

# Primjena rekombinantnih mikroorganizama u proizvodnji biofarmaceutika

---

Iveša, Marko

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:691493>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-16**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Marko Iveša  
0058214748**

**Primjena rekombinantnih mikroorganizama u proizvodnji  
biofarmaceutika**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Tehnologija antibiotika  
Mentor: prof. dr. sc. Blaženka Kos**

**Zagreb, lipanj, 2022.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

## Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za Biokemijsko Inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Primjena rekombinantnih mikroorganizama u proizvodnji biofarmaceutika**  
Marko Iveša, 0058214748

### Sažetak:

Od staničnih linija jainika kineskog hrčka (CHO) i eukariotskih mikroorganizama do sojeva aktinomiceta i drugih bakterija, u proizvodnji biofarmaceutika uglavnom se koriste rekombinantni organizmi dobiveni metodama genetičkog inženjerstva nakon provedenog sekvencioniranja genoma i provedenih analiza primjenom bioinformatičkih alata. Prije razvoja suvremenih tehnologija, evolucija je bila jedini način da se poboljšaju svojstva radnog mikroorganizma. Broj modela, metoda i instrumenata dostupnih za provođenje genetičkih izmjena domaćina sve je veći te su i mogućnosti dobivanja rekombinantnih radnih mikroorganizama s poželjnim svojstvima poboljšane. U ovom je radu dan pregled primjene metoda genetičkog inženjerstva u kreiranju rekombinantnih organizama namijenjenih biotehnološkoj proizvodnji farmaceutika. Opisani su modelni organizmi, potencijalni radni organizmi koji mogu poslužiti kao platforma zbog povoljnih metaboličkih svojstava ili fizioloških značajki i rekombinantne stanice mikroorganizama i stanične linije biljaka, sisavaca i kukaca. Posebno je obrađena važnost posttranslacijskih modifikacija u proizvodnji biofarmaceutika te proizvodne strategije koje omogućuju primjenu najsuvremenijih metoda na radne organizme time omogućavajući ekonomičnost proizvodnje novih lijekova.

**Ključne riječi:** biofarmaceutici, rekombinantni mikroorganizmi, posttranslacijske modifikacije genetičko inženjerstvo

**Rad sadrži:** 36 stranica, 8 slika, 1 tablica, 69 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen** u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Blaženka Kos

**Pomoć pri izradi:** prof. dr. sc. Blaženka Kos

**Datum obrane:** 29.06.2022

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### Undergraduate thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Food Technology or Biotechnology or Nutrition**

**Department of Biochemical Engineering**

**Laboratory for Antibiotic, Enzymatic, Probiotic, and Starter Cultures Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Biotechnology**

**Application of recombinant microorganisms in biopharmaceutical production**

**Marko Iveša, 0058214748**

#### **Abstract:**

From Chinese hamster ovary (CHO) cell lines and eukaryotic microorganisms to actinomycetes and other bacterial strains, the production of biopharmaceuticals mainly uses recombinant organisms obtained by genetic engineering methods after genome sequencing and analysis using bioinformatics tools. Prior to the development of modern technologies, evolution was the only way to improve the properties of the working microorganism. The number of models, methods and instruments available for the genetic modification of hosts is increasing and the possibilities of obtaining recombinant working microorganisms with desirable properties have been improved. Model organisms, potential working organisms that can serve as a platform due to favorable metabolic properties or physiological characteristics, and recombinant microorganisms and plant, mammalian and insect cell lines are described. The importance of post-translational modifications in the production of biopharmaceuticals and production strategies that enable the application of state-of-the-art methods to working organisms, thus enabling the cost-effectiveness of the production of new drugs, are especially discussed.

**Keywords:** biopharmaceutical production, recombinant microorganisms, posttranslational modifications, genetic engineering

**Thesis contains:** 36 pages, 8 figures, 1 table, 69 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Thesis is deposited in printed and electronic form** in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Blaženka Kos, Full Professor

**Technical support and assistance:** Blaženka Kos, Full Professor

**Thesis defended:** 29.06.2022

## Sadržaj

1.	Uvod.....	1
2.	Posttranslacijske modifikacije (PTM) biofarmaceutika.....	2
2.1.	Glikozilacija .....	2
2.2.	$\gamma$ -Karboksilacija .....	5
2.3.	Fosforilacija .....	6
2.4.	Sulfacija.....	7
2.5.	Acetilacija .....	8
2.5.1.	Acetilacija N-kraja .....	8
2.5.2.	Acetilacija lizina.....	9
2.6.	Metilacija .....	10
3.	Ekspresijski sustavi.....	11
3.1.	Rekombinantne stanice sisavaca.....	13
3.2.	Modelni mikroorganizmi.....	14
3.2.1.	Bakterijske ekspresijske platforme.....	14
3.2.2.	Kvaščeve ekspresijske platforme .....	15
3.3.	Biljne ekspresijske platforme.....	15
3.4.	Ekspresijske platforme bazirane na stanicama insekata .....	16
4.	Alati genetičkog inženjerstva.....	16
4.1.	Alati proteinskog inženjerstva .....	17
4.2.	Alati metaboličkog inženjerstva .....	17
4.3.	Primjena RNA u bioinženjerstvu .....	18
4.4.	Endonukleaze u genetičkom inženjerstvu.....	19
4.4.1.	Meganukleaze (MN).....	20
4.4.2.	Nukleaze s proteinskim strukturnim motivima "cinkovi prsti" (ZFN).....	20
4.4.3.	Efektorske nukleaze slične aktivatoru transkripcije (TALEN) .....	21
4.4.4.	CRISPR/Cas sustav .....	21
5.	Primjena alata genetičkog inženjerstva u proizvodnji biofarmaceutika.....	22
5.1.	Primjena CRISPR endonukleaza .....	22
5.2.	Poboljšavanje svojstava modelnih mikroorganizama kao ekspresijskih sustava ...	23
5.3.	Poboljšavanje svojstava CHO staničnih linija .....	25
5.4.	Razvoj novih potencijalnih mikrobnih ekspresijskih sustava .....	26
5.5.	Poboljšavanje svojstava biljnih ekspresijskih sustava .....	28
5.6.	Poboljšavanje svojstava insekata kao ekspresijskih sustava .....	29
6.	Zaključci.....	30
7.	POPIS LITERATURE.....	31

# 1. Uvod

U suvremenom medicinskom i farmaceutskom području, tema koja se sve češće spominje je produženje prosječnog životnog vijeka ljudske populacije koja sa sobom nedvojbeno dovodi do povećane potrebe za proizvodnjom lijekova. Međutim, trenutni procesi proizvodnje biofarmaceutika nisu lako skalabilni za povećanu proizvodnju te nose povećani rizik od dugoročnih posljedica radi negativnog utjecaja na okoliš i potencijalnog razvoja rezistencije. Iz tih razloga, procesi proizvodnje biofarmaceutika su pod stalnim pritiskom kako bi se unaprijedili kvaliteta i ekonomičnost procesa a istovremeno smanjili mogući nepoželjni rizici povećane proizvodnje. Neovisno o vrsti biofarmaceutika koji se proizvodi, poboljšanja se postižu kombinacijom modificiranja radnih organizama i optimizacijom proizvodnog procesa. Međutim, većina trenutnih procesa razvijena je prije razvoja genetičkog inženjerstva, stoga veliki broj pristupa u molekularnoj biologiji, metaboličkom inženjerstvu i sintetskoj biologiji ostaje neiskorišten.

Novi pristupi proizlaze iz napretka u sekvenciranju i sintezi nukleinskih kiselina, posttranslacijskim modifikacijama, računalnim metodama te raznim -omičkim pristupima. Potencijalni radni organizmi su modelni organizmi, rekombinantne ljudske i ne-ljudske stanice sisavaca, biljne stanice te stanice insekata. Kako nove metode povećavaju broj potencijalnih radnih organizama, odabir ekspresijskog sustava mora se pažljivo razmotriti (Goodwin i sur., 2016).

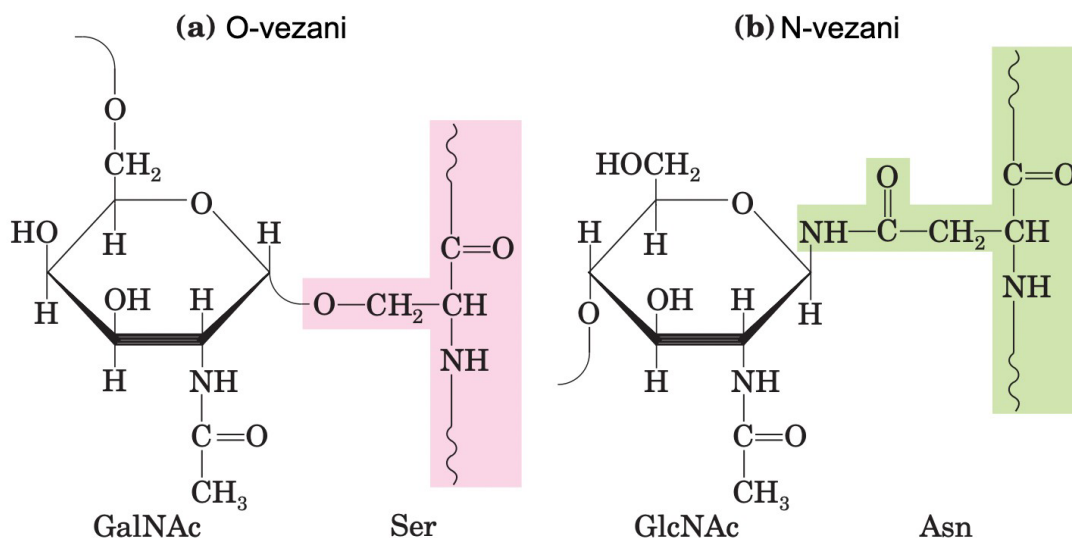
Povećanje broja potencijalnih radnih organizama i razvoj alata genetičkog inženjerstva, omogućuju unaprijeđenje procesa proizvodnje farmaceutskih proizvoda visoke kvalitete. Stoga su u ovom radu, obrađene najvažnije posttranslacijske modifikacije biofarmaceutika, napravljen je pregled mogućih ekspresijskih platformi zajedno s njihovim prednostima, nedostacima i potencijalnim smjerovima razvoja u budućnosti, te su istraženi alati genetičkog inženjerstva koji doprinose razvoju radnih organizama za ekspresiju biofarmaceutika.

## 2. Posttranslacijske modifikacije (PTM) biofarmaceutika

Potražnja za rekombinantnim biofarmaceuticima kontinuirano raste, a s time i udio molekula koje zahtijevaju posttranslacijske modifikacije (PTM). Ispravne PTM-e, posebice N-glikozilacija, ključne su za *in vivo* funkciju farmaceutika, zadovoljavajući poluživot u krvnoj plazmi te za sprječavanje imunoloških reakcija nakon unosa lijeka (Lai i sur., 2018.; Liu, 2015). Osim N-glikozilacije, koja je najvažnija PTM terapijskih proteina, druge PTM-e, neophodne kako bi biofarmaceutici bili slični ljudskim analogima i tako učinkovitiji, obuhvaćaju  $\gamma$ -karboksilaciju, fosforilaciju, acetilaciju, metilaciju i sulfaciju. Mnoge stanične platforme su stoga konstruirane prema ljudskim PTM (Stavenhagen i sur., 2018.). Neglikozilirani farmaceutici uvelike se proizvode u bakterijama i kvascima (Demain i Vaishnav, 2009.), dok glikozilirani uglavnom zahtijevaju ekspresiju u ljudskim i životinjskim staničnim linijama sisavaca.

### 2.1. Glikozilacija

Glikozilacija je najvažnija PTM-a koja utječe na kvalitetu lijeka, a može varirati u duljini glikana, slijedu nukleotida te položaju grananja i broju grananja (Lis i sur., 1993). Kao što je prikazano na slici 1, O-glikozilacija je vezanje šećera na proteine putem kovalentnih veza između anomernih ugljikovih atoma šećera i hidroksilnih skupina pojedinih bočnih ogranaka aminokiselina, a N-glikozilacija je enzimski kataliziran proces formiranja  $\beta$ -glikanskih veza između N-acetilglukozamin oligosaharida i asparaginskih bočnih ogranaka smještenih u specifičnim aminokiselinskim sekvencama Asn-Ser ili Asn-X-Thr (Strasser, 2016).



**Slika 1.** O- i N- glikozilacija (preuzeto i prilagođeno prema Lehninger, 2004)

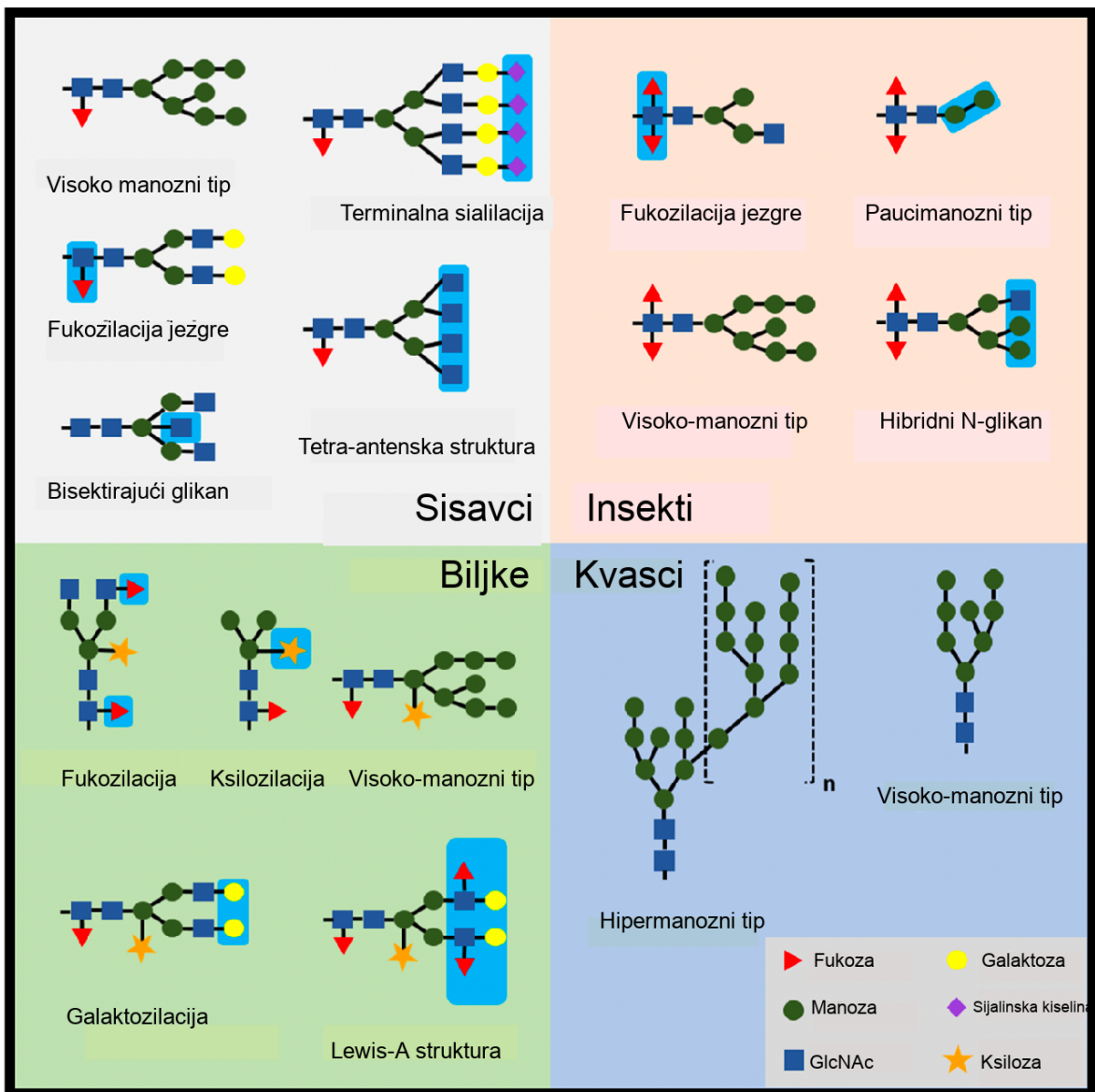
Glikozilacija nije samo specifična za vrste stanica, već na nju utječu i uvjeti uzgoja (Goochee i Monica, 1990.), što dovodi do razlike između rekombinantnih ljudskih (rh) glikoproteina i endogenih radi čega je reproducibilnost procesa veliki izazov. Mogućnosti i ograničenja u tvorbi N-glikana u različitim radnim organizmima o kojima se raspravlja u ovom pregledu prikazana su na slici 2. Sastav N-glikana može imati značajan utjecaj na imunogenost, farmakodinamiku i farmakokinetiku biofarmaceutika (Liu, 2015.). Primjer je nemogućnost proizvodnje složenih N-glikana s terminalnom sijalinizacijom u stanicama kvasaca, biljaka i insekata (Strasser i sur., 2014;), što često ima nepoželjne farmakokinetičke posljedice (Sareneva i sur., 1993.). Nepovoljna glikozilacija glavni je razlog za mali broj odobrenih biofarmaceutika proizvedenih u kvascima, biljkama i insektima kao proizvodnim platformama (Walsh, 2014.). Stoga se biofarmaceutici koji zahtijevaju vrlo specifične i složene N-glikane slične ljudskim proizvode uglavnom u rekombinantnim stanicama sisavaca. Neki od primjera su monoklonska protutijela, enzim DNAaza i rekombinantni terapijski proteini (Houel i sur., 2014.; Stavenhagen i sur., 2018). Nadalje, glikozilacija je glavni fokus u proizvodnji biosličnih lijekova jer glikozilacija biosličnih lijekova mora biti vrlo slična glikozilaciji izvornog lijeka bez prisutnosti imunogenih šećera.

Ispravna glikozilacija posebno je važna u proizvodnji monoklonskih protutijela (mAbs). S obzirom na to da sastav šećera često ima izravan utjecaj na farmakokinetiku, farmakodinamiku i imunogenost monoklonskih protutijela (Liu, 2015.), to je ujedno i glavna meta staničnog inženjerstva. Implikacije prisutnosti ne-ljudske N-glikoilneuraminske



kiseline (Neu5Gc) u biofarmaceuticima proizvedenim u stanicama mijeloma miša dodatno naglašavaju važnost glikozilacije, ali i izbora ekspresijske platforme (Ghaderi i sur., 2010.). U usporedbi sa staničnim linijama miša, udio Neu5Gc u biofarmaceutskim proizvodima s CHO platformom je relativno nizak, što je glavni razlog za prestanak uporabe mišjih staničnih linija za proizvodnju ljudskih protutijela. S druge strane, postoje slučajevi u kojima farmaceutici ne zahtijevaju složenu N-glikozilaciju već im je potrebna velika količina N-glikana s visokim udjelom određenog šećera, primjerice rekombinantni enzim glukocerebrozidaza (GC) koji zahtijeva visoki udjel manoze u N-glikanima. N-glikani cerebrozidaze proizvedene u rekombinantnim staničnim linijama sisavaca previše su složeni te zahtijevaju naknadni enzimski tretman, izvan postupka proizvodnje enzima, kako bi se osigurala željena aktivnost enzima. Ekspresija cerebrozidaze u kulturi stanica korijena mrkve čini naknadni enzimski tretman nepotrebnim (Shaaltiel i sur., 2007.).

Rekombinantni hormoni i interferoni kao što su inzulin, rh hormon rasta (rhGH), rh faktor stimulacije kolonije granulocita (rhG-CSF) i interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) zahtijevaju nekompleksne PTM-e i stoga se mogu proizvesti u *E. coli* ili *S. cerevisiae* (Walsh, 2014.). Primjer je IFN- $\alpha$  dobiven iz *E. coli* bez O-glikozilacije, gdje je bioaktivnost usporediva s ljudskim (Adolf i sur., 1991.). Nadalje, većini rekombinantnih cjepiva nisu potrebne PTM-e nalik ljudskim kako bi imali zadovoljavajuću aktivnost te se pretežito proizvode u *S. cerevisiae* (Walsh, 2014.). Unatoč tome, navedeni primjeri jasno pokazuju da je glikozilacija vrlo važna PTM-a u proizvodnji biofarmaceutika.

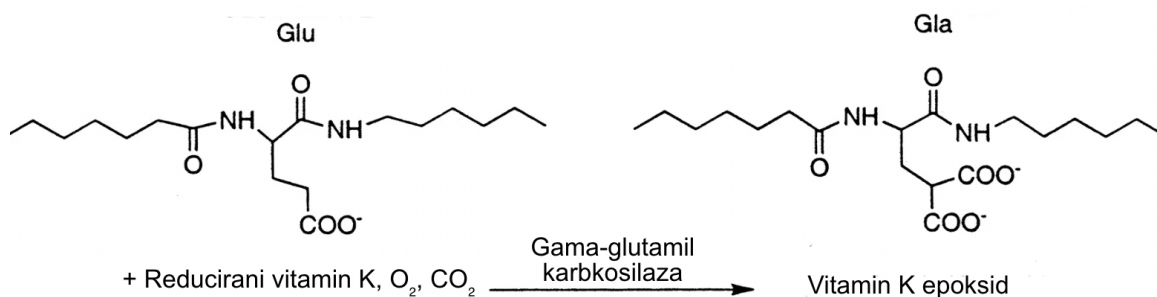


**Slika 2.** Usporedba N-glikozilacije u različitim ekspresijskim platformama (preuzeto i prilagođeno prema Chung i sur., 2017)

## 2.2. $\gamma$ -Karboksilacija

Provođenje određenih N-glikozilacija nije jedini posttranslacijski izazov prilikom optimizacije proizvodnje biofarmaceutika. Karboksilacija je PTM ostataka glutamata (Glu) koju katalizira  $\gamma$ -glutamil karboksilaza u lumenu endoplazmatskog retikuluma (slika 3). Vitamin K je kritični kofaktor u posttranslacijskoj konverziji Glu ostataka u ostatke  $\gamma$ -karboksiglutamata (Gla). Pokazalo se da je proces karboksilacije uključen u kaskadu zgrušavanja krvi i rast kostiju. Za određene rekombinantne terapijske proteine koji se koriste za liječenje krvnih bolesti,  $\gamma$ -glutamil karboksilacija je ključna za učinkovitost i pravilne farmakokinetičke karakteristike te upravo ona predstavlja glavni izazov tijekom

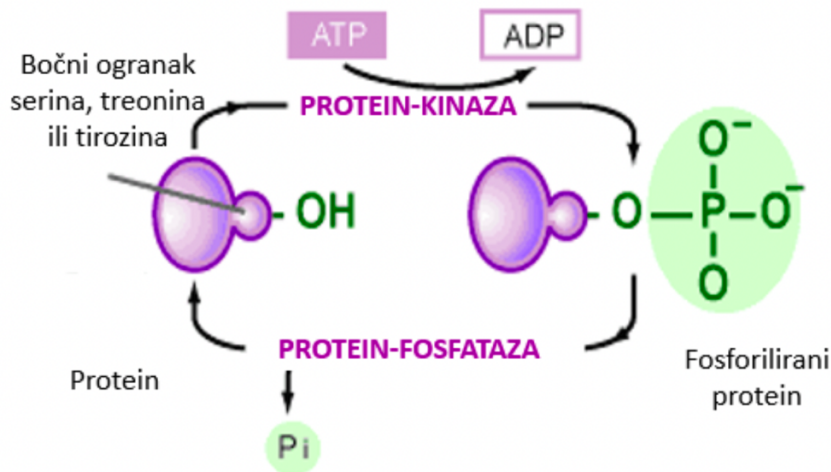
rekombinantne proizvodnje (Walsh, 2010.). Budući da je aktivnost karboksilacije zabilježena samo unutar višestaničnih organizama, na primjer sisavaca i *Drosophila*, biofarmaceutici s potrebom za karboksilacijom proizvode se u platformama koje potječu od višestaničnih organizama, po mogućnosti sisavaca (Bandyopadhyay i sur., 2002.).



**Slika 3.** Karboksilacija glutamata u  $\gamma$ -karboksiglutamata (preuzeto i prilagođeno prema Pradip i sur., 2002)

### 2.3. Fosforilacija

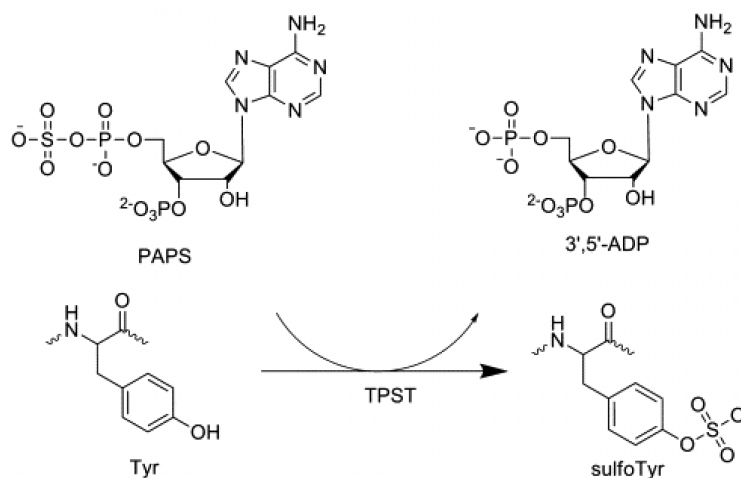
Fosforilacija je proces prijenosa fosfatnih skupina na bočne ogranke jedne aminokiseline u ciljanim proteinima (Slika 4). Aminokiselinski ostaci serina, treonina i tirozina (O-glikozilacija) i ostaci asparaginske kiseline i histidina (N-fosforilacija) mogu biti fosforilirani. Međutim, O-fosforilacija je češća zbog nestabilnosti fosforiliranog aspartata i ostataka histidina. Enzimi koji vrše fosforilaciju nazivaju se protein kinaze, a proteini koji uklanjaju fosfatne skupine iz fosforiliranih proteina nazivaju se protein fosfataze. Iako je fosforilacija najrasprostranjenija posttranslacijska modifikacija u ljudskim organizmima i predstavlja glavni regulatorni mehanizam za reverzibilnu modifikaciju proteina, ona je uglavnom neistražena kao jedan od smjerova razvoja za proizvodnju lijekova u usporedbi s glikozilacijom (Ardito i sur., 2017.).



Slika 4. Fosforilacija i defosforilacija proteina (preuzeto i prilagođeno prema Valla, 2018)

## 2.4. Sulfacija

Sulfacija tirozina je PTM koja uključuje kovalentno vezivanje sulfata na ostatke tirozina (slika 5). Proteini sintetizirani u grubom endoplazmatskom retikulumu modificirani su u trans-Golgijevom području gdje dolazi do sulfacije tirozina koju katalizira enzim tirozilprotein sulfotransferaza. Sulfatirani ostaci tirozina česti su u sekretiranim proteinima, proteinima stanične membrane, koagulacijskim faktorima, i određenim stanicama imunskog sustava. Pravilna sulfacija tirozina u ljudskim stanicama pozitivno utječe na stabilnost proteina, biološku aktivnost te efikasnost sulfatiranih molekula. S obzirom na to da mikroorganizmi nisu sposobni provoditi sulfaciju tirozina, proizvodne platforme za proizvodnju biofarmaceutika koji sadrže sulfotirozin su uvijek rekombinante stanice sisavaca (Stone i sur. 2009.).



Slika 5. Sulfacija tirozina u sulfotirozin (preuzeto i prilagođeno prema Stone i sur., 2009)

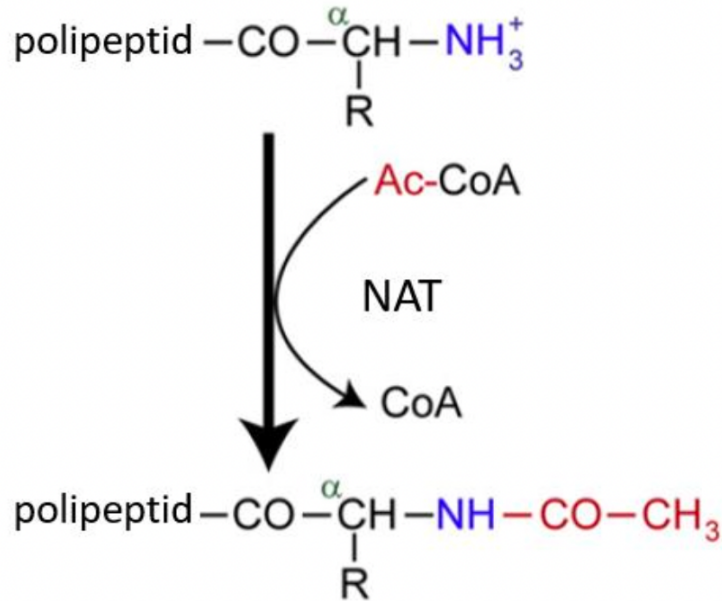
## 2.5. Acetilacija

Acetilacija proteina jedna je od glavnih (PTM-a) kod eukariota, u kojoj se acetilna skupina iz acetil-koenzima A (Ac-CoA) prenosi na određeno mjesto na polipeptidnom lancu. Acetiltransferaze koje kataliziraju acetilacije dijele se na N-terminalne acetiltransferaze i lizinske transferaze. Acetilacija može znatno promijeniti funkciju farmaceutika kroz promjenu njihovih svojstava, primjerice hidrofobnosti, topljivosti i površinskih svojstava, što sve može utjecati na konformaciju proteina kao i interakcije sa supstratima, kofaktorima i drugim makromolekulama (Drazic i sur., 2016). Većina bakterija nosi gene za koje je predviđeno da kodiraju lizin acetiltransferaze i lizin deacetilaze koje dodaju i uklanjaju acetilne skupine. Mnoge bakterije također pokazuju aktivnost acetilacije koja ne ovisi o enzimu, već o izravnom prijenosu acetilnih skupina iz središnjih metabolita acetil koenzima A ili acetil fosfata. Bez obzira na mehanizam, većina metaboličkih enzima posjeduje acetilirane lizinske ostatke te su mnoga od tih reguliranih mjesta očuvana u cijelom carstvu bakterija. Međusobna povezanost acetilacije i središnjeg metabolizma sugerira da acetilacija može biti odgovor na dostupnost hranjivih tvari ili energetske status stanice (Drazic i sur., 2016).

### 2.5.1. Acetilacija N-kraja

Acetilacija N-kraja je vrlo čest proces u eukariotskim stanicama i događa se na većini proteina, dok se u prokariotskim stanicama javlja samo na nekoliko poznatih primjera proteina (slika 6). Iako rijetka kod bakterija i arheja, acetilacija N-kraja pokazala se važnom za funkciju njihovih proteina te se većinom događa na proteinima koji stabiliziraju ribosome. U eukariotskim organizmima je udio acetilnih skupina u proteomu izravno proporcionalan veličini genoma, stoga organizmi poput *Saccharomyces cerevisiae* imaju oko 50-70% acetiliranih proteina, dok je kod ljudi taj broj preko 90%.

Radi potencijalne primjene u medicini i molekularnoj biologiji, acetilacija N-kraja je posljednjih godina često predmet istraživanja, jer bolje razumijevanje njene uloge može potencijalno dati brojne odgovore na pitanja o tome kako liječiti neurodegenerativne i maligne bolesti (Ree i sur., 2018).



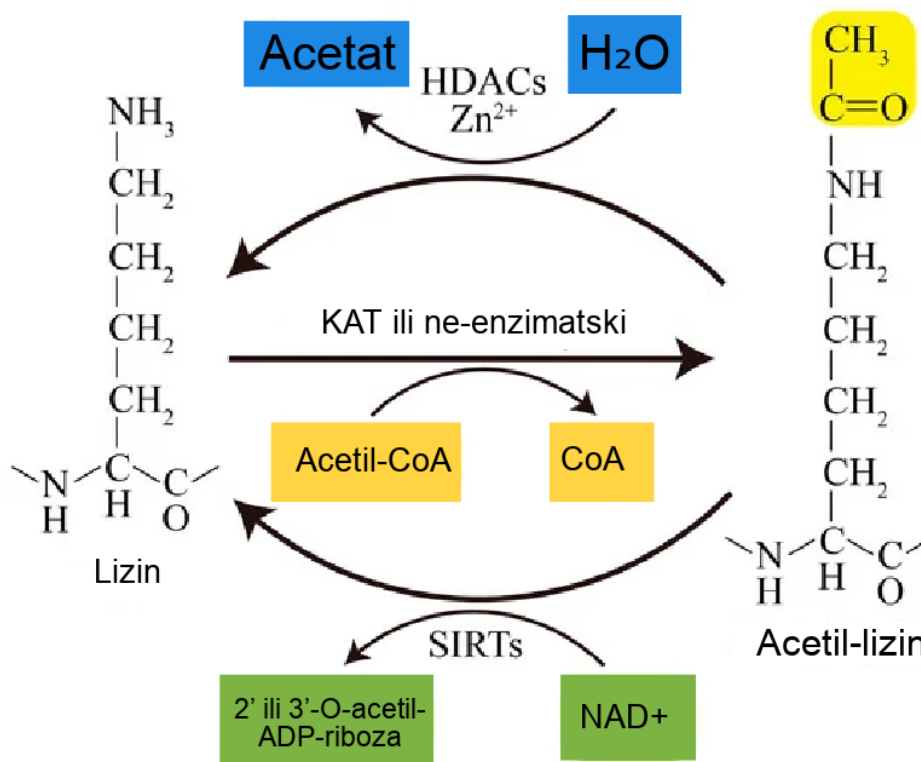
**Slika 6.** Shematski prikaz N-terminalne acetilacije (preuzeto i prilagođeno prema Drazic i sur., 2016)

### 2.5.2. Acetilacija lizina

Prvobitno se smatralo da je acetilacija lizina na ε-amino skupini PTM-a ograničena na histone i popratna regulacija ekspresije gena u eukariotskim stanicama, no nove spoznaje ukazuju na to da je zajedno s fosforilacijom najzastupljenija PTM te da ima značajan učinak na singalizaciju i metabolizam stanice. Poput N-terminalne acetilacije, acetilacija lizina ovisi o koenzimu acetil-CoA (slika 7). Nadalje, enzimi lizin acetiltransferaza (KAT), lizin deacetilaza (KDAC) i proteini koji prepoznaju i vežu modificirane proteine lizina također su uključeni u ovaj proces. Ove proteine karakteriziraju strukturni motivi nazvani „bromodomene“, kroz koje prepoznaju acetilirane lizine (Drazic i sur., 2016). Jedan od primjera opisanih proteina su transkripcijski faktori. Za razliku od N-acetilacije, acetilacija lizina je reverzibilan proces, sličan fosforilaciji, što je važno jer obje PTM-e imaju važnu ulogu u regulaciji metabolizma i signalnih puteva.

Osim acetilacije KAT-om, opažena je spontana, neenzimska acetilacija proteina kroz izravnu interakciju s acetil-CoA u uvjetima visokog pH i visokih koncentracija Ac-CoA koje prevladavaju u mitohondrijima. Nalik N-acetilaciji, udio acetiliranih lizina raste proporcionalno veličini genoma. Za razliku od N-acetilacije, koja je češća u bakterijama, acetilacija lizina je češća u mitohondrijima i kloroplastima. Zanimljiva je činjenica da se

acetilacija češće uočava u visoko organiziranim dijelovima proteina (zavojnice, presavijeni listovi), dok se fosforilacija češće nalazi u fleksibilnim dijelovima proteina (Drazic i sur., 2016).



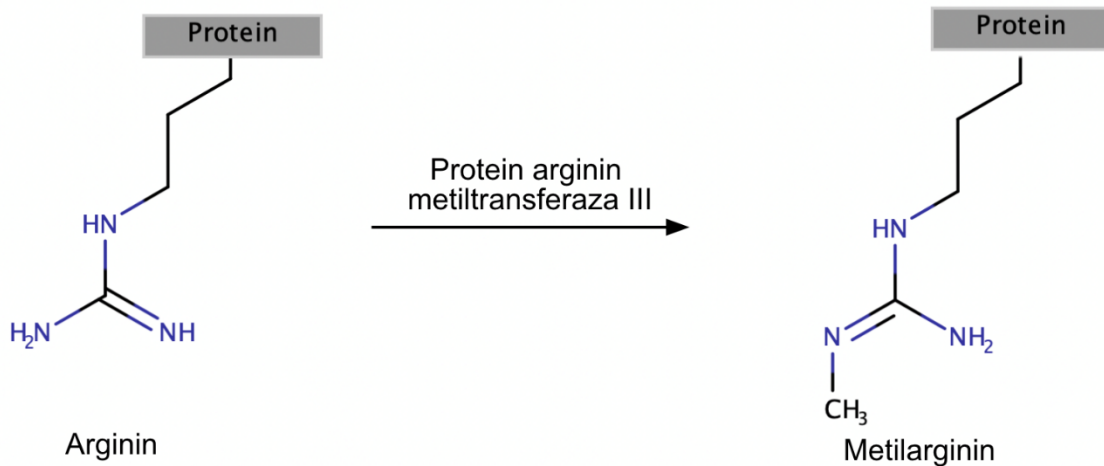
**Slika 7.** Acetilacija lizina na  $\epsilon$ -amino skupini (preuzeto i prilagođeno prema Wang i sur., 2020)

## 2.6. Metilacija

Metilacija je prijenos metilnih skupina s jednim ugljikom na dušik (N-metilacija) ili kisik (O-metilacija) aminokiselinskih ostataka određenih proteina. Posredovana je metiltransferazama, dok je kofaktor S-adenozil metionin (SAM) primarni donor metilne skupine. Metilacija povećava hidrofobnost proteina i može neutralizirati negativan naboj aminokiselina kada se veže na karboksilne kiseline (Slika 8).

Iako nedovoljno istražena u proizvodnji biofarmaceutika, metilacija je vrlo česta modifikacija u ljudskom organizmu, što potvrđuje činjenica da je S-adenozil metionin drugi najčešći supstrat koji se koristi u enzimskim reakcijama nakon ATP-a. Dok je N-metilacija nepovratna, O-metilacija je potencijalno reverzibilna. S druge strane, metilacija je dobro istraženi mehanizam epigenetičke regulacije budući da metilacija i demetilacija histona

imaju utjecaja na dostupnost DNA za transkripciju. Većina modifikacija na bazi metila sačuvane se od bakterija do sisavaca i biljaka, a njihove funkcije uključuju strukturnu i metaboličku stabilizaciju, kao i funkcionalnu ulogu u regulaciji translacije proteina (Raposo i Piller, 2018).



**Slika 8.** Metilacija arginina u metilarginin (preuzeto i prilagođeno prema (vlastita slika))

### 3. Ekspresijski sustavi

Stanice brojnih eukariotskih i prokariotskih organizama koriste se kao ekspresijski sustavi u proizvodnji biofarmaceutika. Ovi ekspresijski sustavi mogu se podijeliti na modelne organizme, rekombinantne ljudske i ne-ljudske stanice sisavaca, biljne stanice i stanice insekata (Karg i Kallio, 2009). Kod svih sustava, stanice su konstruirane tako da proizvode željenu biološku tvar s najvećim mogućim prinosom i čistoćom. Tehnologije za uređivanje genoma temeljene na CRISPR/Cas9 sustavu omogućuju inženjerstvo svih vrsta sustava za ekspresiju s poboljšanim svojstvima te novim funkcionalnostima.

Uz ispravne, ranije objašnjene PTM-e, radni organizmi za proizvodnju biofarmaceutika moraju ispuniti određene dodatne zahtjeve kako bi proces bio što bliže optimalnom; potrebna je dostupnost sustava za genetsko inženjerstvo uz korištenje raznih molekularnih alata, stabilnost genoma, brz rast stanica, jednostavno rukovanje bioprocesom, laka skalabilnost te jednostavno pročišćavanje. Nadalje, povijest odobrenih biofarmaceutika proizvedenih u određenoj vrsti stanica igraju važnu ulogu kada je u pitanju odabir najprikladnijeg sustava



za ekspresiju (Dumont i sur., 2016). Karakteristike svih radnih organizama o kojima se raspravlja u ovom radu sažete su u tablici 1.

**Tablica 1.** Dostupne ekspresijske platforme i evaluacija njihovih karakteristika (preuzeto i prilagođeno prema Amman i sur., 2018)

Karakteristike	Ljudske stanice	CHO*	Bakterijske stanice	Stanice kvasaca	Biljne stanice	Stanice insekata
Biofarmaceutska kompleksnost	+++	+++	+	++	++	++
Veličina genoma	+++	+++	+	+++	+++	++
Dostupnost sekvencioniranog genoma	+++	++	+++	+++	+	+
Molekularni alati	++	++	+++	+++	+	+
Posttranslacijske modifikacije	+++	+++	+	++	++	++
Sekrecija proteina	+++	+++	+	++	++	++
Rast	+	++	+++	+++	++	++
Produktivnost	+	++	++	+++	++	++
Bioprociranje	++	++	+++	+++	++	++
Skalabilnost	++	+++	+++	+++	++	++
Biosigurnost	++	+++	+	++	++	++
Odobrenja	++	+++	++	++	+	+

\* CHO - stanične linije jajnika kineskog hrčka

\* +, ++, i +++ predstavljaju ocjenu određene karakteristike ekspresijske platforme gdje je + najmanje zadovoljavajuća a +++ najviše zadovoljavajuća ocjena

### 3.1. Rekombinantne stanice sisavaca

Kulture stanica sisavaca sposobne su sintetizirati velike i složene proteinske molekule. Najčešće korištene stanične linije su stanice mijeloma miša i stanice jajnika kineskog hrčka (CHO). Međutim, nedavno se sve više koriste ljudske stanične linije čija uporaba osigurava da će ciljani protein imati PTM-e karakteristične za ljudske proteine. S druge strane, stanične linije ne-ljudskih sisavaca koje se najčešće koriste; CHO, stanice bubrega bebe hrčka (BHK) i stanice mijeloma miša kao što je NS0, imaju do određenog stupnja, sposobnost izvođenja PTM-a slično ljudima (Dumont i sur., 2016). Velika prednost, posebice CHO staničnih linija, jest činjenica da su otporniji na kontaminaciju ljudskim virusima, što rezultira povećanom sigurnošću i smanjenim naporima za inaktivaciju virusa te pročišćavanje tijekom daljnje obrade. Nadalje, CHO stanice karakterizira i relativno visoka tolerancija na promjene temperature, kisika, pH i razine tlaka tijekom proizvodnje biofarmaceutika (Dumont i sur., 2016.).

Još jedna od prednosti svih staničnih linija sisavaca je mogućnost izlučivanja heterolognih proteina umjesto lize stanica koja je potrebna kada se proteini proizvode s prokariotskim sustavima (bakterijama).

Međutim, ekspresijski sustavi staničnih linija sisavaca nisu bez ograničenja, odnosno rizika od infekcije životinjskim virusima ili niske razine produktivnosti proizvodnog procesa (Dumont i sur., 2016). Nadalje, medij za stanične linije predstavlja još jednu poteškoću. Procijenjeno je da kulture stanica zahtijevaju više od pedeset različitih komponenti, što otežava optimizaciju njihove koncentracije. Stanice sisavaca često zahtijevaju dodatak faktora rasta, aminokiselina, redukcijskih agenasa ili vitamina, dok mikrobi često zahtijevaju samo jednostavnu kombinaciju osnovnih elemenata, kao što su dušik, ugljik, fosfor ili mineralne soli. To općenito povećava troškove kao i složenost bioprocasa, osobito tijekom „scale-up“ faze. Ova ograničenja su prevladana upotrebom CHO stanica, koje se mogu prilagoditi rastu u suspenziji u podlozi bez dodatka seruma s vremenom udvostručenja od 20 do 24 sata, ovisno o procesu (Kunert i Reinhart, 2016.). U industrijskim razmjerima, prinosi rekombinantnih proteina u rasponu od g/L dobivaju se iz bioprocasa temeljenih na CHO, dok proizvodnja u drugim ekspresijskim sustavima sisavaca rezultira nižom specifičnom produktivnošću i titrima proizvoda.

Trenutno postoji relativno veliki broj biofarmaceutika dobivenih uporabom stanica sisavaca kao ekspresijskih sustava koji su odobreni u SAD-u i Europi. Ipak, genetička nestabilnost i intenzivan razvoj staničnih linija, kao i vremenski okviri bioprocesa, glavni su nedostaci ovog sustava (Vcelar i sur., 2018).

## 3.2. Modelni mikroorganizmi

Među modelnim mikroorganizmima, koji obuhvaćaju bakterije, kvasce i plijesni, najpoznatija je modelna bakterija *Escherichia coli*, i obično je primjenjiva za proizvodnju manjih bioloških lijekova (npr. peptida, proteina, citokina, faktora rasta, plazmidne DNK, nukleinskih kiselina, peptidijela i neglikoziliranih fragmenata antitijela).

Kao i kod razvoja staničnih linija, postignut je značajan napredak u genetičkom inženjerstvu mikrobnih sojeva za industrijsku primjenu. Konstruirani mikrobi su sposobni proizvesti velike količine djelatnih tvari lijekova, u koncentracijama višim od onih koje se mogu postići sa staničnom kulturom. Osim toga, vremenski okviri razvoja i troškovi procesa temeljenih na mikrobnjoj fermentaciji mogu biti mnogo kraći od onih za kulturu stanica sisavaca. (Challener, 2018.)

### 3.2.1. Bakterijske ekspresijske platforme

Za razliku od stanica sisavaca, bakterijski mikroorganizmi nemaju sposobnost izvođenja većine PTM-a, uključujući glikozilaciju, koja je neophodna za proizvodnju aktivnih biofarmaceutika (Brown i sur., 2017). Osim toga, ispravno smatanje proteina, nastajanje disulfidnih veza, kao i pravilno izlučivanje nisu prisutni kod velikog broja bakterijskih vrsta što dovodi do stvaranja inkluzijskih tjelešaca. Korištenjem odgovarajuće signalne sekvence, željeni produkt može se usmjeriti u periplazmu gdje redukcijska okolina omogućuje oksidaciju proteina za nastajanje disulfidnih veza, čime se omogućuje željeno preklapanje proteina. Međutim, ovaj pristup je ostvariv samo kod gram-negativnih bakterija (Miller i Salama, 2018.). Značajno je da *Bacillus subtilis* posjeduje efikasne puteve izlučivanja zbog nedostatka vanjske stanične membrane. U suštini, bakterije imaju male i nekompleksne genome koji broje manje od 10 milijuna parova baza, koji su vrlo dobro okarakterizirani još od 1997. Brza dioba stanica za manje od 1 sata i rast u jednostavnim hranjivim podlogama prednosti su bakterijskih sustava. Osim toga, ove karakteristike omogućuju relativno

jednostavan „scale-up“ bioprocasa. Međutim, bakterijski endotoksini moraju se pažljivo ukloniti tijekom pročišćavanja kako ne bi kasnije izazvali imunogene reakcije kod pacijenta, a gore spomenuti nedostatak sekrecije čini daljnje pročišćavanje još zahtjevnijim. Unatoč tome, visoka razina ekspresije, manje složen i jeftiniji bioprocas, kao i dobro okarakterizirane genske karakteristike uz posjedovanje opsežnih molekularnih alata su prednosti proizvodnje u bakterijama (Sahdev i sur., 2008.). *E. coli*, kao najčešće korišteni mikroorganizam, pokazao se vrlo robusnim i ekonomičnim za proizvodnju bioloških lijekova.

### **3.2.2. Kvaščeve ekspresijske platforme**

Najvažniji predstavnici platformi za ekspresiju terapijskih proteina u kvascima su *Pichia pastoris* i *Saccharomyces cerevisiae*. Stanice kvasca sposobne su ispravno smatati proteine i imaju sposobnost provođenja tipičnih eukariotskih PTM-a uključujući N- i, u određenoj mjeri, O- glikozilaciju, fosforilaciju, sulfaciju i ubikvitinaciju (Irani i sur., 2015; Ptacek i sur., 2005). Na temelju nedostatka glikozilacije slične onoj kod ljudi, sojevi kvasca uglavnom se koriste za komercijalnu proizvodnju manjih terapijskih proteina, hormona i cjepiva. Heterologno izlučivanje proteina može se postići upotrebom odgovarajućeg signalnog peptida. Za razliku od N-glikozilacije u stanicama sisavaca, kvasac vrši hipermanozilaciju i nema sposobnost stvaranja sijaliniziranih N-glikana (Tang i sur., 2016.).

Kao i bakterijski ekspresijski sustavi, sojevi kvasca imaju mali i dobro karakteriziran genom od oko 12 milijuna parova baza, koji se može modificirati molekularnim i sintetičkim alatima koristeći inducibilne promotore (Jakočiūnas i sur., 2018;). Generalno, rekombinantna proizvodnja u stanicama kvasca je brza i isplativa, dok su otpornost na ljudske viruse i odsutnost endotoksina povoljni za daljnju obradu i pročišćavanje. Brzina udvostručenja populacije od nekoliko sati, jednostavni sastavi medija i visoki prinosi rekombinantnih proteina glavni su razlozi zašto su upravo kvasci povoljne platforme.

### **3.3. Biljne ekspresijske platforme**

Od 1990-ih, mnogi istraživači težili su proizvodnji rekombinantnih proteina u biljkama. Obično je prednost bila dana biljkama koje su već korištene u druge istraživačke svrhe jer su određene tehnike genetičkog inženjerstva bile lako dostupne. To je dovelo do razvoja

iznimno raznolikog niza proizvodnih sustava, uključujući cijele biljke, različite tkivne i stanične sustave (dlakavi korijen i kulture stanične suspenzije) i brojne ekspresijske pristupe (stabilno transformirane transgene i transplastomske biljke, inducibilna ekspresija).

Biljke bi se mogle koristiti kao ekspresijski sustavi za proizvodnju antigena, za dizajn brzih dijagnostičkih testova te za proizvodnju cjepiva. Biljne platforme imaju nisku cijenu (0,1% do 10%) u odnosu na druge ekspresijske sustave poput bakterija ili stanica sisavaca (Yao i sur., 2015). Osim toga, imaju veći prinos proteina, manji rizik od kontaminacije, niže troškove skladištenja, sposobnost sinteze složenih proteina s manjim razlikama u glikozilaciji, kao i visoku kvalitetu proizvoda, sigurnost i skalabilnost (Yao i sur., 2015)

Iako su PTM glavni razlog za zabrinutost u slučaju biljnih ekspresijskih sustava, cjepiva biljnog porijekla mogu proizvesti zadovoljavajuće imunološke odgovor. Glikoinženjerstvo omogućuje modifikaciju glikozilacije proteina kako bi se poboljšala imunogenost. Nadalje, polisaharidi dobiveni iz biljaka mogu također poslužiti kao pomoćna sredstva i nosači, što je jedan od dodatnih razloga zašto su biljni ekspresijski sustavi poželjni kao platforme za proizvodnju antigena (Pineo i sur., 2013).

### **3.4. Ekspresijske platforme bazirane na stanicama insekata**

Insekt-bakulovirusni sustavi nude visoke razine ekspresije slične onima u bakterijskim sustavima, pri čemu daju proteine s posttranslacijskim modifikacijama, kao i pravilnim sklapanjem proteina, slično onima dobivenim s kulturama stanica sisavaca. Poput biljaka, oni su također nepatogeni za sisavce. Osim toga, stanice mogu prihvatiti velike ili višestruke gene, a stanice su prikladne za rast u suspenzijskim uvjetima.

Nadalje, stanice insekata prikladne su za proizvodnju virusa i virusnih vektora koji se koriste u proizvodnji virusnih cjepiva i genskih terapija (Lubelski i sur., 2014).

## **4. Alati genetičkog inženjerstva**

Kako bi se riješio problem ostvarivanja željene kvalitete proizvoda, važno je odabrati prikladan tip ekspresijskog sustava koji je sposoban izvesti potrebne modifikacije proteina bez ugrožavanja prinosa proizvoda ili drugih ekonomskih čimbenika. Kako bi se nadišla ograničenja vezana za primjenu staničnih linija u proizvodnji biofarmaceutika odnosno kako

bi se specifično oblikovali tako da odgovaraju na zahtjeve određenih biofarmaceutika, dostupan je sve veći broj alata genetičkog inženjerstva.

## **4.1. Alati proteinskog inženjerstva**

Proteinsko inženjerstvo uključuje sintezu novih proteina, ili izmjenu postojeće proteinske sekvence/strukture kako bi se postigle željene funkcije. Novi algoritmi dizajna proteina, napredak u strukturnoj bioinformatici, poljima molekularne biologije i dostupnost detaljnih 3D modela strukture proteina omogućuju korištenje računalnih pristupa za proteinsko inženjerstvo.

Tijekom posljednja dva desetljeća napredak u masenoj spektrometriji (MS) omogućio je brzo i detaljno profiliranje proteoma. Međutim, selektivna analiza specifičnih subproteoma ostaje znatno zahtjevnija. PTM-e su često prisutne pri niskoj stehiometriji proteina (Tsai i sur., 2015) pa stoga uklanjanje nemodificiranih proteina predstavlja izazov. Također, proteinski kompleksi i specifične stanice moraju biti izolirani prije analize kako bi se sačuvala prostorne informacije. Komplicirani protokoli izolacije izrađuju se radi dinamičke prirode PTM-a, mogućnosti da proteinski kompleksi budu privremeni i nemogućnosti izolacije određenih staničnih odjeljaka, uključujući glavne organele kao što je endoplazmatski retikulum (Chen i sur., 2010). Nedavno su se pojavili modelirani proteini kao važan alat za rješavanje ovih izazova u selektivnoj proteomici. Proteini imaju najmanje tri prednosti kao alati za selektivnu proteomiku, uključujući njihove sposobnosti da: vrlo precizno prepoznaju specifične funkcionalne skupine; budu genetski uvjetovani prema određenom tipu stanica, dijela stanice ili proteinskih kompleksa te činjenica da su evoluirali tako da imaju vrlo kratko vrijeme djelovanja u stanicama.

## **4.2. Alati metaboličkog inženjerstva**

Važni izvori biološki aktivnih tvari su prirodni proizvodi te su neki od najkorištenijih antitumorskih, antibakterijskih i antifungalnih lijekova prirodnog porijekla. Međutim, većina tih prirodnih spojeva evoluirala je radi drugih razloga, a ne za liječenje ljudskih bolesti. Stoga, iako ti prirodni proizvodi djeluju kao ljudski terapeutici, njihova farmakokinetička i farmakodinamička svojstva često nisu optimalna. Također, mnoge od ovih tvari su proizvedene u malim količinama u originalnom radnom organizmu, čineći ih

skupim za izoliranje. Sljedeći logičan korak u sintezi biofarmaceutika je uporaba enzima za kombinatornu (kombiniranu?) sintezu unutar stanica ekspresijskog sustava. To bi omogućilo proizvodnju farmaceutika uz manje troškove „upstream“ procesa i smanjilo potrebu za pročišćavanjem enzima koji su potrebni za *in vitro* sintezu.

Proizvodnja novog ili postojećeg lijeka u heterolognom radnom organizmu generalno uključuje uvođenje i povezivanje nekoliko gena u biosintetske kaskade. No, metaboličko inženjerstvo je mnogo više od samog unošenja nekoliko gena u stanicu — često uključuje pažljivo balansiranje gena u novo-konstruiranom metaboličkom putu tako da nijedan gen ne bude prekomjerno izražen ali niti nedovoljno izražen. To se postiže smanjenjem koncentracije prekursora za rast i biosintezu proizvoda ili manipulacijom koncentracije produkta sinteze. Metaboličko inženjerstvo također uključuje preusmjeravanje resursa iz središnjih metaboličkih puteva do biosintetskog puta za molekulu od interesa. Stoga, kontrola nad više gena istovremeno i metabolička ravnoteža između heterolognog metaboličkog puta i prirodnog metabolizma radnog organizma su ključni problemi u proizvodnji farmaceutika metaboličkim inženjerstvom.

Tijekom proteklog desetljeća, metaboličko inženjerstvo igra važnu ulogu u otkrivanju prirodnih lijekova. Na primjer, saznanje da su sekundarni biosintetski putevi u modelnim organizmima usko povezani na genskoj razini uvelike pojednostavljuje kloniranje i analize sekvenca biosintetskih i regulatornih gena povezanih sa željenim proizvodom. Naposljetku, ulaganje značajnih resursa u metaboličko inženjerstvo ultimativno rezultira jeftinijim lijekovima, posebno za liječenje bolesti u zemljama u razvoju gdje je visoki trošak farmaceutika glavna prepreka radi kojih se isti ne koriste (Garcia-Granados i sur., 2019).

### **4.3. Primjena RNA u bioinženjerstvu**

Tretiranje stanica nekodirajućom RNA (ncRNA), „short hairpin“ RNA (shRNA), mikroRNA ili malom interferirajućom RNA (siRNA) također su načini za kontrolu razine transkriptoma bez utjecaja na sam genom (Inwood i sur., 2018.). Ove RNA molekule mogu ili savršeno vezati ciljanu RNA (mRNA) što rezultira izravnim cijepanjem mRNA ili s nepotpunom komplementarnošću što dovodi do smanjene translacije i degradacije mRNA. Dakle, oba mehanizma inhibiraju translaciju ciljanog proteina. Budući da metode

inženjerstva putem mikroRNA ili interferirajuće RNA (RNAi) utječe na stanje stanice nakon transkripcije, učinak je privremen samo dok su RNA molekule prisutne u stanicama. Bitno je spomenuti i da neke ncRNA imaju višestruka ciljana mjesta, što bi moglo biti korisno kada se više enzima treba mijenjati istovremeno, ali s druge strane može rezultirati neželjenim nuspojavama (Lam i sur., 2015.).

MicroRNA-inducirani kompleks za utišavanje (microRISC) sastoji se od vodiča i argonaut proteina (AGO). Specifičnost microRISC-a je posljedica njegove interakcije s komplementarnim sekvencama na ciljanoj mRNA, nazvane elementi odgovora miRNA (MRE). Stupanj komplementarnosti MRE-a određuje hoće li doći do AGO2-ovisnog cijepanja ciljane mRNA ili microRISC posredovana translacijska inhibicija i raspad ciljane mRNA. Potpuno komplementarna interakcija microRNA-MRE inducira aktivnost endonukleaze AGO2 i na taj način inducira cijepanje mRNA. Međutim, ova interakcija destabilizira vezu između AGO i 3' kraja miRNA radi čega dolazi do njene degradacije (Ameres i sur., 2010).

U životinjskim stanicama većina interakcija microRNA-MRE nije u potpunosti komplementarna već većina MRE sadrži barem središnje nepodudarnosti sa svojom vodećom miRNA, sprječavajući aktivnost AGO2 endonukleaze. Iz tog razloga, AGO2 djeluje kao posrednik interferencije RNA. U mnogim slučajevima, funkcionalna microRNA-MRE interakcija događa se preko 5' regije (nukleotidi 2-8) (Ellwanger i sur., 2015), no dodatna komplementarnost na 3' kraju pomaže u stabilnosti i specifičnosti interakcije.

#### **4.4. Endonukleaze u genetičkom inženjerstvu**

Postoje četiri skupine nukleaza za uređivanje genoma na temelju njihove strukture: meganukleaze (MN), nukleaze s proteinskim strukturnim motivima „cinkovih prstiju“ (ZFN), efektorske nukleaze slične aktivatoru transkripcije (TALEN) i nukleaze uključene u CRISPR/Cas sustav. (Gaj i sur., 2013.)



#### **4.4.1. Meganukleaze (MN)**

Meganukleaze (MN), su restriksijske endonukleaze koje karakterizira veliko mjesto prepoznavanja (14-40 bp) i niska citotoksičnost za stanice sisavaca što ih čini privlačnim alatima za uređivanje genoma. Postojeće inženjerske tehnike uključuju nastajanje fuzijskih proteina iz postojećih meganukleaznih domena i metode inženjerstva meganukleazne specifičnosti promjenom proteinskih ostataka u domeni koja veže DNA. Jedna od najčešće korištenih početnih kalupa za dizajn novih umjetnih MN-a je I-CreI, član obitelji LAGLIDADG, kao najveća od pet poznatih obitelji MN-a. Međutim, broj MN-a koje se prirodno pojavljuju još uvijek je ograničen i nedovoljan za rješavanje svih potencijalno zanimljivih lokusa (Boissel i sur., 2014). Također, zahtjevan proces naknadnog inženjerstva i niska učinkovitost uređivanja također ograničavaju primjenu MN-a (Silva i sur., 2011)

#### **4.4.2. Nukleaze s proteinskim strukturnim motivima "cinkovi prsti" (ZFN)**

ZFN je heterodimer u kojem svaka podjedinica sadrži domenu cinkovog prsta i domenu endonukleaze FokI. FokI domene moraju se dimerizirati radi aktivnosti, čime se povećava specifičnost enzima, što osigurava da se moraju dogoditi dva neposredna događaja vezanja DNA kako bi se postigao dvolančani lom (Urnov i sur., 2010).

Rezultirajući događaj cijepanja je to što omogućuje rad većini tehnologija za uređivanje genoma. Nakon što se napravi lom, stanica ga nastoji popraviti. Najjednostavnija metoda je "nehomologno spajanje krajeva" (NHEJ), u kojoj stanica u osnovi popravlja dva kraja slomljene DNK i ponovno ih spaja, često stvarajući pomak okvira čitanja. Alternativna metoda je popravak usmjeren na homologiju. Ovdje stanica pokušava popraviti prekid koristeći drugu kopiju nukleotidnog slijeda kao rezervnu kopiju - drugi (neprekinuti) kromosom. Uvođenjem specifičnog slijeda inženjeri mogu usmjeriti sustav da umjesto druge kopije ubaci željeni slijed (Urnov i sur., 2010).

### 4.4.3. Efektorske nukleaze slične aktivatoru transkripcije (TALEN)

TALEN nukleaze su konstruirane spajanjem domene koja veže DNA, izvedene iz efektor sličnih aktivatoru transkripcije (TALE) i katalitičke domene FokI endonukleaza TALE, izvorno identificirane iz bakterije *Xanthomonas*, kodirale su DNA-vezujuće domene od kojih se svaka sastoji od monomera koji se vežu za 1 nt u nukleotidnom slijedu. Svaki monomer sastoji se od evolucijski sačuvanih tandem ponavljanja od 34 aminokiselinska ostatka. Ostaci smješteni na pozicijama 12 i 13 vrlo su varijabilni i odgovorni za prepoznavanje specifičnog nukleotida. Budući da je specifičnost vezanja DNA-TALE lakše konstruirati od proteina cinkovih prstiju, TALE imaju širu primjenu nego ZFN (Joung i Sander, 2013).

### 4.4.4. CRISPR/Cas sustav

CRISPR-Cas sustav je u biti sustav nukleaza navođenih s RNA. Za razliku od gore spomenutih nukleaza koje prepoznaju ciljani slijed kroz interakciju protein-DNA, CRISPR-Cas nukleaze prepoznaju ciljane sekvence kroz sparivanje baza RNA i DNA. Uz ciljanu specifičnu CRISPR RNA (crRNA), sekvenca „protospacera“ (PAM) neophodna je da sustav CRISPR-Cas prepozna ciljane sekvence. U ažuriranom sustavu klasifikacije, CRISPR-Cas sustavi podijeljeni su u dvije klase i pet tipova (Makarova i sur., 2015). Sustav klase 1 definiran je prisutnošću višekomponentnog kompleksa crRNA-efektora, dok je sustav klase 2 definiran prisutnošću jednokomponentnog crRNA-efektora. Na primjer, najčešće korišteni *Streptococcus pyogenes* CRISPR-Cas9 (SpCas9) sustav je nukleaza klase 2. Sustav SpCas9 zahtijeva jednostavnu PAM sekvencu (NGG) kao i ciljano specifičnu crRNA i transaktivirajuću CRISPR RNA (tracrRNA), koja se sparuje s RNA vodičem (sgRNA) za uređivanje genoma. Nedavno su proteinskim inženjerstvom razvijene varijante SpCas9 koje mogu prepoznati široki PAM slijed, uključujući NG, GAA i GAT (Masaki i sur., 2018).

Promjenom vodećih sekvenci crRNA ili sgRNA, vrlo je lako ciljati na novu genomsku sekvencu, čineći CRISPR-Cas sustav moćnim alatom za uređivanje genoma (Hsu i sur., 2014). Zbog jednostavnosti i visoke učinkovitosti sustava CRISPR-Cas9, inženjerstvo Cas9 proširilo se na daljnje primjene. Na primjer, Cas9 nikaza, generirana inaktivacijom jedne od

katalitičkih domena, presijeca jedan lanac dvolančane DNA i uvodi dvostruki lom kada se kombinira sa uparenim vodećim RNA.

## **5. Primjena alata genetičkog inženjerstva u proizvodnji biofarmaceutika**

### **5.1. Primjena CRISPR endonukleaza**

Ranije spomenute endonukleaze predstavljaju najveći napredak u manipulaciji biološkim sustavima koje je moguće „programirati“, omogućujući inženjerstvo organizama u većoj mjeri te više različitih pristupa u odnosu na bilo koju drugu metodu. Ključna prednost ove tehnologije je sposobnost preciznog ciljanja i rezanja regija genoma specificiranjem proizvoljnog slijeda u vodećoj RNA (gRNA) za endonukleazu *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) (Cong i sur., 2013).

Proširenje SpCas9 metodama proteinskog inženjerstva i ekstenzivne analize genoma dovele su do čitavog niza primjena CRISPR nukleaza. Na primjer, deadCas9, ili dCas9, je varijanta bez aktivnosti endonukleaze koja može programirati inhibiciju i aktivaciju transkripcije, ali i druge epigenetičke funkcije (Dominguez i sur., 2016). S ovom funkcijom mogu se izgraditi transkripcijski sklopovi u *S. cerevisiae* koji su daleko složeniji od svega što je prije bilo moguće u stanicama kvasaca. Analiza genoma otkrila je homologne nukleaze SpCas9 i nove klase endonukleaza. Jedna od njih je Cpf1 koja može imati nižu aktivnost od Cas9 izvan željene sekvence, a ujedno i veću učinkovitost uređivanja u određenim organizmima. Kao i dCas9, dCpf1 se može koristiti u sintetičkim transkripcijskim faktorima. Za razliku od Cas9, nukleaze Cpf1 stvaraju ljepljivi kraj, koji se može koristiti za in vitro formaciju DNA (Lei i sur., 2017).

Budući da je Cpf1 ortogonalan na Cas9, moguće je istovremeno uređivanje u istom radnom organizmu ili dizajn fuzijske gRNA koja je kompatibilna s obje nukleaze (Kweon i sur., 2017). Druge značajne endonukleaze vođene RNA su C2c1, koja je poput Cpf1, ali koristi dvostruko ciljanje gRNA za smanjeno cijepanje izvan ciljane sekvence i RNA Cas13 (C2c2), koja može cijepati mRNA (Abudayyeh i sur., 2016). Raznolikost, fleksibilnost, učinkovitost i lakoća s kojom se mogu primijeniti sustavi izvedeni iz CRISPR-a uistinu su revolucionirali

inženjerstvo ekspresijskih sustava. Nedavni primjeri uključuju učinkovitu integraciju genoma i metode metaboličkog inženjerstva (Cress i sur., 2017). Ove metode omogućuju identifikaciju važnih gena, prepisivanje DNA radnog organizma bez markera i preusmjeravanje ciklusa ugljika, što je vrlo značajno za optimizaciju aa. Buduća istraživanja u ovom polju će potencijalno raditi na primijeni ove metode na drugim ekspresijskih sustavima.

## **5.2. Poboljšavanje svojstava modelnih mikroorganizama kao ekspresijskih sustava**

Na temelju velikog broja objavljenih radova zadnjih desetljeća, sa sigurnošću se može reći da inženjerske mogućnosti u modelnim organizmima *E. coli* i *S. cerevisiae* nadmašuju iste u svim ostalim organizmima. Moguće je brzo napraviti stotine preciznih genomske modifikacije u *E. coli*, dok je sintetski genom *S. cerevisiae* nadohvat ruke (Richardson i sur., 2017). Nadalje, ovi modelni organizmi konstruirani su da bi sintetizirali cijeli niz malih molekula, prirodnih proizvoda i bioloških tvari. Da bi se proizvele te molekule, heterologni geni i putevi moraju biti reorganizirani, a prirodni metabolizam ponovno uspostavljen. To zahtijeva odabir odgovarajućih heterolognih gena, podešavanje ekspresije s dobro okarakteriziranim dijelovima i poboljšanje proizvodnje inženjerskim metodama na razini genoma. Napredak u uvođenju sintetičkih ciklusa također bi mogao omogućiti dinamičku kontrolu biosinteze.

Odabir potrebnih heterolognih gena moguć je korištenjem javno dostupnih baza podataka dobivenih dugogodišnjim sekvencioniranjem genoma. Transformacija heterolognih gena u radni organizam kao što je *S. cerevisiae* omogućila je heterolognu sintezu mnogih lijekova poput penicilina i opioda (Awan i sur., 2017). Odabir gena uvelike je ovisio o rezultatima „Basic Local Alignment Search Tool“-a (BLAST-a) i iskustvu dizajnera, međutim dodatni alati brzo napreduju. Nadalje, algoritmi koji mogu automatizirati otkrivanje biosintetskih genskih klastera neophodni su za pojednostavljenje tijeka rada i otkrivanje novih specijaliziranih metabolita. U tu svrhu dizajnirani su algoritmi kao što su antiSMASH i SMURF za identifikaciju gena za reorganizaciju pomoću sintetske biologije (van der Lee i Hedema, 2016).

Nakon odabira, ekspresija heterolognih gena mora biti optimizirana kako bi se izbjegla toksičnost i minimizirala potrošnja energije. To zahtijeva precizno praćenje vrste genske ekspresije kao i snage ekspresije gena. Određivanje optimalne snage ekspresije gena za više gena je kompleksan problem s velikim kombinatornim prostorom dizajna. Nedavni napredak u pretraživanju ovih prostora uključuje zaslone visoke propusnosti (Latimer i Dueber, 2017) i racionalno reducirane banke gena korištenjem statističkih metoda. Kako kombinatorno inženjerstvo genskih puteva postaje sve uobičajenije, metode za razvoj dizajna nastavit će napredovati, omogućujući daljnje učenje optimalnog dizajna metaboličkih puteva.

Modelni organizmi zahtijevaju mnoge modifikacije u cijelom genomu kako bi se povećala produktivnost. To je zato što metabolička mreža radnog organizma ima relativno nizak „protok“ u ključnim koracima, a mnoge potrebne modifikacije ostaju nepredvidive. Na primjer, metaboličku mrežu *S. cerevisiae* teško je preusmjeriti od proizvodnje biomase i etanola kako bi se proizveo povišeni titar farnezena, što zahtijeva značajnu reorganizaciju (1,2% genoma) i mnoge neočekivane modifikacije. Kako bi se to riješilo, razvijeno je nekoliko strategija genomskog inženjerstva. Jedan pristup je MAGE, koji uvodi mutacije tijekom replikacije genoma. Slični pristupi su također demonstrirani u kvascu, koristeći CRISPR-potpomognutu integraciju u kvasca. Druga moguća metoda je “Trackable Multiplex Recombineering” (TRMR), temeljena na knockdown-u i ekspresijskoj knjižnici gotovo svih gena *E. coli* koji se mogu pregledati za poboljšanje svojstava (Latimer i Dueber, 2017). Navedene metode imaju prednosti u odnosu na druge jer dopuštaju brojne modifikacije radnog organizma, optimizaciju procesa te se mogu lako replicirati.

Sintetski genski sklopovi kodiraju ekspresiju gena, te se stoga mogu konstruirati za kontrolu staničnih procesa tijekom fermentacije. Dizajn istih, najviše je uznapredovao u modelnim organizmima. Nadalje, transkripcijske kaskade temeljene na CRISPR-u korištene su za izgradnju sklopova u *S. cerevisiae* (Gander i sur., 2017). S predvidljivim dizajnom, sintetski stanična kontrola mogla bi regulirati metabolizam radnog organizma tijekom fermentacije i poboljšati distribuciju metaboličkog toka. U tu svrhu pokazalo se da ciljano uništavanje pfk povećava titar glukuronske kiseline u *E. coli*. Budući rad usredotočen na razvoj ekspresijskih sklopova bez induktora za specifične farmaceutske proizvode mogao bi učiniti fermentacije na industrijskoj skali dinamički ovisnim o uvjetima kulture, time povećavajući njihovu produktivnost.

### 5.3. Poboljšavanje svojstava CHO staničnih linija

Rekombinantni radni organizmi koji se najčešće koriste za proizvodnju proteina je stanična linija jajnika kineskog hrčka (CHO). CHO stanice su u početku odabrane zbog kombinacije produktivnosti, brzine rasta i mogućnosti posttranslacijskih modifikacija. Trenutni razvoj CHO stanične linije usmjeren je na identifikaciju visokoproduktivnih varijanti i osiguravanje klonskog podrijetla, bez modifikacije organizma.

Primjena novih inženjerskih metoda na CHO stanice može povećati produktivnost, smanjiti osjetljivost i poboljšati profile posttranslacijskih modifikacija. Važno je da je inženjerstvo CRISPR-Cas9 primijenljivo na CHO, uključujući CRISPR transkripcijsku interferenciju za poboljšanje izbora dihidrofolat reduktaze/metotreksata koja može povećati broj kopija za gen od interesa. Sustavna analiza CHO stanica može identificirati adaptivne mutacije i predvidjeti ciljeve modifikacija za efikasnu prilagodbu na medij koji ne sadrži serum. Značajno je da su primjene profiliranja ribosoma na CHO identificirale ključne gene rasta i nepotrebno transkribirane gene (Kallehaug i sur., 2017). Nadalje, nedavno su objavljeni metabolički modeli na razini genoma nekoliko sojeva CHO (Hefzi i sur., 2016). Ovi modeli su utvrdili da inhibitori histon deacetilaze neučinkovito koriste metaboličke resurse za povećanu proizvodnju proteina i ukazuju da je inženjerstvo sekretornog puta učinkovitije te da poboljšava proizvodnju proteina u CHO stanicama. Dodatno, primjena metaboličkog inženjerstva za prenamjenu metabolizma ugljika također može poboljšati proizvodnju. Nadalje, uspostavljena metoda metaboličkog inženjerstva analize <sup>13</sup>C-metaboličkog toka (MFA) identificirala je aktivniji oksidativni metabolizam kao zajedničku karakteristiku među visokim proizvođačima (Templeton i sur., 2017).

Posttranslacijske modifikacije ključne su za terapijsku funkciju proteina i imunološki odgovor bolesnika. Kontrola nad profilima glikozilacije CHO mogla bi ubrzati razvoj određenih staničnih linija i omogućiti proizvodnju dodatnih proteina koji zahtijevaju različite modifikacije. U tu svrhu, novo-razvijeni modeli glikozilacije mogu pomoći u predviđanju najbolje CHO stanične linije za željenu glikozilaciju, kao i potrebne modifikacije. Nadalje, ekspresija heterologne sialiltransferaze rezultirala je ne-nativnom  $\alpha$ -2,6 sialinizacijom u CHO, pokazujući da se modifikacije mogu razlikovati. Drugi novi pristup je korištenje projektirane *E. coli* za ekspresiju specifičnih imunostimulirajućih

glikokonjugata CHO koji, nakon ekspresije, uzrokuju da CHO proizvodi prilagođene imunogene.

Metode inženjerstva organizama u razvoju, koje bi mogle biti korisne kada se primjenjuju na CHO uključuju modelom vođeno inženjerstvo (Multilex Automated Genome Engineering) (MAGE), identifikaciju transkripcijskih „hot spotova“ i transkriptomijom vođeno otkrivanje promotora (Wei i sur, 2016). Ovi bi se pristupi mogli koristiti za konfiguraciju genskih sustava u CHO kako bi se dodatno poboljšala metabolička mreža i inducirala sinteza proteina. Također bi moglo biti moguće izgraditi sintetičke sklopove u CHO stanicama koji kontroliraju translaciju u različitim točkama u staničnoj kulturi, smanjujući nepotrebnu sintezu proteina i potencijalno povećavajući produktivnost. Uz kontinuirani razvoj naprednih inženjerskih alata, posttranslacijske modifikacije terapijskih proteina proizvedenih u CHO stanicama, odobrenje regulatornih tijela i značajna kapitalna ulaganja vjerojatno će osigurati dominaciju primjene CHO stanica u narednom vremenu.

#### **5.4. Razvoj novih potencijalnih mikrobnih ekspresijskih sustava**

Radni organizmi osim *E. coli* i *S. cerevisiae* privlačni su zbog povoljnog metabolizma i/ili fiziologije. Na primjer, organizam može prirodno imati visok protok kroz metabolički put koji je jako razgranat, pružajući pristup cijeloj klasi molekula. Mnogi od ovih potencijalnih ekspresijskih sustava počinju se nadmetati s modelnim organizmima, zahvaljujući razvoju genske fleksibilnosti i bioinženjerskih alata za cijeli genom.

Jedan od potencijalnih ekspresijskih sustava je brzo-rastuća bakterija *Vibrio natriegens* koja raste dvostruko brže od *E. coli*, osiguravajući brže molekularno kloniranje i biosintezu bioloških molekula. Za ovaj organizam su poznati brojni genetički alati i metode; uključujući transformaciju, inducibilne promotore, kazete otpornosti i vektorske sustave alelnih izmjene. Osim toga, razvijena je metoda multipleksnog uređivanja genoma (Dalia i sur., 2017). Nadalje, analiza metaboličkog toka *V. natriegens* otkrila je brzi unos glukoze i nizak protok kroz put pentoza fosfata kao ključne razlike od *E. coli*, iako je metabolizam generalno sličan. Buduća istraživanja koja će iskoristiti prednost brzog rasta za farmaceutsku proizvodnju u

industrijskom kontekstu mogla bi uspostaviti bakteriju *V. natriegens* kao jednu od glavnih ekspresijskih platformi.

Drugi potencijalni radni organizam je kvasac *Yarrowia lipolytica*, koji je zanimljiv jer se prirodno prilagodio stvaranju velikih skupina ključnih metabolita kao što je citosolni acetyl-CoA. Kao rezultat toga, *Y. lipolytica* je konstruirana za proizvodnju mnogih spojeva, uključujući molekule koje pripadaju farmaceutskoj klasi terpenoida. Razvijeni su i alati za ekspresiju gena, prekid puta nehomolognog spajanja krajeva (NHEJ) za učinkovitiju integraciju genoma i CRISPR metode (Schwartz i sur., 2017). Stoga je *Y. lipolytica* postala alternativni radni organizam za napredne strategije genetičkog inženjerstva metaboličkih puteva.

Druge potencijalne ekspresijske platforme mogu biti dobivene „pripitomljavanjem“ organizama. Ti su potencijalni sustavi usko povezani s organizmima koji proizvode prirodne proizvode sa sličnom biosintezom, poput neribosomalnih peptida te možda već proizvode lijek. Stoga je metabolička mreža ovih potencijalnih ekspresijskih sustava spremna za željenu biosintezu. Neki primjeri ovih sustava uključuju morsku bakteriju *Myxococcus xanthus*, bakteriju *B. subtilis* i filamentozne gljive poput *Penicillium chrysogenum* i *Aspergillus fumigatus*. Ovi potencijalni ekspresijski organizmi također mogu zahtijevati uređenje puteva za aktivaciju klastera gena. Jedno rješenje je izmjena promotora pomoću homologne rekombinacije, koja omogućuje aktivaciju heterolognog genskog klastera u potencijalnom radnom organizmu (Montiel i sur., 2016).

Postoje i potencijalni platformski organizmi za rekombinantnu terapijsku proizvodnju. To uključuje ljudske stanične linije, stanice insekata i ranije spomenute kvasce *Pichia pastoris* i *Hansenula polymorpha* (Matthews i sur., 2017;). Mnogi od ovih organizama su se kroz povijest koristili u industriji kao alternativa CHO stanicama, a neke tvrtke isključivo koriste ove ne-CHO domaćine. Stoga bi strategije integriranog inženjerstva za te organizme mogle mogle znatno utjecati na učestalost korištenja radnih organizama koji nisu CHO stanice. Da bi se mnogi napredni pristupi prilagodili tim organizmima, potrebne su opširne zbirke promotora i terminatora. U tu svrhu nedavno su objavljene zbirke sintetičkih bioloških dijelova za upotrebu u *P. pastoris* (Vogl i sur., 2016).



Uz nastavak razvoja inženjerskih alata, optimizacija metabolizma i fiziologije potencijalnih platformskih organizama postat će jednostavnija. Na primjer, s novim CRISPR alatima za inženjerstvo genoma (Pohl i sur., 2016), može se dogoditi da će se *Penicillium chrysogenum* proširiti izvan penicilinske platforme, proizvodeći različite  $\beta$ -laktame ili neribosomske peptide. Budući rad usmjeren na razvoj potencijalnih ekspresijskih sustava sigurno će biti fokusiran na istraživanje novih potencijalnih radnih organizama i mogao bi drastično promijeniti koji organizmi se preferiraju u proizvodnji biofarmaceutika.

## 5.5. Poboljšavanje svojstava biljnih ekspresijskih sustva

Biljke sadrže  $\beta$ -heksozaminidaze, koje stvaraju N-glikanske strukture s terminalnim manozama i time se značajno razlikuju od ljudskih staničnih kultura. Međutim, to nije nužno nedostatak, već se ta karakteristika može koristiti za proizvodnju biofarmaceutika s učinkovitom internalizacijom lijeka pomoću manoznih receptora, na primjer u bolesnika s Gaucherovom bolešću (Strasser i sur., 2014). Jedan odobreni lijek za Gaucherovu bolest, rhGC, proizvodi se u kulturi stanica korijena mrkve s uglavnom paucimanoznim N-glikanima. Neke biljke stvaraju moguće imunogene ostatke šećera  $\beta$ -1,2-ksilozu i  $\alpha$ -1,3-fukozu te se mogu projektirati tako da nemaju dva ostatka šećera putem KO („knockout“) / KD („knockdown“) metoda. Također, nekoliko varijacija mAb s konstruiranim N-glikanima proizvedeno je uz pomoć siRNA, CRISPR/Cas9 (Mercx i sur., 2017) i RNAi tehnologija.

Ipak, nakon uklanjanja svih Golgi-rezidentnih glikoziltransferaza, jednokratno ili postupno uvođenje ljudskih glikoziltransferaza omogućuje proizvodnju biofarmaceutika s vrlo homogenim profilima glikozilacije u usporedbi s platformama sisavaca (Strasser i sur., 2014). Takvi biofarmaceutici s definiranim ostacima šećera iznimno su vrijedni za istraživanje utjecaja N-glikana na funkcije proteina. Osim toga, navedeni pristup podržava razumijevanje uloge glikoziltransferaza, dopuštajući odabir ciljeva za pojačanu ekspresiju (OE) ili „knockdown“ (KO) pri konstruiranju staničnih platformi s homogenim i odabranim N-glikanskim profilima.

## 5.6. Poboljšavanje svojstava insekata kao ekspresijskih sustava

Pokazalo se da pojačana ekspresija ljudskih glikoziltransferaza MGAT2, B4GALT i ST6GAL1 smanjuje ostatke oligomanoze i paucimanoze tipične za insekte i uvodi kompleksne vrste N-glikana na rekombinantne proteine proizvedene u staničnim linijama insekata (Kato i sur., 2017). Kao i za prethodno opisane ekspresijske sustave, CRISPR alati se također koriste za stanične linije insekata kako bi se dizajnirali N-glikani sličniji ljudskim. Jedan primjer je poremećaj  $\beta$ -N-acetilglukozaminidaze (GalNAc) / gena spojenih režnjeva (FDL) za proizvodnju eritropoetina sa smanjenim oligomanoznim i paucimanoznim strukturama u Sf9 stanicama (Mabashi-Asazuma i Jarvis, 2017). Kao i u ekspresijskim sustavima u kvascima, biofarmaceutici iz konstruiranih staničnih linija kukaca s humaniziranom glikozilacijom još se ne nalaze na tržištu. Može se nagađati da uvedena ljudska glikozilacija, koja se vrlo razlikuje od endogene glikozilacije insekata, negativno utječe na rast stanica insekata i stoga rezultira neisplativom proizvodnjom zbog niskih titara.

## 6. Zaključci

1. Protokoli za određivanje optimalnog radnog organizma i metode koje će se koristiti pri uređivanju istog, trebat će sve više oslanjati na prediktivne modele koji istovremeno uspoređuju metabolizam i fiziologiju velikog broja različitih radnih organizama kao i metoda genetičkog inženjerstva.
2. Suvremene metode i alati genetičkog, metaboličkog i proteinskog inženjerstva omogućuju brže i preciznije dizajniranje radnih organizama sa optimiziranim karakteristikama za proizvodnju biofarmaceutika od interesa.
3. Iako je N-glikozilacija glavna karakteristika koju radni organizmi za proizvodnju biofarmaceutika moraju zadovoljiti, potreban je također napredak u optimizaciji ostalih posttranslacijskih modifikacija kojima se pridaje manje pažnje, kao što su karboksilacija, metilacija, fosforilacija i sulfacija, kako bi se omogućila proizvodnja što učinkovitijih biofarmaceutika.
4. Genetički uređene kulture stanica kvasca sustižu ljudsku N-glikozilaciju te se očekuje da će ekspresija terapijskih proteina u stanicama kvasaca postati uobičajena u budućim bioprocima.
5. Unatoč velikom potencijalu, metode genetičkog inženjerstva koje se koriste za optimizaciju preopterećuju stanice kvasca i time oduzimaju njihovu glavnu prednost - brz rast i nakupljanje biomase.
6. Manje poznati radni organizmi kao *Vibrio natriegens*, *Yarrowia lypotica*, *Pichia pastoris* pokazuju velik potencijal radi povoljne fiziologije ili metabolizma no potrebna su daljnja istraživanja i razvoj bioinženjerskih alata kako bi se utvrdilo mogu li biti upotrebljavani za industrijsku proizvodnju biofarmaceutika.

## 7. POPIS LITERATURE

Abudayyeh, O.O. *et al.* (2016) “C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector,” *Science*, **353**, 1-11. doi:10.1126/science.aaf5573.

Adolf, G. R., Kalsner, I., Ahorn, H., Maurer-Fogy, I., & Cantell, K. (1991) “Natural human interferon- $\alpha$ 2 is O-glycosylated,” *Biochemical Journal*, **276**, 511–518. doi:10.1042/bj2760511.

Ameres, S. L., Horwich, M. D., Hung, J.-H., Xu, J., Ghildiyal, M., Weng, Z., & Zamore, P. D. (2010) “Target RNA-Directed Trimming and Tailing of Small Silencing RNAs,” *Science*, **328**, 1534–1539. doi:10.1126/science.1187058.

Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., & Muzio, L. L. (2017) “The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review),” *International Journal of Molecular Medicine*, **40**, 271–280. doi:10.3892/ijmm.2017.3036.

Awan, A.R. *et al.* (2017) “Biosynthesis of the antibiotic nonribosomal peptide penicillin in baker’s yeast,” *Nature Communications*, **8**, 15202. doi:10.1038/ncomms15202.

Bandyopadhyay, P. K., Garrett, J. E., Shetty, R. P., Keate, T., Walker, C. S., & Olivera, B. M. (2002) “ $\gamma$ -Glutamyl carboxylation: An extracellular posttranslational modification that antedates the divergence of molluscs, arthropods, and chordates,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 1264–1269. doi:10.1073/pnas.022637099.

Boissel, S. *et al.* (2014) “megaTALs: a rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering,” *Nucleic Acids Research*, **42**, 2591–2601. doi:10.1093/nar/gkt1224.

Brown, C.W. *et al.* (2017) “Large-scale analysis of post-translational modifications in *E. coli* under glucose-limiting conditions,” *BMC Genomics*, **18**, 301. doi:10.1186/s12864-017-3676-8.

Challener, A., Cynthia, Pharmaceutical Technology Europe, Pharmaceutical Technology Europe-07-01-2018, **30**, 19-21

Chen, W.-Q., Priewalder, H., Pradeep John, J. P., & Lubec, G (2010) “Silk cocoon of *Bombyx mori* : Proteins and posttranslational modifications - heavy phosphorylation and evidence for lysine-mediated cross links,” *PROTEOMICS*, **10**, 369–379. doi:10.1002/pmic.200900624.

Chung, C.-Y., Majewska, N. I., Wang, Q., Paul, J. T., i Betenbaugh, M. J. (2017) “SnapShot: N-Glycosylation Processing Pathways across Kingdoms,” *Cell*, **171**, 258-258.e1. doi:10.1016/j.cell.2017.09.014.

Cong, L. *et al.* (2013) “Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems,” *Science*, **339**, 819–823. doi:10.1126/science.1231143.

Cress, B.F. *et al.* (2017) “CRISPRi-mediated metabolic engineering of *E. coli* for O-methylated anthocyanin production,” *Microbial Cell Factories*, **16**, 10. doi:10.1186/s12934-016-0623-3.

Dalia, T. N., Yoon, S. H., Galli, E., Barre, F.-X., Waters, C. M., & Dalia, A. B. (2017) “Enhancing multiplex genome editing by natural transformation (MuGENT) via inactivation of ssDNA exonucleases,” *Nucleic Acids Research*, **45**, 7527–7537. doi:10.1093/nar/gkx496.

Drazic, A., Myklebust, L. M., Ree, R., & Arnesen, T. (2016) “The world of protein acetylation,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **1864**, 1372–1401. doi:10.1016/j.bbapap.2016.06.007.

Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016) “Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives,” *Critical Reviews in Biotechnology*, **36**, 1110–1122. doi:10.3109/07388551.2015.1084266.

Ellwanger, J. H., Zambra, F. M. B., Guimarães, R. L., & Chies, J. A. B. (2018) “MicroRNA-Related Polymorphisms in Infectious Diseases—Tiny Changes With a Huge Impact on Viral Infections and Potential Clinical Applications,” *Frontiers in Immunology*, **9**. doi:10.3389/fimmu.2018.01316.

Endo, M. *et al.* (2019) “Genome editing in plants by engineered CRISPR–Cas9 recognizing NG PAM,” *Nature Plants*, **5**, 14–17. doi:10.1038/s41477-018-0321-8.

Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas, C. F. (2013) “ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering,” *Trends in Biotechnology*, **31**, 397–405. doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004.

Gander, M. W., Vrana, J. D., Voje, W. E., Carothers, J. M., & Klavins, E. (2017) “Digital logic circuits in yeast with CRISPR-dCas9 NOR gates,” *Nature Communications*, **8**, 15459. doi:10.1038/ncomms15459.

García-Granados, R., Lerma-Escalera, J.A. and Morones-Ramírez, J.R. (2019) “Metabolic Engineering and Synthetic Biology: Synergies, Future, and Challenges,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **7**. doi:10.3389/fbioe.2019.00036.

Ghaderi, D., Taylor, R. E., Padler-Karavani, V., Diaz, S., & Varki, A. (2010) “Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins,” *Nature Biotechnology*, **28**, 863–867. doi:10.1038/nbt.1651.

Goochee, C.F. and Monica, T. (1990) “Environmental Effects on Protein Glycosylation,” *Nature Biotechnology*, **8**, 421–427. doi:10.1038/nbt0590-421.

Hefzi, H. *et al.* (2016) “A Consensus Genome-scale Reconstruction of Chinese Hamster Ovary Cell Metabolism,” *Cell Systems*, **3**, 434-443.e8. doi:10.1016/j.cels.2016.10.020.

Houel, S. *et al.* (2014) “N- and O-Glycosylation Analysis of Etanercept Using Liquid Chromatography and Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Equipped with

Electron-Transfer Dissociation Functionality,” *Analytical Chemistry*, **86**, 576–584. doi:10.1021/ac402726h.

Hsu, P.D., Lander, E.S. and Zhang, F. (2014) “Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering,” *Cell*, **157**, 1262–1278. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010.

Inwood, S., Betenbaugh, M. and Shiloach, J. (2018) “Methods for Using Small Non-Coding RNAs to Improve Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells,” *Genes*, **9**, 25. doi:10.3390/genes9010025.

Irani, Z. A., Kerkhoven, E. J., Shojaosadati, S. A., & Nielsen, J. (2016) “Genome-scale metabolic model of *Pichia pastoris* with native and humanized glycosylation of recombinant proteins,” *Biotechnology and Bioengineering*, **113**, 961–969. doi:10.1002/bit.25863.

Jakočiūnas, T., Pedersen, L. E., Lis, A. V., Jensen, M. K., & Keasling, J. D. (2018) “CasPER, a method for directed evolution in genomic contexts using mutagenesis and CRISPR/Cas9,” *Metabolic Engineering*, **48**, 288–296. doi:10.1016/j.ymben.2018.07.001.

Joung, J.K. and Sander, J.D. (2013) “TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **14**, 49–55. doi:10.1038/nrm3486.

Kallehauge, T.B. *et al.* (2017) “Ribosome profiling-guided depletion of an mRNA increases cell growth rate and protein secretion,” *Scientific Reports*, **7**, 40388. doi:10.1038/srep40388.

Karg, S.R. and Kallio, P.T. (2009) “The production of biopharmaceuticals in plant systems,” *Biotechnology Advances*, **27**, 879–894. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.07.002.

Kato, T. *et al.* (2017a) “N-Glycan Modification of a Recombinant Protein via Coexpression of Human Glycosyltransferases in Silkworm Pupae,” *Scientific Reports*, **7**, 1409. doi:10.1038/s41598-017-01630-6.

Kunert, R. and Reinhart, D. (2016) “Advances in recombinant antibody manufacturing,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**, 3451–3461. doi:10.1007/s00253-016-7388-9.

Kweon, J. *et al.* (2017) “Fusion guide RNAs for orthogonal gene manipulation with Cas9 and Cpf1,” *Nature Communications*, **8**, 1723. doi:10.1038/s41467-017-01650-w.

Lam, J. K. W., Chow, M. Y. T., Zhang, Y., & Leung, S. W. S. (2015) “siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing,” *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, **4**, 252. doi:10.1038/mtna.2015.23.

Latimer, L.N. and Dueber, J.E. (2017) “Iterative optimization of xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae* using combinatorial expression tuning,” *Biotechnology and Bioengineering*, **114**, 1301–1309. doi:10.1002/bit.26262.

van der Lee, T.A.J. and Medema, M.H. (2016) “Computational strategies for genome-based natural product discovery and engineering in fungi,” *Fungal Genetics and Biology*, **89**, 29–36. doi:10.1016/j.fgb.2016.01.006.

- Lei, Y. *et al.* (2017) “Targeted DNA methylation in vivo using an engineered dCas9-MQ1 fusion protein,” *Nature Communications*, **8**, 16026. doi:10.1038/ncomms16026.
- LIS, H. and SHARON, N. (1993) “Protein glycosylation. Structural and functional aspects,” *European Journal of Biochemistry*, **218**, 1–27. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18347.x.
- LUBELSKI, J., HERMENS, W., & PETRY, H. (2014). Insect Cell-Based Recombinant Adeno-Associated Virus Production: Molecular Process Optimization. *BioProcessing Journal*, **13**.
- Mabashi-Asazuma, H. and Jarvis, D.L. (2017a) “CRISPR-Cas9 vectors for genome editing and host engineering in the baculovirus–insect cell system,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**, 9068–9073. doi:10.1073/pnas.1705836114.
- Makarova, K.S. *et al.* (2015) “An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems,” *Nature Reviews Microbiology*, **13**, 722–736. doi:10.1038/nrmicro3569.
- Matthews, C. B., Wright, C., Kuo, A., Colant, N., Westoby, M., & Love, J. C. (2017) “Reexamining opportunities for therapeutic protein production in eukaryotic microorganisms,” *Biotechnology and Bioengineering*, **114**, 2432–2444. doi:10.1002/bit.26378.
- Mercx, S., Smargiasso, N., Chaumont, F., De Pauw, E., Boutry, M., & Navarre, C. (2017) “Inactivation of the  $\beta(1,2)$ -xylosyltransferase and the  $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 Cells by a Multiplex CRISPR/Cas9 Strategy Results in Glycoproteins without Plant-Specific Glycans,” *Frontiers in Plant Science*, **8**, doi:10.3389/fpls.2017.00403.
- Miller, S.I. and Salama, N.R. (2018) “The gram-negative bacterial periplasm: Size matters,” *PLOS Biology*, **16**, e2004935. doi:10.1371/journal.pbio.2004935.
- Montiel, D., Kang, H.-S., Chang, F.-Y., Charlop-Powers, Z., & Brady, S. F. (2015) “Yeast homologous recombination-based promoter engineering for the activation of silent natural product biosynthetic gene clusters,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 8953–8958. doi:10.1073/pnas.1507606112.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. & Freeman (ed.) (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition*.
- Pineo, C.B., Hitzeroth, I.I. and Rybicki, E.P. (2013) “Immunogenic assessment of plant-produced human papillomavirus type 16 L1/L2 chimaeras,” *Plant Biotechnology Journal*, **11**, 964–975. doi:10.1111/pbi.12089.
- Pohl, C., Kiel, J. A. K. W., Driessen, A. J. M., Bovenberg, R. A. L., & Nygård, Y. (2016) “CRISPR/Cas9 Based Genome Editing of *Penicillium chrysogenum*,” *ACS Synthetic Biology*, **5**, 754–764. doi:10.1021/acssynbio.6b00082.
- Ptacek, J. *et al.* (2005) “Global analysis of protein phosphorylation in yeast,” *Nature*, **438**, 679–684. doi:10.1038/nature04187.

- Raposo, A.E. and Piller, S.C. (2018) "Protein arginine methylation: an emerging regulator of the cell cycle," *Cell Division*, **13**, 3. doi:10.1186/s13008-018-0036-2.
- Ree, R., Varland, S. and Arnesen, T. (2018) "Spotlight on protein N-terminal acetylation," *Experimental & Molecular Medicine*, **50**(7), 1–13. doi:10.1038/s12276-018-0116-z.
- Richardson, S.M. *et al.* (2017) "Design of a synthetic yeast genome," *Science*, **355**, 1040–1044. doi:10.1126/science.aaf4557.
- Sahdev, S., Khattar, S.K. and Saini, K.S. (2007) "Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies," *Molecular and Cellular Biochemistry*, **307**, 249–264. doi:10.1007/s11010-007-9603-6.
- Schwartz, C., Frogue, K., Ramesh, A., Misa, J., & Wheeldon, I. (2017) "CRISPRi repression of nonhomologous end-joining for enhanced genome engineering via homologous recombination in *Yarrowia lipolytica*," *Biotechnology and Bioengineering*, **114**, 2896–2906. doi:10.1002/bit.26404.
- Shaaltiel, Y. *et al.* (2007) "Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system," *Plant Biotechnology Journal*, **5**, 579–590. doi:10.1111/j.1467-7652.2007.00263.x.
- Silva, G. *et al.* (2011) "Meganucleases and Other Tools for Targeted Genome Engineering: Perspectives and Challenges for Gene Therapy," *Current Gene Therapy*, **11**, 11–27. doi:10.2174/156652311794520111.
- Stone, M. J., Chuang, S., Hou, X., Shoham, M., & Zhu, J. Z. (2009) "Tyrosine sulfation: an increasingly recognised post-translational modification of secreted proteins," *New Biotechnology*, **25**, 299–317. doi:10.1016/j.nbt.2009.03.011.
- Strasser, R. (2014) "Biological significance of complex N-glycans in plants and their impact on plant physiology," *Frontiers in Plant Science*, **5**. doi:10.3389/fpls.2014.00363.
- Strasser, R. (2016) "Plant protein glycosylation," *Glycobiology*, **26**, 926–939. doi:10.1093/glycob/cww023.
- Strasser, R., Altmann, F. and Steinkellner, H. (2014) "Controlled glycosylation of plant-produced recombinant proteins," *Current Opinion in Biotechnology*, **30**, 95–100. doi:10.1016/j.copbio.2014.06.008.
- Tang, H. *et al.* (2016) "N-hypermannose glycosylation disruption enhances recombinant protein production by regulating secretory pathway and cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*," *Scientific Reports*, **6**, 25654. doi:10.1038/srep25654.
- Templeton, N. *et al.* (2017) "Application of <sup>13</sup>C flux analysis to identify high-productivity CHO metabolic phenotypes," *Metabolic Engineering*, **43**, 218–225. doi:10.1016/j.ymben.2017.01.008.



- Tsai, C.-F. *et al.* (2015) “Large-scale determination of absolute phosphorylation stoichiometries in human cells by motif-targeting quantitative proteomics,” *Nature Communications*, **6**, 6622. doi:10.1038/ncomms7622.
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S., & Gregory, P. D. (2010) “Genome editing with engineered zinc finger nucleases,” *Nature Reviews Genetics*, **11**, 636–646. doi:10.1038/nrg2842.
- Valla, R. (2018). 'Posttranslacijske modifikacije proteina', Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, citirano: 23.05.2022., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:092203>
- Vcelar, S. *et al.* (2018) “Changes in Chromosome Counts and Patterns in CHO Cell Lines upon Generation of Recombinant Cell Lines and Subcloning,” *Biotechnology Journal*, **13**, 1700495. doi:10.1002/biot.201700495.
- Vogl, T. *et al.* (2016) “A Toolbox of Diverse Promoters Related to Methanol Utilization: Functionally Verified Parts for Heterologous Pathway Expression in *Pichia pastoris*,” *ACS Synthetic Biology*, **5**, 172–186. doi:10.1021/acssynbio.5b00199.
- Walsh, G. (2010) “Biopharmaceutical benchmarks 2010,” *Nature Biotechnology*, **28**, 917–924. doi:10.1038/nbt0910-917.
- Walsh, G. (2014) “Biopharmaceutical benchmarks 2014,” *Nature Biotechnology*, **32**, 992–1000. doi:10.1038/nbt.3040.
- Wang, R., Sun, H., Wang, G., & Ren, H. (2020) “Imbalance of Lysine Acetylation Contributes to the Pathogenesis of Parkinson’s Disease,” *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 7182. doi:10.3390/ijms21197182.
- Wei, T., Cheng, B.-Y. and Liu, J.-Z. (2016) “Genome engineering *Escherichia coli* for L-DOPA overproduction from glucose,” *Scientific Reports*, **6**, 30080. doi:10.1038/srep30080.
- YANG, J., WEI, L., GU, M., FANG, X., & YANG, P. (2009) “IDENTIFICATION OF PROTEINS INVOLVED IN INFECTIVITY AND ENTEROTOXIN PRODUCTION IN *ENTEROBACTER SAKAZAKII*,” *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, **17**, 164–181. doi:10.1111/j.1745-4581.2009.00169.x.
- Yao, J. *et al.* (2015) “Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges,” *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 28549–28565. doi:10.3390/ijms161226122.

## Izjava o izvornosti

Ja Marko Iveša izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



---

Vlastoručni potpis

