

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Интегрисане академске студије фармације

Г06 – Фармацеутска биотехнологија

ПРОТЕИНИ. ПОСТТРАНСЛАЦИОНЕ МОДИФИКАЦИЈЕ ПРОТЕИНА. АНАЛИЗА ФИНАЛНОГ ПРОИЗВОДА

5. НЕДЕЉА НАСТАВЕ

Летњи семестар 2022/2023. године

Крагујевац

ОПШТЕ ОСОБИНЕ ПРОТЕИНА

Протеини

- Биофармацеутици су у највећем броју случајева протеини, па је познавање особина протеина од суштинског значаја за фармацеутску биотехнологију. Протеини су макромолекули састављени од једног или више полипептида (већег броја аминокиселина повезаних пептидним везама).
- Редослед аминокиселина у полипептидном ланцу је одређен генима који кодирају синтезу тог полипептида. Након што се синтетише, полипептидни ланац заузима одређену конформацију, тј. специфични тродимензионални облик који је стабилизован бројним slabим нековалентним интеракцијама.
- Нарушавањем ових интеракција може се променити нативна конформација полипептида, што условљава губитак биолошке активности.

Протеини

- Протеини могу бити: прости - састављени искључиво од полипептидних ланаца и није им потребно присуство додатних хемијских компоненти како би испољили биолошку активност или коњуговани - поред полипептидних ланаца садрже једну или више простетичних група.
- Простетичне групе у саставу протеина су најчешће:
 - угљенохидратне (гликопротеини),
 - фосфатна група (фосфопротеини),
 - деривати витамина (флавопротеини) и
 - метални јони (металопротеини).
- Протеини поседују примарну, секундарну, терцијарну и понекад кватернарну структуру.

Аминокиселине

- У састав протеина улази 20 различитих α -аминокиселина. α -аминокиселине су оне у којима је амино-група ($-\text{NH}_2$) везана за α -угљеник (угљеник за који је везана карбоксилна група ($-\text{COOH}$)).
- За α -угљеник су везана још два супституента, а то су атом водоника ($-\text{H}$) и такозвани бочни аминокиселински ланац ($-\text{R}$) по коме се аминокиселине разликују.
- Све аминокиселине изузев глицина (чији је бочни ланац атом водоника) имају асиметричан α -угљеник, те могу постојати у D- и L-конфигурацији, али су сви протеини сисара изграђени само од L-аминокиселина.

Пептидна веза

- Аминокиселине су у полипептидном ланцу међусобно повезане пептидним везама, које се формирају између амино и карбоксилних група суседних аминокиселина.
- Пептидна веза је ковалентна веза, ригидне, планарне структуре, дужине 1,33 ангстрема. Настаје у кондензационој реакцији, при чему долази до елиминације молекула воде, а формира се између суседних аминокиселина и то између амино и карбоксилне групе које су директно везане за α -угљеник.
- Пептидна веза је ригидна јер азот из амидне групе има електронски пар који је распоређен дуж везе, те пептидна веза има делимично карактер двоструке везе.

Пептидна веза

- Пептидна везе најчешће има *trans*-конформацију код свих аминокиселина (осим код пролина), јер код *cis*-конформације долази до стерних сметњи између бочних остатака. Код пролина су *cis*- и *trans*-конформације поједнако заступљене, јер се ни у једном ни у другом случају стерне сметње не могу избећи.
- Поред пептидне везе, полипептиди формирају још два типа веза које имају могућност ротације (N-C_α и $\text{C}_\alpha\text{-C}$ везе). Угао ротације око N-C_α везе је ϕ (фи), док се код $\text{C}_\alpha\text{-C}$ везе назива ψ (пси). Углови ротације се називају и ротациони углови, дихедрални углови и торзиони углови. Везе могу да се ротирају између -180° и $+180^\circ$, међутим ротације зависе од присуства стерних сметњи између атома у оквиру скелета полипептида и оних које се налазе у бочним ланцима аминокиселина. Дозвољени ϕ и ψ углови у полипептиду значајно утичу на крајњи тродимензионални облик полипептида.

Класификација аминокиселина према карактеру бочних ланаца

- Хемијски реактивне групе у полипептидима су заправо функционалне групе које се налазе у бочним ланцима (-R) и директно утичу на хемијску реактивност и на конформацију полипептида.
- Хемијске особине бочних ланаца аминокиселина дају сваком протеину јединствене карактеристике. Репулзивне силе које настају између различитих -R, као и оне између -R и воденог медијума, такође утичу на крајњи облик који ће полипептид заузети.
- Аминокиселине се класификују на основу особина -R, тј. на основу вредности негативног декадног логаритма константе дисоцијације киселине (pK_a) и хидропатичког индекса (хидрофобност).

Класификација аминокиселина према карактеру бочних ланаца

- Хидропатички индекс представља скалу која се користи за мерење хидрофобности бочног ланца аминокиселина.
- Што је хидропатички индекс позитивнији, већа је тенденција груписања аминокиселина са другим неполарним молекулима и избацивања воде, тзв. хидрофобни ефекат. Ови хидрофобни бочни ланци често се налазе у мембранским протеинима или у унутрашњости савијених протеина у којима се не налази вода.
- Негативни хидропатички индекс неке аминокиселине значи да је њен бочни ланац хидрофилнији.

Неполарне алифатичне аминокиселине

- Аминокиселински -R неполарних, алифатичних аминокиселина (глицин (Gly, G), аланин (Ala, A), валин (Val, V), леуцин (Leu, L), изолеуцин (Ile, I), пролин (Pro, P) и метионин (Met, M)) нису хемијски значајно реактивни. Међутим, они учествују у нековалентним хидрофобним интеракцијама и тиме утичу на конформацију и стабилизацију протеина.
- Глицин се издваја по томе што је његов -R заправо атом водоника и представља структурно најједноставнију аминокиселину. Глицин нема хирални -C атом, а самим тим ни стереоизомере (D/L-изомери).
- Глицин је често присутан у петљама (кривинама) савијених полипептида.

Неполарне алифатичне аминокиселине

- Аланин и аминокиселине са разгранатим бочним ланцима (валин, леуцин и изолеуцин) поседују волуминозне, алифатичне, неполарне бочне ланце и имају висок степен хидрофобности. Бочни ланци ових аминокиселина се групишу ка унутрашњости протеина стварајући хидрофобна језгра. Бочни ланци ових аминокиселина могу се повезивати и Ван дер Валсовим силама.
- Пролин се разликује од осталих неполарних аминокиселина јер садржи прстен у оквиру ког се налазе α -угљеник и α -амино група, па су они и део пептидне кичме.
- Бочни ланац метионина је неполаран и релативно нереактиван, иако је атом сумпора подложен оксидацији. Његова важна и кључна улога у метаболизму је преношење метил групу везане за атом сумпора на друга једињења.

Ароматичне аминокиселине

- У ароматичне аминокиселине се убрајају фенилаланин (Phe, F), тирозин (Tyr, Y) и триптофан (Trp, W), које се међусобно значајно разликују по поларности.
- Све три ароматичне аминокиселине садрже у својој структури бензен, а тип супституента у овом прстену одређује да ли ће бочни ланац одређене аминокиселине учествовати у поларним или хидрофобним интеракцијама.
- Бочни ланац фенилаланина садржи несупституисан бензенов прстен који је изразито хидофобан и неполаран јер су у њему електрони равномерно распоређени између угљеникових атома.

Ароматичне аминокиселине

- Бочни ланац тирозина садржи хидроксилну групу на бензеновом прстену која учествује у грађењу водоничних веза, па је поларнији и хидрофилнији у односу на бочни ланац фенилаланина.
- Бочни ланац триптофана је сложенији у односу на фенилаланин и тирозин јер садржи индолов прстен који може учествовати у грађењу водоничних веза. Триптофан је због тога поларнији од фенилаланина.
- Тирозин и триптофан значајно апсорбују у UV спектру на таласној дужини од 280 nm, што омогућава детекцију и квантификацију протеина у раствору.

Алифатичне, поларне, ненаелектрисане аминокиселине

- У алифатичне, поларне, ненаелектрисане аминокиселине се убрајају аминокиселине са бочним ланцима који садрже: тиолну групу - цистеин (Cys, C), хидроксилну групу - серин (Ser, S) и треонин (Thr, T) и амидну групу - аспарагин (Asn, N) и глутамин (Gln, Q).
- Цистеин садржи тиолну групу (-SH) која има pK_a дисоцијације око 8,4, тако да је цистеин углавном недисосован и ненаелектисан на физиолошкој вредности pH од 7,4.
- Тиолна група бочног ланца цистеина је веома реактивна, те *in vivo* ова група може да формира комплекс са бројним јонима метала, лако се оксидује, формира дисулфидне мостове који могу бити у истом или различитом аминокиселинском ланцу. Захваљујући настанку дисулфидних мостова тродимензионална структура се стабилизује.

Алифатичне, поларне, ненаелектрисане аминокиселине

- Слободни бочни ланац цистеина може наградити и ковалентну дисулфидну везу са другим молекулом цистеина спонтаном (неензимском) оксидацијом тиолних група, при чему настаје аминокиселина цистин.
- Серин и треонин садрже хидроксилну групу (-OH), док аспарагин и глутамин садрже амидне групе (-CONH₂) у бочном ланцу.
- Хидроксилне и амидне групе им омогућавају формирање водоничних веза са молекулима воде, другим бочним ланцима аминокиселина, полипептидном кичмом или другим поларним једињењима везаним за протеине.
- Због њихове хидрофилности ове аминокиселине су често присутне на површини глобуларних протеина растворљивих у води.

Негативно наелектрисане аминокиселине

- Аминокиселине аспартагинска киселина (Asp, D) и глутаминска киселина (Glu, E), садрже карбоксилне групе које су у физиолошким условима негативно наелектрисане, што им омогућава да хелатирају одређене металне јоне и значајно утичу на конформацију полипептида у чијем се саставу налазе. Хелатирањем јона метала настају сони мостови. Бочни ланци ових аминокиселина могу градити и водоничне везе.
- Амидне групе аспарагина и глутамина подлежу деамидацији услед екстремно високих температура или рН вредности, при чему настају аспарагинска и глутаминска киселина.

Позитивно наелектрисане аминокиселине

- Базне аминокиселине лизин (Lys, K), аргинин (Arg, R) и хистидин (His, H), имају бочне ланце који садрже азот тако да могу бити протонизоване и позитивно наелектрисане на физиолошким и нижим вредностима pH. Ове позитивно наелектрисане аминокиселине остварују електростатичке интеракције са негативно наелектрисаним групама, а такође могу градити соне мостове и водоничне везе.
- Бочни ланац лизина је састављен од хидрофобног угљоводоничног ланца (бутил група), за који је везана амино група ($-\text{NH}_2$), која је у физиолошким условима јонизована ($-\text{NH}_3^+$). Међутим, у већини полипептидних ланаца постоје фракције нејонизованих лизина које су хемијски реактивне и које се могу модификовати до различитих аналога.

Позитивно наелектрисане аминокиселине

- Бочни ланац аргинина је такође „волуминозан“, састављен од три $-\text{CH}_2$ групе, амино групе ($-\text{NH}_2$) и јонизоване гванидино групе ($=\text{NH}_2^+$).
- Хистидин у бочном ланцу има имидазолов прстен, који се хемијски може охарактерисати као терцијарни амин ($\text{R}_3\text{-N}$), и делује као снажан нуклеофилни катализатор (атом азота има слободан електронски пар, што га чини нуклеофилом). Због ове особине бочни ланац хистидина је често кључни део активног места ензима.

Структура протеина

- Протеини се групишу на основу структурних особина на:
 - глобуларне (сферични облик),
 - фибриларне (vlakнасти облик),
 - трансмембранске протеине и
 - протеине који везују ДНК.
- Структура ових протеина описује се и према нивоима њихове организације:
 - примарна,
 - секундарна,
 - терцијарна и
 - кватернарна.

Примарна структура протеина

- Примарна структура протеина је линеарни распоред аминокиселина повезаних пептидним везама, уз тачно дефинисан положај дисулфидних веза, уколико су присутне.
- Пептидна веза је, најчешће, *trans*-конфигурације, што значи да се суседни α -угљеници и њихови бочни остаци налазе на супротним странама пептидне везе.

Секундарна структура протеина

- Захваљујући постојању секундарне и осталих виших структура, протеини заузимају различите просторне облике.
- Постоје два типа секундарних структура:
 - понављајуће: α -хеликс (спирала) и β -набори (набрана структура);
 - неповнављајуће: петље и завоји.
- Понављајуће структуре фаворизују стварање стабилишућих интрамолекулских водоничних веза (између атома из пептидних веза) и своде на минимум репулзију између суседних функционалних група у ланцу. Уз то ове две конформације (α -хеликс и β -набори) су компатибилне са ригидном планарном природом пептидних веза.

α -хеликс

- α -хеликс се формира спонтано и представља најстабилнију конформацију полипептидног ланца са најнижом слободном енергијом.
- Најчешће се среће код: глобуларних, трансмембранских и протеина који везују ДНК.
- Један навој α -хеликса садржи 3,6 аминокиселинских секвенци, што износи отприлике 0,56 nm. Аланин, леуцин, метионин и глутаминска киселина су аминокиселине које најчешће формирају α -хеликс. Док са друге стране, присуство аминокиселина са волуминозним бочним ланцима или групе са сличним наелектрисањем спречавају формирање α -хеликса.

α -хеликс

- Аминокиселина пролин се никада не налази у α -хеликсу због своје прстенасте структуре и немогућности да створи неопходне углове везивања. α -хеликс се најчешће налази на површини протеина, једна страна хеликса је окренута ка хидрофобној унутрашњости протеина, а друга страна је окренута ка воденом медијуму.
- Структура α -хеликса се стабилизује стварањем водоничних веза у полипептидном ланцу између карбонилне ($C=O$) и амино ($N-H$) групе из пептидне везе које су међусобно удаљене за четири аминокиселине.
- Свака пептидна веза је повезана водоничним везама са пептидним везама аминокиселина које су четири места пре и четири места после ње у полипептидном ланцу. Бочни ланци аминокиселина су усмерени ван хеликса чиме су избегнуте стерне сметње.

β-набори

- β-набори се ретко налазе појединачно, најчешће су два или више β-набора груписана заједно, међусобно повезана водоничним везама. Кисеоник из карбонилне групе једне пептидне везе је водоничном везом повезан са водоником из аминокиселине групе пептидне везе суседног ланца. Овакав распоред је супротан у односу на α-хеликс, где водоничне везе настају у оквиру истог ланца. β-набори се описују као паралелни ако су полипептидни ланци усмерени на исту страну, а као антипаралелни ако су С- и N-крајеви супротно оријентисани.
- Бочни ланци аминокиселина сваког полипептидног ланца се наизменично пружају изнад и испод равни β-плоче.
- Паралелни β-набори имају хидрофобне остатке са обе стране, док антипаралелни имају хидрофилну и хидрофобну страну.

Петље, завоји

- Секундарну структуру већине протеина чини неколико α -хеликса и/или β -набраних структура, који су одвојени једни од других петљама и/или завојима. За разлику од α -хеликса и β -набора који су правилног облика, тј. поседују елементе који се понављају, петље и завоји су неправилног облика и повезују непонављајуће структуре.
- Петље карактеришу нагле промене смера и често се могу наћи на површини протеина, могу варирати у погледу дужине и облика и омогућавају полипептиду компактну терцијарну структуру.

Петље, завоји

- Осим што петље имају улогу да повежу различите ланце који чине секундарну структуру у целину (повезују ланце антипаралелних β -набора, или леви и десни α -хеликс), оне учествују, или пак директно доприносе биолошкој функцији полипептида, саставни су део активних или везивних места на ензиму или рецептору.
- Разлика између петљи и завоја је искључиво у дужини, петље садрже више аминокиселина док завоји садрже свега 3-4 аминокиселине.

Суперсекундарне структуре

- Суперсекундарне структуре, или мотиви, су карактеристичне комбинације секундарне структуре дужине од 10 до 40 аминокиселинских остатака које се понављају у различитим протеинима.
- Суперсекундарни мотиви се формирају комбинацијом секундарних структура које садрже α -хеликсе и β -наборе. Ове структуре се налазе у глобуларним протеинима и спојене су петљом или завојем (кратке секвенце аминокиселина које су потребне за спајање α -хеликса и β -набора налазе се у глобуларним протеинима где је потребно савијање). Тако на пример спајањем два α -хеликса завојем настаје α -укосница, или спајањем два β -набора настаје β -укосница.
- Суперсекундарне структуре су између секундарних структура и терцијарних структура протеина.

Терцијарна структура протеина

- Терцијарна структура је скуп секундарних структурних елемената савијених у тродимензионалну конформацију која је флексибилна и омогућава брзе, флукутирајуће промене на одређеним позицијама. Ове промене се дешавају без одмотавања протеина и то омогућава биолошку активност протеина.
- У настанку терцијарне структуре учествују бочни остаци аминокиселина који су у полипептидном ланцу удаљени један од другог.
- За стабилизацију терцијарне структуре одговорне су: ковалентне везе (дисулфидне везе), водоничне везе, јонске интеракције и хидрофобне интеракције.

Терцијарна структура протеина

- Мали полипептиди (до 200 аминокиселина) најчешће граде једну структурну регију, док су већи полипептиди састављени од две или више структурних регија, које се називају домени.
- Домен је део полипептидног ланца који може независно да се савије у компакту делимично независну јединицу.
- Домени су међусобно повезани једноставнијом структуром као што су петље и већи број тако повезаних домена чини подјединицу.
- С обзиром да су домени углавном структурно различити, они могу имати различите функције.

Кватернарна структура протеина

- Кватернарна структура протеина настаје повезивањем појединачних идентичних (хомо) или различитих (хетеро) полипептидних ланаца (подјединица) у одређени геометријски и стехиометријски распоред, стога се ове структуре могу називати комплексом или агрегатом.
- У оквиру агрегата сваки полипептидни ланац представља једну подјединицу која има примарну, секундарну и терцијарну структуру.
- Кватернарна структура описује начин на који су подјединице распоређене у нативном протеину.

Кватернарна структура протеина

- Кватернарна структура је стабилизована водоничним везама и хидрофобним интеракцијама између полипептидних ланаца (али су могуће и све остале интеракције које стабилизују терцијарну структуру).
- Подјединице се држе заједно нековалентним везама, као резултат тога олигомерни протеини могу да претрпе брзе конформационе промене које утичу на биолошку активност.
- Немају сви протеини кватернарну структуру (нпр. миоглобин нема кватернарну, већ само терцијарну структуру).

Стабилност и савијање протеина

- Након биосинтезе протеини заузимају нативну (природну) конформацију, која је структурно стабилна и биолошки активна. Поред нативне конформације сваки протеин поседује још неколико других стабилних конформација, које му омогућавају да буде „прилагодљив“ приликом интеракције са лигандима.
- На конформацију протеина утичу аминокиселине које се налазе у његовом саставу (примарна структура), као и њихове међусобне интеракције (секундарна и терцијарна структура).
- Бочни остаци одређују образац савијања тродимензионалне структуре и распоред подјединица у кватернарој структури.

Стабилност и савијање протеина

- Секундарна структура полипептида стабилизована је интеракцијама на малој удаљености између остатака суседних аминокиселина, док је терцијарна структура стабилизована интеракцијама између остатака аминокиселина, које могу бити доста удаљене у полипептидном ланцу.
- Најзначајније интеракције за стабилизацију протеина су:
 - хидрофобне;
 - електростатичке;
 - ковалентне.

Стабилност и савијање протеина

- Савијање протеина је јако важно јер омогућава протеину формирање функционалног облика, међутим овај процес није увек успешан. Савијање протеина може бити неадекватно у неким случајевима.
- Тако на пример, постојање мутације у ДНК секвенци или „гену“ који кодира протеин може условити промену аминокиселине у ланцу протеина што онемогућава одређеном протеину формирање жељеног набора или стварање нативне конформације.
- Као последица тога може настати патолошко стање, јер је такав протеин нефункционалан (цистична фиброза, анемија српастих ћелија).

Хидрофобне интеракције

- С обзиром да већи део полипептида чине неполарне аминокиселине, хидрофобне интеракције су од великог значаја за стабилизацију нативне структуре протеина.
- Неполарни (хидрофобни) бочни ланци ових аминокиселина се оријентишу ка унутрашњости полипептида („крију“ се од воде), заузимајући на тај начин енергетски најповољнију конформацију. Овакво понашање протеина у воденом медијуму је управо последица хидрофобних интеракција.

Ковалентне везе

- Од ковалентних веза у протеину су присутне пептидне и дисулфидне везе.
- Раскидање једне дисулфидне везе у полипептиду углавном не утиче на његову нативну конформацију. Међутим, код протеина богатих дисулфидним везама, раскидањем већег броја ових веза смањује се конформациона стабилност протеина. Код оваквих протеина дисулфидне везе су јако значајни функционални и структурни елементи терцијарне структуре протеина.

Електростатичке интеракције

- Иако су електростатичке интеракције слабе, узимајући у обзир да су у великој мери присутне, њихов значај за стабилизацију структуре протеина је велики. Стабилишуће електростатичке интеракције укључују:
 - Ван дер Валсове интеракције (релативно слабе);
 - водоничне везе (присутне у протеинима, али не доприносе конформационој стабилности, јер су у савијеном полипептиду енергетски еквивалентне водоничним везама које молекули воде могу да остваре са несавијеним полипептидом);
 - јонске интеракције (називају се соним мостовима, углавном су лоциране на површини полипептида и минимално утичу на конформациону стабилност).

Конформационе промене протеина

- На основу описа протеинске структуре могло би се закључити да се ради о статичним, ригидним молекулима, међутим то није случај.
- Атоми и групе које улазе у састав протеина су стално у покрету, а протеин има ограничену покретљивост (флексибилност; енгл. "*protein breathing*").
- Ограничена покретљивост протеина у воденим растворима је функционално значајна, нпр. дозвољава дифузију малих молекула кроз протеине.
- Поред ограничене покретљивости функционално су значајне и конформационе промене протеина, које су обично реверзибилне. Оне су често индуковане биоспецифичним интеракцијама (везивање супстрата за ензим или везивање антигена за антитело).

ПОСТТРАНСЛАЦИОНЕ МОДИФИКАЦИЈЕ ПРОТЕИНА

Посттранслационе модификације протеина

- Након што је синтеза протеина извршена, поједини бочни остаци аминокиселина се могу даље модификовати ензимски катализованим реакцијама, тако што им се додају хемијске групе, оксидују или на неки други начин модификују. Пошто се синтеза протеина одвија у процесу познатом као транслација, ове промене су посттранслационе модификације.
- Тако да поред претходно поменутих 20 аминокиселина у протеинима се срећу и аминокиселине које настају у реакцијама посттранслационих модификација, којих је до сада описано око 200. Ове модификације мењају структуру једне или више аминокиселина у протеину, што директно утиче на биолошку активност и структурну стабилност полипептида.

Посттранслационе модификације протеина

- Ове модификације могу имати и регулаторну улогу, нпр. стимулишу асоцијацију протеина са другим протеинима или га обележавају за деградацију (убиквитинација).
- Најчешћа посттранслациона модификација протеина је гликозилација, а постоје и:
 - карбоксилација,
 - хидроксилација,
 - сулфација,
 - амидација,
 - фосфорилација,
 - ацетилација,
 - ацилација,
 - АДП-рибозилација.

Гликозилација

- Гликозилација подразумева везивање угљених хидрата за протеин и најчешћа је посттранслациона модификација еукариотских протеина, нарочито еукариотских протеина на површини ћелија и екстрацелуларних еукариотских протеина.
- Када се гликопротеини синтетишу у неком еукариотском експресионом систему гликозилација се не дешава увек на истом месту као код нативног хуманог гликопротеина. Ланце угљених хидрата синтетишу ензими из фамилије гликозилтрансфераза које се налазе у ендоплазматском ретикулуму.
- Ови ланци су најчешће састављени од: манозе, галактозе, глукозе, фукозе, N-ацетилгалактозамина, N-ацетилглукозамина, ксилозе и сијалинске киселине.

Гликозилација

- Ланац олигосахарида се за протеин везује преко атома -N из амидне групе аспарагина или атома -O из хидроксилне групе серина или треонина. Олигосахариди везани N-гликозидном везом се могу наћи у протеинима на површини ћелије, где штите ћелију од протеолизе или препознавања/напада од стране имунских ћелија.
- N-гликозилација је секвенцијоно специфична и подразумева везивање олигосахаридног ланца за секвенце: аспарагин-X-серин, аспарагин-X-треонин или аспарагин-X-цистеин, где је X било која аминокиселинска секвенца осим пролина.
- Код O-гликозилације не постоји специфична секвенца, а O-гликозидна веза је уобичајен начин везивања олигосахарида за хидроксилне групе серина или треонин у секреторним протеинима.

Гликозилација

- Угљенохидратна компонентна може утицати на:
 - Савијање полипептидног ланца и секундарну структуру протеина;
 - Кретање протеина у организму;
 - Везивање протеина за циљна места у организму.
 - Биолошку активност (нпр. уколико се hCG елиминише угљенохидратна компонента, он губи биолошку активност, а при том задржава способност везивања за рецептор);
 - Стабилност и то повећањем растворљивости, заштитом хидрофобних група на површини, заштитом од протеолизе и интеракцијама унутар ланца;
 - Полуживот протеина;
 - Имуногеност.

Карбоксилација и хидроксилација

- γ -карбоксилација и β -хидроксилација су посттранслационе модификације карактеристичне за мали број протеина (најчешће присутне код протеина који учествују у процесима хемостазе - фактори коагулације).
- γ -карбоксилација је ензимска конверзија бочног ланца глутаминске киселине до γ -карбоксиглутаминске киселине, катализована γ -глутамил карбоксилазом. β -хидроксилација представља хидроксилацију аспарагинске киселине до β -хидроксиаспарагинске киселине и аспарагина до 3-хидроксиаспарагина која је катализована аспартил или аспарагинил β -хидроксилазом.
- Ове модификације помажу у везивању калцијумових јона, који су есенцијални за функционисање фактора коагулације VII, IX и X, као и за активирани протеин C и S.

Сулфација

- Сулфација је посттранслациона модификација присутна код малог броја биофармацеутика. То је ензим-катализована реакција (ензим сулфотрансфераза, коензим PAPS – 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосулфат) која подразумева везивање сулфатних група ($-\text{SO}_4^{2-}$) за бочне ланце тирозина.
- Сулфација утиче на биолошку активност појединих неуропептида и протеолизу неких полипептида, значајна је за протеин-протеин интеракције, при чему недостатак ове посттранслационе модификације може умањити активност полипептида.
- Терапијски значајни сулфоновани протеини су антикоагуланс хирудин и фактори коагулације VIII и IX. Рекомбинантни облици ових молекула добијени употребом генетичког инжењеринга су сулфоновани у мањем степену, што није утицало на њихову активност.

Амидација

- Амидација је посттранслациона модификација карактеристична за мали број биофармацеутика која подразумева замену карбоксилне групе на С-терминалном ланцу амидном групом ($-\text{COOH}$ прелази у $-\text{CONH}_2$).
- Ова посттранслациона модификација је карактеристична за пептиде (кратке ланце), ређа је код полипептида. Увођењем α -амидне групе неутралише се негативно наелектрисање на С-терминусу, чиме се спречава јонизација С-терминуса и побољшава способност везивања за рецепторе протеина и пептида.

Амидација

- Реакцију α -амидације катализује пептидилглицин α -амидирајућа монооксигеназа, бифункционални ензим који се састоји од два домена, пептидил- α -хидроксиглицин- α -амидирајуће лиазе и пептидилглицин- α -хидроксилирајуће монооксигеназе.
- Значај амидације није у потпуности разјашњен, али је у неким случајевима показано да има улогу у стабилизацији и биолошкој активности (нпр. амидација је неопходна за остварење биолошке активности калцитонина, вазопресина, и окситоцина).

Фосфорилација

- Фосфорилација се дешава на хидроксилним групама серина, треонина, тирозина, аспарагинске киселине, глутаминске киселине и хистидина. Регулише биолошку активност различитих полипептидних хормона и катализована је ензимом протеин киназа. Обрнуту реакцију, дефосфорилацију (уклањање фосфатне групе), катализује други скуп ензима - фосфатазе.
- Фосфорилација протеина је реверзибилан догађај, који зависи од активности киназа и фосфатаза. Због своје реверзибилне природе, фосфорилација је најчешћи облик модификације протеина и учествује у већини путева трансдукције сигнала у ћелијама (нпр. метаболизам, раст и диференцијација ћелија, апоптоза, ћелијска комуникација).
- Многи протеини могу бити фосфорилисани на више различитих места, тако да је образац фосфорилације одређених протеина комплексан.

Ацетилација

- Ацетилација је процес котранслационе или посттранслационе модификације протеина у којој се ацетил група (пореклом из ацетил-СоА) везује за протеин преко α -амино групе на N-терминусу протеина или преко аминок групе у бочном низу лизина, у присуству ензима ацетилтрансфераза.
- Чак 80-90% протеина се већ за време транслације (котранслационо) ацетиљује, док се остали ацетиљују посттранслационо.
- Најзначајнија је ацетилација лизина у хистонима јер утиче на регулацију експресије еукариотских гена. Поред хистона постоји читав низ протеина који могу да се ацетиљују. Ацетилација на N-терминусу се сматра иреверзибилном, док је ацетилација на аминок групи бочног низа лизина реверзибилна и прецизно је регулисана ензимима лизин деацетилазе.

Ацетилација

- Улога ацетилације је вишеструка:
 - терминална N-ацетилација протеина значајна је за њихову интеракцију са ћелијским органелама (нпр. протеин Arl3 је повезан са Голџијевим апаратом, и уколико овом протеину изостане N-терминална ацетилација овај протеин неће моћи да се веже са Голџијев апарат и испољи своју функцију) или пак регулацију секреције појединих протеина (ацетилација је неким протеинима неопходна јер им омогућава да се задрже у цитосолу, тј. инхибира секреторне путеве).
 - ацетилација такође спречава друге посттранслационе модификације протеина на N-терминусу и омогућава одређене протеин-протеин интеракције, што доприноси олакшавању савијања протеина.

Ацилација (масна ацилација, пренилација)

- Масна ацилација представља увођење липидних група у структуру протеина преко остатака цистеина. Многи мембрански протеини садрже липидне групе везане ковалентном везом, које хидрофобно реагују са липидима у мембрани. Палмитоил-групе (C16) често су везане за протеине плазма мембране (палмитоилација), а миристоил-група (C14) често је везана за протеине у липидним мембранама интрацелуларних везикула (миристоилација).
- Пренилација подразумева додавање фарензил (C15) или геранилгеранил група (C20), које су синтетисане из јединица изопрена са 5 угљеникових атома. Они су везани тиоетарским везама за специфичне остатке цистеина у појединим мембранским протеинима, а посебно у протеинима који учествују у регулаторним процесима.

ADP-рибозилација

- ADP-рибозилација регулише биолошку активност различитих протеина и подразумева пренос ADP-рибозе посредством моно-ADP-рибозилтрансферазе са NAD^+ на бочне остатке аминокиселина аргинин, глутамин и цистеин на циљном протеину у мембрани (углавном у леукоцитима, скелетним мишићима и тестисима).

АНАЛИЗА ФИНАЛНОГ ПРОИЗВОДА

Анализа производа

- Фармацеутски производи подлежу ригорозним контролама квалитета како би се утврдило да ли њихове особине одговарају претходно дефинисаним спецификацијама. Међутим, аналитички тестови за биофармацеутике су обимнији и комплекснији у односу на тестове који се користе за конвенционалне лекове добијене органским синтезама, јер су структурно сложенији и волуминознији молекули који се производе у биолошким системима, па је и ризик од потенцијалне контаминације већи. Тестови за биофармацеутике подразумевају:
 1. анализу активне супстанце (идентификација и концентрација)
 2. тестирање потентности (ефикасност лека) и
 3. испитивање безбедности (присуство различитих потенцијално контаминирајућих супстанци - нечистоћа).

Анализа активне супстанце

Идентификација активне супстанце

- Тестови за идентификацију активне супстанце имају за циљ да потврде да је изоловани протеин заиста активна супстанца, као и да њена примарна секвенца и у мањој мери, виши нивои структуре, одговарају спецификацији производа. За потврду идентитета производа користе се:
 - аминокиселинска анализа;
 - мапирање пептида;
 - секвенцирање N-терминуса или C-терминуса;
 - спектрофотометријске анализе.

Аминокиселинска анализа

- Аминокиселинска анализа је једноставна техника за карактеризацију пептида или малих полипептида у лабораторијским условима (молекулска маса ≤ 10 kDa). Овом методом се одређује врста и количина аминокиселина које су присутне у производу, а добијени резултати се тумаче поређењем добијених резултата са очекиваним (стандардним) вредностима.
- Протеински производ хидролизује при повишеној температури (110 °C), под вакуумом у присуству 6 mol/L HCl у периоду од 12-24 h. Присутне аминокиселине се раздвајају јоно-измењивачком хроматографијом и идентификују поређењем са стандардима. Реакција са нинхидрином омогућава квантификацију присутних аминокиселина.

Аминокиселинска анализа

- Иако је техника једноставна, аутоматизована и комерцијално доступна, ипак постоје бројни недостаци који ограничавају успешну примену ове методе у анализи:
 - услови потребни за хидролизу могу уништити/изменити одређене аминокиселинске секвенце, нарочито триптофан, али и серин, треонин и тирозин;
 - метод је семиквантитативан;
 - сензитивност је умерена.
- Поменути недостаци, уз доступност алтернативних метода за карактеризацију, ограничавају примену ове технике у анализи производа.

Мапирање пептида

- Код ове методе протеински производ се излаже реагенсима који доводе до хидролизе пептидне везе на специфичним тачкама протеинског скелета, при чему настају серије пептидних фрагмената. Ови фрагменти се међусобно одвајају различитим техникама, као што су једнодимензионална/дводимензионална електрофореза и RP-HPLC (течна хроматографија високих перформанси реверзне фазе).
- Када се овој процедури подвргну стандарди протеинског производа они праве карактеристичну мапу („отиске“) са којом се потом пореде пептидне мапе анализираних узорак сваке серије. Уколико су тако добијени пептиди релативно кратки, онда ће промена у само једној аминокиселинској секвенци променити физичко-хемијске карактеристике пептида и променити његове позиције у пептидној мапи.

Мапирање пептида

- На овај начин се могу детектовати:
 - појединачне или вишеструке супституције аминокиселина;
 - делеције;
 - инсерције;
 - модификације.
- Ова техника је значајна за праћење конзистентности серија производа и може омогућити идентификацију производа.
- Да би се мапирање пептида успешно спровело од суштинског значаја је избор реагенса који омогућавају да настану пептидни фрагменти дужине 7 - 14 аминокиселина. Уколико употребом реагенса настане неколико веома дугих пептида, постојање аминокиселинске аберације је теже утврдити него ако постоји већи број краћих пептидних фрагмената. Такође, настанак великог броја јако кратких пептида може бити контрапродуктивно.

Мапирање пептида

- Најчешће коришћен хемијски реагенс је цијаноген бромид који хидролизује пептидне везе на карбоксилној групи метионина.
- Са друге стране, најчешће коришћени протеолитички реагенси за фрагментацију су V8 протеаза (продукују је поједине стафилококе) и трипсин.
- Познавање аминокиселинске секвенце протеина је предуслов за одабир одговарајућег реагенса за фрагментацију (нпр. аминокиселинска секвенца хуманог хормона раста има 20 потенцијалних места за деловање трипсина), а у одређеним ситуацијама могуће је користити и комбинацију фрагментационих реагенса за добијање пептида оптималне дужине.

Мапирање пептида

- Појава тачкастих мутација у генима који кодирају синтезу протеинског производа представља главни проблем код производње биофармацеутика, јер то директно утиче на примарну структуру, као и на биолошку активност тог протеина. Из тог разлога је јако важно благовремено откривање оваквих алтерација. Једина процедура која гарантује откривање тих алтерација је потпуно секвенцирање узорка сваке серије протеина и у ту сврху користи се мапирање пептида.
- Свака серија произведеног рекомбинантног протеина треба да има идентичне пептидне мапе. Уколико постоји мутација гена мења се примарна структура протеина што за последицу има да бар један фрагмент мења положај на пептидној мапи.

Секвенцирање N-терминуса

- Секвенцирање N-терминуса производа, поготово првих 20-30 аминокиселина, често се користи за контролу квалитета биофармацеутика. Главне предности ове методе су:
 - идентификација протеина;
 - потврда тачности аминокиселинске секвенце, бар N-терминуса;
 - идентификација присуства модификованих форми производа код којих недостаје једна или више аминокиселина са N-терминуса.
- Секвенцирање N-терминуса се спроводи Едмановом деградацијом, која је развијена 50-их година прошлог века. Напредак аналитичких метода олакшава брзу и аутоматизовану детекцију првих 100 аминокиселина са N-терминуса већине протеина и захтева малу количину узорка ($<1 \mu\text{mol}$). Овом методом може се утврдити редослед аминокиселина у полипептиду.

Секвенцирање N-терминуса

- Полипептид се инкубира са фенилизотиоцијанатом, који специфично реагује са аминокиселином на N-терминусу полипептида. Потом се додаје 6 mol/L HCl и притом се ослобађа фенилтиохидантоин-аминокиселински дериват и краћи пептид. Дериват фенилтиохидантоина се изолује, а аминокиселине које улазе у његов састав се идентификују поређењем са стандардним растворима деривата фенилтиохидантоина. Краћи пептид се затим подвргава наредном циклусу секвенцирања N-терминуса и тако се идентификује наредна аминокиселина у полипептидном ланцу (новом N-терминусу). Овај поступак се понавља све док се не утврди целокупна аминокиселинска секвенца пептида.
- С обзиром да Едманова деградација почиње од N-терминуса протеина, ова метода неће функционисати уколико је N-терминус хемијски модификован (нпр. ацетилацијом).

Секвенцирање N-терминуса

- Додатно ограничење је да ако се дође до аминокиселине која нема α -угљеник у низу (нпр. изоаспарагинска киселина), Едманова деградација ће се зауставити. Још један од недостатака ове методе је што Едмановом деградацијом није могуће одредити положаје дисулфидних мостова.
- Секвенцирање С-терминуса подразумева постепено уклањање једне или првих пар аминокиселина са С-терминуса помоћу ензима карбоксипептидазе С. Стопа хидролизе може да варира у зависности од аминокиселина које учествују у формирању везе.
- Употреба метода за секвенцирање С-терминуса, базираних на принципу Едманове процедуре, нису прихваћене за широку употребу због слабих приноса и појаве нежељених реакција, па је неопходно да се развију нове задовољавајуће технике секвенцирања.

Спектрофотометријска анализа

- Спектрофотометријска анализа служи за делимичну анализу секундарне и терцијарне структуре протеина (нарочито циркуларним дихроизмом), док мапирање пептида, секвенцирање N-терминуса и аминокиселинска анализа пружају информације о примарној структури полипептида, али не дају информације о вишим нивоима структуре протеина. Такође, за проучавање виших нивоа протеинске структуре могу се користити и рентгенска кристалографија и NMR спектроскопија, али се због техничког и економског аспекта рутинска примена ових метода избегава.
- Циркуларни дихроизам (CD) је спектрофотометријска метода која се заснива на хиралности молекула. Користи се за проучавање и квантификацију оптички активних центара и њихових интеракција, јер хирални молекули различито апсорбују лево и десно поларизовану светлост. На основу ових спектра могу се предвидети секундарна и терцијарна структура протеина.

Одређивање концентрације протеина

- Квантификација укупне количине протеина у финалном производу је још једна од стандардних анализа која се спроводи у склопу контроле квалитета. За квантификацију протеина користе се:
 - UV метода
 - Удаљена UV метода
 - Биуретска (*Biuret*) метода или Пиотровски (*Piotrowski's*) тест
 - Ловријева (*Lowry*) метода
 - Брадфордова (*Bradford*) метода
 - Метода бицинхонинске киселине (*BCA*)
 - Петерсонова (*Peterson*) метода
 - Метода везивања сребра

UV метода

- UV метода (A280) се заснива на чињеници да бочни ланци одређених аминокиселина (посебно тирозина и триптофана) апсорбују на 280 nm. Ова метода представља најједноставнију методу за одређивање концентрације протеина, а главне предности су што је брза (не захтева инкубацију), једноставна за извођење и не оштећује узорак (нема додавања реагенаса). Међутим, ова техника није довољно сензитивна јер идентичне концентрације различитих протеина имају различите вредности апсорбанце, уколико количина триптофана и тирозина у њима значајно варира. Дакле, UV метода се ретко користи за утврђивање тачне концентрације протеина у финалном производу, али се рутински користи током *downstream* процеса за праћење процеса пречишћавања, тј. за детекцију елуирања протеина из хроматографских колона. Овом методом може се детектовати 20 – 3000 µg протеина.

Удаљена UV метода

- Удаљена UV метода се заснива на чињеници да пептидне везе апсорбују на 190 - 220 nm. Код ове методе мери се апсорбанца присутних пептидних веза, па ће састав протеина у мањој мери утицати на резултат.
- Мерење апсорбанце протеина на нижим таласним дужинама од 205 nm (удаљена UV метода) значајно повећава осетљивост есеја.
- Овом методом може се детектовати 1 – 100 µg протеина.

Биуретска метода

- Биуретска (*Biuret*) метода или Пиотровски (*Piotrowski's*) тест се заснива на особини пептидне везе да у алкалним условима са Cu(II) гради љубичасти комплекс.
- Наиме, азот из пептидне везе при повећању рН вредности се депротонује што му омогућава да се координује са Cu(II) . Код ове методе се у раствор протеина додаје бакар сулфат, при чему се ствара љубичаста боја. Интензитет боје се мери на таласној дужини 550 nm и на основу тога се прорачунава концентрација.
- Ова метода се може користити и за доказивање присуства протеина у раствору, јер уколико су протеини присутни у раствору након додатка Биуретовог реагенса (водени раствор Na,K -тартарата, Cu -сулфата и Na -хидроксида; припрема се *ex tempore* због могућности замућења) раствор се боји у љубичасто или остаје безбојан уколико нису. Овом методом може се детектовати 0,5 – 2,5 mg протеина.

Ловријева метода

- Ловријева (*Lowry*) метода подразумева примену Биуретског и “*Folin–Ciocalteu*” реагенса (комплекс фосфо-волфрам-молибденске киселине). У реакцији са протеинима настаје зелено-плава боја чији је максимум апсорпције у опсегу од 650 до 750 nm. Након додатка комбинације реагенса у раствор протеина, мери се апсорбанца на 750 nm и прорачунава концентрација протеина. Овом методом може се детектовати 2 - 100 µg протеина.

Петерсонова метода

- Петерсонова (*Peterson*) метода подразумева да се у раствор протеина додаје трихлоросирћетна киселина која таложи протеине. Протеински талог се додатком различитих реагенса (дестилована вода, NaOH, SDS (натријум додецил сулфат), СТС (бакар тартарат карбонат), натријум карбонат) раствара, а затим се спроводи претходно описана Ловријева метода одређивања протеина, мери се апсорбанца на 750 nm и прорачунава концентрација протеина. Овом методом може се детектовати око 1 µg протеина.

Бредфордова метода

- Бредфордова (*Bradford*) метода подразумева примену Бредфордовог реагенса који садржи Комази плаво Г-250 боју (катјонски облик, црвено-браон боје) у фосфорној киселини, при чему у реакцији са протеином долази до промене боје у плаво. Ова боја има апсорпциони максимум на 465 nm, али када се јонским интеракцијама веже за протеине, њен апсорпциони пик се повећава на 595 nm, па се квантификација протеина спроводи на овој таласној дужини.
- Метод је сензитиван, једноставан, брз и има мале квантитативне варијације између различитих протеина. Представља једну од најчешће примењиваних метода. Овом методом може се детектовати 0,2-20 µg протеина.

Метода бицинхонинске киселине

- Метода бицинхонинске киселине подразумева да се у раствор протеина додаје реагенс који садржи бакар. У присуству протеина (остатака цистеина, тирозина и триптана) на температури од 37 °C раствор бакра се редукује и реагује са бицинхонинском киселином, стварајући комплекс ружичасте боје чији је максимум апсорпције на 562 nm.
- Поред Бредфордове методе, представља једну од најчешће примењиваних метода. Овом методом може се детектовати 0,2 - 50 µg протеина.

Метода везивања сребра

- Метода везивања сребра се користи за детекцију протеина након гел-електрофорезе. Узимајући у обзир да је ова метода врло сензитивна и једноставна, као и да подразумева употребу приступачне опреме и хемикалија, веома се често користи.
- Наиме, протеини везују јоне сребра, који се под одређеним условима могу редуковати, како би се створило „сребрно огледало” које се даље анализира. Међутим, веома је важно да се вишак јона сребра и друге нечистоће уклоне пре даље обраде резултата.