

Μ. Λιακοπούλου - Κυριακίδου
Καθηγήτρια Α.Π.Θ.

ΒΙΟΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ



Κάθε γνήσιο αντίτυπο φέρει την υπογραφή της συγγραφέως

Αφιερώνεται στη μνήμη του αδελφού μου Θανάση

ISBN 960-431-949-3

© Copyright: Λιακοπούλου - Κυριακίδου Μαρία, Εκδόσεις Ζήτη,
Δεκέμβριος 2004, Θεσσαλονίκη

Το παρόν έργο πνευματικής ιδιοκτησίας προστατεύεται κατά τις διατάξεις του Ελληνικού νόμου (Ν.2121/1993 όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει σήμερα) και τις διεθνείς συμβάσεις περί πνευματικής ιδιοκτησίας. Απαγορεύεται απολύτως η άνευ γραπτής άδειας του εκδότη και συγγραφέως κατά οποιοδήποτε τρόπο ή μέσο αντιγραφή, φωτοανατύπωση και εν γένει αναπαραγωγή, εκμίσθωση ή δανεισμός, μετάφραση, διασκευή, αναμετάδοση στο κοινό σε οποιαδήποτε μορφή (ηλεκτρονική, μηχανική ή άλλη) και η εν γένει εκμετάλλευση του συνόλου ή μέρους του έργου.



**Φοτοστοιχειοθεσία
Εκτύπωση**

Π. ΖΗΤΗ & Σια ΟΕ
18ο χλμ Θεσ/νίκης-Περαιάς
Τ.Θ. 4171 • Περαιά Θεσσαλονίκης • Τ.Κ. 570 19
Τηλ.: 23920 72.222 (5 γραμ.) - Fax: 23920 72.229
e-mail: info@ziti.gr

Βιβλιοπωλείο

ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΖΗΤΗ
Αρμενοπούλου 27 • 546 35 Θεσσαλονίκη
Τηλ. 2310 203.720, Fax 2310 211.305
e-mail: sales@ziti.gr

www.ziti.gr

Πρόλογος

Το παρόν αποτελεί την 3η κατά σειρά έκδοση του βιβλίου της Βιοοργανικής Χημείας που απευθύνεται στους σπουδαστές του Τμήματος Χημικών Μηχανικών ΑΠΘ.

Η ύλη έχει διαμορφωθεί έτσι ώστε να εξυπηρετήσει αφενός μεν το πανεπιστημιακό πρόγραμμα αφετέρου δε να γνωρίσει στο Χημικό Μηχανικό το περιεχόμενο και τις δυνατότητες της Βιοοργανικής Χημείας.

Όπως θα διαπιστώσει ο αναγνώστης έχουν δοθεί ελάχιστα βέβαια στοιχεία μικροβιολογίας και βιοχημείας, τα οποία θεώρησα απαραίτητα για την πληρέστερη κατανόηση του μαθήματος αυτού και της Βιοτεχνολογίας στη συνέχεια.

Η υπόδειξη πιθανών λαθών και αβλεψιών είναι ευπρόσδεκτα.

Θεσσαλονίκη, Δεκέμβριος 2004

*Μ. Λιακοπούλου - Κυριακίδου
Καθηγήτρια ΑΠΘ*

Περιεχόμενα

1^ο Κεφάλαιο: *Γενικά για το Κύτταρο*

| | | |
|-------|---|----|
| 1.1 | Είδη κυττάρων | 11 |
| 1.1.1 | Προκαρυωτικά κύτταρα..... | 11 |
| 1.1.2 | Ευκαρυωτικά κύτταρα | 13 |
| 1.2 | Χημικά συστατικά του κυττάρου..... | 16 |
| 1.3 | Κλασμάτωση υποκυτταρικών στοιχείων και παραλαβή | 16 |
| 1.4 | Λύση και ρήξη κυττάρων | 16 |

2^ο Κεφάλαιο: *Αμινοξέα – Πεπτίδια*

| | | |
|-------|--|----|
| 2.1 | Εισαγωγή | 19 |
| 2.2 | Αμινοξέα..... | 19 |
| 2.2.1 | Ονοματολογία – Συμβολισμοί αμινοξέων | 23 |
| 2.2.2 | Πεπτιδικός δεσμός..... | 25 |
| 2.3 | Μέθοδοι σύζευξης αμινοξέων - στρατηγική σύνθεσης πεπτιδίων | 26 |
| 2.3.1 | Μέθοδος του δικυκλοεξυλοκαρβοδιμιδίου (DCC)..... | 26 |
| 2.3.2 | Μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων | 28 |
| 2.3.3 | Μέθοδος των εστέρων με N-υδροξυ-ηλεκτριμίδιο..... | 29 |
| 2.3.4 | Μέθοδος των μικτών ανυδριτών..... | 30 |
| 2.3.5 | Ομάδες για την προστασία της αμινομάδας | 30 |
| 2.3.6 | Ομάδες για την προστασία της καρβοξυλομάδας..... | 31 |
| 2.4 | Προστασία των πλευρικών ομάδων..... | 32 |
| 2.4.1 | Τριτοταγής βουτυλ-ομάδα (But)..... | 33 |
| 2.4.2 | Τριτοταγής βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (t-Boc) | 33 |
| 2.4.3 | Τριτυλομάδα (Trt)..... | 33 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.4.4 | Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (Z ή CbZ) | 33 |
| 2.4.5 | Μεθυλοτριτυλομάδα (Mtt) | 34 |
| 2.5 | Σύνθεση πεπτιδίων σε διάλυμα | 34 |
| 2.6 | Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση | 34 |
| 2.6.1 | Στερεά φάση | 35 |
| 2.6.2 | Πολυμερή που χρησιμοποιούνται σαν στερεά φάση και ιδιότητές τους | 37 |
| 2.6.3 | Μέθοδοι σύζευξης και προστασίας | 37 |
| 2.6.4 | Απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη..... | 38 |
| 2.7 | Σύντομος τρόπος γραφής πεπτιδίων - Ονοματολογία | 38 |
| 2.8 | Γεωμετρία του πεπτιδικού δεσμού..... | 38 |

3^ο Κεφάλαιο: *Πρωτεΐνες*

| | | |
|--------|---|----|
| 3.1 | Διαμόρφωση των πρωτεϊνών..... | 41 |
| 3.2 | Βιολογία των πρωτεϊνών | 46 |
| 3.2.1 | Φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών | 48 |
| 3.2.2 | Μετουσίωση των πρωτεϊνών | 49 |
| 3.2.3 | Μέθοδοι απομόνωσης και καθαρισμού των πρωτεϊνών..... | 50 |
| 3.2.4 | Προσδιορισμός των αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη - πρωτοταγής δομή | 50 |
| 3.2.5 | Προσδιορισμός του N-τελικού αμινοξέος | 52 |
| 3.2.6 | Προσδιορισμός του C-τελικού αμινοξέος | 52 |
| 3.2.7 | Προσδιορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων σε μια πεπτι- δική αλυσίδα | 53 |
| 3.2.8 | Αποικοδόμηση κατά Edman..... | 54 |
| 3.2.9 | Υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών..... | 54 |
| 3.2.10 | Σύγχρονες μέθοδοι ανάλυσης..... | 57 |

4^ο Κεφάλαιο: *Ένζυμα*

| | | |
|-------|----------------------------------|----|
| 4.1 | Γενικά..... | 59 |
| 4.2 | Ταξινόμηση καταλυτών | 61 |
| 4.2.1 | Ετερογενής κατάλυση..... | 61 |
| 4.2.2 | Ομογενής κατάλυση..... | 63 |
| 4.2.3 | Ενζυμική κατάλυση - Ένζυμα | 67 |
| 4.2.4 | Ονοματολογία των ενζύμων | 70 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.5 Ταξινόμηση ενζύμων | 70 |
| 5° Κεφάλαιο: Συνένζυμα ή Προσθετικές Ομάδες | |
| 5.1 Γενικά..... | 73 |
| 6° Κεφάλαιο: Υδρολυτικά Ένζυμα – Εφαρμογές | |
| 6.1 Γενικά..... | 77 |
| 6.1.1 Εστεράσες..... | 77 |
| 6.1.2 Αμυλάσες..... | 79 |
| 6.1.3 Πρωτεολυτικά ένζυμα..... | 81 |
| 6.2 Μη υδρολυτικά ένζυμα - Εφαρμογές..... | 82 |
| 7° Κεφάλαιο: Κινητική Ενζυμικών Αντιδράσεων | |
| 7.1 Γενικά..... | 83 |
| 7.2 Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων | 84 |
| 7.2.1 Υπόθεση Michaelis - Menten | 84 |
| 7.2.2 Επίδραση του pH στην ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης | 88 |
| 7.2.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων..... | 88 |
| 7.2.4 Γραφική αναπαράσταση των κινητικών δεδομένων | 89 |
| 7.3 Τάξη ενζυμικής αντίδρασης..... | 91 |
| 8° Κεφάλαιο: Αναστολείς Ενζύμων | |
| 8.1 Πολλαπλά υποστρώματα | 97 |
| 8.2 Τροποποίηση και ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας..... | 97 |
| 8.3 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων..... | 98 |
| 8.3.1 Συναγωνιστική αναστολή | 98 |
| 8.3.2 Μη συναγωνιστική αναστολή..... | 100 |
| 8.3.3 Μη αντιστρεπτή αναστολή | 102 |
| 8.3.4 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων από το ίδιο το υπόστρωμα ... | 103 |
| 8.3.5 Αναστολή ενζυμικής αντίδρασης από το τελικό προϊόν..... | 104 |
| 9° Κεφάλαιο: Καθλωμένα Ένζυμα – Τεχνολογία | |
| 9.1 Καθήλωση ενζύμων σε αδιάλυτους φορείς – Τεχνικές καθήλωσης.... | 107 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 9.2 | Τεχνικές καθήλωσης | 107 |
| 9.2.1 | Ομοιοπολική σύνδεση | 108 |
| 9.2.2 | Προσρόφηση..... | 110 |
| 9.2.3 | Ιοντική σύνδεση..... | 111 |
| 9.2.4 | Εγκλωβισμός..... | 111 |
| 9.2.5 | Συμπολυμερισμός..... | 111 |
| 9.3 | Εφαρμογές καθηλωμένων ενζύμων στη βιομηχανία..... | 112 |
| 9.4 | Τύποι καθηλωμένων ενζύμων που κυκλοφορούν στο εμπόριο | 118 |
| 9.5 | Καθήλωση κυττάρων | 120 |

10° Κεφάλαιο: Ενζυμικά Μοντέλα ή Ενώσεις που Μιμούνται Ενζυμικές Δράσεις

| | | |
|--------|--|-----|
| 10.1 | Γενικά | 121 |
| 10.1.1 | Κύρια χαρακτηριστικά ενζυμικού μοντέλου..... | 122 |
| 10.1.2 | Χημεία των συμπλόκων host - guest (ξενίζοντος - ξενιστή)..... | 124 |
| 10.2 | Ιοντοφορείς, σαν ενζυμικά μοντέλα | 128 |
| 10.3 | Μυκύλλια σαν ενζυμικά μοντέλα | 130 |
| 10.4 | Πολυμερή σαν ενζυμικά μοντέλα | 136 |
| 10.4.1 | Ανιονικά πολυμερή..... | 137 |
| 10.4.2 | Κατιονικά πολυμερή..... | 137 |
| 10.4.3 | Μη υδατοδιαλυτά πολυμερή - Βινυλοπολυμερή..... | 137 |
| 10.4.4 | Υδατοδιαλυτά κατιονικά πολυμερή..... | 138 |
| 10.4.5 | Κατιονικά πολυμερή με περισσότερες από μία χαρακτηριστικές ομάδες..... | 139 |
| 10.5 | Κυκλοδεξτρίνες σαν ενζυμικά μοντέλα | 139 |

11° Κεφάλαιο: Παραλαβή Ενζύμων σε Βιομηχανική Κλίμακα - Μικροοργανισμοί

| | | |
|------|--|-----|
| 11.1 | Πηγές ενζύμων | 143 |
| 11.2 | Ανάπτυξη μικροοργανισμών – Πολλαπλασιασμός | 144 |
| 11.3 | Ζυμώσεις | 145 |
| 11.4 | Μικροοργανισμοί..... | 146 |

12° Κεφάλαιο: Συνθέσεις

| | | |
|------|--------------------|-----|
| 12.1 | Οργανικά οξέα..... | 149 |
|------|--------------------|-----|

| | | |
|--------|---|-----|
| 12.1.1 | Κιτρικό οξύ..... | 149 |
| 12.1.2 | Ιτακονικό οξύ | 149 |
| 12.1.3 | Γλυκονικό οξύ και γλυκουρονικό οξύ..... | 150 |
| 12.1.4 | Γαλακτικό οξύ | 150 |
| 12.2 | Αμινοξέα..... | 151 |
| 12.2.1 | Γλουταμινικό οξύ | 151 |
| 12.2.2 | Ασπαραγινικό οξύ | 151 |
| 12.2.3 | L-Λυσίνη..... | 151 |
| 12.3 | Αλκοόλες..... | 152 |
| 12.3.1 | n-βουτανόλη..... | 153 |
| 12.3.2 | Γλυκερόλη..... | 154 |
| 12.4 | Βιταμίνες και σάκχαρα | 154 |
| 12.5 | Στεροειδή..... | 156 |
| 12.6 | Αντιβιοτικά | 158 |
| 12.6.1 | Ταξινόμηση..... | 159 |

13° Κεφάλαιο: Νουκλεϊνικά Οξέα

| | | |
|--------|---|-----|
| 13.1 | Γενικά | 163 |
| 13.1.1 | Πρωτοταγής δομή των νουκλεϊνικών οξέων DNA και RNA..... | 163 |
| 13.1.2 | Δευτεροταγής δομή DNA | 166 |
| 13.1.3 | Δευτεροταγής και Τριτοταγής δομή του RNA..... | 167 |
| 13.1.4 | Κυκλικό DNA | 168 |
| 13.1.5 | Μετουσίωση DNA | 168 |
| 13.2 | Χημικές αντιδράσεις..... | 171 |
| 13.2.1 | Χημικές αντιδράσεις των νουκλεϊνικών οξέων που είναι υπεύ- θυνες για γεγονότα που συμβαίνουν σε ζωντανά κύτταρα | 171 |
| 13.2.2 | Χημικές αντιδράσεις των νουκλεϊνικών οξέων που χρησιμο- ποιούνται για τη μελέτη της δομής και τους λειτουργίας τους..... | 172 |
| 13.3 | Χημική σύνθεση των πολυνουκλεοτιδίων | 174 |
| 13.3.1 | Ομάδες για την προστασία των αμινομάδων των βάσεων | 175 |
| 13.3.2 | Ομάδες για την προστασία των υδροξυλομάδων του σακχάρου.. | 176 |
| 13.3.3 | Προστασία των υδροξυλομάδων του φωσφορικού | 177 |
| 13.3.4 | Φωσφοδιεστερικός δεσμός - σύζευξη νουκλεοζιτών..... | 177 |
| 13.4 | Μερικά πολύ γνωστά νουκλεοτίδια και ο ρόλος τους στα βιολογι- κά συστήματα..... | 178 |

| | |
|--|-----|
| 13.4.1 Τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) | 179 |
| 13.4.2 Κυκλικό AMP και κυκλικό GMP | 180 |
| 13.5 Βιοσύνθεση DNA | 181 |
| 13.6 Σύνθεση RNA in vivo | 183 |
| 13.7 Μηχανισμός επιδιόρθωσης βλαβών DNA | 183 |
| | |
| 14° Κεφάλαιο: Βιοσύνθεση Πρωτεϊνών | |
| 14.1 Μεταγραφή των γενετικών πληροφοριών | 187 |
| | |
| 15° Κεφάλαιο: Τροποποίηση Πρωτεϊνών | |
| 15.1 Γενικά για τροποποίηση πρωτεϊνών | 193 |
| 15.2 Χημική τροποποίηση πρωτεϊνών | 194 |
| | |
| 16° Κεφάλαιο: Σάκχαρα | |
| 16.1 Γενικά | 201 |
| | |
| <i>Βιβλιογραφία</i> | 209 |
| <i>Ευρετήριο</i> | 211 |

1^ο Κεφάλαιο

Γενικά για το Κύτταρο

1.1 Είδη κυτάρων

Στο κεφάλαιο αυτό θα αναφερθούμε σύντομα στο κύτταρο, τα είδη (ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά) και γενικά στα διάφορα στοιχεία του, όπως πυρήνα, κυτταρόπλασμα κ.λπ. για να μπορέσει ο αναγνώστης να κατανοήσει καλύτερα πολλές διεργασίες του κυττάρου όταν στη συνέχεια αναφερθούμε στα διάφορα βιοπολυμερή, τις πρωτεΐνες, τα νουκλεϊνικά οξέα, τα σάκχαρα. Είναι φανερό ότι πέραν της χημείας και γενικά των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, θα γίνει εκτενής αναφορά του βιολογικού ρόλου που επιτελούν, στη βιοσύνθεσή τους και κατ' επέκταση στην περιοχή του κυττάρου που αυτή γίνεται.

Σύμφωνα με την κυτταρική θεωρία των Schleiden και Schwann το κύτταρο είναι η πλέον οργανωμένη ομάδα μορίων που βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση. Έχει μορφολογική και χημική οργάνωση και την ικανότητα να απαυτύσσεται και να αναπαράγεται. Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν δείξει ότι υπάρχουν δύο ειδών κύτταρα. Αν και έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους, υπάρχουν σαφείς διαφορές στην οργάνωση και λειτουργία τους, στις οποίες στηρίζεται και ο διαχωρισμός τους σε δύο κατηγορίες: **τα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά κύτταρα**. Γενικά τα κύτταρα και των δύο κατηγοριών παρουσιάζουν ποικιλία μεγεθών και διαστάσεων που αντιπροσωπεύουν την εξελικτική τους προσαρμογή σε διάφορα περιβάλλοντα και τη διαφοροποίησή τους.

1.1.1 Προκαρυωτικά κύτταρα

Τα προκαρυωτικά κύτταρα δεν φέρουν μεμβράνη γύρω από τον πυρήνα. Είναι σχετικά μικρά και απλά στην οργάνωση κύτταρα. Συνήθως απαντούν μόνο τους χωρίς άλλα κύτταρα ενωμένα μεταξύ τους. Τα προκαρυωτικά κύτ-

ταρα μοιάζουν με μικρές σφαίρες, ράβδους ή σπιράλ με διαστάσεις 0.5-5 μm . Για να πάρουμε μια ιδέα του πόσο μεγάλα είναι αυτά τα κύτταρα σε σχέση με τα άλλα συστατικά στοιχεία του σύμπαντος, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι το μέγεθος ενός προκαρυωτικού κυττάρου σε σχέση με τον άνθρωπο είναι ίσο με το μέγεθος του ανθρώπου σε σχέση με τη γη και μικρότερο από το μέγεθος του ατόμου του υδρογόνου.

Ο όγκος των προκαρυωτικών κυττάρων είναι της τάξεως των 10^{-12} mL ανά κύτταρο και απ' αυτό το 50-80% είναι νερό. Η μάζα των προκαρυωτικών κυττάρων είναι 10^{-12} g. Μικροοργανισμοί αυτού του είδους μεγαλώνουν πολύ γρήγορα και είναι ευρέως διαδεδομένοι στη βιόσφαιρα. Μερικοί, π.χ. μπορούν να διπλασιάζουν τον όγκο, τη μάζα τους και τον αριθμό τους μέσα σε 20 min.

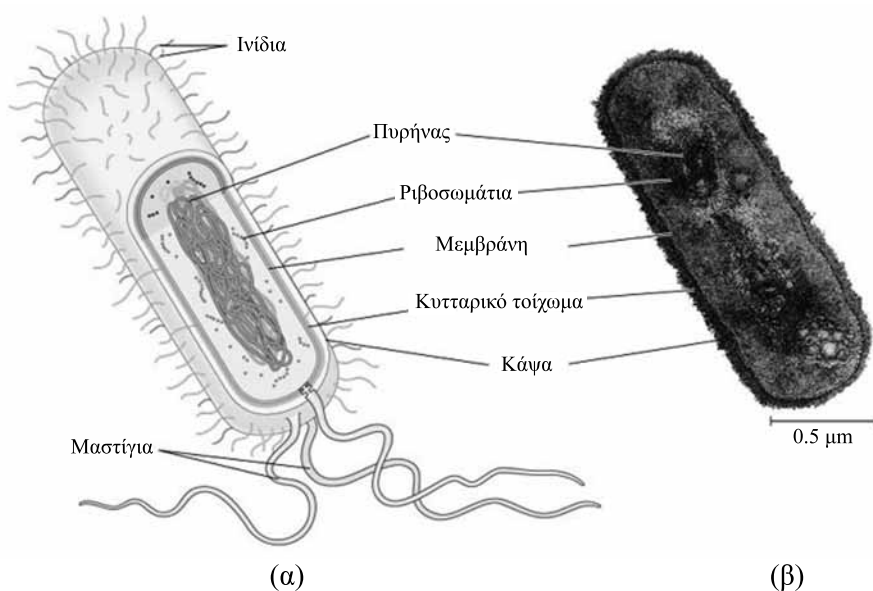
Από βιοχημικής πλευράς, τα προκαρυωτικά κύτταρα, ως οργανισμοί, είναι ευέλικτοι, γιατί μπορούν να επιλέγουν το κατάλληλο θρεπτικό υλικό από μια μεγάλη ποικιλία θρεπτικών συστατικών που διατίθενται στο περιβάλλον τους.

Επειδή οι προκαρυωτικοί οργανισμοί συνήθως απαντούν σαν απομονωμένοι μονοκύτταροι οργανισμοί, έχουν ελάχιστα μέσα ελέγχου του περιβάλλοντός τους. Επομένως, η ευελιξία, όσον αφορά τα θρεπτικά συστατικά, είναι βασικό χαρακτηριστικό για την επιβίωσή τους. Η γρήγορη αύξηση (πολλαπλασιασμός) των προκαρυωτικών οργανισμών σε συνδυασμό με τη βιοχημική τους ευελιξία τα καθιστούν προφανώς καλούς στόχους για τη βιολογική έρευνα και βιοχημική κατεργασία.

Στο σχήμα 1.1 δίνεται η εικόνα ενός προκαρυωτικού κυττάρου, του *Bacillus coagulans*.

Το προκαρυωτικό κύτταρο περιβάλλεται από ένα σταθερό τοίχωμα πάχους 200 Å. Το τοίχωμα αυτό παρέχει στο κύτταρο δομική ισχύ και το κρατά σταθερό από τους ποικίλους παράγοντες που το επηρεάζουν. Αμέσως μετά το **κυτταρικό τοίχωμα** και στο εσωτερικό του υπάρχει η **κυτταρική μεμβράνη**, της οποίας το πάχος είναι 70 Å. Η δομή της είναι παρόμοια με τη δομή της μεμβράνης όλων των κυττάρων. Οι μεμβράνες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στο κύτταρο. Αυτές καθορίζουν ποιες από τις χημικές ουσίες θα μεταφερθούν από και προς το εσωτερικό του κυττάρου.

Στο εσωτερικό του κυττάρου υπάρχει μια περιοχή, όχι πλήρως καθορισμένη, που είναι η **πυρηνική ζώνη**. Εδώ γίνεται ο έλεγχος για κάθε κυτταρική λειτουργία. Αποτελείται από ένα μόριο DNA το οποίο αναδιπλώνεται και σχηματίζει μια σχεδόν ομογενή μάζα.



Σχ. 1.1. Δομή του βακτηρίου *Bacillus coagulans* (προκαρυωτικού κυττάρου).
 (α) Δομή του βακτηρίου σε σχήμα ράβδου με μαστίγια.
 (β) Λεπτή διατομή του ίδιου κυττάρου.

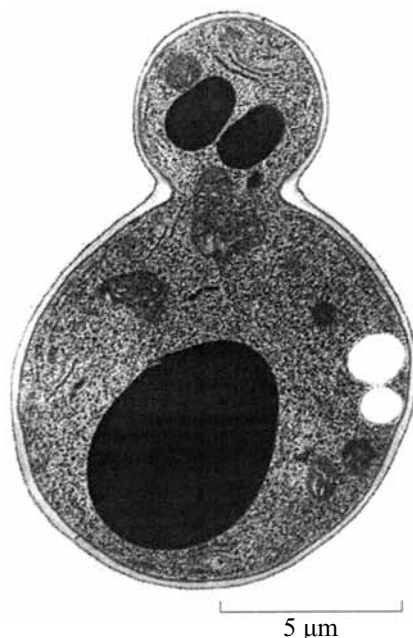
Οι μαύρες κηλίδες μέσα στο κύτταρο είναι τα **ριβοσωμάτια**, τα οποία είναι μικρότερα από τα ριβοσωμάτια των ευκαρυωτικών κυττάρων. Το **κυττόπλασμα** ή **κυτταρόπλασμα** είναι το **υγρό** υλικό που καταλαμβάνει το υπόλοιπο μέρος του κυττάρου. Σε πολλά κύτταρα υπάρχουν μερικές περιοχές σαφουαλλίδες και χρησιμοποιούνται σαν αποθήκες.

Τέλος, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι αν και η δομή των προκαρυωτικών κυττάρων είναι σε γενικές γραμμές η παραπάνω, υπάρχουν και διαφορές σε ορισμένους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Υπάρχουν π.χ. μερικοί μικροοργανισμοί που περιέχουν μεμβράνες που συγκεντρώνουν την ενέργεια του φωτός για φωτοσύνθεση. Χρησιμοποιούν δηλαδή, την ενέργεια του φωτός και αντιδρώντας με οργανικά μόρια ελευθερώνουν οξυγόνο στην ατμόσφαιρα. Αυτοί είναι οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί.

1.1.2 Ευκαρυωτικά κύτταρα

Τα κύτταρα της κατηγορίας αυτής έχουν **πυρήνα** σαφώς διαχωρισμένο από το υπόλοιπο κύτταρο με την **πυρηνική μεμβράνη**. Τα **ευκαρυωτικά κύτταρα** είναι 1000 φορές μεγαλύτερα από τα προκαρυωτικά. Μερικά κύτταρα ζουν

ανεξάρτητα σαν μονοκύτταροι οργανισμοί όπως είναι οι ζύμες (yeasts) (σχήμα 1.2). Η εσωτερική δομή των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι περισσότερο πολύπλοκη από τη δομή των προκαρυωτικών. Υπάρχει ένας βαθμός οργάνωσης και διαφοροποίησης. Το εσωτερικό του κυττάρου διαιρείται σε διάφορα τμήματα.

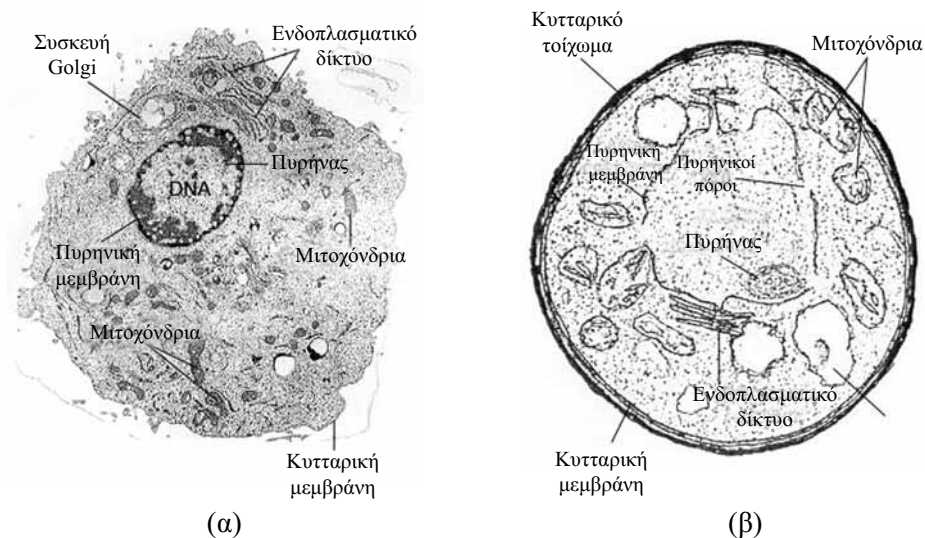


Σχ. 1.2. Φωτομικρογραφία κυττάρων ζύμης.

Το κύτταρο περιβάλλεται από **κυτταρική μεμβράνη** παρόμοια με εκείνη των προκαρυωτικών κυττάρων. Στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης μπορεί να υπάρχει το λεγόμενο κυτταρικό κάλυμμα ή τοίχωμα. Η φύση του τοιχώματος εξαρτάται από το συγκεκριμένο είδος του κυττάρου. Τα κύτταρα, π.χ. των ανωτέρων ζώων έχουν συνήθως ένα λεπτό τοίχωμα. Αυτό το είδος του καλύμματος είναι απαραίτητο για τη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους προς σχηματισμό ιστών και οργάνων, όπως συκώτι, σπλήνα, κ.λπ.

Στο σχήμα 1.3 δίνεται η ηλεκτρονική μικρογραφία ενός ζωϊκού κυττάρου (από το ήπαρ ποντικίου και ενός μικροοργανισμού). **Τα φυτικά κύτταρα έχουν πιο παχύ κυτταρικό κάλυμμα και πιο ανθεκτικό.**

Επιπλέον, τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν μονάδες μεμβρανών μέσα στο κύτταρο. Ένα σύμπλεγμα μεμβρανών είναι και το **ενδοπλασματικό δίκτυο**,



Σχ. 1.3. (α) Ηλεκτρονική μικρογραφία ζωϊκού κυττάρου (από ήπαρ ποντικού).
 (β) του μικροοργανισμού *Candida albicans*.

που ξεκινάει από την κυτταρική μεμβράνη και φτάνει μέσα στο κύτταρο. Ο πυρήνας του κυττάρου περιβάλλεται από μια πορώδη μεμβράνη. Τα **ριβωσωμάτια**, τα οποία απαντούν και στα προκαρυωτικά κύτταρα, βρίσκονται επάνω και κατά μήκος του ενδοπλασματικού δικτύου. Μια από τις κύριες λειτουργίες του πυρήνα είναι ο έλεγχος της καταλυτικής δραστηριότητας των ριβωσωμάτων. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονίσουμε ότι ο πυρήνας όχι μόνο ελέγχει τις ταχύτητες των διαφόρων αντιδράσεων, αλλά και το είδος της κάθε αντίδρασης. Ο πυρήνας είναι γεμάτος με μεμβράνες.

Τα διάφορα κλειστά συστήματα μεμβρανών είναι γνωστά σαν **οργανέλες**. Τα **μιτοχόνδρια**, π.χ. είναι οργανέλες με πλήρως οργανωμένη και εξειδικευμένη εσωτερική δομή. Τα μιτοχόνδρια απαντούν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα που χρησιμοποιούν οξυγόνο κατά τη διαδικασία εξεύρεσης ενέργειας. Τα μιτοχόνδρια έχουν δικό τους γενετικό μηχανισμό με δικό τους DNA, που είναι **κυκλικό δίκλωνο** και πολύ μικρότερο του πυρηνικού DNA. Έχουν επίσης και δικά τους ριβωσωμάτια και γενικά διαθέτουν ολόκληρο το μηχανισμό πρωτεϊνικής σύνθεσης.

Στα κύτταρα που χρησιμοποιούν το φως για εξεύρεση ενέργειας (φυτικά κύτταρα), αντί των μιτοχονδρίων έχουμε τους **χλωροπλάστες**, που ανήκουν και αυτοί στις οργανέλες.

Τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες είναι τα τμήματα εκείνα του κυττάρου όπου γίνονται οι πιο πολλές βιοχημικές αντιδράσεις, πέρα από το ρόλο τους στην παραγωγή ενέργειας. Τέλος, στις οργανέλες ανήκουν και οι **συσκευές Golgi**, τα **λυσοσωμάτια** και οι **βακουόλες**. Τα λυσοσωμάτια είναι όμοια σε μέγεθος με τα μιτοχόνδρια και μοιάζουν με ασκούς που περιέχουν μεγάλα ποσά υδρολυτικών ενζύμων.

1.2 Χημικά συστατικά του κυτάρου

Τα συστατικά του κυττάρου είναι ανόργανα και οργανικά. Στα ανόργανα συστατικά ανήκουν το H_2O (70-80%) και μεταλλικά ιόντα. Στα οργανικά συστατικά υπάγονται οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊνικά οξέα, τα σάκχαρα και τα λιπίδια.

1.3 Κλασμάτωση υποκυτταρικών στοιχείων και παραλαβή

Εάν καταστρέψουμε την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων με κάποιον από τους τρόπους που αναφέρονται στη συνέχεια, δημιουργούμε ομογενοποίηση από το οποίο μπορούμε με διαφορετικές φυγοκεντρήσεις, να πάρουμε κλάσματα εμπλουτισμένα στα διάφορα υποκυτταρικά στοιχεία (βλ. βιβλίο “Βιοτεχνολογία με στοιχεία Βιοχημικής Μηχανικής”).

1.4 Λύση και ρήξη κυττάρων

Η λύση των κυττάρων, δηλαδή η καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, μπορεί να γίνει με μηχανικό, χημικό ή ενζυμικό τρόπο. Η λύση των κυττάρων είναι μια διεργασία που χρησιμοποιείται πολύ στη βιοτεχνολογία για την απελευθέρωση ενδοκυττάρων προϊόντων στο περιβάλλον και την περαιτέρω απομόνωσή τους.

1. Μηχανική ρήξη

Γίνεται με την εφαρμογή ισχυρών διατμητικών τάσεων στα κύτταρα. Διεργασίες που επιτυγχάνουν την εφαρμογή τέτοιων δυνάμεων είναι η ομογενοποίηση, η άλεση και οι **υπέρηχοι**.

Η χρησιμοποίηση της μιας ή της άλλης μεθόδου εξαρτάται από την αντίσταση του κάθε μικροοργανισμού στη διάτμηση (οι μύκητες π.χ. είναι πολύ ανθεκτικοί) και από τον τρόπο που έχει μεγαλώσει ο μικροοργανισμός.

2. Λύση με χημικές μεθόδους και ένζυμα

Η λύση κυττάρων με χημικά αντιδραστήρια χρησιμοποιείται κυρίως για μεγάλες ποσότητες, οπότε δεν ενδείκνυται η χρήση μηχανικών μεθόδων.

Μερική χημική λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται με την προσθήκη κροκιδωτικών όπως θειικού πολυστυρολίου, μπετονίτη, πολυακρυλαμιδίου, τεταρτοταγούς αμμωνίου κ.λπ. Η αύξηση της θερμοκρασίας και οι μεγάλες αλλαγές στο pH οδηγούν επίσης στην καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης.

Η μέθοδος όμως που υπόσχεται περισσότερο είναι η χημική λύση με ένζυμα. Αυτή μπορεί να είναι εξωγενής, όταν γίνεται με προσθήκη ενζύμων, ή ενδογενής (αυτόλυση), όταν πρόκειται για την απελευθέρωση της κυτταρικής λυσοζύμης. Η λυσοζύμη είναι ένα ένζυμο που χρησιμοποιείται ευρέως για τη λύση της κυτταρικής μεμβράνης.

Γενικά, η λύση κυττάρων με χημικό και ενζυμικό τρόπο είναι μια ήπια διεργασία, όπου εφαρμόζονται χαμηλές διατμητικές τάσεις και στην περίπτωση των ενζύμων είναι πολύ εξειδικευμένη.

2^ο Κεφάλαιο

Αμινοξέα – Πεπτίδια

2.1 Εισαγωγή

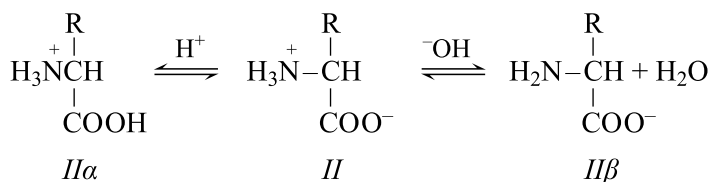
Στο κεφάλαιο αυτό θα αναφερθούμε στα αμινοξέα που όπως είναι γνωστό αποτελούν τα συστατικά των πρωτεϊνών. Ήδη, από το τέλος του περασμένου αιώνα έχει διαπιστωθεί ότι οι πρωτεΐνες με την επίδραση οξέων, αλκαλίων ή ενζύμων διασπώνται σε α-αμινοκαρβοξυλικά οξέα. Θα αναφερθούμε στη δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού καθώς και στα προϊόντα συμπύκνωσης αμινοξέων, τα πεπτίδια και τις πρωτεΐνες. Στο επόμενο κεφάλαιο θα αναφερθούμε με λεπτομέρειες στη δομή, στις φυσικοχημικές ιδιότητες και βιολογικές λειτουργίες των πρωτεϊνών.

2.2 Αμινοξέα

Τα αμινοξέα που απαντούν στις πρωτεΐνες είναι α-αμινοκαρβοξυλικά οξέα

και ο γενικός τους τύπος είναι: $\text{R}-\overset{\text{NH}_2}{\underset{|}{\text{CH}}}-\text{COOH}$ (I).

Εξαίρεση αποτελεί η προλίνη όπου αντί για αμινομάδα έχει ιμινομάδα. Λόγω της παρουσίας αμινομάδας και καρβοξυλομάδας στο μόριό τους σχηματίζουν άλατα και με το καρβοξύλιο και με την αμινομάδα τους γι' αυτό και λέγονται **αμφολύτες**. Ιονίζονται σαν οξέα και βάσεις σχηματίζοντας ανιόντα $-\text{COO}^-$ με την καρβοξυλομάδα και κατιόντα $-\text{NH}_3^+$ με την αμινομάδα.



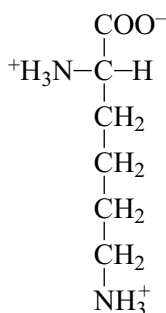
Όταν το αμινοξύ βρίσκεται σε κρυσταλλική κατάσταση ή σε ουδέτερο διάλυμα, το μόριο εμφανίζεται σαν διπολικό ιόν (II, άλας) $\text{H}_3^+\text{N}^+\text{CH}(\text{R})\text{COO}^-$. Όλες οι φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων συμφωνούν με την παραπάνω σύνταξη. Έτσι, τα αμινοξέα είναι στερεά κρυσταλλικά σώματα, τα πιο πολλά υδατοδιαλυτά και αποσυντίθενται πάνω από τους 250 °C.

Στον πίνακα 2.1 που ακολουθεί δίνονται τα είκοσι κοινά αμινοξέα που απαντούν στις πρωτεΐνες, η δομή τους και η ονοματολογία τους.

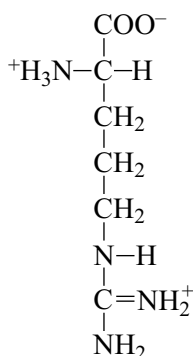
Πίνακας 2.1. Δομή, ονομασία, συμβολισμός και ταξινόμηση των 20 αμινοξέων με βάση την ομάδα R.

| Αρωματικά | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|---|---|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------|--|--|--|---|---|---|--|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{CH} \\ \quad \\ \text{N}=\text{C}-\text{NH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ \quad \\ \text{C}_6\text{H}_4 \quad \text{CH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ | <i>Ιστιδίνη</i> (His, H) | <i>Φαινολαλανίνη</i> (Phe, F) | <i>Τυροσίνη</i> (Tyr, Y) | <i>Τρυπτοφάνη</i> (Trp, W) | Με πολικές ομάδες | | | | $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ // \quad \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ // \quad \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ | <i>Ασπαραγίνη</i> (Asp, N) | <i>Γλουταμίνη</i> (Gln, Q) | <i>Σερίνη</i> (Ser, S) | <i>Θρεονίνη</i> (Thr, T) |
| <i>Ιστιδίνη</i> (His, H) | <i>Φαινολαλανίνη</i> (Phe, F) | <i>Τυροσίνη</i> (Tyr, Y) | <i>Τρυπτοφάνη</i> (Trp, W) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Με πολικές ομάδες | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ // \quad \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ // \quad \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ | <i>Ασπαραγίνη</i> (Asp, N) | <i>Γλουταμίνη</i> (Gln, Q) | <i>Σερίνη</i> (Ser, S) | <i>Θρεονίνη</i> (Thr, T) | | | | | | | | | | | | |
| <i>Ασπαραγίνη</i> (Asp, N) | <i>Γλουταμίνη</i> (Gln, Q) | <i>Σερίνη</i> (Ser, S) | <i>Θρεονίνη</i> (Thr, T) | | | | | | | | | | | | | | | | |

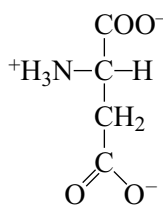
Με φορτισμένες ομάδες



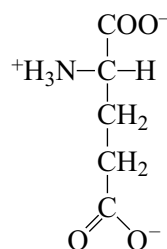
Λυσίνη
(Lys, K)



Αργινίνη
(Arg, R)

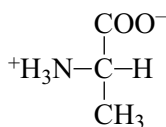


Ασπαραγινικό
(Asp, D)

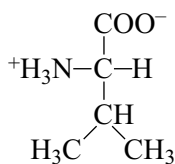


Γλουταμινικό
(Glu, E)

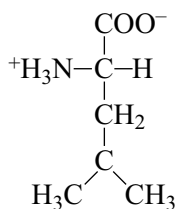
Αλειφατικά



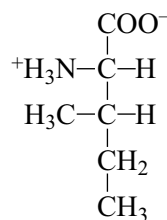
Αλανίνη
(Ala, A)



Βαλίνη
(Val, V)

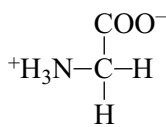


Λευκίνη
(Leu, L)

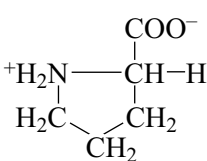


Ισολευκίνη
(Ile, I)

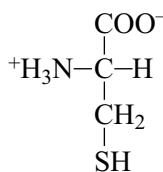
Με άπολες ομάδες



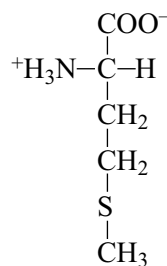
Γλυκίνη
(Gly, G)



Προλίνη
(Pro, P)

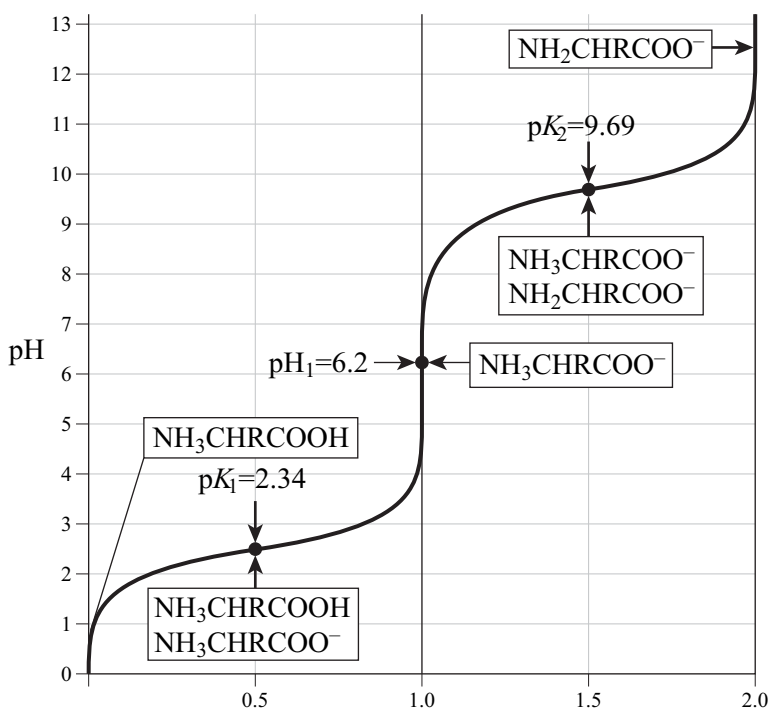


Κυστεΐνη
(Cys, C)



Μεθειονίνη
(Met, M)

Όπως φαίνεται και από τον γενικό τύπο των αμινοξέων, η φύση της ομάδας R ποικίλλει. Σε περίπτωση αμινοξέος με μη φορτισμένη ομάδα R, δηλαδή για ουδέτερα αμινοξέα η καμπύλη τιτλοδότησης είναι αυτή που αναφέρεται στο σχήμα 2.1. Για φορτισμένες ομάδες R όπως συμβαίνει στα βασικά αμινοξέα (π.χ. λυσίνη, αργινίνη κ.λπ.) και στα όξινα (π.χ. γλουταμινικό οξύ, ασπαραγινικό) η καμπύλη τιτλοδότησης δεν θα είναι αυτή του σχήματος 2.1 αλλά περισσότερο πολύπλοκη αφού θα έχουμε ιονισμό και της ομάδας R.



Σχ. 2.1. Καμπύλη τιτλοδότησης της αλανίνης.

Όσον αφορά τη στερεοχημεία τους όλα τα αμινοξέα, εκτός από τη γλυκίνη, που απαντούν στη φύση είναι οπτικά ενεργά και μπορεί να υπάρχουν σε δυο εναντιομερείς μορφές, L και D.

Έχει βρεθεί ότι τα αμινοξέα που απαντούν στις πρωτεΐνες είναι L-στερεοχημικής διαμόρφωσης. D-Αμινοξέα βρέθηκαν μόνο σε προϊόντα από μικροοργανισμούς όπως π.χ. σε μερικά αντιβιοτικά.

Από την τιτλοδότηση ενός υδατικού διαλύματος μονοαμινοκαρβοξυλικού α-αμινοξέος παίρνουμε, όπως φαίνεται και στην καμπύλη του σχήματος 2.1, δύο τιμές pK , οι οποίες αντιστοιχούν στις σταθερές διάστασης της καρβοξυ-

λομάδας που είναι περίπου 2 και της αμινομάδας που είναι 9.

Γενικά για ένα ασθενές οξύ



η σταθερά διάστασης k δίνεται

$$k = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad \text{και} \quad [\text{H}^+] = \frac{k[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \quad (2)$$

Ως γνωστόν, το pH είναι ο δείκτης της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου και δίδεται από τη σχέση:

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+] = \frac{1}{\log[\text{H}^+]}$$

αντίστοιχα για τη σταθερά διάστασης k ισχύει

$$\text{pk} = -\log k = \frac{1}{\log k}$$

Αν την τελευταία εξίσωση (2) τη γράψουμε διαφορητικά δηλαδή:

$$\frac{1}{[\text{H}^+]} = \frac{1}{k} \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (3)$$

και πάρουμε τους λογαρίθμους των δύο πλευρών, έχουμε:

$$\log \frac{1}{[\text{H}^+]} = \log \frac{1}{k} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (4)$$

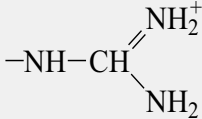
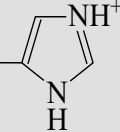
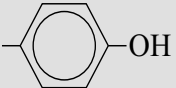
$$\text{ή} \quad \text{pH} = \text{pk} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (5)$$

που είναι η γνωστή εξίσωση **Hederson - Hasselbach**.

Οι τιμές pk υπολογίζονται σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση (5). Στον επόμενο πίνακα 2.2 δίνονται οι τιμές pk των 20 κοινών αμινοξέων.

2.2.1 Ονοματολογία - Συμβολισμοί αμινοξέων

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Βιοχημείας τα αμινοξέα συμβολίζονται με τρία γράμματα ή με ένα. Ο συμβολισμός με τρία γράμματα, ένα κεφαλαίο και δύο μικρά, προέρχεται από την αγγλική ονομασία των αμινοξέων, π.χ. Gly **Πίνακας 2.2.** Οι τιμές pk των 20 βασικών αμινοξέων.

| Αμινοξύ | α -COOH | α -NH ₃ ⁺ | Πλευρική ομάδα | pK _a σε αμινοξύ | pK _a σε πρωτεΐνη |
|---------------|----------------|--|---|----------------------------|-----------------------------|
| Αλανίνη | 2.3 | 9.9 | — | — | — |
| Αργινίνη | 1.8 | 9.0 |  | 12.5 | ≤12 |
| Ασπαραγίνη | 2.0 | 8.8 | — | — | — |
| Ασπαραγινικό | 2.0 | 10.0 | -COOH | 3.9 | 4.4-4.6 |
| Κυστεΐνη | 1.8 | 10.8 | -SH | 8.3 | 8.5-8.8 |
| Γλουταμινικό | 2.2 | 9.7 | -COOH | 4.3 | 4.4-4.6 |
| Γλουταμίνη | 2.2 | 9.1 | — | — | — |
| Γλυκίνη | 2.4 | 9.8 | — | — | — |
| Ιστιδίνη | 1.8 | 9.2 |  | 6.0 | 6.5-7.0 |
| Ισολευκίνη | 2.4 | 9.7 | -NH ₃ ⁺ | 10.8 | 10.0-10.2 |
| Λευκίνη | 2.4 | 9.6 | — | — | — |
| Λυσίνη | 2.2 | 9.2 | — | — | — |
| Μεθειονίνη | 2.3 | 9.2 | — | — | — |
| Φαινυλαλανίνη | 1.8 | 9.1 | — | — | — |
| Προλίνη | 2.0 | 10.6 | — | — | — |
| Σερίνη | 2.1 | 9.2 | — | — | — |
| Θρεονίνη | 2.6 | 10.4 | — | — | — |
| Τρυπτοφάνη | 2.4 | 9.4 | — | — | — |
| Τυροσίνη | 2.2 | 9.1 |  | 10.9 | 9.6-10.0 |
| Βαλίνη | 2.3 | 9.6 | — | — | — |

από Glycine για γλυκίνη, Ala από Alanine για αλανίνη κ.λπ.

Τα τελευταία χρόνια η ίδια εταιρία καθιέρωσε τη γραφή των αμινοξέων με

ένα μόνο κεφαλαίο γράμμα, όπως φαίνεται στον πίνακα 2.1 και δεν αντιστοιχεί πάντα στο πρώτο γράμμα της πρώτης ονομασίας.

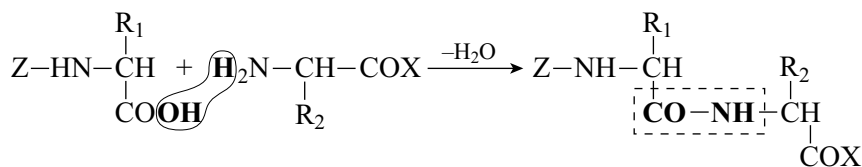
Ο συμβολισμός με ένα γράμμα διέπεται από το ακόλουθο σκεπτικό. Αν με ένα συγκεκριμένο γράμμα ξεκινάει ένα μόνο αμινοξύ τότε το αμινοξύ συμβολίζεται με το αρχικό του, π.χ. η κυστεΐνη Cysteine με C. Αν με το ίδιο γράμμα ξεκινούν περισσότερα από ένα αμινοξέα τότε με το ίδιο γράμμα συμβολίζεται το πιο κοινό από τα δύο αμινοξέα, π.χ. ανάμεσα στη γλυκίνη και γλουταμίνη το πιο κοινό είναι η γλυκίνη άρα αυτή ονομάζεται G ενώ η γλουταμίνη με Q (η τρίτη κατηγορία). Από τα αμινοξέα Alanine και Arginine η αλανίνη με A και η αργινίνη με R. Η τρίτη κατηγορία είναι εκείνη που τα αμινοξέα έχουν ονομασθεί με κάποιο γράμμα που χαρακτηρίζει το αμινοξύ π.χ. η τρυπτοφάνη συμβολίζεται με W, η τυροσίνη με Y, η αργινίνη με R.

2.2.2 Πεπτιδικός δεσμός

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως από την υδρόλυση των πρωτεϊνών παίρνουμε α-αμινοξέα.

Πώς συνδέονται όμως αυτά και σχηματίζουν πρωτεΐνες;

Πρώτος ο Emil Fischer βρήκε ότι τα αμινοξέα ενώνονται μεταξύ τους με απόσπαση νερού και σχηματισμό αμιδικού δεσμού.



Το προϊόν συμπύκνωσης των δύο αμινοξέων ονομάζεται διπεπτίδιο και ο αμιδικός δεσμός που τα ενώνει **πεπτιδικός δεσμός**.

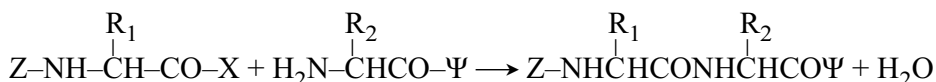
Δύο αμινοξέα ενωμένα με πεπτιδικό δεσμό αποτελούν το διπεπτίδιο, τρία αμινοξέα με δύο πεπτιδικούς δεσμούς το τριπεπτίδιο, δέκα αμινοξέα με εννέα πεπτιδικούς δεσμούς, το δεκαπεπτίδιο, κ.λπ.

Πολυπεπτίδια και πρωτεΐνες

Γενικά πολυμερή αμινοξέων μέχρι και 6.000 M.B., όπως π.χ. είναι το μονομερές της ινσουλίνης (με 51 αμινοξέα), ονομάζονται πολυπεπτίδια, ενώ πάνω από 6.000 M.B. πρωτεΐνες.

2.3 Μέθοδοι σύζευξης αμινοξέων - στρατηγική σύνθεσης πεπτιδίων

Για το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού μεταξύ δύο αμινοξέων είναι αναγκαία η προστασία της καρβοξυλομάδας του ενός αμινοξέος και της αμινομάδας του άλλου με ταυτόχρονη ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος που πρόκειται να σχηματίσει τον πεπτιδικό δεσμό με την ελεύθερη αμινομάδα του άλλου αμινοξέος.



όπου **Z**, **Ψ**: οι προστατευτικές ομάδες της αμινομάδας και καρβοξυλομάδας των αντιστοιχών αμινοξέων

X: η ομάδα που ενεργοποιεί την προς αντίδραση καρβοξυλομάδα του αμινοξέος.

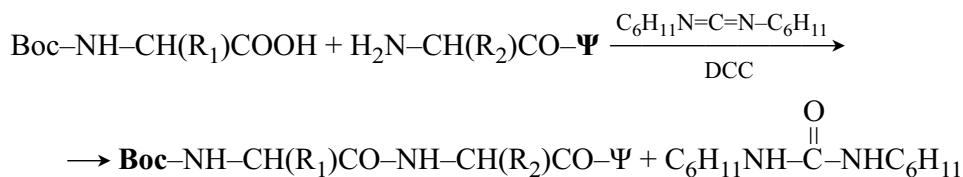
Για τη σύνθεση πεπτιδίων από τα αντίστοιχα αμινοξέα (σύζευξη αμινοξέων και πεπτιδίων) υπάρχουν πάρα πολλές μέθοδοι, πάνω από σαράντα. Από αυτές η μέθοδος του **δικυκλοεξυλοκαρβοδιμιδίου**, η **μέθοδος Woodward**, των **ενεργών εστέρων** (π- νιτροφαινυλεστέρων, εστέρων του **N-υδροξυ-ηλεκτριμιδίου**, **O-νιτροφαινυλοσουλφαινυλεστέρων**) και των **αζιδίων**, είναι οι πιο γνωστές και οι πιο εύχρηστες.

Όλες οι μέθοδοι πεπτιδικής σύζευξης που αναφέρθηκαν βασίζονται στην ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας προς αντίδραση.

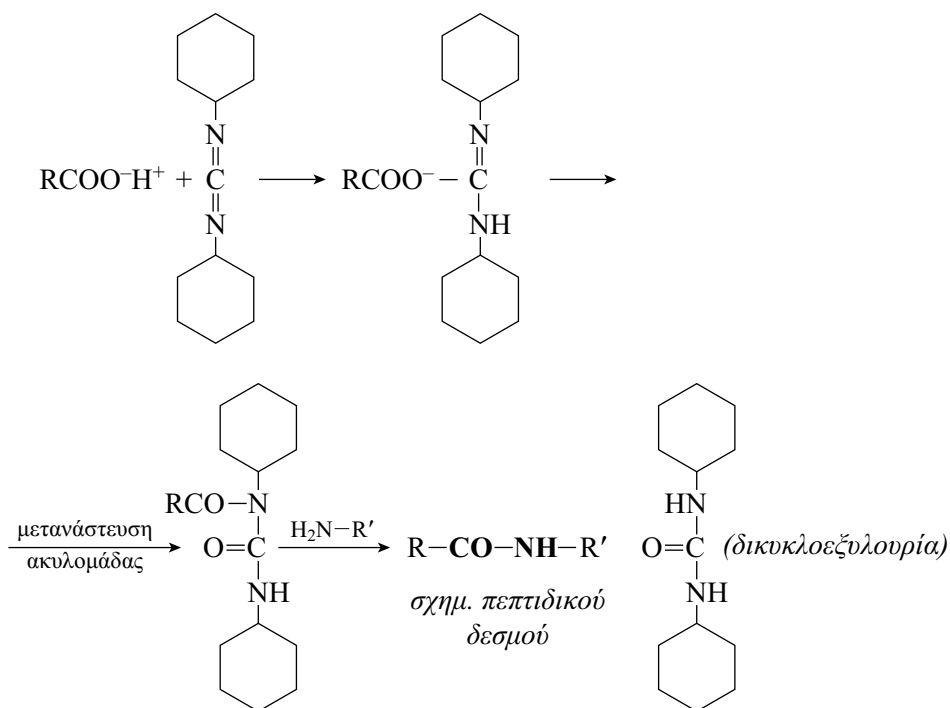
Από όλες αυτές τις μεθόδους σύζευξης πεπτιδίων θα αναφέρουμε μερικές, όπως τη μέθοδο του δικυκλοεξυλοκαρβοδιμιδίου (DCC) και των ενεργών εστέρων (π- νιτροφαινυλεστέρων και εστέρων του N-υδροξυηλεκτριμιδίου), των μικτών ανυδριτών που χρησιμοποιούνται πιο συχνά. Παράλληλα θα αναφέρουμε και τις πιο γνωστές αμινο- και καρβοξυ- προστατευτικές ομάδες.

2.3.1 Μέθοδος του δικυκλοεξυλοκαρβοδιμιδίου (DCC)

Η μέθοδος των καρβοδιμιδίων στην πεπτιδική σύνθεση εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1955 από τους Sheehan και Hess. Το δικυκλοεξυλοκαρβοδιμιδίο είναι μέχρι σήμερα το πιο διαδεδομένο αντιδραστήριο. Η αντίδραση γίνεται στους 0 °C και σε διαλύτες απόλυτο διμεθυλοφορμαμίδιο, οξικό αιθυλεστέρα και διχλωρομεθάνιο. Χρησιμοποιούνται ισομοριακές ποσότητες DCC και των παραγώγων των δύο αμινοξέων.



Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στο σχήμα 2.2.

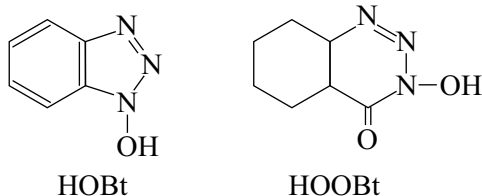


Σχ. 2.2. Σύνθεση διπεπτιδίου με τη μέθοδο του DCC.

Η ευρεία χρήση του οφείλεται στο χρόνο αντίδρασης που είναι μικρός και στις μεγάλες συνήθως αποδόσεις. Μειονέκτημα της μεθόδου του DCC είναι η τάση που έχει το πολύ ενεργό ενδιάμεσο να σχηματίζει οξαζολόνη, με αποτέλεσμα τη ρακεμείωση και σχηματισμό N-ακυλουρίας που δύσκολα απομακρύνεται.

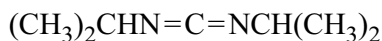
Κατά καιρούς χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι διαλύτες και ασθενείς βάσεις, π.χ. N-μεθυλομορφολίνη, για τον περιορισμό του σχηματισμού N-ακυλουρίας.

Η σημαντικότερη όμως βελτίωση της μεθόδου του DCC έγινε με τη χρήση πυρηνόφιλων υδροξυπαραγώγων του τύπου X-OH. Απ' αυτά το πλέον διαδεδομένο είναι το 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο (HOBt) και η 3-υδροξυ-4-οξο-3,4 διυδρο-1,2,3,-βενζοτριαζίνη (HOObt).



Η μέθοδος DCC/HOBt χρησιμοποιείται κυρίως στην κατά τμήματα σύζευξη πεπτιδίων.

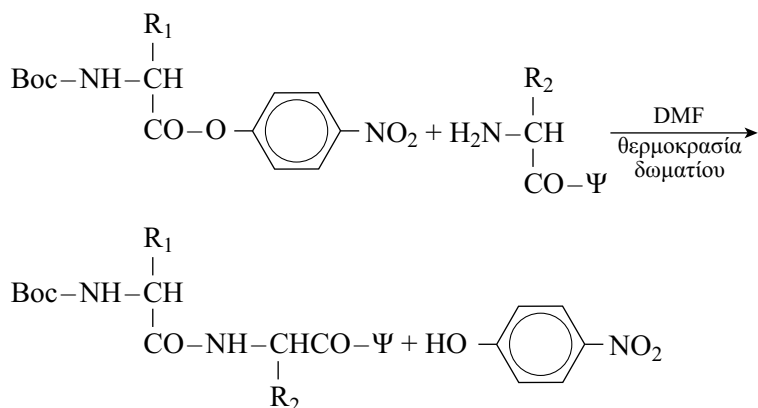
Το DCC χρησιμοποιείται στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση μόνο όταν έχουμε Boc|Bz| προστατευτικές ομάδες. Αντίθετα όταν χρησιμοποιούμε Fmoc|Bu⁺ που δημιουργούνται προβλήματα με την δικυκλοεξυλουρία (δυσδιάλυτη) δεν ενδείκνυται η χρήση του DCC. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούμε δισοπροπυλοκαρβοδιμίδιο (DIC)



το οποίο αντιδρά επίσης με HOBt και μάλιστα ταχύτερα και με μεγαλύτερες αποδόσεις, η δε ουρία που σχηματίζεται απομακρύνεται πολύ εύκολα.

2.3.2 Μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων

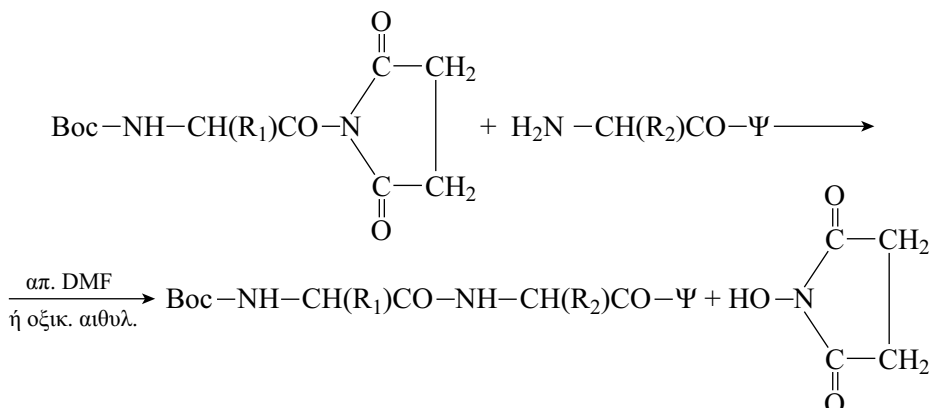
Η ενεργοποίηση της προς αντίδραση καρβοξυλομάδας του αμινοξέος με τη μέθοδο αυτή γίνεται σε ξεχωριστό στάδιο. Η καρβοξυλομάδα του N-προστατευμένου αμινοξέος μετατρέπεται σε π-νιτροφαινυλεστέρα με ισομοριακή ποσότητα π-νιτροφαινόλης, ο οποίος παρασκευάζεται και απομονώνεται σε καθαρή κατάσταση. Στη συνέχεια ο εστέρας του συγκεκριμένου αμινοξέος αντιδρά με την αμινομάδα του άλλου αμινοξέος προς σχηματισμό του αντίστοιχου πεπτιδίου. Η αντίδραση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με διαλύτη απόλυτο DMF, οξικό αιθυλεστέρα ή απόλυτο τετραϋδροφουράνιο.



Η μέθοδος των π-νιτροφαινυλεστέρων και γενικά των ενεργών εστέρων μειονεκτεί έναντι άλλων μεθόδων πεπτιδικής σύζευξης στο ότι ο χρόνος αντίδρασης είναι αρκετά μεγάλος, 24-72 ώρες. Αντίθετα, έχει το πλεονέκτημα ότι δε λαμβάνεται καθόλου ρακεμικό προϊόν.

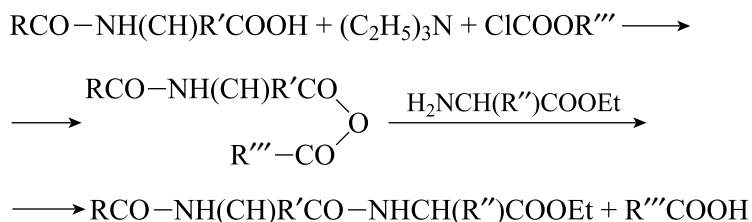
2.3.3 Μέθοδος των εστέρων με N-υδροξυ-ηλεκτριμίδιο

Με τη μέθοδο αυτή, όπως και με τους π-νιτροφαινυλεστέρες, η προς αντίδραση καρβοξυλομάδα ενεργοποιείται, με το σχηματισμό εστέρα, με το N-υδροξυ-ηλεκτριμίδιο. Οι εστέρες αυτοί παρασκευάζονται εύκολα, με καλές αποδόσεις και τις πιο πολλές φορές λαμβάνονται σε κρυσταλλική μορφή.



2.3.4 Μέθοδος των μικτών ανυδριτών

Από τους μικτούς ανυδρίτες που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση πεπτιδίων μεγάλη εφαρμογή έχουν οι ανυδρίτες των N-ακυλιωμένων αμινοξέων με ημιεστέρες του ανθρακικού ή παράγωγα εστέρων οργανικών και ανόργανων οξέων. Παράδειγμα τέτοιου εστέρα είναι ο χλωρο-μυρμηγκικός ισοβουτυλεστέρας. Η αντίδραση σύζευξης γίνεται σε απόλυτο τετραϋδροφουράνιο.



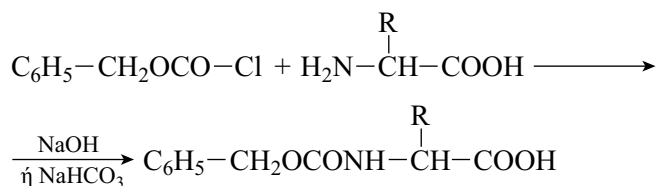
Η μέθοδος των μικτών ανυδριτών παρουσιάζει ένα βασικό μειονέκτημα που είναι ο σχηματισμός ρακεμικού προϊόντος. Η ρακεμείωση γενικά οφείλεται στο σχηματισμό **αζλακτονών**.

2.3.5 Ομάδες για την προστασία της αμινομάδας

Για την προστασία της αμινομάδας χρησιμοποιούνται κυρίως η καρβοβενζοξυομάδα (Z), η τριτοταγής βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (t. Boc), η τοζυλο-, η τρίτυλο-, η μεθυλοτρίτυλο-, η νιτροφαινυλοσουλφονυλ-, η τριφθοροακετυλομάδα και η 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc).

Την **καρβοβενζοξυομάδα** εισήγαγαν οι Bergmann και Ζέρβας το 1932. Η ομάδα αυτή υπερτερεί ακόμη και σήμερα έναντι άλλων προστατευτικών ομάδων γιατί είναι εύκολη η εισαγωγή της, δεν έχουμε σχηματισμό ρακεμικού προϊόντος και η απόδοση σε καρβοβενζοξυαμινοξέα είναι μεγάλη.

N-Καρβοβενζοξυαμινοξέα λαμβάνονται με επίδραση καρβοβενζοξυχλωριδίου στα αντίστοιχα αμινοξέα σε υδατικό διάλυμα NaOH ή NaHCO₃.

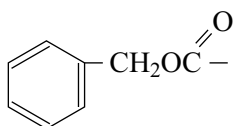


Η απομάκρυνση της καρβοβενζοξυομάδας γίνεται με υδρογόνο/Pd, άνυδρο HF ή HBr/CH₃COOH.

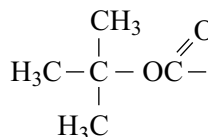
Τριτοταγής βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (t. Boc)

Η τριτοταγής βουτυλοξυκαρβονυλομάδα σαν προστατευτική ομάδα της αμινομάδας των αμινοξέων, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους McKay και Albertson.

Η εισαγωγή της Boc ομάδας γίνεται σχετικά εύκολα με την επίδραση του τριτοταγούς βουτυλοξυκαρβονυλο-χλωριδίου, του αντίστοιχου αζιδίου ή του τριτοταγούς βουτυλοξυκαρβονυλο-π-νιτροφαινυλεστέρα στο αντίστοιχο αμινοξύ. Εξίσου εύκολη είναι και η απομάκρυνση της Boc-ομάδας από τα αντίστοιχα αμινοξέα ή πεπτιδία. Η Boc-βουτυλοξυκαρβονυλο-ομάδα απομακρύνεται με ήπια μέσα, π.χ. HCl/CH₃COOH ή CF₃COOH, και χρησιμοποιείται, κυρίως, σε πεπτιδικές συνθέσεις με θειοαμινοξέα.



καρβοβενζοξυ- ομάδα (Z)

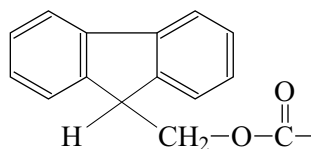


τριτ. βουτυλοξυ-καρβονυλο- ομάδα (t-Boc)

Fmoc ομάδα

Τελευταία, χρησιμοποιείται πολύ για την προστασία της αμινομάδας αμινοξέων η 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc).

Η απομάκρυνση της ομάδας αυτής γίνεται με ασθενείς βάσεις, πιπεριδίνη ή μορφολίνη.



9 - φλουορενυλομεθυλοξυ -
καρβονυλομάδα (Fmoc)

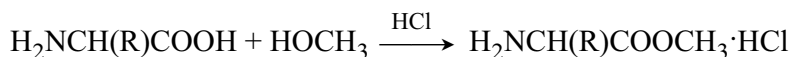
2.3.6 Ομάδες για την προστασία της καρβοξυλομάδας

Η προστασία της α-καρβοξυλομάδας των αμινοξέων γίνεται, κυρίως με εστεροποίηση. Χρησιμοποιούνται συνήθως οι μεθυλ-, αιθυλ- και οι βενζυλεστέρες.

Μεθυλ- και αιθυλεστέρες

Γενικά οι μεθυλ- και αιθυλεστέρες των αμινοξέων δεν διαφέρουν, τουλάχιστον όσον αφορά στον τρόπο παρασκευής τους.

Η εστεροποίηση γίνεται με περίσσεια της αντίστοιχης αλκοόλης παρουσία οξέος σαν καταλύτη:



Όπως φαίνεται και στην αντίδραση οι εστέρες λαμβάνονται σαν υδροχλωρικά άλατα.

Η υδρόλυση των εστέρων (δηλαδή η αποπροστασία της καρβοξυλομάδας) γίνεται συνήθως με άλκαλι.

Βενζυλεστέρες

Οι βενζυλεστέρες χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά από τον Bergmann. Είναι σταθεροί στην επίδραση οξέων όπως $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{COOH}$ ή CF_3COOH που χρησιμοποιούνται για την αποπροστασία της αμινομάδας.

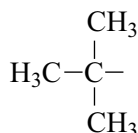
Η απομάκρυνση της βενζυλομάδας γίνεται με καταλυτική υδρογόνωση, με Na σε υγρή αμμωνία ή με $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$.

2.4 Προστασία των πλευρικών ομάδων

Οι πλευρικές ομάδες είναι απαραίτητο να προστατευθούν, ώστε να αποφευχθεί η συμμετοχή τους σε ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις, κάτι που θα οδηγήσει στη δημιουργία παραπροϊόντων που απομακρύνονται δύσκολα. Οι προστατευτικές ομάδες, που χρησιμοποιούνται, θα πρέπει να είναι σταθερές στις συνθήκες αποπροστασίας του N-τελικού και του C-τελικού αμινοξέος και να απομακρύνονται εύκολα μετά το τέλος της σύνθεσης, κάτω από συνθήκες που δεν επηρεάζουν το πεπτιδίο.

Στη σύνθεση σε στερεή φάση, οι περισσότερες προστατευτικές ομάδες συνήθως απομακρύνονται ταυτόχρονα με την αποκόλληση του πεπτιδίου από τη ρητίνη. Όταν χρησιμοποιείται η Fmoc-ομάδα για την προστασία της α-αμινομάδας, οι πλευρικές προστατευτικές ομάδες είναι αναγκαίο να είναι σταθερές στην πιπεριδίνη, ενώ αν χρησιμοποιείται η tBoc-ομάδα, οι ομάδες θα πρέπει να είναι σταθερές στο τριφθοροξικό οξύ (TFA). Ομάδες που χρησιμοποιούνται συχνά στην πεπτιδική σύνθεση για την προστασία των πλευρικών ομάδων των διαφόρων αμινοξέων είναι:

2.4.1 Τριτοπαγής βουτυλ-ομάδα (Bu^t)

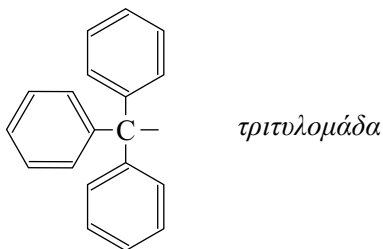


Πρόκειται για την πιο συνηθισμένη προστατευτική ομάδα, σε συνδυασμό με την Fmoc-ομάδα, του ασπαραγινικού και γλουταμινικού οξέος, της τυροσίνης, της σερίνης και της κυστεΐνης. Εισάγεται εύκολα και απομακρύνεται με αραιό διάλυμα TFA.

2.4.2 Τριτοπαγής βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (t-Boc)

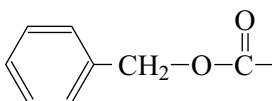
Πρόκειται για την κύρια προστατευτική ομάδα της λυσίνης και της τρυπτοφάνης, σε συνδυασμό με την Fmoc-ομάδα. Επίσης χρησιμοποιείται και για την προστασία της αργινίνης και της ιστιδίνης. Απομακρύνεται με 30% TFA σε διχλωρομεθάνιο ή με $\text{HClHCH}_3\text{COOH}$.

2.4.3 Τριτυλομάδα (Ttt)



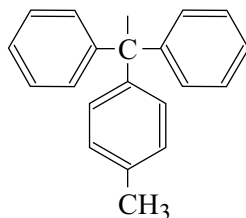
Αποτελεί τη βασική προστατευτική ομάδα της ασπαραγίνης και της γλουταμίνης σε συνδυασμό με την Fmoc-ομάδα. Χρησιμοποιείται επιτυχώς και για την κυστεΐνη, την ιστιδίνη, τη σερίνη και τη θρεονίνη. Είναι ευαίσθητη στο TFA και απομακρύνεται με επίδραση διαλύματος TFA:διχλωροαιθάνιο 50:50 (v/v).

2.4.4 Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (Z ή Cbz)



Η Cbz- ή Z-ομάδα χρησιμοποιείται επίσης για την προστασία της ιστιδίνης, της αργινίνης και της λυσίνης. Απομακρύνεται με καταλυτική υδρογόνωση, σε κανονικές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας, ή με αναγωγή με διάλυμα Na/υγρή αμμωνία και επίδραση ισχυρών οξέων, όπως HCl ή HBr/οξικό οξύ.

2.4.5 Μεθυλοτριτυλομάδα (Mtt)



μεθυλο-τριτυλομάδα

Χρησιμοποιείται για την προστασία της ιστιδίνης, της ασπαραγίνης, της γλουταμίνης, της λυσίνης και της κυστεΐνης. Απομακρύνεται κάτω από ήπιες συνθήκες (1% TFA σε διχλωρομεθάνιο ή οξικό οξύ: τριφθοροαιθανόλη: διχλωρομεθάνιο 1:2:7) που δεν επηρεάζουν ομάδες, όπως τη Bu^t , που συνήθως χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με την Fmoc-ομάδα και κατά συνέπεια μπορεί να εφαρμοστεί και στη σύνθεση κυκλικών πεπτιδίων.

2.5 Σύνθεση πεπτιδίων σε διάλυμα

Επιλέγοντας κάθε φορά τις μεθόδους σύζευξης, προστασίας και αποπροστασίας της αμινομάδας και καρβοξυλομάδας είναι δυνατό να συνθέσουμε ένα πεπτίδιο αρχίζοντας από το C-τελικό αμινοξύ. Η σύνθεση πεπτιδίων μ' αυτό τον τρόπο είναι γνωστή σαν κλασική μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων ή σύνθεση πεπτιδίων σε διάλυμα. Γενικά όταν πρόκειται για πεπτίδια με 10-15 αμινοξέα, η πεπτιδική αλυσίδα μπορεί να γίνει πράγματι με τη σταδιακή προσθήκη των κατάλληλων αμινοξέων αρχίζοντας από το C-τελικό. Για πεπτίδια όμως με περισσότερα από 20 ή 30 αμινοξέα, μπορούμε να συνθέσουμε αρχικά, τμήματα της πεπτιδικής αλυσίδας και στη συνέχεια να τα ενώσουμε στο επιθυμητό πεπτίδιο με τις γνωστές μεθόδους σύζευξης.

2.6 Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση

Εκτός από τη σύνθεση πεπτιδίων σε διάλυμα με τις μεθόδους που αναφέρ-

θηκαν, έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον κυρίως τα τελευταία χρόνια η σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση.

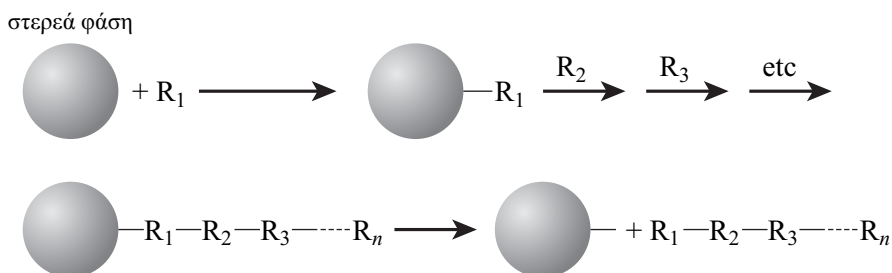
Οι χημικοί στην προσπάθειά τους να συνθέσουν το ταχύτερο δυνατόν πεπτίδια με βιολογικό ενδιαφέρον (πεπτιδοορμόνες, πεπτίδια, διαβιβαστές νευρικών μηνυμάτων κ.λπ.) προκειμένου να μελετήσουν τη σχέση δομής και βιολογικής δραστηρότητάς τους, χρησιμοποίησαν τη μέθοδο σύνθεσης σε **στερεά φάση** (solid state peptide synthesis).

Η μέθοδος αυτή όπως και η κλασική βασίζεται στη σταδιακή αύξηση της πεπτιδικής αλυσίδας από το C-τελικό άκρο, το οποίο αυτή τη φορά είναι ακινητοποιημένο σε αδιάλυτο φορέα (στερεά φάση). Μετά το τέλος της σύνθεσης το πεπτίδιο αποχωρίζεται από το φορέα με ειδικά αντιδραστήρια.

Η διαφορά της μεθόδου αυτής από την κλασική μέθοδο έγκειται ακριβώς στη χρήση του αδιάλυτου φορέα (υπόστρωμα), όπου συνδέεται το καρβοξυτελικό αμινοξύ, και φυσικά στην αδυναμία απομόνωσης, επεξεργασίας και καθαρισμού καθενός πεπτιδικού τμήματος πριν από την ολοκλήρωση της σύνθεσης.

2.6.1 Στερεά φάση

Τη στερεά φάση αποτελεί πολυμερές με χαρακτηριστική ομάδα ή μονομερές τέτοιο, ώστε να μπορεί να αντιδράσει με την καρβοξυλομάδα του C-τελικού αμινοξέος της πεπτιδικής αλυσίδας που πρόκειται να συντεθεί. Στο σχήμα 2.3 φαίνεται διαγραμματικά η σύνθεση πολυπεπτιδίου σε στερεά φάση.



Σχ. 2.3. Μονάδες μονομερούς για σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση.

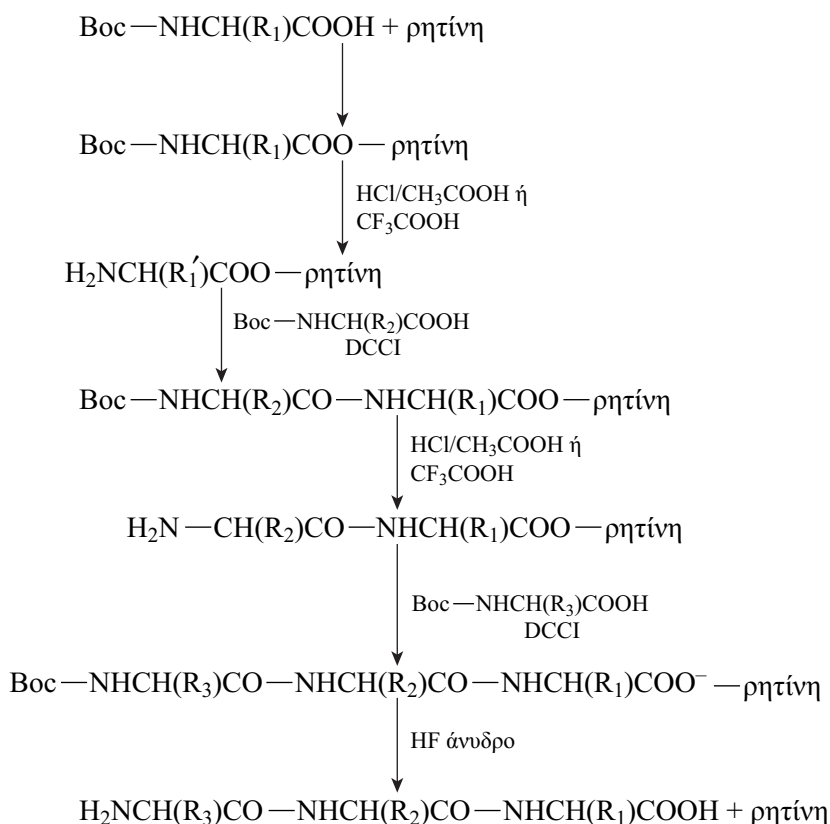
Το προϊόν της αντίδρασης του προστατευμένου C-τελικού αμινοξέος και του πολυμερούς αποτελεί το πρώτο και βασικό προϊόν στη μέθοδο της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση. Στη συνέχεια η προσθήκη των άλλων αμινοξέων στο σύμπλοκο **καρβοξυτελικό αμινοξύ-πολυμερές** γίνεται όπως και στην κλασική μέθοδο (δηλαδή αποπροστασία της $-\text{NH}_2$ του N-τελικού πε-

πτιδίου και σύζευξη με το αμέσως επόμενο αμινοξύ).

Στη σύνθεση αυτή υπάρχει, φυσικά, κάποιος περιορισμός όσον αφορά στη χρήση των προστατευτικών ομάδων και κατ' επέκταση των αντιδραστηρίων για την απομάκρυνσή τους καθώς και των μεθόδων σύζευξης. Η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων θα πρέπει να γίνεται με ήπια μέσα, όπως $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{COOH}$, CF_3COOH , ώστε να μη προσβάλλεται ο εστερικός δεσμός του καρβοξυτελικού αμινοξέος και του πολυμερούς. Ανάλογα ισχύουν και για τις μεθόδους σύζευξης.

Στο σχήμα 2.4 φαίνεται διαγραμματικά πώς γίνεται η σύζευξη του πολυμερούς με το C-τελικό αμινοξύ και στη συνέχεια η σύνθεση μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας και η απομάκρυνσή της από το πολυμερές (ρητίνη).

Με τη μέθοδο σύνθεσης σε στερεά φάση έχουν συντεθεί με επιτυχία η ριβονουκλεάση A με 24 αμινοξέα, η ινσουλίνη που αποτελείται από δύο αλυ-



Σχ. 2.4. Σύνθεση πεπτιδίου σε στερεά φάση. Γενικές αρχές - αντιδράσεις.

σίδες με 21 και 30 αμινοξέα αντίστοιχα, καθώς και άλλες πεπτιδορμόνες. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η επιλογή της ρητίνης (πολυμερούς) σαν στερεάς φάσης αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες για επιτυχημένη σύνθεση με καλή απόδοση.

2.6.2 Πολυμερή που χρησιμοποιούνται σαν στερεά φάση και ιδιότητές τους

Το χρησιμοποιούμενο πολυμερές θα πρέπει να είναι σταθερό στους εκάστοτε χρησιμοποιούμενους διαλύτες και μεθόδους σύζευξης. Επιπλέον η στερεοχημική δομή του πρέπει να διευκολύνει την απομάκρυνση των αντιδραστηρίων με απλές διεργασίες, όπως είναι το πλύσιμο και η διήθηση.

Ένα από τα πολυμερή που πληρούν τους παραπάνω όρους και τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε πάρα πολλές συνθέσεις, είναι η ρητίνη που παρασκευάζεται από το συμπολυμερισμό στυρολίου και 2% διβινυλοβενζολίου, με κόκκους 200-400 Mesh (20-80 μm) γνωστή και ως ρητίνη **Merrifield** που τη χρησιμοποίησε πρώτος. Ο Merrifield πήρε το Νόμπελ γι' αυτή τη ρητίνη και την πρωτοποριακή δουλειά στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση. Το συμπολυμερές αυτό αποτελείται από αλυσίδες πολυστυρολίου όπου ανά πενήντα άτομα άνθρακα ενώνονται με διβινυλοβενζόλιο και δημιουργείται ένα τρισδιάστατο πλέγμα αδιάλυτο στους συνήθεις οργανικούς διαλύτες.

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται και έχει μεγάλη επιτυχία στη σύνθεση πολλών πεπτιδίων σε στερεά φάση, η ρητίνη του **χλωρο-τρίτυλο-χλωριδίου**.

2.6.3 Μέθοδοι σύζευξης και προστασίας

Ανάλογα με το είδος της ρητίνης που θα χρησιμοποιήσουμε σαν στερεά φάση, θα πρέπει να επιλέξουμε τις μεθόδους σύζευξης και προστασίας της αμινομάδας των αμινοξέων που θα χρησιμοποιήσουμε κατά τη σύνθεση όσο και των πλευρικών ομάδων τους.

Για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση χρησιμοποιούνται κυρίως η μέθοδος των ενεργών εστέρων (π-νιτροφαινυλεστέρων, εστέρων του Ν-υδροξυηλεκτριμιδίου) και η μέθοδος του δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου που αναφέρθηκαν προηγουμένως στη σύνθεση σε διάλυμα. Σαν αμινοπροστατευτική ομάδα των αμινοξέων χρησιμοποιείται, κυρίως, η Boc ή Fmoc ομάδα ανάλογα με τη ρητίνη που χρησιμοποιείται σαν στερεά φάση. Για τις ρητίνες Merrifield χρησιμοποιούμε Boc αμινοξέα, ενώ για τη ρητίνη του 2-χλωροτριτυλοχλωριδίου Fmoc-αμινοξέα.

2.6.4 Απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη

Για την απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη Merrifield χρησιμοποιείται κυρίως το άνυδρο HF. Η μέθοδος αυτή πρωτοχρησιμοποιήθηκε το 1967 από τον Sakakibara και τους συνεργάτες του. Με το άνυδρο HF απομακρύνονται ταυτόχρονα και όλες οι προστατευτικές ομάδες (άμινο τελικές και πλευρικές ομάδες). Εκτός από τη μέθοδο του HF, για τον αποχωρισμό του πεπτιδίου από τη ρητίνη υπάρχουν και άλλες μέθοδοι μικρότερης σημασίας, όπως είναι η σαπωνοποίηση με NaOH σε 90% αιθανόλη.

Η σαπωνοποίηση μειονεκτεί έναντι του HF στο ότι η απόδοση σε ελεύθερο πεπτίδιο μειώνεται στο 50% με ταυτόχρονο κίνδυνο ρακεμείωσης και διάσπασης ορισμένων πεπτιδικών δεσμών ευαίσθητων σε άλκαλι. Μικρότερη εφαρμογή βρίσκει, επίσης, η μέθοδος της μετεστεροποίησης και της υδραζινόλυσης.

Για την απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη του 2-χλωροτρίτυλοχλωριδίου χρησιμοποιούνται ασθενείς όξινες συνθήκες π.χ. μίγμα τριφθοροαιθανόλης και οξικού οξέος σε διχλωρομεθάνιο.

2.7 Σύνοτος τρόπος γραφής πεπτιδίων - Ονοματολογία

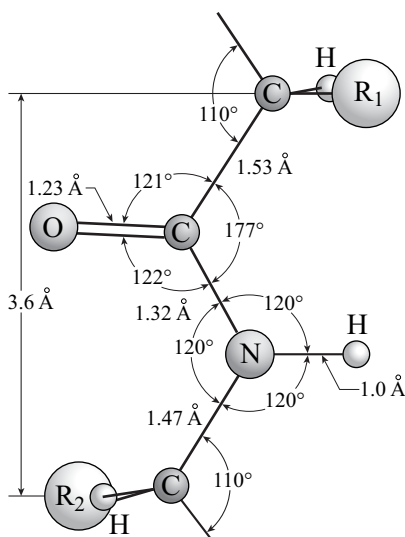
Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε ότι όταν πρόκειται για ένα διπεπτίδιο ή τριπεπτίδιο, είναι εύκολη η αναγραφή του με το συντακτικό του τύπο όπου είναι εμφανής η θέση του αμιδικού δεσμού και των άλλων χαρακτηριστικών ομάδων. Για μεγαλύτερα, όμως, πεπτίδια, όπως οκταπεπτίδια, δεκαπεπτίδια κ.λπ. η γραφή του συντακτικού τύπου είναι μάλλον πολύπλοκη. Η διεθνής επιτροπή βιοχημείας αποφάσισε η γραφή πεπτιδίων, γενικά, να γίνεται χρησιμοποιώντας τη σύντημσή τους από το N-τελικό προς το C-τελικό αμινοξύ. Για το διπεπτίδιο, π.χ., όπου η γλυκίνη είναι το N-τελικό αμινοξύ και έχει ενωθεί με προλίνη με πεπτιδικό δεσμό χρησιμοποιείται η γραφή Gly-Pro ή GP. Πώς ονομάζουμε όμως ένα τέτοιο διπεπτίδιο; Για τα αμινοξέα που συμμετέχουν σε πεπτιδικούς δεσμούς η κατάληξη -υλο ακολουθεί το όνομα του κάθε αμινοξέος. Το διπεπτίδιο Gly-Pro (GP) ονομάζεται γλυκυλο-προλίνη και το τριπεπτίδιο His-Pro-Phe (HPF) ονομάζεται ιστιδυλο-προλυλο-φαινυλαλανίνη.

2.8 Γεωμετρία του πεπτιδικού δεσμού

Όπως είναι γνωστόν, στα οργανικά μόρια οι απλοί δεσμοί έχουν πλήρη

ελευθερία περιστροφής. Στην περίπτωση, π.χ., του αιθανίου, όπου έχουμε πλήρη περιστροφή γύρω από το δεσμό C–C, τα ισομερή εκ περιστροφής θεωρητικά είναι άπειρα. Απ' αυτά, ένα είναι το ισομερές με την πιο σταθερή διαμόρφωση. Οι δύο ακραίες διαμορφώσεις του μορίου είναι γνωστές σαν εκλειπτική και διαβαθμισμένη, οι οποίες, βέβαια, δεν μπορούν να απομονωθούν, γιατί μετατρέπονται πολύ γρήγορα η μια στην άλλη.

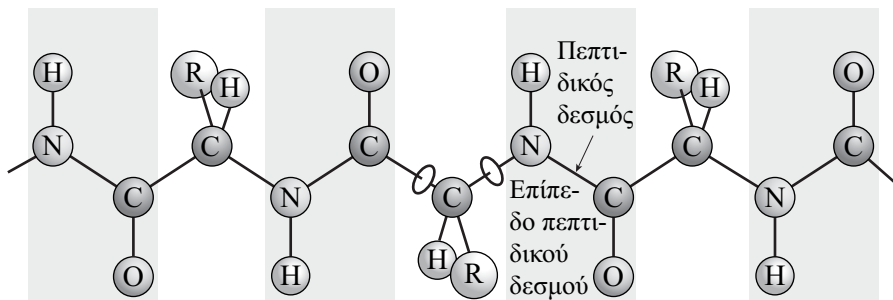
Ο πεπτιδικός σκελετός σε μια πεπτιδική αλυσίδα αποτελείται από απλούς δεσμούς και φυσικά θα περιμέναμε και εδώ έναν άπειρο αριθμό διαμορφωτικών ισομερών. Στην πραγματικότητα όμως, ο πεπτιδικός σκελετός έχει μια μόνο διαμόρφωση κάτω από συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας και pH. Η διαμόρφωση αυτή, γνωστή σαν φυσική διαμόρφωση (native conformation) είναι η πιο σταθερή συνήθως και το μόριο μιας πρωτεΐνης μπορεί να απομονωθεί και να κρατηθεί σ' αυτή τη μορφή. Ποια όμως είναι αυτή η διαμόρφωση; Γύρω στο 1939 οι Pauling και Corey άρχισαν να μελετούν τη δομή των αμινοξέων, διπεπτιδίων, τριπεπτιδίων κ.λπ. σε κρυσταλλική κατάσταση με τη μέθοδο της περίθλασης με ακτίνες X. Από τη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι ο δεσμός C–N σ' έναν πεπτιδικό δεσμό είναι κάτι μεταξύ απλού και διπλού δεσμού και ότι δεν έχουμε ελεύθερη περιστροφή όπως στην περίπτωση του απλού. Οι ίδιοι ερευνητές βρήκαν ότι τα τέσσερα άτομα του πεπτιδικού δεσμού και τα δύο α-άτομα άνθρακα βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο (σχ. 2.5).



Σχ. 2.5. Γωνίες πεπτιδικού δεσμού - επίπεδο.

Το οξυγόνο της καρβonyλομάδας $>C=O$ και το υδρογόνο της $-NH-$ είναι σε θέση *trans*.

Δηλαδή μια πεπτιδική αλυσίδα θα μπορούσε να παρασταθεί με μια σειρά σχετικά σταθερών επιπέδων που ξεχωρίζουν μεταξύ τους με τις ομάδες $-CHR-$ (σχ. 2.6).



Σχ. 2.6. Πεπτιδική αλυσίδα - επίπεδα πεπτιδικών δεσμών.

Σε μια πεπτιδική αλυσίδα π.χ. με 100 αμινοξέα, ανεξάρτητα από το είδος των αμινοξέων, υπάρχουν 300 απλοί δεσμοί στο σκελετό της αλυσίδας και απ' αυτούς μόνο οι 200 παρουσιάζουν ελεύθερη περιστροφή.