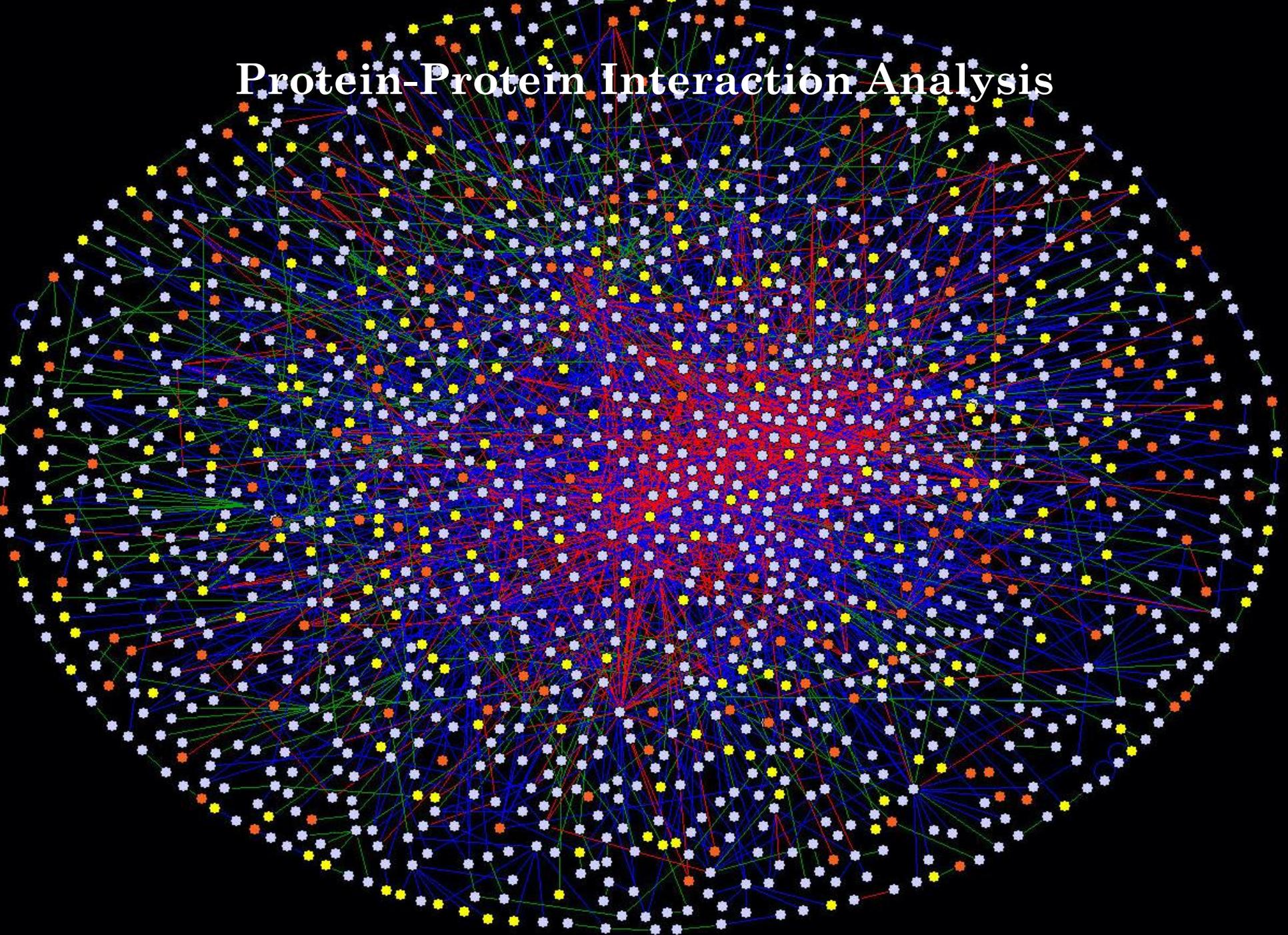
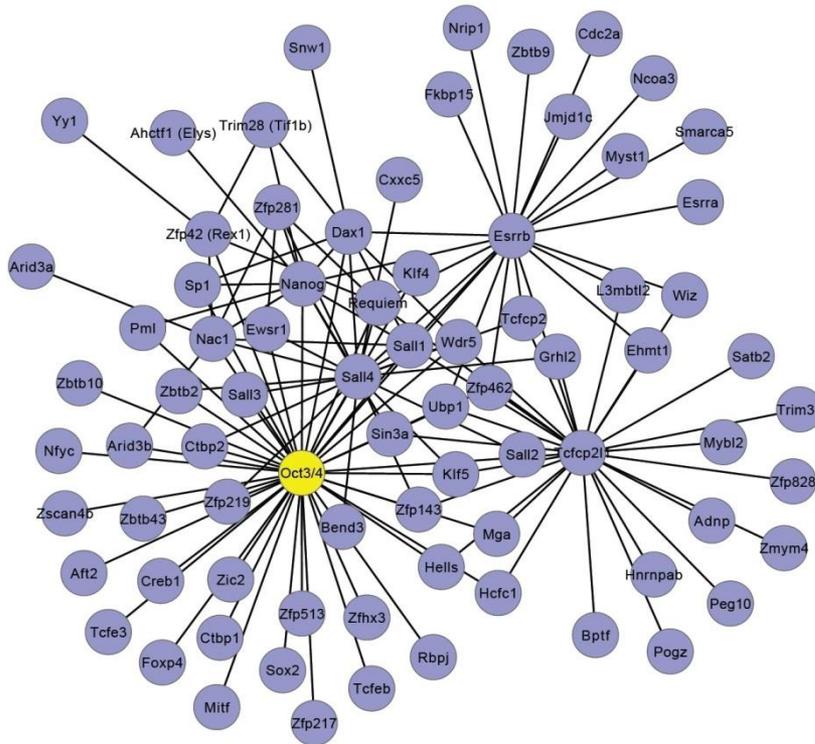


Protein-Protein Interaction Analysis



Studio dell'interazione proteina-proteina



Two-Hybrid

Three-Hybrid

Split-Ubiquitina

Co-Immunoprecipitazione

GST pull-down

TAP-tag

Split YFP

BiFC

FRET

Perchè studiare le interazioni proteina-proteina?

Le interazioni tra due o più proteine sono necessarie per regolare un gran numero di processi biologici. Infatti possono:

- Modificare le proprietà cinetiche di un enzima
- Permettere la corretta localizzazione del substrato
- Formare nuovi siti di legame per molecole effettrici
- Inattivare/attivare proteine
- Cambiare la specificità per il substrato interagendo con differenti partner
- Svolgere attività regolative della funzione proteica

Le interazioni proteiche posso essere:

- Omodimeri o eterodimeri
- Permanenti o transienti: legami transienti sono necessari per le vie di segnalazione, i legami permanenti formano complessi stabili

**L'80% delle proteine eucariotiche
funzionano in complessi proteici**

Sistema del doppio ibrido in lievito (Yeast Two-Hybrid)

- Il sistema del doppio ibrido è una metodologia basata sulla **modularità dei fattori di trascrizione**, che permette di identificare eventuali interazioni proteiche.
- Grazie al doppio ibrido è possibile identificare e clonare contemporaneamente il gene che codifica per la proteina senza bisogno di informazioni preliminari o di strumenti precostituiti (es. anticorpi).

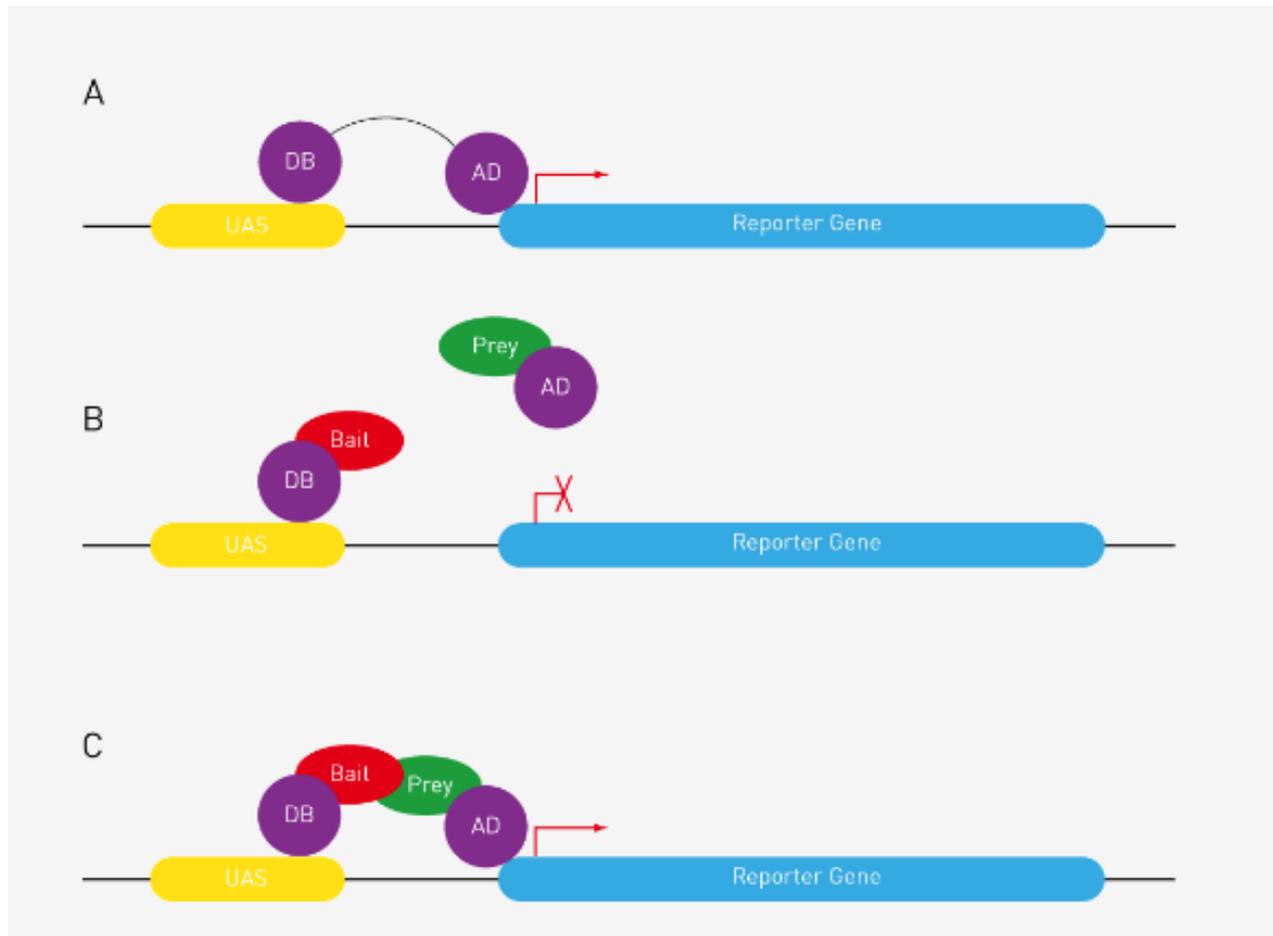
I Fattori trascrizionali sono costituiti da due moduli, considerati funzionalmente indipendenti:

Dominio di legame al DNA, DBD,

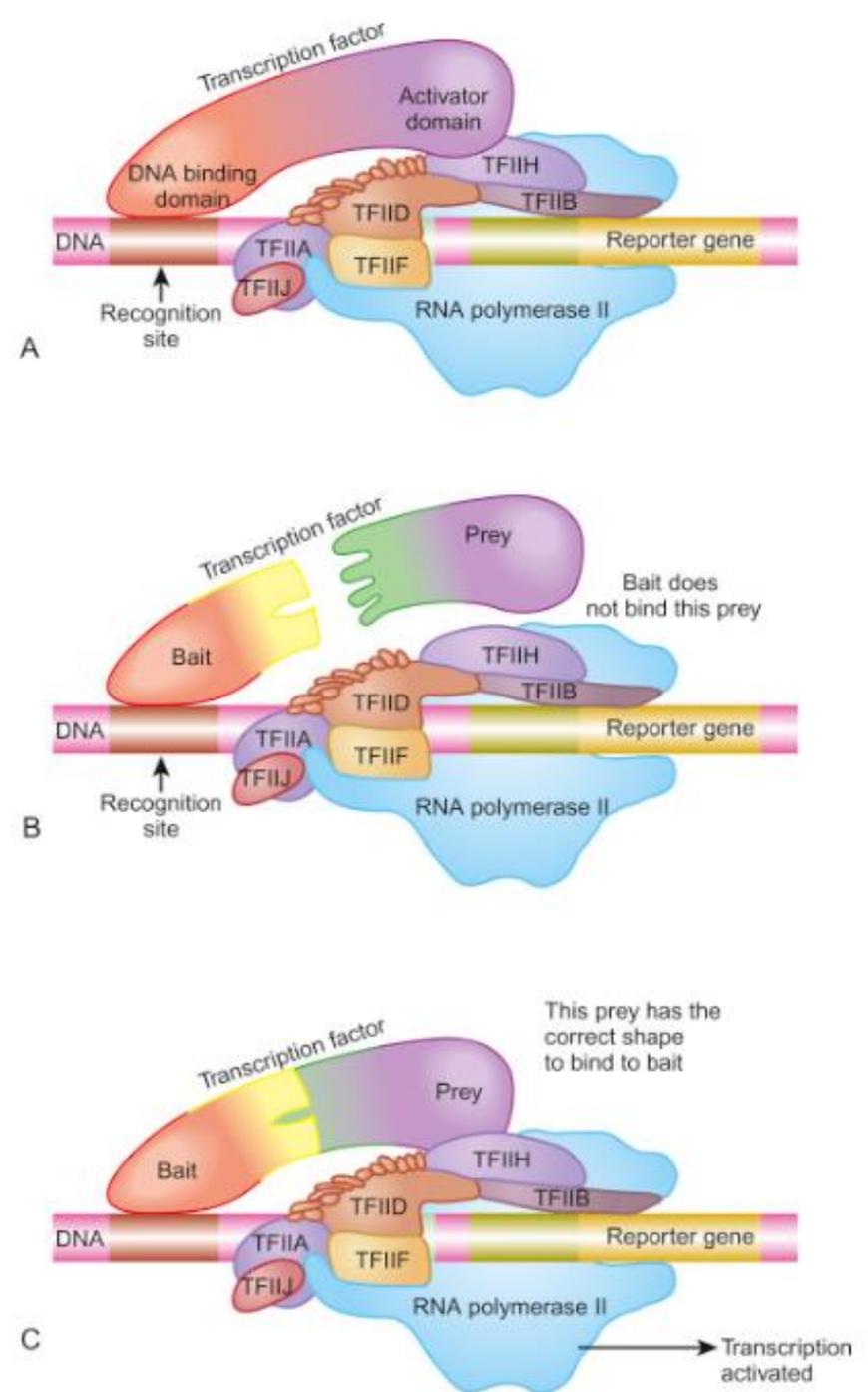
Dominio di attivazione trascrizionale, AD

Due proteine X e Y possono essere fuse rispettivamente al DBD e all'AD.

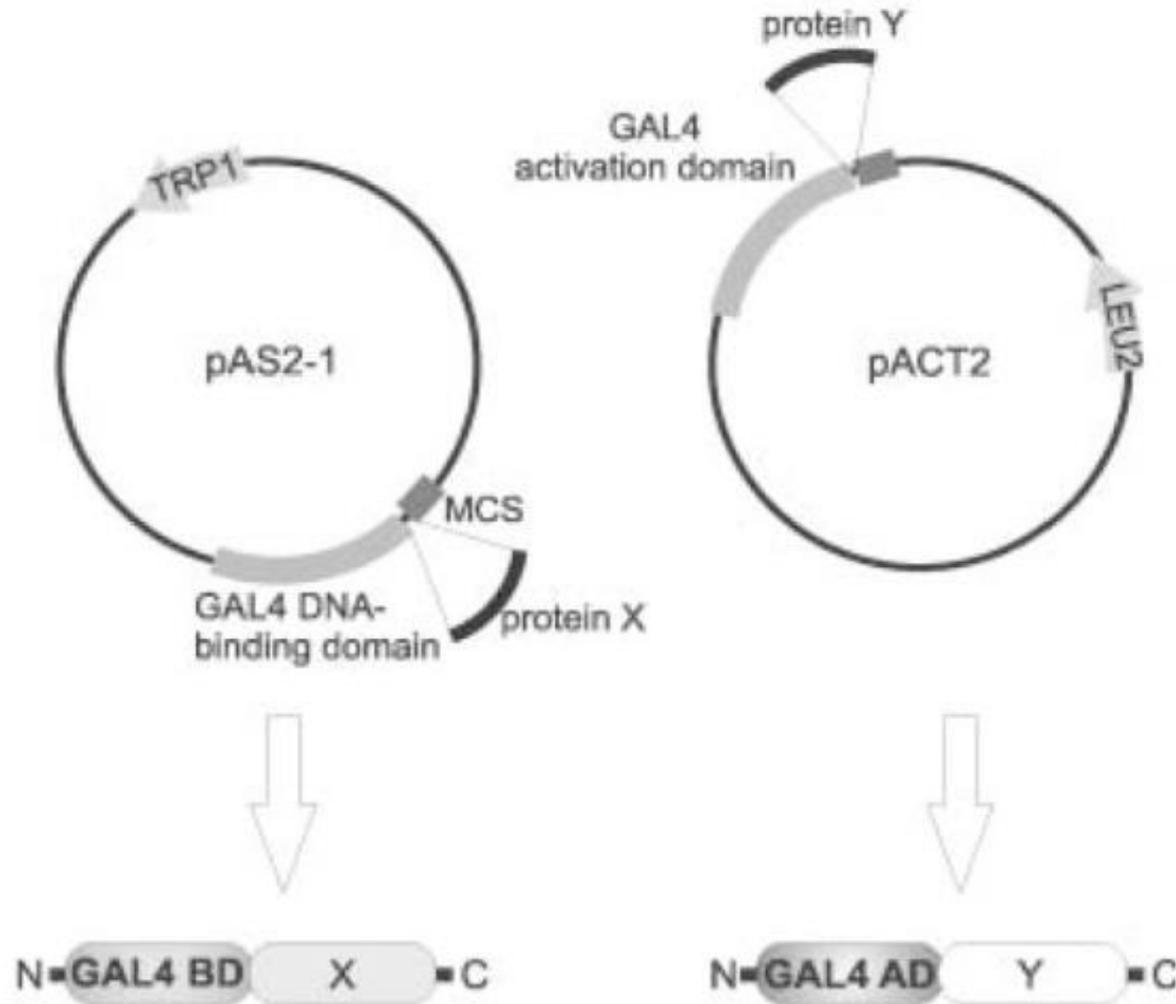
Solo se X e Y interagiscono, allora il fattore trascrizionale si ricostituisce e ci sarà attività trascrizionale.



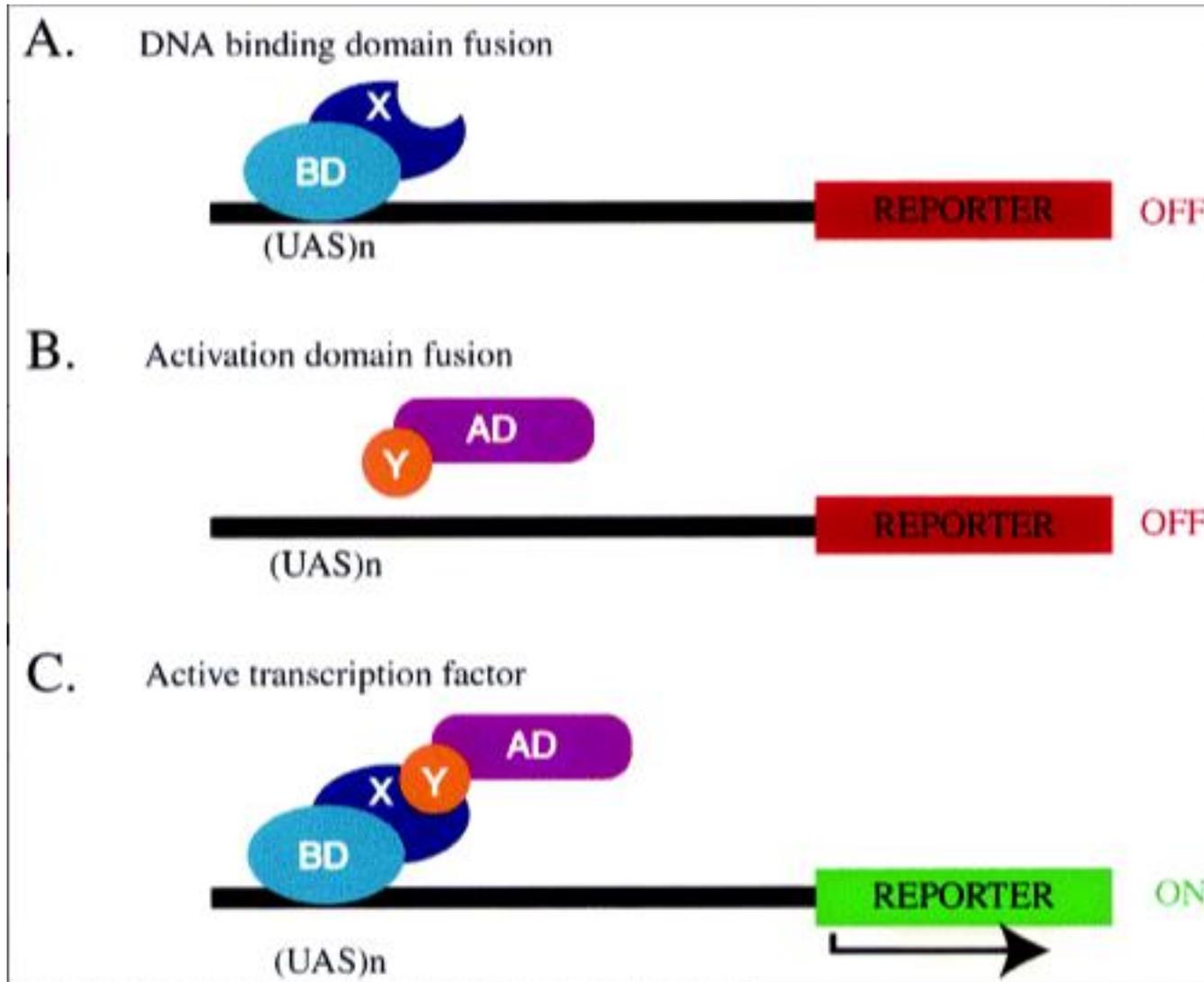
(A) Transcription of a yeast gene involves activation of RNA polymerase by a transcription factor with two different domains. The DNA Binding Domain DBD recognizes upstream regulatory sites, and the Activation Domain AD activates RNA polymerase to start transcription of the reporter gene. For two-hybrid analysis, two proteins (bait and prey) are fused separately to the DBD and AD of the transcription factor. The bait protein is joined to the DBD and the prey protein to the AD. (B) Here, the bait protein and prey protein do not interact and the reporter gene is not turned on. (C) Here, the bait binds the prey, thus bringing the transcription factor halves together. The complex activates the RNA polymerase and the reporter gene is expressed.



I cDNA codificanti per le due proteine di cui si vuole valutare l'interazione, sono clonati, in frame, al **BD di GAL4** o all'**AD di GAL4**... così da ottenere due diverse proteine di fusione: ESCA e PREDA.



Una volta ottenuti i costrutti dell'esca e della preda, si introducono in ceppi di lievito che contengono un **gene reporter** controllato da una **GAL4 UAS**:

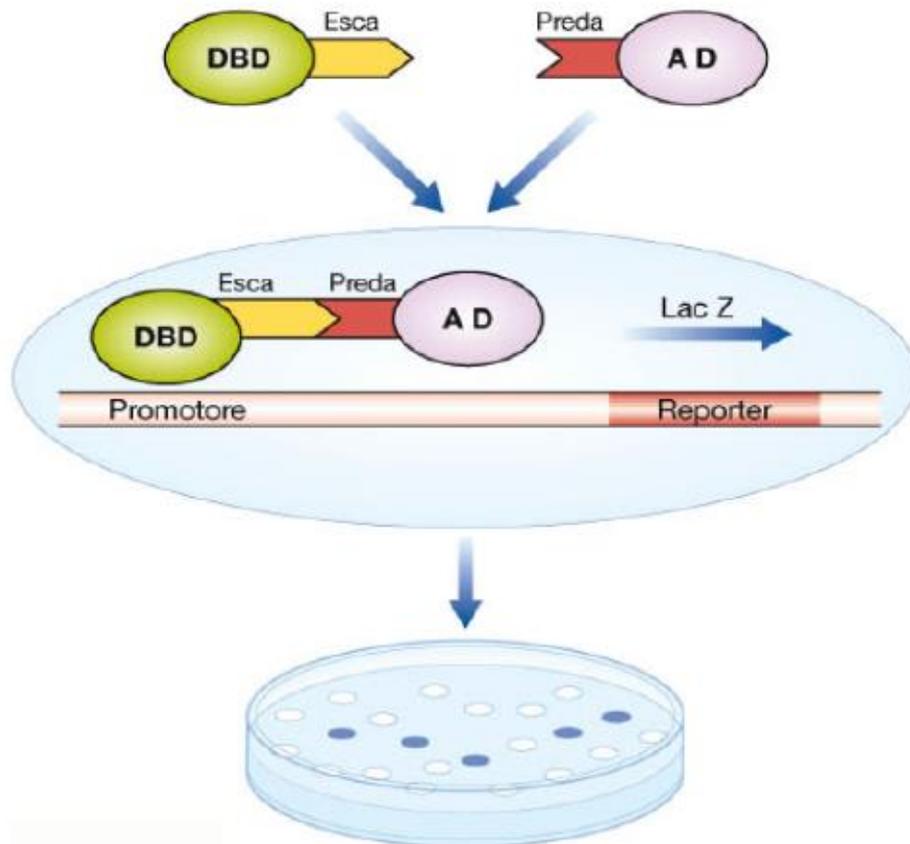


No attivazione trascrizionale, a meno che la proteina Bait non abbia un dominio AD (autoattivazione)

No attivazione trascrizionale

I costrutti esca e preda vengono trasformati contemporaneamente in lievito.

Se le due proteine interagiscono il **BD-esca** e l'**AD-preda** si ricostituiscono e si ha **attivazione del gene reporter**.

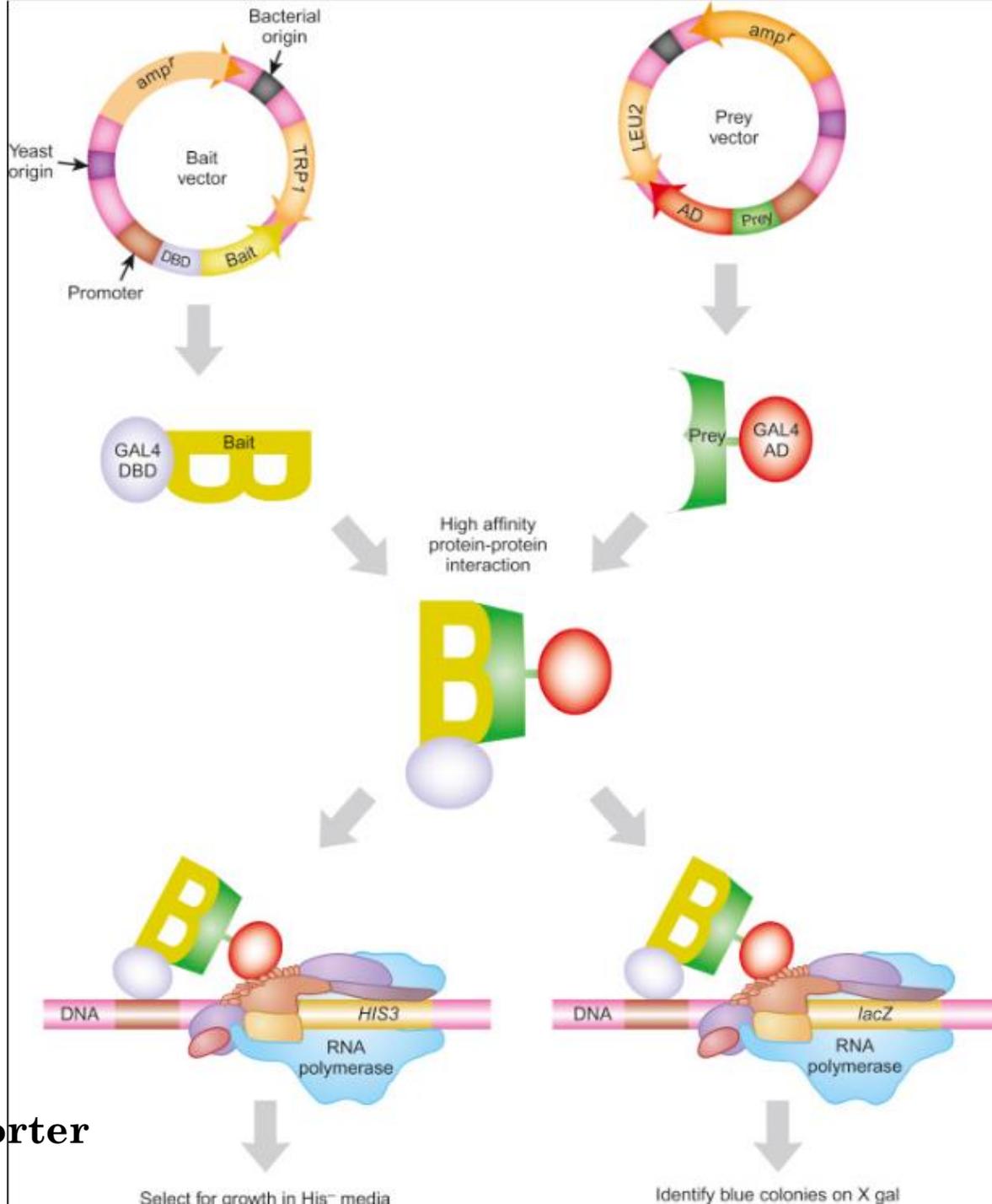


Gene reporter utilizzati:

AUR1-C conferisce resistenza all'Aureobasidina A

HIS3 conferisce al lievito la capacità di crescere su terreno minimo senza His (ceppo lievito his⁻)

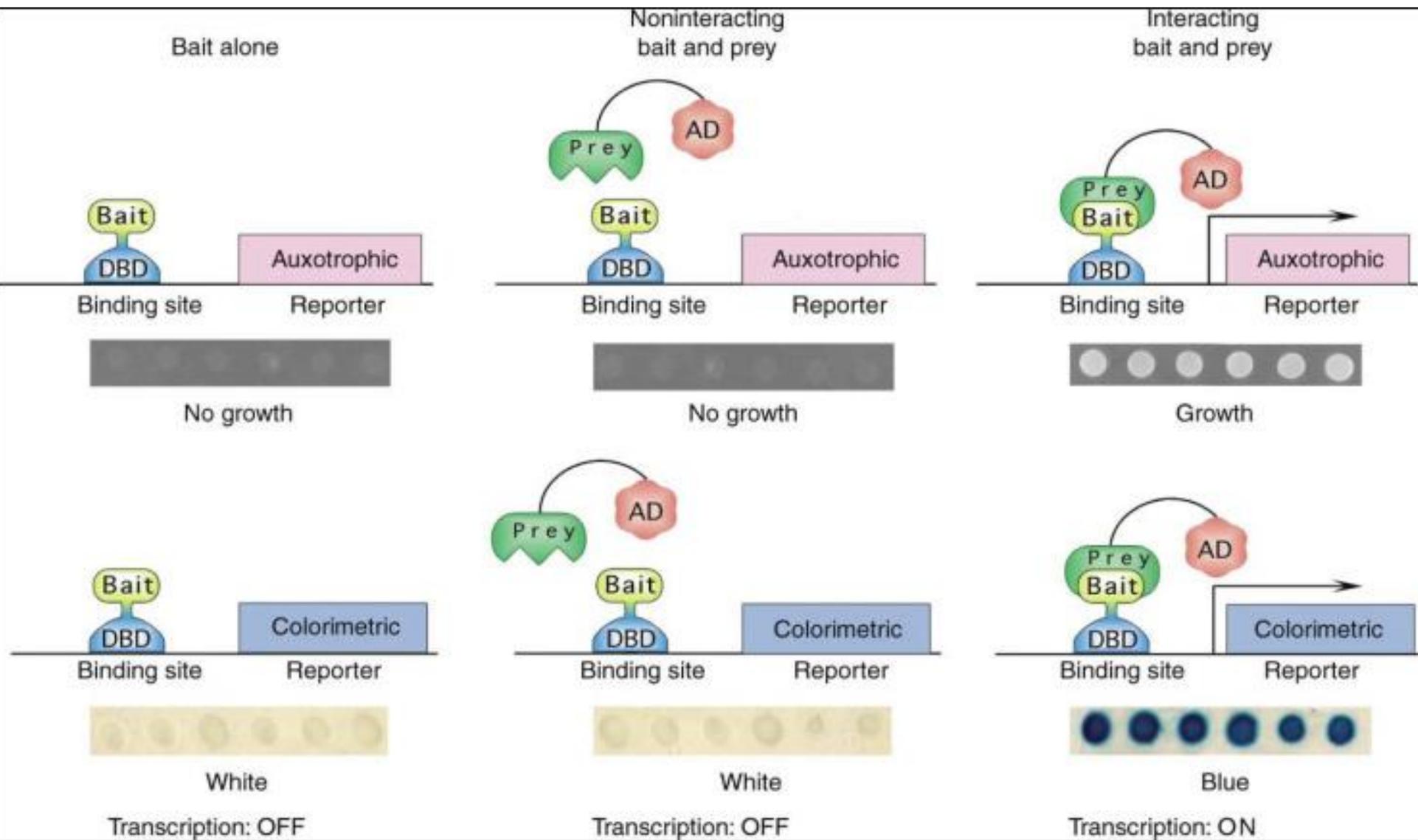
lacZ, codifica per l'enzima α -galattosidasi, che in presenza del substrato, **X-gal**, rende le colonie blu.



Più geni reporter

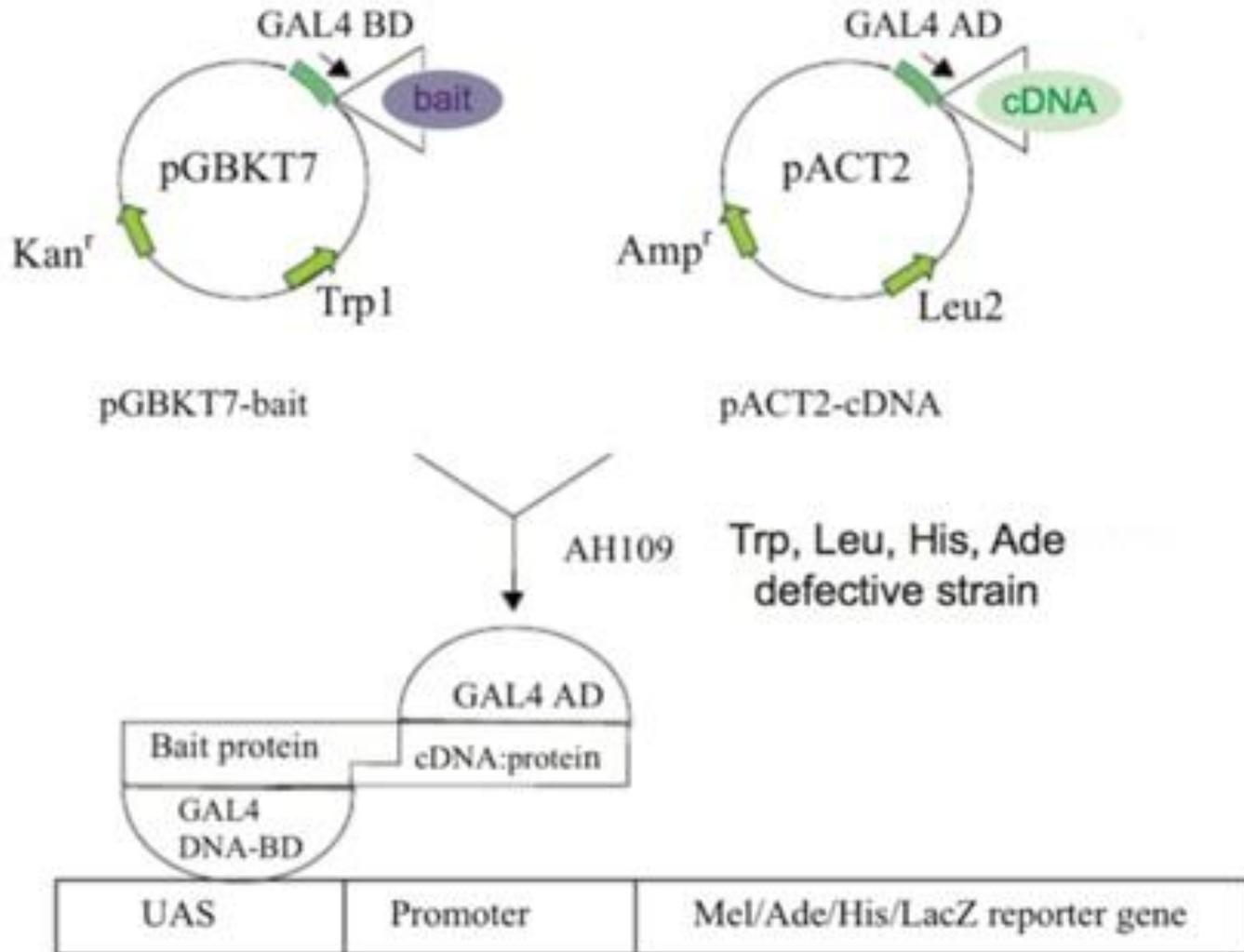
Select for growth in His⁻ media

Identify blue colonies on X gal

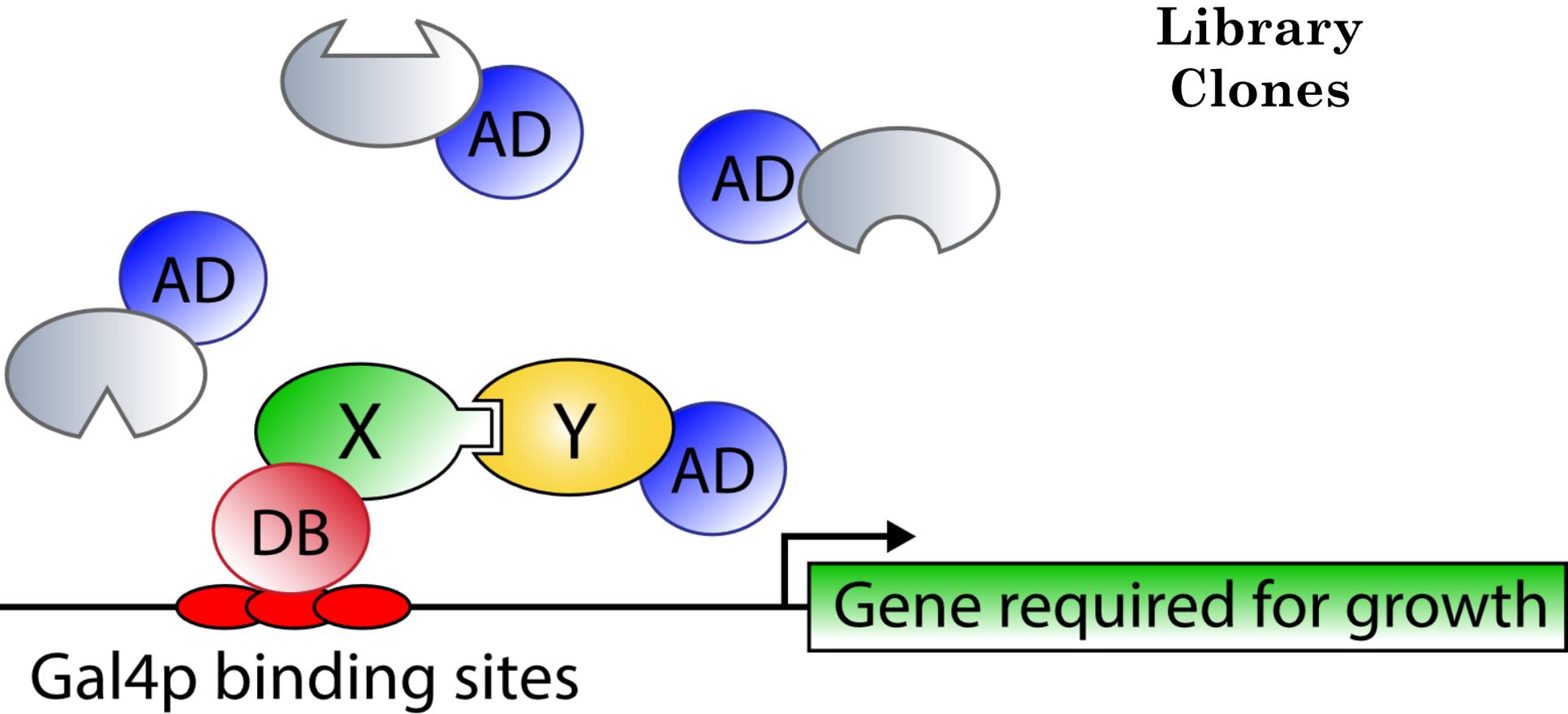


Ma se non conosciamo la Preda.....

Principle for GAL4 System



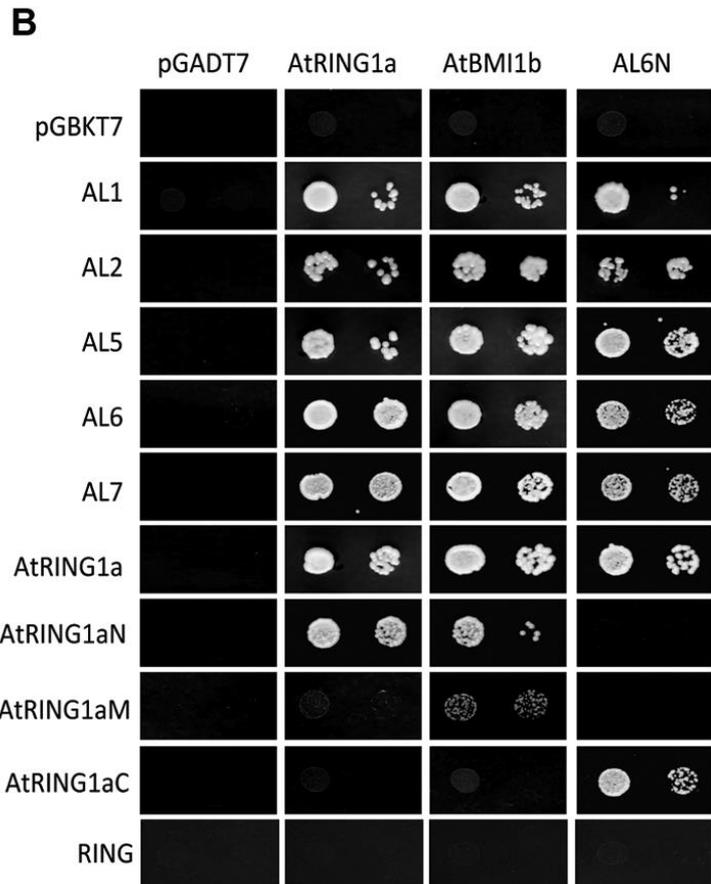
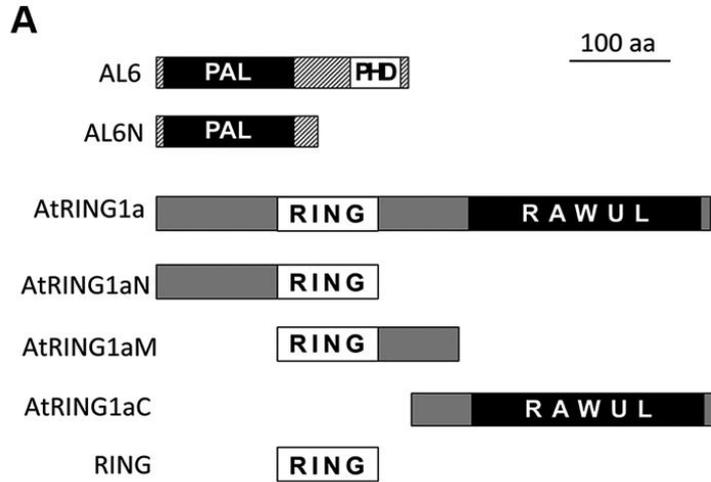
Screening mediante Yeast Two-Hybrid



Gal4p binding sites

Gene required for growth

Library Clones



During a yeast two-hybrid screen using AtRING1a (pGKBT7) as bait, we isolated from an Arabidopsis seedling cDNA library three positive clones corresponding to AL6.

- Arabidopsis genome contains 7 homologs AL1 - AL7
- AL1, 2, 5 6, 7 interact with RING1 BMI
- AL6 N-ter interacts with AL1/2/5/7 and with RING1a C-ter

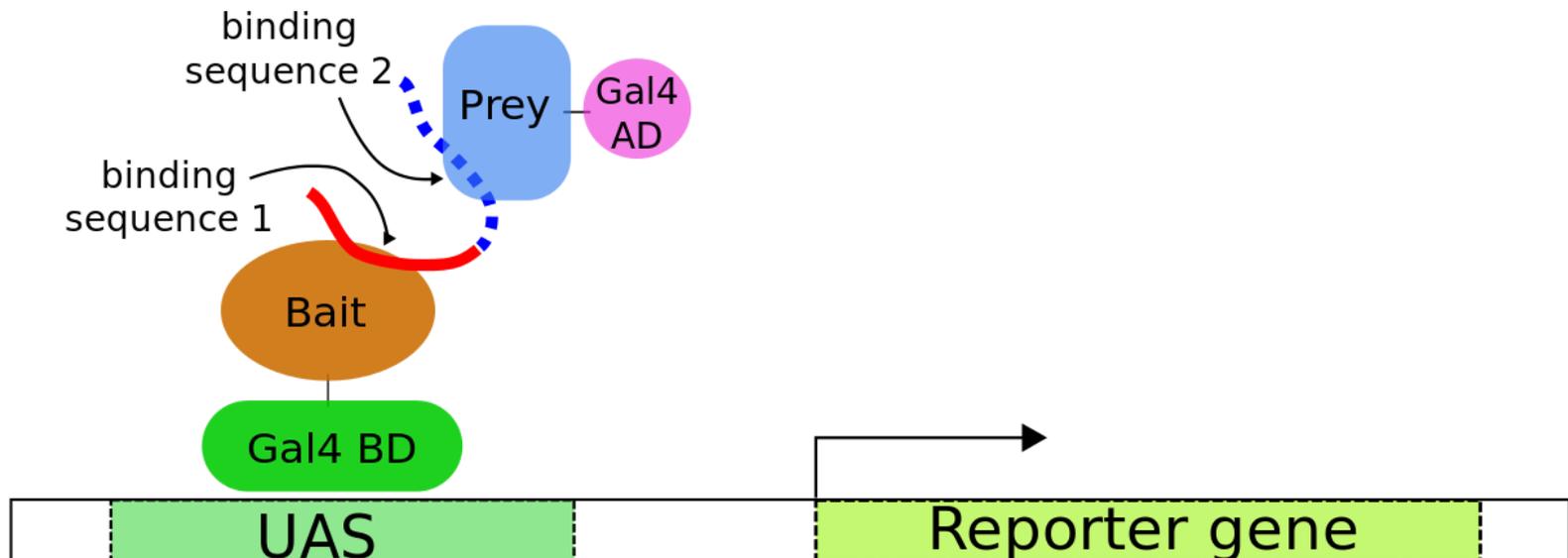
pGBKT7: fusion protein of Bait with the GAL4 DNA-BD

pGAD T7: fusion protein of the Prey with the GAL4-AD

Yeast three Hybrid System

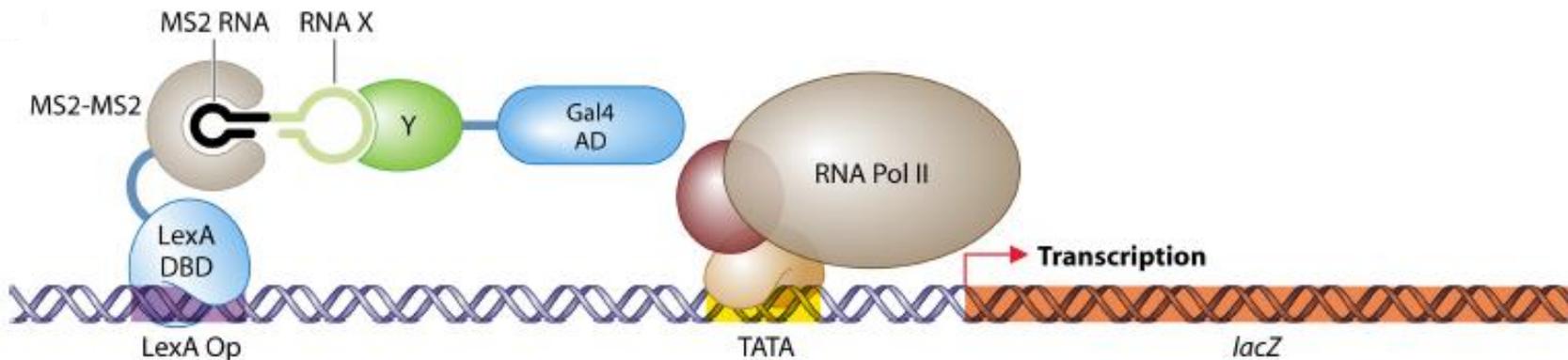
Il Three Hybrid System viene utilizzato quando è necessario l'intervento di un terzo componente per visualizzare l'interazione proteina-proteina:

1. Modifiche post-traduzionali
2. Interazioni RNA-proteine
3. Interazioni Proteina- Piccole molecole



Un esempio di applicazione di Three Hybrid System: Interazione RNA-proteina

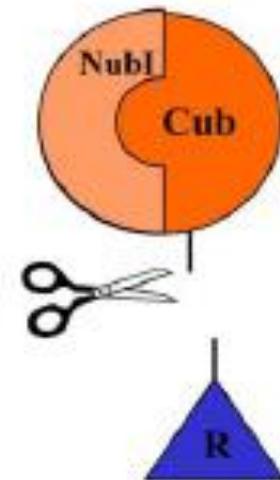
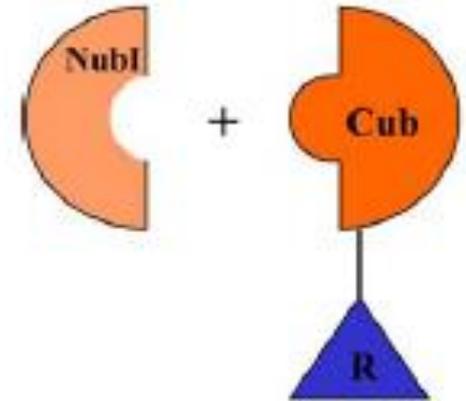
- Il **DNA binding site** è costituito da 17pb del recognition site della proteina **LexA** di *E. Coli*, a monte dei 2 reporter **His3** e **LacZ**;
- La prima proteina chimerica è costituita da **LexA BD** fuso alla proteina del coat del batteriofago MS2, **piccolo polipeptide che lega come dimero una corta sequenza stem-loop**;
- L'RNA ibrido consiste di 2 Binding Sites per MS2 legati ad una sequenza **RNA di interesse X**;
- La seconda proteina chimerica è costituita dal AD di GAL4 fuso ad una **RNA Binding Protein di interesse Y**.



Sistema split-ubiquitina

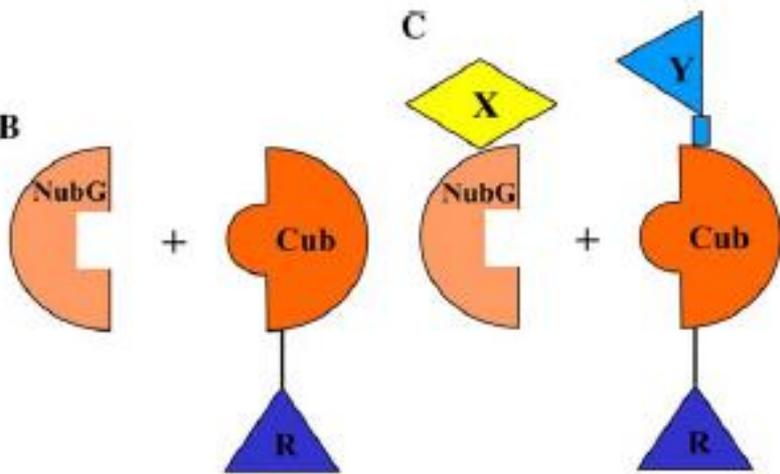
Il sistema **split-ubiquitina**, permette di studiare proteine che non possono essere espresse nel nucleo, quindi non analizzabili con il doppio ibrido, o fortemente idrofobiche, quindi difficili da studiare con metodi biochimici, come ad esempio le **proteine di membrana**.

L'**ubiquitina** è una piccola proteina che si lega covalentemente a proteine target indirizzandole alla degradazione via proteasoma. L'ubiquitina non viene degradata dal **proteasoma** perché esistono proteasi ubiquitina-specifiche (**UBP**) che tagliano l'ubiquitina dalla proteina target, permettendone il riciclo.

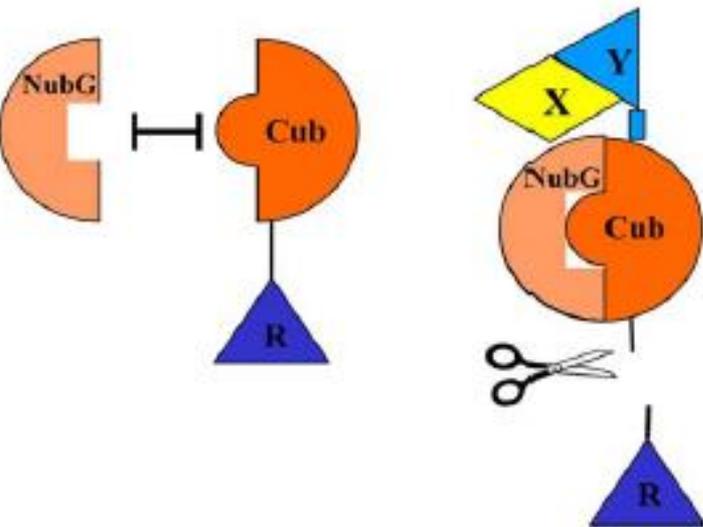


Sistema split-ubiquitina

Se il dominio **N-terminale** e il dominio **C-terminale** vengono espressi in lievito, le due porzioni dell'ubiquitina si riassociano spontaneamente e sono riconosciute da **UBP**.



Nel **sistema split-ubiquitina** si è modificato un residuo amminoacidico nel dominio **N-terminale** **che determina una diminuzione dell'affinità tra i due domini**.

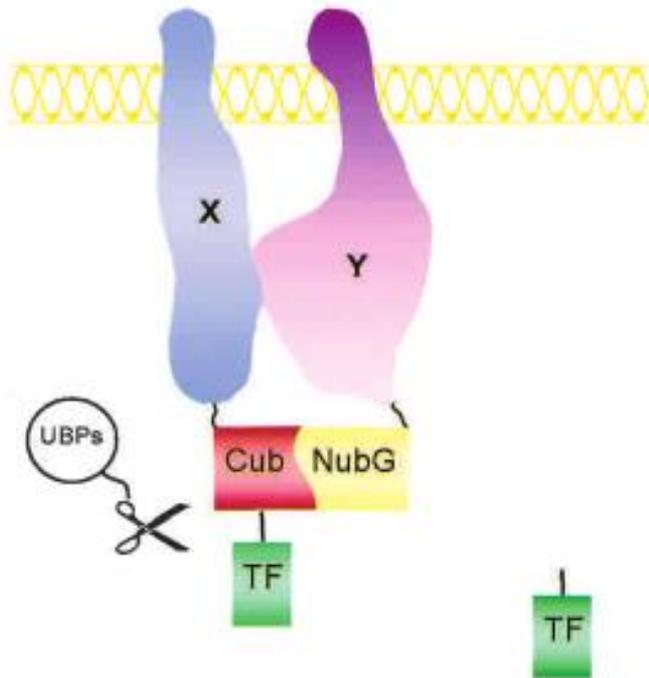


Se i domini **N-terminale** e **C-terminale** vengono fusi rispettivamente a due proteine **X** e **Y**, solo se le due proteine interagiscono si avrà la ricostituzione dell'**ubiquitina** e il taglio da parte dell'**UBP**

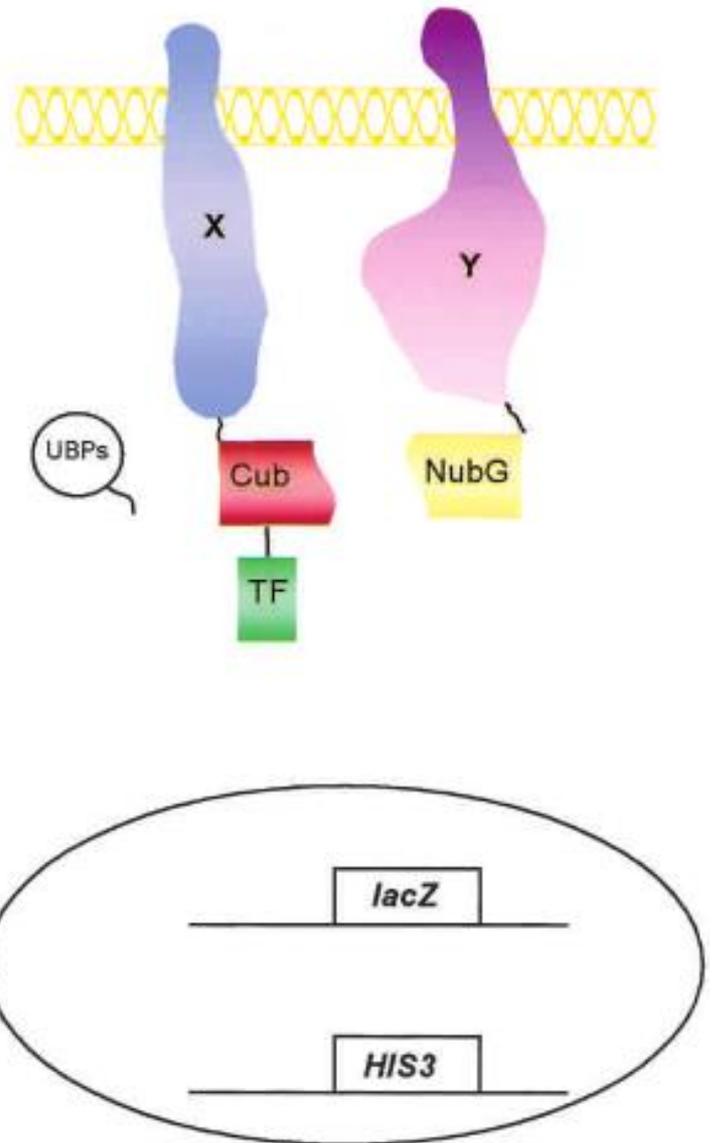
La **proteina target** è un **TF** che, una volta libero, attiverà la trascrizione di un reporter

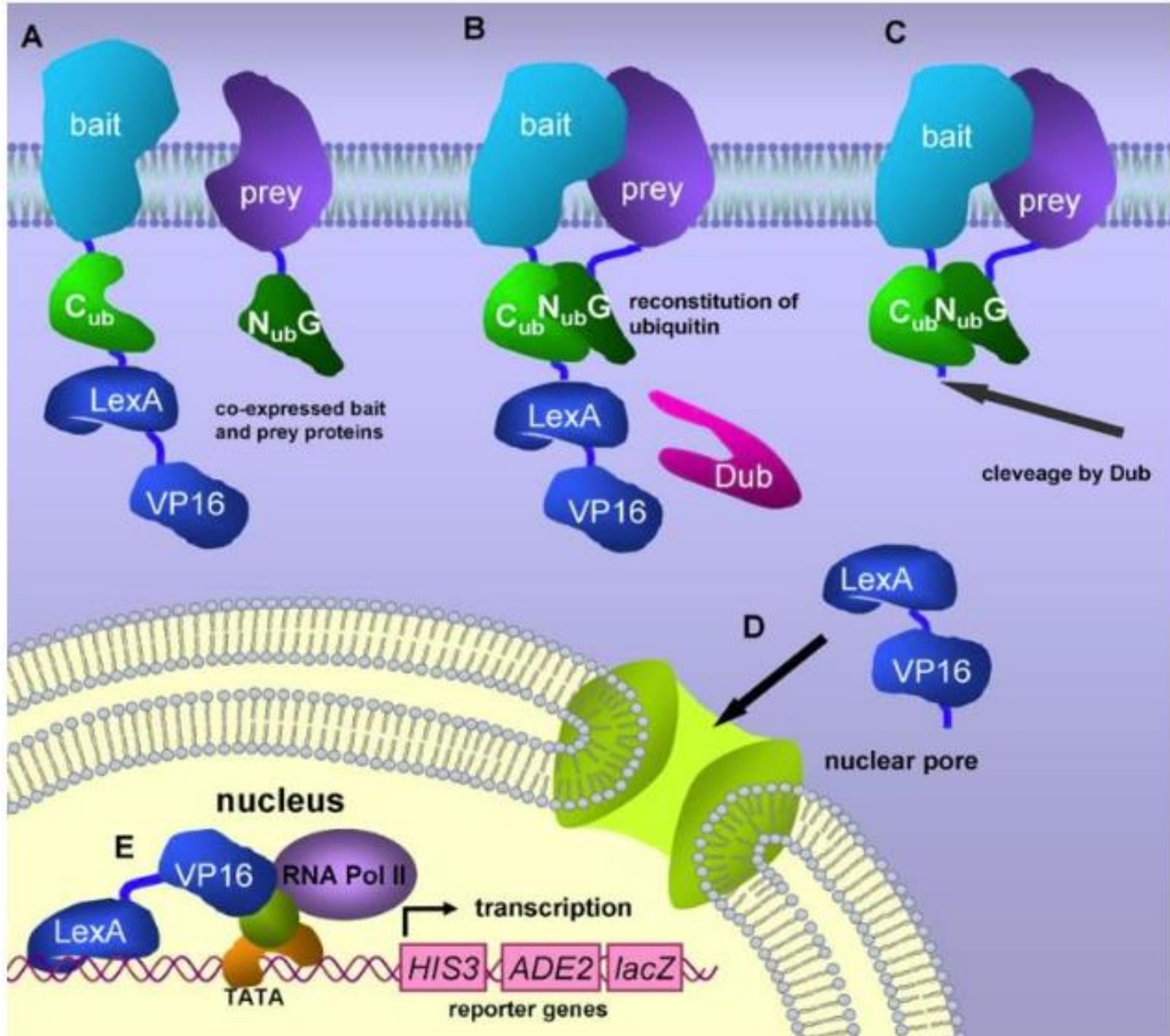
Sistema split-ubiquitina

A



B





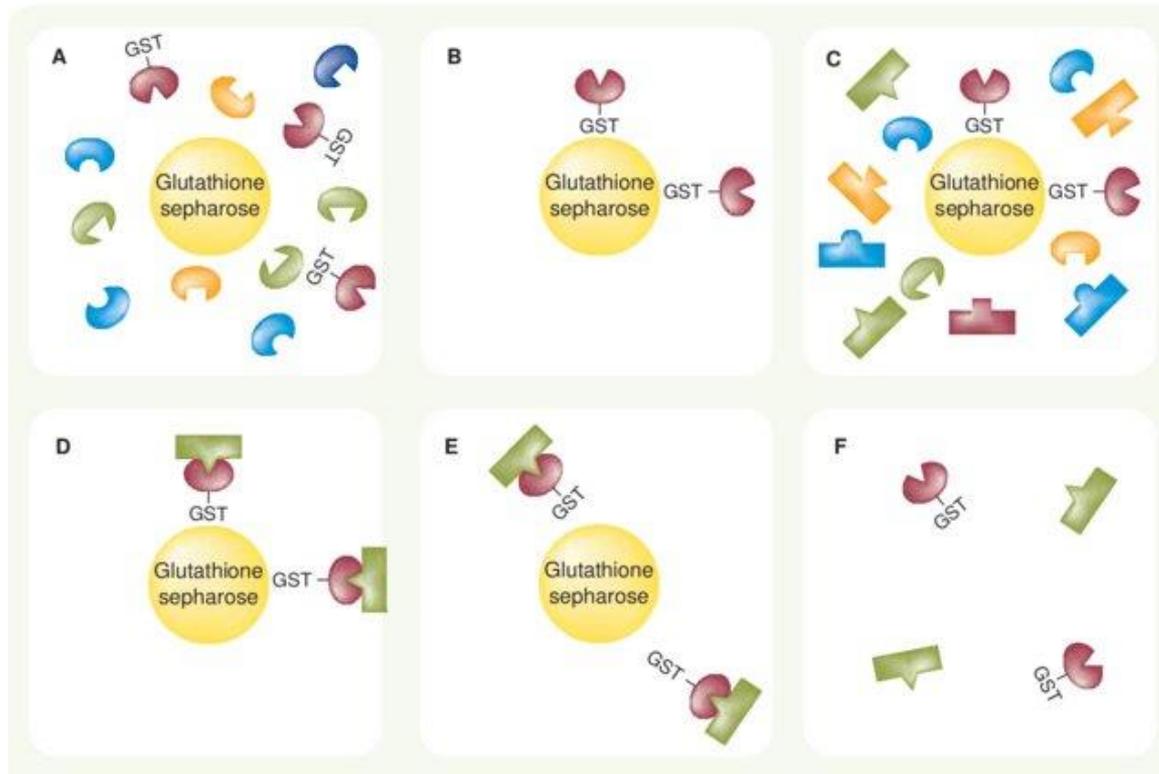
GST Pull-down

- E' possibile far esprimere la proteina d'interesse (Bait) in sistemi eterologhi (es. *E. Coli*) fusa con un **tag GST**.
- Il sistema GST pull-down può essere utilizzato quando non si hanno anticorpi specifici contro la proteina.
- L'anticorpo viene sostituito con un sistema ad affinità costituito da **una resina con glutanione** che è in grado di trattenere proteine fuse al tag GST. Oppure resine di nichel in grado di trattenere proteine con tag ad His.



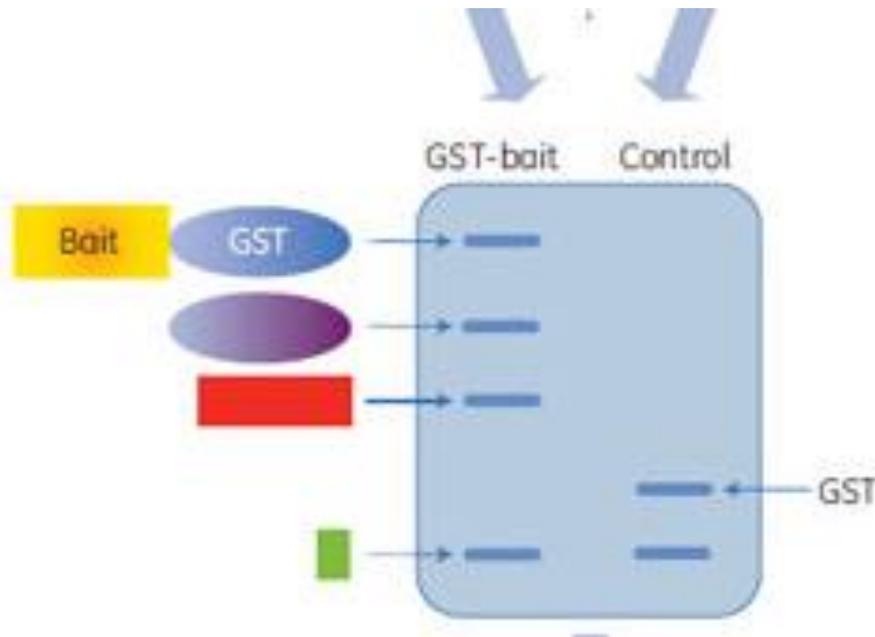
La proteina chimerica funzionerà da esca per catturare la potenziale proteina partner (Prey)

GST Pull-down



(A) A GST-fusion protein (red) is expressed in bacteria, the bacteria are lysed, and the lysates are added to glutathione-sepharose beads (yellow). (B) The GST-fusion protein binds covalently to the beads, and unbound proteins are washed away. (C) A crude lysate (or purified protein) containing the interacting protein partner (green) is then added to the immobilized GST-tagged protein. (D) The beads are washed, leaving the desired protein complex on the beads. (E) The bound protein complex is then eluted from the beads by incubating with reduced glutathione. (F) Protein complexes are denatured by heating under reducing conditions, separated by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, and analyzed by western blot. GST: Glutathione-S-transferase.

GST Pull-down



Analisi dell'immunoprecipitato per
Western blot



Mass Spec per identificare interacting
proteins

Metodi biochimici: Co-Immunoprecipitazione (Co-IP)

- Grazie alla **Co-IP** è possibile isolare una proteina d'interesse che interagisce con la sua proteina target e analizzare ogni componente attraverso Western blot o spettrometria di massa.
- Se due o più proteine interagiscono tra di loro e una delle due lega un anticorpo con alta affinità, ne consegue che anche l'altra può co-precipitare.
- Posso visualizzare l'interazione tra due proteine *in vivo* o *semi-in vivo*

Co-Immunoprecipitazione

- Scelta della strategia da utilizzare per immunoprecipitare la proteina d'interesse:

Immunoprecipitazione con ANTICORPI:

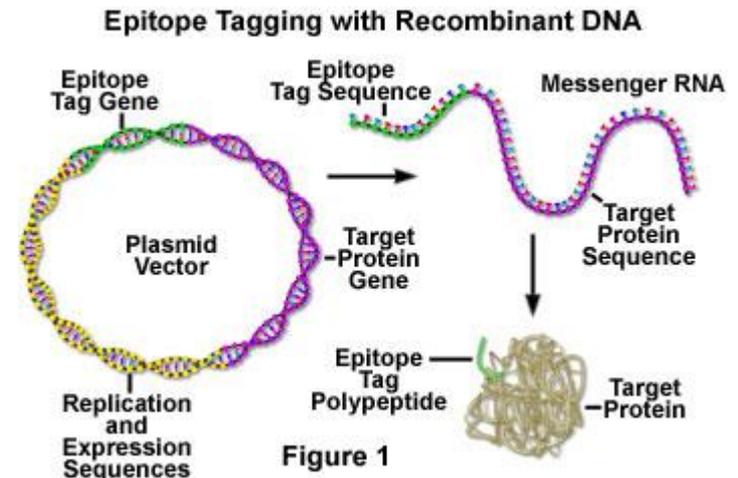
è importante scegliere un'anticorpo con alta specificità e affinità per la proteina

Utilizzo di proteine taggate:

devo produrre linee cellulari esprimenti proteine fuse con epitopi riconosciuti da anticorpi commerciali.

Gli epitopi più usati sono:

HA, MYC, HIS



Co-Immunoprecipitazione



1. Estrazione delle proteine



Scegliere con attenzione il tessuto da cui partire e preparare il lisato cellulare con opportuni buffer di estrazione



2. Aggiungere un anticorpo che riconosce una delle due proteine



Lasciare incubare il lisato cellulare con un anticorpo specifico contro la proteina d'interesse, così che si formi il complesso anticorpo-antigene.



3. Aggiungere una resina a cui si lega l'anticorpo



Vengono utilizzate resine di agarosio coniugate con le proteine A o G di Stafilococco, che sono in grado di legare la porzione Fc degli anticorpi



4. Immunoprecipitazione
della proteina di
interesse



Dopo diverse ore di incubazione la proteina, con gli eventuali interattori, saranno legati alla resina tramite l'anticorpo



5. Eluizione e recupero
delle proteine



Si prosegue con una serie di lavaggi per eliminare eventuali interazioni aspecifiche e si risospende la resina con un buffer che permette la dissociazione del complesso proteico dalla resina

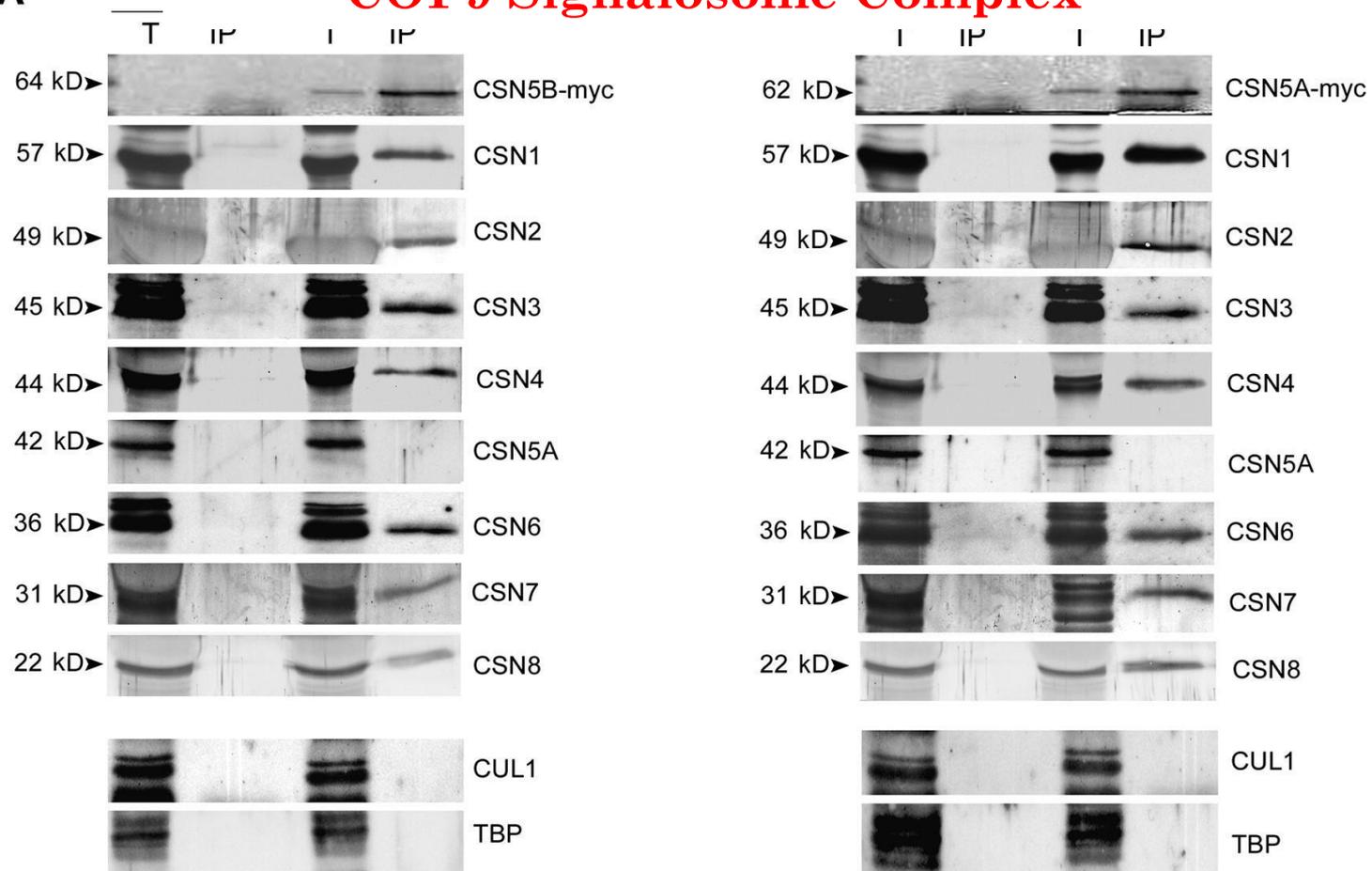
Vantaggi: permette di identificare **l'interazione proteica *in vivo***

Svantaggi: necessari anticorpi specifici o linee cellulari/organismi che esprimano la proteina taggata

Se non conosco già l'interattore devo procedere a spettrometria di massa per identificarlo, i.e. non isolo direttamente il gene che lo codifica

A

COP9 Signalosome Complex



(A) Immunoprecipitation of the CSN^{CSN5B} complex from transgenic *Arabidopsis csn5b* seedlings stably expressing CSN5B-myc. Seedling protein extracts prepared from 2-week-old wild-type and *csn5b/35S:CSN5B-myc* transgenic lines were used.

(B) Immunoprecipitation of the CSN^{CSN5A} complex from transgenic *Arabidopsis csn5b* seedlings stably expressing CSN5A-myc. Seedling protein extracts prepared from 2-week-old wild-type and *csn5b/35S:CSN5A-myc* transgenic lines were used.

The immunoprecipitates and the total extracts were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against myc, CSN1, CSN2, CSN3, CSN4, CSN5, CSN6, CSN7, CSN8, and CUL1. Lane T indicates the total protein extracts. Lane IP indicates the immunoprecipitates with α -myc 9E10 antibody immobilized onto Sepharose fast flow beads matrix (9E10 affinity matrix). α -TBP (TATA binding protein) antibody is used as a pull-down negative control. Data are representative of three independent experiments.

Sistema TAP-tag

Il **TAP-tag** è un sistema per l'isolamento di complessi proteici nella loro forma nativa.

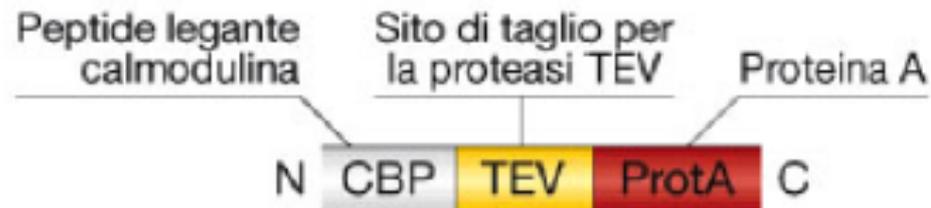
Prevede che la proteina d'interessa venga fusa ad un duplice tag, così da permettere una purificazione a doppio step che garantisce l'integrità del complesso.

Rispetto ai sistemi a singola purificazione (Co-IP) il **TAP-tag** riduce il segnale di background garantendo un'elevata purezza del complesso

Il **TAP-tag** è il sistema ideale per analizzare e caratterizzare complessi multiproteici tramite spettrometria di massa.

Sistema TAP-tag

Prevede la fusione della proteina esca al **TAP (Tandem Affinity Purification)** tag. E la produzione di cellule/organismi esprimenti questa proteina di fusione.



Il TAP tag è formato da tre componenti:

CPB: peptide di legame alla calmodulina

TEV: sito di taglio per la proteasi virali

ProtA: dominio di legame all'immunoglobulina G della Proteina A

Sistema TAP-tag

Il sistema è composto da:

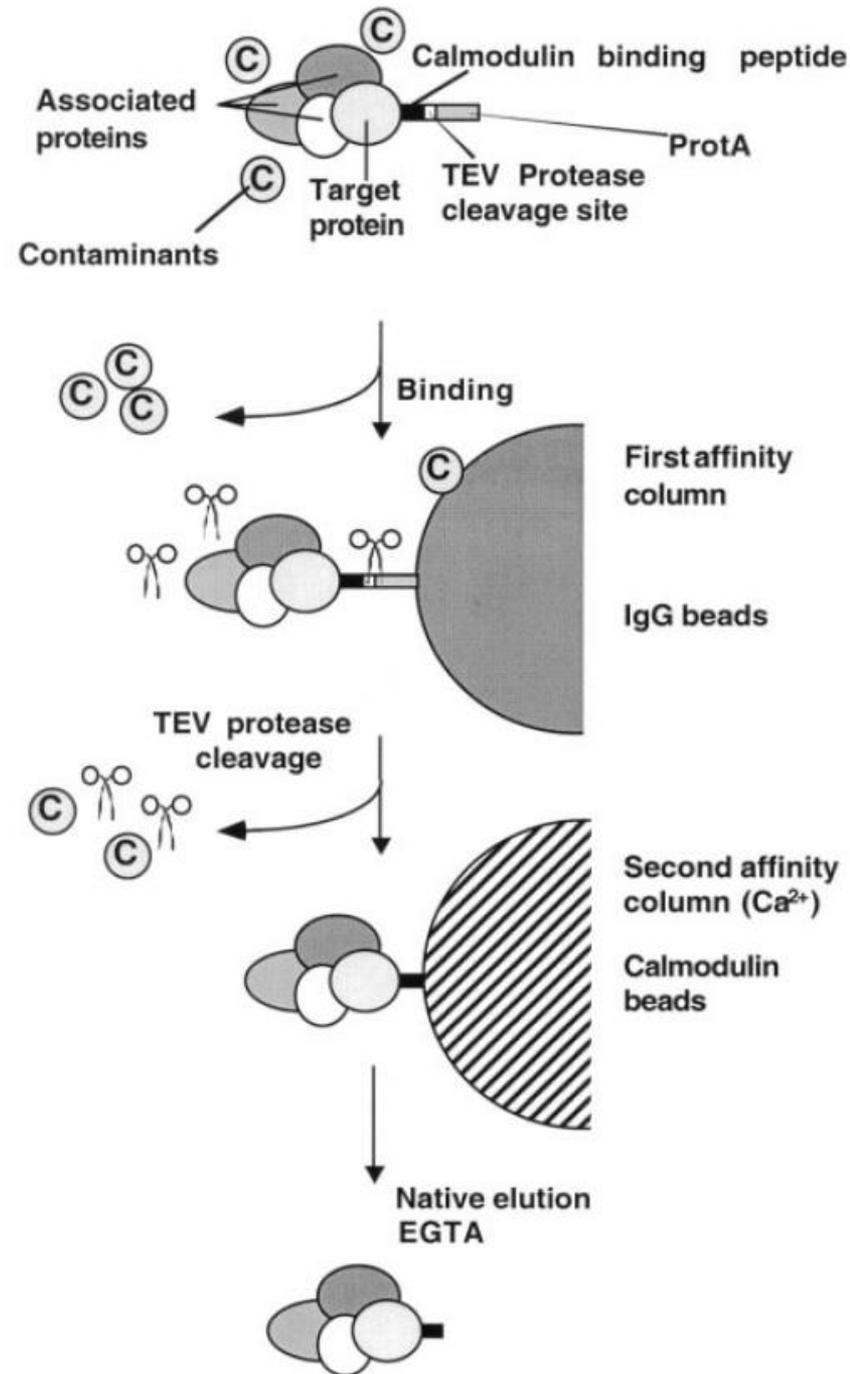
- 2 IgG BD della ProtA di S.aureus
- 1 sito di taglio della proteasi TEV
- 1 calmodulin binding peptide (CBP)

La ProtA lega ad alta affinità la matrice di IgG; il taglio della proteasi permette l'eluizione del complesso proteico in condizioni native.

L'eluato è incubato con beads rivestite di calmodulin in presenza di Ca^{2+} .

Dopo dei lavaggi che rimuovono la proteasi ed eventuali contaminanti, il complesso è eluito in condizioni mild grazie all'aggiunta dell'agente chelante EGTA

B



Evoluzione del TAP-tag...

TAP tag	Approximate size (kDa)	Recovery (%)	Cleavage site	References
ProtA-CBP	21	20–30 ^a	TEV	Rigaut et al. (1999)
SBP-CBP	8	NA ^b	None ^c	Braman et al. (2007)
FLAG-HA	3	NA	None	Zenser et al. (2008)
3× FLAG-His	3	10–20	None	Yang et al. (2006)
ProtA-ProtC	19	10–20	TEV	Schimanski et al. (2005)
ProtG-SBP	19	5	TEV	Bürckstümmer et al. (2006)
2× FLAG-ProtA	19	5–30	TEV	Tsai and Carstens (2006)
His-2× Strep II	6	16	2× TEV	Giannone et al. (2007)
2× Strep II-FLAG	5	27–48	None	Gloeckner et al. (2007)
SBP-HA	5	30–40	None	Glatter et al. (2009)
SBP-His	8 + 1 ^d	>50	None	Li et al. (2011)
His-biotin	10	NA	None	Tagwerker et al. (2006)
GFP-S/His ^e	36	NA	TEV/HRV3C ^f	Cheeseman and Desai (2005)

^a The average value in yeast (the corresponding value in higher eukaryotes is usually much lower)

^b NA not available

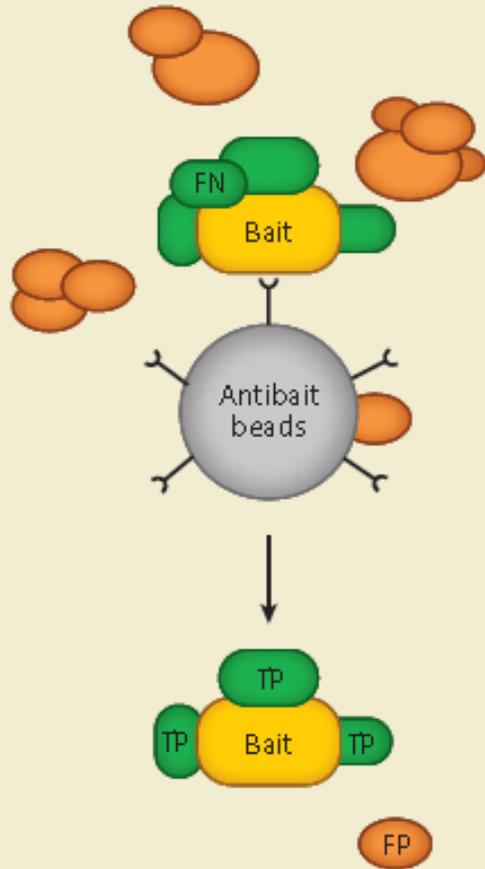
^c Enzymatic cleavage is not required

^d The *N*-terminal SBP-CBP tag plus the *C*-terminal His tag

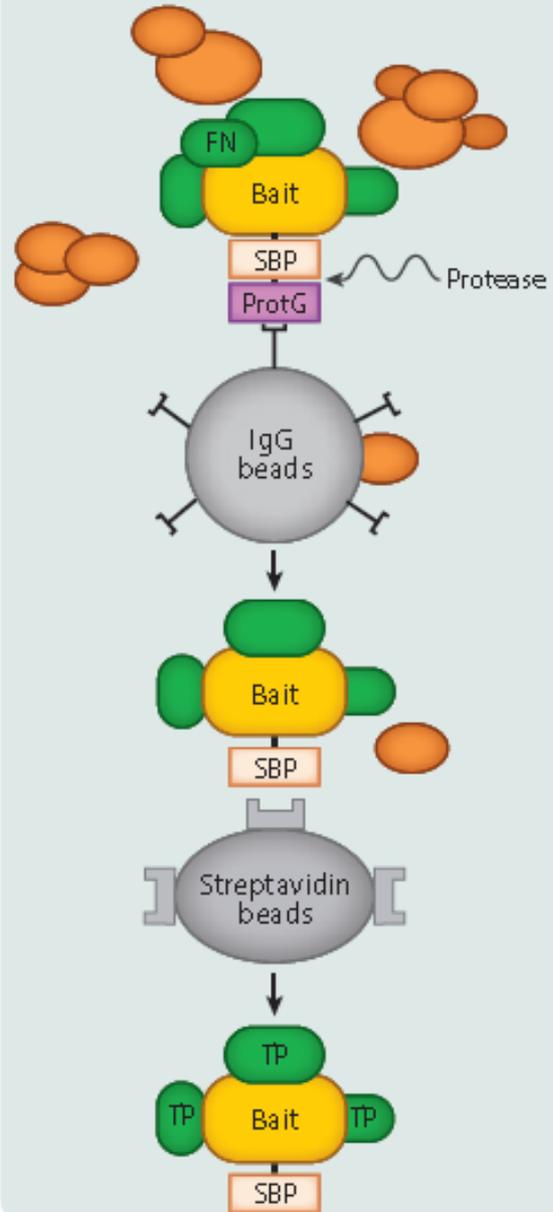
^e The *N*- and *C*-terminal tags use S-peptide and His tag, respectively, as the second affinity handle

^f The *N*- and *C*-terminal tags use TEV and HRV3C protease sites, respectively, to cleave off the GFP moiety

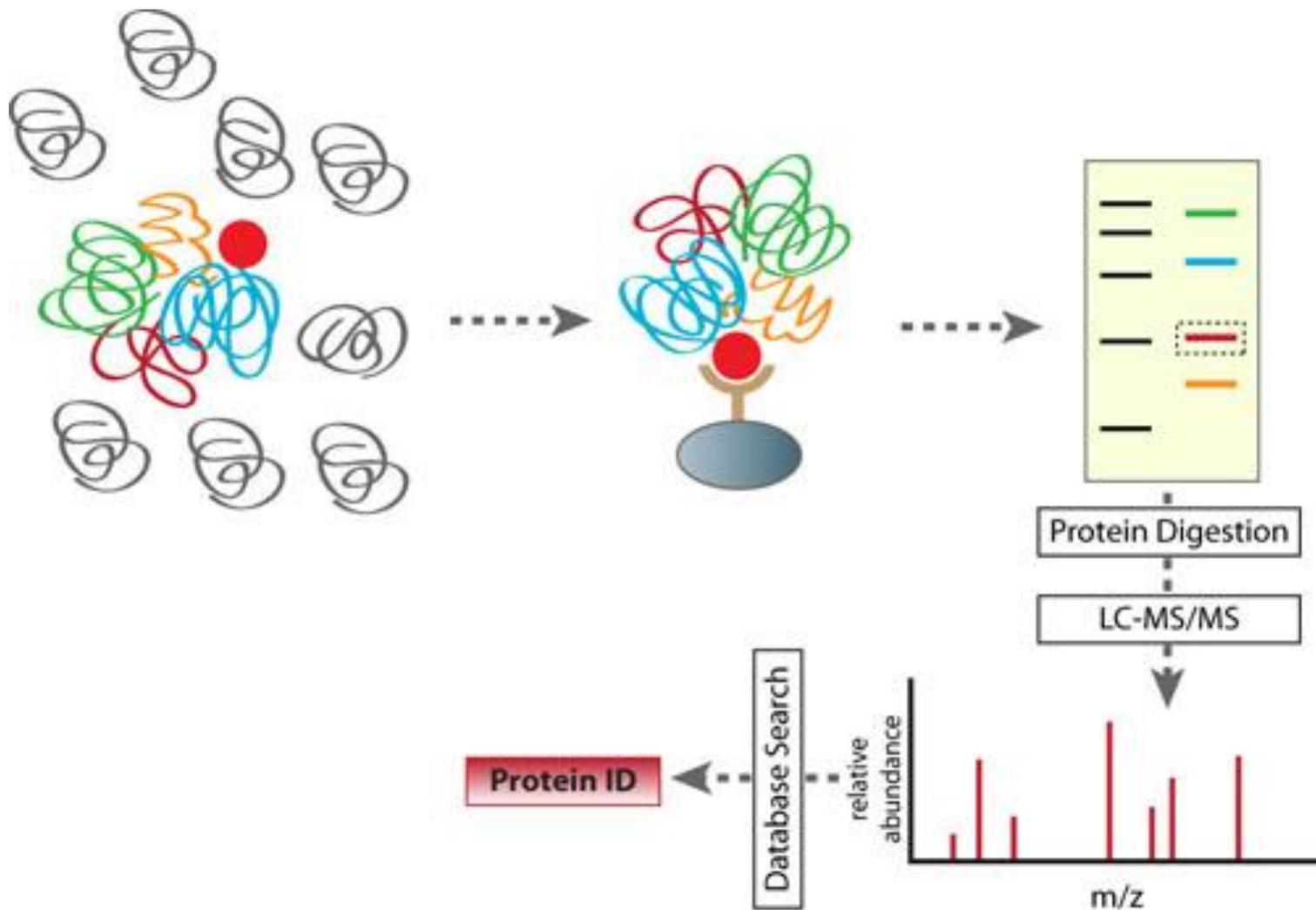
a Immunoprecipitation



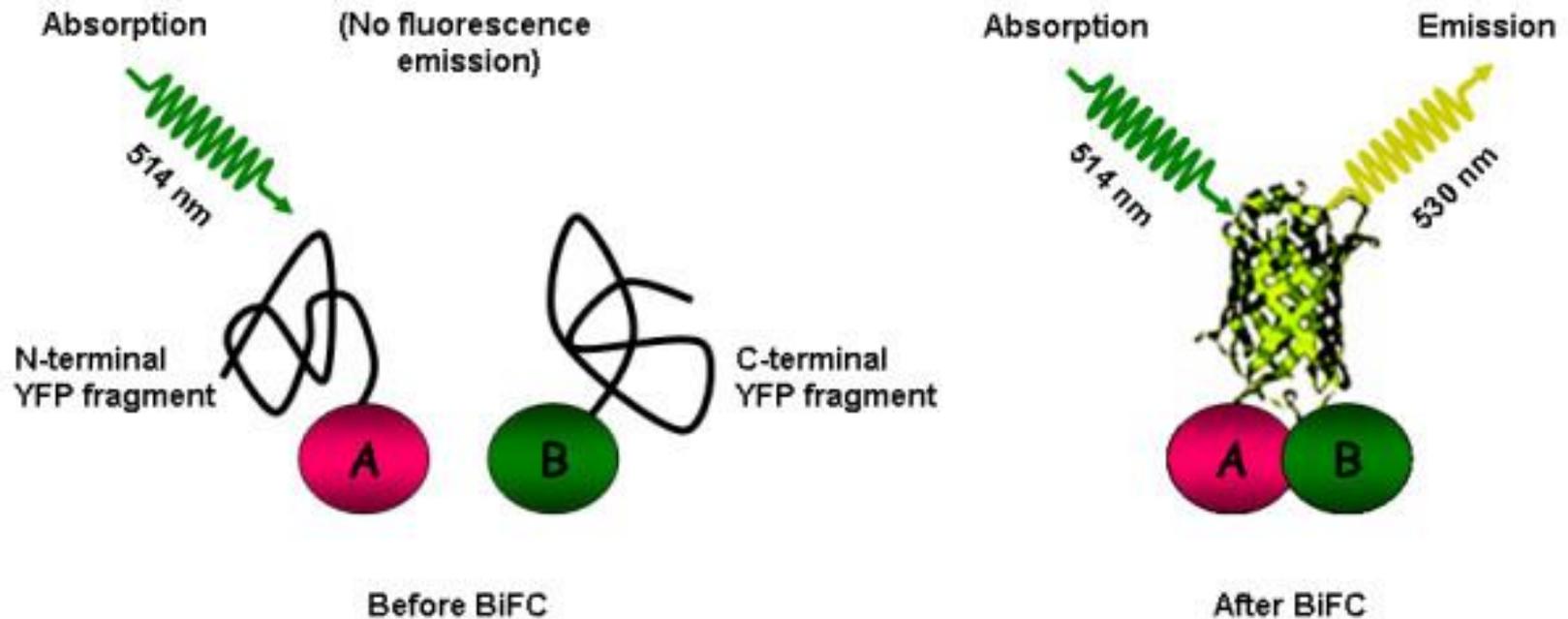
b Tandem affinity purification



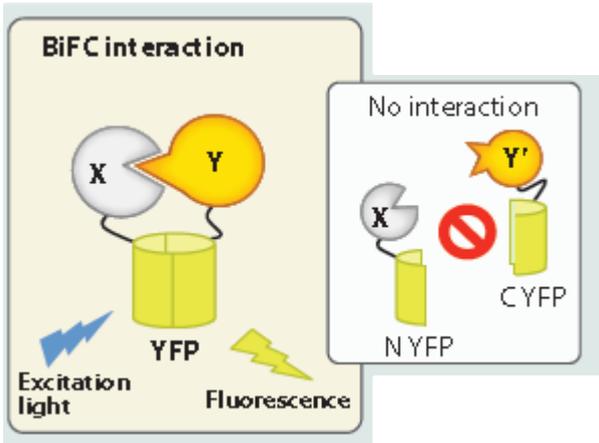
Identificazione di interazioni Proteina-Proteina tramite **Immunoprecipitazione** combinata a **Spettrometria di Massa**



Split YFP or BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation)



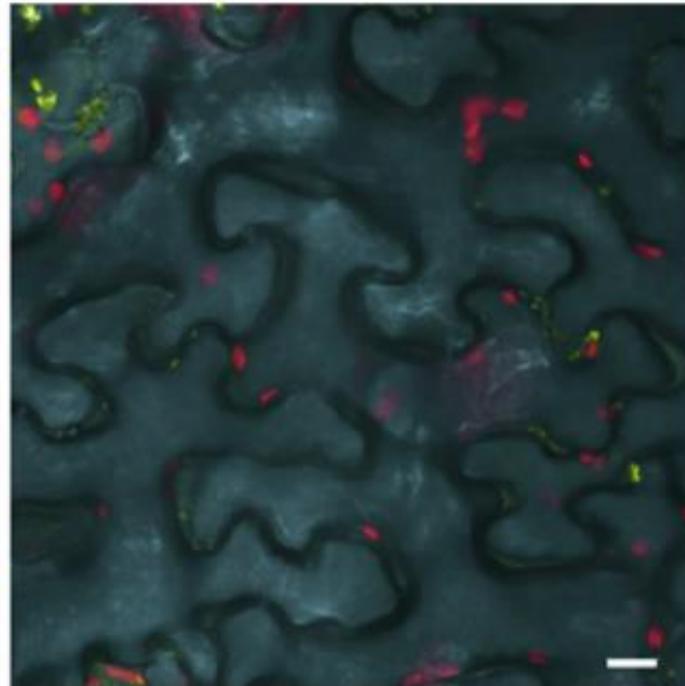
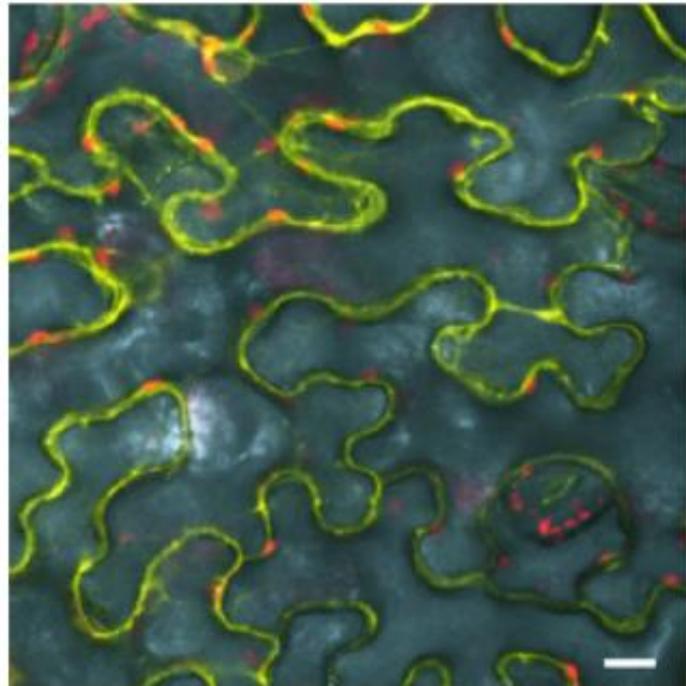
Il saggio BiFC (split YFP) si basa sull'osservazione che i domini N-ter e C-ter della GFP (e suoi derivati es. YFP) non sono in grado spontaneamente di ricostituire un fluoroforo funzionale. Quindi si ha recupero di fluorescenza solo quando 2 proteine di fusione (rispettivamente fuse a N-ter e C-ter) interagiscono. E' dunque possibile monitorare l'interazione tra 2 proteine attraverso la misura della fluorescenza emessa dalla YFP ricostituita



Split YFP or BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation)

INTERAZIONE

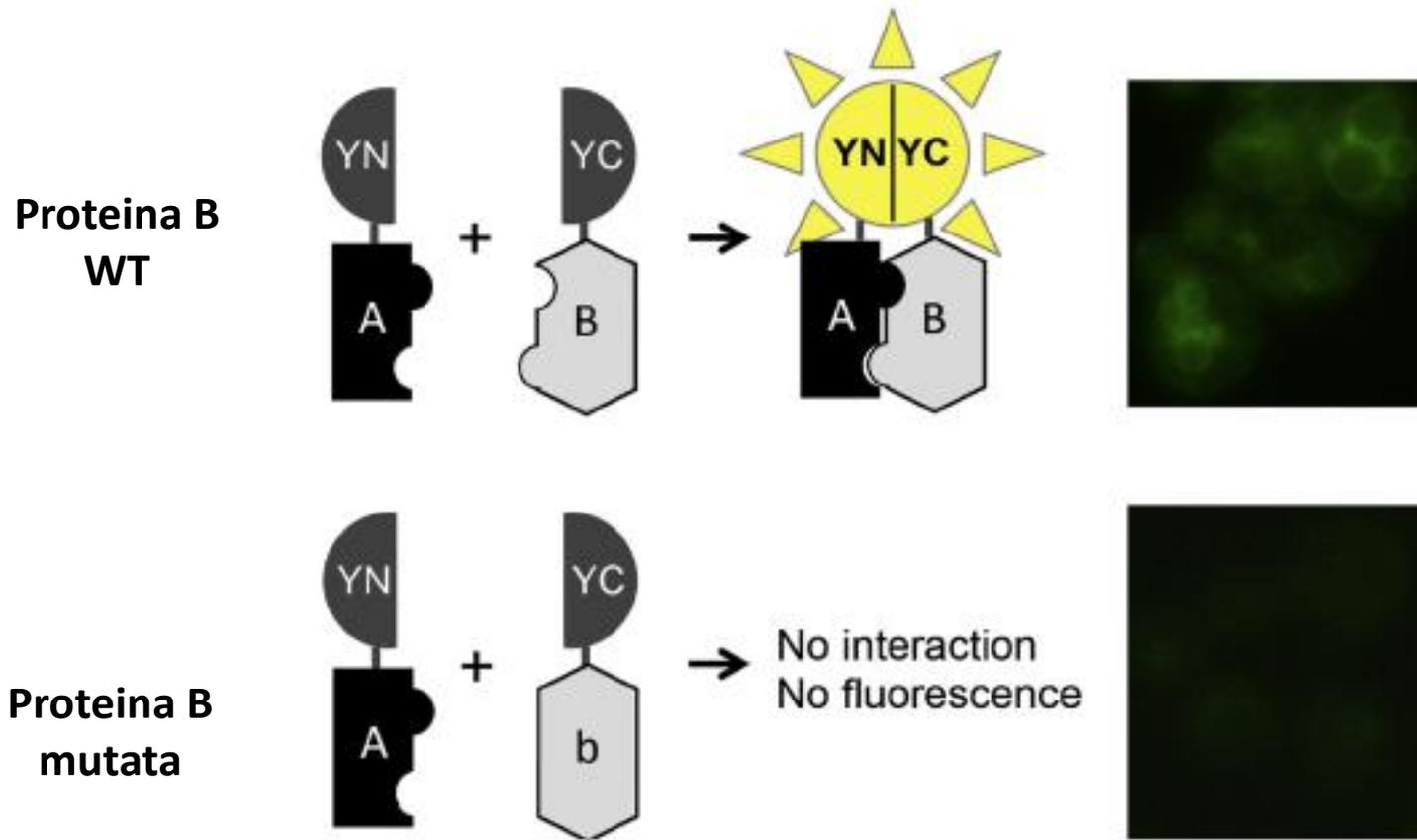
**NESSUNA
INTERAZIONE**



HSP90-HN + YC-HSP90

HSP90-HN + YC-IMP

Posso utilizzare la BiFC anche per studiare quali residui di una proteina sono necessari per l'interazione proteina-proteina



FRET

(Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Il Trasferimento Energetico di Risonanza di Fluorescenza è una **interazione dipendente dalla distanza** tra gli stati elettronici eccitati di due molecole fluorescenti.

L'eccitazione è trasferita da una molecola donatore ad una accettore **senza emissione di fotone**.

Un fluoroforo (donatore) è otticamente eccitato, e trasferisce energia di eccitazione all'accettore.

Lo spettro di emissione del donatore è sovrapponibile allo spettro di assorbimento di un secondo fluoroforo (accettore), posto nelle vicinanze

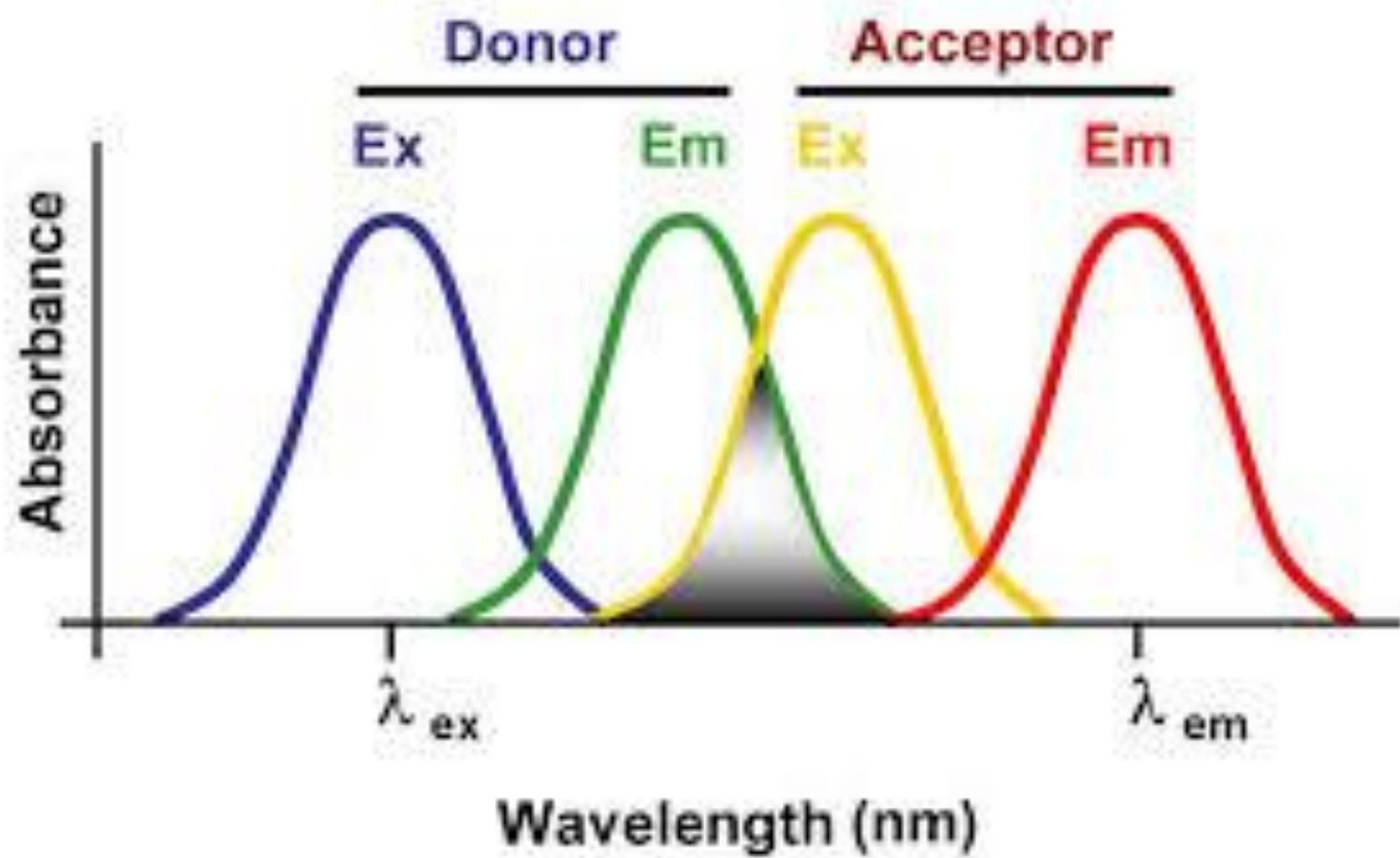
I due fluorofori devono garantire:

- ✓ **Separazione degli spettri di assorbimento tra donatore ed accettore**
- ✓ **Grande sovrapposizione (>30%) tra la fluorescenza del donatore e l'assorbimento dell'accettore.**
- ✓ **Fluorescenze di donatore ed accettore relativamente efficienti.**
- ✓ **Separazione tra la fluorescenza del donatore ed dell'accettore.**

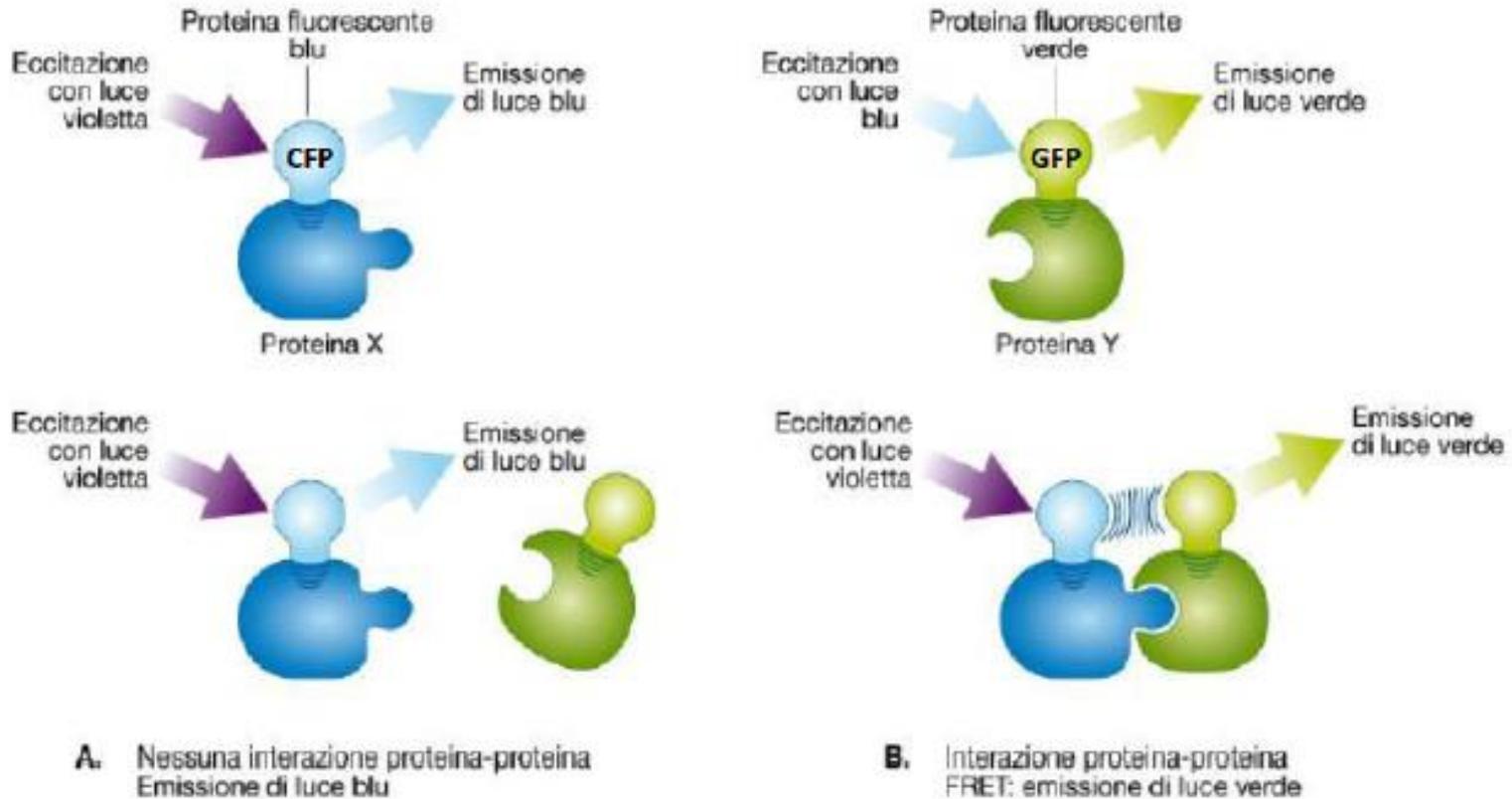
Principali fluorofori utilizzati per FRET e BiFC

La lunghezza d'onda della luce che eccita il donatore non deve direttamente eccitare l'accettore

Donor	Excitation _{Donor}	Emission _{Donor}	Acceptor	Excitation _{Acceptor}	Emission _{Acceptor}
CFP	440nm	480nm	YFP	520nm	535nm
BFP	365nm	460nm	GFP	488nm	535nm
CFP	440nm	480nm	dsRed1	560nm	610nm
FITC	488nm	535nm	Cy3	525nm	595nm
Cy3	525nm	595nm	Cy5	633nm	695nm
GFP	488nm	535nm	Rhodamine	543nm	595nm



FRET



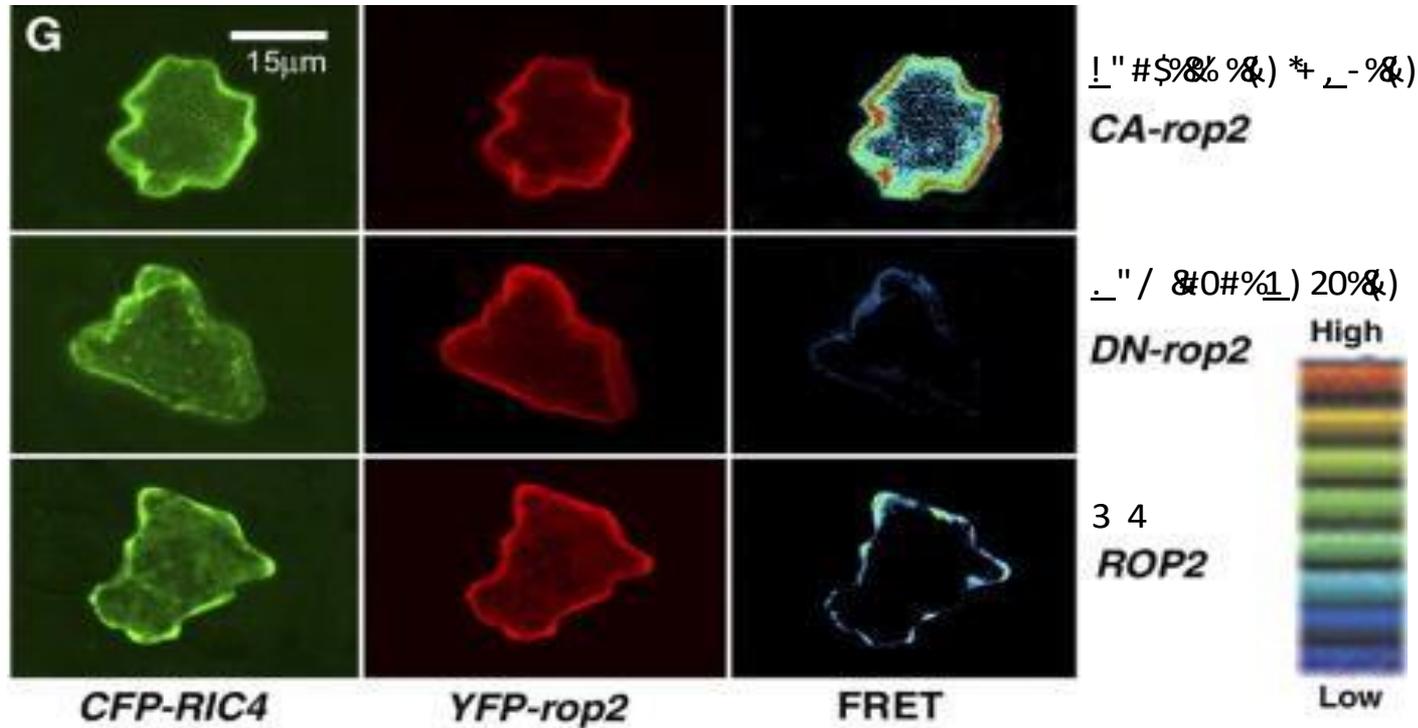
CFP: eccitata da luce violetta, emette luce blu

GFP: eccitata da luce blu, emette luce verde.

VANTAGGI: permette di studiare le interazioni-proteina-proteina *in vivo* e in “tempo reale”

SVANTAGGI: è molto difficile da mettere a punto: è necessario acquisire immagini a due diversi tipi di lunghezza d'onda. Inoltre è necessario che le due proteine siano strettamente associate (meno di 10nm).

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)



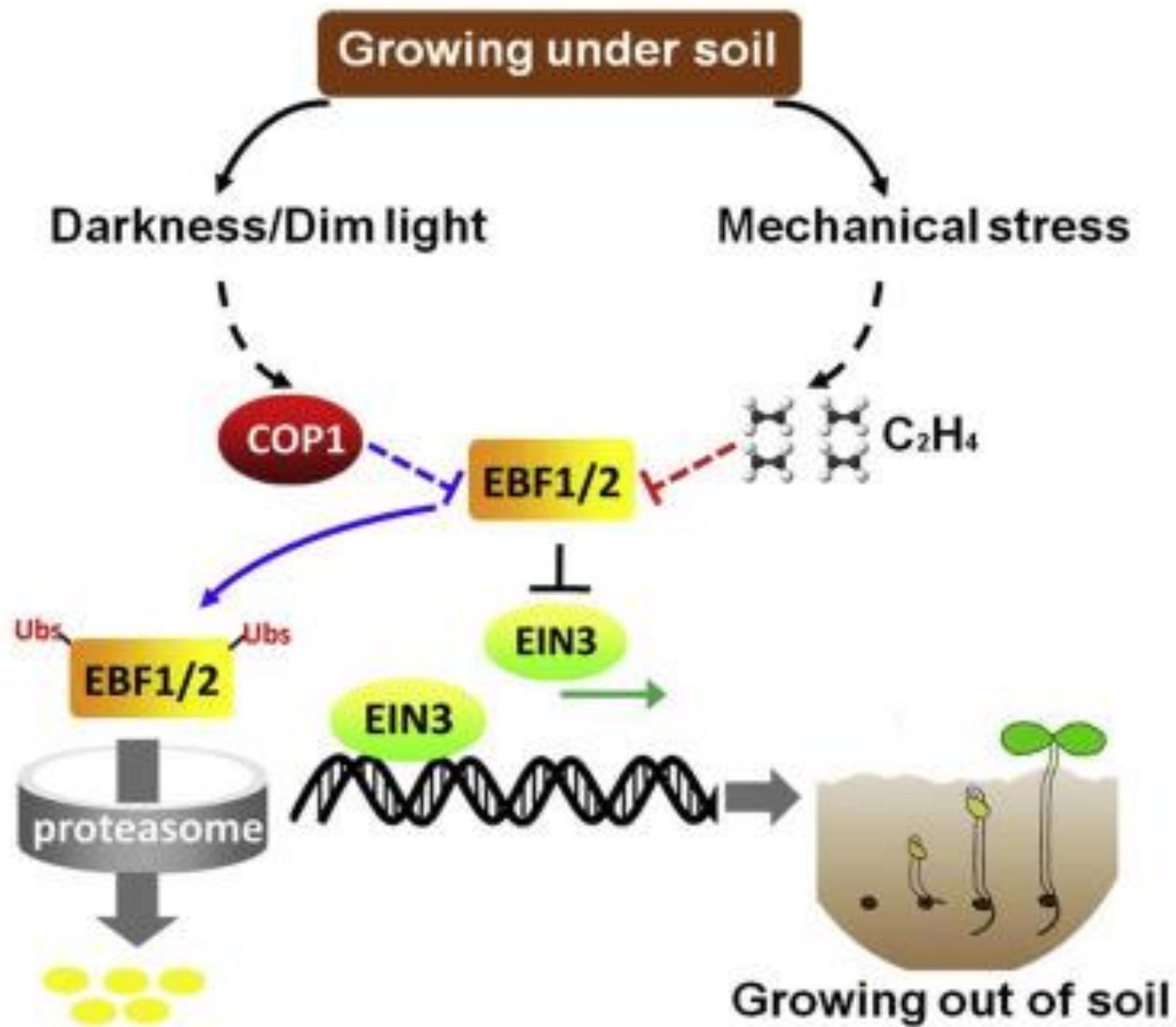
Cell, Vol. 120, 687-700, March 11, 2005, Copyright ©2005 by Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.cell.2004.12.026

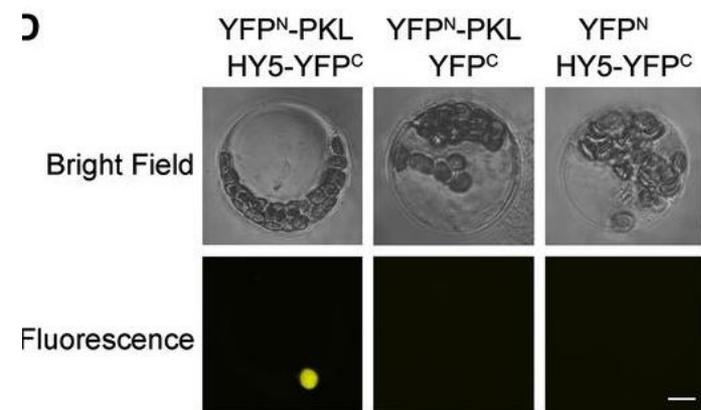
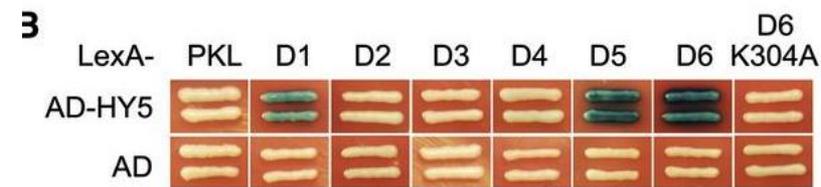
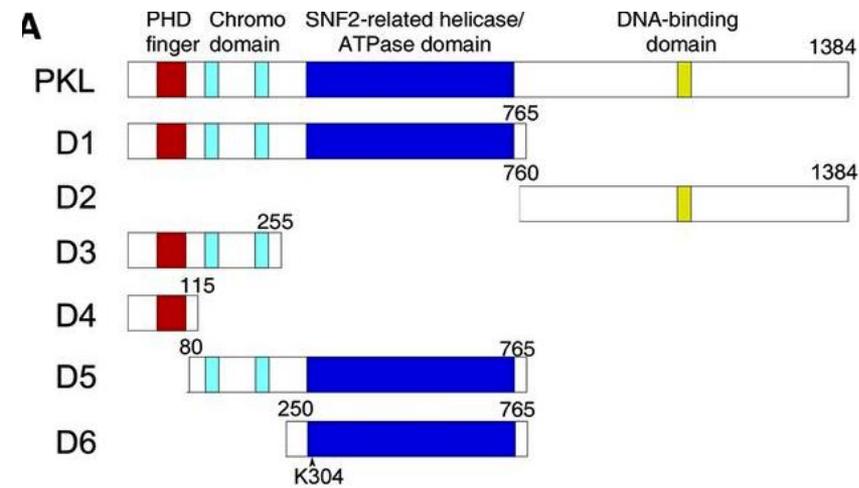
***Arabidopsis* Interdigitating Cell Growth Requires Two Antagonistic Pathways with Opposing Action on Cell Morphogenesis**

Ying Fu,^{1,3} Ying Gu,^{1,3} Zhiliang Zheng,^{1,4} Geoffrey Wasteneys,² and Zhenbiao Yang^{1,*}
¹Center for Plant Cell Biology
 Institute for Integrative Genome Biology and

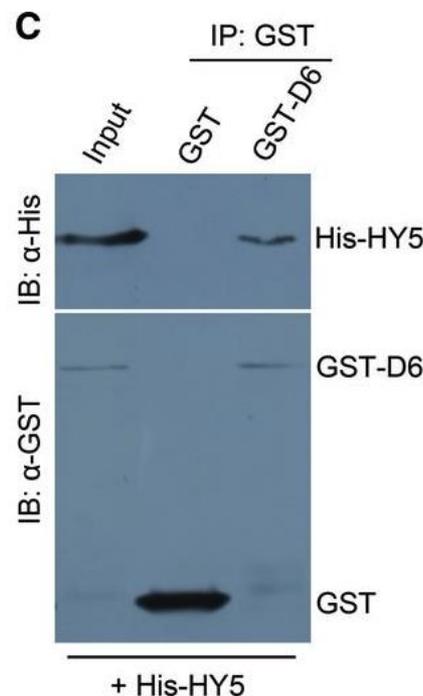
the leaf epidermis serve as an exciting model to investigate the mechanisms for cell shape formation in a multicellular system (Qiu et al., 2002; Deeks and Hussey, 2003; Smith, 2003; Wasteneys and Galway, 2003).

Interazione solo con la forma attiva della proteina ROP2

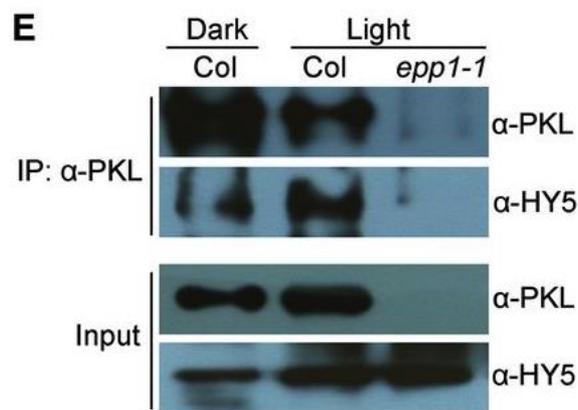




A, B) 2H assay between various fragments/mutant forms of PKL fused to the LexA DB and AD-HY or AD alone

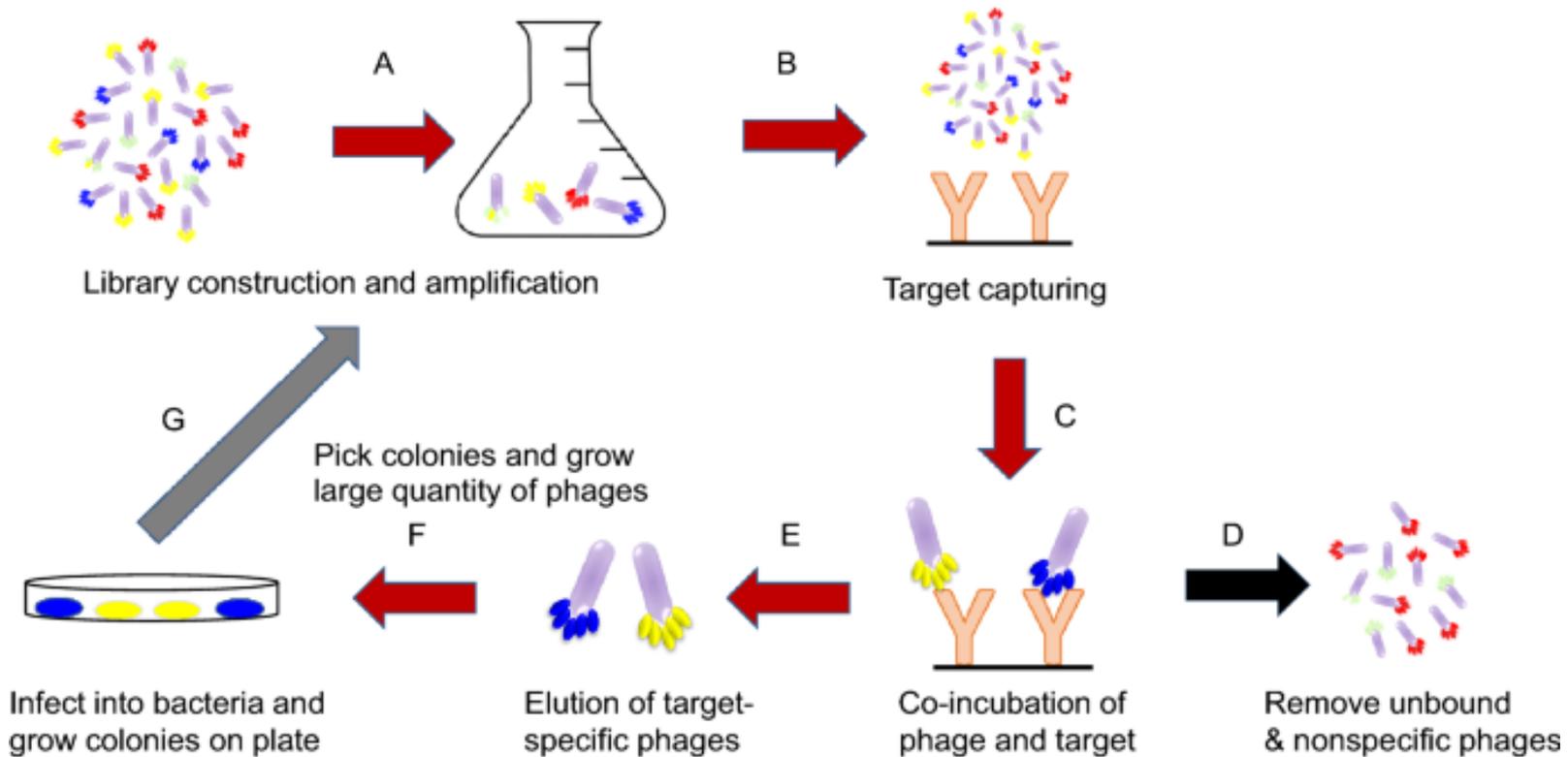


C) Pull-down assay between **GST-PKL-D5** and **His-HY5** proteins. IB, immunoblotting; IP, immunoprecipitation.



E) CoIP assay showing that the **PKL antibody could precipitate HY5** in 5-d-old WT seedlings grown in both white light and darkness *epp: pkl* KO mutant

D) BiFC assay showing that **YFPN-PKL and HY5-YFPc interact to form a functional YFP in the nucleus**



Il **Phage Display** è una tecnica di biologia molecolare per lo studio delle interazioni proteina-proteina, proteina-peptide e proteina-DNA che usa dei batteriofagi (es. M13).

Il gene codificante la proteina d'interesse è espresso in fusione traduzionale con il gene codificante una proteina del coat del fago, così la proteina sarà esposta sull'esterno del fago.

I fagi ricombinanti sono poi sottoposti a screening con altre proteine (es. anticorpi) o peptidi, o molecole di sintesi (**chemical screening**).

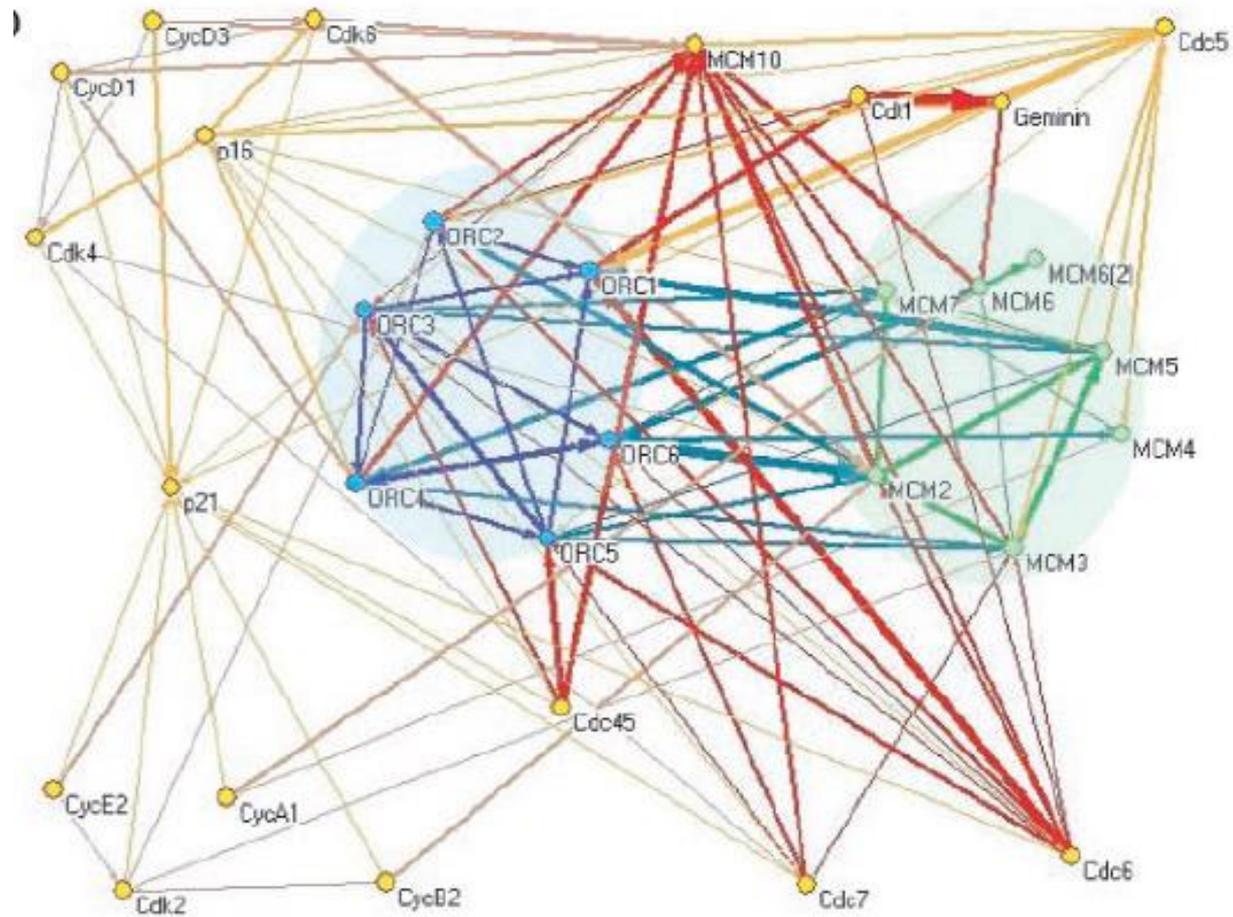
METODI *in silico* PER LA PREDIZIONE DI INTERAZIONI TRA PROTEINE

Metodo predittivo basato sulla struttura proteica: si basa sul concetto che due proteine interagenti hanno una struttura (primaria, secondaria, terziaria) simile. Nel caso in cui non si conosca la struttura esistono software in grado di predire la struttura a partire dalla sequenza

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (**Protein Data Bank**)

Metodo predittivo basato sulla sequenza: si predicono interazioni proteina-proteina basandosi sulle omologie di sequenza. Un'interazione trovata in una specie può essere usata per dedurre interazioni in altre specie.

Metodo «Rosetta stone»: si basa sul concetto di fusione genica, secondo il quale una proteina a singolo dominio in un organismo possa essersi fusa per formare una proteina multidominio in altri organismi.



INTERATTOMA

network di tutte le possibili interazioni proteina-proteina
in una cellula