

La Proteomica e sue applicazioni in Microbiologia



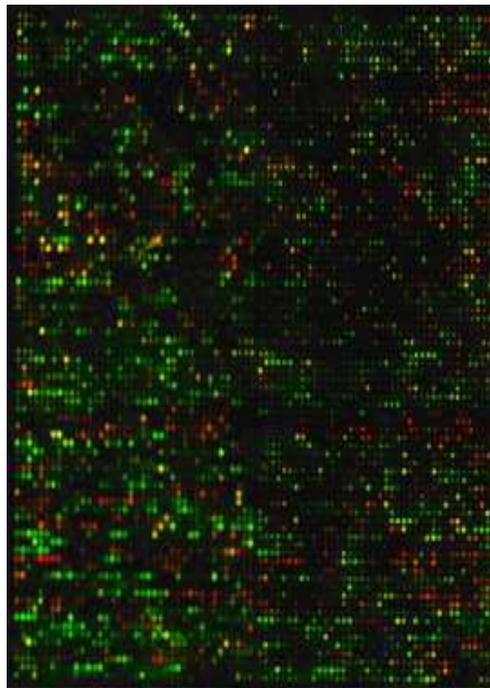
M.FAVARATO
ULSS 13 MIRANO (VE)
Pordenone 05 maggio 2012

Dal gene alla proteina

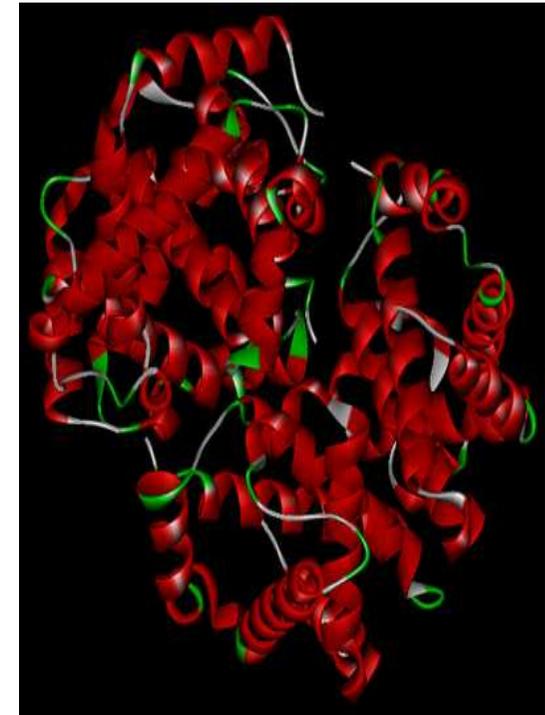
Sequenza nucleotidica

```
taggattccggaatttcgatttac  
ggattagccattaggaaccatt  
aggacttaggacatggactgacg  
gattaaagaccataggagatcca  
gattgacccatgattagagatgta  
gacagatgatggaccctggaga  
gtggattggatggtaggataccca  
ggatggacatgagtagacatgat  
gatacgaatgatagatgatgacca  
ccacgagggattatttatagattag  
gatagagatgagattaggatgg  
ataccaggtaggatgatt-
```

Espressione genica



Struttura terziaria



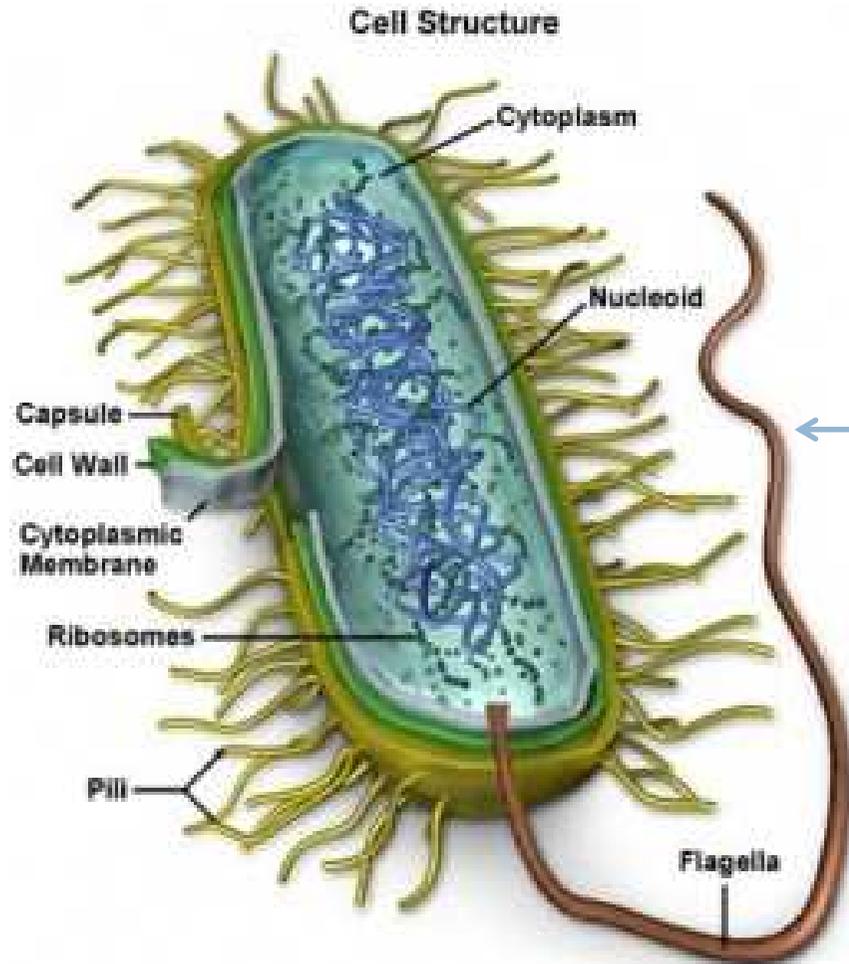
5-10.000 geni attivati

Fino a 60.000 proteine

Dalla genomica alla proteomica

- ✚ L'esperienza quotidiana ci può far riflettere: batteri genotipicamente indistinguibili o cellule di lievito cresciute fianco a fianco possono esprimere differenti sottoinsiemi di trascritto e prodotti genici in ogni dato momento.
- ✚ La sequenza completa di un dato genoma non permette di comprendere tutte le funzioni biologiche che caratterizzano un organismo.

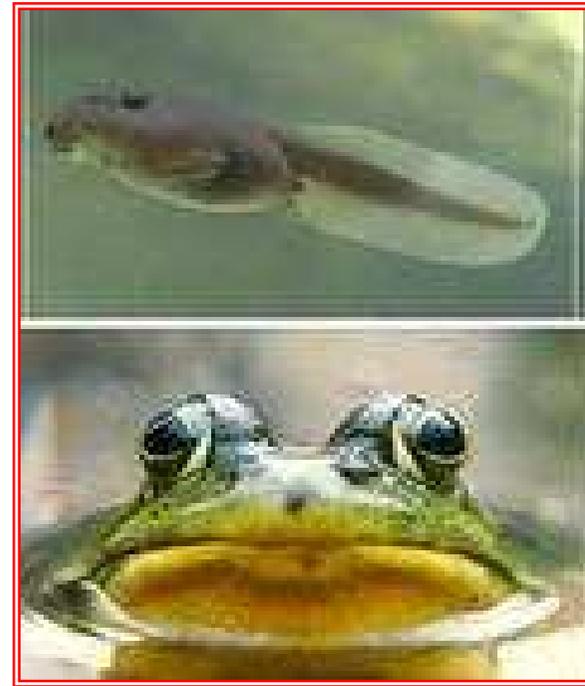
Dalla genomica alla proteomica



Condizioni ambientali diverse o stress indotti da farmaci ecc, condizionano l'attività di particolari gruppi di geni (geni inducibili) attraverso meccanismi di regolazione mediati da fattori trascrizionali, cioè proteine, "accendendo" e/o "spegnendo" vie di segnale - modulazione espressione genica

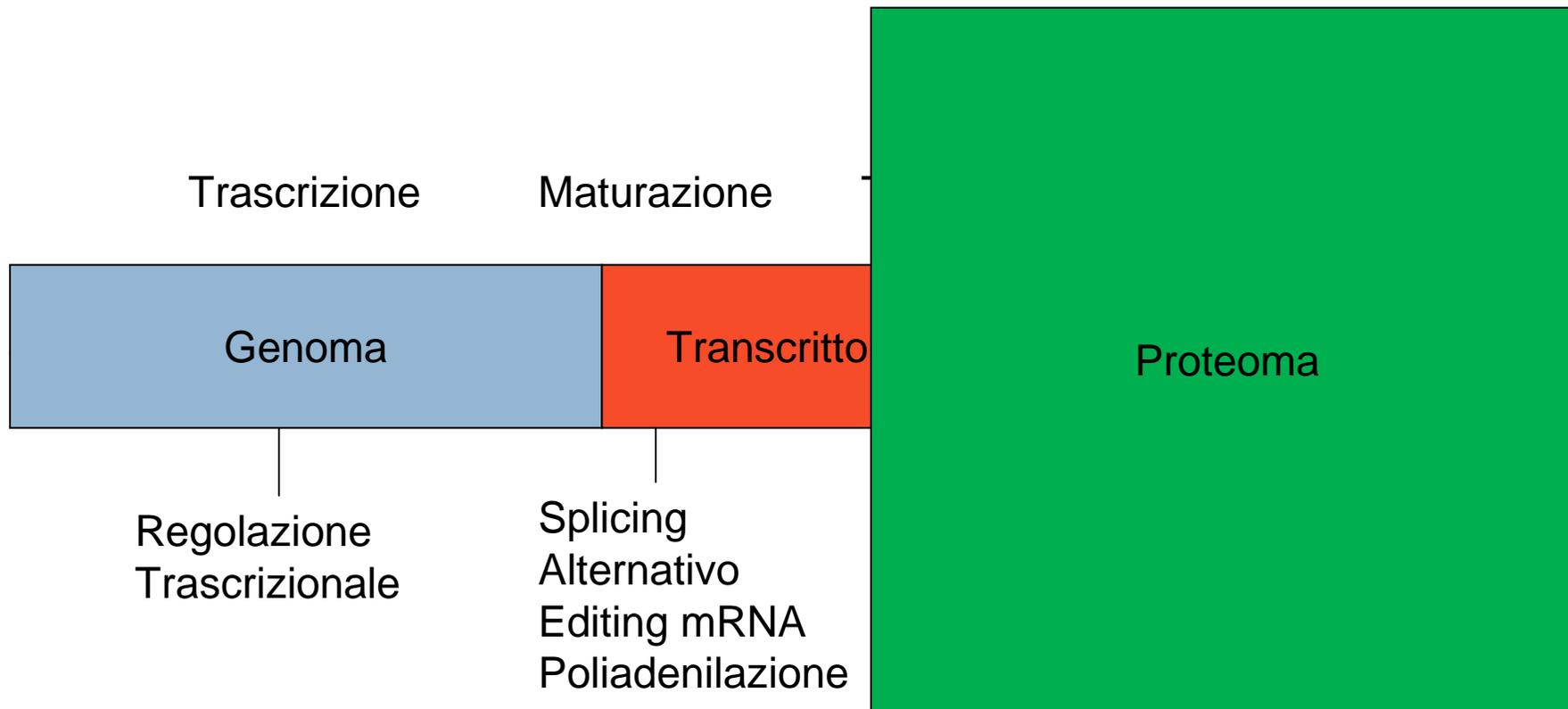
Dalla genomica alla proteomica

- Il Bruco e la farfalla, così come il girino e la rana sono
Sono organismi geneticamente identici, ma
Possiedono diverso proteoma e quindi fenotipo



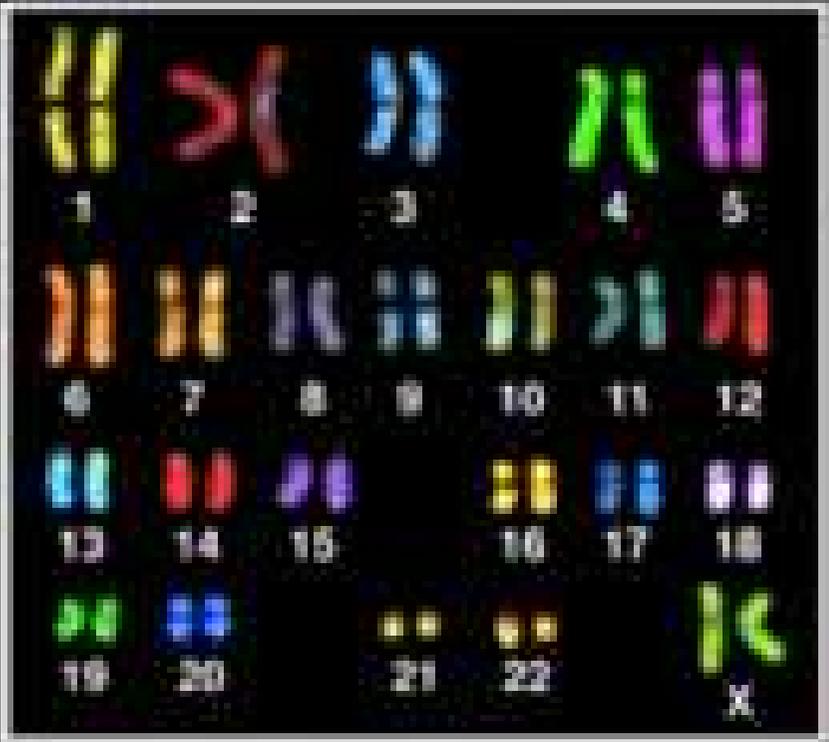
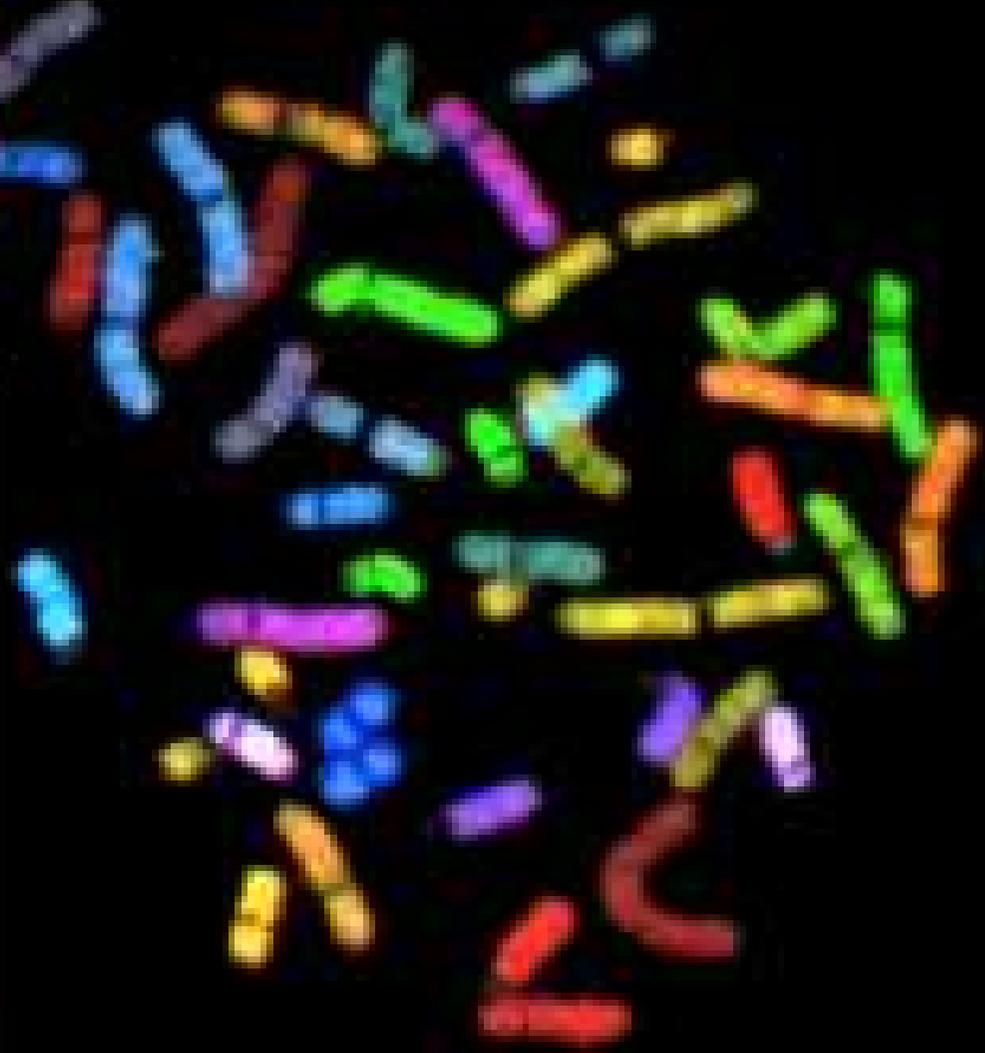
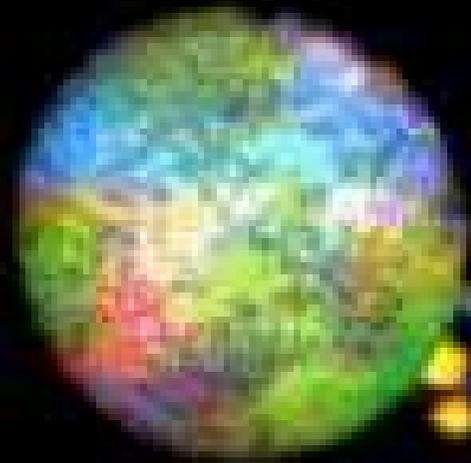
Dalla genomica alla proteomica

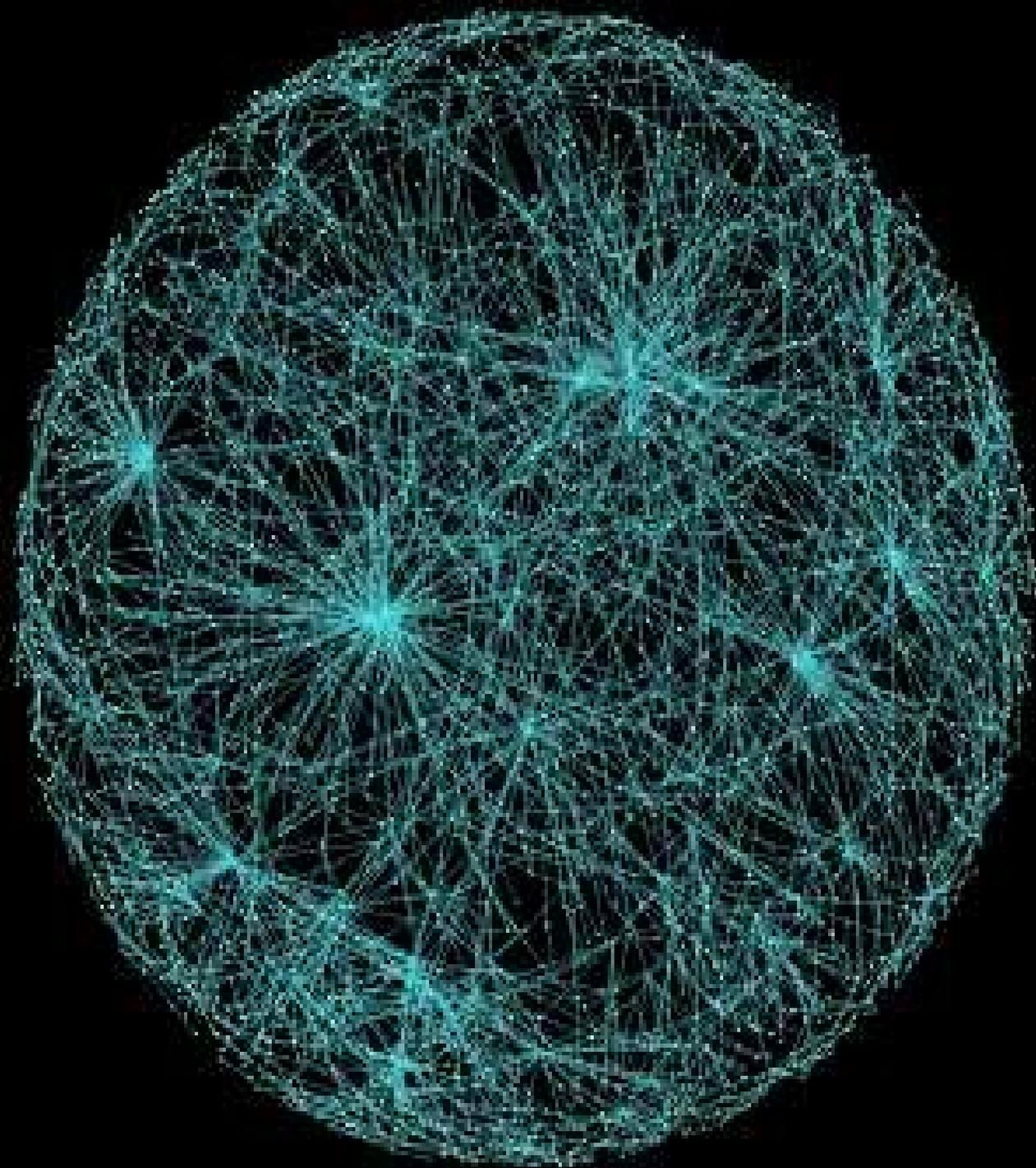
- ✚ Un gene-un-enzima-una-funzione (*Beadle e Tatum, 1941*), fa intravedere l'esistenza di una relazione lineare tra genotipo (sequenza genica) e fenotipo di un organismo (sua espressione fenotipica); la realtà è molto più complessa.
- ✚ Perché un gene esprima la sua essenza deve essere trascritto e poi tradotto, il prodotto tradotto diventerà un proteina funzionale dopo essere stata “rifinita” – modificazioni post-traduzionali.

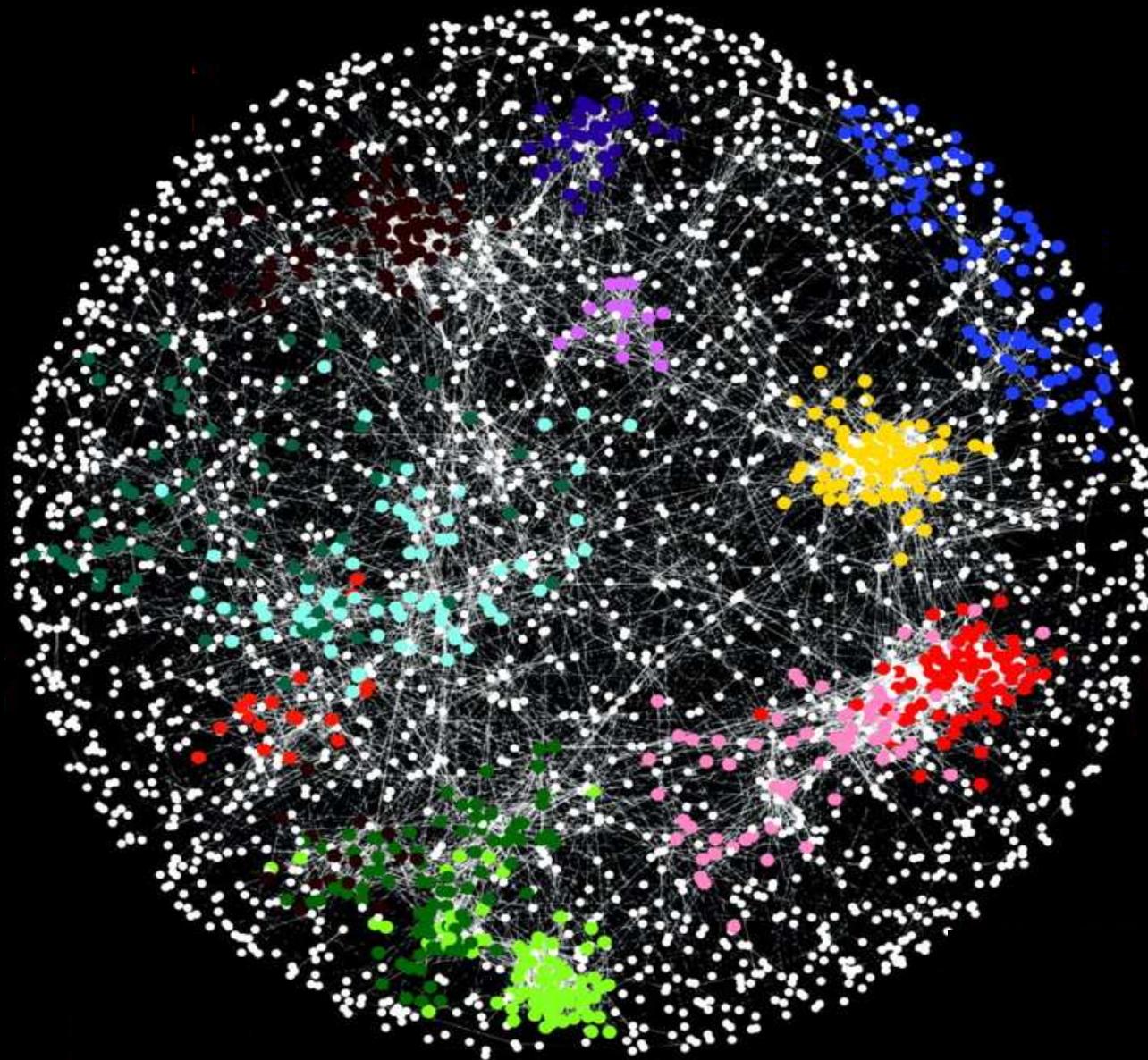


Dalla genomica alla proteomica

- ✚ Genoma: rappresenta la somma complessiva di un numero **definito** di geni specie-specifico in un arrangiamento per lo più lineare;
- ✚ Proteoma: termine coniato nel 1994 da Mark Wilkins che descrive l'insieme delle proteine di un organismo o di un sistema biologico, ovvero le proteine prodotte dal genoma. Si può considerare il proteoma completo di un organismo come l'insieme globale delle proteine di tutti i proteomi cellulari
- ✚ Il proteoma rappresenta l'insieme di un numero **non definito** di proteine collocato in un arrangiamento spaziale altamente complesso, dinamico (cioè in continuo mutamento).







Genomica-Proteomica

- ✚ Il paradigma secondo cui un gene codifica per una sola proteina a questo punto decade;
- ✚ Dovrebbe essere riformulato come: un gene-molte proteine-moltissime funzioni;
- ✚ Le modificazioni post-traduzionali delle proteine possono dare origine a 10-20 milioni di forme proteiche distinte; glicosilazione, fosforilazione, proteolisi e compartimentalizzazione fanno corrispondere ad un genoma proteomi differenti.

Alcune modificazioni post-traduzionali

Modifiche	Residui	Ruolo
Clivaggio	Vari	Attivazione proenzimi e precursori
Glicosilazione	Asn, Ser,Thr	Marcatura molecolare, riconoscimento cell-cell
Fosforilazione	Ser, Thr, Tyr	Controllo processi metabolici, segnale
Idossilazione	Pro, Lys	Aumento legami H e siti di glicosilazione
Acetilazione	Lys	Alterazione carica, interazione DNA
Metilazione	Lys	Altera interazione con altre molecole
Carbossilazione	Glu	Aumenta la carica negativa
Transamidazione	Gln,Lys	Formazione di legami crociati nella fibrina

Proteomica



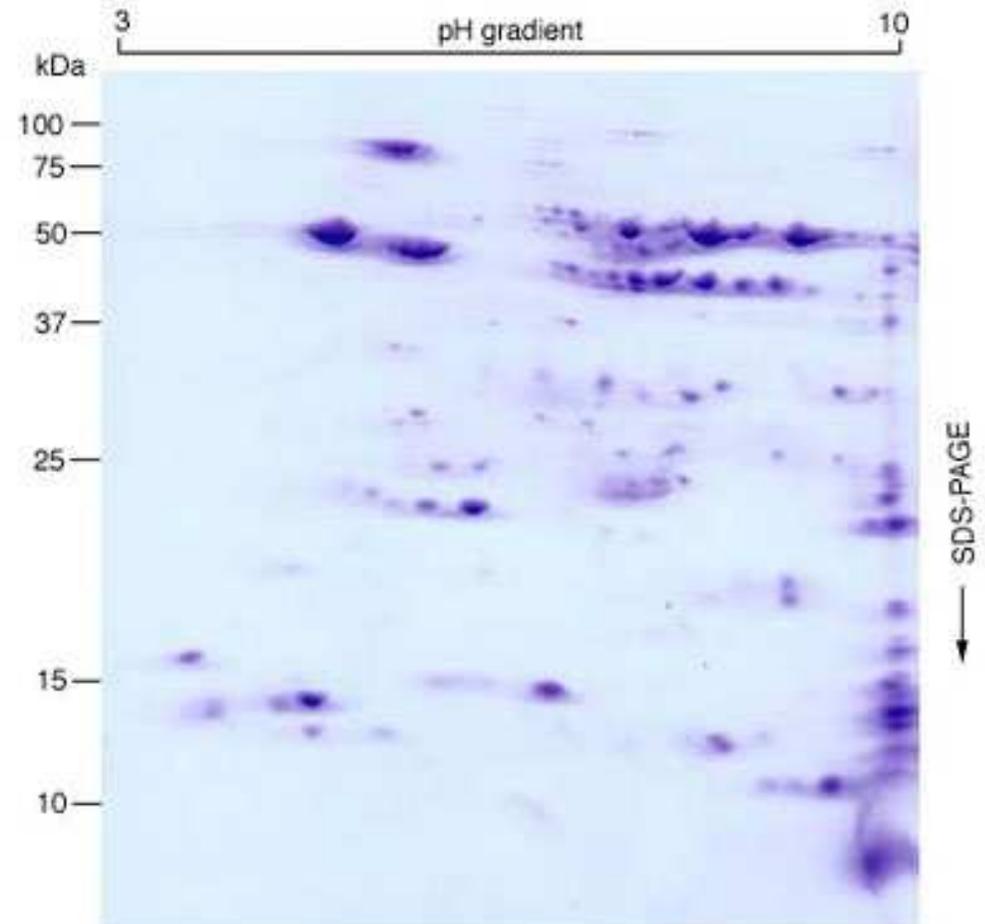
- ✚ La proteomica si rivela, pertanto, complementare alla genomica ed è essenziale per la comprensione dei meccanismi biologici;
- ✚ La proteomica consente lo studio delle proteine, sia nelle forme appena trascritte dai geni sia nelle isoforme o eventuali modifiche post-traduzionali, che possono verificarsi nella cellula dopo la trascrizione;
- ✚ Lo studio delle isoforme o delle modifiche post-traduzionali consente la comprensione dei meccanismi di interazione tra le proteine: tali meccanismi ne condizionano le attività e le funzioni.

Proteomica

- ✚ E' una disciplina che si occupa dello studio di tutte le proteine, e delle loro proprietà rispetto a:
 1. **Struttura**
 2. **Funzione**
 3. **Attività**
 4. **Quantità**
 5. **Interazioni molecolari**
- ✚ descrivendo come queste proprietà siano variabili nello spazio e nel tempo o in un determinato stato fisio-patologico

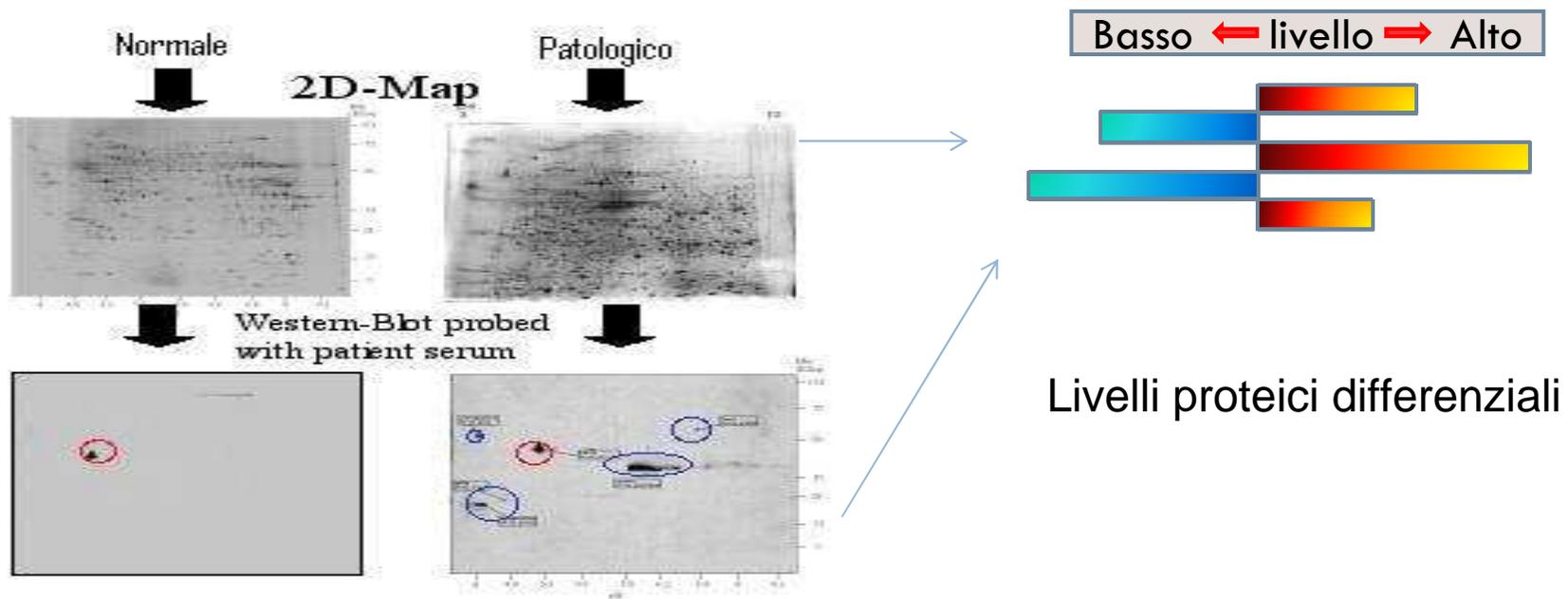
Tipi di proteomica: sistematica

- ✚ Analisi spazio temporale dell'espressione genica, determinazione della composizione proteica cellulare o sub cellulare;
- ✚ Analisi isoforme proteiche;
- ✚ Creazione banche dati proteomiche.



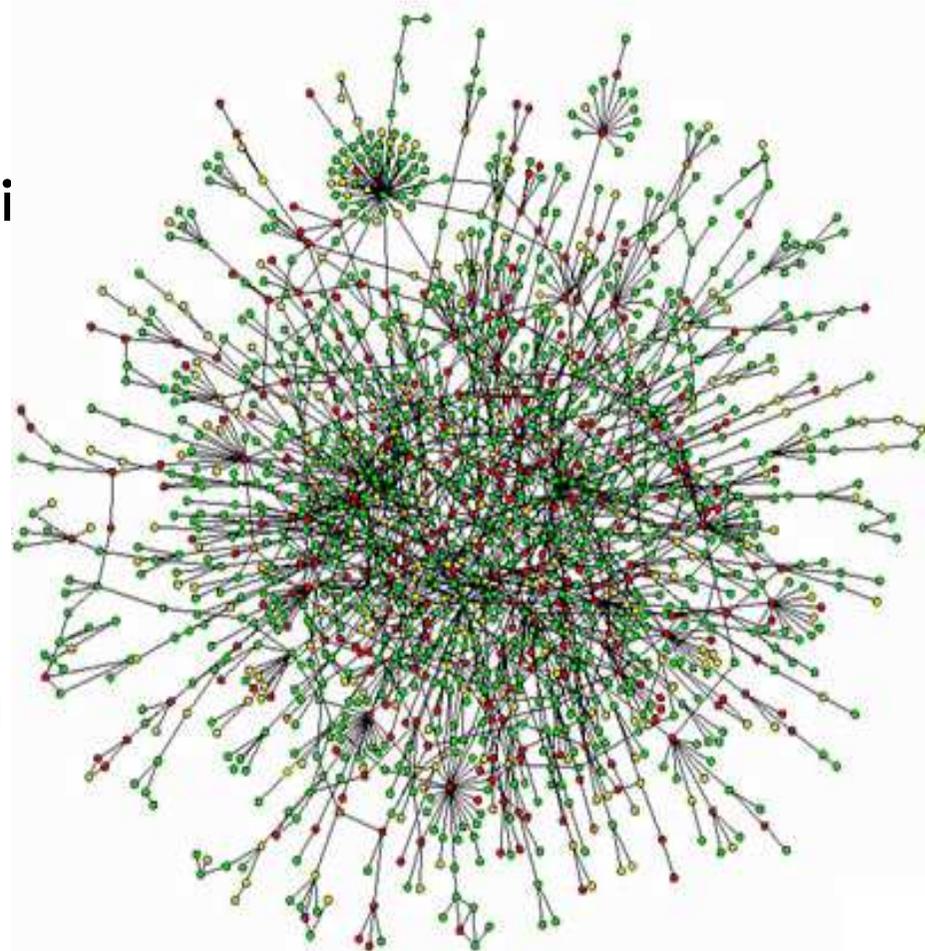
Tipi di proteomica: differenziale

- Studio quantitativo dell'espressione proteica tra campioni che differiscono per alcune variabili, l'espressione delle proteine può infatti modificarsi per variazioni delle condizioni cellulari (diverse condizioni di crescita, stress o presenza di patologie-patogeni)

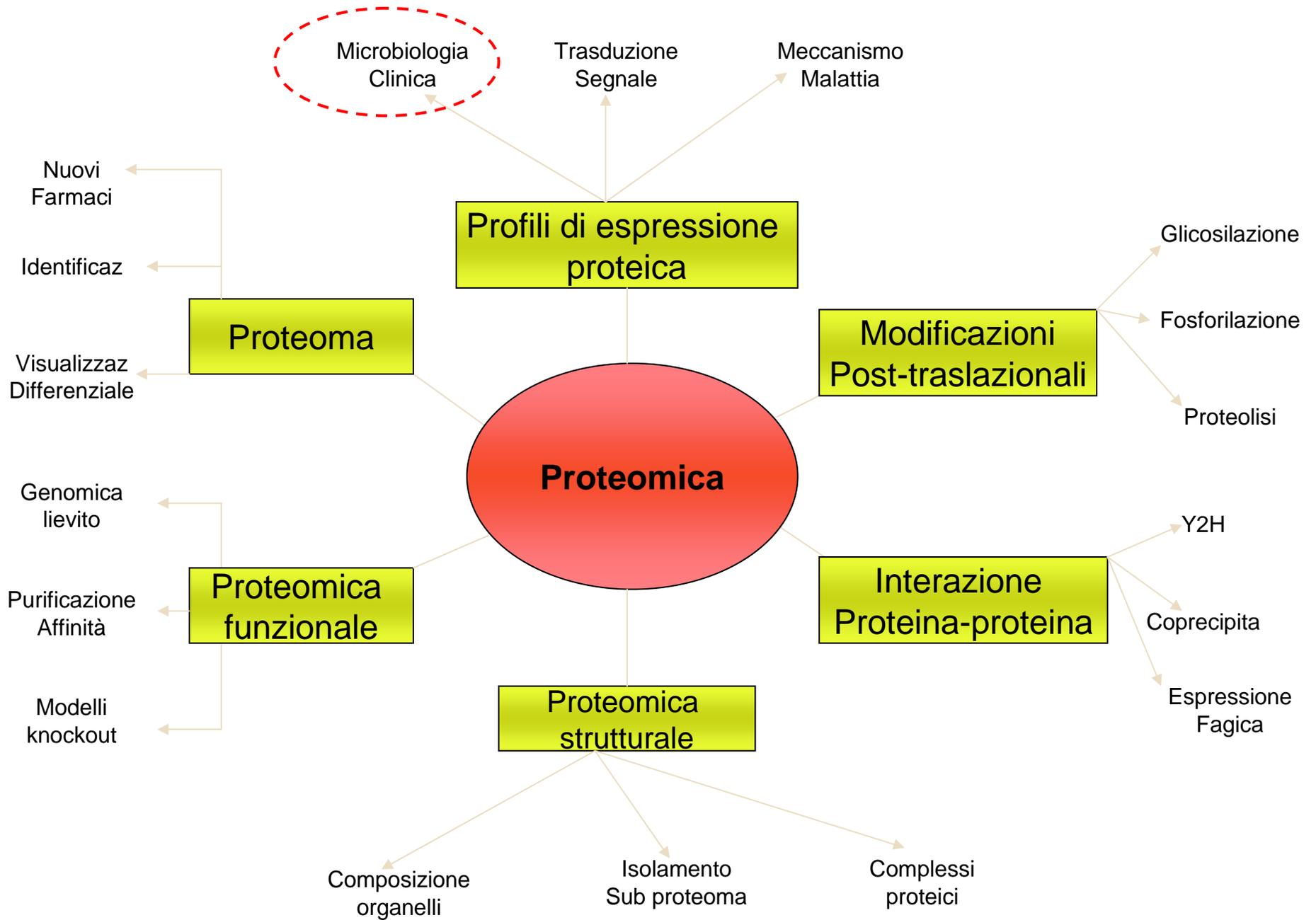


Tipi di proteomica: funzionale

- Rappresenta un termine generico che racchiude un insieme di approcci proteomici ha come obiettivo la definizione della funzione biologica di proteine, il cui ruolo è ancora sconosciuto, e l'identificazione delle interazioni proteina– proteina *in vivo*, per la descrizione a livello molecolare dei meccanismi cellulari;



Dati *in Silico* interazioni proteina-proteina



Proteomica - Obiettivi

Accademici

1. Identificazione delle proteine in vari organismi dai Batteri – Uomo;
2. Studio modificazioni post-traduzionali;
3. Meccanismi molecolari di patogenesi;
4. Strategie integrate con la genomica;

Clinici

1. Diagnostica microbiologica;
2. Nuovi bersagli per farmaci;
3. Patogeno/ospite
4. Caratterizzazione microorganismi.

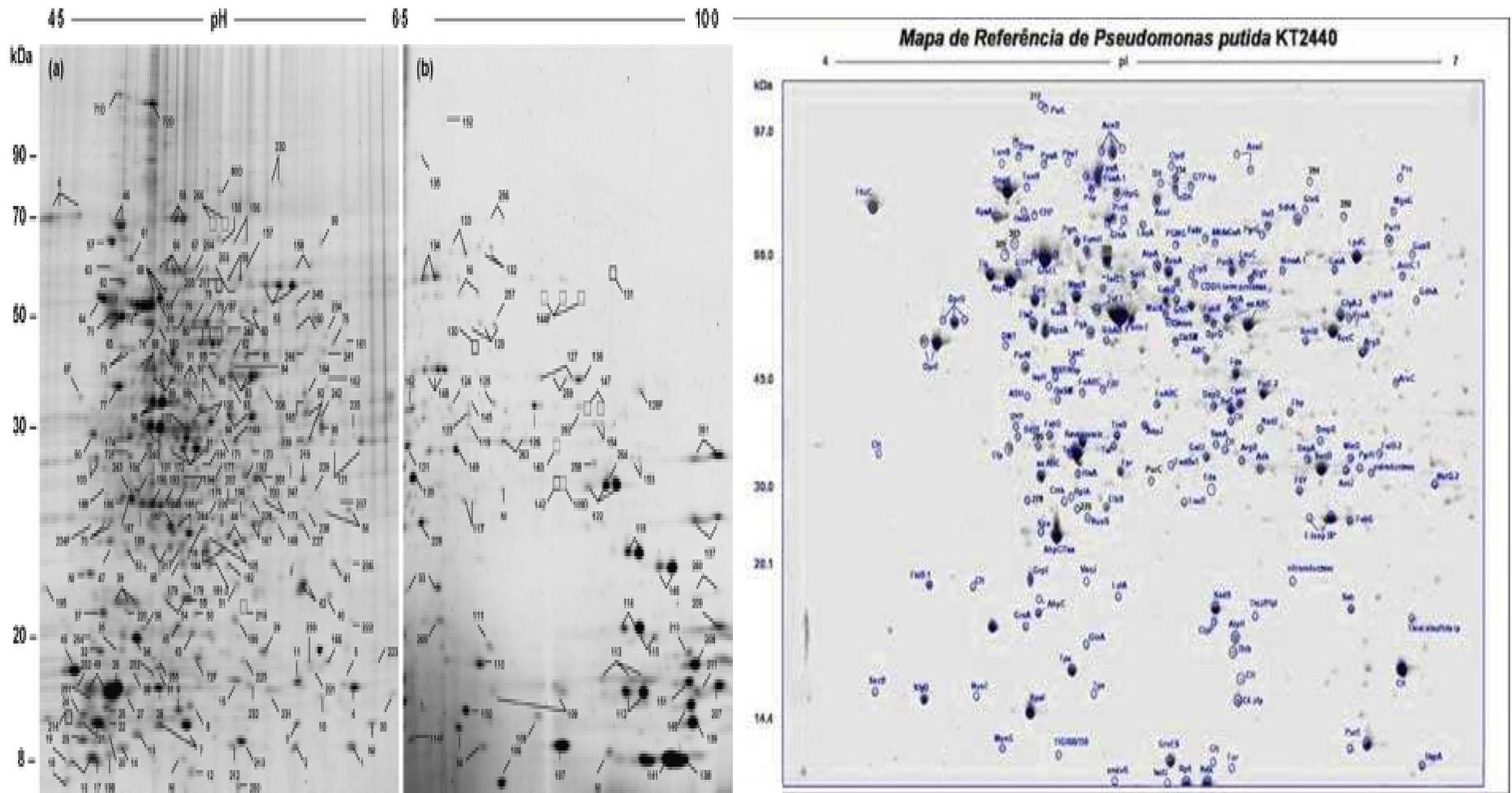
Proteomica: le tecnologie

- ✚ La natura delle proteine rende le analisi di laboratorio particolarmente difficili rispetto a quelle ad esempio per l'analisi genomica;
- ✚ Le principali tecnologie impiegate:
 1. Elettroforesi bidimensionale (2-D)
 2. Spettrometria di massa
 3. Microarray proteici
 4. Bioinformatica

Elettroforesi bidimensionale

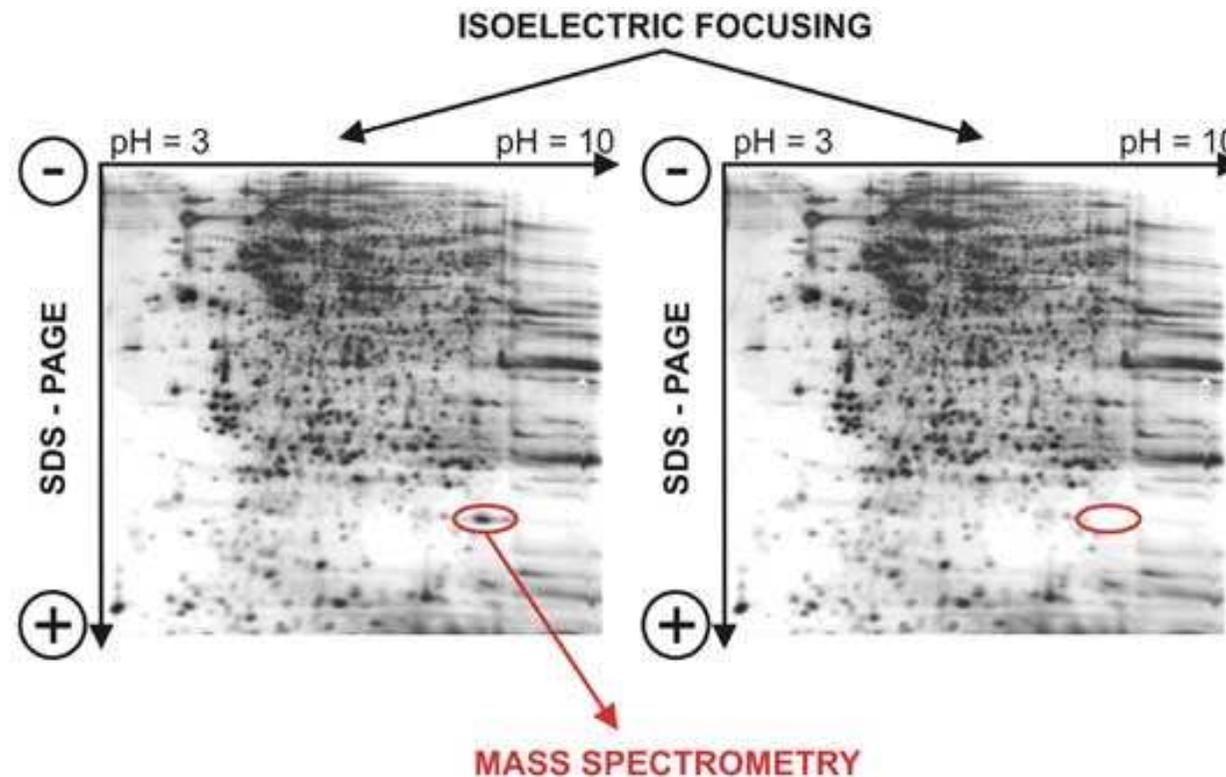
- ✦ E' una tecnica che permette di separare le proteine in base alla carica elettrica e successivamente una seconda migrazione divide le proteine in base al peso molecolare;
- ✦ Come risultato finale si ottiene un lastra in cui virtualmente ciascuna proteina occupa un punto nello spazio bidimensionale.
- ✦ Da questa si può isolare ciascuna proteina (escissione) per effettuare successiva analisi che ne consenta l'identificazione, le lastre possono essere comparate.

Elettroforesi bidimensionale



Elettroforesi bidimensionale

Comparsa di una nuova proteina in
Stafilococco aureo *meticillino-resistente*

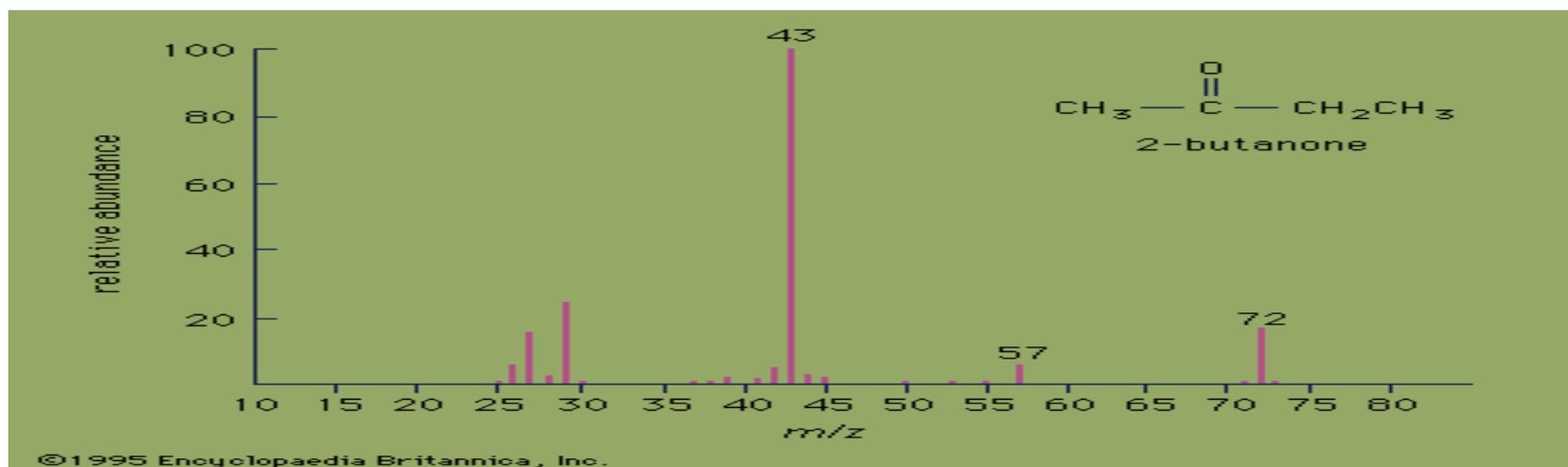
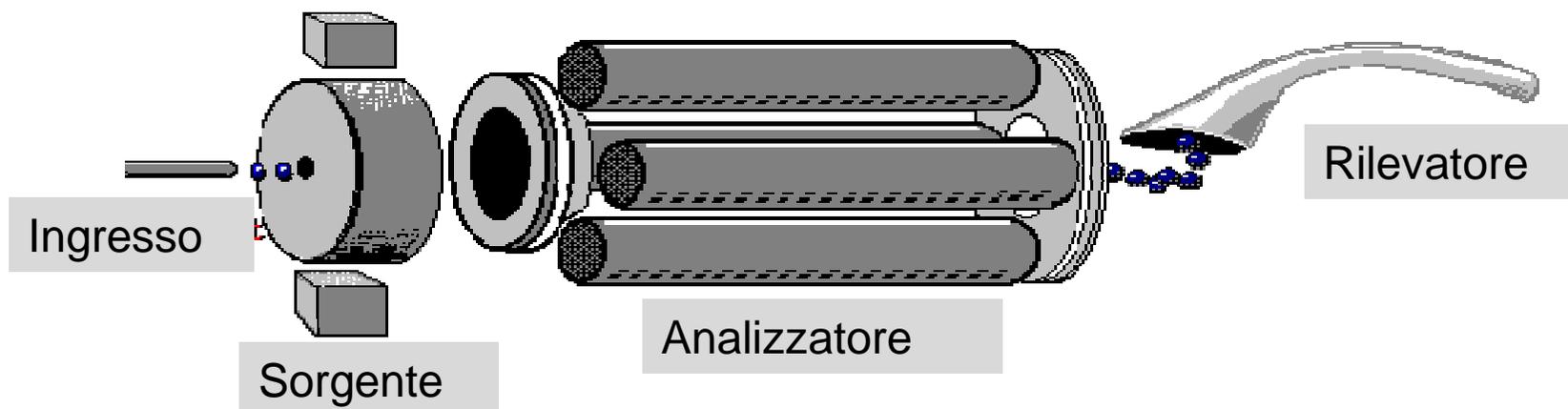


Spettrometria di massa



- ✚ Esistono diverse varianti della spettrometria di massa che vengono usate a seconda del grado di informazione da ottenere.
- ✚ Determinazione del peso molecolare
- ✚ Delucidazione della struttura molecolare
- ✚ Identificazione di componenti di una miscela
- ✚ Indagini quantitative
- ✚ Studi meccanicistici
- ✚ Studio di interazioni intermolecolari

Lo spettrometro di massa



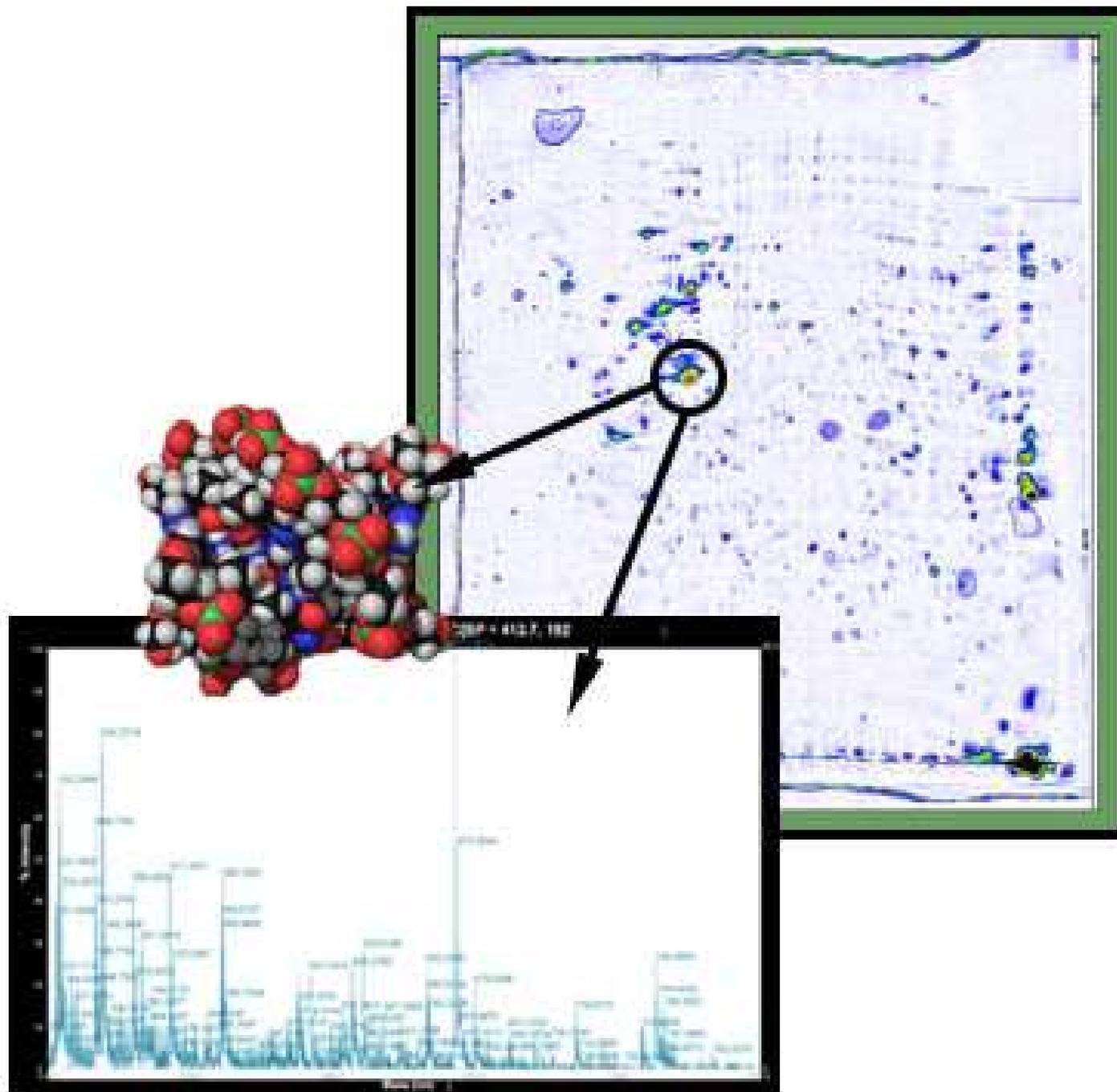
Tipi di spettrometria

+ **Hard Ionization:**

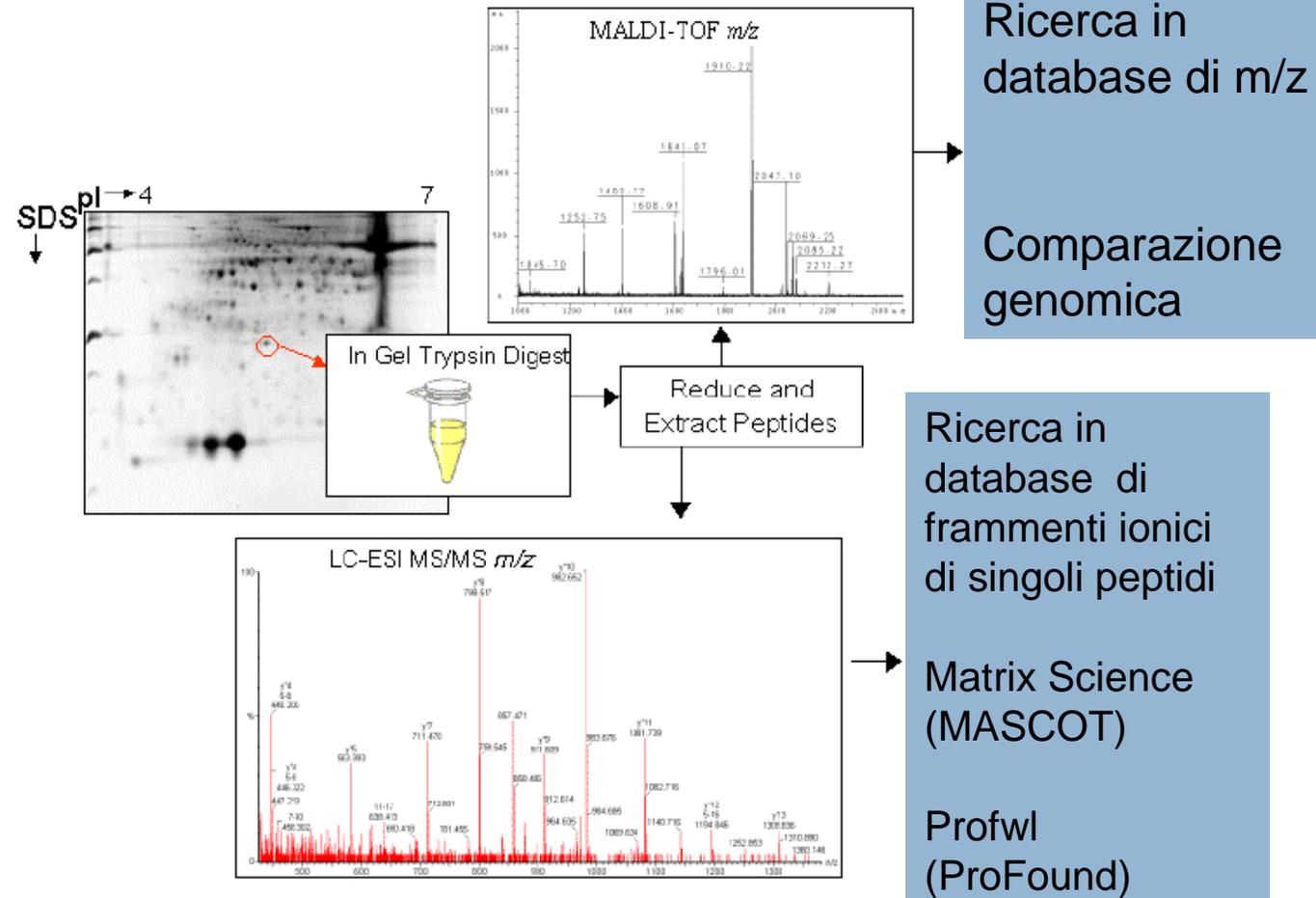
1. Ionizzazione elettronica- *Electron Ionization (EI)*

+ **Soft Ionization:**

1. Ionizzazione chimica - *Chemical Ionization (CI)*
2. Bombardamento con atomi veloci - *Fast Atom Bombardment (FAB)*
3. Ionizzazione termospray-*Thermospray Ionization (TSP)*
4. **Ionizzazione elettrospray- *Electrospray Ionization (ESI)***
5. Ionizzazione chimica a pressione atmosferica- *Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)*
6. **Desorbimento laser assistito da matrice- *Matrix Assisted Laser Desorption (MALDI)***

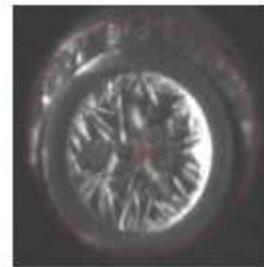
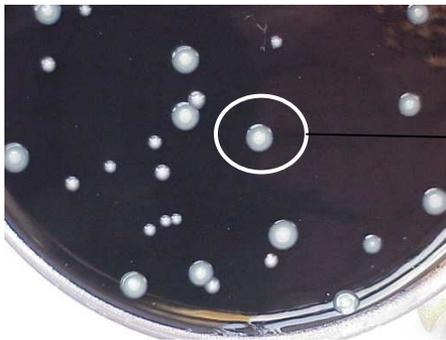


Analisi proteomica

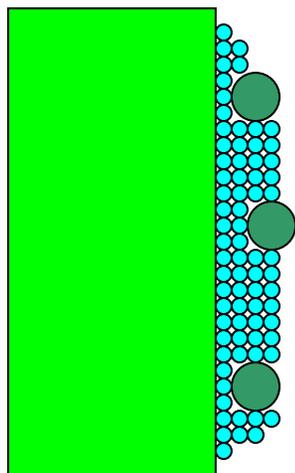


Applicazioni in microbiologia

- ✚ Proteomica sta cominciando ad assumere un ruolo sempre più importante anche nella pratica clinica e fra pochi anni sicuramente diventerà uno strumento insostituibile, riassumendo:
 - ✚ Analisi microbiologica
 - ✚ Studio del metabolismo
 - ✚ Fattori Patogenetici
 - ✚ Regolazione ciclo vitale
 - ✚ Effetti dei patogeni nell'ospite
 - ✚ Sviluppo di nuove molecole farmacologiche

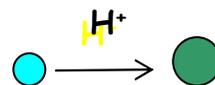


Irraggiamento



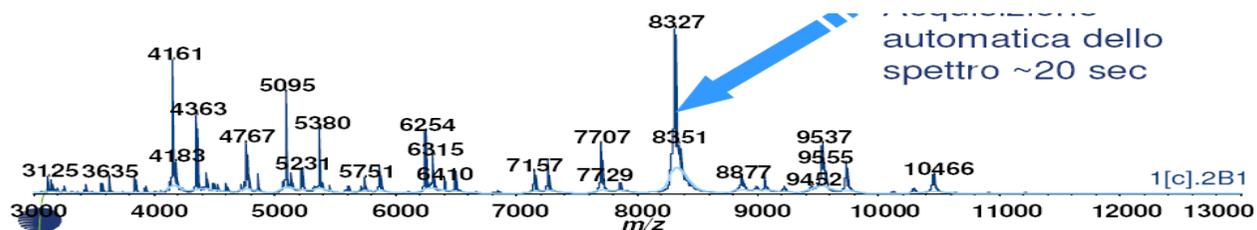
adsorbimento

Desolvation



Sample les are ionized by proton transfer from the matrixMolecu

Proton transfer



Applicazioni proteomica

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Feb. 2010, p. 444–447
0095-1137/10/\$12.00 doi:10.1128/JCM.01541-09

Vol. 48, No. 2

Rapid Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry[∇]

Lindsay G. Stevenson,¹ Steven K. Drake,² and Patrick R. Murray^{1*}

*Microbiology Service, Department of Laboratory Medicine,¹ and Department of Critical Care Medicine,² Clinical Center,
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*

Received 10 August 2009/Returned for modification 23 October 2009/Accepted 19 November 2009

*This method provides a rapid, accurate, definitive identification of bacteria within 1 h of detection in positive blood cultures with the caveat that the identification of *Streptococcus pneumoniae* would have to be confirmed by an alternative test.*

Applicazioni proteomica

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Aug. 2006, p. 2677–2680
0095-1137/06/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.00971-06
Copyright © 2006, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 44, No. 8

MINIREVIEW

Mass Spectrometry for Species or Strain Identification after Culture or without Culture: Past, Present, and Future

Alvin Fox*

*Department of Pathology, Microbiology and Immunology, University of South Carolina,
School of Medicine, Columbia, South Carolina 29223*

This minireview discusses the use of mass spectrometry in biomarker discovery, the current utility of these markers for bacterial identification after culture, and the potential for non-culture-based diagnosis of infectious diseases. The bases of these thoughts are the independent revolutions that have occurred in the fields of molecular biology and analytical chemistry, leading to the current interrelatedness of genomics, proteomics, and bioinformatics.

Applicazioni proteomica



Comparisons of two proteomic analyses of non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a cystic fibrosis patient

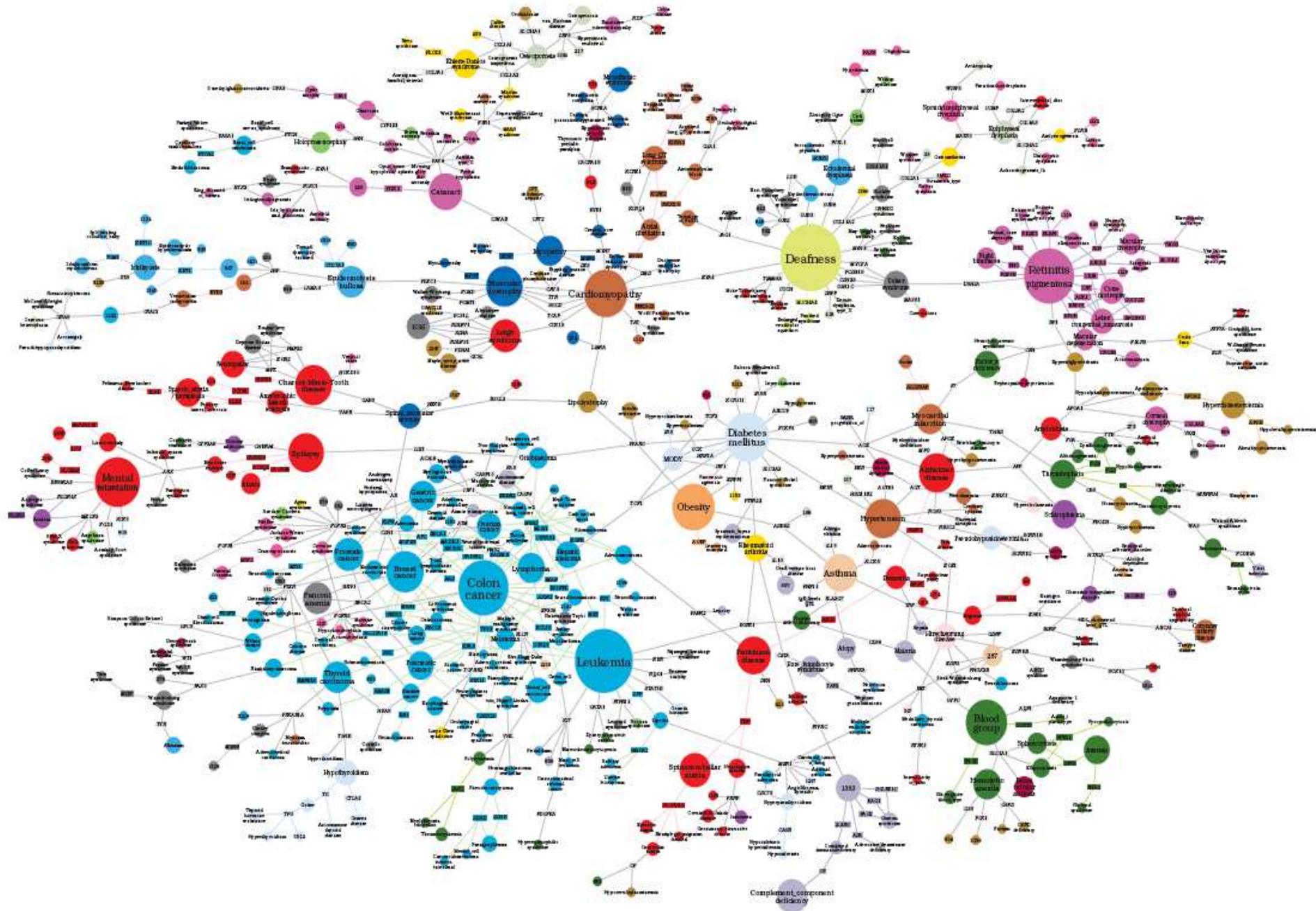
Jayasimha Rao^{1†‡}, F. Heath Damron^{1‡}, Marek Basler², Antonio DiGiandomenico¹, Nicholas E. Sherman^{1,3}, Jay W. Fox^{1,3}, John J. Mekalanos² and Joanna B. Goldberg^{1*}

¹ Department of Microbiology, University of Virginia Health Sciences Center, Charlottesville, VA, USA

² Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

³ W.M. Keck Biomedical Mass Spectrometry Core, University of Virginia Health Sciences Center, Charlottesville, VA, USA

The compilation of these two proteomic methods along with Western blot analysis revealed proteins of the HSI-I operon of the type 6 secretion system, showed increased expression in 383 compared to 2192, confirming the our previous transcriptional analysis. Proteomic analysis of other proteins did not fully correlate with the transcriptome but other differentially expressed proteins are discussed. Also, differences were noted between the results obtained for the two proteomic techniques. These shotgun proteomic analyses identified proteins that had been predicted only through gene identification; we now refer to these as “proteins of unknown functions” since their existence has now been established however their functional characterization remains to be elucidated.



ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: La

STACK:

```
(5)  
/Title  
( )  
/Subject  
(D:20120508100004+02'00')  
/ModDate  
( )  
/Keywords  
(PDFCreator Version 0.9.5)  
/Creator  
(D:20120508100004+02'00')  
/CreationDate  
(5317841)  
/Author  
-mark-
```