

Analiza in identifikacija proteinov

Včasih se je za identifikacijo in karakterizacijo proteinov uporabljala serija kemijskih reagentov, s katerimi so se proteini derivatizirali, fragmentirali ali drugače analizirali.

Temeljna metoda določanja primarnega zaporedja je bila *Edmanova degradacija*.

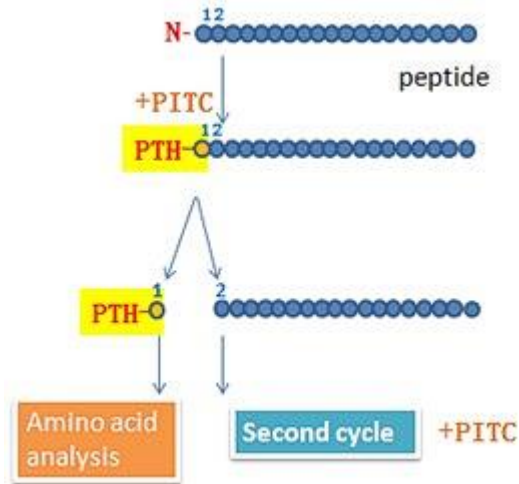
V zadnjih dveh desetletjih so v ospredje prišle drugačne metode in pristopi

- sekvenciranje DNA (cDNA knjižnice, celotni genomi)
- tehnologija rekombinantne DNA
- holistične metode za analizo proteinov v bioloških sistemih – proteomika

Starejše metode se še vedno uporabljajo, le da v manjšem obsegu, včasih v spremenjeni obliki ter v didaktične namene.

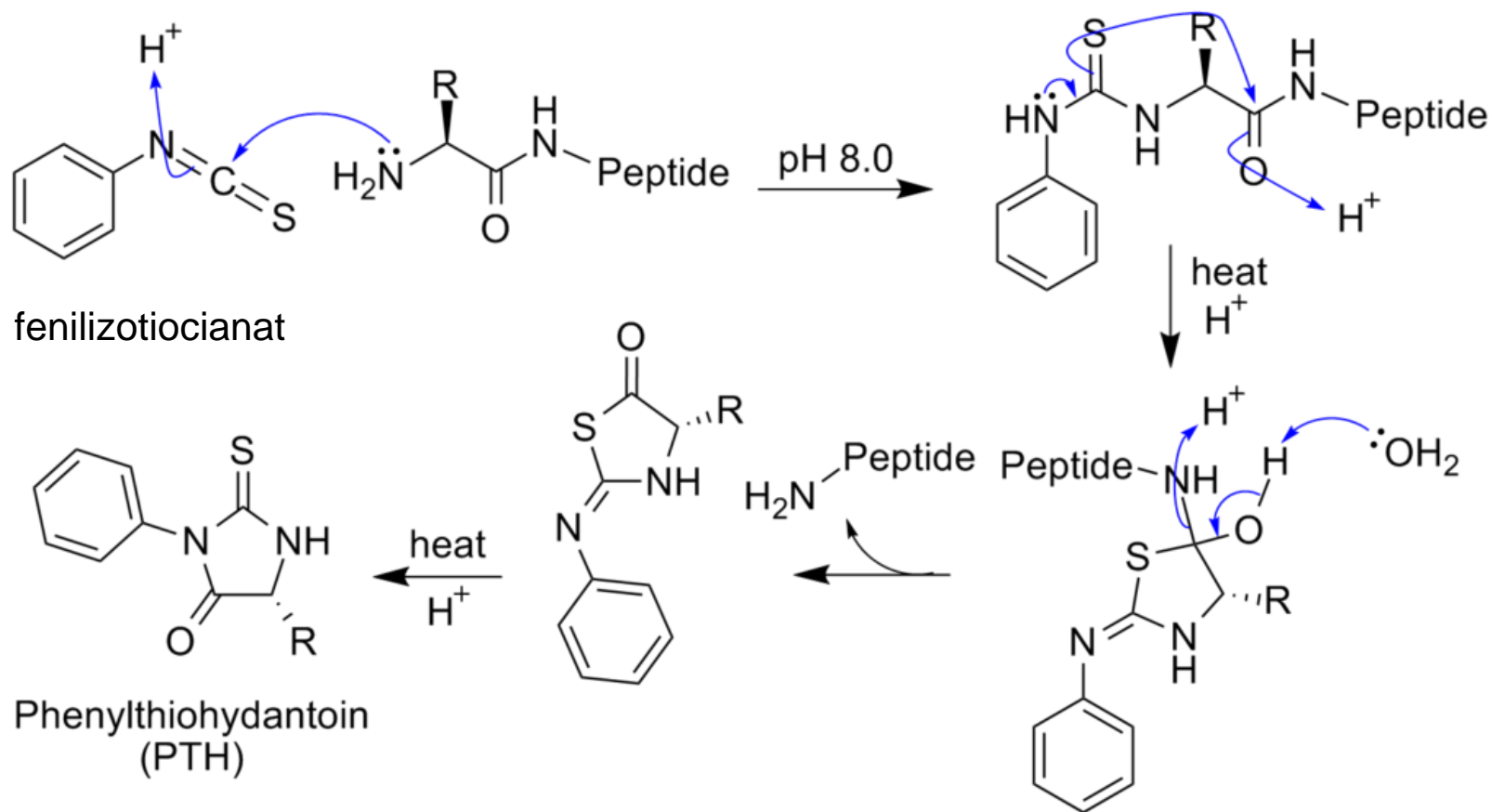
Edmanova degradacija

Določanje zaporedja z N-konca peptida. Temelji na postopni reakciji N-končnega ostanka z reagentom, odcepitvijo N-končne aminokisliline in njeno detekcijo (HPLC, MS). Peptid je vezan ali adsorbiran na nosilec. Reakcija lahko poteka tudi na membrani (PVDF). Postopek je avtomatiziran.



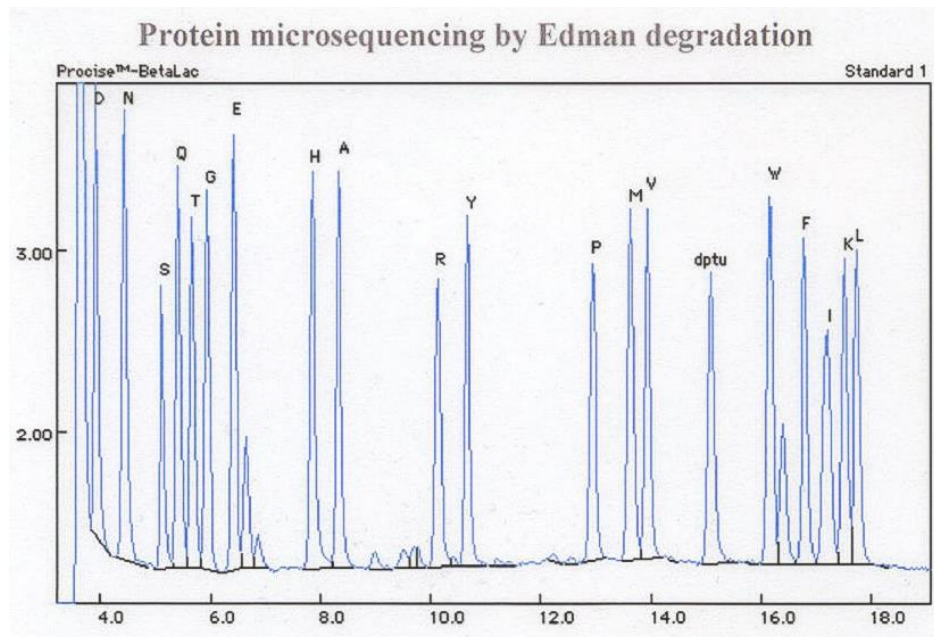
Edmanova degradacija

Določanje zaporedja z N-konca peptida. Temelji na postopni reakciji N-končnega ostanka z reagentom, odcepitvijo N-končne aminokisliline in njeno detekcijo (HPLC, MS). Peptid je vezan ali adsorbiran na nosilec. Reakcija lahko poteka tudi na membrani (PVDF). Postopek je avtomatiziran.

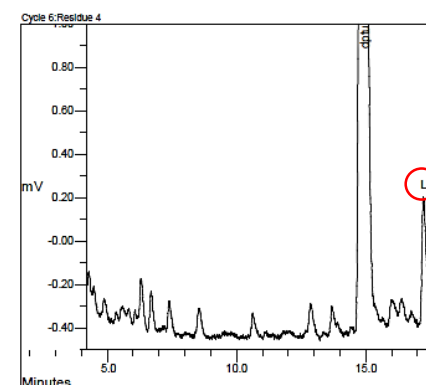
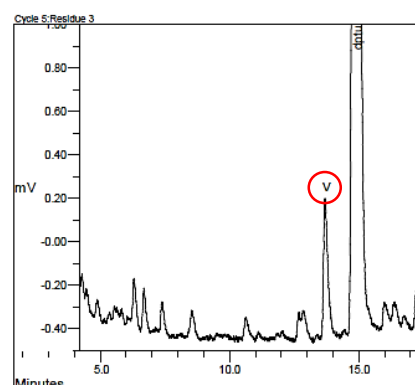
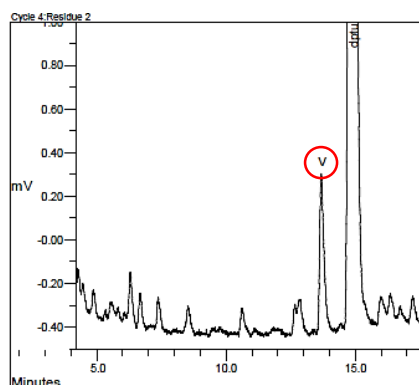
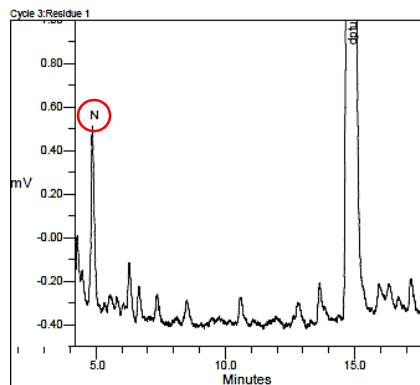


Edmanova degradacija

Identiteto odcepljene aminokisline identificiramo z RP HPLC na podlagi ustreznih standardov (mešanice PTH-ak).



retenzijski čas



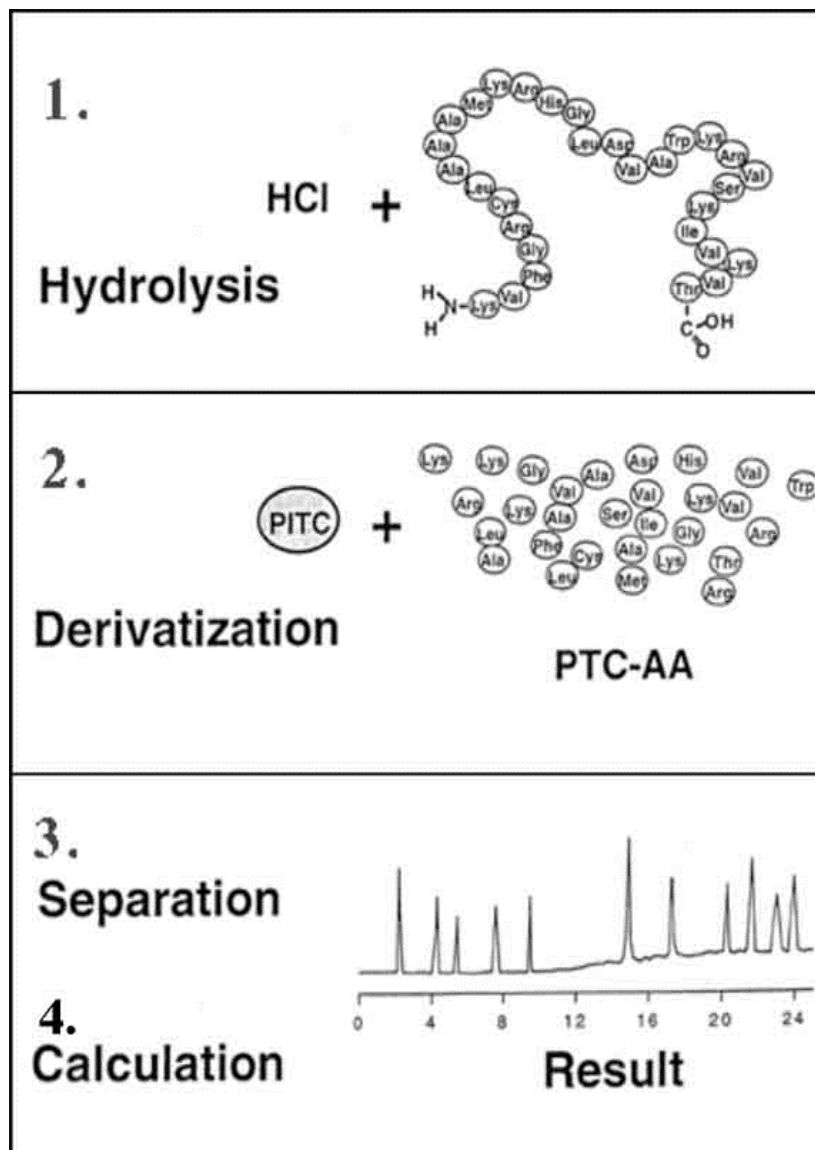
Aminokislinska analiza

Popolna hidroliza proteina in derivatizacija vseh aminokislin z ustreznim reagentom (npr. PITC).

Sorazmerni deleži ak se izračunajo iz intenzitet vrhov v kromatogramu v primerjavi s standardnimi vzorci.

Težave:

Trp se uniči,
Asn/Gln se pretvorita v Asp/Glu,
Met se delno oksidira,
Thr/Ser se delno uničita,
Val/Ile se počasi cepita,
Cys moramo derivatizirati z oksidacijo ali alkilacijo.



Kemijske modifikacije proteinov

Uporabljamo pri:

določanju aminokislinskega zaporedja

določanju vsebnosti posameznih ostankov v proteinu

uvedbi označevalcev za lažjo detekcijo in izolacijo

identifikaciji funkcijsko pomembnih ostankov

spreminjanju reaktivnosti proteinov

Modifikacije so lahko *skupinsko-specifične* ali *mestno-specifične*. Za popolno derivatizacijo je ponavadi potrebna denaturacija proteina.

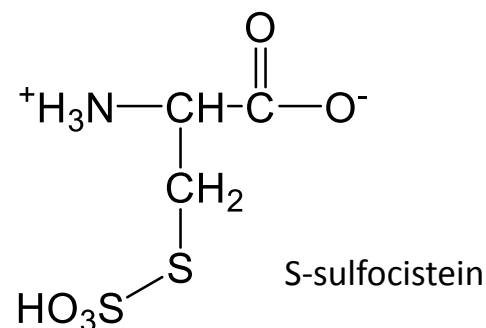
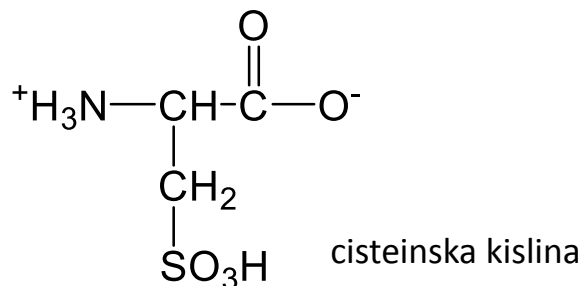
Kemijske modifikacije proteinov

Modifikacije cisteina – cepitev S-S vezi

Za popolno cepitev je ponavadi potrebna denaturacija proteina. Cepitev je lahko redukтивna ali oksidativna.

reagent	nastali derivat
peroksimravljna kislina	cisteinska kislina*
sulfit	S-sulfocistein
merkaptani	cistein
NaBH ₄	cistein
fosfini	cistein

*nespecifična reakcija, oksidira se tudi Met, delno se uničita Tyr, Trp

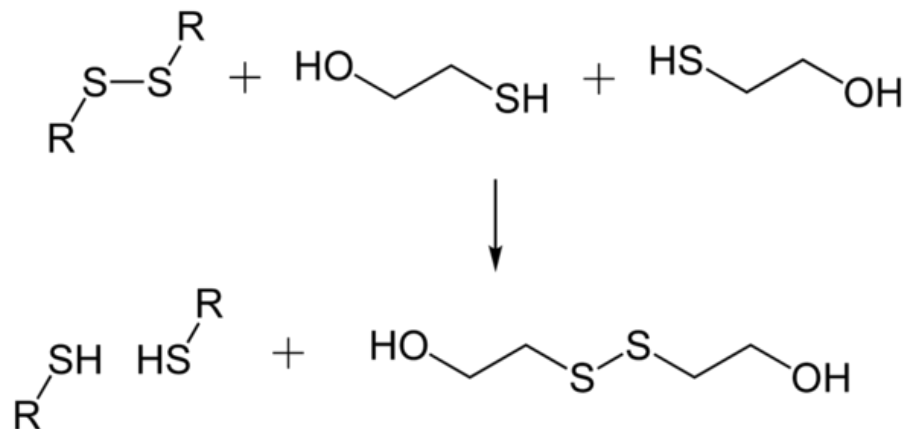


Kemijske modifikacije proteinov

Modifikacije cisteina – cepitev S-S vezi

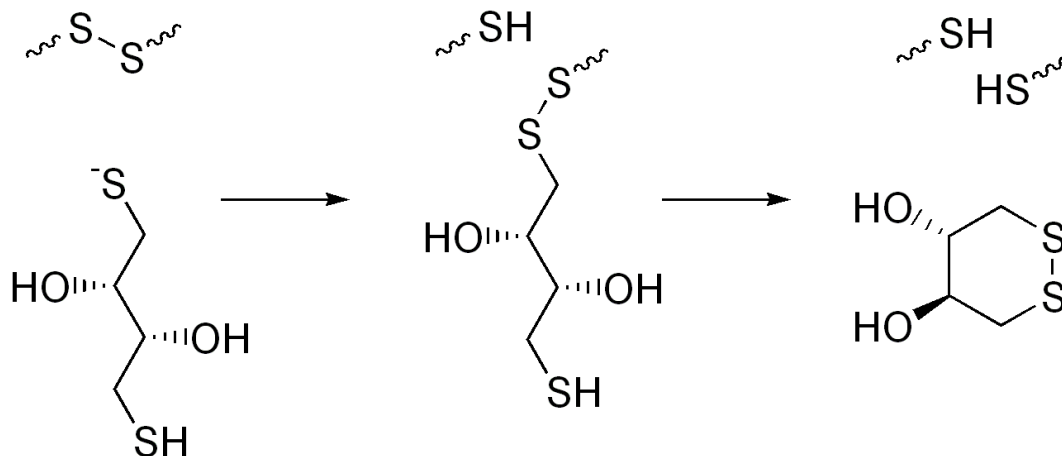
2-merkaptoetanol

dodamo v 100-1000x prebitku



Ditiotreitol

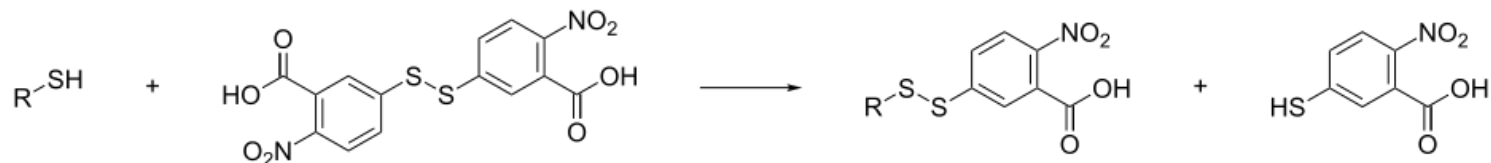
boljši reducent kot 2-ME (potreben manjši prebitek)



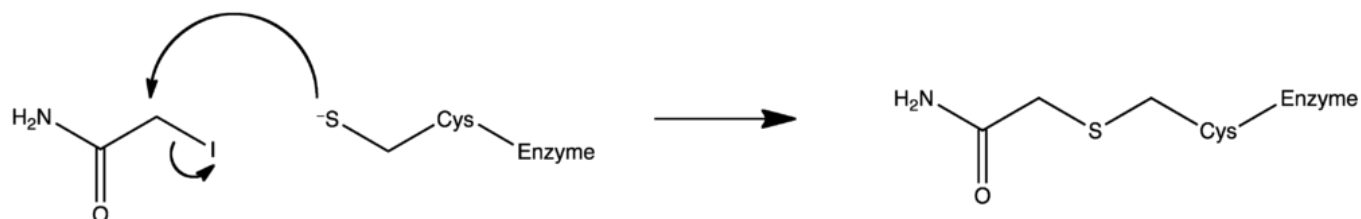
Kemijske modifikacije proteinov

Modifikacije prostega cisteina

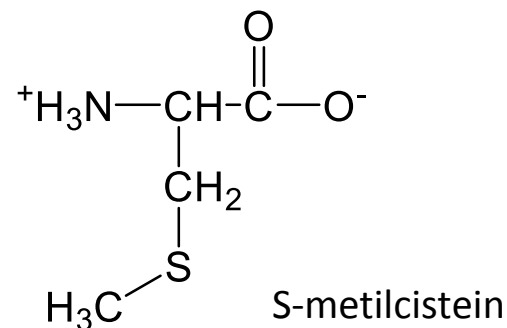
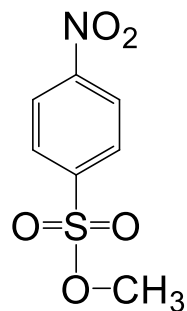
Ellmanov reagent – kvantitativno določanje števila cisteinov in koncentracije proteinov



jodacetamid (ali jodacetat) – uporaben za blokiranje prostih cisteinov



metil jodid, metil p-nitrobenzensulfonat – metilacija cisteina

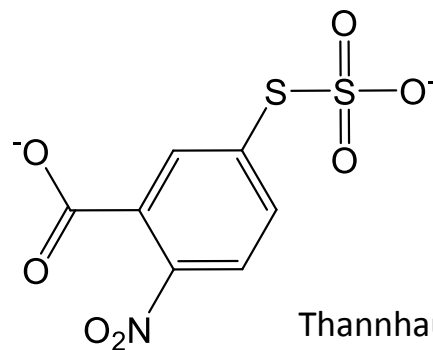
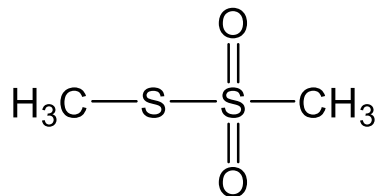


Kemijske modifikacije proteinov

Modifikacije prostega cisteina

sulfiti, sulfonati – reverzibilno sulfoniranje prostih cisteinov

metilmetantiosulfonat, Thannhauserjev reagent



Thannhauserjev reagent (NTSB)

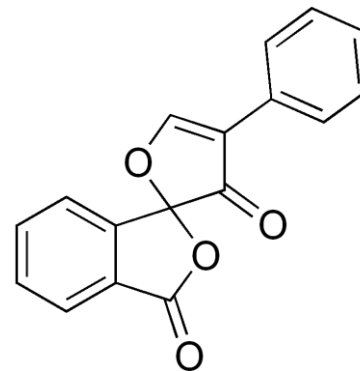
Kemijske modifikacije proteinov

Modifikacije aaminskih skupin (N-konec, Lys, Arg)

Podobno kot tiolno skupino cisteina, lahko s številnimi reagenti modificiramo aaminske skupine.

Reagente, ki reagirajo s primarnimi aaminskimi skupinami lahko uporabljamo tudi za kvantifikacijo proteinov.

fluoreskamin – veže se na aaminske skupine in tvori fluorescenčne produkte



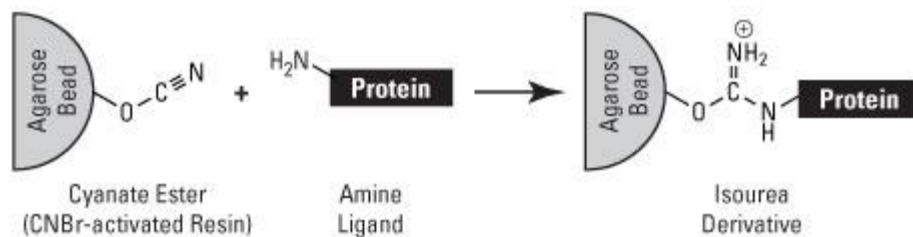
Aaminske skupine pogosto uporabimo pri prečnem povezovanju in pri imobilizaciji proteinov.

Imobilizacija proteinov

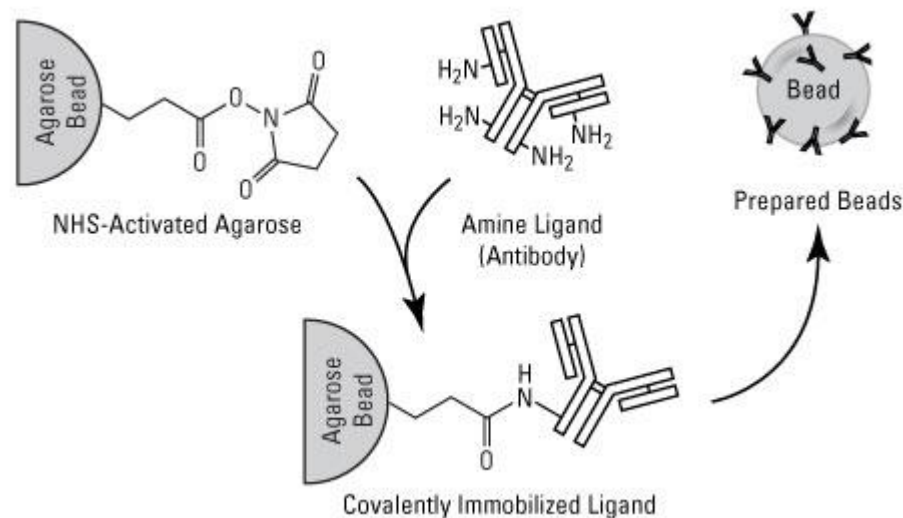
Proteine imobiliziramo na nosilce preko ene izmed njihovih reaktivnih skupin. Nosilci so ponavadi inertni delci (npr. agaroz), na katere so bile predhodno vezane reaktivne spojine. Te se razlikujejo glede na skupinsko-specifično reaktivnost in dolžino verige med nosilcem in reaktivno skupino.

Imobilizacija preko amino skupin:

s CNBr aktiviran nosilec



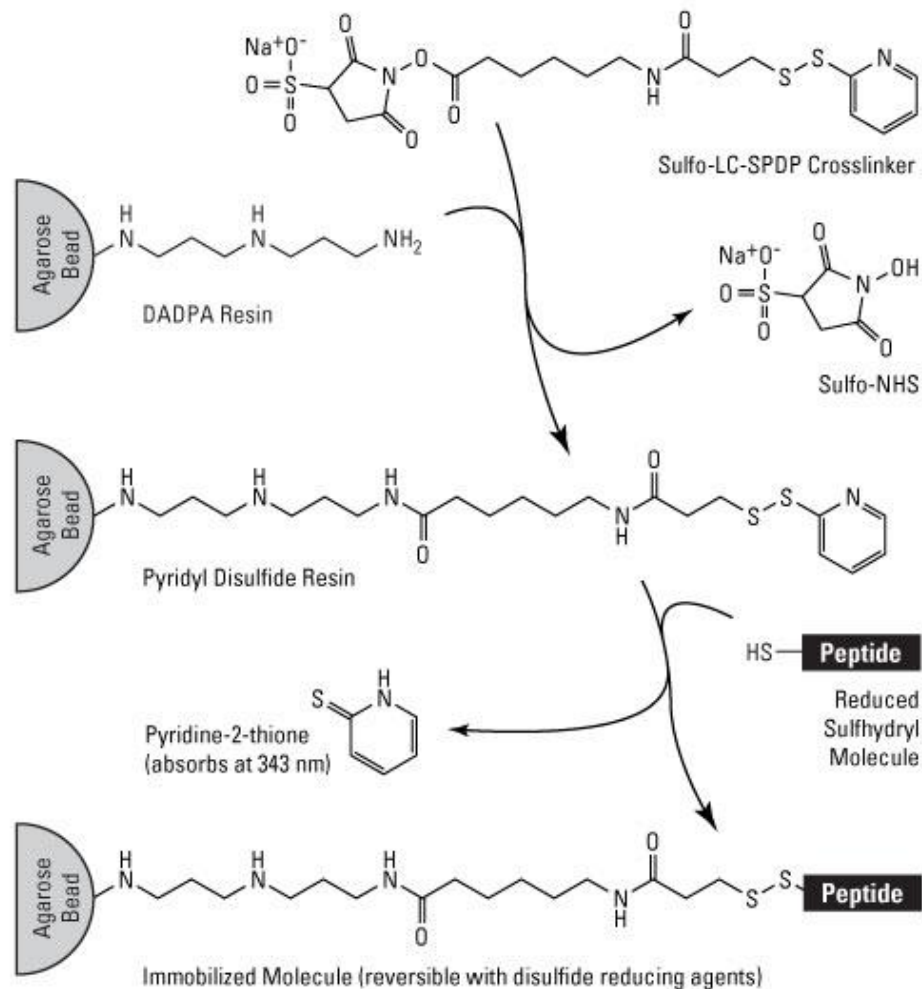
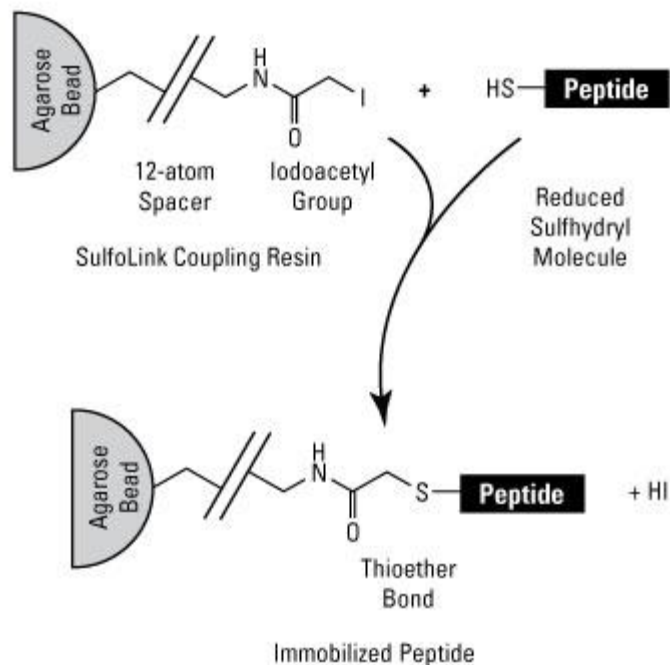
z N-hidroksisukcinimidnim estrom aktiviran nosilec



Imobilizacija proteinov

Proteine imobiliziramo na nosilce preko ene izmed njihovih reaktivnih skupin. Nosilci so ponavadi inertni delci (npr. agaroz), na katere so bile predhodno vezane reaktivne spojine. Te se razlikujejo glede na skupinsko-specifično reaktivnost in dolžino verige med nosilcem in reaktivno skupino.

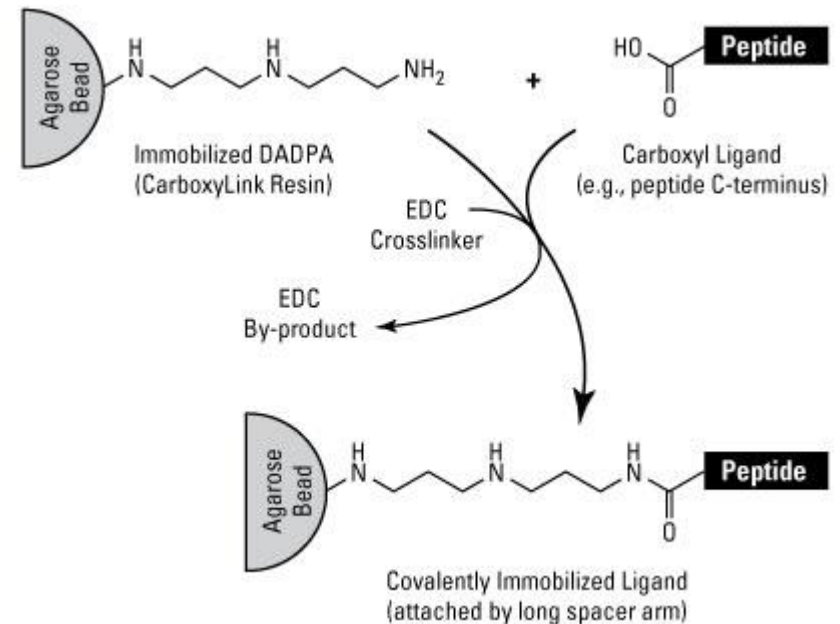
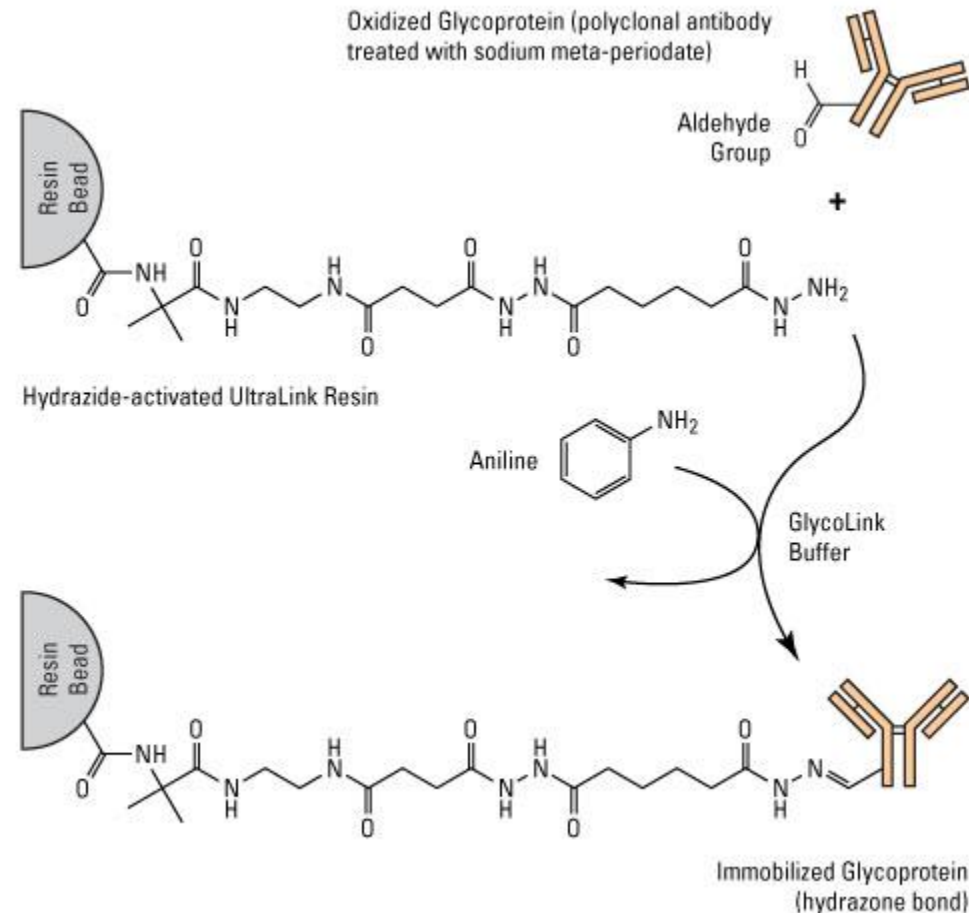
Imobilizacija preko -SH skupin:



Imobilizacija proteinov

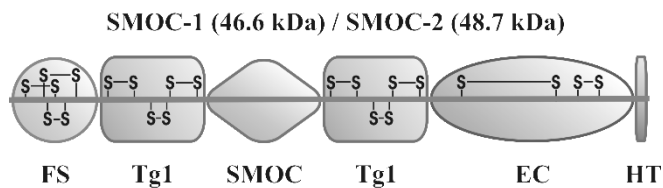
Proteine imobiliziramo na nosilce preko ene izmed njihovih reaktivnih skupin. Nosilci so ponavadi inertni delci (npr. agaroz), na katere so bile predhodno vezane reaktivne spojine. Te se razlikujejo glede na skupinsko-specifično reaktivnost in dolžino verige med nosilcem in reaktivno skupino.

Imobilizacija preko drugih skupin:

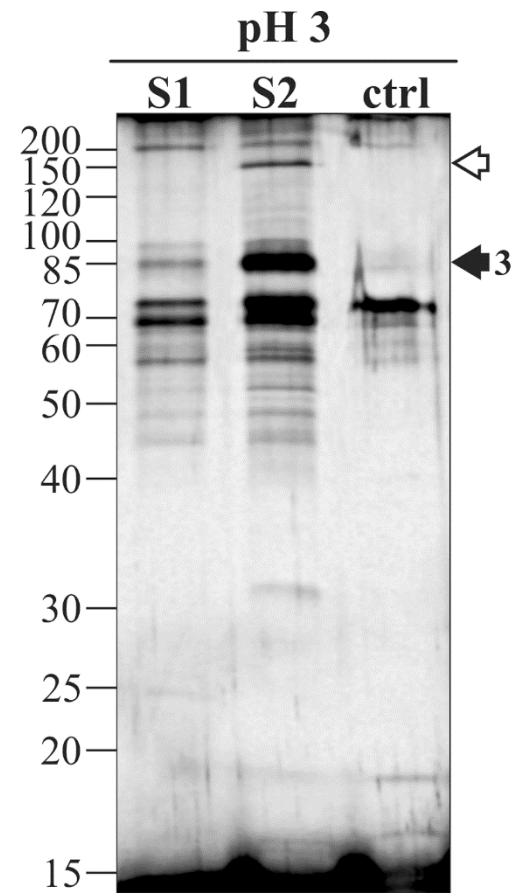
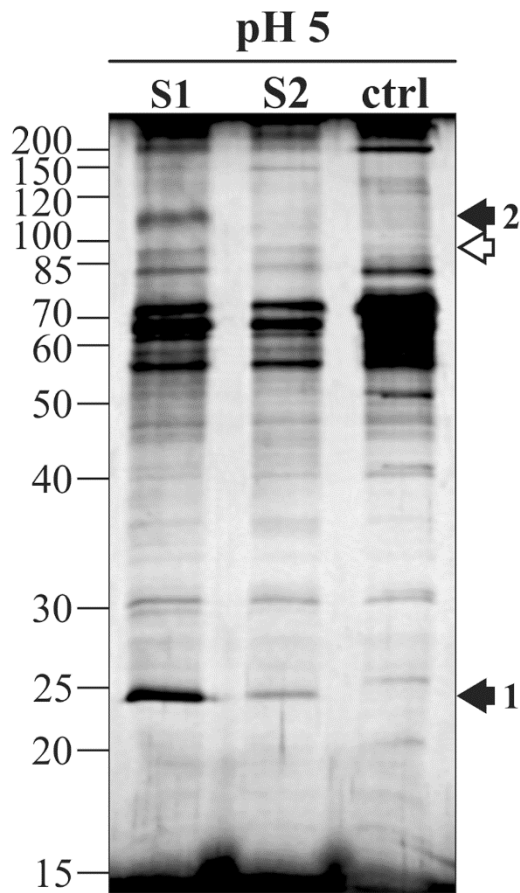


Imobilizacija proteinov

Primer: imobilizacija rekombinantnih proteinov SMOC-1 in -2 na NHS-sefarozi in iskanje vezavnih proteinov v krvnem serumu.



- 1 – C-reaktivni protein
- 2 – fibulin-1
- 3 – vitronektin



Fragmentacija proteinov

Uporaba bolj ali manj specifičnih proteaz ali kemičnih reagentov:

tripsin, kimotripsin

proteaza V8 = endoproteaza GluC

endoproteaza LysC

endoproteaza AspN

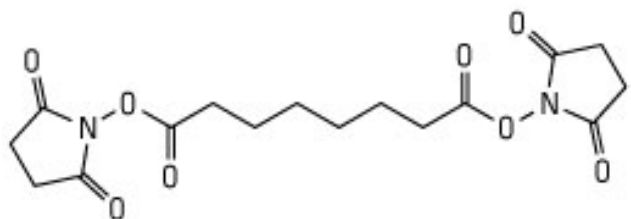
cianogen bromid – cepi za Met ostanki

BNPS-skatol – cepi za Trp ostanki

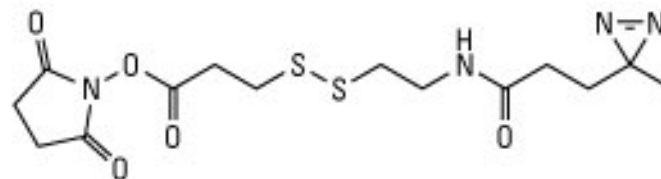
NTSB (Thannhauserjev reagent) – v visokih koncentracijah cepi okoli Cys ostankov

Prečno povezovanje proteinov

Tvorba kovalentnih vezi med interagirajočimi proteini. Lahko so homobifunkcionalni (povežejo dve kemijsko enaki skupini) ali heterobifunkcionalni. Glede na specifičnost poznamo povezovalce, ki reagirajo z aminskimi, sulfhidrilnimi, karboksilnimi, karbonilnimi, etc. Skupinami, ali pa so fotoreaktivni (nespecifični, aktivirajo se s svetlobo). Lahko vsebujejo tudi disulfidne vezi (cepitev kompleksa pod redukcijskimi pogoji)



DSS
Disuccinimidyl suberate
MW 388.34
Spacer Arm 11.4 Å

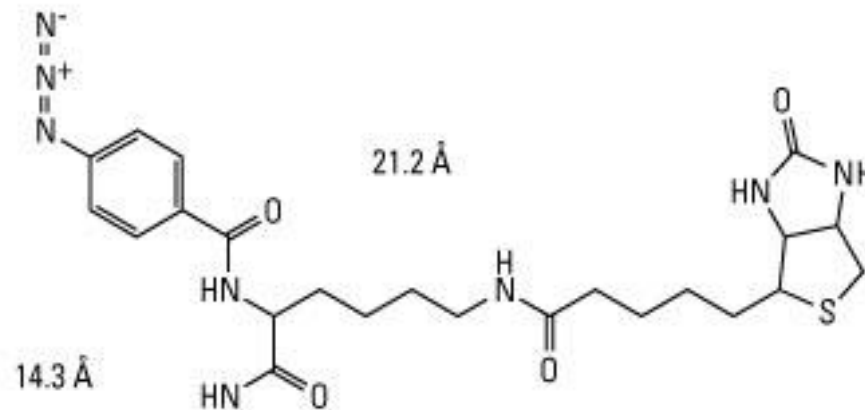


SDAD
(NHS-SS-Diazirine)
MW 388.46
Spacer Arm 13.5 Å

Prečno povezovanje proteinov

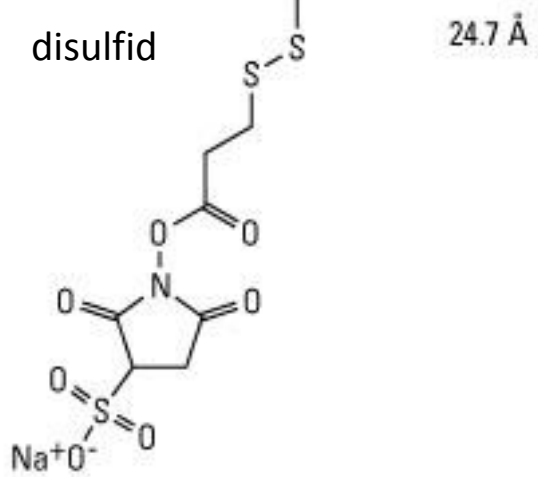
Lahko vsebujejo tudi disulfidne vezi, ki omogočajo razcep kompleksa pod reduktivnimi pogoji in/ali dodatne oznake za specifično označevanje proteinov.

fotoreaktivna skupina



biotin
(label transfer)

disulfid

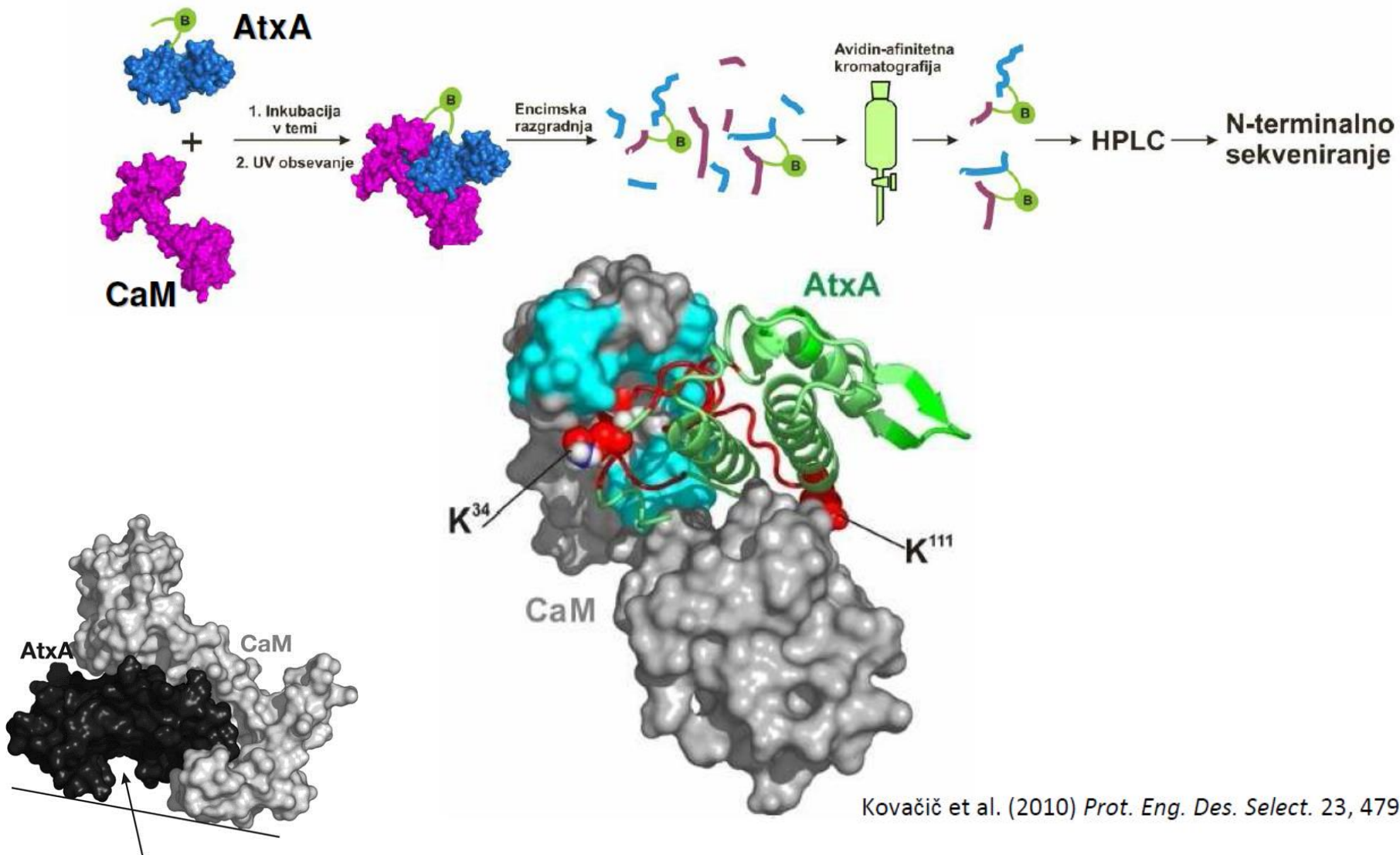


z amini
reagirajoča skupina

Sulfo-SBED
MW 879.98

Prečno povezovanje proteinov

Primer: mapiranje stične površine kompleksa med fosfolipazo amoditoksin A in kalmodulinom.



Kovačič et al. (2010) *Prot. Eng. Des. Select.* 23, 479.

aktivno mesto je prosto – kalmodulin deluje kot aktivator amoditoksina

Biologija sistemov

Klasična biokemija preučuje izolirane komponente bioloških sistemov (redukcionističen pristop).

Molekularna biologija preučuje interakcije posameznih komponent v večjih kompleksih in njihovo kooperacijo pri opravljanju temeljnih funkcij življenja.

Biologija sistemov je interdisciplinarna veja znanosti, ki preučuje biološke sisteme s holističnega vidika, tj. preučuje integracijo vseh komponent bioloških sistemov (celic, organov, organizmov, ...) v celoto.

Proteomika je del biologije sistemov, ki študira časovno in prostorsko dinamiko vseh proteinov v nekem sistemu ter interakcije med njimi.

Pojmi:

Proteom – vsi proteini v sistemu

Transkriptom – vse RNA v sistemu

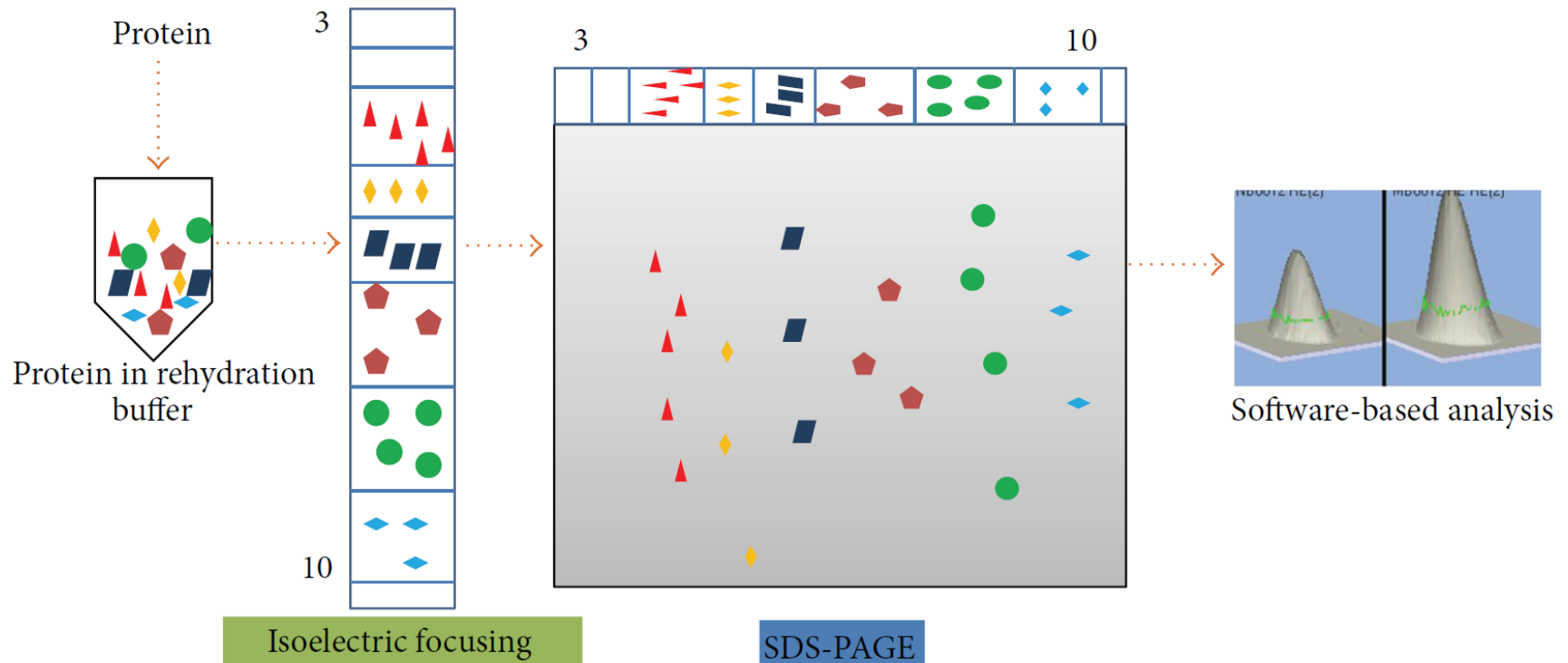
Metabolom – vsi metaboliti v sistemu

Interaktom – vse interakcije v sistemu

Degradom, kinom,

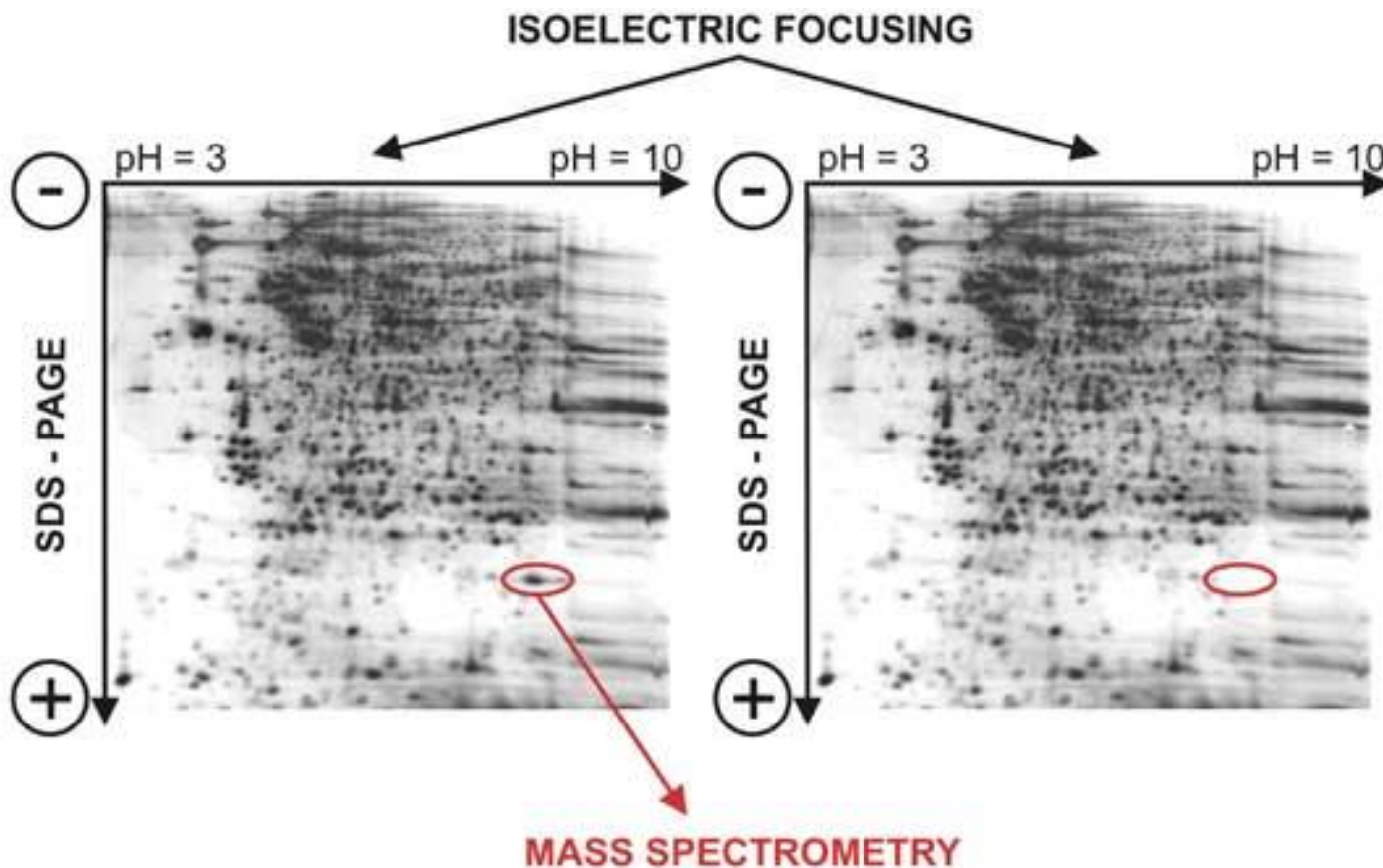
Ločevanje proteinov

Dvodimenzionalna PAGE – kombinacija izoelektričnega fokusiranja in SDS-PAGE (ločevanje najprej po naboju, nato po masi). Količino proteina določimo z integracijo površine točk. Iz razlik v intenzitetah lahko sklepamo na razlike v izražanju proteinov pod različnimi pogoji.



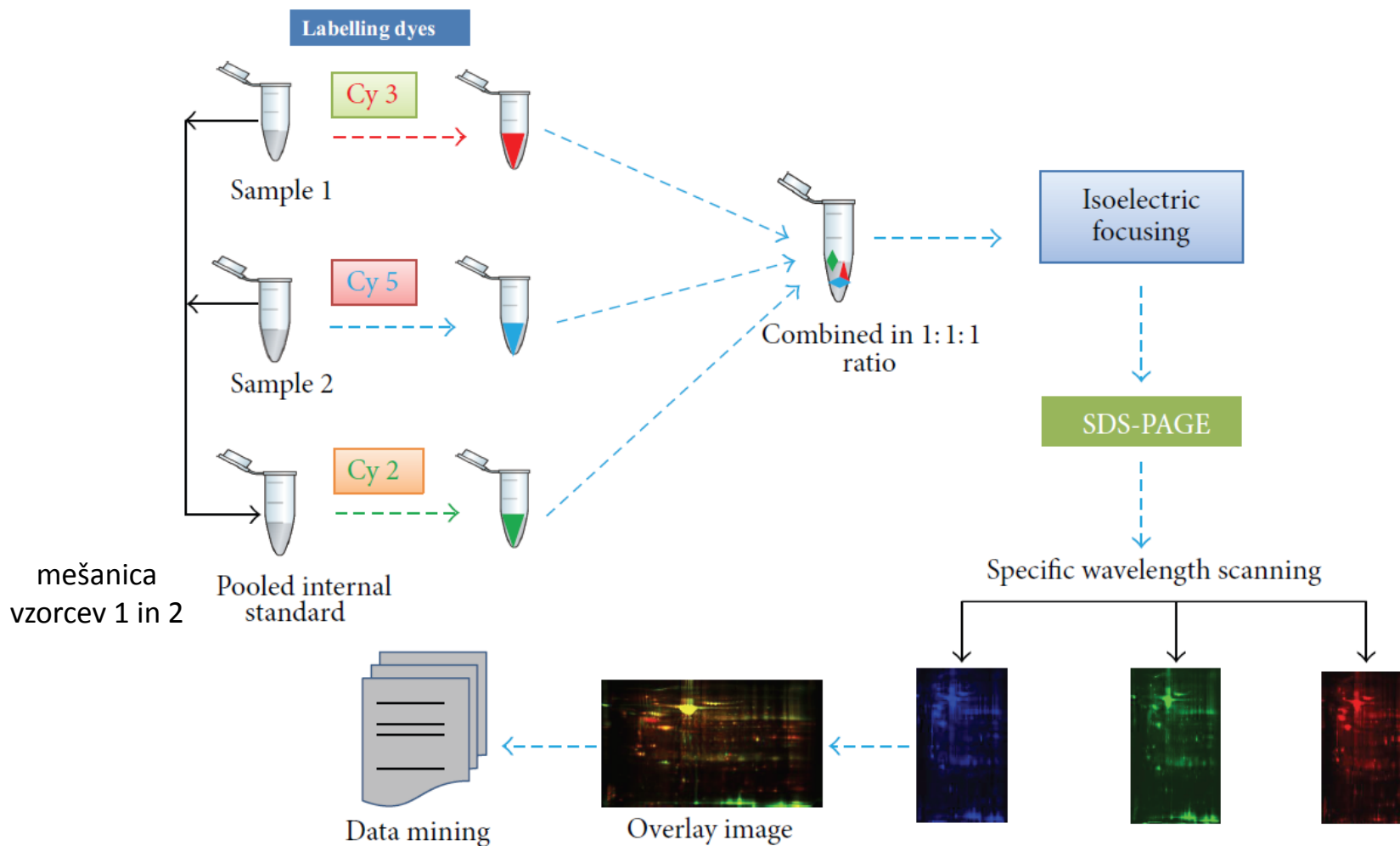
Ločevanje proteinov

Dvodimenzionalna PAGE – kombinacija izoelektričnega fokusiranja in SDS-PAGE (ločevanje najprej po naboju, nato po masi). Količino proteina določimo z integracijo površine točk. Iz razlik v intenzitetah lahko sklepamo na razlike v izražanju proteinov pod različnimi pogoji.



Ločevanje proteinov

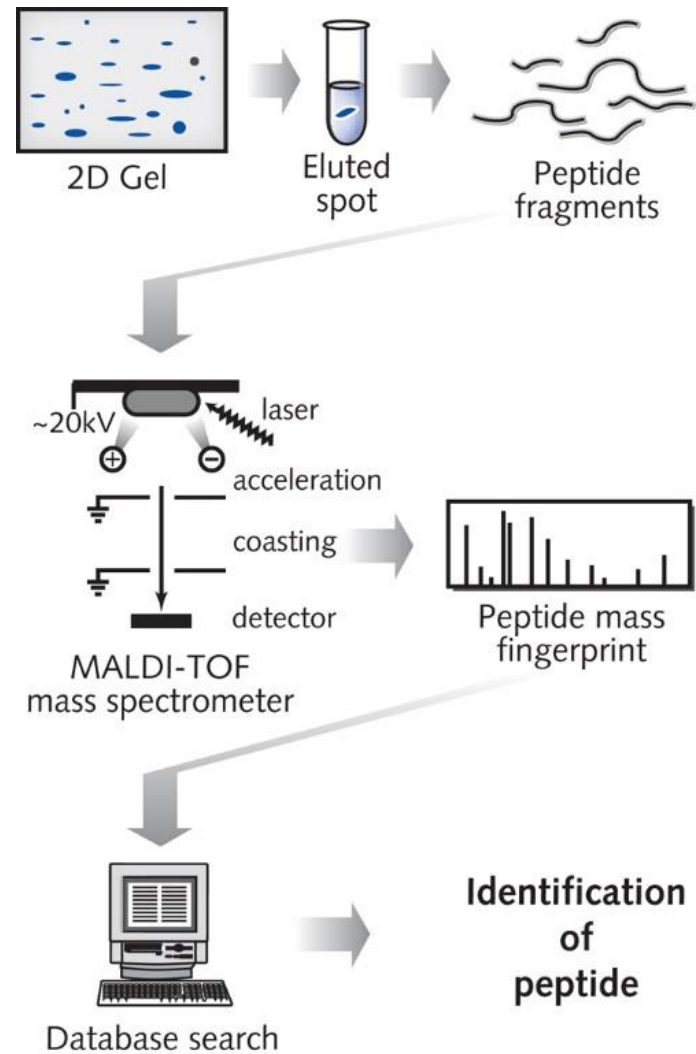
Diferencialna PAGE – DiGE – dva ali tri vzorce označimo z različnimi barvili in ločimo na istem gelu. Prispevek vsakega vzorca posebej analiziramo pri valovnih dolžinah, ki ustrezajo vsakemu barvilu.



Identifikacija proteinov

Za identifikacijo proteinov najpogosteje uporabljamo masno spektroskopijo v kombinaciji z razgradnjo proteina iz izrezane lise s proteazo, najpogosteje tripsinom.

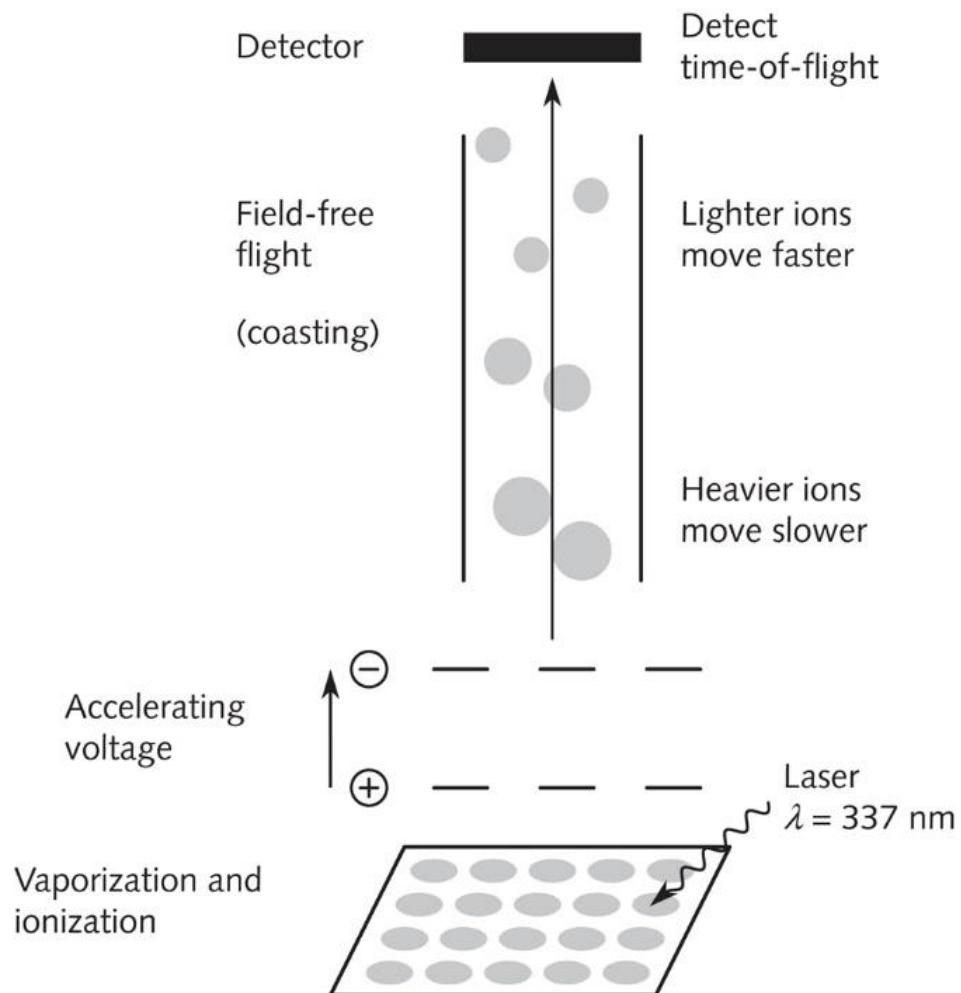
Po 2D PAGE posamezne lise izrežemo, protein razgradimo s proteazo (tripsinom) in iz vzorca mas dobljenih fragmentov (fingerprint) identificiramo protein na podlagi baze podatkov.



Lahko uporabimo tudi Edmanovo degradacijo.

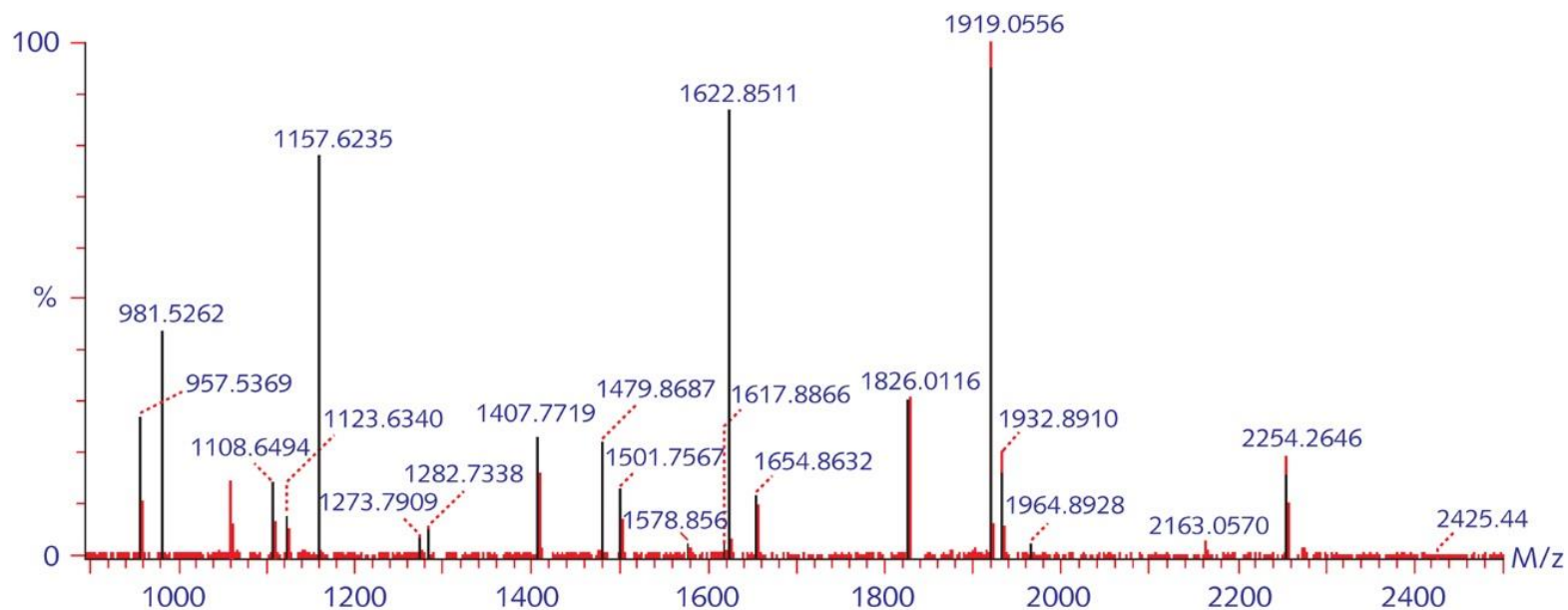
Masna spektroskopija

Masna spektroskopija je fizikalna tehnika, s katero molekule identificiramo na podlagi mase njihovih ionov.



Masna spektroskopija

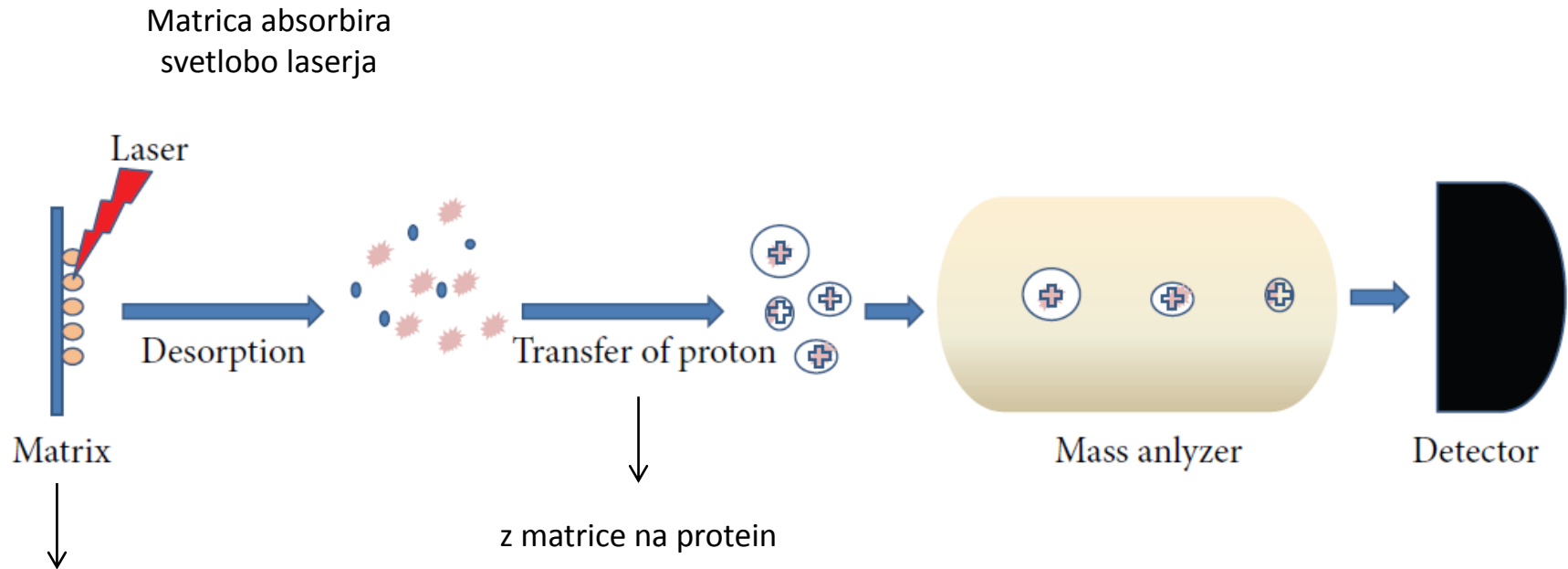
Masni spekter kaže odvisnost intenzitete vrhov od časa potovanja ionov, ki je sorazmerjen z razmerjem med maso in nabojem (m/z).



Masna spektroskopija

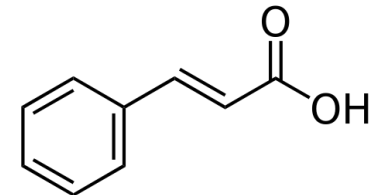
Proteini so občutljive molekule, zato je potrebna t.i. mehka ionizacija. Dve najpogosteje uporabljani metodi sta MALDI (ionizacija v matriksu z desorpcijo z laserjem) in ESI (ionizacija z elektrosprejem).

Shema MALDI experimenta:



vzorec je v suhi (trdni) obliki – kokristaliziran s pomožno snovjo

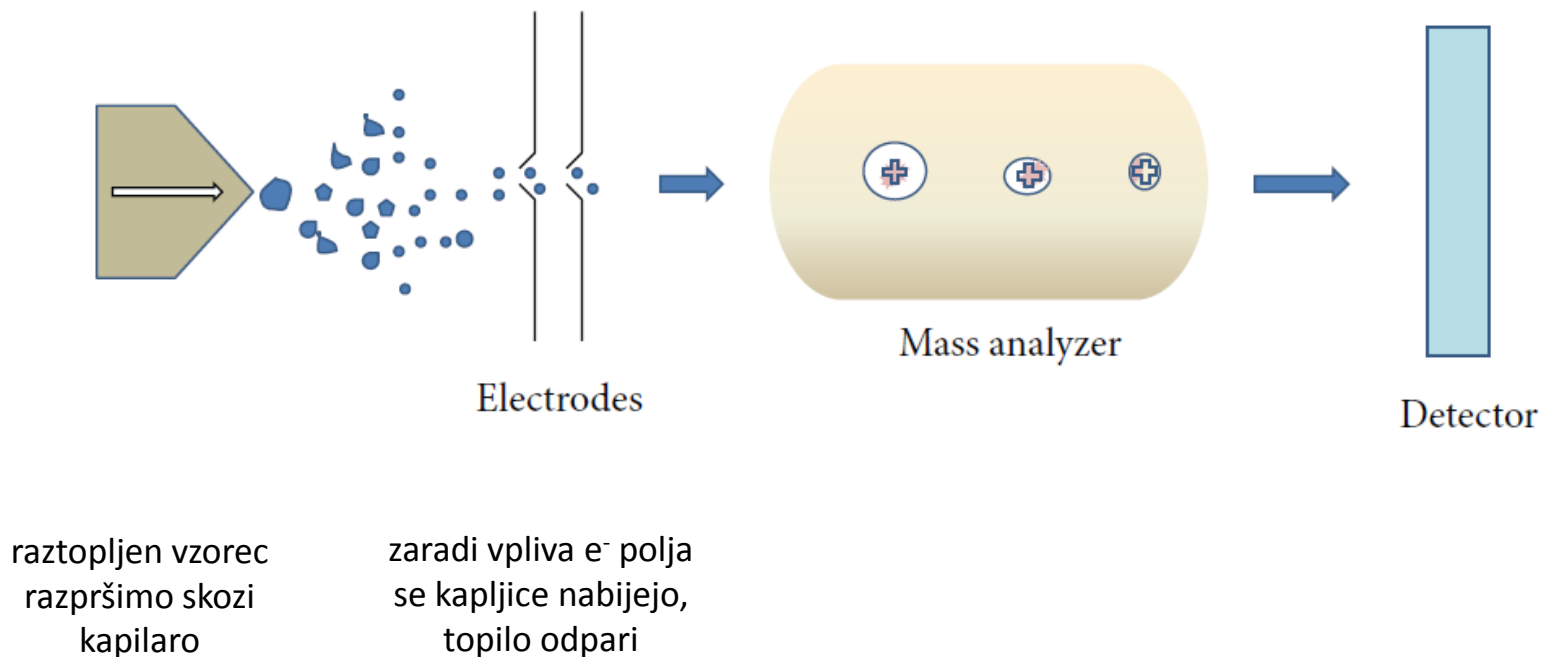
matrico predstavljajo različni derivati cimetove kisline



Masna spektroskopija

Proteini so občutljive molekule, zato je potrebna t.i. mehka ionizacija. Dve najpogosteje uporabljani metodi sta MALDI (ionizacija v matriksu z desorpcijo z laserjem) in ESI (ionizacija z elektrosprejem).

Shema ESI experimenta:



Proteomika

Primer: časovna dinamika izražanja proteinov plazmodija med okužbo.

Osredotočeno na fazo shizonta (32 do 48 ur po okužbi eritrocitov), kjer prihaja do intenzivnega nespolnega razmnoževanja parazita in povzroča tipične simptome malarije.

V tej fazi prihaja do natančno reguliranih sprememb v izražanju proteinov v parazitu.

Avtorji so analizirali proteom parazitov ob časih 34, 38, 42 in 46 ur po okužbi eritrocitov.

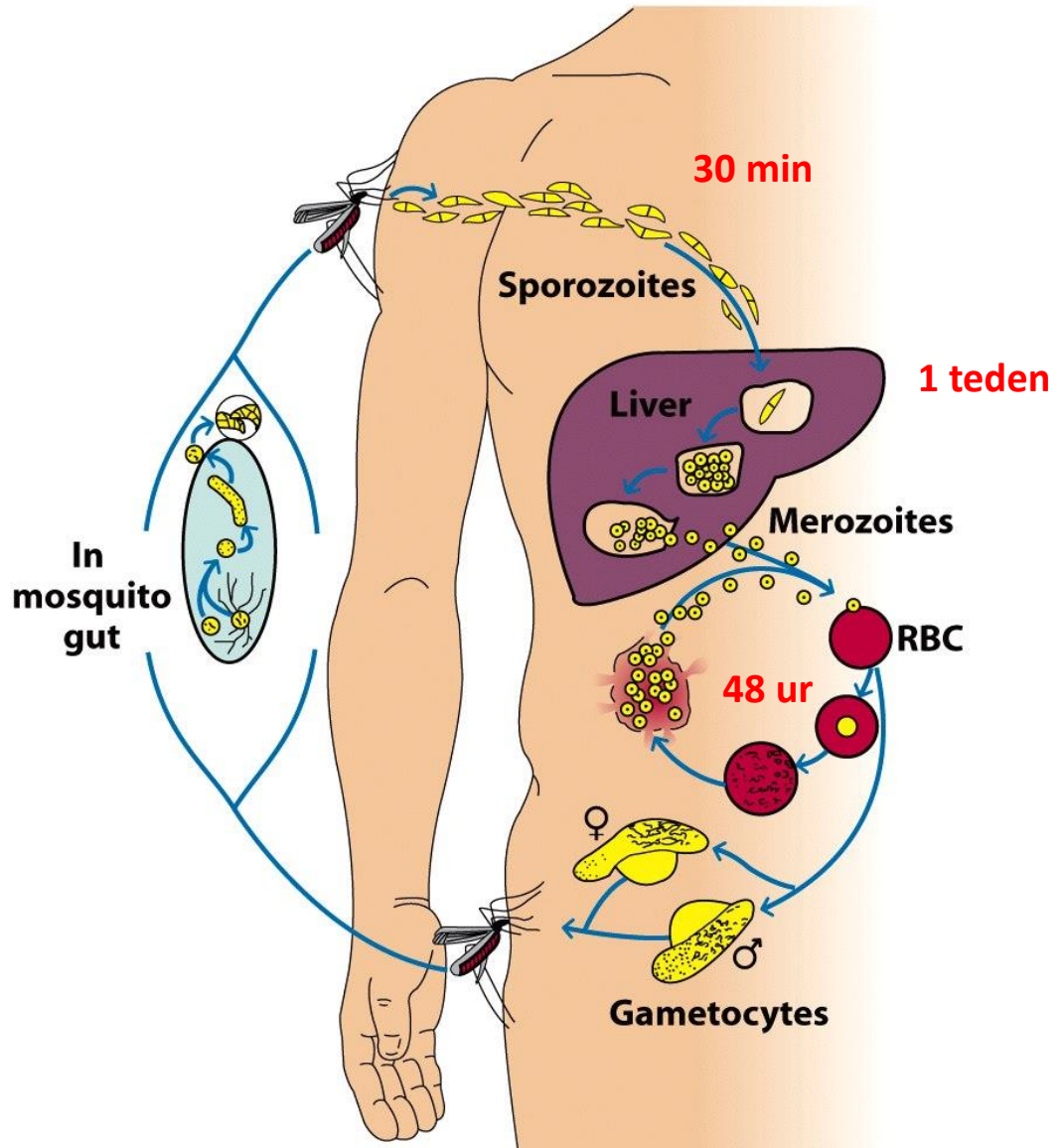
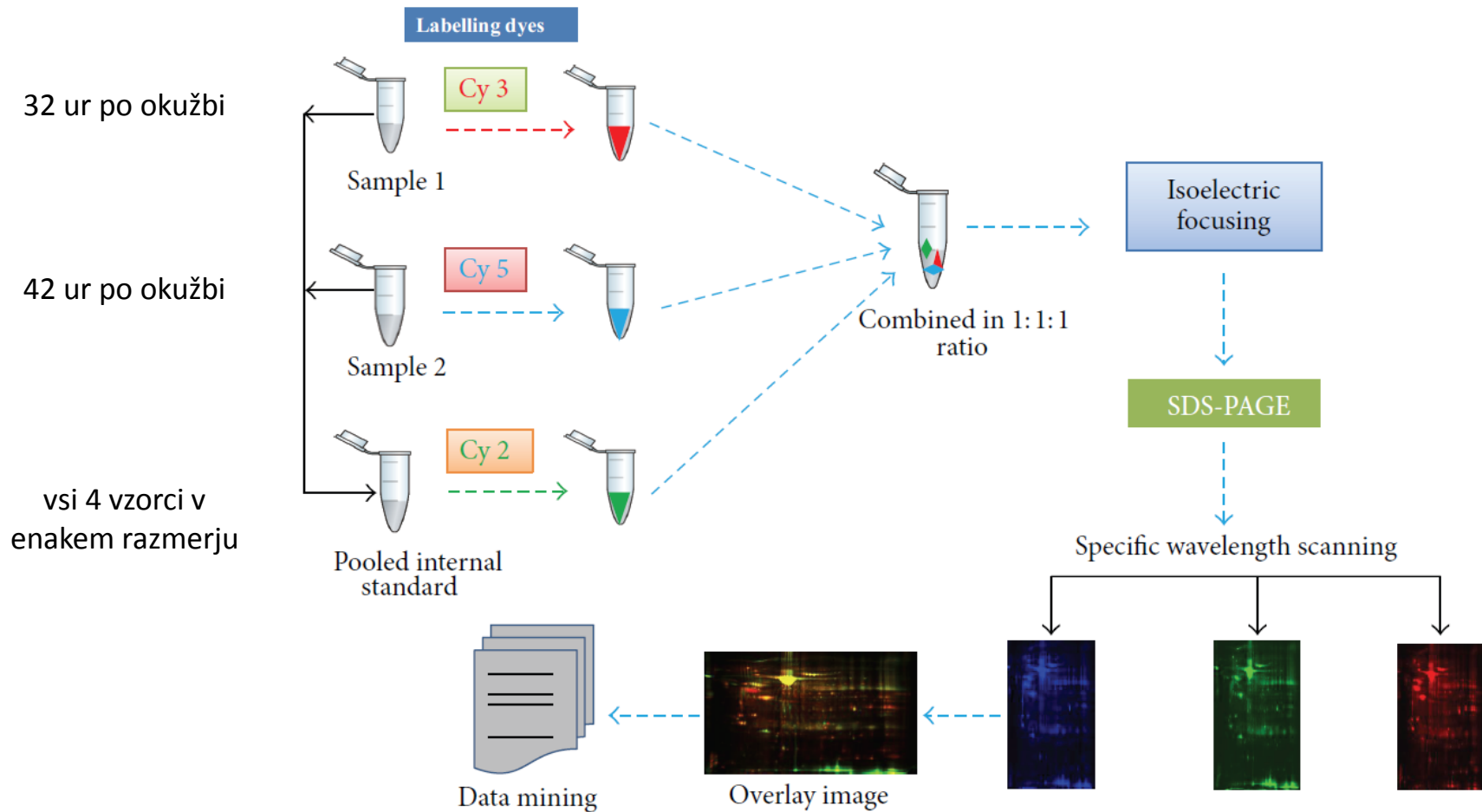


Figure 18-11
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Proteomika

Primer: časovna dinamika izražanja proteinov plazmodija med okužbo.

Uporabili so DiGE.



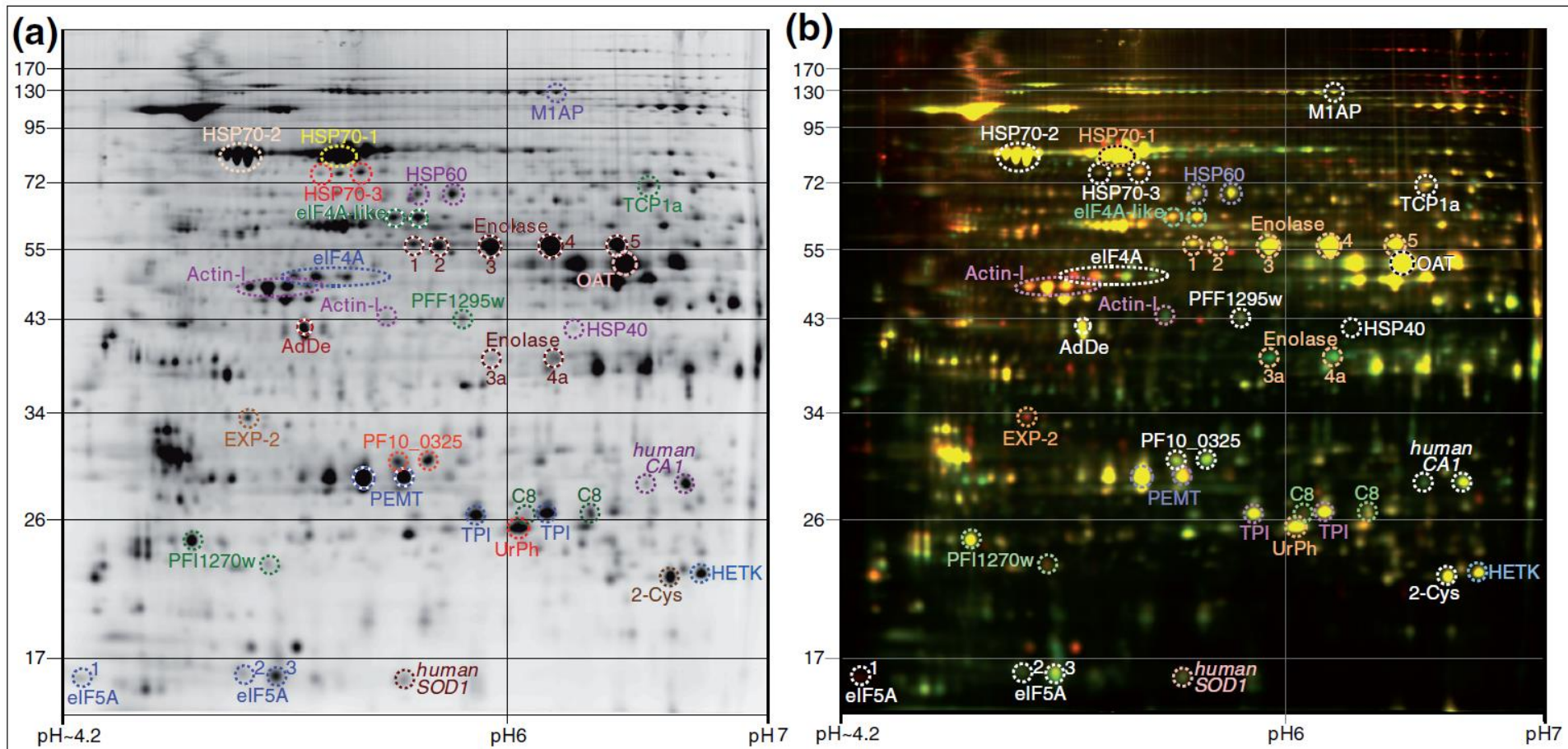
Proteomika

Primer: časovna dinamika izražanja proteinov plazmodija med okužbo.

Uporabili so DiGE.

Referenca

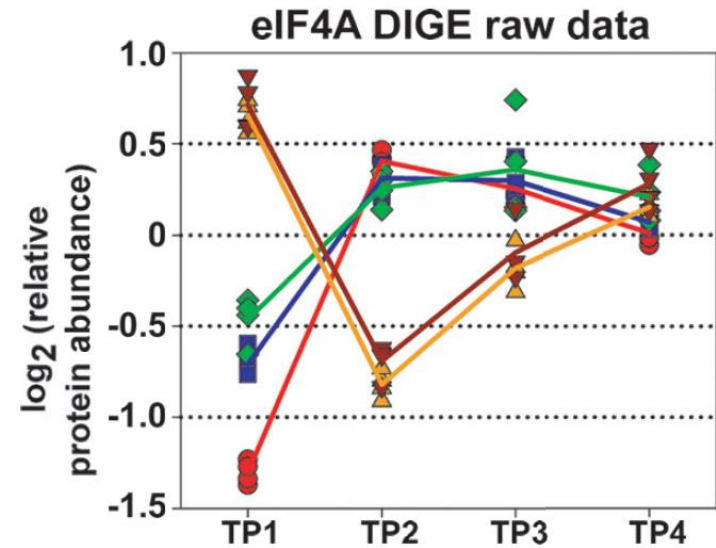
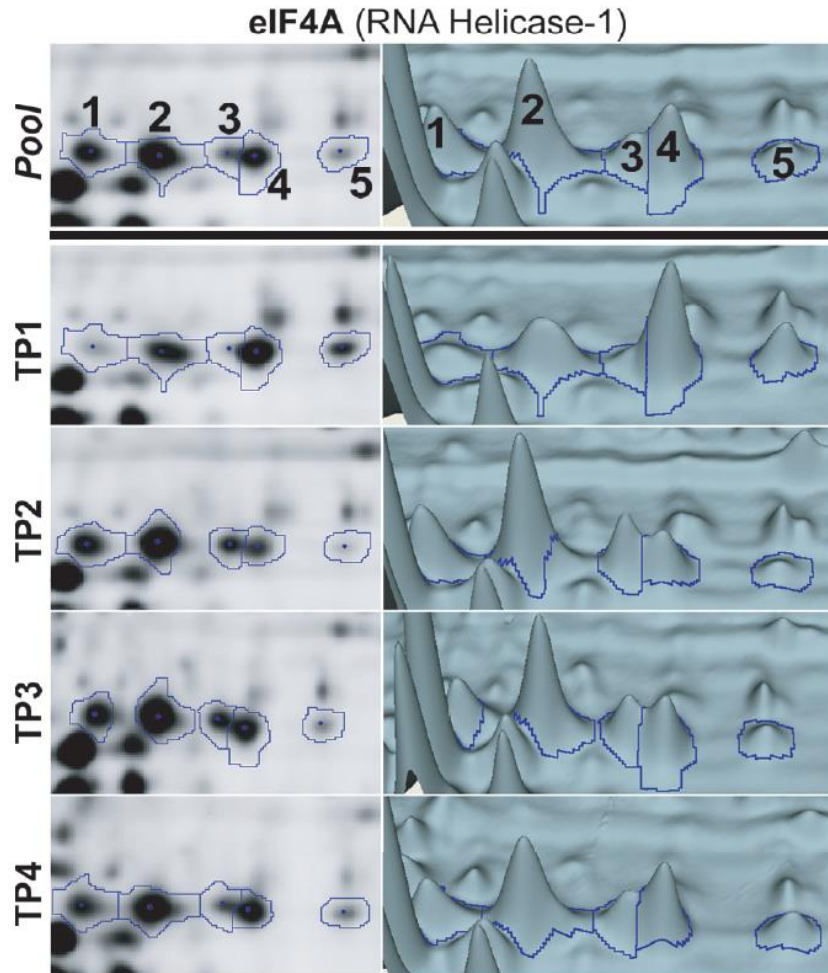
DiGE superpozicija 34h (zeleno) / 42 h (rdeče)



Proteomika

Primer: časovna dinamika izražanja proteinov plazmodija med okužbo.

Časovna dinamika izražanja izooblik eIF4A:

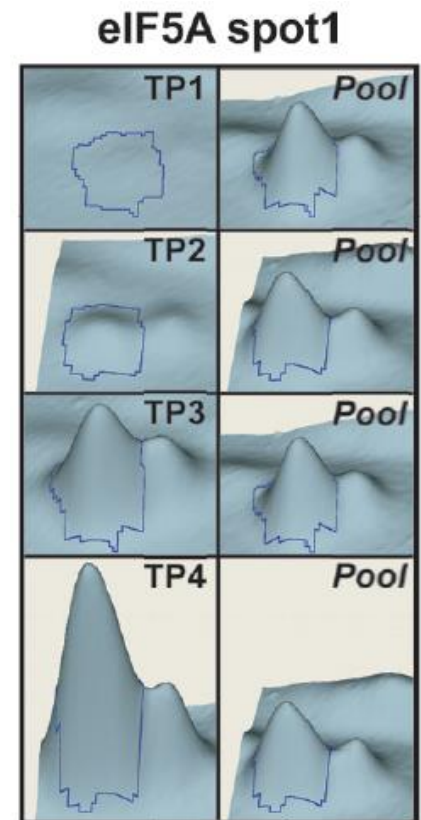
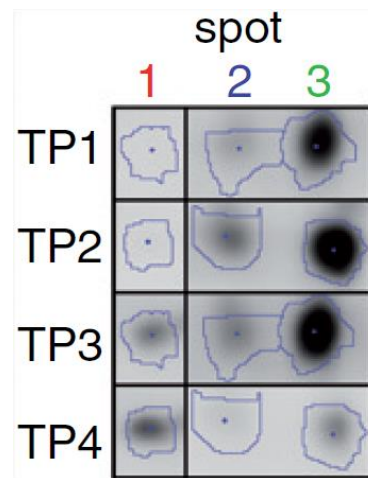
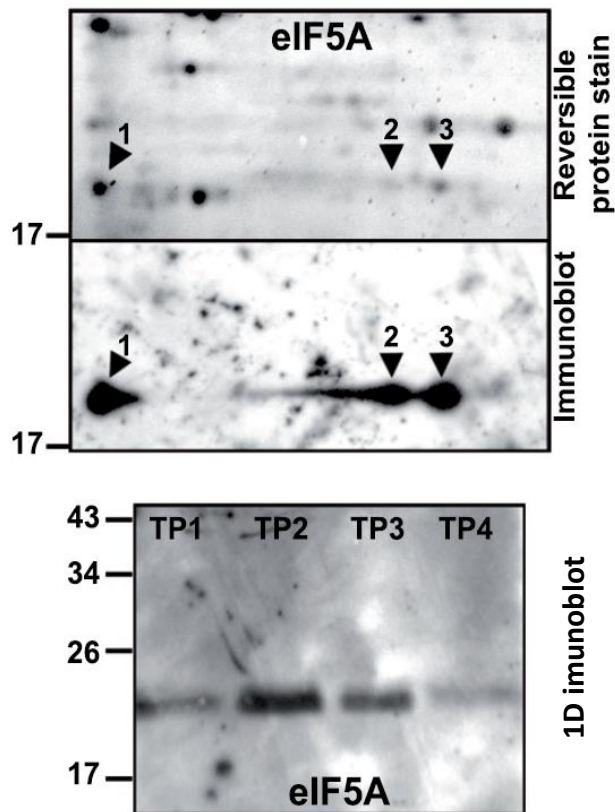


	Spot	Relative Standard Deviation				
		TP1	TP2	TP3	TP4	median
●	1	4.4%	3.7%	7.8%	5.8%	5.1%
■	2	5.6%	5.0%	6.6%	2.7%	5.3%
◆	3	8.8%	6.1%	20.6%	9.5%	9.2%
▲	4	5.7%	5.2%	8.2%	3.6%	5.5%
▼	5	9.6%	6.5%	11.8%	10.4%	10.0%

Proteomika

Primer: časovna dinamika izražanja proteinov plazmodija med okužbo.

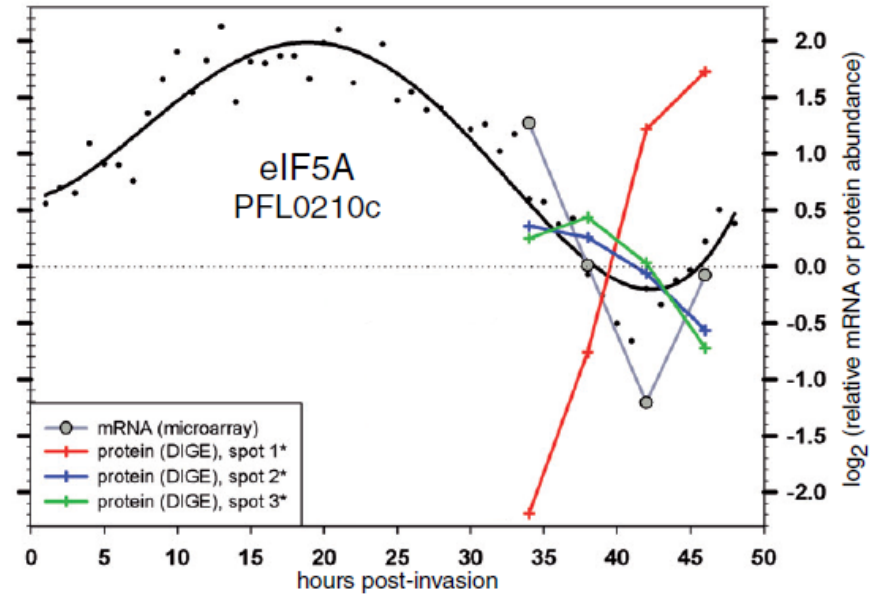
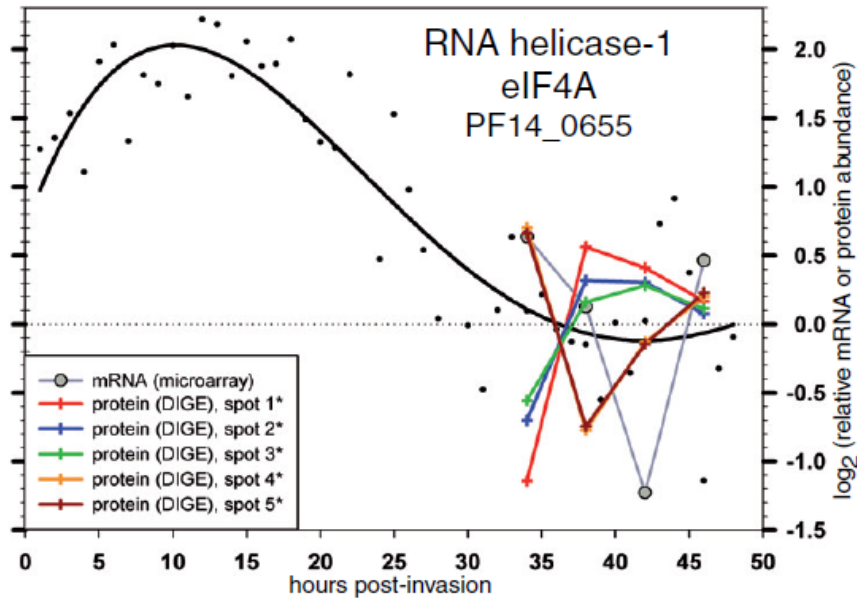
Časovna dinamika izražanja izooblik eIF5A:



Proteomika

Primer: časovna dinamika izražanja proteinov plazmodija med okužbo.

Primerjava nivojev proteinov in mRNA:

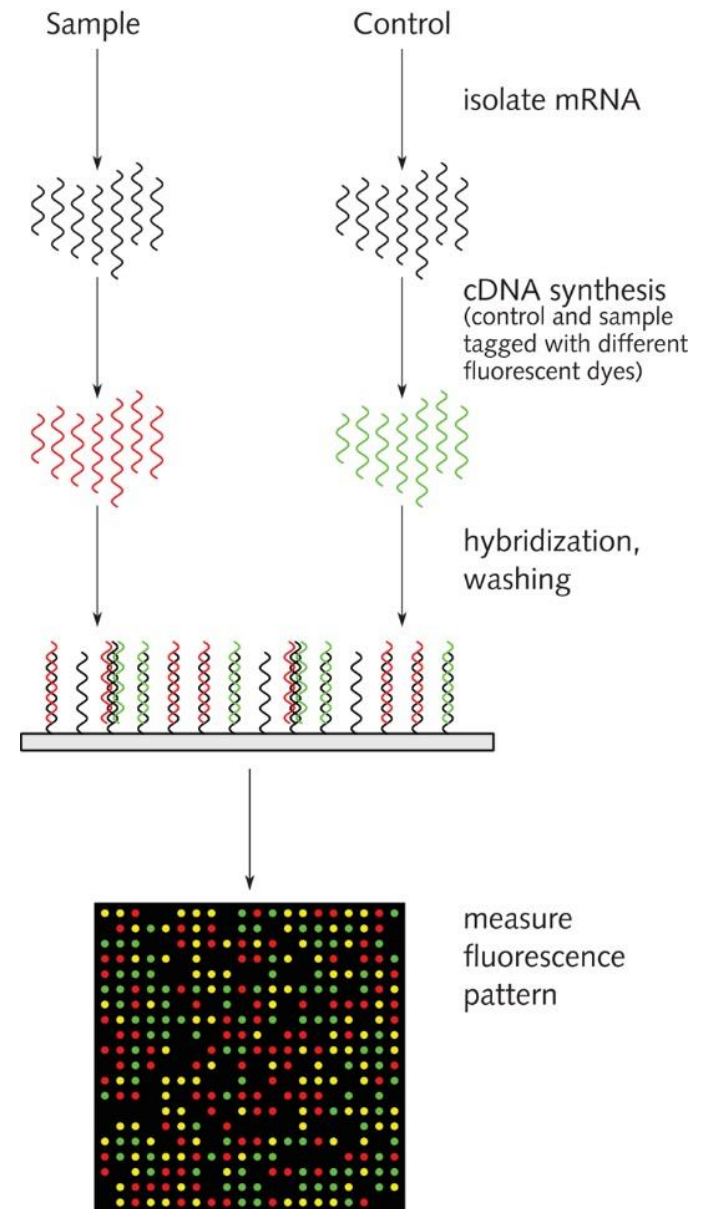


Mikromreže

Mikromreže predstavljajo vmesni člen med genomskimi in proteomskimi analizami. Z njimi analiziramo vzorce mRNA in genomske DNA.

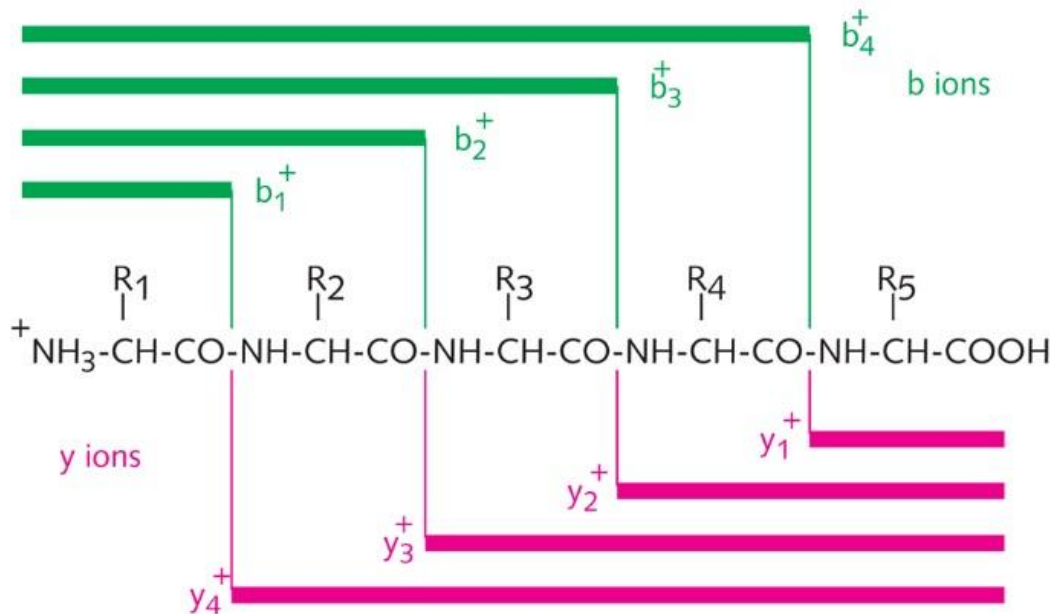
Temeljijo na hibridizaciji tarčnih NA molekul vzorca s *probami*, vezanimi na nosilec. Omogočajo paralelizacijo analize – veliko število različnih prob na čipu.

Čip je ponavadi velik 2 x 2 cm in lahko vsebuje več 1000 vzorcev. Npr. kvasni čip vsebuje preko 6000 oligonukleotidov in pokriva vse kvasne gene.



Masna spektroskopija

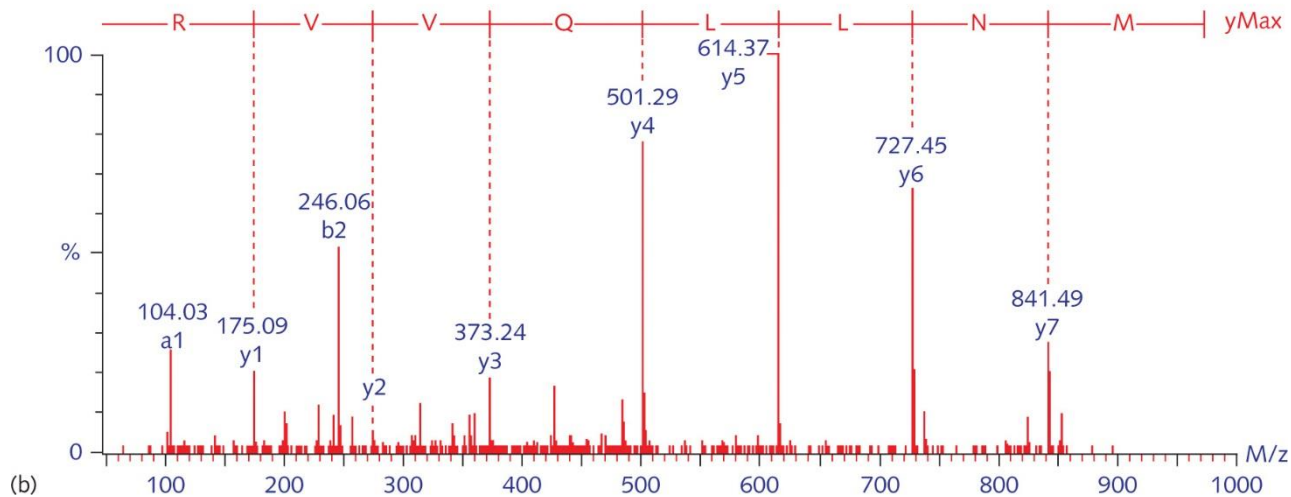
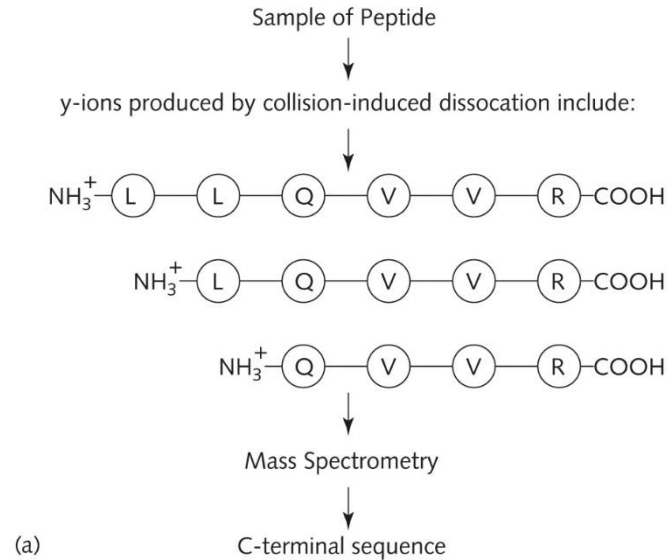
Masno spektroskopijo lahko uporabimo tudi za *de novo* sekvenciranje proteinov/peptidov.



Gly	57.021	Ala	71.037	Ser	87.032
Pro	97.053	Val	99.068	Thr	101.048
Cys	103.009	Leu	113.084	Ile	113.084
Asn	114.043	Asp	115.027	Gln	128.059
Lys	128.095	Glu	129.043	Met	131.040
His	137.059	Phe	147.068	Arg	156.101
Tyr	163.063	Trp	186.079		

Masna spektroskopija

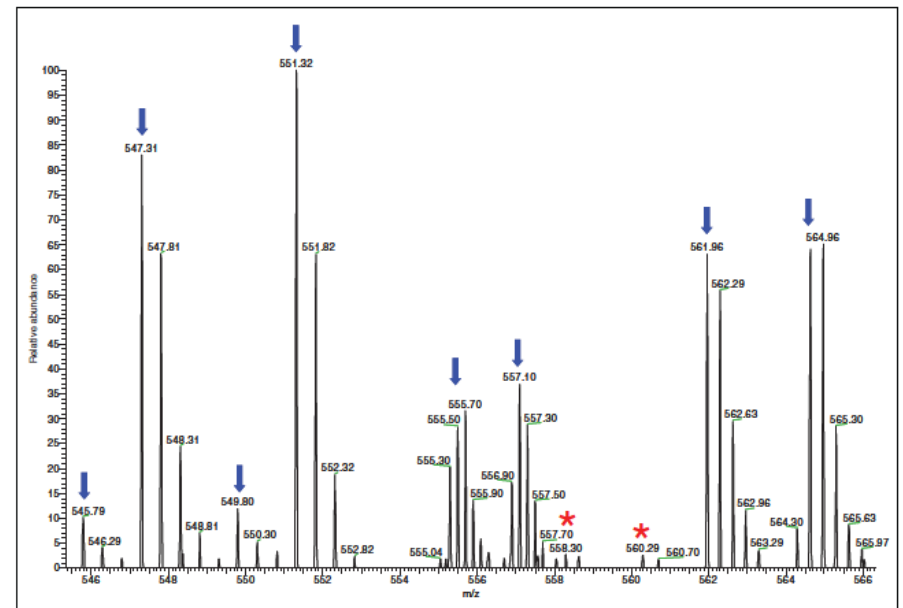
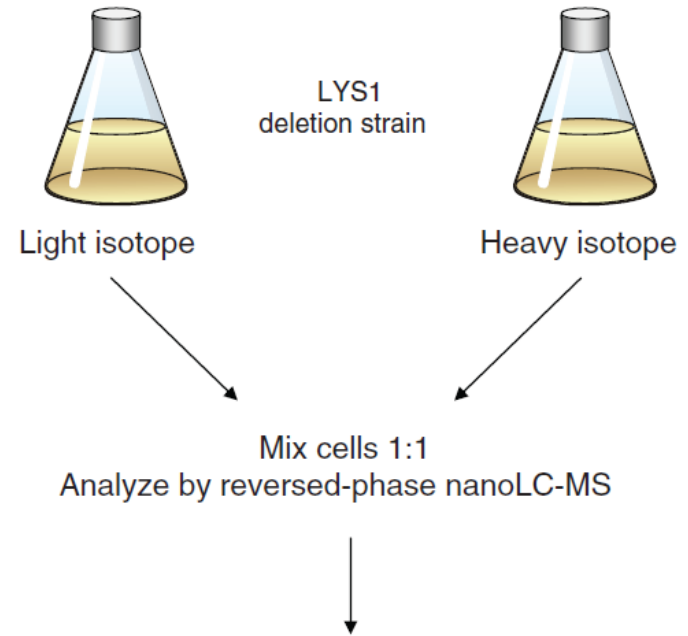
Masno spektroskopijo lahko uporabimo tudi za *de novo* sekvenciranje proteinov/peptidov.



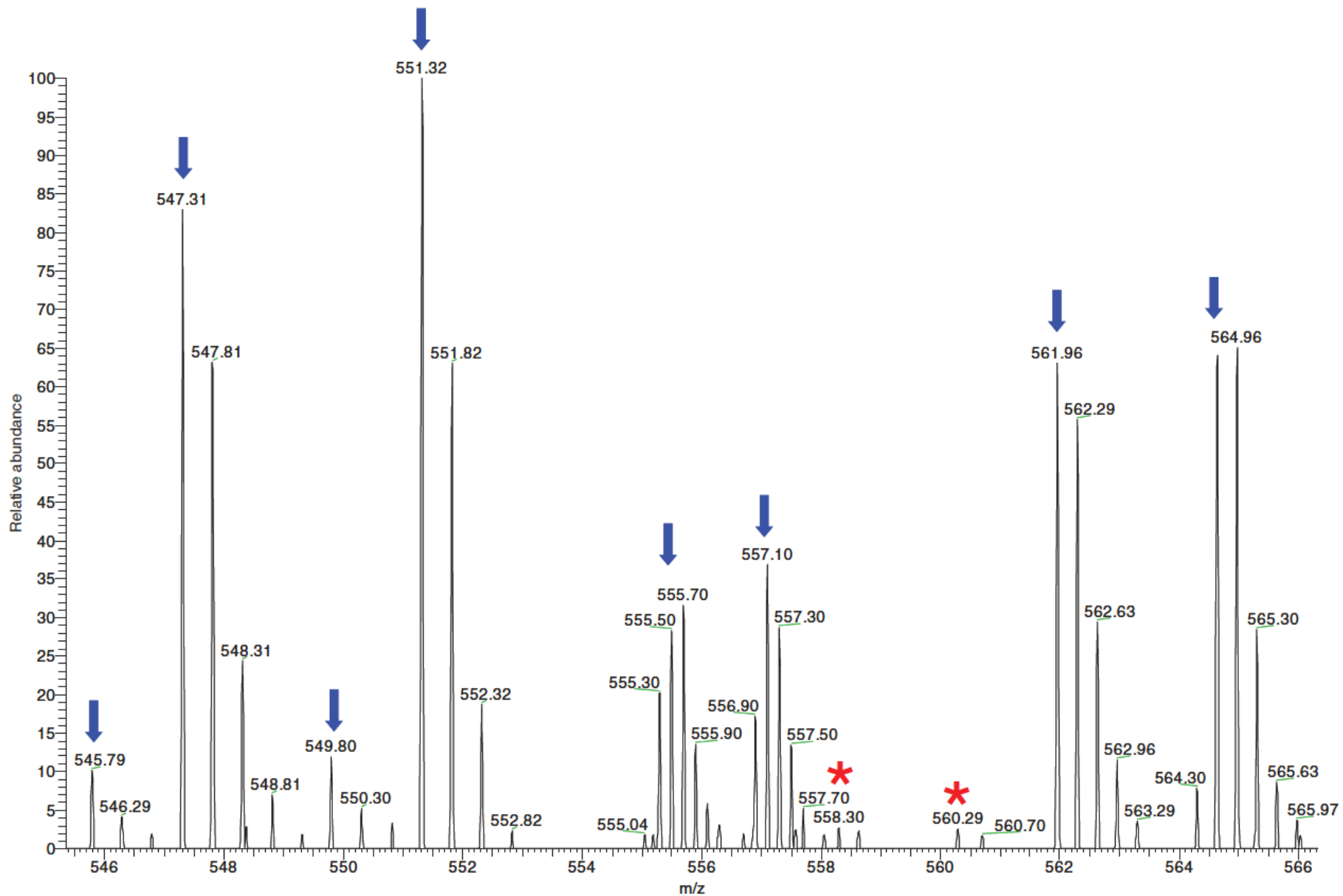
SILAC

SILAC je metoda za kvantitativno primerjavo količin proteinov v dveh vzorcih. Istočasno metoda pomaga identificirati vrhove, ki resnično pripadajo proteinom.

Metoda zahteva uporabo sevov, ki niso sposobni sintetizirati lizina. Paralelno gojimo dve kulturi (isti/različen sev), eno v gojišču z normalnim lizinom, drugo pa v gojišču z lizinom označenim s ^{13}C in ^{15}N . Enaki količini vzorcev obeh kultur zmešamo, (ločimo s PAGE), cepimo z endoproteazo LysC in analiziramo z masno spektroskopijo. Vrhovi, ki pripadajo peptidom, so razmaknjeni za točno 8 Da/z, iz njihovih relativnih intenzitet pa sklepamo na relativni količini proteina v obeh vzorcih.



SILAC



Metagenomika/metaproteomika

Metagenomika in metaproteomika sta aplikaciji genomike in proteomike na kompleksnih okoljskih vzorcih (npr. vzorec vode, prsti,...). Gre predvsem za študije raznolikosti mikroorganizmov in interakcij med njimi.

Metagenomika – sekvenciranje DNA iz okoljskih vzorcev v velikem obsegu (*large-scale*) – pojasni evolucijska razmerja med vrstami v vzorcu. Zajame tudi vzorce organizmov, ki jih je težko gojiti izolirane v laboratoriju.

Metaproteomika – karakterizacija proteoma okoljskih vzorcev v nekem danem času in prostoru. Spremljamo nivoje proteinov, genomskih zaporedij, transkriptov, metabolitov, fluksa metabolnih poti, itd. S tem dobimo informacijo o dinamiki življenjskega ciklusa v vzorcu, interakcijah med vrstami (zaznavanje kvoruma), itd.

Metagenomika/metaproteomika

Primer: škržatek *Homalodisca coagulata* (angl. glassy-winged sharpshooter) je rastlinski zajedalec in prenašalec škodljive bakterije *Xylella fastidiosa*, ki je največji škodljivec v kalifornijskih vinogradih.

H. coagulata živi v simbiozi z dvema vrstama bakterij, *Sulcia muelleri* in *Baumannia cicadellinicola*. Med seboj si vse tri vrste delijo nekatere esencialne metabolne encime.

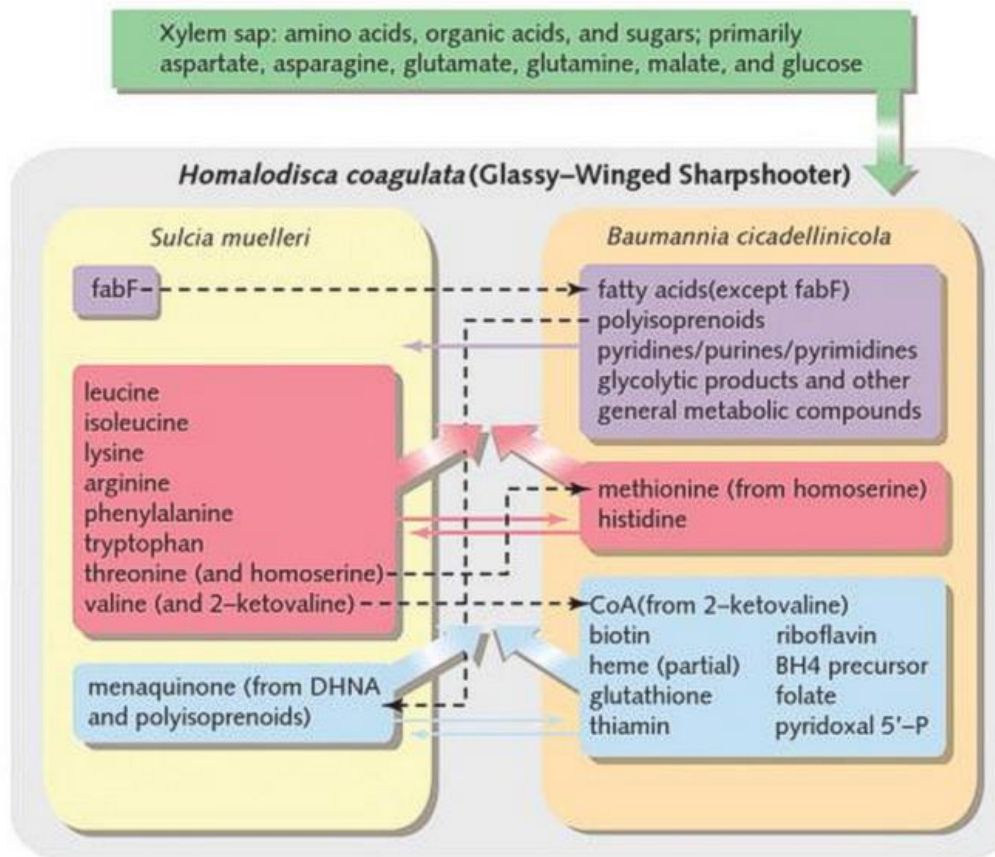
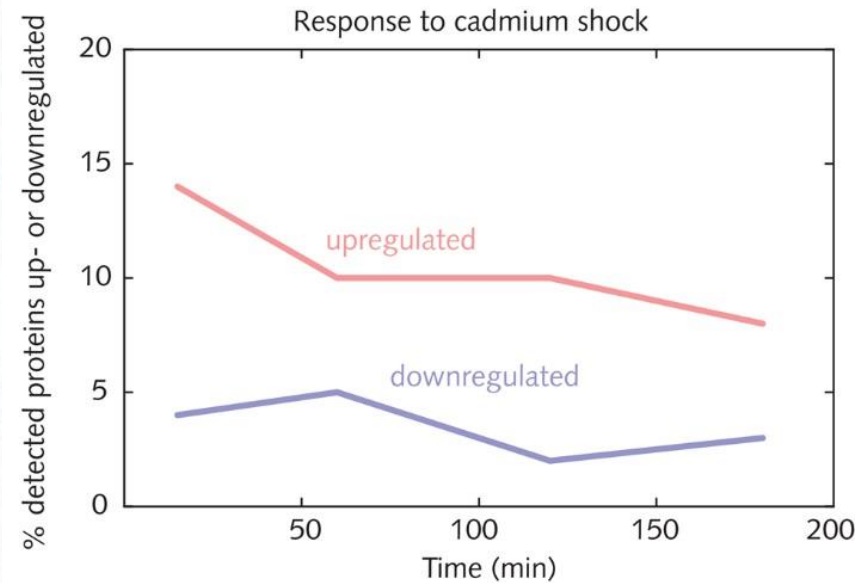
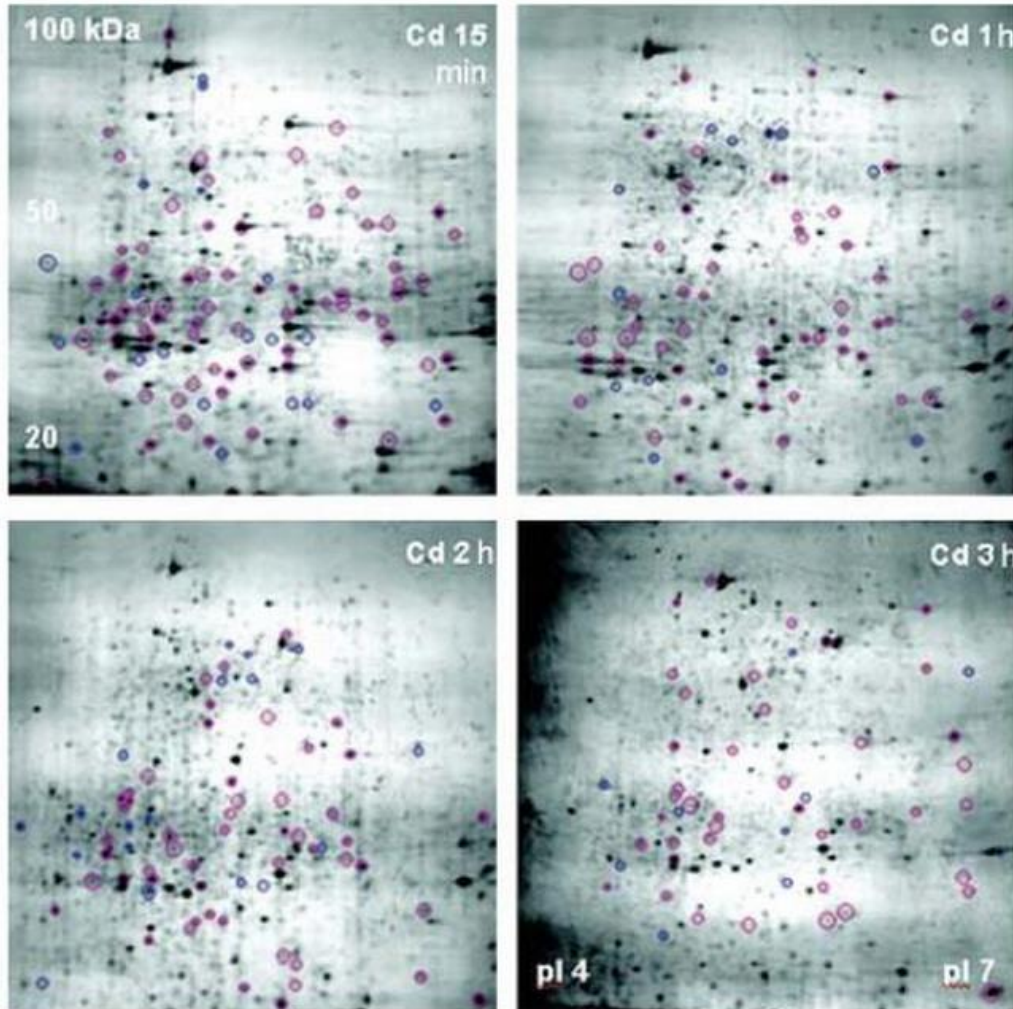


Figure 9.10 Complementarity in metabolic competence between coparasites of the glassy-winged sharpshooter (*Homalodisca coagulata*) *Sulcia muelleri*, and *Baumannia cicadellinicola*. Large coloured arrows: compounds needed by the host that the bacterial symbionts produce. Small coloured arrows (and dashed arrows): compounds (believed to be) shared between the bacterial symbionts. Red: compounds, processes, or genes involved in biosynthesis of essential amino acids. Light blue: vitamin or cofactor biosynthesis. Purple: other metabolic functions.

[From: McCutcheon, J.P. and Moran, N.A. (2007). Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **104**, 19392–19397.]

Metagenomika/metaproteomika

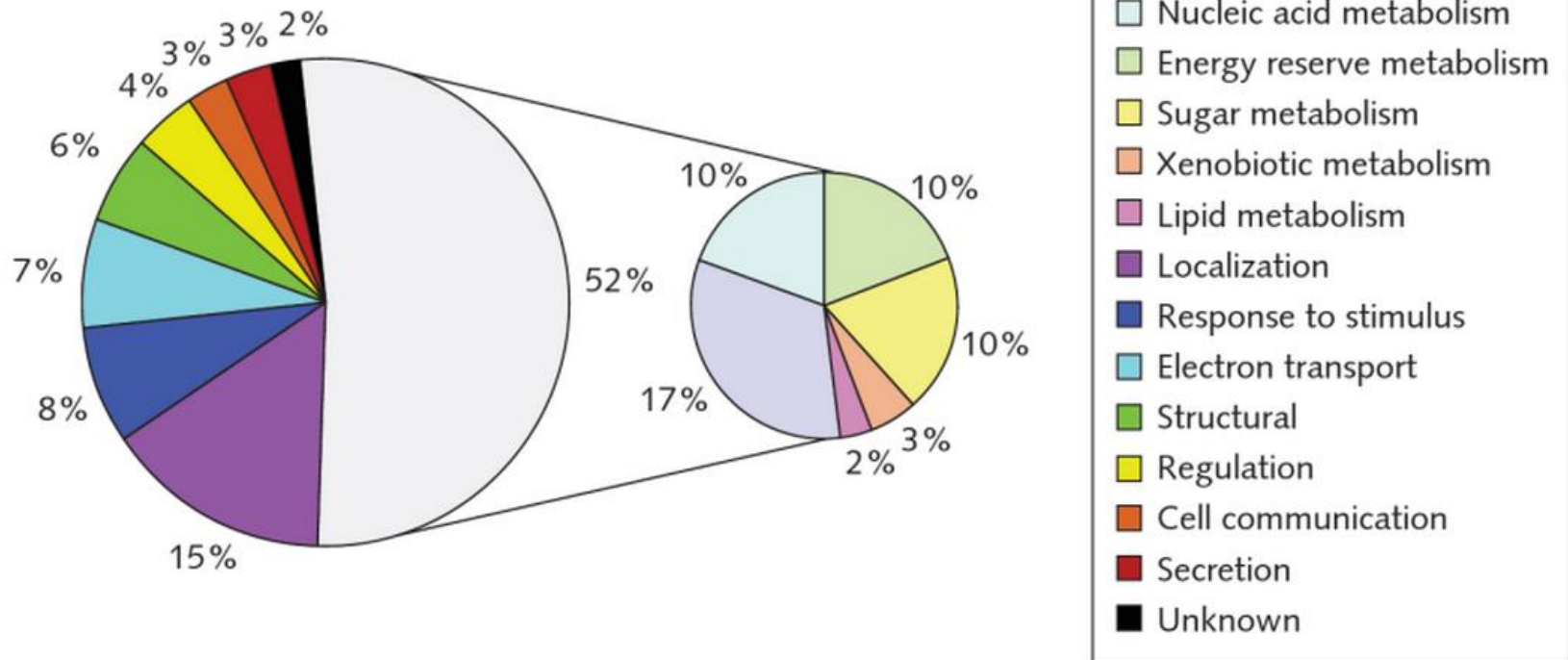
Primer: kadmijev šok, induciran z dodatkom 10 mg/l Cd^{2+} v bioreaktor čistilne naprave, ki vsebuje okoli 50 do 100 različnih vrst mikroorganizmov. Cd^{2+} deluje citotoksično po dveh mehanizmih: veže proste $-\text{SH}$ skupine cisteinov in inducira poškodbe DNA.



Kriterij za up/downregulacijo:
2x sprememba količine proteina

Metagenomika/metaproteomika

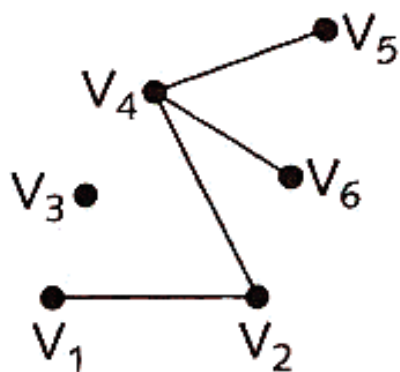
Primer: kadmijev šok, induciran z dodatkom 10 mg/l Cd^{2+} v bioreaktor čistilne naprave, ki vsebuje okoli 50 do 100 različnih vrst mikroorganizmov. Cd^{2+} deluje citotoksično po dveh mehanizmih: veže proste $-\text{SH}$ skupine cisteinov in inducira poškodbe DNA.



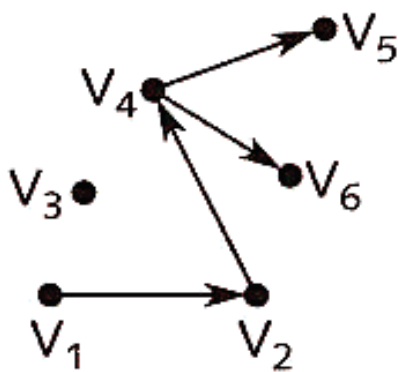
Biologija sistemov

Biologija sistemov se osredotoča na integracijo in regulacijo aktivnosti genov in proteinov. Interakcije v sistemu opisuje v obliki interakcijskih omrežij, ki jih predstavlja v obliki grafov.

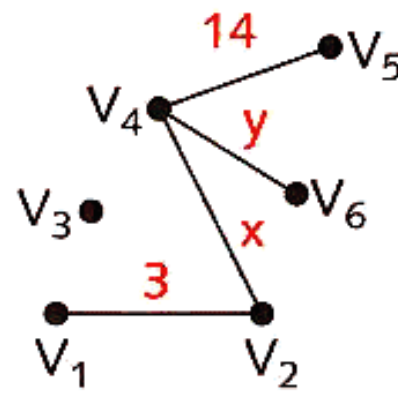
Grafi so abstraktne predstavitve interakcijskih omrežij so lahko različnih tipov:



graf



usmerjen graf



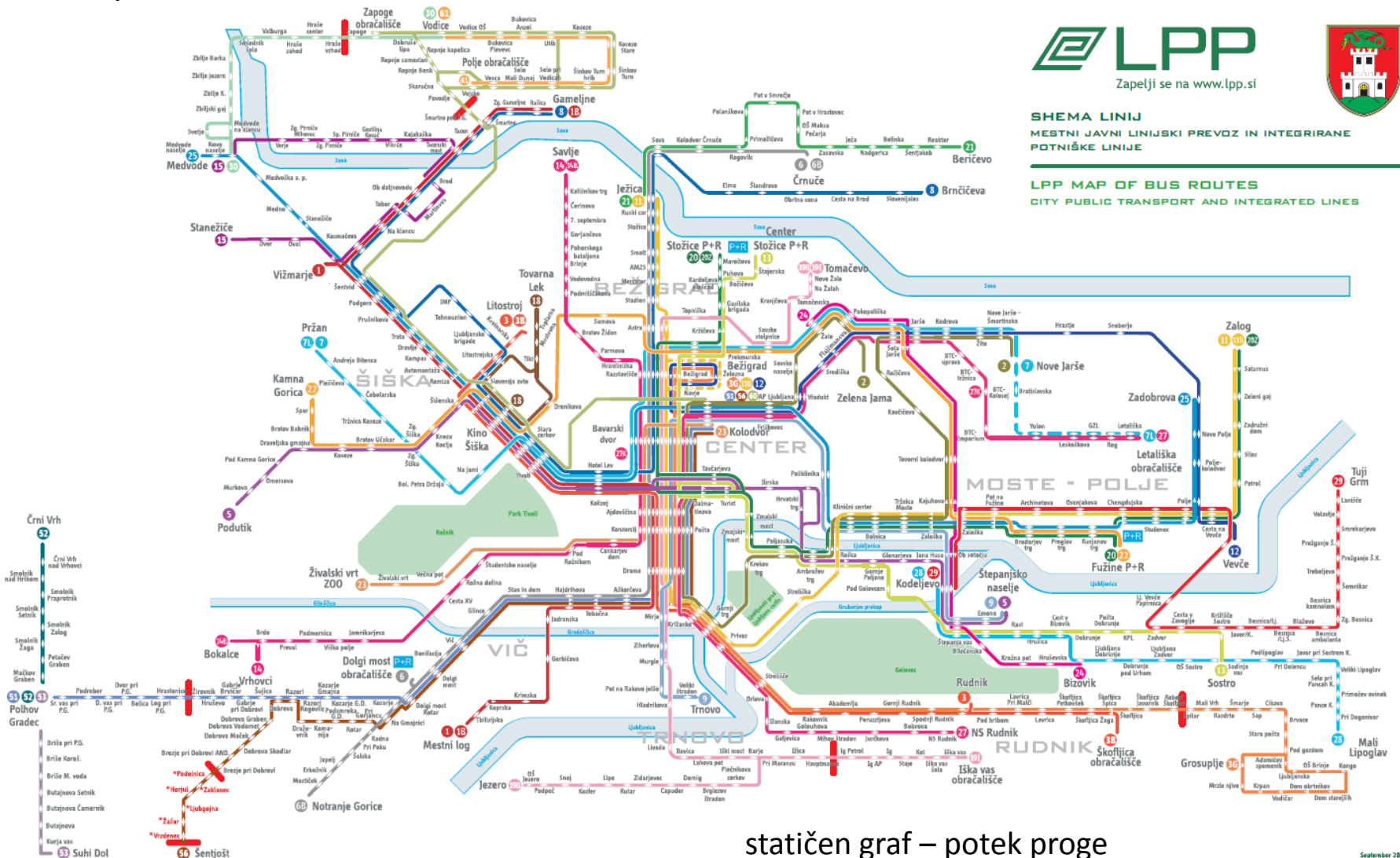
označen graf

Graf kaže povezanost točk v omrežju, vendar njegova topologija ne odraža nujno fizične geometrije sistema. Oznake stranic lahko podajajo dejanske razdalje med oglišči ali opisujejo dinamiko sistema. V usmerjenih grafih puščice ponazarjajo urejenost parov oglišč.

Omrežja so lahko **statična** ali **dinamična**.

Biologija sistemov

Graf kaže povezanost točk v omrežju, vendar njegova topologija ne odraža nujno fizične geometrije sistema.



SHEMA LINIJ
 MESTNI JAVNI LINIJSKI PRAVOZ IN INTEGRIRANE
 POTNIŠKE LINIJE

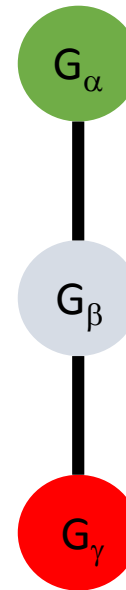
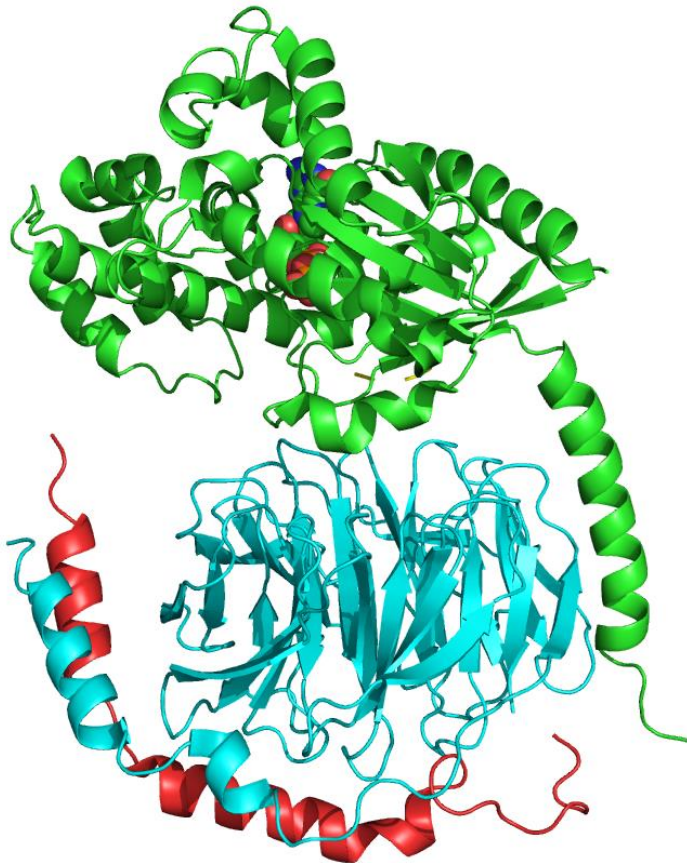
LPP MAP OF BUS ROUTES
 CITY PUBLIC TRANSPORT AND INTEGRATED LINES

statičen graf – potek proge
 dinamičen graf - potek proge + vozni red

Biologija sistemov

Biologija sistemov se osredotoča na integracijo in regulacijo aktivnosti genov in proteinov. Interakcije v sistemu predstavlja v obliki interakcijskih omrežij. V sistemih (npr. celici) vzporedno in med seboj povezano delujeta dve vrsti omrežij: fizična in logična

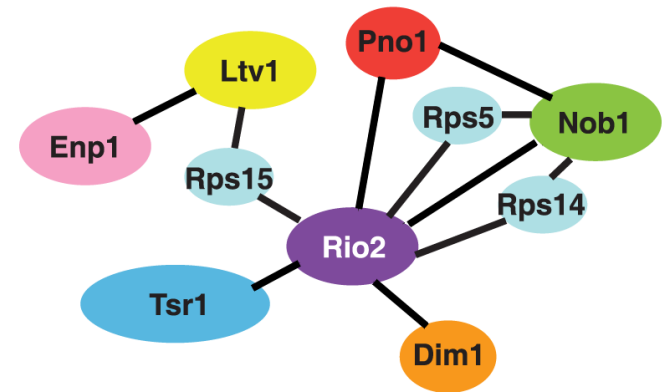
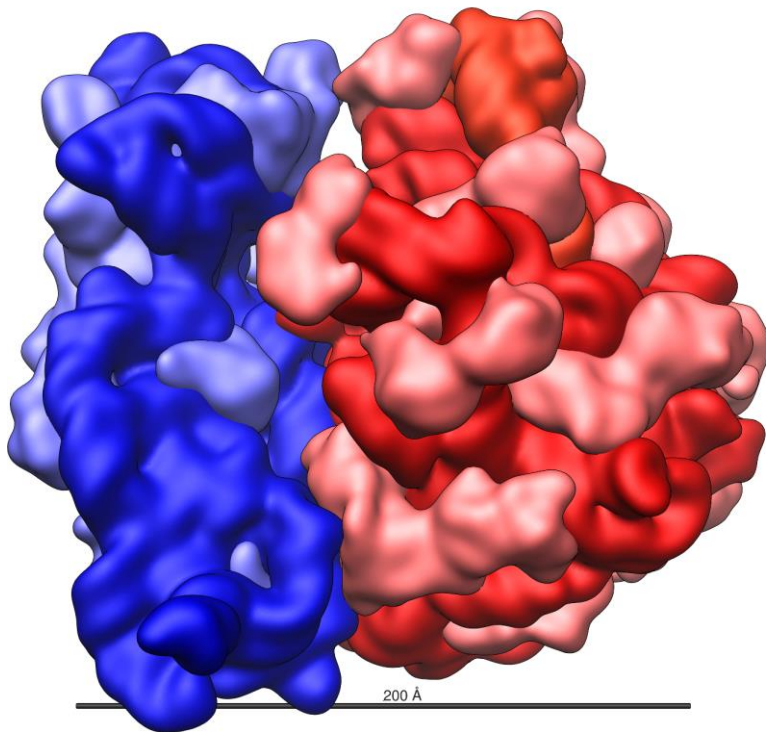
- **Fizična omrežja** – interakcije (kompleksi) protein-protein, protein-nukleinske kisline



Biologija sistemov

Biologija sistemov se osredotoča na integracijo in regulacijo aktivnosti genov in proteinov. Interakcije v sistemu predstavlja v obliki interakcijskih omrežij. V sistemih (npr. celici) vzporedno in med seboj povezano delujeta dve vrsti omrežij: fizična in logična

- **Fizična omrežja** – interakcije (kompleksi) protein-protein, protein-nukleinske kisline



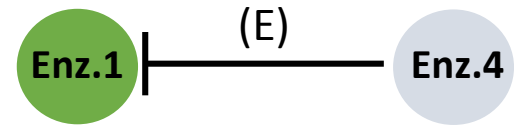
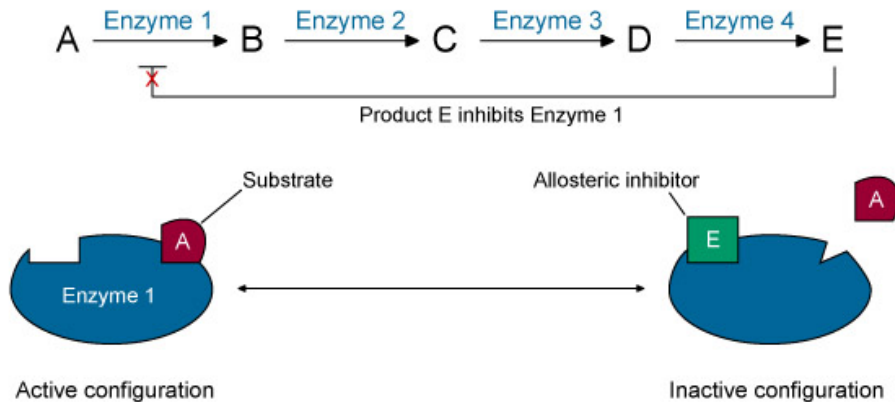
del interakcijskega omrežja ribosoma

Biologija sistemov

Biologija sistemov se osredotoča na integracijo in regulacijo aktivnosti genov in proteinov. Interakcije v sistemu predstavlja v obliki interakcijskih omrežij. V sistemih (npr. celici) vzporedno delujeta dve vrsti omrežij: fizična in logična.

- **Logična omrežja** – regulatorna omrežja signalnih kaskad, ki ponazarjajo prenos informacije

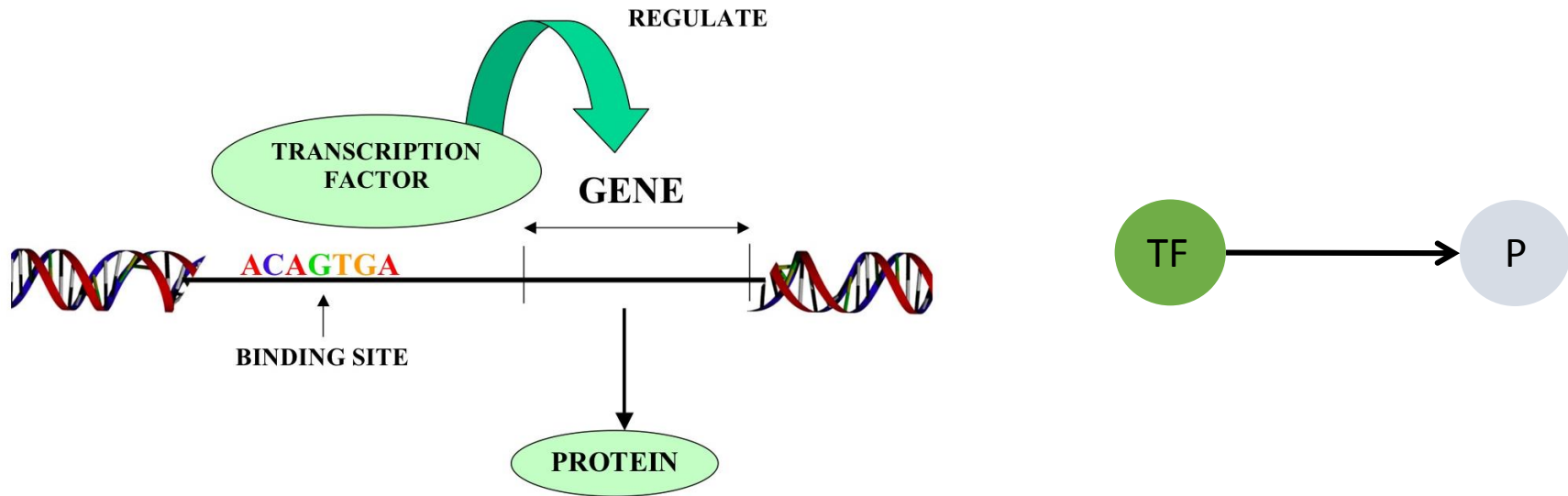
regulacija z negativno povratno zvezo



Biologija sistemov

Biologija sistemov se osredotoča na integracijo in regulacijo aktivnosti genov in proteinov. Interakcije v sistemu predstavlja v obliki interakcijskih omrežij. V sistemih (npr. celici) vzporedno delujeta dve vrsti omrežij: fizična in logična.

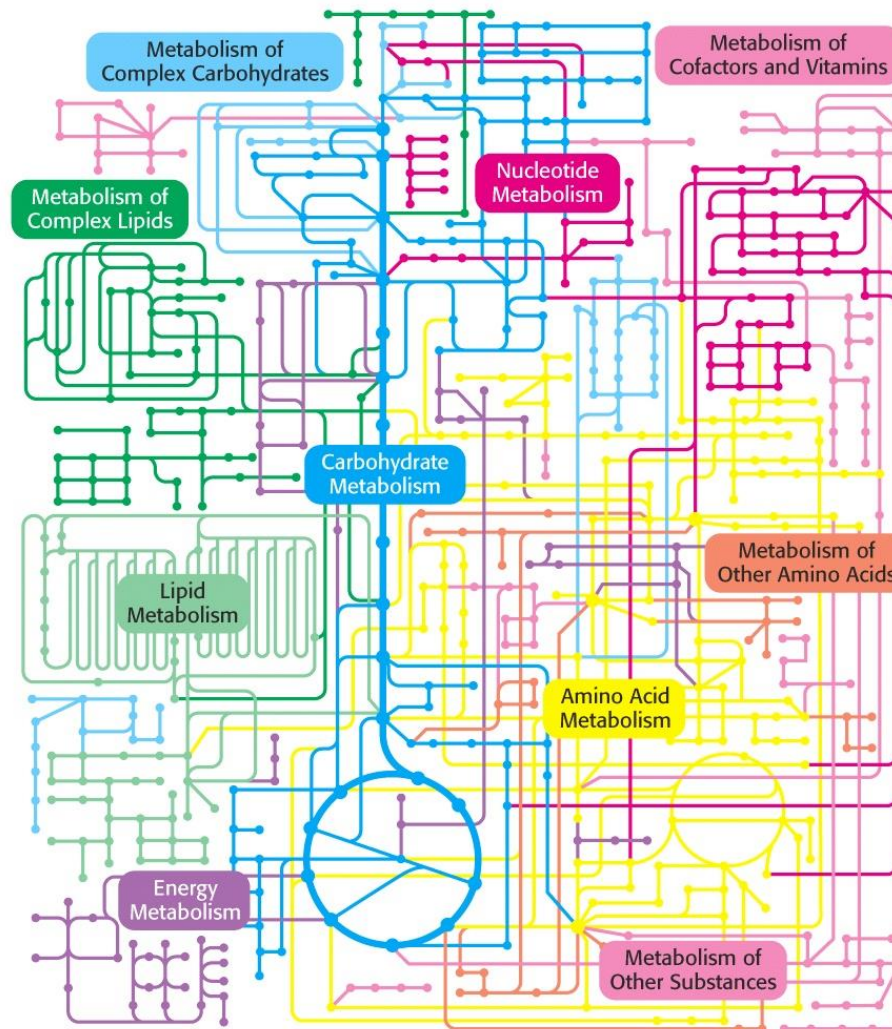
- **Logična omrežja** – regulatorna omrežja signalnih kaskad, ki ponazarjajo prenos informacije



Transkripcijski faktor je regulator izražanja proteina, med njima je logična zveza, čeprav ni fizične interakcije med proteinoma.

Metabolne poti

Verjetno najbolj znan primer interakcijskih omrežij. Metabolne poti lahko vključujejo tako fizična kot logična omrežja, nista pa nujno oba tipa prisotna pri vseh poteh.



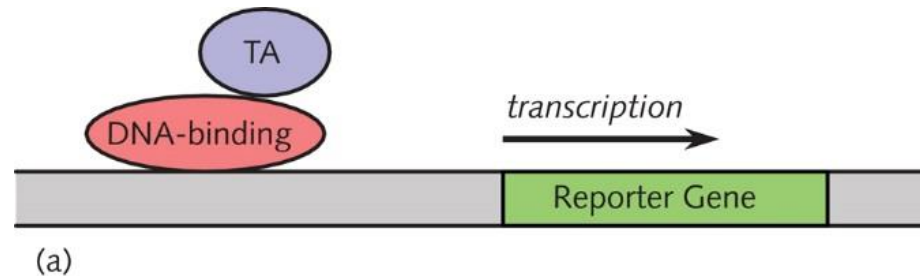
Fizična omrežja proteinov

Za identifikacijo fizičnih omrežij proteinov je na voljo veliko metod. Večinoma je mogoče hkrati določiti le nekaj interakcijskih partnerjev. Interakcijsko omrežje moramo sestaviti in interpretirati sami.

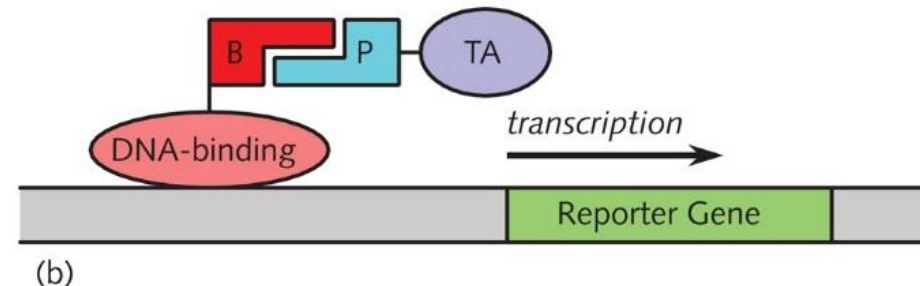
Metode za identifikacijo:

- *rentgenska kristalografija in NMR spektroskopija* – identifikacija načina interakcij in konformacijskih sprememb
- *dvohibridni sistemi* – npr. kvasni dvohibridni sistem - ob interakciji pride do prepisovanja

divji tip



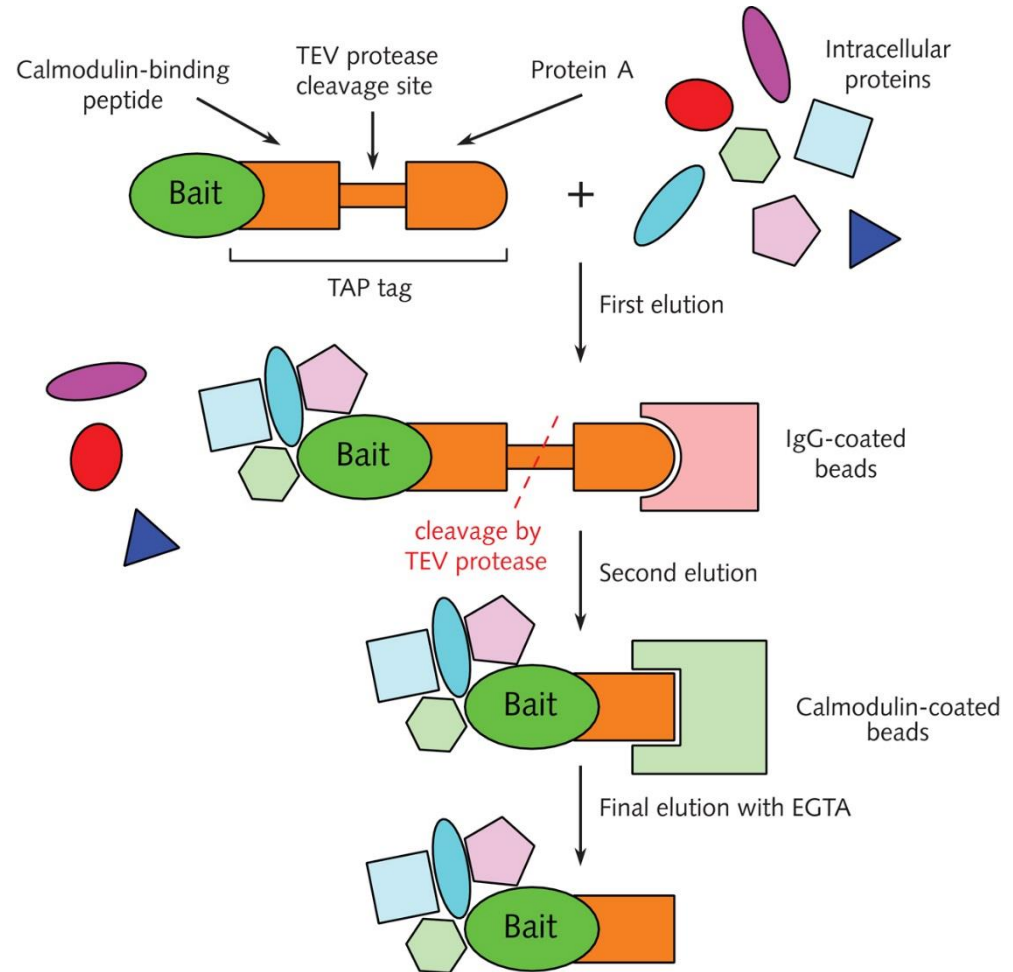
dvohibridni sistem



Fizična omrežja proteinov

Metode za identifikacijo:

- *tandemska afinitetna izolacija (TAP)* – možnost izolacije celotnega interakcijskega kompleksa, dve zaporedni stopnji afinitetne kromatografije ter specifični in blagi pogoji elucije dajejo dobre rezultate pri identifikaciji kompleksov prisotnih v nizkih koncentracijah.



Fizična omrežja proteinov

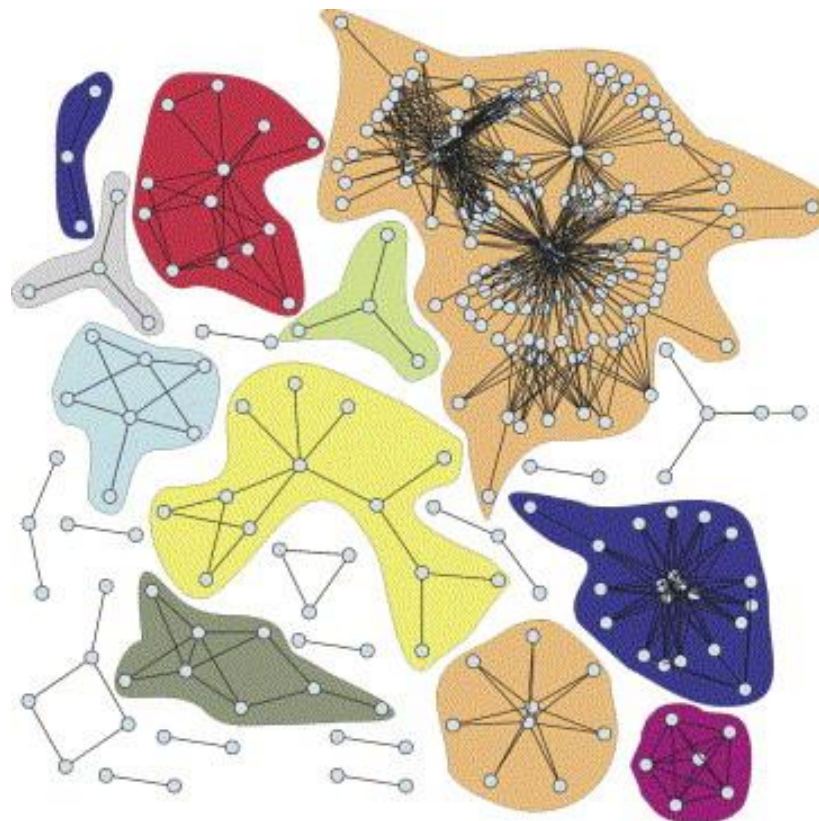
Metode za identifikacijo:

- *prečno povezovanje* – npr. uporaba označene vabe, ki se prečno poveže z interagirajočimi proteini
- *koimunoprecipitacija* – možnost izolacije kompleksov kot pri TAP
- *površinska plazmonska resonanca*
- *FRET*
- *predstavitev na fagih*

Fizična omrežja proteinov

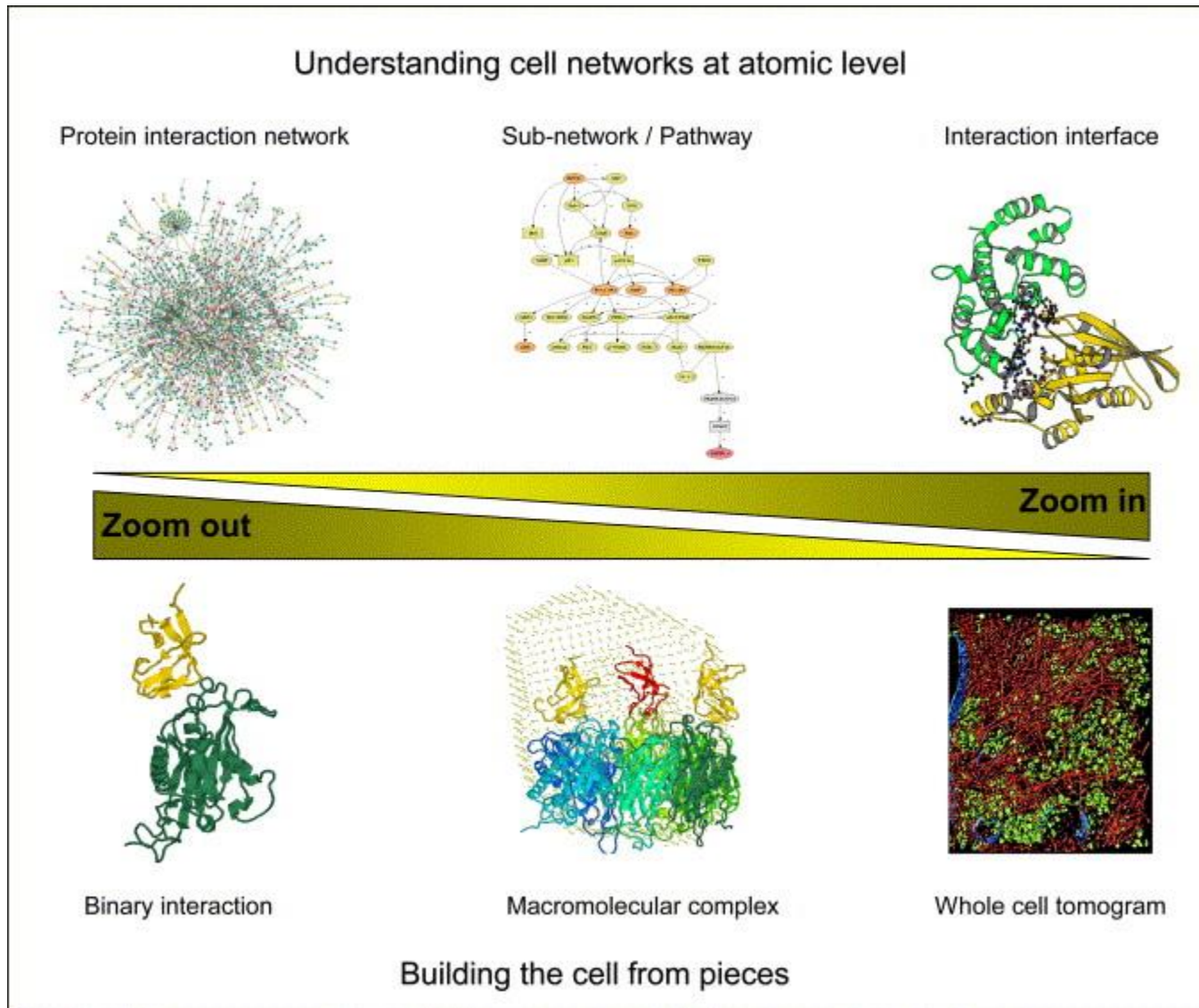
Primer: del interaktoma kvasovke

Vse povezave temeljijo na strukturnih podatkih.



- | | |
|----------------------|--------------------|
| Signalling | RNA polymerase |
| ATP synthase | Folding |
| Secretory pathway | Cytochrome oxidase |
| Ubiquitin-proteases | Cytochrome C1 |
| Chromosome structure | |

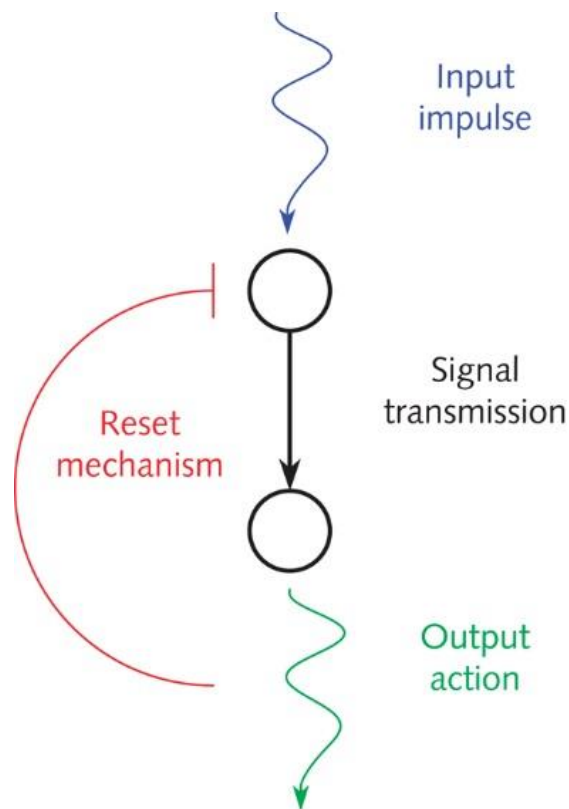
Povezava med proteomiko in strukturno biologijo



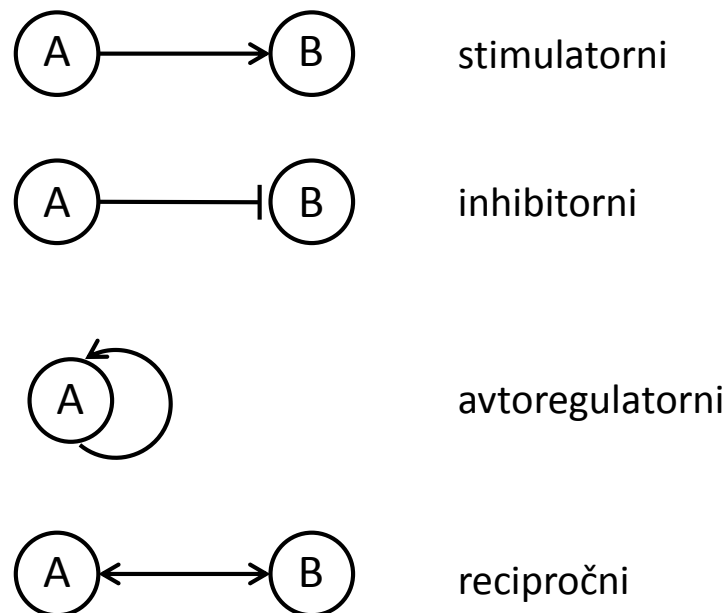
Regulatorna omrežja

Regulatorna omrežja prikazuje organizacijo regulatornih procesov/signalnih kaskad v sistemu. Vsebujejo tako fizične interakcije kot tudi logično komponento s klasičnimi logičnimi operatorji (AND, OR, NOT).

Signaliziranje vključuje 4 elemente:



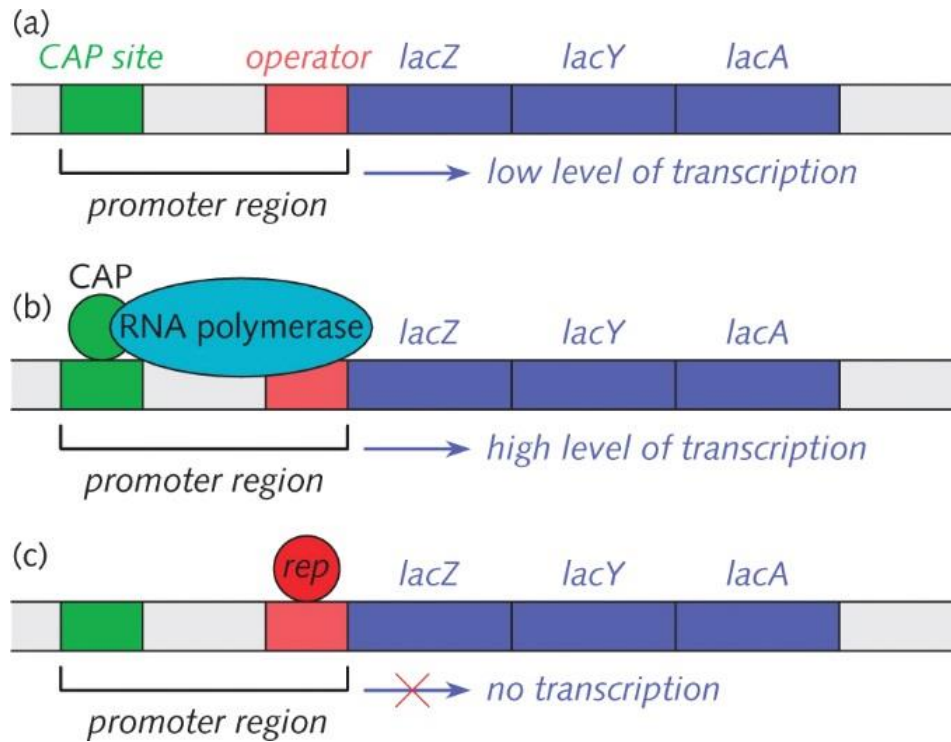
Vrste signalov:



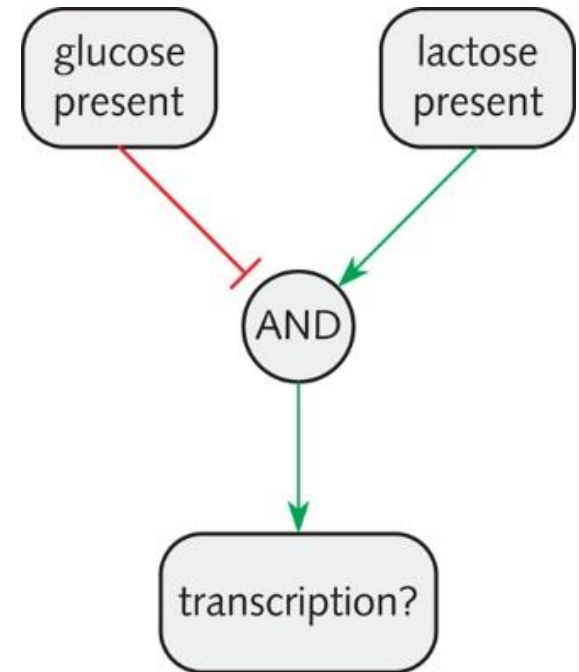
V regulatornih omrežjih so signali ponavadi enosmerni.

Regulatorna omrežja

Primer: regulacija *lac* operona.



logični diagram



Regulatorna omrežja

Primer: omrežje transkripcijskih regulatorjev v *E. coli*.

Modri kvadrati predstavljajo transkripcijske faktorje, rdeči krožci pa operone.

Povezave so obarvane glede na aktivnost transkripcijskega faktorja:

modro – aktivatorji
zeleno – represorji
rjavo – neznana funkcija

