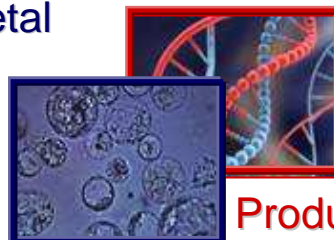


Seminaris de recerca: **Producción biotecnológica de taxol. Aproximación molecular**

Grup de Biotecnologia
Vegetal



2009SGR1217

Producció de
Fitofàrmacs

Miriam Onrubia

Heriberto Vidal

Karla Ramírez

Ana Gállego

Liliana Lalaleo

Diego Hidalgo

Mercedes Bonfill

Elisabet Moyano

Rosa M. Cusidó

Javier Palazón



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Fisiologia Vegetal. Departament de Productes Naturals, Biologia Vegetal y Edafologia. Facultat de Farmàcia.



Departament de Ciències Experimentals i de la Salut.



Metabolismo secundario



**Productos naturales
de origen vegetal**



**50 % drogas utilizadas en la
elaboración de los medicamentos**

~ 500.000 especies de plantas



~ 250.000 han sido descritas
(21.375 registradas en el KNApSAcK database)



~ 15% han sido estudiadas
(35.000 testadas por acción anticancerígena: 10% positivas.
Estudio de su composición: 90 plantas)



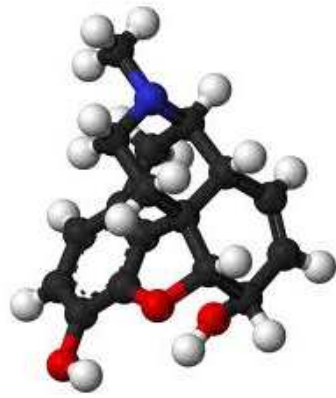
Relación de metabolitos secundarios de origen vegetal ampliamente utilizados en medicina.

Compuestos de origen vegetal ampliamente utilizados en medicina

Acetildigoxina	Escilarenos	Quelina
Aescina	Escopolamina	Quinidina
Ajmalicina	Esparteína	Rescinamina
Alantoina *	Estricnina	Reserpina
Atropina	Fisostigmina	Senósidos
Bromelaína	Hiosciamina	Seudoefedrina *
Cafeína*	L-Dopa*	Taxol R
Codeína	Lanatósido	Teobromina *
Colchicina	α -Lobelina	Teofilina *
Dantrón *	Morfina	Tetrahydrocannabinol
Deserpina	Ouabaína	Tubocurarina
Digitoxina	Papaína	Vinblastina
Digoxina	Papaverina *	Vincristina
Efedrina *	Pilocarpina	Xantotoxina
Emetina	Protoveratrina	

* Producidos industrialmente por síntesis química

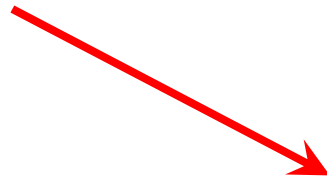
Fuentes alternativas



Compuesto secundario



Cultivo tradicional



Producción biotecnológica



Síntesis química

Biotecnología vegetal

Se considera el conjunto de técnicas para manipular plantas con la finalidad de establecer bioprocesos que nos permitan mejorar la producción vegetal y satisfacer las necesidades mundiales en alimentos, fibras, combustibles y compuestos de importancia química-farmacéutica.



Cultivos *in vitro*



bioreactor

Ventajas de los cultivos celulares:

- Son independientes de las variaciones geográficas y estacionales y de los factores ambientales.
- Ofrecen un sistema de producción definido que asegura una fuente continua de productos en calidad y cantidad uniformes.
- Ofrecen la posibilidad de obtener compuestos nuevos que no se forman en la planta de origen.
- Son independientes de interferencias políticas.
- Permiten una eficaz recuperación del producto de interés.
- Ofrecen una producción muy rápida.
- Permiten llevar a cabo biotransformaciones estereo- y regioespecíficas para la obtención de compuestos a partir de precursores de bajo coste.



Compuestos secundarios

Producción industrial de compuestos secundarios mediante cultivos celulares vegetales



Producción biotecnológica

Costes producción
biotecnológica \leq Costes producción
tradicional



Productos de alto valor añadido



Producción tradicional

Producto	Especie	Aplicación	Firma
Escopolamina	<i>Duboisia sp.</i>	Anticolinérgico	Sumitomo Chemical Industries (Japón)
Podofilotoxina	<i>Podophyllum sp.</i>	Antitumoral	Nippon Oil (Japón)
Protoberberinas	<i>Coptis japonica, Thalictrum minus</i>	Antibiótico, antiinflamatorio	Mitsui Petrochemical Industries (Japón)
Paclitaxel	<i>Taxus sp.</i>	Antitumoral	Phyton Biotech (USA), Samyang Genex (Corea)
Ácido rosmarínico	<i>Coleus brumei</i>	Antiinflamatorio	Nattermann (Alemania)
Ginseng	<i>Panax ginseng</i>	Energizante, antifatiga	Nitto Denko (Japón)
Polisacáridos de Echinaceae	<i>Echinaceae purpurea</i> <i>Echinaceae augustifolia</i>	Antiinflamatorio, inmunoestimulante	Diversa (Alemania)
Sikonina	<i>Lithospermum erythrhizon</i>	Anti-HIV, antitumoral, antiinflamatorio	Mitsui Petrochemical Industries (Japón)
Geraniol	<i>Geramineae sp.</i>	Antitumoral	Mitsui Petrochemical Industries (Japón)

Producción de siconina en cultivos celulares de *Lithospermum erythrorhizon*. (Mitsui Petrochemical LTD.)



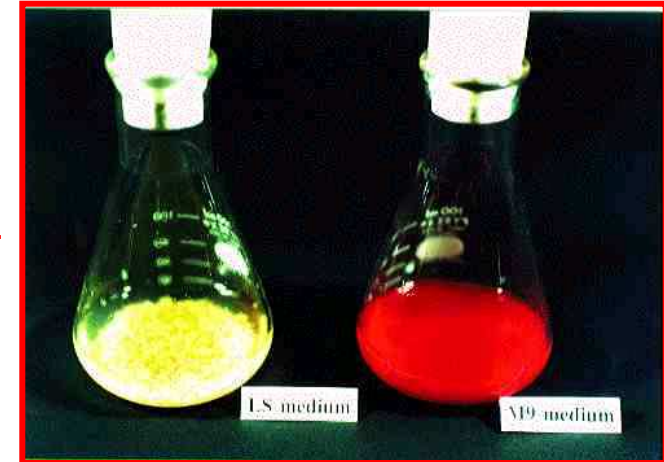
Raíces de Lithospermum erythrorhizon

→ Siconina ←



Acciones:

- Pigmento fenólico utilizado en perfumería y alimentación.
- Antiinflamatorio.
- Antibacteriano.
- Antitumoral

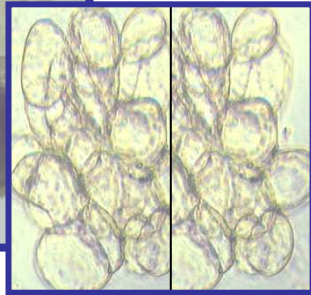
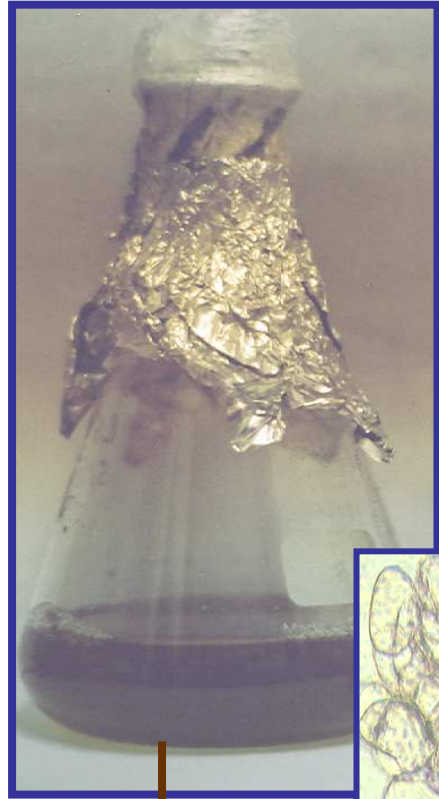


Cultivos celulares

Fuente natural: raíz de 5 –7 años.

Comparación del contenido de siconina y la productividad entre la planta y el cultivo de células en suspensión.

Especies	Compuesto	Cultivo	Edad (Semanas)	Contenido %	Mejora del contenido	Productividad mg/g/semana	Mejora de la productividad
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Siconina	Planta	312	1,53	x 8	0,048	x 1250
		SC	2	12		60	



**Compuestos secundarios
de interés**

**Capacidad biosintética
de las células**



**Productividad del
cultivo**

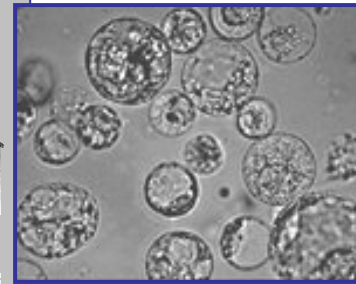


**Rentabilidad del
proceso**



**Producción industrial
de compuestos de alto
valor añadido**





Compuestos secundarios

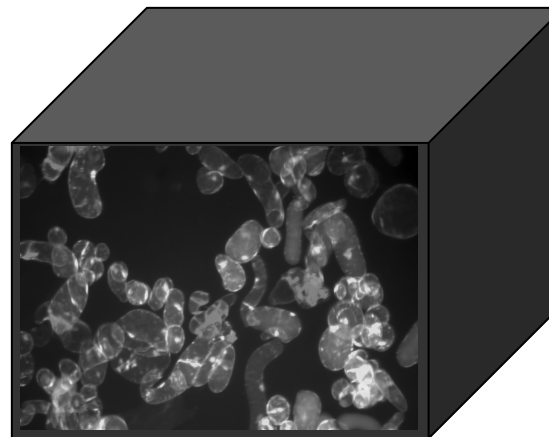
Cultivos celulares

Aproximación empírica

Optimización del sistema de cultivo

In-put factors:

- Selección de líneas**
- Condiciones de cultivo**
- Medios de cultivo**
- Elicidores**
- Biorreactores**



Cultivos celulares

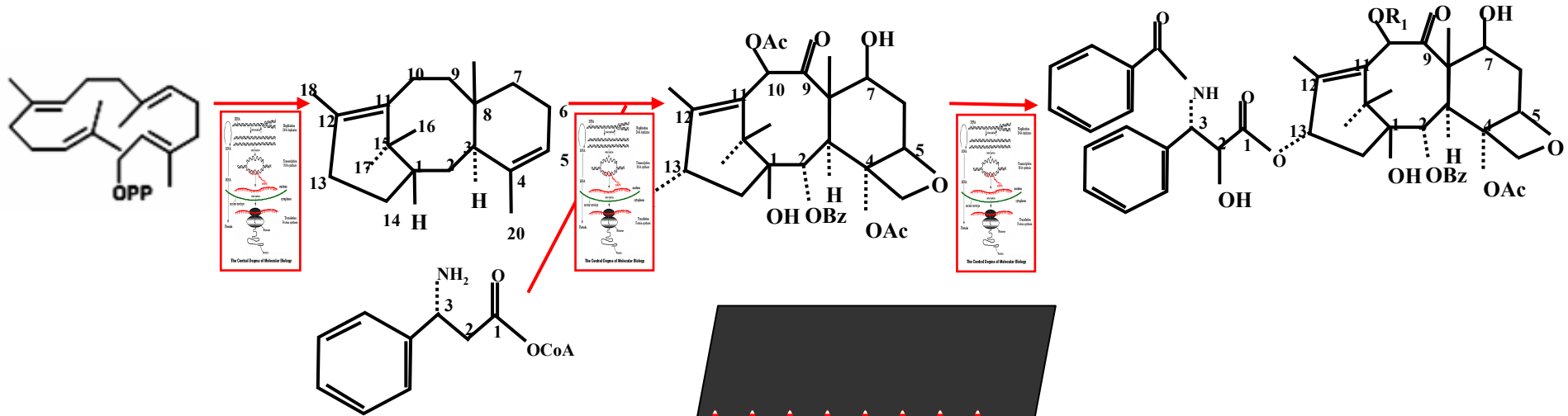


Optimización de la producción

Out-put factors:

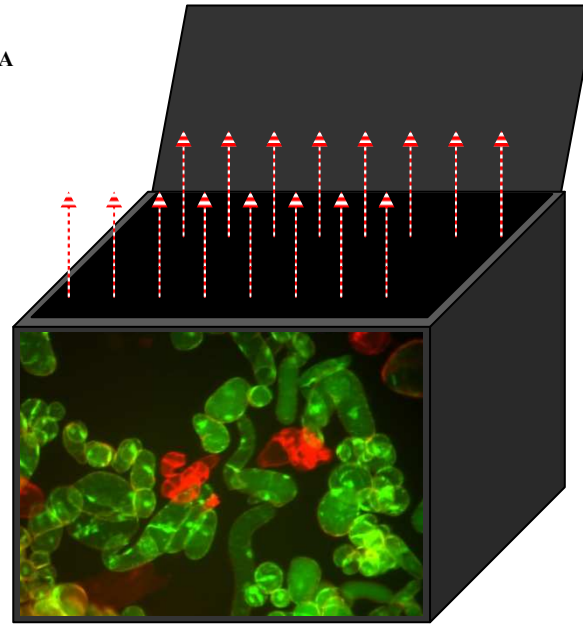
- Crecimiento**
- Producción**
- Productividad**

Aproximación racional



In-put factors:

Selección de líneas
Condiciones de cultivo
Medios de cultivo
Elicitores
Biorreactores



Cultivos celulares

Expresión genética
Actividad enzimática
Viabilidad celular

Out-put factors:

Crecimiento
Producción
Productividad



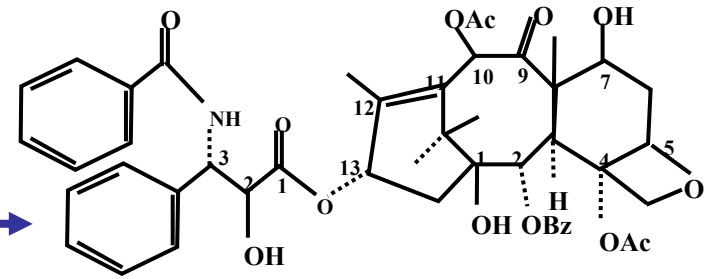
Producción de taxol y taxanos relacionados

Fuente natural:



[0.02% PS]

Taxus spp



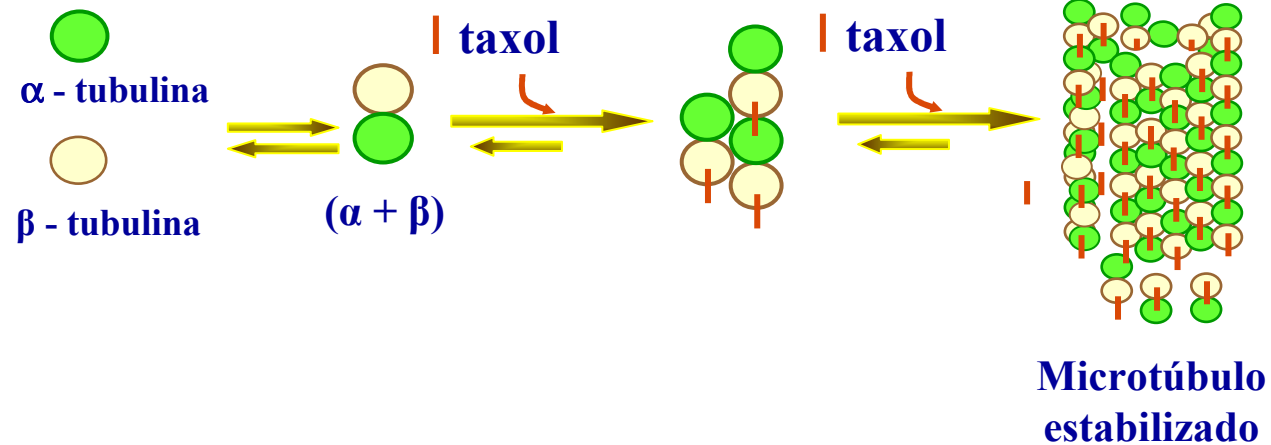
taxol

Procesos tumorales:

- Cancer metastásico refractario de ovario
- Cancer metastásico de mama
- Cancer pulmonar asociado a células pequeñas
- Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA

Estabilización de microtúbulos:

- Taupatias
- Psoriasis
- Esclerosis múltiple



Mecanismo de acción del taxol

Bloqueo de la mitosis

Disfunción del huso acromático

MUERTE CELULAR



Plantaciones de *Taxus yunnanensis* en Yunnan (China)

Yewcare → CECS pharm



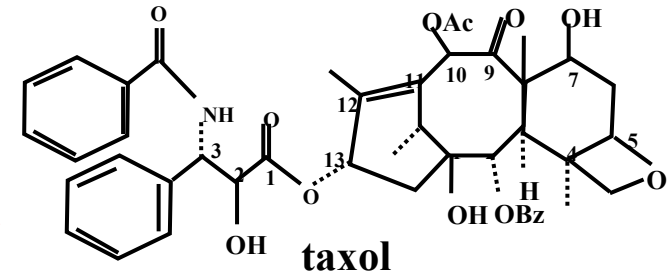
Alternativas:

Síntesis química:

laboratorio



X

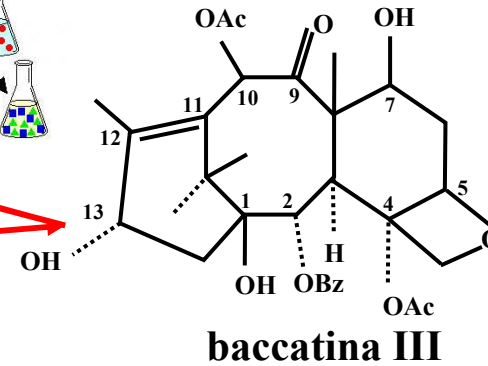
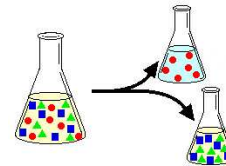


Semisíntesis:



Acículas de *Taxus*

extracción



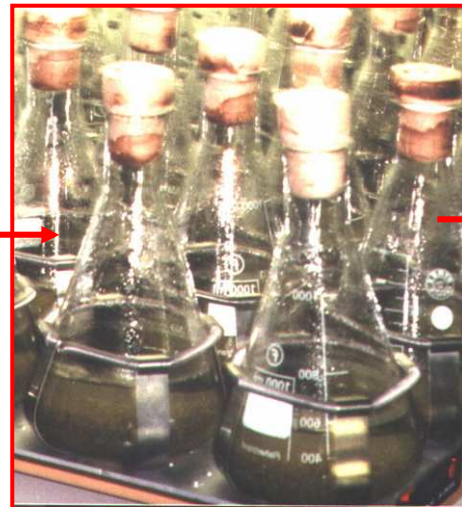
Producción biotecnológica:



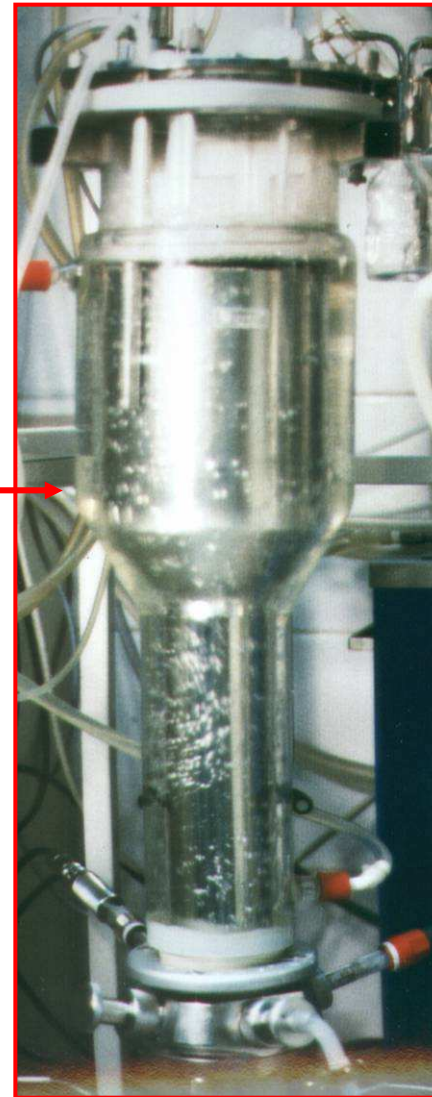
Cultivos celulares:
Phyton,
Cell Therapeutics,
Abraxis
Corean Samyang Genex.....

Producción biotecnológica de Taxol:

Taxus baccata
Taxus media
Taxus wallichiana



Pequeña escala



Biorreactor

Taxol

***1ª etapa: inducción de callo**



0 2 3 4
semanas



Cultivos de callo

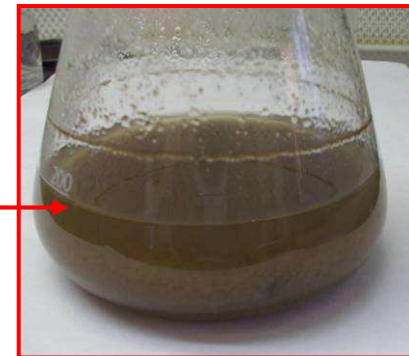
***2ª etapa: establecimiento de cultivos celulares**



Línea de callo



Cultivos celulares



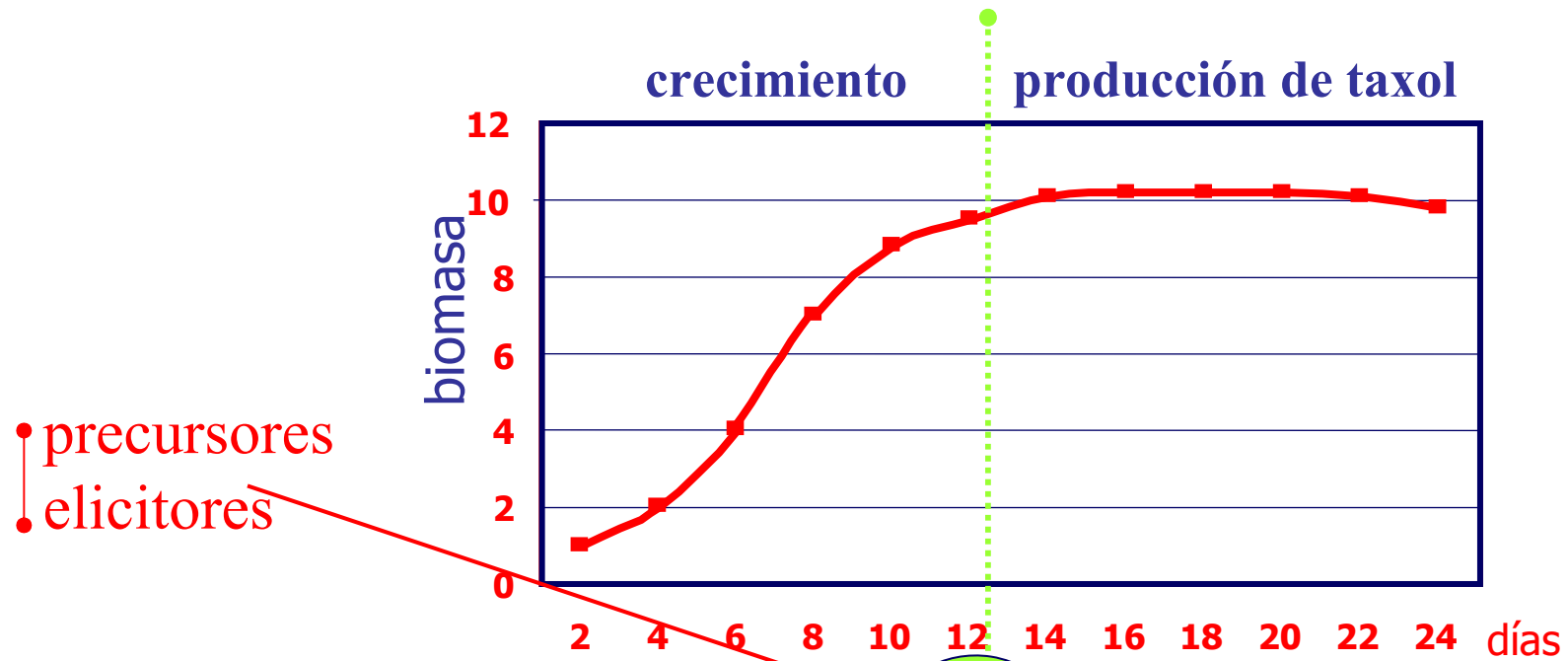
Línea celular

↑ Producción de taxol: Optimización de las condiciones de cultivo

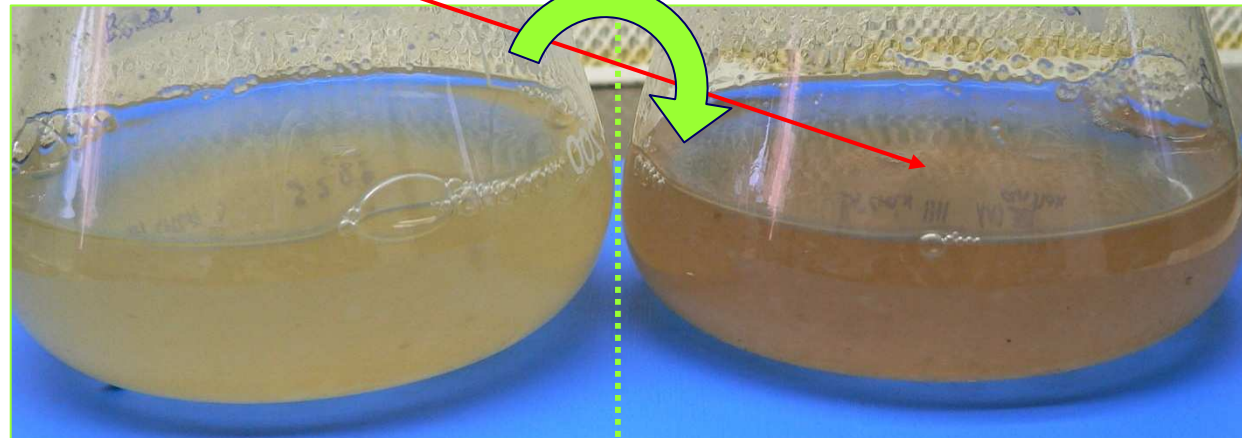


- Medio básico | MS
B₅
- Reguladores de crecimiento | Auxinas
(AIA, NAA, 2,4-D,)
Citoquininas
(kinetin, BAP,)
- Azúcares | Sacarosa
Fructosa

Cultivo en dos etapas:



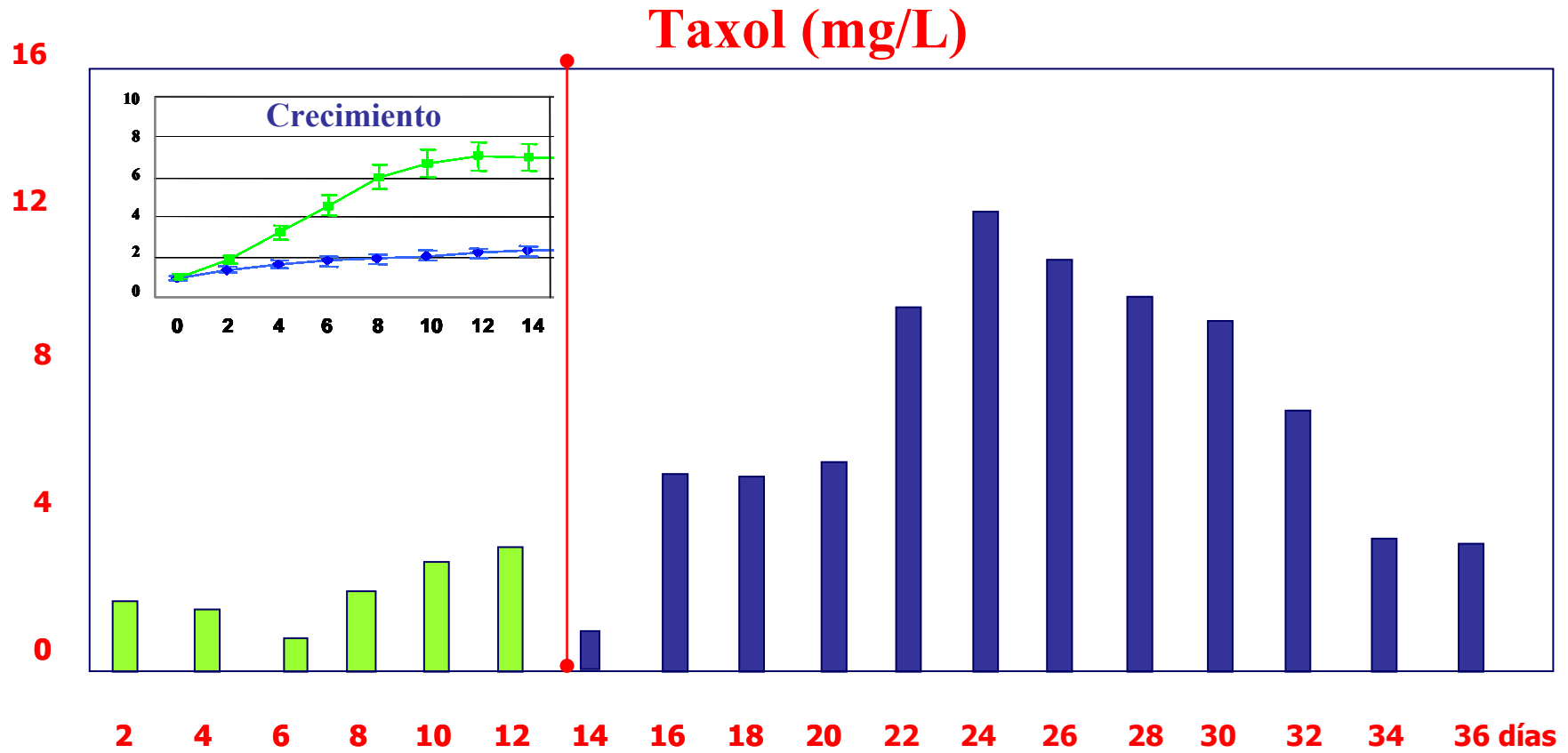
● precursores
● elicitores



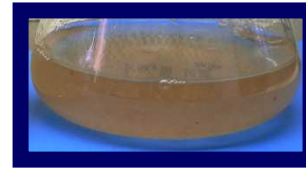
medio de crecimiento

medio de producción

Producción de taxol: cultivo en dos etapas

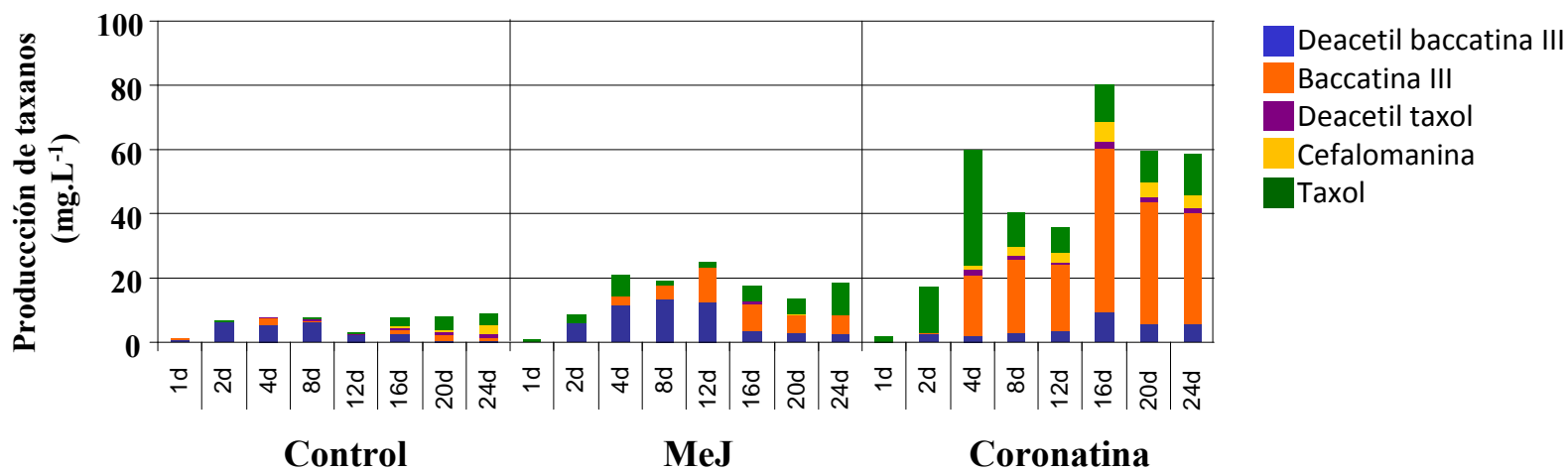
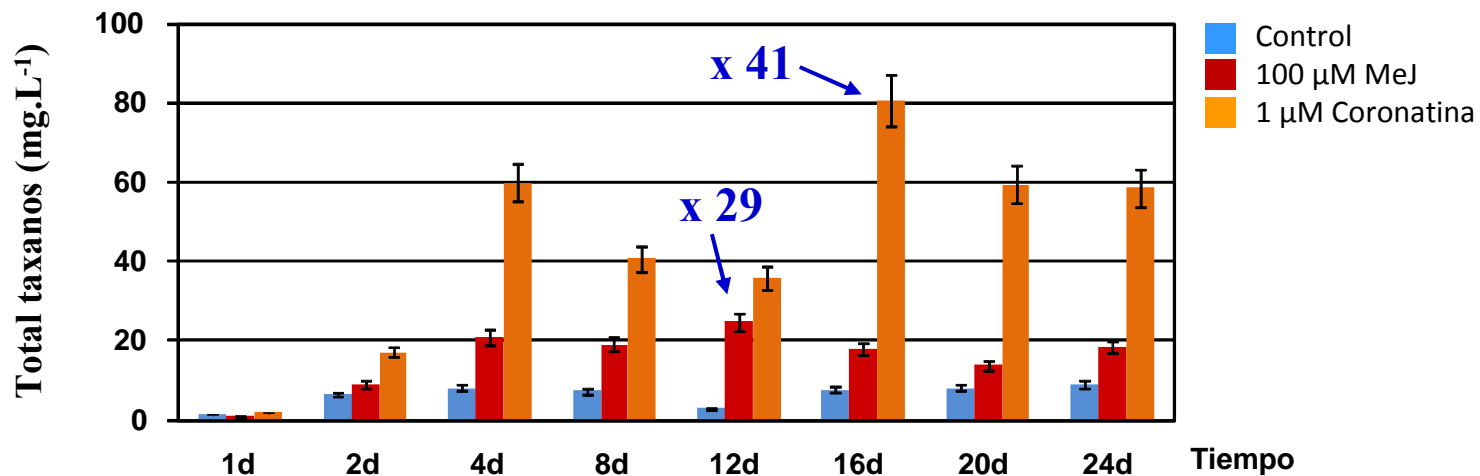


medio de crecimiento

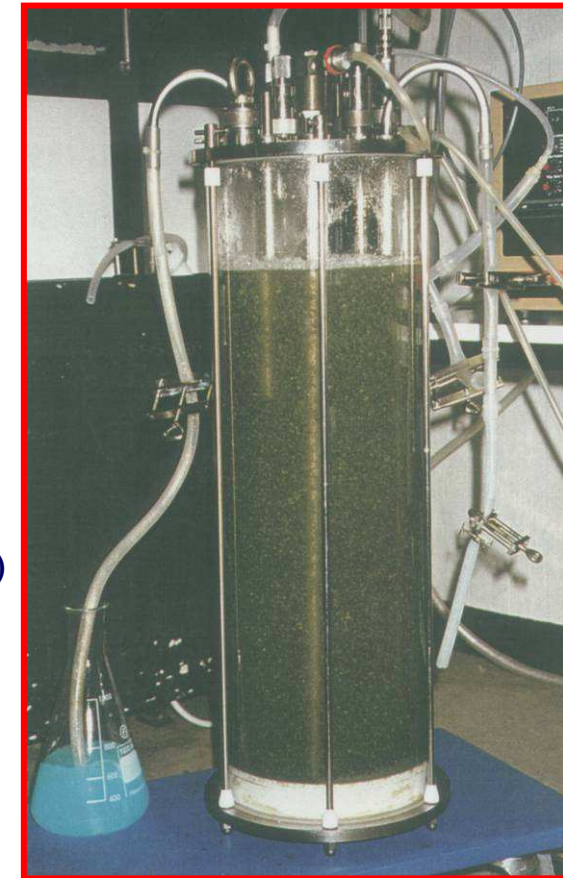
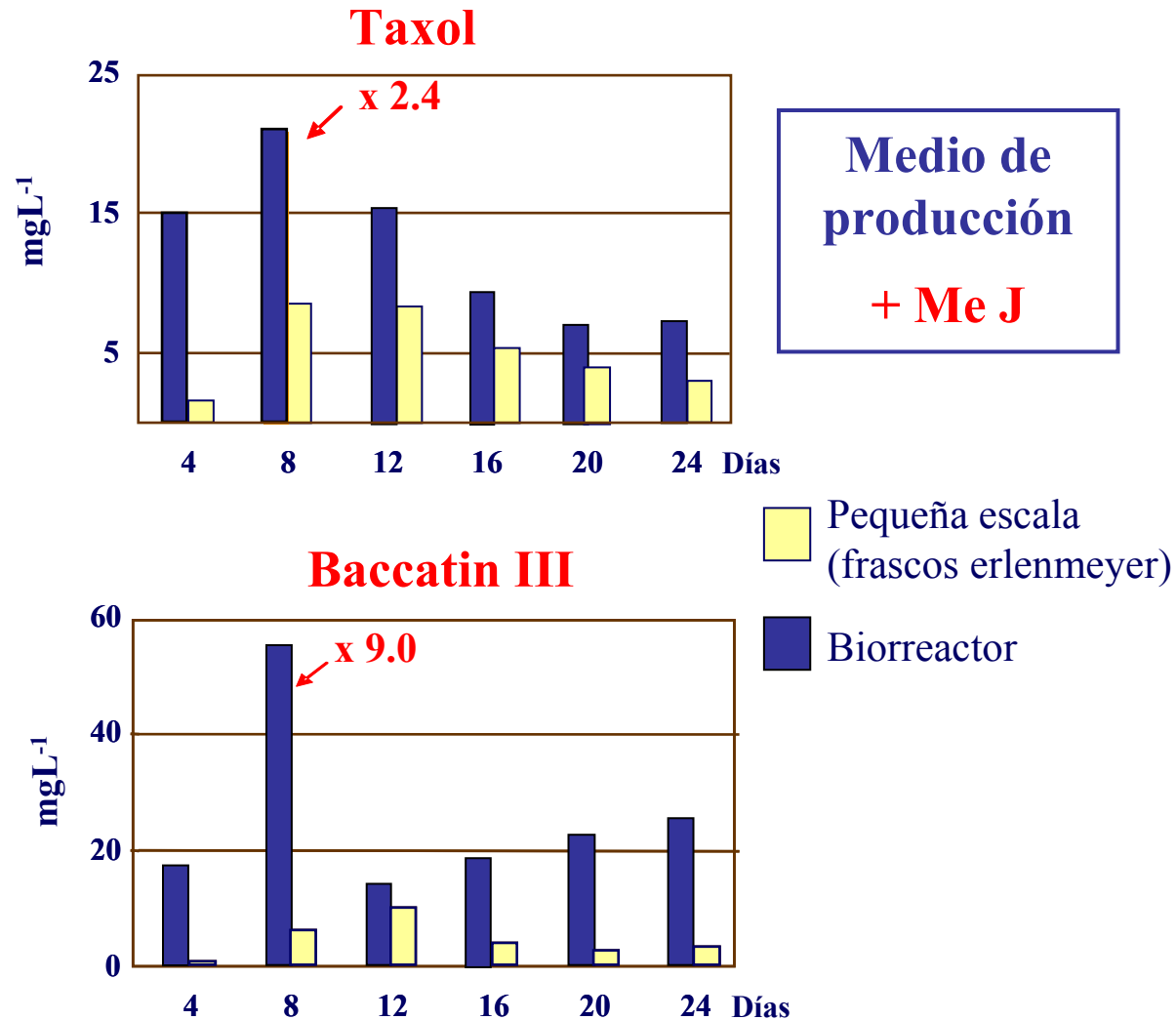


medio de producción

Optimización de la producción: Adición de elicitores al medio de cultivo



Producción de Taxol y baccatina III en cultivos celulares de *T. media* en biorreactor



Biorreactor columna de borboteo

Cultivos de células inmobilizadas en perlas de alginato: Pequeña escala

Perlas (2% alginato)



M. crecimiento

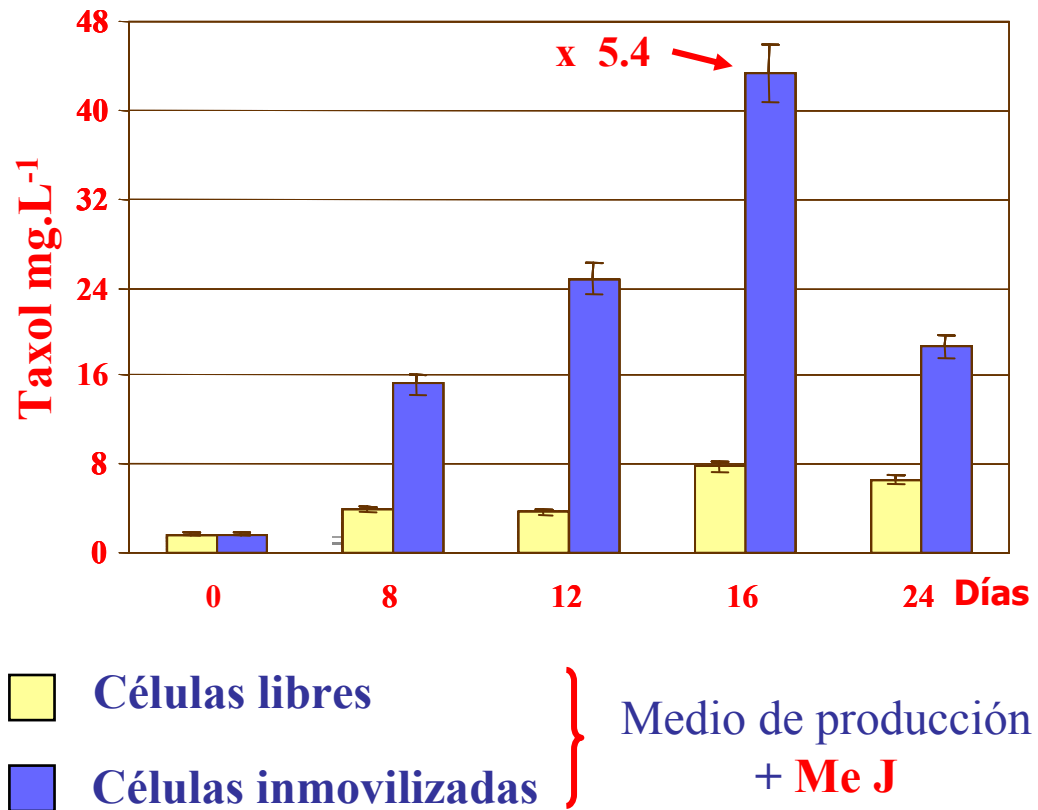
M. producción

Frascos de agitación

Inmovilización → ↑ Producción de metabolitos secundarios de interés

- Mayor concentración celular
- Mayor contacto célula-célula
- Mejores condiciones de diferenciación

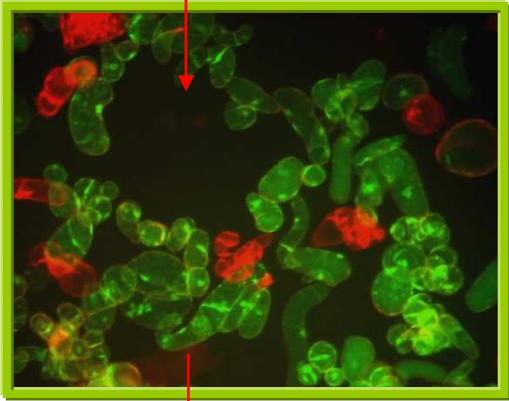
Escalado a un biorreactor de agitación mecánica



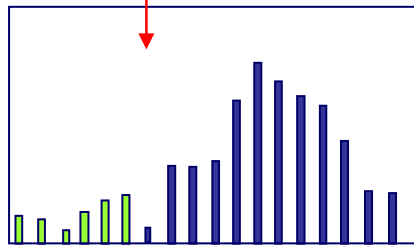
cDNA-amplified fragment length polymorphism (AFLP):

metiljasmonato

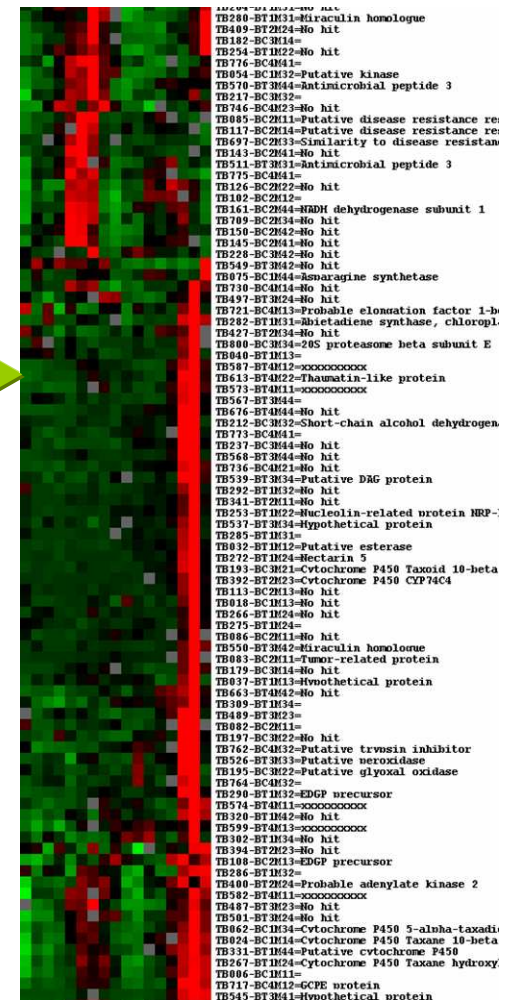
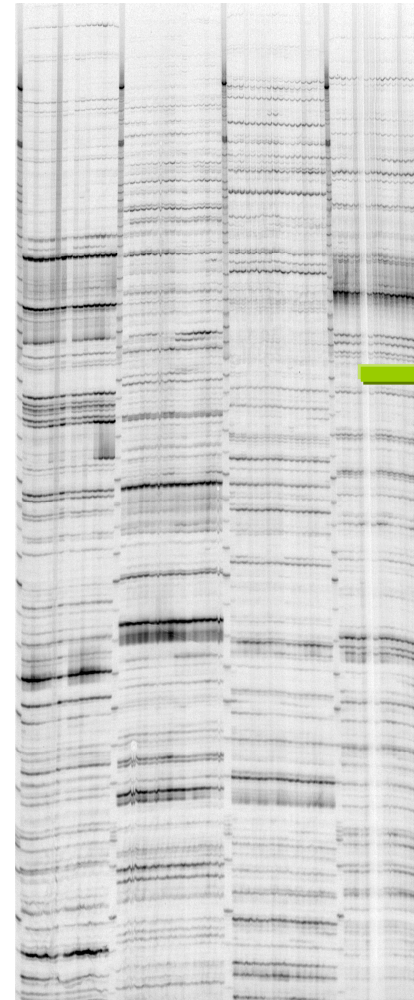
Cultivos celulares



Estudios de viabilidad y crecimiento



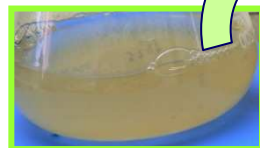
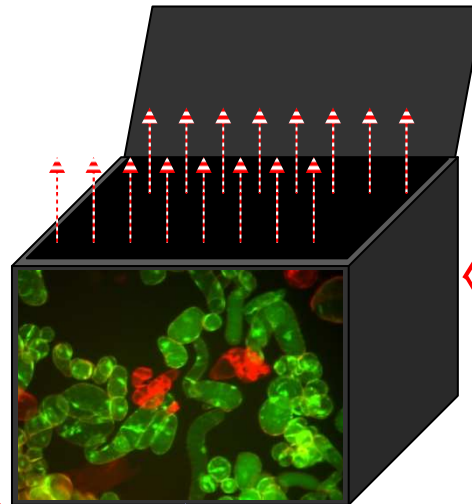
Perfil metabólico: producción de taxol



Estudios por cDNA-AFLP

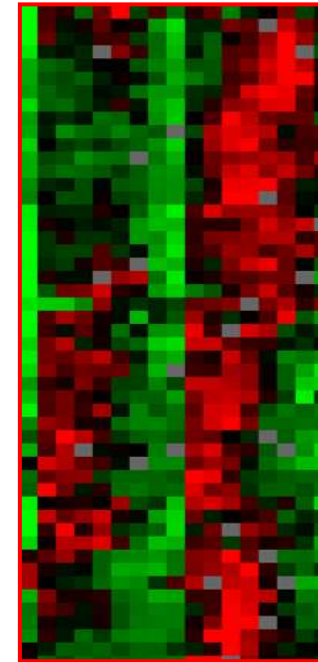
Muestras : 0.5h, 1h, 2h, 8h, 24h, 2d,
4d, 8d, 12d, 16d, 20d, 24d

+ metiljasmonato

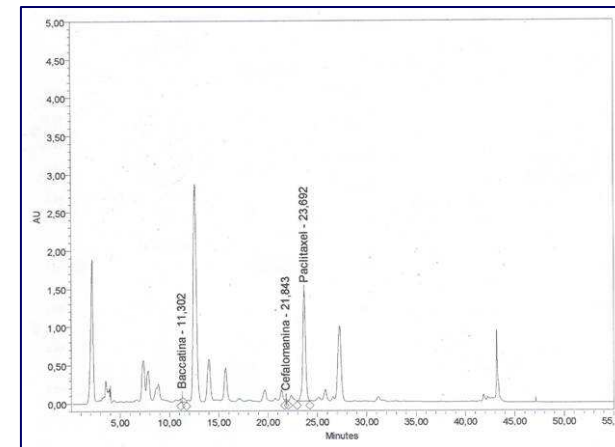


m. crecimiento m. producción

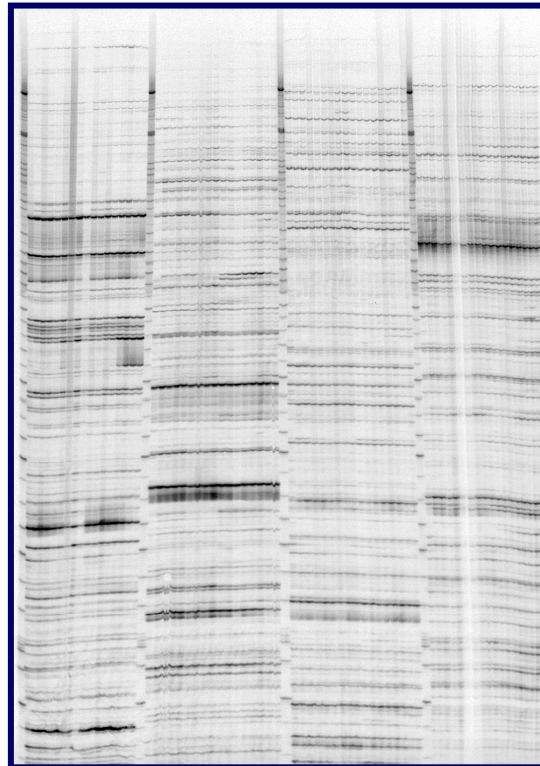
Cultivos en dos etapas de *T. baccata*



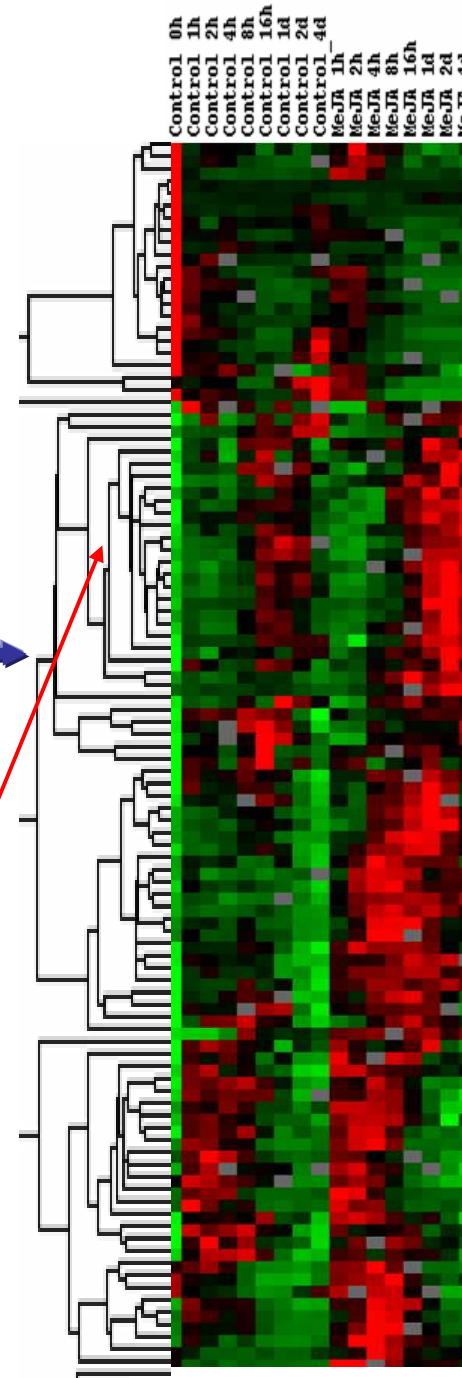
Perfil de transcritos
(cDNA-AFLP)



Perfil metabólico



**Conjuntos de genes activados
o reprimidos**

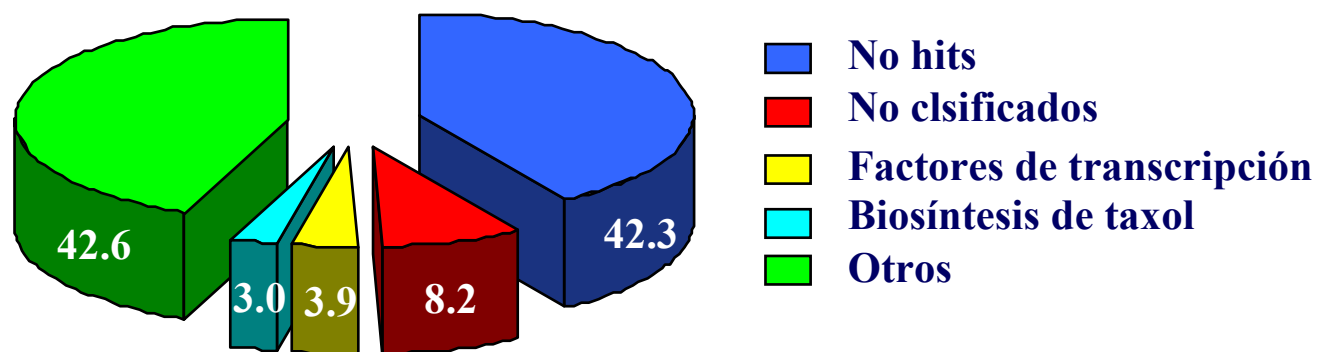


Muy activado

Poco activado

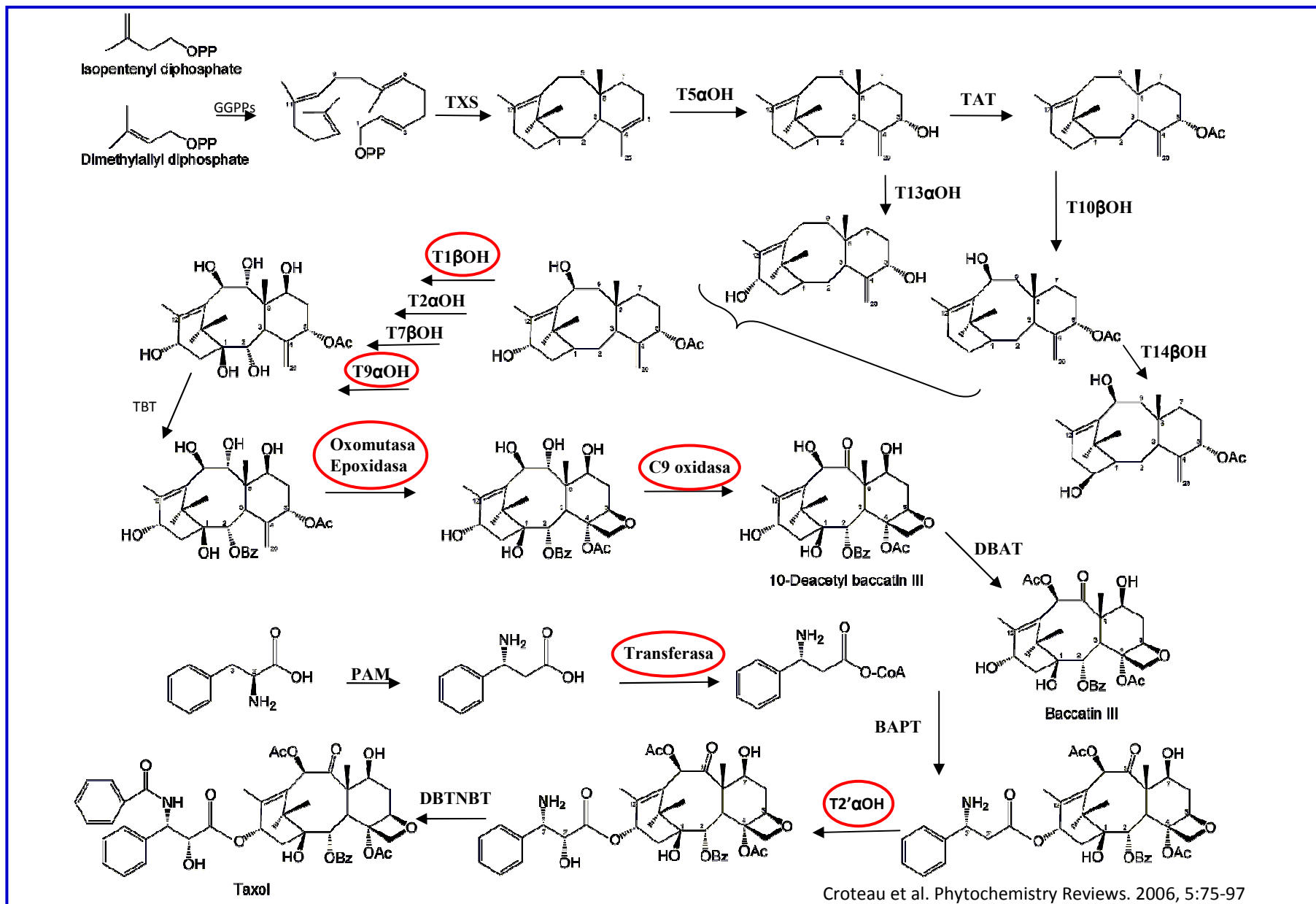
Datos desconocidos

Composición de los tags encontrados



Combinaciones de “primers”	124	
Tags visualizados	8192	
Tags diferenciales	861	10.5 %
Tags únicos	676	78.5 %
“Hits”	390	57.7 %

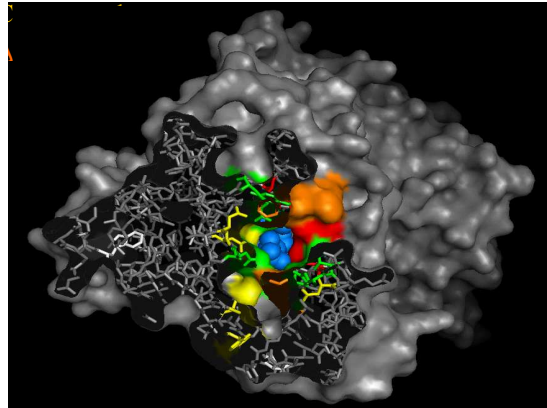
Biosíntesis del Taxol: 19 pasos metabólicos (12 conocidos, 7 desconocidos)



Nuevos genes de la biosíntesis del taxol secuenciados y clonados

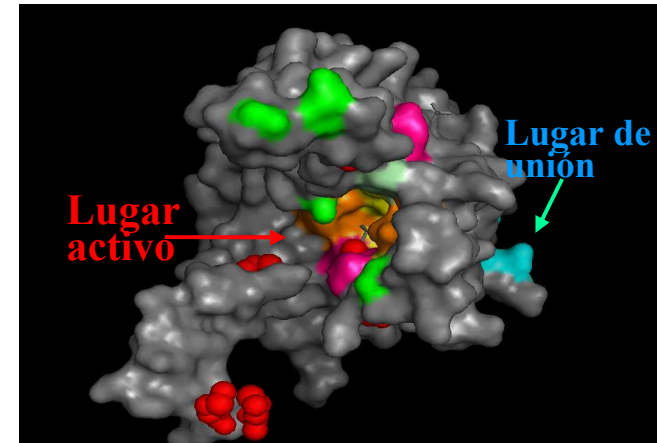
Possible function	TAG	TAG homology	Prot. Acc. Nº	e-value
CoA transferase	TB768	Acyl-Coa ligase	B9GQ39	0.0
C1&C9 hydroxylases	TB506	Cinnamate 4-hydroxylase	B2Z6P5	0.0
	TB331	Putative cytochrome P450	D7T4D5	1.00E-118
	TB574	Putative cytochrome P450	D7T4D5	1.00E-118
	TB224	Putative cytochrome P450	D5A7Y6	1.00E-152
C4-C20 epoxidase	TB328	Putative gibberellin 20-oxidase	A9NW35	1.00E-45
C9 oxidase	TB596	Unknown (FAD/FMN-containing dehydrogenase)	B8LR72	8.00E-87
	TB812	Unknown (GMC oxidoreductase)	A9NXU5	1.00E-151
	TB047	Unknown (GMC oxidoreductase)	A9NXU5	1.00E-109
	TB739	Unknown (GMC oxidoreductase)	A9NXU5	1.00E-148
	TB212	Unknown (Short-chain alcohol dehydrogenase)	A9NU86	6.00E-91
	TB645	Unknown (GMC oxidoreductase)	A9NXU5	1.00E-158
Oxomutase	TB493	Putative Carboxylic ester hydrolase	A9SVY3	1.00E-44
	TB195	Hypothetical protein (Glyoxal oxidase-related)	F6GTQ6	1.00E-164
	TB115	Hypothetical protein (Galactose oxidase)	D8RR64	1.00E-163

Estudios *in silico*



Taxadieno sintasa

- Lugar activo
- Unión del cofactor
- AA conservados
- AA cercanos al lugar activo



Enzima recombinante que posiblemente controla un paso de la biosíntesis de taxanos.

Protein database (DB):



MACiE: 3D structure + catalytic aa + function; hand-annotated proteins.

Catalytic Site Atlas: 3D structure + catalytic aa (+ function); hand-annotated + proteins found by homology.

Swiss-Prot: hand-annotated proteins (nor 3D structure, activity neither catalytic aa)

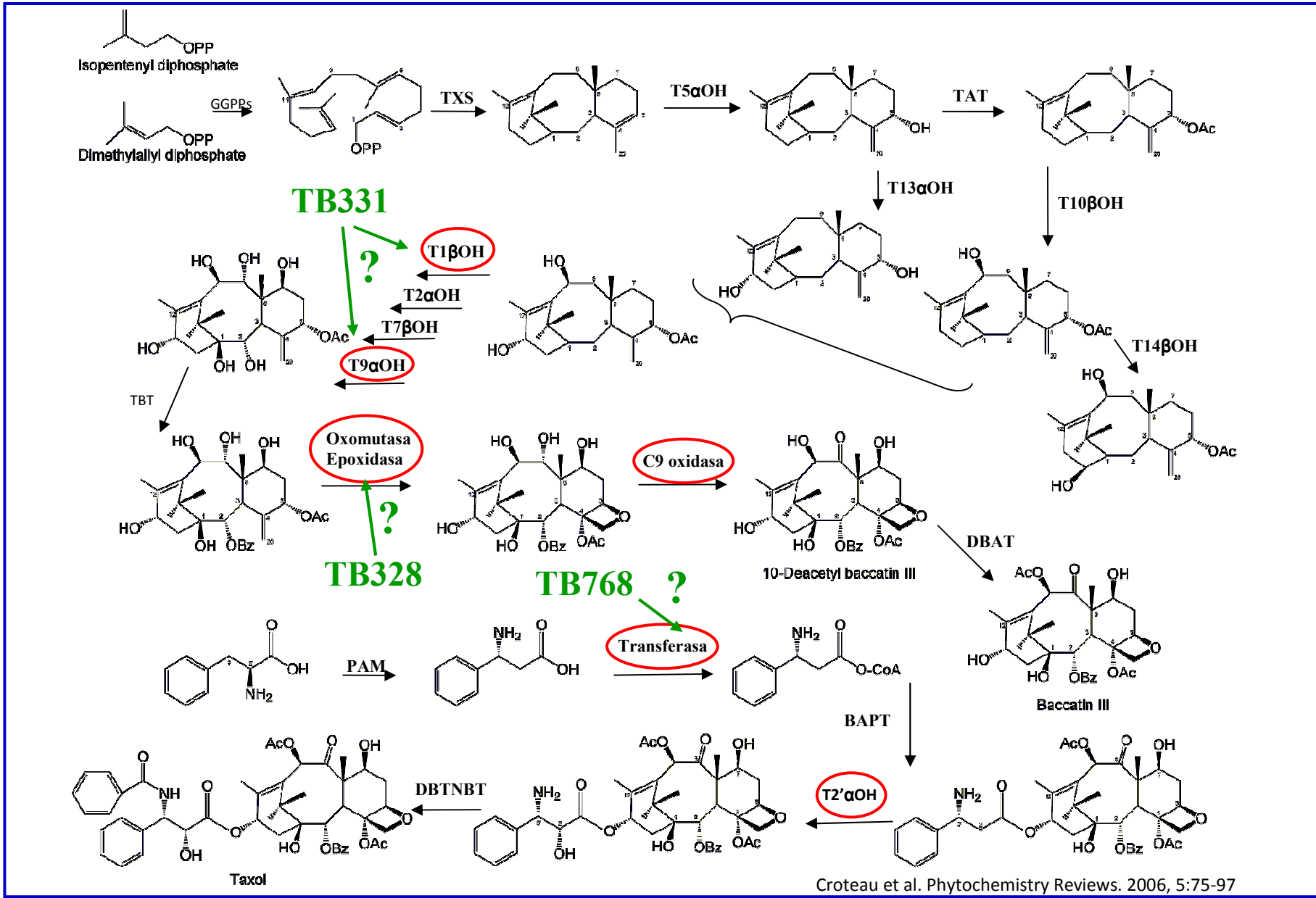
TrEML (Uniprot): Automatically annotated and not reviewed

- Selección de las enzimas recombinantes con más del 65% de homología con enzimas conocidas de *Taxus sp.* con la misma función.
- Descartar el resto de posibilidades.

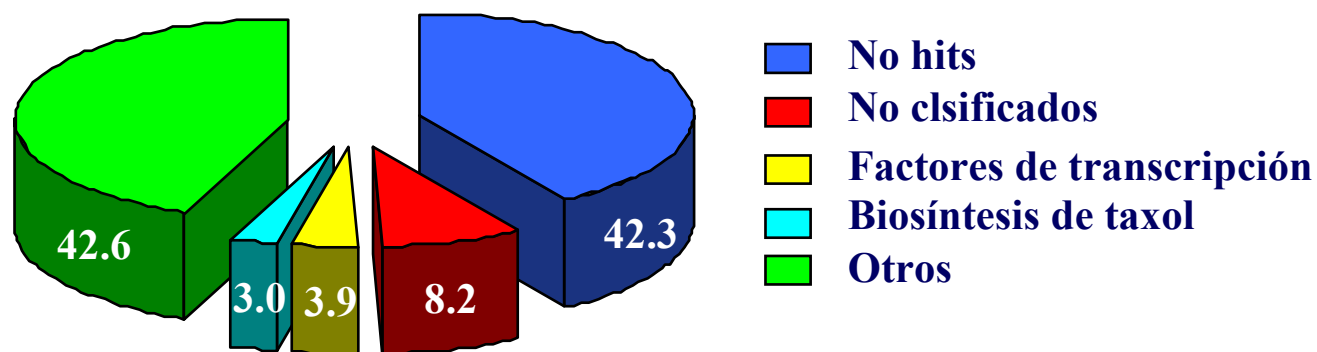
Pasos metabólicos desconocidos: estudios *in silico*

	similar		enzyme	pdb	origin	known AS	best hit to compare		Candidate	best score with	score
	code	function/substrate					code	origin			
Hydroxylases C1C9											
TB224, TB313, TB506, TB574	1yrc	P00183	Camphor 5-monooxygenase	MACIE	Y	T10OH	Q6SPR0	Swiss-Prot	TB506	P46373_CYP450	35.71
						T13OH	Q8W4T9	Swiss-Prot	TB224	Q59831_CYP450	43.75
						ABA8 hydrox.	O81077	Swiss-Prot	TB331	T10OH	65
						KAO2 (GA3)	Q9C5Y2	Swiss-Prot	TB574	ABA8 hydrox / T10OH	55
Oxidases C9											
TB212	2bgm	Q94KL8	Rhizome secoisolariciresinol dehydrogenase	CSA	Y				TB212	2bgm	78.57
	1mg5	P00334	Alcohol dehydrogenase	MACIE	Y	Xanthoxin dehydrogenase	Q9C826	Swiss-Prot			
TB596	2vfv	Q9ZBU1	Probable xylitol oxidase	PDB		NONE					
	---	Q7SGY1	D-arabino-1,4-lactone oxidase	Swiss-Prot							
	---	Q8HXW0	L-gulonolactone oxidase	Swiss-Prot							
TB047, TB645, TB739, TB812	2jbv	Q7X2H8	Choline oxidase	CSA	Y	NONE					
	1g11	Q81158	Choline oxidase	CSA	Y						
Epoxidase											
TB328	2brt	Q0WWD6	Leucoanthocyanidin dioxygenase	CSA	Y	GA3 diox	Q3I411	Swiss-Prot	TB328	GA3 diox	77.78
	1wa6	Q08506	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1	CSA	Y	GA3 diox	Q9ZT84	Swiss-Prot			
Oxomutases											
TB115-TB195	2eic	Q01745	Galactose oxidase	Swiss-Prot		NONE					
TB493	---	Q9FXE8	α -fucosidase 3-precursor	Swiss-Prot		NONE					
	---	P40602	anter-specific Pro-rich prot	Swiss-Prot							
	---	Q7Y1X1	esterase precursor	Swiss-Prot							
	4cc2cc	P11603	1-phenylethanol hemiethylol precursor	Swiss-Prot							
CoA transferase											
TB768	1v25	Q6L8F0	Medium chain fatty acid CoA ligase	MACIE	Y	4CL	Q941M3	PDB	TB768	Acyl CoA liase	96.97
	3a9v	Q941M3	4-coumarate:CoA ligase (4CL)	PDB					TB768	4CL	96.97
	1ba3	P08659	Luciferin 4-monooxygenase	PDB							

Genes desconocidos de la biosíntesis del taxol



Composición de los tags encontrados



Combinaciones de “primers”	124	
Tags visualizados	8192	
Tags diferenciales	861	10.5 %
Tags únicos	676	78.5 %
“Hits”	390	57.7 %

Nuevos genes que codifican para factores de transcripción o péptidos reguladores, secuenciados y clonados

TAG	TAG homology	Prot Acc Nº	e-value	Domains TAG homology (Interpro)
TB219	Unknown (TIFY domain)	A9NZP0	2.00E-12	IPR018467, CCT_CS; IPR010399, Tify.
TB552	Hypothetical protein (TIFY domain)	A9P1Y4	0.007	IPR018467, CCT_CS; IPR010399, Tify.
TB608	JAZ (jasmonate ZIM-domain prot)	D5ADR6	9.00E-17	IPR018467, CCT_CS; IPR010399, Tify.
TB265	Putative bHLH DNA-binding domain protein	B9RRL5	2.00E-49	IPR011598, HLH_DNA-bd
TB449	Putative bHLH DNA-binding domain protein	B7FMA0	4.00E-10	IPR011598, HLH_DNA-bd
TB537	Hypothetical BSD domain protein	XP_002267363	2.00E-39	IPR005607 BSD
TB510	Hypothetical protein	B9SF83	8.00E-14	-----
TB595	Hypothetical protein	E0CSF3	1.00E-19	-----

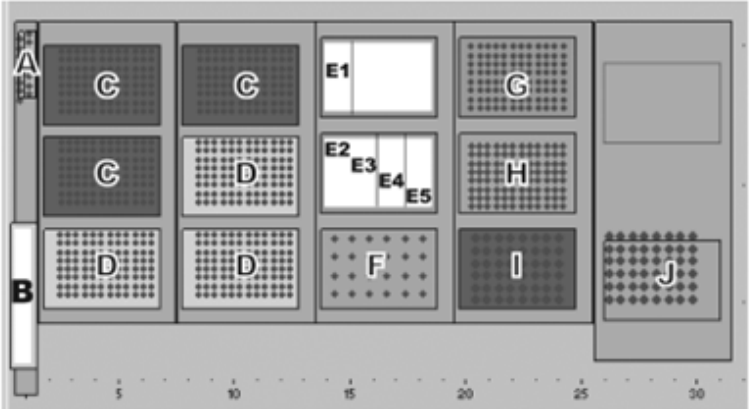
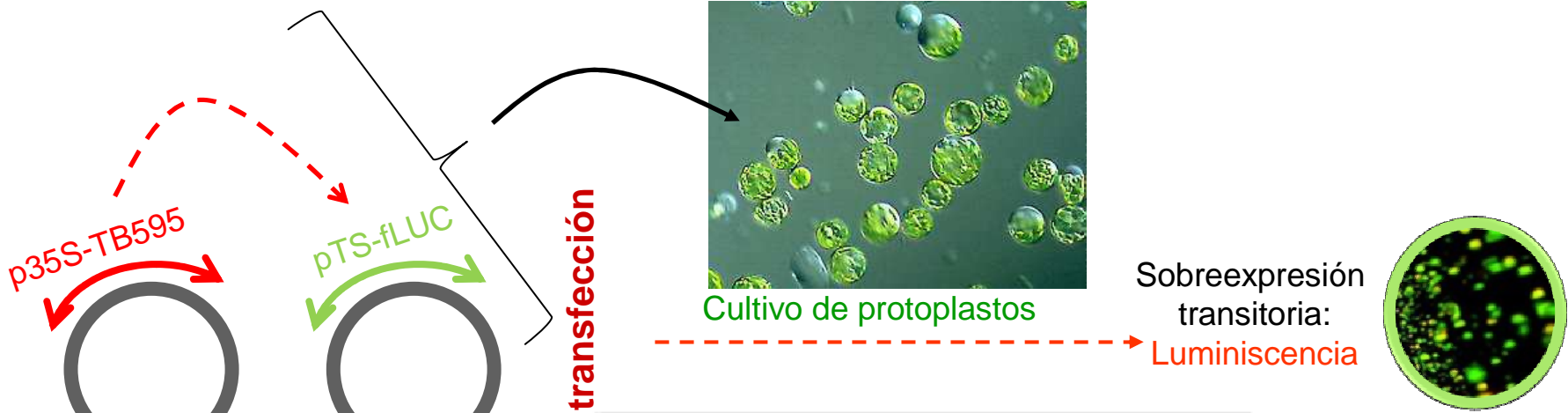
Estudio de la funcionalidad de un posible “Peptido regulador”: Taximin

1. **Expresión transitoria en protoplastos de tabaco: Se ha determinado la acción inductora del péptido regulador Taximin (producto del gen *TB595*) sobre los promotores de los genes:**

- ***TXS***: Taxadiene synthase (*Taxus* sp)
- ***T13OH***: Taxane-13-hydroxylase (*Taxus* sp)
- ***PMT***: Putrescine N-methyl transferase (Tabaco)
- ***QPRT***: Quinolinic acid phosphoribosyltransferase (Tabaco)
- ***STS***: Strictosidine synthase (*Catharanthus roseus*)

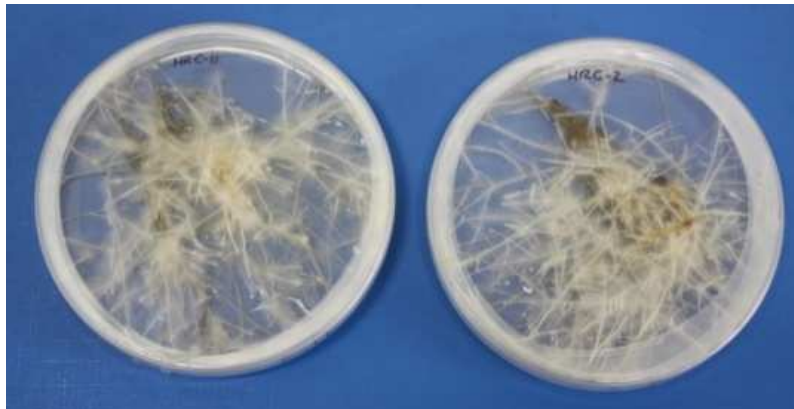


Análisis funcional del gen TB595 mediante el ensayo dual de la luciferasa de luciérnaga/renilla en protoplastos transfectados de tabaco.

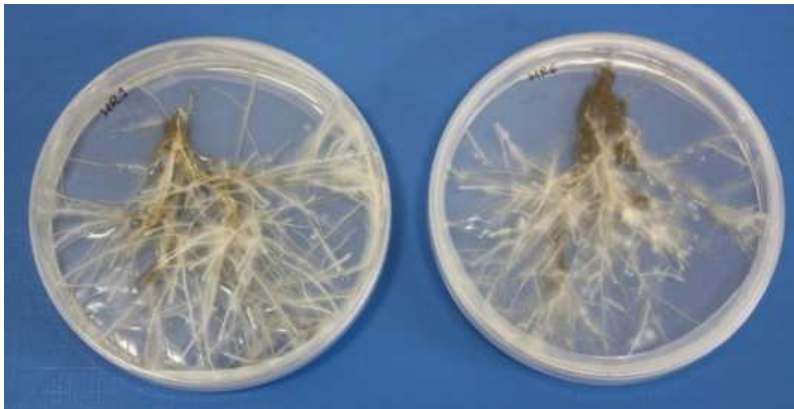


Ensayo automatizado y estandarizado de la expresión transitoria en protoplastos de tabaco.

2. Expresión del gen **TB595** en raíces transformadas de tabaco:

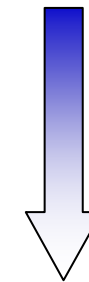


Líneas de raíces transformadas control



Líneas de raíces transformadas que sobre-expresan el gen **TB595**

Sobre-expresión
del gen *TB595*

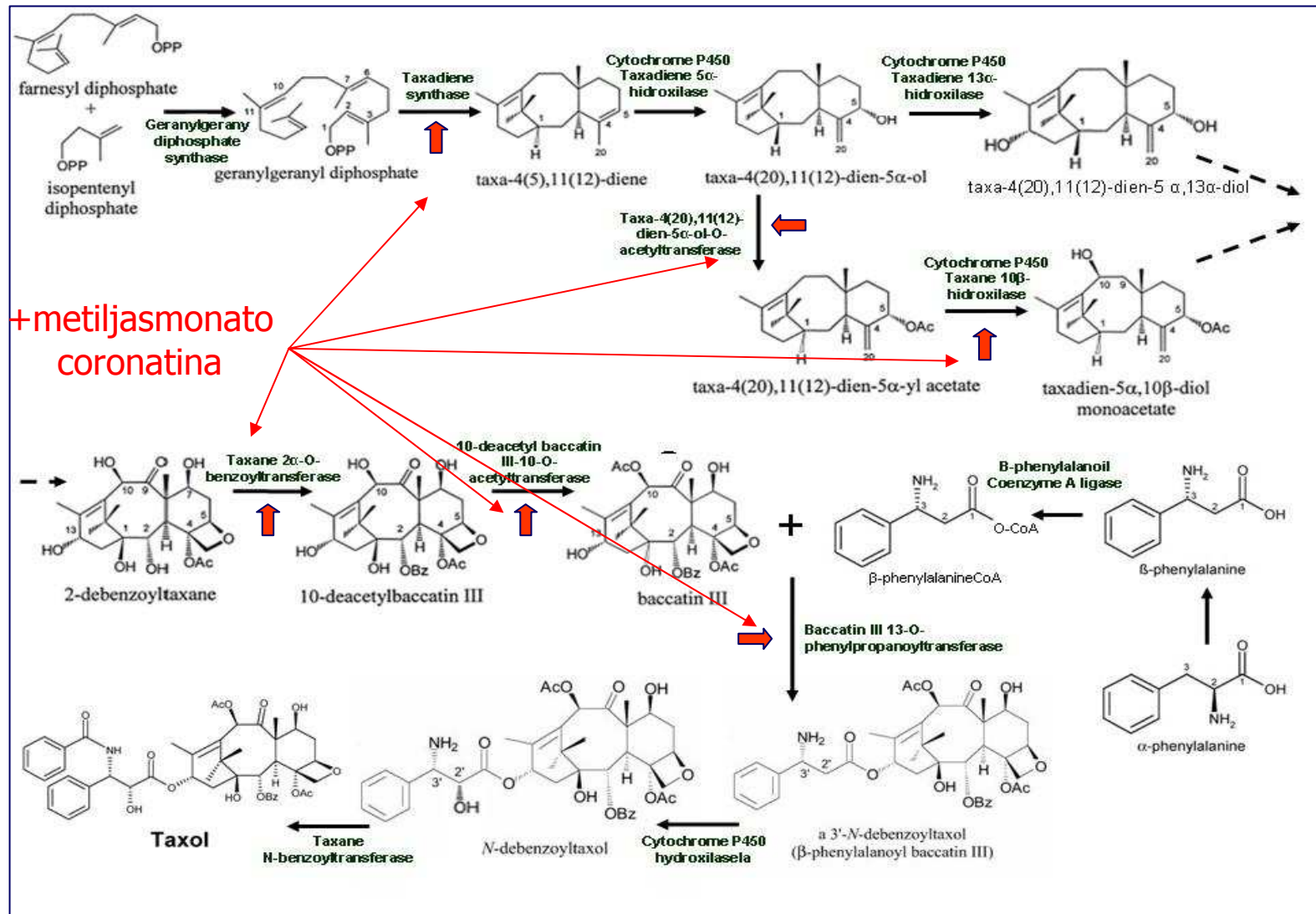


+ MeJ

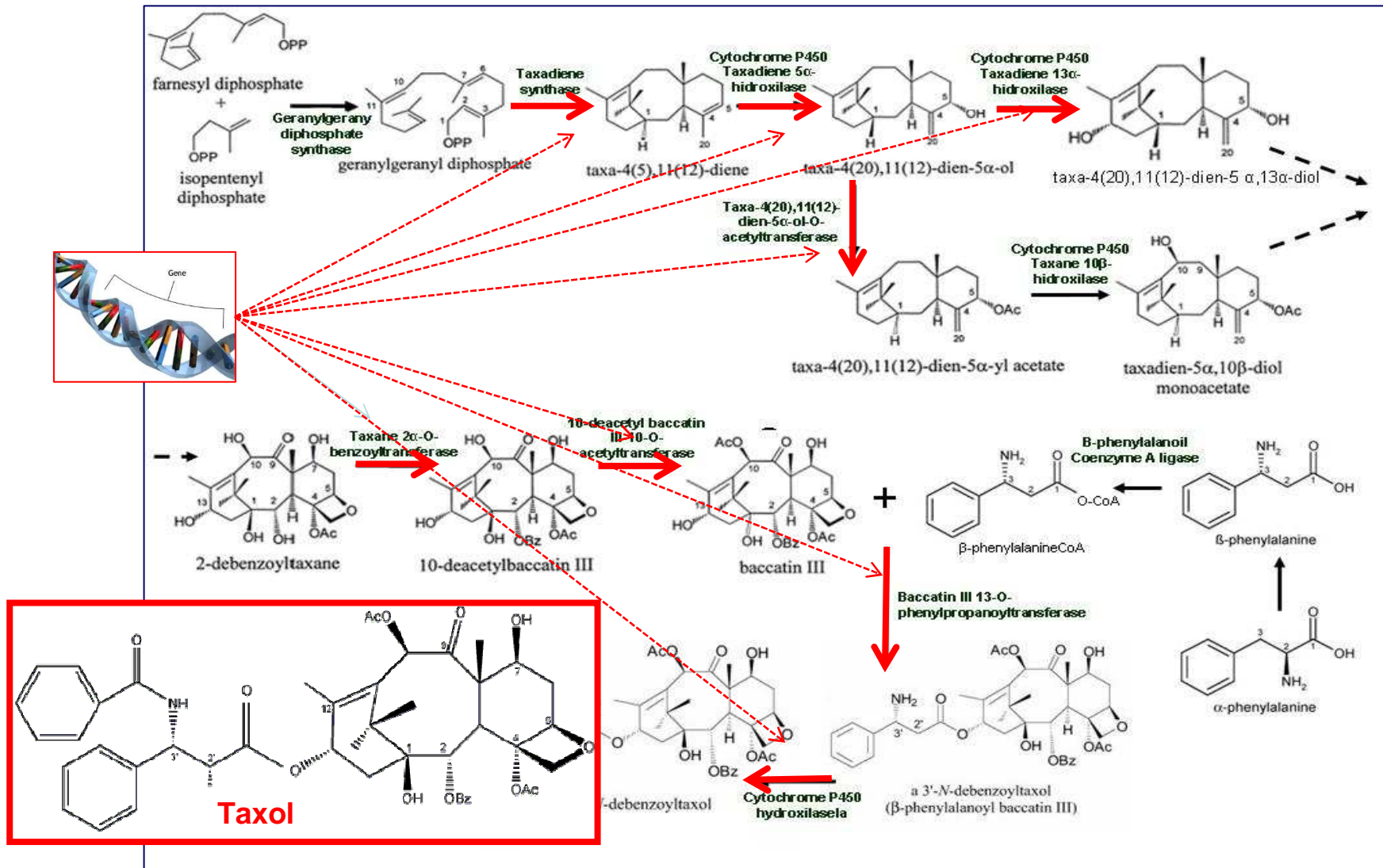


Niveles de alcaloides

Biosíntesis del taxol: reconocimiento pasos flujo limitantes



Biosíntesis del taxol: reconocimiento pasos flujo limitantes

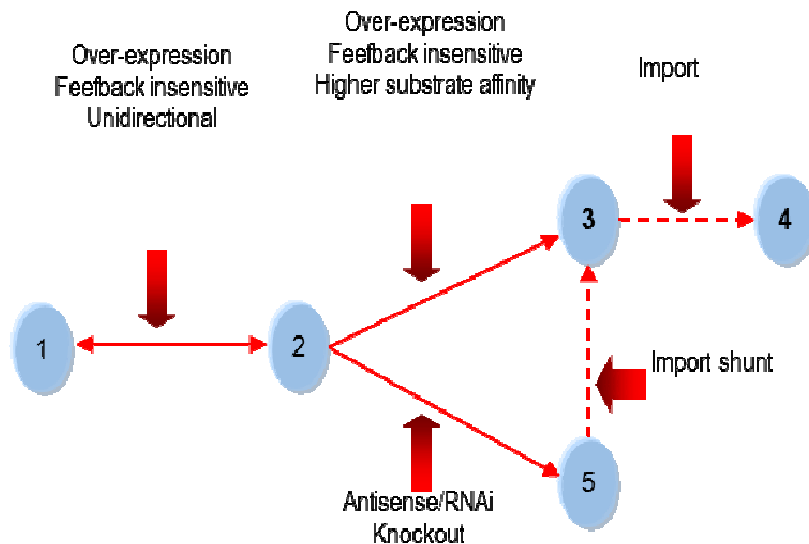


Mejora racional:

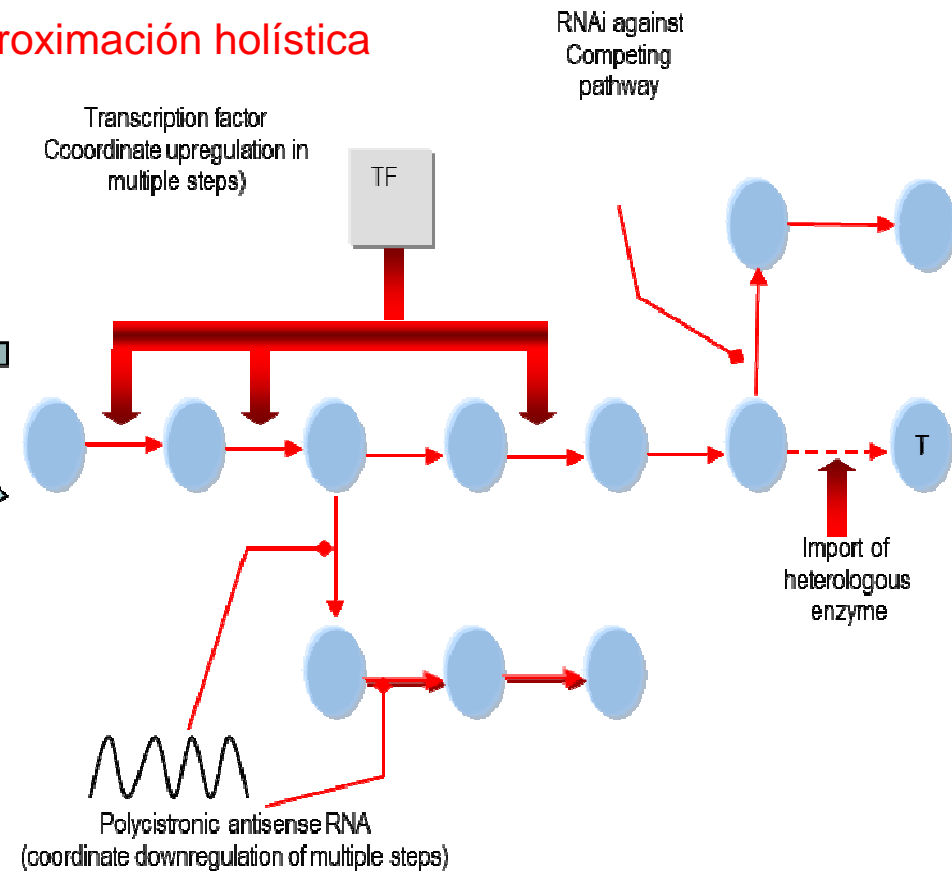
Ingeniería metabólica: Es la manipulación genética de una o más rutas biosintéticas.

Aplicación de la ingeniería metabólica a la producción biotecnológica:

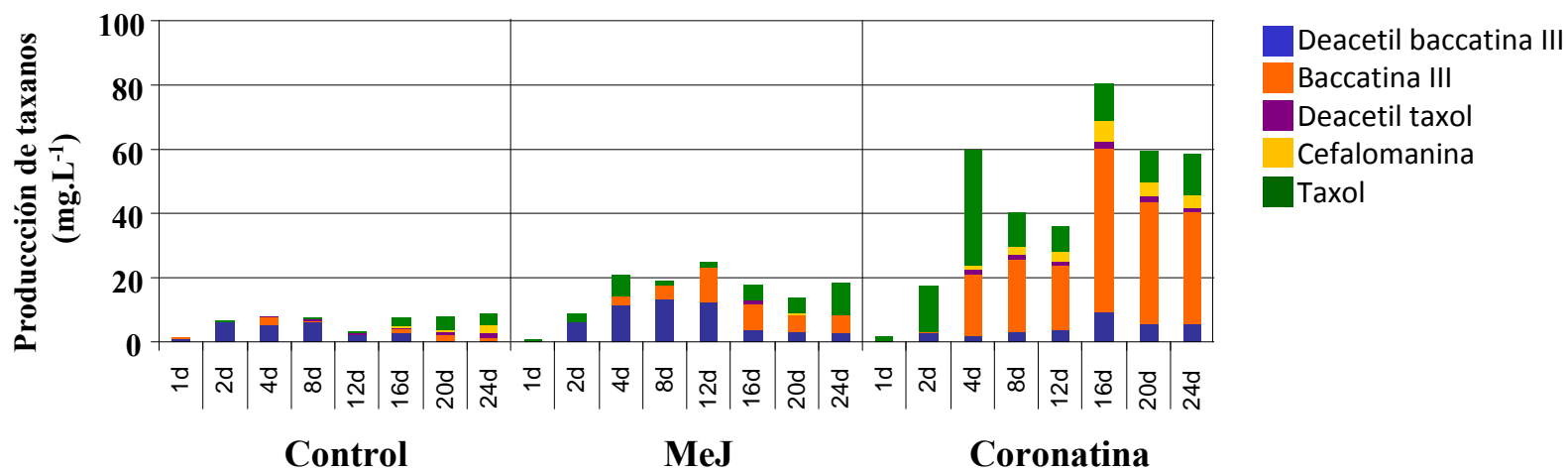
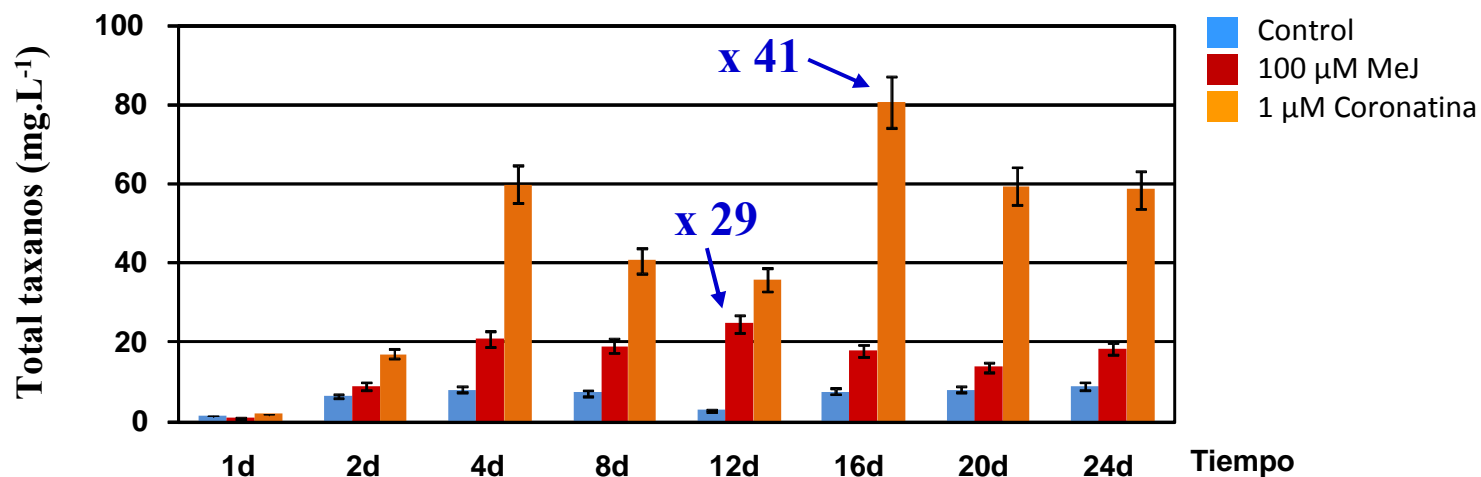
Modulación de pasos individuales



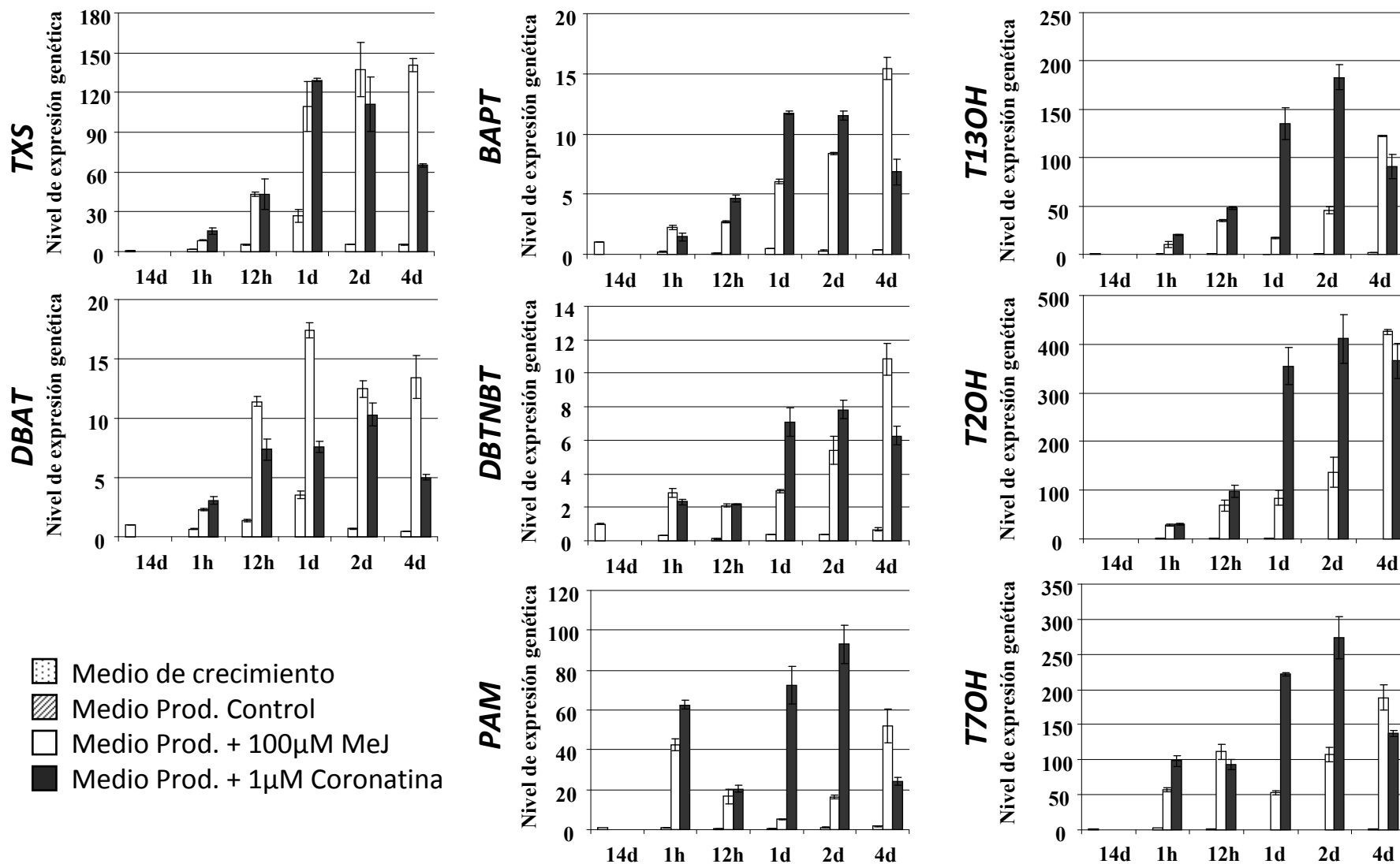
Aproximación holística



Aproximación molecular - Optimización de la producción: Adición de elicitores al medio de cultivo

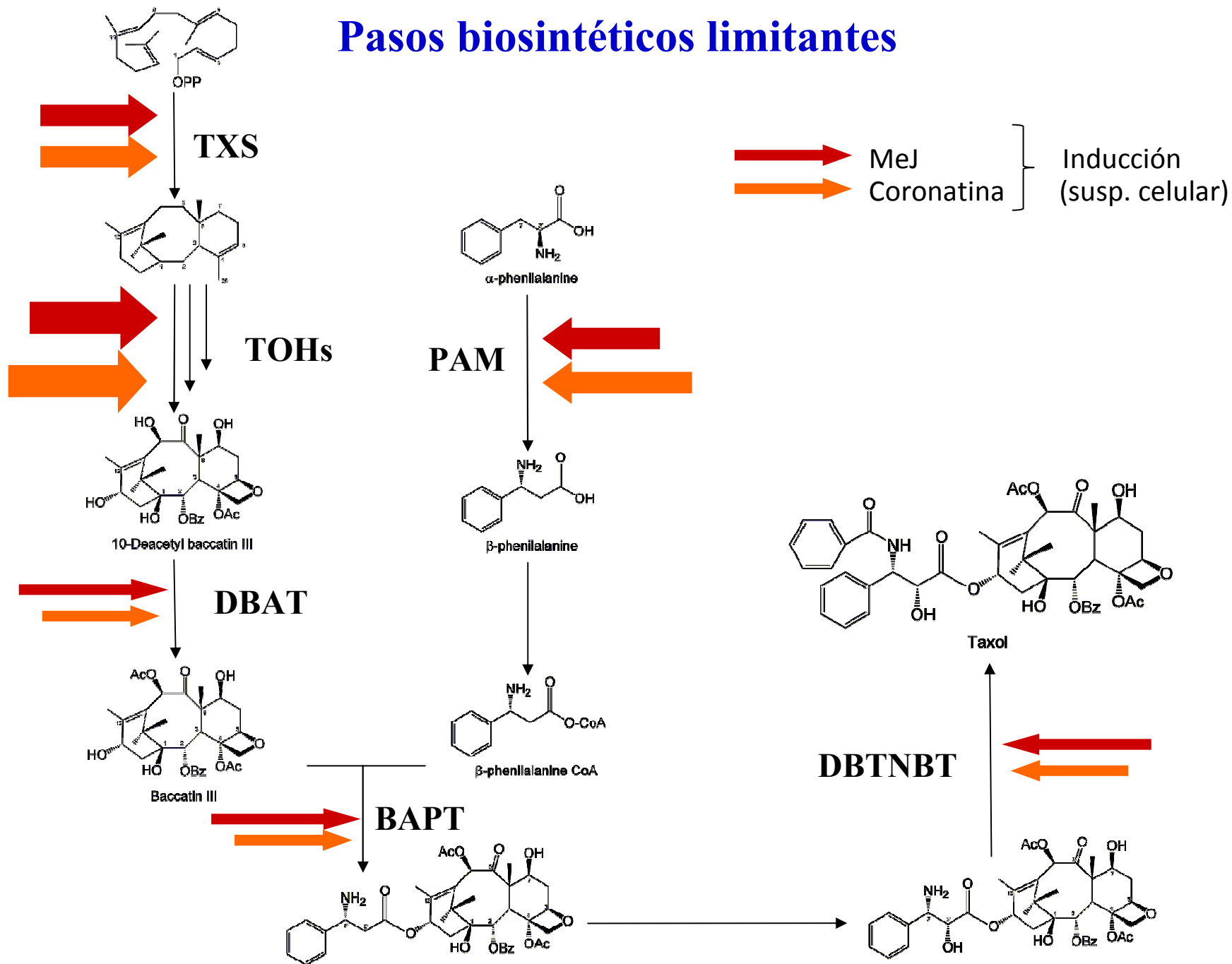


Perfil transcriptómico de cultivos de *T. media* elicitados

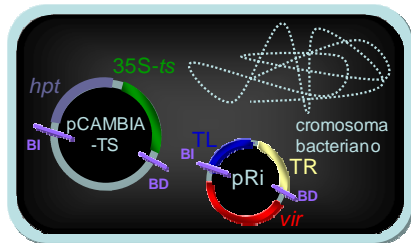


TXS: taxadieno sintasa; **DBAT:** DABIII-10-O-acetil transferasa; **BAPT:** BIII-C13-O-fenilpropanoil-CoA transferasa; **DBTNBT:** 3'-N-debenzoil-2'deoxitaxol N-benzoil transferasa; **PAM:** fenilalanina aminomutasa; **T13OH, T2OH, T7OH:** hidroxilasas.

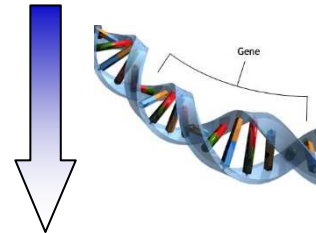
Pasos biosintéticos limitantes



Genes que controlan pasos limitantes y/o genes reguladores de la biosíntesis del taxol



pCAMBIA-TS: Plásmido pCA-TXS-His



Ingeniería metabólica



Cultivos celulares transformados de *Taxus*



Plántulas de *Taxus*



Raíces transformadas



Cultivo de raíces transformadas



Callo transformado