

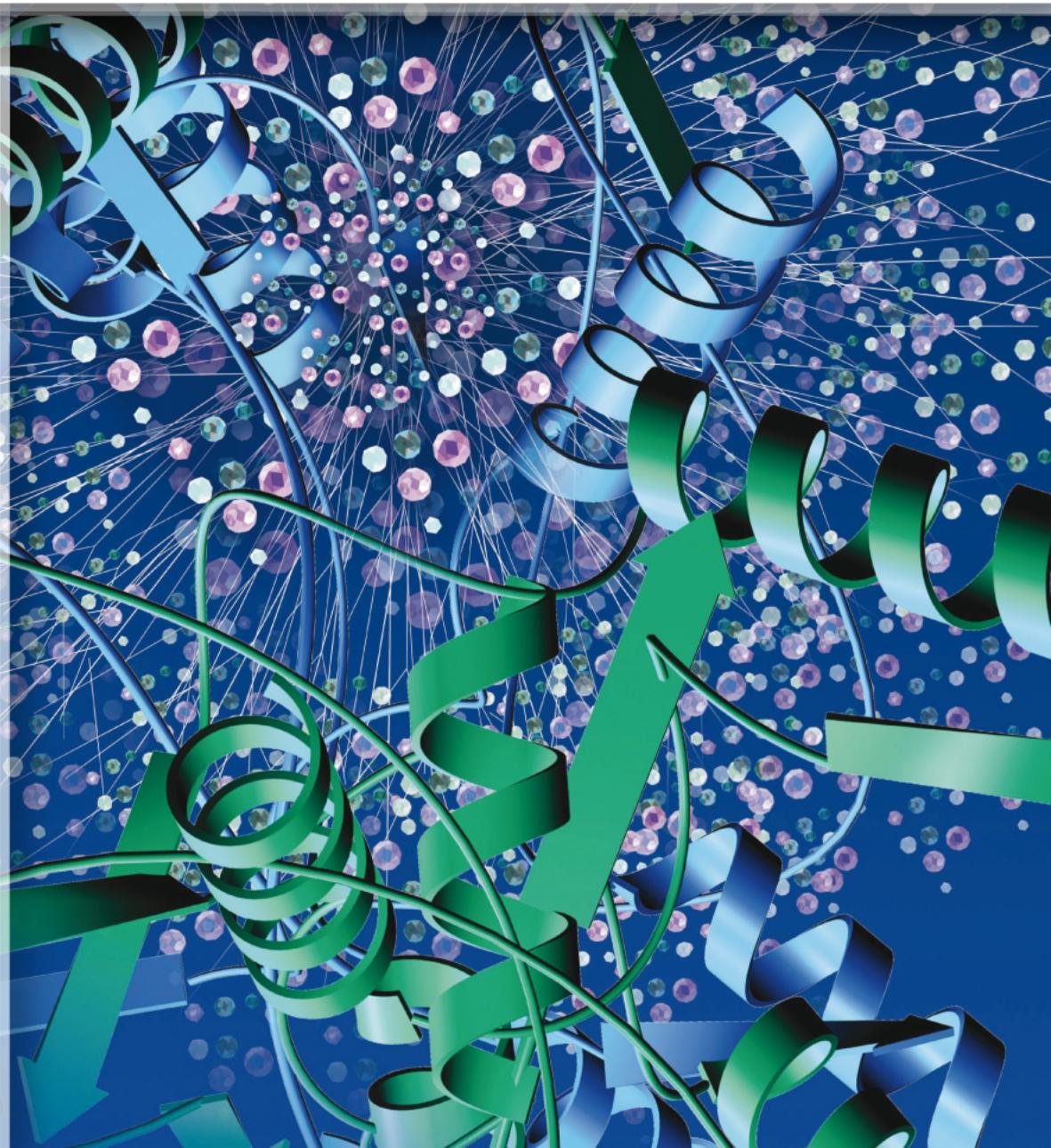
Comprende versione  
ebook



T. Alberio • M. Fasano • P. Roncada

# Proteomica

P. Roncada  
M. Ruoppolo  
C. Desiderio  
L. Giusti  
T. Alberio  
V. Greco  
A. Soggiu





# Accedi ai contenuti digitali

Espandi le tue risorse

un libro che **non pesa**  
e si **adatta** alle dimensioni  
del **tuoi lettore!**



Utilizza il codice personale contenuto nel riquadro per registrarti al sito **edisesuniversita.it** e accedere ai contenuti digitali.

Scopri il tuo **codice personale** grattando delicatamente la superficie

Il volume NON può essere venduto, né restituito, se il codice personale risulta visibile.  
L'accesso ai contenuti digitali sarà consentito **per 18 mesi**.

Per attivare i **servizi riservati**, collegati al sito **edisesuniversita.it** e segui queste semplici istruzioni

## Se sei registrato al sito

- clicca su *Accedi al materiale didattico*
- inserisci email e password
- inserisci le ultime 4 cifre del codice ISBN, riportato in basso a destra sul retro di copertina
- inserisci il tuo **codice personale** per essere reindirizzato automaticamente all'area riservata

## Se non sei già registrato al sito

- clicca su *Accedi al materiale didattico*
- registrati al sito o autenticati tramite facebook
- attendi l'email di conferma per perfezionare la registrazione
- torna sul sito **edisesuniversita.it** e segui la procedura già descritta per *utenti registrati*



I contenuti digitali sono accessibili dalla propria **area riservata** secondo la procedura indicata nel frontespizio.

Dalla sezione **materiali e servizi** della tua area riservata potrai accedere all'**Ebook**, ovvero la versione digitale del testo in formato epub, standard dinamico che organizza il flusso di testo in base al dispositivo sul quale viene visualizzato. Fruibile mediante l'applicazione gratuita Bookshelf, consente una visualizzazione ottimale su lettori e-reader, tablet, smartphone, iphone, desktop, Android, Apple e Kindle Fire.

L'accesso ai contenuti digitali sarà consentito per **18 mesi**.

Tiziana Alberio • Mauro Fasano • Paola Roncada

---

# Proteomica



Tiziana Alberio, Mauro Fasano, Paola Roncada

PROTEOMICA

Copyright © 2021 EdiSES Edizioni S.r.l. – Napoli

9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

2025 2024 2023 2022 2021

Le cifre sulla destra indicano il numero e l'anno dell'ultima ristampa effettuata

*A norma di legge è vietata la riproduzione,  
anche parziale, del presente volume o di  
parte di esso con qualsiasi mezzo.*

L'Editore

*L'Editore ha effettuato quanto in suo potere  
per richiedere il permesso di riproduzione  
del materiale di cui non è titolare del  
copyright e resta comunque a disposizione  
di tutti gli eventuali aventi diritto.*

*Fotocomposizione:*

Fotocomposizione TPM Sas - Città di Castello (PG)

*Stampato presso la:*

PrintSprint - Napoli

*per conto della*

EdiSES Edizioni S.r.l. - Piazza Dante, 89 - Napoli

[www.edisesuniversita.it](http://www.edisesuniversita.it)

[assistenza.edises.it](http://assistenza.edises.it)

ISBN 978 88 3623 049 5

---

I curatori, l'editore e tutti coloro in qualche modo coinvolti nella preparazione o pubblicazione di quest'opera hanno posto il massimo impegno per garantire che le informazioni ivi contenute siano corrette, compatibilmente con le conoscenze disponibili al momento della stampa; essi, tuttavia, non possono essere ritenuti responsabili dei risultati dell'utilizzo di tali informazioni e restano a disposizione per integrare la citazione delle fonti, qualora incompleta o imprecisa.

Realizzare un libro è un'operazione complessa e, nonostante la cura e l'attenzione poste dagli autori e da tutti gli addetti coinvolti nella lavorazione dei testi, l'esperienza ci insegna che è praticamente impossibile pubblicare un volume privo di imprecisioni. Saremo grati ai lettori che vorranno inviarci le loro segnalazioni e/o suggerimenti migliorativi sulla piattaforma [assistenza.edises.it](http://assistenza.edises.it)

# Autori

**Lucia Albano** Università degli Studi di Napoli Federico II

**Tiziana Alberio** Università degli Studi dell'Insubria

**Angela Amoresano** Università degli Studi di Napoli Federico II

**Angela Bachi** Istituto FIRC di Oncologia Molecolare (IFOM)

**Laura Bianchi** Università degli Studi di Siena

**Luca Bini** Università degli Studi di Siena

**Tiziana Bonaldi** Istituto Europeo di Oncologia (IEO)

**Tiziana Cabras** Università degli Studi di Cagliari

**Marianna Caterino** Università degli Studi di Napoli Federico II

**Andrea Carpentieri** Università degli Studi di Napoli Federico II

**Massimo Castagnola** Università Cattolica del Sacro Cuore

**Daniela Cecconi** Università degli Studi di Verona

**Federica Ciregia** Università degli Studi di Pisa

**Giuseppe Corona** Centro di Riferimento Oncologico (CRO) IRCCS

**Daniela Crisci** Università degli Studi di Napoli Federico II

**Alessandro Cuomo** Istituto Europeo di Oncologia (IEO)

**Valli De Re** Centro di Riferimento Oncologico (CRO) IRCCS

**Claudia Desiderio** Istituto di Scienze e Tecnologie Chimiche Giulio Natta (CNR)

**Mauro Fasano** Università degli Studi dell'Insubria

**Tania Gamberi** Università degli Studi di Firenze

**Federica Gevi** Università degli Studi della Tuscia

**Laura Giusti** Università degli Studi di Camerino

**Viviana Greco** Università Cattolica del Sacro Cuore

**Federica Iavarone** Università Cattolica del Sacro Cuore

**Anna Illiano** Università degli Studi di Napoli Federico II

**Marta Lualdi** Università degli Studi dell'Insubria

**Antonio Lucacchini** Università degli Studi di Pisa

**Francesca Magherini** Università degli Studi di Firenze

**Fulvio Magni** Università degli Studi di Milano-Bicocca

**Emanuela Marchese** Università degli Studi di Napoli Federico II

**Claudia Martelli** Università Cattolica del Sacro Cuore

**Vittoria Matafora** *Istituto FIRC di Oncologia Molecolare (IFOM)*

**Chiara Melchiorre** *Università degli Studi di Napoli Federico II*

**Irene Messana** *Istituto di Scienze e Tecnologie Chimiche Giulio Natta (CNR)*

**Stefania Orrù** *Università degli Studi di Napoli Parthenope*

**Isabella Piga** *Università degli Studi di Milano-Bicocca*

**Gabriella Pinto** *Università degli Studi di Napoli Federico II*

**Cristian Piras** *Università degli Studi di Catanzaro Magna Graecia*

**Lorenza Putignani** *Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS*

**Ombretta Repetto** *Centro di Riferimento Oncologico (CRO) IRCCS*

**Umberto Restuccia** *Istituto FIRC di Oncologia Molecolare (IFOM)*

**Paola Roncada** *Università degli Studi di Catanzaro Magna Graecia*

**Margherita Ruoppolo** *Università degli Studi di Napoli Federico II*

**Gianluca Sigismondo** *Istituto Europeo di Oncologia (IEO)*

**Andrew Smith** *Università degli Studi di Milano-Bicocca*

**Alessio Soggiu** *Università degli Studi di Milano*

**Bruno Tilocca** *Università degli Studi di Catanzaro Magna Graecia*

**Anna Maria Timperio** *Università degli Studi della Tuscia*

**Andrea Urbani** *Università Cattolica del Sacro Cuore*

#### **Coordinamento e revisione a cura di:**

**Tiziana Alberio** *Università degli Studi dell'Insubria*

**Mauro Fasano** *Università degli Studi dell'Insubria*

**Paola Roncada** *Università degli Studi di Catanzaro Magna Graecia*

#### **Comitato editoriale:**

**Tiziana Alberio, Claudia Desiderio, Mauro Fasano, Laura Giusti, Viviana Greco, Paola Roncada,**

**Margherita Ruoppolo, Alessio Soggiu**

# Prefazione

Le scienze *-omiche* hanno rivoluzionato la biologia moderna. Infatti, non esiste ambito scientifico, dalla medicina alle scienze ambientali, passando per la biochimica e la farmacologia, che non si sia rivolto a questo nuovo modo di fronteggiare i sistemi complessi e che non ne abbia tratto beneficio negli ultimi due decenni. La proteomica, tra questi ambiti, si prefigge di studiare l'intero set di proteine costitutivo di un tessuto, un organo o un intero organismo in un determinato momento, con l'ambizione di correlare questa "istantanea molecolare" al fenotipo osservato.

Inoltre, fino alla stesura di questa opera, non era disponibile alcun testo in lingua italiana che potesse aiutare il docente universitario nei corsi di proteomica, sempre più frequentemente richiesti e inseriti in molti corsi di laurea, e nemmeno in moduli di proteomica da introdurre nei corsi più tradizionali, che non possono più prescindere dalla descrizione di questo nuovo modo di studiare le proteine.

Per colmare questo vuoto, è nato questo testo di Proteomica, in lingua italiana, come risultato dello sforzo congiunto di molti degli associati della Società Italiana di Proteomica (ItPA). È un'iniziativa emersa dall'esigenza di molti docenti, e qui Autori, che necessitavano di un libro completo di proteomica da adottare nei propri insegnamenti. È un testo disegnato, anche, come supporto integrativo a chi non si occupa direttamente di proteomica, ma la utilizza come metodo di analisi e di studio nelle molteplici applicazioni delle scienze della vita.

È un libro che, decisamente, mancava come supporto alla didattica. L'ItPA ha voluto, nel suo impegno per la formazione dei giovani ricercatori, realizzare fortemente questa opera.

Il testo è diviso in sezioni, che potrebbero corrispondere a moduli di corso: una parte più generale, una sezione che presenta i diversi metodi, una sezione molto più approfondita e, infine, una parte finale più specifica, che si occupa di particolari procedure e di rielaborazione dei risultati proteomici. Il Docente potrà quindi scegliere se adottarle tutte o inserirle in diversi corsi, a seconda delle proprie necessità e di quelle dei suoi studenti.

Siamo quindi estremamente grati a tutti gli Autori della comunità di proteomica per avere aderito con entusiasmo al progetto editoriale e l'enorme sforzo fatto per la realizzazione dell'opera. Con essa speriamo di contribuire a far conoscere e apprezzare le potenzialità di questa scienza agli studenti con diversi percorsi formativi.

*I Curatori*



# Sommario

## Parte I **Generalità**

<b>Capitolo 1</b>	Che cos'è la proteomica?	3
<b>Capitolo 2</b>	Rivoluzione dell'ipotesi a posteriori e ricerca di nuove ipotesi	7
<b>Capitolo 3</b>	Relazione tra proteomica e altre scienze post-genomiche	15

## Parte II **La strada**

<b>Capitolo 4</b>	Preparazione del campione per l'analisi dell'espressione proteica	21
<b>Capitolo 5</b>	Analisi dell'espressione proteica mediante tecniche elettroforetiche	33
<b>Capitolo 6</b>	Analisi dell'espressione proteica mediante tecniche cromatografiche	45
<b>Capitolo 7</b>	Programmi e siti web per l'identificazione delle proteine	57
<b>Capitolo 8</b>	Analisi quantitativa dell'espressione proteica	71
<b>Capitolo 9</b>	Statistica	83

## Parte III **Tecniche**

<b>Capitolo 10</b>	Elettroforesi bidimensionale	101
<b>Capitolo 11</b>	Altre tecniche elettroforetiche	119
<b>Capitolo 12</b>	Cromatografia di peptidi e proteine	125
<b>Capitolo 13</b>	Spettrometria di massa	137
<b>Capitolo 14</b>	Metodi quantitativi	155

## Parte IV Ridurre la complessità

<b>Capitolo 15</b>	Frazionamento subcellulare	171
<b>Capitolo 16</b>	Immunoprecipitazione	183
<b>Capitolo 17</b>	Modifiche post-traduzionali	193

## Parte V Systems Biology

<b>Capitolo 18</b>	Reti di proteine e meta-analisi	207
<b>Capitolo 19</b>	Classificazione ontologica e di pathway	213
<b>Capitolo 20</b>	Strumenti web-based disponibili per la creazione e l'analisi delle reti	225

## Parte VI Oltre la proteomica

<b>Capitolo 21</b>	Una mappa topografica delle proteine: introduzione al MALDI-MS imaging	239
<b>Capitolo 22</b>	Impronta digitale: MALDI profiling	255
<b>Capitolo 23</b>	Impronta biochimica: metabolomica	263

# Indice generale

## Parte I Generalità

### Capitolo 1

#### Che cos'è la proteomica?

■ Introduzione	3
■ Il genoma è costante, il proteoma no	4
■ Evoluzione tecnologica in proteomica	5
■ Approcci ortogonali e integrati	6
Bibliografia	6

### Capitolo 2

#### Rivoluzione dell'ipotesi a posteriori e ricerca di nuove ipotesi

■ Introduzione	7
■ Ricerca di nuove ipotesi	10
■ Proteomica di espressione	10
■ Proteomica funzionale	12
Bibliografia	14

### Capitolo 3

#### Relazione tra proteomica e altre scienze post-genomiche

■ Introduzione	15
■ Disegni sperimentali	17
Bibliografia	18
Parte II La strada	
Bibliografia	6

### Capitolo 4

#### Preparazione del campione per l'analisi dell'espressione proteica

■ Introduzione	21
■ Campioni	21
■ Animali	21
■ Colture cellulari	22
■ Microdissezione tramite laser	24
■ Fluidi biologici	24
■ Piante	25
■ Batteri	25

■ Preparazione del campione proteico: strategia generale	25	■ Applicazioni della 2-DE in proteomica: limiti e prospettive	37
■ Lisi del campione	25	■ Ulteriori tecniche elettroforetiche	38
■ Solubilizzazione delle proteine	27	■ Metodi di rivelazione post-analisi	39
■ Inibizione delle proteasi	27	■ Coloranti organici	39
■ Rimozione dei contaminanti	27	■ Colorazione all'argento	40
■ Tecniche di precipitazione proteica	28	■ Colorazione inversa	40
■ Caso particolare di preparazione dell'estratto proteico per analisi DIGE	29	■ Coloranti fluorescenti	41
■ Linee generali di preparazione dei campioni per analisi LC-MS	29	■ Metodi di rivelazione di modifiche post-traduzionali	41
Bibliografia	31	■ Glicoproteine	42
		■ Fosfoproteine	42
		■ Recupero delle proteine da gel	43
		Bibliografia	44
		Approfondimenti	44

## Capitolo 5

### Analisi dell'espressione proteica mediante tecniche elettroforetiche

33

■ Introduzione	33
■ Materiali di supporto	34
■ Elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilamide in presenza di sodio dodecilossolfoato (1D SDS-PAGE): la nascita della proteomica	34
■ Applicazioni dell'SDS-PAGE alla proteomica	35
■ Isolettofocalizzazione (IEF)	36
■ Applicazioni della IEF alla proteomica	36
■ Elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilamide (2-DE)	37

## Capitolo 6

### Analisi dell'espressione proteica mediante tecniche cromatografiche

45

■ Introduzione	45
■ Approccio proteomico bottom-up	46
■ Metodi di identificazione delle proteine	48
■ Approccio proteomico middle-down	49
■ Metodi di digestione delle proteine nella proteomica middle-down	49
■ Approccio proteomico top-down	50
■ Separazioni multidimensionali	52

Quale approccio utilizzare?	53	Conclusione e sviluppi futuri	69
Bibliografia	54	Bibliografia	70

## Capitolo 7

### Programmi e siti web per l'identificazione delle proteine

Introduzione	57	Introduzione	71
Database di sequenze	59	Proteomica quantitativa basata su metodi di elettroforesi in gel di poliacrilamide (PAGE)	71
■ UniProtKB	59	Proteomica quantitativa basata su sistemi di cromatografia liquida a fase inversa, accoppiata ad analisi MS	72
■ NCBI nr protein database	61	Strategie di quantificazione relativa basata sulla marcatura con isotopi stabili	73
■ DB degli organelli	61	■ Marcatura mediante incorporazione enzimatica	73
Algoritmi per l'identificazione	61	■ Marcatura isotopica di polipeptidi mediante reazione chimica	73
■ Algoritmi per l'identificazione in PMF e PFF mediante database di sequenze di proteine	62	■ Incorporazione di isotopi stabili attraverso marcatura metabolica	75
■ Strumenti computazionali per l'analisi delle proteine intatte	66	Strategie di quantificazione relativa senza marcatura	76
Proteomica differenziale e quantitativa	66	Proteomica quantitativa mirata: SRM	77
■ MaxQuant	66	Strategie di quantificazione assoluta	78
■ Mascot Distiller	66	Strategie di quantificazione: quali e quando?	79
■ Skyline	66	Bibliografia	81
Algoritmi per il <i>de novo</i> sequencing	67		
■ PEAKS	67		
Archivi di dati di proteomica	67		
■ ProteomeXchange	68		
■ PRIDEInspector	68		
■ Massive proteomics repository	69		
■ PeptideAtlas (SpectraST)	69		
■ GPM (X!Hunter)	69		

## Capitolo 8

### Analisi quantitativa dell'espressione proteica

Introduzione	71	Introduzione	71
Proteomica quantitativa basata su metodi di elettroforesi in gel di poliacrilamide (PAGE)	71	Proteomica quantitativa basata su sistemi di cromatografia liquida a fase inversa, accoppiata ad analisi MS	72
Proteomica quantitativa basata su sistemi di cromatografia liquida a fase inversa, accoppiata ad analisi MS	72	Strategie di quantificazione relativa basata sulla marcatura con isotopi stabili	73
■ Marcatura mediante incorporazione enzimatica	73	■ Marcatura isotopica di polipeptidi mediante reazione chimica	73
■ Marcatura isotopica di polipeptidi mediante reazione chimica	73	■ Incorporazione di isotopi stabili attraverso marcatura metabolica	75
■ Incorporazione di isotopi stabili attraverso marcatura metabolica	75	Strategie di quantificazione relativa senza marcatura	76
Strategie di quantificazione relativa senza marcatura	76	Proteomica quantitativa mirata: SRM	77
Proteomica quantitativa mirata: SRM	77	Strategie di quantificazione assoluta	78
Strategie di quantificazione assoluta	78	Strategie di quantificazione: quali e quando?	79
Strategie di quantificazione: quali e quando?	79	Bibliografia	81
Bibliografia	81		

## Capitolo 9

<b>Statistica</b>	83
■ Introduzione	83
■ Tipi di variabili	83
■ Normalizzazione, equalizzazione e missing values	84
■ Probabilità e ipotesi nulla	85
■ Analizzare variabili categoriali	86
■ Statistica descrittiva	86
■ Power analysis: quanti campioni mi servono?	89
■ Analisi univariata di variabili numeriche	89
■ Analisi di correlazione	94
■ Analisi multivariata	95
■ Decision-making: qualche suggerimento utile	97
Bibliografia	98

### Parte III Tecniche

## Capitolo 10

<b>Elettroforesi bidimensionale</b>	101
■ Elettroforesi bidimensionale (2-DE)	101

■ Prima dimensione	101
■ Equilibratore	104
■ Seconda dimensione: SDS-PAGE	104
■ Differential gel electrophoresis (DIGE)	105
■ Standard interno	105
■ Disegno sperimentale	107
■ 2D-DIGE con marcatura minima	108
■ 2D-DIGE a saturazione	109
■ Colorazioni	110
■ Metodi di colorazione generali	110
■ Metodi di colorazione specifica	111
■ Analisi d'immagine	111
■ Acquisizione d'immagine	111
■ Analisi d'immagine mediante software	112
■ Analisi d'immagine per tecnologie multiplexing	114
■ Bibliografia	117

## Capitolo 11

<b>Altre tecniche eletroforetiche</b>	119
■ Elettroforesi in condizioni native	119
■ Elettroforesi blu nativa su gel di poliacrilamide (Blue-Native PAGE)	119
■ Clear Native PAGE (CN-PAGE)	120
■ Elettroforesi gel free	121
■ Elettroforesi capillare	122
■ Elettroforesi su acetato di cellulosa	123
■ Bibliografia	124

## Capitolo 12

### Cromatografia di peptidi e proteine

125

#### ■ Introduzione

125

#### ■ Principi generali di cromatografia liquida

125

#### ■ Parametri cromatografici

127

- Caratteristiche di un picco cromatografico 129
- Efficienza di una colonna cromatografica 129
- Parametri per la valutazione della qualità delle separazioni (fattore di capacità, selettività, risoluzione)
- Separazioni isocratiche e a gradiente

#### ■ Principali tecniche cromatografiche utilizzate per le proteine e i peptidi

132

- Cromatografia di ripartizione in fase inversa
- Cromatografia di ripartizione in fase normale
- Cromatografia a scambio ionico
- Cromatografia ad esclusione dimensionale (o gel filtrazione)
- Cromatografia di affinità

#### Bibliografia

135

## Capitolo 13

### Spettrometria di massa

137

#### ■ Introduzione

137

■ Spettrometro di massa	138
■ Sorgenti ioniche	140
■ Ionizzazione elettronica (EI, Electron Ionization)	140
■ Ionizzazione chimica (CI, Chemical Ionization)	141
■ MALDI	141
■ Termospray ed electrospray	144
■ Analizzatori	145
■ Analizzatori quadrupolari e a trappola ionica	147
■ Analizzatori a tempo di volo	147
■ Analizzatori accoppiati o tandem mass spectrometry	148
■ Rivelatori	148
■ Accoppiamento cromatografia liquida-spettrometria di massa	149
■ Cenni sull'interpretazione degli spettri di massa e massa/massa	150
■ Effetti isotopici	153
Bibliografia	154

## Capitolo 14

### Metodi quantitativi

155

■ Introduzione	155
■ Marcatura enzimatica con <sup>18</sup> O	155
■ Marcatura chimica	156
■ ICAT	156
■ Marcatura col dimetile	157
■ Marcature isobariche	158

Marcatura metabolica <i>in vivo</i>	159	Strategie di validazione della proteomica subcellulare	180
■ $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$	160		
■ SILAC	160	Bibliografia	181
■ SILAC spike-in, Super-SILAC e organismi SILAC	161		
Label-free	162		
■ Metodo label-free	162		
■ Quantificazione	162		
Proteomica quantitativa mirata	163	Capitolo 16	16
■ SRM e MRM	163		
■ DIA	165	Immunoprecipitazione	183
Bibliografia	167	Introduzione	183
		Tipi di immunoprecipitazione	185
		■ Co-immunoprecipitazione	185
		■ IP di proteine con tag	185
		■ Saggi pull-down	185

## Parte IV Ridurre la complessità

Capitolo 15			
Frazionamento subcellulare	171		
■ Introduzione	171		
■ Lisi delle cellule e omogeneizzazione dei tessuti	172		
■ Separazione delle frazioni subcellulari	172		
■ Proteomica delle proteine di membrana	173		
■ Proteomica degli organelli e dei compartimenti intracellulari	174		
■ Proteomica delle strutture cellulari: citoscheletro, centrosoma, fuso mitotico	177		
■ Proteomica dei sinaptosomi	179		
■ Proteomica degli esosomi	179		
		Criticità e possibili soluzioni	189
		■ Immunoprecipitazione per ridurre la complessità di un campione per la spettrometria di massa	189
		■ Immunoprecipitazione e arricchimento di vescicole extracellulari	190
		Bibliografia	191

## Capitolo

17

## Modifiche post-traduzionali

193

Introduzione

193

Glicosilazione

194

Fosforilazione

196

Nitrazione

198

Carbonilazione

201

Bibliografia

202

Parte V  
Systems Biology

## Capitolo

18

## Reti di proteine e meta-analisi

207

Introduzione

207

Elementi di topologia dei grafi

207

Costruzione di una rete di proteine (grafo non direzionale)

208

Validazione statistica di una rete di proteine

209

Analisi di sovrarappresentazione

209

Analisi gerarchica di dati proteomici (grafi direzionali)

209

Meta-analisi

Tool bioinformatici per la meta-analisi

211

## Bibliografia

212

## Capitolo 19

## Classificazione ontologica e di pathway

213

Introduzione

213

Gene ontology

213

Caratteristiche principali dei termini GO

214

Processo biologico

214

Funzione molecolare

214

Componente cellulare

214

Struttura di GO

214

Tipi di annotazioni in GO

215

Navigazione nelle ontologie: Quick GO e altri browser GO

217

Subset di GO: GO slim

217

Classificazioni ontologiche e di pathway: applicazioni specifiche

217

Rappresentazione differenziale (arricchimento/deplezione) di termini GO

219

Classificazione di pathway

221

Pathway metabolici e di segnalazione

221

## Bibliografia

223

## Capitolo 20

### Strumenti web-based disponibili per la creazione e l'analisi delle reti

■ Introduzione	225
■ Strategie per la creazione di reti di proteine	226
■ Strumenti web-based per la creazione di reti di proteine	228
■ Network enrichment	230
■ Cytoscape: costruzione, visualizzazione e analisi di reti	231
■ Analisi delle reti attraverso le applicazioni di Cytoscape (Apps)	233
■ Alternative a Cytoscape per la costruzione e l'analisi delle reti di proteine	234
Bibliografia	234

### Parte VI Oltre la proteomica

## Capitolo 21

### Una mappa topografica delle proteine: introduzione al MALDI-MS imaging

■ Introduzione	239
■ Strumentazione	240
■ Preparazione del campione	242
■ Manipolazione dei campioni: incorporamento, sezionamento e lavaggi	242
■ Digestione <i>in situ</i>	244
■ Deposizione della matrice	244
■ Colorazioni	246
■ Elaborazione dei dati	246
■ Pre-processamento degli spettri	246
■ Analisi statistica	247
■ Applicazioni	248
■ Limiti e prospettive future	251
■ Impronta digitale: MALDI profiling	255
■ MALDI-TOF MS: una visione di insieme	255
■ Identificazione e quantificazione mediante MALDI-TOF MS	257
■ MALDI-TOF MS in proteomica clinica	258
■ Analisi di fluidi biologici	258
■ Applicazioni in microbiologia	260
Bibliografia	261

## Capitolo

## 23

Impronta biochimica:  
metabolomica

263

## Introduzione

263

## Background storico

263

## Workflow

264

## Metabolomica “untargeted”

265

■ Preparazione del campione e metodi di indagine	266
■ Analisi dei dati	267
■ Metabolomica “targeted”: un esempio di applicazione clinica, screening neonatale di malattie metaboliche ereditarie	268
■ Conclusioni	272
Bibliografia	273
Indice analitico	275



# Capitolo 16

## Immunoprecipitazione

Laura Giusti, Federica Ciregia e Antonio Lucacchini

### Introduzione

L'**immunoprecipitazione (IP)** è una metodologia tra le più usate per individuare un antigene e facilitare la sua purificazione. Il principio su cui si basa è veramente semplice e intuitivo: un anticorpo (monoclonale o policlonale) diretto contro una porzione specifica della proteina bersaglio forma un immunocomplesso con quest'ultima in un campione quale un lisato cellulare. Molti anticorpi policlonali (ma non i monoclonali che riconoscono un solo epitopo), hanno la capacità di far precipitare un antigene in soluzione tramite formazione di un reticolo macromolecolare. Questo avviene quando si raggiunge l'equivalenza come rappresentato in [Figura 16.1](#). In realtà le tecniche di IP lavorano quasi sempre in eccesso di anticorpo e gli immunocompleSSI vengono precipitati aggiungendo una componente insolubile in grado di legare gli stessi immunocompleSSI.

Nel metodo classico o tradizionale ([Figura 16.2](#)) l'immunocomplesso è quindi catturato o immunoprecipitato tramite l'aggiunta di una proteina (come proteina A o G) legata a un supporto (ad es. resina di agarosio) in grado di riconoscere la regione costante (Fc) dell'anticorpo dell'immunocomplesso. La resina e il campione sono centrifugati per precipitare l'immunocomplesso, il sovraccarico scartato e la resina con legato l'immunocomplesso lavata più volte e centrifugata al fine di rimuovere le proteine non legate.

Per applicazioni con rese elevate, vengono preferite come supporti sfere magnetiche con immobilizzata la

proteina A o G, al fine di facilitare la separazione dell'immunocomplesso dal resto del campione. Per dissociare il complesso, si usano opportuni tamponi denaturanti (*Laemmli Sample Buffer*, cioè 60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% sodio dodecilsolfato, 10% glicerolo, 5%  $\beta$ -mercaptoetanolo, 0.01% blu di bromofenolo) oppure tamponi con bassi valori di pH. Le proteine rilasciate sono solitamente analizzate tramite elettroforesi SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) monodimensionale o bidimensionale seguita da spettrometria di massa o analisi di Western blot. Nel metodo tradizionale, nella fase finale, sia l'anticorpo sia la proteina bersaglio, indipendentemente dall'ordine di aggiunta nella reazione, vengono rilasciati dopo separazione dell'immunocomplesso e sono quindi presenti nel campione da analizzare. Questo fatto può determinare un problema nell'analisi 1D o 2-DE della proteina bersaglio soprattutto quando il suo peso molecolare si avvicina a quello delle catene anticorpali (pesante e leggera). Per questo motivo sono stati introdotti metodi alternativi che prevedono il crosslinking dell'anticorpo alla proteina A o G che a sua volta è immobilizzata sul supporto (resina o sfere magnetiche o altro) oppure il legame diretto dell'anticorpo sul supporto opportunamente attivato a creare una resina di immunoaffinità.

Queste ultime strategie, che definiremo **metodo di immobilizzazione** ([Figura 16.3](#)), sono particolarmente utili nello studio delle interazioni proteina-proteina e quindi nella tecnica della co-immunoprecipitazione (Co-IP) che usa il complesso antigene-anticorpo per

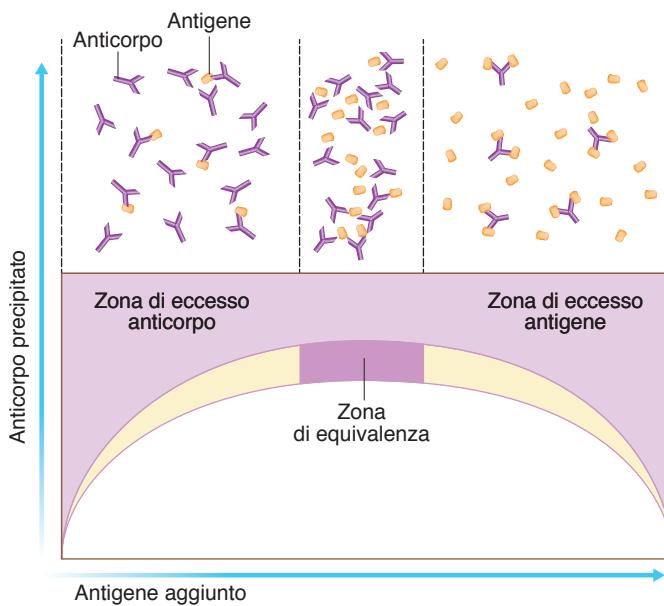


FIGURA 16.1 Principio dell'immunoprecipitazione.

isolare proteine sconosciute in grado di legare l'antigene. Questa variante dell'IP è particolarmente usata per verificare interazioni ligando-recettore ed enzima-substrato o ancora per identificare un complesso multiproteico. Il vantaggio di utilizzare il metodo di immobilizzazione dell'anticorpo supera il problema della presenza di catene leggere e pesanti di immunoglobuline che

potrebbero ostacolare l'identificazione dell'antigene (IP) o delle proteine interagenti non note (Co-IP).

Sia il metodo tradizionale sia il metodo di immobilizzazione hanno sostituito i primi metodi di IP, che implicavano una marcatura diretta della proteina totale mediante precursori radioattivi come gli aminoacidi aggiunti al mezzo di cellule in coltura. Le cellule venivano successivamente lisate e l'antigene purificato dalla miscela utilizzando un anticorpo specifico immobilizzato su un supporto. Gli antigeni purificati venivano poi visualizzati tramite SDS-PAGE seguita da esposizione del gel a pellicola autoradiografica.

Problematiche legate all'utilizzo del radioattivo (quali la sicurezza, normative e costi) e l'avvento di substrati chemiluminescenti in grado di uguagliare la sensibilità delle tecniche radioattive hanno portato a sostituire il metodo radioimmunologico con i metodi non isotopici.

L'IP è utilizzata come metodo di elezione per isolare piccole quantità di antigene o proteine bersaglio da campioni complessi come lisati cellulari, siero e omoogenati tissutali. L'IP può essere usata per molti scopi:

- identificare e studiare la struttura, l'espressione e l'attivazione della singola proteina;
- determinare modificazioni post-traduzionali e ligandi che interagiscono con essa;
- determinare il peso molecolare e il punto isoelettrico della proteina immunoprecipitata attraverso analisi monodimensionale o bidimensionale;

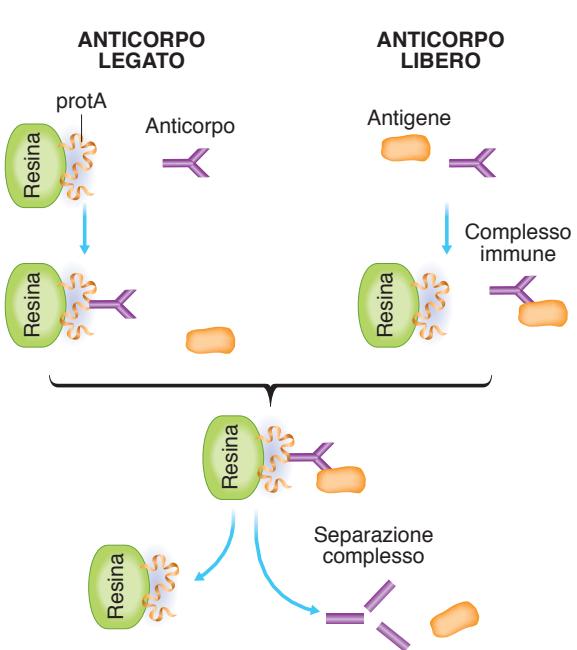
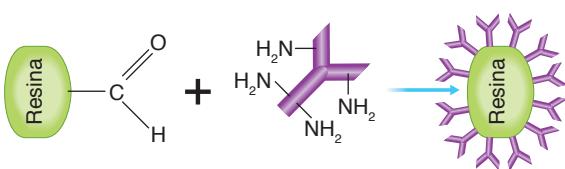


FIGURA 16.2 Immunoprecipitazione: metodo tradizionale.



**FIGURA 16.3** Immunoprecipitazione: metodo di immobilizzazione.

- verificare che un antigene di interesse sia sintetizzato da un tessuto specifico (ad es. la proteina di interesse radiomarcata può essere identificata in un tessuto o cellule con precursori radiomarcati).

Gli anticorpi usati possono essere monoclonali o polyclonali e possono riconoscere l'intera proteina di interesse, una particolare modifica post-tradizionale, o un epitopo (*tag*) [4].

## Tipi di immunoprecipitazione

## ■ Co-immunoprecipitazione

Saggi di Co-IP sono molto simili agli IP poiché la tecnica di base utilizza un anticorpo immobilizzato specifico per un antigene di interesse, ma mentre lo scopo di un IP è di purificare un unico antigene, una co-IP è progettata per isolare l'antigene con eventuali proteine o ligandi che sono associati ad esso. In tali circostanze l'antigene noto è denominato "proteina esca", e le proteine che interagiscono con essa sono chiamate "prede". Queste proteine possono essere proteine partner in complessi, molecole di segnale, proteine strutturali, cofattori, ecc., e la forza dell'interazione può variare da transitoria a molto stabile. Il protocollo della Co-IP di base è lo stesso di quello descritto per IP, e ogni sistema progettato per IP dovrebbe funzionare anche per Co-IP. Tuttavia, ci sono altri fattori da considerare come l'ottimizzazione delle condizioni di legame e di lavaggio, che devono tenere conto degli effetti sulle interazioni esca-preda, nonché su quelle tra l'anticorpo e l'esca.

## ■ IP di proteine con tag

Il primo limite di un saggio di IP è la sua dipendenza dalla disponibilità di anticorpi capaci di riconoscere la proteina bersaglio e di dare un'interazione bassa o nulla con altre proteine. Molti proteine non possono

quindi essere immunoprecipitate a causa della mancanza di un anticorpo. Per superare questo problema, alle proteine può essere legato un **tag** (piccole sequenze di peptidi o proteine fluorescenti), come ad esempio:

- flag (sequenza del peptide DYKDDDDK);
  - c-Myc (sequenza del peptide EQKLISEEDL);
  - emoagglutinina (sequenza del peptide YPYDVP-DYA);
  - proteina fluorescente verde (GFP, Green Fluorescent Protein).

Utilizzando anticorpi specifici che riconoscono queste sequenze, legate covalentemente a supporti insolubili, è possibile immunoprecipitare le proteine con *tag* in modo specifico. Dopo lavaggio per rimuovere le proteine aspecifiche, le proteine che hanno interagito possono essere eluite per aggiunta di un eccesso dello stesso peptide *tag*. Tutti i *tag*, tuttavia, possono potenzialmente influenzare la struttura delle proteine, con conseguente alterazione sia della funzione della proteina che dell'associazione con i partner di legame. Per contrastare questo problema è importante valutare la posizione del *tag*, cioè, carbossi o N terminale. Al contrario, la Co-IP di proteine endogene evita molti problemi associati con l'uso di *tag*. Tuttavia, questa strategia si basa sulla disponibilità di un anticorpo specifico e ad alta affinità in grado di isolare la proteina esca endogena in modo efficiente. Come accennato l'affinità e la specificità dell'anticorpo vanno sempre controllati con attenzione.

## ■ Saggi pull-down

Un **saggio di pull-down** è concettualmente simile a un Co-IP perché viene eseguito per studiare proteine o ligandi che si legano a una proteina esca nota. Il test viene eseguito sia per dimostrare un'interazione ipotetica tra due proteine sia per scoprire nuovi interattori di una proteina di interesse. Il pull-down differisce da IP o Co-IP in quanto non si basa su una interazione anticorpo-antigene e non è quindi un immuno-dosaggio. La proteina esca (o ligando) è adsorbita sul supporto solido, non sulla base di una interazione di affinità antigene-anticorpo, ma mediante attacco covalente ad un supporto attivato o tramite un *tag* di affinità che si lega ad una molecola recettore sul supporto.

Ad esempio, la resina IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) può essere utilizzata per eseguire saggi di precipitazione con proteine esca con

un *tag* di istidina. Un'altra applicazione pull-down è quella riportata in **Figura 16.4** in cui viene sfruttata l'elevata affinità di legame tra streptavidina e biotina. Su una resina di agarosio è immobilizzata streptavidina e la proteina esca è biotinilata. L'ottimizzazione dei saggi di pull-down richiede la considerazione delle peculiari caratteristiche di affinità utilizzate.

## Fattori che influenzano l'immunoprecipitazione

L'IP è una metodologia semplice, ma le variabili e i fattori che influenzano la riuscita di ogni specifico esperimento sono numerose e peculiari, così come le differenze specifiche tra le diverse proteine e i differenti anticorpi primari. Diventa necessario trovare le condizioni ottimali per riuscire ad isolare con suc-

so adeguate quantità di una proteina purificata. Una serie di fattori e variabili in grado di influenzare un saggio di IP sono: la metodica (su colonna o in soluzione); la separazione legato-libero (gravità, centrifugazione); il tipo di supporto; l'immobilizzazione dell'anticorpo; l'immobilizzazione dell'esca; l'ordine di aggiunta dei componenti; il pre-clearing del lisato; il tampone di legame; il tampone di lavaggio; il tampone di eluizione.

### Metodica e separazione legato/libero

L'IP può essere condotta semplicemente mescolando i componenti della reazione in una provetta per microcentrifuga, a cui seguiranno più passaggi in cui l'immunocomplesso sarà separato dalla soluzione contenente il campione e successivamente lavato per rimuovere ligandi aspecifici tramite risospensione e

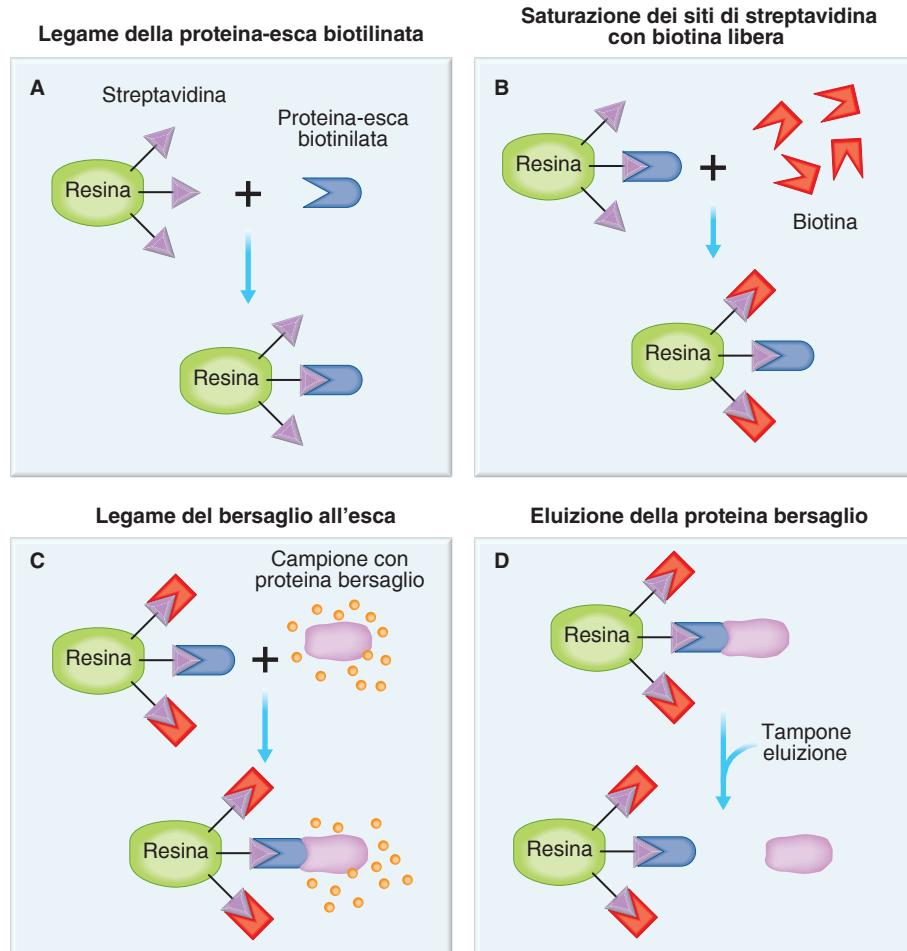


FIGURA 16.4 Saggio pull-down.

successiva centrifugazione. Un metodo alternativo è quello in cui la resina è impaccata in una colonna di vetro o plastica. Possiamo avere colonne su piccola, media e grande scala (volumi > di 10 mL). Di solito su sistemi in colonna a media e grande scala l'interazione del campione con la resina è garantito facendo passare il campione nella colonna per gravità, su piccola scala è richiesta la centrifugazione dal momento che pochi microlitri di soluzione non fluiranno attraverso un filtro per sola gravità. Le fasi successive di separazione, lavaggio ed eluizione vengono sempre condotte per gravità o centrifugazione. L'uso di colonne di rotazione ha un netto vantaggio rispetto sia a colonne per gravità che a metodi in soluzione, perché quasi tutta la soluzione residua può essere filtrata, permettendo separazione delle fasi solide e acquose. Le colonne che sfruttano la gravità richiedono un monitoraggio costante per assicurarsi che la resina non vada a secco e non si formino bolle d'aria. Inoltre l'antigene viene eluito in più frazioni, ognuna delle quali deve essere monitorata per saggierne la presenza. Le frazioni contenenti l'antigene sono normalmente unite insieme e questo porta necessariamente ad un incremento del volume (diluizione) che finirà per essere maggiore di quello del campione di partenza e ciò potrebbe richiedere ulteriori passaggi di concentrazione. Uno svantaggio del metodo in soluzione è che nel precipitato di resina rimane un volume significativo di soluzione che non può essere rimosso facilmente, quindi sono richiesti lavaggi supplementari ed eluizioni per ottenere una buona purezza e resa.

## ■ Tipi di supporto

L'**agarosio** è sicuramente il tipo di resina più utilizzata nelle applicazioni di IP. Questo supporto è versatile e facile da usare, in più può essere modificato in seguito ad attivazione o accoppiamento con un ligando appropriato.

La resina è duratura e robusta, in grado di resistere a forze centrifughe di 5000 x g, a pressioni di 100 psi (a seconda del reticolo) e a temperature fino a 120 °C, senza subire una perdita significativa di struttura o di portata di flusso. L'agarosio presenta un basso legame aspecifico, anche in presenza di campioni complessi, ed è resistente a concentrazioni medie della maggior parte dei detergenti, ai sali, a molti solventi organici o a valori estremi di pH.

Alternative all'agarosio sono l'**acrilamide/bis-acrilamide**, buone per la loro stabilità chimica, resistenza

all'attacco microbico e basso legame aspecifico, ma con alcuni svantaggi quali una bassa portata, una minore stabilità meccanica e una tendenza a ridursi o a gonfiarsi in alcuni tamponi e solventi. Ultimamente si stanno diffondendo le sfere magnetiche perché offrono una facile separazione da banco, senza centrifuga, e risultano in una resa elevata. Diversamente dall'agarosio sono particelle sferiche e il legame dell'anticorpo è limitato alla superficie di ciascuna particella. Non hanno il vantaggio come l'agarosio di avere pori capaci di aumentare la superficie di legame ma sono decisamente più piccole (da 1 a 4 µm contro i 50-150 µm dell'agarosio), garantendo così un adeguato rapporto area/volume per un ottimo legame dell'anticorpo. La separazione magnetica evita la centrifugazione che potrebbe causare perdite di proteina là dove le interazioni proteina-anticorpo sono piuttosto deboli [8].

## ■ Strategie di immobilizzazione degli anticorpi

La proteina A e la proteina G sono le proteine capaci di legare le immunoglobuline più utilizzate nei saggi di IP e Co-IP. Proteina A e G mostrano un'alta specificità per la regione Fc delle catene pesanti degli anticorpi, questo fa sì che l'anticorpo immobilizzato sulla proteina A o G o una loro miscela (A/G) orienti in modo efficace la regione che riconosce l'antigene verso l'esterno, facilitandone il legame. Solitamente queste proteine sono immobilizzate sul supporto di agarosio o su sfere magnetiche o altro. Talvolta il campione da analizzare contiene immunoglobuline non specifiche, è ad esempio il caso del siero, che possono competere nel legame con la proteina A/G con l'anticorpo specifico. In questi casi, l'immobilizzazione dell'anticorpo specifico è preferita. Questa immobilizzazione può essere diretta sul supporto tramite legame covalente dopo attivazione della resina: questo legame si forma tra i gruppi aldeidici attivati della resina e i gruppi aminici dell'anticorpo (Figura 16.3). In alternativa l'anticorpo può legare la proteina A/G già a sua volta immobilizzata sulla resina alla quale sono legati dei cross-linker formati da corte catene di atomi di carbonio con gruppi esterei attivi (N-idrosuccinimide) in grado di reagire con le amine primarie dei residui di lisina dell'anticorpo a formare un legame amidico. Dal momento che gli anticorpi contengono numerosi gruppi aminici non limitati alla regione Fc è molto importante trovare le condizioni ottimali di concentrazione del cross-

linker. Con questo metodo la resina può essere utilizzata più volte.

### ■ Ordine di aggiunta dei componenti

Nell'IP condotta sui supporti convenzionali quali proteina A e G possono essere utilizzati essenzialmente tre differenti approcci nell'aggiunta delle componenti la reazione. Nel primo approccio l'anticorpo viene dapprima incubato con il campione contenente le proteine per permettere così l'interazione con l'antigene, segue l'aggiunta del supporto per legare l'anticorpo e precipitare il complesso. Questa opzione è quella capace di dare le più alte rese di antigene. Un secondo approccio prevede il legame dell'anticorpo al supporto e successivamente l'incubazione con il campione contenente l'antigene. Questa procedura porta a rese e purezza di poco inferiori al metodo precedente (Figura 16.2). Infine, un terzo approccio prevede che le tre componenti della reazione IP e cioè campione, anticorpo e supporto vengano incubate contemporaneamente, in questo caso la rapidità del metodo è a scapito delle rese di antigene e della purezza, che risultano più basse. In tutti e tre i casi l'anticorpo è eluito con l'antigene. Nel caso in cui si scelga di immobilizzare l'anticorpo al supporto sia covalentemente che tramite un cross-linker l'approccio metodologico nell'ordine di aggiunta è il secondo descritto, con il grosso vantaggio di avere l'eluizione dell'antigene senza contaminazione dell'anticorpo che compensa lo svantaggio della resa seppure di poco inferiore rispetto al primo metodo.

### ■ Pre-clearing e controllo

Questa procedura opzionale può essere introdotta prima delle diverse fasi dell'IP, per ridurre il legame aspecifico di componenti del campione. Infatti spesso i lisati o gli estratti tissutali si presentano come complesse miscele di carboidrati, lipidi, acidi nucleici oltre che di proteine che potrebbero legare in modo aspecifico l'anticorpo, la proteina A/G o lo stesso supporto, interferendo con la rilevazione dell'antigene di interesse immunoprecipitato. Solitamente il campione viene incubato con il supporto, così da eliminare componenti che possono interagire con questo in modo aspecifico. Dopo questa fase di pulizia il campione viene immunoprecipitato seguendo i normali passaggi. Se il campione viene incubato oltre che

con il supporto, anche in presenza di un'immunoglobulina non specifica, otterremo dei controlli negativi. Infatti tutti i prodotti ottenuti da questi campioni di controllo possono essere considerati risultato di legami aspecifici.

### ■ Scelta dei tamponi

#### TAMPONE DI LISI

Importante e critica è la scelta del tampone di lisi utilizzato per sospendere il campione che verrà immunoprecipitato, esso dovrà infatti amplificare il rilascio di proteine dalle cellule e tessuti garantendo un buon grado di solubilizzazione della proteina di interesse, inibire l'attività enzimatica e minimizzare la denaturazione del sito di legame dell'anticorpo.

Tra i tamponi di lisi più utilizzati ricordiamo: **tamponi non denaturanti, tamponi denaturanti e tamponi senza detergente**. Tamponi non denaturanti contengono generalmente un detergente di natura non-ionica quale NP-40 o Triton X100. Questo tipo di tampone viene di solito utilizzato quando l'antigene da immunoprecipitare è solubile nel detergente e quando l'anticorpo riconosce la forma nativa della proteina. I tamponi denaturanti sono decisamente tamponi più stringenti a causa dell'aggiunta di detergenti ionici quali SDS o il sodio desossicolato, in presenza di NaCl e Tris-HCl con valori di pH debolmente basici (da 7.4 a 8). Questi tamponi non mantengono la conformazione nativa della proteina, ma vengono utilizzati per estrarre proteine difficili da solubilizzare come le proteine nucleari. Infine, tamponi senza detergenti sono utilizzati per quelle proteine che vengono rilasciate tramite omogeneizzazione meccanica o calore, di solito si tratta di tamponi fosfato con aggiunta di EDTA.

In tutti i casi è importante minimizzare l'azione delle proteasi e delle fosfatasi, che vengono rilasciate durante la lisi cellulare e che potrebbero degradare le proteine di interesse. Per questa ragione, oltre a lavorare a temperature di 4 °C, è importante aggiungere al tampone di lisi inibitori delle proteasi, quali PMSF, aprotinina e leupeptina, oltre a inibitori di fosfatasi, quali sodio ortovanadato o sodio fluoruro.

#### TAMPONE DI LEGAME

Nell'IP tradizionale la scelta di un tampone ottimale riguarderà sia il legame tra proteina A/G e anticorpo sia il legame tra antigene e anticorpo. Nel caso di una

IP con anticorpo immobilizzato, la scelta del tampone ottimale riguarderà il legame tra la proteina e il proprio sito di riconoscimento sull'anticorpo. Solitamente le interazioni antigene-anticorpo sono abbastanza robuste e si realizzano in condizioni di pH neutro con tamponi fosfato o Tris.

### TAMPONE DI LAVAGGIO

Nell'IP il tampone di lavaggio deve avere il compito di preservare le interazioni desiderate tra proteina specifica e anticorpo ma di prevenire e rimuovere le interazioni di proteine aspecifiche. Lo stesso agarosio, essendo un carboidrato, può dare interazioni aspecifiche legando proteine o altre componenti cellulari. Solitamente si parte da un **tampone fosfato (PBS, Phosphate Buffered Saline)** o **Tris (TBS, Tris-HCl Buffered Saline)**, che ha una concentrazione di sali e valori di pH fisiologici, a cui è aggiunta una bassa concentrazione di detergente (tra 0.5-1%) NP-40, Triton X-100, CHAPS o altri detergenti blandi. Se ci troviamo in presenza di interazioni aspecifiche persistenti, la stringenza del tampone può essere aumentata con l'aggiunta di concentrazioni maggiori di sali, quali NaCl da 0.5 a 1 M a ridurre le interazioni ioniche ed elettrostatiche, purché il legame tra proteina bersaglio e anticorpo sia abbastanza forte. Talvolta possono essere aggiunte basse concentrazioni di agenti riducenti quali  $\beta$ -mercaptoetanolo o ditiotriolo (DTT) (da 1 a 2 mM), che possono aiutare a disstruggere interazioni non specifiche dovute alla presenza di ponti disolfuro.

### TAMPONE DI ELUIZIONE

Nell'IP tradizionale il tampone utilizzato per dissociare l'immunocomplesso è un tampone con azione denaturante (per la presenza di SDS) e riducente (per la presenza di  $\beta$ -mercaptoetanolo) (*Laemmli Sample Buffer*, cioè 60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% sodio-dodecilsolfato, 10% glicerolo, 5%  $\beta$ -mercaptoetanolo, 0.01% blu di bromofenolo). Questo tampone è molto efficace nel rompere le interazioni di affinità antigene anticorpo, ma anche anticorpo e proteina A/G (quando non sono legate covalentemente). Un altro tampone di eluizione molto efficace, non denaturante, è la glicina 0.1 M a pH 2.3. Il basso valore di pH dissocia molte interazioni antigene-anticorpo.

Nei saggi pull down l'eluizione richiede specifiche condizioni, come ad esempio l'aggiunta di un tampone che contenga un eccesso del tag a cui la proteina è legata.

## Criticità e possibili soluzioni

Le principali criticità legate alla metodologia dell'immunoprecipitazione sono le seguenti.

- *Specificità e affinità dell'anticorpo.* Disponibilità di un anticorpo per la proteina da immunoprecipitare ad alta specificità e affinità. Prestare molta attenzione nella scelta dell'anticorpo (omologia con altre proteine nella regione di riconoscimento dell'anticorpo e rischio di interazione).
- *Pre-clearing.* L'introduzione di questo passaggio riduce il livello di proteine che si legano in modo aspecifico ma può anche essere che le proteine di interesse abbiano un'alta affinità per la resina o siano poco abbondanti nel campione e per questi motivi possano andare perdute durante il trattamento di pre-clearing. È sempre meglio analizzare l'eluato ottenuto da questa fase.
- *Controllo.* I controlli devono essere fatti in parallelo con il campione, nelle stesse condizioni. Nel campione di controllo sarà presente il supporto e un anticorpo di controllo, naturalmente differente da quello che riconosce la proteina di interesse.
- *Stringenza dei lavaggi.* I vari passaggi di lavaggio, che sono in comune a tutti i protocolli di IP, sono determinanti nell'identificazione finale della proteina. L'utilizzo di un alto numero di lavaggi con alte concentrazioni di sali (>150 mM) aumenta la possibilità di perdere proteine che hanno deboli interazioni come di dissociare gli immunocomplessi. Il modo migliore è quello di procedere con più lavaggi, utilizzando tamponi a basse concentrazioni di sali, usando tempi brevi di incubazione (30 minuti) e preferibilmente a 4 °C.

## Immunoprecipitazione per ridurre la complessità di un campione per la spettrometria di massa

L'IP si presenta come una metodologia vantaggiosa per arricchire il campione con le proteine che vogliamo studiare. Il pre-trattamento di un campione è un passaggio critico nell'analisi di proteine presenti in una miscela complessa, come campioni cellulari e tessutali. Per questo motivo, si rende necessario sviluppare e ottimizzare metodologie analitiche.

che efficaci in grado di rimuovere con efficienza interferenti, aumentando la specificità e la selettività e anche in grado di contribuire alla pre-concentrazione delle proteine di interesse. L'IP costituisce la base di tutte le strategie usate per la ricerca di proteine grazie alla sua elevata sensibilità, infatti è in grado di individuare fino a 100 pg di proteina immuno-marcata. Un'altra potenzialità dell'IP è quella di individuare proteine bersaglio a prescindere da altre macromolecole che interagiscono con loro. Nell'ambito dell'analisi proteomica l'IP, ottenuta utilizzando sfere magnetiche, è un mezzo efficace che permette l'isolamento e di conseguenza la pre-concentrazione della proteina. Ciò permette di raggiungere i livelli di concentrazione richiesti per la spettrometria di massa, che ne determinerà la caratterizzazione. Questo aspetto è sicuramente importante quando si vogliono studiare le modificazioni post-traduzionali in cui è necessariamente richiesta una concentrazione della proteine modificate per la loro individuazione in spettrometria di massa [7]. In particolare le tecniche di spettrometria di massa possono essere utilizzate per individuare i peptidi modificati in un campione dopo digestione con enzimi proteolitici (ad es. tripsina). Tuttavia, i peptidi modificati sono spesso presenti a bassissima concentrazione, ed è quindi assolutamente indispensabile la IP (vedi anche Capitolo 17).

La combinazione delle tecniche di purificazione per affinità (pull-down) con la spettrometria di massa è stata ampiamente sviluppata quale metodo altamente sensibile e sicuro, per identificare partner di interazione proteica e caratterizzare la dinamica di complessi proteici in condizioni diverse [1, 2, 6]. L'elevata sensibilità della spettrometria di massa aumenta il numero totale di proteine identificate in ciascun esperimento pull-down. Tuttavia, la maggior parte di queste proteine è rappresentata generalmente da contaminanti, ad esempio proteine che si legano non specificamente alla matrice di affinità e/o all'anticorpo. In alcuni casi, i contaminanti possono rappresentare più dell'80% del numero totale di proteine identificate.

Quindi la maggior sfida negli esperimenti di IP (tradizionale, o basato su utilizzo di *tag*) e di purificazione per affinità (pull-down) consiste proprio nel riuscire a discriminare in modo affidabile tra proteine e partner di interazione reali e contaminanti non specifici.

Al fine di ottimizzare il protocollo possono essere seguiti diversi approcci, che comprendono la scelta del *tag* o anticorpo, la coniugazione di anticorpi a matrici di affinità, l'IP di specifici complessi proteici. Quando l'IP è combinato a MS, è fondamentale co-niugare in modo covalente l'anticorpo al supporto per evitare che una grande quantità di questo possa essere eluita insieme con i complessi proteici specifici, dato che generalmente l'anticorpo si trova in eccesso rispetto alle proteine da legare.

## ■ Proteomica funzionale e immunoprecipitazione

La proteomica funzionale è capace di descrivere proteine individuali appartenenti a complessi multiproteici coinvolti in specifiche funzioni cellulari. Lo sviluppo di metodologie di pre-frazionamento, per separare singole proteine appartenenti a complessi funzionali preservandone le interazioni native, rappresenta quindi un mezzo essenziale per il futuro della proteomica funzionale [5].

Come già accennato nei precedenti paragrafi, l'isolamento di interi complessi multiproteici può essere ottenuto attraverso approcci basati su affinità (tra questi la tecnica pull-down), in cui ligandi specifici sono usati per legare la proteina di interesse e le proteine che con lei interagiscono, o in alternativa su strategie di IP, finalizzate alla proteina endogena o alla produzione in situ di una versione con *tag* di questa proteina, sfruttando il vantaggio della disponibilità di diversi anticorpi anti-*tag* dotati di alta efficienza di legame. Le componenti proteiche isolate (legate all'esca in modo specifico) sono eluite, separate su SDS-PAGE ed identificate tramite LC-MS/MS.

## ■ Immunoprecipitazione e arricchimento di vescicole extracellulari

Le **vescicole extracellulari** (EV, Extracellular Vesicle) appaiono una grande promessa nel consentire lo sviluppo di test diagnostici clinici non invasivi basati sul sangue, con capacità predittiva e di monitoraggio dell'efficacia dei programmi terapeutici e l'identificazione di nuovi bersagli farmacologici nell'ambito di patologie tumorali e neurodegenerative. Le EV sono particelle sferiche con diametri submicrometrici che

si staccano dalle superficie cellulare (**ectosomi**) o sono secrete dalla cellula dopo la formazione all'interno di corpi multivescolari citoplasmatici (**esosomi**).

La IP, utilizzando particelle magnetiche rivestite di anticorpi in grado di legarsi alla superficie delle EV (sfruttando la presenza di proteine marker come le tetraspanine CD9, CD63 e CD81) produce prepara-

zioni di EV da utilizzare in proteomica *shotgun* con purezza nettamente superiore a quella ottenibile utilizzando le procedure di ultracentrifugazione o precipitazione chimica [3]. La tecnica può essere facilmente utilizzata direttamente con campioni di plasma o di siero. Tutto ciò potrebbe portare ad un miglioramento in accuratezza e sensibilità dei dati delle proteine delle EV.

## Bibliografia

1. Collins MO, Choudhary JS. Mapping multiprotein complexes by affinity purification and mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19:324-30.
2. Gingras AC, Gstaiger M, Raught B, Aebersold R. Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:645-54.
3. Heinzelman P, Powers DN, Wohlschlegel JA, John V. Shotgun Proteomic Profiling of Bloodborne Nanoscale Extracellular Vesicles. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:403-416.
4. Kaboord B, Perr M. Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol.* 2008;424:349-64.
5. Monti M, Cozzolino M, Cozzolino F, Vitiello G, Tedesco R, Flagiello A, Pucci P. Puzzle of protein complexes in vivo: a present and future challenge for functional proteomics. *Expert Rev Proteomics.* 2009;6:159-69.
6. Oeljeklaus S, Meyer HE, Warscheid B. New dimensions in the study of protein complexes using quantitative mass spectrometry. *FEBS Lett.* 2009;583:1674-83.
7. ten Have S, Boulon S, Ahmad Y, Lamond AI. Mass spectrometry-based immuno-precipitation proteomics - the user's guide. *Proteomics.* 2011;11:1153-9.
8. Vila AM, de Arrilucea PR, Peláez EC, Gago-Martínez A. Development of a new magnetic beads-based immunoprecipitation strategy for proteomics analysis. *J Proteomics.* 2010 16;73:1491-501.

T. Alberio • M. Fasano • P. Roncada

# Proteomica

Accedi ai contenuti digitali ➤ Espandi le tue risorse ➤ con un libro che **non pesa** e si **adatta** alle dimensioni del tuo **lettore**



All'interno del volume il **codice personale** e le istruzioni per accedere ai contenuti digitali.  
L'accesso alle risorse digitali è **gratuito** ma limitato a **18 mesi dalla attivazione del servizio**.



€ 26,00

