

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO- MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

HUMANIZACIJA BILJNIH *N*- I *O*-GLIKOZILIRANIH PROTEINA

Humanization of *N*- and *O*-glycosylated plant proteins

SEMINARSKI RAD

Klara Zubčić

Preddiplomski studij biologije

Undergraduate Study of Biology

Mentor: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

ZAGREB, 2015.

Sadržaj

1	Uvod.....	1
2	Glikozilacija u biljkama.....	2
2.1	<i>N</i> -glikozilacija	2
2.2	<i>O</i> -glikozilacija	4
3	Glikomodifikacije	4
3.1	Humanizacija biljne <i>N</i> -glikozilacije	5
3.1.1	Ekspresija usmjerena u endoplazmatski retikulum	5
3.1.2	<i>Knockout</i> specifičnih biljnih glikotransferaza.....	6
3.1.3	<i>Knockin</i> specifičnih ljudskih transferaza.....	6
3.2	Humanizacija biljne <i>O</i> -glikozilacije.....	7
3.2.1	Inženjering mucinskog tipa <i>O</i> -vezanog GalNAc	8
4	Literatura.....	10
5	Sažetak	11
6	Summary	11

1 Uvod

Glavne razlike u bioaktivnosti, farmakokinetici, stabilnosti i topljivosti proteina proizvedenih u različitim tipovima eukariotskih stanica posljedica su različitih posttranslacijskih modifikacija proteina. Jedna od posttranslacijskih modifikacija (PTM) je glikozilacija. Oko polovice svih proteina sisavaca je glikozilirano te oko 1% svih gena sisavaca kodira enzime uključene u sintezu i vezanje tih oligosaharidnih lanaca. Mnogi proteini koji se izlučuju iz stanice su glikozilirani, uključujući većinu proteina prisutnih u krvnom serumu. Na primjer, imunoglobulini i određeni hormoni kao što je folikulostimulacijski hormon (FSH), luteinizirajući hormon (LH) i tireotropin (TSH) su glikoproteini (Nelson i Cox, 2008).

Glikozilacija je važan dio u proizvodnji i modeliranju terapijskih svojstva terapijskih proteina te utječe na njihovu apsorpciju, biodostupnost i distribuciju do ciljnih stanica te cirkulacijsko vrijeme u organizmu i zaštitu od proteaza. Razvojem genetičkog inženjerstva razvijaju se i sofisticiraniji biokemijski ekspresijski sustavi. Trenutno najčešći ekspresijski sustavi za terapijske glikoproteine su stanice sisavaca, uglavnom stanice jajnika kineskog hrčka (CHO). Međutim, tako proizvedene glikanske strukture nisu u potpunosti optimalne i uočena je česta heterogenost *N*- i *O*-glikoformi rekombinantnih terapijskih proteina, vezanje epitopa koji nisu humani i odsutnost nekih glikana humanog tipa. Zbog velike heterogenosti je teško uspostaviti kontrolu nad glikozilacijom, neke humane glikanske strukture ne mogu se proizvesti (ili ne na željenom nivou) te je u mnogim slučajevima proizvodnja pojedinačnih glikoformi nemoguća. Stoga zabrinjava prisutnost ne-humane glikozilacije u glikoziliranim biofarmaceuticima proizvedenim u staničnim linijama sisavaca (Bosch i sur., 2013; Strasser, 2013).

Posljednjih godina biljke su se nametnule kao domaćin za proizvodnju terapijskih proteina s obzirom da imaju prednost pred mikroorganizmima zbog mogućnosti PTM, uključujući glikozilaciju, fosforilaciju i metilaciju, te nude nekoliko prednosti u usporedbi sa ekspresijskim sustavima koji se temelje na stanicama sisavaca. Uzgoj biljaka je jednostavniji i jeftiniji. Biljke nude gotovo neograničenu skalabilnost i smatraju se sigurnima zbog nedostatka ljudskih patogena (Strasser, 2013). Rekombinantni glikoproteini proizvedeni u transgeničnim biljkama zadržavaju svoju bioaktivnost, no ipak, biljke nisu idealne za

proizvodnju farmaceutskih proteina jer proizvode molekule s glikanima koji nisu kompatibilni s terapijskom primjenom u ljudi. To je razlog potrebe pronalaženja strategija humanizacije biljnih *N*- i *O*-glikoziliranih proteina (Kim i sur., 2014; Strasser, 2013).

2 Glikozilacija u biljkama

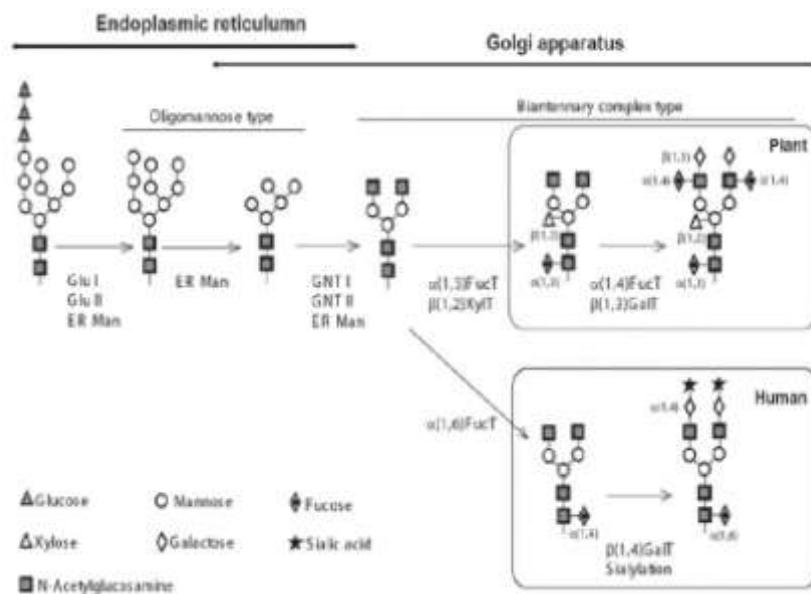
Glikozilacija je proces kovalentnog vezanja ugljikohidrata na polipeptide, lipide, polinukleotide, ugljikohidrate ili druge organske molekule, uglavnom kataliziran glikotransferazama, korištenjem specifičnih šećera nukleotidnih donorskih supstrata (Berg, Tymoczko, Stryer, 2006). Promjene glikozilacije mogu uvelike utjecati na funkciju proteina, imaju važnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima kao što su stanično prepoznavanje, regulacija ekspresije gena i usmjeravanje proteina unutar stanice. Glikani na proteine mogu biti vezani na dva osnovna načina, *N*-glikozilacijom i *O*-glikozilacijom.

Biljke sintetiziraju mnogo istih glikana koje nalazimo i u životinja, ali također proizvode širok spektar jedinstvenih glikana koji imaju važne uloge u životnom ciklusu biljaka (Varki i sur., 2009). U usporedbi s drugim višim eukariotima, biljke pokazuju veću očuvanost glikanskih uzoraka među različitim vrstama i manju raznolikost *N*-glikana (Bosch i sur., 2013), olakšavajući proizvodnju homogenih glikoproteina.

2.1 *N*-glikozilacija

N-glikozilacija je enzimski proces u kojem nastaje glikan (šećerni dio) vezan na bočni lanac asparagina preko amida u proteinu. *N*-glikozilacijsko mjesto je tripeptid Asn-X-Ser/Thr, gdje X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina i asparagina. Svi *N*-glikani dijele zajedničku minimalnu strukturu Man₃GlcNAc₂, koja se sastoji od N,N'-diacilhitobioza, β-manoze vezane na hitobiozu te dvije α-manoze vezane na 3. i 6. hidroksilnu grupu β-manoze. Kao i membranski proteini, sekretorni proteini u eukariotskim stanicama obično prolaze kroz kompleks endoplazmatskog retikuluma (ER) i Golgijevog aparata (GA) - staničnog sustava u

kojem se događa većina procesa glikozilacije. Većina sekretornih biljnih proteina sadrži 4 osnovna tipa *N*-vezanih glikana, različitih po supstituentima vezanim na šećernu jezgru: visoko-manozni, kompleksni, hibridni i paucinomanozni tip (Kim i sur., 2014). Nema značajnih razlika u početnim koracima sinteze *N*-glikana između biljnih i životinjskih ekspresijskih sustava, uključujući prijenos oligosaharidnog prekursora vezanog na dolikol i kontrolu vezanja proteina u ER. Biljne *N*-glikane karakterizira odsutnost sijalinske kiseline te prisutnost α -(1,3)-fukoze i β -(1,2)-ksiloze. Razlike nastaju modifikacijama tijekom prolaska *N*-vezanih glikana kroz GA. Prva modifikacija je vezanje ksiloze na središnju β -manozu stvaranjem β 1-2 glikozidne veze i događa se u središnjem dijelu GA. Zatim, na *trans* strani GA, dolazi do vezanja fukoze α 1-3 vezom na *N*-acetilglukozamin (GlcNAc) koji je vezan na asparagin proteina. Na kraju dolazi do odcjepljivanja pojedinih dijelova glikana, što je katalizirano α -manozidazom II te dodatka jednog ostatka GlcNAc (Varki i sur., 2009) (Slika 1.).



Slika 1. *N*-glikozilacija u ER i GA u biljnoj i ljudskoj stanici, preuzeto iz Ko i sur., 2009. Oligosaharidi vezani na specifične asparaginske ostatke procesirani su uzastopno uklanjanjem glukoze i manoze u ER i dodavanjem glikanskih ostataka specifičnih za vrstu u GA. Oznake: Glu I, glukozidaza I; Glu II, glukozidaza II; ER Man, ER manozidaza; GNT I, *N*-acetilglukozaminil-transferaza I; GNT II, *N*-acetilglukozaminil-transferaza II; β (1,2)XylT, β (1,2)-ksilozil-transferaza; α (1,3)FucT, α (1,3)-fukozil-transferaza; β (1,3)GalT, β (1,3)-galaktozil-transferaza; α (1,4)FucT, α (1,4)-fukozil-transferaza; β (1,4)GalT, β (1,4)-galaktozil-transferaza.

2.2 O-glikozilacija

O-glikozilacija je glikozilacija hidroksilne grupe bočnog lanca aminokiselina. Stvaranje O-glikozidne veze u eukariota se odvija u GA nakon smatanja i oligomerizacije proteina. O-glikani uglavnom započinju N-acetilgalaktozaminom (GalNAc), manozom ili fukozom, nakon čega slijedi postupno dodavanje ostalih monosaharida pomoću glikoziltransferaza.

O-glikozilacija u biljaka, kao i uloga O-glikana na rekombinantnim proteinima, slabo je poznata, za razliku od N-glikozilacije koja je relativno dobro opisan proces. Razlog tome je što su rani koraci N-glikolizacijskog puta visoko konzervirani u sisavaca i biljaka, dok je tijekom O-glikozilacije potpuno je različit u različitim tipova eukariota. O-glikani su mnogo raznolikije strukture od N-glikana. Najčešći oblik O-glikozilacije u životinja je glikozilacija serinskih ili treoninskih ostataka u GA, dok se u biljaka najčešće događa na hidroksilnim grupama hidroksiprolinskih (Hyp) ostataka i samo u manjoj mjeri na ostalim aminokiselinama kao što je serin. Hidroksilne skupine aminokiselina mogu biti modificirane dodavanjem velikog arabinogalaktanskog polisaharida, kratkog lanca arabinoze ili jednog galaktoznog ostatka, ali GalNAc nije tipično prisutan. Prema tome, mucinski tip O-glikozilacije nije nađen u rekombinantnim proteinima proizvedenim u biljkama. Dakle, biljke su vrlo dobro prilagođene za inženjering O-glikozilacijskog puta sisavaca *de novo* (Strasser, 2013; Varki i sur., 2009).

3 Glikomodifikacije

Kontrola glikozilacije ima veliku važnost za proizvodnju terapijskih proteina zato što o njihovim glikanima ovisi njihova stabilnost, aktivnost, antigenost i farmakodinamika. U većini slučajeva, glikozilacija mora biti optimizirana radi povećanja cirkulacijskog vremena u organizmu te distribuciju do ciljnih stanica (Varki i sur., 2009).

Modeliranje biljnih glikana prema humanima zahtijeva dvije vrste modifikacija: dijelovi specifični samo za biljke moraju biti eliminirani te dijelovi koji su specifični samo humanim, a ne i biljnim glikanima moraju biti uneseni. Raznim manipulacijama (poput *knockouta* neželjenog gena glikozilacijskog puta) dobivaju se stanične linije koje su glikozilacijski prihvatljivije i koje omogućuju nesmetanu proizvodnju terapijskih proteina.

Biljke imaju sposobnost sastavljanja proteina i PTM sličnih onima u stanicama sisavaca. Glikozilacija je najvažnija PTM rekombinantnih biofarmaceutika te su mnoge vrste lijekova, kao što su monoklonska protutijela, faktori rasta ili hormoni, glikolizirani. Dokazano je da određene glikoforme drastično utječu na učinkovitost rekombinantnih proteina (Strasser, 2012).

Farmaceutski proteini kao što su eritropoetin ili molekule imunoglobulina IgA sadrže oba tipa glikozilacije. Zato je važno razviti biljnu proizvodnu platformu za modelirane *N*- i *O*-vezane glikane (Strasser, 2013).

3.1 Humanizacija biljne *N*-glikozilacije

3.1.1 Ekspresija usmjerena u endoplazmatski retikulum

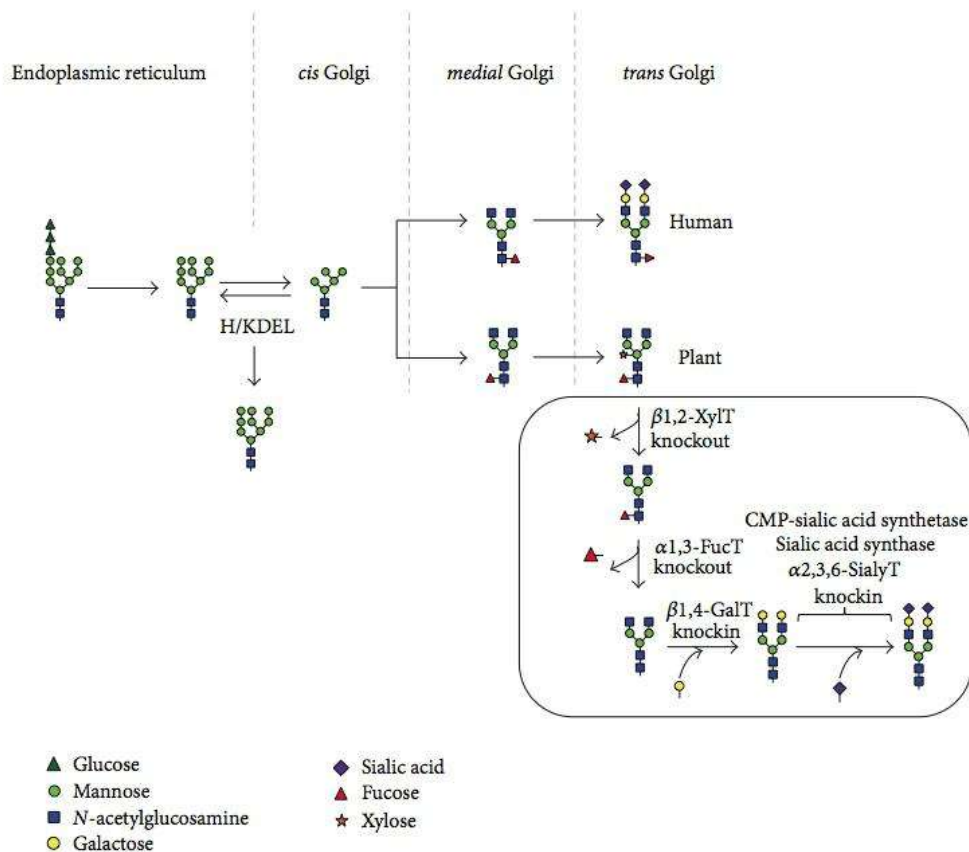
Često korištena strategija ekspresije rekombinantnih glikoproteina u biljkama je njihova akumulacija u ERu dodavanjem C-terminalnog signalnog H/KDEL, motiva za zadržavanje proteina u ER. Proteini zadržani u ERu sadrže visoko-manozne *N*-glikane, strukturno slične u biljaka i sisavaca. S obzirom da su visoko-manozne *N*-glikanske strukture zajedničke biljkama i sisavcima, vjerojatno je da nemaju imunogena svojstva. Zadržavanjem proteina u ERu sprječava se odlazak proteina u kasne odjeljke GA, gdje se događaju modifikacije specifične za biljke. Posljedica je izostanak biljkama specifičnih, imunogenih β 1,2-ksiloznih i α 1,3-fukoznih ostataka (Kim i sur., 2014). Nedostatak ove strategije je smanjena cirkulacija i zadržavanje takvih proteina u organizmu. S obzirom da je visoko-manozni tip *N*-glikana atipičan za ljudske proteine, makrofagi brzo uklanjaju visoko-manozne glikoforme iz krvotoka pomoću receptora za manozu na njihovoj površini. Time je poluživot terapijskih proteina s visoko-manoznim *N*-glikanima proizvedenih u biljkama znatno smanjen u odnosu na iste proteine s kompleksnim tipom *N*-glikana proizvedene u stanicama sisavaca (Bosch i sur., 2013).

3.1.2 *Knockout* specifičnih biljnih glikotransferaza

Jedan od načina humanizacije proteina je sprječavanje adicije imunogenih *N*-glikana na polipeptid. Utišavanje ili inaktivacija gena može se koristiti za reduciranje ili eliminaciju aktivnosti specifičnih biljnih glikotransferaza (β 1,2-ksilozil-transferaza i α 1,3-fukozil-transferaza) koje su odgovorne za prijenos ksiloze i fukoze na *N*-glikan proteina. Takvi glikanski ostatci nisu prisutni u ljudi pa mogu izazvati imunosnu reakciju i stoga su nepoželjni na proteinima namijenjenima za terapijsku uporabu. *Knockout* gena odgovornih za sintezu ovih glikotransferaza jednostavno je rješenje za nestajanje biljnih glikanskih epitopa bez ikakvog utjecaja na sekreciju proteina (Kim i sur., 2014)

3.1.3 *Knockin* specifičnih ljudskih transferaza

N-glikoproteini prirodno proizvedeni u biljkama ne samo da sadrže šećere koji nisu prisutni u glikoproteinima sisavaca, već im nedostaju neke ugljikohidratne strukture prisutne u ljudi. Osim transgeničnih biljaka bez gena za neželjene enzime, za humanizaciju biljne *N*-glikozilacije proteina potreban je i unos gena za željene enzime koji su svojstveni ljudima. Glikoinženjering uglavnom je fokusiran na dodavanje β 1,4-galaktoze i sijalinske kiseline na terminalne krajeve *N*-glikana u mutanata bez biljno-specifičnih *N*-glikanskih ostataka. Za adiciju β 1,4-galaktoze potreban je unos gena za β 1,4-galaktozil-transferazu te unos gena za sintetazu sijalinske kiseline i gena za sijalil-transferaze za adiciju sijalinske kiseline na terminalnu galaktozu (Kim i sur., 2014) (Slika 2.).



Slika 2. Shematski dijagram humanizacije glikozilacijskog puta u biljaka, preuzeto iz Kim i sur., 2014.

3.2 Humanizacija biljne *O*-glikozilacije

Neki važni biofarmaceutici, kao što su IgA i eritropoetin, su *O*-glikozilirani. Proizvodna platforma za modelirane *O*-glikane mogla bi poboljšati kvalitetu biofarmaceutika reducirajući heterogenost glikana, ali i povećati biološku aktivnost rekombinantnih terapeutika.

Inicijalizacija i procesiranje *O*-glikana je kompleksan proces. U ljudi, mucinski tip *O*-glikozilacije može inicirati 20 različitih UDP-GalNAc: polipeptid *N*-acetilgalaktozaminil-transferaza (GalNAc-Ts) koje kataliziraju prijenos jednog GalNAc ostatka na serin/treonin (GalNAc- α -Ser/Thr). Daljnja elongacija GalNAc ostataka događa se pomoću glikoziltransferaza u GA, što dovodi stvaranja do različitih *O*-glikanskih struktura. Nekontrolirana ekspresija ovih endogenih glikoziltransferaza u domaćinskim stanicama sisavaca sprječava nastajanje definiranih struktura, dovodeći do formacije prilično

heterogenih *O*-glikana na rekombinantnim proteinima. Zato su potrebni novi ekspresijski sustavi ili modeliranje uobičajenih ekspresijskih sustava prilagođenih proizvodnji željenih *O*-glikana na rekombinantnim proteinima (Strasser, 2013).

3.2.1 Inženjering mucinskog tipa *O*-vezanog GalNAc

Dvije studije dokazale su da je moguće koristiti biljke za proizvodnju rekombinantnih proteina s mucinskim tipom *O*-vezanog GalNAc. U prvom pokušaju uvođenja *O*-glikozilacije u biljke uridin-difosfat-*N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc) 4-epimeraza iz vrste *Yersinia enterocolitica* i UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc transporter iz vrste *Caenorhabditis elegans* bili su koeksprimirani s humanom *N*-acetilgalatkozaminil-transferazom II (GalNAc-T2) u duhanu *Nicotiana benthamiana*. Jedan ostatak GalNAc vezao se na endogeni biljni protein te su se ostaci GalNAc ugradili u ko-eksprimirani rekombinantni protein koji je sadržavao sekvencu motiva mucinskog tipa sa nekoliko ostataka Ser/Thr. Slična studija pokazala je da su kratkotrajne ekspresije GalNAc C4-epimeraze iz vrste *Pseudomonas aeruginosa* i humane GalNAc-T2 u duhanu *N. benthamiana* dovoljne za formiranje *O*-GalNAc na polipeptidu koji sadrži tandemska ponavljanja mucinskog tipa. Ista strategija upotrijebljena je za kreiranje transgenične biljke *Arabidopsis thaliana* i BY2 stanica duhana s mogućnošću proizvodnje *O*-GalNAc na rekombinantnom proteinu.

Uobičajena terminalna modifikacija mucina je vezanje sijalinske kiseline. S obzirom da biljke nemaju cijeli biosintetski put za pretvorbu prekursora UDP-GlcNAc u CMP-sijalinsku kiselinu, potrebno ga je unijeti u GA. GA sadrži sijalil-transferaze koji prenose sijalinsku kiselinu s CMP-sijalinske kiseline na glikane vezane na proteine.

Proizvodnja *O*-glikana postignuta je i ko-ekspresijom dvije sijalil-transferaze sisavaca, ST3 β -galaktozid α -2,3-sijalil-transferaze 1 (ST3Gal-I) i α 2,6-sijalil-transferaze (6GalNAc-III/IV), s humanim GalNAc-T2 i β 1,3-galaktozil-transferazom (C1GALT1) vinske mušice. Za implementaciju ove *O*-glikomodifikacije na rekombinantnom eritropoetinu proizvedenom u biljci bila je potrebna ko-ekspresija ukupno osam ne-biljnih proteina u duhanu (Strasser, 2013.).

Postoji još nekoliko zapreka upotrebi ovih dostignuća u industrijskoj proizvodnji nove generacije biofarmaceutika. Budući ciljevi su spriječiti stvaranje Hyp aminokiselinskih ostataka u blizini izloženih *O*-glikozilacijskih mjesta na rekombinantnim proteinima. Hyp

ostaci služe kao startne pozicije za vezanje biljnih *O*-glikana, čime se povećava rizik od neželjenih nuspojava kao što su alergijske reakcije (Strasser, 2013).

4 Literatura

- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, (2012). Biochemistry. Eds. S. Moran, A. Baker, N. Tymoczko, D. Goldman, W.H. Freeman and Company, New York, 329-355
- Bosch, D., Castilho, A., Loos, A., Schots, A., & Steinkellner, H. (2013). *N*-glycosylation of plant-produced recombinant proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 19(31), 5503–5512
- Kim, H., Jeon, J., Lee, K. J., & Ko, K. (2014). *N*-Glycosylation modification of plant-derived virus-like particles : an application in vaccines. *BioMed Research International*, 2014, 1-8
- Ko, K., Ahn, M.-H., Song, M., Choo, Y.-K., Kim, H. S., Ko, K., & Joung, H. (2008). Glyco-engineering of biotherapeutic proteins in plants. *Molecules and Cells*, 25(4), 494–503
- Nelson D, Cox M, (2008). Lehninger: Principles of biochemistry. Eds. K. Ahr, R. Rossignol, P. Shriner, P. McCaffrey, E. Geller, B. Moscatelli, W.H. Freeman and Company, New York, 235-270
- Strasser, R. (2013). Engineering of human-type O-glycosylation in *Nicotiana benthamiana* plants. *Bioengineered*, 4(4), 191–196
- Varki, A., (2008). Essentials of glycobiology, second edition. Eds: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 101-128, 321-332, 719-730

5 Sažetak

Glikanske strukture terapeutskih proteina utječu na njihova farmakodinamička i farmakokinetička svojstva. Optimalna glikozilacija povećala bi učinkovitost i sigurnost rekombinantnih farmaceutskih proteina. S obzirom na jeftiniji uzgoj i procesiranje, jednostavan *N*-glikozilacijski put i odsutnost *O*-glikozilacijskog puta karakterističnog za sisavce, biljke su se posljednjih godina nametnule u modeliranju ekspresijskog sustava za proizvodnju potpuno humaniziranih rekombinantnih terapeutskih proteina. Ciljevi pri konstruiranju takvog optimalnog sustava su inaktivacija gena za enzime karakteristične za biljnu glikozilaciju te uvođenje gena za enzime koji su karakteristični za čovjeka.

6 Summary

Glycan structures of therapeutic proteins affect their pharmacodynamics and pharmacokinetic characteristics. Optimal glycosylation would enhance efficiency and safety of recombinant pharmaceutical proteins. Due to inexpensive and simple cultivation, simple *N*-glycosylation pathway and absence of typical mammalian *O*-glycosylation pathway, in recent years plants have emerged as interesting new hosts for the production of fully humanized recombinant pharmaceutical proteins. Aims in engineering optimal expression system are inactivation of genes for plant-specific enzymes and introduction of enzymes that are human-specific.