

AMMINOACIDI

Sono i costituenti elementari di peptidi e proteine (peptidi e proteine = polimeri di aa).

Sono costituiti da un atomo di C centrale detto C α al quale sono legati: un gruppo carbossilico (COOH), un gruppo amminico (NH₂), un H e una catena laterale R che differisce per ciascun amminoacido. Il C α è il C2 in quanto il C1 è costituito dal C del gruppo carbossilico.

Tutti gli aa sono α -amminoacidi poiché il gruppo amminico è legato al C α (ovvero il C2).

Gli aa sono composti chirali in quanto il C α è legato a 4 sostituenti diversi (ad eccezione della glicina in cui due sostituenti sono H). C α è quindi un centro chirale o stereocentro dal quale si originano i due stereoisomeri detti enantiomeri. Gli enantiomeri sono L e D e fanno riferimento alla posizione occupata dal gruppo NH₂, (posizionando COOH in alto e R in basso) se esso si trova a dx si parla di enantiomero D mentre se si trova a sx si parla di enantiomero L.

Gli amminoacidi vengono classificati in base alla presenza di cariche, alla polarità e alla presenza di gruppi aromatici in:

- Amminoacidi apolari (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina)
- Amminoacidi aromatici (fenilalanina, tirosina, triptofano)
- Amminoacidi polari neutri (serina, prolina, treonina, cisteina, asparagina, glutammina)
- Amminoacidi polari carichi + (lisina, arginina, istidina)
- Amminoacidi polari carichi - (aspartato, glutammato)

Gli aa aromatici hanno la caratteristica di assorbire la luce nello spettro ultravioletto, in particolare a 280nm. Questo può essere sfruttato per trovare la concentrazione di un aa tramite la legge di Lambert-Beer.

Gli amminoacidi sono sostanze anfotere \rightarrow reagiscono sia da acidi che da basi, e sono stanze anfiprotiche \rightarrow possono sia cedere che accettare protoni, infatti possono essere descritti sia in forma non ionica che in forma zwitterionica. In condizioni fisiologiche, pH circa 7, gli amminoacidi presentano il COOH nella forma deprotonata e il NH₂ nella forma protonata (zwitterionica). È possibile capire perché osservando i valori di pKa.

Il valore di pH in corrispondenza del quale un aa ha carica pari a zero è detto pI (punto isoelettrico) di un amminoacido. Esso si calcola facendo la media dei due pKa oppure dei due valori di pKa più vicini alla carica dello 0 nel caso ci siano più di due gruppi che possono essere deprotonati o protonati. È importante ricordare che se il pH è < del pI l'amminoacido sarà carico positivamente, mentre se il pH è > del pI l'aa sarà carico negativamente.

Gli aa standard sono 20 e vengono codificati da codoni. Oltre ad essi esistono degli amminoacidi detti non standard che non sono codificati da codoni particolari ma provengono da modificazioni post-traduzionali. Le posizioni delle modifiche vengono indicate sia con i numeri che con le lettere dell'alfabeto greco. Alcuni dei più importanti aa non standard sono: 4-idrossiprolina, 5-idrossilisina, ornitina, citrullina, 6-N-metilmetionina e γ -carbossiglutammina.

PROTEINE: formazione dei peptidi e legame peptidico

Più amminoacidi si associano in una reazione di condensazione a formare un peptide. La reazione di condensazione consiste in un attacco nucleofilo da parte del gruppo amminico sul carbossile e porta alla formazione di una molecola di H₂O e di un legame peptidico.

Il legame peptidico è un'amide, ovvero un legame covalente abbastanza stabile. La formazione di questo legame è sfavorita a livello termodinamico e quindi è resa possibile grazie all'accoppiamento con una reazione esoergonica. Ad esempio nella cellula questa reazione è possibile grazie all'accoppiamento con la formazione dell'amminoacil-tRNA in cui l'energia è fornita dall'idrolisi dell'ATP. A livello cinetico invece è sfavorita l'idrolisi di questo legame, infatti è un legame stabile che ha un'emivita di circa 7 anni. Per fortuna grazie alla presenza di numerosi enzimi l'organismo è in grado di sintetizzare e distruggere una proteina in pochi secondi.

I legami peptidici hanno la caratteristica di avere parziale carattere di doppio legame dovuto alla risonanza tra il C=O e il legame peptidico stesso, per questo motivo sono rigidi e planari (non liberi di ruotare). Altra caratteristica è la configurazione trans.

La proteina però ruotare attorno al C α andando a generare gli angoli diedri, cioè gli angoli tra due piani detti Φ (phi) e Ψ (psi) che assumono valori compresi tra -180° e +180° in base all'ingombro sterico del residuo. Gli angoli permessi sono rappresentati dal ramachandran plot.

PEPTIDE/OLIGOPEPTIDE = pochi residui amminoacidici

POLYPEPTIDE = residui < di 10 kDa

PROTEINA = residui > di 10kDa

I polipeptidi sono rappresentati con l'N-terminale a sinistra e il C-terminale a destra. Il primo aa a sinistra è detto residuo ammino-terminale, mentre l'ultimo a destra è detto residuo carbossi-terminale.

PROTEINE: livelli di struttura proteica

SEQUENZA AMMINOACIDICA = ordine in cui sono disposti gli aa nel peptide/proteina.

COMPOSIZIONE AMMINOACIDICA = quante moli di ogni aa si ottengono dall'idrolisi di una mole di una data proteina → indica quanti aa dei 20 disponibili si possono trovare in una proteina.

CONFORMAZIONE = organizzazione spaziale degli atomi di una proteina; indica che posizione occupa ogni atomo all'interno della proteina e dice come questa si avvolge.

Una proteina può esistere in stati conformazionali differenti e i cambi conformazionali non avvengono tramite rottura di legami ma attraverso la rotazione di essi.

Tra le conformazioni esistono:

- Conformazione folded o stato nativo o funzionale → corrisponde alla forma biologicamente attiva della proteina ed è quello termodinamicamente più stabile (con l'energia libera di Gibbs più bassa).
- Conformazione unfolded → corrisponde allo stato denaturato e non funzionale della proteina.

Tra queste due vi sono innumerevoli conformazioni intermedie.

I fattori che favoriscono lo stato unfolded sono:

- Elevato numero di conformazioni possibili (quindi disordine ed entropia elevati)
- La possibilità di formare numerosi legami idrogeno con l'acqua (quindi liberazione di energia)

I fattori che favoriscono lo stato folded sono:

- La possibilità di formare ponti disolfuro intracatena
- Le interazioni deboli intracatena
- L'aumento del disordine delle molecole d'acqua (quindi l'aumento di entropia) → quest'ultimo punto in particolare favorisce di gran lunga la conformazione folded rispetto all'unfolded.

STRUTTURA PRIMARIA

La struttura primaria descrive la sequenza amminoacidica di una proteina.

STRUTTURA SECONDARIA

È la struttura tridimensionale locale della proteina e definisce la presenza di particolari motivi di folding all'interno di un segmento di proteina.

Questi motivi di folding sono dati dai legami idrogeno tra i gruppi amminici e carbonilici del backbone. A seconda della loro disposizione si possono distinguere i diversi motivi di folding:

- Alpha-elica → il polipeptide si avvolge su se stesso; i legami H tra C=O e N-H di due residui diversi avvengono ogni 3,6 aa; le catene laterali puntano verso l'esterno e hanno un ruolo importante nello stabilizzare o destabilizzare l'elica in funzione della loro carica, dimensione e idrofobicità.
- Alpha-eliche anfipatiche → un lato è idrofobico e l'altro è idrofilico
- B-foglietto → il backbone della proteina è lineare e i legami H avvengono tra catene diverse adiacenti. L'andamento della struttura può essere parallelo o antiparallelo
- B-turn → ripiegamenti dovuti al legame idrogeno tra un amminoacido in posizione 1 con un amminoacido in posizione 4. Sono favoriti da prolina e glicina

Oltre a questi domini strutturali (=domini di folding all'interno della proteina) tipici della struttura secondaria, è possibile individuare delle strutture supersecondarie come: motivo β - α - β loop, α - α corner, connessione tipicamente β , β -barile, β -twist. A volte questi piccoli motivi possono associarsi dando vita a motivi più complessi.

CLASSIFICAZIONE DELLE PROTEINE

Sulla base delle info riportate fino ad ora è possibile classificare le proteine in:

- Classi
 - Tutto α → presenza di solo elementi α
 - Tutto β → presenza di solo elementi β
 - α β mescolati → sia elementi α che elementi β mescolati tra loro
 - α β segregati → tutta una parte α e tutta una parte β
- Famiglie → in funzione della similarità della struttura primaria (della sequenza)
- Superfamiglie → in funzione delle somiglianze nella struttura e nelle funzioni

STRUTTURA TERZIARIA

È la struttura che tiene conto del folding di tutta la proteina, è quella che descrive le coordinate atomiche spaziali dell'intera proteina. Il suo folding è dato da interazioni idrofobiche ed è stabilizzato da ponti salini, legami idrogeno, ponti disolfuro.

La struttura terziaria permette di classificare le proteine in due grosse categorie:

- Proteine fibrose → sono generalmente insolubili in acqua e svolgono funzioni grazie alla loro resistenza ed elasticità. Due esempi sono le α -cheratine e il collagene.
- Proteine globulari → rappresentano la maggior parte delle proteine e hanno la caratteristica di essere compatte e di dimensioni ridotte rispetto a quelle fibrose. Sono generalmente idrofiliche. Due esempi sono l'albumina e la mioglobina.

STRUTTURA QUATERNARIA

Dovuta all'aggregazione di più subunità proteiche e descrive come queste si assemblano.

Vengono usati i seguenti termini:

protomero → l'unità strutturale che si ripete

oligomero → proteina fatta da poche subunità

multimero → proteine multimeriche che possono avere dalle due alle 100 subunità

Le proteine che hanno una struttura quaternaria hanno anche simmetrie rotazionali (ruotando la proteina attorno ad una asse si ottiene sempre la stessa proteina). Si parla di asse di simmetria binario per un dimerico, asse di simmetria ternario per un trimero e così via. Quando si hanno più di 4 subunità è possibile avere anche rotazioni attorno a diversi assi.

PROTEINE: denaturazione e rinaturazione

Denaturare una proteina vuol dire farle perdere la struttura tridimensionale in modo sufficiente da causare una perdita di funzione.

Ci sono diversi modi per denaturare una proteina:

- Calore → che va a rompere soprattutto i legami idrogeno
- Variazioni di pH → che portano alla rottura delle interazioni ioniche in quanto variando il pH si va ad agire variando le cariche della proteina
- Solventi di bassa polarità → che vanno ad agire rompendo le interazioni idrofobiche
- Urea e guanidinio cloruro ad alte concentrazioni (6M, 8M) → che vanno a perturbare le interazioni idrofobiche agendo sulla struttura dell' H_2O
- Detergenti → che essendo costituiti da una parte idrofila ed una idrofoba tendono ad andare a legarsi con le parti idrofobiche delle proteine impedendo che queste facciano interazioni idrofobiche. Un esempio è l'SDS

È possibile monitorare il processo di denaturazione tramite metodi fisici sfruttando la fluorescenza intrinseca di una proteina.

La rinaturazione è il processo inverso alla denaturazione e quindi attraverso il quale si fa riguadagnare alla proteina la struttura nativa e la sua funzione biologica.

Grazie all'esperimento di Anfinsen è stato dimostrato che il processo di rinaturazione è spontaneo; e grazie al paradosso di Levinthal si è potuto dire che il processo di folding non può avvenire in maniera random ma ci deve essere qualcosa che lo guidi. L'ipotesi più avvalorata oggi è il modello del globulo fuso, secondo il quale la proteina inizia a formare prima strutture secondarie grazie alla formazione di legami idrogeno e poi collassa su se stessa per via delle interazioni idrofobiche. Dopo che è collapsata su se stessa la proteina inizia a provare diverse conformazioni via via con minimi energetici sempre minori fino ad arrivare alla nativa, ovvero quella con la più bassa energia libera.

Nelle nostre cellule, per accelerare questo processo intervengono le chaperones, proteine che si legano ai residui idrofobici delle proteine non ancora completamente foldate impedendo interazioni sbagliate. Le chaperones necessitano di ATP.

Nelle nostre cellule interviene anche la PDI (protein disulfide isomerase) che permette di rompere i ponti disolfuro scorretti che altrimenti impiegherebbero troppo tempo a riaprirsi spontaneamente. I ponti di solfuro corretti non vengono riaperti in quanto sono quelli che diventano meno accessibili all'interno della proteina.

PROTEINE: purificazione, caratterizzazione e analisi

PRODUZIONE DI UNA PROTEINA

Quattro fasi:

1. Identificazione di una fonte
 - Naturale
 - fluidi biologici come siero, plasma, urine, latte, saliva, fluido cerebro spinale
 - organi e tessuti
 - coltura cellulare
 - Ricombinante = ottenuta tramite tecniche di ingegneria genetica
Dipende da ciò che si vuole fare con la proteina e dalle caratteristiche che si vuole che siano mantenute.
2. Preparazione di un estratto grezzo
 - Disaggregazione e disintegrazione del tessuto/cellula per ottenere un omogenato
 - omogenizzatore (simil frullatore)
 - sonicatori → strumenti che emettono ultrasuoni che sono in grado di rompere le cellule → utilizzato se la proteina è dentro le cellule
 - Estrazione della proteina dall'omogenato
 - Precipitazione con Sali (es: solfato d'ammonio)
 - Estrazione con solventi o polimeri
Dipende da come è fatta la proteina
3. Frazionamento → passaggi che consentono di purificare la proteina. Il livello di purezza da ottenere è in funzione di quello che voglio fare con la proteina
 - Tecniche cromatografiche
 - Tecniche elettroforetiche
 - Filtrazione
 - Ultrafiltrazione
 - Dialisi
4. Caratterizzazione = test di attività e identità della proteina → verificare che la proteina ottenuta sia effettivamente quella di interesse
 - Determinare il peso molecolare
 - Determinare la purezza
 - Determinare il punto isoelettrico
 - Determinare la concentrazione
 - Composizione e sequenza amminoacidica
 - Attività biologica

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

Viene utilizzata una colonna cromatografica costituita da:

- Fase stazionaria = matrice porosa solida
- Rubinetto sul fondo
- Reservoir in cima contenente la fase mobile o eluente
- Campione che viene inserito in cima alla fase stazionaria con una pipetta

Permette di separare i componenti del campione che è una miscela complessa.

Viene accoppiato con un computer e uno spettrofotometro per ottenere un cromatogramma = grafico con il volume di eluente nel tempo sulle X e assorbanza a 280nm sulle Y. I picchi corrispondono al qualcosa che sta uscendo. Più picchi ci sono più complessa era miscela di partenza. Uno stesso picco può rappresentare proteine diverse che si comportano allo stesso modo.

. V_0 = volume vuoto → volume tra la fase stazionaria, circa 1/3 del volume totale (del cilindro)

. V_i = volume interno → volume dei canalicoli

. V_t = volume totale = $V_0 + V_i$

. V_e = volume di eluizione di una particolare molecola → pari a V_t per le molecole piccole e a V_0 per quelle grandi

Cromatografia size-exclusion o gel filtrazione → separazione delle molecole in base alla dimensione (più precisamente per raggio idrodinamico, non per PM)

La fase solida è costituita da sferette contenenti canalicoli (di dimensioni diverse a seconda dell'esperimento); le molecole grandi non riescono a passare dentro i canalicoli ma solo negli spazi interstiziali, quindi escono dalla colonna prima. Le molecole più piccole hanno un percorso più lungo e tortuoso perché passano attraverso i canalicoli, quindi impiegano più tempo ad uscire.

Non c'è alcuna interazione tra proteina e fase stazionaria.

Cromatografia a scambio ionico

È una cromatografia di assorbimento → le proteine si attaccano alla fase solida e poi dovranno essere staccate.

La fase solida è sostituita da sferette chimicamente modificate in modo tale da essere cariche (negativamente o positivamente a seconda della proteina di interesse). Una parte delle proteine della miscela rimane attaccata alle sferette, l'altra viene lavata via. Le resine delle biglie possono essere fatte di cellulosa o agarosio e funzionalizzate con:

- CM = CarbossiMetil group → carica negativa
- DEAE = DiEtilAmminoEtil group → carica positiva

Staccare la proteina → rompere il legame ionico

- Eluire con una carica più forte → esempio un sale ad elevate concentrazioni che va a competere per il legame con le biglie con le proteine
- Variare il pH → quando diventa = al pI le proteine hanno carica neutra e si staccano

Nel cromatogramma vedo due picchi, un corrispondente alle proteine che non si sono attaccate e l'altro corrispondente a quelle che si sono attaccate.

Cromatografia di affinità

Una delle più efficienti → è possibile purificare 100000 mila volte una proteina = è in grado di pescare 1 proteina da un pool di 100000 molecole.

Le biglie sono funzionalizzate con un ligando bioselettivo per la proteina di interesse. Viene legato covalentemente alla biglia attraverso un braccetto spaziatore e varia a seconda di cosa devo isolare:

- Anticorpo → antigene
- Enzima → inibitore dell'enzima
- Ormone → recettore

Avvenuto il binding, basta lavare abbondantemente per eliminare le impurezze.

Staccare la proteina:

- Cambiare pH → il cambiamento di pH porta ha delle modifiche strutturali della proteina e si perde la complementarità con il ligando
C'è il rischio che abbassando troppo il pH venga denaturata la proteina, se il processo è irreversibile, si perde la proteina
- Cambiare forza ionica → utilizzando dei Sali
- Eluizione basata su una competizione con eccesso di ligando → sconsigliato poiché poi si deve riuscire a staccare la proteina dal ligando in soluzione
- Usare agenti denaturanti → la denaturazione fa perdere la complementarità con il ligando. Se la proteina non è rinaturabile viene persa
 - Urea 8M
 - Guanidinio cloruro 6M

Cromatografia idrofobica → si basa su un'interazione di tipo idrofobico tra biglia e proteina che normalmente ha una superficie prevalentemente idrofila con soltanto delle parti idrofobiche. Queste ultime vengono sfruttate per interagire con la matrice che viene funzionalizzata con gruppi idrofobici.

Le interazioni sono favorite da alte concentrazioni di sali, per far staccare le proteine rimaste attaccate basta lavare diminuendo la concentrazione del sale.

Eluizioni con gradienti → ad esempio, anziché variare il pH bruscamente, lo si fa variare piano piano in modo che si staccino prime le proteine che si sono legate in maniera più blanda, poi quelle che si sono legate in maniera più forte e in fine quelle che si sono legate ancora più tenacemente.

In questo modo non si ottiene un picco singolo, ma essi si separa in più componenti → mi permette di separare più componenti della miscela.

DIALISI

Tecnica che serve per separare molecole molto piccole da molecole grosse (esempio separare Sali da proteine) sfruttando delle membrane porose. I pori di queste membrane sono tali da lasciar passare le molecole piccole ma non le molecole grandi. Nel momento in cui il tubo da dialisi viene messo in un recipiente, le molecole piccole tenderanno ad andare all'equilibrio e quindi a diffondere nel tampone contenuto nel recipiente, quelle grandi non potranno farlo e rimarranno nel tubo. Si fanno più passaggi per eliminare quasi completamente le molecole piccole dal tubo.

TECNICHE ELETTROFORETICHE Sono le principali tecniche per la caratterizzazione delle proteine.

Si possono preparare due tipi di gel:

- **NATIVE-PAGE** → le proteine non vengono denaturate, non hanno una carica omogenea e quindi migrano in funzione sia della carica che del loro peso molecolare (o meglio dal volume idrodinamico).
- **SDS-PAGE** → il campione di proteine viene fatto bollire in presenza di Sodio Dodecil Solfato, un detergente ionico anfipatico. Le proteine, venendo bollite, si svolgono esponendo parti idrofobiche. L'SDS si attacca alle parti idrofobiche delle proteine, comportandosi da "cappotto" e avvolgendo la proteina. Il cappotto ha carica negativa a causa della presenza di un gruppo solfato, di conseguenza tutte le proteine trattate con SDS si caricano negativamente e migreranno solo in funzione del peso molecolare.

Per svolgere completamente una proteina e rompere i ponti disolfuro si usano gli agenti riducenti, un esempio è il betamercaptoetanolo.

ISOELETTROFOCALIZZAZIONE (IEF) = tecnica che permette di separare le proteine in funzione del loro punto isoelettrico, caratteristica che varia molto da una proteina all'altra.

1. Preparazione del gel di poliacrilammide con anfoliti incorporati (anfoliti = sostanze anfotere) in un tubicino
2. Applicazione del campo elettrico → le anfoline migrano e si distribuiscono nel gel formando un tampone lungo tutto il tubicino creando un gradiente di pH decrescente
3. Corsa delle proteine → corrono fino a quando non incontrano il pH uguale al loro pI

Tecnica che può essere combinata con SDS-PAGE dando vita ad una tecnica chiamata two-dimensional gel electrophoresis. Tramite questa tecnica è possibile separare le proteine in senso orizzontale in base al loro punto isoelettrico e in senso verticale in base alla loro massa.

DETERMINAZIONE DELLA SEQUENZA AMMINOACIDICA

La determinazione della sequenza amminoacidica è il metodo più semplice per determinare l'identità di una proteina. Il metodo più comune è la degradazione di Edman che consiste in tre passaggi:

1. Idrolisi completa e determinazione della composizione amminoacidica → l'idrolisi del legame peptidico avviene tramite acido cloridrico 6M a 121°C. dopo si effettua una cromatografia ad alta pressione a scambio ionico e si confrontano i picchi del cromatogramma con i picchi dei singoli amminoacidi standard comprati. L'area del picco è proporzionale alla quantità di aa che si è liberata dall'idrolisi della proteina, facendo una proporzione tra area del picco standard e del picco della proteina è possibile ricavare la quantità di aa presente nella proteina.
2. Marcatura della proteina completa con 2,4-dinitrofluorobenzene → questo composto reagisce con l' α -amminogruppo terminale. Una volta che si è attaccato all'N-terminale si idrolizza nuovamente la proteina e degli amminoacidi liberati solo uno sarà marcato. Dopo l'idrolisi si procede con cromatografia come nello step precedente; nel cromatogramma si troverà un picco in più corrispondente all'aa marcato e comparando quest'ultimo con i picchi degli aa standard marcati che si comprano è possibile individuare qual è il primo amminoacido. (in questo step è possibile anche capire se la proteina è fatta da una o più catene perché se si rilevano più picchi corrispondenti a più aa marcati vuol dire che la proteina è fatta da più catene).
3. Degradazione di Edman → si utilizza il fenil-isotiociano per marcare l'N-terminale della proteina e si procede con un'idrolisi più blanda in modo da separare solo il primo residuo dal resto della catena. In questo modo si può confermare quale sia il primo aa, ma soprattutto è possibile ripetere la marcatura sul secondo aa ed identificarlo. Questo si ripete per tutti i residui che vengono dopo fino ad ottenere la sequenza della proteina intera.

Questo metodo funziona per peptidi non superiori a 50/60 residui, se a proteina è più lunga bisogna frammentarla e sequenziare i singoli frammenti. Per frammentarla si possono rompere i ponti di solfuro ed intervenire con proteasi.

Tra le proteasi da ricordare ci sono:

- Tripsina che taglia a valle di lisina e arginina → Lys, Arg (C)
- Chimotripsina che taglia a valle degli aa aromatici → Phe, Trp, Tyr (C)

- V8 che taglia a valle di aspartato e glutammato → Asp, Glu (c)
- Pepsina che taglia a monte degli aa aromatici → Phe, Trp, Tyr (N)
- Bromuro di cianogeno che in realtà non è una proteasi ma un reagente chimico che rompe a valle delle metionine. Questo è molto comodo perché le metionine non sono frequentissime nelle proteine

SPETTROMETRIA DI MASSA = tecnica che consiste nell'impiego dello spettrometro di massa attraverso il quale è possibile determinare la massa di un composto in maniera molto precisa e accurata. Ne esistono di diversi tipi, ad esempio l'electrospray (ESI-MS) ed è possibile combinarla con la two-d SDS-PAGE. Oggi si utilizza molto perché è in grado di determinare la sequenza amminoacidica di frammenti proteici in poche ore.

SINTESI CHIMICA DI PEPTIDI

Il metodo che si utilizza per la sintesi dei peptidi è il metodo di Merrifield. Esso si basa sull'utilizzo di una fase solida costituita da biglie poste in una colonna simile a quelle cromatografiche funzionalizzate con il gruppo Cl-CH₂. Questo gruppo è molto reattivo e reagisce con il gruppo carbossilico di un aa.

1. Caricamento del primo aa che rimane legato covalentemente alle biglie (la sintesi avviene dal C-terminale all'N-terminale). All'aa va legato all'N-terminale il gruppo Fmoc.
2. (deprotonazione) Lavaggio e rimozione dell'Fmoc tramite base organica.
3. Attacco del secondo aa (anch'esso legato all'Fmoc) con -COOH attivato dal DCC (diciloesilcarbodiimmide) tramite reazione di condensazione.
4. Ripetere il passaggio con tutti i residui amminoacidici di interesse.
5. Rottura del legame estereo tra resina e peptide tramite acido fluoridrico.