

Reaktivní skupiny

- obecný pohled na reaktivní skupiny bez vazby na konkrétní typ biomolekuly - univerzálně použitelné metody
- možnosti konverze existujících skupin
- reakce typické pro vybrané skupiny

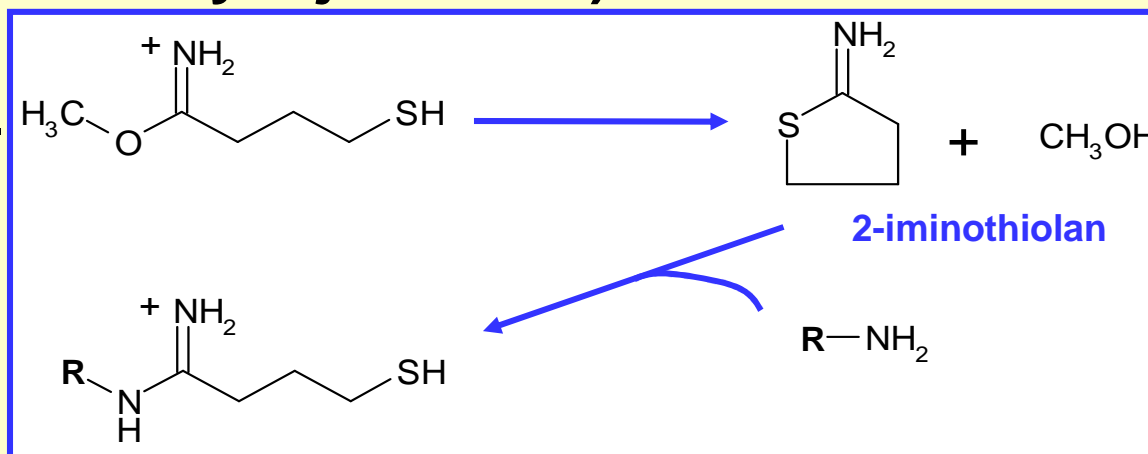
Vnášení reaktivních skupin

- **přírozené reaktivní skupiny biomolekuly nemusí dostačovat pro zamýšlené syntetické postupy**
- **konjugace bílkovin - často heterobifunkční činidla, která vyžadují různé koncové skupiny v obou partnerech**
- **jeden z reakčních partnerů předem upraven zavedením potřebné skupiny**

Thiolace (zavedení -SH)

- volná -SH skupina je pro konjugace velmi oblíbená
- v bílkovinách obvykle zřídka, nebo blokováno ve formě disulfidických -S-S- můstků
- stabilita -SH špatná - oxidace (inertní atmosféra, chelatace iontů kovů - katalyzují oxidaci)

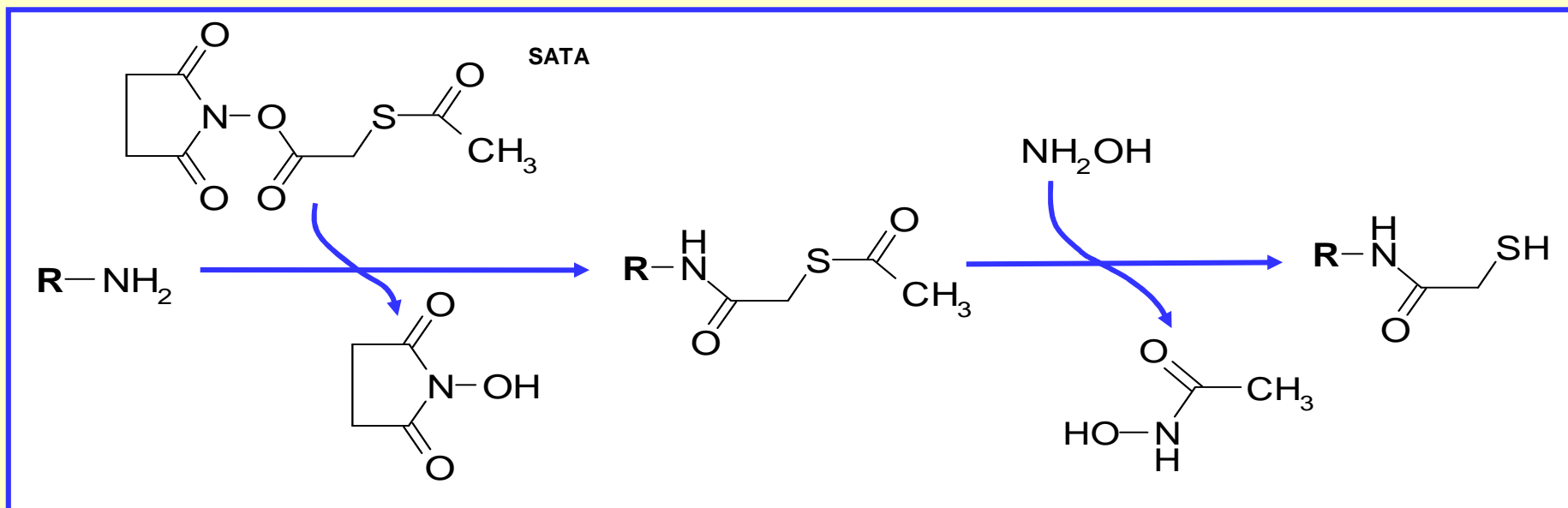
- methyl-4-merkaptobutyrimidát (Trautův reagent) cykl. na 2-iminothiolan (imidothioester)



- v mírně alk. podmínkách reaguje s primárními aminy
- alternativní methyl-3-merkaptopropionimidát poskytne kratší můstkovou část

-NH₂ na -SH pomocí SATA

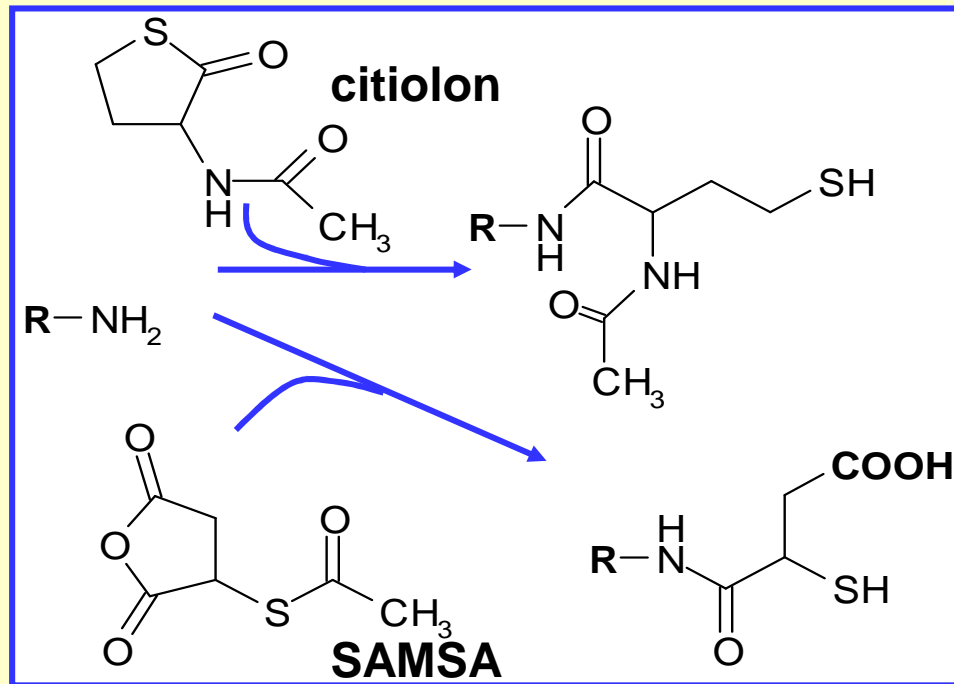
- N-sukcinimidyl-S-acetylthioacetát (SATA) působí konverzi aminoskupiny na thioskupinu
- odštěpí se N-hydroxysukcinimid, produkt obsahuje chráněnou sulfhydrylovou skupinu (lze uchovávat)
- deprotektce nadbytkem hydroxylaminu



- není třeba redukce - neovlivní se tedy nativní -SH skupiny
- analog N-sukcinimidyl-S-acetylthiopropionát (SATP) poskytne delší můstek

-NH₂ na -SH: citiolon a SAMSA

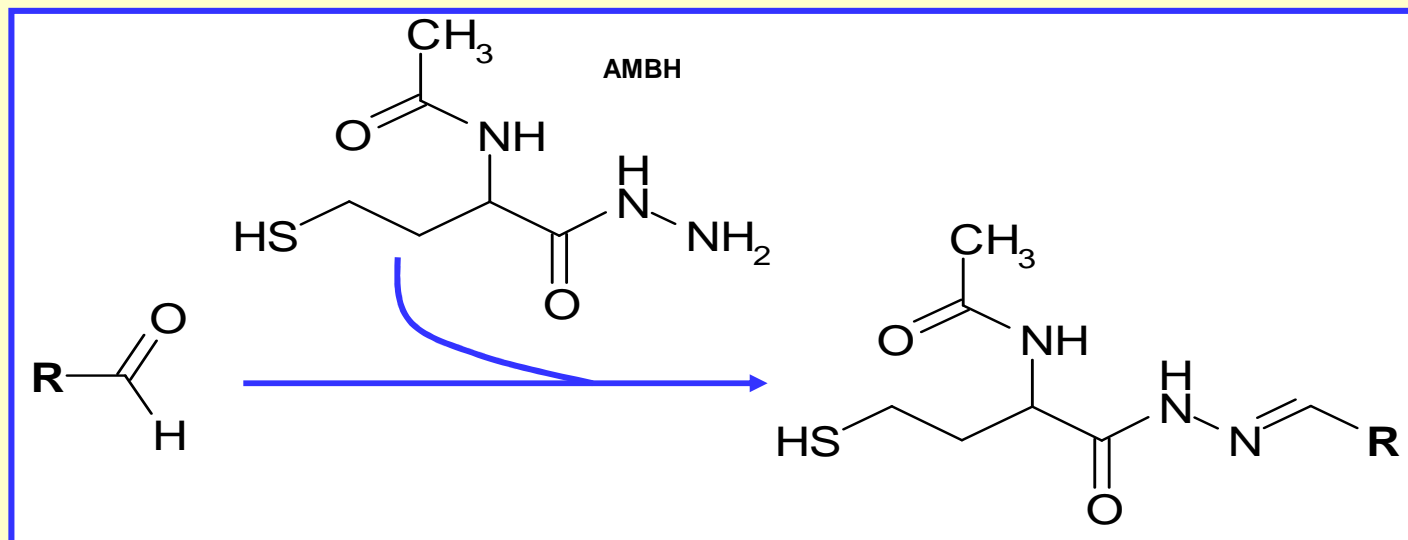
- **citiolon**, N-acetylhomocysteinethiolakton resp. 2-acetamido-4-merkaptobutyrát reaguje jako Trautův reagent, reakci urychluje Ag⁺



- reaktivní cyklický anhydrid - anhydrid S-acetylmerkaptojantarové kyseliny (**SAMSA**)
- uvolnění -SH skupiny deprotekcí s hydroxylaminem

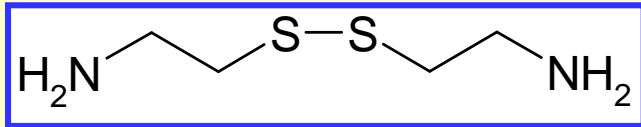
>C=O na -SH

- konverze oxoskupiny (aldehyd / keton) je možná **hydrazidem** 2-**acetamido**-4-**merkaptomáselné** kyseliny (**AMBH**)
- např. pro **jodistanem oxidované sacharidy** či **glykoproteiny**



-COOH nebo -O-PO₃²⁻ na -SH

- **cystamin** v přítomnosti karbodiimidu (EDC)

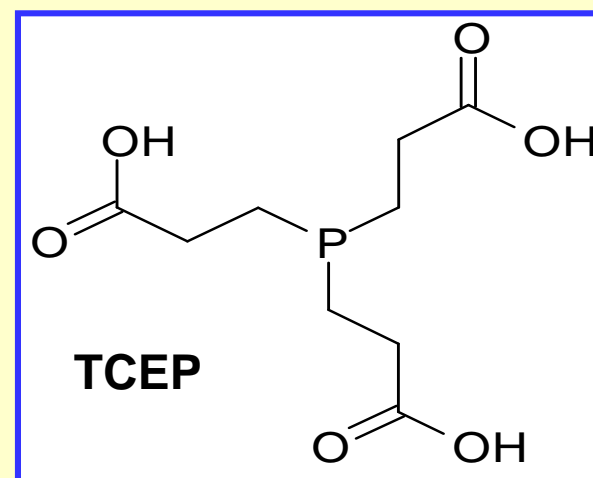


- vznikne amidová resp. fosfamidová vazba
- vnesené -S-S- disulfidové uzkupení je možné přímo spojit s molekulou obsahující volnou -SH skupinu (uvolní se cysteamin)
- nebo lze získat volnou -SH skupinu redukcí, např. DTT

-
- **cysteamin** = 2-aminoethanethiol / 2-merkaptotoethylamin / dekarboxycystein / thioethanolamin
 - **cystein**
 - **cystin**

-S-S- na -SH

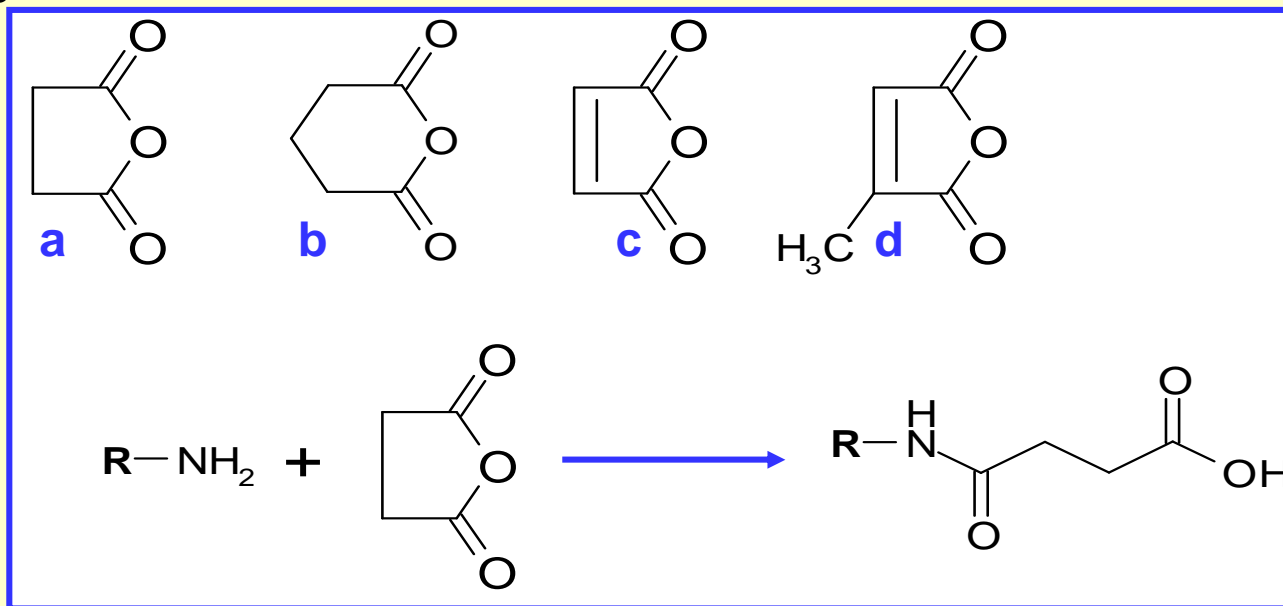
- speciální případ, k rozštěpení dojde redukcí, činidel je celá řada, např. s volnou -SH skupinou:
 - dithiothreitol (DTT, Clelandovo činidlo), 2-merkapt ethanol, 2-merkapt ethylamin
- imobilizované formy činidel - není třeba provádět separaci nadbytečného činidla
- odobný výsledek poskytuje i TCEP, tris(karboxyethyl)fosfin
- nejjednodušší redukce pomocí borohydridu NaBH_4
- má význam i pro štěpení nativních S-S můstků v bílkovinách



Karboxyskupina místo -NH₂

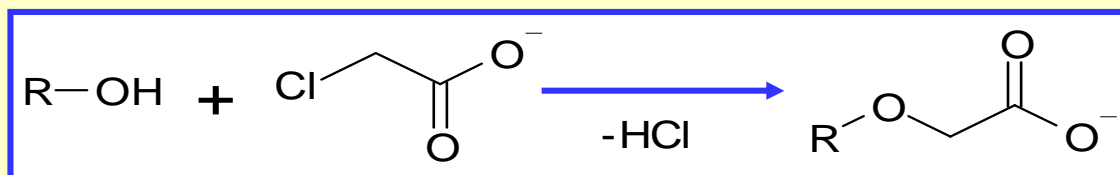
- užívají se **cyklické anhydridy dikarboxylových kyselin**
- reagují s volnou aminoskupinou - otevírá se kruh a vzniká amid
- může reagovat i hydroxyl serinu a threoninu, fenolátový anion dává nestabilní produkt
- dočasné blokování aminoskupiny - anhydrid kyseliny citrkonové
 - poskytuje amidovou vazbu při pH 8, snadno hydrolyzuje při pH 3 až 4 za opětovného uvolnění aminoskupiny
- možnosti: **a** sukcinanhydrid, **b** glutaranhydrid, **c** maleinanhydrid, **d** anhydrid kyseliny citrkonové

- změna aminoskupiny za karboxyskupinu mění náboj a pI dané biomolekuly



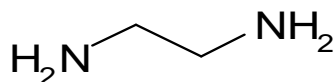
Halogenoctové kyseliny

- **kyselina jodoctová:**
 - může reagovat s aminoskupinami lyzinu nebo imidazolového kruhu histidinu, se sulfhydrylovou skupinou cysteinu i s methylthioskupinou methioninu
 - reakce závisí na pH prostředí
- **další α -halogenoctové kyseliny - podobně**
 - reaktivita derivátů klesá v řadě $I > Br > Cl > F$
 - z druhé strany v řadě **sulfhydryl > imidazolyl > thioether > amin**
 - za ekvimolárních poměrů a v mírně alkalickém prostředí jodacetát reaguje exkluzivně s cysteinovým zbytkem
- **kyselina chloroctová** slouží k derivatizaci hydroxylových skupin v polysacharidových maticích (dextran)
 - reakce probíhá v alkalickém pH:

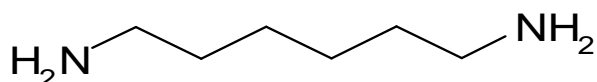


Vnesení aminoskupiny

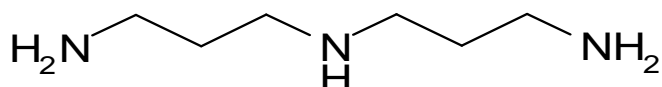
- nejběžněji konverze karboxylu pomocí **diaminů** v přítomnosti karbodiimidu (EDC) - vzniká amidová vazba a druhá koncová aminoskupina zůstává volně k dispozici



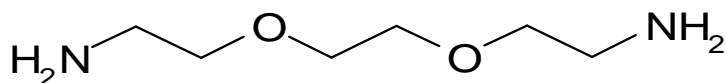
ethylenediamin (krátký můstek)



hexamethylenediamin
(1,6-diaminohexan)



3,3'-iminobis(propylamin)

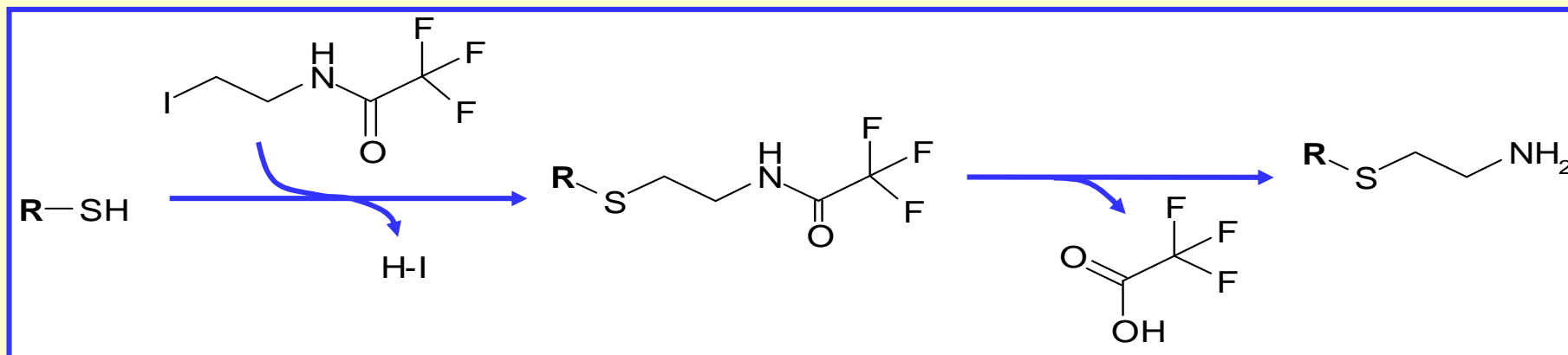


Jeffamin EDR-148 (hydrofilní)

- konverze karboxyskupiny na aminoskupiny výrazně ovlivní celkový náboj biomolekuly a také její pI hodnotu
 - často je to zamýšleným účelem modifikace

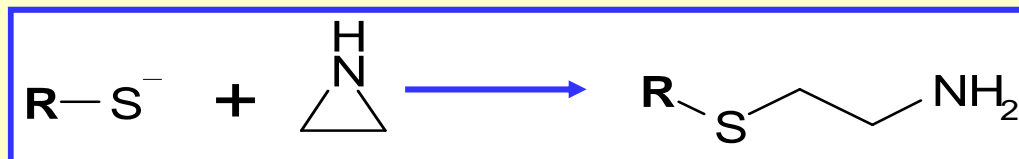
-SH na -NH₂

- lze pomocí **aminoethyl-8,N-(jodoethyl)trifluoroacetamidu**:



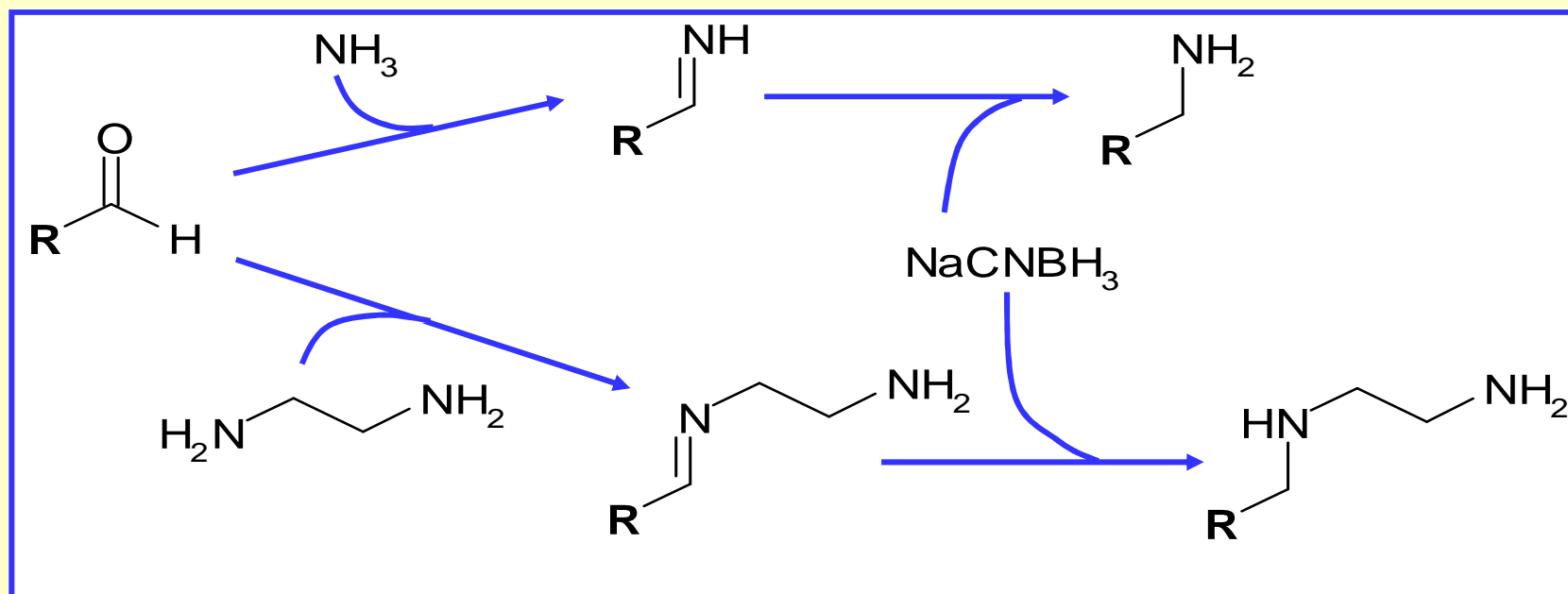
– deblokace v druhém kroku je spontánní

- **ethylenimin** v alkalickém prostředí - reakce převážně pouze s Cys
 - činidlo může vznikat přímo v alk. směsi cyklizací z 2-bromoethylaminu



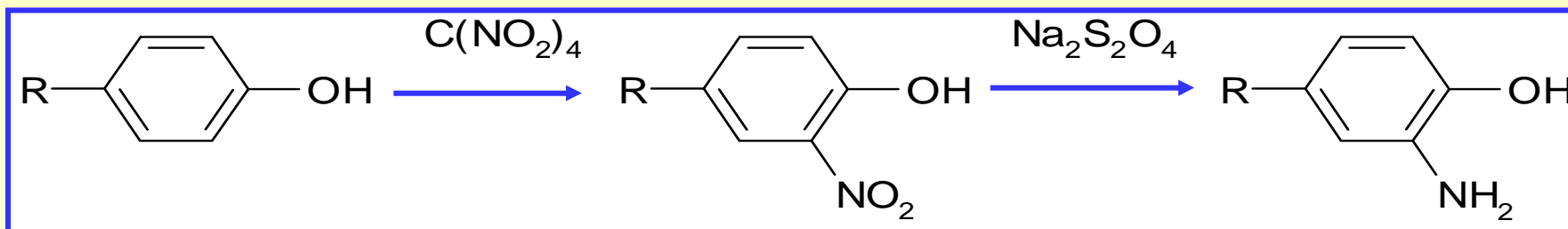
Aldehyd na -NH₂

- redukční aminace pomocí **amoniaku** nebo **diaminu** v přítomnosti kyanoborohydridu sodného **NaCNBH₃**
 - vzniká Schiffova báze, pak stabilizována redukcí
 - lze takto připravit např. aminovaný dextran po předcházející oxidaci jodistanem
 - nedochází k redukci aldehydické skupiny



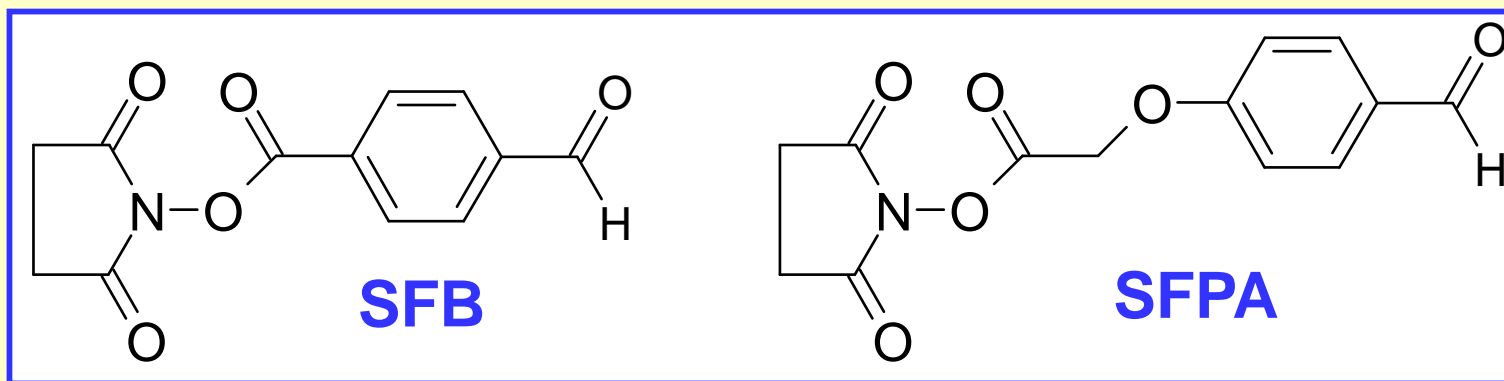
-NH₂ z tyrosinu

- nitrace pomocí **tetranitromethanu**
- nitroskupina se zredukuje na aminoskupinu
- lze výhodně aktivovat **kyselinou dusitou** na diazoniovou sůl pro kopulační reakce



Aminoskupina na aldehyd

- sukcinimidyl-p-formylbenzoová kyselina (SFB)
- sukcinimidyl-p-formylfenoxyoctová kyselina (SFPA)
 - při reakci vzniká amidová vazba, v případě proteinů výrazně narůstá jejich hydrofobicita



Glutaraldehyd

Schiffova báze

-C=N- je redukována na stabilnější formu (A)

reagují i oligomerní adukty glutaraldehydu (E), probíhá adice aminoskupiny na dvojnou vazbu (B)

kondenzace na cykl. produkt (C), pak reakce s lyzinovými zbytky - zesíťení

tvorba smíšených konjugátů, málo definované a často vysokomolekulární

cyklická hemiacetalová forma se vyskytuje zejména v kyselém prostředí, může dále polymerovat (D)

α,β nenasycený aldehydový polymer (E) vzniká při zásaditém pH

