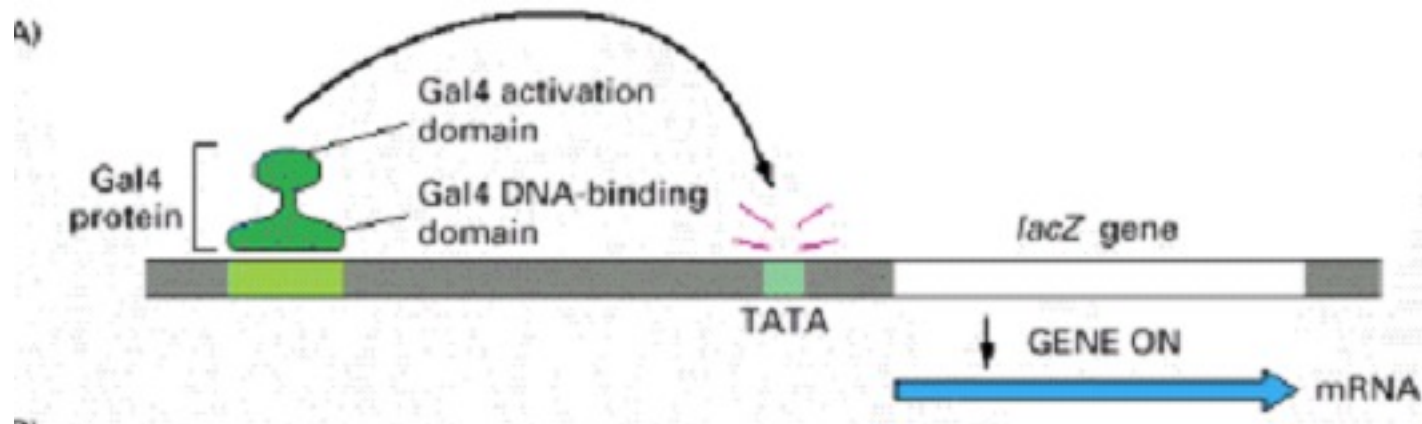


Metodi di studio delle interazioni proteina-proteina

Metodi genetici basati su
split proteins

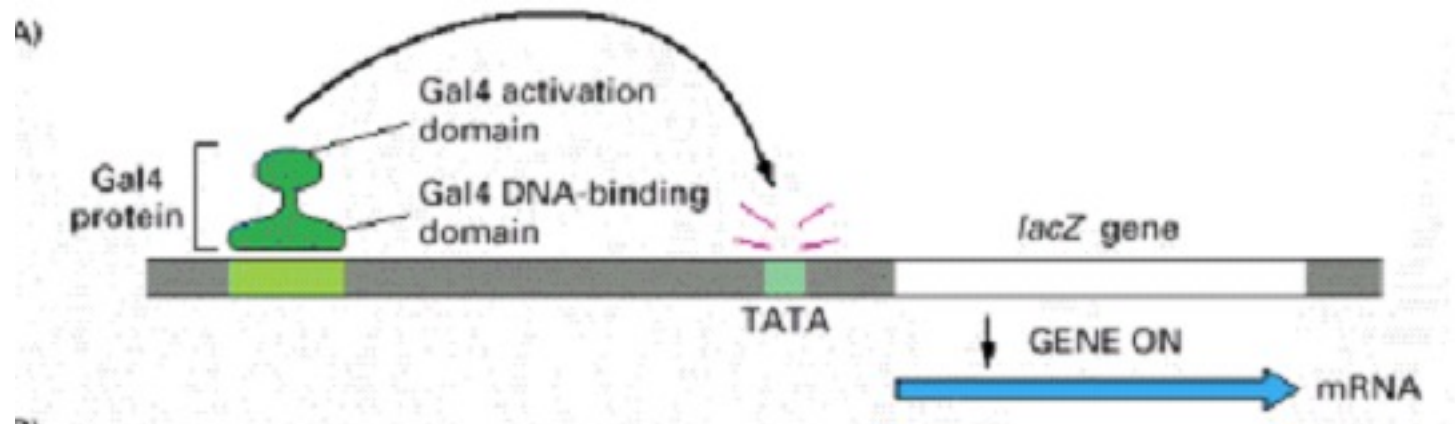
Sistema a doppio ibrido (Y2H: yeast two-hybrid)

- E' un metodo genetico che usa l'attività trascrizionale come misura dell'interazione proteina-proteina *in vivo*
- Gli attivatori trascrizionali sono proteine caratterizzate da un dominio che lega il DNA (DBD) e un dominio che attiva la trascrizione (AD)
- Il dominio che lega il DNA serve per indirizzare il dominio attivatore sul gene che deve essere trascritto, mentre il dominio attivatore viene a contatto con il complesso trascrizionale



Il fattore di trascrizione di lievito *Gal4* può essere separato in un dominio capace di legare il DNA e un dominio in grado di attivare la trascrizione.

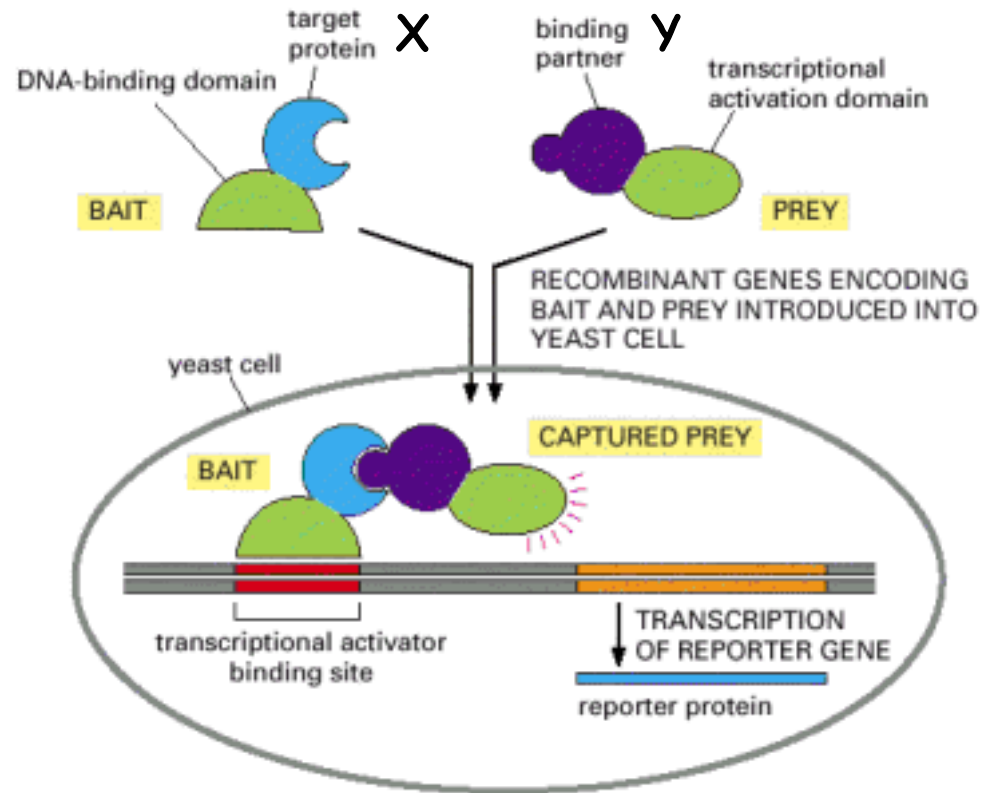
- 147 residui N-terminali codificano per il dominio che lega il DNA (**DBD**)
- 114 residui C-terminali codificano per il dominio che attiva la trascrizione (**AD**)



Per attivare la trascrizione, i due domini non devono necessariamente essere legati covalentemente, ma possono essere messi a contatto dall'interazione di altre due proteine X ed Y (Field e Song, 1989)

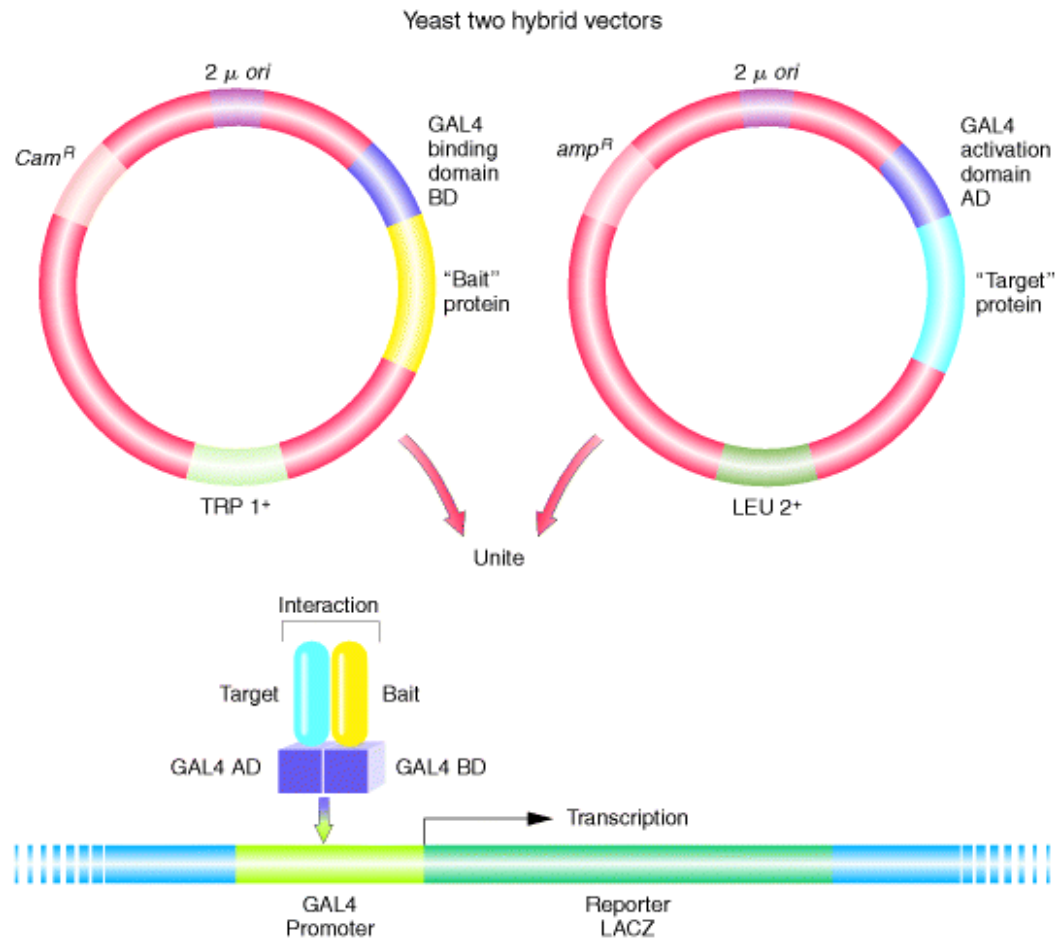
Costruzione dei due ibridi

- il cDNA del **DNA binding domain** deve essere fuso al cDNA della **proteina esca**
- il cDNA dell'**activation domain** deve essere fuso al cDNA della **proteina preda**
- le due chimere devono essere espresse in una cellula in cui sono presenti uno o più **geni reporter** posti sotto il controllo del promotore **Gal**



Se **esca** e **preda** interagiscono si ha la ricostituzione funzionale dell'attivatore trascrizionale Gal4 che attiva l'espressione del gene reporter

I due vettori che contengono Gal4 DNA binding domain fuso alla 'Bait' protein e Gal4 activation domain fuso alla 'Target' protein



Il gene reporter di solito complementa una auxotrofia o è un enzima la cui attività è facilmente rivelabile (es. lacZ, HIS3)

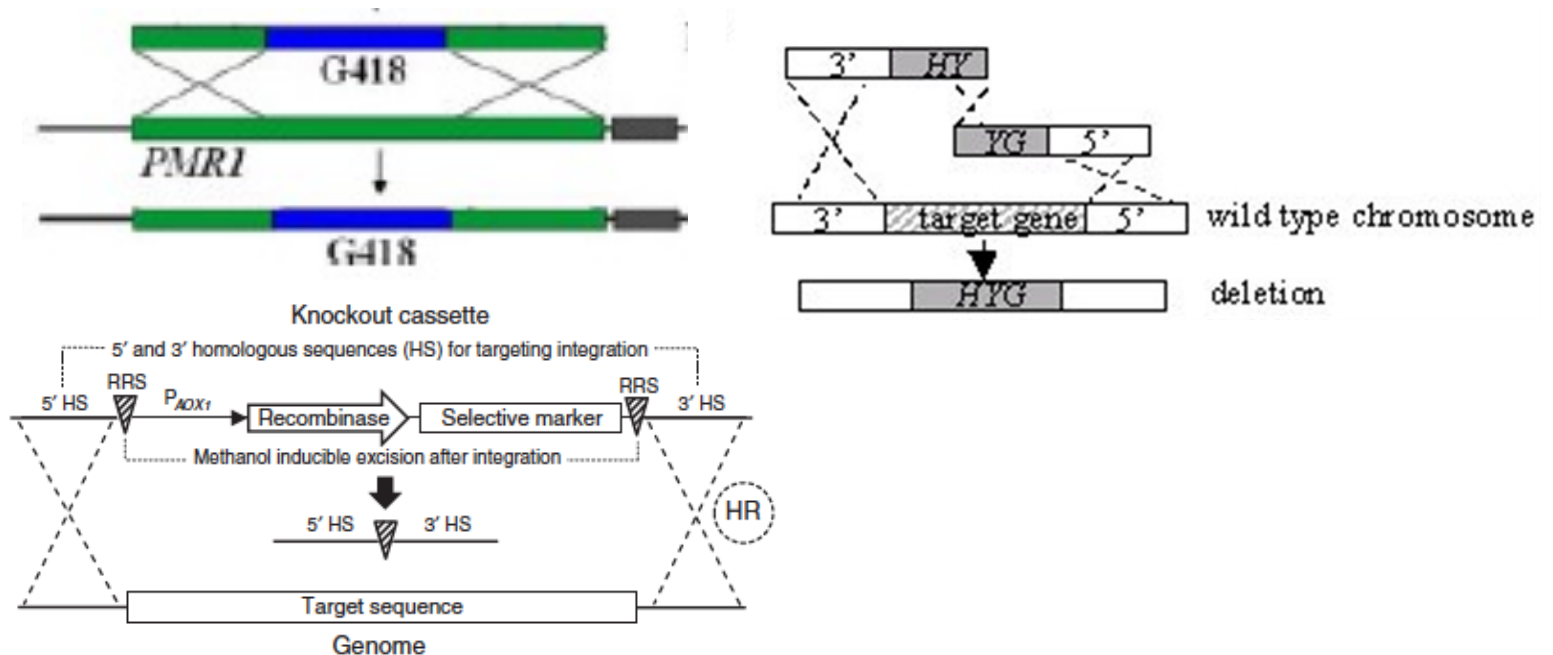
Il ceppo ospite deve

- avere il gene reporter sotto il controllo del promotore Gal
- avere il gene *GAL4* inattivato
- essere auxotrofico per i marcatori di selezione dei due vettori per l'espressione delle due proteine di fusione, e per il gene reporter (eventuale)

Come si inattiva un gene in lievito?

Come si inattiva un gene in lievito?

- Mutageni chimici (aspecifici)
- Cassette geniche per ricombinazione omologa (gene-specifiche)



- Verifica → screening fenotipo e analisi del DNA genomico (PCR)

Applicazione Y2H

Capacità di **identificare** rapidamente proteine che interagiscono con la proteina 'esca'.

E' possibile preparare delle **librerie** di cDNA fuse al dominio di attivazione **AD** da introdurre in ceppi che esprimono DNA-binding domain **DBD** fuso alla proteina 'esca'

Limiti

Non è possibile studiare l'interazione di **proteine di membrana** o di **DNA binding protein** che da sole hanno la capacità di **attivare la trascrizione**

Protein Complementation Assay

- la proteina reporter è separata in due frammenti
- i frammenti sono fusi geneticamente ai potenziali partner dell'interazione
- il ripristino della funzionalità della proteina reporter è mediato dall'interazione delle proteine partner **esca** e **preda**

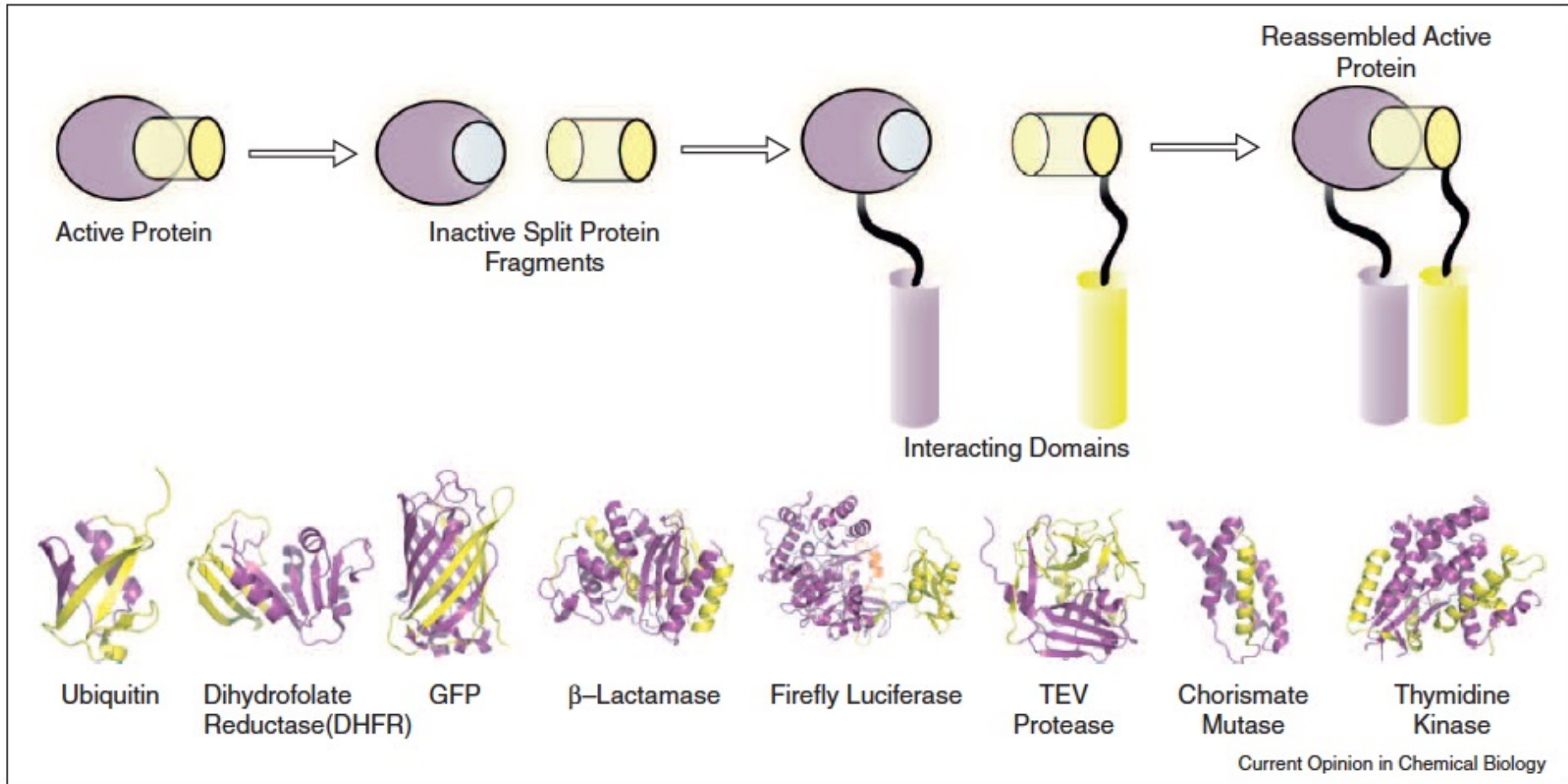


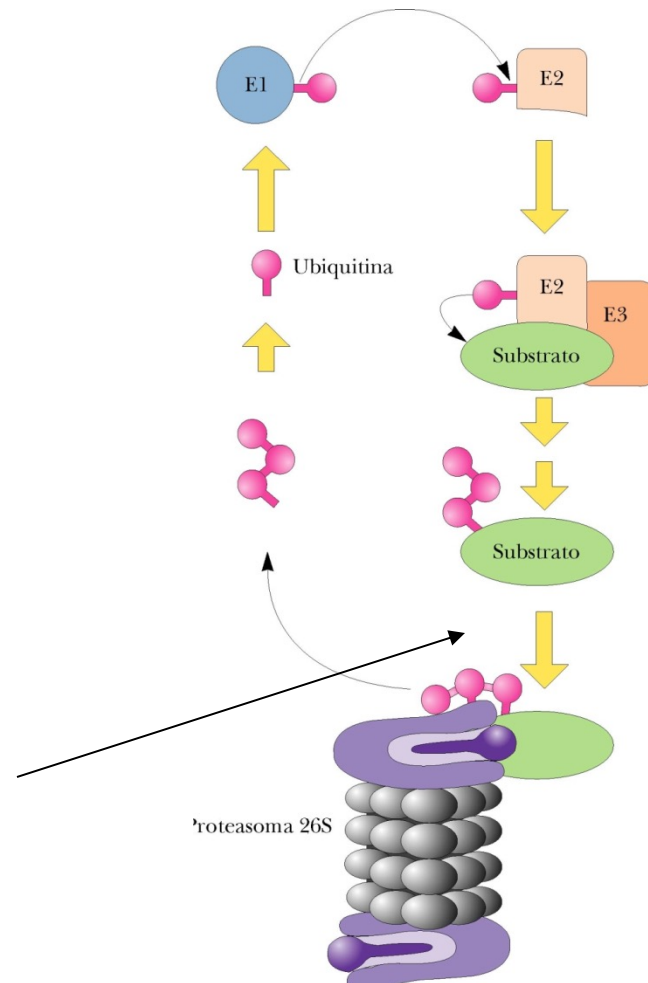
Illustration of conditional split-protein reassembly. A generic split-protein system is shown where a functional protein is dissected into two inactive fragments, purple and yellow. The attachment of two interacting proteins or protein domains brings the inactive fragments into close proximity and overcomes the entropic cost of fragmentation. This leads to the reassembly or complementation of the fragments thus providing a direct readout for the partnership between the interacting domains. Crystal structures of representative proteins which have been shown to be amenable to interaction dependent reassembly, where the N-terminal and C-terminal fragments are shown as purple and yellow respectively.

Split-ubiquitin membrane-based yeast two hybrid system

L'ubiquitina è una proteina di 76 amminoacidi che partecipa al turnover proteico

L'estremità C-terminale dell'ubiquitina forma un legame ammidico con la proteina che deve essere degradata

UBP ubiquitin-specific proteases sono proteasi citosoliche che idrolizzano il legame peptidico tra la proteina 'condannata' e l'ubiquitina



L'ubiquitina può essere separata in due frammenti:

Nub N-terminal fragment (1-34)

Cub C-terminal fragment (35-76)

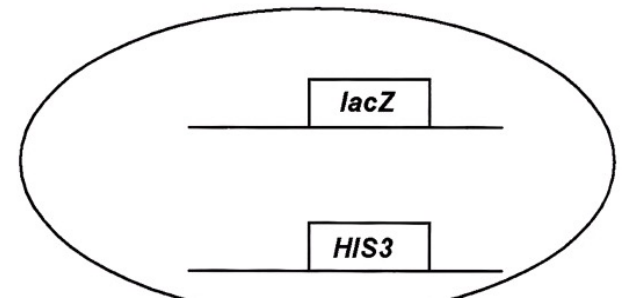
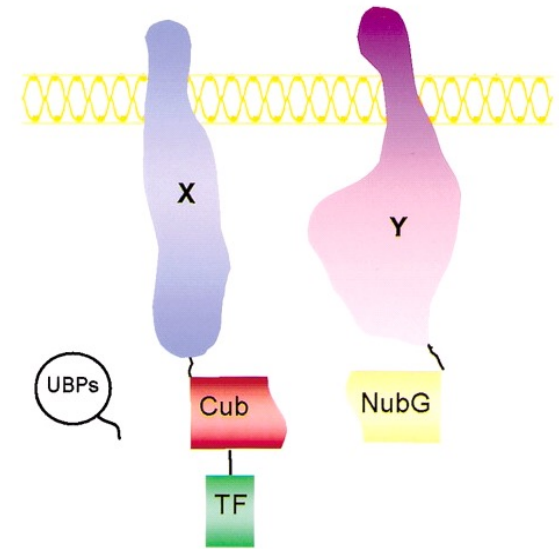
NubG ha una mutazione puntiforme (Ile13Gly) che non permette l'associazione spontanea con **Cub**. L'associazione avviene solo quando le due proteine fuse (X e Y) interagiscono

Costruzione dei due ibridi

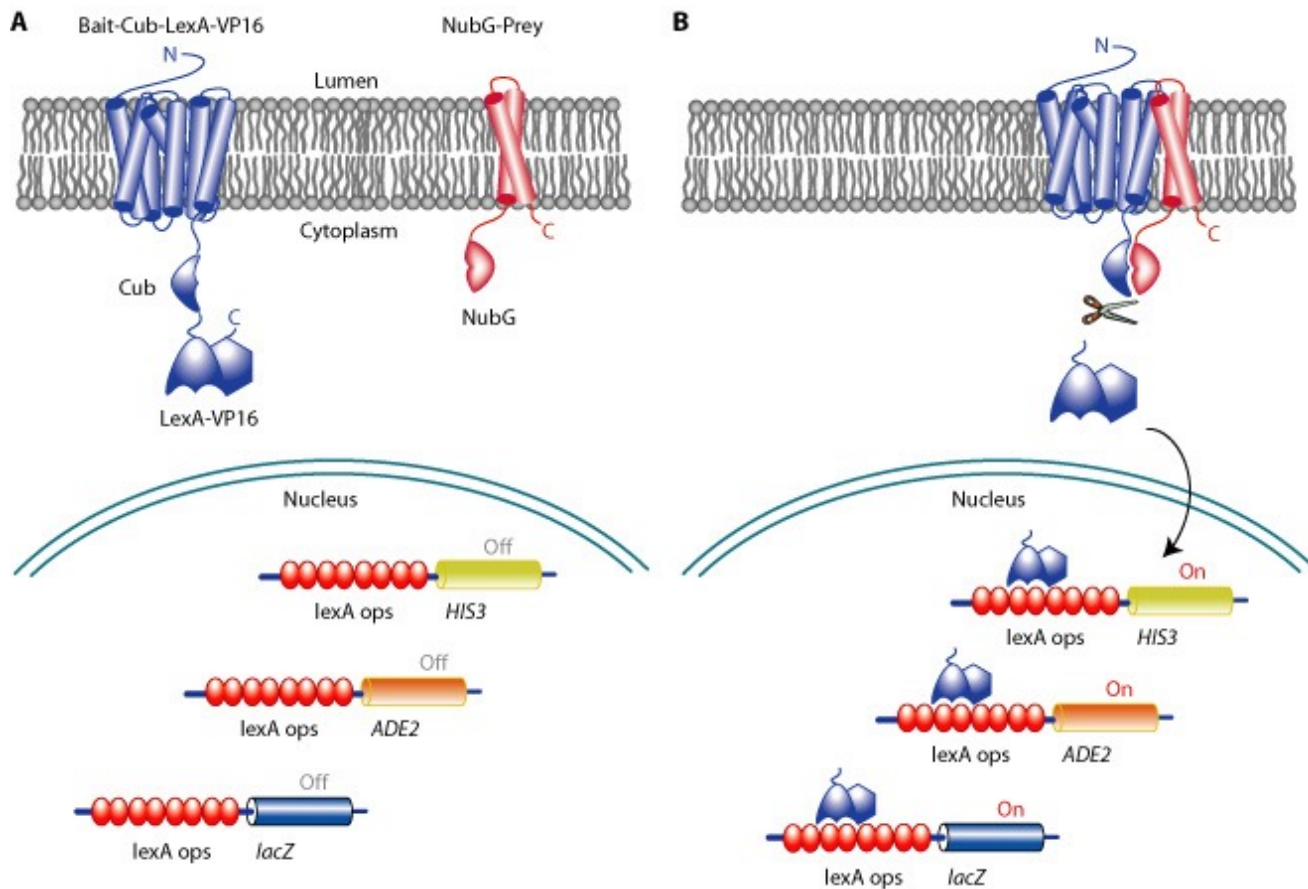
Al 5' del cDNA di **Cub** è fuso il cDNA della **proteina esca (X)**

Al 3' del cDNA di **Cub** è fuso il cDNA di un **fattore di trascrizione TF**

Al 5' del cDNA di **NubG** è fuso il cDNA della **proteina preda (Y)**



- L'associazione tra **esca** e **preda** ricostituisce l'ubiquitina e permette l'azione della proteasi UBP che libera **TF** LexA-VP16.
- LexA-VP16 regola l'espressione di **geni reporter** (HIS3 e lacZ) la cui attività è facilmente rilevabile.



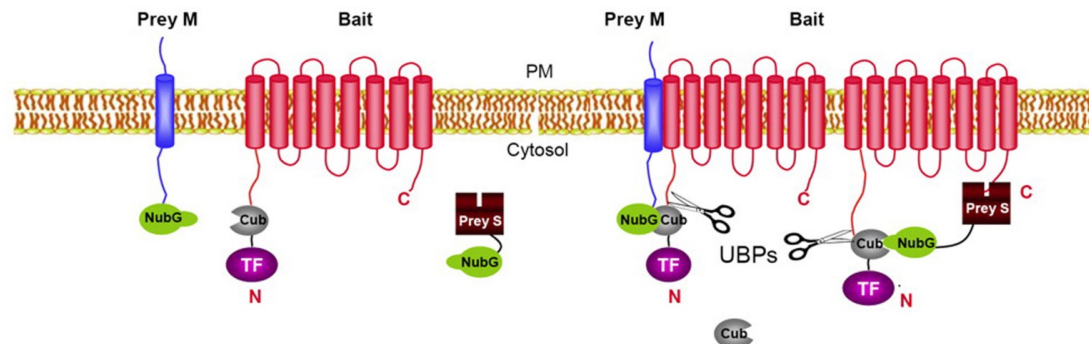
Requisiti e limiti del sistema split-ubiquitina

NubG e Cub devono essere fuse alla estremità della proteina di membrana che si localizza nel **citrosol** perchè la proteasi UBP è localizzata nel citosol

Svantaggio: in uno screening per identificare nuovi partner di interazione della proteina esca si potrebbero non individuare tutte le proteine che interagiscono (falsi negativi)

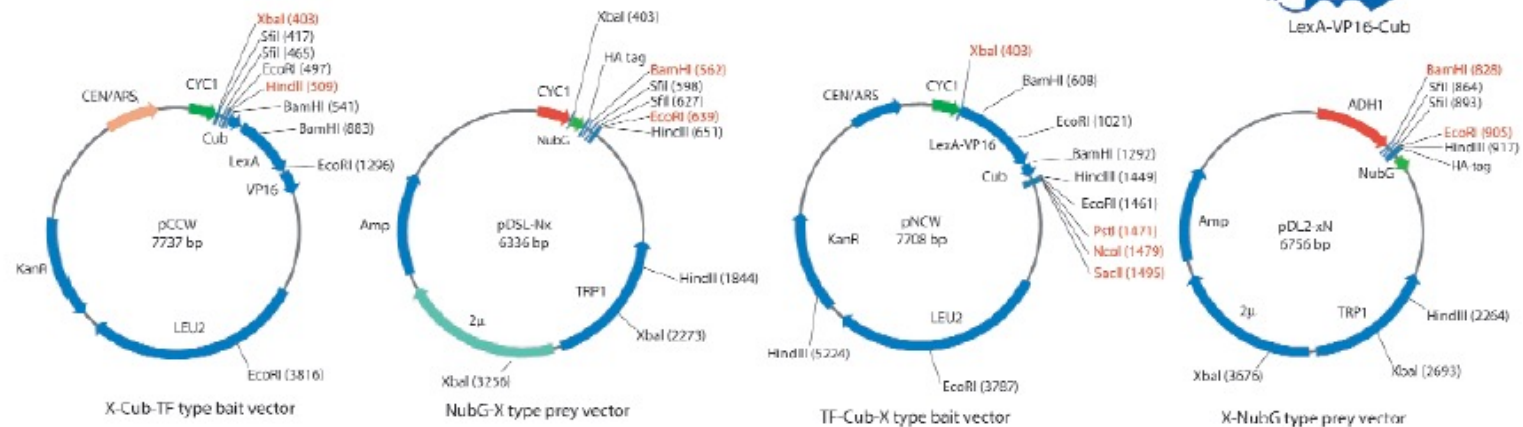
Vantaggio: è possibile avere informazioni sull'**orientamento** della estremità N e C terminale delle proteine di membrana

➔ **Fusioni NubG-X e X-NubG**



Vettori per la costruzione dei due ibridi

È possibile costruire fusioni con la sequenza codificante della split-ubiquitina al 5' o al 3' di X e Y



Un esempio...

Wbp1p-Cub + fusione proteina X-Nub

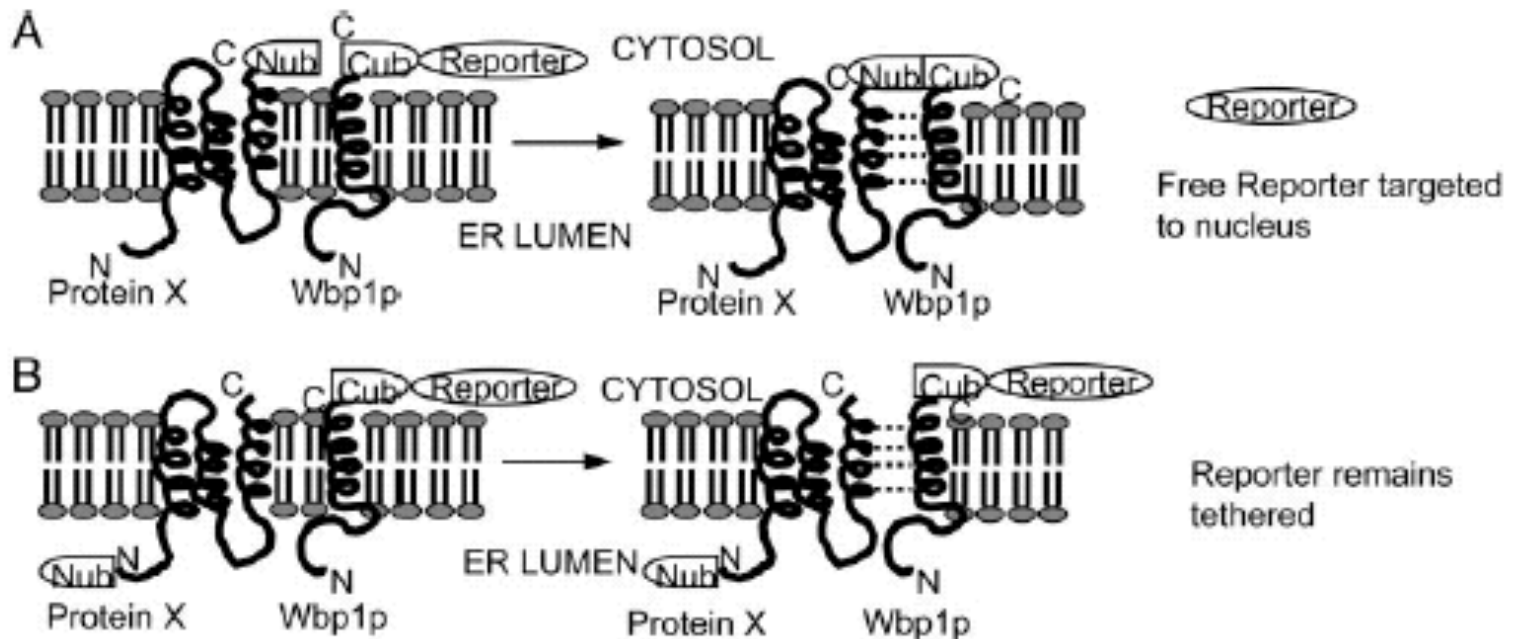
→ Si produce un segnale

→ L'estremità C-terminale della proteina X si trova nel citosol

Wbp1p-Cub + fusione Nub-proteina X

→ NON si produce un segnale anche se le due proteine interagiscono

→ L'estremità N-terminale della proteina X non si trova nel citosol



Protein Complementation Assay

Enzimi come proteine reporter

Il folding indotto dall'interazione delle proteine partner porta al ripristino dell'attività enzimatica

- beta-galattosidasi (lacZ)
- diidrofolato reduttasi (DHFR)
- beta-lattamasi (bla)

- Disponibilità di substrati permeabili cromogenici che permettono di rilevare facilmente l'attività enzimatica
- Saggi basati sulla sopravvivenza

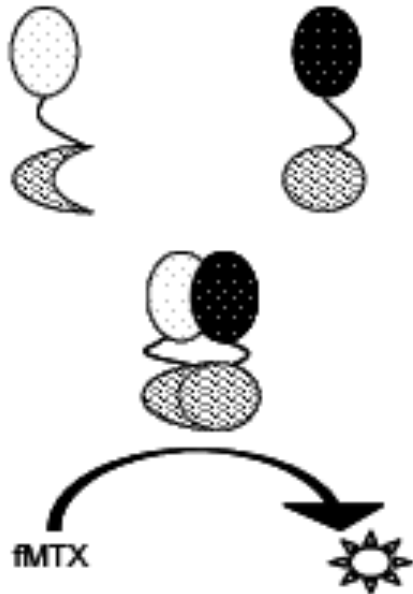
La **diidrolatoreduccasi** catalizza la riduzione del diidrofolato in tetraidrofolato, importante per la biosintesi dei nucleotidi

DHFR murina è separata in due frammenti: 1-105 e 106-186

L'interazione tra le proteine partner è evidenziata:

1. sopravvivenza di cellule DHFR⁻ seminate su terreni privi di nucleotidi
2. Dosaggio della fluorescenza di fMTX (Methotrexate marcato con una sonda fluorescente)

Dihydrofolate Reductase



fMTX lega con elevata affinità DHFR
 $K_d = 540 \text{ pM}$

Limiti del sistema: il tempo di risposta è elevato (da ore a giorni)

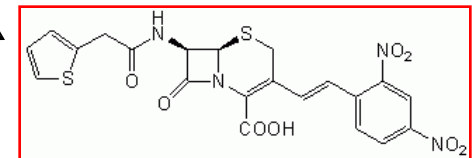
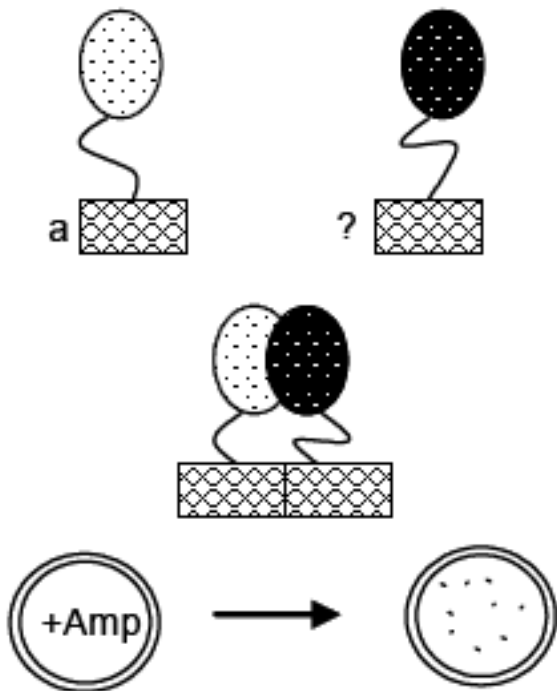
Beta-lattamasi enzima monomerico di 29 kDa

Può essere scisso in due frammenti 24-215 e 216-286 che possono ricostituirsi

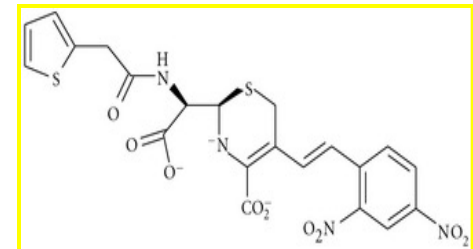
L'interazione tra le proteine partner può essere evidenziata

- misurando la resistenza all'ampicillina
- saggio colorimetrico con nitrocefina

β -Lactamase

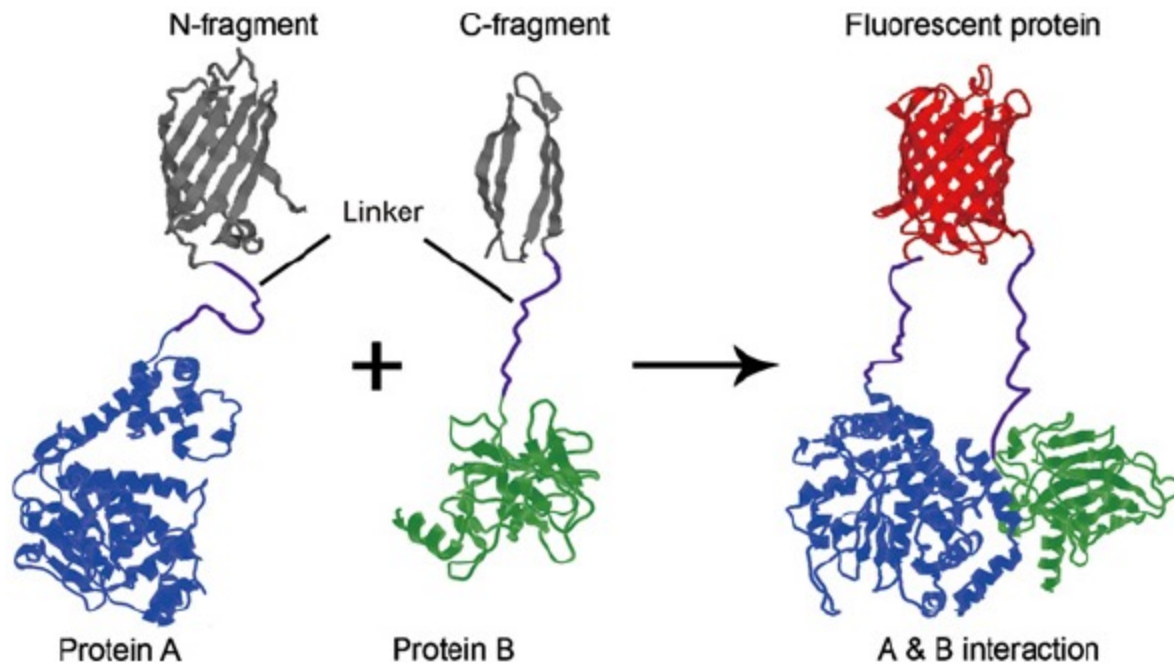


**Beta
lactamasi**



Bimolecular Fluorescent Complementation (BiFC)

Il folding della proteina fluorescente indotto dall'interazione delle proteine partner porta alla formazione del cromoforo



Fluorescenza

- La fluorescenza è l'**emissione di luce** dovuta alla transizione di elettroni da un livello energetico maggiore ad uno minore
- La *lunghezza d'onda* della radiazione assorbita ha valori minori rispetto a quella emessa (*shift* di Stokes)
- La *differenza di energia* tra radiazione assorbita ed emessa viene dissipata sotto forma di calore (collisioni tra le molecole)

$$E = hv = hc / \lambda$$

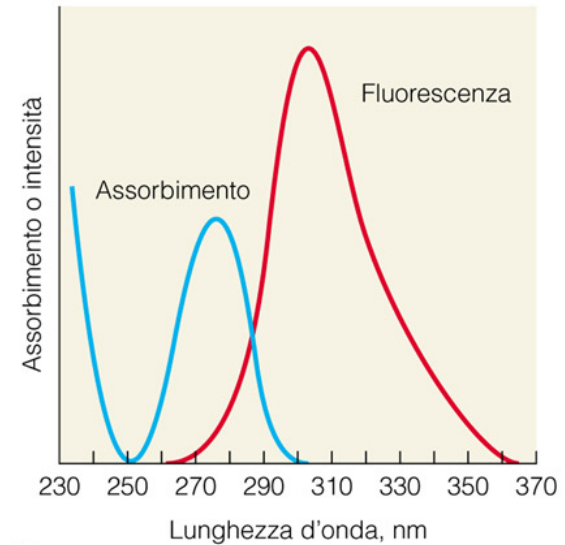
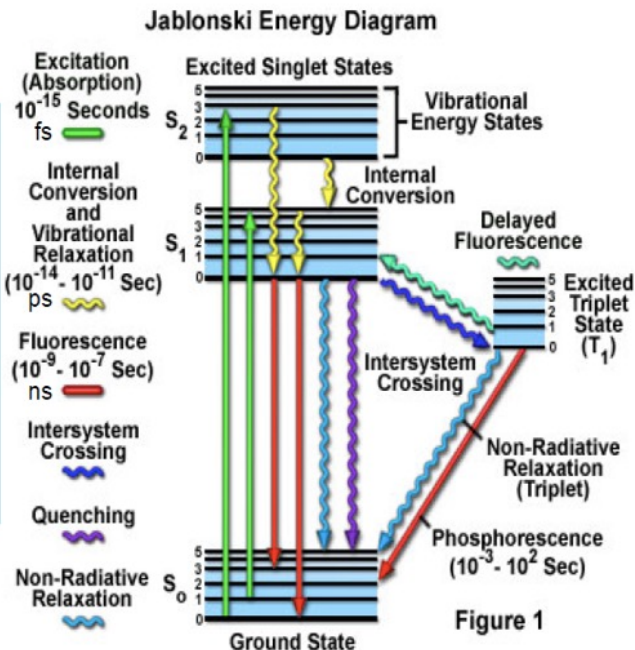
E – energy

v – frequency

λ – wavelength

h – plank

c – speed



Spettroscopia di Fluorescenza

- Si definisce **RESA QUANTICA**

$$Q = \frac{\text{quanti} \cdot \text{di} \cdot \text{fluorescenza} \cdot \text{emessi}}{\text{quanti} \cdot \text{assorbiti}}$$

- La resa quantica è **indipendente** dalla lunghezza d'onda di eccitazione
- A basse concentrazioni del *fluoroforo* l'intensità della fluorescenza (I_f) è proporzionale alla concentrazione:

$$I_f = 2.3 I_0 \varepsilon_\lambda c d Q$$

- c** è la concentrazione del fluoroforo
- d** è il cammino ottico
- ε_λ è il coefficiente di estinzione molare del fluoroforo
- I₀** è l'intensità della radiazione incidente

Struttura della GFP (Green Fluorescent Protein) di *Aequorea victoria*

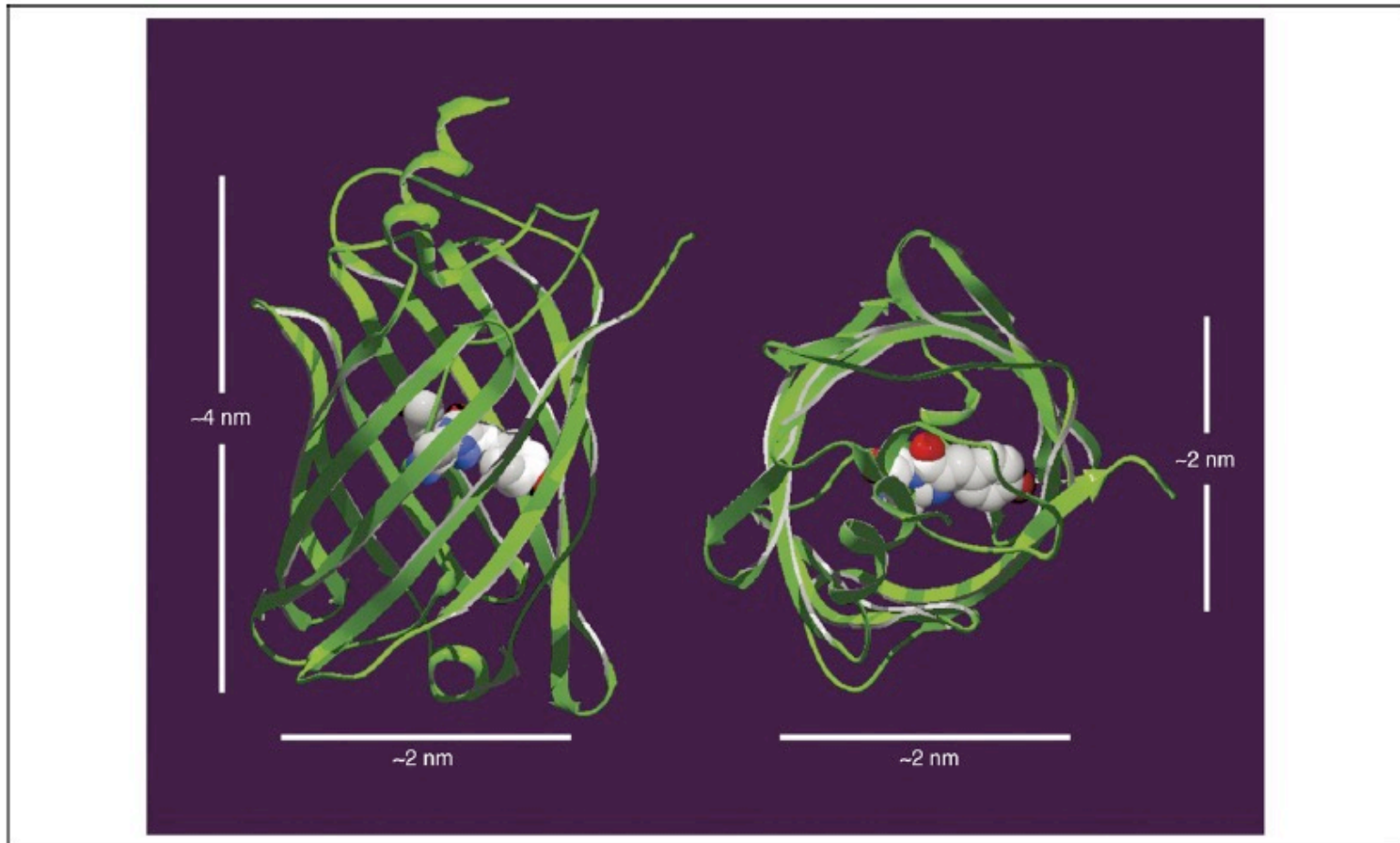
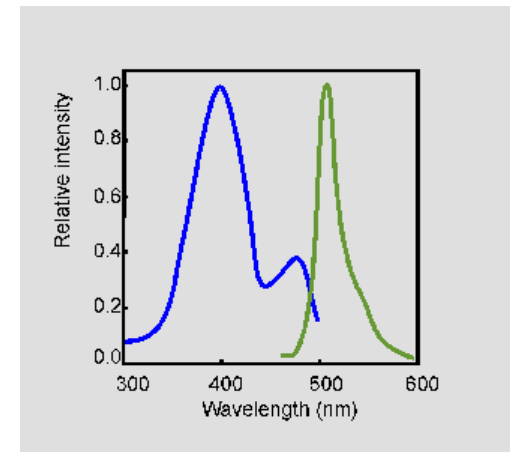
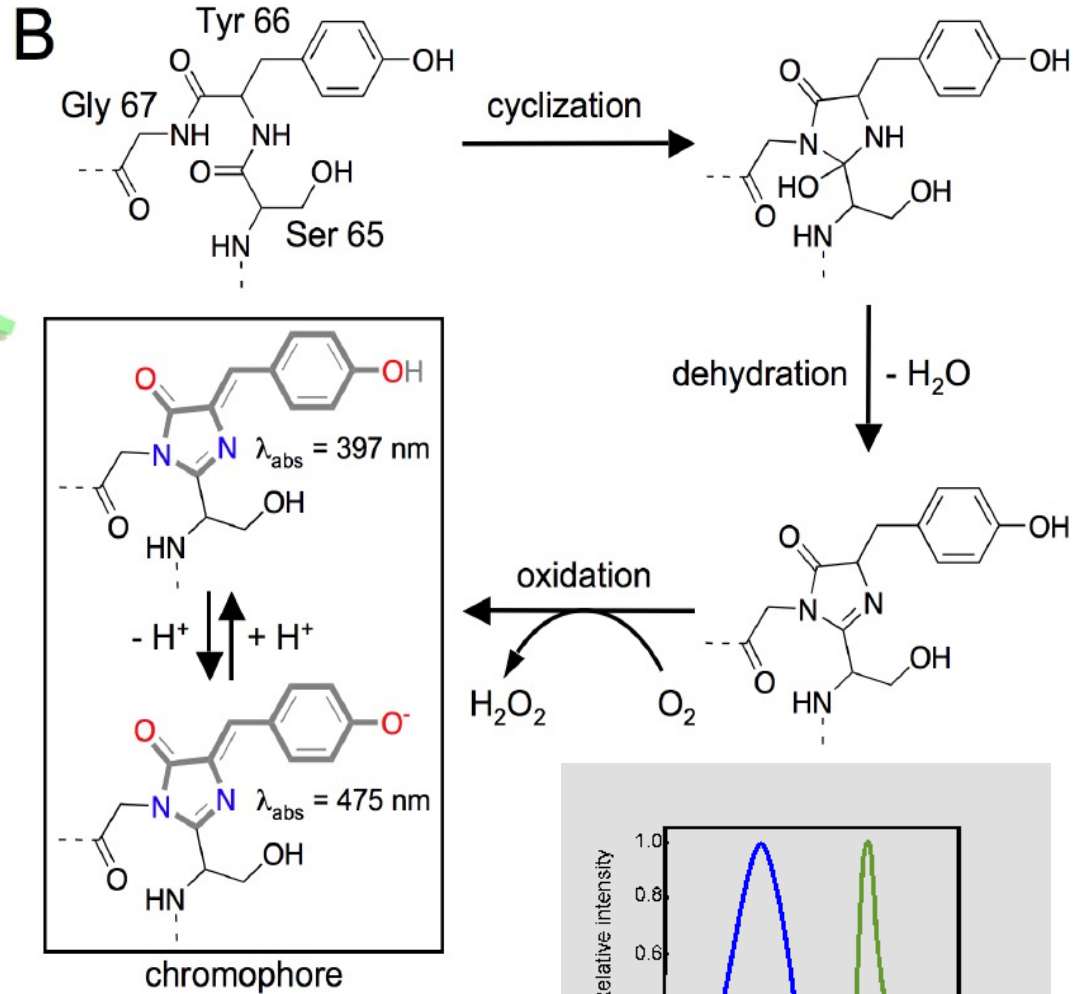
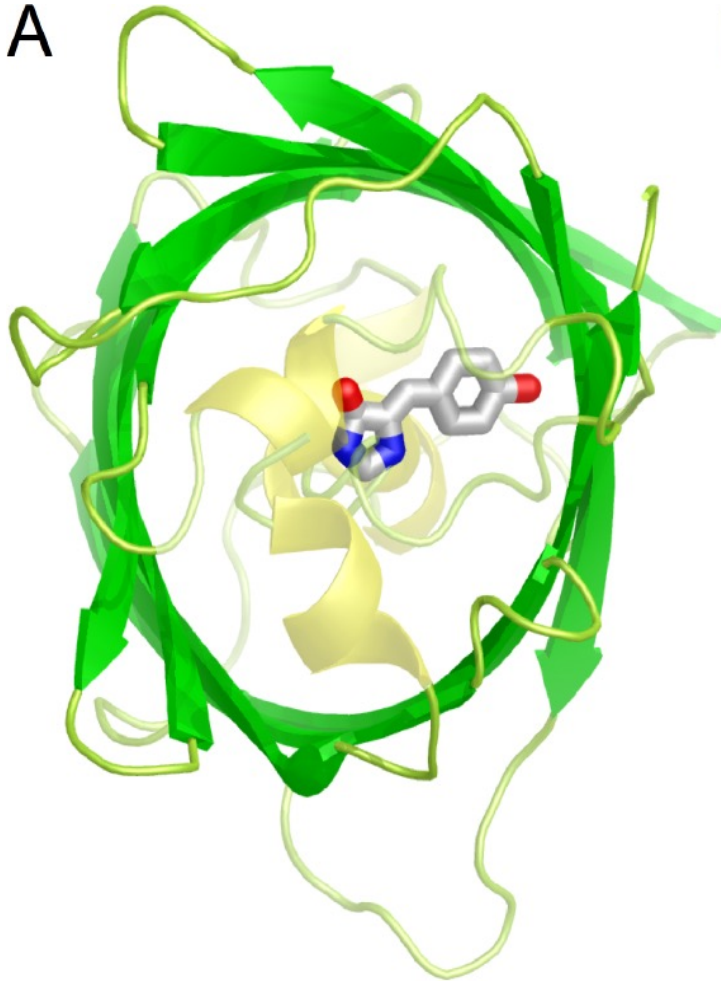
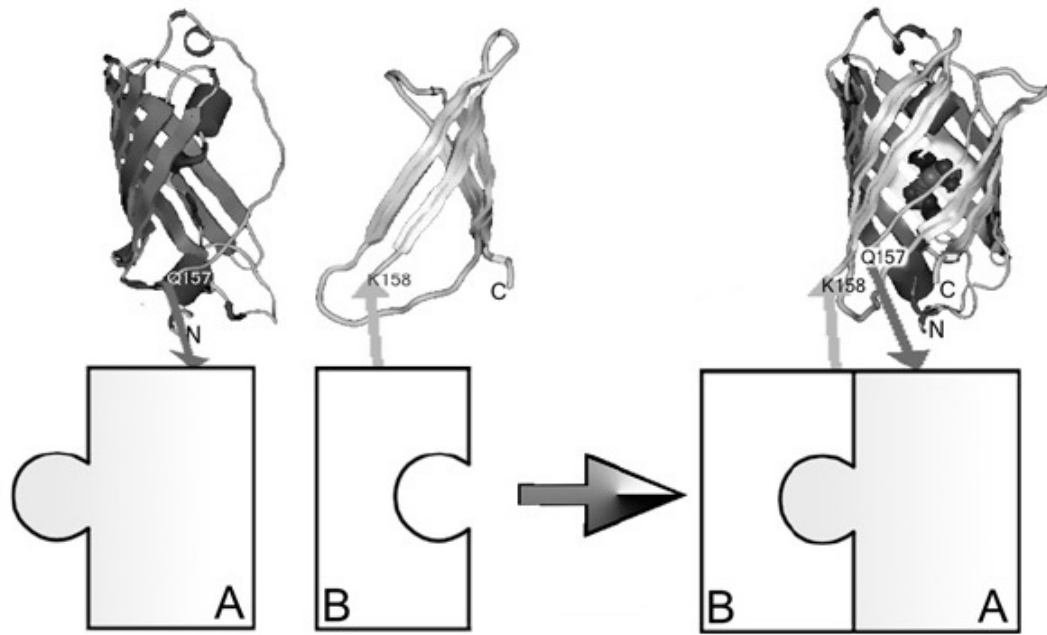


Figure 3. Crystal structure of GFP. The protein is cylindrical, with a diameter of ~ 2.4 nm and a length of 4.2 nm. The cylinder consists of 11 β strands with a single α helix running along its axis. The chromophore is located in the α helix at the center of the protein. All fluorescent proteins have a similar structure.

Formazione del cromoforo

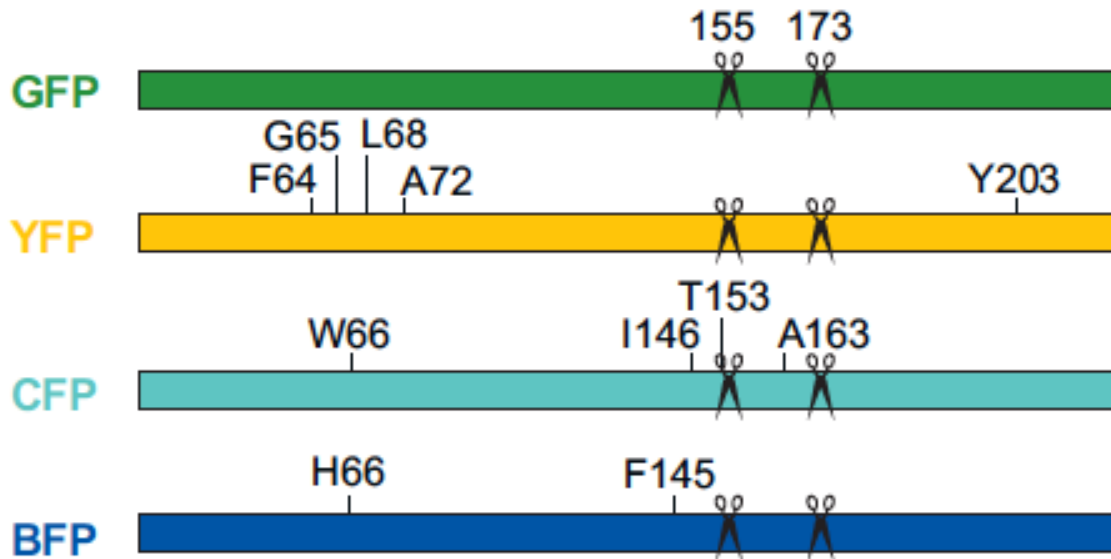


GFP può essere separata tra i residui 157 e 158 per produrre due frammenti non fluorescenti N-GFP e C-GFP.



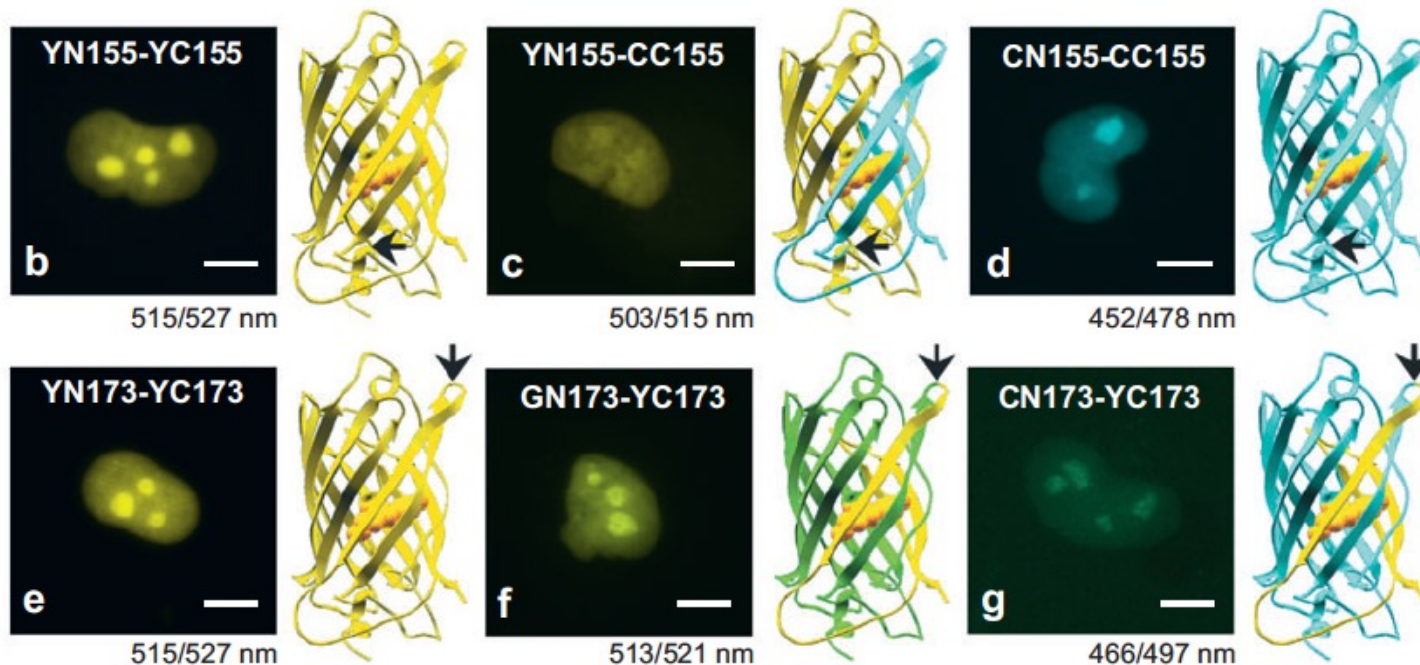
La multicolor bimolecular complementation assay permette la simultanea visualizzazione di complessi proteici nella stessa cellula

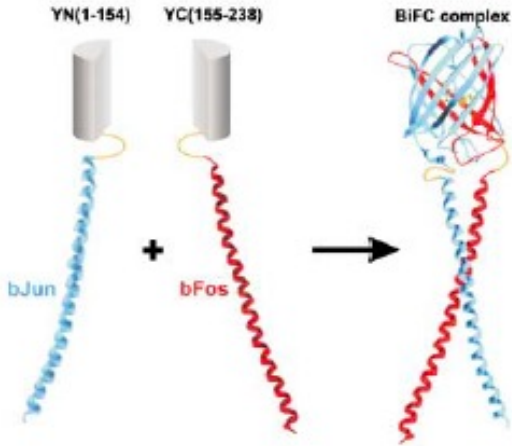
Altre varianti di GFP split



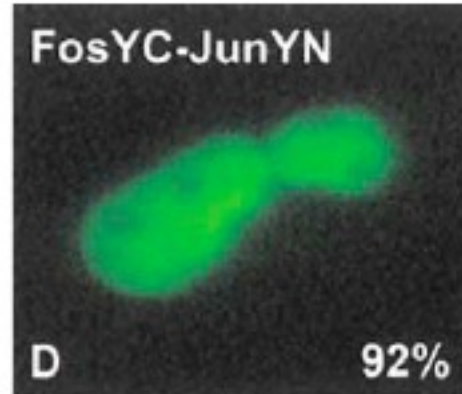
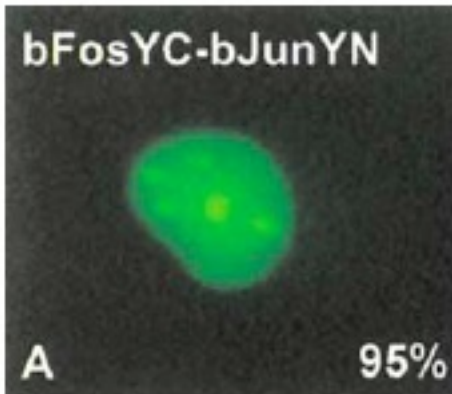
Abs/emissione
(nm)

EGFP	488/509
YFP	514/527
CFP	433/475
BFP	402/457





Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation



FRET

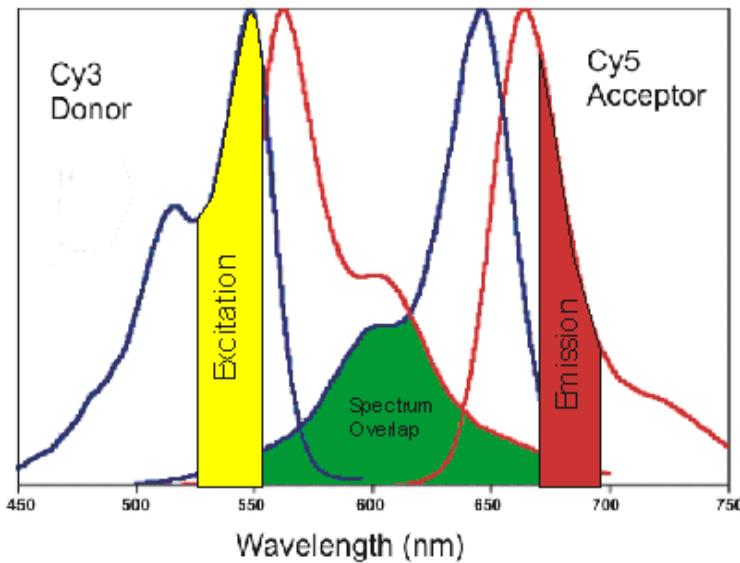
Fluorescence Resonance Energy Transfer

Trasferimento non radiativo di energia (dipolo-dipolo) da parte di un donatore fluorescente ad un accettore fluorescente.

Il trasferimento di energia dipende da:

- proprietà spettrali
- orientamento
- **distanza** tra donatore e accettore (1-10 nm)

Lo spettro di emissione del donatore e lo spettro di eccitazione dell'accettore devono essere parzialmente sovrapposti



$$E_{\text{FRET}} = \frac{F_A}{F_A + \gamma F_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_{\text{DA}}^6}, \quad \gamma = \frac{\eta_A \phi_A}{\eta_D \phi_D}$$

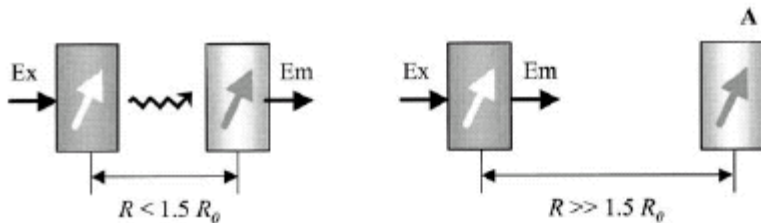
E = efficienza di trasferimento

r = distanza tra cromofori

Φ = resa quantica

η = efficienza di conta

R_0 = distanza alla quale avviene il 50% del trasferimento di energia (è specifica per ogni coppia di fluorofori)



Si osserva FRET se l'eccitazione a $\lambda_{\text{donatore}}$ produce emissione da parte dell'accettore (a $\lambda_{\text{accettore}}$)

Applicazioni della FRET

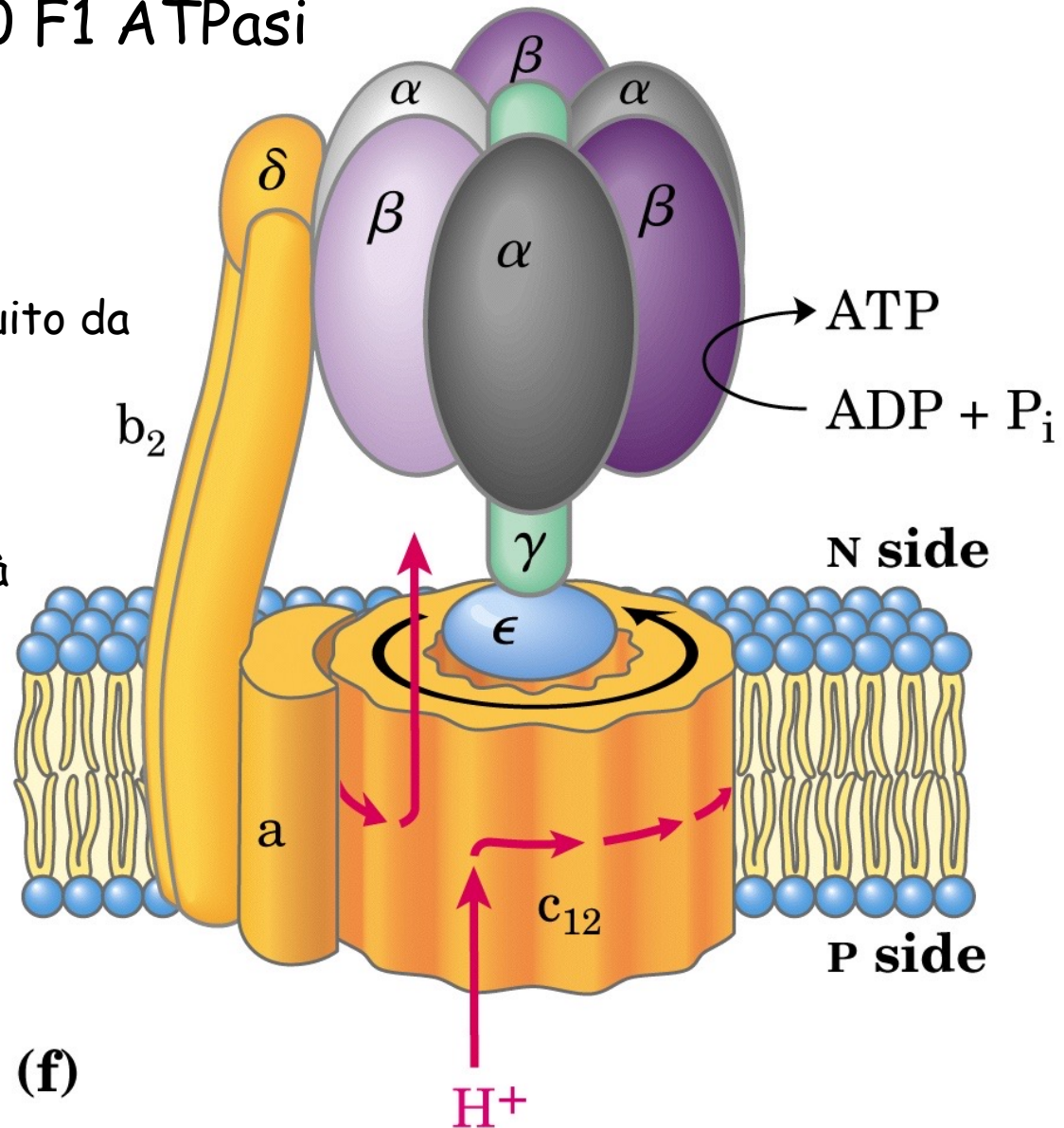
- ◆ Interazioni proteina-proteina *in vitro* e cambiamenti conformazionali di proteine
- ◆ Interazioni proteina-proteina *in vivo*

Analisi delle modifiche conformazionali della subunità ϵ della FO F1 ATPasi mediante FRET

FO è un canale protonico costituito da tre tipi di subunità a, b, c nelle seguenti quantità ab_2c_{10-12}

F1 catalizza la sintesi di ATP ed è costituito da nove subunità $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$

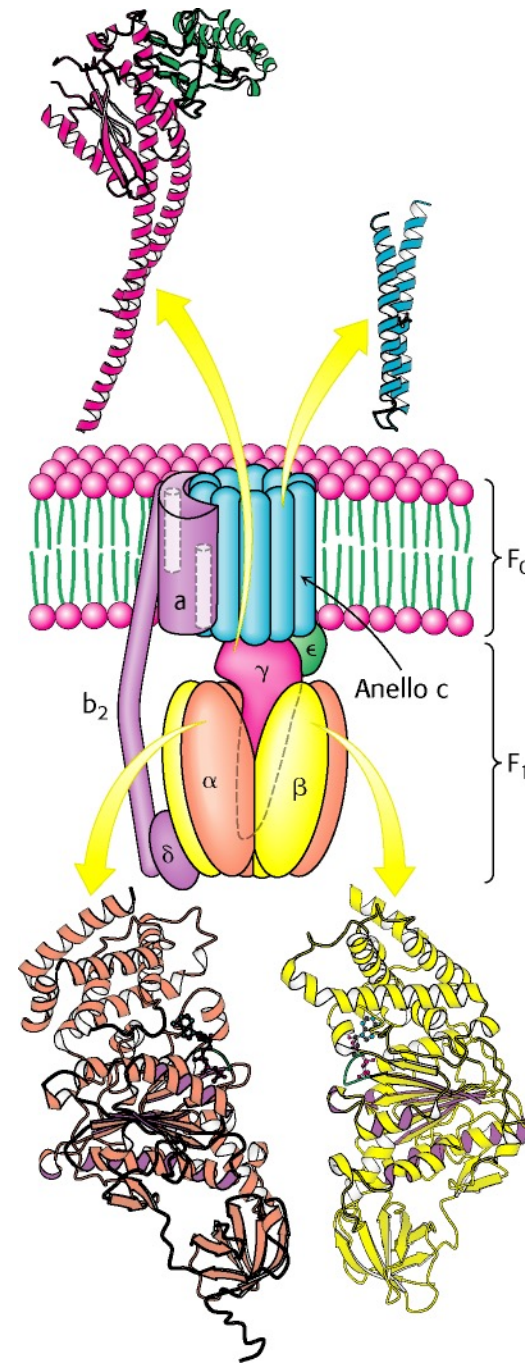
Ogni subunità β ha un sito catalitico per la sintesi di ATP



(f)

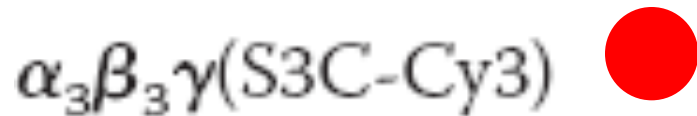
L'enzima è costituito da due parti: una **unità mobile** costituita da c e da γ e ϵ in grado di ruotare e una **unità immobile** o statore costituito dal resto della molecola.

La subunità γ è l'asse centrale del motore molecolare e interagisce con c ed ϵ della porzione F₀ e i dimeri $\alpha\beta$ della porzione F₁.

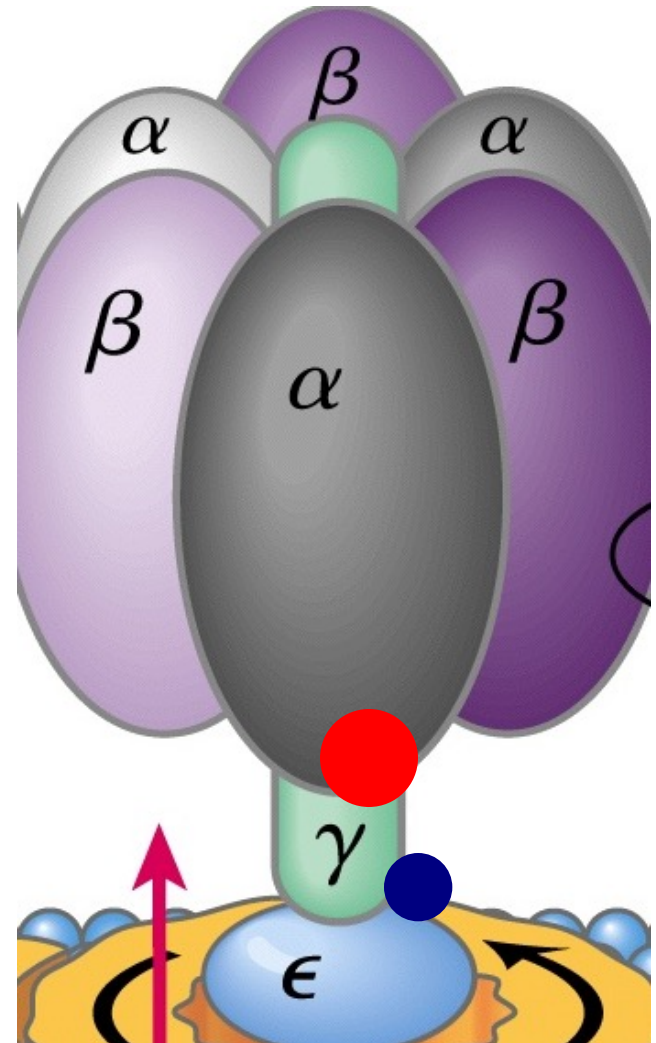
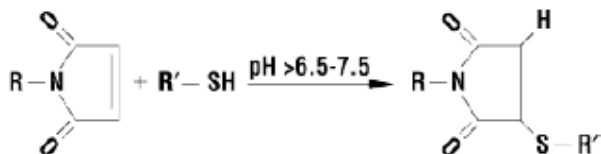


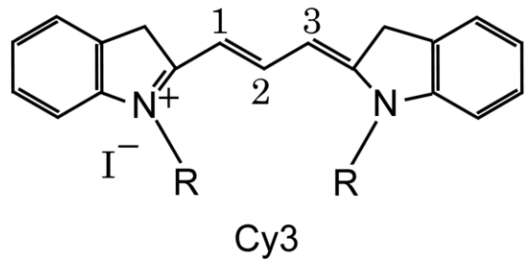
Espressione ricombinante di $\alpha_3\beta_3\epsilon\gamma$

Marcatura sito-specifica delle subunità γ e ϵ con le sonde fluorescenti Cy3 e Cy5

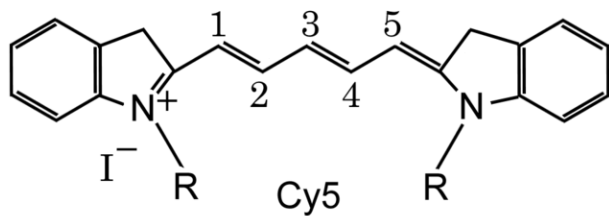


I due fluorofori sono stati coniugati ad una cisteina della proteina mediante reazione con maleimide

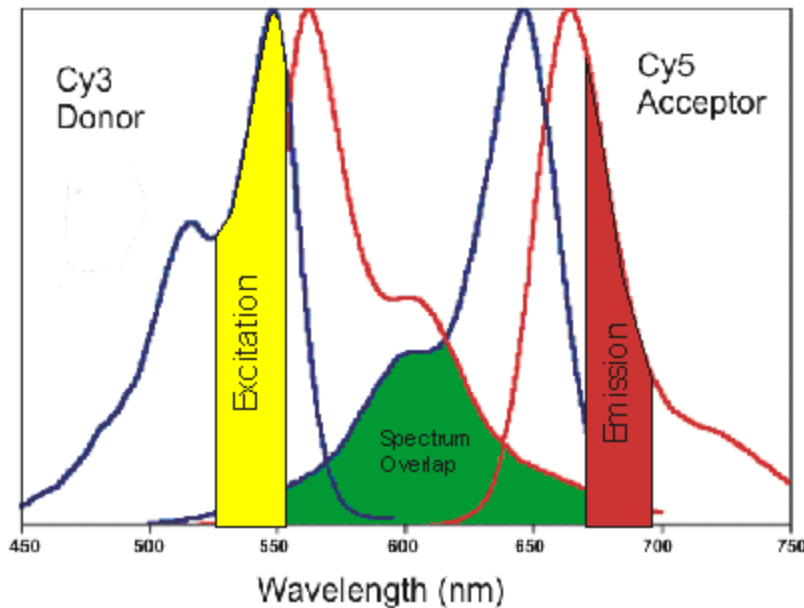




● Assorbe a 530 nm ed emette a 570 (615) nm



● Assorbe a 625 nm ed emette a 670 nm

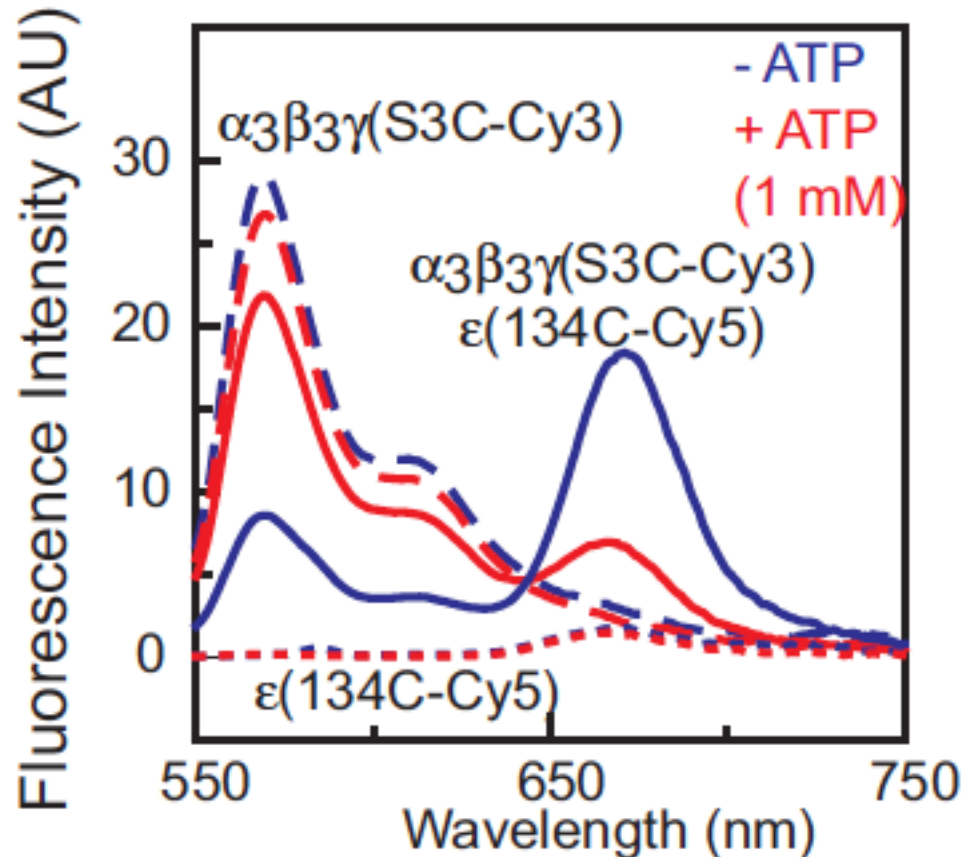


Spettri di fluorescenza (λ_{exc} 532 nm)

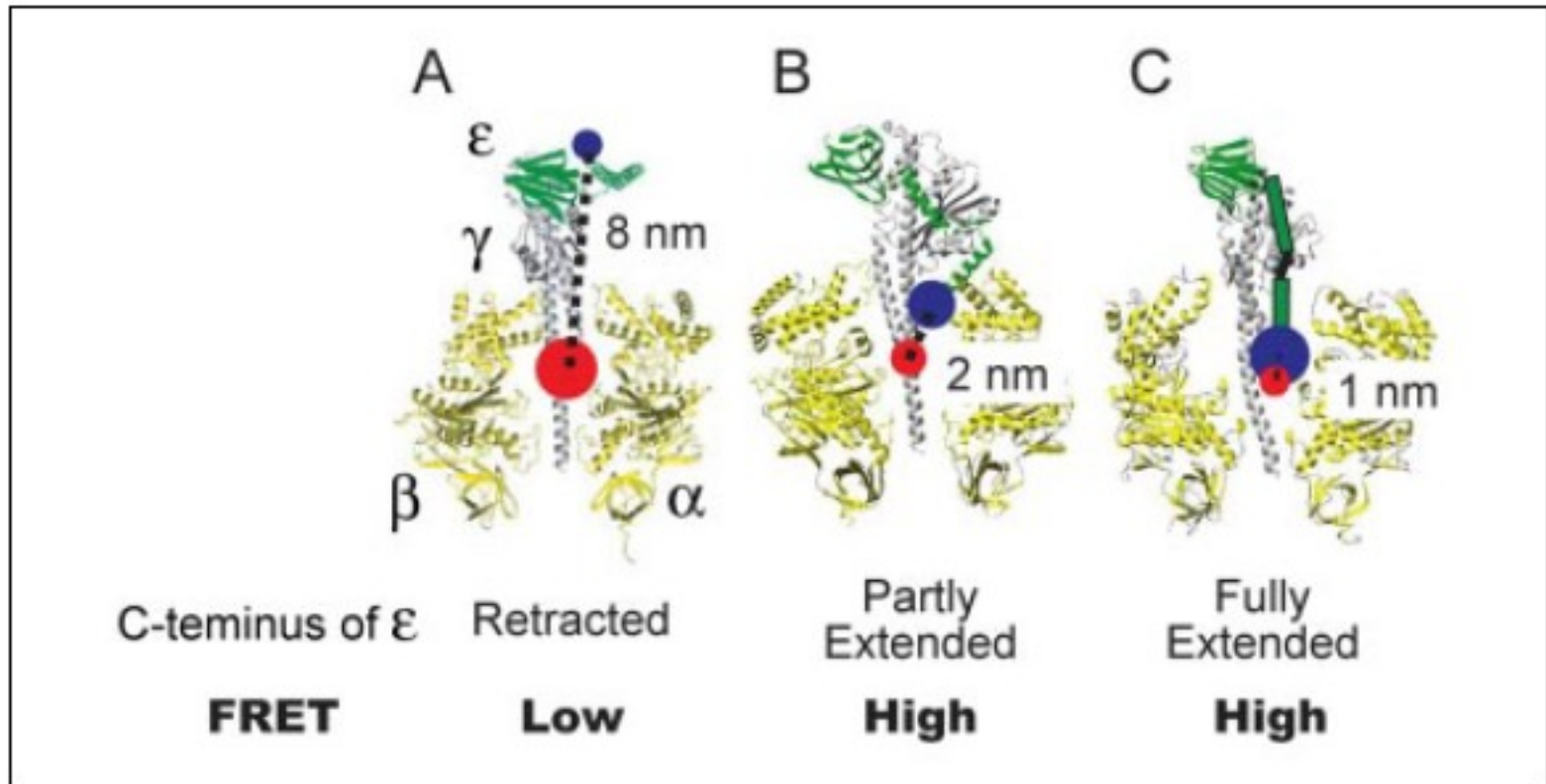
$\alpha_3\beta_3\gamma(S3C-Cy3)$ linea tratteggiata Assorbe a 530 nm emette a 570 nm

$\epsilon(134C-Cy5)$, linea punteggiata Assorbe a 649 nm emette a 670 nm

$\alpha_3\beta_3\gamma(S3C-Cy3)$ $\epsilon(134C-Cy5)$, **linea continua**



Mediante FRET è stato dimostrato che le due alfa eliche di ϵ cambiano conformazione passando da una forma estesa HIGH FRET ad una forma ritratta LOW FRET in presenza di ATP

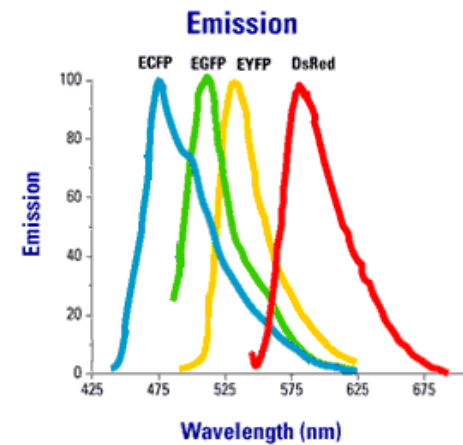
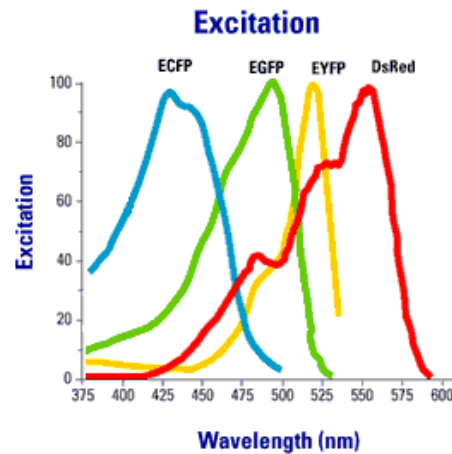
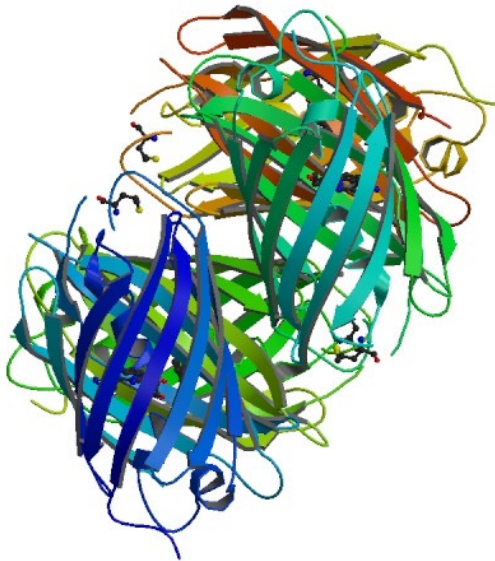
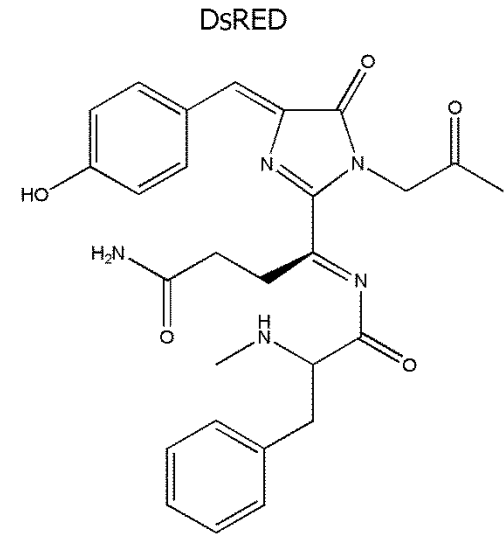
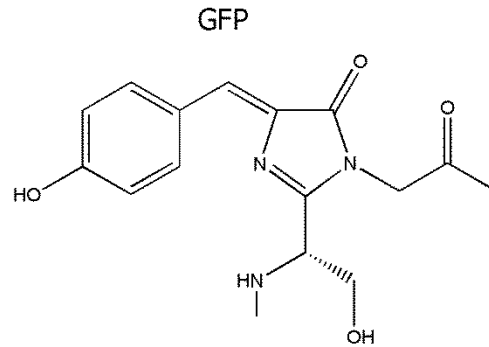


Varianti di GFP con proprietà spettrali diverse

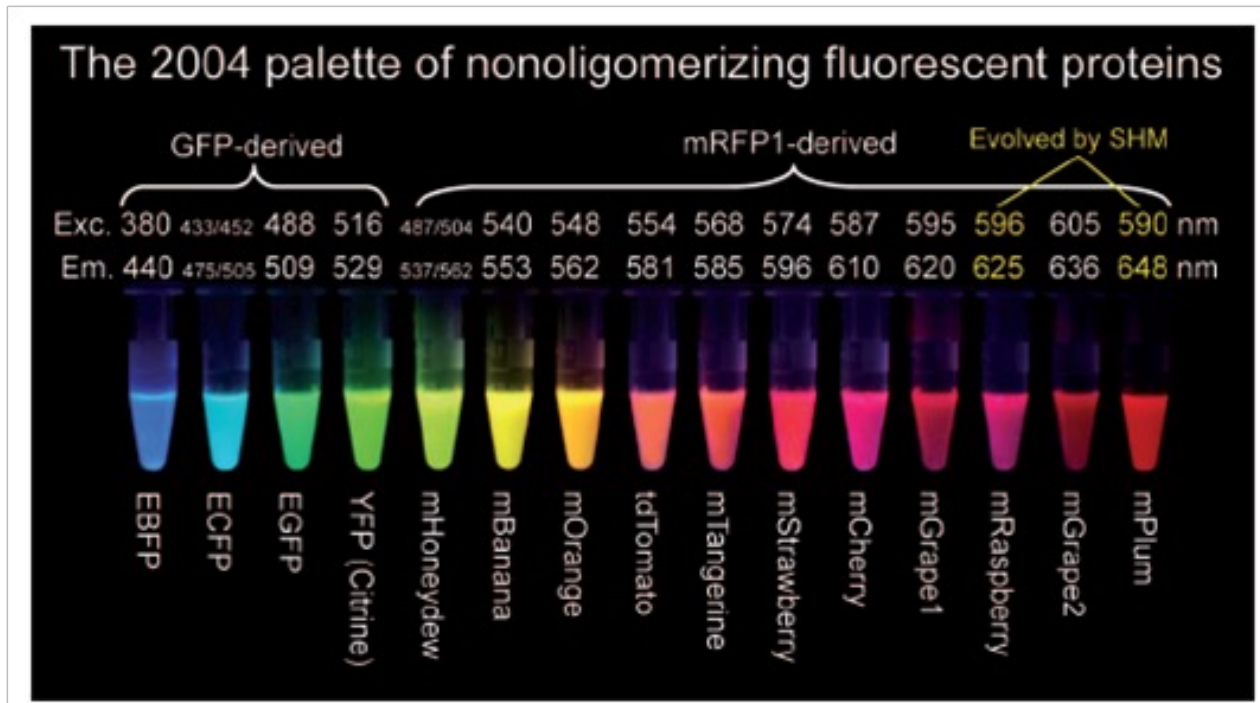
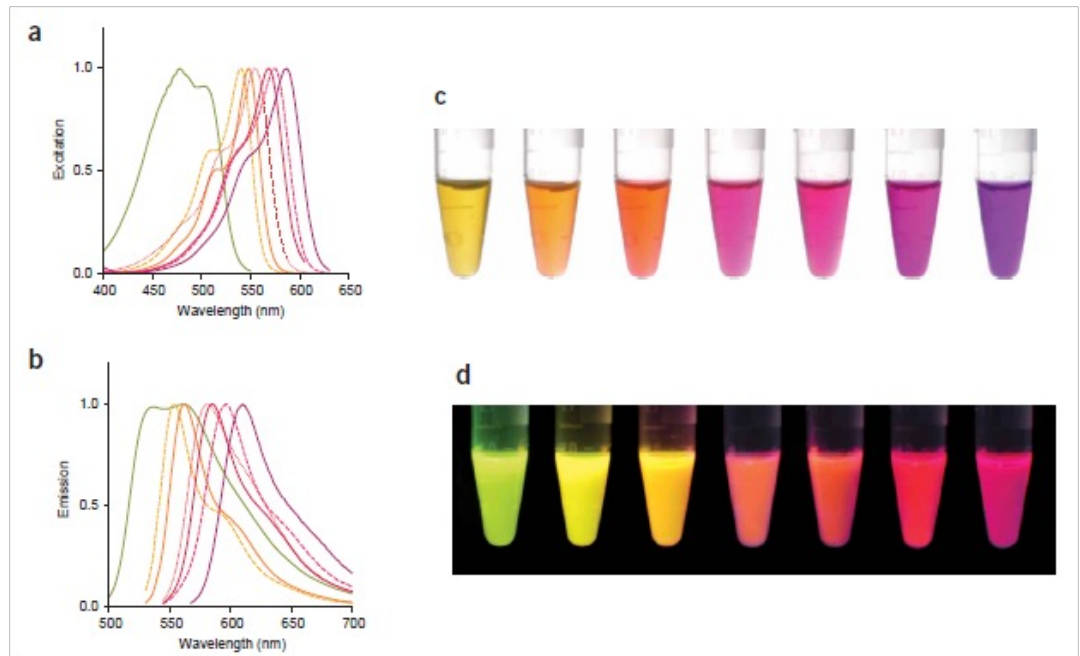
Table 1. Adapted from Tsien (1998).

Fluorescent protein	Amino acid substitutions	Absorbance/emission
GFP (green fluorescent protein)	–	396, 488/505 nm
EGFP (enhanced GFP)	Ser65Thr, Phe64Leu	488/509 nm
CFP (cyan fluorescent protein)	Phe64Leu, Ser65Thr Tyr66Trp, Asn146Ile Met153Thr, Val163Ala Asn212Lys	434, 452/476, 505 nm
YFP (yellow fluorescent protein)	Ser65Gly, Ser72Ala Thr203Tyr	514/527 nm
(less pH-sensitive version of YFP) (Miyawaki)	Ser65Gly, Val68Leu, Gln69Lys, Ser72Ala Thr203Tyr	516/529 nm
BFP (blue fluorescent protein)	Tyr66His, Tyr145 Ser	434, 452/476, 505 nm
DsRed	–	558/583 nm

DsRed, proteina fluorescente rossa dal corallo *Discosoma* sp.



Varianti di GFP e DsRed con proprietà spettroscopiche diverse. Queste proteine sono state ottenute per mutagenesi casuale e sito-specifica.



FRET CFP-YFP

Le proteine CFP e YFP sono utilizzate come donatore e accettore in esperimenti di FRET anche se la sovrapposizione degli spettri di emissione è elevata.

Si analizza il rapporto fluorescenza CFP/YFP

È possibile effettuare FRET *in vivo* su proteine di fusione

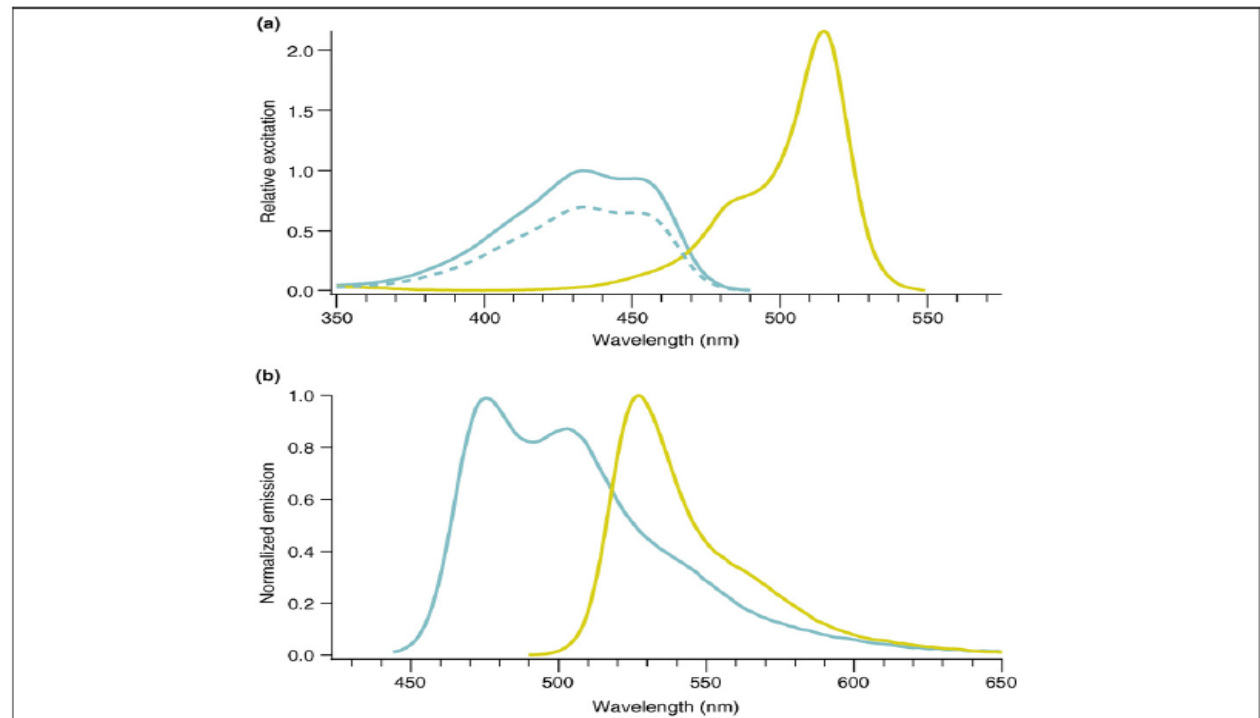
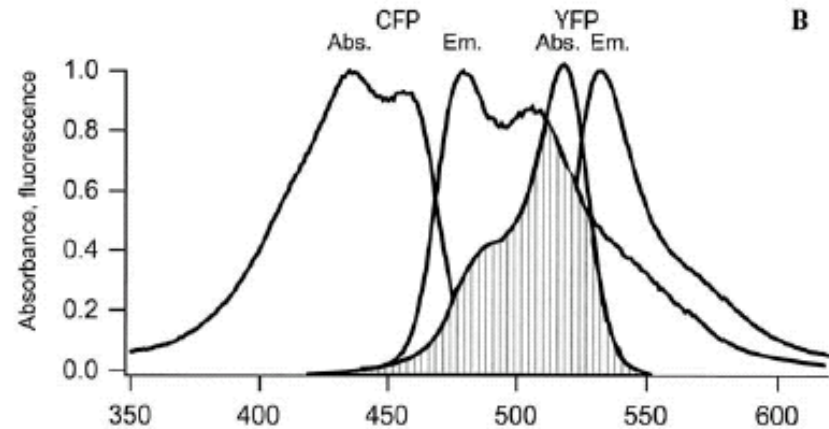
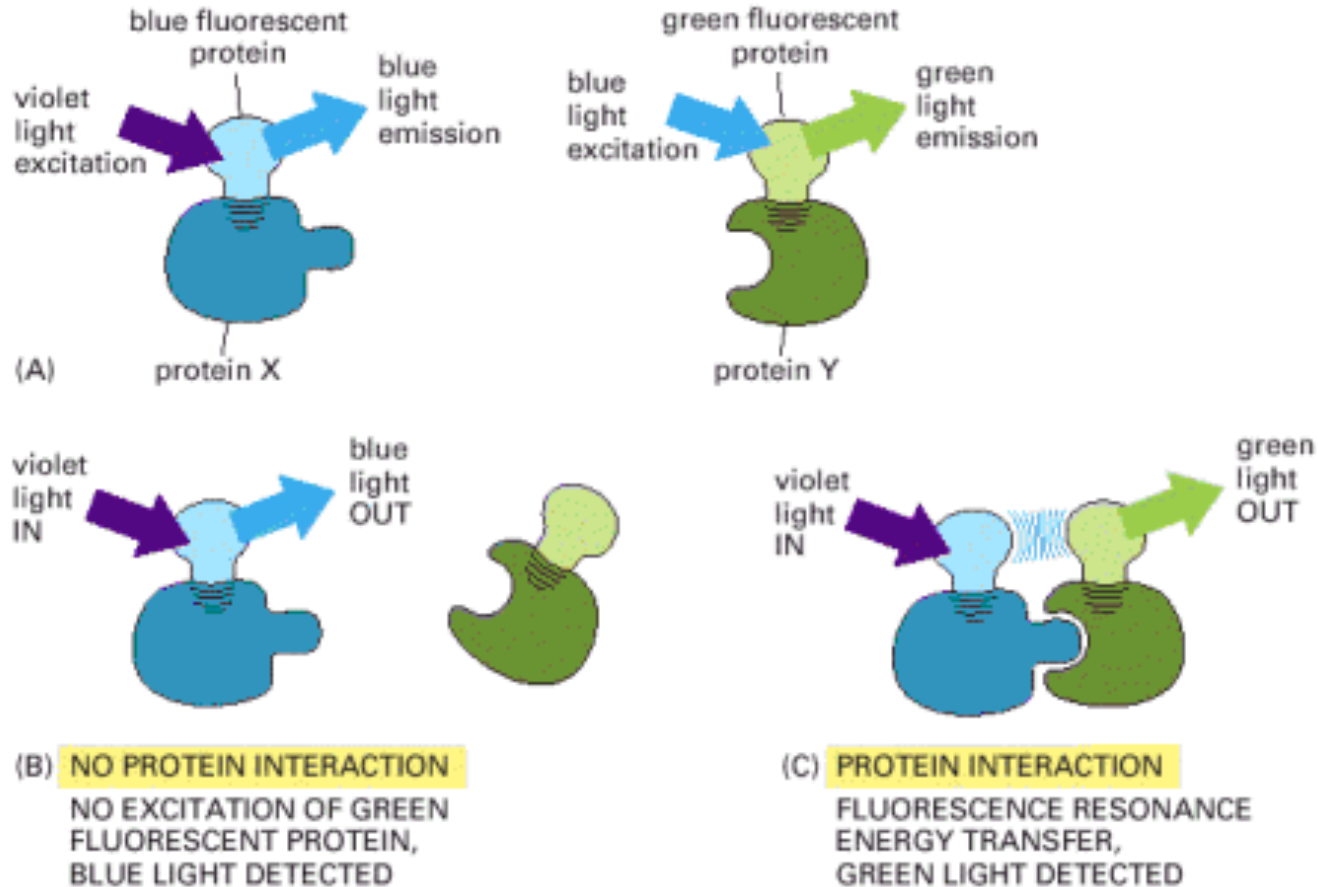


Figure 4. Overlap in the excitation and emission spectra of CFP and YFP. These two proteins have considerable overlap in both excitation (a) and emission (b) spectra. Direct excitation of the acceptor (YFP, yellow line) can be significant depending on the wavelength used for excitation of the donor (CFP, blue lines) owing to the higher extinction coefficient of YFP as compared with CFP. This overlap is especially problematic when enhanced CFP (dotted blue line) is used as the donor and can be partially overcome by using CFP variants with higher extinction coefficients such as mCerulean (unbroken blue line) or SCFP3A. The broad fluorescence emission spectrum of CFP shows considerable intensity in the region of YFP emission.

FRET BFP-GFP mediata dalla interazione tra le proteine X e Y

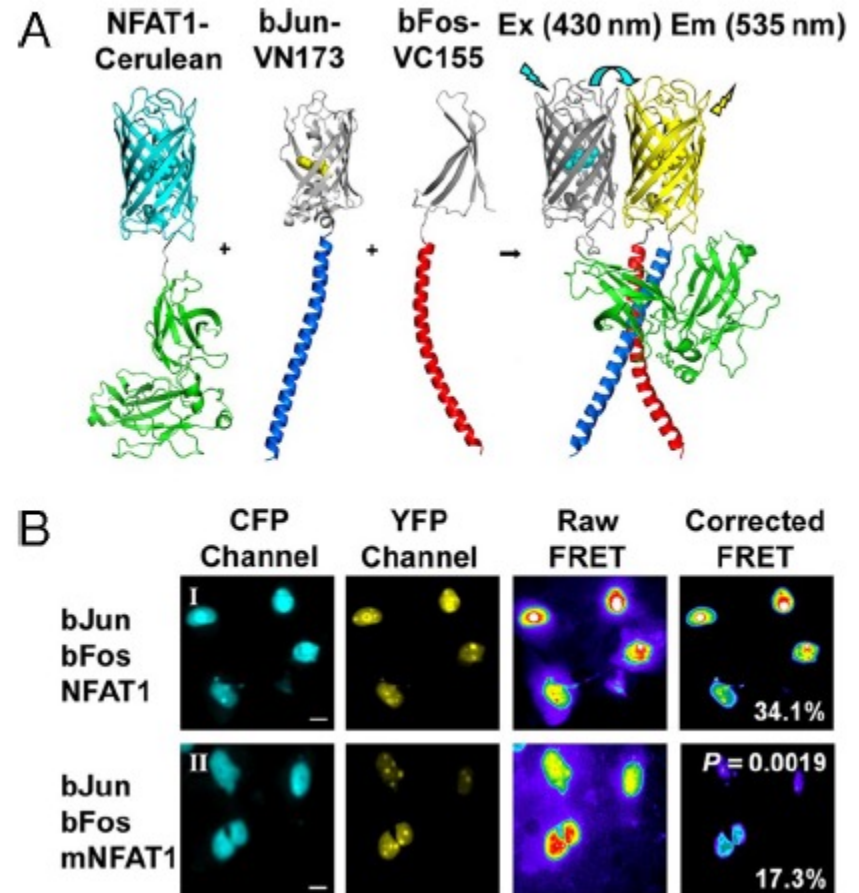


Analisi del complesso ternario dei fattori di trascrizione AP-1 e NFAT

BiFC-FRET tra **Cerulean** e **Venus**, due varianti di CFP e YFP. NFAT1 è un fattore di trascrizione richiesto per lo sviluppo delle cellule T e forma un complesso con il fattore AP-1 (eterodimero Jun-Fos).

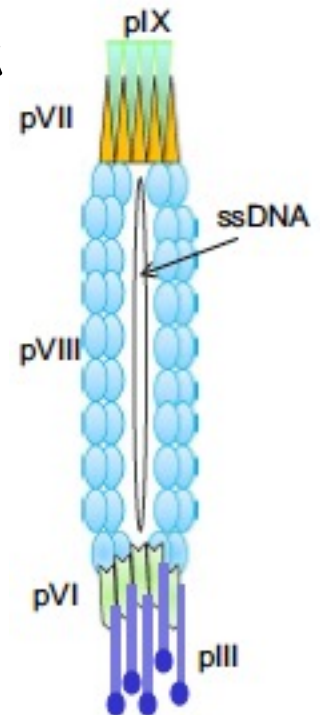
La regione 'leucine zipper' di Jun e Fos è fusa alle regioni N- e C-terminale di Venus (BiFC).

L'interazione con NFAT1 produce FRET tra Cerulean e Venus ricostituita.

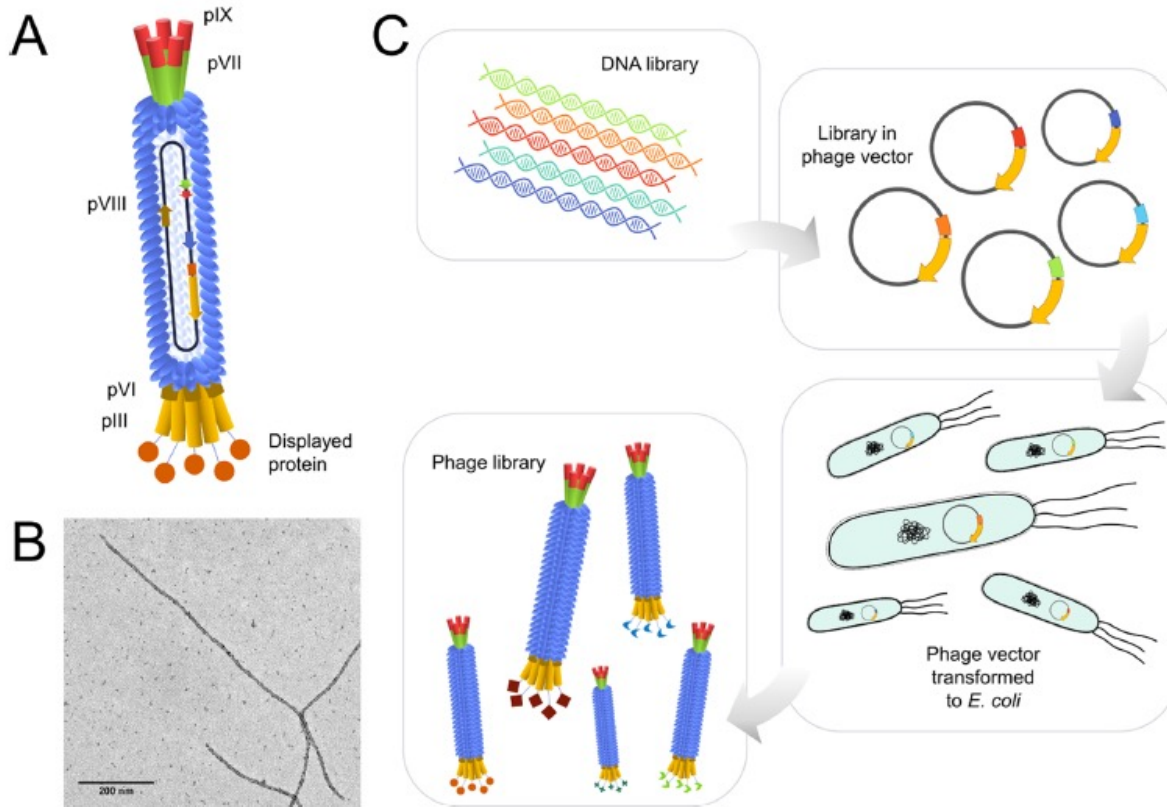


Phage display

- Tecnologia descritta nel 1985 da George Smith (Nobel per la Chimica nel 2018) per selezionare peptidi/proteine che legano una molecola bersaglio
- Prevede l'esposizione di peptidi/proteine sulla superficie di un fago
- Le sequenze codificanti di peptidi o proteine vengono fuse alla sequenza di una proteina dell'involucro del fago
- Il fago filamentoso lisogenico M13 e la sua proteina pIII sono i più utilizzati



Phage display



Fusione al 5' della proteina pIII

Costruzione di un fagemide e cotrasformazione in *E. coli* con un fago helper

Figure 1. (A) Structure of filamentous phage M13 which consists of a protein coat made of the major coat protein (pVIII) and the minor coat proteins (pIII and pVI on one end and pVII and pIX on the other). The genomic DNA encoding for the coat proteins is enclosed within the protein coat. By introducing modified segments into the genomic DNA, the phage can be engineered to display foreign peptides or proteins as a fusion with one of the coat proteins, most commonly pIII. (B) Transmission electron micrograph of the filamentous phage M13 acquired with negative staining using a JEOL JEM-1400PLUS instrument operating at 120 kV, with a LaB6 electron source and a GATAN US1000 CCD camera (2k × 2k). (C) Construction of phage-displayed libraries includes generation of the DNA library encoding for the different variants and introduction of the variable sequences in the phage DNA (typically a phage vector or phagemid system). After transforming the DNA to bacteria, phages are amplified and will display an individual protein or peptide variants outside the virion.

Phage display: strategia di selezione dei fagi che legano la molecola bersaglio immobilizzata

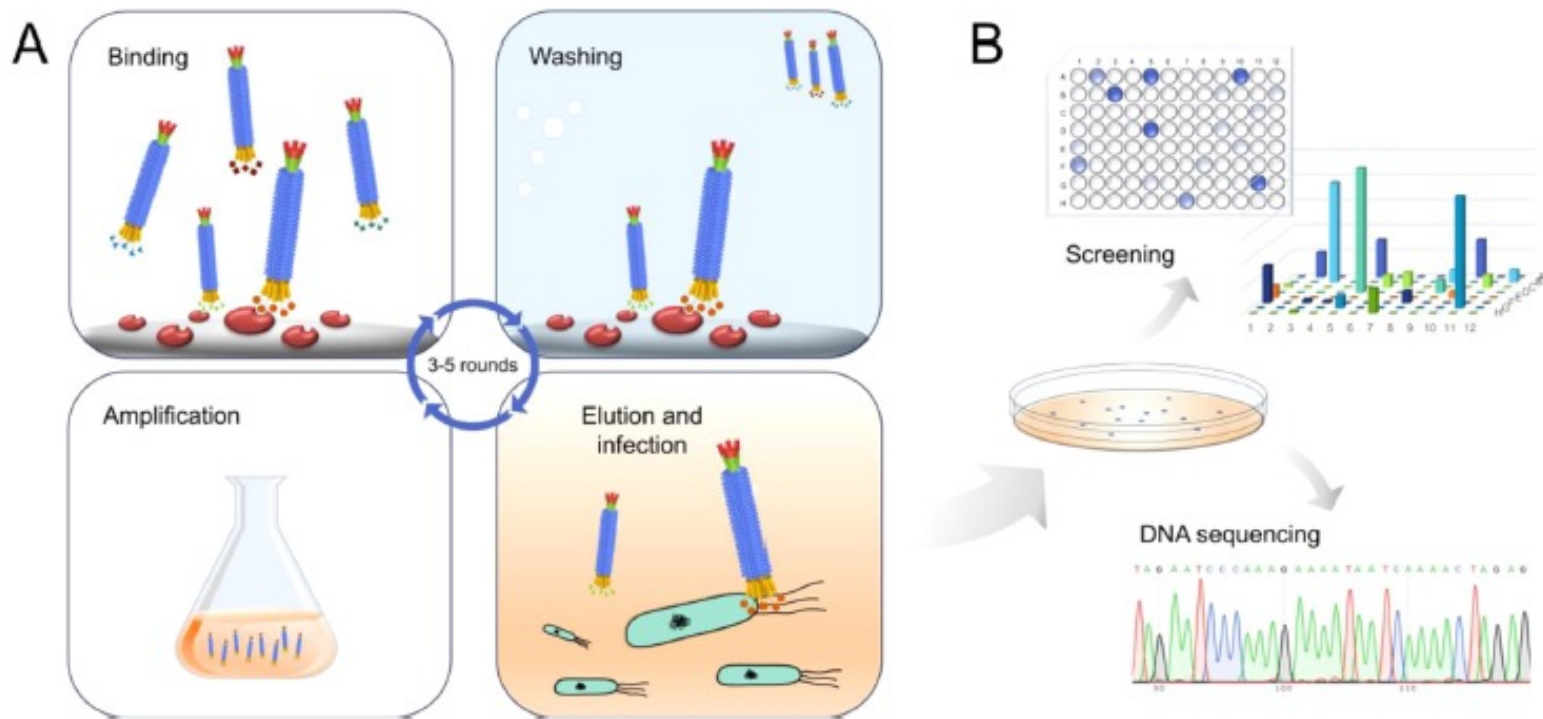


Figure 2. Selection of affinity binders from a phage-displayed library. (A) Selection process consists of binding, washing, elution, and amplification steps, which are usually repeated to three to five times to enrich target-specific binders. (B) Target specificity of individual clones can then be determined by screening the monoclonal clones from single colonies in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the positive clones can be identified by DNA sequencing.

Phage display: limiti per l'analisi di interazioni proteina-proteina

- Dimensioni degli inserti < 1500 bp
- Esporto nel periplasma per l'assemblaggio delle particelle fagiche
- Costruzione librerie di cDNA/ORF complessa: è necessario che gli inserti siano *in frame* con la sequenza di pIII e non devono essere presenti codoni di stop
- Fusioni dirette o indirette a pIII
- Sistema jun-fos: fusione pIII-jun e fos-libreria cDNA. L'interazione jun-fos è stabilizzata da ponti disolfuro introdotti ad hoc

