



FACULTAT DE
FARMÀCIA

SEMINARIS DE RECERCA:

Cultivos celulares de *Taxus* spp., una eficaz herramienta biotecnológica para la producción de taxanos y para el desarrollo de estudios básicos sobre su biosíntesis.

Javier Palazón

Rosa M. Cusido

Elisabeth Moyano

Mercedes Bonfill.

*Laboratorio de Fisiología Vegetal.
Facultad de Farmacia y Ciencias de la
Alimentación*

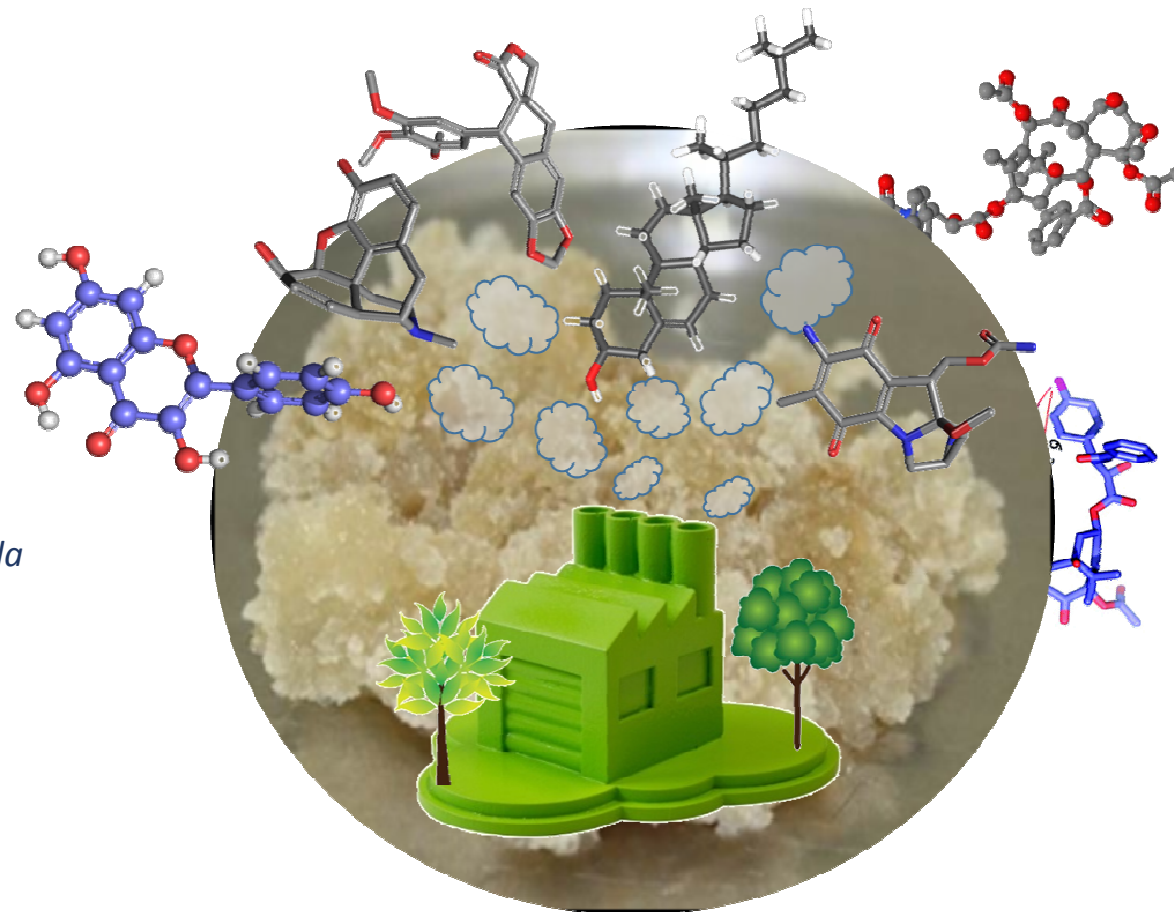


UNIVERSITAT DE
BARCELONA

*Departamento de Ciencias
Experimentales y de la Vida*

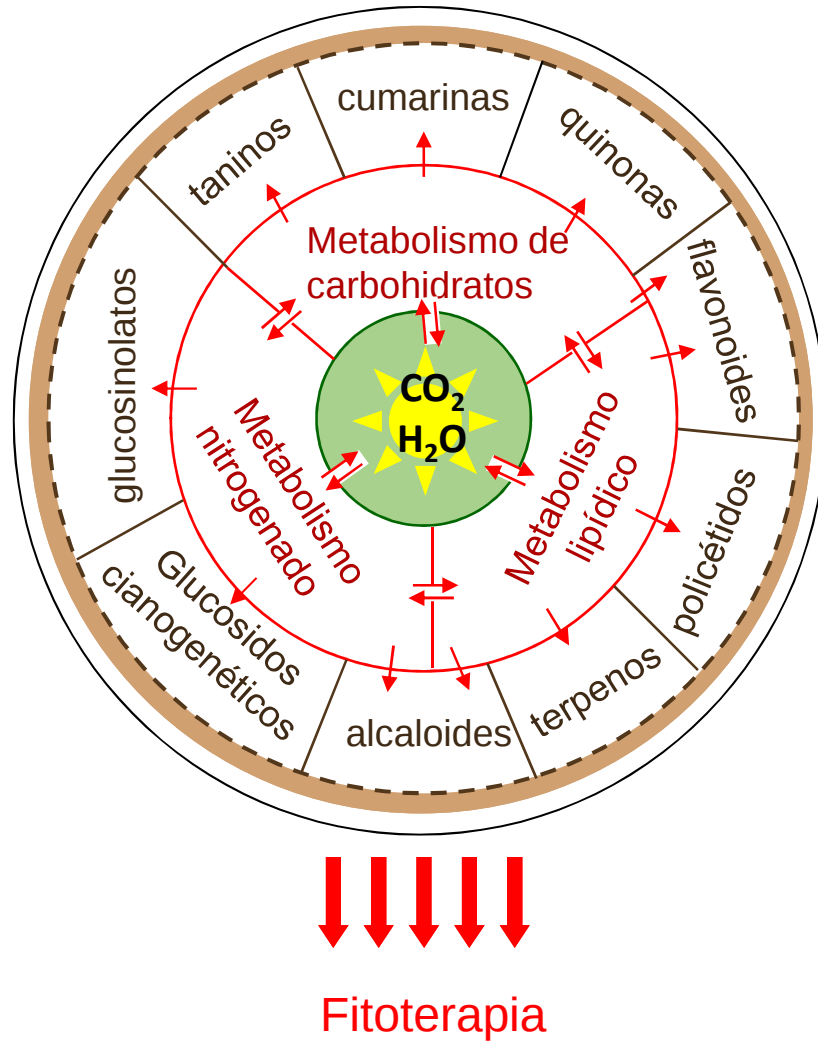


UNIVERSITAT
POMPEU FABRA

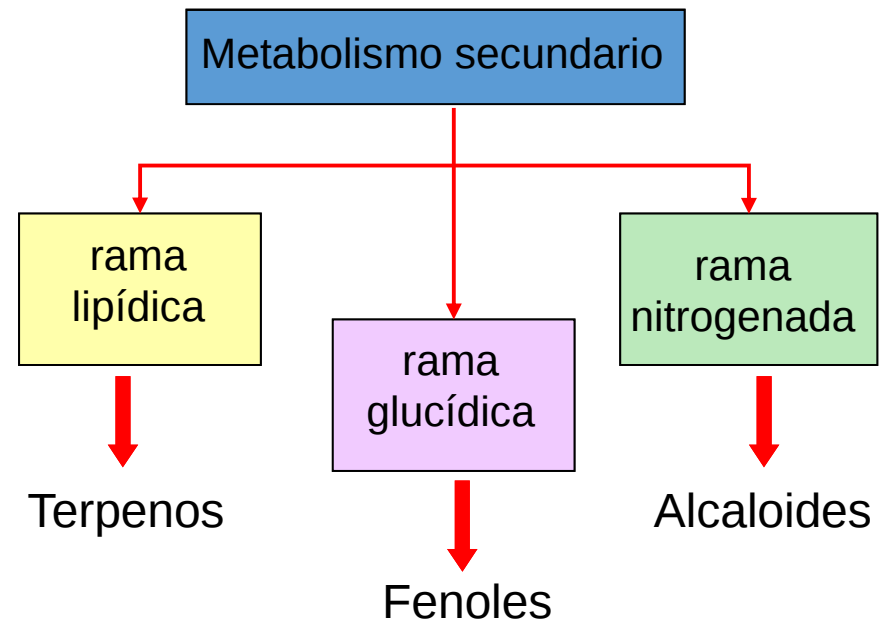


Biofactorias Vegetales

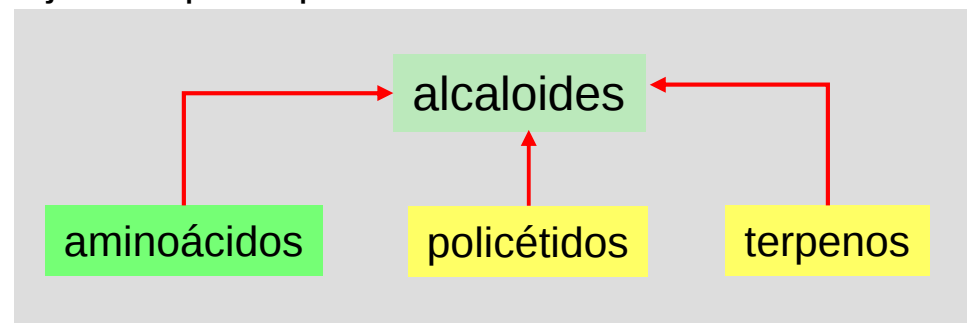
Metabolismo secundario vegetal:



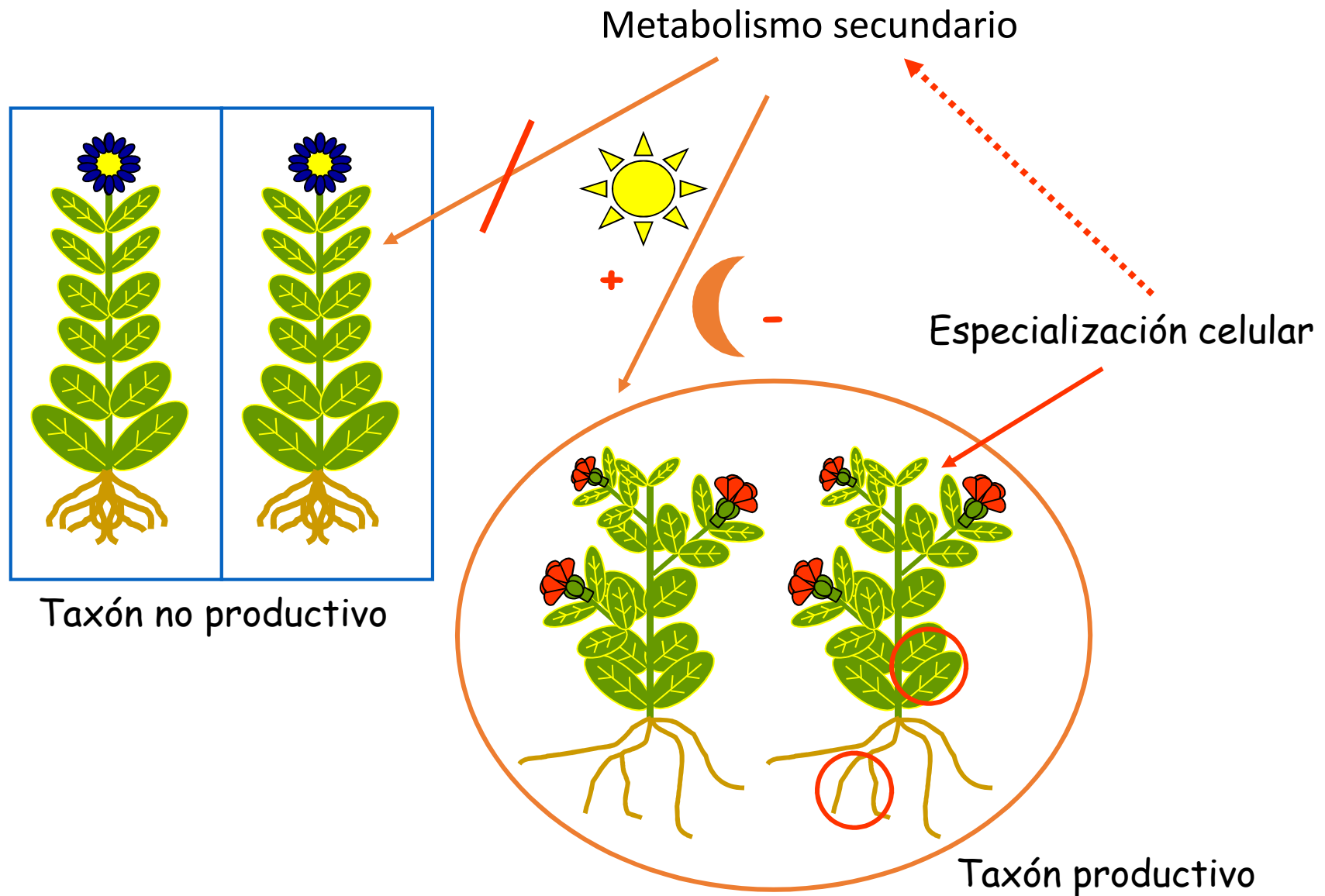
Clasificación biogenética:



Ej. de coparticipación:



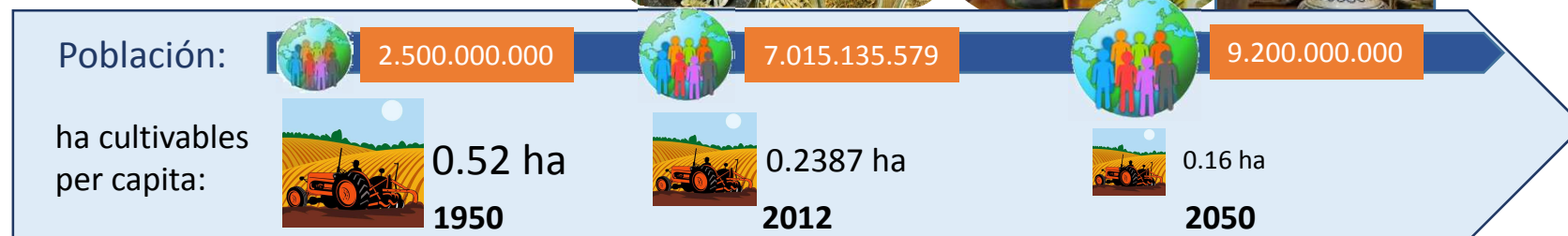
Metabolismo secundario vegetal:



Funciones de los metabolitos secundarios:



Usos de los productos naturales:



Desertización



Cultivos para biodiesel



¿Plantas medicinales y
aromáticas?

Problemas de las plantas medicinales:



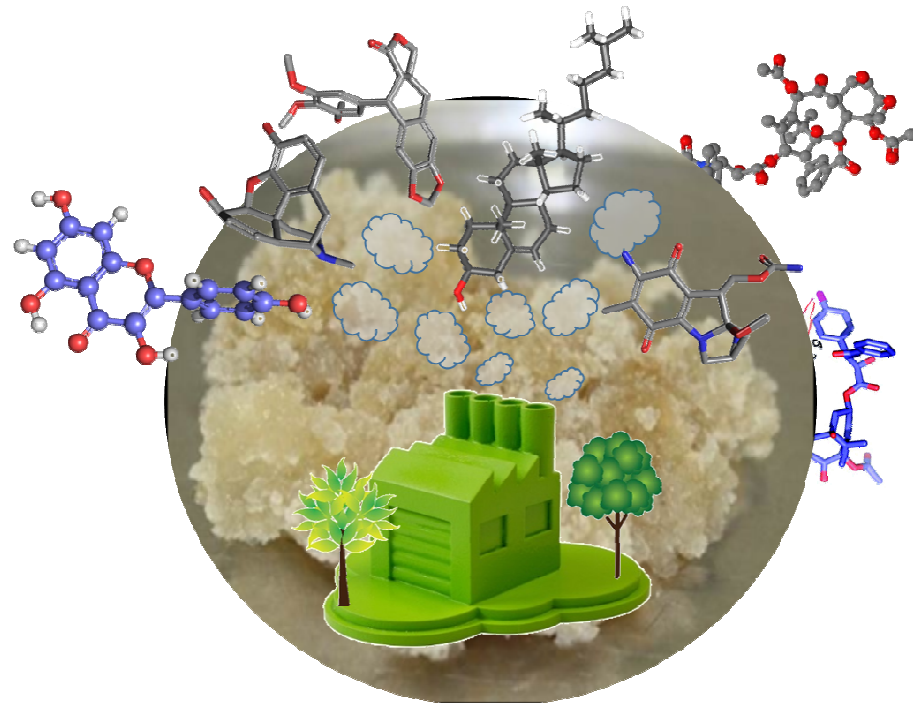
Sobreexplotación



Desertización



Cultivo agronómico



Biofactoría vegetal

Concepto de biofactorias vegetales:

Cultivos
indiferenciados:



Suspensiones
celulares



Células
inmovilizadas

Cultivos
Diferenciados:

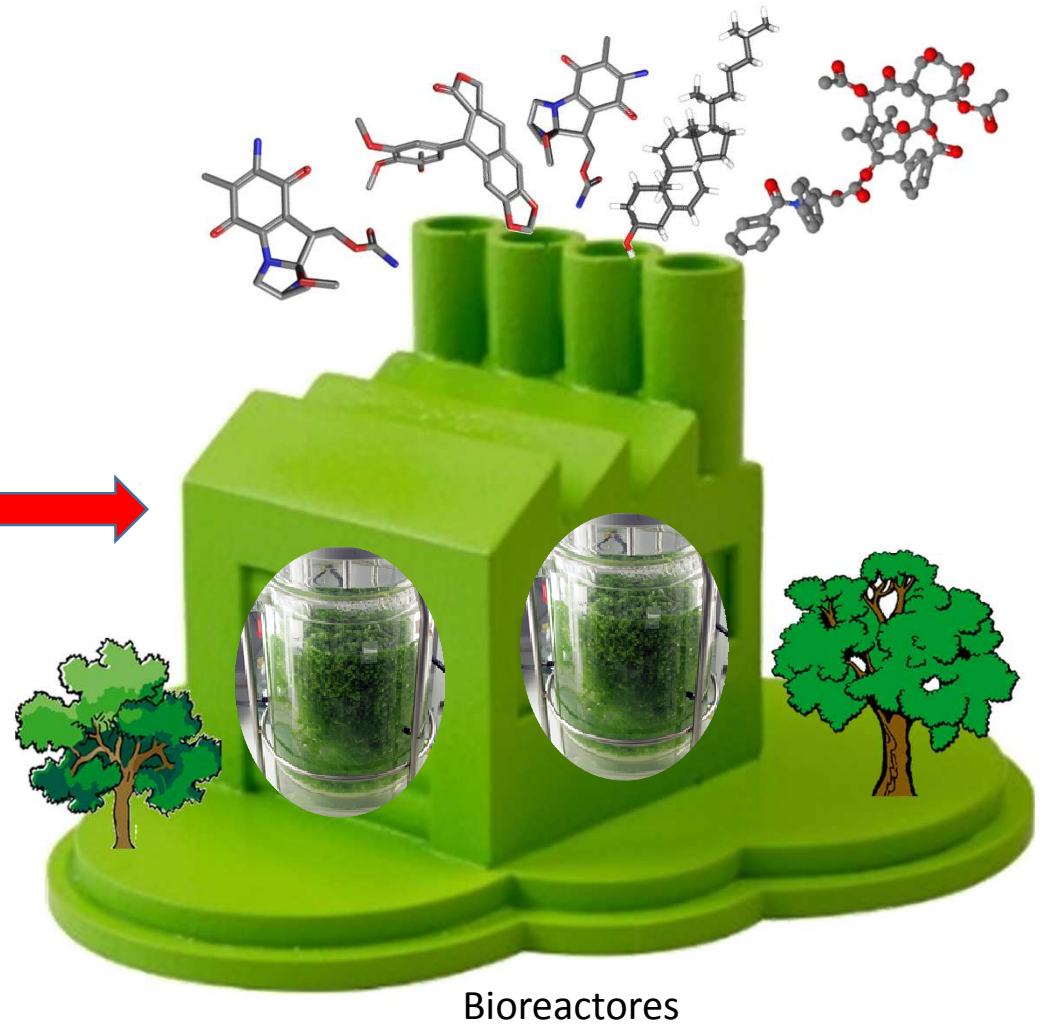


Raíces

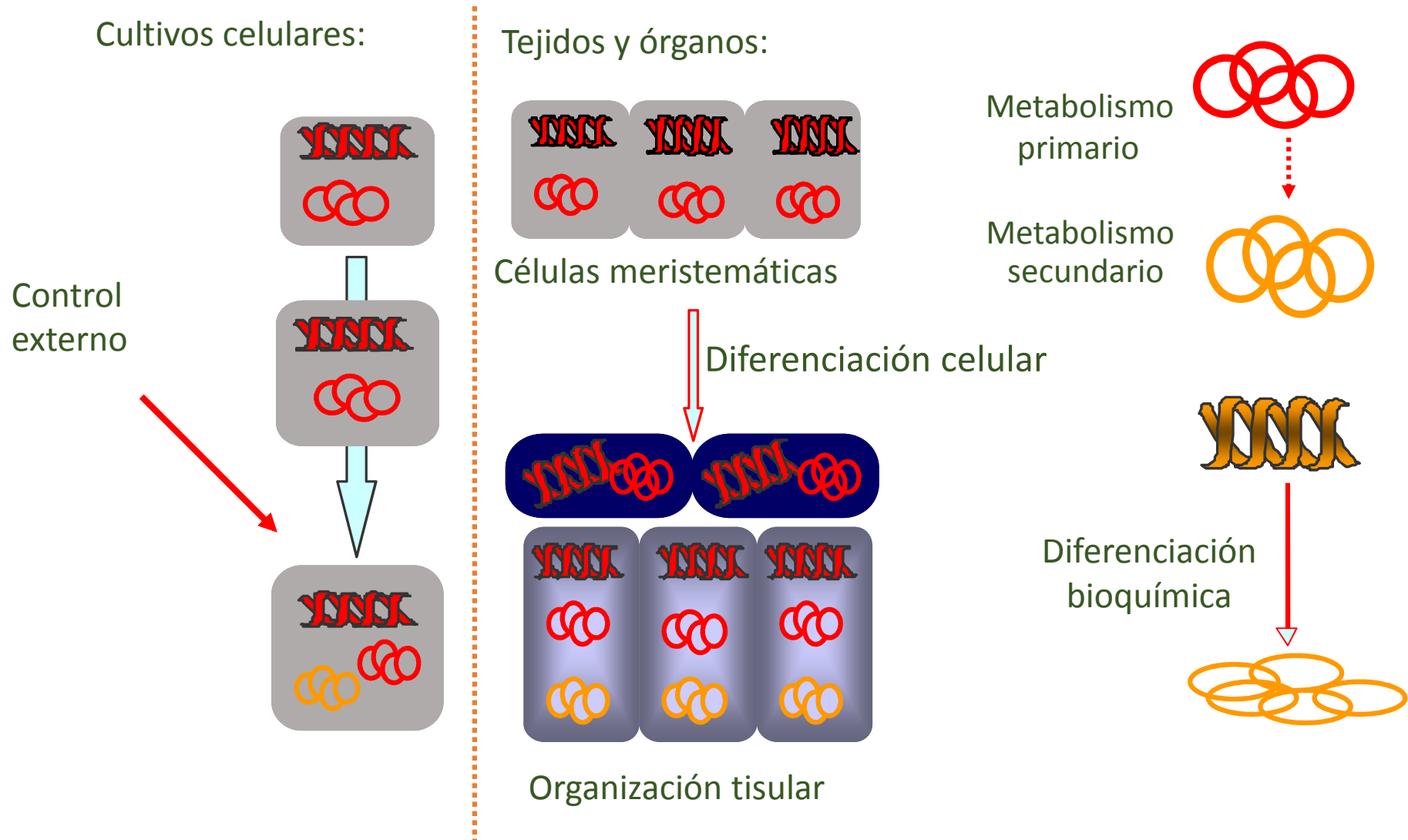


Brotes

Frascos agitados



Expresión del metabolismo secundario:



Concepto de biofactorias vegetales:

Cultivos
indiferenciados:



Suspensiones
celulares



Células
inmovilizadas

Cultivos
Diferenciados:

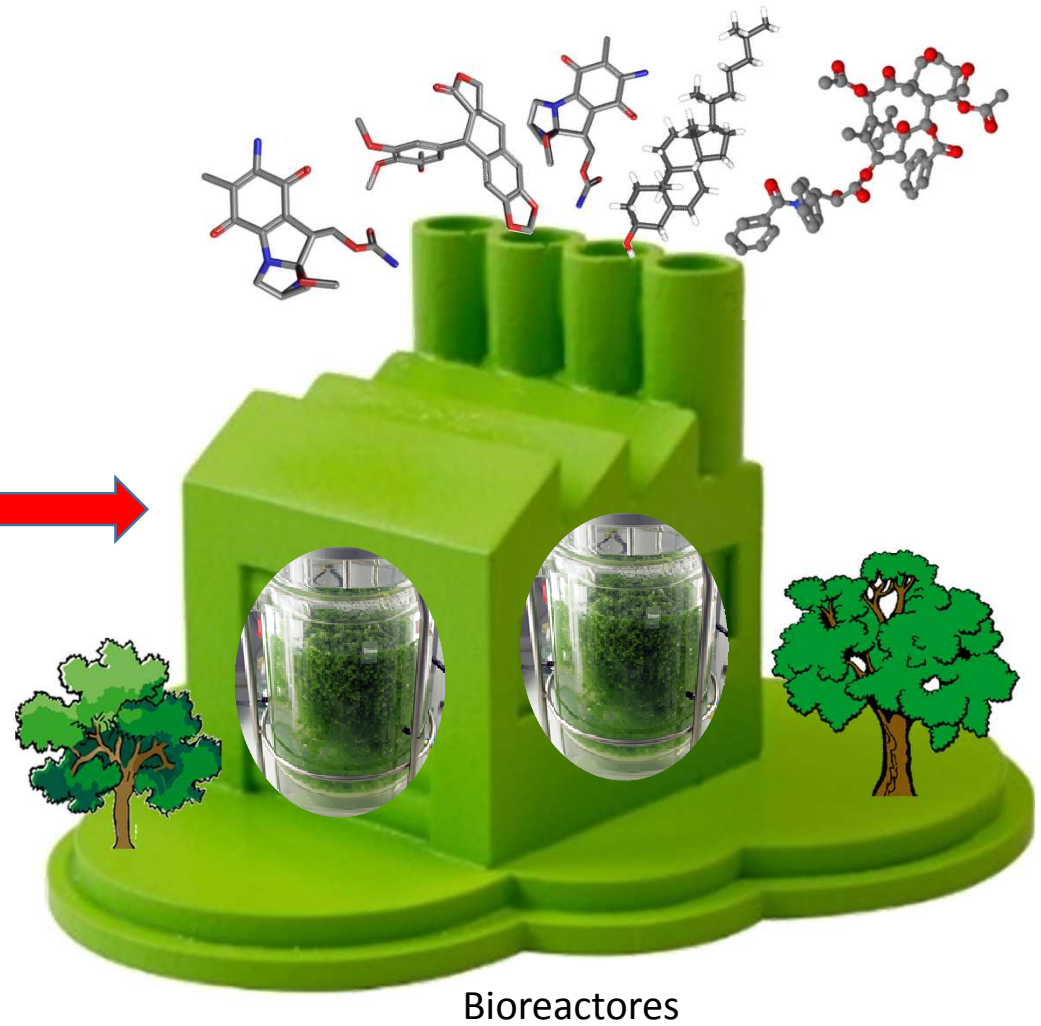


Raíces



Brotes

Frascos agitados





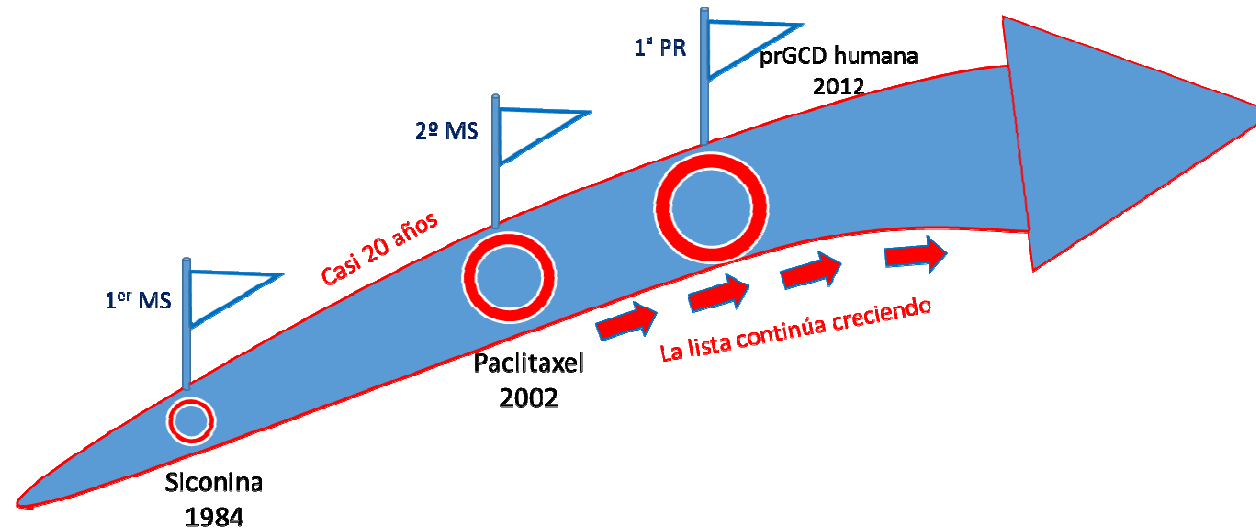
Ventajas biofactorias vegetales:

- Permiten la producción de compuestos bioactivos utilizando un menor número de plantas.
- Se evitan los problemas relacionados con el clima y geopolíticos.
- Potencian la conservación y disponibilidad de especies vegetales en riesgo de extinción para las generaciones venideras.
- Aseguran la no contaminación del material vegetal, ya los cultivos *in vitro* están libres de microorganismos, herbicidas, plaguicidas y fungicidas.
- Los sistemas agrícolas no son necesarios y el suelo se puede utilizar para la producción de alimentos.
- Conducen a una drástica reducción en el agua y del uso disolventes orgánicos pues se simplifican los procesos de extracción.
- Si se utilizan OGM no hay riesgo de dispersión de transgenes.



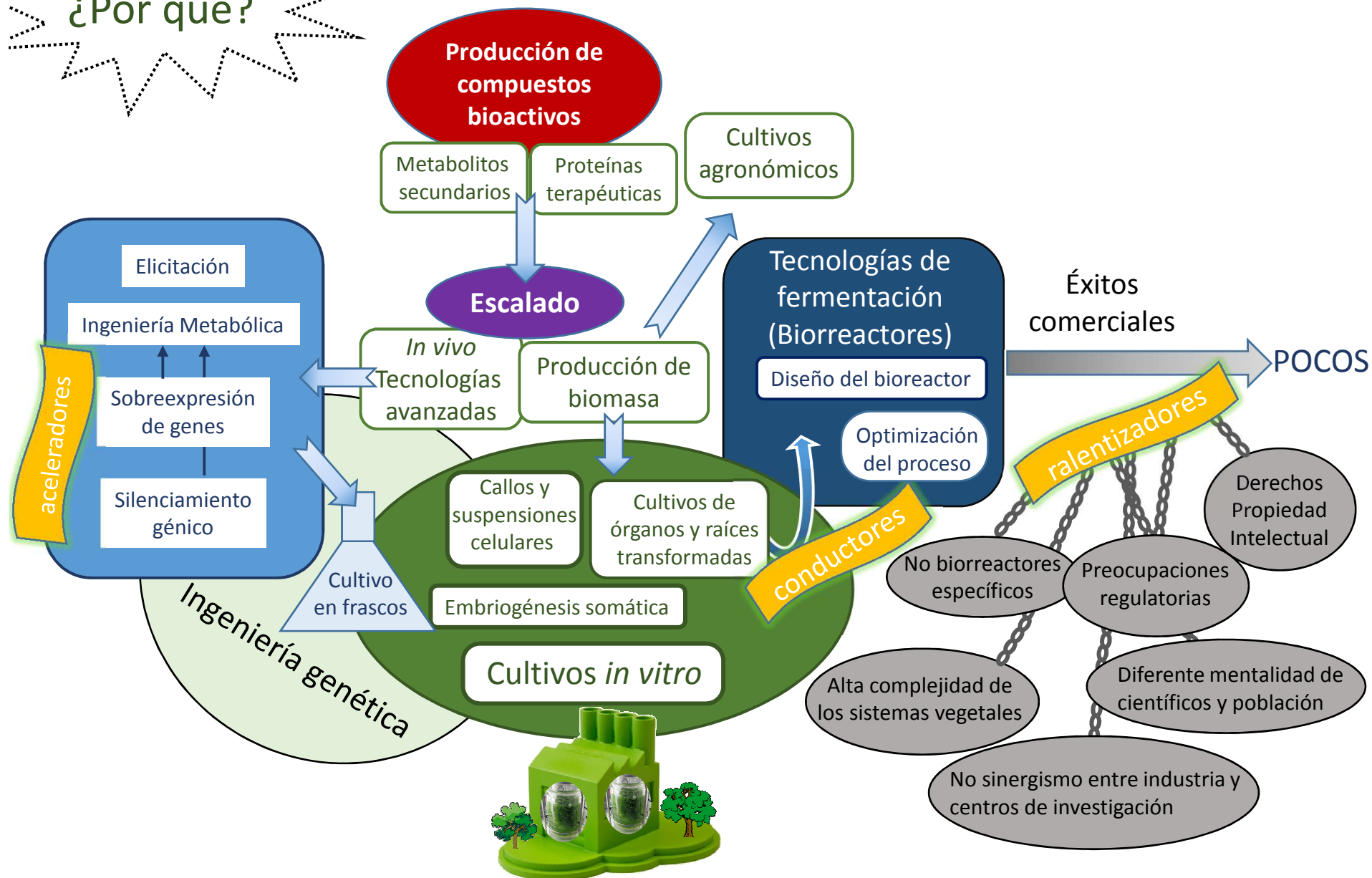
Procesos biosostenibles y ecológicos

Progresión de la producción de compuestos bioactivos en biofactorías vegetales



Sistema vegetal	Bioactivo	Productor
Proteínas recombinantes:		
<i>Daucus carota</i>	Elhelyso™ (glucocerebrosidasa)	Protalix (Israel)
<i>Oryza sativa</i>	Rh-lactoferrina	Invitria (USA)
	Rh-albumina	
	Rh-lisozima	
	Rh-transferrina	
Metabolitos secundarios:		
<i>Catharantus roseus</i>	Arbutina	Mitsui Chemicals, Inc. (Japón)
<i>Coptis japónica</i>	Berberina	Mitsui Chemicals, Inc. (Japón)
<i>Echinacea spp.</i>	Polisacaridos de equinacea	Diversa (Alemania)
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenósidos	Nitto Denko Corporation (Japón)
<i>Taxus spp.</i>	Paclitaxel	Phyton Biotech. Inc. (USA/Alemania); Genexol®-Samyang Genex (Korea)
<i>Podophyllum sp.</i>	Podofilotoxina	Nippon Oil (Japón)
<i>Coleus blumei</i>	Ácido rosmarínico	Natterman & Cie. Gmbh (Alemania)
<i>Duboisia spp.</i>	Escopolamina	Sumitomo Chemical Co. Ltd. (Japón)
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Siconina	Mitsui Chemicals, Inc. (Japón)

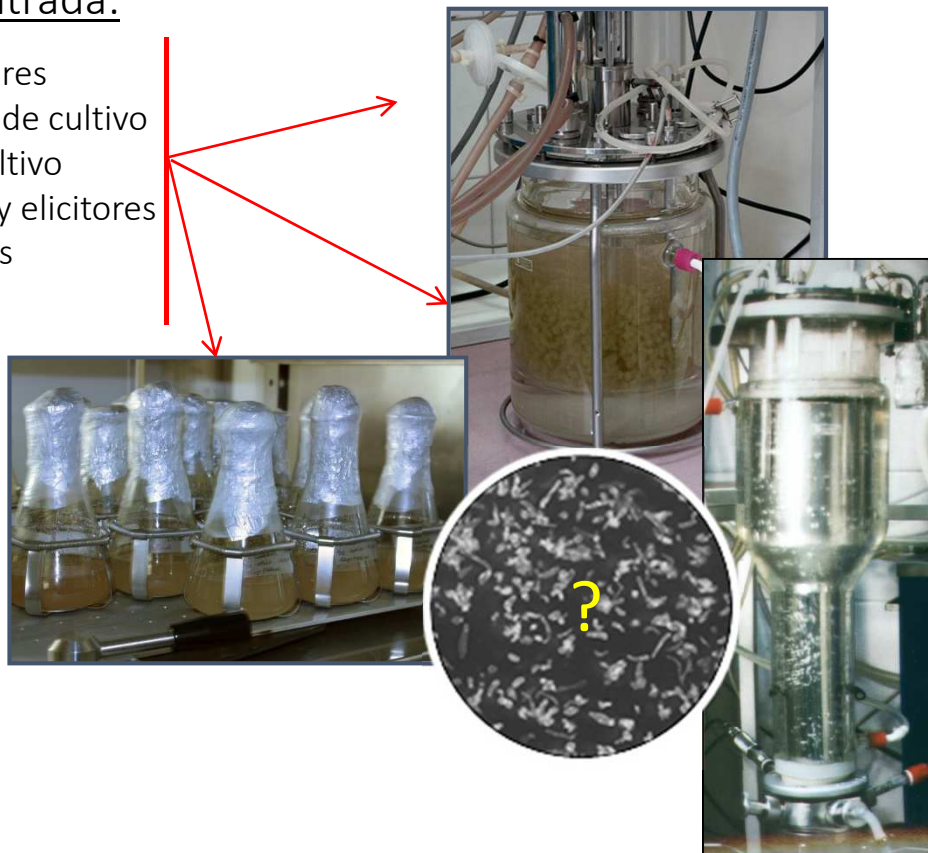
¿Por qué?



Optimización de la producción:

Factores de entrada:

- Líneas celulares
- Condiciones de cultivo
- Medio de cultivo
- Precusores y elicitores
- Biorreactores



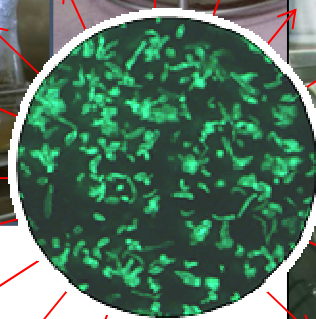
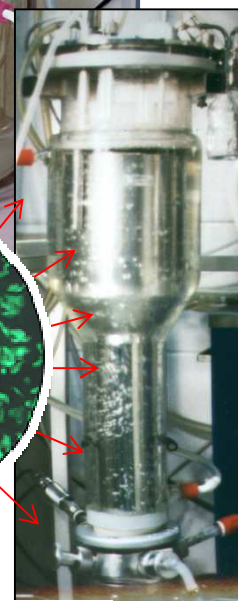
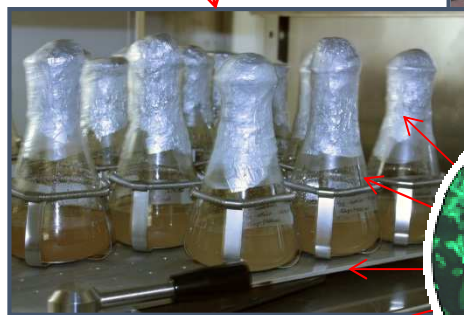
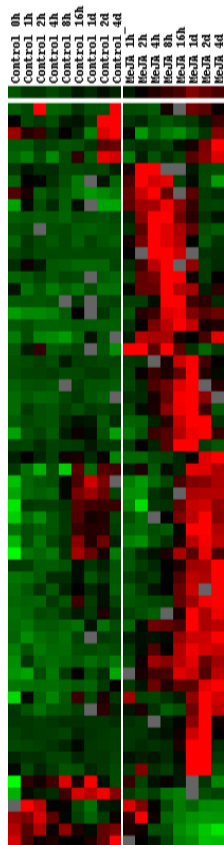
Factores de salida:

- Crecimiento
- Producción
- Rendimiento

Aproximaciones empíricas

Factores de entrada:

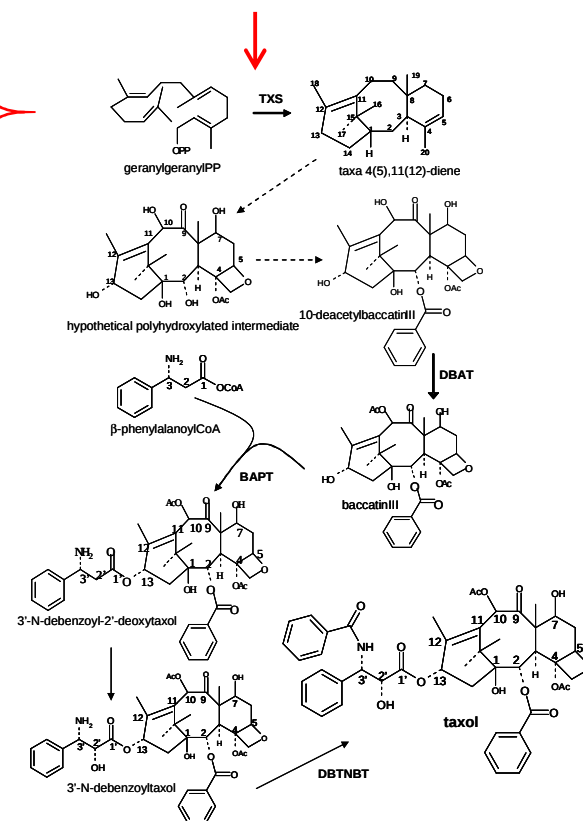
- Líneas celulares
- Condiciones de cultivo
- Medio de cultivo
- Precusores y elicitors
- Biorreactores



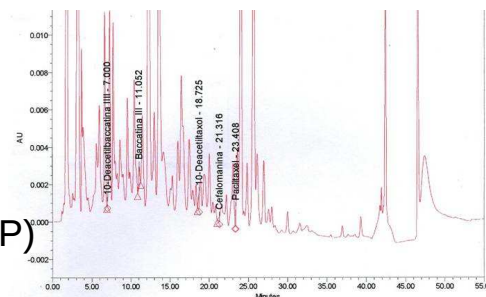
Aproximaciones racionales

Factores de salida:

- Crecimiento
- Producción
- Rendimiento
- Mayor conocimiento del metabolismo

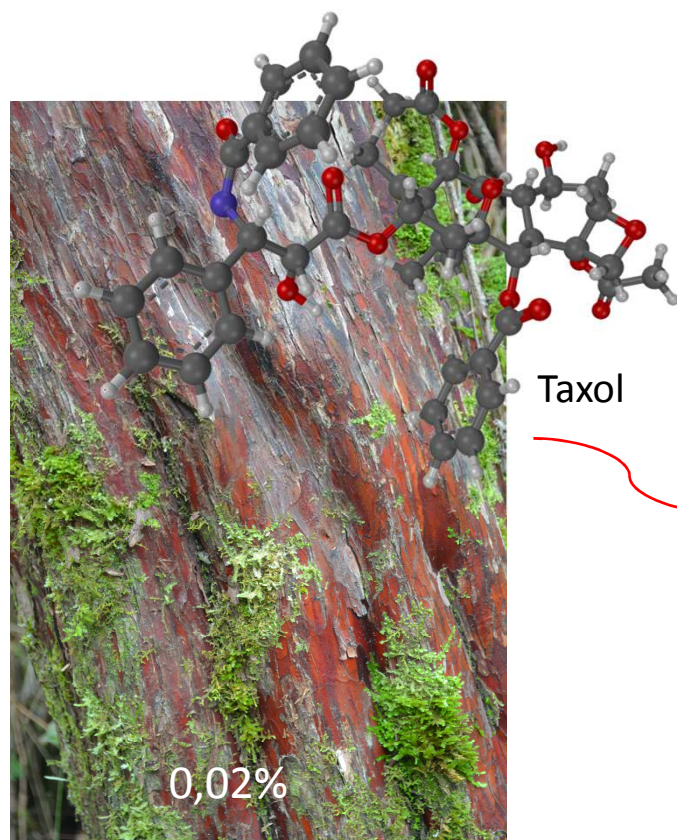


Perfiles transcriptómicos(cDNA-AFLP)
(Expresión génica)



Perfiles metabólicos (HPLC-MS)

Taxol y otros taxanos:

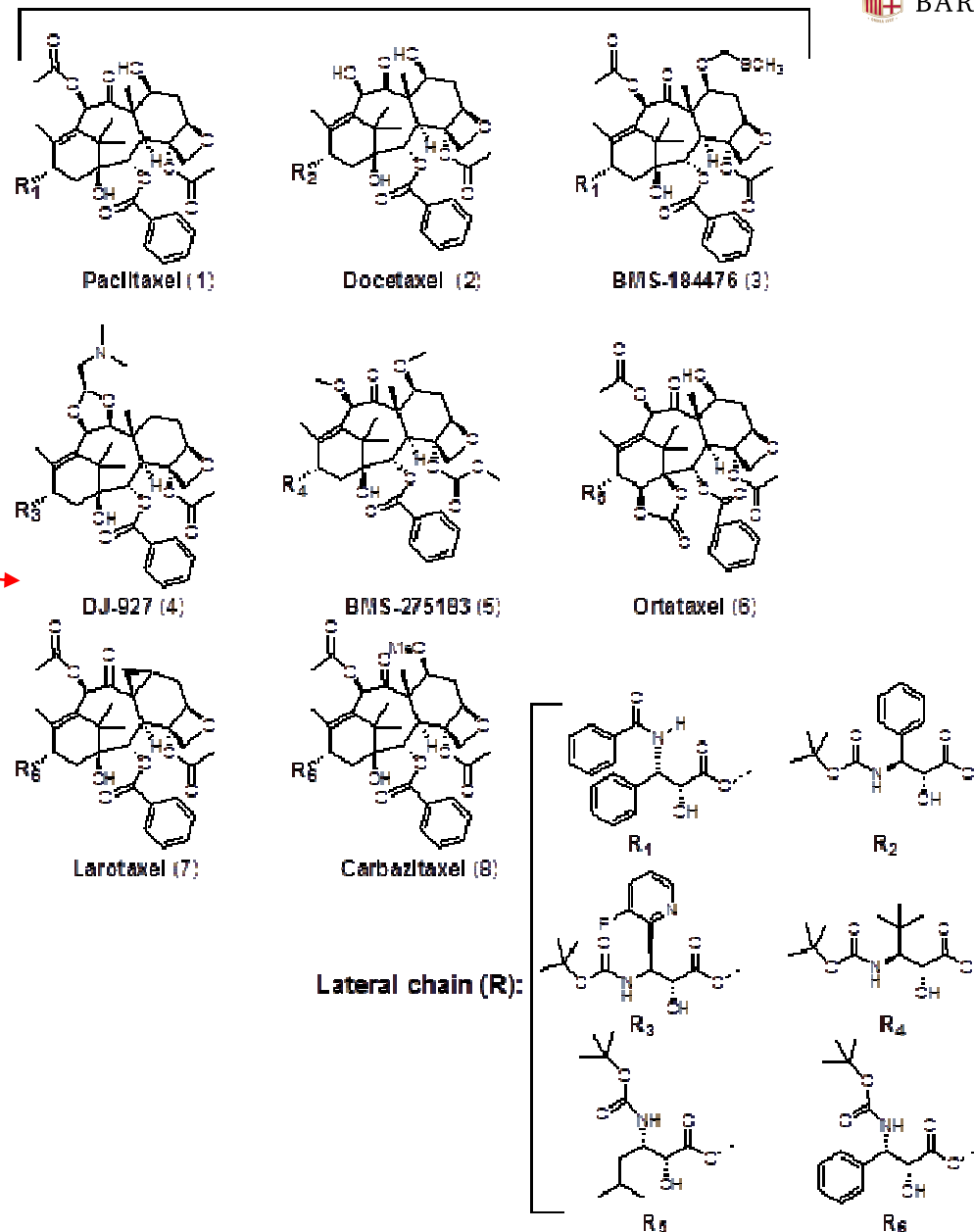


1992 FDA → tratamiento del cáncer

↓ Clasificación ATC
(Anatomical Therapeutic Chemical)

Taxol y análogos (L01CD)

Taxane core:



Estructura química del taxol y sus derivados semisintéticos

Fuentes de taxanos



Árbol centenario de *Taxus baccata*



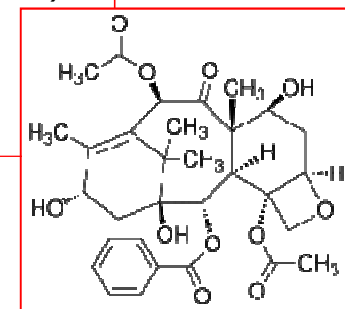
Producción biotecnológica:
Phyton, Cell Therapeutics, Abraxis
Corean Samyang Genex.....



Cultivos tradicionales
(plantaciones en Yunnan)



Semisíntesis



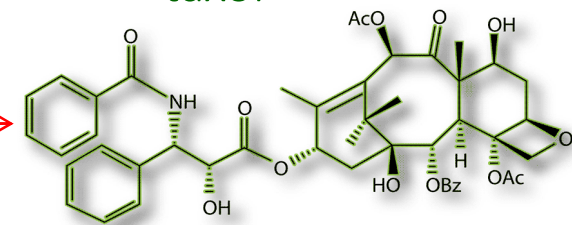
baccatina III
(precursor)



Síntesis química



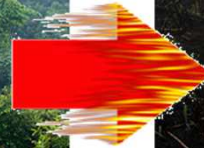
taxol



Coste ecológico del sistema:



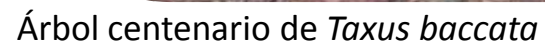
Parque natural de Da Huan (Yunnan)



Deforestación



Mujeres Miao trabajando en las plantaciones de *T. yunnanensis*



The chemical structure shows a complex polycyclic molecule, likely a steroid or terpenoid derivative. It features a central core with several fused and fused rings. Key functional groups include a hydroxyl group (OH) on the left, a carboxylic acid group (COOH) at the top, and a methyl group (CH₃) on the right. The structure is highly detailed, showing stereochemistry and various substituents.



Síntesis química



Nuestros estudios empíricos:

Optimizacion:

Selección de líneas
Medios de cultivo basales
Reguladores del crecimiento
Precusores
Elicitores



Taxus spp.

Especies utilizadas:

T. baccata

T. wallichiana

T. media

T. globosa



Suspensiones celulares



Cultivo en bioreactor

Tipos:

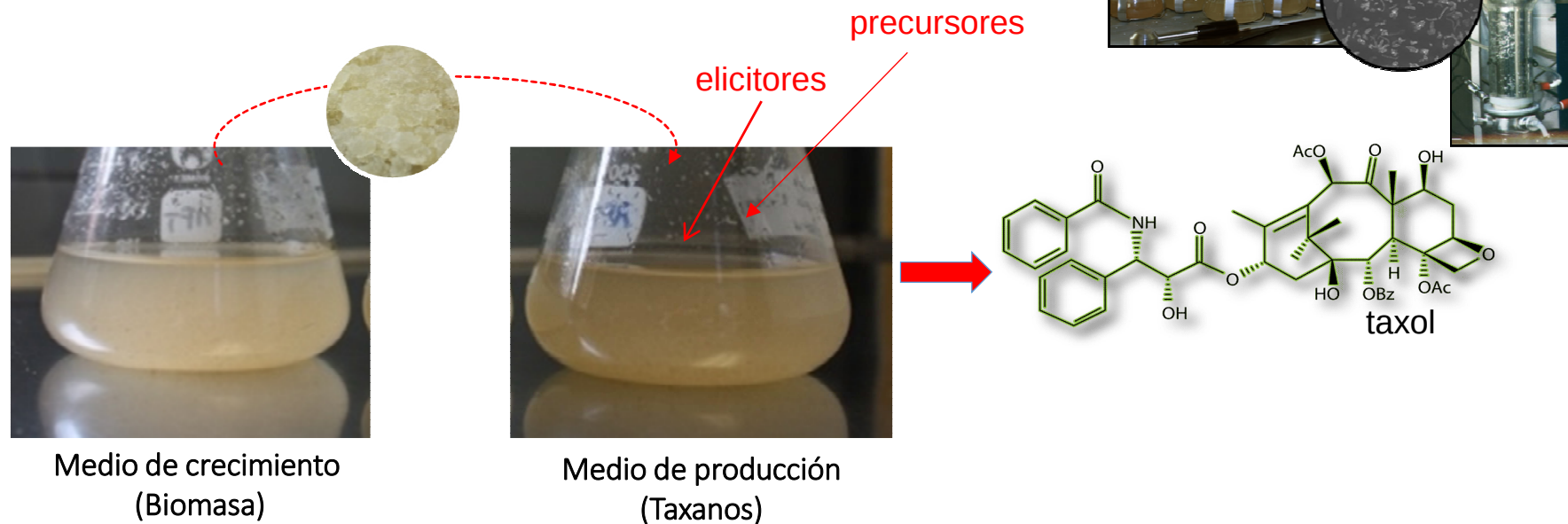
Columna de borboteo

Airlift

Agitación mecánica

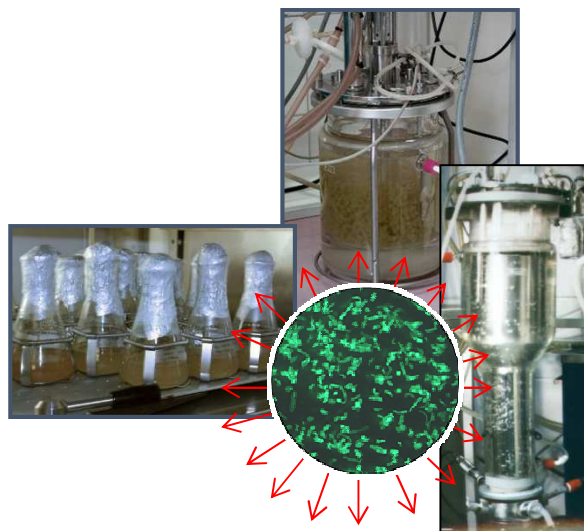
Aproximaciones de tipo empírico:

- Condiciones de cultivo
- Adición de precursores
- Adición de elicitores
- Escalado en biorreactores



Cultivo en dos fases

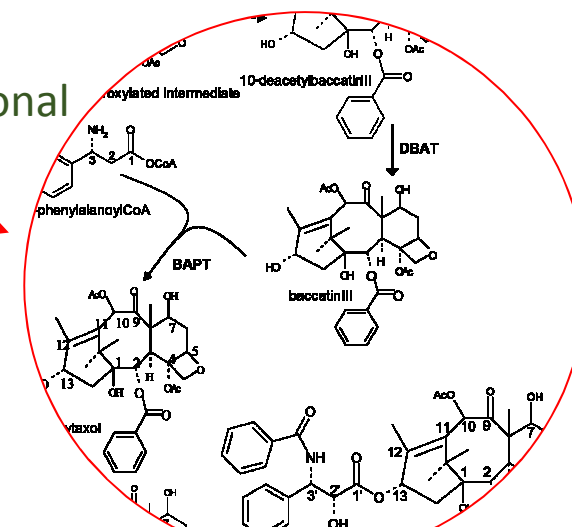
Nuestras referencias: Cusidó, R. et al., 1999, **Plant Sci.** 146: 101 -107; Fornalé, S. et al., 2002, **Plant Physiol.** 40:81-88; Navia-Osorio, A. et al., 2002, **J. Plant Physiol.** 159: 97-102; Navia-Osorio, A. et al., 2002, **Planta Med.** 68: 336-340; Cusidó, R.M. et al., 2002, **Biotech. Prog.** 18:418-423; Palazón, J. et al. 2003, **J. Biotech.** 101:157-163; Bonfill, M. et al. 2003, **Plant Physiol Biochem.** 41: 91-96; Bentebibel, S. et al., 2005, **Biotech. Bioeng.** 89-655; Cusidó, R.M. et al., 2007, **Biochem. Eng. J.** 33: 159-167 ; Bonfill, M. et al. 2007 **Biol. Plant.** 51: 647- 652; Expósito, O. et al., 2009, **New Biotech.** 25: 252-259; Exposito, O. et al., 2010, **Biotech. Progr.** 26:1145-1153; Onrubia, M., 2011, **Plant Sci.** 181: 282-287; Onrubia, M. et al., 2010, **Biochem. Eng. J.** 53:104-111; Onrubia M. et al. 2013, **J. Plant Physiol.** 170: 211- 219.



Aproximaciones de tipo racional

Conocimiento
biosíntesis

producción



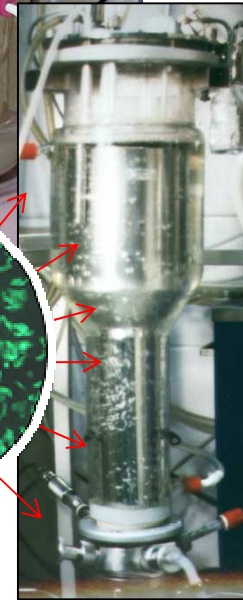
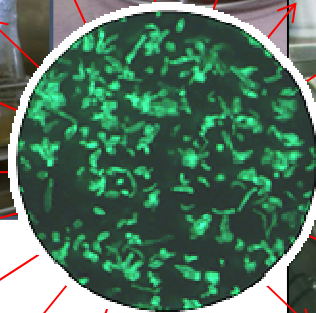
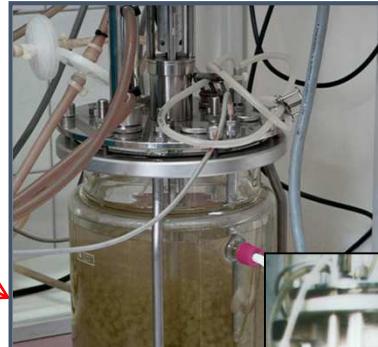
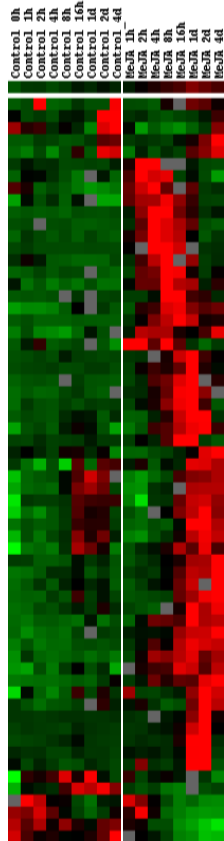
Especie	Elicitor	Incremento producción	Liberación MC	Referencia
<i>T. media</i>	MeJA	x10	45%	Onrubia et al. <i>J Plant Physiol</i> (2013) 170, 211–219
<i>T. baccata</i>	MeJA	x9	40%	Onrubia et al. <i>Plant Biotech J</i> (2014) 12, 971–983
<i>T. media</i>	CORO	x20	52%	Onrubia et al. <i>J Plant Physiol</i> (2013) 170, 211–219
<i>T. media</i>	CD	x6	90%	Sabater-Jara et al. <i>Plant Biotech J</i> (2014) 12, 1075–1084
<i>T. media</i>	MeJA+CD	x83	90%	Sabater-Jara et al. <i>Plant Biotech J</i> (2014) 12, 1075–1084
<i>T. media</i>	CORO+CD	x18	90%	Ramírez-Estrada et al. <i>Phytochemistry</i> (2015) 117, 174–184
<i>T. globosa</i>	CORO+CD	x40	100%	Ramírez-Estrada et al. <i>Phytochemistry</i> (2015) 117, 174–184

MeJA: jasmonato de metilo, CORO: Coronatina; CD: β -metilciclodextrina

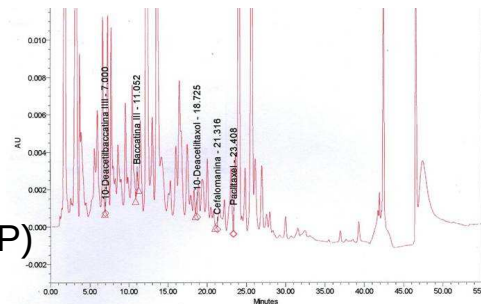
Vidal-Limón et al. 2016 *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*, Reference Series in Phytochemistry. Springer

Factores de entrada:

- Líneas celulares
- Condiciones de cultivo
- Medio de cultivo
- Precusores y elicitores
- Biorreactores

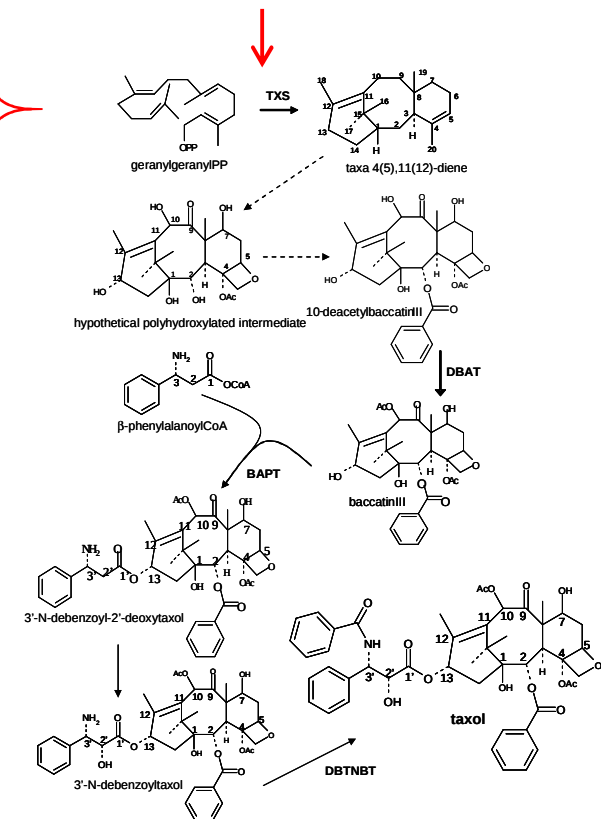


← Aproximaciones racionales →



Factores de salida:

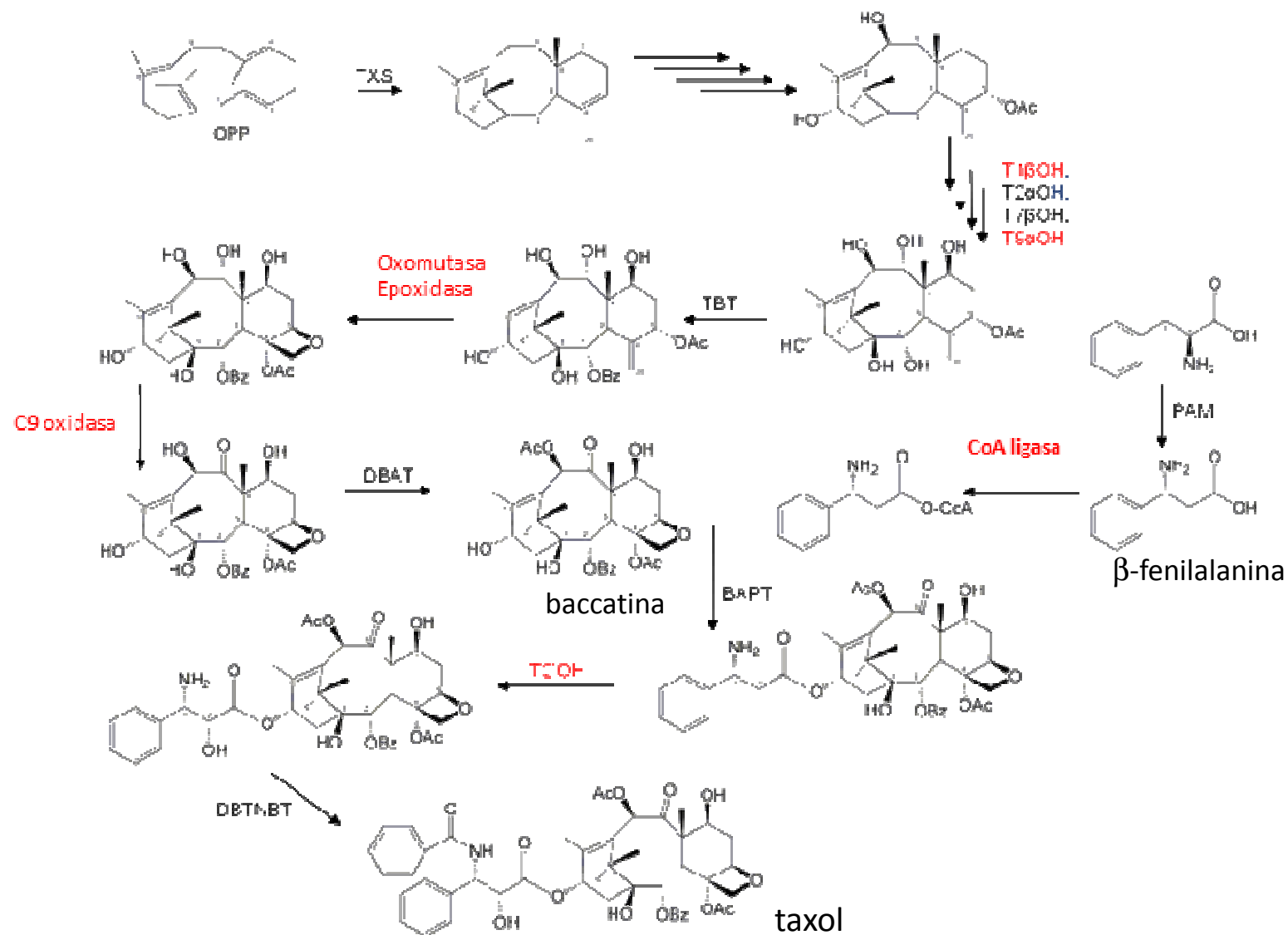
- Crecimiento
- Producción
- Rendimiento
- Mayor conocimiento del metabolismo



Perfiles transcriptómicos(cDNA-AFLP)
(Expresión génica)

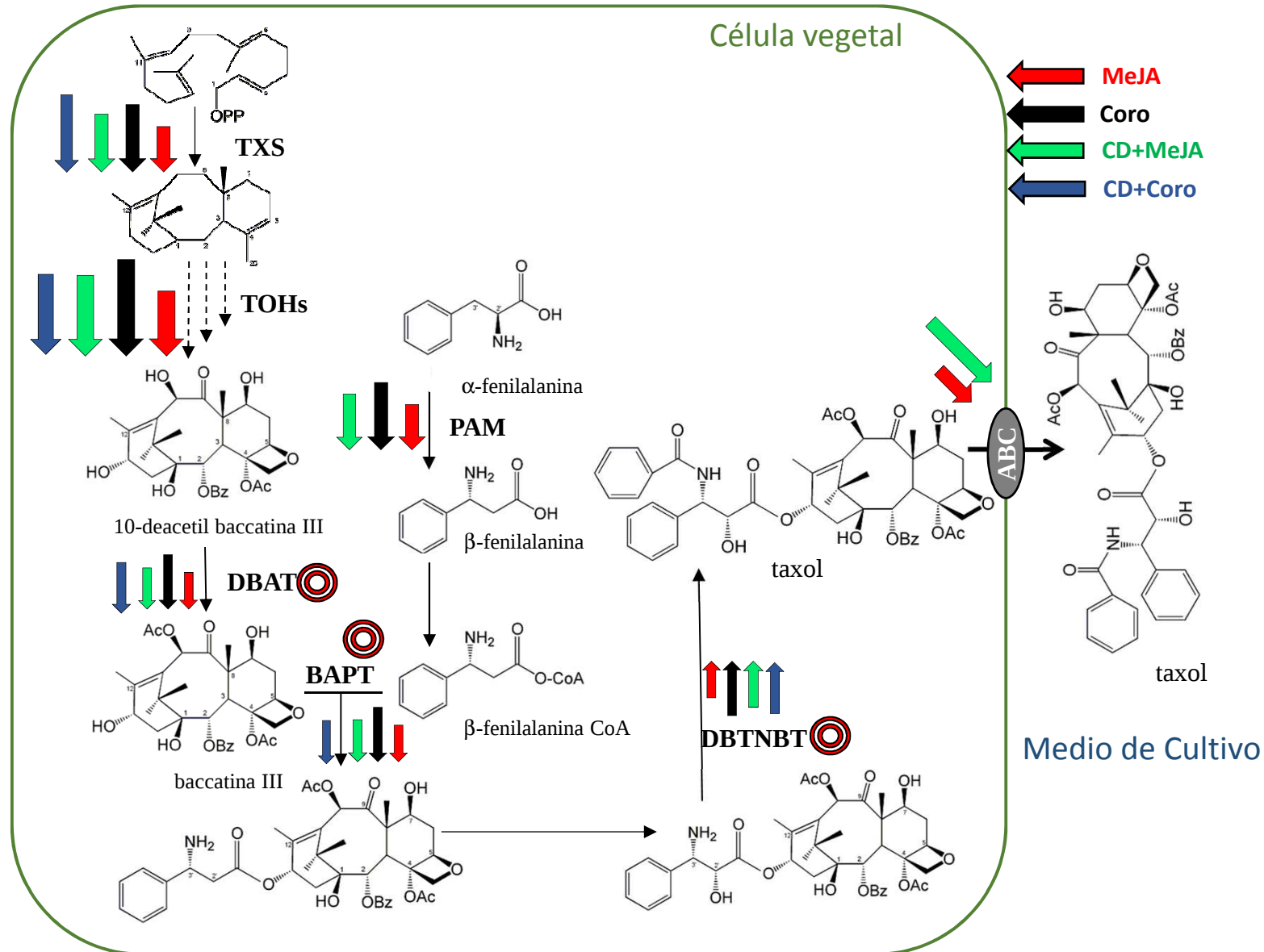
Perfiles metabólicos (HPLC-MS)

Biosíntesis de taxanos:

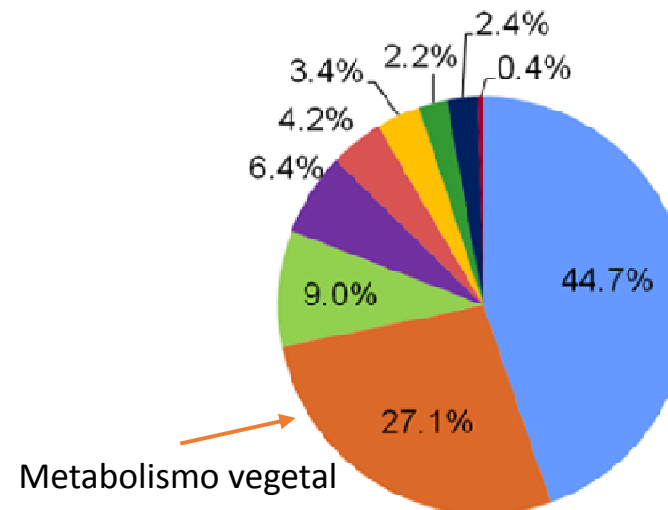
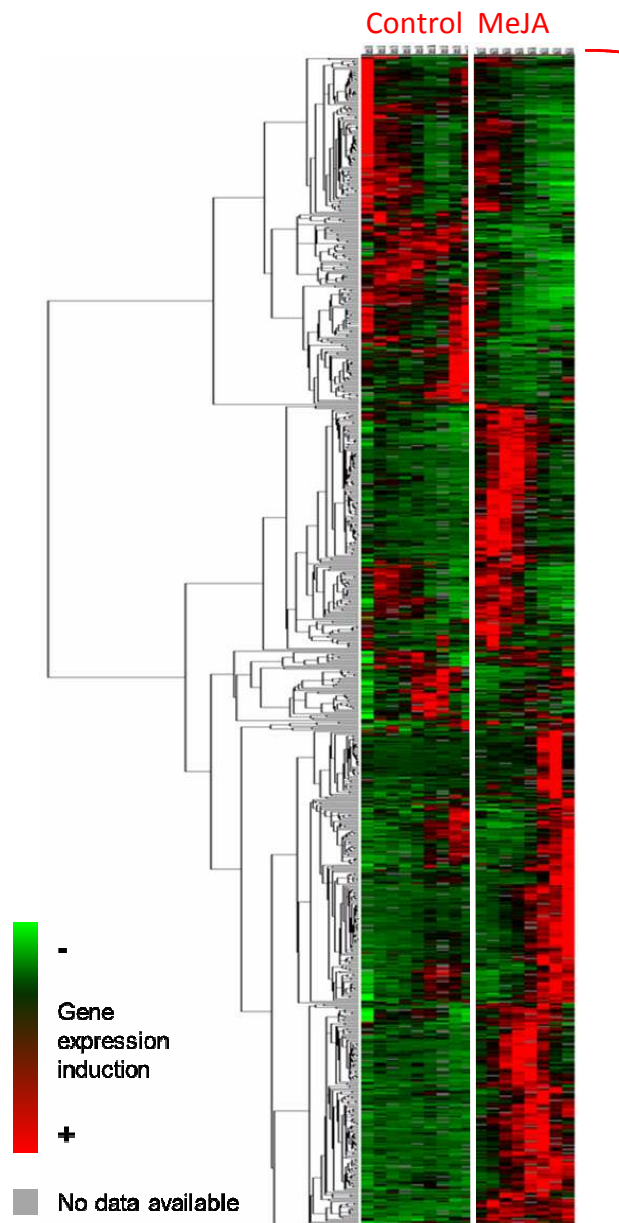


En rojo: Pasos no caracterizados hasta el momento

Efecto de la elicitación sobre el nivel de expresión génica:



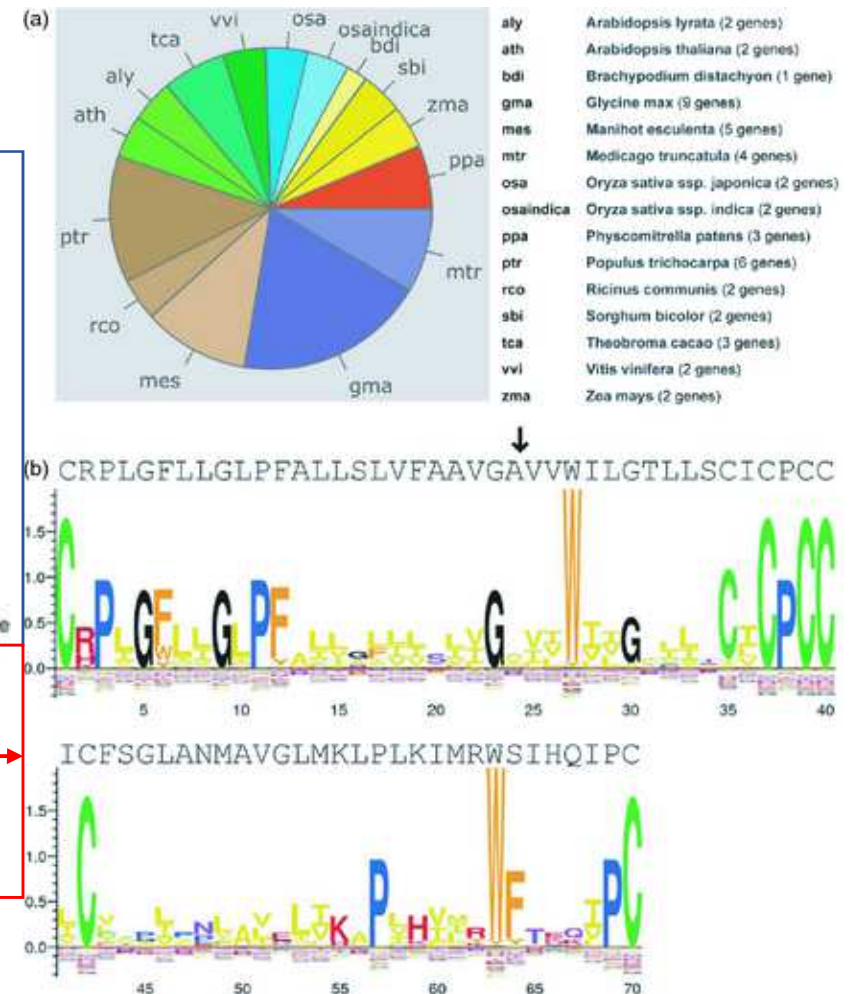
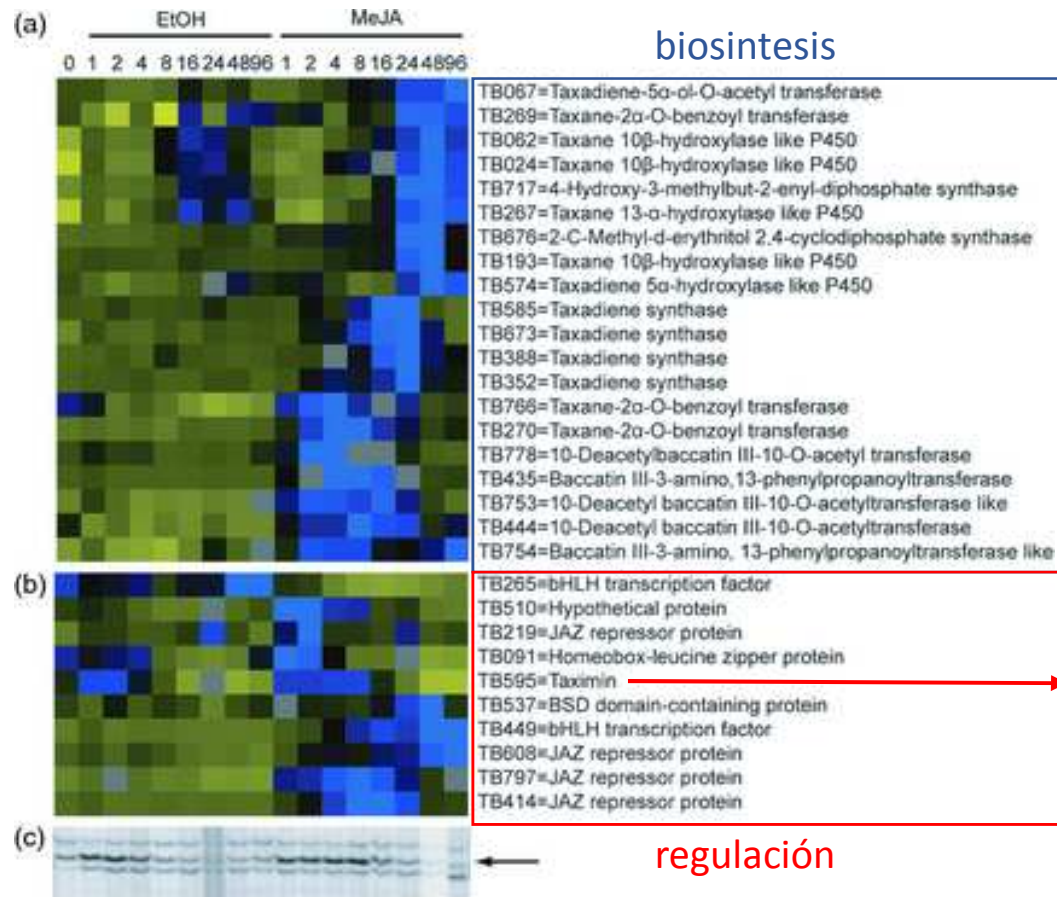
Aproximaciones ómicas: Estudio del transcriptoma de *Taxus* por cDNA-AFLP



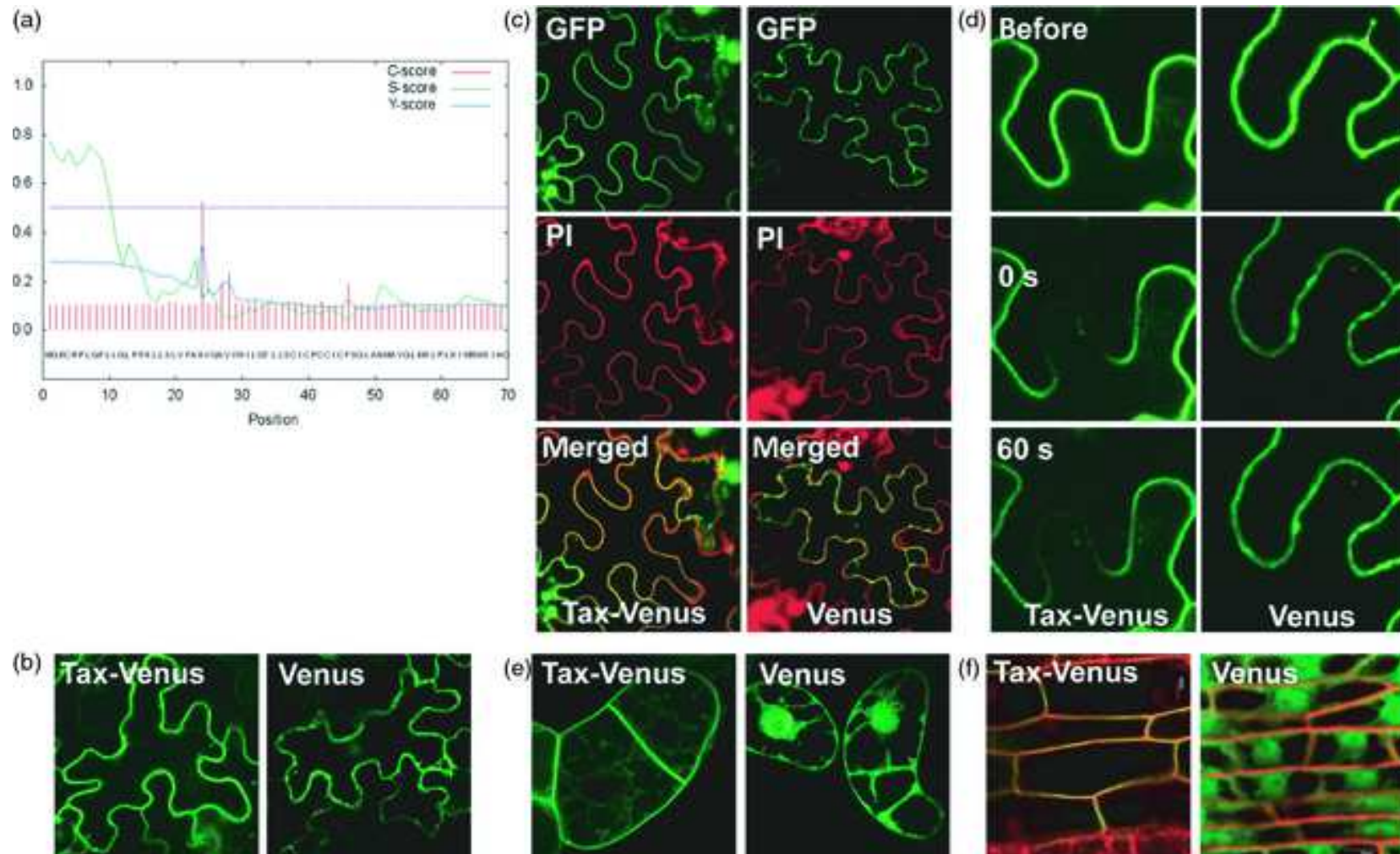
Función

Sin homología	298	44.7
Metabolismo y Energía	181	27.1
Proteínas no clasificadas	60	9.0
Organización celular y defensa	43	6.4
Síntesis de proteínas y grasas	28	4.2
Transporte	23	3.4
Transducción de señales	15	2.2
Transcripción	16	2.4
Transposones	3	0.4
TOTAL DE SECUENCIAS	667	100

Taximin:



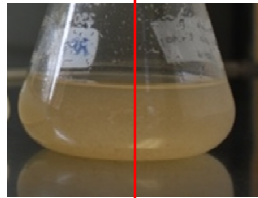
Taximin localización subcelular:



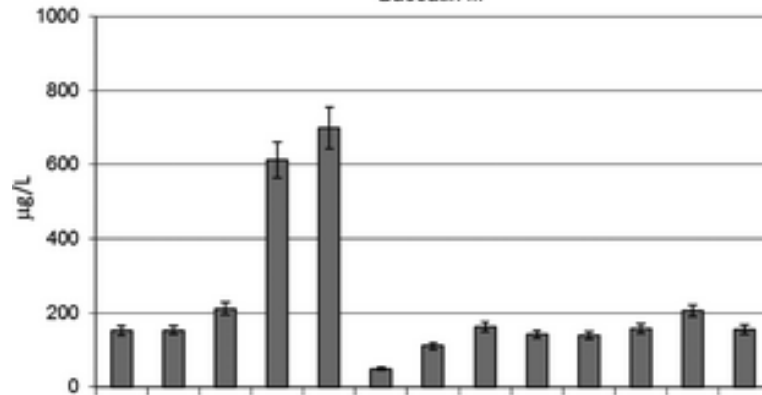
Estudio funcional del taximin:

Taximin → HyproTaximin

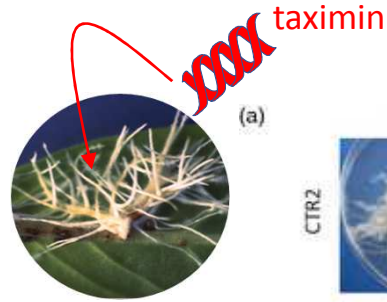
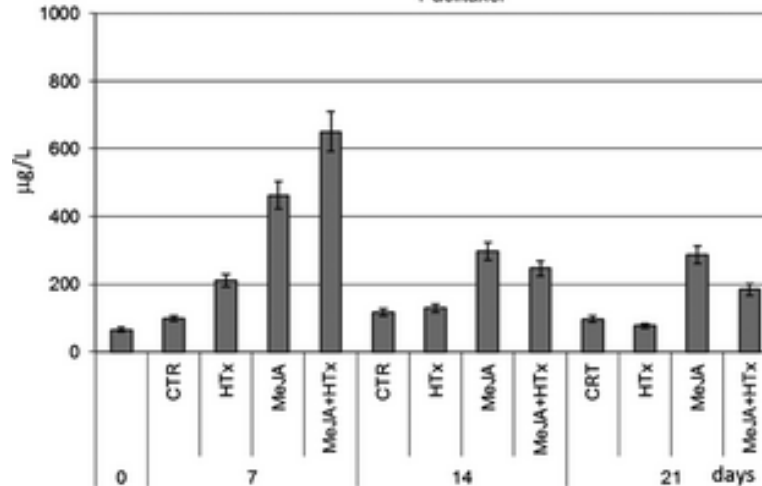
Taxus cells



Baccatin III



Pacitaxel

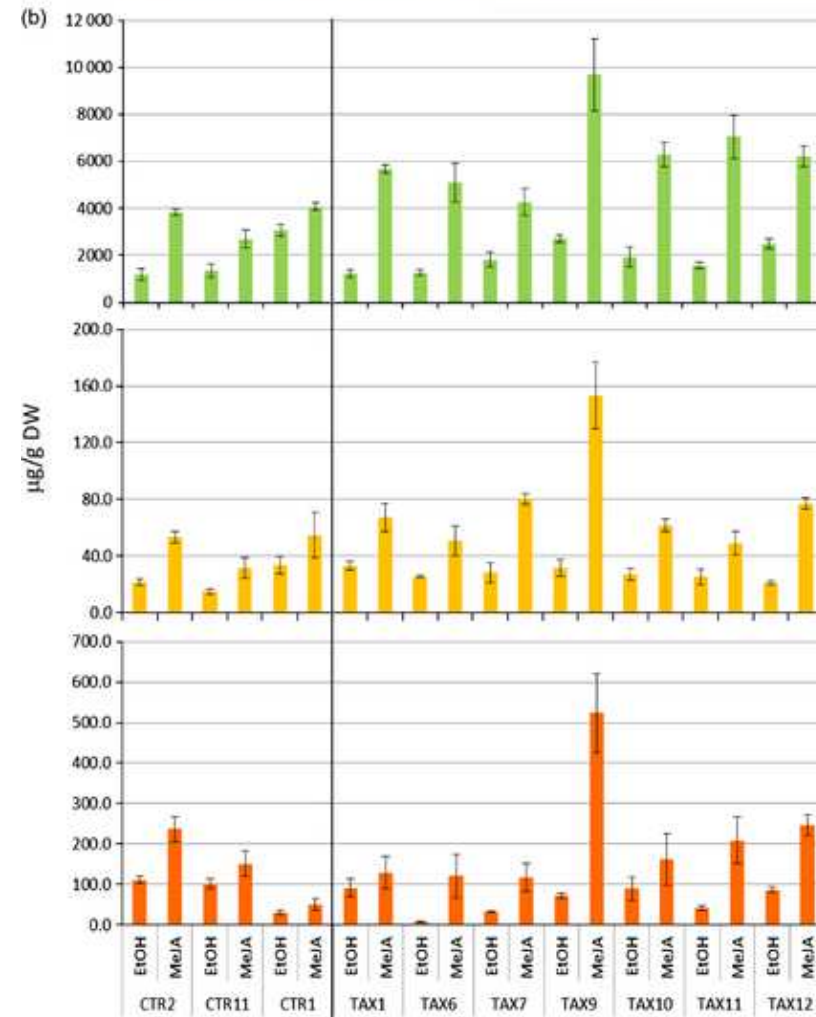


Tobacco hairy roots

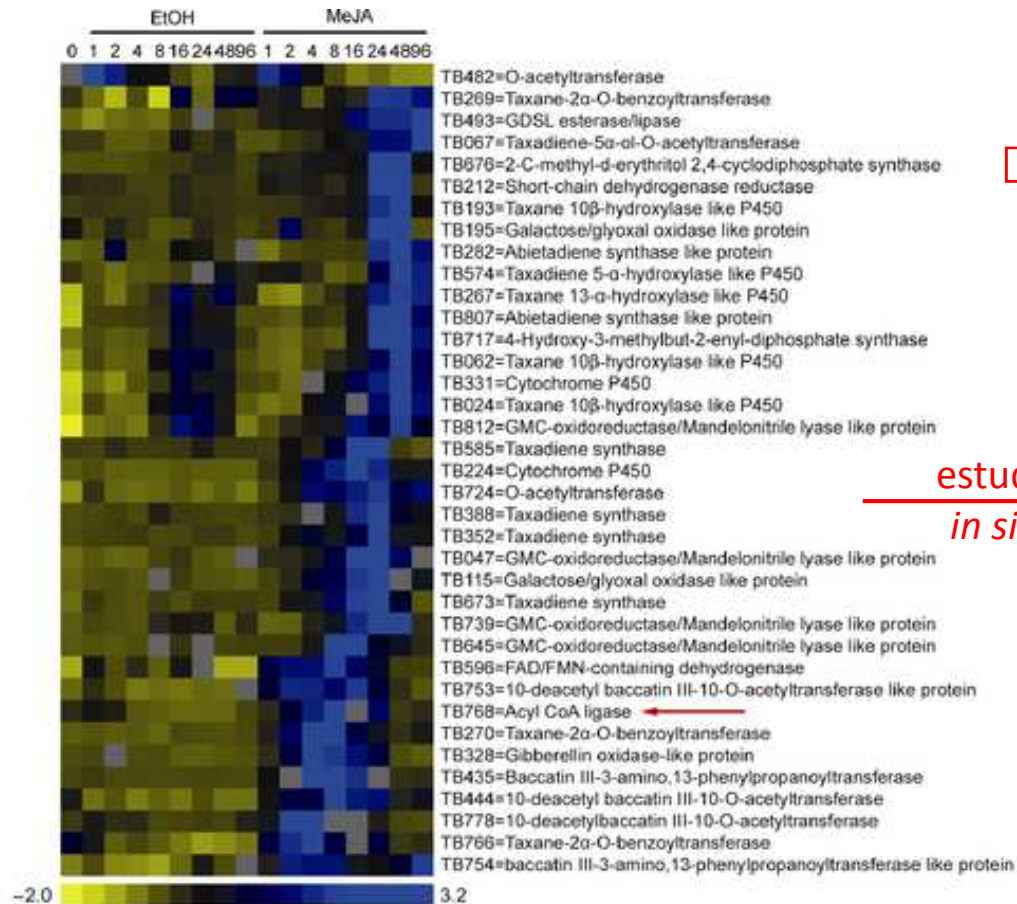
(a)



(b)



Estudio funcional del gen TB768:

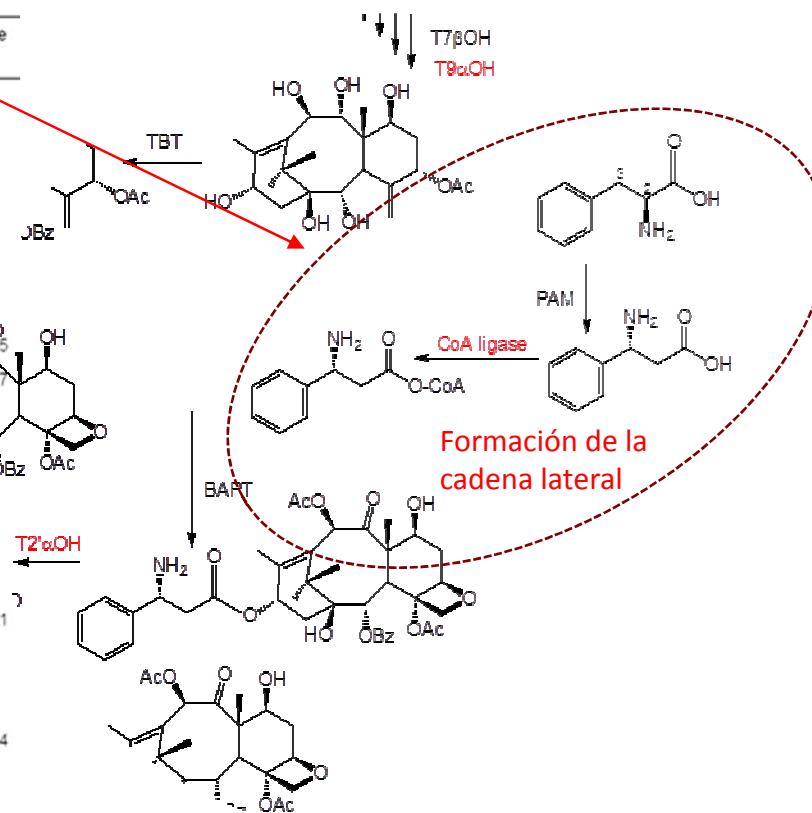


estudios
in silico

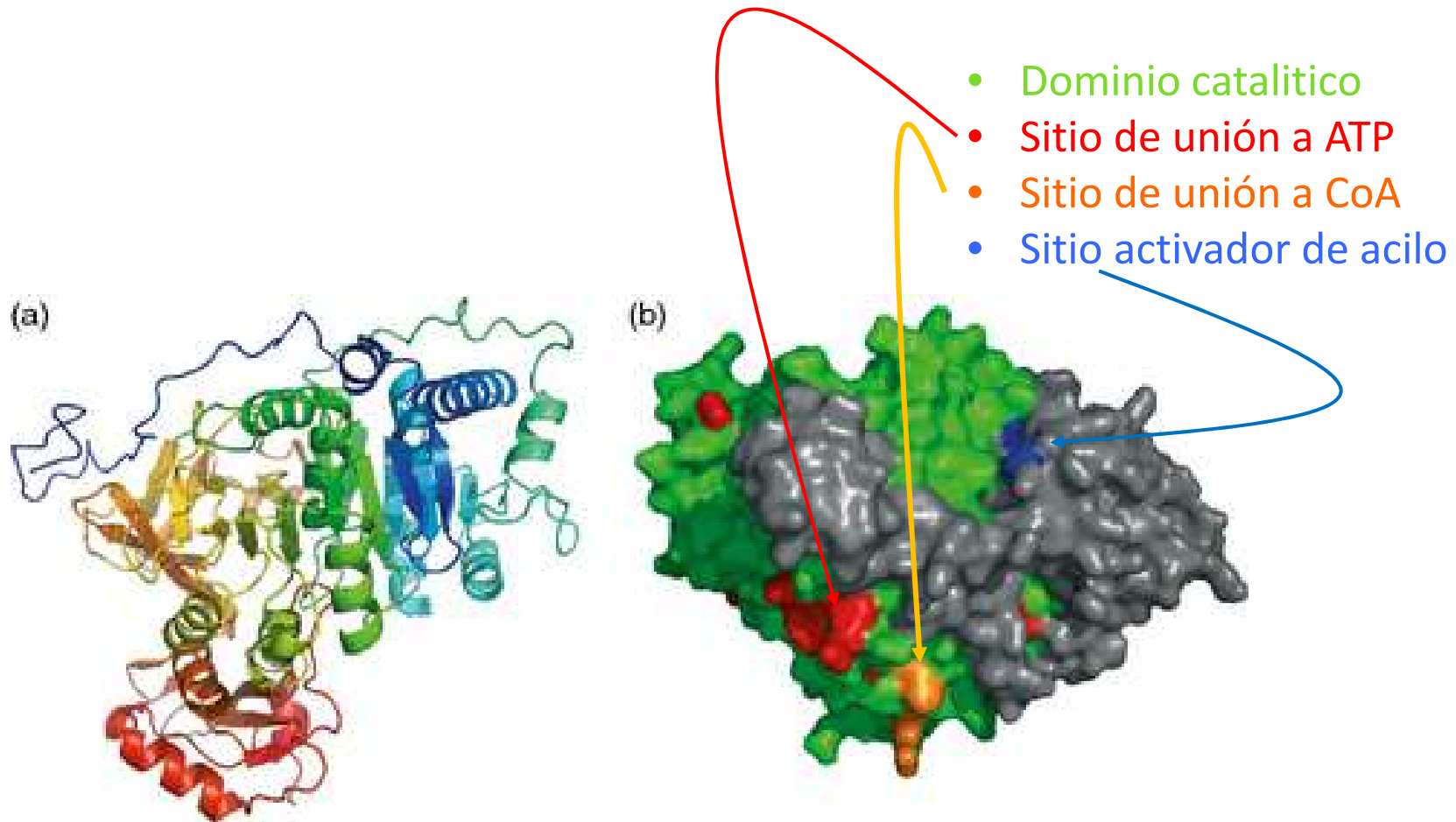
Tentative function	Tag	GenBank accession	Annotation	BLAST hit code	e-value
CoA ligase	TB768	KM593667	Acyl-CoA ligase	B9GQ39	0.0
C1 and C9 hydroxylases	TB506	KP178208	Cinnamate 4-hydroxylase	B2Z6P5	0.0
	TB331	KP178206	Putative cytochrome P450	D7T4D5	1.0E-118
	TB574	KP178209	Putative cytochrome P450	D7T4D5	1.0E-118
	TB224	KP178204	Putative cytochrome P450	D5A7Y6	1.0E-152
C4-C20 epoxidase	TB328	KP178205	Putative gibberellin oxidase	A9NW35	1.0E-45
C9 oxidase	TB596	KP178210	Unknown (FAD/FMN-containing dehydrogenase)	B8LR72	8.0E-87
	TB812	KP178213	Unknown (GMC oxidoreductase)	A9NXU5	1.0E-151
	TB047	KP178200	Unknown (GMC oxidoreductase)	A9NXU5	1.0E-109
	TB739	KP178212	Unknown (GMC oxidoreductase)	A9NXU5	1.0E-148
	TB212	Link to external resource: KP178212	prt-chain dehydrogenase reductase)	A9NU86	6.0E-91
	TB645	KP178211	Unknown (GMC oxidoreductase)	A9NXU5	1.0E-158
Oxomutase	TB493	KP178207	Unknown Putative GDSL esterase	A9SVY3	1.0E-44
	TB195	KP178202	Unknown (galactose/glyoxal oxidase related)	F6GTQ6	1.0E-164
	TB115	KP178201	Unknown (galactose/glyoxal oxidase related)	D8RR64	1.0E-163

Estudio funcional del gen TB768:

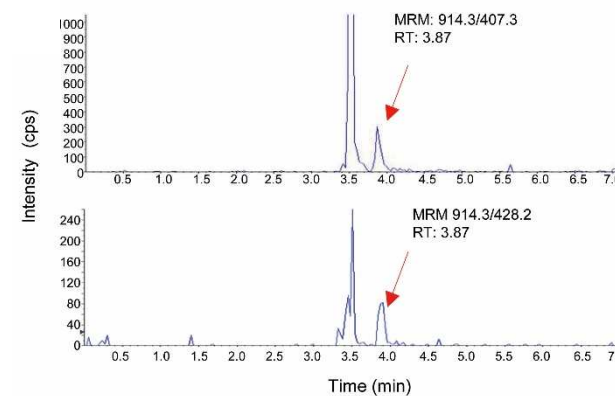
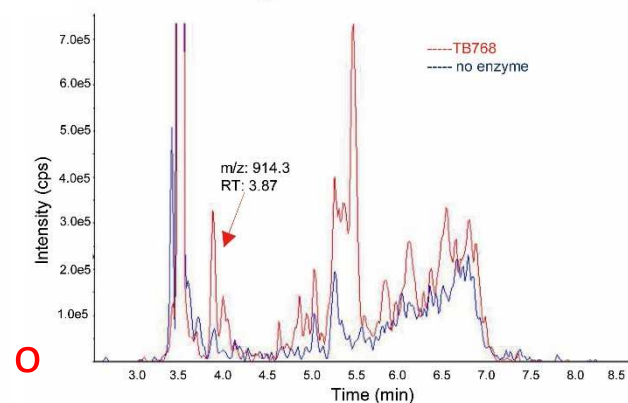
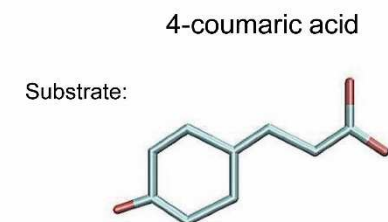
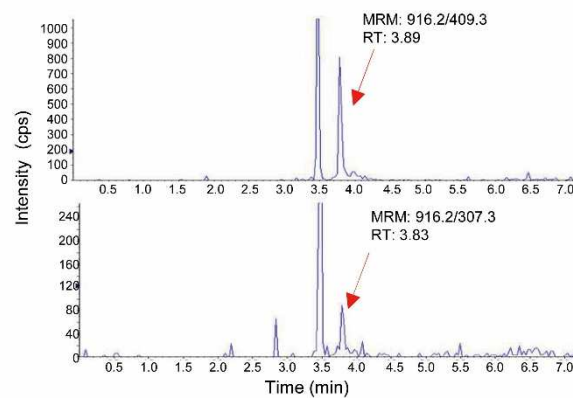
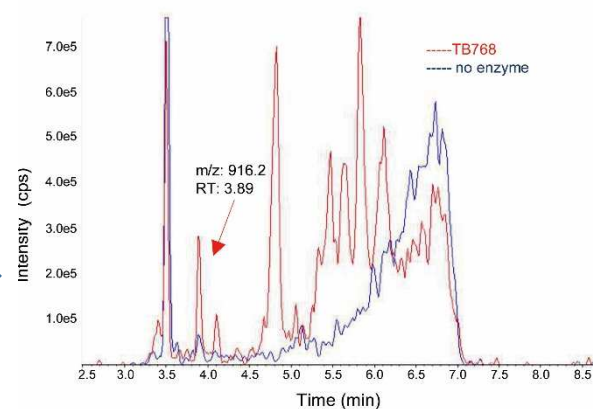
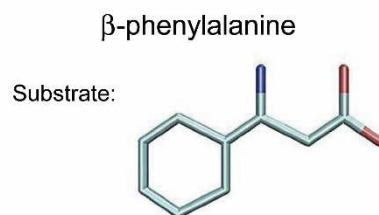
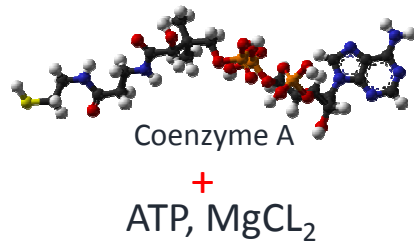
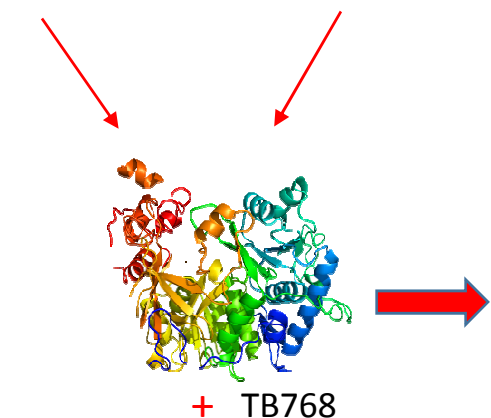
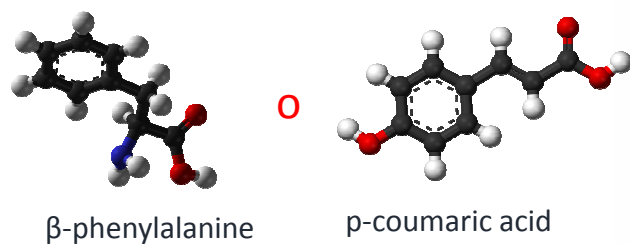
Tentative function	Tag	GenBank accession	Annotation	BLAST hit code	e-value
CoA ligase	TB768	KM593667	Acyl-CoA ligase	B9GQ39	0.0
C1 and C9 hydroxylases	TB506	KP178208	Cinnamate 4-hydroxylase	B2Z6P5	0.0
	TB331	KP178206	Putative cytochrome P450	D7T4D5	1.0E-118
	TB574	KP178209	Putative cytochrome P450	D7T4D5	1.0E-118
	TB224	KP178204	Putative cytochrome P450	D5A7Y6	1.0E-152
C4-C20 epoxidase	TB328	KP178205	Putative gibberellin oxidase	A9NW35	1.0E-151
C9 oxidase	TB596	KP178210	Unknown (FAD/FMN-containing dehydrogenase)	B8LR72	8.0E-87
	TB812	KP178213	Unknown (GMC oxidoreductase)	A9NXU5	1.0E-151
	TB047	KP178200	Unknown (GMC oxidoreductase)	A9NXU5	1.0E-109
	TB739	KP178212	Unknown (GMC oxidoreductase)	A9NXU5	1.0E-148
	TB212	Link to external resource: KP178212	Short-chain dehydrogenase reductase	A9NU86	6.0E-91
	TB645	KP178211	Unknown (GMC oxidoreductase)	A9NXU5	1.0E-158
Oxomutase	TB493	KP178207	Unknown Putative GDLS esterase	A9SVY3	1.0E-44
	TB195	KP178202	Unknown (galactose/glyoxal oxidase related)	F6GTQ6	1.0E-164
	TB115	KP178201	Unknown (galactose/glyoxal oxidase related)	D8RR64	1.0E-163



Hipotética estructura 3D de la proteína TB768:



Estudio funcional del gen TB768:



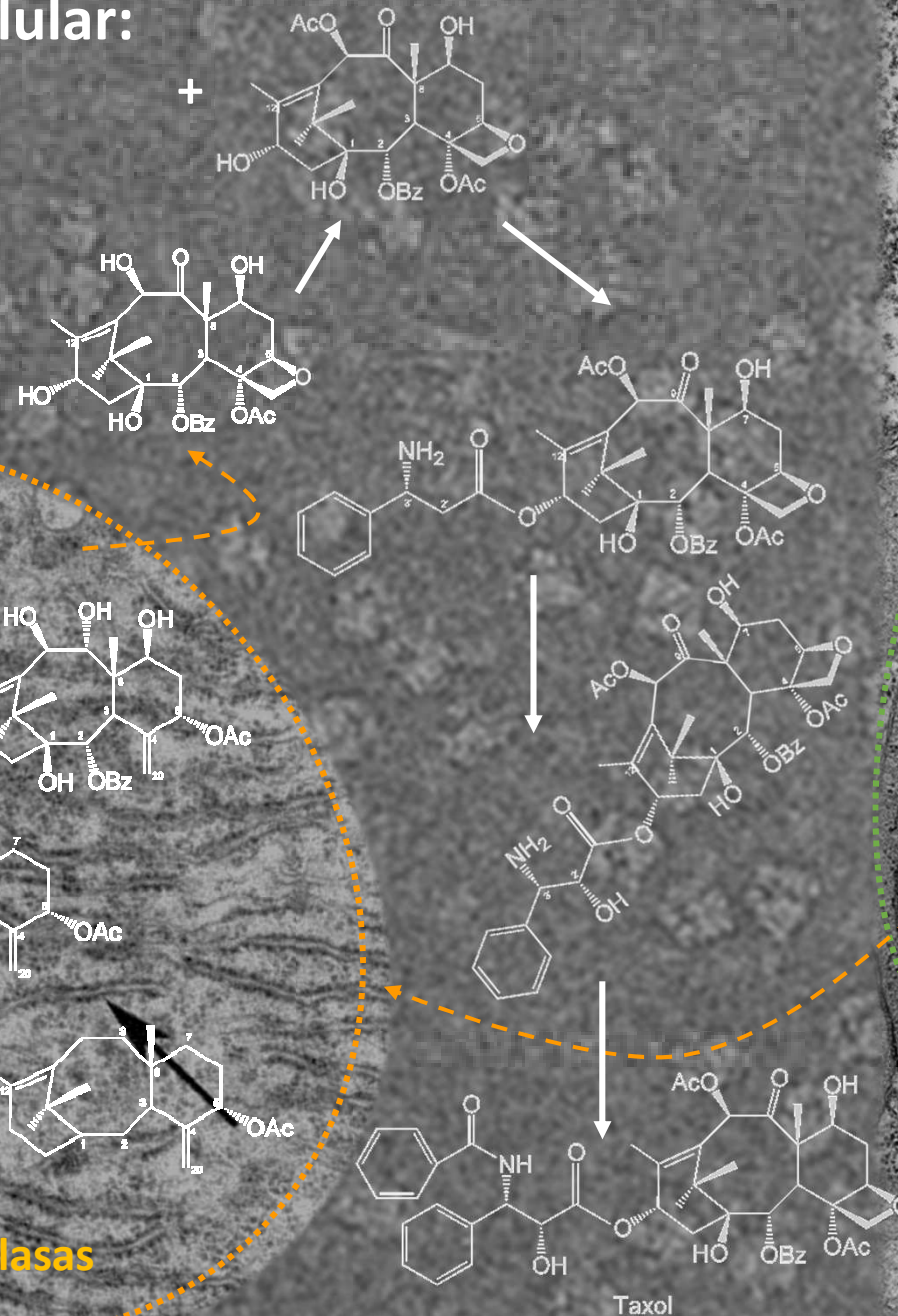
Localización subcelular:

cytoplasm

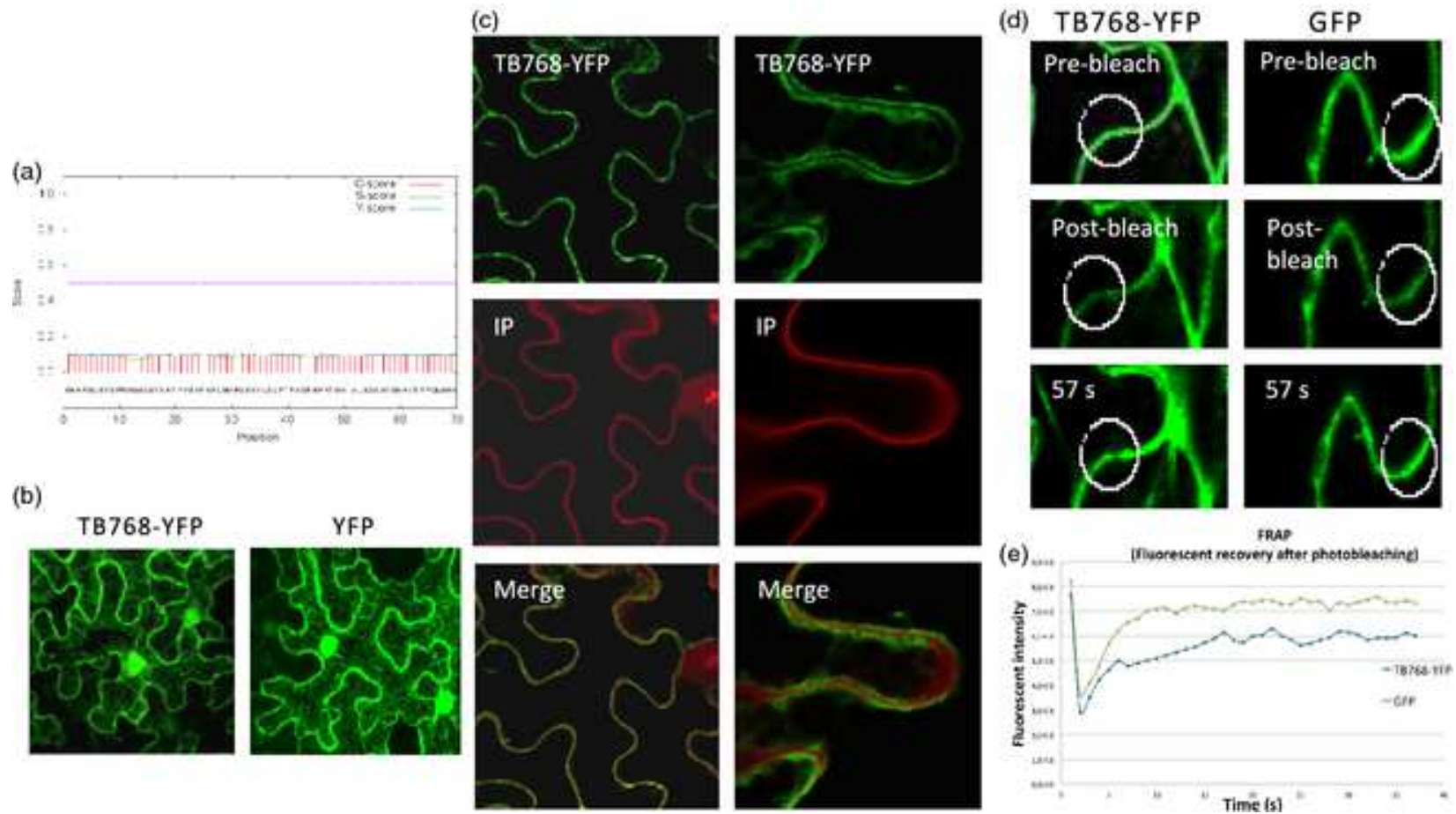
RE

hidroxilasas

plasto

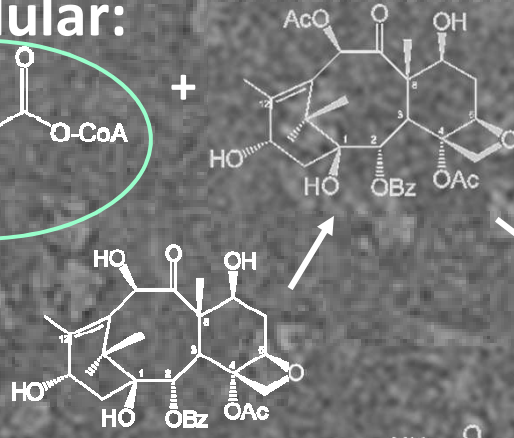
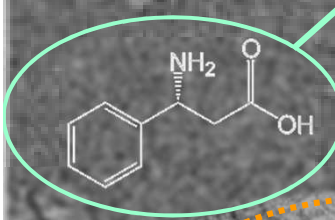


Localización subcelular de TB768:

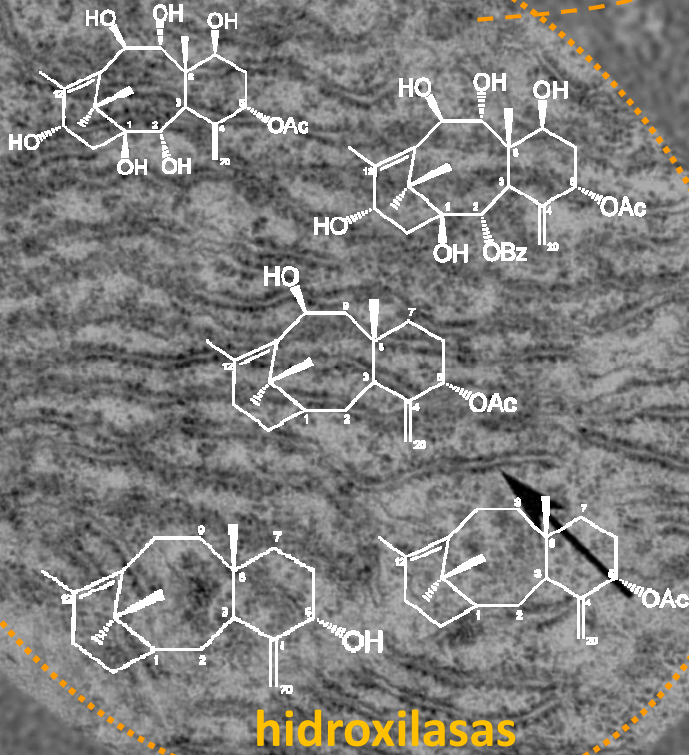


citoplasma

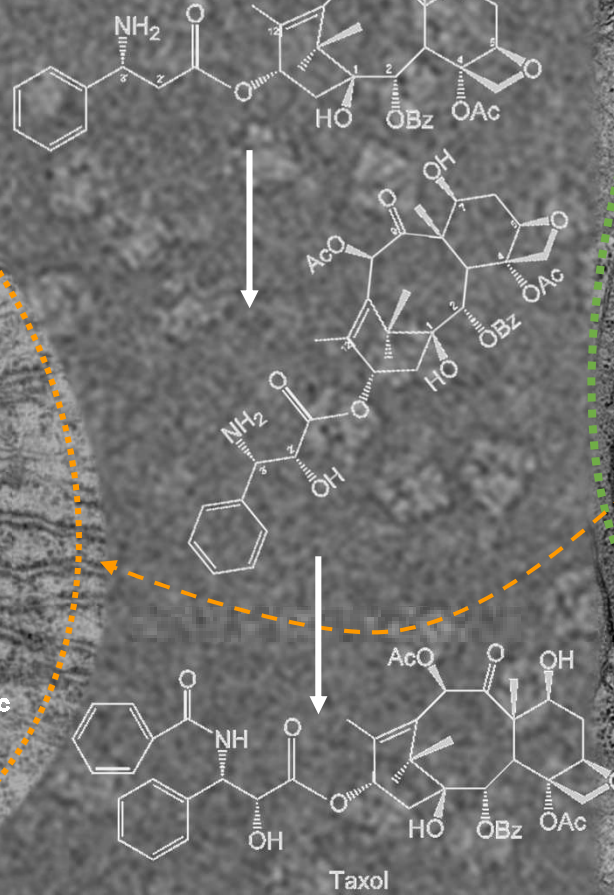
CoA ligasa



RE

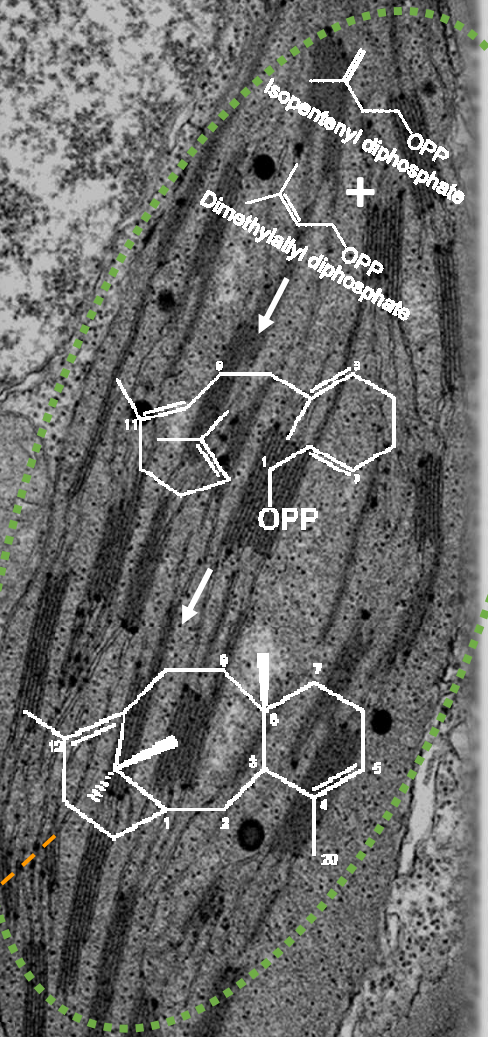


hidroxilasas



Taxol

plasto



Conclusión:



En su conjunto los resultados de este trabajo confirman que los cultivos celulares de *Taxus* spp. elicitados son una excelente plataforma biotecnológica para la producción de taxanos y que este sistema, con el apoyo de las tecnologías ómicas, junto con los estudios bioinformáticos, como catalizadores, potencia el desarrollo de estudios básicos conducentes a un mejor conocimiento de la biosíntesis de taxanos y el metabolismo secundario en general.

Plant Biotechnology
group



Phytochemical
production



Financiación:



BIO2014-51861-R
BIO2011-29856-C02-01
2014SGR215
2009SGR1217

Dra. Teresa Altabella

