A. Peptide und Proteine Teil 1 (5.01.2017)

1. Einleitung

Peptide und Proteine sind ubiquitär in allen Organismen vorhanden. Sie sind die Moleküle des Lebens. Sie sind die Funktionsreagenzien in den Zellen und verantwortlich für:

1. Katalyse chemischer Reaktionen
2. Struktur
3. Regulation / Signalübertragung
4. Transport
5. Abwehr

Der Name Protein wurde vom holländischen Chemiker Gerardus Mulder 1838 geprägt. Das Wort Protein (griechisch) steht für: Von zentraler Bedeutung. Die moderne Biotechnologie hat als zentrales Ziel, Proteine und Peptide für den Menschen nutzbar zu machen. Unter dem Begriff Biologics faßt man therapeutisch aktive Proteine wie die "Antikrebs-Antikörper" zusammen. Biosimilars sind die entsprechenden Nachahmer Medikamente, die Generika der Biologics. Da anders als bei chemischen Substanzen ein exaktes Kopieren der Wirksubstanz im Fall von Biomolekülen unmöglich ist spricht man eben von Biosimilar. Für die Zulassung sind erneut klinische Prüfungen notwendig, was die Biosimilars deutlich von chemischen Generika unterscheidet. Es ist also nicht so einfach ein Biosimilar auf den Markt zu bringen, was das forschen an Biologics aus wirtschaftlichen Gründen sehr attraktiv macht.

2. Aufbau

Peptide und Proteine sind lineare Oligomere (2-40) und Polymere (>30), die aus α-Aminosäuren aufgebaut sind. Proteine sind Polypeptide mit einer Funktion vor allem mit einer definierten dreidimensionalen Gestalt. Enzyme sind Proteine, die chemische Reaktionen katalysieren. Chemisch sind auch Strukturen darstellbar die aus nicht natürlichen Aminosäuren wie z. B. β-Aminosäuren oder aromatischen Aminosäuren wie z.B. *ortho*-, *meta*-, oder *para*-Aminobenzoesäure (die *ortho*-Aminobenzoesäure heißt auch Anthranilsäure) bestehen. Es entstehen dann lineare

oligomere Verbindungen, die sich ebenfalls zu definierten dreidimensionalen Strukturen falten. Diese Strukturen und die dazugehörigen Verbindungen nennt man Foldamere. Man informiere sich über diese Verbindungen:

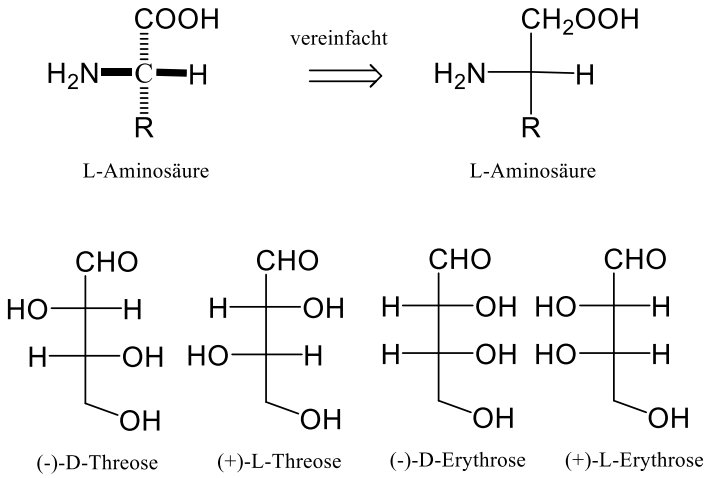
1. Goodman CM, Choi S, Shandler S, DeGrado WF. "Foldamers as versatile frameworks for the design and evolution of function". *Nat. Chem. Biol*. **2007**, *3* (5), 252–62.
2. Zhang DW, Zhao X, Hou JL, Li ZT. "Aromatic Amide Foldamers: Structures, Properties, and Functions". *Chem. Rev.* **2012**, *112* (10): 5271–5316..

3. Aminosäuren

Die kodierten d.h. kanonischen Aminsäuren als Bestandteile von Proteinen sind α-Aminosäuren. Es handelt sich um chirale Moleküle mit einem H, einer Aminogruppe und einer Carboxgruppe, sowie meistens einer Seitengruppe an einem zentralen α-Kohlenstoffatom. Die Moleküle sind L-konfiguriert nach E. Fischer und „meistens“ S in der CIP-Nomenklatur. Es gibt aber auch Aminosäuren die L-konfiguriert sind aber nach der CIP Nomenklatur die absolute Konfiguration R haben, z. B. Cystein. Das hängt mit den Prioritätsregeln zusammen, die in diesem Fall das S-Atom vor dem O-Atom plazieren.

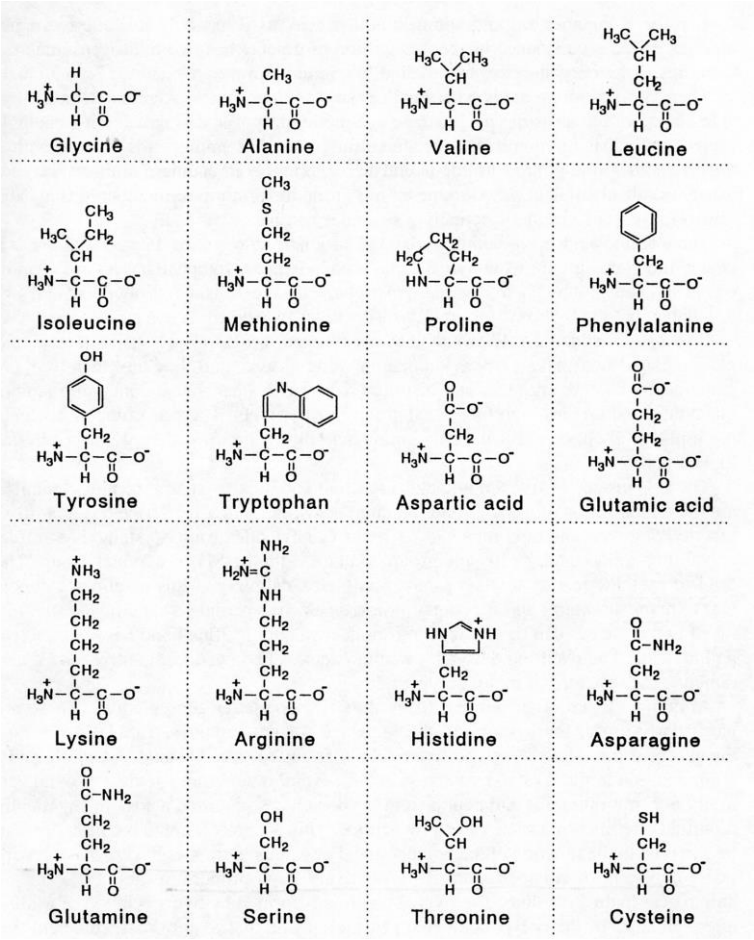
Die in Proteinen vorkommenden Aminosäuren unterscheiden sich alle bezüglich der chemischen Struktur der Seitenkette. Diese kann sauer, basisch, hydrophil, hydrophob etc. sein.

Es gibt 20 proteinogene Aminosäuren. Hinzu kommen Selenocystein und Pyrrolysin als 21 bzw. 22 Aminosäure.

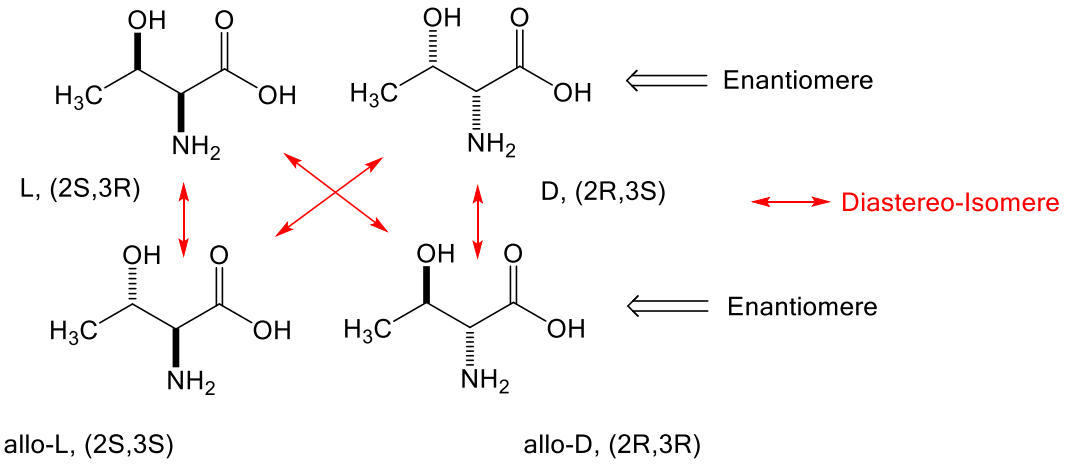


Struktur einer L-Aminosäure sowie zum Vergleich und von Threose und Erythrose nach der schreibweise von E. Fischer.

Strukturen aller 20 proteinogenen (kanonischen) Aminosäuren. Alle Aminosäuren bis auf Glycin haben ein Chiralitätszentrum. Isoleucin und Threonin haben sogar zwei Chiralitätszentren.

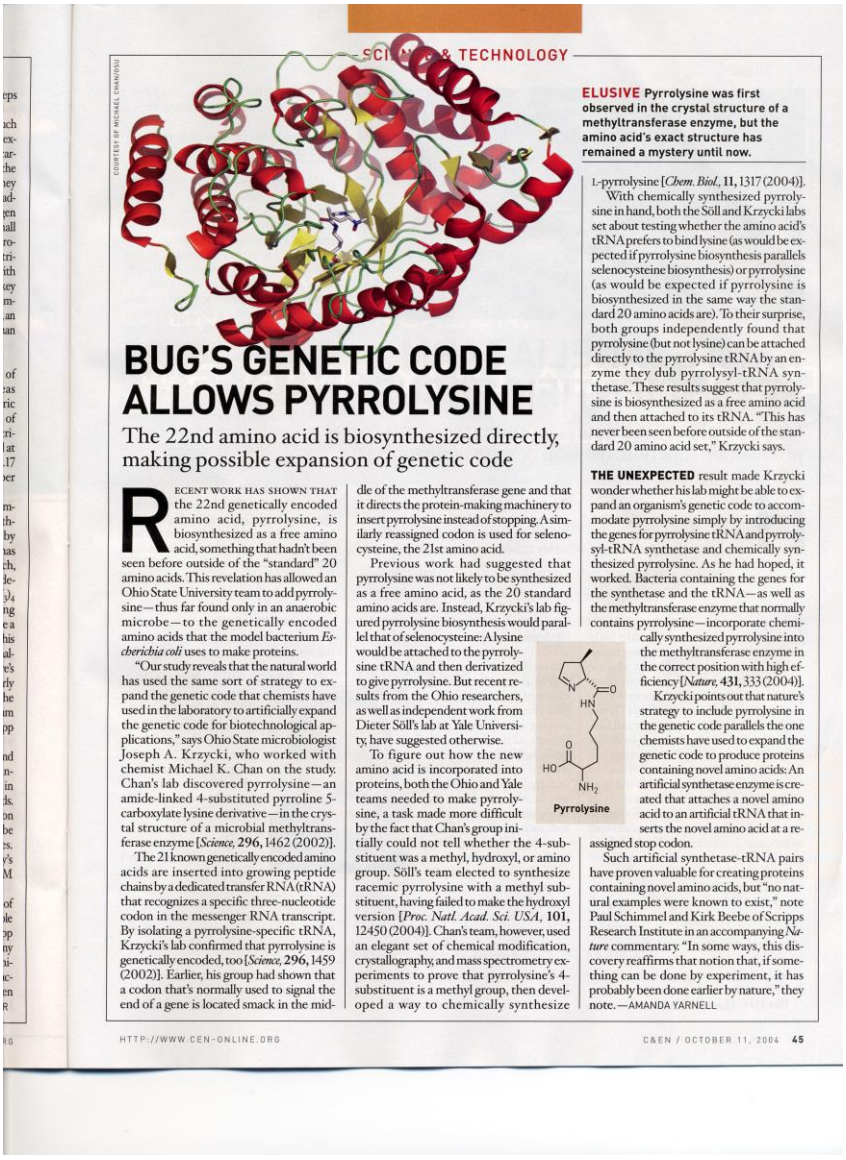


Für das Threonin gilt:



Man informiere sich über die Zusammenhänge beim Isoleucin!

Selenocystein und Pyrrolysin sind weitere Aminosäuren, die kodiert werden. Hier werden Stopp-Kodons verwendet. UAG zur Kodierung von Pyrrolysin und UGA für Selenocystein. Die Basis ist die Biosynthese von transfer-RNAs (tRNA) mit einem anti-Stopp-Codon im Antikodon-*loop*, die die Aminosäuren tragen und so einen Einbau am Ribosom ermöglichen. Im Fall von Pyrrolysin erfolgt die Beladung der tRNA durch eine spezielle Synthetase. Im Fall von Selenocystein (L- oder R-SeCys) wird die Aminosäure an der $tRNA^{Sec}$ (Anticodon = UCA) aus Serin biosynthetisiert. Man informieren sich über die Eigenschaften von SeCys (p*K*a-Werte, Redoxverhalten)



SCIENCE & TECHNOLOGY

COURTESY OF MICHAEL CHANFOSI

ELUSIVE Pyrrolysine was first observed in the crystal structure of a methyltransferase enzyme, but the amino acid's exact structure has remained a mystery until now.

BUG'S GENETIC CODE ALLOWS PYRROLYSINE

The 22nd amino acid is biosynthesized directly, making possible expansion of genetic code

RECENT WORK HAS SHOWN THAT the 22nd genetically encoded amino acid, pyrrolysine, is biosynthesized as a free amino acid, something that hadn't been seen before outside of the "standard" 20 amino acids. This revelation has allowed an Ohio State University team to add pyrrolysine—thus far found only in an anaerobic microbe—to the genetically encoded amino acids that the model bacterium *Escherichia coli* uses to make proteins.

"Our study reveals that the natural world has used the same sort of strategy to expand the genetic code that chemists have used in the laboratory to artificially expand the genetic code for biotechnological applications," says Ohio State microbiologist Joseph A. Krzycki, who worked with chemist Michael K. Chan on the study. Chan's lab discovered pyrrolysine—an amide-linked 4-substituted pyrroline 5-carboxylate lysine derivative—in the crystal structure of a microbial methyltransferase enzyme [*Science*, **296**, 1462 (2002)].

The 21 known genetically encoded amino acids are inserted into growing peptide chains by a dedicated transfer RNA (tRNA) that recognizes a specific three-nucleotide codon in the messenger RNA transcript. By isolating a pyrrolysine-specific tRNA, Krzycki's lab confirmed that pyrrolysine is genetically encoded, too [*Science*, **296**, 1459 (2002)]. Earlier, his group had shown that a codon that's normally used to signal the end of a gene is located smack in the middle of the methyltransferase gene and that it directs the protein-making machinery to insert pyrrolysine instead of stopping. A similarly reassigned codon is used for selenocysteine, the 21st amino acid.

Previous work had suggested that pyrrolysine was not likely to be synthesized as a free amino acid, as the 20 standard amino acids are. Instead, Krzycki's lab figured pyrrolysine biosynthesis would parallel that of selenocysteine: A lysine would be attached to the pyrrolysine tRNA and then derivatized to give pyrrolysine. But recent results from the Ohio researchers, as well as independent work from Dieter Söll's lab at Yale University, have suggested otherwise.

To figure out how the new amino acid is incorporated into proteins, both the Ohio and Yale teams needed to make pyrrolysine, a task made more difficult by the fact that Chan's group initially could not tell whether the 4-substituent was a methyl, hydroxyl, or amino group. Söll's team elected to synthesize racemic pyrrolysine with a methyl substituent, having failed to make the hydroxyl version [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12450 (2004)]. Chan's team, however, used an elegant set of chemical modification, crystallography, and mass spectrometry experiments to prove that pyrrolysine's 4-substituent is a methyl group, then developed a way to chemically synthesize L-pyrrolysine [*Chem. Biol.*, **11**, 1317 (2004)].

Pyrrolysine

With chemically synthesized pyrrolysine in hand, both the Söll and Krzycki labs set about testing whether the amino acid's tRNA prefers to bind lysine (as would be expected if pyrrolysine biosynthesis parallels selenocysteine biosynthesis) or pyrrolysine (as would be expected if pyrrolysine is biosynthesized in the same way the standard 20 amino acids are). To their surprise, both groups independently found that pyrrolysine (but not lysine) can be attached directly to the pyrrolysine tRNA by an enzyme they dub pyrrolysyl-tRNA synthetase. These results suggest that pyrrolysine is biosynthesized as a free amino acid and then attached to its tRNA. "This has never been seen before outside of the standard 20 amino acid set," Krzycki says.

THE UNEXPECTED result made Krzycki wonder whether his lab might be able to expand an organism's genetic code to accommodate pyrrolysine simply by introducing the genes for pyrrolysine tRNA and pyrrolysyl-tRNA synthetase and chemically synthesized pyrrolysine. As he had hoped, it worked. Bacteria containing the genes for the synthetase and the tRNA—as well as the methyltransferase enzyme that normally contains pyrrolysine—incorporate chemically synthesized pyrrolysine into the methyltransferase enzyme in the correct position with high efficiency [*Nature*, **431**, 333 (2004)].

Krzycki points out that nature's strategy to include pyrrolysine in the genetic code parallels the one chemists have used to expand the genetic code to produce proteins containing novel amino acids: An artificial synthetase enzyme is created that attaches a novel amino acid to an artificial tRNA that inserts the novel amino acid at a reassigned stop codon.

Such artificial synthetase-tRNA pairs have proven valuable for creating proteins containing novel amino acids, but "no natural examples were known to exist," note Paul Schimmel and Kirk Beebe of Scripps Research Institute in an accompanying *Nature* commentary. "In some ways, this discovery reaffirms that notion that, if something can be done by experiment, it has probably been done earlier by nature," they note.—AMANDA YARNELL

HTTP://WWW.CEN-ONLINE.ORG

C&EN / OCTOBER 11, 2004 45

1. Srinivasan, G. *et al.*: *Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA.* In: *Science.* **2002,** *296* (5572), S. 1459–1462.

2. Berry, M. J. et al.: *Functional Characterization of the Eukaryotic SECIS Elements which Direct Selenocysteine Insertion at UGA Codons*. *EMBO J.* **1993**, *12* (8), 1993, 3315–3322.

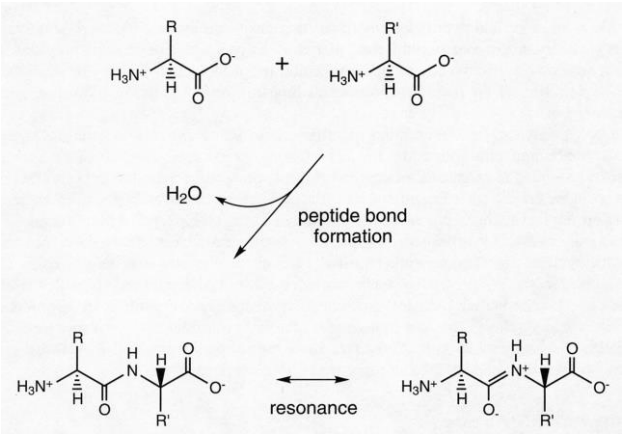
In der Biochemie werden die Aminosäuren entweder durch einen Einbuchstaben-Code oder durch einen Dreibuchstaben-Code dargestellt.

Tabelle 1: Ein- und Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren

Amino Acid	Three-letter Code	One-letter Code
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic Acid	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic Acid	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

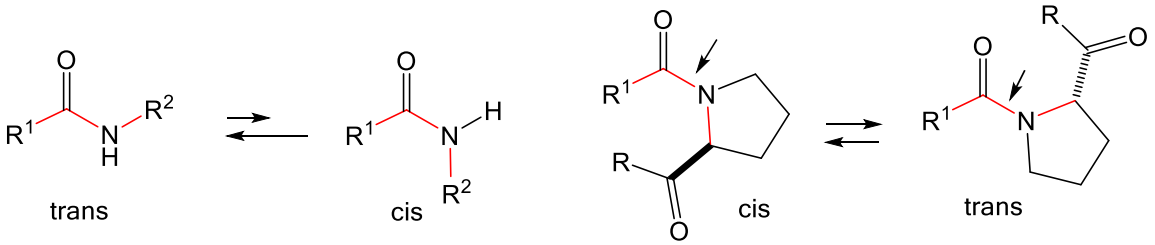
Proteine enthalten neben den 20 (bzw. 22) kodierten Aminosäuren oft auch phosphorylierte (Tyr, Ser, Thr) oder acetylierte (Lys) Derivate.
Die Phosphorylierungen regulieren oft die Funktion der Proteine. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen werden von spezifischen Enzymen (Kinasen) an definierten Stellen durchgeführt. Darüber hinaus sind einige Aminosäuren mit Zuckern derivatisiert. Gerade die Proteine höherer Organismen sind sehr häufig mit linearen oder verzweigten Zuckerstrukturen versehen. Hierbei werden die Zucker entweder mit Asn verknüpft (N-Glycoside) oder es handelt sich um O-Glycoside der Aminosäuren Thr und Ser. Manche Proteine werden auch nahe dem Carboxyterminus mit Lipiden ausgestattet. Diese Modifikation lokalisiert das Protein in der Zellmembran. Alle diese Modifikationen werden posttranslational eingeführt. Die chemische Synthese solcher Strukturen ist eine große Herausforderung: B. Davis *Angew. Chem. Int. Ed*. **2009**, *48*, 4674-4678.

4. Struktur des Polypeptids



Die Peptid-(Amid)bindung.

Die Kondensation zweier Aminosäuren ergibt eine Amidbindung. Diese Amidbindung ist nicht frei drehbar, sondern hat erheblichen Doppelbindungscharakter. Man unterscheided daher cis- und trans Amindbindungen. Die Rotationsbarriere liegt bei ca. 79 kJ/mol für die cis → trans Isomerisierung und bei 89 kJ/mol für die trans → cis Umwandlung. Dre dG°-Wert zwischen dem cis und trans Amid liegt bei 10.7 kJ/ mol (*N*-Methylacetamide). Nur beim Prolin, der einzigen α-Aminosäure mit sek. Amid ist das cis/trans Verhältnis in etwa 1:2.



In Proteinen kann die cis/trans Isomerisierung von Prolin ein Konformationsschalter sein. Es gibt Enzyme, die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen), welche die Umwandlung der Formen katalysieren. Dieser Prozeß ist wichtig und oft raten bestimmend bei der Peptid-Faltung.

Peptide werden immer so notiert, dass der Aminoterminus links und der Carboxyterminus rechts liegt.

Die meisten Peptide und Proteine werden nach Gewicht charakterisiert, z. B. 33,000 Da oder 33 kDa. Man kann die Anzahl der verknüpften Aminosäuren leicht

abschätzen, da im Durchschnitt eine Aminosäure mit 110 Da beiträgt. (1 Da = 1 Masseneinheit. 1 kDa = Molekulargewicht 1000)

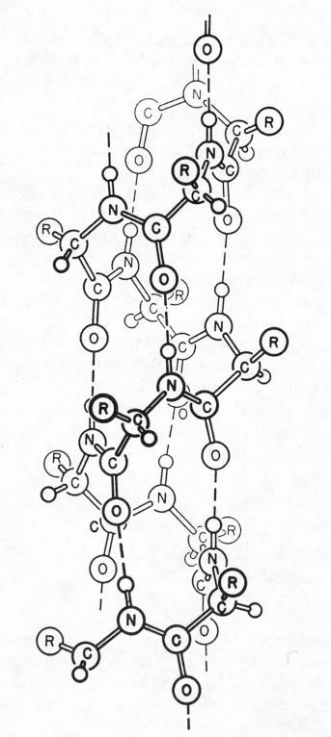
Die Aminosäuresequenz nennt man auch die Primärstruktur eines Proteins. Aminosäuresequenzen falten sich lokal zu Sekundärstrukturen. Diese werden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten. Man unterscheidet die α-Helix, das β-Faltblatt (parallel und antiparallel) und die verschiedenen Schleifen (*turns*), die man zwischen diesen Sekundärstrukturelementen findet.

4.1 Die α-Helix

Alle Sekundärstrukturen, wie auch die α-Helix, können sich nur ausbilden, weil die Peptidbindung auf Grund des Doppelbindungscharakters planar und in der Regel trans (anti) konfiguriert ist. Die Delokalisierungsenergie beträgt ca. 75-88 kJ/mol. Außerdem existiert ein großes Dipolmoment von 3.5 D, das ist dreimal größer als das von HCl.

Was die Konfiguration der Amidbindung betrifft, ist die Aminosäure Prolin eine Ausnahme. In Lösung findet man auch 20-30% des cis-Isomeren Für alle anderen Aminosäuren sind es <0,1%. Die starke Bevorzugung der trans-Amidbindung hat sterische Gründe.

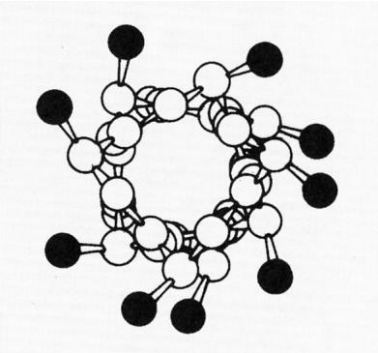
Die α-Helix ist eine rechtsgängige Helix.



Die α-Helix ist eine $3{,}6_{13}$ Helix. Sie hat 3,6 Aminosäuren in einer Windung (360°). Die sich ausbildende H-Brücke bildet einen 13-gliederigen Ring.

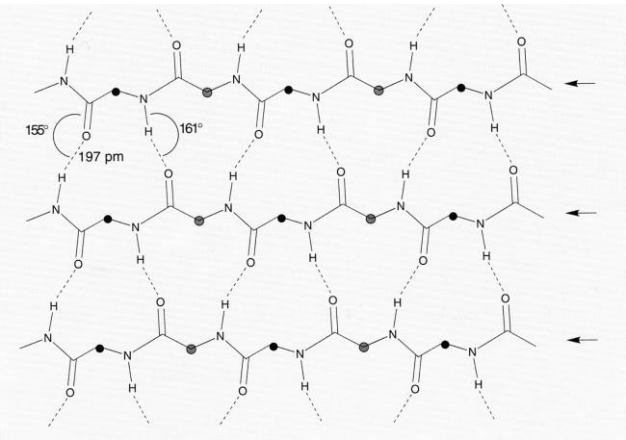
Jede Amidgruppe bildet eine H-Brücke aus zu einer weiteren Amidgruppe, die in der Primärstruktur drei

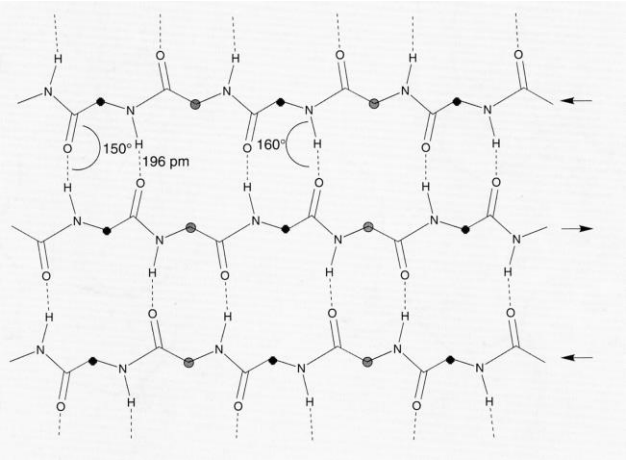
Aminosäuren entfernt ist. Die C=O Gruppen liegen parallel zur Helixachse, die Seitenketten stehen nahezu senkrecht zur Helixachse. 3.6 Aminosäuren bilden eine Helixwindung von 360°. Die Höhendifferenz (Pitch) beträgt 5,4 Å. Die Seitenketten der Aminosäuren zeigen radial nach außen.



4.2 Das β-Faltblatt (parallel und antiparallel)

Eine gestreckte Polypeptidkette kann mit einer zweiten Polypeptidkette eine dimere Struktur bilden. Hierbei können sich die beiden Peptide parallel oder antiparallel anordnen.





Paralleles und antiparalleles β-Faltblatt.

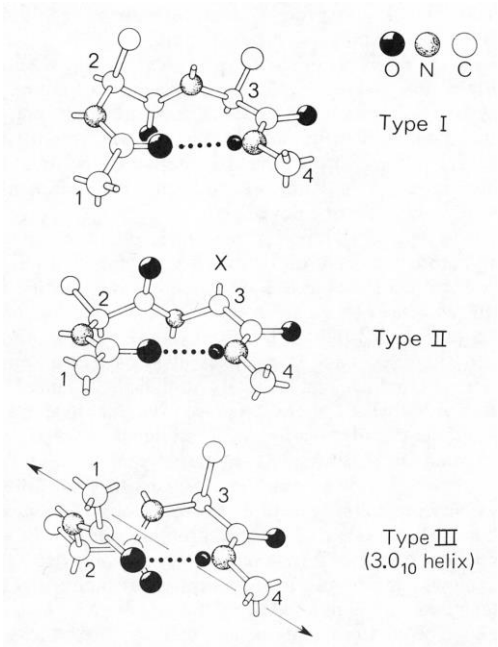
Antiparallele β-Faltblätter finden sich oft in fibrillären Proteinen. Viele dieser Proteine sind sehr schwer löslich. Das parallele β-Faltblatt findet sich hingegen nicht in fibrillären Proteinen, d. h. ausgestreckten, fibrillenhaften und fibrillenbildenden, sondern ausschließlich in globulären.

4.3 Schleifen

Schleifen sind nichtrepetitive Sekundärstrukturen, die die Richtung einer Polypeptidkette umkehren. In einer Schleife gibt es immer eine H-Brücke von einem Akzeptor $(C{=}O)_i^-$ zur Donorgruppe $(N\text{-}H)_{i+n}$. Diese Donorgruppe ist n-Einheiten entfernt. Man kennt α-, β- und γ-Schleifen je nach Größe der Schleife, d. h. je nach n.

α-Schleife	5→1	Ringgröße = 13	n = 4
β-Schleife	4→1	Ringgröße = 10	n = 3
γ-Schleife	3→1	Ringgröße = 7	n = 2

Man unterscheidet noch verschiedene β-Schleifen: β_I, β_{II} und β_{III}.



β_I, β_{II} und β_{III}-Schleifen

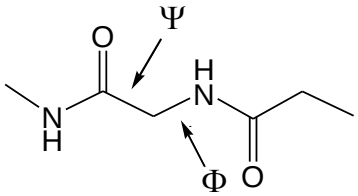
Der β_{II}-Typ benötigt aus sterischen Gründen ein Gly an der dritten Position. Der Typ β_{III} kann beliebig wiederholt werden. Man erhält dann eine reguläre $3{,}0_{10}$ Helix. Das

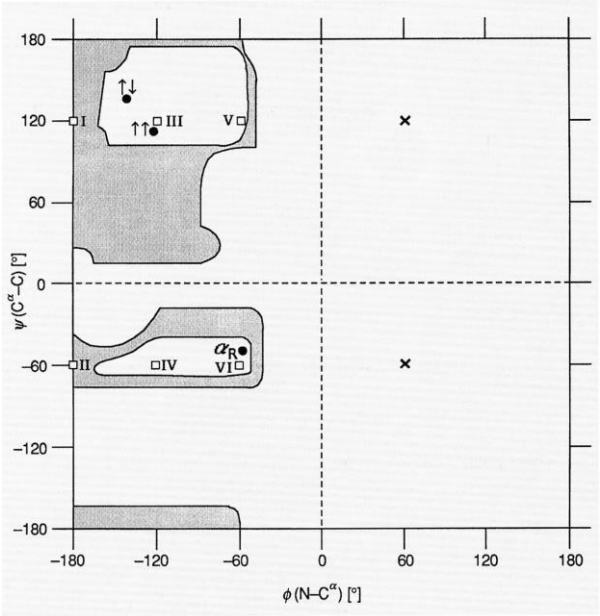
ist eine typische Oligoprolin-Helix. Zum Vergleich: Die α-Helix ist eine $3{,}6_{13}$-Helix. (3,6 = 3,6 Aminosäuren pro volle Drehung).

5. Grundsätzliches zur Konformation von Peptiden

Die Hauptkette eines Peptids wird aus den Atomen Ni, $C^{\alpha}{}_i$ und C_i gebildet.

Die Konformation der Kette wird durch zwei Winkel bestimmt: Φ (Phi), Ψ (Psi). Es gibt Winkelkombinationen, die erlaubt (günstig) und solche, die verboten (ungünstig) sind. Die (Φ, Ψ)-Winkelkombinationen werden in sogenannten Ramachandran-Plots dargestellt.



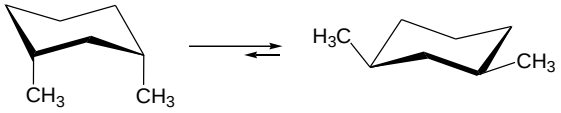


Ramachandran Plot eines kleinen Peptids

Zur Abschätzung, welche Winkelkonfigurationen günstig und welche ungünstig sind, gelten die „Spielregeln“ der Konformationsanalyse. $\Rightarrow$ Vermeiden von Newman- und Pitzer-Spannung.

Pitzer-Spannung: Gestaffelte und nicht ekliptische Anordnung von Atomen entlang der Hauptkette. (σ-σ^* Wechselwirkung). Torsionsspannung

Newman-Spannung: 1,5 Repulsion von nicht-H-Atomen

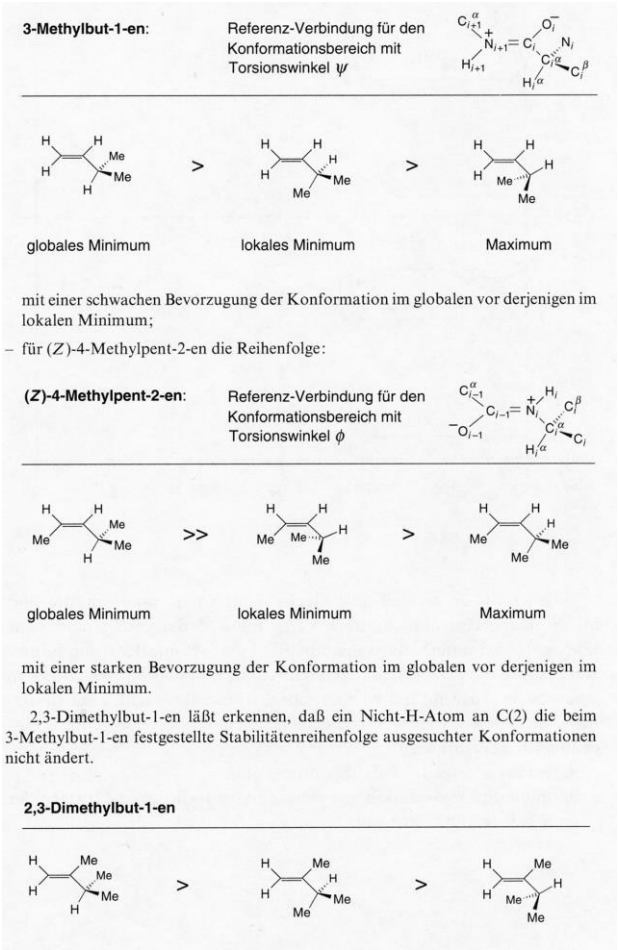


1,5-Repulsion

Bayer-Spannung: Valenzwinkel-Deformation wie im Cyclobutan

Zusätzlich kommt bei Peptiden hinzu:

- Möglichst geringe 1,3-Allylspannung
- Optimale Anordnung zur Bildung von H-Brücken



Zur 1.3 Allylspannung nach F. Johnson und R. W. Hoffmann

Chem. Rev. **1989**, *89*, 1841-1860.

6. Tertiärstruktur von Proteinen

Die Sekundärstrukturen eines Polypeptids falten in eine definierte dreidimensionale Gestalt, die <u>Tertiärstruktur</u>. Diese Struktur wird durch H-Brücken, ionische Wechselwirkungen und hydrophobe Interaktionen stabilisiert. Auch Disulfidbrücken

können gebildet werden. Die Struktur vieler Proteine lässt sich oft in Bereiche unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften unterteilen. Diese Bereiche nennt man Domänen.

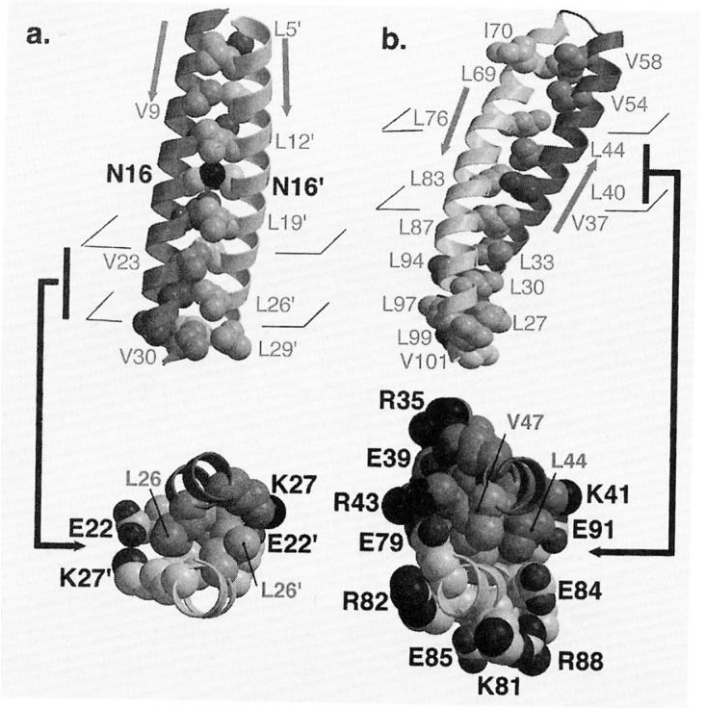
Wenn ein Protein aus unterschiedlichen Polypeptidketten besteht, spricht man von Untereinheiten des Proteins. Untereinheiten lagern sich zur Quartärstruktur eines Proteins zusammen.

Hat ein Protein nur eine Untereinheit, ist es ein Monomer, sonst ein Dimer, Trimer, Tetramer etc.
Homo und Hetero beschreibt, ob die gleichen Oligopeptide oder ob unterschiedliche beteiligt sind.

Es gibt auch im Reich der Tertiärstrukturen stabile sich wiederholende Strukturmerkmale.
Eines der wichtigsten Faltungsmotive ist das coiled-coil. Es lässt sich leicht künstlich konstuieren und wird daher gerne für die Synthese künstlicher, stabil gefalteter Proteine verwendet.

6.1 Das coiled-coil Motif

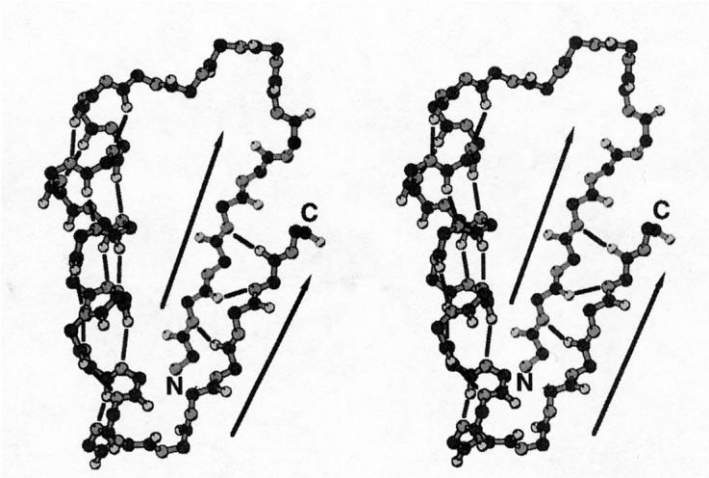
Zwei parallele α-Helices ordnen sich in einem Winkel von ca. 18° zueinander an. Die Helices winden sich dabei umeinander. Die Helices verzahnen sich. In einer α-Helix befindet sich die Seitenkette an jeder 3.5ten und an jeder siebten Stelle auf der gleichen Seite. Wenn zwei Helices sich verzahnen sollen, wird an jeder siebten Stelle in einer α-Helix eine hydrophobe Aminosäure eingebaut (z.B. Leucin). Dann lagern sich die Helices zusammen. Wie ein Reißverschluss stapeln sich die Leucine. Es bildet sich ein Leucin-Zipper Motif aus. Der Abstand zwischen jeder siebten Aminosäure beträgt ca. 10 Å. Nur wenn die zwei Reste hydrophob sind z. B. Leucin, kann eine zweite Helix mit dem gleichen Motif ineinander einrasten. Man spricht von repetitiven Heptadwiederholungen. (Heptade repeats). Leucin-Zipper gibt es parallel und antiparallel.



a: Paralleles und b: antiparalleles Leucin-Zipper Motif

6.2 Der Rossmann Dinukleotid-Bindungsfold

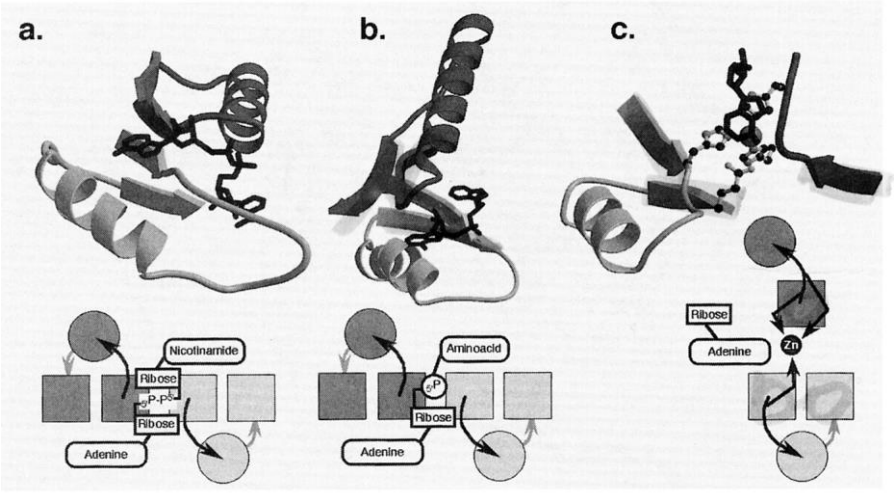
Parallele β-Faltblätter können sich nicht ohne ein dazwischen liegendes anderes Sekundärstrukturelement wie z. B. eine α-Helix ausbilden.



Beispiele für ein paralleles β-Faltblatt mit dazwischenliegender α-Helix. Dieses Motif nennt man einen β-α-β-Fold. Die Pfeile markieren die β-Faltblätter.

Sehr häufig treten zwei β-α-β-Crossovers gleichzeitig auf. Die beiden Einheiten sind häufig 180° zueinander angeordnet. Die beiden Einheiten bilden eine rechtshändige

Anordnung. Proteine, die dieses Strukturmotiv enthalten, binden meistens purinenthaltende Dinucleotide wie ATP, NAD oder auch aktivierte Aminosäuren. 10 der vielen tRNA Synthetasen enthalten daher einen sogenannten Rossmann-Fold.



Der Rossmann-Fold: Zwei β-α-β-Crossovers, in deren Mitte die Bindungstelle für Dinukleotide liegt.

Allgemein lassen sich Proteine in 4 Klassen einteilen:

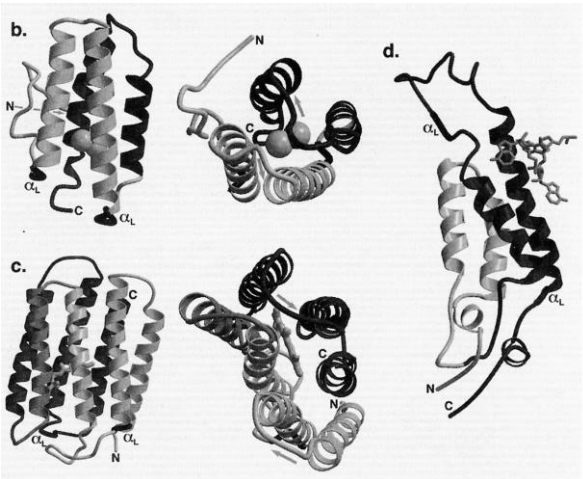
α = nur α-Helices

β = nur β-Sheets (Faltblätter)

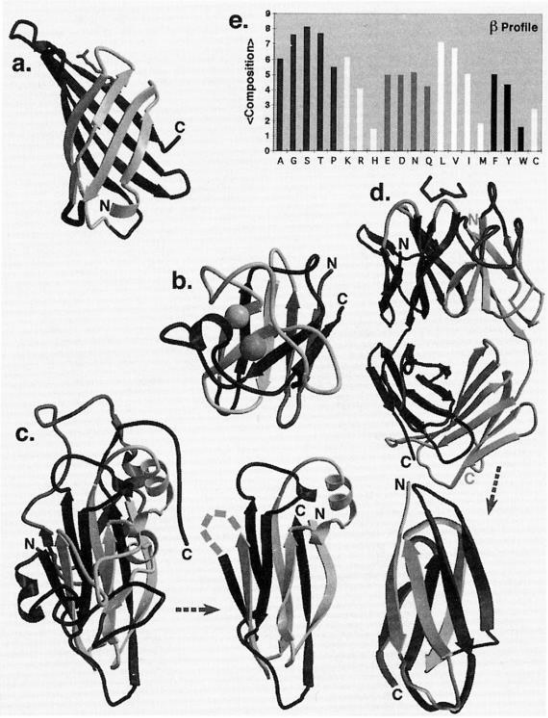
α/β = abwechselnd α und β Domänen

α + β = separierte α und β Domänen

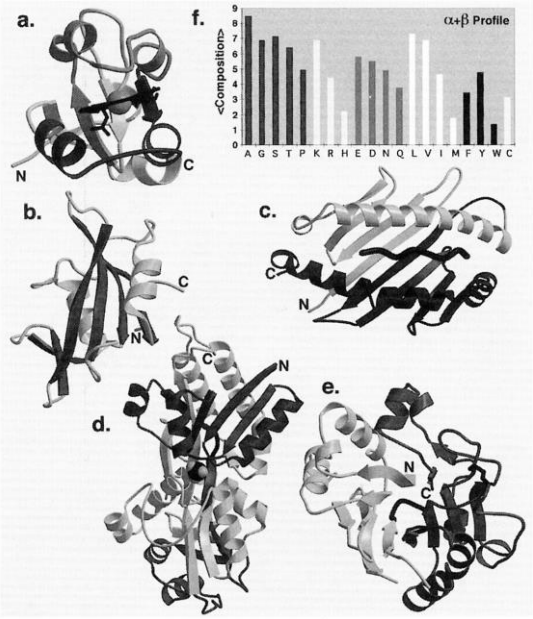
6.3 Einige ausgewählte Proteinstrukturen



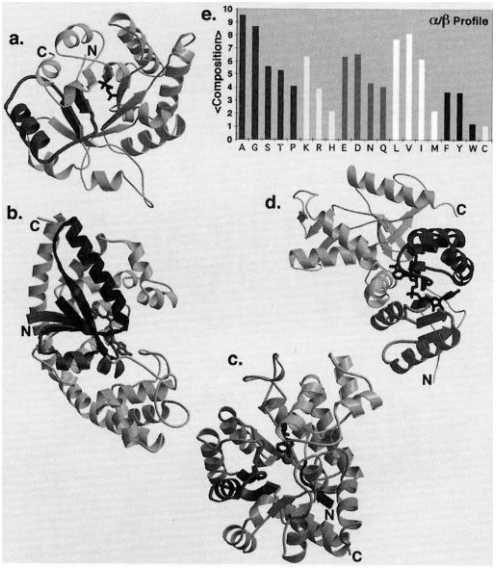
Proteine, die nur aus α-Helices bestehen. b: Myohemerythrin, c: Bakteriorhodopsin, d: Tabakmosaikvirus- Hüllenprotein. Viele dieser Proteine liegen in Membranen.



Proteine, die nur aus β-Sheets bestehen. a: Streptavidin-Biotin Komplex, b: Superoxiddismutase, c: Schnupfenvirus Hüllenprotein.



Proteine, die aus separierten α-Helix und β-Sheet Domänen aufgebaut sind. a: Cytochrom b5, b: SRC Domäne, c: Klasse 1 *major histocompatibility complex in complex with a peptide*, d: Phosphatbindeprotein, e: Desoxyribonuklease.

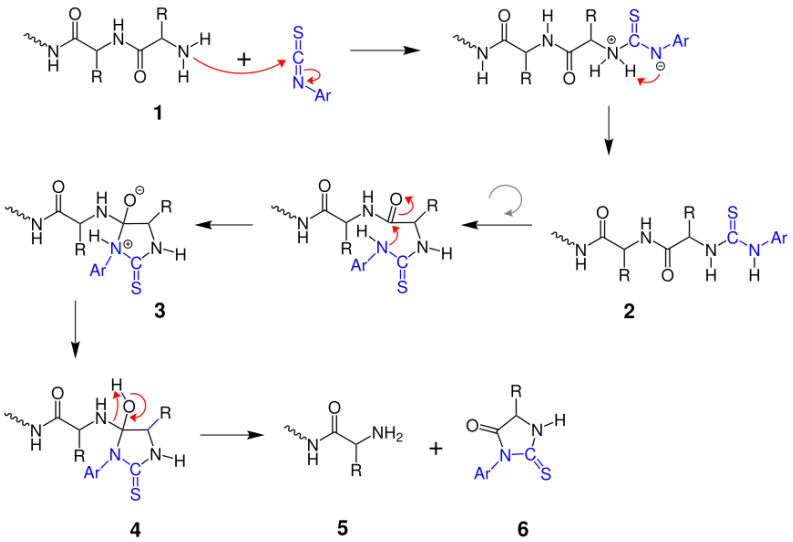


Proteine mit abwechselnden α-Helix und β-Sheet Domänen. a: Triosephosphatisomerase, b: Tryptophanyl-tRNA Synthetase, c: Adenosine Deaminase.

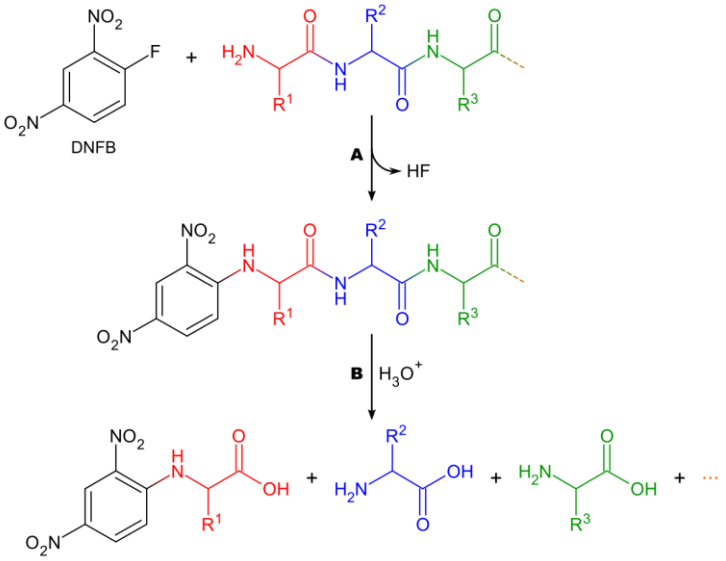
7. Charakterisierung von Peptiden und Proteinen

A) Die einfachste Methode zur Analyse ist der Totalabbau duch saure Hydrolyse der Peptide zu den einzelnen Aminosäuren (6N HCl, 24h). Die Charakterisierung der einzelnen Aminosäuren kann über HPLC an *reversed phase* C18-Material erfolgen. Man informiere sich über *normal phase* und *reversed phase* Chromatographie.

B) Mit Hilfe des Edman Abbaus können die N-terminalen Aminosäuren durch wiederholte Endgruppenbestimmung sequenziert werden. Die Aminosäuren geben unterschiedliche Phenylthiohydantoine. Die Umsetzung erfolgt mit Phenylisothiocyanat.

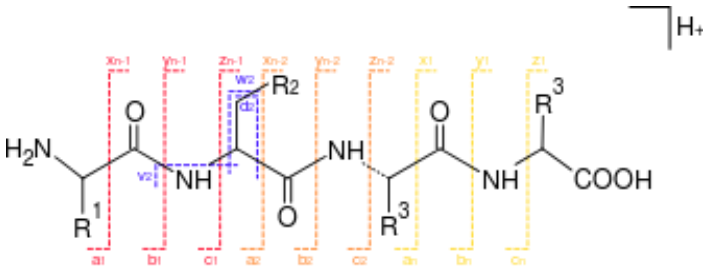


C) Eine einfache Endgruppenbestimmung kann mit Hilfe des Sanger Reagenzes 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol über eine nukleophile aromatische Substitution erfolgen.



Mechanismus der Endgruppenbestimmung

D) heute erfolgt die Sequenzierung von Proteinen meist mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie. Hierzu wird das Protein mit Verdauenzymen wie Trypsin oder Chymotrypsin zunächst zu kurzen Peptiden verdaut. Trypsin spaltet hinter basischen Aminosäuren. Chymotrypsin spaltet hinter aromatischen. Die erhaltenen Peptidmischungen werden dann in einer LC-MS analysiert. Zunächst werden die Peptide in der LC (reversed phase) getrennt. Die Peptide gelangen so getrennt in die MS-Einheit wo bas Molekulargewicht bestimmt wird. Dann erfolgt in einem MS^2 Experiment die weitere Fragmentierung der Peptide. Die Peptide haben eine definierte Fragmentierungschemie, welche es erlaubt aus den erhaltenen Tochterionen auf die Sequenz zu schließen. Hierzu kommen bioinformatische Techniken zum Einsatz.



Im MS beobachtbare Fragmentionen

Bezüglich der Massenspektrometrie-basierten Analyse und Sequenzierung von Peptiden und Proteinen siehe auch Zusatzskript: "Proteomics"