

Metodi di studio delle interazioni proteina-proteina

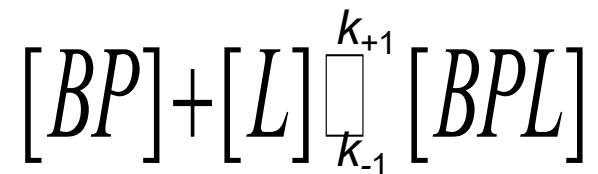
Metodi biochimici

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 $K_D > 10^{-4} \text{ M}$ sono difficili da identificare

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

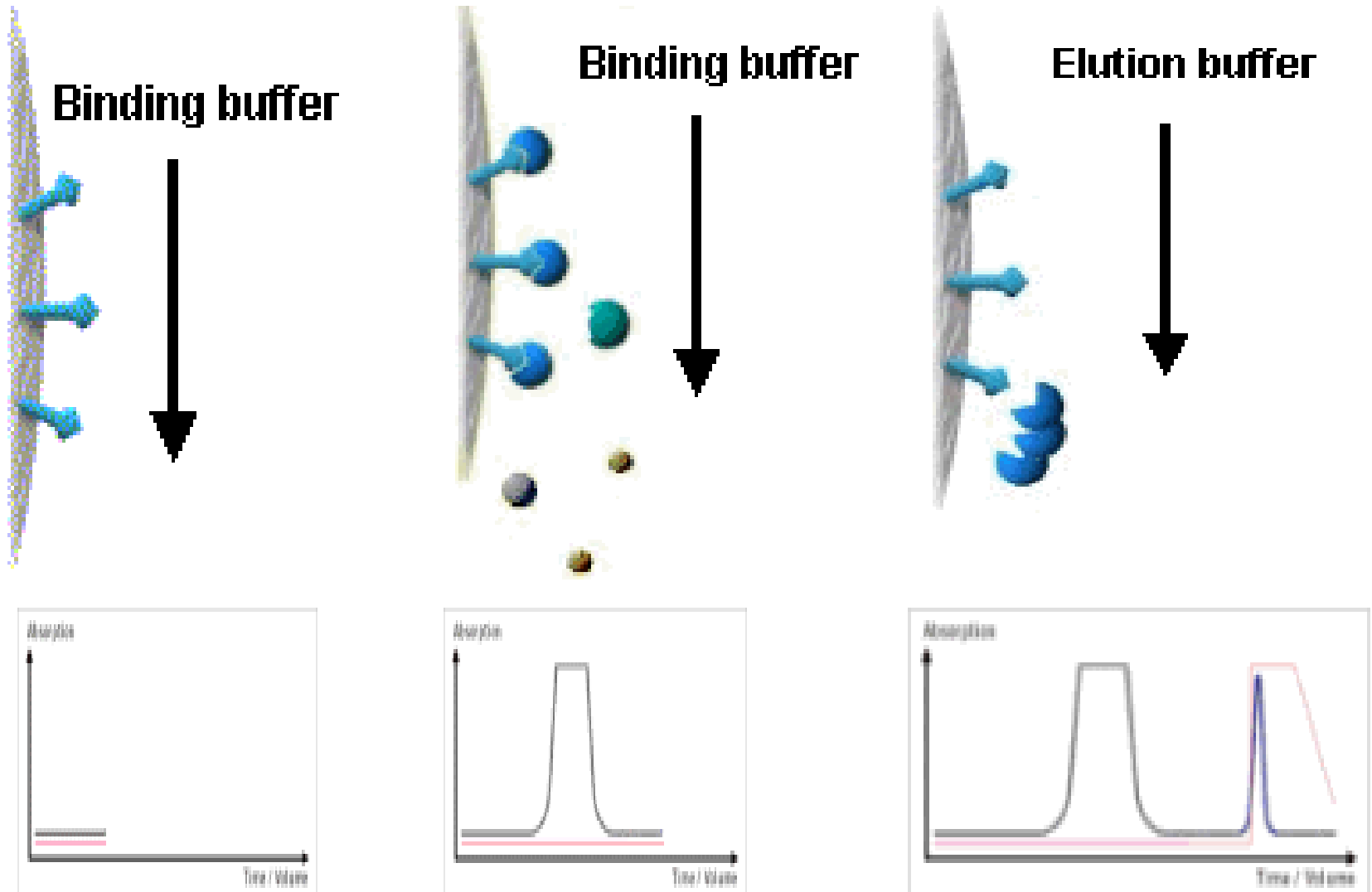
Cromatografia di affinità

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:

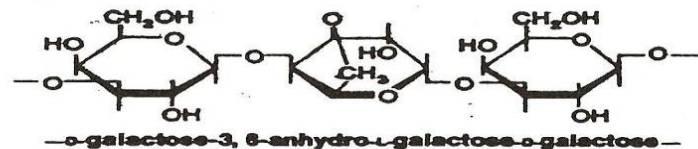
- Contenere gruppi chimici adatti per il legame covalente
- Essere stabile nelle condizioni di legame e di uso
- Essere inerte

Possono essere suddivise in due categorie principali:

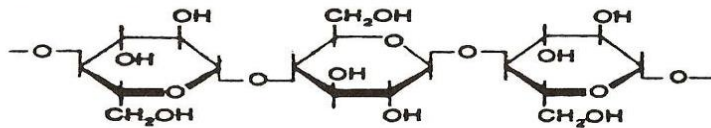
POLIMERI NATURALI: polisaccaridi (agarosio, destrano, cellulosa)

POLIMERI SINTETICI: polistirene, poliacrilati

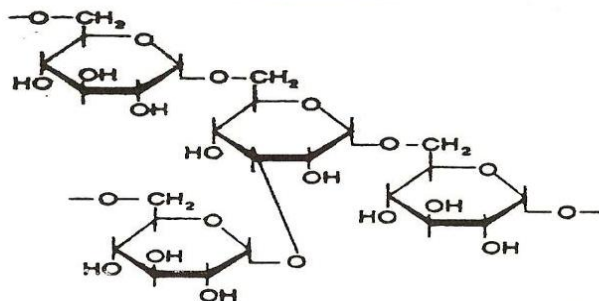
Agarose



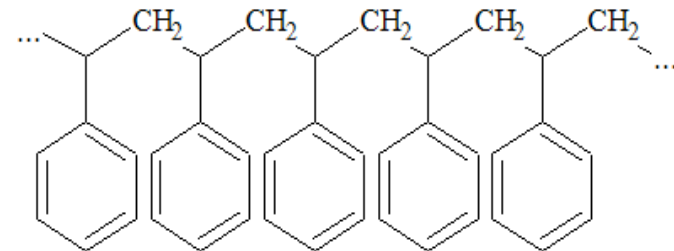
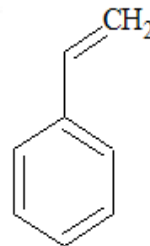
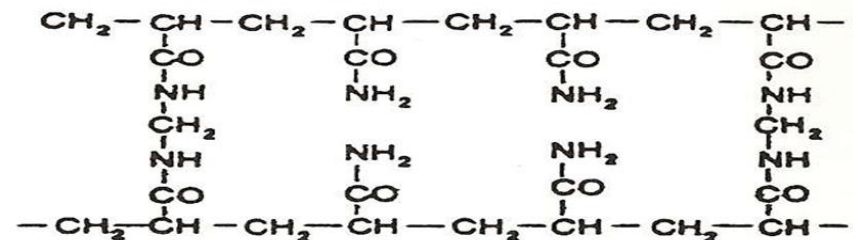
Cellulose



Crosslinked dextran (Sephadex)



Crosslinked polyacrylamide

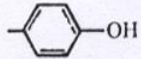
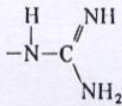
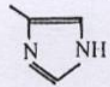
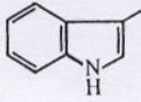


Ligandi

- 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^a

Residue	Originating amino acid
-NH_2	ϵ -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
$\text{CH}_3\text{-S-}$	Thioether of L-methionine
$\text{-CH}_2\text{OH}$	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

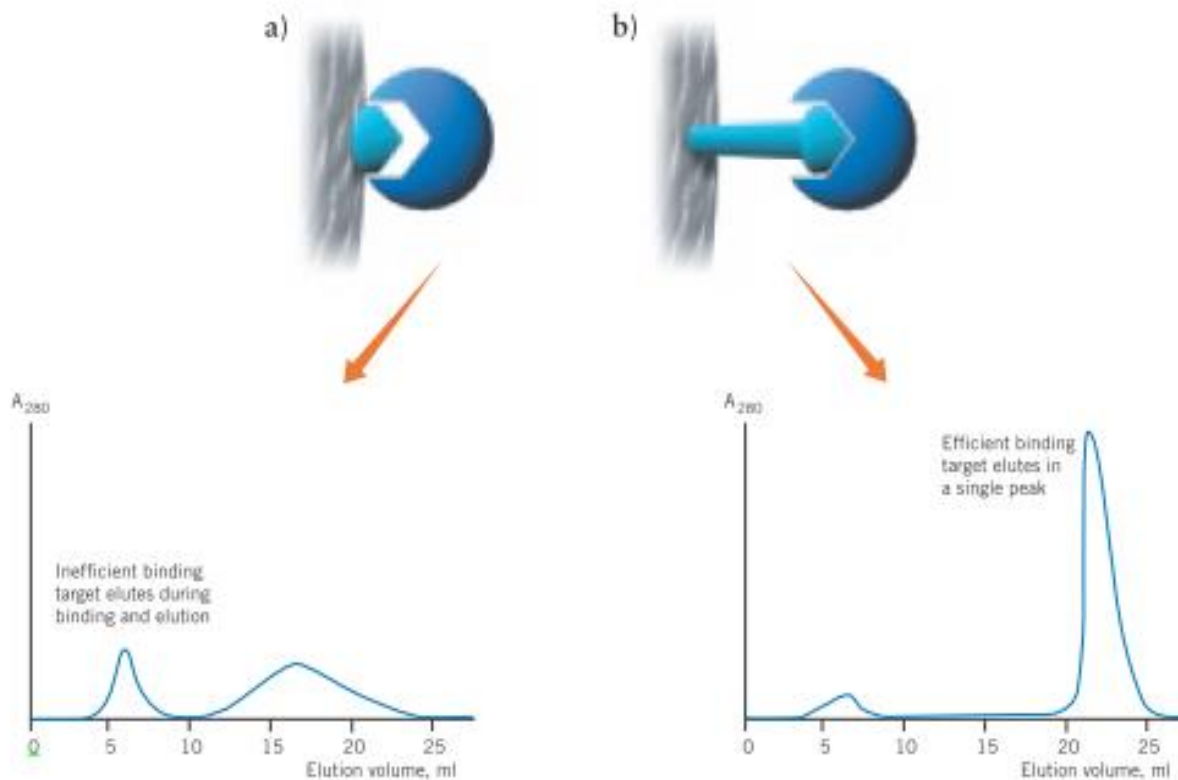
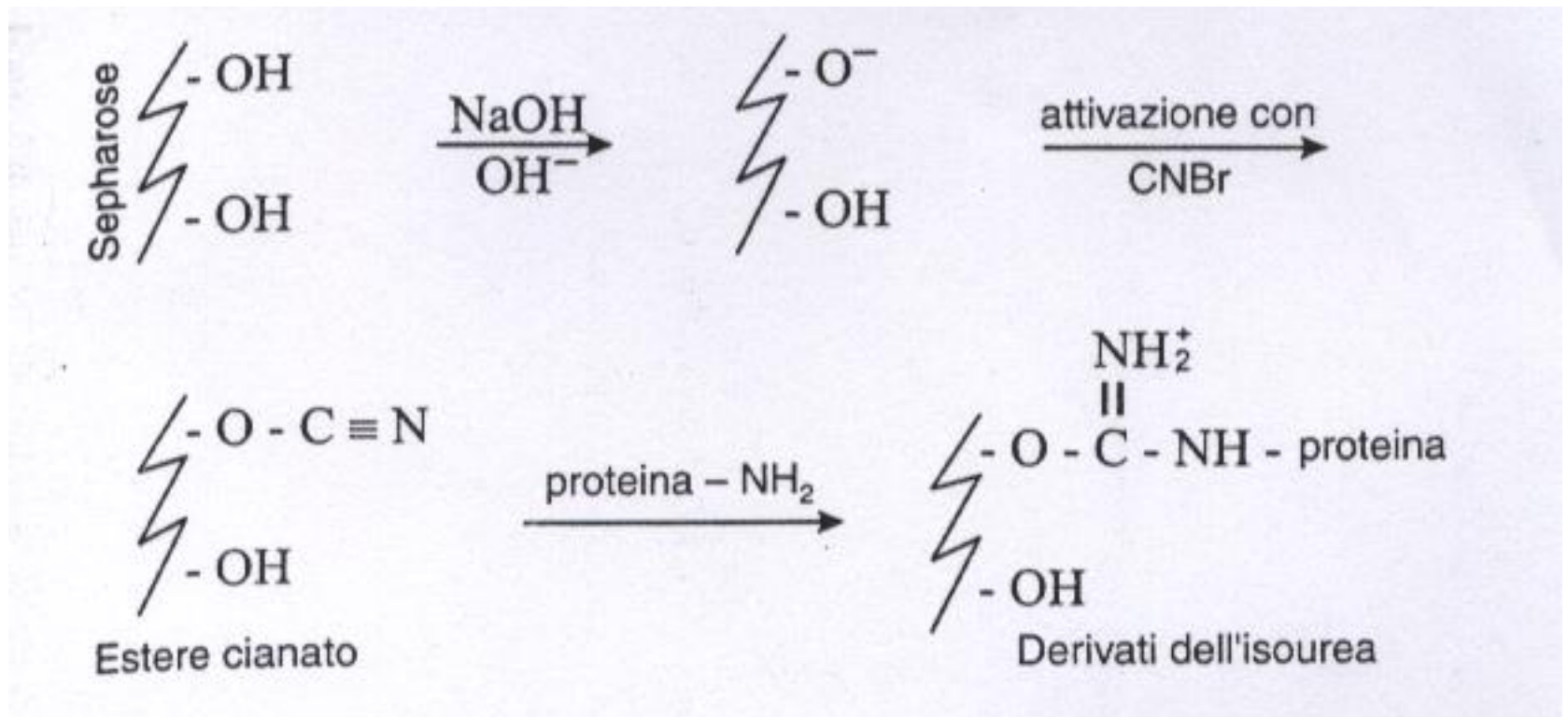


Table 8.

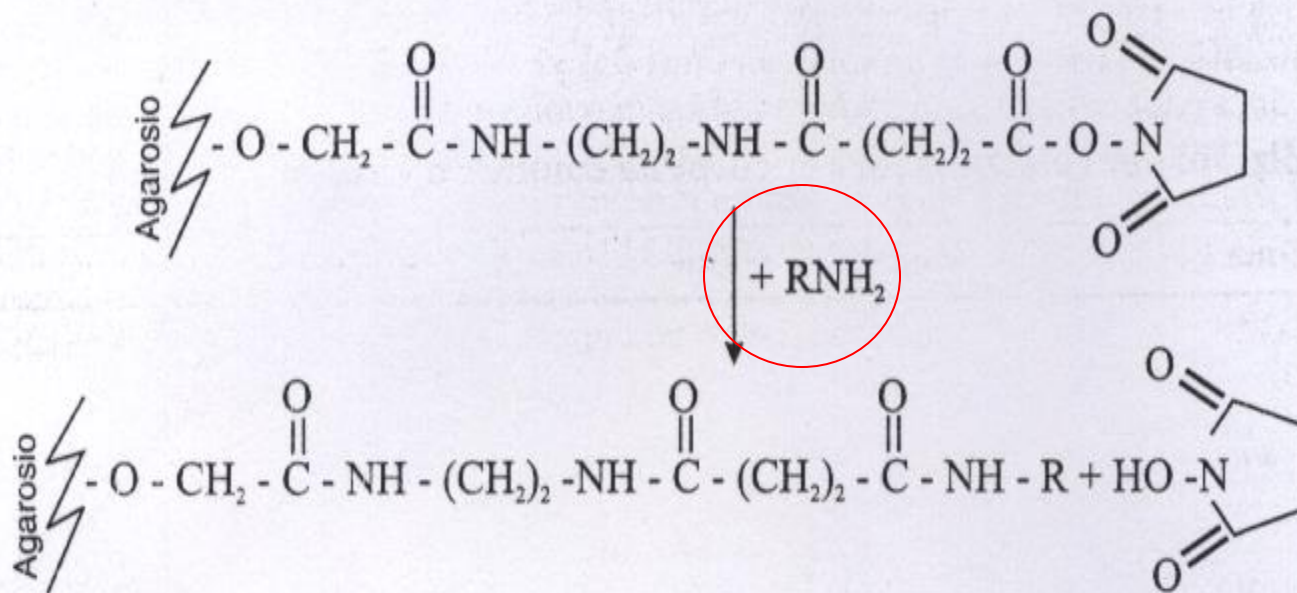
Chemical group on ligand	Length of spacer arm	Structure of spacer arm	Product
Proteins, peptides, amino acids			
amino	10-atom		HiTrap NHS-activated HP NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow
	None	–	CNBr-activated Sepharose 4B CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow
carboxyl	10-atom		ECH Sepharose 4B
	11-atom		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)

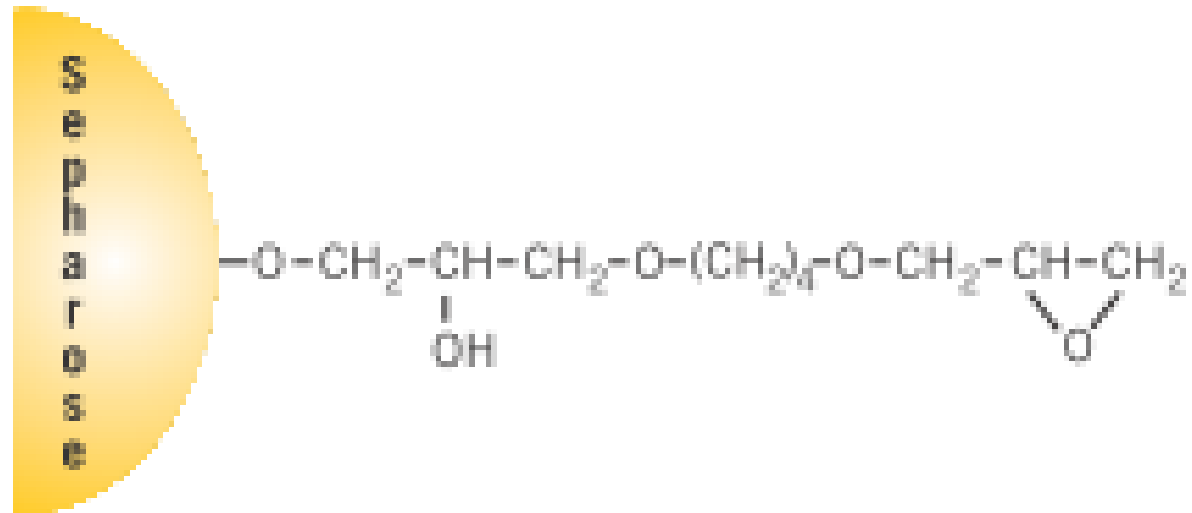
- Si attiva la resina a pH alcalino
- Si aggiunge la proteina 'esca' (ligando)
- Si bloccano i rimanenti gruppi attivi
- Si lava



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

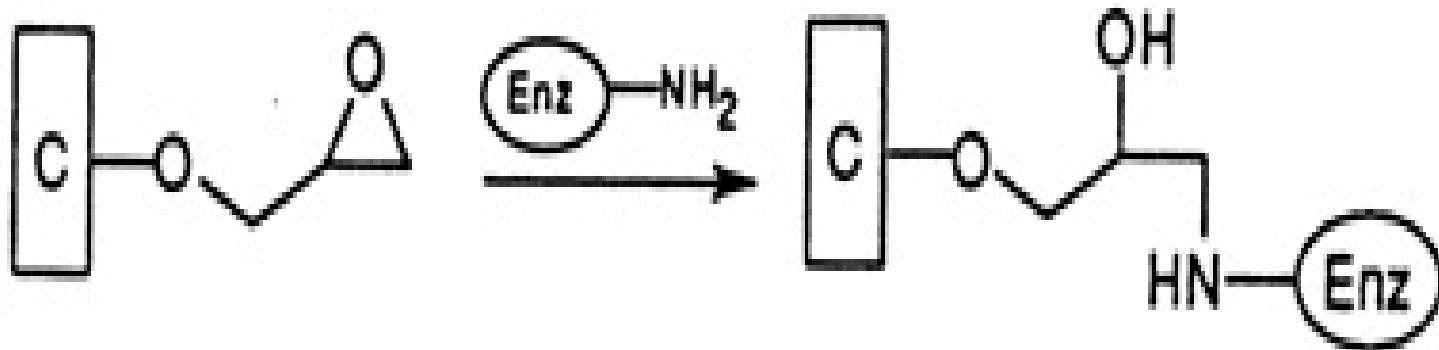


Accoppiamento mediante epossidi
pH basico (gruppi NH_2 , SH , OH)

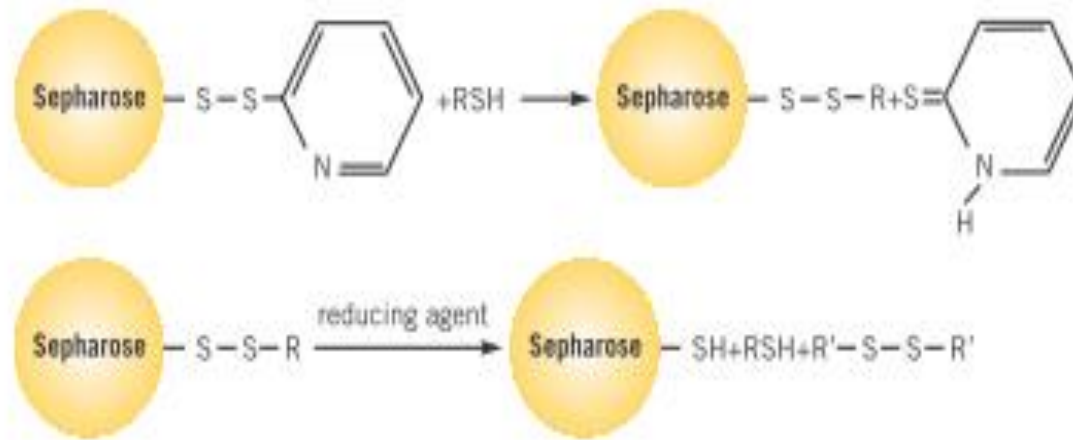


L- NH_2
L-SH
L-OH

Reazione di sostituzione nucleofila



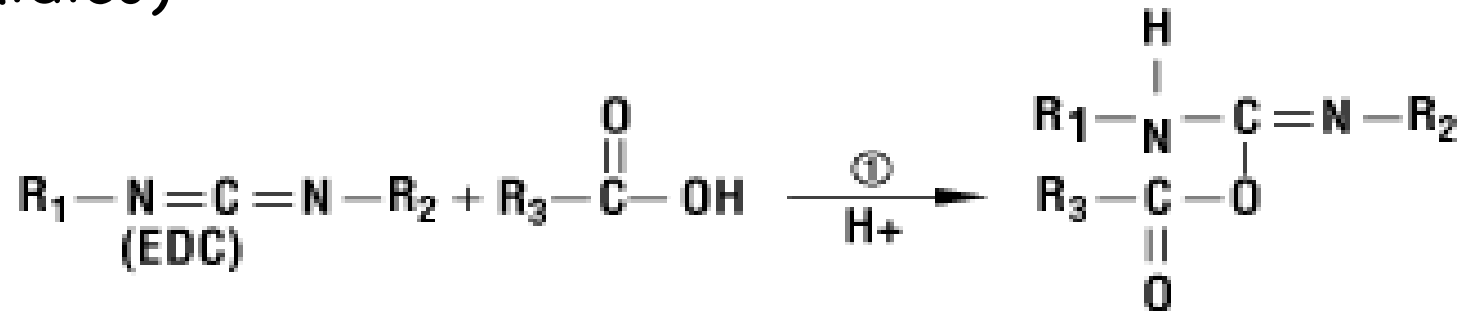
Procedimento per legare proteine contenenti gruppi SH



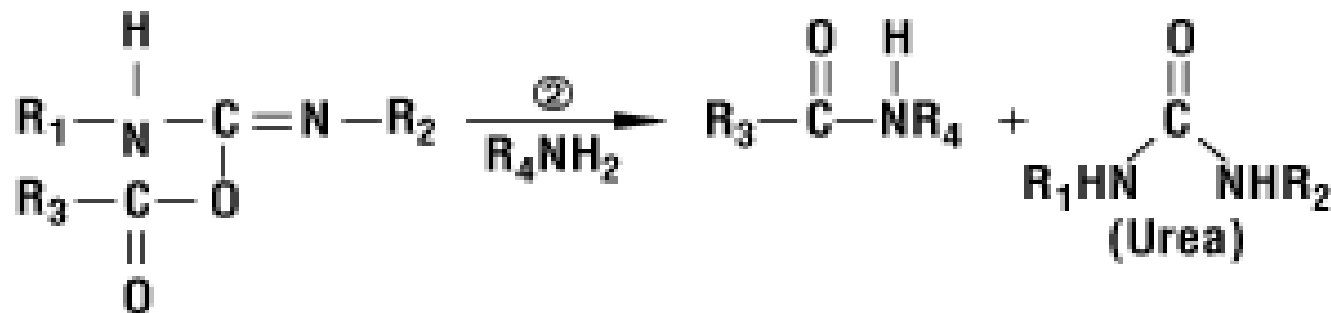
2 piridil-tione
assorbe a 343 nm

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

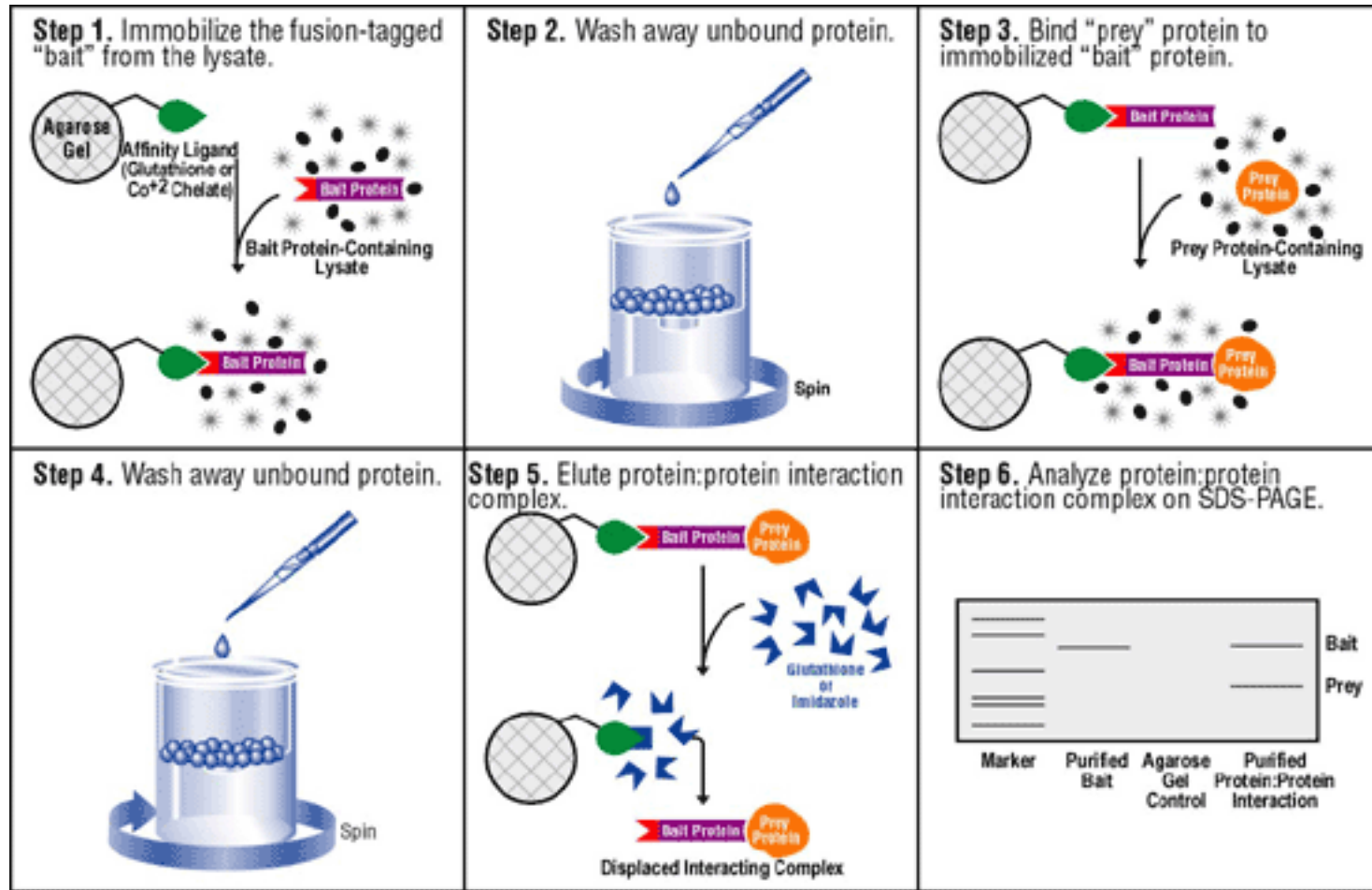


Il carbonio carbonilico dell'ossiacilurea subisce l'attacco nucleofilo dal gruppo amminico per formare un legame ammidico con liberazione di urea

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, glutathione S-transferasi, maltose binding protein si legano a resine che contengono rispettivamente un metallo chelato, il glutathione 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)

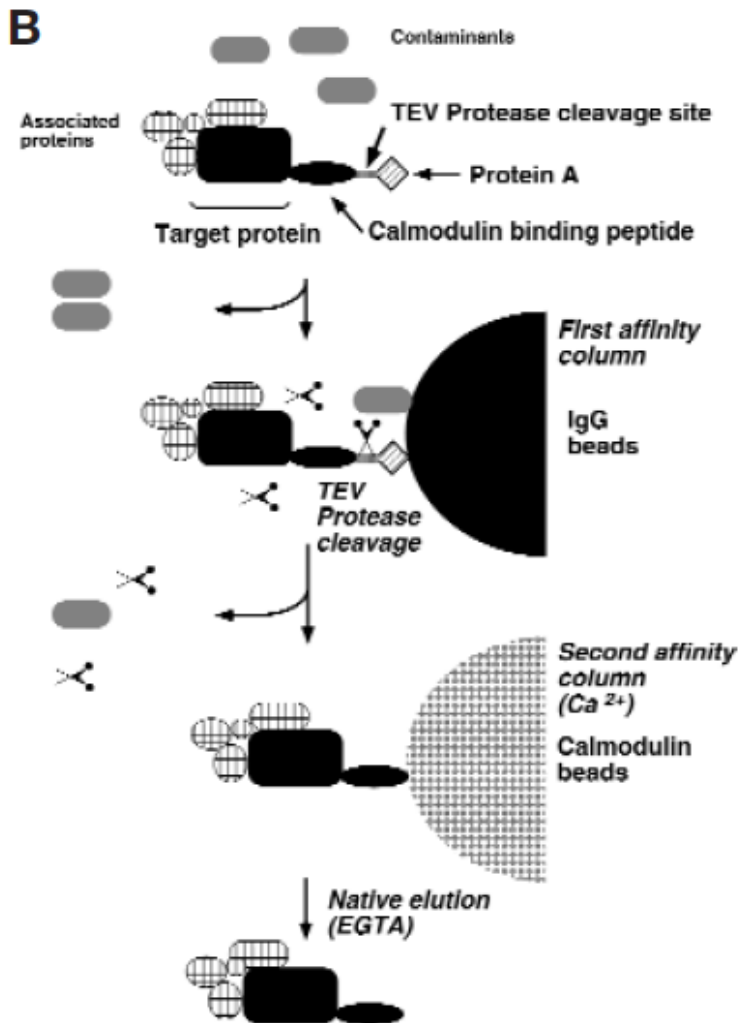
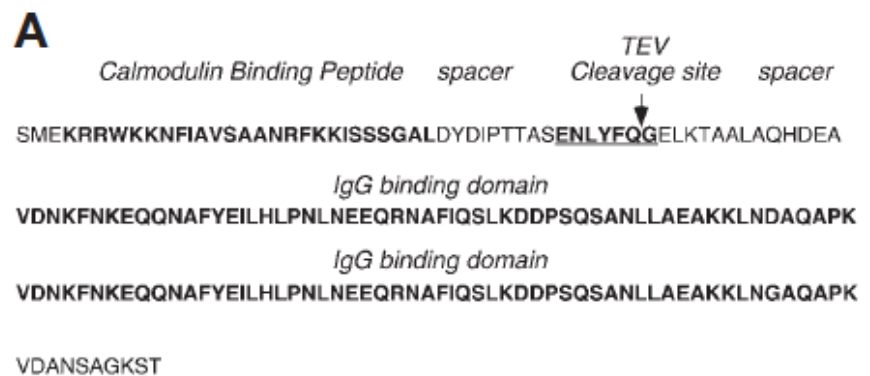
Doppio tag basato su una porzione della proteina A (lega IgG) e un peptide che lega la calmodulina separate da sequenza di riconoscimento per la proteasi TEV

Cromatografia su

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

Eluizione

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



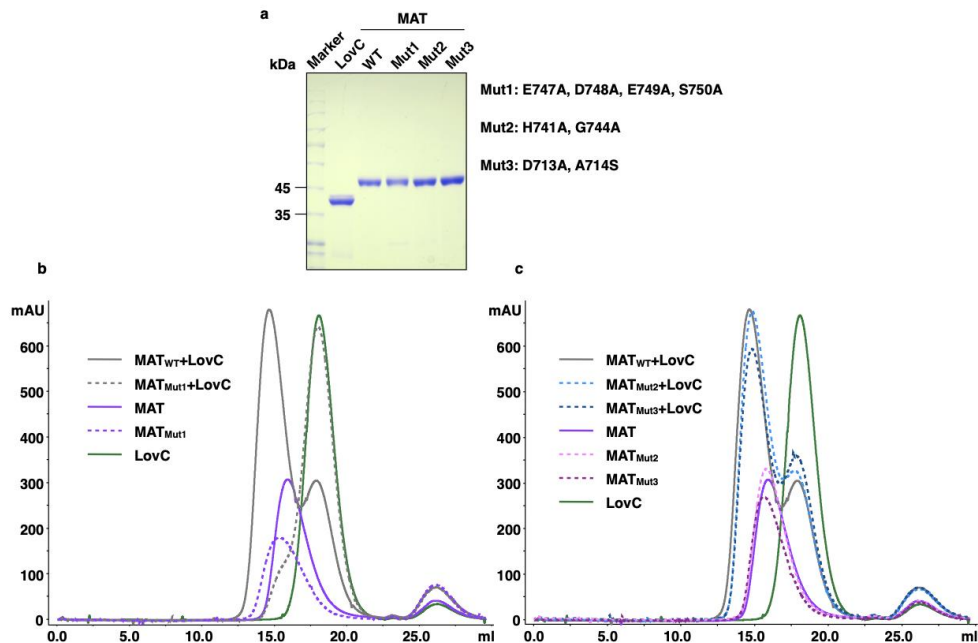
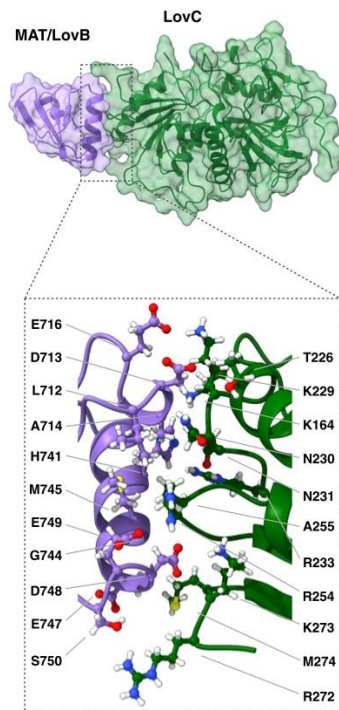
D

Calr

TE

Cromatografia di gel-filtrazione

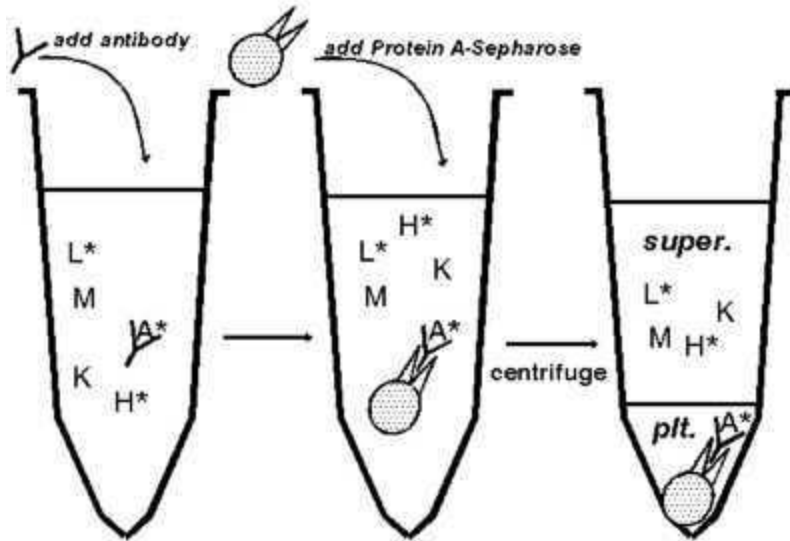
- Richiede proteine purificate e permette l'analisi di mutanti
- La differenza di peso molecolare tra i partner isolati e il complesso deve essere abbastanza elevata
- Il complesso deve essere sufficientemente stabile da non dissociare durante la cromatografia



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

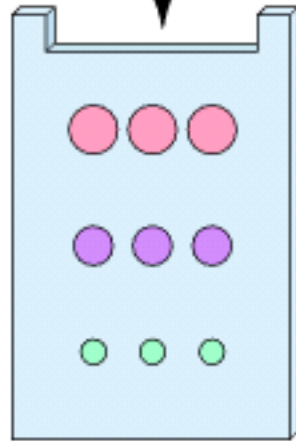
Si utilizzano spesso proteine di fusione contenenti TAG per i quali sono disponibili anticorpi

Limiti:

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

Overlay
o affinity blot

Proteine
da analizzare
SDS-PAGE



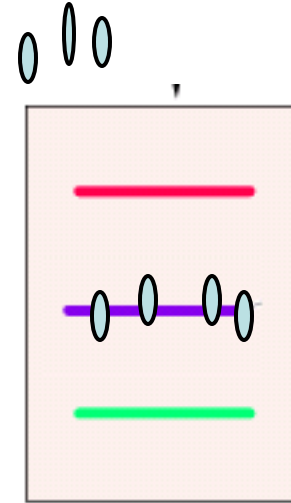
migrazione

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

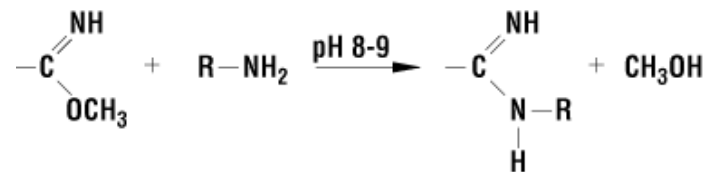
Gruppi funzionali delle proteine che possono reagire con i cross-linker: gruppi amminici, carbossilici, sulfidrilici, carboidrati (carbonili)

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

Schemi di reazione dei cross-linker. Gruppi amminici

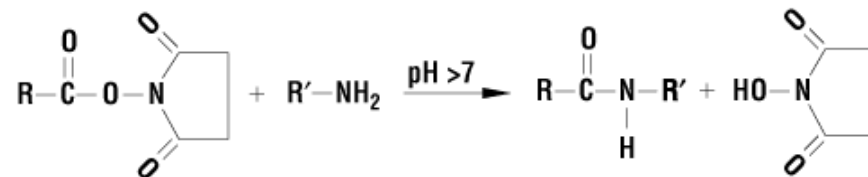
Immidoesteri

Sono instabili a pH neutro



Esteri dell'N-idrossi-succinimide

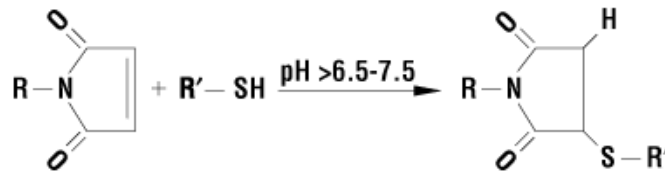
Efficienti a pH neutro



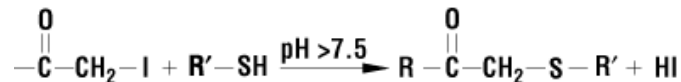
Schemi di reazione dei cross-linker. Gruppi sulfidrilici

Maleimmidi

a pH neutro formano legami tioetere stabili

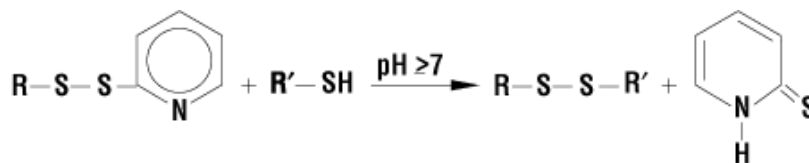


Alogenuri alchilici



Piridil-disolfuri

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

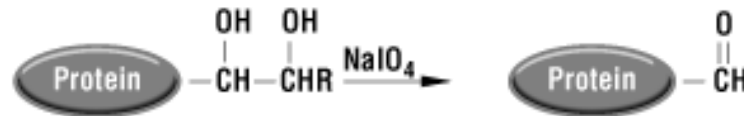


Schemi di reazione dei cross-linker.

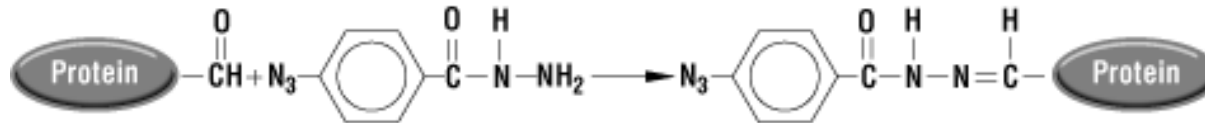
Gruppi carbonilici

Idrazidi

Reagiscono con gruppi carbonilici che derivano dalla ossidazione dei carboidrati



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



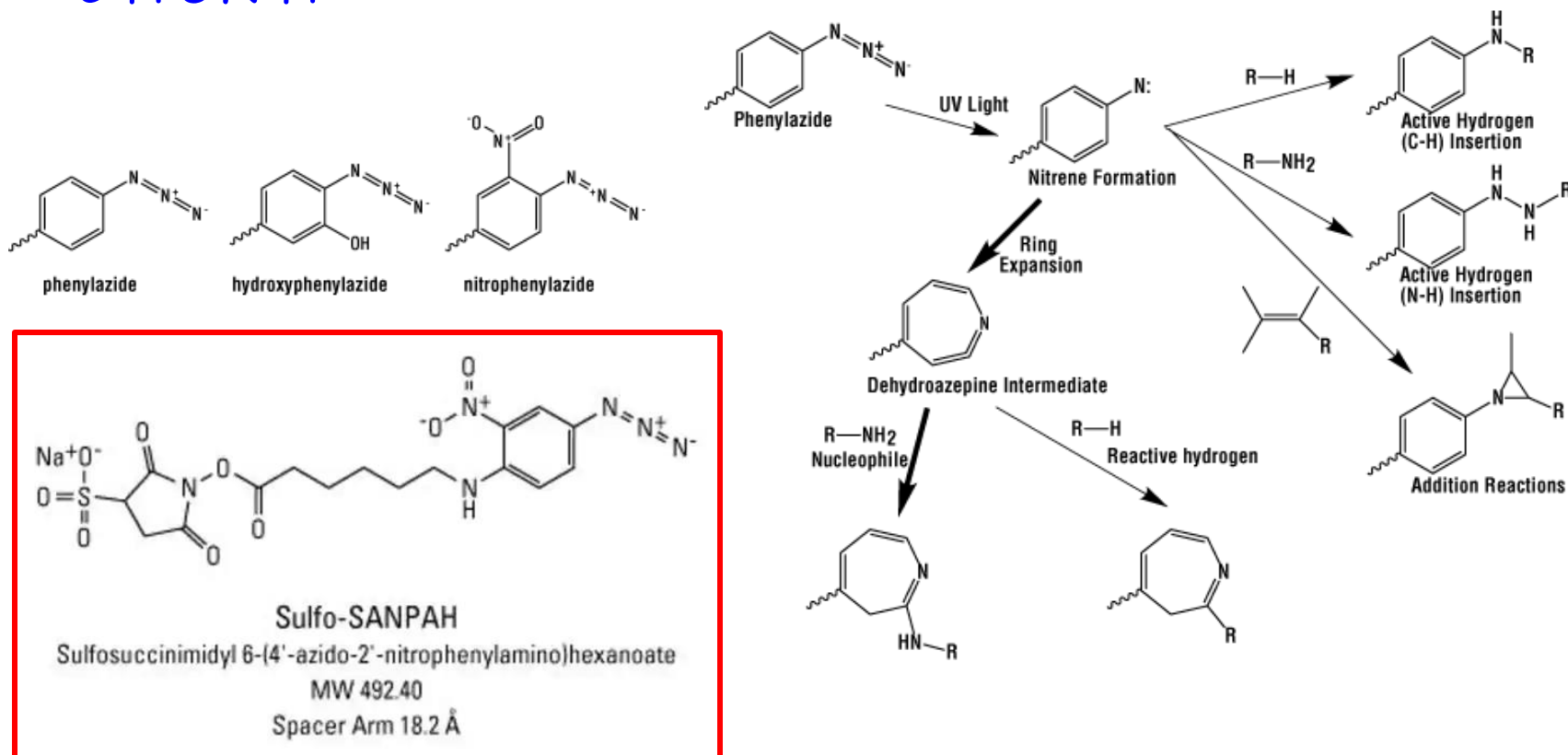
ABH, or Azidobenzoyl Hydrazide, reacts with the aldehyde on the protein to form an arylazide activated protein.

Schemi di reazione dei cross-linker.

Cross-linker fotoreattivi

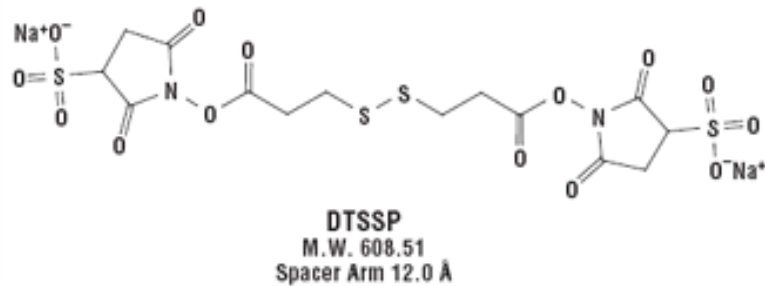
Aril-azidi

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



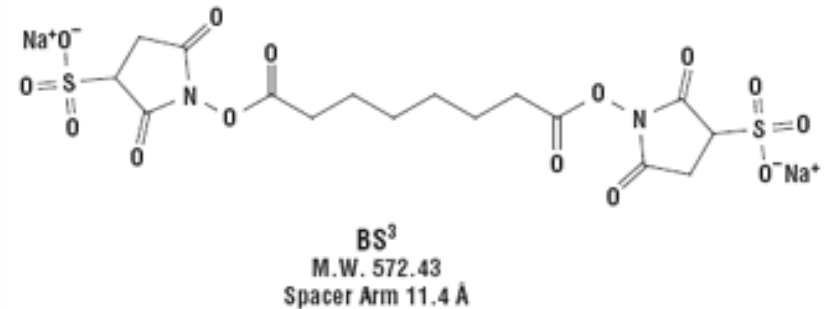
Cross-linker omobifunzionali

DTSSP 3,3'-Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate)



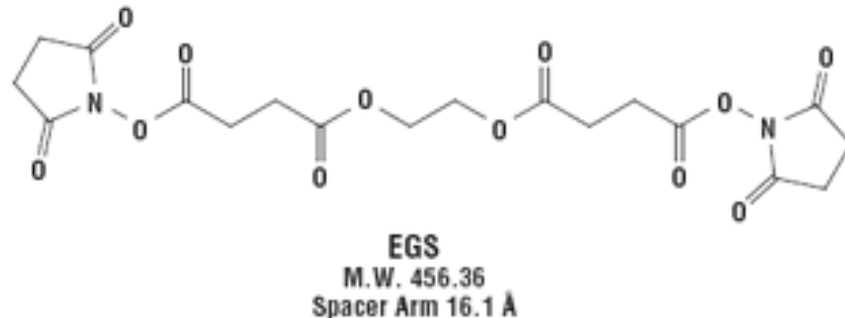
Il cross-link è reversibile con DTT

BS³ Bis(Sulfosuccinimidyl)suberate



Il cross-link è irreversibile

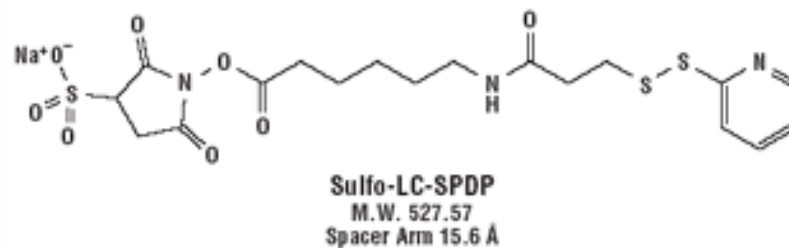
EGS (Ethylene glycol bis[succinimidylsuccinate])



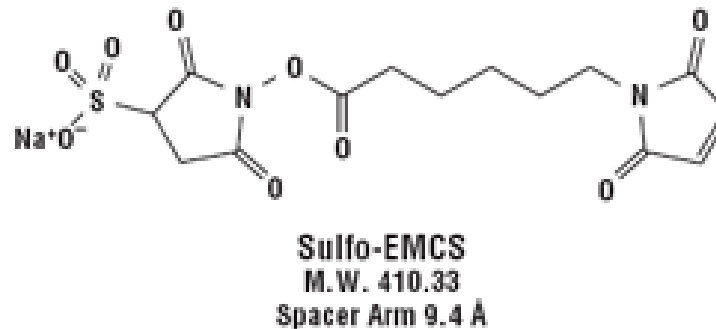
Il cross-link è reversibile
a pH 8.5 con idrossilamina

Cross-linker eterobifunzionali

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



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

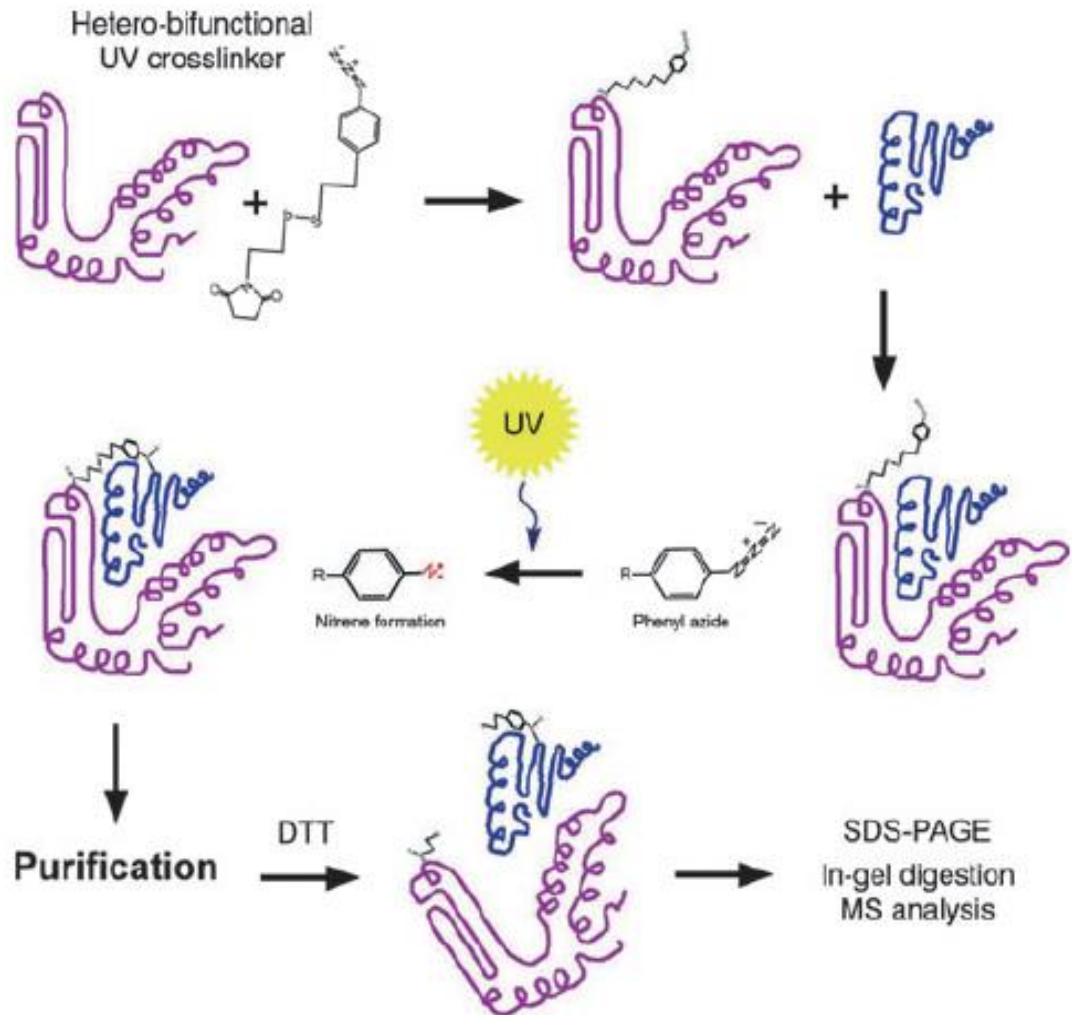


Criteri di scelta dei cross-linker

- 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

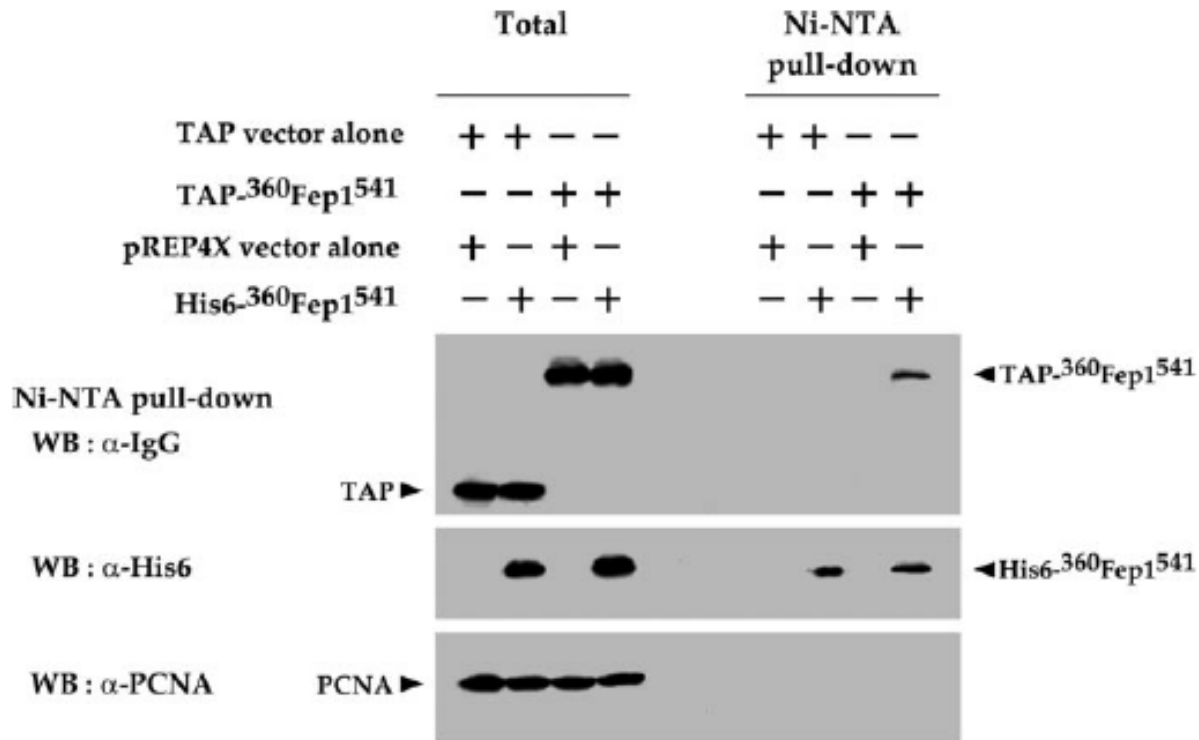


FIG. 8. Self-association of the C terminus of Fep1 in native *S. pombe* extracts. Cell extracts were prepared from *fep1* Δ mutant cells coexpressing the *TAP-³⁶⁰fep1⁵⁴¹* and *His6-³⁶⁰fep1⁵⁴¹* alleles. The cell extracts were incubated with a Ni²⁺ affinity resin and washed, and the bound fraction was 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

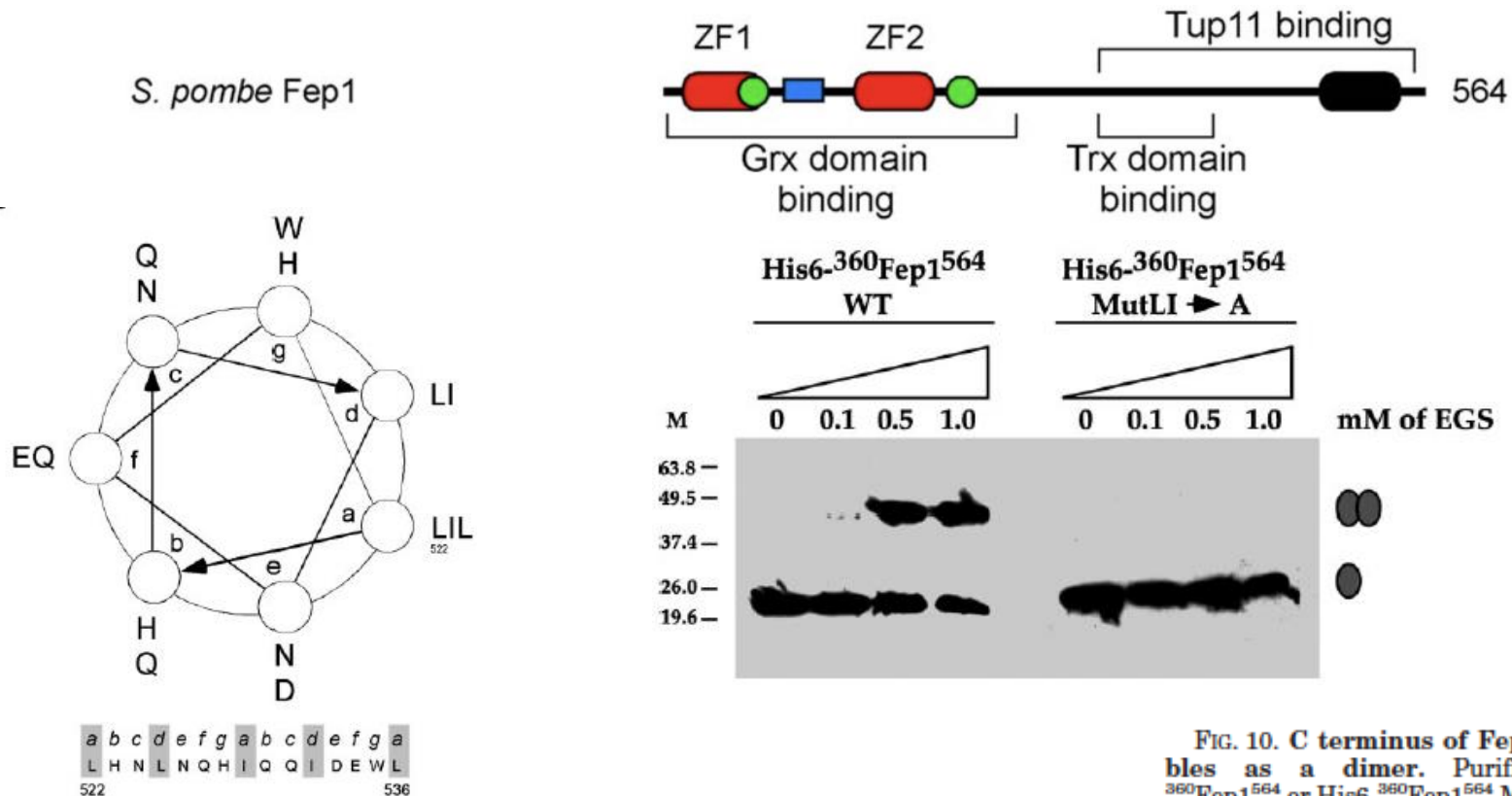


FIG. 10. C terminus of Fep1 assembles as a dimer. Purified His6-³⁶⁰Fep1⁵⁶⁴ or His6-³⁶⁰Fep1⁵⁶⁴ Mut LI → A was incubated with 0, 0.1, 0.5, and 1.0 mM EGS for 30 min at room temperature. The EGS-cross-linked complexes were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and subjected to Western blotting 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