

Strategije določanja poteka disulfidnih vezi v proteinih bogatih z disulfidi

V najinih člankih so bili predmet raziskav conotoxini. Gre za manjše peptide (15-50 AK), ki so bogati s cisteinskimi ostanki, kar povzroči težave pri določevanju disulfidnih povezav, saj se lahko cisteini povežejo med sabo v različnih kombinacijah (scrambling). Za določanje disulfidnih povezav so poskusili uporabiti več metod (npr. retro-selektivno sintezo, analiza z encimsko degradacijo,...) ampak nobena ni tako natančna in učinkovita kot redukcija s Tris(2-karboksietil)fosfinom (TCEP) čemur sledi analiza z masno spektrometrijo. Ta metoda omogočazaznavanje parcialno reduciranih polipeptidnih intermediatov.

Disulfidne povezave se pri nizkem pH ne tvorijo, zato so standardni reducenti kot sta merkaptoetanol in ditiotreitol neprimerni, saj delujejo v območju višjega pH. Kot primeren reducent se je izkazal TCEP, ki spada v skupino trialkilfosfinov, saj deluje tudi v nižjem pH območju.

Analiza poteče v stopnjah:

- najprej poteče delna redukcija s TCEP pri pH 3
- analiza intermediatov z ESMS
- alkilacija prostih tiolov
- separacija produktov na reverzno-fazni HPLC pri pH 2
- analiza alkiliranih intermediatov z MS
- sekvenčna analiza za določanje pozicije označenih cisteinov

Po redukciji s TCEP pri sodobnejši analizi izvedemo t.i. elektro-sprey masno spektroskopijo (ESMS), s čimer opazujemo formacijo intermediatov in s tem olajšamo določitev št. disulfidnih povezav v našem proteinu. Tako zmanjšamo tudi količino potrebnega materiala za analizo.

Nato poteče alkilacija reduciranih cisteinov na intermediatih z N-fenilmaleimidom (PM). Alkilacija intermediatov je ključna, saj zaščiti proste SH skupine pred ponovno oksidacijo. Nato izvedemo še redukcijo ostalih (nereduciranih) cisteinov, pri čemer razbijemo disulfidne vezi. Nato alkiliramo na novo nastale reducirane cisteine z 4-vinilpiridinom (PE).

Zadnja stopnja analize je sekvenčna analiza alkiliranih produktov z Edmanovo degradacijo. Različna reagenta za alkilacijo pa uporabimo zato, da pri edmanovi degradaciji lahko sploh določimo katera dva cisteina sta med seboj povezana, saj imajo cisteini z vezanim PM kiralni center, kar povzroči dvojni vrh v sekvenčnem grafu.