

# Capitolo 6

## STUDIO DELLA STRUTTURA PRIMARIA DELLE PROTEINE

### Analisi della composizione amminoacidica delle proteine

La determinazione della composizione amminoacidica di una proteina permette di sapere da quanti e quali amminoacidi è formata quella proteina.

Gli attuali metodi a disposizione per questo tipo di analisi comportano tre passaggi fondamentali: l'idrolisi della proteina con liberazione degli amminoacidi che la costituiscono, la separazione degli amminoacidi presenti nell'idrolizzato e la quantificazione dei diversi amminoacidi.

**Idrolisi:** l'idrolisi di una proteina può essere condotta in fase liquida o in fase gassosa.

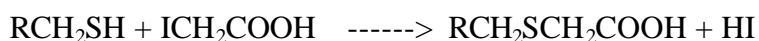
Nel primo caso, la proteina viene ripresa in HCl 6N all'interno di una fiala in cui viene fatto il vuoto in atmosfera di azoto. La fiala viene quindi messa in stufa a 110°C per un tempo variabile compreso tra 24-72 ore.

Nel caso in cui si voglia invece condurre l'idrolisi in fase gassosa, la proteina viene essicata in una fialetta che viene posta all'interno di una fiala più grande munita di un tappo a tre vie con il quale è possibile fare il vuoto in atmosfera di azoto. Sul fondo di questa provetta viene posto l'HCl 6N: l'acido quindi non viene a diretto contatto con il campione proteico che viene idrolizzato in vapori di HCl.

Nelle condizioni in cui viene condotta l'idrolisi delle proteine, tuttavia, alcuni amminoacidi come serina, treonina e tirosina vengono parzialmente distrutti. Mediamente si registra una perdita del 10% per la serina e una perdita del 5% per treonina e tirosina quando si effettua l'idrolisi per 24 h. Altri amminoacidi: la cisteina, la cistina, il triptofano, l'asparagina e la glutammina, vengono addirittura distrutti completamente. Per il dosaggio di questi amminoacidi occorre, quindi, utilizzare alcuni accorgimenti.

**Serina, treonina e tirosina:** si preparano tre campioni uguali di proteina su cui si opera l'idrolisi a tempi differenti: 24, 48 e 72 ore. Su ciascun campione si dosano questi tre amminoacidi, quindi si costruisce un grafico in cui si riportano in ascissa i diversi tempi di idrolisi ed in ordinata la corrispondente concentrazione di ciascun amminoacido. La retta che si ottiene viene estrapolata al tempo 0 per ottenere la concentrazione reale di ciascuno di questi amminoacidi.

**Cisteina, cistina:** vengono identificate come S-carbossimetilcisteina. Per poter fare questo tipo di dosaggio occorre ridurre e carbossimetilare la proteina prima di sottoporla ad idrolisi. Questo procedimento prevede dapprima il trattamento della proteina con un agente riducente (ditiotreitolo) in grado di ridurre i ponti disolfuro presenti nella proteina, e il successivo trattamento con ICH<sub>2</sub>COOH, un reattivo capace di reagire con i residui di cisteina trasformandoli in S-carbossimetilcisteina.



L'S-carbossimetilcisteina a differenza della cisteina e della cistina è resistente alle condizioni di idrolisi e può essere facilmente dosata.

In alternativa a questo metodo si può trattare il campione proteico con acido performico, che converte tutti i residui di cisteina e di cistina in acido cisteico.

Triptofano: si può condurre l'idrolisi non in HCl, ma in acido p toluen solfonico 3M contenente lo 0.2% di triptamina.

Asparagina e Glutamina: in ambiente acido vengono deaminate e vengono quindi dosate insieme ai corrispondenti acidi (acido aspartico e acido glutammico).

Bisogna inoltre tener conto che vi sono alcuni legami peptidici che sono particolarmente resistenti all'idrolisi: è questo il caso di legami in cui sono interessati residui idrofobici (Ile-Val Val-Val etc). Questi legami non vengono completamente idrolizzati nelle 24 h, quindi per un dosaggio accurato degli amminoacidi idrofobici si può prolungare l'idrolisi per 48 o 72 h.

***Separazione e quantificazione degli amminoacidi presenti nell'idrolizzato***: per questo tipo di analisi ormai si utilizzano apparecchi completamente automatizzati che eseguono sia la separazione cromatografica degli amminoacidi sia la loro quantificazione.

Gli amminoacidi liberi presenti nell'idrolizzato devono essere derivatizzati con reagenti opportuni che ne permettano il riconoscimento. La derivatizzazione può essere effettuata sia prima che dopo la colonna cromatografica.

Derivatizzazione post-colonna: gli amminoacidi presenti nell'idrolizzato vengono separati su una colonna a scambio ionico. I tipi di resina solitamente utilizzati sono scambiatori cationici forti costituiti da polistireni solfonati. Gli amminoacidi vengono solubilizzati in un tampone a pH 2 e la colonna cromatografica viene equilibrata con un tampone allo stesso pH, in modo che tutti gli amminoacidi si trovino ad un valore di pH inferiore al loro punto isoelettrico e siano quindi carichi positivamente. In queste condizioni tutti gli amminoacidi si legano alla resina. L'eluizione viene condotta in gradiente aumentando sia la forza ionica che il pH. In questo modo vengono eluiti prima gli amminoacidi acidi, quindi gli amminoacidi neutri ed infine quelli basici. Gli amminoacidi eluiti dalla colonna passano in un *coil* di reazione in cui vengono miscelati a 100°C con la ninidrina che reagisce sia con gli amminoacidi primari che quelli secondari formando due diversi tipi di cromofori, che possono essere rilevati rispettivamente a 570 e 440 nm. L'assorbanza di ciascun picco è proporzionale alla concentrazione dell'amminoacido.

Un altro reattivo che può essere utilizzato per questo tipo di analisi è l'o-ftalaldeide (OPA), la quale in presenza di  $\beta$  mercaptoetanolo, a pH 9, reagisce con gli amminoacidi primari formando dei derivati fluorescenti. Prolina ed idrossiprolina non sono in grado di reagire con l'OPA. Anche la cisteina reagisce debolmente con l'OPA, mentre il suo prodotto di ossidazione (l'acido cisteico) dà un composto fortemente fluorescente. I vantaggi di questo reattivo rispetto alla ninidrina sono rappresentati dall'elevata sensibilità (10-100 pmoli) e dal fatto che il prodotto fluorescente si forma a temperatura ambiente in breve tempo (2 min).

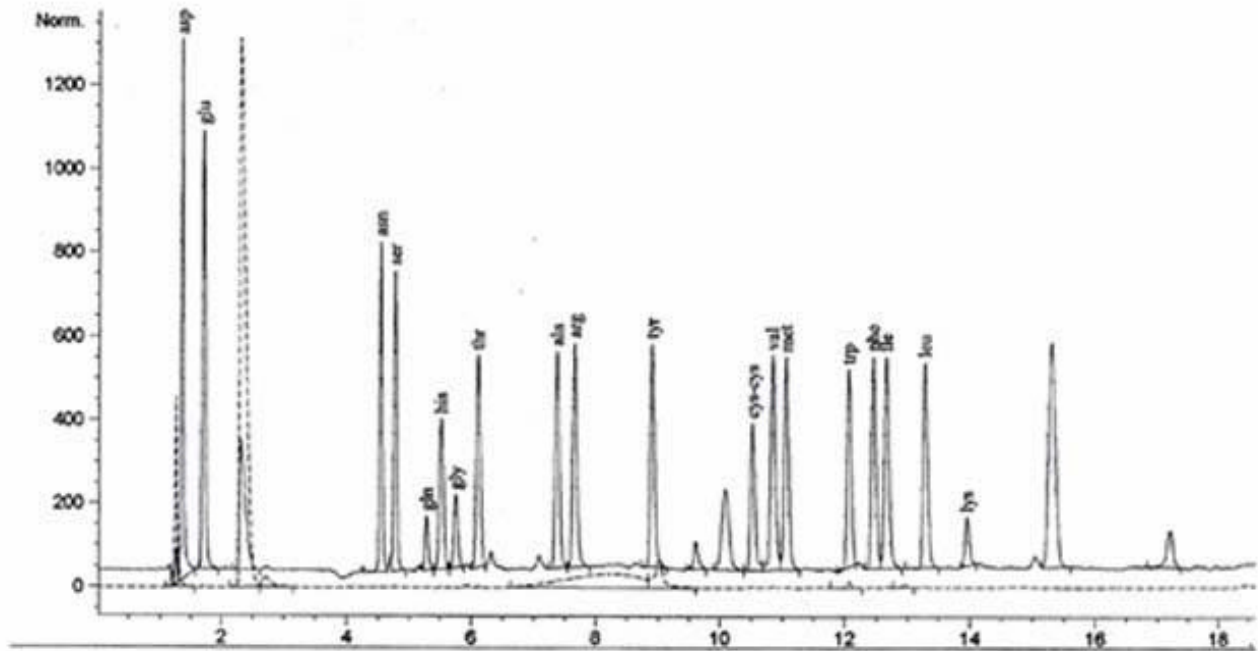
Derivatizzazione pre-colonna : in questo caso, dopo aver idrolizzato la proteina, gli amminoacidi vengono derivatizzati con un reagente opportuno, quindi vengono separati in HPLC con una colonna in fase inversa.

I reagenti che possono essere utilizzati sono:

- dansil cloruro;
- dabsil cloruro;
- OPA;

- 9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOC-Cl);
- fenilsotiocianato (PITC).

La derivatizzazione con l'OPA (che non reagisce con gli amminoacidi secondari) può essere associata alla derivatizzazione con il FMOC. I derivati possono essere rilevati a due diverse  $\lambda$  utilizzando un diode-array come sistema di rivelazione.



Separazione in RP HPLC di amminoacidi derivatizzati con OPA

Anche in questo caso esistono apparecchi che permettono la completa automatizzazione di tutta la procedura.

La determinazione del contenuto in amminoacidi di una proteina è importante per gli studi riguardanti le relazioni tra struttura e funzione delle proteine, tuttavia anche il dosaggio qualitativo e quantitativo degli amminoacidi presenti nei liquidi fisiologici riveste una notevole importanza sia dal punto di vista biochimico che clinico, in quanto può essere di aiuto nella diagnosi di alcuni tipi di malattie.

Esistono infatti numerosi stati patologici caratterizzati da un'elevata concentrazione nelle urine o nel plasma di determinati amminoacidi.

La fenilchetonuria, ad esempio, è una malattia dovuta all'assenza o deficienza di fenilalanina idrossilasi, che catalizza la trasformazione della fenilalanina in tirosina. Conseguenza di questo difetto genetico è un forte aumento della fenilalanina e dei suoi derivati (acido fenilpiruvico ed acido fenil lattico) nel plasma e nelle urine. La fenilchetonuria si manifesta clinicamente nelle prime settimane dopo la nascita e se non viene prontamente trattata con una dieta adeguata provoca gravi forme di ritardo mentale nel neonato. Il test standard per l'identificazione di pazienti affetti da questa malattia consiste nel dosaggio della fenilalanina nel sangue: una concentrazione superiore a 20 mg/100 ml è considerata un segno positivo di questa malattia.

La cistinuria è una malattia genetica dovuta ad un difetto del sistema di trasporto, a livello della membrana delle cellule epiteliali, della cisteina e degli amminoacidi basici, che di conseguenza vengono eliminati in grande quantità nelle urine.

### **Determinazione della struttura primaria di una proteina**

La struttura primaria delle proteine può essere determinata utilizzando la degradazione di Edman. Questa tecnica permette di rimuovere ed identificare un residuo amminoacidico alla volta a partire dall'estremità N-terminale della proteina.

Il metodo di degradazione di Edman comporta il trattamento del polipeptide con fenilisotiocianato (PITC), un reattivo in grado di reagire con l'estremità N-terminale libera della catena polipeptidica formando un feniltiocarbammilderivato o PTC-derivato. La reazione avviene in condizioni di pH basico (circa pH 9). Quando il PTC-derivato viene trattato con un acido anidro, quale l'acido trifluoroacetico, il legame peptidico tra l'amminoacido N-terminale e il secondo amminoacido viene scisso liberando il derivato 2-anilino 5-tiazolinonico del residuo N-terminale e un polipeptide con un amminoacido in meno. Il derivato tiazolinonico, chimicamente instabile, viene separato dal polipeptide e convertito, mediante trattamento con un acido diluito, in un derivato più stabile: il feniltioidantoin-derivato (PTH-amminoacido), che viene identificato in RP-HPLC.

La rimanente catena polipeptidica, più corta di un residuo, viene nuovamente sottoposta ad un altro ciclo di degradazione di Edman.

Questa serie di reazioni viene eseguita automaticamente in apparecchi specifici, che prendono il nome di "sequenziatori automatici di proteine", in cui è possibile ottimizzare le condizioni delle singole fasi del processo degradativo e quindi riuscire ad identificare più di 60 residui della porzione N-terminale della proteina. L'identificazione degli amminoacidi rilasciati nei cicli successivi diventa problematica, a causa degli effetti cumulativi di reazioni incomplete e di reazioni secondarie del processo di degradazione. Questi apparecchi permettono di poter lavorare con quantità molto basse di proteina, nell'ordine di decine di pmoli.

Questi sequenziatori sono collegati *on line* con un HPLC dotato di una colonna in fase inversa, su cui vengono iniettati automaticamente i PTH ottenuti ad ogni ciclo di degradazione. Il riconoscimento a 269 nm e l'analisi quantitativa di ogni PTH avviene per confronto con PTH. E' chiaro che il riconoscimento può avvenire senza problemi solo se è presente un solo PTH per ogni ciclo di degradazione di Edman.

Per poter determinare la struttura primaria di una proteina è quindi necessario che la proteina sia pura almeno per il 90%. Nel caso in cui la proteina sia costituita da subunità differenti è necessario, inoltre, separare le subunità e operare su ogni singola subunità.

LA REAZIONE DI DEGRADAZIONE DI EDMAN

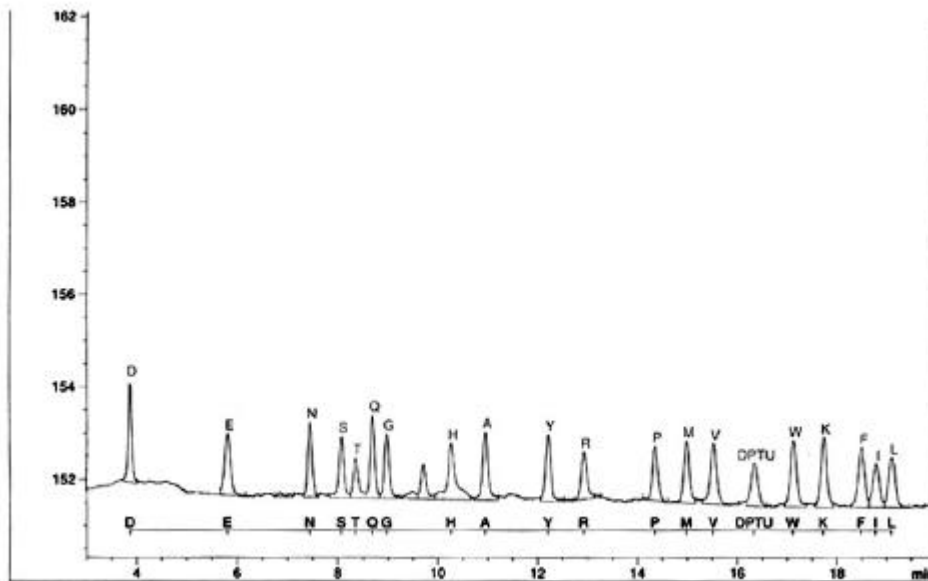
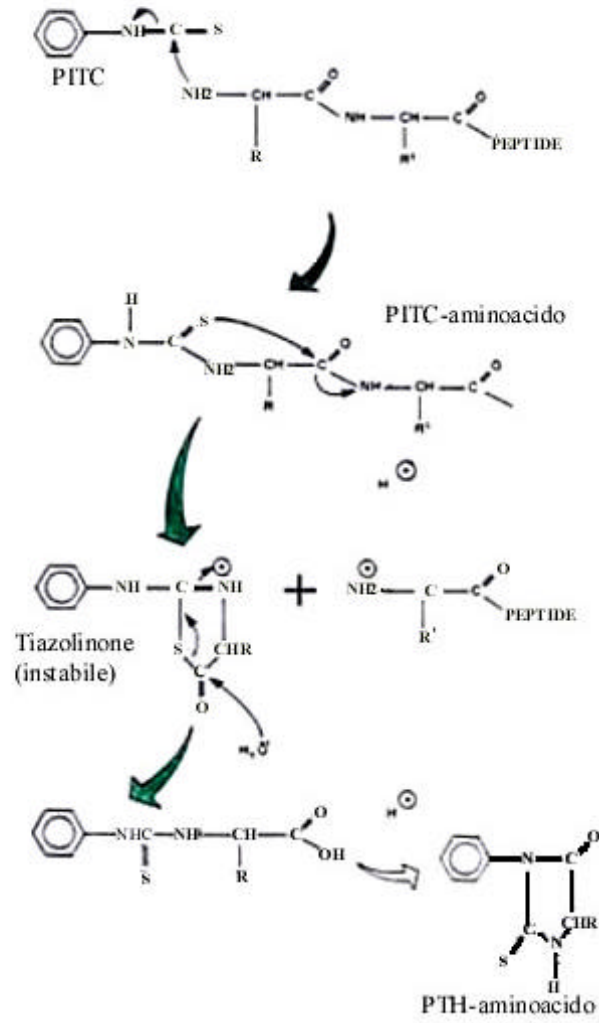


Grafico di eluizione di PTH standard

Prima di sottoporre una proteina alla degradazione di Edman, solitamente, questa viene ridotta e carbossimetilata.

Questo trattamento permette di avere una proteina denaturata, in cui il residuo N-terminale è ben esposto, e di trasformare i residui di cisteina (che durante la degradazione di Edman vengono distrutti) in composti stabili e rilevabili come PTH derivati.

Quando si vuole determinare la struttura primaria completa di una proteina solitamente viene seguito il seguente protocollo:

- analisi sequenziale della porzione N-terminale della proteina carbossimetilata;
- scissione della proteina in peptidi, mediante proteolisi chimiche o enzimatiche;
- separazione dei peptidi ottenuti;
- analisi degli amminoacidi di ciascun peptide;
- analisi sequenziale di ciascun peptide;
- allineamento dei peptidi.

Analizziamo in dettaglio questi diversi punti.

***Analisi sequenziale della porzione N-terminale della proteina carbossimetilata:*** sottoponendo la proteina completa alla degradazione di Edman si può ottenere la sequenza dei primi 60-70 residui amminoacidici. Tuttavia, da questo tipo di analisi non si ottiene nessun risultato nel caso di proteine con l'N-terminale bloccato. Molte proteine hanno, infatti, come amminoacido N-terminale un residuo di acido piroglutammico (derivante dalla ciclizzazione di un residuo di acido glutammico o di glutammina) o un amminoacido acetilato o formilato che non sono in grado di reagire con il fenilisotiocianato.

Nel primo caso, la proteina può essere trattata con un enzima: la piroglutammato ammino peptidasi, capace di scindere il legame peptidico tra il piroglutammato e il successivo amminoacido, viene quindi rilasciata una catena polipeptidica che inizia con il secondo amminoacido e che può essere sequenziata.

Nel caso di amminoacidi acetilati, invece, occorre prima frammentare la proteina, riconoscere il peptide corrispondente alla porzione N-terminale e trattarlo a caldo con un acido diluito.

***Scissione della proteina in peptidi, mediante proteolisi chimiche o enzimatiche:*** dalla semplice analisi sequenziale della porzione N-terminale di una proteina, non è possibile determinarne la struttura completa, poiché solitamente le proteine hanno dimensioni maggiori di 60 amminoacidi. Occorre quindi frammentarle in peptidi più piccoli e completamente sequenziabili.

Questa procedura prevede la scissione dei legami peptidici in punti specifici utilizzando sia metodi chimici che enzimatici.

***Metodi enzimatici:*** la scissione proteolitica di una proteina la si può ottenere incubando la proteina con un enzima proteolitico in un tampone opportuno. Il tempo, la temperatura della reazione e il rapporto enzima /proteina possono essere variati a seconda dell'enzima utilizzato e del pattern di frammentazione desiderato.

La reazione proteolitica viene poi bloccata acidificando il tampone di reazione o congelando la miscela di reazione o ancora aggiungendo degli inibitori delle proteasi.

Tripsina: è uno degli enzimi proteolitici maggiormente impiegati. E' molto specifica, scinde i legami peptidici all'estremità COOH terminale dei residui di Arginina e di Lisina; non è in grado di svolgere la propria attività catalitica nel caso in cui l'amminoacido che segue i residui di Arg o Lys sia una Prolina. Se si prolunga il tempo di reazione tra tripsina e la proteina, si possono avere anche scissioni anomale soprattutto all'estremità COOH terminale dei residui di Tirosina o di altri amminoacidi idrofobici. Queste scissioni sono attribuibili alla presenza di una attività chimotriptica contaminante. Proprio per evitare questo tipo di reazioni solitamente si utilizza tripsina trattata con TPCK (tosil-L-fenialalanina clorometil chetone). Il gruppo reattivo del TPCK è il clorometil chetone che alchila uno degli atomi di N dell'anello dell'His 57, che fa parte del sito attivo della chimotripsina, ed inibisce quindi l'attività catalitica di questo enzima.

Chimotripsina: non è estremamente specifica, scinde i legami peptidici in corrispondenza dell'estremità COOH terminale dei residui idrofobici, soprattutto: Phe, Trp, Tyr e Leu.

Proteasi Arg-specifica: è un enzima isolato dalla ghiandola sottomascellare di topo, scinde i legami peptidici in corrispondenza dell'estremità COOH terminale dei residui di Arginina.

Proteasi Lys-specifica: scinde i legami peptidici in corrispondenza dell'estremità COOH terminale dei residui di Lisina.

Proteasi da Staphylococcus aureus (V8 proteasi): in tampone ammonio carbonato, pH 8 , questo enzima scinde solo i legami Glu-X. La specificità dell'enzima può essere estesa anche ai residui di Asp, facendo avvenire la reazione proteolitica in tampone fosfato, pH 7.8. Esistono anche altre proteasi, che sono meno specifiche di quelle appena descritte. Un esempio è la pepsina. La sensibilità dei legami peptidici all'azione di questo enzima varia da proteina a proteina. Presenta una maggiore specificità per i legami in cui intervengono dei residui di Phe e Leu, sebbene sia capace di idrolizzare anche molti altri legami. Agisce a pH acido.

#### Metodi chimici:

Bromuro di cianogeno (CNBr): il metodo che prevede il trattamento della proteina con CNBr è uno dei metodi chimici che dà i migliori risultati ed è quindi uno dei più utilizzati. Questo reattivo permette di scindere la catena polipeptidica specificamente in corrispondenza dell'estremità COOH terminale dei residui di metionina. Normalmente una proteina contiene un numero molto limitato di residui di Metionina, quindi con il CNBr si ottengono di solito pochi frammenti, di dimensioni anche elevate. I peptidi che si ottengono presentano come amminoacido C-terminale un residuo di omoserina o di omoserina lattone. I legami Met-Ser e Met-Thr vengono scissi solo parzialmente.

Scissione ai residui di Triptofano: Vi sono diversi reattivi che possono scindere una proteina in corrispondenza del lato carbossilico dei residui di Trp, tuttavia molti di essi determinano anche modificazioni a carico di diversi amminoacidi, determinando quindi la formazione di prodotti che non sono poi riconoscibili durante l'analisi sequenziale. Uno dei reattivi migliori sembra essere l'acido o-iodosobenzoico, che tuttavia può scindere la proteina in corrispondenza anche di alcuni residui di Tirosina.

Scissione dei legami Asp-X: Questo tipo di scissione consiste in una idrolisi acida blanda della proteina. Il materiale proteico viene ripreso in HCl 13 mM, all'interno di una fiala che viene chiusa sotto vuoto e messa in stufa a 108°C per 2 ore. Questo metodo può essere utilizzato in alternativa alla V8 proteasi, soprattutto per proteine poco solubili. L'efficienza della scissione varia in funzione dell'amminoacido che segue l'Asp. Ad esempio il legame Asp/Pro è senz'altro quello maggiormente sensibile a questo tipo di scissione. Più stabili a questo tipo di trattamento sembrano essere invece i legami peptidici in cui intervengono residui idrofobici come Leu o Val. Con questo trattamento si ha lo svantaggio della deammidazione di residui di Asn e Gln quando

questi rappresentano l'amminoacido C-terminale della proteina, inoltre i residui di Trp possono essere danneggiati.

Scissione dei legami Asn-Gly: questi due amminoacidi quando si trovano vicini, ciclizzano facilmente formando una succinimide sostituita che risulta particolarmente sensibile all'attacco nucleofilo dell'idrossilamina.

**Separazione dei peptidi ottenuti**: la scelta del metodo di separazione dei peptidi, ottenuti dalla scissione di una proteina, dipende dal numero e dalle dimensioni dei peptidi. Si può scegliere una separazione cromatografica o elettroforetica.

I peptidi possono essere separati in HPLC o FPLC utilizzando un qualsiasi tipo di cromatografia, scelta in base alle caratteristiche chimico-fisiche dei peptidi: fase inversa, scambio ionico, gel filtrazione etc.

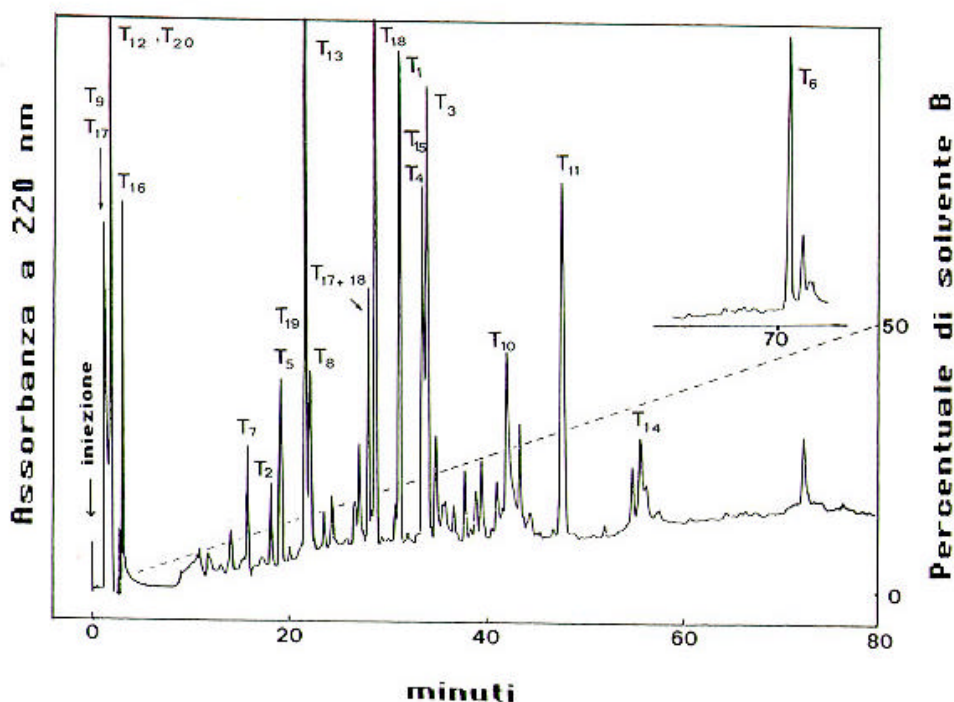


Grafico di separazione in RP HPLC di una miscela di peptidi triptici

Nel caso si sia ottenuto un numero limitato di peptidi con dimensioni abbastanza elevate (in seguito ad esempio ad una digestione chimica o una digestione enzimatica controllata), questi possono essere separati anche mediante elettroforesi in SDS su gel di poliacrilammide. I peptidi separati possono essere poi recuperati mediante elettroeluizione o elettroblotting. I sequenziatori automatici sono infatti in grado di sequenziare anche un peptide trasferito su una membrana di nylon o di PVDF.

**Analisi degli amminoacidi di ciascun peptide**: una aliquota di ciascun peptide separato in cromatografia o in elettroforesi viene sottoposta ad analisi degli amminoacidi. Questo passaggio non è indispensabile, può fornire comunque alcuni dati molto utili:

- valutazione del grado di purezza del peptide: se un peptide non è puro non può essere sottoposto all'analisi sequenziale, ma deve essere ulteriormente purificato;
- valutazione del numero e del tipo di amminoacidi presenti nel peptide.



**Analisi sequenziale di ciascun peptide:** la sequenza di ciascun peptide purificato viene quindi determinata con il metodo di Edman.

**Allineamento dei peptidi:** a questo punto si conosce la sequenza dei singoli peptidi della proteina, ma non il loro ordine. Le ulteriori informazioni si ottengono dall'allineamento dei peptidi. Si deve cioè sottoporre la proteina ad una digestione diversa in grado di produrre peptidi di dimensioni più elevate, che contengano nella loro sequenza più peptidi originati dalla prima digestione. Questi peptidi ottenuti dalla seconda digestione vengono anch'essi sequenziati e dovrebbero permettere di stabilire l'ordine di sequenza dei primi peptidi e quindi l'intera struttura della proteina.

### **Informazioni fornite dalla sequenza degli amminoacidi di una proteina**

La sequenza di una proteina può fornire diverse informazioni:

1. La struttura primaria di una proteina può essere paragonata alle altre sequenze conosciute per individuare eventuali omologie di struttura (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Una ricerca di questo tipo richiede solo pochi minuti con l'uso di un computer collegato tramite Internet alle diverse banche dati di struttura primaria. Da questa ricerca è possibile identificare la proteina, verificare a quale famiglia di proteine appartiene (ad esempio la mioglobina e la emoglobina appartengono alla famiglia delle globine oppure la tripsina ed altri enzimi appartengono alla famiglia delle serina proteasi etc. si potrebbero fare tantissimi altri esempi), individuare particolari sequenze importanti per lo svolgimento della funzione biologica.
2. Il confronto fra le strutture della stessa proteina ottenuta da specie diverse fornisce molte informazioni sulle vie seguite dall'evoluzione. E' possibile dedurre relazioni genealogiche fra specie diverse sulla base delle differenze presenti nella struttura primaria delle proteine di queste specie e anche stimare il tempo di divergenza di due linee evolutive in base alla regolarità della frequenza delle mutazioni casuali. Per esempio, un confronto tra le strutture primarie dell'albumina isolata da diversi primati ha permesso di concludere che gli esseri umani e le scimmie africane si sono separati solo 5 milioni di anni fa e non 30 come si pensava in precedenza.
3. Si possono individuare sequenze ripetute all'interno della struttura primaria di una proteina. La presenza di queste sequenze è dovuta probabilmente al fatto che molte proteine derivano dalla duplicazione di un gene primordiale seguita da una diversificazione. Per esempio la calmodulina, un'aproteina capace di legare il calcio, contiene quattro unità simili ripetute che derivano dalla duplicazione genica. Anche le immunoglobuline sono costituite da serie di domini simili.
4. Dall'analisi della struttura primaria di una proteina è possibile individuare sequenze che contengono segnali importanti per determinare la localizzazione cellulare di quella particolare proteina o per determinare eventuali modificazioni post traduzionali. Ad esempio molte proteine destinate ad essere secrete dalla cellula o a localizzarsi nella membrana contengono una sequenza segnale nella porzione N-terminale corrispondente a circa 20 amminoacidi con prevalente carattere idrofobico. Le sequenze Asn-X-Ser e Asn-X-Thr corrispondono a potenziali siti di glicosilazione della proteina. Le coppie di residui basici, come Arg-Arg, sono siti potenziali per una scissione proteolitica che può comportare l'attivazione della proteina. Etc.
5. La conoscenza della struttura primaria è importante per la determinazione dei successivi livelli di organizzazione strutturale della proteina: struttura secondaria e terziaria.

6. Dalla determinazione della struttura primaria di una proteina è possibile individuare eventuali mutazioni importanti nel modificare la funzione biologica di una proteina. Molte patologie sono dovute a mutazioni anche di un singolo amminoacido di una proteina (l'anemia falciforme è causata dalla sostituzione del residuo di glutammico 6 della catena  $\beta$  dell'emoglobina con un residuo di Val).
7. Conoscendo la sequenza amminoacidica anche parziale di una proteina è possibile sintetizzare una sonda oligonucleotidica che può essere utilizzata per identificare all'interno di una banca genomica il gene che codifica per quella determinata proteina.

La determinazione della struttura primaria di una proteina costituita da qualche centinaio di amminoacidi è tuttavia abbastanza difficoltosa. Per questo motivo, ormai la sequenza di proteine molto grandi viene determinata utilizzando le tecniche di biologia molecolare per il sequenziamento del DNA; la sequenza della proteina viene quindi dedotta dalla sequenza del gene o del cDNA che codifica per quella specifica proteina. Queste sequenze non rivelano tuttavia le modificazioni posttraduzionali che la proteina ha subito. Per chiarire la natura di queste modificazioni, importanti per l'attività biologica di molte proteine, è necessaria l'analisi chimica delle proteine stesse. Quindi le tecniche per il sequenziamento del DNA e quelle per il sequenziamento delle proteine rappresentano due approcci complementari al chiarimento delle basi strutturali della funzione delle proteine.

Un'altra tecnica complementare alla degradazione di Edman per la determinazione della struttura primaria delle proteine è la spettrometria di massa.

Questa tecnica permette di superare alcune limitazioni della degradazione di Edman. Può infatti essere utilizzata per sequenziare peptidi che presentano l'estremità N-terminale bloccata, o identificare eventuali modificazioni post-traduzionali, come la presenza di zuccheri o amminoacidi fosforilati etc.

### **Determinazione dell'amminoacido C-terminale**

L'amminoacido C-terminale di una proteina può essere determinato sia manualmente che automaticamente, in questo ultimo caso si possono utilizzare dei sequenziatori automatici di proteine in cui può essere eseguita sia la degradazione di Edman sia la reazione di degradazione per la porzione C-terminale. Uno di questi apparecchi utilizza una reazione che prevede l'utilizzazione di fosfo-difenilisotiocianato in piridina.

La caratterizzazione della porzione C-terminale di una proteina risulta tuttavia molto difficoltosa, poiché le reazioni utilizzate non sono efficaci come la degradazione di Edman. Infatti anche con i sequenziatori automatici è possibile identificare solo 4-5 amminoacidi della porzione carbossi terminale.

I metodi manuali prevedono l'utilizzazione di carbossipeptidasi, enzimi che sono in grado di rimuovere gli amminoacidi, un residuo alla volta, dalla porzione C-terminale della catena polipeptidica.

Sono state caratterizzati 3 tipi diversi di carbossipeptidasi, che si differenziano per la specificità nei confronti dei diversi amminoacidi:

- Carbossipeptidasi A: di origine pancreatica, è specifica per gli amminoacidi aromatici e idrofobici e non riconosce Pro, Arg e Hypro;
- Carbossipeptidasi B: di origine pancreatica, è specifica per Lisina e Arginina e non riconosce la Prolina;

- Carbossipeptidasi Y: è di origine vegetale, è meno specifica e per questo è anche più utilizzata.

Si incubava la proteina denaturata con una carbossipeptidasi, utilizzando un tampone e un rapporto enzima/proteina opportuno. Si preleva una piccola aliquota del campione al tempo 0 (cioè subito dopo l'aggiunta dell'enzima). Il campione prelevato viene trattato con acido tricloroacetico, in maniera tale da denaturare irreversibilmente l'enzima e far precipitare la proteina, viene quindi centrifugato: nel surnatante rimane l'amminoacido liberato dall'azione dell'enzima. Si fanno prelievi a tempi diversi, sottoponendoli tutti allo stesso trattamento. I surnatanti vengono poi analizzati con un analizzatore di amminoacidi. Nei diversi prelievi si deve registrare un aumento nel tempo della concentrazione dell'amminoacido C-terminale e la comparsa progressiva di altri amminoacidi che a loro volta sono diventati l'amminoacido C-terminale in seguito all'azione dell'enzima.

### **Proteolisi limitata**

Una digestione controllata di una proteina mediante particolari proteasi è stata utilizzata frequentemente per la caratterizzazione di aspetti funzionali e strutturali di domini proteici.

La proteina viene esposta ad una proteasi a vari tempi di incubazione; l'incubazione viene interrotta con inibitori specifici della stessa proteasi o modificando il tampone in modo che risulti incompatibile con l'attività idrolitica dell'enzima. Il prodotto della reazione proteolitica viene separato cromatograficamente e si determinano caratteristiche strutturali e funzionali dei vari frammenti ottenuti dalla digestione. In questo modo si può determinare il dominio proteico in cui è presente un sito attivo o un dominio target per un'attivazione enzimatica di tipo allosterico.

La proteolisi limitata può essere utilizzata in studi in cui si studia cinetica di refolding di proteine e si tenta di stabilire il ruolo di alcuni domini proteici nel guidare il raggiungimento di un folding produttivo. Si riporta un breve riassunto di un brillante lavoro svolto in quest'ottica dal gruppo del Prof. Jaenike sulla lattico deidrogenasi. Questo gruppo di ricercatori ha cercato di determinare quale dominio proteico del monomero della lattico deidrogenasi è importante nella formazione del tetramero che catalizza la riduzione del piruvato a lattato con ossidazione di NADH a NAD.

La scelta della proteasi da usare in questo tipo di lavoro deve soddisfare 3 criteri:

- la proteina (LDH) allo stato nativo deve essere resistente all'attacco proteolitico;
- il taglio proteolitico degli intermedi di refolding deve essere più rapido della cinetica di ricostituzione della proteina nativa;
- deve essere disponibile un metodo molto efficace e rapido per inibire la proteasi.

La lattico deidrogenasi tetramerica veniva denaturata a pH acido e sottoposta a una procedura di refolding in tampone basico. Il refolding veniva condotto in due condizioni:

1. in presenza per qualche minuto della proteasi termolisina;
2. in assenza di proteasi.

Quando la termolisina era presente, anche se per un tempo limitato, la lattico deidrogenasi non era in grado di recuperare l'attività enzimatica ma si ricostituiva in uno stato che dal punto di vista funzionale le garantiva soltanto la capacità di legare il NAD ma non il piruvato. Da un punto di vista strutturale la proteina recuperava una struttura dimerica e non tetramerica e l'analisi della sequenza aminoacidica N-terminale dimostrava la rimozione di 10-11 aminoacidi N-terminali.

Il refolding in assenza di termolisina garantiva un recupero completo di un tetramero completamente attivo.

In conclusione la termolisina che taglia la catena polipeptidica in corrispondenza di aminoacidi idrofobici era in grado di tagliare elettivamente all'N-terminale della LDH quando questa era parzialmente unfolded (monomerica o dimerica) e non quando era nativa. La perdita di capacità di un corretto assemblaggio dei dimeri in un tetramero funzionale in assenza dei 10 residui N-terminali assegna a questa porzione della proteina un ruolo fondamentale nel guidare il folding produttivo della proteina.