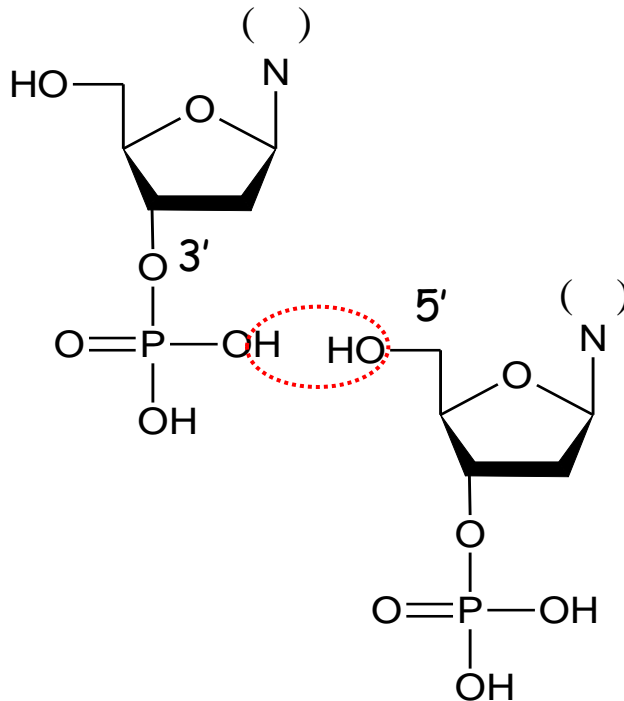


6. Előadás

Oligonukleotidok szintézise, koenzimek, vitaminok

Oligonukleotidok szintézise

Elv:



1. Kondenzáció
5'-OH + H (3')
2. Vízmentes közeg
3. Védőcsoportok

Módszerek

1. Karbodiimid módszer, oldatban (1955)
Tood (Nobel díj 1957), Khorana (Nobel díj 1975)
Kapcsoló szer: DCC/Piridin
8-12 tagszám
2. Foszfít módszer, szilárd hordozón
Beaucage, Caruthers; (1981)
(Merrifield Nobel díj, 1984)

1. Szintézis oldatban

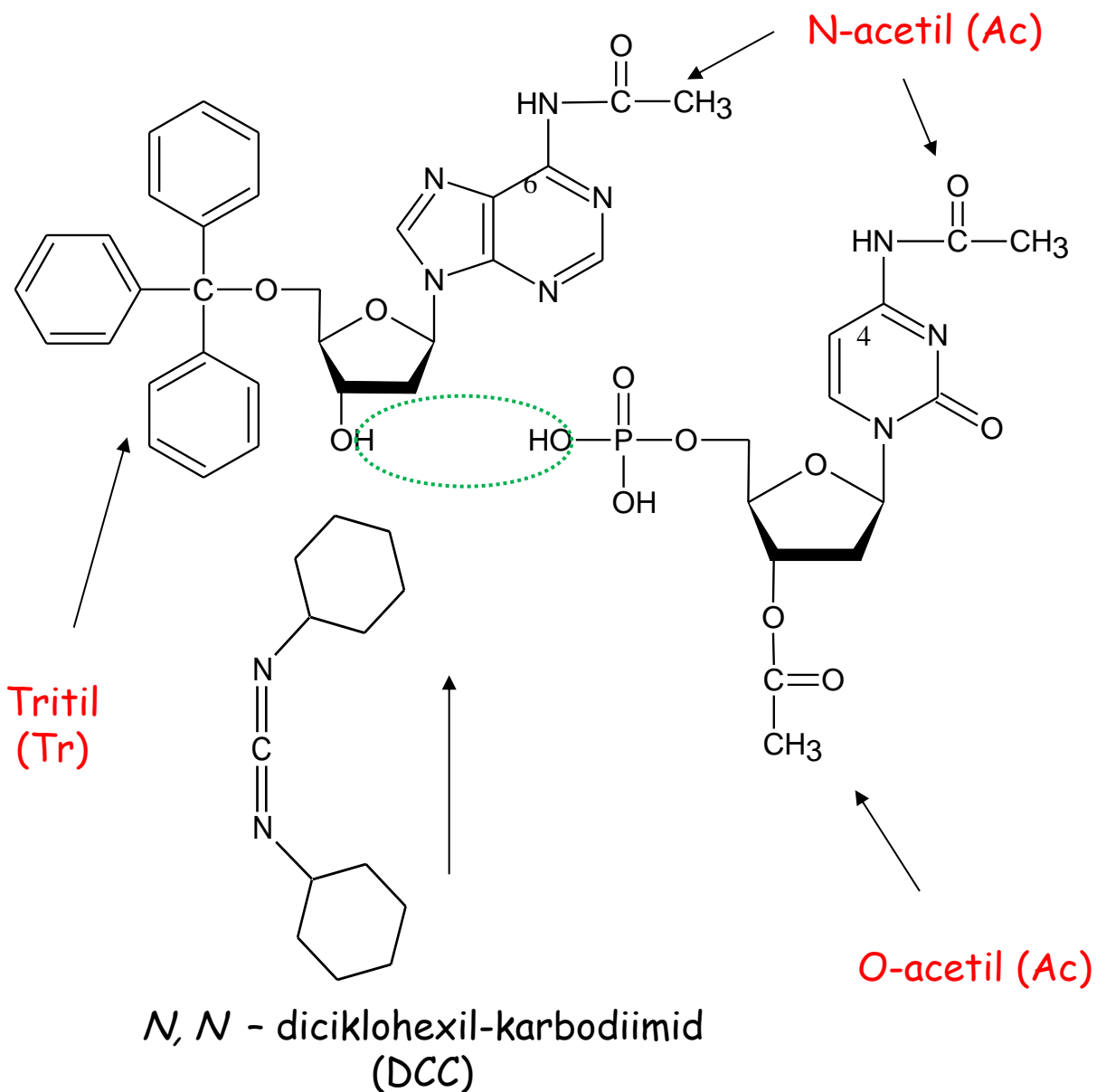


Sir Alexander R. Todd
(1907-1997)

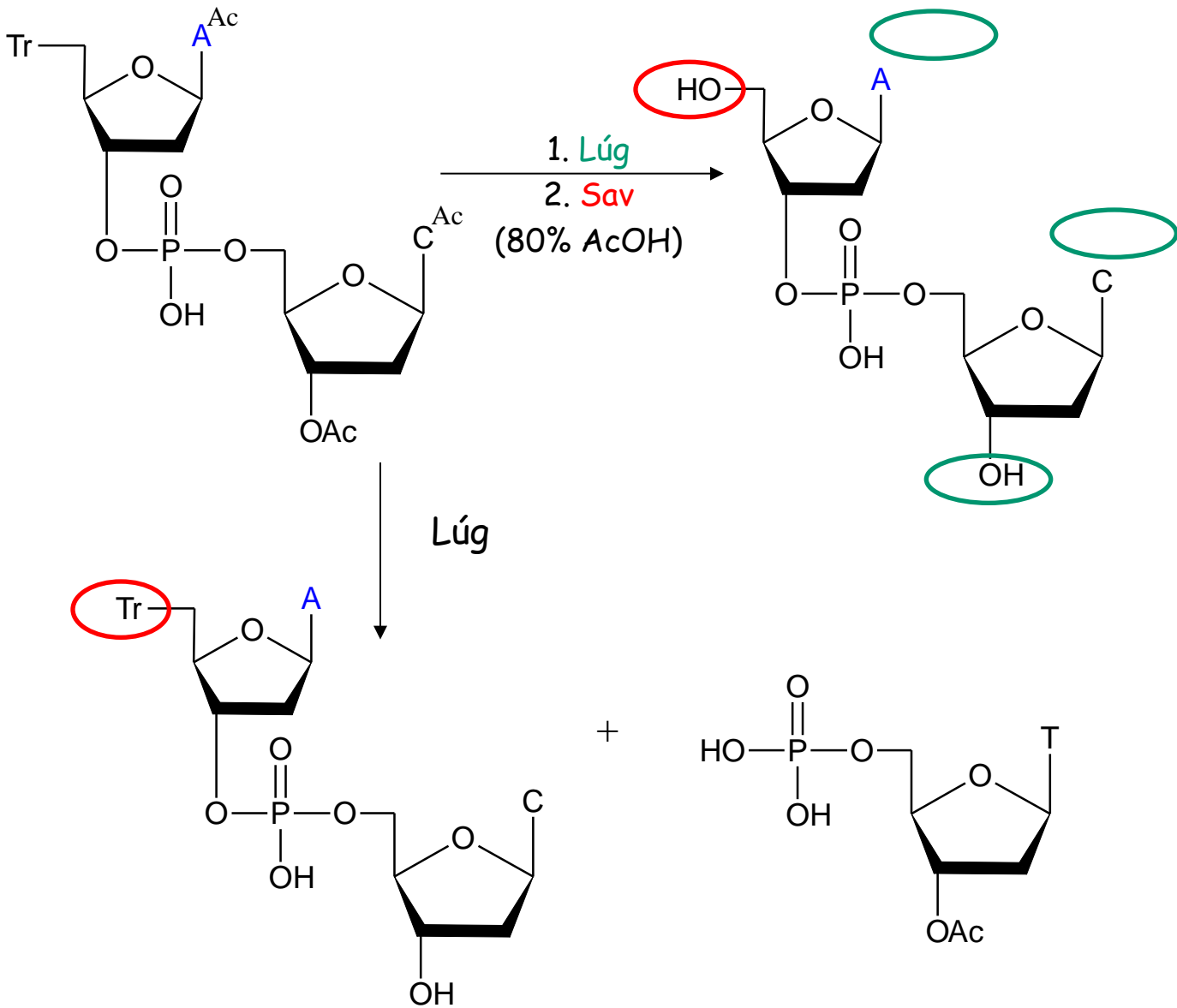
Kapcsoló szer: DCC/Piridin

Védőcsoportok: acetil, tritil

1. lépés: Védett komponensek kapcsolása



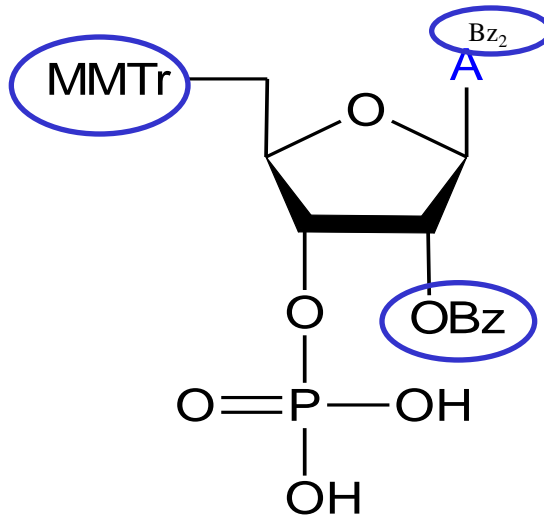
2. lépés: A védőcsoportok eltávolítása



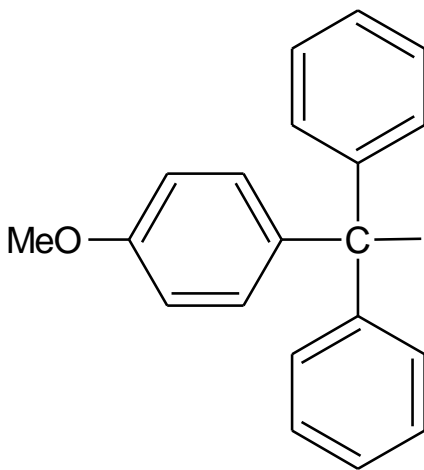
3. lépés: Láncnövekedés

Megjegyzések: (alkalmas a ribooligonukleotid sorban is)

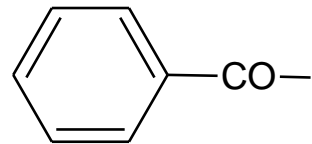
Védőcsoportok



védelem (MMTr)



védelem (Bz)



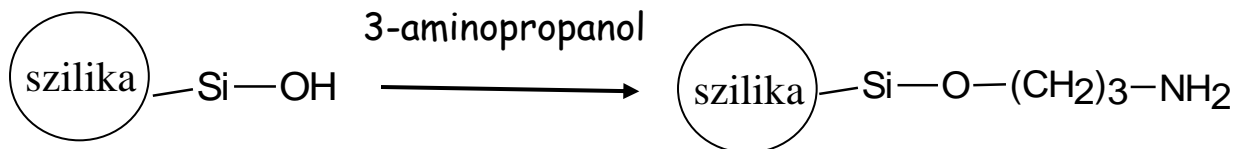
MMTr = monometoxi-tritil

2. Szintézis szilárd fázison

Foszfít módszer

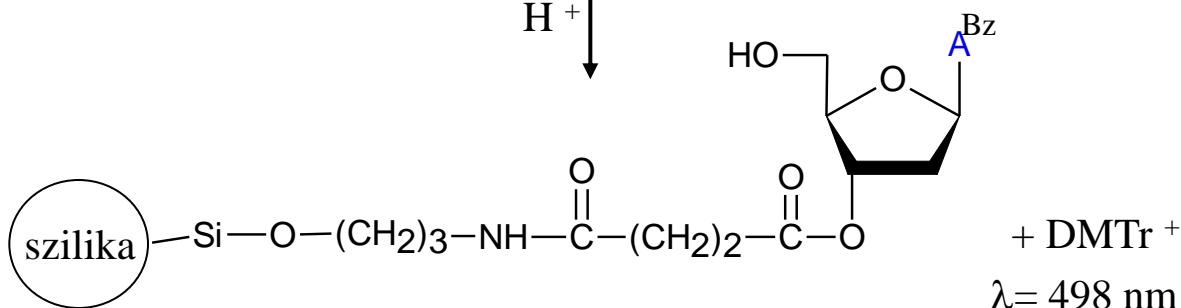
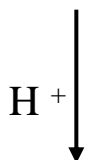
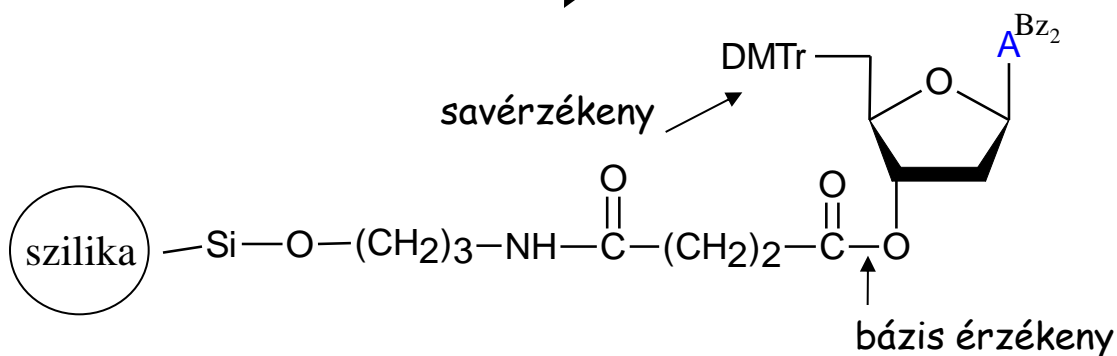
Beaucage, Caruthers (1981)

2.1 Szilárd hordozó: szilika, üvegyöngy, műanyag, cellulóz, papír



1. borostyánkősavanhidrid

2. védett nukleotid

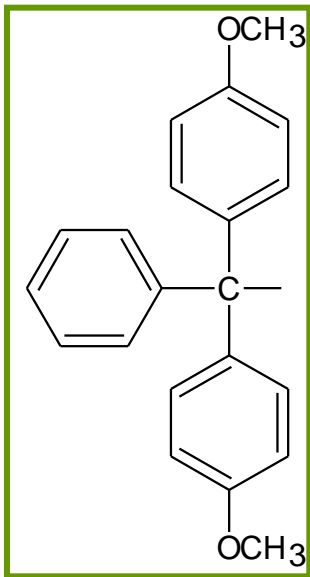
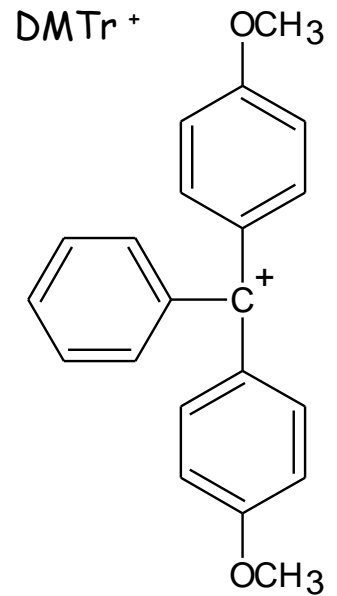
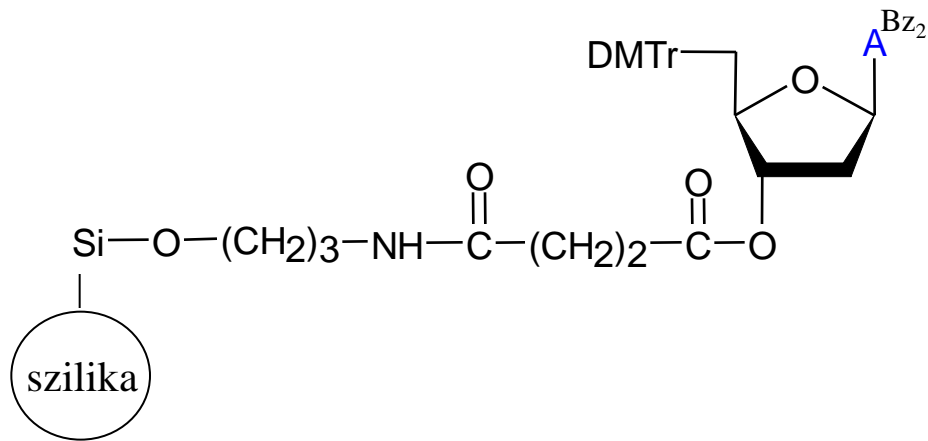


+ DMTr +

$\lambda = 498 \text{ nm}$

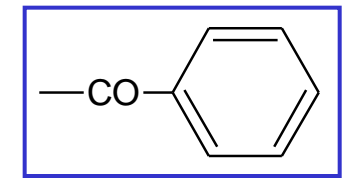
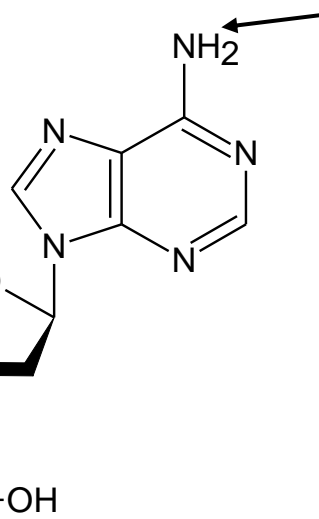
(karbokation)

2.2 Védőcsoportok



4,4'-dimetoxitritil (DMTr)

- a) CH₃-
- b) β-CN-CH₂-CH₂- (β-cianoetil)

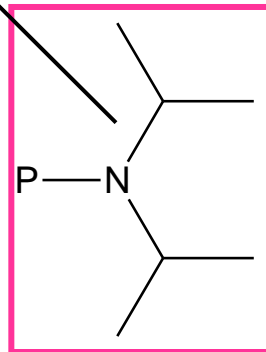


benzoil

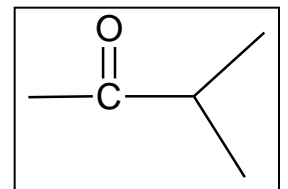
N-6-benzoil adenin [A^{Bz}]

N-4-benzoli citozin [C^{Bz}]

N-2-isobutil guanin [G^{IBu}]

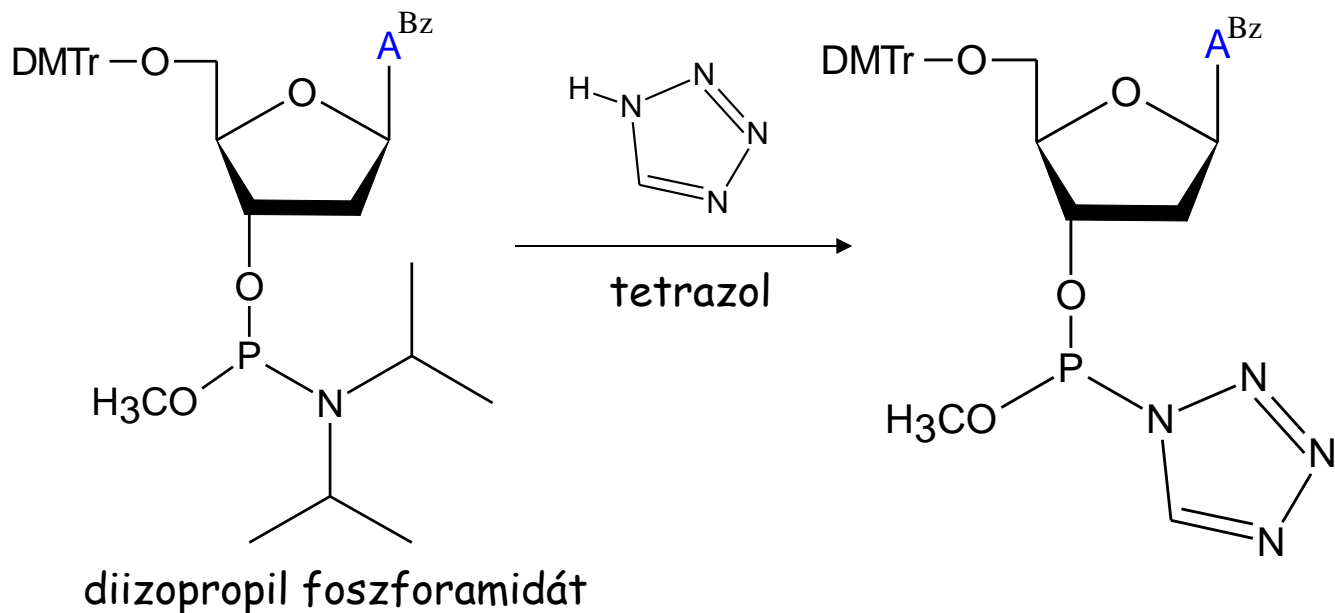


N,N diizopropil

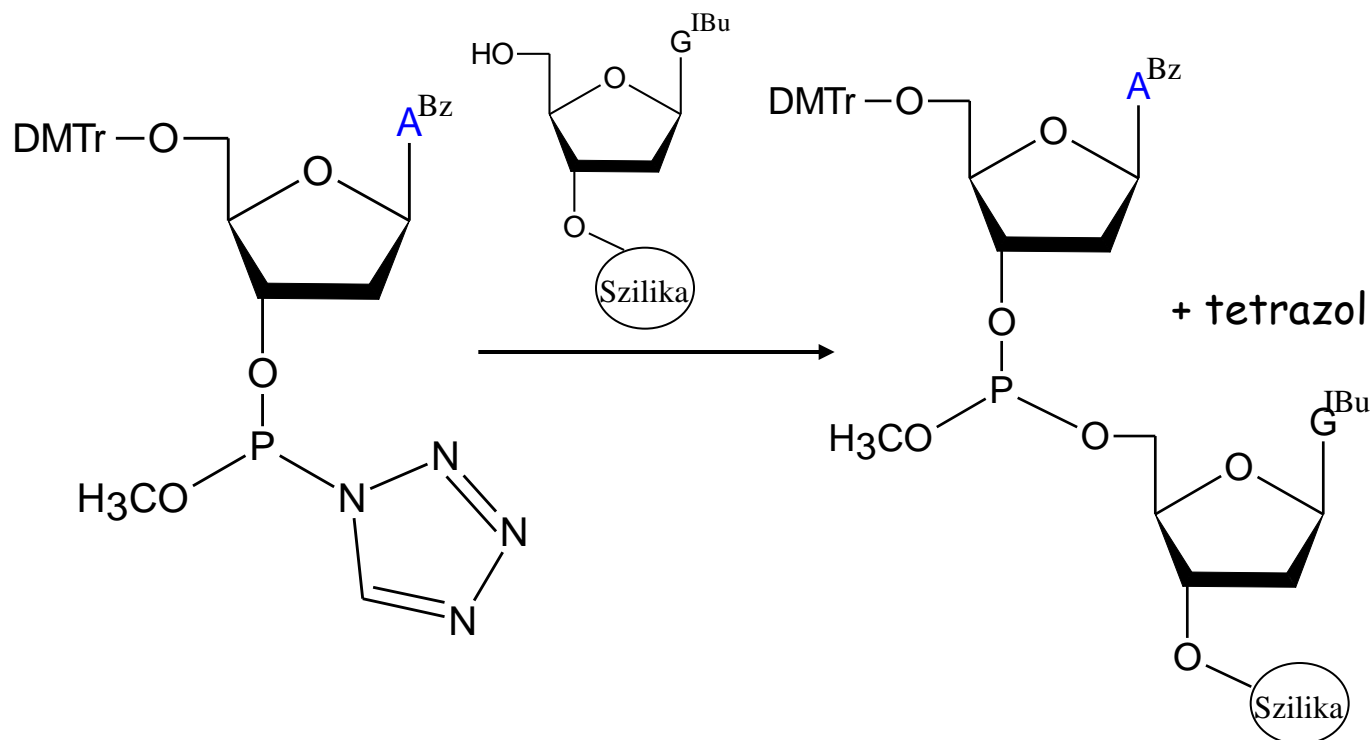


izopropioil

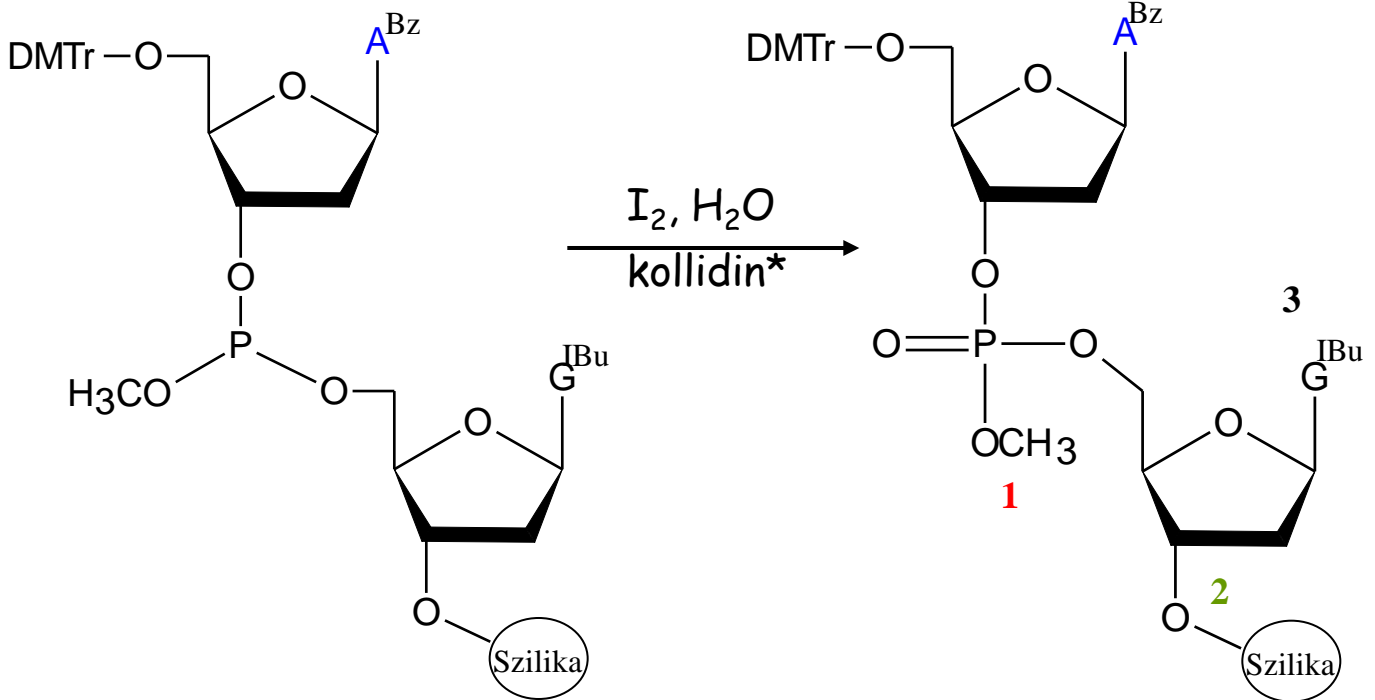
2.3 Aktiválás



2.4 Kapcsolás



2.5 Oxidáció: „foszforos sav (foszfonsav) → foszforsav”



*trimetil-piridin

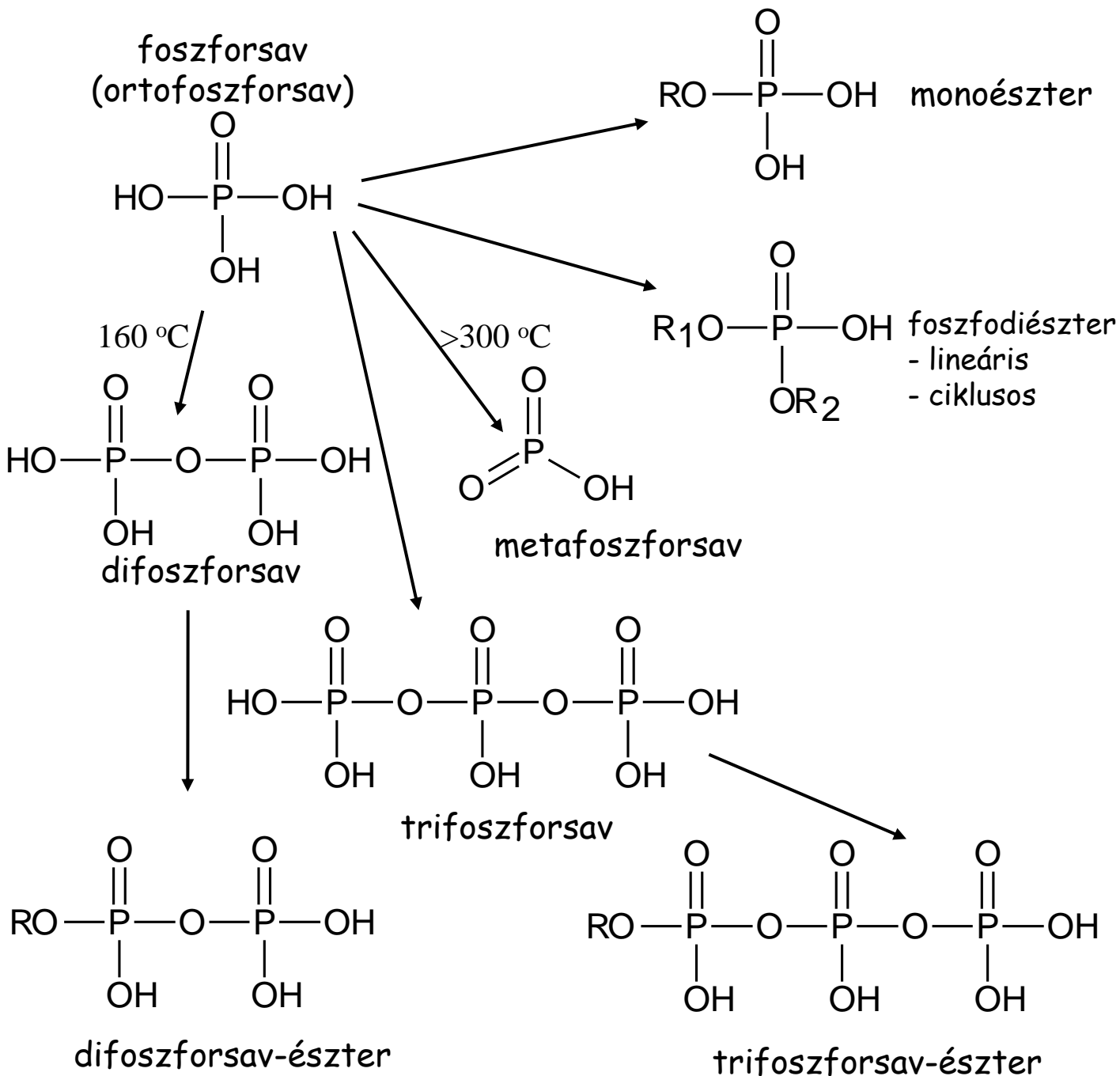
2.6 Hasítás

1. OCH₃ eltávolítása (tiofenol) helyette OH
2. Oligonukleotid lehasítása a (szilika) hordozóról (NH₃)
3. Nukleozid bázis védőcsoport (Bz, ⁱBu) eltávolítása (NH₄OH + hő)

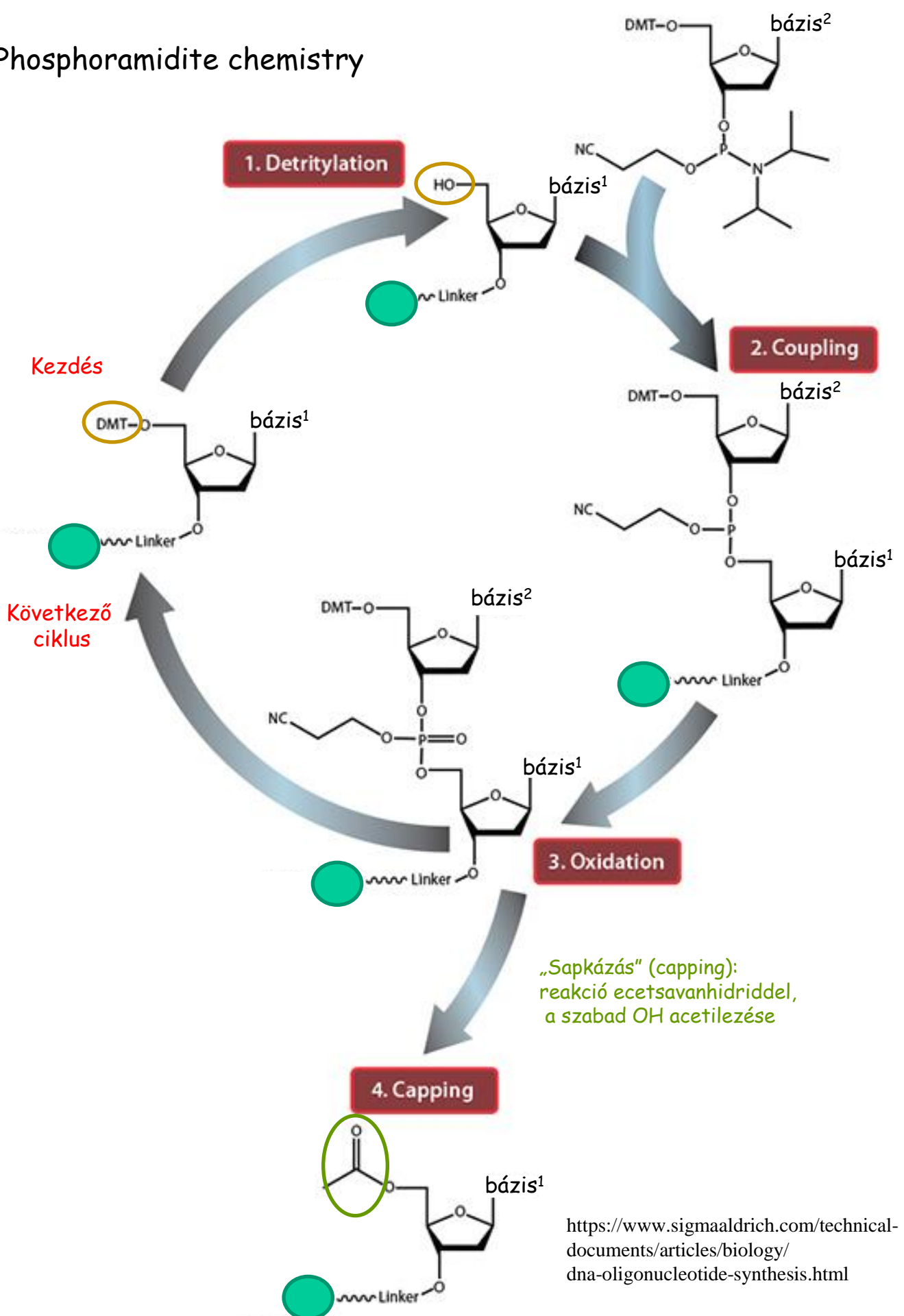
2.7 Tisztítás

HPLC
Elektroforézis

Foszforsavak



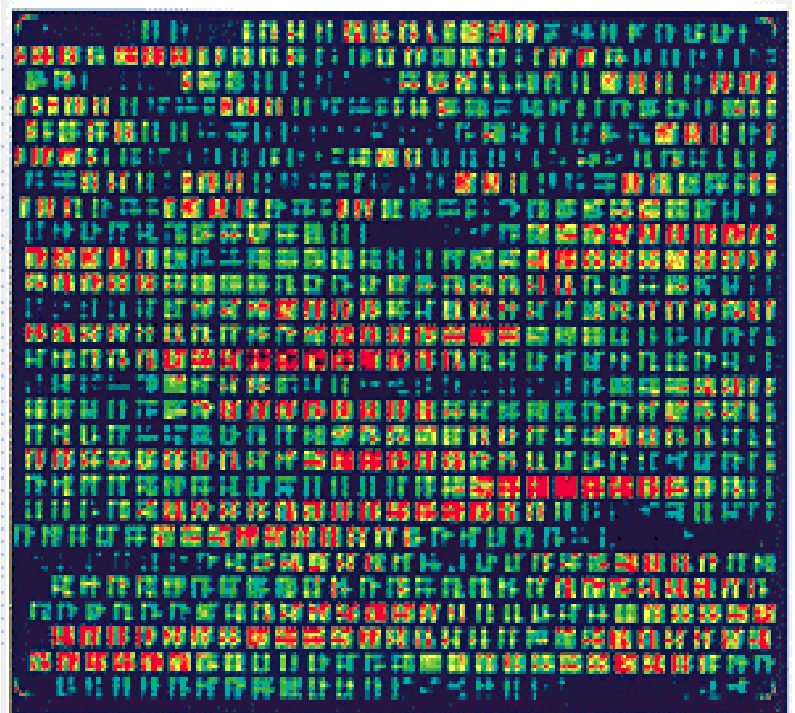
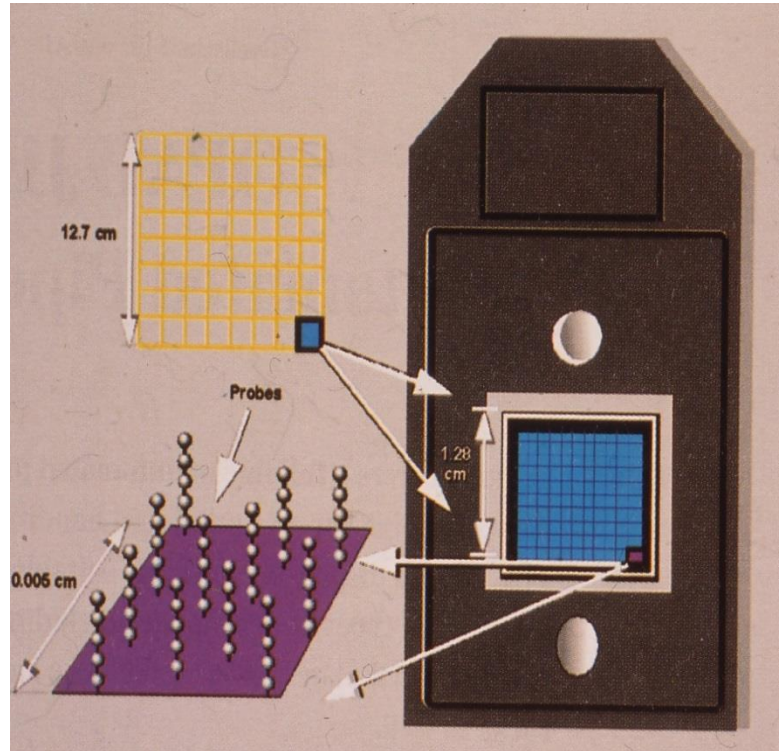
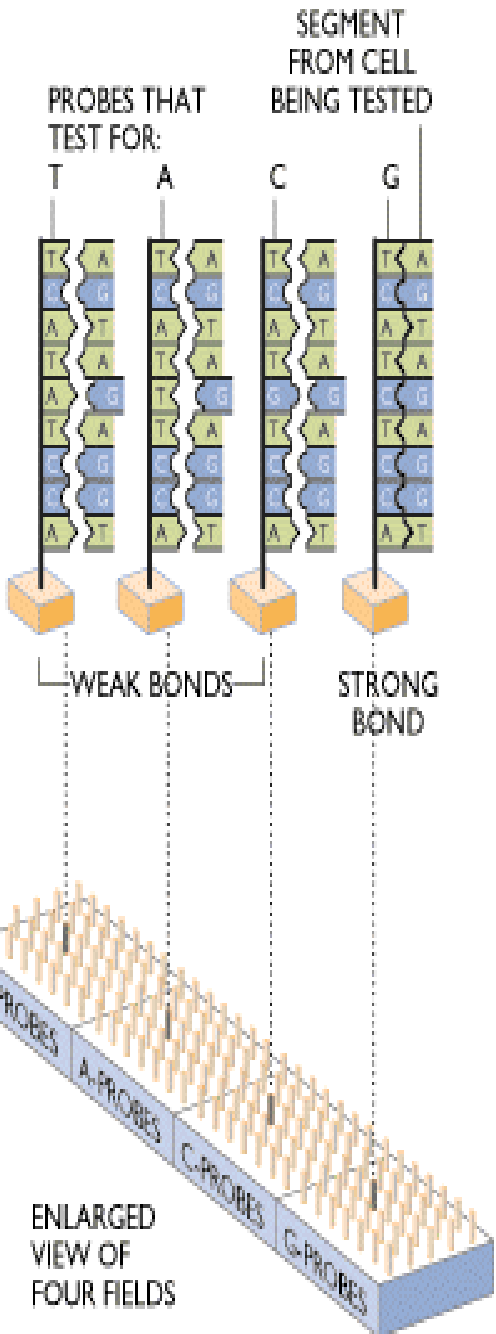
Phosphoramidite chemistry



DNS/oligonukleotid szintetizátor



DNS/oligonukleotid chip (csip)



Koenzimek, vitaminok

Koenzimek

Enzim = apoenzim (fehérje) + koenzim (nem-fehérje)



Szubsztrátspecifitás

Reakciótípus

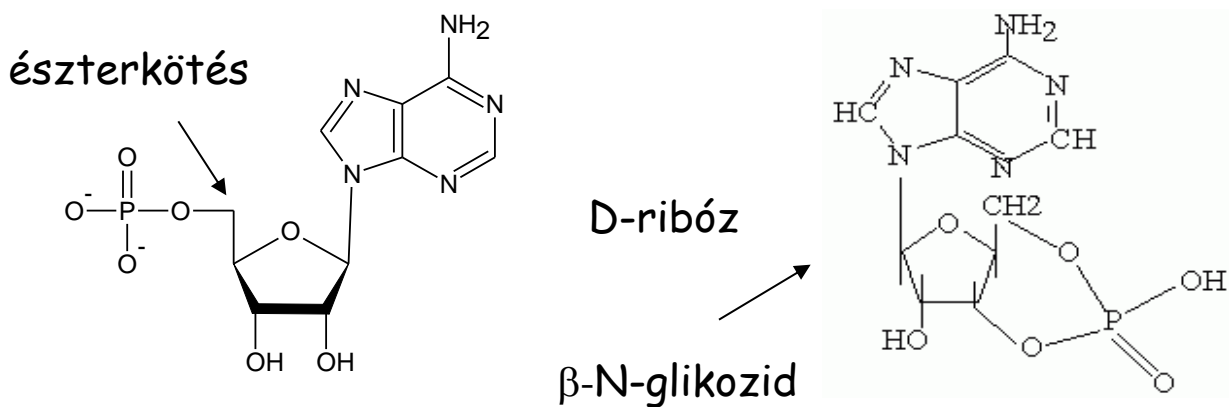
Típusai

Nukleotid	Fémion (példa)	Egyéb
	Fe (citokróm oxidáz)	
NAD	Cu (aszkorbinsav oxidáz)	B1
FAD	Zn (alkohol dehidrogenáz)	B6
ATP	Mn (hisztidin ammónia-liáz)	B12
Koenzim A	Co (glutamát mutáz)	folsav
	Ni (ureáz)	pantoténsav
	Mo (xantin oxidáz)	biotin
	V (nitrát reduktáz)	Koenzim Q
	Se (glutation peroxidáz)	

Nukleotid koenzimek

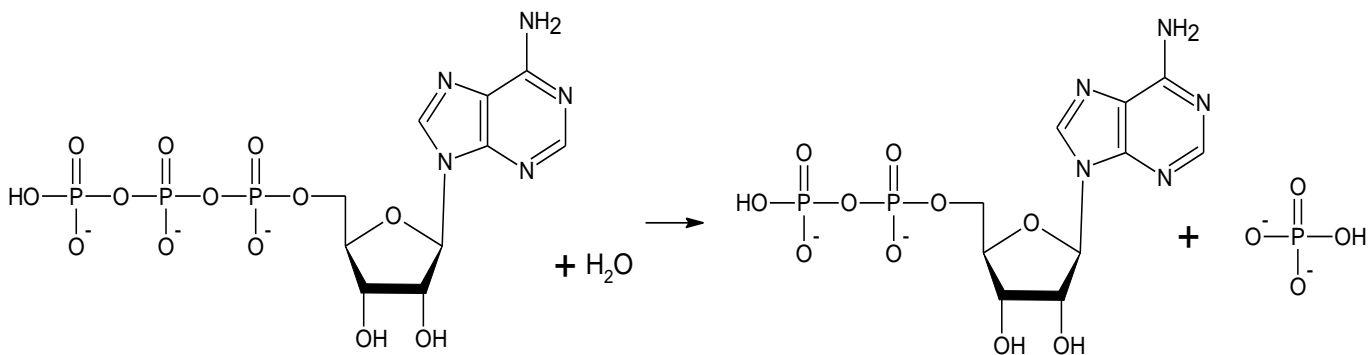
1. Adenozin mono-, di- és trifoszfát

felfedezés: Lohmann, Fiske (1929)



Adenozin-monofoszfát
(AMP)

ciklusos AMP



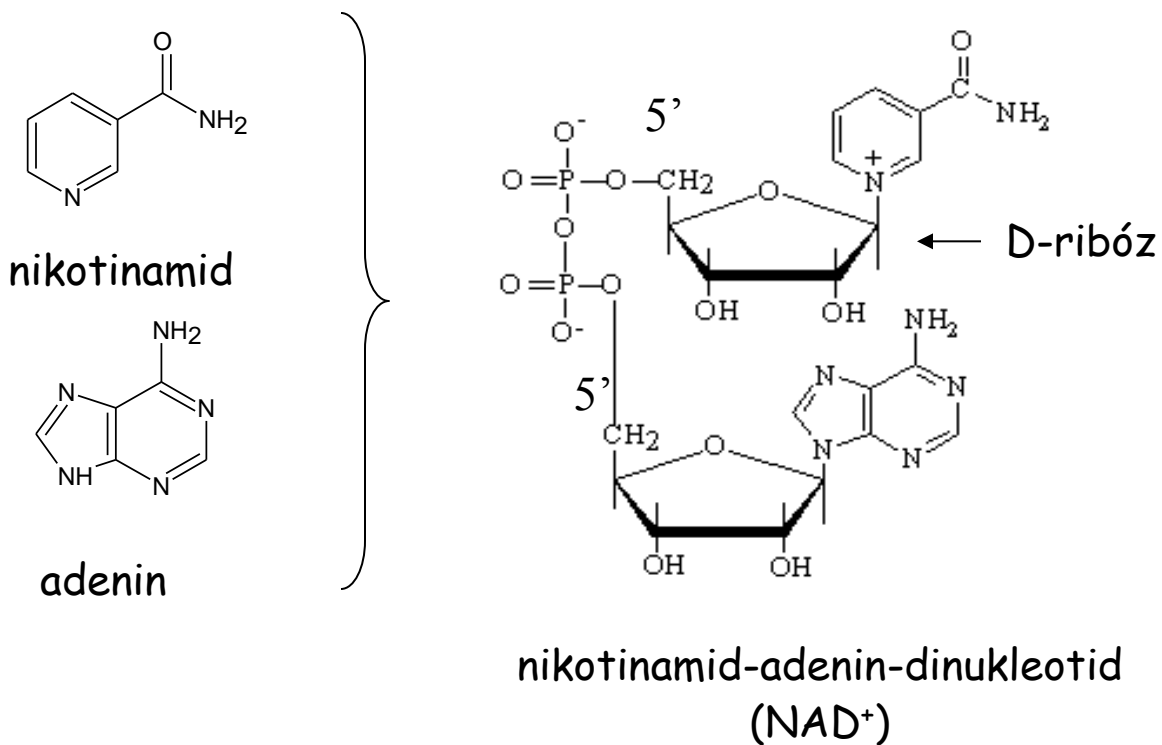
ATP

ADP

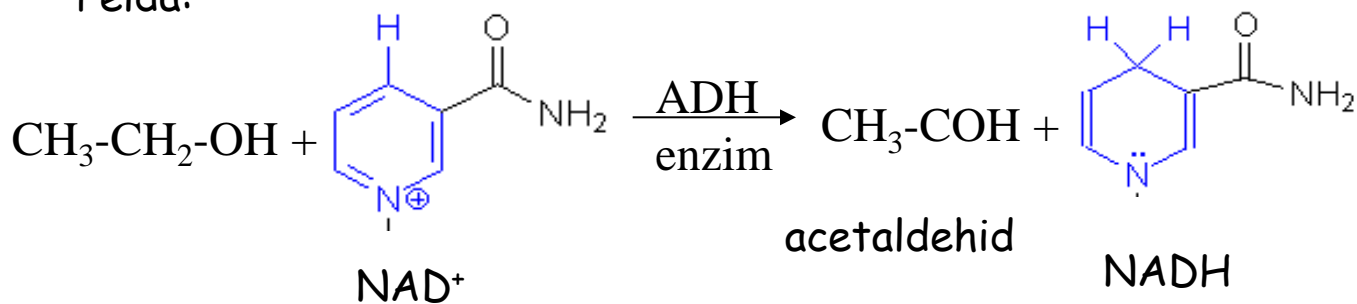
foszforsav

$$\Delta H^\circ = -31 \text{ kJ/mol}$$

2. NAD/NADH: oxidáció

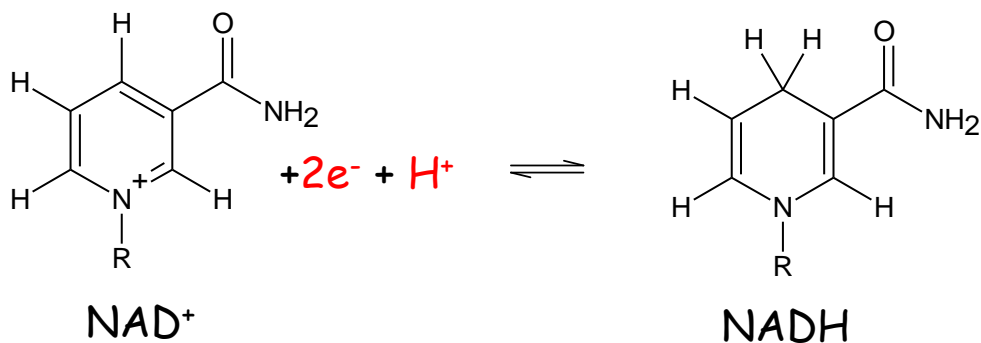


Példa:



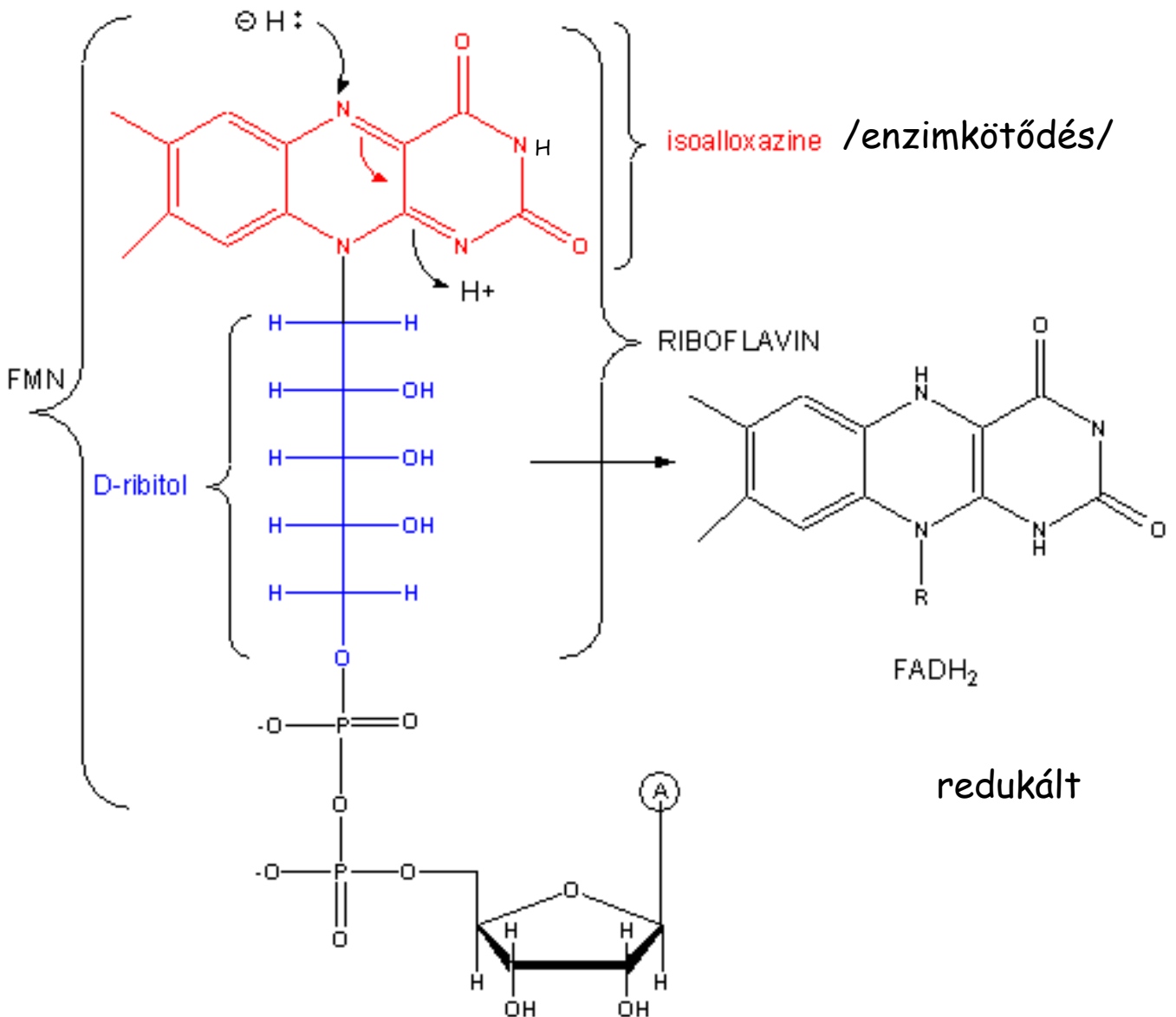
ADH = alkohol dehidrogenáz

Mechanizmus



3. FAD/FADH₂: oxidáció

oxidált

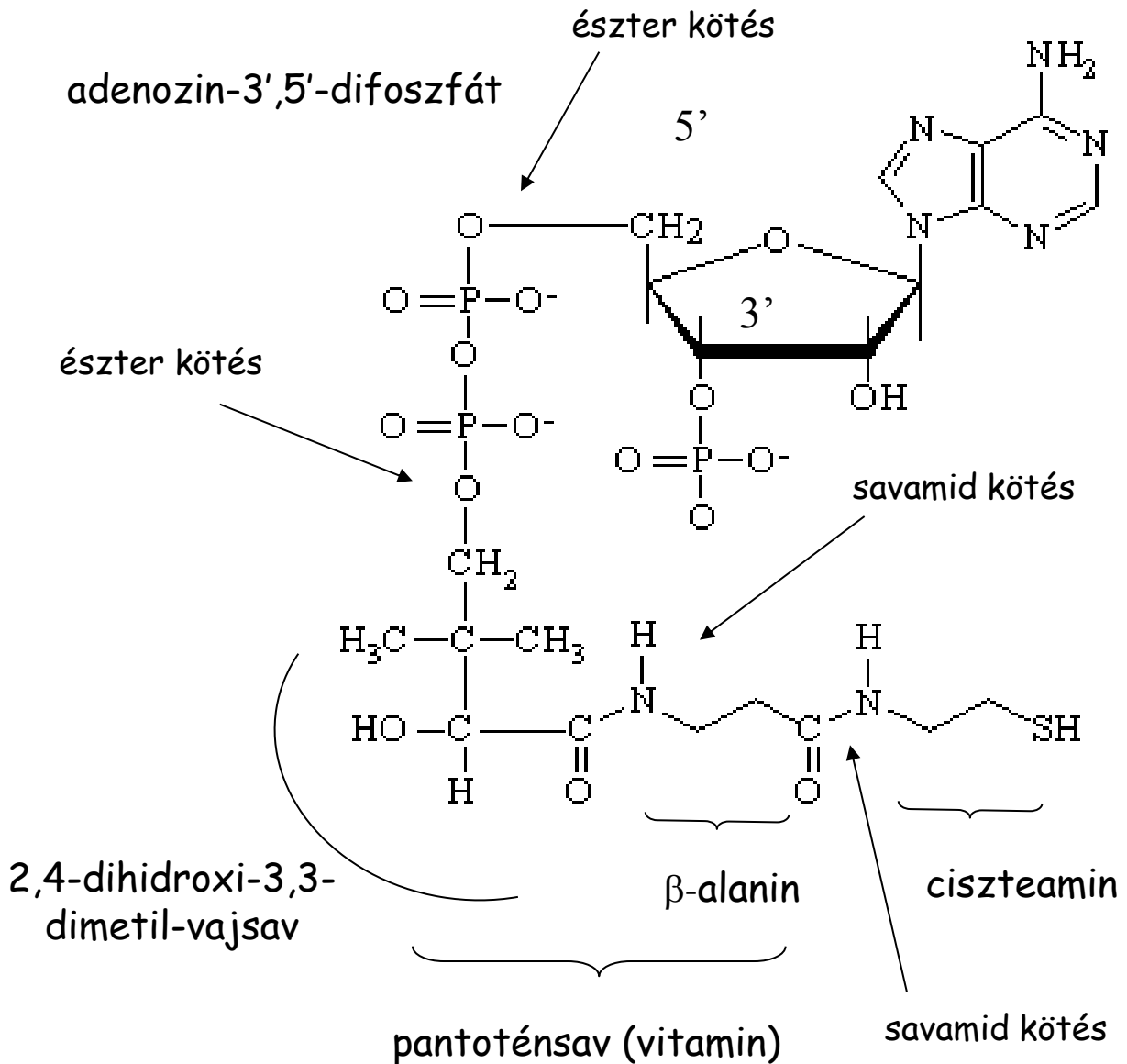


Flavin-adenin-dinukleotid (FAD)

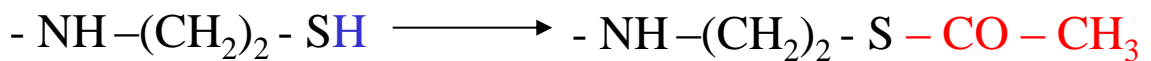
Flavus (latin), sárga

4. Koenzim-A (CoA)

felfedezés: Lipmann, 1946



S-acetil koenzim-A (Ac-CoA)



VITAMINOK

1912: vitamin = vita amines (Casimir Funk)

„Kis mennyiségben kívülről kell felvenni.”

Nem vitaminok: esszenciális aminosavak
 esszenciális zsírsavak

Provitaminok

Antropocentrikus

pl. C-vitamin:	ember (tengeri malac)	igen
	patkány	nem
<i>p</i> -amino-benzoésav:	baktérium	igen
	ember	nem

Kémiai szerkezet: heterogén

Felosztás (oldékonyság alapján)

Vízoldékony

B, C, H és P vitaminok

- koenzimek is
- felesleg kiürül

Zsírban oldódó

A, D, E és K vitaminok

- bélből szívódnak fel
- májban raktározódnak

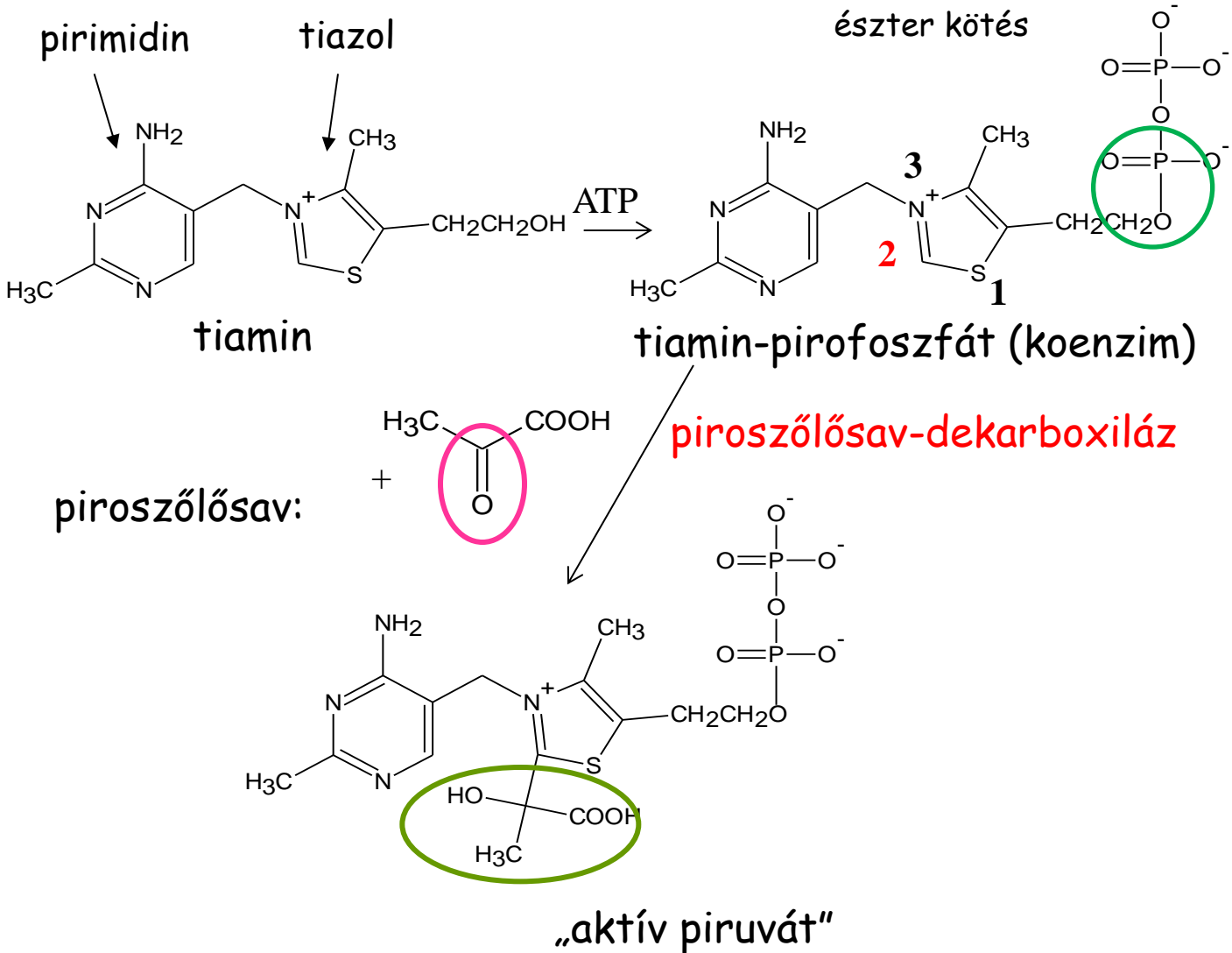
1958: 15-20 féle vitamin

B1 vitamin (tiamin)

szerkezet 1934, szintézis 1936

Beriberi

piroszőlősav nem bomlik le



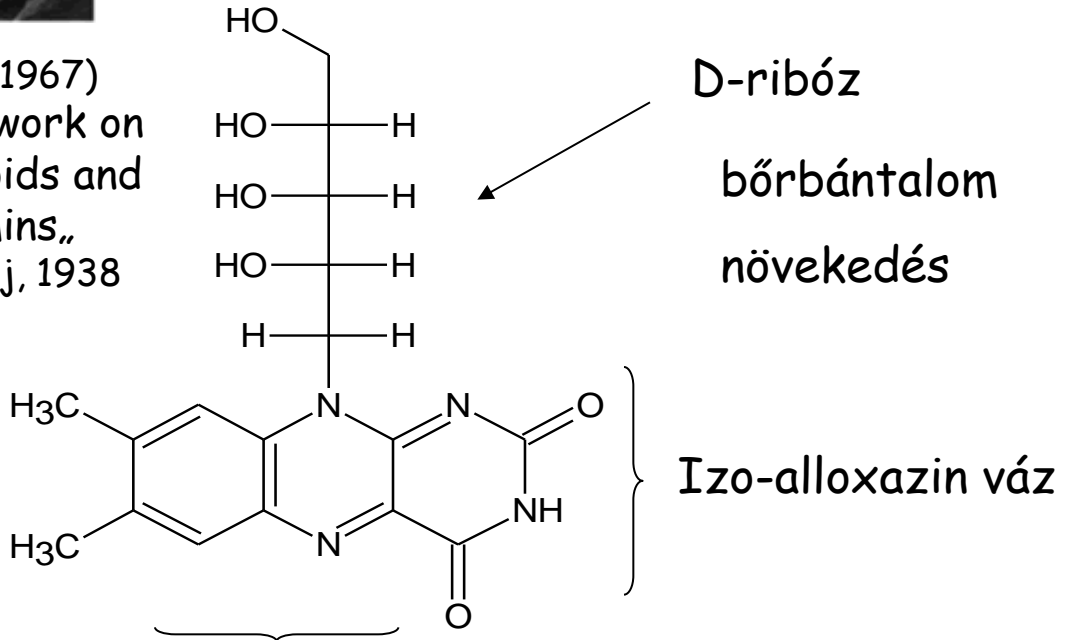
- brit tengerészek (1747)
- Ch. Eijkman (1897), F. G. Hopkins [orvosi Nobel-díj (1929)]
- C. Funk - vita amin (1912)



B₂-vitamin (riboflavin)

izolálás: Richard Kuhn (1933),
4500 liter tejsavóból 1g
(természetben 1-foszfát-észter)

(1900- 1967)
„for his work on
carotenoids and
vitamins,”
Nobel-díj, 1938



D-ribóz

bőrbántalom

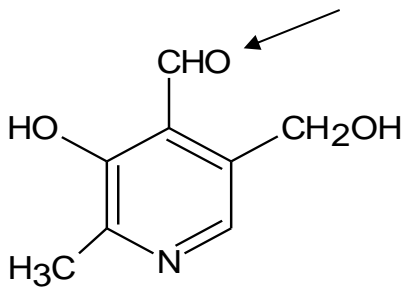
növekedés

Izo-alloxazin váz

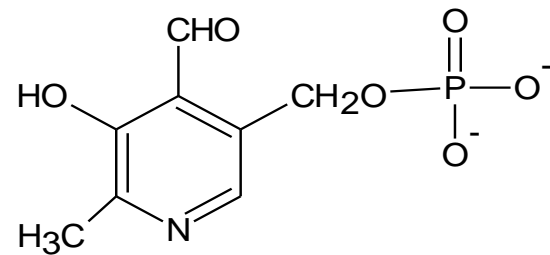
1,3,5,8-tetraazanaftalin (pteridin)

B₆-vitamin (piridoxál, piridoxin)

izolálás: Euler (1937)



piridoxál (- CHO)
piridoxin (- OH)



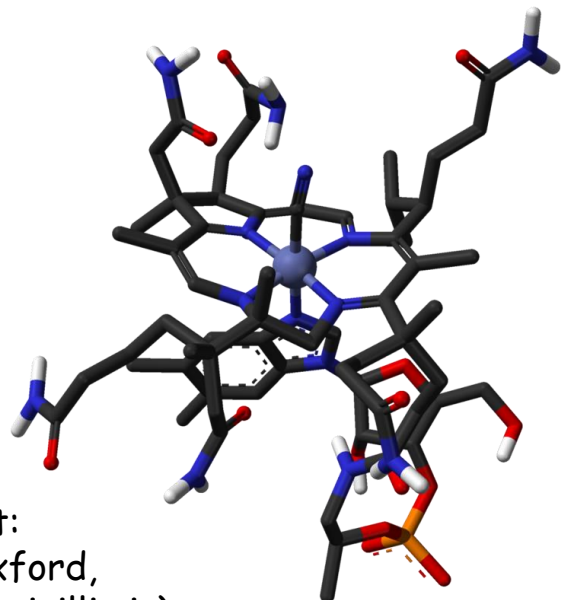
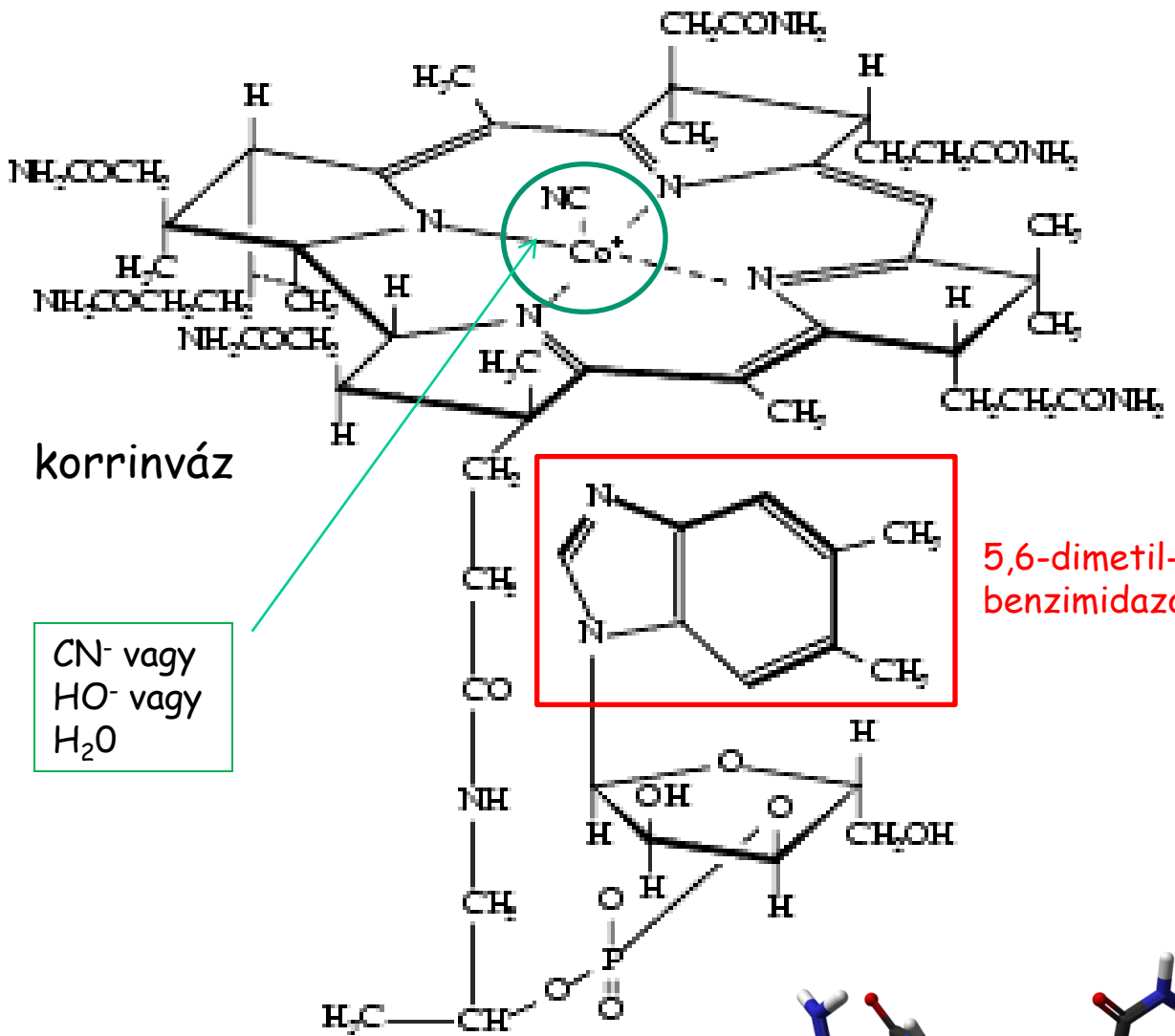
5'-foszfát - észter
(koenzim)

Bőrbántalmak, élesztő



Prof. D. Hodgkin,
National Portrait Gallery, London

B₁₂-vitamin (kobalamin)

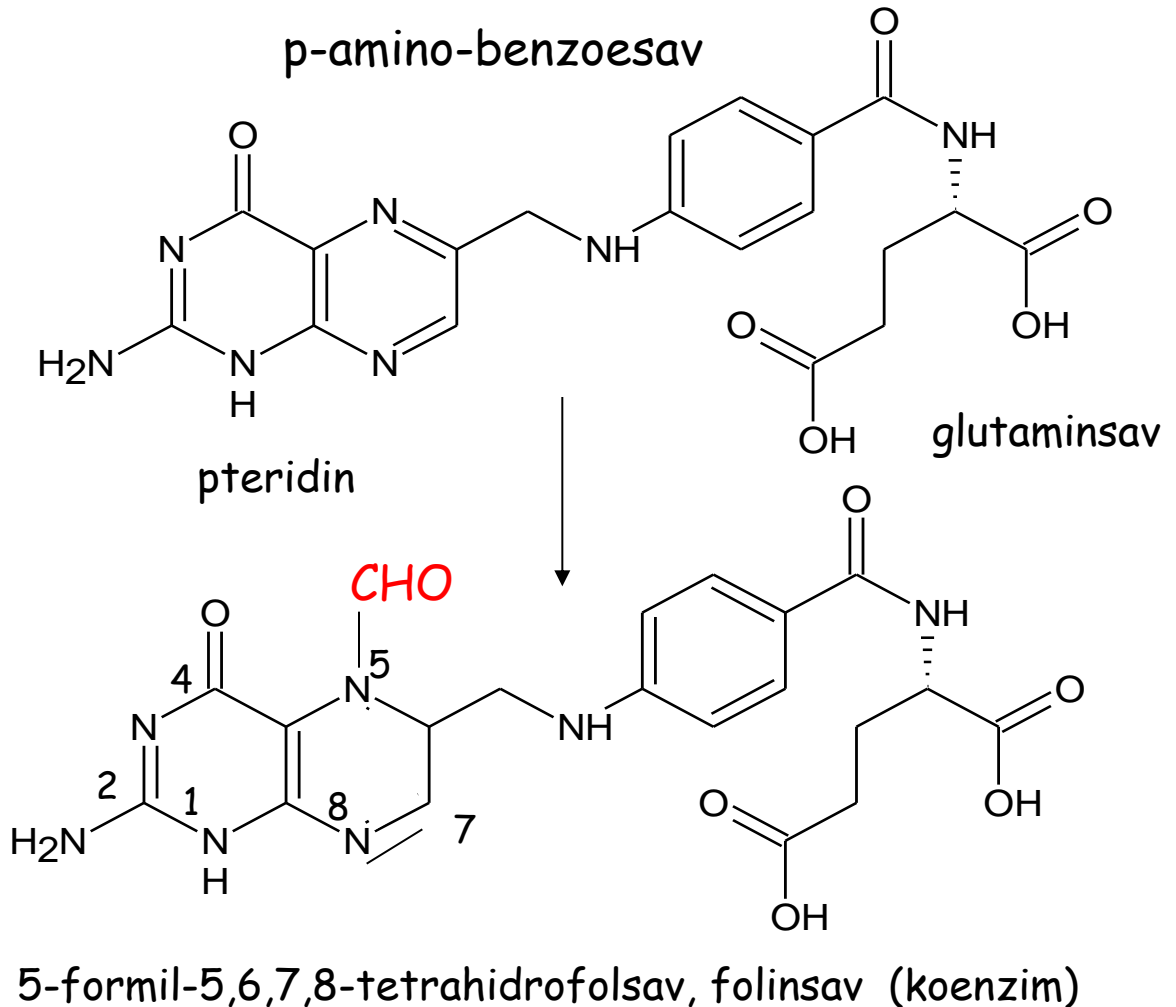


Szerkezet:
D. Hodgkin, Oxford,
Nobel díj, 1964 (penicillin is)

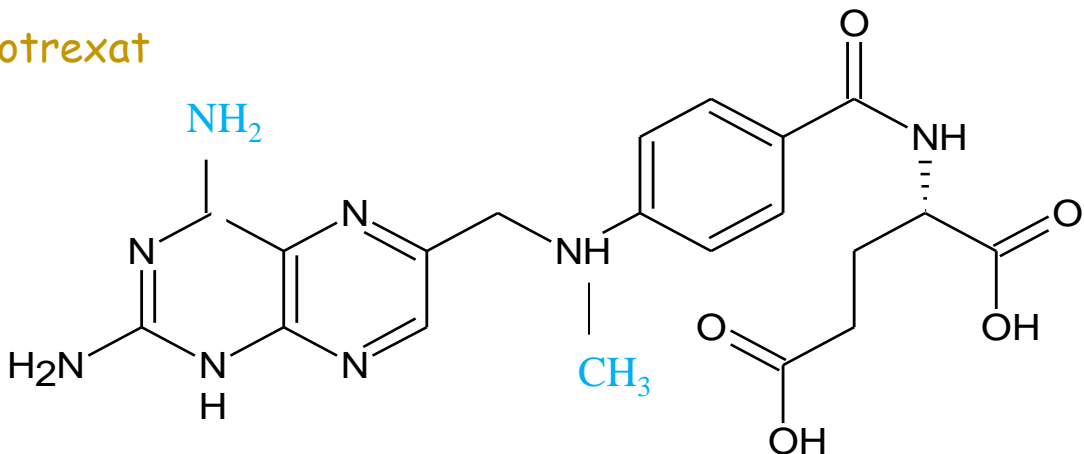
Folsav (pteroil-glutaminsav)

izolálás: Peterson (1940)

•vérszegénység (anémia, leukopénia)

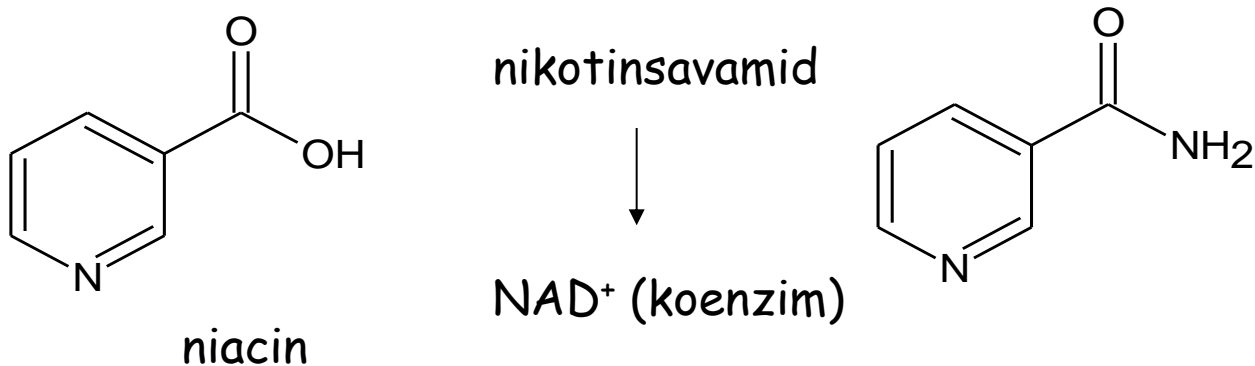


methotrexat



Nikotinsav(niacin)/ B₃ vitamin és a nikotinsavamid

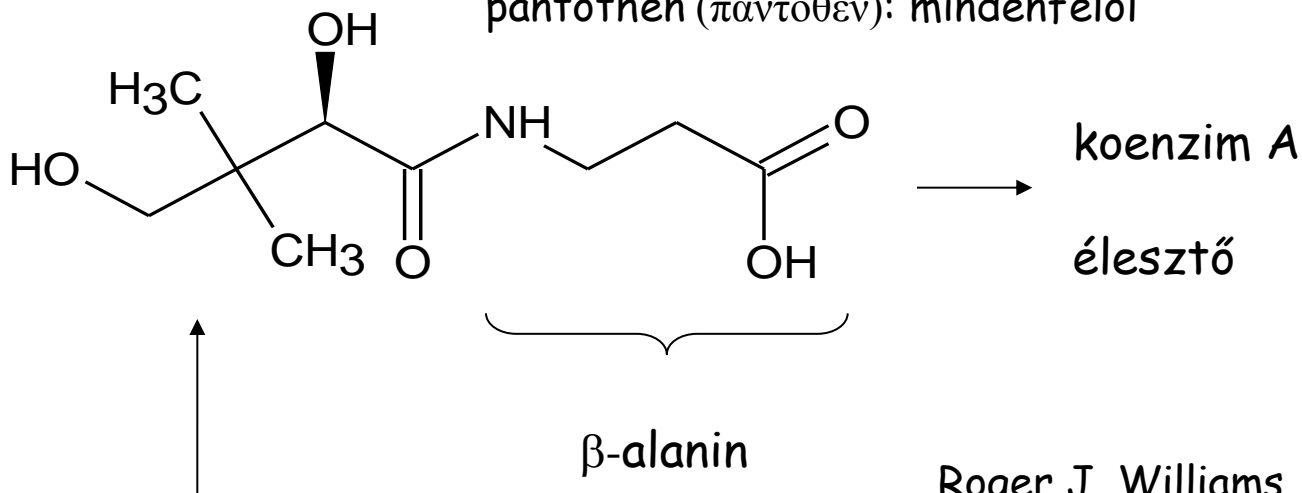
hiánya: pellagra (pelle agra = durva bőr)



Koleszterin szint szabályozó (?)

Pantoténsav/B₅ vitamin

pantothen (πάντοθεν): mindenfelől



Roger J. Williams
1933

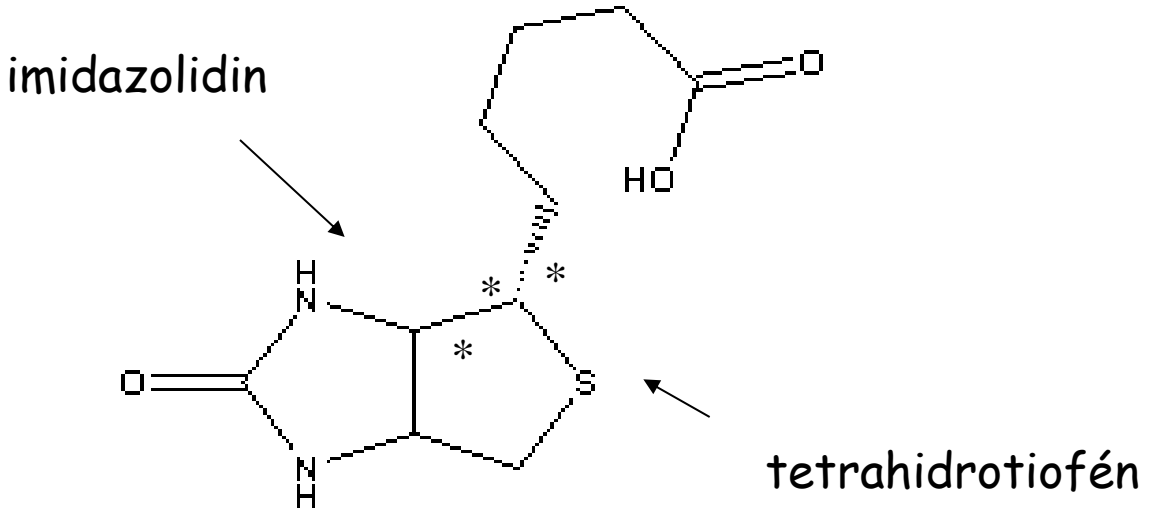
α, γ - dihidroxi - β, β - dimetil-vaajsav

„stressz ellenes” vitamin

H-vitamin (biotin)

izolálás: Kögl (1936)

2800 kg tojássárgája → 390 mg 1 tojás 50 g, ebből 17 g sárgája
390 mg = 164 706 db tojás

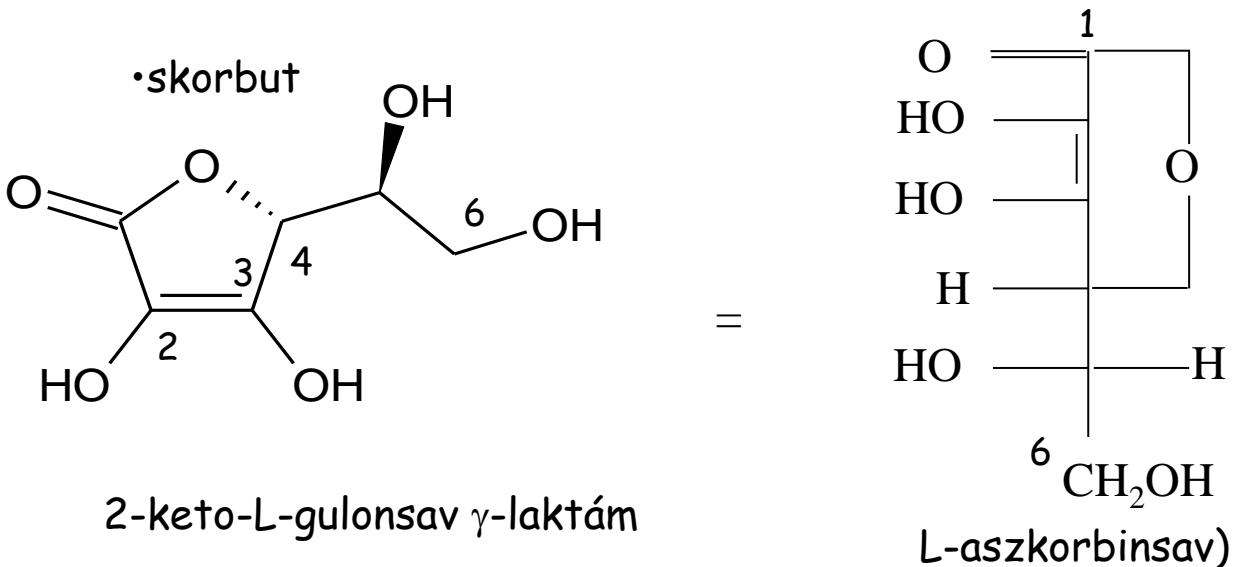


Avidin - biotin $K_d = 10^{-15}$

C-vitamin (L-aszkorbinsav)

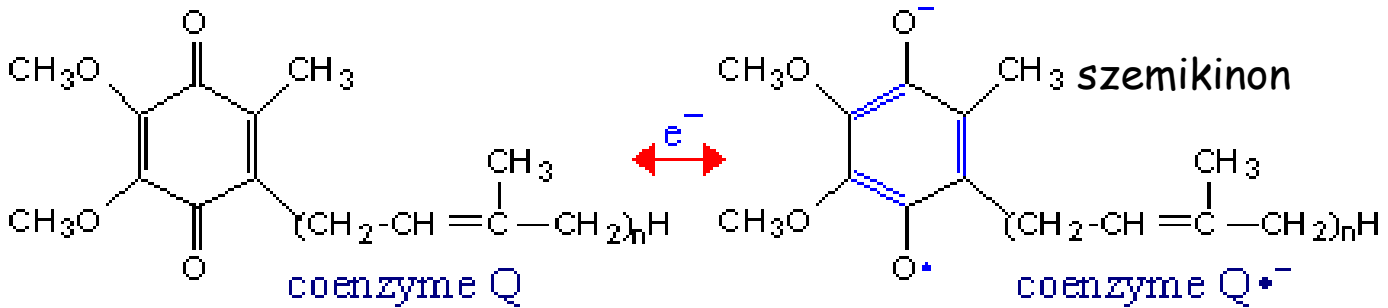
felfedezés: 1928

izolálás: Szentgyörgyi A. (1932)



Koenzim-Q (ubikinon, CoQ)

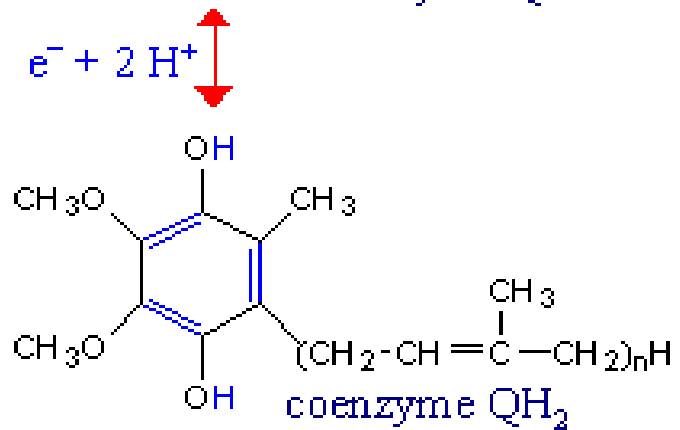
(eukarióta sejtekben, mitokondriumok)



(Izoprén egységek)

ubikinon

Koenzim Q₄, n = 4
Koenzim Q₉, n = 9
Koenzim Q₁₀, n = 10



ubikinol

Peter D. Mitchell, 1961

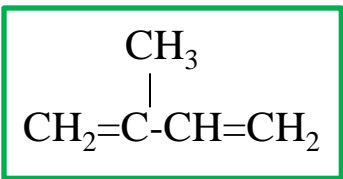
(Nobel díj, kémia, 1978)

„for his contribution to the understanding of biological energy transfer through the formulation of the chemiosmotic theory”.

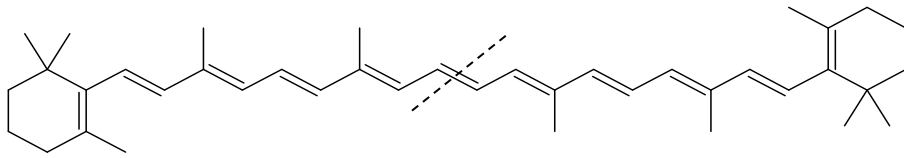
Később: elektrontranszport lánc koncepció - CoQ10 „protonvonzó”



1920-1992



A-vitamin



provitamin:
β-karotin

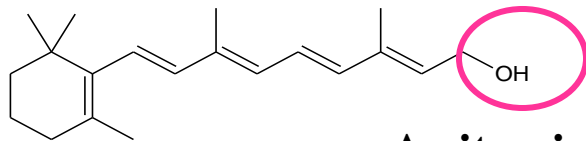
Kuhn, 1931

halak májából

növekedési

faktor,

farkasvakság

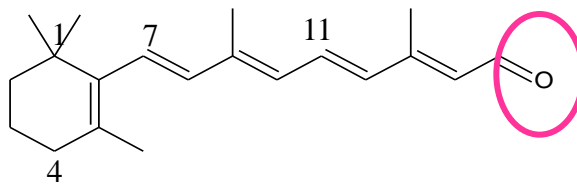


A vitamin

világos sárga olaj
fp.: 136°C (vákuum)

A₁ = retinol

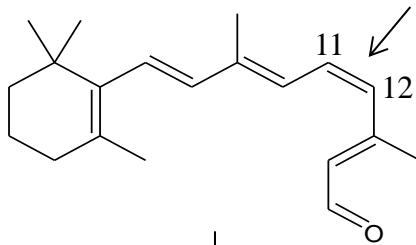
A₂ = dehidroretinol



„all-transz” retinal

0,5-1 mg/nap

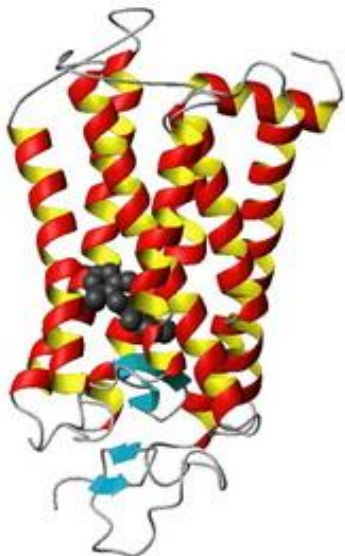
1 NE = 0,6 mg



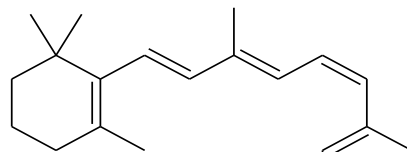
11-cisz-retinal

↓ H₂N-protein

opszin

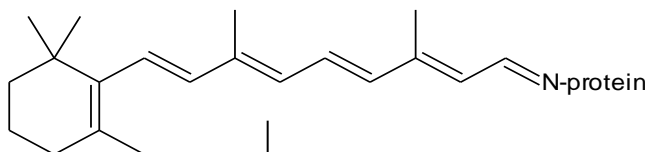


H₂N-protein +

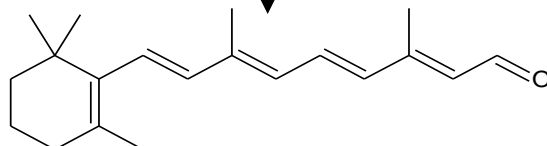


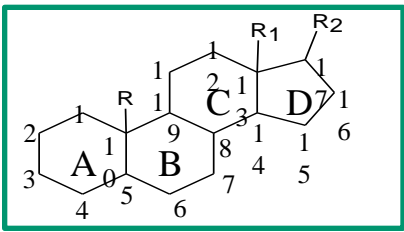
rodopszin

↓ hν

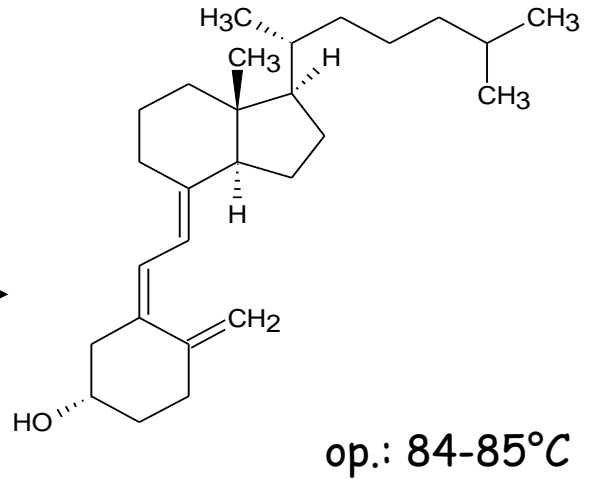
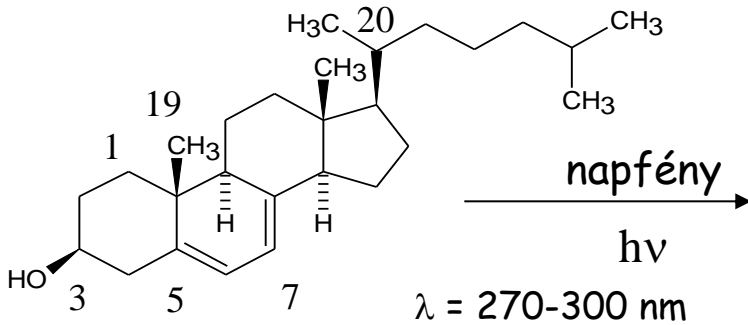


↓ H₂O





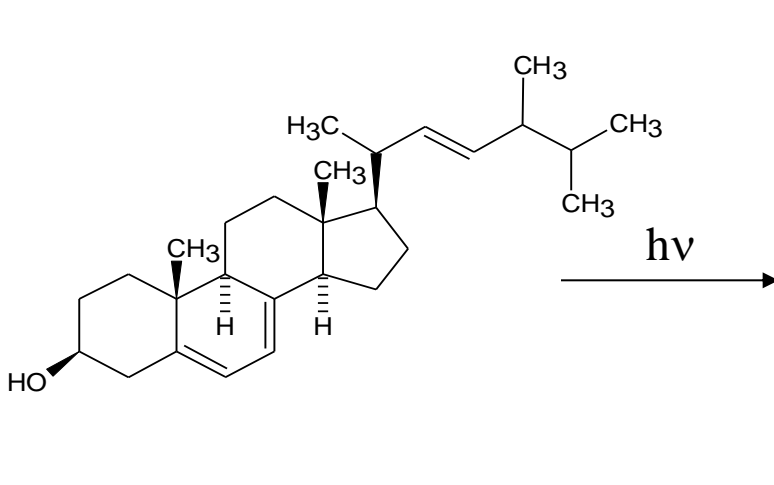
D-vitaminok



7-dehidrokoleszterin

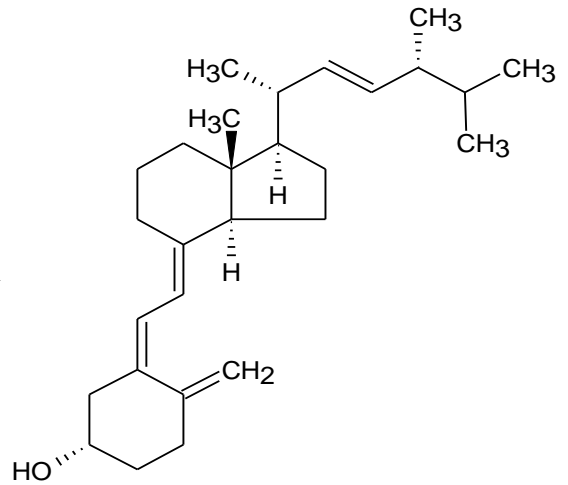
Állati eredetű élelmiszerek
Halolaj, máj, tojás, tejtermék

D₃-vitamin (kolekalciferol)



ergoszterol

Növényi eredetű élelmiszerek
Sörélesztő, gombák



D₂-vitamin op.: 115-117°C (ergo)kalciferol

1 NE = 0,025 mg

Szerepe: Ca²⁺- és foszfát felszívódás, csontképződés
szív- és érrendszer védelme, immunhiányos állapot, osztódás

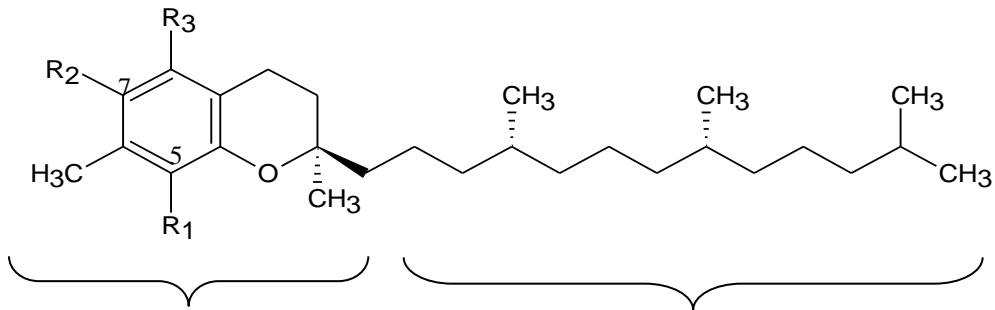
Hiánya: angolkór (rickets), csonttritkulás, csontosodási zavar

Hipervitaminózis: Csontszövet Ca²⁺- lerakódás, vesekőképződés

E-vitamin (tokoferol)

τόκος [*tókos*], φέρειν [*phérein*] = születés, hordozni

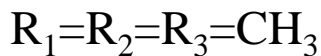
izolálás 1936
felfedezés 1927
szintézis 1938



kromán váz

C16 lánc

halványsárga olaj



α -tokoferol (5,7,8-trimetil)



β -tokoferol (5,8-dimetil)



γ -tokoferol (7,8-dimetil)

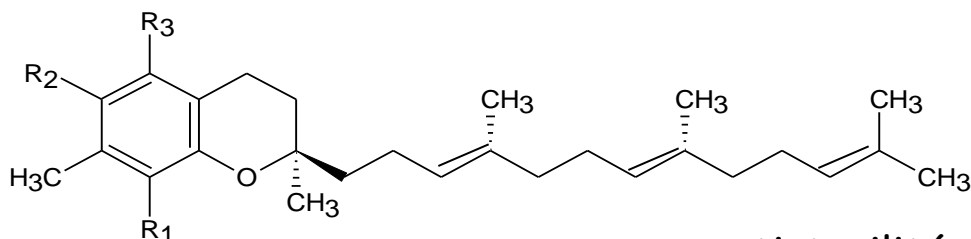
Előfordulás: növényi olajok, napraforgó, oliva, tökmag
hús, máj, tojás, tejtermék

Szerepe: antioxidáns, gyulladásgátló

Hiánya: vérszegénység, izomsorvadás, meddőség (embernél ritka)

Hipervitamiózis: Csontszövet Ca^{2+} - lerakódás, vesekőképződés

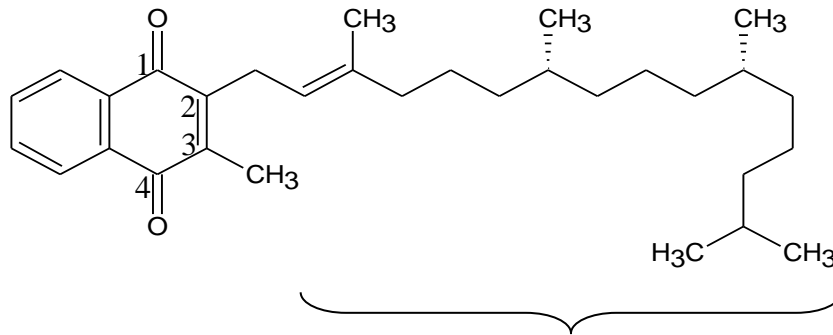
E-vitamin (tokotrienol)



•antisterilitás (patkány)

K₁-vitamin (fillokinon)

sárga olaj



naftokinon

fitil-csoport

2-metil-3-fitil-1,4-naftokinon

Előfordulás: spenót, káposztafélék, saláta, brokkoli
tejtermék, máj

Szerepe: antioxidáns, gyulladásgátló, koaguláció

Hiánya: **vérzékenység (a koaguláció hiánya miatt)**

Bomlás: fény, hő (100°C felett)