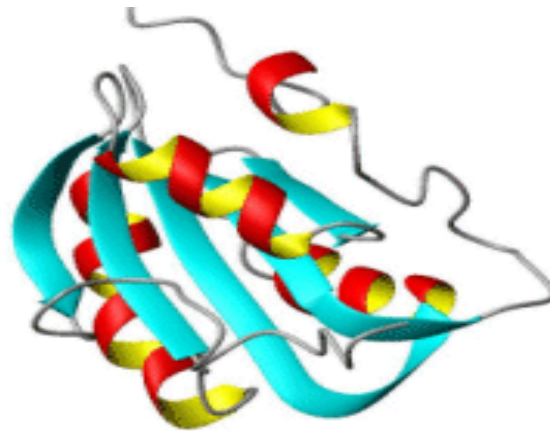


Fehérje Analitika 1.



Kromatográfiás technikák

MSC, 2011. tavaszi félév

Proteomika

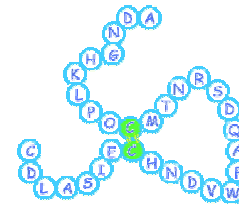
A **proteomika** meg kívánja ismerni a fehérjék szerkezetét, biológiai funkcióját és ezek térbeli és időbeli változását. Nemcsak úgy tekinti a fehérjét, mint izolált molekulát, hanem figyelembe veszi a fehérje és környezete közötti kölcsönhatást. Vizsgálódási körébe tartozik a fehérje eredetének meghatározása, rendszertani besorolása, a különböző forrásból származó, de azonos biológiai funkciót ellátó proteinek szerkezetének összehasonlítása, a fehérje jelenlétének vagy hiányának igazolása egészséges, illetve patológiás körülmények között. **Célja – a korszerű kémiai analitika eszközeit felhasználva – az igen kis mennyiségben, illetve koncentrációban jelen lévő fehérjék kimutatása, azonosítása, szerkezetük meghatározása;** a fehérjékkel kapcsolatos ismeretek taxonómiai, szerkezeti vagy funkcionális rendszerezése, a kísérleti adatok megerősítése (validálás), valamint az így képződő adathalmazok (adatbázisok) információtartalmának elemzése.

Fehérjék tulajdonságai

A fehérjék szerkezete:

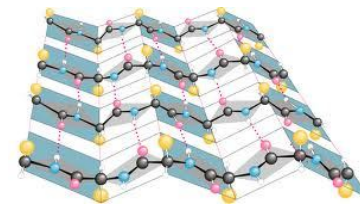
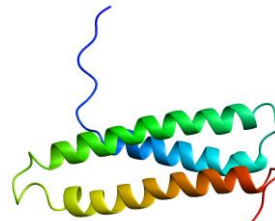
elsődleges szerkezet

aminosavsorrend



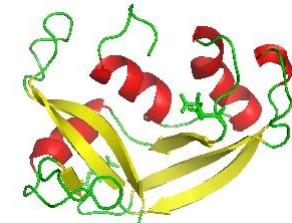
másodlagos szerkezet

α -hélix, β -redő, β -kanyar, random szakaszok



harmadlagos szerkezet

a polipeptidlánc teljes térbeli konformációja



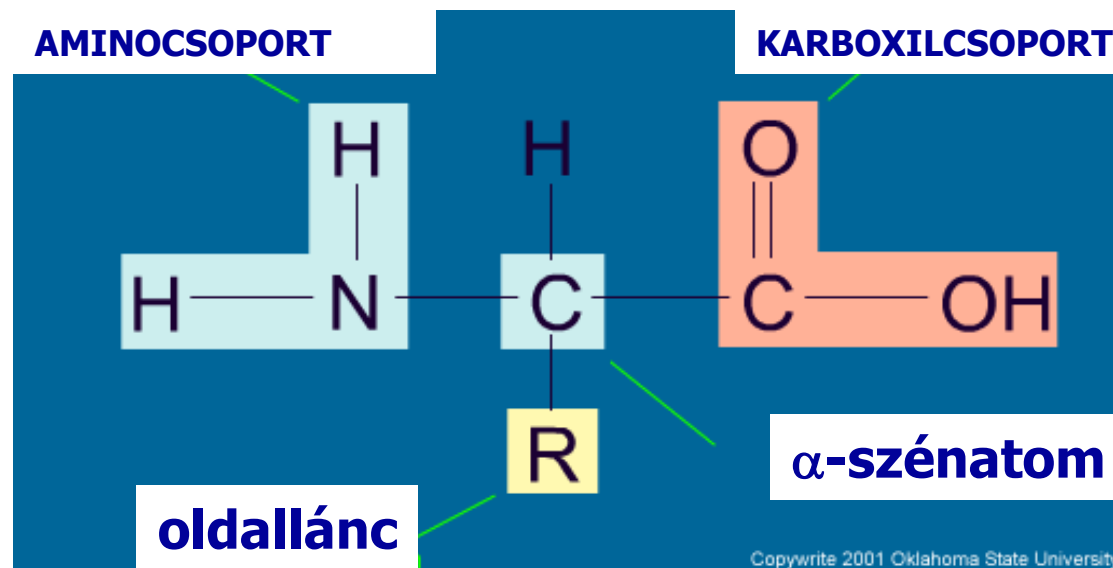
(negyedleges szerkezet)

több peptidlánc (alegységek)



Fehérjék felépítése, aminosavak

- a fehérjéket **α -aminosavak** építik fel, az aminocsoport a karboxilcsoport melletti szénatomhoz kapcsolódik
- az aminosavak az R-oldallánc szerkezetében különböznek egymástól
- Az élő szervezetekben 25-féle aminosav található, ezek közül **20 fehérjeépítő**.



Fehérjék felépítése, aminosavak

Alanin: Ala; A

Arginin: Arg; R

Aszparagin: Asn; N

Aszparaginsav (aszpartát): Asp; D

Cisztein: Cys; C

Fenilalanin: Phe; F

Glutamin: Gln; Q

Glutaminsav (glutamát): Glu; E

Glicin: Gly; G

Hisztidin: His; H

Izoleucin: Ile; I

Leucin: Leu; L

Lizin: Lys; K

Metionin: Met; M

Prolin: Pro; P

Szerin: Ser; S

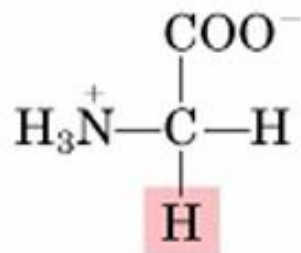
Treonin: Thr; T

Triptofán: Trp; W

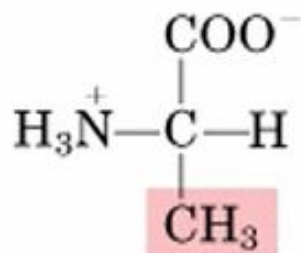
Tirozin: Tyr; Y

Valin: Val; V

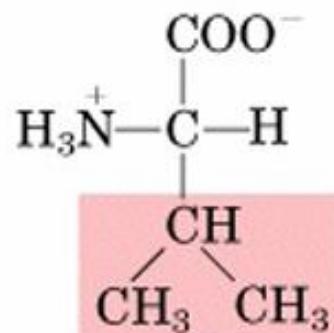
Apoláris, hidrofób oldalláncú aminosavak



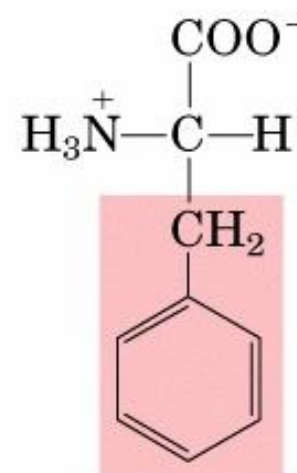
Glycine



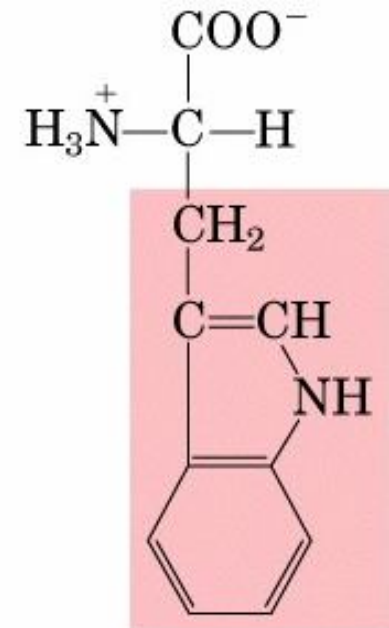
Alanine



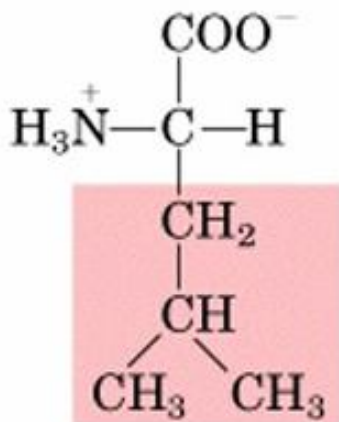
Valine



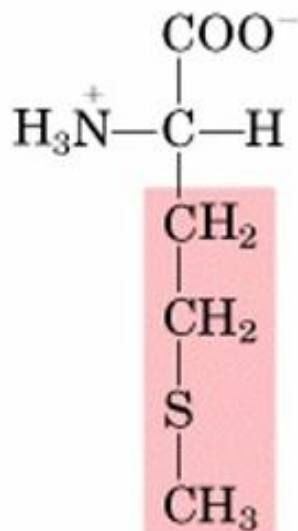
Phenylalanine



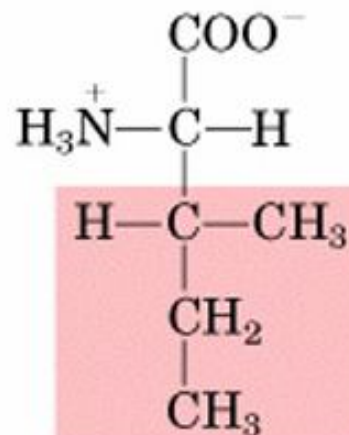
Tryptophan



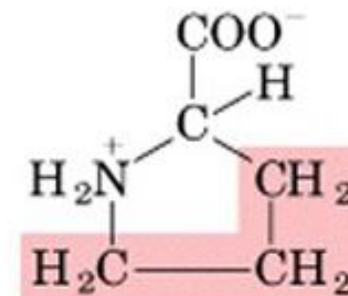
Leucine



Methionine

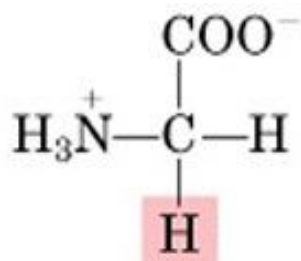


Isoleucine

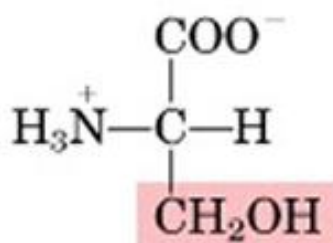


Proline

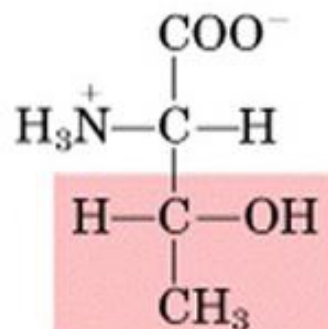
Poláris oldalláncú, töltéssel nem rendelkező aminosavak



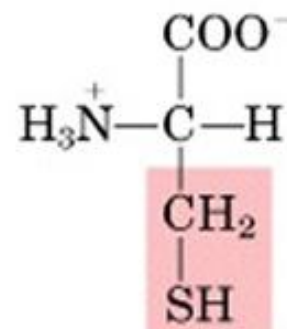
Glycine



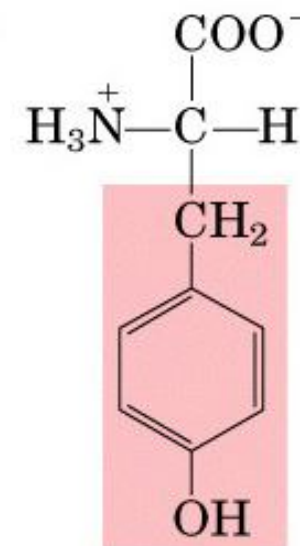
Serine



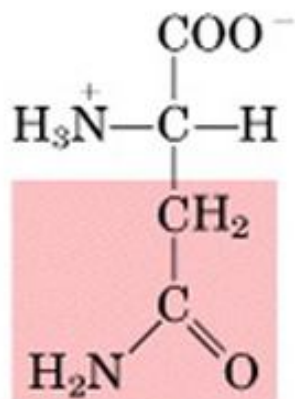
Threonine



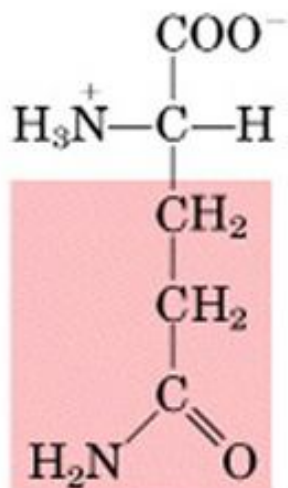
Cysteine



Tyrosine



Asparagine

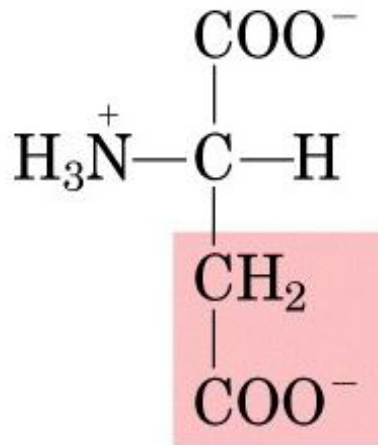


Glutamine

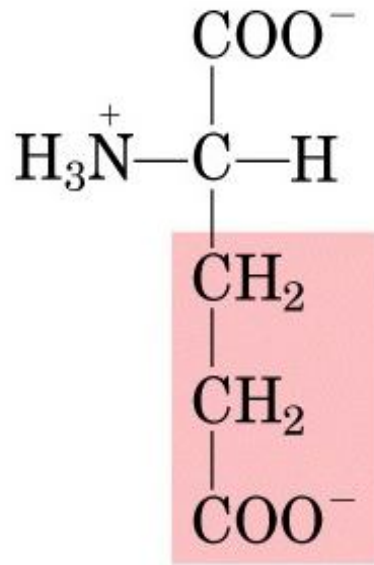
A glicinben található hidrogénatom nem befolyásolja lényegesen a molekula töltéseloszlását, ezért az apoláris oldalláncú aminosavak közé is besorolható.

Aminosavak csoportosítása töltés szerint

Savas oldalláncú, negatív töltésű aminosavak

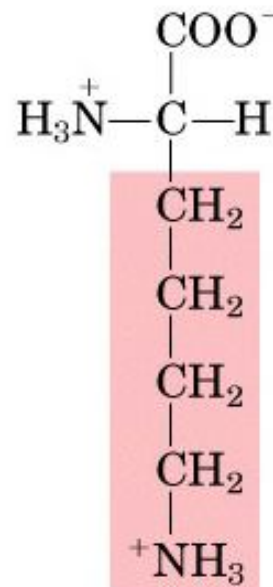


Aspartate

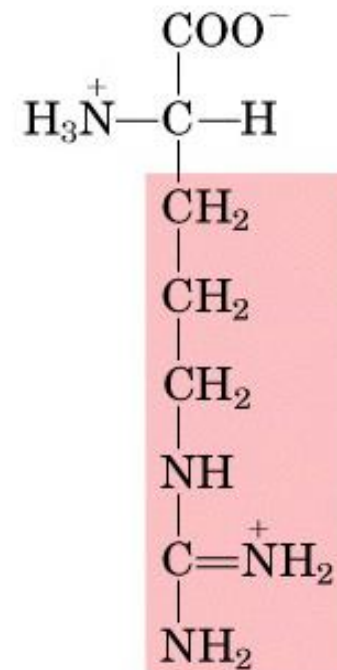


Glutamate

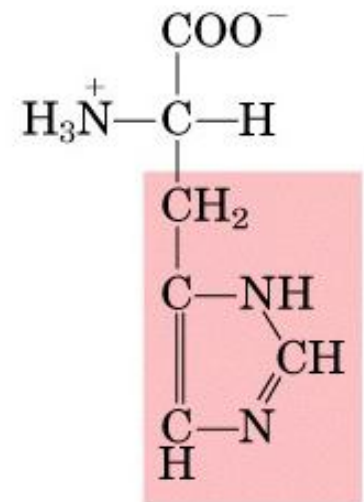
Bázikus oldalláncú, pozitív töltésű aminosavak



Lysine

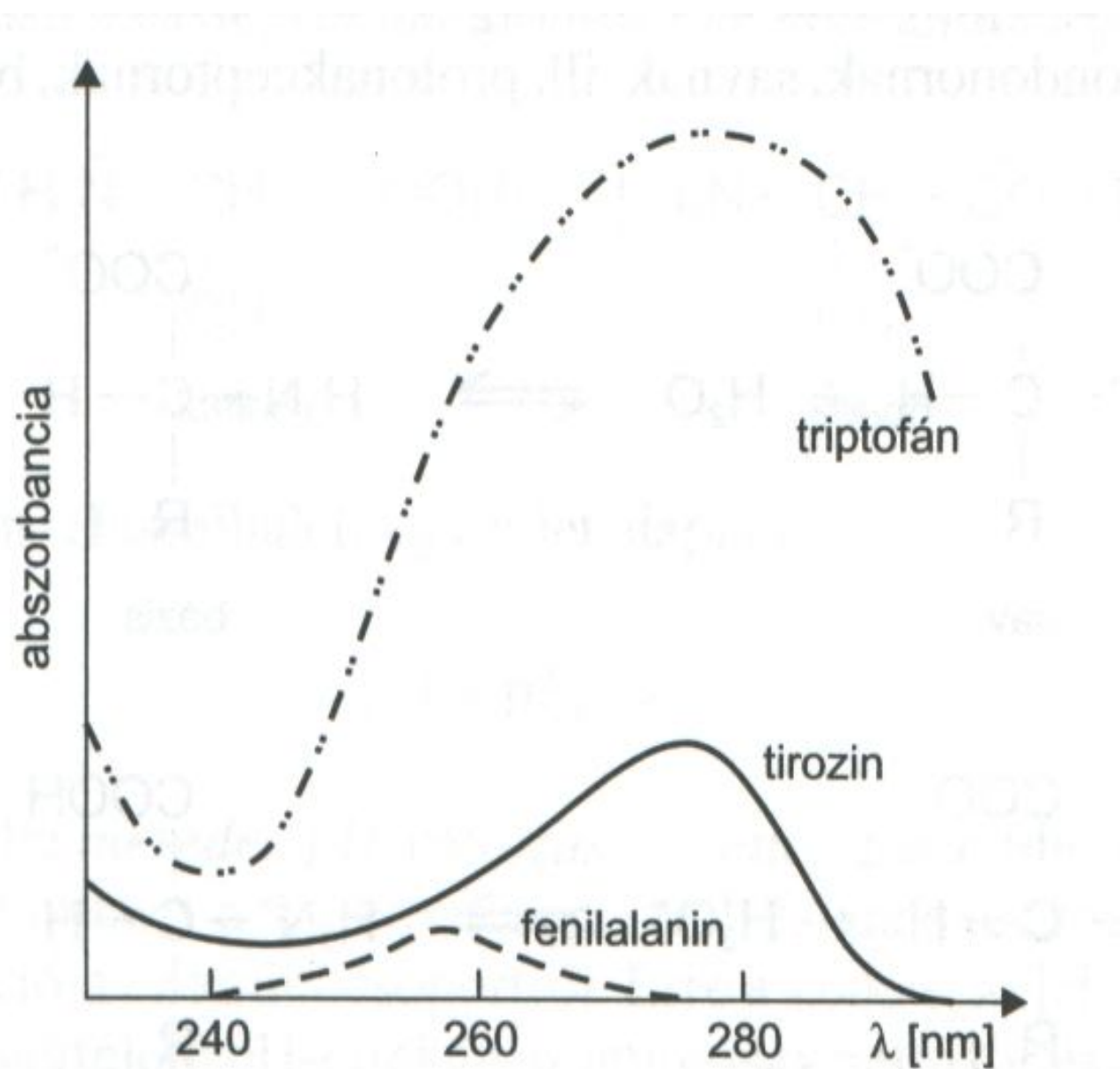


Arginine



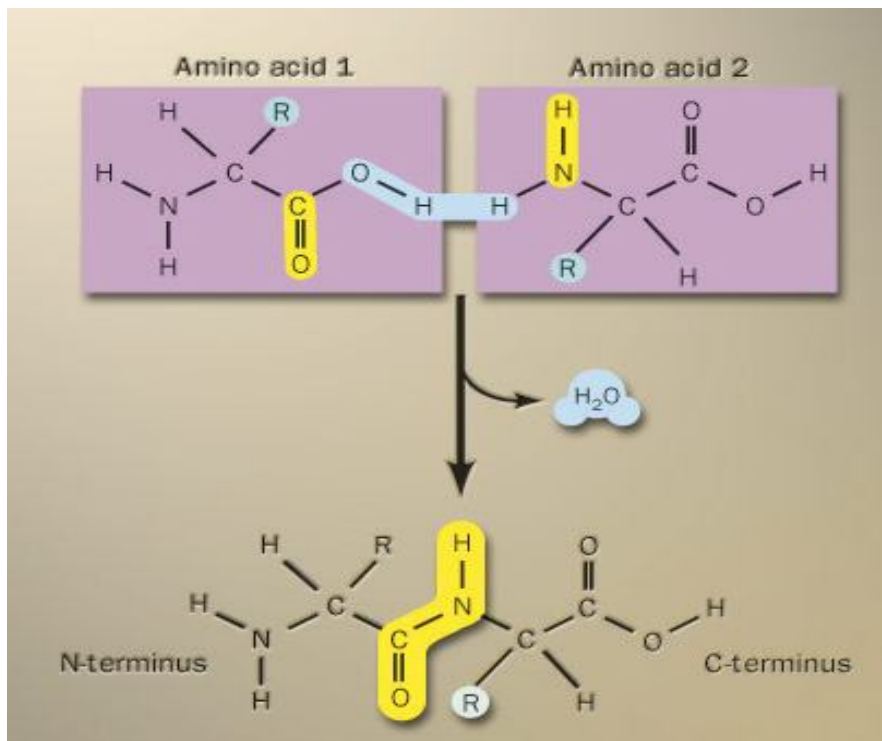
Histidine

Kromofor csoportot tartalmazó aminosavak



Peptid kötés

A peptidek aminosavakból épülnek fel peptidkötéssel. A részt vevő aminosavak száma szerint megkülönböztetünk **dipeptideket** (két aminosav, egy peptidkötés), **tripeptideket** (három aminosav, két peptidkötés), **tetrapeptideket**. Ha a molekulában tíznél kevesebb aminosav található, akkor **oligopeptidekről**, tíznél több aminosav esetében **polipeptidekről** beszélünk. **Fehérjének** akkor nevezzük a polipeptidet, ha az aminosav összetevők száma 100 vagy annál több.



Két aminosavból, például glicinből és alaninból, attól függően, hogy az aminosav vagy a karboxilcsoportjával kapcsolódik az egyik aminosav a másik aminosavhoz, **kétféle dipeptid**, glicil-alanin vagy alanil-glicin **keletkezhet**. E két dipeptid függetlenül attól, hogy mindkettőt ugyanaz a két aminosav alkotja, fizikai és kémiai tulajdonságaikban lényegesen eltér egymástól.

Fehérjék osztályozása alak/oldhatóság szerint

A **globuláris** fehérjéknek a tér egyik irányában sincs kitüntetett méretük, nagyjából gömb alakúak, bennük a polipeptidlánc tömör gombolyaggá gombolyodott össze. Általában olyan, biológiailag aktív, dinamikus funkciókat betöltő fehérjék tartoznak ide, mint például az enzimek és a transzportfehérjék.

A statikus feladatokat betöltő **fibrilláris** fehérjék polipeptidlánca általában megnyúlt, kettesével, hármásával sodort fonalat alkot. Ez utóbbiak vizes közegben rosszul oldódnak vagy oldhatatlanok, szerkezeti, mechanikai vagy védő feladatokat látnak el. Ilyen például a haj, a bőr, a toll, a pata, a köröm fehérjéje, az α -keratin, az inakat alkotó kollagén vagy a selyemlepke által készített fibroin.

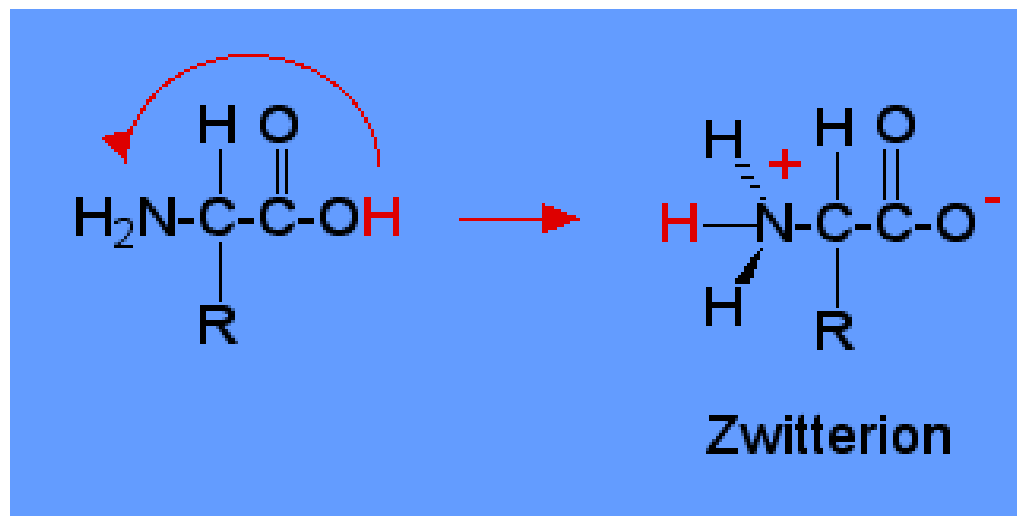
Fehérjék osztályozása biológiai funkció alapján

- Enzimek (katalikus folyamatok)
- Transzportfehérjék (pl. sejthártyáknál)
- Védőfehérjék
- Toxinok
- Hormonok
- Kontraktilis fehérjék
- Struktúrafehérjék
- Tartalékfehérjék (pl. tojás, növények magvai)
- Stb.

Az aminosavak sav-bázis jellege

Az aminosavak ikerionos szerkezetűek, azaz nem egyszerű aminocsoportot és karboxilcsoportot tartalmaznak, hanem pozitív töltésű **ammónium**- és negatív töltésű **karboxilátcsoportot**, a savas karboxilcsoport és a bázikus aminocsoport kölcsönhatása következtében. Tehát ikerionok szilárd halmazállapotban, és vizes oldatban egyaránt. Ezzel magyarázható az, hogy szilárd anyagok és nagyon magas az olvadáspontjuk. Sőt, meg sem olvadnak, hanem az olvadási hőmérsékleten bomlanak. Ugyanakkor jól oldódnak vízben (poláros oldószer), de nem oldódnak apoláros szerves oldószerekben.

- Mindkét funkciós csoport reverzibilisen protonálódhat, ill. deprotonálódhat
- az aminosavak **amfoter** tulajdonsága alakítja ki az **ikerionos** szerkezetet



Az aminosavak sav-bázis jellege

Az aminosavak ún. amfoter tulajdonságú vegyületek, vagyis **amfolitok**: savakkal szemben gyenge bázisként, bázisokkal (lúgokkal) szemben gyenge savként viselkednek. Tehát vizes oldatban egyaránt semlegesítik az erős savak illetve erős bázisok kis mennyiségét, illetve lényegesen tompítják azokat.

Vizes oldatban, egy meghatározott pH értéken, az illető aminosav **izoelektromos pontján** (PI), egyenlő mértékben ionizált az aminosav mindkét csoportja: kifelé semleges, elektromos erőterben ionmigrációt nem mutat (izoelektromos fókuszálás). A legtöbb aminosav izoelektromos pontja közelítőleg semleges pH-nál van. A savas oldalláncú aminosavak izoelektromos pontja savas pH-nál van, a bázikus oldalláncúaké pedig bázikus pH-nál.

Izoelektromos pont

- azt a pH-értéket, ahol az aminosav teljes mennyisége ikerion formában van jelen izoelektromos pontnak nevezzük.
- a Henderson-Hasselbach egyenlet segítségével kiszámíthatók az amino- és karboxilcsoportra jellemző savi disszociációs állandók:

$$pK_s^1 = pK_{COOH} = pH + \log \left[\frac{\text{kation}}{\text{ikerion}} \right] \qquad pK_s^2 = pK_{NH_2} = pH + \log \left[\frac{\text{ikerion}}{\text{anion}} \right]$$

- Az izoelektromos pontot (IP) a pK_{COOH} és pK_{NH_2} értéke határozza meg:

$$IP = \frac{pK_{COOH} + pK_{NH_2}}{2}$$

Fehérjék felépítése, aminosavak

Röv.		Teljes név	Oldallánc típusa	Tömeg	pI
A	Ala	Alanin	hidrofób	89,09	6,11
C	Cys	Cisztein	hidrofób (Nagano, 1999)	121,16	5,05
D	Asp	Aszparaginsav	savas	133,10	2,85
E	Glu	Glutaminsav	savas	147,13	3,15
F	Phe	Fenil-alanin	hidrofób	165,19	5,49
G	Gly	Glicin	hidrofil	75,07	6,06
H	His	Hisztidin	bázikus	155,16	7,60
I	Ile	Izoleucin	hidrofób	131,17	6,05
K	Lys	Lizin	bázikus	146,19	9,60
L	Leu	Leucin	hidrofób	131,17	6,01
M	Met	Metionin	hidrofób	149,21	5,74
N	Asn	Aszparagin	hidrofil	132,12	5,41
P	Pro	Prolin	hidrofób	115,13	6,30
Q	Gln	Glutamin	hidrofil	146,15	5,65
R	Arg	Arginin	bázikus	174,20	10,76
S	Ser	Szerin	hidrofil	105,09	5,68
T	Thr	Treonin	hidrofil	119,12	5,60
V	Val	Valin	hidrofób	117,15	6,00
W	Trp	Triptofán	hidrofób	204,23	5,89
Y	Tyr	Tirozin	hidrofób	181,19	5,64

Fehérjék felépítése

Elsődleges szerkezet: Milyen az egymást követő aminosavak sorrendje, szekvenciája. Az aminosavszekvenciák (aminosavsorrend) a fehérjék elsődleges (primer) szerkezetét határozzák meg .



Másodlagos szerkezet: A másodlagos vagy szekunder szerkezeten a peptidgerinc hidrogénkötések által stabilizált lokális (legalább négy aminosavra kiterjedő) rendezettségét értjük. Ezt a szerkezeti szintet a peptidsíkok egymáshoz képest történő elfordulásával jellemezhetjük. E szerkezeti elemek legfőbb csoportjai a jobb- vagy balmenetes hélixek, a redők, a hurkok és a kanyarok; leggyakoribb az α -hélix, az antiparallel β -redő és a β -kanyar.

Fehérjék felépítése

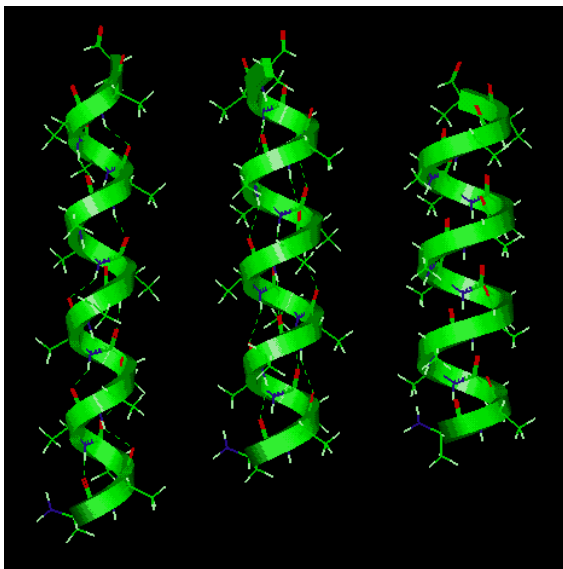
A polipeptid láncok lehetnek fonalas szerkezetűek, és a fonalakon keletkezhetnek periódikusan rendezett szakaszok. A csavarodás következményeként egy jobbra forgató **helix** szerkezet alakul ki. A hélixnek a fehérje belseje felé eső oldalán elsősorban apoláros, a víz felé eső oldalán poláros oldalláncok vannak.

β -redő,

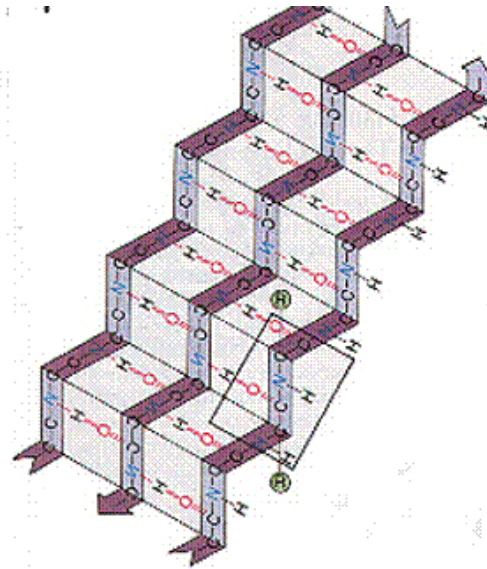
β -kanyar : lehetővé teszik a peptid lánc visszahajlását

Rendezetlen szerkezet (random coil)

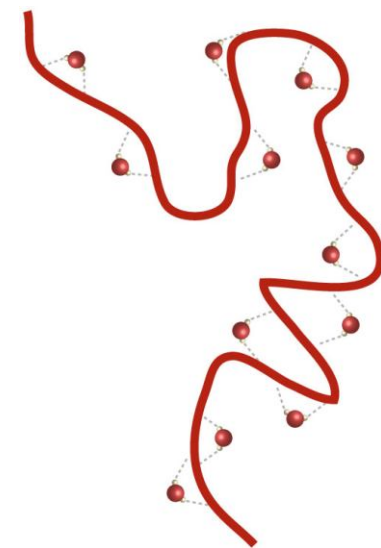
alfa hélix



béta-redő



rendezetlen-régió

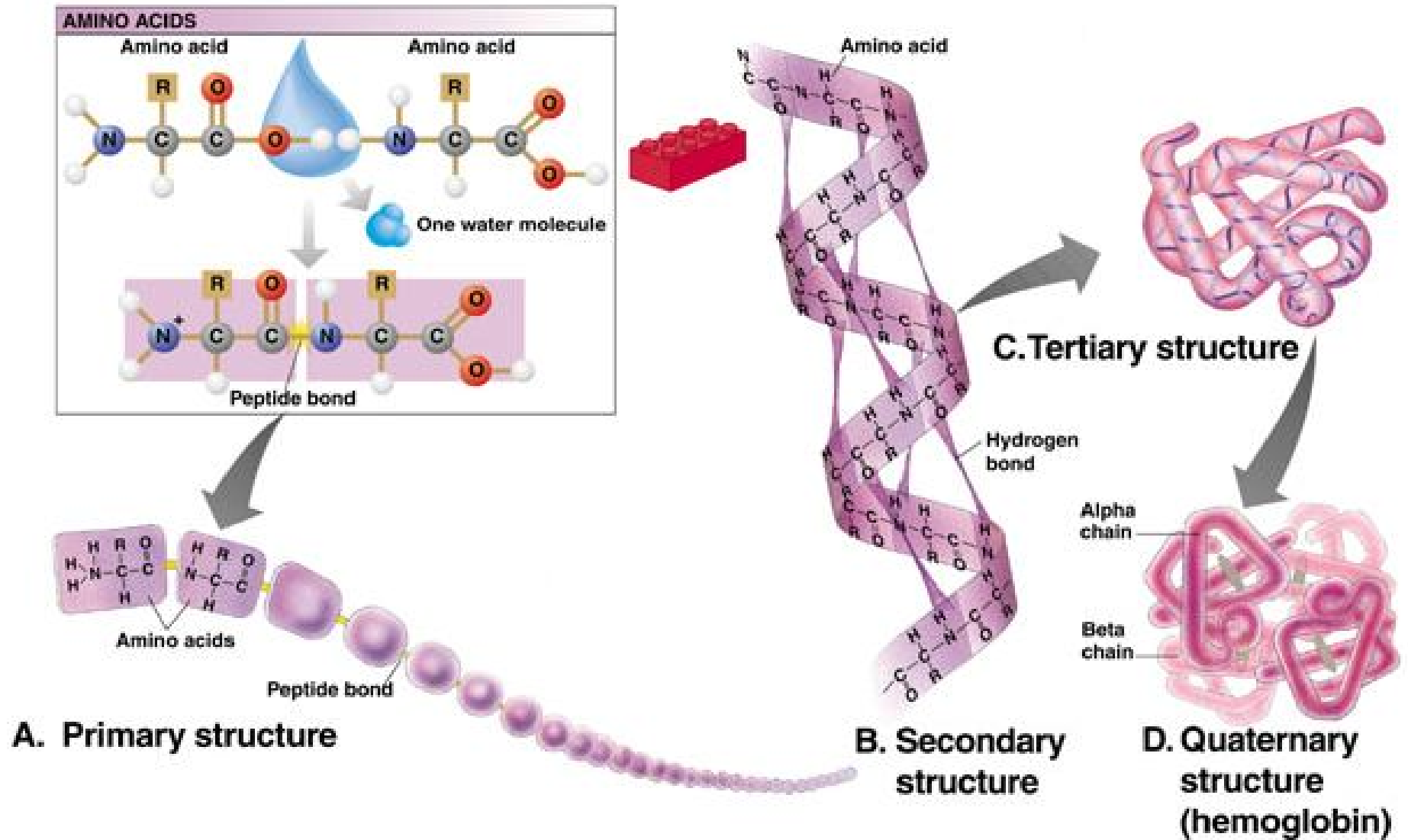


Fehérjék felépítése

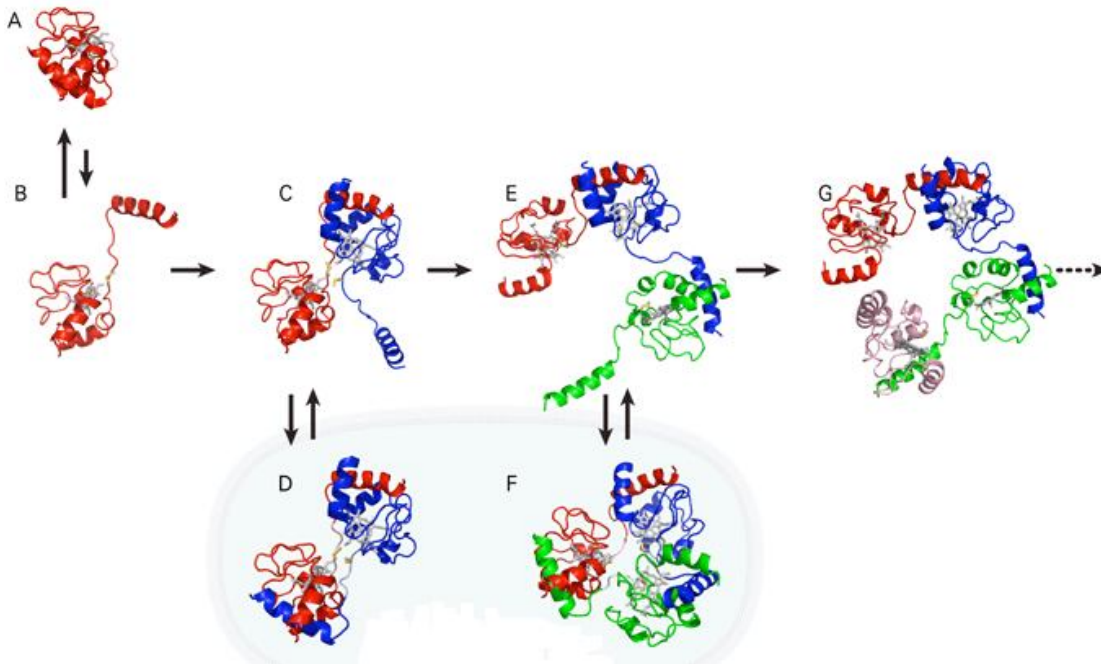
A különböző másodlagos szerkezeti elemek bizonyos arányban megtalálhatók a teljes fehérje szerkezetében.



Tobin/Dusheck, Asking About Life, 2/e
Figure 3.18



Az aggregáció folyamata, következményei



- Kialakulás
 - belső okok (fehérje struktúra)
 - külső okok (közeg, gyártás)
- Biológiai aktivitás csökken, vagy megszűnik
- Mellékhatások
 - Neurodegeneratív betegségek
 - Alzheimer kór
 - Parkinson kór
 - Huntington kór

'Fehérje aggregátum' – A 'Nature' definíciója:

Két, vagy több hibásan feltekeredett fehérje monomer rendellenes összekapcsolódásának eredményeként keletkező nagyobb egység.

Aggregátum típusok, definíció

Csoportosítás

- Reverzibilis / Irreverzibilis
- Kovalens / Nem kovalens
- Oldott állapotban lévő / Oldhatatlan
- Szabad szemmel látható / Szabad szemmel nem látható

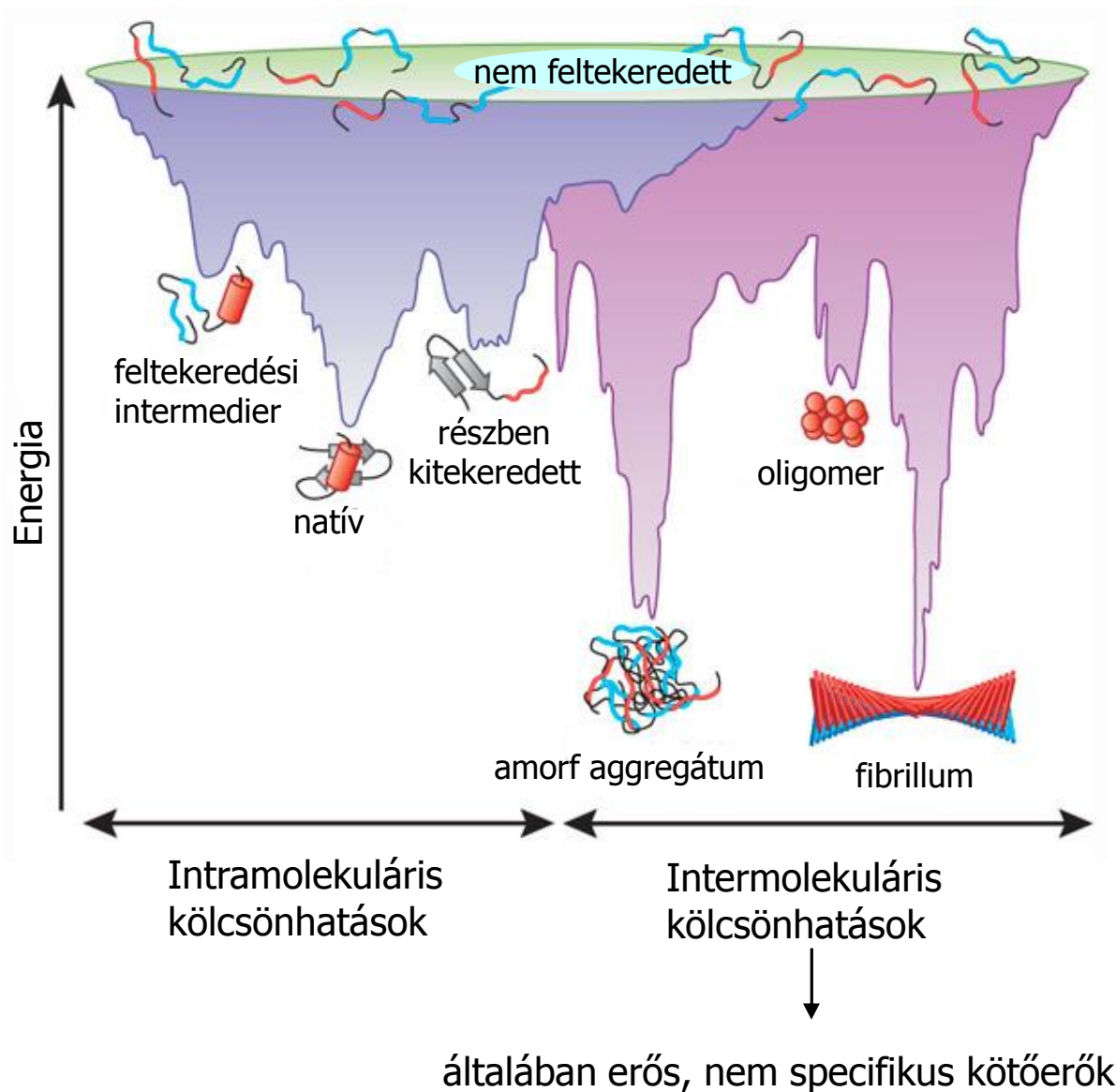
Mit nevezünk újonnan keletkezett aggregátumnak?

Egy javasolt definíció szerint:

Minden, a natív formától eltérő állapotú fehérje, amelynek mérete legalább a natív kétszerese.

A dimerek és trimerek, amelyek megtartják a natívhoz hasonló szerkezetet, nem tekintendők aggregátumnak.

Az aggregátumok kialakulásának magyarázata



Az fizikai aggregáció prekurzorai a részben feltekeredett/kitekeredett intermedierek, mert a natív formánál

- arányaiban a felületen nagyobb hidrofób mintázattal
- fokozottabb flexibilitással
- magasabb diffúziós sebességgel rendelkeznek.

A teljesen feltekeredett/kitekeredett formákban a hidrofób oldalláncok

- vagy a víztől elzárva, a fehérje belsejében található
- vagy véletlenszerűen szétszórva helyezkednek el.

Denaturáció, koaguláció

A fehérjék térszerkezetének olyan megváltozása amely a biológiai aktivitás megszűnését eredményezi **denaturáció**nak nevezzük.

A szerkezeti változás olyan mértékű is lehet, hogy a fehérje kolloid állapotba kerül (kicsapódik) ezt **koaguláció**nak nevezzük.

Mindkét folyamat lehet reverzibilis vagy irreverzibilis.

A fehérje milyen tulajdonságait kell vizsgálni?

Azonosság, azonosítás:

- Elsődleges szerkezet
- Másodlagos szerkezet
- Harmadlagos szerkezet

Tisztaság, bomlási folyamatok:

- Oxidáció
- Deamidáció
- Redukció

Aggregátumok vizsgálata:

- Kis méretű aggregátumok (dimer, trimer)
- Nagy méretű aggregátumok (multimer dissociation)

Poszt-transzlációs módosítások:

- Glikozilálás (O-linked, N-linked)
- Diszulfidhidak helyzete

Segédanyagok:

- Pl. poliszorbátok, PEG

Biológiai aktivitás

Sterilitás

Glikozilálás

A rekombináns fehérjék gyártásánál kulcskérdés, hogy a biológiai aktivitáshoz szükséges szénhidrát részek is megfelelően kialakuljanak. Ez alapvetően meghatározza az alkalmazható organizmus típusát is. Prokariótákat (pl. *E. colit*), amelyek nem képesek glikozilálni, csak olyan egyszerű rekombináns fehérjék gyártásánál használhatunk fel, amelyek nem tartalmaznak szacharidokat (pl. inzulin). Ahol a szénhidrát mintázat pontos reprodukciójára van szükség, ott emlős sejtvonalakat kell alkalmazni.

A cukorrészek az aminosav lánc elkészülte után kerülnek rá a molekulára. Ez csak bizonyos funkciós csoporttal rendelkező aminosavakon lehetséges:

- **N-glikozilálás:** az Asn-X-Ser/Thr/Cys aminosavhármass nitrogénjén, ahol X bármely aminosav lehet.
- **O-glikozilálás:** Ser vagy Thr-on.

A két glikozilálás más biokémiai mechanizmussal történik, más helyen a sejten belül.

Analitikai módszerek, technikák

Kromatográfia:

- Méretkizárás (SEC, GPC)
- Ioncsere (IEX)
- Fordított fázis (RP-HPLC)
- Hidrofil kölcsönhatás (HILIC)
- Hidrofób kölcsönhatás (HIC)

Elektroforézis:

- Gél vagy kapilláris
- SDS-poliakrilamid gél-elfo (SDS-PAGE)
- Izoelektromos fókuszálás (IEF)

Spektrofotometriás módszerek:

- Fluoreszcencia (FL)
- Cirkuláris dikroizmus (CD)
- Ultraibolya-látható (UV-VIS)
- Infravörös (IR, NIR), Raman

Tömeg spektrometria:

- MALDI-TOF (MS-MS)
- HPLC-MS
- CE-MS

Kombinált technikák:

- Fényszórás + fluoreszcencia + UV
- CE + LIF
- HPLC + CD
- Kétdimenziós kromatográfia

Analitikai módszerek, technikák

A módszerek kiegészítik egymást, együtt kell alkalmazni őket, hogy a fehérje minél több tulajdonságát megismerjük!

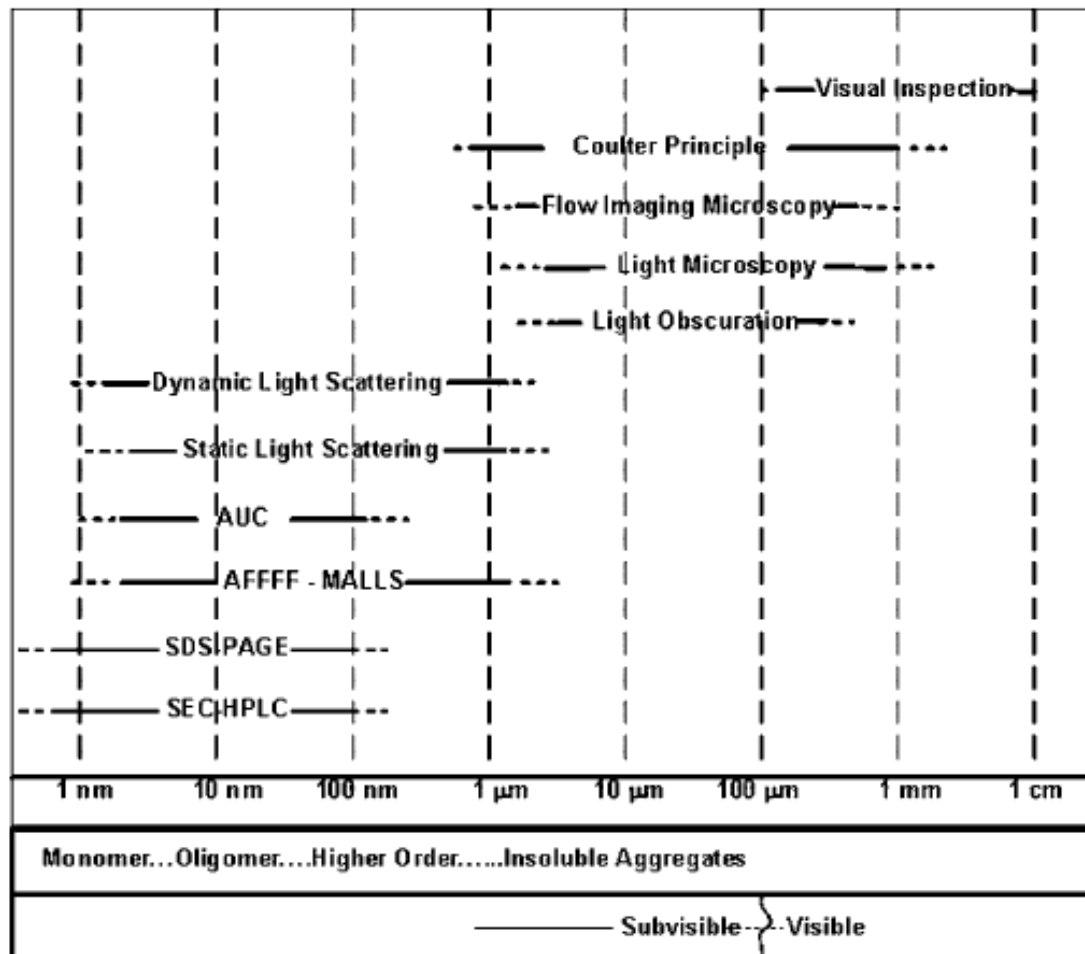
Példa: egy „minimum kör” fehérje analízis

- 1) SDS-PAGE redukáló és nem redukáló:** tömeg, aggregátumok, diszulfid hidak megléte (mass heterogeneity)
- 2) RP-HPLC, natív fehérje:** fehérje eredetű bomlástermékek? Oxidáció, aggregáció, dimerek (related proteins)
- 3) RP-HPLC, emésztett fehérje:** fehérje elsődleges szerkezete (peptide mapping)
- 4) RP-HPLC, savasan hidrolizált fehérje:** aminosav összetétel (amino acid analysis)
- 5) IEX-LC:** deamidáció, töltés heterogenitás (charge heterogeneity)
- 6) SEC:** nagy méretű aggregátumok vizsgálata
- 7) CD:** másodlagos szerkezet
- 8) Fluoreszcencia:** harmadlagos szerkezet, aggregátumok

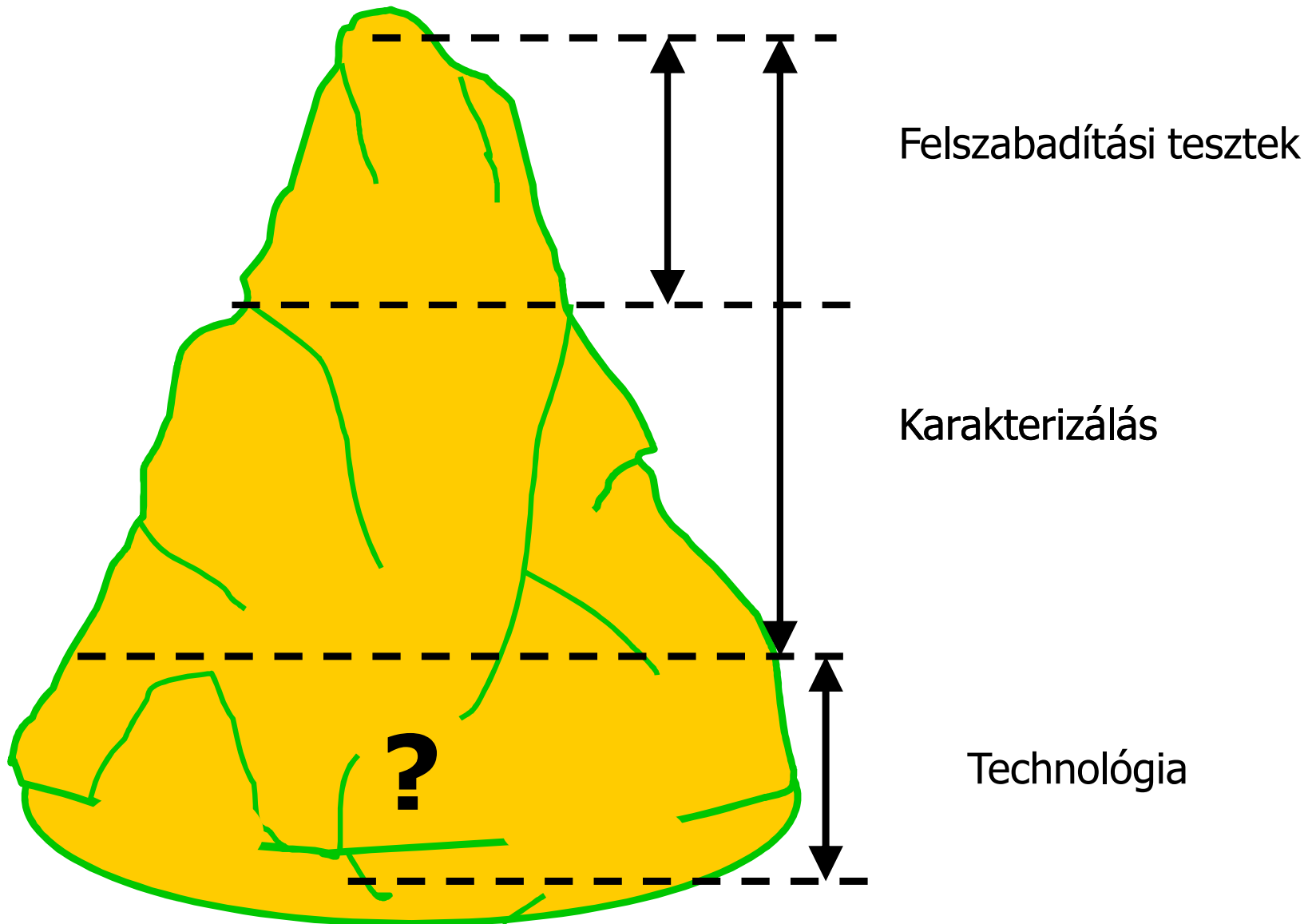
Analitikai módszerek, technikák

Egy fajta tulajdonságot több un. független (vagy ortogonális) módszerrel is mérhetünk (vagy mérni kell).

Például aggregátumok vizsgálata:



A jéghegyből mennyit látunk?

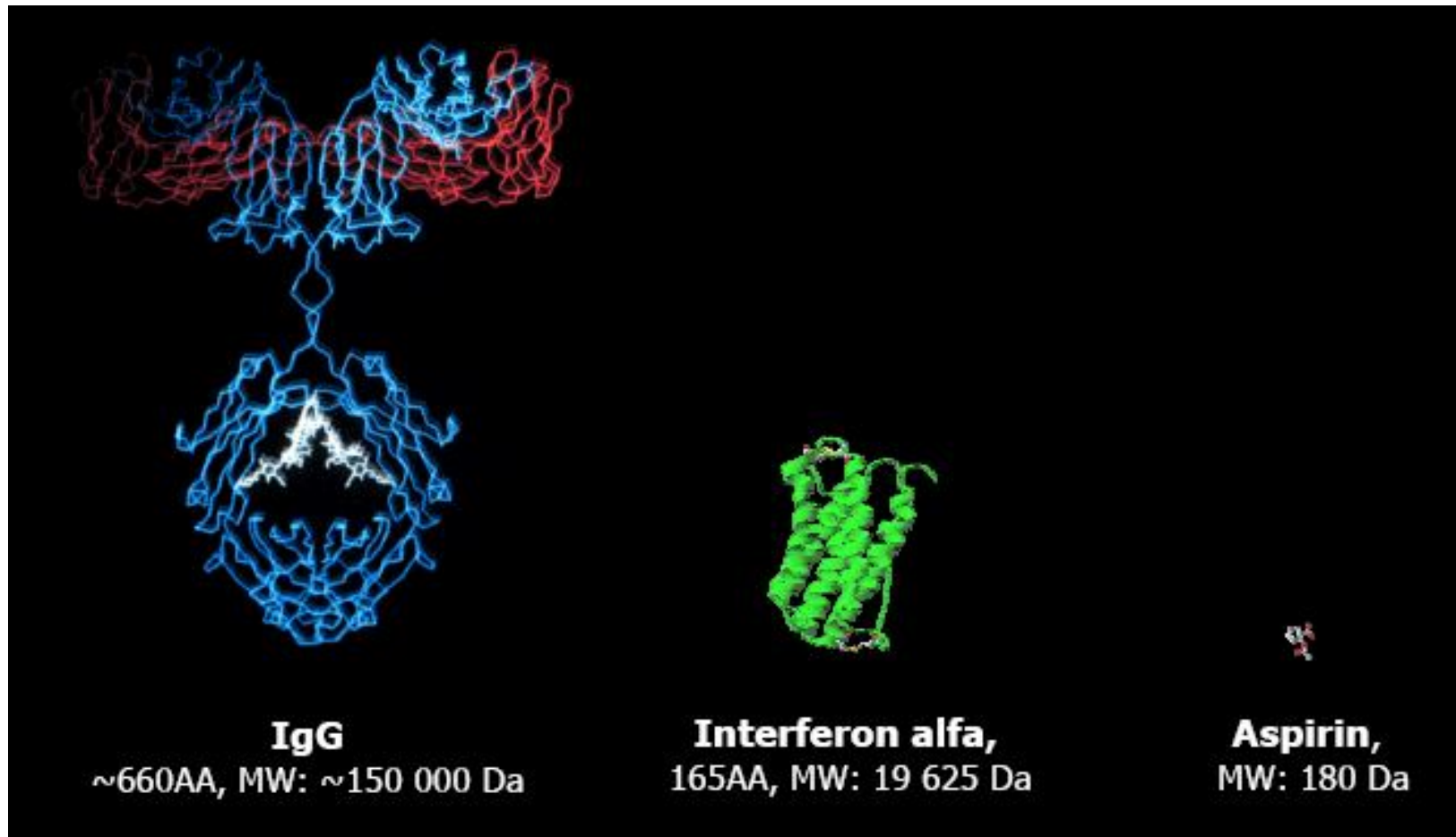


RP-HPLC (UHPLC)

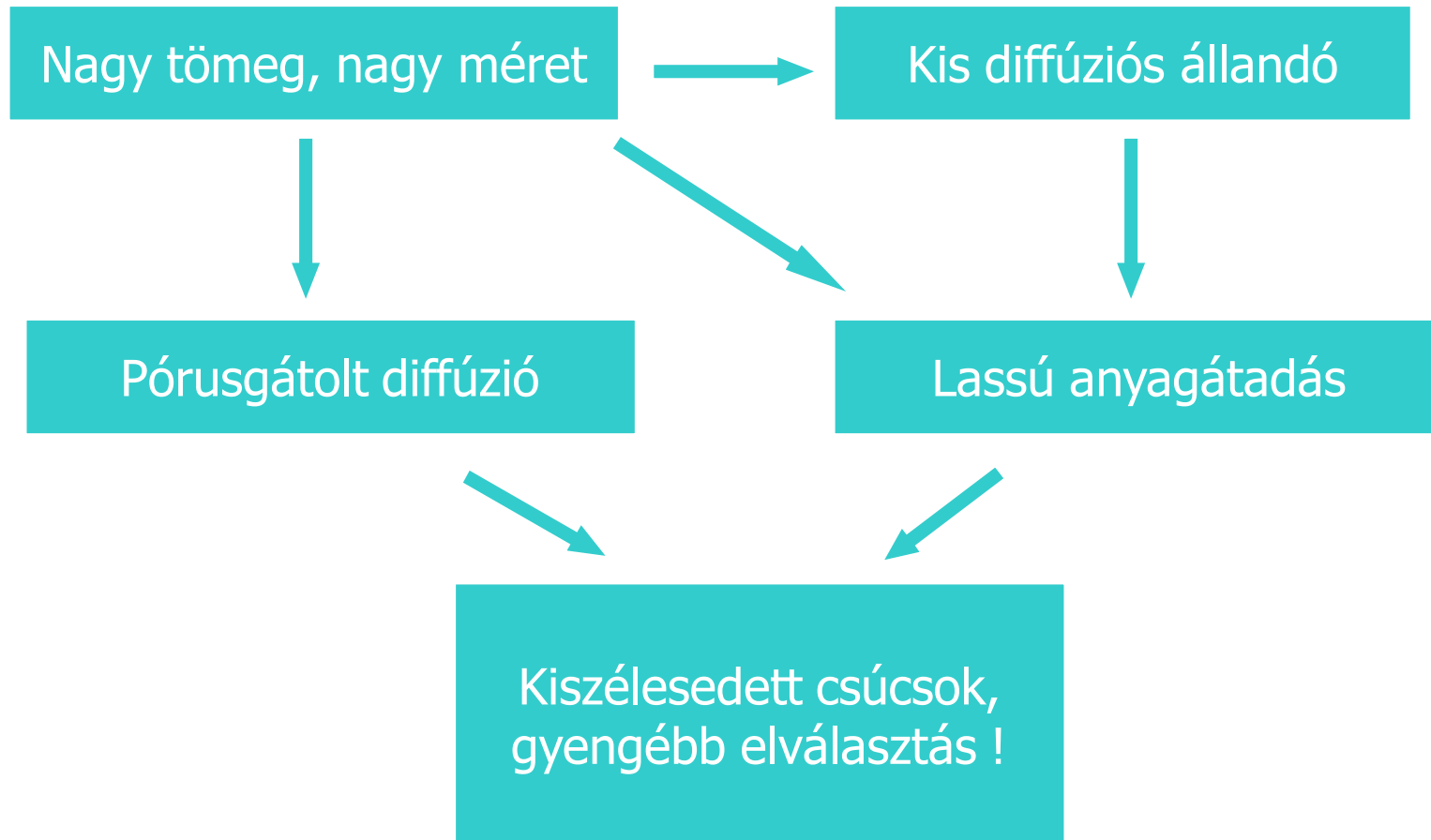
Fordított-fázisú folyadékkromatográfia



Eltérések a „kismolekulás” elválasztáshoz képest



Eltérések a kismolekulák kromatográfiás viselkedéséhez képest



A kromatográfia kinetikus elmélete

van Deemter egyenlet (tapasztalati összefüggés):

$$H = A + B/u + C \cdot u$$

H : elméleti tányérral ekvivalens oszlopmagasság $= L/N$

u : mozgófázis lineáris sebessége

A, B, C : állandók

A : az oszlop geometriájának hatása

B : longitudinális diffúzió

C : anyagátadással szembeni gátlás hatása

A tányérok olyan térfogati elemek, ahol az álló és mozgófázis között pillanatszerűen beáll az egyensúly, mielőtt az anyag tovább menne. A mozgófázis szakaszosan megy egyik tányérról a másikra. A kinetikai hatékonyság mérőszáma, a csúcsszélességet jellemzi.

Anyagátadási folyamat, diffúziós állandó

Diffúzió a pórusokon belüli stagnáló folyadékban (állófázis járulék):

$$H_p = \frac{\Theta(k_0 + k + k_0k)^2 d_p^2 v}{30 D_p k_0 (1 + k_0)^2 (1 + k)^2}$$

Θ : pórusszerkezetre jellemző tényező

k_0 : részecskén belüli térfogat viszonyítva a részecskék közti térfogathoz

v_e : részecskék közti mozgófázis sebessége

k : visszatartási tényező

D_p : pórusbeli diffúziós együttható

Örvénydiffúziós tag Giddings szerint:

$$H_{f,eddy} = \frac{2\lambda d_p}{1 + \frac{w D_m^{1/3}}{d_p^{1/3} u^{1/3}}}$$

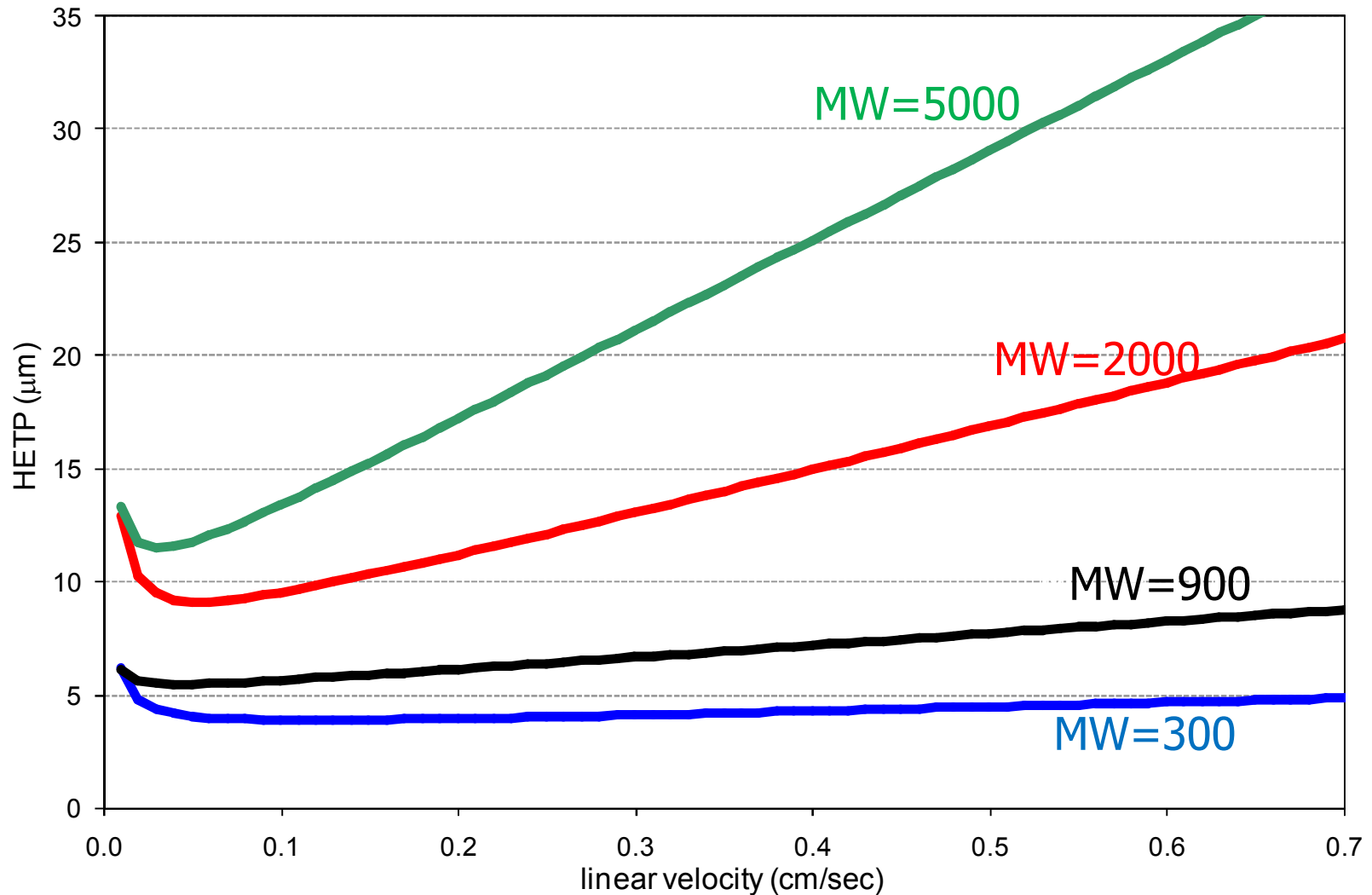
λ : töltési tényező

d_p : szemcseátmérő

w : a kolonna töltésére jellemző állandó

D_m : a komponens diffúziós állandója a mozgó fázisban

Anyagátadási folyamat, diffúziós állandó



Anyagátadási folyamat, diffúziós állandó

Wilke–Chang korreláció:

$$D_M = \frac{A(\psi \cdot M)^{1/2} T}{\eta V^{0.6}}$$

A: konstans

Ψ : oldószertől függő állandó (1-3 között)

T: hőmérséklet

η : viszkozitás

V: a komponens moláris térfogata

Young korreláció:

$$D_M = 3,45 \cdot 10^{-4} \cdot M V^{-0,564}$$

$$V = f(T)$$

Schroder – Lebas szerint


$$D \sim T$$

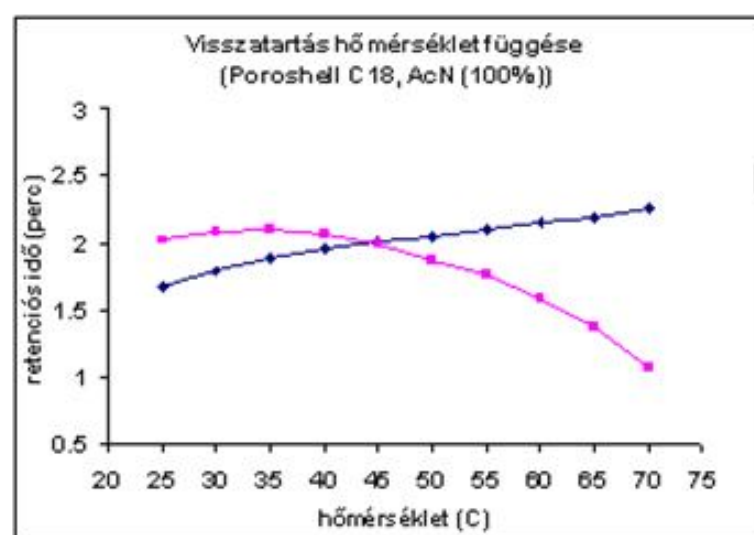
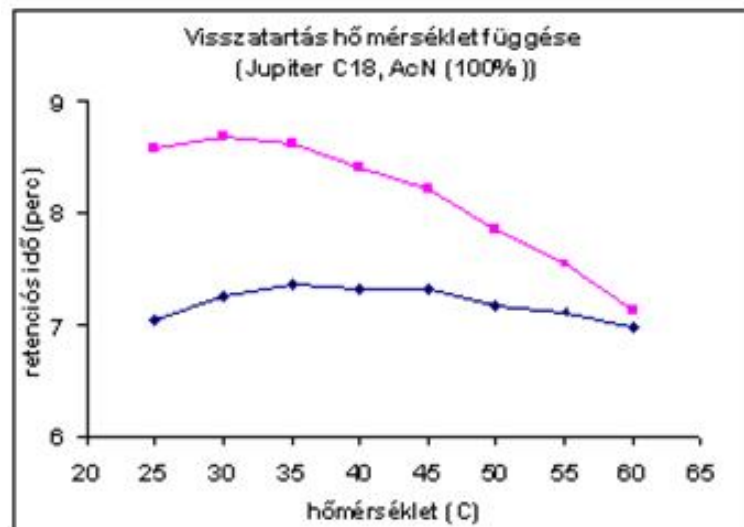
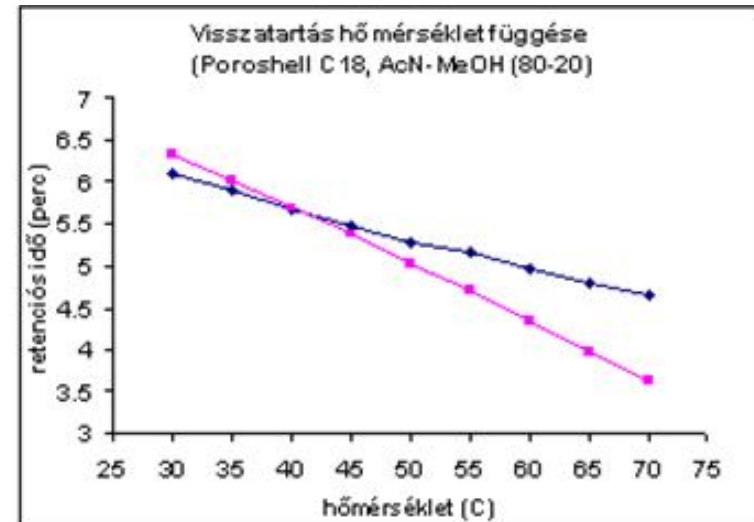
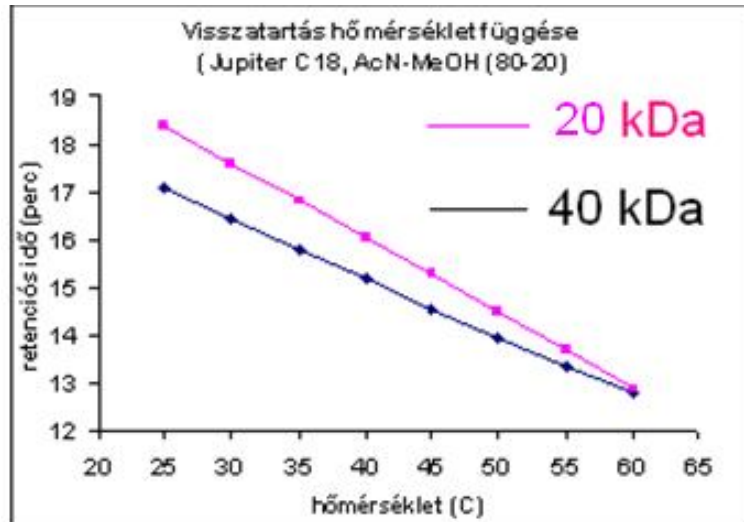
A hőmérséklet emelésével az elválasztás minősége drasztikusan javítható!

Hőmérséklet emelés hatása

- Csökken a mozgófázis viszkozitása
- Nő a diffúziós állandó
- A mérendő komponens és az állófázis közötti kölcsönhatások erőssége csökken
- Változik a visszatartás (nem van't Hoff szerűen!)
- Változik a szelektivitás
- Az analízis idő is csökkenthető!

Szelektivitás, visszatartás változása

Gradiens elúció, fehérjék (makromolekulák):



Héjszerkezetű szemcsék és magas hőmérséklet: 1995

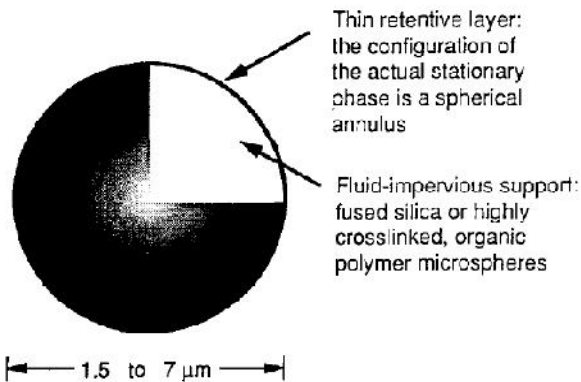


Fig. 3. A schematic illustration of the pellicular stationary phase configuration.

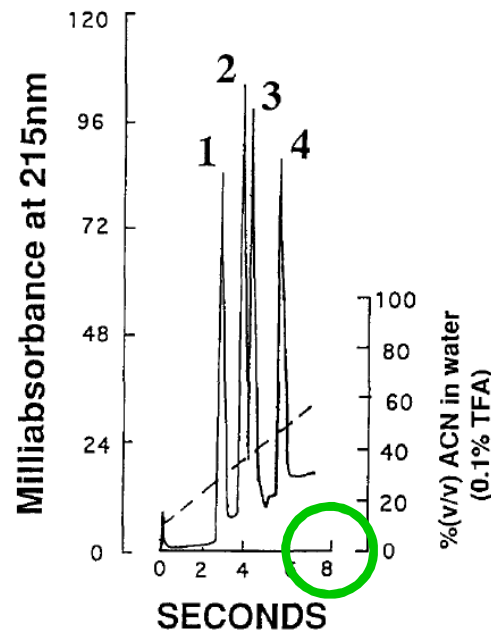


Fig. 4. Rapid separation of standard proteins. Column, 30×4.6 mm, packed with $2\text{-}\mu\text{m}$ pellicular ODS-silica; 12 s linear gradient from 10 to 90% (v/v) acetonitrile (ACN) in water containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA); temperature, 120°C ; flow-rate, 5 ml/min; column inlet pressure, 240 bar. Peaks: 1 = ribonuclease A; 2 = cytochrome c; 3 = lysozyme; 4 = β -lactoglobulin B. From Ref. [42].

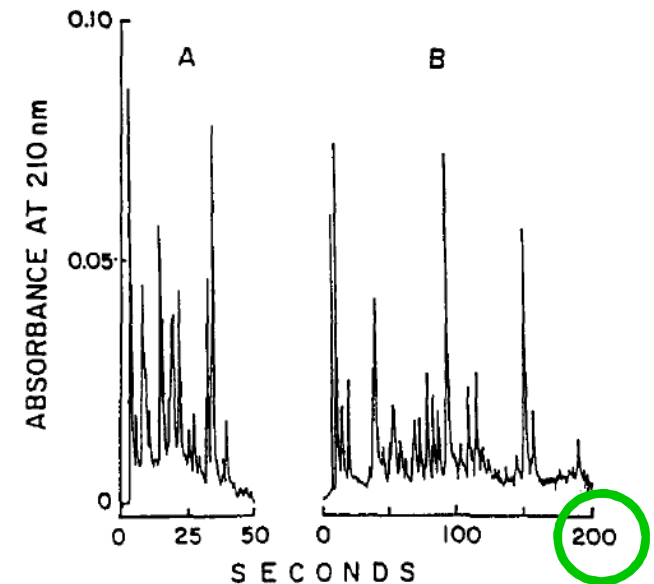
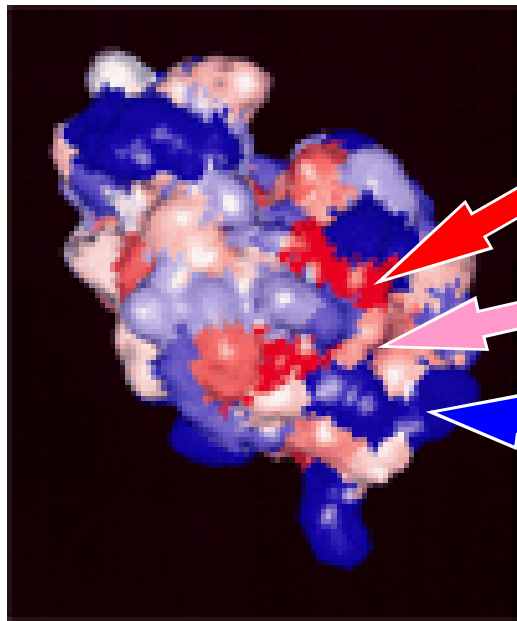


Fig. 5. Chromatographic profiles of tryptic digests of (A) β -lactoglobulin A and (B) methionyl human growth hormone. Column, 30×4.6 mm, packed with $2\text{-}\mu\text{m}$ pellicular ODS-silica; linear gradient from 0 to 95% (v/v) acetonitrile in water containing 0.1% (v/v) TFA in (A) 2 min at 5 ml/min and (B) 6 min at 4 ml/min; temperature, 80°C ; samples, $5\ \mu\text{g}$ of protein digest each. From Ref. [39].

Az elválasztás alapja

Mit is látunk?

Az elválasztás alapja a hidrofóbicitás!



Leghidrofóbabb helyek

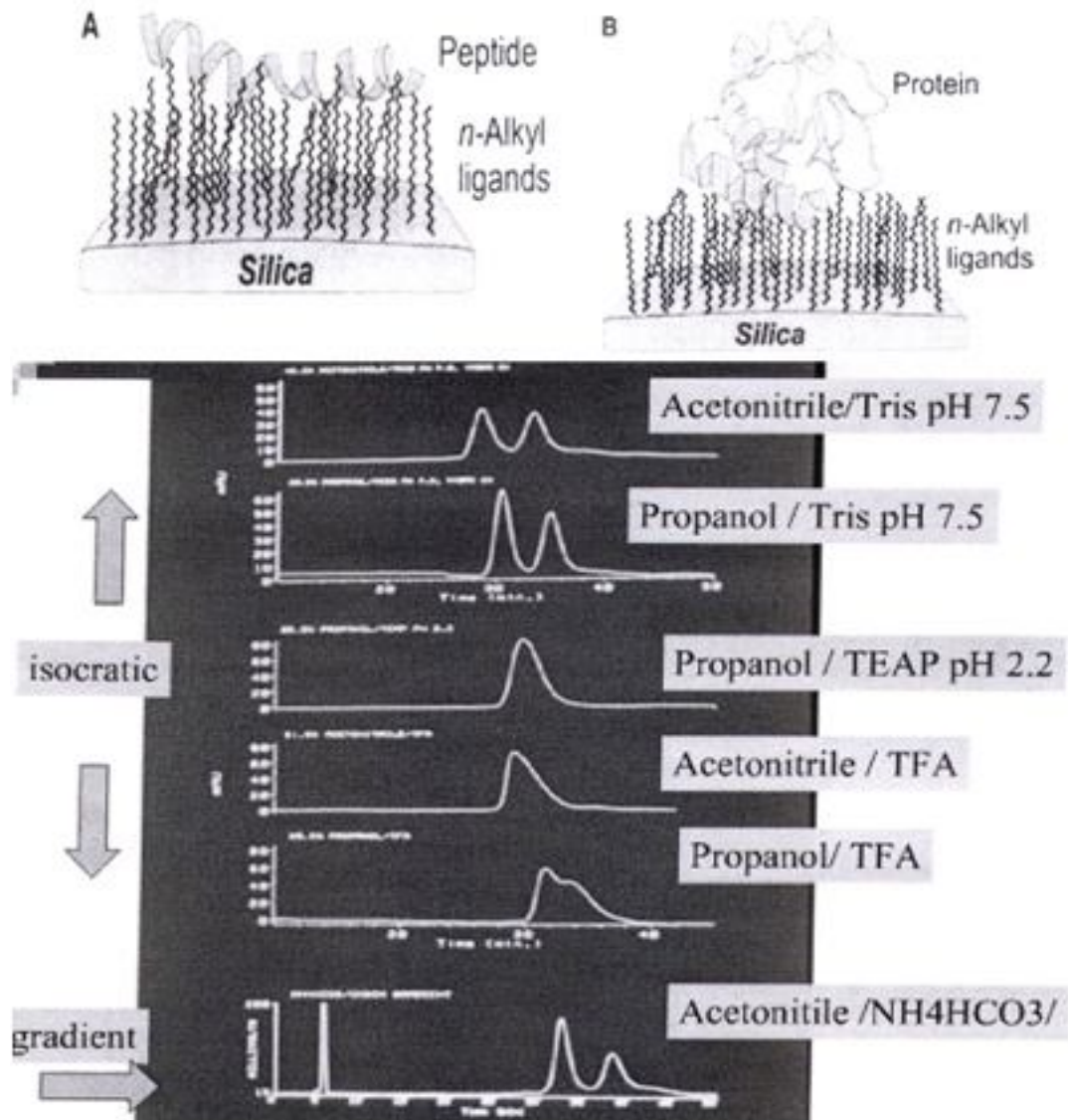
Közepesen hidrofób helyek

Leghidrofilebb helyek

Lizozim

A mozgófázissal elsősorban a fehérje harmadlagos és negyedleges szerkezetét befolyásoljuk. Ennek következtében tudjuk változtatni az állófázissal létrejövő hidrofób kölcsönhatások erejét.

Az elválasztás alapja

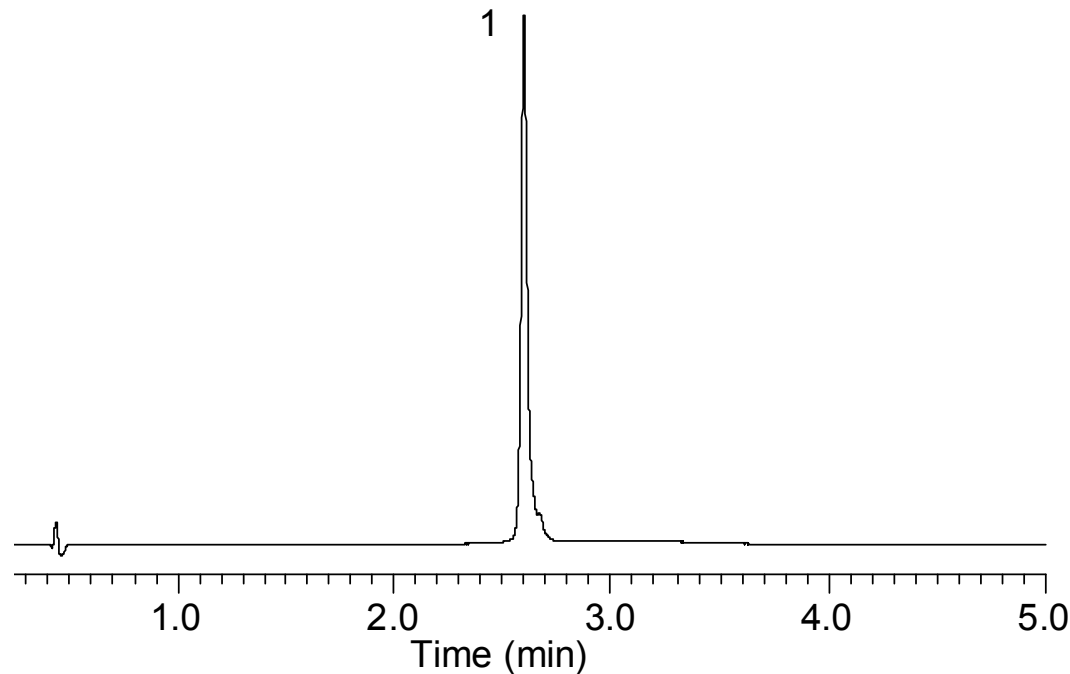


Mire alkalmas az RP-HPLC

- Fehérje eredetű szennyezők (gyártástechnológia eredetű)
- Fehérje eredetű bomlástermékek (oxidáció, redukció, deamidáció)
- Aggregátumok (dimer)
- Variabilitás, természetes heterogenitás
- Peptid térkép, fragmens térkép, könnyű- és nehézláncok
- Diszulfid hidak felderítése
- Segédanyagok, nem fehérje eredetű szennyezések

Hatóanyag-tartalom meghatározás

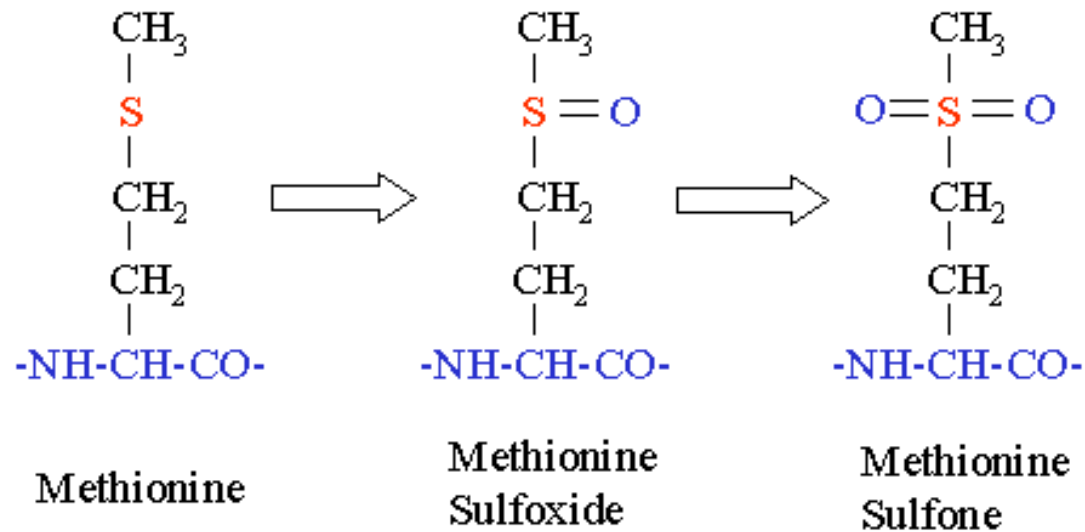
Példa: IG1 MAb, nagy pórusú (300Å) $d_p < 2 \mu\text{m}$ fázison, magas hőmérsékleten ($T=80 \text{ }^\circ\text{C}$)



Magas hőmérsékleten ($T > 75 \text{ }^\circ\text{C}$), megfelelően meredek gradienssel a 150 kDa MAb-ok is éles csúccsal eluálódnak.

Fehérjék fő oxidációs folyamata 1

Metionin oxidáció

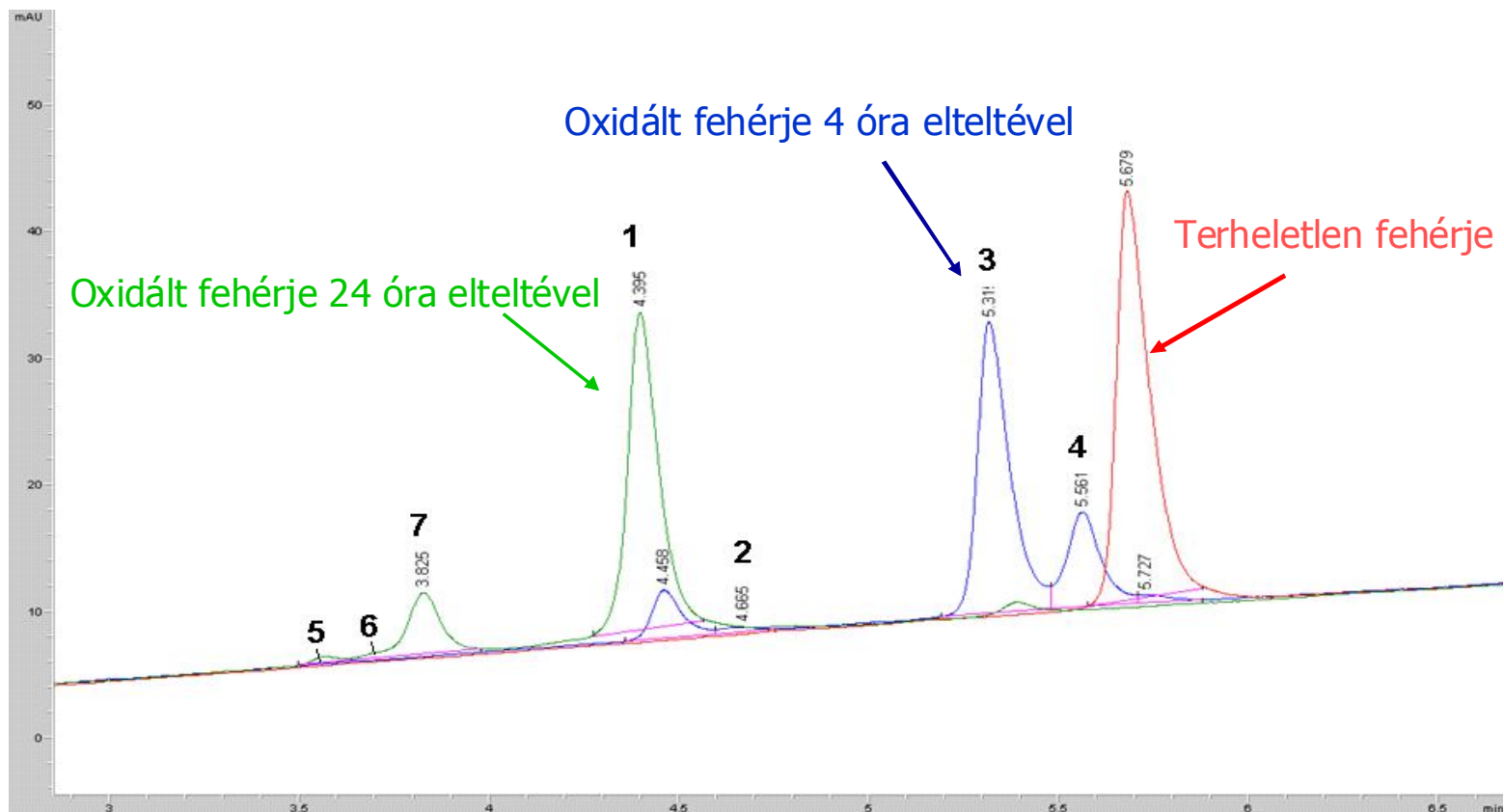


Megváltozik a fehérje mérete (tömege), alakja és polaritása.
Ez a változás jó eséllyel kimutatható fordított fázison.

Fehérjék fő oxidációs folyamata 2

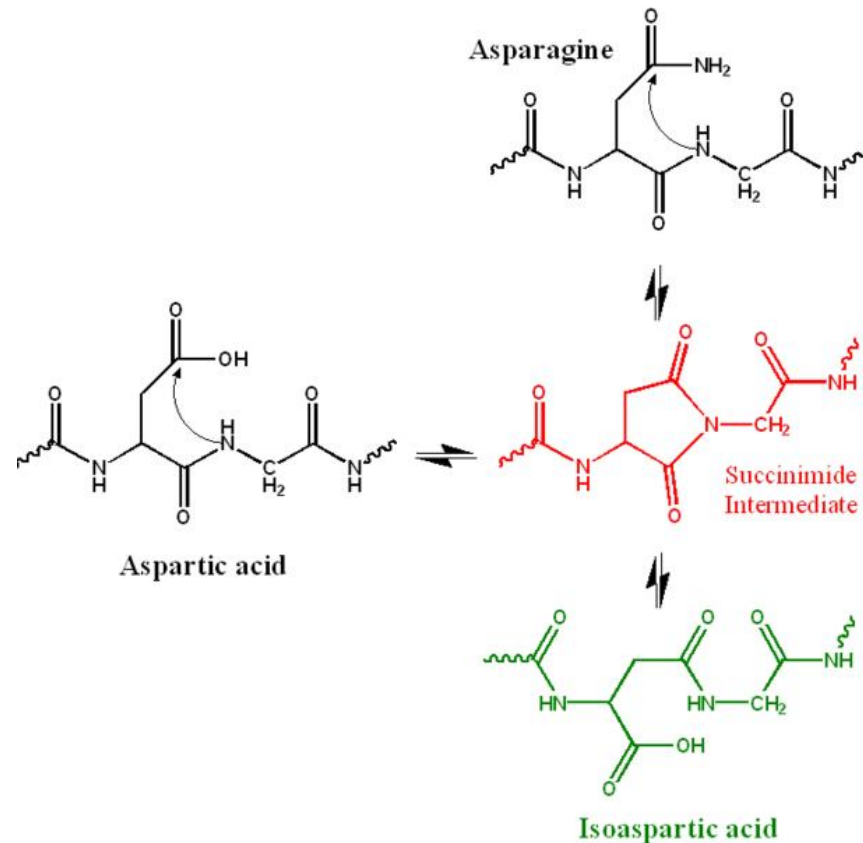
Metionin oxidáció követése

Példa: Egy 40 kDa fehérje 5 metionint tartalmaz amelyek közül 3 hajlamos az oxidációra. Kettő gyorsan a harmadik lényegesen lassabban oxidálódik. A reakció időfüggése jól követhető gyors-kromatográfiás elválasztással.



Deamidálódás folyamata 1

Aszparagin és glutamin deamidálódás



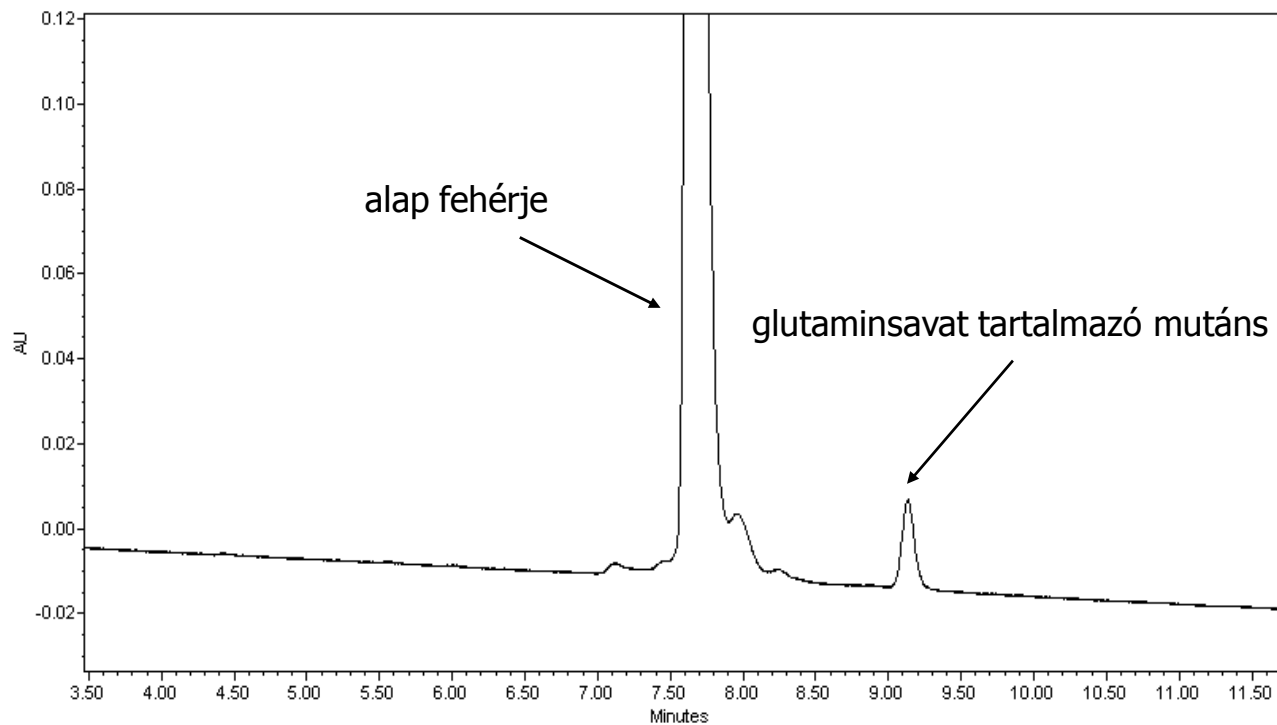
Szabad karboxilcsoport keletkezik, megváltozik a polaritás és hidrofóbicitás.

pH és/vagy hőmérséklet emelés hatására játszódik le.

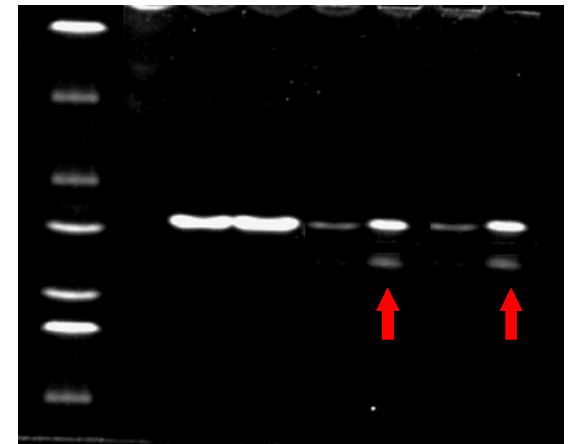
Deamidálódás folyamata 2

Példa: Egy 20 kDa fehérje 1 glutaminját glutaminsavra cseréljük (QxxxE).

Jól kimutatható a deamidálódás (sub-2 μm -es tölteten (1,7 μm), magas hőmérsékleten (85°C))

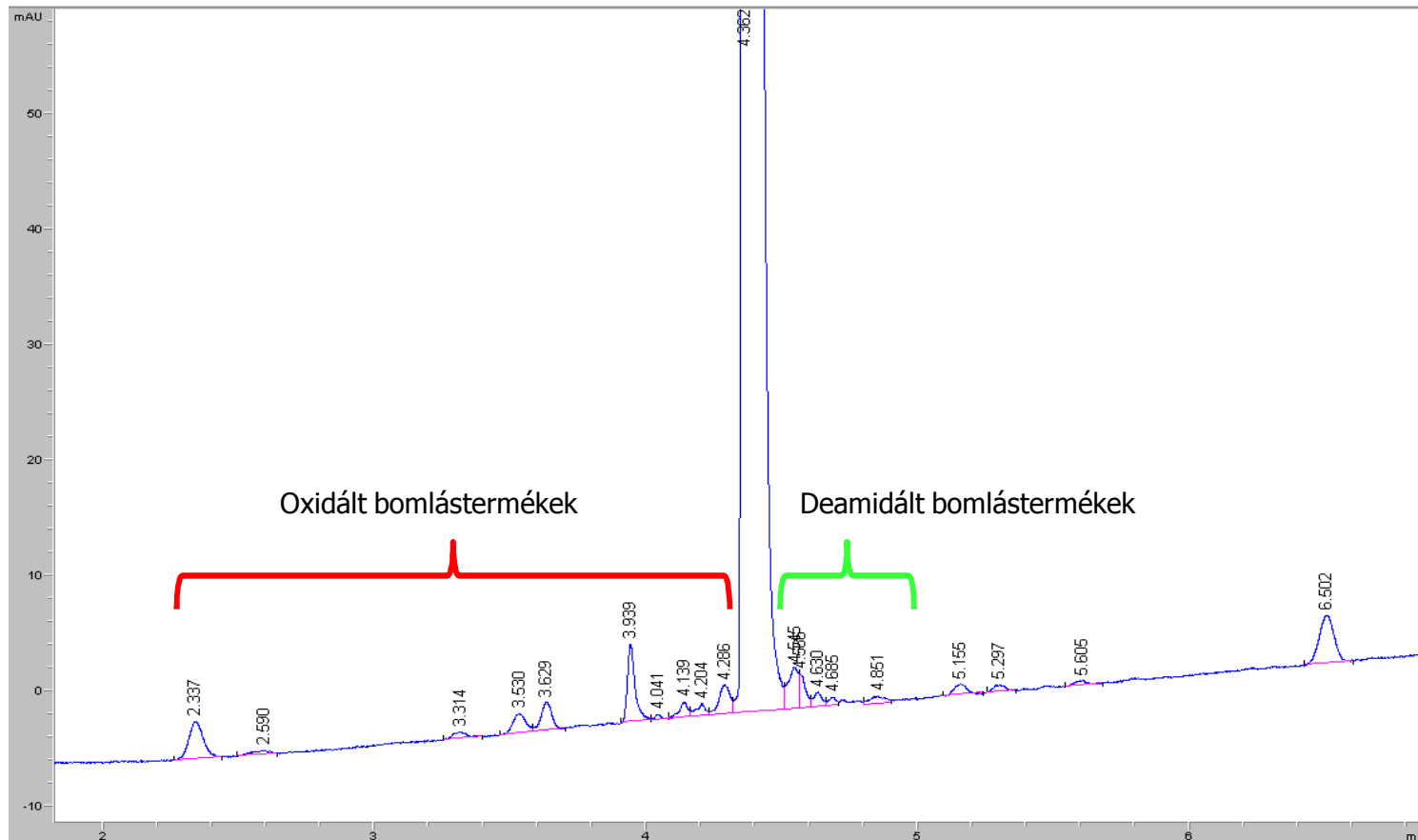


Gél IEF (pH = 5-7)



Fehérje eredetű szennyezők/bomlástermékek

Példa: 5 kDa fehérje, közepes pórusú (175Å) 1,9 µm fázison, emelt hőmérsékleten (T=65 °C)





Peptid térkép (Peptide Map)

A nagy méretű fehérjét specifikus enzimekkel – megfelelő körülmények között – peptidekre hasítjuk. Ezt követően a peptidek jól elválaszthatók fordított fázisú kromatográfiával. Ez esetben a fehérjét felépítő aminosavak sorrendjéről, a fehérje azonosságáról kapunk információt.

Proteases for Use in Peptide Mapping			
Protease	Final Conc. (µg/ml)	pH optimum	Specificity
Trypsin	5-20	7-9	Arg, Lys
Papain	10-20	6-7	Arg, Lys, Gln, His, Gly, Tyr
Chymotrypsin	50-100	7-8	Aromatic
Elastase	50-100	7-9	Uncharged Aliphatic
<i>Staph. Aureus</i> ProteaseV8	50-100	4-8	Asp, Glu


Adatbázisok

Példa: Peptide Cutter



 EXPASY Proteomics Server

Databases Tools Services Mirrors About Contact

You are here: EXPASY CH > Tools > Other prediction tools > PeptideCutter



The sequence to investigate:

10
20
30
 FVNQHLGSH LVEALYLCVG ERGFFYTPKA GIVEQCCA

The sequence is 38 amino acids long.

These enzymes cleave the sequence:

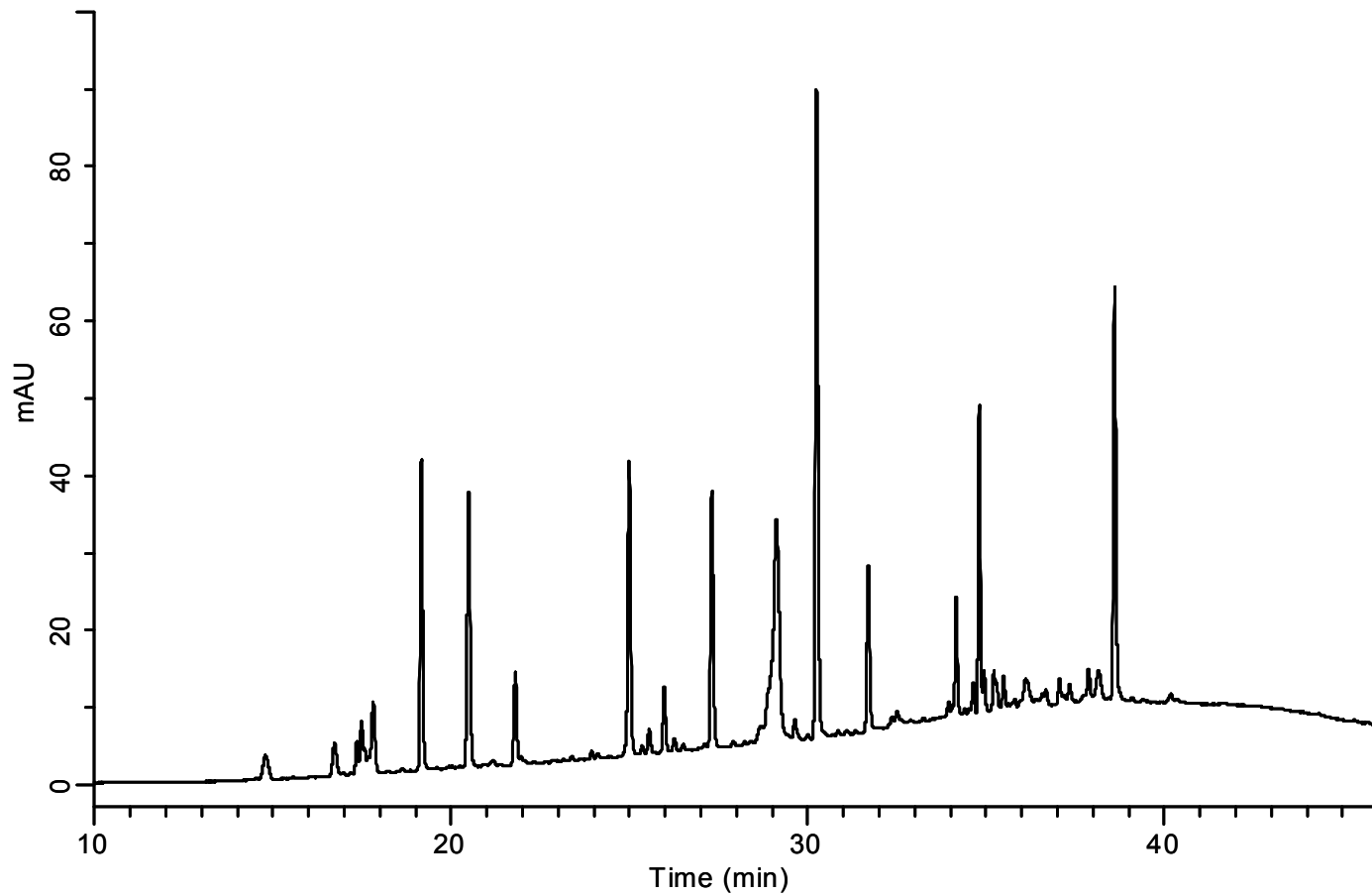
Name of enzyme	No. of cleavages	Positions of cleavage sites
Arg-C proteinase	1	22
Asp-N endopeptidase + N-terminal Glu	3	12 20 33
Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P)	5	1 16 24 25 26
Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	11	1 5 6 10 11 15 16 17 24 25 26
Clostripain	1	22
Glutamyl endopeptidase	3	13 21 34
LysC	1	29
LysN	1	28
NTCB (2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid)	4	6 17 35 36
Pepsin (pH1.3)	14	1 5 6 10 11 14 15 15 16 16 17 23 25 25
Pepsin (pH>2)	11	1 5 6 10 11 14 15 16 17 23 25
Proteinase K	18	1 2 6 11 12 14 15 16 17 19 24 25 26 27 30 32 33 38
Staphylococcal peptidase I	3	13 21 34
Thermolysin	13	1 5 10 11 14 16 18 23 24 29 31 32 37
Trypsin	2	22 29

These chosen enzymes do not cut:

Peptid térkép

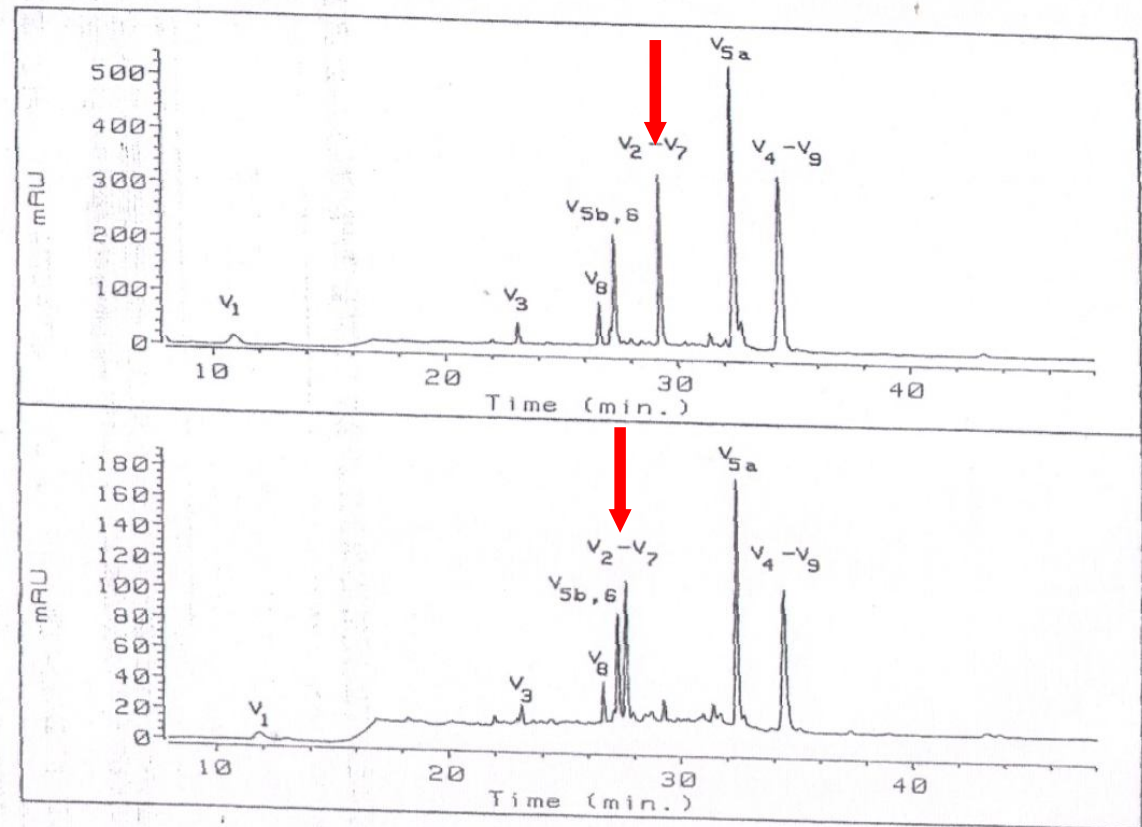
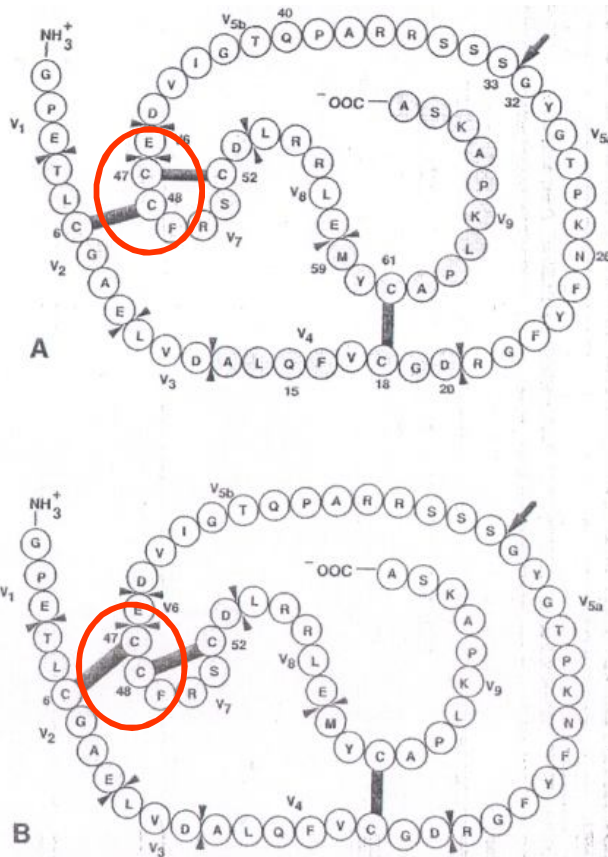
Egy 40 kDa fehérje emésztése (Endo-Glu-C enzimmal)

Glutaminsavnál és aszparaginsavnál történő hasítás

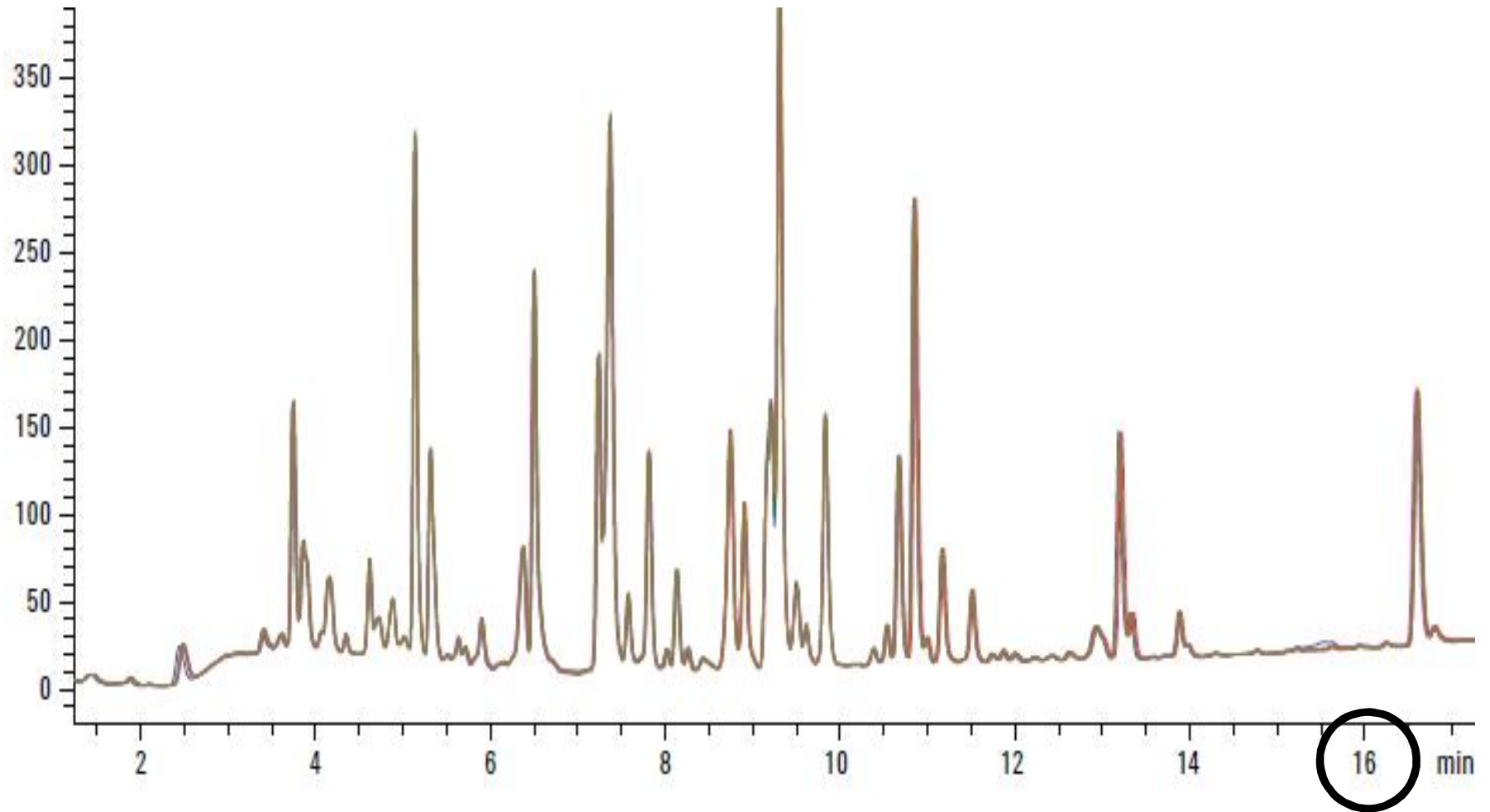


Peptid térkép, diszulfid hidak felderítése

IGF-I fehérje emésztése V₈ proteázzal

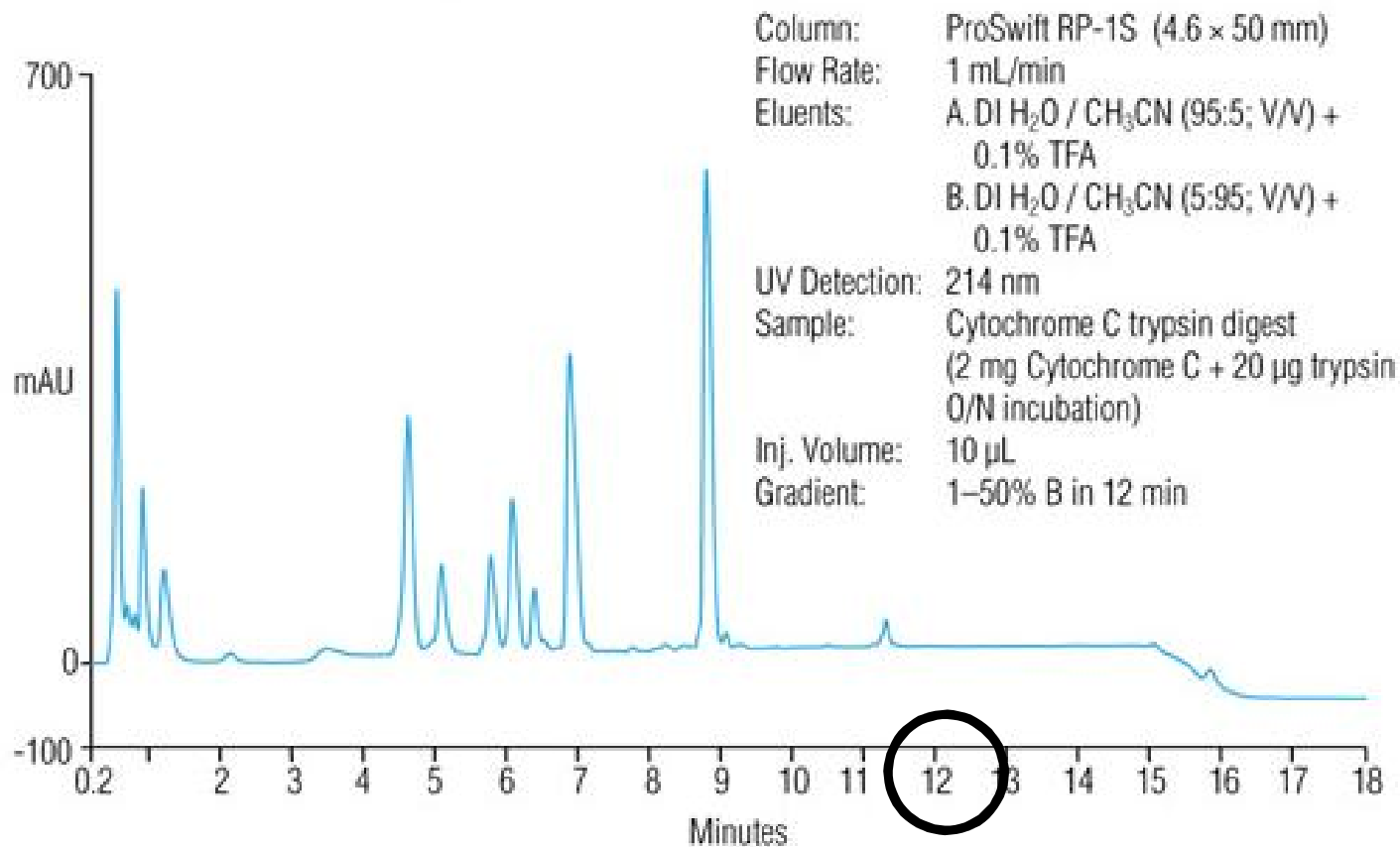


„Next generation peptide map“ UHPLC



„Next generation peptide map“ monolit

Trypsin Digest of Cytochrome C



Monolitok

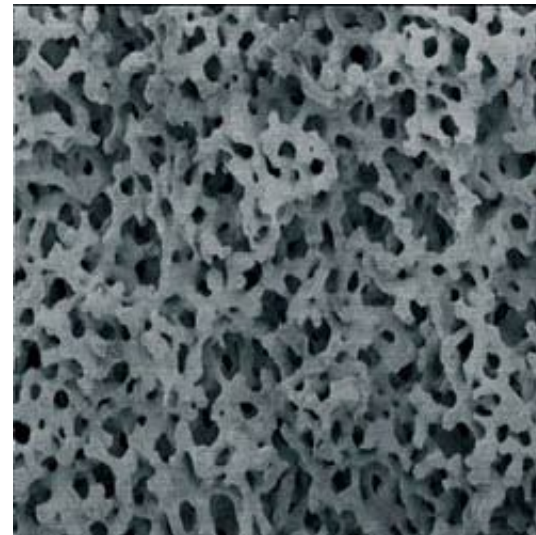
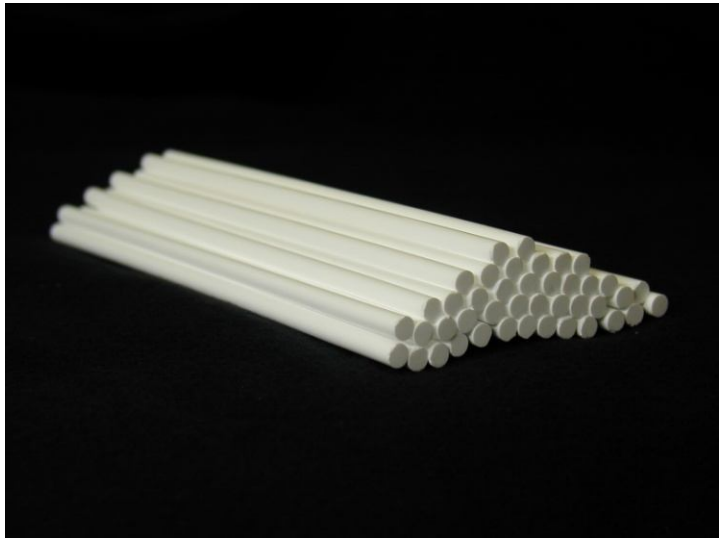
Nagy permeabilitású, csőben polimerizált töltet.

Lehet szilika vagy szerves-polimer (poli-metakrilát, polisztiirén, poli-DVB) alapú a töltet.

Előnye, hogy az oszlopon eső nyomás kb. egy nagyságrenddel kisebb, mint a szemcsés tölteteken.

Nagy áramlási sebesség alkalmazható, rendkívül kedvező az anyagátadás hatékonysága

Alkalmazás: GC-ben, HPLC-ben, kapilláris elektrokratográfiában...

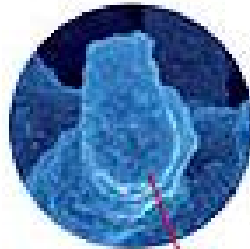


Nagy porozitású monolit

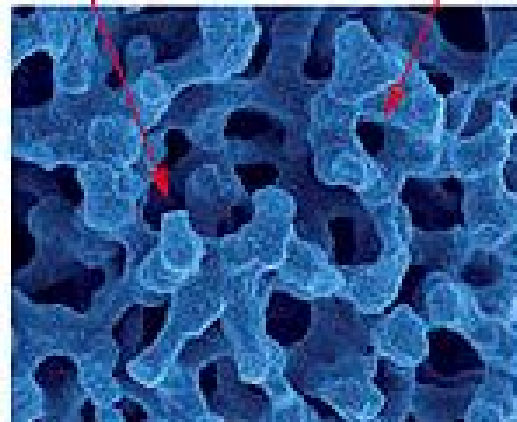
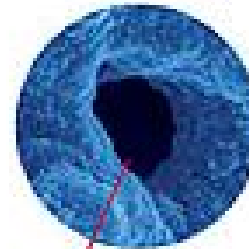
Bimodális pórus-szerkezet:

- Makro-pórusok (2-5 μm): segítségével nagy áramlási sebesség alkalmazható kis nyomáseséssel
- Mezo-pórusok (13-100 nm): adszorpciós helyek (nagy aktív felület), az elválasztásért felelős

Mezo-pórus



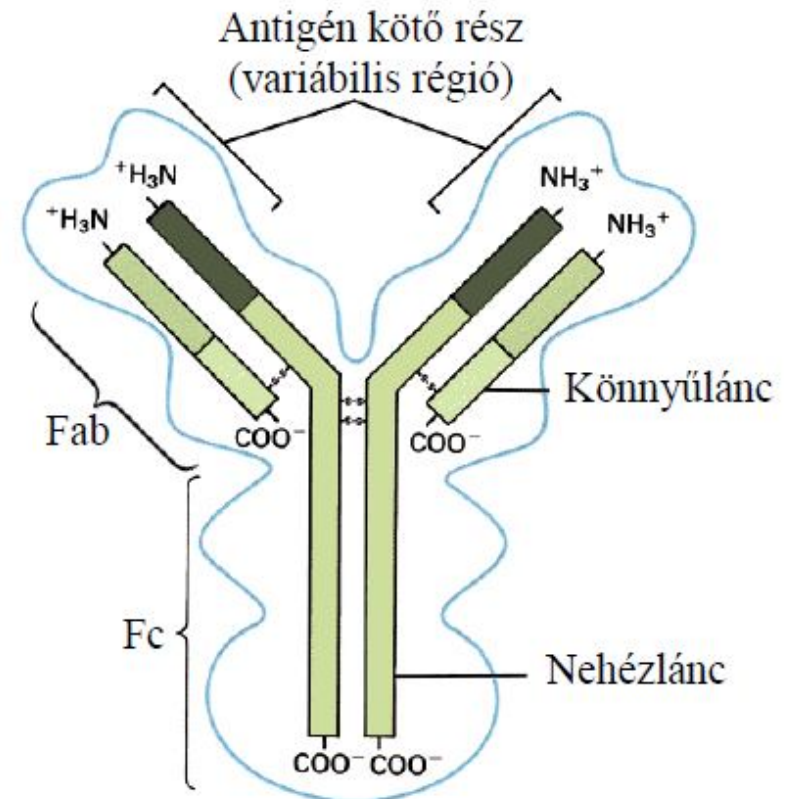
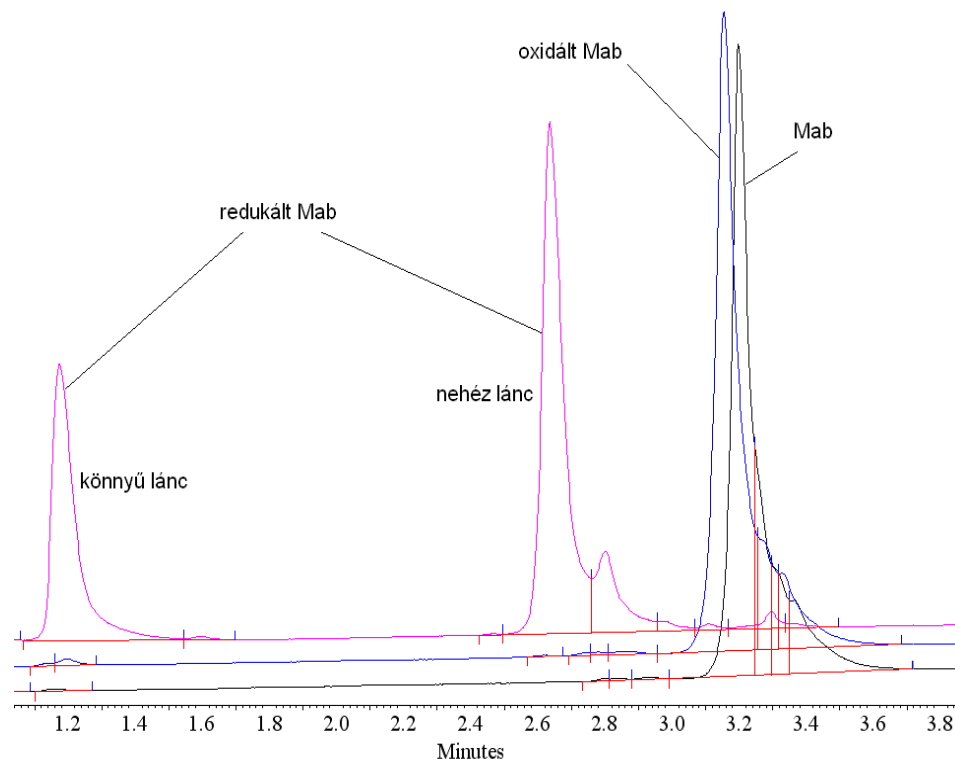
Makro-pórus



MAb-ok könnyű és nehéz láncainak vizsgálata

IG1 MAb könnyű és nehéz láncok vizsgálata

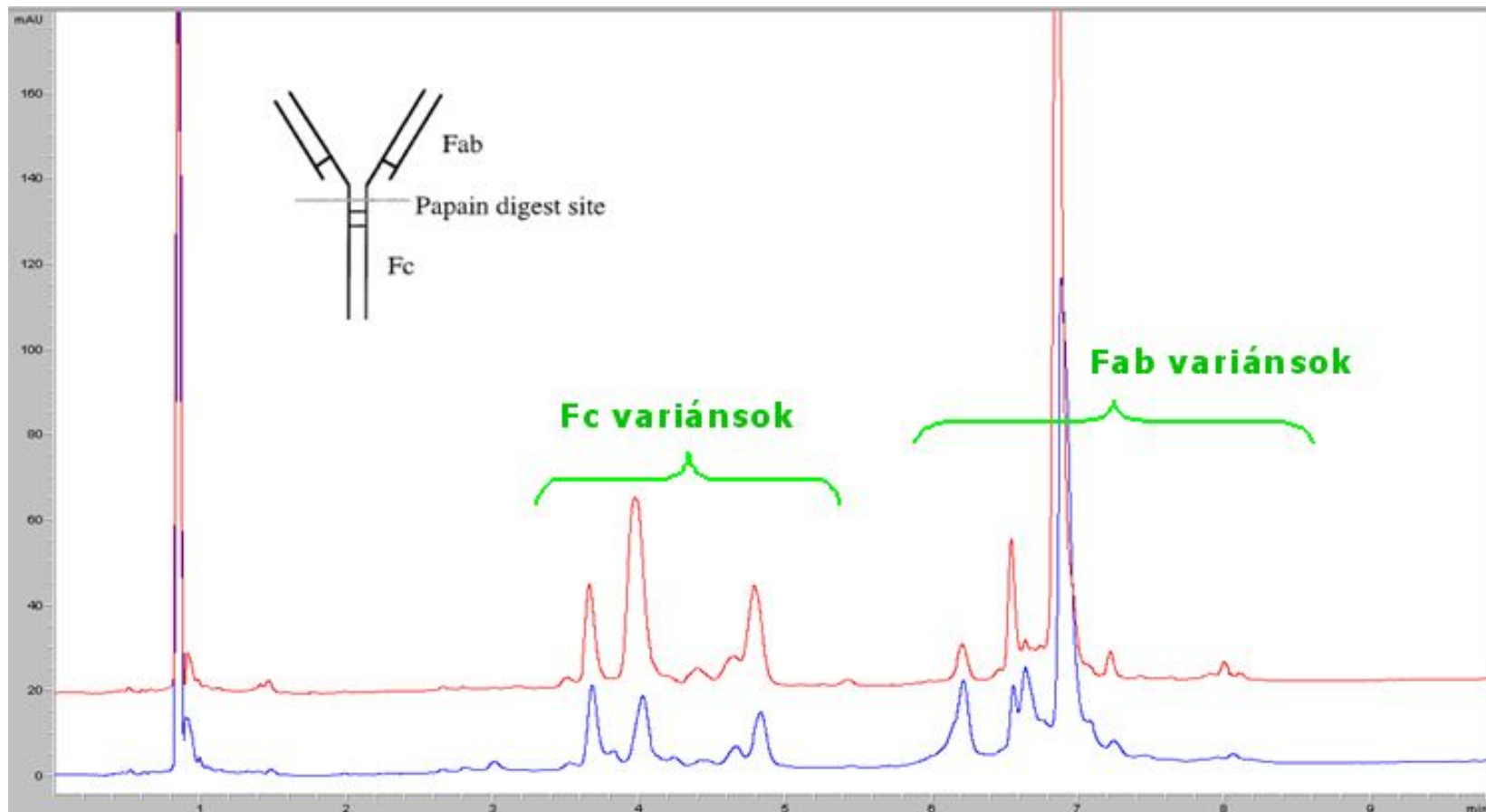
Példa: polimer alapú, nagy pórusú (500A) monolit fázison, emelt hőmérsékleten ($T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$)



MAb-ok Fab és Fc régióinak vizsgálata

MAb papinos emésztmény (Fab és Fc régió)

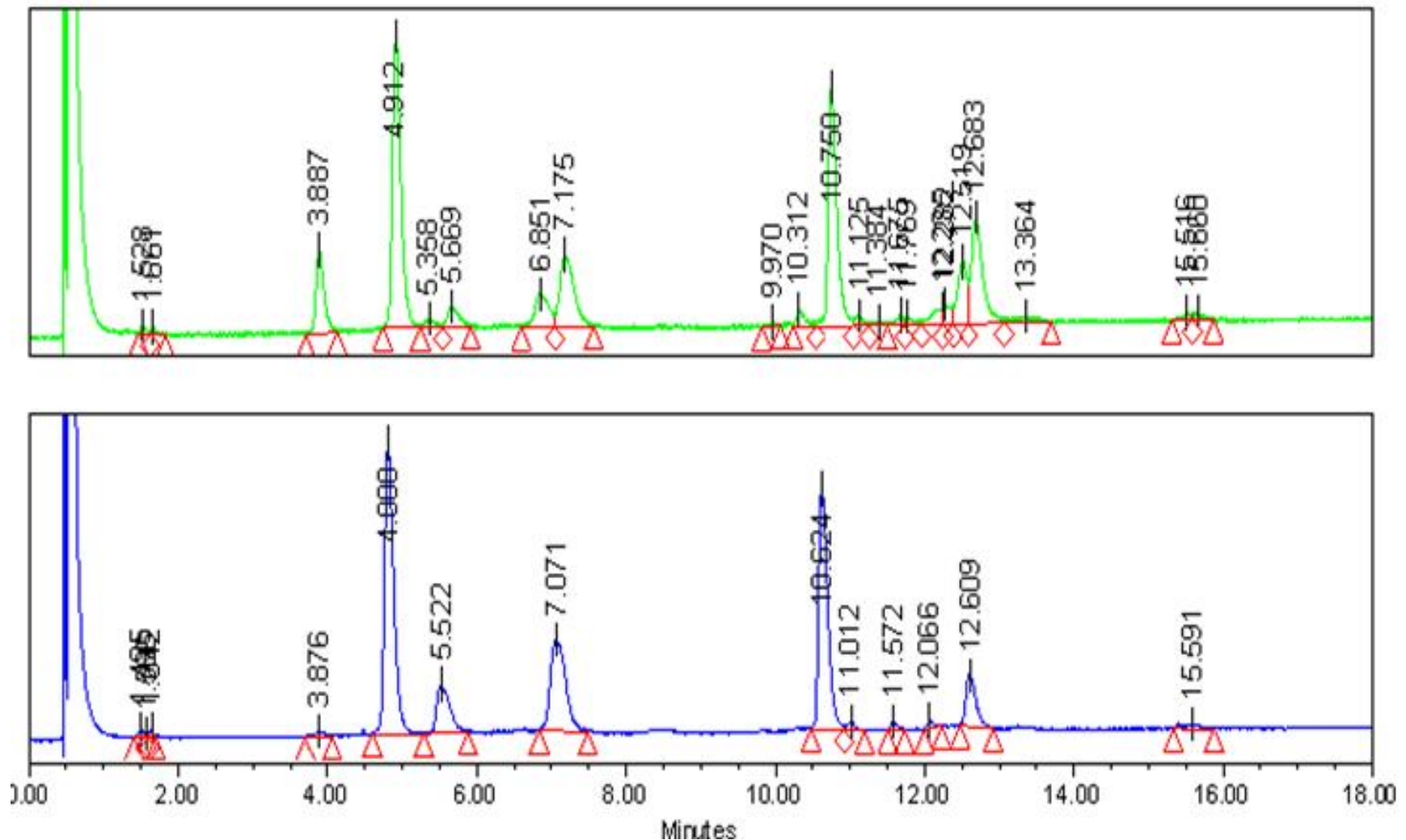
Példa: nagy pórusú (300A) 1,7 μm állófázison, magas hőmérsékleten ($T=85\text{ }^{\circ}\text{C}$)



MAb-ok fragmens térképe

MAb papinos emésztményének redukálása,

Példa: nagy pórusú (300A) 1,7 μm állófázison, magas hőmérsékleten ($T=85^\circ\text{C}$)



Aminosav analízis

Az aminosav-analízis a fehérjék, a peptidek és egyéb gyógyszerkészítmények aminosav-összetételének vagy aminosavtartalmának meghatározására.

Az aminosav-analízist alkalmazhatjuk fehérjék és peptidek mennyiségi meghatározására, fehérjék és peptidek azonosítására aminosav-összetételük alapján, fehérjék és peptidek szerkezetvizsgálatára, a peptid térkép-vizsgálatok fragmentációs stratégiáinak értékelésére, és olyan atípusos aminosavak kimutatására is, amelyek adott fehérjében vagy peptidben esetleg jelen lehetnek. alkalmazott módszereket jelenti.

- 1) Fehérjék, peptidek aminosavakra bontása (hidrolizálása)
- 2) UV vagy fluoreszcens aktív származékok képzése
- 3) Kromatográfiás elválasztás

Aminosav analízis

Számos fehérje hidrolízis módszer terjedt el. Általában 6-7 M sósavval történik a hidrolízis.

Az aminosav-analízist megelőző fehérje-, ill. peptidhidrolízisre alkalmazott, legelterjedtebb eljárás a fenoltartalmú sósavval végrehajtott savas hidrolízis. A fenol szerepe a tirozin halogéneződésének megakadályozása.

Hidrolizáló oldat: 0,1–1,0% fenolt tartalmazó 6 M sósav.

Folyadékfázisú hidrolízis. A mintákat általában 24 órán át, 110 °C-on hidrolizáljuk, mégpedig vákuumban vagy inert gáztérben, hogy oxidációjukat megakadályozzuk. Hosszabb ideig (pl. 48 vagy 72 órán át) csak olyankor hidrolizálunk, amikor okunk van feltételezni, hogy 24 óra alatt a fehérje nem hidrolizál teljesen.

Aminosav analízis

Származékképzés:

Az aminosavak oszlop előtti derivatizálása:

O-ftáldaldehyddel (OPA) történő származékképzése után fluorimetriás detektálással összekapcsolt, fordított fázisú folyadékkromatográfiás elválasztást alkalmazunk. Ez a módszer szekunder amin típusú aminosavak (pl. prolin) kimutatására nem alkalmas.

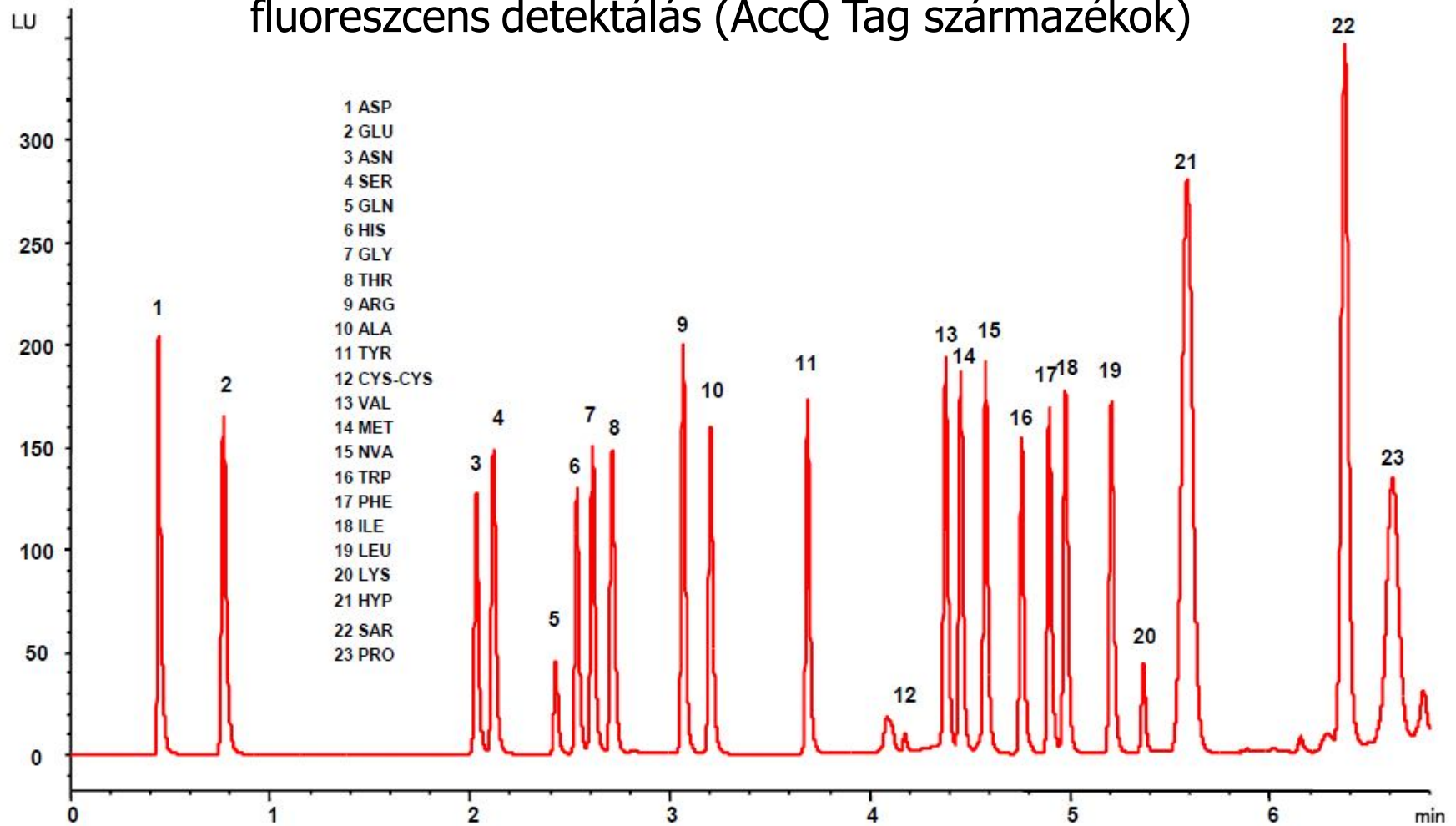
Az FMOC-Cl (9-fluorenilmetil-klórformiát) mind primer, mind szekunder aminosavakkal intenzíven fluoreszkáló vegyületeket képez.

6-aminokinoil-N-hidroxiszukcinimidil-karbamáttal (AQC vagy AccQ-Tag) primer és szekunder aminokkal is fluoreszkáló származékokat képez.

Aminosav analízis (UHPLC)

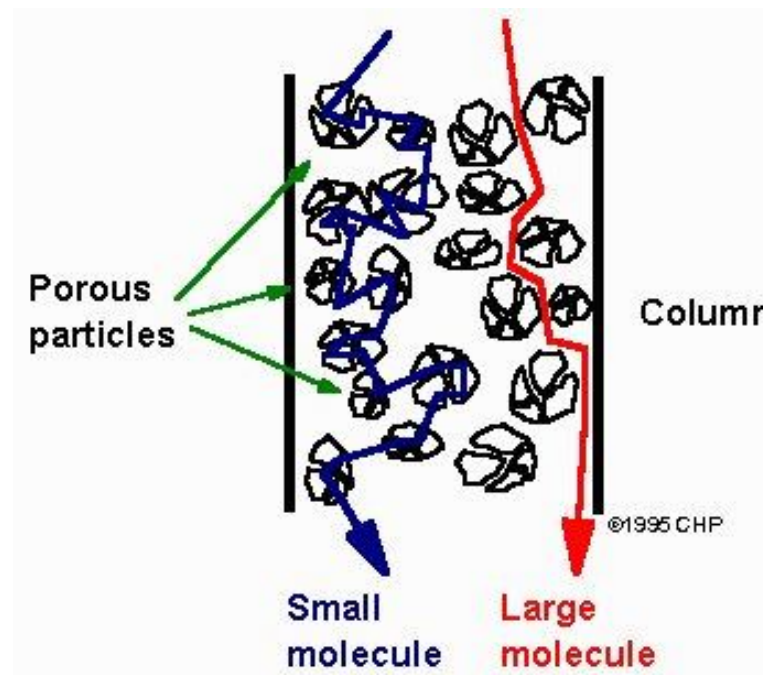
5 cm x 4,6 mm, 1,8 μ m kolonna (C-18),

fluoreszcens detektálás (AccQ Tag származékok)



SEC

Méretkizárásos kromatográfia



SEC (size exclusion), GPC, GFC (gel-permeation, gel-filtration)

A méretkizárásos kromatográfia (*gél permeációs kromatográfia* vagy *gélszűréses kromatográfia*), **méret** (hidrodinamikai átmérő vagy hidrodinamikai térfogat) alapján választja el a komponenseket.

A kisebb molekulák képesek belépni az állófázis pórusaiba, így lassabban eluálódnak, míg a nagyobb molekulák kizáródnak a pórusokból így elúciójuk gyorsabb.

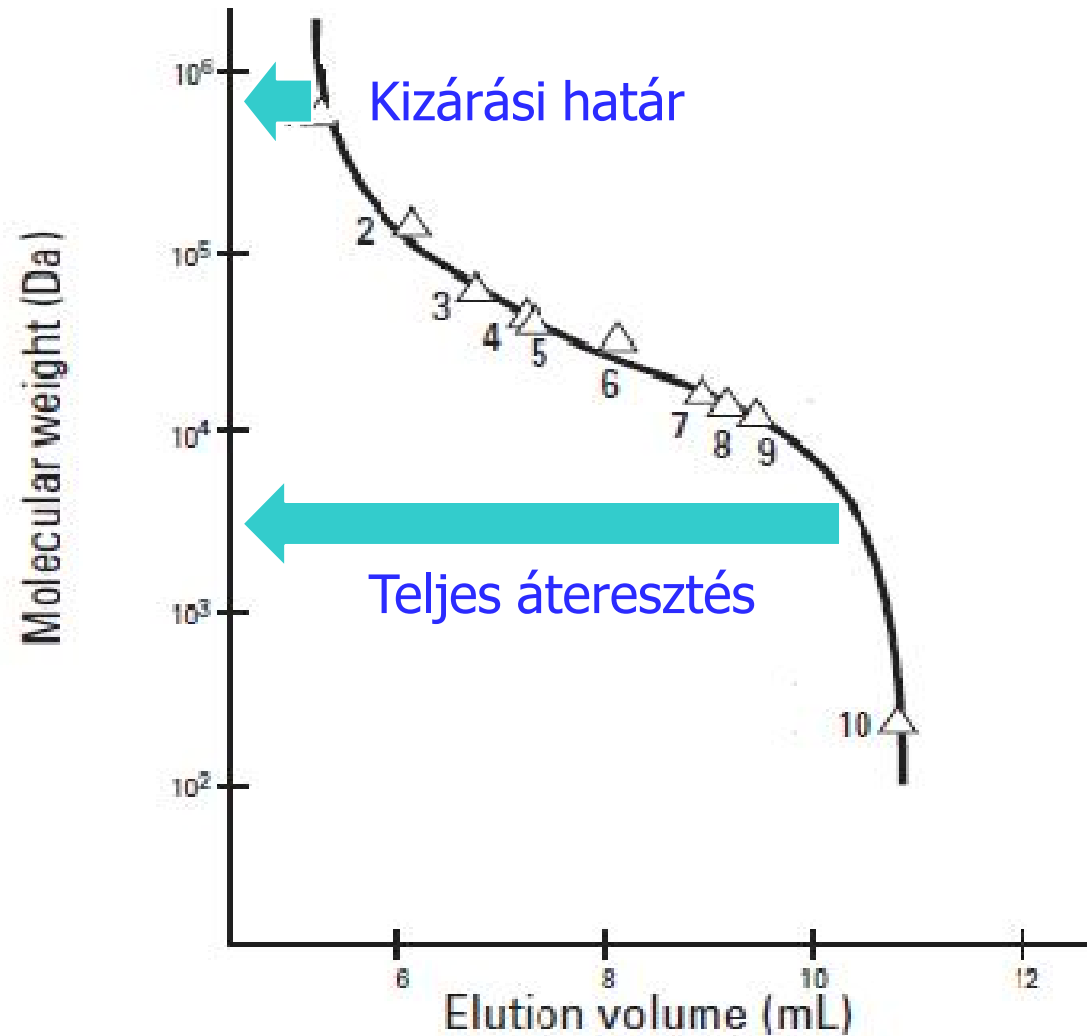
Néha a **gélszűrést**, a méretkizárásos kromatográfia alcsoportjaként sorolják be.

- Gélszűrésnél enyhe kölcsönhatás lehet az állófázissal
- Szerves oldószert alkalmaznak a mozgófázisban

Az elválasztás alapja

- **Teljes áteresztési, vagy teljes átjárási tartomány**nak A legnagyobb méretű molekula, amely egyik pórusba sem fér be, a mozgófázis sebességével halad végig a kolonnán. Ezt a molekulaméretet illetve molekulatömeg tartományt, teljes kizárási tartománynak nevezik. A kizárt molekulák retenciós ideje (retenciós térfogat) a holt idővel (holt térfogat) azonos. Az így definiált holtidő eltér az eddig megadottaktól, mert nem tartalmazza a töltet pórustérfogatát.
- Azon molekulák, amelyek kisebb mérettel rendelkeznek, a kolonna egyes pórusaiba beleférnek. Mivel a pórusban a mozgófázis áll, a molekula lassabban halad előre, a visszatartása nő. Minél több pórusba fér bele, annál lassabban jut végig a kolonnán. Ezt a molekulatömeg tartományt nevezik mérési, vagy működési tartománynak.
- Ha a molekula mérete nagyon kicsi, akkor már minden pórusba belefér, és ha tovább csökken a molekula mérete, a retenció változatlan marad. Ezt a tartományt nevezzük teljes átjárásinak.

Kalibráció, molekulatömeg tartomány



Álló- és mozgófázis

Állófázis:

Inaktív állófázis, semmilyen kölcsönhatást nem alakít ki az elválasztandó molekulákkal, csak méretük szerint különíti el azokat.

Speciális szelektivitás érhető el ún. **kevert módú méretkizárással** (mixed mode). Ez esetben az állófázis nem inert, valamilyen kölcsönhatás – kémiai megoszlás – is kialakul az elválasztandó komponenssel.

Mozgófázis:

Az állófázis felületén esetlegesen kialakuló kölcsönhatások elkerülése érdekében, az elválasztást általában pufferezt eluenssel végezzük.

Állófázisok csoportosítása

Töltetek csoportosítása:

- **Polimerek:** polisztirol, sztírol-divinilbenzol kopolimerek, polimetakrilátok
- **Szilikagél alapúak** (néha „rigid-gel”-ként említik)

Szemcseátmérő: 5; 6; 7; 8; 10 μm , illetve 3 és 1,7 μm !

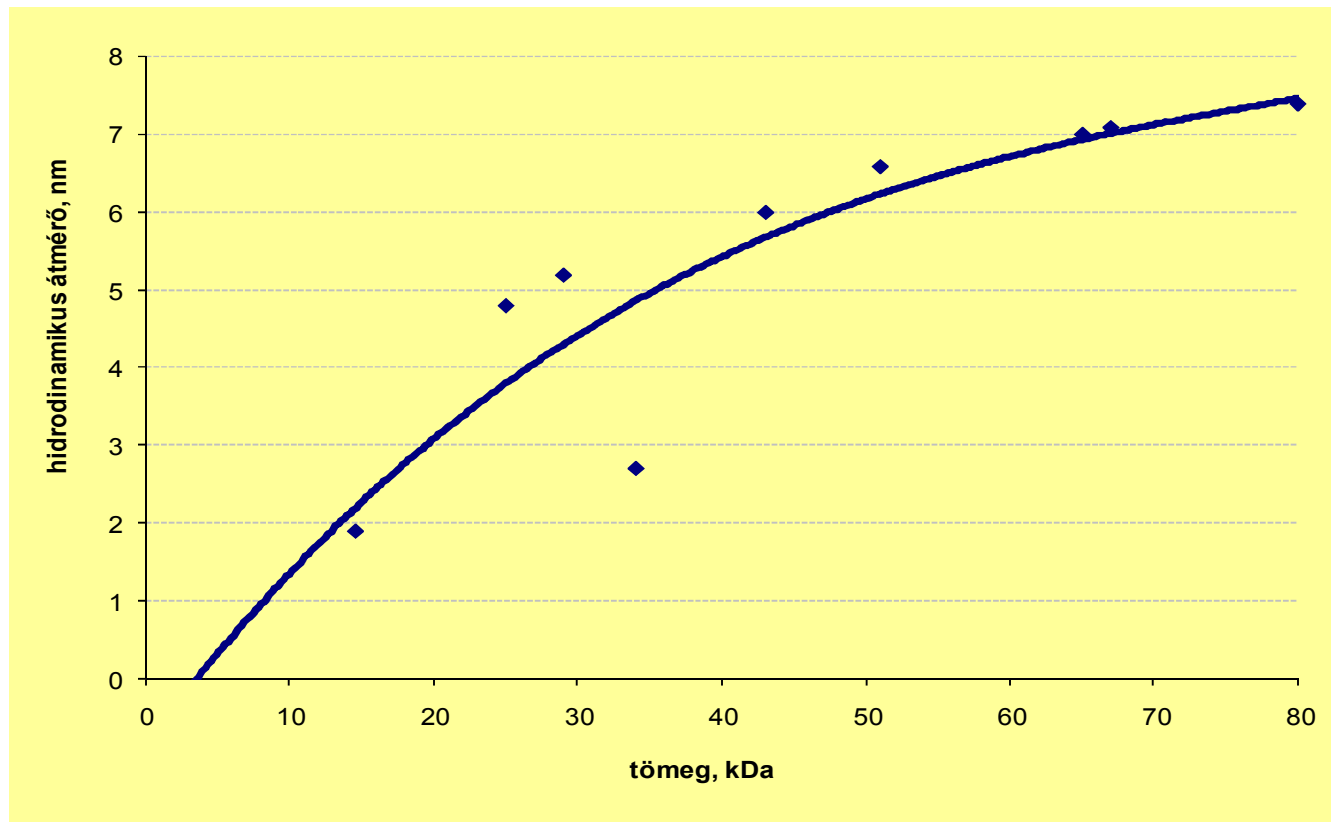
Pórusátmérő: 60, 80, 100, 120, 125, 150, 200, 300, 500, 1000 Å

Kolonna dimenziók: Standard: 30 cm x 7,8 mm (6 vagy 8 mm)
Gyors: 15 cm x 4,6 mm

	metakrilát	szilikagél
pH	2 - 12	2,5 – 7,5
Hőmérséklet (C)	< 80 °C	< 40 °C
Szerves oldószerek	-	+
Adszorpció	-	+
Fő alkalmazási terület	polimerek	fehérjék

Méret vagy tömeg?

A molekula mérete, sugara, átmérője arányos a molekulatömeggel. Az elválasztandó molekula átmérője függ az alkalmazott oldószertől, nyomástól, hőmérséklettől ezért sokszor a komponensek jellemzésére a molekulatömeget használják a molekulaméret helyett.



Elválasztás, csúcsfelbontás?

A retenciós térfogat vagy idő és a molekulatömeg/térfogat között összefüggést lehet megállapítani (kalibrációval), amely alapján következtetni lehet a mért komponensek méretére, tömegére.

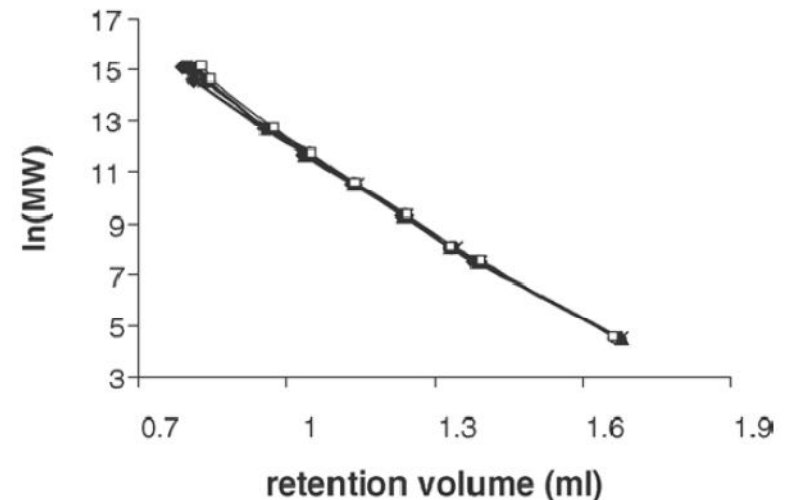
Méretkizárással nem kaphatók magas tányérszámok.

SEC-ben a **csúcsfelbontást** a kalibrációs görbétől függően szokás megadni:

$$R_{SEC} = \frac{\Delta V_R}{4\sigma} \frac{1}{\log(M_i/M_j)}$$

$$\Delta V_R = (V_{R,j} - V_{R,i})$$

ΔV_R : a j-edik és i-edik komponens retenciós térfogata közötti különbség
 σ : csúcsszélesség
M: moláris tömeg



Visszatartás befolyásolása

Mivel a kizárásos kromatográfiában nincs adszorpció, a megoszlási folyamat eltér a megszokotthoz képest. Könnyen levezethető, hogy egy komponens visszatartása az alábbi összefüggéssel leírható:

$$k = \frac{V_R - V_{ip}}{V_p}$$

V_R : retenció térfogat

V_{ip} : szemcsék közötti térfogat

V_p : a töltet teljes pórustérfogata a kolonnában

Azaz k értéke, kizárásos kromatográfia esetén $k = 0 - 1$ közé esik.

A visszatartást és szelektivitást elsősorban a pórustérfogattal azaz az átlagos **pórusátmérővel**, és a szemcsék közötti térfogattal (**szemcseátmérővel**) tudjuk befolyásolni.

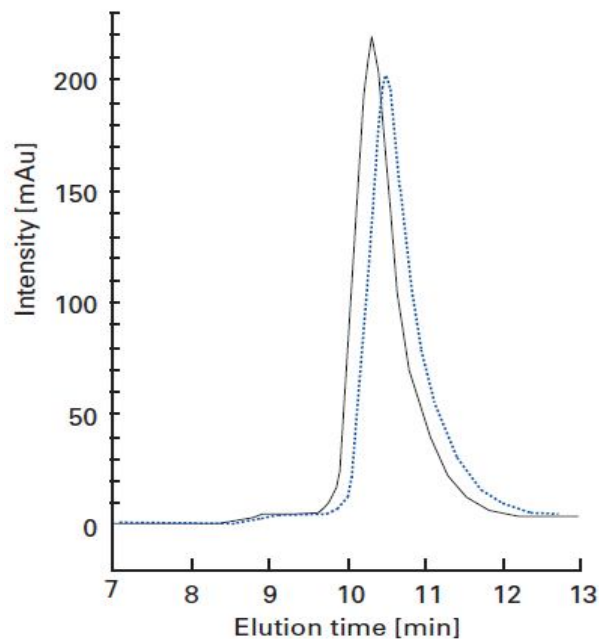
Módszer fejlesztés, optimalizálás

Mozgófázis választás:

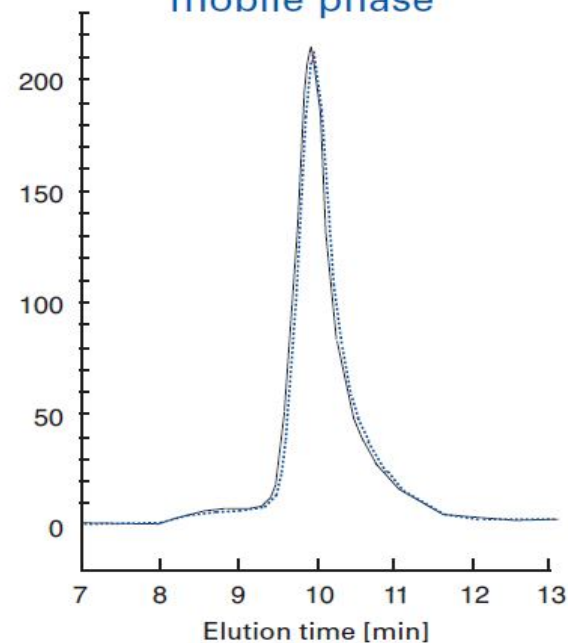
Létrehozhatjuk vagy kiküszöbölhetjük a másodlagos (hidrofób vagy ionos) kölcsönhatásokat az állófázissal.

- pH
- ionerősség, puffer koncentráció
- szerves modifikátorok

SEC of pegylated proteins -
no ethanol in mobile phase



SEC of pegylated proteins -
with 10% ethanol in
mobile phase



Módszer fejlesztés, optimalizálás

Ionerősség:

- $< 0,1$ M só, ionos kölcsönhatások léphetnek fel a mérendő komponens és a szilikagél között
- > 1 M só, akkor hidrofób kölcsönhatások jöhetnek létre
- Az ionerősség további fokozására sókat szoktak adni a pufferbe (pl nátrium-szulfát, nátrium-klorid, kálium-klorid)

Szerves modifikátorok:

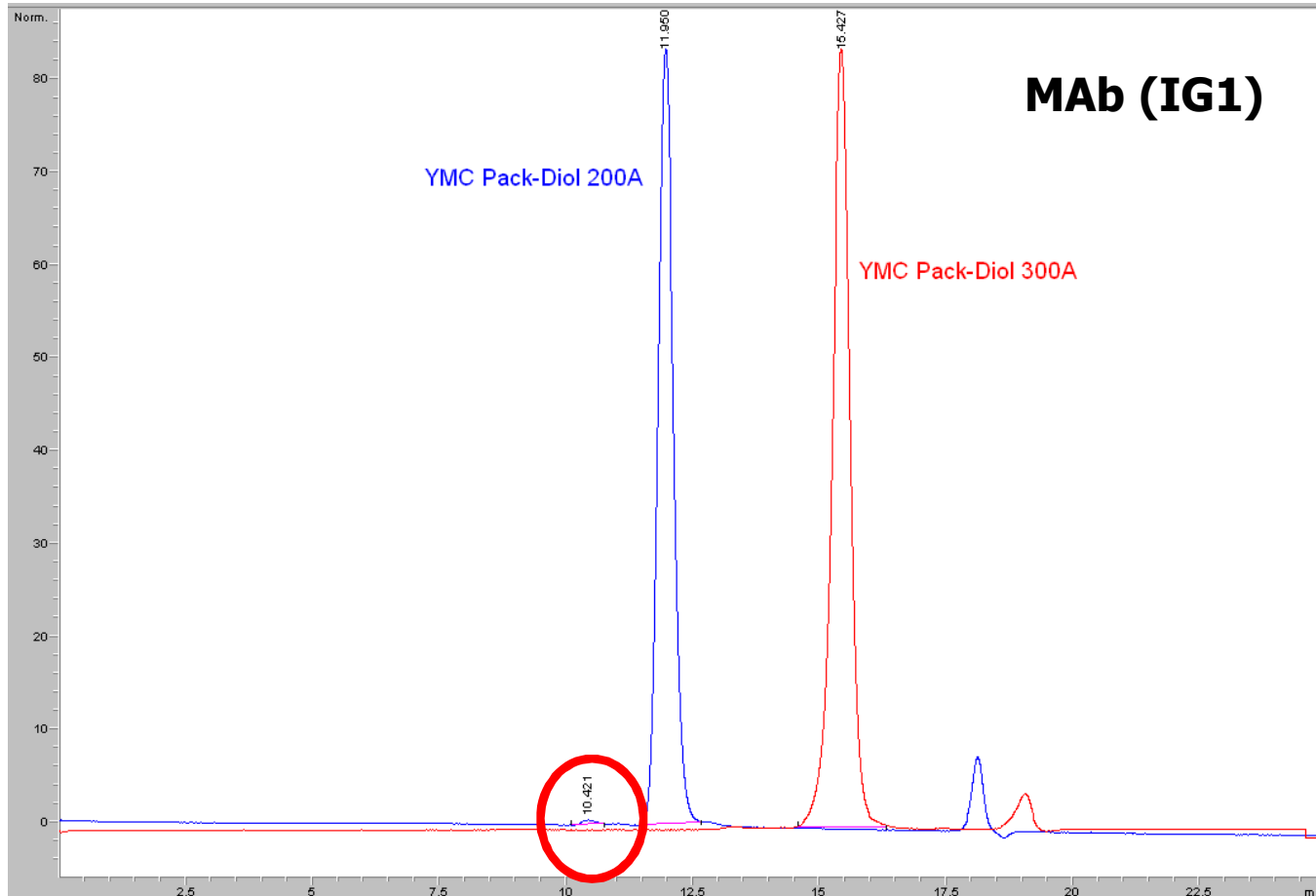
Hidrofób kölcsönhatások kiküszöbölése céljából 0 – 20 % szerves modifikátort adhatunk a mozgófázisba. Leggyakoribbak:

- Acetonitril
- Etanol
- Metanol
- Aceton

Alkalmazási terület

- Fehérjék eltérő tömegű komponenseinek (aggregátumok) meghatározása
- Peptid keverékek elválasztása
- Poliszaharidok, oligoszaharidok elválasztása
- DNS fragmensek vizsgálata
- Kétdimenziós elválasztások egyik dimenziójaként (fehérje karakterizálás)

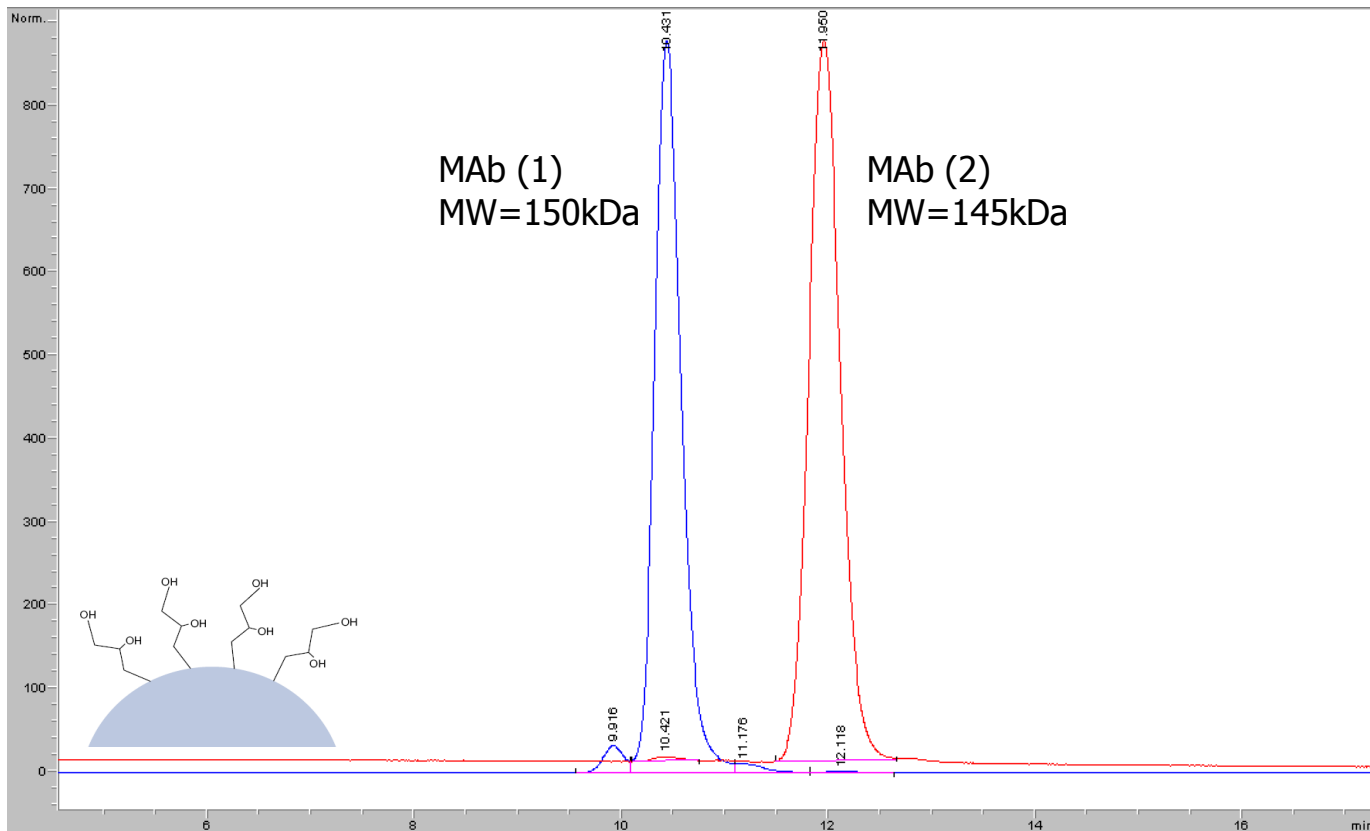
Pórusátmérő hatása



Kolonna: YMC Pack-Diol 200A és 300A (300 x 6 mm)
Mozgófázis: 0,2M kálium-dihidrogénfoszfát + 0,1M káliumklorid, pH=7
F = 0,35 ml/min
T = 30 °C

Felületi kölcsönhatások

1,2-dihidroxi-propil-módosított szilikagél: a diol-réteggel történő **H-hidas kölcsönhatás** erőssége eltér a szilanol csoportokkal létrejövő kölcsönhatásokétól (általában gyengébb). Nagyobb lesz a **fajlagos felület** is. **Változik a szelektivitás!**



Kolonna: YMC Pack-Diol 200A

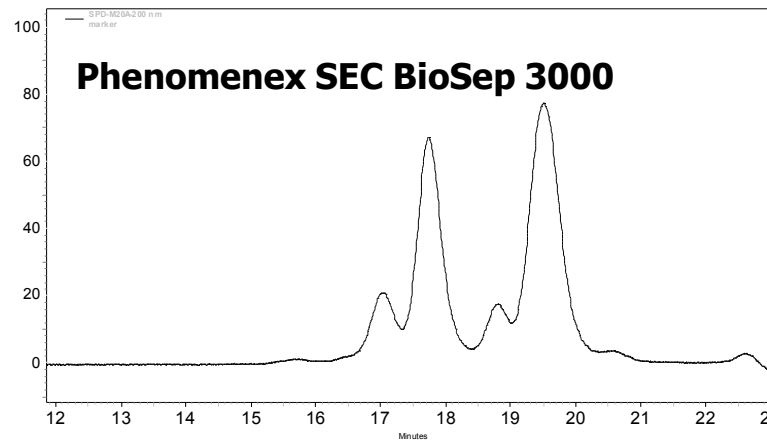
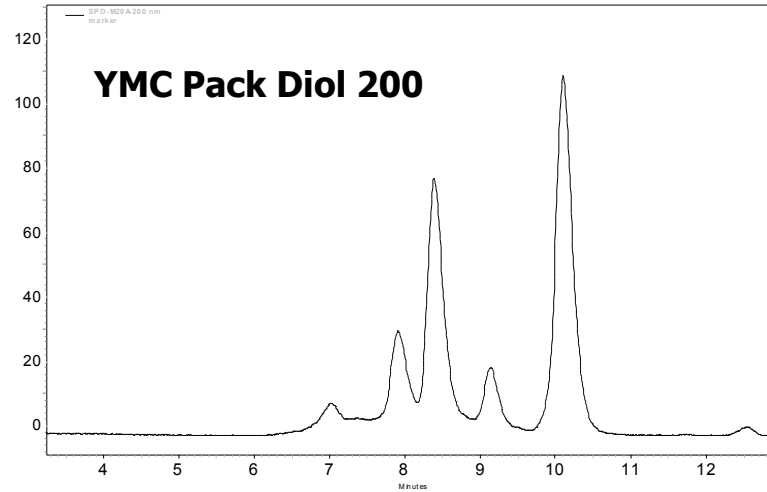
Mozgófázis: 0,2M kálium-dihidrogénfoszfát + 0,1M káliumklorid, pH=7

F = 0,35 ml/min

T = 30 °C

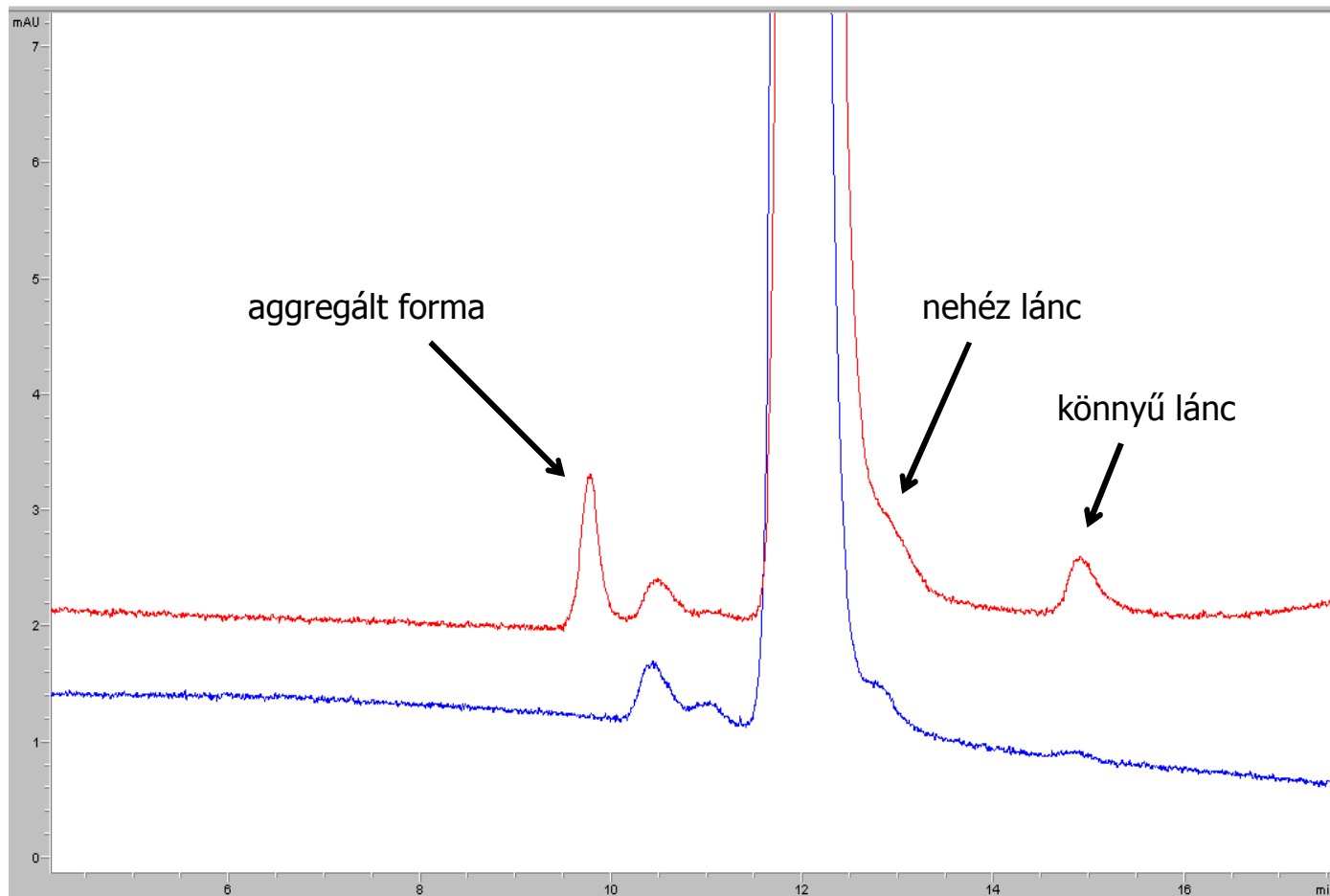
Felületi kölcsönhatások

Diol-módosított szilikagél és nem módosított szilikagél



Mozgófázis: 50 mM ammónium-hidrogénkarbonát, pH=7
Minta: Low molecular weight calibration kit (proteins)

MAb (IG1) könnyű- és nehézlánc, aggregátumok



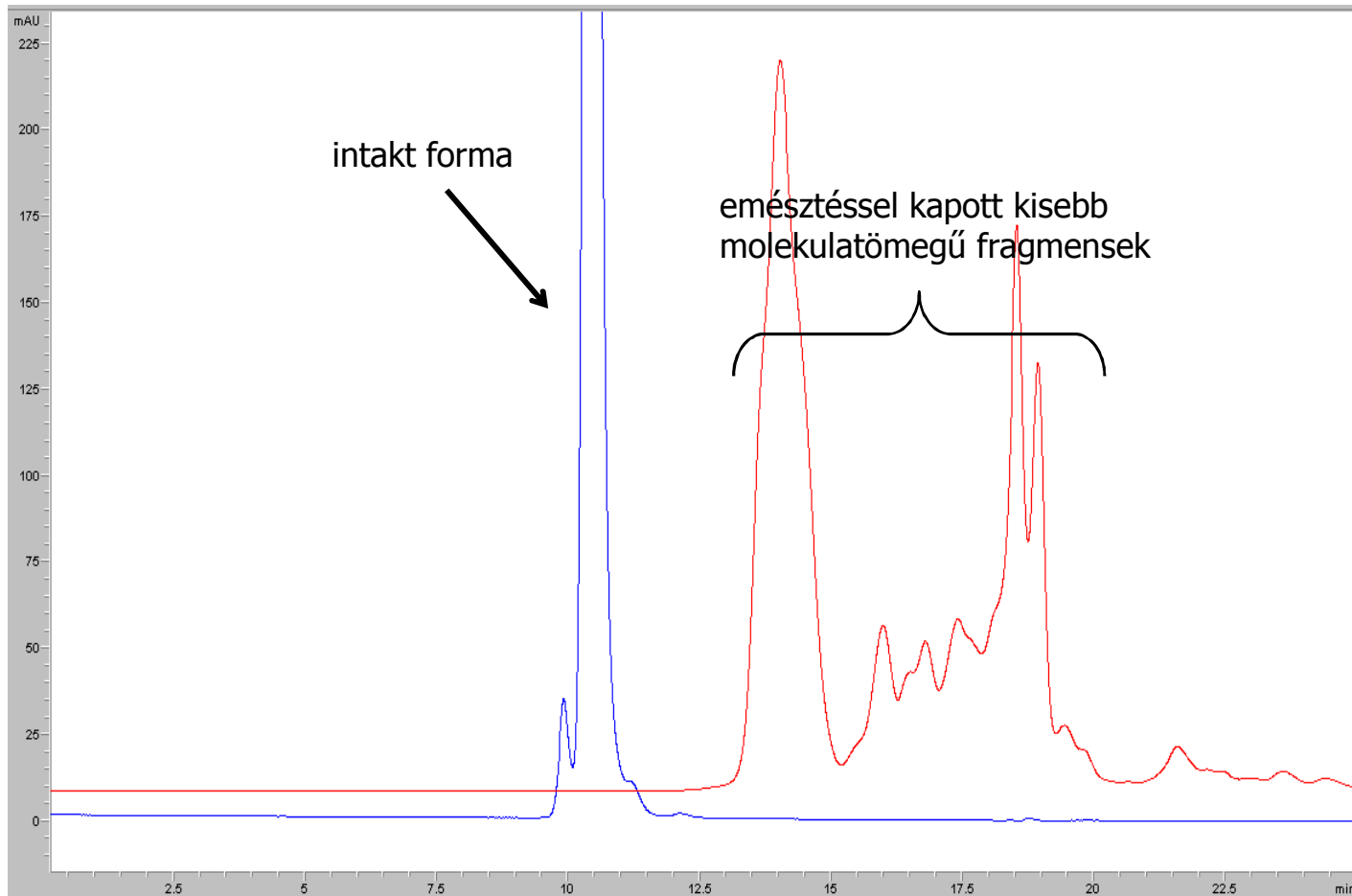
Kolonna: YMC Pack-Diol 200A (300 x 6 mm)

Mozgófázis: 0,2M kálium-dihidrogénfoszfát + 0,1M káliumklorid, pH=7

F = 0,35 ml/min

T = 30 °C

MAb redukált papainos emésztmény



Kolonna: YMC Pack-Diol 200A (300 x 6 mm)

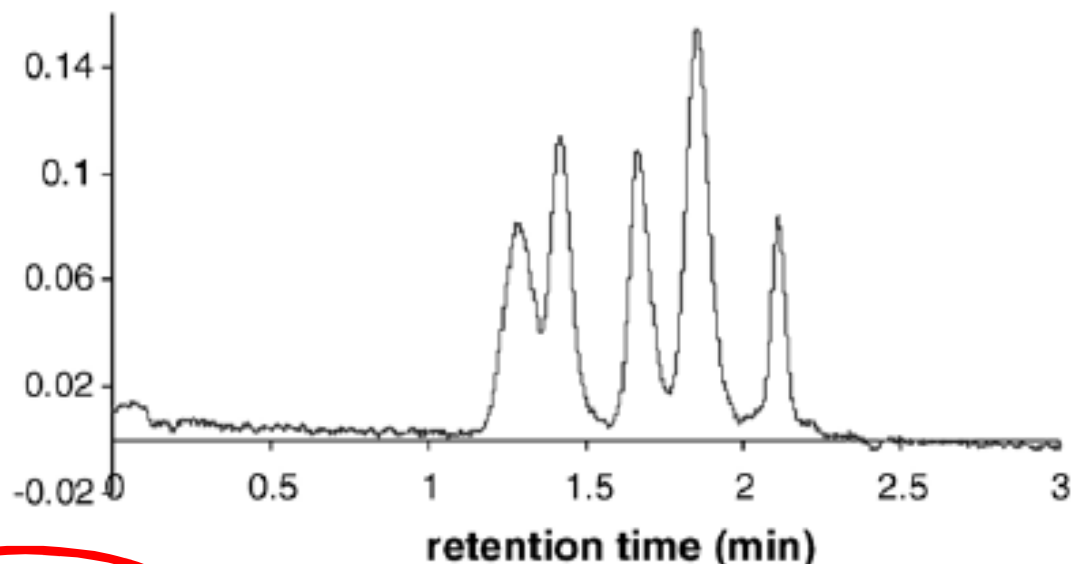
Mozgófázis: 0,2M kálium-dihidrogénfoszfát + 0,1M káliumklorid, pH=7

F = 0,35 ml/min

T = 30 °C

Gyors SEC 1.

1, Oszlopdimenziók csökkentése:



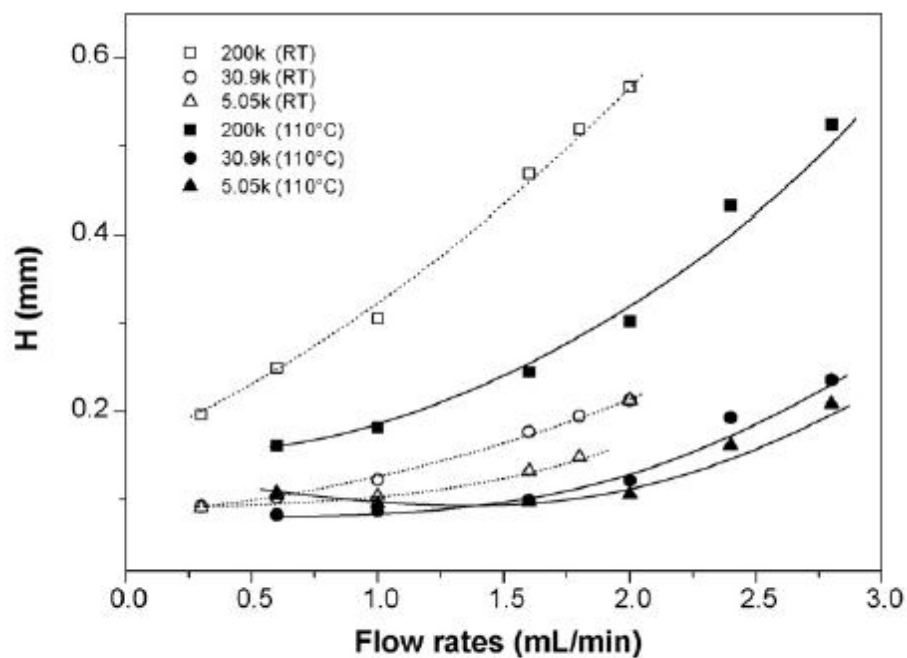
50 x 4,6 mm Fast-SEC kolonna, 0,3 ml/min térfogatáram

- 50 x 4,6 mm,
- 100 x 4,6 mm,
- 150 x 4,6 mm

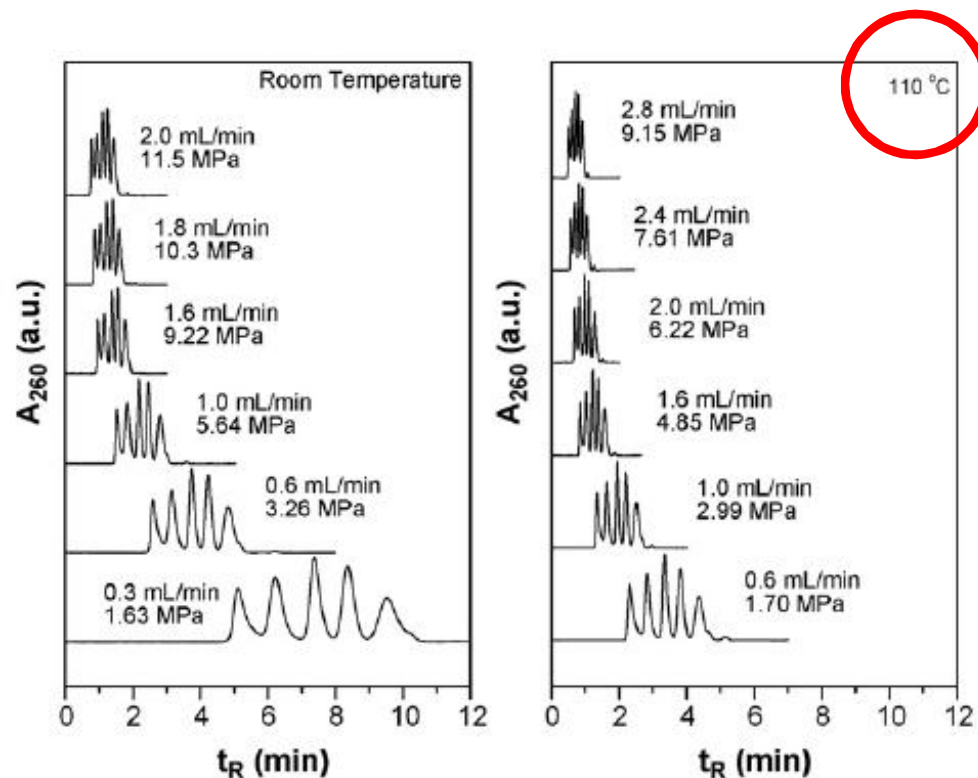
Gyors SEC 2.

2, Hőmérséklet emelése:

Hőstabil sztírol-divinilbenzol alapú töltetek
(PolyPore; 250mm×4.6mm, 5 μm)



van Deemter plot (H vs. flow rate) for the three PS samples using PolyPore column (250 mm × 4.6 mm i.d.) at room temperature (open symbols) and at 110°C (filled symbols). Solid and dotted lines are drawn for visual aid.

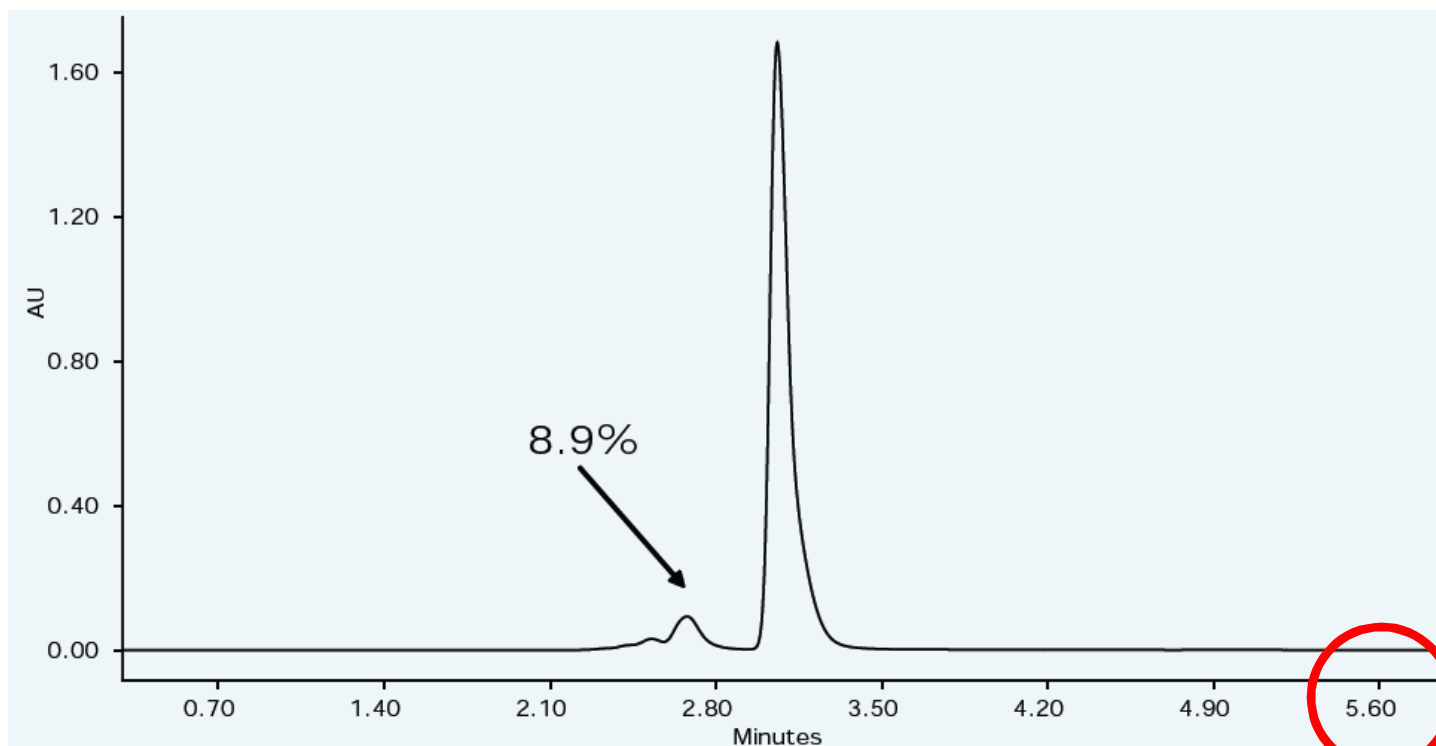


SEC chromatograms of five PS standards at various flow rates at room temperature (left) and at 110°C (right). Column: PolyPore (Polymer Lab.; 250 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size); eluent: THF; PS standards: 1,800,000, 200,000, 30,900, 5050, and 690 g/mol.

Gyors SEC 3.

3, Szemcseátmérő csökkentése: UHPLC-SEC

- 3 μm (Agilent Bio-SEC 3)
- 1,7 μm (Waters, UPLC BEH 200)



Monoklonális antitest (IgG) aggregátumainak vizsgálata

Kolonna: Acquity UPLC BEH, SEC 200, 1,7 μm

A SEC önmagában nem elég

A méretkizárásos kromatográfia **önmagában nem elegendő** az eltérő molekulatömegű komponensek meghatározására.

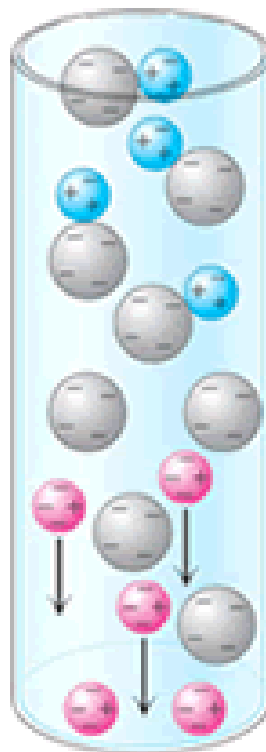
A hatóságok legalább 2 „ortogonális” módszert kérnek az aggregátumok vizsgálatára

Alternatív technikák lehetnek:

FL, DLS, SLS, SDS-PAGE, AUC, FFF, MALDI-TOF

IEX

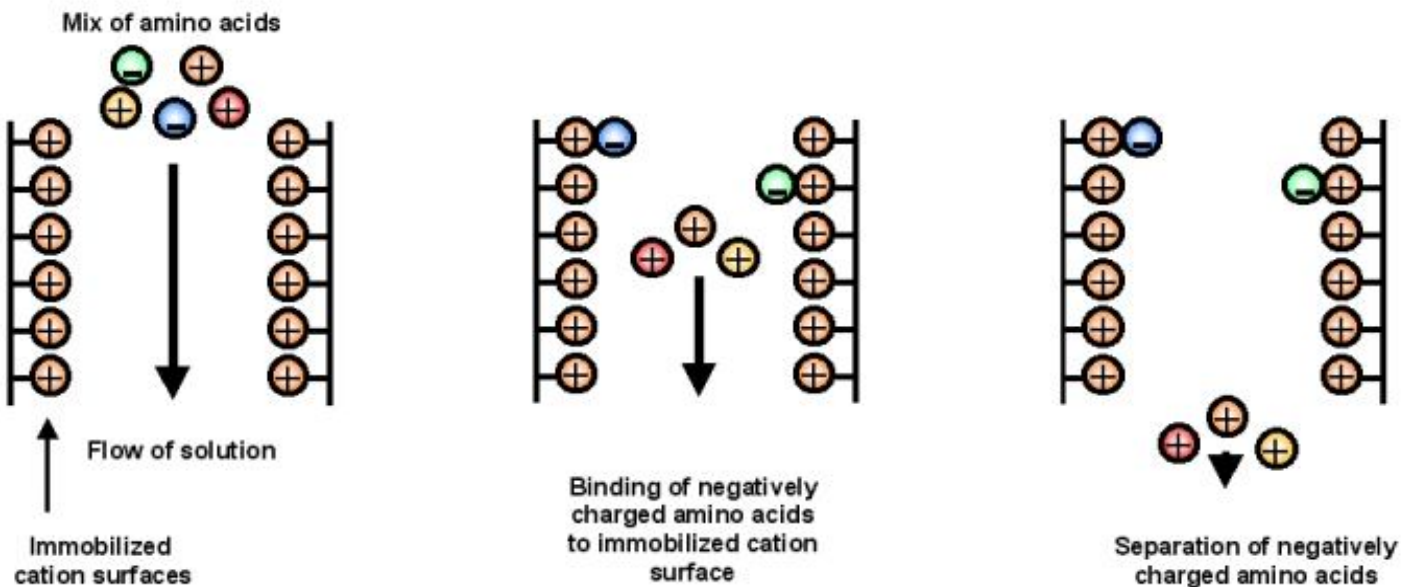
Ioncserés kromatográfia



Az elválasztás alapja

A töltésekkel rendelkező molekulák (aminosavak, peptidek, fehérjék) az ellentétes előjelű töltéssel rendelkező ioncserélő fázison adszorbeálódhatnak (megkötődnek). A dinamikus egyensúlyt a mozgófázis **pH**-ja és a **sókoncentráció**-ja befolyásolja. A megkötődött komponenseket un. sógradienssel lehet lemosni az állófázis felületéről.

Az anioncsere sematikus vázlata:



Az elválasztás alapja

Az álló fázis valamilyen ioncserélő szemcse, amelynek a felületén kötött ionos csoportok vannak (pl. szulfonsav, kvaterner-amin...). Ezekhez kapcsolódnak az ellentétes töltésű ionok, köztük elektrosztatikus kölcsönhatás lép fel. A visszatartás és elválasztás alapja a mérendő komponensek eltérő **ioncserés affinitása**.

Az un. **ellenionok** jelen vannak a mozgófázisban.

Az ioncserélő fázis az ellenionnal azonos töltésű ionokat tartja vissza. A kölcsönhatás erőssége függ:

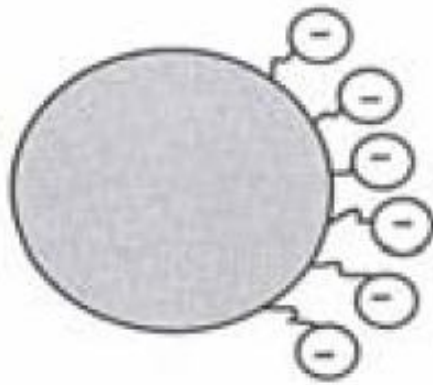
- Az oldat ionerősségétől
- A hidratált ionok tényleges nagyságától

A **pH** változtatásával befolyásolhatjuk a fehérjék eredő töltését, ezért általánosan használatos a szelektivitás szabályozására. Sok esetben alkalmazunk un. pH gradienst.

A mozgó fázisba adagolt **sóban** található versenyző ionok (pl. NaCl) nem befolyásolják a szelektivitást, de elősegítik a fehérjemolekulák deszorpcióját. Minél nagyobb a fehérje eredő töltése, annál erősebben fog abszorbeálódni, és annál magasabb só-koncentráció szükséges a minta deszorbeáltatására.

Az elválasztás alapja

Kationcserélő

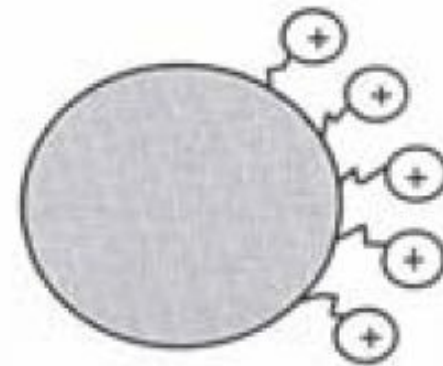


SULPHONIC ACIDS



CARBOXYMETHYL

Anion cserélő



DIETHYLAMINOETHYL
(DEAE)



QUATERNARY
AMINES

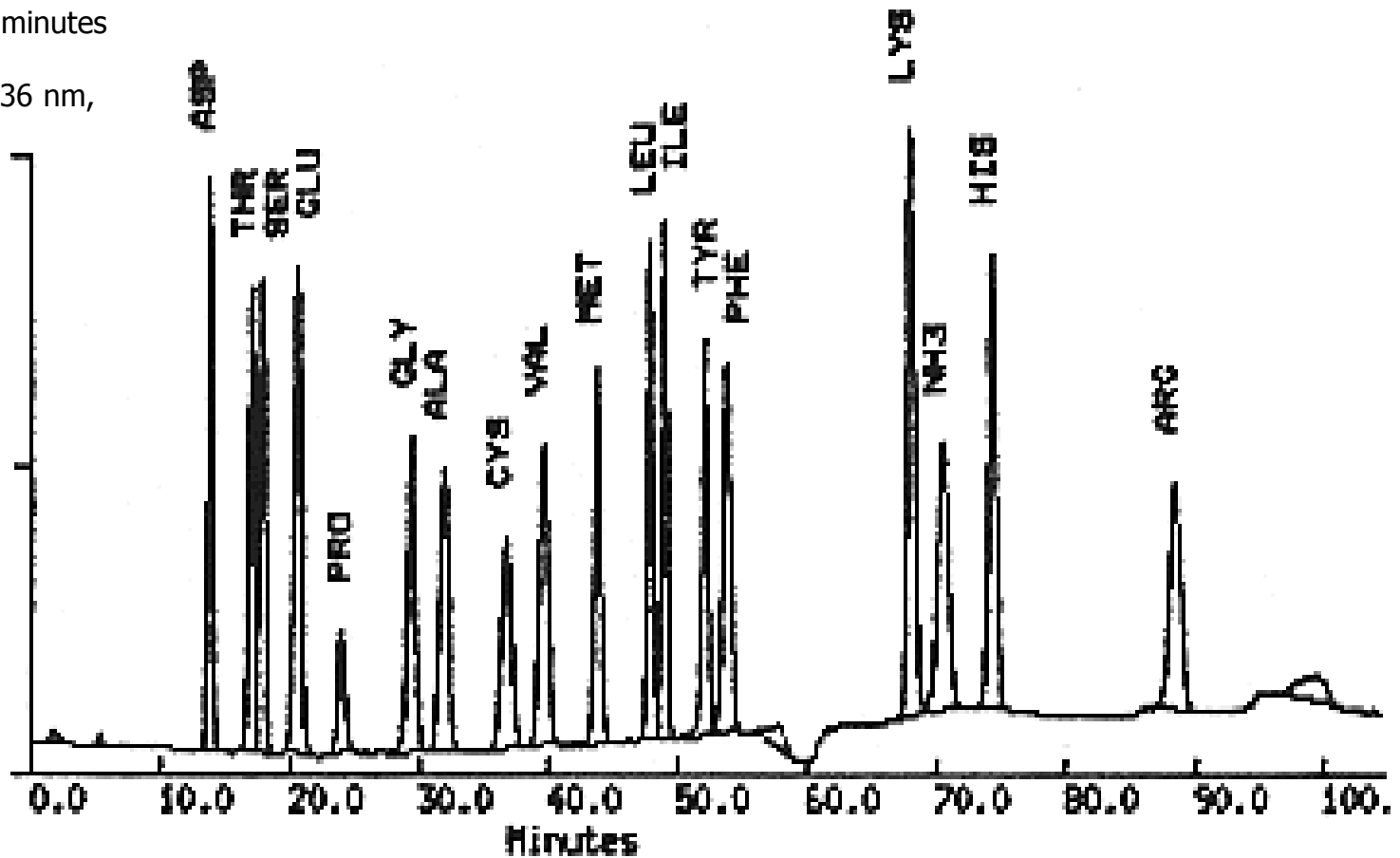
Mire alkalmas az IEX-LC?

- Fehérje eredetű bomlástermékek (oxidáció, redukció, deamidáció)
- Variabilitás, természetes töltés-heterogenitás
- Fragmens térkép, könnyű- és nehézláncok
- Aminosav analízis

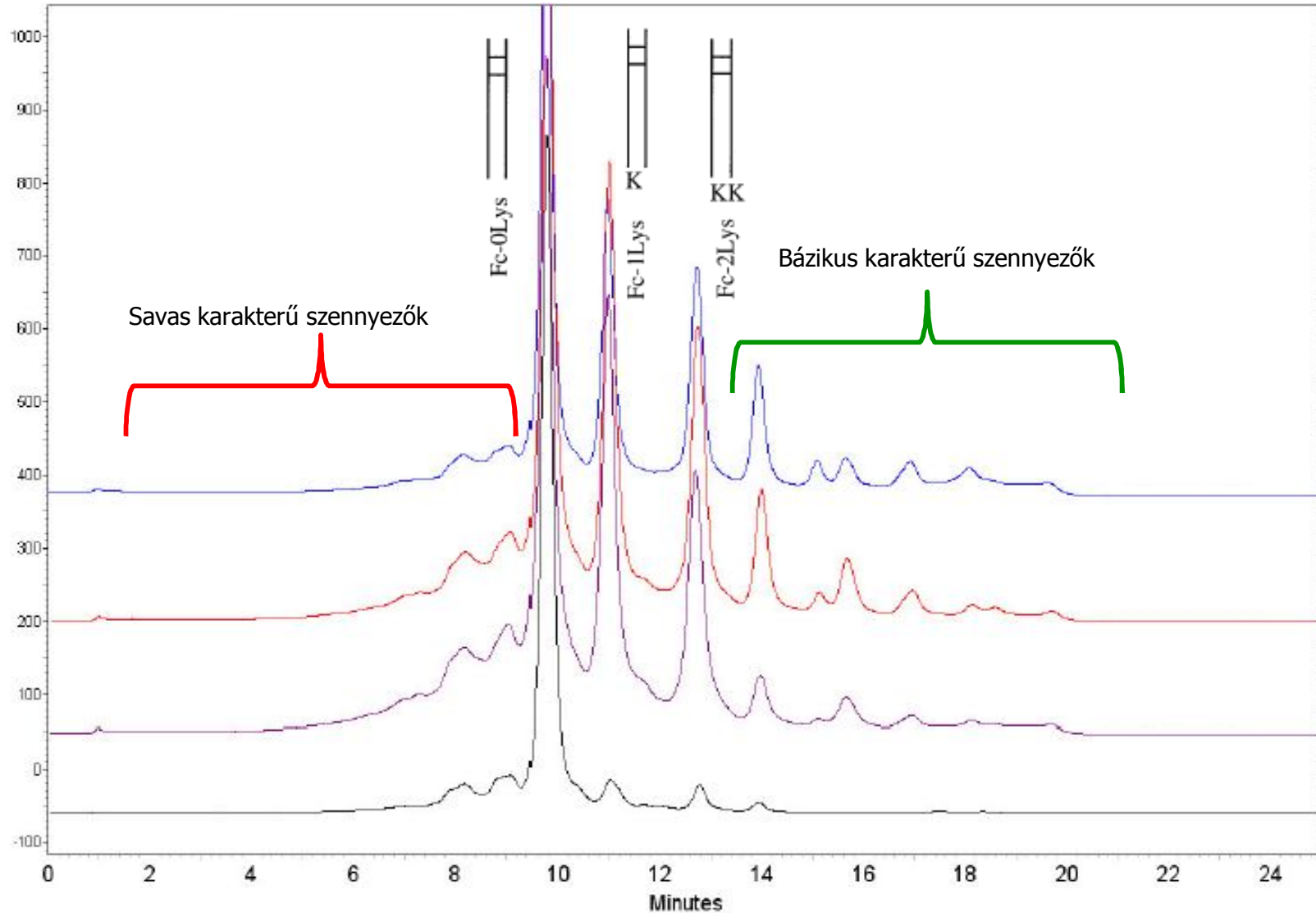
Aminosav analízis (IEX)

Sample: 5 Nanomoles Hydrolysate Standard
Column: Waters Amino Acid Analysis Column
Temperature: 60 C
Elution Buffers: A) 0.2N Na+, pH 3.15
B) 1.0N Na+, pH 7.4

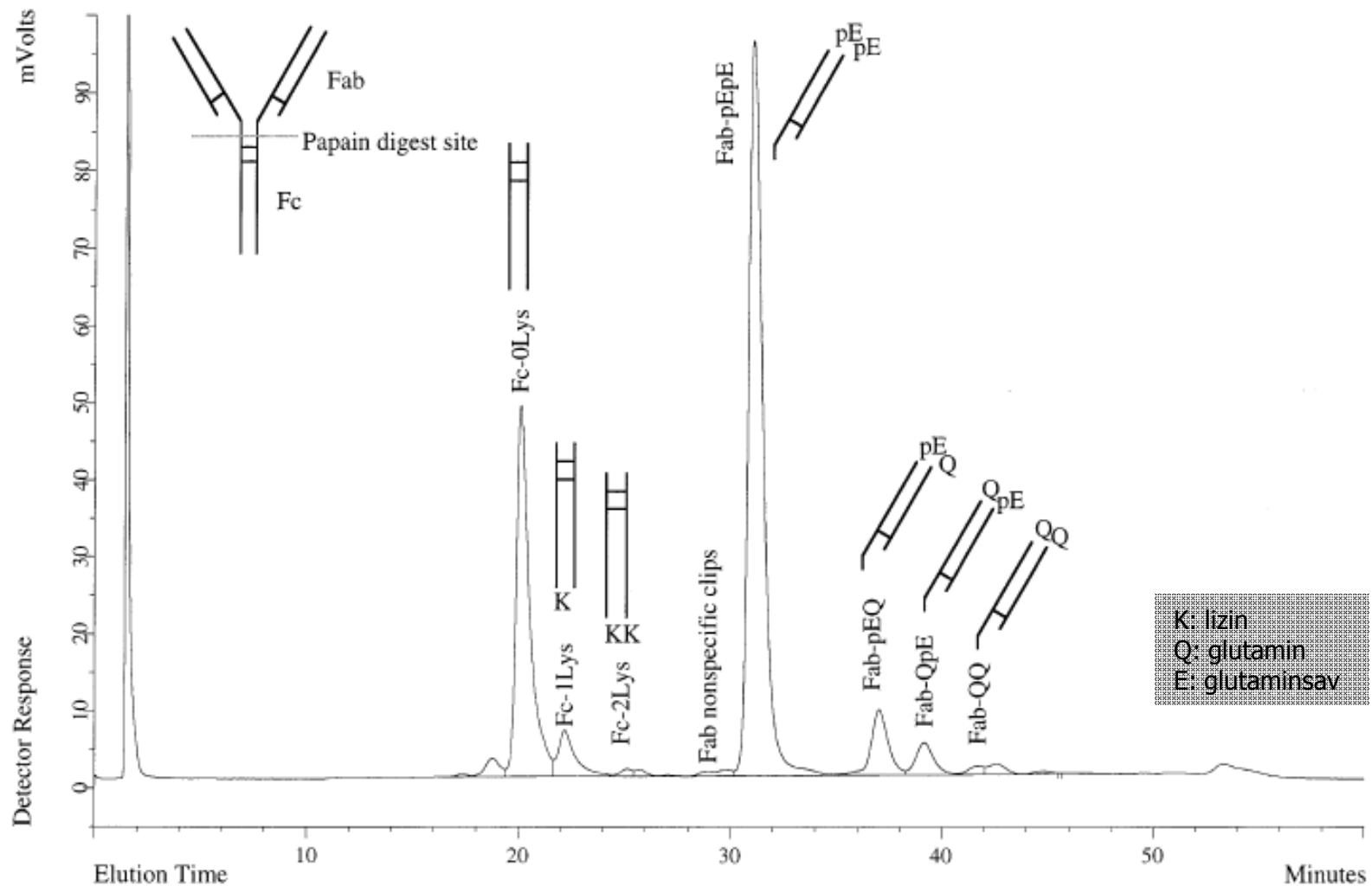
Gradient Conditions:
0-80% B, Curve 8, 45 minutes
80-100% B, Curve 8, 15 minutes
Flow Rate: 0.5 ml/min
Detection: 546 nm and 436 nm,



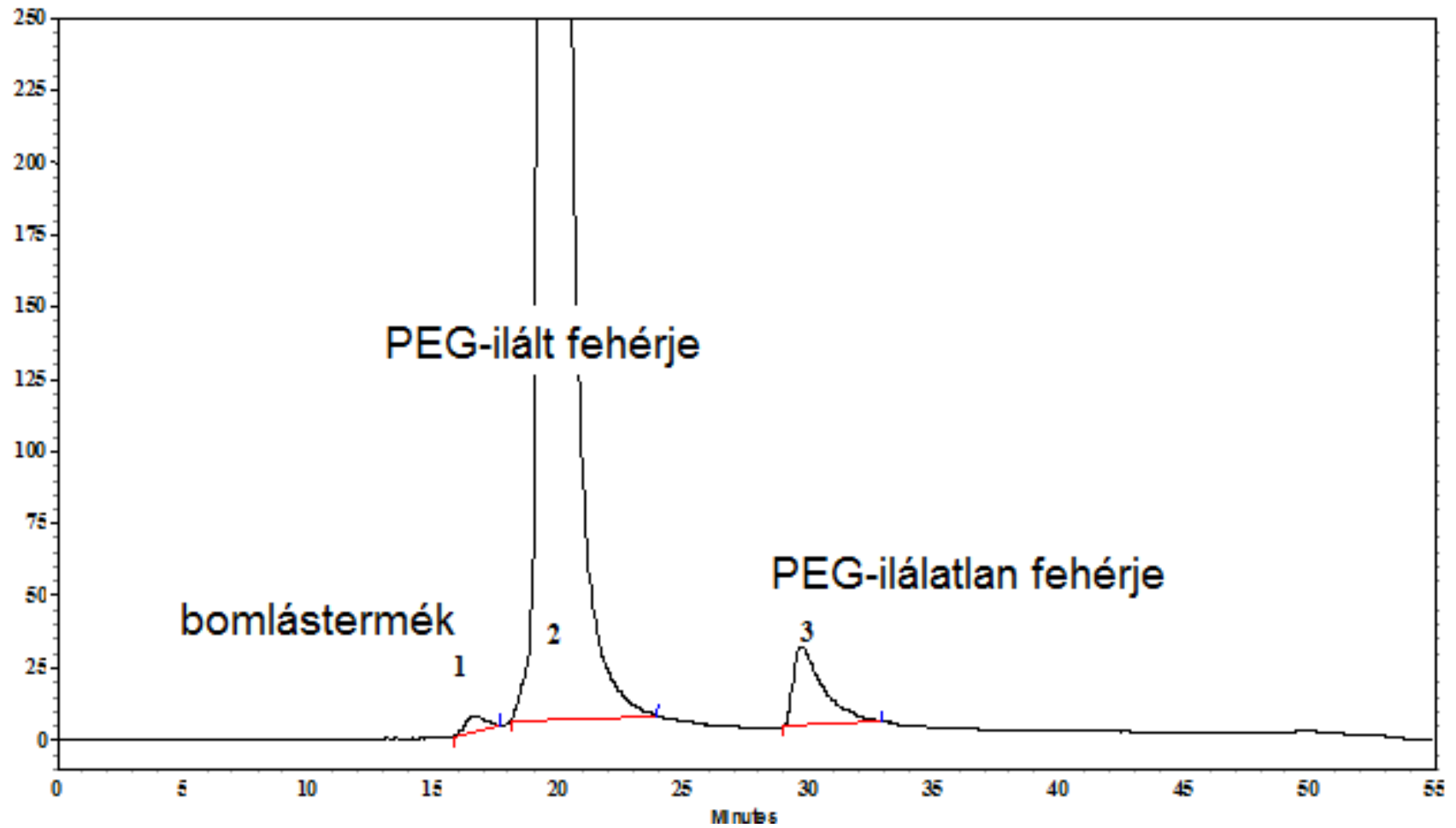
Intakt MAb variabilitás (lizin heterogenitás)



MAb papainos emésztmény (glutamin-glutaminsav, lizin heterogenitás)

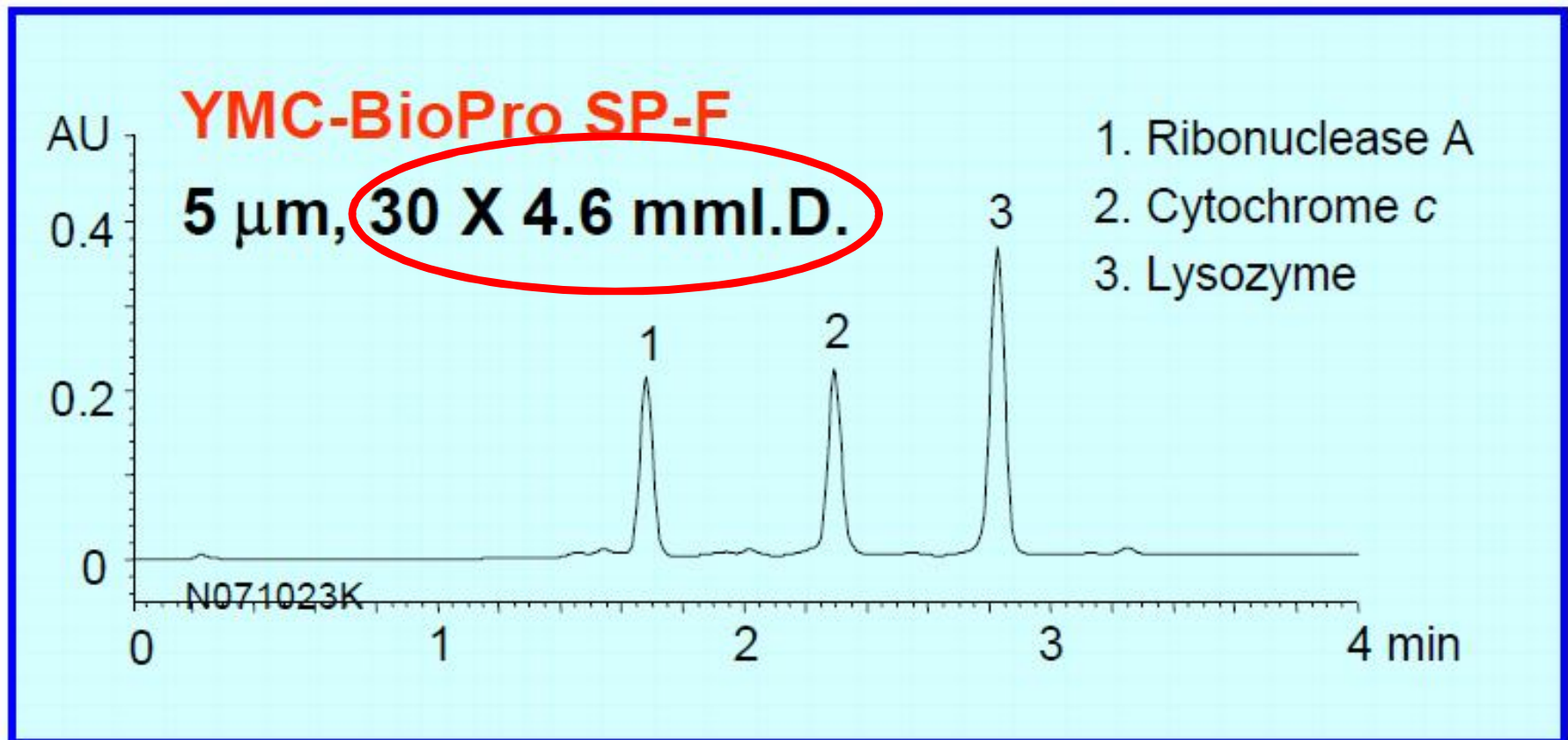


PEG-ilált fehérjék vizsgálata



Gyors ioncserés kromatográfia (Fast-IEX)

Eluent	: A) 20 mM KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 6.8) B) 20 mM KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 6.8) containing 0.5 M NaCl 0-100%B (0-4 min) for YMC-BioPro SP-F 0-100%B (0-4.67 min) for Brand T (non-porous S type)
Flow rate	: 1.5 mL/min
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 20 μL (0.1 mg/mL)



Javasolt irodalom

- Pécs Miklós: Biotermék Technológia 2, Poszttranszlációs módosítások előadás anyag
- Fekete Jenő: A folyadékkromatográfia elmélete és gyakorlata, Tankönyv, 2006
- Fekete Jenő: A folyadékkromatográfia fejlesztési irányai, 2008
- H. Chen, Cs. Horváth / Journal of Chromatography A 705 (1995) 3-20
- William S. Hancock, New Methods in Peptide Mapping for the Characterization of Proteins, CRC Press (Boca Raton, Florida, 1996)
- W.Wang: Protein aggregation Pathways and influencing factors, Int. J. Pharm. 390 (2010) 89-99
- S.T. Popovici, P.J. Schoenmakers / J. Chromatogr. A 1099 (2005) 92–102