



Wytwarzanie paklitakselu i innych taksanów w kulturach *in vitro*

Olga Olszowska, Hanna Olędzka

Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Akademia Medyczna, Warszawa

Production of paclitaxel and other taxanes in *in vitro* cultures

Summary

Paclitaxel is an effective important anticancer drug for advanced breast, ovarian and other cancers. It was first isolated from the bark of the Pacific yew (*Taxus brevifolia*). Paclitaxel belongs to a group of secondary metabolites collectively indicated with the name taxanes. Paclitaxel is found in most yews, but the content is very (0-0,05%) variable. Because of the scarcity of the slow growing trees and the relative low content of paclitaxel, alternative sources are needed to meet the increasing demand. The literature concerning the tissue culture of *Taxus* sp. as an alternative source for taxanes production is reviewed.

Key words:

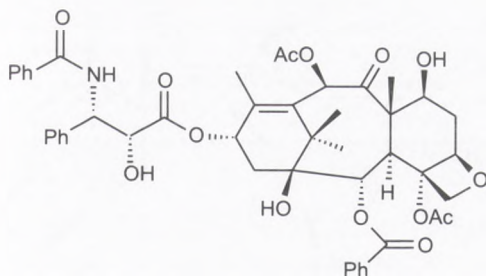
paclitaxel, culture *in vitro*, *Taxus* sp. yew.

1. Wstęp

Taksany są diterpenoidami występującymi w gatunkach z rodzaju *Taxus* – cis. Pierwszy związek z cisów wyizolował Lucas w 1856 r. i nazwał go taksyną. W ciągu 136 lat od pierwszych badań Lucasa do 1992 r. wyizolowano i scharakteryzowano około 100 taksanów, a w ciągu następnych 7 lat ponad 250 nowych związków tej grupy (1). Rozwój badań dotyczących związków chemicznych występujących w cisie był wynikiem wykrycia najbardziej znanego obecnie taksanu – paklitakselu (I).

Adres do korespondencji

Olga Olszowska,
Katedra i Zakład Biologii
i Botaniki
Farmaceutycznej,
Akademia Medyczna,
ul. Banacha 1,
02-097 Warszawa.



I: paklitaxel

Wani i wsp. w 1971 r. (2) wyizolowali ten związek z kory *Taxus brevifolia* i określili jego strukturę. Wykrycie paklitakselu, zwanego początkowo taksolem, było wynikiem stwierdzenia cytotoksycznych właściwości wyciągów z kory *T. brevifolia* w badaniach prowadzonych przez National Cancer Institut w USA.

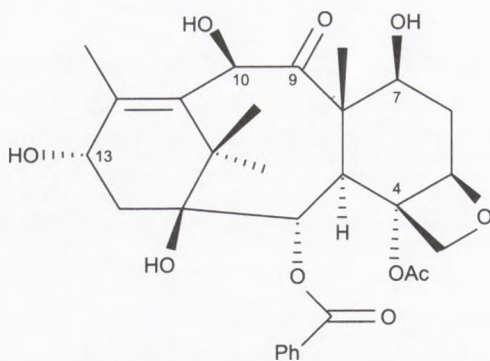
Mechanizm działania paklitakselu opisała Hortwitz (3). Paklitaxel blokuje komórki w fazie G2/M cyklu komórkowego. Komórki te są niezdolne do formowania normalnego aparatu mitotycznego. Specyficznym miejscem działania paklitakselu są mikrotubule. Paklitaxel stabilizuje mikrotubule przez hamowanie ich depolimeryzacji. Aktywność biologiczna paklitakselu uwarunkowana jest przede wszystkim obecnością łańcucha bocznego w pozycji C-13, a także obecnością czterocłonowego pierścienia oksetanowego w pozycji C4-C5 (4). Paklitaxel indukuje apoptozę (5).

W 1992 r. FDA dopuściła stosowanie paklitakselu w leczeniu nowotworów jajnika, a w 1994 r. w leczeniu nowotworów sutka. Paklitaxel stosowany jest także w leczeniu drobnokomórkowego i nie drobnokomórkowego raka płuc, nowotworów głowy i szyi i in. (4). Paklitaxel jest substancją czynną preparatów TAXOL® i YEW TAKSAN®. Docetaxel, syntetyczny analog paklitakselu, jest substancją czynną preparatu TAXOTERE®.

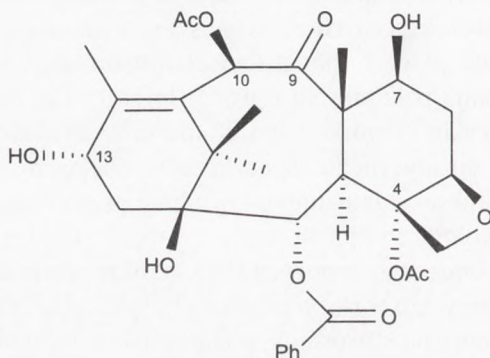
Wykrycie paklitakselu i wprowadzenie go do lecznictwa zaowocowało rozwojem wielokierunkowych badań u podstawy, których było zapewnienie odpowiedniej ilości tego związku.

Początkowo paklitaxel był otrzymywany z kory *T. brevifolia*, gdzie występuje w ilości 0,014% suchej masy (sm), a od 1994 r. jest produkowany do celów leczniczych drogą półsyntezy z 10-deacetylobakkatyny (10-DAB III) (II), pozyskiwanej z igieł i gałązek cisów (6). Również docetaxel jest otrzymywany z 10-DAB III.

Paklitaxel występuje w niewielkich ilościach obok innych taksanów we wszystkich gatunkach cisów. Stwierdzono go także w gatunku *Podocarpus gracilior* (7). Zawartość sumy taksanów, a także poszczególnych związków tej grupy w różnych organach cisów podlega znacznym wahaniom w zależności od gatunku, odmiany, pory zbioru, warunków edaficznych i klimatycznych (8,9). Van Rozendaal i wsp. (10) stwierdzili, że w 750 próbkach igieł różnych gatunków i odmian cisów zawartość paklitakselu i 10-DAB III wahała się odpowiednio od 0 do 500 µg/g sm i od 0 do 4800 µg/g sm.



II: 10-deacetylobakkatyna III (10-DAB III)



III: bakkatyna III (B)

Średnia zawartość 10-DAB III była najwyższa w igłach *T. canadensis* (2665 $\mu\text{g/g}$ sm), przy zawartości paklitakselu 285 $\mu\text{g/g}$ sm paklitakselu. W igłach odmian *T. baccata* było średnio 63 $\mu\text{g/g}$ sm paklitakselu i 468 $\mu\text{g/g}$ sm 10-DAB III. Natomiast w odmianach *T. x media* zawartość paklitakselu wynosiła 211 $\mu\text{g/g}$ sm, a 10-DAB III 230 $\mu\text{g/g}$ sm. Najwyższą zawartość paklitakselu stwierdzono w igłach *T. floridiana* (516 $\mu\text{g/g}$ sm) (10).

W naturalnych populacjach *T. wallichiana* stwierdzono zróżnicowanie zawartości paklitakselu oraz 10-DAB III i bakkatyny III (B) (III) w zależności od m.in. okazu i wieku rośliny: rośliny 50-60-letnie zawierały w igłach więcej paklitakselu niż 2-4-letnie siewki, bądź ukorzenione sadzonki. Zwykle więcej paklitakselu zawierała kora, mniej było go w igłach i gałęziach. Natomiast w gałęziach było najwięcej 10-DAB III i B (11). Wysoką zawartość paklitakselu (0,1% sm) stwierdzono w korze ponad stu dwudziestoletnich okazów *T. wallichiana* (12). Wspomniani autorzy oszacowali, że zawartość paklitakselu w korze całego drzewa waha się od 0,064 do 8,032 g w zależności od okazu. Drzewo około 100-letnie posiada 5,74 kg suchej kory.

2. Otrzymywanie paklitakselu

Zapotrzebowanie na paklitaksel, uznany jako najbardziej znaczący lek przeciwnowotworowy, w ostatnich piętnastu latach ciągle wzrasta. Otrzymywanie paklitakselu i 10-DAB III z roślin pochodzących ze stanowisk naturalnych jest praktycznie niemożliwe, grozi wyniszczeniem zasobów naturalnych cisów, które w wielu krajach są niewielkie i podlegają ochronie. Całkowita synteza paklitakselu była opracowana przez Holtona i wsp. (13) oraz Nicolaou i wsp. (14). Na proces ten składa się jednak aż 28 etapów, a wydajność tego procesu jest bardzo niska. W wielu ośrodkach na świecie trwają wielokierunkowe poszukiwania nowych sposobów otrzymywania taksanów. Badania te dotyczą doskonalenia metod semisyntezy i wykorzystania do tego celu innych prekursorów niż 10-DAB III (15), zakładania wydajnych upraw cisów w gruncie, wykorzystania kultur *in vitro* tkanek i organów cisów, a także kultur endofitycznych bakterii i grzybów (16). Uważa się, że biomasa z kultur *in vitro* byłaby dogodniejszym surowcem do uzyskiwania poszczególnych taksanów niż rośliny rosnące w gruncie, ze względu na mniejszą ilość substancji balastowych utrudniających oczyszczenie izolowanych związków (17).

Prowadzone są także prace nad otrzymaniem kolejnych analogów paklitakselu charakteryzujących się lepszą rozpuszczalnością, lepszą biodostępnością i słabszym działaniem ubocznym (18,19).

Według Jaziri i wsp. (20) pionierami kultur *in vitro* rodzaju *Taxus* byli Larue (21) i Tuleke (22), którzy hodowali gametofity żeńskie i ziarna pyłku cisów. Po raz pierwszy kalus cisa został otrzymany z żeńskiego gametofitu *Taxus baccata* L. przez Zenktelera i Guzowską (23). Mikrorozmnażanie cisów było po raz pierwszy badane przez Amos i McCown w 1981 r. (24). Pierwsze doniesienie dotyczące paklitakselu w hodowli *in vitro* podali Christen i wsp. w 1989 r. (25). Pierwszy patent dotyczący produkcji taksanów w kulturach tkankowych uzyskano w 1991 r. (26).

Od 1991 r. liczba publikacji i patentów dotyczących produkcji taksanów w kulturach *in vitro* ciągle wzrasta. Głównie prowadzone są kultury zawieszinowe, ale otrzymano także kultury transformowanych korzeni (27,28).

Zagadnienia podejmowane w tych pracach to m.in. wpływ różnych warunków prowadzenia kultury, a w szczególności elicytorów i prekursorów na wydajność biomasy i zawartość w niej paklitakselu; badania dróg biosyntezy taksanów i izolacja enzymów biorących udział w biosyntezie oraz klonowanie cDNA w bakteriach i drożdżach; prowadzenie kultur w bioreaktorach.

Do zapoczątkowania kultur tkankowych cisów były stosowane różne eksplanty: gametofit żeński, zarodek, siewki, a także dojrzałe części roślin – igły i gałązki.

W celu stymulowania wzrostu kalusa i kultury zawieszinowej komórek cisa stosowano pożywki Gamborga (B 5) (29), Murashige-Skooga (MS) (30), Woody Plant Medium (WPM) (31), White'a i Rangashwamy'ego (WR) (32), Gupty i Durzana (DCR) (33). Zenkteler i Guzowska (23) stwierdzili, że łączne zastosowanie 5 mg/l 2,4-D i 500 mg/l edaminy było konieczne do otrzymania kultur kalusowych z prabiela

T. baccata. Furmanowa i wsp. (34) ustalili, że 2,4-D może być zastąpione NAA w dawce 1-2 mg/l, a szczególnie korzystny wpływ na wzrost tkanki kalusowej ma dodatek pikloramu w połączeniu z inną auksyną (2,4-D lub NAA).

Fett-Neto i wsp. (35) otrzymali kalus *Taxus cuspidata* na pożywce B5 z 2,4-D i kinetyną (0, 0,5, 1, 2, 4 mg/l w różnych kombinacjach). Wickremesinhe i Arteca (36) otrzymali kalus czterech gatunków cisów na pożywce B5 z 2,4-D, IBA lub NAA w stężeniu od 0,2 do 1 mg/l w kombinacji z kinetyną 0,2 mg/l.

Wielu autorów prowadziło szczegółowe badania dotyczące optymalizacji składu pożywek. Na przykład opracowana przez Ketchum i wsp. (37) pożywka zawierała kompozycję regulatorów wzrostu, składającą się z 1 mg/l pikloramu, 0,1 mg/l kinetyny, 0,1 mg/l kwasu absycynowego, 0,1 mg/l kwasu gibberelinowego. Istotny był również niski stosunek molarny $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ w pożywce, skład witamin i aminokwasów oraz 0,5% sacharozy i 0,5% fruktozy jako źródło węgla.

Zawartość paklitakselu w uzyskanych w wielu ośrodkach naukowych, kulturach kalusowych i zawiesinowych cisów wahała się w szerokich granicach od 0 do 0,6% sm. Czynniki wpływającymi na zawartość taksanów, a wśród nich paklitakselu były m.in. skład pożywki podstawowej, rodzaj i stężenie regulatorów wzrostu, oraz prekursorzy i elicytory biotyczne i abiotyczne. Liczni autorzy zwracali uwagę na konieczność selekcji wydajnych linii komórkowych, a także na właściwy wybór genotypów do zapoczątkowania kultury. Wysoką zawartość paklitakselu (0,032% sm) stwierdzono w kalusie uzyskanym z wyselekcjonowanego okazu *T. x media* „Sargentii”, którego igły zawierały 0,069% sm tego związku (38). Czynnikiem sprzyjającym produkcji paklitakselu i 10-DAB III było różnicowanie się kalusa w korzenie (39,40).

Elicytacja, czyli traktowanie kultur czynnikami biotycznymi (ekstrakty z patogennych grzybów) lub czynnikami abiotycznymi (sole metali ciężkich, zmiana pH, temperatura) pozwoliła zwiększyć produkcję wtórnych metabolitów w kulturach *in vitro* wielu gatunków roślin. Również kultury *in vitro* cisów są podatne na elicytację.

Znaczny wzrost produkcji paklitakselu (z 0,6 do 70 $\mu\text{g/g}$ sm) stwierdzono, gdy wyselekcjonowane kalusy *T. chinensis* zdolne do wzrostu na pożywce z dodatkiem hydrolizatu z endofitycznego grzyba, poddano działaniu tego elicytora. Kalusy nie-selekcjonowane nie były podatne na elicytację (41).

Szczególnie skutecznymi związkami indukującymi biosyntezę taksanów *in vitro* okazały się jasmonian metylu (JM) i kwas jasmonowy (KJ).

Jasmonian metylu po raz pierwszy w kulturze *in vitro* cisów zastosowali Mirjalili i Linden (42). Dodatek 10 μM JM w połączeniu z etylenem (5 ppm) spowodował po 51 godzinach 19-krotny wzrost wydajności paklitakselu w kulturze zawiesinowej *T. cuspidata* w porównaniu z kulturą nie elicytowaną (tab. 1). Korzystny i porównywalny wpływ jasmonianu metylu oraz kwasu jasmonowego w dawce 100 μM na produkcję taksanów obserwowali także Yukimune i wsp. (43). Stwierdzili oni, że zawartość paklitakselu w biomasie *T. x media* rosła liniowo w czasie dwóch tygodni hodowli, osiągając wartość 0,6% sm. Zawartość poszczególnych taksanów pod wpływem JM zwiększała się w różnym stopniu: w kulturze *T. x media* było odpowiednio

4, 16 i 1,8 raza więcej paklitakselu, bakkatyny III i cefalomanniny. Dla kultury *T. baccata* wartości te wynosiły 12, 134 i 0,5 w porównaniu z kulturą nie elicytowaną. Natomiast JM w niewielkim stopniu wpływał na zawartość taksanów w kulturze *T. brevifolia*. Korzystny wpływ JM na syntezę taksanów w kulturach cisów potwierdziło wielu autorów (tab.). Z przeglądu piśmiennictwa wynika jednak, że istnieje duże zróżnicowanie uzyskiwanych wyników w zależności od badanego gatunku, linii komórkowej, czasu elicytacji. Obserwowano zróżnicowanie kultur pod względem ich wrażliwości na elicytację, co przejawiało się w stopniu zwiększenia zawartości sumy taksanów, a także poszczególnych taksanów i w dynamice przebiegu tych zmian w trakcie kultury. Zawartość paklitakselu w sumie wszystkich taksanów w elicytowanych kulturach wahała się w szerokich granicach [od 0% poprzez 20% (44) do 70% (43)]. Ponadto stopień zahamowania wzrostu kultur przez JM i KJ był różny. Yukimune i wsp. (44) wykazali, że spośród czterech stereoizomerów jasmonianu metylu, izomer (3R,7R) najkorzystniej wpływał na zawartość paklitakselu i bakkatyny III. Izomer (3R,7S)-MJ najsilniej hamował wzrost kultury, następnym z kolei był izomer (3R,7R).

Tabela

Wpływ elicytorów na zawartość taksanów w kulturach tkankowych cisów

Elicytor	Gatunek	Rodzaj kultury	Wynik	Wydajność	Literatura
1	2	3	4	5	6
JM (10 mM) + etylen (5 ppm)	<i>T. cuspidata</i>	Z	3,4 mg/l P po 51h: 19 × więcej w porównaniu z kulturą nie elicytowaną	3,4 mg/l P	(42)
JM (100 μM), KJ (100 μM)	<i>T. x media</i> , <i>T. baccata</i>	Z	4 × więcej P, 16 × więcej B, 1,8 × więcej C, 12 × więcej P, 134 × więcej B, 0,5 × mniej C w porównaniu z kulturą nie elicytowaną	110 mg/l P, 25 mg/l B, 10 mg/l C, 48 mg/l P, 53 mg/l B, 3 mg/l C	(43)
JM (30 μM)	<i>T. chinensis</i>	Z	4 × więcej P, 2 × więcej taksujaniny C w porównaniu z kulturą nie elicytowaną	0,4 mg/l P 175 mg/l taksujaniny C, suma taksanów 4% sm	(79)
JM (200 μM)	<i>T. canadensis</i>	Z	względny wzrost produkcji paklitakselu różny dla różnych linii i podlegający wahaniom w kolejnych miesiącach kultury	117 mg/l P	(44)
JM (100 μM)	<i>T. x media</i> cv Hicksii	TK	3 × więcej P	210 μg/g sm	(28)

1	2	3	4	5	6
JM (100 μ M) i hydrolizat chitosanu (75 mg/l)	<i>T. canadensis</i>	Z	4 \times więcej P niż w obecności tylko 100 μ M JM	3 mg/l	(46)
KJ (100 μ M)	<i>T. x media</i> cv Hicksii	Z	16 \times więcej taksanów 19 \times więcej paklitakselu, 81 \times więcej cefalomaniny	2,7 mg/g sm 180 μ g/g sm 130 μ g/g sm	(81)
chitosan (20 mg/l)	<i>T. cuspidata</i> <i>T. x media</i>	K	2 \times więcej P 4 \times więcej 10 DAB III 1,5 \times więcej P 1,1 \times więcej 10 DAB III	35 μ g/g sm 31 μ g/g sm 139 μ g/g sm 205 μ g/g sm	(47)
siarczan wanadylu (0,05 mM)	<i>T. baccata</i>	Z	2,5 \times więcej P 3,6 \times więcej B	13 μ g/g sm 16 μ g/g sm	(48)
siarczan wanadylu (10 mg/l)	<i>T. cuspidata</i>	K	3 \times więcej P 20 \times więcej 10-DAB III	50 μ g/l sm 146 μ g/g sm	(47)

Objaśnienia: JM – jasmonian metylu, KJ – kwas jasmonowy, K – kalus, TK – korzenie transformowane, Z – zawiesina; P – paklitaksel, B – bakkatyna III, C – cefalomannina, 10-DAB III – 10-deacetylobakkatyna III, sm – sucha masa.

Oligosacharydy (preparaty chitosanu i chityny) zwiększały efekt działania jasmonianu metylu (46). Dodatek chitosanu korzystnie wpływał na produkcję taksanów w kulturach kalusowych *T. x media* i *T. cuspidata* (47). Siarczan wanadylu stymulował produkcję obu związków w kulturze *T. cuspidata* (47) oraz wytwarzanie paklitakselu i bakkatyny III w kulturze zawiesinowej *Taxus baccata* (48), nie miał natomiast wpływu na kalus *T. x media* (47).

Fett-Neto i wsp. (49) badali wpływ fenyloalaniny na biosyntezę paklitakselu w kalusie *Taxus cuspidata*. Stwierdzili, że dodanie do pożywki 0,1 mM fenyloalaniny, powoduje dwukrotny wzrost zawartości paklitakselu w kalusie. Furmanowa i wsp. (47,50) udowodniły, że prekursorzy fenyloalanina i kwas p-aminobenzoesowy zwiększały zawartość paklitakselu i 10-DAB III w tkance kalusowej *Taxus cuspidata*. W tkance kalusowej *Taxus x media* fenyloalanina zwiększała zawartość paklitakselu, a kwas p-aminobenzoesowy zwiększał zawartość 10-DAB III (47).

Zhang i wsp. (51) otrzymali w kulturach zawiesinowych *Taxus chinensis* większą zawartość paklitakselu (25,4 mg/l) po dodaniu do pożywki 60 μ M jasmonianu metylu, 50 mg/l chitosanu i 30 μ M Ag^+ . Innymi czynnikami wpływającymi korzystnie na zawartość paklitakselu w kulturach *T. chinensis* były D-fruktoza i siarczan lantanu dodane do pożywki równocześnie (52), zwiększone ciśnienie osmotyczne pożywki (20-100 g/l sacharozy) (53), temperatura 29°C (54), ATP (50 mg/l) i triakontanol (2,5 mg/l), α -pinen, olejek sosnowy i kamfora dodane razem do pożywki (55), a także maltoza (56). Miao Zhi Qui i wsp. (57) otrzymali 3 razy większą zawartość paklitakselu w kulturach zawiesinowych cisów po dodaniu do pożywki 0,1 mg/l kwasu salicylowego.

Z punktu widzenia biotechnologii roślin korzystnym zjawiskiem jest, gdy poszukiwany związek jest wydzielany przez komórki do pożytki. Umożliwia to łatwiejszą jego izolację i nie wiąże się z koniecznością zniszczenia całej, stosunkowo wolno rosnącej biomasy w celu ekstrakcji. Wielu autorów stwierdzało obecność taksanów w pożywce (40,44,58). Aoyagi i wsp. (59) zapoczątkowali kulturę immobilizowanych w agarozie protoplastów *Taxus cuspidata* zakładając, że usunięcie bariery, jaką jest ściana komórkowa, ułatwi wydzielanie taksanów do podłoża, a także zwiększy skuteczność elicytacji dzięki łatwiejszemu dostępowi elicytorów do błony komórkowej. Autorzy wykazali, że około 30-35% paklitakselu w komórkach było zlokalizowane w ścianie komórkowej i/lub w przestrzeni między ścianą i błoną komórkową. W kulturach immobilizowanych protoplastów zawartość paklitakselu w pożywce zwiększyła się sześciokrotnie (z 0,28 do 1,66 mg/l), w porównaniu z kulturą całych komórek.

Kultury zawieszinowe cisów prowadzone są dotychczas przede wszystkim w niewielkich objętościach w kolbach Erlenmeyera, natomiast badania kultur zawieszinowych w bioreaktorach o różnej pojemności prowadziło niewielu autorów.

W kulturze *T. cuspidata* prowadzonej w bioreaktorze Wilsona o pojemności 600 ml wytwarzanie paklitakselu było niezależne od wzrostu. Uzyskana wydajność wynosiła 1,1 mg/l/dzień (60). Kultury zawieszinowe *T. baccata* w bioreaktorze o pojemności 6,2 l prowadzili Vaněk i wsp. (61). W Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej AM w Warszawie prowadzono w fermentorze typu *air-lift* o pojemności 5 l kulturę *T. x media* (40) oraz *T. baccata* (62). Kulturę zawieszinową *T. wallichiana* prowadzono w bioreaktorze o pojemności 20 l. Najlepszą zawartość paklitakselu (20,8 mg/l) stwierdzono w 24 dniu kultury, co odpowiadało wydajności 0,9 mg/l/dzień (63).

Son i wsp. (64) prowadzili kultury zawieszinowe *Taxus cuspidata* w różnych typach bioreaktorów o pojemności 20 l, po czym zwiększyli skalę kultury do 100 l i 500 l uzyskując porównywalne wydajności paklitakselu (3 mg/l) i sumy taksanów (74 mg/l) po 27 dniach kultury.

Niewiele badań dotyczących mikrorozmnażania cisów zakończyło się sukcesem. Organogeneza *Taxus brevifolia* z zarodków zachodziła na pożywce jednej drugiej B5, uzupełnionej 10 μ M BA (65). Liczne pędy z zarodków *Taxus baccata* tworzyły się na pożywce WP z 22,19 mM BAP i 5 mg/l węgla aktywowanego (66). Indukcję licznych pędów z pączków i fragmentów gałązek *Taxus mairei* otrzymali Chang i wsp. (67) na pożywce jednej drugiej MS z 1 mg/l BA i 1 mg/l węgla aktywowanego. Pędy ukorzeniały się na pożywce z 2,5 mg/l IBA.

Nowy kierunek w badaniach kultur *in vitro* cisów wyznacza otrzymanie kultur korzeni transformowanych tych roślin. Korzenie transformowe powstają w wyniku zakażenia komórek roślinnych bakteriami *Agrobacterium rhizogenes*. Ten typ kultur uzyskano dla wielu gatunków roślin okrytozalążkowych z klasy dwuliściennych, istnieją natomiast tylko nieliczne doniesienia o transformowanych korzeniach roślin nagozalążkowych (68). Huang Zunxi et al. (27) otrzymali korzenie transformowane *Taxus brevifolia*, stosując szczep A4 (ATCC 31798). Wydajność transformacji wynosiła

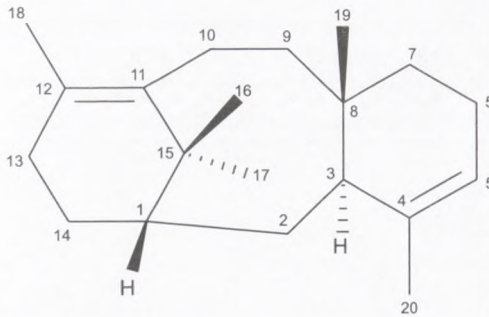
30%. Najbardziej podatne na zakażenie były całe pędy. Transformacja igieł, pni i korzeni nie powiodła się. Transformowane korzenie pojawiły się po 30-35 inkubacji zakażonych eksplantatów. Zawartość paklitakselu w kilku uzyskanych klonach rosnących w pożywce B5 wynosiła od 0,08 do 0,48 mg/g suchej masy. W ciągu 20 dni przyrost masy korzeni był ośmiokrotny.

Furmanowa i Sykłowska-Baranek (28,40) otrzymały korzenie transformowane *T. x media* w wyniku zakażenia igły sterylnej siewki szczepem LBA 9204 *A. rhizogenes*. Wydajność transformacji wynosiła 3%. Masa korzeni rosnących na pożywce DCR zwiększała się 2,5-krotnie w czasie 28 dni kultury. Zawartość paklitakselu w korzeniach wynosiła 69 µg/g sm, a 10-DAB III 82 µg/g sm. Pod wpływem JM zawartość paklitakselu zwiększała się po jednym tygodniu elicytacji do 204 µg/g sm i utrzymywała się na tym poziomie w czasie następnych dwóch tygodni kultury. JM nie miał istotnego wpływu na zawartość 10-DAB III.

Wykorzystanie kultur *in vitro* do wytwarzania paklitakselu i innych taksanów na skalę przemysłową będzie możliwe, gdy zostaną opracowane technologie opłacalne z ekonomicznego punktu widzenia. Natomiast już obecnie dzięki kulturom *in vitro* poznano niektóre z etapów biosyntezy paklitakselu. Przegląd badań w tym zakresie przedstawili Walker i Croteau (69). Jednym z początkowych etapów jest powstawanie pirofosforanu geranylogeranylu (GGPP) z pirofosforanu izopentenyłu i pirofosforanu farnezyłu przy udziale syntazy pirofosforanu geranylogeranylu. Wzrost aktywności tego enzymu, a następnie wzrost zawartości taksanów stwierdzono w kulturze zawiesinowej *Taxus baccata* po dodaniu jasmonianu metylu (70). Hefner i wsp. (71) uzyskali cDNA kodujące syntazę pirofosforanu geranylogeranylu z komórek kultury zawiesinowej *T. canadensis*. Pirofosforan geranylogeranylu ulega cyklizacji do taksa-4(5),11(12)-dienu (IV) pod wpływem syntazy taksadienu i powstaje unikatowy trójpierścieniowy układ taksanu. Enzym ten został wyizolowany najpierw z pędów *T. brevifolia*, a następnie z komórek *T. canadensis* rosnących w kulturze zawiesinowej; sklonowano także cDNA (72,73). W przeprowadzonych badaniach biosyntezy taksanów w kulturach *T. chinensis* wykazano, że kolejne etapy biosyntezy paklitakselu to powstanie taksa-4(20),11(12)-dien-5 α -olu, a następnie jego estryfikacja. Enzym: O-acetylotransferaza: acetylo CoA taksa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol został wyizolowany z komórek kultury zawiesinowej *T. cuspidata*, a następnie częściowo oczyszczony i scharakteryzowany (74).

Lovy-Wheeler i wsp. (75) na podstawie badań produktów transformacji taksa-4(20),11(12)-dien-5 α -olu i jego acylowej pochodnej przez frakcje mikrosomalne uzyskane z elicytowanych jasmonianem metylu kultur zawiesinowych *T. cuspidata* i innych gatunków cisów, stwierdzili, że kolejne grupy hydroksylowe do układu taksanu są wprowadzane kolejno przy węglu C10, C2, C9, C13 i w końcu przy C7 i C1.

Paklitaksel jest obecnie otrzymywany na drodze półsyntezy z 10-deacetylobakatyiny III izolowanej z igieł *T. baccata*, gdzie występuje w ilości 0,2% SM. Pierwszym etapem tego procesu jest otrzymanie bakatyny III. Przypuszczano, że również *in vivo* bakatyna III jest bezpośrednim prekursorem paklitakselu. Stosowanie bakatyny III



IV. taksan-4(5),11(12)-dienu

jako substratu wyjściowego uprościłoby proces semisyntezy paklitakselu. Trwały zatem próby izolacji enzymu katalizującego estryfikację grupy OH przy węglu C10 układu taksanu. Jako pierwsi o otrzymaniu z korzeni i miazgi *Taxus baccata* frakcji białkowej wykazującej aktywność acetylotransferazy: acetylo CoA 10-deacetylobakatyne III donieśli Zocher i wsp. (76) (cf 78). Częściowo oczyszczoną acetylotransferazę: acetylo CoA 10-deacetylobakatyne III z liści, a także z kultury *in vitro* *Taxus cuspidata* otrzymali Pennington i wsp. (77). Natomiast Menhard i Zenk (78) wyizolowali i scharakteryzowali O-acetylotransferazę: acetylo CoA 10-hydroksytaksanu z kultur *in vitro* *Taxus chinensis*. Autorzy udowodnili, że wyizolowany enzym jest regio- i stereospecyficzny w stosunku do grupy 10 β -hydroksylowej przy układzie taksanu. W swoich badaniach wykorzystali deacetylowane pochodne taksujunaniny C. Taksujunaninę C wyizolowano z kultury komórkowej *T. chinensis*, gdzie występowała w ilości 130 mg/l po 10 dniach kultury (79). Związek ten posiada cztery acetylowane grupy hydroksylowe przy węglach C2, C5, C10, C14 układu taksanu. Prowadząc hydrolizę taksujunaniny C w różnych warunkach, uzyskano osiem deacetylowanych pochodnych o różnej liczbie wolnych grup hydroksylowych. Okazało się, że substratami dla wyizolowanej O-acetylotransferazy były tylko pochodne mające wolną grupę hydroksylową przy C10. Wówczas gdy jako substratu użyto 10-deacetylobakatyne III acetylowaniu ulegała tylko grupa OH przy węglu C10, a grupy OH przy C1 i C7 pozostały niezestryfikowane; produktem reakcji enzymatycznej była zatem bakatyne III (78). Walker i Croteau (80) sklonowali w *Escherichia coli* cDNA trzech acylo- i dwóch arylotransferaz uczestniczących w biosyntezie paklitakselu.

3. Wnioski

Kultury *in vitro* cisów okazały się dogodnym materiałem w badaniach biosyntezy taksanów, a także dobrym źródłem enzymów biorących udział w tym procesie. Liczba opublikowanych doniesień i patentów dotyczących produkcji paklitakselu i jego prekursorów w kulturach *in vitro* uświadamia jak wielkie nadzieje na pomoc w roz-

wiązaniu problemów dotyczących zaspokojenia zapotrzebowania na te związki wiązane są z metodą kultur *in vitro*.

Praca finansowana przez KBN, grant nr: 0403/P05/2002/23.

Literatura

1. Baloglu E., Kingston D. G. I., (1999), *J. Nat. Prod.*, 62, 1448-1472.
2. Wani M. C., Taylor H. L., Wall M. E., Coggon P., McPhail A. T., (1971), *J. American Chem. Soc.*, 93, 2325-2327.
3. Hortwitz S. B., (1994), *Annals of Oncology* 5 (Suppl.6), 3-6.
4. Kingston D. G. I., (2000), *J. Nat. Prod.*, 63, 726-734.
5. Chen T. S., Li X., Bollag D., Liu Y., Chang Ch., (2001), *Tetrahedron Letters*, 42, 3787-3789.
6. Croom E. M., (1995), in: *Taxol Science and Applications*, Ed. by Suffnes M., CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo, 37-64.
7. Stahlhut R., Park G., Petersen R., Ma W., Hylands P., (1999), *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 613-622.
8. El Sohly H. N., Croom E. M., Kopycki W. J., Joshi A. S., El Sohly M. A., McChesney J. D., (1995), *Phytochem. Anal.*, 6, 149-156.
9. Hook I., Poupat C., Ahond A., Guenard D., Gueritte F., Adeline M-T., Wang X-P., Dempsey D., Breuillet S., Potier P., (1999), *Phytochemistry*, 52, 1041-1045.
10. van Rozendaal E. L. M., Lelyveld G. P., van Beek T. A., (2000), *Phytochemistry*, 53, 383-389.
11. Mukherjee S., Ghosh B., Jha T. B., Jha S., (2002), *Planta Medica*, 68, 757-759.
12. Nadeem M., Rikhari, Kumar A., Palni L. M. S., Nandii S. K., (2002), *Phytochemistry*, 60, 627-631.
13. Holton R. A., Somoza C., Kim H. B., Liang F., Biediger R. J., Boatman P. D., Shindo M. S., Mith C. C., Kim S. C., (1994), *J. Am., Chem., Soc.*, 116, 1597-1598.
14. Nicolaou K. C., Yang Z., Liu J. J., Ueno H., Nantermet P. G., Guy R. K., Clalborne C. F., Renaud J., Couladouros E. A., Paulvannan K., Sorensen E. J., (1994), *Nature*, 367, 630-634.
15. Baloglu E., Kingston D. G. I., (1999), *J. Nat. Prod.*, 62, 1068-1071.
16. Caruso M., Colombo A. L., Fedeli L., Pavesi A., Quaroni S., Sarachchi M., Ventrella G., (2000), *Annals of Microbiology*, 50, 3-13.
17. Walker K., Croteau R., (2001), *Phytochemistry*, 58, 1-7.
18. Nicotetti M. I., Colombo T., Rossi C., Monardo C., Stura S., Zucchetti M., Riva A., Marazzoni P., Donati M. B., Bombardelli E., D'Incalci M., Giavazzi R., (2000), *Cancer Research*, 60, 842-846.
19. Ishiyama T., Imura S., Yoshino T., Chiba J., Uoto K., Tetasawa H., Soga T., (2002), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12, 2815-2819.
20. Jaziri M., Zhiri A., Guo Y-W., Dupont J-P., Shimomura K., Hamada H., Vanhaelen M., Homes J., (1996), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46, 59-75.
21. Larue C. D., (1953), in: *Abnormal and pathological plant growth. Report of symposium held (August 3-5)*, Brookhaven National Laboratory, Upton, New York, 187-208.
22. Tuleke W., (1959), *Bull. Torrey Bot. Club*, 86, 283-289.
23. Zenktelek M. A., Guzowska I., (1970), *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 39, 161-173.
24. Amos R. R., McCown B. H., (1981), *HortScience*, 16, 457.
25. Christen A. A., Bland J., Gibson D. M., (1989), *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 30, A2252.
26. Christen A. A., Gibson D. M., Bland J., (1991), *US Patent N° 0 568 821 A1*.
27. Huang Zunxi., Mu Y, Zhou Y, Chen W, Xu K, Yu Z., Bian X., Yang Q., (1997), *Acta Botanica Yunnanica*, 19, 292-296.
28. Furmanowa M., Sykłowska-Baranek K., (2000), *Biotech. Let.*, 22, 683-686.
29. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., (1968), *Expt. Cell Res.*, 50, 151-158.
30. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.

31. Lloyd G., McCown B. M., (1981), *Inter Plant. Prop. Soc.*, 30, 421-427.
32. Rangaswamy N. S., (1961), *Phytomorphology*, 11, 109-127.
33. Gupta P. K., Durzan D. J., (1985), *Plant Cell Rep.*, 4, 177-179.
34. Furmanowa M., Główniak K., Zobel A., Guzewska J., Zgórk G., Rapczewska L., Józefczyk A., (1995), Ninth Forum for Applied Biotechnology, (27-29 September, Gent (Belgium)), *Proceedings Part*, 2115-2118.
35. Fett-Neto A. G., DiCosmo F., Reynolds W. F., Sakata K., (1992), *Bio/Technology*, 12, 1572-1575.
36. Wickremesinhe E. R. M., Artega R. N., (1993), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35, 181-193.
37. Ketchum R. E. B., Gibson D. M., Gallo G., (1995), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42, 185-193.
38. Parc G., Canaguier A., Landré P., Hocquemiller R., Chriqui D., Meyer M., (2002), *Phytochemistry*, 59, 725-730.
39. Furmanowa M., Sykłowska-Baranek K., Jaziri M., Główniak K., (1998), *Herba Polonica*, 44, 252-257.
40. Sykłowska-Baranek K., (2000), *Wytwarzanie paklitakselu oraz 10-deacetylobakktatyny III w korzeniach transgenicznych i niezmienionych genetycznie organach i tkankach dwóch odmian cisa Taxus x media Rehd.*, praca doktorska, Akademia Medyczna, Warszawa.
41. Su X., Mei X., Gong W., (2002), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68, 215-223.
42. Mirjalili N., Linden J. C., (1996), *Biotechnol. Prog.*, 12, 110-118.
43. Yukimune Y., Tabata H., Higashi Y., Hara Y., (1996), *Nature Biotechnology*, 14, 1129-1132.
44. Ketchum R. B., Tandon M., Gibson D. M., Begley T., Shuler M. L., (1999), *J. Nat. Prod.*, 62, 1395-1398.
45. Yukimune Y., Hara Y., Nomura E., Seto H., Yoshida S., (2000), *Phytochemistry*, 54, 13-17.
46. Linden J. C., Phisalophon M., (2000), *Plant Science*, 158, 41-51.
47. Furmanowa M., Olędzka H., Sykłowska-Baranek K., Józefowicz J., Gieracka S., (2000), *Biotechnology Letters*, 22, 1449-1452.
48. Cusidó R. M., Palazón J., Navia-Osorio A., Mallol A., Bonfill M., Pinol M. T., (1999), *Plant Science*, 146, 101-107.
49. Fett-Neto A. G., Melanson S. J., Sakata K., Di Cosmo F., (1993), *Bio/Technology*, 11, 731-734.
50. Furmanowa M., Olędzka H., Sykłowska-Baranek K., Olszowska O., Ródek A., (2001), *Herba Polonica*, 47, 1, 22-28.
51. Zhang C. H., Mei X. G., Liu L., Yu L. J., (2000), *Biotechnol. Lett.*, 22, 1561-1564.
52. Li Gan Xiong, Huang QiaoMing, Li G. X., Huang Q. M., (2000), *Journal of Plant Resources and Environment*, 9, 111-114.
53. Kim S. I., Choi H. K., Kim J. H., Lee H. S., Hong S. S., (2001), *Enzyme-Microb. Technol.*, 28, 202-209.
54. Choi H. K., Kim S. J., Son J. S., Hong S. S., Lee H. S., Lee H. J., (2000), *Enzyme-and-Microbiol. Technology*, 27, 8, 593-598.
55. Li Wei, Yu Longjiang, (2000), *Huashong Ligong Daxue Xuebao*, 28, 107-110 (cf baza CAB).
56. Choi H. K., Kim S. I., Son J. S., Hong S., Lee H. S., Lee H. J., (2000), *Biotechnology Letters*, 22, 1793-1796.
57. Miao Zhi Qui, (2000), *Shengwu Gongcheng Xuebao*, 16, 509-513, (cf baza CAB).
58. Linden J. C., Phisalophon M., (2000), *Plant Science*, 158, 41-51.
59. Aoyagi H., DiCosmo F., Tanaka H., (2002), *Planta Medica*, 68, 420-424.
60. Pestchanker L. J., Roberts S. C., Shuler M. L., (1996), *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 256-260.
61. Vaněk T., Malá J., Šaman D., Šilhavá I., (1999), *Planta Medica*, 65, 275-276.
62. Olszowska dane nie publikowane.
63. Navia-Osorio A., Garden H., Cusidó R. M., Palazón J., Alfermann A. W., Pinol M. T., (2002), *Planta Medica*, 68, 336-349.
64. Son S.H., Choi S. M., Lee Y. H., Choi K. B., Yun S. R., Kim J. K., Park H. J., Kwon O. W., Noh E. W., Seon J. H., Park Y. G., (2000), *Plant Cell Reports*, 19, 628-633.
65. Chee P. P., (1995), *Plant Cell Reports*, 14, 560-565.
66. Majada J. P., Sierra M. I., Sanchez -Tames R., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 825-830.
67. Chang S.-H., Ho C.-K., Chen Z.-Z., Tsay J.-Y., (2001), *Plant Cell Rep.*, 20, 496-502.
68. Olszowska O., (2000), *Biotechnologia* 2(49), 54-63.

69. Walker K., Croteau R. M., (2001), *Phytochemistry*, 58, 1-7.
70. Laskaris G., de Jong C. F., Jaziri M., van der Heijden R., Theodoritis G., Verpoorte R., (1999), *Phytochemistry*, 50, 939-946.
71. Hefner J., Ketchum R. E. B., Croteau R., (1998), *Arch. Biochem. Biophys.*, 360, 62-74.
72. Hezari M., Ketchum R. E. B., Gibson D. M., Croteau R., (1997), *Arch. Biochem. Biophys.*, 337, 185-190.
73. Hezari M., Croteau R., (1997), *Planta Medica*, 63, 291-295.
74. Walker K., Ketchum R. E. B., Hezari M., Gatfield D., Goleniowski M., Croteau R., (1999), *Arch. Biochem. Biophys.*, 364, 273-279.
75. Lovy-Wheeler A., Long R. M., Ketchum R. E. B., Rithner Ch. D., Williams R. M., Croteau R., (2001), *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 390, 265-278.
76. Zocher R., Weckwerth W., Hacker C., Kammer B., Hornbogen T., Erwald D., (1996), *Biochemical Biophysical Research Communication*, 229, 16 (cf Menhard, Zenk 1999).
77. Pennington J. J., Fett-Neto A. G., Nicholson S. A., Kingston D. G., Di Cosmo F., (1998), *Phytochem.*, 49, 2261-2266.
78. Menhard B., Zenk M. H., (1999), *Phytochem.*, 50, 763-774.
79. Menhard B., Eisenreich W., Hylands P. J., Bacher A., Zenk M. H., (1998), *Phytochemistry*, 49, 113-125.
80. Walker K., Croteau R., (2002), *Revista de Fitoterapia*, 2, Supl.1, 335.
81. Baebler Š., Camloh M., Kovač M., Ravinkar M., Žel J., (2002), *Planta Medica*, 68, 475-476.