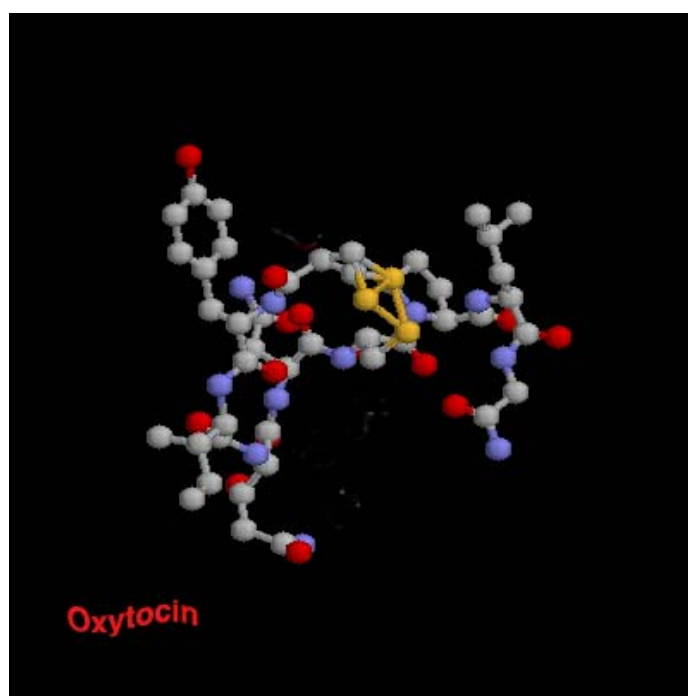


# Kemi for tiden

## Peptider og peptidbiblioteker Opgaver og arbejdsark

af

Hanne Busk og Jørgen W. Anthonsen,  
Frederiksberg Gymnasium



Kemi Forlaget

## Indledning

Nedenstående opgaver og arbejdsark knytter sig til en tilhørende artikel: ***Peptider og peptidbiblioteker***, skrevet af Paul Robert Hansen, Kemisk Institut, KVL, [prh@kvl.dk](mailto:prh@kvl.dk)

Artiklen er sammen med denne publikation udsendt til alle landets gymnasier, htx-skoler og hf-kurser og er desuden trykt på midtersiderne i **dansk kemi, 83, nr. 4, 2002**.

Opgaverne/arbejdsarkene behandler teori, der knytter sig til denne artikel, men omfatter desuden grundlæggende teori omkring aminosyrer og peptider. Opgaverne kan således fint anvendes i forbindelse med andet undervisningsmateriale om aminosyrer, peptider og proteiner.

Til materialet hører endvidere en cd-rom, hvor dette hæfte findes i PDF-format. Desuden indeholder cd'en et omfattende materiale af laboratorieøvelser samt computer og netbaseret materiale omkring aminosyrer, peptider, proteiner, proteinsyntese m.m.

En indholdsfortegnelse over materialet på cd'en findes på de følgende 2 sider.

*Kemi for Tiden er et samarbejde mellem Kemilærerforeningen, Kemisk Forening og Kemiingeniørgruppen, der udgivet en række temanumre omhandlende aktuelle kemiske emner indenfor forskningsverdenen.*

*Baggrundsgruppen består af: Lars Bank, Kemiingeniørgruppen; Poul Erik Hansen, Kemisk Forening, Jørn Kofod, H. Lundbeck A/S, og Preben Albertsen, Kemilærerforeningen.*

*Artikel og opgaver findes desuden på Kemilærerforeningens hjemmeside:*

<http://www.ke.gymfag.dk>

**Kemi Forlaget**

**Slotsgade 2<sup>3</sup>**

**2000 København K**

**Telefon: 35 39 00 64**

**Fax: 35 39 48 14**

**E-mail: LMFK@skolekom.dk**

## **Oversigt over materiale på den tilhørende CD-rom:** *(Nedenstående oversigt findes som filen: Indhold (PDF))*

### **Opgaveark:**

- 1) Arbejdsark om aminosyrer og peptider - materialet er også trykt som opgavehæfter.  
Filnavn: *Opgaveark(PDF)* **Findes også i word-format.**
- 2) Bilag til arbejdsarkene: Figur 2 fra artiklen i Dansk Kemi: Skematisk fremstilling af fastfasesyntese.  
Filnavn: *Fastfasesyntese(PDF)*

### **Øvelser om aminosyrer, peptider og proteiner:**

- 3) Øvelse 1 - øvelsesvejledning til uddeling til eleverne.  
Titel: Hydrolyse af Aspartam.  
Filnavn: *Hydrolyse af Aspartam(PDF)* **Findes også i word-format.**
- 4) Øvelse 2 - øvelsesvejledning til uddeling til eleverne  
Titel: Identifikation af et aminosyrehydrochlorid.  
Filnavn: *Aminosyrehydrochlorid(PDF)* **Findes også i word-format.**
- 5) Øvelse 2 - facitark - titrerkurver tegnet for de tre valgt aminosyrer i "pH-programmet".  
Filnavn: *Titrerkurver(PDF)*
- 6) Øvelse 2 - facitark - strukturformler for de valgte aminosyrer og aminosyrehydrochlorider samt pKs-værdier fra Databogen.  
Filnavn: *Strukturformler(PDF)*
- 7) Øvelse 2 - facitark - måle resultater af titrering af Histidin hydrochlorid, monohydrat og titrerkurve med relevant talbehandling.  
Filnavn: *Histidin(PDF)*
- 8) Øvelse 3 - øvelsesvejledning til uddeling til eleverne  
Titel: Bestemmelse af proteinindhold ved Biuretmetoden  
Filnavn: *Biuretmetode(PDF)* **Findes også i word-format.**
- 9) Øvelse 3 - facitark: Standardkurve samt resultat af en ukendt analyse samt af proteinindholdet i skummetmælk.  
Filnavn: *Biuretmetodefacit(PDF)*
- 10) Lærervejledning. Tips og kommentarer til de forskellige øvelser og til køb af kemikalier m.m.  
Filnavn: *Lærervejledning(PDF)*

## Øvelser om aminosyrer, peptider og proteiner (*FPro-filer*):

- 11) Øvelse 2 - facitark - måleresultater af titrering af L-Histidinmonohydrochlorid, -monohydrat og titrerkurve med relevant talbehandling.  
Filnavn: *His.fpr*
- 12) Øvelse 2 - facitark - måleresultater af titrering af L-Glutaminsyrehydrochlorid, monohydrat og titrerkurve med relevant talbehandling.  
Filnavn: *Glusyre.fpr*
- 13) Øvelse 2 - facitark - måleresultater af titrering af L-Argininhydrochlorid og titrerkurve med relevant talbehandling.  
Filnavn: *Arg.fpr*
- 14) Øvelse 3 - facitark - absorptionsspektrum af  $\text{Cu}^{2+}$ -proteinkomplekset.  
Filnavn: *Biureta.fpr*

## Computer og netbaseret materiale omkring aminosyrer, peptider, proteiner, proteinsyntese m.m.:

Filerne nedenfor kræver, at skolen har programmet Chem3D Pro til rådighed for at få det maximale udbytte. Andre programmer kan med større eller mindre besvær anvendes til nogenlunde det samme. På følgende adresse hos Chemstore kan man til en fornuftig pris købe Chem3D Pro.5.5 i en download Windows og Mac versioner:

<http://chemstore.cambridgesoft.com/software/product.cfm?pid=11>

Materialet er kun kortfattet beskrevet her, da den første PDF-fil nedenfor giver en grundig gennemgang af mulighederne i de forskellige PDF-filer- samt henvisninger til referencer på nettet.

- 15) **START peptid(PDF)**: En kort introduktion til mulighederne i det nedfor præsenterede materiale, med indlagte LINKs og referencer til diverse web-sider. Alle Links er aktive.
- 16) **A(PDF)**: Visualisering og opbygning af octapeptidet SCHTFGDI (fra artiklen) vha. modelleringsprogrammet Chem 3D Pro. Herved fremkommer både *primærstruktur* og *sekundærstruktur* for peptidet. (LINK-1).
- 17) **B(PDF)**: Introduktion til *Protein databanken*. Her arbejdes bl.a. med en mutant af insulin og igen anvendes Chem3D Pro 5.5. (LINK-2)
- 18) **C(PDF)**: Undersøgelse af Asparaginsyres syre/base egenskaber, titreringskurver, "*pH*-programmet" m.m.
- 19) Filen: **peptid.mov**: En god animation af hvordan aminosyre-syntesen foregår *in vivo*. Kan åbnes ved at klikke på Linket i: **START peptid(PDF)**
- 20) Filen: **optimering** bør kunne åbnes ved at klikke på billedet af optimeringen på side 4 i filen : **A(PDF)**. Den er relateret til teksten der berøres her.

## Arbejdsark om aminosyrer og peptider

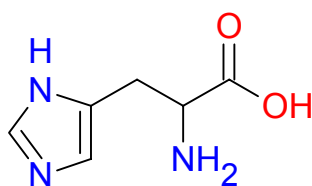
### Opgave a1

Aminosyrerne, der indgår i opbygningen af proteiner, er alle  $\alpha$ -aminosyrer (2-aminosyrer). Opskriv en generel strukturformel i Fischer-projektion for en naturligt forekommende  $\alpha$ -aminosyre.

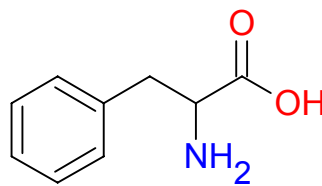
### Opgave a2

Navngiv nedenstående aminosyrer:

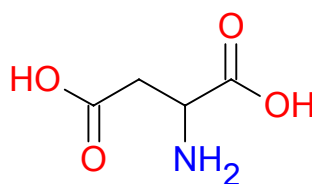
a)



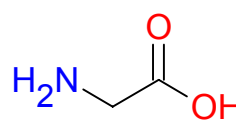
b)



c)

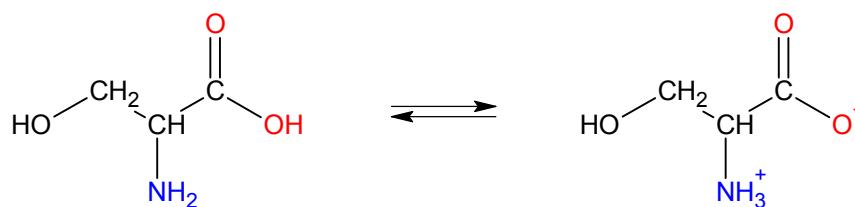


d)



### Opgave a3 - aminosyrernes syrebase egenskaber

Da  $\alpha$ -aminosyrerne indeholder både en syregruppe ( $-\text{COOH}$ ) og en basegruppe ( $-\text{NH}_2$ ) kan der ske en protonoverførsel indenfor selve molekylet, idet der dannes en såkaldt *amfoion* eller *zwitterion*. Så godt som alle aminosyrer er omdannet til *amfoioner*, idet nedenstående ligevægt ligger langt mod højre. Det gælder også i krystallinsk tilstand.



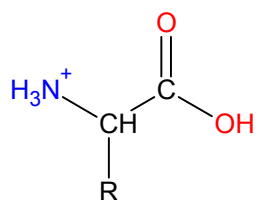
Aminosyre

Amfoion

- a) Opskriv ved hjælp af figur 1a) i artiklen formlerne for nedenstående aminosyrer (Fischer-projektion), idet du opskriver dem på *amfoionform*:  
 1) L-Alanin    2) L-Cystein    3) L-Arginin    4) L-Glutaminsyre
- b) Afgør udfra aminosyrernes sidekæde om ovenstående aminosyrer forventes at være polære, upolære, sure eller basiske.

#### Opgave a4 - aminosyrernes syre-baseegenskaber

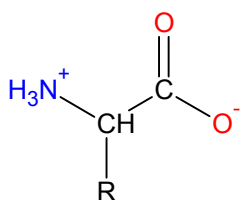
Aminosyrerne er amfolytter. Vi kan betegne aminosyren Amf, dens korresponderende syre S, og dens korresponderende base for B - generelt for en for aminosyre kan så opskrives:



S

$pK_s(\text{S})$

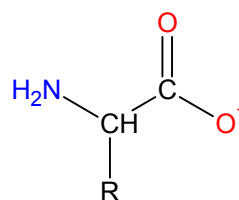
positiv ladet



Amf

$pK_s(\text{Amf})$

neutral



B

negativ ladet

I litteraturen anvendes normalt  $pK_{s1}$  for  $pK_s(\alpha\text{-COOH})$  og  $pK_{s2}$  for  $pK_s(\alpha\text{-NH}_3^+)$  og endelig bruges  $pK_{s3}$  ( $pK_{b3}$ ) som  $pK_s$  ( $pK_b$ ) for R-gruppens syre/base-egenskaber.

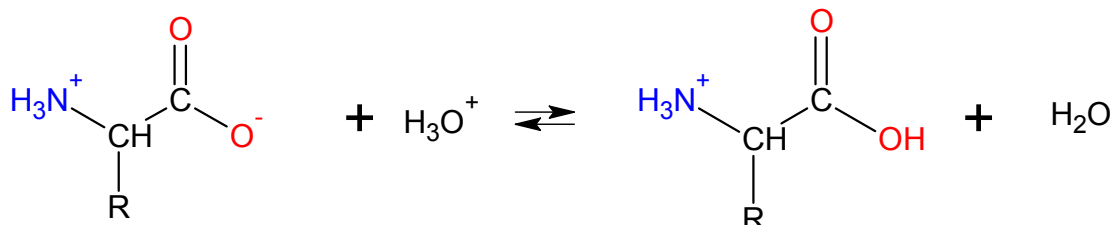
Den  $pH$ -værdi, hvor molekylet udadtil er neutralt kaldes aminosyre's isoelektriske punkt og betegnes  $pH_{iso}$ .  $pH_{iso}$  kan beregnes af amfolytformlen for aminosyrer uden sure eller basiske sidegrupper:

$$pH_{iso} = \frac{1}{2} \cdot \{pK_s(\text{S}) + pK_s(\text{Amf})\}$$

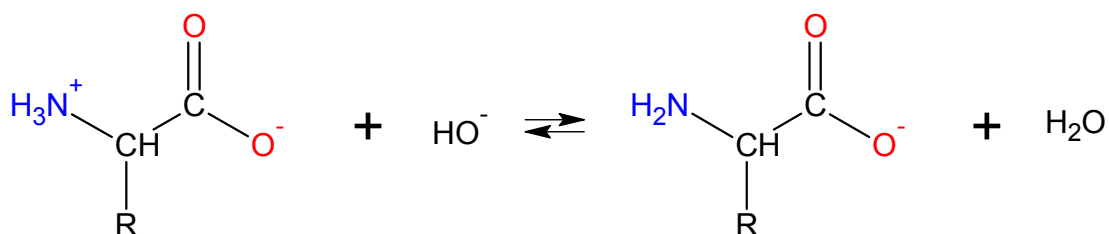
- a) Find de relevante  $pK_s$ -værdier i Databogen (bemærk notationen kan være forskellig!) og beregn  $pH_{iso}$  for aminosyrerne alanin og valin.
- b) Asparaginsyre indeholder 2 carboxylsyregrupper og 1 aminogruppe. Derfor kan den afhængig af  $pH$  optræde som fire forskellige ioner. Opskriv strukturformlerne for de fire forskellige ioner. Find de respektive  $pK_s$ -værdier og find  $pH_{iso}$ . Argumenter for dit valg af  $pK_s$ -værdier til udregningen.

Aminosyrer er som sagt *amfotere* og kan afhængig af omstændighederne optræde som syre eller base fx:

I en sur opløsning optages en proton



I en basisk opløsning afgives en proton



c) Opskriv afstemte reaktionsskemaer for reaktion mellem nedenstående stoffer. Aminosyrerne skrives fra start på *amfoionform*.

- 1) Methionin og saltsyre.
- 2) Phenylalanin og natriumhydroxid.
- 3) Produktet fra 2) med saltsyre i stofmængdeforholdet 1:1.
- 4) Produktet fra 2) med saltsyre i stofmængdeforholdet 1:2.

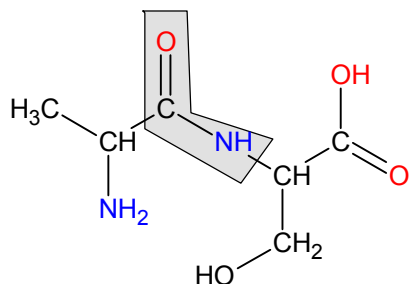
d)  $pK_s$ -værdierne og  $pH_{iso}$  for asparagin kan bestemmes udfra et eksperiment, hvor der er foretaget følgende målinger:

- A) Der afvejes 20,0 mmol asparagin, der opløses i vand og tilsættes 20,0 ml 0,1 M HCl.  $pH$  måles til 2,97.
- B) Der afvejes 20,0 mmol asparagin, der opløses i vand og tilsættes 15,0 mL 0,1 M NaOH.  $pH$  måles til 7,71.

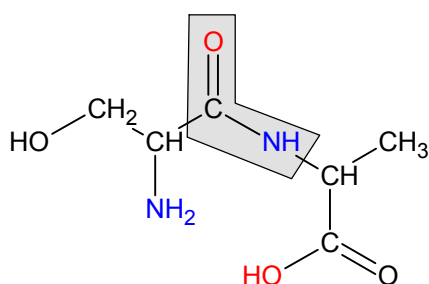
Beregn  $pK_{s1}$ ,  $pK_{s2}$  og  $pH_{iso}$  for asparagin. Sammenlign resultaterne med værdierne i Databogen.

### Opgave p1 - peptider.

Dipeptider dannes ved en kondensationsreaktion mellem to aminosyremolekyler. Man skriver den N-terminale ende til venstre og den C-terminale ende til højre. Amidbindingen er markeret med gråt.



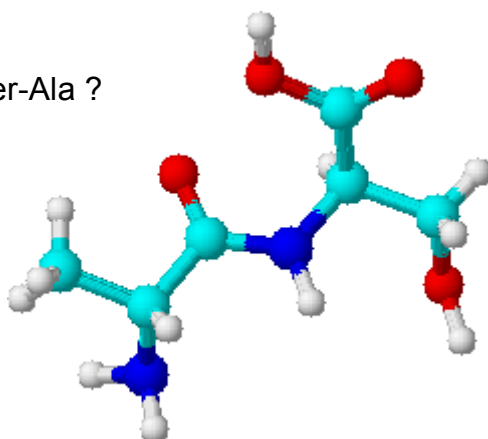
Alanylserin (Ala-Ser)



Serylalanin (Ser-Ala)

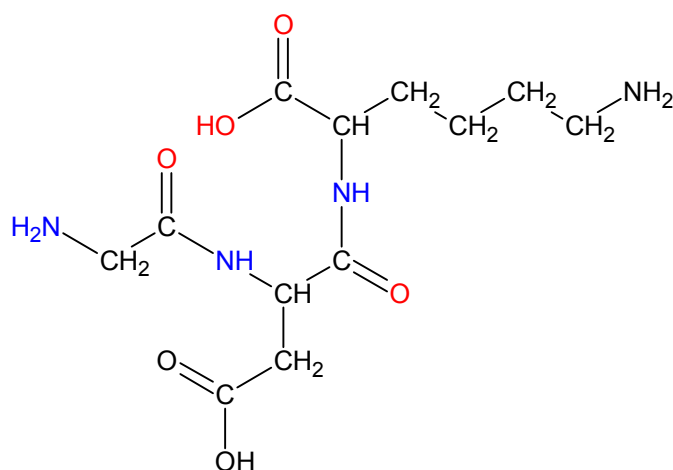
3D form af et dipeptid

Er det Ala-Ser eller Ser-Ala ?



### Opgave p2 - peptider

Navngiv nedenstående peptid med 3-bogstavbetegnelserne:



### Opgave p3 - peptider

Opskriv den komprimerede strukturformel for nedenstående peptider og angiv, hvor amidbindingerne sidder:

a) Ser-gly-ala

b) Met-Pro-Val-Gly

### Opgave p4- peptider

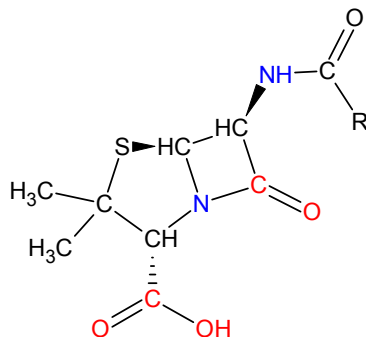
Udfra aminosyrerne methionine, lysine og valin kan dannes seks tripeptider. Opskriv navnene med 3-bogstavbetegnelserne.

### Opgave p5 - peptider

En række peptider er bekendt biologisk aktive fx oxytocin og vasopressin. Find strukturen af disse peptider vha. skolens opslagsværker/internet og angiv peptidernes virkning.

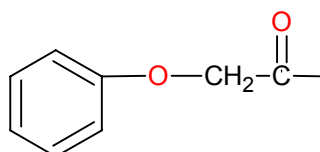
### Opgave p6 - peptider - penicillin

Aktivt penicillin ser ud som nedenfor, idet R-gruppen kan variere afhængig af typen. Penicillin består således af en cyclisk amidgruppe (en såkaldt  $\beta$ -lactamring), en peptidbinding og en R-gruppe.



Penicillin - generel struktur R = sidekæde

- Marker henholdsvis  $\beta$ -lactamringen og peptidbindingen med en ring. Opskriv den simpleste strukturformel på den  $\beta$ -aminosyre, som lactamringen kan dannes fra.
- Grundkæden i penicillin er et dipeptid. Marker de to respektive aminosyredele i molekylet.
- Hvis sidekæden R består af nedenstående struktur fås penicillin V. Opskriv

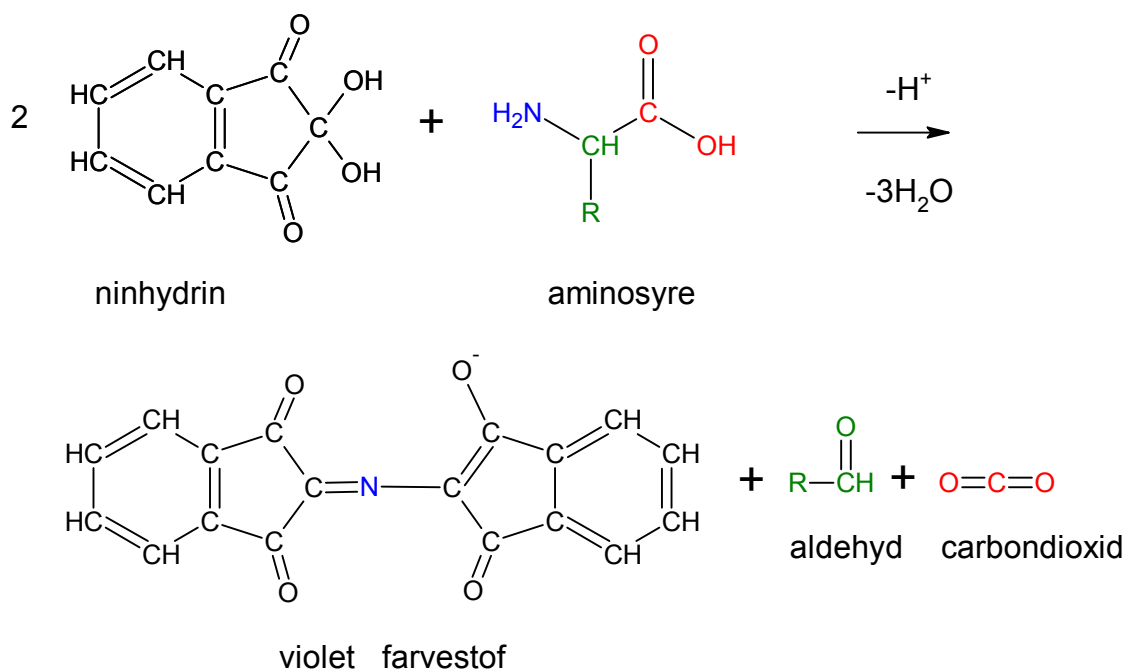


strukturformlen for pencillin V og angiv antallet af asymmetriske C-atomer. Byg evt. molekylet med et molekylebyggesæt.

- d)  $\beta$ -lactamringen påvirkes let af syrer/baser, hvorved en åben kædeform dannes. Kig på bindingsvinklerne og prøv at forklare, hvorfor  $\beta$ -lactamringen er ustabil.
- e) Phenylpenicillin (R= phenylgruppe) kan dannes i tre syntesetrin, hvor det sidste trin er en reaktion mellem benzoylchlorid og 6-APA (grundstammen i penicillin - blot er R-C=O- erstattet af H). Opskriv reaktionsskemaet for syntesen.

### Opgave p7 - peptider - ninhydrin

Man kan fremkalde sine aminosyrer på en TLC-plade ved at sprøjte pladen med en *ninhydrinopløsning* og efterfølgende varme forsigtigt med en hårtørrer, herefter fremkommer der nogle karakteristiske violette pletter. Totalreaktionen er angivet nedenfor:



- a) Opskriv molekylformlen for ninhydrin og angiv, hvilke funktionelle grupper den indeholder.
- b) Aspartam hydrolyseres (se senere) bl.a. til asparaginsyre og phenylalanin. Opskriv strukturformlerne for de aldehyder, der dannes ved reaktionen med ninhydrin.
- c) Reaktionen med ninhydrin kan deles op i to mellemtrin.

Trin 1: Først reagerer 1 molekyle ninhydrin med  $\alpha$ -aminosyren, hvorved ninhydrin reduceres ved en af OH-grupperne og der dannes ammoniak, carbondioxid og R-CHO.

Trin 2: 1 molekyle reduceret ninhydrin + ammoniak + 1 molekyle ninhydrin omdannes til det violette farvepigment samt 3 vandmolekyler og 1 hydrogennion.

Opskriv reaktionsskemaerne for trin 1 og trin 2. Se at det passer med totalreaktionen øverst i opgaven.

### Opgave p8 - peptider - hydrolyse

Ved sekvensbestemmelsen af større peptider benyttes enzymer, der hydrolyserer specifikke peptidbindinger. Ved en sådan hydrolyse af et hexapeptid indeholdende Arg, Gly, Thr, Leu, Pro og Val er fundet følgende fragmenter: Pro-Leu-Gly, Arg-Pro, Gly-Thr-Val. Opskriv aminosyresekvensen i hexapeptidet med 3 bogstav-betegnelser.

*Til besvarelse af nedenstående tekstopgaver til den konkrete artikel skal der bruges en kopi i A4-format af FIGUR 2: Skematisk fremstilling af fastfasesyntese. (Figuren findes bagest i dette opgavehæfte og som bilag på den vedlagte CD-rom)*

### Opgave t1 - tekstspørgsmål - FIGUR 2

- Find TRIN 1 i FIGUR 2 og markér med en ring den aminogruppe, der er bundet til linkeren, og som peptidet skal syntetiseres via.
- Farvelæg alle de beskyttede  $N^\alpha$ -aminogrupper gule (rhombe) ned gennem hele figuren og farvelæg ligeledes alle de beskyttede sidekædefunktionaliteter lyseblå (trekant). Hvad gælder specielt for den beskyttede sidekædefunktionalitet?

### Opgave t2 - tekstspørgsmål - BOKS 1

Find BOKS 1 som handler om aktivering og kobling af aminosyre:

- Opskriv strukturformlen for DIC og for HOAt idet alle bindingsstreger og atomer angives.
- BOKS 1 kan opdeles i nogle mellemtrin. Trin A: Den aktiverede aminosyre fremkommer som beskrevet ved en esterdannelse mellem HOAt og den beskyttede aminosyre. Opskriv reaktionsskemaet for denne reaktion.
- Trin B: Ved esterdannelsen frigøres vand som via en addition til DIC og en omlejring giver det sidste produkt i BOKS 1. Opskriv reaktionsskemaet for denne reaktion.

- d) Vis at summen af reaktionerne i trin A og trin B giver reaktionsskemaet i BOKS 1. Marker estergruppen på den dannede aktiverede aminosyre?

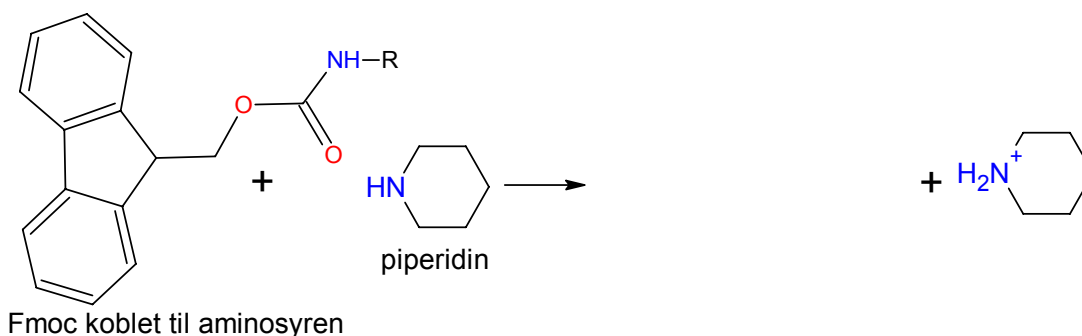
### Opgave t3 - tekstspørgsmål - FIGUR 2 (inkl. Boks 2)- fortsat

I sidste del af TRIN 2 skal den aktiverede aminosyreester reagere med den frie aminogruppe (via linkerens) på resin. Reaktionen kaldes i virkeligheden en nucleophil acyl substitution.

Opskriv reaktionsskemaet for denne reaktion.

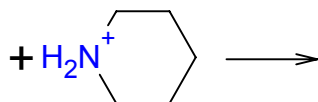
- a) Hvilket stof bliver frigjort igen ved denne reaktion? Kontroller med TRIN 2 i FIGUR 2.
- c) Find evt. reaktionsmekanismen i en videregående organisk kemibog.
- d) I TRIN 3 skal aminosyrens  $\alpha$ -aminobeskyttelsesgruppe (trekant) fjernes med 20% piperidin i dimethylformamid. Processen er beskrevet i Boks 2. Opskriv strukturformlerne med alle bindingsstreger og atomer for DMF og piperidin.
- e) Reaktionerne i Boks 2 er ikke helt afstemte forløbet igennem og de kan opdeles i mellemtrin. Fuldfør trin 1 her nedenfor i overensstemmelse med Boks 2. Kontroller, at antallet af atomer passer ?

Trin 1: Fraspaltning af Fmoc med piperidin



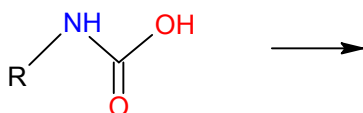
- f) Næste trin er, at produkterne fra trin1 omdannes til dibenzofulven, piperidin og  $\text{RNHCOOH}$ . Fuldfør reaktionsskemaet i trin 2 her nedenfor og kontroller, at reaktionsskemaet er afstemt.
- g) I teksten bliver produktet (2) kaldt for en carbanion. Slå op i Kemisk Ordbog, hvad man forstår ved en "carbanion" ?

Trin 2: Fmoc-mellemprodukt omdannes til dibenzofulven, piperidin og RNHCOOH



- h) Sidste trin er, at aminosyrens aminogruppe skal frigøres så der kan kobles endnu en  $\alpha$ -beskyttet aminosyre på. Færdiggør trin 3 her nedenfor:

Trin 3: Aminosyren med den frie aminogruppe skal nu fraspaltes



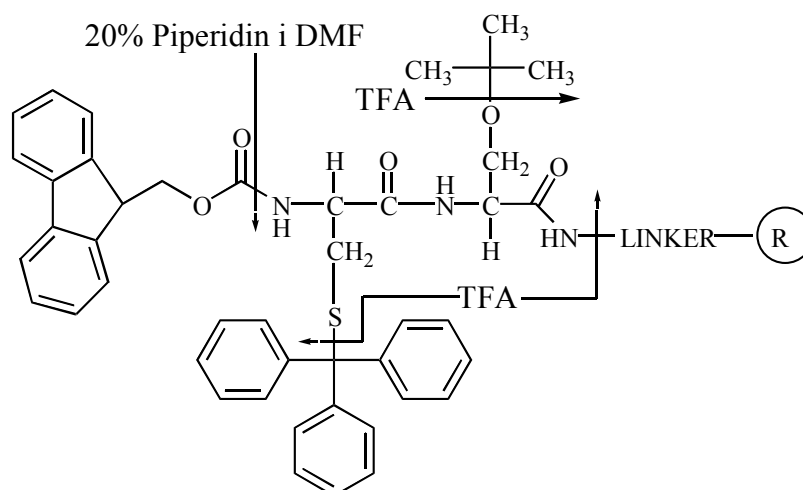
- i) Kontroller dine reaktionsskemaer ved at lægge reaktionerne i trin 1, trin 2 og trin 3 sammen.

#### Opgave t4 - tekstspørgsmål - Boks 3.

I TRIN 4 FIGUR 2 kobles næste aminosyre cystein på. Denne struktur er detaljeret vist i Boks 3.

- a) Opskriv strukturformlerne for aminosyrerne cystein og serin og genfind dem i figuren i Boks 3 (som er gengivet her nedenfor) - marker fx med to forskellige farver.
- b) Marker bagefter på figuren sidekædebeskyttelsesgrupperne med en anden farve. TFA viser det sig "kløver" bindingerne. Opskriv strukturformlen for TFA med alle bindingsstreger angivet.

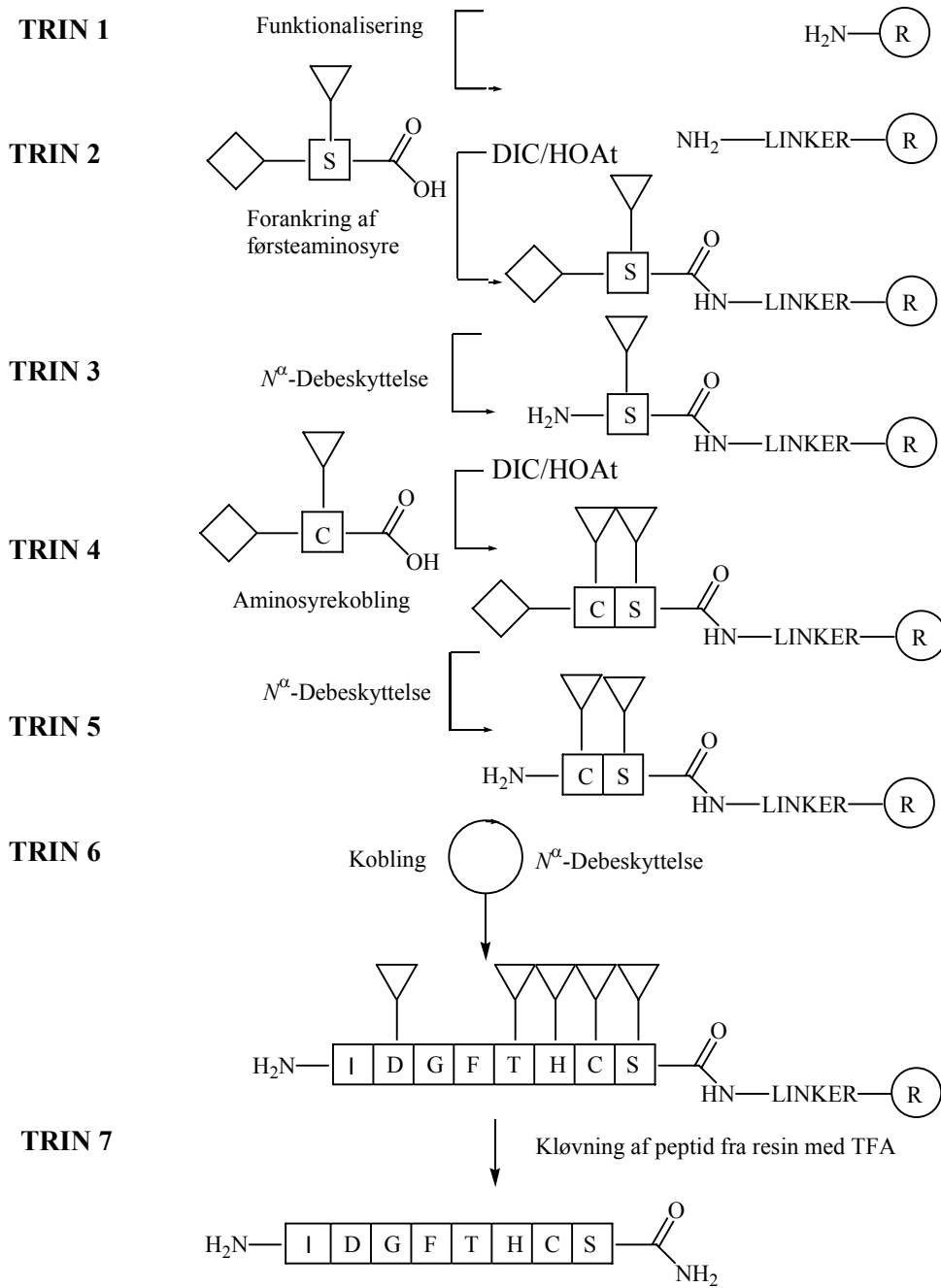
**Boks 3: Beskyttet Cystein-Serin bundet til resin**  
**Pilene viser hvor beskyttelsesgrupperne**  
**kan spaltes og med hvilket reagens**



**Opgave t5 - tekstspørgsmål - FIGUR 2 - fortsat**

- I TRIN 7 fraspaltes som nævnt sidekædebeskyttelsesgrupperne med TFA. Opskriv strukturformlerne for de radikaler, der er brugt som "sidekædebeskyttelsesgrupper". Kan du sige noget specielt om den rummelige opbygning og hvilken betydning det har?
- Til sidst i TRIN 7 er vist peptidet: IDGFTHCS, som er syntetiseret ved den fastfase metode. Opskriv aminosyresekvensen med 3-bogstavbetegnelserne.
- Giv et fornuftigt bud på, hvorfor aminosyrerne I, G og F ikke behøver beskyttelse af sidekæden?

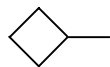
**FIGUR 2: Skematisk fremstilling af fastfasesyntese.  
Syntese af peptidet IDGFTHCS-NH<sub>2</sub>**



R = resin

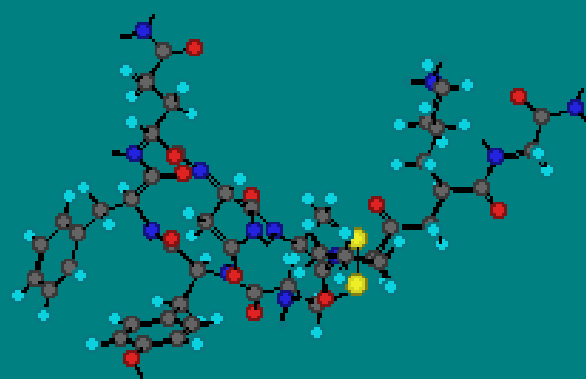


Den beskyttede sideæde funktionalitet



Den beskyttede N<sup>α</sup>-amino gruppe

Bemærk I, G, og F i eksemplet behøver ikke beskyttelse af sidekæden



**Vasopressin**