

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

**TRANSPORT REKOMBINANTNIH PROTEINA SA SIGNALOM  
ZA ZADRŽAVANJE U ENDOPLAZMATSKOM RETIKULUMU  
(ER) U BILJCI UROČNJAK (*Arabidopsis thaliana*)**

**TRAFFICKING OF ENDOPLASMIC RETICULUM (ER)-  
RETAINED RECOMBINANT PROTEINS IN *Arabidopsis thaliana***

**SEMINARSKI RAD**

Antonio Tudić  
Preddiplomski studij biologije  
(Undergraduate Study of Biology)  
Mentor: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2016.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. UROČNJAK ( <i>A. thaliana</i> ) KAO MODELNI ORGANIZAM.....	2
3. SIGNALI ZA ZADRŽAVANJE U ER-u .....	4
3.1. H/KDEL signalni slijed .....	4
3.2. Ostali signali za zadržavanje u ER-u .....	5
4. TRANSPORT REKOMBINANTNIH PROTEINA U <i>A. thaliana</i> .....	7
4.1. Vezikule izvedene iz ER-a .....	7
4.2. Transport prema Golgijevom tijelu .....	9
4.3. Transport prema periplazmatskom prostoru .....	9
5. PRIMJENA U INDUSTRIJI ( <i>MOLECULAR FARMING</i> ) .....	10
6. ZAKLJUČAK .....	12
7. LITERATURA .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8. SAŽETAK.....	16
9. SUMMARY .....	17

## 1. UVOD

Proteini koji nastaju ekspresijom rekombinantne DNA u živim stanicama nazivaju se rekombinantni proteini. Rekombinantna DNA (rDNA) je molekula DNA stvorena pomoću laboratorijskih metoda genetičke rekombinacije, koje omogućuju spajanje genetičkog materijala iz različitih izvora čime nastaje slijed nukleotida koji inače nije prisutan u genomu [1]. Tehnologija rekombinantne DNA, koja se vrlo brzo razvija u posljednja dva desetljeća, omogućuje ekspresiju heterolognih rekombinantnih proteina u različitim sustavima domaćina. Nedavno provedena istraživanja otkrila su veliki potencijal biljaka kao alternativnih sustava za ekspresiju rekombinantnih proteina zbog mnogih praktičnih, ekonomskih i sigurnosnih prednosti u usporedbi s uobičajenim sustavima [2].

Membrana ER-a odvaja lumen ER-a od citosola te posreduje u selektivnom prijenosu molekula između tih dvaju odjeljaka. ER ima središnju ulogu u biosintezi lipida i proteina. Njegova membrana je mjesto proizvodnje svih transmembranskih proteina i lipida za većinu staničnih organela kao što su Golgijevo tijelo, lizosomi, endosomi, sekretorne vezikule, stanična membrana uključujući i sam ER [3]. Mnogo različitih rekombinantnih proteina je proizvedeno u modelnom organizmu *Arabidopsis thaliana*. Mnogi od tih proteina su označeni za sekreciju iz ER-a pomoću N-terminalnog signalnog peptida. Međutim, oni također mogu biti konstruirani da posjeduju signal za zadržavanje u ER-u dodavanjem C-terminalne oznake H/KDEL. Unatoč velikom znanju o transportu proteina, konačna destinacija rekombinantnih proteina, posebno onih s oznakom H/KDEL, vrlo je nepredvidljiva. Upravo zbog toga glikoproteini idealan su predmet istraživanja [4]. Mnogi rekombinantni proteini imaju nekoliko posttranslacijskih modifikacija, među kojima je najčešća glikozilacija. Glavna funkcija glikana vezanih na proteine je pružanje dodatnih epitopa koje prepoznaju proteinski receptori. Takva prepoznavanja nalazimo u brojnim procesima uključujući transport proteina, inicijaciju upalnih procesa, i obranu domaćina [5]. Sastav N-vezanih glikana je od presudne važnosti za strukturu proteina, stabilnost, vrijeme poluraspada i funkciju [4]. Strukture N- i O-vezanih oligosaharida su vrlo različite te sadrže različite ostatke šećera. U svim N-povezanim oligosaharidima, N-acetilglukozamin (GlcNAc) je povezan preko amidnog dušika s asparaginom [6]. O-glikozilacija u animalnim sustavima značajno je različita od one koja se provodi u biljkama. U principu, biljke ne obavljaju GalNAc O-glikozilaciju, već su glikani vezani na hidroksilne skupine serina (Ser), hidroksiprolina (Hyp) i rijetko treonina (Thr). Proces O-glikozilacije započinje u Golgijevom tijelu s enzimskim dodavanjem galaktoze ili arabinoze [7].

## 2. UROČNJAK (*A. thaliana*) KAO MODELNI ORGANIZAM

Vrsta *A. thaliana* (Slika 1) spada u obitelj Brassicaceae koja je široko rasprostranjena u cijeloj Europi, Aziji i Sjevernoj Americi. Mnogo različitih ekotipova je prikupljeno iz prirodnih populacija te su dostupni za eksperimentalnu analizu. Ekotipovi Columbia i Landsberg su prihvaćeni kao standardi za genetička i molekularna istraživanja. Cijeli životni ciklus, uključujući klijanje sjemenki, formiranje rozete, cvatnju i sazrijevanje prvih sjemenki, je završen nakon 6 tjedana [8]. Iako usko povezana sa gospodarski važnim poljoprivrednim kulturama kao što su repa, kupus, brokula i uljana repica, uročnjak nije ekonomski važna biljka. Unatoč tome, objekt je genetičkih, biokemijskih i fizioloških istraživanja više od 40 godina zbog nekoliko osobina koje ga čine vrlo poželjnim za laboratorijske studije. Kao fotosintetski organizam, zahtijeva samo svjetlo, zrak, vodu i nekoliko minerala kako bi završio svoj brz životni ciklus. Također, stvara brojno potomstvo, zahtijeva vrlo malo prostora za uzgoj te se lako uzgaja u stakleniku ili zatvorenom prostoru za uzgoj [9]. Kada je riječ o veličini, gotovo sve kod *A. thaliana* je malo [8]. Posjeduje relativno mali genom koji se može lakše i brže manipulirati genetičkim inženjerstvom za razliku od bilo kojeg drugog biljnog genoma [9].



**Slika 1.** *Arabidopsis thaliana* (preuzeto sa <http://delta-intkey.com/angio/www/crucifer.htm>).

Istraživanja na vrsti *A. thaliana* su pružila korisne uvide u sve aspekte moderne biologije. Mnoge biotehnološke tvrtke računaju na nova istraživanja koja bi mogla pomoći u rješavanju praktičnih problema vezanih uz poljoprivredu, energiju i okoliš. Značajan napredak već je zabilježen u primijenjenim istraživanjima na području molekularnog kloniranja gena za otpornost na bolesti, proizvodnje biljaka otpornih na niske temperature, proizvodnje specijaliziranih ugljikovodika, te stimulacije preuranjenog cvjetanja kod drveća i drugih biljaka s produženim životnim ciklusima [8].

Vrsta *A. thaliana* koristan je biljni sustav i za molekularni uzgoj (eng. *molecular farming*), tj. za masovnu proizvodnju rekombinantnih proteina [10]. Većina rekombinantnih proteina u *A. thaliana* proizvodi se u sjemenkama zbog prednosti kao što su pružanje stabilnog skladišta za rekombinantne proteine, visoki sadržaj proteina, te izostanak interferencije s vegetativnim rastom biljke. Analizirajući razinu akumulacije istog proteina, sjemenke *A. thaliana* su pozitivnije ocjenjene uspoređujući ih sa sjemenkama duhana, petunije i kukuruza. Kada govorimo o molekularnom uzgoju vrlo je važno razumijevanje glikozilacije proteina, odnosno specifičnih glikana koji pružaju signal za transport rekombinantnih proteina koji nije u potpunosti razjašnjen [4].

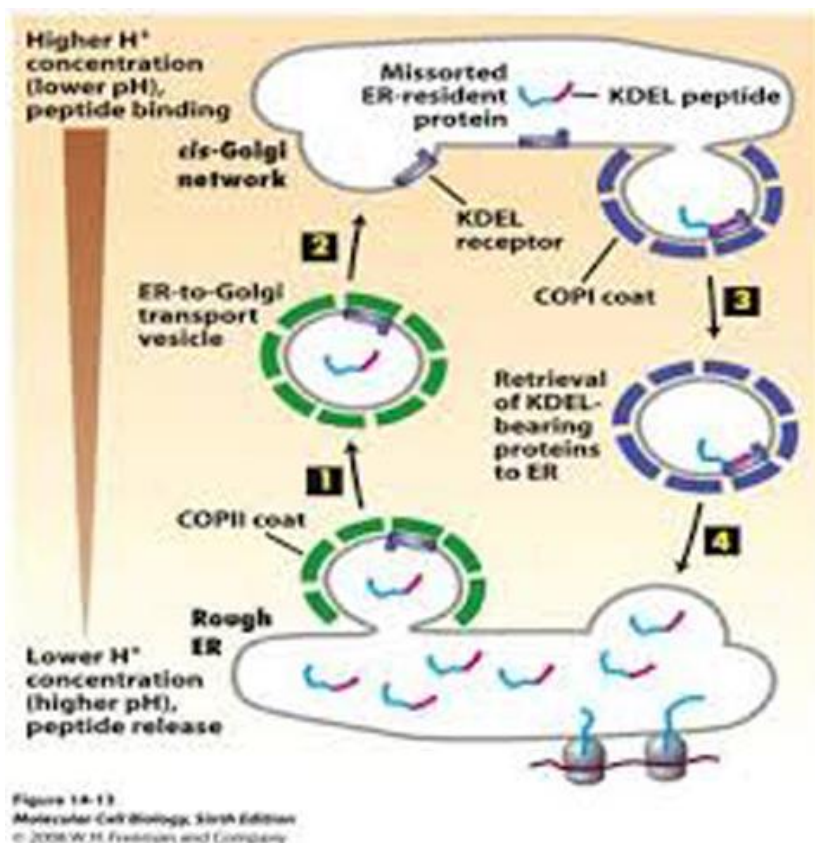
### 3. SIGNALI ZA ZADRŽAVANJE U ENDOPLAZMATSKOM RETIKULUMU

Endoplazmatski retikulum (ER) neprestano stvara vezikule koje prenose svoj sadržaj duž sekretornog puta i retrogradno prima vezikule nastale u Golgijevom tijelu. Veliki dio pravilno smotanih sekretornih i membranskih proteina, kao i membranskih lipida, neprestano se izvozi iz ER-a. Kako bi se izbjegle ovakve situacije, većina rezidentnih proteina ER-a, uključujući šaperone (eng. *chaperones*) i ostale enzime koji pomažu pri smatanju proteina, sadrže signale za zadržavanje i povratak u ER [11].

#### 3.1. Signalni slijed H/KDEL

Jedan od najpoznatijih signala za zadržavanje u ER-u je tetrapeptidna sekvenca KDEL, koja sprječava sekreciju proteina iz ER-a. Kratica KDEL odgovara oznakama odgovarajućih aminokiselina (K je lizin, D je aspartat, E je glutamat i L je leucin). Signalni slijed HDEL (H je histidin, D je aspartat, E je glutamat i L je leucin) za zadržavanje u ER-u ima istu ulogu kao i signalni slijed KDEL, ali ga primarno nalazimo u kvasaca. Ove kratice definirali su IUPAC i IUBMB 1983. godine [12]. Receptor H/KDEL prvotno je otkriven u kvascu kao produkt gena *ERD2*, a kasnije su homolozi receptora otkriveni i u ostalim vrstama uključujući *A. thaliana* [13, 14].

Motiv KDEL ulazi u interakciju s receptorom KDEL i time se osigurava da će protein biti vraćen iz Golgijevog kompleksa u ER [11]. Topljivi rezidentni protein ostaje u ER-u sve dok posjeduje signalni slijed KDEL. Međutim, budući da je pupanje vezikula dinamičan proces, te zbog činjenice da je prisutna velika koncentracija topljivih proteina u ER-u, proteini se nehotice transportiraju u cis-Golgijevu mrežu pomoću vezikula koje su obložene proteinskim kompleksom COP2 (Slika 2). Nakon spajanja s cis-Golgijevom mrežom topljivi protein se oslobađa te membranski receptori prepoznaju njegov signalni slijed KDEL. Receptor i topljivi protein se potom vraćaju u ER-vezikulama koje su obložene proteinskim kompleksom COP1, gdje se sadržaj vezikula oslobađa nakon čega dolazi do disocijacije receptora i proteina. Na spajanje proteina u cis-Golgijevoj mreži i disocijaciju u ER-u najviše utječe pH. Blago kiseli pH, koji nalazimo u cis-Golgijevoj mreži, pruža optimalne uvjete vezivanja [12].



**Slika 2.** Transport proteina sa signalom zadržavanje u ER-u između Golgijevog kompleksa i ER-a [6].

Heterologi glikoproteini također mogu biti zadržani u ER-u dodavanjem C-terminalnog signalnog slijeda H/KDEL. Iako su u biljkama pronađeni endogeni proteini sa signalnim slijedovima KDEL i HDEL, većina rekombinantnih proteina sa signalom za zadržavanje u ER-u sadrži signalni slijed KDEL. Tipično za H/KDEL signalizaciju je nastajanje N-vezanih glikana sastava Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (Man<sub>8</sub>). Međutim, kako se zadržavanje proteina u ER-u temelji na retrogradnom transportu iz cis-Golgijeve mreže u ER, glikoproteini nailaze na procesirajuće enzime u cis-Golgijevoj mreži, kao što je  $\alpha$ -1,2-manozidaza, koja skraćuje N-vezane glikane. Signalizacija H/KDEL može dovesti do povećane razine akumulacije proteina, vjerojatno zbog toga što je ER pogodno mjesto za smatanje i pohranu proteina [4].

### 3.2. Ostali signali za zadržavanje u ER-u

Slično slijedu KDEL, poznato je da signalni slijedovi KKXX ili KXKXX (gdje je X bilo koja aminokiselina) prisutni na C-kraju transmembranskih proteina tipa 1 (sa svojim C-krajem orijentirani su prema citosolu) posreduju povratak u ER direktnom interakcijom s

COP1 proteinskim kompleksom. Izloženi cisteinski ostaci također mogu biti signali za zadržavanje [11].

Signali za zadržavanje i povratak u ER, koji su prisutni u proteinima namijenjenim za sekreciju, također su vrlo važni u kontroli kvalitete (eng. *quality control*) jer pomažu zadržati proteine u ER-u dok ne dođe do njihovog pravilnog smatanja. Najbolje istražen od tih signala je motiv RKR (R je arginin), koji je prvi put opisan u podjedinici ATP-osjetljivih kalijevih kanala [11].

Još jedan zanimljiv primjer regulacije transporta uključuje protein 14-3-3 koji utječe na povratni transport proteina u ER. Protein 14-3-3 spada u obitelj često zastupljenih proteina koji se vežu na motive koji sadrže fosfoserin i fosfotreonin. Vezanjem proteina 14-3-3 na motive kratkih slijedova koji sadrže fosforilirani serin, ne dolazi do istovremenog vezanja proteina  $\beta$ -COP (jedan od proteina proteinskog kompleksa COP1) pa tako ni do povratnog transporta u ER. Dakle, vezanje proteina 14-3-3 na određeni protein isključuje mogućnost vezanja  $\beta$ -COP i obrnuto, što je temelj regulacije zadržavanja i otpuštanja proteina iz ER-a ovisne o fosforilaciji [15].



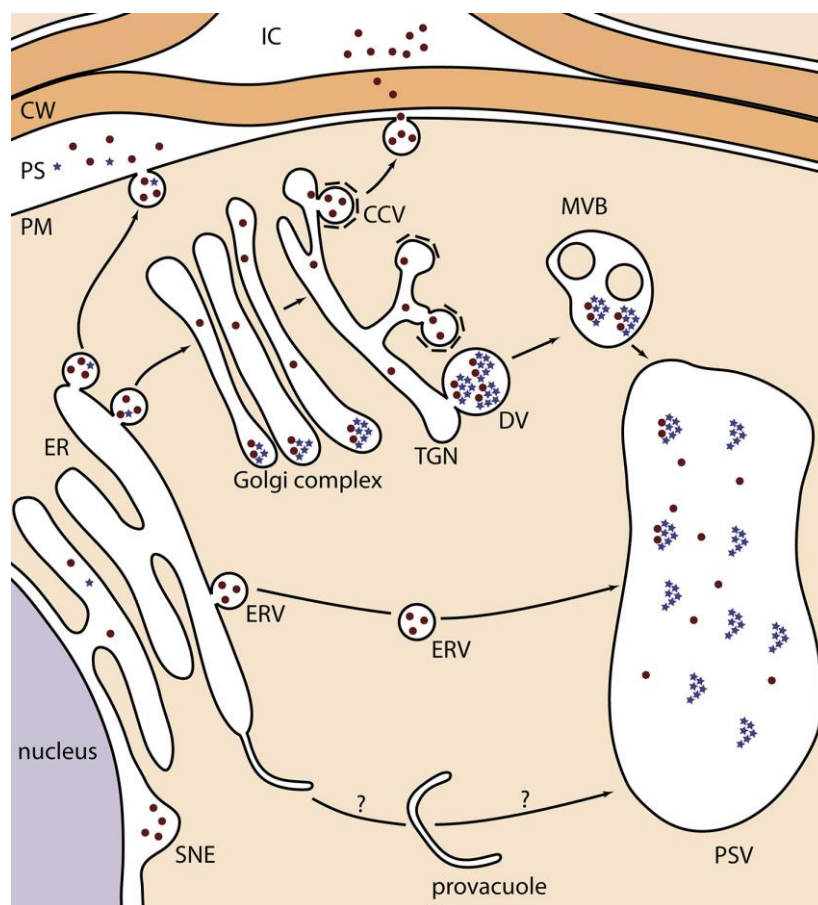
## 4. TRANSPORT REKOMBINANTNIH PROTEINA U *A. thaliana*

Samo je jedno istraživanje provedeno na listovima biljke *A. thaliana*, u kojem je fragment Fab (fragment protutijela na koje se veže antigen, eng. *fragment antigen-binding*, Fab) sa signalnim slijedom KDEL uočen unutar stanice, najvjerojatnije unutar endomembranskog sustava [16]. U istraživanjima na sjemenkama *A. thaliana*, samo su Loos i suradnici dokazali uspješno zadržavanje rekombinantnih proteina u ER-u, naročito monoklonskih protutijela (eng. *monoclonal antibodies*, mAbs) 2G12 koja sadrže signal KDEL i prepoznaju specifični epitop na površni glikoproteina gp120, koji se nalazi u sastavu omotača virusa HIV-a [17]. Sve ostale studije ukazuju na različite lokacije odlaganja rekombinantnih proteina [4].

### 4.1. Vezikule izvedene iz ER-a

Formiranje vezikula izvedenih iz ER-a (ERV) je proces koji nije u potpunosti razumljiv [4]. Spajanjem zelenog fluorescentnog proteina (eng. *green fluorescent protein*, GFP) na C-terminalni signalni slijed H/KDEL možemo dobiti topljive proteinske markere ER-a [18]. Nakon sinteze produkta GFP-KDEL u lišću duhana, opažena su takozvana proteinska tjelešca u većini transformanata s razinom akumulacije GFP od najmanje 0,2% ukupnih topljivih proteina (eng. *total soluble proteins*, TSP) [4]. Produkti GFP-KDEL bili su među prvim GFP-produktima koji su se koristili u biljkama [18]. Izgleda da signal KDEL osigurava lokalno nagomilavanje proteina u lumenu ER-a iz kojeg će nastati ERV ili proteinska tjelešca [4]. Biljne stanice sadrže dvije različite vrste vakuola, litičku vakuolu (LV) i vakuolu za pohranu proteina (PSV). Ove vakuole mogu koegzistirati u istoj stanici, ali generalno LV se nalaze u vegetativnom tkivu kao što su lišće, dok se PSV nalaze u spremišnim tkivima kao što su sjemenke [18]. Iz rezultata dobivenih u zrelih sjemenkama *A. thaliana*, izvedene su dvije hipoteze. Naime, ERV mogu predstavljati zadnji korak u transportu rekombinantnih proteina, dok druga hipoteza govori o tome da ERV posreduju u transportu prema PSV koji je neovisan o Golgijevom tijelu (Slika 3). To je dokazano na temelju osjetljivosti glikoproteina GAD67/65 i velikog dijela oligomanozidnih N-glikana, koji se nalaze na mAbs 2H12, prema vrlo specifičnoj endoglikozidazi (EndoH) koja cijepa oligosaharide bogate manozom koji su vezani na asparagin, ali ne i kompleksne oligosaharide na glikoproteinima [4, 17]. Sličan transportni put iz ER-a prema PSV-i, neovisan o Golgijevom tijelu, uključuje endogene skladišne proteine u sjemenkama bundeve koji se prenose vezikulama PAC (eng. *precursor-accumulating*). Pretpostavlja se da se transport

vezikula PAC razvio za učinkovito i masivno prenošenje neglikoziliranih skladišnih proteina u PSV-u [4]. Nagomilavanje skladišnih proteina unutar vakuole udruženo je sa dodatnim procesiranjem koje može poslužiti za modificiranje i pripremanje proteina za gusto pakiranje. Procesiranje uključuje modifikaciju polipeptidnog lanca kao i bočnog glikanskog lanca, iako se ne modificiraju svi proteini nakon odlaganja u PSV-u [19]. Treba spomenuti da biogeneza vakuole također može predstavljati put iz ER-a prema vakuoli jer je ER nedavno predložen kao glavni izvor membrane za nastanak litičke vakuole (Slika 3). Iako takav mehanizam nije još dokazan za formaciju PSV-e, nagađa se da neki heterologni proteini sa signalom za zadržavanje u ER-u ostaju zarobljeni unutar prekursora PSV-e sličnim procesom [4].



**Slika 3.** Shematski prikaz različitih lokacija rekombinantnih proteina sa signalnim slijedom KDEL u sjemenkama *A. thaliana*. Rekombinantni proteini su označeni kao smeđe točkice, dok su skladišni globulini označeni kao plave točkice. CCV, vezikule obložene klatrinom; CW, stanična stijenka; DV, sekretorske vezikule; ER, endoplazmatički retikulum; ERV, vezikula izvedena iz ER-a; IC, međustanični prostor; MVB, multivezikularno tjelešće; PS, periplazmatički prostor; PSV, vakuola za pohranu proteina; PM, plazma membrana; SNE, nabubrena jezgrina ovojnica; TGN, trans-Golgijev kompleks [4].

## 4.2. Transport prema Golgijevom tijelu

Proteini sa signalnim slijedom KDEL djelomično se prenose prema Golgijevom tijelu (Slika 3) jer je uočeno njihovo nakupljanje u apoplastu, dok neki nose kompleksni tip N-glikana koji spada u signale za sekreciju [4, 17]. Takvo propuštanje proteina opisano je u lucerni i duhanu. Predloženo je nekoliko čimbenika koji mogu utjecati na uspješno zadržavanje u ER-u. Na primjer, treba uzeti u obzir količinu slijedova KDEL po molekuli, te dostupnost i integritet slijeda KDEL. Na temelju analize substancičnih dijelova tehnikom *westernblotting* predloženo je da se ljudska  $\alpha$ -L-iduronidaza<sup>1</sup> sa signalnim slijedom KDEL prenosi prema PSV preko Golgijevog tijela. Nažalost, nedostaju elektronsko-mikroskopske snimke koje bi potvrdile ovu hipotezu [4].

Međutim, konvencionalne elektronsko-mikroskopske snimke elektron-gustih vezikula koje izlaze iz trans-Golgijevog kompleksa i tehnika imuno-elektronske mikroskopije IGS (eng. *immunogold staining*) potvrdili su da skladišni proteini prolaze kroz ER i Golgijev kompleks prije ulaska u sekretorne vezikule koje formiraju PSV-e. U sjemenkama, na većini proteina iz PSV događa se N-glikozilacija, iako sporamin koji nalazimo u gomolju batata sadrži O-vezane bočne glikanske lance. Budući da glikani PSV proteina nemaju funkciju signalizacije, značaj glikozilacije skladišnih proteina i dalje ostaje nejasan [19].

## 4.3. Transport prema periplazmatskom prostoru

Rekombinantno protutijelo MBP10 sastoji se od jednolančanog konstantnog fragmenta (eng. *single-chain constant fragment*, scFc) fuzioniranog s varijabilnim fragmentom (eng. *variable fragment*, Fv) koji sadrži vezno mjesto za maltoza-vezujući protein (eng. *maltose binding protein*, MBP). Nakon proizvodnje protutijela MBP10 scFv-Fc sa signalom KDEL u sjemenkama *A. thaliana*, na elektronsko-mikroskopskim snimkama uočen je taman, neproziran periplazmatski prostor (PS) u kojem je bila pohranjena većina protutijela MBP10. Štoviše, protutijelo MBP10 isključivo je sadržavalo oligomanozidne N-vezane glikane koji ukazuju na transport iz ER-a u PS bez posredovanja Golgijevog kompleksa. Zbog prisutnosti rezidentnih proteina ER-a, kao što su kalretikulin i vezni protein (eng. *binding protein*, BiP), i nakupljanja velike količine proteina MBP10 u periplazmatskom prostoru, predloženo je da dolazi do preopterećenja skladišnog kapaciteta ER-a [4]. Zanimljivo je da se i skladišni globulini pohranjuju u PS-u (Slika 3).

---

<sup>1</sup> Enzim koji katalizira hidrolizu nesulfatiranih  $\alpha$ -L-iduronozidnih veza u dermatan sulfatu (mukopolisaharidu).

## 5. PRIMJENA U INDUSTRIJI (*MOLECULAR FARMING*)

Molekularni uzgoj biljaka (eng. *plant molecular farming*, PMF) odnosi se na proizvodnju rekombinantnih proteina (uključujući lijekove i industrijske proteine) i drugih sekundarnih metabolita u biljkama. PMF uključuje sintezu, nakupljanje, transport, skladištenje, procesiranje i pročišćavanje proteina [20]. Svrha PMF-a je proizvodnja velikih količina aktivnog i sigurnog farmaceutskog proteina na relativno jeftin način [21]. Ova tehnologija ovisi o mogućnosti genetičke transformacije biljaka, koja je prvi put izvedena 1980-tih. Prvi rekombinantni farmaceutski protein biljnog podrijetla (ljudski hormon rasta) i prvo rekombinantno protutijelo proizvedeni su u transgeničnim biljkama. Prvi rekombinantni protein proizveden u komercijalne svrhe bio je avidin, eksprimiran u transgeničnom kukuruzu 1997. godine. Ovakva eksploatacija uistinu pokazuje da biljke mogu služiti kao pogodan biološki sustav za masovnu proizvodnju rekombinantnih proteina. Dokazano je tijekom godina da biljke imaju sposobnost proizvodnje još složenijih funkcionalnih proteina sisavaca s terapijskim svojstvima, kao što su ljudski proteini seruma i regulatori rasta, protutijela, cjepiva, hormoni, citokini i enzimi [20]. Biljke su glavni heterologni sustav za proizvodnju sekretornih protutijela IgA [21]. Antimikrobni proteini, kao što su laktoferin i lizozim, uspješno se proizvode u nekoliko biljnih kultura te su i komercijalno dostupni za upotrebu. Ljudski želučani intrinzični faktor (eng. *human gastric intrinsic factor*, GIF) dobiven iz *A. thaliana* koristi se protiv deficijencije vitamina B12 i komercijalno je dostupan kao Coban [20].

Proizvodnja ovih složenih proteina u biljkama je moguća zbog njihove sposobnosti da provedu posttranslacijske modifikacije koja omogućava rekombinantnim proteinima pravilno smatanje te održavanje njihovog strukturalnog i funkcionalnog integriteta [20]. Osim toga, biljke imaju i druge jedinstvene značajke koje se ne mogu naći u bakterijskim ili životinjskim sustavima. Proteini proizvedeni u biljkama mogu se akumulirati u velikim količinama, te su protutijela dobivena PMF-om funkcionalno ekvivalentna onima proizvedenim u hibridomima, stanicama koje obično nastaju fuzijom limfocita B koji proizvodi protutijelo željene specifičnosti s mijelomskom stanicom koja neobuzdano raste i daje besmrtnost. Sjemenke su skladišni organi bogati proteinima u kojima se rekombinantni proteini mogu pohraniti na neodređeno vrijeme. Najkorišteniji pristup u ekspresiji proteina je obilježavanje proteina sa signalom za zadržavanje u ER-u i obilježavanje proteina za specifičnu ekspresiju u sjemenkama, ako je potrebno dugotrajno skladištenje. Zabrinutost zbog kontaminacije eksprimiranih proteina s ljudskim ili životinjskim patogenima (HIV, hepatitis) u potpunosti se

izbjegava primjenom biljaka kao ekspresijskih sustava [21]. Da bi se zaobišao problem kontaminacije hranidbenog lanca, za PMF se koriste nejestive i neprehrambene biljke poput duhana, vodene leće, uročnjaka, algi i mahovina [20].

U nedostatku daljnje transportne informacije, eksprimirani rekombinantni protein se izlučuje u apoplast. Ovisno o njegovoj veličini, protein se zadržava u stanici ili se izlučuje van nje. Stabilnost rekombinantnih protutijela u apoplastu je manja nego u lumenu ER-a. Prema tome, razina ekspresije protutijela može se dodatno povećati vraćanjem proteina u lumen ER-a korištenjem C-terminalnog signalnog slijeda H/KDEL. Općenito, razina akumulacije proteina koji sadržavaju signalni slijed H/KDEL je 2-10 puta veća u odnosu na one proteine kojima takav signal nedostaje. Kao dodatna prednost, protutijela zadržana u ER-u na ovaj način nisu modificirana u Golgijevom tijelu, što znači da imaju visoko-manozni tip N-glikana, ali ne i ksilozne i fukozne ostatke specifične za biljke [22]. Ovakvo ograničavanje glikozilacije koristi se kako bi se spriječio problem imunogenosti i alergijskih reakcija, koji se može pojaviti kada se proteini sa terapijskim svojstvima proizvedeni u biljkama unose u ljudski organizam. Postoje i druge strategije koje se koriste za modifikaciju N-glikozilacije u biljkama koje uključuju *knock-out* mutantne linije *A. thaliana* i mahovina, korištenje vrste *Physcomitrella patens* koja sintetizira kompleksne N-glikane kojima nedostaje imunogeni ksilozni i fukozni epitop, modulacija količine ksiloznih i fukoznih glikana korištenjem interferencije RNA, kao i ko-ekspresija RNA interferirajućeg konstrukta i proteina sa terapijskim svojstvima [20].

## 6. ZAKLJUČAK

Prisutnost signalnog slijeda H/KDEL na C-kraju proteina je vrlo važan indikator da se radi o rezidentnom proteinu lumena ER-a. Međutim, postoji mogućnost da prisutnost H/KDEL nije jedini signal koji određuje lokalizaciju proteina jer se navedeni signalni slijed nalazi i u proteinima koji nisu uvijek prisutni u ER-u. Kao primjer možemo navesti auksin-vezujući protein koji sadrži signalni slijed KDEL za kojeg je objavljeno da se izlučuje iz ER-a u fiziološkim uvjetima.

Za proizvodnju rekombinantnih proteina izuzetno je važno da je sustav u kojem se proteini sintetiziraju, pouzdan i predvidljiv kada govorimo o kvaliteti proizvoda. U tom smislu, transport rekombinantnih proteina sa signalom KDEL za zadržavanje u ER-u u vrsti *A. thaliana* pokazao se nepredvidljiv, kao i transport u nekim drugim biljnim sustavima. Očito je da su potrebna dodatna istraživanja koja bi pomogla u boljem razumijevanju biljnih sustava i transporta rekombinantnih proteina u biljci *A. thaliana*. Na primjer, mogao bi se analizirati utjecaj razine akumulacije proteina na (ne)predvidljivost transporta proteina, uspoređujući lokalizaciju proteina u sustavima sa slabom i jakom ekspresijom proteina. Korištene promotorske sekvence također mogu utjecati na lokalizaciju proteina. Bilo bi korisno da buduća istraživanja o proizvodnji proteina sa signalom H/KDEL u biljkama uključuju rezultate analize tehnikom *westernblotting* ili analizu imunoprecipitacije rekombinantnih proteina sa komercijalno dostupnim anti-H/KDEL protutijelima. U slučaju da ne dođe do prepoznavanja između protutijela i rekombinantnih proteinima možemo zaključiti kako signalni slijed H/KDEL za zadržavanje u ER-u nije u potpunosti ispravan i da je upravo on odgovoran za nepredvidljivost samog transporta proteina. Navedena istraživanja bi pomogla u predviđanju zadržavanja prekomjerno eksprimiranih proteina sa signalom H/KDEL unutar ER-a u biljkama, te bi doprinijela daljnjem razvijanju molekularnog uzgoja biljaka (PMF).

Biljke imaju praktičnu i ekonomsku prednost nad tradicionalnim sustavima ekspresije proteina što ih čini pogodnim za masovnu proizvodnju rekombinantnih proteina. Tehnološki problemi koji se javljaju uključuju optimizaciju prinosa, modifikaciju strukture glikana i biološku sigurnost. Da bi bila komercijalno isplativa, biljka mora proizvoditi terapijski protein u količini koja premašuje 1% ukupnih topljivih proteina. To je izvedivo za mnoge proteine, ali neki nestabilni proteini se nakupljaju u količinama koje odgovaraju 0.01-0.1% ukupnih topljivih proteina, često odražavajući pogrešno smatanje, pogrešno sastavljanje ili degradaciju tijekom ekstrakcije. Razlike u N-glikozilaciji između biljaka i sisavaca

predstavljaju određeno ograničenje za proizvodnju nekih rekombinantnih proteina. Biljke bi s malim modifikacijama na razini glikozilacije mogle postati pogodni sustavi za masivnu proizvodnju terapijskih glikokonjuganata kompatibilnih za razne terapije u ljudi. Problemi koji uključuju biološku sigurnost ostaju u prvom planu i na njih se obraća najviše pozornosti. Takve probleme moguće je zaobići razvojem novih načina sprječavanja širenja transgena, ograničavanjem nepotrebnog izlaganja organizama koji nisu uključeni u proizvodnju korištenjem transgena i njihovim produktima, i sprječavanjem miješanja transgeničnog biljnog materijala s hranom i hranidbenim lancima.

## 7. LITERATURA

- [1] Watson, J. (2007). *Recombinant DNA*. New York: W. Freeman and Co.
- [2] B. Balen i M. Krsnik-Rasol (2007). Plant specific N-glycosylation, *Food Technology and Biotechnology* 45 (1), pp. 1–10.
- [3] Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science.
- [4] De Meyer, T. i Depicker, A. (2014). Trafficking of endoplasmic reticulum-retained recombinant proteins is unpredictable in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 5.
- [5] Petrescu, A. (2003). Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology*, 14(2), pp. 103-114.
- [6] Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P. i Darnell, J. (1995). *Molecular cell biology*. New York: Scientific American Books.
- [7] Vukušić, K., Šikić, S. i Balen, B. (2016). Recombinant therapeutic proteins produced in plants: towards engineering of human-type O-and N-glycosylation. *Periodicum Biologorum*, 118(2), pp. 75-90.
- [8] Meinke, D. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), pp. 662-682.
- [9] Nsf.gov. (2016). *bio0202-Members of the Multinational Arabidopsis Steering Committee*. [online] Available at: <http://www.nsf.gov/pubs/2002/bio0202/model.htm> [pristupljeno 22. 8. 2016].
- [10] Fischer, R. i Emans, N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research* 9(4-5), pp. 279-99. doi:10.1023/A:1008975123362.
- [11] Ellgaard, L. i Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(3), pp. 181-191.
- [12] Stornaiuolo, M. (2002). KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum,



- intermediate compartment, and Golgi complex. *Molecular Biology of the Cell*, 14(3), pp. 889-902.
- [13] Lewis, M. J., D. J. Sweet i H. R. B. Pelham (1990). The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell*. 61, pp. 1359-1363.
- [14] Lee, H., S. Gal, T. C. Newman i N. V. Ralkhel (1993). The Arabidopsis ER retention receptor functions in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 90, pp. 11433-11437.
- [15] O'Kelly, I., Butler, M., Zilberberg, N. i Goldstein, S. (2002). Forward transport: 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell*, 111(4), pp. 577-588.
- [16] Peeters K., De Wilde C. i Depicker A. (2001). Highly efficient targeting and accumulation of a Fab fragment within the secretory pathway and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*. 268, pp. 4251–4260. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.02340.x.
- [17] Loos A., Van Droogenbroeck B., Hillmer S., Grass J., Kunert R., Cao J. i sur. (2011). Production of monoclonal antibodies with a controlled *N*-glycosylation pattern in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal* 9, pp. 179–192. doi:10.1111/j.1467-7652.2010.00540.x.
- [18] Hanton, S. i Brandizzi, F. (2006). Fluorescent proteins as markers in the plant secretory pathway. *Microscopy Research and Technique*, 69(3), pp. 152-159.
- [19] Herman, E. i Larkins, B. (1999). Protein storage bodies and vacuoles. *The Plant Cell*, 11(4), pp. 601-614.
- [20] Obembe, O., Popoola, J., Leelavathi, S. i Reddy, S. (2011). Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances*, 29(2), pp. 210-222.
- [21] Fischer, R. i Emans, N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research*, 9(4/5), pp. 279-299.
- [22] Twyman, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. i Fischer, R. (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*, 21(12), pp. 570-578.

## 8. SAŽETAK

Mnogi rekombinantni proteini se često proizvode u eukariotskim organizmima, kao što je *A. thaliana*, kako bi se osiguralo pravilno smatanje, formacija disulfidnih mostova i procesiranje N-glikana. Proteini se kotranslacijski prenose u endoplazmatski retikulum (ER), nakon čega se zadržavaju unutar njega ili se transportiraju u različite unutarstanične odjeljke ili u izvanstanični prostor. Razni su molekularni signali potrebni za zadržavanje proteina unutar ER-a ili prijenos u različite odjeljke. Dodavanjem C-terminalnog signalnog slijeda H/KDEL, rekombinantni proteini mogu biti konstruirani za zadržavanje u ER-u. Unatoč velikom znanju o transportu proteina, konačna destinacija rekombinantnih proteina, posebno onih s oznakom H/KDEL, vrlo je nepredvidljiva. Kompleksni proteini sisavaca mogu se proizvesti u transformiranim biljkama ili transformiranim suspenzijama biljnih stanica. Molekularni uzgoj u biljkama ima potencijal za proizvodnju neograničenih količina rekombinantnih proteina koji se koriste kao dijagnostički i terapijski alati u zdravstvu i znanosti. Potrebna su daljnja istraživanja koja bi pomogla u predviđanju zadržavanja prekomjerno eksprimiranih proteina sa signalom H/KDEL unutar ER-a u biljkama, te koja bi doprinijela daljnjem razvijanju molekularnog uzgoja biljaka.

## **9. SUMMARY**

Many recombinant proteins are often produced in eukaryotic host organisms, such as *Arabidopsis*, to ensure proper folding, disulfide bridge formation and N-glycan processing. Proteins are co-translationally transferred into the endoplasmic reticulum (ER) and then either retained or transported to different intracellular compartments or to the extracellular space. Various molecular signals necessary for retention in the ER or targeting to different compartments have been identified. Recombinant proteins can be designed for ER retention by adding a C-terminal H/KDEL-tag. Despite extensive knowledge of the protein trafficking pathways, the final protein destination, especially of such H/KDEL-tagged recombinant proteins, is unpredictable. Complex mammalian proteins can be produced in transformed plants or transformed plant suspension cells. Molecular farming in plants has the potential to provide unlimited quantities of recombinant proteins for use as diagnostic and therapeutic tools in health care and the life sciences. Further investigations will result in a much better predictability of the ER retention of overexpressed H/KDEL-tagged proteins in plants, and eventually contribute to the further establishment of the field of plant molecular farming.