



Modyfikacje genetyczne dróg wtórnego metabolizmu w roślinnych kulturach *in vitro*

Halina Wysokińska

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Akademia Medyczna, Łódź

Genetic modification of secondary metabolic pathways

Summary

The examples given in this presentation show that the levels of secondary metabolites can be modified by genetic engineering methods. In these methods, the specific genes encoding enzymes involved in key steps of biosynthetic pathway can be transferred and expressed in cell lines, hairy root cultures or transgenic plants of the same or another species. Overexpression of the enzymes may lead to the accumulation of intermediates of pathways and increased synthesis of desirable products. Best results will be obtained when the overproduced enzyme activity is clearly the rate-limiting step in the pathway. Therefore, better knowledge of the limiting steps of the pathways is required. The successful of biosynthetic pathways regulation may also be achieved by expressing antisense RNA which is complementary to the mRNA encoding pathway enzyme or by genetic manipulation of degradative pathways. It should be mentioned that genetic engineering also plays a role in the development of novel plant-derived drugs. As secondary metabolites are important in the defense of plants against pathogens, such engineered plants may show an increase in resistance against pathogens.

Key words:

genetic engineering, secondary metabolites, gene expression, hairy roots, transgenic plants.

Adres do korespondencji

Halina Wysokińska,
Zakład Biologii i Botaniki
Farmaceutycznej,
Akademia Medyczna,
ul. Muszyńskiego 1,
90-151 Łódź.

1. Wprowadzenie

Wykorzystanie hodowanych *in vitro* komórek, tkanek i organów roślinnych do biosyntezy metabolitów wtórnych jest jedną

z bardziej dynamicznie rozwijających się dziedzin biotechnologii roślin. Wynika to stąd, że rośliny są producentami wielu cennych dla lecznictwa związków (np. paklitaksel, digoksyna, niektóre alkaloidy). Często jednak zawartość metabolitów wtórnych w kulturach jest niska, a niektóre związki nie są wcale syntetyzowane w warunkach *in vitro* (np. przeciwnowotworowe alkaloidy – winkrystyna, winblastyna).

Ostatnio, dzięki osiągnięciom w zakresie transformacji genetycznej, stało się możliwe wprowadzenie do komórek roślinnych jednego lub więcej genów, zaangażowanych w biosyntezę metabolitów wtórnych. Podstawowe cele tych prac to:

1) stymulacja ekspresji własnych genów dla uzyskania zwiększonej biosyntezy określonych produktów;

2) osiągnięcie ekspresji obcych dla danej rośliny genów, odpowiedzialnych za biosyntezę wartościowych produktów, w tym także związków nowych nie występujących w roślinie nietransformowanej;

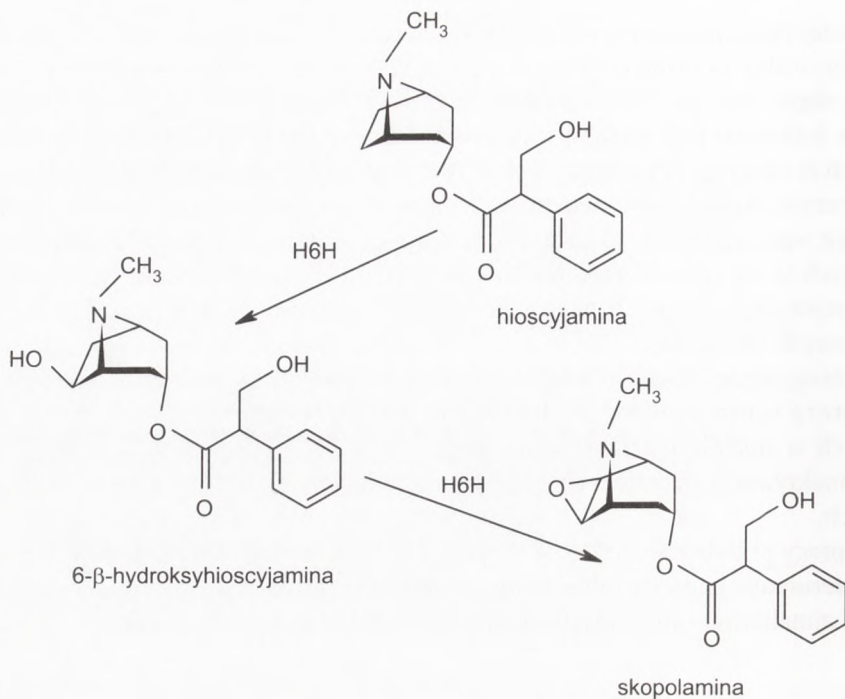
3) inaktywacja określonych genów i zahamowanie niektórych szlaków metabolicznych.

W pracy przedstawiony zostanie aktualny stan wiedzy dla każdego z wymienionych kierunków badań w odniesieniu do biosyntezy alkaloidów (skopolaminy, chinidyny i ajmalicyny) oraz innych metabolitów (serotoniny, szikoniny).

2. Modyfikacje genetyczne prowadzące do stymulacji ekspresji własnych genów, nadprodukcji prekursorów i zwiększonej biosyntezy określonych metabolitów

2.1. Biosynteza skopolaminy

Skopolamina jest cenionym w lecznictwie alkaloidem tropanowym o działaniu parasympatykolytycznym; działa również na ośrodkowy układ nerwowy. Alkaloidy tropanowe (hioscyamina, skopolamina, atropina) syntetyzowane są w korzeniach niektórych roślin z rodziny Solanaceae (*Hyoscyamus*, *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*). Kultury korzeni otrzymane z tych roślin po transformacji *Agrobacterium rhizogenes*, (w przeciwieństwie do kultur zawiesinowych), charakteryzują się wysoką zawartością alkaloidów tropanowych, ale syntetyzują głównie hioscyjamineę, na którą zapotrzebowanie jest 10 razy mniejsze niż na skopolamineę. Szlak biosyntezy skopolaminy w roślinach nie do końca został poznany, ale wiadomo, że powstaje ona z hioscyjminy przy udziale 6- β -hydroksylazy hioscyjminy (H6H). Enzym ten przekształca hioscyjamineę w 6- β -hydroksyhioscyjamineę, a następnie bierze udział w epoksydacji 6- β -hydroksyhioscyjminy do skopolaminy (rys. 1).



Rys. 1. Biokonwersja hioscyjminy do skopolaminy w roślinach; reakcje katalizuje enzym 6-β-hydroksylaza hioscyjminy (H6H).

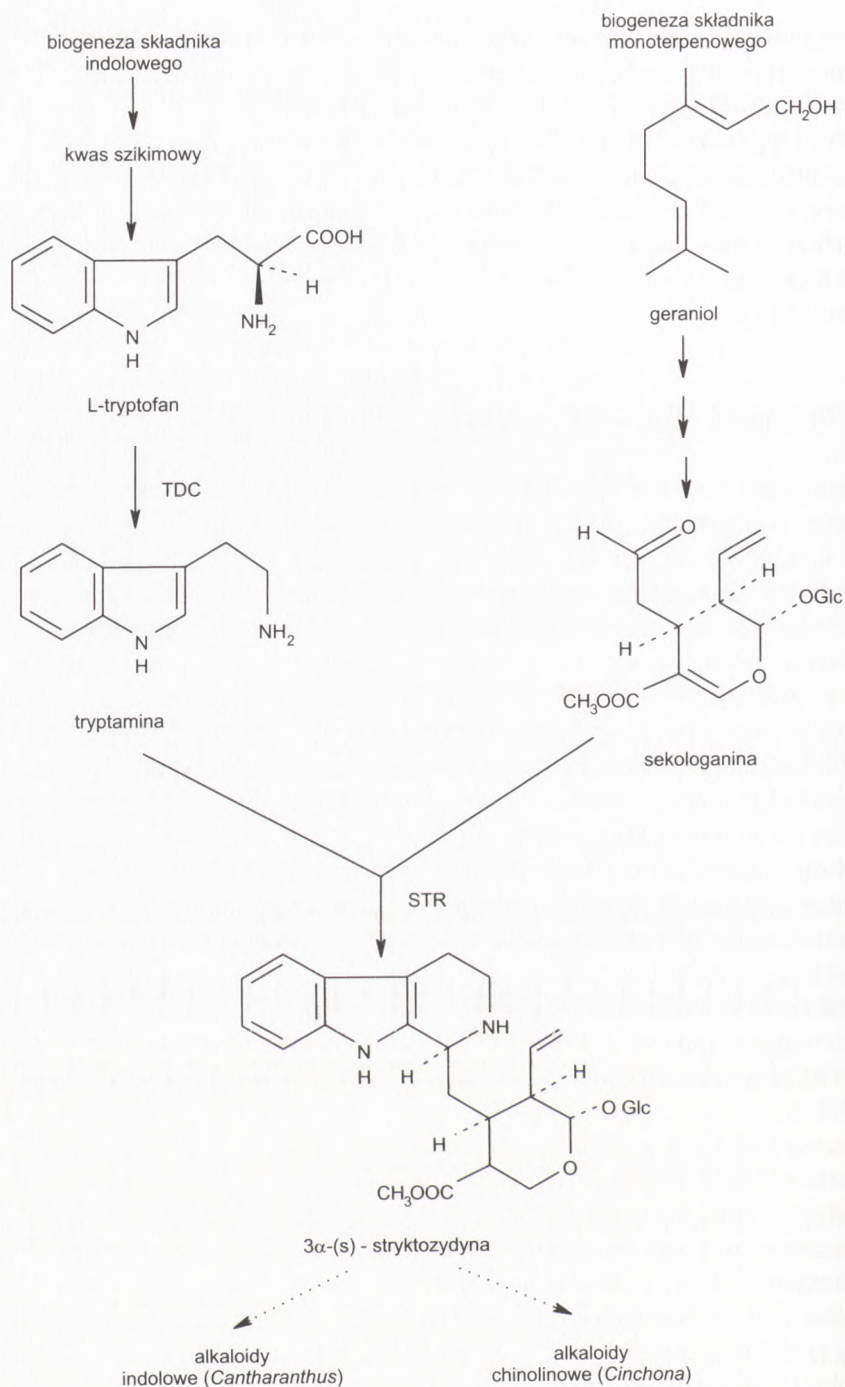
Matsuda i wsp. (1) wyizolowali cDNA dla 6-β-hydroksylazy hioscyjminy (gen *h6h*) z kultur korzeni lulka czarnego (*Hyoscyamus niger*). Następnie, gen ten pod kontrolą wirusa mozaiki kalafiora (35SCaMV) w układzie binarnym *Agrobacterium rhizogenes*, został wprowadzony do bogatych w hioscyjaminę korzeni pokrzyku (*Atropa belladonna*) (2). W wyniku zwiększonej ekspresji genu *h6h* i nadprodukcji β-hydroksylazy hioscyjminy uzyskano kultury korzeni wytwarzające hioscyjaminę, (1 mg/g suchej masy) i skopolaminę (3 mg/g suchej masy). Ilość skopolaminy w tych korzeniach była 5-krotnie wyższa niż w korzeniach transformowanych dzikim szczepem *A. rhizogenes*. Doświadczenie to otworzyło możliwości przenoszenia genu *h6h* także do innych roślin, które są lepszym niż *Atropa belladonna* źródłem skopolaminy. Ostatnio, Jouhikainen i wsp. (3), aby zwiększyć biosyntezę skopolaminy, wprowadzili gen *h6h* do korzeni lulka (*Hyoscyamus muticus*). Do transformacji badacze wykorzystali dwa szczepy *A. rhizogenes* (LBA9402 i 15834), do których wprowadzono plazmid pLAL21 z genem *h6h* połączonym z promotorem pochodzącym z wirusa mozaiki kalafiora (35SCaMV). W przeprowadzonej analizie molekularnej (PCR) wykazano integracje genu *h6h* z genomem komórek w większości otrzymanych klonów (65%). Klony te różniły się ekspresją wprowadzonego genu, aktywnością enzymu 6-β-hydroksylazy hioscyjminy, a także morfologią oraz zawartością hioscyjminy i skopolaminy. Me-

todą hybrydyzacji typu *Northern* udowodniono, że istnieje zależność pomiędzy poziomem ekspresji genu *h6h* a biosyntezą skopolaminy. Najbardziej produktywna linia wytwarzała 17 mg/l skopolaminy, tj. ponad 100 razy więcej niż korzenie kontrolne – 0,12 mg/l) oraz 180 mg/l hioscyjminy. Hioscyjminę znaleziono również w innych analizowanych klonach, w ilości od 0,1 do 288 mg/l. Obecność tego alkaloidu świadczy, że przekształcenie hioscyjminy w skopolaminę w transformowanych korzeniach *H. muticus* nie było całkowite. Zdaniem autorów możliwa jest dalsza konwersja hioscyjminy w skopolaminę, pod warunkiem zwiększenia poziomu ekspresji genu *h6h* (3).

2.2. Biosynteza alkaloidów indolowych i chinolinowych

Przykładem innych ważnych dla lecznictwa metabolitów są alkaloidy barwinka różowego (*Catharanthus roseus*) oraz alkaloidy chinolinowe, występujące w korze drzew należących do rodzaju chinowiec, głównie w gatunkach *Cinchona officinalis* i *C. succirubra*. *Catharanthus roseus* gromadzi w liściach i korzeniach alkaloidy indolowe o strukturze monomerycznej i dimerycznej. Związki monomeryczne, takie jak serpentyna i ajmalicyna stosowane są w kardiologii, jako środki obniżające ciśnienie krwi i poprawiające krążenie obwodowe (4). Szczególnie cenne, z uwagi na działanie przeciwnowotworowe, są alkaloidy dimeryczne *Catharanthus roseus* (winkrystyna i winblastyna). Z alkaloidów chinolinowych w lecznictwie wykorzystywane są chinina (środek przeciwgorączkowy i przeciwbólowy) oraz chinidyna (jeden z najlepszych leków przeciwartmicyznych) (4).

Z dotychczasowych ustaleń wynika, że początkowy etap w łańcuchu biosyntezy alkaloidów indolowych i chinolinowych jest wspólny. Prekursorem obu typu związków jest 3 α -(s)-stryktozydyna, produkt kondensacji sekologaniny i tryptaminy (rys. 2). Reakcja katalizowana jest przez syntazę stryktozydynową. Gen *str* kodujący ten enzym sklonowano z rauwolfii żmijowej (*Rauwolfia serpentina*) (5) i *Catharanthus roseus* (6). Zidentyfikowano i wyizolowano (z *C. roseus*) również gen *tdc* kodujący dekarboksylazę tryptofanową, enzym odpowiedzialny za przekształcanie tryptofanu w tryptaminę (7). Na bazie szczepu LBA9402 *Agrobacterium rhizogenes*, skonstruowano wektor binarny zawierający geny *str* i *tdc* z promotorem pochodzącym z wirusa mozaiki kalafiora, genem reporterowym *gus* dla β -glukuronidazy i genem selekcyjnym warunkującym oporność na higromycynę (koduje fosfotransferazę higromycyny). Wektor ten użyto do transformacji korzeni *Cinchona officinalis* (*C. ledgeriana*) (8). Spośród otrzymanych klonów, wyselekcjonowano linię charakteryzującą się wysoką ekspresją genów *tdc* i *str*, wysoką zawartością tryptaminy (1200 μ g/g suchej masy), stryktozydyny (1950 μ g/g suchej masy) i alkaloidu chinidyny (1000 μ g/g suchej masy). Poziom chinidyny był 3-5-krotnie wyższy niż w korzeniach kontrolnych, tj. korzeniach włośnikowatych *C. officinalis* nietransformowanych genami *tdc* i *str*; korzenie te były otrzymane przez Hamilla i wsp. w 1989 r. (9). W przeciwieństwie do chinidyny, za-



Rys. 2. Początkowe etapy biosyntezy alkaloidów indolowych i chinolinowych; TDC – dekarboksylaza tryptofanowa; STR – syntaza stryktyzydynowa.

wartość innych alkaloidów (chininy, cynchoniny i cynchonidyny) w korzeniach *C. officinalis* transformowanych genami *tdc* i *str* pozostawała na tym samym poziomie co w korzeniach kontrolnych (np. zawartość chininy wynosiła 500 µg/g suchej masy) (8).

Udało się również otrzymać kultury zawieszinowe *Catharanthus roseus* transformowane plazmidem *Agrobacterium tumefaciens*, niosącym geny *tdc* i *str* (10). Ekspresja tych genów doprowadziła w niektórych liniach komórkowych do stymulacji biosyntezy alkaloidu ajmalicyny. Zawartość tego metabolitu osiągnęła 300 mg/l w litrze kultury i była kilkakrotnie wyższa niż w nietransformowanych liniach komórkowych *C. roseus* (77 mg/l). Oprócz ajmalicyny, komórki syntetyzowały również inne monomeryczne alkaloidy indolowe: serpentynę, katarantynę i tabersoninę. Ogólna zawartość alkaloidów w tych kulturach wynosiła 0,2% w odniesieniu do suchej masy.

W opisanych doświadczeniach wskazuje się, że możliwe jest otrzymanie kultur *Cinchona officinalis* i *Catharanthus roseus* z ekspresją obu wprowadzonych genów (*str* i *tdc*). Kłopoty występują z uzyskaniem wysokiej i stabilnej ekspresji tych genów. Poziom ekspresji związany jest z miejscem integracji T-DNA (efekt pozycji) (11) oraz liczbą kopii wprowadzonego genu (12) i może być różny w poszczególnych liniach komórkowych i korzeniowych. Dlatego konieczne jest przeprowadzenie selekcji i wybranie kultury z odpowiednim poziomem ekspresji genów i wysoką biosyntezą pożądaných metabolitów. Jednak wydajności bioproduktów osiągnane w komórkach transformowanych, chociaż wyższe niż w kulturach nietransformowanych, są z reguły niższe niż w roślinie macierzystej (tab. 1).

Tabela 1

Zawartość alkaloidów chinolinowych w kulturach *in vitro* i roślinach *Cinchona officinalis* (8,13)

Material	Zawartość alkaloidów chinolinowych (mg/g suchej masy)
Kultury <i>in vitro</i> :	
zawiesina	0,001
kalus	0,01
pędy	1,0
korzenie nietransformowane	0,1
korzenie transformowane dzikim szczepem <i>A. rhizogenes</i>	0,5*
korzenie transformowane genami <i>tdc</i> i <i>str</i>	2,0
Kora drzewa	150,0

*dotyczy alkaloidu chininy

Ważne jest uzyskanie stabilnej ekspresji transgenów. W badaniach prowadzonych z kulturami korzeni *Cinchona officinalis* transformowanych genami *str* i *tdc* wykazano, że po roku kultura całkowicie utraciła zdolność do wytwarzania alkaloidów

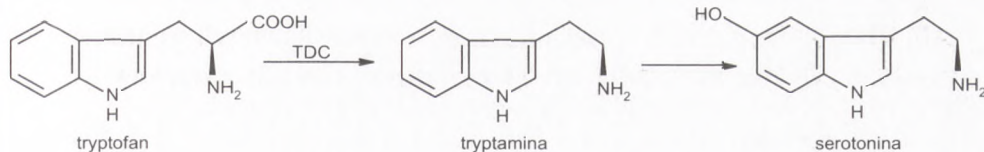
chinolinowych (8). W przeprowadzonej analizie molekularnej (PCR, hybrydyzacja typu *Southern*) wykazano „wyciszenie genu” *tdc* (*gene silencing*), co przejawiało się utratą aktywności dekarboksylazy tryptofanowej i było prawdopodobnie powodem zahamowania biosyntezy alkaloidów. DNA, które integruje z genomem może być inaktywowane w różny sposób, najczęściej poprzez metylację (14). Jednak zastosowanie, jako czynnika demetylującego 5-azacytydyny, nie doprowadziło do aktywacji genu *tdc* w komórkach korzeni *C. officinalis* i przywrócenia biosyntezy alkaloidów. Według Geerlingsa i wsp. (8) utrata ekspresji tego genu była prawdopodobnie spowodowana zjawiskiem kosupresji. Z danych literaturowych wynika, że zjawisko to jest częstym powodem inaktywacji częściowo homologicznych transgenów (15).

Canel i wsp. (10) uważają, że stabilność ekspresji wprowadzonych do komórek *C. roseus* genów *tdc* i *str* i związana z tym stabilność biosyntezy alkaloidów jest uwarunkowana epigenetycznie. Według tych autorów genetyczna interwencja w szlaki biosyntezy może dać pozytywne rezultaty jedynie przy zapewnieniu komórkom odpowiednich warunków hodowli. Udowodniono m.in., że ekspresja genów *tdc* i *str* jest hamowana przez auksyny (16).

Szczególnie interesująca, jak się wydaje, jest możliwość genetycznej ingerencji w biosyntezę winblastyny i winkrystyny, dimerycznych alkaloidów barwinka różowego. Te roślinne leki przeciwnowotworowe osiągają na rynku bardzo wysokie ceny, dochodzące do 20 tysięcy USD/g. W przeprowadzonych badaniach izotopowych wykazano, że bezpośrednimi prekursorami alkaloidów dimerycznych w *Catharanthus roseus* są alkaloidy, windolina i katarantyna (17). Dobrym źródłem katarantyny są kultury *in vitro* (zawiesiny lub korzenie włośnikowate) *C. roseus*. Jednak windolina w warunkach *in vitro* jest syntetyzowana tylko w bardzo małych ilościach. Wiadomo już, że w roślinie alkaloid ten powstaje z tabersoniny (17). Warunkiem wstępnym, aby można było metodami inżynierii genetycznej stymulować biosyntezę dimerycznych alkaloidów w kulturach *C. roseus*, jest poznanie genów i enzymów uczestniczących w konwersji tabersoniny w windolinę (proces ten obejmuje co najmniej 4 reakcje enzymatyczne).

2.3. Biosynteza serotoniny

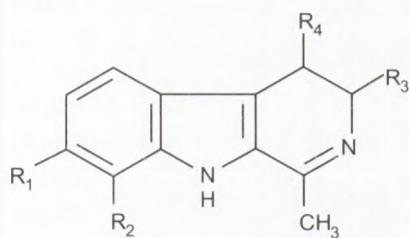
Berlin i wsp. (18) wprowadzili gen *tdc* do komórek ruty syryjskiej (inaczej pogańek stepowy, *Peganum harmala*) i po przeprowadzeniu selekcji otrzymali stabilną linię komórkową, w której aktywność dekarboksylazy tryptofanowej i zawartość serotoniny nie zmieniała się podczas długotrwałej hodowli. Serotonina jest aminą biogenną o charakterze neurohormonu, ważną w fizjologii i farmakologii ośrodkowego układu nerwowego (4). W komórkach *P. harmala* powstaje ona z tryptofanu, który przez dekarboksylazę tryptofanową przekształcany jest w tryptaminę, a ta przy udziale hydroksylaz w serotoninę (5-hydroksytryptaminę) (rys. 3). Ekspresja genu *tdc* prowadziła do znacznego zwiększenia biosyntezy serotoniny. Nietransformowa-



Rys. 3. Przemiany tryptofanu do serotoniny w kulturze *in vitro* *Peganum harmala*; TDC – dekarboksylaza tryptofanowa.

ne kultury komórkowe *P. harmala* wytwarzały 0,1-1 mg serotoniny w 1g suchej masy, podczas gdy w kulturach transformowanych genem *tdc* poziom tego związku wynosił 10-25 mg/g suchej masy. W tych kulturach również egzogeny tryptofan ulegał dekarboksylacji do tryptaminy, o czym świadczy dalszy wzrost poziomu serotoniny (7-8%, w przeliczeniu na suchą masę), po dodaniu 10 mg tryptofanu. Efektu tego nie obserwowano w nietransformowanych liniach komórkowych (18).

Prawdopodobnie, tryptamina jest również prekursorem alkaloidów indolowych z grupy β -karboliny, syntetyzowanych w korzeniach *P. harmala* (rys. 4). Jednak ani w kulturach korzeni, ani w zawiesinach *P. harmala* ekspresja genu *tdc* nie doprowadziła do zwiększenia biosyntezy tych związków. Świadczy to, że biosynteza alkaloidów β -karbolinowych w kulturze *in vitro* *P. harmala* nie jest limitowana aktywnością dekarboksylazy tryptofanowej (18). Nie można jednak wykluczyć niekorzystnego wpływu serotoniny na biosyntezę tych alkaloidów. W korzeniach *P. harmala* transformowanych genem *tdc* stosunek alkaloidów do serotoniny wynosił 1:2-1:3 i kształtował się zupełnie inaczej niż w kulturach korzeni transformowanych dzikim szczepem *A. rhizogenes* (2:1-3:1) (18). Zmodyfikowane genetycznie korzenie i kultury zawiesinowe *P. harmala* mogą być doskonałym modelem badawczym dla lepszego poznania szlaku biosyntezy alkaloidów karbolinowych. Dotychczas nie zostało jeszcze rozstrzygnięte, czy te alkaloidy i serotonina mają wspólny prekursor i czy jest nim na pewno tryptofan. W przypadku pozytywnej odpowiedzi ustalenia wymaga mechanizm dystrybucji tryptofanu do biosyntezy obu typów metabolitów.



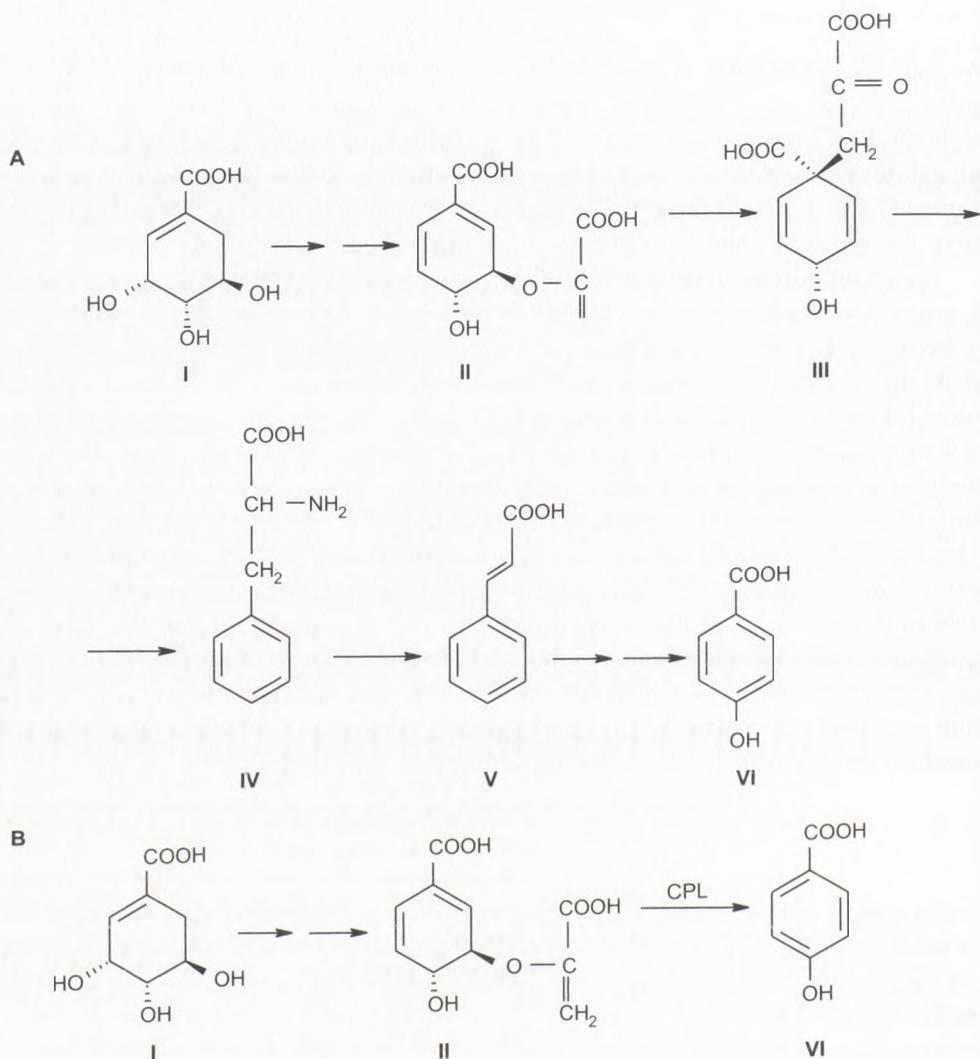
alkaloidy β -karbolinowe

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
harmarol	OH	H	H ₂	H ₂
harmalina	OCH ₃	H	H ₂	H ₂
harmol	OH	H	H	H
harmina	OCH ₃	H	H	H
ruina	OCH ₃	O-Glu	H	H

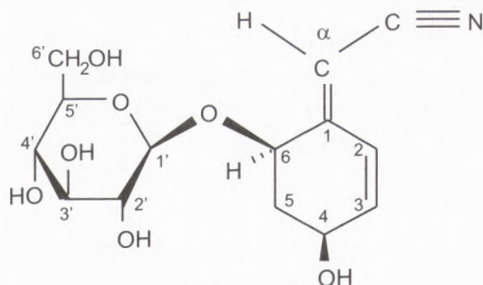
Rys. 4. Struktura chemiczna alkaloidów β -karbolinowych wykrytych w roślinach i kulturach *in vitro* *Peganum harmala*.

3. Modyfikacje genetyczne prowadzące do ekspresji obcych genów, zmiany szlaków metabolicznych i biosyntezy nowych związków

3.1. Biosynteza szikoniny



Ryc. 5. Biosynteza kwasu 4-hydroksybenzoesowego (4HB) w komórkach *Lithospermum erythrorhizon*; A – w roślinie i kulturze nietransformowanej; B – w korzeniach transformowanych genem *ubiC*, kodującym pirogronianio-liażę choryzmianową (CPL); I – kwas szikimowy; II – kwas choryzmowy; III – kwas pantoiczny; IV – fenyloalanina; V – kwas cynamonowy; VI – kwas 4-hydroksybenzoesowy.

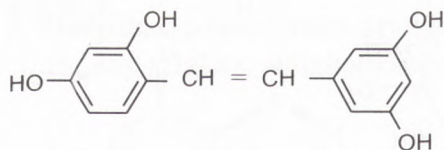


Rys. 6. Menisdauryna.

Szikonina jest naftochinonem syntetyzowanym w korzeniach *Lithospermum erythrorhizon*. Ma właściwości przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe (19,20); wykorzystywana jest również w kosmetyce (jako barwnik w pomadkach do ust). Jest pierwszym wtórnym metabolitem otrzymywanym na skalę przemysłową z roślinnych kultur komórkowych (21).

Skrócenie szlaku biosyntezy szikoniny uzyskano przez wprowadzenie bakteryjnego (z *Escherichia coli*) genu *ubiC* do korzeni *Lithospermum erythrorhizon* (22). Gen *ubiC* koduje pirogroniano-liazę choryzmianową (CPL). Enzym ten przekształca choryzmian bezpośrednio w kwas 4-hydroksybenzoesowy (4HB) (rys. 5B), z którego wywodzi się pierścień benzoilowy szikoniny. Normalnie gen *ubiC* nie występuje w roślinach i powstawanie kwasu 4HB jest procesem wieloetapowym, w którym bierze udział kilka enzymów (rys. 5A). Ekspresja genu *ubiC* doprowadziła do nadprodukcji kwasu 4HB w korzeniach transformowanych *L. erythrorhizon*. Efektem transformacji było również 5-krotne zwiększenie zawartości menisdauryny (rys. 6), prawdopodobnie produktu przemian tyrozyny. Nie obserwowano natomiast znacznego zwiększenia akumulacji szikoniny (22). Być może dla zwiększenia produkcji szikoniny konieczna jest aktywacja enzymów zaangażowanych w dalsze etapy biosyntezy tego naftochinonu, tj. na odcinku między 4HB a produktem końcowym. Uważa się, że głównymi enzymami biosyntezy szikoniny są reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (reduktaza HMG-CoA) (23) i geranylo-transferaza kwasu 4-hydroksybenzoesowego (24). Ten ostatni enzym przez przyłączenie kolejnych cząsteczek difosforanu geranylu do kwasu 4-hydroksybenzoesowego prowadzi do powstania pierścienia chinidowego w strukturze szikoniny.

Gen *ubiC* z *Escherichia coli* wprowadzono również do komórek tytoniu (*Nicotiana tabacum*) (25). Transgeniczne rośliny wykazywały wysoką aktywność pirogroniano-liazy choryzmianowej i wysoką produkcję 4HB. Metabolit ten gromadzony był w postaci β -glukozydu, w ilości 0,52% w przeliczeniu na suchą masę. Ilość ta była 1000 razy wyższa od ilości kwasu 4HB występującego w nietransformowanych roślinach tytoniu. Z praktycznego punktu widzenia ważne może być to, że estry kwasu 4-hydroksybenzoesowego wykazują aktywność przeciwbakteryjną, należą do fitoaleksyn i stymulują produkcję białek obronnych w *Nicotiana tabacum* (26). Możliwe jest zatem w wyniku ekspresji genu *ubiC*, uzyskanie roślin o zwiększonej odporności na patogeny.

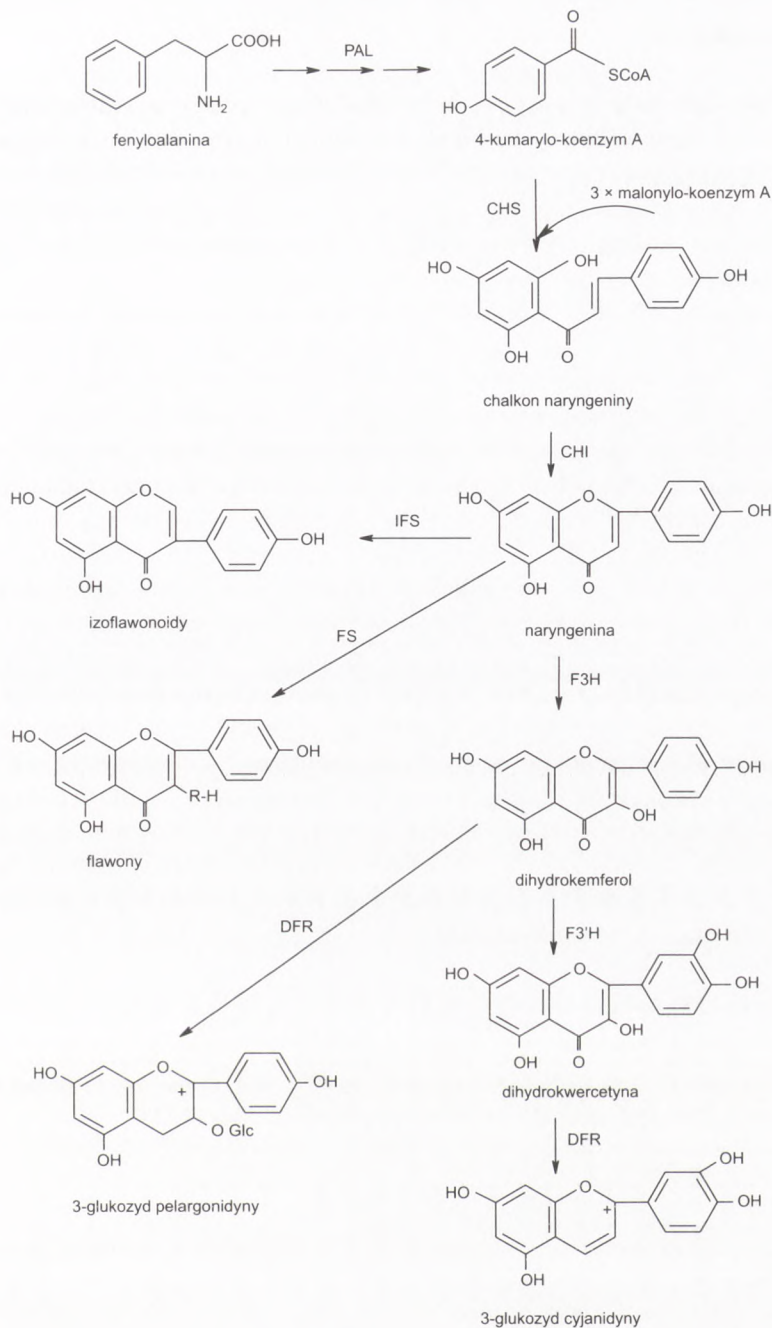


Rys. 7. Resweratrol.

W celu otrzymania roślin bardziej odpornych na infekcję wprowadzono do komórek tytoniu również gen dla syntazy stilbenu, wyizolowany wcześniej z *Arachis hypogea* i *Vitis vinifera* (27,28). W wyniku ekspresji tego genu uzyskano transgeniczne kalusy i rośliny tytoniu wytwarzające resweratrol (rys. 7), fitoaleksynę z grupy stilbenów o właściwościach grzybobójczych i antyagregacyjnych. Związku tego nie wykryto w nietransformowanych roślinach *N. tabacum*. Obecnie najwięcej uwagi poświęca się otrzymywaniu transgenicznych roślin wyposażonych w geny warunkujące produkcję nowych cennych związków polipeptydowych (przeciwciała, szczepionki, nowe leki) (29-31).

4. Modyfikacje genetyczne prowadzące do obniżenia lub zablokowania biosyntezy metabolitów wtórnych

Zablokowanie biosyntezy można osiągnąć poprzez wprowadzenie uczestniczącego w łańcuchu biosyntezy genu w orientacji antysensowej, tj. o sekwencji komplementarnej do wybranego fragmentu DNA lub mRNA. Transkrypcja wprowadzonego cDNA spowoduje wytworzenie antysensowego, czyli komplementarnego do mRNA polinukleotydu, zdolnego do hybrydyzacji z natywnym mRNA. Utworzona hybryda, antysensowy RNA/natywny mRNA, blokuje proces biosyntezy białka zakodowanego w blokowanym fragmencie RNA. Prowadzi to do obniżenia poziomu określonego enzymu. W odniesieniu do metabolitów wtórnych, strategię antysensu zastosowano po raz pierwszy pod koniec lat osiemdziesiątych. Celem tych badań była zmiana barwy kwiatów petunii (*Petunia hybrida*), przez wprowadzenie antysensowego DNA syntazy chalkonowej (CHS) do komórek tej rośliny (32). Syntaza chalkonowa (CHS) katalizuje reakcję kondensacji jednej cząsteczki kumarylo-CoA z trzema cząsteczkami malonylo-CoA (rys. 8). Zablokowanie genu syntazy chalkonowej antysensowym konstruktem uniemożliwiło biosyntezę chalkonu naryngeniny – prekursora flawonoidów, w tym także antocyjanów (rys. 8). W konsekwencji otrzymano transgeniczne petunie o białych kwiatkach (32). Podobne doświadczenia przeprowadzono dla tytoniu (32), gerbery (33) i torenii (34). Uważa się, że technika antysensu może w przyszłości doprowadzić do otrzymywania roślin z niższą zawartością niektórych alkaloidów, np. kofeiny w nasionach kawy, czy nikotyny w liściach tytoniu.



Rys. 8. Biosynteza flawonoidów i antocyjanów w roślinach; PAL – amoniako-liaza fenyloalaninowa; CHS – syntaza chalkonowa; CHI – izomeraza chalkonowa; IFS – syntaza izoflawonowa; FS – syntaza flawonowa; F3H – 3-hydroksylaza flawonoidowa; F3'H – 3'-hydroksylaza flawonoidowa; DFR – reduktaza dihydroflawonowa.

5. Podsumowanie

Najważniejszym obecnie aspektem badań dotyczących genetycznych modyfikacji dróg wtórnego metabolizmu w roślinnych kulturach *in vitro* jest poszerzenie wiedzy na temat genów i enzymów uczestniczących w szlakach metabolicznych oraz mechanizmów ich regulacji. Pomimo znacznych postępów w tej dziedzinie, dotychczas jedynie szlak prowadzący z fenyloalaniny do flawonoidów został poznany na poziomie molekularnym (35).

Przedstawione w tekście przykłady świadczą, że wykorzystując metody inżynierii genetycznej można także otrzymać kultury *in vitro* (zawiesiny, korzenie włośnikowate) z wyższą wydajnością niektórych produktów. Obserwowany efekt zależy w dużym stopniu od funkcji wprowadzonego genu w łańcuchu biosyntezy. Najlepsze rezultaty osiąga się gdy sklonowany gen steruje syntezą enzymu biorącego udział w końcowym etapie biosyntezy danego metabolitu. Na przykład dla biosyntezy skopolaminy takim genem, jest *h6h*, kodujący hydroksylazę hioscyjminy. Osiągane wydajności są jeszcze zbyt niskie, aby można było wykorzystać zmodyfikowane genetycznie kultury do produkcji metabolitów na skalę przemysłową. Można się jednak spodziewać, że postęp w dziedzinie transformacji i konstrukcji wektorów umożliwiających wprowadzanie do genomów rośliny dużych fragmentów DNA, niosących geny fragmentów lub nawet całych szlaków metabolicznych, stworzy nowe możliwości i przyspieszy praktyczne wykorzystanie transgenicznych kultur do biosyntezy szczególnie cennych metabolitów. Nadzieje wiąże się również z opracowaniem systemów opartych na ekspresji roślinnych genów w mikroorganizmach. Jest jeszcze jednak wiele zagadnień związanych z rozwojem tego kierunku badań. Wynikają one m.in. ze złożoności dróg metabolicznych w roślinie. Są to zwykle procesy wieloetapowe, kontrolowane przez wiele genów i enzymów, powiązane z różnicowaniem i rozwojem komórek.

Literatura

1. Masuda J., Okaba S., Hashimoto T., Yamada Y., (1991), *J. Biol. Chem.*, 266, 9460-9464.
2. Hahimoto T., Yun D-J., Yamada Y., (1993), *Phytochemistry*, 32, 713-718.
3. Jouhikainen K., Lindgren L., Jokelainen T., Hiltunen R., Teeri T.H., Oksman-Caldentey K-M., (1999), *Planta*, 208, 545-551.
4. Kohlmünzer S., (1985), *Farmakognozja*, PZWL, Warszawa.
5. Kutchan T. M., (1989), *FEBS Lett.*, 257, 127-130.
6. McKnight T. D., Roessner C. A., Devagupta R., Scott A. I., Nessler C. L., (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 4939.
7. de Luca V., Marineau C., Brisson W., (1989), *Proc. Natt. Acad. Sci. USA*, 86, 2582-2586.
8. Geerlings A., Hallard D., Caballero A. M., Cardoso I. L., van der Heijden R., Verpoorte R., (1999), *Plant Cell Rep.*, 19, 191-196.
9. Hamill J. D., Robins R. J., Rhodes M. J. C., (1989), *Planta Med.*, 55, 354-357.
10. Canel C., Lopes-Cardoso M. I., Whitmer S., van der Fits L., Pasquali G., van der Heijden R., Hoge J. H. C., Verpoorte R., (1998), *Planta*, 205, 414-419.

11. Amasino R. M., Powell A. L. T., Gordon M. P., (1984), *Gen. Genet.*, 197, 437-446.
12. Scott R. J., Draper J., (1987), *Plant. Mol. Biol.*, 8, 265-274.
13. Verpoorte R., (1996), *Plant Cell Culture Secondary Metabolism*, Eds. DiCosmo F., Misawa M., 203-228, Boca, New York.
14. Scheid O. M., Parzkowski J., Potrykus I., (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 228, 104-112.
15. Finnegan J., McElroy D., (1994), *Biotechnology*, 12, 883-888.
16. Pasquali G., Goddiju O. J. M., de Waal A., Verpoorte R., Schilperoot R. A., Hoge J. H. C., Memelink J., (1992), *Plant Med. Biol.*, 18, 1121-1131.
17. Shanks J. V., Bhadra R., (1997), *Hairy Roots. Culture and Application*, Ed. Doran P. M., 51-63, Harwood Academic Publishers, Australia.
18. Berlin J., (1999), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 45, *Transgenic Medicinal Plants*, Ed. Bajaj Y. P. S., 202-214, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
19. Hayashi M., (1977), *Folia Pharmacol. Japan.*, 73, 205-214.
20. Pagageorgiou V. P., (1980), *Planta Med.*, 38, 193-203.
21. Tabata M., Fujita Y., (1985), *Biotechnology in Plant Science*, Eds. Day P., Zaitlin M., Hollaender A., 207-218, Academic Press, Orlando, F.L.
22. Sommeer S., Köhle A., Yazaki K., Shimomura K., Bechthold A., Heide L., (1999), *Plant Mol. Biol.*, 39, 683-693.
23. Lange B. M., Severin K., Bechthold A., Heide L., (1998), *Planta*, 204, 234-241.
24. Heide L., Nishioka N., Fukui H., Tabata M., (1989), *Phytochemistry*, 28, 1873-1877.
25. Siebort M., Sommer S., Li S.-M., Wang Z.-X., Severin K., Heide L., (1996), *Plant Physiol.*, 112, 811-819.
26. Abad P., Marais A., Cardin L., Poupet A., Ponchet M., (1988), *Antiviral Res.*, 9, 315-327.
27. Hain R., Reif H. J., Krause E., Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P. H., Stöcker R. H., Stenzel K., (1993), *Nature*, 361, 153-156.
28. Hain R., Bieseler B., Kindl H., Schröder G., Sköcker R., (1996), *Plant Mol. Biol.*, 15, 325-335.
29. Haq T. A., Mason H. S., Clements J. D., Arntzen Ch. J., (1995), *Science*, 268, 714-716.
30. Miele L., (1997), *TIBTECH*, 15, 45-49.
31. Kapusta J., (1999), *Biotechnologia*, 3(46), 94-105.
32. van der Krol A. R., Lenting P. E., Veenstra J., van der Meer I. M., Koes R. E., Gerats A. G. M., Mol J. N. M., Stuitje A. R., (1988), *Nature*, 333, 866-869.
33. Elomaa P., Honkanen J., Puska R., Seppanen P., Helariutta Y., Mehto M., Kotilainen M., Nevalainen L., Teeri T. H., (1993), *Biotechnology*, 11, 508-511.
34. Aida R., Kishimoto S., Tanaka Y., Shibata M., (2000), *Plant Sci.*, 153, 33-42.
35. Narożna D., Mądrzak C. J., (1999), *Biotechnologia*, 3(46), 154-168.