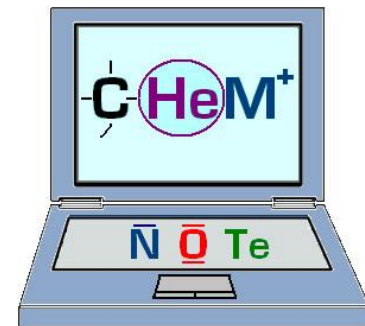




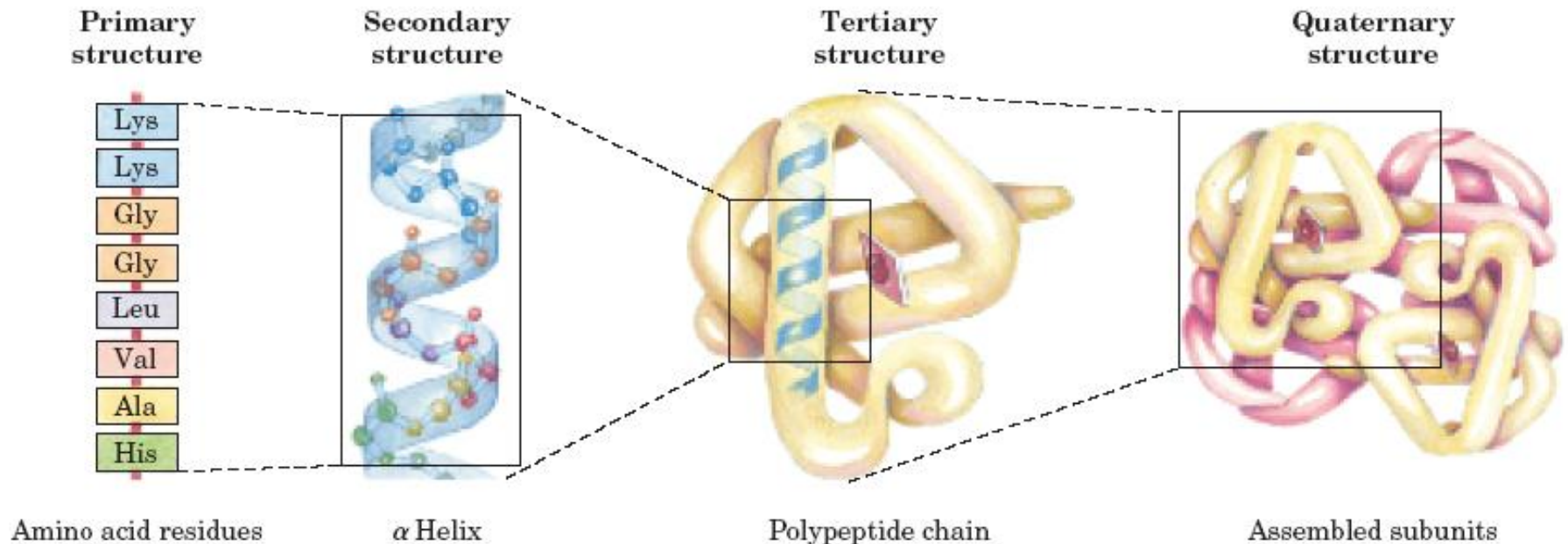
Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti



URČOVÁNÍ PRIMÁRNÍ STRUKTURY BÍLKOVIN

Primární struktura

- primární struktura bílkoviny je dána pořadím AK jejích polypeptidových řetězců



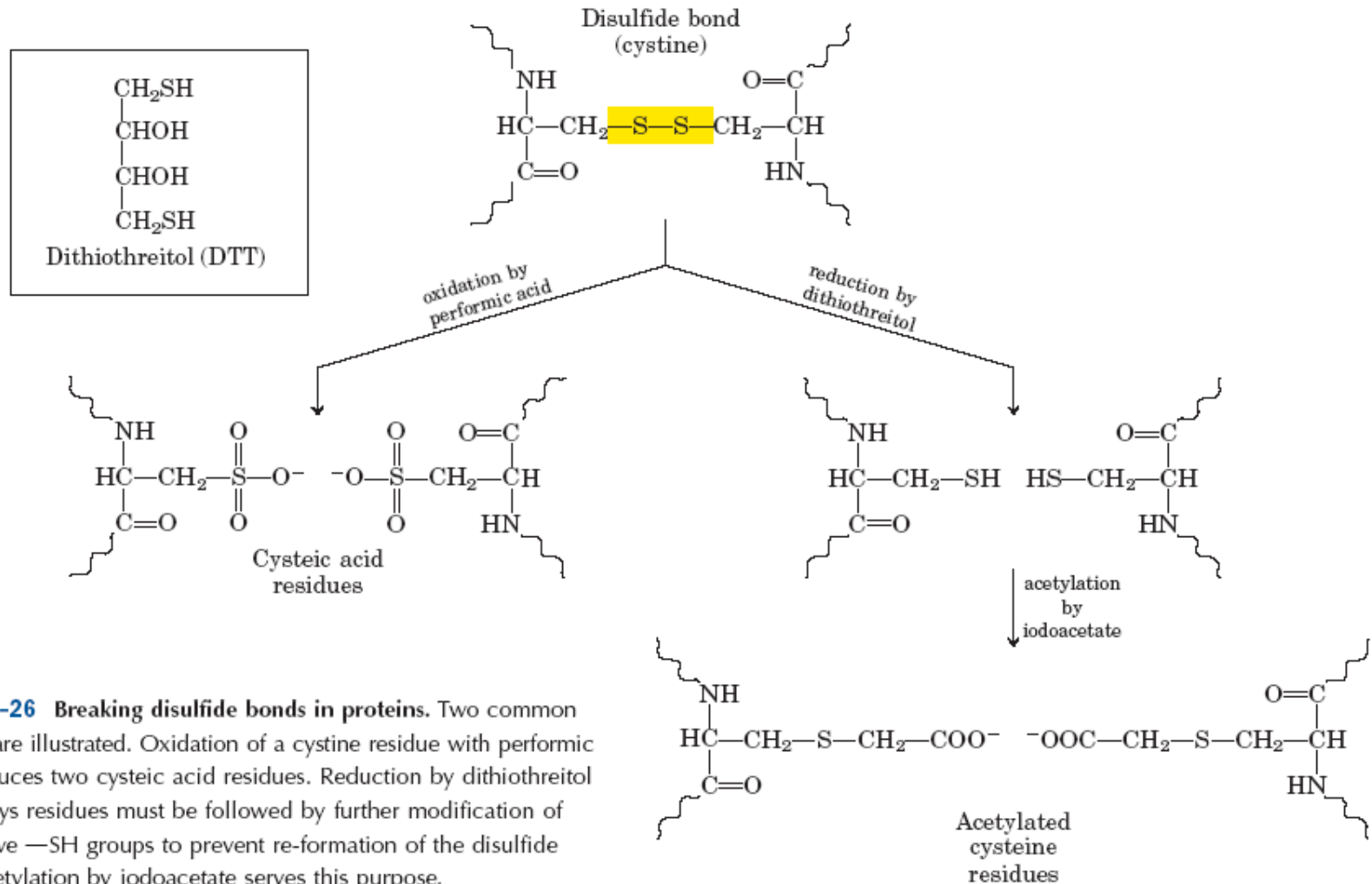
Proč určovat primární strukturu ?

- znalost sekvence je nutná pro objasnění vyšších struktur proteinů
 - každý protein má unikátní strukturu a funkce, ta je dána primární strukturou
- porovnáním sekvencí např. jedinců stejného druhu – evoluce, taxonomie
 - podobné proteiny různých druhů si MOHOU BÝT podobné (extrém – UBIKVITIN 76 AK – stejný u ovocné mušky i u člověka)
- klinické aplikace (mutace příčinou řady chorob)
 - defektní protein už při změně jediné AK
 - 20 – 30% lidských proteinů je ovšem **polymorfních** - mají různé AK složení v populaci při zachování stejné funkce

Jak určovat primární strukturu ?

- příprava proteinu pro sekvenování
 - určení počtu různých podjednotek v proteinu
 - rozštěpení disulfidových vazeb
 - rozdělení a vyčištění jednotlivých podjednotek
 - stanovení AK složení podjednotek
- sekvenace polypeptidových řetězců
 - rozštěpení jednotlivých podjednotek v určitých místech
 - rozdělení a vyčištění fragmentů
 - stanovení pořadí AK každého fragmentu
 - opakování s použitím štěpení odlišné specifity
- sestavení celé struktury
 - vyhledání míst, kde došlo ke štěpení na peptidové fragmenty
 - porovnáním sekvencí skupin polypeptidů je lze složit do pořadí, ve kterém jsou v podjednotce
 - lokalizace případných disulfidických vazeb v podjednotkách

Štěpení disulfidických vazeb



Určení celkového AK složení

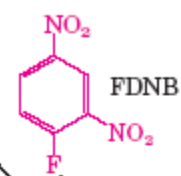
- kyselá hydrolýza - 6 M HCl
 - Asn→Asp, Gln→Glu, degradace Trp, částečné poškození Ser, Thr, Tyr
- alkalická hydrolýza 2-4 M NaOH
 - rozklad Cys, Ser, Thr, Arg, racemizace

Určení N- a C-koncové AK

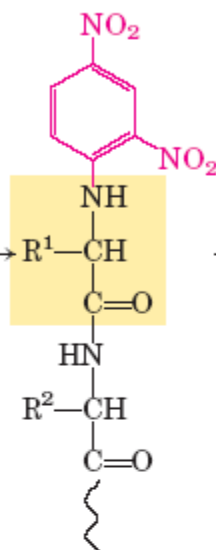
- N-koncová AK Sangerova metoda, postupné odbourávání aminopeptidasami nebo Edmanovo odbourávání
 - Sangerova metoda – jen pro N-konec, po totální hydrolýze peptidu (nelze opakovat pro AK druhou od N-konce), dnes jiná činidla – dansylchlorid, dabsylchlorid
 - Edmanovo odbourávání – uvolnění N-koncové AK v modifikované podobě (zbytek peptidu zůstává netknutý)
 - modifikovanou AK lze stanovit pomocí HPLC, TLC, ELFO
 - lze opakovat a takto postupně osekvenovat od N-konce celé, lze automatizovat
- C-koncová AK odbourávání karboxypeptidasami, hydrazinolýza, reakce s LiBH_4 , (neexistuje ekvivalent Edmanova odbourávání pro C-konec)



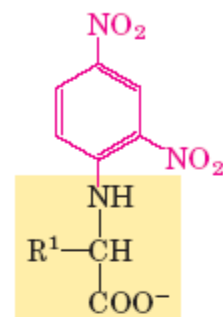
Polypeptide



2,4-Dinitro-phenyl derivative of polypeptide



6 M HCl



2,4-Dinitrophenyl derivative of amino-terminal residue

+ Free amino acids

Identify amino-terminal residue of polypeptide.



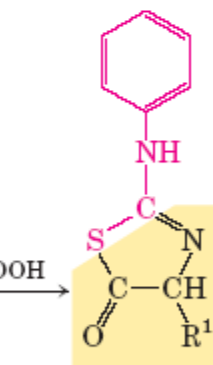
phenylisothio-cyanate

-OH



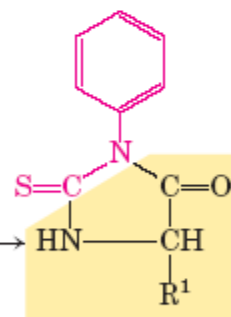
PTC adduct

CF₃COOH



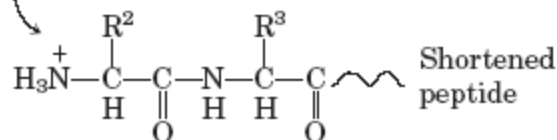
Anilinothiazolinone derivative of amino acid residue

H⁺



Phenylthiohydantoin derivative of amino acid residue

Identify amino-terminal residue; purify and recycle remaining peptide fragment through Edman process.



Shortened peptide

Specifita exopeptidas

- EXOpeptidasa – polypeptidový řetězec štěpí na konci
 - karboxypeptidasa A – štěpí C-koncovou, pokud to není Arg, Lys, Pro a pokud předposlední není Pro
 - karboxypeptidasa B – štěpí C-koncovou, pokud to je Arg, Lys a pokud předposlední není Pro
 - karboxypeptidasa C – štěpí všechny C-koncové aminokyseliny, pH optimum 3,5
 - karboxypeptidasa Y – štěpí všechny C-koncové aminokyseliny, pouze Gly pomaleji
 - Aminopeptidasa M – všechny N-koncové aminokyseliny

Specifita endopeptidas

- ENDOpeptidasy – štěpí uvnitř polypeptidového řetězce
 - trypsin – za Arg, Lys (kladně nabitě), pokud následující není Pro, vysoká specifita
 - chymotrypsin – za Phe, Trp, Tyr (objemné hydrofobní), pokud následující není Pro, pomalejší štěpení za Asn, His, Met, Leu
 - elastasa – za Ala, Gly, Ser, Val (malé neutrální), pokud následující není Pro
 - pepsin – před Leu, Phe, Trp, Tyr, pokud předchozí není Pro, malá specifita
 - endopeptidasa V8 – za Glu
 - thermolysin – před Ile, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, pokud předchozí není Pro
- neenzymové štěpení – bromkyan
 - specifické a kvantitativní štěpení na C-straně methioninových zbytků („za“ MET)

TABLE 3-7 The Specificity of Some Common Methods for Fragmenting Polypeptide Chains

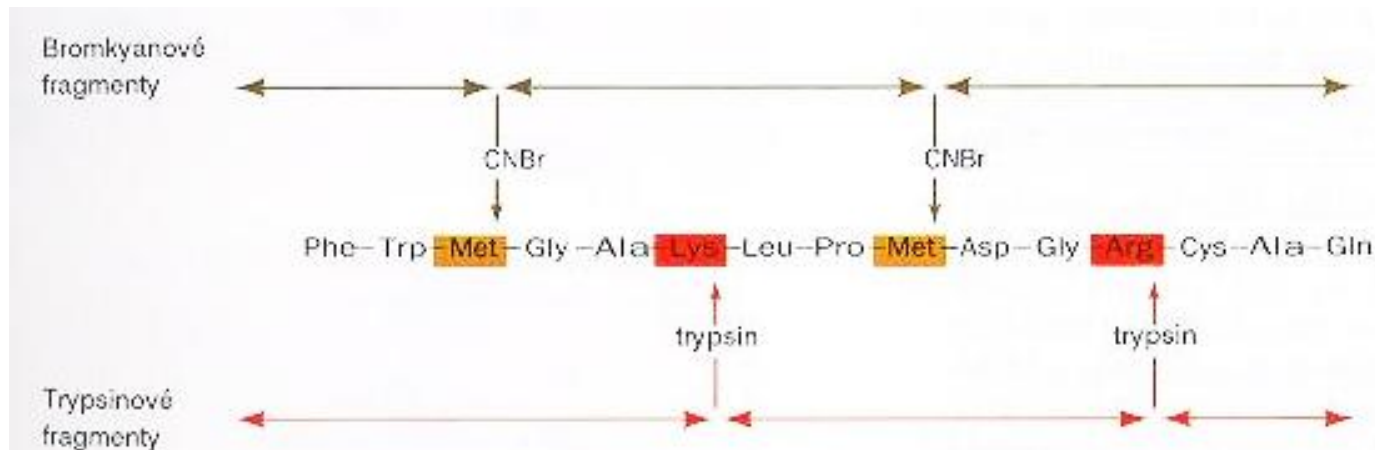
<i>Reagent (biological source)*</i>	<i>Cleavage points†</i>
Trypsin (bovine pancreas)	Lys, Arg (C)
<i>Submaxillarus</i> protease (mouse submaxillary gland)	Arg (C)
Chymotrypsin (bovine pancreas)	Phe, Trp, Tyr (C)
<i>Staphylococcus aureus</i> V8 protease (bacterium <i>S. aureus</i>)	Asp, Glu (C)
Asp-N-protease (bacterium <i>Pseudomonas fragi</i>)	Asp, Glu (N)
Pepsin (porcine stomach)	Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinase Lys C (bacterium <i>Lysobacter enzymogenes</i>)	Lys (C)
Cyanogen bromide	Met (C)

*All reagents except cyanogen bromide are proteases. All are available from commercial sources.

†Residues furnishing the primary recognition point for the protease or reagent; peptide bond cleavage occurs on either the carbonyl (C) or the amino (N) side of the indicated amino acid residues.

Uspořádání peptidových fragmentů

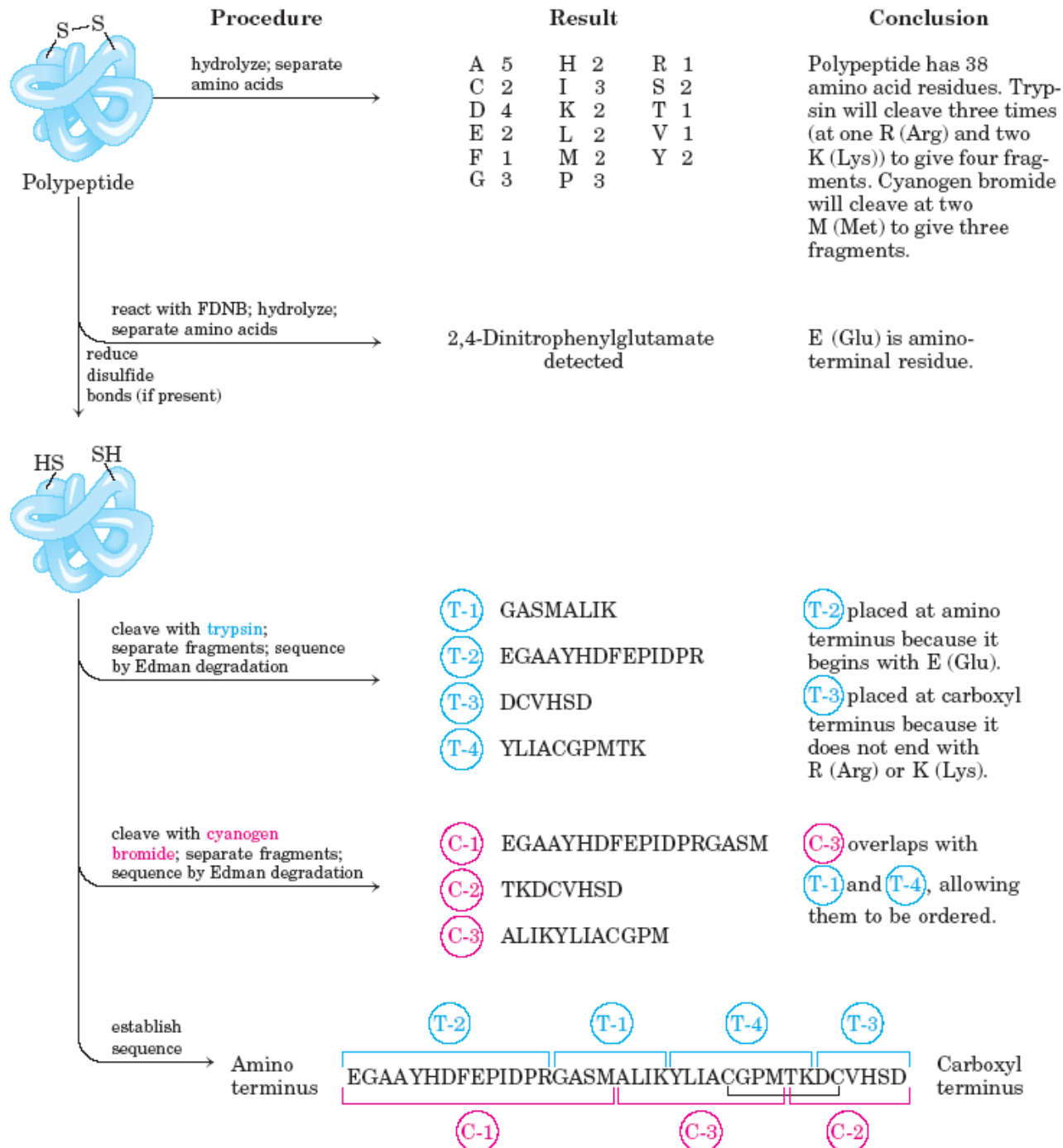
- máme jednotlivé sekvenované segmenty, teď je potřeba je „složit“, porovnání AK sekvencí jedné sady fragmentů s jinou sadou, jejíž specifická místa štěpení se překrývají s místy první sady



Sekvence aminokyselin polypeptidového řetězce stanovujeme srovnáním sekvencí dvou sad překrývajících se peptidových fragmentů. V tomto případě vznikají dvě sady peptidových fragmentů štěpením polypeptidu za všemi zbytky argininu a lysinu trypsinem a v oddělené reakci za všemi zbytky methioninu působením CNBr. Pořadí prvních dvou tryptických fragmentů stanovíme např. pozorováním, že peptid o složení Gly-Ala-Lys-Leu-Pro-Met vzniklý štěpením CNBr má N- a C-terminální sekvence stejné jako C- a N-konce dvou tryptických peptidů. Tímto způsobem stanovíme pořadí peptidových fragmentů v původním peptidu.

Lokalisace disulfidických vazeb

- vzorek proteinu je znovu štěpen např. trypsinem, ale **bez předchozího zrušení** disulfidických vazeb
- výsledné peptidy jsou rozdělány elektroforézou (neredukující) a porovnány s předchozí sadou (štěpení po zrušení S-S vazeb)
- pro každou S-S vazbu budou chybět dva původní peptidy a objeví se jeden větší – ty dva původní fragmenty jsou spojeny disulfidickou vazbou



Další metody určování AK sekvence

- 20 – 30 AK peptid lze „sekvenovat“ pomocí hmotnostního spektrometru
- dnes daleko snazší a proto častěji používané je izolovat gen pro daný protein, zjistit jeho nukleotidovou sekvenci a „přeložit“ si jí do AK sekvence

Amino acid sequence (protein)	Gln–Tyr–Pro–Thr–Ile–Trp
DNA sequence (gene)	CAGTATCCTACGATTGG