



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Andraž MARINČ

**PRIDOBIVANJE KEMOTERAPEVTSKE
UČINKOVINE PAKLITAKSEL Z
BIOTEHNOLOŠKIMI POSTOPKI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Andraž MARINČ

**PRIDOBIVANJE KEMOTERAPEVTSKE UČINKOVINE
PAKLITAKSEL Z BIOTEHNOLOŠKIMI POSTOPKI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**PRODUCTION OF THE CHEMOTERAPEUTIC PACLITAXEL USING
BIOTECHNOLOGICAL METHODS**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2018

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Boruta Bohanca.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednica: prof. dr. Mojca Narat
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Borut Bohanec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Polona Jamnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 7. 9. 2018

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK 615.28:582.471.1:602.3:58.086.83(043.2)
- KG paklitaksel, rastlinske celične kulture, tisa, biotehnološki postopki, proizvodnja
- AV MARINČ, Andraž
- SA BOHANEČ, Borut (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
- LI 2018
- IN PRIDOBIVANJE KEMOTERAPEVTSKE UČINKOVINE PAKLITAKSEL Z BIOTEHNOLOŠKIMI POSTOPKI
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VI, 17, [2] str., 1 pregl., 1 pril., 75 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Paklitaksel je visoko oksigeniran diterpenoid in je ena najuspešnejših učinkovin za zdravljenje raka. Zaradi velike svetovne potrebe po kemoterapevtikah, redkosti paklitaksela v naravi in trajnostno nevzdržnega načina ekstrakcije iz naravnih virov (lubja in iglic dreves *Taxus* spp.) se za produkcijo uporabljajo biotehnološki postopki. Ker gre za tržno pomemben proizvod z visoko dodano vrednostjo, je optimizacija obstoječih postopkov velikega pomena, prav tako pa se išče alternativne vire paklitaksela in prekurzorjev; kot obetavne so se izkazale endofitske glive. Odkritje paklitaksela v navadni leski (*Corylus avellana* L.) nakazuje možnost izrabe odpada prehranske industrije, kakor tudi obstoj še neznanih rastlinskih producentov paklitaksela, katerih lastnosti bi bile ugodnejše za industrijsko uporabo. Dobra proučenost, praktičnost in enostavnost uporabe mikrobnih organizmov za proizvodnjo kompleksnih molekul botruje poskusom prenosa biosintezne poti paklitaksela v *E. coli* in *S. cerevisiae*, kar pa se je sicer izkazalo za težavno. V tem delu smo napravili krajši pregled biotehnoloških postopkov proizvodnje paklitaksela, vključno z načini izboljšave donosa celičnih kultur, proizvodnjo prekurzorjev v ustaljenih industrijskih mikororganizmih in z endofitskimi glivami.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 606:616.895.8:575.822:577.2(043.2)
- CX paclitaxel, plant cell culture, yew, biotechnological methods, production
- AU MARINČ, Andraž
- AA BOHANEČ, Borut (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2018
- TI PRODUCTION OF THE CHEMOTHERAPEUTIC PACLITAXEL USING BIOTECHNOLOGICAL METHODS
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 17, [2] p., 1 tab., 1 ann., 75 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Paclitaxel, a highly oxygenated diterpenoid, is one of the most successful therapeutics used in the treatment of various cancers. Due to the high global demand for the substance, its relative scarcity in nature and most of all, because the extraction from natural materials is either unsustainable or impractical a variety of biotechnological methods are employed for its industrial production. The substantial market for the substance allows for the production of a high added-value product, rationalising the ongoing optimization of the production processes as well as the search for alternative sources of paclitaxel. One of the most promising alternative sources are endophytic fungi, albeit their industrial use is yet to be realized. The discovery of paclitaxel in the common hazel (*Corylus avellana* L.) indicates the possible existence of yet unknown taxoid producing plant species, the intrinsic properties of which might make them more suitable for industrial use. A tentative option of utilizing the waste products of the food industry for paclitaxel extraction also emerges. Our understanding of commonly used microorganisms, their practicality and simplicity result in attempts to transfer the biosynthetic pathway for paclitaxel production away from the sometimes challenging plant hosts, although the progress is slow and troublesome. In this work we give a condensed review of the common paclitaxel production methods, the ways of improving said methods and the production of paclitaxel precursors in common industrial microorganisms and the endophytic fungi.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VI
	KAZALO PRILOG	VI
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VI
1	UVOD	1
1.1	PAKLITAKSEL	1
1.2	MIKROTUBULI	1
1.3	MEHANIZEM DELOVANJA PAKLITAKSELA	1
1.4	SINTEZA PAKLITAKSELA IN-VIVO	1
2	PRIDOBIVANJE PAKLITAKSELA	2
2.1	VIRI PAKLITAKSELA	2
2.2	PRODUKCIJA S SUSPENZIJSKIMI CELIČINIMI KULTURAMI	4
2.2.1	Selekcija in izbira stabilnih in hiperproducirajočih celic iz heterogene suspenzije	4
2.2.2	Pogoji	5
2.2.3	Elicitorji	5
2.3	HETEROLOGNA EKSPRESIJA	8
2.3.1	Druge biosintetske poti	8
2.3.2	E. coli	8
2.3.3	Delitev metabolne poti med člane mikorbnega konzorcija	9
2.4	EKSTRAKCIJA	9
3	SKLEPI	10
4	VIRI	11

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam endofitksih gliv, ki proizvajajo paklitaksel modificirano po Isah, 2015	3
--	---

KAZALO PRILOG

Priloga A: shema reakcij biosinteze paklitaksela	
--	--

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

HS	Toplotni šok (Heat Shock)
HSP	HS Proteini
ABA	abscizinska kislina
CYP450	citokrom P450
JA	jasmonska kislina
MeJa	metil jasmonat

1 UVOD

1.1 PAKLITAKSEL

Paklitaksel je visoko oksigeniran diterpenoid in je ena najbolj uspešnih učinkovin za zdravljenje raka. Prvič je bil izoliran leta 1962 iz pacifiške tise (*Taxus brevifolia* Nutt.). Paklitaksel je odobren za zdravljenje bolnikov z rakom na pljučih, jajčnikih, dojkah, vratu, bolnikov z rakom glave, oblikami kaposijevega sarkoma in številnimi drugimi rakavimi obolenji. Uporablja se tudi za preprečevanje restenoze žilnih opornic na srcu. Značilnost omenjenih lokalizacij oziroma tipov raka je trdna morfologija tvorbo (Stanton in sod., 2011). Paklitaksel deluje na mikrotubulni sistem celic, in tako inhibira proliferacijo celic v fazi G2 celičnega cikla z blokado mitoze.

1.2 MIKROTUBULI

Mikrotubuli, dolge filamentne strukture iz 13 paralelnih protofilamentov, sestojijo iz vzdolž longitudinalne osi izmenjujočih se α - in β -tubulinskih podenot. Tako je osnovna enota mikrotubula heterodimer α in β podenot. *In vivo* je tvorjenje mikrotubulov vezano na centrosom. Zaradi razlike med α in β monomeri so mikrotubuli »polarni«, pola se podaljšujeta z različno hitrostjo. Rast plus konca je hitra, minus konec je pri rasti počasnejši. β -tubulini so izpostavljeni na + koncu, α -tubulin pa na minus koncu. Alfa konci so večinoma zasidrani v centrosomu, β (+) konci pa se pogosto prosti v citoplazmi in lahko dosežejo tudi plazmalemo (Stanton in sod., 2011). Na hitro rastočem plus koncu je prisotna GTP kapa saj se na GTP vezani monomeri dodajajo hitreje kot se hidrolizira prejšnja enota GTP-ja. Hitrost depolimerizacije mikrotubulov je 100-krat večja na – koncu zaradi odsotnosti GTP kape. Druga lastnost GTP kape pa je ohranjanje ravnosti in togosti mikrotubula (Stanton in sod., 2011). Obstajajo stabilizirajoči in destabilizirajoči proteini (MAP in MCAK). Mikrotubuli so dinamični polimeri, stalno oscilirajoči med fazami rasti in krajšanja z vmesnimi premori.

Navkljub energijski potratnosti takšnega sistema igrajo ključno vlogo v citoskeletu celice in tvorbi mitotskega vretena za segregacijo kromosomov (Stanton in sod., 2011).

1.3 MEHANIZEM DELOVANJA PAKLITAKSELA

Taksani se vežejo na β -tubulin v lumnu mikrotubulov (Stanton in sod., 2011). Paklitaksel povzroči nastanek na depolimerizacijo zelo odpornih mikrotubulov, razporejenih v ploskvam podobne strukture (Stanton in sod., 2011). Paklitaksel olajša sintezo mikrotubulov v različnih pogojih; od odsotnosti MAP, GTP, ob nizkih koncentracijah proteinov in tudi ob nizkih temperaturah. Takšni mikrotubuli so krajši od normalnih. Taksani delujejo »stabilizirajoče« in preprečujejo depolimerizacijo mikrotubulov — poglobitno lastnost, nujno za funkcionalnost celičnega skeleta in mitotskega vretena.

1.4 SINTEZA PAKLITAKSELA IN-VIVO

Čeprav paklitaksel kaže posebno dobro aktivnost proti oomicetam različnih taksonomskih skupin ostaja evolucijska prednost za tiso (*Taxus* spp.) nepojasnjena, saj so prav tako učinkoviti manj kompleksni taksani (Heinig in sod., 2013). Taksola ne proizvajajo vrste iz rodov *Pseudotaxus*

in *Austrotaxus*. Enostavne taksane brez oksetana ali D-obročja so našli v *Austrotaxus spicata* C., ki velja za primitivnega prednika rodu *Taxus* (raste na Novi Kaledoniji) in je tudi edina vrsta v omenjenem rodu.

Sinteza paklitaksela obsega več kot 20 reakcij in ima za končni produkt več fiziološko aktivnih snovi. Poteka tako v plastidih, kot endoplazmatksem retikulumu in citosolu (Heinig in sod., 2013).

2 PRIDOBIVANJE PAKLITAKSELA

Komercialno se je paklitaksel najprej pridobival iz lubja tise kar pa se je izkazalo kot netrajnostno in nepraktično zaradi počasne rasti dreves in majhne koncentracije paklitaksela (Lin in sod., 2018). Uspešna klinična uporaba je povzročila pomanjkanje te kompleksne substance, kar je sprožilo obsežno iskanje alternativnih virov in novih metod proizvodnje. Kot alternativo ekstrakciji sta Holton in Kingston razvila pol-sintetično molekulo registrirano kot taxotere™ (Gallego in sod., 2017), ki se je proizvajala iz bakatina III in deacetil bakatina III; prekursorjev paklitaksela (Holton in sod., 1994). Oba prekursorja ne izkazujeta citotoksičnih učinkov in sta prisotna v iglicah navadne tise (*Taxus baccata* L.) (Holton in sod., 1994).

Eden najboljših primerov uporabe biotehnoloških metod za produkcijo spojin z visoko dodano vrednostjo je uporaba celičnih kultur *Taxus* spp. za proizvodnjo paklitaksela in taksanov za produkcijo pilsinteznih učinkovin (Vidal-Limon in sod., 2018).

2.1 VIRI PAKLITAKSELA

Leska (*Corylus avellana* L.) proizvaja taksol v celičnih kulturah (Bestoso in sod., 2006). Metanolni ekstrakti lubja, poganjkov in listov leske, tudi lupin lešnikov, vsebujejo paklitaksel z antimitotksim delovanjem (Ottaggio in sod., 2008). Ekstrakti lupin lešnikov poleg paklitaksela vsebujejo še 10-deacetilbakatintin III, bakatin III, paklitaksel C in 7-epipaklitaksel; največ v listju. Ekstrakcija paklitaksela iz lupin lešnikov je, nižji koncentraciji navkljub, zanimiva saj so lupine odpadek preahrambne industrije (Ottaggio in sod., 2008).

Prvi endofitski organizem, ki proizvaja paklitaksel so odkrili v *T. brevifolia* Nutt. v devetdesetih letih. Gre za glivo *Taxomyces andreanae*. V tisi najpogostejši endofit so glive *Pestalotiopsis* spp. (Strobel in sod. 2008, Miller in sod. 2008). Endofitske glive tvorijo spore, imajo zato visok potencial za namnoževanje in se lahko razširijo na druge rastlinske vrste, ki same ne proizvajajo taksola (Miele in sod. 2012). Kot posebej obetavne so se izkazale rastlinske vrste v vlažnih okoljih (Ji in sod. 2006). Obetavnosti navkljub je bilo izoliranih relativno malo gliv, ki proizvajajo taksol (Miele in sod. 2012). Dodatna ovira je nizka produktivnost kultur gliv, donosi se tipično gibljejo med 24 in 70 ng/L (Gangadevi in Muthumary 2009). Končni produkt biološke sinteze taksenov je lahko bakatin III ali pa 10-DABIII, pri takšnih glivah (npr. *Trichoderma* sp.) ni mogoče zaznati produkcije taksola. Predvideva se, da so endofiti razvili različne stopnje sinteze taksanov med koevolucijo z gostiteljsko rastlino (Li in sod., 2015).

Preglednica 1: Seznam endofitskih gliv, ki proizvajajo paklitaksel, modificirano po Isah, 2015

Vrsta	Gostiteljska rastlina	Referenca
<i>Alternaria alternata</i>	<i>T. chinensis</i> var. <i>mairei</i>	(Tian in sod., 2006)
<i>Alternaria</i> sp.	<i>T. cuspidata</i>	(Yechun, 2011)
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Ginkgo biloba</i>	(Kim in sod., 1999)
<i>Aspergillus aculeatinus</i>	<i>Usticia gendarussa</i>	(Qiao in sod., 2017)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Podocarpus</i> sp.	(Sun in sod., 2008)
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>taxi</i>	<i>T. cuspidata</i>	(Zhao in sod., 2009)
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	<i>T. baccata</i>	(Venkatachalam in sod., 2008)
<i>Botrytis</i> sp.	<i>T. chinensis</i> var. <i>mairei</i>	(Hu in sod., 2006)
<i>Botrytis</i> sp.	<i>T. cuspidata</i>	(Zhao in sod., 2008)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>T. media</i>	(Zhang in sod., 2009)
<i>Cladosporium oxysporum</i>	<i>Moringa oleifera</i>	(Raj in sod., 2015)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Moringa oleifera</i>	(Gangadevi in Johnpaul, 2008)
<i>Ectostroma</i> sp.	<i>T. chinensis</i> var. <i>mairei</i>	(Guo in sod., 2006)
<i>F. mairei</i> (UH23)	<i>T. chinensis</i>	(Dai in Tao, 2008)
<i>F. solani</i>	<i>T. celebica</i>	(Chakravarthi in sod., 2008)
<i>Fusarium arthrosporioides</i>	<i>T. cuspidata</i>	(Li in sod., 2008)
<i>Fusarium lateritium</i>	<i>T. baccata</i>	(Yechun, 2011)
<i>Fusarium mairei</i> (Y1117)	<i>T. chinensis</i> var. <i>mairei</i>	(Elavarasi in sod., 2012)
<i>Fusarium solani</i> (Tax-3)	<i>T. chinensis</i>	(Deng in sod., 2008)
<i>Grammothele lineata</i>	<i>Corchorus olitorius</i>	(Das in sod., 2017)
<i>Guignardia mangiferae</i>	<i>T. media</i>	(Xiong in sod., 2013)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>T. chinensis</i>	(Liu in sod., 2009)
<i>Monochaetia</i> sp.	<i>T. baccata</i>	(Yechun, 2011)
<i>Mucor rouxianus</i>	<i>T. chinensis</i>	(Miao in sod., 2009)
<i>Nodulisporium sylviforme</i>	<i>T. cuspidata</i>	(Onrubia in sod., 2013a)
<i>Ozonium</i> sp.	<i>T. chinensis</i> var. <i>mairei</i>	(Guo in sod., 2006)
<i>P. dioscoreae</i> (No. 605)	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	(Kumaran in sod., 2009)
<i>P. microspora</i> (Ne-32)	<i>T. wallichiana</i>	(Strobel in sod., 1996)
<i>P. microspora</i> (No 1040)	<i>T. wallichiana</i>	(Strobel in sod., 1996)
<i>P. microspora</i> (Cp-4)	<i>Taxodium distichum</i>	(Kusari in sod., 2014)
<i>P. spinarum</i> (No. 625)	<i>Cupressus</i> sp.	(Kumaran in sod., 2009)
<i>Papulaspora</i> sp.	<i>T. chinensis</i> var. <i>mairei</i>	(Hu in sod., 2006)
<i>Periconia</i> sp.	<i>Torreya grandifolia</i>	(Li in sod., 1998)
<i>Pestalotia bicilia</i>	<i>T. baccata</i>	(Yechun, 2011)
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	<i>Wollemia nobilis</i>	(Strobel in sod., 1997)
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>T. cuspidata</i>	(Yechun, 2011)
<i>Pestalotiopsis pauciseta</i>	<i>Cardiospermum helicacabum</i>	(Gangadevi in sod., 2008)
<i>Pestalotiopsis terminaliae</i>	<i>Terminalia arjuna</i>	(Gangadevi in Johnpaul, 2008)
<i>Phyllosticta citricarpa</i>	<i>Citrus media</i>	(Kumaran in sod., 2008)
<i>Pithomyces</i> sp.	<i>T. sumatrana</i>	(Strobel in sod., 1996)
<i>Seimatoantlerium nepalense</i>	<i>T. wallichiana</i>	(Bashyal in sod., 1999)
<i>Seimatoantlerium tepuiense</i>	<i>Maguireothamnus speciosus</i>	(Strobel in sod., 1999)
<i>Sporormia minima</i>	<i>T. wallichiana</i>	(Shrestha in sod., 2001)
<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	(Stierle in sod., 1993)
<i>Taxomyces</i> sp.	<i>T. yunnanensis</i>	(Isah, 2015)
<i>Trhoderma</i> sp.	<i>Taxus wallichiana</i> var. <i>mairei</i>	(Li in sod., 1998)
<i>Trichothecium</i> sp.	<i>T. wallichiana</i>	(Shrestha in sod., 2001)
<i>Tubercularia</i> sp.	<i>T. chinensis</i> var. <i>mairie</i>	(Wang in sod., 2000)

Pojavili so se dvomi o zmožnosti gliv za produkcijo paklitaksela (vključno s prvo identificirano endofitsko glivo, ki proizvaja paklitaksel) saj niso našli taksidien sintaze v glivah, pozitivni rezultati številnih študij pa naj bi bili posledica akumulacije paklitaksela v membranah gliv (Heinig in sod., 2013). Paklitaksel je stabilen v liposomih več mesecev, kar se izkorišča tudi za

dostavo učinkovine pri zdravljenju (Crosasso in sod., 2000). Občutljivost analitskih metod in, v primeru uporabe imunoloških tehnik za detekcijo paklitaksela, navzkrižno reagiranje protiteles (tako so paklitaksel zaznali v listu tobaka) lahko v kombinaciji z akumulacijo v glivah povzroči lažno pozitivne rezultate. Po prvi in drugi pasaži taksanov niso mogli zaznati (Heinig in sod., 2013). V kolikor bi te trditve držale, in torej endofitske glive ne bi proizvajale taksanov, temveč jih zgolj akumulirale, bi težko pojasnili detekcijo taksola s citotoksično aktivnostjo v endofitih izoliranih iz raslinskih vrst, ki same po sebi ne premorejo mehanizmov za sintezo taksola. Tudi v primeru lažno pozitivnih rezultatov imunoloških metod detekcije bi potemtakem morala obstajati alternativna razlaga za učinke ekstraktov prehod celic med metafazo in anafazo.

2.2 PRODUKCIJA S SUSPENZIJSKIMI CELIČNIMI KULTURAMI

Prehod na produkcijo s celičnimi kulturami je omogočil uporabo strategij izboljšave produkcijskih procesov, dasiravno so le-ti omejeni z viabilnostjo kultur in nizkimi donosi (Roberts, 2007). Dodatno oviro predstavlja akumulacija sekundarnih metabolitov; ta vodi v inhibicijo rasti celične kulture in nestabilnost produkcije ter pripomore k nastanku celičnih agregatov in heterogenosti, kar še dodatno poudari produkcijsko nestanovitnost. Prav nestabilnost in variabilnost sta ena glavnih težav pri uporabi celičnih kultur *Taxus* spp. — med celičnimi linijami in celo pri posamičnih celičnih linijah (tekem daljšega časovnega obdobja) so bile opažene do desetkratne razlike v produktivnosti (Roberts, 2007).

Način deljenja celic in s pektinom bogata osrednja lamela, ki jih trdno povezuje, botrujeta nastanku agregatov, tipično iz 2 do 50 celic. Velikost takšnih skupkov (premera do 2 mm) je že dovoljšna za nastanek — glede na koncentracijo kisika in mikrohranil — heterogenih okolij. Celice v notranjosti agregata se morfološko in metabolno razlikujejo od tistih bližje površini (Roberts, 2007).

Načini zoperpostavljanja omejenim težavam vključujejo modifikacijo gojišč, dohranjevanje, dovajanje prekursorjev, dvofazno ekstrakcijo z organskimi topili, uporabo elicitorjev npr. (hitosan, srebrovi ioni, metil jasmonat) in razbijanje celičnih agregatov z ultrazvokom. Izkorišča se trdne adsorbente (polimerne smole in samo-imobilizirajoče agregate (Y. Li in sod., 2015). Trdni adsorbenti veljajo za relativno nepraktične v primerjavi s tekočimi (Zhong, 2002).

Ker je produkcija taksanov obratno sorazmerna s tvorbo biomase se uporablja dvostopenjski proces, kjer se najprej povečuje biomasa, nato pa se celice prestavi v produkcijsko gojišče. Za komercialno proizvodnjo se uporablja optimizirane bioreaktorske sisteme. Na voljo so reaktorji z mešanjem, airlift, pnevmatski in valovni reaktorji. Dvofazne rastlinske celične kulture uporabljajo particijski sistem za preusmerjanje ekstracelularnih produktov v drugo, pogosto nepolarno fazo (Zhong, 2002).

2.2.1 Selekcija in izbira stabilnih in hiperproducirajočih celic iz heterogene suspenzije

Kulture ene celice (single cell culture) se subkultivira in spremlja sposobnost posameznih generacij subkultivirane za produkcijo biomase in paklitaksela. Iz najbolj optimalnega kalusa, ko se produkcija taksanov in biomase ustali, se selekcionira stabilne celične linije za produkcijo paklitaksela (S. J. Wang in sod., 2018). Celične linije tise so genetsko nestabilne, pojavljajo se kromosomske prerazporeditve, ki povzročijo variacije v velikosti genoma. Po več precepljanjih začnejo v kulturah prevladovati celice z višjo vsebnostjo jedrne DNA. Tovrstne spremembe so

pogoste v dolgoročnih suspenzijskih kulturah. Spremljanje stabilnosti genomske DNA je zato priporočljivo, uporablja se pretočno citometrijo (Baebler in sod., 2005). Sposobnost proizvodnje paklitaksela v celični liniji pogosto upada s časom, redko ostaja na enaki ravni (Hren in sod., 2006).

2.2.2 Pogoji

Plinska sestava gojišč za rastlinske celice je pomembna, še posebej koncentracija kisika, etilena in ogljikovega dioksida. Nizka koncentracija kisika nad vodno fazo (»headspace concentration«) (10 % V/V) spodbuja zgodnjo produkcijo paklitaksela, visoka koncentracija ogljikovega dioksida (10 % V/V) pa jo zavira (Zhong, 2002).

Osmotski tlak ima velik vpliv na celično fiziologijo (Kim in sod., 2001). Višji osmotski tlaki ustvarjeni z dodajanjem ne-metabolnih sladkorjev (manitol, sorbitol) ali pa polietilenglikola pripomorejo k produkciji paklitaksela (Kim in sod., 2001).

Kondicionirano gojišče (conditioned medium) ima stimulirajoč učinke na rast biomase in stopnjo produktivnosti in produkcije taksanov (Kim in sod., 2001).

Imobilizacija v kalcijevem alginatu v optimalnih pogojih omeji fiziologijo celic *T. baccata* in posledično poveča produkcijo taksanov v bioreaktorjih in stresalnih posodah majhnega volumna. Preprečevanje rasti biomase celic ima pozitiven efekt na titer paklitaksela v kulturi *T. baccata* (Bentebibel in sod., 2005). Dodatna prednost imobilizacije je, da se sekundarni metaboliti v majhni meri izločajo v gojišče in ostajajo ujeti v alginatu, ki se ga nato raztopi v EDTA-fosfatni raztopini. Na ta način se zmanjšajo delovni volumni za prečiščevanje (Bentebibel in sod., 2005).

2.2.3 Elicitorji

Čeprav so številne študije namenjene večanju donosa taksanov v celičnih kulturah dosegle omembe vreden napredek ostajajo donosi skromni. Zato poteka iskanje novih elicitorjev in kombinacij le-teh (Vidal-Limon in sod., 2018). Elicitorji so kemikalije ali biofaktorji različnega izvora, ki lahko inducirjao fiziološke in morfološke spremembe v tarčnih organizmih (Jamshidi in Ghanati, 2017).

Alifatske ionske kapljevine se uporabljajo in-situ ekstrakcije v organiskih topilih topnih snovi. P14TFSI (N-metil-n-butilpirorolindinium bis(trifluorometansulfonil)imid je ena novejših hidrofobnih ionskih kapljev (Yamamoto in sod., 2018). Uporaba 5 % (vol) P14TFSI v navadnem gojišču je 2-krat povečala produkcijo paklitaksela in sorodnih taksanov v primerjavi s kontrolo. Po vsej verjetnosti do povečane produkcije pride ker paklitaksel prehaja iz vodne faze v ionsko tekočino kar zmanjša povratno regulacijo. Avtorji ugibajo o možnem vplivu na encime za sintezo paklitaksela. P14TFSI nima citotoksičnih učinkov (Yamamoto in sod., 2018).

Citodekstrini so ciklični oligosaharidi. Nastanejo iz škroba z encimatsko degradacijo, ki jo katalizira bakterijska ciklodekstrin glikoziltransferaza (Vidal-Limon in sod., 2018). Njihova struktura omogoča tvorjenje v vodi slabo topnih inkluzijskih kompleksov z nepolarnimi spojinami (kar olajša ekskrecijo iz celic in nato še izolacijo iz gojišča), so uporabni kot elicitorji zaradi aktiviranja različnih družin transkripcijskih faktorjev (Sabater-Jara in sod., 2014). Elicitacija je še posebej učinkovita v kombinaciji s koronatinom (Vidal-Limon in sod., 2018) ali pa MeJa.

Koronatin je fitotoksin bakterije *Pseudomonas syringae* (Bender in sod., 1999). Deluje kot oponaševalec konjugata JA in izoleucina (Katsir in sod., 2008). Korantin je aktivator jasmonatnega signaliziranja (Onrubia in sod., 2013b). Kulture *T. media* so največ paklitaksela in bakatina III producirale na 12. in 16. dan po elicitaciji, produkcija pa je začela naraščati po 4-ih dneh. Zanimivo je, da v primerjavi z elicitacijo z MJ niso zaznali povečane ekspresije proučevanih genov, kar nakazuje, da koronatin deluje na še neznane regulatorne mehanizme. Produkcija paklitaksela v kulturah *T. media* je ob elicitaciji s koronatinom 3,6-krat večja kot ob uporabi metil-jasmonata, produkcija bakatina III pa je 4,8-krat višja. Koronatin je učinkovit v manjših koncentracijah kot MJ, največkrat pri 1 μM (Onrubia in sod., 2013b).

Trivalentni ioni lantana (La^{3+}) imajo elicitorski efekt na celične suspenzije *T. chinensis* Rehder in *T. wallichiana* Zucc. v 5,8 μM koncentraciji. Produkcija paklitaksela se poveča za približno 3-krat (2.6190.37 do 9.8991.92 mg/L v laboratorijskem merilu) (Wu in sod., 2001).

Derivati jasmonske kisline, najpogosteje metil-jasmonat, so trenutno ena najbolj učinkovitih elicitorjev višanja donosa taksanov in je poleg delovanja na *Taxus* spp. uporabna še pri drugih rastlinskih vrstah za ostale sekundarne metabolite (Bentebibel in sod., 2005). V kulturah *T. baccata* se lahko inducira hitro sintezo MJ z dodatkom kvasovk kot elicitorja (Mueller in sod., 1993). Jasmonska kislina zmanjša permeabilnost membrane celic za majhne molekule, kar lahko vpliva na primarni metabolizem celic in tako povzroča stres. Zmanjšanje propustnosti za velike molekule, ki lahko difuzno prehajajo skozi celične membrane (kakor velja za taksane) vpliva na prehajanje paklitaksela iz celic (Hren in sod., 2005).

Izpostavljenost ozonu je pogost stresni dejavnik za rastline med rastno sezono zaradi prisotnosti ozona v troposferi, koncentracija katerega se v zadnjem času zaradi delovanja ljudi veča. Izpostavljenost ozonu v rastlinah sproži raznolike odzive (Xu in sod., 2011). V naravnem okolju je eden prvih takšnih odgovorov akumulacija sekundarnih metabolitov (Sharma in Davis, 1997). Po tretiranju celic *T. chinensis* z ozonom (60 nL/L) produkcija paklitaksela naraste in vrh doseže približno 35 h po tretmaju. Produkcija paklitaksela je tedaj 2,7-krat višja kot pri kontroli. Natančno še nepojasnjeno vlogo pri elicitaciji z ozonom ima abscizinska kislina; ob dodatku inhibitorja delovanja ABA ozon nima učinka na produkcijo paklitaksela (Xu in sod., 2011).

Perfluorodekalin ($\text{C}_{10}\text{F}_{18}$ - PFD) — fluorovodik z vsemi vodikovimi atomi nadomeščenimi s fluorom. Gre za gosto kapljevino v kateri se raztaplja velike količine nepolarnih plinov (O_2 35 – 44 $\mu\text{Mol/L}$) (Vidal-Limon in sod., 2018). Ko se ga doda v tekoče gojišče olajša nastanek dodatne faze pod nivojem vodne faze (Lowe, 2002). Z zrakom nasičen PFD lahko omogoči večjo produkcijo biomase, kar je razvidno iz poskusov na celičnih kulturah tobaka, kjer se je v primerjavi s kontrolo biomasa povečala kar trikrat (Pilarek in Szewczyk, 2008). Raztopljeni čisti kisik ima negativen vpliv na biomaso tobakovih celic, odvisno od občutljivosti na visoke koncentracije kisika (Pilarek in Szewczyk, 2008). Pri kulturah adventivnih korenin PFD (čist ali pa z raztopljenim kisikom) poveča produkcijo taksanov, še posebej ob prisotnosti 100 μM MeJa (Syklovska-Baranek in sod., 2015). Korenine rastejo tudi v ločeno fazo PFD in del taksanov so izolirali iz PFD, kar nakazuje možnost izrabe PFD za »In-situ« ekstrakcijo taksanov (Vidal-Limon in sod., 2018).

Heksanol je naravno prisotna hlapna organska spojina. Nastaja v ranjenem zelenem tkivu rastlin. Je mediator pri zaščitnih interakcijah med rastlinami. Če se ga dodaja lahko sproži obrambne mehanizme. Pri rastlinah čaja inducira sintezo JA in etilena, kakor tudi povišano regulacijo genov povezanih z obrambnimi mehanizmi. Kombinacija heksanola in mešanice

koronatina z β -dekstrini povzroči padec produkcije taksanov; skupna produkcija je manjša kot v primeru elicitacije samo z heksanolom ali pa koronatinom + β -dekstrini, predvidoma ker si elicitorja medsebojno motita delovanje (Vidal-Limon in sod., 2018).

Uporaba nanodelcev postaja vse bolj razširjena saj imajo veliko razmerje med površino in volumnom. Posledično imajo različne kemične, mehanske in optične lastnosti. Nanodelci imajo izrazito protimikrobno delovanje (Rai in sod., 2009). Srebrovi nanodelci producirajo Ag^+ ione in reaktivne kisikove spojine; slednje povzročajo oksidativni stres, ki velja za poglavitni vzrok opažene toksičnosti (Kaur in Tikoo, 2012). Na celičnih kulturah leske se lahko uporabijo nanodelci premera 30 – 50 nm. Celice leske so bile odzivne za koncentracije nad 5 ppm. Odziv je obsegal zmanjšanje hitrosti rast in zmanjšanje integritete membrane. Produkcija paklitaksela se je v primerjavi s kontrolo povečala 2 do 5-krat; $43 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ po 24h (Jamshidi in Ghanati, 2017).

Odziv na toplotni šok (Heat shock response) je ohranjen celični obrambni mehanizem prisoten v vseh organizmih. Karakteriziran je s povečano ekspresijo HS proteinov. Abscizinska kislina v odzivu na HS inducira sintezo HSP. Optimalni parametri za produkcijo paklitaksela v z ABA predtretiranih celicah *T. yunnanensis* Zucc. vedno povzročijo padec viabilnosti celic, ki niso bile predtretirane na 50 %. Viabilnost netretiranih celic je dober indikator primerne stopnje HS; dolžina in temperatura tretmaja nista pomembni, dokler povzročita padec viabilnosti netretiranih celic na 50 %. Optimalni rezultati se dosežejo z uporabo HS v 15. dnevu po inokulaciji tj. v pozni eksponentni fazi rasti. Čas po inokulaciji je pomemben faktor pri učinkovitosti HS za povečanje vsebnosti paklitaksela (Zhang in Fevereiro, 2007).

Izpostavitev nizko energetskega ultrazvoku poveča produkcijo paklitaksela v suspenzijskih kulturah celic *T. chinensis*. Ob prisotnosti inhibitorjev JA in ROS odstranjevalcev se učinek ultrazvoka skoraj izniči, kar kaže, da stimulacija z ultrazvokom povzroči nastanek ROS in JA derivatov. Ultrazvok deluje kot mehanski dražljaj, podobno kot ranitev tkiv, saj povzroča hidrodinamične efekte (kavitacija, mikrotokovi), ki poškodujejo rastlinske celice. Podoben učinek se doseže z močnim mešanjem medija. Prednost ultrazvoka je v priročnosti, uniformnosti širjenja po mediju in natančni določitvi jakosti (Wu in Ge, 2004). Izpostavitev ultrazvoku poleg oksidativnega stresa povzroči tudi sintezo dušikovega oksida (Wang in sod., 2006).

Hitosan je deacetilirana oblika hitina, glavne komponente celičnih sten številnih gliv, eksoskeletov žuželk in rakov. Za celulozo je drugi najbolj pogost polisahard. Hitosan je kationski polimer, zaradi svoje biokompatibilnosti se uporablja za stimulacijo sinteze sekundarnih metabolitov v rastlinah — oponaša rastlinske patogene. Spodbuja izločanje sekundarnih metabolitov v gojišče, stimulira rast in razvoj rastlin in lahko pripomore k večji odpornosti na ostale stresne dejavnike, v primeru celičnih kultur ostale elicitorje, ki sicer zmanjšajo viabilnost celic (Zhang in sod., 2007). Tvorba paklitaksela se poveča 3,2 do 4,6-krat, v gojišče se sprošča 2,8 do 3,2-krat več paklitaksela kot ob ne-adaptiranih celicah. Tudi viabilnost celic se poveča (Zhang in sod., 2007).

2.3 HETEROLOGNA EKSPRESIJA

2.3.1 Druge biosintetske poti

Čeprav rastlinske celične kulture ostajajo viabilen in poglavitni način proizvodnje paklitaksela bi razširjeno razumevanje encimatike biosintetske poti paklitaksela (in drugih taksanov) pripomogla k povečanju donosa, bodisi s prenosom v za gojenje in modificiranje bolj primerne producente (predvsem mikroorganizme) ali pa optimizacijo biosintezne poti v rastlinskih celicah. Podrobno znanje o posameznih korakih transformacije prekursorjev omogoča izboljšave končnih produktov (Li in sod., 2015).

Pri biosintezi paklitaksela je ciklizacija GGPP katalizirana z encimom taxidien sintazo. Nastali taksidien hidroksilirajo citokromi P450 na pozicijah C5, C10, C13, C9, C7 in C2. Sledjo nadaljnje modifikacije (acetilacije, benzilacije, formacije epoksida, oksidacije), dokler ne nastane bakatin. Nazadnje se pripne še C13 stranska veriga, 2'-hidroksilacija in benzoilacija (Dziggel in sod., 2017). Večina encimov za sintezo paklitaksela je karakteriziranih in heterologno izraženih, nerazjasnjen pa ostaja vrstni red reakcij. Prvi koraki metabolne poti so uspešno prenesli v mikrobne sisteme, najprej *S. cerevisiae*, nato uspešneje v *E. coli* (Dziggel in sod., 2017). Počasen napredek pri razjasnjevanju biosinteze paklitaksela nakazuje, da je le-ta bolj kompleksna kot se je sprva predvidevalo (Biggs in sod., 2016).

2.3.2 *E. coli*

V *E. coli* je vstavljena delna metabolna pot za sintezo paklitaksela iz *E. coli* lastne »navzgorne« izoprenoidne poti (osem genov) in heterologne »navzdolne« terpenoidne poti (dva gena). MEP je naravno prisotna »navzgorna« pot, MVA pa je heterologna. Pri obeh nastajata IPP in DMAPP (Ajikumar in sod., 2010). Za povečanje fluksa se je kot uspešen pristop izkazal kombinatorni multivariabilni, modularni inženiring, saj so se pri racionalnem pristopu za pomembne izkazali negativni nespecifični efekti, kot so toksičnost intermediatov, vpliv ekspresijskih vektorjev in skrite metabolne poti ter metaboliti, ki inhibirajo produkcijo zaželjene molekule. Tak pristop omogoča učinkovito spreminjanje in spremljanje glavnih parametrov navkljub odsotnosti visoko zmogljivih testov. Uporablja se različne promotorje in različno število kopij genov (Ajikumar in sod., 2010).

Glavni inhibitor navzgorne izoprenoidne poti v *E. coli* je indol. Z modularnim pristopom se doseže približno 15.000-kratno povečan titer taksidiena ($1,02 \pm 0,08$ g/L v šarži z dohranjevanjem). Dodatek enega samega gena, odgovornega za prvo funkcionalizacijo ogrodja paklitaksela (Biggs in sod., 2016) (CYP725A4 za T5 α H (taksoid 5 α -hidroksilazo) je porušil ravnovesje in titer je padel (Ajikumar in sod., 2010). Ovira za produkcijo paklitaksela ostaja izražanje metabolno obremenjujočih encimov P450 in težavnost ohranjanja ravnovesja navzdolnih reakcij z ozirom na navzgorne (Biggs in sod., 2016). Funkcionalna ekspresija rastlinskega CYP450 v *E. coli* je zahtevna zaradi omejitev bakterijskega ustroja; odsotnost dejavnikov za prenos elektronov, CYP450-reduktaz (CRP) in translacijska nekompatibilnost membranskih signalnih modulov CYP450 v odsotnosti endoplazemskega retikuluma (Ajikumar in sod., 2010). Za produkcijo paklitaksela je sicer potrebnih več takšnih encimov (Biggs in sod., 2016), do zdaj pa se je od osmih za biosintezo paklitaksela relevantnih rastlinskih CYP450 uspešno izrazila samo omenjena hidroksilaza. Tip promotorja in število kopij

plazmida se izkažeta za zelo pomembna parametra; šibkejši »luknjičast« promotor je boljši napram močnemu (T7) promotorju, nadalje je razlika v titru med 10 in 5 kopijami plazmida za velikostni razred. Optimalno število plazmidov je 5, optimalni promotor je Trc. Pomembno je razmerje med CYP450 in CRP, z zmanjšanjem števila CRP napram CYP450 se omili metabolno breme in doseže večje titre. Višja hidrofilitnost N koncev P450 in CPR zmanjša metabolno breme, nasprotno pa bolj hidrofobni N konci povečajo izplen. Suboptimalni sevi *E. coli* so regulirani na proteinski ravni; močna ekspresija P450 ima širok vpliv na ekspresijo navzgornih encimov. Natančen vzrok še ni pojasnjen, predvideva se, da encim P450 monopolizira redke tRNA, šaperone ali pa časovno zasede razpoložljive ribosome (Biggs in sod., 2016).

2.3.3 Delitev metabolne poti med člane mikrobnega konzorcija

Optimiziranje metabolizma posameznih organizmov z ozirom na dolge in kompleksne metabolne poti se je izkazalo za težavno (Biggs in sod., 2016) toda premostljivo v primeru ekspresije CYP 450 za prvo oksigenacijo ogrodja paklitaksela. Pričakovati je, da bo optimiziranje nadaljnjih korakov sintezne poti ob naraščanju kompleksnosti regulacije in povratnih interakcij še težavnejše (Biggs in sod., 2016). Morebitna rešitev je kokultivacija organizmov z izraženimi posameznimi moduli, ki najbolj ustrezajo značilnostim in prednostim posameznega ekspresijskega sistema (Zhou in sod., 2015). *S. cerevisiae* ima napredno proteinsko ekspresijo in obilo intracelularnih membran, zato je primeren organizem za ekspresijo citokromov P450 za funkcionalizacijo taksidiena. *E. coli* pa ja zaradi svoje hitre rasti primerna za produkcijo taksidiena (Zhou in sod., 2015).

2.4 EKSTRAKCIJA

Separacija in čiščenje metabolitov je pogost problem pri produkciji metabolitov z uporabo rastlinskih celic. Pri produkciji paklitaksela je še posebej težavno ločevanje cefalomanina zaradi strukturne in fizikalne podobnosti paklitakselu (McPartland in sod., 2012). Splošni korak za ekstrakcijo paklitaksela so sledeči (McPartland in sod., 2012):

- homogenizacija/filtracija (85-95 %, 0,1-0,5 % čistost)
- ekstrakcija (80-90 %, 1-4 % čistost)
- vakuumaska kristalizacija (75-90 %, 60-65 % čistost)
- kromatografija (75-85 %, 98.5-99.5 % čistost)

Celice se homogenizira saj lahko do 90 % paklitaksela ostane ujetega v ostankih celične stene (Roberts in sod., 2003). Uporabi se lahko encime, sonikacijo, ki ji sledi namakanje trdnih usedlin v metanolu ali etanolu (Roberts in sod., 2003). Uporablja se organska topila, pogosto diklorometan in kloroform (raziskave potekajo v smeri uporabe ionskih alifatskih spojin (Yamamoto in sod., 2018) in perfluorodekalina (Vidal-Limon in sod., 2018)). Sledi evaporacija organskega topila za reciklažo. Nadaljevanje postopka vključuje vse bolj prefinjene kromatografske stopnje. Surovi produkt se raztopi v metanolu in loči v posamezne taksane s HPLC (McPartland in sod., 2012). Po več kromatografskih separacijah se doseže čistost nad 99 % (Pyo in Choi, 2011). Dodatek ekstraktantov (reaktivni agens, »carrier molecule«) tj. snovi, ki lahko tvorijo komplekse z zaželeno komponento vodne faze, v tem primeru paklitakselom,

poveča particijski koeficient (razmerje med željeno snovjo in neželenimi snovmi v topilu) (McPartland in sod., 2012).

3 SKLEPI

V tem delu smo kratko povzeli poglobitvene značilnosti paklitaksela, trende in razvoj biotehnoloških postopkov proizvodnje te nadvse pomembne kemoterapevtske učinkovine. Po našem vedenju smo navedli najboljše seznam endofitskih gliv, ki proizvajajo paklitaksel. Uporaba rastlinskih tkivnih kultur za proizvodnjo rastlinskih sekundarnih metabolitov ima številne prednosti; poteka neodvisno od vremenskih pogojev, izvzemši kontaminacije brez prisotnosti škodljivcev in patogenov, nima škodljivih vplivov na ekosisteme in okolje ter omogoča hitre rastne cikle v primerjavi z večletnimi (v primeru *Taxus* spp.) obdobji rasti rastlin v naravnem okolju. Z odkrivanjem novih organizmov, tako rastlin (*Corylus avellana* L.) kot številnih endofitskih gliv (Tabela 1), ki proizvajajo taksane, bi se lahko pojavili producenti za in-vitro gojenje in manipulacijo z bolj ugodnimi lastnostmi. Delo poteka na prenosu sintezne poti za paklitaksel iz zahtevnih rastlinskih organizmov v ustaljene, dobro poznane organizme kot sta *E. coli* in *S. cerevisiae*. Napredek na tem področju je počasen in preprečen s številnimi preprekami, katerih premostitev pa bi (bo) pomenila znatno olajšanje proizvodnje paklitaksela in, v luči same tehnične zahtevnosti prenosa sintezne poti takšne kompleksnosti, tudi pomemben napredek v industrijski biosintezi kompleksnih molekul na splošno. Zaenkrat ostaja najbolj realistična proizvodnja v rastlinskih celičnih kulturah.

Navkljub uspešni komercialni proizvodnji paklitaksela z uporabo rastlinskih celičnih kultur ostaja mnogo prostora za izboljšave postopkov in razumevanja sekundarnega metabolizma rastlin v in-vitro pogojih (Cusido in sod., 2014).

Za polsintezno proizvodnjo paklitaksela in umetnih derivatov se lahko izrablja prekursorje paklitaksela, kar razširi razpoložljive vire (primer je uporaba bakatina III iz iglic *Taxus baccata* L.). Produktivnost celičnih kultur se izboljšuje s selekcijo hiperprodukcijskih celičnih linij, optimizacijo gojišč in pogojev.

Velikega pomena je izbira elicitorjev in njihovih kombinacij, ki lahko za večkrat povečajo produkcijo taksanov v celičnih kulturah ob minimalnih vložkih. V delu smo zbrali opise po vsej verjetnosti večine znanih elicitorjev za produkcijo paklitaksela.

Za ekstrakcijo uporabljeni reagenti se bodo v prihodnosti spreminjali, kar smo nakazali tudi v tem delu z opisom standardnih postopkov in morebitnih izboljšav z uporabo alifatskih ionskih kapljev, kakor je navedeno v najnovejših raziskavah (Yamamoto in sod., 2018).

Na splošno je ob pregledu literature postalo jasno, da z izjemo odkritja in uporabe alternativnih virov paklitaksela (*Corylus avellana* L., endofitske glive) in uspešnega prenosa biosintezne poti v druge organizme, ni pričakovati edinstvenega, skokovitega napredka pri proizvodnji paklitaksela — nasprotno, napredek se odraža v majhnih izboljšavah obstoječih postopkov, ki

pa skupaj znatno povečajo donosnost rastlinskih celičnih kultur *Taxus* spp. Slednje bodo, morebiti kot odsev evolucijske stanovitnosti in nespremenjenosti tise ostale stalnica v proizvodnji paklitaksela.

4 VIRI

- Ajikumar P. K., Xiao W. H., Tyo K. E., Wang Y., Simeon F., Leonard E., Mucha O., Phon T. H., Pfeifer B., Stephanopoulos G. 2010. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 330, 6000: 70-74
- Baebler S., Hren M., Camloh M., Ravnikar M., Bohanec B., Plaper I., Uzman R., Zel J. 2005. Establishment of cell suspension cultures of yew (*Taxus x Media* Rehd.) and assessment of their genomic stability. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41, 3: 338-343
- Bashyal B., Li J. Y., Strobel G., Hess W. M., Sidhu R. (1999). Seimatoantlerium nepalense, an endophytic taxol producing coelomycete from Himalayan yew (*Taxus wallachiana*). *Mycotaxon*, 72: 33-42
- Bender C. L., Alarcon-Chaidez F., Gross D. C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 2: 266-292
- Bentebibel S., Moyano E., Palazon J., Cusido R. M., Bonfill M., Eibl R., Pinol M. T. 2005. Effects of immobilization by entrapment in alginate and scale-up on paclitaxel and baccatin III production in cell suspension cultures of *Taxus baccata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 6: 647-655
- Bestoso F., Ottaggio L., Armirotti A., Balbi A., Damonte G., Degan P., Mazzei M., Cavalli F., Ledda B., Miele M. 2006. In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes. *BMC Biotechnology*, 6: 45, doi: 10.1186/1472-6750-6-45: 11 str.
- Biggs B. W., Lim C. G., Sagliani K., Shankar S., Stephanopoulos G., De Mey M., Ajikumar P. K. 2016. Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated Taxol precursor synthesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 12: 3209-3214
- Chakravarthi B. V. S. K., Das P., Surendranath K., Karande A. A., Jayabaskaran C. 2008. Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. *Journal of Biosciences*, 33, 2: 259-267
- Crosasso P., Ceruti M., Brusa P., Arpicco S., Dosio F., Cattel L. 2000. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *Journal of Controlled Release*, 63, 1-2: 19-30
- Cusido R. M., Onrubia M., Sabater-Jara A. B., Moyano E., Bonfill M., Goossens A., Angeles Pedreno M., Palazon J. 2014. A rational approach to improving the biotechnological

- production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. *Biotechnology Advances*, 32, 6: 1157-1167
- Dai W. L., Tao W. Y. (2008). *Preliminary study on fermentation conditions of taxol-producing endophytic fungus*. *Chemical Industry and Engineering Progress* 27:883-886.
- Das A., Rahman M. I., Ferdous A. S., Amin A., Rahman M. M., Nahar N., Uddin M. A., Islam M. R., Khan H. 2017. An endophytic Basidiomycete, *Grammothele lineata*, isolated from *Corchorus olitorius*, produces paclitaxel that shows cytotoxicity. *PLoS One*, 12, 6: e0178612, doi: 10.1371/journal.pone.0178612: 17 str.
- Deng B. W., Liu K. H., Chen W. Q., Ding X. W., Xie X. C. 2008. *Fusarium solani*, Tax-3, a new endophytic taxol-producing fungus from *Taxus chinensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1: 139-143
- Dziggel C., Schafer H., Wink M. 2017. Tools of pathway reconstruction and production of economically relevant plant secondary metabolites in recombinant microorganisms. *Biotechnology Journal*, 12, 1: 1600145, doi: 10.1371/journal.pone.0178612: 14 str.
- Elavarasi A., Rathna G. S., Kalaiselvam M. 2012. Taxol producing mangrove endophytic fungi *Fusarium oxysporum* from *Rhizophora annamalayana*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 2: S1081-S1085
- Gallego A., Malik S., Yousefzadi M., Makhzoum A., Tremouillaux-Guiller J., Bonfill M. 2017. Taxol from *Corylus avellana*: paving the way for a new source of this anti-cancer drug. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129, 1, doi: 10.1007/s11240-016-1164-5: 16 str.
- Gangadevi V., Johnpaul M. (2008). Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. *Mycologia Balcanica* 5: 1-4
- Gangadevi V., Murugan M., Muthumary J. 2008. Taxol Determination from *Pestalotiopsis pauciseta*, a Fungal Endophyte of a Medicinal Plant. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24, 8: 1433-1438
- Gokul Raj K., Manikandan R., Arulvasu C., Pandi M. 2015. Anti-proliferative effect of fungal taxol extracted from *Cladosporium oxysporum* against human pathogenic bacteria and human colon cancer cell line HCT 15. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 138: 667-674
- Guo B. H., Wang Y. C., Zhou X. W., Hu K., Tan F., Miao Z. Q., Tang K. X. 2006. An endophytic Taxol-producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. mairei. *African Journal of Biotechnology*, 5, 10: 875-877
- Heinig U., Scholz S., Jennewein S. 2013. Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi. *Fungal Diversity*, 60, 1: 161-170

- Holton R. A., Somoza C., Kim H. B., Liang F., Biediger R. J., Boatman P. D., Shindo M., Smith C. C., Kim S. 1994. First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *Journal of the American Chemical Society*, 116, 4: 1597-1598
- Hren M., Baebler P., Camloh M., Kovac M., Ravnikar M., Zel J. 2006. Yew (*Taxus x media* Rehd.) cell suspension cultures as a source of taxanes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28, 1, doi: 10.1007/s11738-006-0061-7: 5 str.
- Hren M., Zel J., Baebler S., Nemec M., Ravnikar M., Schara M. 2005. Estimating the plasma membrane permeability of *Taxus x media* cells with the spin probe TEMPOL by EPR. *Plant Science*, 168, 2: 535-540
- Isah T. Natural Sources of Taxol. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 6, 4: 214-227
- Jamshidi M., Ghanati F. 2017. Taxanes content and cytotoxicity of hazel cells extract after elicitation with silver nanoparticles. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110: 178-184
- Katsir L., Schillmiller A. L., Staswick P. E., He S. Y., Howe G. A. 2008. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 19: 7100-7105
- Kaur J., Tikoo K. Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. *Food Chemical Toxicology*, 51, doi: 10.1016/j.fct.2012.08.044: 14 str.
- Kim S.-I., Choi H.-K., Kim J.-H., Lee H.-S., Hong S.-S. 2001. Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 2: 202-209
- Kumaran R. S., Muthumary J., Hur B.-K. 2008. Taxol from *Phyllosticta citricarpa*, a leaf spot fungus of the angiosperm *Citrus medica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 1: 103-106
- Kumaran R. S., Muthumary J., Kim E.-K., Hur B.-K. 2009. Production of taxol from *Phyllosticta dioscoreae*, a leaf spot fungus isolated from *Hibiscus rosa-sinensis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14: 76, doi: 10.1007/s12257-008-0041-4: 8 str.
- Kusari S., Singh S., Jayabaskaran C. 2014. Rethinking production of Taxol (R) (paclitaxel) using endophyte biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 32, 6: 304-311
- Li B. J., Wang H., Gong T., Chen J. J., Chen T. J., Yang J. L., Zhu P. 2017. Improving 10-deacetylbaccatin III-10-beta-O-acetyltransferase catalytic fitness for Taxol production. *Nature Communications*, 8: 15544, doi: 10.1038/ncomms15544: 13 str.
- Li C.-T., Li Y., Wang Q.-J., Sung C.-K. 2008. Taxol Production by *Fusarium Arthrosporioides* Isolated from Yew, *Taxus Cuspidata*. *Journal of Medical Biochemistry*, 27, 4: 454-458

- Li J. Y., Sidhu R. S., Ford E. J., Long D. M., Hess W. M., Strobel G. A. 1998. The induction of taxol production in the endophytic fungus-- *Periconia* sp from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 5: 259-264
- Li Y., Zhang G., Pfeifer B. A. 2015. Current and emerging options for taxol production. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 148: 405-425
- Lin S. L., Wei T., Lin J. F., Guo L. Q., Wu G. P., Wei J. B., Huang J. J., Ouyang P. L. 2018. Bio-production of Baccatin III, an Important Precursor of Paclitaxel by a Cost-Effective Approach. *Molecular Biotechnology*, 60, 7: 492-505
- Liu K., Ding X., Deng B., Chen W. 2009. Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 9: 1171-1177
- Lowe K. C. 2002. Perfluorochemical respiratory gas carriers: benefits to cell culture systems. *Journal of Fluorine Chemistry*, 118, 1-2: 19-26
- McPartland T. J., Patil R. A., Malone M. F., Roberts S. C. 2012. Liquid-Liquid Extraction for Recovery of Paclitaxel from Plant Cell Culture: Solvent Evaluation and Use of Extractants for Partitioning and Selectivity. *Biotechnology Progress*, 28, 4: 990-997
- Miao Z., Wang Y., Yu X., Guo B., Tang K. 2009. A new endophytic taxane production fungus from *Taxus chinensis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45, 1: 81, doi: 10.1134/S0003683809010141: 5 str.
- Mueller M. J., Brodschelm W., Spannagl E., Zenk M. H. 1993. Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 16: 7490-7494
- Onrubia M., Cusido R. M., Ramirez K., Hernandez-Vazquez L., Moyano E., Bonfill M., Palazon J. 2013a. Bioprocessing of Plant In Vitro Systems for the Mass Production of Pharmaceutically Important Metabolites: Paclitaxel and its Derivatives. *Current Medicinal Chemistry*, 20, 7: 880-891
- Onrubia M., Moyano E., Bonfill M., Cusido R. M., Goossens A., Palazon J. 2013b. Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology*, 170, 2: 211-219
- Ottaggio L., Bestoso F., Armirotti A., Balbi A., Damonte G., Mazzei M., Sancandi M., Miele M. 2008. Taxanes from Shells and Leaves of *Corylus avellana*. *Journal of Natural Products*, 71, 1: 58-60
- Pilarek M., Szewczyk K. W. 2008. Effects of perfluorinated oxygen carrier application in yeast, fungi and plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 41, 1: 38-42
- Pyo S.-H., Choi H.-J. 2011. An improved high-performance liquid chromatography process for the large-scale production of paclitaxel. *Separation and Purification Technology*, 76, 3: 378-384

- Qiao W., Ling F., Yu L., Huang Y., Wang T. 2017. Enhancing taxol production in a novel endophytic fungus, *Aspergillus aculeatinus* Tax-6, isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Fungal Biology*, 121, 12: 1037-1044
- Rai M., Yadav A., Gade A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27, 1: 76-83
- Roberts S. C. 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology*, 3, 7: 387-395
- Roberts S. C., Naill M., Gibson D. M., Shuler M. L. 2003. A simple method for enhancing paclitaxel release from *Taxus canadensis* cell suspension cultures utilizing cell wall digesting enzymes. *Plant Cell Reports*, 21, 12: 1217-1220
- Sabater-Jara A. B., Onrubia M., Moyano E., Bonfill M., Palazon J., Pedreno M. A., Cusido R. M. 2014. Synergistic effect of cyclodextrins and methyl jasmonate on taxane production in *Taxus x media* cell cultures. *Plant Biotechnology Journal*, 12, 8: 1075-1084
- Sharma Y. K., Davis K. R. 1997. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 23, 3: 480-488
- Shrestha K., Strobel G. A., Shrivastava S. P., Gewali M. B. 2001. Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of Himalayan yew of Nepal. *Planta Med*, 67, 4: 374-376
- Stanton R. A., Gernert K. M., Nettles J. H., Aneja R. 2011. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Medicinal Research Reviews*, 31, 3: 443-481
- Stierle A., Strobel G., Stierle D. 1993. Taxol and taxane production by *taxomyces-andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science*, 260, 5105: 214-216
- Strobel G. A., Ford E., Li J. Y., Sears J., Sidhu R. S., Hess W. M. 1999. *Seimatoantlerium tepuiense* gen. nov., a Unique Epiphytic Fungus Producing Taxol from the Venezuelan Guyana. *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 3: 426-433
- Strobel G. A., Hess W. M., Li J.-Y., Ford E., Sears J., Sidhu R. S., Summerell B. 1997. *Pestalotiopsis guepinii*, a Taxol-producing Endophyte of the Wollemi Pine, *Wollemia nobilis*. *Australian Journal of Botany*, 45, 6: 1073-1082
- Strobel G., Yang X., Sears J., Kramer R., Sidhu R. S., Hess W. M. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, 142, 2: 435-440
- Sun D., Ran X., Wang J. (2008). Isolation and identification of a taxol-producing endophytic fungus from *Podocarpus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 48, 5: 589-595
- Syklowska-Baranek K., Pilarek M., Bonfill M., Kafel K., Pietrosiuk A. 2015. Perfluorodecalin-supported system enhances taxane production in hairy root cultures of *Taxus x media* var. *Hicksii* carrying a taxadiene synthase transgene. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 120, 3: 1051-1059

- Tian R., Yang Q., Zhou G., Tan J., Zhang L., Fang C. 2006. Taxonomic study on a taxol producing fungus isolated from bark of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Wuhan zhi wu xue yan jiu* = Wuhan botanical research, 24, 6: 541-545
- Venkatachalam R., Subban K., John Paul M. (2008). Taxol from *Botryodiplodia theobromae* (BT 115)—AN endophytic fungus of *Taxus baccata*. *Journal of Biotechnology*, 136: S189-S190
- Vidal-Limon H. R., Almagro L., Moyano E., Palazon J., Pedreno M. A., Cusido R. M. 2018. Perfluorodecalins and Hexenol as Inducers of Secondary Metabolism in *Taxus media* and *Vitis vinifera* Cell Cultures. *Frontiers in Plant Science*, 9:335, doi: 10.3389/fpls.2018.00335: 15 str
- Wang J. W., Zheng L. P., Wu J. Y., Tan R. X. 2006. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide*, 15, 4: 351-358
- Wang J., Li G., Lu H., Zheng Z., Huang Y., Su W. 2000. Taxol from *Tuberculariasp.* strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS Microbiology Letters*, 193, 2: 249-253
- Wang S. J., Wang H. J., Li T., Li C., Zhou Y. J., Zhong X. M. 2018. The selection and stability analysis of stable and high Taxol-producing cell lines from *Taxus cuspidata*. *Journal of Forestry Research*, 29, 1: 65-71
- Wu J., Ge X. 2004. Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 85, 7: 714-721
- Wu J., Wang C., Mei X. 2001. Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus* spp cell cultures by rare earth chemical lanthanum. *Journal of Biotechnology*, 85, 1: 67-73
- Xiong Z.-Q., Yang Y.-Y., Zhao N., Wang Y. (2013). Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from Anglojap yew, *Taxus x media*. *BMC Microbiology*, 13:71, doi: 10.1186/1471-2180-13-71: 10 str.
- Xu M. J., Jin H. H., Dong J. F., Zhang M., Xu X. B., Zhou T. 2011. Abscisic Acid Plays Critical Role in Ozone-Induced Taxol Production of *Taxus chinensis* Suspension Cell Cultures. *Biotechnology Progress*, 27, 5: 1415-1420
- Yamamoto S., Sonoda Y., Kataoka T., Hayashi S., Miyasaka H. 2018. Enhanced Productivity of Paclitaxel and Related Taxanes in Plant Cell Culture Including Aliphatic Ionic Liquids. *Solvent Extraction Research and Development-Japan*, 25, 2: 125-130
- Yechun W. 2011. A new endophytic taxol- and baccatin III-producing fungus isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *African Journal of Biotechnology*, 10, 72, e16380, doi: 10.5897/AJB11.876: 8 str.

- Zhang C. H., Fevereiro P. S. 2007. The effect of heat shock on paclitaxel production in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures: Role of abscisic acid pretreatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 96, 3: 506-514
- Zhang C. H., Fevereiro P. S., He G. Y., Chen Z. J. 2007. Enhanced paclitaxel productivity and release capacity of *Taxus chinensis* cell suspension cultures adapted to chitosan. *Plant Science*, 172, 1: 158-163
- Zhang P., Zhou P.-P., Yu L.-J. 2009. An Endophytic Taxol-Producing Fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Current Microbiology*, 59, 3: 227-232
- Zhao K., Ping W., Li Q., Hao S., Zhao L., Gao T., Zhou D. (2009). *Aspergillus niger* var. *taxi*, a new species variant of taxol-producing fungus isolated from *Taxus cuspidata* in China. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 4: 1202-1207
- Zhao K., Sun L. X., Ma X., Li X. L., Wang X., Ping W. X., Zhou D. P. 2011. Improved taxol production in *Nodulisporium sylviforme* derived from inactivated protoplast fusion. *African Journal of Biotechnology*, 10, 20: 4175-4182
- Zhao K., Zhao L. F., Jin Y. Y., Wei H. X., Ping W. X., Zhou D. P. (2008). Isolation of a taxol-producing endophytic fungus and inhibiting effect of the fungus metabolites on HeLa cell. *Mycosistema*, 27: 735-744
- Zhong J.-J. 2002. Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 6: 591-599
- Zhou K., Qiao K. J., Edgar S., Stephanopoulos G. 2015. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. *Nature Biotechnology*, 33, 4: 377-383
- Zhou X., Wang Z., Jiang K., Wei Y., Lin J., Sun X., Tang K. 2007. Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologija*, 43, 4: 490-494

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Borutu Bohancu se zahvaljujem za pomoč pri izbiri teme, načrtovanju in pregledovanju diplomske naloge, kakor tudi za hitro odzivnost.

PRILOGA A

Shema reakcij biosinteze paklitaksel

