

Laboratorio

Esercitazioni 2012-13

Isolamento e caratterizzazione preliminare di una proteina ricombinante: la Cu,ZnSOD di *Haemophilus ducreyi*

Obiettivi:

- 1) Simulare un esperimento nella sua interezza
- 2) Fornire esempi concreti ed approfondimenti su alcune delle più comuni tecniche di laboratorio, già discusse a lezione: frazionamenti cellulari, cromatografia IMAC, dosaggio proteine (Lowry), applicazioni di base della spettrofotometria e della legge di Lambert-Beer, SDS-PAGE, determinazione PM di una proteina.

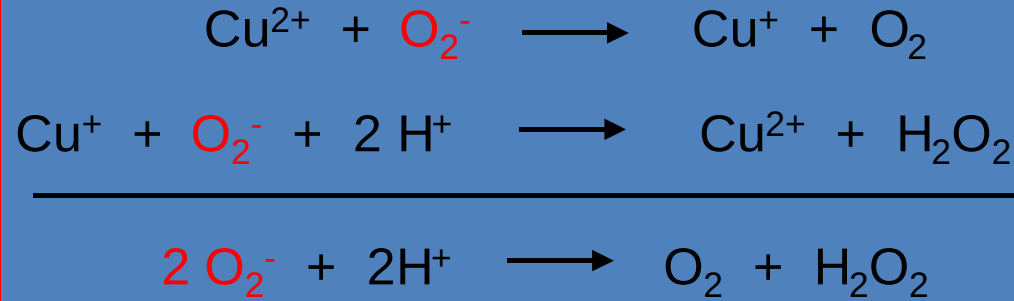
Superoossido dismutasi



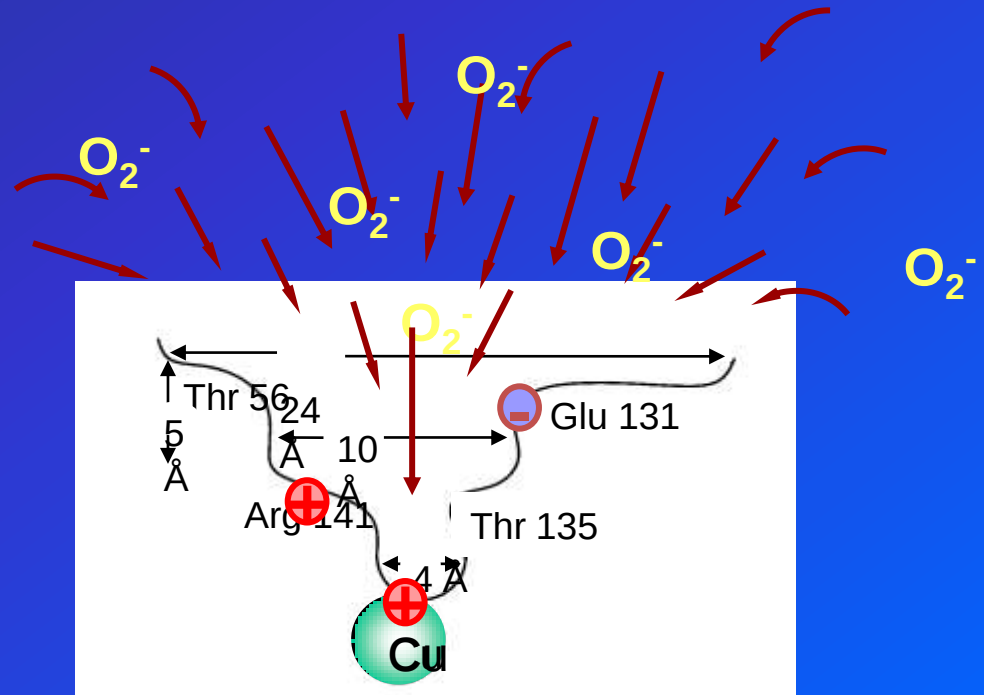
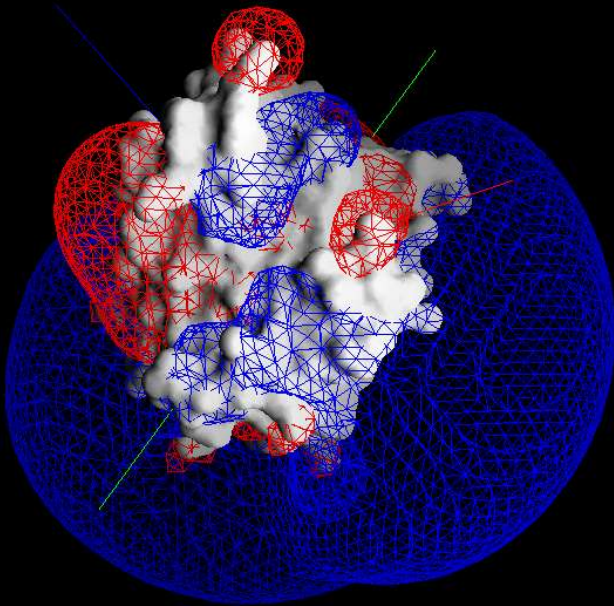
Prokaryotes

MnSOD	→	Prokaryotes and mitochondria	}	sodA	cytoplasmic
FeSOD	→	some plants		sodB	cytoplasmic
Cu,ZnSOD	→	Prokaryotes and all eukaryotes	}	sodC	extracytoplasmic

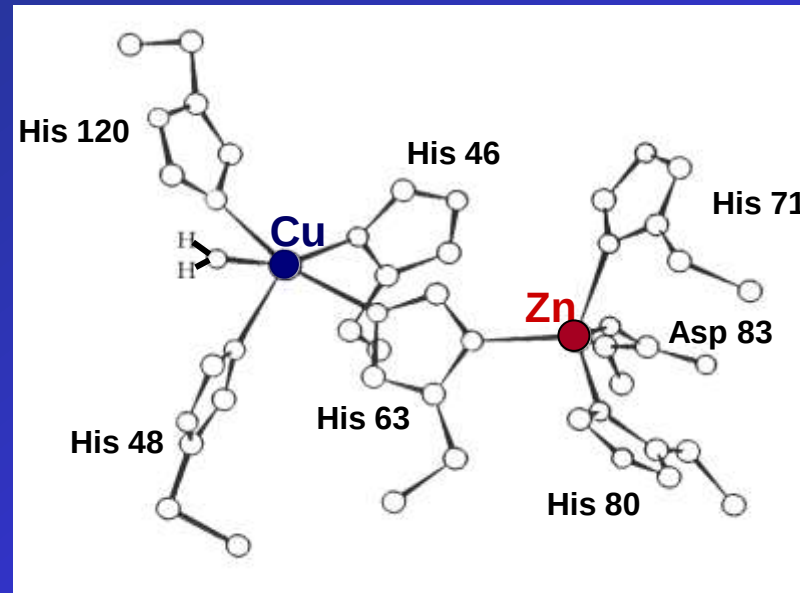
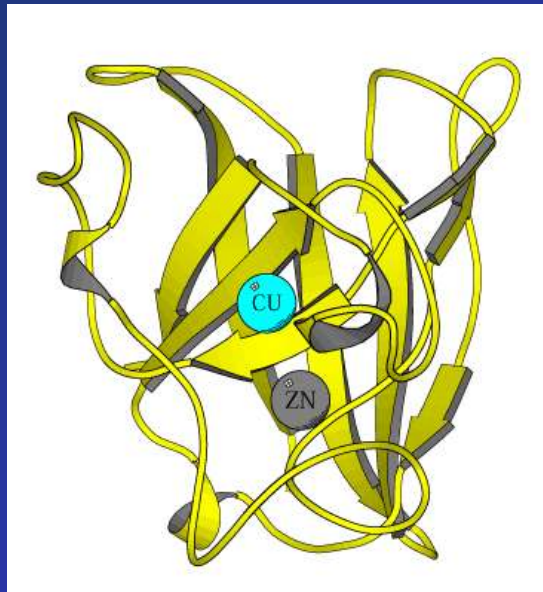
Cu,Zn superossido dismutasi (SOD1)



E. coli wt sito attivo visto di fronte



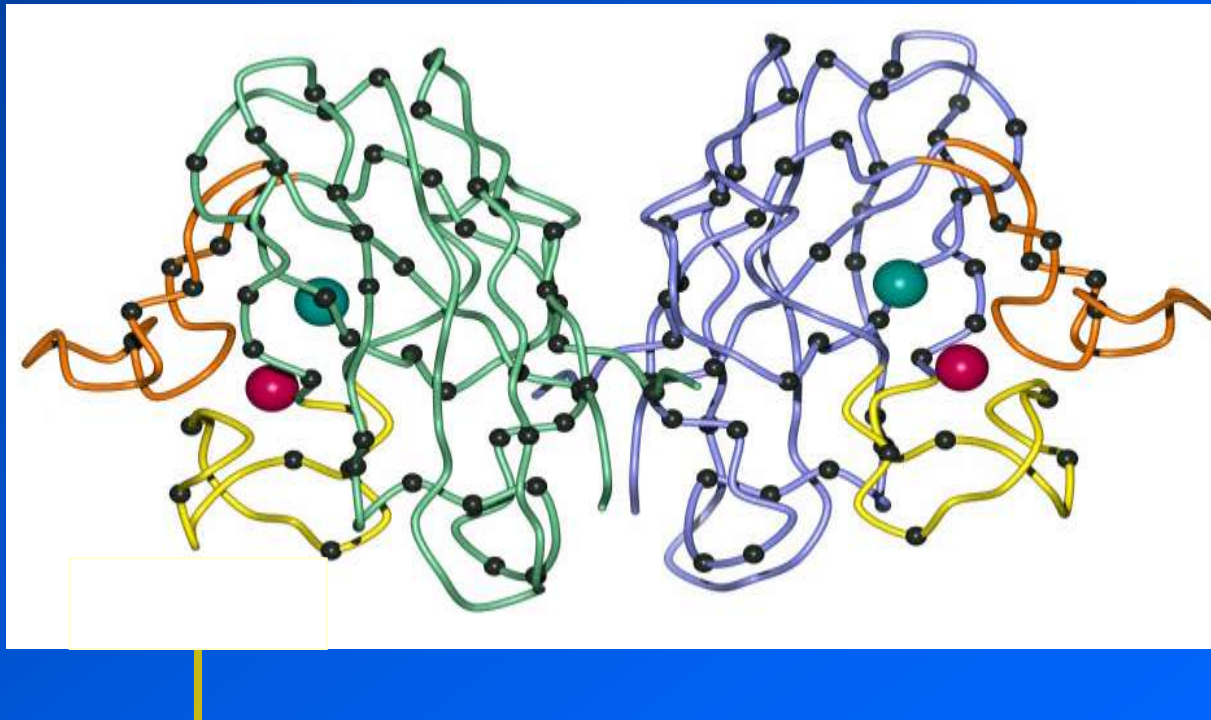
Le Cu,ZnSOD eucariotiche e procariotiche condividono lo stesso ripiegamento a β -barrel ed una simile organizzazione del centro metallico al sito attivo



Tuttavia le Cu,ZnSOD eucariotiche sono caratterizzate da un impressionante livello di conservazione strutturale e funzionale, mentre le varianti batteriche mostrano significative differenze specie-specifiche

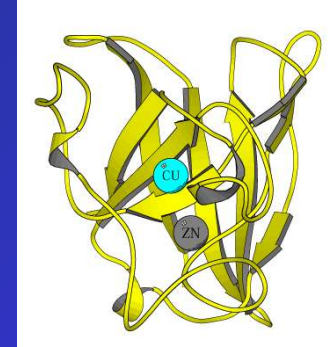
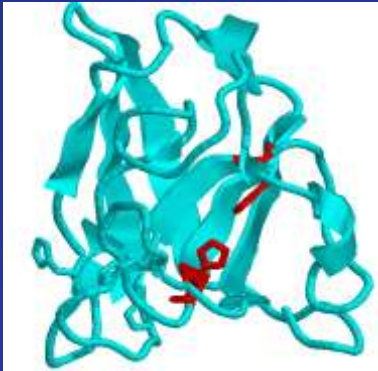
Eukaryotic Cu,ZnSODs do not tolerate mutations

All known mutations in humans (more than 140) are associated to familial forms of Amyotrophic Lateral Sclerosis

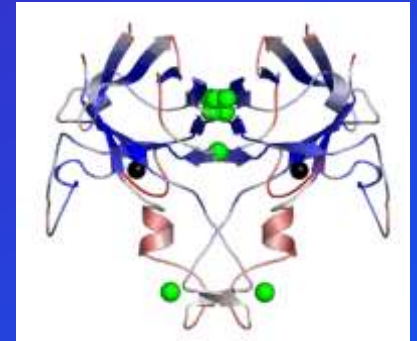


Structural variability in prokaryotic Cu,ZnSODs

Monomeric or dimeric structure

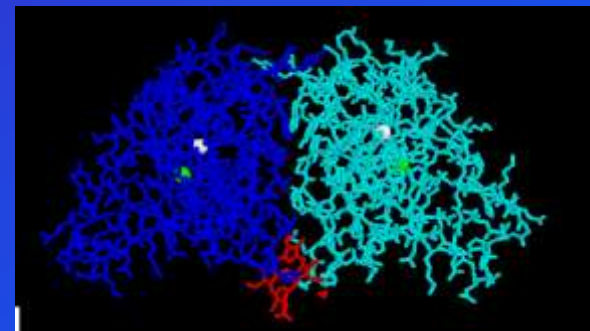


Mutations in the active site metal ligands



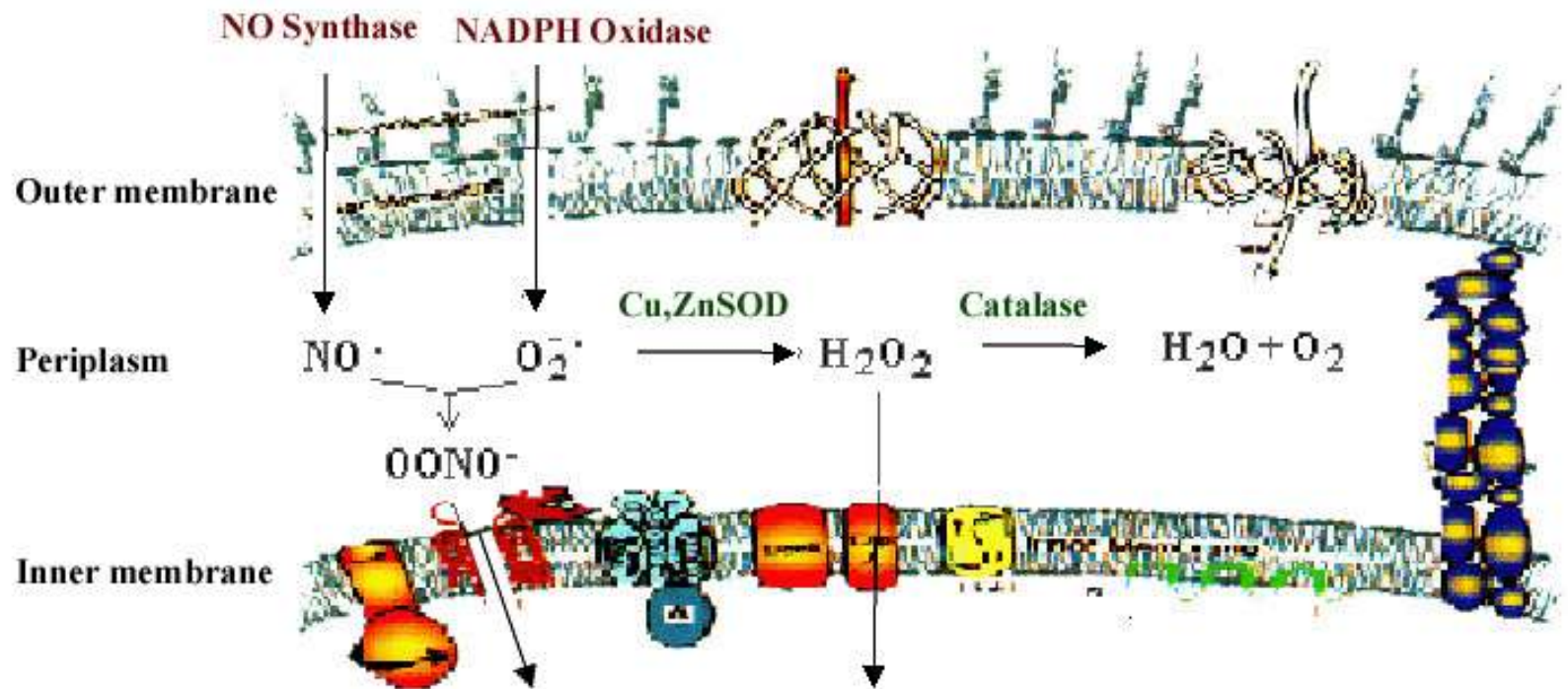
Additional protein domains at C- or N- termini

Ability to bind novel cofactors (i.e. heme)

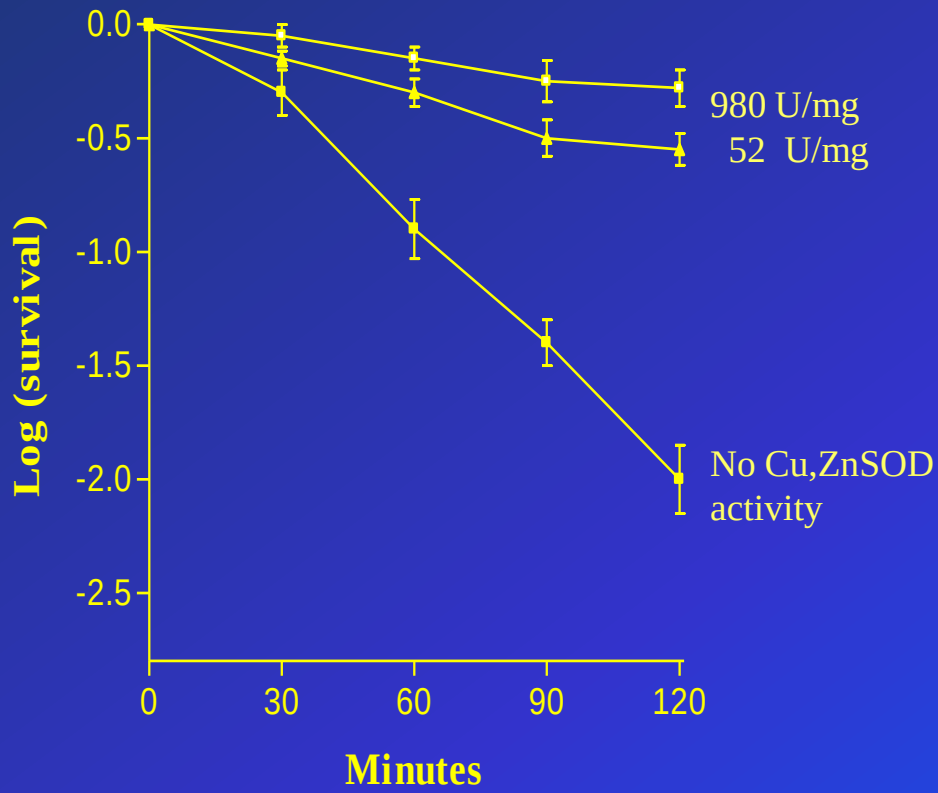


Qual è il significato di questa variabilità
strutturale?

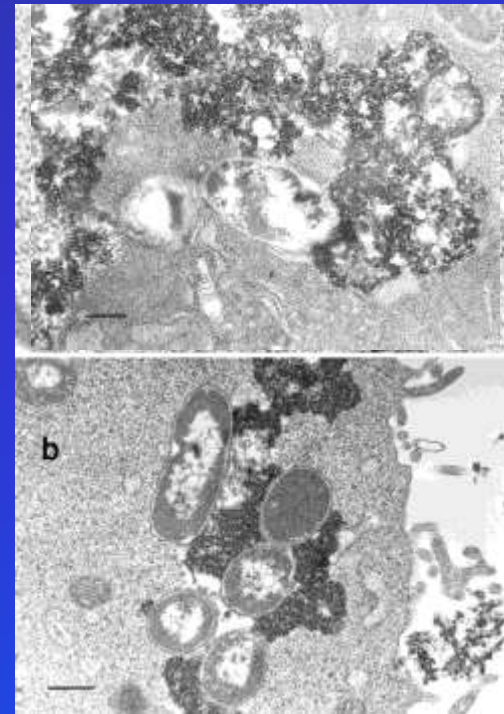
Which is the function of Cu,ZnSOD in bacteria?



Overexpression of periplasmic Cu,ZnSOD protects *E. coli* from phagocytic attack and modulates invasive *E.coli* survival within epithelial cells



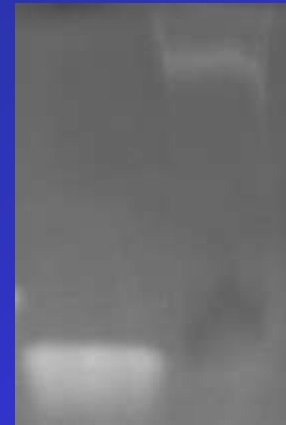
Battistoni et al BBRC 1998



Battistoni et al infect.Immun. 2000

M. tuberculosis sodC is up-regulated in response to phagocytosis by human macrophages

Low activity
in synthetic medium

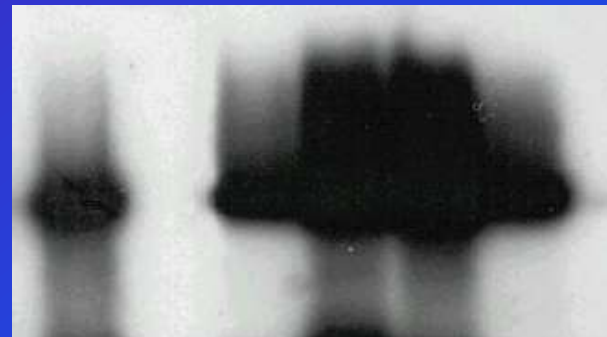


But...

Strong activation of transcription
(more than 10 fold) in infected
macrophages

Detected by RT-PCR

In vitro In macrophages



← sodC

- Periplasmic Cu,ZnSOD protects bacterial cells from killing
- Cu,ZnSOD as a target for therapy in cystic fibrosis ?

Histidine-rich Cu,ZnSOD from *Haemophilus* species

N-terminal His-rich region
constitutes a metal binding domain

	1	10	20	30	40
		-----+	-----+	-----+	-----+
E.coli,				ASEKYENNLYTSQGYGQS	
S.typhimurium-sodC2,				ASEKYENNLYTAQGYGQS	
S.typhimurium-sodC1,				ENTLTYKMDALSSGTGEN	
P.leiognathi,				QDLTYKMTDLQTG-KP	
H.ducreyi	<u>HGDHMHNHDT</u>	KNDTMSKDMMSHEKIYYPY	QQQLDPQNGNKD		
a.pleuropneumoniae,		<u>HADHDHKKADN</u>	SSYEKLYYQYQQQLDPYKGNKD		
H.parainfluenzae,			<u>HDHMAKPAGPS</u>	IEYKYQQQLDPANGNKD	
H.influenzae,			<u>HDHMAKPAGPS</u>	IEYKYQQQLDPANGNKD	
N.meningitidis,			<u>HEHNTIPKGAS</u>	IEYKYQQQLDPYNGNKD	

Cromatografia **per affinità**

Fase stazionaria : granuli di resina coniugata al ligando

Fase mobile: solventi acquosi

Uso comune: separazione di proteine



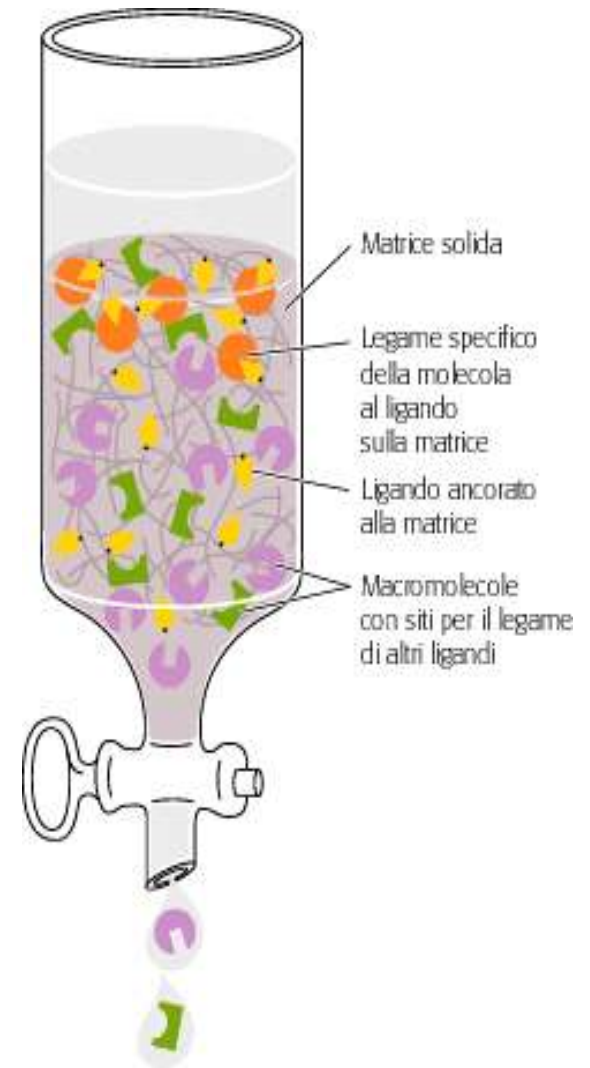
molecola A



Ligando specifico
per la molecola A

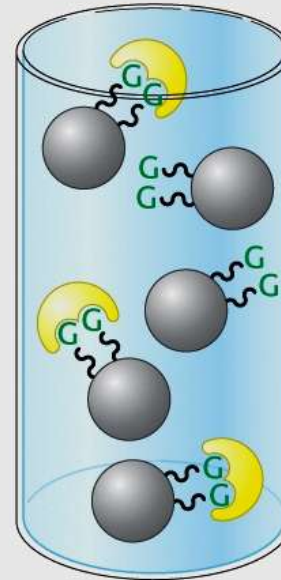


Altre molecole
non affini al ligando

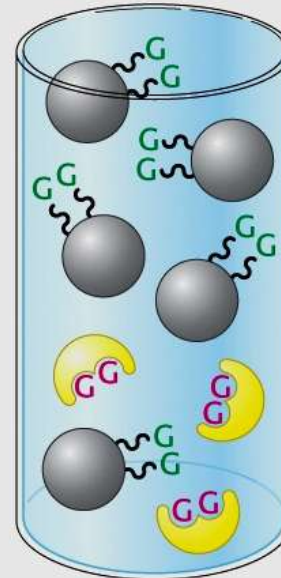


Cromatografia per affinità

Glucose-binding protein attaches to glucose residues (G) on beads

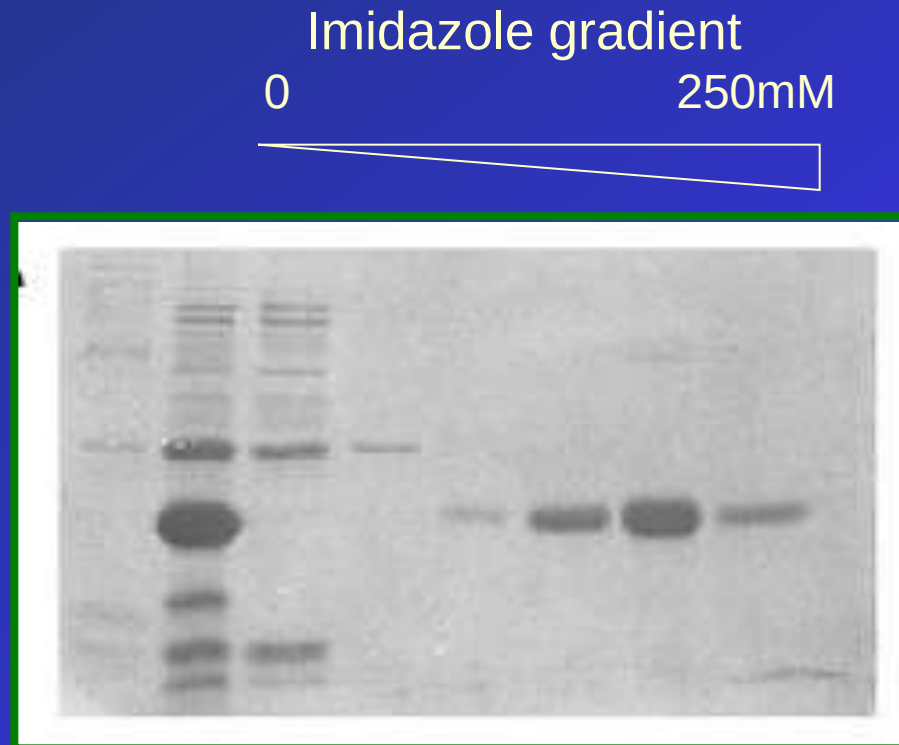


Addition of
glucose (G)

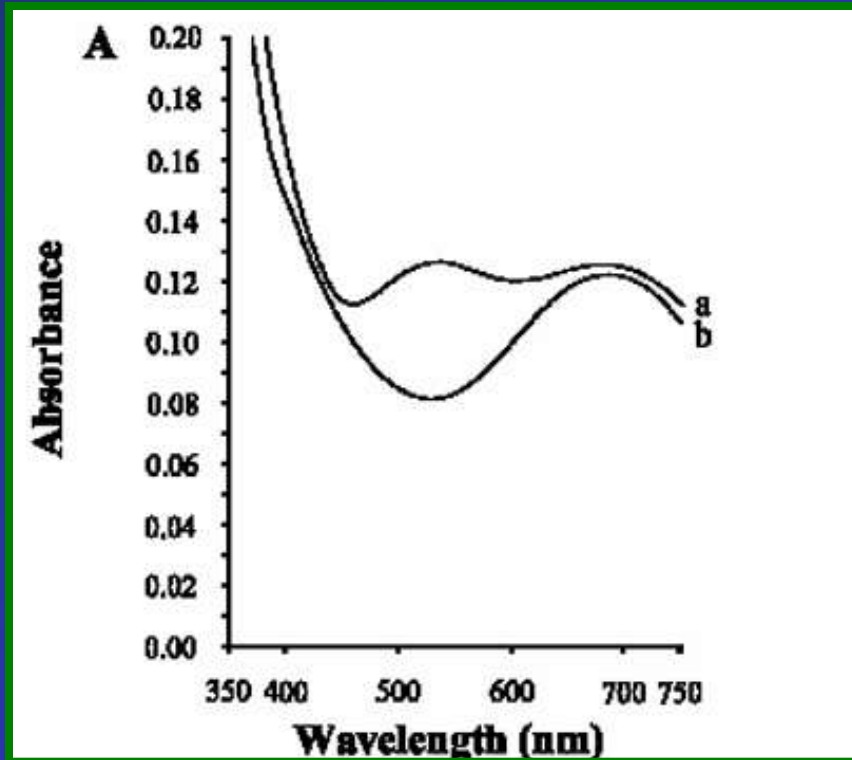


Glucose-binding proteins are released on addition of glucose

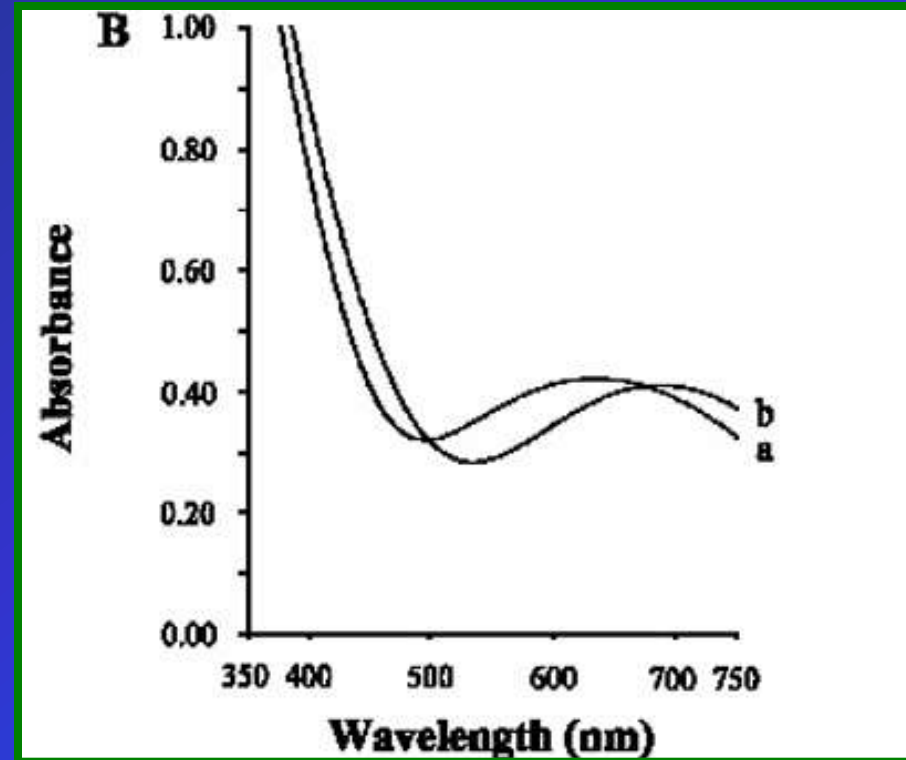
His-rich N-terminal extensions confer high affinity for immobilized metal ions to the Cu,ZnSODs from *H. ducreyi*



The Cu,ZnSODs from *H. ducreyi* and *H. parainfluenzae* display anomalous spectroscopic features

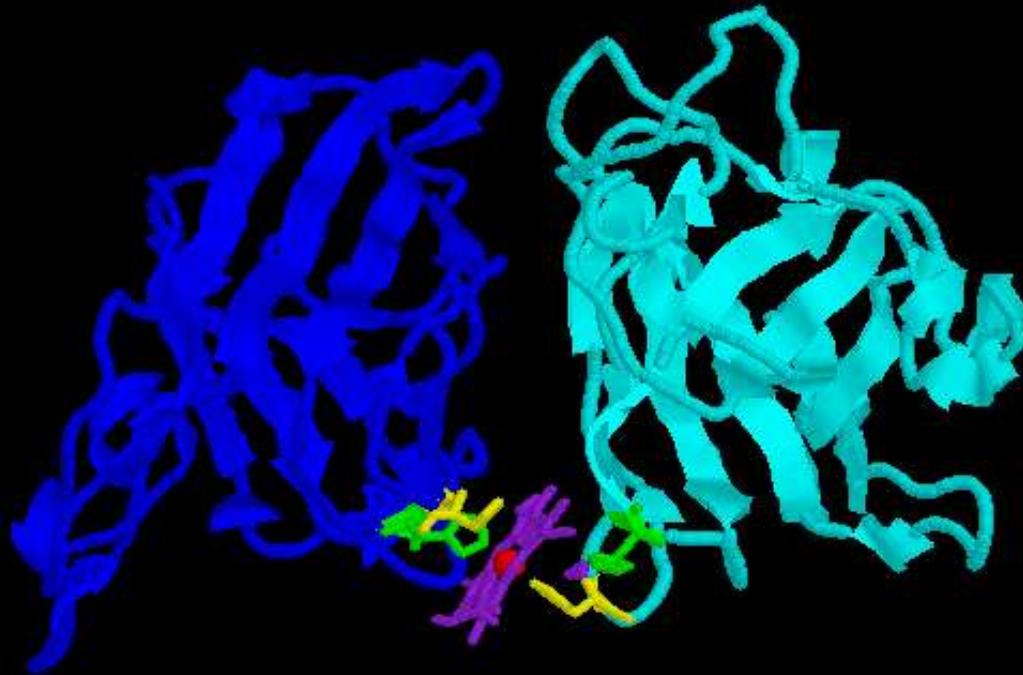


H. parainfluenzae
Cu,ZnSOD



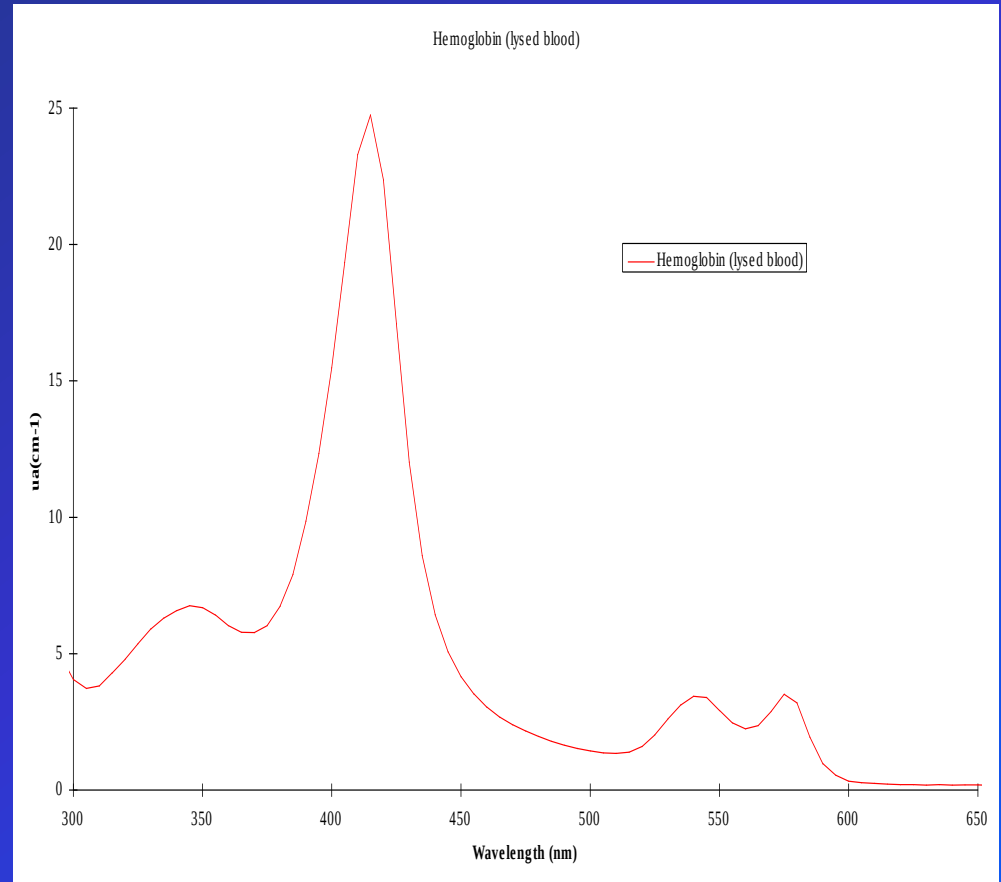
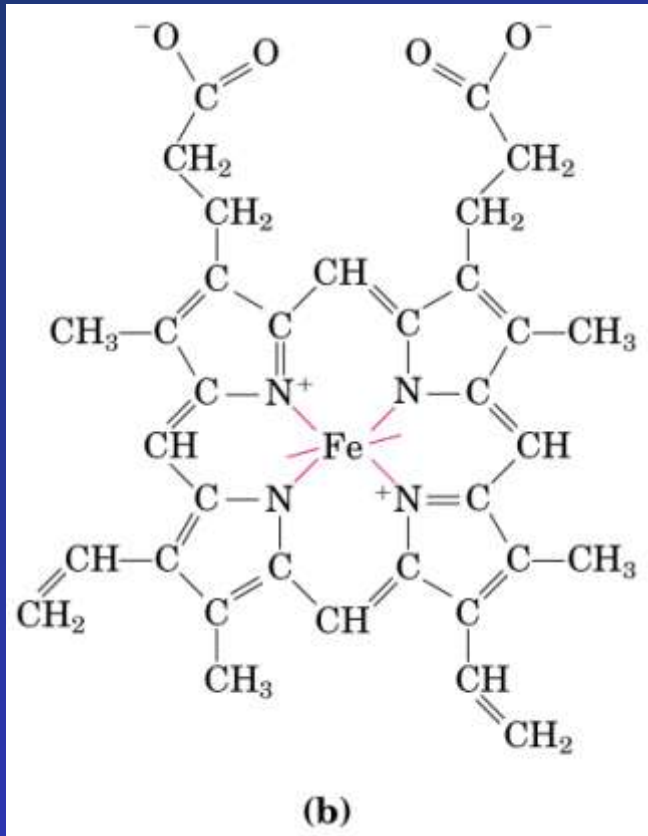
H. ducreyi
Cu,ZnSOD

The Cu,ZnSOD from *Haemophilus ducreyi* binds heme at the dimer interface

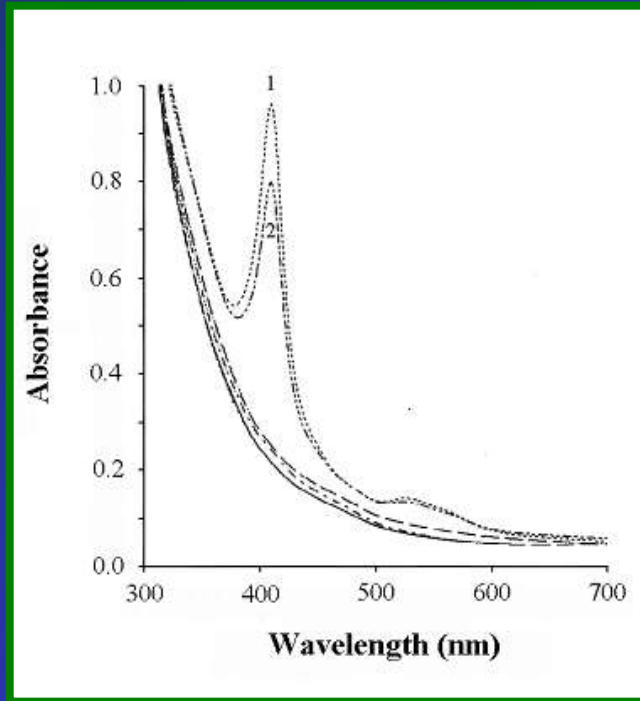


His 64
His 124

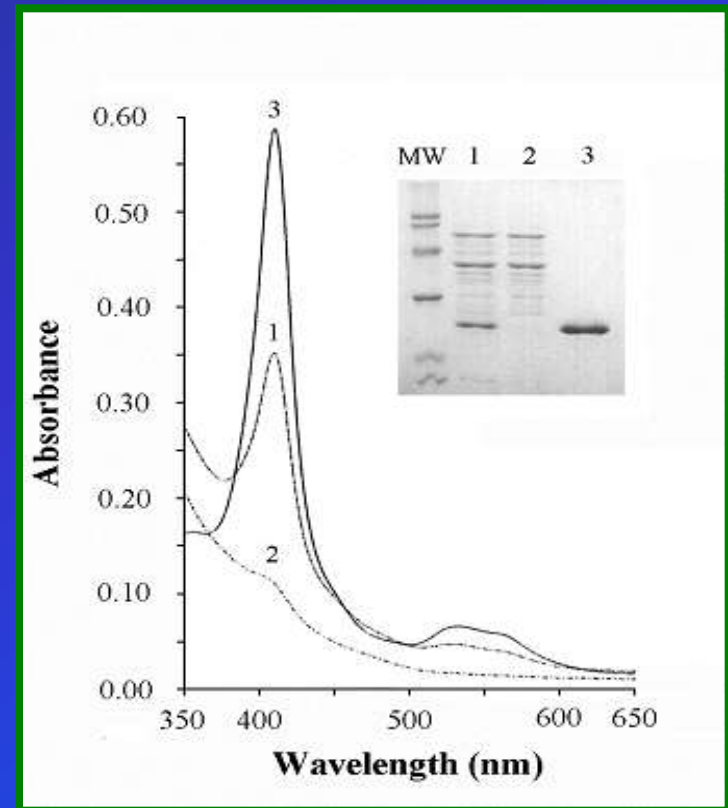
Spettro uv/vis dell'emoglobina



The periplasm of bacteria expressing *H. ducreyi* Cu,ZnSOD accumulates heme



Nearly all this heme is associated to Cu,ZnSOD



Why Cu,ZnSOD from *H.ducreyi* binds heme?

- a) By mere chance
- b) Cu,ZnSOD sequesters excess heme in case of overload, thus preventing oxy-radical damage
- c) Heme confers novel catalytic activities to the enzyme (small ligand sensor?)
- d) Cu,ZnSOD participates to, or modulates the activity of periplasmic heme transport routes

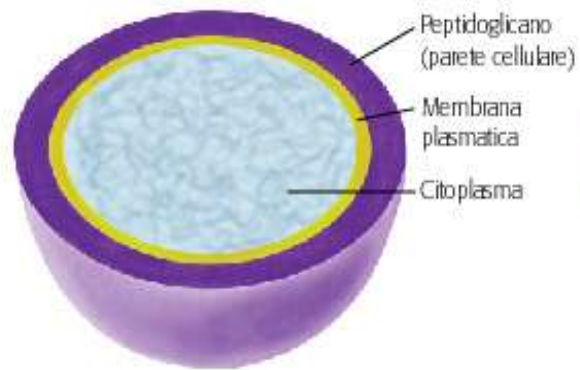
Esercitazione:

Estrazione proteine periplasmatiche

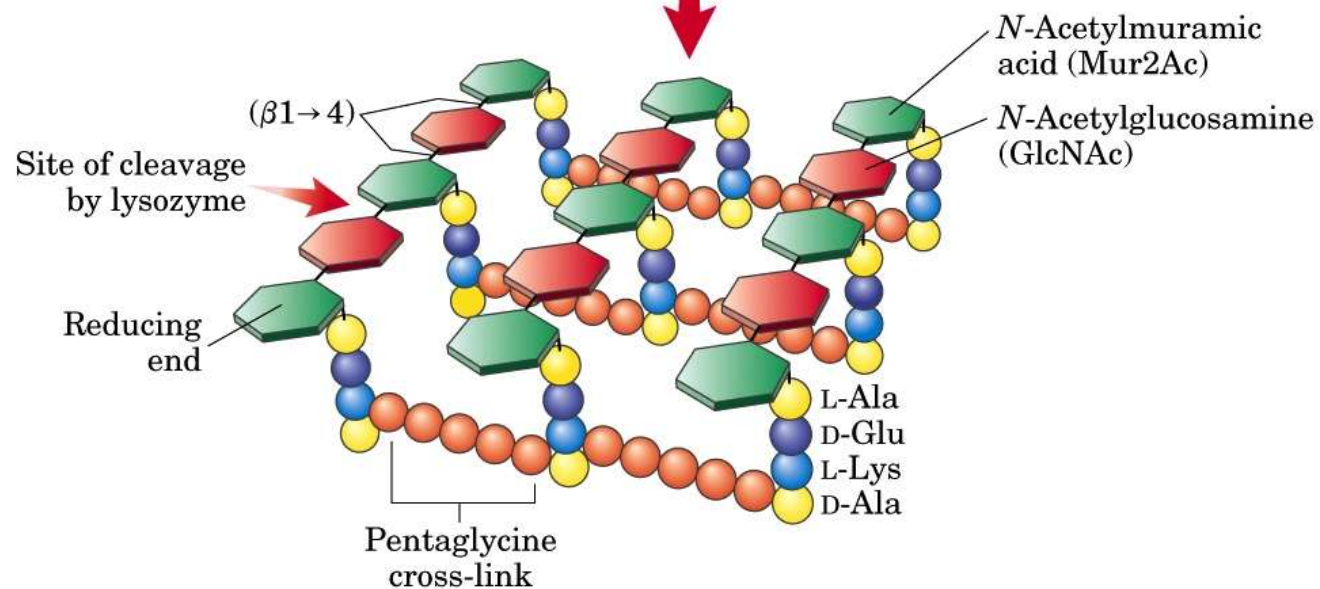
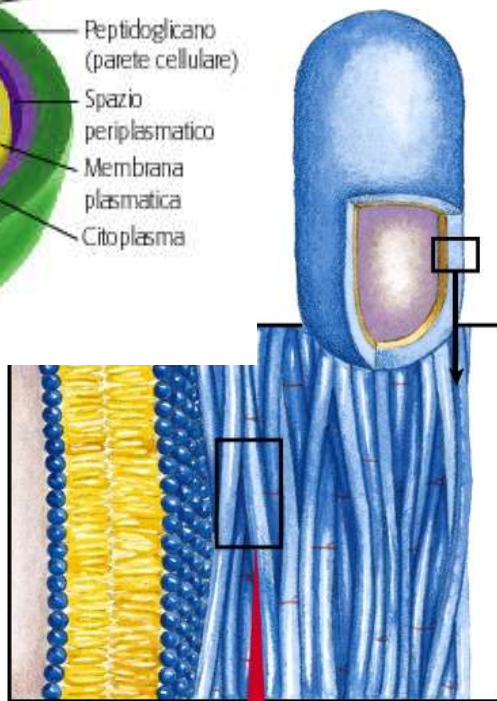
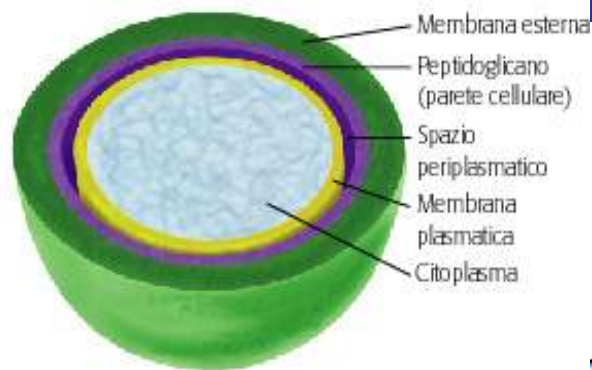
DOMANDE:

- 1) Come sovraesprimere una proteina?
- 2) C'è un vantaggio nel fare esprimere una proteina ricombinante in un compartimento rispetto ad un altro?
- 3) Perché frazionare?
- 4) Come separare le proteine periplasmatiche da quelle citoplasmatiche

(a) Batteri gram-positivi



(b) Batteri gram-negativi



Esercitazione:

Purificazione Cu,ZnSOD

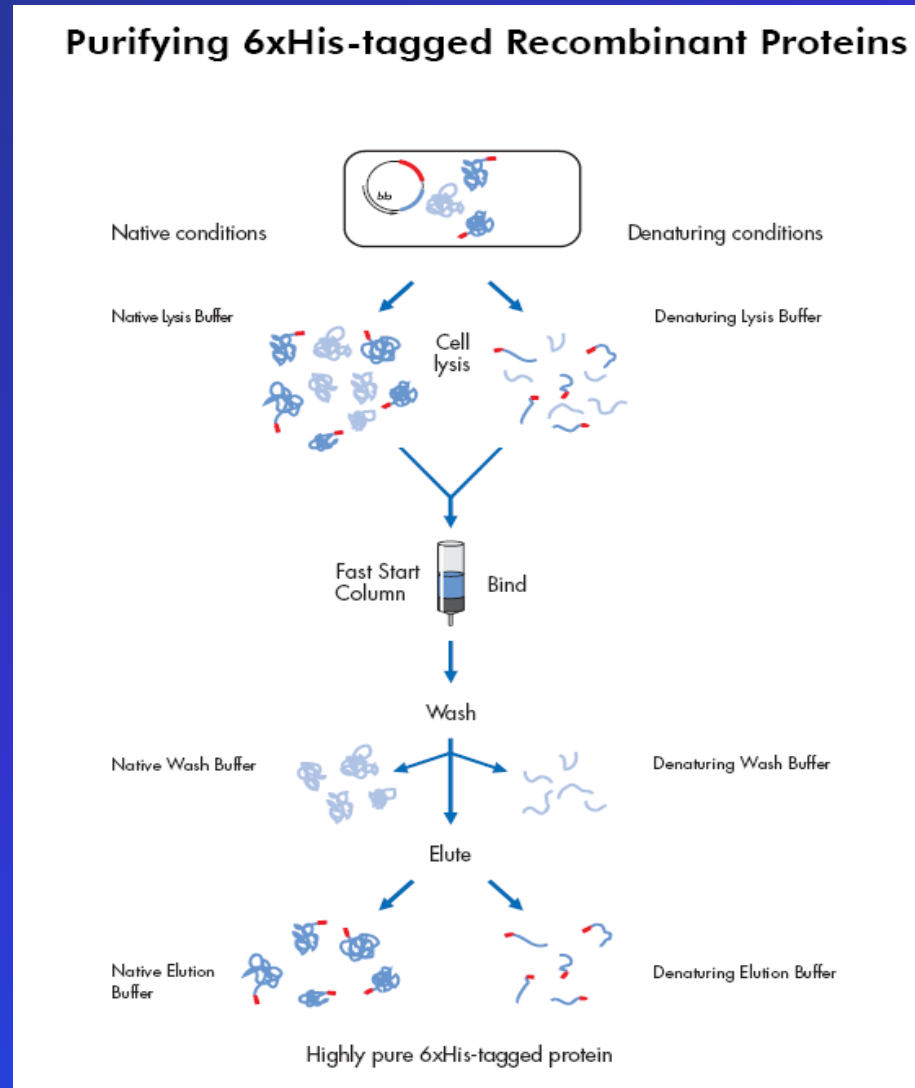
- DOMANDE:
- Come può essere purificata una proteina in un solo passaggio cromatografico?
- E' possibile modificare le proteine per favorirne la purificazione?
- Come si può controllare il successo della procedura?

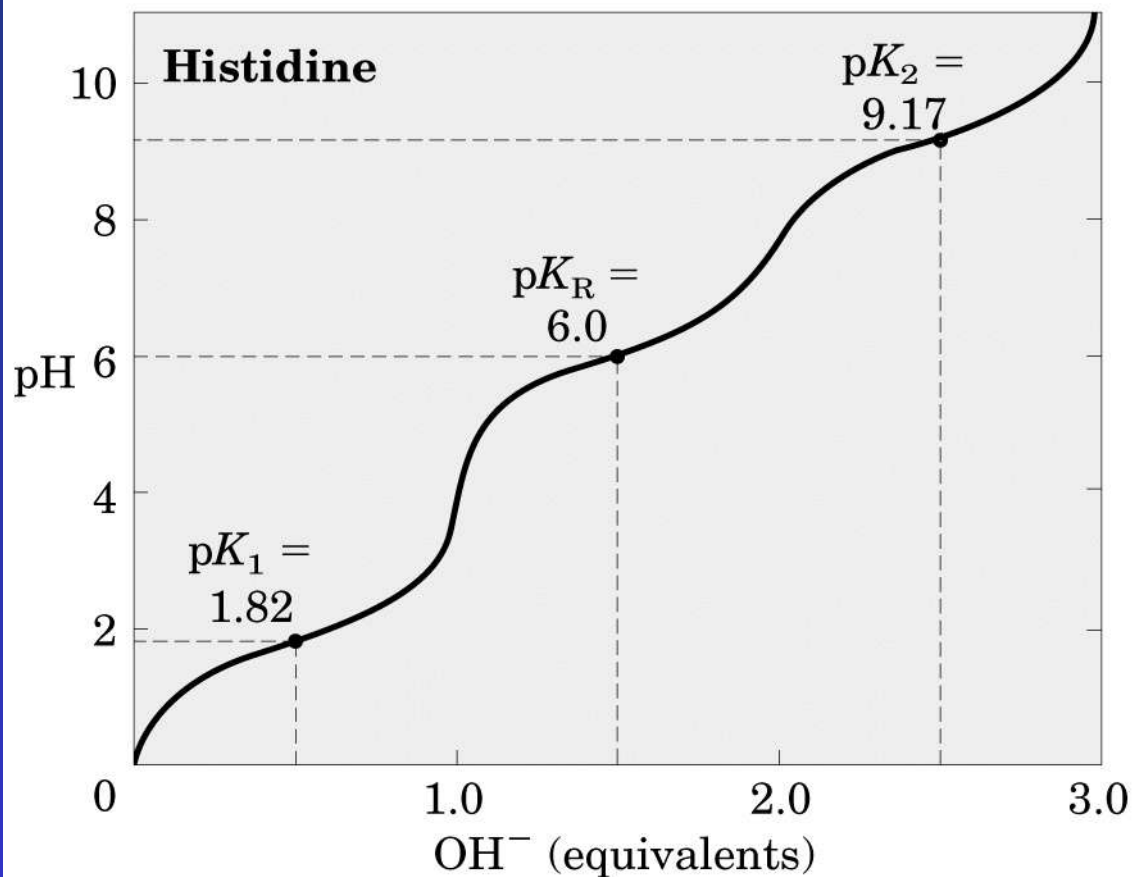
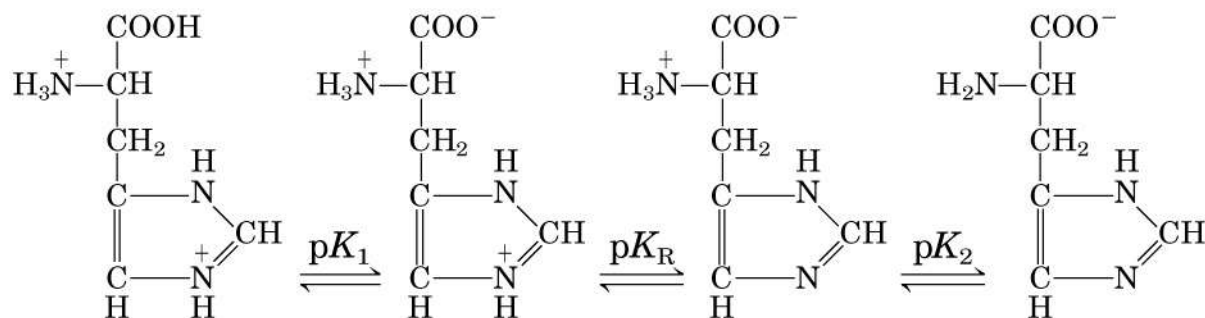
Esercitazione: Cromatografia di affinità IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromathography)

Uno dei metodi più comuni è quello di inserire delle sequenze di poli-istidina ad una delle estremità della proteina da purificare.

Quali sono le proprietà dell'istidina?????

STUDIARE!





(b)

Cromatografia di affinità IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromathography)



Ni-Nitrilotriacetic acid

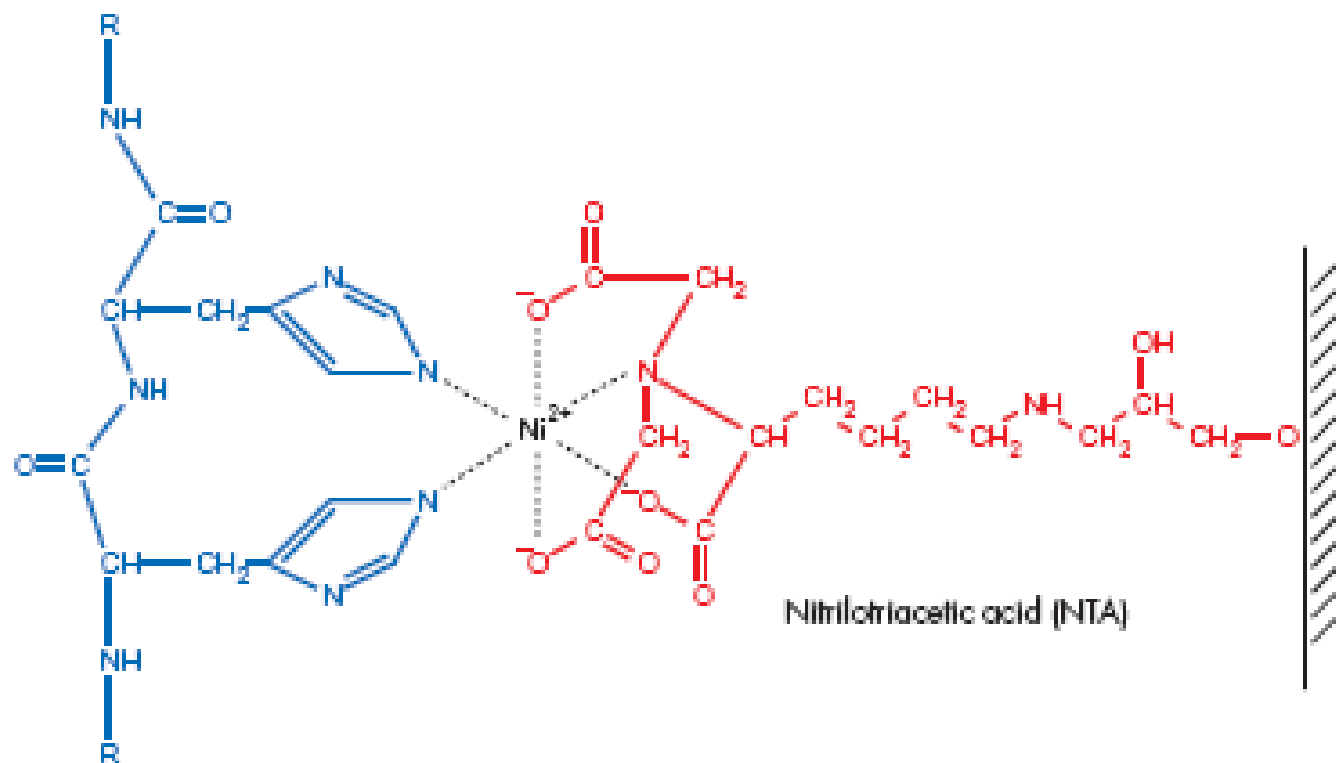
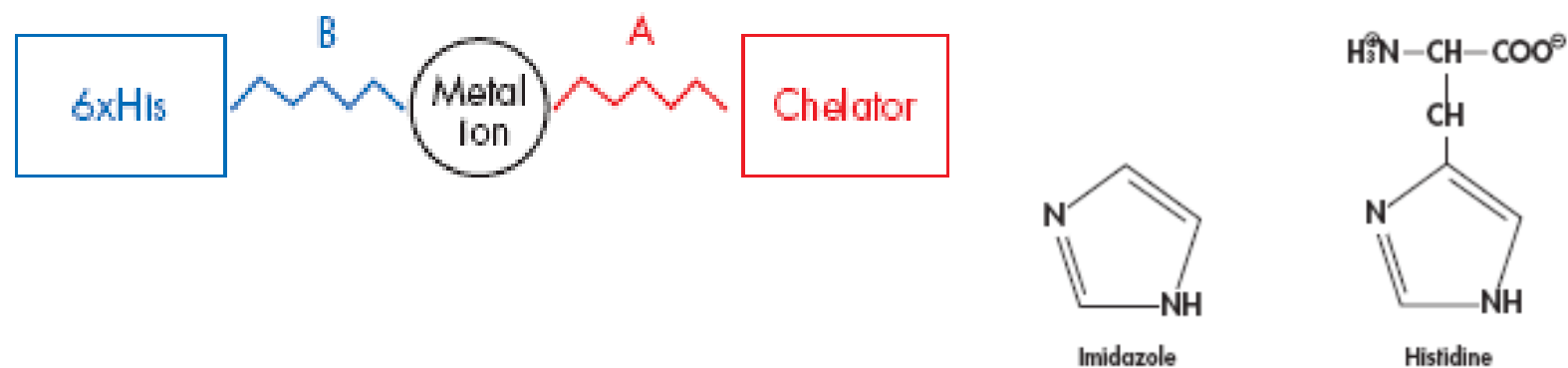


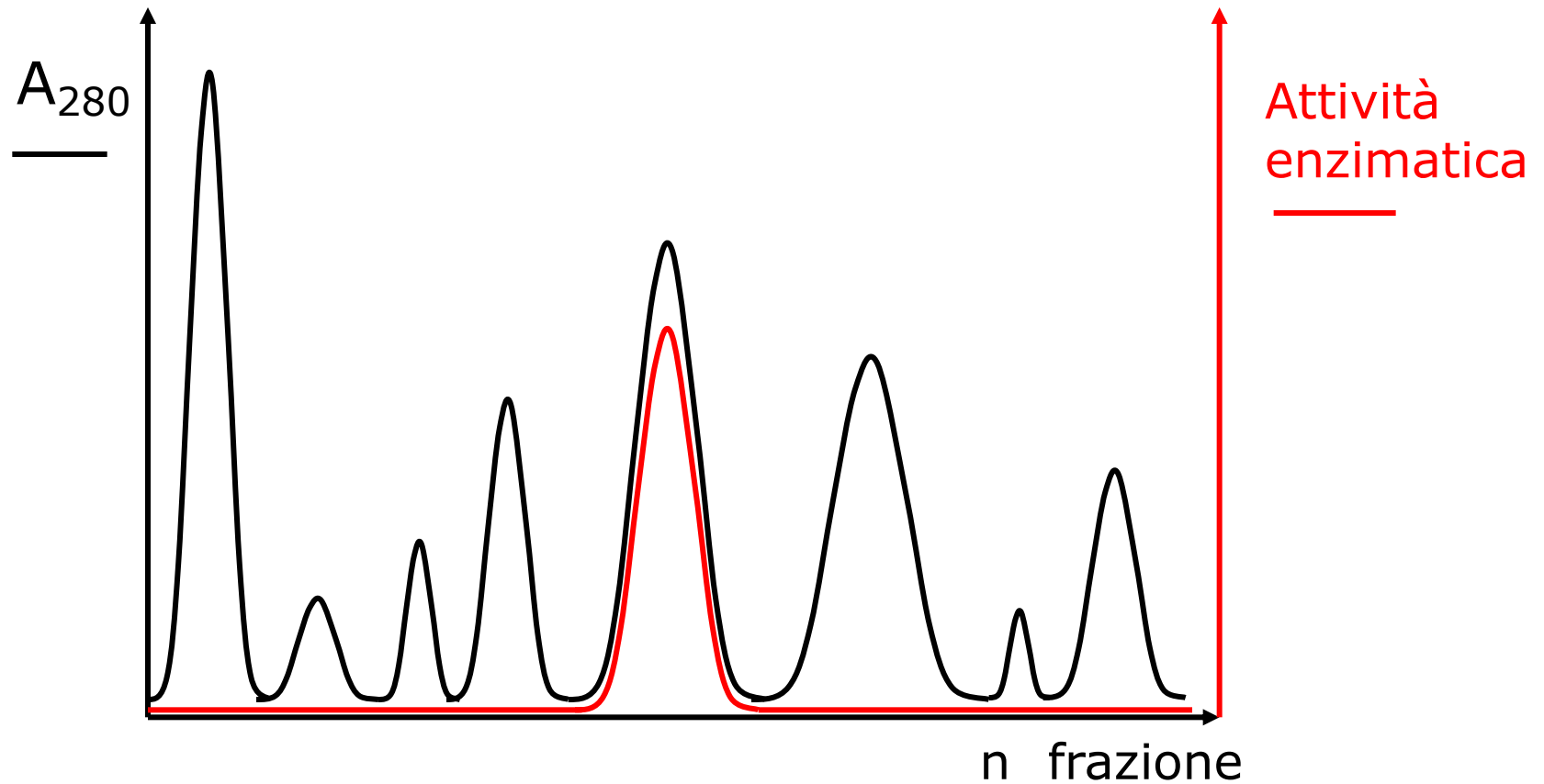
Figure 4. Interaction between neighboring residues in the 6xHis tag and N-NTA matrix.



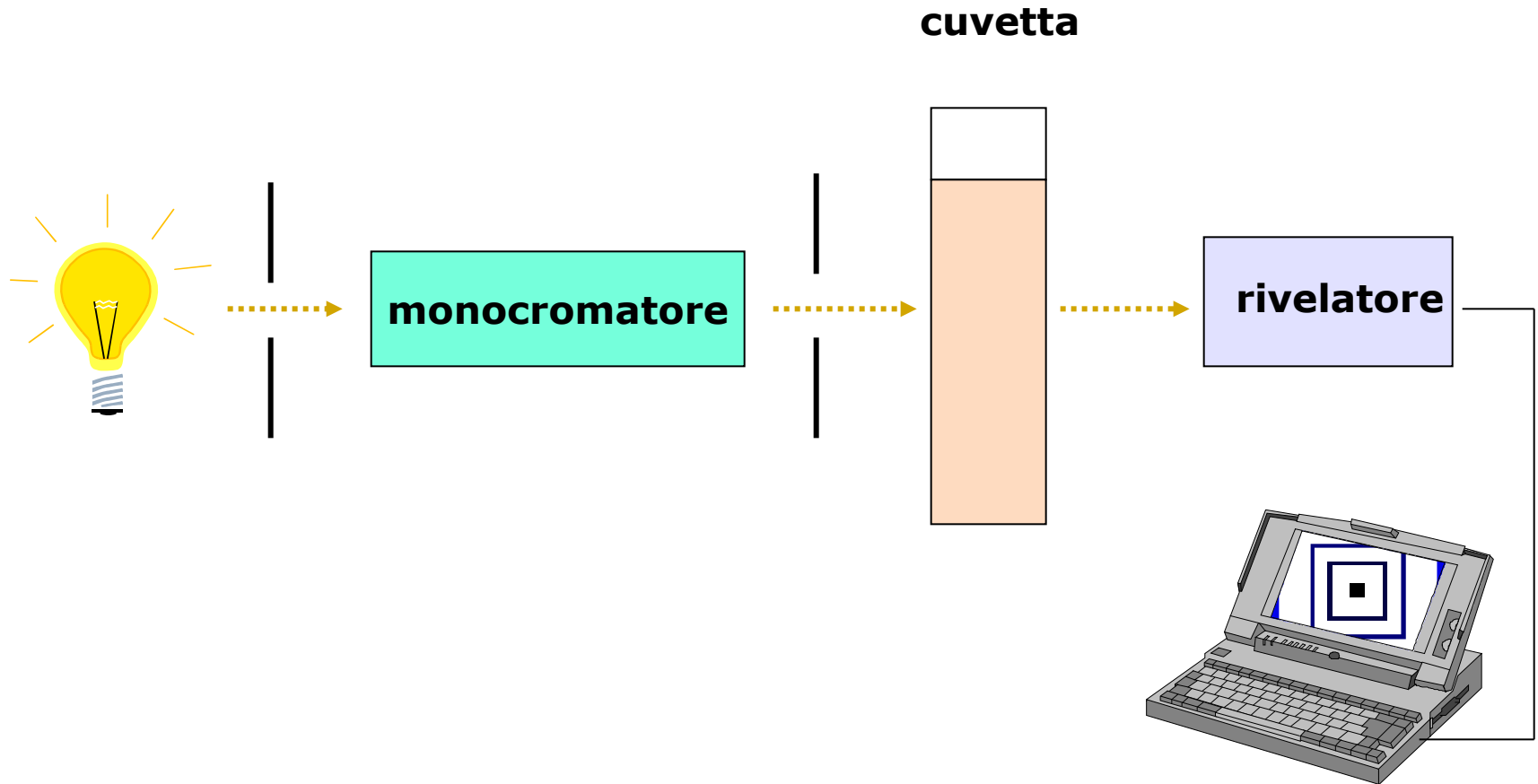
La SOD di *H. ducreyi* possiede un His-Tag naturale.

	1	10	20	30	40
		-----+	-----+	-----+	-----+
E.coli,				ASEKYEHNLVTSQGVGQS	
S.typhimurium-sodC2,				ASEKYEHNLVTAQGVGQS	
S.typhimuriumsodC1,				ENTLTYKMDALSSGTGEN	
P.leiognathi,				QDLTYKMTDLQTG-KP	
H.ducreyi	<u>HGDHMH</u>	NHDTKMDTMSKDMMSMEKIYYPYQQLPQNGNKD			
a.pleuropneumoniae,		<u>HADHDH</u>	KKADMSSYEKLYYQYQQLPYKGNKD		
H.parainfluenzae,			<u>ADHMAK</u>	PAGPSIEYKYQQLPANGNKD	
H.influenzae,			<u>ADHMAK</u>	PAGPSIEYKYQQLPANGNKD	
N.meningitidis,			<u>HEHNTI</u>	PKGASIEYKYQQLPYNGNKD	

Individuazione delle frazioni contenenti l'enzima purificato



Spettrofotometro



Esercitazione:

Dosaggio delle proteine

Domanda: come si misura la concentrazione delle proteine in soluzione ?

La legge di Lambert e Beer

$$A = \epsilon_{\lambda} c l$$

A = assorbanza alla lunghezza d'onda λ

ϵ_{λ} = coeff. di estinzione molare

c = concentrazione molare

l = lunghezza del cammino ottico (1 cm)

Si può usare per una proteina **PURIFICATA** oppure se si è sicuri che a λ utilizzata ci sia **un'unica componente** in grado di assorbire

Determinazione della quantità di proteina: Metodo di **Lowry** – modifica del metodo di Biuret

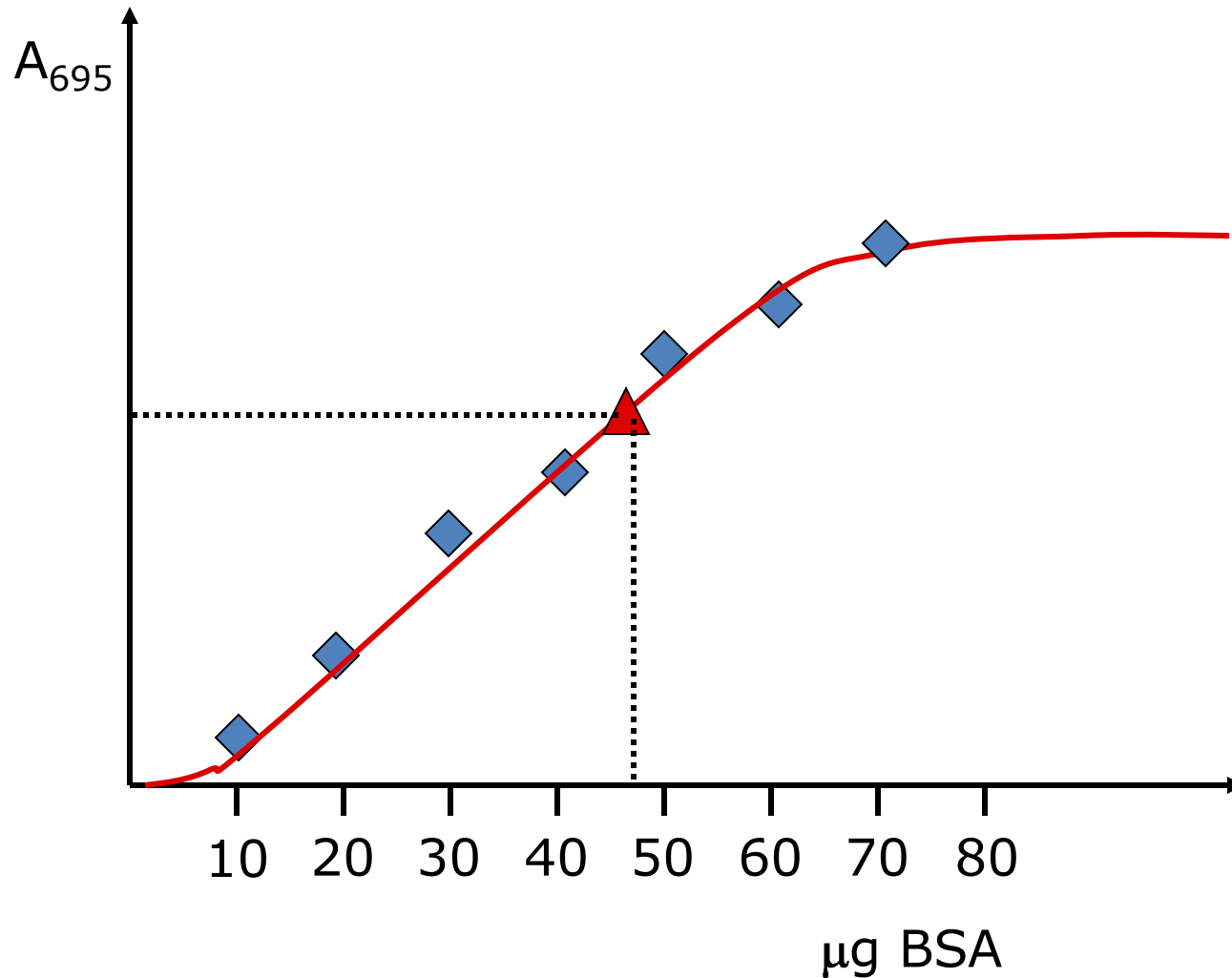
Principio: formazione di complessi colorati

- a) Reazione di Biuret
- b) Reazione del Cu(I) con un reagente complesso (reattivo di Folin – contenente molibdato, tungstato e fosfato di sodio) con sviluppo di una colorazione blu intensa.

Svantaggi : Interferenze con tamponi comuni (TRIS, HEPES, PIPES) e detergenti, dipendenza da specie proteiche, limitata linearità

Vantaggi : riproducibilità rispetto allo standard, sensibilità

Determinazione per **interpolazione grafica** rispetto ad una **curva standard**



Esercitazione: SDS-PAGE

Domande:

Come è possibile verificare la purezza di una proteina purificata?

Come è possibile determinarne il PM approssimativo?

Come è possibile determinare la composizione in subunità di una proteina?

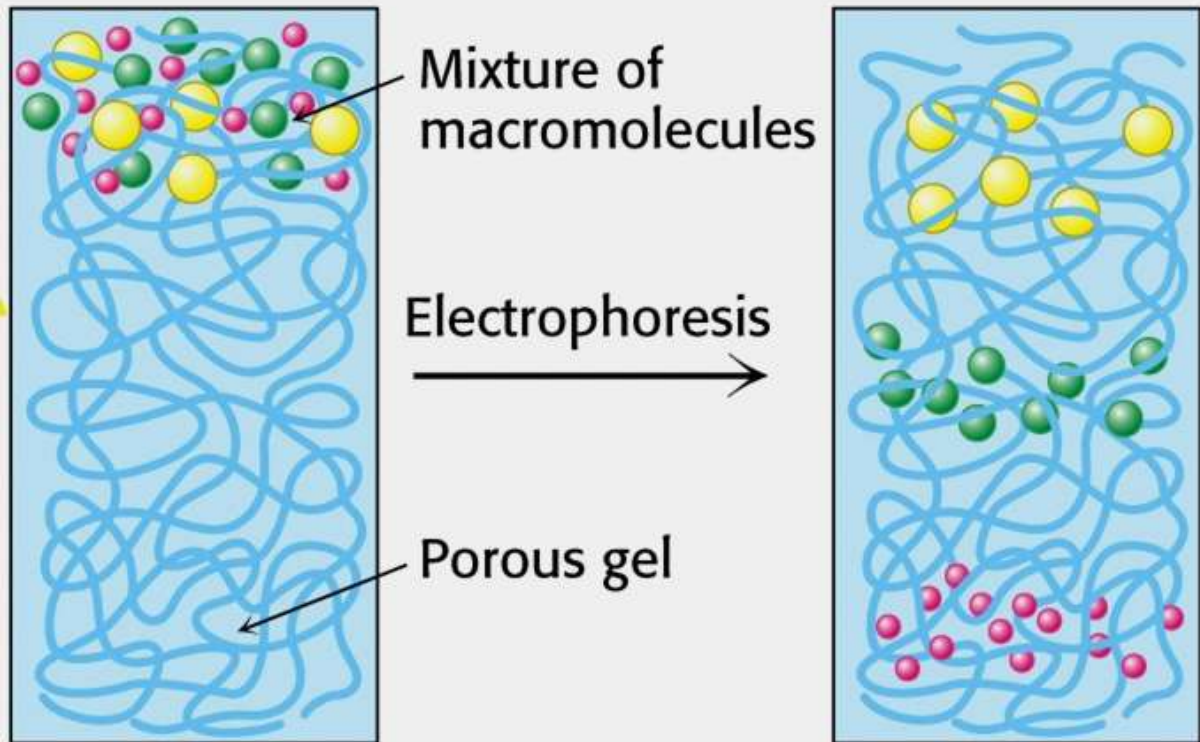
Elettroforesi : movimento (e separazione) di molecole cariche in un campo elettrico

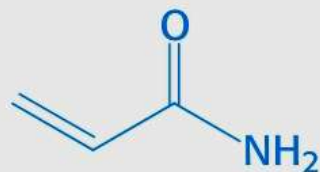
Molte molecole di interesse biologico possiedono gruppi ionizzabili. In opportune condizioni di pH presentano una carica elettrica + o – e quindi sono in grado di migrare in un campo elettrico.

Il supporto agisce da setaccio molecolare



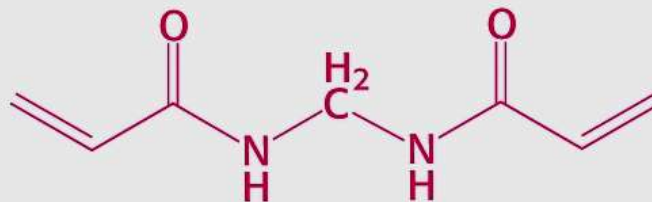
(B)





Acrylamide

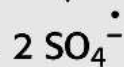
+



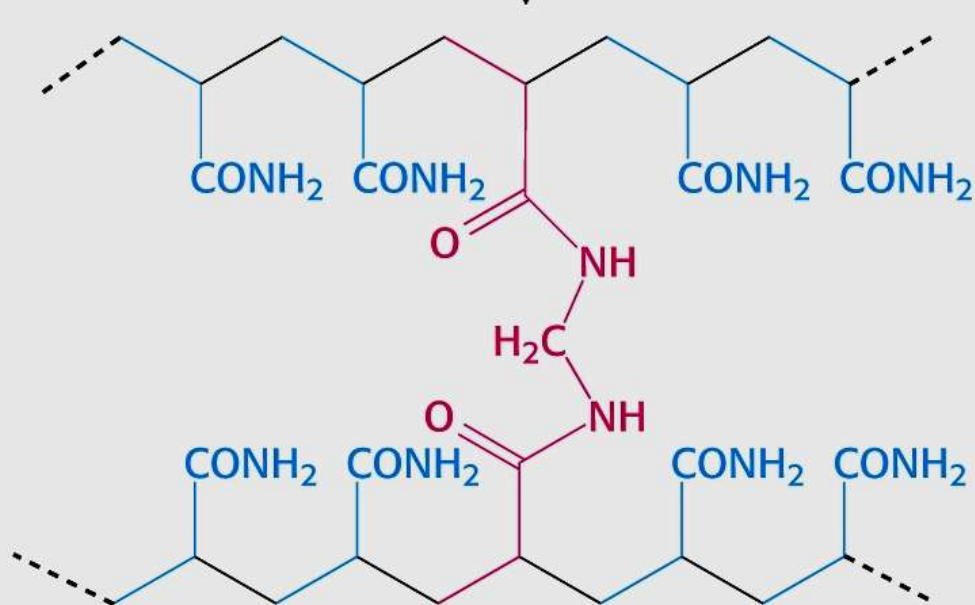
Methylenebisacrylamide



(persulfate)

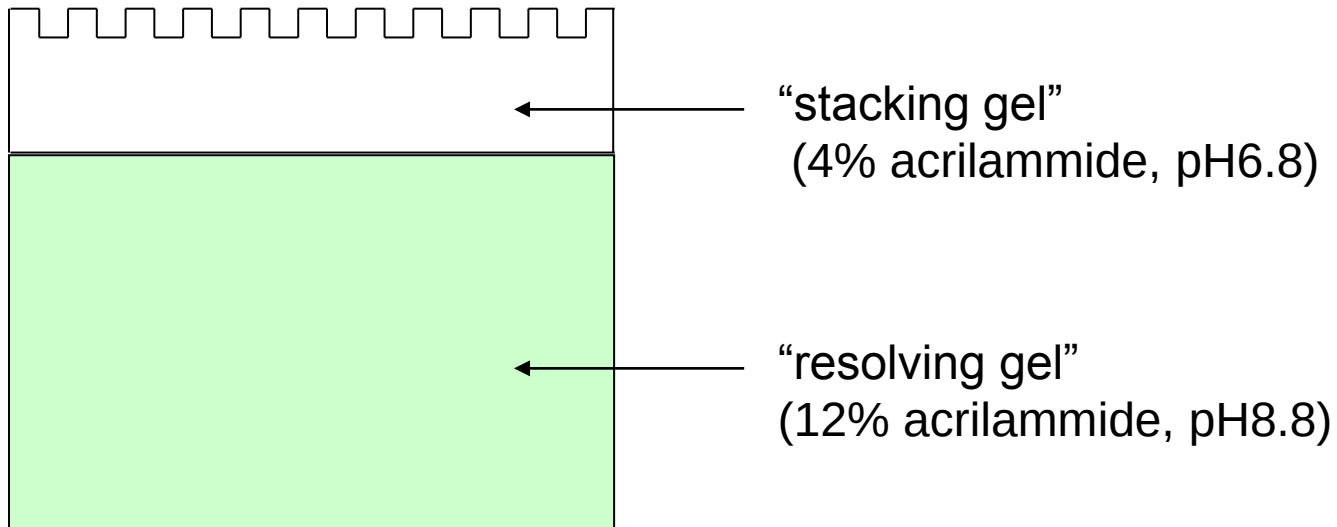


(sulfate radical,
initiates polymerization)

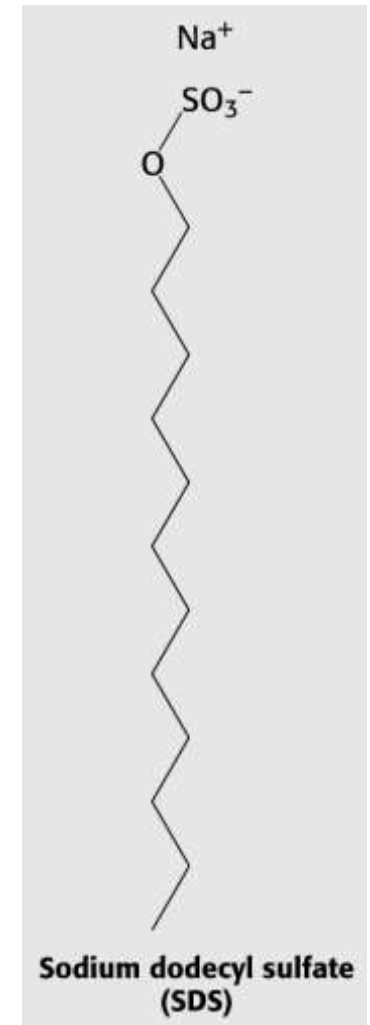


Discontinuous SDS-PAGE

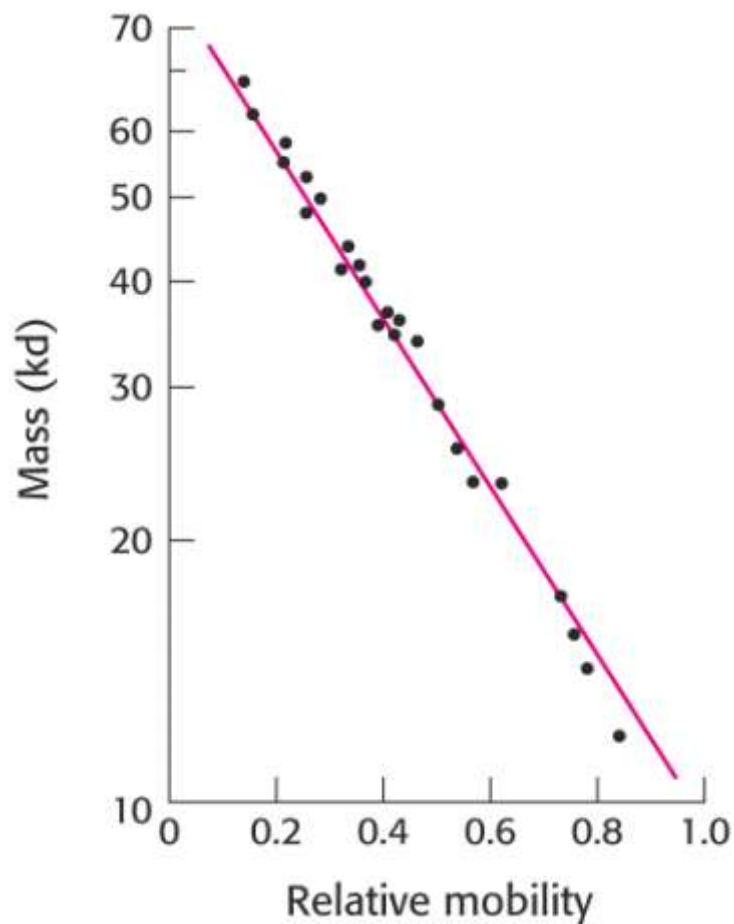
Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis in SDS



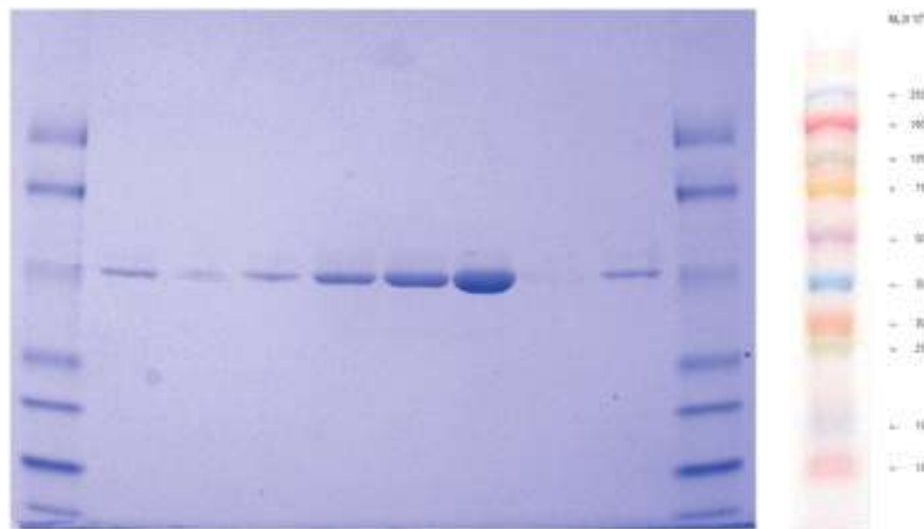
1g di proteina si lega a circa 1,4 g di SDS



Determinazione del PM di una proteina mediante SDS-PAGE



In un gel di acrilammide e SDS la mobilità relativa di una specie molecolare è proporzionale al log della massa molecolare.



Portare :

- Camice
- Matita e gomma
- Calcolatrice
- Righello

La frequenza è obbligatoria

Mart.- Merc.- Giov dalle 14 al PP1