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 , same AK pa ne absorbirajo!
Cys – Cys A_{280}
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.

3. **Detekcija AK z DABSIL KLORIDOM**
   - dobro: - reagirajo z prim. in sek. amini => oranžni derivati (A_{436}) stabilni več mesecev
     - določimo jih hkrati
     - detekcija: subpmolarna
   - slabo: - kratka življenjska doba prebitega reagenta

4. **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)

5. **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

6. **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

7. **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 + Cu^{2+}** (+GvHCl): reakciji prod. delno stabilen (prehaja nazaj v Cys)
     - **merkoptan**: kvantitativna in selektivna redukcija
     - **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 -ME

- $NaBH_4$: (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

2) **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:** (SO_3^{2+} + Cu^{2+} // NaS_4O_6)
  - visoko specifična in selektivna modifikacija
  - S-sulfoCys popolnoma razpade pri AK analizi in sekveniranju
  - uporabna kot začasna blokada
- **jodoocetna kislina in jodacetamid** ($J\text{-}CH_2COO^-$)
  - S-karboksimetilcistein kvantificiramo z AK in sekvenčno analizo
  - lažje in bolj natančnejša analiza cisteina in cistein vsebujočih peptidov z označevanjem s JCT_2COOH
  - stranske reakcije: tvorba S-karboksimetil metionina
  - reakcija s His in Lys
  - redukcija stranske reakcije: JCH_2COO^-: 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** ($Br\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH_3^+$)
  - 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 A_{254} 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 A_{305}
- **ellmanov (DTNB)**
  - absorbira pri A_{412} (rumena barva)
- **NTCB (2-nitro-5-tiocianobenzojska kislina)**
  - absorbira pri A_{412} -> da nam isti produkt kot elman

3) **Modifikacija NH_2 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 NH_2 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), $NaBH_4$
  - ⇨ fizikalne lastnosti proteinov so podobne nativnim
  - ⇨ možno radiaktivno označevanje z ^{14}C-formaldehidom ali ^{3}H-formaldehidom
  - z acetalaldehidom ali acetonom monoalkilni derivati Lys

4) **Modifikacija NH_2, nevtralni derivat**

→ Vpliv na topnost in fizikalne lastnosti.

- KARBAMILACIJA
  - ⇨ izocianat v karbamat
  - ⇨ reagirajo α in - NH_2 , SH, imidazol, fenolni OH (NH_2 derivati stabilni v alkalnem)
  - ⇨ pogoji: pH = 8.8, T=30°C, 24H (4M GvHCl)

⇨ determitev 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 NH_2

- 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 NH_2) NHS s SH in OH tvori tioestre oziroma estre, ki v vodnem mediju hidrolizirajo
  - NHS ester aktivacija pri aciliranju
  ⇨ **acethidrid**: - relativna specifična blokada NH_2
  - 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 C_2H_5SH 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 NH_2, SH, imidazoliloma, fenolatom tvorijo barvane produkte (FDNB)
  ⇨ **arilsulfonati:**
  - TNBS (2,4,6-3nitrobenzensulfonat) reagira z α in -NH_2 ter SH
  - v alkalnem derivat (TNP) ni stabilen
  - pogoji: pH=9.5, s.T., 1-4h (4 do 6M GvHCl)
  - absorpcija derivata λ_{max} = 345 nm
  - kinetika reakcije info. o reaktivnosti NH_2 v protein
  - kalorimetrična določitev NH_2 skupine TNP-AK so stabilne pri kisli hidrolizi
  - olajšana izolacija Lys-vsebujočih peptidov po hidrolizi proteina

5) **Modifikacija NH_2 negativno nabit protein**
→ velik vpliv na topnost in fizikalne lastnosti

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

 Tyr in His derivata zelo labilna v alkalnem
 estri labilni na NH_2OH 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 (?)

6) **Reverzibilna modifikacija NH_2**

- MALEINACIJA:

⇨ reagirajo: - α in - 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 => $t_{1/2}$= 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 NH_2 pred modifikacijo z drugimi reagenti

7) **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 NH_2OH, 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)

8) **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 NH_2 skupino so neuporabni (TRIS, GvHCl), ker potem pufer pobere ves reagent kot pa substrat (ker ga je več) zaščita NH_2 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.)

9) **Modifikacija Tyr**

- NITRIRANJE
  ⇨ absorpcija 3-nitrotiozilne skupine je odvisna od okolice (A_{350}) indikator konformacijske sprememb v proteinu
  ⇨ slabo: številne stranske reakcije: selektivne modif. __?__, če je reakcija zelo hitra

10) **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

11) **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 (^{125}I, ^{131}I močnejša energija sevanja ($t_{1/2}$ = 8 dni) več poškodb proteina)
- reagent prostega I_2 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

1. 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 (NH_4HCO_3, 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 H_2O
- 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 (NH_4OAc) , 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

-tripsin

- serinska proteinaza (Mr=24000)
- inhibitorji: TLCK, α_1- antitripsin, DTP, PMSF, aprotinin, leupeptin, α_2-makroglobulin
- stabiliziran v 20 mM Ca^{2+}
- 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 -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, □ - 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, Hg^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, α_2- 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 N_2, 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, α_1- antitripsin, aprotinin, α_2- 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, Hg^{2+}, $AgNO_3$, oksalat, citrat, Pi, α_2- 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 $CaCO_3$ 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: Hg^{2+}, JCH_2COOH, 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, α_1- antitripsin, α_2- 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: Hg^{2+}, JCH_2COOH, DFP, TPCK, TLCK, E – 64, α_2- makroglobulin
- precipitivna ≥ 0.2 M NaCl ; aktiven v 8 M urei
- optimalen pH= 6.0 – 7.0,
- potreben dodatek reducenta: - 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, α_2- 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

2. 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 -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 → -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 NH_2OH
- vzrok: enostaven nastanek cikličnega imida, ki ga cepi NH_2OH v α- in -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, N_2, 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 – NH_2 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 - NH_2Lys (pri pH=8 je reakcija nepopolna)
nekatere nečistoče lahko močno znižajo izkoristek nastanka PTC – peptida
oksidanti (atm. O_2) 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 - 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 (-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 : H_2O = 1:1 (v/v)
+ DABITC v piridinu (40 ml; 2,8 mg/ml) /N_2
50'/52°C
+ 10 ml PITC/N_2 (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 H_2O + 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, N_2). 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 NH_2 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: $H_2N – R_N – Y$ --- 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*).

3. **Separacija produktov** HPLC = iščemo vrhove vzorcev, kjer so po in pred fragmentacijo na kromatogramih različni (različni S – S mostički).
4. **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.
5. **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.

2. **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.

3. **hibridni tip oligosaharida**

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

4. **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

N^{α} – 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 N^{α} – acilanino- acil peptidna hidrolaza.

N^{α} – 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 N^{α} – formilni skupini.
2. Piroglutamil aminopeptidaza

N^{α} – miristoilacija (C_{14})

poteče na Gly^1, 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:**
   a) KOH – MeOH; cepitev vseh oksi in tioesterskih vezi
   b) Neutralna hidroksilaminoliza cepi prefernčno tioesterske vezi
   c) Kisla hidroliza sprosti amidno vezane maščobne kisline
2. **TLC ali HPLC analiza sproščene maščobna kisline**
3. **Razgradnja proteina s proteolizami in izolacija N^{α} – miristoiliziranega peptida** → MS

Palmitolacija (C_{16})

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 (C_{15}) → seskviterpen
- geranilgeranilacija (C_{12}) → 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, Ca^{2+}, proteinov)

Alkilacija

Najbolj pogosta je metilacija na:

a) α – NH_2 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 TFA_w (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.