

Metodi di studio delle proteine :

- determinazione della quantità
- determinazione della **struttura primaria** (sequenza a.a.)
- determinazione della struttura 3D

Determinazione della sequenza aminoacidica di una proteina

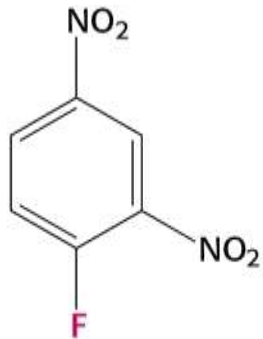
1953: La prima determinazione completa
Insulina bovina F.Sanger 51 a.a.
100 g di proteina in 10 anni

Oggi: centinaia di migliaia di proteine note
Pochi giorni, pochi μg di proteina

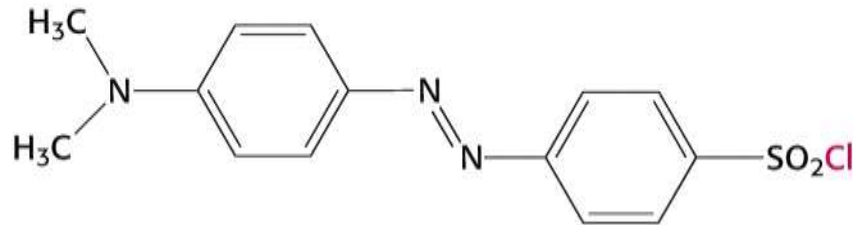
Determinazione della sequenza aminoacilica di una proteina

- Purificazione della proteina
- Determinazione dei gruppi terminali
- Determinazione di eventuali ponti disolfuro
- Preparazione di una mappa triptica
- Determinazione della composizione aa. dei peptidi
- Determinazione della sequenza aa. dei peptidi
- Ricostruzione della sequenza della proteina

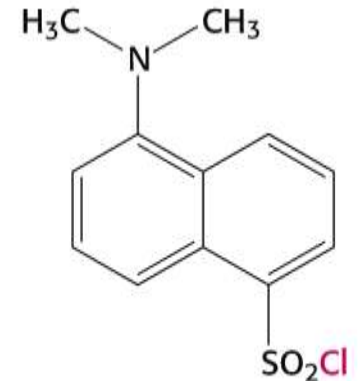
I singoli aminoacidi possono essere individuati in HPLC dopo derivatizzazione con composti fluorescenti



Fluorodinitrobenzene



Dabsyl chloride



Dansyl chloride

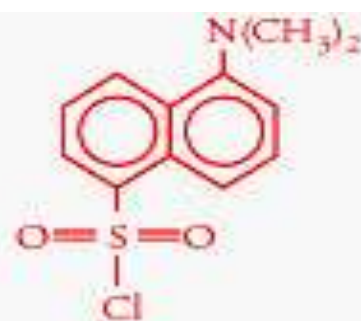
Determinazione dei gruppi terminali

Serve a stabilire da quanti tipi di catene è formata la proteina.

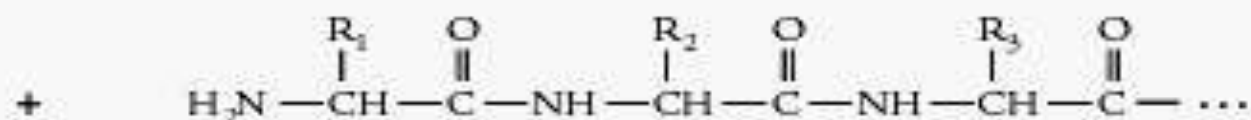
Il residuo N-terminale (ammina primaria)

- viene fatto reagire con il CLORURO DI DANSILE per formare peptidi dansilati
- liberato mediante idrolisi acida
- separato con metodi cromatografici (HPLC)
- identificato per fluorescenza (giallo)

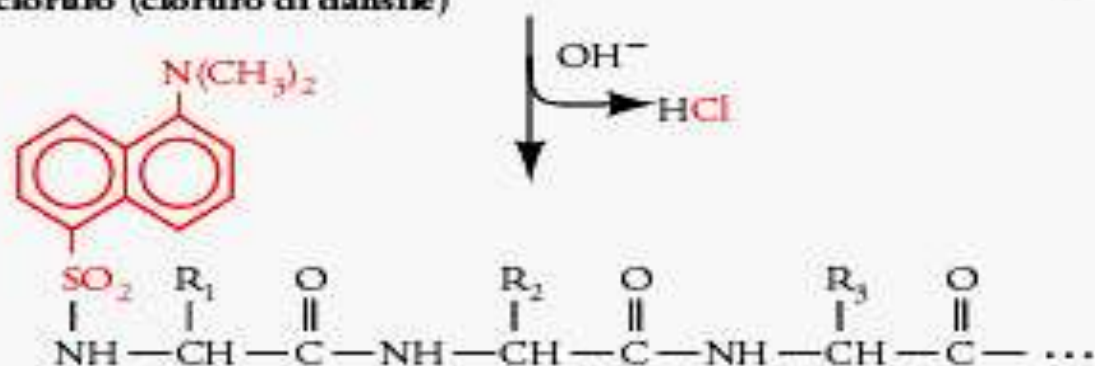
Il residuo C-terminale può essere identificato staccandolo con carbossipeptidasi specifiche per tipi di residui aa.



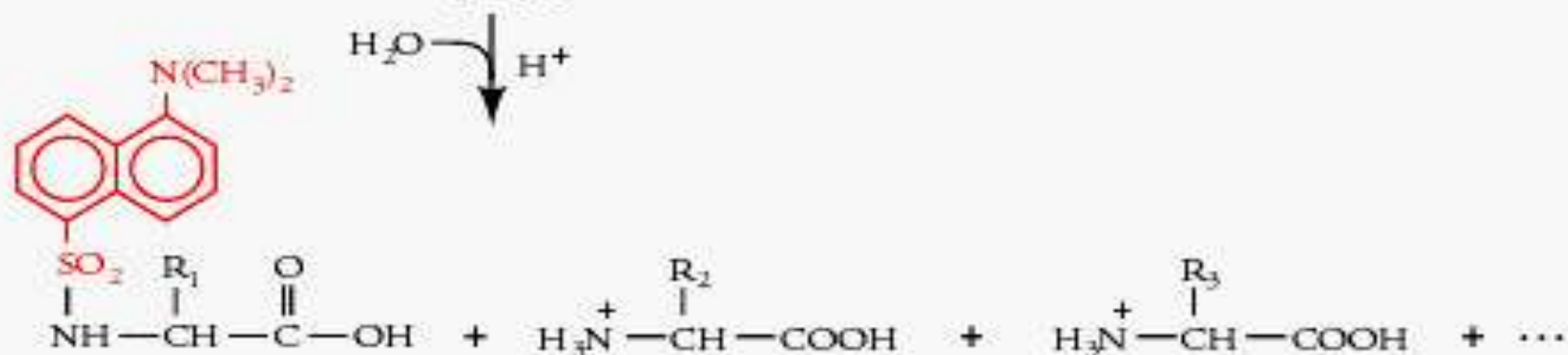
1-Dimetilamminonaftalene-5-sulfonil cloruro (cloruro di dansile)



Poliptide



Dansil-poliptide

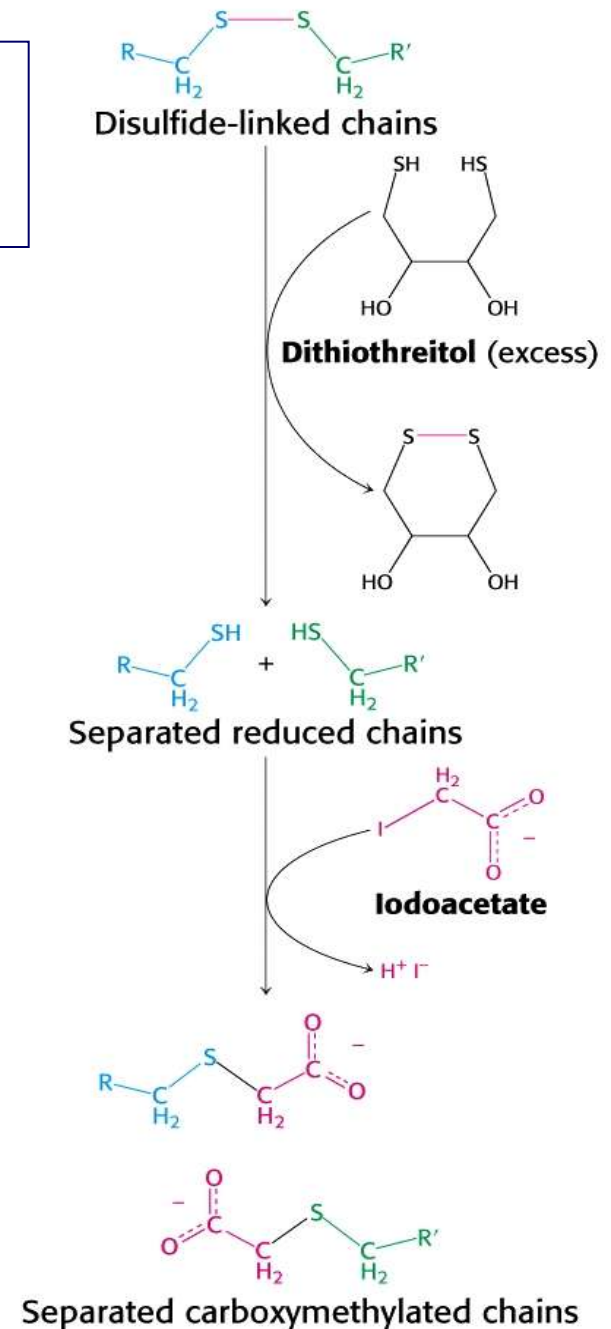


**Dansil-amminoacido
(fluorescente)**

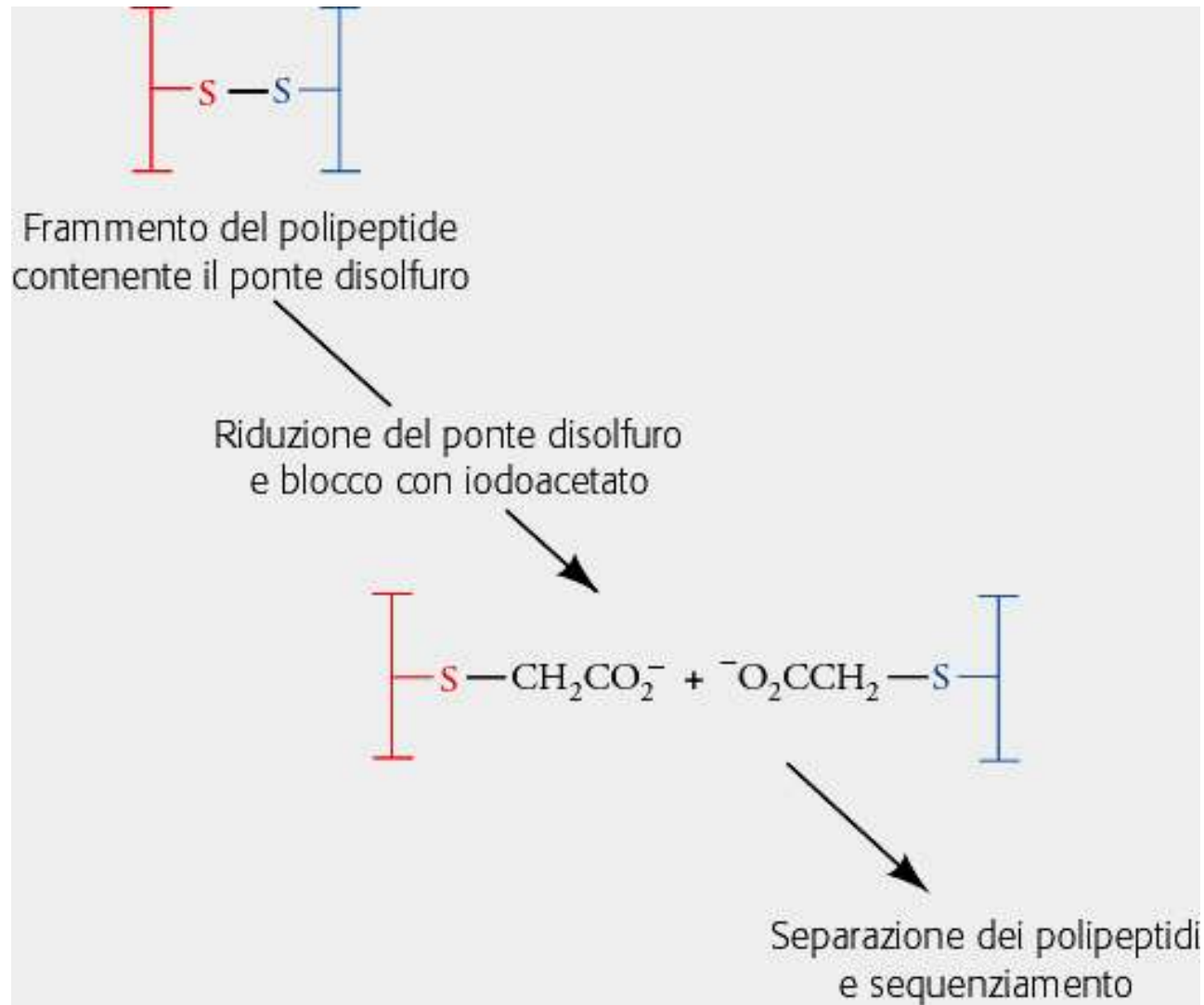
Amminoacidi liberi

Determinazione di eventuali ponti disolfuro inter-catena

Si possono usare ossidanti
(ad es. acido performico)
o riducenti (ad es. mercaptani, DTT)



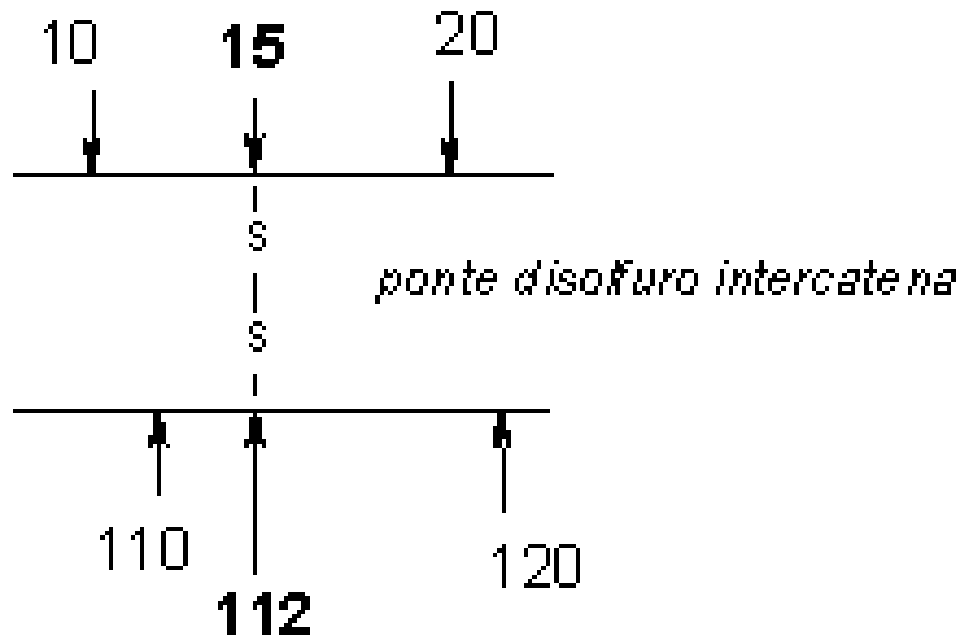
Determinazione della posizione di ponti disolfuro



Determinazione della posizione di ponti disolfuro

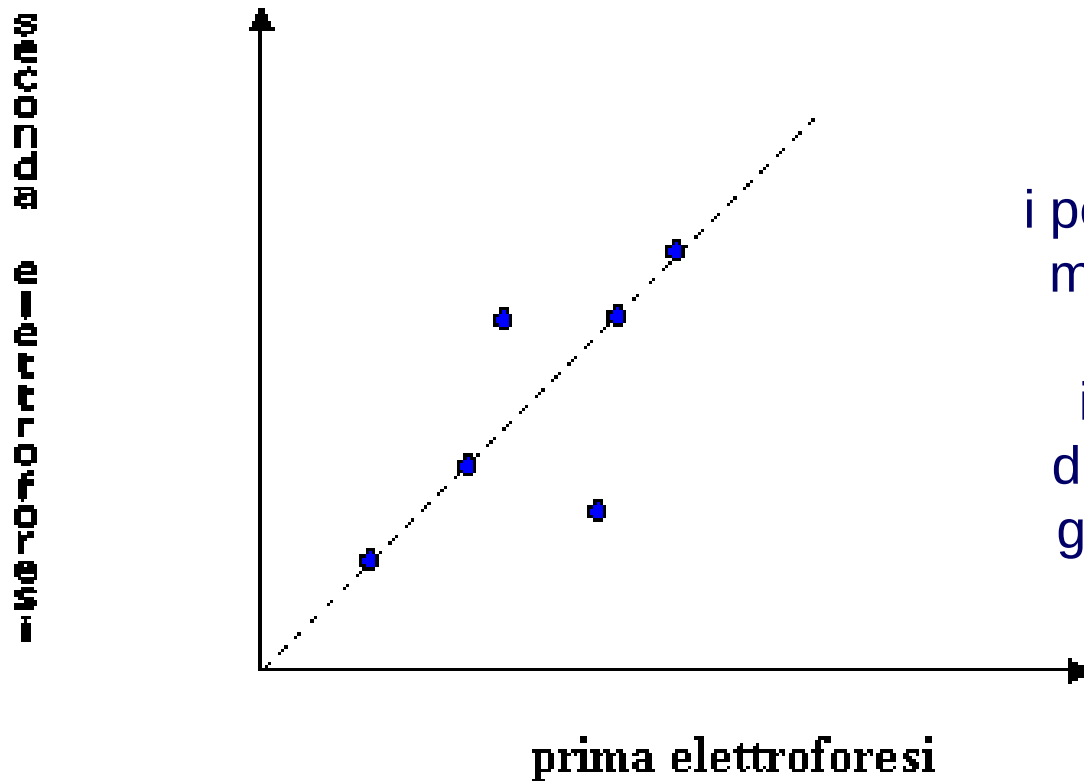
Mediante elettroforesi diagonale

1. si idrolizza la proteina nativa in frammenti. Si produrranno sia frammenti "lineari" sia "cluster", ossia due o più peptidi tenuti insieme da ponti disolfuro. Esempio:



2. Elettroforesi della miscela di peptidi nativi in una dimensione
3. Elettroforesi della miscela di peptidi dopo ossidazione con acido performico che ossida (spezzando) i ponti disolfuro.

Questa elettroforesi è condotta in direzione
perpendicolare alla prima

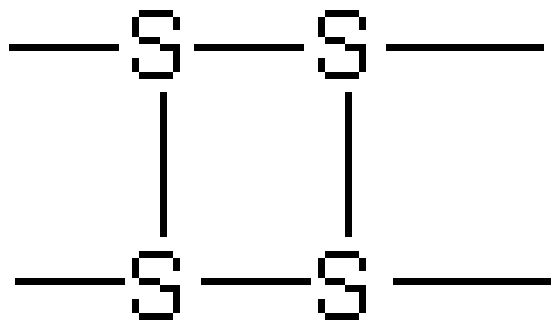


i peptidi lineari avranno la stessa mobilità e si disporranno lungo una **diagonale**.

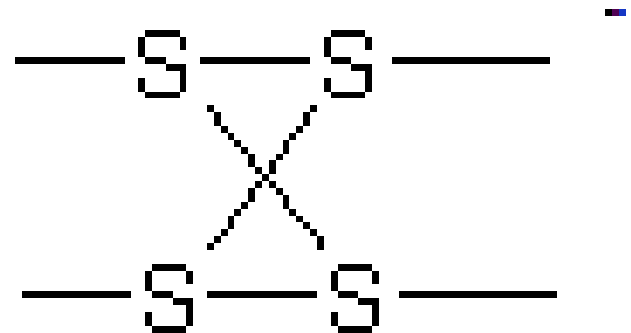
i peptidi che non seguono la diagonale sono quelli formatisi grazie alla scissione dei ponti.

4. si isolano e si sequenziano i peptidi ossidati

La determinazione univoca si può avere soltanto se il frammento contiene **un solo ponte** disolfuro. Se infatti il frammento contiene 2 ponti disolfuro, si hanno le possibilità



oppure



In questi casi il frammento viene sub-digerito con metodi chimici o enzimatici diversi da quello usato per la frammentazione, in modo da ottenere più "sottoframmenti", ciascuno contenente un solo ponte disolfuro.

Determinazione della mappa triptica

Endopeptidasi :

Tripsina

R_{n-1} = residuo positivo (Arg, Lys)

$R_n \neq \text{Pro}$

Chimotripsina

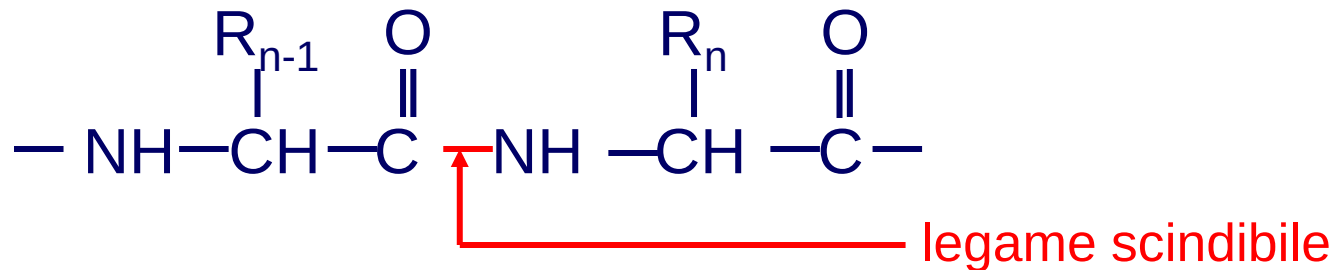
R_{n-1} = grossi residui idrofobici
(Phe, Trp, Tyr)

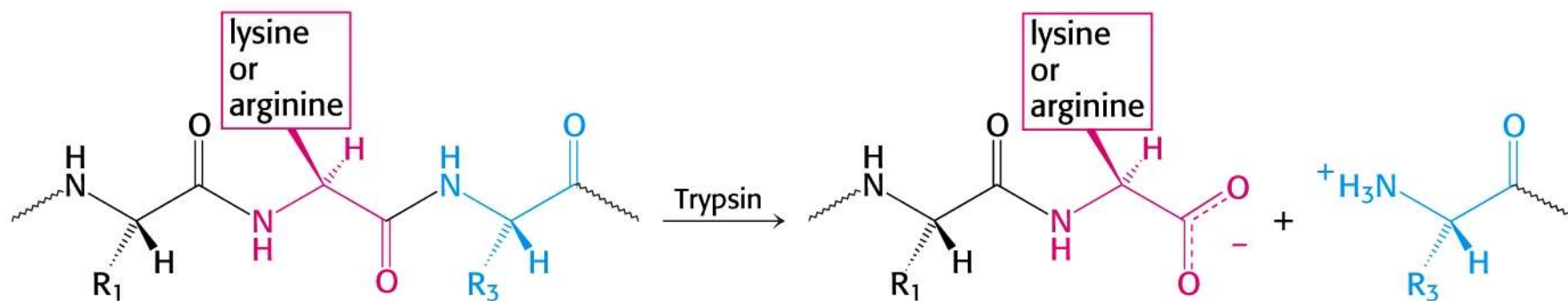
$R_n \neq \text{Pro}$

Pepsina

R_n = Leu, Phe, Trp, Tyr

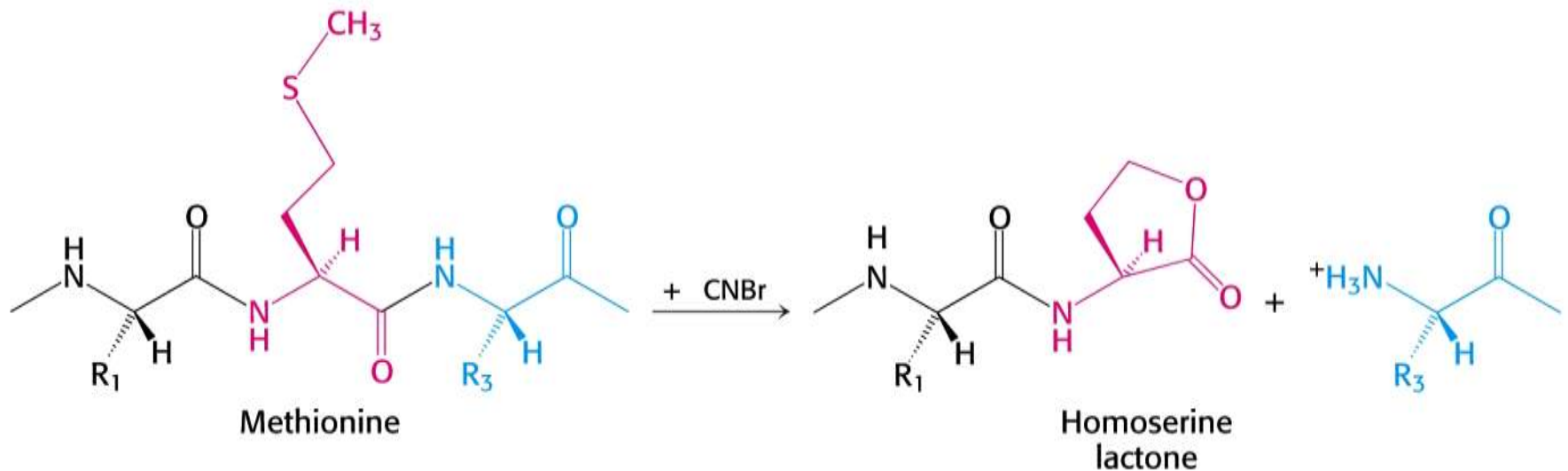
$R_{n-1} \neq \text{Pro}$





Determinazione della mappa triptica

La proteolisi limitata può essere ottenuta anche mediante peptidasi chimiche (non enzimatiche), ad es. il BROMURO di CIANOGENO (CNBr) che scinde sul lato C dei residui di Met



Proteina digerita con

1) **Tripsina**

2) **Chimotripsina**

AVLFCSMPR

FTFAVLR AIR

WFLFCR

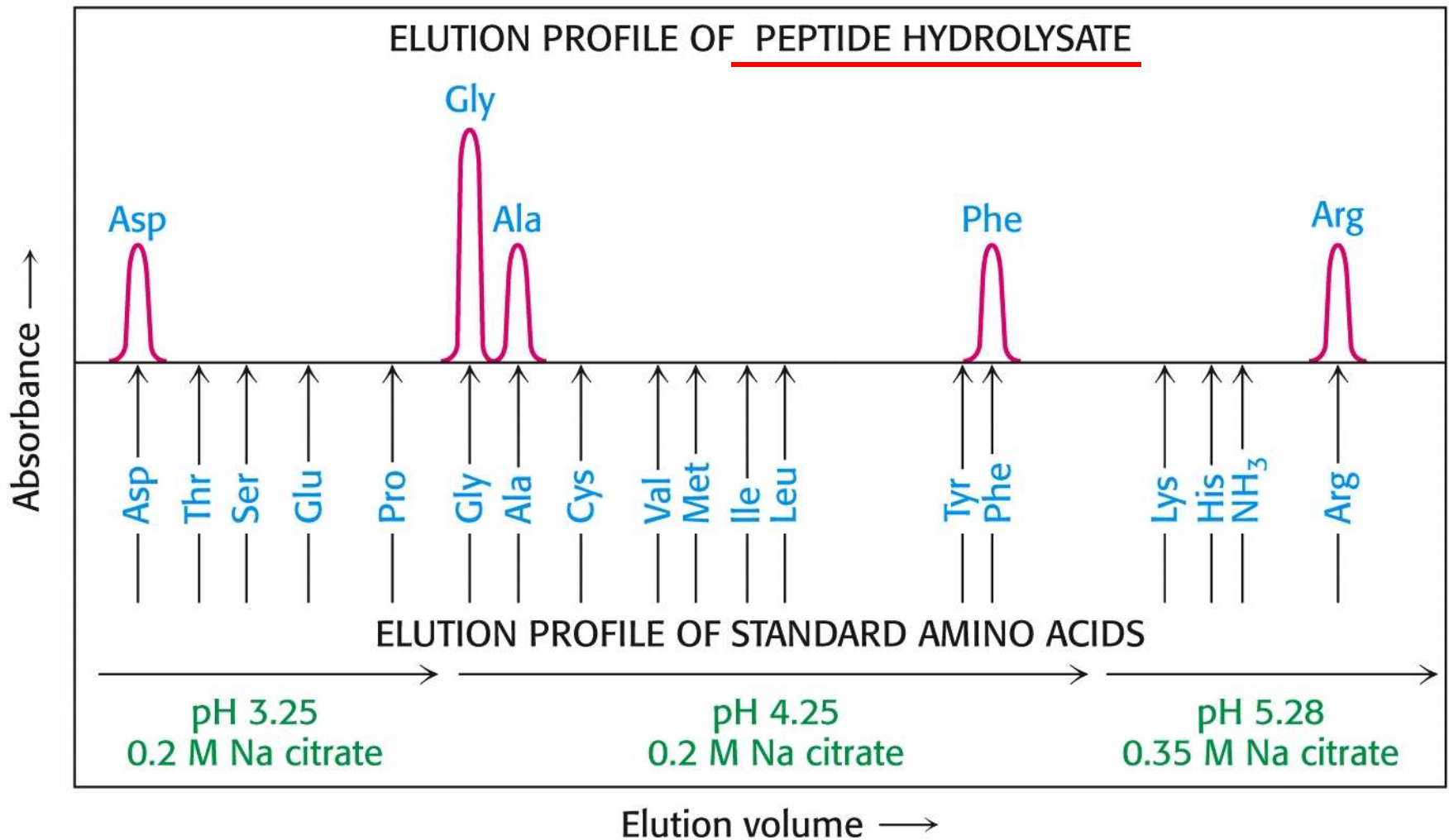
CSMPRTRKFTF

LRCAIRHLF

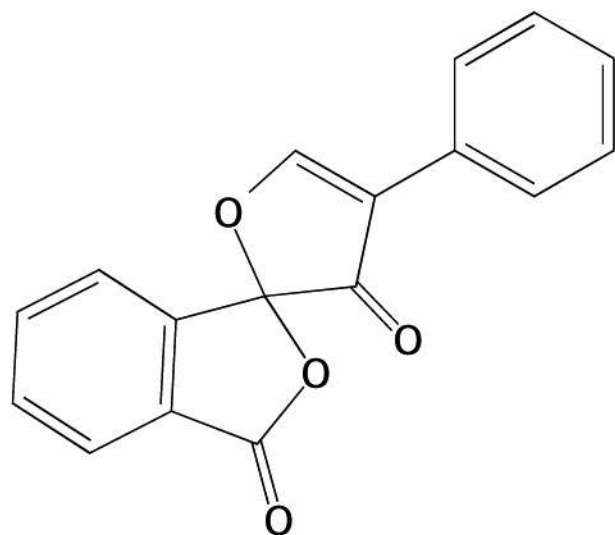
DNWF

RSAQTY

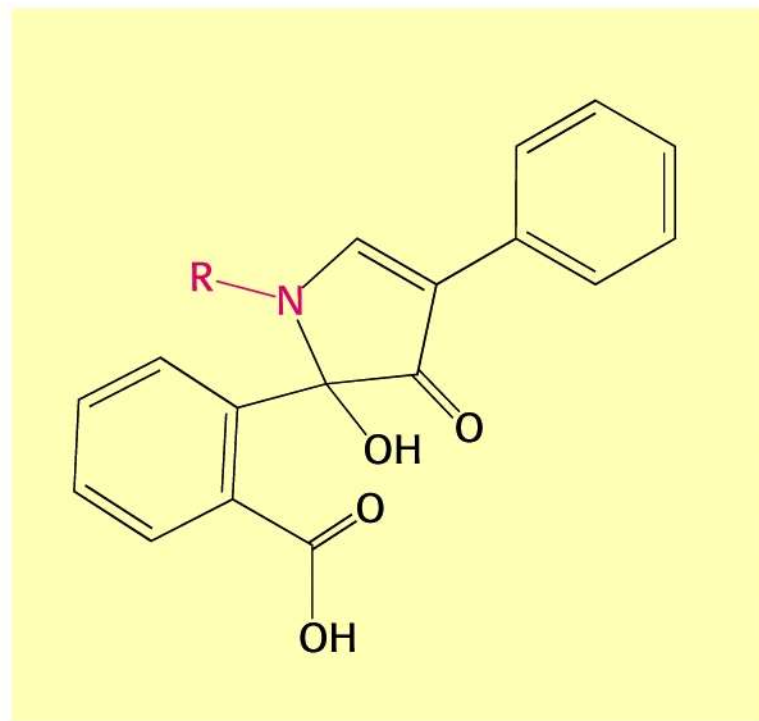
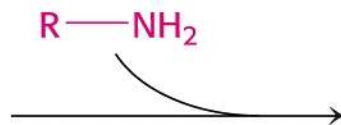
Determinazione della **composizione** aa. dei peptidi



I singoli aminoacidi possono essere individuati in HPLC dopo derivatizzazione con composti fluorescenti

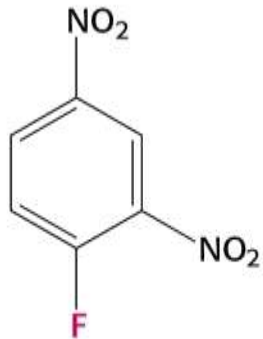


Fluorescamine

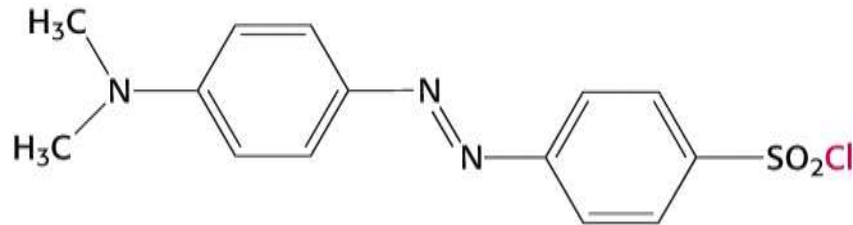


Amine derivative

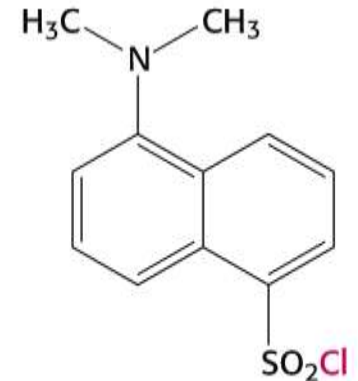
I singoli aminoacidi possono essere individuati in HPLC dopo derivatizzazione con composti fluorescenti



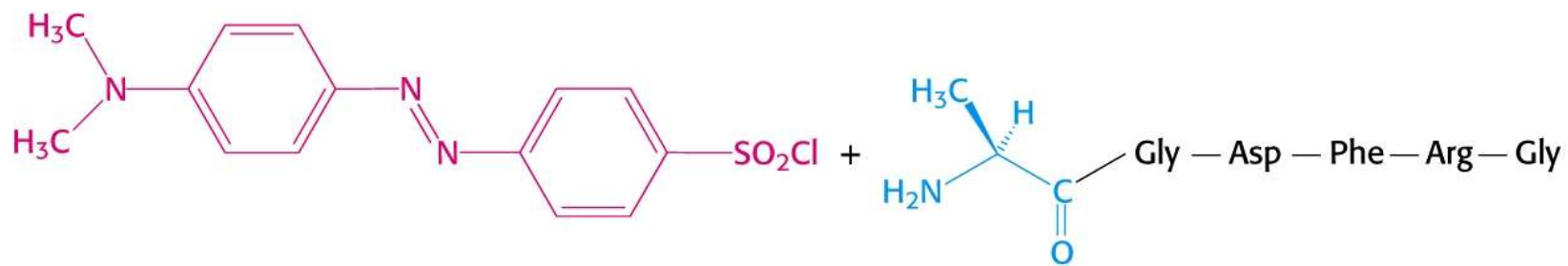
Fluorodinitrobenzene



Dabsyl chloride



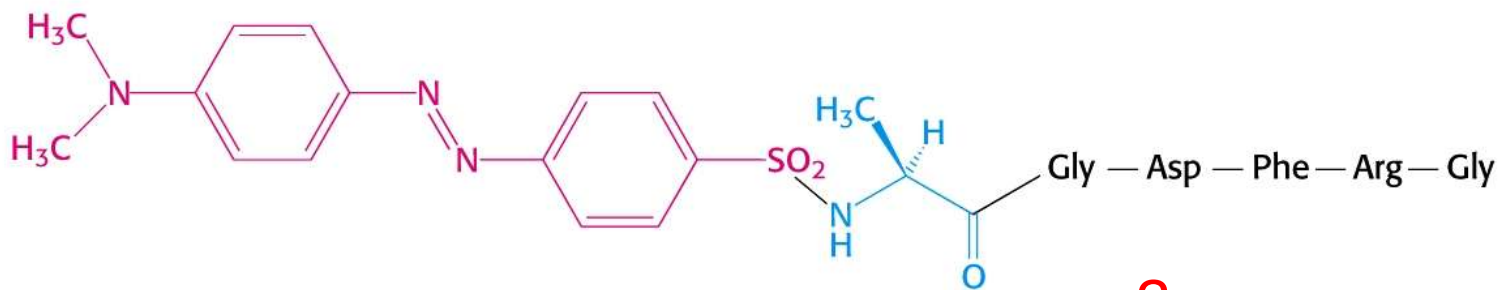
Dansyl chloride



Dabsyl chloride

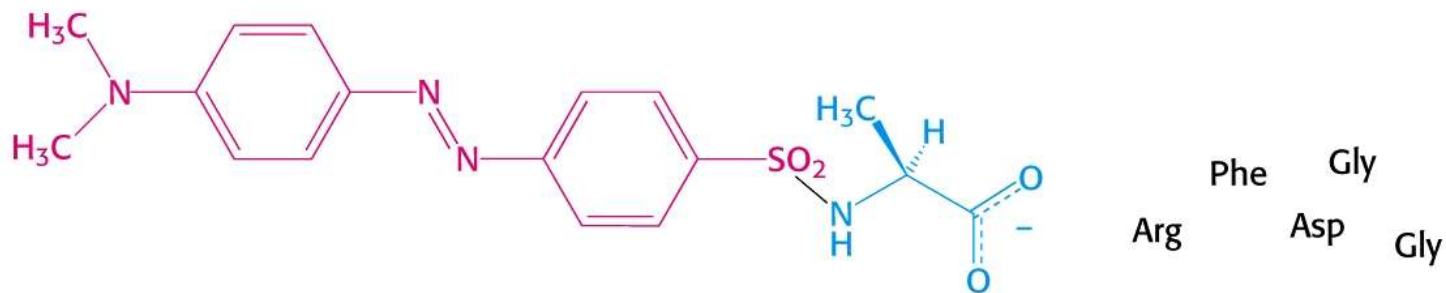
1.

Labeling

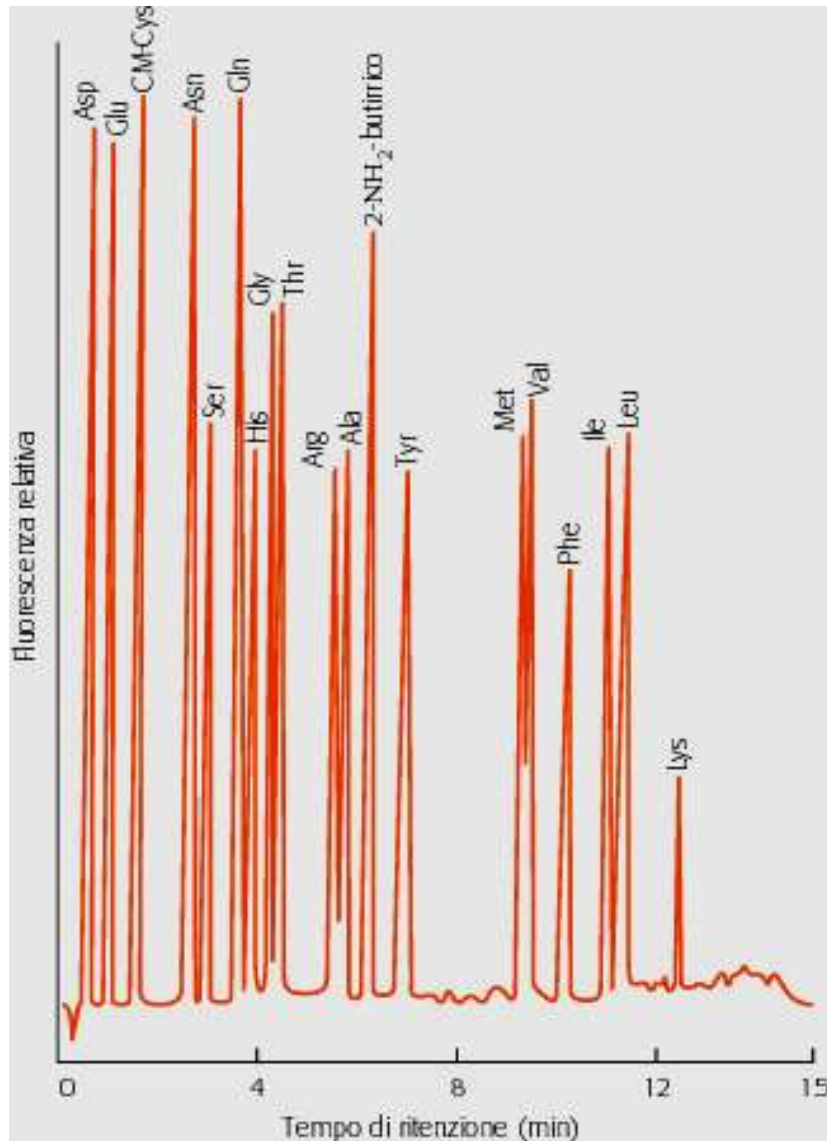


2.

Hydrolysis



Dabsyl alanine

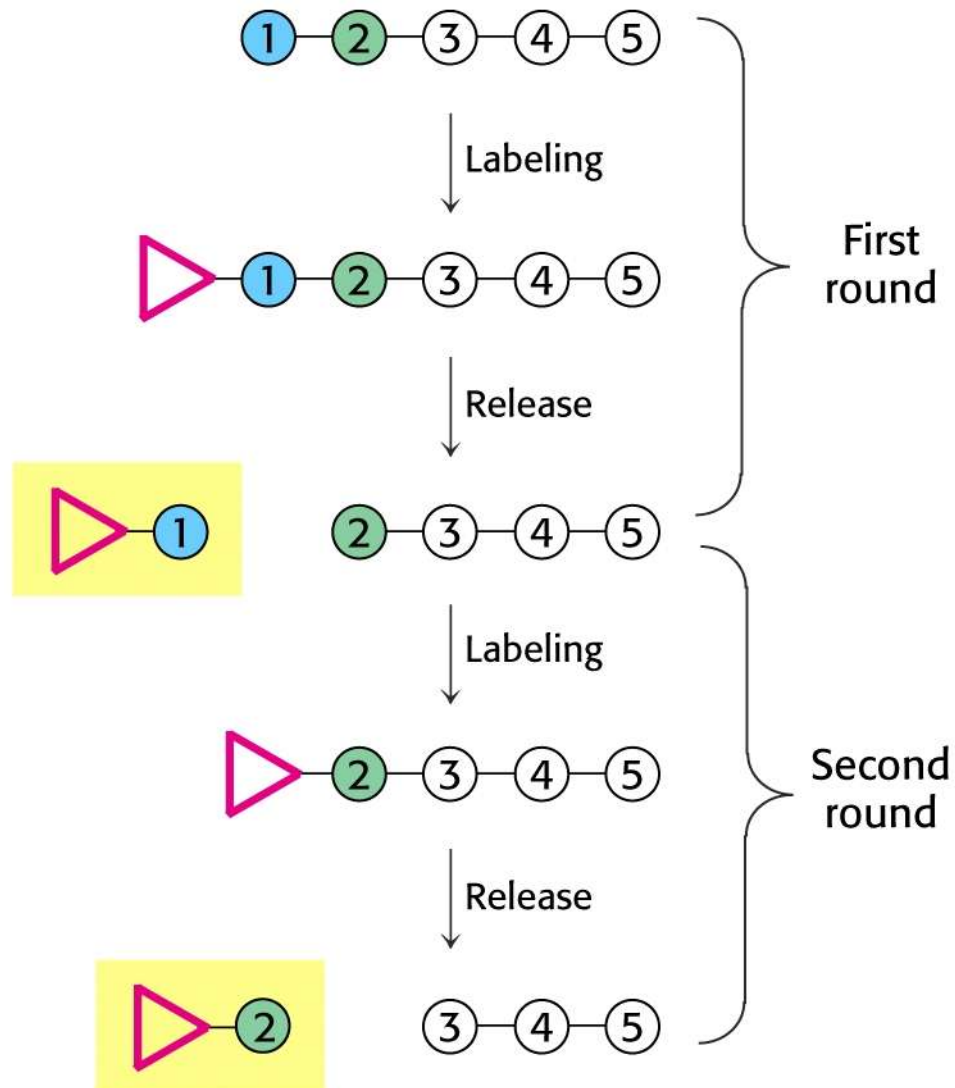


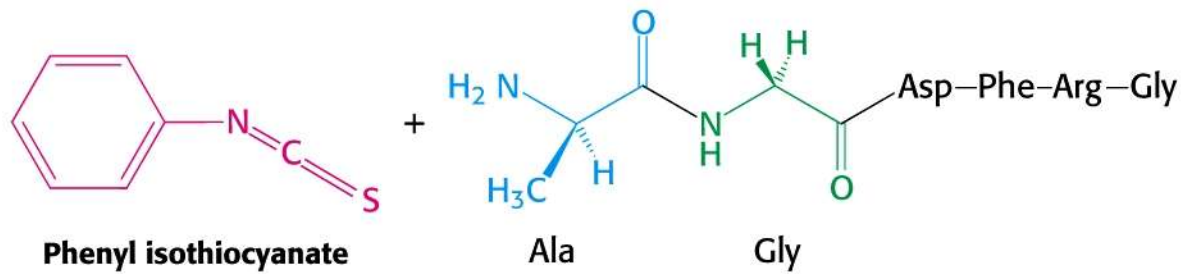
Determinazione della
composizione a.a.
mediante separazione
in HPLC dei derivati
fluorescenti

Determinazione della **sequenza** degli aa. dei peptidi

Qual è l'ordine degli a.a. nel peptide ?

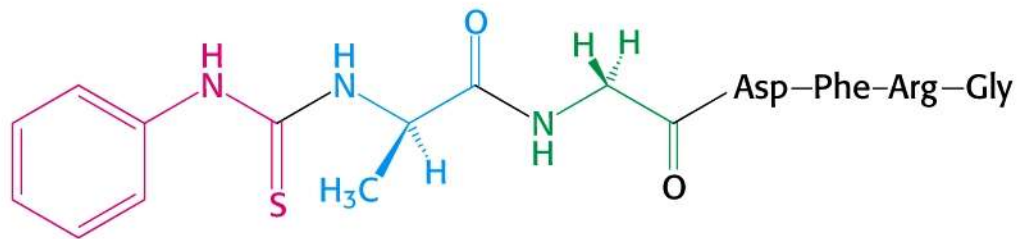
EDMAN DEGRADATION





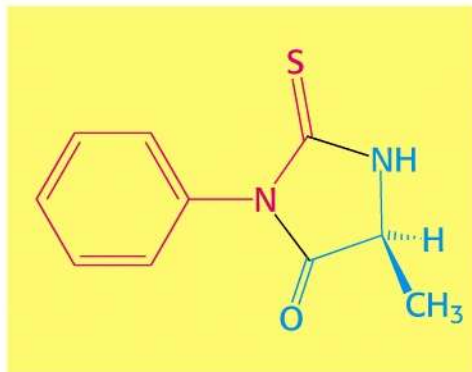
Labeling

1. Marcatura N-terminale

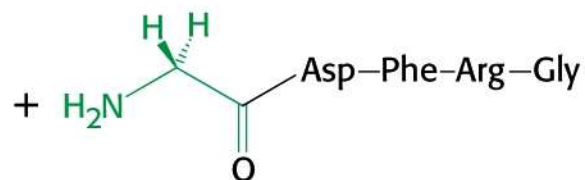


Release

2. + acido trifluoroacetico



PTH-alanine



Peptide shortened by one residue

Limiti :

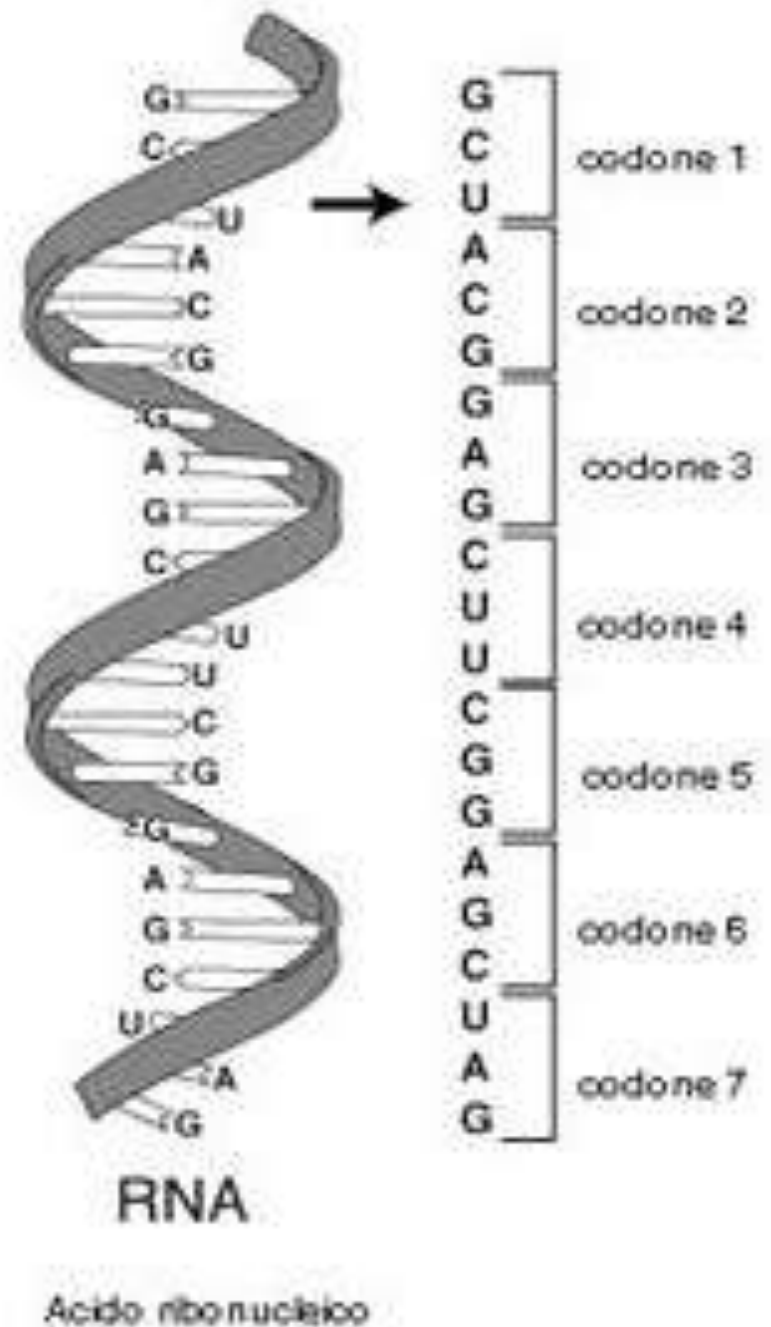
1. l'a.a. N-terminale NON deve essere “bloccato” da modificazioni post-traduzionali (ad es. acetilazione)
2. Si riesce a determinare l'ordine degli a.a. in peptidi (40-50 aa) (non in una proteina grande)



Vantaggi : procedura semi-automatica

Svantaggi : limitato a peptidi (max 50 aa), costo apparecchi

La sequenza delle proteine può essere dedotta da quella del suo mRNA (cDNA)



La sequenza aa. delle proteine può essere dedotta mediante **spettrometria di massa**

Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica applicata sia all'identificazione di sostanze sconosciute, sia all'analisi in tracce di sostanze. Viene comunemente usata in combinazione con tecniche separative, quali GLC e HPLC

Principio : una miscela di **ioni** può essere suddivisa nei suoi componenti in funzione del loro **rapporto massa/carica** utilizzando campi magnetici.

Le molecole del campione vengono **ionizzate** facendo loro attraversare un fascio di elettroni, divengono **instabili** e si **frammentano** in ioni più leggeri secondo **schemi tipici** in funzione della loro struttura chimica.

Metodi di ionizzazione :

- * Ionizzazione elettronica (EI: Electron ionization)
- * Ionizzazione chimica (CI: Chemical ionization)
- * Desorbimento di campo (FD: Field desorption)
- * Desorbimento laser (LD: Laser desorption)
- * Desorbimento a plasma (PD: Plasma desorption)
- * Bombardamento con atomi veloci (FAB: Fast atom bombardment)
- * Thermospray (TS)
- * Electrospray/Ionspray (ESI)
- * Desorbimento/ionizzazione laser assistita da matrice (MALDI: Matrix-assisted laser desorption/ionization)
- * Ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI: Atmospheric pressure chemical ionization)
- * Fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI: Atmospheric pressure photoionization)
- * Desorbimento per ionizzazione elettrospray (DESI: Desorption electrospray ionization)
- * Analisi diretta in tempo reale (DART: Direct analysis in real time)
- * Ionizzazione elettrospray con sonda di campionamento (SPESI: Sampling probe electrospray ionization)
- * Spettrometria di massa di ioni secondari (SIMS: Secondary ion mass spectrometry); spettrometria di massa liquida di ioni secondari (LSIMS: Liquid secondary ion mass spectrometry)

Le molecole vengono **separate** in base alla **quantità di moto** in maniera analoga a come un monocromatore separa le diverse lunghezze d'onda in spettrofotometria e quindi **analizzate**.

Esistono diversi tipi di analizzatore:

- * Settore magnetico. Insieme al settore elettrostatico forma la doppia focalizzazione.

- * Quadrupolo; esapolo; ottapolo

- * Trappola ionica

- * Tempo di volo (TOF: Time of flight)

- * FT-Orbitrap

- * Risonanza ionica ciclotronica a trasformata di Fourier (FT-ICR: Fourier transform-ion cyclotron resonance)

Tempo di volo (time of flight, TOF)

L'energia cinetica degli ioni creati nella camera di ionizzazione dipende dal potenziale di accelerazione; questo significa che gli ioni, lasciati liberi di muoversi su una traiettoria rettilinea in assenza di altri campi elettrici o magnetici, si muovono con velocità diverse in funzione della loro massa.

Per un analizzatore di data lunghezza, il TOF, cioè il tempo impiegato da uno ione per percorrere l'intero spazio dell'analizzatore e giungere al rivelatore, dipende dalla sua **carica** e **massa** e dalle caratteristiche dello **strumento**

Il valore di t è generalmente dell'ordine di pochi (5 - 20) microsecondi.

La sequenza delle proteine può essere dedotta mediante **spettrometria di massa**

1. Si frammenta la proteina nativa con metodi enzimatici e/o chimici
2. Una parte del campione frammentato viene ridotta
3. Si paragonano gli spettri delle due miscele; lo spettro della miscela "nativa" conterrà dei segnali che saranno invece assenti nello spettro della miscela "ridotta" → identificazione di questi segnali come appartenenti a dei "cluster" contenenti peptidi uniti fra di loro da uno o più ponti disolfuro, lungo la sequenza nota.
4. Conferma delle assegnazioni fatte, effettuando uno o più passi di Edman sulla miscela "nativa" ed analizzando gli spettri risultanti.

Ricostruzione della sequenza della proteina

