

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

GLIKOZILACIJA TERAPEUTSKIH PROTEINA  
GLYCOSYLATION OF THERAPEUTIC PROTEINS

SEMINARSKI RAD

Hrvoje Gali  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)  
Mentor: doc. dr. sc. Ita Gruić -Sovulj

Zagreb, 2012.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>2</b>
<b>2. GLIKOZILACIJA PROTEINA</b> .....	<b>8</b>
2.1. <i>N</i> -GLIKOZILACIJA .....	10
2.2. <i>O</i> -GLIKOZILACIJA .....	12
<b>3. TERAPEUTSKI PROTEINI</b> .....	<b>14</b>
3.1 EKSPRESIJSKI SUSTAVI I PROIZVODNJA TERAPEUTSKIH PROTEINA .....	15
3.2. ERITROPOETIN – PRVI TERAPEUTSKI PROTEIN.....	17
<b>4. GLIKOINŽENJERING</b> .....	<b>20</b>
4.1. GLIKOOPTIMIZACIJA.....	21
4.2. PRIMJENA GLIKOINŽENJERINGA I TERAPIJE ZAMJENE ENZIMA PRI LIJE ENJU GAUCHEROVE BOLESTI .....	24
<b>5. LITERATURA</b> .....	<b>26</b>
<b>6. SAŽETAK</b> .....	<b>28</b>
<b>7. SUMMARY</b> .....	<b>29</b>

## 1. UVOD

Glikozilacija je najsloženiji oblik procesiranja novonastalih proteina i nužan za uspostavljanje njihove pravilne strukture i funkcije. Glikani (oligosaharidi i polisaharidi) su strukturno heterogena skupina molekula čiji primarni slijed nije predodređen kalupom, već ovisi o količini i aktivnosti procesiraju ih enzima – glikoziltransferaza i glikozidaza. I najmanja promjena u strukturi glikanske komponente se može negativno odraziti na stabilnost, topljivost i funkciju proteina, što često uzrokuje mnoge bolesti (Kusali, 2010).

Proteini svih živih bića se najčešće *N*-glikoziliraju, što uključuje vezanje ugljikohidrata na amidni dušikov atom asparagina slijeda Asn-X-Ser/Thr. Za uspješnu *N*-glikozilaciju, osim enzima, potreban je lipidni nosač koji će vezati glikanski prekursor, translocirati ga na drugu stranu membrane i konačno biti izlazna skupina prilikom prijenosa glikana na protein. Reakcije *O*-glikozilacije najviše su zastupljene kod eukariota prilikom sinteze proteoglikana, važnih za određivanje elastičnosti i strukture izvanstaničnog matriksa (Schwarz i Aeberli, 2011; Kusali, 2010).

Terapeutski proteini su široka skupina glikoproteina koji služe liječenju različitih patoloških stanja. Glikozilacija igra veoma važnu ulogu u modeliranju terapeutskih svojstva takvih proteina te utječe na njihovu apsorpciju, biodostupnost i distribuciju do ciljnih stanica te cirkulacijsko vrijeme u organizmu i zaštitu od proteaza (Bladon, 2002; Solá i Greibenow, 2010).

Prvi proizvedeni terapeutski protein je bio humani rekombinirani eritropoetin, a poslužio je, između ostalog, liječenju anemije nastale kroničnim zatajenjem bubrega. Za proizvodnju terapeutskih proteina se uglavnom koriste tri stanične linije: *E. coli*, kvasci i stanice jajnika kineskog hrčka. Sva tri ekspresijska sustava imaju svoje prednosti i nedostatke, pošto je teško reproducirati isti glikozilacijski obrazac kakav nastaje u stanicama *in vivo*. Raznim manipulacijama (poput *knockouta* neželjenog glikozilacijskog gena) se dobivaju stanične linije koje su glikozilacijski prihvatljivije i koje omogućuju nesmetanu proizvodnju terapeutskih proteina (Garnier i Reichard, 2005).

Glikoinženjering obuhvaća metode kojima je moguće manipulirati glikozilacijom terapeutskih proteina u svrhu postizanja veće terapijske efikasnosti. Dodatak ili eliminacija ugljikohidrata može pozitivno utjecati na farmakokinetiku i

farmakodinami ka svojstva terapijskih proteina. Pokazano je da prisutstvo negativno nabijenih glikana (poput sialnih kiselina, geni označeni simbolom \* su



o svih glikozilacijskih gena. Geni označeni simbolom \*\* su pojačano ekspresirani)

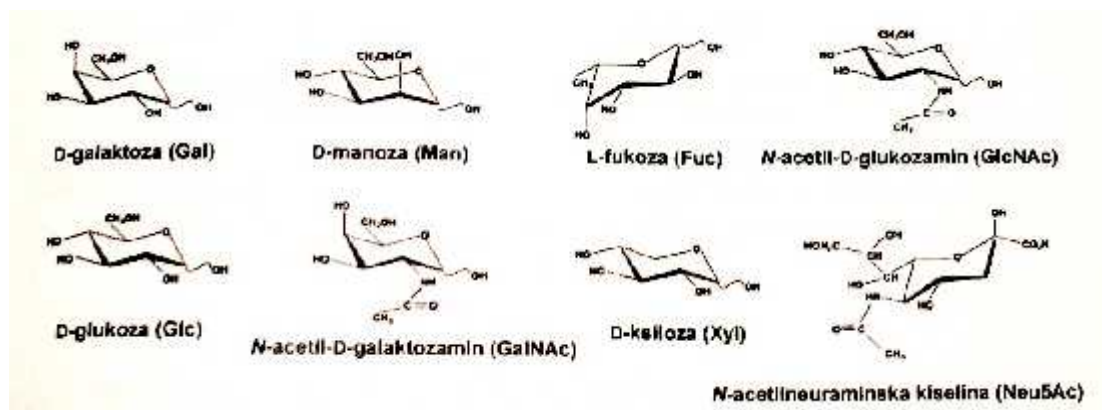
(preuzeto iz Xu, Nagarajan i suradnici, 2009)

### 3.2. Eritropoetin – prvi terapijski protein

Humani eritropoetin (EPO) je esencijalni glikoproteinski hormon koji se u odraslo doba sintetizira u bubrezima i izlučuje u krv. Krvotokom odlazi u koštanu srž gdje vezanjem na EPO receptor stimulira eritropoezu. Eritropoeza uključuje procese diferencijacije i proliferacije stanica eritroidne loze iz pluripotentne hematopoetske liferacije stanica eritroidne loze iz pluripotentne hematopoetske matične stanice. Smanjena koncentracija kisika, kao i smanjen broj eritrocita u krvi (uslijed npr. boravka na visokim nadmorskim visinama) glavni su stimulansi za izlučivanje eritropoetina (Sl.8). Patološko stanje smanjenog broja eritrocita u krvi ili nedovoljno sintetiziranog hemoglobina u eritrocitima zove se anemija. Anemija koja nastaje zbog deficita željeza, lako se liječi i nadoknadi željeza putem **hrane i tableta**. Međutim, terapija i kronično zatajenje bubrega uništavaju stanice bubrega koje proizvode eritropoetin što ireverzibilno sprečava stvaranje novih eritrocita (Kusali, 2010) čemu dolazi do vezanja ugljikohidrata na protein pomoću *N*- ili *O*- glikozidne veze ili rjeđe *C-C* veze. Glikozilacija je složen, ali nužan proces jer uvelike utječe na stabilnost proteina, njihovo smatanje i uspostavu pravilne konformacije, topljivost, biomolekularno prepoznavanje i prijenos signala, te zaštitu od proteaza i uklanjanje iz krvotoka (Kusali, 2010).

Glikani (oligosaharidi ili polisaharidi) su strukturno veoma raznolike molekule čija svojstva variraju ovisno o identitetu i broju monosaharida koji ih izgrađuju, načinu povezivanja (ravni ili razgranati lanci), te kemiji veze ( $\alpha$  ili  $\beta$  konfiguracija glikozidne veze) (Kusali, 2010). Za razliku od proteina čija je aminokiselinski slijed predodređen DNA kalupom, konačna struktura glikana ovisi o količini ekspresiranih procesivnih enzima – glikoziltransferaza (sintetiziraju glikan) i glikozidaza (hidroliziraju glikozidnu vezu, cijepaju glikan) te njihovoj specifičnosti prema supstratu (Garnier i Reichard, 2005).

Uobičajeni monosaharidi koje nalazimo u *N*-glikoproteinima uključuju: D-glukozu, D-galaktozu, L-fukozu, *N*-acetilneuroaminsku (sijalinsku) kiselinu, dok u *O*-glikoproteinima još nalazimo i *N*-acetil-D-glukozamin, *N*-acetil-D-galaktozamin i D-manozu (Sl.1). Promjene u glikanskim komponentama mogu značajno utjecati na biološku funkciju proteina na kojeg su vezani, stoga nepravilna ili nepotpuna glikozilacija može uzrokovati ozbiljne patološke i maligne promjene (Kusali, 2010).



**Slika 1.** Monosaharidi koji sudjeluju u izgradnji glikoproteina

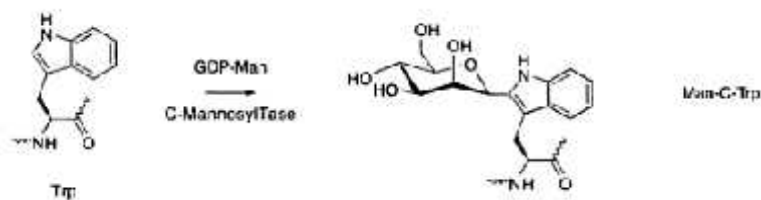
(preuzeto iz Kusali, 2010)

U osnovi razlikujemo dvije vrste glikoziliranih proteina ovisno o veličini ugljikohidratne komponente: proteoglikane, koji su važni za uspostavljanje i održavanje integriteta izvanstaničnog matriksa, te glikoproteine, koji imaju niz bioloških funkcija: na ekstracelularnoj strani membrane sudjeluju u prijenosu signala i prepoznavanju stanice, unutar stanice sudjeluju u vezikularnom transportu, a u krvi sudjeluju kao protutijela u imunološkoj reakciji (Nelson i Cox, 2008). Postoji i treća vrsta glikoziliranih proteina, tzv. mucini, koji sadrže velik broj *N*-acetilglukozamina povezanih na serinske ili treoninske bočne ogranke. Funkcija im je lubrikacija, stoga su neizostavni u mukoznom sekretu dišnog, probavnog i urogenitalnog sustava (Berg, Tymoczko, Stryer, 2012).

Ugljikohidrati se povezuju na proteine složenim enzimskim reakcijama koje se u eukariotskoj stanici odvijaju u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu. Postoje više različitih načina povezivanja ugljikohidrata i proteina:

1. *N*-glikozilacija, uključuje povezivanje ugljikohidrata na amidni dušikov atom asparagina u slijedu Asn-X-Ser/Thr gdje je X bilo koja aminokiselina izuzev prolina (Kusali, 2010), stoga aminokiselinski slijed proteina može otkriti potencijalna mjesta *N*-glikozilacije. Ovisno o tipu stanice, isti protein ne mora biti

- jednako i na svim potencijalnim mjestima glikoziliran (Berg, Tymoczko, Stryer, 2012).
2. *O*-glikozilacija, uključuje povezivanje ugljikohidrata na bojni ogranak serina ili treonina, te 4-hidroksilizina i 4-hidroksiprolina (Kusali, 2010).
  3. *C*-glikozilacija (*C*-manozilacija), ugljikohidrat (manozna) se povezuje na ugljikov atom bojnog ogranka triptofana (Sl.2). Rezultat povezivanja nije tipična glikozidna veza, već *C-C* veza. Istraživanja su pokazala da je supstrat *C*-glikozilacije prvi triptofan u slijedu Trp-X-X-Trp, a makar više od 300 proteina kod sisavaca sadrži slijed Trp-X-X-Trp, to znači da funkcija ove specifične modifikacije nije još poznata (Varki, Cummings, Esko i suradnici, 1999; Kusali, 2010).
  4. Ugljikohidrati su komponente glikofosfatidilinozitolnog sidra i time posreduju u vezanju nekih proteina na membranu (protein je vezan na ugljikohidrate preko fosfoetanolamina, a ugljikohidrati su vezani na membranu preko fosfatidilinozitola) (Kusali, 2010).



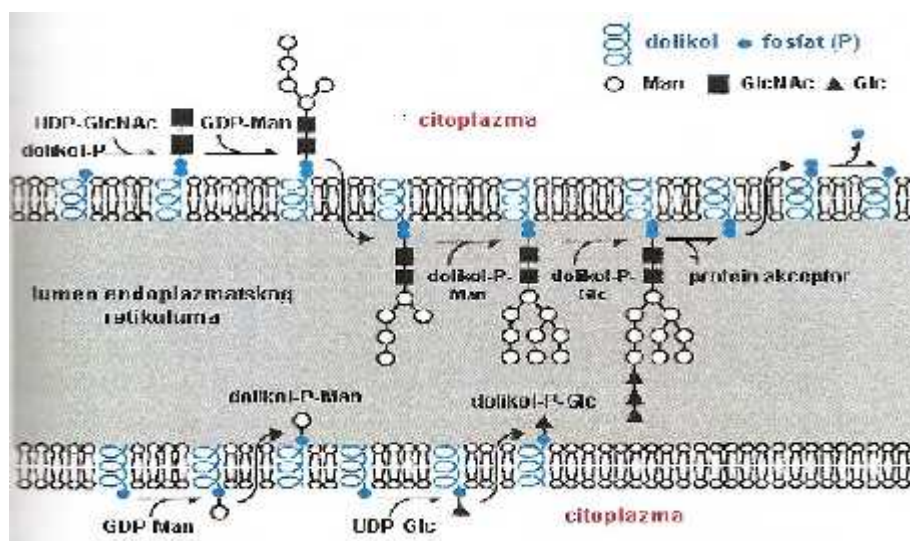
**Slika 2.** Reakcija *C*-glikozilacije manoze na bojni ogranak triptofana katalizirana *C*-manoziltransferazom (preuzeto iz Walsh, 2006)

Monosaharidi poput glukoze, fruktoze i galaktoze mogu se vezati na proteine neenzimskim procesom koji se naziva glikacija. Glikacija se odvija u krvotoku u prisustvu visoke koncentracije navedenih monosaharida. Za razliku od glikozilacije koja se pod kontrolom enzima odvija na točno definiranim mjestima proteina i nužna je za njihovo pravilno smatanje, stabilnost i funkciju, glikacija je štetan proces koji remeti funkciju proteina i potiče stvaranje poprečnih kovalentnih veza. Dugoročno, glikacija uzrokuje nakupljanje različitih polimeriziranih produkata koji su odgovorni za brojne kardiovaskularne, autoimune i neurodegenerativne bolesti (<http://www.legendarypharma.com/glycation.html>).



## 2.1. N-glikozilacija

Naj eš i na in glikozilacije proteina je stvaranje *N*-glikozidne veze s asparaginom signalnog slijeda Asn-X-Ser/Thr. Nedavna istraživanja su pokazala da je *N*-glikozilacija prisutna i kod arheja i bakterija gdje je tako er od fundamentalne važnosti za funkciju proteina. Oligosaharidni supstrat nužan za glikozilaciju sintetizira se u nizu enzimskih reakcija na plazmatskoj membrani prokariota i citosolnoj strani ER-a eukariota. Mnoštvo glikoziltransferaza katalizira prijenos monosaharidnih jedinica na lipidni nosa membrane (monosaharidi su prije transporta nukleotidno aktivirani). Nastali oligosaharid usidren na lipidni nosa (u daljnjem tekstu LLO, od eng. *lipid-linked oligosaccharide*) translocira se u periplazmatski prostor kod prokariota, odnosno u lumen ER-a kod eukariota gdje sudjeluje kao donor u procesu glikozilacije. Oligosahariltransferaza (OST) pretražuje signalni slijed Asn-X-Ser/Thr na akceptorskom proteinu te katalizira prijenos oligosaharida na bo ni ogranak asparagina (Sl.3) (Schwarz i Aebi, 2011).



**Slika 3.** Prikaz biosinteze LLO-a, prijenos glikana na akceptorski protein i kona na regeneracija fosforiliranog lipidnog nosa a (preuzeto iz Kusali , 2010)

Lipidni nosa je evolucijski konzerviran, a po kemijskoj strukturi je fosforilirani poliizoprenoid - dolikol ili undekaprenol. Svojim specifi nim strukturnim svojstvima sudjeluje u translokaciji, utje e na efikasnost procesa glikozilacije ovisno o dostupnosti za vezanje supstrata, te je dobra izlazna skupina za OST reakciju, nakon

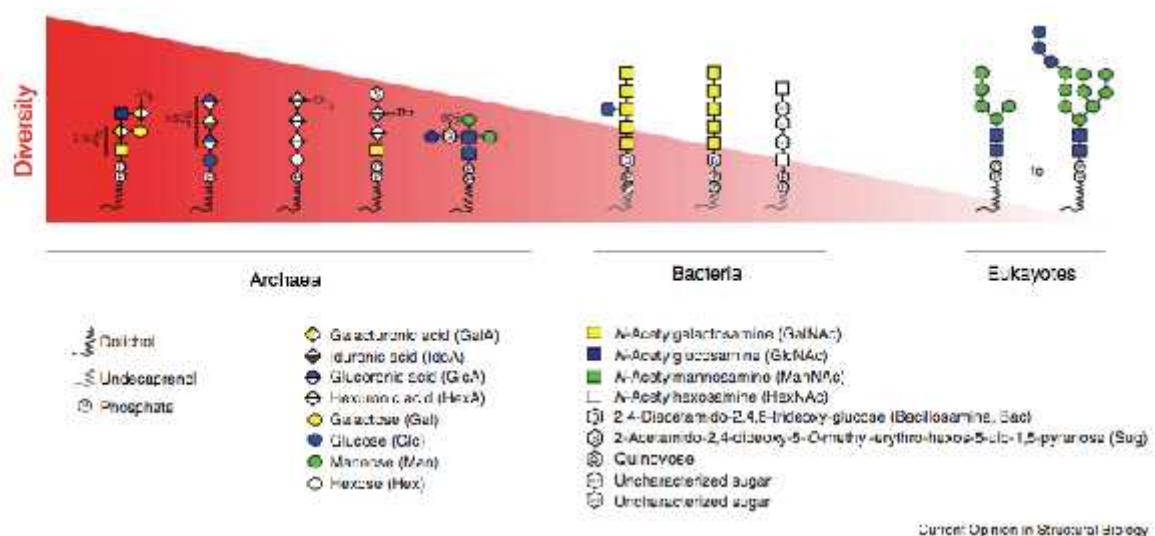
koje ostaje vezan na membranu spreman za idu i kataliti ki ciklus (Schwarz i Aebi, 2011).

Za razliku od konzerviranog lipidnog nosa a, oligosaharidna komponenta LLO-a uvelike varira izme u prokariota i eukariota (Schwarz i Aebi, 2011) (Sl.4). Glikozilirani proteini arheja i bakterija su uglavnom površinski proteini, flagelini te enzimi koji razgra uju polisaharide (Kusali , 2010).

Arheje, kao što je *Halobacterium salinarum*, pokazuju najve u heterogenost u gra i LLO-a. Arheje obi no sadrže više od jedne vrste LLO-a po stanici pošto se arhealni glikani mogu modificirati metilacijom, sulfonacijom ili adicijom aminokiselina, te se sintetiziraju na dolikol-fosfatu ili dolikol-pirofosfatu.

Mali broj bakterija uop e može katalizirati procese *N*-glikozilacije, uglavnom se radi o Gramm negativnim bakterijama. Takve bakterije pokazuju manju heterogenost u gra i LLO-a u odnosu na arheje (Schwarz i Aebi, 2011).

Prekursori eukariotskih *N*-glikana slijede odre eni strukturni obrazac, sastoje se od 3 molekule glukoze, 9 molekula manoze i 2 molekule *N*-acetilglukozamina (Kusali , 2010). Nakon sinteze, slijedi translokacija u lumen ER-a pomo u flipaze, gdje eukarioti mogu dodatno produljiti glikansku komponentu LLO-a. Glikan se prenosi na ciljni protein koji se dalje procesira u ER-u i Golgijevom aparatu (Schwarz i Aebi, 2011). Procesiranje podrazumijeva niz enzimskih procesa koji rezultiraju odcjepljivanjem manoze pomo u manozidaze, dodatkom razli itih vrsta monosaharida na glikansku okosnicu te razgranjenjem itavog glikana. (Kusali , 2010).



**Slika 4.** Raznolikost u strukturi LLO-a izme u domena.

(arheje i bakterije sintetiziraju više različitih i strukturno heterogenih vrsta LLO-a, dok eukarioti sintetiziraju LLO-e određene konzervirane strukture)  
(preuzeto iz Schwarz i Aebi, 2011)

## 2.2. O-glikozilacija

Stvaranje *O*-glikozidne veze se u eukariota odvija u Golgijevom aparatu nakon smatanja i oligomerizacije proteina. *O*-glikani uglavnom započinju *N*-acetilgalaktozaminom, manozom ili fukozom, nakon čega slijedi postupno dodavanje ostalih monosaharida pomoću glikoziltransferaza. Signalni slijed ne postoji, ali uobičajeno su glikozilirani serini i treonini u slijedu bogatim prolinima (Kusali, 2010). Negativno nabijeni glikozaminoglikani se procesom *O*-glikozilacije povezuju na tzv. proteine srži, čime nastaju proteoglikani. Proteoglikani ostvaruju interakcije s kolagenom izvanstaničnog matriksa, ali i raznim faktorima rasta, stoga su važni za proces rasta i diferencijacije stanica (Nelson i Cox, 2008).

Postoje, međutim, slučajevi *O*-glikozilacije 4-hidroksiprolina i 4-hidroksilizina. Hidroksilacija i glikozilacija lizina u kolagenu sprječavaju međusobno povezivanje molekula kolagena poprečnim kovalentnim vezama što je važno za održavanje elastičnosti i integriteta izvanstaničnog matriksa. *O*-glikozilacija postoji i kod arheja i nekih patogenih bakterijama kao što su *Helicobacter pylori*, *N. Gonorrhoeae* i *Pseudomonas aeruginosa* (Kusali, 2010).

### 3. TERAPEUTSKI PROTEINI

Terapeutski proteini su najčešće rekombinantni humani proteini koje *in vitro* mogu sintetizirati različite stanične linije. Obuhvaćaju veliku skupinu proteina koji služe liječenju različitih metaboličkih i biokemijskih abnormalnosti nastalih kao posljedica bolesti (poput dijabetesa i anemija), nasljednih poremećaja (poput hemofilije i Gaucherove bolesti) i tumora. Terapeutski proteini ublažavaju simptome ili potpuno liječe, makar nisu usmjereni na neutralizaciju uzroka patološkog stanja. Terapeutski proteini su uglavnom glikoproteini (hormoni, enzimi, faktori rasta, neka monoklonalna protutijela i dr.) stoga je proces glikozilacije važan prilikom njihove proizvodnje jer značajno utječe na stabilnost i terapijsku učinkovitost proteina (Bladon, 2002; Baumaister, 2004).

Postoje tri temeljne primjene terapeutskih proteina u liječenju:

1. Direktna zamjena proteina/enzima (*eng. enzyme replacement therapy*). Takva terapija služi liječenju bolesti u kojima nedostaje određeni protein ili enzim (kao što je kod dijabetesa i hemofilije). Terapija zahtjeva konstantno uzimanje deficitarnog proteina nakon njegove degradacije u krvotoku ili izlučivanja. Glikoinženjeringom se

može manipulirati glikozilacijom terapijskih proteina i tako znatno povećati vrijeme zadržavanja proteina u krvi (više u poglavlju *Glikoinženjering*).

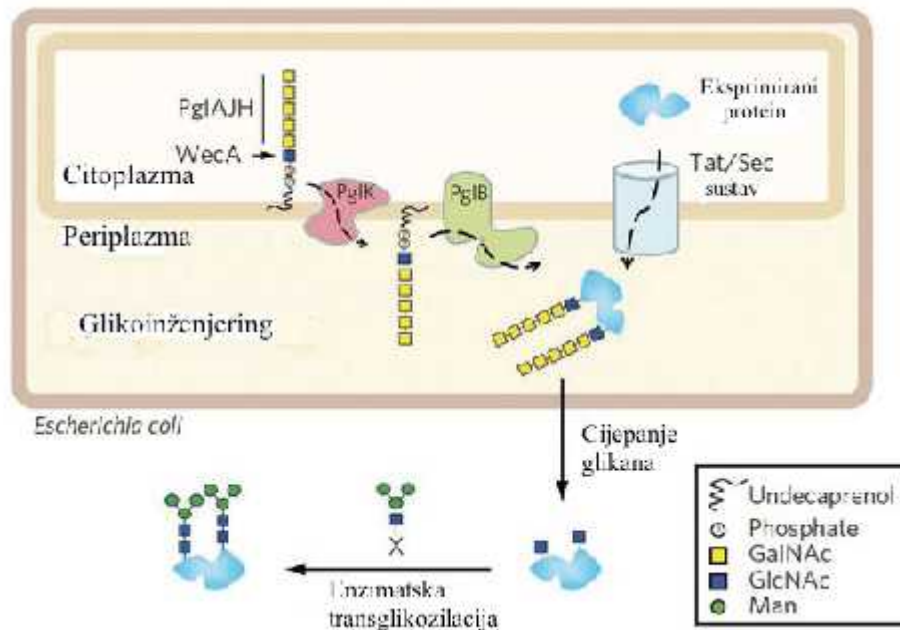
2. Simptomatsko liječenje uključuje veoma selektivnu i kratkotrajnu intervenciju terapijskog proteina u suzbijanju nekog patološkog procesa. Formiranje krvnog ugruška u arterijama koje snabdjevaju srčani mišići hranjivim tvarima može dovesti do infarkta, stoga postoje terapijski proteini (rekombinantni plazminogeni aktivatori) koji enzimski razgrađuju ugrušak.

3. Profilaktičko liječenje omogućava imunološku zaštitu protiv različitih patogena. Poznavanjem molekularne strukture uzročnika, moguće je dio površine (epitop) izolirati ili sintetizirati u laboratoriju, te iskoristiti za stimuliranje imunološkog sustava prije kontakta s patogenom (cijepljenje). Zahvaljujući cijepljenju moguća je prevencija raznih bolesti kao što su polimijelitis, ospice, rubeola i tetanus (Bladon, 2002; Baumaister, 2004).

### 3.1 Ekspresijski sustavi i proizvodnja terapijskih proteina

Općenito postoje dvije vrste ekspresijskih sustava: prokariotski i eukariotski. Za sintezu terapijskih proteina najčešće se koriste tri tipa stanin linija: *Escherichia coli* (prokariotski ekspresijski sustav), kvasci i stanice jajnika kineskog hrčka (eukariotski ekspresijski sustavi). Međutim, danas se sinteza terapijskih proteina provodi i u humanim stanin linijama. Odabir prikladne stanin linije najviše ovisi o istraživaču i zadanim ciljevima (Garnier i Reichard, 2005).

Prokariotski sustav (*E. coli*) jednostavan je za manipulaciju, industrijski jeftin i proizvodi velike količine rekombinantnih proteina (Sl.5). Međutim, *E. coli* na drugačiji način glikozilira svoje proteine od eukariota. Nema potrebne glikoziltransferaze i glikozidaze, stoga humani terapijski proteini ekspimirani u *E. coli* imaju promijenjen glikozilacijski obrazac i svojstva. *E. coli* se svejedno koristi za sintezu prve generacije terapijskih proteina prije prebacivanja proizvodnje u prikladan eukariotski sustav (Garnier i Reichard, 2005; Kusali, 2010).

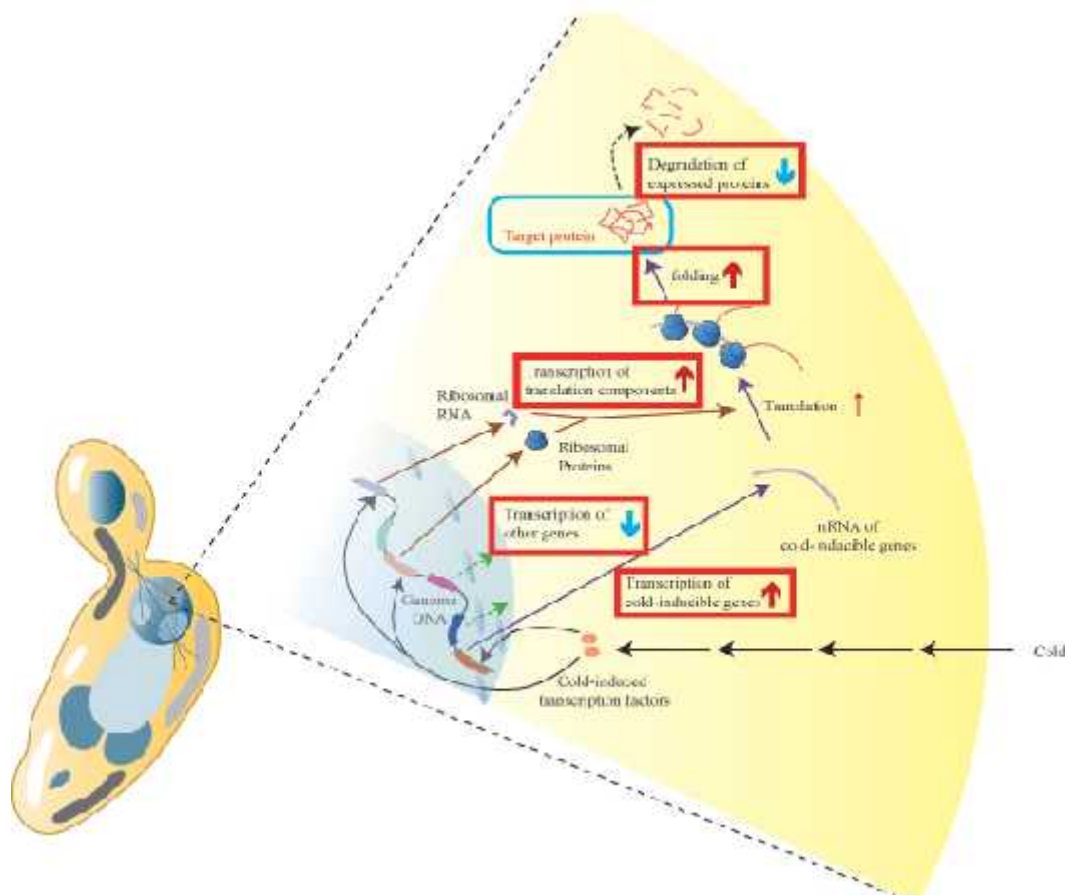


**Slika 5.** Shematski prikaz ekspresijskog sustava kod *E. coli*

(u prikazanom sustavu, proteini se nakon sinteze i glikozilacije translociraju u periplazmatski prostor. Tamo enzimi cijepaju glikane na manje fragmente, nakon čega ih tranzglikozilaze remodeliraju da izgledaju poput eukariotskih *N*-glikana)

(prilagođeno prema Shwarz, Huang, Li i suradnici, 2010)

Kvasci (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) i neke filamentozne gljivice su, također, veoma prikladni sustavi za proizvodnju velikih količina terapeutskih proteina (Sl.6). Stanice se relativno brzo dijele i stvaraju guste nakupine koje se uzgajaju u mediju koji ne sadrži komponente animalnog porijekla koje bi mogle interferirati u proizvodnji humanih glikoproteina. *N*-glikani koje sintetiziraju spomenuti organizmi su bogati manozom. Manoza je često prisutna na površini bakterijskih stanica i virusnih čestica te je u visokim koncentracijama snažno imunogeni na - sposobna je potaknuti sudionike specifičnog imunološkog odgovora na senzibilizaciju i sintezu protutijela, koja bi potom neutralizirala terapijski protein. Radi izbjegavanja takvog ishoda, provodi se tzv. humanizacija glikozilacijskog puta, deletiranjem gena koji kodira endogene kvasčeve glikoziltransferaze. Ostale se glikoziltransferaze, koje stvaraju glikanske strukture prikladnije za unos u ljudski organizam, lokaliziraju i ostavljaju intaktne (Garnier i Reichard, 2005; Kusali, 2010).

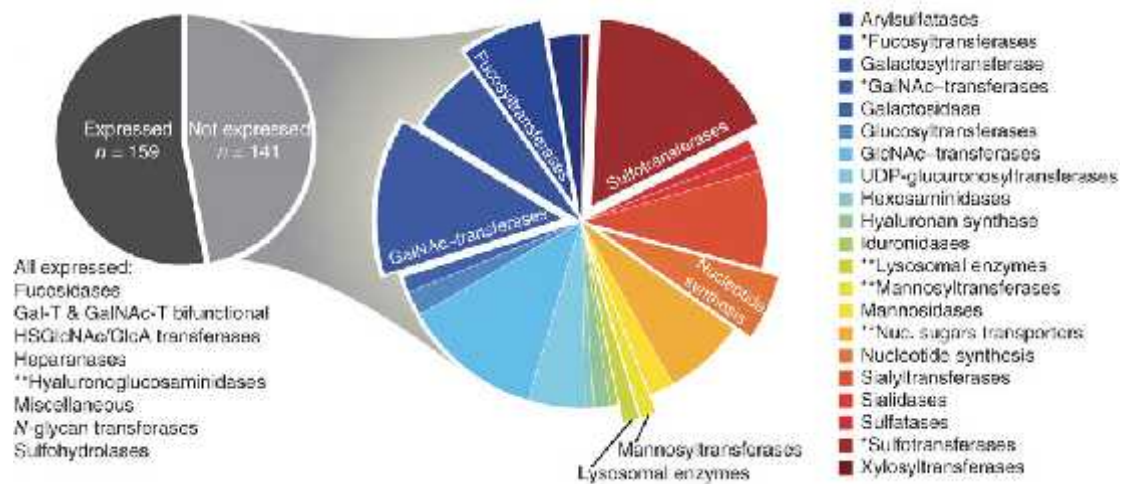


**Slika 6.** Ekspresijski sustav kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

(prikazani ekspresijski sustav je modificiran tako da se sintetiziran protein pravilno smata jedino pri niskim temperaturama)

(preuzeto s [http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-mbt/research\\_e.html](http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-mbt/research_e.html))

Za proizvodnju humanih terapijskih proteina naj eš e se odabiru stanice jajnika kineskog hr ka (*eng. chinese hamster ovary*, CHO), radi postizanja što prikladnije glikozilacije. Sisavci posjeduju jako kompleksni glikozilacijski sustav kojeg, ovisno o tipu stanice, ini više od 200 procesiraju ih enzima. Za razliku od humanih stanica, CHO stanice stvaraju nizak postotak sijaliziranih proteina, proteini koji su sijalizirani sadrže sijalinsku kiselinu Neu5Gc umjesto humane Neu5Ac (što potencijalno može izazvati imunološku reakciju), te glikani esto sadrže disaharid Gal( 1-3)Gal koji ne postoji kod ljudi. Primjenom geneti kog inženjerstva mogu e je uvesti gen za sijaliltransferazu i tako pove ati udio sijalinske kiseline u humanim terapijskim proteinima koje ekspimiraju CHO stanice (Sl.7) (Garnier i Reichard, 2005).



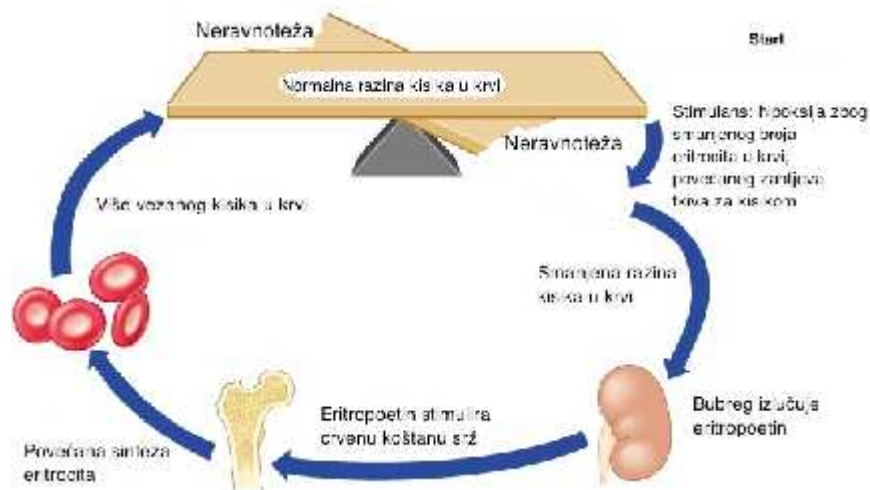
**Slika 7.** Prikaz glikozilacijskih gena koje eksprimira stani na linija CHO-K1, izvedena iz originalne CHO linije

(53% svih glikozilacijskih gena je ekspimirano. Zahvaljuju i geneti kim preinakama, geni ozna eni simbolom \* su znatno manje ekspimirani, makar ine ve i udio svih glikozilacijskih gena. Geni ozna eni simbolom \*\* su poja ano ekspimirani)  
 (preuzeto iz Xu, Nagarajan i suradnici, 2009)

### 3.2. Eritropoetin – prvi terapijski protein

Humani eritropoetin (EPO) je esencijalni glikoproteinski hormon koji se u odraslo doba sintetizira u bubrezima i izlu uje u krv. Krvotokom odlazi u koštanu srž gdje vezanjem na EPO receptor stimulira eritropoezu. Eritropoeza uklju uje procese diferencijacije i proliferacije stanica eritroidne loze iz pluripotentne hematopoetske matične stanice. Smanjena koncentracija kisika, kao i smanjen broj eritrocita u krvi (uslijed npr. boravka na visokim nadmorskim visinama) glavni su stimulansi za izlu ivanje eritropoetina (Sl.8). Patološko stanje smanjenog broja eritrocita u krvi ili nedovoljno sintetiziranog hemoglobina u eritrocitima zove se anemija. Anemija koja nastaje zbog deficita željeza, lako se lije i nadoknadom željeza putem hrane i tableta. Me utim, razne infekcije, kemoterapija i kroni no zatajenje bubrega uništavaju stanice bubrega koje proizvode eritropoetin što ireverzibilno sprje ava stvaranje novih eritrocita (Kusali , 2010) (<http://apbrwww5.apсу.edu/thompsonj/>).





**Slika 8.** Shematski prikaz odgovora na sniženu koncentraciju kisika u krvi

(izlučivanje eritropoetina je pod negativnom povratnom spregom)

(prilagođeno prema <http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/>)

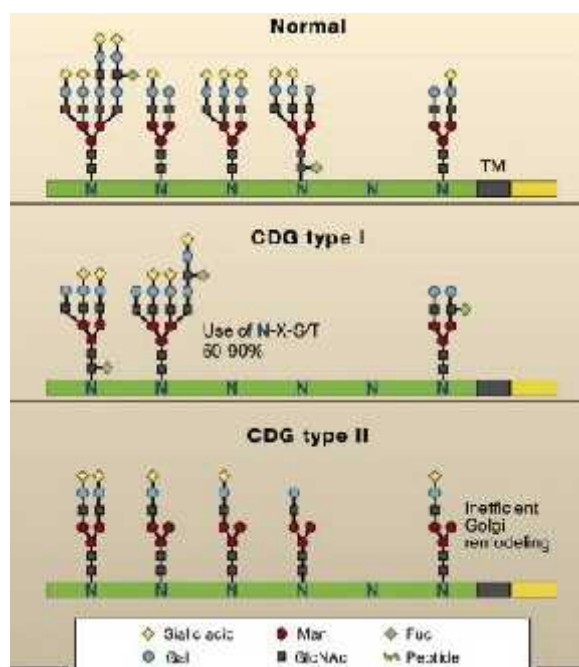
EPO je izrazito glikozilirani protein čiji uobičajeni vijek poluživota u krvi iznosi oko 5 sati. Istraživanja su pokazala da je neglikozilirani EPO jako nestabilan i formira agregate što rezultira potpunim gubitkom funkcije. Također je pokazano da nepravilna glikozilacija proteina EPO (npr. nedostatak sialinske kiseline) dovodi do prijevremene degradacije hormona u krvi. Dakle, na biološku aktivnost EPO utječe i stupanj glikozilacije (konkretno sializacije) što je bila značajna činjenica prilikom proizvodnje humanog rekombinantnog eritropoetina (*rhEPO*) u CHO stanicama. *rhEPO* je prvi terapijski protein, pojavio se na tržištu 1980-ih godina i znatno je pomogao liječenju anemija uzrokovanih uništavanjem stanica bubrega. *rhEPO* nije pokazivao imunogenost pri unosu u organizam, makar se od prirodnog hormona razlikovao u strukturi vezanih glikana (posljedica sinteze u CHO stanicama). Do danas je sintetski proizvedeno nekoliko vrsta *rhEPO*, a od 2001. se za liječenje anemija koriste hiperglikozilirani analog *rhEPO*-a nazvan NESP (eng. *novel erythropoiesis stimulating protein*) ili darbepoetin alfa. NESP sadrži pet *N*-glikozilacijskih mjesta (tri prirodna i dva uvedena). Zahvaljujući dodatnim glikozilacijskim signalnim slijedovima, povećan je sadržaj sialinske kiseline što dovodi do duže cirkulacije i zadržavanja hormona u organizmu, ali i manjeg afiniteta za vezanje na EPO receptor u odnosu na *rhEPO*. Međutim, dulji poluživot u krvi nadmašuje smanjeni afinitet vezanja na receptor, stoga NESP djeluje efikasnije od

*rhEPO* i zahtjeva manje u estali unos u organizam uz isti terapijski u inak. (Kusali , 2010.; Garnier i Reichard, 2005).

#### **4. GLIKOINŽENJERING**

Pojedini glikoprotein može postojati u više glikoformi, ako je aminokiselinski slijed o uvan, a varira broj i vrsta monosaharidnih jedinica vezanih glikana te okupiranost glikozilacijskih mjesta. Postojanje razli itih glikoformi istog glikoproteina ovisi o koli ini eksprimiranih procesiraju ih enzima (glikoziltransferaza i glikozidaza), njihovoj specifi nosti prema supstratu, vremenskom trajanju

procesiranja istim enzimom i lokalizaciji enzima u stanici (Sl.9) (Kusali , 2010; Garnier i Reichard, 2005).



**Slika 9.** Prikaz tri različite glikoforme istog proteina

(u ovom slučaju je postojanje različitih glikoformi posljedica tzv. glikozilacijske kongenitalne bolesti i može dovesti do snažne autoimune reakcije i smrti. U prvom tipu bolesti, osim što je promjenjena struktura N-vezanih glikana, preostala uobičajena glikozilacijska mjesta su ostala prazna. Dok su u drugom tipu bolesti prisutni svi glikani, ali su također potpuno izmjenjeni zbog nedostatnog procesiranja u Golgijevom aparatu)

(preuzeto iz Dennis, Nabi i Demetriou, 2009.)

Promjena glikozilacijskog obrasca na površini proteina omogućava manipulaciju fizikalno-kemijskim i farmakodinamičkim svojstvima terapijskih proteina s ciljem stimuliranja njihove terapijske efikasnosti. Glikoinženjeringom možemo ciljano uvoditi glikanske strukture (pomoću specifičnih glikoziltransferaza) koje se dodatno stabiliziraju i sprječavaju farmakološki neželjene promjene poput oksidacije, poprečnog povezivanja, denaturacije, precipitacije, kinetičke inaktivacije ili agregacije. Također, dodatna glikozilacija može usporiti proteolitičku degradaciju proteina *in vivo* što produžuje vrijeme njihovog biološkog djelovanja. Uz sve spomenuti NESP, neki od terapijskih proteina kojima je proteoliza znatno odgođena glikozilacijom uključuju i interferon- $\gamma$ , protutijela slična IgG-u, urokinazu alfa i tireotropin alfa, a nedavna istraživanja su pokazala da proteolizu najefikasnije

odga aju negativno nabijeni glikani poput sijalinske kiseline (Solá i Greibenow, 2010).

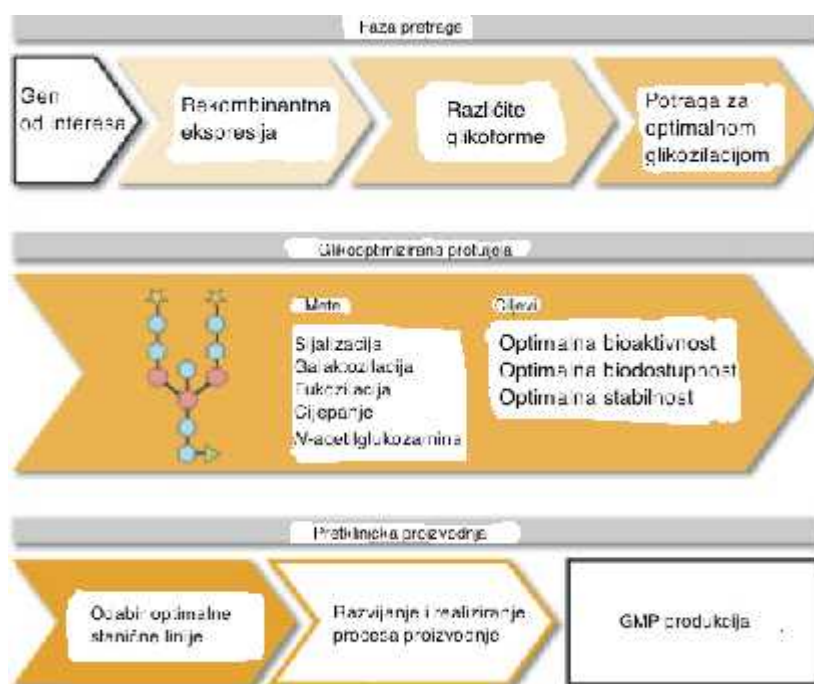
#### 4.1. Glikooptimizacija

Glikozilacijom terapeutskih proteina moduliraju se i njihova farmakokineti ka svojstva što utje e na njihovu apsorpciju, distribuciju i cirkulaciju u organizmu te izlu ivanje. Optimalna glikozilacija stoga podrazumijeva bolju apsorpciju terapeutskog proteina, duže cirkulacijsko vrijeme i distribuciju do svih organa, tkiva i stanica u organizmu gdje potencijalno može djelovati te pravovremenu degradaciju i uklanjanje iz organizma, zbog mogućeg toksi nog djelovanja ili izazivanja imunološkog odgovora (Solá i Greibenow, 2010; Baumaister i Goletz, 2010).

Glikooptimizacija terapeutskih proteina postiže se na idu e na ine (Sl.10):

1. Glikozilacija se enzimski modificira nakon proizvodnje terapeutskih proteina (tzv. metoda remodeliranja glikoproteina). Metoda se temelji na *in vitro* manipulaciji glikozilacije dodatkom glikoziltransferaza i/ili glikozidaza (ovisno o efektu koji želimo postići) u stani nu kulturu koja proizvodi terapijske proteine. Me utim, mora se imati na umu da razli ita regioselektivnost, specifi nost prema supstratu i interakcija enzima sa supstratom može utjecati na ishod glikozilacije, pa se ne e dobiti potpuno homogena populacija proteina (Baumaister i Goletz, 2012; Garnier i Reichard, 2005).
2. Odabire se što prikladnija stani na linija za proizvodnju glikoproteina i strogo se kontroliraju uvjeti proizvodnje. Raznim manipulacijama (poput ve navedene s CHO stanicama) može se dobiti stani na linija s glikozilacijskim mehanizmom prilago enim proteinu od interesa. Npr. biljne stanice u svoje *N*-glikane ugra uju velike koli ine monosaharida ksiloze. U ljudskim *N*-glikanima ksiloza nije prisutna, stoga ako se želi postići da biljna stani na linija proizvede terapijske proteine kojim e se lije iti ovjeka, mora se napraviti *knockout* gena koji kodira glikoziltransferazu specifi nu za ksilozu. Za proizvodnju ljudskih proteina u novije vrijeme se umjesto CHO stanica koriste i ljudske stani ne linije razli itih profila glikozilacije (sa/bez 1,6-fukozilacije, sa/bez 2,6-sijalinizacije, puno/malo galaktozilacije i sl.) što omogu ava odabir najprikladnije glikoforme proteina.

3. Geneti kim inženjerstvom se mogu dodati ili eliminirati glikozilacijska mjesta (signalni slijedovi) na proteinu (Baumaister i Goletz, 2010).

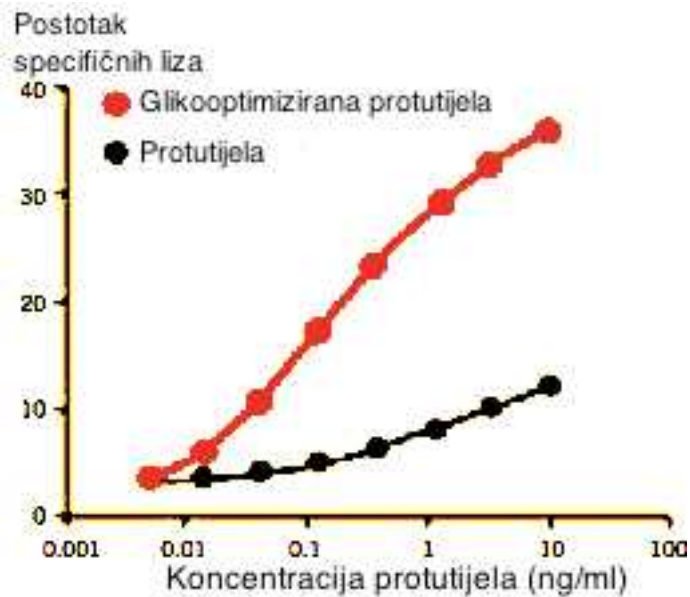


**Slika 10.** Prikaz glikooptimizacije kroz nekoliko etapa

(posljednji korak se odnosi na sintezu proteina za preklinička testiranja, zbog provjeravanja kvalitete i sigurnosti nastalih proteina)

(prilagođeno prema Baumaister i Goletz, 2010)

U posljednje vrijeme se farmaceutski laboratoriji intenzivno bave glikooptimizacijom terapijskih protutijela (Baumaister i Goletz, 2010). Protutijela (imunoglobulini) su glikoproteini građeni od dva temeljna funkcionalna fragmenta: Fab koji stvara vezno mjesto te specifično veže epitetop antigena i Fc koji sudjeluje u prijenosu signala u stanici (efektorska uloga) (Andreis, 2010). IgG sadrži dva *N*-glikozilacijska mjesta na Fc fragmentu, a 30% IgG-a izoliranih iz ljudskog seruma, sadrži i jedno dodatno *N*-glikozilacijsko mjesto na Fab fragmentu. Proizvodnja tih protutijela u modificiranim humanim stanicama koje ne provode 1,6-fukoizaciju, znatno stimulira efikasnost protutijela *in vivo* i *in vitro* te takva protutijela snažnije aktiviraju antitumorske stanice NK (*natural killer*) kao i citotoksične T-limfocite (Sl.11) (Baumaister i Goletz, 2010).

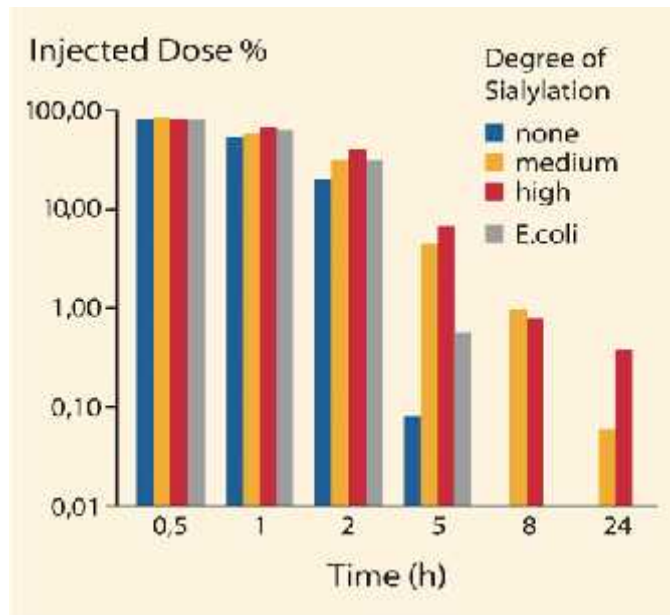


**Slika 11.** Značajna promjena efikasnosti citotoksičnosti zbog manipuliranja glikozilacijom protutijela

(Rezultati pokazuju da, pri jednakoj koncentraciji, glikozilirana protutijela efikasnije aktiviraju citotoksične stanice)

(prilagođeno prema Baumaister i Goletz, 2010)

Osim do sad navedenih, postoji još mnogo primjera terapijskih proteina kojima je efikasnost značajno poboljšana glikoinženjeringom. Dvije farmaceutske tvrtke su dugi niz godina jedan (neimenovani) faktor rasta proizvodile u *E.coli* i stanicama kvasca. U tim staničnim linijama ili uopće nije dolazilo do glikozilacije ili jest, ali je sadržaj sialinske kiseline bio jako nizak. Nakon određenog vremena, proizvodnja faktora rasta je prebačena u treću staničnu liniju koja je glikozilirala proteine s većim stupnjem sializacije. Nakon testiranja na miševima, potvrđen je znatni porast aktivnosti faktora rasta što je naposljetku dovedeno u vezu sa stupnjem sializacije (S1.12).

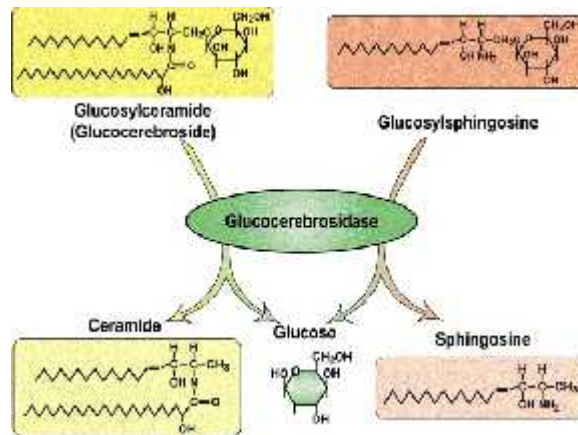


**Slika 12.** Dostupnost različitih glikoformi u krvi (prikazano kao postotak unesene doze) kroz 24 sata

(faktori rasta sa srednjim i najvećim udjelom sialinske kiseline su se zadržali u krvi i nakon 24 sata. Plava boja predstavlja galaktoziliranu glikoformu bez sialinske kiseline. Ta glikoforma i neglikoziliran protein iz *E.coli* su degradirani između 5. i 8. sata. Interesantno je primjetiti kako je prije degradiran galaktoziliran produkt od neglikoziliranog. Graf potvrđuje prethodno navedenu činjenicu da sialinska kiselina odgađa proteolizu i produžuje cirkulacijsko vrijeme glikoproteina u organizmu) (preuzeto iz Baumaister i Goletz, 2010).

#### 4.2. Primjena glikoinženjeringa i terapije zamjene enzima pri liječenju Gaucherove bolesti

Danas svako 5000. – 10000. novorođeno dijete boluje od jedne lizosomske bolesti pospremanja. Riječ je o skupini bolesti koje karakterizira nakupljanje toksičnih metabolita u organizmu zbog nefunkcionalnosti enzima koji ih inače razgrađuju (<http://medicalxpress.com/conditions/lysosomal-storage-disease/>). Gaucherova bolest je teški nasljedni poremećaj koji spada u lizosomske bolesti pospremanja, a nastaje mutacijom gena GBA. Normalni produkt gena GBA je enzim  $\beta$ -glukocerebrozidaza koja u lizosomu katalizira reakciju hidrolize glukocerebrozida na glukozu i ceramid (S1.13).



**Slika 13.** Shematski prikaz reakcije koju katalizira  $\beta$ -glukocerebrozidaza.

(prikazana je i hidroliza alternativnog supstrata, glukozilsfingozina, na glukozu i sfingozin)

(preuzeto iz Sidransky, 2004)

Nakon što je enzim mutacijom izgubio funkciju, dolazi do toksi nog porasta koncentracije glukocerebrozida naj eš e u stanicama makrofaga koji su rasprostranjeni itavim organizmom i sudjeluju u imunološkom odgovoru. Osim makrofaga, nakupljanje glukocerebrozida mogu e je i u jetri, slezeni, plu ima i mozgu, što tako er remeti njihovo normalno funkcioniranje, a u kona nici izaziva teška ošte enja i smrt (<http://ghr.nlm.nih.gov/condition/gaucher-disease>). Makar je bolest neizlje iva, pomo u glikoinženjeringa i terapije zamjene enzima postižu se odli ni rezultati i pacijentima se znatno produžuje život i neutraliziraju simptomi. Rekombinantna  $\beta$ -glukocerebrozidaza sadrži dva *N*-vezana glikana koji se prije unosa u organizam cijepaju glikozidazom (cijepa se terminalna sijalinska kiselina). Glikani se nakon cijepanja sastoje od 3 terminalne manoze, 2 *N*-acetilglukozamina i fukoze što olakšava transport  $\beta$ -glukocerebrozidaze u stanice makrofaga gdje uspješno komplementira defektni enzim (Garnier i Reichard, 2005).



## 5. LITERATURA

- Andreis I, Batini D, Ulo F, Gr evi D, Lukinovi -Škudar V, Maruši M, Taradi M, Višnji D, 2010. Imunologija. Eds. S. Glamulin, A. Jureti , B. Malenica, Medicinska naklada, Zagreb, pp. 144-155.
- Baumeister H, 2004. Biotopics 24. Eds. C. Puhan, G. Harms, BioTOP Berlin-Brandenburg, Berlin, pp. 10-11.
- Baumeister H, Goletz S, 2010. A matter of cell line development. *European Biopharmaceutical Review* **129**, 54-58.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, 2012. Biochemistry. Eds. S. Moran, A. Baker, N. Tymoczko, D. Goldman, W.H. Freeman and Company, New York, pp. 329-355.
- Bladon C, 2002. Pharmaceutical Chemistry: Therapeutic Aspects of Biomacromolecules. Eds. I. W. Waive, M. Little, John Wiley & Sons LTD, Chichester, pp. 1-6.
- Dennis JW, Nabi IR, Demetriou M, 2009. Metabolism, Cell Surface Organization, and Disease. *Cell* **139**, 1229-41.
- Garnier P, Reichardt NC, 2005. The Glycosylation of therapeutic proteins. *IPT* **18**, 50-53.
- Freeze HH, Haltiwanger RS, 1999. Essentials of Glycobiology. 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, pp. 163-175.
- Kusali T, 2010. Strukturna karakterizacija glikoproteina tehnikama spektrometrije masa, doktorska disertacija, pp. 7-10, 14-18, 25-29, 33-41.
- 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, pp. 235-270.
- Schwarz F, Huang W, Li C, Schulz BL, Lizak C, Palumbo A, Numao S, Neri D, Aebi M, Wang LX, 2010. A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. *Nat Chem Biol* **6**, 264-6.
- Schwarz F, Aebi M, 2011. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* **21**, 576-82.
- Sidransky E, 2004. Gaucher disease: complexity in a “simple” disorder. *Molecular Genetics and Metabolism* **83**, 6–15.
- Solá R, Greibenow K, 2010. Glycosylation of therapeutic proteins: An effective strategy to optimize efficacy. *BioDrugs* **24**, 9-21.

Xu X, Nagarajan H, Lewis N, et al., 2011. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotechnol* **29**, 735–741

<http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/>

<http://ghr.nlm.nih.gov/condition/gaucher-disease>

<http://www.legendarypharma.com/glycation.html>

[http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-mbt/research\\_e.html](http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-mbt/research_e.html)

<http://medicalxpress.com/conditions/lysosomal-storage-disease/>

## 6. SAŽETAK

Mnoga impresivna dostignuća terapijskih proteina u liječenju teških bolesti, ne bi bila moguća bez glikoinženjeringa. Terapeutske proteini su sami po sebi kratkog vijeka u organizmu i ograničene su biološke aktivnosti, stoga je nužno uvesti dodatne glikozilacijske mehanizme koji će poboljšati farmakodinamiku i farmakokinetiku svojstva terapijskih proteina.

U ovom radu su ukratko izloženi osnovni principi glikozilacije proteina u sve tri domene života. Poseban naglasak je stavljen na važnost samog procesa i njegovog utjecaja na stabilnost, strukturu i funkciju (terapijskih) proteina. Detaljnije su obrađeni načini proizvodnje terapijskih proteina, problematika glikozilacije humanih proteina u drugim organizmima, te načini postizanja optimalne glikozilacije i dobivanja proteina željene glikoforme.

Navedeni su brojni primjeri poboljšanja *in vivo* biološke aktivnosti proteina glikoinženjeringom, od hiperglikoziliranog analoga humanog rekombinantnog eritropoetina (EPO-a) do terapijskih protutijela i  $\beta$ -glukocerebrosidaze.

## 7. SUMMARY

Many impressive achievements of therapeutic proteins in treating serious illnesses would not be possible without glycoengineering. Therapeutic proteins have a short serum half-life and limited biological activity. That is why it's necessary to include more glycosylation mechanisms which will consequentially enhance the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of therapeutic proteins.

In this paper, the basic glycosylation principles in all domains of life are presented. A special emphasis was given to the importance of the glycosylation process itself on the stability, structure and function of (therapeutic) proteins. In more detail were explained the various methods of synthesis, the problem of glycosylation of human proteins in other organisms and various ways to obtain the wanted glycoform of a therapeutic protein.

There were given many examples of *in vivo* enhancements of protein bioactivity via glycoengineering, from the hyperglycosylated analog of the human recombinant erythropoietin (NESP) to therapeutic antibodies and  $\beta$ -glucocerebrosidase.