1° metodo estrattivo – prefrazionamento nucleo/citoplasma**)

Proteine estratte dai nuclei attraverso alta forza ionica (**2° metodo estrattivo – prefrazionamento: proteine istoniche** (legate saldamente al DNA e non rilasciate dalla forza ionica – proteine non istoniche - rilasciate grazie alla forza ionica)).

Tamponi per l'Estrazione Proteica da Campioni Biologici

L'estrazione proteica da campioni biologici richiede tamponi che preservino la struttura e la funzione delle proteine mentre le solubilizzano dal loro ambiente nativo. La scelta del tampone è cruciale per il successo dell'esperimento e dipende dal tipo di analisi che si vuole condurre sul campione..

Componenti Fondamentali:

1. Agente tamponante - Mantiene il pH stabile:

Tris-HCl (pH 7-9): il più comune, economico, ma sensibile alla temperatura

HEPES (pH 7-8): migliore capacità tamponante, meno sensibile alla temperatura

Fosfati (pH 6-8): da usare con cautela (inibitore di alcune fosfatasi)

2. Sali per il controllo della forza ionica:

NaCl (50-150 mM): simula condizioni fisiologiche / **KCl:** alternativa al NaCl

3. Detergenti per la solubilizzazione:

Non ionici (più delicati): Triton X-100 (1%); NP-40 (1%); Tween-20 (0.1-0.5%)

Ionici (più denaturanti): SDS (0.1-2%); CHAPS (zwitterionico)

4. Inibitori di proteasi e fosfatasi - solitamente cocktail.

Inibitori di serin-proteasi (PMSF, AEBSF), cistein-proteasi (leupeptina), metallo-proteasi (EDTA, EGTA); Inibitori di fosfatasi (NaF, Na₃VO₄).

5. Agenti riducenti/chelanti

- DTT (1-5 mM): rottura ponti disolfuro.

- EDTA (1-5 mM): chela ioni metallici

SOLUZIONI di LISI

Tampone RIPA (RadiolImmunoPrecipitation Assay Buffer)

Il tampone RIPA rappresenta lo standard per l'estrazione proteica totale, particolarmente efficace per proteine di membrana. La sua formulazione tipica prevede: Tris-HCl a 50 mM (pH 7.4-8.0), NaCl a 150 mM, NP-40 o Triton X-100 all'1% (v/v), sodio deossicolato allo 0.5% (w/v), SDS allo 0.1% (w/v), e EDTA a 1-2 mM. Per proteine particolarmente resistenti o complessi strettamente associati alle membrane, si utilizza una variante "forte" che aumenta l'SDS fino allo 0.5% e il sodio deossicolato all'1%. Questa combinazione bilanciata di detergenti non ionici (NP-40), anionici (deossicolato) e denaturanti (SDS) permette di solubilizzare efficacemente la maggior parte delle proteine cellulari mantenendo un certo grado di struttura per successivi saggi.

Buffer di Lisi per SDS-PAGE e Western Blot (denaturante)

Per la preparazione diretta di campioni per SDS-PAGE, si utilizza un buffer fortemente denaturante. La formulazione standard del buffer di Laemmli 2X include: Tris-HCl a 62.5 mM (pH 6.8), SDS al 2% (w/v), glicerolo al 10% (v/v), DTT a 100-200 mM, e tracce di blu di bromofenolo allo 0.002%. L'alta concentrazione di SDS garantisce la completa denaturazione e carica negativa uniforme delle proteine, mentre il DTT rompe i ponti disolfuro. Il glicerolo aumenta la densità del campione facilitando il caricamento nei pozzi del gel. Questo buffer viene tipicamente preparato come soluzione concentrata (2X o 4X) e mescolato in rapporto 1:1 con il campione prima del riscaldamento a 95°C per 5 minuti.

Buffer di Lisi Non Denaturante (per saggi enzimatici / studi protein-protein interaction)

Per applicazioni che richiedono la preservazione delle interazioni proteina-proteina o dell'attività enzimatica, come l'immunoprecipitazione o i saggi funzionali, si utilizzano buffer non denaturanti. Questi contengono tipicamente: Tris-HCl a 20-50 mM (pH 7.4-8.0), NaCl a 100-150 mM (simile ad una forza ionica fisiologica), NP-40 o Triton X-100 allo 0.5-1% (v/v), glicerolo al 10% (v/v), e spesso $MgCl_2$ a 1-5 mM per mantenere l'attività di enzimi dipendenti da magnesio. La caratteristica fondamentale è l'assenza completa di SDS, che denaturerebbe irreversibilmente le proteine. La concentrazione di detergente è calibrata per solubilizzare le membrane senza disaggregare complessi proteici nativi.