

АМИНОКИСЕЛИНИ

АДАПТИРАНО СПОРЕД

ЛЕНИНЦЕР ПРИНЦИПИ НА БИОХЕМИЈАТА , ДЕЈВИД НЕЛСОН, МАЈЛК КОКС И
ОРГАНСКА ХЕМИЈА, ЏОН МЕКМУРИ

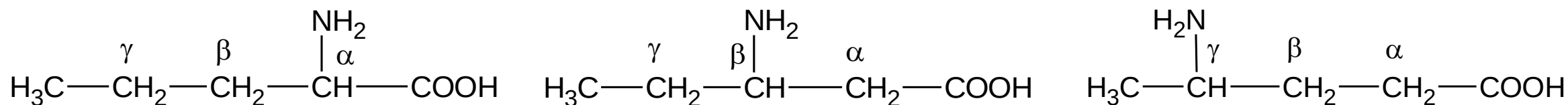
доц. д-р Наташа Ристовска, Институт за хемија, ПМФ-Скопје

Вовед

ПОИМ ЗА АМИНОКИСЕЛИНИ
СТЕРЕОХЕМИЈА
НОМЕНКЛАТУРА
КЛАСИФИКАЦИЈА
ДЕРИВАТИ НА
АМИНОКИСЕЛИНИ

Поим за аминокиселини

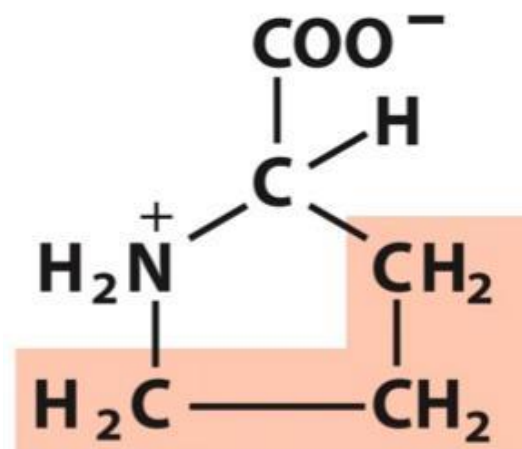
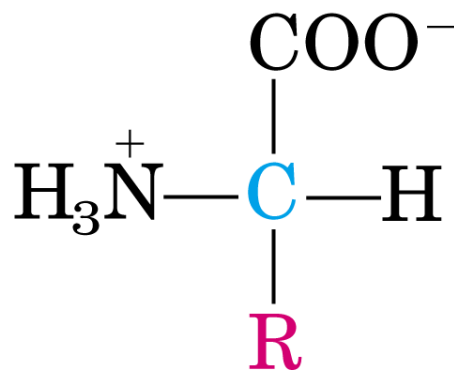
- ▶ Аминокиселините се органски соединенија со две карактеристични функционални групи: **амино (-NH₂) група** и **карбоксилна (-COOH) група**.
- ▶ Аминокиселините се amino супституирани карбоксилни киселини.
- ▶ Амино групата може да има различна положба, според што се класифицирани како: **алфа- (α-), бета-(β-), гама-(γ-) или делта- (δ-)** аминокиселини (500).



- ▶ Најзначајни се **α-аминокиселините** (20) кои влегуваат во составот на протеините.

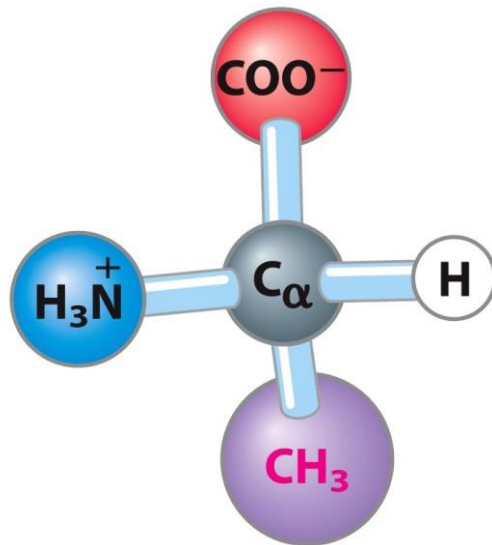
Општа структура на аминокиселините

- ▶ **α**-јаглеродниот атом на аминокиселините е поврзан со четири различни групи: карбоксилна група, amino група, R група и водороден атом.
- ▶ α-јаглеродниот атом е **хирален**, освен кај глициноот ($R = H$).
- ▶ Аминокиселините се разликуваат според страничните низи R.
- ▶ Општата структура не се однесува за цикличната аминокиселина пролин.

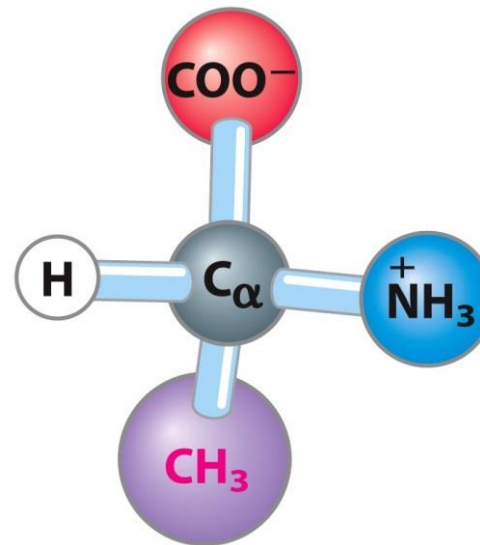


Енантиомери

- ▶ Поради постоењето на хирален центар (C_α), можни се два **стереоизомери**:
- ▶ Тие се однесуваат како предмет и лик во огледало, а не се преклопуваат (**енантиомери**).



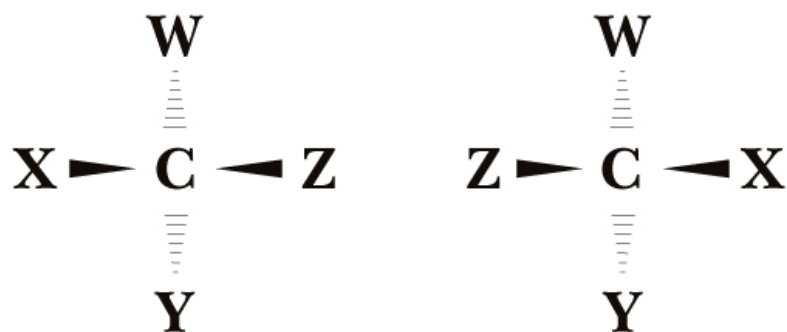
L-аланин



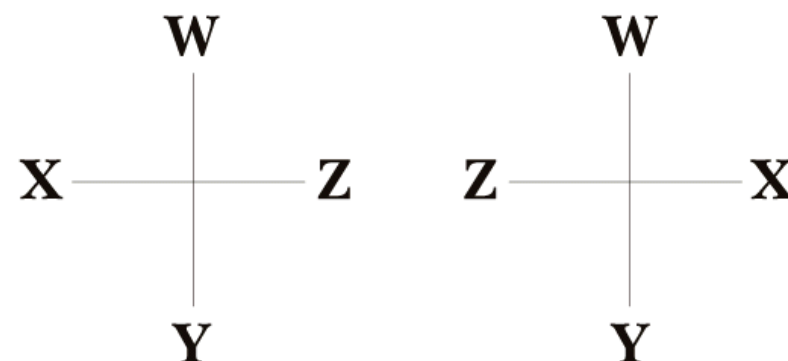
D-аланин

Претставување на стереоизомери

- Со W е претставена групата со најоксидирана форма на јаглерод.



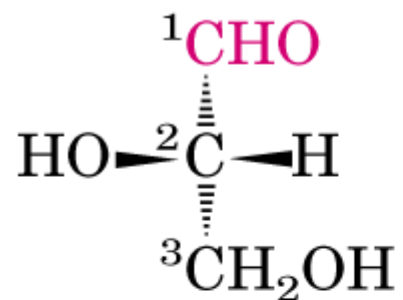
Перспективни формули (клинести структури)



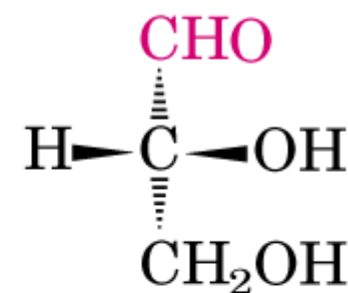
Фишерови проекциони формули

Апсолутна конфигурација

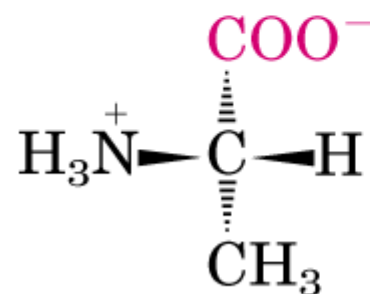
- ▶ Апсолутната конфигурација на аминокиселините се определува според **D, L системот** како кај моносахаридите.
- ▶ Фишер (1891): споредба со **апсолутната конфигурација на глицералдехид**.
- ▶ **L- аминокиселините** (амино групата е лево) преовладуваат во природата.
- ▶ При синтеза се добиваат смеси од двата енантиомери, познати како **рацемски смеси**.



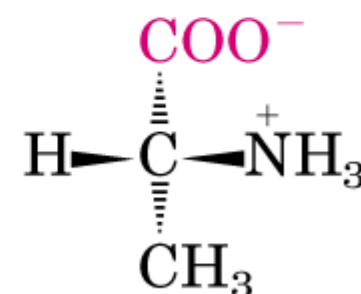
L-глицералдехид



D-глицералдехид



L-аланин



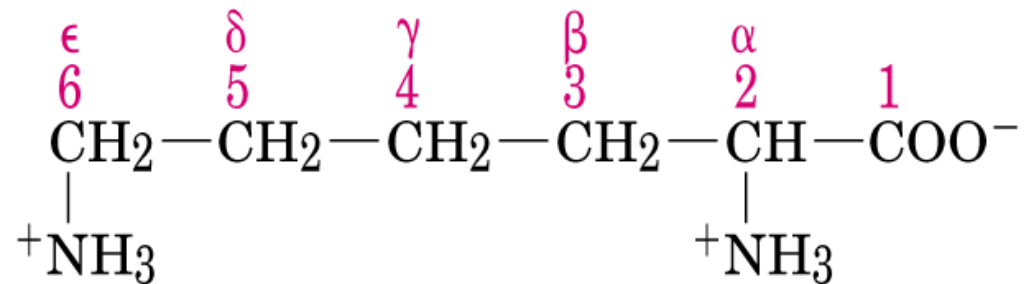
D-аланин

Именување на аминокиселините

► Тривијални имиња

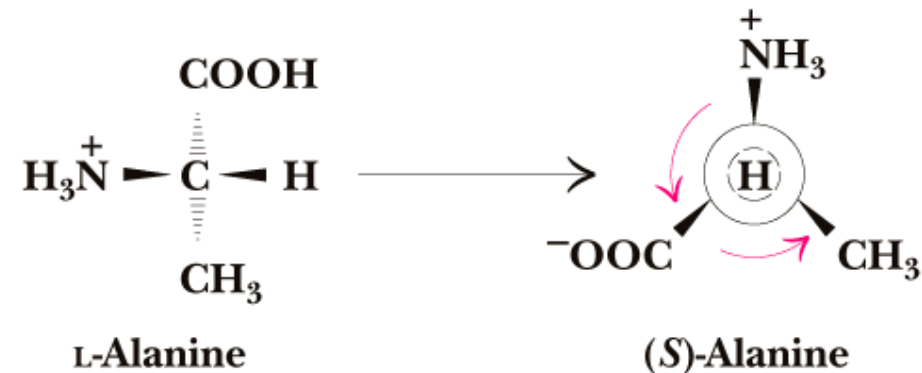
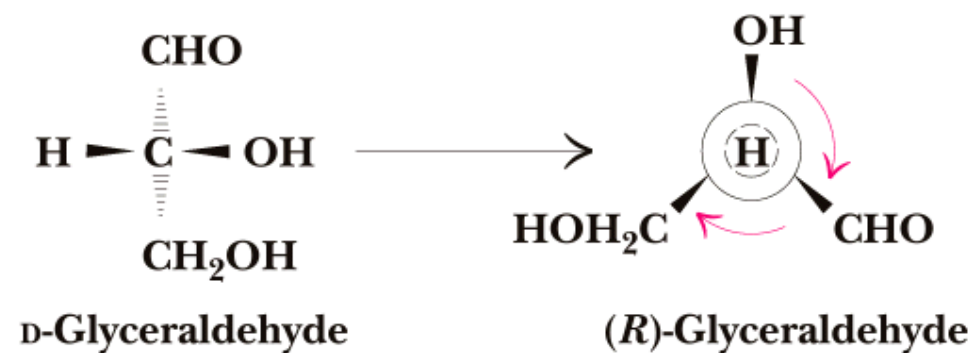
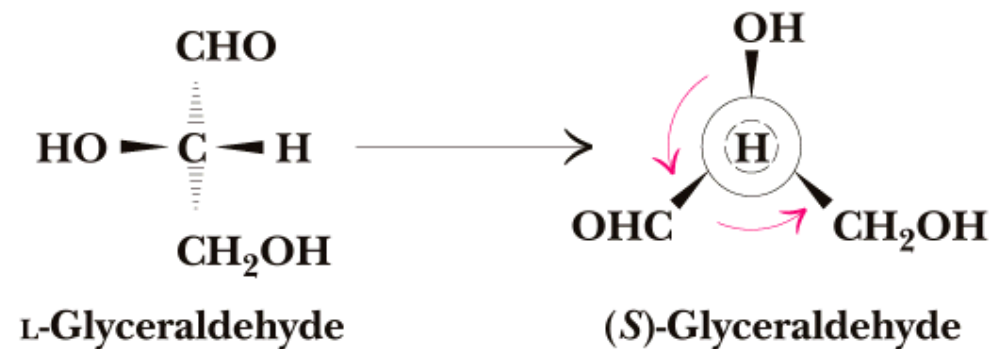
- Според **изворот од кој за прв пат е изолирана**: аспарагин – аспарагус (1806), глутаминска киселина – глутен, тирозин – тирос, сирење.
- Според **органо-лептичка карактеристика**: глицин – гликос, слатко.
- Според **структурна градба**: треонин (1938), слична структура на треоза, моносахарид со четири јаглеродни атоми ($C_4H_8O_4$).

► Именување според IUPAC



R,S- номенклатура

- ▶ Номенклатурата според R,S- системот најчесто се користи за опишување и точно претставување на конфигурацијата на молекули со повеќе од еден хирален центар.
- ▶ Претставете ги аминокиселините со Фишерови проекциони формули и применувајќи ги познатите КИП-ови правила определете ја R, S конфигурацијата на стереогениот центар!
- ▶ **L- аминокиселините имаат S конфигурација на α-С атомот.**
- ▶ **Дали постојат исклучоци?**



Класификација на аминокиселините

- ▶ Во природата постојат **20 стандардни аминокиселини**.
- ▶ **Треба да се знаат структурите, имињата и нивните кратенки!**
- ▶ Во различни учебни помагала постојат различни поделби на аминокиселините, но заедничко е што **поделбата е направена според природата на страничната низа R**.
- ▶ Најважна особина е **поларноста на групите R**.

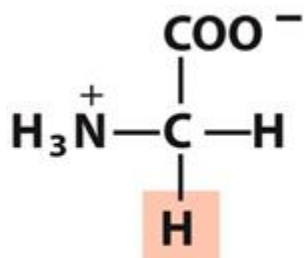
Lenhinger, Principles of biochemistry

- ▶ Аминокиселини со **неполарни алифатични R** групи
- ▶ Аминокиселини со **ароматични R** групи
- ▶ Аминокиселини со **поларни R** групи, **без полнеж**
- ▶ Аминокиселини со **R** групи со **позитивен полнеж**
- ▶ Аминокиселини со **R** групи со **негативен полнеж**

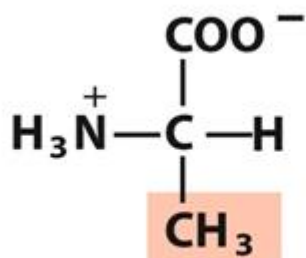
Garret and Grisham, Biochemistry

- ▶ **Неполарни** аминокиселини
- ▶ **Поларни** аминокиселини **без полнеж**,
- ▶ **Кисели** аминокиселини
- ▶ **Базни** аминокиселини

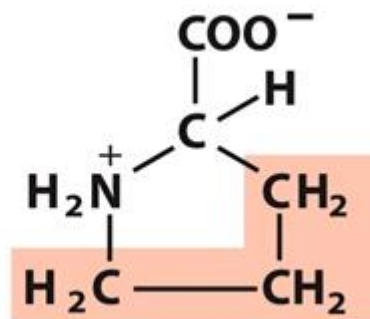
Неполарни алифатични групи



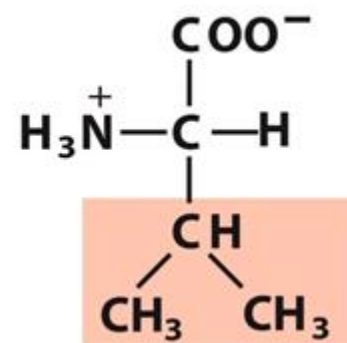
Глицин



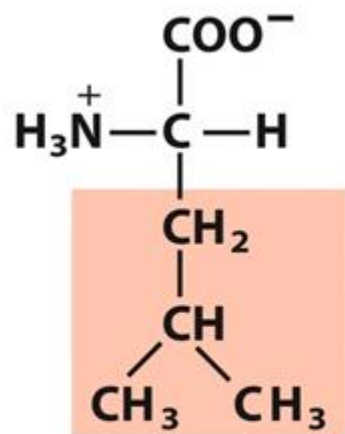
Аланин



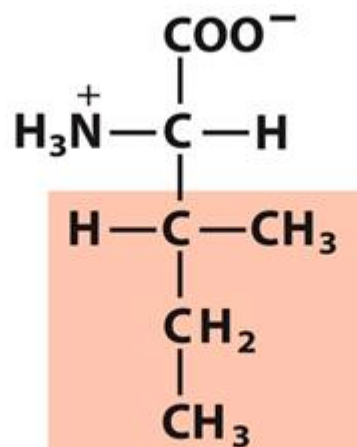
Пролин



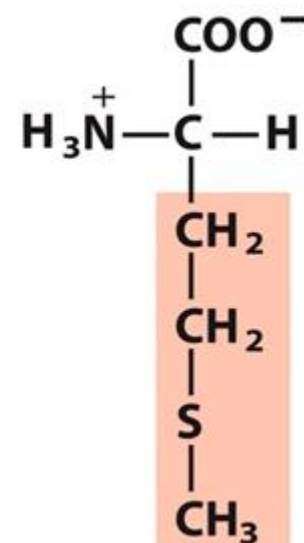
Валин



Леуцин

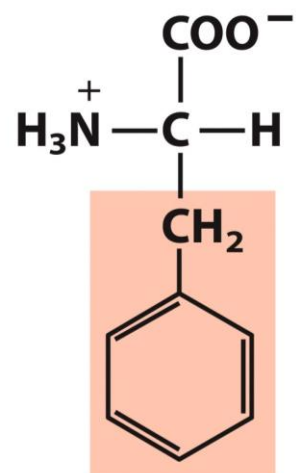


Изолеуцин

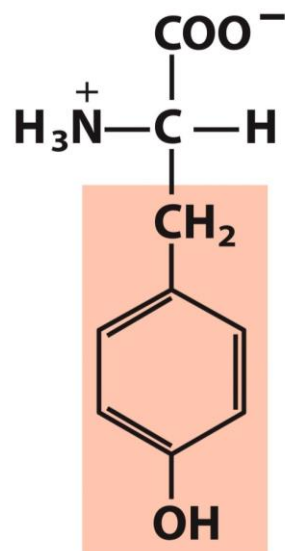


Метионин

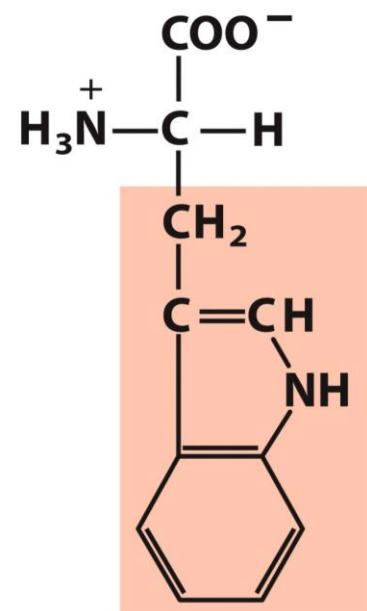
Ароматични R групи



Фенилаланин

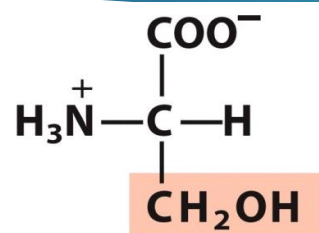


Тирозин

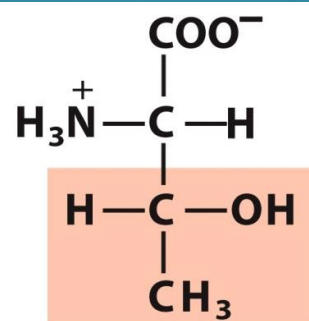


Триптофан

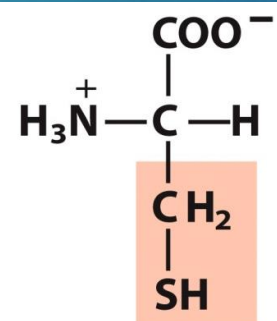
Поларни R групи без полнеж



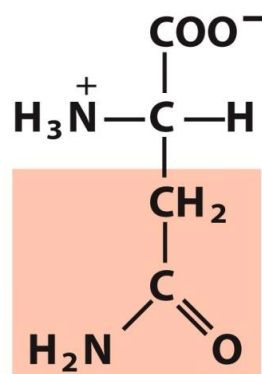
Серин



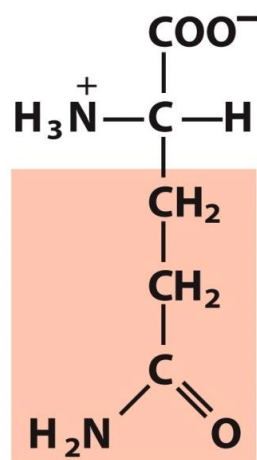
Треонин



Цистеин

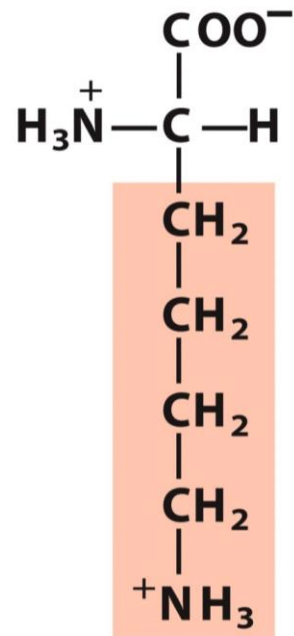


Аспарагин

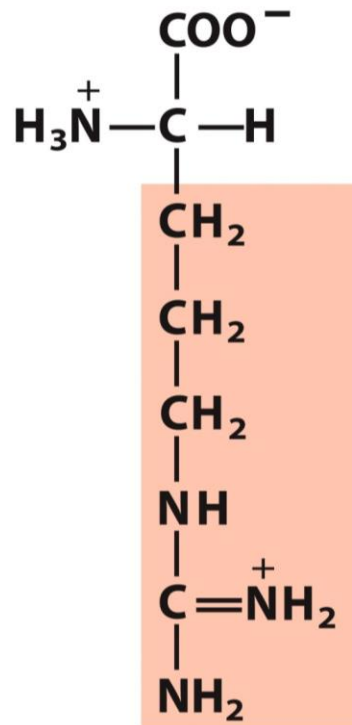


Глутамин

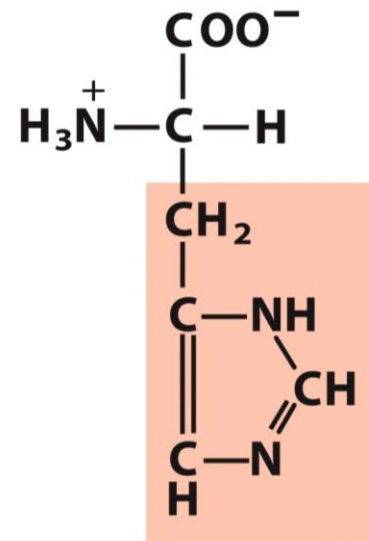
R групи со позитивен полнеж



Лизин

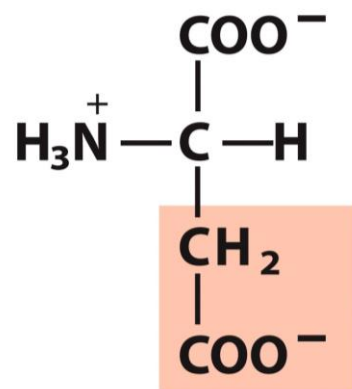


Аргинин

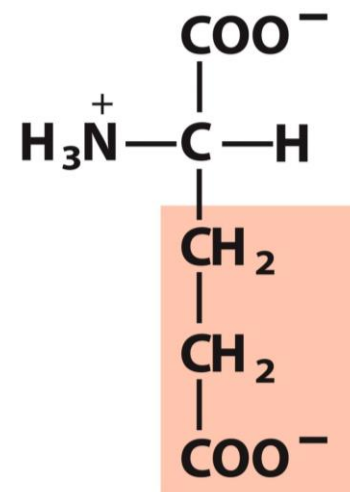


Хистидин

R групи со негативен полнеж



Аспартат



Глутамат

Кратенки за аминокиселините

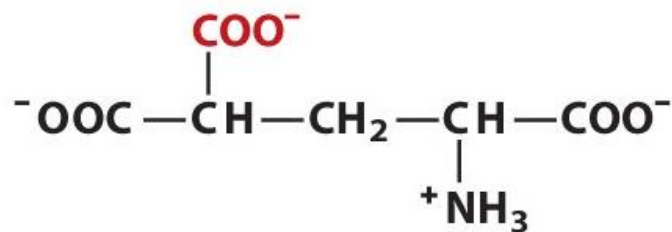
- ▶ **Кратенки со три букви:** **Ala** (Alanine, аланин), **Met** (Methionine, метионин), **Gly** (Glycine, глицин), **Cys** (Cysteine, цистеин), **Arg** (Arginine, аргинин)
- ▶ **Кратенки со една буква** (Margaret Oakley Daynoff, 1925-1983, биоинформатика):
 - ▶ **Првата латинична буква** од англиското име на аминокиселината која е **единствена со таа почетна буква:** **C** -цистеин, **V** - валин, **M** – метионин...
 - ▶ Како да се разликуваат пролин (Pro) и фенилаланин (Phe): Кратенката P се однесува за **позастапената аминокиселина** (пролин), на другата аминокиселина и се дава **буквата според изговорот на англиски** (F).
 - ▶ Кратенки кои **произлегуваат од звучноста на името** на киселината: **N** asparagine, аспарагин; **D** aspartic аспартат.
 - ▶ Како да се разликуваат лизин и леуцин: Леуцинот е позастапен L, додека лизинот ја добива **најблиската слободна буква од абecedата** K.



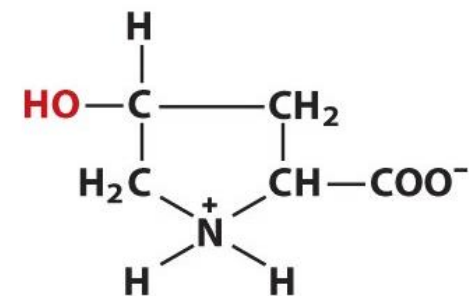
Alanine A, Ala	Leucine L, Leu
Arginine R, Arg	Lysine K, Lys
Asparagine N, Asn	Methionine M, Met
Aspartic acid D, Asp	Phenylalanine F, Phe
Cysteine C, Cys	Proline P, Pro
Glutamine Q, Gln	Serine S, Ser
Glutamic Acid E, Glu	Threonine T, Thr
Glycine G, Gly	Tryptophan W, Trp
Histidine H, His	Tyrosine Y, Tyr
Isoleucine I, Ile	Valine V, Val

Ретки аминокиселини

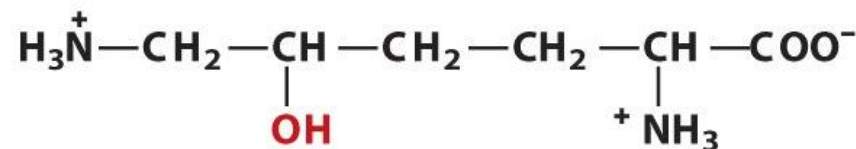
- ▶ Иако ретки, се наоѓаат во составот на некои протеини:
 - ▶ Хидроксилизин и хидроксипролин се застапени кај колаген.
 - ▶ Карбоксиглутамат е застапен кај протеините во крвта.



γ-Карбоксиглутамат



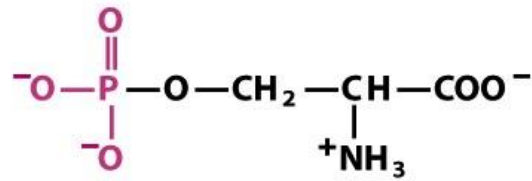
4-Хидроксипролин



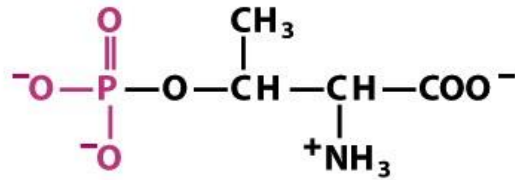
5-Хидроксилизин

Деривати на аминокиселини

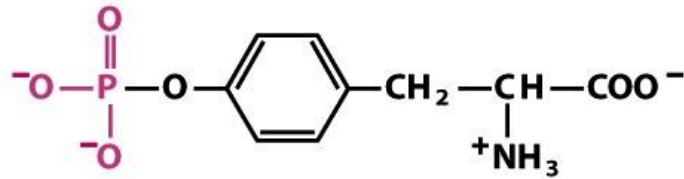
- ▶ Аминокиселините во состав на протеините може реверзибилно да се трансформираат со:
 - ▶ N-алкилирање и N-ацилирање
 - ▶ Метилирање
 - ▶ Фосфорилирање
 - ▶ Декарбоксилирање
 - ▶ Дезаминирање/аминирање
 - ▶ Естерификација
 - ▶ Оксидоредукција
- ▶ Некои деривати иако не влегуваат во состав на протеините имаат **биохемиска важност**:
 - ▶ **Невротрансмитери и регулатори**: γ -аминобутерна киселина (GABA) (дериват на глутаминска киселина), хистамин (дериват на хистидин) и серотонин (дериват на триптофан).
 - ▶ **Хормони**: епинефрин познат како адреналин (дериват на тирозин).



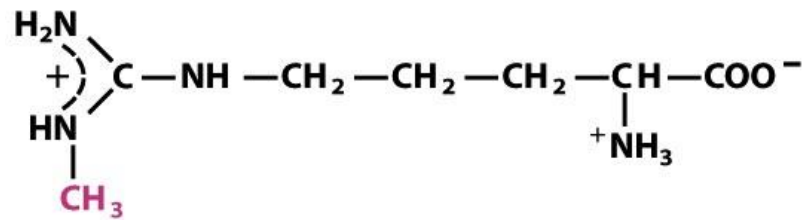
Phosphoserine



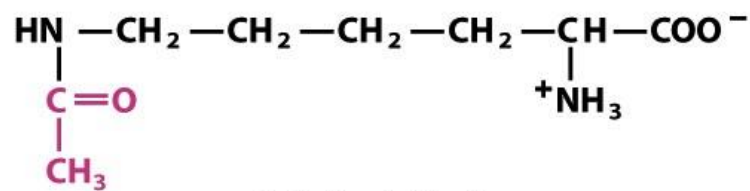
Phosphothreonine



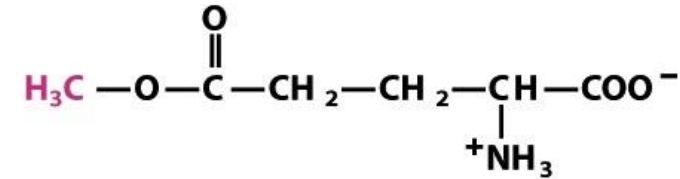
Phosphotyrosine



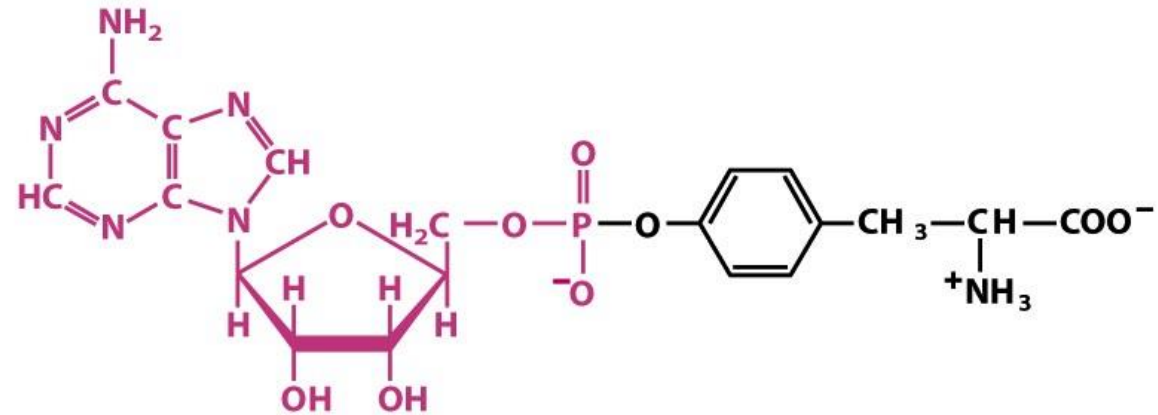
σ -N-Methylarginine



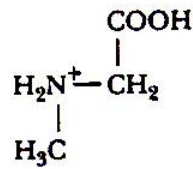
6-N-Acetyllysine



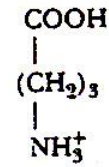
Glutamate methyl ester



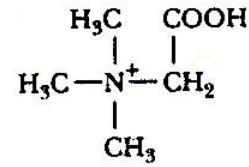
Adenylyltyrosine



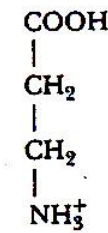
Sarcosine
(N-methylglycine)



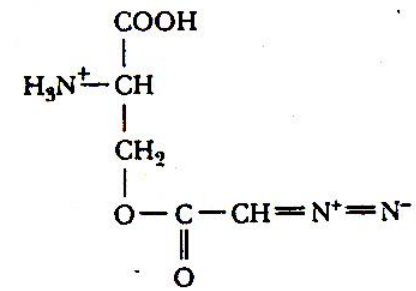
γ -Aminobutyric acid
(GABA)



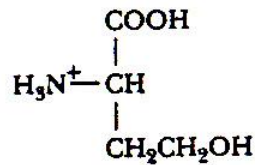
Betaine
(N,N,N-trimethylglycine)



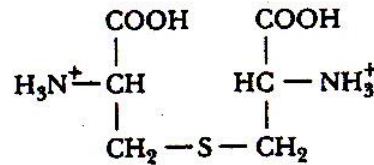
β -Alanine



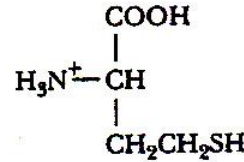
Azaserine
O-diazoacetylserine



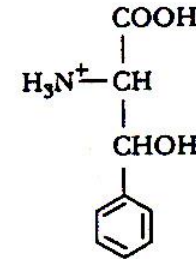
Homoserine



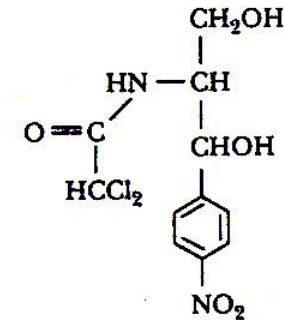
L-Lanthionine



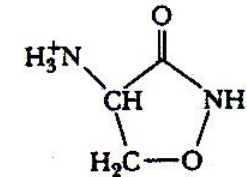
Homocysteine



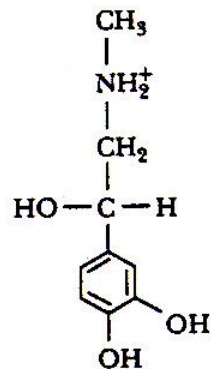
L-Phenylserine



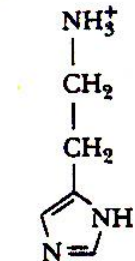
L-Chloramphenicol



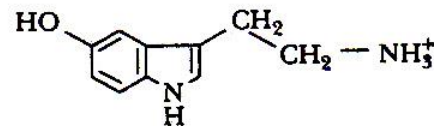
Cycloserine



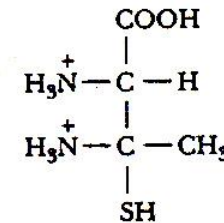
Epinephrine



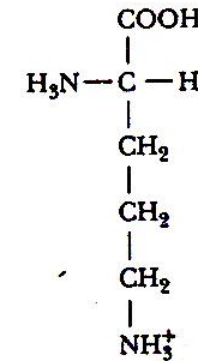
Histamine



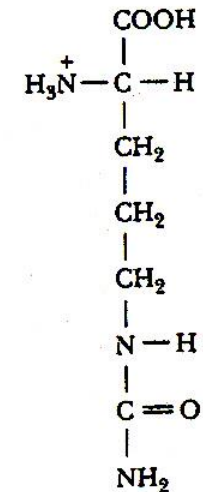
Serotonin



Penicillamine



Ornithine



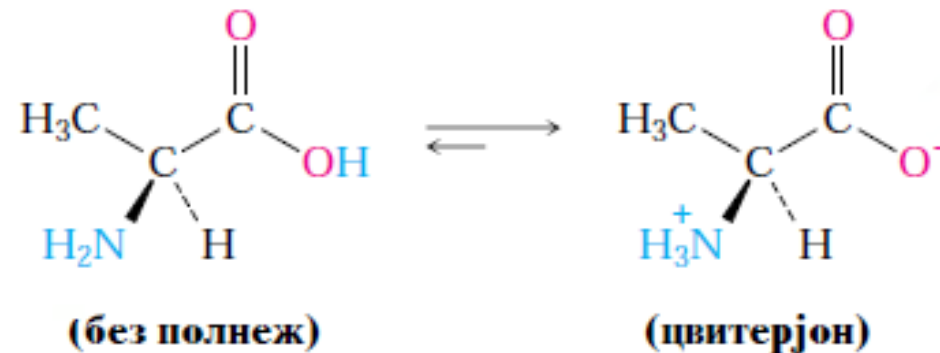
Citrulline

Кисело-базни својства на аминокиселини

ЦВИТЕРЈОН
ИЗОЕЛЕКТРИЧНА ТОЧКА
КРИВИ НА ТИТРАЦИЈА

Цвистерјон

- ▶ Поради присуството на кисела и базна група, аминокиселините се подложни на интрамолекуларна кисело-базна реакција и **постојат во форма на диполарен цвистерјон**.
- ▶ Имаат **својства карактеристични за соли**:
 - ▶ Имаат голем диполен момент
 - ▶ Растворливи се во вода, нерастворливи во органски растворувачи
 - ▶ Кристални супстанции со високи температури на топење.

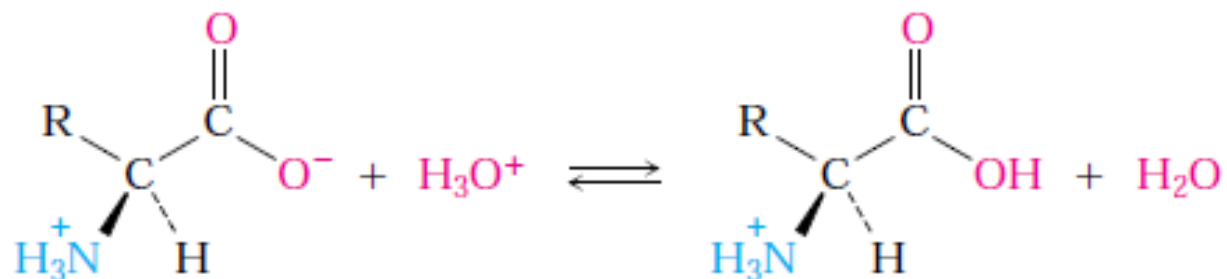


Аланин

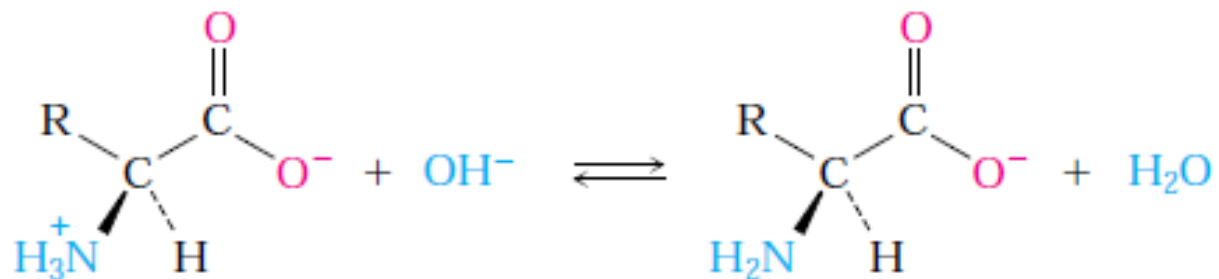
Амфотерност

- ▶ Аминокиселините се **амфолити** (амфотерни супстанции).
- ▶ Во зависност од pH на средината може да **реагираат и со киселини и со бази**.

Во кисел раствор

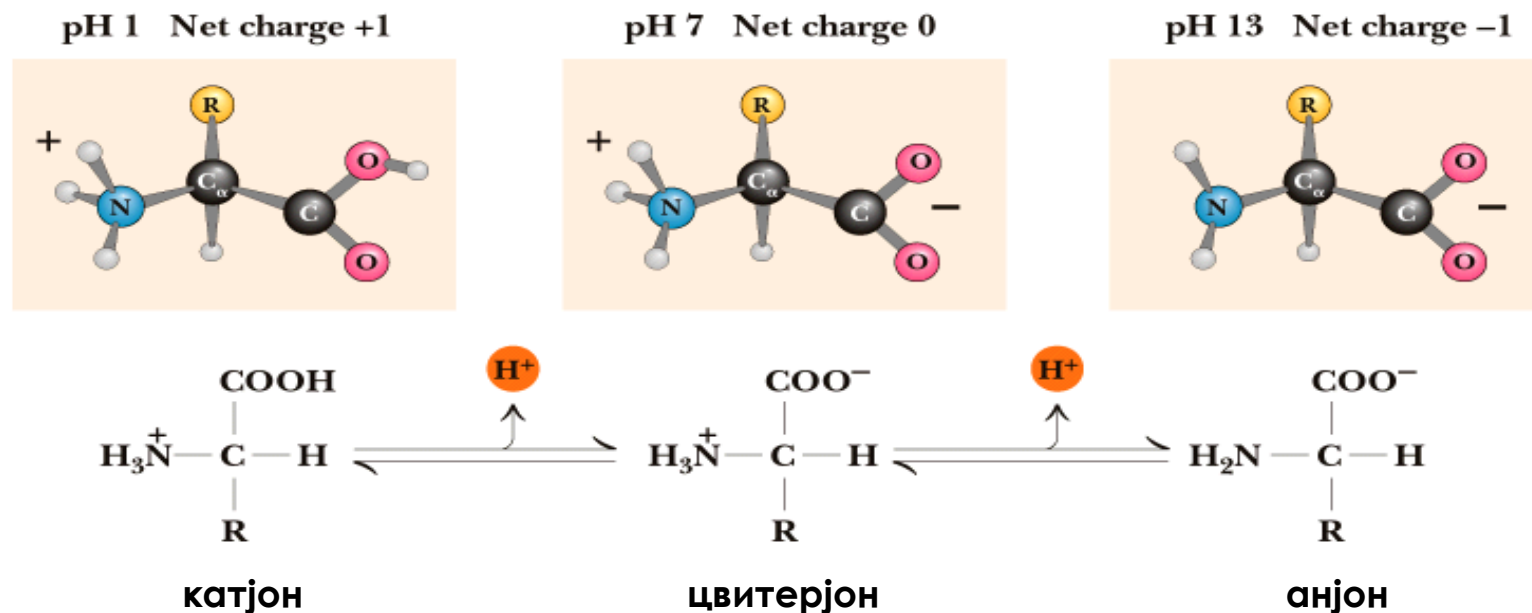


Во базен раствор



Изоелектрична точка

- ▶ Цвитерјонот има вкупен полнеж 0 (електронеутрална честичка).
- ▶ Карактеристична pH вредност при која вкупниот електричен полнеж е еднаков на 0, се нарекува **изоелектрична точка pI**.
- ▶ Изоелектричната точка на аминокиселината зависи од нејзината структура (природа на страничната група R).



Properties and Conventions Associated with the Standard Amino Acids

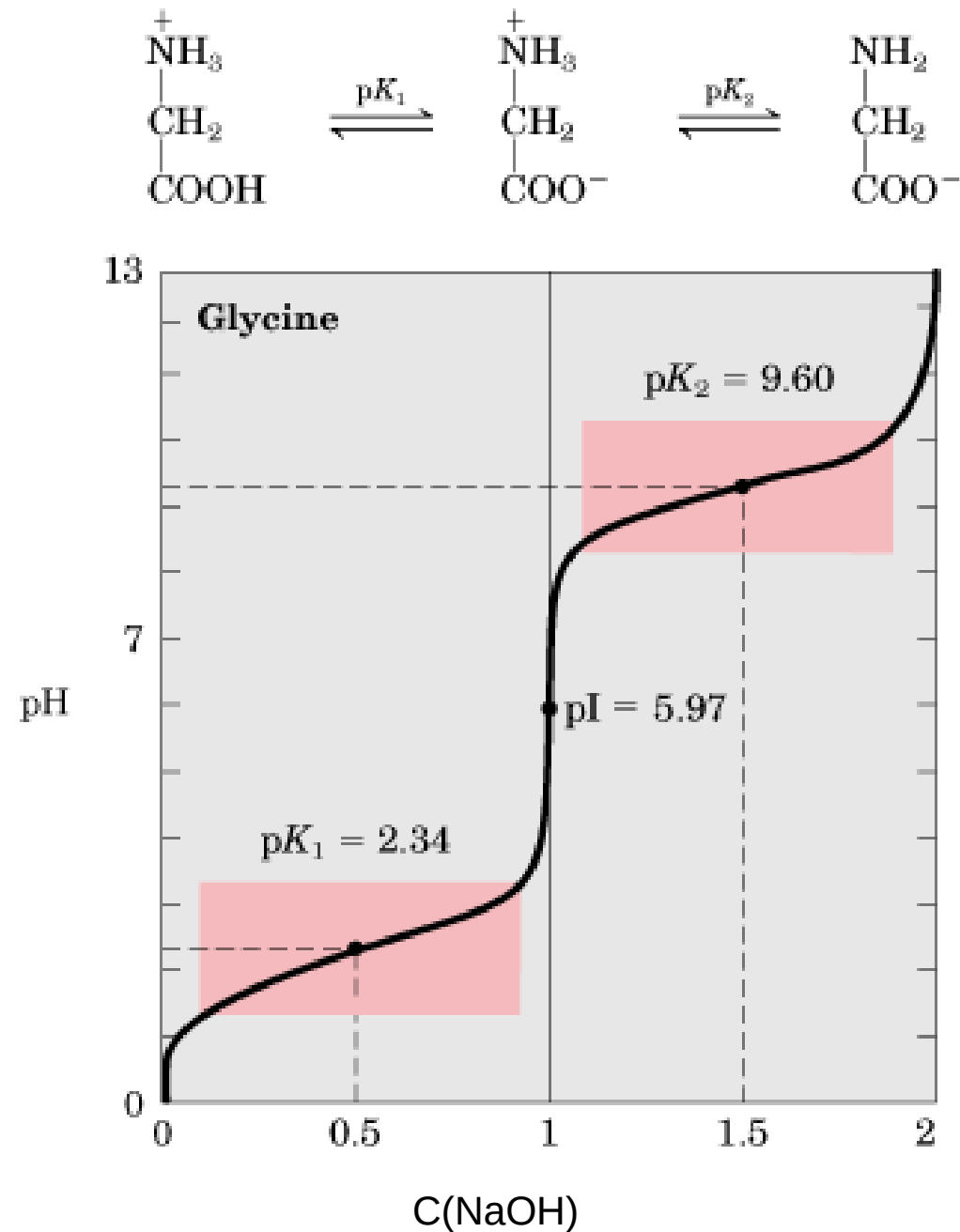
Amino acid	Abbreviated names		M_r	pK_a values			pI	Hydropathy index ^a	Occurrence in proteins (%) [†]
				pK_1 (—COOH)	pK_2 (—NH ₃ ⁺)	pK_R (R group)			
Nonpolar, aliphatic R groups									
Glycine	Gly	G	75	2.34	9.60		5.97	−0.4	7.2
Alanine	Ala	A	89	2.34	9.69		6.01	1.8	7.8
Valine	Val	V	117	2.32	9.62		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
Aromatic R groups									
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
Polar, uncharged R groups									
Serine	Ser	S	105	2.21	9.15		5.68	−0.8	6.8
Proline	Pro	P	115	1.99	10.96		6.48	1.6	5.2
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
Positively charged R groups									
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
Negatively charged R groups									
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

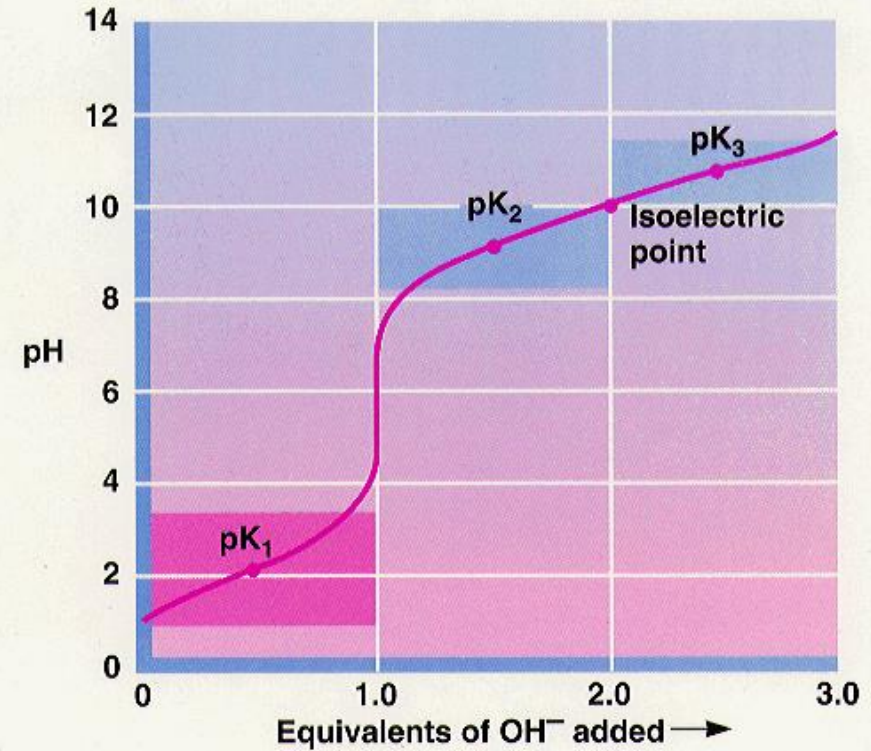
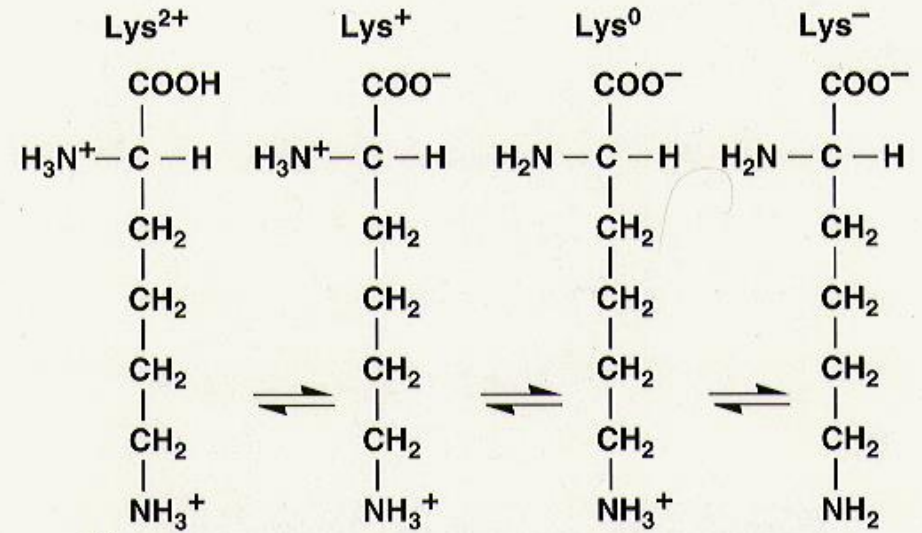
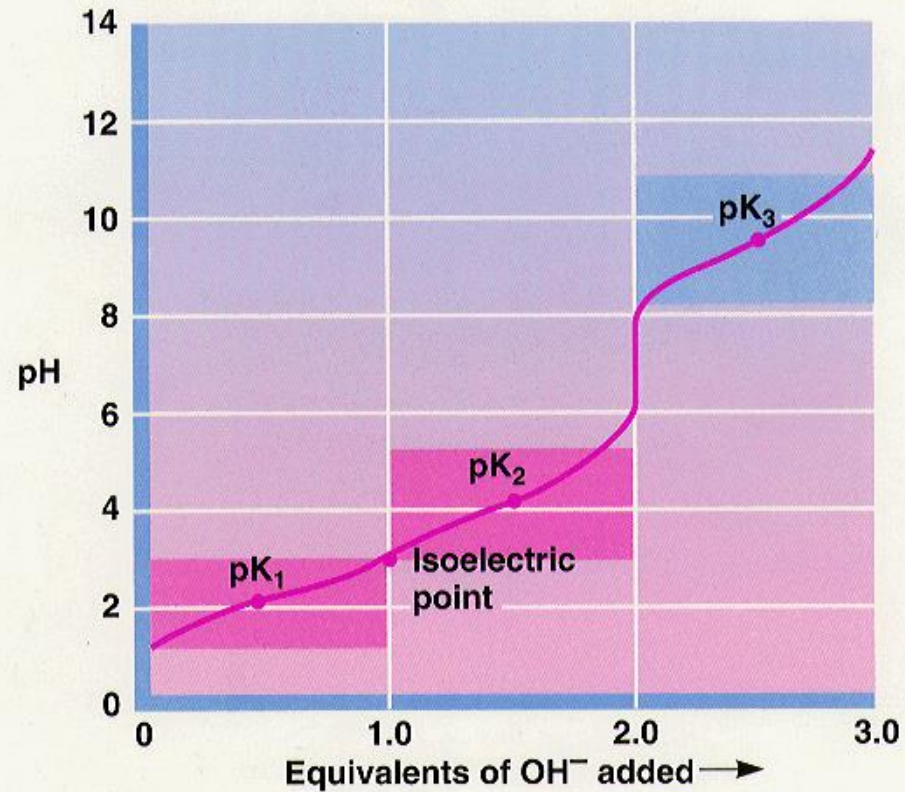
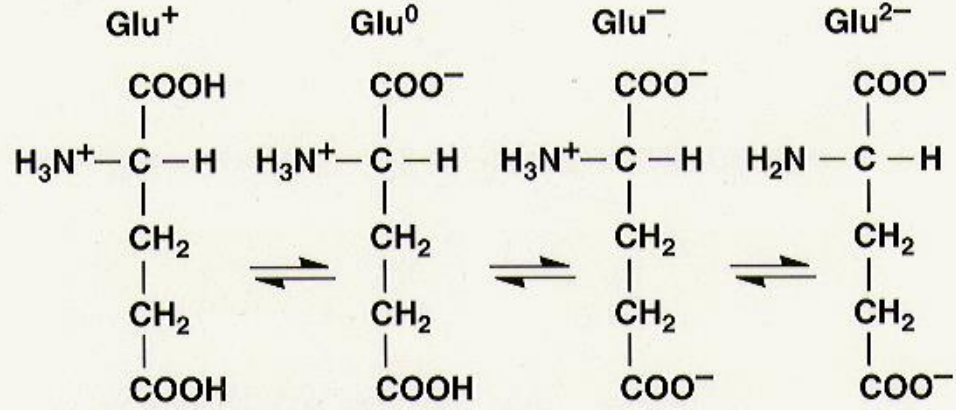
Константи на дисоцијација

- ▶ Константа на дисоцијација K_a ; вообичаена е употребата на **$pK_a = -\log K_a$** .
- ▶ **$pK_1 (-COOH) \approx 2$** , се однесува на pK_a за **карбоксилната група** на α – аминокиселината. До оваа вредност карбоксилната група е протонирана, а при $pH > pK_1$ таа е дисоцирана COO^- .
- ▶ **$pK_2 (NH_3^+) \approx 9$** , се однесува на pK_b за **амино групата** на α – аминокиселината. При pH вредности повисоки од **pK_2** , амино групата постои во депротониран облик NH_2 .
- ▶ **pK_R** се однесува на природата на **страничната група**, има удел во проценката на изоелектричната точка на базните и киселите аминокиселини.
- ▶ **Аланин**: $pK_1 (-COOH) = 2,34$ $pK_2 (-NH_3^+) = 9,69$ **$pI = (pK_1 + pK_2)/2 = 12,03/2 = 6,015$**
- ▶ **Аргинин**: $pK_1 (-COOH) = 2,17$ $pK_2 (-NH_3^+) = 9,04$ $pK_R = 12,48$ **$pI = (pK_2 + pK_R)/2 = 21,52/2 = 10,76$**

Криви на титрација

- Со постепено додавање на база во текот на титрацијата, се добиваат **разни јонски форми на киселината: катјон, цвистерјон, анјон**.
- Секоја фаза во титрацијата се одразува на формата на кривата на титрација.
- Глицин: $pK_1 (-COOH) = 2,34$ $pK_2 (-NH_3^+) = 9,60$
 $pI = (pK_1 + pK_2)/2 = 11,94/2 = 5,97$
- Пуфери: $pKa \pm 1$
- Што се пуфери? Колку пуфери постојат за глицин и напиши ги пуферските системи!?





Задачи

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

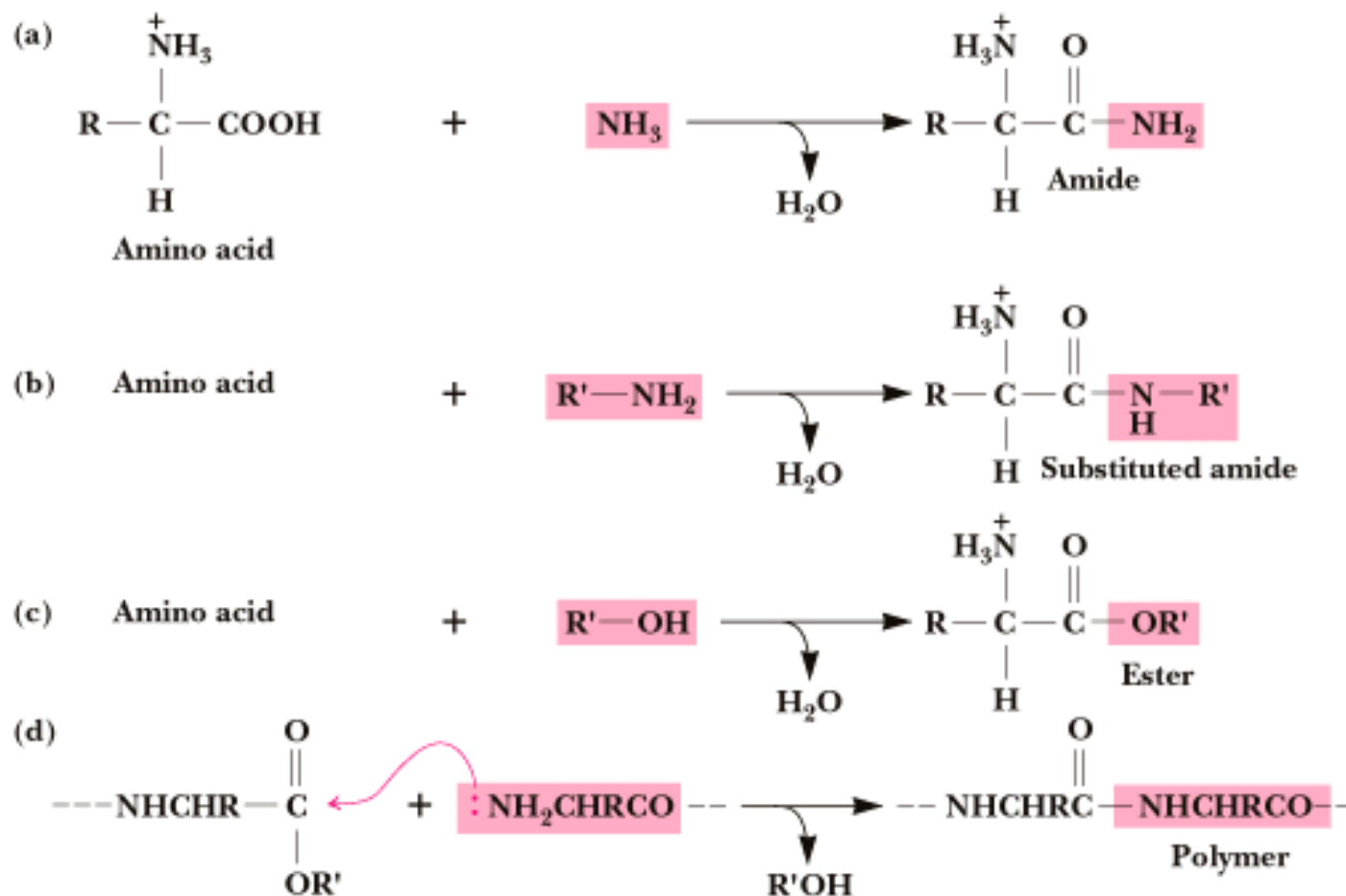
1. Пресметај ја изоелектричната точка на аминокиселините глутамат и лизин и спореди ги добиените вредности со податоците од кривата на титрација?
 2. Коментирај ги кривите на титрација! Постојат ли пуферски системи?!
 3. Колку изнесува pH на раствор на лизин во вода, кога страничната низа е 75 % дисоцирана? ($\text{p}K_R$ на лизин е 10,5).
- ▶ Водните раствори на аминокиселини се однесуваат како пуфери. Затоа се користи формулата на **Хендерсон – Хаселбахова равенка** која ја дава врската меѓу pH, pK и концентрација на пуферот.
 - ▶ Се заменува вредноста за $\text{p}K_R$ и вредноста за концентрацијата на конјугираната база и киселина за аминокиселината. При 75 % дисоцијација односот на $[\text{A}^-]/[\text{HA}]$ е 3 : 1.

Хемиски реакции на аминокиселини

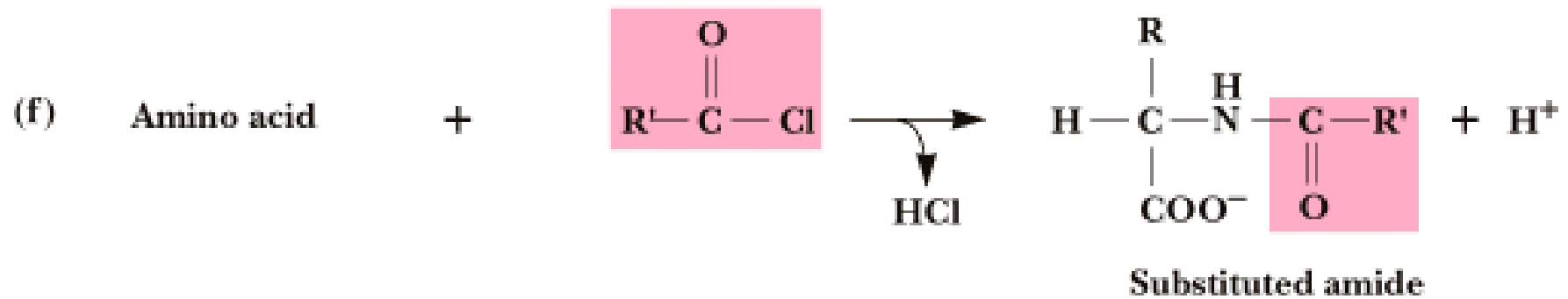
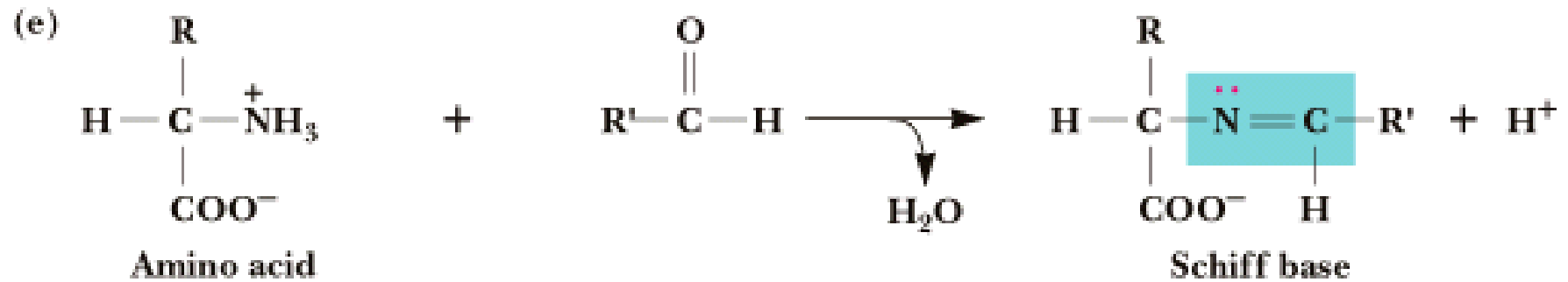
Реактивност на аминокиселините

- ▶ Хемиските својства на аминокиселините се должат на присуството на двете функционални групи amino ($-\text{NH}_2$) и карбоксилна група ($-\text{COOH}$), и нивните карактеристични својства.
- ▶ Покажуваат **хемиски особини на карбоксилни киселини и амини**
 - ▶ Карбоксилните групи се дериватизираат до амиди и естери
 - ▶ Амино групите формираат Шифови бази и амиди
- ▶ Страничните низи во сврзани аминокиселини даваат карактеристични реакции:
 - ▶ Цистеинските остатоци даваат дисулфиди, може лесно да се алкилираат и др.

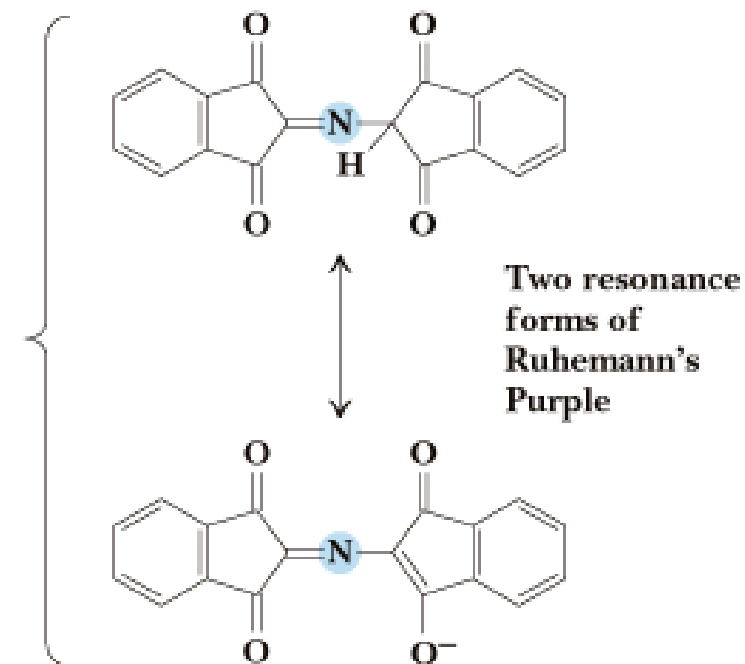
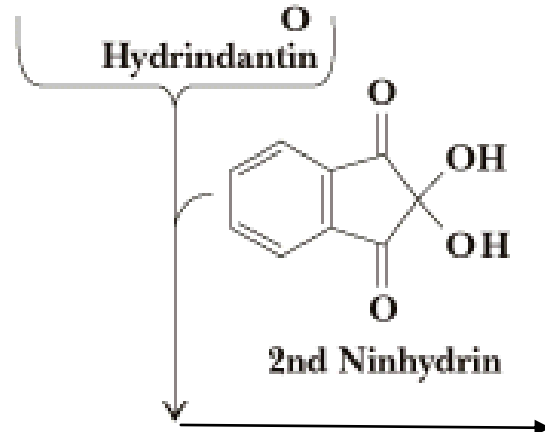
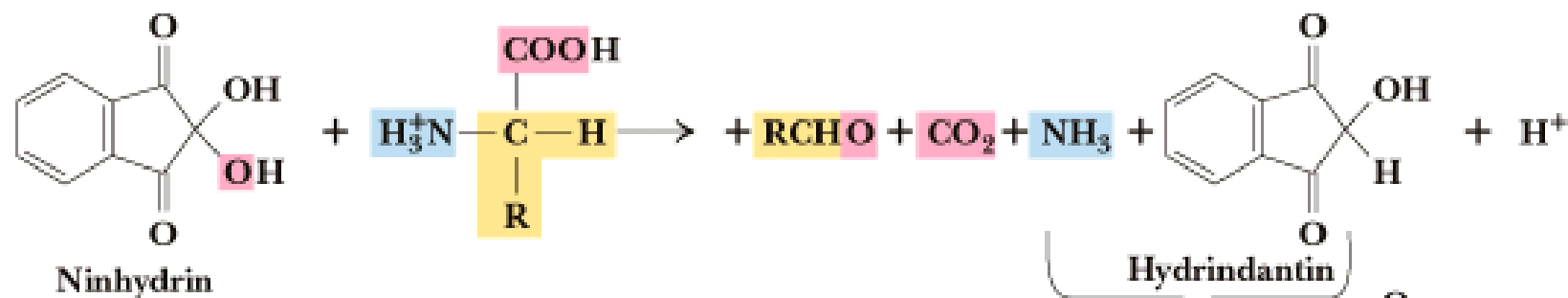
Реакции на карбоксилната група од аминокиселините



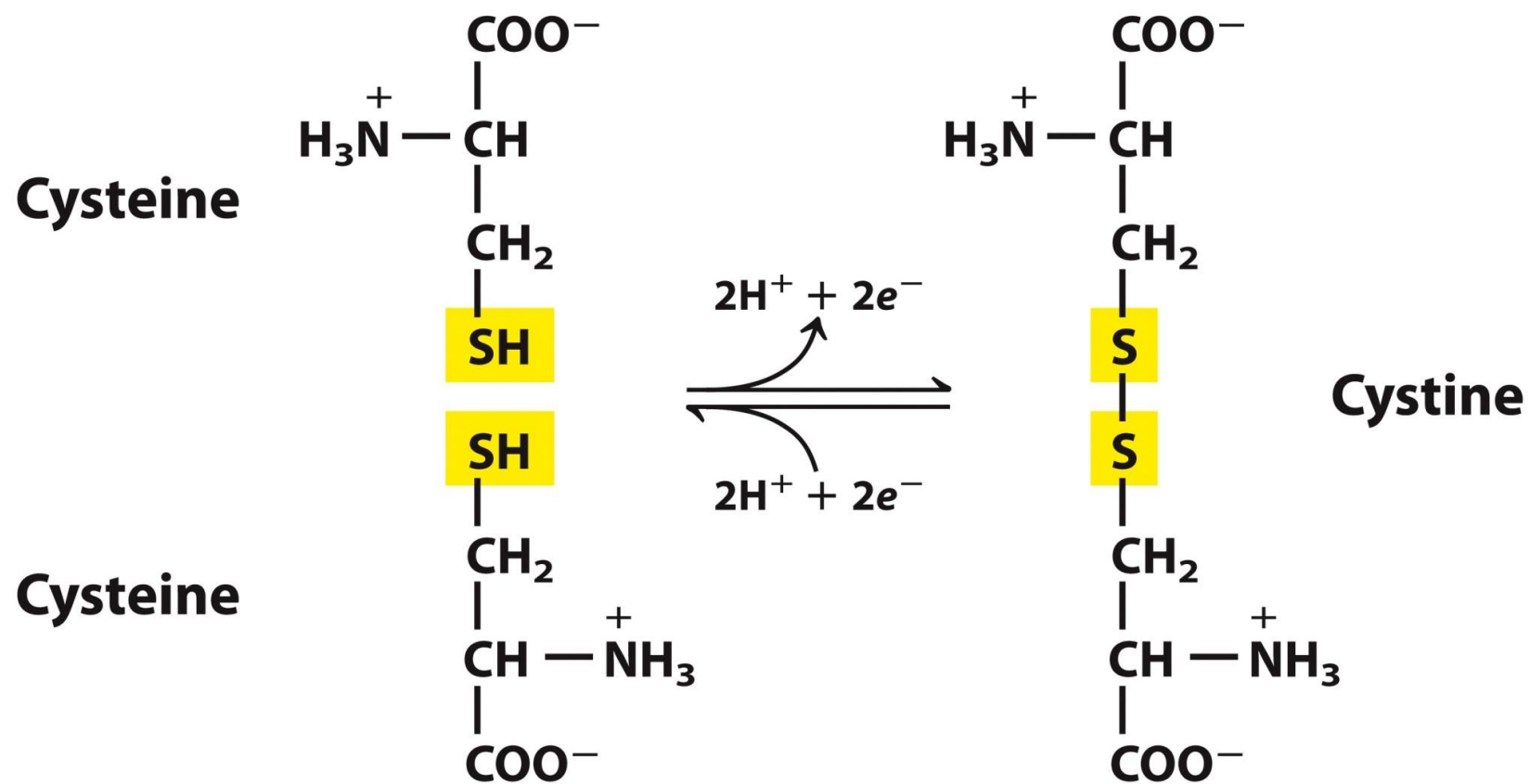
Реакции на амино групата од аминокиселините



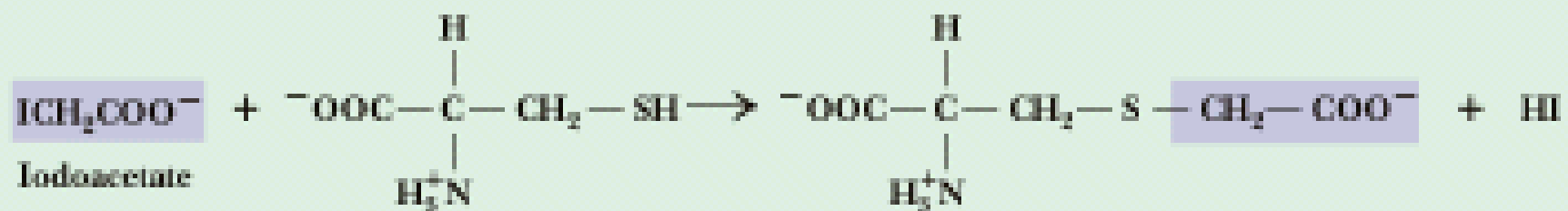
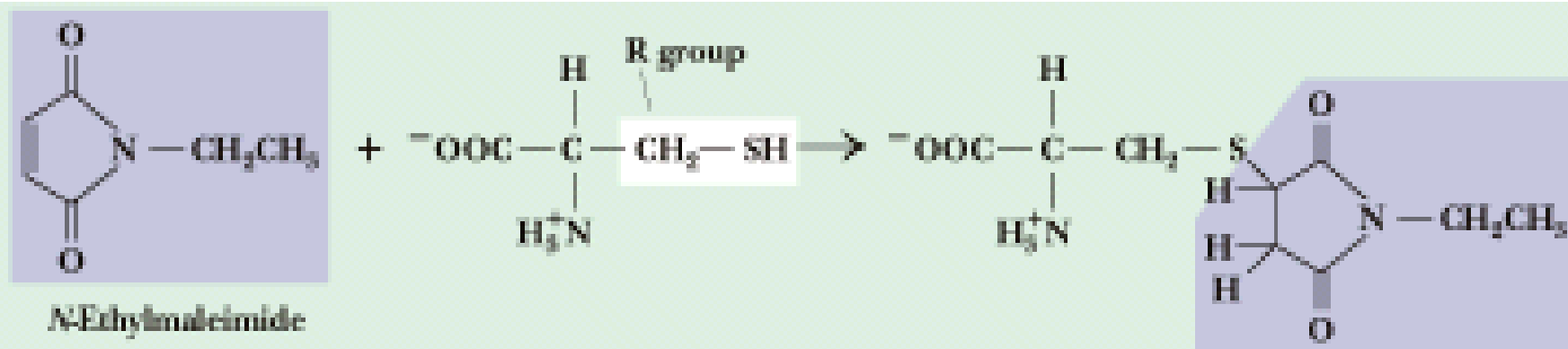
Нинхидринска реакција



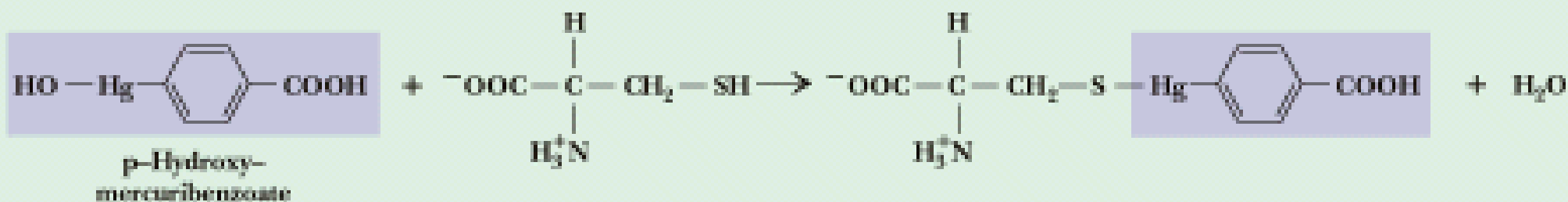
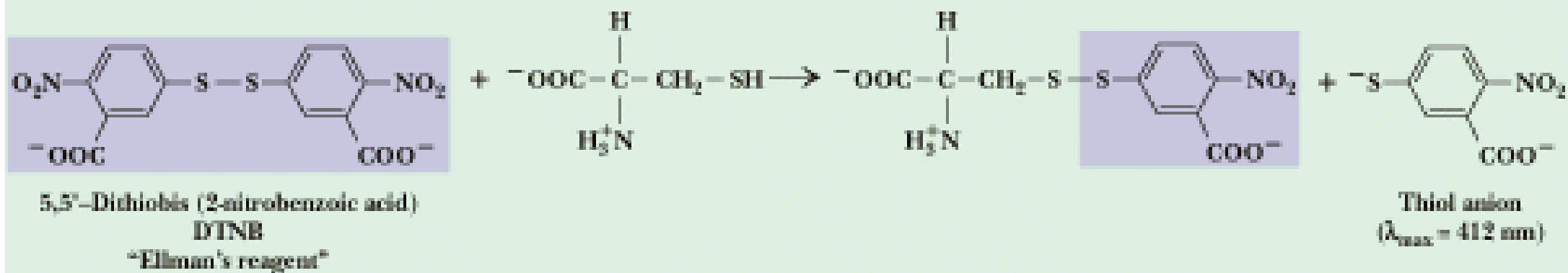
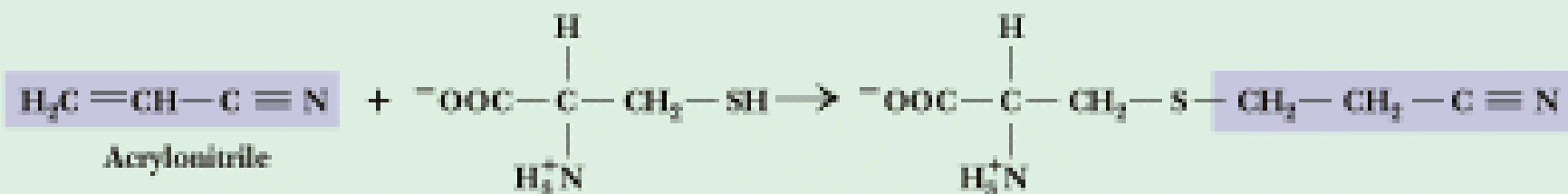
Реакции на цистеин



Реакции на цистеин

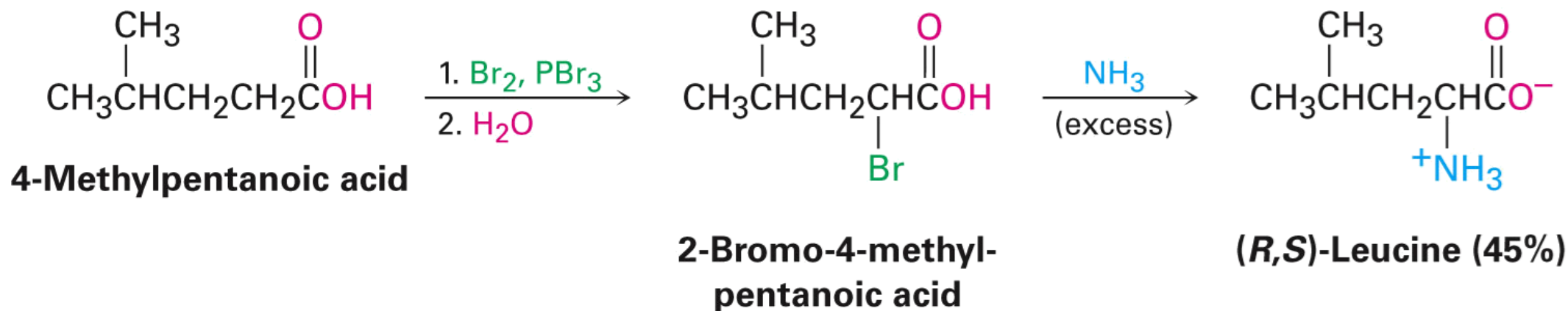


Реакции на цистеин



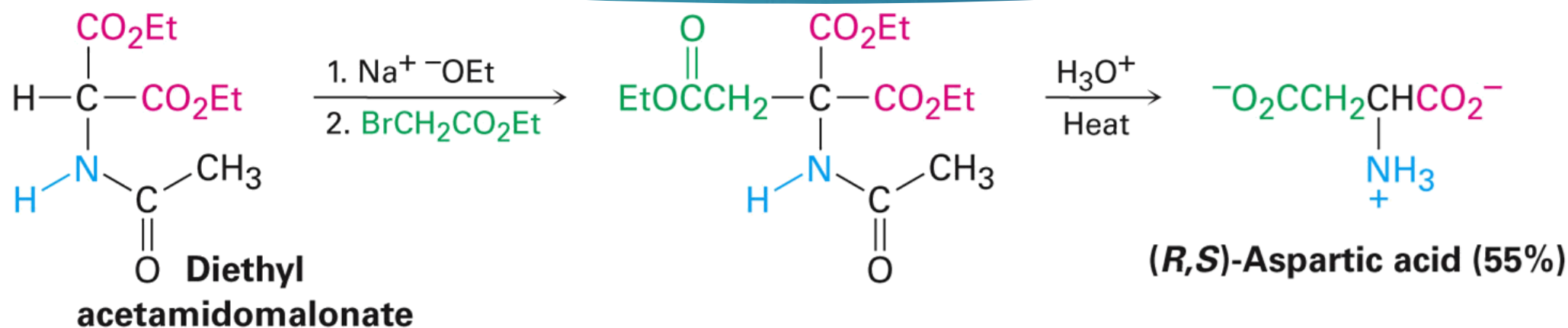
Синтеза на аминокиселини

Синтеза според Hell-Volhard-Zelinskii



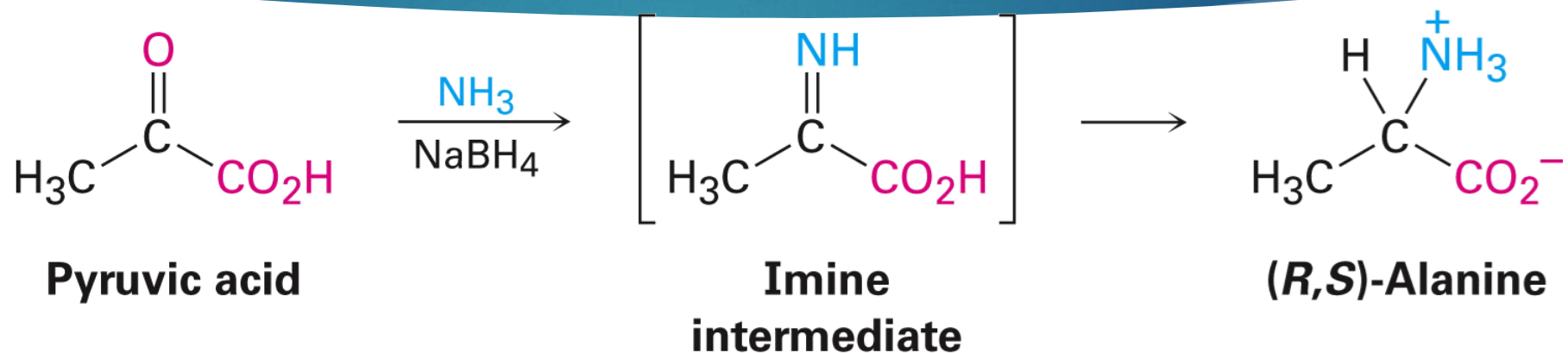
- ▶ Најстар метод за синтеза на α-аминокиселини:
- ▶ При третман со Br₂ или PBr₃ се врши α-бромирање на карбоксилната киселина.
- ▶ Во вториот чекор се врши нуклеофилна супституција на бромот од α-бромо киселината со амонијак или фталамид

АМИДОМАЛОНАТНА СИНТЕЗА



- ▶ Методот се базира на малон естерската синтеза за зголемување на низата.
- ▶ При третман со база, диетилацетамидомалонатот конвертира во **енолатен јон**. Потоа се врши алкилирање со **примарен алкил халид**.
- ▶ Заштитните групи (естерска и амидна) **хидролизираат** при загревање во воден раствор на киселина.
- ▶ Со **декарбоксилација** се добива α-аминокиселина.

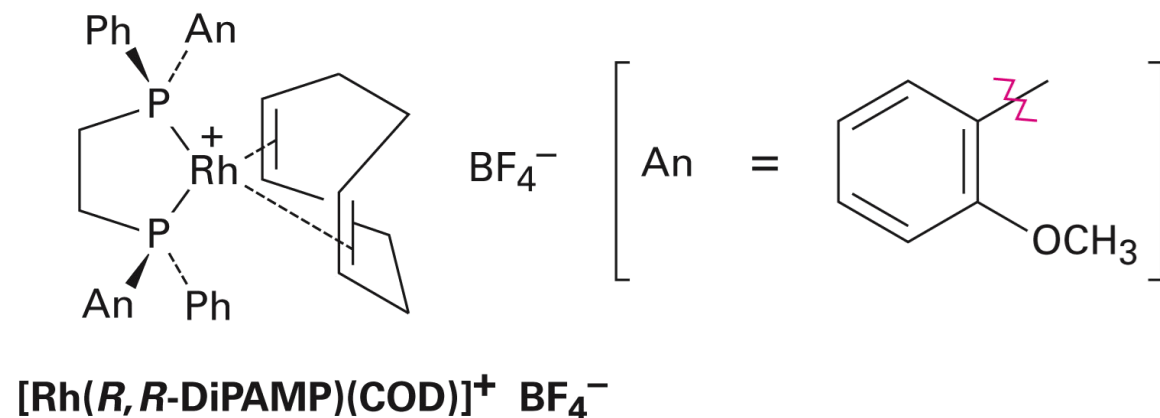
Редуктивно аминирање на α -кето киселини



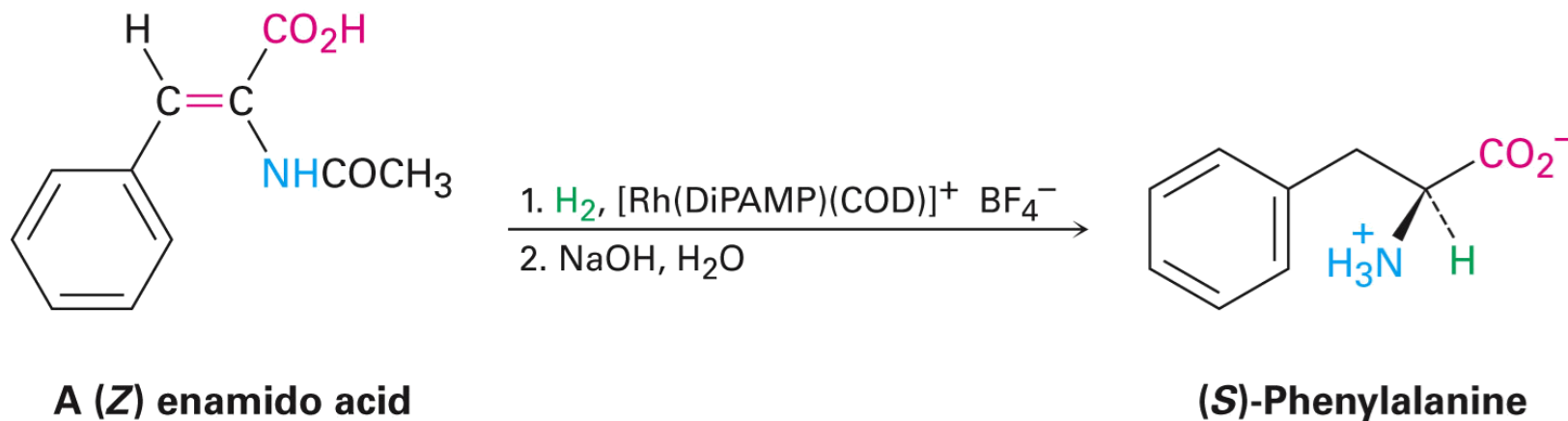
- ▶ Во лабораторија, редукцијата на α -кето киселините се одвива со амонијак и редукционо средство.
- ▶ Лабораториска синтеза на α -аминокиселина е аналогна со нивната биосинтеза.
- ▶ Биолошки редукциски агенс е никотинамид аденин динуклеотид (NADH), а реакцијата е катализирана со ензим - соодветна дехидрогеназа.

Енантиоселективна синтеза на аминокиселини

- Добивањето на чист енантиомер со:
 - **Раздвојување на рацемската смеса** на чисти енантиомери (неефикасна и губиток на 50% од продуктот).
 - **Енантиоселективна синтеза**: изнаоѓање на хирален реакционен катализатор кој привремено ќе ја држи молекулата на супстратот во несиметрична околина.
- Пример за катализатор: **комплекси на родиум(I)** со циклооктадиен; или со дифосфинот (R,R)-1,2-bis(o-анизилфенилфосфино)етан – DiPAMP лиганд.

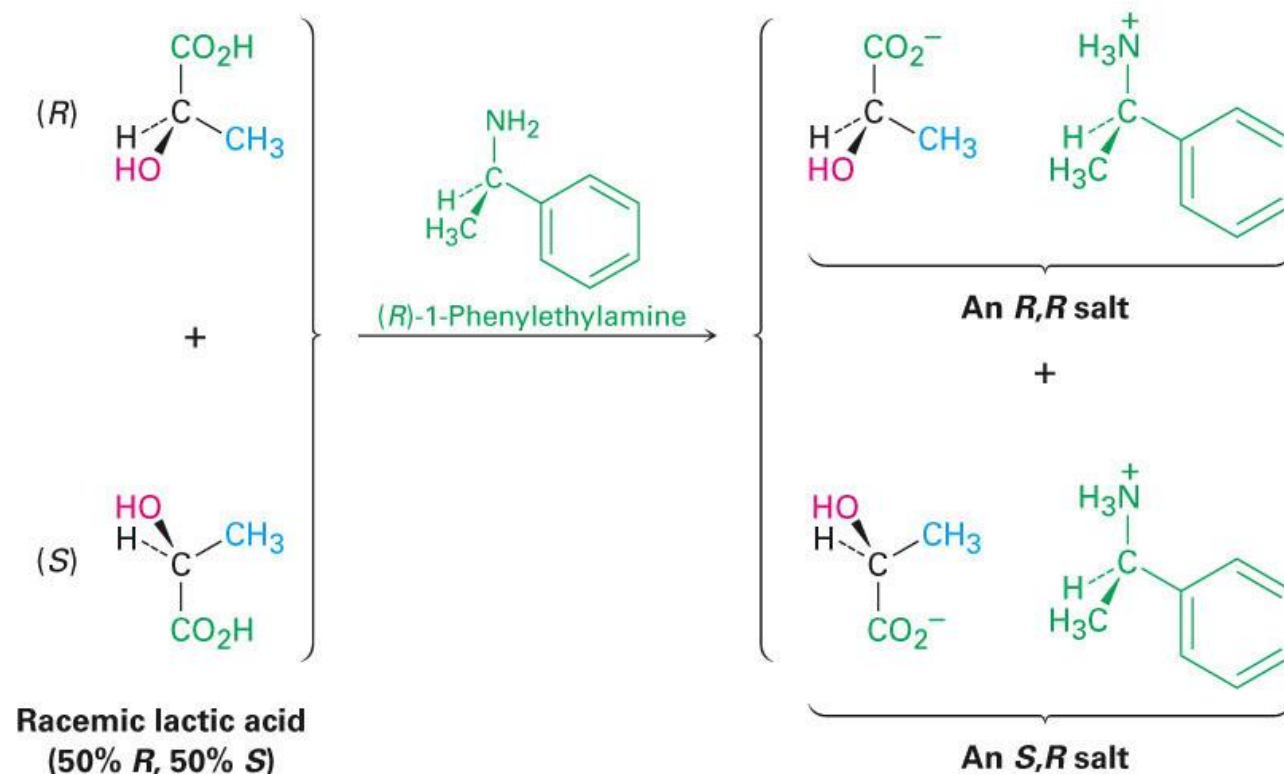


- При реакција на хидрогенирање на Z-енамидо киселина се добива само еден продукт, S-енантиомер, во присуство на хирален катализатор на родиум:

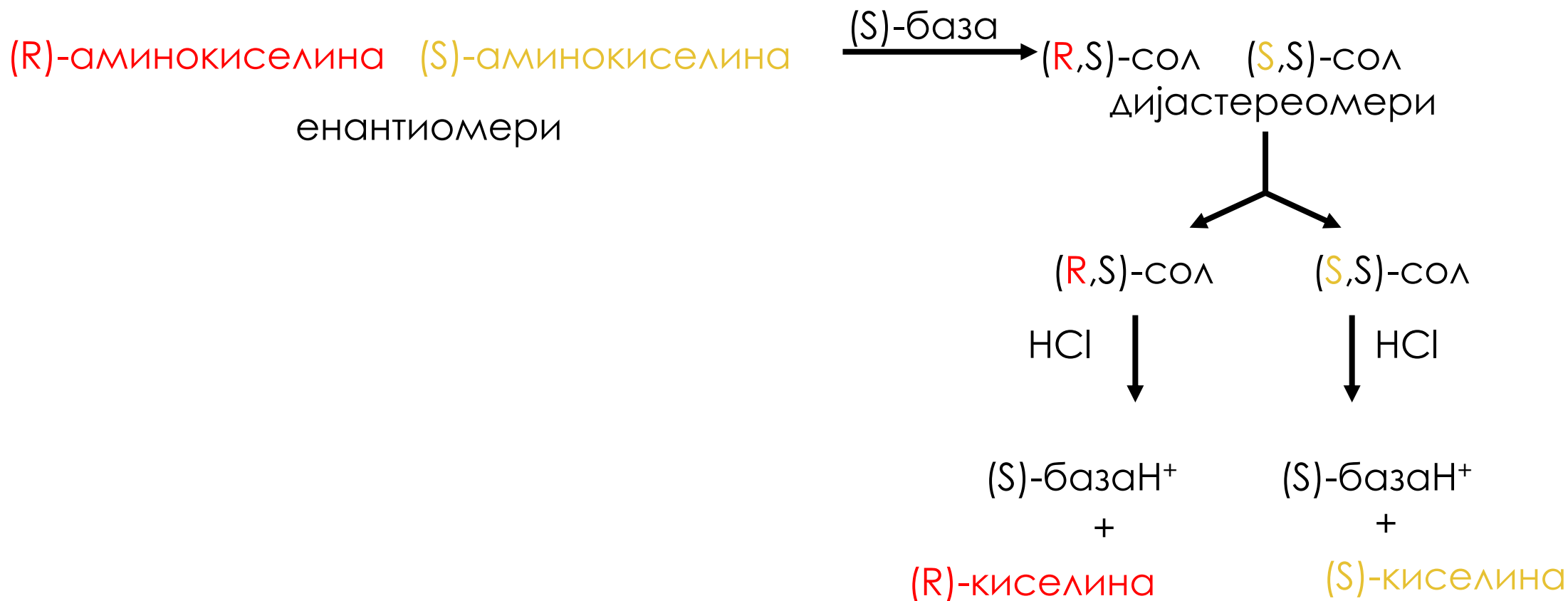


Раздвојување на рацемска смеса

- Реакција на рацемски смеси со оптички активни реагенси
- Енантиомерите во рацемска смеса не може да се разделат со едноставни физички методи, но при реакција со хирална молекула се образуваат дијастереомери, кои се разликуваат според своите физички својства и може да се разделат.
- Пр: Разделување на енантиомерите по реакција со хирален амин.

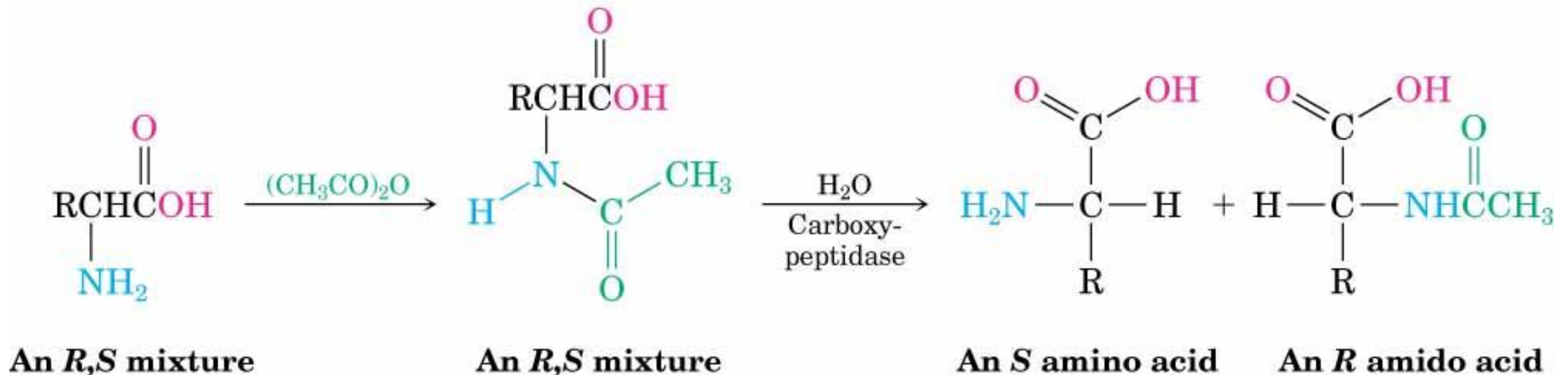


Раздвојување на рацемска смеса од аминокиселини



Ензимски катализирани реакции

- Ензимите **селективно ја катализираат хидролизата** на амидите, при што се добиваат само L аминокиселини (S стереоген центар):

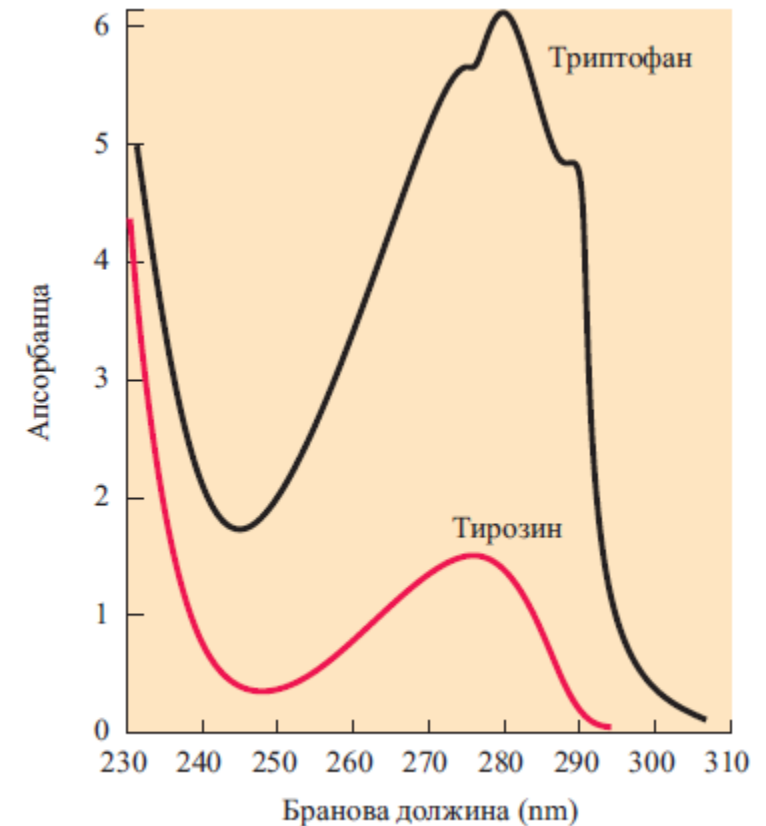


Методи за разделување и идентификација на аминокиселини

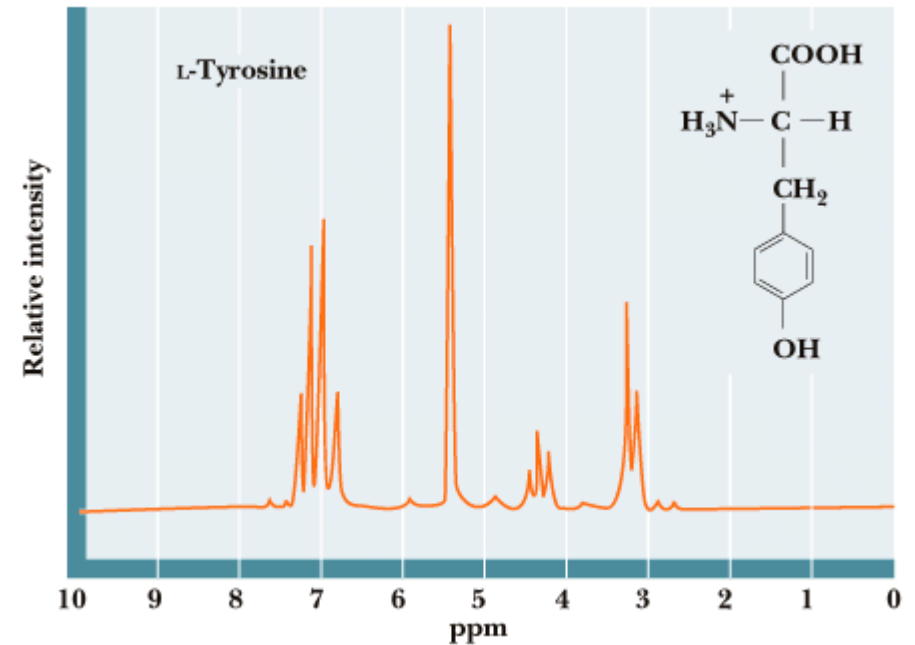
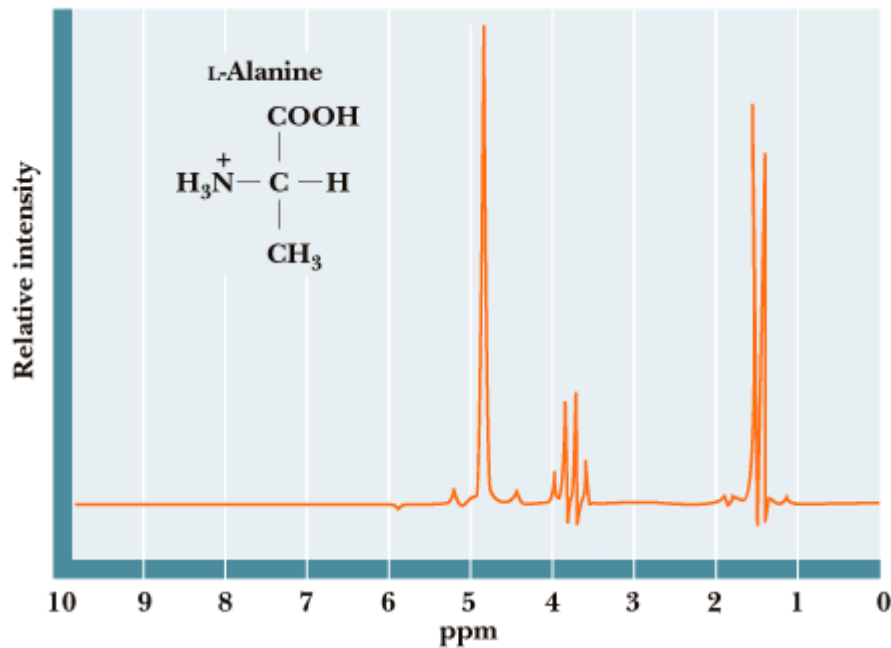


Спектроскопски методи

- ▶ **Сите аминокиселини апсорбираат во инфрацрвениот регион**, некои апсорбираат UV зрачење, ниту една аминокиселина не апсорбира светлина во видливиот дел од електромагнетниот спектар.
- ▶ **Само ароматичните аминокиселини** фенилаланин, триптофан и тирозин **покажуваат значителна UV апсорпција** на бранова должина од околу 280 nm.
- ▶ Ароматичните аминокиселини покажуваат и **слаба флуоресценција**.
- ▶ За триптофанот е карактеристична **фосфореценција**.
- ▶ Заклучок: Многу детали за структурата на аминокиселините може да се добијат со спектроскопски мерења.



Нуклеарно-магнетна резонанца

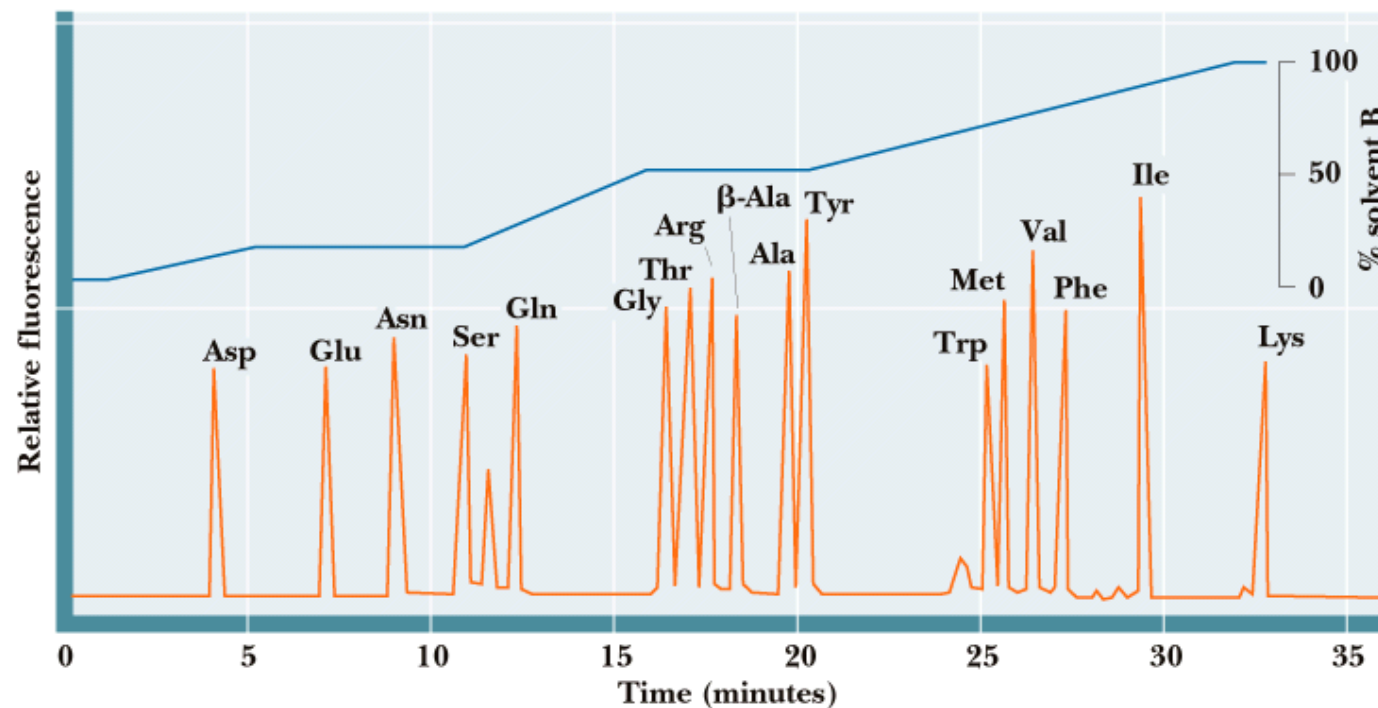


- **^1H NMR на аминокиселините L-аланин и L- тирозин.**
- Хемиско поместување во однос на интерен стандард TMS.

(Високите вредности за резонанца на околу 5 ppm се должат на присутната вода во растворувачот D_2O).

Хроматографски методи

- ▶ Распределителна хроматографија (TLC, хартиена хроматографија)
- ▶ Јонско-изменувачка хроматографија
- ▶ HPLC



Електрофореза

- ▶ Разликата во изоелектричните точки може да се искористи за **разделување на смеса од аминокиселини** со помош на електрофореза.
- ▶ Раствор од различни аминокиселини се става во центарот на хартиена лента или гел, кој се потопува во со пуфер со позната pH. На краевите се поставуваат електроди и се пропушта еднонасочна струја.
- ▶ Различни аминокиселини се движат кон електродите со различна брзина, што зависи од нивната pI и од pH на пуферот (на слика pH на пуфер 5,97).

