

Aminokiseline, proteini

Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić

Značaj aminokiselina

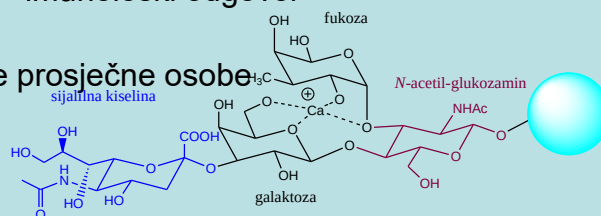
Vrste

- Strukturni
- Kontrakcija
- Transport
- Skladištenje
- Hormonalni
- Enzimi
- Protekcija

Primjeri

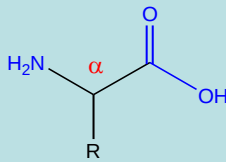
- tetiva, hrskavica, kosa, nokti
- mišići
- hemoglobin
- mlijeko
- insulin, hormon rasta
- katalitičke reakcije u stanici
- imunološki odgovor

- Čine 15 % mase prosječne osobe



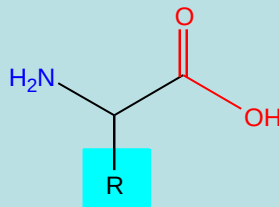
Aminokiseline

- Proteini pripadaju poliamidnoj klasi organskih spojeva
- Poliamidi su polimeri čije se monomerne jedinice vezane amidnom skupinom
- Monomerne jedinice proteina = α -aminokiseline



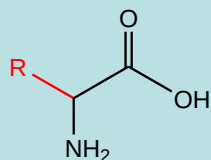
α -aminokiseline

- Aminokiseline – sadrže dvije funkcijske skupine: COOH i NH_2
- α -aminokiseline – amino skupina vezana na α C atom $\Rightarrow$ proteini
- Strukturna jedinica, $\text{RCH}(\text{NH}_3^+)\text{CO}_2^-$, R = pobočni lanac ili ogranak

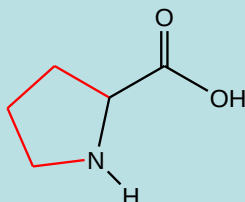


α -aminokiseline

- Od 20 α -aminokiselina sve su primarni amini osim prolina
- Prolin je sekundarni amin



osnovna jedinica
primarni amin

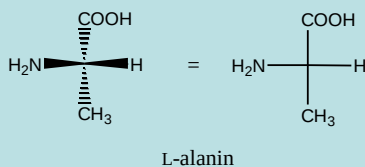


prolin
sekundarni amin

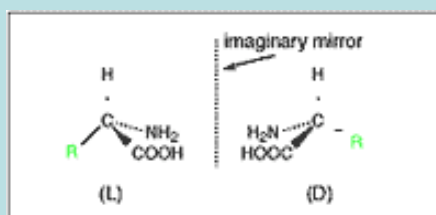
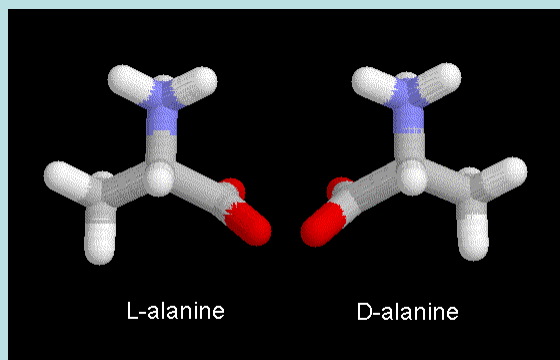
Stereokemija

Relativna konfiguracija

- Fischerova projekcijska formula
- 20 aminokiselina koje se nalaze u prirodi imaju L-konfiguraciju



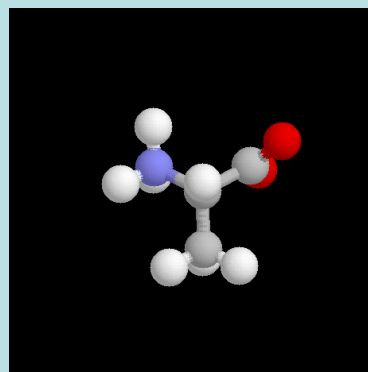
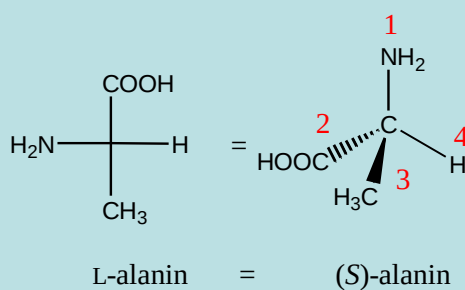
L- i D-izomeri alanina



Stereokemija

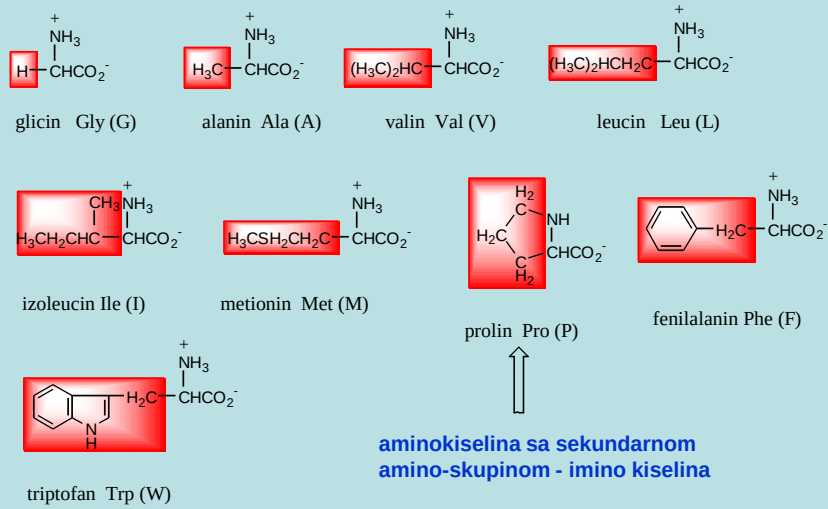
Apsolutna konfiguracija

- Sve AK u prirodi imaju S-konfiguraciju, osim cisteina ($R = \text{CH}_2\text{SH}$)

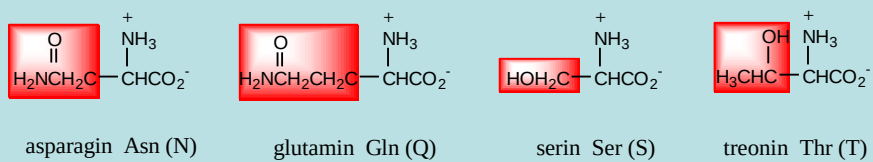


(S)-alanin

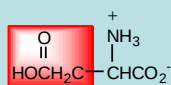
Aminokiseline s nepolarnim pobočnim lancima



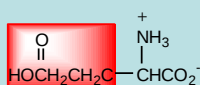
Aminokiseline s polarnim pobočnim lancima



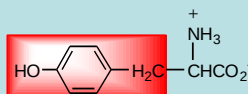
Aminokiseline s kiselim pobočnim lancima



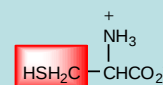
asparaginska
kiselina Asp (D)



glutaminska
kiselina Glu (E)

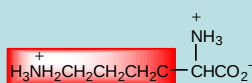


tirozin Tyr (Y)

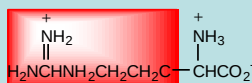


cistein Cys (C)

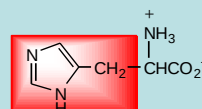
Aminokiseline s bazičnim pobočnim lancima



lizin Lys (K)



arginin Arg (R)



histidin His (H)

IUPAC-ova pravila i preporuke za nomenklaturu α -aminokiselina

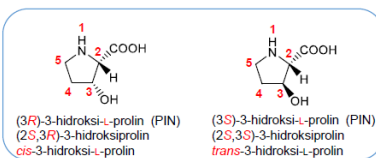
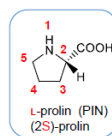
Imena (trivijalna) uobičajenih α -aminokiselina	Troslovnici simboli
alanin	Ala
arginin	Arg
asparagin	Asn
asparaginska kiselina	Asp
cistein	Cys
fenilalanin	Phe
glicin	Gly
glutamin	Gln
glutaminska kiselina	Glu
histidin	His
isoleucin	Ile
leucin	Leu
lizin	Lys
metionin	Met
prolin	Pro
serin	Ser
tirozin	Tyr
treonin	Thr
triptofan	Trp
valin	Val
neodređena aminokiselina	Xaa

Deskriptori za označivanje konfiguracije α -aminokiselina

➤ Stereodeskriptori za α -ugljikov atom

Apsolutna konfiguracija α -ugljikova atoma: **D** ili **L**

Racemična smjesa: **DL** > **rac**



➤ Stereodeskriptori za kiralne ugljikove atome različite od α -ugljikova atoma **R** ili **S** (**R*** i **S***)

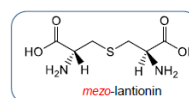
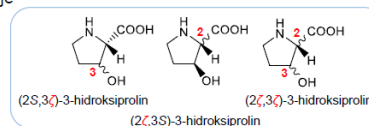
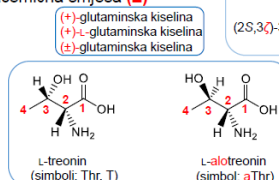
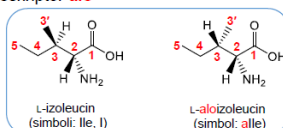
➤ Preporuka zadržavanja specifičnih stereodeskriptora **D** ili **L** za označivanje α -ugljikova atoma i **R** ili **S** za ostale kiralne C-atome

➤ Stereodeskriptor za nepoznatu konfiguraciju C-atoma je **ζ**

➤ Deskriptori optičkog skretanja su **(+)**, **(-)**, racemična smjesa **(±)**

➤ Deskriptor **mezo**

➤ Deskriptor **alo**



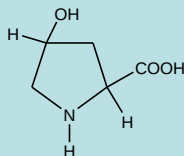
Esencijalne aminokiseline

- Od 20 aminokiselina koje grade proteine 10 AK se ne sintetiziraju u organizmu $\Rightarrow$ esencijalne AK
- Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val
- Te AK moramo unijeti prehranom: mliječni proizvodi, žitarice i povrće

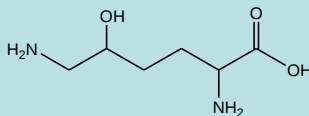


Rijetke i neobične aminokiseline

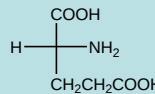
- 4-hidroksiprolin i 5-hidroksilizin su hidroksilirani derivati uobičajenih aminokiselina
- Nazivaju se rijetkim AK, izgrađuju kolagen
- U prirodi se također nalaze neuobičajeni D-izomeri AK:
 - D-glutaminska kiselina (gradi stanične stijenke nekih bakterija)
 - D-serin (gliste)



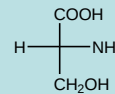
hidroksiprolin



5-hidroksilizin



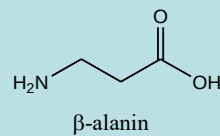
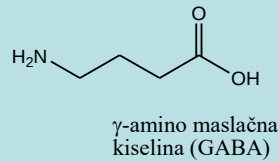
D-glutaminska
kiselina



D-serin

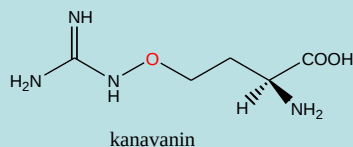
Rijetke i neobične aminokiseline

- Neke AK koje se nalaze u prirodi nisu α -aminokiseline:
 - γ -aminomaslačna kiselina (GABA) – neurotransmiter
 - β -alanin – gradi vitamin pantotensku kiselinu



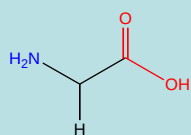
Rijetke i neobične aminokiseline

- Vinova loza *Vitis rotundifolia* (Dioscorea) sadrži kanavanin
- Zamijena arginina s kanavaninom (zamijena CH_2 s O) u svrhu "obrambenog mehanizma" od predatora
- Samo kukac *Caryedes brasiliensis* ima enzim koji prepoznaje razliku tih dviju AK i enzim koji razgrađuje kanavanin

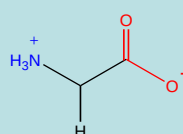


Fizikalna i kemijska svojstva aminokiselina

- Visoka točka tališta, uz raspadanje
- Odlična topljivost u vodi, netopljive u nepolarnim organskim otapalima (eter)
- Ionizacija -NH_2 i -COOH skupine
- Zwitter-ion sadrži oba naboja, + i – naboj
- Sveukupan naboj zwitter-iona α -aminokiselina (bez kiselih i baznih ogranaka) otopljenih u vodi kod pH7 je jednak 0



glicin

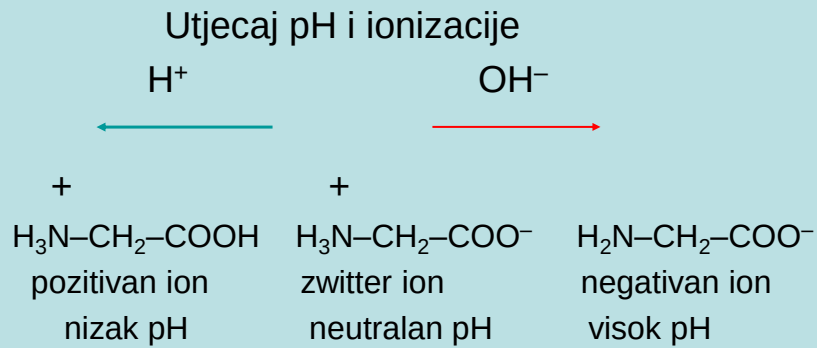


zwitter ion glicina

Fizikalna i kemijska svojstva aminokiselina

- Aminokiseline imaju veći dipolni moment (μ) od amina i kiselina:
 - glicin, $\mu = 14$ D, propilamin, $\mu = 1.4$ D, propionska kiselina, $\mu = 1.7$ D (izražena u debye-ima D, Peter Debye, Nobelova nagrada za kemiju 1936.)

Aminokiseline kao baze i kiseline



- α -aminokiseline – amfoterna svojstva jer reagiraju s kiselinom i bazom
- Djelotvorni puferi u biološkim sistemima

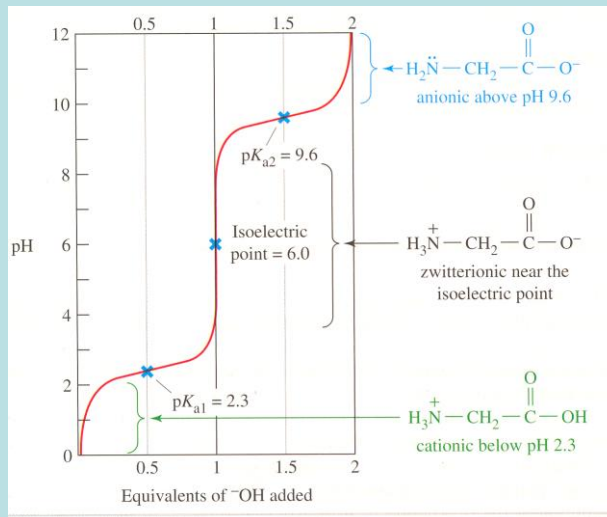
Aminokiseline kao baze i kiseline

- Niski pH - α -aminokiseline s cjelokupnim pozitivnim nabojem molekule
- Visoki pH - α -aminokiseline kao ioni s cjelokupnim negativnim nabojem
- Za svaku AK između tih vrijednosti postoji pH kod kojeg je sveukupni naboj molekule neutralan (pI)

Izoelektrična točka, pI

- **Izoelektrična točka** = pH kod kojeg je koncentracija amonijevih iona ($^+\text{NH}_3\text{CHRCOOH}$) jednaka koncentraciji karboksilnih ($\text{NH}_2\text{CHRCOO}^-$) iona

- Titracijska krivulja za glicin:
 - kationski oblik pH < 2.3
 - anionski oblik pH > 9.6
 - zwitter ion 2.3 > pH < 9.6



Izoelektrična točka

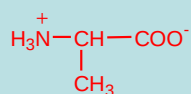
- Izoelektrična točka ovisna je o strukturi AK:
 - kisele AK: asparaginska (2.8) i glutaminska (3.2) kiselina
 - neutralne AK: 5.6 – 6.3
 - bazične AK: lizin (9.7), arginin (10.8), histidin (7.6)

Kemijska svojstva aminokiselina

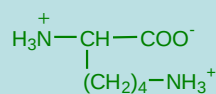
- Zbog ovakvih svojstava omogućena djelotvorna analiza i separacija AK iz smjese
- Pod utjecajem električnog polja kod pl vrijednosti aminokiseline ne putuju
- Tehnika odvajanja aminokiselina (proteina) – **elektroforeza** – molekule s različitim pl putuju u električnom polju kod određenog pH različitom brzinom

Elektroforeza

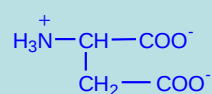
- Odvajanje aminokiselina s različitim izoelektričnim točkama iz smjese
- Smjesa AK na sredini akrilamidnog gela (ili filter papira) u pufer otopini, elektrode, napon - odvajanje molekula na gelu jer putuju različitom brzinom ovisno o njihovoj veličini i naboju
- Smjesa alanina (6.0), lizina (9.7) i asparaginske kiseline (2.8) u pufer otopini pH 6
- *Strukture AK kod pH 6:*



alanin
(naboj 0)

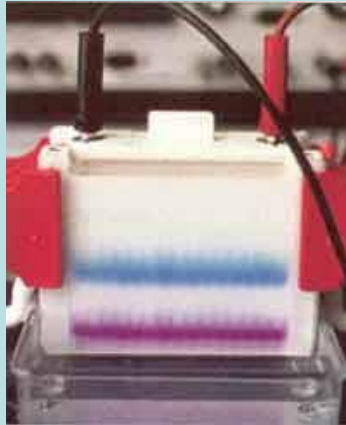


lizin
(naboj +1)



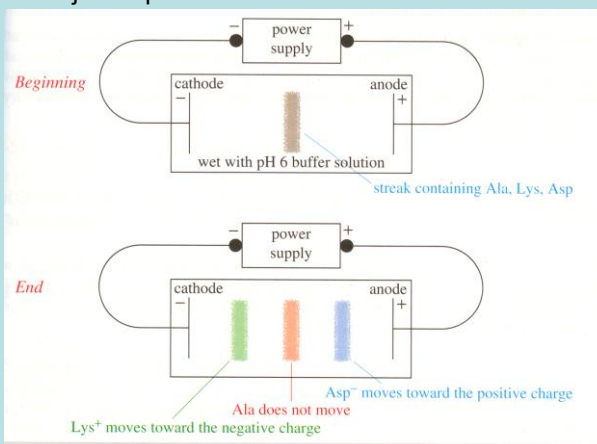
asparaginska kis.
(naboj -1)

Vertikalna gel-elektroforeza



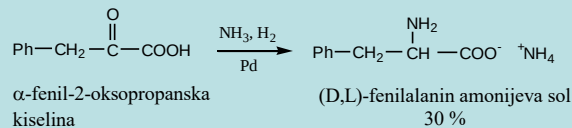
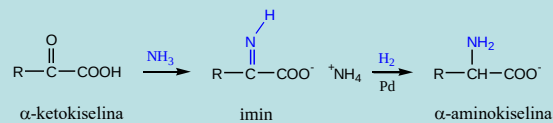
Elektroforeza

- *Horizontalna gel-elektroforeza*
- Lizin putuje prema katodi, a asparaginska kiselina prema anodi, alanin ne putuje
- Analitička metoda i metoda izolacije AK (separacija AK iz gela)
- Kod analitičke metode se koristi reagens ninhidrin za obilježavanje AK, određivanje AK prema standardu



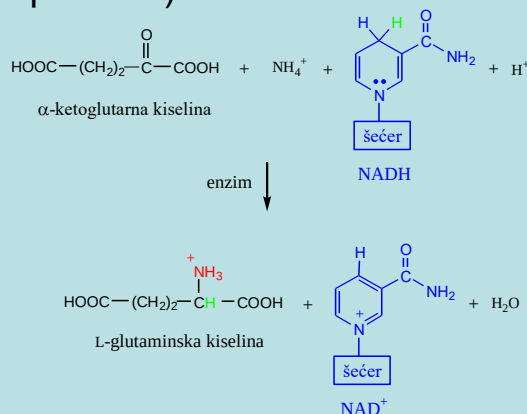
Sinteza aminokiselina

- **Reduktivno aminiranje** – priprava amina i aminokiselina
- α -ketokiselina s amonijakom $\rightarrow$ nastaje imin, potom redukcijom imina pomoću vodika i paladija kao katalizatora nastaje amin (karboksilna skupina se ne reducira)
- Produkt je u obliku racemične smjese



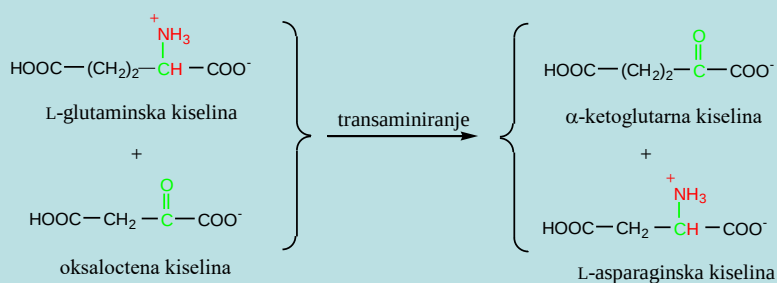
Sinteza aminokiselina

- Reduktivno aminiranje slično biološkoj sintezi aminokiselina $\rightarrow$ biomimetika (oponašanje bioloških procesa)



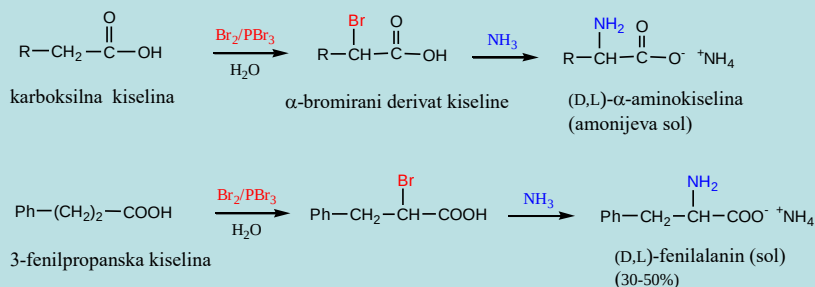
Biosinteza aminokiselina

- L-glutaminska kiselina kao donor amino funkcionalne skupine u sintezi drugih aminokiselina → transaminiranje (prijenos amino skupine s jedne molekule na drugu)
- Biosinteza katalizirana enzimom daje enantiomerno čist produkt, L-enantiomer



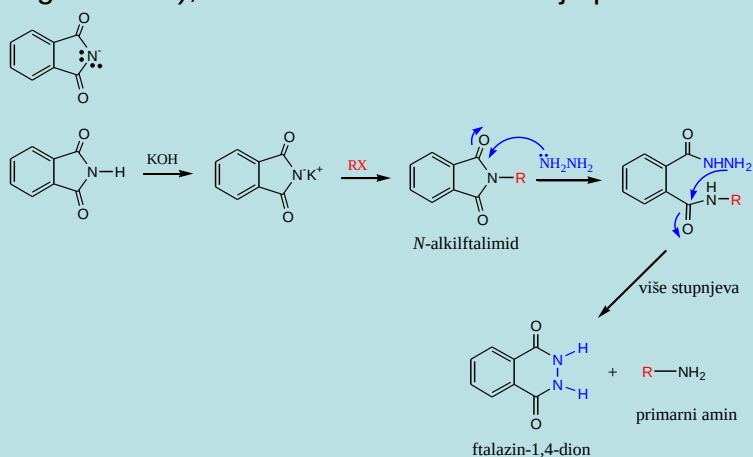
Sinteza aminokiselina

- *Aminiranje α -halogenih kiselina*
- Hell-Volhard-Zelinsky reakcija – djelotvorna metoda za uvođenje atoma broma u α -položaj karboksilne kiseline
- Racemična smjesa α -brom-kiseline prevodi se direktnim aminiranjem (NH_3 u suvišku) u α -aminokiselinu u obliku racemične smjese



Sinteza aminokiselina

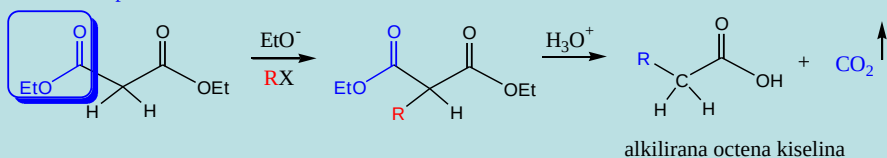
- Gabrijelova sinteza amina (1887.) – sinteza primarnih amina pomoću aniona ftalimida (dobar nukleofil koji zamjenjuje halogeni atom), zatim s hidrazinom nastaje primarni amin



Sinteza aminokiselina

- Reakcije estera malonske kiseline
 - alkiliranje dietilnog estera malonske kiseline
 - hidroliza i dekarboksiliranje – alkilirani derivat octene kiseline

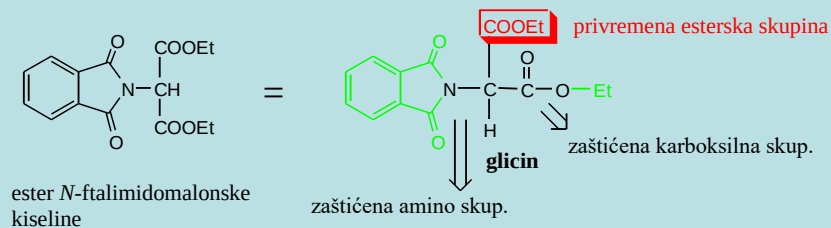
privremena
esterska skupina



Sinteza aminokiselina

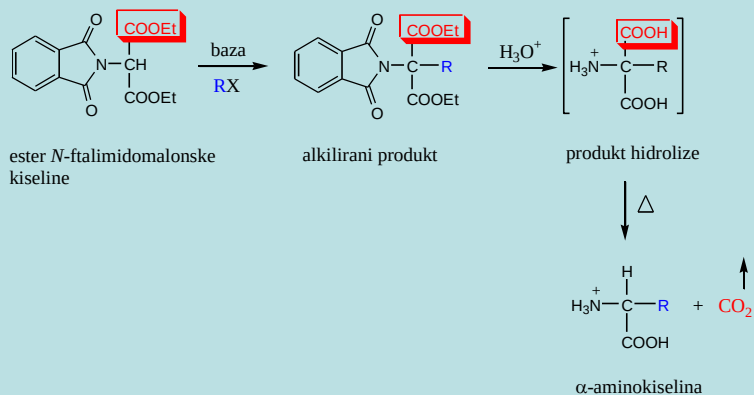
- Kombinirana sinteza modificirane *Gabrijelove sinteze i reakcije estera malonske kiseline*

1. Ester *N*-ftalimidomalonske kiseline



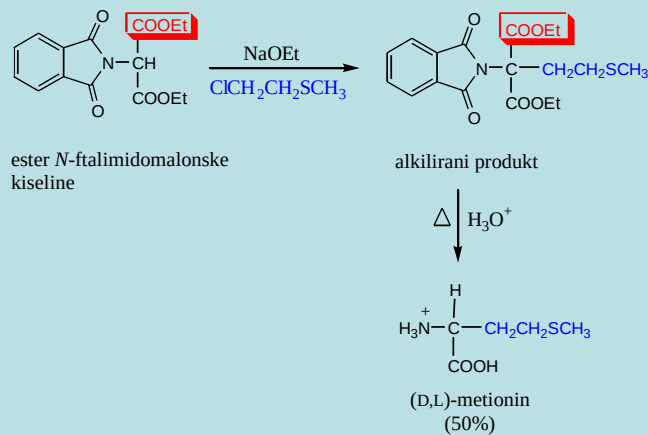
Sinteza aminokiselina

- Alkiranje estera *N*-ftalimidomalonske kiseline
- Hidroliza ftalimidne skupine i dviju esterskih skupina – alkilirana aminomalonska kiselina
- Dekarboksiliranje – racemična smjesa α -aminokiseline



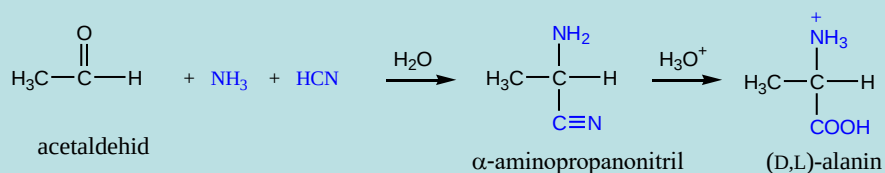
Sinteza aminokiselina

- Sinteza metionina



Sinteza aminokiselina

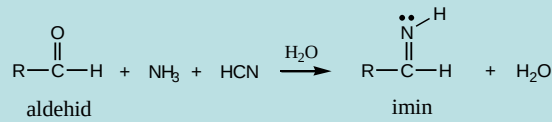
- Streckerova sinteza** (1850.) – acetaldehid u vodenoj otopini amonijaka i HCN $\rightarrow$ potom hidrolizom α -aminopropionitrila nastaje racemična smjesa alanina



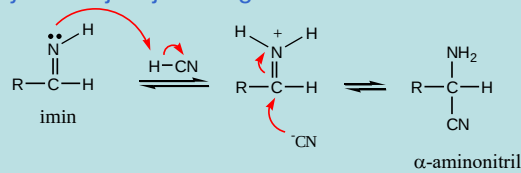
- Streckerovom sintezom nastaju mnoge aminokiseline iz odgovarajućih aldehida

Sinteza aminokiselina

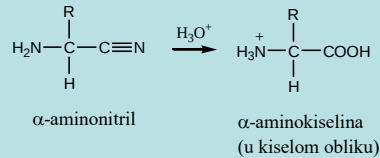
1. stupanj: aldehid s amonijakom daje imin



2. stupanj: reakcija cijanidnog aniona s iminom α-aminonitril

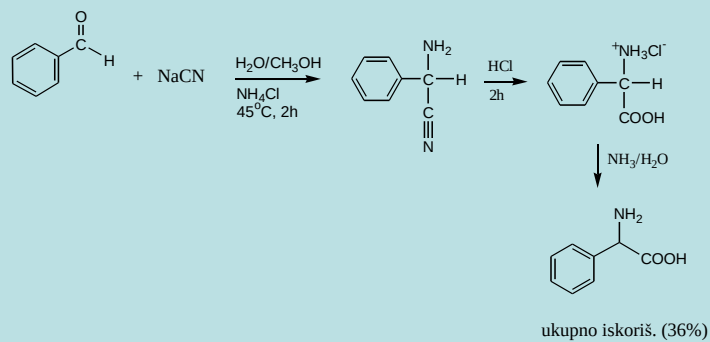


3. stupanj: hidroliza α-aminonitrila do α-aminokiseline



Sinteza aminokiselina

• Streckerova sinteza

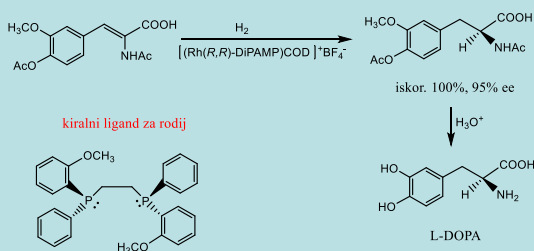


Asimetrična sinteza aminokiselina

- Asimetrična (enantioselektivna) sinteza – kojom nastaje samo ili uglavnom jedan enantiomer
- Metoda hidrogeniranja enamida pomoću prijelaznog metala kao kiralnog katalizatora
- Enantioselektivna sinteza L-DOPA, (S)-3,4-dihidroksifenilalanin (lijek za liječenje Parkinsonove bolesti), Knowles, 2001. god. Nobelova nagrada

Asimetrična sinteza aminokiselina

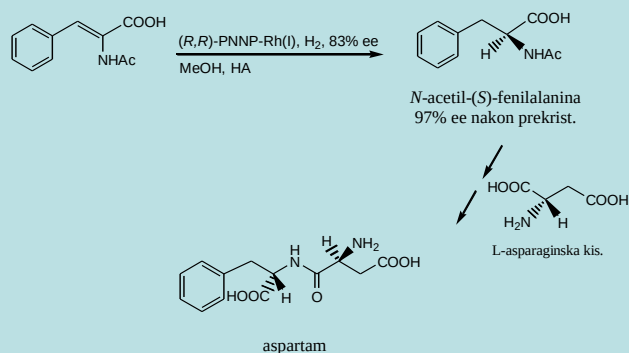
- Sinteza L-DOPA primjenom kiralnog rodijeveg fosfornog liganda, (R,R)-DiPAMP, reakcija hidrogeniranja u 95% enantiomernom suvišku, te potom skidanje zaštitnih skupina



(R,R)-DiPAMP
(R,R)-1,2-bis(1-(2-metoksifenil)fenil)fosfinoetan

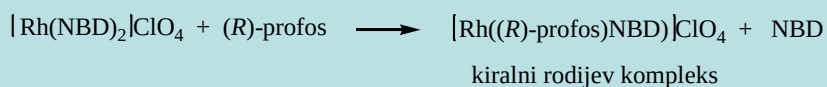
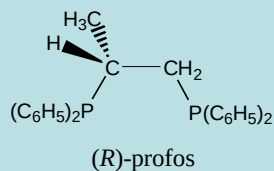
Asimetrična sinteza aminokiselina

- Primjena kod industrijske sinteze acetiliranog derivata L-fenilalanina koji se primijenjuje u sintezi umjetnog sladila aspartama
- *(R,R)*-PNNP, *N,N*-bis(difenilfosfino)bis[*(R)*-1-feniletil]etilendiamin - kiralni ligand za hidrogeniranje



Asimetrična sinteza aminokiselina

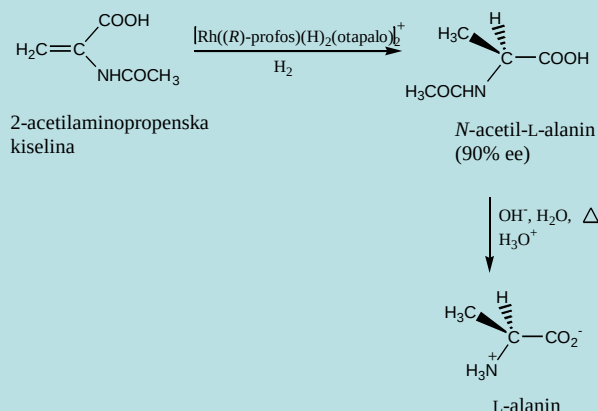
- Primjena kompleksa rodij-norbornadien(NBD)-(*R*)-profos



- Rodijev kompleks s vodikom u etanolu daje aktivni kiralni katalizator za reakciju hidrogeniranja

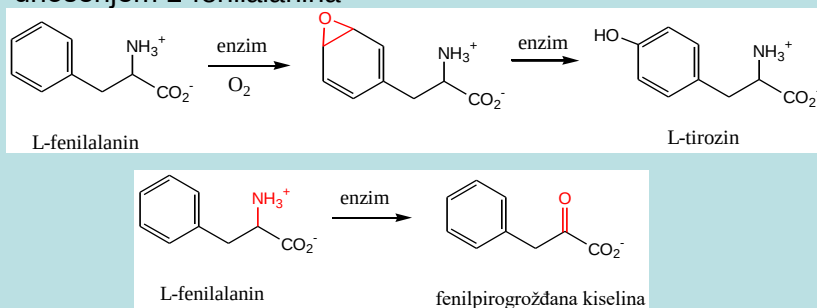
Asimetrična sinteza aminokiseline

- Hidrogeniranjem 2-acetilaminopropenske kiseline s kiralnim katalizatorom nastaje *N*-acetil-L-alanin u 90% ee, potom hidrolizom nastaje L-alanin



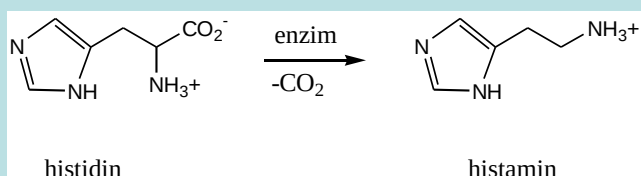
Biokemijske reakcije AK

- L-fenilalanin esencijalna AK, dok njezin *p*-hidroksi derivat, L-tirozin to nije
- Hidroksilacijom aromatskog prstena se prevodi L-fenilalanin u L-tirozin
- Neki ljudi nemaju enzim za transformaciju L-fenilalanin već tu AK prevode u fenilpirogroždanu kis.
- Može izazivati mentalnu retardaciju kod novorođenčadi – bolest nazvana fenilketonurija, PKU – kontrolirati ograničenim unošenjem L-fenilalanina



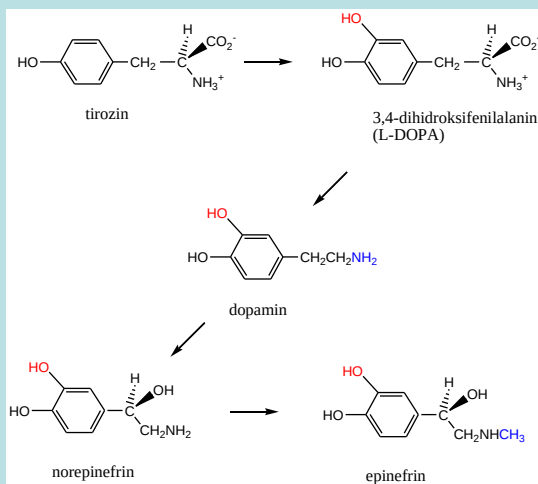
Biokemijske reakcije AK

- Histamin – odgovoran za mnoge simptome peludne groznice i drugih alergijskih reakcija
- Antihistaminici – ublažavaju simptome blokiranjem djelovanja histamina



Biokemijske reakcije AK

- Neurotransmiteri
- Nastali strukturnim modifikacijama i dekarboksilacijom iz L-tirozina

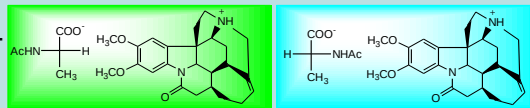
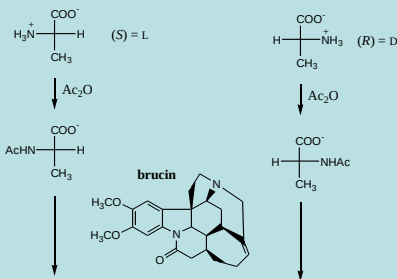


Rezolucija aminokiselina

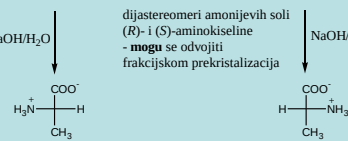
- Pripravom diastereomernih amonijevih soli (različita svojstva) - mogu se odvojiti prekrizacijom ili kromatografijom
- Koriste se kiralni amini poput alkaloida (brucin) - optički aktivni alkaloidi dostupni u prirodi



Strychnos nux-vomica L.)

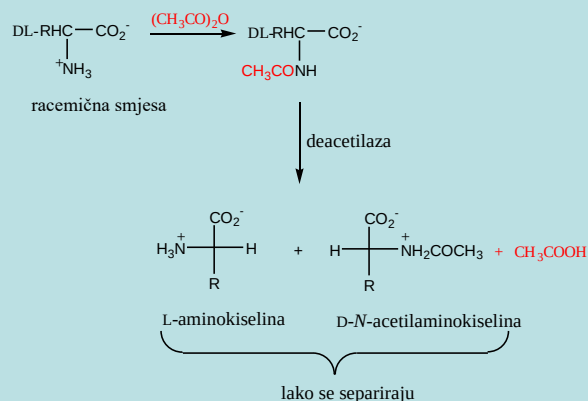


dijastereomeri amonijevih soli (R)- i (S)-aminokiseline - mogu se odvojiti frakcijskom prekrizacijom



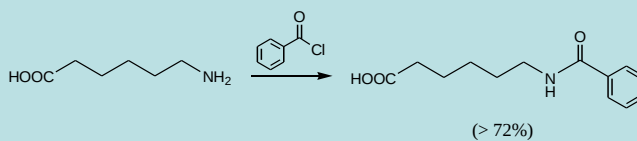
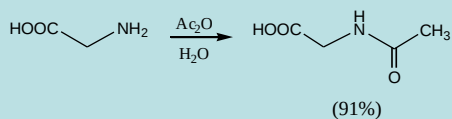
Rezolucija aminokiselina

- Rezolucija aminokiselina primjenom enzima *deacetilaze* – katalizira hidrolizu *N*-acetilaminokiselina u organizmu
- Zbog kiralnog aktivnog mjesta enzima odvija se hidroliza samo L-*N*-acetilaminokiselina



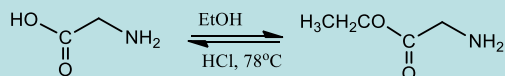
Reakcije aminokiselina

- Reakcije s amino i karboksilnom skupinom
- Aciliranje
 - aciliranje amino skupine pomoću acilirajućih reagensa (acetanhidrid, benzoil-klorid, acetil-klorid...)



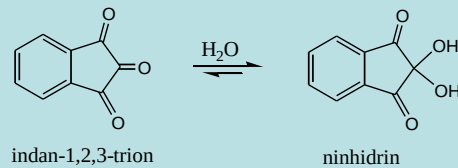
Reakcije aminokiselina

- Esterifikacija
 - esterifikacija karboksilne skupine aminokiselina



Reakcije aminokiselina

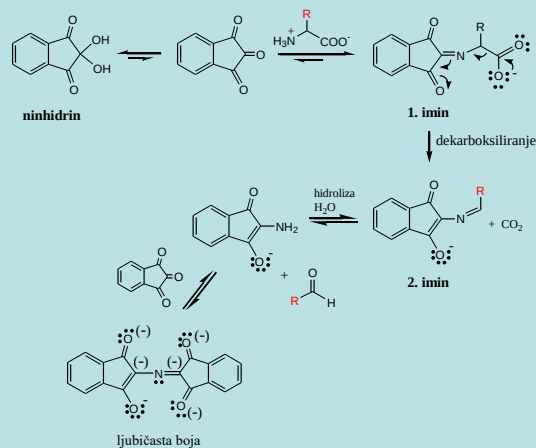
- Reakcije s ninhidrinom
 - aminokiseline (osim prolina i hidroksiprolina) s ninhidrinom stvaraju tamnoljubičastu boju – detekcija AK



- Ravnoteža hidratnog oblika i karbonilnog derivata ninhidrina

Reakcije aminokiselina

- Aminokiselina s trionom daje 1. imin $\rightarrow$ dekarboksiliranje, 2. imin $\rightarrow$ hidroliza, gubitak ogranka R aminokiseline, nastaje amin $\rightarrow$ reakcija amina s drugom molekulom ninhidrina, konjugirani produkt



Sinteza polipeptida: primjena zaštitnih skupina

- Selektivna sinteza peptida zahtijeva primjenu zaštitnih skupina
- Reagensi koji se primjenjuju za zaštitu funkcionalnih skupina:

ClC(=O)OCC1=CC=CC=C1

benzilklorformat

CC(C)(C)OC(=O)C(=O)OC(C)(C)C

di-*tert*-butilkarbonat

ClC(=O)OCC1=C2C(=C3C=C1C=CC=C3C2)C=C4C=CC=CC=C4

9-fluorenilmetilklorformat

- Reagiraju s amino skupinom i blokiraju je u sljedećim reakcijama
- Skidanje navedenih zaštitnih skupina u uvjetima koji ne mijenjaju peptidne veze

- $$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{Cl}$$

benzylchlorformat

$$(\text{CH}_3)_3\text{CO}-\text{C}(=\text{O})-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$$

di-*tert*-butylkarbonat



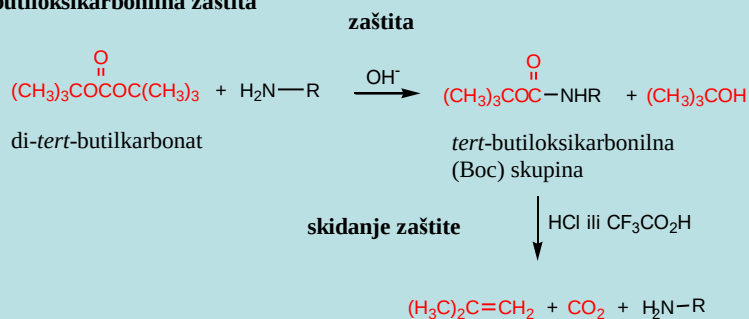
9-fluorenylmethylchlorformat

- # Sinteza polipeptida: primjena zaštitnih skupina
- Benziloksikarbonilna skupina može se skinuti katalitičkim hidrogeniranjem ili pomoću HBr u octenoj kislini
- Benziloksikarbonilna skupina**
- zaštita
- benziloklorformat** + $\text{H}_2\text{N}-\text{R} \xrightarrow{\text{OH}^-}$ **benziloksikarbonilna skupina** + Cl^-
- skidanje zaštite**
- HBr / octena kis.
- $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{Br} + \text{CO}_2 + \text{NH}_2-\text{R}$
- H_2/Pd
- $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 + \text{CO}_2 + \text{NH}_2-\text{R}$

Sinteza polipeptida: primjena zaštitnih skupina

- Tert*-butiloksikarbonilna (Boc) skupina može se skinuti s pomoću trifluoroctene kiseline ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) u octenoj kiseline

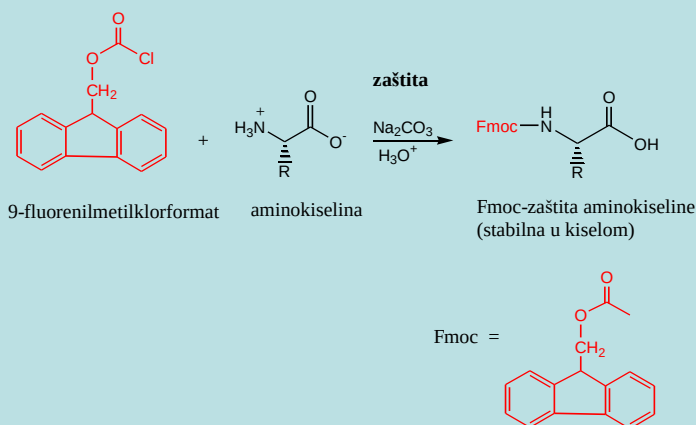
Tert-butiloksikarbonilna zaštita



Sinteza polipeptida: primjena zaštitnih skupina

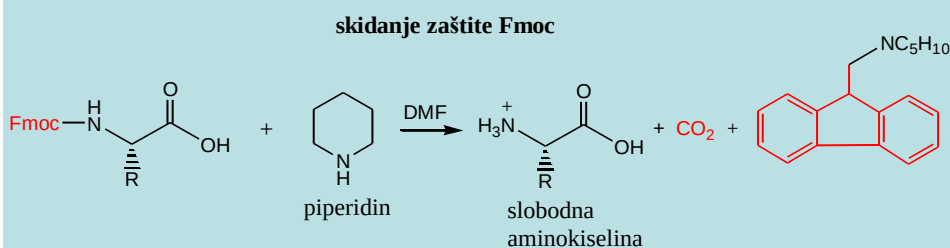
- 9-Fluorenilmetoksikarbonilna (Fmoc) skupina stabilna je u kiselim uvjetima

9-fluorenilmetoksikarbonilna zaštita



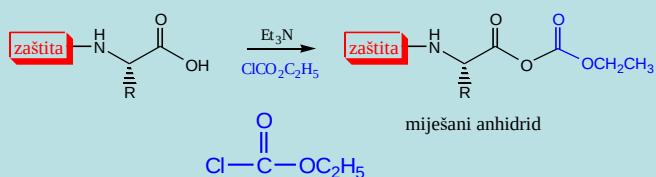
Sinteza polipeptida: primjena zaštitnih skupina

- Uklanjanje Fmoc skupine provodi se u blagim bazičnim uvjetima primjenom piperidina



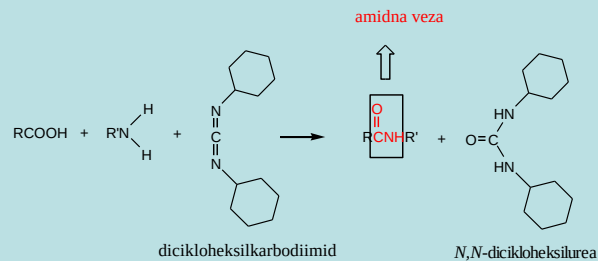
Sinteza polipeptida: primjena zaštitnih skupina

- **Aktiviranje karboksilne skupine**
- U ranoj metodi sinteze peptida prevođenje karboksilne skupine u acil-kloridnu skupinu – nedostatak: velika reaktivnost i nus-reakcije
- Primjena etilklorformata – nastaje miješani anhidridni derivat AK koji se može nadalje koristiti za stvaranje amidne veze, vezanje s drugom AK



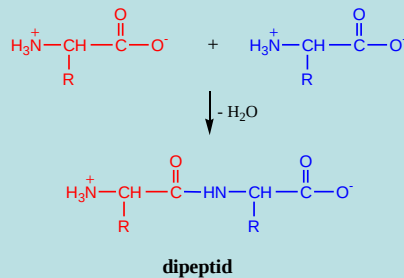
Sinteza polipeptida: primjena zaštitnih skupina

- **Aktiviranje karboksilne skupine**
- Dicikloheksilkarbodiimid (DCC) - često korišteni reagens



Polipeptidi i proteini

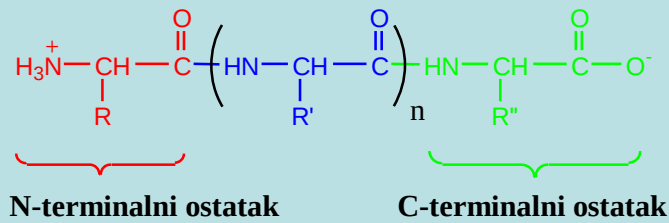
- Polimerizacija aminokiselina pomoću enzima u živim organizmima – povezivanje AK preko amino i karboksilne skupine → PEPTIDI



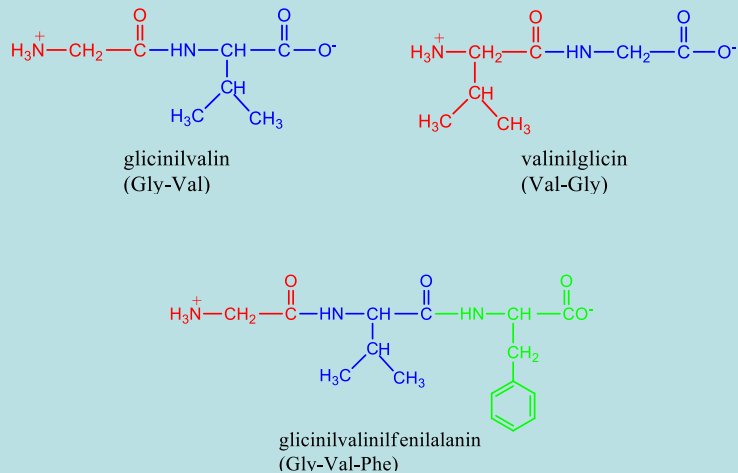
- Dipeptidi (2 AK), tripeptidi (3 AK), oligopeptidi (3-10 AK) i polipeptidi
- Proteini su polipeptidi koji se sastoje od jednog ili više polipeptidnih lanaca

Polipeptidi i proteini

- Poli-peptidi su linearni polimeri
- Na jednom kraju lanca je slobodna --NH_3^+ skupina, dok je na drugom kraju lanca slobodna --CO_2^- skupina
- N-terminalni ostatak na lijevoj, a C-terminalni ostatak na desnoj strani polipeptidnog lanca

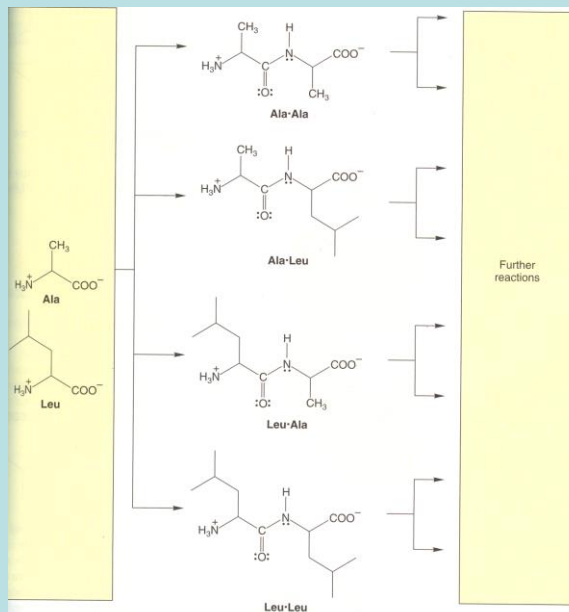


Polipeptidi i proteini



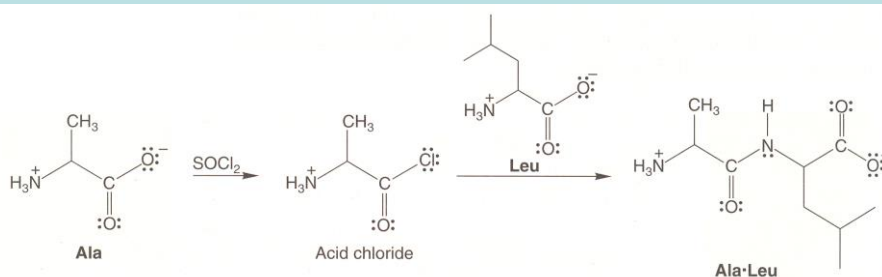
Sinteza polipeptida

- U sintezi dipeptida Ala-Leu možemo dobiti 4 dimerne molekule i ostale veće peptide



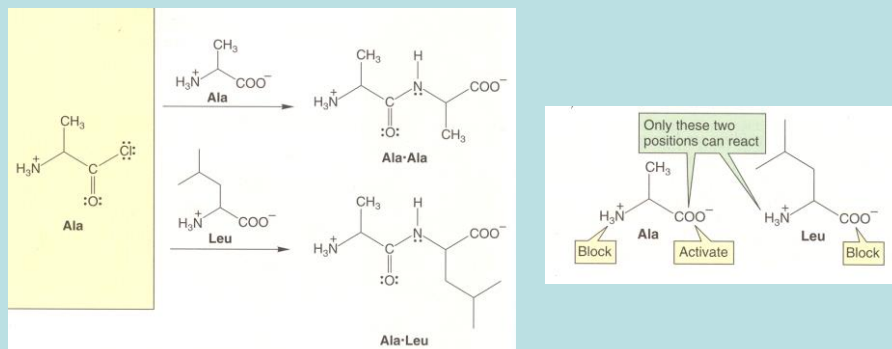
Sinteza polipeptida

- Strategija
 - aktivirati karboksilnu skupinu alanina prevođenjem u acilni klorid ili mješoviti anhidrid
 - nakon toga reakcija s leucinom



Sinteza polipeptida

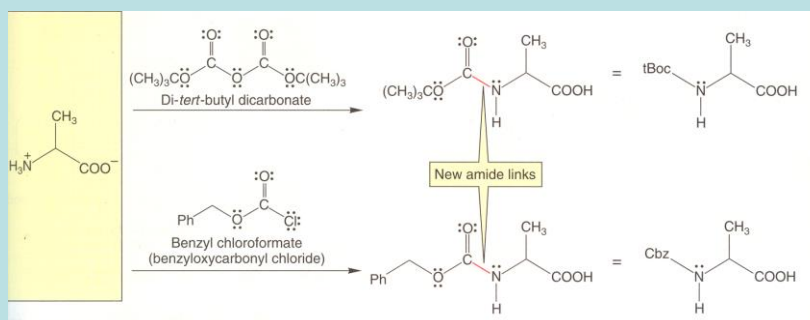
- Reakcijom acil-klorida s amino skupinom alanina i leucina dobijemo smjesu produkata



- Blokirati karboksilnu skupinu leucina i amino skupinu alanina!
- Moramo imati na umu da ćemo zaštitne skupine uklanjati!

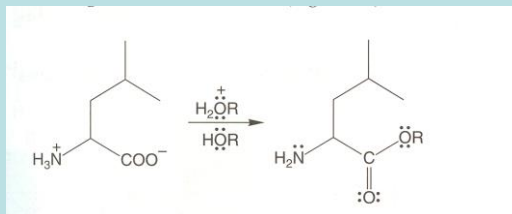
Sinteza polipeptida

- Deaktiviranje amino skupine transformacijom (adicija-eliminacija) u *tert*-butiloksikarbonilnu (Boc) i benziloksikarbonilnu skupinu (Cbz)



Sinteza polipeptida

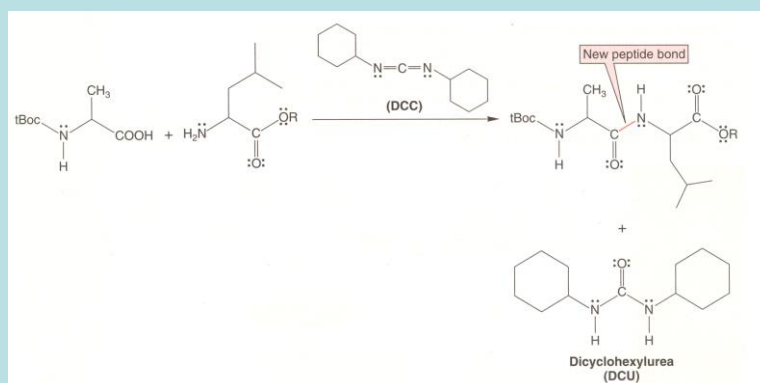
- Deaktiviranje karboksilne skupine leucina jednostavnim prevođenjem u ester



- Povezati nezaštićenu amino skupinu Leu i karboksilnu skupinu Ala u blagim uvjetima
- Dicikloheksilkarbodiimid (DCC) za stvaranje peptidne veze
- Nastajanje amidne veze je reakcija dehidratiranja, DCC snažan reagens za dehidratiranje

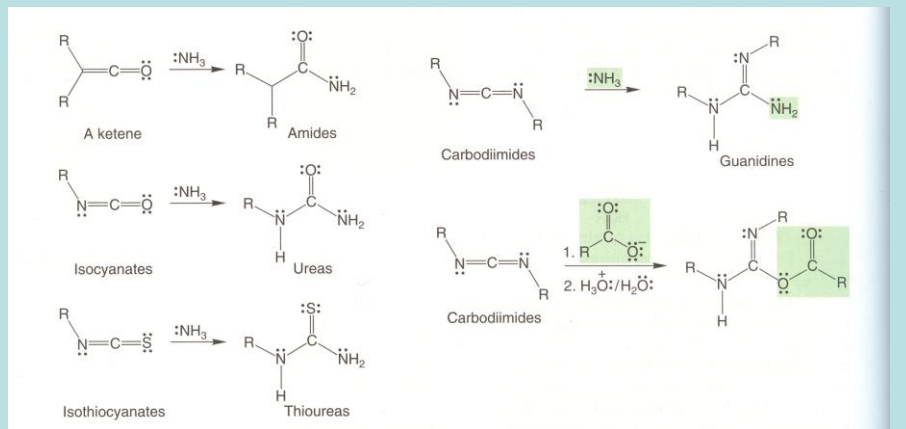
Sinteza polipeptida

- DCC se prevodi u hidratirani oblik dicikloheksilureu (DCU)



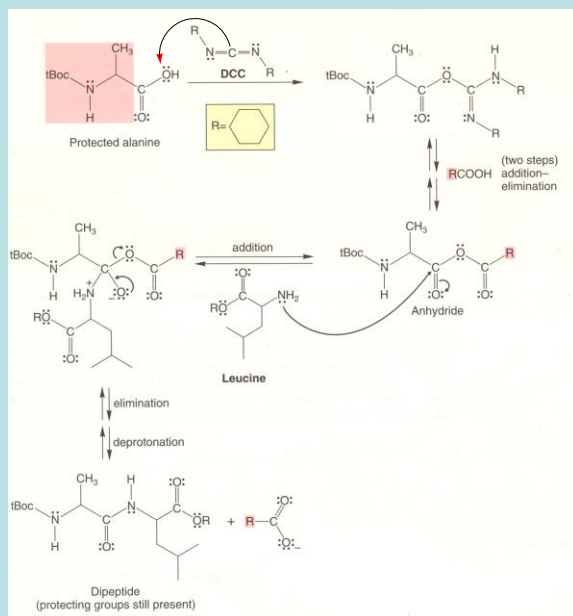
Sinteza polipeptida

- Keteni, izocijanati i izotiocijanati: spojevi s kumuliranim dvostrukim vezama snažno reagiraju s nukleofilima
- DCC reagira s aminima i nastaje gvanidin
- Reakcija DCC-a s karboksilatima



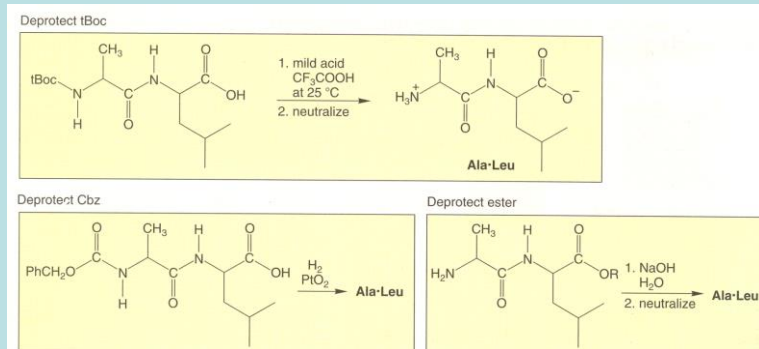
Sinteza polipeptida

- Nezaštićena karboksilna skupina u Ala i DCC → intermedijar koji reagira s karboksilnom kis. → anhidrid koji adic.-elim. meh. s Leu tvori dipeptid sa zaštićenim skupina



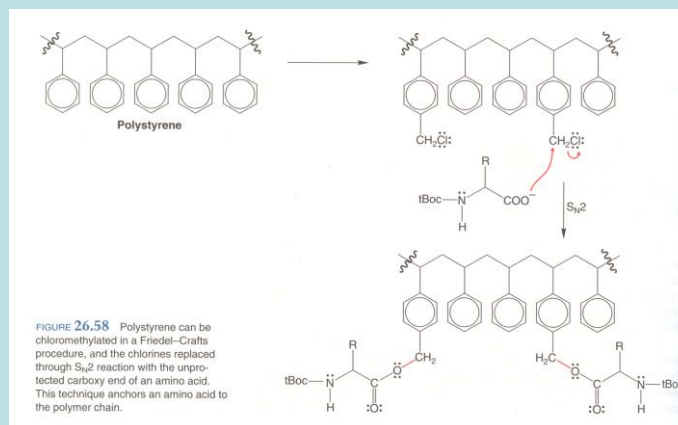
Sinteza polipeptida

- Slijedi skidanje zaštite Boc u blago kiselim uvjetima (nema cijepanja amidne veze) ili zaštite Cbz katalitičkim hidrogeniranjem
- Tretiranje estera s bazom → regeneriranje kis. → **Ala-Leu**
- Višestupnjevite sinteze većeg peptida ili proteina, nedostatak: nisko ukupno iskorištenje



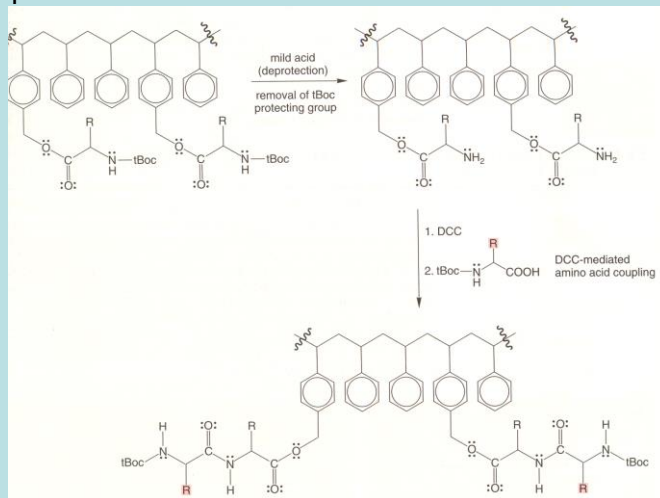
Sinteza polipeptida

- Automatizirane sinteze - **Merrifieldov** postupak
- Vežanje karboksilne skupine Boc-zaštićene AK na polimerni materijal izgrađen od polistirena u kojem su neki fenilni prstenovi supstituirani s klometilnim skupinama
- $\text{S}_{\text{N}}2$ reakcijom atom klora zamjenjuje se s AK



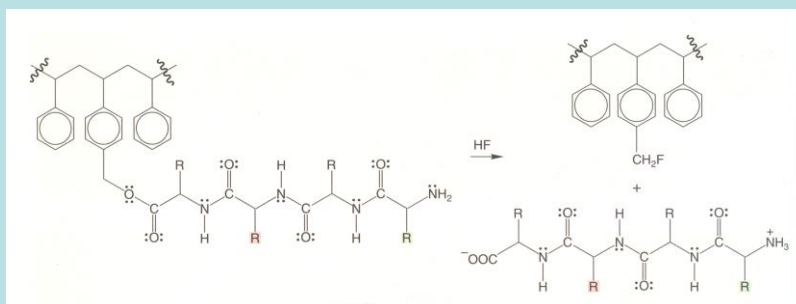
Sinteza polipeptida

- Skidanje zaštite Boc – slobodne amino skupine, povezivanje s AK primjenom dicikloheksilkarbodiimida (DCC)
- Ponavljanje ovog stupnja ovisno o duljini željenog peptida koji je vezan na polistiren



Sinteza polipeptida

- Završni stupanj je skidanje sintetiziranog peptida s nosača reakcijom s fluorovodičnom (HF) ili drugom kiselinom



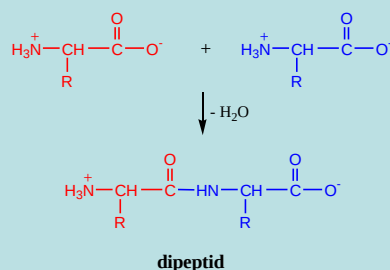
- Prvim automatiziranim postupkom Merrifield je sintetizirao peptidni lanac od 124 AK (iskorištenje 17%)
- Sinteza peptida na čvrstoj fazi - Nobelova nagrada 1984. god.

Reakcije povezivanja ogranaka AK

- Kod većine proteina α -AK kovalentno povezane – R skupine međusobno reagiraju
- Najčešća povezanost ogranaka pomoću disulfidnog mosta (-S-S-) – nastaje iz dvije molekule cisteina, unakrsno povezivnje (“cross-link”) važan u formiranju 3D strukture proteina
- Nastajanje i kidanje disulfidne veze je redoks reakcija

Reakcije kondenzacije

- U snažnijim reakcijskim uvjetima amino-skupina jedne molekule i karboksilna skupina druge se povezuju $\Rightarrow$ sekundarni amid
- Reakcija kojom organizmi grade proteine iz α -aminokiselina
- Zašto je kemičarima problem tom konvencionalnom tehnikom sintetizirati proteine?

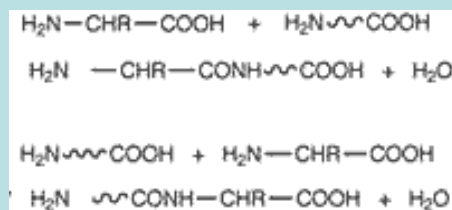


Reakcije kondenzacije

- Problemi s kojima se susreće sintetski organski kemičar:
 1. Skupina -COOH u α -aminokiselinama nedovoljno reaktivna za kondenzaciju s -NH_2 skupinom u blagim uvjetima
 2. Polipeptidni lanac gradi se jedinicu po jedinicu – ne izlagati sintetizirani peptid uvjetima u kojima će se nastala peptidna veza hidrolizirati
 3. Mnoge α -aminokiseline sadrže pobočne lance s funkcionalnim skupinama koje reagiraju u reakcijskim uvjetima za izgradnju peptidne veze

Reakcije kondenzacije

4. Polipeptidni lanac ima dva reaktivna kraja (COOH , NH_2), sintetski kemičar mora biti siguran da se svaka nova NH_2 skupina doda na ispravan kraj lanca



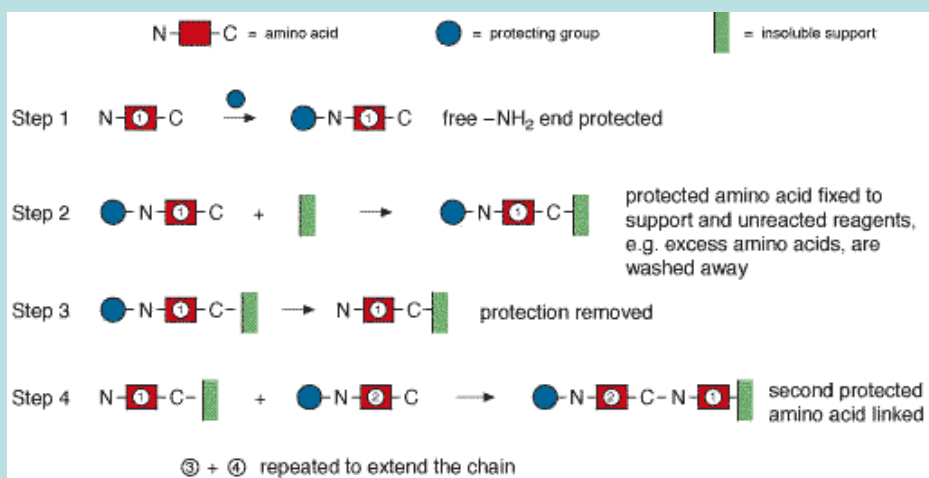
5. Svako produljavanje peptidnog lanca za jednu AK je jedan stupanj reakcije nakon kojeg slijedi pročišćavanje i izolacija produkta – svaki stupanj mora imati visoko iskorištenje

Reakcije kondenzacije

- Kemičari su probleme riješili na sljedeće načine:
 - problemi 1 i 2 - primjenom reagensa koji povećava reaktivnost - COOH skupine u blagim uvjetima
 - problem 3 – zaštitom reaktivnih funkcijskim skupina sa zaštitnim skupinama koje se na kraju mogu skinuti u blagim uvjetima
 - problem 4 – zaštitom skupina α -AK i polipeptida koje se ne povezuju sa zaštitnim skupinama koje se na kraju mogu lako skinuti
 - problem 5 – vezivanjem rastućeg polipeptidnog lanca za netopljiv nosač izgrađen od smole, ispiranje topljivih nus-produkata i neizreagiranog reagensa prije dodatka sljedeće α -AK. Nakon završene sinteze polipeptidni lanac se skida sa smole

Sinteza peptida na čvrstoj fazi

- Stupnjevi uključeni u sintezi peptida na čvrstoj fazi:

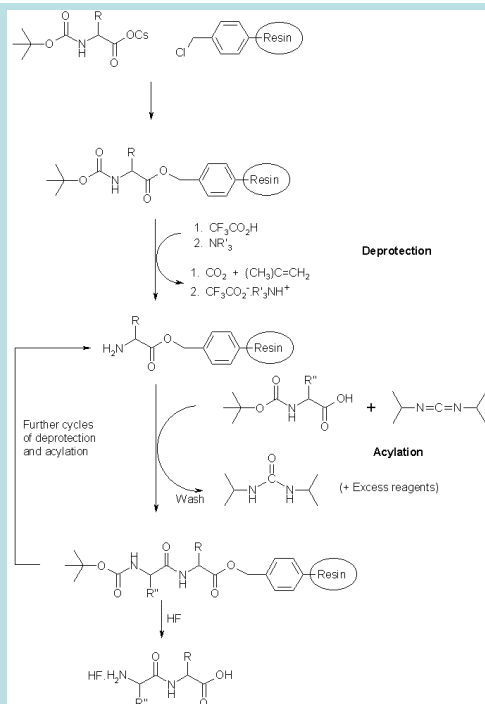


Sinteza peptida na čvrstoj fazi – Merrifieldova sinteza

- R. B. Merrifield - Nobelova nagrada 1984. god. za automatiziranu tehniku sinteze hormona inzulina (51 α -AK)
- Vezivanje aminokiseline na inertni netopljivi nosač (polistiren, polietilenglikol) - nosač supstituiran s klormetilfenilnom skupinom
- Produkt svakog stupnja krutina - laka izolacija, ispiranje i pročišćavanje produkta prije svakog sljedećeg stupnja
- Automatizirana sinteza - sinteza inzulina za 8 dana, ribonukleaze (124 AK) više od mjesec dana
- Prednost metode - 99% iskorištenje svakog stupnja, u sintezi ribonukleaze (369 reakcija, sveukupno iskorištenje 17%)

Merrifieldova sinteza

1. Zaštita amino skupine (*tert*-BOC)
2. Prva AK se veže na nosač supstitucijom klorida sa cezijevom soli BOC-aminokiseline – benzilni ester AK
3. Vezivanje aminokiseline - dicikloheksilkarbodiimid (DCC) reagens za sintezu peptidne veze



Merrifieldova sinteza

4. Jedna po jedna aminokiselina se veže na rastući polipeptidni lanac
5. Deprotekcija BOC skupine – 20-50 % otopina trifluoroctene kiseline (TFA) i neutralizacija amonijeve soli s tercijarnom bazom
5. Završno cijepanje AK i nosača, deprotekcija benzilirane zaštitne skupine uz jaku kiselinu (HF)