

# Proizvodnja monoklonalnih protutijela u biljkama

---

**Faraho, Ivan**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2012**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:206947>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-27**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK**

**PROIZVODNJA MONOKLONALNIH PROTUTIJELA U  
BILJKAMA**

**PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN  
PLANTS**

**SEMINARSKI RAD**

Ivan Faraho  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)  
Mentor: doc. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2012.

# SADRŽAJ

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| SADRŽAJ .....                                             | 1  |
| 1. UVOD .....                                             | 2  |
| 2. IMUNOGLOBULINI.....                                    | 3  |
| 3. GLIKOZILACIJA.....                                     | 5  |
| 3.1. Biosinteza i tipovi N-glikana .....                  | 5  |
| 3.2. Modifikacije glikozilacije u biljnim stanicama ..... | 6  |
| 4. BILJNE VRSTE I NAČINI PROIZVODNJE .....                | 8  |
| 4.1 <i>Nicotiana benthamiana</i> .....                    | 8  |
| 4.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                     | 9  |
| 5. TRANSFORMACIJA BILJAKA .....                           | 13 |
| 6. ZAKLJUČAK .....                                        | 15 |
| 7. LITERATURA.....                                        | 16 |
| 8. SAŽETAK.....                                           | 17 |
| 9. SUMMARY .....                                          | 17 |

## 1. UVOD

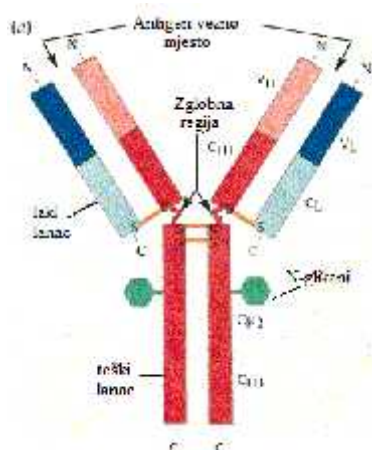
Protutijela su kompleksni glikoproteini koje proizvodi imunološki sustav kralježnjaka, a vrlo specifično prepoznaju i vežu se na antigene. Upravo ovo pojedinačno i specifično vezanje omogućuje protutijelima da se koriste u dijagnostici, prevenciji i liječenju različitih bolesti. Danas se uvelike stvaraju rekombinantna protutijela, koja primjenu pronalaze u dijagnozi raka, te dijagnozi i liječenju infektivnih, autoimunih, kardiovaskularnih, neuroloških, kožnih i dišnih poremećaja, te u prevenciji odbacivanja organa nakon transplantacije (Fischer *i sur.* 2002). Razlikujemo 2 vrste protutijela – monoklonalna, izolirana iz jednoga tipa stanica, te poliklonalna, izolirana iz krvi imunizirane životinje. Iako je tehnologija rekombinantnih protutijela u razvitku, te se broj protutijela konstantno povećava, mogućnosti proizvodnje imaju efekt uskoga grla boce. Upravo iz tog razloga potrebno je potražiti alternativne mogućnosti proizvodnje, što je zainteresiralo znanstvenike. Odgovor su pronašli u biljkama, koje predstavljaju jeftin izvor rekombinantnih protutijela, ali imaju i brojne druge prednosti (Schähs *i sur.* 2007).

Biljke su viši eukarioti i možemo naći mnogo sličnosti između biljnih i animalnih stanica, kao što su sustav endomembrana i sekretorni putevi. Upravo te sličnosti osiguravaju točno smatanje i organizaciju proteina, što je i potvrđeno eksperimentima. Nadalje, kod proizvodnje protutijela izuzetno je bitan proces glikozilacije, koji postoji i u biljnoj stanici, ali je nešto drugačiji, te ga je potrebno modificirati kako bi protutijela bila učinkovita.

Glikozilacija je posttranslacijska modifikacija kojom nastaju glikoproteini, kompleksi u kojima su na proteine kovalentnom vezom vezani ugljikohidrati. Danas je poznato da je to najkompliciranija modifikacija proteina u stanici, jer enzimi koji sudjeluju u glikozilaciji nisu pod kontrolom genoma, već mnogobrojnih faktora u stanici, te se razlikuju među različitim organizmima, ali i različitim tipovima stanica istoga organizma. Najvažniji oblici glikozilacije su N- i O-glikozilacija. U eukariotskim stanicama prevladavaju N-glikozilirani proteini, što znači da je šećerni ostatak povezan s proteinom preko veze amino skupine bazične aminokiseline (arginin, asparagin), koja se još naziva i N-glikozidna veza, za razliku od O-glikozidne veze, koja nastaje vezanjem šećernog ostatka na hidroksilne skupine (aminokiseline s –OH funkcionalnom skupinom, treonin, serin). Najrašireniji oblik veze ugljikohidrat – peptid predstavlja β-glikozidna veza između N-acetilglukozamina (GlcNAc) i aminokiseline asparagina (Asn) (Spiro, 2002).

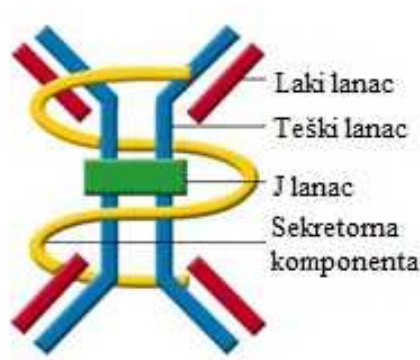
## 2. IMUNOGLOBULINI

Protutijela sisavaca se nazivaju imunoglobulini (Ig), a postoji 5 vrsta (IgG, IgM, IgA, IgD i IgE). Svaki imunoglobulin se sastoji od 2 identična laka lanca i 2 identična teška lanca povezana disulfidnim vezama, pri čemu je laki lanac je građen od 2 domene, dok je teški lanac građen od 4 domene, od kojih su po dvije sa svake strane „zgloba“, što mu omogućuje poprimanje karakterističnoga Y-oblika. Na N-kraju molekule imoglobulina se nalazi paratop (antigen – vezno mjesto), regija koja prepoznaje i specifično veže epitop, koji se nalazi na antigenu (vezanje po principu ključ – brava) (Sl. 1.). Paratop predstavlja i varijabilnu regiju protutijela, s obzirom da je odgovoran za specifično vezanje različitih antigena, za razliku od ostatka lanca, koji predstavlja konstantnu (Fc) regiju, koja se nalazi ispod „zgloba“. Unutar Fc regije se nalazi konzervirani Asn na mjestu 297, na koji se najčešće dodaju N-glikanski lanci.



**Slika 1.** Izgled molekule imunoglobulina IgG s označenim regijama. (preuzeto i prilagođeno iz <http://www.lookfordiagnosis.com>)

Razlikujemo sekretorna i serumska protutijela, ovisno o mjestu gdje se u organizmu nalaze (sekretorna se nalaze u sekretima žlijezda, dok se serumska nalaze u krvnome serumu). Sukladno tome, nalazimo i razlike u njihovim strukturama. Naime, sekretorna protutijela (IgA, Sl. 2.) su imunoglobulinski dimeri, pri čemu su 2 monomera povezana preko tzv. J lanca. Sadrže i dodatni polipeptidni lanac koji se naziva sekretorna komponenta, a njegova uloga je zaštita protutijela od djelovanja proteaza (Fischer *i sur.* 2002).



**Slika 2.** Prikaz dimera IgA s označenim dijelovima strukture. (preuzeto i prilagođeno iz <http://www.invivogen.com>)

Svi se imunoglobulini sastoje pretežito od aminokiselina, a uz njih i od nešto oligosaharida (3-18%), koji ne utječu na specifičnost vezanja antigena, već na biološka svojstva protutijela. U molekuli se ugljikohidrati nalaze kao jednostavni ili složeni postranični lanci, kovalentno vezani za konstantnu regiju teškog lanca (Fc regija), J lanac ili sekretornu komponentu, a iznimno za varijabilnu regiju. Njihov sastav i broj nisu stalni za određeni razred ili podrazred imunoglobulina, jer nisu određeni genima, nego se dodaju protutijelima dok su u Golgijevom aparatu (GA). Ugljikohidratni sadržaj ima određenu ulogu u sekreciji protutijela iz plazma – stanica, kao i u vezanju za površinu različitih stanica (npr. IgE za mastocyte). Također, poluvijek imunoglobulinskih molekula u plazmi ovisi o ugljikohidratnim postraničnim lancima (Andreis *i sur.* 2010).

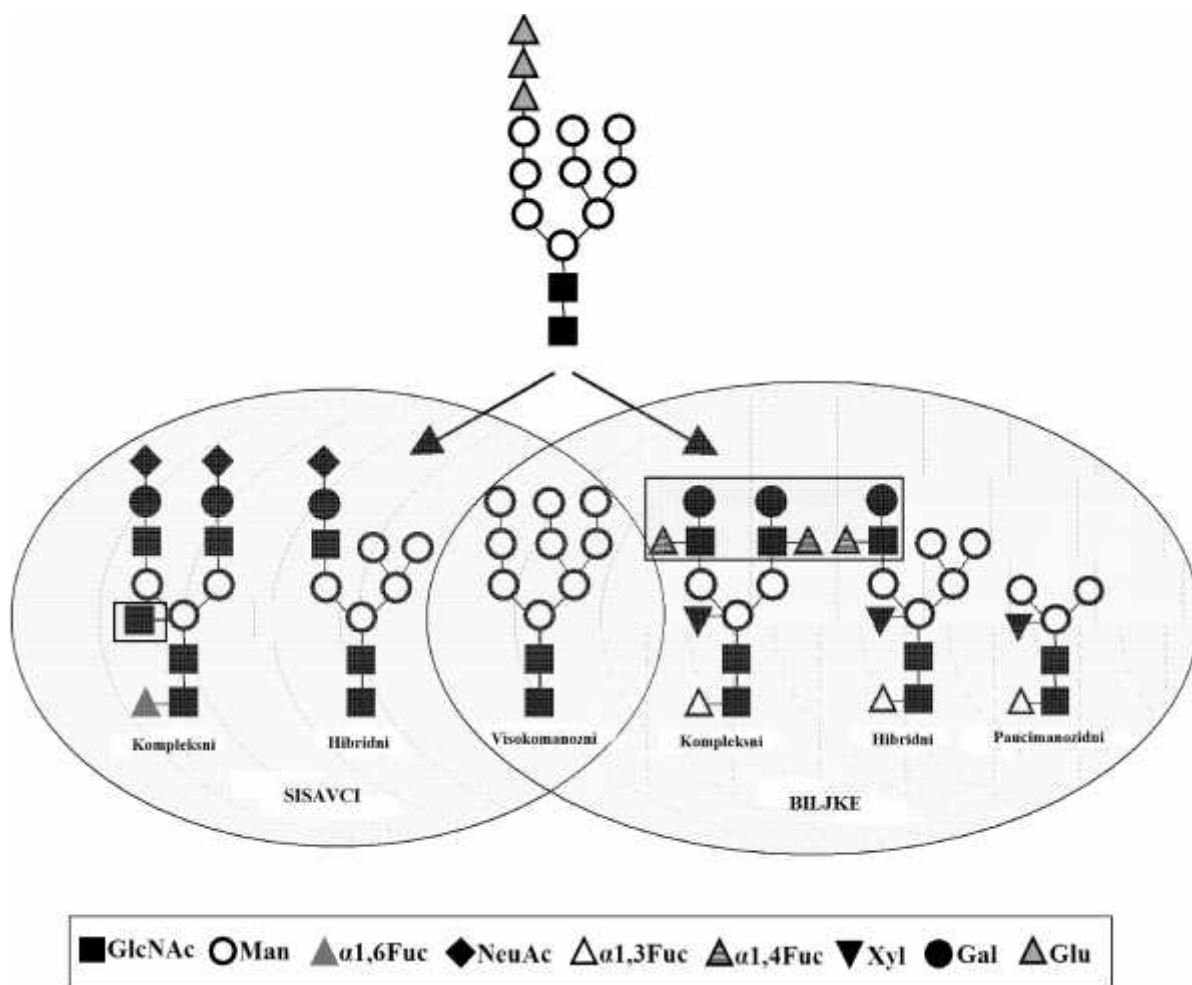
### 3. GLIKOZILACIJA

#### 3.1. Biosinteza i tipovi N-glikana

Biosinteza N-glikana započinje u endoplazmatskome retikulumu (ER) kotranslacijskim prijenosom prekursoranog oligosaharida,  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , iz dolikolnog lipidnog nosača na nascentni polipeptidni lanac. Obrada ovoga oligosaharida u visokomanozni, složeni, hibridni ili paucimanozidni tip N-glikana odvija se tokom sekretornoga puta kada se glikoprotein seli iz ER na konačno odredište u stanici. Tri terminalne glukozne jedinice se uklanjaju s oligosaharidnog prekursora enzimima glukozidaza I i II u ER. ER manozidaza specifično uklanja jednu manoznu jedinicu s prekursora kako bi se dobila struktura  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ . Ovaj dio biosintetičkog puta je identičan u svim eukariotskim stanicama i krajnji rezultat su N-glikani visokomanoznoga tipa, koji se mogu dodatno modificirati u GA (Balen i Krsnik-Rasol, 2007).

N-glikani složenoga tipa se formiraju nakon modifikacija visokomanoznoga tipa N-glikana u GA. Karakterizira ih  $\alpha$ 1,3-fukozni ostatak na proksimalnom  $\text{GlcNAc}$  i/ili  $\beta$ 1,2-ksiloza povezana s  $\beta$ -manoznim ostatkom jezgre oligosaharida. Ovo su specifičnosti biljnih glikoproteina jer animalni i ljudski N-glikani imaju  $\alpha$ 1,6-fukozu vezanu na proksimalni  $\text{GlcNAc}$ , te ne sadrže fukozne jedinice. Hibridni tip N-glikana je rezultat procesiranja  $\alpha$ 1,3-manoznoga ogranka intermedijera  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ , koji daje oligosaharid s  $\alpha$ 1,3-fukozom i/ili  $\beta$ 1,2-ksilozom vezanima na  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ . Paucimanozidni tip N-glikana je specifičan za biljne stanice, te nije detektiran u ljudi i životinja. To su modificirani oligosaharidi koji sadrže samo  $\alpha$ 1,3-fukozu vezanu na proksimalni  $\text{GlcNAc}$  i/ili  $\beta$ 1,2-ksilozu vezanu na  $\beta$ -manozni ostatak netaknute,  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ , ili skraćene jezgre  $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$ . N-glikani ovoga tipa pronađeni su u mnogim biljnim glikoproteinima, te se smatraju tipičnima za biljne vakuole (Balen i Krsnik-Rasol, 2007).

Strukture ovih tipova N-glikana, te njihove sličnosti i razlike prikazane su na slici 3.



**Slika 3.** Usporedba struktura složenih N-glikana u stanicama sisavaca i biljaka. (preuzeto i prilagođeno iz Balen i Krsnik-Rasol, 2007)

### 3.2. Modifikacije glikozilacije u biljnim stanicama

Kako bi se izbjegla biljno-specifična glikozilacija, znanstvenici su razvili nekoliko strategija. Prva mogućnost je bila zadržavanje proteina u ER kako bi glikoproteini zadržali osnovnu strukturu identičnu onoj u animalnoj stanici (visokomanozni N-glikani), no to je rezultiralo nakupljanjem proteina u toj staničnoj tvorbi, kao i bržim raspadom proteina *in vivo* (Schähs *i sur.* 2007).

Druga strategija je temeljena na promjeni puta glikozilacije u domaćinskim biljkama. Temelji se na prekomjernoj ekspresiji ljudske  $\beta$ 1,4-galaktozil-transferaze, koja se natječe za isti supstrat kao i biljne  $\beta$ 1,2-ksilozil-transferaza (XT) i  $\alpha$ 1,3-fukozil-transferaza (FT). Iako kompletna eliminacija tih specifičnih biljnih epitopa nije nikada postignuta, moguće je djelomično produžiti biljne N-glikane s  $\beta$ 1,4-galaktozom, terminalnim ostatkom koji je prisutan u mnogim životinjskim N-glikanima, no koji nedostaje u biljnima. Naime, važnost ovoga ostatka je dvojaka – može utjecati na stabilnost i/ili aktivnost proteina *in vivo*, te je preduvjet za vezanje sijalične kiseline (Schähs *i sur.* 2007). Danas su znanstvenici razvili metode proizvodnje monoklonalnih protutijela u različitim biljnim vrstama, s individualnim metodama prilagođenima za svaku pojedinačno.

## 4. BILJNE VRSTE I NAČINI PROIZVODNJE

### 4.1 *Nicotiana benthamiana*

*N. benthamiana* (Sl. 4.) je uspravna, godišnja biljka nativna u Australiji. Doseže visinu od 0,2 – 1,5 m. Ukoliko se uzgaja u plastenicima, rijetko naraste preko 0,45 m. Listovi su tamno zelene boje i ovalnoga oblika, narastu do maksimalne širine od 10 cm i dužine od 12,7 cm. Cvjeta malim bijelim cvjetovima cijele godine, a najbolje se uzgaja iz sjemena. Ova biljka se koristi u istraživanjima biljnih virusa, te su njezini mehanizmi stoga dobro izučeni ([www.plantoftheweek.org](http://www.plantoftheweek.org)).



**Slika 4.** *Nicotiana benthamiana* (preuzeto s [www.plantoftheweek.org](http://www.plantoftheweek.org))

Divlji tip ove biljke ima mehanizam glikozilacije kao i druge biljne vrste, što podrazumijeva ugradnju ksiloze i fukoze u lance N-glikana. Kako je potrebno postići uzorak glikozilacije kao u sisavaca, stvoreni su transgenični sojevi *N. benthamiana* u kojima su FT i XT inaktivirane pomoću molekula RNAi, te takve biljke (tzv. „knock-out“ sojevi (Whaley i sur. 2011) ) proizvode N-glikane koji su u osnovi identični onima iz sisavaca. Također, glikoproteini sintetizirani u biljkama na ovaj način su mnogo homogeniji nego oni iz kultura stanica sisavaca, te je pokazano da uklanjanje fukoze iz jezgre N-glikana dramatično povećava staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelu, koja je važna u lijekovima protiv raka. Razvijen je i „knock-in“ mehanizam (Whaley i sur. 2011), koji stvara protutijela s galaktoziliranim i sijaliziranim N-glikanima.

Monoklonalna protutijela proizvedena u *N. benthamiani* su većinom vrlo specifična, a njihovim međusobnim kombiniranjem mogu se napraviti mikrobicidi, koji bi bili učinkoviti protiv patogena uzročnika spolnih bolesti, te mogu imati i kontracepcijsku ulogu. Pojavila se mogućnost razvijanja protutijela koja bi bila učinkovita protiv virusa HIV-a, te je dosada stopa učinkovitosti takvih protutijela uvelike iznad onih proizvedenih u stanicama sisavaca. Nadalje, u ovim biljkama razvijena su i protutijela koja bi bila učinkovita protiv stanica raka, kao i u liječenju upalnih i zaraznih bolesti, ali i potencijalni lijek za Alzheimerovu bolest (Whaley i sur. 2011).

## 4.2 *Arabidopsis thaliana*

*A. thaliana* (Sl. 5.) je 20-25 cm visoka cvjetnica nativna u Europi, Aziji i sjeverozapadnoj Africi. Ima brzi životni ciklus (6 tjedana), te daje velik broj potomaka. S jednim od najmanjih genoma u biljnome svijetu i samo 5 kromosoma, njegov genom je sekvenciran još 2000. godine, te je uvelike važan kao modelni organizam u genetici, ali i molekularnoj biologiji ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)).

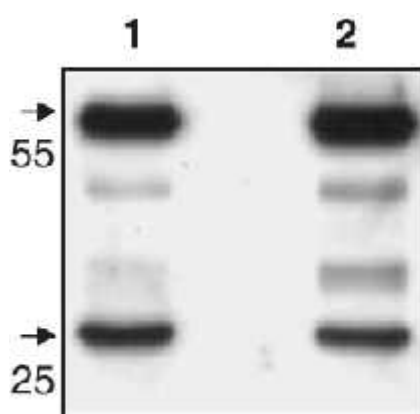


**Slika 5.** *Arabidopsis thaliana* (preuzeto s [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org))

Za proizvodnju monoklonalnih protutijela u biljci *A. thaliana* korištena je metoda „*knock-out*“, odnosno stvoreni su transgenični sojevi u kojima su inaktivirani enzimi XT i FT, odgovorni za transfer  $\beta$ 1,2-ksiloze i  $\alpha$ 1,3-fukoze. Ovi sojevi dakle proizvode humanizirane strukture, s terminalnim GlcNAc, a biljke su vijabilne, te ne pokazuju očite fenotipske promjene pri standardnim uvjetima rasta. Za eksperimentalno određivanje uspješnosti proizvodnje uspoređeni su divlji tip i transgenični soj, a protutijelo koje se uspoređivalo je IgG1, koji ima ulogu protiv virusa HIV-a (Schähs *i sur.* 2007).

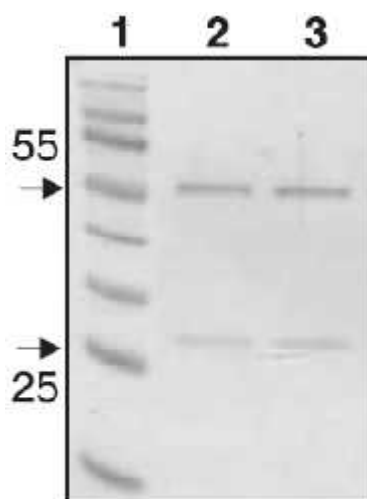
Metode korištene u eksperimentu su bile najčešće laboratorijske metode prilikom analize proteina. Prva je elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutstvo natrijevog dodecil-sulfata (SDS-PAGE), prilikom koje dolazi do razdvajanja proteina na gelu u ovisnosti samo o njihovoj masi (SDS ima ulogu detergenta, što znači da on okružuje proteine, daje svima negativan naboj, te ih denaturira i na taj način masa proteina postaje jedini kriterij njihova razdvajanja na gelu). Druga metoda je prijenos proteina na membranu (*western blotting*), što uključuje i detekciju proteina na membrani specifičnim protutijelima, a to nam daje uvid u posttranslacijske dorade proteina, ovisno o korištenom protutijelu za detekciju.

Prvi korak u analizi protutijela bila je analiza *western blotting*. Proteini su bili izolirani iz listova biljke, razdvojeni su metodom SDS-PAGE, te su preneseni s gela na membranu i detektirani protutijelima, u ovom slučaju su to bila protutijela na teške i lake lance imunoglobulina. U rezultatima je vidljiva ekspresija oba lanca (mase 25 i 55 kDa) i u divljem i u transgeničnome soju (Sl. 6.).



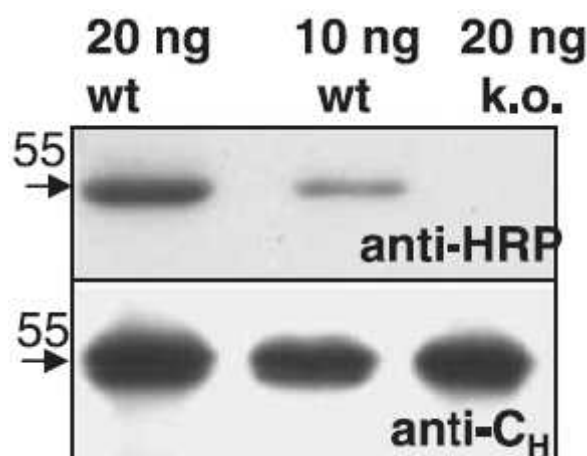
**Slika 6.** Rezultati analize *western blotting* (1 – divlji tip; 2 – transgenični soj). (Preuzeto i prilagođeno iz Schähs *i sur.* 2007)

Nadalje, proteini su pročišćeni afinitetnom kromatografijom, te je provedena SDS–PAGE, nakon koje su na gelu detektirane 2 proteinske vrpce specifičnih lanaca, čime je dokazano da se uistinu radi o tim protutijelima, te nisu vidljivi produkti degradacije lanaca u biljnim stanicama (Sl. 7.).



**Slika 7.** Rezultati analize SDS-PAGE (1 – biljeg molekulskih masa; 2 – divlji tip; 3 – transgenični soj). (Preuzeto i prilagođeno iz Schähs *i sur.* 2007)

Slijedeći korak je bila detekcija epitopa protutijela, i to ponovno metodom *western blotting*, no u ovome slučaju protutijela za detekciju su bila anti-HRP (*anti-horseradish peroxidase*), koja prepoznaju ksilozne i fukozne ostatke, te anti-C<sub>H</sub>, koja prepoznaju teške lance imunoglobulina. Rezultati su pokazali da se teški lanci nalaze u svim uzorcima, dok anti-HRP nije detektirao rezultate u imunoglobulinima transgeničnih biljki, što ukazuje na odsustvo imunogeničnih glikanskih epitopa (Sl. 8.).

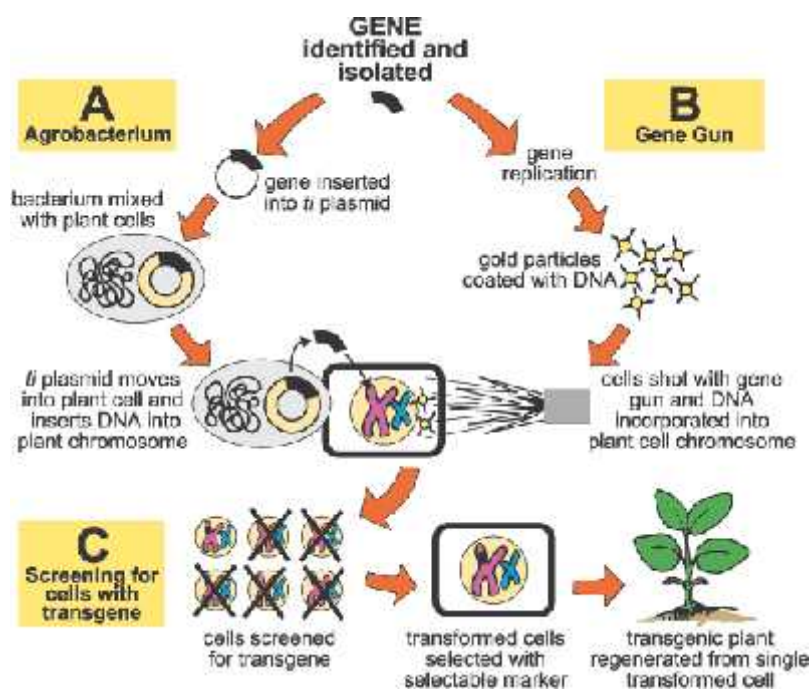


**Slika 6.** Rezultati analize *western blotting* (wt – divlji tip; k.o. – transgenični soj). (Preuzeto i prilagođeno iz Schähs *i sur.* 2007)

Kako bi se ustanovila mogućnost vezanja protutijela, provedena je metoda ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), gdje se uspoređivala vezna sposobnost protutijela iz kulture stanica sisavaca i transgeničnog soja *A. thaliana*, te je pokazano da protutijela iz biljke imaju veznu sposobnost 100%, što demonstrira nenadmašnu antigen-vezujuću specifičnost. Za utvrđivanje točnog sastava N-glikana imunoglobulina iz transgeničnoga soja korištene su metode masene spektrometrije nakon prethodne obrade proteina tripsinom, te su analizirani novonastali glikopeptidi (tripsin cijepa proteinski dio glikopeptida, te su nastala 2 manja glikopeptida digestijom teškoga lanca imunoglobulina). Rezultati su pokazali da je moguće u biljci proizvesti monoklono protutijelo s humaniziranim N-glikanskim uzorkom, u kojemu neće biti biljno-speifičnih epitopa, kao ni  $\alpha$ 1,6-fukoze (Schähs *i sur.* 2007).

## 5. TRANSFORMACIJA BILJAKA

Većina protutijela proizvedenih u biljkama ekspimirana je upravo u transgeničnim biljkama, što zahtjeva stabilnu transformaciju biljke, bilo upotrebom bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, bilo bombardiranjem česticama (metoda *Ballistic*) (Sl. 7.), ovisno o biljnoj vrsti (za dvosupnice je bolja metoda zarazom *A. tumefaciens*, dok je za jednosupnice bolja metoda *Ballistic*). Konačni rezultat je jednak, a podrazumijeva integraciju transgena protutijela u genom biljke, što rezultira stabilnom ekspresijom u transgeničnoj liniji. Iako je proces transformacije brz, potrebno je i do nekoliko mjeseci kako bi se uzgojile transgenične biljke, te je ukupno potrebno oko 2 godine kako bi proizvodnja produkata iz takvih biljaka postala rutinska (Fischer *i sur.* 2002).



**Slika 7.** Usporedba transformacije biljke dvjema metodama (A – zaraza bakterijom *A. tumefaciens*, B – metoda *Ballistic*, C – pretraživanje stanica i selekcija željenih mutanata). (preuzeto iz <http://www.ag.ndsu.edu>).

Slika 7. prikazuje usporedbu dvije navedene metode transformacije. Prvi korak u transformaciji bakterijom *A. tumefaciens* je umetanje željenog gena u tzv. Ti plazmid, koji se zatim unosi u bakterije, koje se miješaju s biljnim stanicama. Prilikom zaraze dolazi do unosa Ti plazmida unutar biljne stanice i umetanja željenoga gena u biljni genom. Ako pak

koristimo metodu *Ballistic*, potrebno je replicirati željeni gen, koji se zatim prenese na čestice zlata, te se bombardiranjem biljnih stanica tim česticama geni unose u biljni genom. Slijedeći korak je zajednički objema metodama, a sastoji se od pretraživanja (selekcije) stanica mutanata i odabira željenoga, te uzgoja transgenične biljke iz istoga.

Metoda transformacije u kojoj se koristi *A. tumefaciens* uglavnom služi za prijenos stranih gena u genom biljke u jezgri stanice, gdje se geni za proizvodnju lakih i teških lanaca koekspimiraju i stvaraju monoklonalno protutijelo u punoj veličini. Ukoliko primjenjujemo metodu *Ballistic*, moguć je unos stranih gena u jezgru stanice, ali i u genom plastida, ovisno o građi vektora. Plastidi, primjerice kloroplasti, imaju prednost u tome što mogu procesirati strane proteine s disulfidnim mostovima, što je funkcija potrebna za pravilno smatanje proteina. No, transgenični sustav temeljen na kloroplastima ne može proizvoditi čitava monoklonalna protutijela jer u kloroplastu ne postoji sustav glikozilacije, te takva protutijela nisu u potpunosti funkcionalna.

Razvijena je i alternativna metoda za testiranje potencijala biljke, a nazvana je agroinfiltracija. Tom metodom strani gen se unosi putem biljnog virusa kao vektora, te se u vrlo kratkom vremenu pokaže potencijal biljke za stvaranje potpunih oblika monoklonalnih protutijela prije same transformacije. Ovaj sustav je potencijalno učinkovitiji nego uspostava transgeničnih linija jer virusne infekcije su brže i sistematičnije, te rezultiraju velikim prinosima virusnih produkata, ali i produkata unesenih virusima. S druge strane, poznato je da replikaciju biljnih virusa prati visoka stopa mutacija i delecija, te je moguć gubitak gena od interesa (Ko i Koprowski, 2005).

## 6. ZAKLJUČAK

Razvojem molekularne biologije i genetičkog inženjerstva znanstvenici su uvidjeli kako biljke predstavljaju novi izvor rekombinantnih proteina. Građa njihovih stanica, uvelike nalik stanicama viših kralježnjaka, te njihova sposobnost umnažanja i brze reprodukcije čini ih idealnim organizmima za ovakve eksperimente. Ako uzmemo u obzir i mnogobrojne načine transformacije biljaka, te prinose proteina koje možemo dobiti, postaje očito kako su biljke budućnost genetičkog inženjeringa.

U nekoliko proteklih desetljeća vođena su istraživanja mnogih bolesti kod ljudi, od infektivnih pa sve do nasljednih, te su otkriveni uzroci i potencijalni lijekovi tih bolesti. Jačanjem farmaceutske industrije i kombiniranjem sa znanjima proizašlima iz istraživanjima na biljkama utvrđeno je kako je moguća proizvodnja generičkih lijekova u biljkama, te čak i protutijela. Naravno, postoje razlike u posttranslacijskoj doradi tih proteina, no pravilnom transformacijom i izmjenom metaboličkih puteva u biljnoj stanici uspješno su eksprimirana i izolirana monoklonalna protutijela koja imaju jednaka svojstva kao ona izolirana iz živoga organizma, te čak i bolja od onih izoliranih iz kultura animalnih stanica.

Uzevši u obzir sve navedene činjenice, može se zaključiti da istraživanja na ovome području nisu ni približno gotova, jer postoje mnogobrojne pogodnosti koje biljke još nude i mnoga još neistražena područja koja bi mogla pridonijeti boljitku samoga čovječanstva. Nadalje, u 21. stoljeću postoji puno zemalja niskoga standarda, kako ekonomskoga, tako i zdravstvenoga. Zasada proizvodnja protutijela u biljkama pokazuje izrazitu ekonomičnost, te se može pretpostaviti da masovna proizvodnja neće donijeti dobro samo ekonomski snažnim zemljama, nego bi ovakvi lijekovi bili pristupačni svima, te se potencijalno mnoge bolesti mogu iskorijeniti na ovaj način.

## 7. LITERATURA

Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović – Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D, 2010. Imunologija. Medicinska naklada – Zagreb, str. 60 – 66.

Balen B, Krsnik-Rasol M, 2007. N-Glycosylation of Recombinant Therapeutic Glycoproteins in Plant Systems. *Food Technol. Biotechnol.* **45**, 1-10.

Fischer R, Twyman R, Schillberg S, 2002. Production of antibodies in plants and their use for global health. *Vaccine* **21**, 820-825.

Ko K, Koprowski H, 2005. Plant biopharming of monoclonal antibodies. *Virus Research* **111**, 93-100.

Schähs M, Strasser R, Stadlmann J, Kunert R, Rademacher T, Steinkellner H, 2007. Production of a monoclonal antibody in plants with a humanized N-glycosylation pattern. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 657-663.

Spiro R, 2002. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**, 43-56.

Whaley K, Hiatt A, Zeitlin L, 2011. Emerging antibody products and Nicotiana manufacturing. *Human Vaccines* **7**, 349-356.

<http://www.ag.ndsu.edu/>

<http://www.bio.davidson.edu/>

<http://www.invivogen.com/>

<http://www.lookfordiagnosis.com/>

<http://www.plantoftheweek.org/>

## 8. SAŽETAK

Monoklonalna protutijela su protutijela izolirana iz samo jednog tipa stanica. Do nedavno su se izolirala samo iz animalnih stanica, no uočeno je da se kao izvor rekombinantnih protutijela mogu koristiti i biljke, no potrebno im je izmijeniti glikozilacijski put na način da se prilagodi onome u animalnim stanicama.

Usporedbom proizvodnje protutijela u biljnim i animalnim stanicama znanstvenici su došli do zaključka da protutijela proizvedena u biljkama pokazuju pravilnu strukturu, te čak i bolju sposobnost vezanja antigena. Također, biljke su prepoznate i kao ekonomičniji izvor rekombinantnih protutijela, uzevši u obzir brzinu i cijenu proizvodnje.

## 9. SUMMARY

Monoclonal antibodies are antibodies which can be isolated from one cell type. Until recently they were isolated only from animal cell cultures, but it has been discovered that plants as well can be used as a source of recombinant antibodies, but it is necessary to change glycosylation patterns in order to be mammalian-like.

Comparing plant- and animal-derived antibodies scientists have concluded that antibodies produced in plants show right structure, and have even better antigen-binding specificity. Furthermore, plants have been recognized as a more economical source of recombinant antibodies, considering speed and cost of production.