Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби

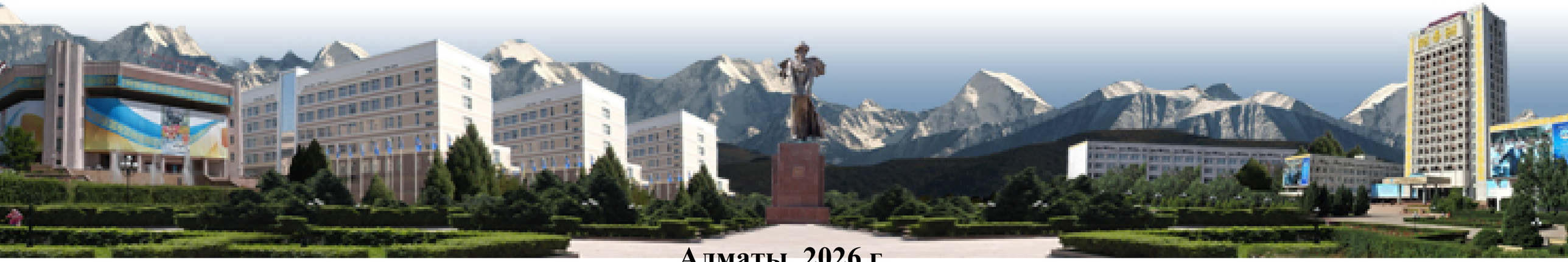
Факультет Химии и Химической Технологии

Лекция 3.
Методология создания пептидной связи для дизайна пептидов, аналогичных природным. Твердофазный метод синтеза пептидов.

Цель:

изучить строение, функции и структурные уровни белков (от первичной до четвертичной структуры), методологию образования пептидных связей, классические методы синтеза пептидов (включая твердофазный метод Меррифилда), а также современные экспериментальные подходы к исследованию первичной структуры белков.

К.х.н., ассоциированный профессор Литвиненко Ю.А



Алматы, 2026 г.

БЕЛКИ (протеины) – высокомолекулярные азотсодержащие органические соединения, мало отличающиеся по элементарному составу, но резко отличающиеся по химическому составу, строению, свойствам, функциям и составляющие основу всего живого — это биополимеры, структурными единицами которых (мономерами) являются аминокислоты, соединенные между собой пептидными связями. 20 аминокислот, из которых построены все белки, называются протеиногенными.

Функции белков:

- Каталитические (ферменты)
- Регуляторные (гормоны)
- Рецепторая (мембранные, цитозольные и др. рецепторы)
- Транспортные (Hb, трансферрин)
- Защитные (Ig, шапероны)
- Сократительные (актин, миозин)
- Структурные (коллаген, эластин)
- Питательные (казеин, овальбумин)

Элементарный состав белков (%)

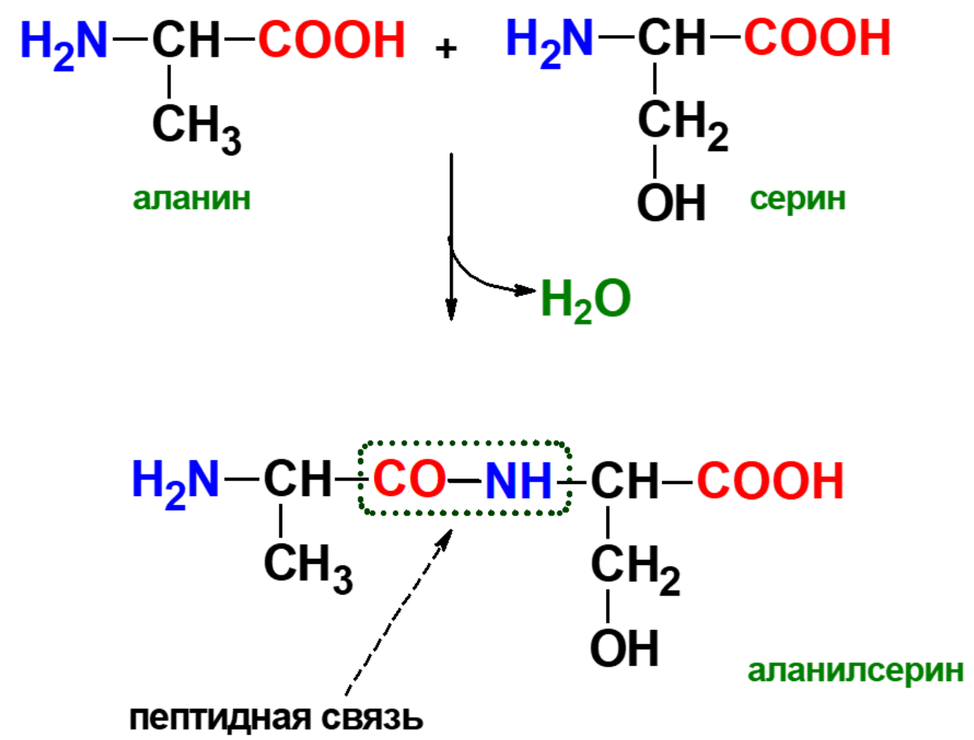
Углерод	50,5-54,5
Кислород	21,5-23,5
Азот	15,0-17,6
Водород	6,5-7,3
Сера	0,5-2,5

Классификация производных аминокислот:

- 2-10 аминокислотных остатков – пептид,
- 10-100 —" — полипептид,
- > 100 —" — белок

Молекулярная масса белков от 10000 до нескольких миллионов.

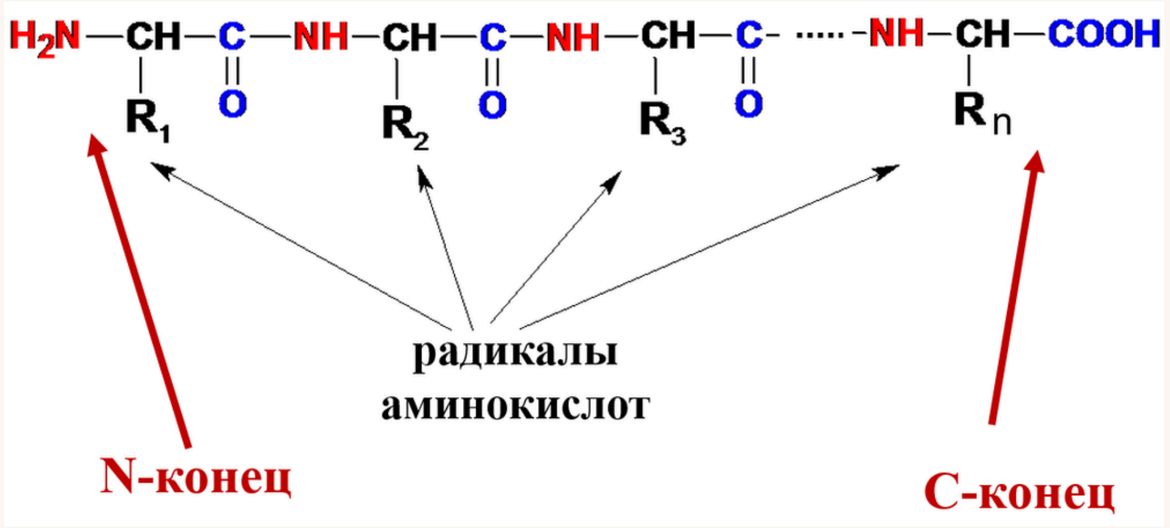
Пептидная связь:



Первичная структура белка – это последовательность аминокислот в полипептидной цепи, соединенных пептидными связями. Связи между аминокислотами ковалентные, очень прочные.

Первичная структура определяет:

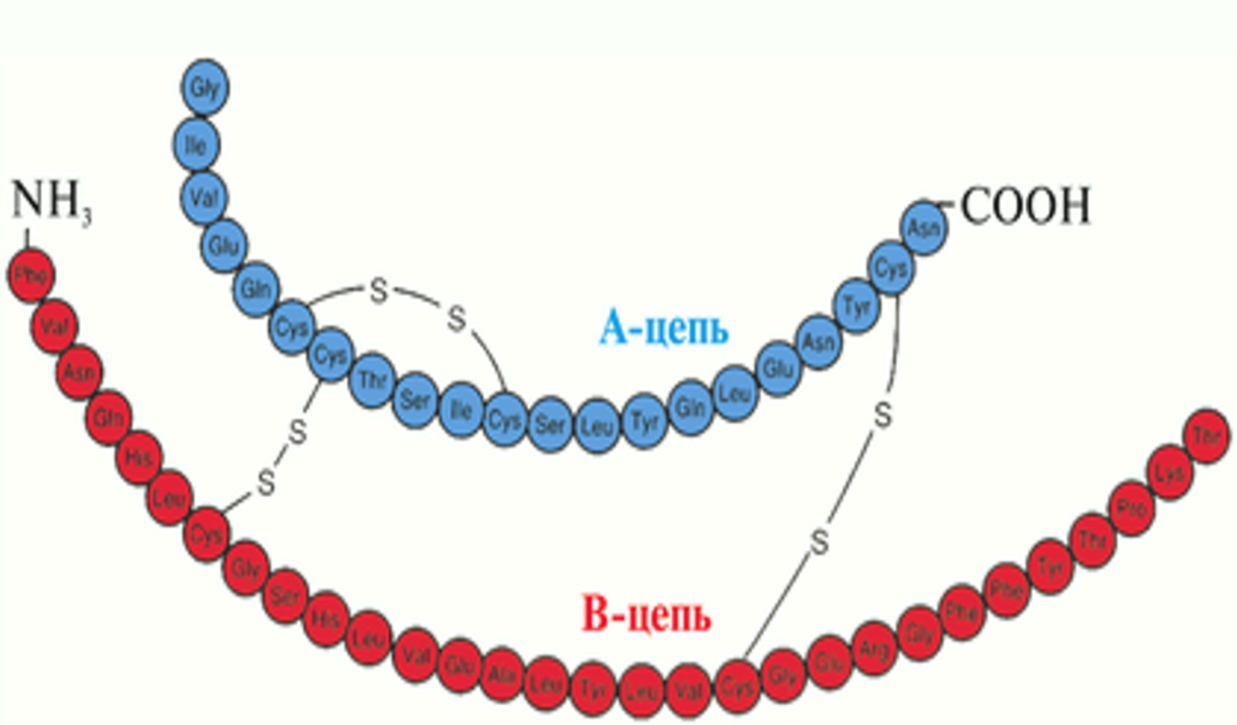
•Физико-химические свойства (размер, массу, растворимость, заряд и т.д.)
•Все последующие уровни структурной организации белка, а следовательно
•Биологическую активность белка
•Видовую и тканевую специфичность белка



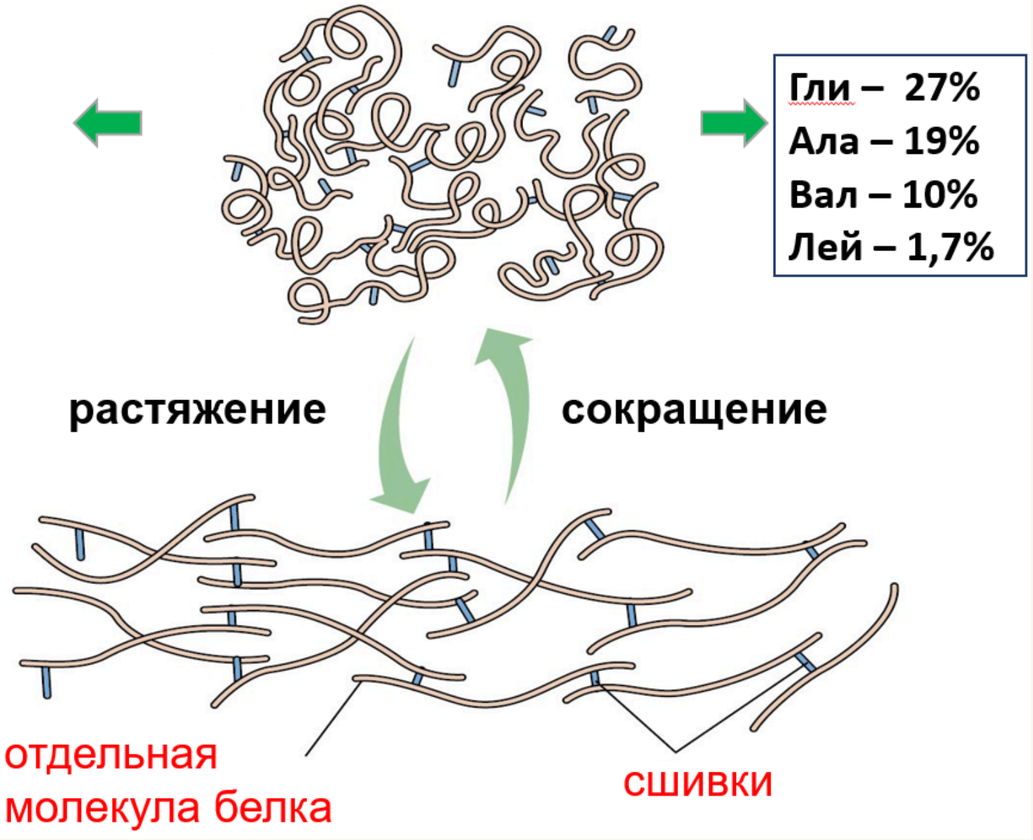
Закономерности первичной структуры:

1.Чем важнее роль белка в процессах жизнедеятельности, тем разнообразнее его аминокислотный состав (и, наоборот, чем примитивнее функция белка, тем беднее его «аминокислотная корзина»)
2.Чем важнее роль белка в процессах жизнедеятельности, тем больше сходство первичных структур гомологичных белков (гомологичные белки – белки, выполняющие одну и ту же функцию у разных видов животных)
3.Чем ближе расположены виды на эволюционной лестнице, тем больше сходство первичных структур гомологичных белков

Строение молекулы инсулина



Строение эластина



Твердофазный метод синтеза пептидов (solid-phase peptide synthesis, SPPS) — это наиболее распространённый способ лабораторного и промышленного получения пептидов, предложенный Р. Брюсом Меррифилдом в 1963 г. (за что он получил Нобелевскую премию по химии в 1984 г.).

Суть метода:

Пептид синтезируется пошагово на нерастворимом носителе (обычно это полимерные смолы, например, полистирол или полиэтиленгликоль-сополимеры). Каждый новый аминокислотный остаток присоединяется к растущей цепи, прочно закреплённой на твёрдой фазе.

Этапы синтеза:

1.Закрепление первой аминокислоты

1.Аминогруппа первой аминокислоты защищена ((например, Fmoc группа).

2.Карбоксильная группа этой аминокислоты ковалентно связывается с функциональными группами на смоле.

2.Деблокирование защитной группы

1.С аминогруппы удаляют защитную группу (например, Fmoc снимают пиперидином).

2.Аминогруппа становится свободной для реакции с новой аминокислотой.

3.Удлинение цепи (циклы конденсации)

1.К свободной аминогруппе присоединяют следующую аминокислоту, защищённую по N-концу и активированную по С-концу (например, в виде активного эфира).

2.После связывания аминокислоты защитная группа снова снимается, и цикл повторяется.

4. Защита боковых цепей

Функциональные группы в боковых радикалах аминокислот (–OH, –NH2, –COOH, –SH и др.) также защищают, чтобы они не вступали в побочные реакции.

5. Завершение синтеза

После сборки всей цепи пептид отщепляют от носителя (обычно сильной кислотой, например, TFA при использовании Fmoc-метода). Одновременно удаляются защитные группы с боковых цепей.

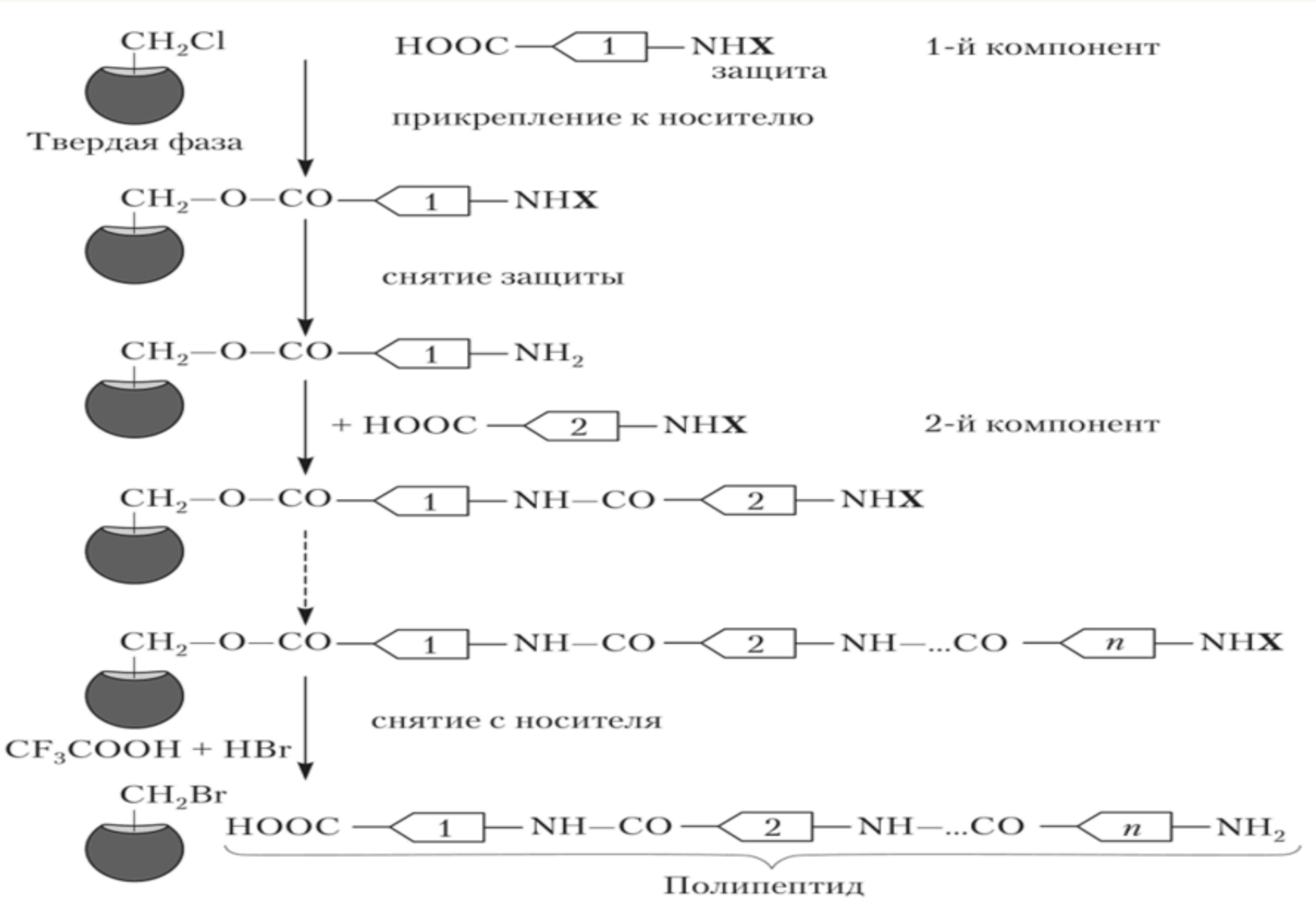
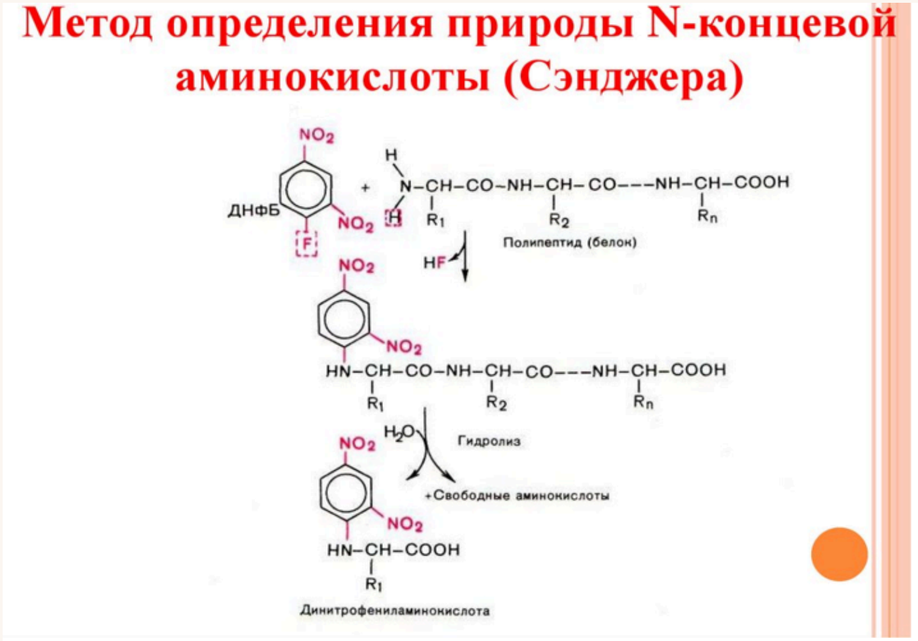


Схема твердофазного синтеза полипептидов

Методы изучения I структуры белка:

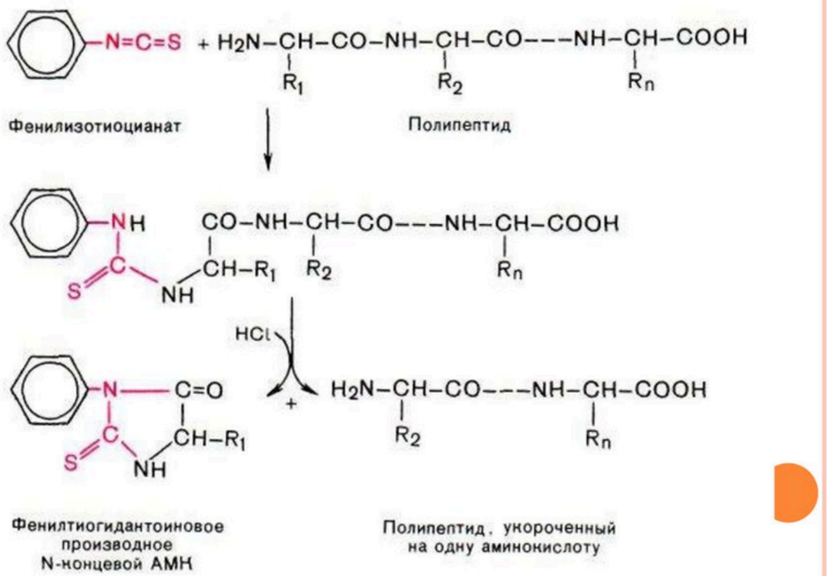
- Методы «меток» – определение концевых аминокислот (методы Сэнджера, Эдмана, Акабори, дансильный)
- Гидролиз
- Хроматография
- Секвенирование



Метод Сэнджера используется для идентификации N-концевой аминокислоты в белках, определения их начальной структуры и идентификации пептидов при их анализе и очистке.

Метод Сэнджера, или секвенирование по Сэнджеру, является биохимическим методом определения N-концевой аминокислоты белка путем его реакции с 2,4-динитрофторбензолом. ДНФБ реагирует со свободной аминогруппой N-концевой аминокислоты белка, образуя 2,4-динитрофенильное производное. После такого взаимодействия полипептид подвергают кислотному гидролизу, при котором все пептидные связи разрываются, но N-концевая аминокислота остается связанной с ДНФБ в виде стабильного 2,4-динитрофениламинокислоты. Полученную 2,4-динитрофениламинокислоту затем выделяют и идентифицируют, что позволяет установить природу N-концевой аминокислоты. Это помогло Фредерику Сэнгеру в определении аминокислотной последовательности инсулина.

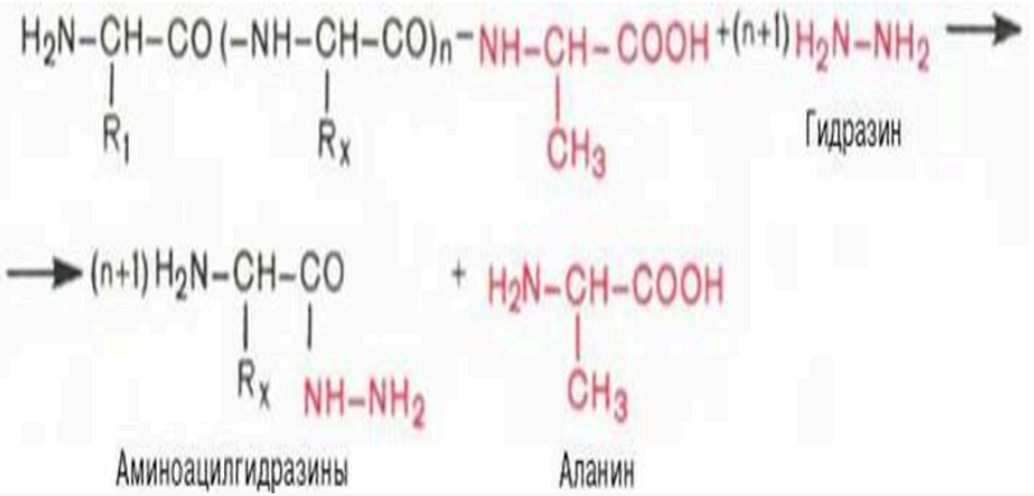
Метод определения природы N-концевой аминокислоты (Эдмана)



Метод Эдмана широко используется в биохимии для определения последовательности аминокислот в белках, так как позволяет последовательно удалять и идентифицировать аминокислоты по одной, двигаясь от N-конца к C-концу белка. Это ключевой инструмент для анализа структуры белков

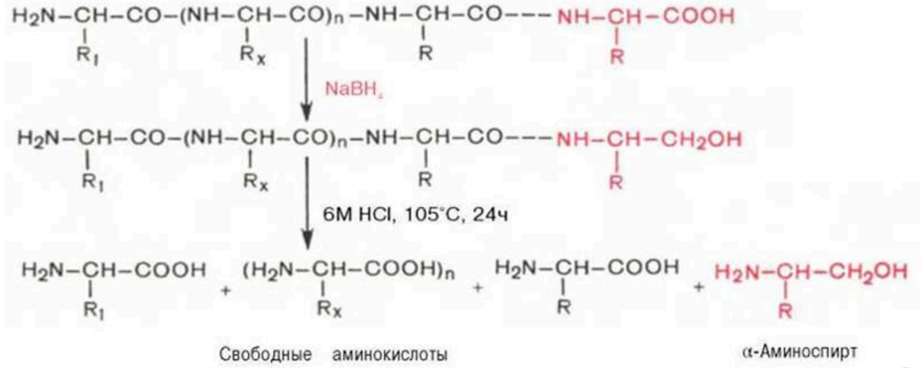
Для определения природы С-концевой аминокислоты часто используют ферментативные методы. Обработка полипептида карбоксипептидазой, которая разрывает пептидную связь с того конца пептида, где содержится свободная COOH-группа, приводит к освобождению С-концевой аминокислоты, природа которой может быть идентифицирована методом хроматографии.

Предложен также химический ***метод Акабори*** (S. Akabori), который основан на гидразинолизе полипептида:



Гидразин, вызывая распад чувствительных к нему пептидных связей полипептида, реагирует со всеми аминокислотами, за исключением С- концевой аминокислоты, поскольку ее карбоксильная группа не участвует в образовании пептидной связи. При этом образуется смесь аминоацилгидразинов и свободной С-концевой аминокислоты. Последнюю после обработки всей смеси ДНФБ отделяют и идентифицируют хроматографически, для чего образовавшиеся динитрофенилпроизводные аминоацилгидразинов предварительно экстрагируют уксусно-этиловым эфиром.

С-концевую аминокислоту идентифицируют также путем обработки полипептида восстанавливающим агентом, например боргидридом натрия. В простейшей форме эту процедуру можно представить в следующем виде:



Видно, что в указанных условиях только одна, а именно С-концевая, аминокислота будет превращаться в а-аминоспирт, легко идентифицируемый методом хроматографии. Таким образом, при помощи указанных методов определяют природу N- и С-концевых аминокислот.

Метод Эдмана (***фенилизотиоцианатный метод***) — это химический процесс, который позволяет определить N-концевую аминокислоту белка путем ее химического модифицирования, удаления в виде производного и последующего определения. Этот метод включает реакцию N-концевой аминокислоты с фенилизотиоцианатом (PITC) в щелочной среде, образование аминокислотного производного, отщепление этого производного и его анализ методами ВЭЖХ или масс-спектрометрии для определения его структуры и идентификации аминокислоты.

1. Модификация аминокислоты:

N-концевая аминокислота белка реагирует с фенилизотиоцианатом (PITC) в щелочной среде. При этом образуется фенилтиокарбамил-производное (PTC-белок).

2. Отщепление аминокислоты:

В кислой среде PTC-белок подвергается разрыву пептидной связи между N-концевой аминокислотой и следующим за ней остатком. В результате образуется аногалогенированное производное аминокислоты и "обезглавленный" белок.

3. Идентификация аминокислоты:

Полученное производное (например, аминокислоты) анализируется. Чаще всего для этого используются методы высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) или масс-спектрометрии, которые позволяют точно определить структуру и идентифицировать аминокислоту.

Дансильный метод. Дансильный реагент (1-диметиламинонафталин-5-сульфонилхлорид) реагирует с первичными и вторичными аминогруппами аминокислот, образуя флуоресцентные дансилированные производные, что позволяет использовать его для флуориметрического определения аминокислот и их идентификации, а также для измерения их содержания и как маркер в биохимических исследованиях.

1. Ацилирование аминогруппы:

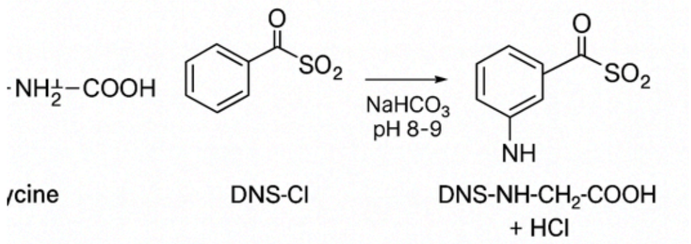
Дансильный реагент, являясь хлорангидридом сульфокислоты, вступает в реакцию с аминогруппой аминокислоты

2. Образование сульфонамида:

Происходит образование стабильной ковалентной связи, в результате чего образуется дансил-производное аминокислоты (сульфонамид).

3. Флуоресценция:

Образовавшаяся дансиламидная группа придает молекуле флуоресцентные свойства, позволяя наблюдать ее с помощью флуоресцентного микроскопа или спектрофлуориметра.



Общая реакция

$$R\text{–}CH(NH_2)\text{–}COOH + DNS\text{–}Cl \xrightarrow[pH\ 8\text{–}9]{NaHCO_3} R\text{–}CH(NH\text{–}DNS)\text{–}COOH + HCl$$

где **R–CH(NH₂)–COOH** — аминокислота,

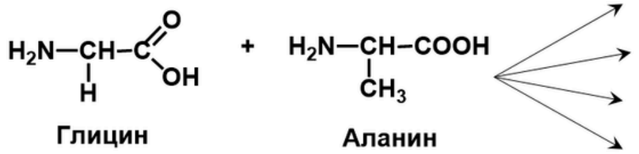
DNS–Cl — дансилхлорид,

R–CH(NH–DNS)–COOH — дансильное производное аминокислоты (флуоресцентный продукт).

Пример (глицин):

$$H_2N\text{–}CH_2\text{–}COOH + DNS\text{–}Cl \longrightarrow DNS\text{–}NH\text{–}CH_2\text{–}COOH + HCl$$

Дансилхлорид используется как флуоресцентный реагент для маркировки белков, аминокислот и других молекул, содержащих аминогруппы.



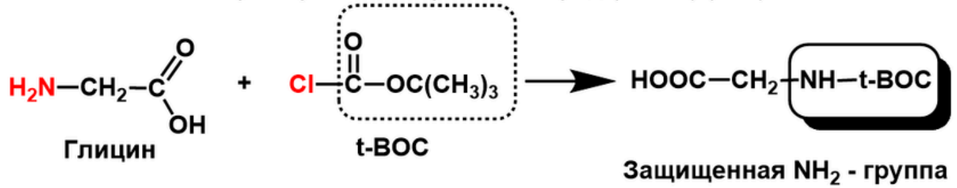
глицилаланин
аланилглицин
глицилглицин
аланилаланин

Синтез пептида ***in vitro*** с заданной последовательностью α-аминокислот, осуществляется с выполнением последовательности следующих стадий:

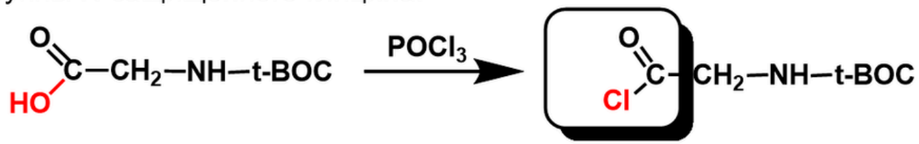
1. ***Защита аминогруппы;***
2. ***Активация карбоксильной группы;***
3. ***Образование пептидной связи;***
4. ***Удаление защитных групп и получение свободного пептида.***

1 этап: Защита аминогруппы

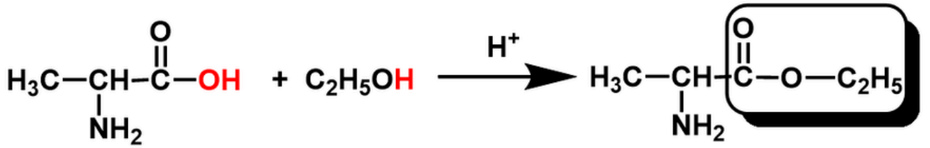
Наиболее удобным реагентами являются бензилоксикарбонил хлорид $C_6H_5CH_2OCOCl$ и трет-бутилоксикарбонилхлорид (t-BOC) $(CH_3)_3COCOCl$



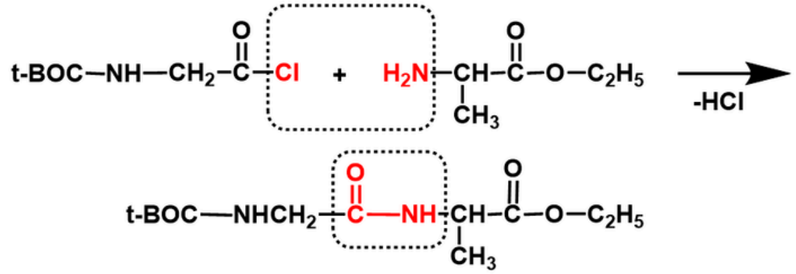
Следующий этап синтеза дипептида – активация карбоксильной группы N-защищенного глицина.



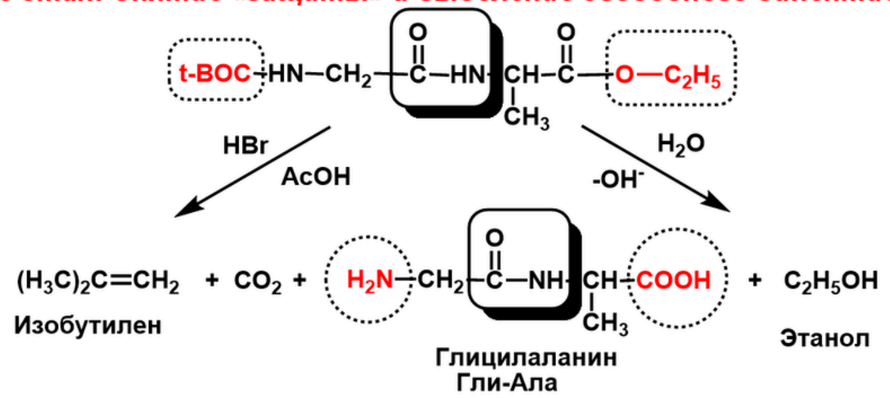
2 этап: Защита карбоксильной группы второй аминокислоты (аланина) реакцией этерификации



Синтез дипептида путем взаимодействия защищенного по аминогруппе и активированного по карбоксильной группе глицина и защищенного по карбоксильной группе аланина.



3 этап: Снятие «защиты» и выделение свободного дипептида



Метод определения природы С-концевой аминокислоты (Акабори)



Методы изучения I структуры белка:

гидролиз

по характеру катализатора
- **кислотный**
- **щелочной**
- **нейтральный (ферментативный)**

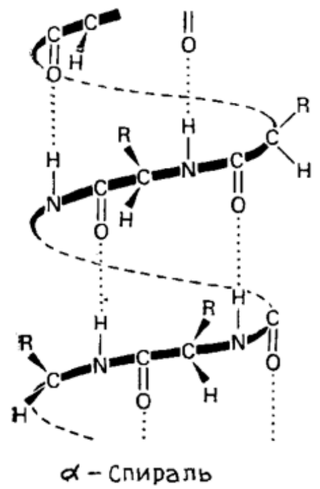
по глубине
- **полный**
- **неполный**

по условиям
- **мягкий** (ферменты, t≈36ºC, нормальное давление)
- **жёсткий** (высокая температура, кислоты, щёлочи)

Вторичная структура белка – это конфигурация полипептидной цепи в пространстве, образующаяся в результате взаимодействий между функциональными группами, входящими в состав пептидного остова.

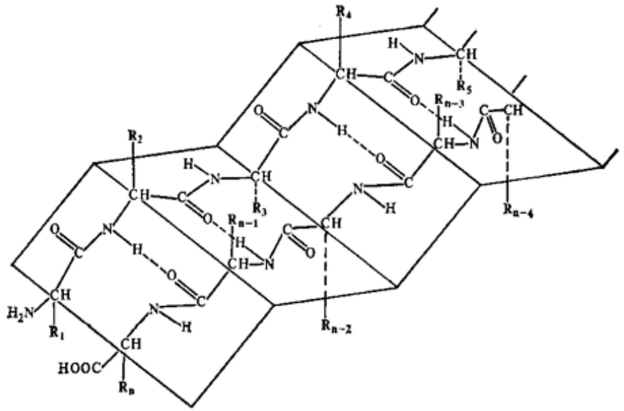
представляет собой способ укладки I структуры в виде:

α-спирали



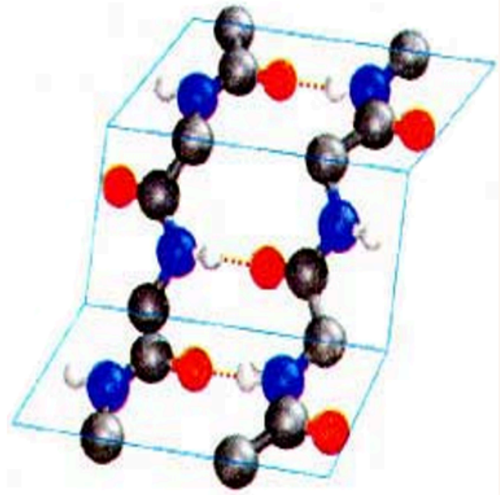
α – Спираль

β-структуры



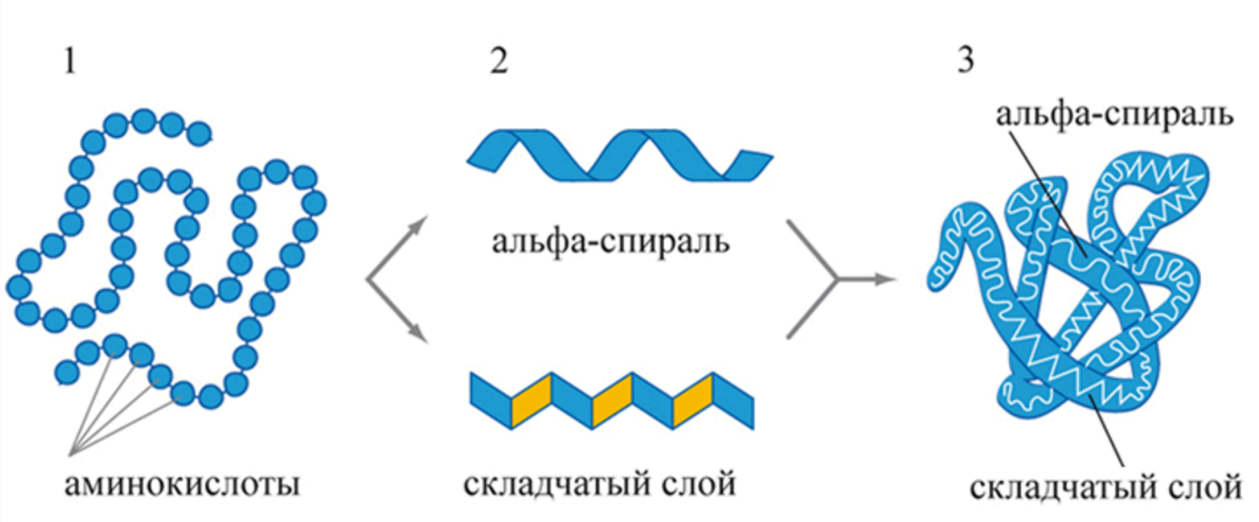
удерживается водородными связями за счет между COOH и NH_2





α-спираль **β-структура**

Формирование третичной структуры белка:

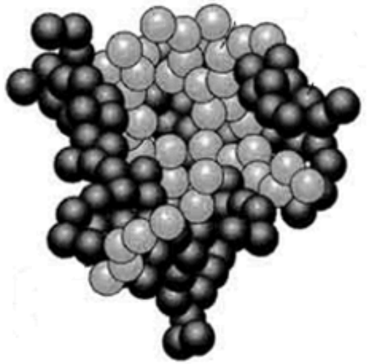




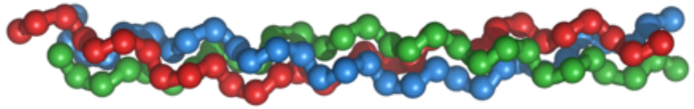
Третичная структура - это способ укладки полипептидной цепи в пространстве в виде компактной упаковки, за счет связей между радикалами.

Форма белковых молекул:

- Глобулярные (шарообразные)
- Фибриллярные (нитевидные)

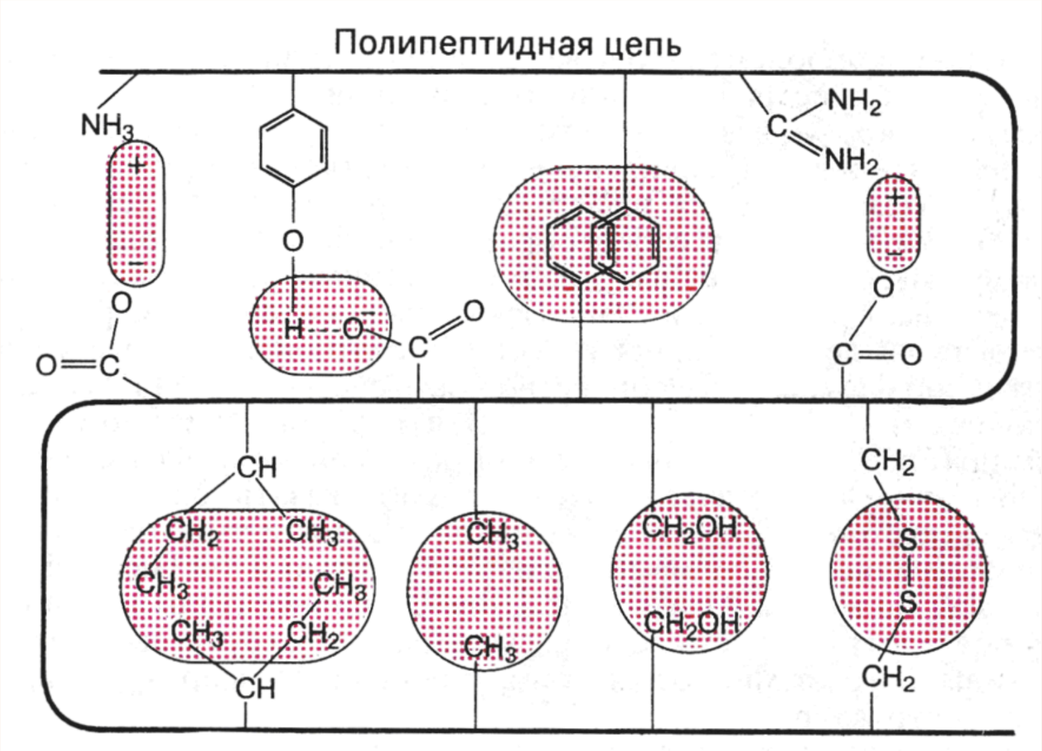


глобула



фибрилла

Связи, характерные для третичной структуры:



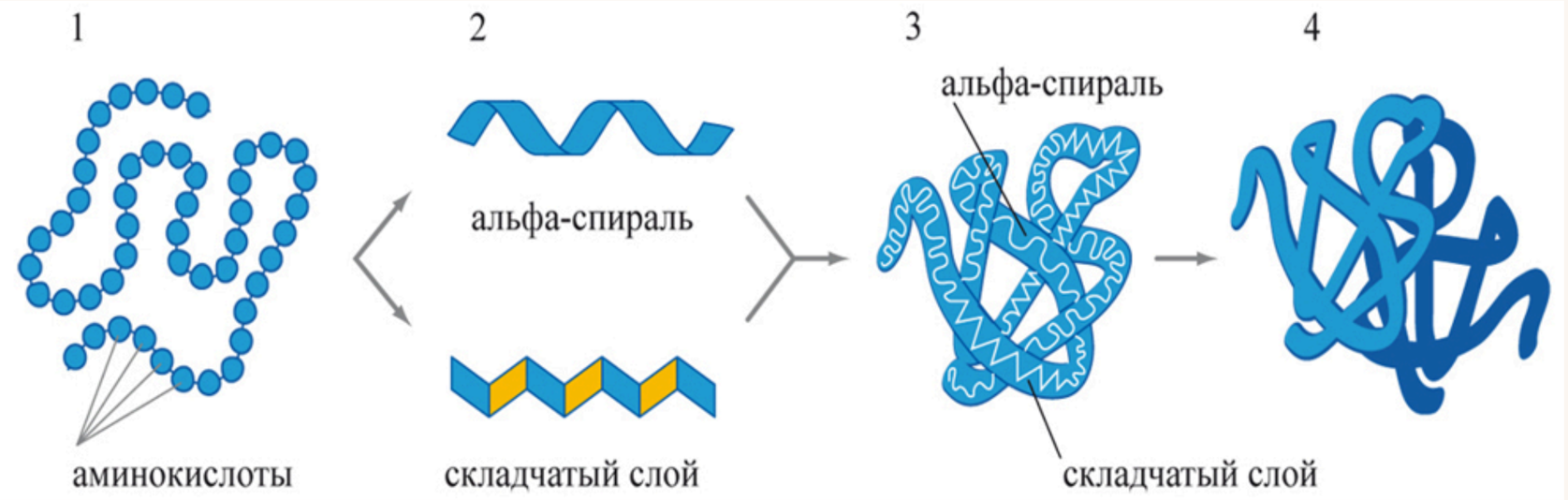
В поддержании третичной структуры участвуют:

1. водородные связи
2. ионные связи
3. гидрофобные взаимодействия
4. дисульфидные связи

Четвертичная структура - это высший уровень структурной организации, возможный не у всех белков. Формирование четвертичной структуры белка -это способ укладки в пространстве третичных структур (глобул) и формирование единого в структурном и функциональном отношениях макромолекулярного образования.

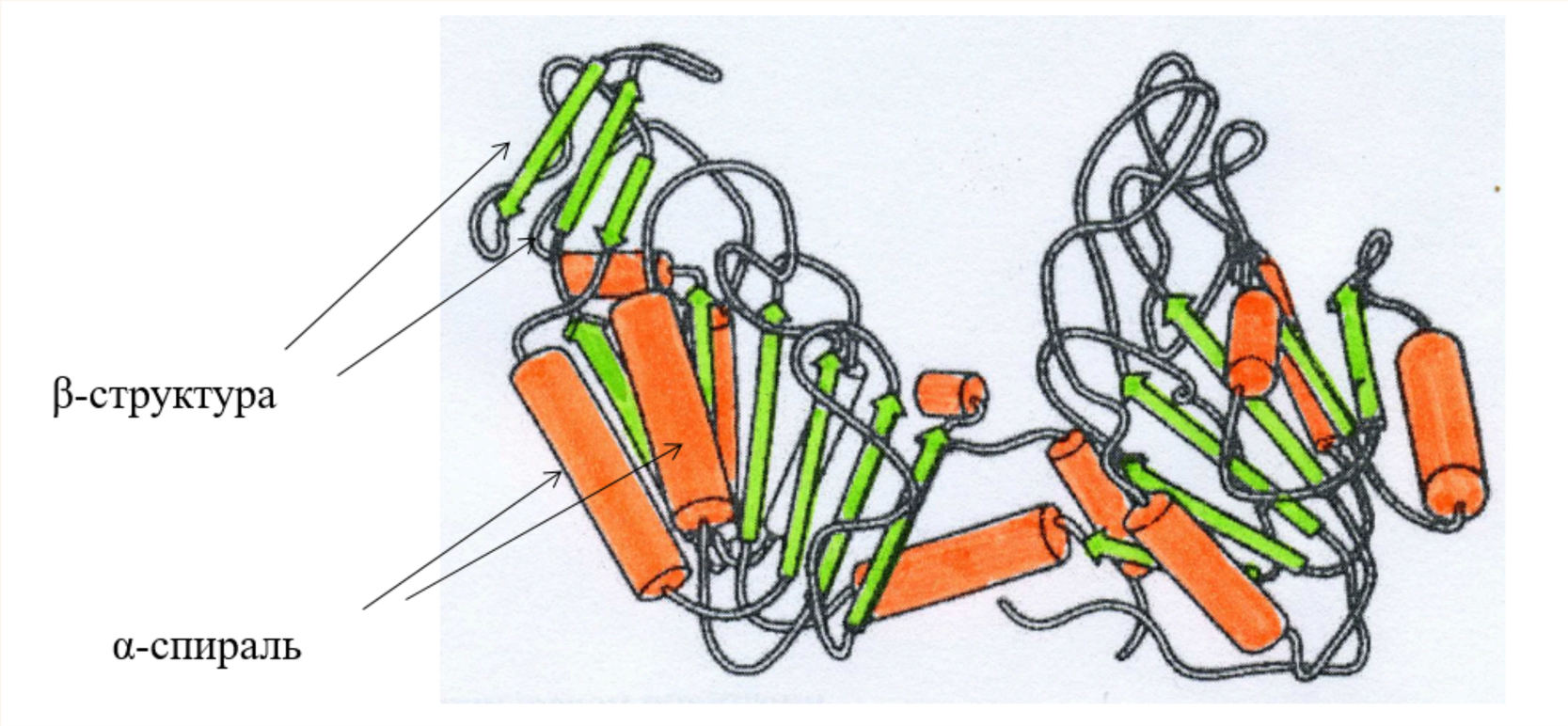
- Каждая отдельно взятая глобула, получившая название протомера или субъединицы, чаще всего не обладает биологической активностью.

Она образуется слабыми нековалентными ионными, водородными связями и гидрофильно-гидрофобным взаимодействиями.



Доменное строение глобулярных белков

Домен – часть полипептидной цепи, сходная с самостоятельным глобулярным белком.



Важнейшие свойства белков:

•Способность к специфическим взаимодействиям (образование белково-лигандных комплексов)
•Способность к самосборке (образование надмолекулярных структур)

Типы классификации белков:

•По форме молекулы
•По физико-химическим свойствам
•По происхождению
•По биологической ценности
•По функциям
•По химическому составу

Классификация по функциям:

- Каталитические (ферменты)
- Регуляторные (гормоны)
- Транспортные (Hb, трансферрин)
- Защитные (Ig, шапероны)
- Сократительные (актин, миозин)
- Структурные (коллаген, эластин)
- Питательные (казеин, овальбумин)

Простые:

- Альбумины;
- Глобулины;
- Проламины;
- Глютелины;
- Протамины;
- Гистоны;
- Склеропротеины

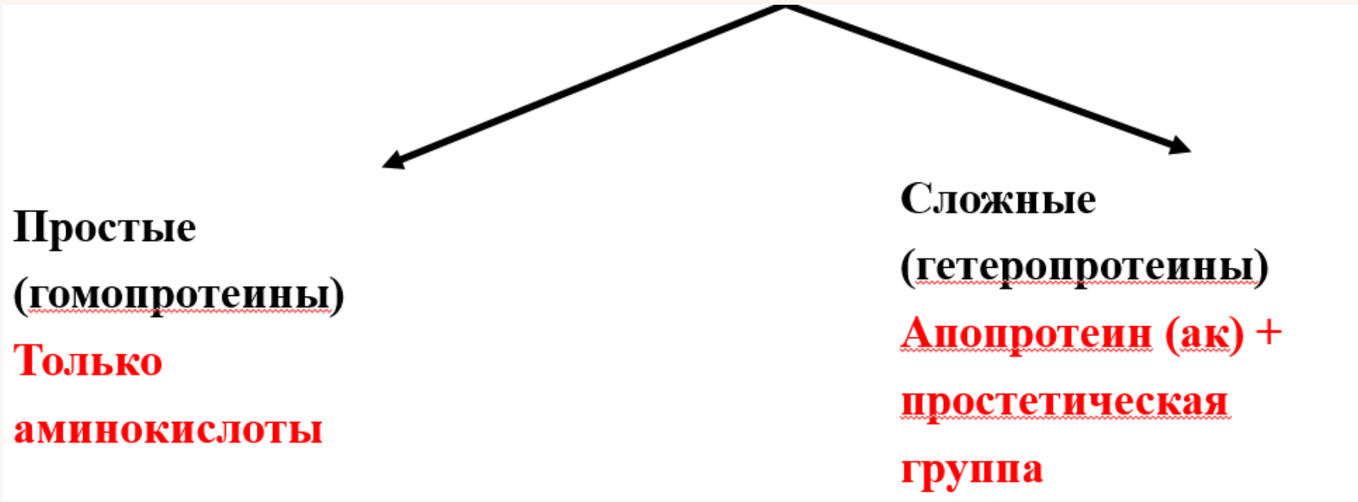
Сложные:

- Нуклеопротеины;
- Хромопротеины;
- Гликопротеины;
- Фосфопротеины;
- Липопротеины;
- Металлопротеины

Химическая классификация белков

п

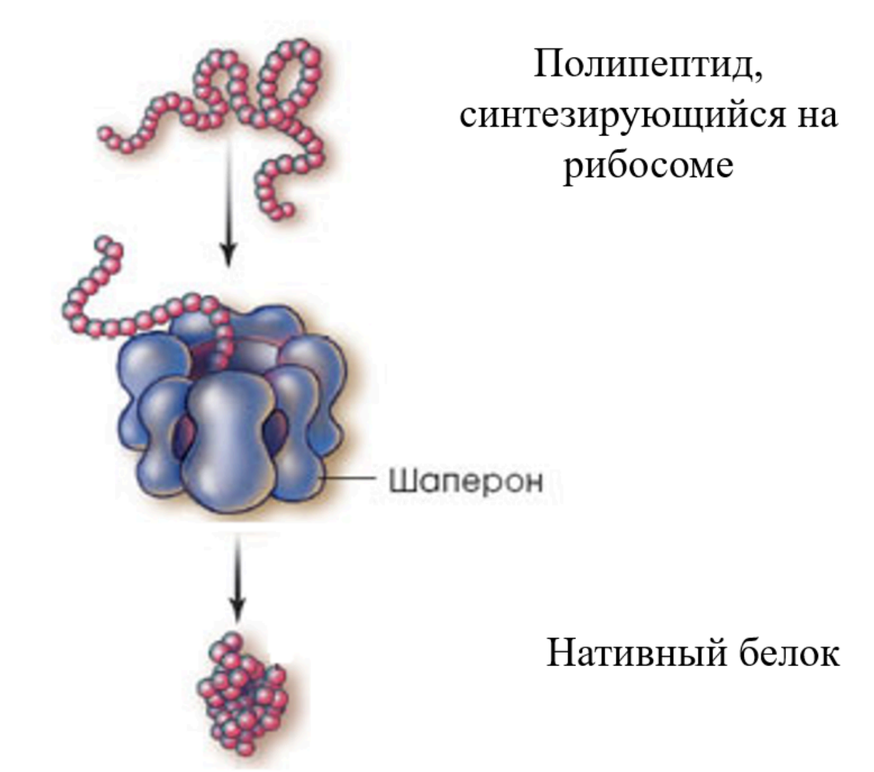
Белки (протеины)



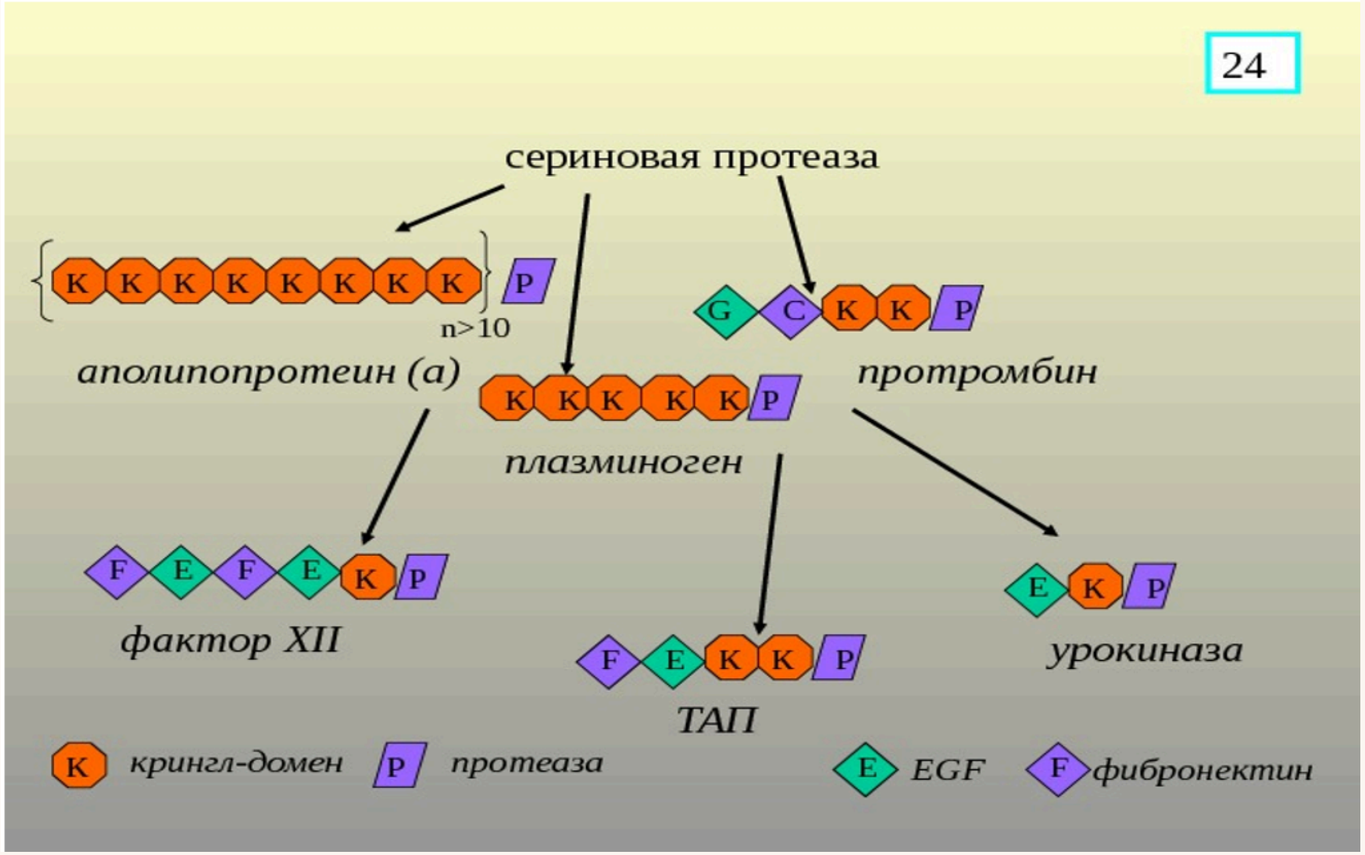
Классификация белков по семействам:

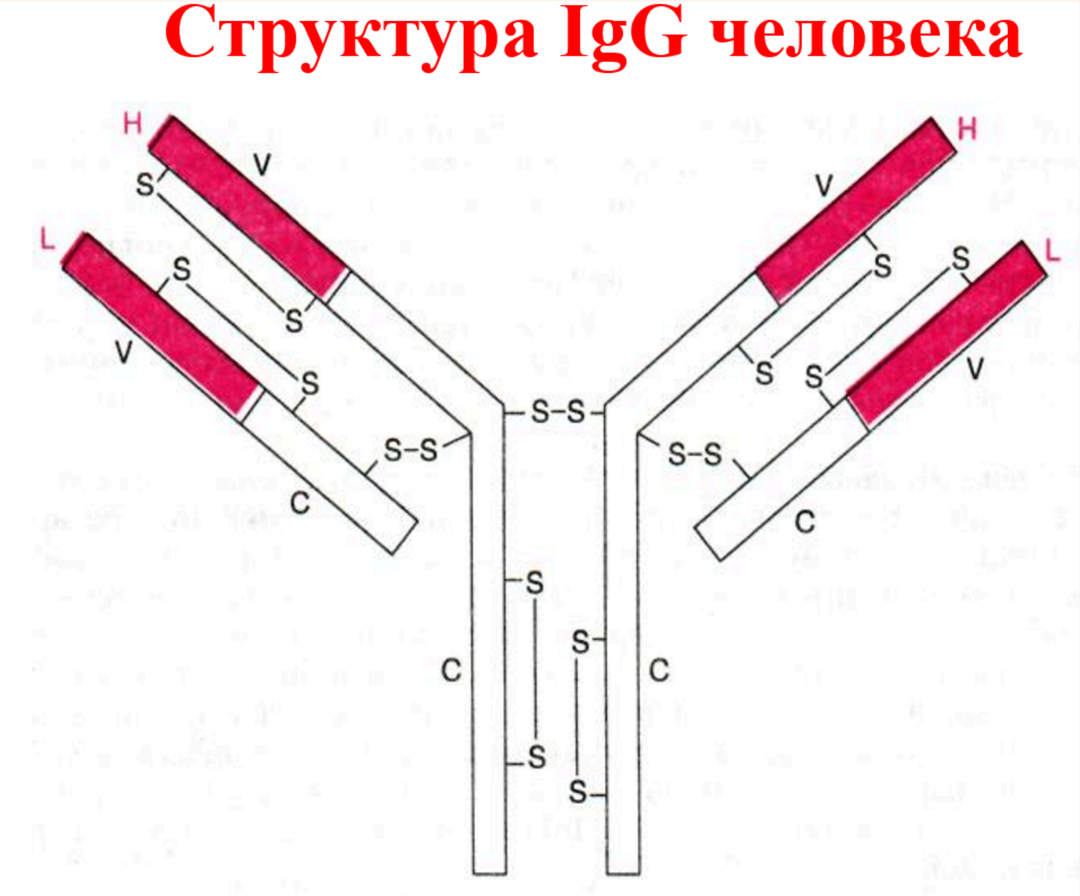
- Сериновые протеиназы
- Шапероны
- Иммуноглобулины

Шапероны



Сериновые протеазы





Пептидные гормоны и нейропептиды, например, регулируют большинство процессов организма человека, в том числе, и принимают участие в процессах регенерации клеток. Пептиды иммунологического действия защищают организм от попавших в него токсинов. Для правильной работы клеток и тканей необходимо адекватное количество пептидов. С возрастом и при патологии возникает дефицит пептидов, который существенно ускоряет износ тканей, что приводит к старению всего организма. Сегодня проблему недостаточности пептидов в организме научились решать с помощью синтеза пептидов в лабораторных условиях.