

# Metodi di studio delle interazioni proteina-proteina

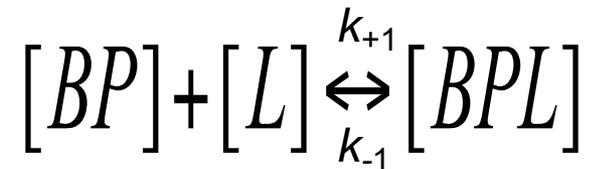
Metodi biochimici

# Interazioni proteina-proteina

- Interazioni **stabili**: complessi proteici
- Interazioni **transienti**: controllano la maggior parte dei processi cellulari

# Equilibrio di legame

- BP (binding protein) e L (ligand) formano un complesso BPL
- Le costanti di associazione  $K_A$  e di dissociazione  $K_D$  definiscono la forza (affinità) dell'interazione



$$k_{+1}[BP][L] = k_{-1}[BPL]$$

$$\frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_D = \frac{[BP][L]}{[BPL]}$$

$$\frac{k_{+1}}{k_{-1}} = K_A = \frac{[BPL]}{[BP][L]}$$

# Come **identificare** e **caratterizzare** una interazione proteina-proteina o proteina-ligando?

Metodi biochimici: cromatografia di affinità  
affinity blot (overlay)  
co-immunoprecipitazione  
cross-linking  
cromatografia di gel-filtrazione

Metodi genetici: sistema a doppio ibrido e varianti  
(protein complementation assay)  
phage display

Metodi biofisici: **FRET**: Fluorescence Resonance Energy Transfer  
**SPR**: Surface Plasmon Resonance  
**ITC**: Isothermal Titration Calorimetry

# Cromatografia di affinità

- Il metodo si basa sulla formazione reversibile del complesso BPL tra ligando L (proteina 'esca') e 'binding protein' BP (proteina 'preda')
- Il ligando L viene immobilizzato su una matrice cromatografica

Complessi con  $K_D > 10^{-4} M$  sono difficili da identificare

Complessi con  $K_D < 10^{-10} M$  difficilmente si possono eluire in condizioni native

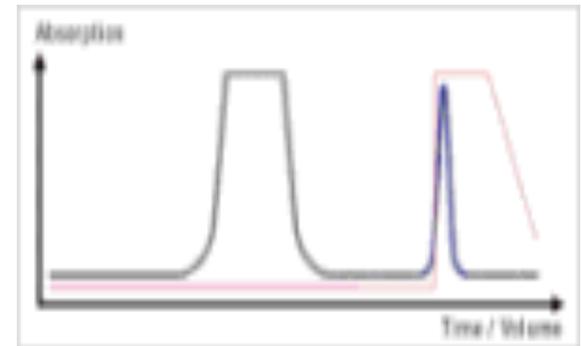
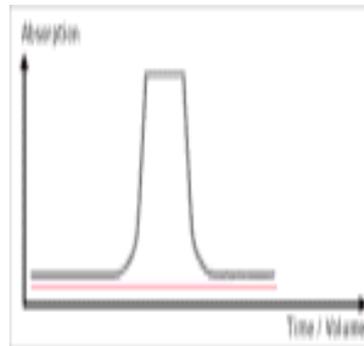
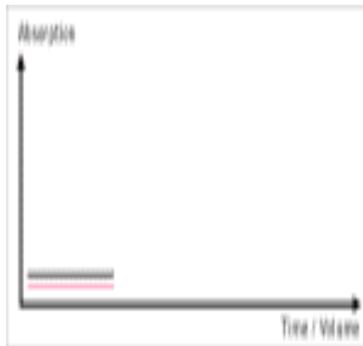
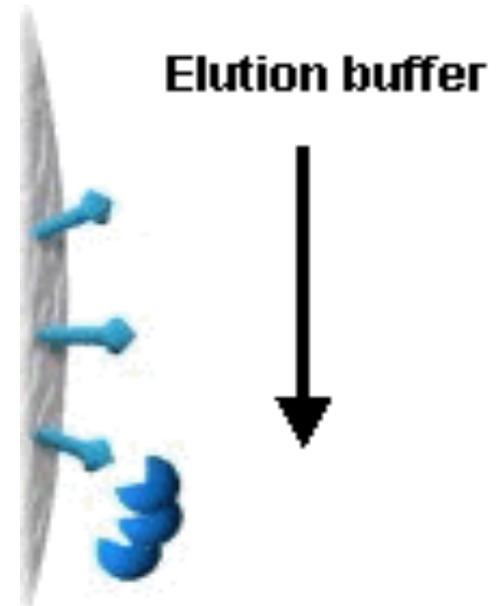
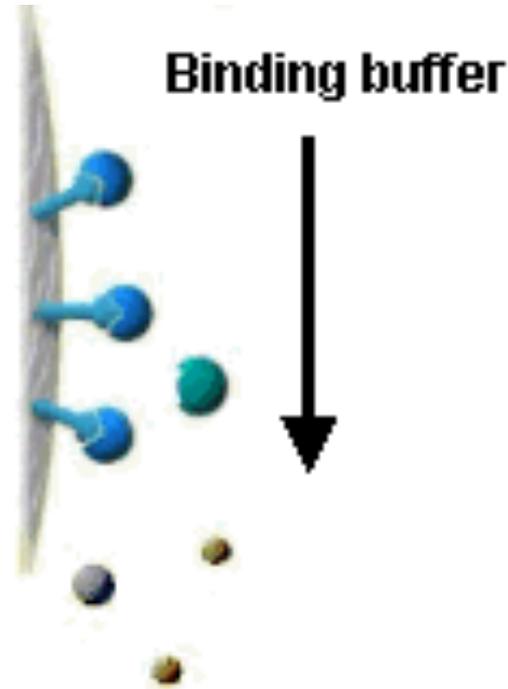
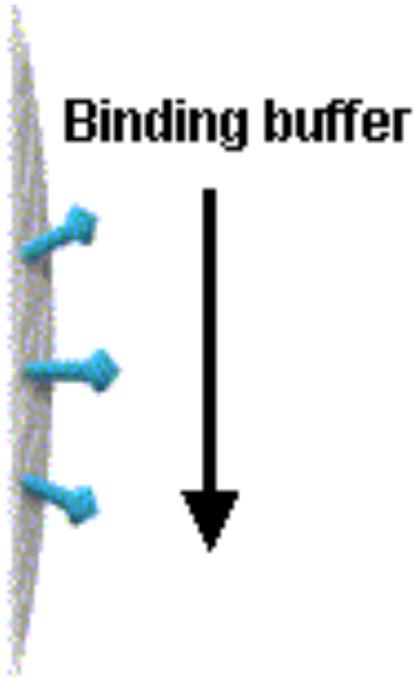
# Cromatografia di affinità

Immobilizzazione della proteina 'esca' (o del ligando) su resina cromatografica

Fattori che influiscono sulla efficacia della cromatografia di affinità

- purezza della proteina 'esca' da immobilizzare
- influenza di modificazioni post-sintetiche e cofattori
- concentrazione della proteina immobilizzata ( $>K_D$ )
- si possono usare miscele proteiche molto complesse
- può essere utilizzata sia per identificare nuovi partner di interazione con la proteina 'esca' che per definire le regioni di interazione → si possono usare proteine mutate

# Cromatografia di affinità



**Matrice:** una matrice ideale deve avere le seguenti caratteristiche:

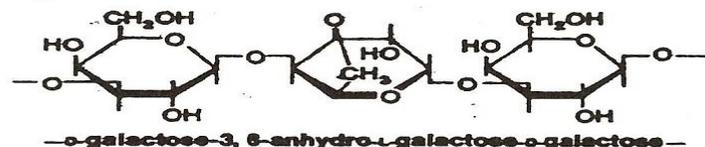
- Contenere gruppi chimici adatti per il legame covalente
- Essere stabile nelle condizioni di legame e di uso
- Essere inerte

Possono essere suddivise in due categorie principali:

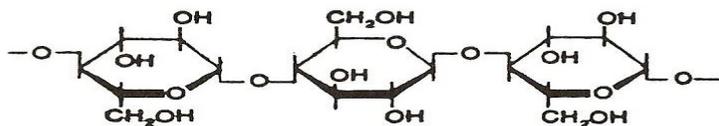
**POLIMERI NATURALI:** polisaccaridi (agarosio, destrano, cellulosa)

**POLIMERI SINTETICI:** polistirene, poliacrilati

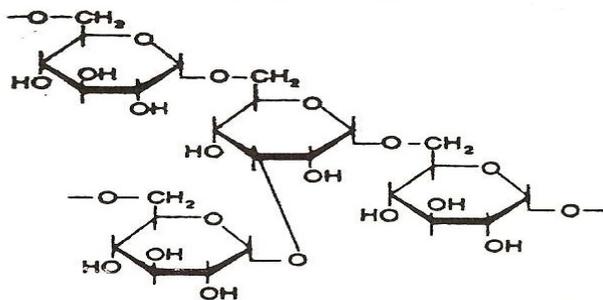
**Agarose**



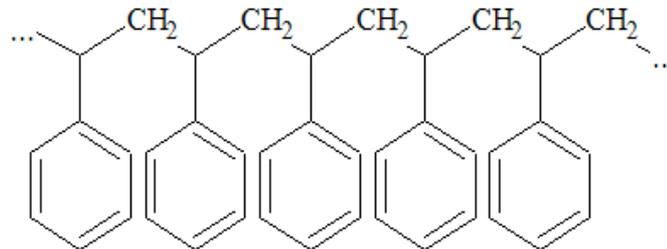
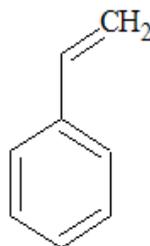
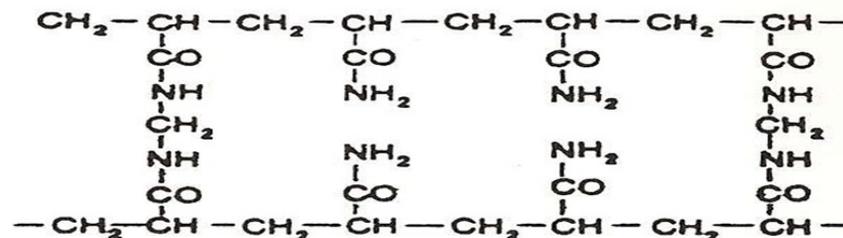
**Cellulose**



**Crosslinked dextran (Sephadex)**



**Crosslinked polyacrylamide**

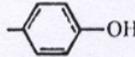
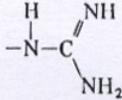
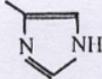
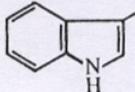


# Ligandi

- Devono avere uno o più gruppi adatti per il legame covalente non coinvolti con il legame con la binding protein.
- I gruppi più comuni sono  $-NH_2$ ,  $COOH$ ,  $SH$ ,  $OH$

## Residui reattivi delle proteine

Table 5.8. Reactive residues of proteins<sup>a</sup>

| Residue   | Originating amino acid  |
|---|---|
| $-NH_2$   | $\epsilon$ -Amino of L-lysine and <i>N</i> -terminus amino group              |
| $-SH$   | Thiol of L-cysteine   |
| $-COOH$   | Carboxyl of L-aspartate and L-glutamate and <i>C</i> -terminus carboxyl group |
|    | Phenolic of L-tyrosine  |
|   | Guanidino of L-arginine   |
|  | Imidazole of L-histidine  |
| $-S-S-$   | Disulphide of L-cystine   |
|  | Indole of L-tryptophan  |
| $CH_3-S-$   | Thioether of L-methionine   |
| $-CH_2OH$   | Hydroxyl of L-serine and L-threonine  |

In genere si interpone al ligando un braccetto spaziatore di lunghezza variabile che aumenta l'accessibilità del ligando alla binding protein

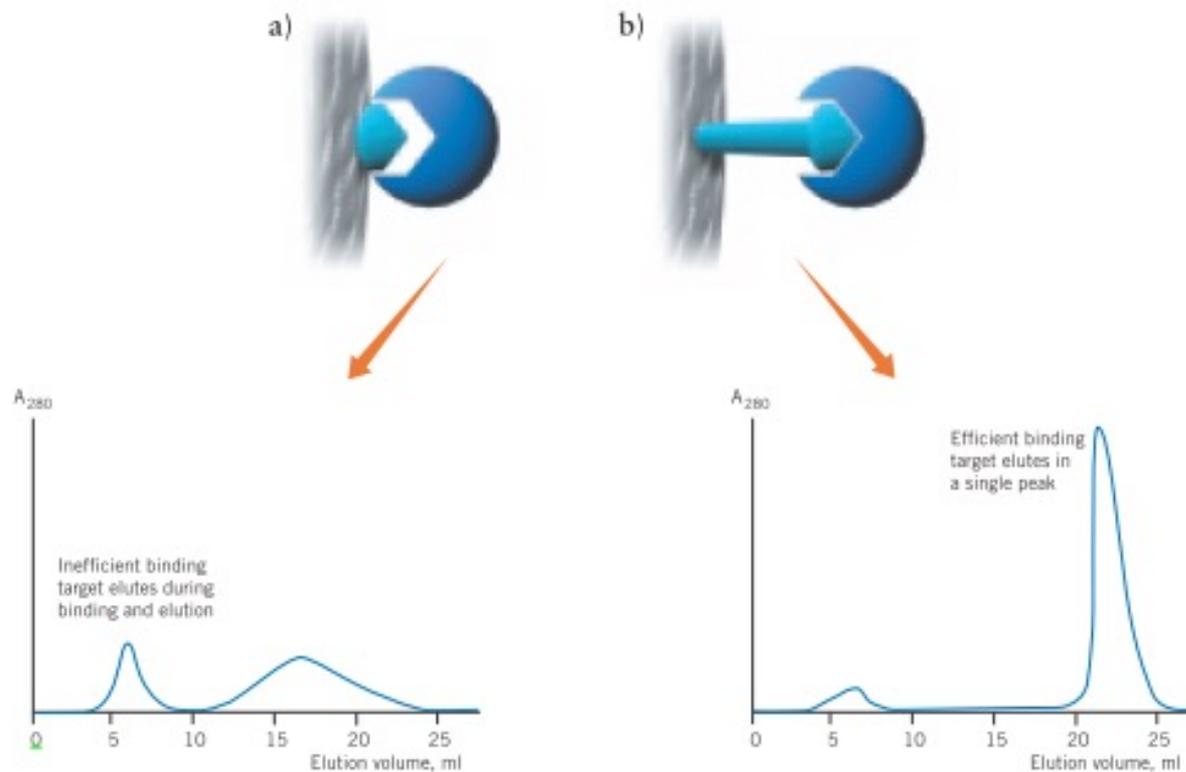
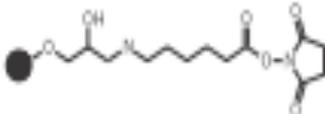
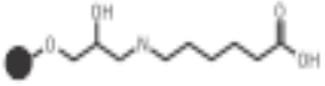
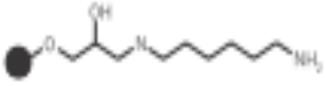
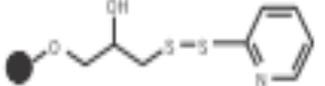
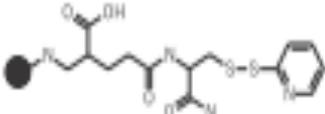
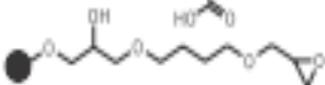
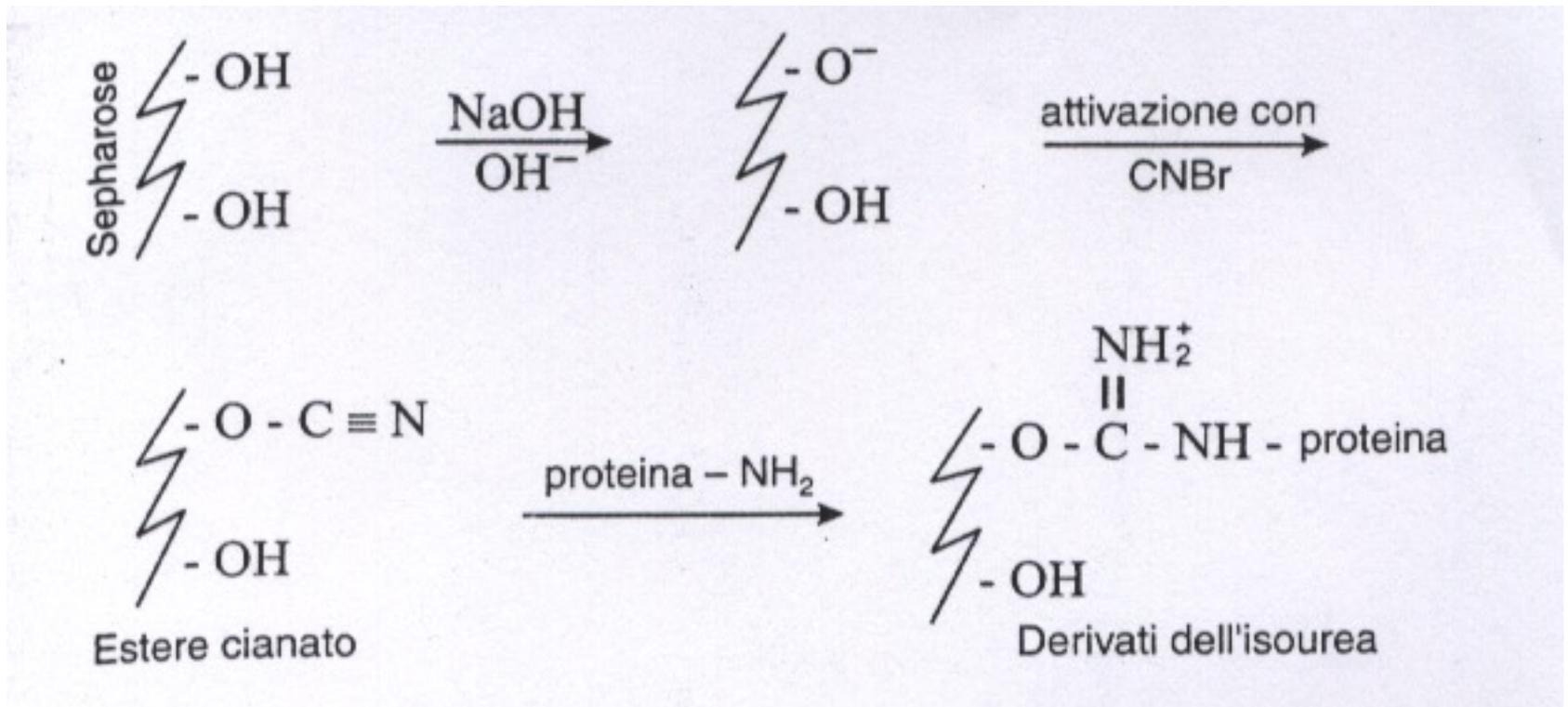


Table 8.

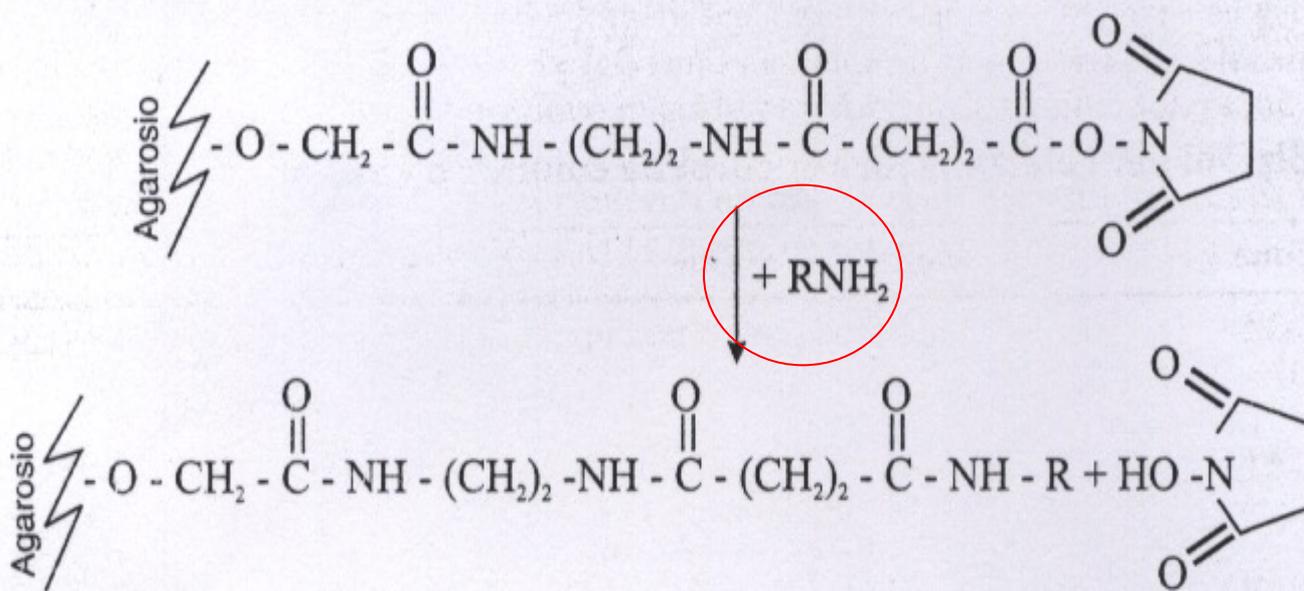
| Chemical group on ligand               | Length of spacer arm | Structure of spacer arm  | Product   |
|--|----------------------|--|---|
| <b>Proteins, peptides, amino acids</b> |                      |  |   |
| amino                                  | 10-atom              |    | HiTrap NHS-activated HP<br>NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow      |
|  | None                 | –  | CNBr-activated Sepharose 4B<br>CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow |
| carboxyl                               | 10-atom              |    | ECH Sepharose 4B  |
|  | 11-atom              |    | EAH Sepharose 4B  |
| thiol                                  | 4-atom               |    | Thiopropyl Sepharose 6B   |
|  | 10-atom              |   | Activated Thiol Sepharose 4B  |
|  | 12-atom              |  | Epoxy-activated Sepharose 6B  |

# Procedura di accoppiamento mediante bromuro di cianogeno (gruppi amminici)

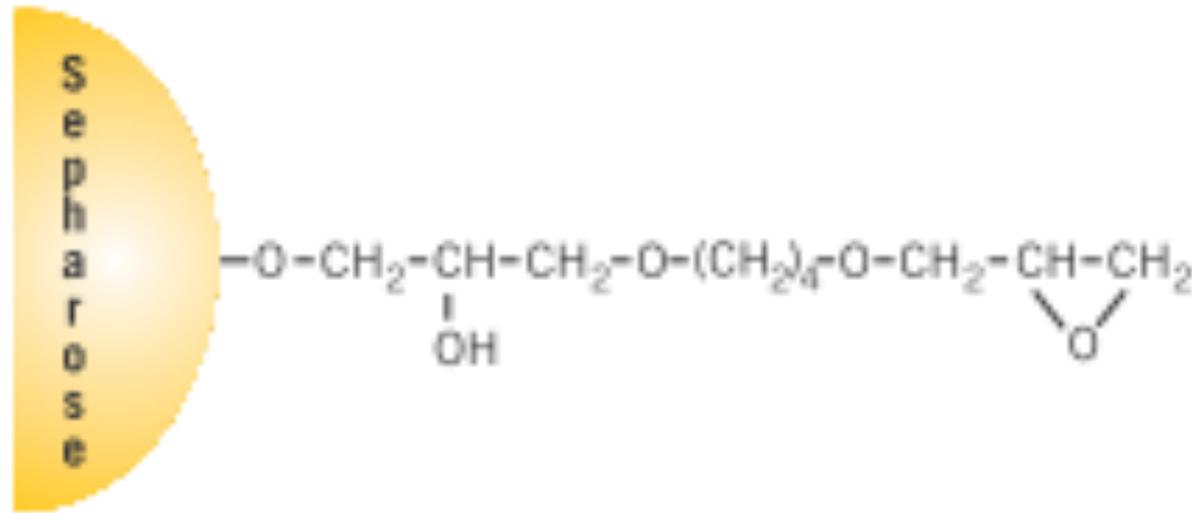
- Si attiva la resina a pH alcalino
- Si aggiunge la proteina 'esca' (ligando)
- Si bloccano i rimanenti gruppi attivi
- Si lava



Accoppiamento con esteri della N-idrossisuccinimide (gruppi amminici) a pH neutro

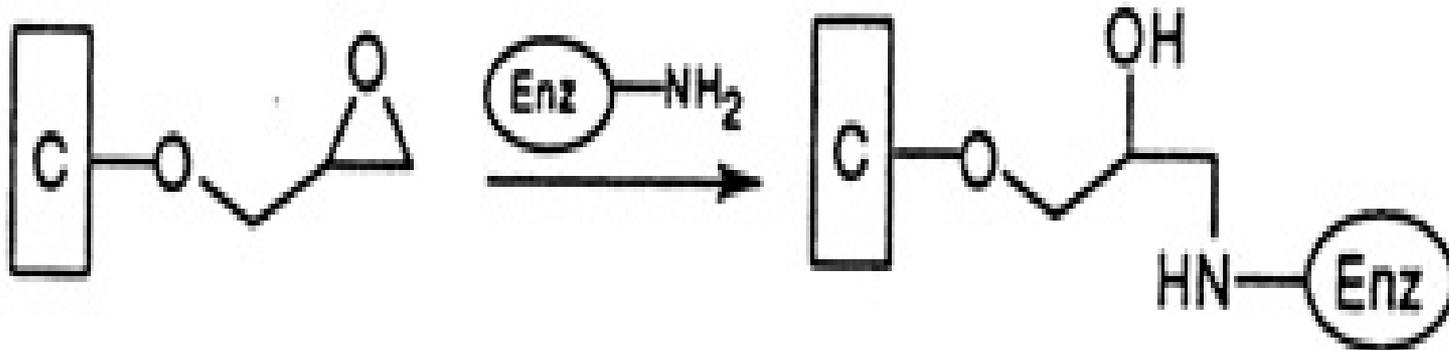


# Accoppiamento mediante epossidi pH basico (gruppi $\text{NH}_2$ , $\text{SH}$ , $\text{OH}$ )

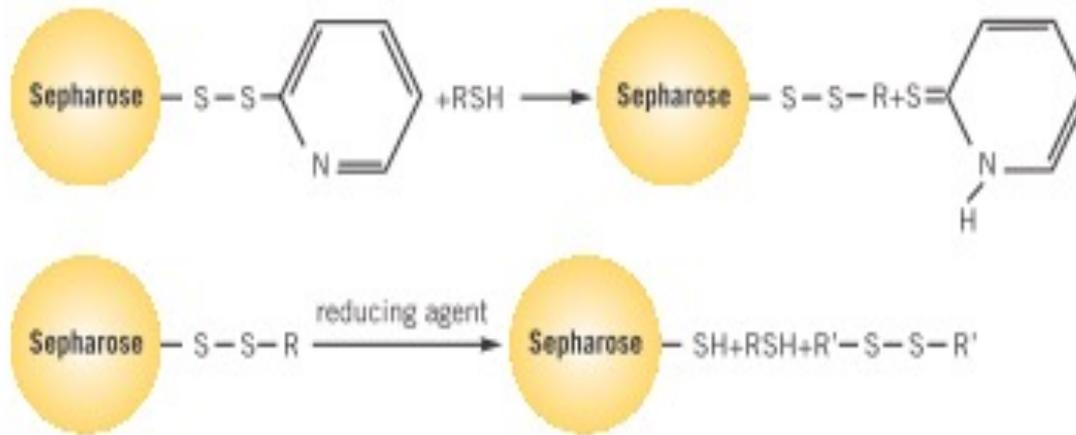


L- $\text{NH}_2$   
L-SH  
L-OH

## Reazione di sostituzione nucleofila



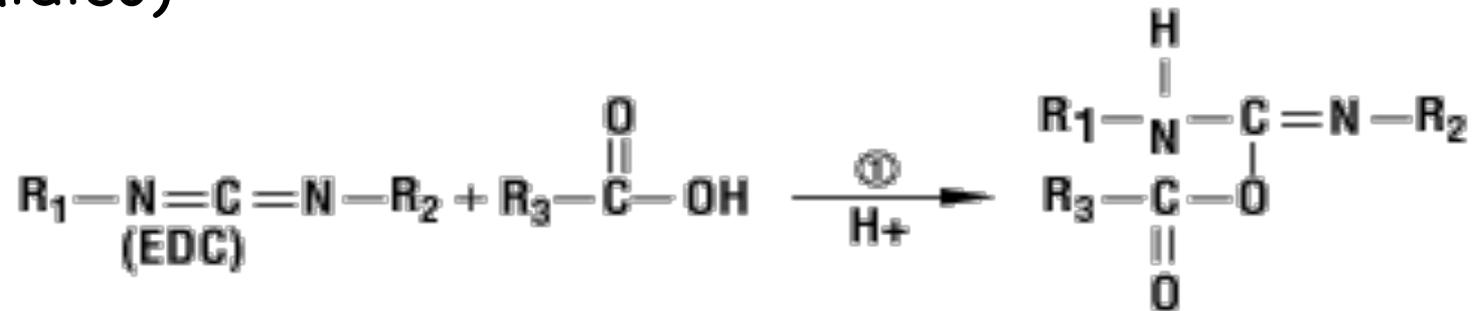
# Procedimento per legare proteine contenenti gruppi SH



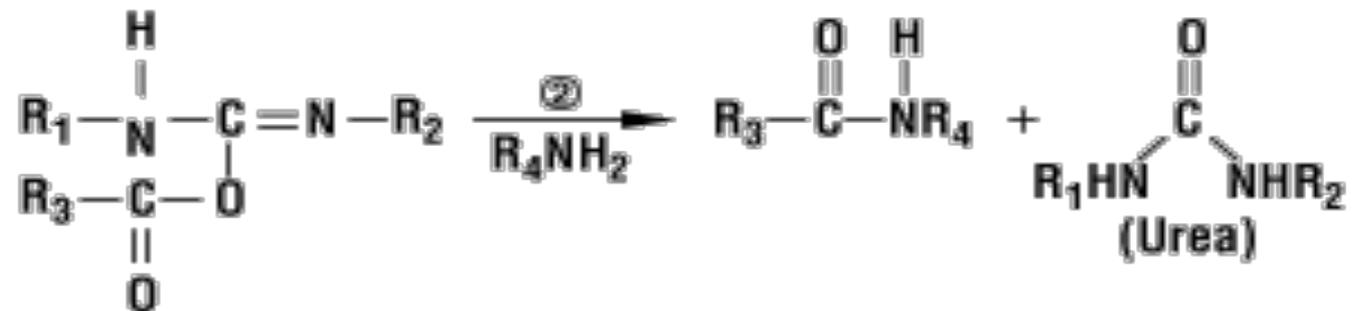
2 piridil-tione  
assorbe a 343 nm

L'attacco prevede uno scambio tra gruppi tiolici  
formazione di ponti disolfuro tra proteina e resina  
liberazione di 2 piridil-tione

Reazione di accoppiamento tra gruppi carbossilici e gruppi amminici mediante **carbodiimmidi** (Formazione legame ammidico)



La carbodiimmide reagisce con il gruppo carbossilico a pH 4.5 per formare l'ossiacilurea

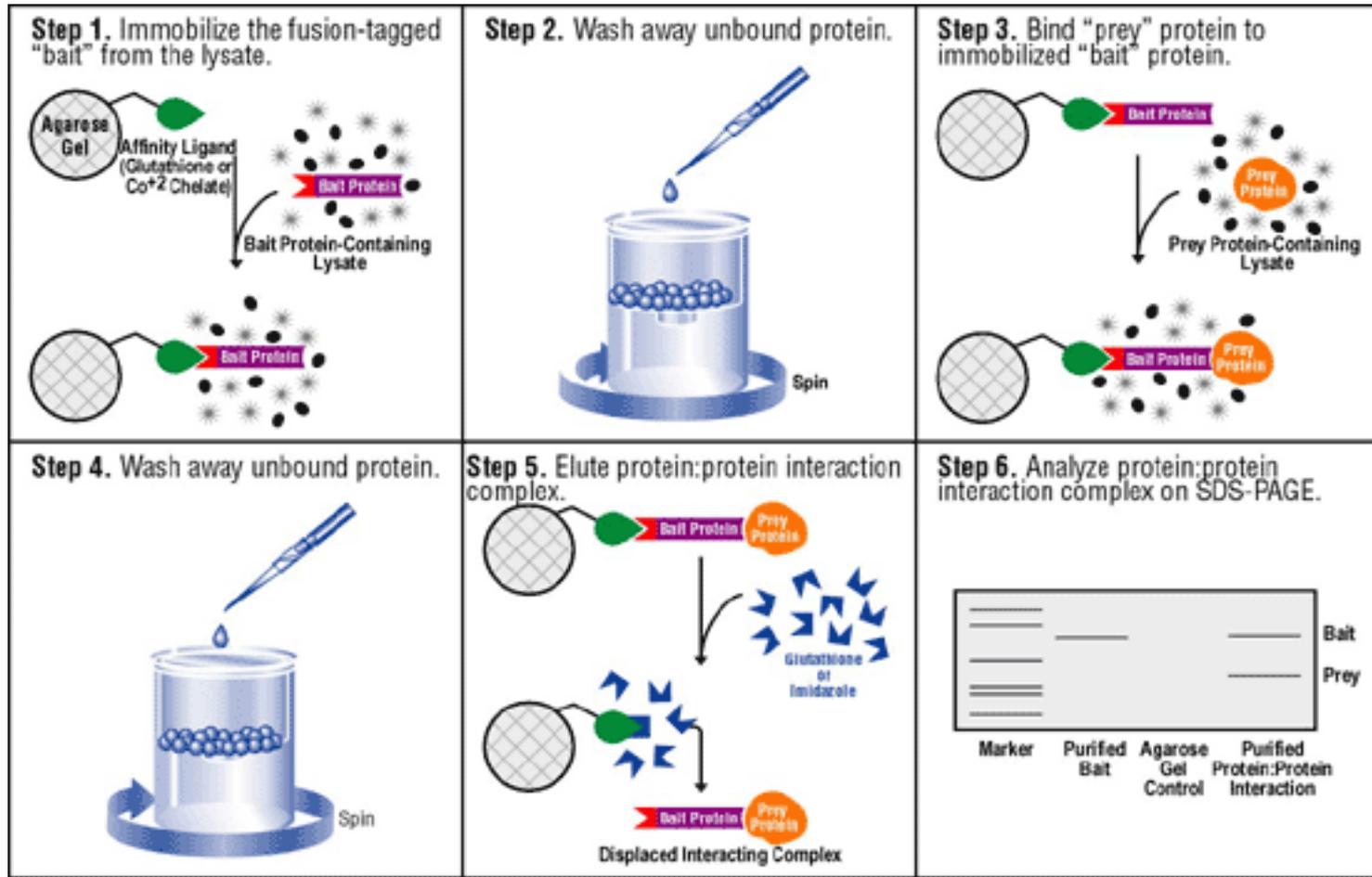


Il carbonio carbonilico dell'ossiacilurea subisce l'attacco nucleofilo dal gruppo amminico per formare un legame ammidico con liberazione di urea

## Proteine ricombinanti con 'affinity tag': cromatografia di affinità 'Pull-down'

- **Tag: Peptidi o proteine** che possono essere purificate mediante l'interazione con **piccole molecole** immobilizzate sulle resine. Ad esempio His-Tag, glutatione *S*-transferasi, maltose binding protein si legano a resine che contengono rispettivamente un metallo chelato, il glutatione ed il maltosio
  - **Tag: Peptidi** che possono essere purificati su resine in cui sono immobilizzate le **proteine partner** (calmodulin binding peptide CBP si lega a resine in cui è stata immobilizzata la calmodulina)
  - **Tag: Peptidi** che possono essere purificati su resine in cui sono immobilizzati **anticorpi** (peptide FLAG etc)
- **Immobilizzazione della proteina 'esca' sfruttando il tag**

# PROTEINE RICOMBINANTI CON AFFINITY TAG 'Pull-down'



➤ = Fusion Tag (GST or polyHis)

# Tandem Affinity Purification (TAP)

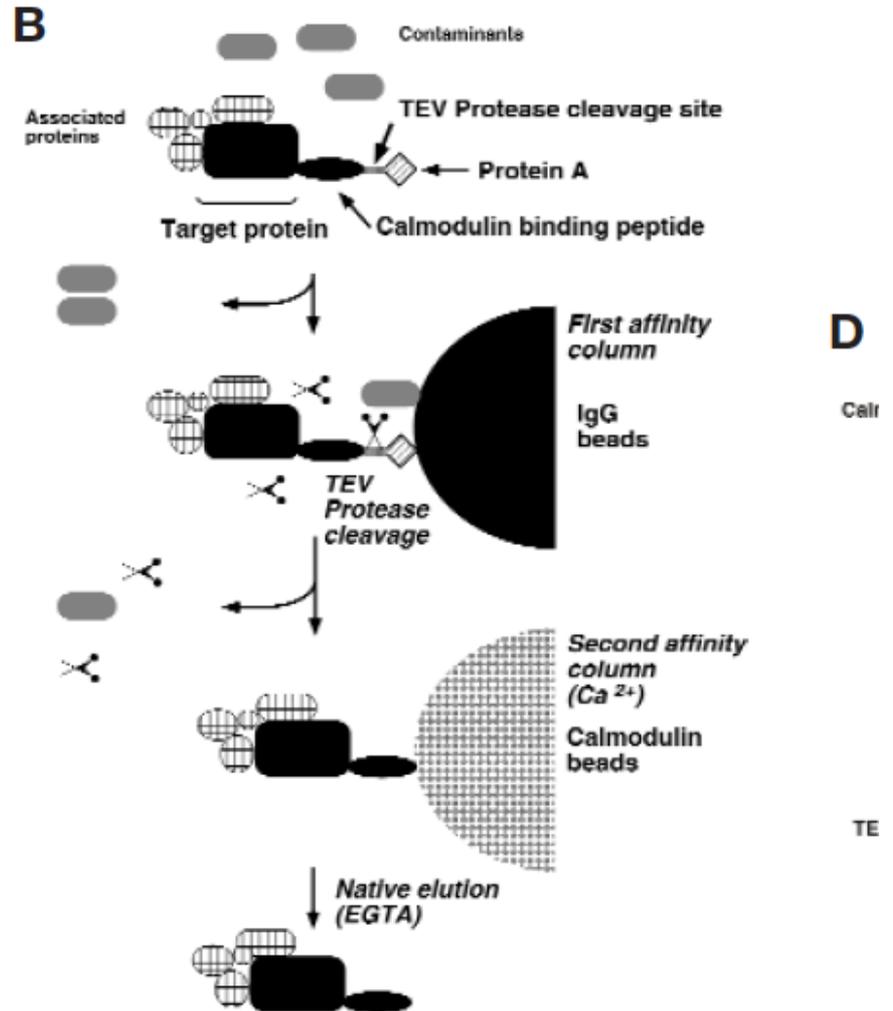
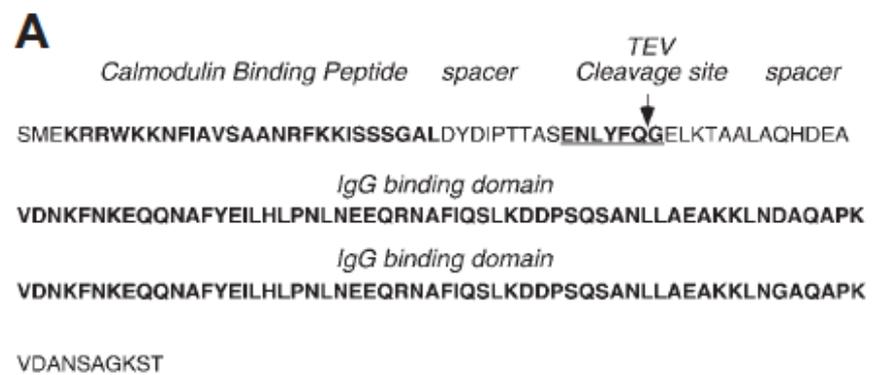
Doppio tag basato su una porzione della proteina A (lega IgG) e un peptide che lega la calmodulina separate da sequenza di riconoscimento per la proteasi TEV

Cromatografia su

1. IgG
2. calmodulina (+  $Ca^{2+}$ )

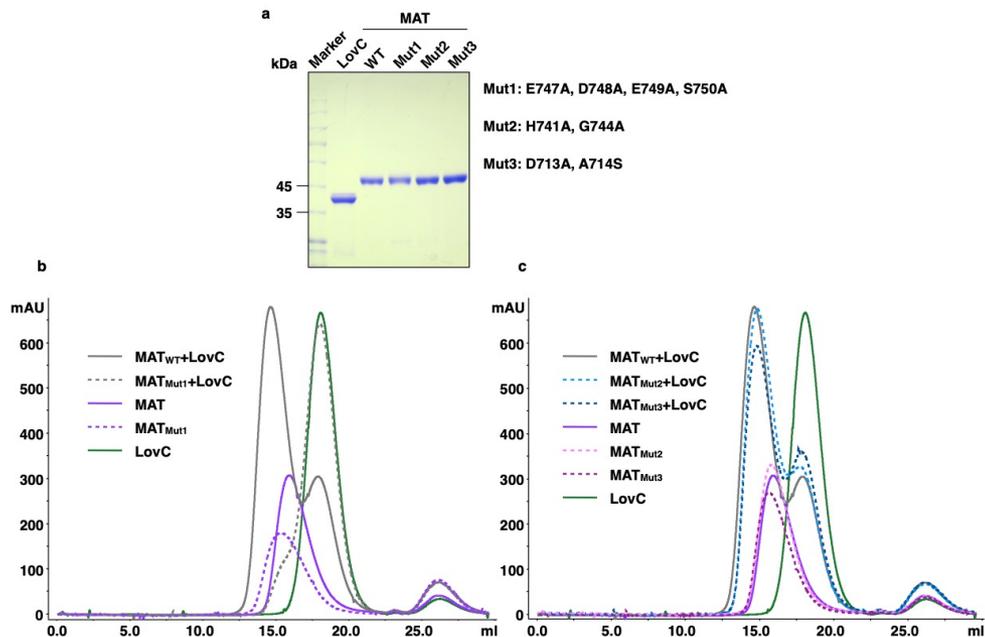
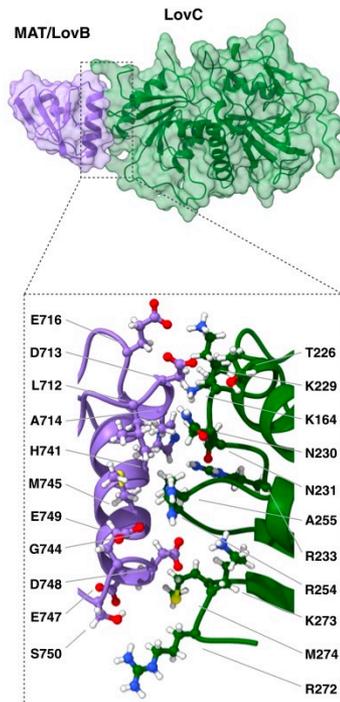
Eluizione

1. taglio con TEV
2. EGTA (chelante  $Ca^{2+}$ )



# Cromatografia di gel-filtrazione

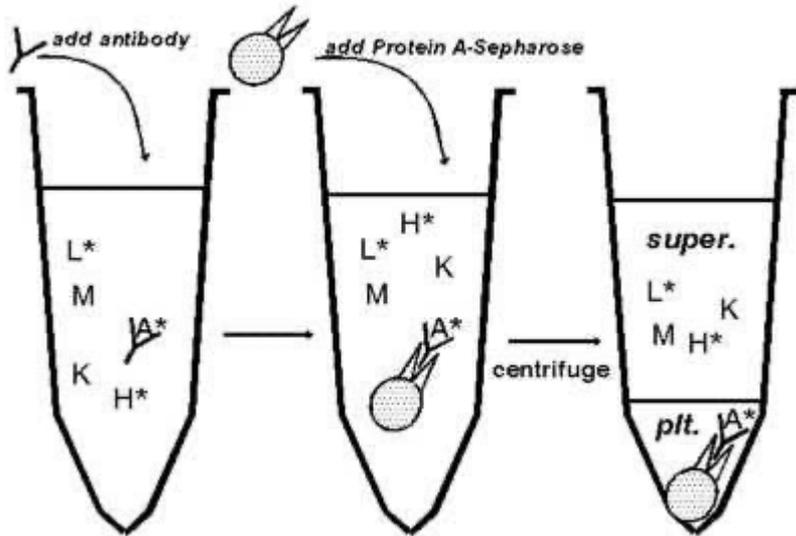
- Richiede proteine purificate e permette l'analisi di mutanti
- La differenza di peso molecolare tra i partner isolati e il complesso deve essere abbastanza elevata
- Il complesso deve essere sufficientemente stabile da non dissociare durante la cromatografia



# IMMUNOPRECIPITAZIONE

E' un metodo per purificare un antigene

Si fa reagire un anticorpo (monoclonale o policlonale) contro un bersaglio specifico



Si aggiunge la proteina A (proteina che lega regione costante delle IgG) immobilizzata su agarosio

Si 'precipita' l'immunocomplesso per centrifugazione

Ogni proteina non 'precipitata' dal supporto-proteina A viene lavata via

## CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE

La reazione di immunoprecipitazione può far 'precipitare' oltre all'antigene altre macromolecole che interagiscono con l'antigene

# Valutazione pull-down e co-immunoprecipitazione

I componenti sono eluiti e analizzati su SDS-PAGE seguita da spettrometria di massa o Western blot per identificare le proteine presenti

- Verificare che la proteina 'preda' non interagisca con la resina o con l'anticorpo in assenza della proteina 'esca'
- Determinare se l'interazione sia diretta o indiretta
- Determinare che l'interazione avvenga nella cellula e non sia una conseguenza della lisi

# Affinity blot Overlay o Far Western blotting

La tecnica prevede:

- separazione delle proteine da analizzare in SDS-PAGE
- blotting su nitrocellulosa o PVDF
- incubazione con la sonda di interesse (proteina 'esca' di cui si vuol studiare l'interazione).

Per la visualizzazione la proteina 'esca' può essere:

- Marcata radioattivamente
- Marcata con biotina
- Visualizzata con uno specifico anticorpo

Si utilizzano spesso proteine di fusione contenenti TAG per i quali sono disponibili anticorpi

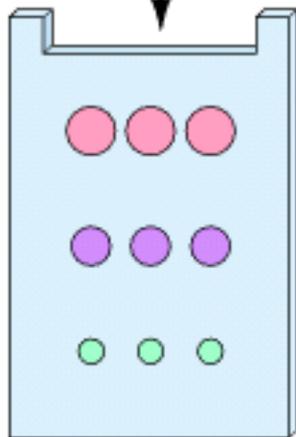
**Limiti:**

SDS-PAGE avviene in condizioni riducenti e denaturanti alle quali non sempre è possibile mantenere le interazioni proteina-proteina

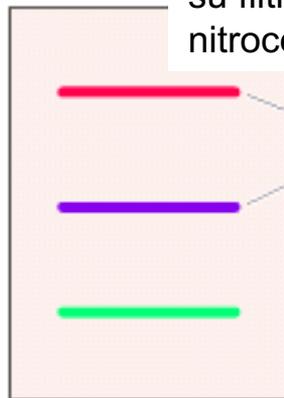
Overlay  
o affinity blot



migrazione

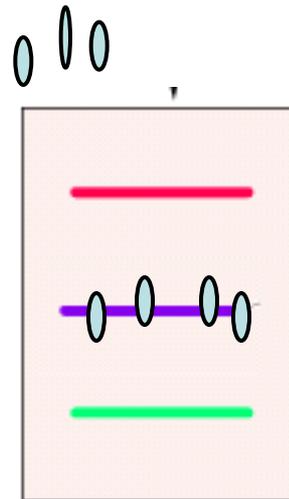


Trasferimento  
su filtro di  
nitrocellulosa



bande  
proteiche

Incubazione del filtro con la sonda  
( proteina radioattiva )



Autoradiografia



# Cross-linkers

- I cross-linker permettono di legare covalentemente due proteine che interagiscono
- Sono molecole che contengono due gruppi funzionali reattivi uguali (omobifunzionali) o diversi (eterobifunzionali) separati da un braccio spaziatore

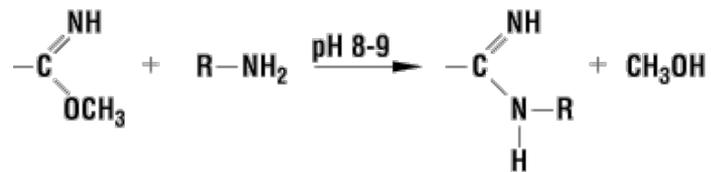
Gruppi funzionali delle proteine che possono reagire con i cross-linker: gruppi amminici, carbossilici, sulfidrilici, carboidrati (carbonili)

Gruppi reattivi dei cross-linker: spesso sono gli stessi usati per le immobilizzazioni

# Schemi di reazione dei cross-linker. Gruppi amminici

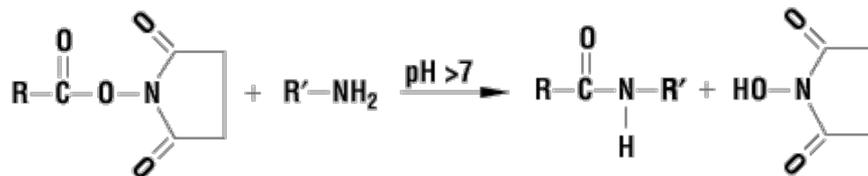
## Immidoesteri

Sono instabili a pH neutro



## Esteri dell'N-idrossi-succinimide

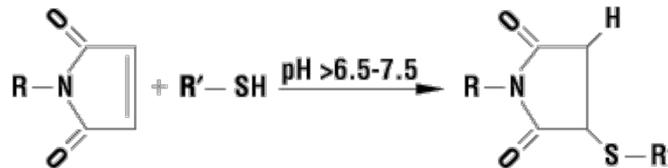
Efficienti a pH neutro



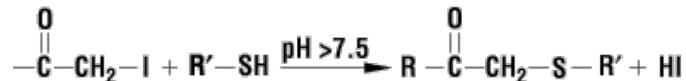
# Schemi di reazione dei cross-linker. Gruppi sulfidrilici

## Maleimmidi

a pH neutro formano legami tioetere stabili

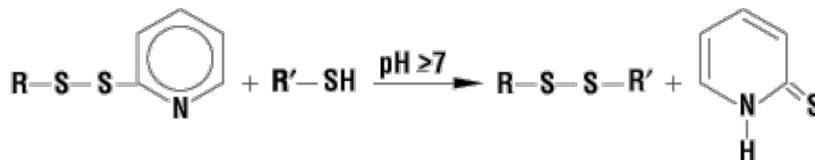


## Alogenuri alchilici



## Piridil-disolfuri

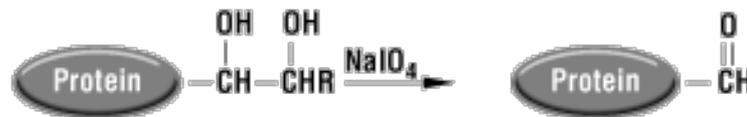
Formano ponti disolfuro. Il 2-piridil-tione assorbe a 343 nm.



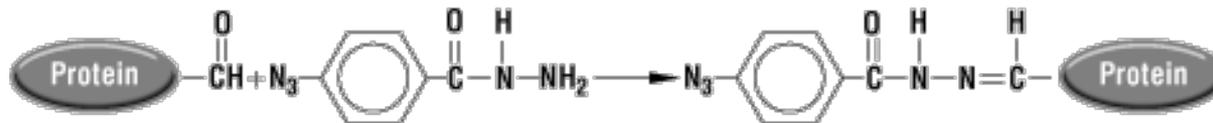
# Schemi di reazione dei cross-linker. Gruppi carbonilici

## Idrazidi

Reagiscono con gruppi carbonilici che derivano dalla ossidazione dei carboidrati



The oxidation of a Protein Carbohydrate (*cis*-diol) to an aldehyde.

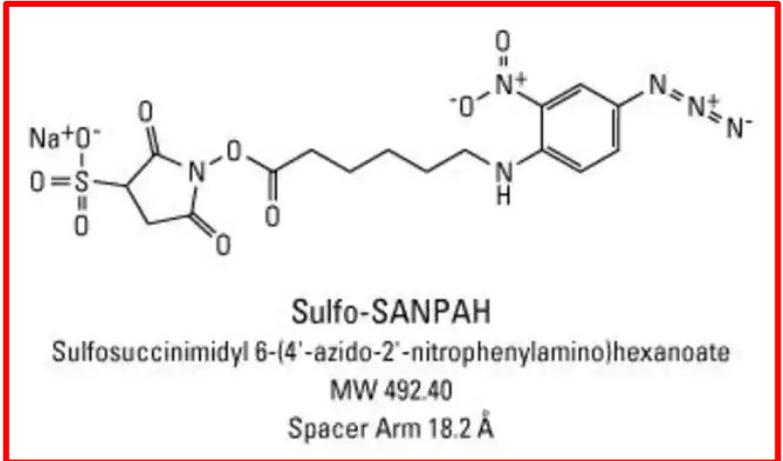
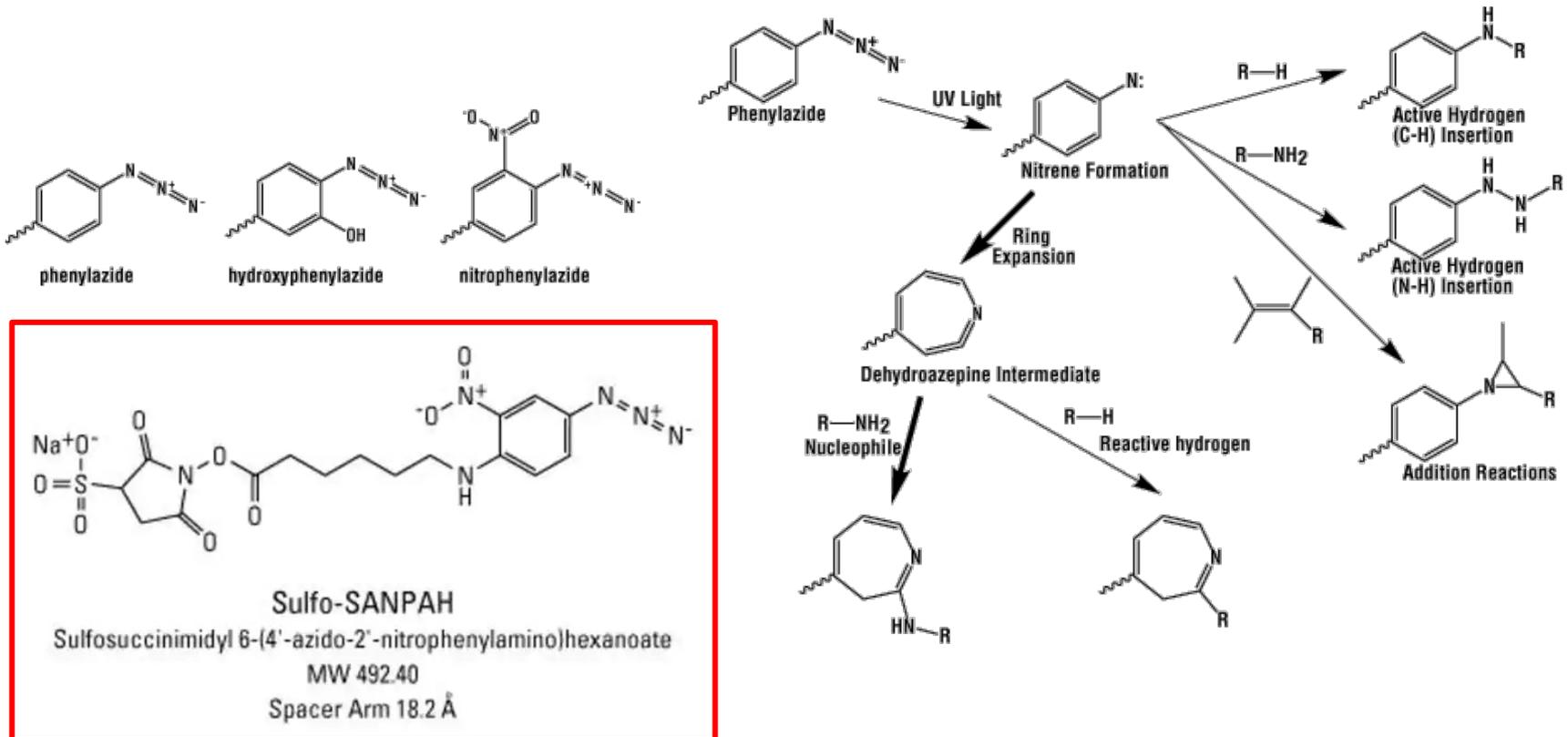


ABH, or Azidobenzoyl Hydrazide, reacts with the aldehyde on the protein to form an arylazide activated protein.

# Schemi di reazione dei cross-linker. Cross-linker fotoreattivi

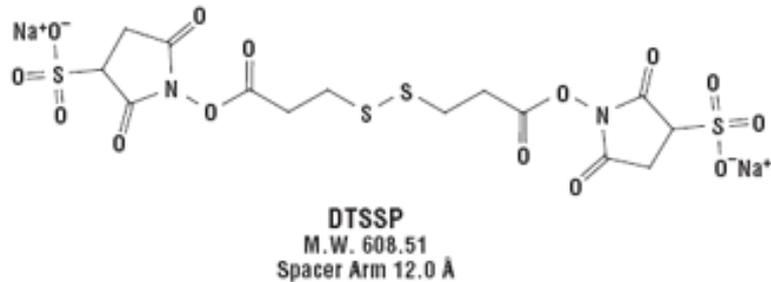
## Aril-azidi

Sono chimicamente inerti e attivate dalla luce UV, il gruppo nitrene reattivo che si forma reagisce con doppi legami, legami C-H e N-H



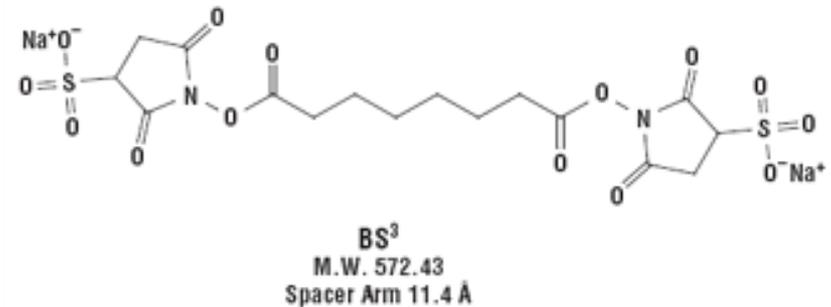
# Cross-linker omobifunzionali

DTSSP 3,3'-Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate)



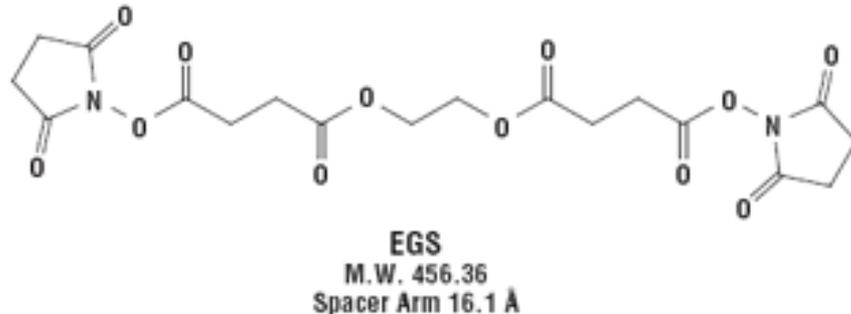
Il cross-link è reversibile con DTT

BS<sup>3</sup> Bis(Sulfosuccinimidyl)suberate



Il cross-link è irreversibile

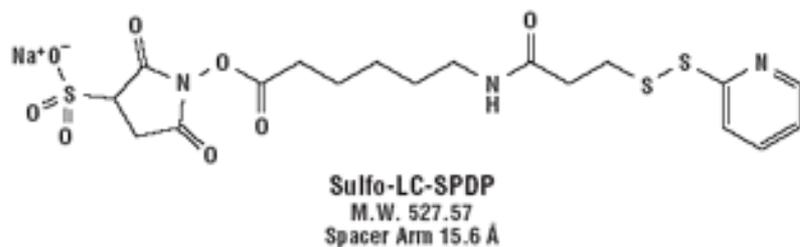
EGS (Ethylene glycol bis[succinimidylsuccinate])



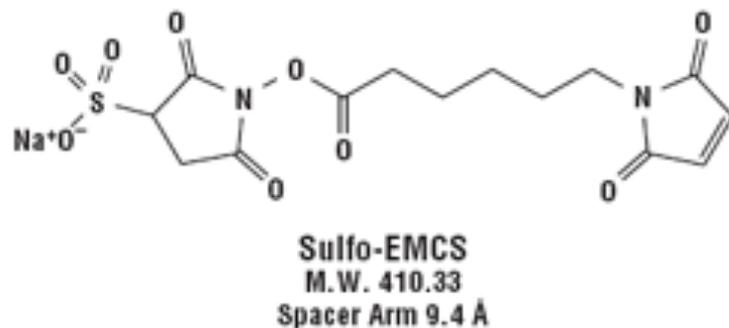
Il cross-link è reversibile  
a pH 8.5 con idrossilamina

# Cross-linker eterobifunzionali

Sulfo-LC-SPDP (Sulfosuccinimidyl 6-(3'-[2-pyridyldithio]-propionamido)hexanoate)



Sulfo-EMCS ([N-e-Maleimidocaproyloxy] sulfosuccinimide ester)

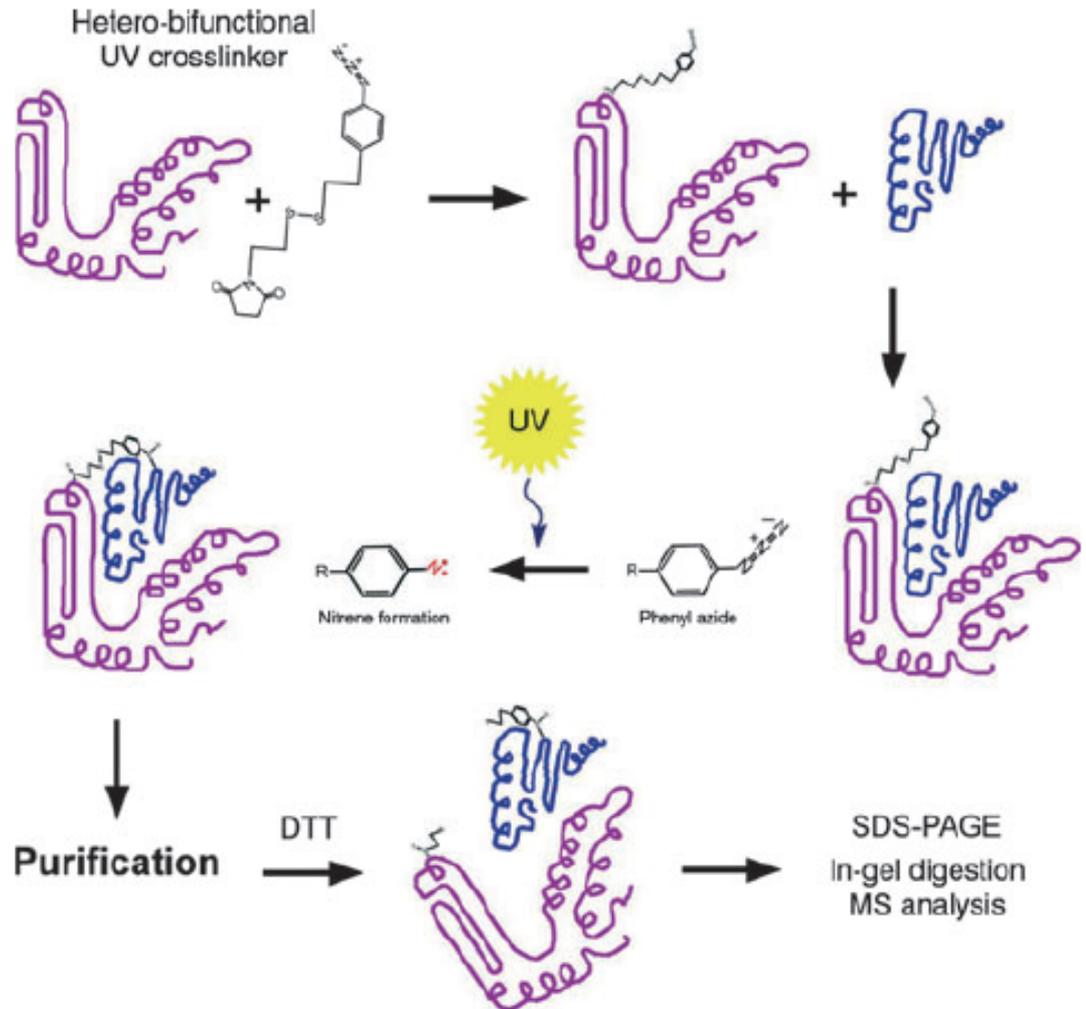


# Criteri di scelta dei cross-linker

- Specificità chimica
- Lunghezza del braccio spaziatore
- Solubilità in acqua e permeabilità alle membrane
- Gruppi reattivi uguali (omobifunzionali) o differenti (eterobifunzionali)
- Cross-link reversibile o irreversibile
- Possibilità di cross-link two-step

# Uso dei cross-linker per caratterizzare l'architettura molecolare di un complesso

- Complesso proteico purificato (non strettamente necessario)
- Cross-linking
- Proteolisi
- Separazione ed **identificazione** dei peptidi modificati, mediante spettrometria di massa (LC-MS)



# Il repressore trascrizionale Fep1 forma omodimeri: pull-down

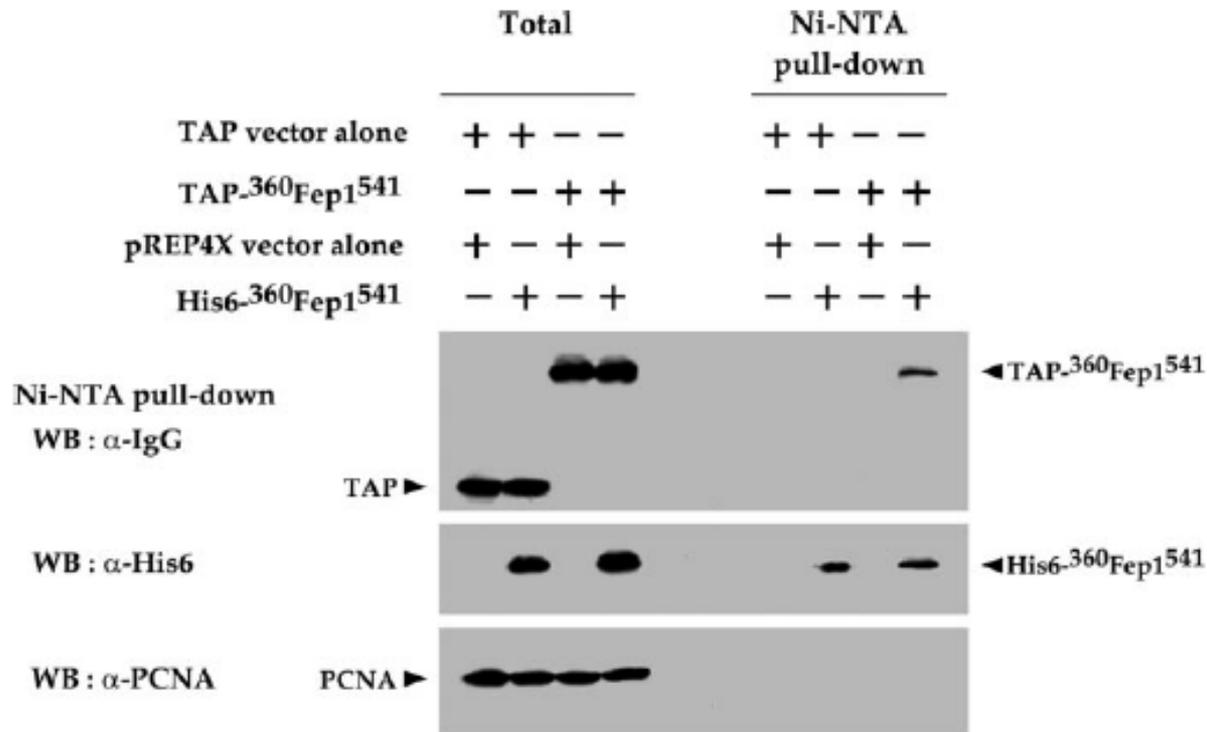


FIG. 8. Self-association of the C terminus of Fep1 in native *S. pombe* extracts. Cell extracts were prepared from *fep1Δ* mutant cells coexpressing the *TAP-<sup>360</sup>fep1<sup>1+541</sup>* and *His6-<sup>360</sup>fep1<sup>1+541</sup>* alleles. The cell extracts were incubated with a Ni<sup>2+</sup> affinity resin and washed, and the bound fraction was eluted with 150 mM imidazole (nickel-nitrilotriacetic acid pull-down). A portion (~2%) of the total cell extract was also included to monitor the presence of the proteins prior to chromatography (*Total*). All samples were subjected to immunoblotting with the indicated antibodies. WB, Western blot.

# Il repressore trascrizionale Fep1 forma omodimeri: cross-link

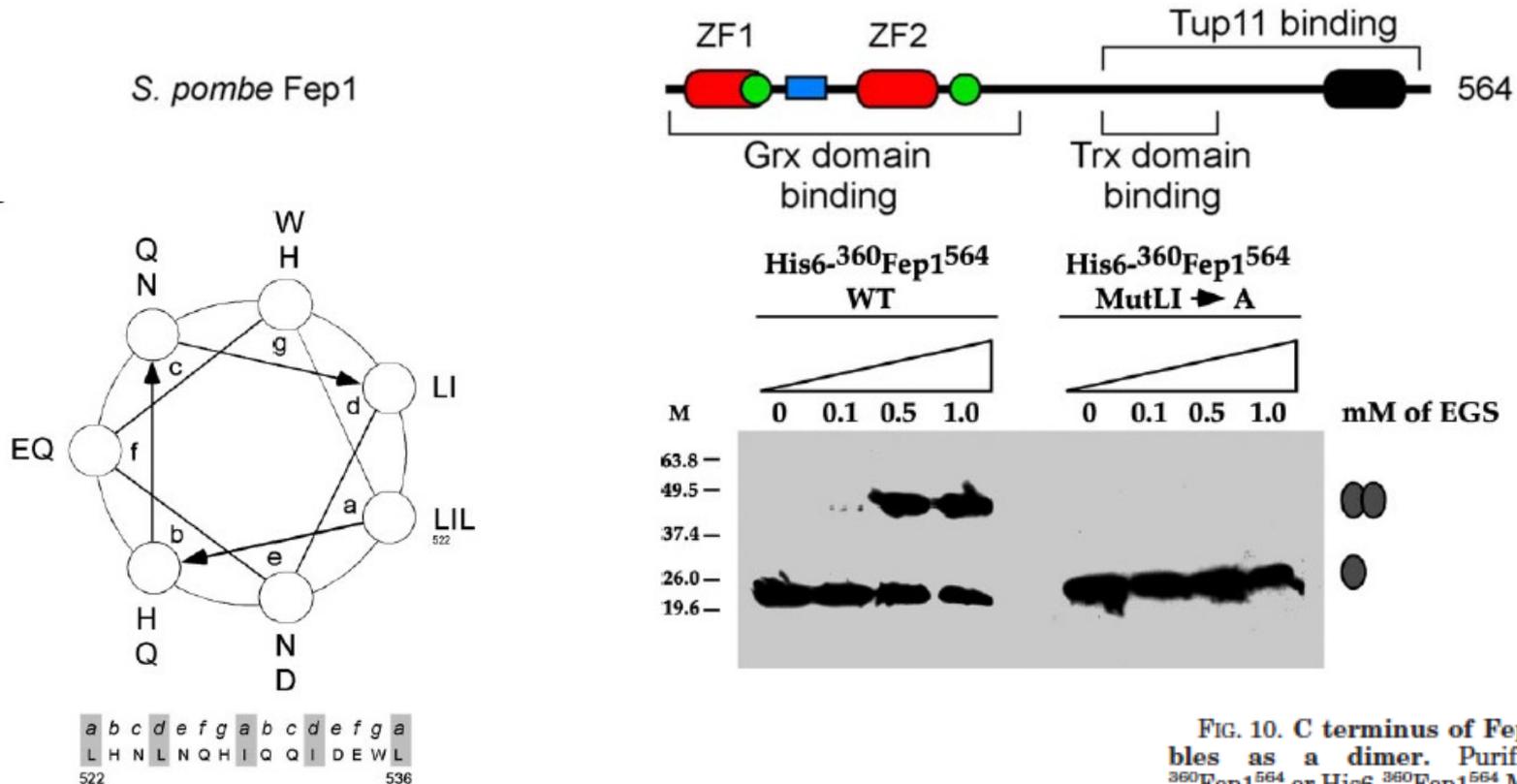


FIG. 10. C terminus of Fep1 assembles as a dimer. Purified His6-<sup>360</sup>Fep1<sup>564</sup> or His6-<sup>360</sup>Fep1<sup>564</sup> Mut LI → A was incubated with 0, 0.1, 0.5, and 1.0 mM EGS for 30 min at room temperature. The EGS-cross-linked complexes were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and subjected to Western blotting using anti-His monoclonal antibody. Monomeric (~22-kDa, 1 oval) and dimeric (~44-kDa, 2 ovals) forms were detected. M, reference marker.

Un'elica anfipatica in posizione 522-536 è responsabile della dimerizzazione di Fep1