

FOR REFERENCE

NOT TO BE TAKEN FROM THIS ROOM

KATI FAZDA PEPTİD SENTEZİ



Dr. EMEL YAKALI

Bogazici University Library



39001100543647

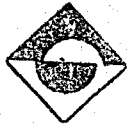
Doçentlik Tezi

Mart 1978

BİTİRİLMİŞ BİR TEZİN KOPYASIDIR. BİTİRİMİNİN KOPYASINDA BİR DEĞİŞİKLİK YAPILMASI İZİN DEĞİLDİR.

T E Ő E K K Ü R

Bu çalışmanın maddi olanaklarını sağlayan
Boğaziçi Üniversitesi ile A.B.D.'de Arizona
Üniversitesi, Kimya Bölümü idarecilerine teşek-
kürü borç bilirim.



İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	1
SUMMARY	2
FORMÜLLER	3

Ş E K İ L L E R

Şekil 1.1	Katı Fazda Peptid Sentezinde Kullanılan Temel Plan	7
Şekil 1.2	Hem c	8
Şekil 1.3	Ton Balığının Kalbindeki Sitokrom c'nin İndirgenmiş Halinde Polipeptid Zincirinin Kıvrılma Modeli	9
Şekil 2.1	At Kalbindeki Sitokrom c'nin (XXI) Hemsiz Peptid (XXIII) Parçasının ve Üç Benzerinin (XXIV-XXVI) Sentezlerinde Uygulanan Plan	10
Şekil 2.2	Sitokrom c'nin (XXI) Hemsiz Peptid Parçasının (XXIII) ve Üç Benzerinin (XXIV-XXVI) Katı Faz Yöntemiyle Sentezlerinde Yararlanılan Reaksiyonlar	11
Şekil 3.1	Katı Fazda Peptid Sentezinde Kullanılan Özel Deney Kabı	34
Şekil 3.2	N-t-Bütiloksikarbonil-p-kloro-L-fenilalanin'in (XXVIIa) Nükleer Manyetik Rezonans Spektrumu	47
Şekil 3.3	N-t-Bütiloksikarbonil-L-2-aminoheptanoyik Asid'in (XXVIIIa) Nükleer Manyetik Rezonans Spektrumu	55
Şekil 3.4	66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Polimerden Koparılmasından (A) Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Sonuçları	59
Şekil 3.5	66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Polimerden Koparılmasından (B) Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Sonuçları	63
Şekil 3.6	66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Polimerden İkinci Koparılmasından (B) Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Sonuçları	65

Şekil 3.7	66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Polimerden İkinci Koparılmasından (B) Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Tekrarlandığında Elde Edilen Sonuçlar	66
Şekil 3.8	p-Kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXIV) Polimerden Koparılmasından Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Sonuçları	70
Şekil 3.9	p-Kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXIV) Polimerden İkinci Koparılmasından Sonra Kullanılan Jel Kromatografisi Sonuçları	71
Şekil 3.10	p-Kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXV) Polimerden İkinci Koparılmasından Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Sonuçları	74
Şekil 3.11	p-Kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXVI) Polimerden İkinci Koparılmasından Sonra Arıtılmasından Kullanılan Jel Kromatografisi Tekrarlandığında Elde Edilen Sonuçlar	75
Şekil 3.12	L-2-Aminoheptanoyik Asid-79'lu 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXVI) Polimerden Koparılmasından Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Sonuçları	78

T A B L O L A R

Tablo 2.1	At Kalbindeki Sitokrom c'nin (XXI) Amino Asid Sayı ve Sırası	12
Tablo 2.2	66-104 Hemsiz Peptid (XXIII) ve Üç Benzerinin (XXIV-XXVI) Sentezlerinde Kullanılan Birleştirme Yöntemi	13
Tablo 2.3	66-104 Hemsiz Peptid (XXIII) ve Üç Benzerinin (XXIV-XXVI) Amino Asid Analizleri	14
Tablo 3.1	86-104-Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asidlerin Ağırlıkları	35
Tablo 3.2	86-104-Polimer Parçasının Amino Asid Analizi	35

Tablo 3.3	83-104-Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asidlerin Ağırlıkları	37
Tablo 3.4	83-104-Polimer Parçasının Amino Asid Analizi	37
Tablo 3.5	75-104-Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asidlerin Ağırlıkları	39
Tablo 3.6	75-104-Polimer Parçasının Amino Asid Analizi	39
Tablo 3.7	68-104-Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asidlerin Ağırlıkları	41
Tablo 3.8	68-104-Polimer Parçasının Amino Asid Analizi	41
Tablo 3.9	66-104-Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asidlerin Ağırlıkları	43
Tablo 3.10	66-104-Polimer Parçasının Amino Asid Analizi	43
Tablo 3.11	N-t-Bütiloksikarbonil-p-kloro-L-fenilalanin'in (XXVIIa) Nükleer Manyetik Rezonans Spektrum Değerleri	46
Tablo 3.12	p-Kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104 Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asidlerin Ağırlıkları	49
Tablo 3.13	p-Kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104 Polimer Parçasının Amino Asid Analizi	49
Tablo 3.14	p-Kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104 Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asidlerin Ağırlıkları	51
Tablo 3.15	p-Kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104 Polimer Parçasının Amino Asid Analizi	51
Tablo 3.16	N-t-Bütiloksikarbonil-L-2-aminoheptanoyik Asid'in (XXVIIIa) Nükleer Manyetik Rezonans Spektrum Değerleri	54
Tablo 3.17	L-2-Aminoheptanoyik Asid-79'lu 66-104 Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asidlerin Ağırlıkları	57
Tablo 3.18	L-2-Aminoheptanoyik Asid-79'lu 66-104 Polimer Parçasının Amino Asid Analizi	57

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.19 66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Amino Asid Analizleri (A)	60
Tablo 3.20 66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Amino Asid Analizleri (B)	64
Tablo 3.21 66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Son Amino Asid Analizleri (B)	67
Tablo 3.22 p-Kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXIV) Amino Asid Analizleri	72
Tablo 3.23 p-Kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXV) Amino Asid Analizleri	76
Tablo 3.24 L-2-Aminoheptanoyik Asid-79'lu Hemsiz Peptid Benzerinin (XXVI) Amino Asid Analizi	79

BÖLÜM I

ÖN BİLGİLER

1.1 Peptidler ve Proteinler	15
1.2 Katı Fazda Peptid Sentezi	16
1.3 Sitokrom c	19

BÖLÜM II

AMAÇ, SENTEZLER VE ELDE EDİLEN SONUÇLAR

2.1 Amaç	22
2.2 Sentezler	23
2.3 Elde Edilen Sonuçlar	26

BÖLÜM III

DENEYSEL KISIM

3.1 Glutamik Asid (Ib)-104'ün Polimere Bağlanması	31
3.2 Glutamik Asid (Ib)-104-Polimer Parçasının Hidroliz Yoluyla Analizi	32

	<u>Sayfa</u>
3.3 86-104-Polimer Parçasının Sentezi	32
3.4 83-104-Polimer Parçasının Sentezi	36
3.5 75-104-Polimer Parçasının Sentezi	38
3.6 68-104-Polimer Parçasının Sentezi	40
3.7 66-104-Polimer Parçasının Sentezi	42
3.8 N-Asetil-p-kloro-DL-fenilalanin'in (XXIX) Sentezi	44
3.9 N-Asetil-p-kloro-DL-fenilalanin'in (XXIX) Enzim ile Rezolüsyonu; p-Kloro-L-fenilalanin'in (XXVIIb) Sentezi	44
3.10 N-t-Bütiloksikarbonil-p-kloro-L-fenilalanin'in (XXVIIa) Sentezi	45
3.11 p-Kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104-Polimer Parçasının Sentezi	48
3.12 p-Kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104-Polimer Parçasının Sentezi	50
3.13 N-Asetil-DL-2-aminoheptanoyik Asid'in (XXX) Sentezi	52
3.14 N-Asetil-DL-2-aminoheptanoyik Asid'in (XXX) Enzim ile Rezolüsyonu; L-2-Aminoheptanoyik Asid'in (XXVIIIb) Sentezi	52
3.15 N-t-Bütiloksikarbonil-L-2-aminoheptanoyik Asid'in (XXVIIIa) Sentezi	53
3.16 L-2-Aminoheptanoyik Asid-79'lu 66-104-Polimer Parçasının Sentezi	56
3.17 66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Polimerden Koparılması (A)	58
3.18 Peptidlerin Hidroliz Yoluyla Analizi	61
3.19 66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Polimerden Koparılması (B)	61
3.20 p-Kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXIV) Polimerden Koparılması	68
3.21 p-Kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXV) Polimerden Koparılması	73
3.22 L-2-Aminoheptanoyik Asid-79'lu 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin Polimerden Koparılması	77

Ö Z E T

Bu çalışmada, her biri 39 amino asidden oluşan üç yeni peptid'in (XXIV-XXVI; Tablo 2.2) katı faz yöntemi ile sentezleri yapılmıştır. Sentezlerde kullanılmak üzere hazırlanan N-t-butiloksikarbonil-p-kloro-L-fenilalanin (XXVIIa) ve N-t-butiloksikarbonil-L-2-aminoheptayonik asid (XXVIIIa) de literatüre yeni geçecek maddelerdir.

Sentezleri gerçekleştirilen bu peptidler, tüm çekirdekli hücrelerde bulunan ve sitokrom c adı ile bilinen proteinin "hemsiz" peptid parçasının benzerleridir. Bilindiği gibi, çeşitli hücrelerden elde edilen sitokrom c moleküllerinin amino asid sayı ve sırasında farklılıklar görülebilmektedir. Atların kalp hücrelerinde bulunan sitokrom c (XXI), bir "hem c" grubu ile 104 amino asidden kurulu bir polipeptid zincirinden oluşur. Bu zincirin 66'ncı ve 104'cü amino asidleri arasında kalan parçasına hemsiz peptid (XXIII) adı verilir. Çalışmada sentezleri yapılan peptidler bu hemsiz peptid (XXIII) parçasından birer konumda farklıdır. Birinci peptid'de (XXIV) zincirdeki tirozin-67 yerine p-kloro-L-fenilalanin; ikinci peptid'de (XXV) tirozin-74 yerine p-kloro-L-fenilalanin; üçüncü peptid'de (XXVI) ise lizin-79 yerine L-2-aminoheptanoyik asid bulunmaktadır.

Sentezleri yapılan peptidlerin, atların kalp hücrelerinden elde edilen sitokrom c'nin (XXI) 1-65 "hemli" peptid (XXIIb) parçası ile birleştirilmesinden yarı sentetik proteinler elde edilebilir. Bu proteinlerin özelliklerinin incelenmesi, hücrelerde oksijenin suya indirgenmesinde ve adenosin trifosfat'ın üretiminde elektron taşıyıcılığı görevini yapan sitokrom c'nin yükseltgeme ve indirgeme reaksiyonlarının mekanizmasına açıklık getirecek ve sitokrom c'nin yapısı ile görevi arasındaki ilişkilerin anlaşılmasını sağlayacaktır.

Katı faz yönteminin uygulandığı bu çalışmada, her peptidin sentezi için, peptidin serbest karboksil grubunun bulunduğu amino asid (104) bu gruptan yararlanarak katı fazı oluşturan polimere kovalan bağ ile bağlanmış; ondan sonra gelen amino asidler (103-66) tek tek bu amino aside peptid bağları ile eklenmiştir. Sonunda, polimer ile peptid arasındaki kovalan bağ koparılmış ve peptid çözelti içinde elde edilmiştir. Bu çözeltilerden liyofilizasyon yoluyla katı halde elde edilen peptid, jel kromatografisi ile arıtılmıştır.

SUMMARY

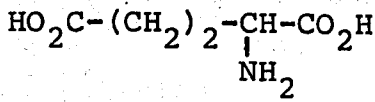
In this work, the syntheses of three new peptides (XXIV-XXVI, Table 2.2), each containing 39 amino acids, are reported. N-t-butyloxy-carbonyl-p-chloro-L-phenylalanine (XXVIIa) and N-t-butyloxycarbonyl-L-2-aminoheptanoic acid (XXVIIIa), necessary for the above syntheses, have also been prepared for the first time.

These peptides are analogs of the "nonheme" peptide of cytochrome c which is a protein found in all cells having a nucleus. Cytochromes c from different species are known to show differences in their amino acid sequences. Horse heart cytochrome c (XXI) consists of one "heme c" group and 104 amino acid residues in a single polypeptide chain. The 66-104 fragment of this chain, containing 39 amino acids, is known as the non-heme peptide (XXIII). The peptides synthesized differ from this nonheme peptide (XXIII) only in one position. In the first peptide (XXIV), tyrosine-67 has been replaced by p-chloro-L-phenylalanine; in the second one, (XXIV) tyrosine-67 by p-chloro-L-phenylalanine; and in the third one (XXVI), lysine-79 by L-2-aminoheptanoic acid.

Combination of these analogs with the native 1-65 heme peptide (XXIIb) of horse heart cytochrome c (XXI) would yield semi-synthetic proteins. Studies on these semi-synthetic proteins would then give information about cytochrome c, which functions as an electron-transport protein in the cells for the reduction of oxygen to water and the synthesis of adenosine triphosphate. Specifically, this information would be useful in determining the mechanism of oxidation-reduction reactions of cytochrome c and in understanding the structure-function relationships in the molecule.

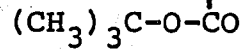
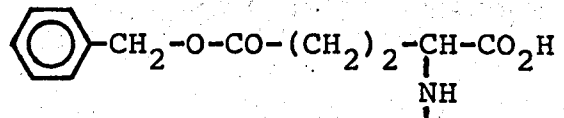
In the solid phase method applied in the synthesis of each peptide, the amino acid (104) which contains the free carboxyl group of the peptide has been attached to a polymer, known as the solid support, by forming a covalent bond between this carboxyl group and the polymer; and then all the other amino acids (103-66) have been added one at a time in a stepwise manner to this amino acid on the polymer. After the completion of addition, the free peptide has been released into solution by cleavage of the covalent bond between the peptide chain and the polymer. Finally, the peptide, obtained in the solid form by lyophilization of the solution, has been purified by gel chromatography.

F O R M Ü L L E R

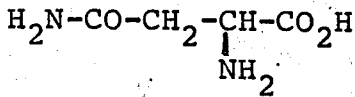


Ia

Glutamik Asid (Glu)

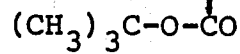
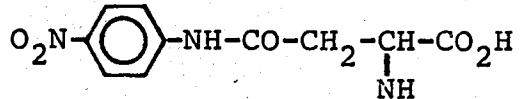


Ib

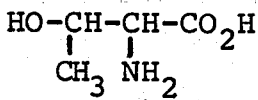


IIa

Asparagin (Asp.NH₂)

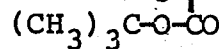
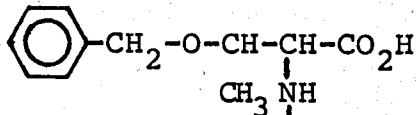


IIb

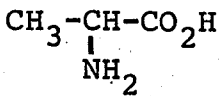


IIIa

Treonin (Tre)

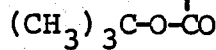
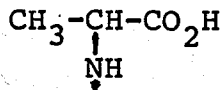


IIIb

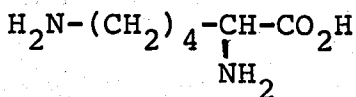


IVa

Alanin (Ala)

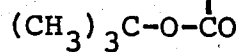
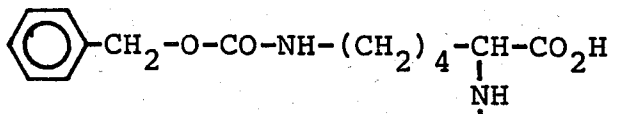


IVb

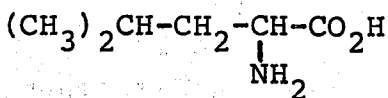


Va

Lizin (Liz)

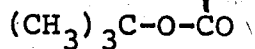
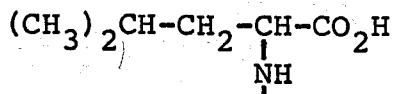


Vb

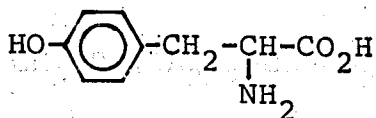


VIa

Lösin (Lös)

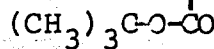
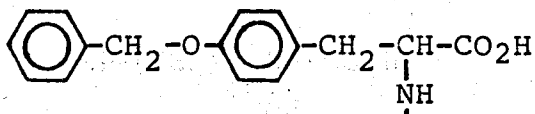


VIb

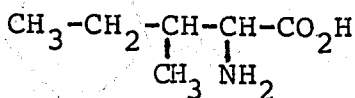


VIIa

Tirozin (Tir)

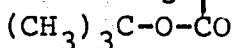
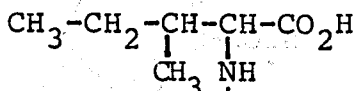


VIIb

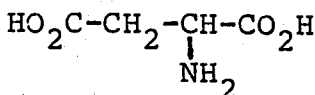


VIIIa

Izolösin (ilös)

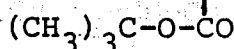
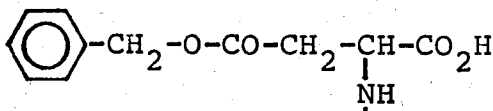


VIIIb

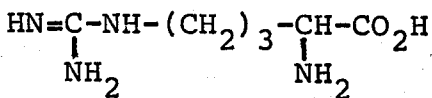


IXa

Aspartik Asid (Asp)

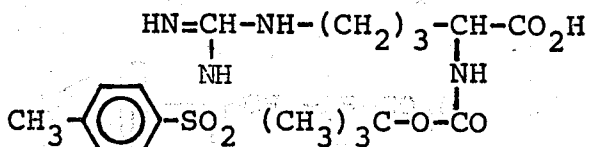


IXb

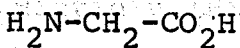


Xa

Arginin (Arg)

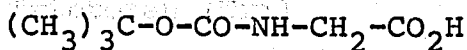


Xb

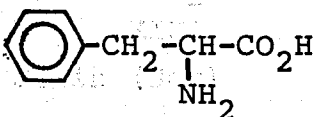


XIa

Glisin (Gli)

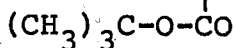
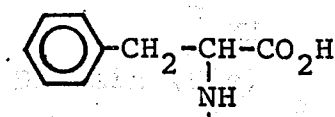


XI b

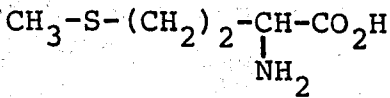


XIIa

Fenilalanin (Fen)

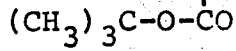
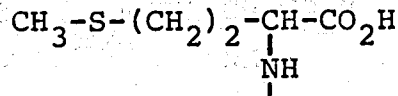


XIIb

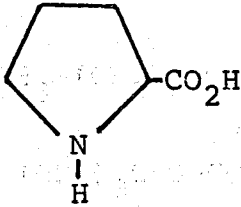


XIIIa

Metionin

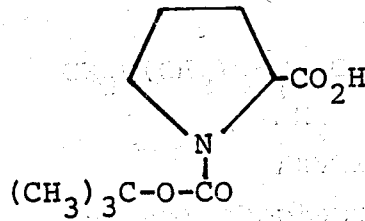


XIIIb

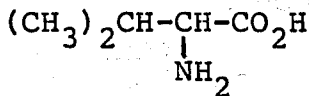


XIVa

Prolin (Pro)

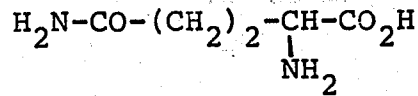


XIVb



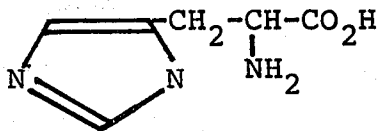
XV

Valine (Val)



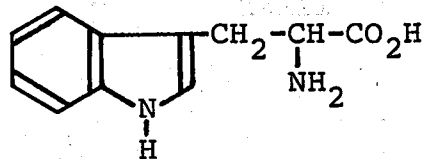
XVI

Glutamin (Glu-NH₂)



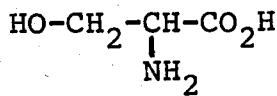
XVII

Histidin (His)



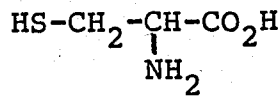
XVIII

Triptofan (Tri)



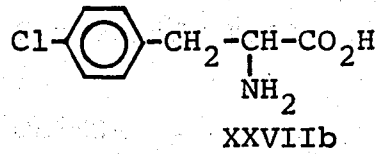
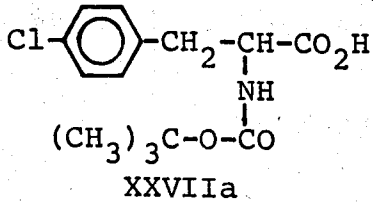
XIX

Serin (Ser)

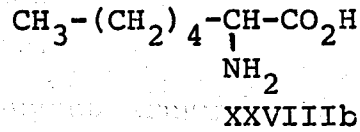
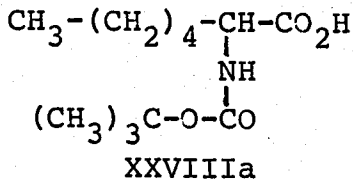


XX

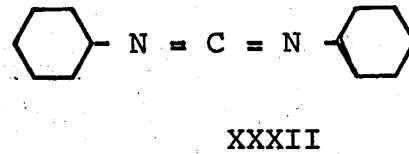
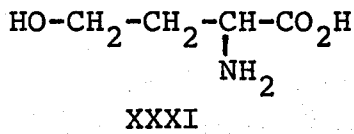
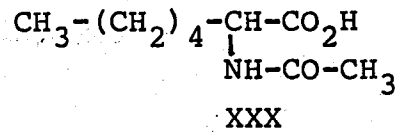
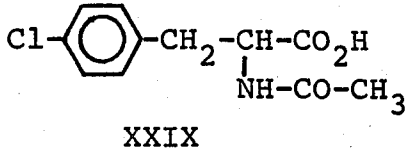
Sistein (Sis)



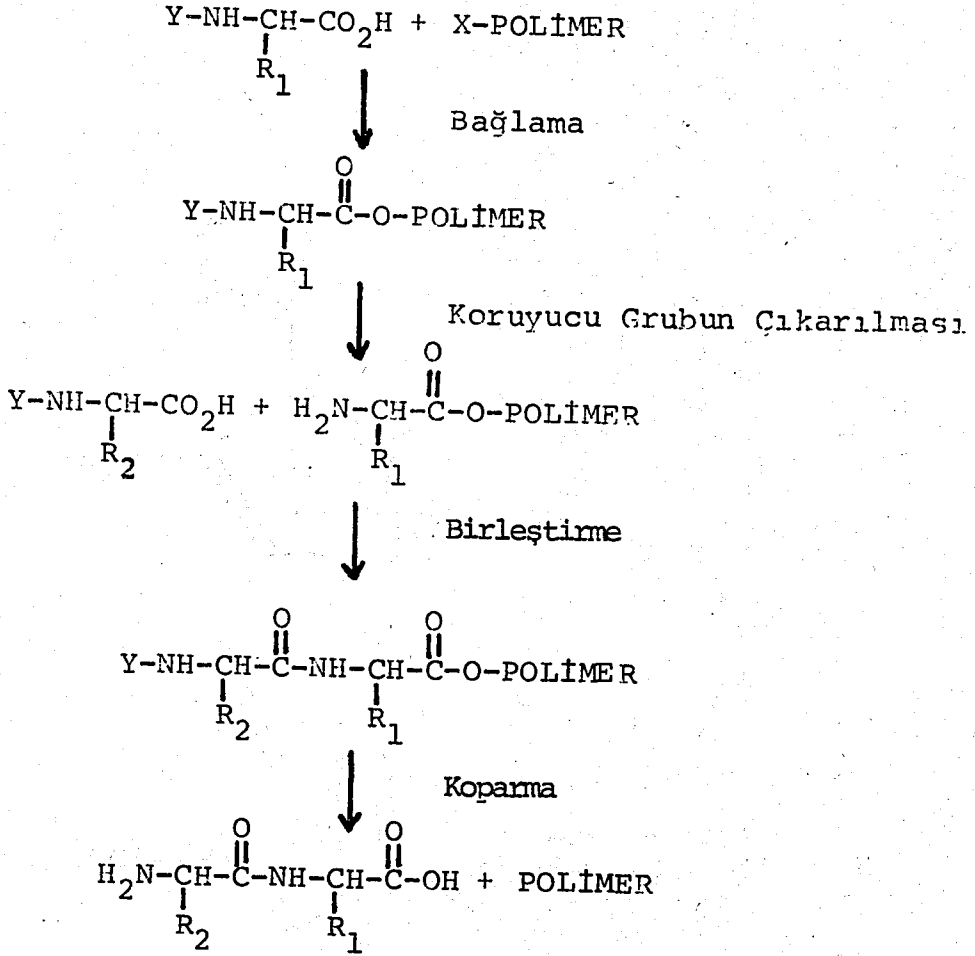
p-Kloro-L-fenilalanin (p-Cl-Fen)



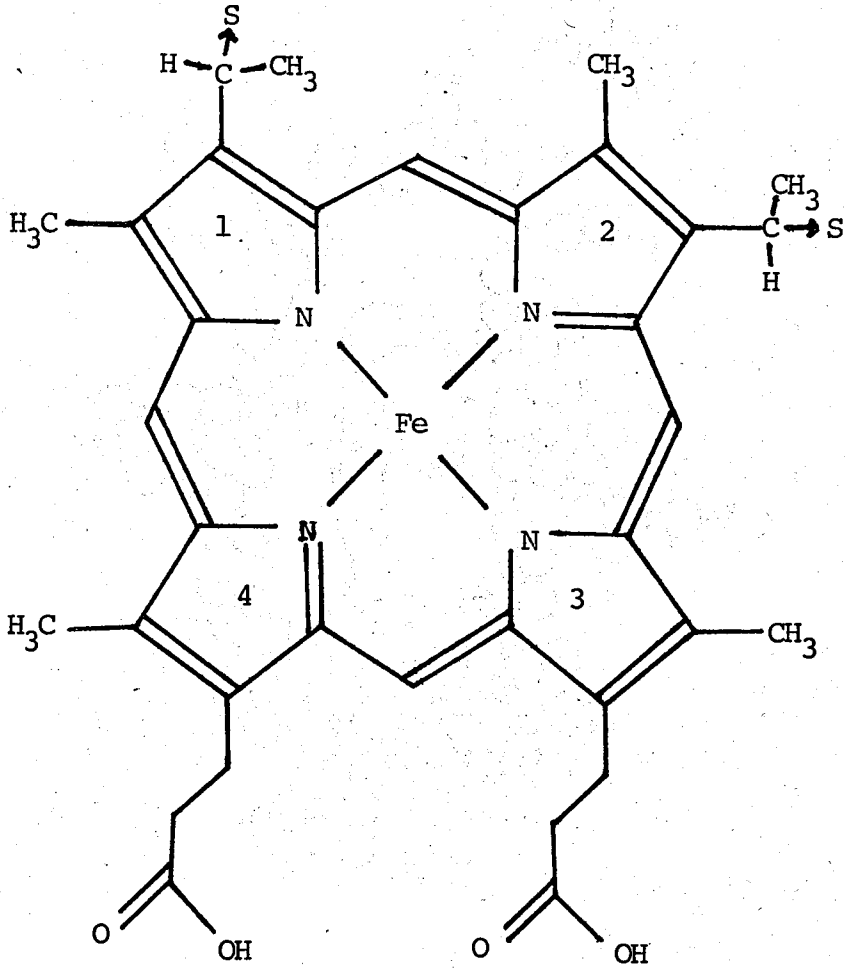
L-2-Aminoheptanoyik Asid (2-Aha)

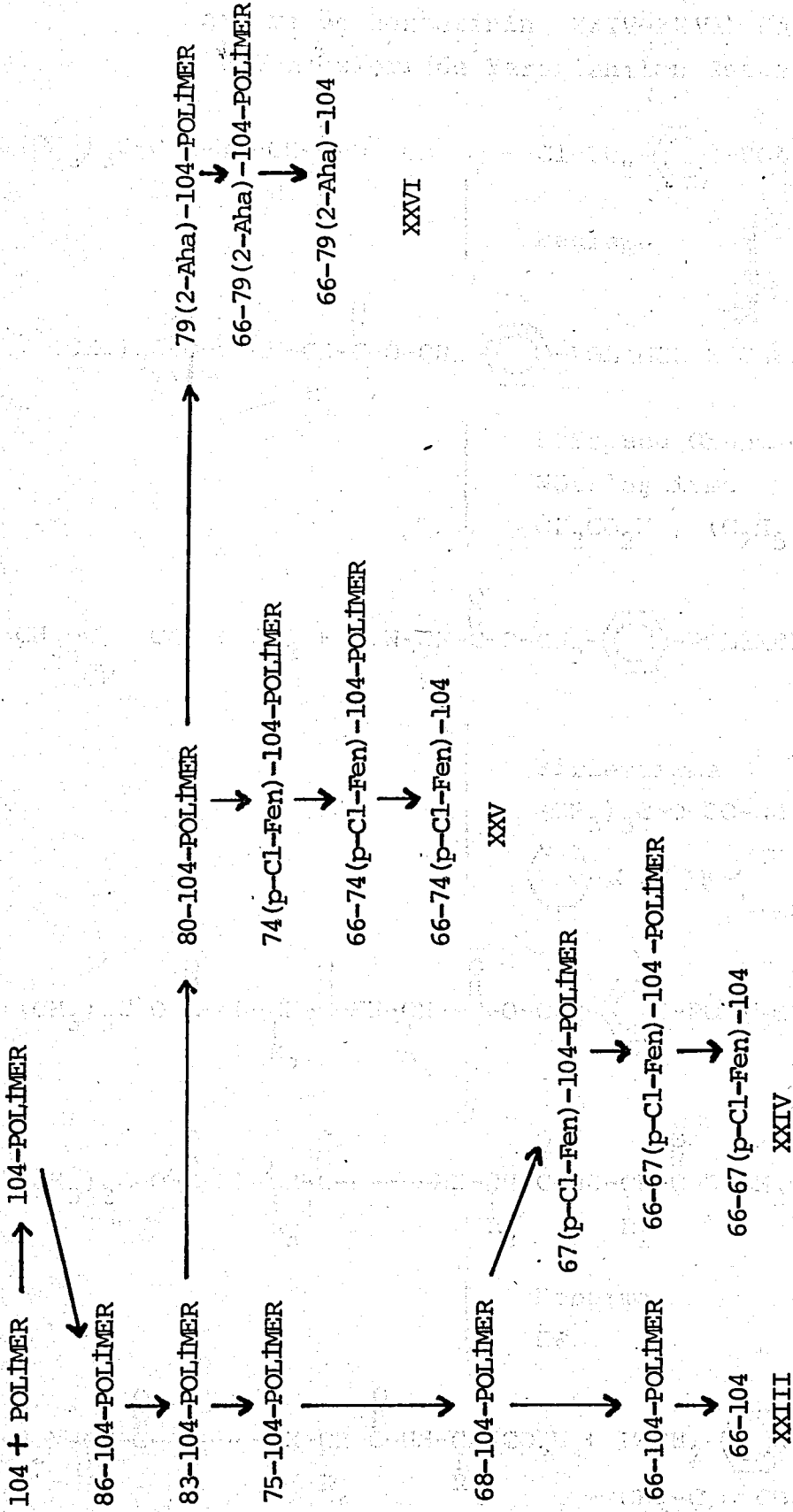


Şekil 1.1. Katı Fazda Peptid Sentezinde Kullanılan Temel Plan



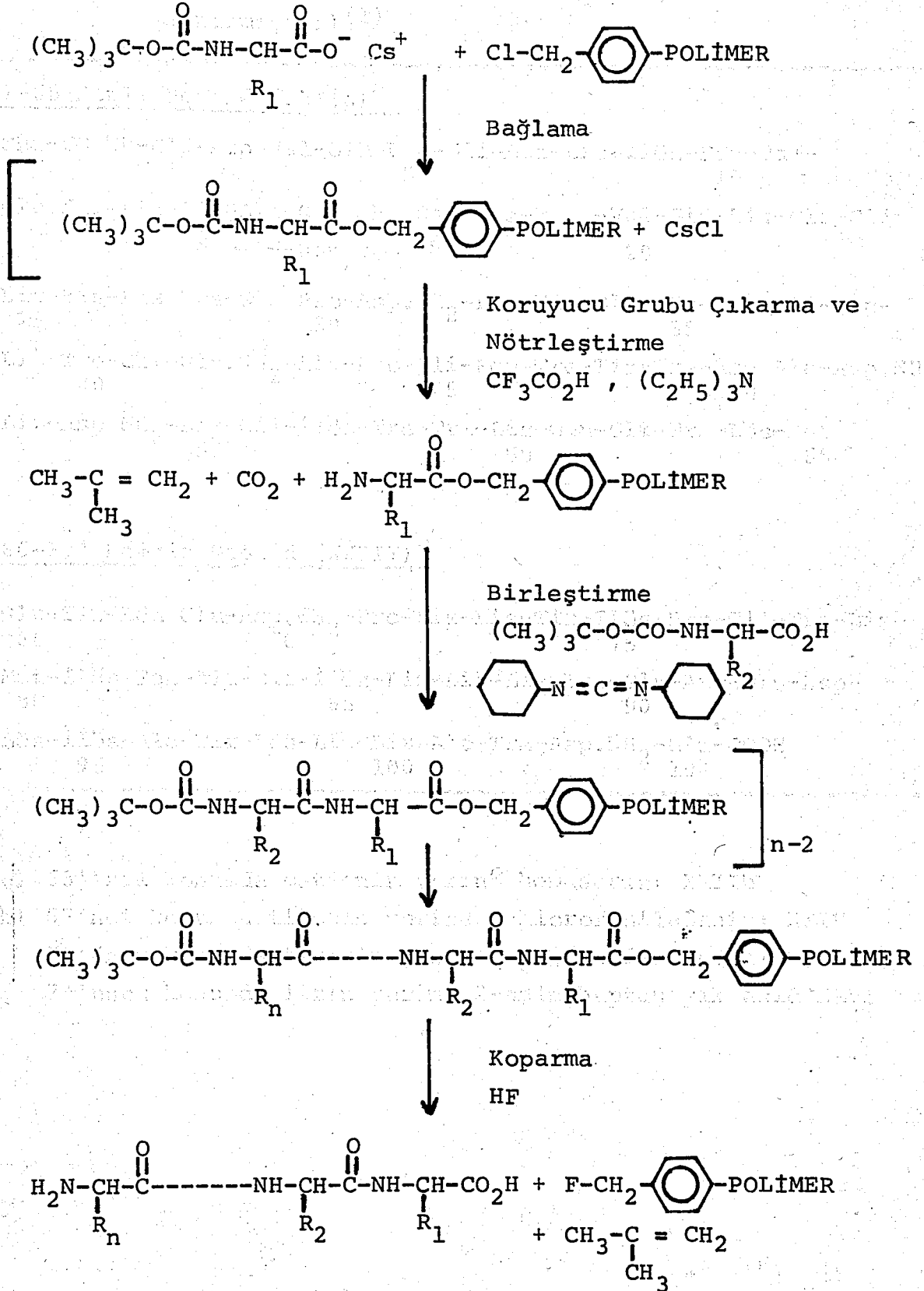
Şekil 1.2. Hem c (Pirrol halkaları alışıl gelmiş sisteme göre numaralandırılmıştır. Kükürt atomları proteinin sistein'lerinin yan dallarına aittir) (17).





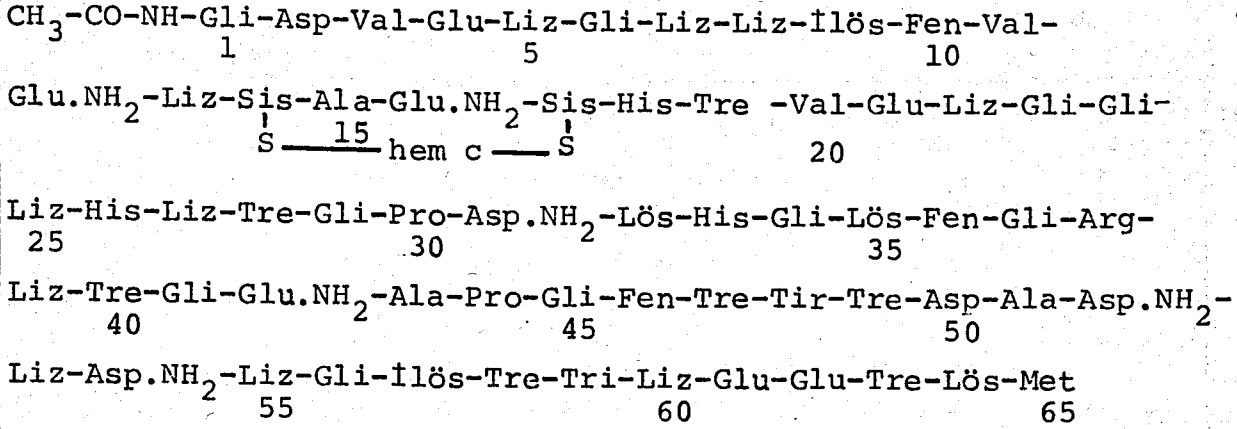
Şekil 2.1. At Kalbindeki Sitokrom c'nin (XXI) Hemsiz Peptid (XXIII) Parçasının ve Üç Benzerinin (XXIV-XXVI) Sentezlerinde Kullanılan Plan (Sayılar, bu konumlardaki amino asitleri göstermek için kullanılmıştır).

Şekil 2.2. Sitokrom c'nin (XXI) Hemsiz Peptid (XXIII) Parçasının ve Üç Benzerinin (XXIV-XXVI) Katı Faz Yöntemiyle Sentezlerinde Yararlanılan Reaksiyonlar

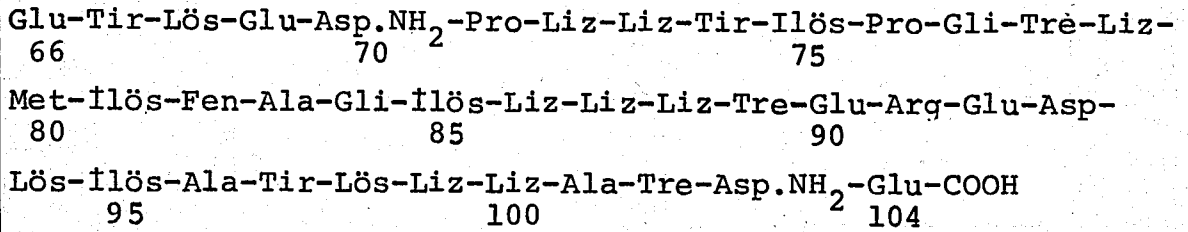


Tablo 2.1. At Kalbindeki Sitokrom c'nin (XXI) Amino Asid Sayı ve Sırası⁽¹⁷⁾. (Tüm amino asidler sol (L) amino asidlerdir ve bunların kısaltılmış isimleri kullanılmıştır)⁽¹⁾.

1-65 Hemli Peptid (XXIIa)^a



66-104 Hemsiz Peptid (XXIII)^b



- a) 65'inci konumda metionin yerine homoserin: XXIIb
b) 67'nci konumda tirozin yerine p-klorofenilalanin: XXIV
74'üncü konumda tirozin yerine p-klorofenilalanin: XXV
79'uncu konumda lizin yerine 2-aminoheptanoyik asid: XXVI

Tablo 2.2. 66-104 Hemsiz Peptid (XXIII) ve Üç Benzerinin (XXIV-XXVI) Sentezlerinde Kullanılan Birleştirme Yöntemi

Adım	Reaktif	Çalkalama süresi	Tekrar sayısı
1	CH_2Cl_2	2d	3
2	$\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (25:75)	10d	1
3	CH_2Cl_2		
4	$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (10:90)	2d	2
5	CH_2Cl_2	2d	3
6	Korunmuş Amino Asid ^a / CH_2Cl_2 DSKI ^b / CH_2Cl_2	4-6s	1
7	CH_2Cl_2	2d	3
8	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	2d	2
9	CH_2Cl_2	2d	3

a) N-t-Bütiloksikarbonil ve varsa yan dal fonksiyonel grubu korunmuş amino asid

b) DSKI: Disikloheksilkarbodiimid (XXXII)

Tablo 2.3. 66-104 Hemsiz Peptid (XXIII) ve Üç Benzerinin (XXIV-XXVI) Amino Asid Analizleri^a

Amino Asid	66-104 Hemsiz Peptid (XXIII)		p-Cl-Fen-67'li Benzer (XXIV)		p-Cl-Fen-74'lü Benzer (XXV)		2-Aha-79'lu Benzer (XXVI)	
	Sayı	Oran	Sayı	Oran	Sayı	Oran	Sayı	Oran
p-Kloro-L-fenilalanin (XXVIIb)			1	1,0	1	0,72		
Lizin (Va)	8	7,9	8	7,6	8	7,9	7	7,0
Arginin (Xa) ^b	1	1,0	1	1,0	1	1,0	1	1,0
Aspartik Asid (IXa) ^{c,d}	3	3,0	3	3,0	3	3,0	3	3,0
Treonin (IIIa)	3	2,9	3	2,8	3	2,9	3	2,9
Glutamik Asid (Ia)	5	5,2	5	5,0	5	5,1	5	4,6
Prolin (XIVa)	2	1,9	2	1,8	2	2,1	2	1,6
Glisin (XIa)	2	2,0	2	1,9	2	2,1	2	1,8
Alanin (IVa)	3	3,1	3	3,1	3	3,3	3	3,1
Metionin (XIIIa)	1	0,95	1	0,65	1	0,42	1	0,47
İzolösin (VIIIa)	4	3,8	4	3,8	4	3,9	4	4,1
Lösin (VIa)	3	3,0	3	3,1	3	3,2	3	3,0
Tirozin (VIIa)	3	1,9	2	1,4	2	1,2	3	1,9
Fenilalanin (XIIa)	1	1,1	1	0,92	1	0,96	1	0,94
L-2-Aminoheptanoyik Asid (XXVIIIb)							1	0,73

- a) Bu ve aşağıdaki açıklamalar tüm analiz tabloları için geçerlidir. Amino asidlerin yazılış sıraları, bazik amino asidlerin kısa iyon de-ğiştirici kolondan, asidik ve nötr amino asidlerin de uzun iyon-değiştirici kolondan iniş sıralarına göre dir.
- b) Bazik amino asidlerin (arginin ve ondan önce gelenler) analizinde oranlar, arginin miktarının arginin sayısına eşit olduğu kabul edilerek hesaplandı.
- c) Asidik ve nötr amino asidlerin (aspartik asid ve ondan sonra gelenler) analizinde oranlar, aspartik asid miktarının aspartik asid sayısına eşit olduğu kabul edilerek hesaplandı.
- d) Asparagin (IIa) hidroliz sonucu aspartik asid'e (IXa) dönüştüğünden, analizde aspartik asid olarak görünür.

BÖLÜM I

ÖN BİLGİLER

1.1. Peptidler ve Proteinler

Çeşitli amino asitlerin peptid bağı ile birbirine zincirleme bağlanması sonucu ortaya çıkan bileşiklere genel olarak "peptid" denir. Peptid bağları, bir amino asidin α -karboksil grubu ile diğer bir amino asidin α -amino grubu arasında bir molekül su kaybı sonucu oluşur. Peptidler, yapılarında bulunan amino asit sayısına göre di-, tri-, tetra- ve polipeptid olarak adlandırılır.

Temel yapıları polipeptid olan proteinler, genellikle, basit ve bileşik proteinler olmak üzere iki gruba ayrılır. Basit proteinler bir veya daha fazla polipeptid zincirinden oluşur. Bileşik proteinlerin kimyasal yapılarında ise polipeptid zinciri veya zincirleri dışında "prostetik grup" olarak tanımlanan diğer organik veya anorganik bileşikler vardır. Proteinlerin temel kimyasal yapısını oluşturan uzun polipeptid zincirlerinin kısmen hidrolizi sonucu daha kısa peptid zincirleri elde edilir. Kimyasal yapıları tam olarak bilinen proteinlerin polipeptid zincirleri çoğunlukla 100-300 amino asitten kuruludur. Bunların molekül ağırlıkları ise 12.000-36.000 arasındadır. Örneğin, tek polipeptid zincirinden oluşan ribonükleaz A, sitokrom c ve miyoglobin moleküllerinde

100-155 amino asid vardır. Kimyasal yapısı nedeniyle protein olarak kabul edilen antidiyabetik hormon insulin'in biri 21 ve diğeri 30 amino asidden oluşan iki polipeptid zinciri bulunur ve molekül ağırlığı 5.700'dür. Bu değer ile insulin, protein olarak tanımlanan polipeptidlerin en küçüklerinden-
dir.

Polipeptid ve proteinler arasındaki başlıca ayrıcalık, yapılarında bulunan amino asid sayısına dayanır. Yapılarından-
ki amino asidlerin sayıca fazla olması ve bu amino asidler arasında hidrojen bağı, disülfid bağı veya elektrostatik etkiler gibi bir takım etkenlerin artması sonucu, proteinlerin kendilerine özgü üç boyutlu şekilleri (konformasyon) vardır. Polipeptidler de ise böyle bir konformasyon görülmez.

Her türlü hücrenin yapısında ve çalışmasında vazgeçilmez unsurlar olan proteinler (örneğin, enzimler, hormonlar, toksinler, koruyucu ve taşıyıcı proteinler ve diğerleri) tüm hücrelerde bulunan organik bileşiklerin en büyük çoğunluğunu meydana getirir. Doğadaki tüm proteinler, kaynaklarına ve görevlerine bakmaksızın toplam 20 kadar temel, sol (L) α -amino asidden (Formüller Ia-XIVa, XV-XX)⁽¹⁾ kurulur.

Proteinlerin kısmen hidrolizi sonucu elde edilen çok sayıda kısa peptid dışında doğada, proteinlerle ilgili olmayan birçok peptid daha vardır. Bu tür peptidler, çoğunlukla yapı olarak proteinlerden elde edilen peptidlerden farklıdır. Örneğin, bunların yapısında β -amino asidler, sağ (D) α -amino asidler veya γ - peptid bağları bulunabilir.

1.2. Katı Fazda Peptid Sentezi

Klasik sentez yöntemi ile peptidler çözelti içinde, amino asidlerin tek tek birbirine eklenmesiyle veya birkaç amino asidden oluşan parçaların birleştirilmesiyle hazırlanır.

du Vigneaud ve diğerlerinin⁽²⁾ 1953 yılında başardığı oksitosin sentezi bu alandaki en önemli aşamalardan biridir. O zamandan bu yana insulin⁽³⁾, gastrin⁽⁴⁾, glukagon⁽⁵⁾, sekretin⁽⁶⁾, kalsitonin⁽⁷⁾ ve biyolojik yönden önemli birçok peptid bu klasik yöntemle hazırlanmıştır. Bu yöntem uzun zincirli, çok sayıda amino asitten oluşan peptidlerin hazırlanması için pek elverişli değildir. Bunun nedeni, amino asid sayısı arttığı zaman karşılaşılan çözünürlük ve arıtılma ile ilgili teknik zorluklardır. 1960'larda R.B.Merrifield^(8,9) "katı fazda peptid sentezi" denilen yeni bir yöntem geliştirmiştir. Bu yöntem peptid sentezini büyük ölçüde basitleştirmiş ve hızlandırmıştır. Bir tetrapeptid olan L-Lösil-L-alanil-L-glisil-L-valin bu yöntemle hazırlanan ilk peptiddir (Kurallara göre, peptidin serbest amino grubunun bulunduğu amino aside N-sonu, peptidin serbest karboksil grubunun bulunduğu amino aside ise C-sonu amino asid denir ve N-sonu amino asid sol başta, C-sonu amino asid de sağ başta yazılır). Bu yeni yöntem daha sonra bradikinin⁽¹⁰⁾ (9 amino asid), angiotensin⁽¹¹⁾ (14 amino asid) ve daha birçok peptid, hatta insulin⁽¹²⁾ (biri 21, diğeri 30 amino asitten oluşan iki zincir), ribonükleaz A⁽¹³⁾ (124 amino asid) ve lisozim⁽¹⁴⁾ (129 amino asid) gibi birkaç proteinin sentezlerinde kullanılmıştır.

Katı fazda peptid sentezi kavram olarak basittir (Şekil 1.1). Peptid zincirindeki ilk amino asid, kovalan bir bağ ile katı bir dayanağa bağlanır. Diğer amino asidler, istenilen amino asid sayı ve sırası elde edilinceye kadar, tek tek katı dayanak üzerindeki bu amino aside peptid bağları ile eklenir. Sentezin sonunda ortaya çıkan peptid katı dayanaktan koparılır. Bu yöntemde her amino asidin eklenmesi ile ortaya çıkan yeni reaksiyon ürünü katı dayanağa bağlı olarak elde edildiğinden, bu yeni ürünü ortamda bulunan diğer madde ve yan ürünlerden arıtmak için yalnız yıkama ve süzme işlemi yeterlidir. Ayrıca, sentez ile ilgili tüm reaksiyon ve işlemler aynı özel deney kabı içinde yapıldığından sentez için gereken zaman da büyük ölçüde kısalır.

Katı dayanak, çözünmeyen, üzerinde fonksiyonel grubu (X) olan sentetik bir polimerdir. Bu fonksiyonel gruptan yararlanarak polimer ile ilk amino asidin α -karboksil grubu arasında kovalan bir bağ kurulur ve böylece amino asid ile polimer birbirine bağlanmış olur. Bu reaksiyon sırasında amino asidin α -amino grubunun özel bir grup (Y) ile korunması gerekir; aksi halde α -amino grubu polimerle reaksiyona girebilir. Ayrıca, bu N-koruyucu grubun amino asid ile polimer arasındaki kovalan bağı kırmadan çıkarılabilecek bir grup olması gerekir. Bu koruyucu grubun çıkarılmasından sonra, ilk amino asidin serbest kalan α -amino grubu ile N-koruyucu grubu olan ikinci amino asidin α -karboksil grubu ilk peptid bağını verir. Bu iki adım (koruyucu grubu çıkarma ve birleştirme) tekrar edilerek istenilen sayı ve sıradaki amino asidler katı dayanak üzerinde biraraya getirilir. Bundan sonra ilk amino asidi polimere birleştiren kovalan bağ ayrı bir reaktif ile koparılır ve serbest kalan peptid çözelti içinde elde edilir. Sonunda peptid uygun bir yöntemle arıtılır. Örneğin, kromatografi (jel, ince tabaka veya iyon-değiştirme), elektroforez veya karşı akımla dağılım tekniği kullanılabilir.

Katı faz yönteminde değişik katı dayanaklar, koruyucu gruplar (amino ve yan dal fonksiyonel grupları için), birleştirici reaktifler, çözücüler ve ilk amino asid ile polimer arasındaki bağı koparıcı reaktifler kullanılabilir^(15,16). Bunlardan hangilerinin kullanılacağı sentezi yapılacak peptidi oluşturan amino asidlere bağlıdır.

Bu yöntemin kullanıldığı ilk sentezde, peptidin C-sonu amino asidinin serbest α -karboksil grubu katı dayanağa bağlanmış, ondan sonra da N-koruyucu grubu olan amino asidler peptidin N-sonuna doğru tek tek eklenmiştir. Bu C'den N'ye doğru sıralama halen en çok kullanılan uygulamadır. Bunun yanında değişik sıralamalar da geliştirilmiştir; örneğin, N-sonu amino asidinin serbest amino grubunun polimere bağlanması ve N'den C'ye doğru sıralama, yan dal fonksiyonel grubu olan

bir amino asidin bu yan dal grubunun polimere bağlanması ve C'den N'ye veya N'den C'ye doğru sıralama.

Katı fazda sentez sırasında birçok problemler ortaya çıkabilir. Bunlar katı dayanakla ilgili olabilir; örneğin, polimer üzerindeki fonksiyonel grupların dağılımı, bu grupların birbirleriyle etkileşmeleri veya dayanağa bağlı peptidin erişilebilirliği ile ilgili problemler. Bundan başka, peptidin değişik yerlerinde istenmeyen yan reaksiyonlar olabilir; örneğin, karboksil sonunda (polimere geç bağlanma, polimerden erken kopma), bir α -karbon atomunda (rasemizasyon), amino sonunda (yetersiz koruyucu grup çıkması, nötrleştirme veya birleşme), bir peptid bağında veya bir yan dal fonksiyonel grubunda.

Tüm kolaylıkları ve problemleri ile katı fazda sentez hâlâ gelişmekte olan bir yöntemdir. Oldukça uzun bir peptidin bu yöntemle hazırlanması, bu yöntemin geliştiricisi R.B. Merrifield tarafından da kabul edildiği gibi, hâlâ büyük bir çaba gerektirir.

1.3. Sitokrom c

Tüm çekirdekli hücrelerde (ökaryotlar) bulunan sitokrom c, bir "hem c" (Şekil 1.2) grubu ile bu prostetik gruba kovalan olarak bağlı ve 103-113 amino asidden kurulu tek bir polipeptid zincirinden oluşan bir proteindir.

Sitokrom c, doğadaki yaygınlığından dolayı proteinler arasında amino asid sayı ve sırası üzerinde en çok çalışma yapılan proteindir. Halen 67 tür bitki, hayvan ve mikroorganizmada bulunan sitokrom c'lerin amino asid sayı ve sırası bilinmektedir⁽¹⁷⁾. Bu 67 tür içinde 60 değişik amino asid sayı ve sırası tespit edilmiştir. Ton balığının kalbindeki 103 amino asidden kurulu sitokrom c standard olarak kabul edildiğinde, diğer türlerin çoğunda karboksil sonunda 1-2 fazla amino asid; omurgasız hayvanların büyük bir çoğunluğunda ve

bitkilerde ise amino sonunda 4-9 fazla amino asid görülür. Tüm omurgalı hayvanların ve bazı bitkilerin amino sonları asetil grubu ile bloke edilmiştir ($\text{CH}_3\text{-CO-NH-}$). Öglena'nın sitokrom c'si zincir içinde değişiklik (aradan çıkarma veya ekleme) gösterdiği bilinen tek örnektir. Bu nedenlerden dolayı sitokrom c, proteinler içinde en az evrimsel değişiklik geçiren protein olarak kabul edilir.

Ton balığının sitokrom c'sinin hem indirgenmiş (ferro), hem de yükseltgenmiş (ferri) şekillerinde polipeptid zincirinin aynı kıvrılma modeline (Şekil 1.3) sahip olduğu tespit edilmiştir^(18,19). Bu kıvrılma modeli, tüm diğer sitokrom c'ler için de geçerli kabul edilebilir. Şekil 1.3'de de kolayca görülebileceği gibi, oldukça kısa olan polipeptid zinciri bir demir porfirin olan "hem c" grubunu bu gruba hidrofobik bir ortam verecek şekilde sarar. Böylece, "hem c" grubu molekülün iç kısmına gömülü durur ve dışarıya, yalnız ikinci pirrol halkasının kenarı ile ikinci halkayı üçüncü halkaya bağlayan kenar boyunca açıktır. "Hem c" grubu polipeptid zincirine sistein (XX)-14 ve -17'de kovalan sülfid bağları ile tutunur. Histidin (XVII)-18'in ε-azot atomu ve metionin (XIIIa)-80'in kükürt atomu da demirin iki ligand başını kurarlar. En içte gömülü olan dördüncü pirrol halkası üzerindeki propiyonik asid yan dalı hidrojen bağları ile tirozin (VIIa)-48, triptofan (XVIII)-59 ve asparagin (IIa)-52'ye bağlıdır. Üçüncü halka üzerindeki ve kısmen açıkta olan propiyonik asid yan dalı ise treonin (IIIa)-49 ve -78'e hidrojen bağları ile bağlıdır. Yukarıda adı geçen tüm amino asid konumları, ikisi (49 ve 14) dışında, 67 tür ökaryotun hepsinde aynıdır. Bu türlerin yarısında 49'uncu konumda, treonin (IIIa) kadar kuvvetli hidrojen bağı kurabilen serin (XIX) bulunur. İki türde 14'üncü konumda sistein (XX) yerine alanin (IVa) vardır. Bu da, "hem c" ile polipeptid zinciri arasındaki kovalan sülfid bağlarının moleküler kararlılık yönünden vazgeçilmez olmadığını gösterir. Tüm bu konumlardan başka daha birçok konumda her zaman aynı amino asidler bulunur. 67 tür içinde konumu değişmeyen amino asidlerin toplam sayısı 28'dir⁽¹⁷⁾.

Sitokrom c'nin biyolojik yönden çok önemli bir görevi vardır: Mitokondriyonların solunum zincirindeki iki makromoleküler kompleks arasında, oksijenin suya indirgenmesi ve adenosin trifosfat'ın üretimi için elektron taşıyıcılığı yapar. Yükseltgeme ve indirgeme reaksiyonları bu iki makromoleküler kompleks içinde olur. Bunlar aynı zamanda sitokrom c'nin biyolojik yükseltgen ve indirgeni olarak çalışırlar. Bu kompleksler, mitokondriyonun iç zarının iç yüzeyinde; sitokrom c ise aynı zarın dış yüzeyinde bulunur. Sitokrom c ile bu kompleksler arasındaki ve bu kompleksler içindeki elektron transferlerinin mekanizmaları hâlâ pek iyi bilinmemektedir.

Son zamanlara kadar sitokrom c'den ve sitokrom c'ye elektron transferi için öne sürülen iki değişik mekanizma vardı. Bunlardan ilki Dickerson ve diğerleri (20,23) tarafından at ve ton balığının kalbindeki sitokrom c'nin yükseltgenmiş ve indirgenmiş haldeki yapılarına dayanarak ve polipeptidin "hem" grubunun sol tarafındaki amino asitlerinin değişmezliğini gözönüne alarak öne sürülmüştü. Bu mekanizmaya alternatif olarak Salemme ve diğerleri tarafından ilk defa bakteriyel sitokrom c₂ için öne sürülen bir mekanizma daha vardı. Bu mekanizmada ise "hem" çukuru çevresinde hidrojen bağlarından oluşan bir ağ ön görülüyor, ayrıca biyolojik indirgen ve yükseltgenin moleküle "hem" çukuru üzerinden yaklaştığı savunuluyordu. Fakat ton balığının sitokrom c'si üzerindeki son kristal çalışmaları (18,19) ve diğer sitokrom c'ler üzerindeki yeni çalışmalar (25,26) bu genel mekanizmaların tüm yönleri ile geçerliliğini şüpheye düşürmüştür.

Şimdiye kadar elde edilen bilgiler, sitokrom c'nin biyolojik yükseltgen ve indirgeninin "hem" çukuru çevresinde sitokrom c'ye iki ayrı yerden tutunduğunu; sitokrom c'den ve sitokrom c'ye elektron transferlerinin de yine "hem" çukuru çevresinde, büyük bir olasılıkla aynı yoldan, olduğunu belirtmektedir. Ayrıca, bu elektron transferleri sırasında biyolojik yükseltgen ve indirgenin "hem" çukurunun kenarında bulunan amino asitlerin oluşturduğu pozitif yüklü halka ile etkilendiği sanılmaktadır.

BÖLÜM II

AMAÇ, SENTEZLER VE ELDE EDİLEN SONUÇLAR

2.1. Amaç

Sitokrom c'lerin, genellikle, "hemli" peptid ve "hemsiz" peptid denilen iki parçadan meydana geldiği kabul edilir⁽²⁷⁾. Tablo 2.1'de amino asid sayı ve sırası görülen at kalbindeki sitokrom c'de (XXI) hemli peptid (XXIIa) 1-65 amino asidlerinden, hemsiz peptid (XXIII) de 66-104 amino asidlerinden kuruludur. Sitokrom c ile ilgili mekanizmalarda önemli olan amino asidlerin büyük bir çoğunluğu hemsiz peptid parçasında bulunur.

Yukarıdaki bilgilerin ışığında bu araştırmaya iki amaç ile başlanmıştır:

1) Sitokrom c'nin yükseltgeme ve indirgeme reaksiyonlarının mekanizması ile ilgili bilgiler verebilecek ve böylece sitokrom c'deki yapı-görev ilişkilerinin anlaşılmasına yardımcı olabilecek 66-104 hemsiz peptid'in (XXIII) p-kloro-L-fenilalanin-67 (XXIV), p-kloro-L-fenilalanin-74 (XXV) ve L-2-aminoheptanoyik asid-79'lu (XXVI) üç benzerinin (Tablo 2.1) sentezleri,

2) Bu sentezlerin de ilk defa, belli bir plan içinde mümkün olduğu kadar aynı zamanda, katı faz yöntemi ile gerçek-

leştirilmesi.

Çalışma sonunda bu amaçlara erişilmiş, her üç peptidin sentezleri ilk defa gerçekleştirilmiş ve bunun için de yine ilk defa katı faz yöntemi kullanılmıştır. Sentezlerde kullanılmak üzere hazırlanan N-t-bütiloksikarbonil-p-kloro-L-fenilalanin (XXVIIa) ve N-t-bütiloksikarbonil-L-2-aminoheptanoyik asid (XXVIIIa) de daha önce literatüre geçmemiştir.

2.2. Sentezler

39 amino asidden oluşan 66-104 hemsiz peptid'in (XXIII) p-kloro-L-fenilalanin-67 (XXIV), p-kloro-L-fenilalanin-74 (XXV) ve L-2-aminoheptanoyik asid-79'lu (XXVI) üç benzerinin katı fazda sentezleriyle beraber, kontrol amacı ile kullanılmak üzere hemsiz peptid'in (XXIII) de sentezi Şekil 2.1'deki plan içinde gerçekleştirilmiştir.

Bu dörtlü sentezde katı dayanak olarak Merrifield Resin'i^(8,9) diye bilinen, üzerinde klorometil fonksiyonel grubu (X = Cl-CH₂-) bulunan stiren ve % 2 divinilbenzenden oluşan kopolimer kullanılmıştır. C'den N'ye sıralamada ilk amino asid olan glutamik asid (Ia)-104, α-amino ve γ-karboksilik asid fonksiyonel grupları korunmuş olarak (Formül Ib) Gisin'in⁽²⁹⁾ yöntemi ile polimere bağlanmıştır. Bundan sonraki tüm amino asidler, α-amino ve varsa yan dal fonksiyonel grupları korunmuş olarak (Formüller Ia-XIVa) Tablo 2.2'de gösterilen birleştirme yöntemiyle tek tek, katı dayanağa ester bağı ile bağlı bu amino aside eklenmiştir.

Şekil 2.1'deki plana uygun olarak ilk aşamada 19 amino asidlik 86-104-Polimer parçasının sentezi yapılmış, bunun için de Tablo 2.2'deki yöntem aynen uygulanmıştır. Dörtlü sentezin geri kalan kısmında ise Tablo 2.2'deki ikinci adımın süresi 20 dakikaya, kullanılan trifloroasetik asid-diklorometan çözeltisindeki trifloroasetik asid oranı % 40'a çıkarılmıştır. Ayrıca, katı dayanak üzerindeki son amino asid ile eklen-

mek istenen amino asidi birleştirme adımı (adım 6) 4-6 ve 18-24 saatlik süreler olarak iki defa tekrar edilmiştir.

İkinci aşamada, üç amino asidin eklenmesinden sonra 83-104-Polimer parçası elde edilmiş; 79'lu ve belki 82'li benzerlerin hazırlanmasında kullanılmak üzere belli bir miktar polimere bağlı peptid reaksiyon kabından alınmıştır. Bundan sonra 75-104-Polimer parçası sekiz amino asidin eklenmesiyle elde edilmiş ve yine belli bir miktar polimere bağlı peptid 74'lü benzerin sentezi için ayrılmıştır. Geriye kalan 75-104-Polimer parçasına yedi amino asidin eklenmesiyle 68-104-Polimer parçası hazırlanmış ve yine belli bir miktar polimere bağlı peptidin ayrılmasından sonra, iki amino asidin eklenmesiyle 66-104 hemsiz peptid (XXIII) polimere bağlı olarak elde edilmiştir.

67'li ve 74'lü benzerlerin (XXIV ve XXV) sentezi için gerekli N-t-bütiloksikarbonil-p-kloro-L-fenilalanin (XXVIIa) p-kloro-DL-fenilalanin'den üç adımda hazırlanmıştır. Önce DL-fenilalanin'in N-asetil türevi (XXIX), bunun enzimle rezolüsyonundan da p-kloro-L-fenilalanin (XXVIIb) elde edilmiştir⁽³⁰⁾. N-t-Bütiloksikarbonil-p-kloro-L-fenilalanin (XXVIIa) ise bu sol (L) amino asidden Stewart'ın⁽³¹⁾ yöntemi ile hazırlanmıştır.

Sentezin üçüncü aşamasında 68-104-Polimer parçasına, 67'nci amino asid tirozin'in (VIIa) yerine N-t-bütiloksikarbonil-p-kloro-L-fenilalanin (XXVIIa) kullanılarak p-kloro-L-fenilalanin (XXVIIb) yerleştirilmiş; 66'nci amino asidin de eklenmesiyle p-kloro-L-fenilalanin-67'li benzerin (XXV) polimere bağlı olarak sentezi tamamlanmıştır.

75-104-Polimer parçasına, 74'üncü amino asid tirozin'in (VIIa) yerine, yine N-t-bütiloksikarbonil-p-kloro-L-fenilalanin (XXVIIa) kullanılarak p-kloro-L-fenilalanin (XXVIIb) yer-

leştirilmesi ve ondan sonra gelen sekiz amino asidin eklenmesiyle p-kloro-L-fenilalanin-74'lü benzerin (XXV) polimere bağlı olarak sentezi dördüncü aşamayı oluşturmuştur.

Beşinci aşamada ise L-2-aminoheptanoyik asid-79'lu benzerin (XXVI) sentezi yapılmıştır. Bunun için önce DL-2-aminoheptanoyik asid'in asetik asid ve asetanhidridi kullanarak N-asetil türevi (XXX), bunun enzimle rezolüsyonundan da L-2-aminoheptanoyik asid (XXVIIb) elde edilmiştir⁽³²⁾. N-t-Bütiloksikarbonil-L-2-aminoheptanoyik asid (XXVIIIa) bu sol (L) amino asidden yine Stewart'ın⁽³¹⁾ yöntemi ile hazırlanmıştır. 83-104-Polimer parçasına üç amino asidin eklenmesinden sonra, 79'uncu amino asid lizin'in (Va) yerine, N-t-bütiloksikarbonil-L-2-aminoheptanoyik asid (XXVIIIa) kullanılarak L-2-aminoheptanoyik asid (XXVIIb) yerleştirilmiş ve ondan sonra gelen onbeş amino asidin eklenmesiyle de L-2-aminoheptanoyik asid-79'lu benzerin (XXVI) polimere bağlı olarak sentezi gerçekleştirilmiştir.

Tüm sentezlerin kontrolü için genellikle her üç veya dört amino asidin eklenmesinden sonra polimere bağlı peptid parçalarından örnekler alınmış; bu örneklerin hidrolizinden sonra analizi (amino asid analiz makinesi ile) yapılmıştır.

Yukarıda sentezleri anlatılan dört peptid (XXIII-XXVI), polimere bağlı olarak elde edildiklerinde, son (66'ncı) amino asidin üzerinde α -amino grubuna bağlı t-bütiloksikarbonil grubu, yan dal fonksiyonel grupları olan amino asidlerin üzerinde de bu fonksiyonel gruplara bağlı diğer koruyucu gruplar bulunur. Bu nedenle, peptidlerin polimerden koparılmasında, hem polimerle peptid arasındaki kovalan ester bağı kırabilen, hem de tüm koruyucu grupları çıkarabilen hidroflorik asid kullanılmıştır^(33,34). Hidroflorik asid ile olan reaksiyonun sonunda peptidler, iyofilizasyon ile, katı halde elde edilmişlerdir. Bunlar, jel kromatografisi kullanılarak Sephadex G-50 ile doldurulmuş kolonlardan geçirilmek suretiyle arıtılmışlardır.

2.3. Elde Edilen Sonuçlar

Sitokrom c'nin (XXI) 66-104 hemsiz peptid (XXIII) parçasının üç benzerinin (XXIV-XXVI) katı faz yöntemiyle sentezleri sitokrom c ile ilgili elektron transfer reaksiyonlarının mekanizmasına açıklık getirebilecek katkılarda bulunmak amacı ile yapılmış, bu peptidlerin henüz literatüre geçmemiş olması bunların sentezleri için ayrı bir sebep teşkil etmiştir.

Bu tür katkıları mümkün kılacak bir yöntem Harbury ve Corradin(27,35,36) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde, at kalbinden elde edilen sitokrom c'nin (XXI) polipeptid zinciri siyanojen bromür ile metionin (XIIIa)-65'de, 1-65 hemli peptid benzeri (XXIIb) ve 66-104 hemsiz peptid (XXIII) denilen iki parçaya ayrılmıştır. 1-65 hemli peptid benzeri (XXIIb) hemli peptid'den (XXIIa) yalnız 65'incikonumda farklıdır, bu konumda metionin (XIIIa) yerine homoserin (XXXI) vardır (Homoserin ile metionin arasındaki tek farklılık, homoserin'de metionin'in -SCH₃ grubu yerine -OH grubu bulunmasıdır). Daha sonra bu iki parça tekrar kovalan bir bağ ile birleştirilmiş ve at kalbinden ayrılan sitokrom c'den (XXI) bir konumda farklı (metionin-65 yerine homoserin-65) fakat tümüyle etkin bir protein elde edilmiştir. Ayrıca, sitokrom c'nin yükseltgeme ve indirgeme reaksiyonlarının mekanizması ile ilgili çalışmalar yönünden çok önemli olan elektron transfer etkinliğinin (aktivite) bu iki protein için aynı olduğu görülmüştür.

Bu yöntemin değişik bir uygulaması olarak 66-104 hemsiz peptid'in (XXIII) ilk defa sentezi katı faz yöntemi ile yapılmış ve bu sentetik hemsiz peptid, at kalbinden ayrılan sitokrom c'nin (XXI) siyanojen bromür ile reaksiyonundan elde edilen 1-65 hemli peptid benzeri (XXIIb) ile birleştirilmiştir(37,38). Bu yarı-sentetik proteinin indirgenmiş ve yükseltgenmiş hallerde bu yöntemin ilk uygulamasında elde edilen sitokrom c'den farksız olduğu görülmüştür. Örneğin, oksijen

tüketimi olarak ölçülen biyolojik etkinlikleri, polarografi ile ölçülen elektron transfer etkinlikleri, absorpsiyon spektrumları, dikroizm (circular dichroism) spektrumları, amino asid analizleri ve antikor bağlanmaları aynıdır.

Böylece, tarafımdan sentezleri yapılan 66-104'lü üç peptid'in (XXIV-XXVI), at kalbinden ayrılan sitokrom c'nin (XXI) siyanojen bromür ile reaksiyonundan elde edilen 1-65'li peptid (XXIIb) ile birleştirilebilmesi ve eğer bu gerçekleşirse, elde edilen yarı-sentetik sitokrom c benzerlerinin özelliklerinin incelenmesi sitokrom c'nin yapı-görev ilişkileri ve elektron transfer mekanizmaları hakkında bilgiler verebilecektir.

Özellikle bu üç peptid'in (XXIV-XXVI) sentezlerinin yapılmasında birkaç neden vardır. Birinci bölümde de belirtildiği gibi, bugüne kadar mekanizması hakkında kesin bir bilgi elde edilmemiş ise de, sitokrom c ile biyolojik yükseltgen ve indirgen arasındaki elektron transferlerinde "hem" çukurunun ve bu çukurun kenarında bulunan amino asidlerin oluşturduğu pozitif yüklü halkanın çok önemli olduğu bilinmektedir^(17,25). 79'uncü konumdaki lizin (Va) "hem" çukurunun kenarındaki bu pozitif yüklü halkada bulunur. Bu lizin'in yerine 2-aminoheptanoyik asid konulmasıyla lizin'in pH 6-7'de pozitif yüklü olan polar amino yan dalı polar olmayan, hidrofobik metil grubuna dönüştürülmüş olmakta, böylece, pozitif yüklü halkanın bu pozitif yükü azaltılmaktadır. Bu işlem, sitokrom c'ye iki ayrı yerden tutundukları bilinen biyolojik yükseltgen ve indirgenden hangisinin nereye tutunduğunu göstermekte yararlı olabilir. Ayrıca, bu değiştirmenin yükseltgeme ve indirgeme reaksiyonlarını da etkilemesi beklenir.

At kalbindeki sitokrom c'de 67'nci ve 74'üncü konumlar da tirozin (VIIa) bulunur. Amino asid sayı ve sırası tesbit edilen 67 tür ökaryotta görülen 60 değişik amino asid sayı ve sırasının ellidokuzunda 67'nci konumda, ellisekizinde de 74'üncü konumda tirozun vardır⁽¹⁷⁾. Bunlardan tirozin -67 "hem" çuku-

runa gömülü haldedir ve fenol yandalı ile "hem" grubuna dahilidir, Tirozin-74 ise "hem" çukuruna yarı gömülü durur. Ayrıca her iki tirozin de molekülün büyük ölçüde evrimsel değişmezlik gösteren sol yanındadır^(18,19). Bu tirozin'lerin yerine p-klorofenilalanin konulmasıyla tirozin'in fenol yan dalının hidrojen bağları kurabilen hidroksil grubu fenil halkasının etkinliğini azaltan klor atomu ile değiştirilmiş olmaktadır. Bu işlemin, her iki tirozin'in görevlerini ve elektron transfer yolu üzerinde olup olmadıklarını anlamakta yararlı olması beklenir. Bu konularda kesin bilgiler verebilecek olan yarı-sentetik proteinlerin hazırlanması için, sentetik 66-104 hemsiz peptid parçaları (XXIV-XXVI) ile at kalbinden ayrılan sitokrom c'nin siyanojen bromür ile reaksiyonundan elde edilen 1-65 hemli peptid parçasının (XXIIb) birleştirilmesi ile ilgili çalışmalar halen Harbury tarafından yürütülmektedir.

Katı faz yöntemiyle gerçekleştirilen dörtlü sentezde kullanılan reaksiyonlar Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Bu sentezde ilk adım olan 104'üncü amino asit glutamik asit'in (Ia) polimere bağlanması için, önce Gisin'in⁽²⁹⁾ yöntemi ile α -amino ve γ -karboksilik asit fonksiyonel grubu korunmuş glutamik asit'in (Ib) sezyum tuzu hazırlanmış, bunun Merrifield Resin'i^(8,9) ile reaksiyonu sonucu glutamik asit (Ib)-104'le polimer arasında kovalan bir ester bağı kurulmuştur. Bundan sonraki tüm reaksiyon ve işlemler aynı özel deney kabı içinde yapılmıştır. Amino asitlerin eklenmesinde Tablo 2.2'deki birleştirme yöntemi, bazen çok az farkla, uygulanmıştır. Bu yöntemde, boncuk yapılı polimeri şişirip, polimer üzerindeki peptid reaksiyonlar için erişilebilir hale getirmek (adım 1 ve 9) ve yan ürünler ile artık reaktifleri atmak (adım 3, 5 ve 7) için diklorometan kullanılmıştır. Ayrıca diklorometandan çözücü olarak (adım 2, 4 ve 6) da yararlanılmıştır. Her amino asidin eklenmesinden önce, polimerin üzerindeki son amino asidin α -amino grubunu koruyan t-butiloksikarbonil grubunu çıkartmak için polimerle peptid arasındaki bağı kırmayan ve yan dal fonksiyonel grubu olan amino asitlerin koruyucu gruplarını etkilemeyen trifloroasetik asit tercih edilmiştir (adım 2). Bu

ikinci adımda ilk 19 amino asidlik 86-104-Polimer parçasının sentezinde % 25 trifloroasetik asid-diklorometan çözeltisi ve 10 dakikalık bir süre yeterli olmuştur. Buna karşılık peptid zincirinin oldukça uzaması nedeni ile bundan sonra yetersiz birleşme görülmüştür (amino asid analizi yolu ile). Dolayısıyla, trifloroasetik asid oranı % 40'a yükseltilmiş, reaksiyon süresi de 20 dakikaya çıkarılmıştır. Tüm amino asidlerin N-koruyucu grubu olan t-bütiloksikarbonil grubunun çıkarıldığı ikinci adımın sonunda α -amino grubu bir proton eklenmiş olarak elde edildiğinden, α -amino grubunu tam serbest bırakmak için % 10 trietilamin-diklorometan çözeltisi kullanılmıştır (adım 4). Polimerin üzerindeki α -amino grubu serbest son amino asid ile eklenmek istenen α -amino ve varsa yan dal fonksiyonel grubu korunmuş amino asidin peptid bağı ile birleştirilmesinde, disikloheksilkarbodiimid (XXXII) kullanılmıştır (adım 6). Bu adımın farklı uygulandığı tek amino asid olan asparagin (IIa), peptid zincirine β -amid grubu (H_2N-CO-) p-nitrofenil grubu ile korunmuş olarak (IIB) dimetil formamid içinde ve birleştirici reaktif disikloheksilkarbodiimid (XXXII) olmadan, eklenmiştir. Ayrıca, bu eklemeyen önce ve sonra dimetilformamid ile yıkama yapılmıştır. Bu altıncı adımda ilk 19 amino asidlik parçanın sentezinde 4-6 saatlik bir reaksiyon süresi yeterli olmuştur. Ondan sonra yetersiz birleşme görüldüğünden, bu adım, 4-6 ve 18-24 saatlik süreler olarak iki defa tekrar edilmiştir. Sekizinci adımda diklorometanla çözeltiye girmeyen bazı yan ürünleri atmak için etanol kullanılmıştır.

Benzerlerin sentezinde gerekli N-t-bütiloksikarbonil-p-kloro-L-fenilalanin (XXVIIa) ve N-t-bütiloksikarbonil-L-2-aminoheptanoyik asid'in (XXVIIIa) hazırlanmasında DL-amino asidlerin N-asetil türevlerinden (XXIX ve XXX) yararlanılmış; bu türevlerin enzimle (Asilaz) rezolüsyonundan L-amino asidlerin elde edilmesinde p-kloro-L-fenilalanin (XXVIIb) için fenilalanin'le (XXIIa) kullanılan yöntem⁽³⁰⁾, L-2-aminoheptanoyik asid (XXVIIIb) için de lösin'le (VIa) kullanılan yöntem⁽³²⁾ uygulanmıştır. Her iki L-amino asidin N-t-butiloksikarbonil türevlerinin hazırlanmasında ise Stewart'ın⁽³¹⁾ glu-

tamik asid için uyguladığı, L-amino asidin t-butiloksikarbonilazid ve trietilamin ile dimetilsülfoksit içinde reaksiyonundan yararlanılmıştır. Böylece, bu iki L-aminoasidin N-t-butildisikarbonil türevlerinin ilk defa sentezleri yapılmış olmaktadır.

Dörtlü sentezin sonunda polimere bağlı olarak elde edilen peptidlerin (XXIII-XXVI) polimerden koparılması ve aynı zamanda tüm koruyucu grupların çıkarılması için hidroklorik asit kullanılmıştır^(33,34). Koparılmış peptidlerden bazıları için, amino asit analizi sonuçlarına dayanarak bu reaksiyon iki defa tekrar edilmiştir. Elde edilen peptidlerin arıtılmasında jel kromatografisinden yararlanılmıştır. Moleküler eklek tekniği de denilen jel kromatografisi uzun zincirli sentetik peptidlerin arıtılmasında başlangıç adımı sayılabilir. Bu yöntem bazı tuzların, amino asit türevlerinin, kısa peptid parçalarının ve polimerleşmiş maddelerin esas peptidten ayrılmasında yararlıdır. Bundan sonra başka arıtma yöntemlerinin (örneğin, ince tabaka, kağıt veya iyon-değiştirme kromatografisi, elektroforez veya geri akımla dağılım gibi) kullanılması gerekir. Tarafımdan sentezleri yapılan peptidlerin (XXIII-XXIV) arıtılmasında yalnız jel kromatografisi kullanılmasında belli bir neden vardır. Bu peptidler at kalbinden ayrılan sitokrom c'nin siyanojen bromür ile reaksiyonundan elde edilen l-65 hemli peptid parçası (XXIIb) ile birleştirileceklerdir. Daha önceki deneylerden, bu birleştirme reaksiyonunun bir tür arıtma yöntemi gibi etkili olduğu bilinmektedir^(37,38). Bu nedenle jel kromatografisi yeterli görülmüş; peptidler Sephadex G-50 ile doldurulmuş kolonlardan geçirilmişlerdir. Bunun için de akan faz olarak 0,2 N asetik asit kullanılmıştır. Toplanan ayrımların (fraksiyon) 250 nm'deki absorpsiyonu mor ötesi (UV) spektrofotometresi ile ölçülmüş, elde edilen grafiğe dayanarak ayrımlar birleştirilmişlerdir. Bu birleştirilen ayrımlardan peptidler (XXIII-XXVI), liyofilizasyon ile katı halde elde edilmişlerdir. Bu peptidlerden alınan örneklerin hidrolizinden sonra yapılan amino asit analizleri Tablo 2.3'de gösterilmiştir.

BÖLÜM III

DENEYSEL KISIM

3.1. Glutamik Asid (Ib)-104'ün Polimere Bağlanması

15g (44,5 milimol) N-t-bütüloksikarbonil- γ -0-benzil-glutamik asid (Ib) ve 8,6 g (44,5 milimol) sezyum bikarbonat bir litrelik tek boyunlu cam balona konuldu⁽²⁹⁾. 32 ml saf etanol ve 3,2 ml iyonsuz su eklendikten sonra karışım oda sıcaklığında bir saat karıştırıldı. Elde edilen çözelti 40°C sıcaklıkta evaporatörde koyulaştırıldı. Bu işlem iki kere daha tekrar edildikten sonra korunmuş glutamik asid'in (Ib) sezyum tuzu kirli beyaz bir katı olarak elde edildi. Bu tuz, alçak basınç altında kurutulduktan sonra üzerine geri akışlı soğutucu ve kurutma tübü takılı üç litrelik üç boyunlu cam balona konuldu. Buna, 415 ml saf dimetilformamid ve 57,2g Merrifield Resin'i^(8,9) (1 milimol klor/lg polimer) eklendi. Karışım, 50°C sıcaklıkta 24 saat karıştırıldıktan sonra soğutuldu ve büyük delikli cam süzgeçten geçirildi. Süzgecin üzerinde kalan glutamik asid (Ib)-104-Polimer parçası, dimetilformamid-su (9:1) karışımı (3 x 300 ml), saf etanol (3 x 300 ml) ve diklorometan (3 x 400 ml) ile yıkandıktan sonra alçak basınç altında kurutuldu. Sonunda 61,4 g (% 96) glutamik asid (Ib)-104-Polimer parçası elde edildi.

3.2. Glutamik Asid (Ib)-104-Polimer Parçasının Hidroliz Yoluyla Analizi

Bu yöntem tüm polimere bağlı peptidlerin analizi için de uygulanmıştır.

11,35 mg glutamik asid (Ib)-104-Polimer parçası ve 1 ml propiyonik asid-derişik hidroklorik asid (1:1) çözeltisi iki mililitrelik bir ampul içine konuldu ve ampulün ağzı alçak basınç altında kapatıldı. Ampul 130°C sıcaklıkta 3 saat ısıtıldıktan sonra soğutuldu; ampulün ağzı açıldı ve ampul, içinde potasyum hidroksit taneleri bulunan desikatöre konuldu. Ampulün içindeki sıvı alçak basınç altında uçuruldu. Geride kalan amino asidin analizi amino asid analiz makinesi (Beckman Model 120c) ile yapıldı. Elde edilen grafiğe göre glutamik asid'in (Ib) polimer üzerindeki süstitüsüyonu 0,35 milimol/lg polimer olarak hesaplandı.

3.3. 86-104-Polimer Parçasının Sentezi

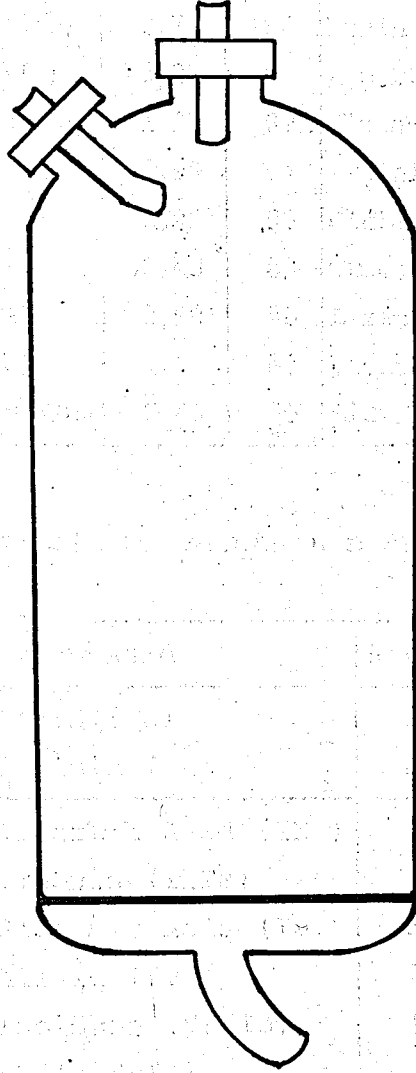
103-86 amino asidlerinin 104-Polimer parçasına tek tek eklenmesinde Tablo 2.2'deki yöntem uygulandı. Tüm reaksiyon ve işlemler özel deney kabında gerçekleştirildi. Bu cam kap, Şekil 3.1'de de görüldüğü gibi, iki boyunlu, silindire benzeyen, tabanı büyük delikli cam süzgeçten yapılmış ve alttan çıkışı olan bir kaptır. Bir boynu azot tankına diğer boynu da bu yöntemde kullanılan reaktiflerin bulunduğu şişelere bağlandı için tüm reaksiyonlar azot atmosferinde yapılır. Ayrıca reaksiyonlardan ve yıkama işlemlerinden sonra gerekli süzme işlemi için de azot basıncının yükseltilmesi yeterlidir.

86-104-Polimer parçasının sentezi için 10g (0,35 milimol glutamik asid (Ib)-104/lg polimer) 104-Polimer parçası özel deney kabına konuldu ve diklorometan (3 x 100 ml) ile 2 dakika çalkalanarak yıkandı ve süzüldü (adım 1). 100 ml trifloroasetik asid-diklorometan (25:75) çözeltisi ile 10 dakikalık reaksiyon ve süzmeden (adım 2) sonra, diklorometan ile yıkama ve süzme işlemi tekrar edildi (adım 3). Bundan sonra,

deney kabına 100 ml trietilamin-diklorometan (10:90) çözeltisi eklendi ve 2 dakikalık reaksiyondan sonra süzüldü; bu reaksiyon bir kere daha tekrar edildikten (adım 4) sonra yine diklorometan ile yıkama ve süzme işlemi yapıldı (adım 5). Amino asitlerin eklendiği 6'ncı adımda, 103'üncü amino asit asparagin'in (11a) eklenmesi diğerlerinden farklı olarak yapıldı. Bunun için kabın içindeki parça önce dimetilformamid (3 x 100 ml) ile 2 dakika çalkalandı ve süzüldü; ondan sonra da N^α-t-bütoksikarbonil-N^γ-p-nitrofenilasparagin'in (11b) 100 ml dimetilformamid içindeki çözeltisi deney kabına konuldu ve kabın içindekiler 72 saat çalkalandı. Bu sürenin sonunda ve süzme işleminden sonra, dimetilformamid (3 x 100 ml) ile yıkama yapıldı. Tüm diğer amino asitler için bu 6'ncı adımda ağırlıkları Tablo 3.1'de verilen korunmuş amino asitlerin (10,5 milimol) 50 ml diklorometan içindeki çözeltisi ve 1,96 g (9,5 milimol) disikloheksilkarbodiimid'in (XXXII) 50 ml diklorometan içindeki çözeltisi deney kabına konuldu ve karışım 4-6 saat çalkalandı. Bu sürenin sonunda ve süzme işleminden sonra, deney kabının içindekiler diklorometan (3 x 100 ml) ile 2 dakika (adım 7), saf etanol (2 x 100 ml) ile 2 dakika (adım 8) ve yine diklorometan (3 x 100 ml) ile 2 dakika çalkalandı ve süzüldü (adım 9). Bu yöntemin tekrarı ile 86'ncı amino asidin eklenmesinden sonra deney kabının içinde bırakılan polimere bağlı peptid parçası desikatörde ve alçak basınç altında kurutuldu. Sonunda 18g 86-104-Polimer parçası elde edildi.

Bu 19 amino asitlik peptidin sentezinde, kontrol için, 100'üncü, 95'inci, 91'inci ve 86'ncü amino asitlerin eklenmesinden sonra örnekler (10 mg) alındı; bu örneklerin Kısım 3.2'deki gibi hidrolizinden sonra amino asit analizi yapıldı. En son analiz sonuçları (19 amino asit için) Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Şekil 3.1. Katı Fazda Peptid Sentezinde Kullanılan Özel Deney Kabı



Tablo 3.1. 86-104-Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asitlerin Ağırlıkları

Konum	Amino Asid	Ağırlık (g)	Konum	Amino Asid	Ağırlık (g)
103	Asparagin (IIb)	3,71	94	Lösin (VIb)	2,43
102	Treonin (IIIb)	3,25	93	Aspartik Asid (IXb)	3,39
101	Alanin (IVb)	1,99	92	Glutamik Asid (Ib)	3,54
100	Lizin (Vb)	3,99	91	Arginin (Xb)	4,50
99	Lizin (Vb)	3,99	90	Glutamik Asid (Ib)	3,54
98	Lösin (VIb)	2,43	89	Treonin (IIIb)	3,25
97	Tirozin (VIIb)	3,90	88	Lizin (Vb)	3,99
96	Alanin (IVb)	1,99	87	Lizin (Vb)	3,99
95	İzolösin (VIIIb)	2,43	86	Lizin (Vb)	3,99

Tablo 3.2. 86-104-Polimer Parçasının Amino Asid Analizi

Amino Asid	Sayı	Oran
Lizin (Va)	5	4,9
Arginin (Xa)	1	1,0
Aspartik Asid (IXa)	2	2,0
Treonin (IIIa)	2	1,4
Glutamik Asid (Ia)	3	3,2
Alanin (IVa)	2	1,8
İzolösin (VIIIa)	1	0,95
Lösin (VIa)	2	2,1
Tirozin (VIIa)	1	0,62

3.4. 83-104-Polimer Parçasının Sentezi

83-104-Polimer parçasının sentezi için 15g 86-104-Polimer parçası özel deney kabına konuldu ve Tablo 2.2'deki yöntem çok az farkla Kısım 3.3'de olduğu gibi uygulandı. 2'nci adımda kullanılan trifloroasetik asid oranı % 25'den % 40'a, reaksiyon süresi de 10 dakikadan 20 dakikaya çıkarıldı. Ayrıca, amino asidleri birleştirme adımı (adım 6) ve ondan sonra gelen adımlar her amino asid için iki kere tekrar edildi ve ikinci tekrarda 6'ncı adımın reaksiyon süresi 18-24 saate çıkarıldı. Bu 83-104-Polimer parçasının sentezinde kullanılan korunmuş amino asidlerin ağırlıkları (5,88 milimol) Tablo 3.3 de gösterilmiştir (Bu ağırlıklar 15g 86-104-Polimer parçasının 8,4 g 104-Polimer parçasından elde edildiği kabul edilerek hesaplandı). Ayrıca, 6'nci adımda her amino asid için 1,10 g (5,29 milimol) disikloheksilkarbodiimid (XXXII) kullanıldı. Üç amino asidin eklenmesinden sonra elde edilen 83-104-Polimer parçasından bir örnek (10 mg) alındı; bunun Kısım 3.2'deki gibi hidrolizinden sonra amino asid analizi yapıldı. Bu analizin sonuçları (22 amino asid için) Tablo 3.4'de gösterilmiştir.

Sentezin tamamlanmasından sonra elde edilen polimere bağlı peptid parçasından 4g, daha sonra benzerlerin sentezinde kullanılmak üzere deney kabından çıkarıldı; gerisi senteze devam etmek için deney kabında bırakıldı.

Tablo 3.3. 83-104-Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asitlerin Ağırlıkları

Konum	Amino Asid	Ağırlık (g)
85	İzolösin (VIIIb)	1,36
84	Glisin (XIb)	1,03
83	Alanin (IVb)	1,11

Tablo 3.4. 83-104-Polimer Parçasının Amino Asid Analizi

Amino Asid	Sayı	Oran
Lizin (Va)	5	4,9
Arginin (Xa)	1	1,0
Aspartik Asid (IXa)	2	2,0
Treonin (IIIa)	2	1,6
Glutamik Asid (Ia)	3	3,0
Glisin (XIa)	1	0,83
Alanin (IVa)	3	2,5
İzolösin (VIIIa)	2	1,7
Lösin (VIa)	2	2,0
Tirozin (VIIa)	1	0,70

3.5. 75-104-Polimer Parçasının Sentezi

Kısım 3.4'de anlatıldığı gibi deney kabında bırakılan 83-104-Polimer parçasına Tablo 2.2'deki yöntem Kısım 3.4'de olduğu gibi uygulanarak sekiz amino asid eklendi; böylece 75-104-Polimer parçası elde edildi. Bu sentezde birleştirme adımı (adım 6) kullanılan korunmuş amino asidlerin ağırlıkları (4,34 milimol) Tablo 3.5'de gösterilmiştir (Bu ağırlıklar kullanılan 83-104-Polimer parçasının 6,2g 104-Polimer parçasından elde edildiği kabul edilerek hesaplandı). Ayrıca, bu 6'ncı adımda her amino asid için 0,81g (3,91 milimol) disikloheksilkarbodiimid (XXXII) kullanıldı. Sentezin kontrolü için 79'uncu ve 75'inci amino asidlerin eklenmesinden sonra örnekler (10 mg) alındı; bu örneklerin Kısım 3.2'deki gibi hidrolizinden sonra amino asid analizi yapıldı. En son amino asid analiz sonuçları (30 amino asid için) Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

Bu sentezin sonunda elde edilen polimere bağlı peptid parçasından 2g, daha sonra bir benzerin sentezinde kullanılmak üzere deney kabından çıkarıldı; gerisi senteze devam etmek için deney kabında bırakıldı.

Tablo 3.5. 75-104-Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asitlerin Ağırlıkları

Konum	Amino Asid	Ağırlık (g)	Konum	Amino Asid	Ağırlık (g)
82	Fenilalanin (XI Ib)	1,15	78	Treonin (III Ib)	1,34
81	İzolösin (VIII Ib)	1,00	77	Glisin (XI Ib)	0,760
80	Metionin (XIII Ib)	1,08	76	Prolin (XIV Ib)	0,934
79	Lizin (V b)	1,65	75	İzolösin (VIII Ib)	1,00

Tablo 3.6. 75-104-Polimer Parçasının Amino Asid Analizi

Amino Asid	Sayı	Oran
Lizin (V a)	6	6,8
Arginin (X a)	1	1,0
Aspartik Asid (IX a)	2	2,0
Treonin (III a)	3	2,3
Glutamik Asid (I a)	3	3,0
Prolin (XIV a)	1	0,65
Glisin (XI a)	2	1,6
Alanin (IV a)	3	2,5
Metionin (XIII a)	1	0,47
İzolösin (VIII a)	4	3,1
Lösin (VI a)	2	2,0
Tirozin (VII a)	1	0,62
Fenilalanin (XI a)	1	0,72

3.6. 68-104-Polimer Parçasının Sentezi

Bu parçanın sentezi için Kısım 3.5'de belirtildiği gibi deney kabında bırakılan 75-104-Polimer parçasına Tablo 2.2'deki yöntem Kısım 3.4'de olduğu gibi uygulanarak yedi amino asid eklendi. Bu sentezde birleştirme adımında (adım 6) kullanılan korunmuş amino asidlerin ağırlıkları (3,50 milimol) Tablo 3.7'de gösterilmiştir (Bu ağırlıklar, kullanılan 75-104-Polimer parçasının 5,0g 104-Polimer parçasından elde edildiği kabul edilerek hesaplandı). Ayrıca, birleştirme adımında asparagin (IIa) dışında her amino asid için 0,65 g (3,15 milimol) disikloheksilkarbodiimid (XXXII) kullanıldı. Asparagin'in korunmuş olarak (IIb) eklenmesi ise Kısım 3.3'de olduğu gibi gerçekleştirildi. Sentezin kontrolu için 71'inci ve 68'inci amino asidlerin eklenmesinden sonra örnekler (10 mg) alındı; bu örneklerin Kısım 3.2'deki gibi hidrolizinden sonra amino asid analizi yapıldı. En son analiz sonuçları (37 amino asid için) Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Sentezin tamamlanmasından sonra elde edilen 68-104-Polimer parçasından 2g, deney kabından çıkarıldı, gerisi senteze devam etmek için reaksiyon kabında bırakıldı.

Asparagin (IIa)	1	3,50
Alanin (IIIa)	3	3,50
Glutamin (IVa)	2	0,35
Glutamat (VIB)	1	3,50
Lizin (VIa)	3	3,50
Metionin (VIIa)	2	1,2
Ornithin (VIIIa)	1	0,35

Tablo 3.7. 68-104-Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asitlerin Ağırlıkları

Konum	Amino Asid	Ağırlık (g)	Konum	Amino Asid	Ağırlık (g)
74	Tirozin (VIIb)	1,30	70	Asparagin (IIb)	1,24
73	Lizin (Vb)	1,33	69	Glutamik Asid (Ib)	1,18
72	Lizin (Vb)	1,33	68	Lösin (VIb)	0,809
71	Prolin (XIVb)	0,753			

Tablo 3.8. 68-104-Polimer Parçasının Amino Asid Analizi

Amino Asid	Sayı	Oran
Lizin (Va)	8	7,8
Arginin (Xa)	1	1,0
Aspartik Asid (IXa)	3	3,0
Treonin (IIIa)	3	2,3
Glutamik Asid (Ia)	4	4,1
Prolin (XIVa)	2	1,5
Glisin (XIa)	2	1,6
Alanin (IVa)	3	2,6
Metionin (XIIIa)	1	0,35
İzolösin (VIIIa)	4	3,2
Lösin (VIa)	3	3,1
Tirozin (VIIa)	2	1,2
Fenilalanin (XIIa)	1	0,92

3.7. 66-104-Polimer Parçasının Sentezi

66-104-Polimer parçasının sentezi için, Kısım 3.6'da belirtildiği gibi, deney kabında bırakılan 68-104-Polimer parçasına Tablo 2.2'deki yöntem uygulanarak iki amino asid eklendi. Bu sentezde birleştirme adımında (adım 6) kullanılan korunmuş amino asidlerin ağırlıkları (2,74 milimol) Tablo 3.9'da gösterilmiştir (Bu ağırlıklar, kullanılan 68-104-Polimer parçasının 3,9g 104-Polimer parçasından elde edildiği kabul edilerek hesaplandı). Ayrıca, birleştirme adımında, her amino asid için 0,51g (2,47 milimol) disikloheksilkarbodiimid kullanıldı. Sentezin sonunda 6,8 g 66-104-Polimer parçası elde edildi. Bu parçadan bir örnek (10 mg) alınarak Kısım 3.2'deki gibi hidrolizi, ondan sonra da amino asid analizi yapıldı. Bu analizin sonuçları Tablo 3.10'da gösterilmiştir.

Bu sentezin tamamlanması ile amaçlanan dörtlü sentezin ilk bölümü, sitokrom c'nin (XXI) hemsiz peptid (XXIII) parçasının sentezi, katı dayanak üzerinde gerçekleştirilmiş oldu.

Tablo 3.9. 66-104-Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asitlerin Ağırlıkları

Konum	Amino Asid	Ağırlık (g)
67	Tirozin (VIIb)	1,02
66	Glutamik Asid (Ib)	0,924

Tablo 3.10. 66-104-Polimer Parçasının Amino Asid Analizi

Amino Asid	Sayı	Oran
Lizin (Va)	8	7,7
Arginin (Xa)	1	1,0
Aspartik Asid (IXa)	3	3,0
Treonin (IIIIa)	3	2,2
Glutamik Asid (Ia)	5	5,1
Prolin (XIVa)	2	1,7
Glisin (XIa)	2	1,8
Alanin (IVa)	3	3,1
Metionin (XIIIIa)	1	0,53
İzolösin (VIIIa)	4	3,3
Lösin (VIa)	3	3,0
Tirozin (VIIa)	3	1,8
Fenilalanin (XIIa)	1	0,96

3.8. N-Asetil-p-kloro-DL-fenilalanin'in (XXIX) Sentezi

9,5g (0,048 mol) p-kloro-DL-fenilalanin ve 45 ml asetik asid şlifli erlene konuldu, erlenin boynuna kurutma tübü takıldı. Karışım yavaş yavaş karıştırılarak kaynama noktasına getirildikten sonra 3 dakika soğutuldu. Bu sürenin sonunda 7,0 ml (0,075 ml) asetanhidridi azar azar karışıma eklendi. Elde edilen çözelti ısıtılarak kaynama noktasına getirildi ve 2 dakika bu sıcaklıkta tutulduktan sonra soğutuldu; 40°C sıcaklıkta evaporatörde koyulaştırıldı. Geride kalan sarımsı sıvıya 10 ml su eklendi ve su 40°C sıcaklıkta evaporatörde uçuruldu. Bu işlem iki kere daha tekrar edildikten sonra N-asetil-p-kloro-DL-fenilalanin (XXIX) sarımsı renkte bir katı olarak elde edildi. Bu katı 500 ml asetonda çözüldü. Çözelti biraz bulanık olduğundan süzüldü, aseton evaporatörde uçuruldu. Elde edilen sarımsı katı 50 ml eterle yıkanarak arıtıldıktan sonra alçak basınç altında oda sıcaklığında kurutuldu. Sonunda 10,5 g (% 91) saf N-asetil-p-kloro-DL-fenilalanin (XXIX) beyaz kristaller halinde elde edildi. Bu ürünün ergime noktası 181.5 - 182.5°C'dir⁽³⁹⁾.

3.9. N-Asetil-p-kloro-DL-fenilalanin'in (XXIX) Enzimle

Rezolüsyonu; p-Kloro-L-fenilalanin'in (XXVIIb) Sentezi

9,68 g (0,040 mol) N-asetil-p-kloro-DL-fenilalanin (XXIX) 320 ml su ile karıştırıldı ve bu karışımın pH'ı yavaş yavaş 2N lityum hidroksid eklenerek 7,10'a çıkarıldı⁽³⁰⁾. Bu pH'da tüm amino asid çözüldü. Bundan sonra çözeltinin hacmi su eklenerek 400 ml'ye tamamlandı, böylece 0,1 molar amino asid çözeltisi elde edildi. Bu 0,1 molar çözeltiye 250 mg enzim (Asilaz) eklendi ve karışım 50°C sıcaklıkta 96 saat bekletildi. Reaksiyonun bu sürenin sonunda tamamlanmış olduğu, reaksiyon sırasında değişik zamanlarda alınan örneklerin amino asid (p-kloro-L-fenilalanin olarak) analizi yapıldığında son iki örnekte amino asid miktarında hiç değişiklik görülmemesinden anlaşıldı. Bu sü-

renin sonunda asetik asid eklenerek karışımın pH'ı 5,0'e düşürüldü, 1g kömür tozu konulup karıştırıldı. Bundan sonra karışım süzgeçten geçirildi, kömür tozlarına takılan protein süzgecin üzerinde kaldığından duru bir çözelti elde edildi. Bu çözeltinin hacmi 40°C sıcaklıkta evaporatörde 40-50 ml'ye indirildiğinde beyaz kristaller ayrıştı. Elde edilen karışım 0°C'da 24 saat bekletildikten sonra süzüldü; süzgecin üzerinde kalan kristaller eterle (2 x 25 ml) yıkandıktan sonra alçak basınç altında kurutuldu ve 2,96g (% 74) p-kloro-L-fenilalanin (XXVIIb) elde edildi.

3.10. N-t-Bütiloksikarbonil-p-kloro-L-fenilalanin'in (XXVIIa) Sentezi

2,96g (14,8 milimol) p-kloro-L-fenilalanin (XXVIIb) ve 74 ml dimetilsülfoksit 250 mililitrelik erlene konuldu; 4,1 ml (29,6 milimol) trietilamin ve 2,1 ml (14,8 milimol) t-bütiloksikarbonilazid eklendi ve karışım oda sıcaklığında 20 saat karıştırıldı⁽³¹⁾. Elde edilen çözeltiliye 240 ml su eklendikten sonra eter (3 x 60 ml) ile ayrımı yapıldı. Geriye kalan sulu fazın pH'ı katı sitrik asid eklenerek 3,0'e düşürüldü; çözelti, etil asetat (3 x 100 ml) ile ayrıştırıldı. Elde edilen etil asetat çözeltisi, su (3 x 50 ml) ile ayrıştırıldıktan sonra sudan arık magnezyum sülfat ile kurutuldu ve süzüldü. Bundan sonra etil asetat 40°C sıcaklıkta evaporatörde uçuruldu. Geride kalan koyu sıvıya petrol eteri (50 ml) eklendiğinde beyaz kristaller ayrıştı. Bu kristaller alçak basınç altında kurutuldu; sonunda 2,9 g (% 49) N-t-bütiloksikarbonil-p-kloro-L-fenilalanin (XXVIIa) elde edildi. Bu amino asidin saf olduğu, ince tabaka kromatografisi yapıldığında bir tek nokta görülmesinden anlaşıldır.

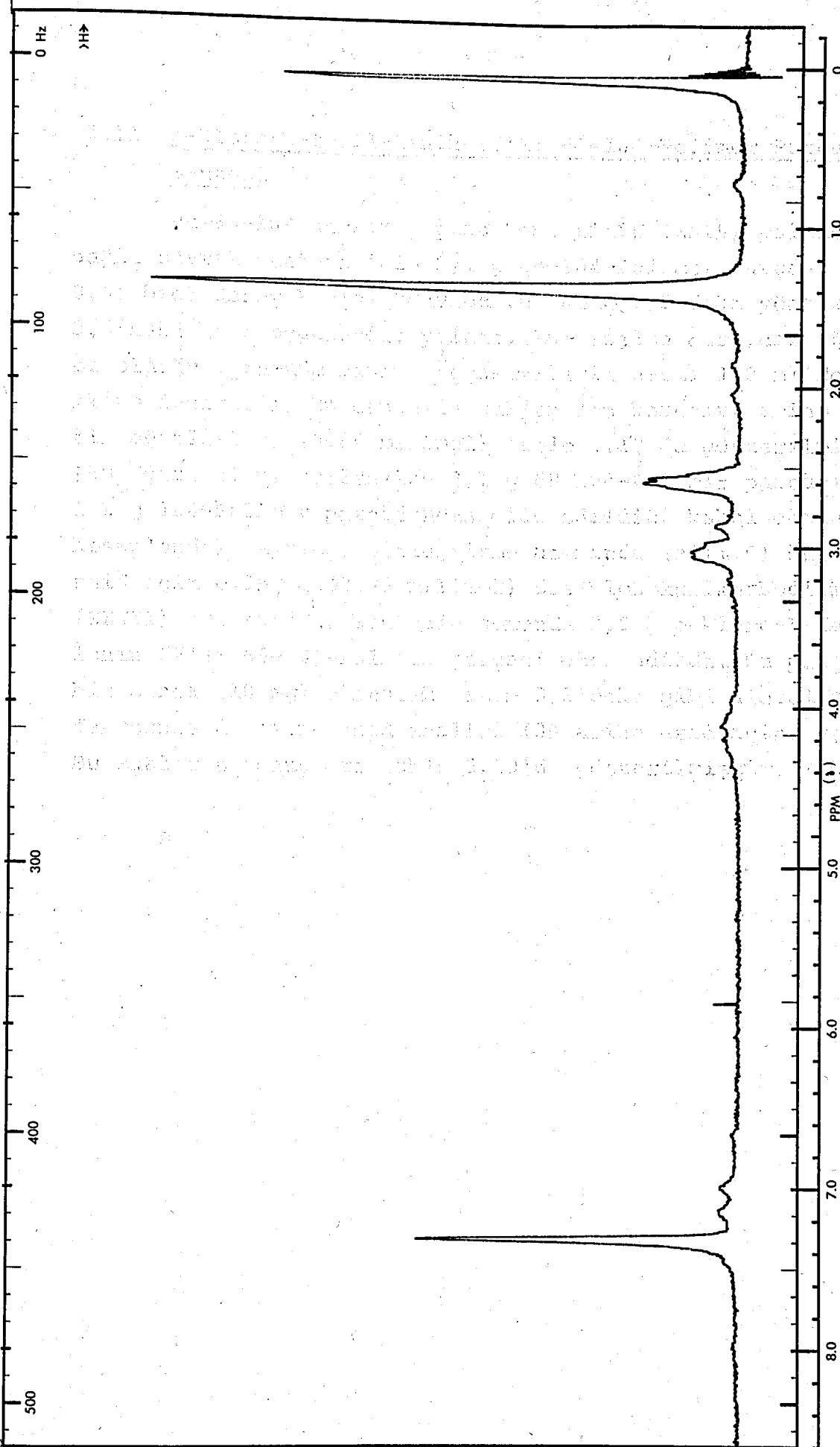
Bu ürünün nmr spektrum değerleri Tablo 3.11'de verilmiş, nmr spektrumu da Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

Ergime noktası 106-106.5°C olan N-t-bütiloksikarbonil-p-kloro-L-fenilalanin'in (XXVIIa) analiz sonucu bulunan kar-

bon, hidrojen, klor ve azot yüzdeleri % C, 55,73; % H, 5,91; % Cl, 12,35; % N, 4,94 olup $C_{14}H_{18}ClNO_4$ için hesaplanan teorik karbon, hidrojen, klor ve azot yüzdeleri % C, 56,09; % H, 6,05; % Cl, 11,83 ve % N, 4,67'dir.

Tablo 3.11. N-t-Bütiloksikarbonil-p-kloro-L-Fenilalanin'in (XXVIIa) Nükleer Manyetik Rezonans Spektrum Değerleri

Tepenin Kayma Değeri (Hz)	Tepe Katlılığı	Tepenin Belirlediği Proton(lar)
79	Birli	$(CH_3)_3 C-O-\overset{O}{\parallel}C-$
150	İkili	$Cl-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$
178	Üçlü	$-\underset{ }{\text{CH}}-$
246	Çok katlı	$-\text{NH}-$
439	Birli	$Cl-\text{C}_6\text{H}_4-$



Şekil 3.2. N-t-Bütüloksikarbonil-p-kloro-L-fenilalanin'in (XXVIIa) Nükleer Manyetik Rezonans Spektrumu.
Tarama Alanı: 500 Hz, Çözücü: D₆-DMSO (TMS)

Tablo 3.12. p-Kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104-Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asidlerin Ağırlıkları

Konum	Amino Asid	Ağırlık (g)
67	p-Klorofenilalanin (XXVIIa)	0,252
66	Glutamik Asid (Ib)	0,283

Tablo 3.13. p-Kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104-Polimer Parçasının Amino Asid Analizi

Amino Asid	Sayı	Oran
p-Kloro-L-fenilalanin (XXVIIb)	1	0,92
Lizin (Va)	8	7,9
Arginin (Xa)	1	1,0
Aspartik Asid (IXa)	3	3,0
Treonin (IIIa)	3	2,4
Glutamik Asid (Ia)	5	5,2
Prolin (XIVa)	2	1,5
Glisin (XIa)	2	1,8
Alanin (IVa)	3	3,0
Metionin (XIIIa)	1	0,29
İzolösin (VIIIa)	4	3,5
Lösin (VIa)	3	3,2
Tirozin (VIIa)	2	1,3
Fenilalanin (XIIa)	1	0,97

3.12. p-Kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104-Polimer Parçasının Sentezi

Bu 66-104 hemsiz peptid benzerinin (XXV) polimere bağlı olarak sentezi için 1,05 g 75-104-Polimer parçası (Kısım 3.5) özel deney kabına konuldu ve Tablo 2.2'deki yöntem Kısım 3.4'deki gibi uygulandı; yalnız, kullanılan parçanın ağırlığı az olduğu için, tüm sıvı ve çözeltilerin hacmi 100 ml'den 50 ml'ye indirildi. Birleştirme adımı (adım 6) kullanılan korunmuş amino asitlerin ağırlıkları (0,42 milimol) Tablo 3.14'de gösterilmiştir (Bu ağırlıklar, kullanılan 1,05 g 75-104-Polimer parçasının 0,6 g 104-Polimer parçasından elde edildiği kabul edilerek hesaplandı). Ayrıca, birleştirme adımı 70'inci amino asit asparagin (IIa) dışında her amino asit için 0,080 g (0,38 milimol) disikloheksilkarbodiimid (XXXII) kullanıldı. Asparagin'in korunmuş olarak (IIb) eklenmesi Kısım 3.3'de olduğu gibi gerçekleştirildi. Sentezin sonunda 0,950 g p-kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104-Polimer parçası elde edildi.

Sentezin kontrolü için 72'nci, 68'inci ve 66'nci amino asitlerin eklenmesinden sonra örnekler (10 mg) alındı; bu örneklerin Kısım 3.2'deki gibi hidrolizinden sonra amino asit analizi yapıldı. En son analiz sonuçları (39 amino asit için) Tablo 3.15'de gösterilmiştir.

Grub	Oran
1	1,0
2	1,0
3	1,0
4	1,0
5	1,0
6	1,0
7	1,0
8	1,0
9	1,0
10	1,0
11	1,0
12	1,0
13	1,0
14	1,0
15	1,0
16	1,0
17	1,0
18	1,0
19	1,0
20	1,0
21	1,0
22	1,0
23	1,0
24	1,0
25	1,0
26	1,0
27	1,0
28	1,0
29	1,0
30	1,0
31	1,0
32	1,0
33	1,0
34	1,0
35	1,0
36	1,0
37	1,0
38	1,0
39	1,0

Tablo 3.14. p-Kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104-Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asitlerin Ağırlıkları

Konum	Amino Asid	Ağırlık (g)	Konum	Amino Asid	Ağırlık (g)
74	p-Kloro-L-fenilalanin (XXVIIa)	0,126	69	Glutamik Asid (Ib)	0,142
73	Lizin (Vb)	0,175	68	Lösin (VIb)	0,097
72	Lizin (Vb)	0,175	67	Tirozin (VIIb)	0,156
71	Prolin (XIVb)	0,091	66	Glutamik Asid (Ib)	0,142
70	Asparagin (IIb)	0,149			

Tablo 3.15. p-Kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104-Polimer Parçasının Amino Asid Analizi

Amino Asid	Sayı	Oran
p-Kloro-L-fenilalanin (XXVIIb)	1	0,98
Lizin (Va)	8	8,5
Arginin (Va)	1	1,0
Aspartik Asid	3	3,0
Treonin	3	2,7
Glutamik Asid	5	5,6
Prolin	2	2,0
Glisin	2	2,2
Alanin	3	3,5
Metionin	1	0,23
İzolösin	4	4,1
Lösin	3	3,7
Tirozin	2	1,2
Fenilalanin	1	1,2

3.13. N-Asetil-DL-2-aminoheptanoyik Asid'in (XXX) Sentezi

20 g (0,14 mol) DL-2-aminoheptanoyik asid'in 325 ml sıcak asetik asid içindeki çözeltisi kaynama noktasına getirildi ve 29 ml (0,31 mol) asetanhidridi azar azar eklendi. Elde edilen çözelti 5 dakika kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Asetik asid ve artık asetanhidridi 40°C sıcaklıkta evaporatörde uçuruldu. Geride kalan sıvıya 40 ml su eklendi ve damıtma işlemi tekrar edildi. Elde edilen katı-sıvı karışımı 325 ml sıcak asetonda çözüldü; bir miktar kömür tozu eklenip çalkalandıktan sonra süzgeçten geçirildi. Süzülen çözelti evaporatörde koyulaştırıldığında beyaz kristaller ayrıştı. Karışım 0°C'da 18 saat bekletildikten sonra süzüldü. Süzgecin üzerinde kalan kristaller, soğuk aseton (2 x 25 ml) ve eterle (2 x 25 ml) yıkandıktan sonra alçak basınç altında kurutuldu; 18,2 g (% 70) N-asetil türevi (XXX) elde edildi.

3.14. N-Asetil-DL-2-aminoheptanoyik Asid'in (XXX) Enzim ile Rezolüsyonu; L-2-Aminoheptanoyik Asid'in (XXVIIItb) Sentezi

17,4 g (0,093 mol) N-asetil-DL-2-aminoheptanoyik asid (XXX) bir litrelik erlene konuldu ve 750 ml su eklendi⁽³²⁾. Bu karışımın pH'ı derişik amonyum hidroksid kullanarak 7,18'e getirildi. Bu pH'da tüm amino asid çözüldü. Bundan sonra, çözeltinin hacmi su eklenerek 930 ml'ye tamamlandı; böylece 0,1 molar amino asid çözeltisi elde edildi. Bu 0,10 molar çözeltiye 120 mg enzim (Asilaz) eklendi ve karışım 38°C sıcaklıkta 48 saat bekletildi. Reaksiyonun bu sürenin sonunda tamamlanmış olduğu, reaksiyon sırasında değişik zamanlarda alınan örneklerin amino asid (L-2-aminoheptanoyik asid olarak) analizi yapıldığında son iki örnekte hiç değişiklik görülmemesinden anlaşıldı. Bu sürenin sonunda karışıma 10 ml asetik asid ve 1 g kömür tozu eklenip karıştırıldı; sonra da süzgeçten geçirildi. Süzülen çözelti oda sıcaklığında 24 saat bekletildi. Bir miktar protein daha ayrıştığından kömür tozu ekleyip

süzme işlemi tekrar edildi. Elde edilen çözeltiye köpüklenmeyi kesmek için 5 ml 2-oktanol katılıp çözeltinin hacmi evaporatörde 60-70 ml'ye indirildiğinde beyaz kristaller ayrıştı. Bu karışım süzüldü, süzgecin üzerinde kalan kristaller 50 ml saf etanol ve 50 ml eter ile yıkandıktan sonra açıkta kurutuldu. Saf L-2-aminoheptanoyik asid (XXVIIIB) ile beraber ayrılan çok az miktardaki proteini atmak için bu kristaller 750 ml sıcak suda çözüldü, biraz kömür tozu eklenip karıştırıldı. Bu karışım sıcakken süzgeçten geçirildi. Süzülen çözeltide kristaller ayrışmağa başladığından 750 ml sıcak saf etanol eklendi ve çözelti 0°C'da 24 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda kristaller ayrıştığından karışım süzüldü. Süzgecin üzerinde kalan kristaller 50 ml saf etanol ve 50 ml eter ile yıkandı. Elde edilen kristaller az olduğu için, süzülen çözelti evaporatörde 90-100 ml kalana kadar koyulaştırıldı, beyaz kristallerin ayrıştığı görüldü. Karışım 0°C'da 24 saat bekletildikten sonra süzüldü, kristaller 50 ml saf etanol ve 50 ml eter ile yıkandıktan sonra tüm kristaller birleştirildi. Bunlar alçak basınç altında kurutulduğunda 4,3 g (% 64) L-2-aminoheptanoyik asid (XXVIIIB) elde edildi.

3.15. N-t-Bütiloksikarbonil-L-2-aminoheptanoyik Asid'in (XXVIIIA) Sentezi

4,22 g (29,1 milimol) L-2-aminoheptanoyik asid (XXVIIIB), 8,0 ml (58,2 milimol) trietilamin ve 4,1 ml (29,1 milimol) t-bütiloksikarbonilazid'in 145 ml dimetilsülfoksit içindeki karışımı oda sıcaklığında 18 saat karıştırıldı⁽³¹⁾. Bu sürenin sonunda beklenildiği gibi bir çözelti elde edilmediği için 50 ml dimetilsülfoksit ve 0,84 ml (0,6 milimol) t-bütildesikarbonilazid eklendi ve karışım oda sıcaklığında 24 saat karıştırıldı. Bu sürenin sonunda da bir çözelti elde edilemedi, fakat yeteri kadar reaksiyon olduğu düşünülerek bir sonraki adıma geçildi. Bunun için karışıma 600 ml su eklenip eter (3 x 100 ml) ile ayrımı yapıldı. Geride kalan sulu fazın pH'ı katı sitrik asid ilave edilerek 3'e düşürüldü ve sonra

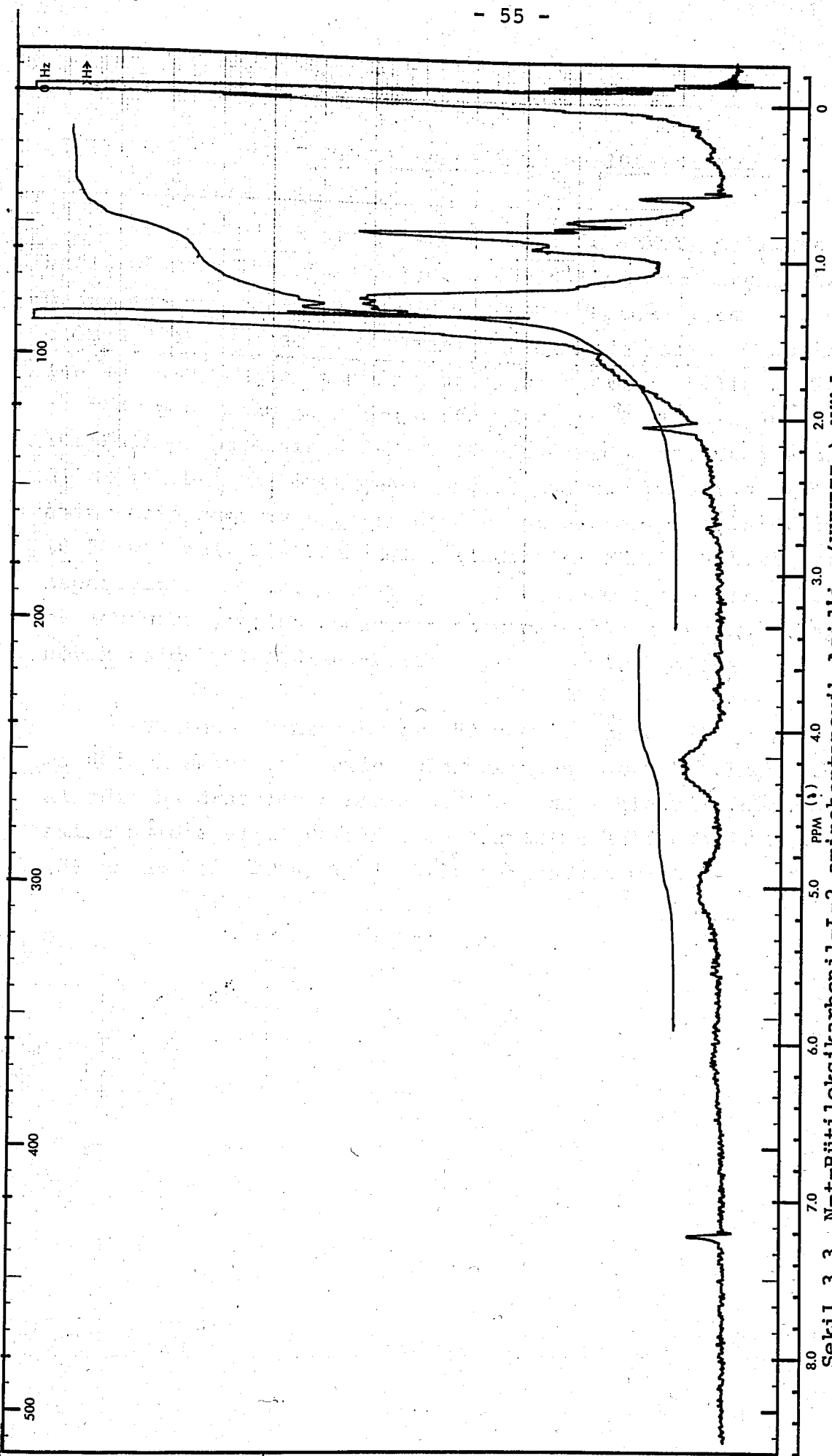
etil asetat (3 x 100 ml) ile ayrıştırıldı. Elde edilen etil asetat çözeltisi su (3 x 50 ml) ile yıkandıktan sonra sudan arık magnezyum sülfat ile kurutuldu, süzüldü ve etil asetat 40°C sıcaklıkta evaporatörde uçuruldu. Geride kalan sıvıya petrol eteri (50 ml) eklenip, petrol eteri evaporatörde uçuruldu, bu işlem üç kere tekrar edildiği halde kristaller ayrışmadı. Böylece 2,36 g (% 56) N-t-bütiloksikarbonil-L-2-aminoheptanoyik asid (XXVIIIa) çok koyu bir sıvı olarak elde edildi. Bu amino asidin saf olduğu ince tabaka kromatografisi yapıldığında bir tek nokta görülmesinden anlaşıldı.

Bu ürünün nmr spektrum değerleri Tablo 3.16'da verilmiş, nmr spektrumu ise Şekil 3.3'de gösterilmiştir.

N-t-bütiloksikarbonil-L-2-aminoheptanoyik asid'in (XXVIIIa) analiz sonucu bulunan karbon, hidrojen ve azot yüzdeleri % C, 58,47; % H, 9,38; % N, 6,02 olup C₁₂ H₂₃ NO₄ için hesaplanan teorik karbon, hidrojen ve azot yüzdeleri % C, 58,78; % H, 9,38 ve % N, 5,71'dir.

Tablo 3.16. N-t-Bütiloksikarbonil-L-2-aminoheptanoyik Asid'in (XXVIIIa) Nükleer Manyetik Rezonans Spektrum Değerleri

Tepenin kayma Değeri (Hz)	Tepe Katlılığı	Tepenin Belirlediği Proton(lar)
52	Üçlü	CH ₃ -
97	Birli	(CH ₃) ₃ C-
60-120	Çok katlı	-(CH ₂) ₄ -
254	Geniş, çok katlı	-CH-
301	Geniş, çok katlı	-NH-



Şekil 3.3. N-t-Bütüloksikarbonil-L-2-aminoheptanoik Asid'in (XXVIIIa) Nükleer Manyetik Rezonans Spektrumu
Tarama Alanı: 500 Hz, Çözücü: CDCl₃ (TMS)

3.16. L-2-Aminoheptanoyik Asid-79'lu 66-104-Polimer
Parçasının Sentezi

Bu 66-104 hemsiz peptid benzerinin (XXVI) polimere bağlı olarak sentezi için 1,00 g 83-104-Polimer parçası özel deney kabına konuldu ve Tablo 2.2'deki yöntem Kısım 3.12'de olduğu gibi uygulandı. Birleştirme adımında (adım 6) kullanılan korunmuş amino asidlerin ağırlıkları (0,59 milimol) Tablo 3.17'de gösterilmiştir (Bu ağırlıklar, kullanılan 1,00 g 83-104-Polimer parçasının 0,56 g 104-Polimer parçasından elde edildiği kabul edilerek hesaplandı). Ayrıca, bu adımda 70'inci amino asid asparagin'in (IIa) dışında her amino için 0,110 g (0,53 milimol) disikloheksilkarbodiimid (XXXII) kullanıldı. Asparagin'in korunmuş olarak (IIb) eklenmesi ise Kısım 3.3'de olduğu gibi yapıldı. Sentezin sonunda 0,735 g L-2-aminoheptanoyik asid-79'lu 66-104-Polimer parçası elde edildi.

Sentezin kontrolü için 80'nci, 79'uncu, 75'nci, 70'nci ve 66'ncı amino asidlerin eklenmesinden sonra örnekler (10 mg) alındı; bu örneklerin Kısım 3.2'deki gibi hidrolizinden sonra amino asid analizi yapıldı. En son amino asid analiz sonuçları (39 amino asid için) Tablo 3.18'de gösterilmiştir.

Amino Asid	Oran (%)
Alanin	10,5
Arginin	1,0
Asparagin	1,0
Asparagik Asid	1,0
Glisin	1,0
Glutamin	1,0
Glutamik Asid	1,0
İsovalerik Asid	1,0
L-Alanin	1,0
L-Arginin	1,0
L-Asparagin	1,0
L-Asparagik Asid	1,0
L-Glisin	1,0
L-Glutamin	1,0
L-Glutamik Asid	1,0
L-İsovalerik Asid	1,0
L-Lizin	1,0
L-Metionin	1,0
L-Prolin	1,0
L-Serin	1,0
L-Treonin	1,0
L-Tyrosin	1,0
L-Valin	1,0
L-2-Aminoheptanoyik Asid	1,0

Tablo 3.17. L-2-Aminoheptanoyik Asid-79'lu 66-104-Polimer Parçasının Sentezinde Kullanılan Korunmuş Amino Asidlerin Ağırlıkları

Konum	Amino Asid	Ağırlık (g)	Konum	Amino Asid	Ağırlık (g)
82	Fenilalanin (XIIb)	0,157	73	Lizin (Vb)	0,245
81	İzolösin (VIIIb)	0,137	72	Lizin (Vb)	0,245
80	Metionin (XIIIb)	0,147	71	Prolin (XIVb)	0,127
79	2-Aminoheptanoyik Asid (XXVIIIa)	0,145	70	Asparagin (IIb)	0,209
78	Treonin (IIIb)	0,183	69	Glutamik Asid (Ib)	0,199
77	Glisin (XIb)	0,103	68	Lösin (VIb)	0,137
76	Prolin (XIVb)	0,127	67	Tirozin (VIIb)	0,129
75	İzolösin (VIIIb)	0,137	66	Glutamik Asid (Ib)	0,199
74	Tirozin (VIb)	0,129			

Tablo 3.18. L-2-Aminoheptanoyik Asid-79'lu 66-104-Polimer Parçasının Amino Asid Analizi

Amino Asid	Sayı	Oran
Lizin	7	7,1
Arginin	1	1,0
Aspartik Asid	3	3,0
Treonin	3	2,7
Glutamik Asid	5	5,7
Prolin	2	1,3
Glisin	2	2,1
Alanin	3	4,0
Metionin	1	0,35
İzolösin	4	4,1
Lösin	3	3,7
Tirozin	3	1,3
Fenilalanin	1	1,2
L-2-Aminoheptanoyik Asid (XXVIIIb)	1	1,0

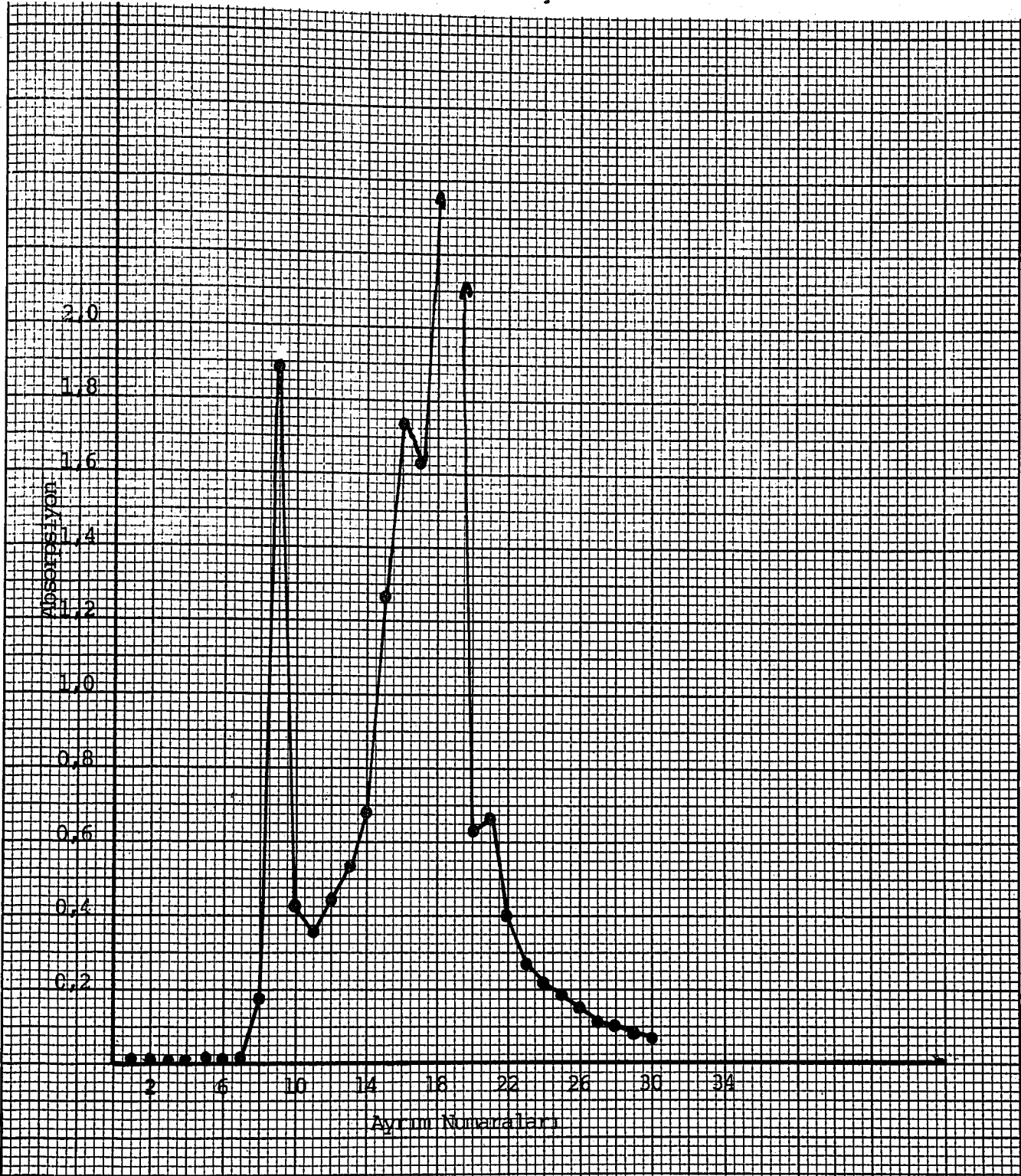
3.17. 66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Polimerden Koparılması (A)

1,0 g polimere bağılı 66-104 hemsiz peptid (Kısım 3.7) ve 0,5 ml anisol Teflon reaksiyon kabına konuldu ve 20 ml sudan arık hidroflorik asid, kobalt triflorid ile karıştırıldıktan sonra, alçak basınç altında damıtma yoluyla sıvı azot ile soğutulan reaksiyon kabına aktarıldı^(33,34,38). Karışım, 0°C'da 40 dakika karıştırıldıktan sonra artık hidroflorik asid yine alçak basınç altında damıtma yoluyla reaksiyon kabından alındı. Geride kalan karışım 0,2 N asetik asid (3 x 30 ml) ile ayrıştırıldı ve süzülen asetik asid çözeltisinden liyofilizasyon ile 410 mg peptid katı halde elde edildi.

Bu 66-104 hemsiz peptid'in (XXIII) kısmen arıtılması için jel kromatografisi kullanıldı. Bunun için de 202 mg peptidin % 50 asetik asid (3 ml) içindeki bulanık çözeltisi Sephadex G-50 ile doldurulmuş kolona (1,25 cm x 100 cm) konuldu ve akan faz olarak 0,2 N asetik asid (0,4 ml/dakika) kullanıldı. Otomatik makine ile toplanan ayrımların (fraksiyon) (16 dakika/test tüp) 250 nonametre'deki absorpsiyonu mor ötesi (UV) spektrofotometresi ile ölçüldü. Elde edilen grafiğe (Şekil 3.4) dayanılarak ayrımlar birleştirildi. İlk tepeyi oluşturan üç ayırım (8-10) polimere bağılı peptid gösterdiğinden diğer ayrımlar iki grupta (13-16, 17-19) birleştirildi (Daha sonraki ayrımlarda yalnız molekül ağırlığı küçük olan yan ürünler bulunduğundan bu ayrımlar kullanılmadı). Bu iki büyük ayırımdan liyofilizasyon ile 35 mg (13-16) ve 104 mg (17-19) katı elde edildi. Bunlardan alınan örneklerin (1 mg) Kısım 3.18'de peptidler için anlatıldığı gibi hidrolizinden sonra amino asid analizi yapıldı. Bu analizlerin sonuçları Tablo 3.19'da gösterilmiştir. Bu tabloda ayrıca, koparmadan sonraki analiz sonuçları da verilmiştir.

Bu sonuçlara bakarak, polimerden koparmanın ve arıtılmanın tam olarak gerçekleştirilemediği görüldü; yalnız, ilk büyük ayırımda daha çok 66-104 hemsiz peptid (XXIII) bulunduğu belirlendi.

Şekil 3.4. 66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Polimerden Koparılmasından (A) sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Sonuçları



Tablo 3.19. 66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Amino Asid Analizleri (A)

Amino Asid	Sayı	O r a n		
		Koparmadan Sonra	Aritmadan Sonraki Ayrımlar	
			13-16	17-19
Lizin (Va)	8		8,3	7,7
Arginin (Xa)	1		1,0	1,0
Aspartik Asid (IXa)	3	3,0	3,0	3,0
Treonin (IIIa)	3	2,9	3,0	2,8
Glutamik Asid (Ia)	5	5,3	5,2	5,1
Prolin (XIVa)	2	1,6	1,7	1,6
Glisin (XIa)	2	1,8	2,1	1,8
Alanin (IVa)	3	3,2	3,2	3,1
Metionin (XIIIa)	1	0,75	0,85	0,72
İzolösin (VIIIa)	4	3,4	3,7	3,3
Lösin (VIa)	3	3,1	3,1	3,0
Tirozin (VIIa)	3	1,8	1,7	1,7
Fenilalanin (XIIa)	1	0,92	0,97	0,82

3.18. Peptidlerin Hidroliz Yoluyla Analizi

Bu yöntem tüm peptidlerin analizi için uygulandı.

1 mg peptid ve 1 ml 6N hidroklorik asid iki mililitrelik bir ampul içine konuldu ve ampulün ağzı alçak basınç altında kapatıldı. Ampul 110°C sıcaklıkta 22-24 saat ısıtıldıktan sonra soğutuldu. Ampulün ağzı açıldı ve ampul, içinde potasyum hidroksid taneleri bulunan desikatöre konuldu. Ampulün içindeki sıvı desikatörde, alçak basınç altında uçuruldu. Geride kalan amino asidlerin analizi yine amino asid analiz makinesi (Beckman Model 120 c) ile yapıldı.

3.19. 66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Polimerden Koparılması (B)

1,0 g polimere bağlı 66-104 hemsiz peptidin (Kısım 3.7) hidroflorik asid ile polimerden koparılmasında ve kısmen arıtılmasında Kısım 3.17'deki yöntem uygulandı (33,34,38). Yalnız, kullanılan hidroflorik asid miktarı azaltıldı (15 ml) ve reaksiyon süresi de 30 dakikaya indirildi. Sonunda, liyofilizasyon ile 452 mg peptid katı halde elde edildi.

Bu peptidin kısmen arıtılması için 204 mg peptid yine aynı kolona konuldu; yalnız, toplanan ayırımların hacmi azaltıldı (10 dakika/test tüp). Ayırımların 250 nonametré'deki absorpsiyonlarının ölçülmesinden sonra elde edilen grafiğe (Şekil 3.5) dayanılarak ayırımlar iki grupta (22-25, 26-30) birleştirildi. Bu iki büyük ayırımdan, liyofilizasyon ile 30 mg (22-25) ve 95 mg (26-30) katı elde edildi. Bunlardan alınan örneklerin (1 mg) Kısım 3.18'deki gibi hidrolizinden sonra amino asid analizi yapıldı. Bu analizlerin sonuçları Tablo 3.20'de gösterilmiştir. Bu tabloda ayrıca, koparmadan sonraki analiz sonuçları da verilmiştir.

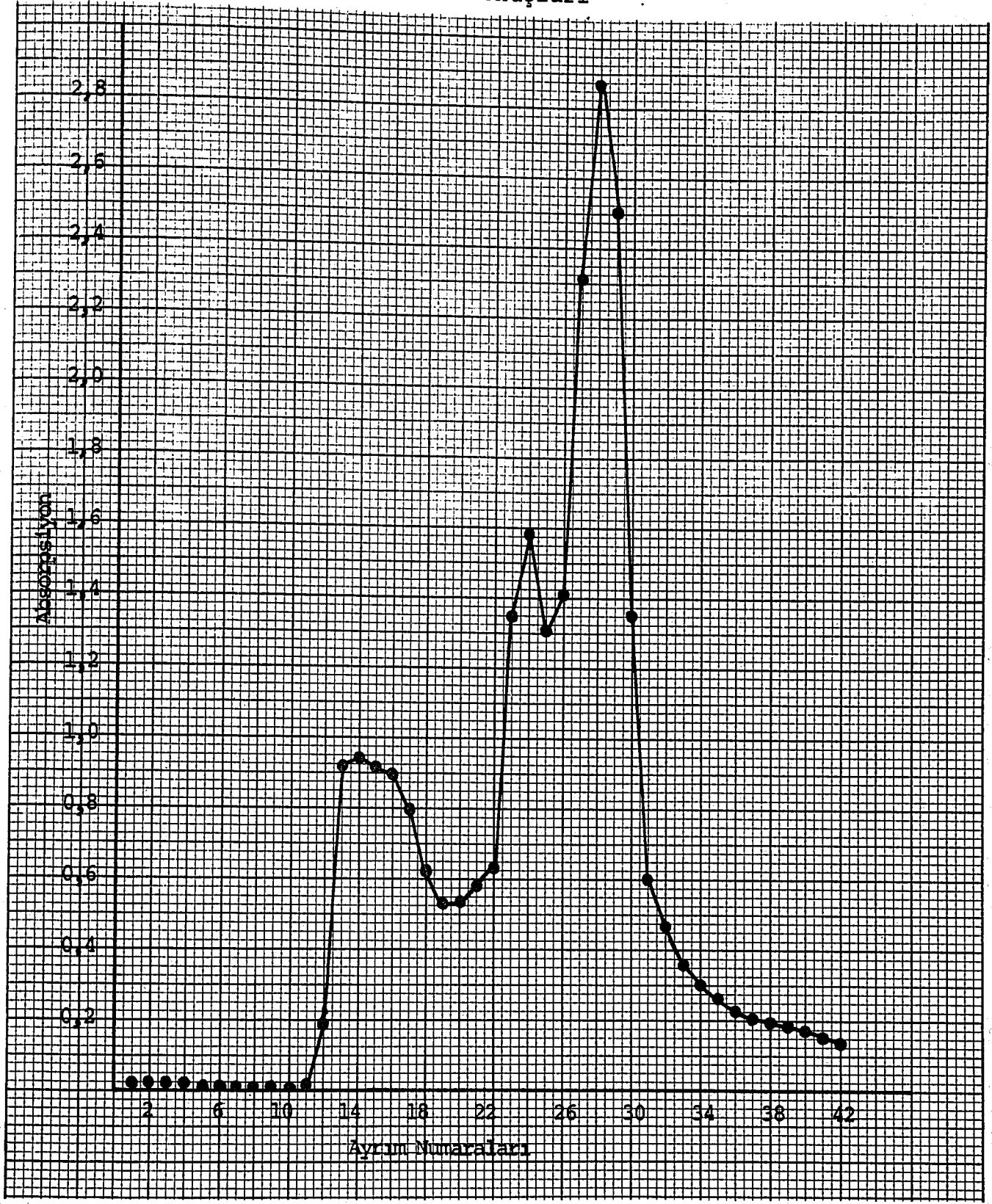
Bu sonuçlara bakarak, ilk koparma reaksiyonundan elde edilen peptidin kolona konulmayan kısmı (245 mg) için koparma reaksiyonu tekrar edildi. Bu kez, 0,2 ml anisol ve 10 ml hidroflorik asid kullanıldı. Sonunda liyofilizasyon ile 207

mg peptid elde edildi.

Bu peptid kolona konulduğunda, kolondan aşağı düzgün bir şekilde inmediği görüldü. Ayrımların absorpsiyonu ölçüldüğünde elde edilen grafik (Şekil 3.6) de bunu doğruladığından ayrımların büyük bir çoğunluğu birleştirildi. Bunlardan liyofilizasyon ile 155 mg peptid elde edildi. Bu peptid tekrar kolona konuldu. Ayrımların absorpsiyonunun ölçülmesinden sonra elde edilen grafiğe (Şekil 3.7) dayanılarak ayrımlar iki grupta (23-25, 26-31) birleştirildi. Bu iki büyük ayırmadan liyofilizasyon ile 20 mg (23-25) ve 65 mg (26-31) katı elde edildi. Bunlardan alınan örneklerin (1 mg) Kısım 3.18'deki gibi hidrolizinden sonra amino asid analizi yapıldı. Bu analizlerin sonuçları Tablo 3.21'de gösterilmiştir.

Bu analizlerden, ilk büyük ayırmadan elde edilen 20 mg 66-104 hemsiz peptid'in (XXIII) 1-65 hemli peptid benzeri (XXIIb) ile birleştirilebilecek saflıkta olduğu belirlendi.

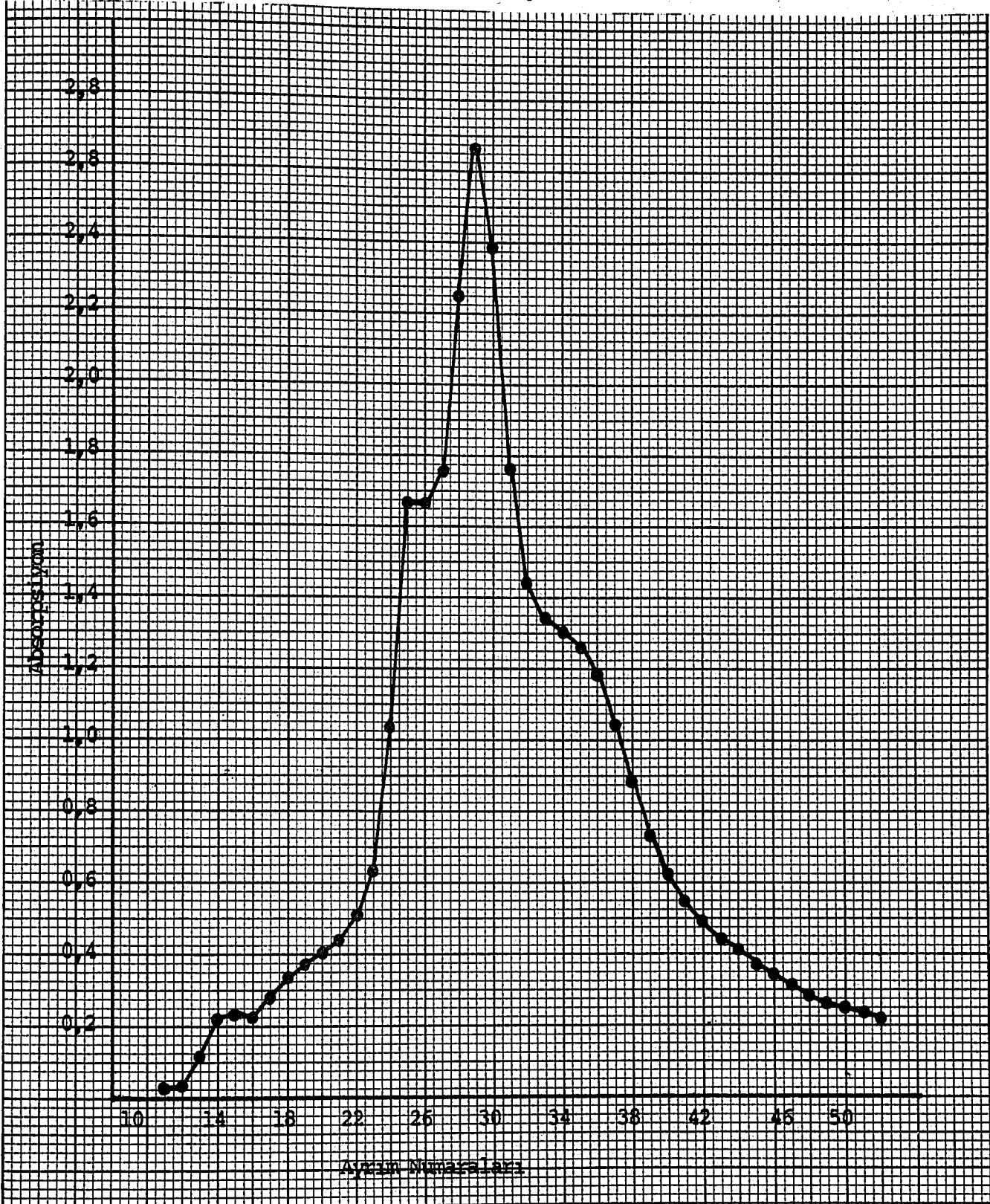
Şekil 3.5. 66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Polimerden Koparılmasından (B) Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Sonuçları



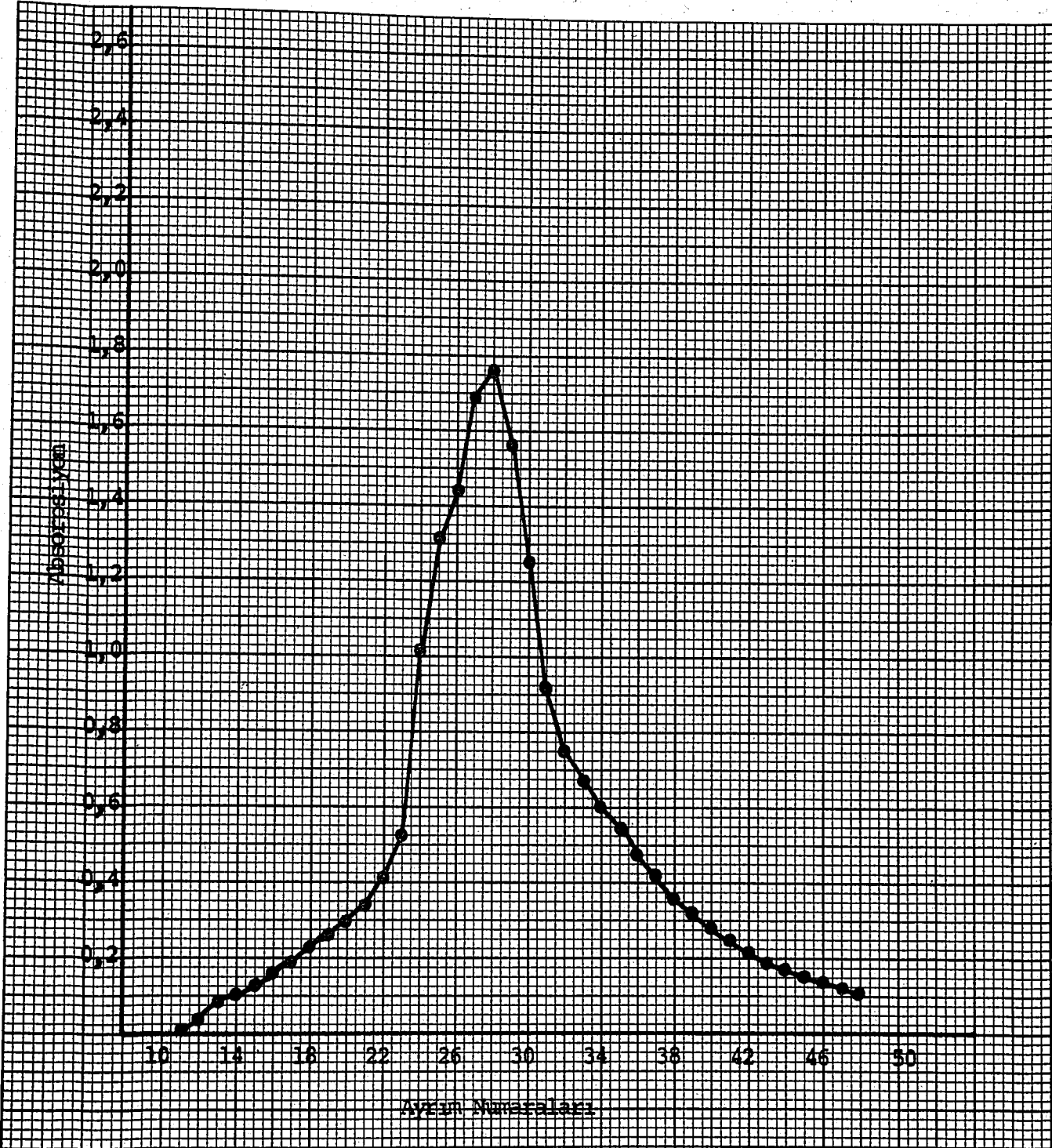
Tablo 3.20. 66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Amino Asid Analizleri (B)

Amino Asid	Sayı	Oran		
		Konarmadan Sonra	Arıtmadan Sonraki Ayrımlar	
			22-25	26-30
Lizin (Va)	8		7,9	
Arginin (Xa)	1		1,0	
Aspartik Asid (IXa)	3	3,0	3,0	3,0
Treonin (IIIa)	3	2,8	2,9	2,8
Glutamik Asid (Ia)	5	5,1	5,2	5,0
Prolin (XIVa)	2	1,6	1,9	1,6
Glisin (XIa)	2	1,7	2,0	1,8
Alanin (IVa)	3	2,8	3,1	3,0
Metionin (XIIIa)	1	0,75	0,95	0,81
İzolösin (VIIIa)	4	3,8	3,8	3,4
Lösin (VIa)	3	3,0	3,0	3,1
Tirozin (VIIa)	3	1,7	1,9	1,8
Fenilalanin (XIIa)	1	0,90	1,1	0,90

Şekil 3.6. 66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) İkinci Koparılmasından (B) Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Sonuçları



Şekil 3.7. 66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Polimerden İkinci Koparılmasından (B) Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Tekrarlandığında Elde Edilen Sonuçlar



Tablo 3.21. 66-104 Hemsiz Peptid'in (XXIII) Amino Asid Analizleri (B)

Amino Asid	Sayı	O r a n	
		İki Kere Koparmadan ve Arıtma Tekrarlandıktan Sonraki Ayrımlar	
		23-25	26-30
Lizin (Va)	8	8,1	7,4
Arginin (Xa)	1	1,0	1,0
Aspartik Asid (IXa)	3	3,0	3,0
Treonin (IIIa)	3	3,0	2,2
Glutamik Asid (Ia)	5	5,3	5,0
Prolin (XIVa)	2	2,0	1,4
Glisin (XIa)	2	2,2	1,7
Alanin (IVa)	3	3,2	3,0
Metionin (XIIIa)	1	0,85	0,72
İzolösin (VIIIa)	4	3,7	3,1
Lösin (VIa)	3	3,1	3,1
Tirozin (VIIa)	3	2,0	1,8
Fenilalanin (XIIa)	1	1,0	0,88

3.20. p-Kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXIV) Polimerden Koparılması

0,738 g polimere bağlı p-kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104 hemsiz peptid benzeri ve 0,5 ml anisol Teflon reaksiyon kabına konuldu ve 15 ml sudan arık hidroflorik asid, kobalt triflorid ile karıştırıldıktan sonra, alçak basınç altında damıtma yoluyla sıvı azot ile soğutulan reaksiyon kabına aktarıldı (33,34,38). Karışım 30 dakika 0°C'da karıştırıldıktan sonra artık hidroflorik asid yine alçak basınç altında damıtma yoluyla reaksiyon kabından alındı. Geride kalan karışım 0,2 N asetik asid (3 x 30 ml) ile ayrıştırıldı; süzölen asetik asid çözeltisinden liyofilizasyon ile 346 mg peptid katı halde elde edildi.

Bu peptidin kısmen arıtılması için jel kromatografisi kullanıldı. Bunun için de 202 mg peptidin % 50 trifloroasetik asid (3 ml) içindeki bulanık çözeltisi Sephadex G-50 ile doldurulmuş kolona (1,25 x 100 cm) konuldu ve akan faz olarak 0,2 N asetik asid (0,4 ml/dakika) kullanıldı. Otomatik makine ile toplanan ayrımların 250 nonametre'deki absorpsiyonu mor ötesi (UV) spektrofotometresi ile ölçüldü. Elde edilen grafiğe (Şekil 3.8) dayanılarak ayrımlar bir grup (22-32) olarak birleştirildi. Bu büyük ayrımdan liyofilizasyon ile 158 mg peptid elde edildi.

Bu peptidin hidroflorik asid ile reaksiyonu, Kısım 3.19'da hemsiz peptid (XXIII) için olduğu gibi, tekrar edildi. Bu kez 0,2 ml anisol ve 10 ml hidroflorik asid kullanıldı. Sonunda liyofilizasyon ile 118 mg peptid elde edildi.

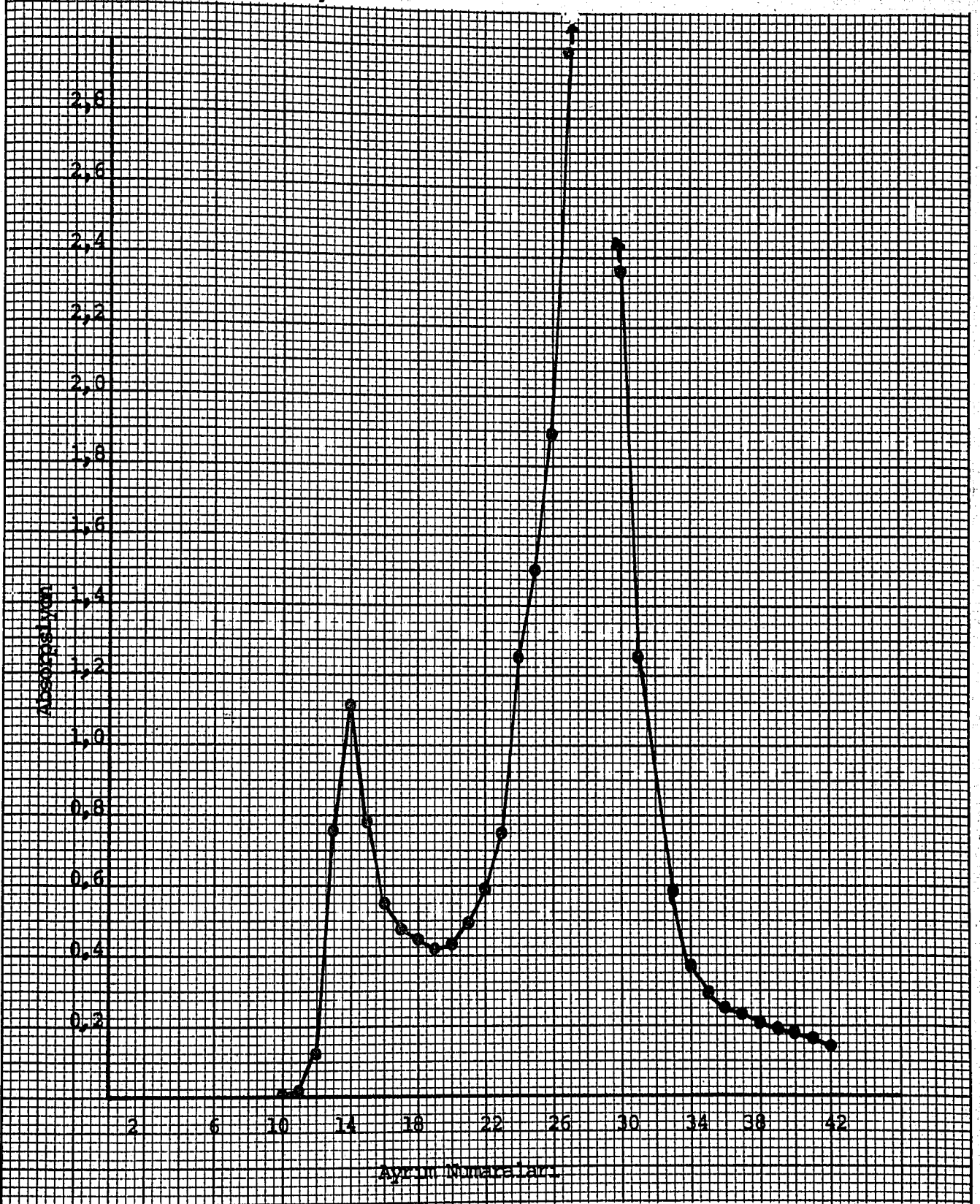
Bu peptid arıtılmak için kolona konulduğunda otomatik ayırım toplama makinesi ile ilgili problemler oldu; bazı test tüplerin boş kaldığı, test tüplerin çevresinde de kurumuş katı bulunduğu görüldü. Diğer ayrımların absorpsiyonu ölçüldükten sonra elde edilen grafiğe bakarak birleştirilen ayrımlardan liyofilizasyon ile yalnız 9 mg katı elde edildi. Bu ne-

denle ilk koparma reaksiyonundan elde edilen 346 mg peptidin kullanılmayan kısmı (143 mg) için hidröflorik asid ile olan koparma reaksiyonu tekrar edildi, sonunda 122 mg peptid elde edildi.

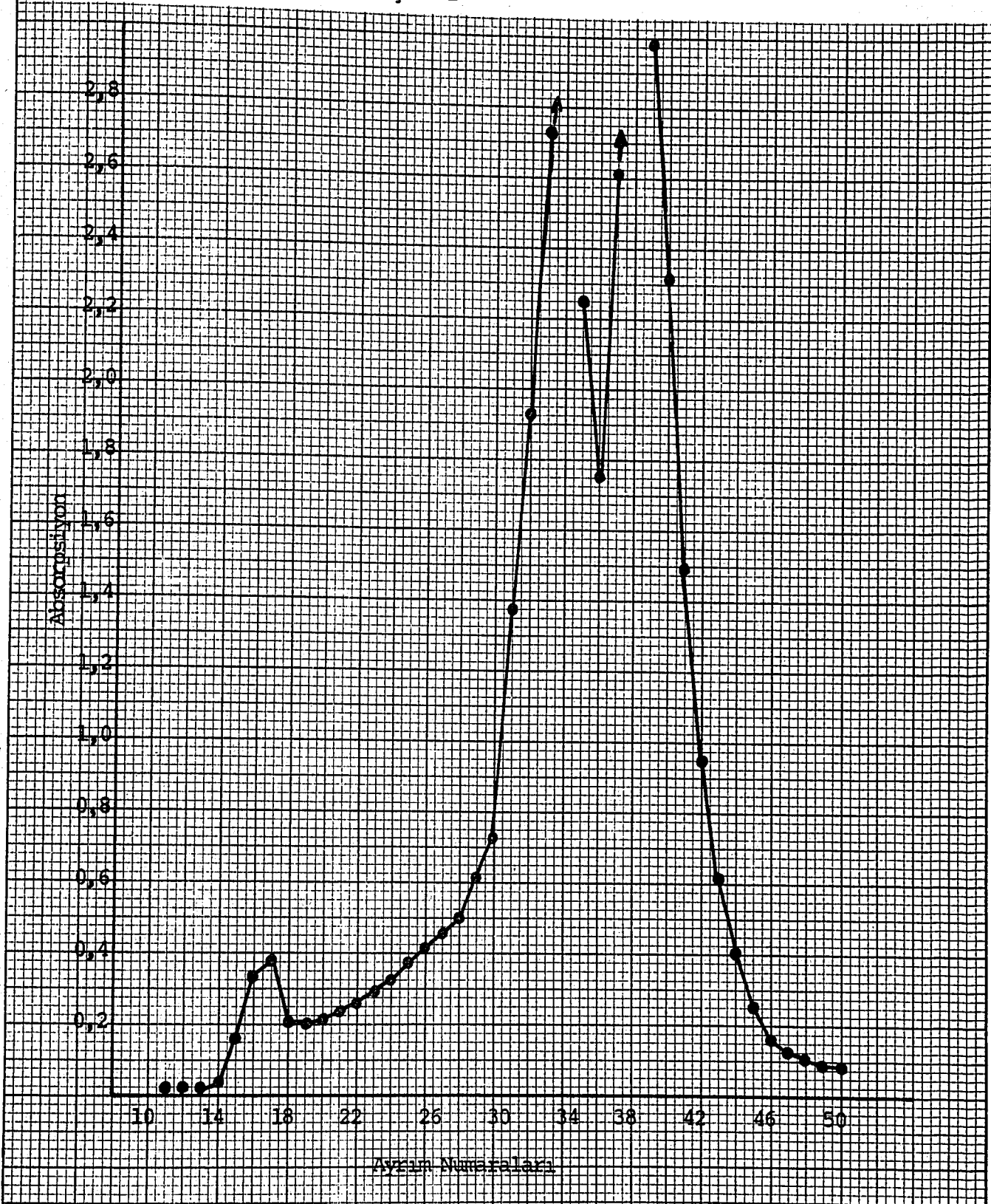
Bu p-kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104 hemsiz peptid benzeri (XXIV) yine jel kromatografisi ile kısmen arıtıldı. Ayrımlar, absorpsiyonun ölçülmesinden sonra elde edilen grafiğe (Şekil3.9) dayanılarak iki grupta (30-35, 36-42) birleştirildi. Bu iki büyük ayırmadan liyofilizasyon ile 80 mg (30-35) ve 3 mg (36-42) katı elde edildi. İlk büyük ayırmadan alınan örneğin (1 mg) Kısım 3.18'deki gibi hidrolizinden sonra yapılan amino asid analizi sonuçları Tablo 3.22'de gösterilmiştir. Bu tabloda ayrıca ilk koparmadan sonraki analiz sonuçları da verilmiştir.

Bu analizden, elde edilen 80 mg p-kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104 hemsiz peptid benzerinin (XXIV) 1-65 hemli peptid benzeri (XXIIb) ile birleştirilebilecek saflıkta olduğu belirlendi.

Şekil 3.8. p-Kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXIV) Polimerden Koparılmasından Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Sonuçları



Şekil 3.9. p-Kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXIV) Polimerden İkinci Koparılmasından Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Sonuçları



Tablo 3.22. p-Kloro-L-fenilalanin-67'li 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXIV) Amino Asid Analizleri

Amino Asid	Sayı	O r a n	
		İlk Koparmadan Sonra	İki Kere Koparma ve Arıtmadan Sonraki Ayrımlar (30-35)
p-Kloro-L-fenilalanin (XXVIIb)	1	0,88	1,0
Lizin (Va)	8	7,5	7,6
Arginin (Xa)	1	1,0	1,0
Aspartik Asid (IXa)	3	3,0	3,0
Treonin (IIIa)	3	2,9	2,8
Glutamik Asid (Ia)	5	5,2	5,0
Prolin (XIVa)	2	1,8	1,8
Glisin (XIa)	2	1,9	1,9
Alanin (IVa)	3	3,1	3,1
Metionin (XIIIa)	1	0,70	0,65
İzolösin (VIIIa)	4	3,4	3,8
Lösin (VIa)	3	3,2	3,1
Tirozin (VIIa)	2	1,3	1,4
Fenilalanin (XIIa)	1	0,93	0,92

3.21. p-Kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXV) Polimerden Koparılması

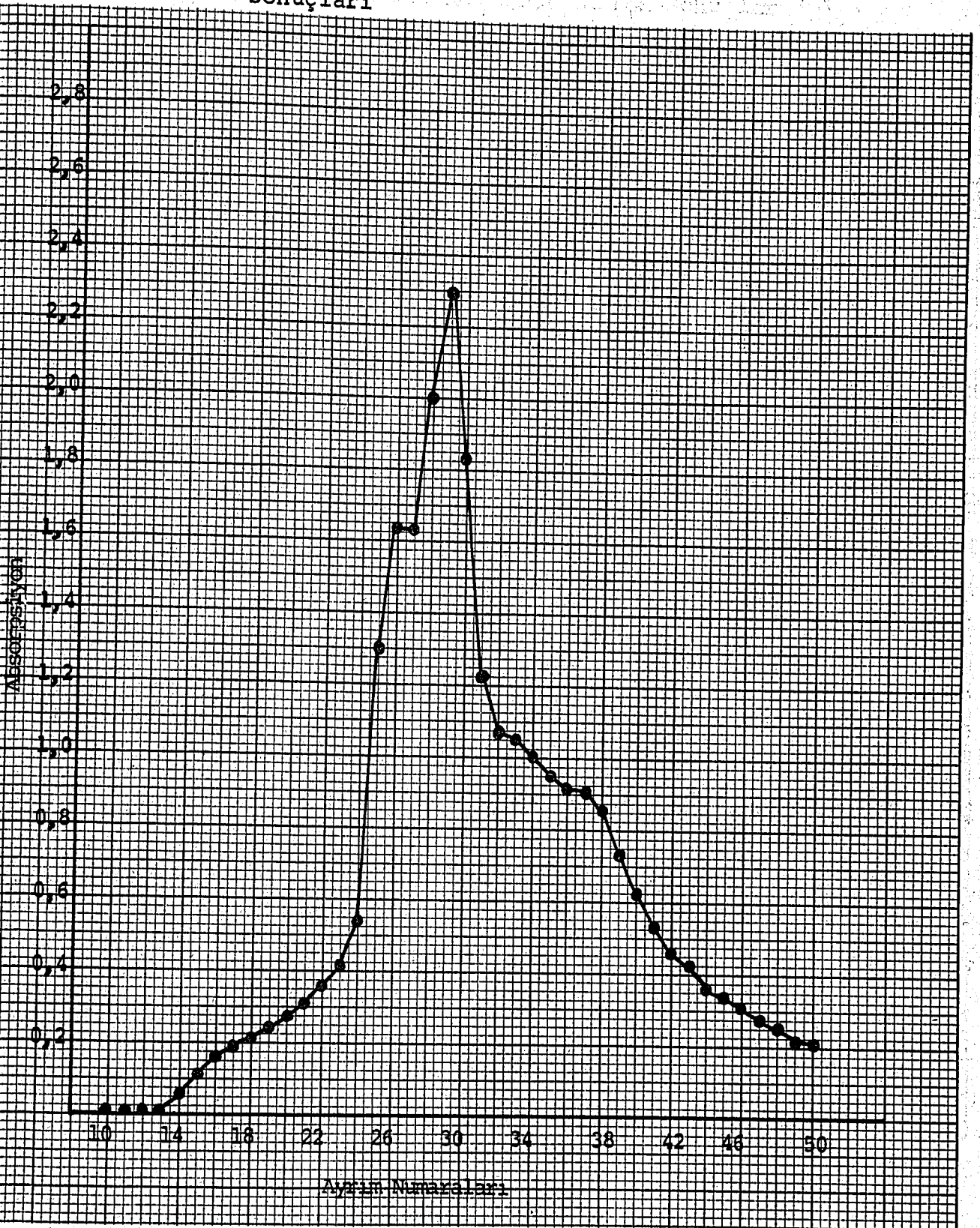
0,430 g polimere bağlı p-kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104 hemsiz peptid benzerinin polimerden koparılmasında Kısım 3.19'daki yöntem, 0,5 ml anisol ve 15 ml hidroflorik asid kullanılarak uygulandı (33,34,38). Sonunda, liyofilizasyon ile 171 mg peptid katı halde elde edildi. Bu peptidten alınan bir örneğin (1 mg) Kısım 3.18'deki gibi hidrolizinden sonra amino asid analizi yapıldı. Bu analizin sonuçları Tablo 3.23'de gösterilmiştir.

Geride kalan 170 mg peptid arıtılmadan önce, hidroflorik asid ile olan koparma reaksiyonu, 0,2 ml anisol ve 10 ml hidroflorik asid kullanılarak tekrar edildi. Sonunda liyofilizasyon ile 160 mg peptid elde edildi.

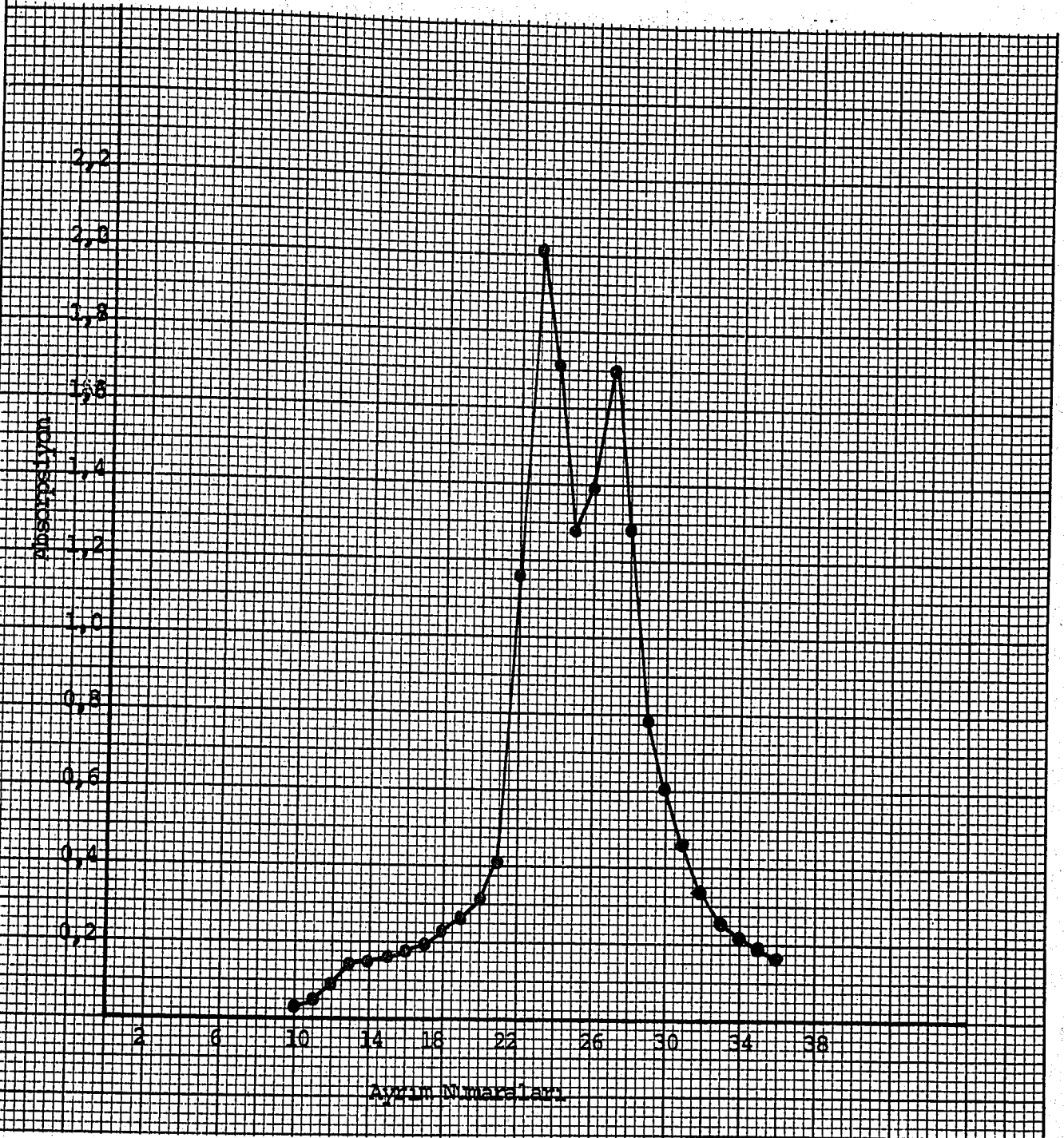
Bu peptidin kısmen arıtılması için yine jel kromatografisi (Kısım 3.19) kullanıldı. Ayrımların absorpsiyonu ölçüldüğünde elde edilen grafikten (Şekil 3.10) peptidin kolona düzgün konulamadığı görüldü. Bu nedenle ayrımların büyük bir çoğunluğu (24-43) birleştirildi. Bu büyük ayırmadan liyofilizasyon ile 110 mg peptid katı halde elde edildi. Bu peptid tekrar jel kromatografisi ile arıtıldı. Ayrımlar, yine elde edilen grafiğe (Şekil 3.11) dayanılarak iki grupta (21-25, 26-31) birleştirildi. Bu iki büyük ayırmadan liyofilizasyon ile 56 mg (21-25) ve 25 mg (26-31) katı elde edildi. Bunların ilkinden alınan bir örneğin (1 mg) Kısım 3.18' deki gibi hidrolizinden sonra yapılan amino asid analizi Tablo 3.23'de gösterilmiştir.

Bu analizden, elde edilen 56 mg p-kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104 hemsiz peptid benzerinin (XXV) 1-65 hemli peptid benzeri (XXIIb) ile birleştirilebilecek saflıkta olduğu belirlendi.

Şekil 3.10. p-Kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXV) Polimerden İkinci Koparılmasından Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Sonuçları



Şekil 3.11- p-Kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXV) Polimerden İkinci Koparılmasından Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Tekrarlandığında Elde Edilen Sonuçlar



Tablo 3.23. p-Kloro-L-fenilalanin-74'lü 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXV) Amino Asid Analizleri

Amino Asid	Sayı	O r a n	
		İlk Koparmadan Sonra	İki Kere Koparma ve Arıtmadan Sonraki Ayrımlar (21-25)
p-Kloro-L-fenilalanin (XXVIIb)	1	0,74	0,72
Lizin (Va)	8	9,2	7,9
Arginin (Xa)	1	1,0	1,0
Aspartik Asid (IXa)	3	3,0	3,0
Treonin (II Ia)	3	3,1	2,9
Glutamik Asid (Ia)	5	6,0	5,1
Prolin (XIVa)	2	2,3	2,1
Glisin (XIa)	2	2,3	2,1
Alanin	3	3,8	3,3
Metionin (XIIIa)	1	0,39	0,42
İzolösin (VIIIa)	4	4,0	3,9
Lösin (VIa)	3	3,4	3,2
Tirozin (VIIa)	2	1,3	1,2
Fenilalanin (XIIa)	1	0,87	0,96

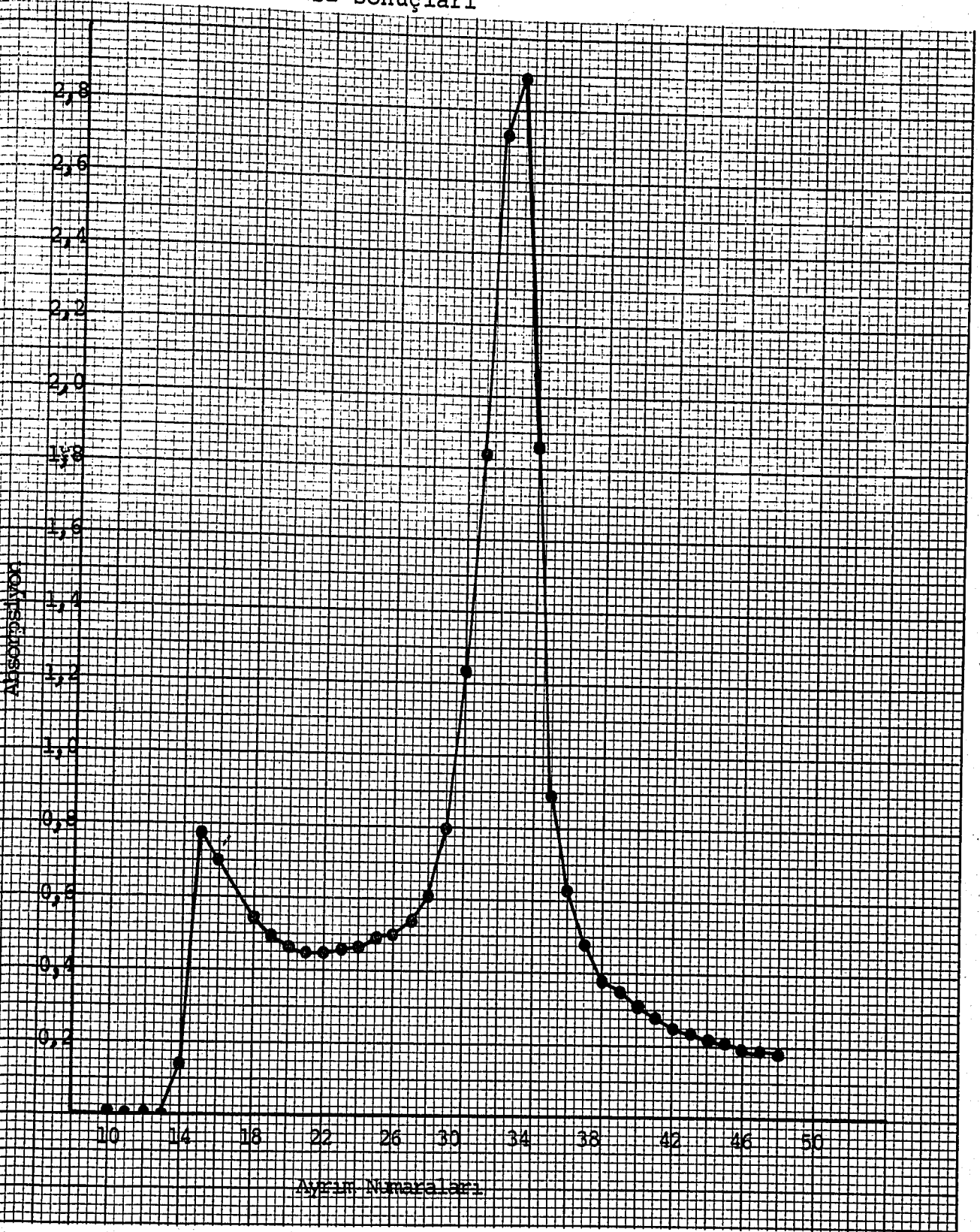
3.22. L-2-Aminoheptanoyik Asid-79'lu 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXVI) Polimerden Koparılması

0,256 g polimere bağlı L-2-aminoheptanoyik asid-79'lu 66-104 hemsiz peptid benzerinin hidroflorik asid ile polimerden koparılmasında Kısım 3.19'daki yöntem uygulandı (33,34,38). Bu kez, 0,3 ml anisol ve 15 ml sudan arık hidroflorik asid kullanıldı. Ayrıca, iki ayrı koparma reaksiyonu yerine reaksiyon süresi -10°C 'da 40 dakika ve 0°C 'da 60 dakika olarak uzatıldı. Sonunda liyofilizasyon ile, 99 mg peptid katı halde elde edildi.

Bu peptidin kısmen arıtılması için yine jel kromatografisinden yararlanıldı. Ayrımlar absorpsiyonun ölçülmesinden sonra elde edilen grafiğe (Şekil 3.12) dayanılarak bir grupta (29-35) birleştirildi. Bu büyük ayırmadan liyofilizasyon ile 58 mg L-2-aminoheptanoyik asid-79'lu 66-104 hemsiz peptid benzeri (XXVI) elde edildi. Bundan alınan bir örneğın (1 mg) Kısım 3.18'deki gibi hidrolizinden sonra yapılan amino asid analizi sonuçları Tablo 3.24'de gösterilmiştir.

Bu sonuçlardan, elde edilen 58 mg L-2-aminoheptanoyik asid-79'lu 66-104 hemsiz peptid benzerinin (XXVI) l-65 hemli peptid benzeri (XXIIb) ile birleştirilebilecek saflıkta olduğu belirlendi.

Şekil 3.12. L-2-Aminoheptanoyik Asid-79'lu 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXVI) Polimerden Koparılmasından Sonra Arıtılmasında Kullanılan Jel Kromatografisi Sonuçları



Tablo 3.24. L-2-Aminoheptanoyik Asid-79'lu 66-104 Hemsiz Peptid Benzerinin (XXVI) Amino Asid Analizi

Amino Asid	Sayı	Oran (Aritmadan Sonra)
Lizin (Va)	7	7,0
Arginin (Xa)	1	1,0
Aspartik Asid (IXa)	3	3,0
Treonin (IIIa)	3	2,9
Glutamik Asid (Ia)	5	4,6
Prolin (XIVa)	2	1,6
Glisin (XIa)	2	1,8
Alanin (IVa)	3	3,1
Metionin (XIIIa)	1	0,47
İzolösin (VIIIa)	4	4,1
Lösin (VIa)	3	3,0
Tirozin (VIIa)	3	1,9
Fenilalanin (XIIa)	1	0,94
L-2-Aminoheptanoyik Asid (XXVIIIb)	1	0,73

K A Y N A K L A R

- 1- Ş.Tekman ve N.Öner "Genel Biokimya" s.351, Baha Matbaası, İstanbul (1974).
- 2- V.du Vigneaud, C.Ressler, J.M.Swan, C.W.Roberts, P.G.Katsoyannis ve S.Gordon, J.Amer.Chem.Soc., 75, 4879 (1953).
- 3- J.Meienhofer, E.Schnabel, H.Brenner, O.Brinkoff, R.Zabel, W.Sroka, H.Klostermeyer, D.Brandenburg, T.Okuda ve H.Zahn, Z.Naturforsch, 18b, 1130 (1963).
- 4- J.C.Anderson, M.A.Barton, R.A.Gregory, P.M.Hardy, G.W.Kenner, J.K.Mac Lead, J.Preston, R.C.Shephard ve J.S.Morley, Nature (London), 204, 933 (1964).
- 5- E.Wünsch, E.Jaeger ve R.Scharf, Chem.Ber., 101, 3664 (1968).
- 6- M.Bodanszky ve N.J.Williams, J.Amer.Chem.Soc., 89, 685 (1967).
- 7- S.Guttman, J.Pless, E.Sandrin, P.A.Jaguenaud, H.Bossert ve H.Willems, Helv.Chim.Acta., 51, 1155 (1968).
- 8- R.B.Merrifield, Federation.Proc., 21, 412 (1962).
- 9- R.B.Merrifield, J.Amer.Chem.Soc., 85, 2149 (1963).
- 10- R.B.Merrifield, J.Amer.Chem.Soc., 86, 304 (1964).
- 11- N.S.Thampi, G.Schoellmann, M.W.Hurst ve C.G.Higgins, Life Sci., 7, 641 (1968).
- 12- A.Marglin ve R.B.Merrifield, J.Amer.Chem.Soc., 88, 5051 (1966).
- 13- B.Gutte ve R.B.Merrifield, J.Amer.Chem.Soc., 91, 501 (1969).

- 14- L.E.Barstow, D.A.Cornelius, V.J.Hruby, T.Shimoda, J.A.Rupley, J.J.Sharp, A.B.Robinson ve M.D.Kamen, "Chemistry and Biology of Peptides" (J.Meienhofer, ed) s.231-233, Ann Arbor Sci.Publ., Ann Arbor, Michigan (1972).
- 15- J.M.Stewart ve J.D.Young "Solid Phase Peptide Synthesis" s.27-49 W.H.Freeman and Company, San Francisco (1969).
- 16- B.W.Erickson ve R.B.Merrifield, Proteins, 2, 256 (1976).
- 17- R.E.Dickerson ve R.Timkovich, Enzymes, 11, 396 (1975).
- 18- R.Swanson, B.L.Trus, N.Mandel, G.Mandel, O.B.Kallai ve R.E.Dickerson, J.Biol.Chem., 252, 759 (1977).
- 19- T.Takano, B.L.Trus, N.Mandel, G.Mandel, O.B.Kallai, R.Swanson ve R.E.Dickerson, J.Biol.Chem., 252, 776 (1977).
- 20- R.E.Dickerson, T.Takano, D.Eisenberg, O.B.Kallai, L.Samson, A.Cooper ve E.Morgaliash, J.Biol.Chem., 246, 1511 (1971).
- 21- T.Takano, O.B.Kallai, R.Swanson ve R.E.Dickerson, J.Biol.Chem., 248, 5234 (1973).
- 22- T.Takano, R.Swanson, O.B.Kallai ve R.E.Dickerson, Cold Spring Harbor Sym.Quant.Biol., 36, 397 (1971).
- 23- R.E.Dickerson, T.Takano, O.B.Kallai ve L.Samson "Structure and Function of Oxidation-Reduction Enzymes" (A.Åkeson ve A.Ehrenberg, eds) s.69-83, Pergamon, Oxford (1972).
- 24- F.R.Salemme, S.T.Freer, Ng.H.Xuong, R.A.Alden ve J.Kraut, J.Biol.Chem., 248, 3910 (1973).
- 25- F.R.Salemme, Annual Rev.Biochemistry., 46, 299 (1977).
- 26- R.Timkovich ve R.E.Dickerson, J.Biol.Chem., 251, 4033 (1976).

- 27- G.Corradin ve H.A.Harbury, *Biochim. Biophys.Acta*, 221, 489 (1970).
- 28- E.Morgaliash, E.L.Smith, G.Kreil ve H.Tuppy, *Nature (London)*, 192, 1125 (1961).
- 29- B.F.Gisin, *Helv.Chim.Acta*, 56, 1476 (1973).
- 30- S.M.Birnbaum, L.Levintow, R.B.Kingsley ve J.P.Greenstein, *J.Biol.Chem.*, 194, 455 (1952).
- 31- J.M.Stewart ve J.D.Young "Solid Phase Peptide Synthesis" s.29, W.H.Freeman and Company, San Francisco (1969).
- 32- S.M.Birnbaum, L.Levintow, R.B.Kingsley ve J.P.Greenstein, *J.Biol.Chem.*, 194, 507 (1952).
- 33- J.Lenard ve A.B.Robinson, *J.Amer.Chem.Soc.*, 89, 181 (1967).
- 34- R.S.Feinberg ve R.B.Merrifield, *J.Amer.Chem.Soc.*, 97, 3485 (1975).
- 35- G.Corradin ve H.A.Harbury, *Procl.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 68, 3036 (1971).
- 36- G.Corradin ve H.A.Harbury, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 61, 1400 (1974).
- 37- L.E.Barstow, R.S.Young, J.J.Sharp, J.C.O'Brien ve H.A.Harbury, *Federation Proc.*, 36, 758 (1977).
- 38- L.E.Barstow, R.S.Young, E.Yakalı, J.J.Sharp, J.C.O'Brien, P.Berman ve H.A.Harbury, *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A*, 74, 4248 (1977).
- 39- T.N.Ghosh ve S.Dutta, *J.Indian Chem.Soc.*, 32, 719 (1955).