

# Osnove kemije prirodnih organskih spojeva

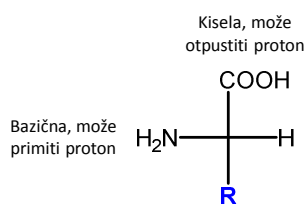
## 3. Aminokiseline i proteini

Kiselo-bazna svojstva i stereokemija aminokiselina. Reakcije aminokiselina *in vivo* i *in vitro*. Sinteze aminokiselina. Resolucija racemične smjese aminokiselina. Enantioselektivne sinteze aminokiseline. Peptidi i proteini. Sinteze peptida i proteina. N-zaštitne skupine. C-zaštitne skupine. Aktiviranje i spajanje-sinteza peptida na krutoj fazi. Neki specifični linearni i ciklički peptidi i proteini.

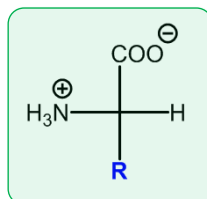
doc. dr. sc. Đani Škalamera

1

### Aminokiseline

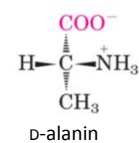
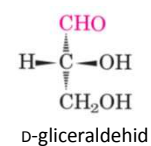
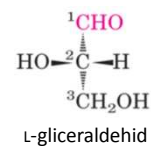


#### Fischerova projekcija



unutarnja sol,  
zwitterion

#### Prikaz klinastim formulama



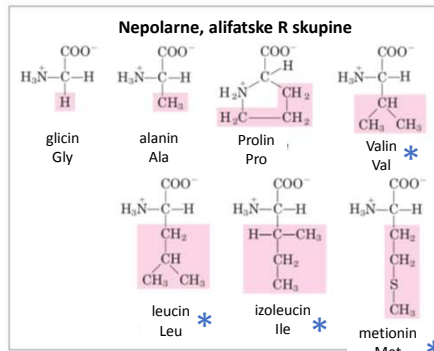
- L-aminokiseline su prirodne aminokiseline koje grade peptide i proteine
- D-aminokiseline nađene kod nekih bakterija
- aminokiseline razlikujemo po **R** skupinama koje imaju – za svaku aminokiselinu možemo reći je li:
  - polarna ili nepolarna
  - kisela, neutralna ili bazična
  - negativno, pozitivno nabijena ili neutralna
  - alifatska ili aromatska

L- = lijeve aminokiseline,  
relativna konfiguracija prema  
gliceraldehidu

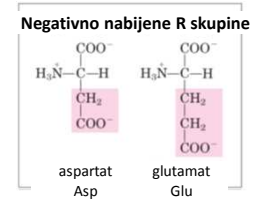
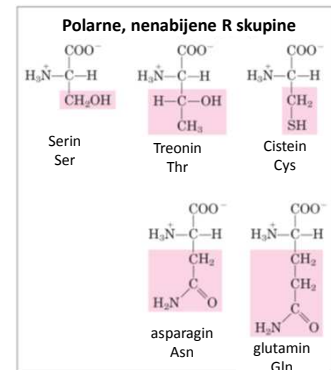
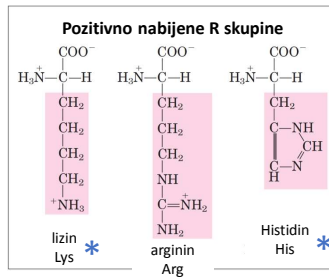
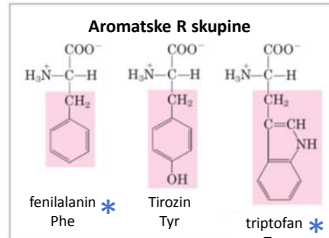
D,L- konfiguracije ne treba  
miješati s R,S-  
Nešto što je D, nije nužno R!  
→ CIP pravila

2

## Standardne aminokiseline i njihove troslovne kratice



\* = esencijalne aminokiseline



3

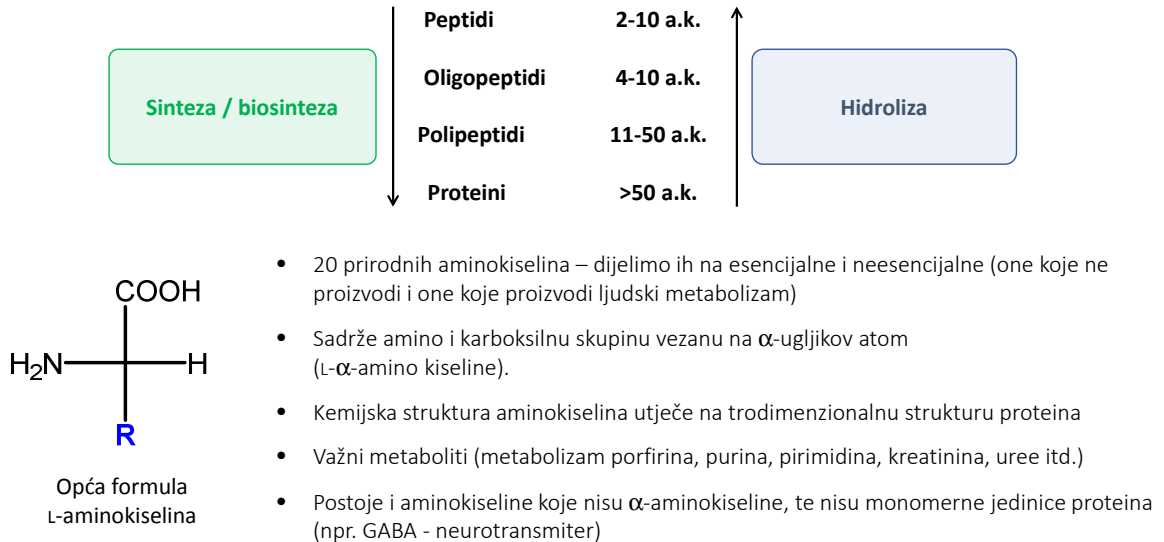
## ZADATAK

Fischerovom projekcijskom formulom nacrtajte aminokiseline:

L-fenilalanin, L-cistein, D-glutaminsku kiselinu

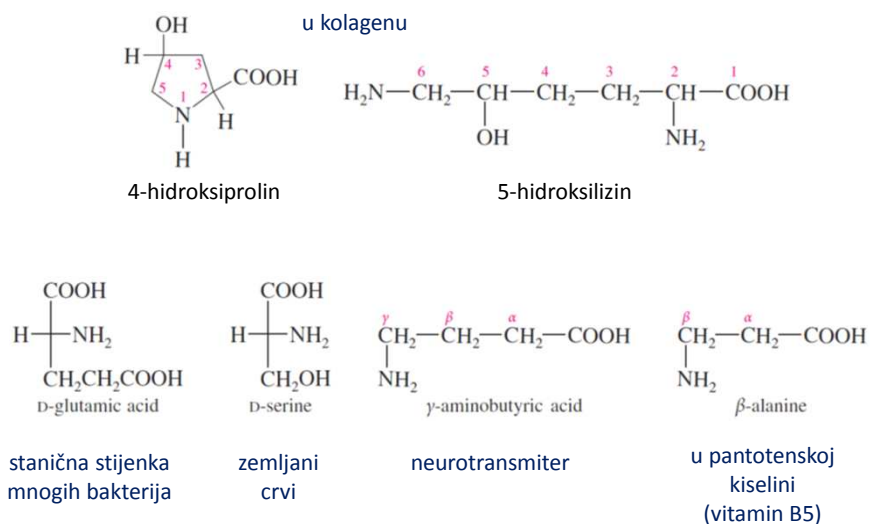
4

## Aminokiseline – gradivni blokovi peptida i proteina



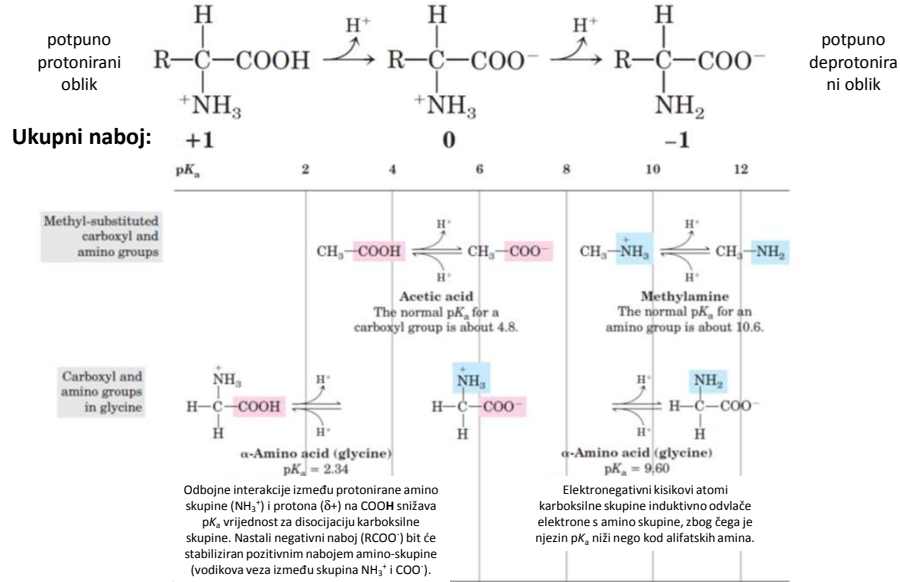
5

## Nestandardne aminokiseline



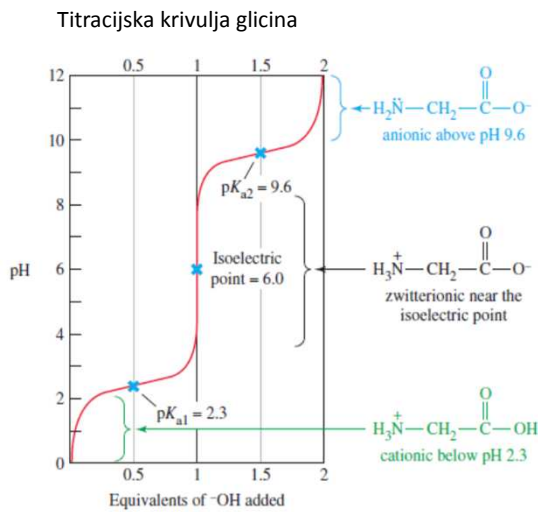
6

### Kiselo-bazna svojstva aminokiselina



7

### Kiselo-bazna svojstva aminokiselina



#### IZOELEKTRIČNA TOČKA

➤ pH pri kojem je ukupan naboj molekule jednak nuli, tj. u otopini je prisutna jednaka količina jednostruko pozitivno i jednostruko negativno nabijenog oblika. Prevladava zwitterionski oblik.

$$pI = \frac{1}{2} (pK_1 + pK_2)$$

8

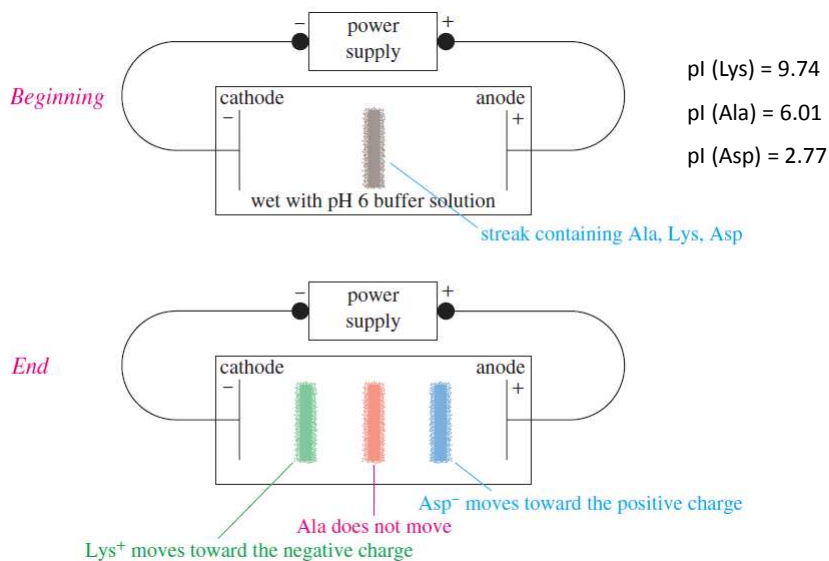
## Kiselo-bazna svojstva aminokiselina

Amino acid	Abbreviation/ symbol	$M_r$	$pK_a$ values			$pI$	Hydropathy index*	Occurrence in proteins (%) <sup>†</sup>
			$pK_1$ (-COOH)	$pK_2$ (-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	$pK_R$ (R group)			
<b>Nonpolar, aliphatic R groups</b>								
Glycine	Gly G	75	2.34	9.60		5.97	-0.4	7.2
Alanine	Ala A	89	2.34	9.69		6.01	1.8	7.8
Proline	Pro P	115	1.99	10.96		6.48	1.6	5.2
Valine	Val V	117	2.32	9.62		5.97	4.2	6.6
Leucine	Leu L	131	2.36	9.60		5.98	3.8	9.1
Isoleucine	Ile I	131	2.36	9.68		6.02	4.5	5.3
Methionine	Met M	149	2.28	9.21		5.74	1.9	2.3
<b>Aromatic R groups</b>								
Phenylalanine	Phe F	165	1.83	9.13		5.48	2.8	3.9
Tyrosine	Tyr Y	181	2.20	9.11	10.07	5.66	-1.3	3.2
Tryptophan	Trp W	204	2.38	9.39		5.89	-0.9	1.4
<b>Polar, uncharged R groups</b>								
Serine	Ser S	105	2.21	9.15		5.68	-0.8	6.8
Threonine	Thr T	119	2.11	9.62		5.87	-0.7	5.9
Cysteine	Cys C	121	1.96	10.28	8.18	5.07	2.5	1.9
Asparagine	Asn N	132	2.02	8.80		5.41	-3.5	4.3
Glutamine	Gln Q	146	2.17	9.13		5.65	-3.5	4.2
<b>Positively charged R groups</b>								
Lysine	Lys K	146	2.18	8.95	10.53	9.74	-3.9	5.9
Histidine	His H	155	1.82	9.17	6.00	7.59	-3.2	2.3
Arginine	Arg R	174	2.17	9.04	12.48	10.76	-4.5	5.1
<b>Negatively charged R groups</b>								
Aspartate	Asp D	133	1.88	9.60	3.65	2.77	-3.5	5.3
Glutamate	Glu E	147	2.19	9.67	4.25	3.22	-3.5	6.3

9

## Kiselo-bazna svojstva aminokiselina, izoelektrična točka

### Primjena u odvajanju aminokiselina, peptida i proteina - ELEKTROFOREZA



10

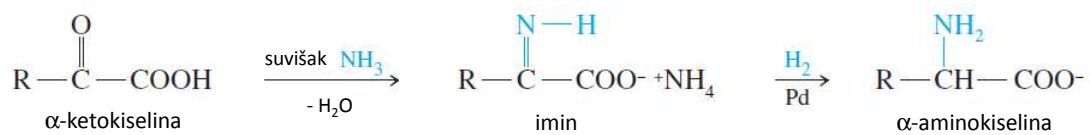
## Kiselo-bazna svojstva aminokiselina - ZADATAK

Napišite jednađbu postupne disocijacije glutaminske kiseline od potpuno protoniranog oblika do potpuno deprotoniranog oblika te izračunajte njezinu izoelektričnu točku. Skicirajte titracijsku krivulju i označite koje su vrste prisutne u kojem području.

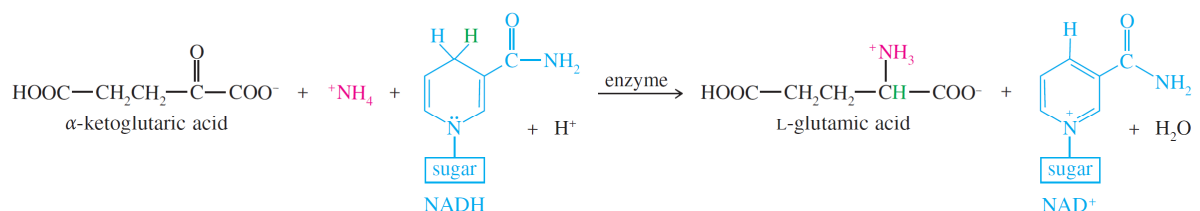
11

## Sinteza aminokiselina

### 1. Reduktivna aminacija



- reduktivna aminacija je **biomimetička** metoda, jako nalikuje biosintezi aminokiselina:

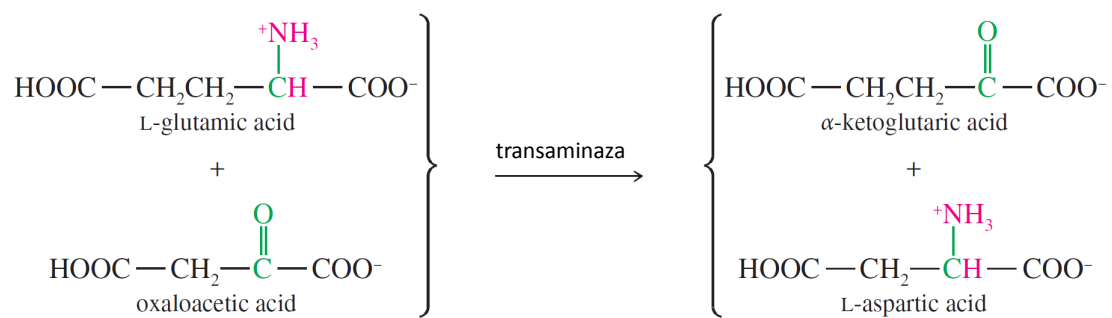


12

## Sinteza aminokiselina

### 1. Reduktivna aminacija *in vivo*

- biosinteza ostalih aminokiselina koristi L-glutaminsku kiselinu kao izvor amino skupine



13

## Sinteza aminokiselina

### 1. Reduktivna aminacija - ZADATAK

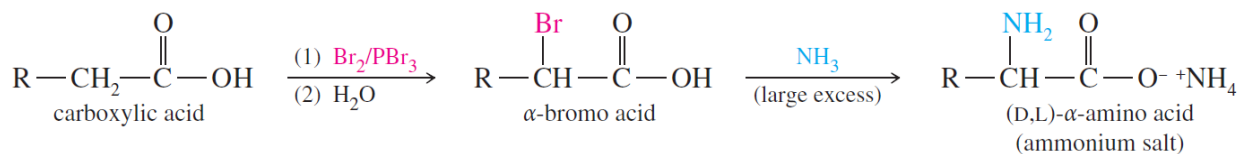
Napišite produkt(e) sljedeće reakcije:



14

## Sinteza aminokiselina

### 2. Aminacija $\alpha$ -halokiselina

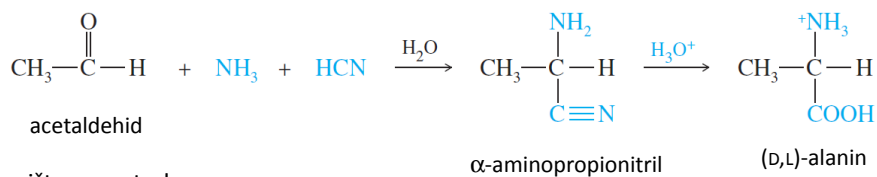


- iskorištenja su obično niska pa se vrlo rijetko primjenjuje

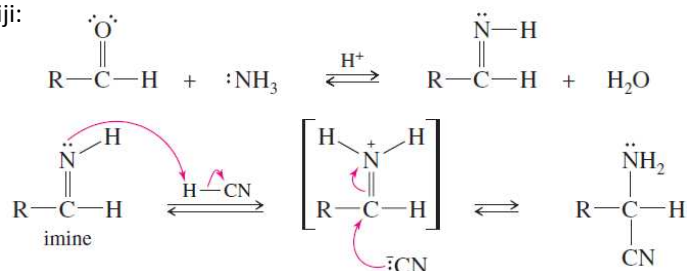
15

## Sinteza aminokiselina

### 3. Streckerova sinteza



- puno korištena metoda
- mehanizam reakcije uključuje nastanak imina (iz aldehida i amonijaka), koji podliježe cijanhidrinskoj reakciji:

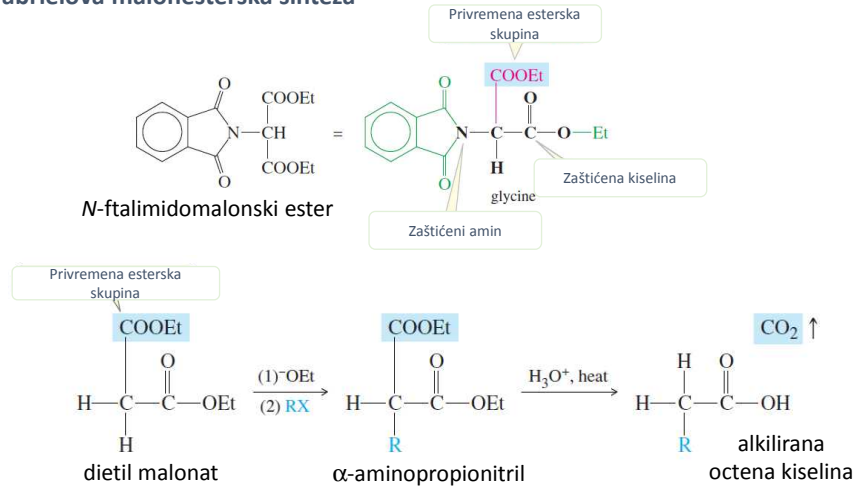


16



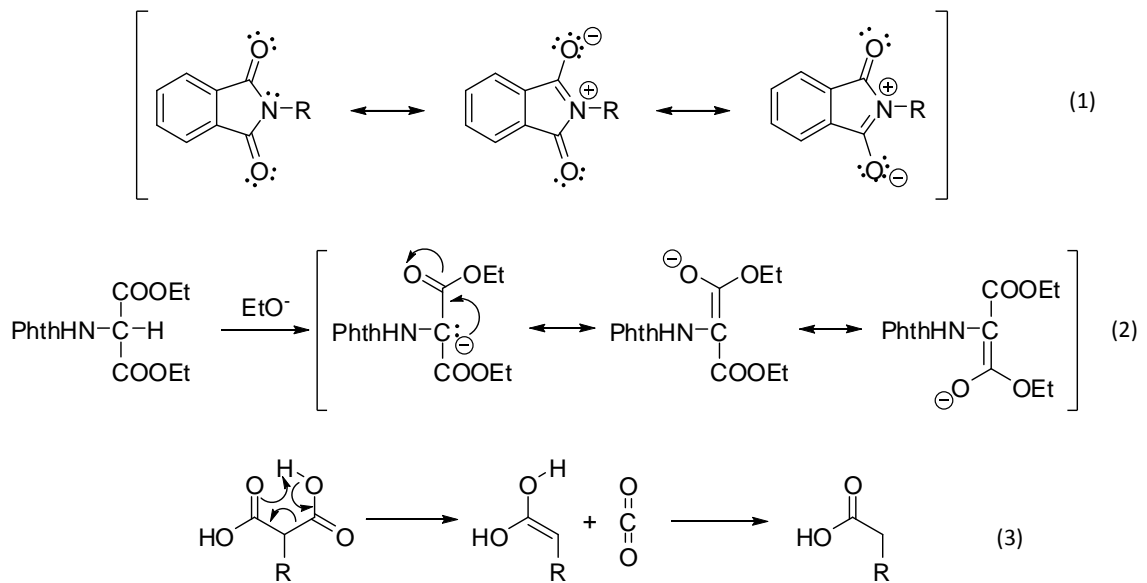
## Sinteza aminokiselina

### 4. Gabrielova malonesterska sinteza



- N-ftalimidomalonski ester – molekula glicina s amino-skupinom zaštićenom u obliku imida, kako bi se spriječilo da bude nukleofil

17

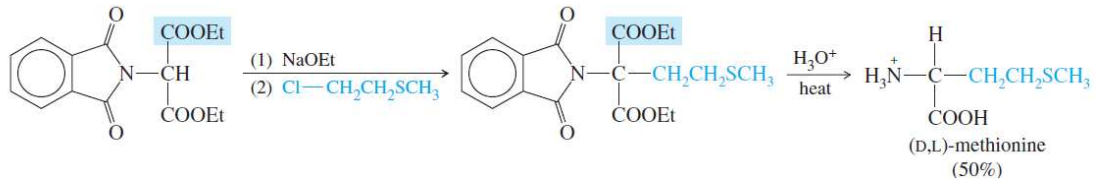


Phth = ftalimid

18

## Sinteza aminokiselina

### 4. Gabrielova malonesterska sinteza



➤ Sve prikazane kemijske sinteze aminokiselina daju **racemične produkte**. U većini slučajeva, samo su L-aminokiseline biološki aktivne, dok D-aminokiseline mogu čak biti i toksične. Postoje metode kojima možemo odijeliti racemičnu smjesu aminokiselina na enantiomere.

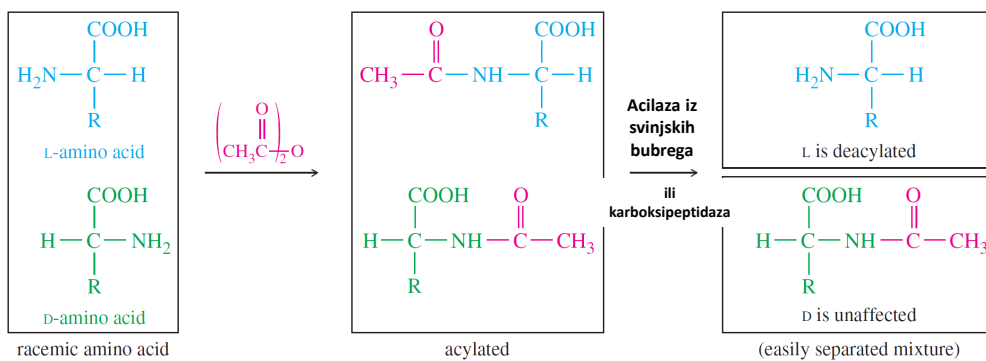
➤ **Kemijske metode** odvajanja enantiomera – npr. tvorbom soli s kiralnim kiselinama (vinska kiselina) ili aminima (strijhinin, brucin) → odvajanje kristalizacijom ili kromatografskim metodama.

➤ **Enzimska rezolucija**

19

## Rezolucija racemične smjese aminokiselina

### Enzimska rezolucija

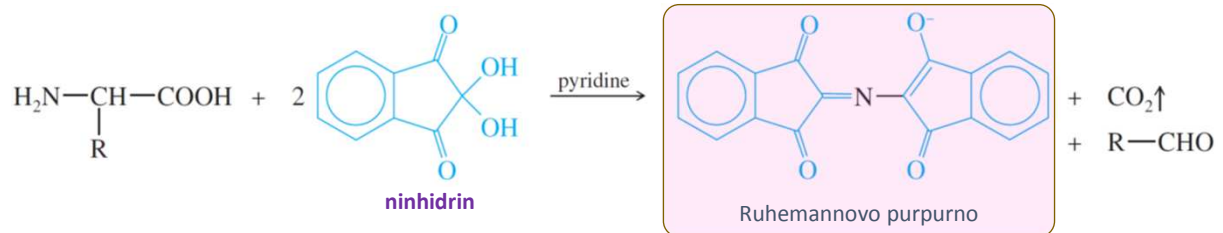


- enzim prepoznaje samo ester aminokiseline L-konfiguracije (dobro sjeda u njegovo aktivno mjesto) pa ga hidrolizira
- ester aminokiseline D-konfiguracije hidrolizira puno sporije ili ne hidrolizira jer loše sjeda u aktivno mjesto enzima

20

## Reakcija aminokiselina s ninhidrinom

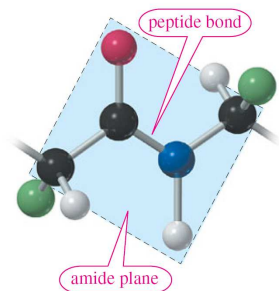
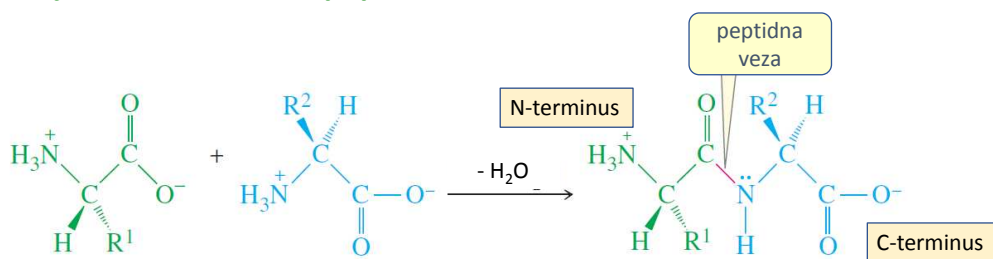
- ninhidrin je reagens koji nam služi za vizualizaciju mrlja ili vrpca aminokiselina odvojenih kromatografijom ili elektroforezom



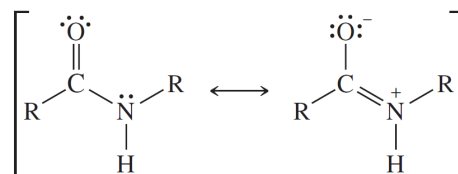
Sve aminokiseline daju ovaj produkt, bez obzira na to kakav im je bočni lanac.

21

## Povezivanje aminokiselina – peptidi



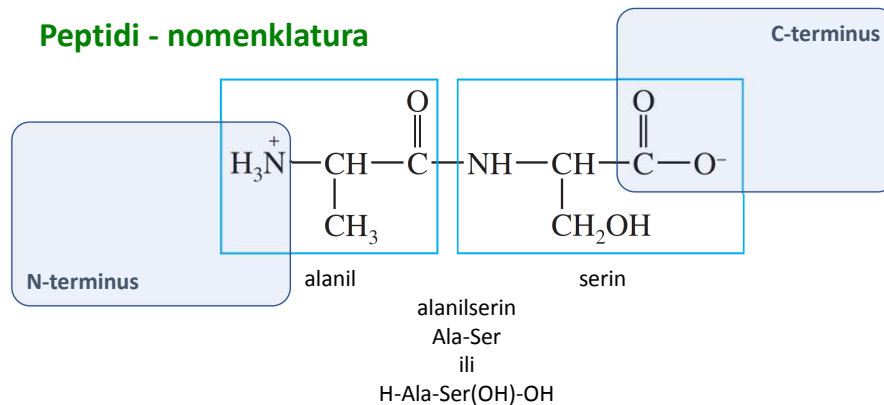
### DIPEPTID



- parcijalni karakter dvostruke veze između C i N → otežana rotacija

22

## Peptidi - nomenklatura



**Bradikinin:** arginilprolilproiliglicilfenilalanilserilprolilfenilalanilarginin

→ vrlo nezgrapno

Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

troslovne  
kratice

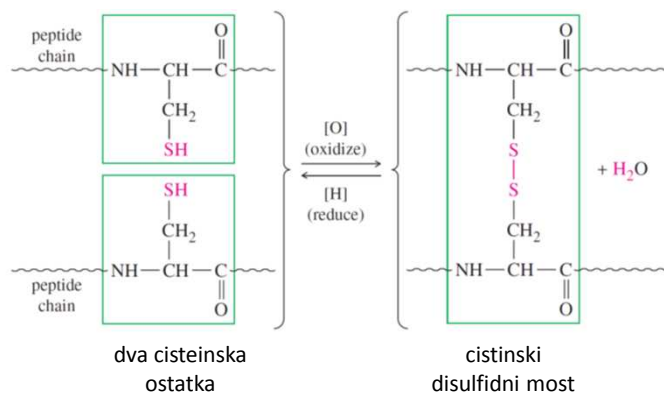
RPPGFSPFR

jednooslovne  
kratice

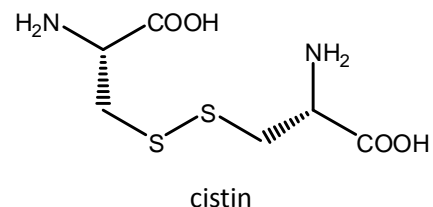
23

## Peptidi - povezivanje

- osim peptidnom vezom, aminokiseline se u peptidnom lancu mogu povezivati i disulfidnim vezama (iako peptidnom vezom u pravom smislu te riječi nazivamo samo amidnu vezu između dvije aminokiseline)



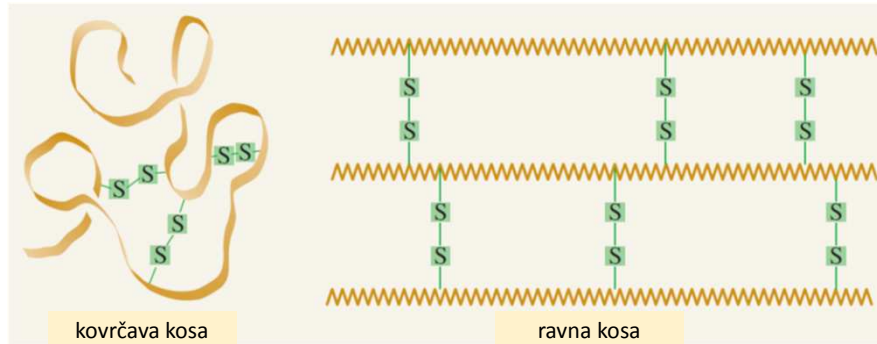
Najjednostavniji peptid s disulfidnom vezom – dimer aminokiseline cisteina



- Kosa i nokti sadrže 10-15% cistina
- može se naći i u rogovima i kopitima životinja
- može biti sastojak bubrežnih kamenaca

24

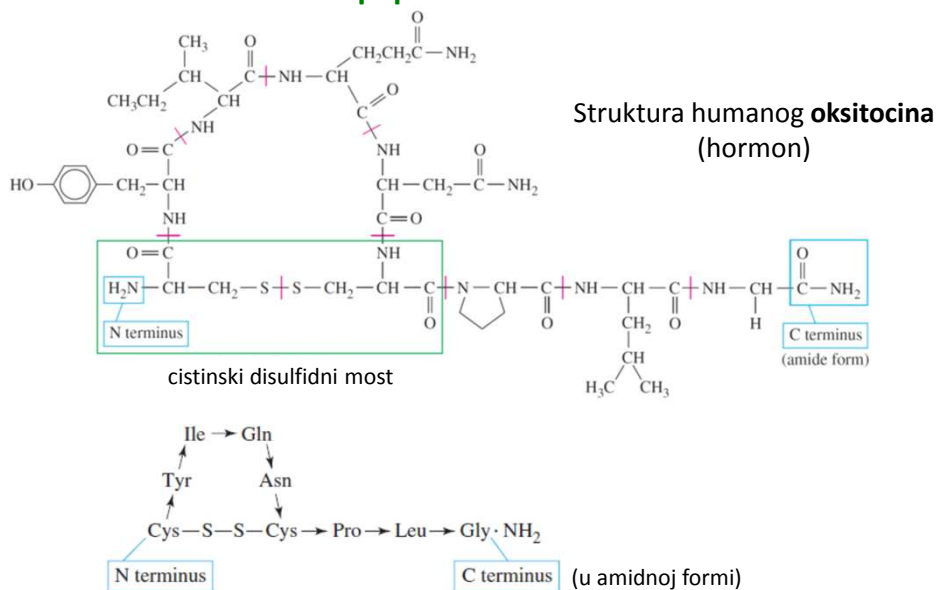
## Povezivanje - umreženje peptidnih lanaca disulfidnim mostovima



- disulfidni mostovi prežive istežanje ostatka proteina i nakon toga ga vraćaju u prvotni oblik → elastičnost i čvrstoća kose
- stupanj umreženja (broj disulfidnih veza) je puno veći u proteinima koji tvore nokte, pandže, kopita i papke pa su oni čvršće strukture od kose

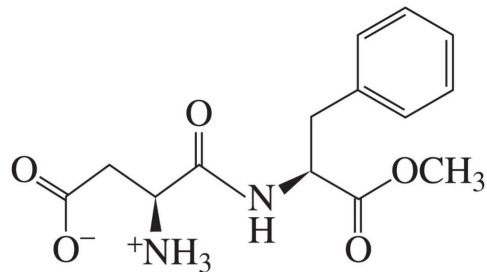
25

## Neki specifični linearni i ciklički peptidi



26

### Neki specifični linearni i ciklički peptidi

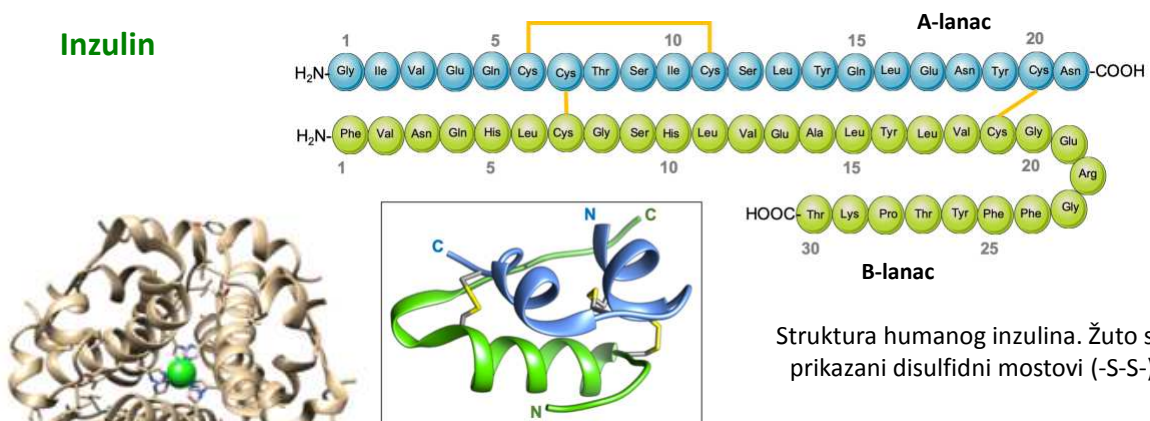


aspartam



27

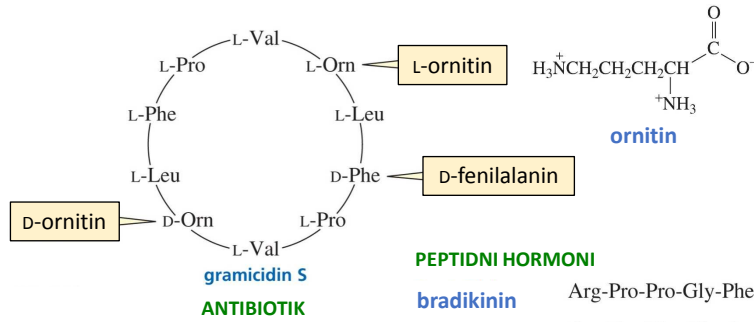
### Inzulin



Monomeri se pomoću međumolekulskih interakcija udružuju u heksamer. U sredini je ion cinka (Zn<sup>2+</sup>).

28

### Neki specifični linearni i ciklički peptidi i proteini



**PEPTIDI KOJE TIJELO SINTETIZIRA ZA KONTROLU BOLI**

Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu  
leucinski enkefalin

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met  
metioninski enkefalin

**PEPTIDNI HORMONI**

**bradikinin** Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

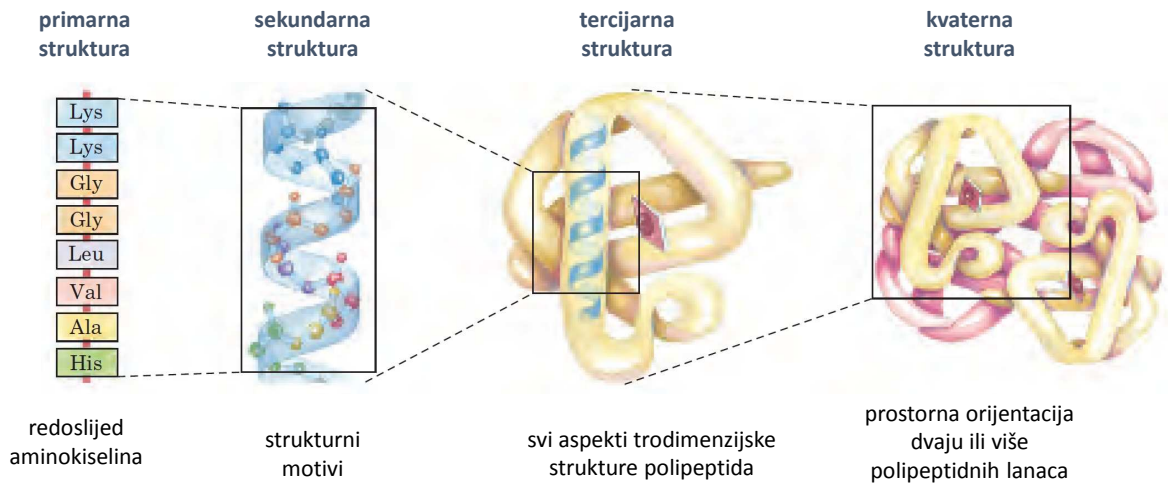
**vazopresin** Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>  
S ————— S

**okситocin** Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>  
S ————— S

- **bradikinin** – inhibira upalu tkiva
- **vazopresin** – regulira zadržavanje vode u organizmu; otpušta se pri stresu
- **okситocin** – inducira trudove i stimulira laktaciju

29

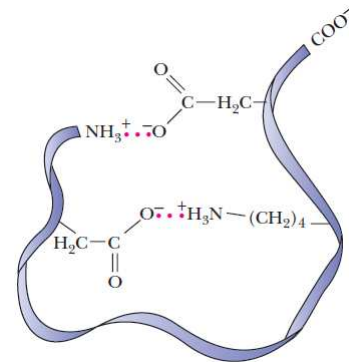
### Razine strukture u peptidima i proteinima



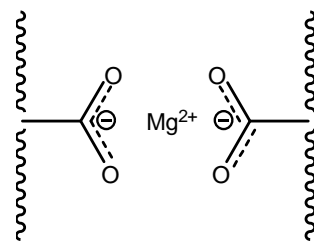
30

## Proteini

- Struktura peptida i proteina određena je kemijskom strukturom i kemijskim (kovaletnim) vezama, ali veliki utjecaj na strukturu imaju i međumolekulske interakcije, u prvom redu **vodikove veze**
- **solni mostovi** – interakcije između nabijenih udaljenih dijelova peptidnog lanca



Vodikove veze između slobodnih karboksilatnih i amino skupina

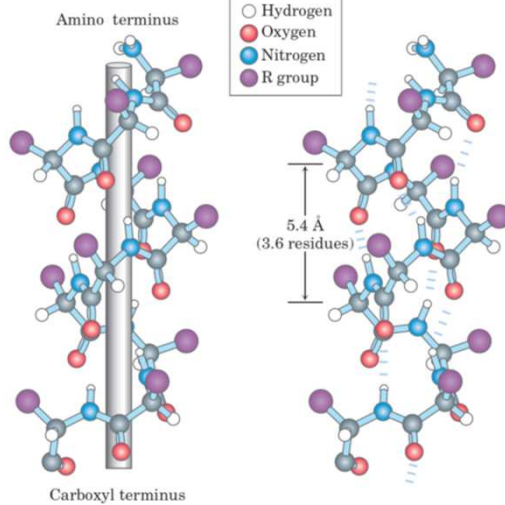


Dva aspartatna ili glutamatna ostatka u interakciji preko magnezijevog kationa

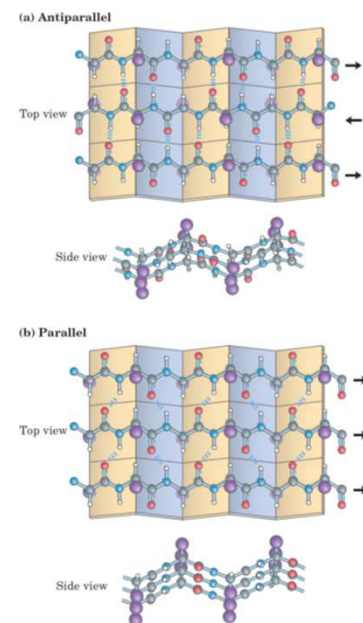
31

## Strukturni motivi u peptidima i proteinima (sekundarna struktura)

### $\alpha$ -zavojnica



### $\beta$ -nabrana ploča

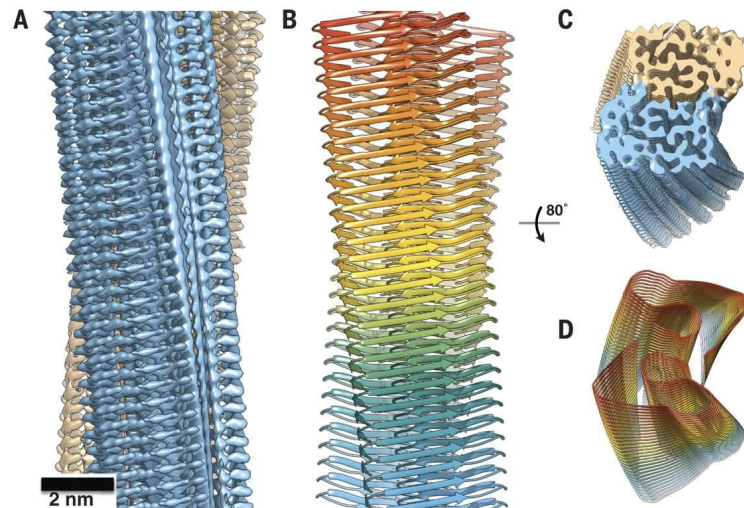


32



## $\beta$ -nabrane ploče – amiloidni plakovi

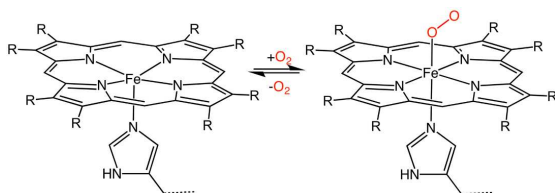
Vlaknasta struktura amiloida- $\beta$ (1–42), ključnog patološkog čimbenika Alzheimerove bolesti.



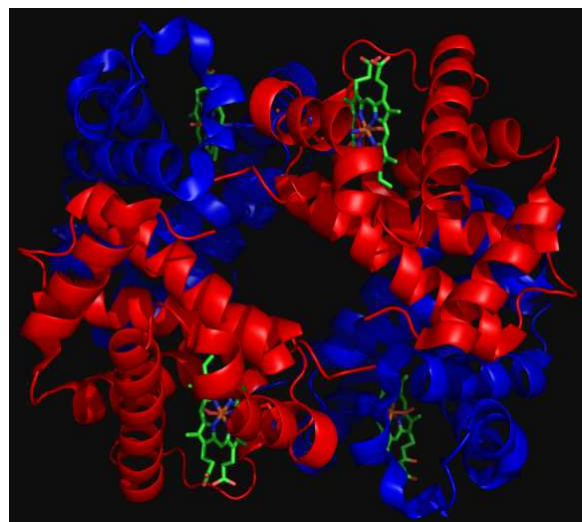
33

## Proteini

- >50 aminokiselina
- 1 ili više peptidnih lanaca
- nekad sadrže i neproteinske skupine, npr. hem u hemoglobinu. Takve skupine se nazivaju **prostetičke skupine**
- **hemoglobin** sadrži po dvije  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinice (ukupno 4 polipeptidna lanca) i 4 hem skupine



Struktura hema i vezanje kisika



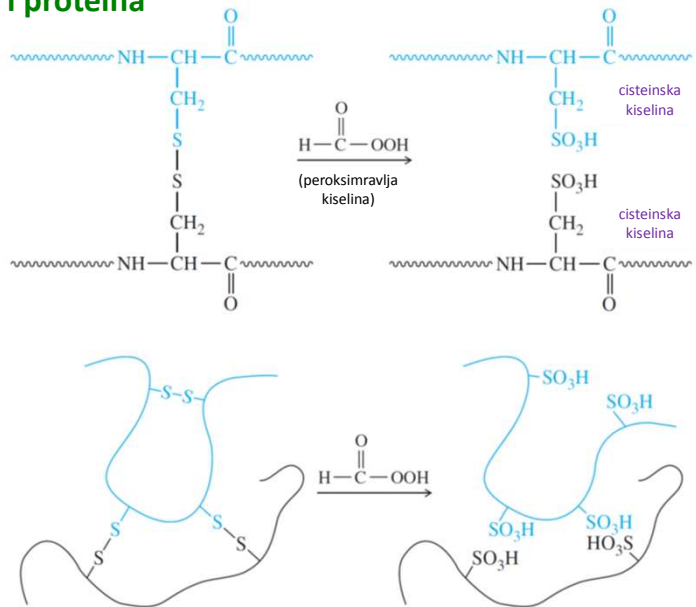
Struktura hemoglobina (PDB: 1GZX)

34

## Određivanje strukture peptida i proteina



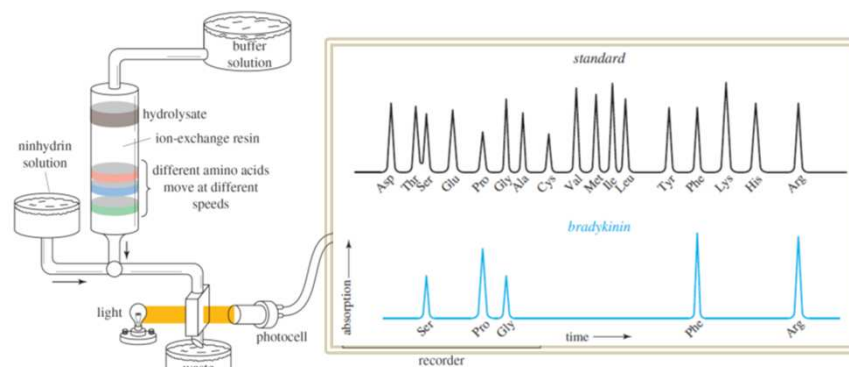
- prvi korak u određivanju strukture proteina je najčešće cijepanje svih disulfidnih veza. Npr. kod inzulina se tako dobivaju dva individualna peptidna lanca koja se mogu odijeliti i dalje svaki zasebno analizirati.



35

## Određivanje strukture peptida i proteina

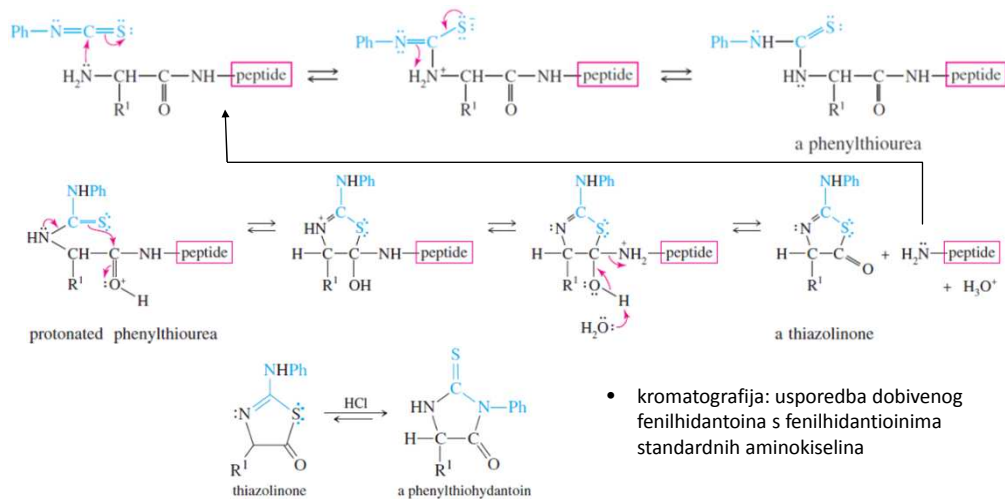
- peptidne veze u proteinu mogu se potpuno razoriti kuhanjem 24h u 6M HCl
- rezultat je smjesa aminokiselina, koja se može analizirati → nema informacije o redoslijedu njihovog povezivanja, već samo o sastavu proteina
- ako nas zanima redoslijed kojim su povezane aminokiseline u peptidnom lancu, koristimo **metode postupne odgradnje** gdje se lanac skraćuje za jednu po jednu aminokiselinu (sekvenciranje; Edmanova ili Sangerova metoda)



36

## Određivanje strukture proteina - sekvenciranje

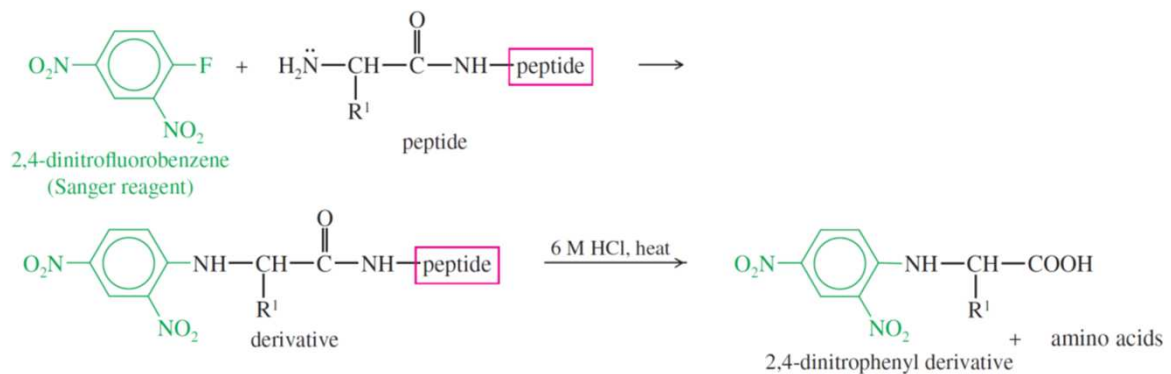
- najčešće korištena metoda je **Edmanova odgradnja**
- odgradnja od N-kraja prema C-kraju, jedna po jedna aminokiselina



37

## Određivanje strukture proteina - sekvenciranje

- rjeđe korištena metoda je **Sangerova metoda**
- može se odrediti koja je aminokiselina na N kraju peptida/proteina

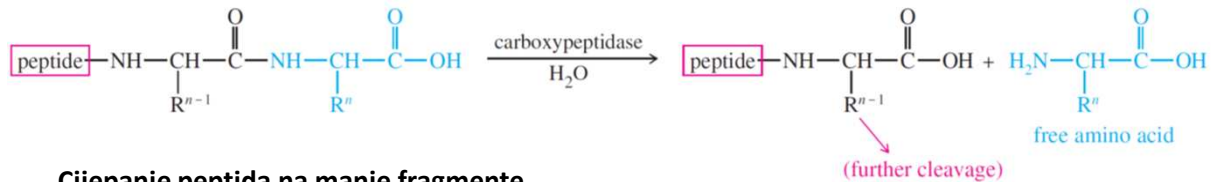


38

## Određivanje strukture proteina - sekvenciranje

### Analiza C-terminusa

- Enzimatsko cijepanje pomoću enzima karboksipeptidaze



### Cijepanje peptida na manje fragmente

- enzimatski pomoću enzima: tripsin, kimotripsin

Cijepanje na  
fragmente:

Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly · NH<sub>2</sub>

Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn

Ile-Gln-Asn-Cys

Gln-Asn-Cys-Pro

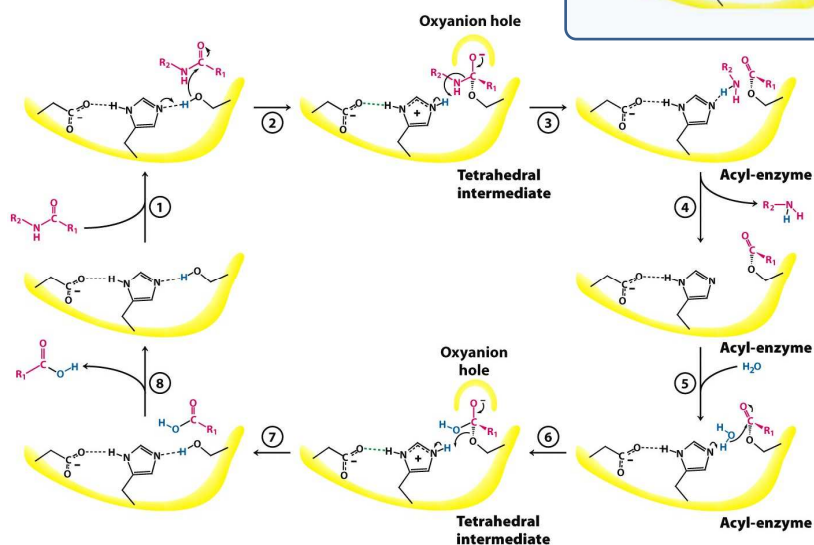
Cys-Pro-Leu-Gly

Pro-Leu-Gly · NH<sub>2</sub>

39

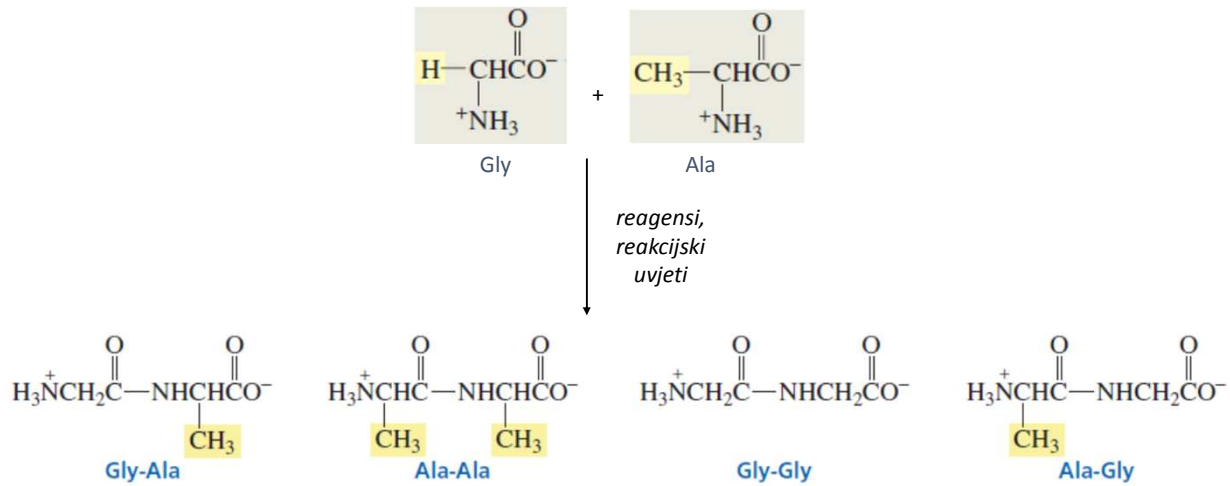
## Katalitička trijada

- npr. kod enzima kimotripsina



40

### Kemijske sinteze peptida

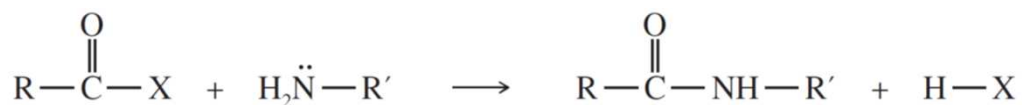


➤ Rezultat je smjesa 4 različita dipeptida

41

### Kemijske sinteze peptida

- za reakciju nastanka amidne veze, karboksilna skupina koja reagira treba biti aktivirana, a aminoskupina koja reagira slobodna



- amino-skupina i karboksilna skupina koje ne trebaju stupiti u reakciju moraju biti zaštićene → **zaštitne skupine**
- skupine iz bočnog lanca mogu također stupati u reakciju → i njih treba zaštititi

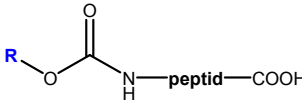

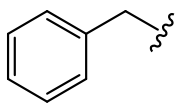
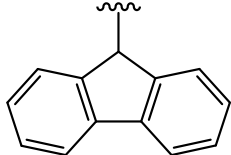
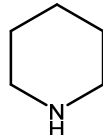
**Zaštitna skupina** – skupina kojom se derivatizira neka funkcionalna skupina, kako bi se onemogućila njezina kemijska transformacija u uvjetima reakcije koju treba provesti. Nakon što je reakcija provedena, zaštitna skupina se uklanja.

Na ovaj način smanjuje se broj nastalih nusprodukata, a time povećava iskorištenje i smanjuje potreba za pročišćavanjem.

42

## Kemijske sinteze peptida

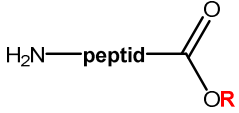
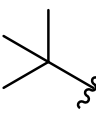
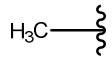
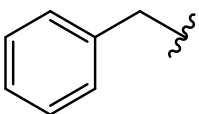
Zaštitne skupine za **amino skupinu** – karbamati

	R =			Stabilnost pri uvjetima		Uvjeti za uklanjanje
				kiselo	bazno	
			<b>Boc</b>	-	+	CF <sub>3</sub> COOH
			<b>Cbz, Z</b>	+	+	H <sub>2</sub> / Pd-C
			<b>Fmoc</b>	+	-	

43

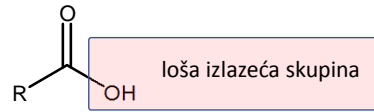
## Kemijske sinteze peptida

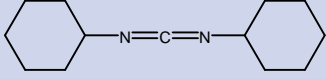
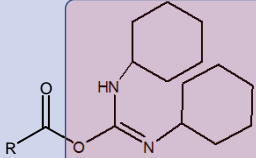
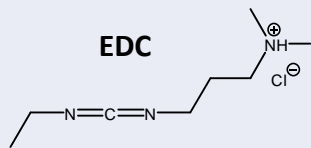
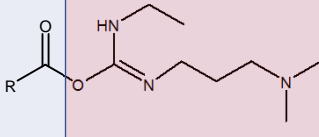
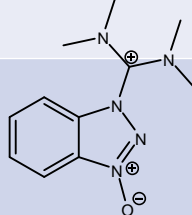
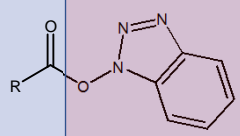
Zaštitne skupine za **karboksilnu skupinu** – esteri

	R =			Stabilnost pri uvjetima		Uvjeti za uklanjanje
				kiselo	bazno	
			<b>tBu</b>	-	+	CF <sub>3</sub> COOH
			<b>Me</b>	+	-	OH <sup>-</sup> / H <sub>2</sub> O
			<b>Bn</b>	+	+	H <sub>2</sub> / Pd-C

44

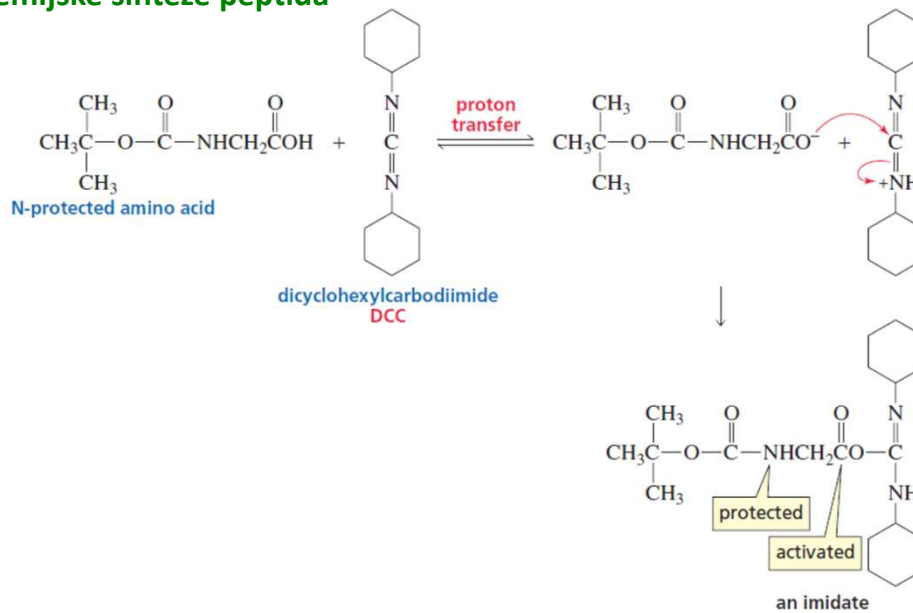
## Kemijske sinteze peptida



Reagensi za tvorbu aktiviranog estera	Aktivirani ester
 <p><b>DCC</b></p>	
 <p><b>EDC</b></p>	
 <p><b>HBTU</b></p>	 <p>dobra izlazeća skupina</p>

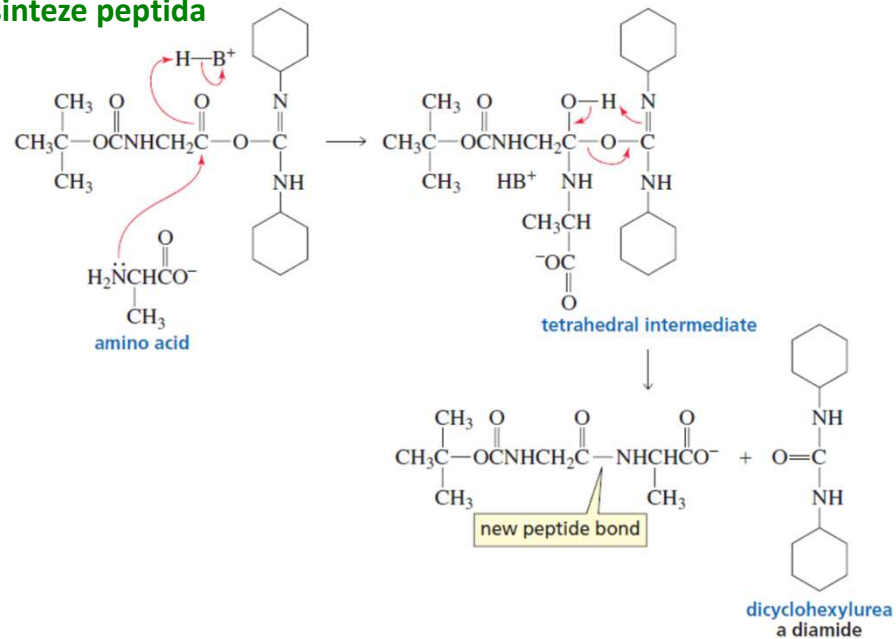
45

## Kemijske sinteze peptida



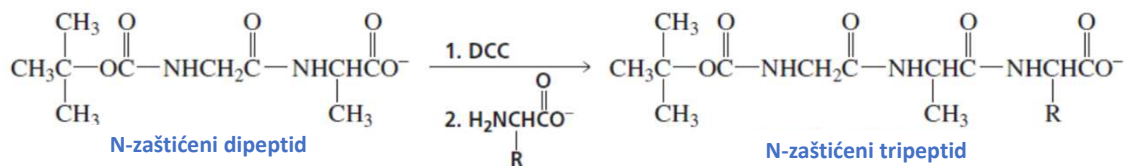
46

### Kemijske sinteze peptida



47

### Kemijske sinteze peptida



- ako pretpostavimo da je iskorištenje svake reakcije dodavanja nove aminokiseline 80%, što je prilično dobro, ukupno iskorištenje ipak jako opada s porastom broja reakcija:

Broj aminokiselina	2	3	4	5	6	7	8	9
Ukupno iskorištenje	80%	64%	51%	41%	33%	26%	21%	17%

- **sinteza u otopini** obično se koristi za peptide do 5 aminokiselina. Oduzima puno vremena i zahtijeva pročišćavanje između svakog koraka. Za peptide duljeg lanca koristimo metode **sinteze na čvrstom nosaču**. Njima je moguće sintetizirati i manje proteine.

48

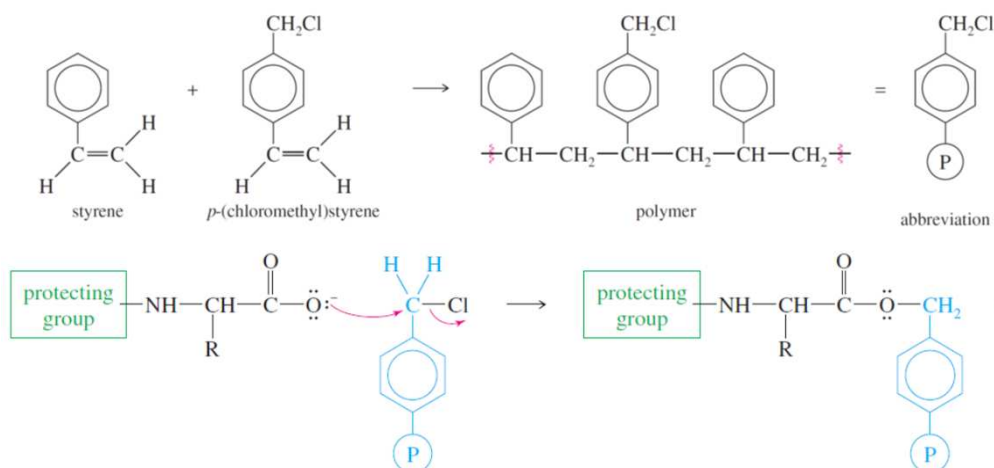


## Kemijske sinteze peptida - ZADATAK

Često se peptidi pripremaju spajanjem dvaju kraćih peptidnih lanaca, umjesto da se struktura dograđuje jednu po jednu jedinicu. Primjerice, heksapeptid se može sintetizirati prethodnom pripravom dvaju tripeptida da bi ih se zatim spojilo – to je tzv. konvergentna sinteza. Pretpostavimo da se pojedinačne peptidne veze stvaraju s iskorištenjem od 90%. Izračunajte ukupna iskorištenja u primjeru kada se šest aminokiselina postupno dograđuje, u usporedbi s iskorištenjem tvorbe istog heksapeptida iz prethodno pripremljenih tripeptida.

49

## Kemijske sinteze peptida – sinteza na krutom nosaču

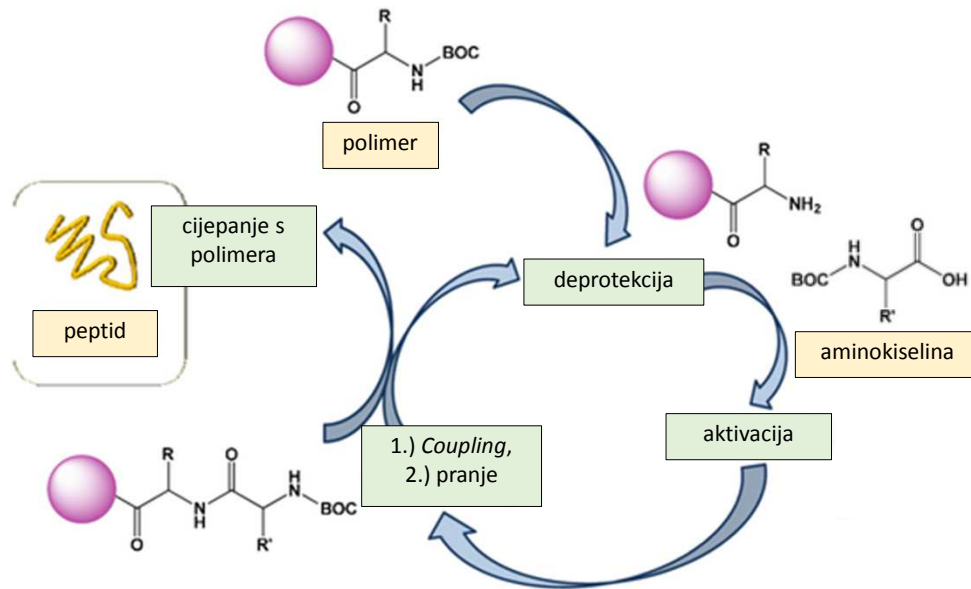


**Bruce Merrifield**  
(1921.-2006.)  
Nobelova nagrada  
za kemiju  
1984. godine

- sinteza od C prema N terminusu
- nonapeptid bradikinin je na ovaj način sintetiziran u ukupnom iskorištenju od 85% u svega 27 sati
- peptid od 100 aminokiselina može se sintetizirati unutar par dana
- proces se može potpuno automatizirati, postoje uređaji koji automatizirano vrše proces

50

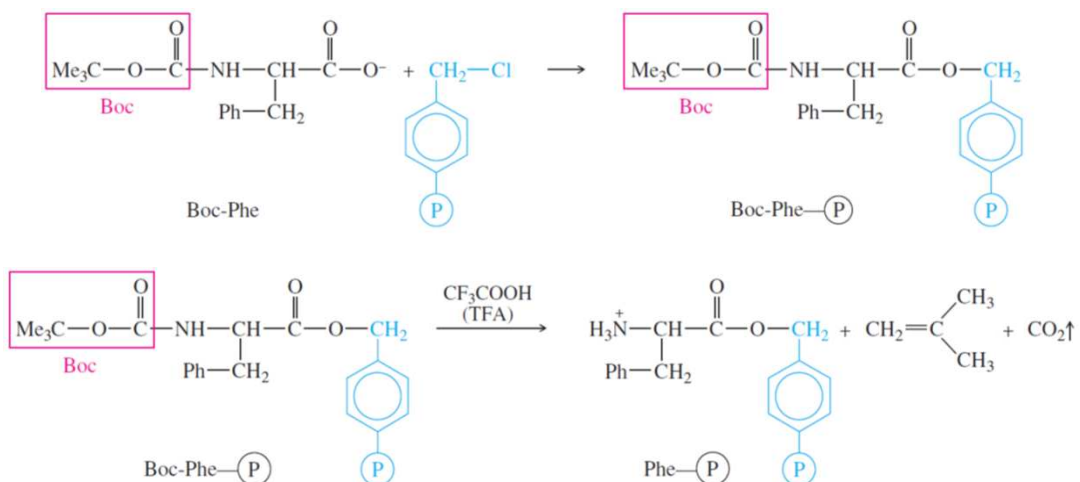
## Kemijske sinteze peptida – sinteza na krutom nosaču



51

## Kemijske sinteze peptida – sinteza na krutom nosaču

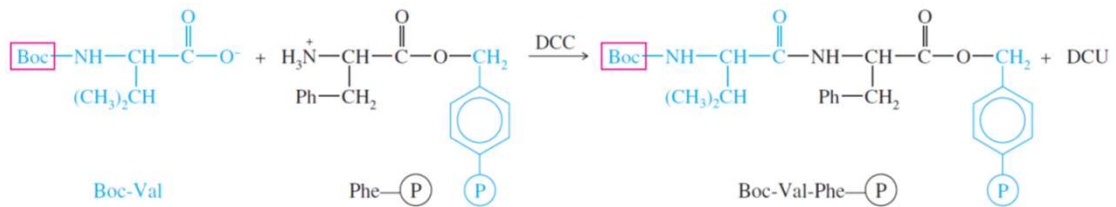
Primjer: Sinteza tripeptida Ala-Val-Phe



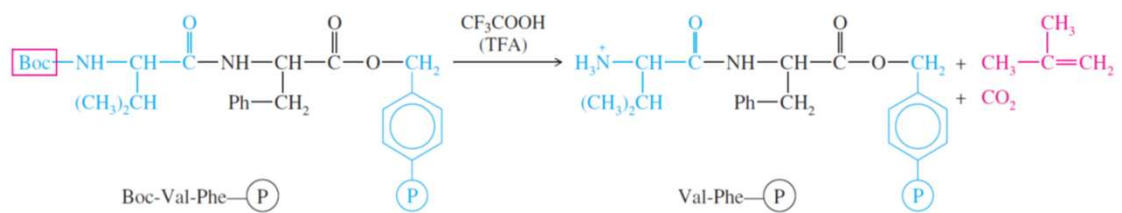
52

## Kemijske sinteze peptida – sinteza na krutom nosaču

### Primjer: Sinteza tripeptida Ala-Val-Phe



#### Step 1: Deprotection

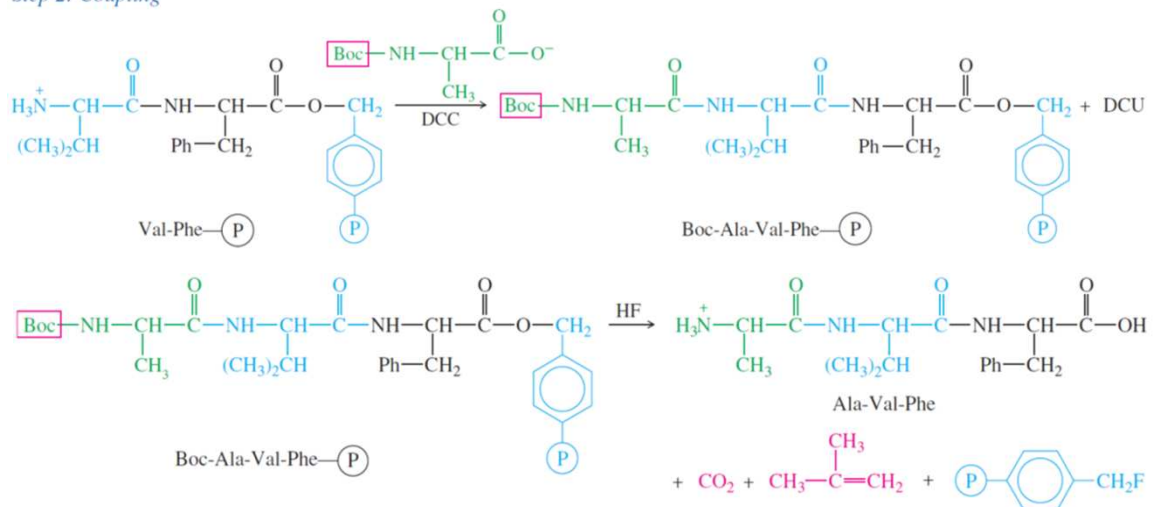


53

## Kemijske sinteze peptida – sinteza na krutom nosaču

### Primjer: Sinteza tripeptida Ala-Val-Phe

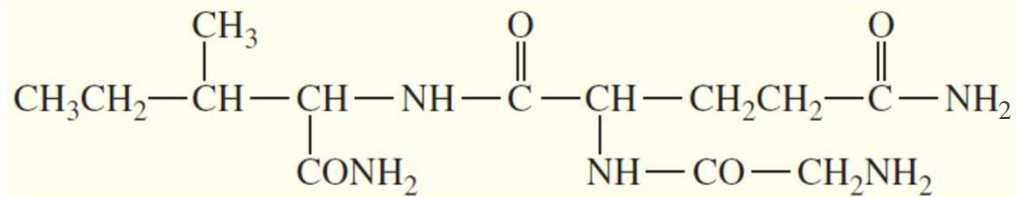
#### Step 2: Coupling



54

### Zadaci

1. Nacrtajte strukturu peptida čiji je slijed aminokiselina: Ser-Gln-Met·NH<sub>2</sub>. Sve aminokiseline su L-konfiguracije.
2. Sljedeća struktura prikazana je na neuobičajen način.



- (a) Označite N i C terminus.
- (b) Označite peptidne veze.
- (c) Odredite koje su aminokiseline prisutne.
- (d) Napišite skraćeno ime peptida.

55

### Zadaci

3. Nacrtajte Fischerove projekcijske formule L-treonina i L-izoleucina te odredite apsolutnu konfiguraciju svih kiralnih centara.
4. Ako je iskorištenje svakog koraka u sintezi oktapeptida A-B-C-D-E-F-G-H 90%, izračunajte iskorištenje najduljeg linearnog slijeda ako se sinteza provodi:
  - a) građenjem lanca dodavanjem jedne po jedne aminokiseline
  - b) građenjem fragmenata A-B, C-D, E-F, G-H i njihovim međusobnim povezivanjem u A-B-C-D i E-F-G-H te povezivanjem nastalih dvaju tetrapeptida u oktapeptid.
5. Napišite kako bi kemijskim putem (sinteza u otopini) sintetizirali dipeptid valilfenilalanin. Krenite iz odgovarajućih Boc i Bn zaštićenih aminokiselina.

56