Peptidno vez med CO in NH ločimo z hidrolizacijo, ki je lahko kisla ali bazična. S tem ko cepimo polipeptid na krajše fragmente olajšamo natančnejšo določitev sestave peptida.

Amino kisline lahko določujemo s spektroskopijo s tem, da pripravimo derivate, ki absorbirajo svetlobo pri določeni λ, same AK pa ne absorbirajo!

Cys – Cys ⇒ A280

Trp A=320-360nm ob ekstrakciji pri 28nm

**Metode za derivatizacijo aminokislin**

1. **Detekcija z ninhidrinom**
	* post-kolonska
	* izgubimo info. o izhodnem stanju pri pred-kolonskem → ločili bi lahko samo Pro (edini sek. amin)
	* meje detekcije: 50 pmol /200 pmol Trp
	* ne reagirajo: N – acilirane AK, piroGlu.
	* pufri z primarni ali sekundarni amini niso uporabni
	* reakcija: 60°C , 15 – 60min
	* detekcija: 570nm, 440nm Pro (rumen derivat)
2. **Detekcija z O–ftaloaldehid (OPA)**
* pred – in post-kolonska derivatizacija (D,S,D ; S,D,D)
* meja detekcije: - sub – pmolarno

- Trp da nižji signal kot z ninhidrinom,

- slab fluorescenčen odziv Lys, HO-Lys in Cys-Cys

* Pro in HO-Pro ne reagirata (sek. amin) → oksidacija prim. aminov (v alkalnem)
* pri pred-kolonski derivatizaciji je včasih problematično ločit Gly-Thr; Trp-Met (kratke kolone); Ala-Tyr (modif. grad.); Gln-His (sprememba pH)
* Pri kromatografski eluciji je najslabši His (+/- 1,7 s) najboljši pa Lep (+/- 0,3s); povprečje je+/- 0,8.
1. **Detekcija AK z DABSIL KLORIDOM**
* dobro: - reagirajo z prim. in sek. amini => oranžni derivati (A436) stabilni več mesecev

- določimo jih hkrati

- detekcija: subpmolarna

* slabo: - kratka življenjska doba prebitega reagenta
1. **Detekcija AK z FMOC-Cl** (9-fluoroenilmetil kloroformiat)
* dobro: - enostavna derivatizacija

 - zelo občutljiva metoda

 - določanje primarnih in sekundarnih aminov

* slabo: - FMOC močno fluorescira

- Neprimerno za Trp in Cys. ⇒ detektiramo jih v UV vendar z nizko določljivostjo (FMOC-W in FMOC-C)

1. **Detekcija AK z NBD-u** (4-kloro-7-nitrobenzofurazan)
* dobro: - reagirajo z primarnimi in sekundarnimi amini

- stabilni derivati

- sam reagent ne fluorescira

* slabo: - tvorbe multiderivatov

- derivatizacija poteka pri povišani T (60°C) več min.

- karcirogen

- ~ 100x nižja občutljivost kot z OP ali FMOC .

- kombinirane OPA/NBD-u brez 2-ME= relektivna določitev sek. AK

1. **Detekcija AK s FLUORESKAMINOM**
* pri r. pod pH > 7 se formira kiralni center
* dobro: - specifičen reagent za AK

- r. pri s.T.

- širok spekter vzorcev

* slabo: - ne reagira s Pro

 - šibak signal za Trp

 - ni primeren za pred-kolonsko deri., ker tvori diastereoizomerni pas z L-AK

 - pufer in reagent ločena ⇒ potrebni 2 črpalki za post-kolonsko

1. **Detekcija AK z DANSILKLORIDOM (DNS-Cl)**
* slabo: - dolgi čas derivatizacije in visok T

 - tvorbe multiderivatov => težavne kvartifikacija

* detekcija AK s PITC (fenilizotiocianatom)
* r. poteka s prim. aminsko sk. v alkalnem, kjer r. potrebuje deprotonitamo sp. (poteče do tiokarbonata)
* detekcija v UV A=254nm

**Ionska izmenjevalna kromatografija AK** ⇐ po ninhidrinski derivatizaciji

* prednosti: - relativna toleranca do nečistoči

 - optimizirana metoda; elucijski pogoji za večino fizioloških amino sp. so znani

 - lahko ločimo med zelo velikim št. AK

* slabosti: - specifičen kromatgrafksi sistem

 - dolgotrajne analize

 - rel. Nizka občutljivost (neugodna razmerje signal: šum)

**Kemijska modifikacija protein**

1. **Modif. Cys in Cys-Cys**
	* + - cepimo S-S vezi → denaturacija: 6 M GvHCl, 8-9M urea, 19 NaDS
			- reagent : - **peroksimravljična kis:** reakcija ni specifična (oksidacija Met)

Tyr in Trp delno uničen

 **-** **sulfit + Cu2+** (+GvHCl): reakciji prod. delno stabilen (prehaja nazaj v Cys)

 **- merkoptan**: kvantitativna in selektivna redukcija

 **- β merkoptoetanol**: 6 M GvHCl, 37-50°C, čez noč - 4h , pH= 8.0-8.5, EDTA

* + - * ~> 100 – 1000x prebitek nad S – S
			* DTT in DTE je boljši reducent od β-ME

 **- NaBH4:** (vsebnost SH skupin)

* + - * kvantitativna reakcija
			* ni popolnoma selektiven za S – S (mogoča cepitev C – N vezi)
			* nizka stabilnost v raztopini
			* zelo reaktiven

 **- fosfini:** trialkilfosfin je močen in specifičen reducira S – S

* slabo: niso vodotopni, avtooksidirajo
1. **Modifikacije SH skupine**

→ pretvorbe cisteina v bolj stabilne derivate, primerne za aminokislinsko in sekvenčno analizo (cistein in cistin tu razpadeta ⇒ luknja v sekvenci).

Reagenti:

* **peroksimravljična kislina :**
* dobro: cisteinska kislina (CA) lahko indentificiramo z AK in sekvenčno analizo, tudi PTH.-CA
* slabo: poleg cisteina se oksidirajo tudi met, Tyr in Trp (heterogena zmes peptida)
* **sulfid + oksidant:** (SO32+ + Cu2+ // NaS4O6)
* visoko specifična in selektivna modifikacija
* S-sulfoCys popolnoma razpade pri AK analizi in sekveniranju
* uporabna kot začasna blokada
* **jodoocetna kislina in jodacetamid** (J-CH2COO-)
	+ S-karboksimetilcistein kvantificiramo z AK in sekvenčno analizo
	+ lažje in bolj natančnejša analiza cisteina in cistein vsebujočih peptidov z označevanjem s JCT2COOH
	+ stranske reakcije: tvorba S-karboksimetil metionina
	+ reakcija s His in Lys
	+ redukcija stranske reakcije: JCH2COO-: 2-Me=0.9-0.95:1, pH>8
	+ S-karboksiamidometilcistein pri kislinski hidrolizi razpade v S-karboksimetilcistein

⇒ sekvenčni analizi oba PTH derivata

* **metiljodid:**
* nastane SMC
* stranska reakcija z Met, ki se razgradi (pod pH=7) ⇒ ni cepitve za Met
* uporaben za radioaktivno označevanje cisteina
* **metil-p-nitrobenzen sulfonat**
* kvantitativna in selektivna reakcija
* slabši od MeJ ⇒ slabo topen v vodni raztopini
* **etilenimin (aziridin)**
* uvedemo pozitivni naboj v protein
* stabilen derivat pri veliki AK in sekvenčni analizi
* reakcija specifična za cistein
* S-β-aminoetilcistein je analog Lys ⇒ uvedba cepitvenih mest v proteinu za tripsin
* **β-bromoetilamin** (Br-CH2-CH2-NH3+)
* počasnejša reakcija kot z etilenimiom
* manj specifična za cistein
* **4-vinilpiridin** (pH=8.5, s.T., tema, 90min)
* specifična modifikacija cisteina
* stabilen derivat
* uvedemo skupino ki absorbira pri A254 zaradi piridina

⮡ identifikacija cistin vsebujočih peptidov

* **N-etilmaleimid (NEM)** (pH ~ 7)
* delno specifična reakcija
* produkt slabo stabilen (pri kisli hidrolizi preide v S-sukcinilcistein)
* absorbira pri A305
* **ellmanov (DTNB)**
* absorbira pri A412 (rumena barva)
* **NTCB (2-nitro-5-tiocianobenzojska kislina)**
* absorbira pri A412 -> da nam isti produkt kot elman
1. **Modifikacija NH2 skupine**

→ pozitivni naboj se ohrani

* AMIDINACIJA:
* prevedemo imido skupino v imidoamid
* pogoji: pH = 8.5, s.T., 2h, (6M GvHCl)
* hidroliza v alkalnem (delna regeneracija NH2 pri kisli hidrolizi)
* efekti modifikacij: manjša sprememba v naboju, topnosti, fizikalni lastnosti produkta
* minimalna aktivnost imidnih estrov do drugih Nu skupin v proteinu
* uporaba **DMS** (dimetilsuberimidat):
* raziskave podenotne strukture v oligoproteinih
* določanje razdalj med funkcionalnimi skupinami v proteinih
* določanje ˝sosedstva˝
	+ - * GVANIDINACIJA:
* iz lizina tvorimo homoArg
* pogoji: pH ≥ 9.5, T=4-25°C, 4-5 dni
* bolj učinkovita pri pH ≥ 10.5; pod 10 pa obratno

⮡ protein vsebuje SH skupine ⇒ S-metilacija

* + - * REDUKTIVNA ALKILACIJA
* reakcija z aldehidi in ketoni
* pogoji: pH = 9, T=0 - 4°C, 30 min (6M GvHCl), NaBH4
* fizikalne lastnosti proteinov so podobne nativnim
* možno radiaktivno označevanje z 14C-formaldehidom ali 3H-formaldehidom
* z acetalaldehidom ali acetonom ⇒ monoalkilni derivati Lys
1. **Modifikacija NH2,** ⇒ **nevtralni derivat**

→ Vpliv na topnost in fizikalne lastnosti.

* + - * KARBAMILACIJA
* izocianat v karbamat
* reagirajo α in ε - NH2 , SH, imidazol, fenolni OH (NH2 derivati stabilni v alkalnem)
* pogoji: pH = 8.8, T=30°C, 24H (4M GvHCl)
* določitev m-Lys po kislinski hidrolizi modificiran protein; postopen razpad homocitrulina pri kislinski hidrolizi nazaj v Lys
* restrikcijska encimska fragmentacija ⇒ tripsin za homocitrulinom ne cepi
	+ - * TIOKARBAMILACIJA
* pretvorba izotiocianata v tiokarbamat (ITC)
* ITC reagira z Nu: amini, SH, fenolatnim ionom (Tyr)
* stabilen le produkt α in ε NH2
	+ - * SULFONIRANJE
* sulfonilklorid v sulfonilamid
* sulfonska kislina je sestavni del fluorescenčnih reagentov
	+ - * ALCILIRANJE (tvori se amidna vez!)
* uporabimo **NHS,** ki je dobra izstopajoča skupina ⇒ tvori se amidna vez (blokada NH2) NHS s SH in OH tvori tioestre oziroma estre, ki v vodnem mediju hidrolizirajo

⮡ NHS ester ⇒ aktivacija pri aciliranju

* **acethidrid**: - relativna specifična blokada NH2

 - o-acetilTyr nestabilen ⇒ hidrolizira v alkalnem

* **acilazidi**: azidi so dobre izstopajoče skupine; pH= 8.5 – 10
	+ - * TRIFLUOROACITILIRANJE:
* pogoji: pH=10, 1+ 0.5 h; nato pH=5-6
* reagent: **etiltiotrifluoroacetat**
* slabo: sproščeni C2H5SH v alkalnem povzroči disrupcijo in preureditev S-S

⮡ v brezvodnem mediju, T=24°C, 60 min teh težav ni

TFA Lys ni več mesto za tripsin (restrikcija encimske fragmentacije)

TFA skupino odstranimo: 1M piperidin, T=0°, 24H; nato 0.5 M AcOH na pH=6.0

* + - * ARILIRANJE:
* **arilhalidi:** reagirajo z NH2, SH, imidazoliloma, fenolatom ⇒ tvorijo barvane produkte (FDNB)
* **arilsulfonati:**

- TNBS (2,4,6-3nitrobenzensulfonat) reagira z α in ε-NH2 ter SH

⮡ v alkalnem derivat (TNP) ni stabilen

- pogoji: pH=9.5, s.T., 1-4h (4 do 6M GvHCl)

- absorpcija derivata λmax = 345 nm

- kinetika reakcije ⇒ info. o reaktivnosti NH2 v protein

- kalorimetrična določitev NH2 skupine TNP-AK so stabilne pri kisli hidrolizi

- olajšana izolacija Lys-vsebujočih peptidov po hidrolizi proteina

1. **Modifikacija NH2 ⇒ negativno nabit protein**

→ velik vpliv na topnost in fizikalne lastnosti

* + SUKCINILACIJA:
* nastane amidna vez
* na mesto pozitivnega smo uvedli negativni naboj
* reagirajo: α in ε-NH2, OH (Tyr, Ser, Thr), SH, imidazolna skupina (His)

⮡ Tyr in His derivata zelo labilna v alkalnem

⮡ estri labilni na NH2OH pri pH=10

* pogoji: pH=8, s.T, nekaj minut (GvHCl)
* uporaba: - disociacija podenot v oligomernih proteinih
* solubilizacija proteina
* restrikcija encimske fragmentacije (tripsin)
* je reverzibilna (?)
1. **Reverzibilna modifikacija NH2**
	* MALEINACIJA:
* reagirajo: - α in ε - NH2, Tyr in His ⇒ zelo labilna produkta
* hidroliza pri pH= 9.0

- Ser in Thr-OH ⇒ slabša Nu od NH

- SH (stabilen derivat) adira se na dvojno vez (težave pri določanje)

- pogoji: pH= 8.5-9.0, T= 0-30°C, 5 min (8 M urea ali GvHCl ) ⇒ pazit moremo na pH

⮡ odstranitev maleinske skupine z NH2:

* v kislem pride do intramolekularne hidrolize ( optimalni pH=4) in kislina ciklizira, NH-R pa se odcepi
* optimum: pH= 3.5, T= 37°C => t1/2= 11-12h

Uporabnost reverzibilne modifikacije NH2:

* restrikcija encimskega delovanja
* spreminjanje naboja proteina
* disociacija agregiranih sistemov (oligomernih proteinov)
* raziskave re-asociacije agregiranih sistemov
* solubilizacija proteina
* zaščita NH2 pred modifikacijo z drugimi reagenti
1. **Modifikacija COOH skupine**

→ je slabo reaktivna ⇒ pri modifikaciji jo je treba aktivirat

→ sprememba naboja proteina ⇒ vpliv na fizikalne lastnosti, topnosti

→ restrikcijsko delovanje proteinaz

→ raziskave vloge COO- skupine v proteinu

* + ESTERIFIKACIJA:
* Reakcije v Nu v prisotnosti karbodiimida (R1-N=C=N-R1)
* aktiviramo COO- z karbodiimidom ⇒ o-acilizourea
* o-acilizourea reagira z Nu ⇒ produkt je amidna vez

⮡ EDC

* stranske reakcije : - Tyr(-OH) ⇒ regeneracija z NH2OH, pH=7, T=25°C

- SH

⮡ blokada COOH skupine: na mesto COO- skupine uvedemo nepolarne skupine s čimer se izognemo nezaželenim reakcijam

* Reakcije z Nu po aktivaciji z N,N'- karbonildiimidazolom
* aktiviramo v brezvodnem mediju
* konjugiramo v vodnem ali brezvodnem mediju pri pH = 7-9

⮡ formira se amidna vez

* Reakcja z Nu po aktivaciji z N- hidroksisukcinilninhidridom v prisotnosti karbodiimida
* tvorimo NHS pri EDC in pH=6.0 (glej shemo 43)
1. **Modifikacija Arg:**

→ restrikcija delovanja proteinaz

→ študij funkcuonalnega pomena Arg v proteinu

* + reakcija s **butandionom** (a-ketoni)
* pogoji: pH=7.5,T=20°C, 15-60 min boratni pufer! (pospeši reakcijo)

⮡ pufri z NH2 skupino so neuporabni (TRIS, GvHCl), ker potem pufer pobere ves reagent kot pa substrat (ker ga je več) ⇒ zaščita NH2 skupine ali uporaba cikloheksan-1,2-diona v boratnem pufru

* produkt pri kislinski hidrolizi ne razpadejo nazaj v Arg ⇒ trimer ali dimer 2,3-butandiona
* regeneracija Arg: hidroksilamin, pH=7.0, 6-7h, 37°C
	+ reakcija s **fenilglioksalom** (FG)
* pogoji pH=8.0, T=28°C, 20h
* nastaneta dva produkta; nestabilna pri rahlo alkalnih pogojih ⇒ omejitev izbire načina fragmentacije
* kisla hidroliza ne regenerira Arg
* stranske reakcije FG: deanimira proste AK in N-terminalne AK v protein
* deblokacija Arg: (uporabimo ker nastanejo težko ločljive kompleksne zmesi) N-metilmorfolinacetat, pH=8.0, T=25°C, 48H ⇒ 66% regenerajoči Arg
	+ reakcija z **nitromalandialdehidom**
* pogoji: pH=12-14 (uporabimo le za denaturirane proteine) 2h, T=0-5°C
* s tem reagentom blokiramo tripsinske cepitve ⇒ na mestu Arg preprečimo fragmentacijo
* nastali nitropirimidin reduciramo NaBH4 ⇒ produkt: tetrahidropirimidil

tripsin cepi (reverz. modif.) ⮥

1. **Modifikacija Tyr**
	* NITRIRANJE
* absorpcija 3-nitrotiozilne skupine je odvisna od okolice (A350) ⇒ indikator konformacijske sprememb v proteinu
* slabo: številne stranske reakcije: selektivne modif. \_\_?\_\_, če je reakcija zelo hitra
1. **Modifikacija His**
	* ALKILIRANJE:
* α-halokisline (amidi) ⇒ okoli nevtralnega pH, na nativni protein ⇒ relativna selektivnost
* reagirajo tudi Cys, Lys, Met
	+ HALOGINIRANJE:
* bromiranje: **NBS**
* jodiranje : - preferenčno se jodira Tyr

 - oksidativne stranske reakcije na Met, Cys, Trp

1. **Modifikacije Trp**
	* OKSIDACIJA: **BNPS** (2-(2-nitrofenilsulfenil)-3-metil-3-bromoindolemil)
* selektivna oksidacija indola (Trp) v oksiindol pri nizkem razmerju protein: reagent
* stranske reakcije: oksidacija Cys in Met
* če je reagenta v prebitku, lahko selektivno cepimo verigo, kjer je Trp
	+ SULFENILACIJA z **arilsulfenilhalidi**: NPS-Cl
* NPS-Cl reagira s Trp in Cys pri pH ≤ 3.5
* pogoji: v 25% (v/v) CH3COOH, 6H, tema
* odsotnost ali alkilirani ⇒ specifično za Trp!

**Afinitetno označevanje proteinov**

**Radio jodiranje proteinov:**

* Pomembno pri tvorbi ligandov za iskanje membranske receptorjev

⮡ Jod se veže ob prisotnosti oksidantov ker je aktivni delec I-

* detekcija skupine v aktivnem mestu
* raziskave relativne aktivnost Tyr
* vnos težkih aktivnostih v protein (X-žarkovna kristolagrafija)
* prirava radioaktivnih derivatov-ligandov (125I, 131I ⇒ močnejša energija sevanja (t1/2 = 8 dni) ⇒ več poškodb proteina)
* reagent prostega I2 ni mogoče detektirati

⮡ selektivno jodiranje površinskih Tyr (oksidacija stranske reakcije minimalne) lahko pa se jodira tudi His Cys

* oksidativne stranske reakcije (Med, Tyr, Trp) prevladajo nad substitucijo v kislem!

# Fragmentacija proteinov

### Encimske metode

* Denaturacija proteinov zelo pospeši encimsko fragmentacijo. Odvisno od tega ali želimo omejeno cepitev ali pa popolno fragmentacijo uvedemo reakcijo na nativnem oz. denaturiranem proteinu.
* Uporaba hlapni pufrov je boljša ⇒ odstranitev z liofilizacijo (NH4HCO3, N-etilmorfolin)
* Za doseg želene stopnje fragmentacije variacija časa in T cepitve ter razmerje encim: substrat (E:S), pH,…
* Prekinitev reakcije z acidifikacijo, zamrznjenjem in liofilizacijo, zavretjem vzorca, dodatkom inhibitorjev.
* Dobro je spremljati potek fragmentacije (NaDS-PAGE)

##### Visoko specifične proteinaze, ki ne cepijo pri kislih AK ostankov v proteinu

###### Endoproteinaza Glu- C (staphylococcus aureus (V8) proteinaza)

* serinaska proteinaza (Mr= 27000)
* topna v H2O
* stabilen pH= 4-10 ; precipitira pH<4
* avtorazgradnja T: 40-65°C ; ohrani popolno aktivnost pri 25°C v 2 mg/ml NaDS
* večino aktivna pri 5 mg/ml NaDS v 4-6 M urei ali 5.5 M GvHCl
* ima dva pH optimuma z različnima specifičnostma:

**⮡ pH=4.0** (NH4OAc) , 37°C, 24-48 h, 2% (m/m)= E:S

* cepi za: **Glu (in Glu – Glu**)
* ne cepi: **Glu – Gly,Glu – Pro, Glu – Lys, Glu – Arg, blizu C- termi. konca**
* slabše cepi: **Glu – X**, kjer ima X veliko stransko skupino

**⮡ pH=7.8** (Na fosfat)

* cepi za: **Glu, Gln, Asp, Asn** (cepitev za Asn in Asp je manj učinkovita)
* slabo cepi: oborjene proteine ⇒ podaljšan čas cepitve, urea ali NaDS za stabilizacijo⇒ nespecifična cepitev
* uspešna uporaba V8 na nativnih proteinih⇒ krajši čas reakcije (2-3h) pri s. T nam da daljše fragmente.

###### Endoproteinaza Asp-N

* + metaloproteinaza
	+ optimalen pH= 6.0 – 8.5
	+ aktivne tudi v 2 M urei, 0.001% (m/v) NaDS, 1M GvHCl , 2-18h, 25-37°C, <5% (m/m) =E:S
	+ cepi: **X – Asp, X – CA** (v fosfatnem, acetatnem ali TRIS pufru)
	+ stranska reakcija: **X –Glu** (~ 2000 počasneje)

##### Visoko specifične proteinaze, ki cepijo pri bazičnih AK ostankih

###### β-tripsin

* serinska proteinaza (Mr=24000)
* inhibitorji: TLCK, α1- antitripsin, DTP, PMSF, aprotinin, leupeptin, α2- makroglobulin
* stabiliziran v 20 mM Ca2+
* optimalni pH= 7.5 – 8.5
* aktiven tudi v ≤ 6.5 M urei, 1 mg/ml NaDS, 37°C, na finem precipitatu proteina (precipitacija z dializo, sonifikacijo), ponavadi 2× dodatek 1+1% (m/m)= E:S ; na precipitatu tudi večji % E
* cepi: **Arg – X, Lys – X, EAC – X** (S-aminoetilCys)
* slabo/ne cepi: **Arg – Pro, Lys – Pro**
* ima nizko eksoproteinazno aktivnost ⇒ **Arg – Arg –**
* naspecifično cepi ob podaljšani inkubaciji na **C-strani hidrofobnih AK** (Tyr)

⮡ 1. vzrok: kontaminacija tripsina s kimotripsinom (uporaba TPCK prebitnega trpsina)

⮡ 2. vzrok: prisotnost ψ- tripsina, avtoliznega produkta β-tripsina, ki ima kimotripsično specifičnost

* specifičnost delovanja tripsina omejimo za **Arg – X** (X ≠ Pro) z modifikacijo Lys in za **Lys – X** (X ≠ Pro) z modifikacijo Arg.
* specifičnost delovanja tripsina razširimo za **Cys –** s S-aminoletilacijo Cys (aziridin, β - bromoetilamin)

###### Clostipain

* cisteinska proteinaza
* potrebna aktivacija s predinkubacijo v pufru z DTT ali DTE
* reakcija: Na fosfat, pH= 7.5, DTT, 2-3h, 37°C, 1-2% (m/m)=E:S
* aktiven tudi v 6 M GvHCl
* cepi: **Arg – X**

###### Endoproteinaza Arg-C

* serinska proteinaza (Mr= 25000)
* inhibitorji: DFP,TLCK, Hg2+, Zn2+, Cu2+, α2- makroglobulin
* optimalni pH= 8.0-8.5 , 6-8 h (pri dolgih inkubacijah izguba specifičnosti)
* precej aktivna v 1mg/ml NaDS, 25°C
* cepi: **Arg – X**

###### Armillaria mellca proteinaza

* metaloproteinaza; endoproteinza
* optimalen pH= 7.5 , pod N2, 37°C, 24h, 1%(m/m)=E:S
* precej aktivna v 5% (m/v) NaDS pri 50°C!!!
* cepi: **X – Lys, X – Lys – Lys**
* minimalno cepi: **Arg – X, AEC – X**

###### Endoproteinaza Lys-C

* serinska proteinaza ( Mr= 30000)
* inhibitorji: DFP, TLCK, leupeptin, aprotin
* stabilna pri pH= 5-12, v 5 M urei, 5 mg/ml NaDS ⇒ primerna za razgradnjo proteina v NaDS-PAGE
* optimalen pH= 8.5-8.8 , 37°C, 1% (m/m) =E:S 2h + 1% (m/m)=E:S 11h
* cepi: **Lys – X**

##### Proteinaze, ki cepijo za hidrofobnimi AK ostanki

###### α- kimotripsin

* serinska proteinaza (Mr= 25000)
* inhibitorji: TPCK, PMSF, DFP, α1- antitripsin, aprotinin, α2- makroglobulin
* mogoča je kontaminacija s tripsinom ⇒ inhibicija s TLCK
* pogoji cepitve so identični tripsinskim
* cepi**: – Phe – X, – Trp – X, – Tyr – X, – Leu – X** (hitrost cepitve pada)
* včasih dobra cepitev: **– Met – X, His – X, Ala – X** (predvsem pri dolgih inkubacijah)
* sosedstvo je zelo pomembno za hitrost cepitve. Če X=Pro , cepitve praktično ni!!!

###### Termolizin

* metaloproteinaza
* inhibitorji: EDTA, Hg2+, AgNO3, oksalat, citrat, Pi, α2- makroglobulin
* optimalni pH= 7-9 , termostabilen preko 60°C, 2h/37°C ali 1h/45°C, 6-8 M urea, 0.5 (w/w) NaDS, 1-5 mM CaCO3 ga termostabilizira
* cepi: **X – Leu – , X – Ile , X – Phe – , X – Val** (preferenca pada)

**Thr, Asx, Tyr, Ala** (nižja preferenca)

* ne cepi: **pred Trp, X – Y – Pro** (inhibicija cepitve)

##### Ostale specifične proteinaze

###### Pro- specifične proteinaze

* pogoji iz flavobacteriuma: pH= 7.0, fosfat, 1% (m/m)=E:S , 2h, 30°C
* cepi: **– Pro – X**

###### Endoproteinaza Gly – C

* cisteinska proteinaza (Mr=21000)
* inhibitorji: Hg2+, JCH2COOH, DFP, TPCK, TLCK, E-64
* optimalni pH= 6-7 (fosfatni pufer), 1mM EDTA, 2mM DTT (aktivator), 2% (m/m)=E:S , 10min – nekaj ur, s.T
* cepi: **– Gly – X –**
* ob podaljšani cepitvi se lahko cepi tudi kakšna druga vez : **– Ser –, – CmC – , – Ile –**
* deluje v prisotnosti visoke konc. GvHCl ali uree!

##### Nizko specifične proteinaze

* določeno mero specifičnosti lahko dosežemo z omejeno hidrolizo

###### Elastaza

* serinska proteinaza (Mr=25900)
* inhibitorji: PMSF, DFP, α1- antitripsin, α2- makroglobulin
* optimalni pH= 8.0 – 8.5 , pogoji podobni tripsinskim
* cepi: **– X – Y –** X= nenabite, nearomatska AK (Ala, Val, Leu, Ile, Gly, Ser)

Y= nespecifična AK

###### Pepsin

* aspartatna proteinaza (Mr= 35000)
* inhibitorji: pepstatin A, diaketoni, pH> 6
* optimalni pH= 2.0 - 4.0, 1 mM HCl, 25°C, 2h, < 1%(m/m)=E:S
* cepi: **– X – Y –** X= nespecifična AK (preferenca za Phe, Leu)
	+ - * X,Y ≠ Arg, Lys, Pro, Ile
* širša okolica vezi določa stopnjo njene hidrolize!
* uporaba pepsina v kislem je ugodna takrat, ko želimo ohraniti S-S mostičke. V alkalnem se lahko preuredijo

###### Papain

* cisteinska proteinaza (Mr=21000)
* inhibitorji: Hg2+, JCH2COOH, DFP, TPCK, TLCK, E – 64, α2- makroglobulin
* precipitivna ≥ 0.2 M NaCl ; aktiven v 8 M urei
* optimalen pH= 6.0 – 7.0,
* potreben dodatek reducenta: β - ME, DT,DTE in 0.1 mM EDTA
* cepi: **Z – X – Y –** X= nespecifična AK (do neke mere preferenca za Arg, Lys)

Z= Phe

Y= nespecifična AK

###### Subtilizin

* serinska proteinaza (Mr= 27500)
* inhibitorji: PMSF, DFP, indol, fenol, aprotinin, α2- makroglobulin
* hitra denaturacija T > 55°C in v kislem
* optimalni pH= 7.0 – 8.0 , reakcijski pogoji podobni tripsinu
* aktiven v 1% (m/v) NaDS
* cepi: **– X – Y –**  X= nespecifična AK (do neke mere preferira neutralne in kisle AK)

Y= nespecifična AK

### Kemijske metode fragmentacije proteinov

###### Cepitev za Met s CNBr

* dobiš dolge fragmente ker je Met redek v proteinih
* zelo specifična cepitev
* redko problem topnosti
* visok izkoristek
* pri optimalnih pogojih skoraj kvantitativno cepi za Met – X
* težave z nizkim izkoristkom pri: Met – Thr in Met – Ser

⮡ vzrok : participacija sosedne β-OH skupine (manjša je v 70% (v/v) TFA)

* stranske reakcije:
* včasih oksidativne cepitve pri Tyr,Trp in drugih AK (nespecifična kis. hidroliza)
* oksidacija Cys in Cys-Cys v CA
* bromiranje Tyr
* delna ciklizacija Asn – Gly → β-Asp peptidna vez
* CNBr cepitev ne poteče za Met sulfonom in Met sulfoksidom

###### Cepitev Asn – Gly vezi s hidroksilaminom

* Asn – Gly vez je občutljiva na cepitev s NH2OH
* vzrok: enostaven nastanek cikličnega imida, ki ga cepi NH2OH v α- in β-aspartil hidroksamata in preostali peptid
* izkoristek: do 70% (izpostavitev prot brezvodnemu TFA pred cepitvijo ga dvigne)
* stranske reakcije:
* cepitve z nizkim izkoristkom možne tudi za Asn – X

###### Cepitev Asp – X (Pro) vezi v kislem

* Asp – Pro vez je kislinsko zelo labilna
* mila kislinska hidroliza nam da precej selektivno cepitev D – P vezi zaradi močno bazičnega prolil N atoma

###### Cepitev za Trp z BNPS (produkt spirolakton)

* precej specifična cepitev za Trp
* ugodna za pridobivanje dolgih fragmentov, ker je Trp redka AK v proteinih
* izkoristek: 15 – 70%
* stranske reakcije:
* oksidacija Tyr in His
* deaminacija
* kislinska hidroliza občutljivih vezi (D – P)

###### Cepitev za Trp z o-jodobenzojsko kislino

* še bolj specifična za Trp
* izkoristek: 70 – 80%
* reakcija v 80% (v/v) ocetni kislini, N2, s. T , 24h, tema
* dodatek Tyr ali p – krezola dodatno prepreči oksidacijo Tyr v proteinu
* produkt je spirolakton

# Edmanova degradacija

### 1. PRIPAJANJE:

* reakcija poteče v alkalnem, ker je potrebna prosta α – NH2 ⇒ pH > 8
* ne več kot pH > 10 ⇒ stranska reakcija hidrolize PTIC

⮡ tvorba anilina in drugih stranskih produktov

* T= 45 – 48°C, 15 min, velik prebitek reagenta
* PITC reagira tudi z ε - NH2Lys (pri pH=8 je reakcija nepopolna)
* nekatere nečistoče lahko močno znižajo izkoristek nastanka PTC – peptida
* oksidanti (atm. O2) povzročijo desulfurizacijo (urea -> ni cepitve ⇒ nižji izkoristek ; uporabimo argon)
* kisle kontaminante nam znižajo pH kar nam da nižji izkoristek pripajanja
* po derivatizaciji odstranimo prebitni reagent in stranske produkte z organskimi topili ⇒ hidrofobne peptide lahko v veliki meri izgubimo
* produkti reakcij v fazi pripajanja porabljajo reagent PITC

Če imamo His na N – terminalnem koncu se lahko PTC – His – peptid zelo hitro cepi in to že v fazi pripajanja. V prisotnosti PITC se sprosti že naslednji AK ostanek ⇒ delno pripajanje.

Rezultat je detekcija dveh AK v istem ciklu in v vseh nadaljnjih.

Posebno hitra cepitev: **PTC – His – Pro – ; PTC – His – Gly –**

### 2. CIKLIZACIJA IN CEPITEV

* izkoristek je odvisen od strukturne stranske skupine, a pri vseh AK visok, razen pri visokih konc. His ali His – Pro
* občutno nepopolna je cepitev: PTC – Gly – His – ; PTC – Pro – His – vezi; ostale imajo ~98% izkoristek
* naraščanje signala za predhodni AK ostanek (t.i. ˝LAG˝) je posledica nepopolnih reakcij pripajanja in cepitve
* posledica neciklizacije in cepitve je zamik v obratni smeri ⇒ ker se ne cepi ostaja daljši
* v kislih pogojih cepitve lahko pride tudi do delnih nespecifičnih internih cepitev v proteinu (interna hidroliza). Najbolj občutljive vezi so Asp – X vezi, še posebej Asn – Pro. Vzrok je N oz. njegov pozitivni efekt in težnja po polarnosti
* N-terminali reagirajo s feniltiocianatom ⇒ zvišujejo se ozadja
* Po Asn – Gly vezi izkoristek sekveniranja ponavadi močno upade. V kislem nastaja ciklični sukcilamid, ki se v alkalnem odpira pretežno v β - položaju. Ta konformacija pa je rezistentna za nadaljnjo analizo.

**Gln in S-karbamoilCys na N – terminalu**

* možna parcialna blokada Edmanove degradacije zaradi ciklizacije v kislem
* to je resen problem pri izolaciji, če je vzorec v kisle več kot 15 min.

**Trp**

* je zelo občutljiv na oksidacijo ⇒ razpadni produkti preprečijo degradacijo
* nestabilen v kislem, še posebej v prisotnosti oksidantov
* težavna identifikacija zaradi številnih razpadnih produktov (dobimo več pikov)
* oksidativna cepitev – Trp – X – vezi v proteinu ⇒ ozadje

**Ekstrakcija ATZ-AK**

* **O – glikozilacija**: Ser, Thr, zelo redko Tyr
* **N – glikozilacija**: Asn (N – X – T, N – X – S, N – X – C; X≠P)

Po cepitvi so ATZ glikozirane AK (ekstrahirajo se v nepolarnih topilih); prehidrofilne, da bi jih lahko ekstrahirali z organskimi topili in prevedli v PTH- derivate ⇒ luknja v sekvenci

Fosforilacija: Ser, Thr, Tyr

Peptid ostane v eni komori, ekstrakt pa v drugi. Ekstrakcija je slaba, ker so zelo hidrofobni.

### 3.PRETVORBA

* ATZ- AK niso zadosti stabilne za zanesljivo kromatografsko analizo, zato jih pretvorimo v stabilne PTH- AK
* kritična stopnja ciklizacija ⇒ težave pri Gly, ki zelo počasi ciklizira iz tiokarbamata v PTH-AK (~85% konverzija)
* tudi PTH-Pro je počasna, a ima 100% konverzijo
* stranske reakcije:
* delna deanimacija Asn in Gln v Asp in Glu
* dehidracija PTH-Ser in PTH- Thr (β-eliminacija) ⇒ sledijo adicije na dvojno vez (signal za PTH je s tem dosti bolj nižji)

### *Ročno sekveniranje z uporabo DABITC* (4-NN-dimetilaminoazobenzen4'-izotiocianat)

To je metoda dvojnega pripajanja ~ 140'/cikel.

1. pripajanje (derivatizacija):

* peptid v 80 ml piridinu : H2O = 1:1 (v/v)
* + DABITC v piridinu (40 ml; 2,8 mg/ml ) /N2
* 50'/52°C
* + 10 ml PITC/N2 (kvantitativni derivat)
* 30'/52°C

2. ekstrakcija 1:

* n-heptan : etilacetat = 1:1(v/v)
* posušimo vodno fazo

3. cepitev:

* 50 ml TFA/ 15'/52°C/posušimo

4. ekstrakcija 2:

* 50 ml H2O + 200 ml butilacetata
* vodno fazo (peptid -1) posušimo
* organsko fazo (ATZ – AK) posušimo

5. pretvorba:

* 20 ml konc. HCl + 40 ml konc. AcOH/20'/52°C
* Posušimo in topimo v 10 ml EtOH

### *Avtomatska Edmanova degradacija – sekvenatorji*

Celotno dogajanje poteka na inertni podlagi. Dosegamo velike izkoristke zaradi učinkovite izključitve kisika iz sistema (Ar, N2). Prihranek fizičnega napora.

Tipi sekvenatorjev:

* **reakcijska zmes je homogena** → » liquid – phase sequencer « ; reakcija poteka v tek. fazi
* **vzorec je vezan na podlago** → » solid – phase sequencer « ; vzorec je kovalentno ali nakovalentno vezan na površino

KOVALENTNO

Dobro: ni izpiranja vzorca, uspešno sekveniranje zelo hidrofobnih peptidov, uporaba tudi polarnih topil → možna ekstrakcija polarnih ATZ - AK derivatov

Slabo: dodatna stopnja kovalentne vezave peptida na nosilec z variabilnim izkoristkom, ostanki preko katerih je peptid vezan na podlago izostanejo

Podlage za kovalentno imobilizacijo pri »solid-phase« sekvenatorjih:

Aminopolistiren, trietilentetraminpolistiren, 3- aminopropil steklo, izotiocianatno steklo, jodoacetilno steklo.

NEKOVALENTNO; vzorec je adsorbiran na inertni nosilec ni pa imobiliziran

Dobro: enostavna izvedba

Slabo: prisotno izpiranje, sploh ni hidrofobnih peptidov, polarni ATZ - AK derivati se ne ekstrahirajo v topila, ki jih lahko uporabimo.

### *Načini sekveniranja glede na način dovajana TFA*

TFA dovajamo kot tek.:

* **kontinuirno** (»liquid-phase seq.«) → višja kontaminacija in spiranje
* **v pulzih** (»pulsed liquid-phase seq.«)

TFA dovajamo v obliki hlapov → nižja kontaminacija in spiranje → reakcijski čas se znižuje

(» gas- phase seq.«)

Analiza ATZ- ali PTH- aminokislin

* **HPLC**
* **TLC**
* **MS**
* **Plinska kromatografija**

Doseg jasne analize povečamo z **OPA blokado.** Če vemo na katerem mestu v proteinu je Pro, lahko degradacijo tam prekinemo in dodamo OPA.. Ta reagira le s primarnimi NH2 ne pa s Pro, kar učinkovito prepreči Edmanovo degradacijo na vseh peptidih, razen tistem, ki ima N- terminalni Pro → redukcija ozadja.

# Dloločanje C – terminalnega AK ostanka in C – terminalno sekveniranje

* strukturna karakterizacija (identifikacija) N- terminalno blokiranih peptidov
* potrjevanje DNA sekvenčnih rezultatov( C – terminalna sekv.)
* identifikacija prot. z 2D PAGE (proteomika) → C – terminalni konec se krajša
* kloniranje (sinteza primerjev – začetnih oligonukleotidov)
* karakterizacija rekombinantnih in nativnih proteinov ( C – terminalno procesiranje)

Glavne metode:

1. hidrazinoliza

2. tririjacija (uporaba 3H izotopa za označevanje)

3. razgradnja s karboksipeptidazami

4. selektivna kemijska razgradnja

**HIDRAZINOLIZA**

Določimo lahko samo C – terminalno AK, saj reagira samo na C – koncu, ker je COO- slab nukleofil. Z AK-analizo identificiramo prosto AK. Če je prisotna le ena AK, je vzorec homogen!

Polipeptid razgradimo s pomočjo hidrazina, ki cepi amidno vez med AK. Dobimo proste AK.

**TRITIJACIJA**

S tritijem označen peptid hidroliziramo. Sledi AK-analiza pri čemer je C – terminalna AK radioaktivna; z merjenejem le tega pa ugotovimo, katera AK je na C – koncu! Možno je hkratno določevanje AK sestave in C – terminalne AK → določanje homogenosti vzorca. Pro in blokirane AK se ne tritinirajo. Pro težko tvori oksazolon. Dobimo bicikličen sistem, čemur pa se upira N.

**RAZGRADNJA S KARBOKSIPEPTIDAZAMI**

Eksopeptidaze s C – konca polipeptidov zaporedoma cepijo po eno L – AK. Idealno bi bilo, če bi za vseh 20 AK delovalo enako. Ker ne, vzamemo več karboksipeptidaz, ki skupaj delujejo neselektivno.

**Karboksipeptidaza A** (metalo proteinaza)

Hitro sprošča: Q, H, T, A, Y, M, W, V, F, I, L

Počasi sprošča: N, S, K

Zelo počasi sprošča: D, E, G, CMC

Ne sprošča: R, P, HyP, D – AK, amidi L – AK

**Karboksipeptidaza B** (metalo proteinaza)

Hitro sprošča: R, K, ornitin, homoR

Ne sprošča: H

**Karboksipeptidaza C** (metalo proteinaza)

Zelo hitro sprošča: H, Y, W, V , F, L, I

Hitro sprošča: D, E, CMC, N, Q, S, T, R, A, K, P(nenavadno)

Počasi sprošča: G

Ne sprošča: HyP, D- AK, amidi L- AK

Če je G na predzadnjem mestu→običajno upočasnjena cepitev C- term. AK)

**Karboksipeptidaza Y** (serinska proteinaza)

Zelo hitro sprošča: Y, W, F, M, I, L, V

Hitro sprošča: P, A, E, S, T, Q, N, CMC

Počasi sprošča: D, H, R, K, G

Ne sprošča: D- AK, dipeptidi

Če so D, H, R, K ali G na predzadnjem mestu običajno upočasnijo cepitev C – terminalnih AK. Če je tam aromatska ali velika alifatska AK, potem bo cepitev zelo hitra)

**Karboksipeptidaza P** (serinska proteinaza)

Specifičnost: H2N – RN – Y --- X – COOH ; X ≠ Ser, Gly

# Primerjava edmanove degradacije in THM

DERIVATIZACIJA:

+ Edman: selektivna, precej neodvisna od sekvence ⇒ visok izkoristek

− THM: nereaktivnost COOH zahteva aktivacijo ⇒ ostri pogoji⇒ stranske reakcije.

Nizki začetni izkoristki in izkoristki cikla. Zelo odvisno od sekvence.

CIKLIZACIJA IN CEPITEV:

+ Edman: potečeta hkrati ⇒ zelo specifičen proces ⇒ visok izkoristek

− THM: cepitev sledi tvorbi TH peptida ⇒ potreba po selektivni cepitvi.

Vez je relativno stabilna ⇒ ostri pogoji ⇒ neselektivnost ⇒ stranske reakcije

⇒ nizki izkoristek

DERIVAT AK:

− Edman: potreba po pretvorbi nestabilnih ATZ – v stabilne PTH – AK

+ THM: izomerizacija produkta ni potrebna

Težave THM:

1. **Pro:** ni razgradnje oz. je minimalna:

* težka aktivacija zaradi težke tvorbe oksazolinonijevega iona
* težka ciklizacija v TH zaradi potrebe po nastanku kvarternega N
* težka odcepitev TH zaradi poz. naboja na N

2. **Asp, Glu:** nizek izkoristek ⇒ tvorba cikličnega anhidrida – ne reagira z SCN¯

3. **Ser, Thr:** nizek izkoristek ⇒ tvorba nenasičenega oksazolina – ne reagira z SCN¯

4. **α – amidi:** ni razgradnje

# Post-translacijske modifikacije proteinov

### Disulfidne vezi

* intremolekularne ⇒ med molekulami
* intramolekularne ⇒ v molekuli sami

Za analizo prostih –SH v molekuli določimo razmerje med prostimi in v S–S mostičke vezan Cys.

Analiza poteka S – S vezi

1. **Blokada vseh prostih –SH skupin v vzorcu**, ker lahko katalizirajo S – S izmenjavo, zlasti v alkalnem, s tem pa dobimo napačno določitev parov. (Izločimo jih, ker iščemo samo S – S mostičke)
2. **Fragmentacija proteina na kemijski ali encimski način.**

Del vzorca reduciramo in alkiliramo ter analiziramo na isti način kot nereduciran vzorec. Peptidi, ki vsebujejo disulfid se ponavadi eluirajo na drugih mestih (*diagonalna elektroforeza*).

1. **Separacija produktov** ⇒ HPLC = iščemo vrhove vzorcev, kjer so po in pred fragmentacijo na kromatogramih različni ( različni S – S mostički).
2. **Analiza fragmentov na prisotnost S – S** ⇒ iščemo vrhove, ki so zamenjali pozicijo, saj smo S – S mostičke cepili. Tisti vrhi, ki niso vsebovali S – S mostičkov, so obstali na diagonali, drugi peptidi z mostički pa so pristali nekje izven diagonale.
3. **Sekvenčna analiza S – S vsebujočih peptidov**

dve sekvenci ⇒ predela, ki ju povezuje S – S mostiček

ena sekvenca ⇒ S – S je znotraj peptida

### Glikolizacija proteinov

Gliozidna vez = vez med prot. in oligo- oz. polisaharidi (nastane s kondenzacijo oz. dehidracijo)

O – glikozidi = sladkor vezan na protein preko hidroksilnega kisika Ser, Thr, Tyr, Hyl, Hyp.

N – glikozidi = sladkor vezan na protein preko amidnega dušika Asn.

Glikon = karbohidratni del glikozida (glikoprot.)

Aglikon = proteinski del glikorpteina

Glikan = nesubstituiran oglikohidrat (ali karbohidratni del glikoproteina po separaciji od proteinskega dela).

**O – glikozidi** ⇒ sladkor je vezan na Ser, Thr, Tyr, Hyl, Hyp – OH skupino v proteinu.

Ta glikolizacija je manj predvidljiva od N – glikolizacije. Glikoziliran Ser/Thr je običajno del β – zavoja v bližini Pro. Dolžina karbohidrata v O – glikolizaciji je običajno krajša kot pri N – glikolizaciji.

**N – glikozidi** ⇒ oligosaharid je vezan na Asn proteina, ki se nahaja v zaporedju :

- Asn – Xaa – Thr/Ser/Cys - ; Xaa ≠ Pro.

Prisotnost tega zaporedja v proteinu še ni porok za glikolizacijo!!!. Glikolizacija je lahko le parcialna. Na Asn se običajno veže N – acetil – D – glikozamin (GN) nanj pa manoza (M). Sekvenčne razlike oligosaharidov se pojavljajo na nereducirajočih koncih molekule.

1. **oligosaharidi z visoko vsebnostjo manoze (5, 8, 9M)**

Pri nekaterih glikoproteinih tega tipa je ena ali več zunanjih manoz fosforiliranih (Man-6-P). Včasih je na zunanji manozi sulfat, metilP, fruktoza ali ksiloza.

1. **kompleksni oligosaharidi**

Na terminalni manozi » jedra « so vezani GN. Vsaka veja začeta z GN se imenuje **antena**. Glede na število ločimo: - biantenarni kompleks

 - triantenarni kompleks

 - tetraantenarni kompleks

Glikoproteini sesalcev imajo običajno 2-4 antene.

1. **hibridni tip oligosaharida**

Struktura oligosaharida nosi elemente prvih dveh. Na manozi je vezana skupina GN, ki je antena. Tako dobimo biantenarni ali triantenarni hibrid.

1. **razpolavljanje struktur**

V večini hibridnih in nekaterih kompleksnih oligosaharidnih strukturah. Če vsebuje glikoprotein več Asn – vezanih oligosaharidov, ni nujno, da so vsi istega tipa ali sekvence!!

###### Glikozil fosfadil inozitolna sidra (GPI)

Številni proteini, ki so orientirani v ekstracelularni prostor so z amfipatskim glikolipidnim repom zasidrani v celično membrano. Sidro je preko amidne vezi kovalentno vezano na C – koncu proteina. C – terminalne AK na katere se lahko pripne GPI sidro so Cys, Asp, Asn, Gly, Arg ali Ser. GPI sidra blokirajo C – konce proteina. Za analizo sproščamo komponente posamično in analiziramo z GLC, MS,…

###### ADP – ribozilacija

ADP – ribozilacija Gs prepreči hidrolizo GTP in s tem prenos signala. Pri analizi uporabljano fosfodiestereze in fosfataze. Reakcijo katalizirajo ADP–riboziltransferaze. Znana je poliribozilacija na γ – COOH skupini Glu in α – COOH skupini C - terminalnega Lys.

###### Amidacija

Nesubstituiran amid analiziramo z uporabo CY → HPLC analiza derivata amidirane AK, MS,…

Substituiran amid; v tubulinu se na α – COOH post-translacijsko doda Tyr v odsotnosti ribosoma in mRNA – detekcija take post-translacijske modifikacije je mogoča šele po primerjavi proteinske in cDNA sekvence proteina.

###### Proteolitska degradacija

Analiza s C – terminalnim sekveniranjem; lahko tudi na N – terminalnem koncu proteina; pogosto tudi znotraj molekule.

### Acilacija

###### Nα – acilacija (prepreči Edmanovo degradacijo)

* pogosta modifikacija pri evkariontih
* največkrat modifikacija na Ala, Ser, Met, Thr, Gly.

Analiza

1. **izolacija N – terminalno blokiranega peptida**.

* N – terminalno blokiran protein razgradimo s proteinazami. Z ionskim izmenjevalcem ločimo neznano (dipolarni peptidi) in nevezano (N – terminalno blokiran peptid) obliko.

2.**analiza.**

* Hidrazinoliza ⇒ določimo acetilhidrazida, acetil-dausil hidrazin. Kvantifikacija acetata z acetat kinazno metodo.
* Parcialna kisla hidroliza (pH=2,105°C,90') ⇒ acetil- AK ⇒ kromatografska analiza (primerjava s standardom)
* MS
* Encimska de-blokada ⇒ Nα – acilanino- acil peptidna hidrolaza.

###### Nα – formilacija

* redka pri evkariontih, a pogosta pri prokariontih
* α – N – formilna skupina je bolj labilna kot α – N – acetilna skupina.

Analiza

1. **Izolacija formil-peptida** (MS)

2. **Deblokada**: 0.1 – 3 M HCl v brezvodnem MeOH, 20-30°C, 1-48 h

3. **Edmanova degradacija**

De-blokada

1. Isti pogoji kemijske deblokade kot pri Nα – formilni skupini.

2. Piroglutamil aminopeptidaza

###### Nα – miristoilacija (C14)

* poteče na Gly1, ostanek 5 je ponavadi Ser/Thr. Ostanka 6 in 7 pa sta bazična (pri citosolni proteinih)
* kotranslacijska acilacija ( N – miristoil transferaza)

Analiza

1. **Sekvenčna hidroliza:**

1. KOH – MeOH; cepitev vseh oksi in tioesterskih vezi
2. Neutralna hidroksilaminoliza cepi prefernčno tioesterske vezi
3. Kisla hidroliza sprosti amidno vezane maščobne kisline

2. **TLC ali HPLC analiza sproščene maščobna kisline**

3. **Razgradnja proteina s proteolizami in izolacija Nα – miristoiliziranega peptida** → MS

###### Palmitolacija (C16)

* + post-translacijska modifikacija na Cys pri nekaterih proteinih

Analiza

1. **Neutralna hidroksilaminoliza**

2. **TLC ali HPLC analiza sproščene maščobne kisline**

3. **Proteoliza in izolacija peptida z modifikacijo** → MS

### Prenilacija

Najdena pri številnih proteinih, ki sodelujejo pri prenosu signalov in usmerjanju proteinov.

* farnezilacija ( C15) → seskviterpen
* geranilgeranilacija (C12) → diterpen

Premilirani proteini se izključijo iz lipidnih raftov; zaradi svoje razvejane strukture se proteini ne ujemajo z raftom → ima bolj urejeno strukturo kot okolica.

* + funkcije transmembranske signalizacije specifičnih proteinov
	+ prenašanje zadev v celico (preko kaviol, ionov, Ca2+, proteinov)

### Alkilacija

Najbolj pogosta je metilacija na:

a) α – NH2 skupini (blokada Edmanove degradacije – ni postopka za deblokado)

b) stranskih skupinah (Arg, His, Lys)

Metilacija specifičnih ostankov v proteinu ponavadi ni popolna.

Analiza

**HPLC analiza PTH – derivata alkilirane AK.**

### Hidroksilacija

To je encimska post-translacijska modifikacija zlasti značilna za kolagen. Modifikacija, ki je pomembna za zvijanje in sekrecijo kolagena

* Pro(4OH) stabilizira trojni heliks
* Lys (5OH) tvorba intramolekularnih prečnih povezav in vezava sladkorjev.

Analiz

**HPLC analiza PRH – derivatov hidroksiliranih AK.**

### Fosforilacija

Reverzibilna fosforilacija proteinov je zelo pomemben mehanizem za regulacijo številnih fizioloških procesov. Običajna mesta za fosforilacijo so Ser, Thr, Tyr AK ostanki.

Analiza

1. **Določitev tipa fosforilacije**

2. **Fragmentacija proteina, separacija peptidov in identifikacija** tistih, ki vsebujejo fosfoamino kislinske ostanke.

3. **Sekvenčna analiza** fosfoamino kislino vsebujočih peptidov na način primeren detektiranemu tipu fosfoamino kislinskega ostanka.

***1. določitev tipa fosforilacije oz. vrste fosfoamino kis., ki je v proteinu/peptidu prisotna.***

* + Parcialna kislinska hidroliza vzorca
	+ Priprava Dabsyl ali PTH derivatov AK
	+ Kapilarna elektroforeza → le fosfoamino kisline so negativno nabite!

ALI

* Uporaba protiteles specifičnih za pSer, pThr, pTyr.

***2. fragmentacija fosfoproteina in separacija peptidov***

Identifikacija fosfopeptidov (parcialna kislinska hidroliza in kapilarna elektroforeza Dabsyl ali PTH derivatov AK; LC – MS – MS lahko identificira tudi že mesto fosforilacije)

***3. sekvenčna anliza***

a) Fosfo – Ser v peptidu

Že direktna Edmanova degradacija lahko identificira mesto fosforilacije.

* Ser(P) – β – eliminacija → dehidroAla → adicija DTT → DSer (Ser')

Možne napake, kjer je več Ser zapovrstjo ali kjer je parcialni P! Za nedvoumen rezultat prevedemo Ser(P) v S-etilCys (SEC) z β – eliminacijo in adicijo etandiola.

b) Fosfo – Thr v peptidu

Kot pri Ser(P) je včasih mogoča direktna identifikacija z Edmanovo degradacijo ( po β – eliminaciji tvori več aduktov z DTT).

Prevedba v β – Me – S – etil – Gys (βMeSEC) po β – eliminaciji in adiciji etantiola. Težava je v omejeni topnosti βMeSEC–ATZ v organskih topilih, predvsem butilkloridu, kjer ni ekstrakcije ATZ-ja po cepitvi. Ekstrakcija z etilacetonom je zadovoljiva. Alternativa temu je kovalenta vezava peptida in ekstrakcija s TFAw (solid-phase seq.).

c) Fosfo – Tyr v peptidu

Običajna Edmanova degradacija ne da signala za Tyr(P). Vzrok je v nedostopnosti ATZ – Tyr (P) v butilkoridu ali etilacetonu, ker po cepitvi ni ekstrakcije. Rešitev je kovalentna vezava peptida (solis-phase seq.), ki omogoča ekstrakcijo z vodno TFA. Težava nastane pri HPLC analizi PTH – Tyr (P), ker ne dobimo signala. Ta problem rešimo z identifikacijo s pomočjo kapilarne elektroforeze.