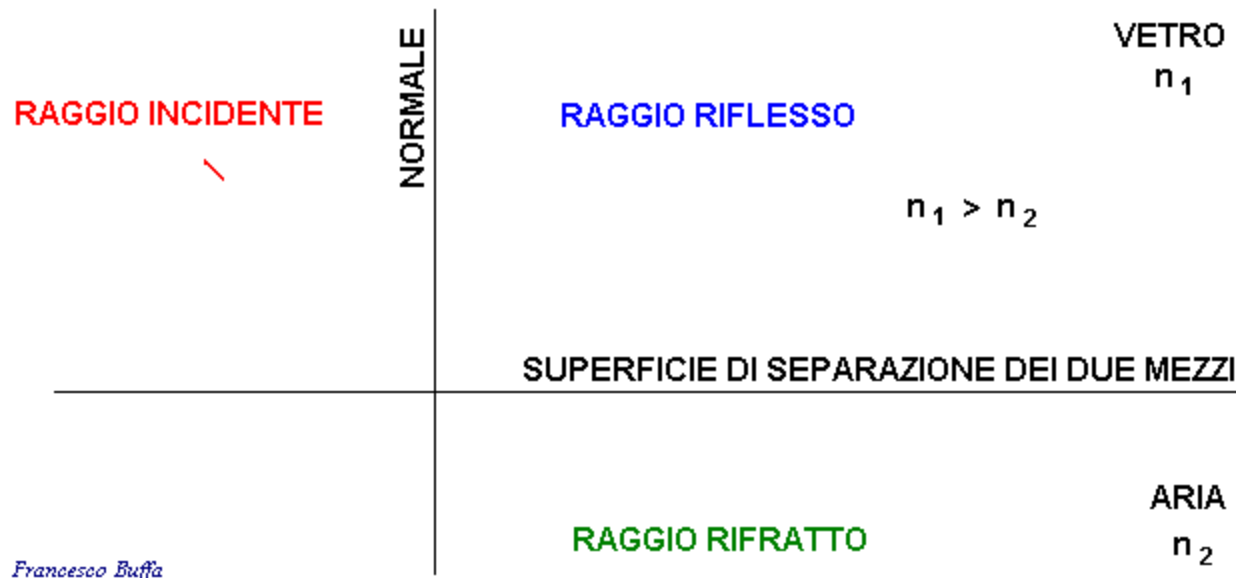


SPR

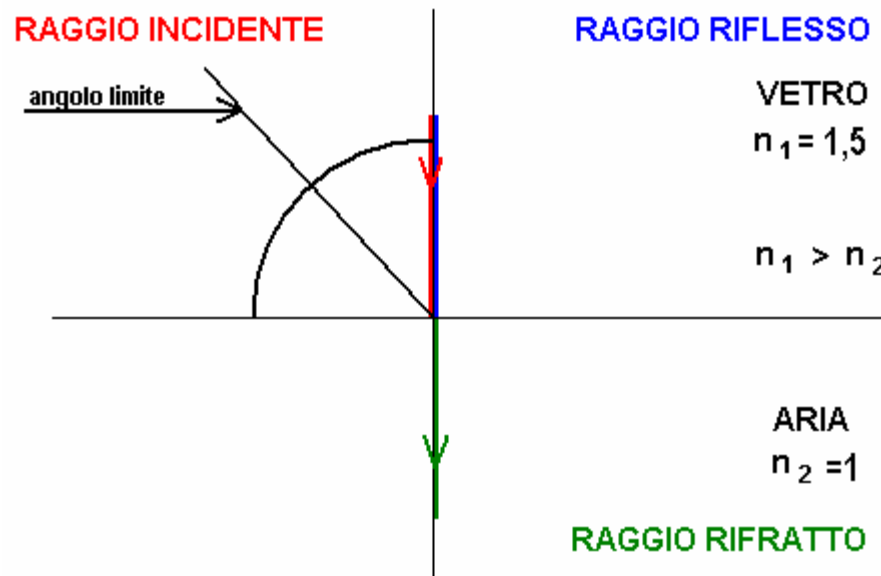
Surface Plasmon Resonance tecnica utilizzata per misurare interazioni molecolari in tempo reale si basa sul **cambiamento dell'indice di rifrazione** sulla superficie di un sensore (chip) provocato da una alterazione correlata al legame tra ligando e analita.

SPR **risonanza plasmonica di superficie** è un processo fisico che si osserva quando la luce p-polarizzata colpisce un film metallico in condizioni di **riflessione totale interna**

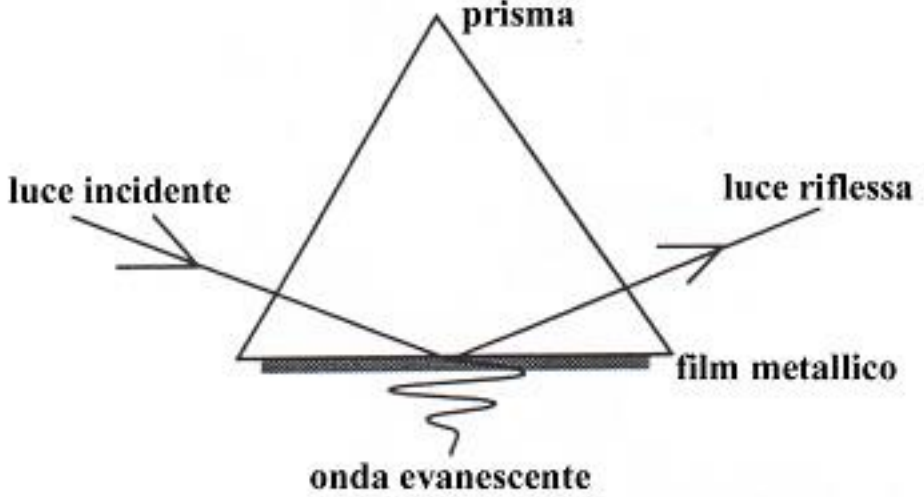
In corrispondenza dell'interfaccia tra due mezzi trasparenti con diverso **indice di rifrazione** (ad esempio vetro e soluzione) la luce proveniente dal lato del mezzo con più alto indice di rifrazione viene in parte riflessa ed in parte rifratta.

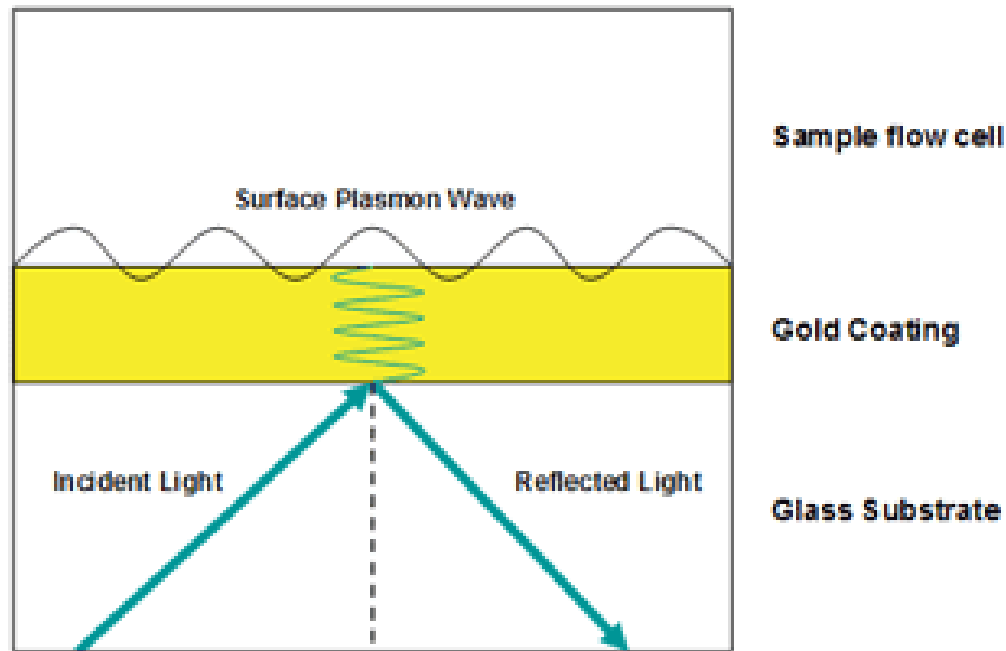


Al di sopra di un angolo di incidenza detto critico non viene rifratta alcuna luce attraverso l'interfaccia e si ha **riflessione totale**.



Se a contatto tra i due mezzi c'è un film metallico una componente del campo elettromagnetico della radiazione incidente, detta **ONDA EVANESCENTE** si propaga ad una certa distanza nel mezzo dotato di più basso indice di rifrazione.





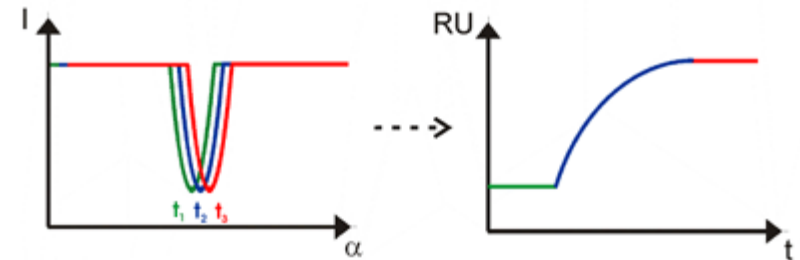
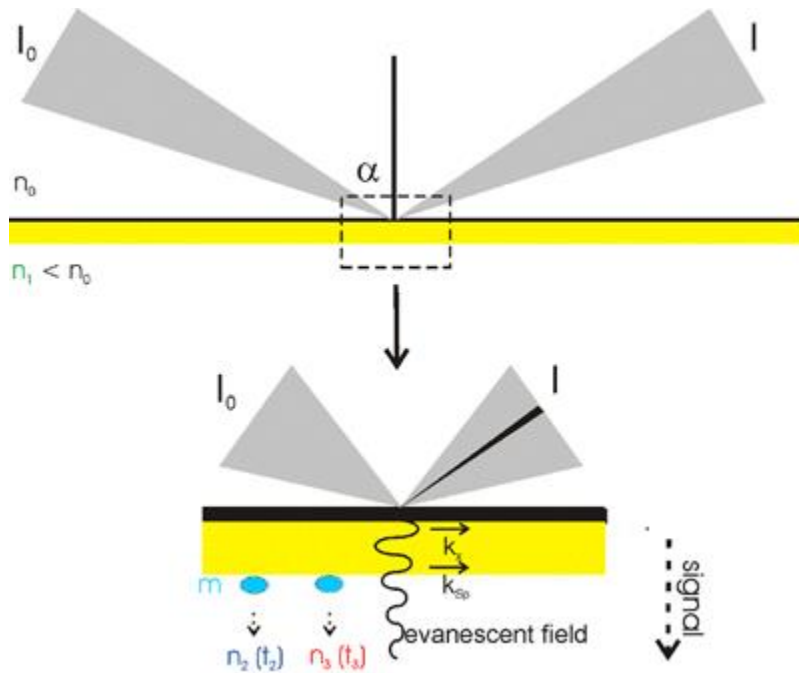
Questo accoppiamento della luce incidente con i plasmoni di superficie porta a una perdita di energia, in quanto l'energia dei fotoni viene trasmessa ai plasmoni, così si assiste ad una **riduzione dell'intensità della luce riflessa.**

L' accoppiamento tra onda evanescente elettroni di superficie risulterà in un minimo nell' intensità della radiazione riflessa.

Si osserva così una riga scura nel raggio di luce riflesso in corrispondenza della luce assorbita dai plasmoni superficiali.

Il sensore registra lo spostamento della riga scura

QUESTO FENOMENO E' APPUNTO L' SPR



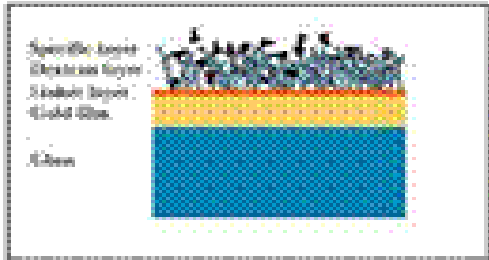
La **risonanza di plasmoni superficiali** è un fenomeno ottico che deriva dall'interazione tra un'onda elettromagnetica e gli elettroni di conduzione presenti in un elemento metallico, reso sotto forma di film sottile

Gli elettroni sulla superficie del metallo sono mobili, vengono definiti come un liquido ad alta densità elettronica (plasma) e creano delle oscillazioni, che si propagano in direzione parallela all'interfaccia metallo-dielettrico. Le onde di plasma che si propagano sono chiamate plasmoni superficiali.

Quando ad un particolare angolo, il vettore dell'onda della luce incidente si accoppia con il vettore degli elettroni che si muovono (plasmoni), si hanno le condizioni di risonanza. Questo accoppiamento della luce incidente con i plasmoni di superficie porta a una perdita di energia, in quanto l'energia dei fotoni viene trasmessa ai plasmoni, Si osserva così una banda con una riga scura nel raggio di luce riflesso in corrispondenza della luce assorbita dai plasmoni superficiali

Il **SENSOR CHIP** è costituito da un supporto in vetro su cui è stato depositato un sottilissimo strato in oro. Lo strato in oro a sua volta è ricoperto da una matrice sulla quale vengono immobilizzate le biomolecole (LIGANDO). Nel sensor chip i due mezzi con diverso indice di rifrazione sono il **vetro** e la **soluzione tampone**;


Cold-Dextran Surfaces



The diagram illustrates the layered structure of a Cold-Dextran Surface. From top to bottom, the layers are: a layer of specific ligands (represented by black and white structures), a dextran layer (represented by a grey, porous-looking matrix), a gold layer (represented by a thin yellow line), and a glass substrate (represented by a blue block). Labels on the left side of the diagram identify these layers: Specific Ligand, Dextran Layer, Gold Film, and Glass.

- Biocompatible
- Low non-specific binding.
- More than 100 runs on the same surface

100

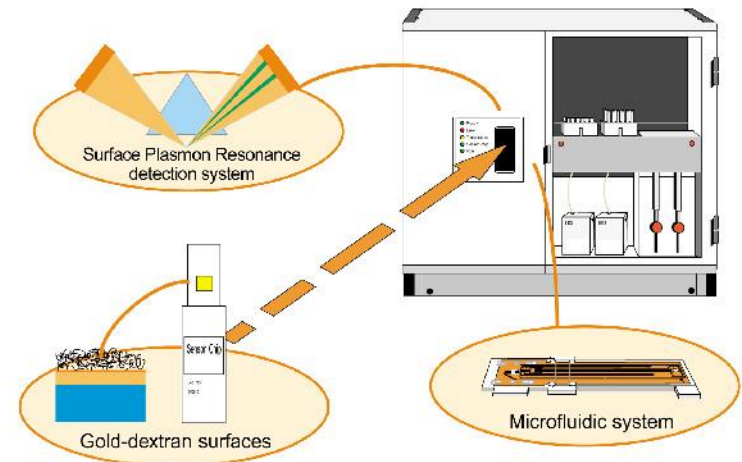


Un biosensore SPR consta di

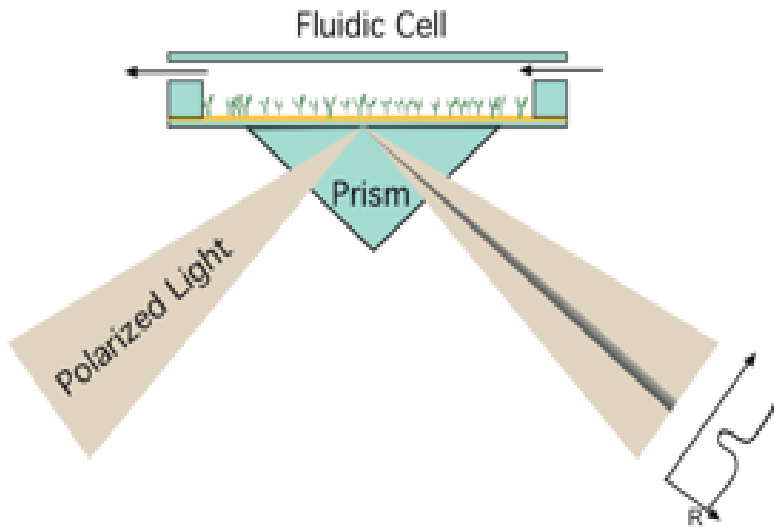
- un prisma
- un sensor chip con sottile strato metallico
- una sorgente di luce p-polarizzata,
- un detector che misuri l'intensità di luce totalmente riflessa
- un sistema che contenga il mezzo nel quale è presente l'analita.

La strumentazione è costituita da diverse parti fondamentali che sono

- **UNITA' DI RIVELAZIONE:** include componenti ottici ed elettronici per generare e misurare la risposta SPR (sorgente luminosa, prisma, e rivelatore);
- **SENSOR CHIP:** presenta una superficie biospecifica dove hanno luogo le interazioni tra analita e ligando;
- **INTEGRATED MICROFLUIDICS CARTRIDGE (IFC) Sistema a microfluido:** contiene i microtubi che trasportano il tampone, il loop per il caricamento del campione e le valvole;
- **MICROPROCESSORI:** controllano il flusso della pompa e lo stato delle valvole dell' IFC e analizzano il segnale SPR.



Una specie interagente, detta **LIGANDO**, viene immobilizzata sulla superficie di un sensore (sensor chip), mentre l'altra, detta **ANALITA**, è in soluzione



Il detector misura l'intensità della luce riflessa e di conseguenza la caduta del segnale in corrispondenza dell'angolo di accoppiamento

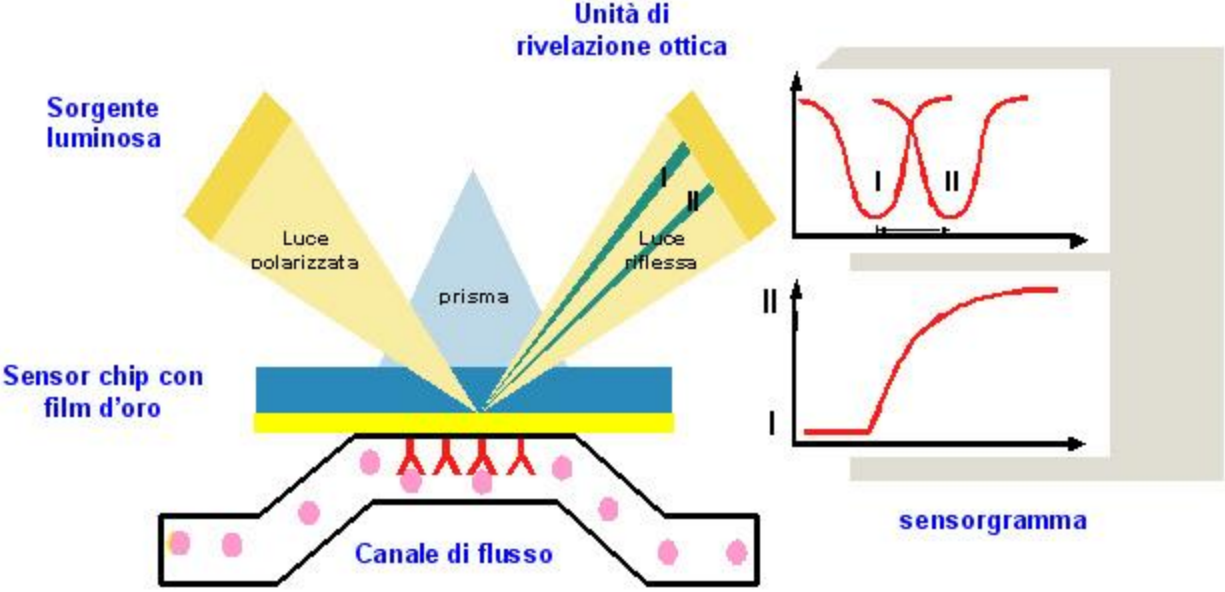
L'angolo al quale si osserva questo fenomeno è detto ANGOLO SPR

L'angolo SPR è influenzato da tre parametri:

caratteristiche del film metallico;

- lunghezza d'onda della radiazione incidente;
- indice di rifrazione dei mezzi presenti a livello dei due lati del metallo (vetro e soluzione)

L'interazione tra l'analita ed il ligando porta una **variazione dell'indice di rifrazione** dello strato acquoso e con conseguente **cambiamento dell'angolo SPR da I a II**; quest'ultimo effetto determina un segnale registrato dallo strumento .



L'indice di rifrazione è influenzato principalmente dalla **concentrazione** oltre che dal **PM** dell'analita a livello della superficie del chip. (*tanto maggiore è il PM tanto maggiore sarà il segnale in SPR*)

1. La macromolecola viene immobilizzata sulla superficie metallica e viene quindi aggiunto un analita in soluzione; questo può essere riconosciuto dalla macromolecola, andando a formare un complesso macromolecola-analita
2. La formazione di tale complesso modifica le proprietà dell'onda evanescente, che porterà ad uno spostamento dell'angolo SPR.
3. L'angolo, è direttamente proporzionale alla quantità di ligando legato alla macromolecola.
4. Il lettore ottico del biosensore misura lo spostamento dell'angolo SPR

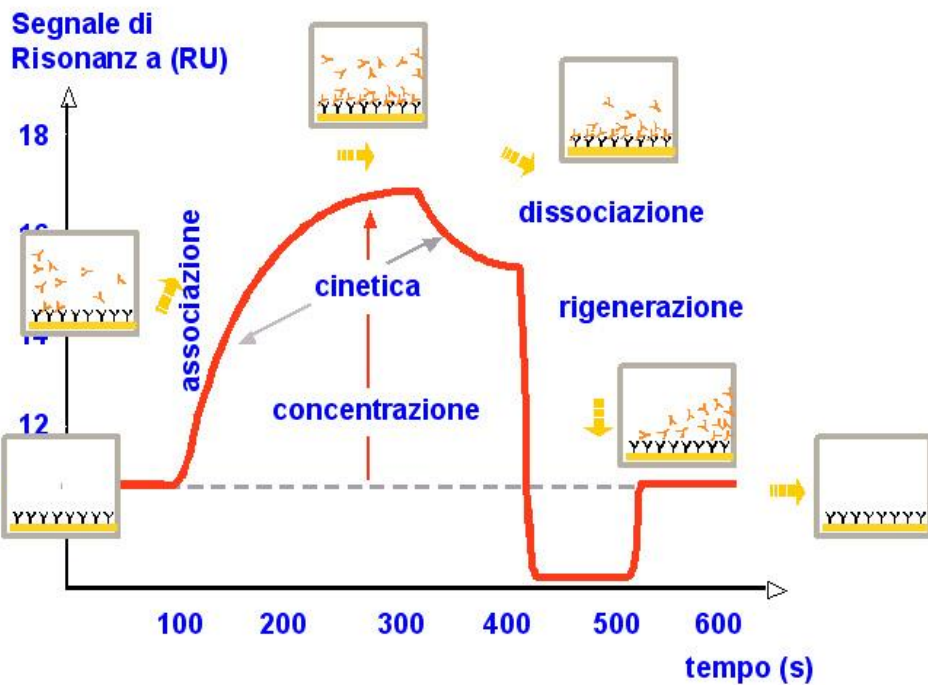
.

ANALISI DELL' INTERAZIONE LIGANDO ANALITA

- Il campione viene caricato manualmente o attraverso un autocampionatore e viene trasportato attraverso un sistema di pompe a livello della cella d' analisi dove può interagire con la biomolecola immobilizzata sul sensor chip.
- Se avviene l' interazione si crea un segnale SPR che viene registrato nel tempo.
- L' unità di misura dell' SPR è l' UNITA' DI RISONANZA o RU.
- Una RU rappresenta il cambiamento di 0.0001° dell' angolo di risonanza

Monitorando in modo continuato il segnale SPR si ottiene un diagramma detto SENSOGRAMMA nel quale si distinguono le diverse fasi dell'interazione

:

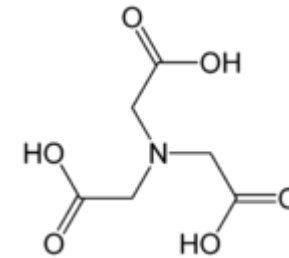
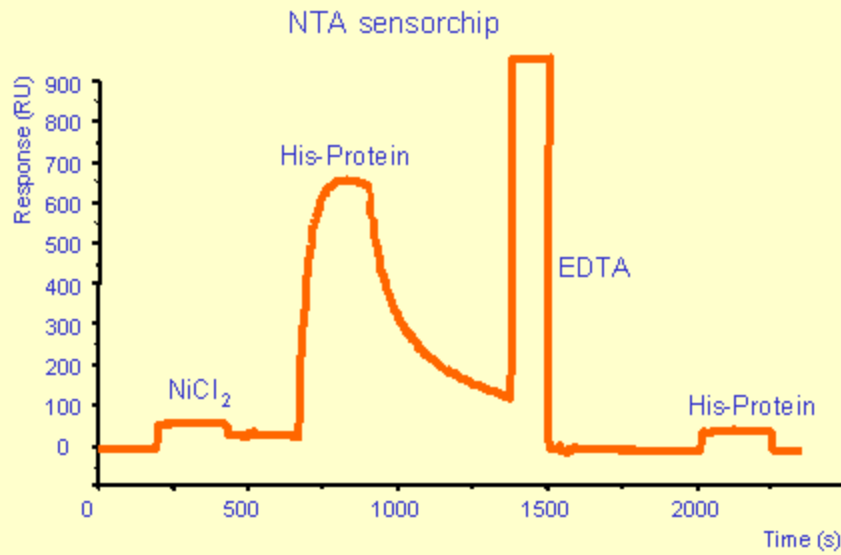


la fase di associazione: l'analita si lega al ligando fino al raggiungimento dell'equilibrio;

la fase di dissociazione: coincide col termine dell'iniezione e fornisce dati utili sulla stabilità del complesso analita-ligando;

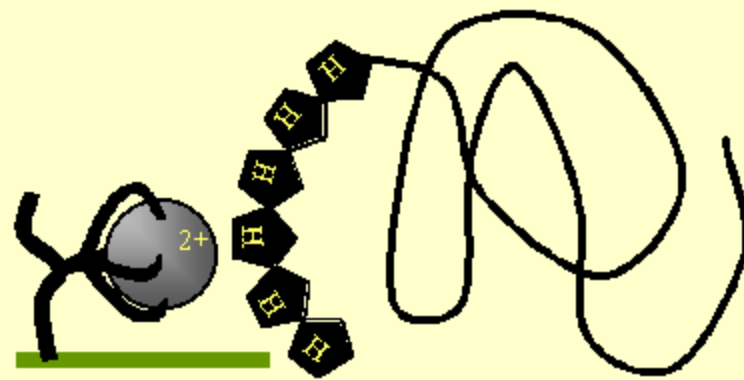
la fase di rigenerazione: l'analita viene completamente rimosso dalla superficie del chip.

Chip name	Dextran	Modification	Application
<u>CM5</u>	100 nm	100% carboxylation	general
<u>NTA</u>	100 nm	NTA	capturing poly HIS-groups
<u>HPA</u>	none	hydrophobic	lipid capturing
<u>L1</u>	100 nm	lipophilic substances	bilayers to mimic membranes
<u>SA</u>	100 nm	streptavidin	capturing of biotin



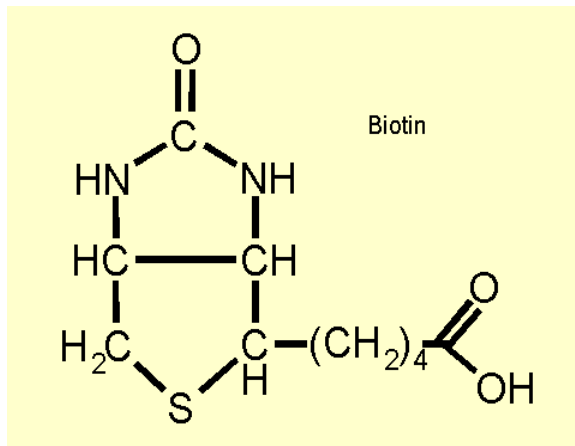
nitrilotriacetic acid

Tetradente chelator with 2+ metal ion and 6 HIS protein



Adapted from CLONETECH Talon™ Metal Affinity Resin

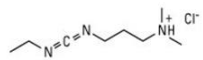
Sensor chip SA - streptavidin



IMMOBILIZZAZIONE DEL LIGANDO su CHIP CM5 (destrano carbossimetilato) mediante accoppiamento di gruppi amminici

L'immobilizzazione del LIGANDO sulla superficie del chip prevede 3 fasi:

1. **ATTIVAZIONE:** i gruppi carbossilici vengono attivati chimicamente tramite N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodimide cloridrato (EDC) N-idrossisuccinimide (NHS)
2. **COUPLING:** il ligando che contiene gruppi NH₂ reagisce coi gruppi carbossilici attivati della matrice (esteri dell' Nidrossisuccinimide),
3. **INATTIVAZIONE:** gli esteri dell'Nidrossisuccinimide che non hanno reagito con il ligando vengono fatti reagire con ETANOLAMINA.

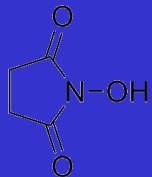


EDC

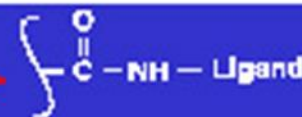
Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide • HCl

MW 191.70

Spacer Arm 0.0 Å



Ligand - NH₂

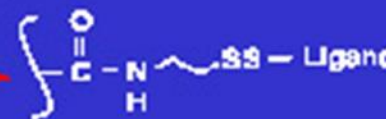


Amine

PDEA

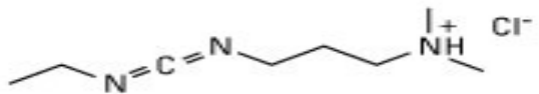


Ligand - SH



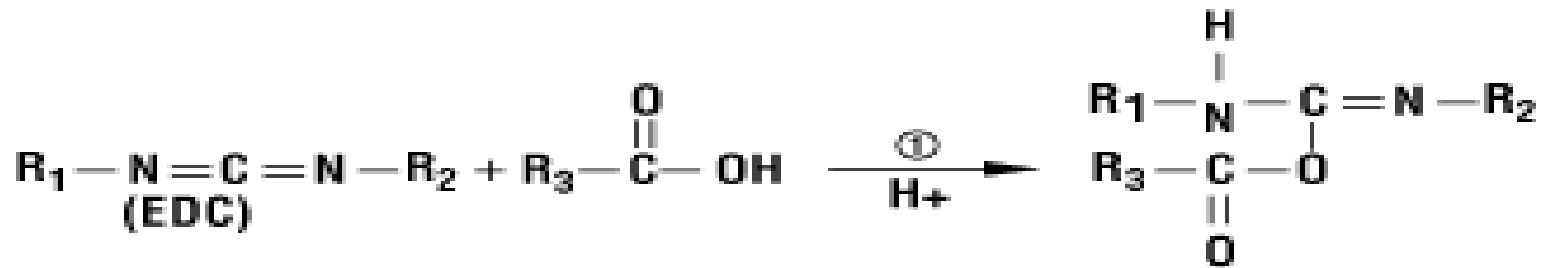
Ligand thiol

Reazione di accoppiamento tra gruppo carbossilico e **carbodiimmidi**

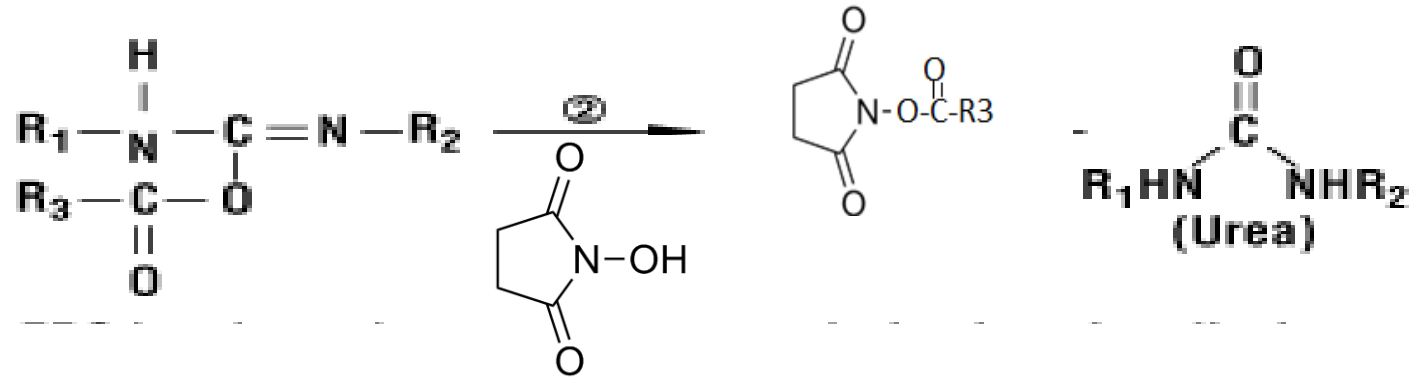


EDC

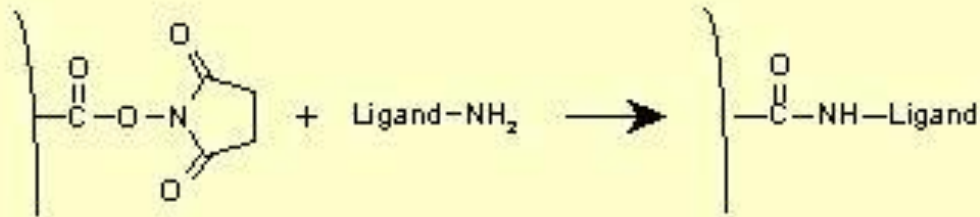
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide • HCl



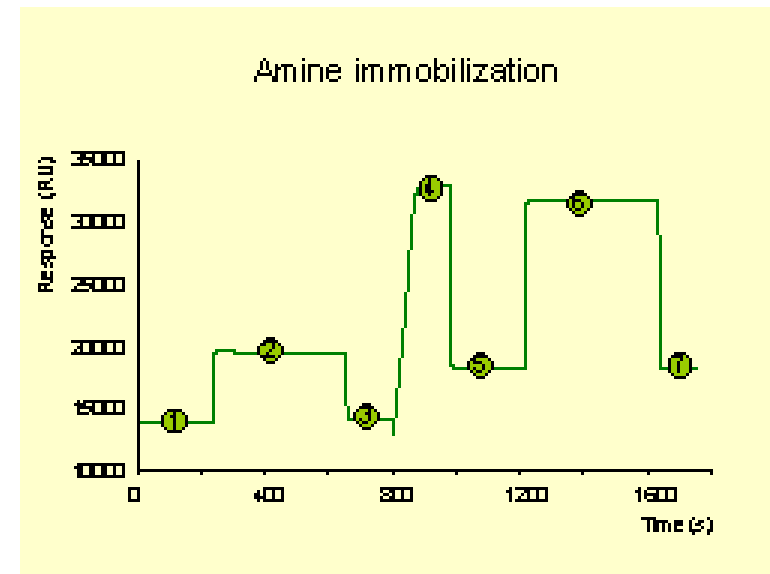
La carbodiimide reagisce con il gruppo carbossilico a pH4.5 per formare l'ossiacilurea



Ossiacilurea reagisce con l'Nidrossisuccinimide per formare l'estere dell'Nidrossisuccinimide e urea



1. linea di base flusso 5 μ l/min
2. Iniezione di 35 μ l NHS/EDC
3. Linea di base dopo l'attivazione
4. Iniezione del ligando
5. Immobilizzazione del ligando
6. Inattivazione NHS-estere che non ha reagito (iniezione di 35 μ l 1 M ethanolamina)



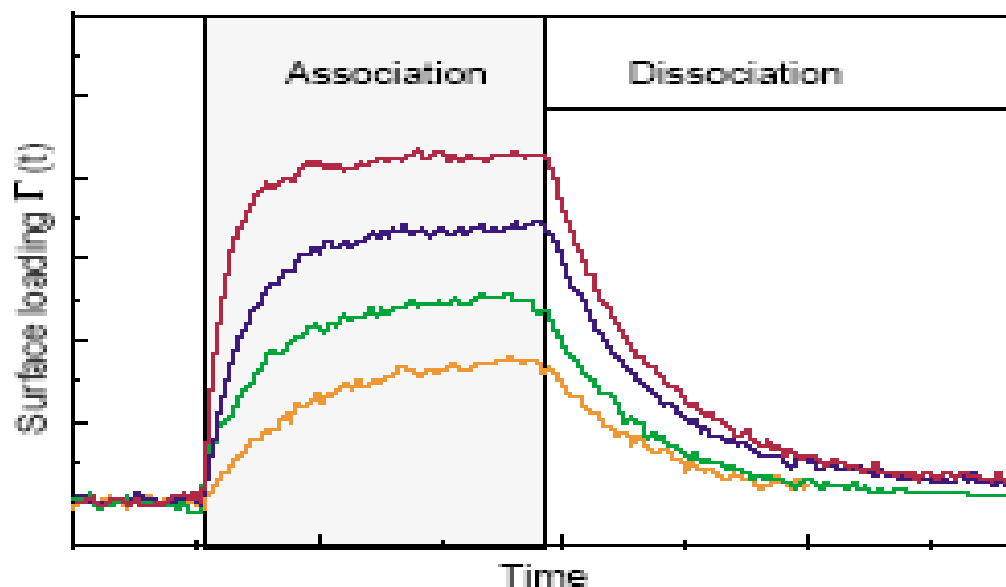
Una volta che il ligando è stato immobilizzato sul sensor chip si può procedere con la seconda fase che è rappresentata dall'analisi dell'interazione ligando-analita.

Ogni sensor chip con uno specifico ligando può essere utilizzato:
per numerose analisi per studiare le interazioni con diversi analiti;

DETERMINAZIONE DELLE COSTANTI DI VELOCITÀ DI ASSOCIAZIONE E DISSOCIAZIONE E DELLE COSTANTI D' EQUILIBRIO DI ASSOCIAZIONE E DISSOCIAZIONE

L'impiego di questa tecnica permette il monitoraggio diretto delle fasi di associazione e dissociazione del complesso.

(b)



In genere per ogni esperimento vengono registrati almeno 6-8 sensorgrammi caricando **diverse concentrazioni** di analita

La rielaborazione dei sensorgrammi mediante un opportuno software consente di ottenere dei valori delle costanti di velocità di associazione e dissociazione e delle costanti d'equilibrio di affinità e dissociazione.

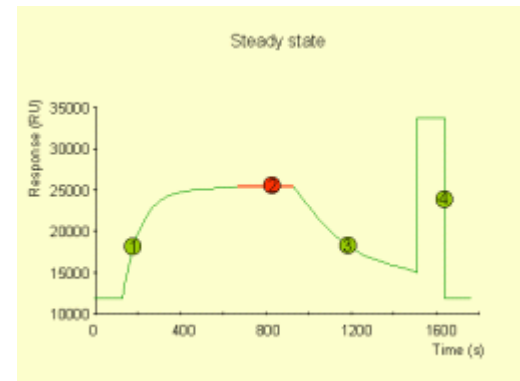
k_a o k_{on} = costante di velocità di associazione

k_d o k_{off} = costante di velocità di dissociazione .

KD = costante di dissociazione (M) = k_{off}/k_{on}

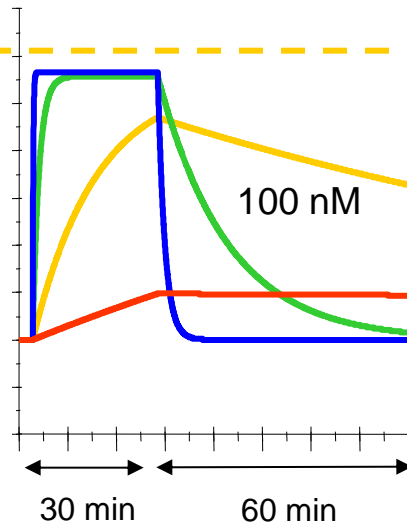
KA = costante di associazione (M-1) = k_{on}/k_{off}

$$\frac{k_a}{k_d} = \frac{[IA]}{[L][A]} = K_A \quad \text{or} \quad \frac{k_d}{k_a} = \frac{[L][A]}{[IA]} = K_D$$



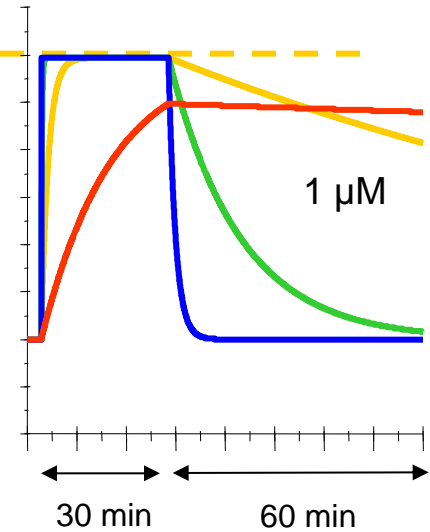
Stessa KD diverse kon e koff

All target sites occupied



k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]
10^6	10^{-2}
10^5	10^{-3}
10^4	10^{-4}
10^3	10^{-5}

K_D 10 nM



La combinazione tra tecnologia SPR e spettrometria di massa (MS) permette di identificare e caratterizzare le proteine che interagiscono sulla superficie del sensor chip.

Le proteine legate possono essere eluite dal sensor chip e successivamente analizzate: in tal caso il vantaggio della tecnica sta nella piccola quantità di campione necessario per l'analisi e nella possibilità di rilevare in tempo reale l'attività di binding presente nel fluido biologico o nella frazione analizzata.

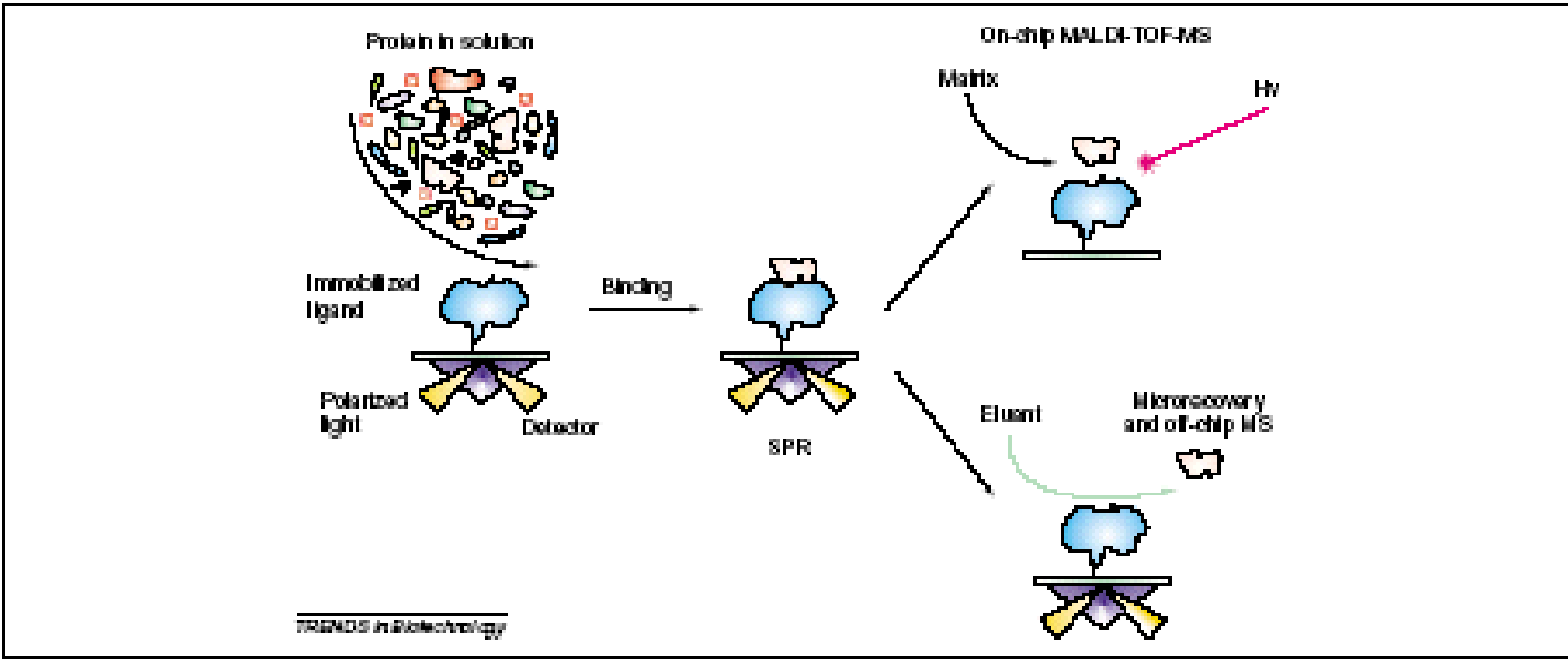


Fig. 1. Surface plasmon resonance (SPR)-mass spectrometry (MS). A ligand is covalently attached to the surface of an SPR sensor chip. The solution containing the targeted protein is passed over the surface and the protein-ligand interaction monitored by SPR. The affinity-retrieved protein can then be analyzed either by: (a) removal of the chip from the biosensor followed by application of matrix to the surface in preparation for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS; or (b) microelution from the surface and recovery for subsequent electrospray ionization (ESI) MS or MALDI-TOF MS.

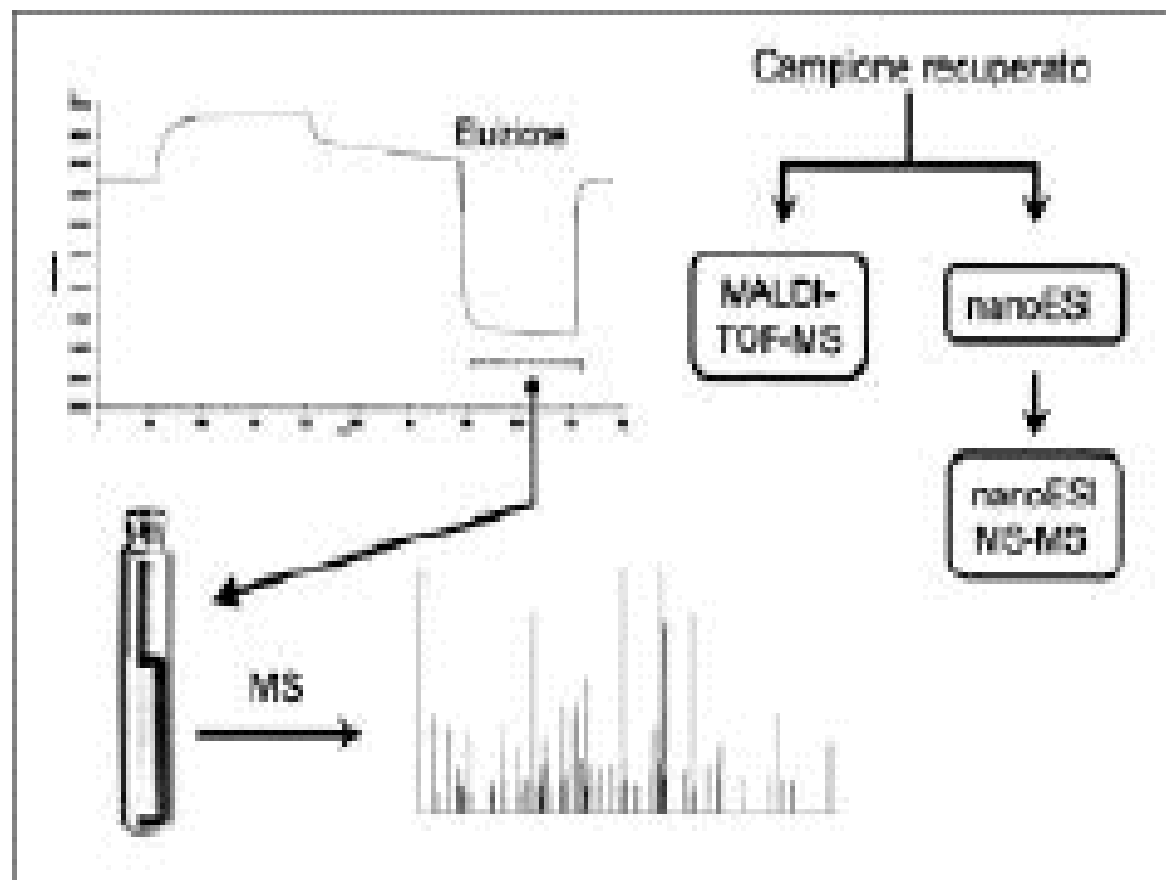


Fig. 2 - Schema della combinazione EIA-MS con elutatore dell'analita.

Vantaggi

- Monitoraggio in tempo reale del legame fra le specie in questione (rispetto ad ELISA, RIA, cromatografia di affinità e spettroscopia)
- Marcatura non necessaria delle molecole che interagiscono fra loro
- Protocolli con meno fasi, che quindi hanno meno punti critici
- Alto costo iniziale per la strumentazione, ma abbattimento dei costi per i seguenti accertamenti analitici
- Lunga durata delle superfici "sensibilizzate" che possono essere riutilizzate per più analisi, qualora la procedura non causi la distruzione di legante e/o ligando
- Semplice e veloce utilizzo dell'apparecchiatura
- Sistema stabile e riproducibile
- Alta precisione, sensibilità e selettività
- Rapidità di risposta
- Pochissimi reagenti utilizzati
- Minima preparazione del campione



Available online at www.sciencedirect.com



Protein Expression and Purification 52 (2007) 74–81

Protein
Expression
& Purification

www.elsevier.com/locate/yprep

Helicobacter pylori acyl carrier protein: Expression, purification, and its interaction with β -hydroxyacyl-ACP dehydratase

Weizhi Liu ^a, Li Du ^a, Liang Zhang ^a, Jing Chen ^a, Xu Shen ^{a,b,*}, Hualiang Jiang ^{a,b,*}

^a *Drug Discovery and Design Center, State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, 555 Zuchongzhi Road, Shanghai 201203, China*

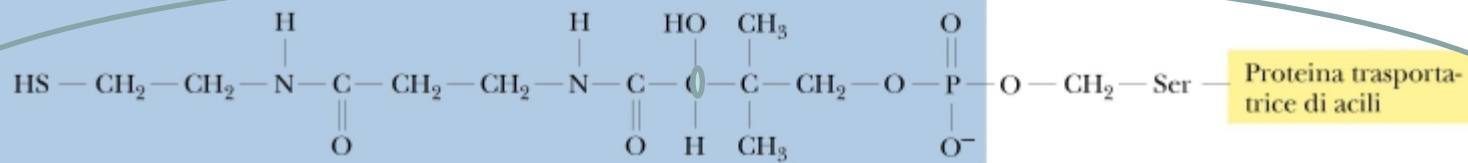
^b *School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China*

Received 10 July 2006, and in revised form 4 September 2006

Available online 15 September 2006

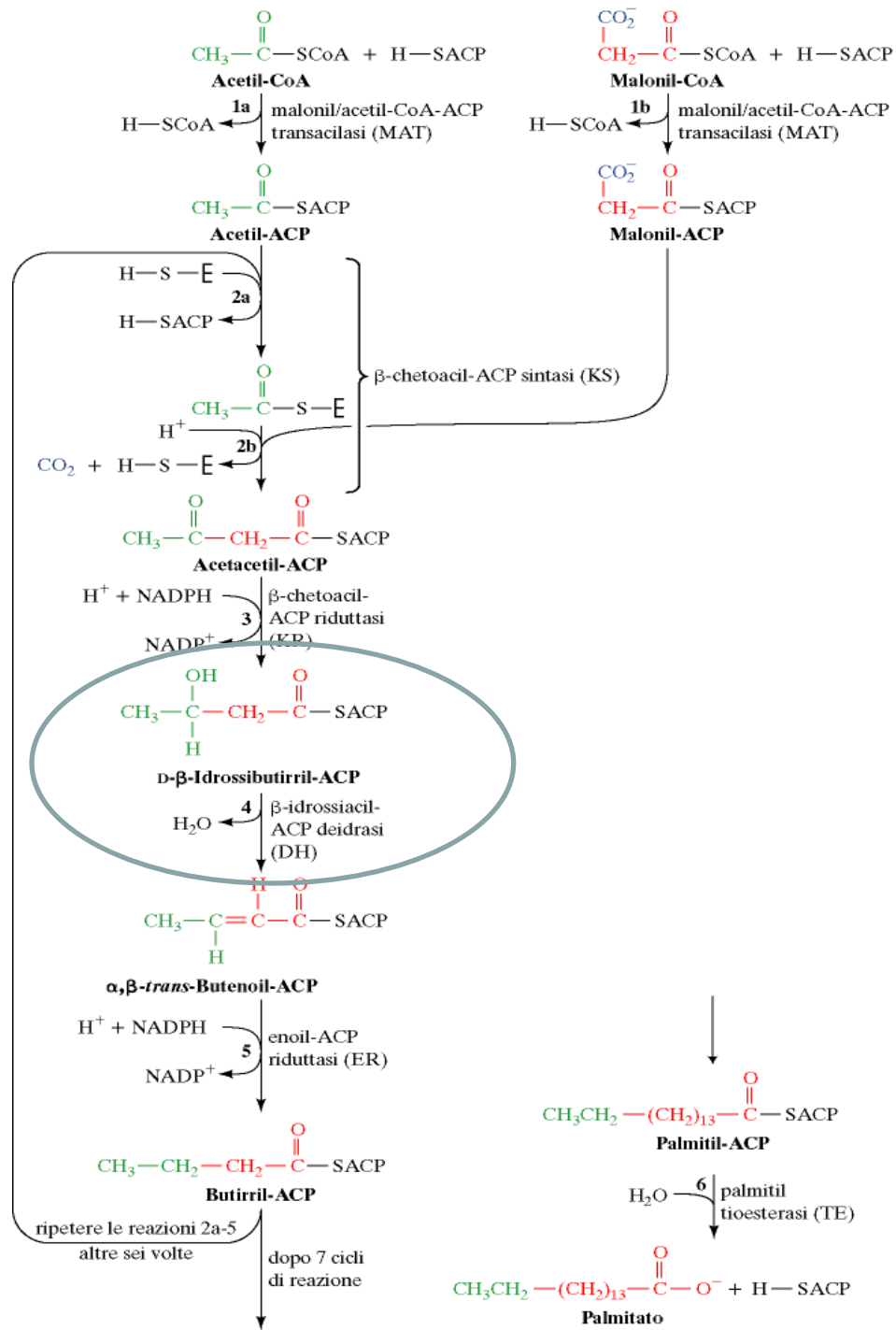
La catena di acido grasso è ancorata ad una proteina trasportatrice di acili **ACP**
Nei batteri l' ACP è una proteina di 10kDa mentre negli animali fa parte del complesso multienzimatico

Gruppo fosfopanteteinico



Proteina trasportatrice di acili

Gruppo fosfopanteteinico di ACP



H. pylori	-----
P. falciparum	---MKILLLCIIFLYVYVAFKNTQKDGVSLLQILKKKRSNQVNFNRKNDYNLKKNPSS 57
E. coli	-----
B. subtilis	-----
Spinach	MASLSATTIVRVQPSSSSLHKLQSGNGRCSIVCLD*GKSSFPPLRTSR---RRSFISA 56
M. Tuberculosis	-----
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> Helix II Loop </div> <div style="text-align: center; margin-top: 5px;"> </div>
H. pylori	--MALFEDIQAVIAEQLNVDAAQVTPEAEFVKDGGADSDVVELIMALEEKFGIEIPDEQ 58
P. falciparum	SLKSTFDDIKKIISKQLSVEEDKIQMNSNPTKDDGADSDLVVELIMALEEKFNVTISDQD 117
E. coli	-MSTIEERVKKIIGEQLVGKQEEVTTNNSPFVEDLGGADSDLVVELVMALEEFOTEIPDEE 59
B. subtilis	-MADTLERVTKIIVDRILGVDEADVLEASFKEDEGGADSDLVVELVMELEDEFDEMEISDED 59
Spinach	AKKETIDKVCDIVKEKLAGADVVTADSEPSKGGADSDLVVEIVMNEEERGINVDEDK 116
M. Tuberculosis	---MKEAINATIQRILRTDRG-ITANQVLVDDLGGADSKLFLITELDEEDIAISPRD 55
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> : : : * : ..** ***. .::: **::* : . </div>
H. pylori	AEKIYVNGDVVYKIEDNKLA----- 78
P. falciparum	ALKINTVQDAIDYIEKNNKQ----- 137
E. coli	AEKITTVAIVYINGNQA----- 78
B. subtilis	AEKIATVGDVAVNYIQNQ----- 77
Spinach	AQDISTIQQAADVIESLLEK----- 137
M. Tuberculosis	AQNIKTVGDVYTSVAVWFPETAKPAPLGGTA 87

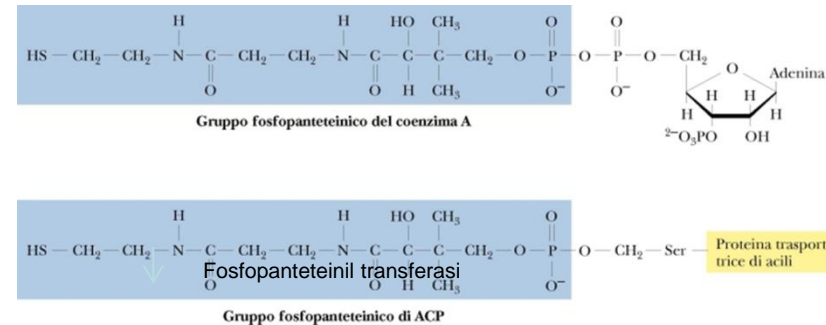
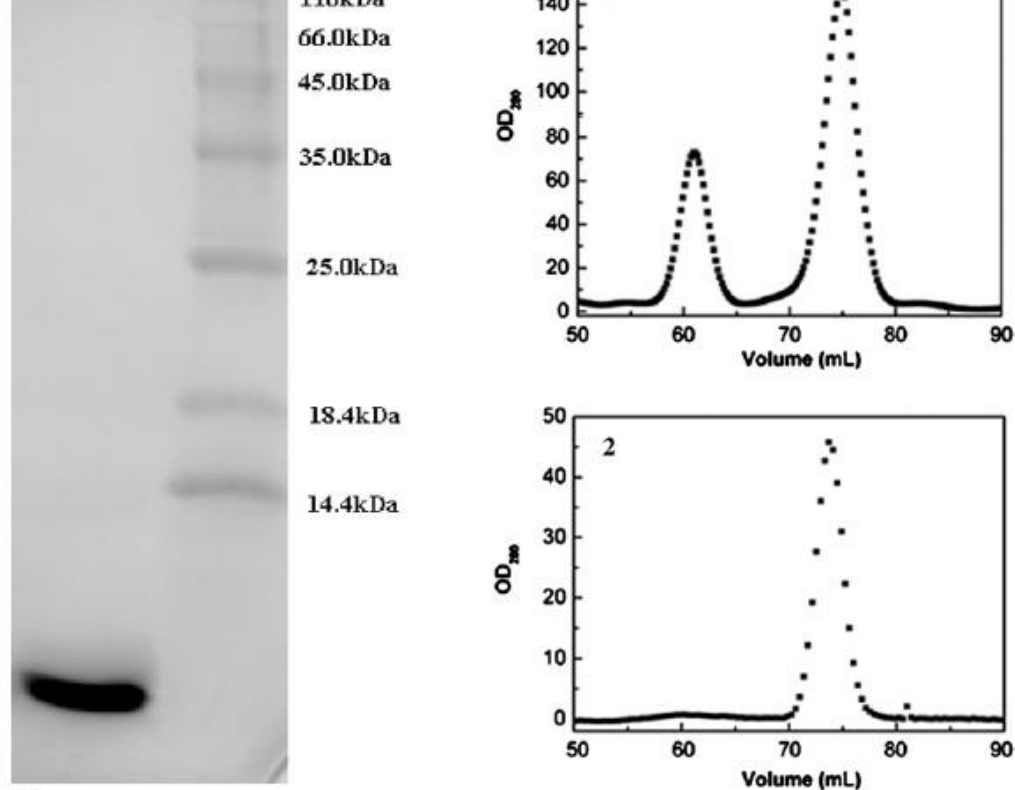


Fig. 1. Multiple alignment of ACP sequences from different species. *Escherichia coli* (*E. coli*), *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Spinach acyl carrier protein I* (*ACP-I*), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). The strictly conserved residues are marked with asterisk “*”. The conserved substitutions are represented as “:”, and “.” means the semi-conserved substitutions. Two conserved motifs were highlighted and labeled. Alignment was performed via Clustal W at <http://www.ebi.ac.uk/clustal/index.html> website.



C

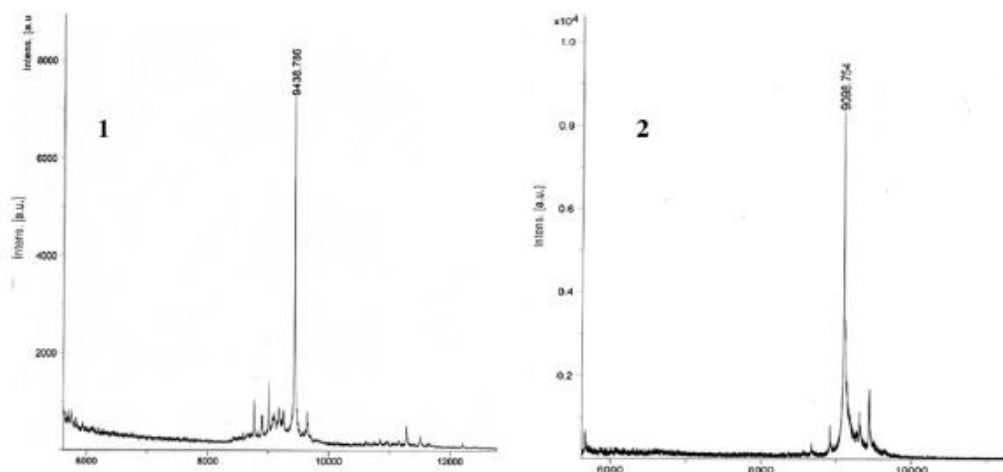


Fig. 2. Characterization of the purified *HpACP*. (A) SDS-PAGE in 5% pH 6.8 stacking gel and 12% pH 8.8 separating gel. Lane 1, molecular mass marker; lane 2, *HpACP*. (B) Size exclusion chromatography. The *HpACP* sample was analyzed on the Superdex 75 column under the conditions as described in “Materials and methods” (1, The elution fraction from Ni^{2+} -NTA affinity column; 2, The first fraction after treated with 100 mM DTT at 37 °C overnight). (C), MALDI-TOF mass spectra of the two forms of *HpACP* (apo, holo). The purified two forms prepared as described in “Materials

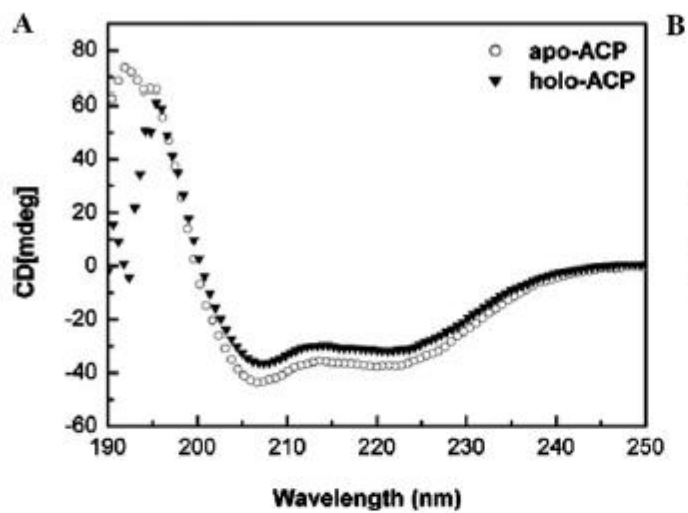
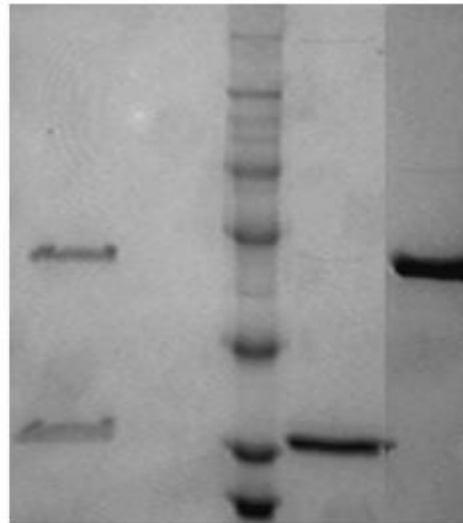


Fig. 3. Far-UV CD based analysis of the apo-ACP and holo-ACP in PBS buffer in the range of 190–250 nm. (A) The CD spectra of apo-ACP and holo-ACP recorded at 25 °C in PBS buffer. (B) The CD spectra of apo-ACP and holo-ACP recorded at 25 °C in PBS buffer. (C) The linear relationship between the $\ln(\ln(1/F_{app}))$ and $1/T$.

and holo-ACP were recorded at 25 °C in PBS buffer. (B) The CD spectra of apo-ACP and holo-ACP recorded at 25 °C in PBS buffer. (C) The linear relationship between the $\ln(\ln(1/F_{app}))$ and $1/T$.



GST-ACP+FabZ Gel Marker FabZ GST-ACP

Fig. 4. The direct interaction between *Hp*ACP and *Hp*FabZ was determined by GST pull-down. Samples were analyzed on a 10% SDS-polyacrylamide gel, and the band was stained with Coomassie brilliant blue R-250. Lane 1, the purified His-tagged *Hp*FabZ; lane 2, the purified GST-tagged *Hp*ACP; lane 3, molecular mass marker; lane 4, agarose gel control; lane 5, GST-tagged *Hp*ACP and the pull-down *Hp*FabZ.

$KD = 1.2 \cdot 10^{-8}M$,

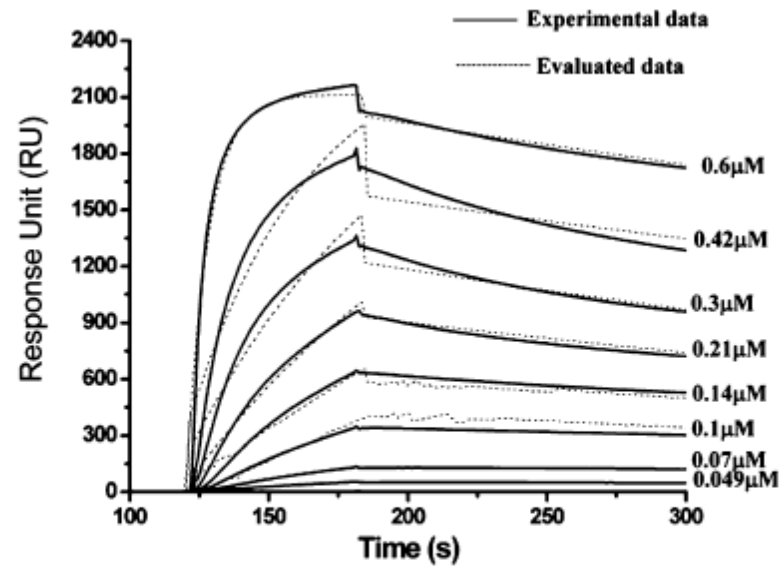


Fig. 5. Sensorgrams of *HpFabZ* binding to the immobilized *HpACP*. The binding curves were fitted to 1:1 Langmuir binding model. Superposition of fitting curves (···) to original curves (—).

Esperimenti effettuati con SPR hanno evidenziato che la fusicoccina fa diminuire la k_{off} rendendo il legame tra H+ ATPasi e 14-3-3 praticamente irreversibile

TABLE II

Kinetic rate constants and equilibrium dissociation constants for the interaction between 14-3-3 protein and various peptides

	k_{on}	k_{off}	$K_D = k_{off}/k_{on}$
	$M^{-1} s^{-1}$	s^{-1}	nM
BA-(933–948)-P	1.6×10^5	1.4×10^{-2}	88
BA-(933–948)-P + FC ^a	1.3×10^5	9.5×10^{-4}	7
RSRST _p STP (PS-Raf-259) ^{b,c}			510 ^b
RLYH _p SLP ^{b,d}			37.4 ^b

^a 10^{-5} M FC.

^b Ref. 32.

^c A phosphopeptide representing a 14-3-3 binding sequence in Raf-1 kinase.

^d A phosphopeptide representing an optimized sequence for 14-3-3 binding.

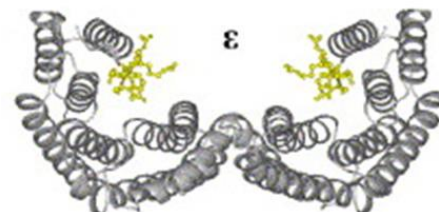
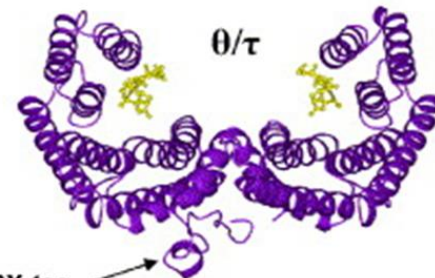
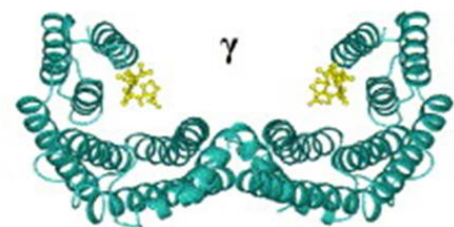
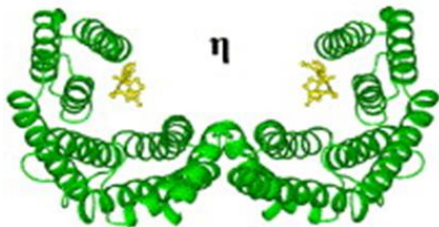
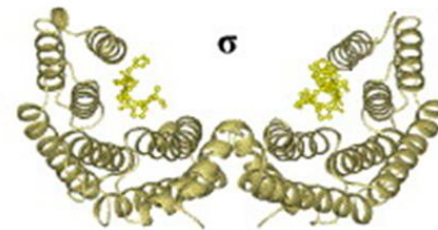
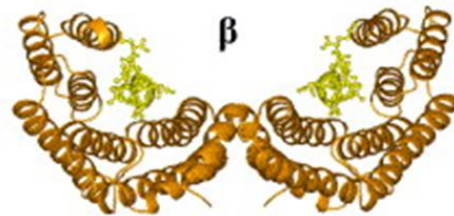
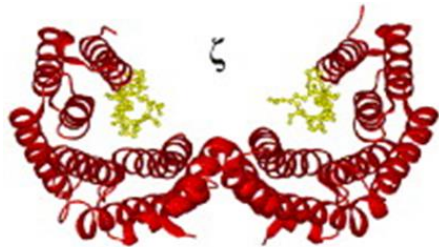
Motivi consenso riconosciuti dalle 14-3-3

RSX**pSXP** (mode I)

RXY/FX**pSXP** (mode II)

pSX₁-COOH (mode III)

pSX₁-X₂COOH (mode III)



His6X-tag

◆ Interazioni proteina-proteina *in vivo*

**BRET (Bioluminescence
Resonance Energy Transfer)
FRET, Foster resonance energy
transfer)**

La visualizzazione avviene mediante lettori di micropiastre in fluorescenza o mediante microscopia

GFP

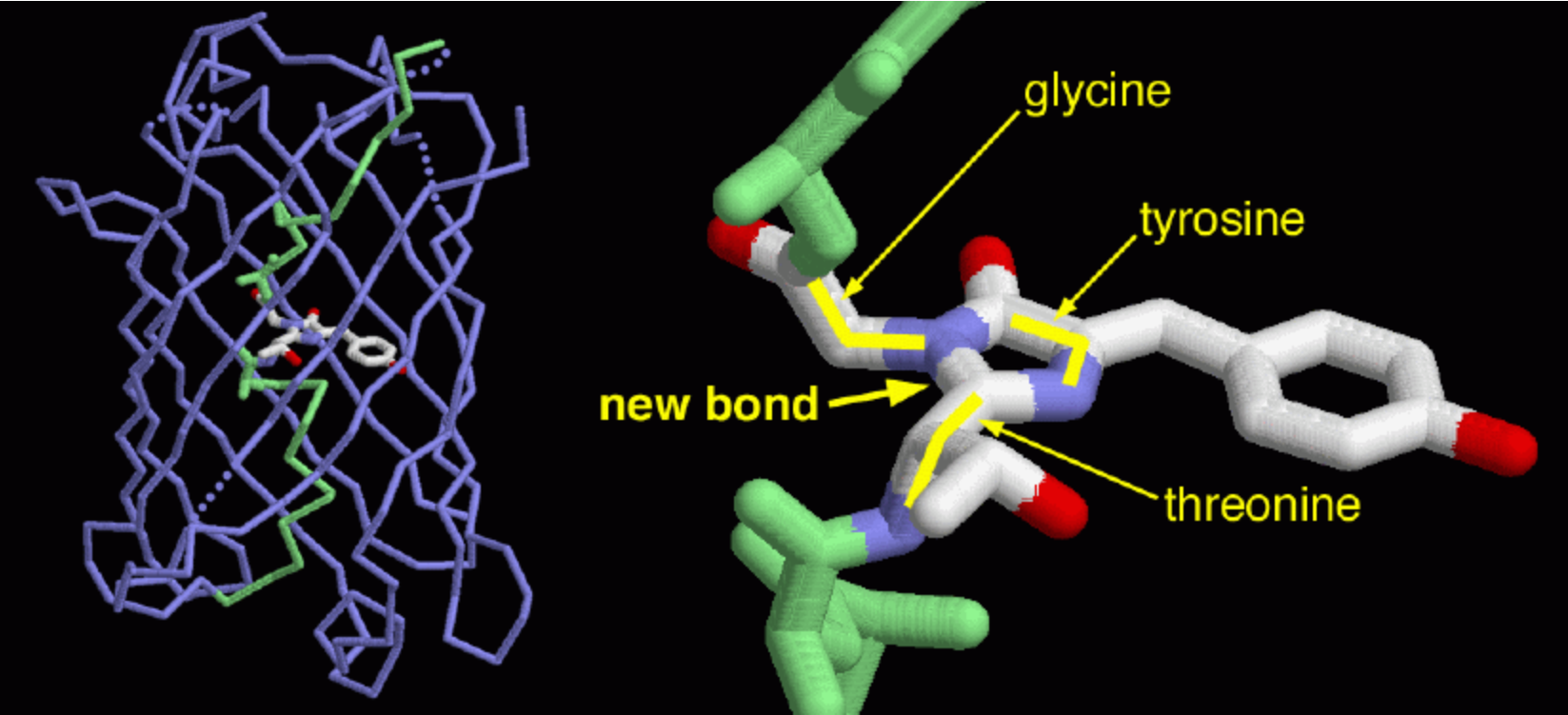
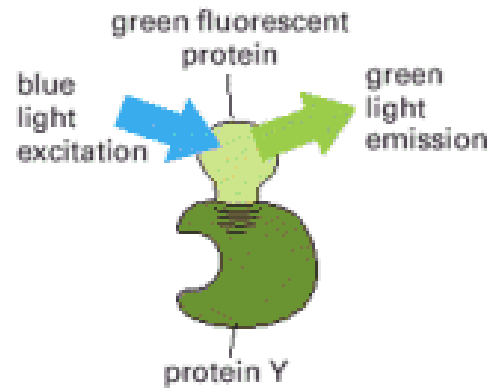
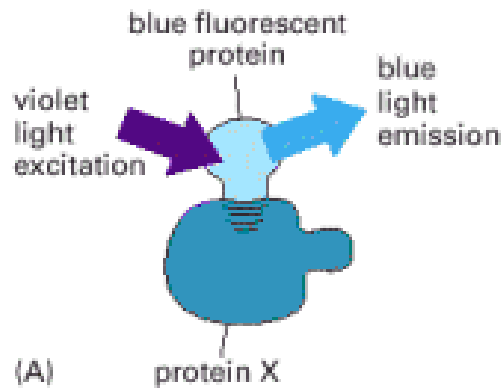
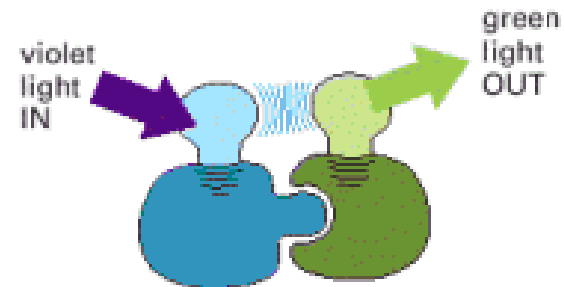


Table 1. Adapted from Tsien (1998).

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

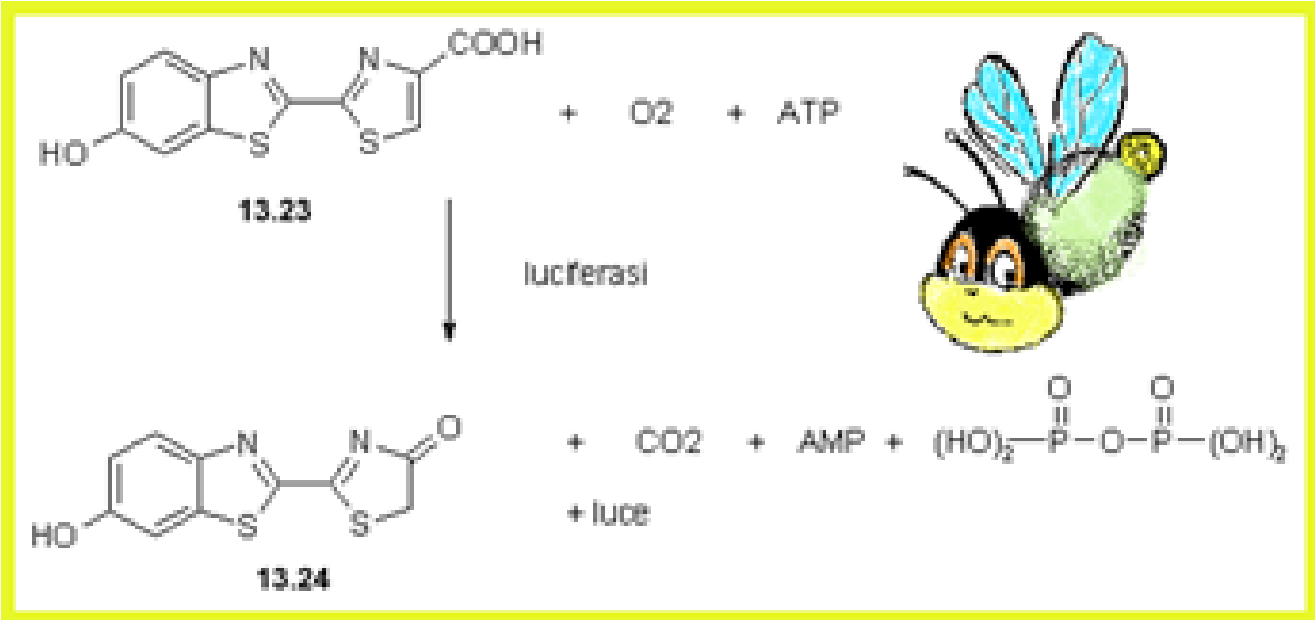


(B) **NO PROTEIN INTERACTION**
 NO EXCITATION OF GREEN
 FLUORESCENT PROTEIN,
 BLUE LIGHT DETECTED



(C) **PROTEIN INTERACTION**
 FLUORESCENCE RESONANCE
 ENERGY TRANSFER,
 GREEN LIGHT DETECTED

La **bioluminescenza** è un fenomeno osservato in natura, ad esempio nelle lucciole, *Photinus pyralis*. La biochimica di questa manifestazione naturale è dovuta alla reazione tra l'enzima luciferasi e il suo substrato luciferina e la molecola adenosin-trifosfato (ATP).



La luce è prodotta dall'ossidazione della luciferina in presenza di ATP

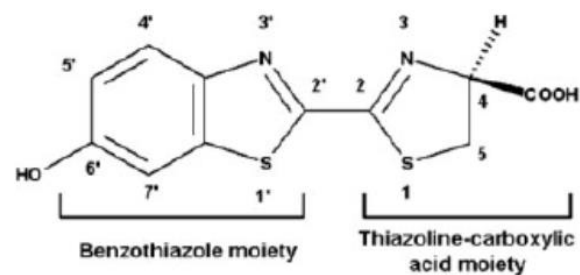
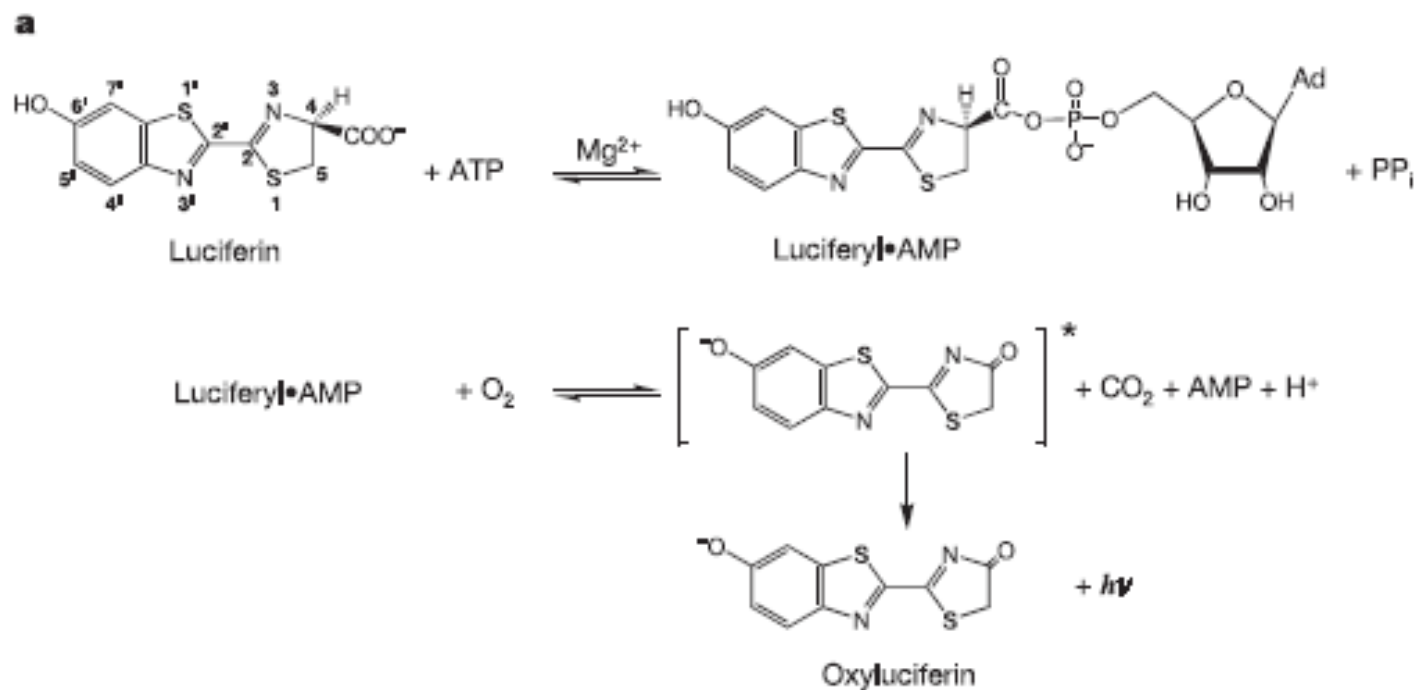


Figure 3. Chemical structure of firefly luciferin, D-LH₂. The two principal moieties of the molecule are shown, with the atoms numbering. Figure adapted from ref. 15.



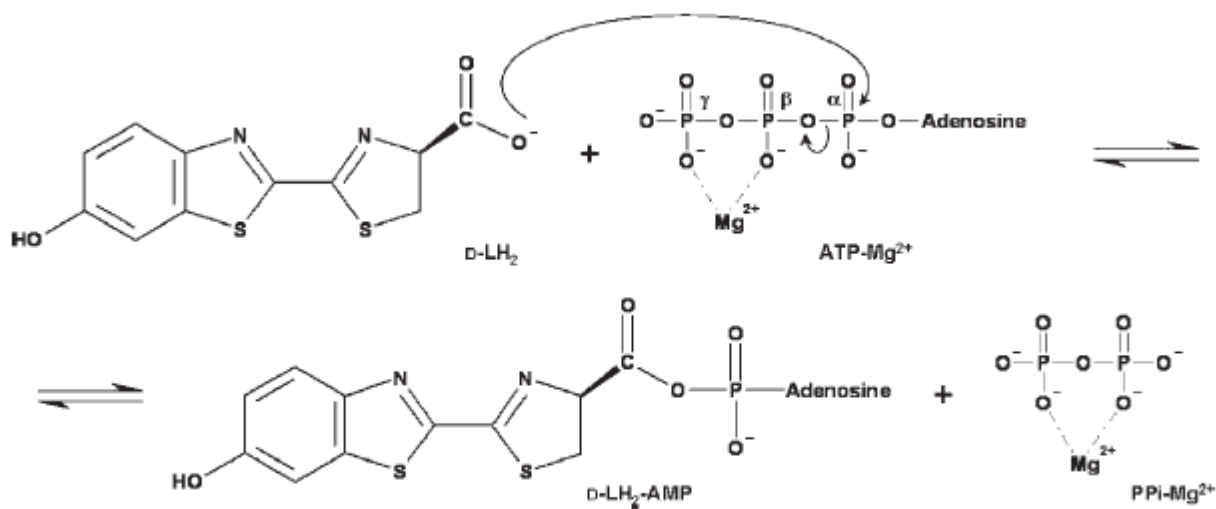


Figure 4. Chemical mechanism of the adenylation of D-LH₂. The reaction involves the displacement of inorganic pyrophosphate (PPI) as a leaving group from the ATP molecule, which leads to the formation of the intermediate D-luciferyl-adenylate (D-LH₂-AMP).

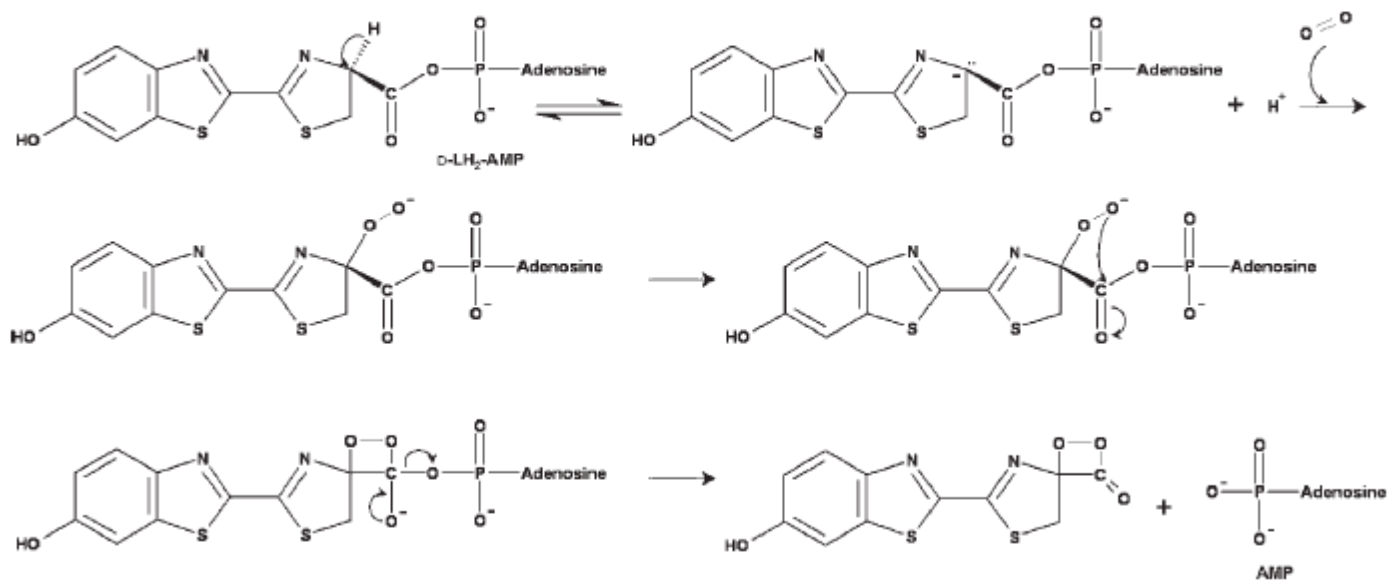


Figure 5. Mechanism of dioxetanone formation from D-LH₂-AMP. After its formation the intermediate D-LH₂-AMP loses a proton

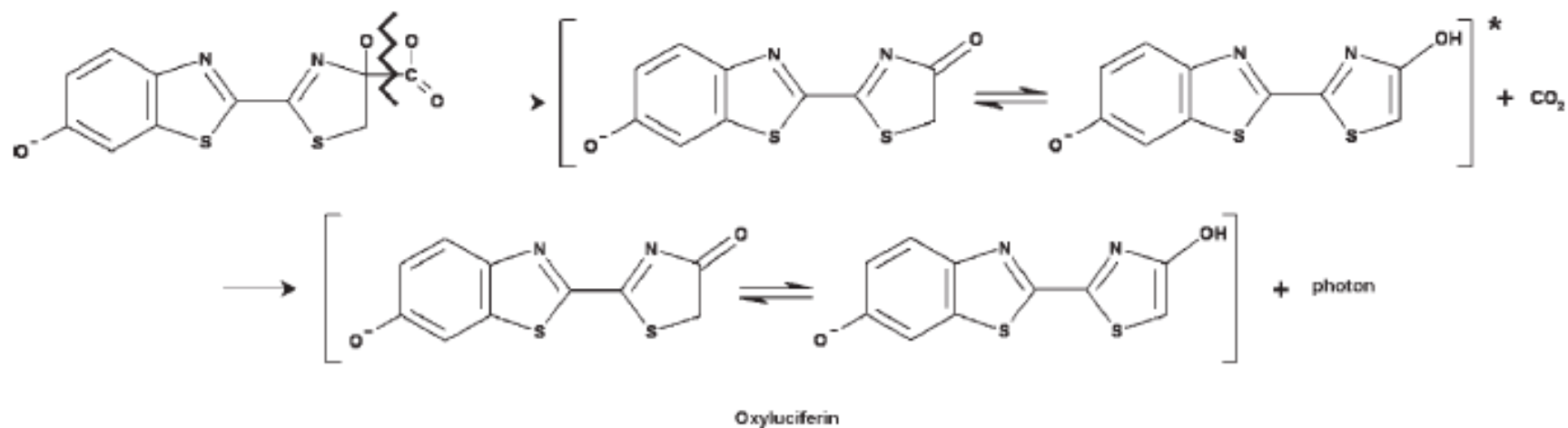


Figure 6. Oxidative decarboxylation of the dioxetanone ring in D-LH₂ to yield the light-emitter oxyluciferin. The spontaneous break-up of the dioxetanone ring, through a process not yet fully understood, produces oxyluciferin in a singlet excited state (repre-

-Studio dell'interazione fra due proteine mediante Bret.

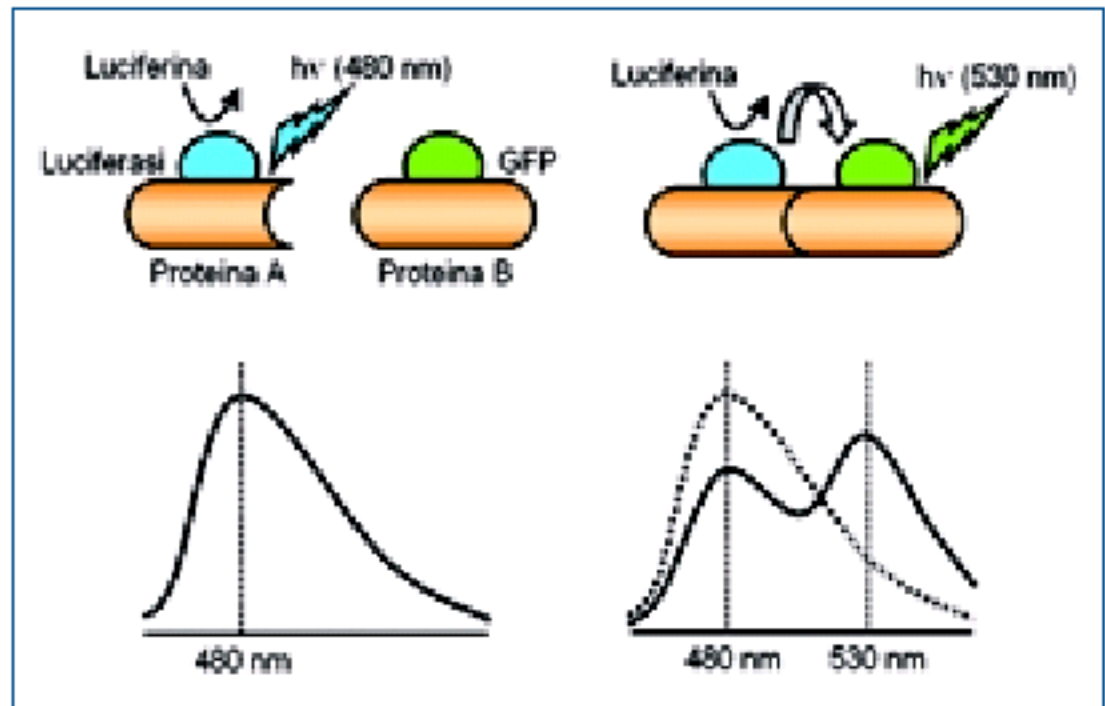
-Alla proteina A viene legato un donatore bioluminescente (luciferasi),

-Alla proteina B un accettore fluorescente (GFP).

-L'aggiunta della luciferina determina l'emissione di bioluminescenza:

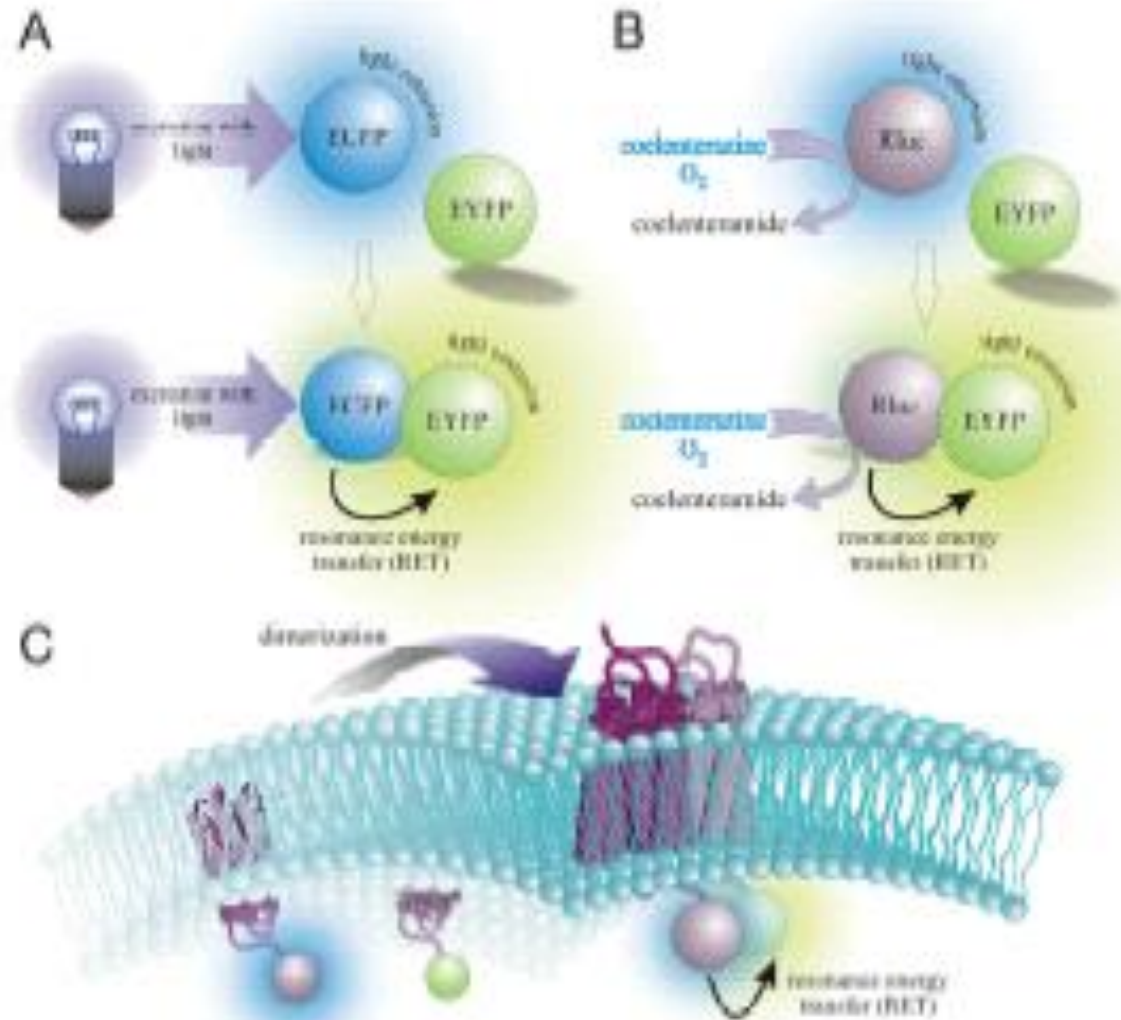
-**in assenza di interazione proteina-proteina** si osserva l'emissione dell'ossiluciferina con un massimo a 480 nm;

-**in presenza di interazione** si osserva anche l'emissione della GFP a 530 nm dovuta al processo di trasferimento di energia



l'efficienza del trasferimento di energia viene misurata dal rapporto tra l'emissione dell'accettore e quella del donatore,

Dimerizzazione dei recettori associati a proteine-G



Il principale vantaggio di FRET rispetto a BRET è permettere la visualizzazione in una singola cellula di interazioni proteina–proteina mediante osservazione al microscopio

Svantaggi

FRET il fluoroforo deve essere eccitato da luce monocromatica che può eccitare anche il fluoroforo accettore

L' eccitazione del donatore mediante illuminazione del campione può determinare photobleaching “sbiancamento” dell' accettore con conseguente perdita del segnale

L' illuminazione induce autofluorescenza di componenti endogene determinando background che complica l' interpretazione dei dati

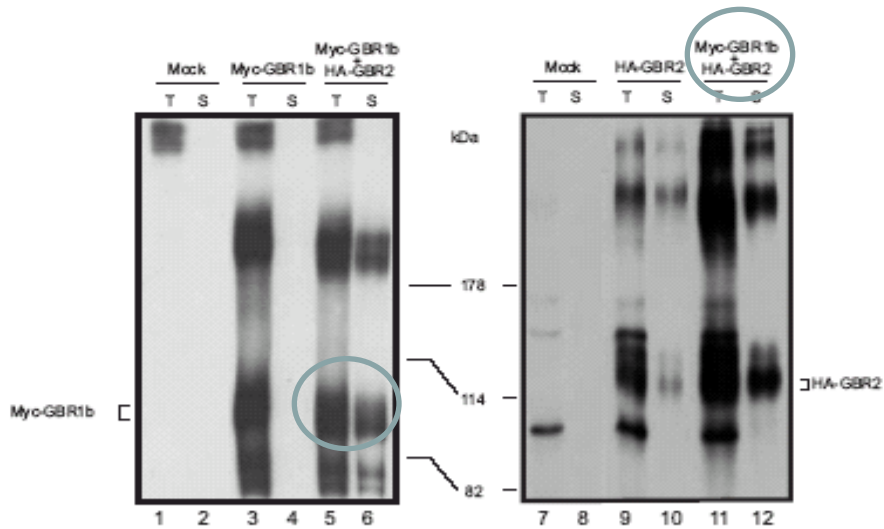
Subcellular distribution of GABA_B receptor homo- and hetero-dimers

Josée-France VILLEMURE*, Lynda ADAM*¹, Nicola J. BEVAN†, Katy GEARING†, Sébastien CHÉNIER* and Michel BOUVIER*^{2,3}

*Department of Biochemistry, Université de Montréal, C. P. 6128, succursale Centre-Ville, Montreal, QC, Canada H3C 3J7, and †GlaxoSmithKline Research and Development, Medicines Research Centre, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY, U.K.

IP : Anti-Myc
WB : Anti-Myc

IP : Anti-HA
WB : Anti-HA



Immunoprecipitazione su estratti totali e membrane di cellule trasfettate rispettivamente con :
Myc GBR1b e HA GBR2 o cotrasfettate
Myc GBR1b e HA GBR2

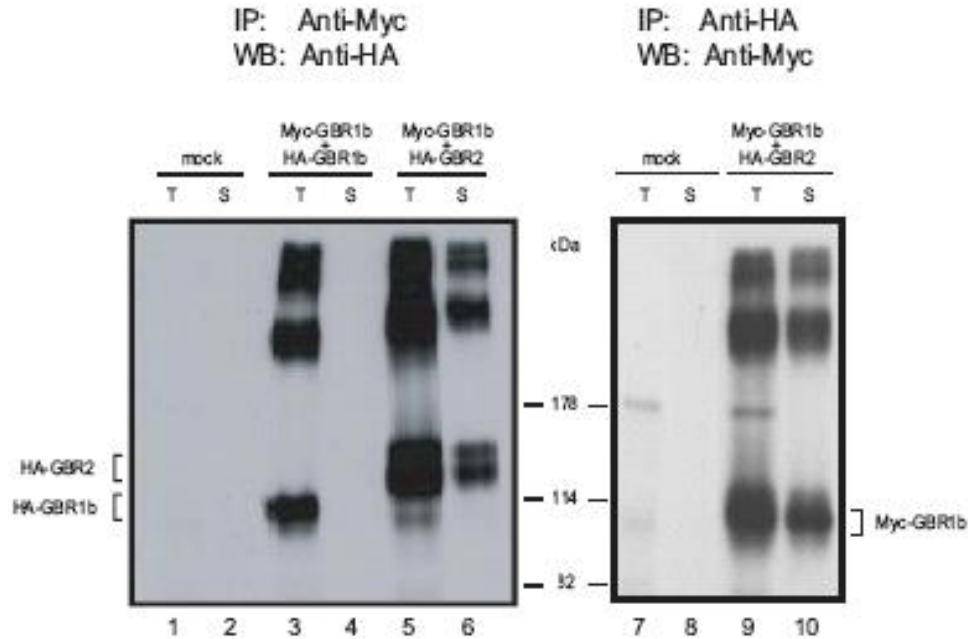
GBR1b è espresso solo nella frazione citoplasmatica (T) delle cellule trasformate solo con Myc GBR1b

GBR2 è espresso sia nella frazione citoplasmatica (T) che nelle membrane (S) di cellule trasformate con HA GBR2

GBR1b è presente in membrana nelle cellule che coesprimono i due recettori

GBR2 è necessario per la localizzazione di GBR1b in membrana

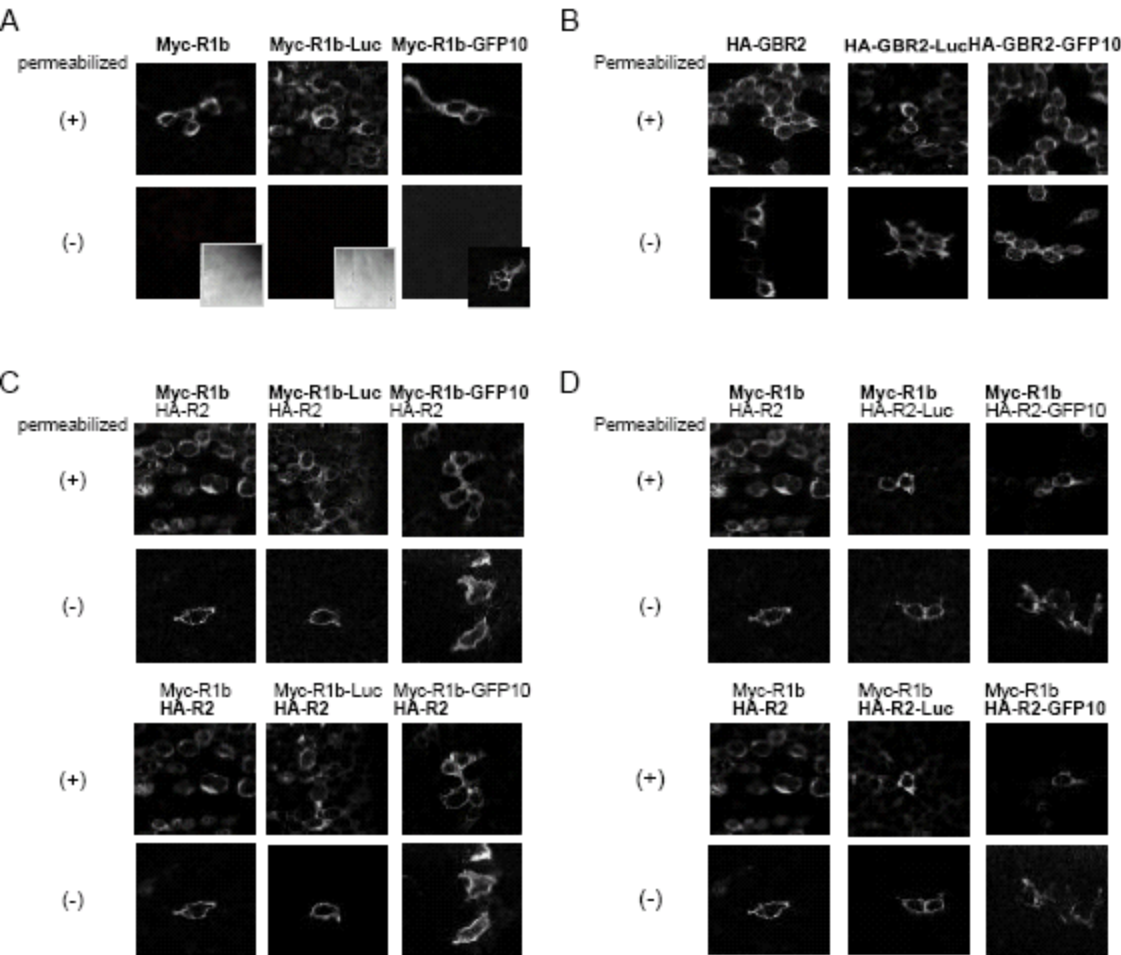
Immunoprecipitazione su cellule trasfettate con MycGBR1b e HA GBR1b o con MycGBR1b e HA GBR2



GBR1b dimerizza
e forma complessi
a più alto peso
molecolare ma è
espresso solo nel
citosol (corsia 3)

GBR1b forma
eterodimeri con
GBR2 presente
anche in membrana

Analisi di immunofluorescenza per determinare la localizzazione di GBR1b e GBR2 utilizzando costrutti in cui i due recettori erano fusi al C-terminale con GFP o luciferasi

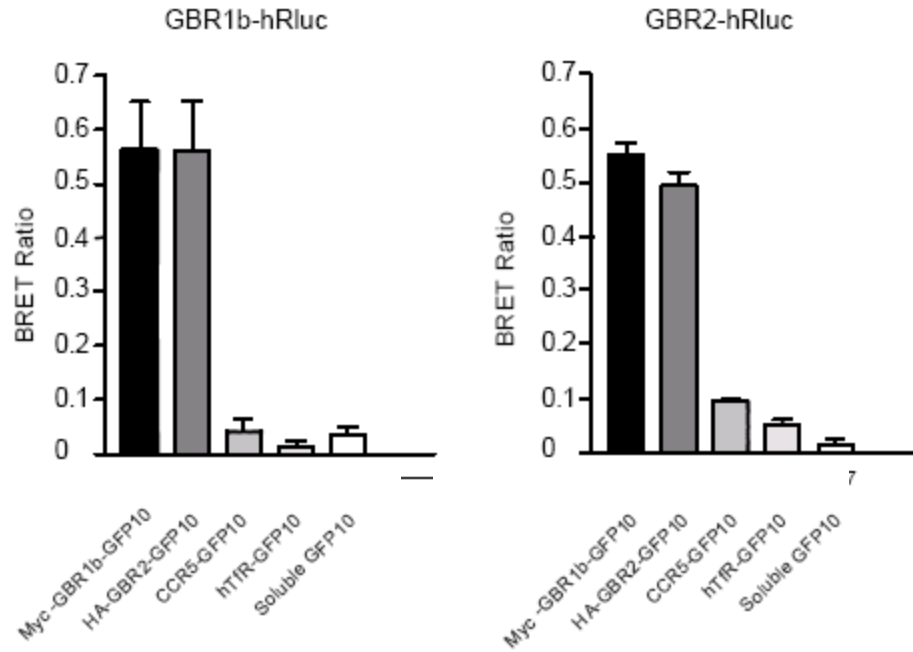


A la distribuzione di GBR1b nei tre costrutti è identica: GBR1b è presente solo nel citosol

B la distribuzione di GBR2 nei tre costrutti è identica: GBR2 è presente sia nel citosol che sulla superficie cellulare

C e D la coespressione dei due recettori determina la traslocazione di GBR1b in membrana

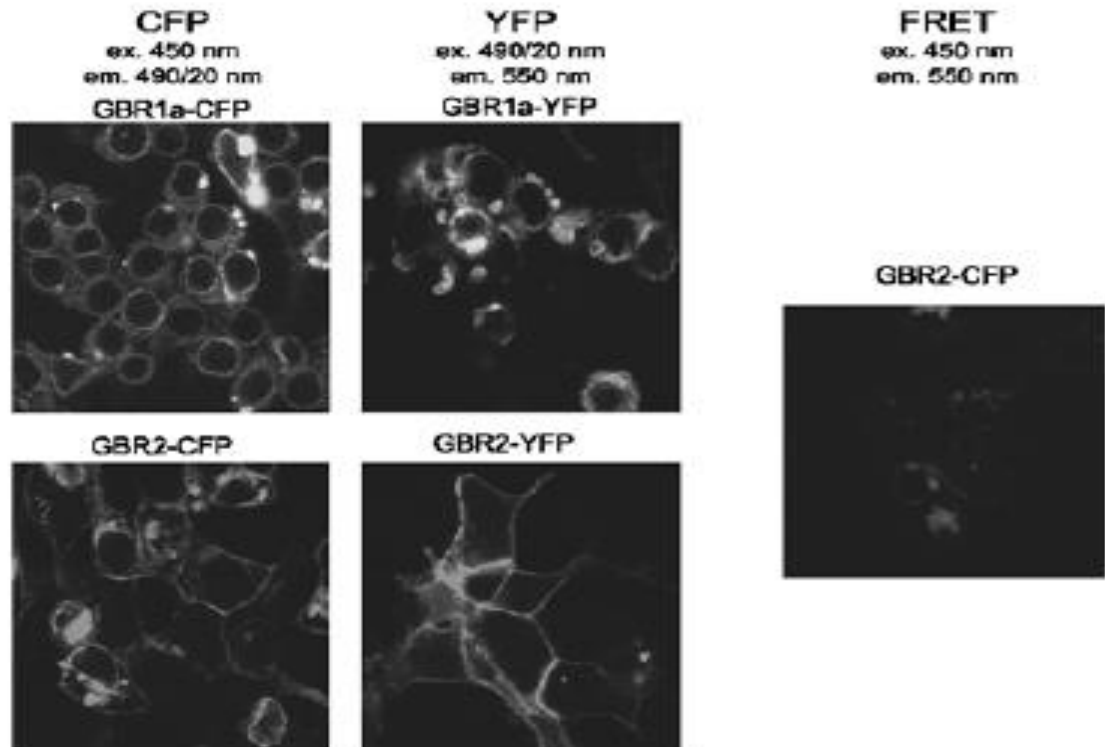
Interazione tra GBR1b e GBR2 misurata con BRET



BRET rapporto della luce emessa dal recettore-GFP10 (500–530 nm) e luce emessa dal recettore-Rluc (370–450 nm).

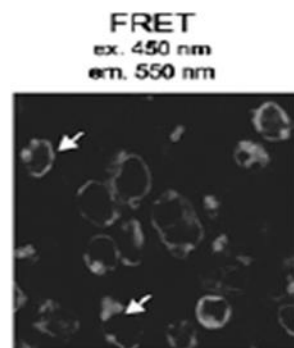
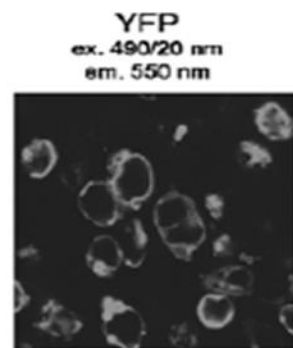
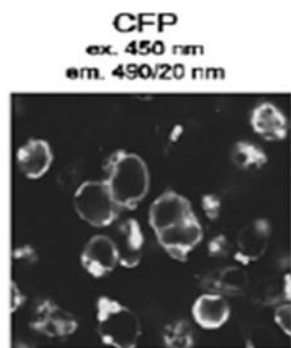
A

Receptors
individually
expressed

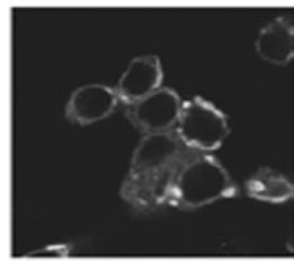
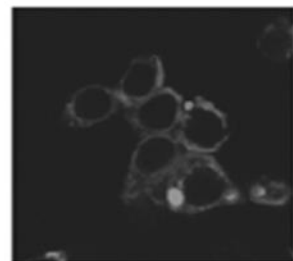
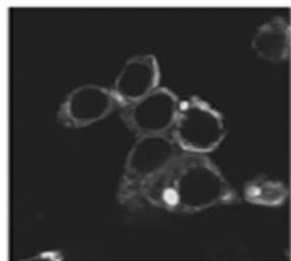


B

GBR2-CFP
+
GBR1a-YFP



GBR1a-CFP
+
GBR1a-YFP



GBR2-CFP
+
GBR2-YFP

