

Prefrazionamento proteico

Semplificazione dell'estratto proteico – abbassamento della complessità del campione in termini di numero di componenti.

Può essere basato su diverse metodiche – Elettroforetiche, cromatografiche, centrifugative, etc.



- **semplifica il campione che verrà sottoposto ad analisi proteomiche**
- **Possibilità di focalizzarsi su di un particolare subset di proteine**



- **aumenta il numero di analisi necessarie per avere una visione “globale”**
- **più passaggi equivale a maggiore probabilità di perdita/modificazione proteine**

Metodi di Prefrazionamento

Primo problema:

Due conti: se ipotizziamo che ci siano circa 25000 - 30000 geni in una cellula umana e supponendo che per ciascuno di essi ne esistano 10 varianti, tra splicing alternativo, PTMs, forme degradate etc. => 250000-300000 proteine. **Numero troppo elevato per pensare di visualizzarle/analizzarle contemporaneamente.**

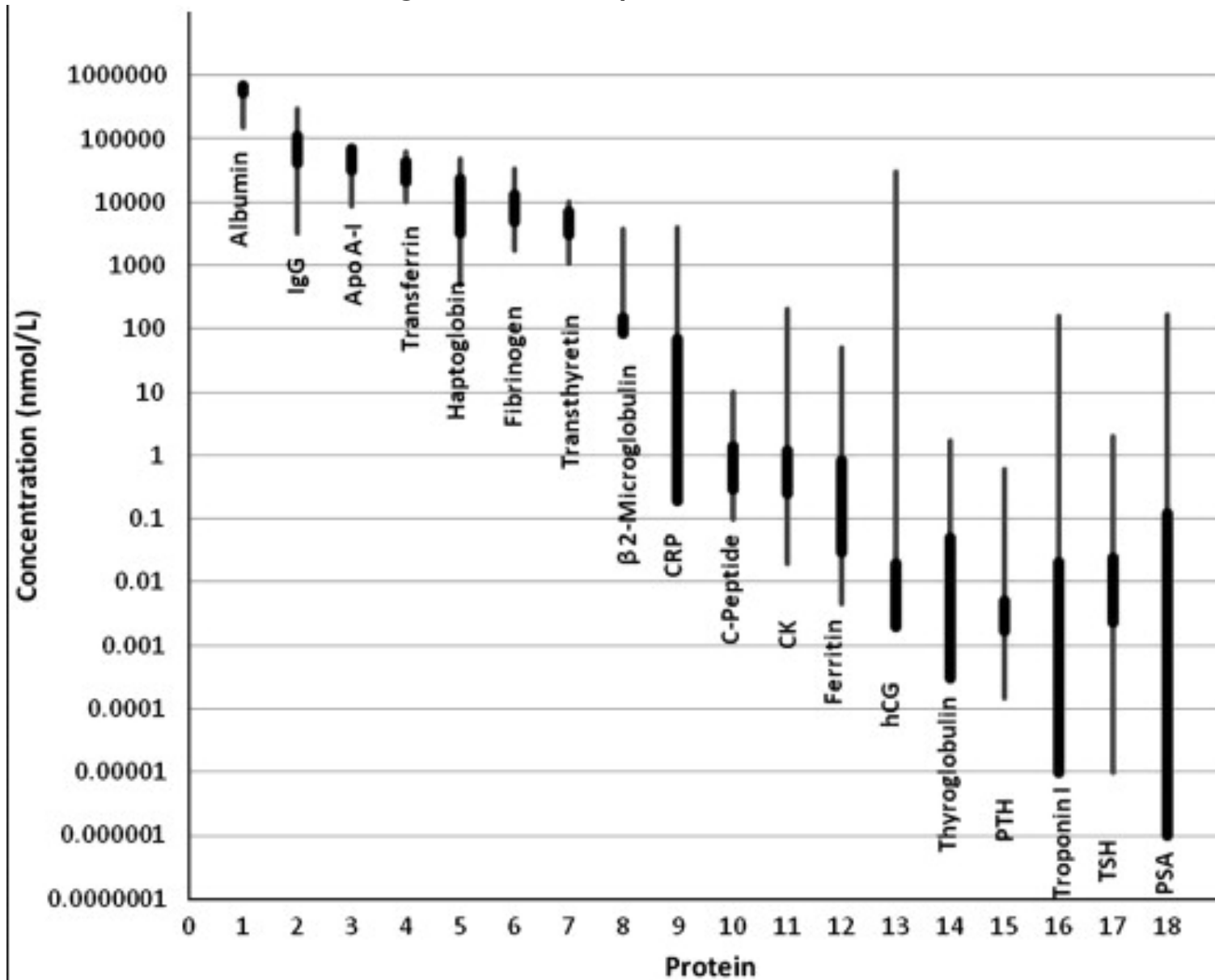
Nessuna metodica analitica separativa è attualmente in grado di offrire un POTERE RISOLUTIVO così elevato da riuscire ad analizzare contemporaneamente tutte le proteine presenti in un proteoma (almeno uno a complessità pari a quello umano)

Secondo problema:

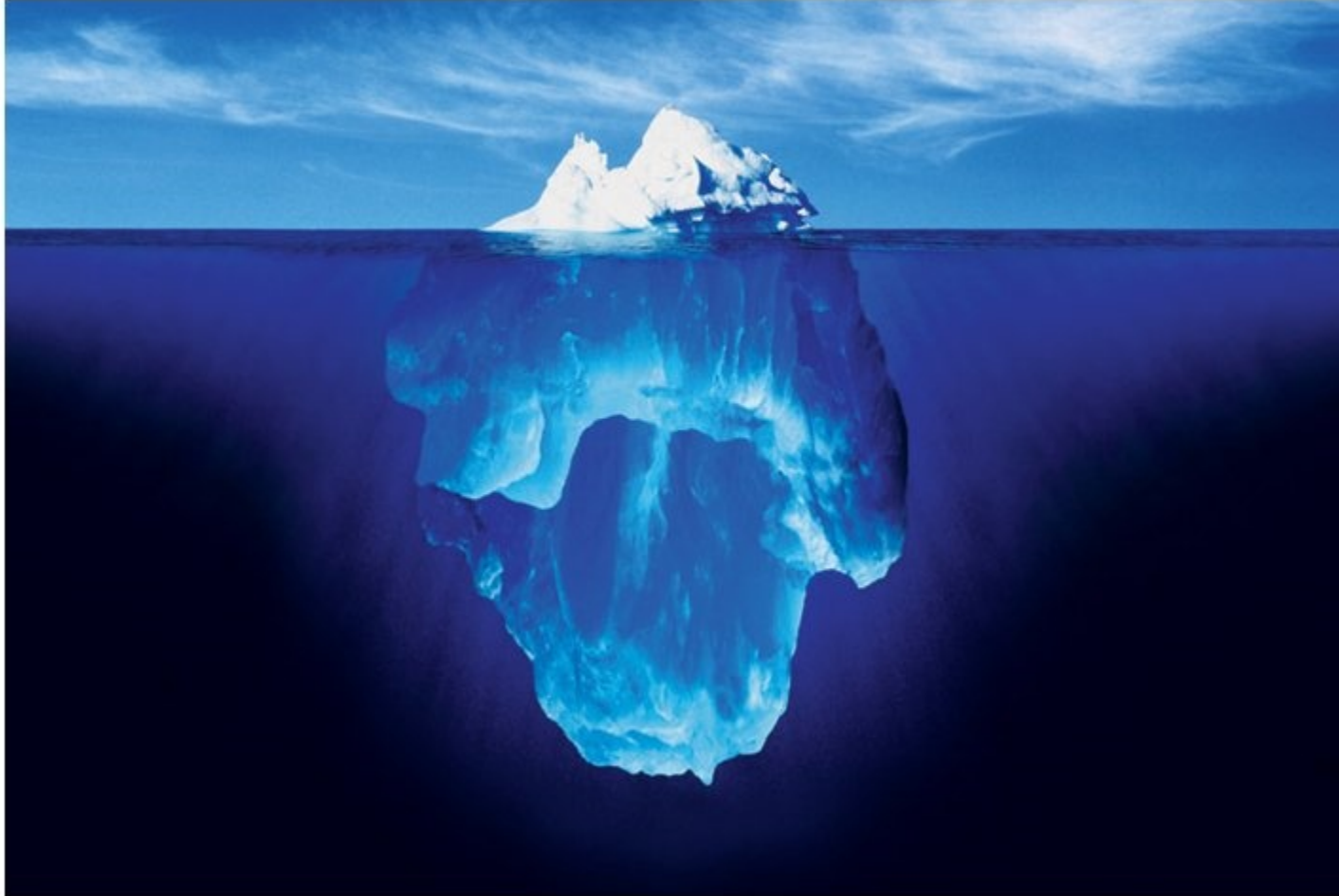
Le proteine non sono espresse tutte allo stesso livello - ad esempio il range dinamico delle proteine del siero è di 10 ordini di grandezza, ovvero una proteina potrebbe essere presente in 10 copie, un'altra in 10×10^{10} .

Nessuna metodica analitica è attualmente in grado di offrire un RANGE DINAMICO nella visualizzazione delle proteine in grado di mettere in evidenza proteine presenti con una così diversa abbondanza.

Range dinamico proteine del Plasma



PROTEOMA



Quello che vediamo

Quello che
non vediamo...
o meglio quello
che non
adottando
particolari
strategie non
siamo in grado
di vedere

Come vengono analizzate le proteine/peptidi in proteomica:

Metodiche cromatografiche

Metodiche elettroforetiche

Spettrometria di massa

In generale la tendenza è stata quella di non adottare metodi di prefrazionamento, ma si è visto che senza di essi, nessuna delle tre metodiche sopra elencate ha le caratteristiche, in termini di **risoluzione** e **range dinamico** in grado di soddisfare le esigenze richieste.

Le metodiche elettroforetiche presentano delle buone possibilità in termini di innalzamento della capacità risolutiva

(quando tratteremo delle IEF discuteremo di questo aspetto, anche se oggi gli approcci proteomici basati sulla elettroforesi come metodica separativa sono state soppiantate dagli approcci di tipo shotgun proteomics)

Stesso discorso vale per quanto concerne le metodiche cromatografiche prese singolarmente. La loro combinazione in versioni multidimensionali è alla base della shotgun proteomics, che sfrutta anche l'alto grado di automatismo che la cromatografia offre rispetto alle analisi elettroforetiche (vedasi in seguito)

La spettrometria di massa, se pur con i notevoli avanzamenti degli ultimi 5-10 anni, soffre ancora di alcune limitazioni in fase di ionizzazione (vedasi in seguito) che non sono ancora state superate (in particolare la competizione per l'acquisizione di carica durante il processo di ionizzazione, sia ESI che MALDI).

=>

i **metodi di prefrazionamento** rappresentano un'insostituibile opportunità per semplificare i sistemi biologici e permettere la rilevazione ed identificazione di un numero sempre maggiore di proteine.

Metodi di prefrazionamento basati sulle estrazioni selettive

A volte i particolari mezzi/sistemi estrattivi utilizzati consentono di estrarre selettivamente solo alcune molecole. Questo può esser visto come un sistema per condurre analisi proteomiche su di un “ristretto” numero di proteine, andando in questo modo a semplificare la complessità del campione biologico.

Esempi:

- **Estrazione con acido perclorico** al 5%: estrazione selettiva per l'istone linker H1 e per le HMG (High Mobility Group Proteins).
- **Estrazione con acidi concentrati** (Acido cloridrico / acido solforico): Estrazione selettiva per gli istoni dell'ottamero istonico (H2A, H2B, H3 e H4).
- ETC.

Queste particolari estrazioni dipendono dalla combinazione delle proprietà chimico/fisiche delle molecole e dai particolari reagenti/pH/forze ioniche/etc. scelti per l'estrazione.

La maggior parte delle proteine quando viene messa in contatto con un acido forte tende a denaturarsi e in tal modo le sue porzioni idrofobiche interne possono stabilire contatti intermolecolari e dare luogo a processi di aggregazione e quindi a **precipitazione** (vedasi precipitazioni con TCA, acido tricloroacetico). Queste metodiche di precipitazione sono anche utilizzate per **deproteinizzare** delle soluzioni, laddove la presenza di proteine sia indesiderata. Esiste però anche una categoria di proteine che non ha struttura secondaria/terziaria, denominate **proteine intrinsecamente disordinate** che, a differenza delle proteine strutturate, non va incontro a precipitazione quando messe a contatto con soluzioni contenenti acidi, come il PCA o il TCA. Esse rimangono in soluzione e possono essere in questo modo recuperate nel surnatante e separate da quelle che invece precipitano => estrazione selettiva (o prefrazionamento).

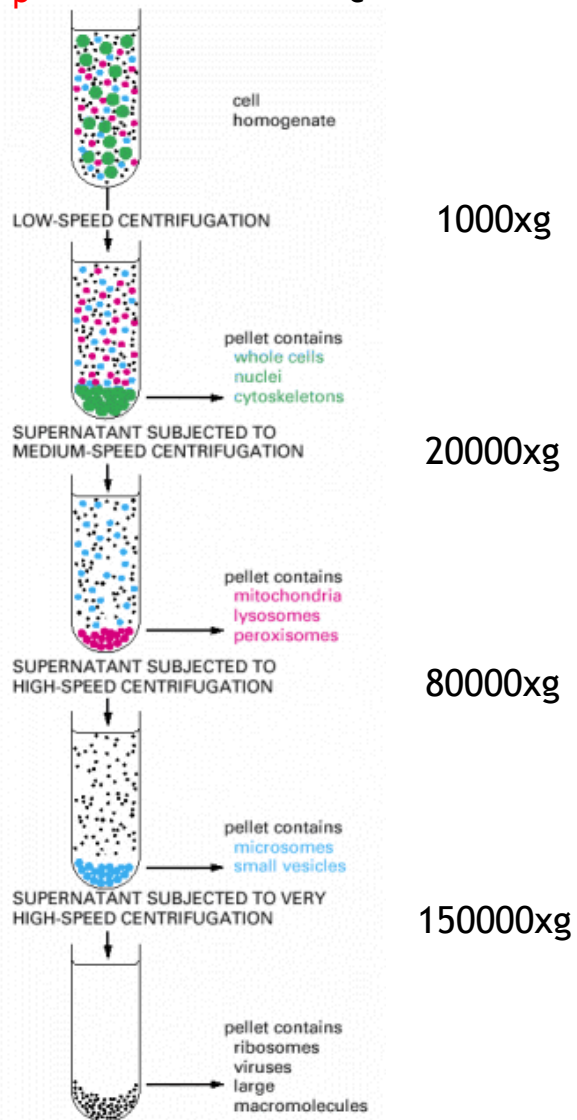
Metodi di prefrazioneamento basati sulla centrifugazione

V: velocità di sedimentazione

$$V = \frac{2r_p^2(\Delta \text{ densità})\omega^2 r_c}{9\text{viscosità}_m}$$

I vari organelli vengono separati in base alla loro massa, forma e densità => sedimentazione

Prefrazioneamento => centrifugazione **preparativa**



Centrifugazione differenziale

Centrifugazione differenziale: (esempio riportato sulla sinistra). Le particelle/organuli si separano in base alla loro **velocità di sedimentazione**, che dipende, tra gli altri fattori anche dalle dimensioni [r^2 , se assimilabile ad una sfera], densità e forma

Si applicano una serie di centrifugazioni a g crescenti, da ciascuna delle quali si recupera il pellet e il surnatante, ottenendo in questo modo una serie di frazioni.

I pellet possono essere risottoposti a centrifugazione differenziale dopo esser stati risospesi per aumentarne la purezza (tutte le particelle/organuli si muovono verso il fondo ed è per questo che il pellet è sempre "contaminato", ma ad ogni ripetizione esso diventa sempre più puro).

Centrifugazione in gradiente di densità di tipo:

a) **zonale di velocità**

b) **Isopicnica (isodensità o uguale densità)**

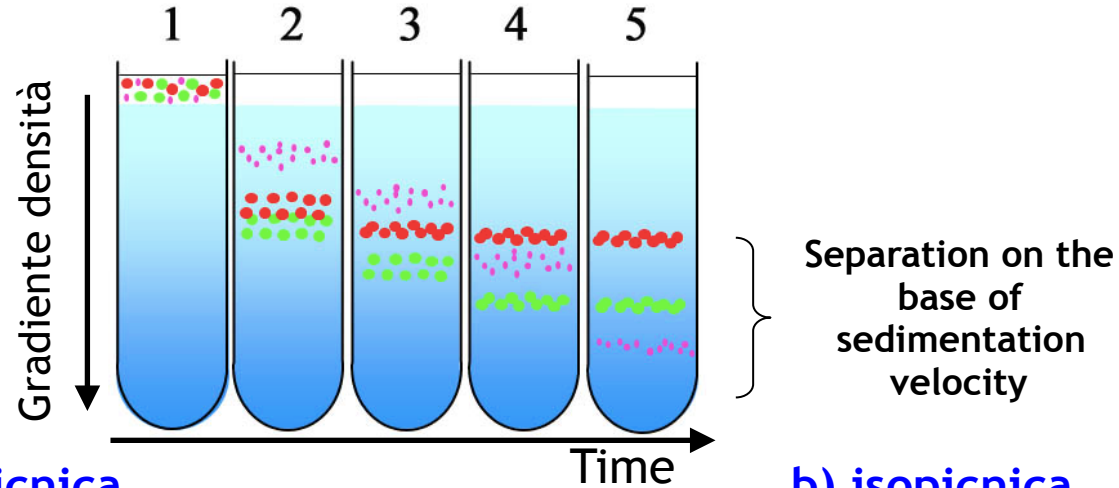
Nella prima (**zonale di velocità**), il gradiente ha la funzione di migliorare la risoluzione della separazione (evitando anche il rimescolamento per moti convettivi) e si basa sulla velocità di sedimentazione (dipendente da forma, **dimensione** (r^2) e densità). Questa centrifugazione viene utilizzata, ad esempio, per separare molecole con densità simile ma dimensioni (r^2) diverse che quindi hanno una velocità diversa di sedimentazione. Non è un metodo all'equilibrio e pertanto se la centrifugazione non viene opportunamente fermata, tutti gli "oggetti" andranno a depositarsi sul fondo (i.e. si predilige separare oggetti con **densità simile e dimensioni diverse**, come ad esempio proteine con notevole differenza di MW, non buona invece per separare organuli con dimensioni simili ma densità diverse). Gradiente: densità massima minore di quella del componente a densità minima.

Nella seconda (**isopicnica**) la separazione si basa esclusivamente sulla densità idrostatica delle particelle, e non dalla forma o dimensione. Le particelle si fermano quando durante la separazione nel gradiente di densità raggiungono una zona di densità pari alla loro => **metodo all'equilibrio**: la densità maggiore del gradiente deve superare quella del componente più denso da separare.

Tecnica buona per separare molecole con densità diverse (dipende dalla bontà (estensione/range) del gradiente).

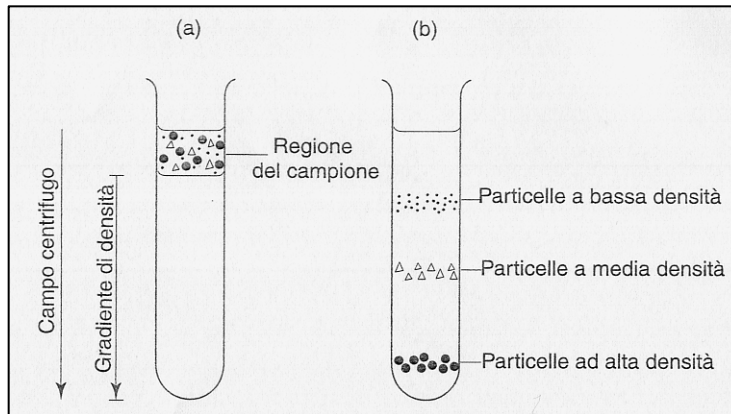
Centrifugazione in gradiente

zonale

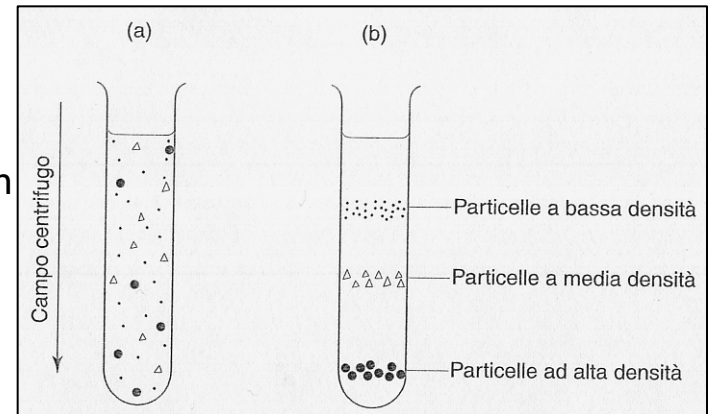


a) isopichnica
su gradiente preformato

b) isopichnica
con gradiente non preformato



Separation on
the base of
density

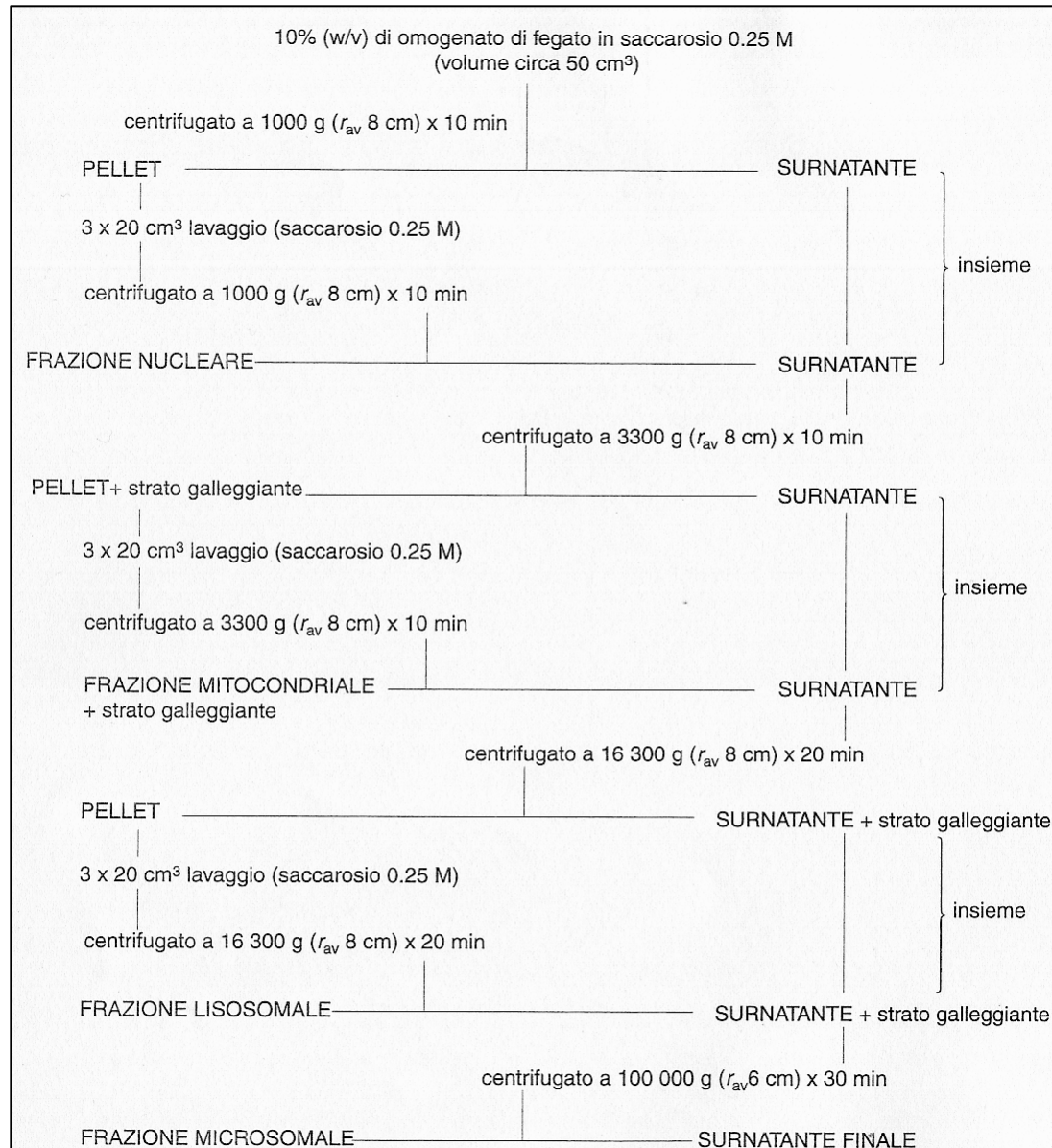


Velocità di sedimentazione, $V = \frac{2r_p^2(\Delta \text{ densità})\omega^2 r_c}{9\text{viscosità}_m}$

Coefficiente di sedimentazione, $s = v / \omega^2 r_c$ (1×10^{-13}) = unità Svedberg (S)

i.e RNA ribosomiale 5S => ha un coefficiente di sedimentazione pari a 5×10^{-13}

Centrifugazione differenziale - un esempio



Nuclei - Resto (1)

Mitocondri - Resto (2)

Lisosomi - Resto (3)

Microsomi - Resto (4)

Metodi di prefrazionamento basati sulla centrifugazione:

Nomogramma: relazione tra raggio (r), RCF (xg) e RPM

Una qualsiasi particella che viene fatta ruotare all'interno di un rotore di centrifuga si trova sottoposta ad un campo centrifugo (G) pari a:

$$G = \omega^2 r$$

r : distanza radiale della particella dall'asse della rotazione espressa in cm;

ω : velocità angolare del rotore espressa in angoli radianti/sec.

Solitamente, però, la velocità angolare del rotore viene espressa in rpm (rivoluzioni per min), dove una rivoluzione del rotore è pari a 2π radianti. (radiante: l'angolo al centro di una circonferenza che sottende un arco che rettificato ha una lunghezza pari a r)

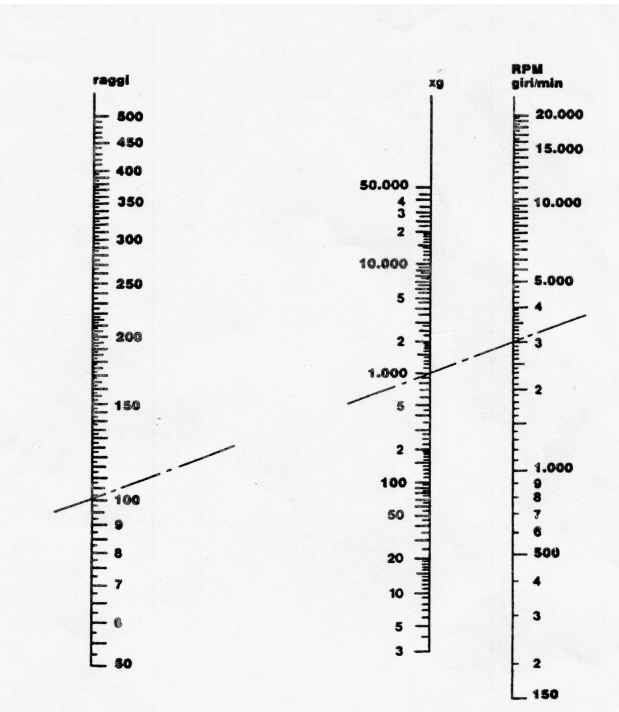
$$\omega = 2\pi \text{ rpm}/60$$

G espresso in rpm è:

$$G = 4\pi^2(\text{rpm})^2 r / 3600$$

Il campo centrifugo G può essere generalmente espresso in multipli del campo gravitazionale terrestre ($g = 980 \text{ cm s}^{-2}$), cioè come rapporto tra il peso della particella sottoposta al campo centrifugo e il peso della particella in presenza della sola forza di gravità. In questo caso viene espresso in termini di **campo centrifugo relativo (RCF)** o più comunemente come "numero di g, xg"

$$\text{RCF} = G/g = 4\pi^2 \text{ rpm}^2 r / 3600 \times 980 = 1,118 \times 10^{-5} \text{ rpm}^2 r$$



Metodi di Prefrazionamento: il caso emblematico del Plasma

Proteoma del Plasma: si pensa contenga moltissime, se non tutte le proteine umane...in effetti abbiamo visto che è identificabile nel plasma il 20% delle proteine codificabili dal genoma umano...

C'è stata ed è attualmente presente una grossa spinta nell'analisi del proteoma del siero a causa della possibilità di ritrovare dei **BIOMARKER** (indicatori di un determinato stato patologico che siano presenti in circolo e rilevabili tramite un prelievo di sangue - Fluidi corporei sono estremamente attraenti da questo punto di vista per la facilità con cui essi sono reperiti/campionabili (siero, urine, lacrime, liquido seminale, muco, saliva etc.)

ma...

...il 90% delle proteine in esso contenute sono rappresentate da solo 9 proteine: Albumin, IgG, haptoglobin, transferrin, transthyretin, alfa1-antitrypsin, alfa1-acid glycoprotein, hemopexin, e alfa2-macroglobulin.

Queste 9 proteine più abbondanti “oscurano” tutte le altre.

Come affrontare questo problema?...

Strategia n° 1: rimozione delle proteine più abbondanti

Sistemi di immunodeplezione: utilizzo di resine derivatizzate con opportuni anticorpi (anti-albumina etc.) per rimuovere selettivamente le proteine più abbondanti.

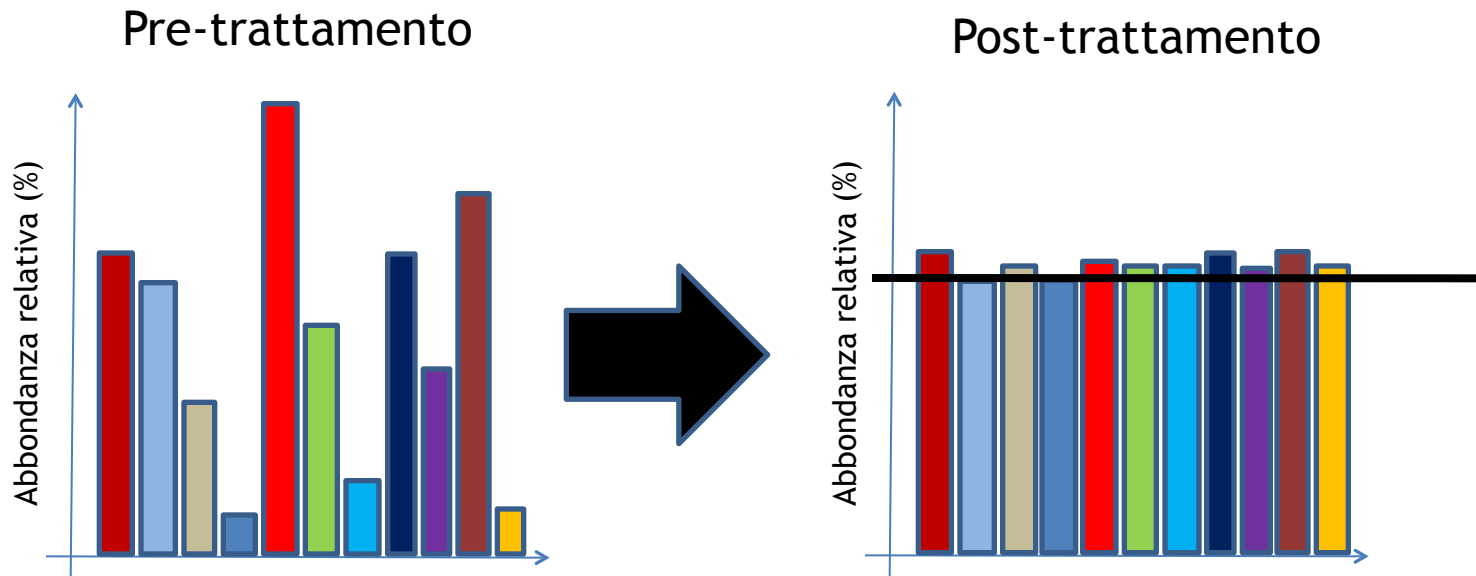
- primo problema - necessità di avere reagenti (anticorpi) estremamente specifici.
- secondo problema - rimozione contemporanea di proteine che sono legate a quelle immunodeplete (l'albumina è un noto carrier molecolare)
- terzo problema - le proteine che rimangono non sono sottoposte ad un processo di concentrazione e questo è un problema se esse sono presenti a concentrazioni sotto i limiti di rilevabilità.
- quarto problema: costi.

Nonostante questo i kit per l'immunodeplezione sono tra i più diffusi per la semplificazione dei campioni di siero.

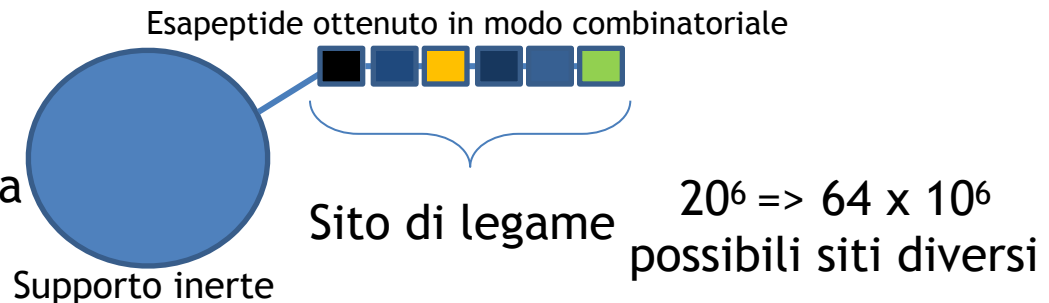
Strategia n° 2: utilizzo della “Protein Equalizer Technology”

Utilizzo di librerie esa-peptidiche immobilizzate su resine come reagenti d'affinità per la cattura specifica di proteine. Costituiscono una sorta di cromatografia d'affinità dove ciascuna “esca” - l'esapeptide - è presente in una quantità limitante e pertanto anche le “prede” - le varie proteine del siero - possono essere legate in quantità limitata. Questo fa sì che si giunga ad una sorta di normalizzazione tra le quantità di tutte le proteine con cui questa libreria è venuta a contatto.

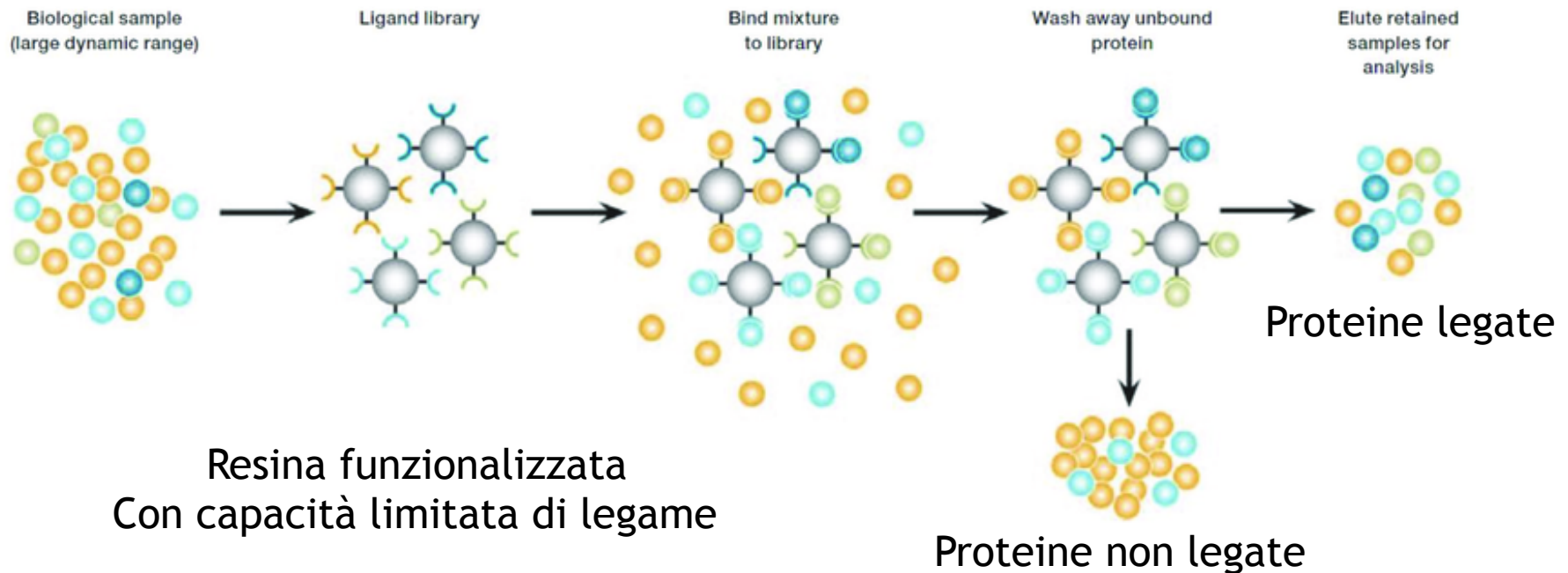
Problema: proteine molto grandi possono avere più siti di legame per i peptidi => sovrarappresentate??!!



Ogni singolo diverso esapeptide può essere legato da una proteina



ProteoMiner™ Protein Enrichment - BIO RAD

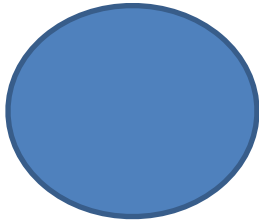


The enrichment protocol uses a large, highly diverse library of combinatorial peptide ligands bound to beads. After high-abundance proteins have saturated all their high-affinity ligands, the unbound excess protein is washed away. Most medium- and low-abundance proteins will not saturate their ligands, resulting in no excess to be washed away.

Metodi di prefrazionamento basati sulla cromatografia

Basandosi sulle metodiche cromatografiche a disposizione (vedasi in seguito) è possibile ottenere, a partire da un lisato proteico più frazioni, la cui complessità è sicuramente minore rispetto al totale

- Gel permeazione o size exclusion
- Scambio ionico (cationico o anionico)
- HIC hydrophobic interaction chromatography
- RP-HPLC
- Affinity chromatography
- etc...



“Superficie” con particolari proprietà di legame
=> solo alcune molecole si legano ad essa oppure si legano
ma con “forze” diverse” e possono essere quindi
successivamente o recuperate in toto oppure distaccate
progressivamente...vedasi più avanti nel corso...

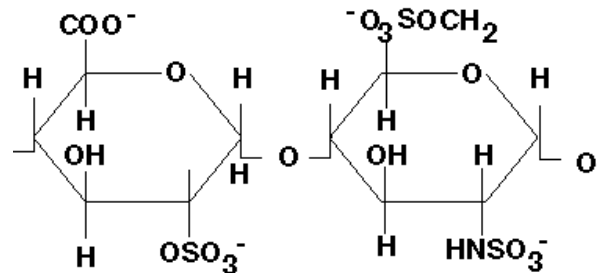
matrice cromatografica

A parte le metodiche cromatografiche convenzionali che verranno trattate in seguito, è rilevante sottolineare l'utilizzo di altre metodiche, il cui impiego risulta maggiormente ristretto all'ambito del pre-frazionamento proteico

1) Cromatografia basata sull'**EPARINA**

Eparine: polisaccaridi (glicosaminoglicani) polidispersi lineari carichi negativamente che sono in grado di legare diverse proteine

=> **selettività particolare**



Repeat unit of heparin

L'eparina, immobilizzata su una matrice solida (come agarosio o perle magnetiche), viene utilizzata come **ligando di affinità** per purificare proteine che legano specificamente i **glicosaminoglicani solfati (GAGs)**, di cui l'eparina è il rappresentante più carico negativamente.

L'eparina **mima l'eparan solfato dei proteoglicani della matrice extracellulare** e interagisce con molte proteine fisiologiche. È ideale per purificare:

- **Fattori di crescita** (VEGF, FGF, TGF- β)

- **Citochine e chemochine**

- **Enzimi della coagulazione** (trombina, antitrombina)

- **Proteine di legame al DNA** (fattori di trascrizione, proteine nucleari)

- **Lipoproteine** (lipoprotein lipasi)

- **Virus e proteine virali** (per studi di interazione ospite-patogeno)

L'eparina è un **polisaccaride altamente carico negativamente** grazie ai gruppi solfato (N-solfato, O-solfato) e carbossilici. Le proteine che legano l'eparina possiedono solitamente **domini di legame basici** ricchi di **residui di lisina e arginina**, che formano:

- **Interazioni elettrostatiche** con i gruppi solfato / **Legami idrogeno** / **Interazioni idrofobiche** minori

Non tutte le proteine basiche legano l'eparina; la specificità dipende dalla distribuzione spaziale dei residui basici nel dominio di legame. L'eparina può quindi discriminare tra proteine con cariche simili ma arrangiamenti differenti.

2) Cromatografia a Affinità con Lectine (Lectin Affinity Chromatography, LAC)

Lectine: proteine che legano in modo **multivalente** i carboidrati

Il loro utilizzo come componenti di matrici per cromatografia d'affinità costituiscono un metodo per **l'arricchimento di glicoproteine**.

Principio di Funzionamento

Base Biochimica:

Le lectine sono proteine di origine vegetale (o animale) che legano **specificamente** e reversibilmente **carboidrati** (zuccheri) senza modificarli.

Esempio: **Concanavalina A (ConA)** dal fagiolo *Canavalia ensiformis* lega specificamente residui α -D-mannosio e α -D-glucosio.

Meccanismo di Separazione:

La lectina viene immobilizzata su un supporto solido (matrice cromatografica, come agarosio). La miscela di proteine (o glicoproteine) viene fatta passare attraverso la colonna.

Solo le molecole contenenti **zuccheri specifici** (leganti per quella lectina) si legano alla matrice. Le componenti non legate vengono lavate via.

Le molecole legate vengono eluite selettivamente:

- a) Usando soluzioni di **zuccheri competitivi** (es. mannosio per ConA) che competono per il sito di legame;
- b) Modificando il pH o la forza ionica.

Table 1 Examples of heparin-binding proteins

Cytokines/growth factors

BMP-2

FGF-1

FGF-2

Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)

FGFR2

Hepatocyte growth factor

Heparin binding-epidermal growth factor (HB-EGF)

Interleukin-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -10, -12

VEGF-A165

Transforming growth factor- β (TGF- β)

Ori et al. (2011)

Schlessinger et al. (2000)

Schlessinger et al. (2000)

Schlessinger et al. (2000)

Schlessinger et al. (2000)

Muñoz and Linhardt (2004)

Aviezer and Yayon (1994)

Koopmann et al. (1999)

Robinson et al. (2006)

Coombe and Kett (2005)

Lipid-binding proteins

Annexin V

Apolipoprotein B (ApoB)

ApoE

Capila et al. (2001)

Cardin and Weintraub (1989)

Dong et al. (2001)

Adhesion proteins

Fibronectin

Vitronectin (Vn)

Chemokines

Platelet factor 4 (PF4)

Coombe and Kett (2005)

Cardin and Weintraub (1989)

Imberty et al. (2007)

Others

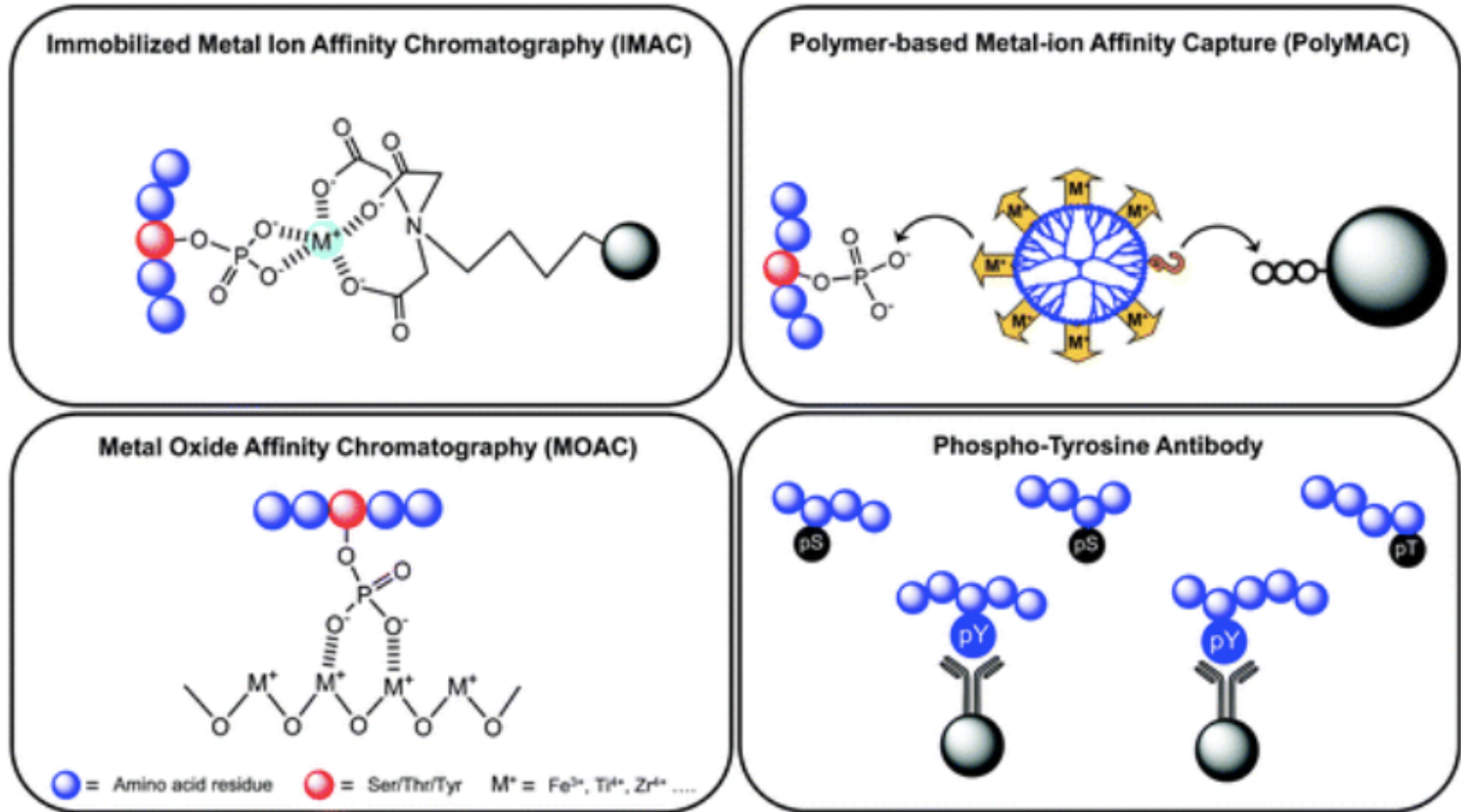
AT III

Thrombin

Johnson and Huntington (2003)

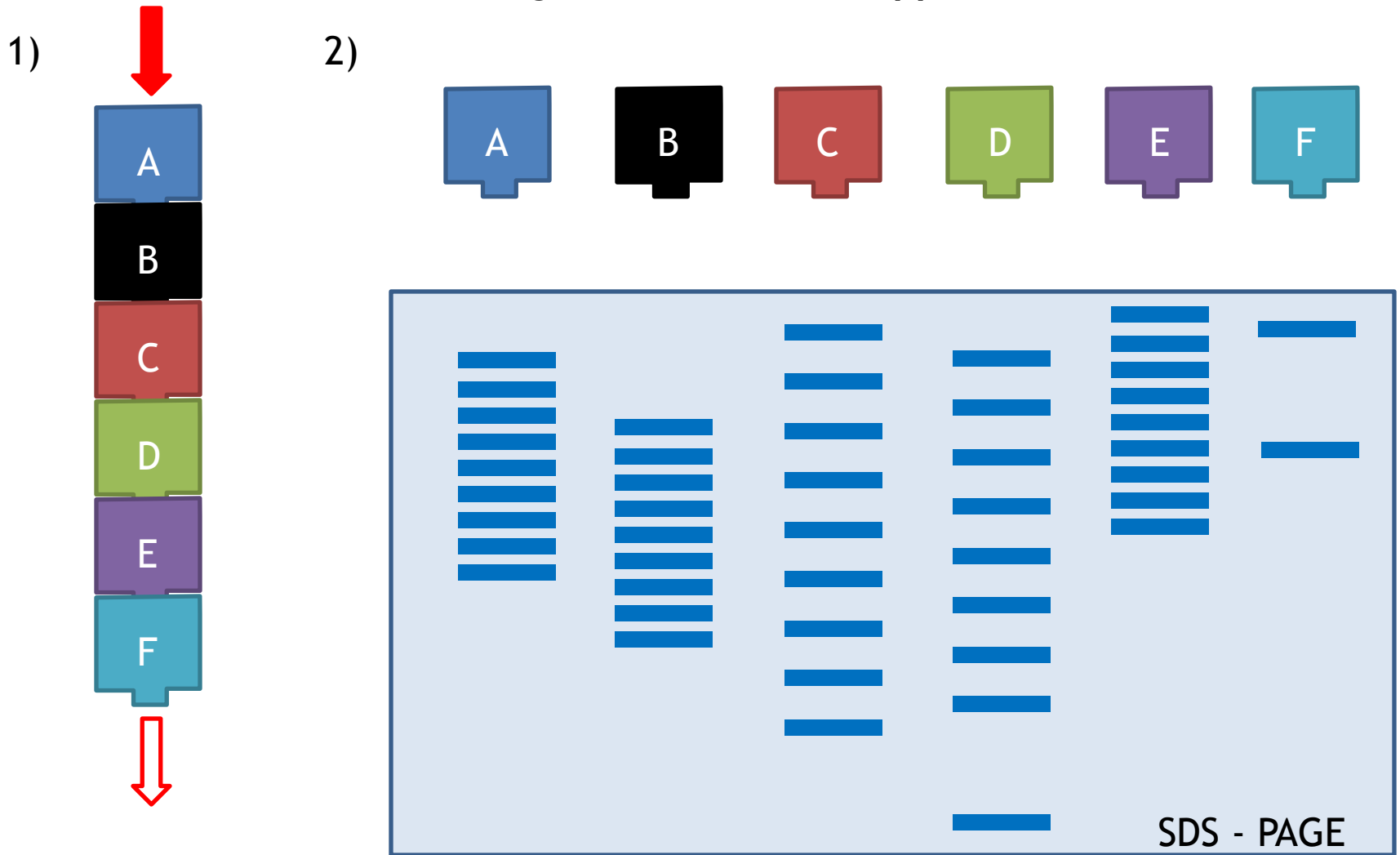
Carter et al. (2005)

3) Cromatografia di Affinità per gruppi fosfato - arricchimento di peptidi/proteine fosforiate



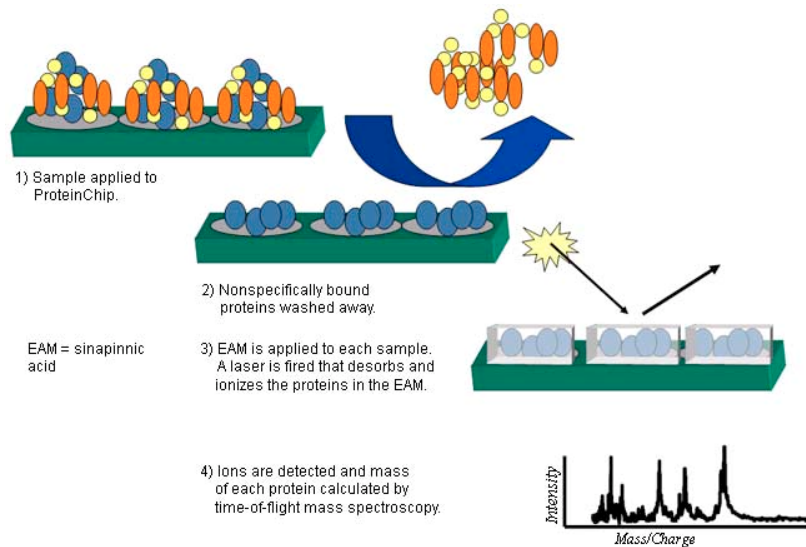
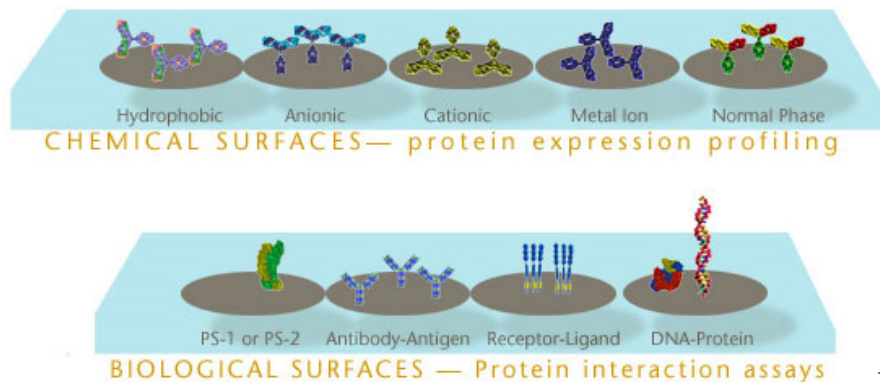
Arricchimento/prefrazionamento porta a superare la problematica relativa al fatto che solitamente le varie modifiche post-tradizionali non interessano tutte le molecole di una determinata proteina, ma solo una frazione. Come si vede, alcune si basano su interazioni di tipo elettrostatico e questo può comportare dei problemi di aspecificità derivante dal riconoscimento delle marche di aspartato e glutammato

Cromatografia con fasi sovrapposte



- 1) L'estratto proteico viene fatto passare attraverso una colonna composta da diverse fasi stazionarie sovrapposte, ciascuna con una specifica selettività (capacità di legare specifiche molecole).
- 2) Alla fine del processo cromatografico, ciascuna delle fasi stazionarie viene separata e le proteine ad esse legate eluite ed analizzate con una metodica separativa come ad esempio l'elettroforesi SDS-PAGE.

Tecnologia SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization)



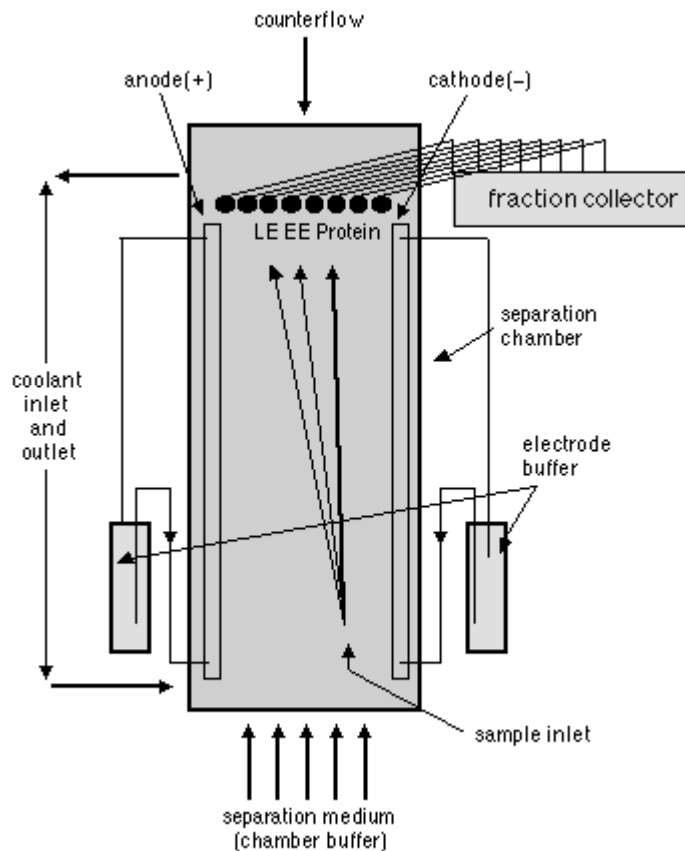
Cattura su di un Chip per MALDI di specifiche molecole sfruttando “**ligandi**” immobilizzati - fasi cromatografiche o ligandi biologici .i.e anticorpi, recettori etc.

Le molecole catturate vengono poi direttamente analizzate in spettrometria di massa tipo MALDI-TOF (vedasi più avanti nel corso).

=> semplificazione del campione d'origine!

Metodi di prefrazionamento basati sulla elettroforesi

FFE (Free Flow Electrophoresis)



FFE (Free Flow Electrophoresis)

Il campione proteico viene caricato in un determinato punto in un liquido sottoposto ad un determinato flusso e contemporaneamente sottoposto ad un campo elettrico. Le molecole vengono quindi a muoversi sia per l'azione del flusso che per l'azione del campo elettrico e quindi percorrono una traiettoria diagonale. L'entità della diagonale dipende principalmente dal rapporto m/z della molecola.

Questo sistema è adatto al pre-frazionamento di proteine, ma anche di cellule o organuli.

All'estremità opposta rispetto a dove il campione viene caricato, sono presenti delle provette in cui vengono "raccolte" le molecole separate.

Di metodi di pre-frazionamento basati sulla elettroforesi ne esistono diversi tipi...solo per citarne alcuni:

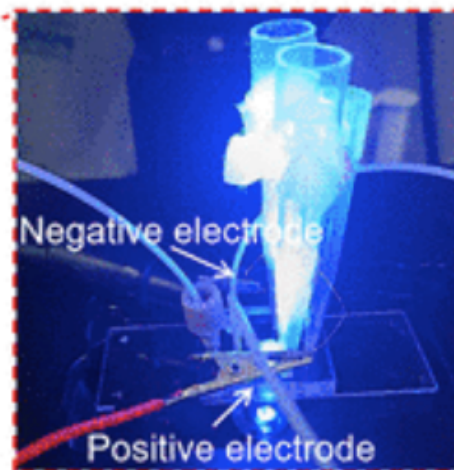
a) Rotofor: Sistema basato sulla separazione delle proteine in dipendenza del loro punto isoelettrico (vedasi in seguito) in un gradiente di pH

b) Gradiflow: Sistema basato sull'utilizzo di membrane a porosità differenziale e di un campo elettrico.

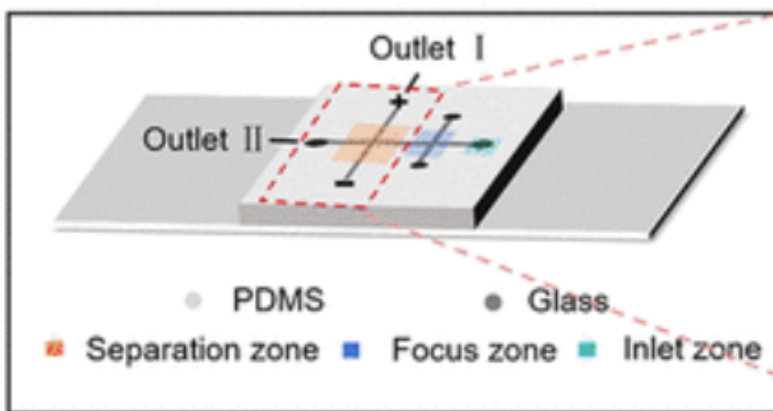
FFE (Free Flow Electrophoresis)

Principio ancora attualmente esplorato per il frazionamento proteico

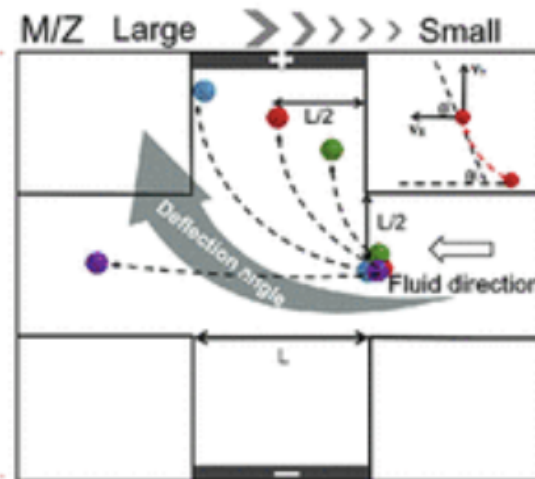
(a)



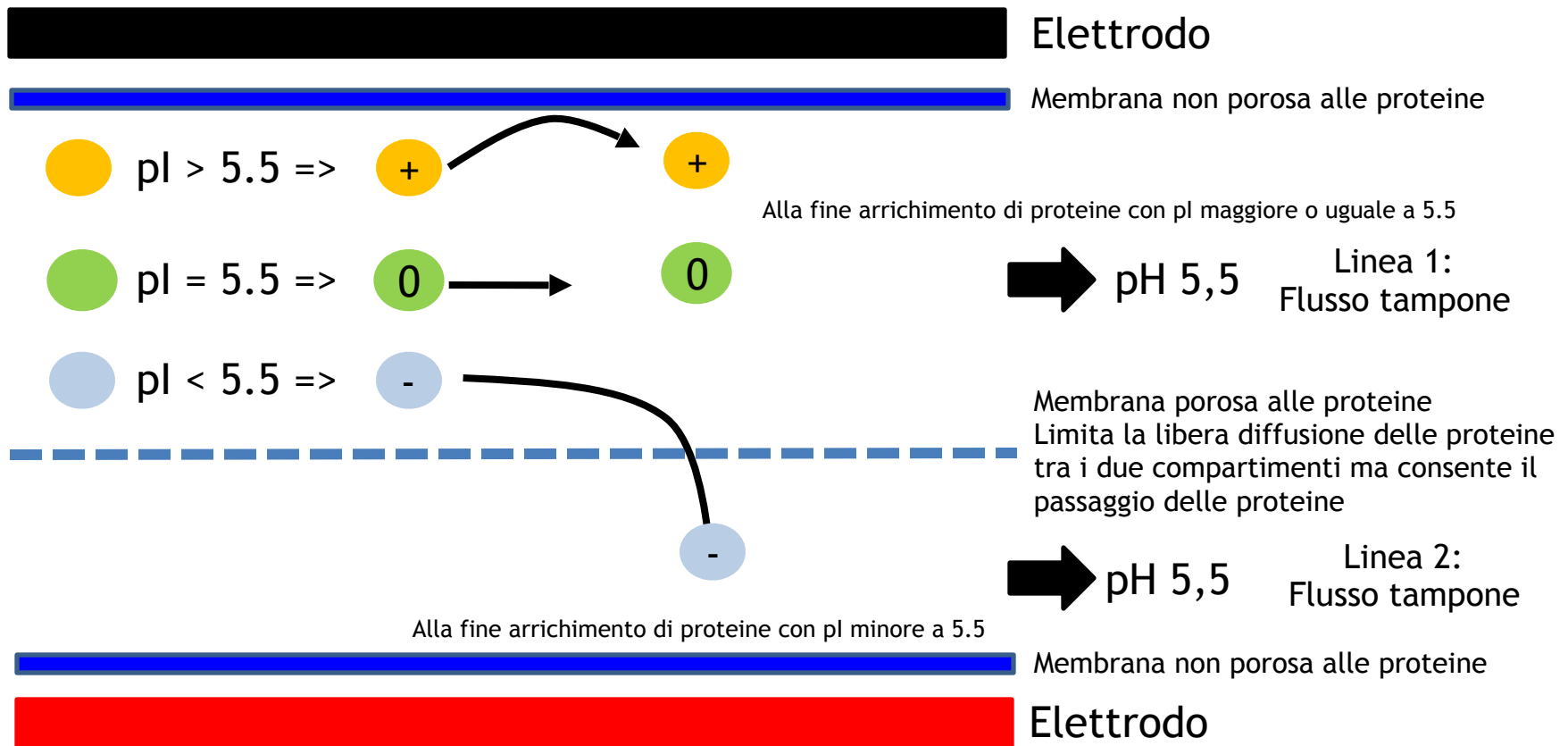
(b)



(c)

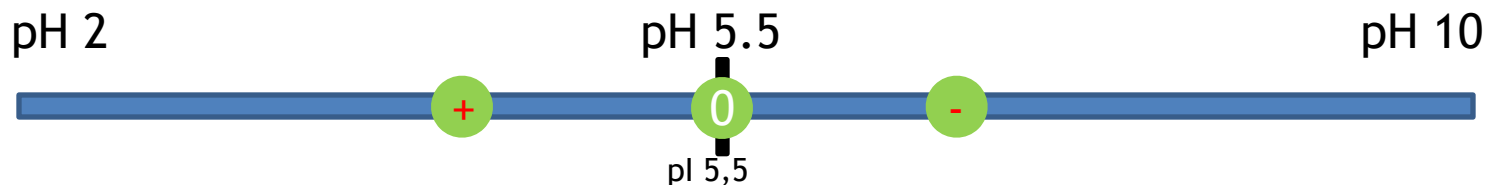


Principio di funzionamento del Gradiflow (1995/2010)



Le proteine vengono caricate nella linea 1. A pH 5,5 ci saranno proteine con carica netta 0, positiva o negativa a seconda del loro diverso pI. Essendo applicato una differenza di potenziale (ddp) si otterrà un frazionamento delle proteine in base alla loro carica (in pratica si separeranno proteine con pI maggiore o uguale a 5,5 da quelle con pI minore di 5,5. Questa operazione può essere fatta in serie ottenendo alla fine frazioni separate in base al pI delle proteine.

Carica di una proteina in funzione del proprio pI e del pH della soluzione

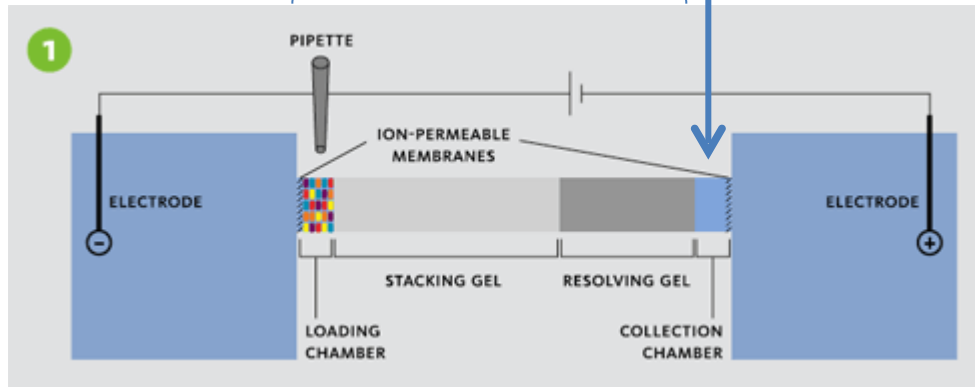


Gelfree 8100 Fractionation System

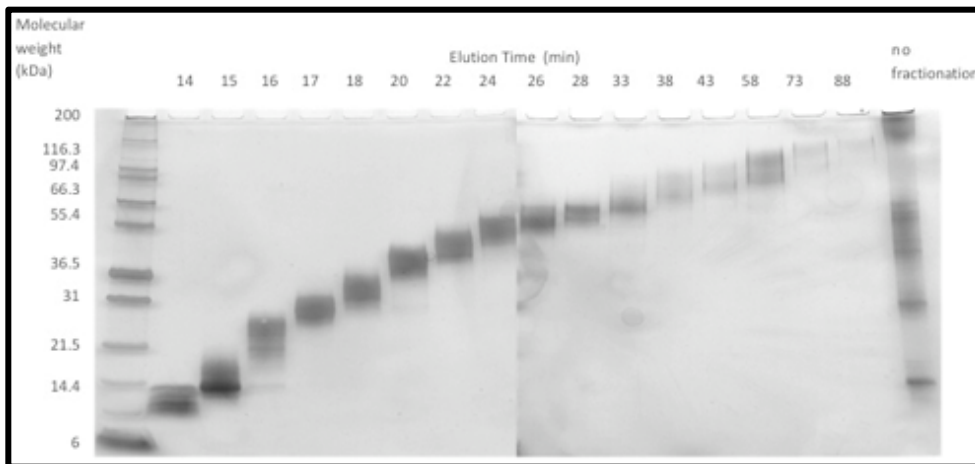
Principio: separazione mediante gel-elettroforesi e recupero delle proteine dopo che escono dal gel (quindi in fase liquida)

Accumulo e separazione

Proteine che escono dalla matrice vengono raccolte



Proteine vengono caricate in un SDS PAGE, vengono fatte separare mediante applicazione di una ddp. A seconda delle loro dimensioni ad un certo punto usciranno dal gel e vengono intrappolate in una camera (collection chamber). La ddp viene interrotta e recuperando il liquido in questa camera si recuperano anche le proteine che in essa si trovano. La camera viene riempita con liquido nuovo, e la corsa fatta partire per un altro intervallo di tempo, al termine del quale si ripete l'operazione descritta sopra (questo può essere fatto per un numero n di volte). In questo modo si ottengono n frazioni proteiche che si differenziano per il loro peso molecolare. Se queste frazioni fossero fatte correre su di un SDS-PAGE si otterrebbe un risultato analogo a quello mostrato nell'immagine riportata a sinistra



Controllo mediante separazione in SDS PAGE delle frazioni ottenute mediante Gelfree 8100

Metodi di prefrazionamento - CONCLUSIONI-

I metodi di prefrazionamento sono essenziali per la semplificazione dei campioni proteici o campioni biologici sottoposti ad analisi proteomiche.

Aiutano a risolvere il problema della risoluzione dei metodi analitici e del loro range dinamico

Si basano prevalentemente su:

- a) estrazioni selettive
- b) metodi centrifugativi
- c) metodi cromatografici
- d) metodi elettroforetici

Vantaggi:

Essenziali dove ci si voglia concentrare su di una particolare sub-proteoma, poichè attenua i problemi sopra-indicati

Svantaggi:

Dove si voglia avere una visione completa del proteoma di una particolare cellula/tessuto/etc. sicuramente i metodi di prefrazionamento portano al superamento delle problematiche connesse a risoluzione e range dinamico, ma contemporaneamente amplificano il numero di campioni da analizzare (Le analisi da effettuare sono infatti pari al numero delle frazioni ottenute)

CONSIDERAZIONI GENERALI - ATTUALI al 2026

L'evoluzione della MS si è spinta ad un punto tale che oggi, con strumenti di ultima generazione, si ha la quasi totale copertura del proteoma senza ricorrere a tecniche di prefrazionamento. Il prefrazionamento è utile in casi particolari, dove è necessario arricchire fortemente la concentrazione di determinate proteine, ad esempio per vedere specifiche modificazioni post-traduzionali o studiare proteine ad abbondanza molto bassa