



Rośliny jako reaktory do produkcji biofarmaceutyków

Michał Jasiński, Joanna Banasiak, Marta Frankowska,
Marek Figlerowicz

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

Plants as the reactors for production of biopharmaceuticals

Summary

Modern biotechnology is looking for a new source of high quality pharmaceuticals. Interestingly, many of such pharmaceuticals are often natural products provided by plants. An example is a vast array of secondary metabolites. Apart from extraction of these compounds from plant material, many different strategies have been proposed to efficiently produce some of them, using suspension cell cultures. Plants are also a good source of many recombinant proteins, offering a possibility of posttranslational modifications which are limited in prokaryotes. Efficient systems of stable and transient heterologous protein expression for the industrial scale were developed. Here, we briefly introduce such strategies and give examples of different plant products obtained by applying them.

Key words:

protein and secondary metabolite production, transgenic plants, suspension cell cultures.

1. Wstęp

Istotną konsekwencją niezwykle dynamicznego rozwoju nauk biomedycznych jest coraz powszechniejsze stosowanie wysoko przetworzonych preparatów pochodzenia naturalnego (biofarmaceutyków) zarówno w leczeniu chorób (leki hormonalne, przeciwnowotworowe), jak i w ich profilaktyce (antygeny wirusowe i bakteryjne stosowane w szczepionkach, gotowe przeciwciała). Istotną zaletą biofarmaceutyków jest ich duża skuteczność, a podstawową wadą wysokie koszty produkcji. W rezultacie,

Adres do korespondencji

Marek Figlerowicz,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań.

biotechnologia

3 (74) 53–66 2006

jednym z najważniejszych wyzwań, przed jakimi stanęła nowoczesna, „czerwona” biotechnologia jest znalezienie tanich i wydajnych metod pozyskiwania różnego typu produktów naturalnych dla potrzeb medycyny.

Szczególnie cennymi i trudno dostępnymi składnikami leków czy szczepierek są białka. Przez długi czas głównym sposobem ich produkcji była ekspresja kodujących je genów w komórkach bakteryjnych. Niestety uzyskane tą drogą proteiny są często nieaktywne. Dzieje się tak, gdy w pełni dojrzała forma białka powstaje dopiero po zajściu specyficznych modyfikacji potranslacyjnych, do których nie dochodzi w komórkach prokariotycznych. Problemu tego można uniknąć stosując eukariotyczne systemy ekspresyjne, np. hodowle komórek owadzych, zwierzęcych czy ludzkich. Prowadzenie hodowli komórkowych wiąże się jednak z bardzo wysokimi kosztami. Wynikają one przede wszystkim z konieczności przestrzegania niezwykle wyrynkowanych wymogów technologicznych. Innym rozwiązaniem jest otrzymanie transgeniczných zwierząt. Jednakże taki sposób produkcji białek nie redukuje znacząco kosztów, dodatkowo budzi wiele wątpliwości natury etycznej i prawnej. W tej sytuacji jednym z najciekawszych rozwiązań, jest jak się wydaje, wykorzystanie genetycznie zmodyfikowanych roślin jako naturalnych reaktorów do produkcji biofarmaceutyków.

Inną, niezwykle cechą roślin wyższych jest zdolność do syntezy szerokiej gamy produktów określaných mianem metabolitów wtórnych. Są to związki, które odgrywają ważną rolę w interakcjach roślin ze środowiskiem. Pełnią między innymi funkcje antybakteryjne czy przeciwgrzybiczne. Zidentyfikowano, jak dotąd, ponad sto tysięcy tego rodzaju związków, a tylko część z nich ma bliżej znaną strukturę (1). W zależności od szlaku biosyntetycznego można je podzielić zasadniczo na trzy klasy: terpenoidy, alkaloidy oraz związki fenolowe. Te niskocząsteczkowe, często złożone strukturalnie związki bardzo szybko stały się obiektem zainteresowań ludzi, z racji swoich właściwości, np. smaku, zapachu czy barwy. Wiele spośród nich jest cennymi farmaceutykami, np. taxol, winkrystyna, winblastyna. Niestety skomplikowana budowa metabolitów wtórnych sprawia, że ich chemiczna synteza jest nie tylko trudna, ale i nieopłacalna ekonomicznie. W efekcie większość farmaceutyków wywodzących się z metabolitów wtórnych lub ich prekursorów produkowana jest bezpośrednio w roślinach.

2. Zalety stosowania roślin jako bioreaktorów

W przeprowadzonych w ostatnich latach badaniach ujawniono wiele niezwykle istotnych zalet roślinnych systemów ekspresyjnych. Pokazano, że systemy takie są bardzo ekonomiczne – powstanie biomasy wymaga jedynie energii słonecznej i podłoża mineralnego. Dodatkowo zbiór roślin oraz ich obróbka przemysłowa nie wymagają opracowania nowych technologii, stosowane obecnie są bowiem dość skutecznie efektywne. Z dotychczasowych doświadczeń wynika, że z jednego hektara

uprawy można uzyskać do 20 kg czystego białka. Ponadto w wielu przypadkach istnieje możliwość pominięcia skomplikowanych procedur oczyszczania białek. Dotyczy to przede wszystkim sytuacji, gdy preparat białkowy dostarczany jest drogą pokarmową. W ostatnich latach wykazano na przykład, że spożycie rośliny transgenicznej, w której wytwarzane są antygeny wirusowe tak samo indukuje odpowiedź immunologiczną, jak klasyczna doustna szczepionka przeciw polio (2).

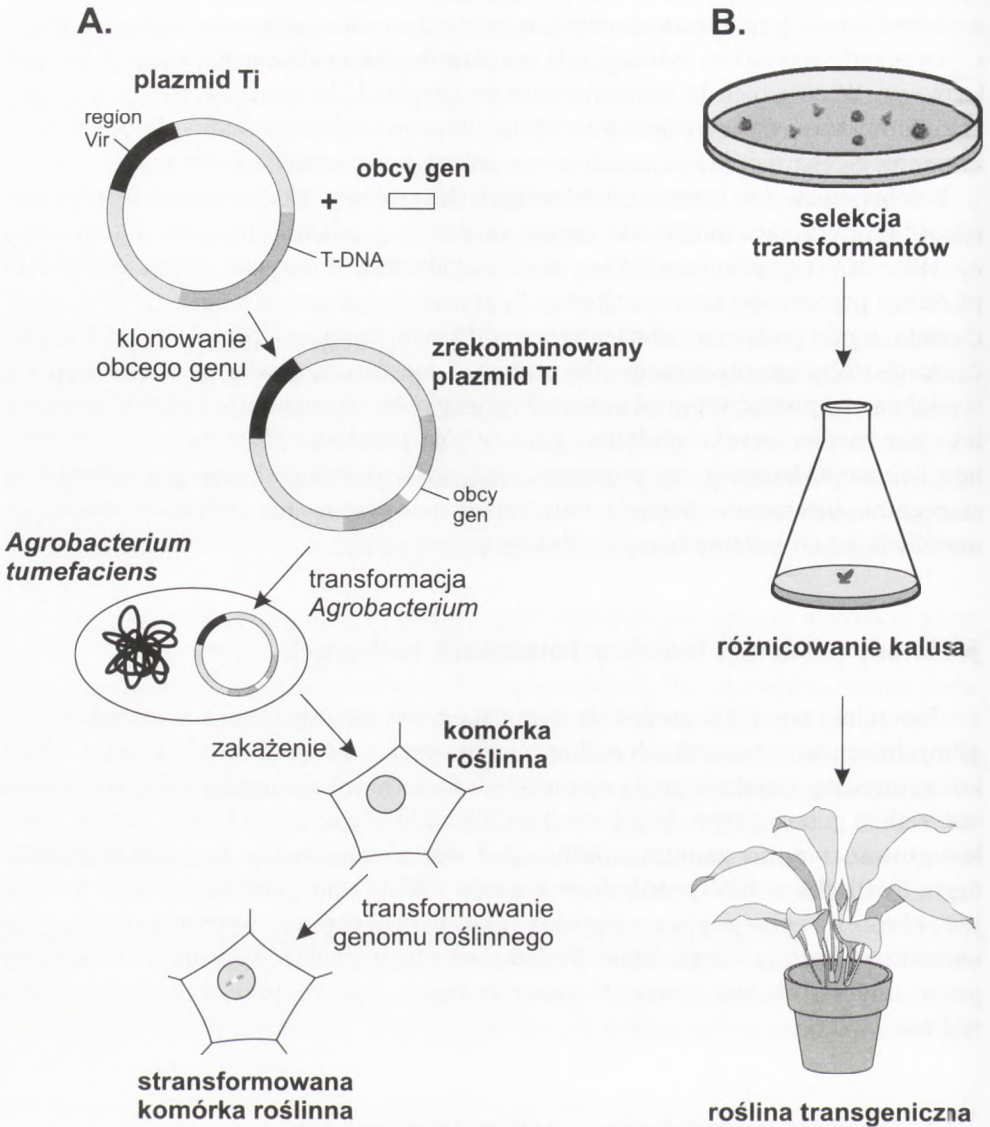
Kolejną niezwykle istotną zaletą roślinnych systemów ekspresyjnych jest ich sterowność wykluczająca możliwość zanieczyszczenia produktu groźnymi patogenami, np. HIV, HCV czy prionami. Wagę tego zagadnienia doskonale ilustruje problem produkcji preparatów krwiopochodnych, zawierających przeciwciała. Gotowe przeciwciała często podawane są pacjentom poddanym immunosupresji, np. podczas leczenia choroby nowotworowej. Aby otrzymać pojedynczą dawkę, tj. około 1 g przeciwciał należy pobrać krew od prawie 2 tysięcy osób. W rezultacie koszt otrzymania leku jest bardzo wysoki, podobnie jak i ryzyko zakażenia pacjenta jakimś patogenem (wirusem, bakterią czy prionem). Stąd też w ostatnich latach prowadzone są szczególnie intensywne badania zmierzające do opracowania systemów roślinnych umożliwiających przemysłową produkcję przeciwciał.

3. Metody produkcji białek w komórkach roślinnych

Generalnie wyróżnić można dwie podstawowe metody ekspresji obcych (egzogenych) genów w komórkach roślinnych. Pierwszą z nich jest ekspresja stała zwana konstytutywną. Uzyskuje się ją na drodze transformacji komórek roślinnych obcym materiałem genetycznym. W jej wyniku DNA kodujący wybrane białko zostaje trwale wprowadzony do genomu roślinnego i jest przekazywany następnym pokoleniom. Dochodzi w ten sposób do powstania rośliny transgenicznej. Drugą metodą jest ekspresja przejściowa. Wymaga ona wprowadzenia wybranego genu do ukształtowanego już organizmu. Dodatkowo należy znaleźć sposób umożliwiający powielanie się obcego materiału genetycznego i jego rozprzestrzenianie w całej roślinie.

3.1. Ekspresja konstytutywna – rośliny transgeniczne

Obecnie jest to najbardziej rozpowszechniony sposób wytwarzania białek heterologicznych, wykorzystujący rośliny transgeniczne jako naturalne bioreaktory. Wprowadzenie do genomu roślinnego DNA kodującego obce białko i zapewnienie wysokiego poziomu jego ekspresji nie jest jednak zabiegiem prostym (rys. 1). W pierwszym etapie sklonowany wcześniej gen wprowadzony zostaje do specjalnego plazmidu posiadającego zdolność do rekombinacji z genomem roślinnym (plazmid Ti, ang. *Tumor inducing plasmid*). Wraz z genem do plazmidu wstawione zo-



Rys. 1. Schemat obrazujący proces wytwarzania roślin transgenicznych. A. Transformacja roślin. Interesujący gen wprowadzony zostaje do plazmidu posiadającego zdolność do rekombinacji z genomem roślinnym oraz wyposażonego w gen warunkujący oporność na używany do selekcji antybiotyk lub herbicyd (plazmid Ti). Uzyskany plazmid umieszczany jest w bakterii *Agrobacterium tumefaciens* charakteryzującej się zdolnością do infekcji komórek roślinnych. Następnie fragment rośliny zostaje zakażony szczepem bakteryjnym. B. Selekcja i regeneracja roślin. Zainfekowane komórki roślinne umieszczane są na pożywce selekcyjnej zawierającej antybiotyk lub herbicyd. Przeżywają i namnażają się tylko te komórki, w których gen selekcyjny (a wraz z nim transgen) ulega ekspresji. Następnie z pojedynczych transformowanych komórek odtworzone zostają całe rośliny w procesie zwanym regeneracją.

stają sekwencje regulatorowe (tj. promotor warunkujący odpowiednio wysoki poziom transkrypcji genu i terminator transkrypcji) oraz gen umożliwiający selekcję transformantów (zwykle jest to gen zapewniający oporność na antybiotyki lub herbicydy). Nowo powstały plazmid umieszczany jest w bakterii charakteryzującej się zdolnością do infekcji komórek roślinnych, np. *Agrobacterium tumefaciens*. W kolejnym etapie fragment rośliny zostaje zakażony szczepem bakteryjnym. Następnie plazmid Ti wnika do komórki roślinnej i kasetę zawierającą obcy gen, sekwencje regulatorowe oraz gen selekcyjny ulega integracji z genomem gospodarza. Miejsce integracji „wybierane” jest w sposób losowy.

Kolejny etap polega na selekcji transformantów. Zainfekowane komórki roślinne umieszczane są na pożywce zawierającej antybiotyki lub herbicydy. W rezultacie przeżywają i namnażają się tylko te komórki, w których gen selekcyjny (a wraz z nim gen obcy) ulega ekspresji. Następnie z pojedynczych transformowanych komórek odtworzone zostają całe rośliny w procesie zwanym regeneracją. W ostatnim etapie uzyskane rośliny transgeniczne poddawane są szczegółowym badaniom. Ponieważ obcy gen integruje się w różnych miejscach genomu roślinnego należy stwierdzić czy ulega on wydajnej ekspresji oraz czy jego obecność nie wpływa negatywnie na funkcjonowanie rośliny, np. uniemożliwia jej kwitnienie lub wytwarzanie nasion. Dopiero odpowiednio wyselekcjonowane rośliny mogą zostać wykorzystane jako bioreaktory.

W ostatnich latach otrzymano szereg roślin transgenicznych wytwarzających ludzkie białka. Podstawowe informacje dotyczące zastosowanych systemów ekspresyjnych przedstawione zostały w tabeli 1.

Tabela 1

Ekspresja wybranych rekombinowanych białek w różnych roślinach transgenicznych

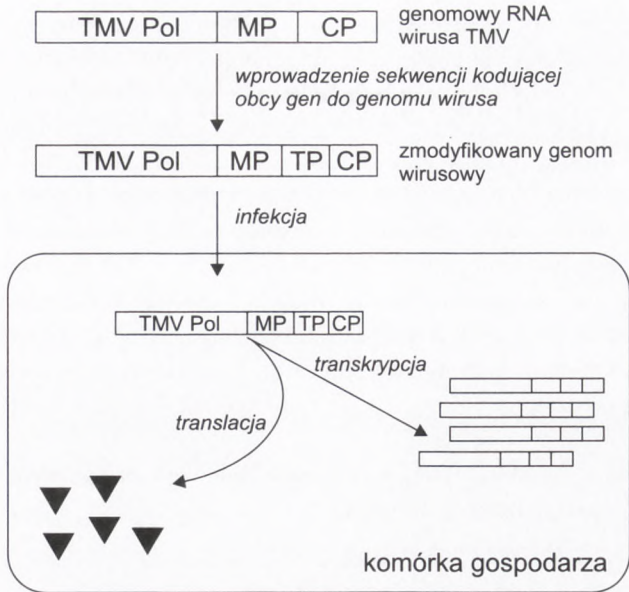
| Zrekombinowane białko | Poziom ekspresji | Tkanka roślinna | Literatura |
|---|------------------|----------------------------------|------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| β -glukuronidaza | 0,4-0,7% TSP* | nasiona (kukurydza) | (3) |
| β -glukuronidaza | 10% TSP | liście (tytoń) | (4) |
| awidyna | 5,7% TSP | nasiona (kukurydza) | (5) |
| lizozym | 5-45% TSP | nasiona (ryż) | (6) |
| białko nici pajęczej | 2% TSP | bulwa (ziemniak), liście (tytoń) | (7) |
| białko nici pajęczej | 2% TSP | nasiona (tytoń) | (8) |
| ludzka somatotropina | 0,16% TSP | bulwa (ziemniak) liście | (9) |
| albumina osocza ludzkiego | 0,2% TSP | kultura komórkowa | (10) |
| albumina osocza ludzkiego | 0,2% TSP | tytoń | (11) |
| ludzki kolagen | 0,1 mg/g | liście (tytoń) | (12) |
| ludzka α -laktalbumina | 5 μ g/g | liście (tytoń) | (13) |
| podjednostka B enterotoksyny z <i>E. coli</i> | 13 μ g/g | bulwa (ziemniak) | (14) |
| termostabilna β -glukanaza | 0,1-5,4% TSP | nasiona (jęczmień) | (15) |

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|-------------------|--|------|
| ludzka interleukina-2 | 115 U/g | bulwy (ziemniak) | (16) |
| aprotynina | 0,17% TSP | nasiona (kukurydza) | (17) |
| trypsyna bydłęca | 3,3% TSP | nasiona (kukurydza) | (18) |
| β -kazeina | 0,01% TSP | liście (ziemniak) | (19) |
| podjednostka B toksyny cholery | 0,3% TSP | liść, bulwa (ziemniak) | (20) |
| białko p-24 wirusa HIV | 0,35% TSP | liście (tytoń) | (21) |
| antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby B | 0,33-16 μ g/g | bulwa (ziemniak) | (22) |
| ludzka laktoferyna | 0,1% TSP | bulwa (ziemniak) | (23) |
| ludzka laktoferyna | 0,5% | nasiona (ryż) | (24) |
| ludzka laktoferyna | nieznany | nasiona (kukurydza) | (25) |
| ludzka laktoferyna | 4,3% TSP | kultura komórkowa (tytoń) | (26) |
| ludzka laktoferyna | 3% TSP | kultura komórkowa (żeńszeń) | (27) |
| glikoproteina B ludzkiego cytomegalowirusa | 1% TSP | nasiona (tytoń) | (28) |
| przeciwciała monoklonalne | 0,01-0,25%TSP | liście (tytoń) | (29) |
| przeciwciała monoklonalne | 0,5 mg/g | liście (tytoń) | (30) |
| przeciwciała monoklonalne | 1% TSP | lucerna | (31) |
| przeciwciała monoklonalne | 11,7 μ g/g | ryzosekrecja (tytoń) | (32) |
| scFv | 0,01-6,8% TSP | liście, nasiona (tytoń) | (33) |
| scFv | 30 μ g/g | liście, nasiona (pszenica, ryż) | (34) |
| scFv | 1% TSP | <i>Petunia hybrida</i> | (35) |
| scFv | 36,5% TSP | nasiona (<i>Arabidopsis</i>) | (36) |
| diabody | 0,5 mg/kg | liście (tytoń) | (37) |
| ludzki interferon- α | 560 IU/g | ziemniak | (38) |
| główna proteina L1 kapsydu wirusa HPV | 0,2-0,5% TSP | bulwa (ziemniak), liście (tytoń) | (39) |
| ludzka interleukina-18 | 0,05% TSP | liście (tytoń) | (38) |
| ludzka glukocerebrozydaza | 1 mg/g | liście (tytoń) | (40) |
| podjednostki α i β ludzkiej hemoglobiny | 0,05% TSP | nasiona (tytoń) | (41) |
| ludzka a1 antytrypsyna | 18,2-24 mg/g | kultura komórkowa (ryż) | (42) |
| ludzka alkaliczna fosfatasa łożyskowa | 20-28 μ g/g | ryzosekrecja (tytoń) | (43) |
| ludzki naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) | 30 mg/L | kultura komórkowa (mech Ph. pa- tens) | (44) |

* TSP Całkowita ilość białek rozpuszczalnych (ang. *Total Soluble Proteins*)

3.2. Ekspresja przejściowa

W pierwszej chwili można by sądzić, że ekspresja przejściowa obcej informacji genetycznej w dojrzałej roślinie jest zadaniem niezwykle trudnym. Szczególnie skomplikowane jest, jak się wydaje, zagadnienie równoczesnego dostarczenia obcego genu do wielu komórek czy tkanek. Niewątpliwym przełomem w badaniach nad możliwością prowadzenia ekspresji przejściowej było zastosowanie zmodyfikowanych wirusów (tzw. wektorów wirusowych) jako nośników obcej informacji gene-



Rys. 2. Schematyczny opis przejściowej ekspresji obcych genów prowadzonej przy użyciu wektora wirusowego: TMV Pol, Polimeraza TMV; MP białko umożliwiające systemyczną infekcję (ang. *movement protein*); CP, białko płaszczka (ang. *coat protein*); TP, gen kodujący interesujące białko (ang. *Target protein*), ▼ pożądaný produkt białkowy.

tycznej (rys. 2). Wykorzystywane w praktyce wektory z reguły zbudowane są z RNA, gdyż aż 99% wszystkich wirusowych patogenów roślinnych stanowią wirusy RNA. Ich niewielki genom (zwykle 6-10 tysięcy nukleotydów) występuje najczęściej w formie pojedynczej nici RNA (ssRNA, ang. *single stranded RNA*). U niektórych wirusów składa się z dwóch, trzech lub nawet czterech jednoniciowych RNA. Najprostsze wirusy kodują zaledwie kilka białek: niezbędną do replikacji genomu zależną od RNA polimerazę RNA (RdRp, ang. *RNA-dependent RNA polymerase*), białko umożliwiające systemiczną infekcję (MP, ang. *movement protein*) oraz strukturalne białko płaszczka (CP, ang. *coat protein*). Istnieją również bardziej złożone wirusy RNA, których genomy kodują wiele białek.

Na podstawie dotychczasowych badań przypuszcza się, że najlepszym materiałem do konstrukcji wektorów są wirusy o jednoniciowym genomie, posiadającym polarność mRNA ((+)RNA wirusy). Wysoki poziom ich akumulacji w zainfekowanej tkance (do 8,6 mg wirionu / g świeżej masy), jak również naturalna zdolność do rozprzestrzeniania się i przełączania metabolizmu rośliny na niezwykle wydajną syntezę własnych komponentów białkowych (synteza miligramowych ilości białka / g tkanki roślinnej) czynią z układu wirus RNA – gospodarz roślinny, system o olbrzymim potencjale produkcyjnym – wydajność syntezy produktu może sięgać 80% rozpuszczalnych białek rośliny (45). Jego dodatkową zaletą jest możliwość manipulowania

klonami cDNA genomów wirusowych, co w połączeniu z ich niewielkimi wymiarami, w znacznym stopniu ułatwia pracę oraz skraca czas konstruowania zrekombinowanych cząstek wektora do kilku tygodni. Kolejnym walorem wymienionego systemu, jest możliwość wyboru momentu infekcji wirusem. Można jej dokonać w sposób kontrolowany podczas dowolnego etapu rozwoju rośliny. Ma to szczególnie znaczenie w przypadku syntezy białek toksycznych dla metabolizmu gospodarza. Wszystkie wymienione zalety w połączeniu z szerokim zakresem gospodarzy roślinnych (rośliny jedno- i dwuliścienne) czynią wirusowe wektory RNA niezwykle atrakcyjnym rozwiązaniem umożliwiającym syntezę białek o znaczeniu terapeutycznym. Nie mniej ważną pozostaje kwestia biobezpieczeństwa systemu. Ze względu na dość niską stabilność wektora RNA, faworyzującą dryf potomstwa wirusowego w kierunku typu dzikiego, ryzyko wymknięcia się takiego układu spod kontroli jest ograniczone.

Szereg przykładów skutecznego zastosowania wektorów wirusowych do produkcji białek przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Przebiegowa ekspresja przy udziale wektorów wirusowych

| Zrekombinowane białko | Poziom ekspresji | Wektor | Gospodarz | Literatura |
|---------------------------|----------------------------|---------|-----------------------|------------|
| reduktaza dihydrofoliowa | 8 $\mu\text{g g}^{-1}$ | CaMV* | rzepa | (46) |
| metalotioneina II | 0,5% TSP | CaMV | rzepa | (47) |
| interferon $\alpha\beta$ | 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ | CaMV | rzepa | (48) |
| interferon γ | 0,5% TSP | BMV** | protoplasty tytoniu | (49) |
| ScFv | 12-30 $\mu\text{g g}^{-1}$ | TMV*** | <i>N. benthamiana</i> | (50) |
| przeciwciała monoklonalne | nieznany | TMV | <i>N. benthamiana</i> | (51) |
| glikoproteina D z BHV-1 | 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ | TMV | <i>N. benthamiana</i> | (52) |
| α -amylaza | 5% TSP | TMV | <i>N. benthamiana</i> | (53) |
| alergen pyłkowy Bet v1 | 0,2 mg g^{-1} | TMV | <i>N. benthamiana</i> | (54) |
| GFP, DsRed | 5 mg g^{-1} | TMV | <i>N. benthamiana</i> | (55) |
| ludzka laktoferyna | 0,6% TSP | PVX**** | <i>N. benthamiana</i> | (56) |

* wirus mozaiki tytoniu (ang. *Cauliflower mosaic virus*), ** wirus mozaiki stokłosy (ang. *Brome mosaic virus*), *** wirus mozaiki tytoniu (ang. *Tobacco mosaic virus*), **** wirus X ziemniaka (ang. *Potato virus X*).

4. Produkcja metabolitów wtórnych w komórkach roślinnych

Przez długi czas jedynym źródłem stosowanych w medycynie metabolitów wtórnych były rośliny występujące w środowisku naturalnym. Uprawy takich roślin są często czasochłonne i dodatkowo charakteryzuje je niska wydajność produktu o wysokiej jakości (57). Stąd interesującą alternatywą dla pozyskiwania naturalnych produktów stały się roślinne hodowle *in vitro*. Techniki propagacji komórek roślinnych

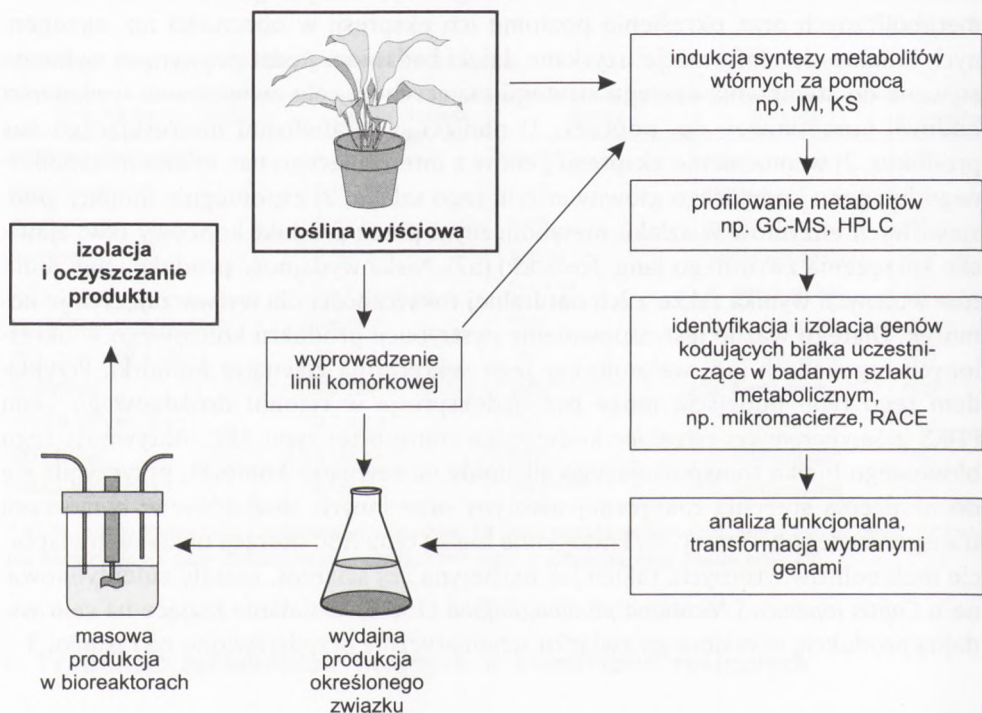
są znane już od ponad 50. lat. Takie hodowle oferują dobre źródło homogennego materiału w stosunkowo krótkim czasie przy wykorzystaniu syntetycznych pożywek o kontrolowanym składzie. Istnieje kilka różnych typów materiału roślinnego *in vitro*. Obok hodowli takich jak transformowane korzenie włośnikowe, największą popularnością cieszą się hodowle komórek w zawieszynie, które mogą być propagowane na dużą skalę w bioreaktorach. Obecnie znanych jest wiele takich linii komórkowych m.in. z: *Arabidopsis thaliana* (58), *Taxus cuspidata* (59), *Catharantus roseus* (60), a także tytoniu (61), ryżu (62) i fasoli (63). Mimo niewątpliwych korzyści, jakie dają hodowle komórkowe w porównaniu z uprawą roślin, często również i w tym przypadku wydajność produkcyjna tych systemów jest niska (64). Tylko nieliczne z roślinnych hodowli komórkowych nadają się do produkcji metabolitów na skalę przemysłową (tab. 3). Celem poprawienia wydajności linie komórkowe są poddawane modyfikacjom przy wykorzystaniu inżynierii genetycznej. Podstawowym wyzwaniem nadal pozostaje jednak lepsze poznanie szlaków metabolicznych oraz mechanizmów i genów je regulujących. To zadanie realizują np. projekty profilowania transkryptów wielu genów jednocześnie w określonych warunkach przy wykorzystaniu mikromacierzy. Pozwala to na identyfikację nowych genów białek szlaków metabolicznych oraz określenie poziomu ich ekspresji w obecności np. egzogennej indukcji. Informacje uzyskane dzięki badaniom podstawowym są wykorzystywane do stworzenia szeregu strategii mających na celu zwiększenie wydajności hodowli komórkowej, np. poprzez: 1) obniżenie katabolizmu interesującego nas produktu, 2) wzmocnienie ekspresji genów z interesującego nas szlaku metabolicznego lub genu kodującego główny enzym tego szlaku, 3) zapobieganie inhibicji podstawowych enzymów w szlaku metabolicznym przez produkt końcowy tzw. zjawisko sprzężenia zwrotnego (ang. *feedback*) (57). Niska wydajność produkcji metabolitów wtórnych wynika także z ich naturalnej toksyczności dla wytwarzających je komórek. Dlatego ważne jest zapewnienie dystrybucji produktu końcowego w określonych organellach (np. wakuoli) czy jego sekrecja na zewnątrz komórki. Przykładem tego typu podejścia może być nadekspresja w tytoniu drożdżowego genu PDR5 z *Saccharomyces cerevisiae* kodującego transporter typu ABC. Aktywność tego błonowego białka transportującego alkaloidy na zewnątrz komórki, przyczyniła się do obniżenia stężenia toksycznej nikotyny oraz innych alkaloidów w komórkach transgenicznego tytoniu (74). Endogenne białka typu ABC biorące udział w transporcie metabolitów wtórnych, takich jak berberyna czy sclareol, zostały zidentyfikowane u *Coptis japonica* i *Nicotiana plumbaginifolia* (75,76). Działania mające na celu wydajną produkcję określonego związku schematycznie przedstawiono na rysunku 3.

Tabela 3

Wydajność roślinnych systemów produkujących metabolity wtórne

| Produkt | Gatunek rośliny | Wydajność (% s.m.*) | Literatura |
|------------------|----------------------------|---------------------|------------|
| kwas rozmarynowy | <i>Salvia officinalis</i> | 36,0 | (65) |
| kwas rozmarynowy | <i>Coleus blumei</i> | 21,4 | (66) |
| berberyna | <i>Thalictrum minus</i> | 10,6 | (67) |
| jatroryzyna | <i>Berberis wilsonae</i> | 10,0 | (68) |
| antocyjany | <i>Perilla frutescens</i> | 8,9 | (69) |
| berberyna | <i>Coptis japonica</i> | 7,5 | (70) |
| diosgenin | <i>Dioscorea deltoidea</i> | 3,8 | (71) |
| sangwinaryna | <i>Papaver somniferum</i> | 2,5 | (72) |
| serpentina | <i>Catbaranthus roseus</i> | 2,2 | (73) |

*s.m. sucha masa



Rys. 3. Przykładowy schemat działań mających na celu uzyskanie wydajnych systemów do produkcji metabolitów wtórnych w hodowlach komórkowych. Skrót: JM, jasmonian metylu; KS, kwas salicylowy; GC-MS, chromatografia gazowa i spektroskopia mas (ang. *Gas Chromatography Mass Spectrometry*); HPLC, wysokosprawną chromatografię cieczą (ang. *High-performance Liquid Chromatography*); RACE, szybka amplifikacja końców cDNA (ang. *Rapid Amplification of cDNA Ends*).

Przykładem skutecznego wykorzystania hodowli komórkowych na skalę przemysłową jest produkcja taxolu, naturalnego leku przeciwrakowego uzyskiwanego z komórek *Taxus cuspidata* (77). System ten jest tańszą alternatywą dla procesów ekstrakcji tego związku z kory *Taxus brevifolia* (57).

5. Podsumowanie

Unia Europejska rozpoczyna właśnie finansowanie serii projektów wartych kilkanaście milionów euro, mających na celu produkcję szczepionek m.in. przeciwko wirusowi HIV, przy wykorzystaniu roślin jako systemów ekspresyjnych. Rosnące zainteresowanie komercyjne tego typu preparatami zachęca jednocześnie do współpracy ośrodki akademickie, których badania podstawowe często mają znaczący wkład w powstanie wysoko zaawansowanych produktów końcowych. Dobór właściwego systemu ekspresji, jego udoskonalanie pod kątem bezpieczeństwa, wydajności i łatwości dostosowywania go do różnych białek docelowych to zadania, przed którymi stają dziś laboratoria biotechnologiczne. Coraz większą uwagę zwracają na siebie systemy przejściowej ekspresji oparte na wektorach wirusowych. Są one dobrą alternatywą dla funkcjonującego obecnie modelu konstytutywnej ekspresji. Ta ostatnia wiąże się bowiem z dużym nakładem czasu potrzebnym dla uzyskania transgeniczných roślin i koniecznością ich hodowli w bardzo dużej skali, np. na polach. Wydajne systemy wirusowe pozwalają na uzyskanie większej ilości pożądanego białka z mniejszej ilości biomasy (hodowle szklarniowe). Co więcej, proces produkcyjny jest stosunkowo szybki i nie wymaga genetycznej modyfikacji roślin. Obecnie jednak możliwa jest produkcja tylko stosunkowo małych białek, a systemy do produkcji polipeptydów (np. przeciwciał) wymagają lepszego dopracowania. O rosnącym zainteresowaniu towarzyszącemu produkcji białek w roślinnych systemach może świadczyć liczba firm wykorzystujących je jako naturalne bioreaktory (tab. 4).

Tabela 4

Firmy stosujące systemy roślinne do produkcji zrekombinowanych białek

| Firma | Strona internetowa | System roślinny |
|---------------------|---|---------------------------|
| 1 | 2 | 3 |
| Biolex | http://www.biolex.com | rzęsa wodna |
| Chlorogen | http://www.chlorogen.com | tytoń |
| Dow Chemical | http://www.dow.com/plantbio/index.htm | kukurydza |
| Greenovation | http://www.greenovation.com | mech <i>Phscomitrella</i> |
| Icon Genetics | http://www.icongenetics.com | tytoń |
| Large Scale Biology | http://www.lsb.com | tytoń |
| LemnaGene | http://www.lemnagene.com | rzęsa wodna |

| 1 | 2 | 3 |
|-----------------------|---|--------------------|
| Meristem Therapeutics | http://www.meristem-therapeutics.com | kukurydza, tytoń |
| Medicago | http://www2.medicago.com | lucerna |
| Novoplant | http://www.novoplant.com | różne |
| SemBioSys | http://www.sembiosys.ca | krokosz barwierski |
| Syngenta Biopharma | http://www.syngenta.com/en/biopharma/ | różne |
| Phytomedics | http://www.phytomedics.com | tytoń |
| Planet Biotechnology | http://www.planetbiotechnology.com | tytoń |
| Plantigen | http://www.plantigen.com/ | tytoń |
| ProdiGene | http://www.prodigene.com | kukurydza |
| Protalix | http://www.protalix.com | kultury komórkowe |
| Ventria | http://www.ventriabio.com | ryż |

Praca powstała w ramach realizacji projektu Unii Europejskiej: MERG-CT-2005-016182.

Literatura

- Dixon R. A., (2001), *Nature*, 411, 843-847.
- Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A., (2000), *Nature Biotechnol.*, 18, 1151-1155.
- Kusnadi A. R., Evangelista R. L., Hood E. E., Howard J. A., Nikolov Z. L., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 60 (1), 44-52.
- Outchkourov N. S., Peters J., de Jong J., Rademakers W., Jongsma M. A., (2003), *Planta*, 216 (6), 1003-1012.
- Kusnadi A. R., Hood E. E., Witcher D. R., Howard J. A., Nikolov Z. L., (1998), *Biotechnol. Prog.*, 14 (1), 149-155.
- Yang D., Guo F., Liu B., Huang N., Watkins S. C., (2003), *Planta*, 216(4), 597-603.
- Scheller J., Guhrs K. H., Grosse F., Conrad U., (2001), *Nat. Biotechnol.*, 19 (6), 573-577.
- Scheller J., Henggeler D., Viviani A., Conrad U., (2004), *Transgenic Res.*, 13 (1), 51-57.
- Leite A., et al., (2000), *Molecular Breeding*, 6 (1), 47-53.
- Farran I., Sanchez-Serrano J. J., Medina J. F., Prieto J., Mingo-Castel A. M., (2002), *Transgenic Res.*, 11 (4), 337-346.
- Sijmons P. C., Dekker B. M., Schrammeijer B., Verwoerd T. C., van den Elzen P. J., Hoekema A., (1990), *Biotechnology (NY)*, 8 (3), 217-221.
- Ruggiero F., Exposito J. Y., Bourmat P., Gruber V., Perret S., Comte J., Olgagnier B., Garrone R., Theisen M., (2000), *FEBS Lett.*, 469 (1), 132-136.
- Takase K., Hagiwara K., (1998), *J. Biochem. (Tokyo)*, 123 (3), 440-444.
- Lauterslager T. G., Florack D. E., van der Wal T. J., Molthoff J. W., Langeveld J. P., Bosch D., Boersma W. J., Hilgers L. A., (2001), *Vaccine*, 19 (17-19), 2749-2755.
- Horvath H., Huang J., Wong O., Kohl E., Okita T., Kannangara C. G., von Wettstein D., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 (4), 1914-1919.
- Park Y., Cheong H., (2002), *Protein Expr. Purif.*, 25 (1), 160-165.
- Azzoni A. R., Kusnadi A. R., Miranda E. A., Nikolov Z. L., (2002), *Biotechnol. Bioeng.*, 80 (3), 268-276.
- Woodard S. L., Mayor J. M., Bailey M. R., Barker D. K., Love R. T., Lane J. R., Delaney D. E., McComas-Wagner J. M., Mallubhotla H. D., Hood E. E., Dangott L. J., Tichy S. E., Howard J. A., (2003), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 38 (Pt 2), 123-130.

19. Chong D. K., Roberts W., Arakawa T., Illes K., Bagi G., Slattery C. W., Langridge W. H., (1997), *Transgenic Res.*, 6 (4), 289-296.
20. Arakawa T., Chong D. K., Merritt J. L., Langridge W. H., (1997), *Transgenic Res.*, 6 (6), 403-413.
21. Zhang G. G., Rodrigues L., Rovinski B., White K. A., (2002), *Mol. Biotechnol.*, 20 (2), 131-136.
22. Richter L. J., Thanavala Y., Arntzen C. J., Mason H. S., (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18 (11), 1167-1171.
23. Chong D. K., Langridge W. H., (2000), *Transgenic Res.*, 9 (1), 71-78.
24. Nandi S., et al., (2002), *Plant Science*, 163, 713-722.
25. Samyn-Petit V., et al., (2001), *Glycoconj. J.*, 18, 519-527.
26. Choi S. M., Lee O. S., Kwon S. Y., Kwak S. S., Yu D. Y., Lee H. S., (2003), *Biotechnol. Lett.*, 25 (3), 213-218.
27. Kwon S. Y., Jo S. H., Lee O. S., Choi S. M., Kwak S. S., Lee H. S., (2003), *Planta Med.*, 69 (11), 1005-1008.
28. Tackaberry E. S., Prior F., Bell M., Tocchi M., Porter S., Mehic J., Ganz P. R., Sardana R., Altosaar I., Dudani A., (2003), *Genome*, 46 (3), 521-526.
29. Stevens L. H., Stoopen G. M., Elbers I. J., Molthoff J. W., Bakker H. A., Lommen A., Bosch D., Jordi W., (2000), *Plant Physiol.*, 124 (1), 173-182.
30. Ma J. K., Hikmat B. Y., Wycoff K., Vine N. D., Chargelegue D., Yu L., Hein M. B., Lehner T., (1998), *Nat. Med.*, 4 (5), 601-606.
31. Khoudi H., Laberge S., Ferullo J. M., Bazin R., Darveau A., Castonguay Y., Allard G., Lemieux R., Vezi-
na L. P., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 64 (2), 135-143.
32. Drake P. M., Chargelegue D. M., Vine N. D., van Dolleweerd C. J., Obregon P., Ma J. K., (2003), *Plant
Mol. Biol.*, 52 (1), 233-241.
33. Fischer R., Schumman D., Zimmermann S., Drossard J., Sack M., Schillberg S., (1999), *Eur. J. Bio-
chem.*, 262 (3), 810-816.
34. Stoger E., Vaquero C., Torres E., Sack M., Nicholson L., Drossard J., Williams S., Keen D., Perrin Y.,
Christou P., Fischer R., (2000), *Plant Mol. Biol.*, 42 (4), 583-590.
35. de Jaeger G., Buys E., Eeckhout D., de Wilde C., Jacobs A., Kapila J., Angenon G., van Montagu M.,
Gerats T., Depicker A., (1999), *Eur. J. Biochem.*, 259 (1-2), 426-434.
36. de Jaeger G., Scheffer S., Jacobs A., Zambre M., Zobell O., Goossens A., Depicker A., Angenon G.,
(2002), *Nat. Biotechnol.*, 20 (12), 1265-1268.
37. Vaquero C., Sack M., Schuster F., Finnern R., Drossard J., Schumann D., Reimann A., Fischer R.,
(2002), *FASEB J.*, 16 (3), 408-410.
38. Ohya K., Matsumara T., Ohashi K., Onuma M., Sugimoto C., (2001), *J. Interferon Cytokine Res.*, 21
(8), 595-602.
39. Biemelt S., Sonnewald U., Galmbacher P., Willmitzer L., Muller M., (2003), *J. Virol.*, 77 (17), 9211-9220.
40. Cramer C. L., Weissenborn D. L., Oishi K. K., Grabau E. A., Bennett S., Ponce E., Grabowski G. A., Ra-
din D. N., (1996), *Ann. NY Acad. Sci.*, 792, 62-71.
41. Dieryck W., Pagnier J., Poyart C., Marden M. C., Gruber V., Bournat P., Baudino S., Merot B., (1997),
Nature, 386 (6620), 29-30.
42. Terashima M., Ejiri Y., Hashikawa N., Yoshida H., (2001), *Biotechnol. Prog.*, 17 (3), 403-406.
43. Borisjuk N. V., Birisjuk L. G., Logendra S., Petersen F., Gleba Y., Raskin I., (1999), *Nat. Biotechnol.*,
17 (5), 466-469.
44. Decker E. L., Reski R., (2004), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7 (2), 166-170.
45. Herbers K., Sonnewald U., (1999), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, 163-168.
46. Brisson N., et al., (1984), *Nature*, 310, 511-514.
47. Lefebvre D., Miki B., Laliberte J., (1987), *Bio-technology*, 5, 1053-1056.
48. de Zoeten G. A., Penswick J. R., Horisberger M. A., Ahl P., Schultz M., Hohn T., (1989), *Virology*,
172 (1), 213-222.
49. Mori M., Zhang G. H., Kaido M., Okuno M., Furusawa I., (1993), *J. Gen. Virol.*, 74 (Pt 7), 1255-1260.
50. McCormick A. A., Kumagai M. H., Hanley K., Turpen T. H., Hakim I., Grill L. K., Tuse D., Levy S.,
(1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (2), 703-708.
51. Verch T., Yusibov V., Koprowski H., (1998), *J. Immunol. Methods.*, 220 (1-2), 69-75.

52. Perez Filgueira D. M., Zamorano P. I., Dominguez M. G., Taboga O., Del Medico Zajac M. P., Puntel M., Romera S. A., Morris T. J., Borca M. V., Sadir A. M., (2003), *Vaccine*, 21 (27-30), 4201-4209.
53. Kumagai M. H., Donson J., della-Cioppa G., Grill L. K., (2000), *Gene*, 245 (1), 169-174.
54. Krebitz M., Wiedermann U., Essl D., Steinkellner H., Wagner B., Turpen T. H., Ebner C., Scheiner O., Breiteneder H., (2000), *FASEB J.*, 14 (10), 1279-1288.
55. Marillonnet S., Giritich A., Gils M., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (18), 6852-6857.
56. Li Y., Geng Y., Song H., Zheng G., Huan L., Qiu B., (2004), *Biotechnol. Lett.*, 26 (12), 953-957.
57. Oksman-Caldentey K. M., Inze D., (2004), *Trends Plant Sci.*, 9, 433-440.
58. Desikan R., Hancock J. T., Neill S. J., Coffey M. J., Jones O. T., (1996), *Biochem. Soc. Trans.* 24, 199.
59. Seki M., Ohzora C., Takeda M., Furusaki S., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 53, 214-219.
60. van der Heijden R., Verpoorte R., ten Hoopen H. J., (1989), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 18, 231-280.
61. Nagata T., Nemoto Y., Seiichiro H., (1992), *Int. Rev. Cytol.*, 132, 1-30.
62. Chen M.-H., Liu L.-F., Chen Y.-R., Wu H.-K., Yu S.-M., (1994), *Plant J.*, 6, 625-636.
63. Hoehl U., Upmaier B., Barz W., (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 319-323.
64. Ramachandra Rao S., Ravishankar G. A., (2002), *Biotechnol. Adv.*, 20, 101-153.
65. Hippolyte I., Marin B., Baccou J. C., Jonard R., (1992), *Plant Cell Rep.*, 11, 109-112.
66. Ulbrich B., Wiesner W., Arens H., (1985), *In Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, Neumann, Berlin, Springer-Verlag, 293-303.
67. Kobayashi Y., Fukui H., Tabata M., (1988), *Plant Cell Rep.*, 7, 249-253.
68. Breuling M., Alfermann A. W., Reinhard E., (1985), *Plant Cell Rep.*, 4, 220-223.
69. Zhong J. J., Konstantinov K. B., Toshida T., (1994), *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 445-447.
70. Matsubara K., Yamada Y., Kitani S., Yoshioka T., Morimoto T., Fujita T., (1989), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 46, 61-69.
71. Sahai O., Knuth M., (1985), *Biotechnol. Prog.*, 1, 1-9.
72. Park J. M., Yoon S. Y., Giles K. L., Songstad D. D., Eppstein D., Novakovski D., Friesen L., Rosevear I., (1992), *J. Ferment. Bioeng.*, 74, 292-296.
73. Zenk M. H., El-Shagi E., Arens H., Stöckigt J., Weiler E. W., Deus B., (1977), *Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application*, Berlin, Springer-Verlag, 27-43.
74. Goossens A., Hakkinen S. T., Laakso I., Oksman-Caldentey K. M., Inze D., (2003), *Plant Physiol.*, 131(3), 1161-1164.
75. Shitan N., Bazin I., Dan K., Obata K., Kigawa K., Ueda K., Sato F., Forestier C., Yazaki K., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 21, 100, 751-756.
76. Jasinski M., Stukkens Y., Degand H., Purnelle B., Marchand-Brynaert J., Boutry M., (2001), *Plant Cell.*, 13, 1095-1107.
77. Fett-Neto A. G., Melanson S. J., Sakata K., DiCosmo F., (1993), *Biotechnology (NY)*, 11, 731-734.