

PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS

Consequences

- **Alter the kinetic properties of enzymes:** changes at the level of substrate binding or at the level of an allosteric effect.
- **Allow for substrate channeling** by moving a substrate between or among subunits.
- **Create a new binding site**, typically for small effector molecules.
- **Inactivate or destroy a protein.**
- **Change the specificity of a protein** for its substrate through interaction with different binding partners.
- **Regulatory role** in either an upstream or a downstream action (pathways).

PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS

“**System biology** is the study of an organism, viewed as an **integrated** and **interacting network** of genes, **proteins**, and biochemical reactions which give rise to life.”



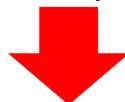
Studio del network d'interazioni molecolari tra proteine è parte integrante della system biology



Una volta che i partner molecolari di una determinata molecola sono stati **isolati**, i diversi approcci proteomici portano ad ottenere **l'identità** dei vari partner

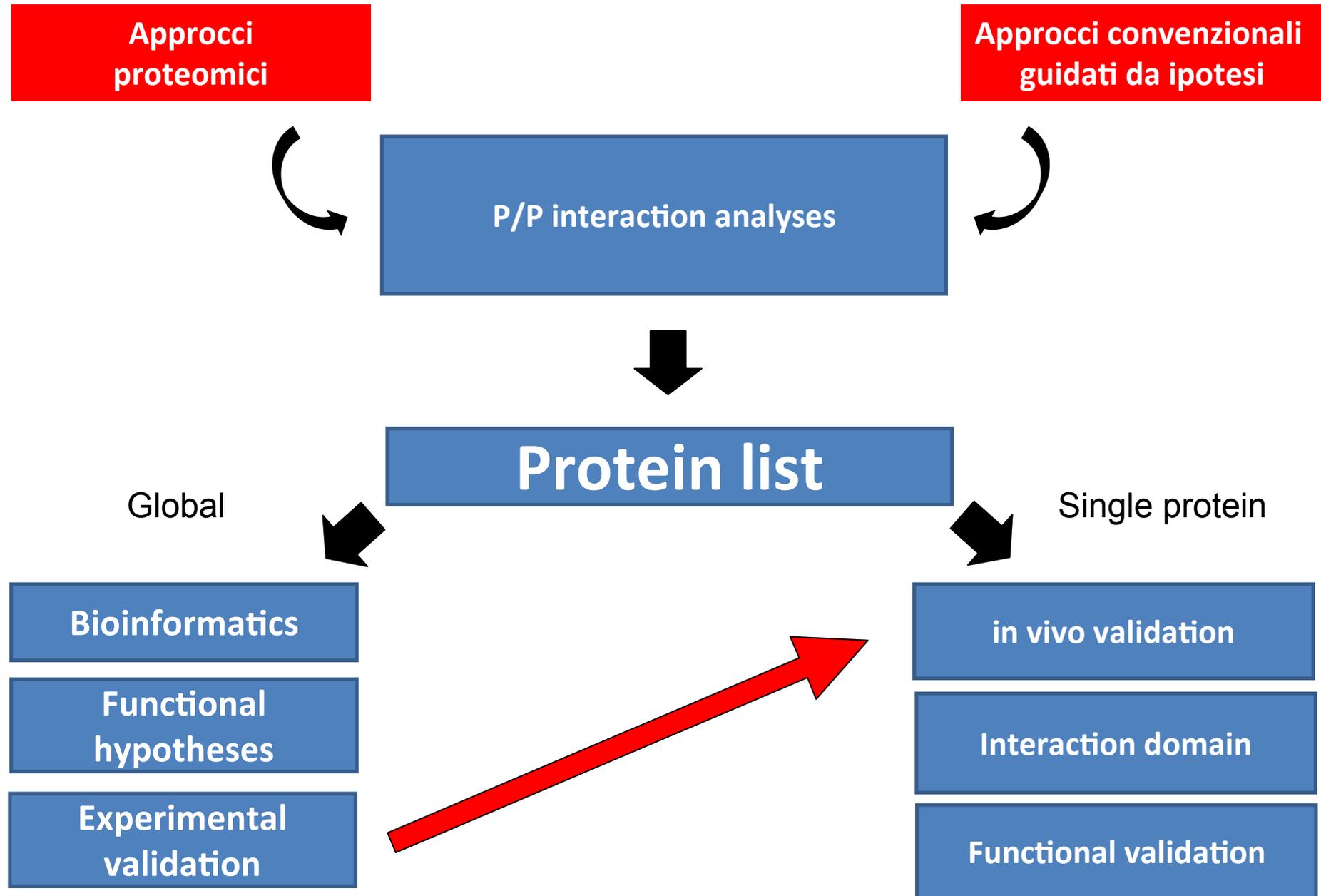


Informazioni funzionali: “guilt by association principle”
sia sui partner (**prede**) che sulla proteina sotto indagine (**esca**)



Come fare a isolare i partner molecolari di una determinata proteina?

PROTEIN-PROTEIN INTERACTION WORKFLOW



Types of Protein Interactions

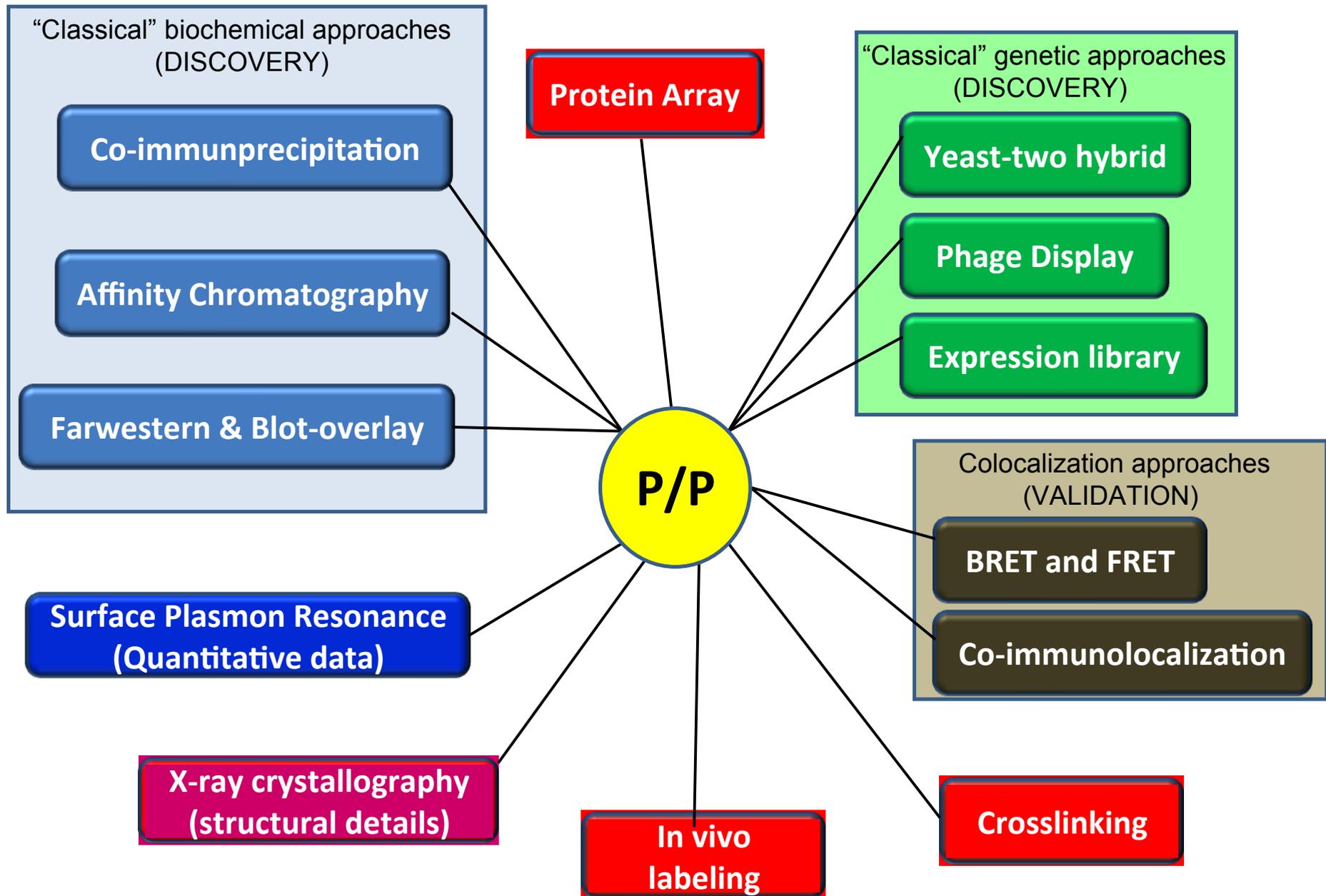
Stable interactions are those associated with proteins that are purified as multi-subunit complexes (hemoglobin, core RNA polymerase). Stable interactions are best studied by co-immunoprecipitation, pull-down or far-Western methods.

Transient interactions are expected to control the majority of cellular processes. Are **on/off** or **temporary** in nature and typically require a set of conditions that promote the interaction. Transient interactions can be captured by **cross-linking or label transfer methods**.



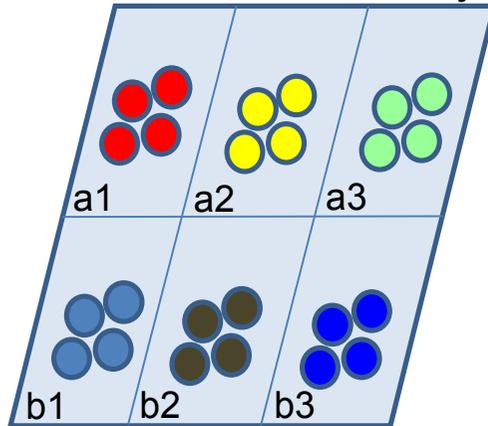
The choice of the experimental conditions to detect the interaction is **fundamental**

PROTEIN-PROTEIN INTERACTION METHODS



Protein array

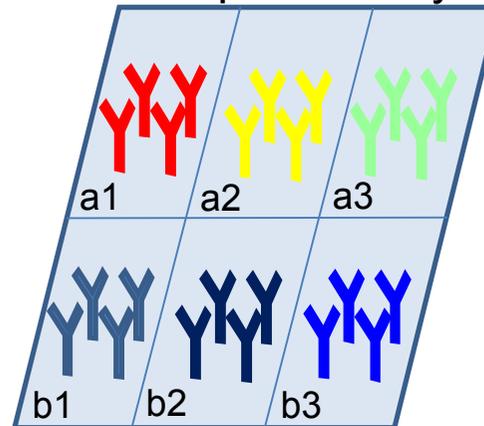
Functional Array



In a1=>b3 sono spottate proteine ricombinate pure, una diversa dall'altra. La scelta delle proteine depositate dipende dallo scopo dell'esperimento di protein array. L'array di proteine può essere utilizzato per:

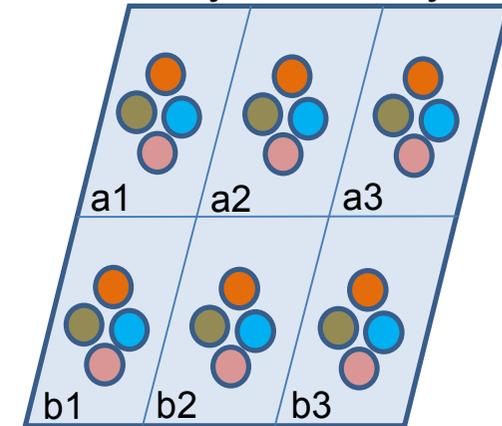
- valutare l'interazione di una proteina X con le proteine presenti sull'array;
- saggiare l'attività di un enzima verso le proteine presenti sull'array;
- valutare la presenza di autoanticorpi presenti in siero.
- ...

Capture Array



In a1=>b3 sono spottati anticorpi contro specifiche proteine. La scelta degli anticorpi dipende dalle proteine di cui si vuole seguire i livelli d'espressione. Le proteine dei campioni sotto indagine possono essere marcate con una strategia simile a quella utilizzata per la metodica DIGE. In questo modo si possono comparare i livelli d'espressione di selezionate proteine in due campioni diversi. Possono anche essere utilizzati per saggiare la presenza di determinati biomarker.

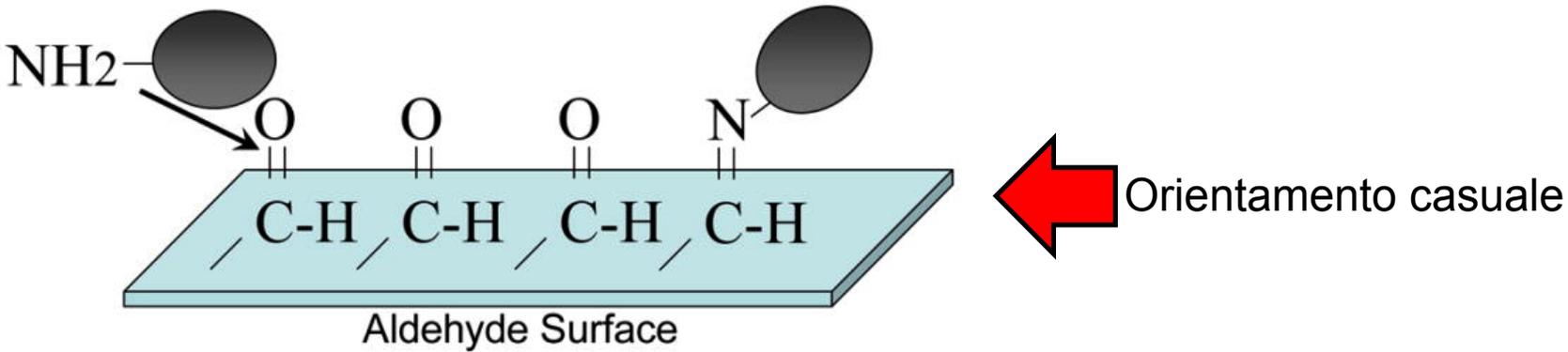
Lysate Array



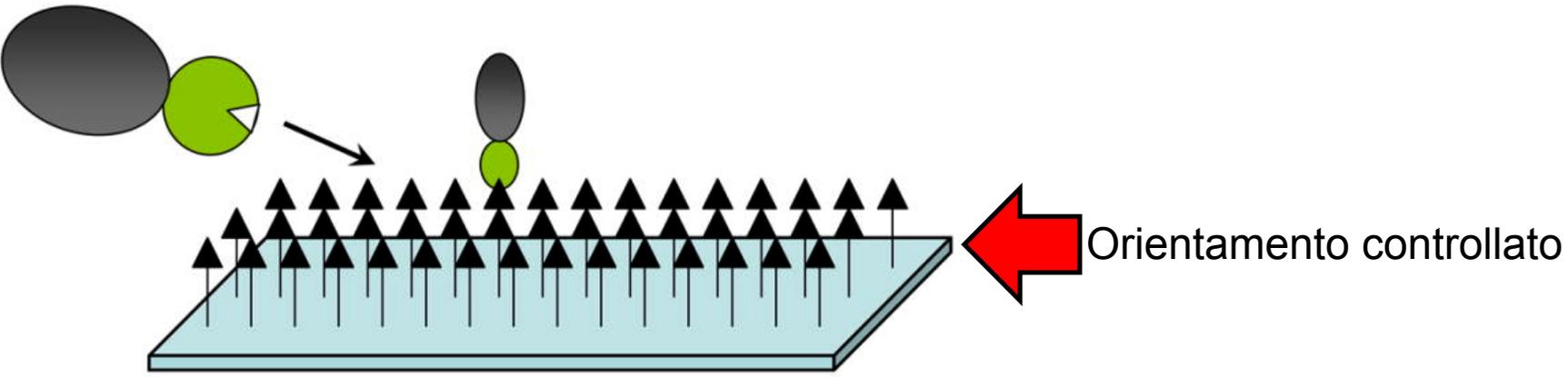
In a1=>b3 sono spottati lisati cellulari ottenuti con la medesima procedura da campioni diversi. Attraverso l'utilizzo di anticorpi contro specifiche proteine è possibile valutare in parallelo su diversi campioni i livelli d'espressione di selezionate proteine.

Protein array – Protein attachment

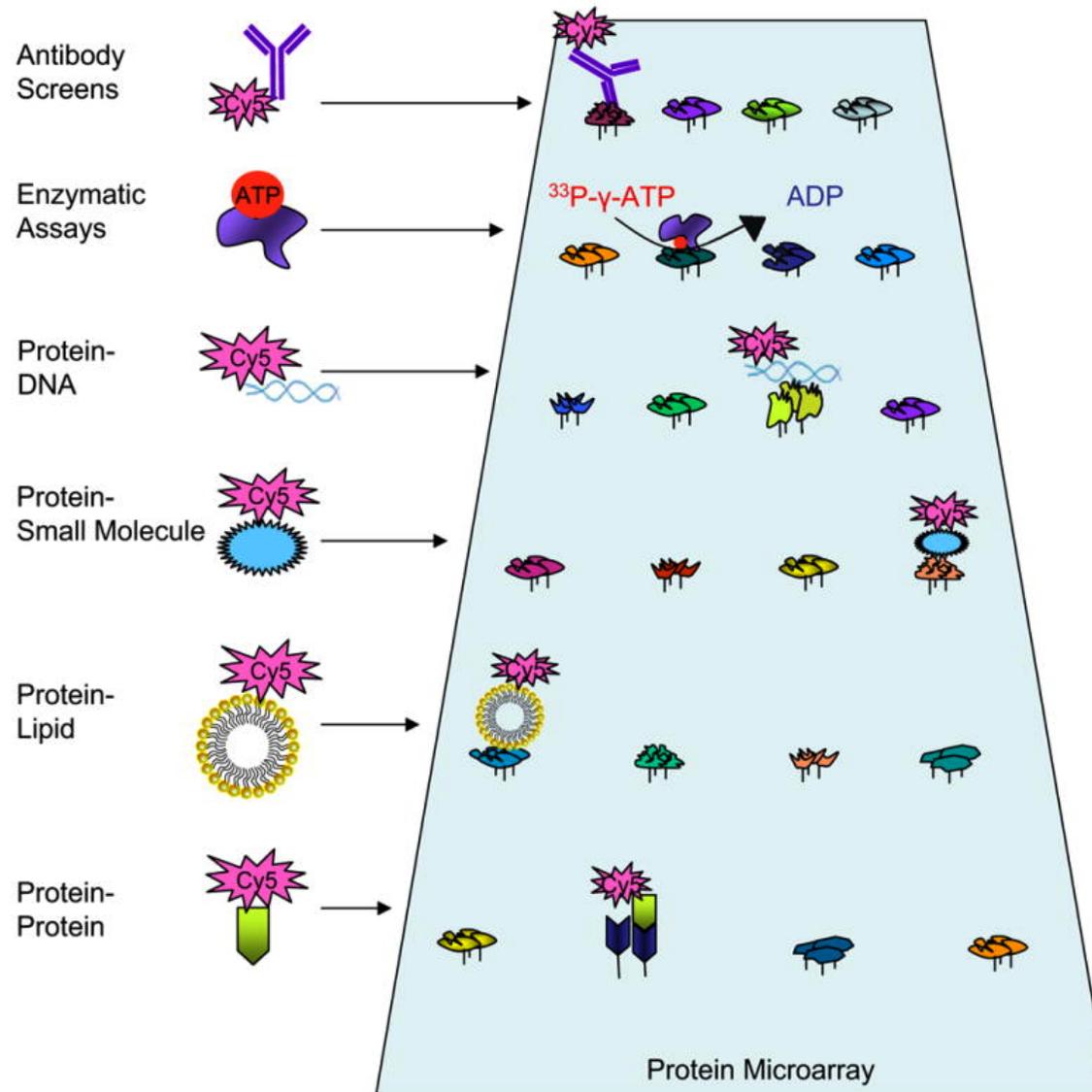
Random Attachment (chemical groups of the selected molecules)



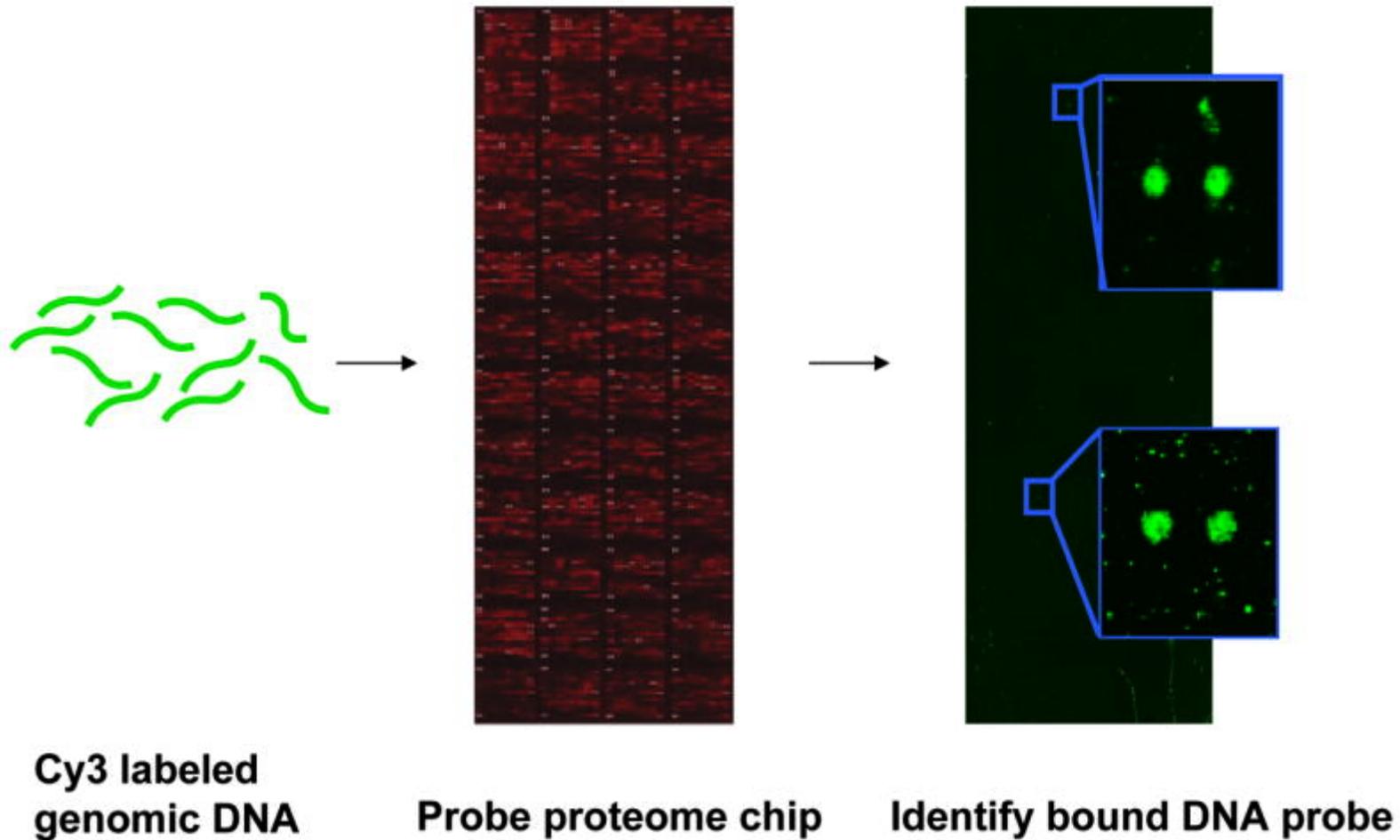
. Ligand Attachment (His-tag, GST-fused proteins, Biotin, Antibodies, ...)



Protein array – Functional array

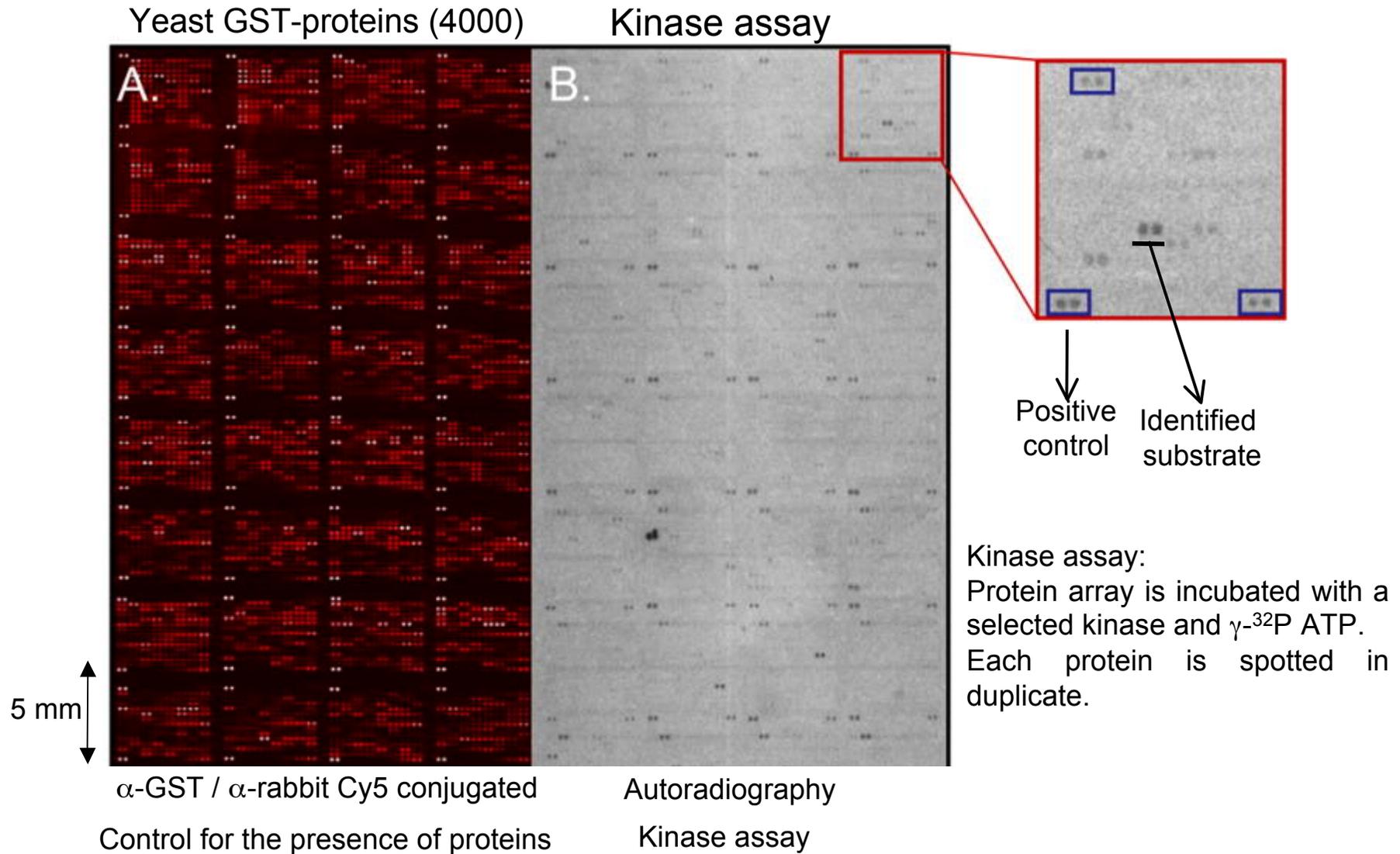


Protein array – Functional array



In questo esempio si forniscono informazioni circa quali proteine sono in grado di legare una specifica sequenza di DNA che in questo caso viene usata come sonda per saggiare le proteine presenti sul functional array.

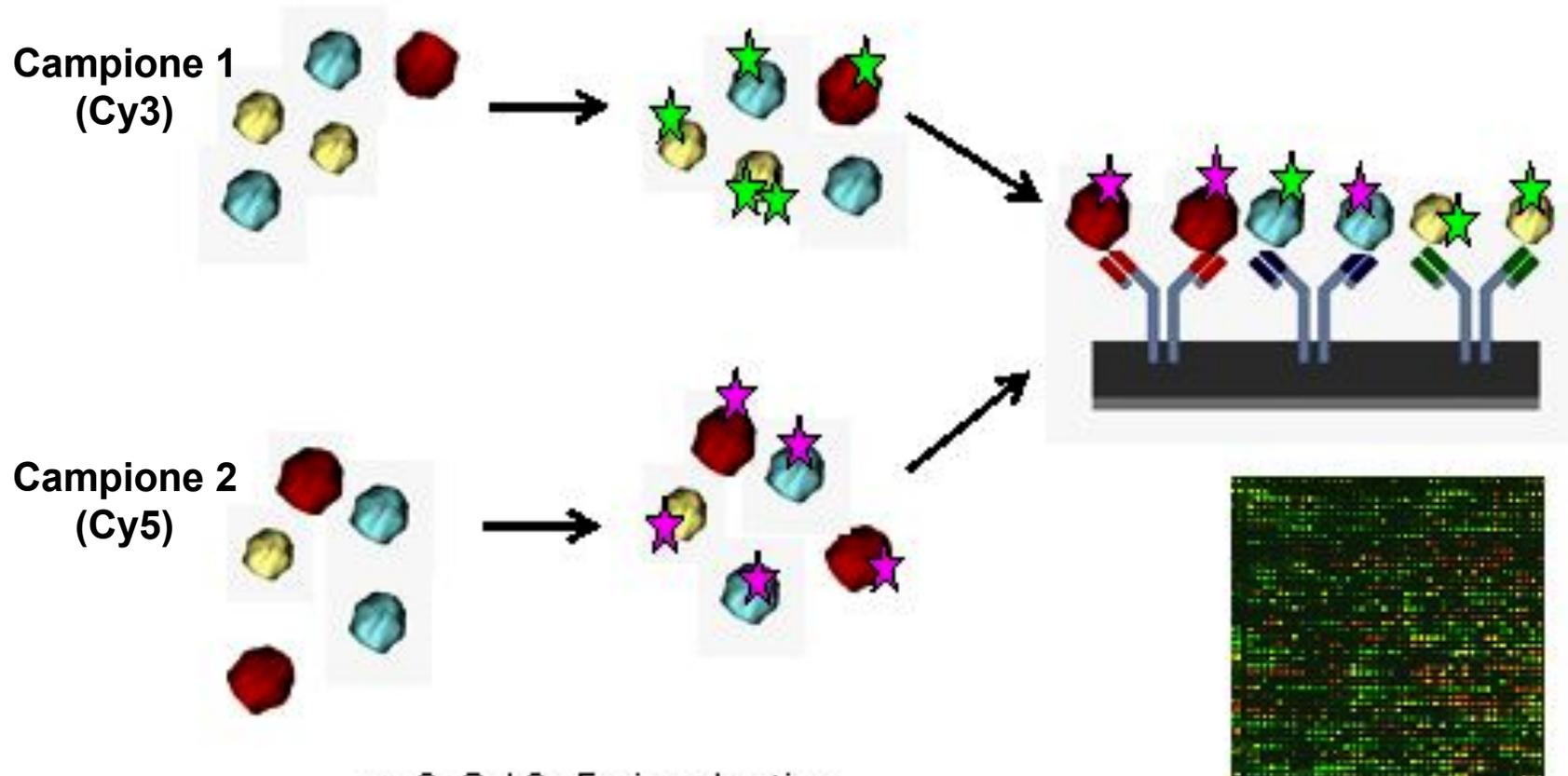
Protein array – Functional array



In questo esempio si forniscono informazioni circa quali proteine sono substrati di una specifica chinasi che è stata messa in condizione di fosforilare le proteine presenti sul functional array.

Protein array – Capture array

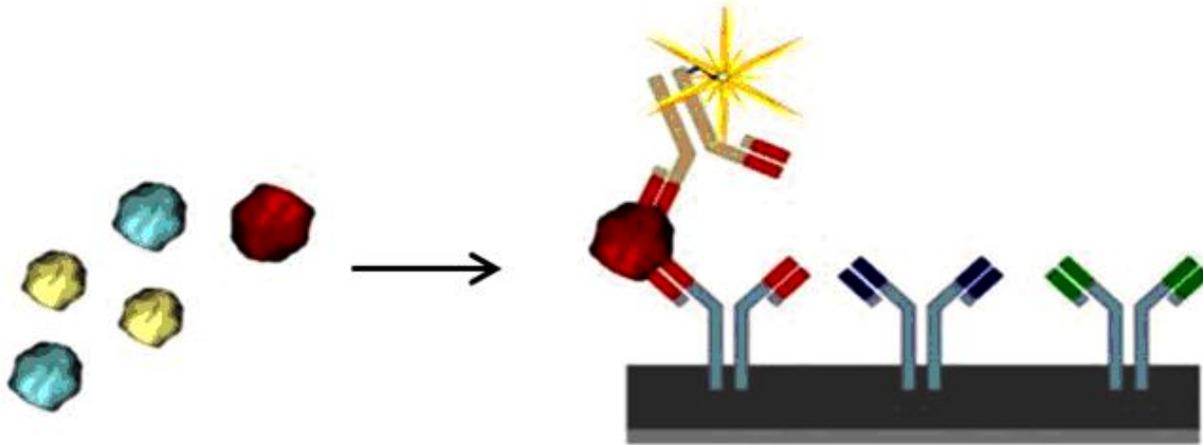
Protein expression profiling on capture arrays



- Cy3 / Cy5 signal ratios
- Pairwise comparison of protein expression levels
- (Direct analogy to classical 2 colour DNA array procedures)

In questo esempio un capture array viene utilizzato per comparare i livelli d'espressione di un set di proteine presenti in due campioni. Le proteine che vengono valutate sono quelle corrispondenti ai vari anticorpi che vengono utilizzati nell'array.

Two Levels of Detection: Sandwich Assays

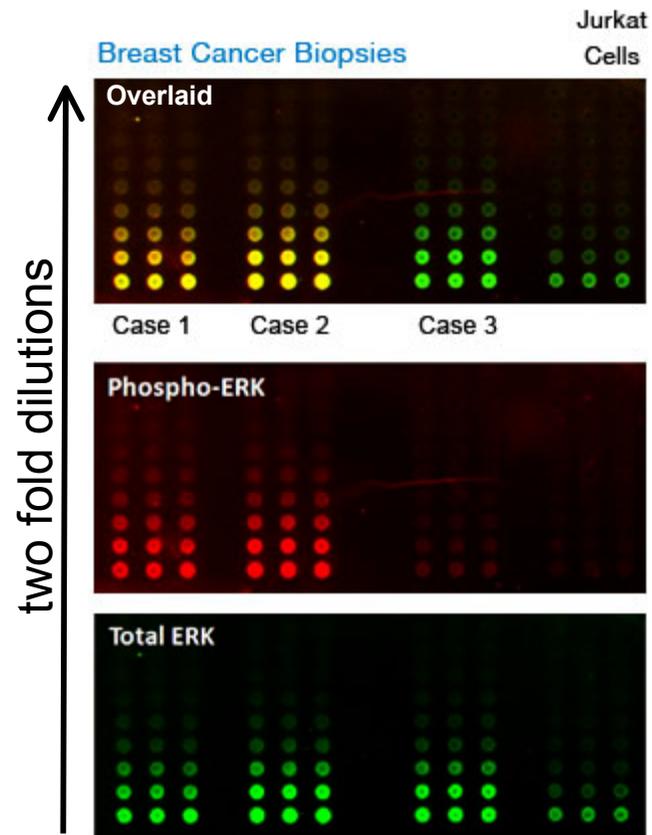


- Dual level target recognition crucial for higher specificity in multiplex assays
- Pairs of binders: same target, different epitope
- NB: The 2nd level of detection could be by another technology

(MS ...)

In questo esempio si forniscono informazioni circa quali delle proteine corrispondenti agli anticorpi immobilizzati sono presenti nel campione analizzato. Il fatto di utilizzare per la rilevazione un secondo anticorpo con epitopo diverso rispetto a quello immobilizzato sull'array consente di avere una elevata specificità. **Modalità spesso utilizzata per verificare la presenza di determinati biomarcatori.**

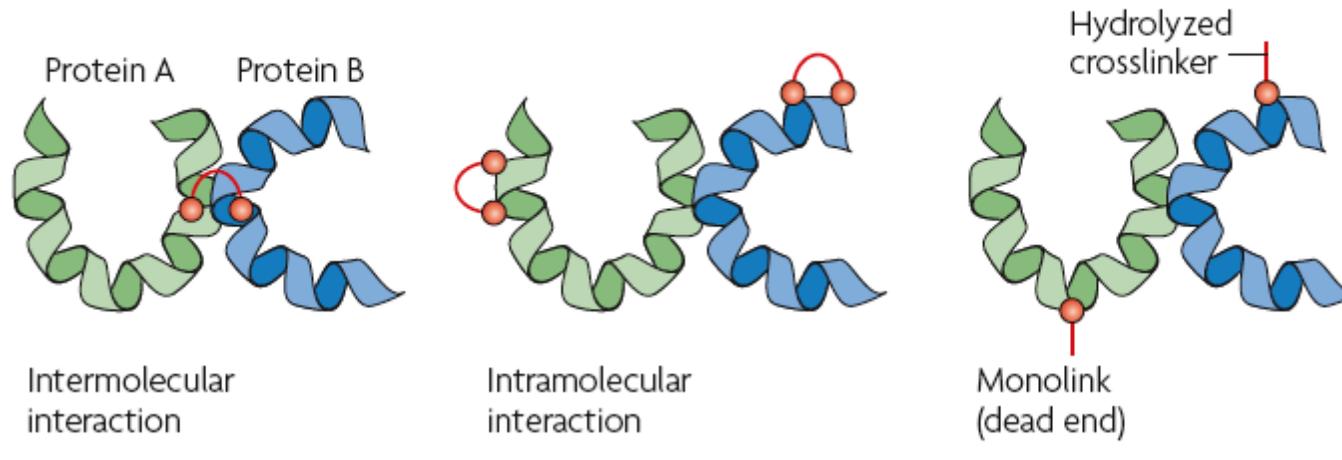
Protein array – Lysate array



In questo esempio si fornisco informazioni circa i livelli di fosforilazione di una molecola comparando più campioni derivanti da tessuti diversi (lisati proteici). Singola molecola valutata in più campioni. Esiste anche la versione Tissue microarray per effettuare delle analisi IHC in modalità array, ovvero per verificare la presenza di un biomarcatore in diversi tessuti/sezioni istologiche.

Crosslinking

Box 3 | Crosslinkers in proteomics



Molecole bifunzionali in grado di formare legami covalenti con specifici gruppi (in dipendenza della particolare strategia chimica adottata). I due gruppi sono distanziati da una porzione (linker). La grandezza di questa porzione determina la distanza massima alla quale i due gruppi appartenenti alla proteina/proteina possono trovarsi.

Si possono avere informazioni circa interazioni intermolecolari (e la loro topologia)

Si possono avere informazioni circa interazioni intramolecolari (e la loro topologia)

Questi reagenti possono recare anche dei tag per essere purificati tramite strategie d'affinità, modo da arricchire per molecole "unite".

La reazione di formazione del legame covalente può essere anche inducibile (ad esempio considerando i reagenti fotoattivabili)