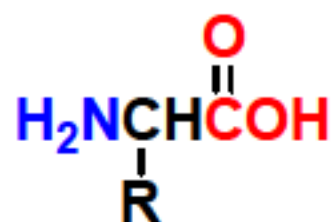
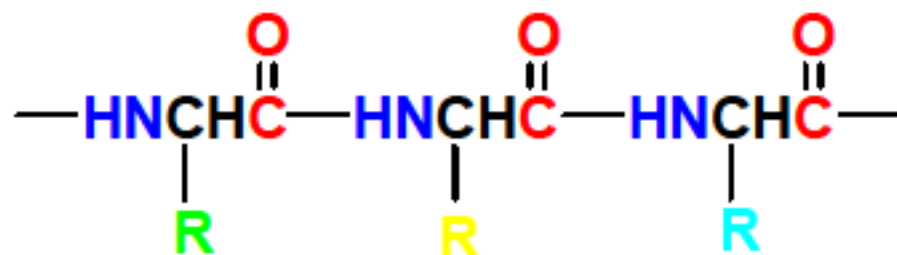


AMINOΞEA

Αμινοξέα, πεπτίδια, πρωτεΐνες



αμινοξύ

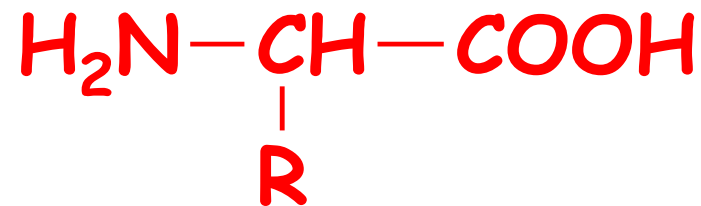


ΠΕΠΤΙΔΙΟ

πρωτεΐνες τα πεπτίδια με περισσότερα από 50 αμινοξέα

→ Τα **αμινοξέα** αποτελούν τις δομικές μονάδες των πρωτεϊνών και αποτελούν βασικό στοιχείο των οργανισμών.

→ Ο γενικός μοριακός τύπος ενός **α-αμινοξέος** παρουσιάζεται στο διπλανό σχήμα και συνίσταται από ένα μόριο που περιέχει μια αμινομάδα και μια καρβοξυλομάδα (συνδεδεμένα συνήθως με το ίδιο άτομο C).



Τα **α-αμινοξέα** αποτελούν τον επικρατέστερο τύπο φυσικού αμινοξέος. Συνιστούν δε το σύνολο των αμινοξέων που ανιχνεύονται στις πρωτεΐνες και πρωτοεγλυκάνες. Για τους παραπάνω λόγους αναφέρονται απλά ως **αμινοξέα**.

Η δομική διαφορά μεταξύ των ποικίλων αμινοξέων συνίσταται στον πλευρικό υποκαταστάτη R.

Κατηγορία
Τύπος

Όνομα

Συντμήσεις

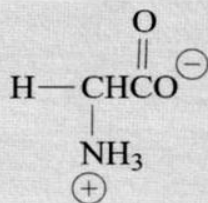
Μέση
συχνότητα
στις
πρωτεΐνες

pKa
α-COOH

pKa
α-NH₃⁺

pKa
πλευρικής
αλυσίδας

Αλειφατικά αμινοξέα



Γλυκίνη

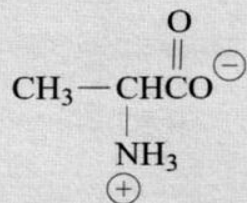
Gly G

7,5%

2,34

9,60

—



Αλανίνη

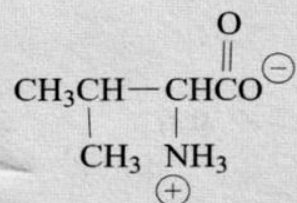
Ala A

9,0%

2,34

9,69

—



Βαλίνη

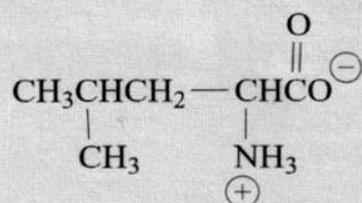
Val V

6,9%

2,32

9,62

—



Λευκίνη

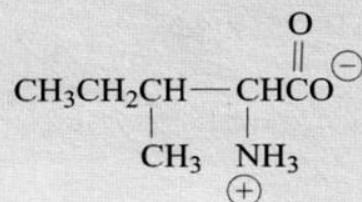
Leu L

7,5%

2,36

9,60

—



Ισολευκίνη

Ile I

4,6%

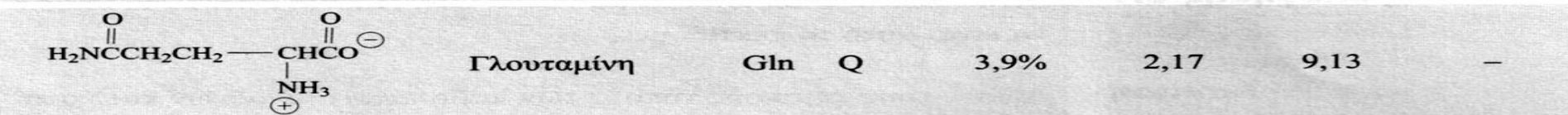
2,36

9,68

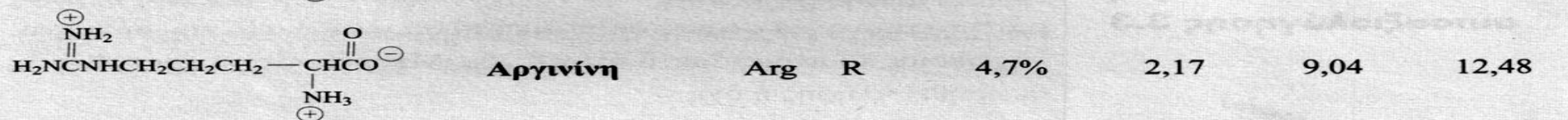
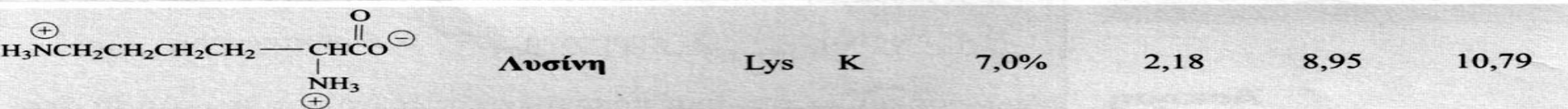
—

Κατηγορία Τύπος	Όνομα	Συντμήσεις	Μέση συχνότητα στις πρωτεΐνες	pKa α-COOH	pKa α-NH ₃ ⁺	pKa πλευρικής αλυσίδας
Υδροξυαμινοξέα						
	Σερίνη	Ser S	7,1%	2,21	9,15	—
	Θρεονίνη	Thr T	6,0%	2,63	9,10	—
Θειοαμινοξέα						
	Κυστεΐνη	Cys C	2,8%	1,71	10,78	8,33
	Μεθειονίνη	Met M	1,7%	2,28	9,21	—
Όξινα αμινοξέα						
	Ασπαραγινικό οξύ	Asp D	5,5%	2,09	9,82	3,86
	Γλουταμινικό οξύ	Glu E	6,2%	<u>2,19</u>	9,67	<u>4,25</u>
Αμίδια όξινων αμινοξέων						
	Ασπαραγίνη	Asn N	4,4%	2,02	8,84	—

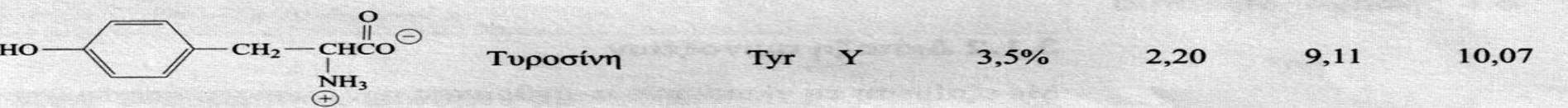
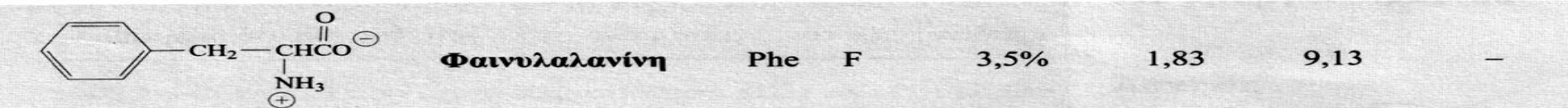
Αμίδια όξινων αμινοξέων (συνέχεια)



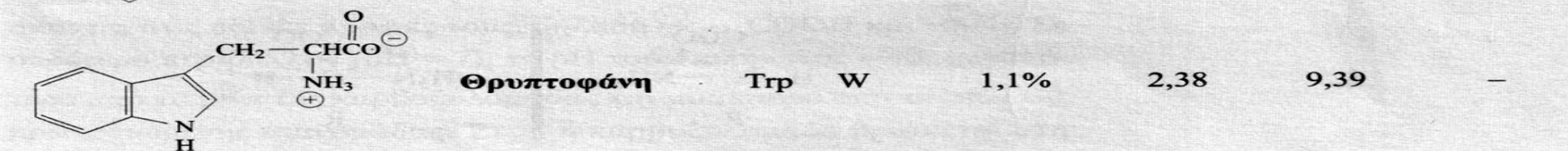
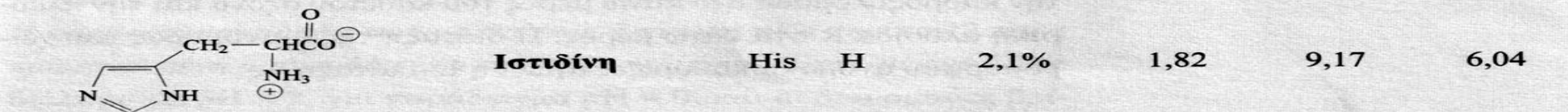
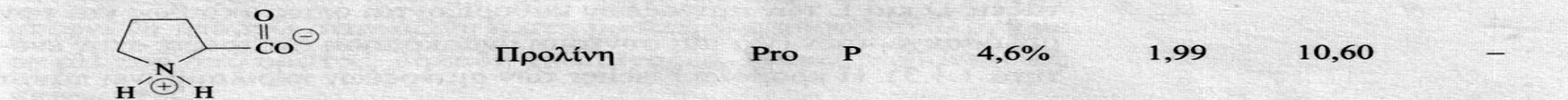
Βασικά αμινοξέα



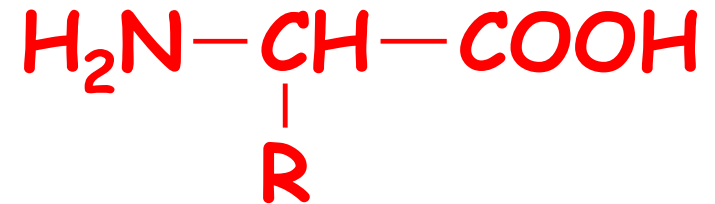
Βενζυλαμινοξέα



Ετεροκυκλικά αμινοξέα



→ Τα **αμινοξέα** κατατάσσονται σε **υδροξυ**, **βασικά** και **όξινα**, ανάλογα με την υποκατάσταση **R** της πλευρικής αλυσίδας (**OH**, **NH₂** ή **COOH**). Επίσης, δυο από τα αμινοξέα περιέχουν θείο στην πλευρική τους αλυσίδα (κυστεΐνη και μεθειονίνη).



Τέλος, ανάλογα με τη φύση του υποκαταστάτη, **τα αμινοξέα** διακρίνονται και σε αλειφατικά, αρωματικά και ετεροκυκλικά.

→ Οι ονομασίες των **αμινοξέων** είναι αποκλειστικά εμπειρικές, οι οποίες συνδέονται με την προέλευση ή κάποια ιδιότητά τους.

→ Τα πρωτεϊνικά αμινοξέα είναι είκοσι. Βέβαια ανάλογα με τη φύση εκάστης πρωτεΐνης, αυτή απαρτίζεται από διαφορετικά αμινοξέα.

→ Δέκα από τα είκοσι πρωτεϊνικά αμινοξέα χαρακτηρίζονται ως **απαραίτητα**, αφού ο οργανισμός δεν μπορεί να τα συνθέσει και πρέπει να τα προσλάβει έτοιμα από τις τροφές.

Τα αμινοξέα αυτά είναι:

Βαλίνη

Ισολευκίνη

Μεθειονίνη

Αργινίνη

Ιστιδίνη

Λευκίνη

Θρεονίνη

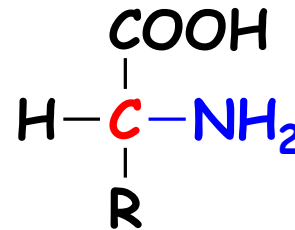
Λυσίνη

Φαινυλαλανίνη

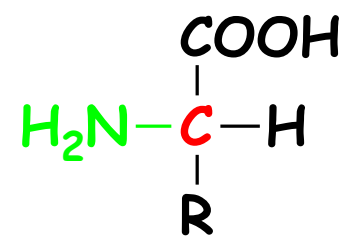
Θρυπτοφάνη

→ Με εξαίρεση τη γλυκίνη (R=H), τα υπόλοιπα φυσικά αμινοξέα περιέχουν τουλάχιστον έναν **ασύμμετρο άτομο C**.

Η στερεοαπεικόνιση του άνθρακα αυτού καθορίζεται ως **D** ή **L**, κατά τρόπο αντίστοιχο με αυτόν των σακχάρων.



D-αμινοξύ



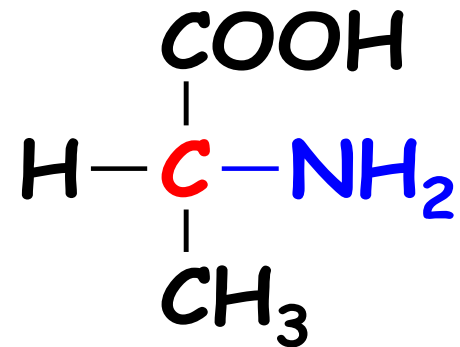
L-αμινοξύ

Αναλυτικότερα, το αμινοξύ γράφεται με την καρβοξυλομάδα στο πάνω μέρος του κάθετου άξονα και την ομάδα R στο κάτω μέρος.

Στη συνέχεια, ο προσανατολισμός της αμινομάδας καθορίζει την **D** (δεξιά) ή **L** (αριστερά) διάταξη.

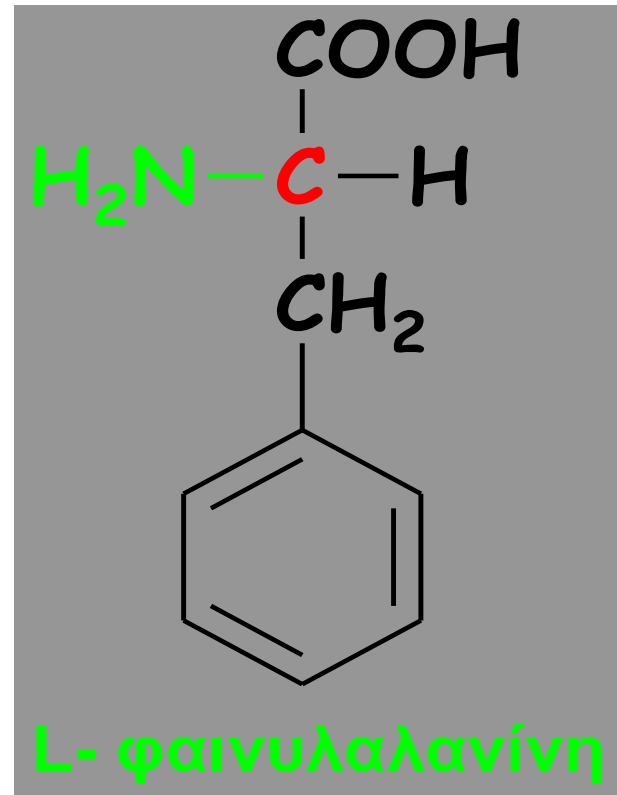
Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημάνουμε ότι όλα τα φυσικά αμινοξέα έχουν **L** στερεοαπεικόνιση.

Για παράδειγμα, στο διπλανό σχήμα παρουσιάζεται ο συντακτικός τύπος του απλούστερου ασύμμετρου φυσικού αμινοξέος, της **D-αλανίνης** (R=CH₃). Σε αυτόν, η καρβοξυλομάδα και ο υποκαταστάτης αναγράφονται στο πάνω και κάτω μέρος του κάθετου άξονα αντιστοίχως. Οπότε η ύπαρξη της **αμινομάδας στα δεξιά** του **ασύμμετρου ατόμου C** ορίζει ότι η διάταξη του μορίου είναι **D**.



D-αλανίνη

Αντίστοιχα, στο μόριο της **L-φαινυλαλανίνης** η αμινομάδα είναι στο αριστερό μέρος του **ασύμμετρου ατόμου C**, οπότε η διάταξη του μορίου είναι η **L**.



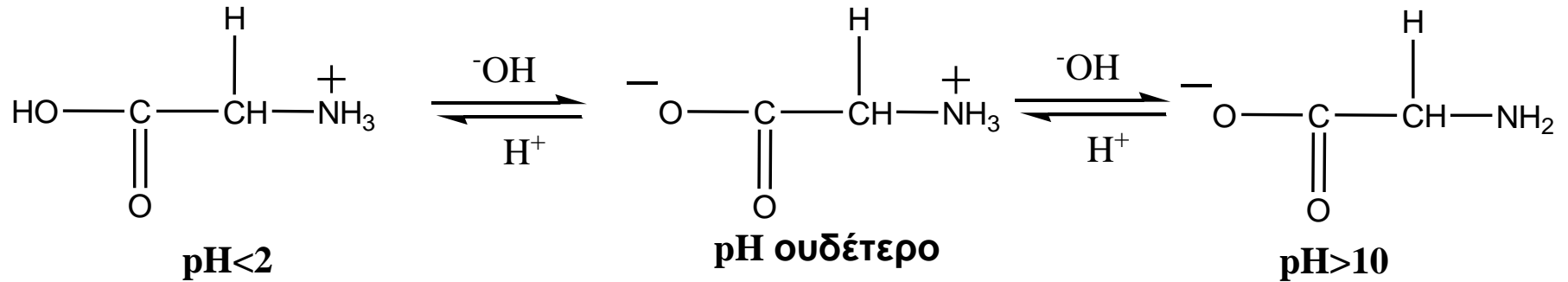
Οξεοβασικές ιδιότητες των αμινοξέων

Τα αμινοξέα επειδή περιέχουν μια καρβοξυλομάδα και μια αμινομάδα εμφανίζουν -ανάλογα με το περιβάλλον- όξινες ή βασικές ιδιότητες, δηλαδή είναι αμφολύτες.

Μελετώντας αναλυτικότερα τις παραπάνω παραμέτρους για τη γλυκίνη -το απλούστερο αμινοξύ- βλέπουμε ότι:

1. Η καρβοξυλική της ομάδα έχει $pK_a=2,34$ με αποτέλεσμα σε τιμές $pH < 2$, η καρβοξυλομάδα και η αμινομάδα του μορίου (οι δυο λειτουργικές ομάδες) υφίστανται με τις όξινες μορφές τους ($COOH$ και NH_3^+ αντιστοίχως).
2. Σε ουδέτερο pH , η καρβοξυλομάδα είναι πλέον με τη βασική της μορφή (COO^-), ενώ η αμινομάδα παραμένει στην όξινη μορφή της, αφού το pK_a της αμινομάδας είναι 9,60.
3. Τέλος, σε βασικό pH (> 10) το μόριο έχει πλέον και τις δυο ομάδες με τις βασικές τους μορφές.

Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται η μορφές της γλυκίνης σε σχέση με τη μεταβολή του pH.



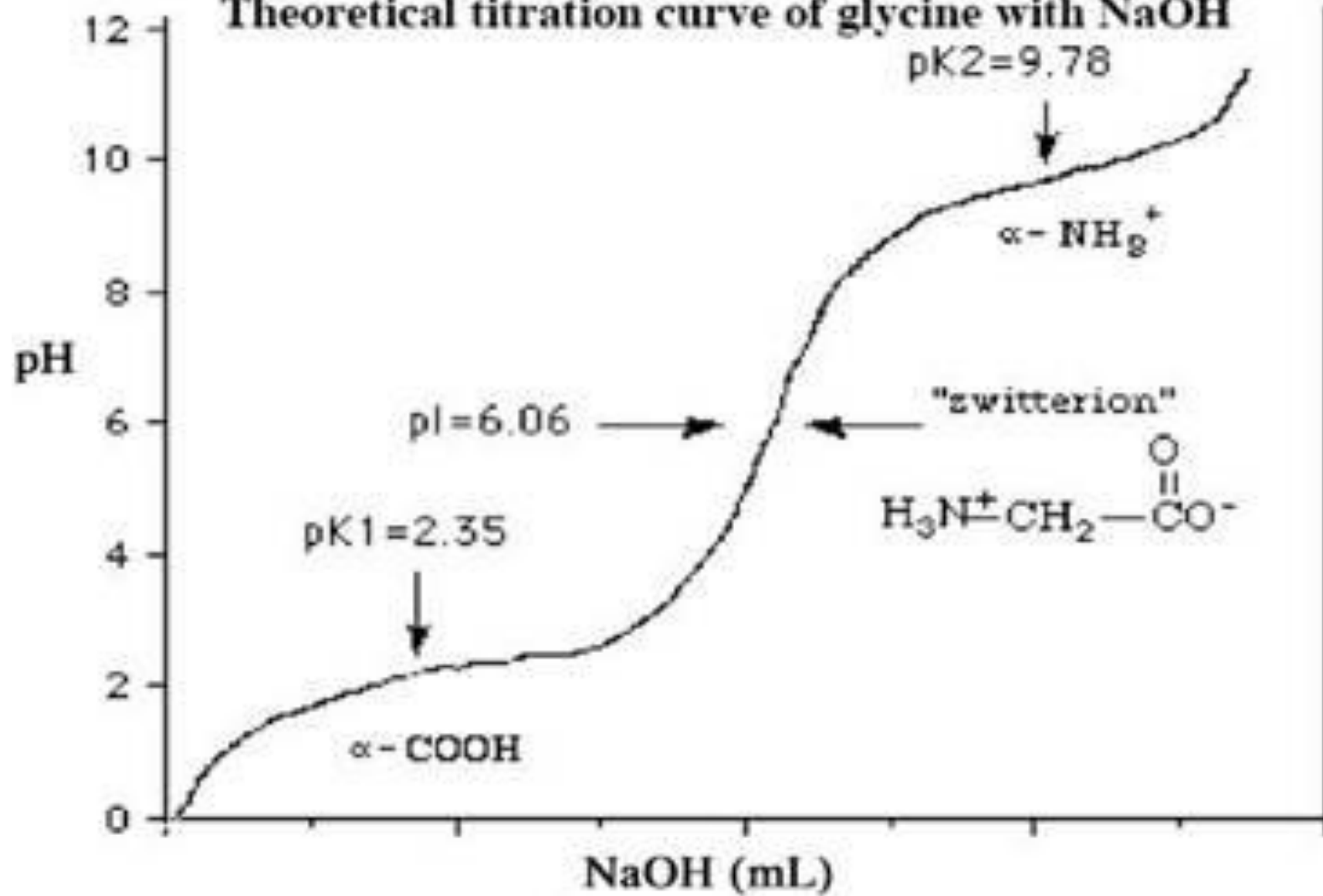
Σε ουδέτερη τιμή pH το αμινοξύ υφίσταται κυρίως με τη μορφή που περιέχει και τις δυο ομάδες φορτισμένες (διπολικό ιόν, zwitterion). Η ακριβής τιμή pH στην οποία το αμινοξύ έχει καθαρό φορτίο ίσο με μηδέν (δηλαδή έχει μετατραπεί όλο σε διπολικό ιόν) ονομάζεται **ισοηλεκτρικό σημείο (pI)**.

Η δε τιμή του υπολογίζεται ως το ημιάθροισμα των δυο τιμών pKa.

Για παράδειγμα, η τιμή του **pI** της γλυκίνης ισούται με:

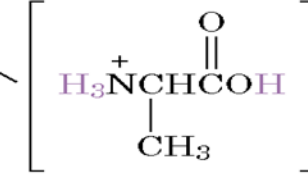
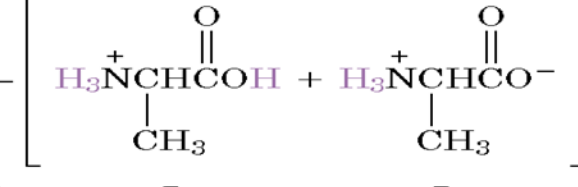
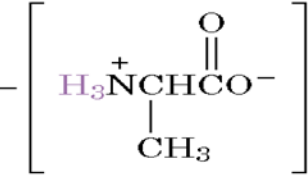
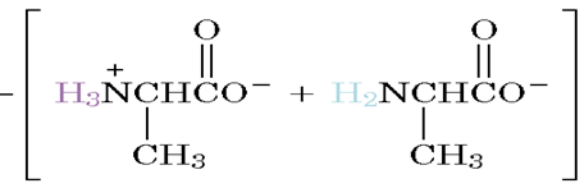
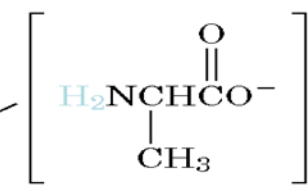
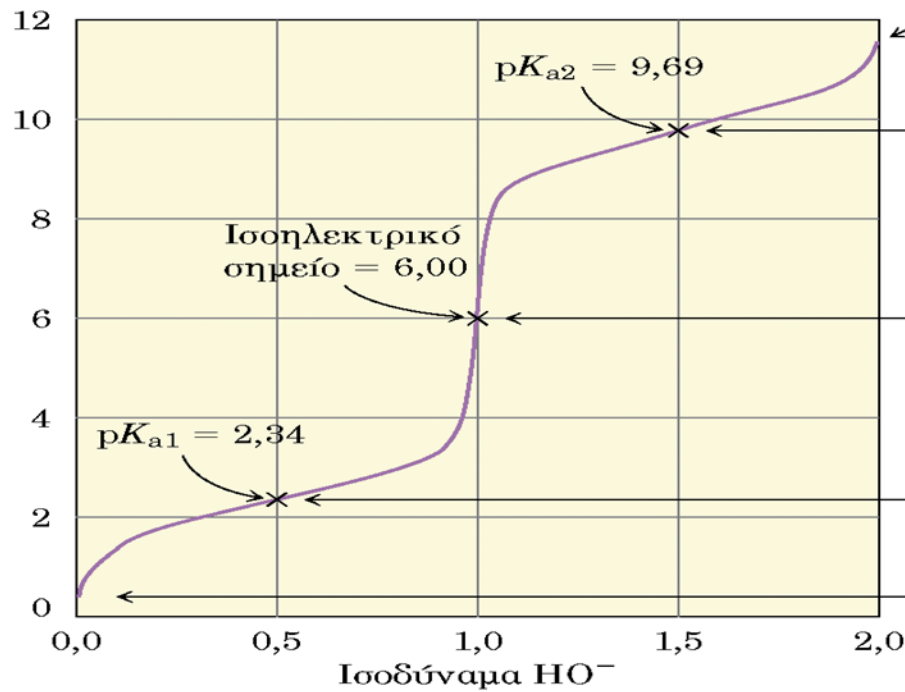
$2,34 + 9,60 / 2$, δηλαδή είναι **5,97**.

Theoretical titration curve of glycine with NaOH



Για π
 ρΗ τ
 Σε π
 όξιν
 σε π
 διίστ
 της ξ
 Η τιμ
 υφίσι

pH



ΙΕ ΤΟ
 ν
 /α
 και
 νη
 .

Σχήμα 27.2 Καμπύλη τιτλοδότησης της αλανίνης, η οποία σχεδιάστηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση Henderson-Hasselbalch. Κάθε ένα από τα δύο σκέλη σχεδιάστηκε χωριστά. Σε pH < 1, η αλανίνη πρωτονιώνεται πλήρως. Σε pH = 2,34, η αλανίνη απαντά ως μίγμα 50:50 της πρωτονιωμένης και της ουδέτερης μορφής. Σε pH = 6,00, η αλανίνη απαντά εξ ολοκλήρου σε ουδέτερη μορφή, ενώ σε pH = 9,69, αποτελεί ένα μίγμα 50:50 της ουδέτερης και της αποπρωτονιωμένης μορφής. Σε pH > 11, η αλανίνη είναι πλήρως αποπρωτονιωμένη.

Για κάθε αμινοξύ υπάρχει μια χαρακτηριστική **καμπύλη τιτλοδότησης**, η οποία αντιστοιχεί με το διάγραμμα του pH ενός υδατικού του διαλύματος σε συνάρτηση με την προσθήκη ισοδυνάμων HO^- .

- Σε μια τυπική καμπύλη τιτλοδότησης η προσθήκη HO^- ξεκινά από την πλήρως πρωτονιωμένη μορφή του αμινοξέος (ισχυρά όξινο pH), με αποτέλεσμα στην αρχή παρατηρείται αύξηση της τιμής pH του διαλύματος, αφού αφαιρούνται πρωτόνια από το διάλυμα.

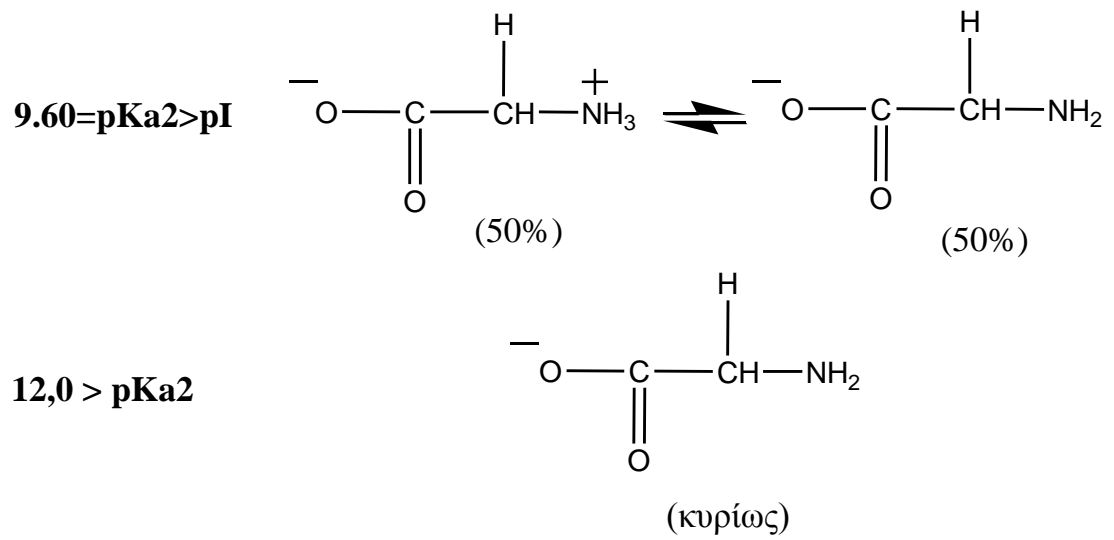
- Σε κάποιο χρονικό σημείο παρατηρείται μια σημαντική ελάττωση του ρυθμού αύξησης του pH (σχηματισμός πλατό). Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι τα HO^- αντιδρούν πλέον με τα πρωτόνια κάποιας από τις ιοντισμένες ομάδες του αμινοξέος.

- Η επόμενη απότομη αύξηση της τιμής του pH αποτελεί ένδειξη ότι τα συγκεκριμένα πρωτόνια έχουν αντιδράσει πλήρως (η τιμή του pH στο κέντρο του πλατό αντιστοιχεί με το pK_a της ιοντισμένης ομάδας).

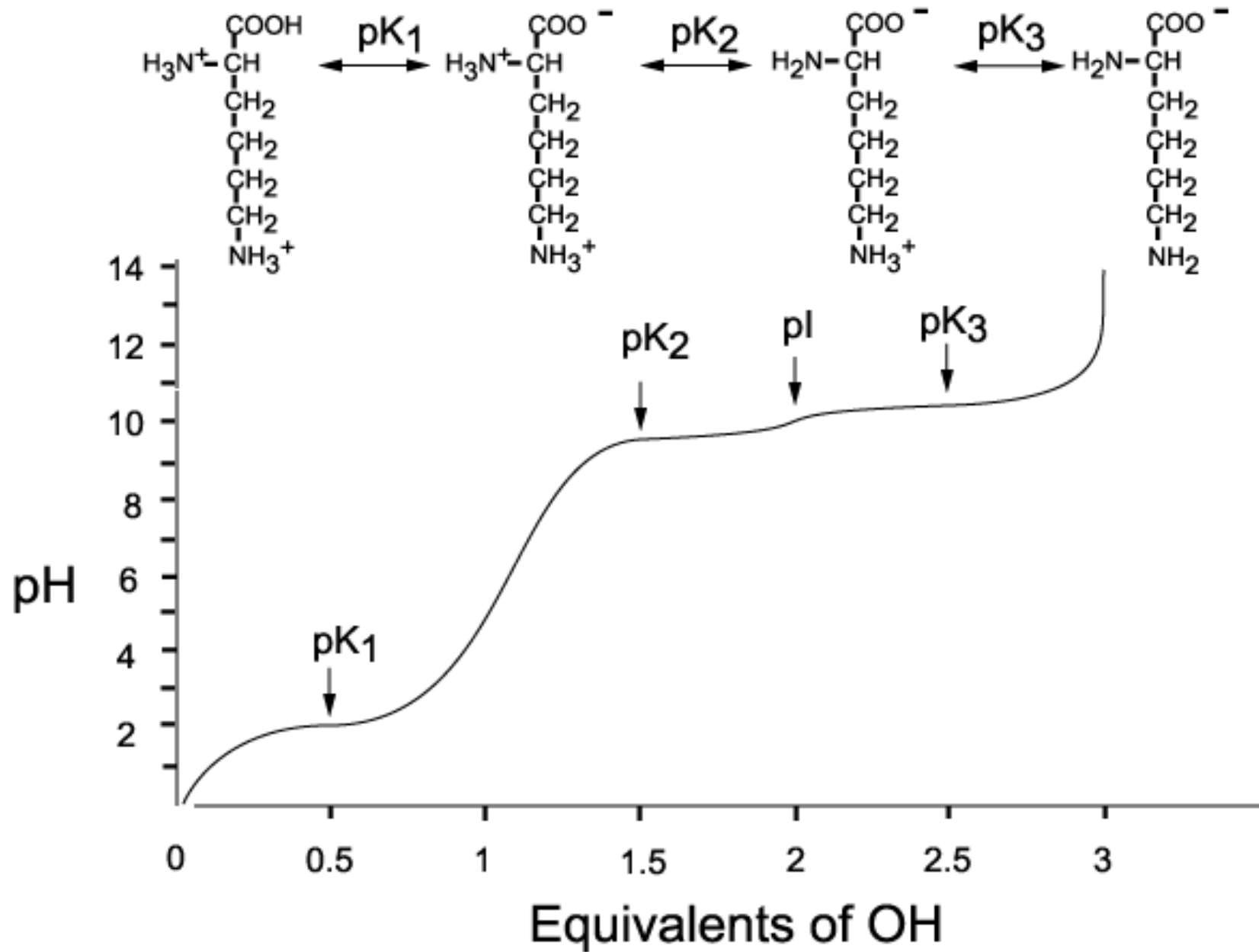
Ο σχηματισμός δυο πλατό είναι ένδειξη ότι το αμινοξύ δεν είναι ουδέτερο. Έτσι, εάν αυτά εμφανίζονται σε $\text{pH} < 7$, τότε το αμινοξύ είναι όξινο. Αντίθετα εμφάνιση των πλατό σε βασικό pH είναι ασφαλής ένδειξη ότι το αμινοξύ είναι βασικό.

Σε $\text{pH}=9,60$ ($=\text{pK}_a$ αμινομάδας), η αμινομάδα έχει αρχίσει να μην έχει την όξινη μορφή της (δίνοντας το πρωτόνιο) και η γλυκίνη είναι πλέον μίγμα της ισοηλεκτρικής και βασικής τη μορφής.

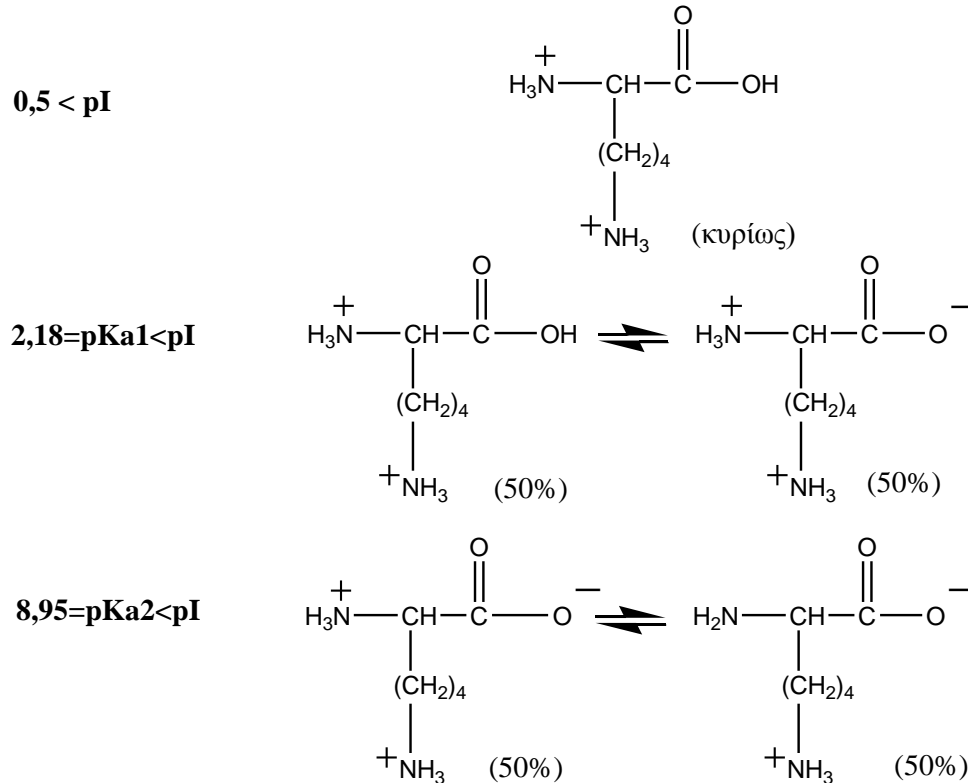
Τέλος σε $\text{pH}=12$ επικρατεί μόνο η βασική μορφή της γλυκίνης.



Σ
Γ
C
r
C
Γ
C
T
F
A
T



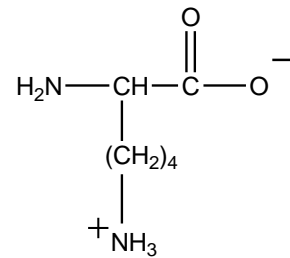
Έτσι, σε $\text{pH}=1$ η λυσίνη (pK_a καρβοξυλίου) υφίσταται με την όξινη μορφή της (COOH , NH_3^+)
σε $\text{pH}=2,18$ ($=\text{pK}_a1$ καρβοξυλίου), η καρβοξυλομάδα έχει αρχίσει να διίσταται και το αμινοξύ είναι πλέον μίγμα δυο μορφών
σε $\text{pH}=8,95$ ($=\text{pK}_a2$ αμινομάδας), η πλέον όξινη αμινομάδα δεν είναι πλέον πρωτονιωμένη, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται και η διπολική (ισοηλεκτρική) μορφή της λυσίνης.



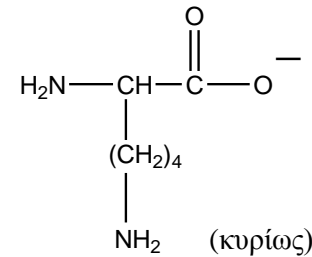
Η τιμή $\text{pH}=9,87$ αντιστοιχεί με το ισοηλεκτρικό σημείο **pI** ($=\text{pKa}1+\text{pKa}2/2$), οπότε η λυσίνη είναι πλέον ως η διπολική (ισοηλεκτρική) της μορφή.

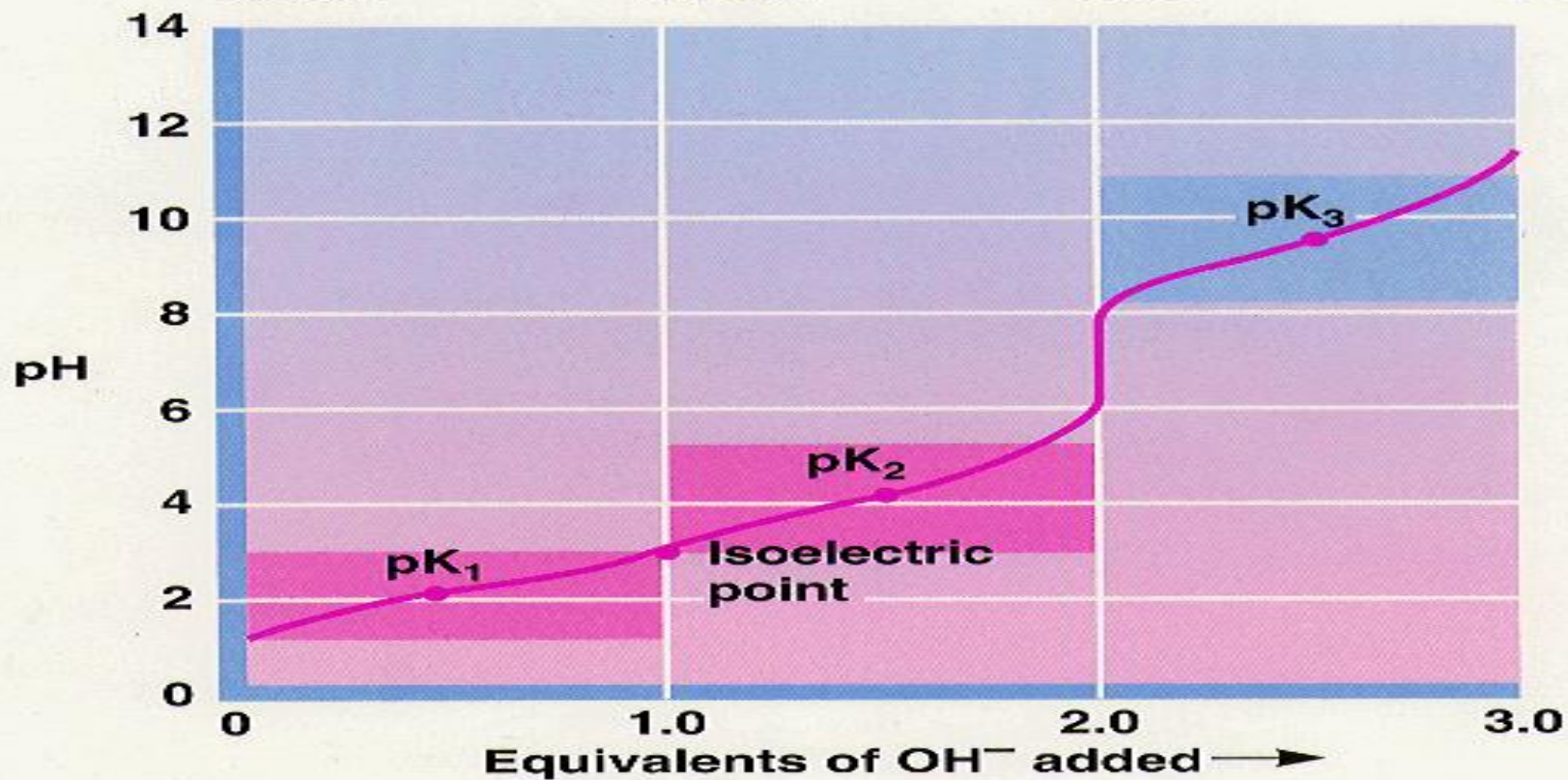
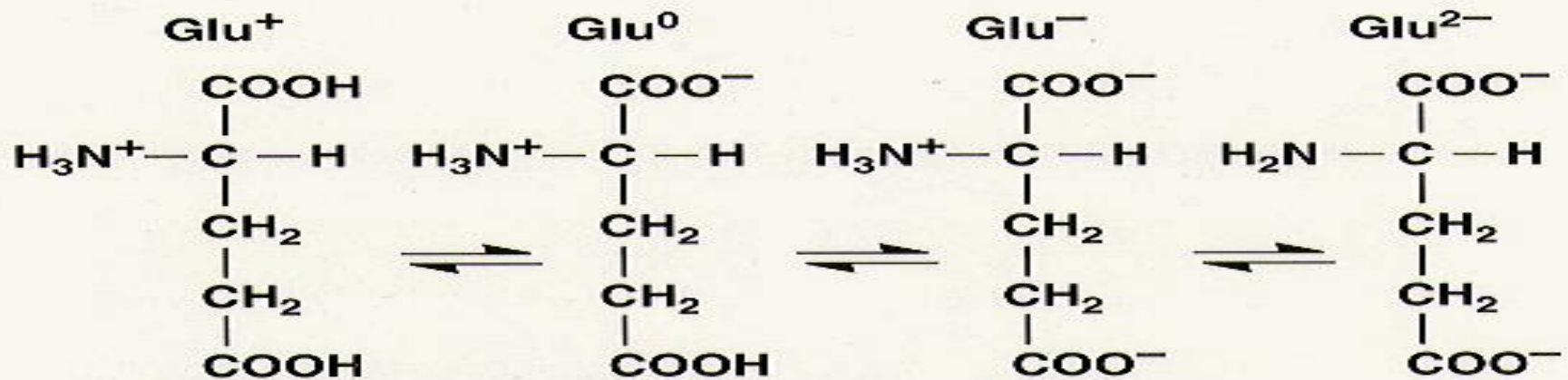
Τέλος, σε $\text{pH}>11,5$ ($>\text{pKa}3$ αμινομάδας= $10,79$), επικρατεί πλέον η βασική μορφή του αμινοξέος.

9,87=pI

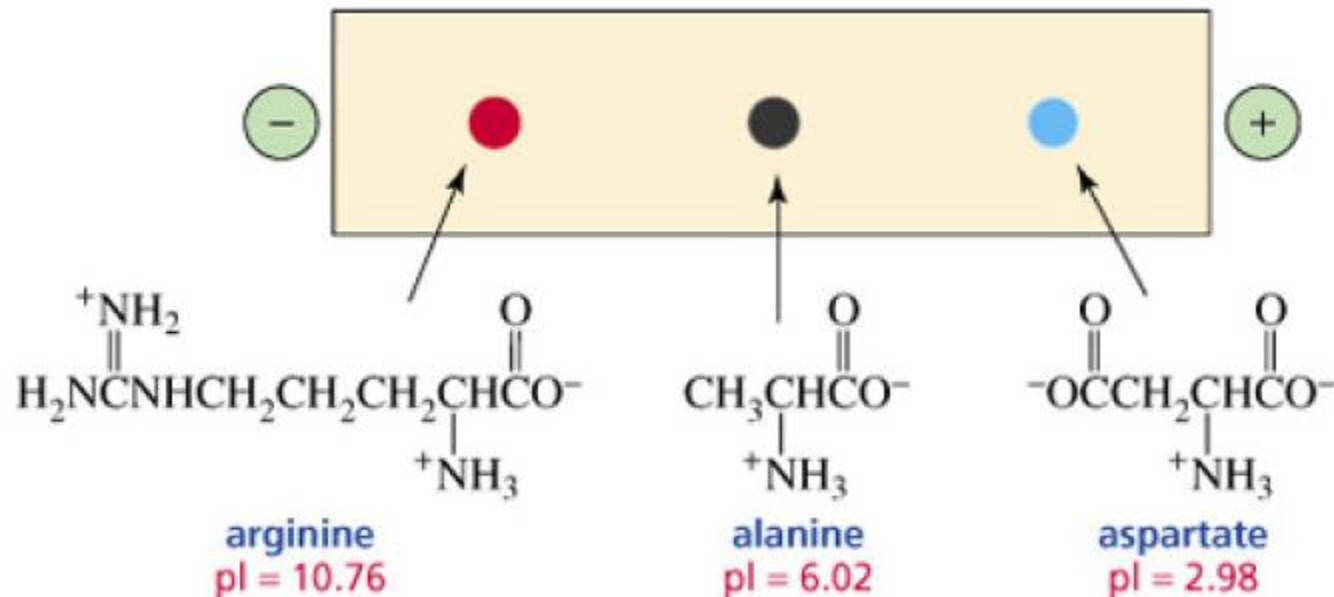
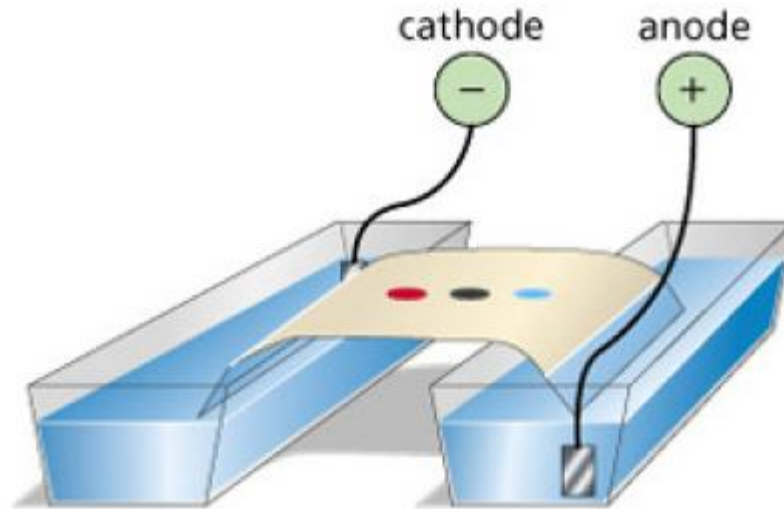


11,5 > pKa2 > pI



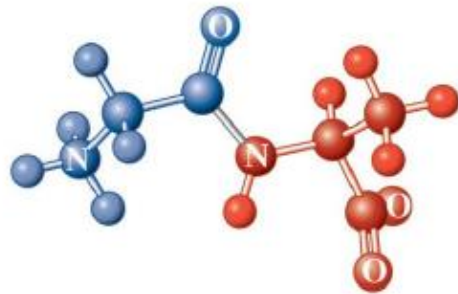
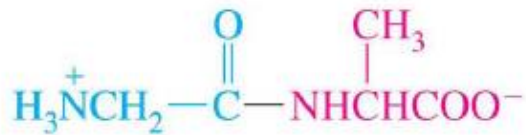


Διαχωρισμός μίγματος αμινοξέων με ηλεκτροφόρηση

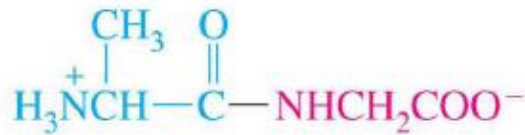


ΠΕΠΤΙΔΙΑ-ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

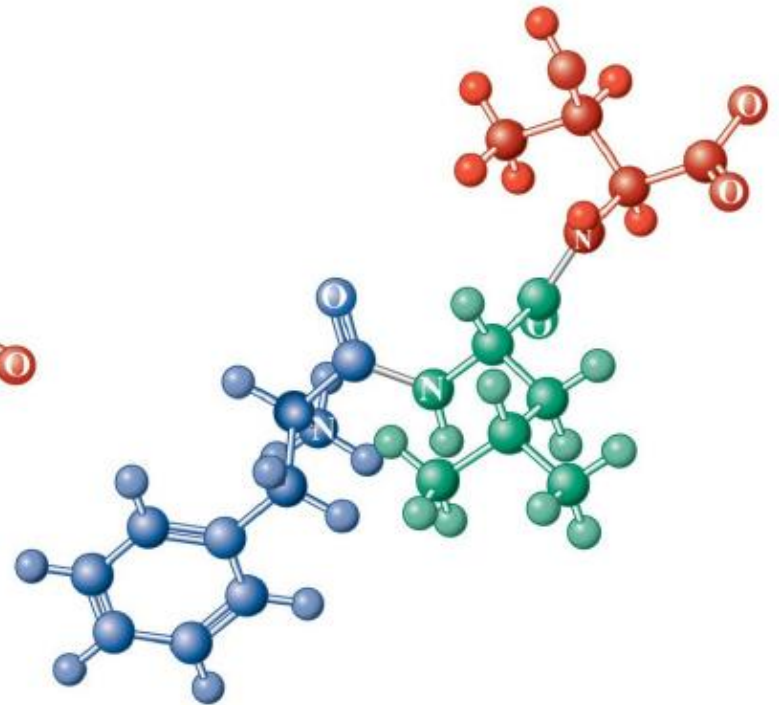
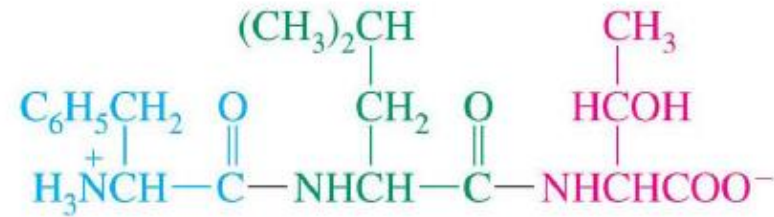
Πεπτίδια



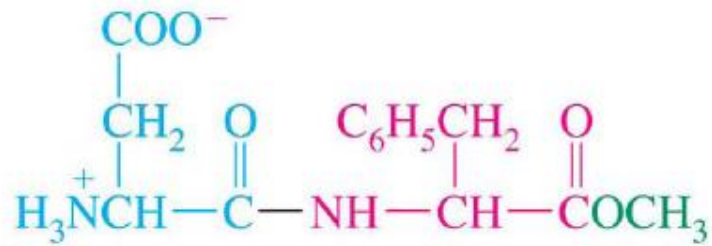
Γλυκυαλανίνη
Gly-Ala



Αλανυλογλυκίνη
Ala-Gly



Φαινυλαλανυλολευκυλοθρεονίνη
Phe-Leu-Thr



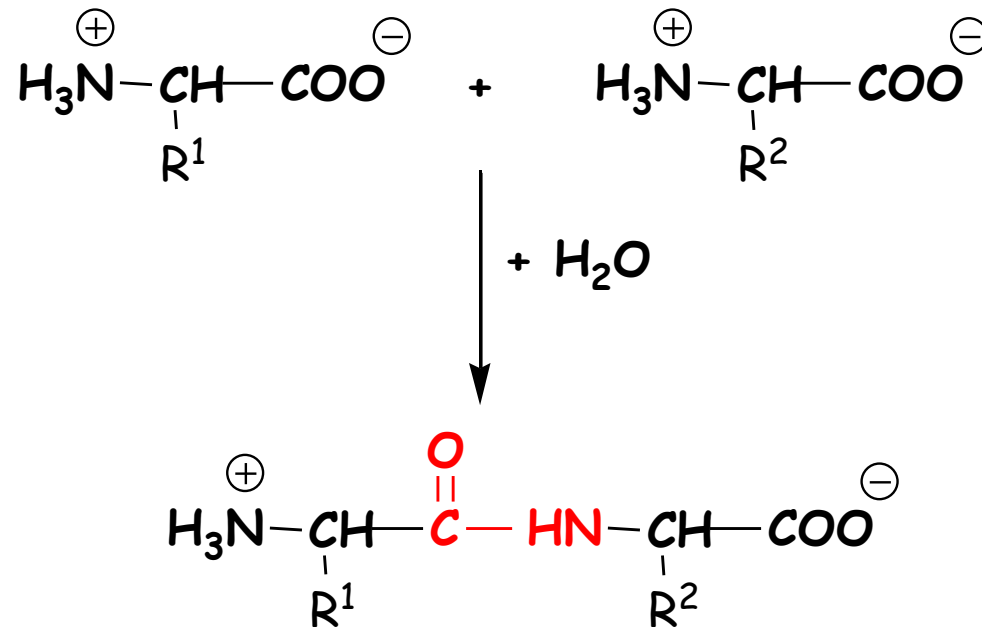
Μεθυλεστέρας της ασπαρτυλοφαινυλαλανίνης
Asp-Phe-OCH₃
 (Ασπαράμη)



γ-Γλουταμυλοκυστεϊνυλο γλυκίνη
γ-Glu-Cys-Gly
 (Γλουταθειόν)

Πεπτίδια

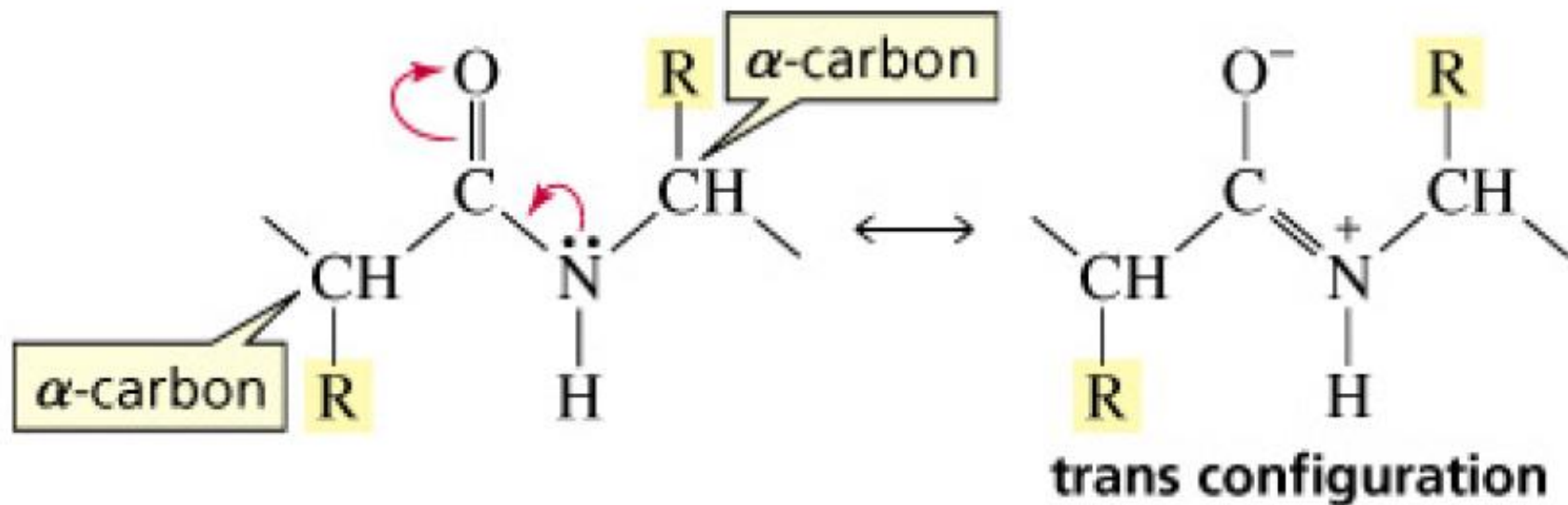
Ως **πεπτίδια** ορίζονται τα μόρια που προκύπτουν από την αμιδική συμπύκνωση αμινοξέων, μέσω ενός **πεπτιδικού (αμιδικού) δεσμού**, σύμφωνα με τον τύπο:



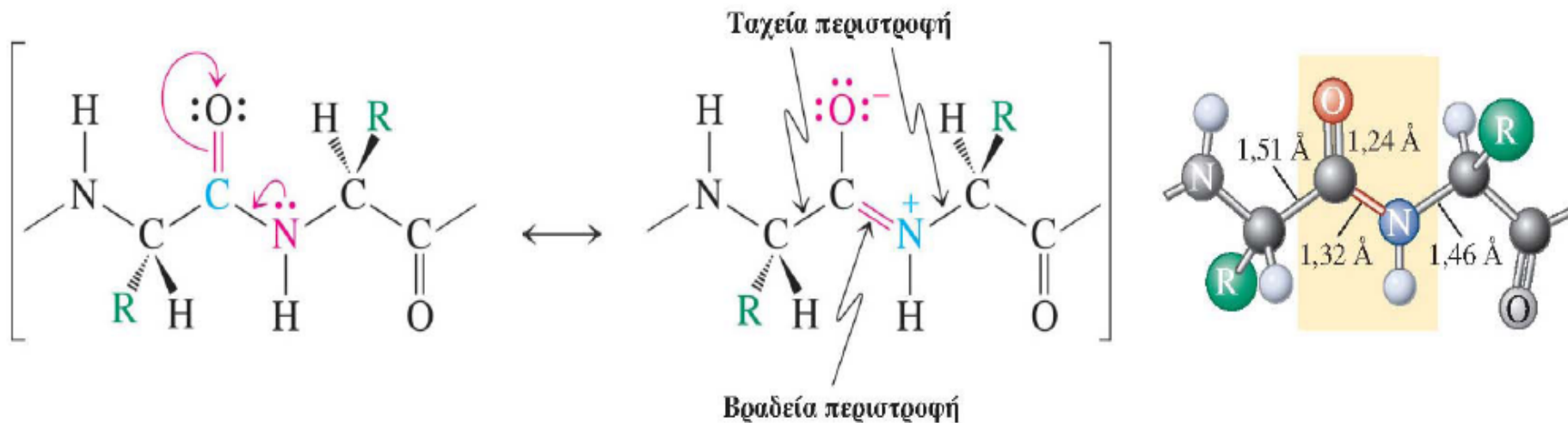
Τα πεπτίδια είναι συνήθως γραμμικά (και πολύ σπάνια κυκλικά). Κατά συνθήκη τα πεπτίδια έχουν μοριακό βάρος έως 10.000.

Όσα έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος κατατάσσονται στις πρωτεΐνες.

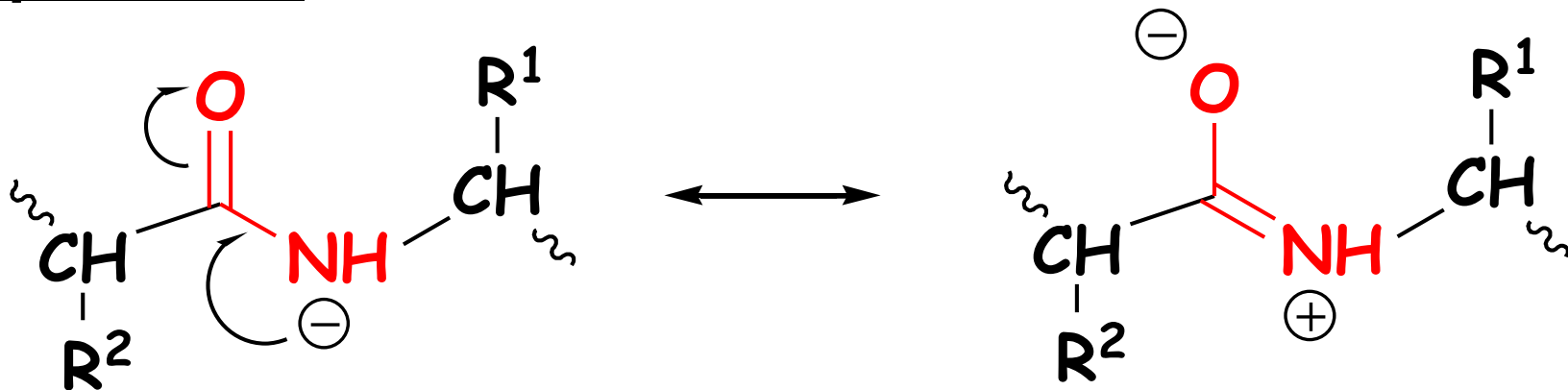
Πεπτιδικός δεσμός



Επιπεδότητα επαγόμενη από τον συντονισμό στον πεπτιδικό δεσμό



Ένας **πεπτιδικός δεσμός** έχει (λόγω του συντονισμού που δίνεται στο παρακάτω σχήμα) μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού (περίπου 40%). Έτσι, **είναι αδύνατη και η ελεύθερη περιστροφή του δεσμού αυτού.**

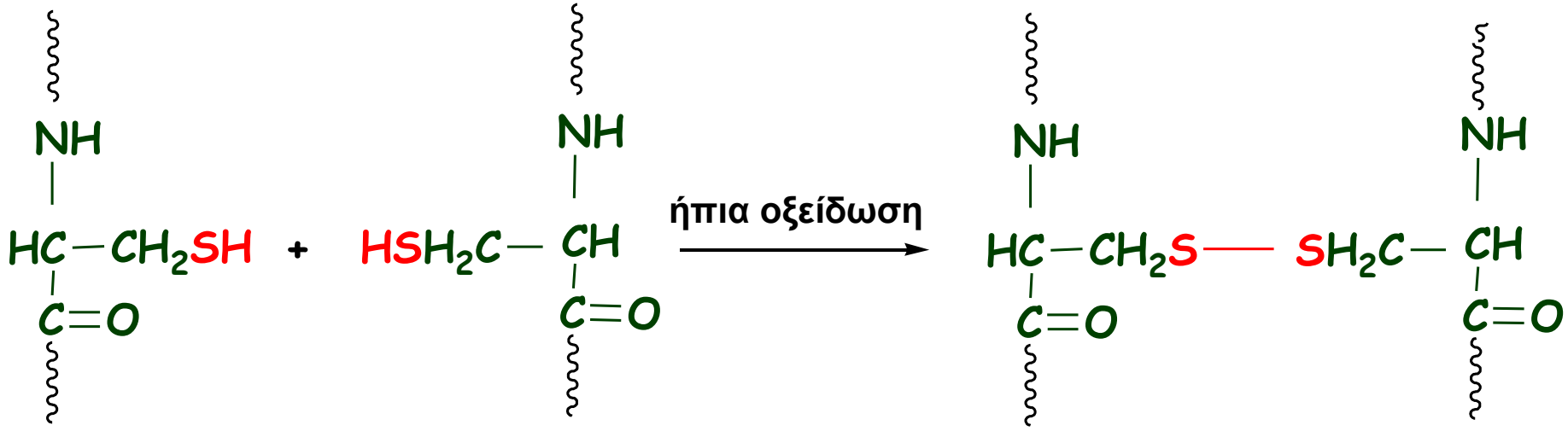


Σε έναν πεπτιδικό δεσμό, λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης που προκαλεί η παρουσία των ανθρακαλυσίδων R¹ και R², επικρατεί η *trans* διάταξη.

Με τη διάταξη αυτή οι α -άνθρακες των αμινοξέων έχουν μεταξύ τους τη μεγαλύτερη δυνατή απόσταση και κατά συνέπεια τη μικρότερη παρεμπόδιση.

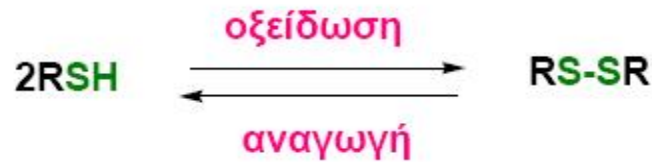
Στο χώρο κάθε πεπτιδικός δεσμός ορίζει ένα επίπεδο. Έτσι, οι υποκαταστάτες R των ανθρακαλυσίδων των αμινοξέων εναλλάσσονται στις δυο πλευρές του επιπέδου.

Στα πεπτίδια υφίσταται και ένα άλλος τύπος δεσμού. Είναι ο ομοιοπολικός δεσμός που συνδέει δυο μόρια **ΚΥΣΤΕΪΝΩΝ** (αμινοξύ που διαθέτει σουλφυδρυλομάδα) τα οποία ευρίσκονται στην ίδια ή διαφορετική πεπτιδική αλυσίδα. Ο δεσμός αυτός αναφέρεται ως **δισουλφιδικός δεσμός** (ή **δισουλφιδική γέφυρα**):



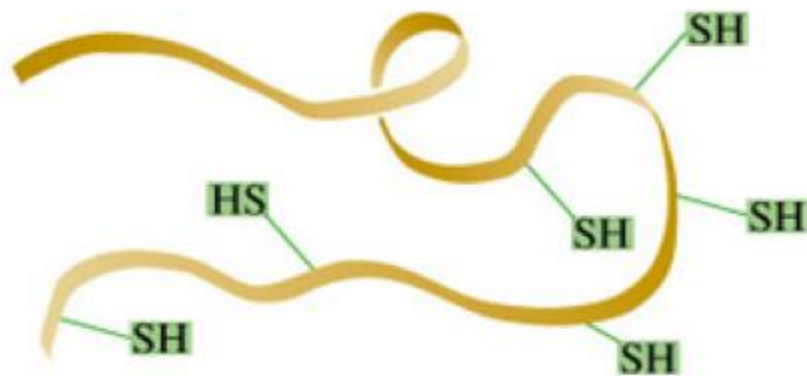
Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο **δισουλφιδικός δεσμός** διασπάται με αναγωγή με 2-μερκαπτοαιθανόλη (HSCH₂CH₂OH).

Δισουλφιδικός δεσμός στα πεπτίδια



ΚΥΣΤΕΪΝΗ

ΚΥΣΤΙΝΗ



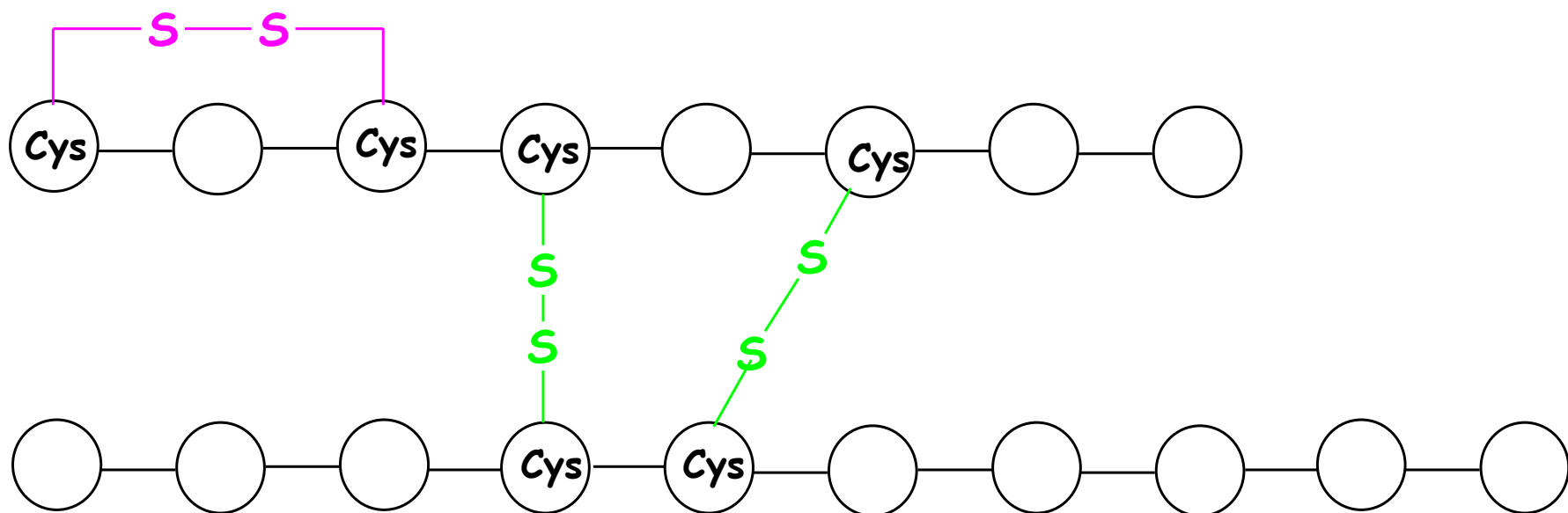
polypeptide

oxidation
reduction

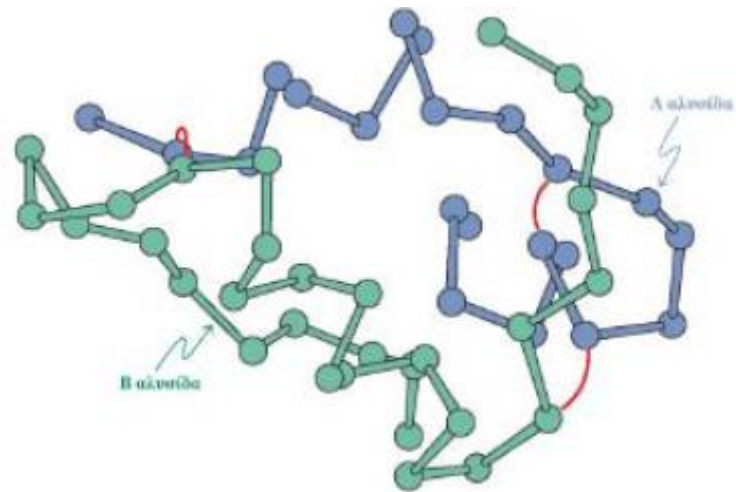
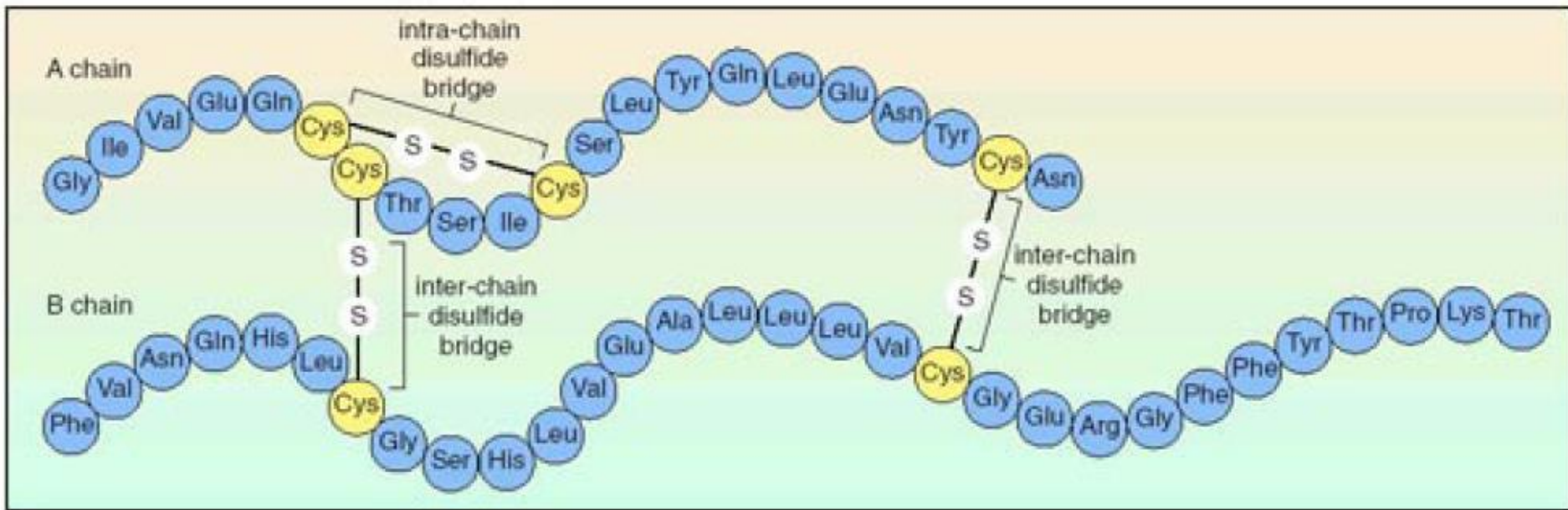


disulfide bridges
cross-linking portions
of a polypeptide

Εάν η δισουλφιδική γέφυρα δημιουργείται μεταξύ δυο κυστεϊνών που ανήκουν στην ίδια πεπτιδική αλυσίδα, τότε αναφέρεται ως **ενδο-σουλφιδική**, ενώ εάν συνδέει κυστεΐνες διαφορετικών πεπτιδίων, τότε αυτή χαρακτηρίζεται ως **διαδισουλφιδική** γέφυρα.



Ινσουλίνη



Τα πεπτίδια αναγράφονται και ονομάζονται ως:

Όταν είναι γνωστή η ταυτότητα των αμινοξέων, αλλά όχι η σειρά της αλληλουχίας τους, τότε αναφέρονται οι συντμήσεις των αμινοξέων παρεμβάλλοντας μεταξύ τους ένα κόμμα, όπως το παρακάτω επταπεπτίδιο: Gly, His, Cys, Val, Ser, Ala, Glu

Εάν είναι γνωστή και η αλληλουχία των αμινοξέων, τότε μεταξύ των συντμήσεων των αμινοξέων παρεμβάλλονται παύλες.

Για παράδειγμα, εάν το προηγούμενο πεταπεπτίδιο αναφερθεί ως: Val-Ala-His-Gly-Ser-Glu-Cys σημαίνει ότι:

α. η βαλίνη είναι το N-τελικό άκρο του πεπτιδίου. Δηλαδή έχει ελεύθερη την αμινομάδα του και η καρβοξυλομάδα του είναι συνδεδεμένη (με πεπτιδικό-αμιδικό δεσμό) με την αμινομάδα του δεύτερου αμινοξέος που είναι η αλανίνη.

β. Τα υπόλοιπα αμινοξέα αναφέρονται με τη σειρά που υπάρχουν στο πεπτίδιο.

Για παράδειγμα, η γλυκίνη είναι το 4^ο στη σειρά αμινοξυ, άρα η αμινομάδα της έχει πεπτιδικό δεσμό με την καρβοξυλομάδα της ιστιδίνης (3^ο αμινοξυ), η δε καρβοξυλομάδα της έχει δεσμό με την αμινομάδα της σερίνης (5^ο αμινοξυ).

γ. Το τελευταίο στη σειρά αμινοξυ (η κυστεΐνη) είναι το C-τελικό αμινοξυ, δηλαδή έχει συνδεσμένη με πεπτιδικό δεσμό μόνο την αμινομάδα της, ενώ η καρβοξυλομάδα της είναι ελεύθερη.

Ένας εναλλακτικός τρόπος αναγραφής του ιδίου επταπεπτιδίου είναι ο ακόλουθος: H-Val-Ala-His-Gly-Ser-Glu-Cys-OH

Τέλος, όσον αφορά την ονομασία των πεπτιδίων, αυτή περιλαμβάνει την αναφορά των αμινοξέων με την αλληλουχία που υπάρχουν στο μόριο του πεπτιδίου χρησιμοποιώντας την κατάληξη «υλιο», εκτός από το C-τελικό αμινοξυ που αναφέρεται απλώς με το όνομά του.

Για παράδειγμα, το επταπεπτίδιο Val-Ala-His-Gly-Ser-Glu-Cys θα πρέπει να ονομαστεί ως: Βαλινυλο-αλανυλο-ιστιδινυλο-γυκινυλο-σερινυλο-γλουταμινυλο-κυστεΐνη.

Πεπτιδική σύνθεση

Θεωρητικά, η σύνθεση ενός διπεπτιδίου (αποτελείται από δυο αμινοξέα) αναφέρεται στην αντίδραση των δυο αμινοξέων, η οποία όμως έχει ως αποτέλεσμα την παρασκευή ενός μίγματος πεπτιδίων.

Αναλυτικότερα, όταν αντιδρά η Gly με τη Ala με στόχο τη σύνθεση του διπεπτιδίου Gly-Ala, επειδή κάθε ένα από τα μόρια αυτά διαθέτει δυο δραστικές ομάδες (αμινομάδα και καρβοξυλομάδα), θα παραχθούν επιπλέον και τα διπεπτίδια Ala-Gly, Ala-Ala και Gly-Gly (όπως χαρακτηριστικά παρουσιάζεται στο σχήμα της σελίδας 113 του διδακτ. βιβλίου σας).

Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της παράλληλης σύνθεσης των μη επιθυμητών αυτών προϊόντων, μια καλή στρατηγική αναφέρεται στην προκατεργασία των αμινοξέων. Συγκεκριμένα, προστατεύεται η NH_2 του N-τελικού αμινοξέος (γλυκίνη) και ενεργοποιείται η COOH του μορίου αυτού. Επίσης προστατεύεται και η COOH του άλλου αμινοξέος (αλανίνη).

Με τον τρόπο αυτό, αφενός αποκλείεται η πιθανότητα να αντιδράσει η NH_2 της γλυκίνης (εξασφαλίζεται το N-τελικό) και αφετέρου εξασφαλίζεται ότι θα αντιδράσει η ενεργοποιημένη COOH της. Επίσης αποκλείεται και η περίπτωση σύνθεσης διμερών, αφού είναι προστατευμένη η NH_2 της γλυκίνης (Gly-Gly) και η COOH της αλανίνης (Ala-Ala).

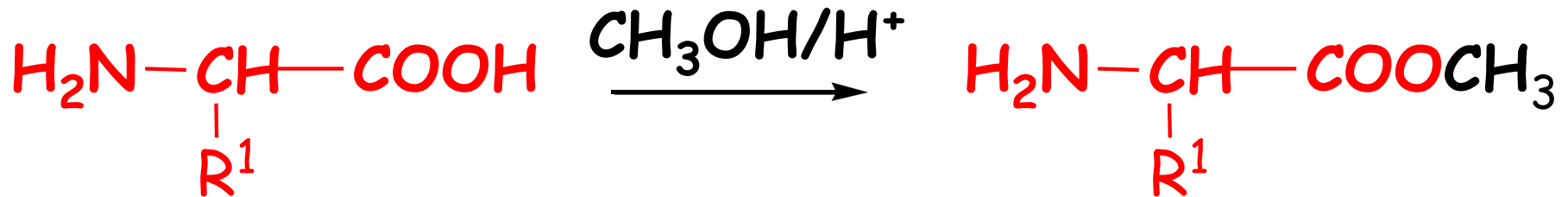
Όταν στόχος της σύνθεσης είναι η σύνθεση ενός πολυπεπτιδίου, δηλαδή μορίου που περιέχει περισσότερα από δυο αμινοξέα, τότε χρησιμοποιείται η στρατηγική σύνθεσης από το C-τελικό προς το N-τελικό αμινοξύ. Η αντίθετη πορεία δεν ενδείκνυται, αφού η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου σε ένα πεπτίδιο ενέχει μεγάλο κίνδυνο ρακεμίωσης του C-τελικού του αμινοξέος. Έτσι, η ορθή στρατηγική είναι να ξεκινήσει η σύνθεση με φορά από το C-τελικό στο N-τελικό αμινοξύ, οπότε κάθε φορά ενεργοποιείται ένα N-προστατευμένο, π.χ. με την Boc ομάδα, αμινοξύ και όχι ένα N-προστατευμένο δι- ή τρι- ή γενικά πολυ-πεπτίδιο

Συνοπτικά, τα στάδια μιας τυπικής πεπτιδικής σύνθεσης αναφέρονται στην:

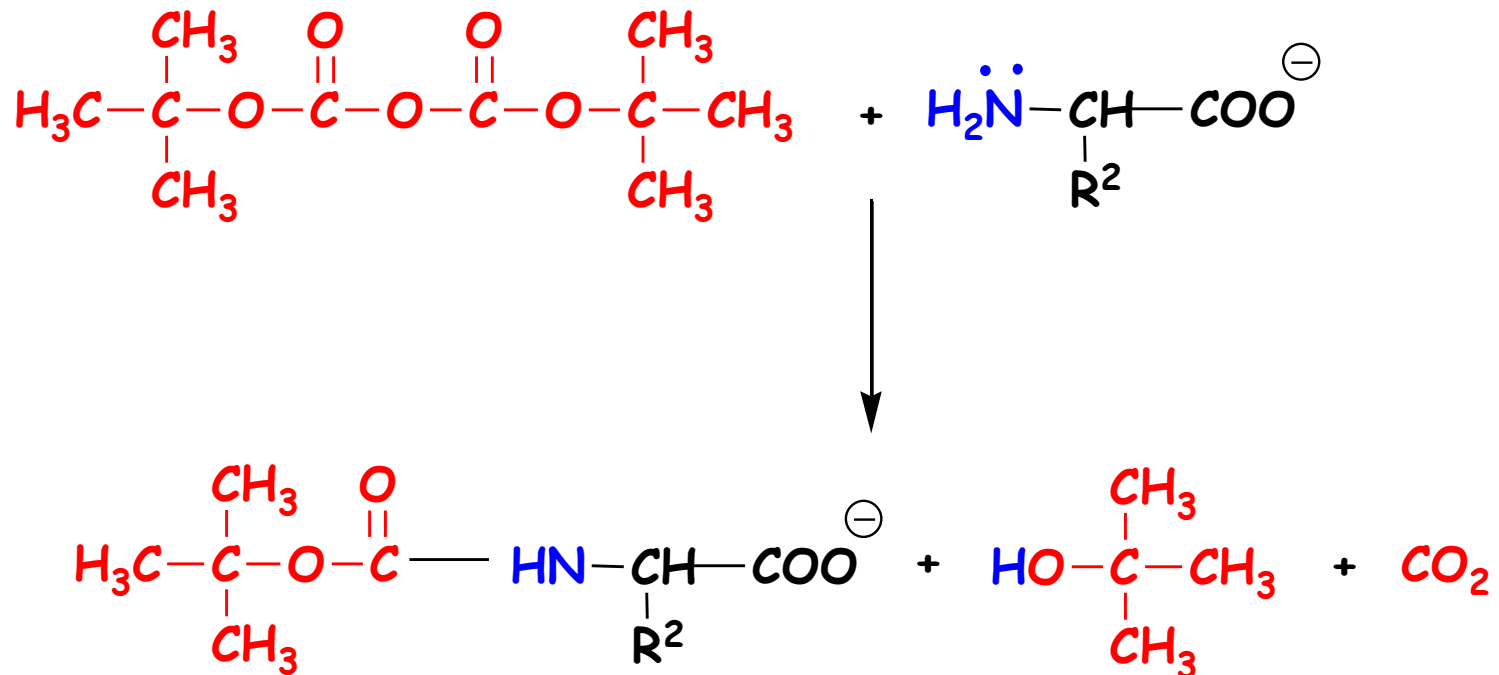
1. Προστασία της καρβοξυλομάδας του C-τελικού αμινοξέος
2. Προστασία της αμινομάδας του επόμενου αμινοξέος, και
3. Ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του
4. Αντίδραση της ενεργοποιημένης καρβοξυλομάδας του ενός με την ελεύθερη αμινομάδα του επόμενου αμινοξέος, με στόχο τη δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού.

Αναλυτικότερα, έναστο στάδιο της πεπτιδικής σύνθεσης αφορά:

1. Στην προστασία της καρβοξυλομάδας του C-τελικού αμινοξέος, η οποία πραγματοποιείται τη μετατροπή της σε μεθυλεστέρα αντιδρώντας με τον διαλύτη μεθανόλη υπό όξινες συνθήκες (αέριο HCl).

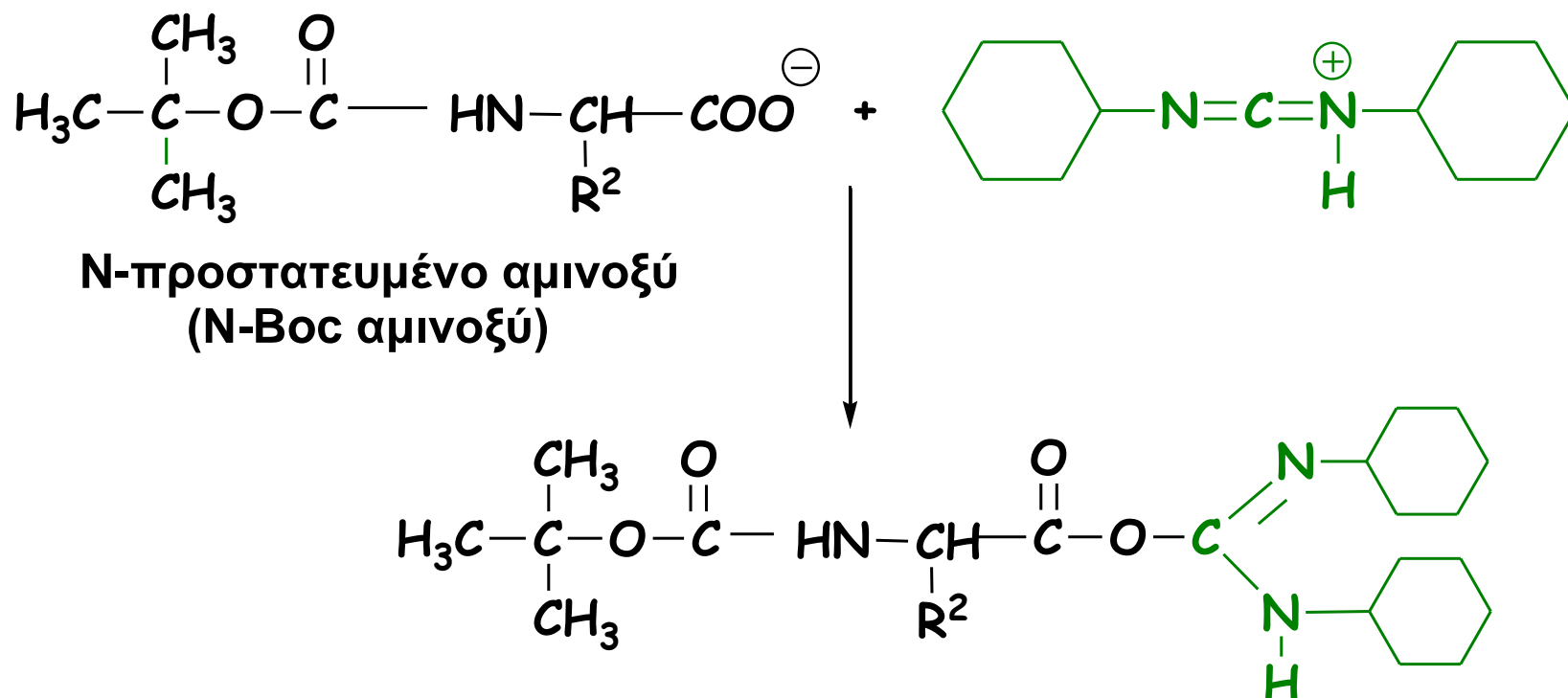


2. Στην προστασία της **αμινομάδας** του **άλλου αμινοξέος**, η οποία συνήθως πραγματοποιείται με αντίδραση με τον **διανθρακικό δι(τριτ-βουτυλ)εστέρα** (γνωστό και ως αντιδραστήριο **Boc**), σύμφωνα με την αντίδραση:



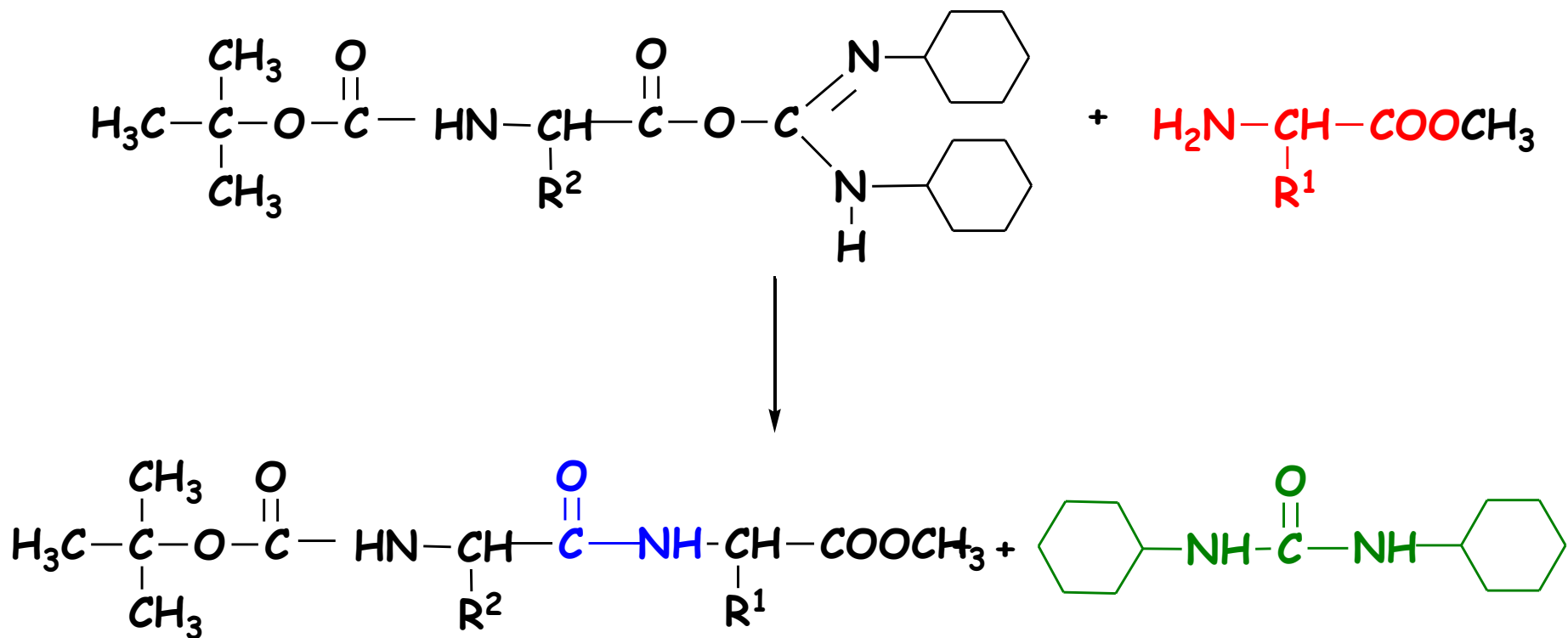
N-προστατευμένο αμινοξύ
(N-Boc αμινοξύ)

3. Στην ενεργοποίηση της **καρβοξυλομάδας** του N-προστατευμένου αμινοξέου, η οποία πλέον δεν πραγματοποιείται με τη μετατροπή της σε ακυλοχλωρίδιο (δεν είναι εύχρηστη, αφού το ακυλοχλωρίδιο είναι ιδιαίτερα δραστικό και συνήθως αντιδρά και με τις πυρηνόφιλες ομάδες των πλευρικών αλυσίδων). Πλέον οι καρβοξυλομάδες των N-προστατευμένων αμινοξέων ενεργοποιούνται αντιδρώντας με **δικυκλο-εξυλοκαρβοδιϊμίδιο (DCC)**, αφού ο άνθρακας της καρβοξυλομάδας ενεργοποιείται σχηματίζοντας δεσμό με μια καλή αποχωρούσα ομάδα.

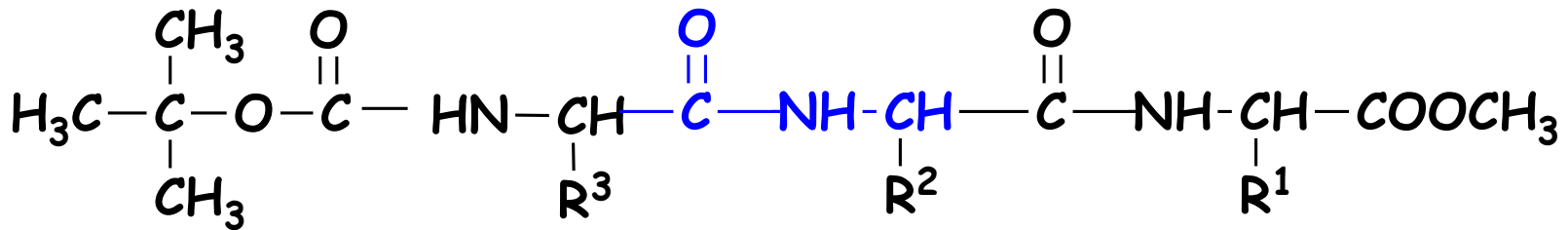
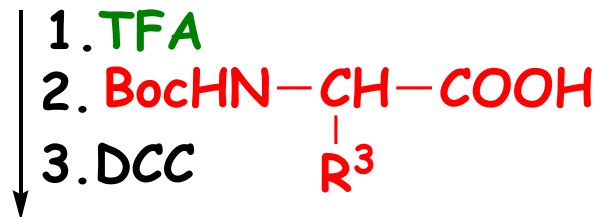
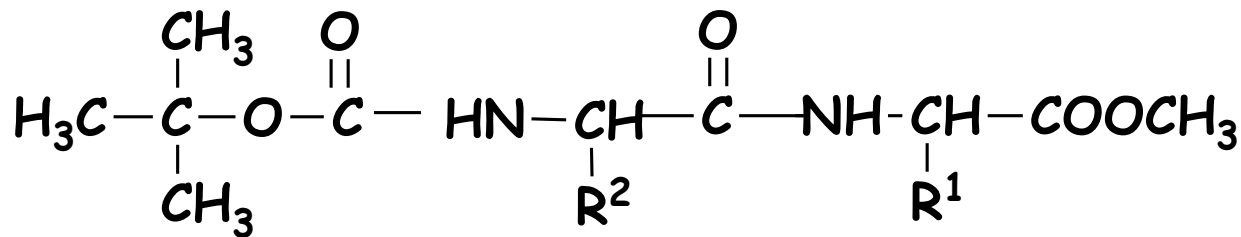


4. Στη σύζευξη, δηλαδή την αντίδραση των δυο αμινοξέων για να σχηματιστεί ο **πεπτιδικός δεσμός**.

Ως παραπροϊόν της αντίδρασης αυτής σχηματίζεται **δικυκλοεξυλουρία** (DCU, ένα σταθερό διαμίδιο).

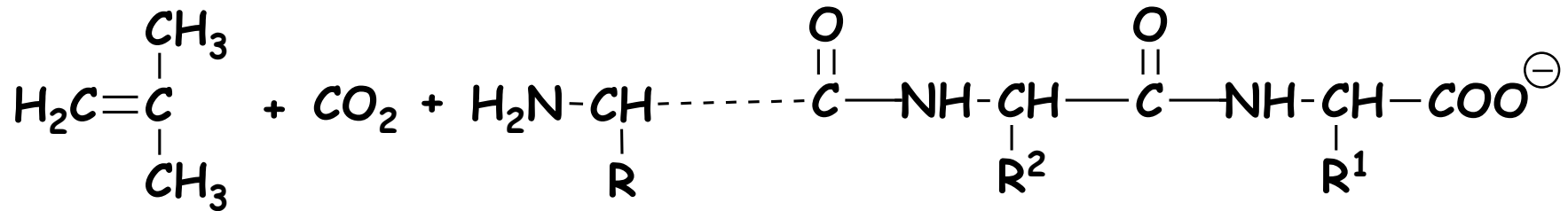
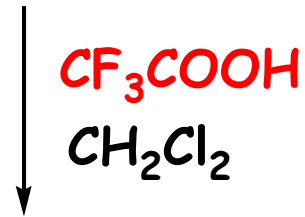
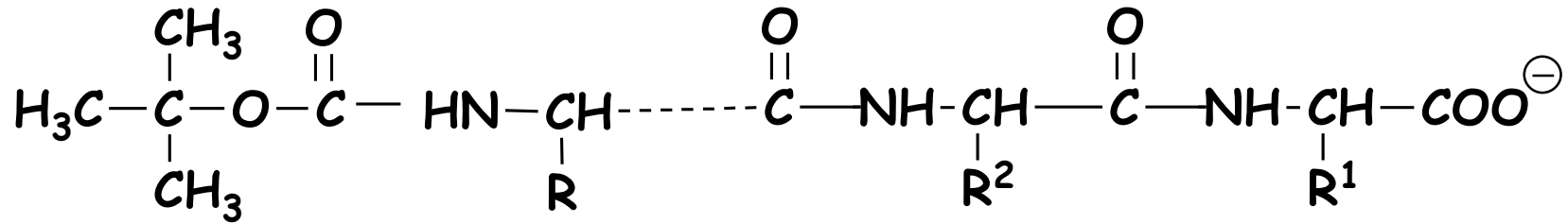


Στη συνέχεια, η αμινομάδα του N-προστατευμένου διπεπτιδίου αποπροστατεύεται με αντίδρασης με **τριφθοροξικό οξύ (TFA)**. Έτσι το διπεπτίδιο είναι πλέον σε θέση να αντιδράσει με ένα **επιπλέον N-προστατευμένο αμινοξύ**, το οποίο θα ενεργοποιηθεί με DCC και αντιδρώντας θα σχηματίσει ένα νέο **πεπτιδικό δεσμό**, και το αντίστοιχο τριπεπτίδιο.



Η διαδικασία αυτή μπορεί να **επαναληφθεί αρκετές φορές** έως ότου επιτευχθεί η σύνθεση του πεπτιδίου που έχει την επιθυμητή αλληλουχία και αριθμό αμινοξέων.

Αφού επιτευχθεί η σύνθεση του επιθυμητού πεπτιδίου, η προστατευτική ομάδα της αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος απομακρύνεται με αντίδραση με **τριφθοροξικό οξύ** (TFA) σε CH_2Cl_2 .



Αν και θεωρητικά η διαδικασία αυτή (πεπτιδική σύνθεση σε υγρή φάση) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση πεπτιδίων με μεγάλο αριθμό αμινοξέων, οι σχετικά χαμηλές αποδόσεις εκάστου σταδίου περιορίζουν τη χρήση της στη σύνθεση μόνο μικρού μεγέθους πεπτιδίων (το πολύ έως δεκαπεπτίδια).

Πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση

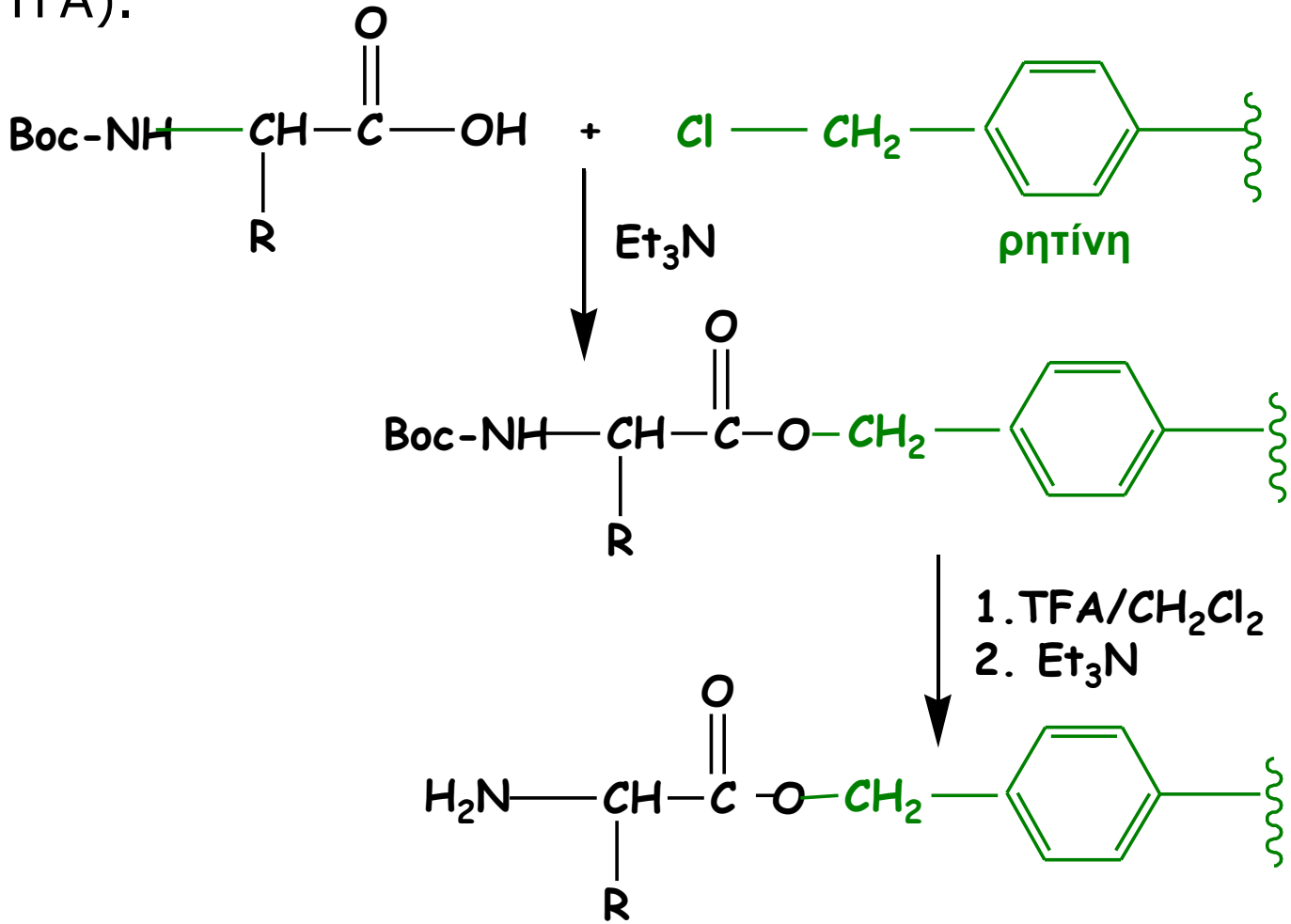
Οι χαμηλές αποδόσεις και οι περιορισμοί στο μέγεθος των πεπτιδίων που είναι δυνατόν να συντεθούν μέσω της πεπτιδικής σύνθεσης σε υγρή φάση ξεπεράστηκαν με την ανακάλυψη από τον **Merrifield** της **πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση**.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή το C-τελικό αμινοξύ συνδέεται ομοιοπολικά με ένα στερεό υλικό (**ρητίνη**) που είναι τοποθετημένο σε μια στήλη. Στη συνέχεια προστίθενται και συνδέονται με τη σειρά τα επόμενα αμινοξέα έως ότου προστεθεί ως τελευταίο το N-τελικό αμινοξύ και ολοκληρωθεί η σύνθεση του επιθυμητού πεπτιδίου.

Η μέθοδος αυτή έχει πλέον αυτοματοποιηθεί και περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

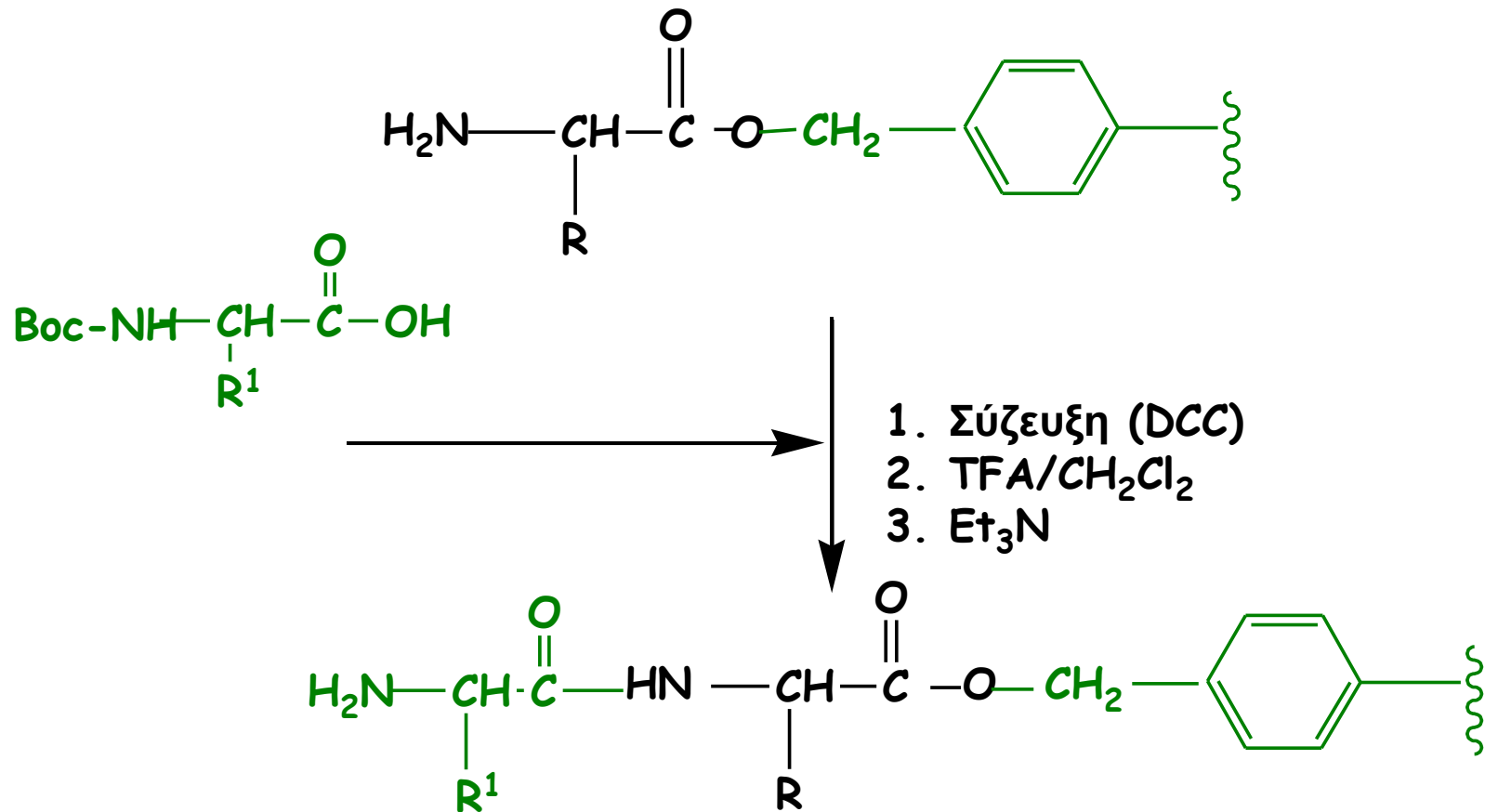
1. Την προστασία της αμινομάδας του C-τελικού αμινοξέος με την Boc προστατευτική ομάδα με σκοπό τον αποκλεισμό της πιθανότητας αντίδρασης της αμινομάδας με τη **ρητίνη**.

2. Τη δέσμευση της καρβοξυλομάδας του C-τελικού αμινοξέος (με μηχανισμό S_N2) από μια **ρητίνη πολυστυρενίου** στην οποία ο βενζολικός δακτύλιος έχει ως υποκαταστάτες χλωρομεθυλενομάδες.
3. Την αποπροστασία της αμινομάδας με αντίδραση με τριφθοροξικό οξύ (TFA).



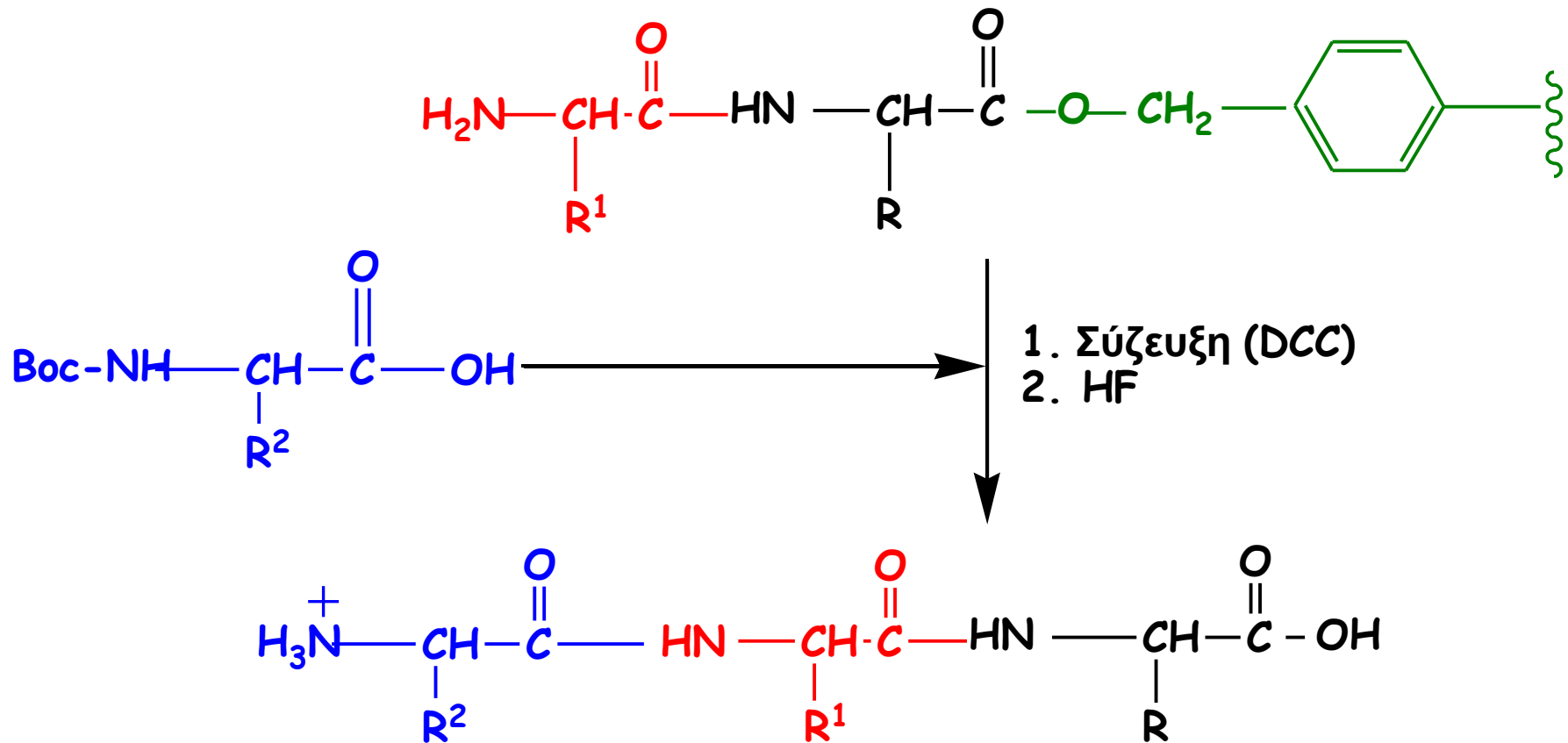
4. Την αντίδραση με το **επόμενο αμινοξύ**, του οποίου όμως έχει προστατευτεί η αμινομάδα και ενεργοποιηθεί η καρβοξυλομάδα (με DCC).

5. Την αποπροστασία της αμινομάδας με αντίδραση με τριφθοροξικό οξύ (TFA).



6. Η σύνθεση μπορεί να συνεχιστεί προσθέτοντας ένα **επιπλέον αμινοξύ**, του οποίου όμως έχει προστατευτεί η αμινομάδα και ενεργοποιηθεί η καρβοξυλομάδα (με DCC).

7. Αφού προστεθεί ο επιθυμητός αριθμός αμινοξέων, η ρητίνη απομακρύνεται με κατεργασία με υδροφθορικό οξύ (HF).



Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της μεθόδου **Merrifield** (**πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης**) είναι ότι η **ρητίνη** δεν δεσμεύει τα διάφορα παραπροϊόντα. Έτσι, αυτά απομακρύνονται με την έκπλυση της στήλης και λαμβάνεται μόνο το καθαρό προϊόν της αντίδρασης.

Πρακτικά, η αυτοματοποιημένη αυτή μέθοδος έχει τη δυνατότητα να εφαρμοστεί για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων που περιέχουν έως και 50 αμινοξέα. Τα μεγαλύτερα πολυπεπτίδια συντίθενται με αντίδραση επιμέρους μικρότερων πεπτιδίων. Για παράδειγμα, ένα πολυπεπτίδιο με 120 αμινοξέα είναι δυνατόν να συντεθεί από τον συνδυασμό τριών επιμέρους μικρότερων πεπτιδίων (πχ που περιέχουν 45, 40 και 35 αμινοξέα αντιστοίχως).

Η τεχνητή αυτή μέθοδος δεν είναι δυνατόν να συγκριθεί με αυτήν της φύσης, η οποία έχει τη δυνατότητα να συνθέτει με ευκολία ιδιαίτερα πολύπλοκες πρωτεΐνες και πεπτίδια. Με στόχο τη διαλεύκανση και χρησιμοποίηση του μηχανισμού αυτού ερευνητικές προσπάθειες (γενετική μηχανική) έχουν καταφέρει να απομονώσουν ή παράγουν βακτήρια που έχουν τη δυνατότητα να παράγουν πολλά χρήσιμα πεπτίδια και πρωτεΐνες, όπως π.χ. η ανθρώπινη ινσουλίνη.

Πρωτεΐνες

A. Δομή

Η **δομή** των **πρωτεϊνών** διακρίνεται σε:

1. Πρωτοταγή, η οποία αναφέρεται στη σειρά (αλληλουχία) με την οποία τα αμινοξέα συντάσσονται στην πρωτεϊνική αλυσίδα και τις θέσεις που πιθανά υπάρχουν δισουλφιδικές γέφυρες.

2. Δευτεροταγή, που δίνει τον τρόπο με τον οποίο η πρωτεϊνική αλυσίδα (πρωτοταγής δομή) αναδιπλώνεται έτσι ώστε η πρωτεΐνη να έχει τη μεγαλύτερη σταθερότητα (δομή ελάχιστης ενέργειας). Οι κυριότεροι παράγοντες που καθορίζουν τη δευτεροταγή δομή είναι:

α) οι δεσμοί H μεταξύ του O του καρβονυλίου με αμινομάδες άλλων αμινοξέων, και

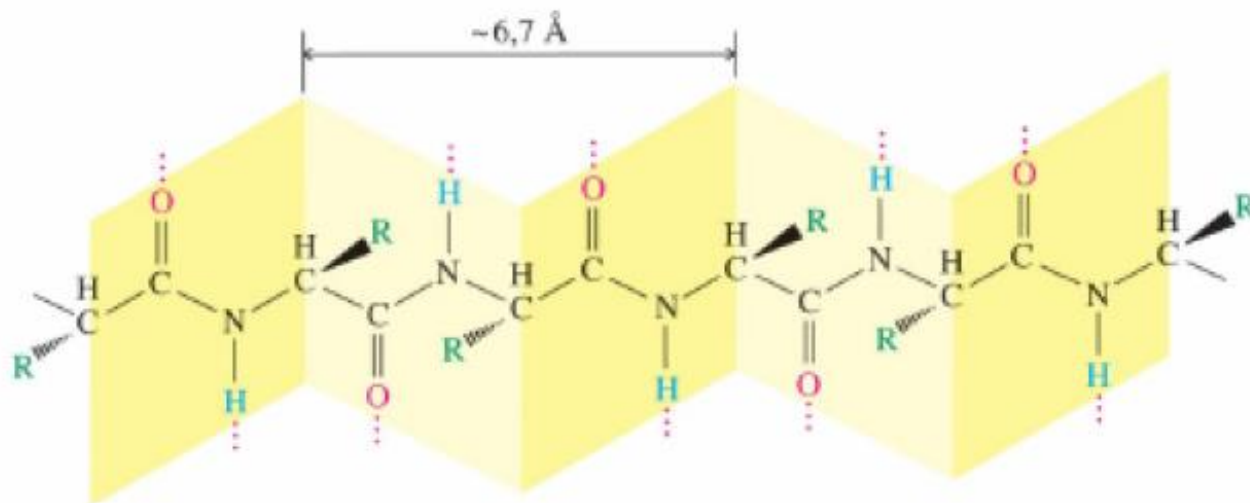
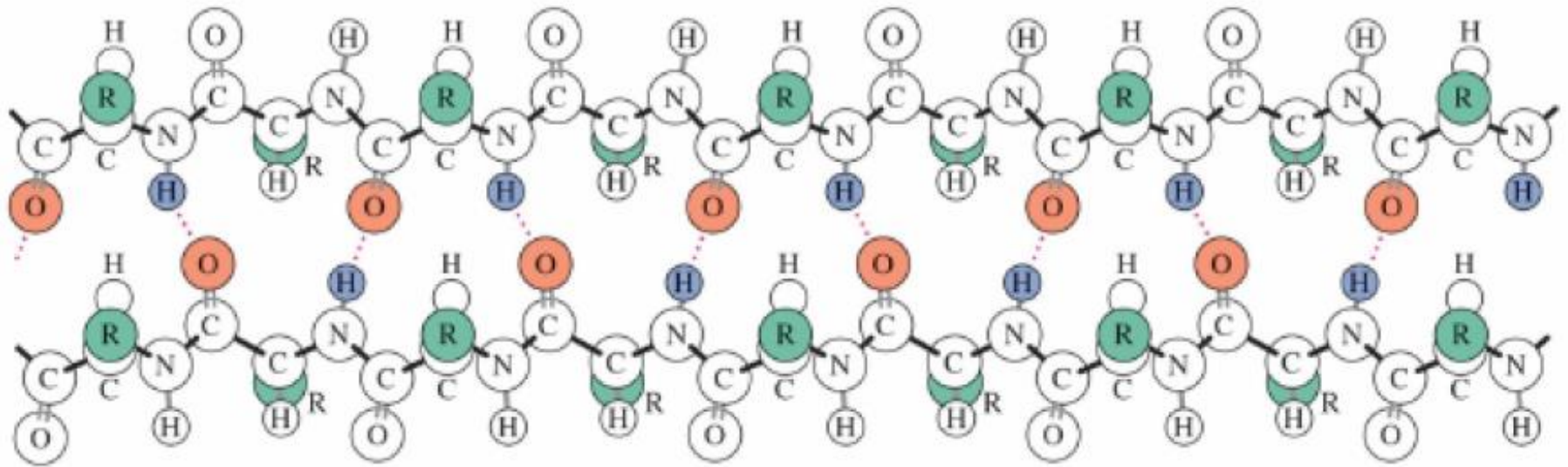
β) η διευθέτηση των πλευρικών αλυσίδων έτσι ώστε να αποφεύγεται η στερεοχημική παρεμπόδιση και άπωση μεταξύ των φορτισμένων ομάδων.

Δυο είναι οι τύποι δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, η *α-έλικα* και το *β-πτυχωτό*

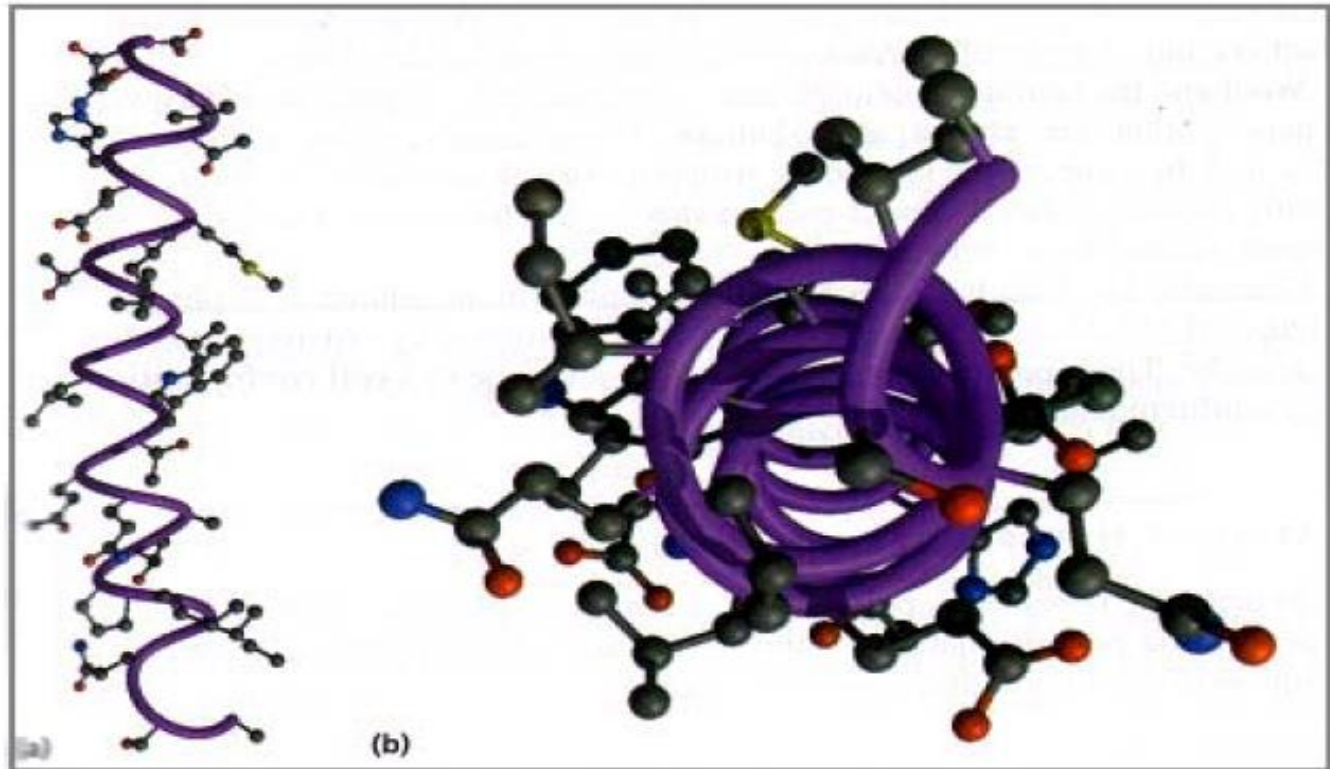
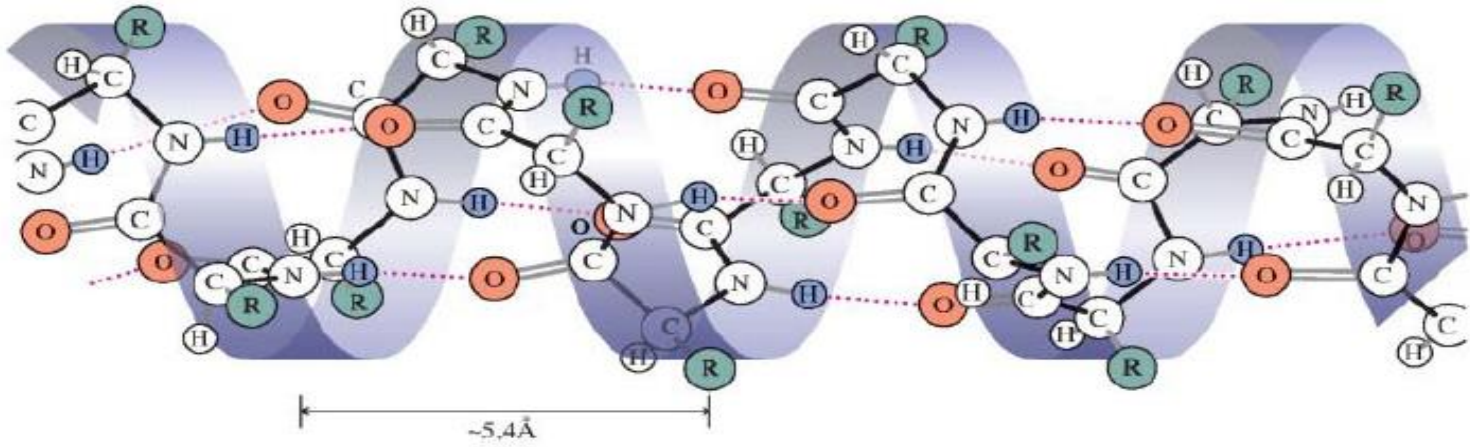
Δευτεροταγείς δομές πρωτεϊνών

- Πτυχωτή δομή
- Δομή α-έλικας
- Μικτή

Πτυχωτή δομή



Δομή α-έλικας



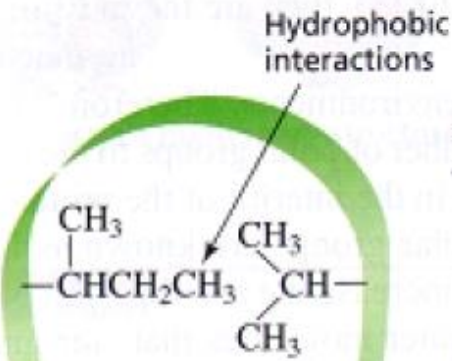
Μικτή δομή



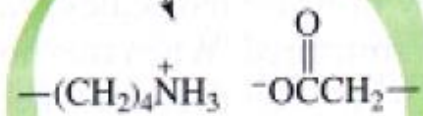
Δομή καρβοξυπεπτιδάσης

3. Τριτοταγή, η οποία περιγράφει τη δομή (σε τρεις διαστάσεις) της πρωτεΐνης στο χώρο. Η δομή αυτή καθορίζεται κατά κύριο λόγο από την πρωτοταγή δομή, αφού αυτή είναι υπεύθυνη για τα μόρια που εμπεριέχονται και τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται είναι ομοιολογικοί δεσμοί, ηλεκτροστατική έλξη, δεσμοί υδρογόνου και δυνάμεις *Van der Waals* (χαρακτηριστική τριτοταγής δομή πρωτεΐνης απεικονίζεται στο σχήμα της σελίδας 125 του διδακτικού βιβλίου).

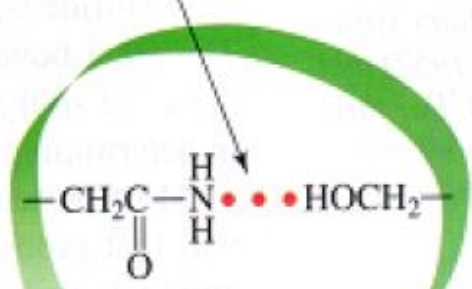
Sheet Structure



Electrostatic attraction



Hydrogen bond between side chains

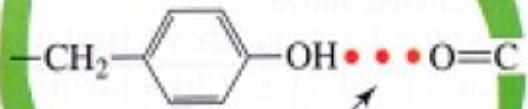


COO⁻

Helical structure

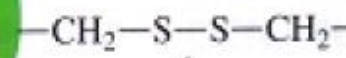
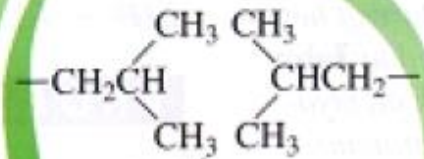


Hydrogen bond between peptide groups



Hydrogen bond between side chain and peptide group

Hydrophobic interactions



Disulfide bond

Hydrogen bond

4. Τεταρτοταγή, η οποία περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο διαφορετικές αλυσίδες διευθετούνται μεταξύ τους. Η δομή αυτή έχει έννοια μόνο όταν στο σχηματισμό της πρωτεΐνης συμμετέχουν περισσότερες από μια διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες ονομάζονται και υπομονάδες.

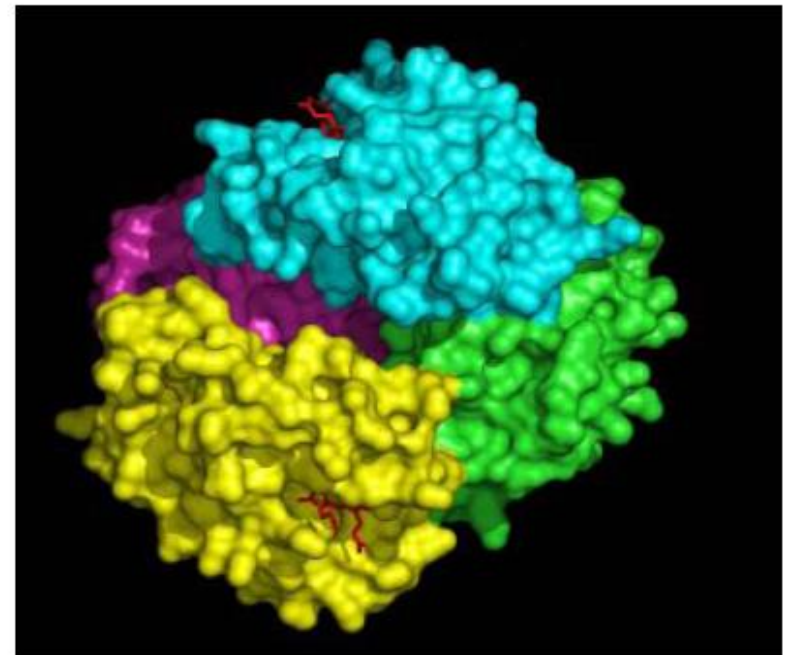
Μια πρωτεΐνη με μια υπομονάδα (η οποία συνεπώς στερείται τεταρτοταγούς δομής) χαρακτηρίζεται ως μονομερής, μια άλλη με δυο διμερής και κατ'αντιστοιχία τριμερής, τετραμερής κλπ.

Τεταρτοταγής δομή πρωτεϊνών

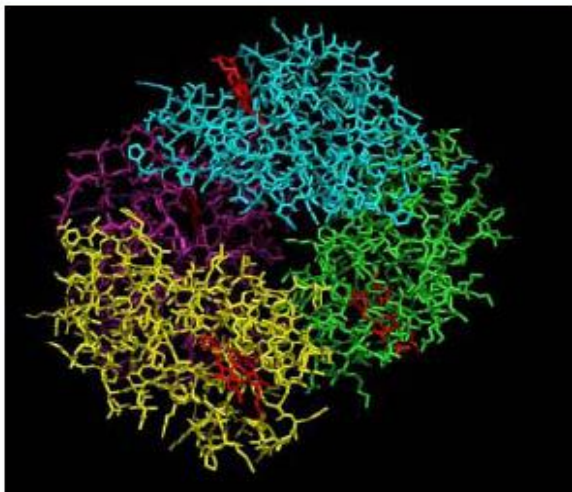
Αιμοσφαιρίνη – Απεικόνιση cartoon



Αιμοσφαιρίνη– Απεικόνιση επιφάνειας



Αιμοσφαιρίνη– Απεικόνιση δεσμών



B. Μετουσίωση

Μετουσίωση μιας πρωτεΐνης ονομάζεται η καταστροφή ή αποδιάταξη της τριτοταγούς δομής της και η τυχαία εκ νέου αναδίπλωσή της. Η διαδικασία της μετουσίωσης είναι σχετικά απλή, αφού οι δεσμοί που διασπώνται είναι σχετικά ασθενείς μπορεί και λαμβάνει χώρα:

1. Αλλαγή pH, η οποία επιφέρει αλλαγή στα φορτία των φορτισμένων ομάδων με αποτέλεσμα την αλλαγή της ηλεκτροστατικής έλξης και των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται.

2. Δημιουργία δεσμών H, μεταξύ της πρωτεΐνης και άλλων μορίων. Επιτυγχάνεται με την επίδραση χημικών αντιδραστηρίων, τα οποία σχηματίζουν ισχυρότερους δεσμούς H με τις πεπτιδικές ομάδες με αποτέλεσμα να αποδιοργανωθεί η αναδίπλωση της αλυσίδας από τους προϋπάρχοντες ασθενέστερους δεσμούς H.

3. Προσθήκη απορρυπαντικών, τα οποία αλληλεπιδρούν με τις μη πολικές ομάδες των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του σχηματισμού των δεσμών H και τη δημιουργία της τριτοταγούς δομής.

4. Θέρμανση διαλυμάτων, που επιφέρει μετουσίωση αυξάνοντας την κινητικότητα των ατόμων με αποτέλεσμα να εξασθενούν οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις που συνεισφέρουν στη δημιουργία της τριτοταγούς δομής.

Προσδιορισμός της δομής των πεπτιδίων

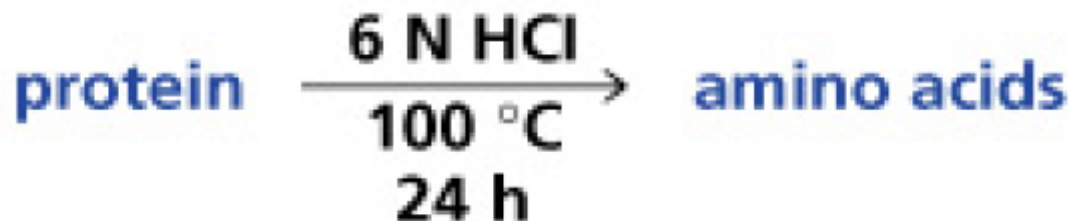
- Καθαρισμός του πεπτιδίου
- Ανάλυση Αμινοξέων (Είδος και αναλογία αμινοξέων)
- Ακολουθία αμινοξέων στη πεπτιδική αλυσίδα

Καθαρισμός του πεπτιδίου

- Διάλυση σε συγκεκριμένο διαλύτη και διήθηση μέσω ημιπερατών μεμβρανών-*διαχωρισμός ανάλογα με το μέγεθος*
- Χρωματογραφία διήθησης με πηκτή (gel-filtration chromatography)-*διαχωρισμός ανάλογα με το μέγεθος*
- Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (ion exchange chromatography)
- *διαχωρισμός ανάλογα με το φορτίο*
- Ηλεκτροφόρηση- *διαχωρισμός ανάλογα με το φορτίο*
- Χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography)-*διαχωρισμός λόγω ειδικών αλληλεπιδράσεων*

Ανάλυση Αμινοξέων

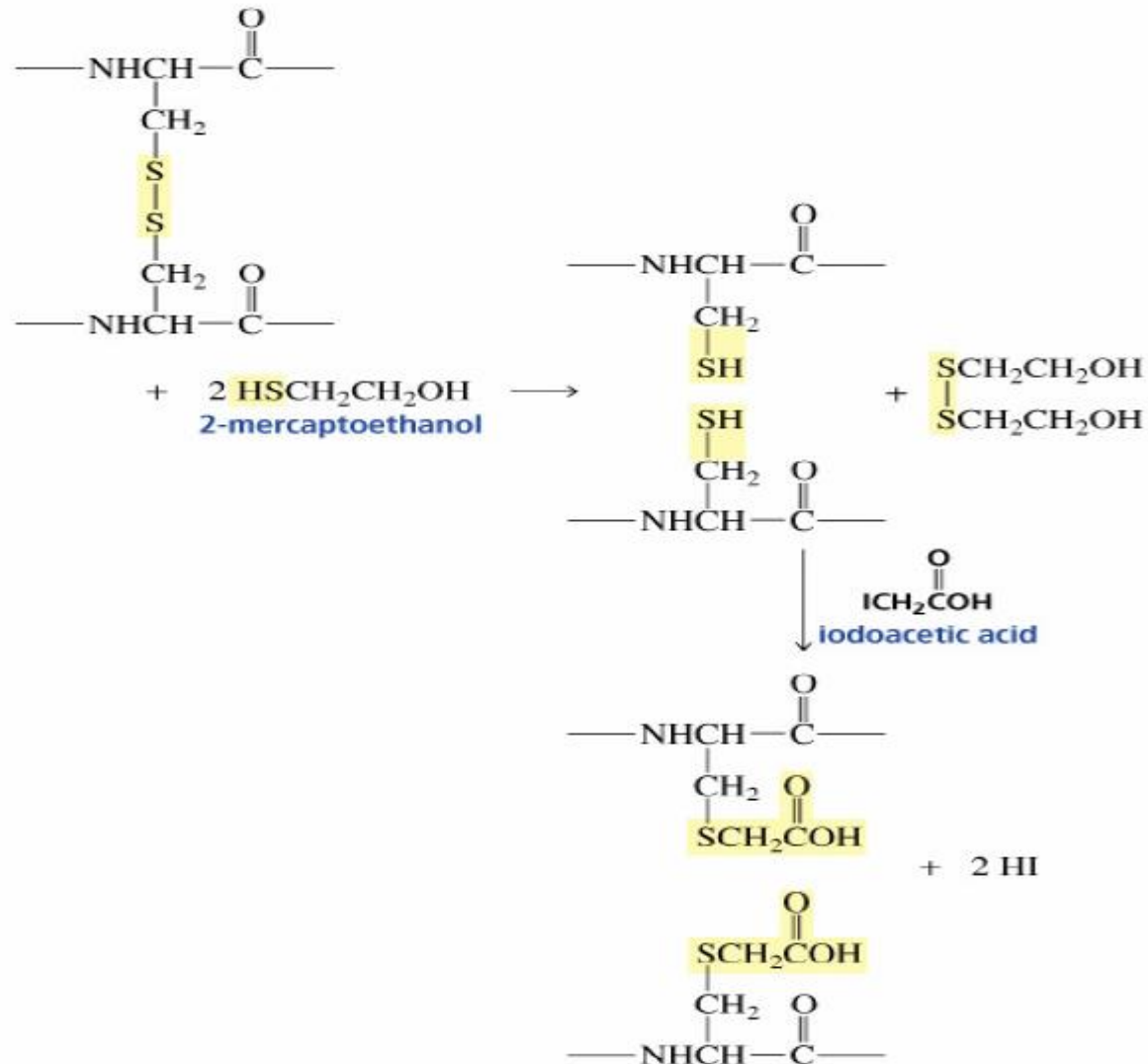
- Αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών
- Υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών



- Διαχωρισμός με τον αυτόματο αναλυτή αμινοξέων σε στήλη ιοντοανταλλακτικής ρητίνης με έκλουση με ρυθμιστικά διαλύματα. Τα διάφορα αμινοξέα κινούνται στη στήλη με διαφορετική ταχύτητα και στην έξοδο αναμιγνύονται και ανιχνεύονται με διάλυμα νινυδρίνης

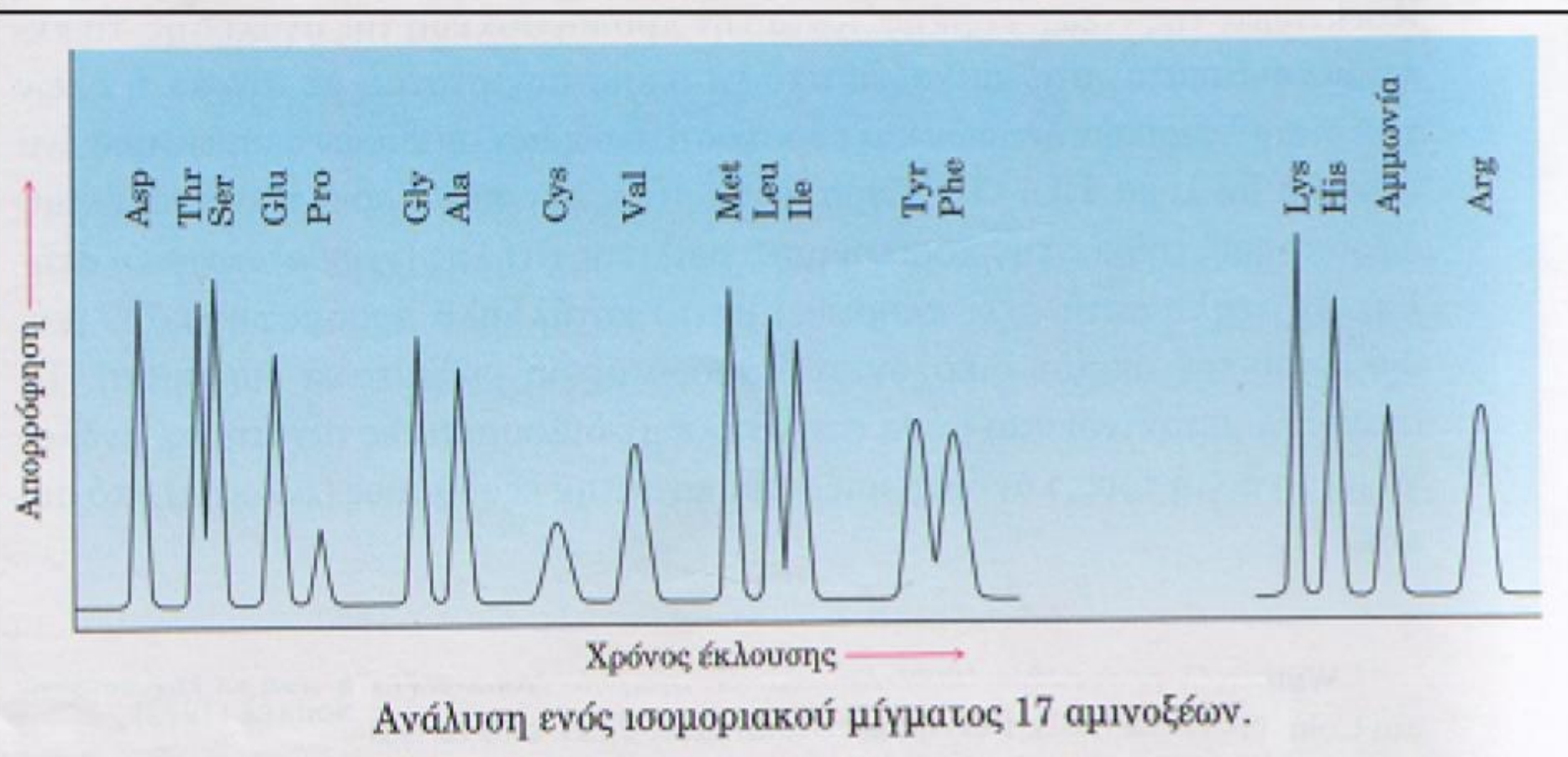
Αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών

cleaving disulfide bridges

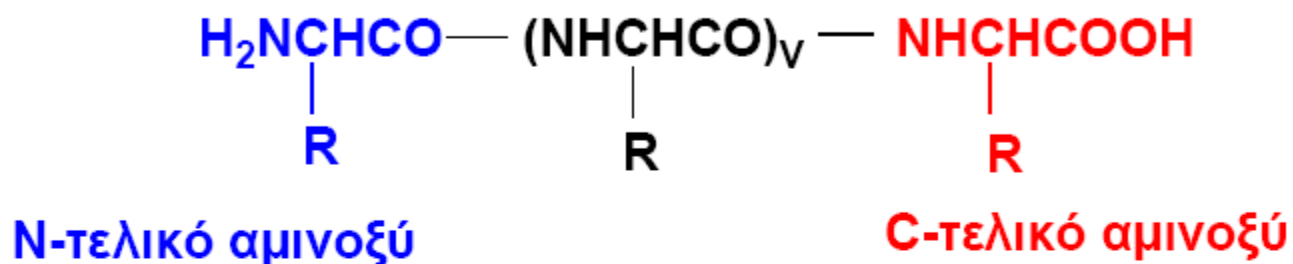


Χρωματογράφημα αναλυτή αμινοξέων

Ο χρόνος έκλουσης χαρακτηριστικός του είδους του αμινοξέος και η ένταση της απορρόφησης ανάλογη της ποσότητας



Εύρεση της ακολουθίας των αμινοξέων στη πεπτιδική αλυσίδα



1. Προσδιορισμός *N*-τελικού αμινοξέος

Μέθοδος Sanger

Αποικοδόμηση Edman

2. Προσδιορισμός *C*-τελικού αμινοξέος

Υδραζινόλυση

Μέθοδος καρβοξυπεπτιδάσης

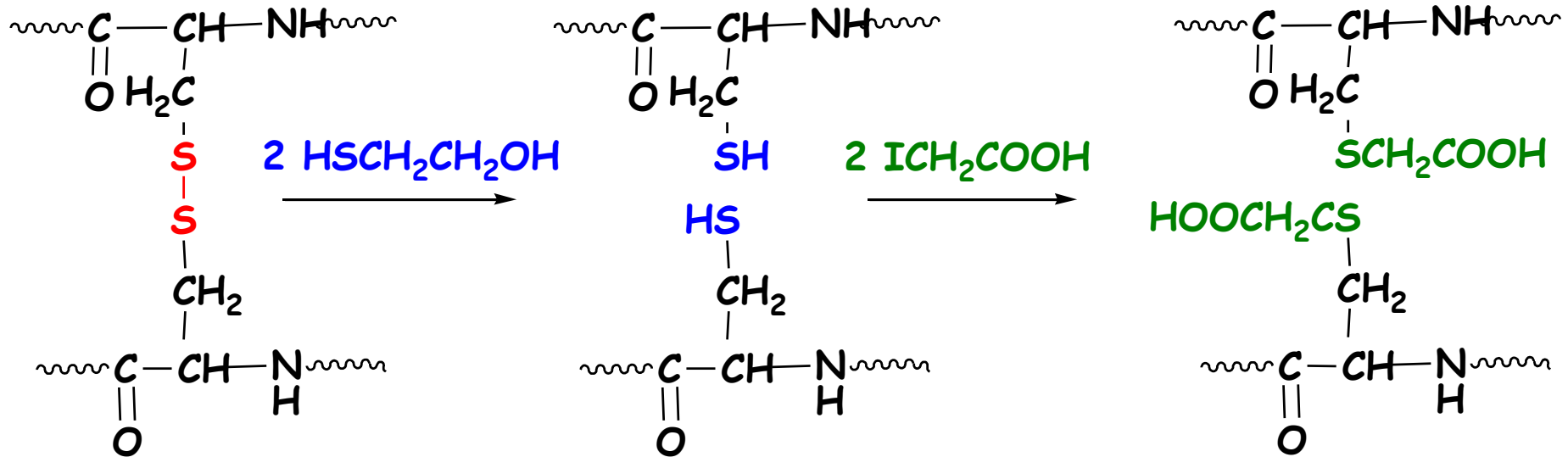
3. **Εκλεκτική μερική υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών**

Προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής των πρωτεϊνών

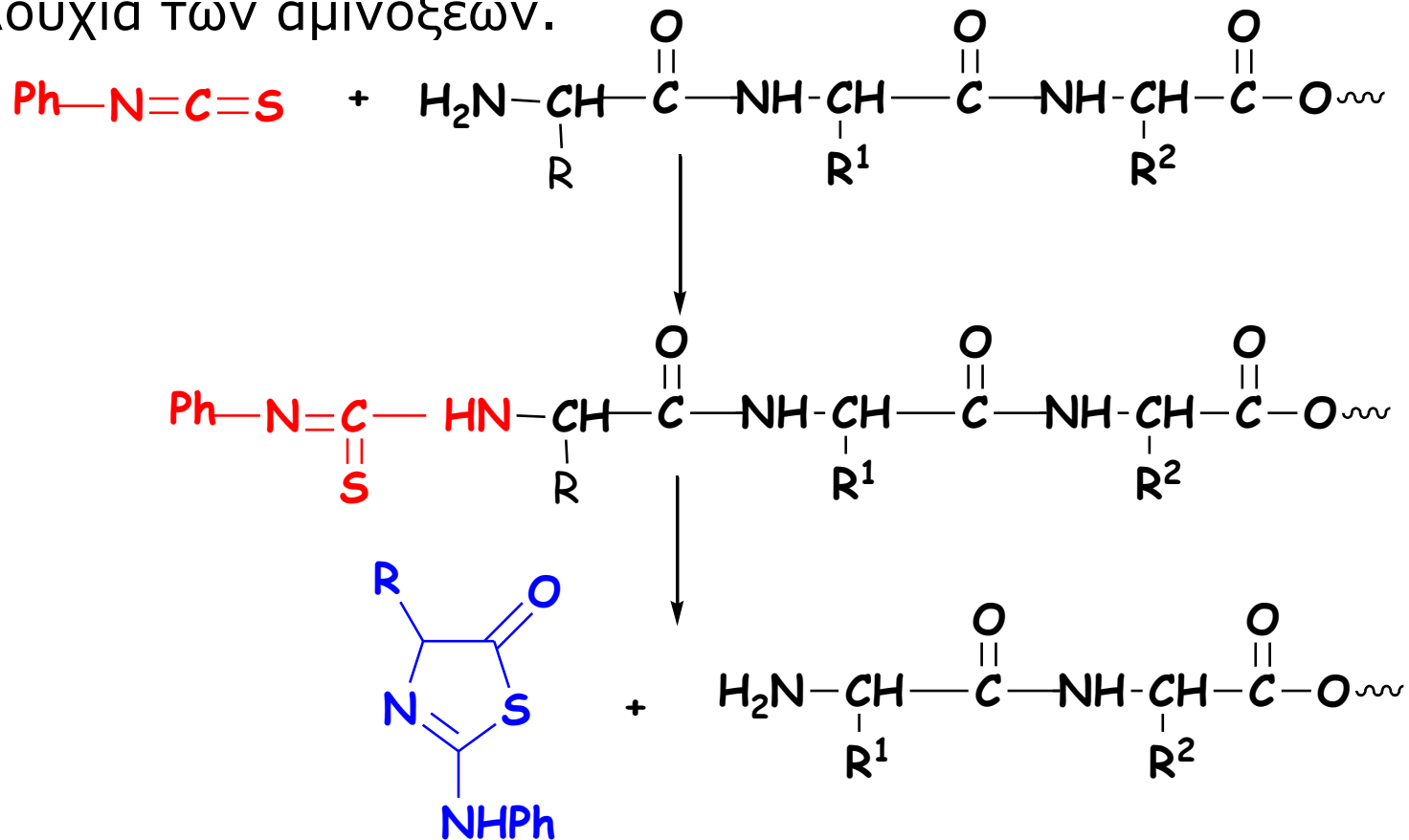
Η διασάφηση της πρωτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης είναι πολύ σημαντική για τη μελέτη της, αφού αυτή είναι που καθορίζει περαιτέρω τη μορφή και οργάνωση των ανώτερων δομών της.

Για τη διασάφηση της πρωτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης ακολουθούμε τα παρακάτω στάδια:

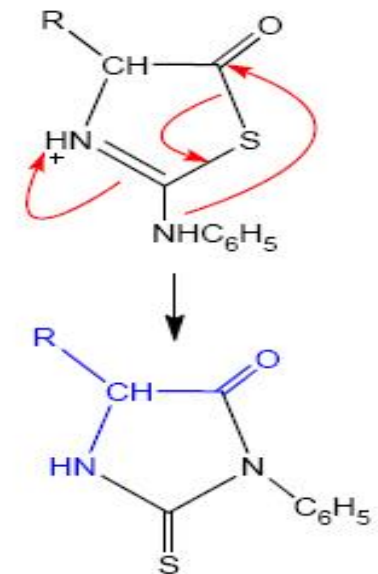
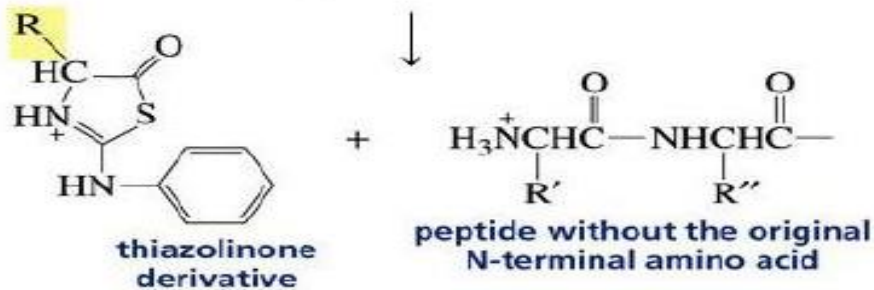
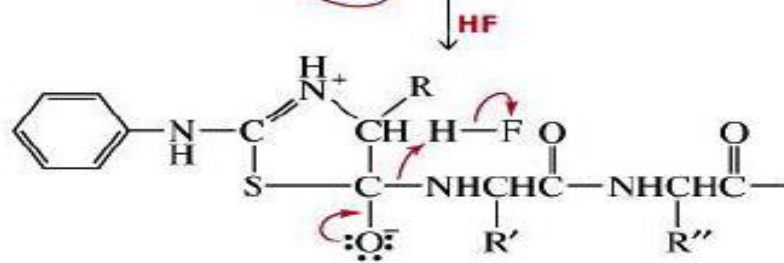
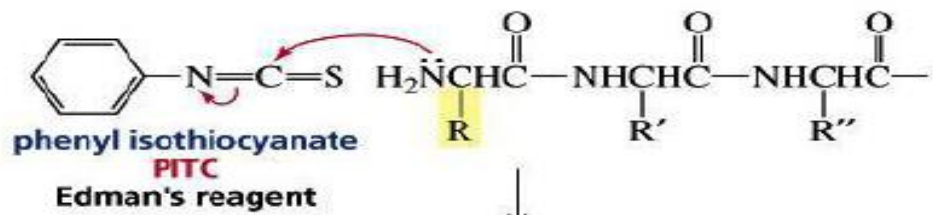
1. Αναγωγή των δισουλφιδικών γεφυρών, η οποία πραγματοποιείται με αντίδραση με **2-μερκαπτοαιθανόλη**. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προστασία με **ιωδοξικό οξύ** των **σουλφυδρυλομάδων** που προκύπτουν.



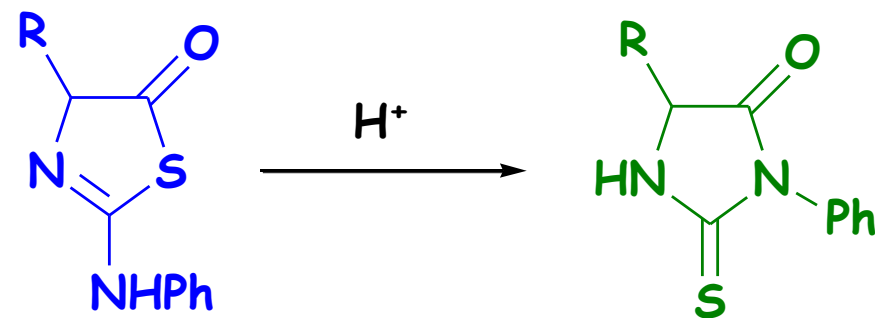
Από τις διάφορες τεχνικές που έχουν προταθεί για τον προσδιορισμό του N-τελικού αμινοξέος, η πλέον αξιόλογη είναι η κατεργασία της πρωτεΐνης με **ισοθειοκυανικό φαινύλιο (PITC)**, αντιδραστήριο Edman). Το αντιδραστήριο αυτό αντιδρά αποκλειστικά με την ελεύθερη αμινομάδα του N-τελικού αμινοξέος δίνοντας τελικά το **θειαζολινονικό παράγωγο** του αμινοξέος, που υπό όξινες συνθήκες διασπάται από την αλυσίδα αφήνοντας άθικτη την υπόλοιπη αλληλουχία των αμινοξέων.



Αποικοδόμηση Edman



Τέλος, η εκχύλιση υπό όξινες συνθήκες του **θειαζολινονικού** παραγώγου του N-τελικού αμινοξέος έχει ως αποτέλεσμα τον μετασχηματισμό του και την παραλαβή ενός σταθερού **φαινυλοϋδαντοϊνικού (PTH)** παραγώγου του N-τελικού αμινοξέος.



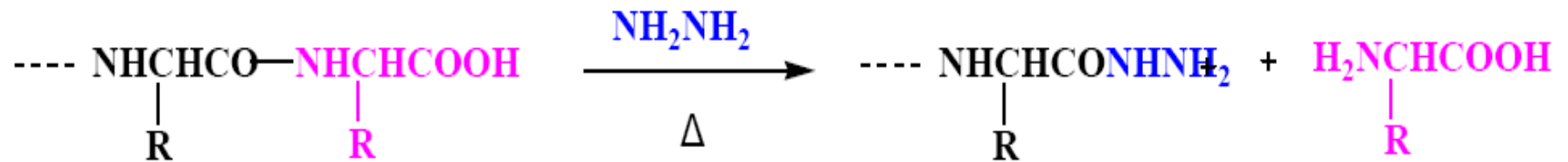
Το **PTH παράγωγο** που δημιουργείται έχει άμεση σχέση με το N-τελικό αμινοξύ που αντέδρασε (διαφορετικό **R**) με αποτέλεσμα να είναι εύκολη η πιστοποίηση του αμινοξέος που αντέδρασε (αφού υπάρχουν πρότυπα για τα **PTH-παράγωγα** όλων των φυσικών αμινοξέων).

Η διαδικασία που περιγράφηκε αποτελεί μια διάσπαση **Edman**. Σε αυτήν προσδιορίστηκε το N-τελικό αμινοξύ και έμεινε τη υπόλοιπη αλυσίδα ανέπαφη, με αποτέλεσμα πλέον το επόμενο στη σειρά αμινοξύ να έχει τη θέση του N-τελικού. Το αμινοξύ αυτό μπορεί εύκολα να ανιχνευτεί στα πλαίσια ενός επόμενου κύκλου **Edman**. Πλέον υπάρχουν αυτοματοποιημένα συστήματα που έχουν την ικανότητα να προσδιορίζουν την ακριβή αλληλουχία αμινοξέων σε πεπτίδια που περιέχουν έως και 50 αμινοξέα.

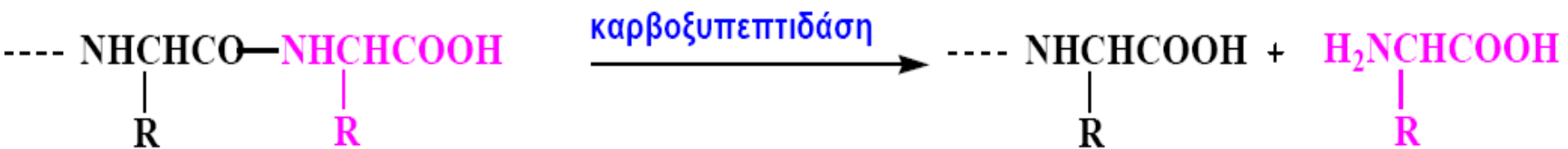
5. Προσδιορισμός του C-τελικού αμινοξέος επιτυγχάνεται με την κατεργασία μιας πρωτεΐνης με καρβοξυπεπτιδάσες. Τα ένζυμα αυτά είναι εξωπεπτιδάσες, δηλαδή καταλύουν την υδρόλυση μόνο των C-τελικών αμινοξέων, τα οποία στη συνέχεια μπορούν προσδιοριστούν με μια από τις μεθόδους ανάλυσης των αμινοξέων. Εξειδικεύοντας, θα πρέπει να τονιστεί ότι η **καρβοξυπεπτιδάση A** διασπά εκλεκτικά όλα τα C-τελικά αμινοξέα εκτός από την αργινίνη και τη λυσίνη, τα οποία όμως διασπώνται αποκλειστικά από την **καρβοξυπεπτιδάση B**.

Προσδιορισμός C-τελικού αμινοξέος

Υδραζινόλυση

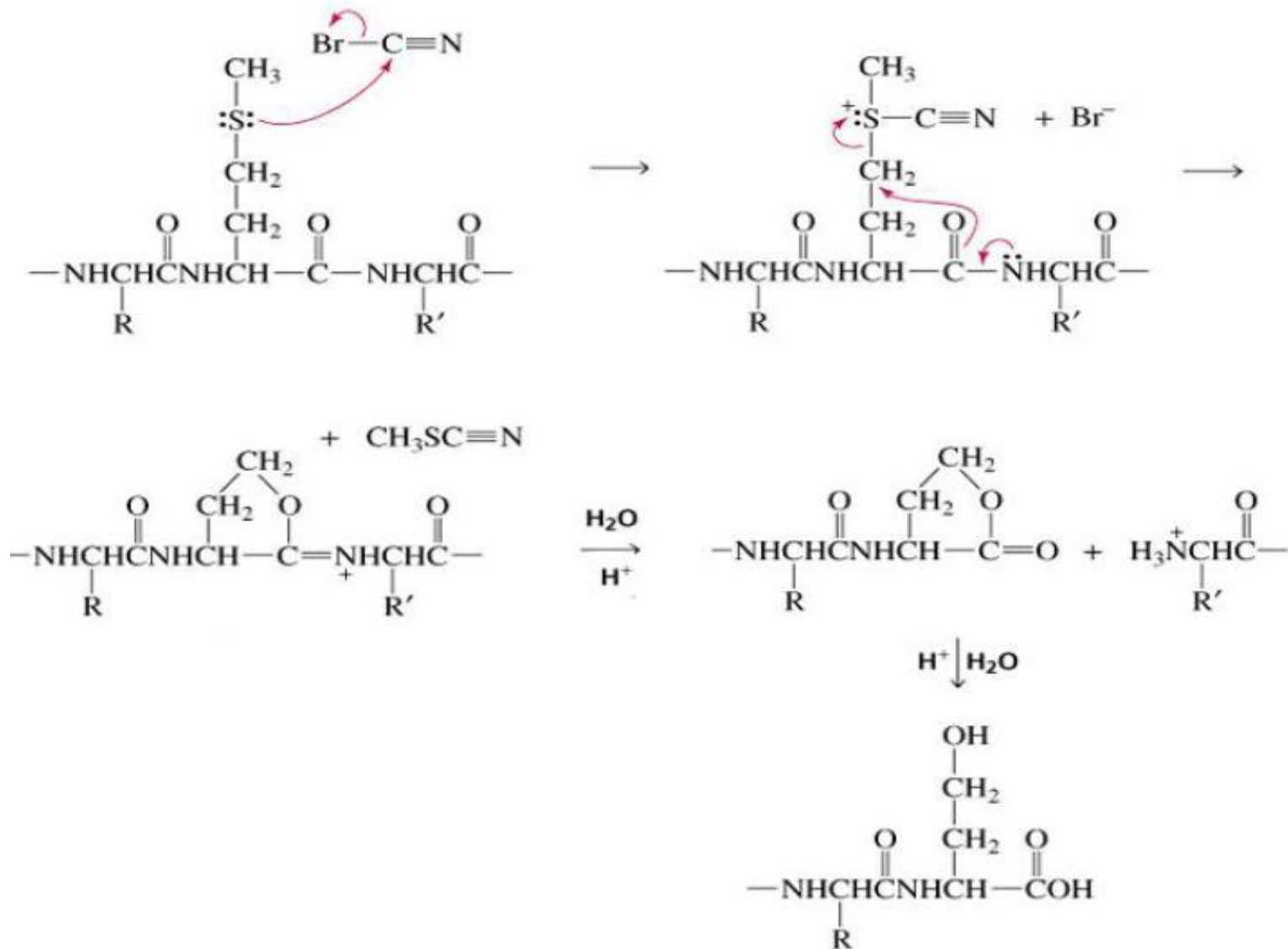


Μέθοδος καρβοξυπεπτιδάσης



Διάσπαση πεπτιδίων με βρωμοκυάνιο

Διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών της μεθειονίνης από την C-πλευρά

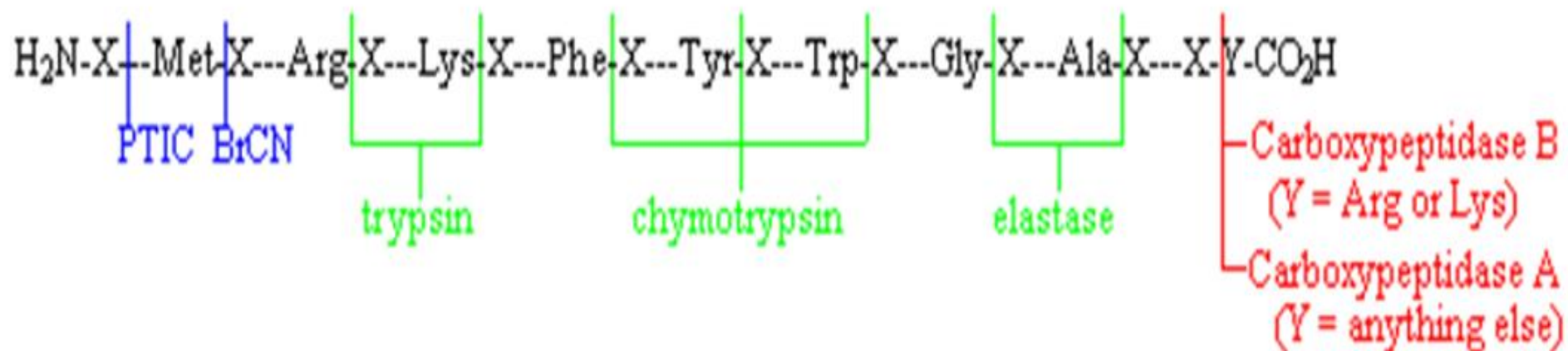


Εκλεκτική μερική υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών

chemical reagents

endopeptidases

exopeptidases



X must not be proline for peptidases

7. Προσδιορισμός των θέσεων των δισουλφιδικών γεφυρών, η οποία επιτυγχάνεται με υδρόλυση ενός δείγματος πρωτεΐνης με ακέραιο αριθμό δισουλφιδικών δεσμών. Επίσης προσδιορίζοντας τα επιμέρους αμινοξέα είναι πλέον δυνατό να προσδιοριστεί και η θέση των δισουλφιδικών γεφυρών.

Χημικά αντιδραστήρια

Εξειδίξευση

Αντιδραστήριο Edman

Αποσπά το N-τελικό αμινοξύ

Κυανοβρωμίδιο

Υδρολύει τη C-πλευρά της Met

Ένζυμα

*Εξωπεπτιδάσες **

Καρβοξυπεπτιδάση A

Αποσπά C-τελικά αμινοξέα (εκτός από Arg, Lys)

Καρβοξυπεπτιδάση B

Αποσπά C-τελικά αμινοξέα (μόνο Arg, Lys)

*Ενδοπεπτιδάσες **

Θρυψίνη

Υδρολύει τη C-πλευρά των Arg και Lys

Χυμοθρυψίνη

Υδρολύει τη C-πλευρά των Phe, Tyr, Trp

Ελαστάση

Υδρολύει τη C-πλευρά των Gly και Ala

Να προσδιοριστεί η πρωτοταγής δομή ενός οκταπεπτιδίου από τα ακόλουθα δεδομένα

- Όξινη υδρόλυση δίνει: 2Arg, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Tyr
- Το αντιδραστήριο Edman δίνει λευκίνη Leu
- Το BrCN σχηματίζει δυο πεπτίδια : i) Arg, Phe, Ser ii) Arg, Leu, Lys, Met, Tyr
- Η θρυψίνη , ένζυμο που υδρολύει την C-πλευρά της αργινίνης και της λυσίνης δίνει: i) Arg ii) Ser iii) Arg, Met, Phe iv) Leu, Lys, Tyr

Leu-Tyr-Lys-Arg-Met-Phe-Arg-Ser

ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΙΚΗ ΕΠΙΛΥΣΗ ΑΣΚΗΣΕΩΝ

**ΑΜΙΝΟΞΕΑ –
ΠΕΠΤΙΔΙΑ & ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ**

Άσκηση 3-1

-

Ποιες είναι οι επικρατέστερες μορφές του αμινοξέος αλανίνη σε διάλυμα με pH 1,0, 2,34, 6,0, 9,69 και 12,0 και ποιο το ισοηλεκτρικό σημείο του.

(Χρησιμοποιήστε τις τιμές pKa του Πίνακα 3.1 του βιβλίου σας)

Απάντηση 3-1

Η αλανίνη είναι ένα ουδέτερο αμινοξύ, με συνέπεια το ισοηλεκτρικό του σημείο να ισούται με το ημιάθροισμα των τιμών pK_a των λειτουργικών του ομάδων:

Συγκεκριμένα $pI = (2,34 + 9,69) / 2 = \underline{\underline{6,015}}$.

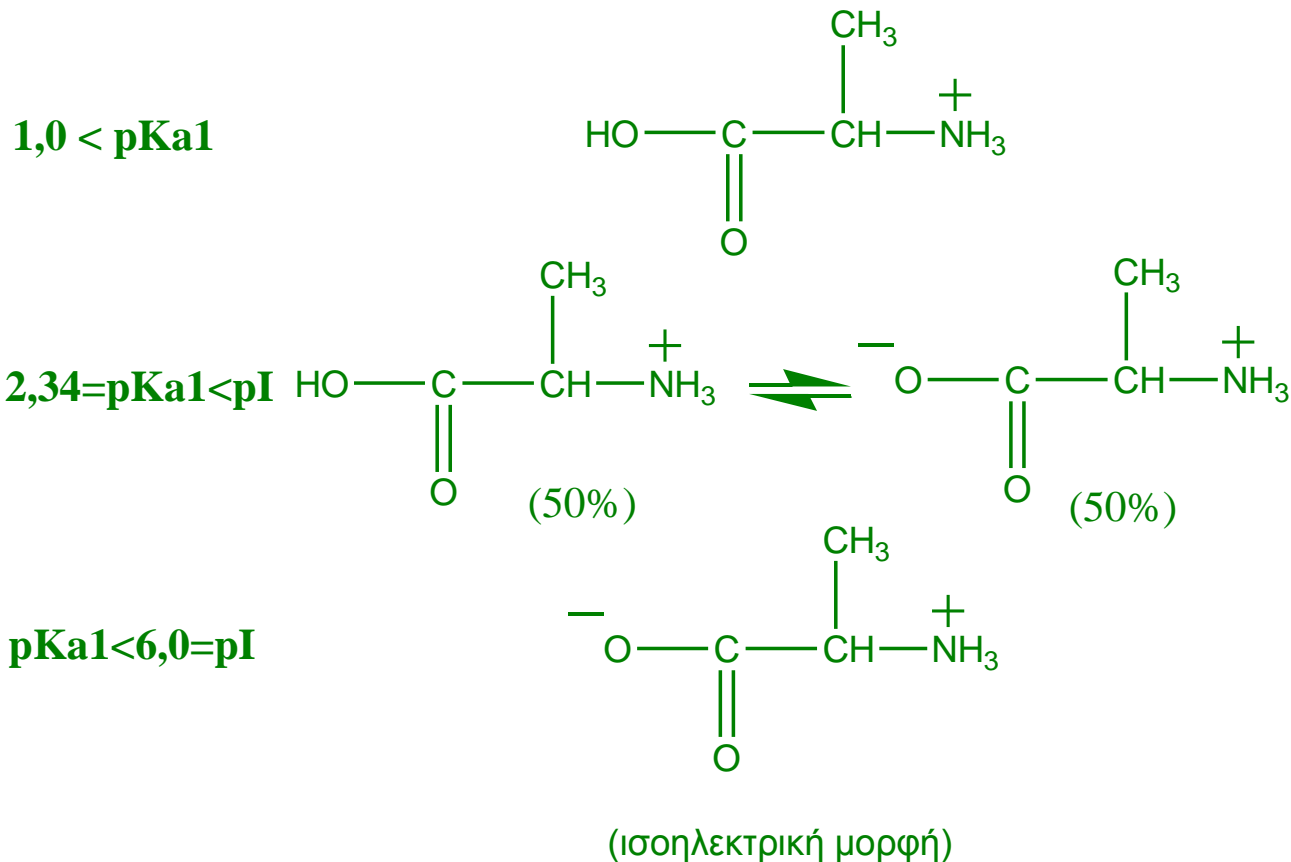
Οι μορφές του αμινοξέος εξαρτώνται από τη σχέση του pH του διαλύματος με το pI και τις τιμές pK_{a1} και pK_{a2} .

Οι μεταβολές αυτές δίνονται παραστατικά στα παρακάτω σχήματα:

Σε τιμή $pH=1$ ($<pK_a$ καρβοξυλίου) και οι δυο ομάδες υφίστανται με την όξινη μορφή τους ($COOH$, NH_2).

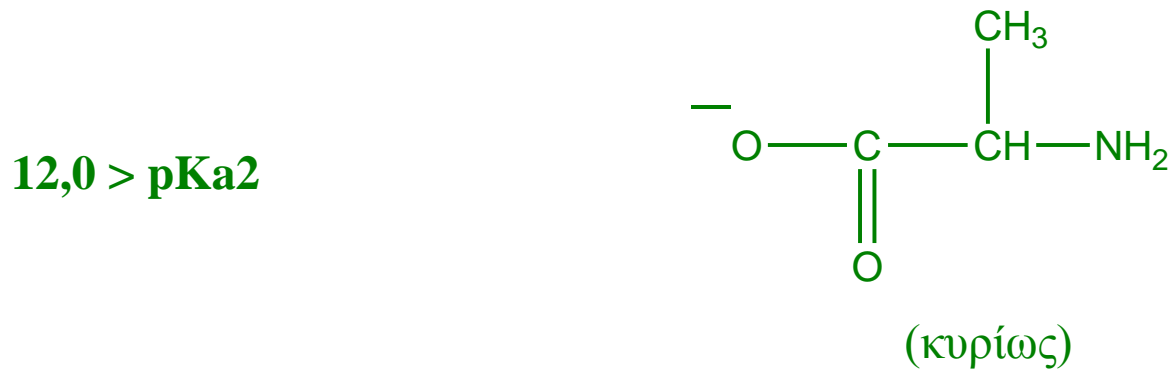
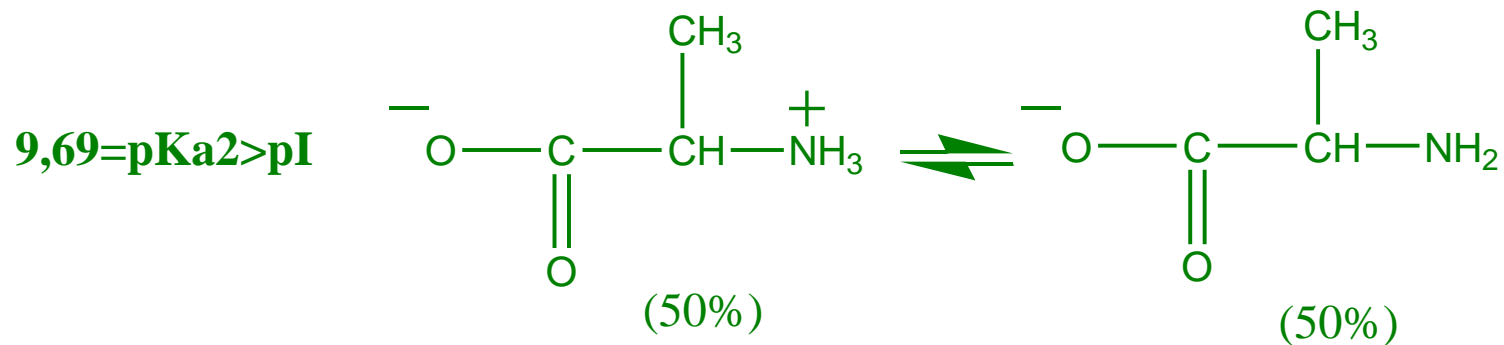
Σε $pH=2,34$ ($=pK_{a1}$), η καρβοξυλομάδα έχει αρχίσει να διίσταται και η αλανίνη είναι πλέον μίγμα δυο μορφών, της όξινης και της ισοηλεκτρικής (διπολικής) του μορφής.

Η τιμή $pH=6$ αντιστοιχεί με το ισοηλεκτρικό σημείο, οπότε το αμινοξύ υφίσταται ως η ισοηλεκτρική του μορφή (διπολικό ιόν, zwitterion).



Σε $\text{pH}=9,69$ ($=\text{pKa}_2$), η αμινομάδα έχει αρχίσει να μην έχει την όξινη μορφή της (δίνοντας το πρωτόνιο) και η αλανίνη είναι πλέον μίγμα της ισοηλεκτρικής και βασικής της μορφής.

Τέλος σε $\text{pH}=12$ επικρατεί μόνο η βασική μορφή.



Άσκηση 3-2

Ποιες είναι οι επικρατέστερες μορφές του ασπαραγικού οξέος σε διάλυμα με pH 1,0, 2,09, 3,0, 3,86, 7,0, 9,82 και 11,5 και ποιο το ισοηλεκτρικό σημείο του.

(Χρησιμοποιήστε τις τιμές pK_a του Πίνακα 3.1 του βιβλίου σας)

Απάντηση 3-2

Το ασπαραγινικό οξύ είναι όξινο (περιέχει δυο καρβοξυλομάδες), οπότε το ισοηλεκτρικό του σημείο θα ισούται με το ημιάθροισμα των τιμών pK_{a1} και pK_{a2} των καρβοξυλομάδων του:

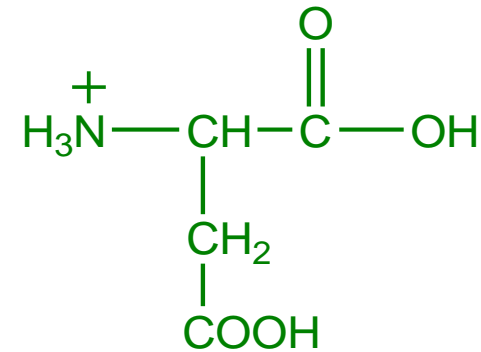
Συγκεκριμένα $pI = (2,09 + 3,86) / 2 = \underline{\underline{2,975}}$.

Οι μορφές του αμινοξέος εξαρτώνται από τη σχέση του pH του διαλύματος με το pI και τις τιμές pK_{a1} , pK_{a2} και pK_{a3} . Δίνονται δε παραστατικά στα παρακάτω σχήματα:

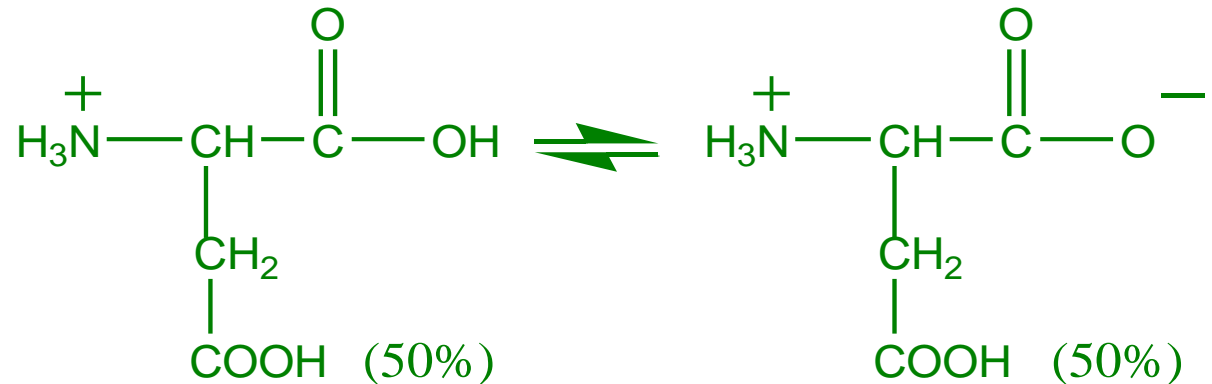
Συγκεκριμένα σε $\text{pH}=1$ ($< \text{pK}_a$ καρβοξυλίων), όλες οι λειτουργικές ομάδες υφίστανται με την όξινη μορφή τους.

Σε $\text{pH}=2,09$ ($= \text{pK}_a1$), η περισσότερο όξινη καρβοξυλομάδα έχει αρχίσει να διίσταται και το αμινοξύ είναι πλέον μίγμα δυο μορφών, της όξινης και της διπολικής (ισοηλεκτρικής) μορφής.

$1,0 < \text{pK}_a1$

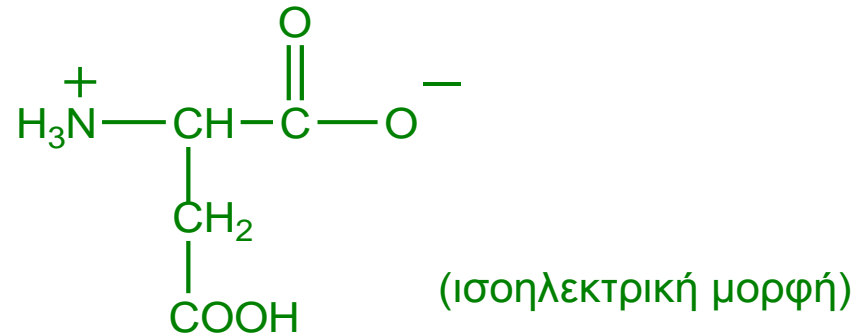


$2,09 = \text{pK}_a1 < \text{pI}$

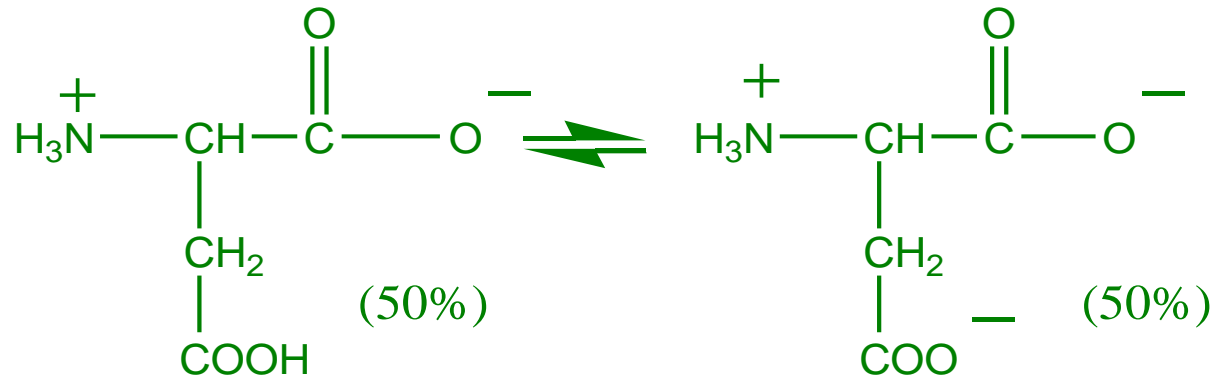


Η τιμή $pH=3$ αντιστοιχεί με το ισοηλεκτρικό σημείο, οπότε το αμινοξύ υφίσταται υπό την ισοηλεκτρική του μορφή (διπολικό ιόν, zwitterion). Σε $pH=3,86$ ($=pK_{a2}$) διίσταται και η δεύτερη καρβοξυλομάδα, με αποτέλεσμα το αμινοξύ να υφίσταται ως μίγμα της ισοηλεκτρικής και της πλήρως ιονισμένης του μορφής.

$3,0=pI$

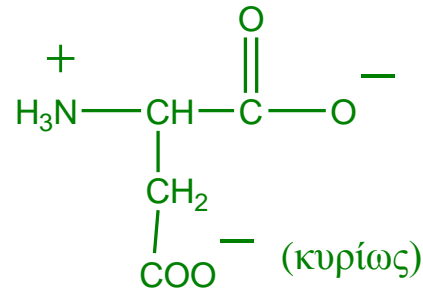


$3,86=pK_{a2}>pI$

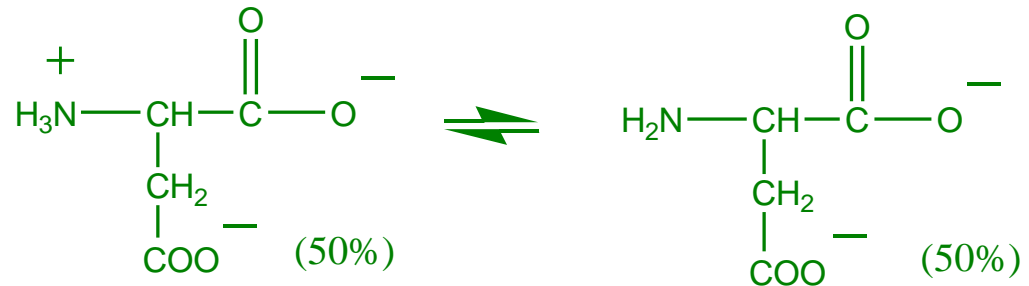


Σε $\text{pH}=7$, το αμινοξύ είναι πλέον με την πλήρως ιονισμένη μορφή του. Σε $\text{pH}=9,82$ ($=\text{pK}_a3$), η αμινομάδα έχει αρχίσει να μην έχει την όξινη μορφή της (δίνοντας το πρωτόνιο) και το αμινοξύ είναι πλέον μίγμα της ιονισμένης και βασικής του μορφής. Τέλος σε $\text{pH}=11,5$ επικρατεί μόνο η βασική μορφή.

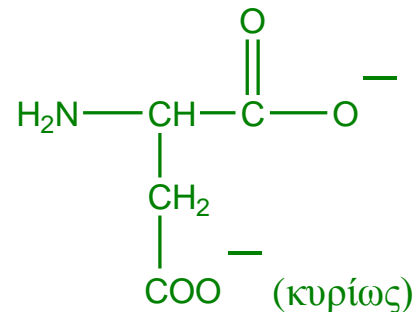
$7,0 > \text{pK}_a2 > \text{pI}$



$9,82 = \text{pK}_a3 > \text{pI}$



$11,5 > \text{pK}_a3 > \text{pI}$



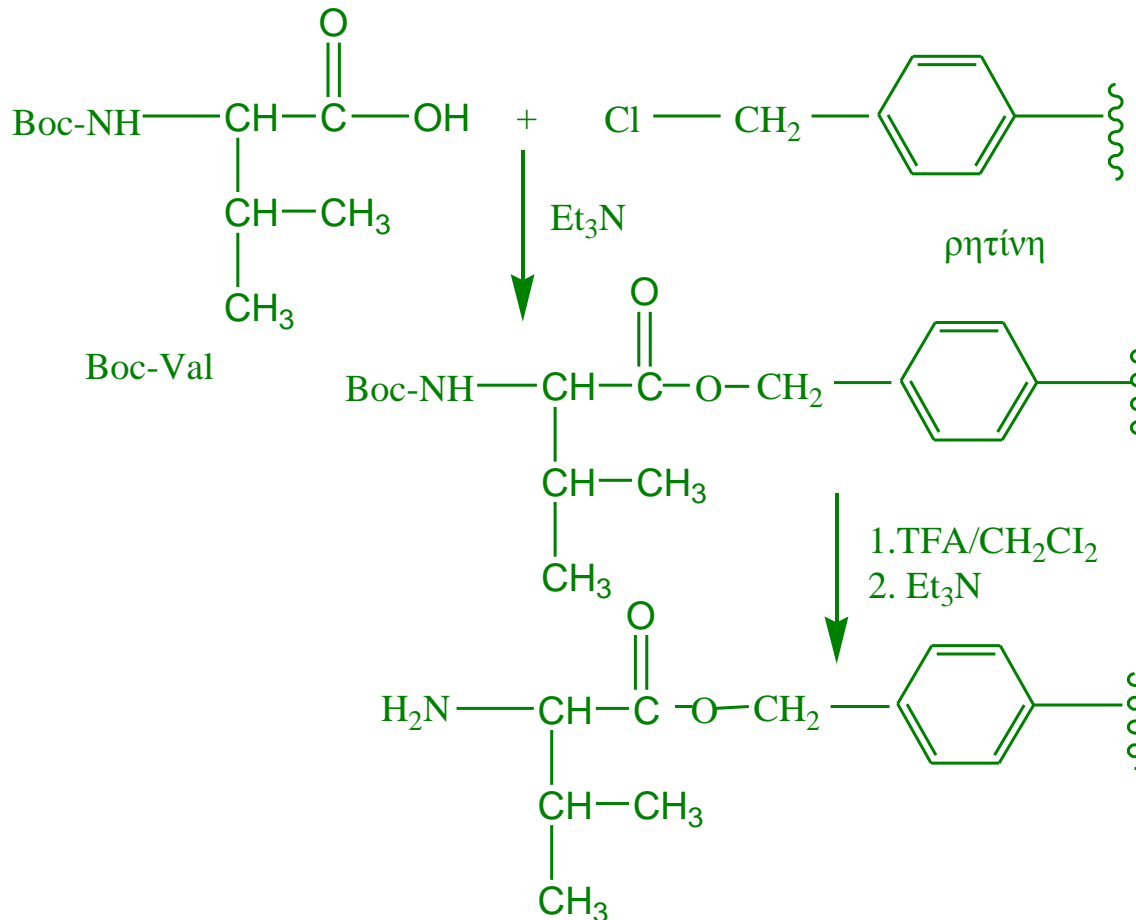
Άσκηση 4-3

-

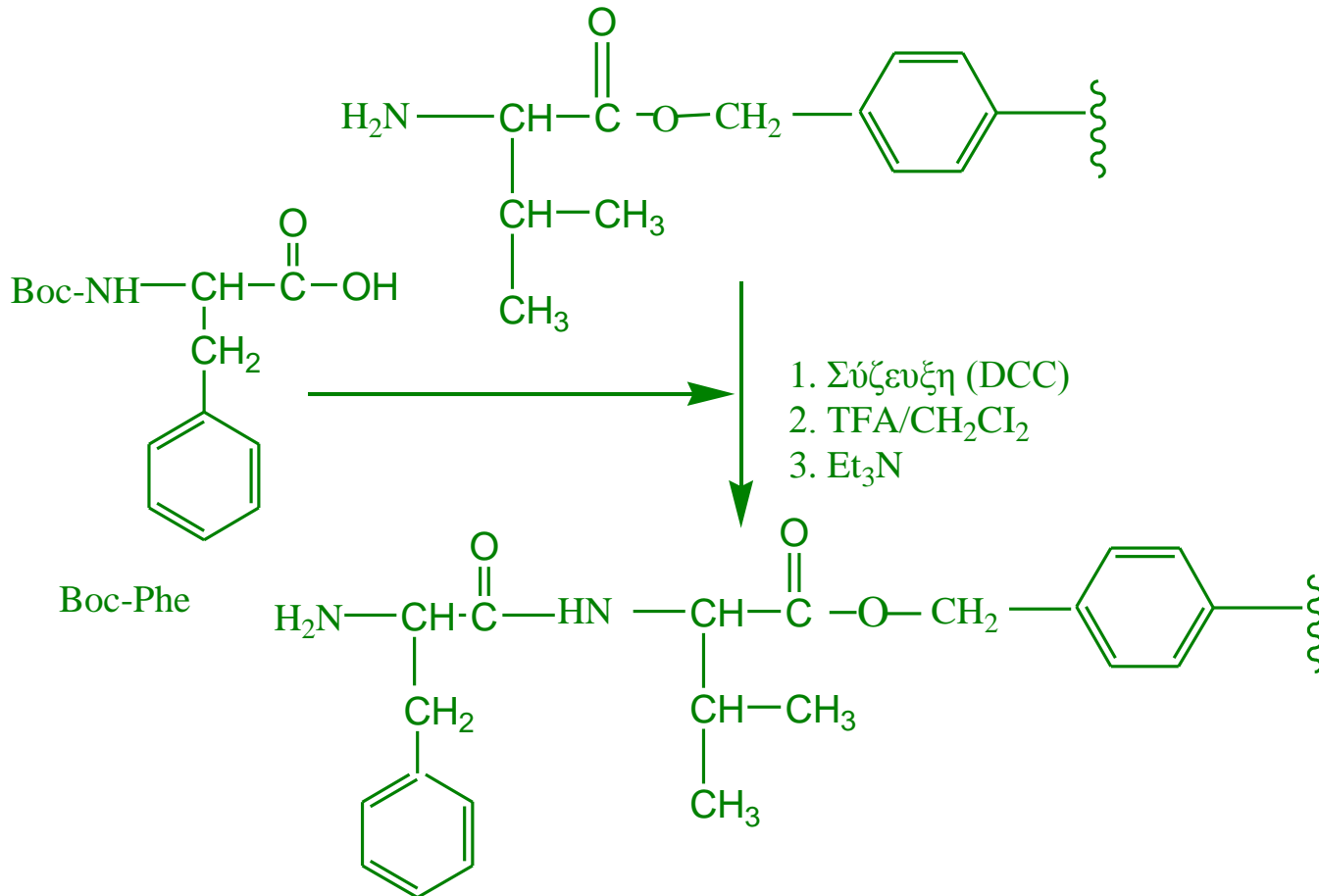
Με βάση τη μέθοδο σύνθεσης σε στερεή φάση να προτείνετε πορεία σύνθεσης του τριπεπτιδίου H-Gly-Phe-Val-OH.

Απάντηση 4-3

Το C-τελικό αμινοξύ είναι η Βαλίνη. Αρχικά λοιπόν θα πρέπει να προστατευθεί η αμινομάδα της Val με την Boc ομάδα. Στη συνέχεια θα προσδεθεί η καρβοξυλομάδα της Val με τη ρητίνη και θα αποπροστατευτεί το N-άκρο του για να είναι δυνατό να αντιδράσει με το επόμενο αμινοξύ (Phe).

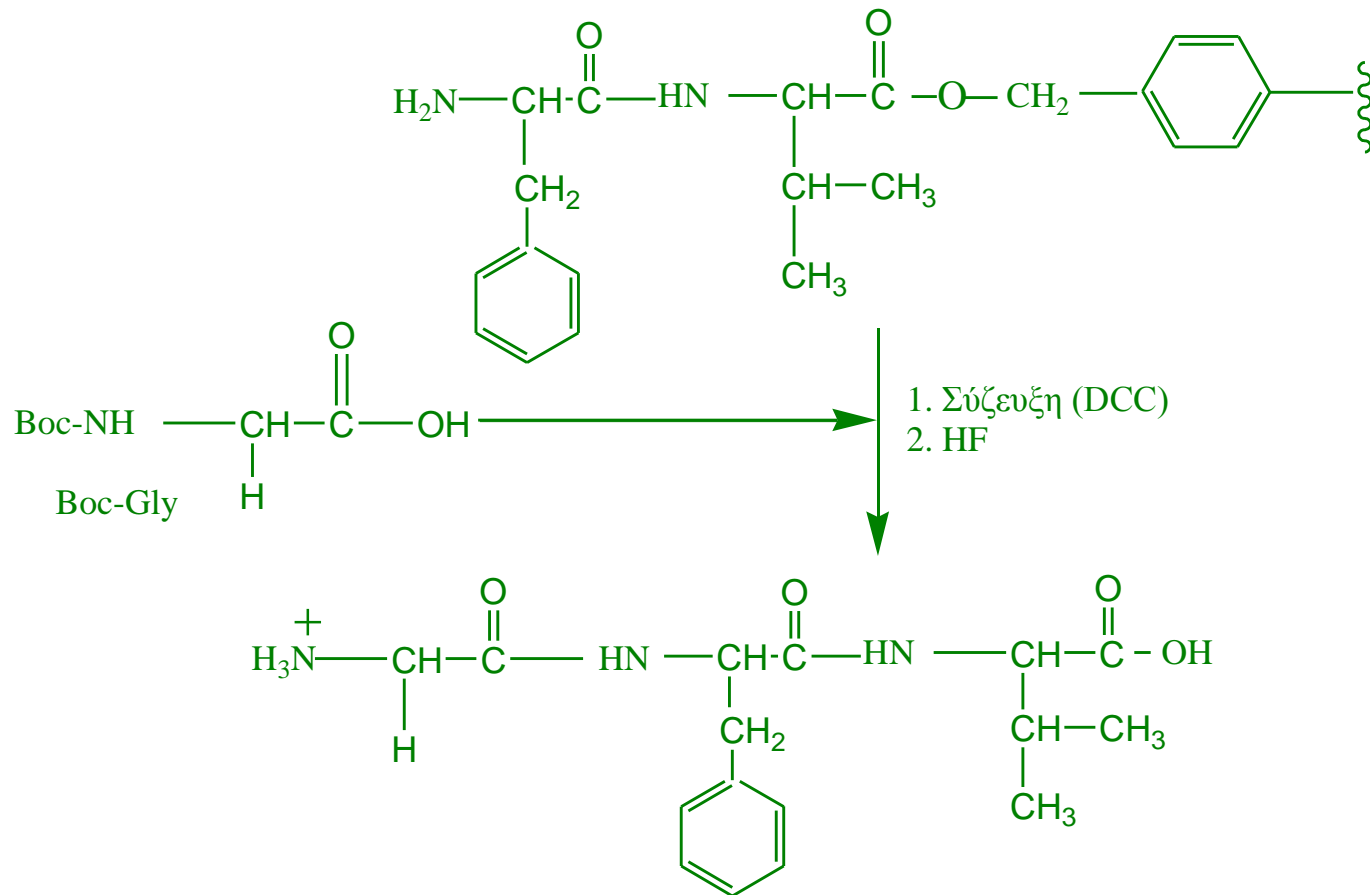


Το δεύτερο αμινοξύ (Phe) θα συζευχθεί με τη συνδεδεμένη στη ρητίνη Val (αφού βέβαια πρώτα προστατευτεί η αμινομάδα του). Στη συνέχεια, θα αποπροστατευτεί η αμινομάδα με τριφθοροξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο και εξουδετέρωση με Et_3N .



Η ίδια διαδικασία (προστασία αμινομάδας με Boc, σύζευξη, απομάκρυνση προστατευτικής ομάδας) ακολουθείται και για το τρίτο αμινοξύ (Gly).

Τέλος, το τριπεπτίδιο θα απομακρυνθεί από τη ρητίνη με κατεργασία με HF.

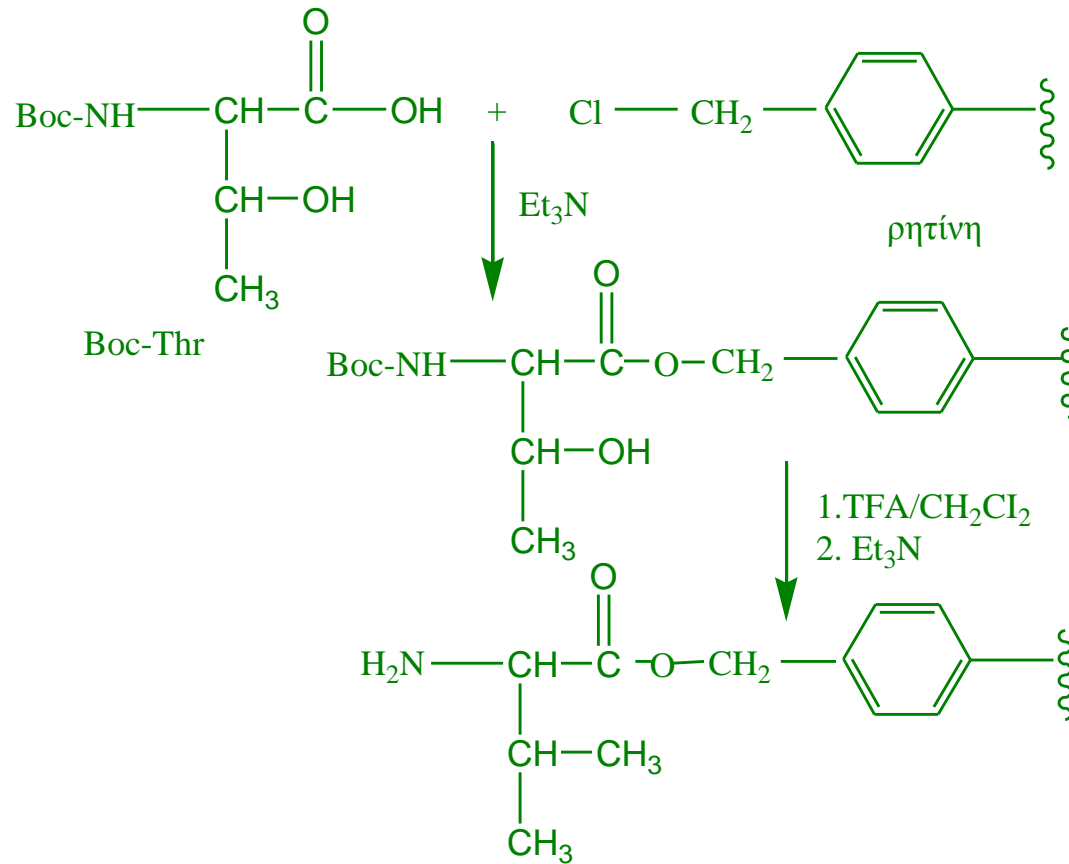


Άσκηση 4-4

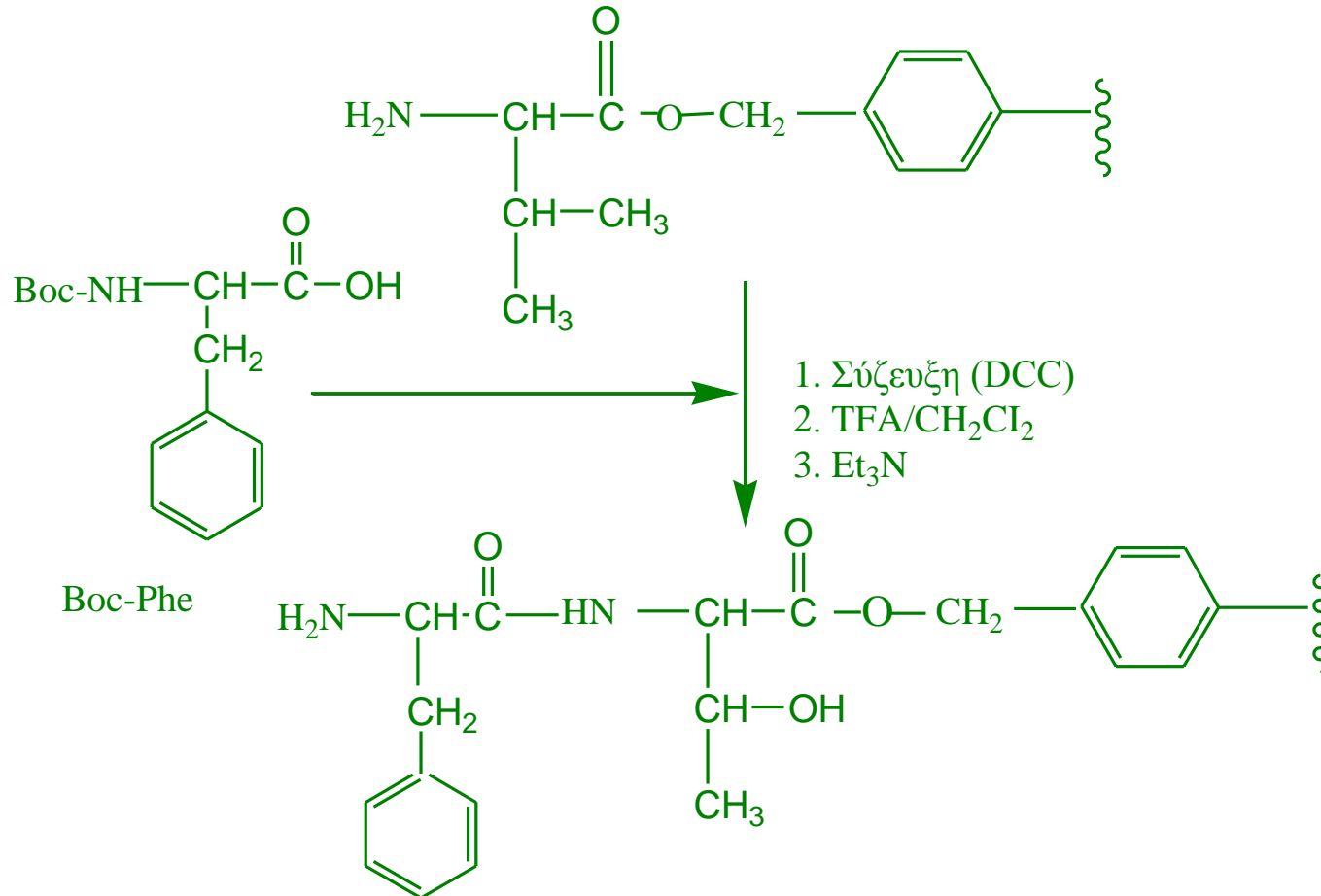
Με βάση τη μέθοδο σύνθεσης⁻ σε στερεή φάση να προτείνετε πορεία σύνθεσης του τριπεπτιδίου H-Ala-Phe-Thr-OH (Δεν χρειάζεται προστασία η πλευρική αλυσίδα της θρεονίνης).

Απάντηση 4-4

Το C-τελικό αμινοξύ είναι η Θρεονίνη. Αρχικά λοιπόν θα γίνει προστασία της αμινομάδας της α -Thr με την Boc ομάδα. Στη συνέχεια θα προσδεθεί η καρβοξυλομάδα της Thr με τη ρητίνη και θα αποπροστατευτεί το N-άκρο της για να είναι δυνατό να αντιδράσει με το επόμενο αμινοξύ (Phe).

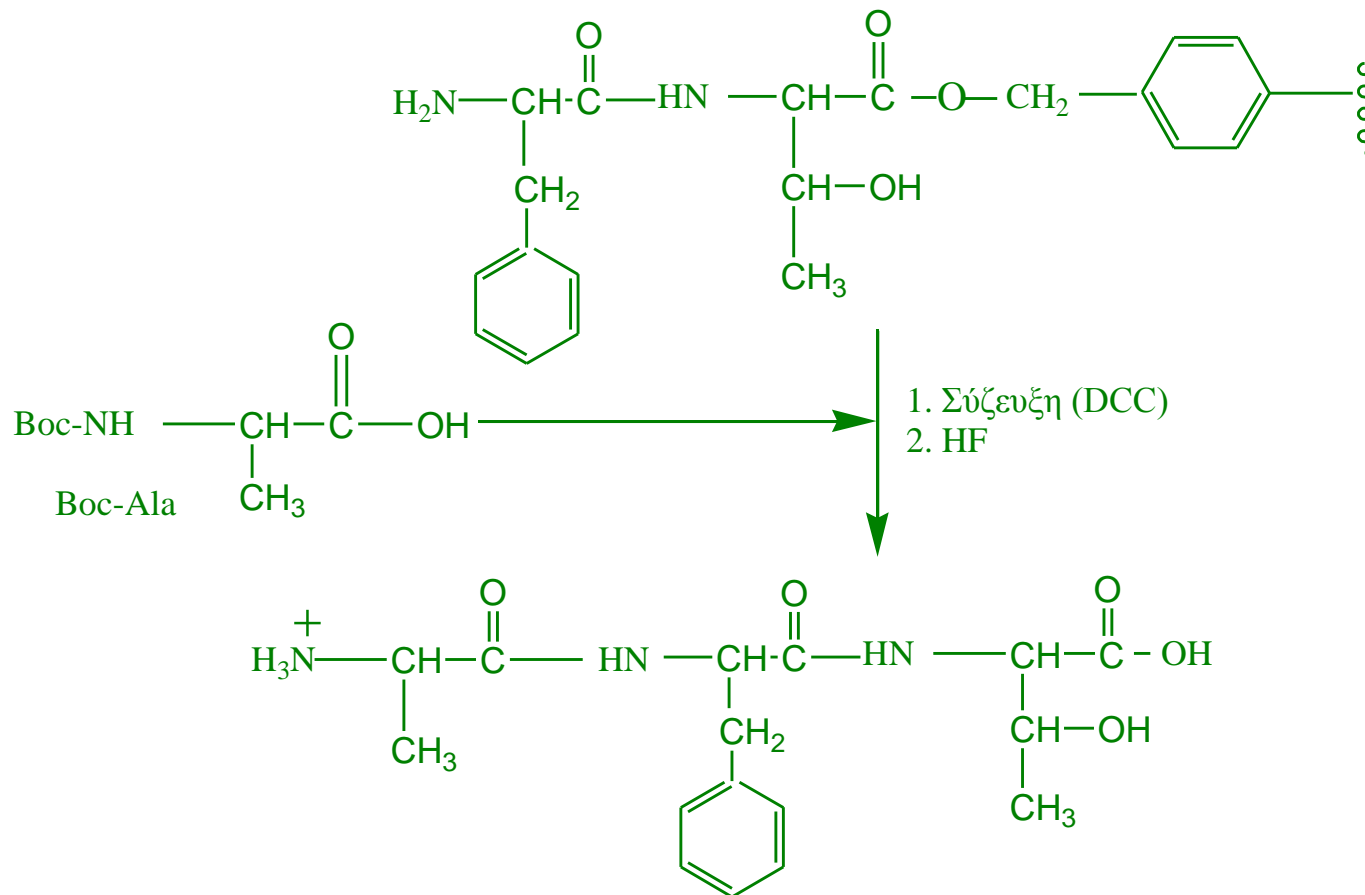


Το δεύτερο αμινοξύ (Phe) θα συζευχθεί με τη συνδεδεμένη στη ρητίνη Thr (αφού βέβαια πρώτα προστατευτεί η αμινομάδα του με αντιδραστήριο Boc). Στη συνέχεια, θα αποπροστατευτεί η αμινομάδα με τριφθοροοξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο και εξουδετέρωση με Et₃N.



Η ίδια διαδικασία (προστασία αμινομάδας με Boc, σύζευξη, απομάκρυνση προστατευτικής ομάδας) ακολουθείται και για το τρίτο αμινοξύ (Ala).

Τέλος, το τριπεπτίδιο θα απομακρυνθεί από τη ρητίνη με κατεργασία με HF.



Άσκηση 4-5

Υπολογίστε την πρωτοταγή δομή ενός οκταπεπτιδίου για το οποίο γνωρίζουμε ότι:

- α). Κατεργασία με το αντιδραστήριο Edman δίνει PTH-Leu
- β). Μετά από κατεργασία με καρβοξυπεπτιδάση A παράγεται Val, και
- γ). Μετά από μερική όξινη υδρόλυση διαχωρίζονται και ταυτοποιούνται τα παρακάτω επιμέρους πεπτίδια:

Met, Ala, Leu,
Ala, Gly
Gly, Glu
Leu, Met
Gly, Glu, Pro
Lys, Pro, Val

Απάντηση 4-5

-

Με βάση τα στοιχεία που μας δόθηκαν είναι δυνατόν να συμπεράνουμε ότι:

α. Επειδή η κατεργασία με το αντιδραστήριο Edman δίνει PTH-Leu, συνεπάγεται ότι το N-τελικό αμινοξύ του οκταπεπτιδίου είναι η Λευκίνη (Leu).

β. Αφού η κατεργασία του οκταπεπτιδίου με καρβοξυπεπτιδάση A παράγει Βαλίνη (Val), τότε αυτή είναι το C-τελικό αμινοξύ του.

γ. Η πρωτοταγής δομή του οκταπεπτιδίου είναι δυνατόν να υπολογιστεί εάν κατατάξουμε τα αμινοξέα των πεπτιδίων που παράγονται κατά την υδρόλυσή του.

Έτσι, ξεκινώντας από το N-τελικό αμινοξύ και χρησιμοποιώντας ως βάση τη σύσταση των επιμέρους πεπτιδίων και τη λογική σειρά που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα μπορούμε :

Leu							
Leu	Met						
Leu	Met	Ala					
		Ala	Gly				
			Gly	Glu			
			Gly	Glu	Pro		
					Pro	Lys	Val
							Val

να συνάγουμε ότι η πρωτοταγής δομή του πεπτιδίου είναι:

H-Leu-Met-Ala-Gly-Glu-Pro-Lys-Val-OH.

Άσκηση 4-6

Προτείνετε την πρωτοταγή δομή ενός οκταπεπτιδίου για το οποίο γνωρίζουμε τα εξής:

- α). Κατεργασία με το αντιδραστήριο Edman δίνει PTH-Ala
- β). Μετά από κατεργασία με καρβοξυπεπτιδάση A παράγεται Leu και
- γ). Μετά από μερική όξινη υδρόλυση διαχωρίζονται και ταυτοποιούνται τα παρακάτω επιμέρους πεπτίδια:

Ala, Met, Asp

Gly, Asp

Gly, Glu

Gly, Glu, Pro

Pro, Leu, Met

Απάντηση 4-6

-

Με βάση τα στοιχεία που μας δόθηκαν είναι δυνατόν να συμπεράνουμε ότι:

α. Επειδή η κατεργασία με το αντιδραστήριο Edman δίνει PTH-Ala, συνεπάγεται ότι το N-τελικό αμινοξύ του οκταπεπτιδίου είναι η Αλανίνη (Ala).

β. Αφού η κατεργασία του οκταπεπτιδίου με καρβοξυπεπτιδάση A παράγει Λευκίνη (Leu), τότε αυτή είναι το C-τελικό αμινοξύ του.

γ. Η πρωτοταγής δομή του οκταπεπτιδίου είναι δυνατόν να υπολογιστεί εάν κατατάξουμε τα αμινοξέα των πεπτιδίων που παράγονται κατά την υδρόλυσή του.

Έτσι, ξεκινώντας από το N-τελικό αμινοξύ και χρησιμοποιώντας ως βάση τη σύσταση των επιμέρους πεπτιδίων και τη λογική σειρά που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα μπορούμε :

Ala	Met	Asp					Leu
		Asp	Gly				
			Gly	Glu			
			Gly	Glu	Pro		
					Pro	Met	Leu

να συνάγουμε ότι η πρωτοταγής δομή του πεπτιδίου είναι:

H-Ala-Met-Asp-Gly-Glu-Pro-Met-Leu-OH.