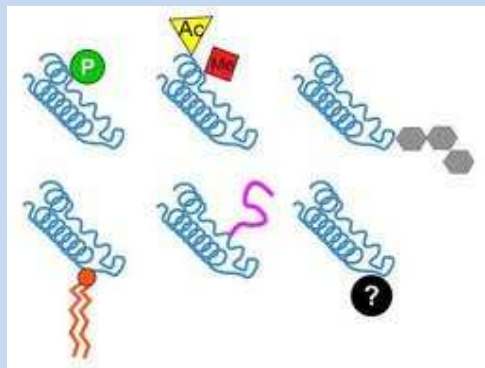


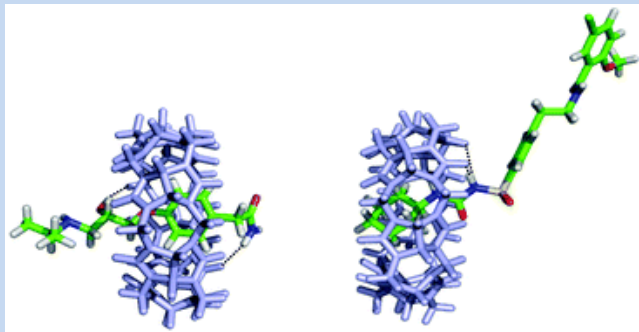
KARAKTERIZACIJA POST-TRANSLACIJSKIH MODIFIKACIJ Z UPORABO OBOGATITVENE TEHNIKE



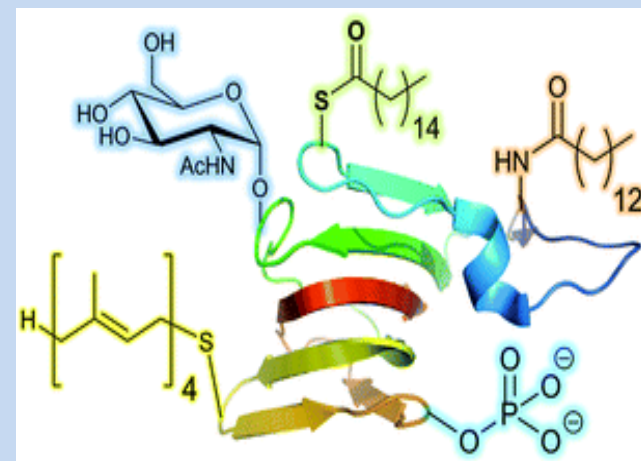
Teja B., Sara D., Tina G.

POST-TRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE

- Mehanizem, ki ureja proteom celice
- Kemičnih dogodki, ki potečejo na aminokislinskem zaporedju kodiranem v ribosomu z encimskimi reakcijami

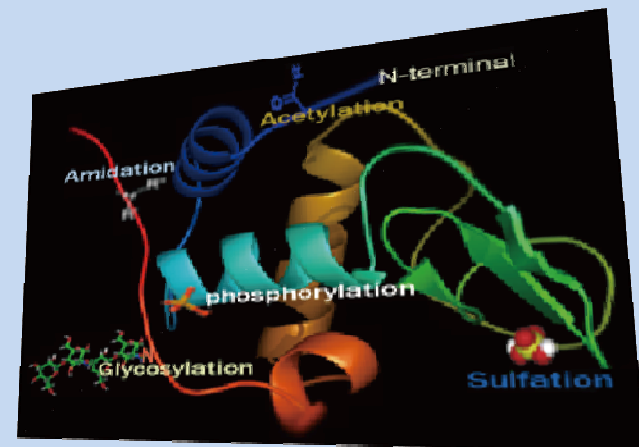
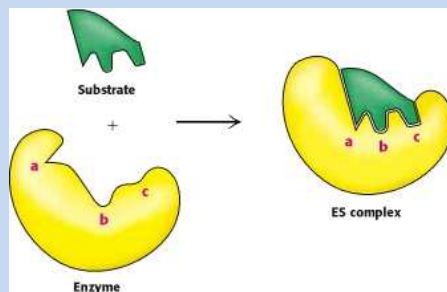


- 300 različnih vrst proteinov s post-translacijsko modifikacijo
- Malo raziskanih na ravni proteoma



BIOKEMIČNA ANALIZA POST-TRANSLACIJSKIH MODIFIKACIJ

- Določitev vloge modifikacij pri vzpostavitvi vezi encim-substrat
- Identifikacija proteinskih substratov
- Določitev post-translacijskih mest



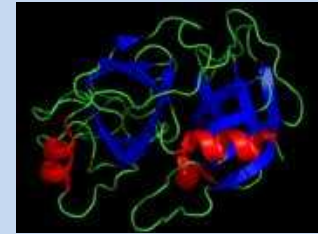
- Metoda obogatitvene tehnike z MS in računalniško analizo podatkov

IDENTIFIKACIJA PROTEINSKIH SUBSTRATOV

- Težke biokemične analize in vitro post-translacijskih modifikacij

METODA	IN VITRO/IN VIVO	PREDNOSTI	SLABOSTI
Radioaktivni izotopi	In vitro / in vivo	Dostopni reagenti	Radioaktivnost, nizka občutljivost
Western blot	In vitro / in vivo	Dobra afiniteta	Zmerna občutljivost
Peptidni/protein ski nizi	In vitro	Hitro, globalna raven	Nespecifično, nizka občutljivost, preverjanje
MS-proteomika	In vitro	Specifična, globalna raven	Potrebujemo bogatitveno metodo

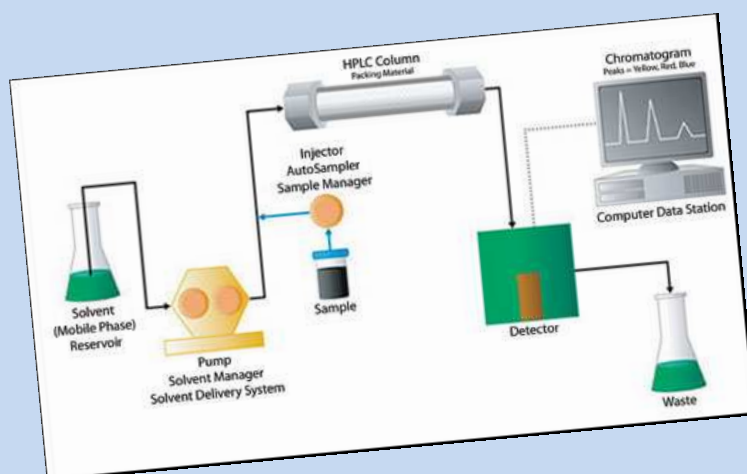
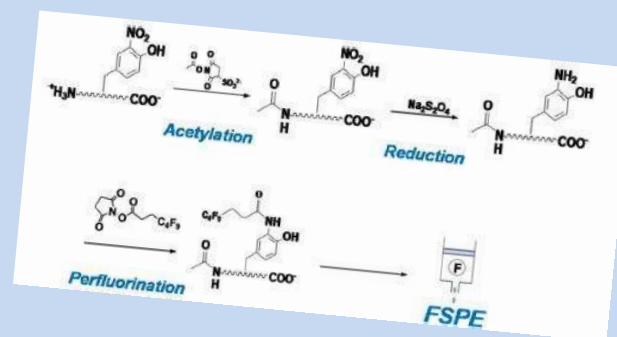
MS-PROTEOMIKA



- Najuporabnejša metoda za identifikacijo substrata in označevanje post-translacijskih mest
 1. Proteolitična prebava s specifično proteazo
 2. Ločevanje post-translacijsko modificiranih peptidov od ostalih peptidov + obogatitvena metoda
 3. Izolacija post-translacijskih peptidov in analiza z HPLC ali MS (identifikacija peptida in natančna lokalizacijo post-translacijskih mest)
 4. Ocena možnih peptidov z ročnimi ali avtomatskimi načini preverjenja za zagotovitev natančnosti

ODKRIVANJE POST-TRANSLACIJSKIH MODIFIKACIJ

- Obogatitvene metode
- Visoka občutljivost
 - Delež obogatitvene afinitete
 - Stopnja kontaminacije
 - Občutljivost HPLC/MS
 - Kompleksnost vzorca



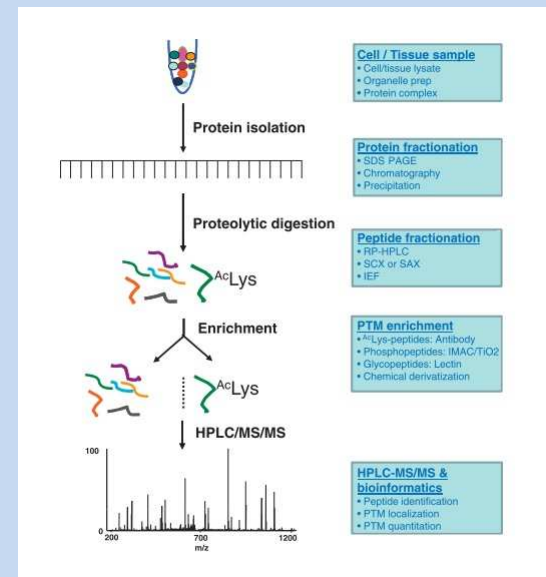
EKSPERIMENTALNI POSTOPEK

Izolacija iz celičnih kultur ali tkiv

Proteolitična razgradnja

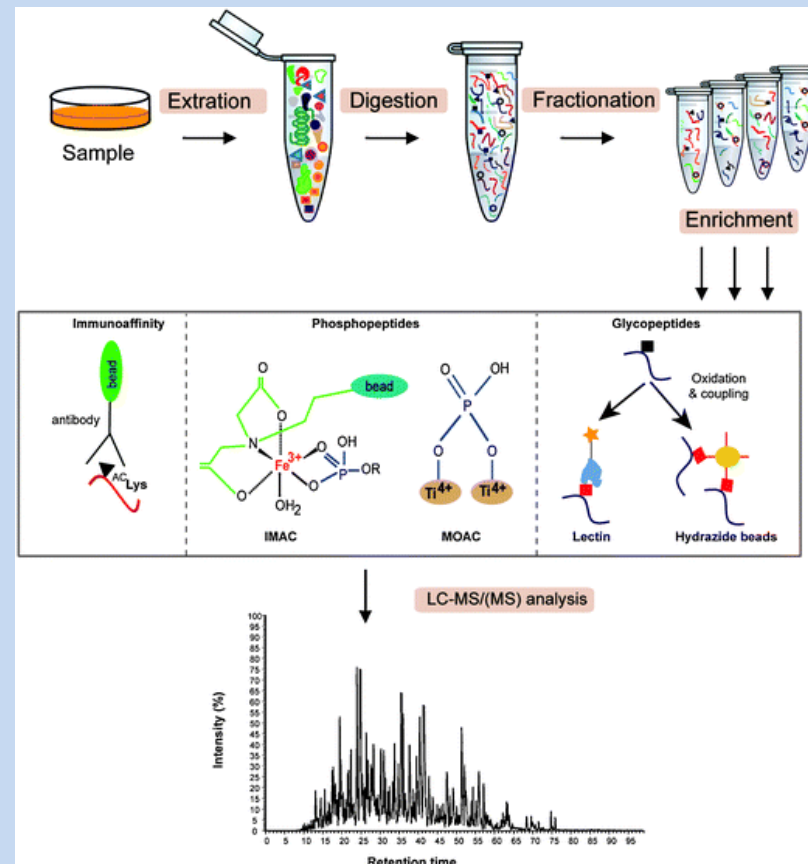
Obogatitvene metode

Analiza post-translacijskih
modifikacij



ZMANJŠANJE KOMPLEKSNOSTI VZORCA

- Separacija organelov ter frakcionacija proteinov in proteolitičnih peptidov z elektoroforeznimi tehnikami ali večdimenzionalnimi kromatografijami
- Frakcionirani proteini in peptidi so bolj dovzetni za obogatitev



Načini separacije

Razgradnji proteinov v peptide sledi postopek obogatitve post-translacijsko modificiranih peptidov

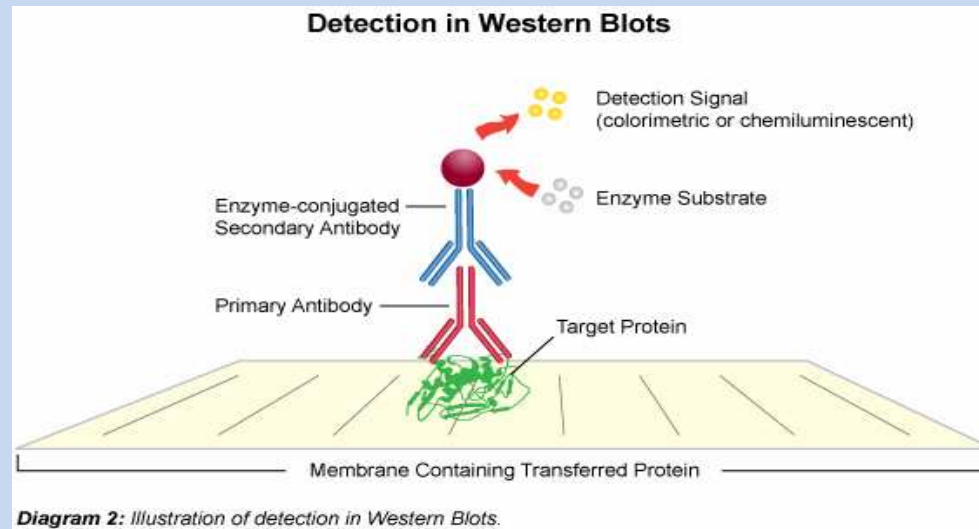
- 1)S protitelesi
- 2)S kemijsko derivatizacijo
- 3)Z ionsko interakcijo

OBOGATITVENE TEHNIKE

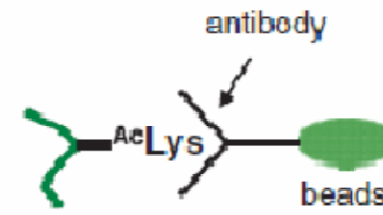
1) SEPARACIJA S PROTITELESI

-Western blot analiza:

- metoda ločevanja proteinov pod vplivom električnega polja,
- prenos na membrano,
- detekcija modifikacij z vezavo protiteles

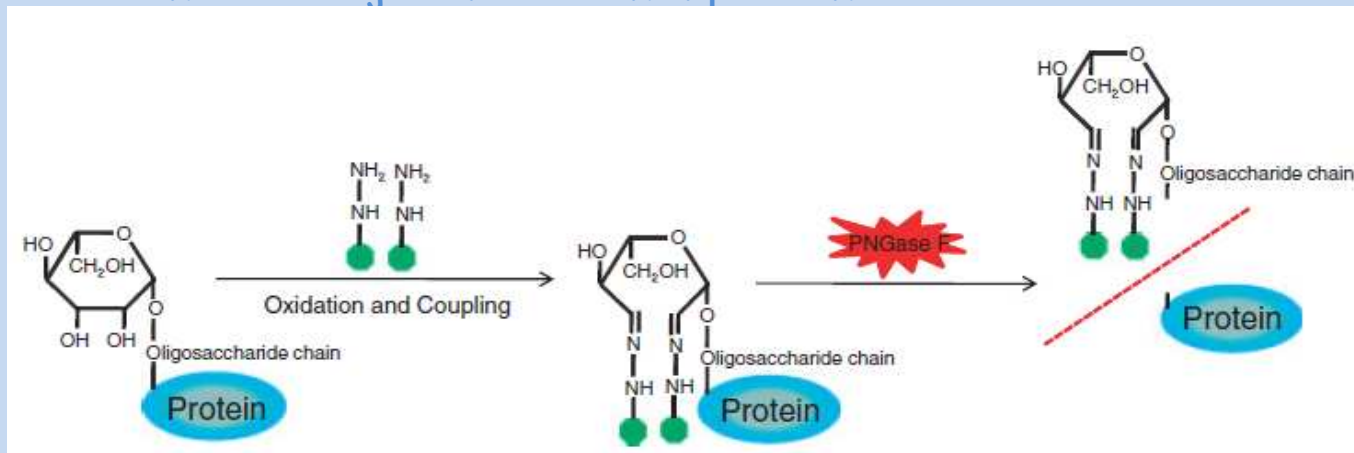


- Fosforilacija tirozina
- Acetilacija lizina
- Metilacija arginina
- Nitracija tirozina
- Za analizo nimamo vedno na voljo visoko kakovostnih protiteles (vezava z majhno afiniteto)
- Sestavni del PTM mora biti antigenski ter večji od metilne in acetilne skupine



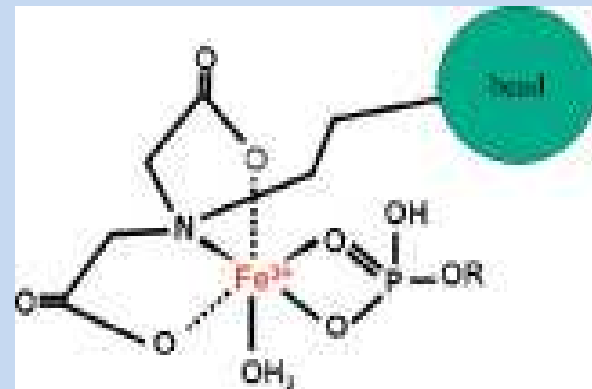
2) SEPARACIJA S KEMIJSKO DERIVATIZACIJO

- Separiramo kompleksne glikozilirane proteine
- Oksidacija ogljikohidratnega dela
- Vezava hidrazida
- Neglikozilirane proteine odstranimo
- PNGaza F (peptid-N-glikozidaza F)
- Identificiramo in kvantificiramo glikoproteine ki so povezani s plazemsko membrano, tkivi, telesnimi tekočinami
- Velika izguba vzorca ob neučinkoviti derivatizaciji
- Nastanek nezaželenih stranskih produktov



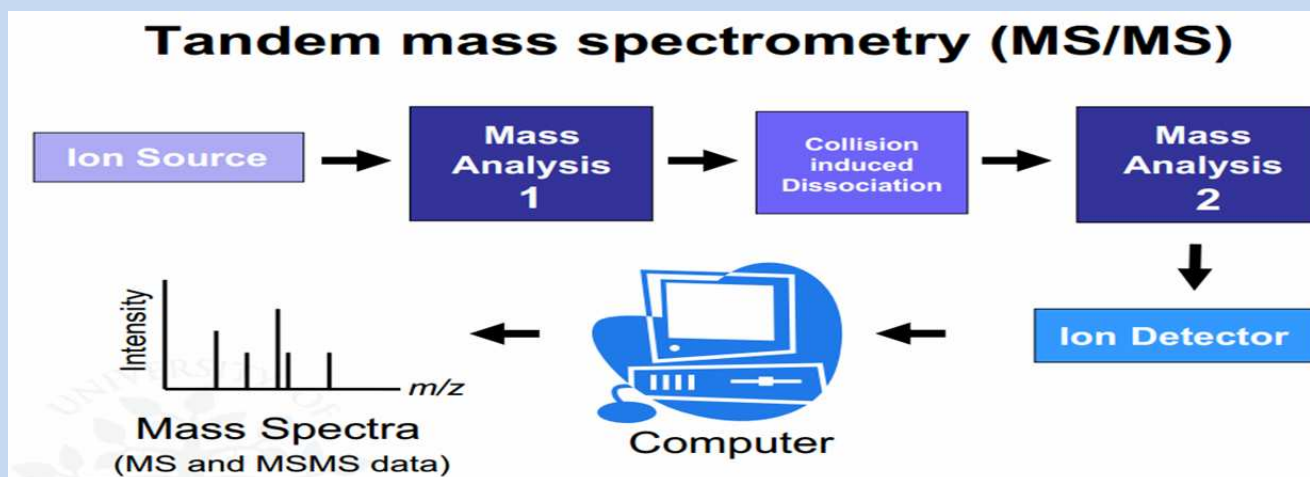
3) SEPARACIJA Z IONSKO INTERAKCIJO

- IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography)
- Separacijska tehnika
- Osnova je koordinacijska kovalentna vez med kovinskim ionom in proteinom
- Večinoma za čiščenje rekombinantnih proteinov, ker je v naravi malo proteinov ki imajo afiniteto za kovinske ione
- Ločevanje proteinov z lizinskim repom
- Obogatitev fosfopeptidov (Fe(III))

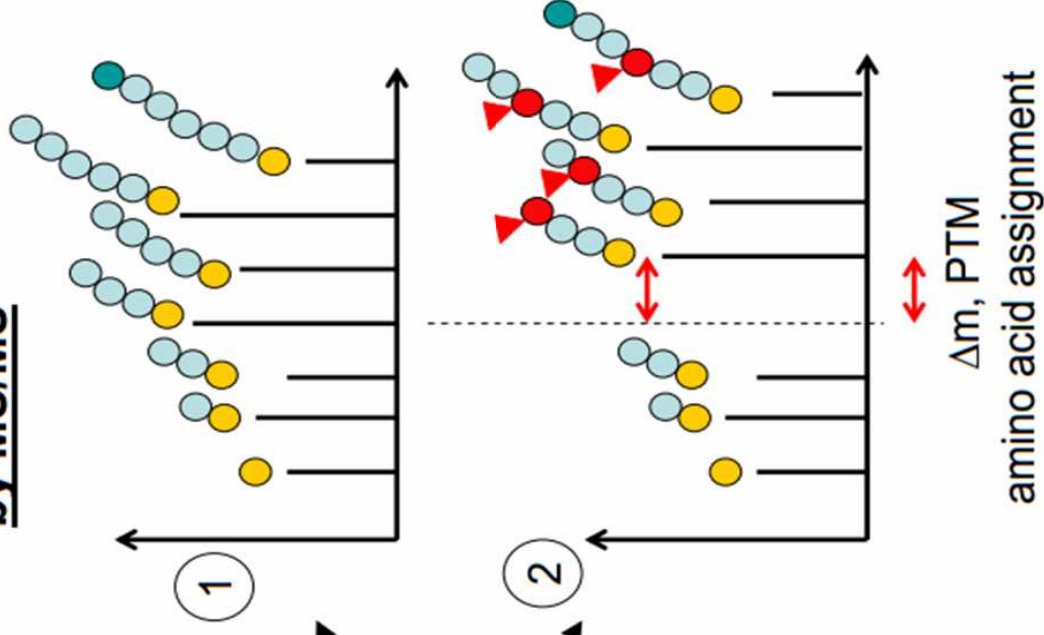


MS/MS (Tandemska masna spektrometrija)

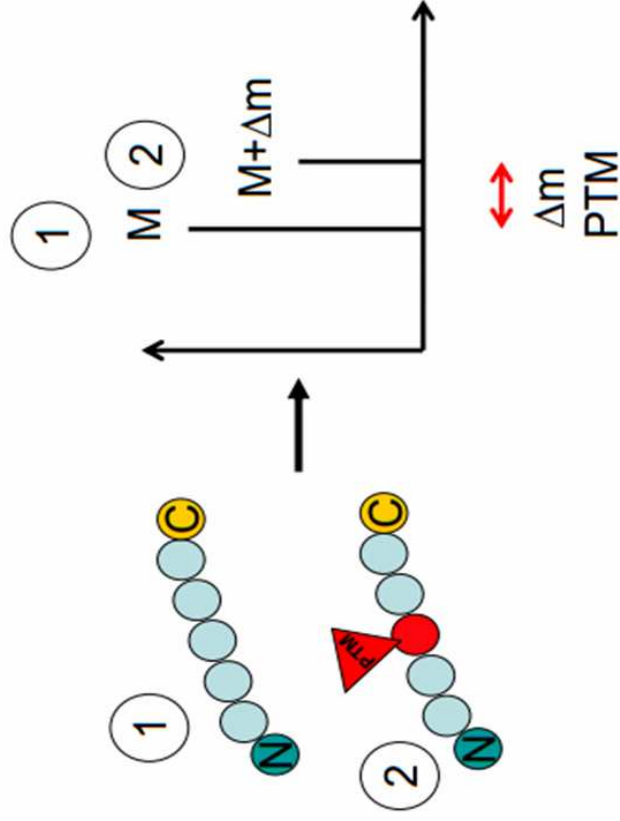
- Identifikacija PTM
- Določanje lokacije PTM
- Kvantitativno določanje



Peptide sequencing by MS/MS



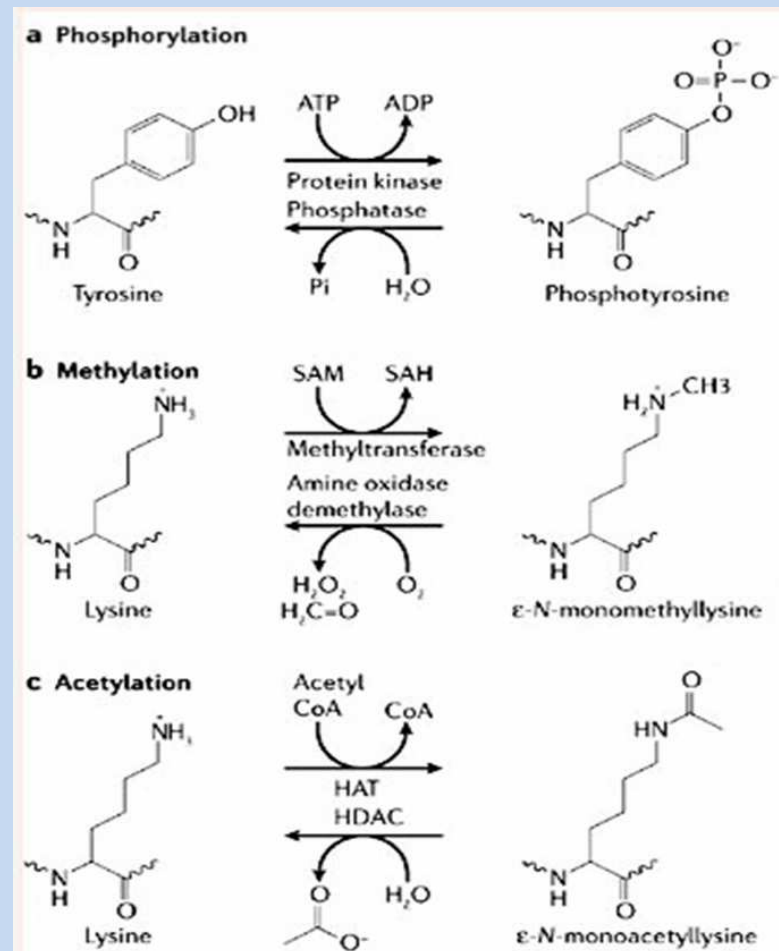
Peptide analysis by MS



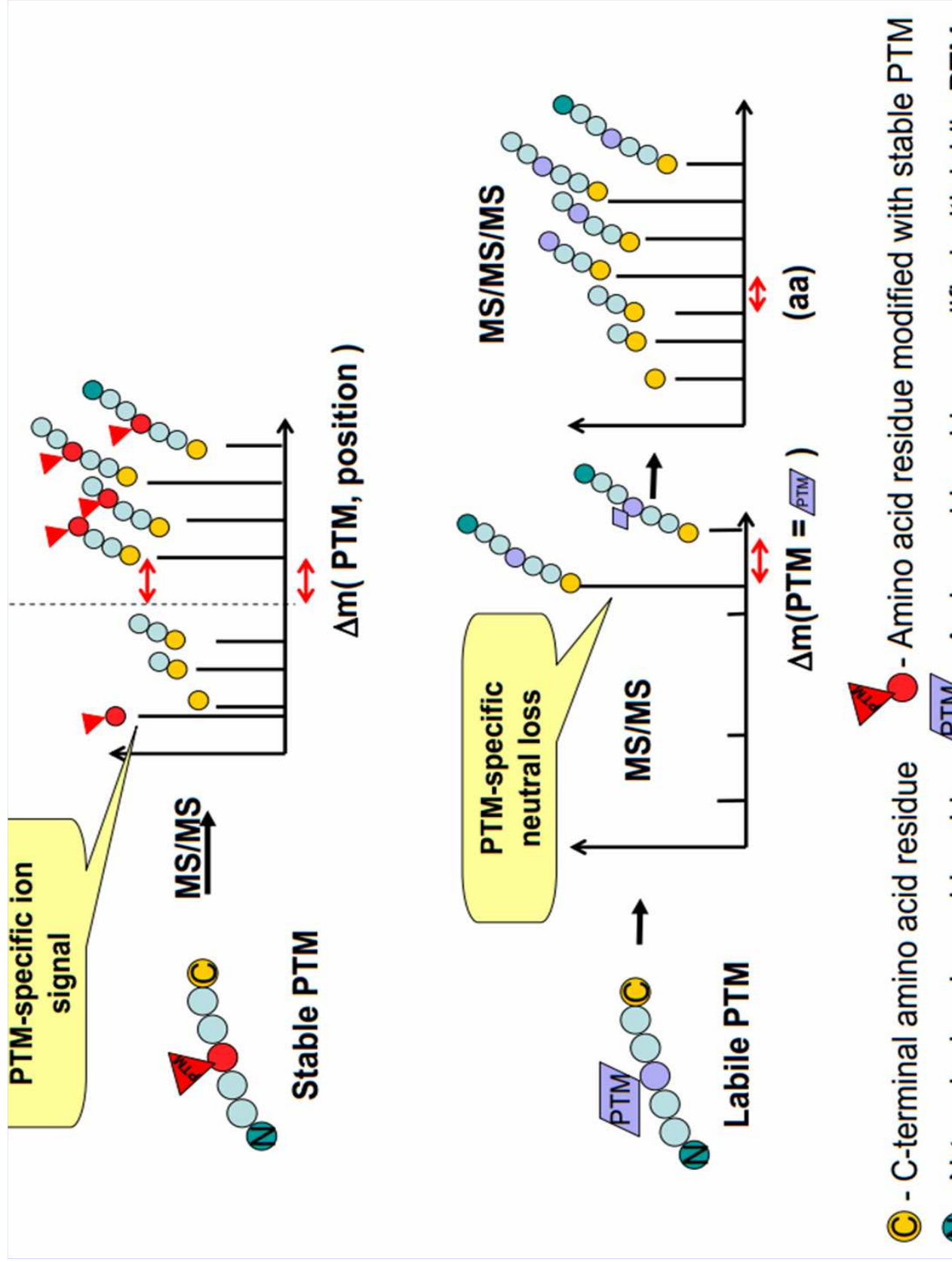
-  - Amino acid residue modified with PTM
-  - Amino acid residue
-  - C-terminal amino acid residue

PTM

- Metilacija (Arg, Lys, Asp, Glu, Asn, Cys, His in Ser)
- Acetilacija (Lys, Ser, Thr, Try)
- Fosforilacija (Ser, Thr, Try in His)



PTM	Δm (MS) (Da)	Δm (MS/MS) Neutral loss (Da)
Phosphotyrosine	79.966	79.966
Phosphothreonine		
Phosphoserine	79.966	97.977
Acetyllysine	42.011	
Methyllysine	14.016	See ref.
Dimethyllysine	28.031	See ref.
Methylarginine	14.016	59.073
Dimethylarginine	28.031	
Trimethyllysine	42.047	
N-linked glycans	162.053 (hexose) 203.079 (hexosamins) 291.095 (sialic acids) 365.148 (HexHexNAc)	162.053 203.079 291.095 365.148
Nitrotyrosine	44.985	
Palmitoyl	238.230	272.217
Acylation	Various, see ref	See ref
Ubiquitin	114.043 (Gly-Gly tag remains after tryptic digestion)	
Methionine oxidation	15.995	63.998



Prihodnost...

- PTM analize v prokariontih, evkariontih, tudi kvasovkah
- *Saccharomyces cerevisiae*

