

# Upotreba biljnih stanica za proizvodnju terapeutskih glikoproteina

---

**Begović, Erin**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*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:217:634196>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-28**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Erin Begović

**Upotreba biljnih stanica za proizvodnju  
terapeutskih glikoproteina**

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Erin Begović

**Plant cell based production of therapeutic  
glycoproteins**

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu Sveučilišnog prijediplomskog studija Molekularne biologije na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof.dr.sc. Biljane Balen.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

## Upotreba biljnih stanica za proizvodnju terapijskih glikoproteina

Erin Begović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mnogi terapeutici kao što su cjepiva, antitijela i rekombinantni proteini po sastavu su glikoproteini. Biljne stanice sve se češće koriste za proizvodnju rekombinantnih terapijskih glikoproteina jer nude određene prednosti pred animalnim i prokariotskim stanicama. Glavno svojstvo koje im omogućuje sintezu glikoproteinskih terapeutika je sposobnost N- i O-glikozilacije. Ipak, korištenje biljnih stanica u te svrhe ima i svojih nedostataka. Glikoproteini proizvedeni u biljnim stanicama mogu sadržavati karakteristične biljne epitope koji u ljudskom organizmu mogu dovesti do alergije, a postoji i problem brzog klirensa glikoproteinskog terapeutika iz ljudskog seruma, čime se smanjuje njegova učinkovitost. Ovi izazovi nadilaze se raznim tehnikama kao što su inaktivacija i/ili ubacivanje specifičnih gena u biljne stanice.

Ključne riječi: N-glikozilacija, O-glikozilacija, glikoinženjering, epitop, utišavanje gena, ubacivanje gena

(21 stranica, 3 slike, 41 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof.dr.sc. Biljana Balen

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

# Plant cell based production of therapeutic glycoproteins

Erin Begović

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Many therapeutics such as vaccines, antibodies, and recombinant proteins are glycoproteins. The use of plant cells for the production of recombinant therapeutic glycoproteins is constantly increasing due to certain advantages of plant cells over animal and prokaryotic cells. The main property that enables them to synthesize glycoprotein therapeutics is their ability to perform N- and O-glycosylation. However, using plant cells for these purposes also has its disadvantages. Glycoproteins produced in plant cells can contain characteristic plant epitopes that can cause allergic reactions in the human body. There is also a problem of the rapid clearance of the glycoprotein therapeutics from human serum, which reduces its effectiveness. These challenges are overcome through various techniques such as inactivation and/or insertion of specific genes into plant cells.

Keywords: N-glycosylation, O-glycosylation, glycoengineering, epitope, gene silencing, gene knockout, gene knockin

(21 pages, 3 figures, 41 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Biljana Balen, PhD

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Biljke kao ekspresijski sustav za proizvodnju glikoproteinskih terapeutika .....	2
3. N-glikozilacija.....	3
4. Rekombinantni terapeutski N-glikoproteini .....	5
5. Ograničenja proizvodnje rekombinantnih terapeutskih N-glikoproteina u biljnim stanicama	6
5.1. Targetiranje u ER.....	7
5.2. Inaktivacija gena .....	8
5.2.1. Homologna rekombinacija.....	9
5.2.2. RNA interferencija (RNAi).....	9
5.2.3. Sustav CRISPR/Cas9 .....	10
5.3. Ubacivanje gena.....	11
6. O-glikozilacija.....	12
7. Rekombinantni terapeutski O-glikoproteini .....	14
8. Zaključak.....	16
9. Literatura.....	17
10. Životopis .....	21

## 1. Uvod

Posttranslacijske i kotranslacijske modifikacije podrazumijevaju doradu specifičnih aminokiselina koje izgrađuju proteine. Posttranslacijska modifikacija odnosi se na doradu već sintetiziranog proteina, dok se kod kotranslacijske modifikacije protein doraduje tijekom njegove sinteze na ribosomu. Kovalentnim vezanjem modificirajućih skupina na bočni ogranak aminokiselina mijenja se struktura proteina, što utječe na njegovu stabilnost, bioaktivnost, topivost i ostala biokemijska svojstva. Modifikacije uključuju glikozilaciju, acetilaciju, fosforilaciju, metilaciju i slične dorade proteina koje mu omogućuju pravilnu strukturu i funkciju (Ramazi i Zahiri, 2021).

Glikozilacija je jedna od temeljnih vrsta kotranslacijskih i posttranslacijskih modifikacija proteina u domeni eukariota. Ovisno o načinu vezanja saharida na protein, glikozilacija se može podijeliti na N- i O-glikozilaciju. Kod N-glikozilacije dolazi do kovalentnog vezanja oligosaharida na dušikov atom bočnog ogranaka asparagina u slijedu aminokiselina asparagin-X-serin/treonin (Asn-X-Ser/Thr), pri čemu X predstavlja bilo koju aminokiselina osim prolina. O-glikozilacija karakteristična je po vezanju pojedinačnih saharida na aminokiseline koje sadrže hidroksilne (OH) skupine, kao što su prolin (Pro), treonin (Thr), hidroksiprolin (Hyp) i hidroksilizin (Hyl) (Gomord i sur., 2010).

Mnoga cjepiva, antitijela i rekombinantni terapijski proteini po sastavu su glikoproteini. Za proizvodnju ovih terapeutika često se koriste živi ekspresijski sustavi, a istraživanja su sve više usmjerena na korištenje biljnih stanica za proizvodnju glikoproteinskih terapeutika. Zbog mogućnosti glikozilacije, otpornosti na animalne patogene, relativno velikog prinosa i niske cijene, biljne stanice imaju prednost pred prokariotskim i animalnim stanicama. Ipak, postoje određena ograničenja biljnih stanica koja je potrebno nadvladati za uspješnu proizvodnju glikoproteinskih terapeutika (Lee i sur., 2023).

Cilj ovog rada je napraviti pregled ograničenja proizvodnje terapijskih N- i O-glikoproteina u biljnim stanicama, zajedno s rješenjima navedenih izazova.



## **2. Biljke kao ekspresijski sustav za proizvodnju glikoproteinskih terapeutika**

U posljednjem desetljeću veliki udio farmaceutske biotehnologije usmjeren je na korištenje biljnih stanica za proizvodnju cjepiva, antitijela i rekombinantnih terapeutskih glikoproteina, čija je svrha sprječavanje zaraze, liječenje bolesti ili ublažavanje njihovih simptoma. Za razliku od terapeutika proizvedenih kemijskom sintezom, većina terapeutika proizvedenih u živim sustavima ima visoko kompleksnu strukturu dobivenu posttranslacijskom modifikacijom kao što je N-glikozilacija (Dammen-Brower i sur., 2022).

Prokariotske stanične linije koriste se za proizvodnju proteina relativno jednostavne strukture koji ne zahtijevaju posttranslacijske modifikacije. Prokariotski sustavi brzo se dijele i daju visok prihod u kratkom razdoblju, no nisu često korišteni zbog nemogućnosti posttranslacijskih modifikacija te prisutnosti bakterijskih endotoksina. S druge strane, eukariotske animalne stanične linije sposobne su proizvoditi modificirane glikozilirane proteine, no kod njih postoji problem visoke cijene i niske stope proizvodnje. Također, ovi sustavi podložni su kontaminaciji animalnim patogenima, stoga se proizvodnja sve više usmjerava na biljne kulture. Biljni sustavi su jednostavniji i jeftiniji od animalnih, rješavaju problem zagađenosti kultura animalnim patogenima te za razliku od prokariota, imaju mogućnost glikozilacije (Lee i sur., 2023).

Za proizvodnju terapeutika jedna od najčešće korištenih biljnih vrsta je *Nicotiana benthamiana*. Široka uporaba ove biljke rezultat je njezina brza rasta, kratkog životnog ciklusa, velikog prinosa biomase te dobro poznatog sekvenciranog genoma. Postoje i drugi ekspresijski sistemi kao što su mrkva (*Daucus carota*), duhan (*Nicotiana tabacum*) i mahovina (*Physcomitrella patens*), a koriste se zbog jednostavnog uzgoja, lagane ekstrakcije produkata te poznatog genoma kojim je lako manipulirati (Lee i sur., 2023).

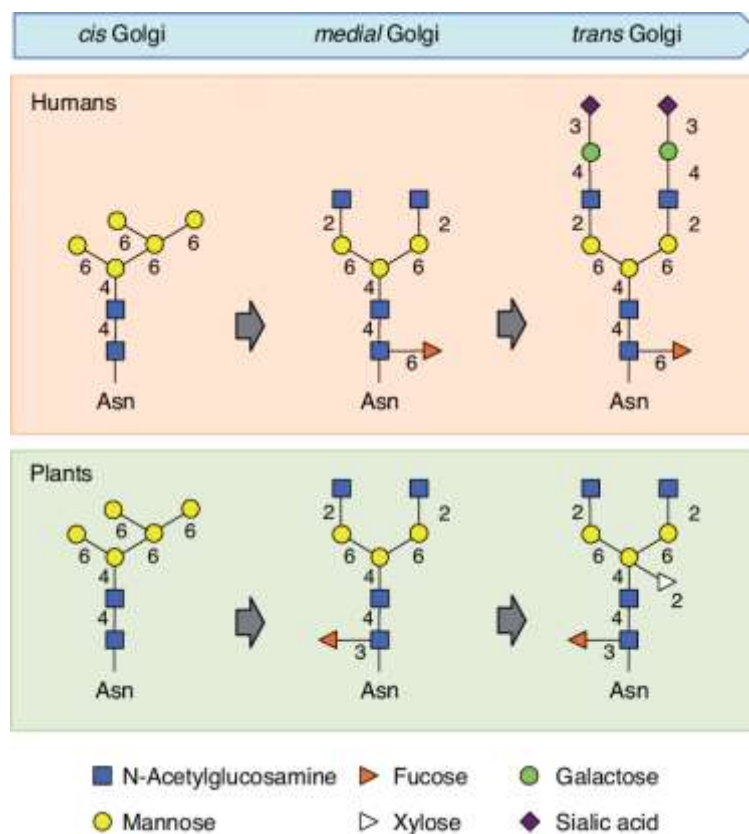
### 3. N-glikozilacija

N-glikozilacija je kotranslacijska i posttranslacijska modifikacija prilikom koje dolazi do kovalentnog vezanja oligosaharida na dušikov atom bočnog ogranaka aminokiseline Asn u slijedu aminokiselina Asn-X-Ser/Thr, pri čemu X predstavlja bilo koju aminokiselina osim prolina. Saharid koji je direktno vezan na aminokiselinu Asn je N-acetilglukozamin (GlcNAc). Početni koraci N-glikozilacije, koji se odvijaju u endoplazmatskom retikulumu (ER), visoko su konzervirani u biljkama, gljivama i životinjama, dok se završna faza dorade u Golgijevom aparatu (GA) značajno razlikuje kod biljaka i životinja (Strasser, 2016).

Proces modifikacije započinje na membrani ER sintezom oligosahardinog prekursora. Na lipidni nosač dolikol-fosfat veže se prekursor, oligosaharid slijeda  $\text{Glu}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  (Glu – glukoza, Man – manoz, GlcNAc – N-acetilglukozamin). Polipeptid koji će biti kotranslacijski N-glikoziliran signalnim slijedom prepoznaje transmembranski kanal translokon koji mu omogućuje kotranslaciju u ER. Dolazi do prepoznavanja oligosaharidnog prekursora i specifičnog aminokiselinskog slijeda te nastaje amidna veza između monosaharida GlcNAc i aminokiseline Asn. Daljnja dorada podrazumijeva uklanjanje tri molekule Glu s oligosaharida nakon čega nastaje struktura slijeda  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  vezana na aminokiselinu Asn. Za ispravnu funkciju proteina ključna je njegova konformacija dobivena smatanjem do 3D strukture. Zato se glikoprotein, nakon uklanjanja dvije molekule Glu, veže na kalneksin koji mu omogućuje smatanje te odlazak do transportne vezikule. Ukoliko dođe do neispravnog smatanja, enzim UDP-glukoziltransferaza prepoznaje hidrofobne ogranke proteina te dodaje molekulu Glu na glikoprotein, čime mu daje novu priliku za ispravno smatanje. Ispravno smotan protein transportnom vezikulom odlazi do cis cisterne GA (Cooper, 2019).

U cis cisternama GA, enzim  $\alpha$  manozidaza I (MANI) uklanja najčešće četiri molekule Man tvoreći  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ . Enzim N-acetilglukozamintransferaza I (GNTI) dodaje molekulu GlcNAc na Man ostatak, čime nastaje struktura  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  koja je u medijalnim i trans cisternama obrađena  $\alpha$  manozidazom II (MANII) i N-acetilglukozamin transferazom II (GNTII) (Gomord i sur., 2010). Do nastanka intermedijera  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (GnGn), koraci kod biljaka i životinja vrlo su slični. Kod životinja struktura GnGn služi kao ishodište za daljnju modifikaciju i elongaciju N-glikana pružajući veliku strukturnu raznolikost. Kod biljaka najčešće dolazi do specifične modifikacije intermedijera GnGn djelovanjem enzima  $\alpha$ 1,3 fukoziltransferaze ( $\alpha$ 1,3 FucT) i  $\beta$ 1,2 ksiloziltransferaze ( $\beta$ 1,2 XylT). Ljudski N-glikani ne sadrže molekule ksiloze (Xyl), dok je fukoza (Fuc) prisutna u  $\alpha$ 1,6 vezama, za razliku od  $\alpha$ 1,3 vezane molekule Fuc u biljkama (Castilho i sur., 2013). Nadalje, djelovanjem enzima  $\beta$ 1,3

galaktoziltransferaza ( $\beta$ 1,3 GalT) i  $\alpha$ 1,4 fukoziltransferaza ( $\alpha$ 1,4 FucT) nastaje Lewisov epitop ( $Le^a$ , Gal $\beta$ 1,3(Fuc $\alpha$ 1,4)GlcNAc), evolucijski očuvana struktura uključena u adheziju i prepoznavanje stanica. Osim prisutnosti  $\alpha$ 1,3 Fuc i  $\beta$ 1,2 Xyl, između animalnih i biljnih N-glikana postoji razlika u prisutnosti terminalne sijalinske kiseline (Neu5Ac). U animalnim stanicama enzim  $\beta$ 1,4 galaktozidaza ( $\beta$ 1,4 GalT) dodaje ogranke galaktoze (Gal) na N-glikane koji mogu biti supstrat za vezanje terminalne molekule Neu5Ac. Molekula Neu5Ac je „molekularni sat“ koji ima važnu ulogu u određivanju poluživota proteina, ali također utječe i na apsorpciju, klirens te kemijska svojstva glikoproteina. Za razliku od animalnih, biljne stanice nemaju gene za sintezu, aktivaciju i prijenos molekule Neu5Ac (Gomor i sur., 2010).



**Slika 1.** Prikaz strukture N-glikana doradenih u GA u ljudskim (gore) i biljnim stanicama (dolje). Preuzeto iz Orzáez i sur., (2009).

#### 4. Rekombinantni terapijski N-glikoproteini

Prvi biljni rekombinantni terapijski glikoprotein koji je odobrila Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) je Elelyso®. Proizveden je u stanicama vrste *D. carota*, a koristi se za liječenje Gaucherove bolesti, nasljedne bolesti uzrokovane mutacijom u genu za  $\beta$ -glukocerebrozidazu (Fox, 2012). Od ovog dostignuća prošlo je više od desetljeća u kojem je razvijena značajna količina terapijika u biljnim stanicama. Neke od njih je odobrila FDA, no mnogi moraju proći kroz opsežna klinička istraživanja zbog ograničenja biljnih stanica, opisana u poglavlju 4.0.

Čestice nalik virusu (engl. *virus like particles*, VLPs) proteinske su strukture koje slične virusnoj kapsidi, no ne sadrže genetički materijal stoga nisu patogene. Na svojoj površini sadrže antigene koji potiču imunsku reakciju organizma, odnosno stjecanje imunosti na određeni virus. Zbog nepatogenosti VLP, mnoga cjepiva se baziraju na njima (Mohsen i Bachmann, 2022). Glikoprotein šiljka (engl. *spike*, S) transmembranski je glikoprotein na površini virusa SARS-CoV-2, a ključan je za ulaz virusa u stanice domaćina. Glikoprotein S sastoji se od podjedinica S1 i S2. Podjedinicom S1 veže se na receptor angiotenzin-konvertirajući enzim 2 (engl. *angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2), a podjedinica S2 ima ulogu u fuziji virusne membrane s membranom stanice domaćina (Salleh i sur., 2021). Glikoprotein S je N-glikozilirani na 22 i O-glikozilirani na 17 mjesta (Aloor i sur., 2022). Metodom agroinfiltracije, gen za glikoprotein S transformiran je i eksprimiran u stanicama vrste *N. benthamiana* te je uspješno proizvedeno koronavirus VLP cjepivo (engl. *coronavirus-like particle*, CoVLP), koje je odobreno u Kanadi 2022. godine (Lee i sur., 2023).

Imunoterapija vrsta je liječenja u kojoj se potiče imunski sustav oboljelog da identificira i ukloni maligne stanice. Monoklonalna antitijela (engl. *monoclonal antibodies*, mAbs) prepoznaju specifične antigene na malignim stanicama, vežu se na njihovu površinu te potiču raspad plazmatske membrane ili označe maligne antigene da bi ih prepoznale ostale stanice imunskog sustava. Sastoje se od regije Fab (engl. *fragment antigen-binding*), koja prepoznaje i veže specifične antigene i regije Fc (engl. *fragment crystallizable*), koja se veže na Fc receptore imunoloških stanica i komplementarnih proteina uključenih u aktivaciju imunološkog odgovora. Regija Fc najčešće je mjesto N-glikozilacije koja određuje funkciju, strukturu i aktivnost mAbs (Nessa i sur., 2020). U stanicama vrste *N. benthamiana* proizvedene su tri vrste mAbs za liječenje Ebola virusa (EBOV). Koktel mAbs poznat je pod nazivom ZMapp (*Zaire ebolavirus Mapp*), koje je dobio prema kompaniji koja uzgaja biljke za proizvodnju terapijika, *Mapp Biopharmaceutical* (Wong i sur., 2024). Za liječenje bolesti

ključna je interakcija između mAbs i glikoproteinskih epitopa na EBOV, no točan mehanizam prepoznavanja i djelovanja mAbs proizvedenih u biljnim stanicama još uvijek je nepoznat (Wong i sur., 2024; Davidson i sur., 2015). Zbog nedostatka informacija o mehanizmu, FDA je zadnje odobrila tek Fazu 2 kliničkih ispitivanja (Lee i sur., 2023).

## **5. Ograničenja proizvodnje rekombinantnih terapijskih N-glikoproteina u biljnim stanicama**

Najveće ograničenje u proizvodnji glikoproteinskih terapeutika u biljnim sustavima predstavlja prisutnost molekula  $\beta$ 1,2 Xyl,  $\alpha$ 1,3 Fuc i Le<sup>a</sup> epitopa na kompleksnim glikanima te odsutnost terminalne molekule Neu5Ac. Molekule  $\beta$ 1,2 Xyl i  $\alpha$ 1,3 Fuc u N-glikanima su vezna mjesta za imunoglobulin E (IgE) te potiču proizvodnju imunoglobulina G (IgG). Prisutnost ovih antitijela u ljudskom serumu potiče brzi klirens glikoproteina s tipičnim biljnim glikoepitopima iz krvi, čime se smanjuje njihova efektivnost. Osim toga, antitijela klase IgE karakteristična su za alergijske reakcije, što predstavlja sigurnosni problem korištenja terapijskih glikoproteina proizvedenih u biljnim stanicama. Epitope Le<sup>a</sup> ne proizvode samo biljke, nego su prisutni i na površini eritrocita. Dodatkom biljnih glikoproteina s epitopima Le<sup>a</sup> u serum osobe s Le<sup>a</sup> pozitivnim eritrocitima potiče se aglutinacija eritrocita, stoga se proizvodnja farmaceutika s biljnim epitopom Le<sup>a</sup> strogo izbjegava (Gomord i sur., 2010).

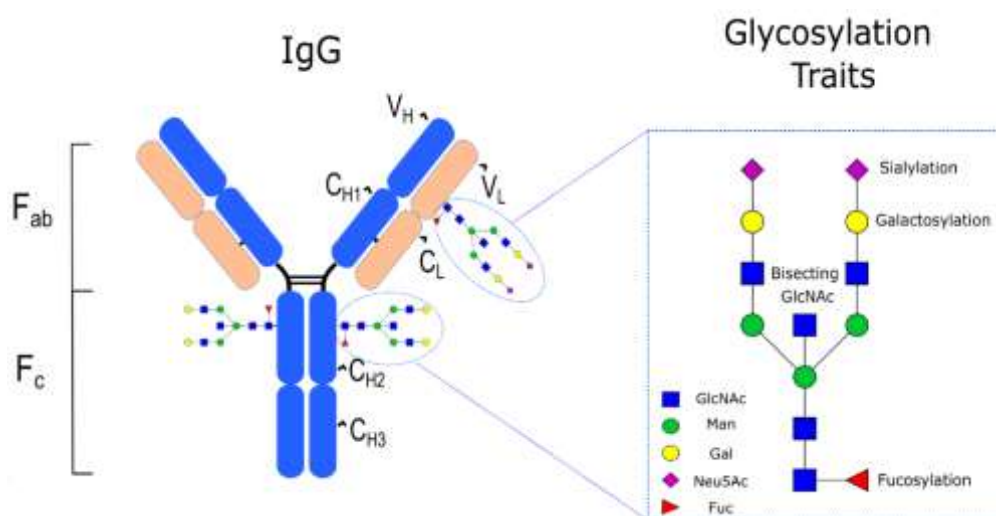
Osim prisutnosti karakterističnih biljnih glikoepitopa, za proizvodnju rekombinantnih terapijskih glikoproteina u biljkama postoji i problem odsutnosti molekule Neu5Ac. Nedostatak molekule Neu5Ac uzrokuje brzi klirens terapeutika iz krvi pacijenta. U animalnim stanicama asijaloglikoproteinski receptor (engl. *asialoglycoprotein receptor*, ASGPR) prepoznaje terminalnu molekulu Gal na kojoj je prethodno bila vezana molekula Neu5Ac, čime se potiče uklanjanje glikoproteina iz krvi (Dammen-Brower i sur., 2022).

Potencijalna rješenja navedenih izazova opisana su u nastavku.

## 5.1. Targetiranje u ER

Visoko manozni tip glikana sintetizira se u ER i ne podliježe doradama u GA. Konzervirani C-terminalni slijed KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) omogućuje zadržavanje proteina u ER, čime se onemogućava daljnja dorada u GA te dodavanje molekula Xyl, Fuc i epitopa Le<sup>a</sup> na glikoprotein (Gomord i sur., 2010).

Antitijelo IgG jedno je od najzastupljenijih antitijela u ljudskom serumu, a uloga mu je neutralizacija patogena i toksina, opsonizacija, aktivacija komponenti komplekta i neonatalna imunost. Antitijelo IgG je homodimer od dva jednaka teška i dva jednaka laka lanca. N-glikozilacija molekule IgG odvija se na domeni CH2 regije Fc oba teška lanca, na aminokiselini Asn na položaju 297 (Asn297). Ovisno o izoformi, do N-glikozilacije može doći i na regiji Fab. Oligosaharidna struktura većine izoformi IgG je kompleksna struktura od dvije antene. Srž strukture je heptasaharid kojeg tvore saharidi GlcNAc i Man. Ovisno o izoformi, na srž mogu biti vezani dodatni saharidi kao što su Fuc, Gal i Neu5Ac. Odgovarajuća N-glikozilacija ključna je za održavanje stabilnosti i pravilne funkcije antitijela (Jefferis, 2009; Flevaris i Kontoravdi, 2022).



**Slika 2.** Struktura molekule IgG i N-glikana vezanih na regije Fc i Fab. Preuzeto iz Flevaris i Kontoravdi, (2022).

Fuzioniranjem slijeda KDEL na laki i teški lanac mAb IgG u transgeničnoj biljci vrste *N. tabacum* dobiven je visoko manozni IgG. Veliki udio visoko manoznog IgG pokazuje da je retencijom glikoproteina u ER moguće izbjeći dodavanje alergeničkih molekula Xyl i Fuc na N-glikan (Triguero i sur., 2005). Uspješna retencija glikana u ER postignuta je i u proizvodnji

visoko manoznih mAbs uključenih u neutralizaciju virusa bjesnoće. Pokazano je da mAbs koja su paralelno proizvedena u biljnim i animalnim stanicama imaju jednaku učinkovitost, no problem je predstavljao brzi klirens mAbs proizvedenih u biljkama (Ko i sur., 2003). Brzi klirens visoko manoznih glikoproteina događa se zbog prisutnosti receptora koji vežu molekulu Man (engl. *mannose-binding receptors*, MRs) u animalnim stanicama. Receptori MRs prisutni su na hepatocitama, fibroblastima, endotelnim stanicama te na makrofagima i dendritima. Hidrolaze, mijeloperoksidaze i tkivni aktivator plazminogena, enzimi s visokim udjelom Man, imaju ulogu u imunološkom odgovoru organizma. Ako ostanu u tkivu duže nego što je potrebno, mogu oštetiti zdrave stanice. Visoki udio Man na površini ovih enzima omogućuje im brzo uklanjanje pomoću MRs. Osim za održavanje ravnoteže udjela glikoproteina u serumu, MRs imaju važnu ulogu u prepoznavanju i uklanjanju patogena koji na površini imaju glikoproteine s visokim udjelom Man kao što je gljivica *Candida albicans* (Dammen-Brower i sur., 2022).

No, prisutnost visokomanoznih N-glikoproteina ima i svojih prednosti. Naime, lijek za Gaucherovu bolest Eleyso®, proizveden u stanicama vrste *D. carota*, je visoko manozni rekombinantni glikoprotein koji se uspješno koristi u liječenju bolesti. Zbog nefunkcionalne  $\beta$  glukocerebrozidaze, kod bolesnika dolazi do nakupljanja glukocerebrozida u makrofagima. Veliki udio visoko manoznih glikana na molekuli Eleyso omogućuje da ga makrofagi brzo i učinkovito prepoznaju i fagocitiraju, čime se omogućuje razgradnja glukocerebrozida u odsutnosti  $\beta$  glukocerebrozidaze (Shawky i Elsayed, 2016). Brzi klirens visoko manoznih glikana može biti od koristi i kod liječenja u kojem bi moglo doći do neželjene interakcije između imunoterapije i aktivne imunizacije organizma, a koristan bi bio i za uklanjanje nespecifičnih toksičnih antitijela koja se koriste u imunoterapiji (Gomord i sur., 2010).

## **5.2. Inaktivacija gena**

Inaktivacija gena (engl. *gene knockout*) često je korištena tehnika u genetičkom inženjerstvu koja služi za utišavanje, odnosno inaktivaciju određenih gena. Inaktivaciju gena omogućuju metode kao što su homologna rekombinacija, CRISPR/Cas9 tehnologija te RNA interferencija (RNAi) (Xu i sur., 2019). U kontekstu korištenja biljnih stanica za proizvodnju terapeutika, inaktivacija gena ima veliku ulogu kod utišavanja gena ključnih za dodavanje alergenijskih molekula Xyl i Fuc (Gomord i sur., 2010).

### 5.2.1. Homologna rekombinacija

U biljnoj vrsti *P. patens*, homolognom rekombinacijom utišani su geni koji kodiraju za enzime  $\alpha$ 1,3 FucT i  $\beta$ 1,2 XylT. Dobiveni su jednostruki mutanti koji imaju inaktiviranu ili samo  $\alpha$ 1,3 FucT ili samo  $\beta$ 1,2 XylT te dvostruki mutanti s inaktiviranim genima za obje transferaze. Mutanti nisu imali morfološke ni razvojne promjene u usporedbi s divljim tipom. Utjecaj mutiranih gena proučavan je na ljudskom vaskularnom endotelnom faktoru rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF). Protein VEGF je homodimer povezan disulfidnom vezom, a uključen je u proliferaciju, migraciju i diferencijaciju stanica u procesu angiogeneze (Brandner i sur., 2006). Ovisno o izrezivanju introna, nastaju različite izoforme proteina, a najčešća izoforma je VEGF165. Na svakom monomeru proteina VEGF165 dolazi do N-glikozilacije na aminokiselini Asn75. Oligosaharidna struktura sastoji se od srži bogate molekulama Fuc i dvije antene koje mogu završavati molekulom Neu5Ac (Keck i sur., 1997). Protein VEGF eksprimiran je u stanicama vrste *P. patens*, a spektrometijom masa MALDI-TOF (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*) pokazano je da N-glikani jednostrukih mutanata nisu sadržavali molekule Xyl/Fuc, dok dvostruki mutanti nisu sadržavali niti Xyl niti Fuc. Taj rezultat je očekivan jer se u cijelom genomu vrste *P. patens* oba gena nalaze u samo jednoj kopiji, što omogućava jednostavnu inaktivaciju. Ovim eksperimentom pokazano je da je moguće uspješno izbjeći dodavanje molekula Xyl i Fuc prilikom N-glikozilacije bez narušavanja učinkovitosti izlučivanja proteina (Koprivova i sur., 2004).

### 5.2.2. RNA interferencija (RNAi)

Osim homologne rekombinacije, za utišavanje gena koji kodiraju za  $\alpha$ 1,3 FucT i  $\beta$ 1,2 XylT koristi se i RNAi. Metoda RNAi služi za degradaciju mRNA koja je potaknuta komplementarnim sparivanjem dvolančane male interferirajuće RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA). Za ciljano utišavanje gena dizajnira se siRNA koja je potpuno komplementarna ciljanom genu (Xu i sur., 2019).

Virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*, HIV) je retrovirus koji u ljudskom organizmu napada limfocite, najviše CD4<sup>+</sup> T, što vodi do slabljenja imuniteta zaražene osobe. Potpuno liječenje zaraženog još uvijek nije moguće, odnosno jednom kada se osoba zarazi virusom HIV, nije ga moguće ukloniti iz organizma. Ipak, postoje mnogi načini liječenja koji značajno produljuju život, olakšavaju simptome infekcije te podižu kvalitetu života (Zulficar i sur., 2017). Antiretrovirusna terapija (engl. *anti-retroviral therapy*, ART) jedna je od najšire korištenih tehnika liječenja, a u kombinaciji s koktelom mAbs njezina



učinkovitost znatno raste. Vežanje mAbs na specifične glikoproteine na ovojnici virusa potiče neutralizaciju virusa te sprječava njegovo sustavno širenje. Jedno od najranije otkrivenih mAbs je 2G12 koje pripada skupini široko neutralizirajućih antitijela (engl. *broadly neutralising antibodies*, bNAbs). U kombinaciji s raznim vrstama bNAbs, 2G12 koristi se za liječenje i istraživanje mehanizma infekcije virusom HIV. Ovojnica virusa HIV sadrži glikoprotein gp120 čija je uloga fuzija membrane domaćina i virusa. Protein gp120 N-glikoziliran je na pozicijama Asn295, Asn332, Asn339 i Asn392. Ovi N-glikani imaju visoki udio Man, što čini protein gp120 dobrom metom za mAb 2G12 koje je bogato N-glikoproteinima. Interakcije između N-glikana na proteinu gp120 i mAb 2G12 ključne su za uspješnu neutralizaciju virusa (Kong i sur., 2013; Murin i sur., 2014).

Strasser i sur., (2008) eksprimirali su protein 2G12 u vrsti *N. benthamiana* te pokazali da je metodom RNAi moguće utišavanje gena ključnih za dodavanje molekula  $\beta$ 1,2 Xyl i  $\alpha$ 1,3 Fuc na N-glikan. Prema kalupu gena za  $\alpha$ 1,3 FucT i  $\beta$ 1,2 XylT umnožena je antisense RNA koja je ligirana u vektor te unesena u stanice vrste *N. benthamiana* agroinfiltracijom. Rezultati su pokazali visok postotak funkcionalnih 2G12 proteina bez alergenijskih molekula Xyl i Fuc, a biljke nisu pokazivale mutirani fenotip.

### 5.2.3. Sustav CRISPR/Cas9

Sustav CRISPR/Cas-9 jedna je od najnovijih metoda uređivanja genoma. U prirodi, bakterije koriste ovaj sustav za obranu od strane DNA, a sam proces se odvija u tri koraka: adaptacija, ekspresija i interferencija. Adaptacija podrazumijeva ugradnju strane DNA u CRISPR lokus. Tijekom ekspresije CRISPR lokus se transkribira i nastaje pre-crRNA (pre-CRISPR RNA) koja se procesira do crRNA i udružuje s Cas proteinima. Interferencija podrazumijeva komplementarno sparivanje crRNA sa stranom DNA te cijepanje strane DNA pomoću Cas nukleaze. U metodi uređivanja genoma dizajnira se sgRNA (engl. *single guide RNA*) koja se sastoji od crRNA (engl. *CRISPR RNA*) i tracrRNA (engl. *trans activating crRNA*), a omogućuje cijepanje DNA pomoću nukleaze Cas9 na točno određenom lokusu (Jiang i Doudna, 2017).

Koristeći sustav CRISPR/Cas9, Göritzer i sur., (2022) uspješno su utišali 8 gena za  $\alpha$ 1,3 FucT i četiri gena za  $\beta$ 1,2 XylT u vrsti *N. benthamiana*. Proizvedeno je potpuno funkcionalno bNAb VRC01 bez  $\alpha$ 1,3 Fuc i  $\beta$ 1,2 Xyl. Glikoprotein VRC01 ima ulogu u neutralizaciji virusa HIV. Kao i 2G12, VRC01 bogato je glikoziliran, pa je i mehanizam neutralizacije sličan kod oba bNAbs. Mjesta N-glikozilacije nalaze se na lakom i teškom lancu VRC01 na pozicijama Asn71 i Asn297. Autori navode da je ovom metodom prvi puta uspješno postignuto potpuno

utišavanje gena za dodavanje molekula  $\alpha$ 1,3 FucT i  $\beta$ 1,2 XylT na temelju ekspresije DNA u vrsti *N. benthamiana*.

### 5.3. Ubacivanje gena

Osim alergenijskih molekula Xyl i Fuc, ograničenje u korištenju biljaka za proizvodnju terapeutika predstavlja i nedostatak sposobnosti biljnih stanica da dodaju terminalnu molekulu Neu5Ac na oligosaharidnu strukturu. Terminalna molekula Neu5Ac ključna je za regulaciju brzine klirensa glikoproteina iz organizma te za kontrolu bioaktivnosti glikoproteina. Sijaliltransferaze su enzimi lokalizirani u GA, a kataliziraju prijenos aktivirane molekule Neu5Ac (CMP-Neu5Ac) na N-glikoprotein koji na oligosaharidnom kraju sadrži Gal ostatak (Li i Ding, 2019). Drugim riječima, N-glikoprotein s terminalnom molekulom Gal ima ulogu supstrata u dodavanju terminalne molekule Neu5Ac na oligosaharid.

Osim što molekula Gal ima ulogu supstrata, također čini visoki udio saharida u mAbs kao što je IgG, stoga je velik broj glikoinženjerskih istraživanja usmjeren na ekspresiju ljudskog enzima  $\beta$ 1,4 GalT u biljnim stanicama. Strasser i sur., (2009) transformirali su stanice vrste *N. benthamiana* plazmidom u koji je insertiran kimerni gen za ljudski enzim  $\beta$ 1,4 GalT. Istraživanje je rađeno na dvije vrste bNAbs, 2G12 i 4E10. Dobiveni su potpuno funkcionalni glikoproteini 2G12 i 4E10, bez molekula Xyl i Fuc u sastavu, s velikom učinkovitošću neutralizacije virusa HIV *in vitro*. Enzim je uspješno lokaliziran u GA, a značajna količina N-glikana sadržavala je terminalnu molekulu Gal što pokazuje da se biljne stanice mogu koristiti za proizvodnju antitijela s tipičnim ljudskim glikoepitopima.

Eritropoetin (EPO) je hormon koji se proizvodi u bubrezima, a njegova uloga je kontrola eritropoeze u koštanoj srži. Kronične bolesti bubrega i određene vrste karcinoma mogu uzrokovati anemiju koja se liječi injektiranjem hormona EPO. Zreli EPO je N-glikoziliran na aminokiselinama Asn24, Asn38 i Asn83 te O-glikoziliran na aminokiselini Ser126. Sva tri N-glikozilacijska mjesta sadrže slične oligosaharidne strukture, a najviše ih sadrži GnGn strukturu (Castilho i sur., 2013). O-vezani oligosaharid sastoji se od molekula GalNAc, Gal i Neu5Ac (Strasser, 2012). Istraživanja pokazuju da O-glikozilacija ne utječe na stabilnost i bioaktivnost u jednakoj mjeri kao N-glikozilacija te je struktura O-glikana manje istražena i opisana (Delorme i sur., 1992). Mnogi rekombinantni terapijski glikoproteini imaju problem kratkog poluzivota, odnosno prebrzog klirensa iz seruma. Jedno od rješenja je dodavanje terminalne molekule Neu5Ac na N-glikane, što nije jednostavno za napraviti u biljnim stanicama. Dok je za dodavanje galatkoze potrebno transformirati biljne stanice sa samo

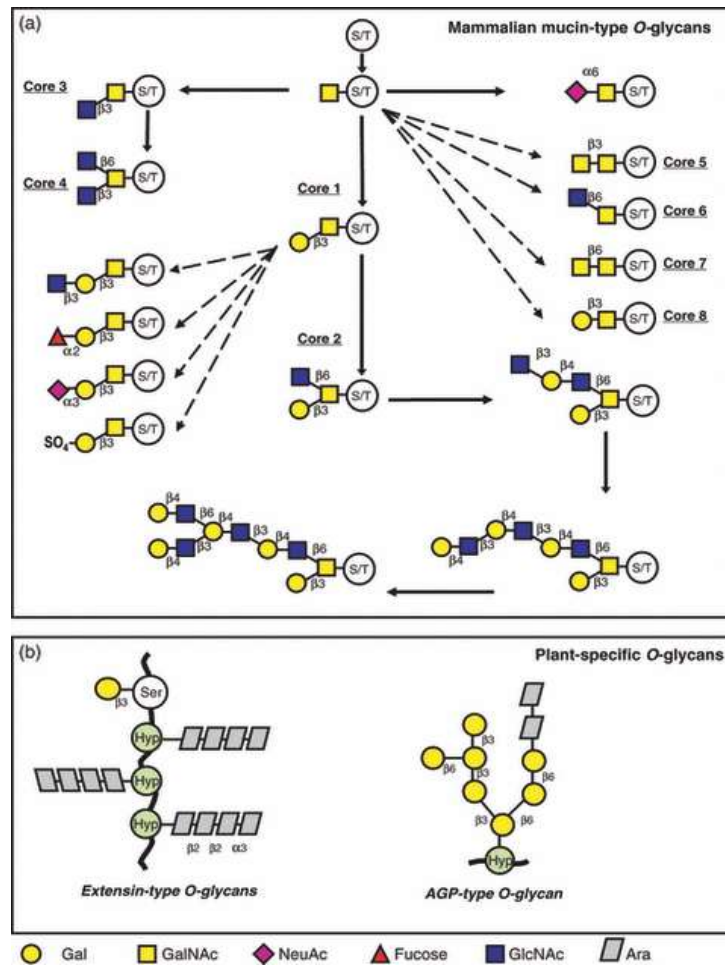
jednim ljudskim genom, dodavanje molekule Neu5Ac zahtjeva ekspresiju gena za biosintezu i aktivaciju nukleotidnog prekursora molekule Neu5Ac njegov transport u GA i prenošenje na terminalnu molekulu Gal. Osim što se mora unijeti velik broj gena, oni moraju biti ekspimirani u točno određenom trenutku (Castilho i sur., 2010). Primjer uspješne sinteze N-glikoproteina s terminalnom molekulom Neu5Ac je rekombinantni ljudski hormon EPO. Unosom komplementarne DNA (cDNA) s genom za hormon EPO i genima potrebnim za grananje,  $\beta$ 1,4 galaktozilaciju, sintezu, aktivaciju i transport molekule Neu5Ac uspješno je dobiven hormon EPO koji na glikanima ima terminalne molekule Neu5Ac. Navedena modifikacija ne utječe na stabilnost i bioaktivnost proteina, a produžuje mu poluživot, čime se povećava njegova efektivnost (Castilho i sur., 2013). Mnogi rekombinantni terapijski glikoproteini imaju problem prekratkog poluživota, odnosno prebrzog klirensa iz seruma. Jedno od rješenja je dodavanje terminalne molekule Neu5Ac na N-glikane, što nije jednostavno za napraviti u biljnim stanicama. Dok je za dodavanje molekule Gal potrebno transformirati biljne stanice sa samo jednim ljudskim genom, dodavanje molekule Neu5Ac zahtjeva ekspresiju gena za biosintezu i aktivaciju nukleotidnog prekursora Neu5Ac, njegov transport u GA i prenošenje na terminalnu molekulu Gal. Osim što se mora unijeti velik broj gena, oni moraju biti ekspimirani u točno određenom trenutku (Castilho i sur., 2010). Primjer uspješne sinteze N-glikoproteina s terminalnom molekulom Neu5Ac je rekombinantni ljudski hormon EPO. Unosom komplementarne DNA (cDNA) s genom za hormon EPO i genima potrebnim za grananje,  $\beta$ 1,4 galaktozilaciju, sintezu, aktivaciju i transport molekule Neu5Ac uspješno je dobiven hormon EPO koji na glikanima ima terminalne molekule Neu5Ac. Navedena modifikacija ne utječe na stabilnost i bioaktivnost proteina, a produžuje mu poluživot, čime se povećava njegova efektivnost (Castilho i sur., 2013).

## **6. O-glikozilacija**

O-glikozilacija je posttranslacijska modifikacija prilikom koje dolazi do kovalentnog vezanja oligosaharida na hidroksilnu skupinu (OH) serina (Ser), treonina (Thr), hidroksiprolina (Hyp) ili hidroksilizina (Hyl). Tijekom O-glikozilacije, monosaharidi se dodaju pojedinačno na skupinu OH, za razliku od N-glikozilacije kod koje se na protein mogu dodati kompleksne polisaharidne strukture u jednom koraku. Iako se mehanizmi N- i O-glikozilacije razlikuju, obje modifikacije imaju jednaku ulogu: utjecaj na stabilnost, topivost i smatanje proteina te otpornost proteina na proteaze i visoku temperaturu (Gomord i sur., 2010).

U animalnim stanicama najčešća je O-glikozilacija mucinskog tipa prilikom koje enzim N-acetil-galaktozaminiltransferaza (GalNAcT) dodaje molekulu N-acetilgalatkozamina (GalNAc) na aminokiselinu Ser/Thr potpuno smotanog proteina u GA. Na takav modificirani protein mogu dodatno djelovati razne glikoziltransferaze dajući veliku raznolikost O-glikana mucinskog tipa. Najčešći saharidi koji se dodaju su Gal, Fuc, GlcNAc i Neu5Ac (Jensen i sur., 2010; Strasser, 2012). Struktura mucina omogućuje vezanje velike količine molekula vode, zbog čega mucini mogu tvoriti zaštitni sloj epitela, odnosno sluz. Također, uloga im je i modifikacija bioaktivnosti hormona i citokina (Gomord i sur., 2010). Osim na mucinima, mehanizam O-glikozilacije često je istraživan i na kolagenu. Kolagen je jedan od najzastupljenijih proteina u ljudskom organizmu te ima visoki udio aminokiselina Pro i Lys, stoga je podložan O-glikozilaciji. Za razliku od O-glikozilacije mucina, koja se najčešće odvija na aminokiselinama Ser/Thr, O-glikozilacija kolagena odvija se na aminokiselini Hyp nastaloj djelovanjem enzima prolil 4-hidroksilaze (P4H) (Ludovic i sur., 2015).

U biljnim stanicama, O-glikozilacija najčešće se odvija na aminokiselinama Ser, Thr ili Hyp. Proteini bogati aminokiselinom Hyp (engl. *Hyp-rich glycoproteins*, HRGPs) skupina su O-glikoproteina kojoj pripadaju ekstenzini i arabinogalaktani (AGPs), skupine glikoproteina koje se nalaze u staničnoj stijenci biljnih stanica, a imaju važnu ulogu u odvijanju pravilne embriogeneze. Njihovu modifikaciju započinje enzim P4H koji na aminokiselinu Pro dodaje OH skupinu u ER. U GA, glikoziltransferaze mogu dodatno doraditi glikoprotein dodavanjem Gal, arabinoze (Ara) ili AGPs (Gomord i sur., 2010).



**Slika 3.** Biosintetski put mucinskog mucinskog tipa O-glikana kod životinja (a) i specifični O-glikani u biljkama (b). Preuzeto iz Gomord i sur., (2010).

## 7. Rekombinantni terapijski O-glikoproteini

Dok je početni put N-glikozilacije jednak je kod biljnih i animalnih stanica, kod O-glikozilacije se i početni put razlikuje. Nadalje, O-glikani manje su istraženi i okarakterizirani od N-glikana i više su heterogeni, što predstavlja izazov u bioinženjerstvu O-glikoproteina.

Kao i kod bioinženjerstva N-glikoproteina, i kod proizvodnje O-glikoziliranih rekombinantnih terapijskih glikoproteina jedan od najznačajnijih problema je uklanjanje alergeni biljnih epitopa. U slučaju O-glikozilacije, najveći problem su glikoproteini s molekulom Ara i/ili AGPs koji sadrže vezna mjesta za antitijela IgG i IgE, sudionike alergijske reakcije (Gomord i sur., 2010). Primjer takvog alergena je Art v 1 koji se nalazi na peludi biljke pelin (*Artemisia vulgaris*) (Leonard i sur., 2005).

Osim potencijalnih alergena, problem predstavlja i nedostatak konsenzus slijeda aminokiselina na kojima se odvija O-glikozilacija, kao i relativno slabo istražena specifičnost enzima P4H. Enzim P4H izoliran iz uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) i zelene alge *Chlamydomonas reinhardtii* učinkovito hidroksilira aminokiselinu Pro u kolagenu, dok P4H iz vrste *N. tabacum* nema mogućnost hidroksilacije (Gomord i sur., 2010). Aminokiselina Hyp supstrat je za glikoziltransferaze koje mogu dodatno modificirati glikoprotein, odnosno dodati alergene Ara/AGPs, stoga je za proizvodnju glikoproteinskih terapeutika nužno inaktivirati gene koji kodiraju za P4H.

Jedan od prvih uspješno proizvedenih rekombinantnih terapeutskih O-glikoproteina mucinskog tipa je hormon EPO, dobiven u stanicama vrste *N. benthamiana*. Nakon inaktivacije gena za P4H, prekomjerno je eksprimiran gen za GalNAc-transferazu 2 (GalNAcT2), što je prvi korak O-glikozilacije mucinskog tipa. Ekspresijom gena za enzim  $\beta$ 1,3 GalT i gena uključenih u biosintetski put monosaharida Neu5Ac, uspješno je dobiven O-glikozilirani protein EPO (Montero-Morales i Steinkellner, 2018). Hormon EPO ima samo jedno mjesto O-glikozilacije, na aminokiselini Ser126, zbog čega je njegova proizvodnja relativno jednostavna.

Antitijelo IgA1 ima ulogu u sprječavanju ulaska patogena kroz epitelnu sluz. Broj mjesta glikozilacije IgA1 ovisi o njegovoj izoformi, no sve izoforme su bogato N- i O-glikozilirane. Iako se razlikuju u broju mjesta i poziciji, svi N-glikani na molekuli IgA1 imaju strukturu  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ . Za razliku od hormona EPO, antitijelo IgA1 bogato je O-glikanima te postoji 9 potencijalnih mjesta O-glikozilacije. Struktura O-glikana je heterogena i ovisi o izoformi (Ding i sur., 2022). Ako je način proizvodnje antitijela IgA1 jednak načinu proizvodnje hormona EPO, samo nekoliko mjesta molekule IgA1 će biti O-glikozilirano, što dovodi do nepravilne strukture i funkcije. Pretpostavlja se da u biljnoj stanici postoji ograničena količina molekule UDP-GalNAc što može dovesti do ograničene O-glikozilacije. Ukoliko se eksprimira enzim UDP-GlcNAc 4-epimeraza koja katalizira pretvorbu iz UDP-GlcNAc u UDP-GalNAc, O-glikozilacija je uspješnija te se nadilazi problem ograničenja supstrata (Montero-Morales i Steinkellner, 2018).

Velik broj glikoproteinskih terapeutika ima problem brzog klirensa iz seruma. Da bi se povećalo vrijeme cirkuliranja terapeutika u krvi te tako povećala njegova učinkovitost, na glikoprotein se često veže molekula polietilen glikola (PEG). Vezanje molekule PEG povećava molekularnu masu glikoproteina, čime se smanjuje brzina glomerularne filtracije bubrega. Osim toga, PEG štiti glikoproteine od proteaza, čime se također produžuje poluzivot

glikoproteina u krvi. S druge strane, vezanje PEG na glikoprotein je zahtjevna i skupa metoda, može dovesti do smanjenja bioaktivnosti terapeutika te je potencijalno toksična (Gomord i sur., 2010).

Osim dodatkom molekule PEG ili terminalne molekule Neu5Ac na glikan, poluživot terapeutika moguće je produljiti i O-glikozilacijom. Xu i sur., (2007) eksprimirali su kimerni interferon  $\alpha 2b$  (IFN $\alpha 2$ ) s ponavljajućim slijedom aminokiselina Ser-Hyp na C-terminalnom kraju u stanicama vrste *N. benthamiana*. Ponavljajući slijed bogato je O-glikoziliran, što je rezultiralo značajnim produljenjem poluživota molekule IFN $\alpha 2$ , čime je povećana efikasnost terapeutika.

## 8. Zaključak

Korištenje biljnih stanica za proizvodnju rekombinantnih terapeutskih glikoproteina sa sobom nosi mnoge izazove, no mnogi od njih danas su nadvladivi zahvaljujući širenju znanja i napretku biotehnologije. Jedan od najvećih izazova u proizvodnji N- i O-glikoproteina je uklanjanje karakterističnih biljnih epitopa kao što su  $\alpha 1,3$  Fuc,  $\beta 1,2$  Xyl, Le<sup>a</sup> epitop, Ara i AGPs, koji u ljudskom organizmu mogu izazvati ozbiljnu alergijsku reakciju. Postoje mnoge metode utišavanja gena koji imaju ulogu u dodavanju karakterističnih biljnih epitopa na rekombinantni glikoprotein, no ne pokazuju sva istraživanja stopostotnu učinkovitost utišavanja gena. Jedna od obećavajućih metoda je CRISPR/Cas9 koja omogućuje specifično modificiranje ili utišavanje željenih gena. Također, prilikom utišavanja gena bitno je da biljka nema fenotipske promjene koje bi potencijalno mogle utjecati na učinkovitost glikozilacije i prihod glikoproteina.

Mnogi rekombinantni glikoproteini imaju brzi klirens iz ljudskog seruma, čime se gubi učinkovitost terapeutika. Problem je rješiv dodavanjem terminalne molekule Neu5Ac na glikoprotein, no biljne stanice nemaju biosintetski put za proizvodnju monosaharida Neu5Ac. Osim što se u biljnu stanicu mora unesti relativno veliki broj gena, oni moraju biti eksprimirani u točno određenom trenutku da bi sinteza, aktivacija i prijenos molekule Neu5Ac bio uspješan. Unatoč kompleksnosti, na rekombinantne glikoproteine moguće je dodati terminalnu molekulu Neu5Ac zahvaljujući bioinženjeringu. Smanjenje brzine klirensa glikoproteina moguće je i dodatkom O-glikana na protein, čime se povećava molekulska masa proteina i smanjuje brzina filtracije.

Ipak, O-glikozilacija još uvijek je manje istražena nego N-glikozilacija, zbog čega je i bioinženjerstvo O-glikoproteina manje razvijeno. Manja količina informacija posljedica je neistraženih funkcija enzima, velike heterogenosti O-glikana, manjka konsenzus sekvence na kojoj se provodi modifikacija te drugačijeg mehanizma odvijanja glikozilacije kod biljaka i životinja.

Da bi se u budućnosti omogućila sigurna proizvodnja rekombinantnih terapijskih glikoproteina, razvijaju se mnoge tehnike koje šire znanje o specifičnosti enzima, točnom sastavu glikana te o interakciji biokemijskih puteva N- i O-glikozilacije.

## 9. Literatura

Aloor, A., Aradhya, R., Venugopal, P., Gopalakrishnan Nair, B., & Suravajhala, R. (2022). Glycosylation in SARS-CoV-2 variants: A path to infection and recovery. *Biochemical Pharmacology*, 206. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115335>

Brandner, B., Kurkela, R., Vihko, P., & Kungl, A. J. (2006). Investigating the effect of VEGF glycosylation on glycosaminoglycan binding and protein unfolding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.079>

Castilho, A., Neumann, L., Gattinger, P., Strasser, R., Vorauer-Uhl, K., Sterovsky, T., Altmann, F., & Steinkellner, H. (2013). Generation of biologically active multi-sialylated recombinant human EPOFc in plants. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054836>

Castilho, A., Strasser, R., Stadlmann, J., Grass, J., Jez, J., Gattinger, P., Kunert, R., Quendler, H., Pabst, M., Leonard, R., Altmann, F., & Steinkellner, H. (2010). Planta protein sialylation through overexpression of the respective mammalian pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 285(21). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.088401>

Cooper, G. (2019). *The cell: A molecular approach*. Oxford University Press, Oxford.

Dammen-Brower, K., Epler, P., Zhu, S., Bernstein, Z. J., Stabach, P. R., Braddock, D. T., Spangler, J. B., & Yarema, K. J. (2022). Strategies for glycoengineering therapeutic proteins. *Frontiers in Chemistry*, 10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.863118>

Davidson, E., Bryan, C., Fong, R. H., Barnes, T., Pfaff, J. M., Mabila, M., Rucker, J. B., & Doranz, B. J. (2015). Mechanism of binding to Ebola virus glycoprotein by the ZMapp, ZMAb, and MB-003 cocktail antibodies. *Journal of Virology*, 89(21). <https://doi.org/10.1128/jvi.01490-15>

Delorme, E., Lorenzini, T., Giffin, J., Martin, F., Jacobsen, F., Boone, T., & Elliott, S. (1992). Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry*, 31(41). <https://doi.org/10.1021/bi00156a003>



- Ding, L., Chen, X., Cheng, H., Zhang, T., & Li, Z. (2022). Advances in IgA glycosylation and its correlation with diseases. *Frontiers in Chemistry*, 10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.974854>
- Flevaris, K., & Kontoravdi, C. (2022). Immunoglobulin G N-glycan biomarkers for autoimmune diseases: Current state and a glycoinformatics perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/ijms23095180>
- Fox, J. L. (2012). First plant-made biologic approved. *Nature Biotechnology*, 30(6). <https://doi.org/10.1038/nbt0612-472>
- Gomord, V., Fichette, A. C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D., & Faye, L. (2010). Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal*, 8(5). <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00497.x>
- Göritzer, K., Grandits, M., Grünwald-Gruber, C., Figl, R., Mercx, S., Navarre, C., Ma, J. K. C. (2022). Engineering the N-glycosylation pathway of *Nicotiana tabacum* for molecular pharming using CRISPR/Cas9. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1003065>
- Jefferis, R. (2009). Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(7). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.04.007>
- Jensen, P. H., Kolarich, D., & Packer, N. H. (2010). Mucin-type O-glycosylation - Putting the pieces together. *FEBS Journal*, 227(1). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07429.x>
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Keck, R. G., Berleau, L., Harris, R., & Keyt, B. A. (1997). Disulfide structure of the heparin binding domain in vascular endothelial growth factor: Characterization of posttranslational modifications in VEGF. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 344(1). <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0145>
- Ko, K., Tekoah, Y., Rudd, P. M., Harvey, D. J., Dwekt, R. A., Spitsin, S., Hanlon, C. A., Rupprecht, C., Dietzschold, B., Golovkin, M., & Koprowski, H. (2003). Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13). <https://doi.org/10.1073/pnas.0832472100>
- Kong, L., Lee, J. H., Doores, K. J., Murin, C. D., Julien, J. P., McBride, R., Liu, Y., Marozsan, A., Cupo, A., Klasse, P. J., Hoffenberg, S., Caulfield, M., King, C. R., Hua, Y., Le, K. M., Khayat, R., Deller, M. C., Clayton, T., Tien, H., Feizi, T., Sanders, R.W., Paulson, J.C., Moore, J.P., Stanfield, R.L., Burton, D.R., Ward, A.B., & Wilson, I. A. (2013). Supersite of immune vulnerability on the glycosylated face of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(7). <https://doi.org/10.1038/nsmb.2594>
- Koprivova, A., Stemmer, C., Altmann, F., Hoffmann, A., Kopriva, S., Gorr, G., Reski, R., & Decker, E. L. (2004). Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plant-specific

- immunogenic N-glycans. *Plant Biotechnology Journal*, 2(6). <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00100.x>
- Lee, J., Lee, S. K., Park, J. S., & Lee, K. R. (2023). Plant-made pharmaceuticals: exploring studies for the production of recombinant protein in plants and assessing challenges ahead. *Plant Biotechnology Reports*, 17(1). <https://doi.org/10.1007/s11816-023-00821-0>
- Leonard, R., Petersen, B. O., Himly, M., Kaar, W., Wopfner, N., Kolarich, D., Van Ree, R., Ebner, C., Duus, J., Ferreira, F., & Altmann, F. (2005). Two novel types of O-glycans on the mugwort pollen allergen Art v 1 and their role in antibody binding. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9). <https://doi.org/10.1074/jbc.M410407200>
- Li, F., & Ding, J. (2019). Sialylation is involved in cell fate decision during development, reprogramming and cancer progression. *Protein and Cell*, 10(8). <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0597-5>
- Ludovic, M., Eric, N.-O., Maxime, G., Abdoul-Salam, K., Follet-Gueye, M.-L., Azeddine, D., Maïté, V.-G., & Sophie, A.-A. (2015). O-glycosylation in plant and mammal cells: the use of chemical inhibitors to understand the biosynthesis and function of O-glycosylated proteins. *Plant Science Today*, 2(2). <https://doi.org/10.14719/pst.2015.2.2.67>
- Mohsen, M. O., & Bachmann, M. F. (2022). Virus-like particle vaccinology, from bench to bedside. *Cellular and Molecular Immunology*, 19(9). <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00897-8>
- Montero-Morales, L., & Steinkellner, H. (2018). Advanced plant-based glycan engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00081>
- Murin, C. D., Julien, J.-P., Sok, D., Stanfield, R. L., Khayat, R., Cupo, A., Moore, J. P., Burton, D. R., Wilson, I. A., & Ward, A. B. (2014). Structure of 2G12 Fab 2 in complex with soluble and fully glycosylated HIV-1 Env by negative-stain single-particle electron microscopy. *Journal of Virology*, 88(17). <https://doi.org/10.1128/jvi.01229-14>
- Nessa, M. U., Rahman, M. A., & Kabir, Y. (2020). Plant-produced monoclonal antibody as immunotherapy for cancer. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3038564>
- Orzáez, D., Granell, A., & Blázquez, M. A. (2009). Manufacturing antibodies in the plant cell. *Biotechnology Journal*, 4(12). <https://doi.org/10.1002/biot.200900223>
- Ramazi, S., & Zahiri, J. (2021). Post-translational modifications in proteins: Resources, tools and prediction methods. *Database*, 2021. <https://doi.org/10.1093/database/baab012>
- Salleh, M. Z., Derrick, J. P., & Deris, Z. Z. (2021). Structural evaluation of the spike glycoprotein variants on SARS-CoV-2 transmission and immune evasion. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147425>
- Shawky, R. M., & Elsayed, S. M. (2016). Treatment options for patients with Gaucher disease. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 17(3). <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2016.02.001>

- Strasser, R. (2012). Challenges in O-glycan engineering of plants. *Frontiers in Plant Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00218>
- Strasser, R., Castilho, A., Stadlmann, J., Kunert, R., Quendler, H., Gattinger, P., Jez, J., Rademacher, T., Altmann, F., Mach, L., & Steinkellner, H. (2009). Improved virus neutralization by plant-produced anti-HIV antibodies with a homogeneous  $\beta$ 1,4-galactosylated N-glycan profile. *Journal of Biological Chemistry*, 284(31). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014126>
- Strasser, R., Stadlmann, J., Schähs, M., Stiegler, G., Quendler, H., Mach, L., Glössl, J., Weterings, K., Pabst, M., & Steinkellner, H. (2008). Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure. *Plant Biotechnology Journal*, 6(4). <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00330.x>
- Strasser, R. (2016). Plant protein glycosylation. *Glycobiology*, 26(9). <https://doi.org/10.1093/glycob/cww023>
- Triguero, A., Cabrera, G., Cremata, J. A., Yuen, C. T., Wheeler, J., & Ramírez, N. I. (2005). Plant-derived mouse IgG monoclonal antibody fused to KDEL endoplasmic reticulum-retention signal is N-glycosylated homogeneously throughout the plant with mostly high-mannose-type N-glycans. *Plant Biotechnology Journal*, 3(4). <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00137.x>
- Wong, G., Biens, K.M., Xii, A., Fausther-Bovendo, H., Kobinger, G.P. (2024). Ebola-specific therapeutic antibodies from lab to clinic: The example of ZMapp. *Antiviral research*, 226. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.105873>
- Xu, J., Tan, L., Goodrum, K. J., & Kieliszewski, M. J. (2007). High-yields and extended serum half-life of human interferon  $\alpha$ 2b expressed in tobacco cells as arabinogalactan-protein fusions. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(5). <https://doi.org/10.1002/bit.21407>
- Xu, W., Jiang, X., & Huang, L. (2019). RNA interference technology. *Comprehensive Biotechnology*, 5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00282-2>
- Zulfiqar, H. F., Javed, A., Sumbal, A., Afroze, B., Ali, Q., Akbar, K., Nadeem, T., Rana, M. A., Nazar, Z. A., Nasir, I. A., & Husnain, T. (2017). HIV diagnosis and treatment through advanced technologies. *Frontiers in Public Health*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00032>

## 10. Životopis

Rođena sam 2002. godine u Koprivnici gdje sam upisala i završila osnovnu školu. Završila sam dva razreda opće gimnazije u Koprivnici, nakon čega sam upisala International Baccalaureate (IB) program u Varaždinu, kojeg sam završila 2021. godine. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja bila sam volonter u Udruzi udomitelja za djecu i mlade „Zipka“. U sklopu IB programa provela sam istraživanje te napisala rad pod temom „Effect of copper(II) sulfate concentration on morphometric parameters, chlorophyll and proline concentrations of *Triticum aestivum* L.“, koji sam predstavila na konferenciji „Hrana i klimatske promjene“ na Sveučilištu Sjever 2021. godine. Iste godine upisala sam Prijeddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.