

POSZTTANSZLÁCIÓS MÓDOSÍTÁSOK:

GLIKOZILÁLÁSOK

Dr. Pécs Miklós



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Glikozilálás

A rekombináns fehérjék gyártásánál kulcskérdés, hogy a biológiai aktivitáshoz szükséges szénhidrát részek is megfelelően kialakuljanak. Ez alapvetően meghatározza az alkalmazható organizmus típusát is. Prokariótákat (pl. *E. coli*-t), amelyek nem képesek glikozilálni, csak olyan egyszerű rekombináns fehérjék gyártásánál használhatunk fel, amelyek nem tartalmaznak szacharidokat (pl. inzulin). Az élesztők képesek ugyan a termelt fehérjék glikozilálására, de túlnyomórészt mannánokat kapcsolnak rájuk, ami eltér a humán fehérjék mintázatától. Ahol a szénhidrát mintázat pontos reprodukciójára van szükség, ott emlős sejtvonalakat kell alkalmazni, még ha ezek a technológiák nehezebbek és költségesebbek is, mint a mikroorganizmusok tenyésztése.



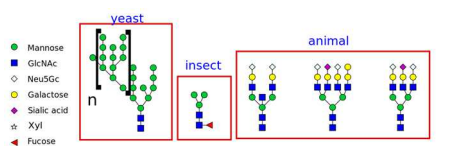
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Glikozilálás

Az eukarióta szervezetek különböző szénhidrátmintázatokat hoznak létre:

Baktériumok: nincs Élesztők: sok mannóz egység
Rovarok: fukozilált Emlős sejtek: komplex „kétágú”
Növényi sejtek: fukozilált és xilozilált



3

A glikozilálás típusai

A cukorrészek az aminosav lánc elkészülte után kerülnek rá a molekulára. Ez csak bizonyos funkciós csoporttal rendelkező aminosavakon lehetséges:

- N-glikozilálás → az Asn-X-Ser/Thr/Cys aminosav-hármas nitrogénjén, ahol X bármely aminosav lehet.
- O-glikozilálás → Ser vagy Thr-on.

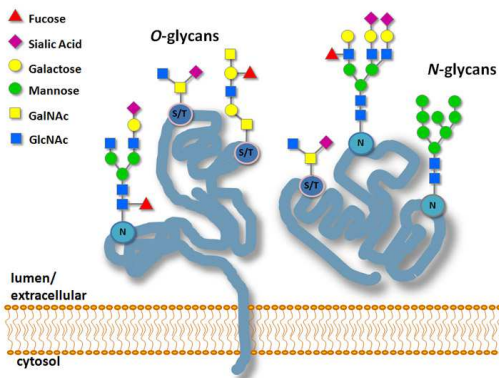
A két glikozilálás más biokémiai mechanizmussal történik, más helyen a sejten belül.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

N- és O-glikoziláció



Glikozilálás és glikáció

A glikozilálás folyamata nem azonos a glikációval, ami szintén cukor molekula kapcsolódása a fehérjékhez. Az előbbi a fehérje érésének része és a sejt membránszerveiben enzimkatalízissal végbemenő viszonylag gyors folyamat.

A glikáció viszont egy spontán, nem-enzimes folyamat, ami utólag, a fehérje működése során, lassan, napok, hetek, hónapok alatt megy végbe. A redukáló cukrok (glükóz, fruktóz, galaktóz) aldehid csoportja Schiff-bázist képezve reagál a fehérjék valamely $-NH_2$ csoportjával. Ez később lassan átalakul Amadori terméké. Példa: a hemoglobin A láncának N-terminális valinjára a glükóz kapcsolódik – a HgA1c szint arányos a háromhavi átlagos vércukor szinttel.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Glikáció

Fehérje aminosoport

$$\text{fehérje} - \text{NH}_2 + \text{cukor}$$

Schiff bázis

$$\text{fehérje} - \overset{+}{\text{N}} = \text{CH} - \overset{\text{OH}}{\text{C}} - \text{R} + \text{H}_2\text{O}$$

Amadori átrendeződés

Amadori termék

$$\text{fehérje} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \overset{\text{O}}{\text{C}} - \text{R}$$

N-glikozilálás

A fehérjékben előforduló Asn-X-Ser/Thr egységeknek mintegy kétharmad részéhez kapcsolódik cukorrész. A továbbiak sztérikus okok vagy az X aminosav savas jellege miatt fedetlenek maradnak.

A fehérjék szénhidrát részeik kialakulása során hosszú utat tesznek meg a sejtben belül. A riboszómáról az ER lumenjébe kerülnek, onnan transzport vezikulákban végig haladnak a Golgi komplex cisz-, médium- és transz rétegein és csak ezután kerülnek a felhasználási helyükre. Az útvonal minden állomásán lokalizált enzimek végeznek egy-egy átalakítást az oligoszacharidokon.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 8

Az N-glikozilálási lépés

Maga a glikozilálás az endoplazmás retikulum membránjának belső oldalán történik, ott, ahol a membrán felületén kötött riboszóma egy transzlokonon keresztül „betolja” a fehérjeláncot a lumen térébe. A megfelelő aminosavhármás felbukkanása esetén egy OST = oligoszacharil-transzferáz enzim helyezi át a 14-oligoszacharidot a dolicholról a fehérjére.

KEY:

- = glucose
- = mannose
- = N-acetylglucosamine

BME Alk. 9

http://www.fredonia.edu/bio241/images5-19_ER_and_Golgi.jpg 10

PROTEIN SYNTHESIS

11

N-glikozilálás

Az N-glikozilálás során először egy 14 cukoregységből álló szerkezet alakul ki, az ER membránjába horgonyozott dolichol (19 tagú poli-izoprénil pirofoszfát) templáton. Ez tevődik át a fehérjére és soklépéses érési folyamat eredményeképpen jön létre a végső, komplex forma.

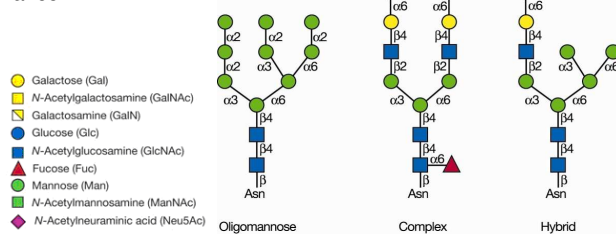
- Galactose (Gal)
- N-Acetylgalactosamine (GalNAc)
- Galactosamine (GalN)
- Glucose (Glc)
- N-Acetylglucosamine (GlcNAc)
- ▲ Fucose (Fuc)
- Mannose (Man)
- N-Acetylmannosamine (ManNAc)
- ◆ N-Acetylneuraminic acid (Neu5Ac)

$\text{Glc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 12

N-glikozilálás

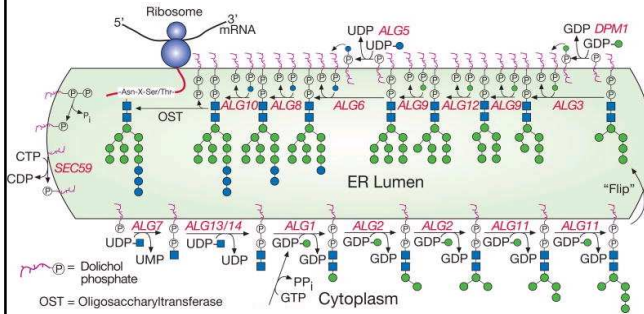
Oligomannóz (köztes) forma: a teljes szerkezet bioszintézise során kétszer is előfordul köztitermék.
 Komplex és hibrid formák: a fehérjéken kialakuló végső láncok.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

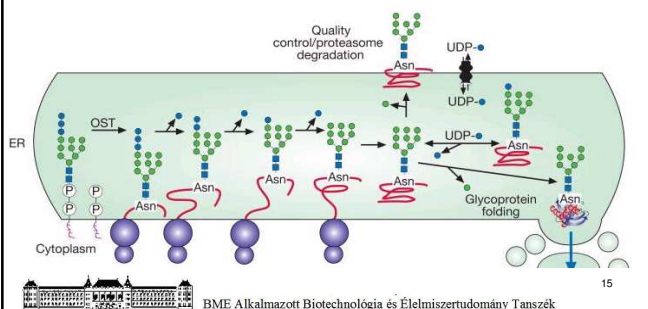
A 14-oligoszacharid bioszintézise

Az első hét egység beépülése az ER külső felületén történik, aztán „befordul” (flip) a lumenbe és ott folytatódik.



További reakciók az ER lumenben

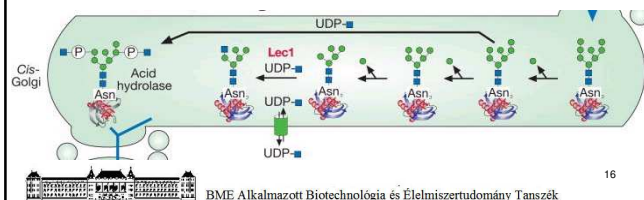
Leválnak a glükóz egységek és visszaalakul oligomannóz-zá. A fehérjerész chaperonhoz (pl. calnexinhez) kötődik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

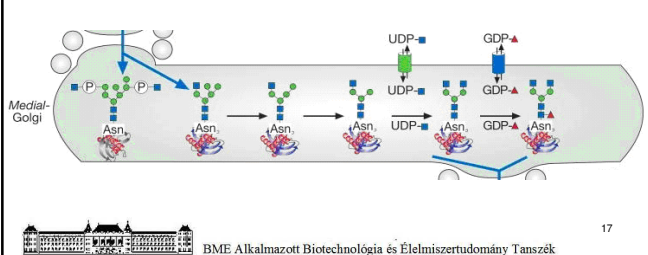
Reakciók a Golgi komplexben

A cisz-Golgi rétegben a további bioszintézis eltérő az élesztőkben és az emlős sejtekben. Az élesztők további mannóz egységeket építenek hozzá, miáltal nagy, immunogén oligomannánok jönnek létre. Az emlős sejtekben viszont mannóz egységek hasadnak le a „komplex” és „hibrid” egységek kialakulása során.



Reakciók a Golgi komplexben

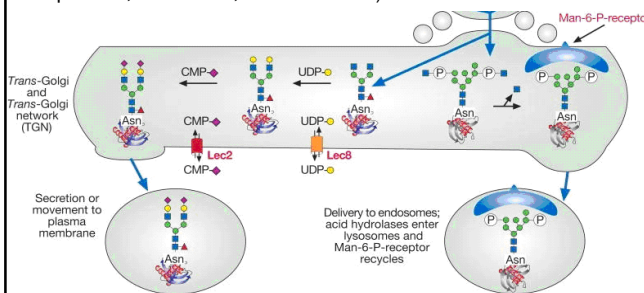
A Golgi komplex középső ciszternáiban a mannóz egységek száma tovább csökken (3) és megkezdődik az új egységek (N-acetil-glükózamin és fukóz) beépítése.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

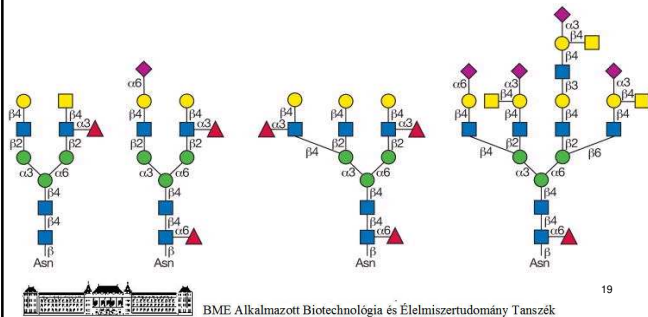
Reakciók a Golgi komplexben

A transz-Golgi komplex fejezi be a szénhidrátláncok kialakítását galaktóz és N-acetil-neurámsav egységek rákapszolásával. Innen a kész fehérjék többfelé távoznak (citoplazma, lizoszóma, extracelluláris)



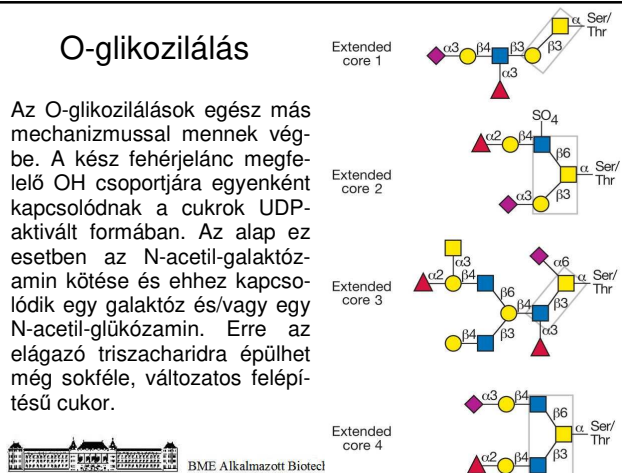
Reakciók a Golgi komplexben

A bemutatott fő szintézisút végén a galaktóz láncvégű oligoszacharidok sokféleképpen „dekorálhatók” tovább:



O-glikozilálás

Az O-glikozilálások egész más mechanizmussal mennek végbe. A kész fehérjelánc megfelelő OH csoportjára egyenként kapcsolódnak a cukrok UDP-aktivált formában. Az alap ez esetben az N-acetil-galaktózamin kötése és ehhez kapcsolódik egy galaktóz és/vagy egy N-acetil-glükózamin. Erre az elágazó triszacharidra épülhet még sokféle, változatos felépítésű cukor.



Vércsoportok

O-glikozilálások hordozzák a vércsoport tulajdonságokat is (glikoforinon).

