

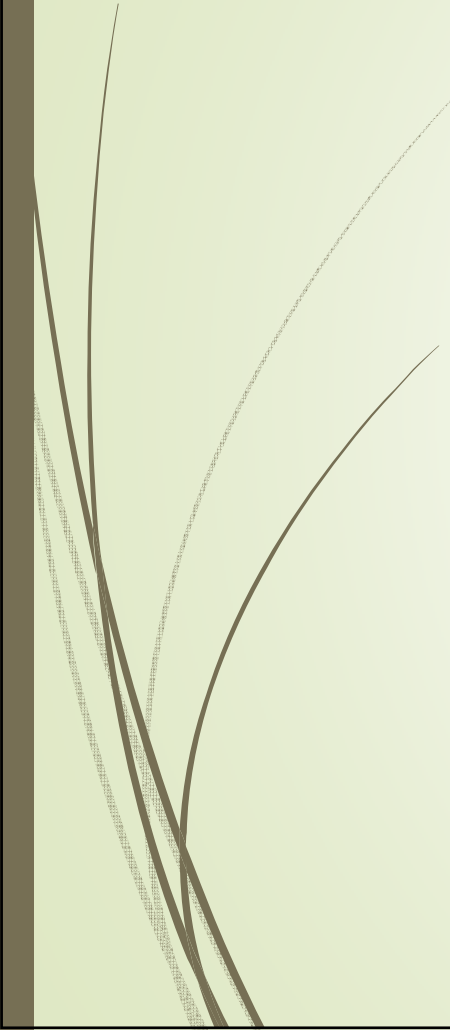


Molekulární „pharming“, tvorba sekundárních metabolitů

H. Cempírková, Principy rostlinných biotechnologií



Cíle

- ▶ pochopení výhod využívání rostlin k tvorbě léčivých látek
 - ▶ získání přehledu několika základních metod pro produkci proutlétek a sekundárních metabolitů v rostlinách
- 



Hlavní směry biofarmingu

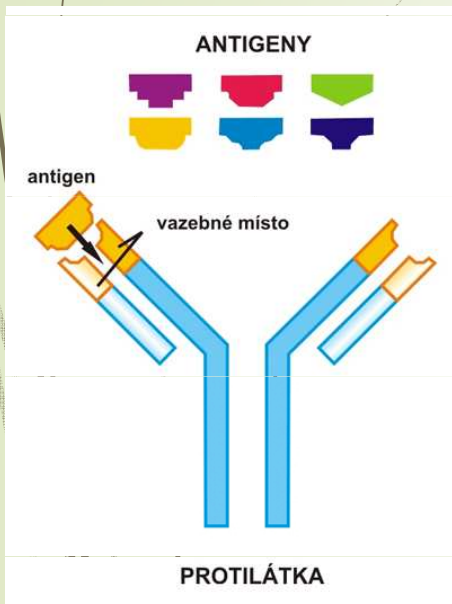
- ▶ produkce **protilátek** v rostlinách
- ▶ produkce **peptidů, proteinů a enzymů** cenných pro průmysl a farmacii
- ▶ transgenní rostliny jako systém produkce **vakcín**
- ▶ manipulace s metabolismem rostlin pro produkci nových sloučenin a **sekundárních metabolitů** s medicínální hodnotou



Rostliny jako továrny na syntézu léčebných proteinů

- ▶ možnost GM plodin pro produkci terapeutických proteinů
- ▶ ve srovnání s kulturami bakterií, či živočišných buněk = pěstování GM rostlin = levnější produkce
- ▶ v současné době se rozvíjí jako „plant-made pharmaceuticals (PMPs)“ = „farming“, molekulární farming nebo biofarming

Protilátky



- Bílkoviny produkované imunitním systémem obratlovců
- specificky se vážou na antigen, což umožňuje aplikace v diagnostice, prevenci a léčbě lidských a zvířecích nemocí (rakovina, infekční nemoci, „odhojování“ (rejekce) transplantací...)
- Potřeba technik, které výkonné, ekonomicky výhodné a bezpečné
- Většinou v mikrobiálních nebo savčích bioreaktorových systémech



Savčí buněčné kultury

- Rozdíly mezi strukturou protilátek z hlodavců a lidí (vaječné buňky křečků vs. lidské jaterní buněčné kultury)
- Vysoké počáteční i udržovací náklady
- Limitované možnosti pro produkci velkého množství
- Možná kontaminace lidskými patogeny

- Bakteriální fermentační systémy: ekonomicky výhodnější, ale problémy se správným skládáním (folding) proteinů

- ALE: jsou dobře charakterizované a zavedené, proto vyhovují náročným regulacím v biofarmaceutickém průmyslu



Další systémy pro tvorbu protilátek

- ▶ Kvasinky a vláknité houby – výhody bakterií, ale nevyhovující protilátky
- ▶ Hmyzí buňky – stejný způsob kultivace jako savčí, správné struktury
- ▶ Z mléka transgenních živočichů – obavy z přenosu patogenů nebo onkogenních DNA sekvencí
- ▶ Ze slepičích vajíček – bohaté na proteiny, obsahují protilátky, ale zatím málo prozkoumáno

- ▶ **Rostliny** – nízké náklady (využití zemědělských technik bez nutné odbornosti pracovníků), možnost vysoké produkce a minimální rizika spojená s kontaminací



Rostliny a tvorba protilátek

- ▶ Obecné základy stavby a tvorby proteinů stejné ve všech eukaryotech
- ▶ Posttranslační modifikace jsou velmi podobné
- ▶ Minimální rozdíly ve struktuře (zbytky alpha-1,3-fucosy a beta-1,2-xylosy), které mohou způsobit imunologickou odpověď v lidech, ale ne v myších – ale už umíme odstranit



Rostliny a tvorba profilátek

Key features of plant antibodies in a nutshell

Renewable – light, water and soil

Easy – we know how to grow plants

Scalable – 1 plant → billions of plants

Cheap – growing plants is inexpensive

Global – we grow plants on the entire planet

Diverse – many different species, tissues, and products

Feasible – the knowledge and technology are available today

Rapid – from gene to product in a few weeks with transient systems

Intrinsically safe – animal and human pathogens do not infect plant cells



Edgue, G., Twyman, R. M., Beiss, V., Fischer, R. and Sack, M. (2017), [Antibodies from plants for bionanomaterials](#). WIREs Nanomed Nanobiotechnol, 9: n/a, e1462. doi:10.1002/wnan.1462

Rostliny a tvorba profilátek

Produkce v listech

- velká biomasa a možná znemožnění kvetení (zabránění šíření transgenního pylu)
- Problém se stabilitou ve vodním prostředí
- Např. tabák (*Nicotiana tabacum* L.), vojtěška (*Medicago sativa* L.)

Produkce v semenech

- Dlouhodobé skladování
- Jednodušší zpracování (jednoduchý proteom, nepřítomnost fenolických látek)
- Nižší výtěžky (biomasa listů vs. biomasa semen)
- Problémy s legislativou (transport GMO semen je regulován, musely by se nejdříve rozdrtit – ztrácí se výhoda dlouhodobého skladování)
- Např. kukuřice, ječmen, sója, brambory, rajčata

Rostliny a tvorba protilátek

Transformace chloroplastového genomu

Výhody:

- Velké množství chloroplastů vs. jedno jádro (větší množství přenesených transgenů v buňce)
- Není riziko epigenetických problémů
- Exprese více proteinů z jediného transkriptu (díky původu chloroplastů z bakterií)
- Chloroplasty nejsou obsaženy v pylu, takže se omezuje možný přenos do dalších rostlin křížením

Nevýhody:

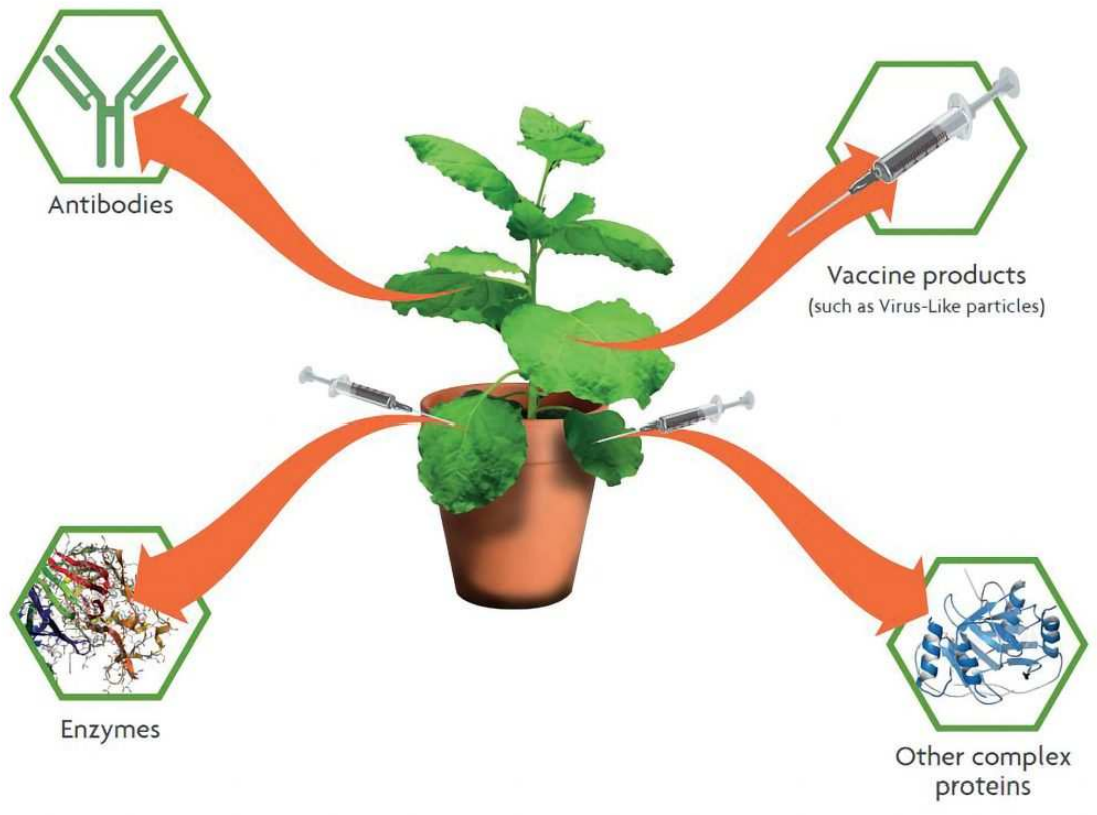
- Obtížnější transformace chloroplastů
- Chybí posttranslační modifikace

Další systémy tvorby protilátek v rostlinách

- Kultivace jednotlivých orgánů
- Suspenzní buněčné kultury
- Rhizosekrece, phyllosekrece
- Hairy roots
- Kultury jednobuněčných rostlin a vodních rostlin – např. řasy, mechy, okřehek (*Lemna* spp.)

Transientní exprese

Transientní transfekce



- nevkládá se cizorodý gen do celé rostliny, jen do nereproduktivních pletiv
- agroinfiltrace, biolisticky
- rychlejší než tvorba transgenních rostlin
- produkt během několika dnů, jednoduché převedení do většího měřítka
- 2006 první vakcína z rostlin proti nemoci drůbeže (USA, ekonomicky neúspěšné)
- firma Medicago (Kanada) – vakcína proti COVID-19 v listech *Nicotiana benthamiana* (tvorba virus-like particles), schváleno v Kanadě březen 2022



<http://www.plantadvanced.com/home>

➤ 1. „PAT Plant milking“ - získávání sekundárních metabolitů z kořenových exudátů:

- Rostliny pěstované aeroponicky
- Zvýšení tvorby sek. met. pomocí elicitorů (útok → obrana zvýšením tvorby exudátů)
- až 8 cyklů ročně
- Např. látky při léčbě osteoporózy, Alzheimerera, proti-rakovinové

➤ 2. „PAT Friday“ – GMO rostliny se sekrety, např. masožravé

- Do DNA rostlin vložena informace pro tvorbu terapeutického proteinu v sekretu
- Zisk proteinu nedestruktivně
- Např. *Nepenthes*, *Drosera*



<https://labiotech.eu/for-anti-ageing-creams-to-alzheimers-this-biotech-milks-tropical-plants/>

Produkce vakcín a proteinů

- ▶ transgenní rostliny → produkce antigenů patogenů
→ po požití imunizace živočichů (resp. člověka)
- ▶ úspěšně testováno na myších i lidech
- ▶ plodiny využitelné jako **jedlé vakcíny** =
ovoce a zelenina (poživatelná bez tepelné úpravy, cílem
jsou brambory, banány, rajčata)





Produkce vakcín a proteinů

vakcíny proti:

- ▶ virovým a bakteriálním původcům průjemových onemocnění
- ▶ HIV
- ▶ vzteklině
- **hepatitida B** 2015 - Američané zveřejnili, že začínají klinické zkoušky s GM bramborami navozujícími u konzumentů odolnost proti hepatitidě B

lékařsky důležité proteiny:

- ▶ růstové hormony
- ▶ inzulín
- ▶ krevní náhrady
- ▶ inhibitory trypsinu


Edgue, G., Twyman, R. M., Beiss, V., Fischer, R. and Sack, M. (2017), Antibodies from plants for bionanomaterials. WIREs Nanomed Nanobiotechnol, 9: n/a, e1462. doi:10.1002/wnan.1462

Molecular farming	Therapy and passive immunization	CEA,[56, 57] Human immunodeficiency virus,[58-60] Rabies virus,[61-63] <i>Streptococcus mutans</i> ,[64, 65] Ebola virus,[66] HSV,[67] ferritin,[68] interleukins,[69] EGFR,[70] CD40,[71] anthrax toxin,[72] <i>Salmonella enterica</i> lipopolysaccharide,[73] and EpCAM[74, 75]
	Active immunization	B-cell lymphoma,[76, 77] and tetanus toxin[78]
	Diagnosis and research	Rhesus D antigen,[79] MAK33,[80, 81] and hCG[82]
	Bionanomaterials	Antibody-ELP fusions,[83-85] and tandibodies[86]
	Affinity sorbent	Hepatitis B virus surface antigen[87, 88]

CEA, carcinoembryonic antigen; HSV, Herpes simplex virus; EGFR, epidermal growth factor receptor; EpCAM, Epithelial cell adhesion molecule; MAK33, human creatine kinase-MM; hCG, human chorionic gonadotropin; ELP, elastin-like-peptide.



Sekundární metabolity *v in vitro*



Využití tkáňových a buněčných kultur pro produkci sekundárních metabolitů

množení rostlin - nahrazuje úbytek z přírodních lokalit

produkce sekundárních metabolitů *in vitro*

kalusy
buněčné suspenze
kultury orgánů

výhody:

1. řízené prostředí bez klimatických vlivů
2. absence mikroorganismů a škůdců
3. možnost selekce produktivních linií
4. automatizace (bioreaktory) - definovaná kvalita, pokles výrobní ceny, kontinuální produkce

Obecná metodologie biotechnologických postupů pro produkci SM (ZENK 1978)

plané nebo pěstované rostliny

vysoce produktivní rostliny

primární kalus

stabilní produktivní klony

optimální podmínky

masová kultura v bioreaktorech

výběr

iniciace kultury

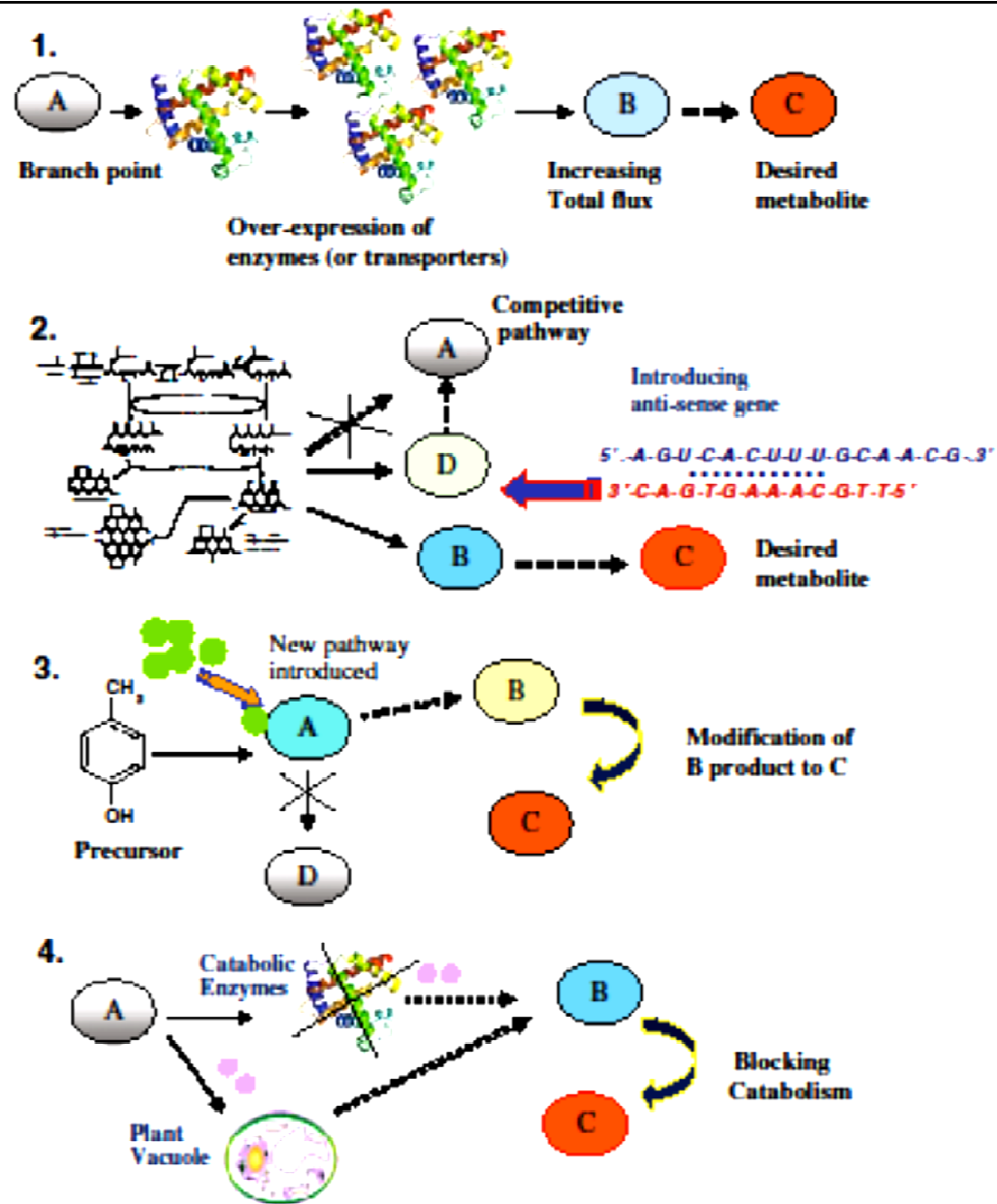
selekce klonů

optimalizace kultury

zvětšení objemu

Strategie metabolického inženýrství

1. nadprodukce enzymů nebo transportérů
2. eliminace kompetitivní dráhy nebo anti-sense technologie
3. přidání enzymů nové dráhy
4. blokace aktivity katabolických enzymů nebo přesun metabolitů do vakuoly





„Anti-sense“ inaktivace

Romer et al., 2002

metabolické inženýrství = brambor bohatý na zeaxanthin

„antisense“ inaktivace a kosuprese epoxidace karotenoidů

„sense“ a „antisense“ konstrukty kódující zeaxanthin epoxidasu

vložené do genomu bramboru

inhibice konverze zeaxanthinu na violaxanthin

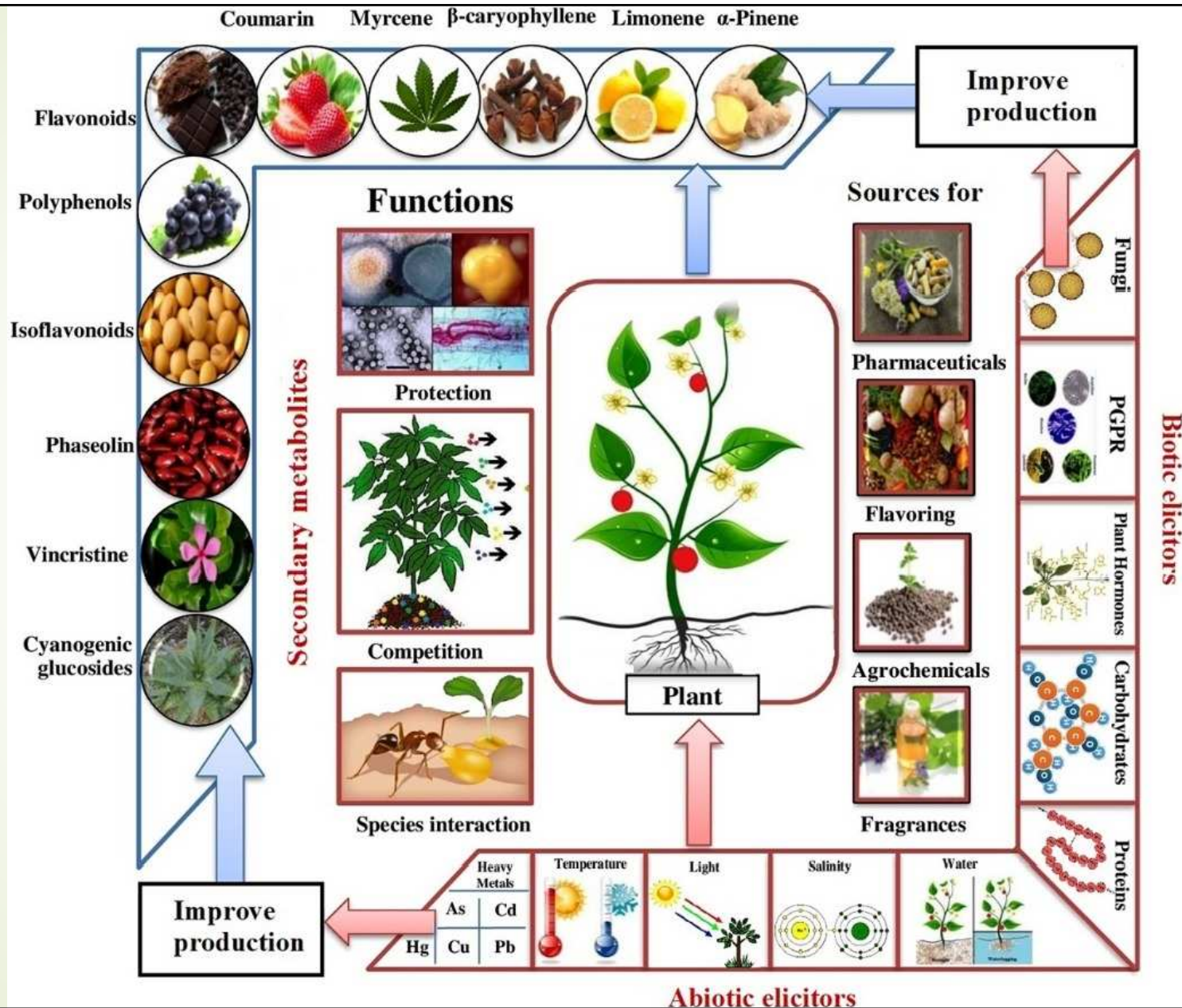
vyšší hladina zeaxanthinu



simultánní zvýšení celkového obsahu karotenoidů (až 5.7x)

Elicitace

Thakur et al. 2019:
Improving production of
plant secondary
metabolites through
biotic and abiotic
elicitation



Biokonverze

Kultury rostlinných buněk obsahují **enzymy**, které mohou **katalyzovat** velký počet reakcí.

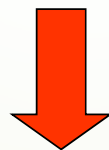
Výhodou aplikace rostlinných enzymů při biosyntéze je, že jsou tak produkovány **čisté stereochemické látky** (a ne směsi izomerů jako při chemické syntéze).

Biokonverze - postup, při kterém se používají buněčné kultury, kterým se přidá prekurzor a v průběhu kultivace dojde k jeho přeměně na žádaný sekundární metabolit.
= levnější než biosyntéza SM od počátku



Nevýhody tkáňových a buněčných kultur pro produkci sekundárních metabolitů

1. nízká produkce SM x **vyšší náklady**
2. **absence SM v buněčných kulturách** (narození od mateřských rostlin nebyly SM u mnoha kalusových a buněčných kultur zjištěny. Produkce SM začíná až při tvorbě kořenů nebo prýtlů či při embryogenezi = **nutnost diferenciac pletiv**)



**produkce SM není zatím (až na výjimky)
komerčně úspěšná**

Důvody absence SM v buněčných kulturách

- ▶ **přesun prekurzorů** do primárního metabolismu
- ▶ **suprese nebo redukce exprese klíčových enzymů biosyntézy**
- ▶ **absence diferenciacce** = nedostatek vhodných skladovacích míst, jako jsou sekreční buňky, dutiny nebo váčky, latexová pletiva nebo žláznaté trichomy - vyskytující se pouze v diferencovaných pletivech

Sibiřský žen-šen - mikropropagace pomocí SE

Eleutherococcus senticosus

(= *Acanthopanax senticosus*, *Araliaceae*)



35g

↓ 40 dnů

576g

1/3MS

Vinca rosea, barvínek z Madagaskaru



vincristin a vinblastin
antikancerogeny



kalusové linie *Vinca rosea*
variabilita mezi liniemi



Development of efficient *Catharanthus roseus* regeneration and transformation system using *Agrobacterium tumefaciens* and hypocotyls as explants – Wang et al. 2012

To develop a genetic transformation method for *C. roseus*, *Agrobacterium tumefaciens* strain binary vector pCAMBIA2301 containing a report β -glucuronidase (**GUS**) gene and a selectable marker neomycin phosphotransferase II gene (**NTPII**). The influential factors were investigated systematically and the optimal transformation condition was achieved using hypocotyls as explants, including the sonication treatment of 10 min with 80 W, *A. tumefaciens* infection of 30 min and co-cultivation of 2 d in 1/2 MS medium containing 100 μ M acetosyringone. With a series of selection in callus, shoot and root inducing kanamycin-containing resistance media, we successfully obtained **stable transgenic regeneration plants**. The expression of *GUS* gene was confirmed by histochemistry, polymerase chain reaction, and genomic southern blot analysis. To prove the efficiency of the established genetic transformation system, the rate-limiting gene in TIAs biosynthetic pathway, *DAT*, which encodes deacetylvindoline-4-O-acetyltransferase, was transferred into *C. roseus* using this established system and 9 independent transgenic plants were obtained. The results of metabolite analysis using high performance liquid chromatography (HPLC) showed that **overexpression of DAT increased the yield of vindoline in transgenic plants**.

SM produkované buněčnými nebo orgánovými kulturami

alkaloid	ajmalicin	antihypertensivum zlepšení cirkulace v mozku	<i>Catharanthus roseus</i>
alkaloid	berberin	antimikrobiální	<i>Coptis japonica</i>
seskviterpen	artemisinin	antimalarikum	<i>Artemisia annua</i>
diterpen	taxol	cytostatikum	<i>Taxus brevifolia</i>
alkaloid	codeine, morphine		<i>Papaver somniferum</i>
alkaloid	atropin scopolamine		<i>Atropa bella-donna</i>
glykosid	digoxin digitoxin	kardiotonikum	<i>Digitalis lanata</i>



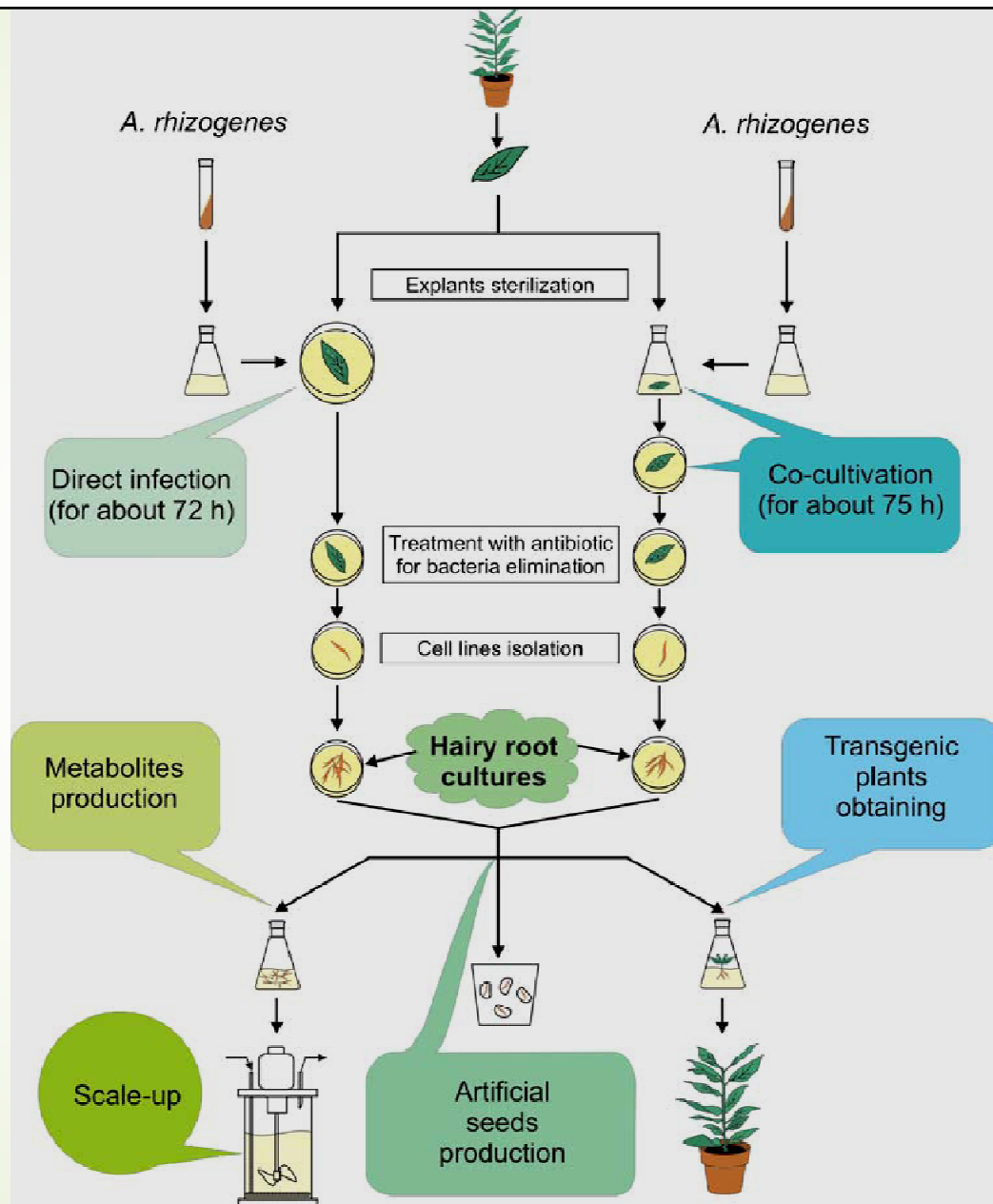
Využití transgenozy pro tvorbu SM

při produkci SM v kořenech rostlin
indukce tvorby kořínků pomocí *Agrobacterium rhizogenes*
Nicotiana rustica, Datura stramonium

pro zvýšení produkce prýtlů - vnášení genu *ipt* nebo pro auxiny
z *Agrobacterium tumefaciens*
Mentha

Indukce kultur kořenů a jejich aplikace

Georgiev et al. 2007



Příklady metabolitů získaných z kultur transformovaných kořenů

ajmalicin	<i>Rauvolfia micrantha</i>	antihypertenzivum	Sudha et al. 2003
artemisinin	<i>Artemisia annua</i>	antimalarikum	Weathers et al. 2005
betalainy	<i>Beta vulgaris</i>	antioxidant, barvivo	Pavlov and Bley 2006
camptothecin	<i>Camptotheca acuminata</i>	antitumor	Lorence et al. 2004
rutin, hispidulin a syringin	<i>Saussurea involucrata</i>	protizánětlivý, fungicidní	Fu et al. 2006
scopolamin a hyoscyamin	<i>Datura innoxia</i>	anticholinergní	Dechaux and Boitel-Conti 2005
taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	antikancer	Huang et al. 1997
6-methoxy-podophyllotoxin	<i>Linum album;</i> <i>Linum persicum</i>	antikancer	Wink et al. 2005

Georgiev et al. 2007



LEAF SURFACE RESEARCH

- Produkce proteinů v trichomech listů tabáku
- Vývoj pesticidů z proteinu z povrchu listů



High Quality | Rapid | Scalable | Competitive



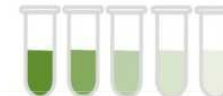
Plant uses the new instructions to make the target protein which starts building up inside leaf cells



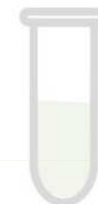
Leaves are harvested and blended into a liquid



Liquid containing the target protein is separated from solids



A series of purification techniques are used to purify the protein



Pure protein

Shrnutí

