

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

**ZBORNİK RAZŠIRJENIH SEMINARJEV ŠTUDENTOV
BIOTEHNOLOGIJE PRI PREDMETU
BIOTEHNOLOGIJA RASTLIN (2022/23)**

Ljubljana, 2023

ZBORNİK RAZŠIRJENIH SEMINARJEV ŠTUDENTOV BIOTEHNOLOGIJE PRI
PREDMETU BIOTEHNOLOGIJA RASTLIN (2022/23)

V monografiji je zbranih nekaj najnovejših znanstveno-raziskovalnih dosežkov na področju rastlinske biotehnologije, ki so bili dobljeni s postopki moderne biotehnologije in objavljeni v različni literaturi. Študenti na študiju 1. stopnje Biotehnologija pri predmetu Biotehnologija rastlin so del teh dosežkov predstavili v sklopu seminarjev v študijskem letu 2022/23. Devet se jih je odločilo, da izbrano tematiko poglobijo s študijem dodatne literature in jo predstavijo v preglednih prispevkih.

Avtorji: Peter Ribič, Franci Kastelic, Tinkara Tanja Valcl, Breda Gartner, Tea Dular, Julija Vodenik, Ana Plavec, Kaja Tori in Andraž Pangerc

Zvrst: Znanstvena monografija

Nosilki predmeta in recenzentki: prof. dr. Nataša Štajner in prof. dr. Zlata Luthar

Urednica: prof. dr. Zlata Luthar

Tehnična urednica: prof. dr. Zlata Luthar

Izdajatelj in založnik: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Leto izida: 2023

Elektronska izdaja

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID 165437187

ISBN 978-961-6379-83-0 (PDF)

(dostopno: <https://repozitorij.uni-lj.si/admin/GradivoOsnovno.php?id=150757>)

KAZALO VSEBINE

UPORABA RNA INTERFERENCE ZA ZAŠČITO RASTLIN Peter Ribič	4
GENETSKE IZBOLJŠAVE ODPORNOSTI RASTLIN PROTI SUŠI Franci Kastelic	17
VIRUSOM PODOBNI DELCI RASTLINSKEGA IZVORA KOT CEPIVA PROTI SARS-CoV-2 IN DRUGIM NALEZLJIVIM BOLEZNIM Tinkara Tanja Valcl	27
FITOREMEDIACIJA TEŽKIH KOVIN Z GENSKO SPREMENJENIMI RASTLINAMI Breda Gartner	36
MOLEKULARNE OSNOVE DELOVANJA POGOSTO UPORABLJENIH KEMIČNIH SNOVI V KOZMETIKI Tea Dular	48
RASTLINSKA SINTEZA AMIDIRANIH PROTIMIKROBNIH PEPTIDOV Z AKTIVNIM DELOVANJEM PROTI PATOGENOM 'ESKAPE' IN <i>E. coli</i> Julija Vodenik	61
ZMANJŠANJE VSEBNOSTI ALERGOGENOV V HRANI RASTLINSKEGA IZVORA S POMOČJO RNA INTERFERENCE Ana Plavec	69
SINTEZA TERAPEVTSKIH BELJAKOVIN S TRANSGENIMI RASTLINAMI ZA ZDRAVLJENJE NALEZLJIVIH IN AVTOIMUNSKIH BOLEZNI Kaja Tori	78
IMUNOTERAPIJA RAKA Andraž Pangerc	95

UPORABA RNA INTERFERENCE ZA ZAŠČITO RASTLIN

Peter Ribič

IZVLEČEK

Človeška populacija se hitro povečuje in naj bi se v naslednjih petdesetih letih podvojila, kar bo povzročilo večje potrebe po pridelavi hrane. Eden od načinov za povečanje kakovostne pridelave hrane je žlahtnjenje rastlin, ki povečuje odpornost na glive, viruse in bakterije. Ti predstavljajo znatno grožnjo kmetijstvu, saj se velik delež pridelkov izgubi zaradi bolezni. Ena izmed najbolj obetajočih metod žlahtnenja rastlin temelji na RNA interferenci, ki omogoča hitre prilagoditve, specifičnost na patogene in manjši vpliv na okolje. Omogoča nam utišanje tarčnih genov, bodisi rastlinskih ali patogenih. Preko utišanja genov lahko izboljšamo lastnosti rastlin ali inhibiramo delovanje patogena. RNA interferenco lahko induciramo preko treh glavnih metod: preko sestavljanja virusa znotraj rastline (VIGS), s pršenjem dvoverižne RNA na rastlino (SIGS) ter z transformacijo rastline, da sama izraža dvoverižno RNA (HIGS). RNA interferenca je močno orodje tudi na raziskovalnem področju.

Ključne besede: RNA interferenca, žlahtnjenje rastlin, VIGS, SIGS, HIGS

Using RNA interference for plant protection

ABSTRACT

The human population is rapidly increasing and is expected to double in the next fifty years, leading to greater food production needs. One way to enhance the quality of food production is through plant breeding, which increases resistance to fungi, viruses, and bacteria. These pathogens pose a significant threat to agriculture, as a large portion of crops is lost due to diseases. One of the most promising methods of plant breeding is based on RNA interference, which allows for rapid adaptation, pathogen specificity, and minimal environmental impact. It enables us to silence target genes, whether they are of plant or pathogen origin. By silencing genes, we can improve plant traits or inhibit pathogen activity. RNA interference can be induced through three main methods: virus-induced gene silencing (VIGS), spray-induced gene silencing (SIGS), host-induced gene silencing (HIGS). RNA interference is also a powerful tool in the field of research.

Key words: RNA interference, plant breeding, VIGS, SIGS, HIGS

1 Uvod

Svetovna človeška populacija se hitro povečuje in naj bi se podvojila v naslednjih petdesetih letih, kar bo vplivalo na povečane potrebe po pridelavi hrane. Vedno več držav je odvisnih od uvoza hrane, kar povečuje nestabilnost pri oskrbi. Razlog za to so nepredvidljivi lokalni dogodki v pridelavi in proizvodnji, ki jih povzročijo rastlinski škodljivci, okoljske in ekonomske razmere. To je lahko težavno, saj je pogosto širše območje vezano na eno pridelavalno lokacijo (Suweis in sod., 2015). Eden izmed načinov za povečanje kakovostne

pridelave hrane je žlahtnjenje rastlin, s katerim povečujemo odpornost na biotske dejavnike kot so glive, virusi in bakterije. Ti trenutno predstavljajo znatno grožnjo kmetijstvu, saj se 20 do 25 % pridelkov izgubi zaradi bolezni pred in po žetvi (Akbar in sod., 2022). Ta delež se povečuje zaradi podnebnih sprememb, ki vplivajo na variabilnost temperatur, padavin in tokov vetra, kar povzroči spremembo aktivnosti in vigorja patogenov (Dixon, 2012).

Ocenjuje se, da že rastlinski virusi povzročijo 60 milijard dolarjev škode letno, odgovorni pa so za 50 % na novo pojavljajočih se rastlinskih boleznih (Sastry in Zitter, 2014; Bernardo in sod., 2017). Med njimi veliko škode povzročijo: ječmenov virus rumenenja in pritlikavosti (BYDV - barley yellow dwarf virus), ki okužuje pšenico, oves, riž, koruzo in ostala žita; določeni mozaični virusi, ki se pojavljajo na manioki, ki se množično goji v revnejših državah Afrike in njene izgube pogosto vodijo v lakoto (Strange in Scott, 2005); virus zvijanja listov krompirja (PLRV - potato leaf roll virus), ki prizadane krompir in že samo v ZDA letno povzroči 100 milijonov dolarjev škode (Wale in sod., 2008).

Bakterijske bolezni so prav tako pogosto uničevalne. Bakterije iz rodu *Xanthomonas* povzročajo več kot 350 bolezni na rastlinah (Leyns in sod., 1984), še posebej na rižu v tropski Aziji in Indiji (Strange in Scott, 2005). *Pseudomonas solanacearum* okužuje več kot 200 rastlinskih vrst, med njimi tudi banane, ingver in razhudnikovke, kot so krompir, jajčevec, paprika in paradižnik (Schell, 2000).

Veliko škodo povzročijo tudi glive, saj obilno sporulirajo in se zato učinkovito širijo, imajo kratko latentno obdobje, sintetizirajo fitotoksične spojine in omejujejo pravilno rast rastlin s sintezo rastnih regulatorjev (Strange, 2003). Glivne bolezni so poznane po tem, da jih s klasičnimi pristopi zatiranja, kot sta kolobarjenje in uporaba kemičnih sredstev, pogosto ne uspemo nadzirati (Palmieri in sod., 2022). Uničujejo tudi skladiščeno hrano, nekateri rodovi, kot so *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* in *Penicillium* pa sintetizirajo tudi mikotoksine (Sanzani in sod., 2016). Precej izgub povzročijo *Fusarium* spp. *Verticillium* spp. in *Pythium* spp. na skoraj vseh industrijsko pomembnih rastlinah (Ampt in sod., 2018). Pomembni patogeni so tudi oomicete, ki spadajo v kraljestvo protistov, znana primera sta *Phytophthora* in *Peronospora* (Thakur in Mathur, 2002). Manjšo škodo povzročajo nematode. V nekaterih primerih delujejo kot prenašalci virusov (Brown in sod., 2003). Parazitske rastline, kot so *Striga* spp. in *Orobanche* spp., lahko povzročijo popolno izgubo pridelka. Parazitirajo predvsem dvokaličnice v predelih Afrike in Azije. V boju proti rastlinskim patogenom se zato neprestano razvijajo nove metode zaščite. Novejša generacija metod temelji na RNA interferenci, ki omogoča hitre prilagoditve, specifičnost na patogene in manjši vpliv na okolje.

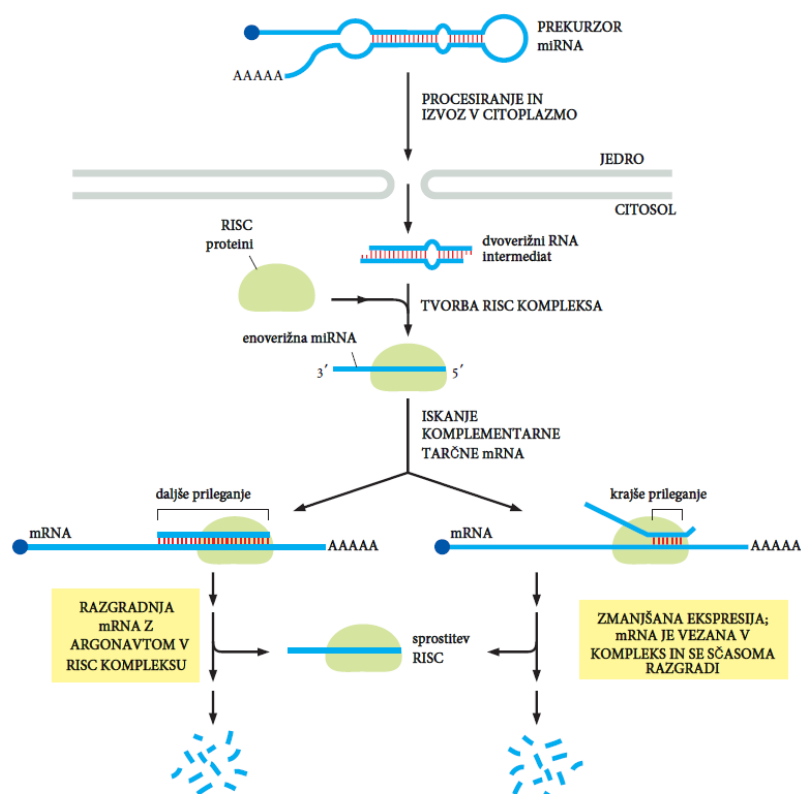
2 RNA INTERFERENCA

V zadnjih dvajsetih letih se je naše znanje RNA funkcij precej razširilo z odkritjem malih RNA, ki omogočajo pojav RNA interference (RNAi). RNAi je endogena pot negativne post-transkripcijske regulacije, njeno odkritje pa je bilo 2006 nagrajeno z Nobelovo nagrado. Omogoča nam "knockdown" študije, pri katerih se zniža raven izražanja določenega gena. Gene lahko z RNAi utišamo v celotnem organizmu, tkivno specifično in glede na razvojno fazo

(Milhavet in sod., 2003). RNAi najdemo v evkariontih, v prokariontih pa se je neodvisno razvil podoben sistem, ki je po funkciji analogen, a genetsko ni homologen (Shabalina in Koonin, 2008). RNA interferenco sproži dvoverižna RNA (dsRNA), ki omogoča targetiranje in uničenje homologne mRNA oz. preprečitev njene transkripcije ali translacije. S tem se tarčni geni utišajo (Almeida in Allshire, 2005). Ta mehanizem nam omogoča razvoj okolju prijaznega orodja za izboljšanje lastnosti rastlin, vključno z odpornostjo na bolezni. Osredotočili se bomo na delovanje RNA interference ter njene aplikacije za nastanek odpornih rastlin.

RNAi je skupek RNA procesov, ki vodi v nukleotidno-specifično inhibicijo ekspresije na nivoju transkripcije, translacije ali stabilnosti mRNA. Najverjetneje se je razvila kot mehanizem za preprečevanje ekspresije tujih genov (Wani in sod., 2010). Utišanje genov je posledica prisotnosti malih RNA (sRNA). Pod sRNA spadajo male interferenčne RNA (siRNA) in mikro RNA (miRNA), odvisno od izvora in načina procesiranja. miRNA imajo običajno dolžino 21-22 bp, siRNA pa 21-24 bp.

RNAi se prične, ko se dolge verige dvoverižne RNA (dsRNA) razrežejo v manjše fragmente sRNA z dolžino 21-24 bp s pomočjo encima Dicer, ki je podoben ribonukleazi III. Nastali sRNA duplexi se razvijejo in se povežejo v proteinski kompleks RISC (RNA induced silencing complex), s tem ga aktivirajo. sRNA verige, ki se vgradijo v RISC, se imenujejo guide (vodilna) sRNA. Kompleks RISC z guide sRNA se veže na tarčno mRNA, ki ji je guide sRNA komplementarna. Protein Argonavt (AGO), ki je sestavni del RISC, nato povzroči represijo oz. razgradnjo tarčne mRNA. AGO ima namreč endonukleazno aktivnost.

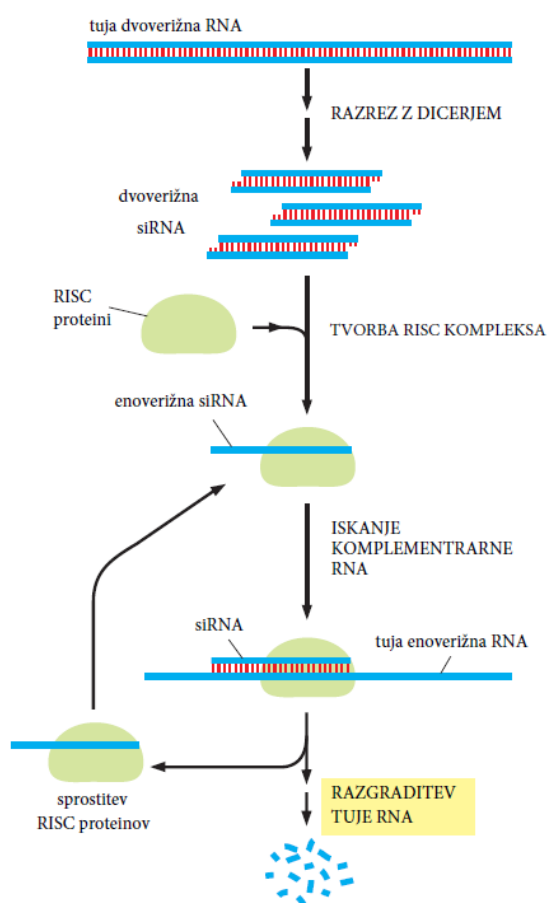


Slika 1: RNA interferenca z miRNA (prirejeno po Alberts, 2019)

Proces utišanja gena se vzdržuje s pomočjo RNA-odvisne RNA polimeraze (RDRP), ki omogoča amplifikacijo sRNA. RDR pomnožuje sRNA in jo pretvori v dvoverižno obliko, ki ponovno razpade in vstopi v kompleks RISC (Akbar in sod., 2022).

Kot omenjeno pod sRNA, ki lahko vstopi v pot RNAi, spadata miRNA in siRNA, ki sta podobne dolžine, a različnega izvora. miRNA, tako kot druge oblike RNA, potrebuje procesiranje, da preide v zrelo obliko (Slika 1). Prepiše se v jedru iz miRNA genov in s tem

nastane prekursor miRNA. Zaradi svojega nukleotidnega zaporedja samokomplementarnosti pridobi značilno lasnično strukturo z dvoverižno RNA. Ta se procesira in z Dicerjem razreže v zrele enoverižne miRNA, ki se vgradijo v RISC kompleks. Glede na stopnjo prileganja med miRNA in tarčno mRNA se ob boljšem prileganju razgradnja mRNA zgodi takoj, ob slabšem prileganju pa se za krajši čas inhibira translacija, dokler mRNA ne razgradijo citoplazemske nukleaze (Alberts, 2019). Veliko mRNA vsebuje nukleotidna zaporedja, ki so komplementarne različnim miRNA. Ena miRNA torej lahko inhibira veliko število genov, več različnih miRNA skupaj pa lahko tvori kompleksne vzorce izražanja. Regulacija izražanja z miRNA sodeluje pri vseh morfoloških fazah rastline: pri razvoju, cvetenju in odzivu na okolje, npr. na abiotični stres. Zaradi zelo širokega vpliva miRNA jo lahko uporabimo za manipulacijo ključnih agronomskih lastnosti kot je oblika rastline, hitrost razvoja, spol, fertilitetnost in odpornost na stres (Millar, 2020), kar bo podrobneje opisano v naslednjih poglavjih.



Slika 2: RNA interferenca s siRNA (prirejeno po Alberts, 2019)

heterokromatina se transkripcija tujih genov ustavi. RITS mehanizem velja kot trajnejši način obrambe pred prekomernim širjenjem predvsem mobilnih genetskih elementov (Alberts, 2019).

Začetek RNA interference v nekaj celicah vodi v sistematsko utišanje tarčnih genov v celotni rastlini preko dveh mehanizmov (Kalantidis in sod., 2008). Lokalno širjenje doseže bližnje celice s transportom sRNA preko plazmodezem po simplastu (Melnik in sod., 2011). Sistematsko širjenje se odvija preko vaskularnega sistema rastline, običajno iz fotosintetskih

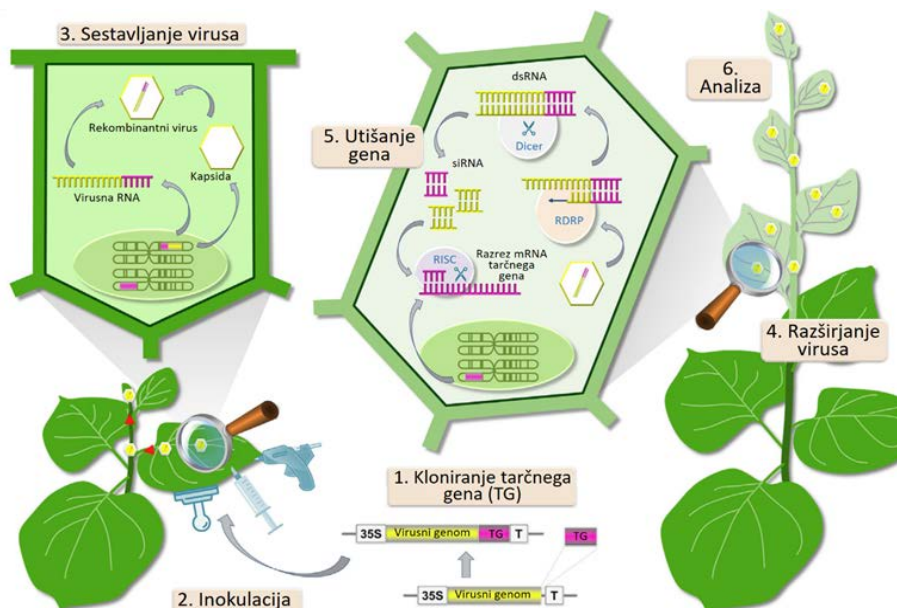
siRNA sodeluje v celičnem obrambnem sistemu proti dolgim dvoverižnim RNA molekulam (Slika 2). Takšne dsRNA molekule redko nastanejo kot posledica endogenih genov, so pa pogost intermediat v življenjskem ciklu virusov in pri premikanju mobilnih genetskih elementov. Nastanek siRNA torej ščiti celico pred negativnim vplivom teh dejavnikov. Dolga dsRNA se z Dicerjem v citoplazmi razreže v dvoverižno siRNA, ki nato vstopi v enak RISC kompleks kot miRNA. RISC nato eno izmed verig siRNA zavrže in išče komplementarne RNA. Ker je v tem primeru komplementarnost vedno popolna, se ob vezavi tarčno RNA takoj razgradi. S tem mehanizmom okužena celica tujo RNA uporabi samo proti sebi. Poleg tega celica lahko uporabi siRNA za inhibicijo na nivoju transkripcije tuje RNA. V tej poti se siRNA vgradi v proteinski kompleks RITS (RNA-induced transcriptional silencing). Ta se s pomočjo vgrajene siRNA veže na novo nastajajočo tujo RNA še med tem, ko se prepisuje. RITS kompleks nato aktivira določene proteine, ki kovalentno modificirajo bližnje histone, kar povzroči nastanek lokalnega heterokromatina. Zaradi tesne strukture

organov (listov) k ponorom glukoze preko floema. Ksilem praviloma ne vsebuje RNA (Buhtz in sod., 2008). Mediator pri sistematskem širjenju je sRNA ter njeni prekurzorji. Za večjo stabilnost RNA med transportom so najverjetneje odgovorni specifični proteini (Yoo in sod., 2004). Proces širjenja traja nekaj tednov.

RNA interferenco lahko uporabimo za modifikacijo lastnosti rastlin v agronomске in raziskovalne namene z vnosom dsRNA ali komplementarne RNA, ki tvori dsRNA z mRNA v celici. Vnos lahko opravimo preko treh glavnih metod, ki so podrobneje opisane v naslednjih poglavjih.

2.1 VIGS METODA

Pri VIGS metodi (virus-induced gene silencing) utišanje genov dosežemo z izkoriščanjem rastlinskega obrambnega sistema proti virusom. Modificirani virusni vektor, ki vsebuje tudi dele rastlinskih tarčnih genov, najprej transformiramo v Ti plazmid *Agrobacterium tumefaciens*. Uporabimo cDNA virusnega vektorja, ki ima odstranjene patogene gene. Nato *A. tumefaciens* uporabimo za transformacijo rastlinskega materiala, pri katerem del Ti plazmida vstopi v rastlinsko celico. Tam se prične prepisovati in replicirati z endogeno RDR polimerazo, ki tvori dvoverižne RNA in s tem sproži proces RNAi. Iz dsRNA z encimom Dicer nastane siRNA, ki se nato vgradi v encim RISC in povzroči razgradnjo tarčne RNA (Lange in sod., 2013). RNAi se nato sistematsko razširi po rastlini kot je omenjeno v poglavju 2. Rekombinantni virusni vektor lahko vnesemo tudi direktno, npr. z injiciranjem. Za boljše sistemsko širitev RNAi preko celotne rastline se lahko poslužujemo vektorjev, ki tvorijo rekombinantni virus, kot kaže slika 3. To uporabimo v primerih, ko metoda z *A. tumefaciens* ni mogoča ali je otežena, npr. v lilijah (Courdavault in Besseau, 2021). Vnos vektorja je možen tudi z biolistiko (Yamagishi in sod., 2010). VIGS običajno uporabljamo na mladih rastlinah, cel proces od okužbe z vektorjem do utišanja pa traja 3-4 tedne (Burch-Smith in sod., 2004).



Slika 3: VIGS metoda (prirejeno po Courdavault in sod., 2020)

Zaradi porasta dostopnosti celotnih genomov in s tem na tisoče genov se je povečalo tudi zanimanje za njihove funkcije. VIGS metoda je pri tem nepogrešljiva, saj nam z utišanjem specifičnih genov razkrije njihovo funkcijo. Je hitra in omogoča okarakterizacijo fenotipov, ki so letalni v stabilnih linijah (Burch-Smith in sod., 2004). Gene lahko utišamo tudi s stabilno gensko transformacijo, a je to pogosto zahtevnejši in dolgotrajen proces v primerjavi z VIGS. Pri lilijah za regeneracijo in aklimatizacijo po klasični transformaciji potrebujemo tri ali več let (Courdavault in Besseau, 2021). VIGS metoda se je izkazala kot učinkovitejša tudi od ostalih klasičnih pristopov utišanja genov kot je mutageneza, insercija T-DNA z *A. tumefaciens*, uporaba transpozonov in modernejši TILLING (Burch-Smith in sod., 2004). Naštete metode so običajno vrstno omejene in za njihovo izvedbo potrebujemo velike rastlinske populacije, kar ne velja za VIGS. Zaradi velikega števila duplikacij in obsežnih genskih družin v rastlinskih genomih točkaste mutacije ali insercije ne privedejo vedno do zelenih fenotipov. Če gen, ki je prisoten na večih lokusih ali v večih sorodnih različicah oz. alelih, mutiramo le na enem izmed teh lokusov, bo funkcija gena ostala neznana. Z VIGS zajamemo inhibicijo vseh mRNA, ki imajo določeno ~22 bp dolgo nukleotidno zaporedje. Pogosto se uporablja bolj ohranjene regije, da zajamemo celo družino genov. Nekatere klasične metode povzročijo mutacijo tudi na netarčnih mestih, kar oteži interpretacijo "knockout" fenotipa. Za izolacijo mutacije se zato uporablja povratna križanja, ki so zamudna. VIGS ne transformira rastlin in je prehodna metoda. Olajša nam primerjavo različnih genetskih ozadij, ki imajo lahko vpliv na končni fenotip "knockout" gena. Modificirani virusni vektorji lahko delujejo v večih rastlinskih vrstah (Burch-Smith in sod., 2004). VIGS se uporablja tudi za raziskovanje metabolnih poti, kot so to storili za: sintezo določenih inhibitorjev zaradi napada žuželk (Saedler in Baldwin, 2004); fotosistem II v fotosintezi (Saitoh in Terauchi, 2002); celuloza sintazo (Burton in sod., 2000).

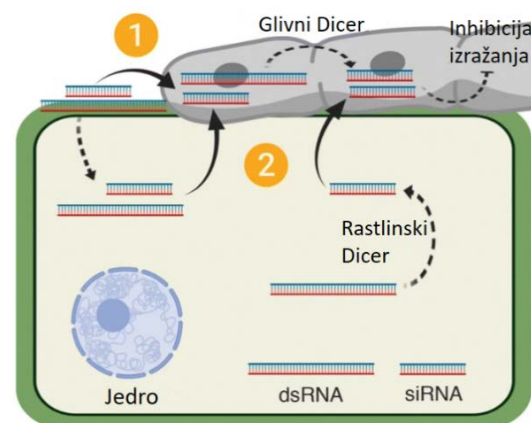
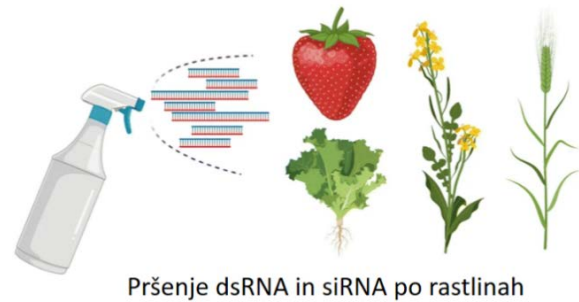
Slabost VIGS metode je, da redko pride do popolnega utišanja genov. Če rastlina še vedno sintetizira dovolj funkcionalnega proteina, se fenotip ne bo izrazil. Raven RNAi ni vedno enaka po rastlini in med eksperimenti, zato se običajno uvede pozitivno kontrolo, pri kateri v rastlino ne vnesemo vektorja. Sam rekombinantni virus prav tako lahko vpliva na razvoj rastline in opazovani fenotip. V primeru, ko celoten rastlinski genom še ni znan, lahko pride do utišanja netarčnih genov (Burch-Smith in sod., 2004).

2.2 SIGS METODA

SIGS oz. spray-induced gene silencing je metoda utišanja genov, pri kateri v organizem vnesemo dsRNA ali sRNA s pršenjem po površini (slika 3). SIGS se uporablja tako za inducirane RNAi v rastlinah kot tudi v rastlinskih škodljivcih. V tem primeru se raztopino RNA poprši po listih rastline, kjer vstopi v patogene in v njih utiša ključne gene za preživetje. Je obetajoča metoda, saj omogoča okolju prijazno zatiranje specifičnih patogenov in se ne poslužuje genskega spreminjanja rastlin. To je koristno zaradi javnega mnenja o GSO in zaradi pomanjkanja učinkovitih postopkov za transformiranje določenih rastlinskih vrst.

dsRNA ali sRNA v patogena lahko vstopi na dva načina – direktno s površine lista v škodljivca ali preko rastlinskih celic, kjer dsRNA/sRNA preide najprej v rastlinsko celico, se z Dicerjem razreže le v sRNA in nato prestopi v patogena (Wang in Jin, 2017). Po tej poti se RNAi razširi po celotni rastlini, kar omogoča zaščito netretiranih predelov rastline ter podaljša trajanje zaščite. SIGS metoda se je večkrat dokazala kot učinkovita.

Pri ječmenovih listih je močno inhibirala rast *Fusariuma* (Koch in sod., 2016). Dokazali so tudi visoko učinkovitost proti plesni pri oljni ogrščici (McLoughlin in sod., 2018) in rižu (Qiao in sod., 2021). Nekatere glive, kot so *Botrytis* in *Verticillium* spp., povzročajo precejšno izgubo pridelkov tako, da v rastlino vnesejo sRNA, ki utišajo gene imunosti. Wang in sod. (2016) so dokazali, da tretiranje površine paradižnikov, grozdja, jagod, solate in čebule z dsRNA/sRNA, ko v glivi ciljajo Dicerju-podobne gene, bistveno zmanjša takovrstne glivne bolezni. RNAi ima visoko specifičnost, a se izkaže, da je možno oblikovati dsRNA molekule, ki inhibirajo veliko število patogenov pri različnih rastlinskih vrstah (Gu in sod., 2019).



Slika 4: SIGS metoda (prirejeno po Sang in Kim, 2020)

SIGS metoda je uporabna tudi za izboljšavo rastlinskih lastnosti, pri katerih ima negativna regulacija ugoden fenotip. Primer tega je odpornost na sušo pri jabolani (Feng in sod., 2021), pri kateri inhibiramo metabolizem citokininov. Ti igrajo ključno vlogo pri zakasnitvi senescence, zmanjšanju oksidativnega stresa in rasti kljub sušnim razmeram. Z negativno regulacijo lahko spreminjamo tudi čas cvetenja, s čimer pospešimo vstop v reproduktivno fazo, kot so to dokazali Hong in sod. (2021) v *Arabidopsis*. Vplivamo lahko tudi na odpornost proti slanosti (Myo in sod., 2021).

Za uspešno okužbo patogeni pogosto ciljajo specifične rastlinske proteine, ki so ključni za imunski odziv ali za interakcijo med patogenom in rastlino. Ti proteini se imenujejo dovzetnostni faktorji (van Schie in Takken, 2014). Pri paradižniku je utišanje petih dovzetnostnih faktorjev zmanjšalo posledice pozne sneti, ki jo povzroča *Phytophthora* (Sun in sod., 2016). Podobno je “knockout” določenega gena v baziliki zmanjšalo biomaso sneti za 93%. SIGS metoda predstavlja dobro alternativo GS rastlinam. Prav tako bi lahko GS rastlina, ki ima izbit gen, izkazovala negativne posledice. Temu se izognemo z utišanjem gena le v določenih fazah razvoja s SIGS metodo.

Uporaba SIGS metode je omejena, saj za mnoge patogene še ni dokazano delujoča. Prav tako nekateri škodljivci, kot so *Zymoseptoria* spp. in *Colletotrichum* spp., niso sposobni privzema dsRNA (Qiao et al., 2021), torej RNAi metode na njih ne bi imele učinka. Mehanizmi, ki povzročijo različen privzem RNA pri škodljivcih, še niso poznani, vendar se predvideva, da ima ključno vlogo sestava celične stene in membrane. Raziskave na področju privzema RNA v različnih organizmih so zato ključen korak v razvoju SIGS metode (Qiao in sod., 2021).

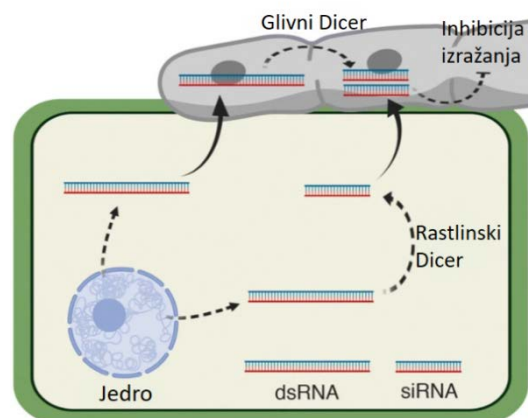
Eden izmed glavnih omejitev SIGS metode je nestabilnost RNA v okoljskih razmerah. Obstojnost dsRNA lahko izboljšamo s formulacijo nanodelcev, ki RNA zaščitijo pred razgradnjo. Mitter in sod. (2017) so pokazali, da imajo nanodelci dsRNA, zmešani z hidroksidno glino (BioClay), bistveno daljšo obstojnost in se ne sperejo iz listov. Omogočajo tudi postopno izločanje dsRNA. Ugotovili so, da je samo dsRNA nudila zaščito 5-7 dni, dsRNA v nanodelcih pa 20 dni, moč pa jo je bilo zaznati tudi 30 dni po nanosu. Druge raziskave kažejo, da samo dsRNA učinkovito ščiti pred glivami 8 dni (Wang in sod., 2016). Za podaljšanje obstojnosti se razvijajo tudi nanodelci na osnovi karbona (Schwartz in sod., 2020) in hitina (Zhang in sod., 2010). Največja omejitev omenjenih metod je cena sinteze dsRNA in nanodelcev.

2.3 HIGS METODA

HIGS oz. host-induced gene silencing je utišanje genov preko dsRNA, ki jo izraža gostitelj, v našem primeru rastlina (Slika 4). Tarča utišanja so najpogosteje geni patogena, lahko pa tudi geni same rastline. Zahteva gensko modifikacijo rastlin, saj vnesemo samokomplementarno ponovljivo nukleotidno zaporedje, ki po izražanju tvori dsRNA, ta pa vstopi v pot RNAi. Nastale dsRNA in sRNA preidejo v patogena, kjer inhibirajo kritične gene za njegovo preživetje (Qi in sod., 2019). Inhibicija izražanja se lahko odvije tudi v rastlinski celici, če ta izraža tarčne gene. HIGS metoda je bila uspešno uporabljena za zaščito banane (Dou in sod., 2020), paradižnika (Song in Thomma, 2018), krompirja (Jahan in sod., 2015) in mnogih drugih vrst proti glivam *Fusarium*, *Verticilium* in oomicetam. Cheng in sod. (2015) so pridobili transgeno linijo pšenice, ki je izkazovala visoko odpornost na *Fusarium* spp. z inhibicijo hitin sintaze. Odpornost se je uspešno prenesla tudi na kasnejše generacije pšenice. S HIGS metodo se izognemo škropljenju z dsRNA in s tem bistveno znižamo stroške pridelave. Utišanje genov pogosto ni popolno, kar zmanjša učinkovitost zaščite, prav



Transgene rastline, ki izražajo dsRNA



Slika 5: HIGS metoda (prirejeno po Sang in Kim, 2020)

tako pa mnogo vrst ni primernih za transgenezo. HIGS metoda ni možna pri mrtvih tkivih in plodovih, saj sinteza dsRNA ni dovoljšna (Qi in sod., 2019).

Izražanje siRNA v transgenih rastlinah nudi zaščito tudi pred insekti, virusi in nematodami, pri katerih je bil pojav RNAi prvič odkrit. Več raziskav je potrdilo, da je pri zaščiti proti listnim ušem idealna tarča protein toplotnega šoka 90 (HSP90) zaradi njegove ključne vloge, pogostosti in ohranjenosti – to so lastnosti, ki jih mora imeti tarčni gen (Qi in sod., 2019). Trenutno edini strategiji proti širjenju virusov sta drago tretiranje proti njihovim prenašalcem in izbor rezistentnih sort, kar pogosto ni dovolj. Shoup Rupp in sod. (2016) in mnogi drugi (Sivamani in sod., 2000; Sivamani in sod., 2002) so dokazali uspešnost HIGS metode proti virusom tudi v šesti generaciji po transgenezi. Pri metodah RNAi je potrebna pazljivost glede vpliva na netarčne gene. Pri tem nam pomagajo genomske knjižnice. Eden izmed večjih pomislekov pri HIGS metodi je vpliv siRNA na živali in ljudi, ki te rastline zaužijejo. Dokazali so namreč, da sRNA, ki se izraža v GS rastlinah, lahko vpliva na izražanje genov v sesalcih, ki so te rastline zaužili (Zhang in sod., 2012), kar še bolj oteži izbiro primerne tarče.

3 ZAKLJUČEK

RNA interferenca je močno orodje tako na raziskovalnem področju kot tudi pri zaščiti poljščin in pridelkov, od katerih izgubimo velik delež zaradi bolezni virusov, bakterij, nematod in predvsem gliv. Porast sekvenciranih genomov je povzročilo povečano povpraševanje po metodah za ugotavljanje funkcije genov, pri čemer se je VIGS metoda izkazala za odlično alternativo zaradi svoje hitrosti. SIGS je obetajoča metoda zaščite rastlin in skladiščene hrane, saj je prehodne narave in ne zahteva uporabe GS rastlin. HIGS metoda se poslužuje GS rastlin in nudi znatno zaščito, a s sabo prinaša marsikatero varnostno vprašanje. Preden bodo rastline, pridelane z metodami RNAi, prispele na naše krožnike, bo potrebno še mnogo raziskav in optimizacije.

4 VIRI

- Akbar, S., Wei, Y., & Zhang, M. Q. (2022). RNA interference: Promising approach to combat plant viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5312. <https://doi.org/10.3390/ijms23105312>
- Alberts, B. (2019). *Essential Cell Biology*. W. W. Norton & Company.
- Almeida, R., & Allshire, R. C. (2005). RNA silencing and genome regulation. *Trends in Cell Biology*, 15(5), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.03.006>
- Ampt, E. A., van Ruijven, J., Raaijmakers, J. M., Termorshuizen, A. J., & Mommer, L. (2018). Linking ecology and plant pathology to unravel the importance of soil-borne fungal pathogens in species-rich grasslands. *European Journal of Plant Pathology*, 154(1), 141–156. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1573-x>
- Buhtz, A., Springer, F., Chappell, L., Baulcombe, D. C., & Kehr, J. (2008). Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *The Plant Journal*, 53(5), 739-749.

- Burton, R. A., Gibeaut, D. M., Bacic, A., Findlay, K., Roberts, K., Hamilton, A., Baulcombe, D. C., & Fincher, G. B. (2000). Virus-Induced Silencing of a Plant Cellulose Synthase Gene. *The Plant Cell*, 12(5), 691–706.
- Bernardo, P., Charles-Dominique, T., Barakat, M., Ortet, P., Fernandez, E., Filloux, D., Hartnady, P., Rebelo, T. A., Cousins, S. R., Mesleard, F., Cohez, D., Yavercovski, N., Varsani, A., Harkins, G. W., Peterschmitt, M., Malmstrom, C. M., Martin, D. P., & Roumagnac, P. (2017). Geometagenomics illuminates the impact of agriculture on the distribution and prevalence of plant viruses at the ecosystem scale. *The ISME Journal*, 12(1), 173–184. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.155>
- Brown, D., Karanastasi, E., & Wyss, U. (2003). An in vitro examination of the feeding behaviour of paratrichodorus anemones (Nematoda: Trichodoridae), with comments on the ability of the nematode to acquire and transmit tobnavirus particles. *Nematology*, 5(3), 421–434. <https://doi.org/10.1163/156854103769224403>
- Burch-Smith, T. M., Anderson, J. C., Martin, G. B., & Dinesh-Kumar, S. P. (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal*, 39(5), 734–746. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02158.x>
- Cheng, W., Song, X.-S., Li, H. P., Cao, L.-H., Sun, K., Qiu, X. L., Xu, Y. B., Yang, P., Huang, T., Zhang, J. B., Qu, B., & Liao, Y. C. (2015). Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to Fusarium head blight and seedling blight in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 13(9), 1335–1345. <https://doi.org/10.1111/pbi.12352>
- Courdavault, V., Besseau, S., Oudin, A., Papon, N., & O'Connor, S. E. (2020). Virus-Induced Gene Silencing: Hush Genes to Make Them Talk. *Trends in Plant Science*, 25(7), 714–715. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.02.013>
- Courdavault, V., & Besseau, S. (Eds.). (2021). Virus-induced gene silencing in plants: Methods and protocols. HUMANA.
- Dixon, G. R. (2012). Climate change – impact on crop growth and food production, and plant pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(3), 362–379. <https://doi.org/10.1080/07060661.2012.701233>
- Dou, T., Shao, X., Hu, C., Liu, S., Sheng, O., Bi, F., Deng, G., Ding, L., Li, C., Dong, T., Gao, H., He, W., Peng, X., Zhang, S., Huo, H., Yang, Q., & Yi, G. (2020). Host-induced gene silencing of Foc TR4 ERG6/11 genes exhibits superior resistance to Fusarium wilt of banana. *Plant Biotechnology Journal*, 18(1), 11–13. <https://doi.org/10.1111/pbi.13204>
- Feng, Y., Wang, Y., Zhang, G., Gan, Z., Gao, M., Lv, J., Wu, T., Zhang, X., Xu, X., Yang, S., & Han, Z. (2021). Group-C/S1 bZIP heterodimers regulate MdIPT5b to negatively modulate drought tolerance in apple species. *The Plant Journal*, 107(2), 399–417. <https://doi.org/10.1111/tpj.15296>
- Gu, K. X., Song, X. S., Xiao, X. M., Duan, X. X., Wang, J. X., Duan, Y. B., Hou, Y. P., & Zhou, M. G. (2019). A β 2-tubulin dsRNA derived from *Fusarium asiaticum* confers plant resistance to multiple phytopathogens and reduces fungicide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 153, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.10.005>
- Hong, L., Niu, F., Lin, Y., Wang, S., Chen, L., & Jiang, L. (2021). MYB117 is a negative regulator of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 16(5), 1901448. <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1901448>

- Jahan, S. N., Åsman, A. K. M., Corcoran, P., Fogelqvist, J., Vetukuri, R. R., & Dixelius, C. (2015). Plant-mediated gene silencing restricts growth of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *Journal of Experimental Botany*, 66(9), 2785–2794. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv094>
- Kalantidis, K., Schumacher, H. T., Alexiadis, T., & Helm, J. M. (2008). RNA silencing movement in plants. *Biology of the Cell*, 100(1), 13–26. <https://doi.org/10.1042/bc20070079>
- Koch, A., Biedenkopf, D., Furch, A., Weber, L., Roszbach, O., Abdellatef, E., Linicus, L., Johannsmeier, J., Jelonek, L., Goesmann, A., Cardoza, V., McMillan, J., Mentzel, T., & Kogel, K. H. (2016). An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery. *PLOS Pathogens*, 12(10), e1005901. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005901>
- Lange, M., Yellina, A. L., Orashakova, S., & Becker, A. (2013). Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: An overview of target species and the virus-derived vector systems. *Methods in Molecular Biology*, 1–14. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-278-0_1
- Leyns, F., De Cleene, M., Swings, J. G., & De Ley, J. (1984). The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botanical Review*, 50(3), 308–356. <https://doi.org/10.1007/bf02862635>
- McLoughlin, A. G., Wytinck, N., Walker, P. L., Girard, I. J., Rashid, K. Y., de Kievit, T., Fernando, W. G. D., Whyard, S., & Belmonte, M. F. (2018). Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Scientific Reports*, 8(1), 7320. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25434-4>
- Melnyk, C. W., Molnar, A., & Baulcombe, D. C. (2011). Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *The EMBO Journal*, 30(17), 3553–3563. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.274>
- Milhavet, O., Gary, D. S., & Mattson, M. P. (2003). RNA interference in biology and medicine. *Pharmacological Reviews*, 55(4), 629–648. <https://doi.org/10.1124/pr.55.4.1>
- Millar, A. A. (2020). The function of miRNAs in plants. *Plants*, 9(2), 198. <https://doi.org/10.3390/plants9020198>
- Mitter, N., Worrall, E. A., Robinson, K. E., Li, P., Jain, R. G., Taochy, C., Fletcher, S. J., Carroll, B. J., Lu, G. Q. M., & Xu, Z. P. (2017). Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature Plants*, 3, 16207. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>
- Myo, T., Wei, F., Zhang, H., Hao, J., Zhang, B., Liu, Z., Cao, G., Tian, B., & Shi, G. (2021). Genome-wide identification of the BASS gene family in four *Gossypium* species and functional characterization of GhBASSs against salt stress. *Scientific Reports*, 11(1), 11342. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90740-3>
- Palmieri, D., Ianiri, G., Del Grosso, C., Barone, G., De Curtis, F., Castoria, R., & Lima, G. (2022). Advances and perspectives in the use of biocontrol agents against fungal plant diseases. *Horticulturae*, 8(7), 577. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070577>
- Qi, T., Guo, J., Peng, H., Liu, P., Kang, Z., & Guo, J. (2019). Host-Induced Gene Silencing: A Powerful Strategy to Control Diseases of Wheat and Barley. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 206. <https://doi.org/10.3390/ijms20010206>

- Qiao, L., Lan, C., Capriotti, L., Ah-Fong, A., Nino Sanchez, J., Hamby, R., Heller, J., Zhao, H., Glass, N. L., Judelson, H. S., Mezzetti, B., Niu, D., & Jin, H. (2021). Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnology Journal*, 19(9), 1756–1768. <https://doi.org/10.1111/pbi.13589>
- Saedler, R., & Baldwin, I. T. (2004). Virus-induced gene silencing of jasmonate-induced direct defences, nicotine and trypsin proteinase-inhibitors in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Experimental Botany*, 55(395), 151–157. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh004>
- Saitoh, H., & Terauchi, R. (2002). Virus-induced silencing of FtsH gene in *Nicotiana benthamiana* causes a striking bleached leaf phenotype. *Genes & Genetic Systems*, 77(5), 335–340. <https://doi.org/10.1266/ggs.77.335>
- Sang, H., & Kim, J. I. (2020). Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by host-induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS). *Plant Biotechnology Reports*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00588-3>
- Sanzani, S. M., Reverberi, M., & Geisen, R. (2016). Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.07.003>
- Sastry, K. S., & Zitter, T. A. (2014). Management of virus and viroid diseases of crops in the Tropics. *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics*, 149–480. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7820-7_2
- Schell, M. A. (2000). Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annual Review of Phytopathology*, 38(1), 263–292. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.263>
- Shabalina, S., & Koonin, E. (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(10), 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.005>
- Schwartz, S. H., Hendrix, B., Hoffer, P., Sanders, R. A., & Zheng, W. (2020). Carbon Dots for Efficient Small Interfering RNA Delivery and Gene Silencing in Plants. *Plant Physiology*, 184(2), 647–657. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00733>
- Song, Y., & Thomma, B. P. H. J. (2018). Host-induced gene silencing compromises *Verticillium* wilt in tomato and *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, 19(1), 77–89. <https://doi.org/10.1111/mpp.12500>
- Shoup Rupp, J. L., Cruz, L. F., Trick, H. N., & Fellers, J. P. (2016). RNAi-Mediated, Stable Resistance to Triticum mosaic virus in Wheat. *Crop Science*, 56(4), 1602–1610. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.09.0577>
- Sivamani, E., Brey, C. W., Dyer, W. E., Talbert, L. E., & Qu, R. (2000). Resistance to wheat streak mosaic virus in transgenic wheat expressing the viral replicase (NIb) gene. *Molecular Breeding*, 6(5), 469–477. <https://doi.org/10.1023/A:1026576124482>
- Sivamani, E., Brey, C. W., Talbert, L. E., Young, M. A., Dyer, W. E., Kaniewski, W. K., & Qu, R. (2002). Resistance to wheat streak mosaic virus in transgenic wheat engineered with the viral coat protein gene. *Transgenic Research*, 11(1), 31–41. <https://doi.org/10.1023/a:1013944011049>
- Strange, R. N. (2003). *Introduction to plant pathology*. John Wiley & Sons.

- Strange, R. N., & Scott, P. R. (2005). Plant disease: A threat to Global Food Security. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 83–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>
- Suweis, S. et al. (2015) “Resilience and reactivity of Global Food Security,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(22), pp. 6902–6907. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1507366112>.
- Sun, K., Wolters, A. M. A., Vossen, J. H., Rouwet, M. E., Loonen, A. E. H. M., Jacobsen, E., Visser, R. G. F., & Bai, Y. (2016). Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance. *Transgenic Research*, 25(5), 731–742. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9964-2>
- Thakur, R. P., & Mathur, K. (2002). Downy mildews of India. *Crop Protection*, 21(4), 333–345. [https://doi.org/10.1016/s0261-2194\(01\)00097-7](https://doi.org/10.1016/s0261-2194(01)00097-7)
- van Schie, C. C. N., & Takken, F. L. W. (2014). Susceptibility genes 101: How to be a good host. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 551–581. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045854>
- Wale, S., Platt, B., & Cattlin, N. D. (2008). *Diseases, pests and disorders of potatoes: a colour handbook*. CRC Press.
- Wang, M., & Jin, H. (2017). Spray-Induced Gene Silencing: A Powerful Innovative Strategy for Crop Protection. *Trends in Microbiology*, 25(1), 4–6. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.011>
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F. M., Thomma, B. P. H. J., Huang, H. D., & Jin, H. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, 2(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.151>
- Wani, S. H., Sanghera, G. S., & Singh, N. B. (2010). Biotechnology and plant disease control: role of RNA interference. *American Journal of Plant Sciences*, 01(02), 55–68. <https://doi.org/10.4236/ajps.2010.12008>
- Yamagishi, M., Shimoyamada, Y., Nakatsuka, T., & Masuda, K. (2010). Two R2R3-MYB genes, homologs of *Petunia AN2*, regulate anthocyanin biosyntheses in flower Tepals, tepal spots and leaves of asiatic hybrid lily. *Plant & cell physiology*, 51(3), 463–474. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq011>
- Yoo, B. C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y. M., ... & Lucas, W. J. (2004). A systemic small RNA signaling system in plants. *The Plant Cell*, 16(8), 1979-2000.
- Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X., Yin, Y., Wang, C., Zhang, T., Zhu, D., Zhang, D., Xu, J., Chen, Q., Ba, Y., Liu, J., ... Zhang, C.-Y. (2012). Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: Evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research*, 22(1), 107–126. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.158>
- Zhang, X., Zhang, J., & Zhu, K. Y. (2010). Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology*, 19(5), 683–693. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01029.x>

GENETSKE IZBOLJŠAVE ODPORNOSTI RASTLIN PROTI SUŠI

Franci Kastelic

IZVLEČEK

Dandanes se na področju pridelave hrane kot posledica globalnega segrevanja ozračja in naraščanja števila prebivalstva soočamo s številnimi izzivi. Da bomo lahko v prihodnosti zagotovili dovolj pridelkov bo izrednega pomena odpornost rastlin proti abiotičnim stresom, ki vključuje tudi sušni stres. Žlahtnjenje genetsko spremenjenih rastlin z vnosom željenih genov predstavlja možno rešitev, ki lahko izboljša odpornost rastlin proti sušnemu stresu. Različne študije so pokazale, da igrajo ključno vlogo v odpornosti proti sušnim razmeram različne družine transkripcijskih faktorjev (TF ang. transcription factor), kot so NAC (kratica izvira iz treh različnih genov, ang.: No Apical Meristem – NAM; Arabidopsis Transcription Activation Factor – ATAF; Cup-Shaped Cotyledon – CUC), MYB (ang. v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog), WRKY (so velika družina regulativnih proteinov, ki so vključeni v različne rastlinske procese pri obvladovanju biotskih in abiotičnih stresov), DREB (ang. dehydration responsive element binding protein) in HSP (ang. heat-shock protein). Novejši izsledki so potrdili, da prenos posameznih genov iz teh družin iz ene vrste v drugo in njihova prekomerna ekspresija lahko bistveno izboljšajo odpornost rastlin proti suši. NAC TF igrajo vlogo v regulaciji fotosinteze, stabilnosti celične membrane in prispevajo k vzdrževanju turgorja ob pomanjkanju vode. MYB TF so pomemben dejavnik v biosintezi lignina. WRKY TF imajo pomembno vlogo pri regulaciji ekspresije proteinov, ki delujejo antioksidativno in odstranjujejo škodljive reaktivne kisikove spojine. DREB TF se vključujejo v signalne poti abscizinske kisline in vplivajo na vsebnost MDA (malondialdehid), ki je povezana s stopnjo celičnih poškodb. HSP pa so ključni za zvitje in stabilizacijo proteinov kot tudi njihovo funkcijo v stresnih razmerah. Transgene rastline s prekomerno ekspresijo teh genov imajo višjo stopnjo preživetja v sušnih razmerah.

Ključne besede: žlahtnjenje, pridelava hrane, sušni stres, abiotični stres, toleranca proti stresu, genski inženiring, transgene rastline

Genetic improvements in plant drought resistance

ABSTRACT

Today's food production faces many challenges as a result of global warming and population growth. Plant resilience to abiotic stresses, including drought stress, will be of great importance to ensure sufficient yields in the future. Breeding genetically modified plants by introducing desired genes is a possible solution that can improve plant resistance to drought stress. Various studies have shown that different families of transcription factors (TFs), such as NAC (abbreviation derived from three different genes: No Apical Meristem – NAM; Arabidopsis Transcription Activation Factor – ATAF; Cup-Shaped Cotyledon – CUC), MYB (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homologue), WRKY (a big family of regulatory proteins involved in various plant processes to cope with biotic and abiotic stresses), DREB (dehydration responsive element binding protein) and HSP (heat-shock protein) play a key role in drought

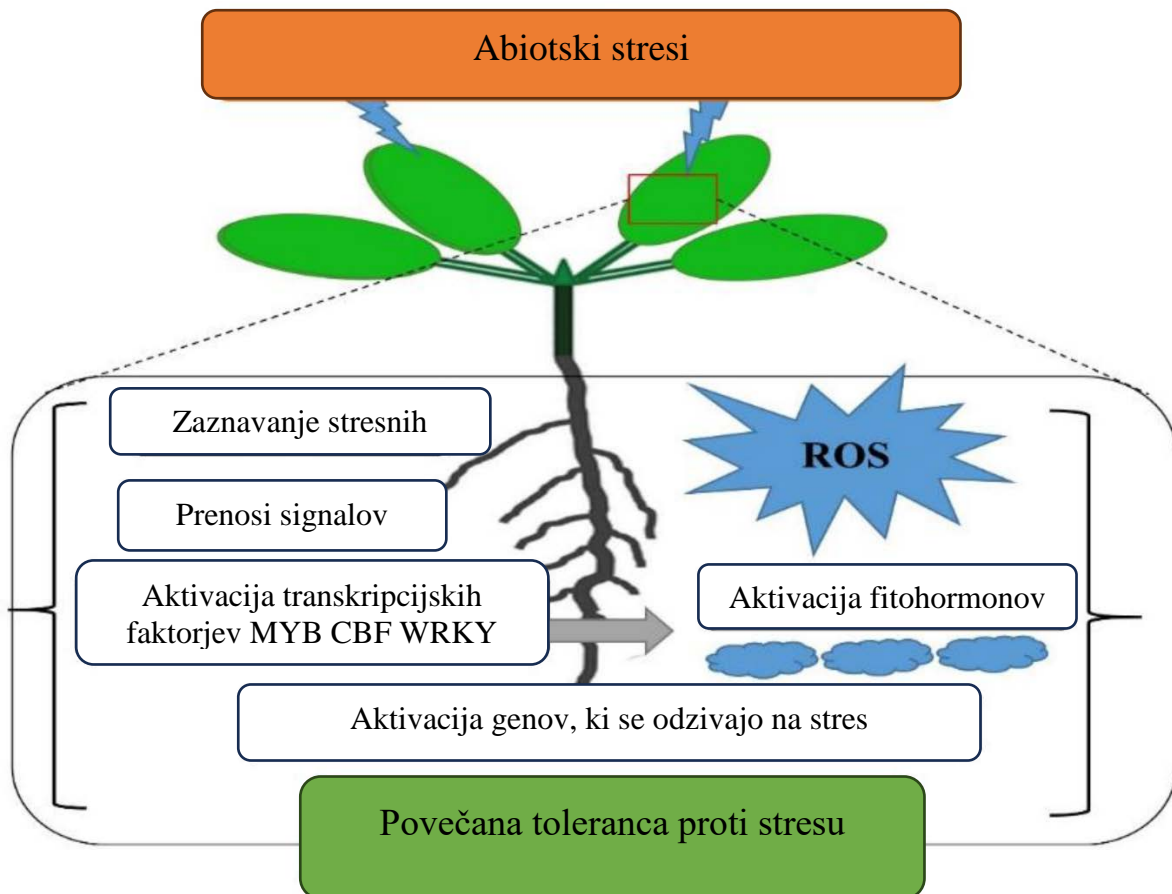
tolerance. Recent findings have confirmed that the transfer of individual genes from these families from one species to another and their overexpression can significantly improve plant drought resistance. NAC TFs play a role in the regulation of photosynthesis, cell membrane stability and contribute to the maintenance of turgor in the face of water deficit. MYB TFs are an important factor in lignin biosynthesis. WRKY TF play an important role in the regulation of the expression of proteins that act as antioxidants and scavenge harmful reactive oxygen species. DREB TFs are involved in abscisic acid signalling pathways and influence MDA (malondialdehyde) content, which is related to the degree of cellular damage. HSPs are crucial for protein folding and stabilisation as well as their function under stress conditions. Transgenic plants overexpressing these genes have a higher survival rate under drought conditions.

Key words: breeding, food production, drought stress, abiotic stress, stress tolerance, genetic engineering, transgenic plants

1 UVOD

Svetovno prebivalstvo se iz dneva v dan intenzivno povečuje, pričakuje se, da se bo število ljudi na Zemlji do leta 2050 povečalo na 9,7 milijarde (Anwar in Kim, 2020). Da bomo lahko nahranili vse ljudi na svetu, bo potrebno pridelati dovolj hrane. Poleg problematike naraščanja števila prebivalstva pa se dandanes borimo s podnebnimi spremembami in onesnaževanjem okolja. Posledično prihaja do naraščanja biotskih in abiotskih obremenitev v okolju, kar povzroča škodo v rastlinski pridelavi. Čeprav je razvoj na področju žlahtnjenja znatno izboljšal pridelavo in s tem količino in kakovost pridelkov, potrebujemo nove tehnologije, da zadostimo povpraševanju po hrani (Anwar in Kim, 2020). Ena izmed abiotskih obremenitev v okolju je sušni stres. Suša sama povzroči večje izgube v količini pridelka kot vsi patogeni kmetijskih rastlin skupaj (Luo in sod., 2022). Suša se danes pojavlja na mnogih območjih kot posledica podnebnih sprememb in vpliva na naravno razširjenost rastlin. Suša tudi omejuje produktivnost kmetijskih rastlin in ogroža prehransko varnost. Kot posledica sušnega stresa rastline trpijo zaradi inhibicije fotosinteze, metabolnih motenj in poškodb celične strukture (Xu in sod., 2020). Suša velja, zaradi nezadostnih količin padavin ali pomanjkanja vode za namakanje za glavno grožnjo v rastlinski pridelavi po vsem svetu. Zaradi pomanjkanja vode je na svetu ena tretjina vseh kmetijskih zemljišč suhih ali polsuhih. Tako povzroča sušni stres skupaj z drugimi podnebnimi spremembami izpad pridelka in zmanjšuje pridelovalne površine (slika 1) (Anwar in Kim, 2020).

Če bomo želeli v prihodnje zadostiti naraščajočemu povpraševanju po hrani in preprečiti učinke abiotskih stresov, je pridelava transgenih rastlin, odpornih proti suši in drugim abiotskim stresom, neizogibna. Tradicionalne tehnike žlahtnjenja za povečanje odpornosti proti okoljskim stresom imajo številne omejitve. Žlahtnjenje rastlin je dolgotrajen postopek, poleg zaželenih genov pa se lahko prenesejo tudi nezaželeni geni. Zaradi kompleksnosti dedovanja na stresni odziv lahko pridobimo manj pridelka, prav tako ni zagotovljeno, da bomo v velikem številu križanj dobili potrebno kombinacijo genov.



Slika 1: Mehanizmi tolerance proti abiotskim stresom v rastlinah (prirejeno po Anwar in Kim, 2020)

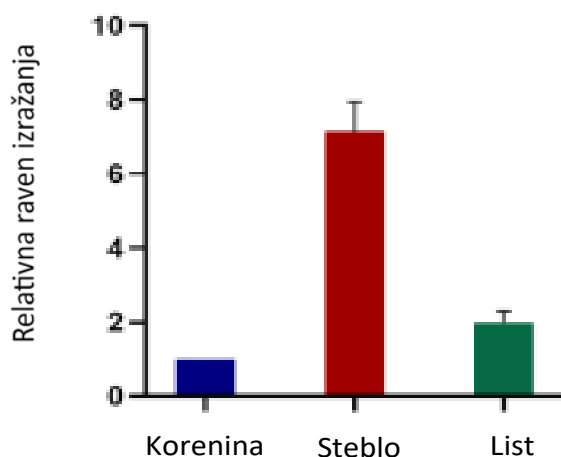
Pristopi rastlinske biotehnologije in genskega inženiringa za toleranco proti abiotskim stresom temeljijo na iskanju in izražanju genov, vključenih v regulativne in signalne poti, ki nadzorujejo gene, odgovorne za proteine, odporne proti stresu, in encime za sintezo funkcionalnih metabolitov. Za identifikacijo kandidatnih genov se uporablja različne molekularne tehnike, kot so selekcija s pomočjo markerjev (MAS), genomski selekcija (GS) in kartiranje lokusov kvantitativnih lastnosti (QTL) (Anwar in Kim, 2020).

2 TRANSFORMACIJA RIŽA Z GENOM *SiMYB56*

Biosinteza lignina ima pomembno vlogo pri odpornosti rastlin proti biotskemu stresu, zlasti proti boleznim in žuželkam. V zadnjih letih pa so študije pokazale, da lahko visoke ravni lignina v rastlinah vodijo tudi do večje odpornosti proti suši. Splošno velja, da biosintezo lignina nadzira večstopenjsko hierarhično regulativno omrežje, ki vključuje transkripcijske faktorje NAC in MYB. Ugotovljeno je bilo, da nekateri transkripcijski faktorji NAC, vključno z *VND1-7* in *NST1-3* geni služijo kot primarna stikala tega omrežja. Proteina MYB46 in MYB83, ki sta nadaljnji tarči proteinov NAC, pa predstavljata sekundarna stikala omrežja. V nadaljevanju so vključeni v regulacijo biosinteze lignina še nekateri drugi MYB geni. Mehanizem biosinteze lignina je relativno dobro poznan pri modelnih rastlinah, kot je *Arabidopsis*, pri glavnih poljščinah iz družine Gramineae, pa je slabo raziskan (Xu in sod., 2020).

Osrednji regulator odpornosti proti abiotičnemu stresu v rastlinah je abscizinska kislina (ABA). Zlasti pomanjkanje vode povzroči kopičenje ABA. Ta sproži hitre biokemične in fiziološke odzive, ki izboljšajo prilagajanje proti stresu. Ugotovljeno je, da MYB transkripcijski faktorji igrajo pomembno vlogo pri signalizaciji ABA ob sušnem stresu, in da prekomerna ekspresija gena *SiMYB56* iz bara (*Setaria italica*) v rižu znatno izboljša odpornost transgenega riža proti suši skozi celotno rastno dobo. Za vnos gena *SiMYB56* v riž je bil uporabljen vektor pMBW014. Gen *SiMYB56* je bil vstavljen v riž s transformacijo z vektorskim sistemom *Agrobacterium*. Analiza mehanizma je pokazala, da je gen *SiMYB56* izboljšal odpornost transgenega riža proti suši z uravnavanjem biosinteze lignina in signalne poti ABA. To je obogatilo tudi študij funkcionalne genomike v baru (*Setaria italica*), kar zagotavlja nove strategije za izboljšanje odpornosti družine Gramineae proti suši (Xu in sod., 2020).

Analiza promotorske regije gena *SiMYB56* je pokazala več cis-delujočih promotorskih elementov, ki so povezani z odpornostjo proti suši, toleranco na sol in odzivom na ABA. Kvantitvna PCR v realnem času je pokazala, da je največje izražanje gena *SiMYB56* v steblo, najmanj pa v koreninah in da ga lahko povzročijo različni stresi (slika 2). Ugotovljeno je bilo, da ima gen *SiMYB56* aktivnost zaviranja transkripcije (Xu in sod., 2020).



Slika 2: Relativno izražanje *SiMYB56* v različnih tkivih bara (prirejeno po Xu in sod., 2020)

V sklopu poskusa so raziskovalci primerjali rast transgenih riževih rastlin in rastlin divjega tipa. Rastline so izpostavili različnim stresom, vključno s sušnim stresom. Za oceno funkcije gena *SiMYB56* je bila izvedena analiza odpornosti proti suši. Uporabili so semena treh transgenih linij riža in divjega tipa riža. Po dveh tednih je bilo prekinjeno namakanje za 15 dni. Po tem je bila izračunana stopnja preživetja. Same rastline niso kazale očitnih razlik v uspešnosti rasti med transgenimi rastlinami in rastlinami divjega tipa, vendar je bila stopnja preživetja v vegetativni fazi pri treh transgenih linijah bistveno višja (50-80 %) kot pri divjem tipu riža (10 %). S pomočjo izpostavitve rastlin 10 % PEG6000 za simulacijo sušnega stresa je bilo ugotovljeno, da gen *SiMYB56* izboljšal odpornost transgenega riža proti sušnem stresu s povečanjem biosinteze lignina in zmanjšanjem poškodb membran. Analiza vsebnosti lignina je pokazala, da je bila v transgenih rastlinah riža vsebnost lignina bistveno višja kot v kontrolah divjega tipa. Transgene rastline riža so bile v generativni fazi rasti uspešnejše v primerjavi s

kontrolnimi rastlinami divjega tipa. Rezultati primerjave so namreč pokazali, da so imele transgene rastline riža večjo skupno maso zrnja kot divji tip v sušnih razmerah. Z merjenjem izražanja več genov, ki so povezani z biosintezo lignina, s kvantitativno PCR v realnem času, je bilo ugotovljeno, da v normalnih razmerah ni pomembnih razlik v ekspresiji med transgenimi rastlinami riža in rastlinami divjega tipa. V sušnih razmerah pa je bilo izražanje genov v transgenih rastlinah od 2 do 8-krat večje kot pri rastlinah divjega tipa. Ugotovljeno je bilo tudi, da prekomerna ekspresija gena *SiMYB56* povzroči kopičenje ABA, kar prispeva k večji odpornosti transgenega riža proti suši (Xu in sod., 2020). Podobno kot gen *SiMYB56* v rižu, izboljša gen *AtMYB2* v rodu *Brassica* odpornost proti sušnim razmeram (Kumar in Srivastava, 2020).

3 TRANSFORMACIJA REPNJAKOVCA (*Arabidopsis thaliana*) Z GENOM *ZmSNAC13*

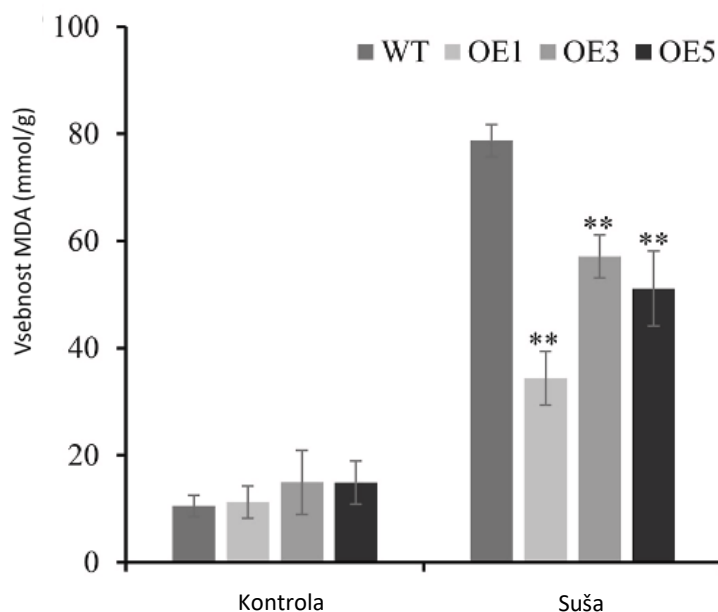
Za odpornost proti suši je zanimiv gen *ZmSNAC13*. Gen *ZmSNAC13* spada v skupino NAC transkripcijskih faktorjev, ki se jih povezuje z odpornostjo proti abiotskemu stresu, vključno z odpornostjo proti suši. Transgen repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*), ki je prekomerno izražal *ZmSNAC13*, je izkazoval boljšo odpornost proti suši kot divji tip. Prekomerno izražanje *ZmSNAC13* je tudi znatno povečalo fotosintezo v repnjakovcu, ki je tesno povezana s pridelki rastlin. Poleg tega je prekomerno izražanje *ZmSNAC13* povzročilo povečanje izražanja genov, ki so povezani z odpornostjo proti suši (Luo in sod., 2022).

Zaporedje *ZmSNAC13* gena je bilo pridobljeno iz samooprašene (inbridirane) linije koruze. PCR pomnožki so bili nato obdelani z restrikcijskima encimoma: NotI in XhoI ter vstavljeni v vektor pGreen s promotorjem CaMV35S. Nato se je genski konstrukt vnesel v *Agrobacterium tumefaciens* sev GV3101, ki vsebuje pSoup pomožni plazmid. S tem se je transformiralo *Arabidopsis*. Za selekcijo transformantov so bila semena inokulirana na ½ MS gojišče z 1 % saharoze in 50 mg/mL higromicina B (Luo in sod., 2022).

Za ugotavljanje učinkov prekomerne ekspresije gena *ZmSNAC13* v transgenem *Arabidopsis* se je primerjalo tri transgene linije in divji tip *Arabidopsis*. Da bi se odkrilo razlike v odpornosti proti suši, se je izvedlo začasno prekinitve zalivanja rastlin. Po začasni prekinitvi zalivanja je večina rastlin divjega tipa ovenela, medtem ko so bile transgene rastline *ZmSNAC13* po videzu normalne z zelenimi listi. Ugotovitve so pokazale, da si je iz stresa po obdobju suše opomoglo 75-81 % transgenih rastlin, kar je bistveno več kot rastlin divjega tipa (okoli 35 %). Primerjava stopnje odprtosti listnih rež je pokazala razlike med transgenimi rastlinami in rastlinami divjega tipa. V sušnih razmerah rastline z zapiranjem listnih rež povečajo svojo sposobnost zadrževanja vode. Opazovanje zapiranja listnih rež z mikroskopi je pokazalo, da so si deleži odprtih, delno odprtih in popolnoma zaprtih listnih rež v normalnih razmerah med transgenimi rastlinami in rastlinami divjega tipa zelo podobni. Nasprotno je bilo, ko so bile rastline v sušnih razmerah. Takrat se je izkazalo, da je delež listnih rež, ki so popolnoma zaprte večji pri transgenih rastlinah (49,33 %) kot rastlinah divjega tipa (45,5 %). Zanimivo je, da je bilo v transgenih rastlinah 37,66 % delno odprtih in 13,3 % odprtih rež, medtem ko je bilo v rastlinah divjega tipa 16,4 % delno odprtih in 38,1 % odprtih rež. To nakazuje, da se listne reže transgenih rastlin postopoma

zapirajo, da bi ohranile vodo. Stopnja izgube vode je bila bistveno počasnejša pri transgenih rastlinah kot pri rastlinah divjega tipa (Luo in sod., 2022).

Sušni stres lahko povzroči tudi kopičenje škodljivih kisikovi reaktivnih spojin (ROS), ki lahko poškodujejo rastlinske celice, DNA in proteine. Pri odstranjevanju ROS sodelujejo antioksidativni encimi, ki ščitijo pred oksidativnimi poškodbami. Analiza aktivnosti antioksidativnih encimov v transgenih rastlinah in rastlinah divjega tipa je pokazala, da je aktivnost encimov v vseh treh transgenih linijah (139,12 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 180,29 $\mu\text{g}/\text{mg}$ in 190,34 $\mu\text{g}/\text{mg}$) večja kot v divjem tipu (115,87 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Po izpostavitvi sušnim razmeram je bila vsebnost MDA v rastlinah divjega tipa 78,72 nmol/g, kar je bistveno več kot v transgenih rastlinah, kjer je vsebnost znašala 47,52 nmol/g (slika 3). To nakazuje, da so transgene rastline manj poškodovane kot divji tip. Merjenje relativne prevodnosti celične membrane pri transgenih rastlinah in divjem tipu je pokazalo, da je celična membrana stabilnejša pri transgenih rastlinah. Relativna prevodnost divjega tipa je znašala 18,83 %, medtem ko je znašala v transgenih rastlinah 13,93 % in 14,05 %. Analiza klorofilne fluorescence ni kazala bistvenih razlik, dokler so bile rastline dovolj zalite. Po sušnem stresu so bile vrednosti pri *ZmSNAC13* transgenih rastlinah boljše od tistih pri divjem tipu, kar kaže, da je *ZmSNAC13* sodeloval pri uravnavanju fotosinteze v suši (Luo in sod., 2022).



Slika 3: Primerjava vsebnosti MDA v kontrolnih in sušnih razmerah (WT=divji tip, OE=transgene linije) (prirejeno po Luo in sod., 2022)

4 TRANSFORMACIJA PŠENICE Z GENOM *GmDREB1*

Pomembna skupina transkripcijskih faktorjev je tudi DREB (ang. drought-response-element binding) skupina. Zanimiv transkripcijski faktor iz te skupine je gen *GmDREB1* iz soje, saj je bilo že dokazano, da prekomerna ekspresija tega gena v pšenici izboljša odpornost na sušo. Nedavno je bilo ugotovljeno, da izboljša odpornost proti suši tudi na polju. To novo spoznanje je zelo pomembno, saj se je nivo podtalnice v zadnjih letih v Veliki kitajski nižini, kjer se

pridela več kot 50 % kitajske pšenice, močno znižal (Zhou in sod., 2020). Gojenje transgene pšenice z odpornostjo na sušo bi lahko pripomoglo preprečiti izpad pridelka in potencialno lakoto.

Za transformacijo pšenice se je *GmDREB1* gen iz soje vstavil v plazmid pAHC25 pod kontrolo Ubi promoterja. Nato se je T-DNA plazmida vnesela v pšenico z biolistično metodo. Za selekcijo transgenih rastlin se je uporabil bar gen za herbicidno odpornost (Zhou in sod., 2020).

Po primerjavi stopnje preživelosti transgenih linij in divjega tipa po 7 dneh suše v rastlinjaku se je potrdilo, da je stopnja preživelosti transgenih linij bistveno višja (45,57 %, 77,53 % in 74,17%) kot pri divjem tipu (15,57 %). Spremljanje izgube vode v listih je pokazalo, da je stopnja izgube vode manjša pri transgenih rastlinah, čeprav je ena izmed treh transgenih linij imela podobno stopnjo kot divji tip. Ugotovljeno je bilo, da je bila odpornost proti suši povezana s stopnjo ekspresije gena *GmDREB1*. Višja ekspresija *GmDREB1* je bila povezana z boljšo odpornostjo proti suši (Zhou in sod., 2020).

Po primerjavi rasti transgenih rastlin in rastlin divjega tipa na polju se je ugotovilo, da so pridelki pri transgenih rastlinah bistveno večji kot pri divjem tipu. Tudi vsebnost MDA je bila v transgenih rastlinah manjša kot pri divjem tipu, kar kaže na manj poškodb transgenih rastlin. Določitev indeksa občutljivosti na stres (ang. Stress susceptibility index – SSI) je pokazala, da so transgene rastline odpornejše na stres, saj je SSI znašal vedno manj pri transgenih rastlinah kot pri divjem tipu. Tudi merjenje učinkovitosti porabe vode (ang. Water-use efficiency – WUE) je bilo v prid transgenim rastlinam. WUE je bila pri transgenih rastlinah kar 20 % večja, kot pri divjem tipu. Analiza fotosinteze je pokazala, da je bila vsebnost klorofila pri rastlinah divjega tipa v sušnih razmerah nekoliko nižja od vsebnosti v transgenih rastlinah. Ugotovljeno je bilo, da imajo transgene rastline, pri katerih se izraža gen *GmDREB1* intenzivnejšo fotosintezo, kar je posledica večje stabilnosti kloroplastov. Z RNA-seq analizo je bilo ugotovljeno, da so bili geni COMT v transgenih rastlinah v sušnih razmerah 2 do 8-krat močnejše izraženi. COMT je vključen v zadnjo stopnjo biosinteze melatonina. Poleg tega sta se povečala tudi TDC in SNAT, ki sta prav tako vključena v biosintezo melatonina. Vsebnost melatonina je bila v sušnih razmerah večja v transgenih rastlinah kot v divjem tipu, kar povezuje melatonin z učinki gena *GmDREB1* in izboljšano odpornostjo proti suši (Zhou in sod., 2020).

5 PREKOMERNO IZRAŽANJE GENA *TaWRKY46* V *Arabidopsis thaliana*

V razvojnih procesih in odzivu na stres pri pšenici igrajo ključno vlogo WRKY transkripcijski faktorji. Predvsem je zanimiv gen *TaWRKY46* iz te družine. Ugotovljeno je bilo namreč, da prekomerna ekspresija *TaWRKY46* v *Arabidopsis thaliana* izboljša odpornost proti sušnim razmeram (Li in sod., 2020).

Transformacija *Arabidopsis thaliana* je bila izvedena tako, da se je nukleotidno zaporedje (sekvenca) *TaWRKY46* gena vključilo (ligiralo) v binarni vektor pBI1304 na restrikcijskih mestih *NcoI* in *SpeI*, pod kontrolo promoterja CaMV35S. Genski konstrukt se je vnesel v *Agrobacterium tumefaciens* sev GV3101 z zamrzovanjem in odtajanjem. Sledil je vnos v

Arabidopsis thaliana. Za selekcijo se je v ½ MS gojišču uporabil higromicin v koncentraciji 25 µg/mL (Li in sod., 2020).

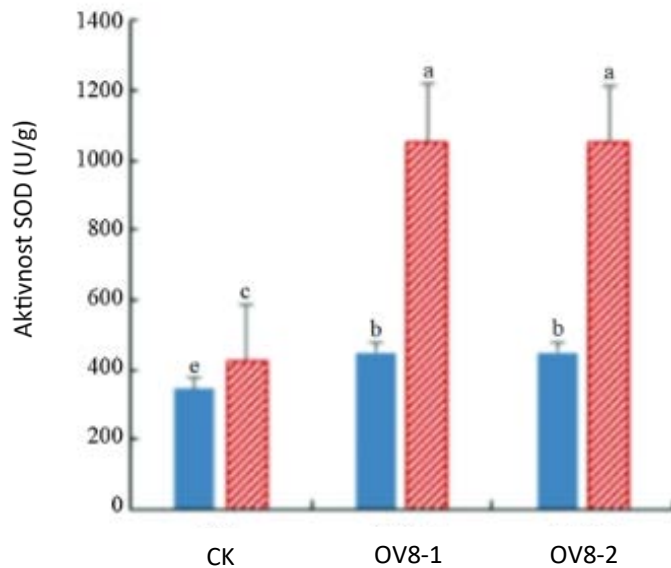
PCR in qRT-PCR analizi sta pokazali prisotnost gena *TaWRKY46* v dveh transgenih linijah *Arabidopsis thaliana*, ne pa v divjem tipu. Za liste transgenih rastlin je veljala nižja stopnja izgube vode kot pri divjem tipu. Po 24 dneh rasti so bile transgene rastline in rastline divjega tipa izpostavljene sušnim razmeram za naslednjih 25 dni. Listi divjega tipa so se zvili in obarvali rumeno, medtem ko so listi transgenih rastlin ostali zeleni. Očitna razlika je bila tudi v stopnji preživelosti. Stopnja preživelosti transgenih linij je znašala 61,13 % in 63,33 %, medtem ko je znašala pri divjem tipu le 17,34 %. Analiza stopnje kalitve na ½ MS gojišču z manitolom je pokazala, da so transgene rastline uspešnejše pri kalitvi, kar nakazuje na boljšo odpornost proti osmotskemu stresu med kalitvijo semen. Merjenje dolžine korenin je prav tako pokazalo, da so transgene rastline odpornejše od divjega tipa proti osmotskemu stresu (Li in sod., 2020).

6 PREKOMERNO IZRAŽANJE GENA *sHSP26* V SOJI

V sušnih razmerah se lahko rastline odzovejo z ekspresijo sHSP. To je specifičen tip gena v HSP (ang. heat-shock protein) družini. sHSP se lahko spoprijemajo z različnimi okoljskimi obremenitvami, vključno s sušo. Primer tega je gen *sHSP26* iz soje (Liu in sod., 2022).

Gen *sHSP26* je bil najprej namnožen s PCR s pomočjo rekombinantnega vektorja za kloniranje. PCR pomnožki in ekspresijski vektor - plazmid pCAMBIA3301 so bili encimsko razgrajeni z Bgl II in BstE II. Razgrajeni produkti so bili obnovljeni s kompletom za obnovo DNA produktov v gelu, nato pa oba produkta razgradnje povezana z ligazo T4. Pripravil se je tudi CRISPR vektor pCBSG015-sHSP26 s pomočjo kompleta za pripravo CRISPR/Cas vektorja. Oba vektorja sta bila transformirana v *Agrobacterium tumefaciens* sev kompetentnih celic EHA105. S pomočjo transformacije z *Agrobacterium* so bile dobljene rastline soje s prekomerno ekspresijo transgena *sHSP26* (Liu in sod., 2022).

Ugotovljeno je bilo, da je aktivnost SOD (superoksid-dismutaza, odgovorna za razpad superoksidnega aniona na vodikov peroksid) bistveno večja v transgeni soji (slika 4). Višja aktivnost SOD pomeni boljšo odpornost rastline proti suši. Ugotovljeno je bilo tudi, da se po izpostavitvi manitolu v rastlinah s prekomerno ekspresijo bistveno poveča aktivnost POD (peroksidaza, odgovorna za preprečevanje prekomerne akumulacije vodikovega peroksida), medtem ko je povečanje aktivnosti POD v kontrolnih rastlinah in CRISPR rastlinah manjše. Za rastline s prekomerno ekspresijo je bila prav tako ugotovljena najmanjša vsebnost MDA, kar pomeni, da so bile te rastline manj poškodovane kot kontrolne in CRISPR rastline (Liu in sod., 2022). Iz tega primera je razvidna prednost transgenih rastlin soje pred uporabo CRISPR/Cas tehnologije za izboljšanje lastnosti na področju odpornosti proti suši.



Slika 4: Aktivnost SOD v kontrolnih (CK) in transgenih (OV8-1, OV8-2) linijah po času izpostavitve 0h (modro) in 6h (rdeče) (prirejeno po Liu in sod., 2022)

7 ZAKLJUČEK

Žlahtnjenje genetsko spremenjenih rastlin predstavlja učinkovito rešitev za doseg odpornosti proti abiotičnim stresom in je bistveno hitrejši postopek od tradicionalnih pristopov žlahtnjenja. To bo v prihodnosti ključno za večjo pridelavo hrane in preprečevanje lakote. Postopek žlahtnjenja se usmerja predvsem v dva pristopa, to sta žlahtnjenje z vnosom željenih genov in žlahtnjenje s prekomernim izražanjem tarčnega gena. Rezultati študij so pokazali, da vnos željenih genov in prekomerno izražanje določenih genov bistveno izboljša preživelost rastlin ob izpostavitvi sušnim razmeram. Izvajanje tovrstnih študij je pomembno, da odkrijemo čim več načinov za izboljšanje lastnosti, ki so pomembne za odpornost proti abiotičnim stresom. Veliko oviro za aplikativno uporabo teh rastlin še predstavlja prepričanje družbe, da so genetsko spremenjene rastline nekaj negativnega in niso varne kot vir hrane, zato je pomembno družbi predstaviti znanstveno ozadje in jim tematiko približati.

8 VIRI

- Anwar A., Kim J.-K. 2020. Transgenic Breeding Approaches for Improving Abiotic Stress Tolerance: Recent Progress and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 8, doi: 10.3390/ijms21082695
- Kumar P., Srivastava D. K. 2020. Molecular and Biotechnological Interventions for Improving Brassicaceae Crops for Abiotic Stress Tolerance. V: *The Plant Family Brassicaceae*, 1. Hasanuzzaman M. (ur.). Singapur, Springer Singapore: 437-450
- Li X., Tang Y., Zhou C., Zhang L., Lv J. 2020. A Wheat WRKY Transcription Factor TaWRKY46 Enhances Tolerance to Osmotic Stress in transgenic Arabidopsis Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 4, doi: 10.3390/ijms21041321
- Liu S., Liu J., Zhang Y., Jiang Y., Hu S., Shi A., Cong Q., Guan S., Qu J., Dan Y. 2022. Cloning of the Soybean sHSP26 Gene and Analysis of Its Drought Resistance. *Phyton – International Journal of Experimental Botany*, 91, 7, doi: 10.32604/phyton.2022.018836: 1465-1482

- Luo P., Chen Y., Rong K., Lu Y., Wang N., Xu Z., Pang B., Zhou D., Weng J., Li M., Zhang D., Yong H., Han J., Zhou Z., Gao W., Hao Z., Li X. 2022. ZmSNAC13, a maize NAC transcription factor conferring enhanced resistance to multiple abiotic stresses in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 170, doi: 10.1016/j.plaphy.2021.11.032: 160-170
- Xu W., Tang W., Wang C., Ge L., Sun J., Qi X., He Z., Zhou Y., Chen J., Xu Z., Ma Y.-Z., Chen M. 2020. SiMYB56 Confers Drought Stress Tolerance in Transgenic Rice by Regulating Lignin Biosynthesis and ABA Signaling Pathway. *Frontiers in Plant Science*, 11, doi: 10.3389/fpls.2020.00785
- Zhou Y., Chen M., Guo J., Wang Y., Min D., Jiang Q., Ji H., Huang C., Wei W., Xu H., Chen X., Li L., Xu Z., Cheng X., Wang C., Wang C., Ma Y. 2020. Overexpression of soybean DREB1 enhances drought stress tolerance of transgenic wheat in the field. *Journal of Experimental Botany*, 71, 6, doi: 10.1093/jxb/erz569: 1842-1857

VIRUSOM PODOBNI DELCI RASTLINSKEGA IZVORA KOT CEPIVA PROTI SARS-CoV-2 IN DRUGIM NALEZLJIVIM BOLEZNI

Tinkara Tanja Valcl

IZVLEČEK

Rastlinsko izražanje virusom podobnih delcev (VLP - ang. virus-like particle) ponuja varen, poceni in potencialno neomejen način za hitro in prilagodljivo proizvodnjo cepiv, ki so potrebna za nadzor morebitnih pandemij. VLP so podobni virusov, vendar ti ne vsebujejo nalezljivega genomskega zapisa. Kljub temu pa lahko še vedno povzročijo zelo močan imunski odziv, zaradi česar so idealni kandidati za cepiva. V prispevku so zbrani podatki o pomenu rastlin kot ekspresijskih sistemov za hitro in poceni proizvodnjo cepiv na osnovi VLP.

Ključne besede: VLP, cepiva, SARS-CoV-2, cVLP, antigen, rastlinski ekspresijski sistemi

Plant-derived virus-like particles as vaccines against SARS-CoV-2 and other infectious diseases

ABSTRACT

Plant expression of virus-like particles (VLPs) offers a safe, inexpensive and potentially unlimited way to rapidly and flexibly produce the vaccines needed to control potential pandemics. VLPs are similar to viruses, but they lack the viral genome. However, they can still induce a very strong immune response, making them ideal candidates for vaccines. This paper summarises the importance of plants as expression systems for the rapid and inexpensive production of VLP-based vaccines.

Key words: VLP, vaccines, SARS-CoV-2, cVLP, antigen, plant expression systems

1 UVOD

V današnjih časih se srečujemo s številnimi virusnimi ali bakterijskimi nalezljivimi boleznimi, kot so virus človeške imunske pomankljivosti (HIV), koronavirus SARS-CoV-2, malarija, tuberkuloza ter še številne druge. Cepljenje je eden najpomembnejših ukrepov na področju javnega zdravja v 20. stoletju, saj po ocenah prepreči kar šest milijonov smrti letno. Prizadevanja proizvajalcev cepiv so privedla do dolgega seznama licenciranih preventivnih cepiv, vendar je njihova učinkovitost v nekaterih primerih zmerna ali celo slaba ter ne zagotavlja dolgotrajne zaščite in izkoreninjenja tarčnih bolezni. Zaradi tega zanimanje za alternativne rešitve v proizvodnji novih cepiv in izboljšanje obstoječih cepiv nenehno narašča (Balke in Zeltins, 2020).

V zadnjih desetletjih je razvoj rastlinske virologije in tehnik genskega inženiringa močno vplival na način izdelave cepiv in omogočil izdelavo cepiv na osnovi rastlinskih virusov za zaščito pred različnimi povzročitelji nalezljivih bolezni (Balke in Zeltins, 2019). Razvoj genskega inženiringa je omogočil kloniranje virusnih strukturnih genov in njihovo izražanje v heterolognih gostiteljskih celicah, kar je vodilo v razvoj tehnologij virusom podobnih delcev

(VLP). Ta strategija se je pokazala, kot uporabna za pridobivanje rastlinskih VLP za boj proti nalezljivim boleznim tudi na industrijski ravni (Monreal-Escalante in sod., 2022). V zadnjih letih so rastline postale privlačno orodje za proizvodnjo številnih farmacevtskih sestavin, saj so številni raziskovalci odkrili prednosti rastlin kot bioreaktorjev pred obstoječimi sistemi (Marsian in Lomonosoff, 2016).

Pojav koronavirusa SARS-CoV-2 je zahteval drugačne strategije za proizvodnjo cepiva, ena od rešitev bi lahko bila prav cepiva rastlinskega izvora, ki bi jih lahko uporabili za hitro izražanje in sestavljanje cepiv VLP proti virusom, pri katerih so pogoste mutacije njihovih površinskih antigenov (Hemmati in sod., 2022).

2 VIRUSOM PODOBNI DELCI

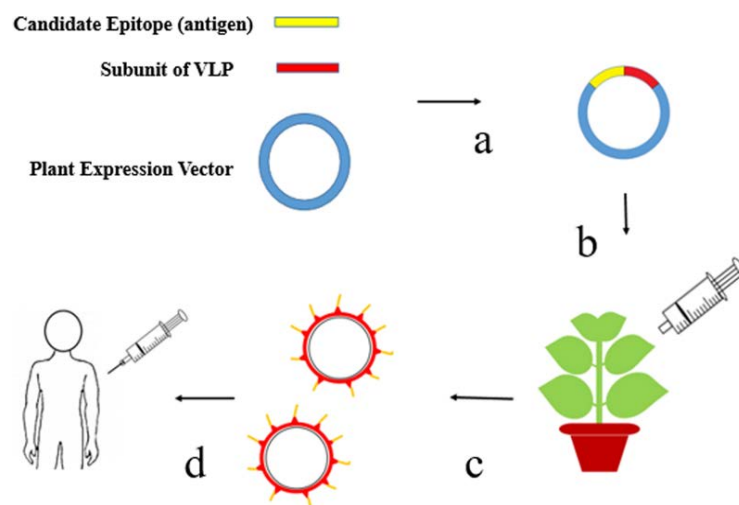
Virusom podobni delci (VLP) so sestavljeni iz virusnih antigenov, ki se sami sestavijo v strukturo izvirnih virusov, vendar ne vsebujejo virusnega genoma. VLP ohranjajo izvorno antigensko konformacijo imunogenih proteinov in ponovljajočo strukturo izvirnega virusnega delca (Chen in Lai, 2013). Predstavljajo varnejšo alternativo sedanji generaciji živih, oslabljenih ali inaktiviranih cepiv, saj ne vsebujejo virusne nukleinske kisline in so zato neinfektivni. Kljub temu pa vodijo v sproženje močnih humoralnih in celičnih imunskih odzivov. Poleg tega so antigeni, ki so predstavljeni v svoji naravni konformaciji na površini VLP, bolj stabilni kot v obliki podenot, zaradi česar so potrebni manjši in manj pogosti odmerki antigena, da se sproži zaščitni imunski odziv (Hemmati in sod., 2022).

Lahko se sintetizirajo rekombinantno v ekspresijskih sistemih, ki ne potrebujejo virusne replikacije. VLP so bili uspešno sintetizirani v celičnih kulturah bakterij, kvasovk, žuželk in sesalcev, pri čemer ima vsaka sintetska platforma svoje prednosti in omejitve (Hemmati in sod., 2022). Rastline ponujajo številne prednosti, kot platforma pri proizvodnji VLP cepiv namenjenih za nadzor izbruhov morebitnih panedemij. Zaradi imunogenih epitopov na površini in velikosti VLP vzajemno delujejo z dendritičnimi celicami. Te prevzamejo VLP, jih obdelajo ter pridobijo na tisoče epitopov, ki jih en VLP vsebuje na molekulah MHC (major histocompatibility complex - poglobitni histokompatibilnostni kompleks) razreda I/II, kar povzroči močan imunski odziv, posredovan s T celičnimi receptorji. Visoka gostota epitopov v ponavljajočih se nizih na površini VLP lahko povzroči tudi visoke titre in trajne imunске odzive celic B brez uporabe adjuvansov (Hemmati in sod., 2022).

3 RASTLINE, KOT PRODUKCIJSKI SISTEMI ZA SINTEZO VLP

Rastlinski sistem je učinkovit za pridobivanje različnih vrst cepiv, kot so proteinske podenote, VLP, himerični VLP (cVLP) in multiepitopna cepiva, z možnostjo prehodne in stabilne ekspresije (Monreal-Escalante in sod., 2022). V zadnjih 20 letih so rastline postale resna konkurenca drugim proizvodnim sistemom za farmacevtske izdelke, kot so bakterije, kvasovke ali celice sesalcev. So velike, poceni se jih da gojiti in prinašajo majhno tveganje kontaminacije z endotoksini ali patogenimi organizmi sesalcev, kar je lahko težava pri celičnih kulturah sesalcev. Za svojo rast in razvoj potrebujejo le preprosta anorganska hranila, vodo, ogljikov dioksid in sončno svetlobo. Za razliko od prokariotskih ekspresijskih sistemov lahko rastline

opravljajo posttranslacijske spremembe, kot je glikozilacija (Marsian in Lomonosoff, 2016). Predstavljajo privlačen alternativni sistem za proizvodnjo cepiv VLP, saj so sposobne sinteze velikih količin rekombinantnih proteinov po nizkih stroških ter imajo predelovalne mehanizme za pravilno sestavljanje proteinov. Rastlinsko pridobivanje biomase in zmogljivost predelave v začetni fazi proizvodne verige je enostavno povečati ali upravljati na ekonomsko učinkovit način, kar predstavlja prednost v primerjavi s tehnologijo, ki temelji na fermentaciji. Od uvedbe rastlinskih ekspresijskih sistemov je bilo razvitih veliko VLP kot kandidatov za sintezo aktivnih komponent v rastlinah za proizvodnjo cepiv. Virusi hepatitisa B (HBV), humani papiloma virus (HPV), virus gripe, SARS-CoV-2, virus Norwalk, virus človeške imunske pomanjkljivosti, virus slinavke in parkljevke, rotavirusi, virus bolezn modrikastega jezika in virus hepatitisa C (slika 1) (Hemmati in sod., 2022).



Slika 1: Ekspresija rekombinantnih proteinov v rastlinah: a) Izdelava rekombinantnega vektorja, b) Agroinfiltracija v rastline, c) 3-7 dni po infiltraciji se rekombinantni proteini izrazijo v listih, podenote VLP pa se sestavijo v VLP z epitopom na površini in d) VLP-ji se očistijo in uporabijo kot cepivo za sprožitev imunskega odziva (Hemmati in sod., 2022)

Vrsta tobaka *Nicotiana benthamiana* je že dolgo priljubljen gostitelj sinteze rekombinantnih proteinov in VLP, saj je dobro raziskana, agroinfiltracija pa je enostavna in ne povzroča velikih poškodb tkiva. Poleg tega omogoča razmnoževanje številnih rastlinskih virusov, zaradi česar je vsestranski gostitelj za virusne ekspresijske vektorje. Vendar pridobivanje cepiv z rastlinami ni omejena samo na *N. benthamiana*. Za pridobivanje VLP je bilo uporabljenih več vrst rastlin in rastlinskih tkiv, vključno z *Arabidopsis thaliana* (preglednica 1) (Marsian in Lomonosoff, 2016).

Razvitih je bilo več kot 25 farmacevtskih izdelkov z rastlinsko ekspresijo, ki so bili ocenjeni v kliničnih preskušanjih. Zato ni presenetljivo, da so komercialna podjetja uspešno razvila številna farmacevtska cepiva in terapije, izražene z rastlinami (Hemmati in sod., 2022).

Preglednica 1: Rastlinsko proizvedena cepiva na osnovi VLP, ki so dosegla stopnjo kliničnega preskušanja pri ljudeh (prijejeno po Chen in Lai, 2013)

Izdelek	Ciljna bolezen	Rastlinski gostitelj	Stopnja kliničnega razvoja
Influenca A H5N1 HA z ovojnico VLP	Pandemična gripa	<i>N. benthamiana</i>	Faza I/II
Influenca A H1N1 HA z ovojnico VLP	Sezonska gripa	<i>N. benthamiana</i>	Faza I
VLP-ji brez ovojnice NVCP	Virus Norwalk	krompir in tobak	Faza I
VLP z ovojnico HBsAg	Hepatitis B	tobak	Faza I
VLP z ovojnico HBsAg	Hepatitis B	solata	Faza I

3.1 PREHODNI EKSPRESIJSKI SISTEMI ZA SINTEZO VLP V RASTLINAH

Prvi poskusi sinteze VLP v rastlinah so imeli več pomanjkljivosti, vključno z nizkimi količinami in zelo počasnim proizvodnim postopkom, ki je vključeval žlahtnjenje stabilnih transgenih rastlin. Nedavni razvoj sistemov za prehodno izražanje na osnovi rastlinskih virusov, je močno povečal hitrost in izkoristek proizvodnje VLP (Hemmati in sod., 2022).

Sistem prehodnega izražanja lahko proizvede ciljni antigen v enem tednu po vnosu zaporedja, ki kodira antigen, v primerjavi z enim ali več leti pri stabilnem transgenem sistemu izražanja. Ta edinstvena lastnost sistema za prehodno izražanje za hitro pridobivanje cepiva je običajno prva in odlična izbira za proizvodnjo cepiva, zlasti v izrednih razmerah, kot so pandemije (Monreal-Escalante in sod., 2022). Pri prehodnem izražanju se za prenašanje tujih zaporedij v rastline uporablja bakterija *Agrobacterium tumefaciens*, ki v naravi povzroča tumorske tvorbe na koreninskem vratu. Že od sedemdesetih let prejšnjega stoletja je znano, da lahko ta gramnegativna bakterija prenese del svojega Ti plazmida v rastlinsko celico, kjer se nato vključi v genom gostitelja. Tarčni gen se vstavi v območje T-DNA binarnega plazmida, ki se po transformaciji izrazi v rastlinski celici. Ta omogoča ekspresijo in sintezo v nekaj dneh. Vendar je izražanje omejeno na infiltrirano tkivo (Marsian in Lomonosoff, 2016). D'Aoust in sod. (2010) so razvili sistem prehodnega izražanja za sintezo rastlinskih VLP gripe, ki se uporablja za obsežno proizvodnjo (D'Aoust in sod., 2010).

Številne študije poročajo, da je kloniranje in prehodna ekspresija VLP rastlinskega izvora na visoki ravni, enostavna za izvedbo in jo je mogoče hitro doseči v 1-2 tednih infiltracije vektorja z replikonom RNA virusa tobačnega mozaika ali geminivirusnim sistemom replikona DNA. Pomembno je, da te nove izboljšave v skrajšanju časa in povečani sintezi VLP zagotavljajo rastlinskemu sistemu kritično lastnost visoke vsestranskosti za proizvodnjo cepiv VLP proti virusom, ki hitro mutirajo svoje površinske antigene, kar zagotavlja izrazito prednost pred drugimi proizvodnimi sistemi pri pridobivanju cepiv za nadzor morebitnih pandemij.

Vprašanje rastlinsko specifičnih glikanov je bilo uspešno rešeno z razvojem transgenih rastlinskih linij s "humaniziranimi" potmi. Prav tako je bila v rastlinah dokazana uspešna proizvodnja in sestava VLP z do tremi različnimi vrstami proteinov (Hemmati in sod., 2022).

3.2 VIRUSNI VEKTORJI ZA SINTEZO VLP

Za prehodno izražanje VLP so bili uporabljeni številni rastlinski virusi. Razpon teh vektorjev sega od vektorjev, ki temeljijo na celotnem virusnem genomu, ki mu je bil dodan tuj gen, do dekonstruiranih vektorjev, v katerih so bile odstranjene nebistvene funkcije virusa. Popolni virusni vektorji se obnašajo kot divji tip virusa, gibljejo se v gostitelju in proizvajajo nalezljive virusne delce, prav tako pa izražajo tudi heterologne proteine. Njihova sposobnost razmnoževanja in premikanja iz celice v celico povzroča izredno visoke ravni izražanja proteinov. Vendar lahko med replikacijo pride do mutacije ali izbrisa genskega vložka, zato je težko izraziti več genov v isti celici. Dva popolna virusna vektorja, ki temeljita na krompirjevem virusu X (PVX) in virusu mozaika kitajskega fižola (CPMV), sta bila uporabljena za rastlinsko izražanje jedru podobnih delcev hepatitisa B. Izdelava dekonstruiranih virusnih vektorjev vključuje odstranitev virusnih genov, ki niso bistveni za sintezo ciljnega proteina, na primer virusnega plaščnega proteina. Ti so lahko replikacijsko kompetentni ali pomanjkljivi. Namenjeni so za hitro in visoko stopnjo sinteze rekombinantnih proteinov v rastlinah brez težav z biološkim omejevanjem. Za sintezo VLP v rastlinah pa sta večinoma uporabljena sistema pEAQ in magnICON (Marsian in Lomonosoff, 2016).

3.3 HIMERNI VLP RASTLINSKEGA IZVORA S ŠIROKIM DELOVANJEM

Novejši model VLP je osredotočen na razvoj himernih VLP, katerih prednost je, da so večvalentni, kar pomeni, da so sestavljeni iz antigenov različnih patogenov. Ena od prednosti pristopa s himernimi VLP je prav večvalentnost in dejstvo, da lahko nekateri epitopi ali antigeni služijo kot adjuvansi za druge (Monreal-Escalante in sod., 2022). VLP lahko, zaradi lastnosti delcev in visoke gostote kapsidnih proteinov na njihovi površini delujejo tudi kot predstavitveni sistem za prikaz heterolognih epitopov imunskemu sistemu (Hemmati in sod., 2022). Tuji epitopi so povezani s kapsidnimi proteini na površini VLP in so prisotni v ponavljajočih se nizih visoke gostote. Pridobi se jih s pomočjo genske fuzije ali s kemično konjugacijo. Čeprav se z gensko fuzijo ustvari stabilnejša vez med VLP in antigenom, ni mogoče z gotovostjo napovedati, ali se bodo himerni VLP pravilno sestavili, saj je sestava odvisna od dejavnikov, kot sta dolžina peptidnega vložka in naboj. Da bi premagali omejitve velikosti in naboja vstavka se pri pravilnem sestavljanju himernih VLP, izvede kemična konjugacija ciljnega antigena z nativnim VLP. Antigeni se na VLP povežejo bodisi s kovalentnimi vezmi ali z nekovalentnimi vezmi (Chen in Lai, 2013).

Ti himerni VLP (cVLP) ščitijo dotični antigen ter zaradi svoje trdne narave in predstavitve epitopov z visoko gostoto povečajo sprejem in stimulacijo imunskih celic (Chen in Lai, 2013). Vrsta nosilnega VLP ter gostota in dostopnost tujega antigena na/znotraj VLP pomembno določajo smer in intenzivnost imunskega odziva, pri čemer se spodbuja humoralni ali celični imunski odziv ali oboje. Poleg tega lahko že obstoječa imunost proti epitopom nosilnega VLP pomembno vpliva na odziv proti heterogenskemu antigenu. Več takšnih rekombinantnih himernih VLP, je bilo vključenih v klinična preizkušanja, vključno z VLP HBcAg, ki povezuje epitop M2 gripe A in s transpozonom Ty kvasa, ki povezuje antigene HIV p17/p24 in VLP HBcAg z epitopi malarije (Chen in Lai, 2013).

4 VLP RASTLINSKEGA IZVORA, KOT PLATFORMA ZA IZDELAVO CEPIVA PROTI SARS-COV-2

Po pojavu in hitremu razširjanju SARS-CoV-2 konec leta 2019 ga je Svetovna zdravstvena organizacija marca 2020 razglasila za pandemijo, ki je zahtevala več kot 2,8 milijona življenj. Na svetovni ravni so potekala obsežna prizadevanja za razvoj cepiva proti SARS-CoV-2, hitra in poceni proizvodnja velikih količin cepiva pa je bila nujno potrebna za zagotovitev ustrežne oskrbe (Hemmati in sod., 2022).

SARS-CoV-2 je enovijačni linearni RNA virus z velikostjo genoma od 26 do 32 kb iz družine koronavirusov. Genom kodira glikoprotein S, ki je podoben bodici in predstavlja pomembno tarčo za razvoj cepiv, saj lahko povzroči močne imunske odzive in je glavna tarča nevtralizirajočih protiteles (Moon in sod., 2022). Glikoprotein spike (koničasti glikoprotein) (S) tvori homotrimerje, ki so predstavljeni na površini viriona, zaradi česar je značilen videz koronavirusne krone. Ta protein S je nepogrešljiv za interakcije med virusom in celičnimi receptorji med vstopom virusa in je glavni antigen, ki lahko izzove zaščitne imunske odzive. Strukturni protein E je majhen (8-12 kDa) integralni membranski protein, ki ga v virionu najdemo v omejenih količinah, vendar ima verjetno pomembno vlogo pri sestavljanju virusa. Najštevilčnejši strukturni protein M pa sodeluje z vsemi drugimi strukturnimi proteini (S, E in N) (Monreal-Escalante in sod., 2022). Prejšnje izkušnje z oblikovanjem VLP za antigene MERS in SARS-CoV-1, heterologno izražene v rekombinantnih sistemih, zagotavljajo najboljšo platformo za razvoj cepiva proti SARS-CoV-2 (Kumar in sod., 2021).

Biofarmacevtsko podjetje Medicago Inc. s sedežem v Kanadi se ukvarja s prehodno ekspresijo proteina S virusa SARS-CoV-2 z uporabo virusom podobnih delcev (VLP), sintetiziranih v rastlini *Nicotiana benthamiana*, za razvoj potencialnega cepiva proti koronavirusni bolezni. Tehnologija vključuje uporabo listov vrste tobaka *Nicotiana benthamiana* kot bioreaktorjev za sintezo proteina S, ki predstavlja VLP kot kandidat za cepivo COVID-19 VPL (CoVLP). Rekombinantni CoVLP podjetja Medicago posnema strukturo virusa SARS-CoV-2 in omogoča prepoznavanje s strani imunskega sistema (Parvathy, 2020). Medicagovo cepivo COVID-19 rastlinskega izvora je skupaj s pandemskim adjuvansom podjetja GlaxoSmithKline (GSK) vstopilo v tretjo fazo kliničnih preizkušanj. Dva odmerka po 3,75 mikrograma cepiva CoVLP se dajeta v razmaku 21 dni. Podatki so pokazali, da je kombinacija kandidatnega cepiva in pandemskega adjuvansa družbe GSK po dveh odmerkih povzročila pomemben humoralni imunski odziv. Podobne odzive protiteles so opazili pri mlajših osebah in odraslih srednjih let ter pri starejših odraslih (Kumar in sod., 2021).

Podobno je tudi podjetje iBio (Bryan, TX, ZDA) razvilo IBIO-200, cepivo VLP proti SARS-CoV-2. Kot bioreaktor so tudi oni uporabili rastlino tobaka. Delali so na podlagi svojega lastniškega sistema Fast Pharming v kombinaciji z avtomatizirano hidroponično rastlinsko kulturo, vertikalnim kmetovanjem in tehnologijami glikanskega inženiringa. To cepivo je trenutno še v fazi predkliničnih preizkušanj (Shohag in sod., 2021).

Poleg VLP, ki so podobni virusu SARS-CoV-2, je drugi možni pristop sprejetje epitopov SARS-CoV-2 in njihovo izražanje v himernih VLP. Na ta način lahko VLP iz nepovezanega virusa služi kot ogrodje za predstavitev ciljnih epitopov SARS-CoV-2. V ta namen je bil kot ogrodje za prikaz nepovezanih antigenov nekaterih patogenov uporabljen jedrni protein hepatitisa B (Rosales-Mendoza in sod., 2020).

5 AGROINFILTRACIJA IN IZRAŽANJE PROTEINOV

Suspenzije bakterije *Agrobacterium tumefaciens* s vključenimi plazmidi pEAQ-HT-E, pEAQ-HT-M ali pEAQ-HT-S, ki so bili zasnovani za izražanje nativnih različic proteinov SARS-CoV-2 E, M oziroma S, so bile infiltrirane v liste *N. benthamiana* posamično ali v kombinaciji. Pri listih, infiltriranih samo s pEAQ-HT-M (M), se je v štirih dneh po infiltraciji pojavila nekroza, medtem ko so listi, infiltrirani s pEAQ-HT-E (E), pEAQ-HT-S (S) ali kombinacijo vseh treh plazmidov (EMS), pokazali le blago klorozo, podobno kot pri listih, infiltriranih s praznim vektorjem (EV) 6 dni po infiltraciji. Kar nakazuje na to, da sočasno izražanje E in S z M ublaži nekrozo, povezano z infiltracijo samo z M (Monreal-Escalante in sod., 2022). Da bi dokazali, da je v infiltriranih listih prišlo do izražanja proteina S, so iz listov, infiltriranih samo s pEAQ-HT-S (S) ali s kombinacijo vseh treh plazmidov (EMS), pripravili skupne proteinske ekstrakte in jih analizirali z elektroforezo v natrijevem dodecil sulfatu in na poliakrilamidnem gelu (SDS-PAGE) v reduciranih in nereduciranih pogojih. Temu je sledila Western blot analiza z uporabo poliklonskega protitelesa proti proteinu S, katera je pokazala prisotnost značilne črte več kot 100 kDa, kar ustreza prisotnosti polne dolžine proteina S. Intenzivnost signalov je bila dosledno večja v primeru infiltracije samo s proteinom S, kar kaže na to, da prisotnost proteinov E in M zmanjša stopnjo kopičenja proteinov. Da bi ocenili, ali je izražen protein S vključen v strukture višjega reda, kot so VLP, so izvlečke listov, infiltriranih z S ali EMS analizirali z ultracentrifugiranjem skozi dvojno saharozno blazino. Na splošno so rezultati pokazali, da je v strukturah višjega reda, kot so VLP, prisoten protein S polne dolžine, ne pa njegovi cepilni produkti (Monreal-Escalante in sod., 2022).

6 EKSTRAKCIJA IN KARAKTERIZACIJA RASTLINSKIH VLP SARS-COV-2

Za nadaljnje čiščenje potencialnih rastlinskih VLP-jev SARS-CoV-2 je bila frakcija pripravkov S in EMS iz dvojnih saharoznih blazin razsoljena in centrifugirana prek stopenjskih gradientov 12-30 % (m/v) jodiksana. Frakcije pa so bile analizirane z metodo Western blot z uporabo protitelesa anti-SARS-CoV-2 S protein. Frakcija (vmesnik med 18 % in 24 % (m/v) jodiksana), ki je pokazala najvišjo raven proteina S polne dolžine je bila uporabljena za nadaljnjo analizo. Izvedena je bila posredna ELISA analiza, pri kateri je bil za izdelavo standardne krivulje uporabljen komercialen trimeren protein S iz celic jajčnikov kitajskega hrčka. Ta je pokazala, da je bila koncentracija prečiščenega proteina S iz listov, infiltriranih samo z S ali EMS, $170,0 \pm 11,3$ oziroma $59,4 \pm 6,8$ ng/ μ l. Te vrednosti pomenijo povprečni skupni izkoristek približno 23 mg proteina S polne dolžine na kilogram sveže mase infiltriranih listov po infiltraciji z S in 8 mg/kg po infiltraciji z EMS. Približno trikratna razlika v izkoristku med vzorci S in EMS je skladna s predhodno analizo Western blot. To je bilo dodatno potrjeno

s primerjavo količine proteina S polne dolžine v vsakem vzorcu z znanimi količinami komercialno dostopnega proteina S na obarvanem gelu (Jung in sod., 2022) .

Da bi potrdili nastanek VLP-jev, so vzorce frakcije iz listov, infiltriranih samo s proteinom S ali EMS pregledali s transmisijsko elektronsko mikroskopijo (TEM) z uporabo negativnega barvanja. V jodksanolsko prečiščenih vzorcih z EMS in S so bile opažene bodičaste (koničaste) strukture, značilne za VLP koronavirusov, velike od 75 do 100 nm. Prisotnost takšnih struktur višjega reda, ki spominjajo na VLP koronavirusov, kaže, da lahko prehodno izražen protein S polne dolžine interagira z membranami gostitelja in tvori virusom podobne delce (VLP) (Jung in sod., 2022).

7 PREIZKUS ANTIGENOSTI PROTEINOV S IN VLP SARS-COV-2

Da bi preverili, ali lahko VLP S in EMS prepoznajo človeška protitelesa, se je z metodo ELISA testiralo človeški serum 24 ozdravljenih bolnikov s COVID-19. Kot negativno kontrolo so vzporedno analizirali 24 vzorcev seruma posameznikov, zbranih pred pandemijo. Za kontrolno titracijo sta bila uporabljena dva negativna in dva anti-SARS-CoV-2 IgG-pozitivna človeška seruma, kot je bilo predhodno določeno s komercialnimi kemiluminiscenčnimi imunoanalizami (CLIA). Test ELISA je pokazal, da lahko protitelesa, proizvedena iz ozdravljenih bolnikov s COVID-19, vežejo VLP S in EMS rastlinskega izvora, kar kaže, da je material rastlinskega izvora imunološko pomemben. Serum ozdravljenega bolnika, pozitiven na anti-SARS-CoV-2 IgG, je uspešno prepoznal tudi rekombinantni protein S z Western blot analizo (Monreal-Escalante in sod., 2022).

8 ZAKLJUČEK

Virusom podobni delci rastlinskega izvora predstavljajo obetavno tehniko za razvoj cepiv proti SARS-CoV-2 ter drugim nalezljivim boleznim. Ta pristop lahko zagotovi hitro in poceni proizvodnjo cepiv, ki so varna in učinkovita. Imajo številne prednosti, kot so prilagodljive tehnike izdelave cepiva, preprosti postopki za proizvodnjo in čiščenje virusov in VLP ter stabilnost. V tem trenutku še ni na voljo komercialno dostopnih cepiv na osnovi rastlinskih virusov. Vendar je bilo razvitih več rastlinskih sistemov za pridobivanje cepiv, ki omogočajo izdelavo novih cepiv v velikih količinah in razmeroma kratkem času, kar je ključnega pomena pri nadzoru pandemij (Hemmati in sod., 2022; Monreal-Escalante in sod., 2022).

9 VIRI

Balke I., Zeltins A. 2019. Use of plant viruses and virus-like particles for the creation of novel vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 145, 119–129, doi: 10.1016/j.addr.2018.08.007:

Balke I., Zeltins A. 2020. Recent Advances in the Use of Plant Virus-Like Particles as Vaccines. *Viruses*, 12, 3: 270, doi: 10.3390/v12030270:

Chen Q., Lai H. 2013a. Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9, 1: 26–49, doi: 10.4161/hv.22218:

- D'Aoust M.-A., Couture M. M.-J., Charland N., Trépanier S., Landry N., Ors F., Vézina L.-P. 2010. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 5: 607–619, doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00496.x:
- Hemmati F., Hemmati-Dinarvand M., Karimzade M., Rutkowska D., Eskandari M. H., Khanizadeh S., Afsharifar A. 2022. Plant-derived VLP: a worthy platform to produce vaccine against SARS-CoV-2. *Biotechnology Letters*, 44, 1: 45–57, doi: 10.1007/s10529-021-03211-0:
- Jung J.-W., Zahmanova G., Minkov I., Lomonosoff G. P. 2022. Plant-based expression and characterization of SARS-CoV-2 virus-like particles presenting a native spike protein. *Plant Biotechnology Journal*, 20, 7: 1363–1372, doi: 10.1111/pbi.13813:
- Kumar M., Kumari N., Thakur N., Bhatia S. K., Saratale G. D., Ghodake G., Mistry B. M., Alavilli H., Kishor D. S., Du X., Chung S.-M. 2021. A Comprehensive Overview on the Production of Vaccines in Plant-Based Expression Systems and the Scope of Plant Biotechnology to Combat against SARS-CoV-2 Virus Pandemics. *Plants*, 10, 6: 1213, doi: 10.3390/plants10061213:
- Marsian J., Lomonosoff G. P. 2016. Molecular pharming—VLPs made in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 201–206, doi: 10.1016/j.copbio.2015.12.007:
- Monreal-Escalante E., Ramos-Vega A., Angulo C., Bañuelos-Hernández B. 2022. Plant-Based Vaccines: Antigen Design, Diversity, and Strategies for High Level Production. *Vaccines*, 10, 1: 100, doi: 10.3390/vaccines10010100:
- Moon K.-B., Jeon J.-H., Choi H., Park J.-S., Park S.-J., Lee H.-J., Park J. M., Cho H. S., Moon J. S., Oh H., Kang S., Mason H. S., Kwon S.-Y., Kim H.-S. 2022. Construction of SARS-CoV-2 virus-like particles in plant. *Scientific Reports*, 12, 1: 1005, doi: 10.1038/s41598-022-04883-y:
- Parvathy S. T. 2020. Engineering Plants as Platforms for Production of Vaccines. *American Journal of Plant Sciences*, 11, 5: 707–735, doi: 10.4236/ajps.2020.115052:
- Rosales-Mendoza S., Márquez-Escobar V. A., González-Ortega O., Nieto-Gómez R., Arévalo-Villalobos J. I. 2020. What Does Plant-Based Vaccine Technology Offer to the Fight against COVID-19? *Vaccines*, 8, 2: 183, doi: 10.3390/vaccines8020183:
- Shohag M. J. I., Khan F. Z., Tang L., Wei Y., He Z., Yang X. 2021. COVID-19 Crisis: How Can Plant Biotechnology Help? *Plants*, 10, 2: 352, doi: 10.3390/plants10020352:

FITOREMEDIACIJA TEŽKIH KOVIN Z GENSKO SPREMENJENIMI RASTLINAMI

Breda Gartner

IZVLEČEK

Težke kovine, ki se kopičijo v okolju, predstavljajo nevarnost za zdravje ljudi in živali ter negativno vplivajo na obstoj mikroorganizmov. Fitoremediacija s pomočjo gensko spremenjenih rastlin je obetaven pristop za reševanje problema onesnaževanja okolja s težkimi kovinami. Je okolju prijazna tehnologija z nekaj omejitvami, ki bi jih z gensko spremenjenimi rastlinami lahko odpravili. Cilj genskega inženiringa za pridobivanje rastlin, primernih za fitoremediacijo, je uporabiti njihovo sposobnost za sprejemanje, kopičenje in presnovo onesnaževal. Velik potencial predstavljajo drevesa zaradi velike biomase in globokega koreninskega sistema. Biomasa rastlin, uporabljenih za fitoremediacijo, se lahko nadalje uporabi za pridobivanje oglja, olja ter plina.

Ključne besede: fitoremediacija, težke kovine, gensko spremenjene rastline, onesnaženje okolja, akumulacija

Phytoremediation of heavy metals with genetically modified plants

ABSTRACT

Heavy metals that accumulate in the environment pose a threat to the health of humans and animals and negatively affect the survival of microorganisms. Phytoremediation with genetically modified plants is a promising approach to addressing the problem of environmental pollution with heavy metals. It is an environmentally friendly technology with some limitations that could be overcome with genetically modified plants. The goal of genetic engineering to obtain plants suitable for phytoremediation is to harness their ability to take up, accumulate, and metabolize pollutants. Trees hold great potential due to their large biomass and deep root systems. The biomass of plants used for phytoremediation can be further utilized for the production of charcoal, oil and gas.

Key words: phytoremediation, heavy metals, genetically modified plants, environmental pollution, accumulation

1 UVOD

Onesnaževanje okolja s težkimi kovinami postaja vse resnejši svetovni problem. Z razvojem industrije in kmetijstva se v okolje sprošča vse več strupenih kemikalij. Težke kovine niso biorazgradljive in se zato kopičijo v okolju. Te snovi bi lahko vstopile tudi v prehranjevalno verigo, kar bi pomenilo veliko grožnjo za varnost in zdravje ljudi ter živali. Za remediacijo okolja so bile v preteklih letih uporabljene številne metode, ki jih lahko razdelimo na biološke, kemične in fizikalne. Fizikalna in kemična remediacija vključujeta predvsem električno remediacijo in izpiranje tal. Pri tem nastajajo visoki stroški, lastnosti tal se spremenijo in uničijo se talne strukture mikrobnih združb. Bioremediacija pa vključuje tehnike, pri katerih se za

remediacijo uporabljajo rastline, živali in mikroorganizmi. V zadnjem obdobju je veliko pozornosti pritegnila fitoremediacija (Shen in sod., 2022). Fitoremediacija je zelena, okolju prijazna in hitro razvijajoča se tehnologija, ki uporablja rastline in njihove encime za čiščenje voda, zraka in tal, onesnaženih s težkimi kovinami in drugimi onesnaževali (Ibañez in sod., 2015). Rastline, ki so sposobne fitoremediacije, so znane kot fitoremediatorji. Imajo lahko več omejitev, med njimi tudi počasno rast in majhen pridelek biomase. Z uporabo genskega inženiringa bi te težave lahko obšli in ustvarili hiperakumulativne rastline z velikim pridelkom biomase in prilagodljivostjo na okoljske razmere (Bhattacharyya in sod., 2023).

2 TEŽKE KOVINE IN NJIHOV VPLIV NA OKOLJE

Težke kovine so naravne sestavine Zemljine skorje. Delimo jih na esencialne in neesencialne. Esencialne težke kovine so tiste, ki jih živi organizmi potrebujejo v zelo majhnih količinah in so nujno potrebne za normalne biokemične in fiziološke funkcije. To so na primer: Fe, Mn, Cu, Zn, Ni. Neesencialne so tiste, ki jih živi organizmi ne potrebujejo nujno za normalen potek fizioloških in biokemičnih funkcij. Koncentracije težkih kovin, ki presegajo mejne vrednosti, imajo škodljive učinke na zdravje živih organizmov, saj lahko povzročijo oksidativni stres zaradi nastajanja prostih radikalov. Oksidativni stres je povezan z nastajanjem reaktivnih kisikovih spojin (ROS), ki lahko vodijo v celične poškodbe in smrt. Poleg tega lahko težke kovine zamenjajo esencialne kovine v encimih in pigmentih, kar ovira normalno delovanje. Težke kovine v okolju izvirajo iz naravnih in antropogenih virov. Naravne vire predstavljajo minerali, erozije in vulkanske dejavnosti. Antropogeni viri pa so rudarjenje, taljenje, galvanizacija, uporaba pesticidov in gnojil, biološki odpadki kmetijstva in industrijski izpusti (Ali in sod., 2013).

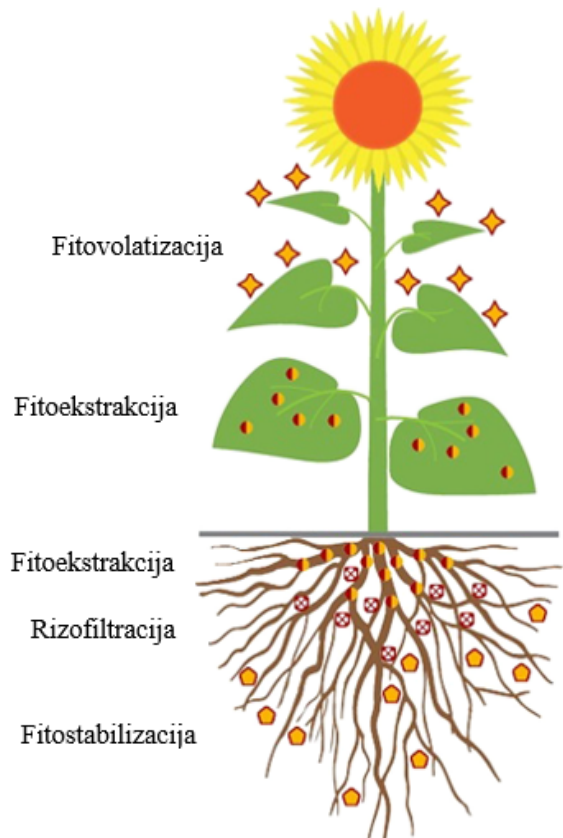
3 FITOREMEDIACIJA

Fitoremediacija se v osnovi nanaša na uporabo rastlin in talnih mikrobov za zmanjševanje koncentracij ali strupenih učinkov onesnaževal v okolju. Uporablja se tako za odstranjevanje težkih kovin in radionuklidov kot tudi za odstranjevanje organskih onesnaževal. Gre za novejšo, stroškovno učinkovito, uspešno in okolju prijazno tehnologijo. Rastline imajo izjemno sposobnost, da iz okolja odstranijo onesnaževala in z različnimi mehanizmi poskrbijo za njihovo razstrupljanje. Fitoremediacija je primerna za obsežne lokacije ali površine, kjer ostale remediacijske metode niso učinkovite ali izvedljive. Rastline lahko s fitoremediacijo (Ali in sod., 2013):

- omejijo tveganje prenosa težkih kovin, na primer v vodo (fitostabilizacija),
- naložijo težke kovine s tržno vrednostjo (fitoekstrakcija),
- izboljšajo stanje tal za gojenje rastlin z visoko tržno vrednostjo.

Procesi fitoremediacije, prikazani na sliki 1, so (Ali in sod., 2013):

- **Fitoekstrakcija:** Gre za absorpcijo onesnaževal iz tal ali vode s koreninami in njihovo akumulacijo v nadzemni biomasi, torej v poganjkih, listih in cvetovih. Ta prenos je zaželen, saj je nadzemno biomaso lažje odstranjovati kot korenine.
- **Fitofiltracija:** Fitofiltracijo delimo na rizofiltracijo (uporaba korenin), blastofiltracijo (uporaba sadik) ter kaulofiltracijo (uporaba poganjkov). Onesnaževala se tako absorbirajo ali adsorbirajo, kar prepreči njihovo zahajanje v okolje.
- **Fitostabilizacija:** Ta tehnika se uporablja za zmanjševanje mobilnosti in biološke dostopnosti onesnaževal v okolju, s čimer se prepreči njihov prehod v podtalnico ali prehranjevalno verigo. To rastline dosežejo s sorbcijo s koreninami, obarjanjem, kompleksacijo ali redukcijo težkih kovin. To ni trajna rešitev, saj se težke kovine še vedno kopičijo v tleh, le njihovo premikanje je omejeno.
- **Fitovolatizacija:** Pri tej tehniki, rastline sprejemajo onesnaževala iz tal, jih pretvorijo v hlapno obliko in jih kasneje sprostijo v ozračje. Ta tehnika se najpogosteje uporablja za organska onesnaževala ter za nekatere težke kovine, kot sta Hg in Se. Uporaba te metode je omejena, ker se onesnaževala le prenesejo v atmosfero, od koder se lahko ponovno vrnejo v tla.
- **Fitodegradacija:** Pri tej tehniki gre za razgradnjo organskih onesnaževal z rastlinskimi encimi. Primerna je samo za organska onesnaževala, saj težke kovine niso biorazgradljive.



Slika 1: Mehanizmi fitoremediacije (prirejeno po Ozyigit in Dogan, 2015)

Čeprav je fitoremediacija obetaven pristop, ima nekaj omejitev. Med njimi so: dolgotrajnost metode, počasna rast rastlin in omejena količina biomase, težave pri mobilizaciji težje vezanih težkih kovin, omejenost le na zmerno onesnažena področja in tveganje kontaminacije prehranjevalne verige ob neustreznem ravnanju rastlin, vključenih v fitoremediacijo (Ali in sod., 2013).

Učinkovitost fitoremediacije je mogoče izboljšati z različnimi pristopi, kot so povečanje biološke dostopnosti kovin, povečanje biomase rastlin in skrajšanje fitoremediacijskega cikla. Za to lahko uporabljamo mikrobiološke metode, agronomske metode, fizične in kemične metode ter genski inženiring (Shen in sod., 2022).

4 FITOREMEDIACIJA S POMOČJO GENSKO SPREMENJENIH RASTLIN

Genski inženiring se je izkazal za obetavno metodo izboljšanja fitoremediacijskih sposobnosti rastlin za odstranjevanje težkih kovin iz okolja. Da požlahtnimo oziroma pridobimo gensko spremenjene rastline, je potreben tuj vir genov. Ti geni lahko izvirajo iz rastlin, lahko pa tudi iz bakterij, gliv ali živali (Yan in sod., 2020). Tuje gene prenesemo v genom tarčne rastline s pomočjo različnih tehnik: s transformacijo z *Agrobacterium tumefaciens*, z biolistiko, z elektroporacijo ali s tarčnim preurejanjem genoma (CRISP/Cas, TALEN, ZFN) (Ozyigit in sod., 2021).

4.1 GENSKO SPREMENJENE RASTLINE ZA FITOREMEDIACIJO

Cilj genskega inženiringa za pridobivanje rastlin primernih za fitoremediacijo je manipulirati z rastlinsko sposobnostjo za prenašanje, kopičenje in presnovo onesnaževal. Številni geni, ki sodelujejo pri pridobivanju, razporejanju in razstrupljanju kovin, so bili identificirani in opisani iz različnih organizmov, zlasti bakterij in kvasovk. Transgene rastline so bile modificirane za prekomerno sintezo rekombinantnih proteinov, ki sodelujejo pri keliranju, asimilaciji in membranskem prenosu kovin. Povečana akumulacija in toleranca sta bili doseženi s prekomerno sintezo molekul, ki kelirajo kovine. Te molekule so: citrat, fitohelatini, metalotioneini, fitosiderofori in feritin (Srivastava, 2016).

Rastlinski genski inženiring je eden od številnih pristopov za izboljšanje hiperakumulacije v rastlinah. Prepoznavanje in razkrivanje strukturnih, fizioloških, genetskih in molekularnih mehanizmov hiperakumulacije, zlasti s tehnologijami omik, kot so transkriptomika, metabolomika, proteomika in genomika rastlin s hiperakumulacijo kovin, je pomagalo biotehnologom in ekologom pri inženiringu hiperakumulativnih rastlin z velikim pridelkom biomase (Kaur in sod., 2019).

Težke kovine lahko povzročijo prekomeren pojav reaktivnih kisikovih spojin (ROS), to pa vodi v oksidativni stres. Rastline, ki so tolerantne na težke kovine, so sposobne obrambe pred oksidativnim stresom. Tako je najpogostejša strategija za povečanje tolerance na težke kovine izboljšanje antioksidativne obrambe pri rastlinah, kar je mogoče doseči s prekomernim izražanjem genov, ki so udeleženi v antioksidativnih mehanizmih. Za povečanje sposobnosti akumulacije težkih kovin je najpogostejša strategija vstavljanje in prekomerno izražanje genov, ki so ključni za privzem, translokacijo in sekvestracijo težkih kovin. V ta namen se uporabljajo geni, ki kodirajo prenašalce ionov težkih kovin oziroma metaloide. Kelatorji kovin delujejo kot kovinski vezavni ligandi in izboljšujejo biološko razpoložljivost, spodbujajo privzem težkih kovin v korenine do poganjkov in posredujejo znotrajcelično sekvestracijo ionov težkih kovin v organelih. Celični mehanizmi fitoremediacije težkih kovin so prikazani na sliki 2 (Yan in sod., 2020).

Z genskim inženiringom lahko:

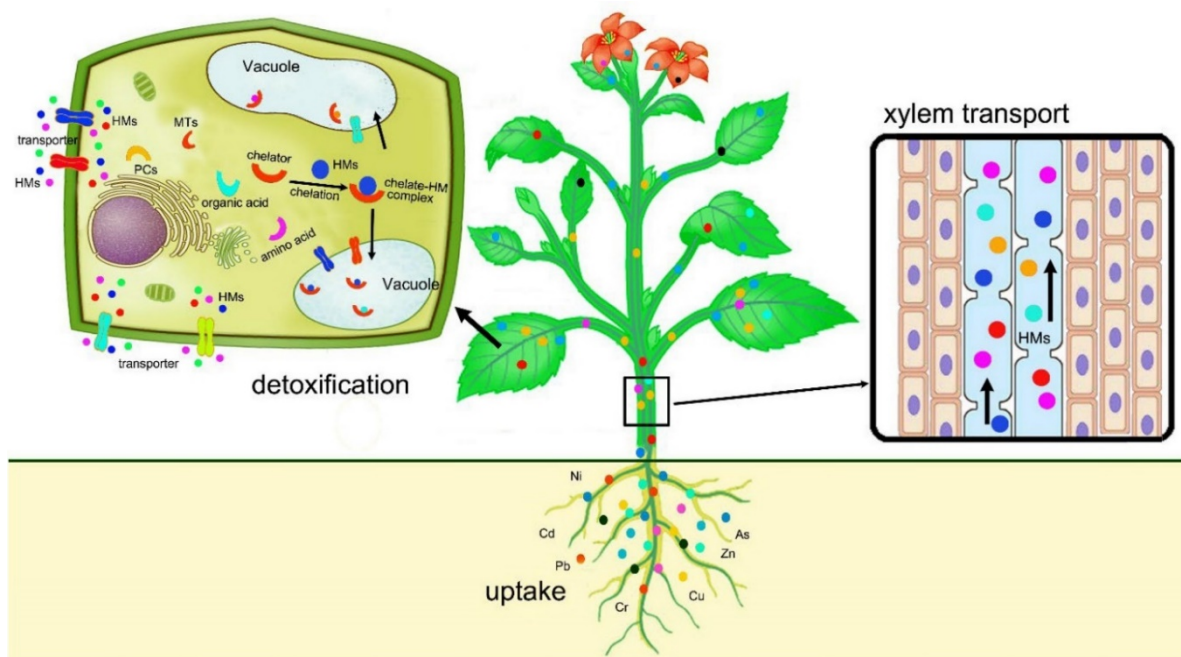
- Spodbudimo sintezo kelatorjev in tako izboljšamo akumulacijo težkih kovin. Prav tako lahko spodbudimo prekomerno ekspresijo genov, ki kodirajo naravne kelatorje in tako izboljšamo privzem in translokacijo težkih kovin (Yan in sod., 2020).
- Povečamo aktivnost encimov (na primer glutation reduktaze), ki sodelujejo pri splošni odpornosti na (oksidativni) stres (Srivastava, 2016).

Ker je v sprejemanje, translokacijo, sekvestracijo in premeščanje kovin, toleranco ter akumulacijo težkih kovin vključenih več genov, obstaja ogromno kombinacij le-teh, na katere lahko vplivamo z genskim inženiringom (Srivastava, 2016).

Požlahtnimo lahko rastline, ki (Srivastava, 2016):

- kopičijo težke kovine v nadzemnem delu in jih lahko pobiramo oziroma požanjemo (fitoekstrakcija),
- adsorbirajo kovine na površini korenin (rizofiltracija).

Prekomerna ekspresija genov za prenašalce težkih kovin lahko vodi v povečan sprejem težkih kovin, translokacijo ali sekvestracijo, odvisno od tega, v katerem tkivu se gen izraža (korenina, poganjek, vaskularno tkivo ali v vseh) in kaj je tarča gena (celična membrana, tonoplast). Klasične genetske študije, ki so spodbudne za transgenezo, kažejo, da je običajno zelo malo genov odgovornih za toleranco na kovine. Prav tako kopičenje kovin, toleranca in produktivnost rastlin niso nujno povezani. Zato bi bilo potrebno požlahtniti ali gensko spremeniti rastline z visoko toleranco in akumulacijo kovin ter visoko produktivnostjo. To bi bil idealen ideotip rastline za fitoekstrakcijo kovin (Srivastava, 2016).



Slika 2: Celični mehanizmi fitoremediacije težkih kovin (Yan in sod., 2020)

Raziskovalci se poslužujejo alternativnega pristopa, pri katerem v rastlino z genskim inženiringom uvedejo popolnoma novo pot za metabolizem težkih kovin iz drugega organizma. Povečanje biomase rastlin poskušajo doseči tudi z modifikacijo različnih rastlinskih hormonov, na primer giberelinov (Srivastava, 2016).

V preglednici 1 je prikazanih nekaj poskusov, v katerih so z genskim inženiringom vplivali na različne gene, vključene v sprejem, translokacijo ali kopičenje težkih kovin (Gomes in sod., 2016).

Preglednica 1: Primeri genesko spremenjenih rastlin primernih za fitoremediacijo (prirejeno po Gomes in sod., 2016)

Donorski organizem	Prejemni organizem	Gen, na katerega so vplivali z genskim inženiringom	Učinek na lastnost v rastlini
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Metaltionein	Bistveno večja akumulacija Cd v poganjkih.
<i>Streptococcus thermophils</i>	<i>Beta vulgaris</i>	g-glutamilcistein sintetaza-glutation sintetaza	Transgene rastline so v poganjkih kopičile več Cd, Zn in Cu kot netransgene rastline, višje ravni GSH in fitokelatina pod različnimi obremenitvami s težkimi kovinami.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Brassica juncea</i>	ATP sulfurilaza	Transgene rastline kažejo večjo preživelost, daljše korenine in večjo biomaso.
<i>Astragalus bisulcatus</i>	<i>Brassica juncea</i>	Selenocistein metiltransferaza	Večja proizvodnja hlapnega Se pri transgenih rastlinah.
<i>Spinacia oleracea</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Cistein sintetaza	Boljša toleranca na Cd, Ni, ter Se, ne pa na Pb in Cu.
<i>E. coli</i>	<i>Brassica juncea</i>	Glutation sintetaza	Transgene rastline so kopičile več Cd in imele boljšo toleranco na Cd.

4.2 PREDNOSTI IN OMEJITVE UPORABE GENSKO SPREMENJENIH RASTLIN ZA FITOREMEDIACIJO

Genski inženiring omogoča hitro spreminjanje rastlin, da pridobijo zaželene lastnosti. Omogoča tudi prenos genov na spolno nezdružljive rastlinske vrste, kar je nemogoče doseči s tradicionalnimi metodami žlahtnjenja, kot je križanje (Yan in sod., 2020).

Zaradi velikih pridelkov biomase lahko transgene rastline na dolgi rok kopičijo in dekontaminirajo onesnaževala. Znižajo se tudi stroški uporabe kemikalij. Biomasa neužitnih transgenih rastlin se lahko nadalje uporablja za različne namene, kot je pridobivanje energije z uporabo anaerobne digestije, preprečevanje erozije tal, sanacijo zemljišč in stabilizacijo vodnih kanalov. »Zelena kemija« je še ena velika prednost transgenih rastlin. Transgene rastline se lahko uporabijo za ekstrakcijo produktov z visoko vrednostjo, kot so na primer encimi, polisaharidi, različne kemikalije in goriva (Gunarathne in sod., 2019).

Čeprav se je pristop genskega inženiringa izkazal kot privlačna možnost izboljšanja fitoremediacije težkih kovin, obstaja nekaj ovir. Mehanizmi razstrupljanja in kopičenja težkih kovin so zelo zapleteni in vključujejo več genov, zato sta genski inženiring in manipulacija teh genov dolgotrajna, zahtevna in običajno neuspešna. Druga težava je, da so gensko spremenjene rastline v Evropski skupnosti pod strogo regulativo in jih je težko odobriti za namerno sproščanje v okolje tudi za poskusne namene za poljske poskuse in so prepovedane za pridelavo, saj potencialno lahko predstavljajo tveganje za zdravje človeka in živali, varno hrano in ekosisteme (Yan in sod., 2020).

Težave obstajajo tudi pri prilagajanju rastlin različnim okoljskim razmeram. Postopek je lahko tudi dolgotrajen. Take rastline bi potrebovale tudi desetletja, da bi očistile te velike površine onesnaženega okolja. Druge omejitve fitoremediacije so še nepopolna presnova, toksični metaboliti, manjša sposobnost razstrupljanja in morebitno povečanje biološke dostopnosti onesnaževal. Čeprav se je genski inženiring izkazal za postopek z nizkimi stroški, je sinteza genov lahko zahtevna. Prav tako so očiščenja potrebne velike površine, število transgenih rastlin za presnovo določenega onesnaževala pa je trenutno omejeno. Velika omejitev je tudi slabo poznavanje mehanizmov in poti, ki sodelujejo pri fitoremediaciji (Gunarathne in sod., 2019).

4.3 IZBOR PRIMERNIH GENSKO SPREMENJENIH RASTLIN ZA ČIŠČENJE TAL, ONESNAŽENIH S TEŽKIMI KOVINAMI

Rastline, primerne za genski inženiring z namenom izboljšanja fitoremediacijskega potenciala, so rastline z veliko biomase. Lahko so eno- ali večletnice (drevesa), s sposobnostjo fitoremediacije. Prav tako morajo biti dovzetne za gensko transformacijo (Srivastava, 2016). Za nekatere rastline, ki so hiperakumulatorji težkih kovin z veliko biomase, so že razviti postopki transformacije in regeneracije. Te rastline so: indijska gorčica (*Brassica juncea*), sončnica (*Helianthus annuus*), paradižnik (*Lycopersicon esculentum*) in rumeni topol (*Liriodendron tulipifera*) (Srivastava, 2016).

Rastlinske vrste in sorte, namenjene uporabi v procesih fitoremediacije, so po možnosti tiste, ki imajo velike pridelke biomase, globoke koreninske sisteme, so prilagodljive na različne podnebne razmere, so enostavne za gojenje in spravilo ter kopičijo, prenašajo, biorazgrajujejo ali stabilizirajo velike količine onesnaževal. Zato se v zadnjih nekaj letih povečuje potreba po divjih in gensko spremenjenih rastlinskih vrstah, sposobnih fitoremediacije (Boechat in sod., 2021).

4.4 PRIMERNOST DREVES ZA FITOREMEDIACIJO

V prihodnosti bo velik poudarek na fitoremediatorskih drevesnih vrstah zaradi daljše življenjske dobe in velike nadzemne biomase. Čeprav imajo drevesa počasno rast, so sposobna izvajati remediacijo več desetletij in prenašati velike količine onesnaževal v nadzemne organe (veje in liste), ki se zlahka odstranijo. Nekatere drevesne vrste so naravno tolerantne na težke kovine ter imajo sposobnost hitre rasti z veliko nadzemne biomase, kar jim omogoča kopičenje velikih količin težkih kovin. Topol je dober kandidat za rastlinsko vrsto mediatorja, saj zelo

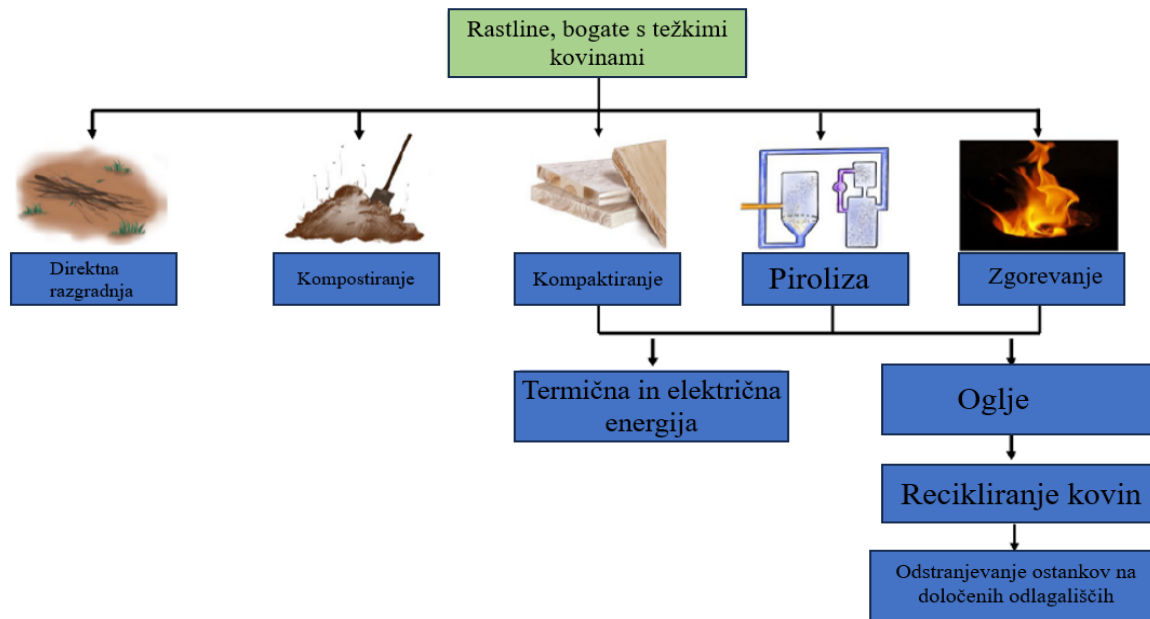
hitro raste in ima obsežen koreninski sistem, uporaben za fitostabilizacijo organskih onesnaževal. Poleg tega topol predstavlja zmanjšano tveganje onesnaženja prehranjevalne verige, ker ni užiten in ga je mogoče uporabiti za izdelavo oglja (Boechat in sod., 2021).

4.5 UPORABA BIOMASE RASTLIN, UPORABLJENIH ZA FITOREMEDIACIJO

Ravnanje z biomaso je ključna faza, ki je opredeljena kot velik izziv v postopku fitoremediacije. Sprejeti je potrebno pomembne ukrepe za varno odstranjevanje rastlinske biomase, saj vsebuje veliko koncentracijo težkih kovin, ki lahko ogrozi okolje.

Za rešitev tega problema so predlagani naslednji pristopi, ki so prikazani tudi na sliki 3 (Quarshie in sod., 2021):

- **Neposredno odstranjevanje** rastlinske biomase je časovno učinkovita in enostavna metoda, a neprimerna. Biomasa se zbere na odlagališčih brez obdelave, kar še dodatno onesnažuje okolje. Te rastline so škodljive za kopenske organizme, zato neposredno odlaganje ni priporočljivo.
- **Kompostiranje** je uporaba organske rastlinske biomase za povečanje rodovitnosti tal. Potrebna je predhodna obdelava rastlinske biomase z mikroorganizmi. Nevarnost tega pristopa je, da bi razpadajoča biomasa onesnaževala podtalno vodo.
- Namen **kompaktiranja** je zmanjšati prostornino biomase ali pa jo spremeniti v obnovljivo gorivo.
- **Piroliza** vključuje razgradnjo biomase v anaerobnih pogojih z nadzorovano toploto. Pri tem procesu se v okolje ne sprošča dim, zato ne pride do onesnaževanja okolja. Je prednostna tehnika obdelave rastlinske biomase, saj pri njej nastanejo oglje, pirolitično olje in plin. Ostanke pirolize je potrebno ustrezno odstraniti na odlagališčih za nevarne odpadke.
- Pri **uplinjanju** iz ogljikove biomase nastanejo gorljivi plini, kot so vodik, ogljikov dioksid, metan in ogljikov monoksid. Postopek zahteva več toplote kot piroliza. Plini, ki pri tem nastanejo, se lahko uporabljajo za pridobivanje toplotne in električne energije. Poleg tega ne nastajajo plini, ki bi onesnaževali zrak, zato je ta postopek okolju prijazen.
- **Zgorevanje** v nadzorovanih aerobnih pogojih močno zmanjša prostornino rastlinske biomase. Nastali pepel se lahko uporabi za pridobivanje kovin. Sežiganje rastlin, bogatih s kovinami, na prostem ni okolju prijazno, saj je lahko škodljivo za kopenske organizme.



Slika 3: Postopki obdelave rastlinske biomase po fitoremediaciji (prirejeno po Quarshie in sod., 2021)

Razumno odstranjevanje in uporaba onesnažene biomase sta zelo pomembna. Kompostiranje, piroliza in sežiganje imajo veliko tveganje za sekundarno onesnaženje. Te pristope zato lahko kombiniramo z drugimi postopki, ki imajo sposobnost inaktivacije nastalih nezaželenih snovi (Ali in sod., 2013).

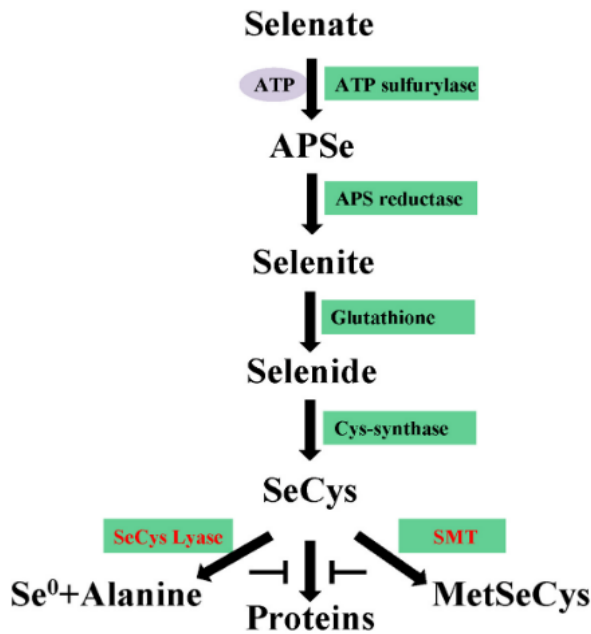
Z zgoraj opisanimi postopki lahko (Quarshie in sod., 2021):

- Izvedemo biofortifikacijo: rastline uporabljene pri fitoremediaciji, so bogate z vitamini in minerali in se lahko po odstranitvi težkih kovin uporabijo v prehrani oziroma za krmo. S kovinami obogatena rastlinska biomasa, ki vsebuje bistvene elemente za obogatitev tal, se predela in uporabi kot gnojilo.
- Pridobivamo bio-olja, bio-goriva,
- pridobivamo les, če se za fitoremediacijo uporabljajo drevesa.

4.6 PRIMER USPEŠNE UPORABE GENSKO SPREMENJENIH RASTLIN

Li in sodelavci (2022) v prispevku: Enhanced phytoremediation of selenium using genetically engineered rice plants, opisujejo študijo o izboljšani fitoremediaciji selena.

Selen je mikroelement, nujno potreben za ljudi, živali in mikroorganizme. Pri visokih koncentracijah je strupen zaradi nespecifične zamenjave cisteina s selenocisteinom, ki se vgradi v beljakovine, kar lahko vodi v nepravilno zvitje in delovanje beljakovin. Z namenom, da bi preprečili nespecifično vgrajevanje selenocisteina v proteine, so v tej raziskavi prekomerno izrazili dva gena.



Slika 4: Pretvorba selenata v gensko spremenjenem rižu (Li in sod., 2022)

Prvi gen kodira selenocistein liazo (*SL*) v *Homo sapiensu* (*HsSL*) in katalizira pretvorbo selenocisteina v elementarni selen in alanin. Drugi gen pa kodira selenocistein metiltransferazo (*SMT*) v *Astragalus bisulcatusu* (*AbSMT*) in metilira selenocistein v metilselenocistein. Reakcije pretvorbe so prikazane na sliki 4. Zanimalo jih je, ali lahko s povečano ekspresijo teh dveh genov v rižu zmanjšajo količino selenocisteina. V zadnjem obdobju pa se pojavlja tudi vse večja zaskrbljenost zaradi svetovnega problema onesnaženosti okolja s selenom. Raziskovalci so tako hkrati proučevali, ali ima na tak način gensko spremenjen riž potencial za fitoremediacijo (Li in sod., 2022).

Najprej so izvedli **gensko transformacijo riža**. Izdelali so gensko kaseto, ki je vsebovala gen *HsSL* in *AbSMT*, 35S promotor, NOS terminator ter selekcijski gen. Ta genski konstrukt so vstavili v vektor pCAMBIA1301. Transformacijo riža so izvedli z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* sev GV3101, transformirali pa so sorto riža ZH11. Po transformaciji so semena divjega tipa riža ZH11 in transgenega riža površinsko razkužili in dali kaliti na ½ MS gojišče. Sedem dni stare kalice so prenesli v hidroponične posode v rastne komore s temperaturo 28 °C, 60 % vlažnostjo in 16-urno fotoperiodo. Iz tritedenskih rastlin riža so potem **ekstrahirali RNA** z uporabo komercialnega kompleta. Izražanje obeh ciljnih transgenov so preverjali z uporabo metode qRT-PCR. Tri tedne stare rastline ZH11 in transgene rastline, gojene v tekočem ½ MS gojišču, so izpostavili tudi selenatu, da bi **določili količino alanina in metilselenocisteina**. Aktivnost selenocistein liaze so določili z določitvijo alanina, aktivnost selenocistein metiltransferaze pa z merjenjem vsebnosti metilselenocisteina. Nato so opravili **teste kalivosti**, tako, da so semena površinsko razkužili in jih enakomerno razporedili na ½ MS gojišče ali ½ MS gojišče z dodanim selenatom ali selenitom. Da so preverili **odpornost rastlin na selenatni oziroma selenitni stres**, so tri tedne stare rastline ZH11 in transgene rastline, gojene v tekočem ½ MS gojišču, izpostavili selenatu oziroma selenitu. Izveden je bil še **fitoremediacijski test**, da bi proučili učinek odstranjevanja selena iz okolja s transgenimi rastlinami. Štirideset tritedenskih hidroponično vzgojenih sadik različnih genotipov so prenesli v steklene epruvete, v katere so dodali ½ MS tekočega gojišča, ki mu je bil dodan selenat ali selenit (Li in sod., 2022).

Ekspresija obeh genov je bila pri transgenem rižu višja kot pri divjem tipu. Tretiranje s selenatom je rezultiralo v višjih koncentracijah alanina in metilselenocisteina v transgenih rastlinah kot v rastlinah divjega tipa. To kaže, da lahko ta pristop uspešno preusmeri

metabolizem selen v rastlinah in prepreči napačno inkorporacijo selenocisteina v proteine. Ob dodatku selenata ali selenita so semena transgenih rastlin vzkli in rasla nekoliko hitreje kot netransformirana semena ZH11. Pri tretiranju rastlin s selenatom ali selenitom so listi netransformiranega riža hitreje uveli, sveža masa tega riža je bila manjša kot pri transformiranem rižu. Pri preverjanju potenciala za fitoremediacijo so ugotovili, da je po treh dneh tretiranja s selenatom ali selenitom skupni ostanek selen v gojišču epruvet s transgenimi rastlinami veliko manjši kot v epruveti z netransgenimi rastlinami, kar kaže na dober fitoremediacijski potencial transgenega riža (Li in sod., 2022).

Ta študija daje upanje, da bodo gensko spremenjene rastline lahko imele vlogo pri obnovi okolja, onesnaženega s selenom (Li in sod., 2022).

5 ZAKLJUČEK

Fitoremediacija je obetavna tehnologija za čiščenje okolja, onesnaženega s težkimi kovinami. Njen razvoj in uporaba pa sta močno omejena zaradi nizke učinkovitosti remediacije in pomankanja učinkovitih metod odstranjevanja onesnažene biomase (Shen in sod., 2022). Veliko vrst rastlin je bilo že prepoznanih kot potencialnih kandidatki za fitoremediacijsko uporabo. Požlahtnjene so bile transgene rastline z izboljšano sposobnostjo sprejemanja, prenosa in kopičenja kovin ter razstrupljanja organskih onesnaževal. V razumevanju procesov interakcij med rastlinami in mikrobi, kopičenja kovin in ionske homeostaze obstaja še vedno veliko vrzeli, ki jih bo potrebno proučiti.

6 VIRI

- Ali H., Khan E., Anwar Sajad M. 2013. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*, 91, 7, 869-881, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Bhattacharyya N., Anand U., Kumar R., Ghorai M., Aftab T., Jha N. K., Upamali Rajapaksha A., Bundschuh J., Bontempi E., Dey A. 2023. Phytoremediation and sequestration of soil metals using the CRISPR/Cas9 technology to modify plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 21, 429-445, <https://doi.org/10.1007/s10311-022-01474-1>
- Boechat C. L. , de Souza Miranda R., de Jesus Lacerda J.J., Coelho D. G., Sobrinho L. S., Saraiva P. C. 2021. Transgenic plants and rhizosphere-associated microbiota in phytoremediation of heavy metals and organic pollutants. *Elsevier*, 5, 299-328, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820318-7.00015-0>
- Gomes M. A. , Hauser-Davis R. A. , de Souza A. N. , Vitória A. P. 2016. Metal phytoremediation: General strategies, genetically modified plants and applications in metal nanoparticle contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 134, 133-147, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.024>
- Gunarathne V., Mayakaduwa S., Ashiq A., Weerakoon S. R., Biswas J. K., Vithanage M. 2019. *Transgenic Plants: Benefits, Applications, and Potential Risks in Phytoremediation*. Academic Press, 5, 89-102, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814389-6.00005-5>
- Ibañez S.G., Paisio C.E., Oller A. L. W., Talano M.A., González P.S., Medina M.I., Agostini E. 2015. Overview and new insights of genetically engineered plants for improving

- phytoremediation. V: *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*. Ansari A. A., Gill S. S., Gill R., Lanza G. R. (ur.). Springer International Publishing Switzerland, str. 99-113, https://doi.org/10.1007/978-3-319-10395-2_8
- Kaur R., Yadav P., Kohli S. K., Kumar V., Bakshi P., Mir B. A., Thukral A. K., Bhardwaj R. 2019. Emerging trends and tools in transgenic plant technology for phytoremediation of toxic metals and metalloids. *Academic Press*, 4, 63-88, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814389-6.00004-3>
- Li Z., Tian Y., Wang B., Peng R., Xu J., Fu X., Han H, Wang L., Zhang W., Deng Y., Wang Y., Gong Z., Jianjie Gao J., Yao Q. 2022. Enhanced phytoremediation of selenium using genetically engineered rice plants. *Journal of Plant Physiology*, 271, 153665, <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153665>
- Ozyigit I. I., Can H., Dogan I. 2021. Phytoremediation using genetically engineered plants to remove metals: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 669–698, <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01095-6>
- Ozyigit I.I., Dogan I. 2015. *Plant–Microbe Interactions in Phytoremediation Soil Remediation and Plants*, Elsevier Inc., 255-285, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-799937-1.00009-7>
- Quarshie S.DG, Xiao X., Zhang L. 2021. Enhanced phytoremediation of soil heavy metal pollution and commercial utilization of harvested plant biomass: a review. *Water Air Soil Pollut*, 232, 475, <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05430-7>
- Shen X., Dai M., Yang J., Sun L., Tan X., Peng C., Ali I., Naz I. 2022. A critical review on the phytoremediation of heavy metals from environment: Performance and challenges. *Chemosphere*, 291, 3, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132979>
- Srivastava N. 2016. *Phytoremediation of Heavy Metals Contaminated Soils Through Transgenic Plants*. V: *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*. Ansari A. A., Gill S. S., Gill R., Lanza G. R. (ur.). Springer International Publishing, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-40148-5>
- Yan A., Wang Y., Ngin Tan S., Yusof M. L. M., Ghosh S., Chen Z. 2020. Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land. *Frontier in plants science*, 11, 359, <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>

MOLEKULARNE OSNOVE DELOVANJA POGOSTO UPORABLJENIH KEMIČNIH SNOVI V KOZMETIKI

Tea Dular

IZVLEČEK

V prispevku so predstavljena znanstvena ozadja sedmih kemičnih snovi, ki se pogosto uporabljajo v izdelkih za nego kože obraza. Prikazani so kemijska struktura, sinteza, mehanizmi delovanja in možni učinki hialuronske kisline, retinola, vitamina C, α - in β -hidroksi kislin, niacinamida, peptidov in ceramidov, ki pomembno prispevajo k zdravju in videzu kože. Te snovi nudijo številne koristi za kožo, vključno z zadrževanjem vlage, sintezo kolagena, antioksidativno zaščito in celovitim izboljšanjem teksture kože. Razumevanje mehanizmov delovanja teh spojin je ključno za ozaveščeno uporabo izdelkov za nego kože in optimalno izkoriščanje njihovih lastnosti.

Ključne besede: nega kože, staranje kože, hiperpigmentacija, hialuronska kislina, retinol, vitamin C, hidroksi kisline, niacinamid, peptidi, ceramidi

The molecular mechanisms of action of commonly used chemical substances in cosmetics

ABSTRACT

This article presents the scientific background of seven chemical substances commonly used in facial skin care products. The chemical structure, synthesis, mechanisms of action and potential effects of hyaluronic acid, retinol, vitamin C, α - and β -hydroxy acids, niacinamide, peptides and ceramides, which are all important contributors to skin health and appearance, were investigated. These substances offer a number of benefits for the skin, including moisture retention, collagen synthesis, antioxidant protection and overall improvement of skin texture. Understanding the mechanisms of action of these compounds is key for informed use of skin care products and optimal use of their properties.

Key words: skin care, skin ageing, hyperpigmentation, hyaluronic acid, retinol, vitamin C, hydroxy acids, niacinamide, peptides, ceramides

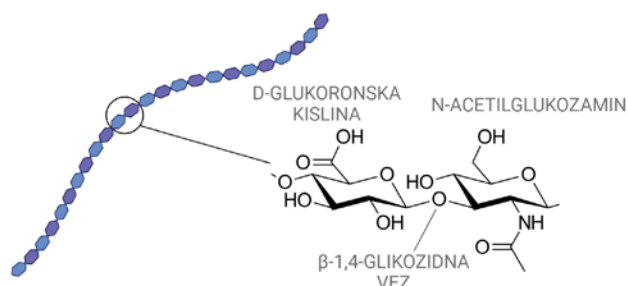
1 UVOD

Ker se proučevanje in zdravje kože prepletata, se je na področju nege kože pojavil nabor snovi, ki obljublajo preobrazbene učinke, ter so zato pritegnile pozornost marsikoga. Koža predstavlja bariero za naše telo, omogoča zaščito, absorpcijo, sekrecijo, termo-regulacijo, regulacijo imunskega sistema in senzorične zaznave. Videz kože ima vpliv tudi na socialne odnose in status posameznika. Zaradi mnogih funkcij koža predstavlja del telesa, katerega nega ima bistven pomen za naše življenje. Kot vsi ostali deli telesa, pa je tudi koža podvržena dejavnikom staranja. Dejavnike razdelimo med notranje, na katere vpliva genetika, in zunanje, med katere med drugimi uvrščamo tudi nego kože (Rodan in sod., 2016; Zhang in Duan, 2018).

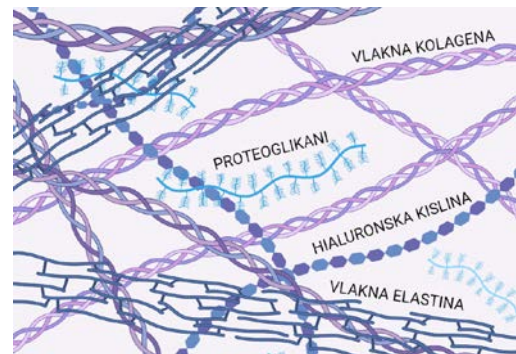
V prispevku so predstavljeni izsledki proučevanj 7 pogosto uporabljenih skupin kemičnih snovi v kozmetičnih izdelkih namenjeni negi kože obraza, od kemijske strukture, pridobivanja, mehanizmov delovanja, pa do potencialnih učinkov na videz in zdravje kože. Razumevanje načina delovanja teh substanc je bistveno za premišljene odločitve ob nakupu kozmetičnih izdelkov, kar zagotavlja najbolj učinkovito izrabo njihovih koristi.

2 HIALURONSKA KISLINA

Hialuronska kislina (HA), imenovana tudi hialuronan, je naraven polimer z molekulsko formulo $C_{28}H_{44}N_2O_{23}$. Sestavljena je iz ponovitev disaharida D-glukoronske kisline in N-acetilglukozamina, povezanih z β -1,4-glikozidno vezjo (Slika 1) (Chong in sod., 2005; Sudha in Rose, 2014; Keen, 2017). Od ostalih glikozaminoglikanov se razlikuje po tem, da ne vsebuje sulfatne skupine (Saranraj in Naidu, 2013). Je ključna makromolekula prisotna v ekstracelularnem matriksu (ECM) vezivnega tkiva vseh vretenčarjev, najdemo pa jo tudi v kapsuli nekaterih bakterij, kot so *Streptococcus* spp. in *Staphylococcus* spp. (Saranraj in Naidu, 2013; Bukhari in sod., 2018). V tkivu se nahaja v naključni konfiguraciji, ki pa je pri fiziološkem pH polianionska. Pri visokih molekulskih masah se vijačnice zapletejo in tvorijo viskoelastični gel, ki je izredno mazljiv in hidrofilen (Saranraj in Naidu, 2013). HA je biorazgradljiva, netoksična in neimunogena, ter zato primerna za uporabo v najrazličnejših biomedicinskih postopkih (Saranraj in Naidu, 2013; Bukhari in sod., 2018).



Slika 1: Kemijska struktura disaharida hialuronske kisline



Slika 22: Ekstracelularni matriks z vlakni kolagena ter elastina, hialuronsko kislino in proteoglikani

Poleg ključne sestavine v izdelkih za nego kože, kjer izkoriščamo njene lastnosti proti staranju in lastnosti popravljanja kože, se uporablja tudi za diagnozo raka, celjenje ran, regeneracijo tkiva in imunomodulacijo. V kozmetiki jo uporabljamo v obliki hidrogelov, dermalnih ter intradermalnih polnil, krem, pen in gelov (Bukhari in sod., 2018).

V koži najdemo HA vezano na vlakna kolagena in elastina, kjer HA skrbi za njuno primerno konfiguracijo (Slika 2). V koži ob staranju te povezave izginejo, kar vodi v podrtje konfiguracije elastina ter kolagena, in vidnega nagubanja kože. HA je tudi močan antioksidant, ki pomaga pri navlaževanju kože na način vezave vode v tkivo. Veže lahko tudi količino vode, ki je 100-krat težja od lastne teže molekule, in s tem poskrbi za bolj mehko in gladko kožo, ter upočasnjuje nastanek globokih tankih gub, ki se naravno pojavijo s staranjem (Bukhari in sod., 2018).

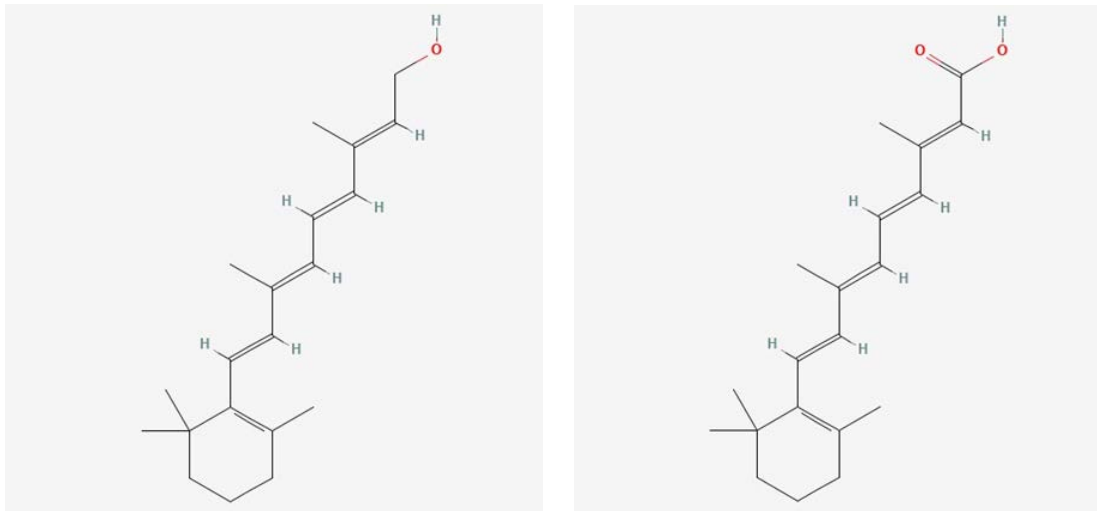
Avtorji Pavicic in sod. (2011) so proučevali učinkovitost HA na skupini 76 žensk s kliničnimi znaki obočesnih gub. Dvakrat dnevno so 60 dni nanašali različno molekulsko maso 0,1 % HA (med 50 in 2000 kDa) in opazovali spremembo prožnosti ter hidracije kože. Statistično značilne razlike v primerjavi s placebo skupino, so opazili pri posameznicah, ki so uporabljale 0,1% HA z nizko molekulsko maso (50 in 130 kDa), kar so pripisali boljšim penetracijskim sposobnostim manjših molekul. Enako je ugotovila tudi študija Farwick in sod. (2008), različna učinkovitost pa naj bi bila posledica razlik v perkutani absorpciji različnih molekulskih mas HA v zunanji plasti kože imenovani rožena plast oz. stratum corneum.

Pridobivanje HA poteka z mikrobno biosintezo in encimatsko ali kemijsko sintezo. Tradicionalno se HA pridobiva iz petelinjih grebenov in govejih oči. Visoko-molekulsko HA je na ta način težko izolirati, saj tvori kompleksne proteoglikane, pojavljajo pa se tudi etični zadržki za tovrstno pridobivanje. Boljši način pridobivanja je zato pridobivanje z mikroorganizmi, kot so *Streptococcus* spp. Bakterije rodu *Streptococcus* sintetizirajo HA kot stranski produkt metabolizma glukoze, in jo izločajo v gojišče kot del ECM. Bakterije so sposobne sinteze HA tako v aerobnih, kot anaerobnih pogojih, vendar pa se za pridobivanje večjih koncentracij visoko-molekularne HA poslužujejo aerobnih pogojev (Saranraj in Naidu, 2013).

Kemijska sinteza HA lahko poteka po dveh metodah – z pre-glikolizacijsko oksidacijsko metodo ali post-glikolizacijsko oksidacijsko metodo, ki se razlikujeta glede na način vključitve glukuronske kisline. V post-glikolizacijski oksidacijski metodi, kjer so vsebnosti večje, se enote glukoze oksidirajo na glukuronsko kislino. Pri tem nastanejo HA disaharidi, ki se polimerizirajo v HA. Encimatsko-kemijska sinteza poteka na način posnemanja biosinteznih poti nastanka HA. Poglavitni encim je glikoziltransferaza, pridobljena iz bakterije, ki katalizira kemijsko reakcijo združevanja monosaharidov za nastanek disaharida in elongacijo oligosaharidov HA (Li in sod., 2020).

3 RETINOL

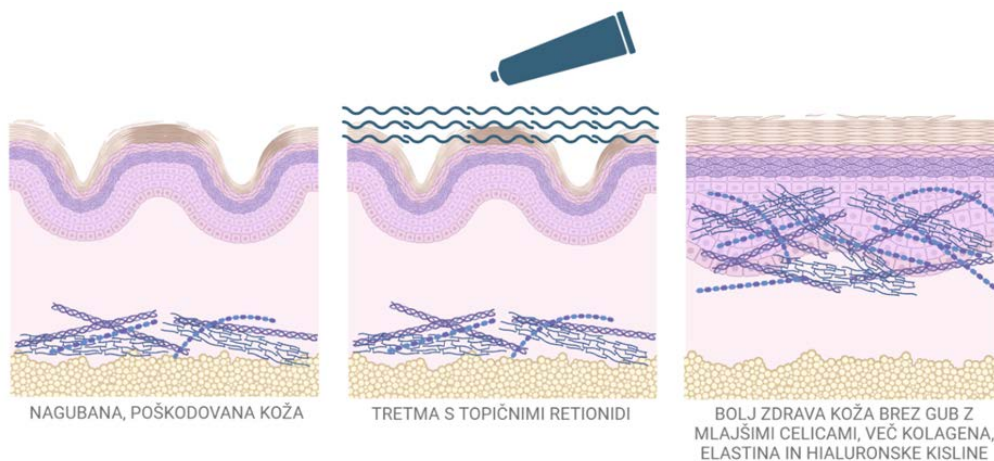
Retinoidi so skupina derivatov vitamina A, ki jih v kozmetiki uporabljamo že od leta 1943, z namenom manjšanja znakov t.i. foto-staranja. Foto-staranje je proces, ki ga povzroči ponavljajoča izpostavljenost UV žarkom, in se kaže kot globoke gube, neelastičnost kože, madeži na koži in hrapava koža (Riahi in sod., 2016). Retinoidi so lipofilni izoprenoidi, sestavljeni iz ciklične skupine in linearne verige, ki ima na koncu hidrofilno skupino (Jang in sod., 2011). Retinol je eden izmed predstavnikov retinoidov, in ga pogosto poimenujemo tudi kar vitamin A (Shao in sod., 2017). Njegova kemijska formula je $C_{20}H_{30}O$ (Slika 3 – levo) (National Center for Biotechnology Information, 2023a). Je prekurzor retinolne kisline, spojine znane po svojih lastnostih proti staranju (Slika 3 – desno). Koža ima sposobnost pretvorbe retinola v biološko aktivno retinolno kislino, zato ima uporaba retinola v kozmetičnih izdelkih mnoge pozitivne učinke na zdravje in videz kože (Shao in sod., 2017).



Slika 3: Kemijska struktura: retinola – levo (NCBI, 2023a) in retinolne kisline – desno (NCBI, 2023b)

Vsi retinoidi in posledično tudi retinol v koži delujejo na različne načine: preko spodbujanja celične diferenciacije in proliferacije, preko sinteze kolagena in elastina, z proti-vnetnimi ter z antioksidativnimi učinki (Riahi in sod., 2016).

Preko celične diferenciacije in proliferacije retinoidi izboljšajo videz in zdravje kože na način interakcije z receptorji retinolne kisline (RARs) v celicah kože. Interakcija vodi v spremembe transkripcije genov ter posledično povečanja celične diferenciacije, proliferacije in sinteze ECM. Na ta način se spodbudi menjava celic, stare celice se luščijo, nastajajo pa nove bolj zdrave celice. Retinoidi delujejo preko genske regulacije tudi na način spodbujanja sinteze kolagena ter elastina, ki sta bistvena proteina za ohranjanje strukture ter elastičnosti kože, pa tudi hialuronske kisline, ki povezuje vlakna prej omenjenih proteinov. Delovanje obeh mehanizmov prikazuje Slika 4 (Riahi in sod., 2016; Shao in sod., 2017).



Slika 4: Delovanje retinoidov na koži

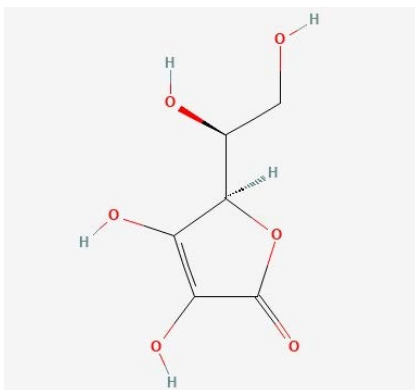
Retinoidi imajo hkrati tudi protivnetne in antioksidativne učinke. Kronična izpostavljenost UV sevanju sproži v koži vnetni odziv, ki se kaže v rdečici ter razdraženosti kože. Retinoidi ta vnetni odziv omilijo preko zaviranja nastanka provnetnih modulatorjev in zaviranja aktivacije

vnetnih celic. Antioksidativno delovanje retinoidov je bistveno za zaščito pred reaktivnimi kisikovimi spojinami (ROS), ki nastajajo zaradi UV sevanja. ROS v koži povzročajo oksidativni stres, ki vodi v poškodbe celic, vnetje in prezgodnje staranje kože. Retinoidi nevtralizirajo proste radikale ter na ta način zaščitijo kožo pred oksidativnim stresom. Vsi naštetni mehanizmi omogočajo izboljšanje strukture kože, zmanjšanje hrapavosti in vračanje mladostnega videza kože (Riahi in sod., 2016).

Retinol se pridobiva iz narave ali sintetično. Naravni viri retinola so jetra in ribje olje, za potrebe kozmetike pa se poslužujejo predvsem kemijske sinteze. Mikrobna sinteza se danes še ne uporablja (Jang, 2011).

4 VITAMIN C

Vitamin C, poznan tudi pod imenom L-askorbinska kislina, je naraven antioksidant, ki ga iz glukoze sintetizira večina rastlin in živali. Ljudje sinteze nismo sposobni in ga pridobimo s hrano. Glavni viri vitamina C so citrusi, zelena listnata zelenjava, jagode, rdeča paprika in brokoli. Vitamin C ima kemijsko formulo $C_6H_8O_6$ in kemijsko strukturo, kot jo prikazuje Slika 5. V kozmetiki se vitamin C uporablja za manjšanje znakov foto-staranja in hiperpigmentacije kože. Problem uporabe vitamina C predstavljajo njegova nestabilnost in slab prehod v dermis. Njegova nestabilnost se kaže ob izpostavljanju svetlobi, zraku ali višjim temperaturam (Telang, 2013).



Slika 5: Kemijska struktura vitamina C (NCBI, 2023c)

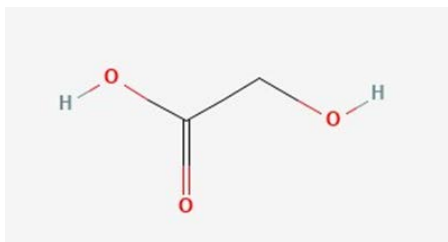
V koži vitamin C deluje kot antioksidant in na način vezave ter nevtralizacije ROS, ki nastajajo ob izpostavljenosti UV svetlobi, zaščiti kožo pred oksidativnim stresom. Vitamin C sodeluje tudi v procesu sinteze kolagena, saj je ključen faktor za encimsko pretvorbo prolina in lizina v kolagenska vlakna. Ustrezne količine vitamina C so nujne za vzdrževanje sinteze kolagena, ki pomaga izboljšati elastičnost, čvrstost in strukturo kože. Vitamin C zmanjša tudi hiperpigmentacijo, saj zavira encim tirozinazo, ki sodeluje pri nastanku melanina (Telang, 2013). S svojimi provnetnimi lastnostmi je koristen za zdravljenje kožnih bolezni, kot so akne in rozacea – kronična vnetna bolezen kože (Telang, 2013; Rainer in sod., 2017).

5 α - IN β -HIDROKSI KISLINE

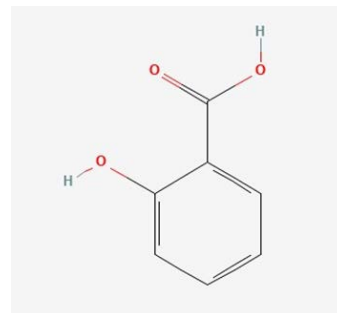
Hidroksi kisline (HAs) so organske karboksilne kisline, ki jih ločimo na α -hidroksi kisline (α HAs) in β -hidroksi kisline (β HAs). Pogosto jih uporabljamo v številnih kozmetičnih ter terapevtskih pripravkih, v namene zdravljenja stanj kot so akne, brazgotine povzročene z aknami, hiperpigmentacija in foto-staranje (Kornhauser in sod., 2010; Sharad, 2013).

α HAs so karboksilne kisline z eno hidroksilno skupino vezano na položaj α karboksilne skupine. Predstavnica α HAs je glikolična kislina (GA). GA, s kemijskih imenom hidroksiocetna kislina, ima molekulska formulo $C_2H_4O_3$ (Slika 6) (Kornhauser in sod., 2010). GA je predstavnica α HAs z najmanjšo molekulska maso, zato najlažje penetrira kožo. Uporabljamo jo predvsem v obliki pilingov. Pridobivamo jo iz sladkornega trsa (Sharad, 2013).

Predstavnica β HAs je salicilna kislina (SA). SA je 2-hidroksibenzojska kislina s kemijsko formulo $C_7H_6O_3$ (Slika 7) (Kornhauser in sod., 2009; Ribeiro in sod., 2019). Je sekundarni metabolit rastlin, v katerih deluje kot endogena signalna molekula, izkazuje pa tudi bakteriocidno in fungicidno delovanje (Ribeiro in sod., 2019). SA se pridobiva iz lubja vrbe, sladke breze in listov zimzelenih dreves, lahko pa se jo tudi umetno sintetizira (Arif, 2015).



Slika 6: Kemijska struktura glikolne kisline (NCBI, 2023d)



Slika 7: Kemijska struktura salicilne kisline (NCBI, 2023e)

GA sodeluje pri manjšanju znakov foto-staranja na več načinov. Eden izmed načinov je "piling", kjer odstranjuje odmrle kožne celice iz zunanjega sloja kože imenovanega epidermis, z mehanizmom raztapljanja vezi med odmrliimi kožnimi celicami. Posledično se zmanjša videz drobnih gub in izboljša sijaj kože. GA spodbuja tudi sintezo kolagena v dermisu, zaradi česa se izboljša elastičnost kože. GA hkrati v koži zadržuje vodo, saj veže njene molekule. Podobno kot vitamin C, GA zmanjšuje hiperpigmentacijo z mehanizmom zaviranja delovanja encima tirozinaze, kar vodi v manjšo sintezo melanina in bolj enakomerno polt (Sharad, 2013).

6 NIACINAMID

Niacinamid, amid vitamina B₃, je molekula s kemijsko formulo $C_6H_6N_2O$ (Slika 8). Niacinamid najdemo tako v rastlinah kot živalih, ljudje pa ga pridobimo s hrano (Wohlrab, 2014). V organizmu deluje kot prekurzor za pomembne kofaktorje, kot sta nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) in nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP) (Bissett, 2005).



Slika 8: Kemijska struktura niacinamida (NCBI, 2023f)

Niacinamid v koži deluje na različne načine, kot so: protivnetno, protimikrobno, protipruritično, proti hiperpigmentaciji in proti znakom foto-staranja. Protivnetno deluje preko inhibicije polimeraze, ki regulira eno izmed glavnih vnetnih poti NF- κ B, ter posledično vpliva na izražanje pro-vnetnih citokinov. Protipruritično deluje zaradi vloge pri zagotavljanju kožne bariere, kjer niacinamid aktivira transferazo ključno v biosintezi ceramidov in keratinocitov. Dokazano protimikrobno niacinamid deluje proti bakteriji *Mycobacterium tuberculosis* in virusu HIV, zadnje raziskave pa nakazujejo tudi na fungicidno delovanje. Na enak način kot vitamin C in GA, tudi niacinamid zmanjšuje hiperpigmentacijo preko inhibicije tirozinaze odgovorne za sintezo melanina (Wohlrab, 2014).

7 PEPTIDI

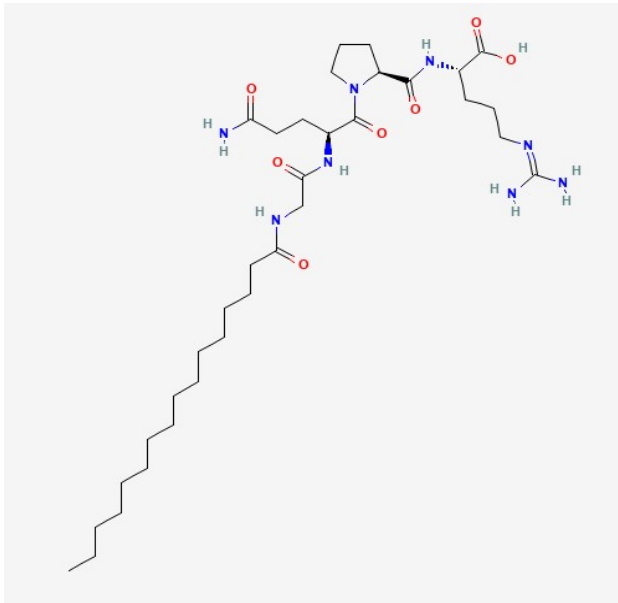
Peptidi so kratkoverižne aminokisljine, ki igrajo ključno signalno in regulatorno vlogo v večini fizioloških procesov (Pai in sod., 2017). Peptidi so v koži vključeni v modulacijo celične proliferacije, celične migracije, vnetja, melanogeneze in sinteze proteinov v koži (Fields in sod., 2009).

Peptidi, kot aktivne učinkovine v kozmetiki, predstavljajo posebno področje, saj jih lahko enostavno spreminjamo z zamenjavo in modifikacijo aminokisljin, zato je nadzorovanje njihove moči, topnosti, toksičnosti in formulacije, bistveno lažje, kot za ostale učinkovine. Bioaktivni peptidi predstavljajo širok nabor učinkovin in tehnološko priložnost za prilagajanje kozmetiki specifičnim potrebam kože (Fields in sod., 2009).

Veliko proteinov in peptidov v koži najdemo kot del ECM. Takšni proteini so: kolagen, laminin, fibronektin, elastin in različni proteoglikani. Ob staranju pride v senescentnih fibroblastih, ki tudi počasneje proliferirajo, do sinteze manj kolagena in povečanja proteolitične aktivnosti letga. Pri tem pojavu lahko pomagajo peptidi pridobljeni po vzoru signalnih zaporedij za sintezo kolagena, kot sta palmitoil pentapeptid-3 in palmitoil oligopeptid. Palmitoil pentapeptid-3 izvira iz pro-kolagena in stimulira sintezo kolagena in fibronektina. Palmitoil oligopeptid temelji na zaporedju elastina in stimulira rast fibroblastov (Fields in sod., 2009).

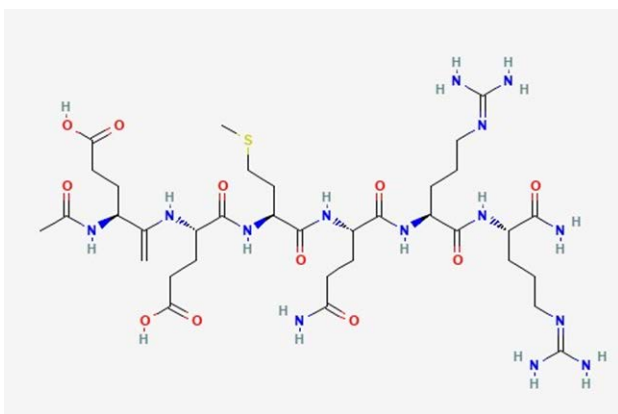
Palmitoil tetrapeptid-7 je peptid, ki ga uvrščamo med rigine (Slika 9). Rigini so peptidi, ki izvirajo iz molekule imenovane dehidroepiandrosteron (DHEA), ki ga v našem telesu izloča nadledvična žleza. DHEA sodeluje pri upočasnjevanju staranja, celjenju ran in zmanjšanju

vnetja. Palmitoil tetrapeptid-7 deluje podobno kot DHEA in zavira citokin IL-6 ter s tem manjša vnetje v koži, kar se kaže v večji čvrstosti, elastičnosti in gladkosti kože (Fields in sod., 2009).



Slika 9: Kemijska strukturi palmitoil tetrapeptid-7 (NCBI, 2023g)

Raziskane so tudi možnosti uporabe peptidov, ki bi nadomeščali butulin nevrotoksin, s komercialnim imenom botoks. Ta deluje na način paraliziranja mišic preko blokiranja acetilholina. Nadomestek botoksa predstavljajo peptidi, ki posnemajo aminokislinsko zaporedje sinaptičnega proteina SNAP-25, saj ta deluje kot zaviralec nevrosekrecije že pri mikromolarnih koncentracijah. Primer takšnega peptida je acetil heksapeptid-3 (Slika 10) (Fields in sod., 2009).



Slika 10: Kemijska struktura acetil heksapeptida-3 (NCBI, 2023h)

Peptidi v koži sodelujejo tudi v imunskem odzivu, kjer modulirajo vnetje, vežejo toksine in nevtralizirajo patogene. Mnoge kožne bolezni, kot so akne, kjer pride do vnetja, so posledice endotoksinov, kot sta lipopolisaharid (LPS) iz Gram negativnih bakterij in lipotehojična kislina (LTA) iz Gram pozitivnih bakterij. Peptidi sodelujejo pri zmanjšanju vnetnega odziva, saj nevtralizirajo bakterijske ostanke s temi endotoksini, in na ta način zmanjšajo sintezo

9 ZAKLJUČEK

Koža predstavlja naš prvi stik z okoljem in sodeluje v mnogih pomembnih vidikih našega življenja, vse od imunskega sistema pa do socialnega statusa posameznika. Še posebej veliko pozornosti posvečamo videzu kože obraza, za nego katere najdemo na trgu ogromno izdelkov z najrazličnejšimi kemičnimi spojinami, ki obljublajo preobrazbene učinke. Za kar se da optimalno izbiro in uporabo izdelkov za nego kože, je nujno razumevanje delovanja ključnih učinkovin. Z namenom ozaveščanja in širjenja znanja med splošno publiko, smo v prispevku opisali molekularne osnove delovanja 7 skupin kemičnih snovi.

Hialuronska kislina je učinkovina, ki je tudi naravno prisotna v naši koži. V kozmetiki pripomore k ohranjanju strukture kolagena in elastina, hkrati pa z vezavo vode kožo tudi navlaži. Retinol, eden izmed predstavnikov derivatov vitamina A, v koži spodbuja celično diferenciacijo in proliferacijo, sintezo kolagena in elastina ter k izboljšanju zdravja kože pripomore s svojimi protivnetnimi in antioksidativnimi lastnostmi. Vitamin C je močan antioksidant, hkrati pa zmanjšuje hiperpigmentacijo in spodbuja sintezo kolagena. V izdelkih za nego kože predstavlja velik problem njegova nestabilnost.

Hidroksi kisline, ki jih delimo na α - in β -hidroksi kisline, se uporabljajo predvsem v namene odstranjevanja odmrlih kožnih celic in obnove kože. Niacinamid ima na zdravje in videz kože več vplivov. Ima protivnetne, protimikrobne, protipruritične lastnosti, lastnosti proti hiperpigmentaciji in znakom foto-staranja. Peptidi na kožo vplivajo kot ključni modulatorji signalnih poti za izboljšanje elastičnosti in zmanjšanje vnetja kože, obetavna pa je njihova uporaba v namene personalizirane kozmetike. Ceramidi so ključni za barierno funkcijo kože in pripomorejo k obnavljanju epidermisa.

Pri izbiri izdelkov za nego kože moramo torej premišljeno upoštevati potrebe naše kože ter razumeti, kako posamezne sestavine vplivajo na njeno zdravje in videz. Le tako lahko dosežemo optimalne rezultate in prispevamo k dolgoročnemu zdravju ter lepoti naše kože, ki je v interesu mnogim izmed nas.

10 VIRI

- Arif T. 2015. Salicylic acid as a peeling agent: a comprehensive review. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 8, 455–461, <https://doi.org/10.2147/CCID.S84765>
- Bissett D. L., Oblong J. E., Berge C. A. 2005. Niacinamide: A B vitamin that improves aging facial skin appearance. *Dermatologic Surgery*, 31, 860–865, <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31732>
- Bukhari S. N. A., Roswandi N. L., Waqas M., Habib H., Hussain F., Khan S., Sohail M., Ramli N. A., Thu H. E., Hussain Z. 2018. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1682–1695, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.18>

- Chong B. F., Blank L. M., Mclaughlin R., Nielsen L. K. 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 66, 341–351, <https://doi.org/10.1007/s00253004-1774-4>
- Farwick M., Lersch P., Strutz G. 2008. Low molecular weight hyaluronic acid: its effects on epidermal gene expression & skin ageing, 134–137.
- Fields K., Falla T. J., Rodan K., Bush L. 2009. Bioactive peptides: signaling the future. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 8, 1, 8–13, <https://doi.org/10.1111/j.14732165.2009.00416.x>
- Jang H. J., Yoon S. H., Ryu H. K., Kim J. H., Wang C. L., Kim J. Y., Oh D. K., Kim S. W. 2011. Retinoid production using metabolically engineered *Escherichia coli* with two-phase culture system. *Microbial Cell Factories*, 10, 59, <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-59>
- Keen M. A. 2017. Hyaluronic acid in dermatology. *Skinmed*, 15, 6, 441–448, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5749699/>
- Kornhauser A., Coelho S. G., Hearing V. J. 2010. Applications of hydroxy acids: classification, mechanisms, and photoactivity. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 3, 135–142, <https://doi.org/10.2147/CCID.S9042>
- Kornhauser A., Wei R. R., Yamaguchi Y., Coelho S. G., Kaidbey K., Barton C., Takahashi K., Beer J. Z., Miller S. A., Hearing V. J. 2009. The effects of topically applied glycolic acid and salicylic acid on ultraviolet radiation-induced erythema, DNA damage and sunburn cell formation in human skin. *Journal of Dermatological Science*, 55, 1, 10–17, <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.03.015>
- Li J., Qiao M., Ji Y., Lin L., Zhang X., Linhardt R. J. 2020. Chemical, enzymatic and biological synthesis of hyaluronic acids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 199–206, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.2
- Meckfessel M. H., Brandt S. 2014. The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71, 1, 177–184, <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.01.891>
- National Center for Biotechnology Information. 2023a. PubChem Compound Summary for CID 445354, Retinol, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Retinol> (8. avg. 2023)
- National Center for Biotechnology Information. 2023b. PubChem Compound Summary for CID 444795, Tretinoin, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tretinoin> (8. avg. 2023)
- National Center for Biotechnology Information. 2023c. PubChem Compound Summary for CID 54670067, Ascorbic Acid, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ascorbic-Acid> (8. avg. 2023)
- National Center for Biotechnology Information. 2023d. PubChem Compound Summary for CID 757, Glycolic Acid, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glycolic-Acid> (8. avg. 2023)
- National Center for Biotechnology Information. 2023e. PubChem Compound Summary for CID 338, Salicylic Acid, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Salicylic-Acid> (8. avg. 2023)
- National Center for Biotechnology Information. 2023f. PubChem Compound Summary for CID 936, Nicotinamide, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nicotinamide> (8. avg. 2023)

- National Center for Biotechnology Information. 2023g. PubChem Compound Summary for CID 10078408, Palmitoyl tetrapeptide-7, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Palmitoyl-tetrapeptide-7> (8. avg. 2023)
- National Center for Biotechnology Information. 2023h. PubChem Compound Summary for CID 71587772, Acetyl hexapeptide-3, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetyl-hexapeptide-3> (8. avg. 2023)
- National Center for Biotechnology Information. 2023i. PubChem Compound Summary for CID 121494113, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/121494113> (8. avg. 2023)
- National Center for Biotechnology Information. 2023j. PubChem Compound Summary for CID 5497136, N-acetylsphingosine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-acetylsphingosine> (8. avg. 2023)
- Pai V. V., Bhandari P., Shukla P. 2017. Topical peptides as cosmeceuticals. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 83, 1, 9–18, <https://doi.org/10.4103/03786323.186500>
- Pavicic T., Gauglitz G. G., Lersch P., Schwach-Abdellaoui K., Malle B., Korting H. C., Farwick M. 2011. Efficacy of cream-based novel formulations of hyaluronic acid of different molecular weights in anti-wrinkle treatment. *Journal of Drugs in Dermatology*, 10, 9, 990–1000.
- Rainer B. M., Kang S., Chien A. L. 2017. Rosacea: Epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Dermatoendocrinology*, 9, 1, <https://doi.org/10.1080/19381980.2017.1361574>
- Riahi R. R., Bush A. E., Cohen P. R. 2016. Topical retinoids: Therapeutic mechanisms in the treatment of photodamaged skin. *American Journal of Clinical Dermatology*, 17, 3, 265–276, <https://doi.org/10.1007/s40257-016-0185-5>
- Ribeiro C. L. Santos J. G. M., Souza J. R., Paterno L. G. 2019. Highly sensitive determination of salicylic acid in skin care product by means of carbon nanotube/iron oxide nanoparticle voltammetric sensors. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 23, 783–793, <https://doi.org/10.1007/s10008-018-4095-4>
- Rodan K., Fields K., Majewski G., Falla T. 2016. Skincare Bootcamp: The Evolving Role of Skincare. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open*, 4, 12, <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000001152>
- Saranraj, P., Naidu, M. A. 2013. Hyaluronic Acid Production and its Applications – A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 4, 5, 853–859.
- Shao Y., He T., Fisher G. J., Voorhees J. J., Quan T. 2017. Molecular basis of retinol anti-aging properties in naturally aged human skin in vivo. *International Journal of Cosmetics Science*, 39, 1, 56–65, <https://doi.org/10.1111/ics.12348>
- Sharad J. 2013. Glycolic acid peel therapy – a current review. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 6, 281–288, <https://doi.org/10.2147/CCID.S34029>
- Sudha P. N., Rose M. H. 2014. Beneficial effects of hyaluronic acid. In N. Prasad (Ed.), *Review of Advances in Food and Nutrition Research*, 72, 137–176, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800269-8.00009-9>
- Telang P. S. 2013. Vitamin C in dermatology. *Indian Dermatology Online Journal*, 4, 2, 143–146. doi:10.4103/2229-5178.110593

Wohlrab J., Kreft D. 2014. Niacinamide - mechanisms of action and its topical use in dermatology. *Skin Pharmacology and Physiology*, 27, 6, 311–315, <https://doi.org/10.1159/000359974>

Zhang S., Duan E. 2018. Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell Transplantation*, 27, 5, 729–738, <https://doi.org/10.1177/0963689717725755>

RASTLINSKA SINTEZA AMIDIRANIH PROTIMIKROBNIH PEPTIDOV Z AKTIVNIM DELOVANJEM PROTI PATOGENOM 'ESKAPE' IN *E. coli*

Julija Vodenik

IZVLEČEK

Odpornost patogenov na antibiotike se pojavlja že od samega odkritja antibiotikov, vendar pa se je v zadnjih letih oziroma desetletjih zaradi prekomerne rabe teh sredstev, problematika odpornosti še povečala. Protimikrobni peptidi (AMP) so ena izmed obetavnih strategij v boju proti mikrobni odpornosti na antibiotike, saj uspešno uničijo bakterijske celice prek sprožitve različnih mehanizmov, ter delujejo hitreje kot klasični antibiotiki. AMP je mogoče proizvajati v bakterijskih in kvasnih celicah, vendar je uporaba rastlin kot proizvodnih sistemov varnejša in z vidika proizvodnje enostavnejša.

Ključne besede: Amidirani protimikrobni peptidi (AMP), rastlinski proizvodni sistemi, patogeni ESKAPE

Plant synthesis of amidated antimicrobial peptides with active activity against 'ESKAPE' pathogens and *E. coli*

ABSTRACT

Pathogen resistance to antibiotics has been around since the discovery of antibiotics, but in recent years or decades, the problem of resistance has increased due to the overuse of antibiotics. Antimicrobial peptides (AMPs) are one of the promising strategies to combat microbial resistance to antibiotics, as they successfully kill bacterial cells through the triggering of different mechanisms and act faster than conventional antibiotics. AMPs can be produced in bacterial and yeast cells, but using plants as production systems is safer and simpler from a production point of view.

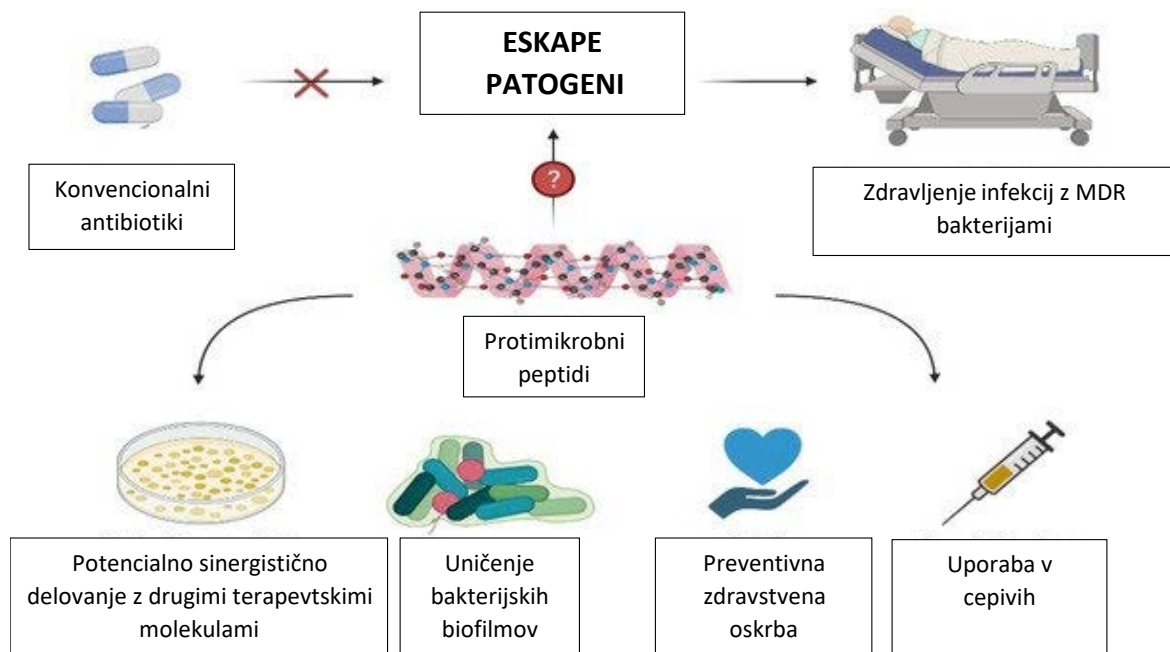
Key words: Amidated antimicrobial peptides (AMP), plant production systems, ESKAPE pathogens

1 UVOD

Zaradi obsežne uporabe antibiotikov v zadnjih desetletjih se razvija vse več na antibiotike odpornih mikroorganizmov. Poleg tega uporaba antibiotikov proti živalskim patogenom v živinoreji in ribogojništvu prispeva k sproščanju antibiotikov v okolje in s tem spodbuja selekcijo odpornih mikrobov. V humani medicini lahko odpornost proti pogosto uporabljenim antibiotikom, še posebej pa hkratna odpornost proti večjemu številu antibiotikov (MDR), v bližnji prihodnosti pripelje do nezmožnosti učinkovitega zdravljenja okužb (Zeitler in sod., 2013).

Bolnišnične okužbe pogosto povzročajo multirezistentni sevi, ki spadajo v tako imenovano skupino ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Enterobacter* species. Zmožnost teh

bakterij, da tvorijo biofilme, oziroma skupke bakterij v matriksu ekstracelularnih substanc, ki jih proizvedejo same, dodatno otežuje zdravljenje. Bakterije, ki se nahajajo v biofilmih, so namreč od 10 do 1000-krat bolj tolerantne za običajne antibiotike kot bakterije, ki biofilmov ne tvorijo (De Brij in sod., 2018).



Slika 1: Protimikrobni peptidi (AMP) in njihova uporaba v zdravljenju (prirejeno po Rima in sod., 2021)

Z naraščanjem problema mikrobne antibiotične rezistence številnih človeških patogenov, postajajo zanimiva alternativa antibiotikom protimikrobni peptidi (AMP) in peptidi za obrambo gostitelja (HDP), oboji pa so obetavni tudi za klinično uporabo (slika 1) (Chaudhary in sod., 2023).

2 LASTNOSTI PROTIMIKROBNIH PEPTIDOV (AMP)

AMP so evolucijsko ohranjene komponente prirojenega imunskega sistema večine živih organizmov. V osnovnem zaporedju se zelo razlikujejo, vendar imajo nekatere pomembne skupne značilnosti, kot so (Bundó in sod., 2014):

- hidrofoben značaj - posledica velikega števila hidrofobnih ostankov,
- pretežno kationski značaj - posledica velikega števila bazičnih aminokislinskih ostankov in
- amfipatska struktura.

Učinkujejo kot naravni antibiotiki, s hitrim, močnim in dolgotrajnim delovanjem proti širokemu spektru patogenov, njihova tarča pa so številnim mikrobov skupne, oziroma evolucijsko ohranjene lastnosti mikrobnih celičnih membran (Bundó in sod., 2014).

Razvili so se kot del imunskega sistema številnih vrst in uničujejo bakterijske celice (vključno z rezistentnimi sevi) z interakcijo z njihovimi membranami, čemur sledijo različni mehanizmi, kot so poškodba membrane, inhibicija sinteze celične stene in inhibicija znotrajceličnih procesov, vključno s sintezo makromolekul. Delujejo hitreje kot klasični antibiotiki in omejujejo razvoj odpornosti na zdravila, delujejo pa tudi proti bakterijskim biofilmom. Poleg tega AMP izkazuje različne imunomodulatorne učinke (Chaudhary in sod., 2023).

AMP najdemo pri različnih taksonomskih skupinah kot so vretenčarji, žuželke, glive in rastline. V preteklosti so jih izolirali in eksperimentalno preizkusili na tisoče, še več pa jih je mogoče odkriti z uporabo algoritmov za pregledovanje genomskih podatkovnih baz. Čeprav se je pri bakterijah izkazalo, da se določena odpornost razvije tudi proti AMP, naj bi bil pojav odpornosti zaradi številnih in raznolikih protimikrobnih učinkov ter nizke afinitete tarčnih mest, značilnih za AMP, otežen (Ghidey in sod., 2020).

Z okoljskega vidika AMP v odpadnih vodah niso prisotni dolgotrajno in imajo tudi s tega vidika manj možnosti da izzovejo odpornost mikrobov. Nasprotno lahko že nizke koncentracije antibiotikov v istem okolju povzročijo odpornost mikrobnih skupnosti tako v tleh, kot v vodi. Čeprav AMP ne morejo v celoti nadomestiti antibiotikov, bi se lahko uveljavili kot alternativa za nekatere aplikacije, če bi optimizirali njihovo proizvodnjo tako, da bi ta potekala z ustrežno nizkimi stroški. Čeprav so AMP v preteklosti že uporabili v klinični praksi, imajo prav poseben potencial za uporabo v velikem merilu. Med drugim bi jih lahko uporabili v živilski industriji kot konzervanse, razkužila ali dodatek h krmi živine ali perutnine. Vendar bi bilo za ta namen potrebno razviti postopke, ki bi omogočili prenos v večje količine, ter enostavno sintezo in čiščenje (Ghidey in sod., 2020).

3 RAZVOJ PEPTIDNIH ZDRAVIL

Ameriška zvezna Uprava za zdravila (FDA) je odobrila že več peptidnih zdravil, eno izmed njih je fuzeon, zaviralec fuzije virusa HIV (human immunodeficiency virus). Odobritev uporabe peptidov je odprla možnost za zdravljenje bolezni s pomočjo večplastnih sistemov na osnovi peptidov in njihovo komercialno uporabo. A sintetična proizvodnja AMP je še posebej zahtevna in draga, kar omejuje njihovo uporabo v klinični praksi. Proizvodnja AMP temelji na sintezi peptidov v trdni fazi (SPPS), ter stane od 100 do 600 ameriških dolarjev (USD) na gram. Vendar je mogoče z optimizacijo sinteze v velikih količinah doseči zadostno učinkovitost, posledica le te pa je znižanje stroškov. Kot primer, v neki študiji so rastno gojišče za *E. coli* optimizirali s poldefiniranim bogatim gojiščem NAB, kar je omogočilo prej nedosegljivo povečanje celične biomase in zmogljivosti proizvodnje AMP. V drugi študiji so za heterologno proizvodnjo rekombinantnih AMP v bioreaktorjih uporabili gensko spremenjene kvasovke (*Pichia pastoris*), pri čemer so pridobili 1 g AMP z minimalnimi stroški 1 USD (Chaudhary in sod., 2023).

Dodaten problem pri SPPS so: omejitev dolžine peptida, ki ne sme presegati 50 aminokislin, prisotnost hidrofobnih peptidov, ki v topilih, uporabljenih pri sintezi AMP tvorijo agregate, ter

potreba po uporabi nevarnih kemikalij in topil med postopki sinteze in čiščenja peptidov (Chaudhary in sod., 2023).

Čeprav je možno AMP sintetizirati v bakterijskih in kvasnih celicah, velja, da je pri proizvodnji kompleksnih bioloških zdravil uporaba rastlin varnejša, zahteva manj infrastrukture in omogoča hitro povečanje proizvodnje. Ocenjuje se, da je proizvodnja beljakovin v rastlinah 10- do 50-krat cenejša od proizvodnje tekom fermentacije v *E. coli*. Poleg tega AMP, pridobljeni iz rastlin, izkazujejo močno učinkovitost oziroma smrtonosno aktivnost proti šestim zelo virulentnim in na antibiotike odpornim patogenom ESKAPE (Chaudhary in sod., 2023).

Pri proizvodnji peptidov z rastlinami pa se je pokazal nov problem, pojav proteolize z rastlinskimi proteazami, zaradi katere je omenjena proizvodnja težavna. Da bi se temu izognili, so uporabili različne strategije, na primer znižanje ravni izražanja genov, ki kodirajo rastlinske proteaze, ter omejevanje proizvodnje AMP na določen organel. Poleg tega so ugotovili, da vključitev D-aminokislin v peptidno os ovira proteolitično razgradnjo AMP s proteazami, kar bi lahko bila ena izmed rešitev tega problema. Kljub temu so pridelki v rastlinah proizvedenih peptidov na splošno nizki (Chaudhary in sod., 2023).

Klinično uporabo AMP ovirajo tudi nekatere druge lastnosti teh peptidov, slabo namreč prenašajo kislo pH okolje, poleg tega so slabo stabilni v serumu, kar ustvarja neugoden farmakokinetični profil, proteaze pa jih zlahka cepijo. Da bi se izognili tem pomanjkljivostim in dosegli enake klinične rezultate kot jih dosegajo običajni antibiotiki, je torej potrebno izboljšati farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti AMP (Chaudhary in sod., 2023).

Za izboljšanje samih farmakokinetičnih lastnosti AMP so se razvile različne strategije (Lico in sod., 2012):

- modifikacija aminokislin na koncu peptida, npr. acetilacija N-konca ali amidacija C-konca,
- cirkularizacija ali modifikacija peptidnih vezi, kar izboljša biološko dostopnost in selektivnost in
- konjugacija s polietilen glikolom (PEG) za zmanjšanje ledvičnega in jetrnega očistka ali enkapsulacija v liposome ali podobne nanodelce na osnovi polimlečne ali polimlečno-glikolne kisline, kar izboljša ciljno specifičnost in nadzorovano sproščanje.

Amidacija je posttranslacijska modifikacija, ki pogosto sledi sintezi peptidnih hormonov z glicinskim ostankom, da se v celoti razvije njihova biološka aktivnost *in vivo*. Amidacija AMP naj bi izboljšala njihovo elektrostatično vezavo na negativno nabito bakterijsko membrano, izboljšala učinkovitost in preprečila njihovo encimsko razgradnjo. Proces amidacije je še posebej pomemben pri krajših peptidih (< ~ 15 aminokislin) (Chaudhary in sod., 2023).

4 RASTLINSKA SINTEZA PROTIMIKROBNIH PEPTIDOV IN NJIHOVA UČINKOVITOST

V raziskavi, ki so jo izvedli Chaudhary in sodelavci (2023), so poručevali proizvodnjo AMP z rastlinami. Dosegli so učinkovito sintezo bioaktivnih amidiranih AMP v rastlinski liniji *Nicotiana benthamiana*, ki sintetizira sesalski encim PAM, ter prehodno izraža AMP z glicinskimi podaljški. Encime PAM so uporabili za uvedbo poti C-terminalne amidacije sesalcev v rastline *N. benthamiana*. Za prehodno proizvodnjo AMP so izbrali aminokislinska zaporedja treh sintetičnih HDP, ki so pokazali močne protimikrobne, antibiofilmske in imunomodulatorne profile delovanja proti patogenom, odpornim na zdravila, *in vitro* in *in vivo* (Chaudhary in sod., 2023).

V raziskavo so vključili rastline *N. benthamiana*, ki izražajo podganje encime PAM1, saj se kationski AMP v transgenih rastlinah PAM kopičijo v znatnih količinah v primerjavi z netransgenimi rastlinami. Te rastline so stabilno integrirale podganji PAM1 in niso kazale očitnih morfoloških napak, bile so fenotipsko normalne in so ohranile sposobnost proizvodnje PAM1 vsaj do generacije T4, čeprav so iz neznanega razloga proizvedle veliko manj semen. Vendar pa naj ta učinek na reproduktivni sistem ne bi predstavljal večje omejitve za nadaljnjo biotehnološko uporabo (Chaudhary in sod., 2023).

Kot rezultat raziskave so prikazali uspešno proizvodnjo tako neamidiranih Gly-prekurzorjev za AMP-je, kot tudi končnih encimsko (PAM) procesiranih, amidiranih AMP produktov. Poleg tega so dosegli raven proizvodnje 1,4 mg peptida na 20 g infiltrirane listne biomase. Kot standard za primerjavo so navedli podatek, da 1 L dobro aerirajoče *E. coli* daje 10-100 mg AMP. Čeprav obojega ni mogoče enostavno primerjati, menijo, da količina peptida, o kateri poročajo v študiji, lahko predstavlja enakovreden donos kot kultura *E. coli* (Chaudhary in sod., 2023).

Aktivnost pridobljenih peptidov rastlinskega izvora so ocenili s pomočjo primerjave z aktivnostjo sintetično proizvedenih peptidov proti skupini MDR patogenov, ki spadajo v skupino ESKAPE. Prečiščeni peptidi so bili biološko aktivni proti različnim ESKAPE patogenom in so pokazali samo nizko toksičnost za celice sesalcev. Vsi trije rastlinsko prečiščeni AMP so zavirali rast patogenov ESKAPE v koncentracijah med 6,25 µg/ml in 50 µg/ml. Ekstrakti, pridobljeni iz divjega tipa *N. benthamiana*, niso inhibirali rasti patogenov ESKAPE (Chaudhary in sod., 2023).

Pomembno je odkritje, da je prečiščeni AMP1 nekoliko učinkovit proti *E. coli* PI-7 (50 µg/mL), rezistentnemu sevu drugega varnostnega razreda, na katerega dokazano učinkuje le antibiotik kolistin. Poleg tega so bili pridobljeni rastlinsko prečiščeni peptidi zelo učinkoviti proti patogenemu sevu drugega varnostnega razreda MRSA (USA300), med drugim pri preprečevanju tvorbe biofilma, kar se sklada s predhodno pridobljenimi rezultati sintetično proizvedenih AMP (Chaudhary in sod., 2023).

Na splošno ti rezultati poudarjajo izjemno prilagodljivost rastlinskih sistemov za potencialno obsežno proizvodnjo amidiranih AMP. Raziskava je dober primer optimizacije načina

pridobivanja AMP, ki so zelo pomembni v boju proti rezistenčnim patogenom, njeni rezultati pa imajo veliko uporabno vrednost v nadaljnjih raziskavah (Chaudhary in sod., 2023).

V raziskavi, ki jo je izvedel Patiño-Rodríguez s sodelavci, so uporabili prehodni ekspresijski sistem za izražanje AMP širokega spektra protegrin-1 (PG-1) v tobaku *Nicotiana tabacum*. PG-1 je protimikrobni peptid, ki deluje prek drugačnih mehanizmov kot obstoječi antibiotiki in kot tak predstavlja potencialno rešitev problema odpornosti proti antibiotikom. Vendar je glavna težava pri proizvodnji PG-1 v velikem obsegu visoka cena. Kemična sinteza protegrina je namreč zapletena, saj je za biološko aktivnost potrebna formacija dveh disulfidnih mostičkov. Na splošno pa kemična sinteza zapletenih sekundarnih struktur, kot so AMP sesalskega izvora, zahteva več kemijskih modifikacij (Patiño-Rodríguez in sod., 2013).

Prehodna transformacija, ki jo posreduje virusna transfekcija, ima veliko prednosti pred drugimi ekspresijskimi sistemi, kot so hitra proizvodnja heterolognih proteinov, višje ravni ekspresije, cenovno ugodna proizvodnja, vsestranskost in biološka varnost (Patiño-Rodríguez in sod., 2013).

Ekspresijski sistem, ki so ga uporabili v raziskavi, temelji na dekonstruiranem virusu tobačnega mozaika in združuje prednosti treh bioloških sistemov, vključno z vnosom tuje DNA s pomočjo *Agrobacterium tumefaciens*, hitro replikacijo in visoko stopnjo izražanja rastlinskega virusa, ustreznimi posttranslacijskimi modifikacijami ter cenovno ugodno skalabilnostjo in enostavno povečanje rastlinskega sistema. Čeprav se *Nicotiana tabacum* uporablja za proizvodnjo številnih rekombinantnih proteinov, prisotnost visokih koncentracij alkaloidov povečuje stroške proizvodnje zaradi potrebe po čiščenju pridobljenih proteinov. Zato se za proizvodnjo rekombinantnih proteinov priporoča uporaba tobaka z nizko vsebnostjo alkaloidov (Patiño-Rodríguez in sod., 2013) ali transgenega tobaka brez alkaloidov.

Ena izmed prednosti prehodne transformacije, uporabljene v tej raziskavi je, da omogoča pridobitev rekombinantnega proteina v kratkem času - manj kot en mesec. Ta učinkovitost proizvodnje je zelo zaželena in še posebej izrazita v primerjavi z drugimi sistemi transformacije rastlin, kot je transformacija kloroplasta, ki zahteva vsaj tri kroge selekcije, kar traja več kot dva meseca, in stabilna jedrna transformacija, ki zahteva več mesecev (Patiño-Rodríguez in sod., 2013).

Ustrezna sinteza in prisotnost rekombinantnih beljakovin v rastlinskih tkivih sta zelo pomembni, da lahko rastline uporabimo kot bioreaktorje za proizvodnjo terapevtskih beljakovin. Tekom raziskave so zaznali tako transkripte GFP (reporterski gen), kot tudi transkripte PG-1, kar je dokazovalo, da je sestavljanje različnih pro-vektorjev in izrez intronov potekalo pravilno, da je nastal aktiven virusni replikon (Patiño-Rodríguez in sod., 2013).

Protimikrobni testi beljakovinskih ekstraktov pridobljenih iz transformiranih rastlin tobaka *N. tabacum* so pokazali aktivnost peptida PG-1 v rastlinskih tkivih, ki je rezultirala v bakterijski inhibiciji: 53,2 % *Klebsiella pneumoniae*, 70,2 % *Staphylococcus aureus* in 56,6 % *Escherichia coli*. Ekstrakti rastlin divjega tipa *N. tabacum* kot pričakovano niso povzročili inhibicije nobenega od bakterijskih patogenov (Patiño-Rodríguez in sod., 2013).

Ugotovitve te raziskave so zelo obetavne in predstavljajo alternativo za učinkovito ter hitro proizvodnjo protimikrobnih terapevtskih proteinov z aktivnim delovanjem proti različnim patogenim povzročiteljem nalezljivih bolezni (Patiño-Rodríguez in sod., 2013).

5 ZAKLJUČEK

AMP imajo velik potencial pri razvoju inovativnih pristopov zdravljenja v klinični biotehnologiji. Potreba po hitrih in cenovno ugodnih sistemih za proizvodnjo velikih količin rekombinantnih proteinov spodbuja raziskave na področju rastlinskega molekularnega kmetijstva. V zadnjih desetletjih so uspešno obravnavali izzive, kot so trajanje ciklusa proizvodnje, "pobeg" transgena in splošna varnost. Težave, povezane z nizkimi pridelki in časom, povezanim s stabilnim izražanjem, so rešili z razvojem prehodnih ekspresijskih sistemov. Danes je za doseganje velikih pridelkov, zelene funkcionalnosti, varnosti in kakovosti izdelkov ključna pravilna izbira ekspresijske strategije, vektorja in tehnik ekstrakcije oziroma čiščenja (Shanmugaraj in sod., 2021).

Rastlinski ekspresijski sistemi veljajo za zelo obetavne zaradi prednosti pred drugimi biološkimi sistemi, saj imajo rastline vgrajene primerne mehanizme posttranslacijskih modifikacij, ne predstavljajo tveganja okužbe z virusi in patogeni sesalcev, proizvodnja v velikem obsegu pa lahko poteka z znatno nižjimi stroški. Poleg tega so za uporabo v rastlinskih sistemih na voljo učinkovite metode transformacije in preproste tehnike nadaljnje obdelave ter optimizirane tehnologije pridelave (Holásková in sod., 2018).

Integracija obstoječega znanja o rastlinski biotehnologiji, velikega napredka, ki je bil dosežen pri strategijah prehodne ekspresije in glikoinženiringa rastlin, skupaj z zasnovo, razvojem in dostopnostjo AMP, je idealna podlaga za zasnovo novega razreda terapij zdravljenja z AMP rastlinskega izvora, ki kažejo velik potencial (Shanmugaraj in sod., 2021).

Obstoječe znanje o rastlinskih ekspresijskih sistemih odpira pot proizvodnji AMP, ki jih je mogoče proizvesti hitro, z nizkimi stroški in zanemarljivim tveganjem. Rastlinska proizvodnja AMP zaradi svojih prednosti velja za perspektivno orodje za nove aplikacije v medicini in veterini. V postantibiotični dobi pa so AMP ključni za boj proti številnim rezistentnim patogenom (Shanmugaraj in sod., 2021).

6 VIRI

Bundó M., Montesinos L., Izquierdo E., Campo S., Mieulet D., Guiderdoni E., Rossignol M., Badosa E., Montesinos E., San Segundo B., Coca M. 2014. Production of cecropin A antimicrobial peptide in rice seed endosperm. *BMC Plant Biology*, 14, 1: 102, doi: 10.1186/1471-2229-14-102:

Chaudhary S., Ali Z., Tehseen M., Haney E. F., Pantoja-Angles A., Alshehri S., Wang T., Clancy G. J., Ayach M., Hauser C., Hong P.-Y., Hamdan S. M., Hancock R. E. W., Mahfouz M. 2023. Efficient in planta production of amidated antimicrobial peptides that are active against drug-resistant ESKAPE pathogens. *Nature Communications*, 14, 1: 1464, doi: 10.1038/s41467-023-37003-z:

- De Breij A., Riool M., Cordfunke R. A., Malanovic N., De Boer L., Koning R. I., Ravensbergen E., Franken M., Van Der Heijde T., Boekema B. K., Kwakman P. H. S., Kamp N., El Ghalbzouri A., Lohner K., Zaat S. A. J., Drijfhout J. W., Nibbering P. H. 2018. The antimicrobial peptide SAAP-148 combats drug-resistant bacteria and biofilms. *Science Translational Medicine*, 10, 423: eaan4044, doi: 10.1126/scitranslmed.aan4044:
- Ghidey M., Islam S. M. A., Pruett G., Kearney C. M. 2020. Making plants into cost-effective bioreactors for highly active antimicrobial peptides. *New Biotechnology*, 56, 63–70, doi: 10.1016/j.nbt.2019.12.001:
- Holásková E., Galuszka P., Mičúchová A., Šebela M., Öz M. T., Frébort I. 2018. Molecular Farming in Barley: Development of a Novel Production Platform to Produce Human Antimicrobial Peptide LL-37. *Biotechnology Journal*, 1700628, doi: 10.1002/biot.201700628:
- Lico C., Santi L., Twyman R. M., Pezzotti M., Avesani L. 2012. The use of plants for the production of therapeutic human peptides. *Plant Cell Reports*, 31, 3: 439–451, doi: 10.1007/s00299-011-1215-7:
- Patiño-Rodríguez O., Ortega-Berlanga B., Llamas-González Y. Y., Flores-Valdez M. A., Herrera-Díaz A., Montes-de-Oca-Luna R., Korban S. S., Alpuche-Solís Á. G. 2013. Transient expression and characterization of the antimicrobial peptide protegrin-1 in *Nicotiana tabacum* for control of bacterial and fungal mammalian pathogens. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 115, 1: 99–106, doi: 10.1007/s11240-013-0344-9:
- Rima M., Rima M., Fajloun Z., Sabatier J.-M., Bechinger B., Naas T. 2021. Antimicrobial Peptides: A Potent Alternative to Antibiotics. *Antibiotics*, 10, 9: 1095, doi: 10.3390/antibiotics10091095: <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/9/1095>
- Shanmugaraj B., Bulaon C. J. I., Malla A., Phoolcharoen W. 2021. Biotechnological Insights on the Expression and Production of Antimicrobial Peptides in Plants. *Molecules*, 26, 13: 4032, doi: 10.3390/molecules26134032:
- Zeitler B., Bernhard A., Meyer H., Sattler M., Koop H.-U., Lindermayr C. 2013. Production of a de-novo designed antimicrobial peptide in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology*, 81, 3: 259–272, doi: 10.1007/s11103-012-9996-9:

ZMANJŠANJE VSEBNOSTI ALERGOGENOV V HRANI RASTLINSKEGA IZVORA S POMOČJO RNA INTERFERENCE

Ana Plavec

IZVLEČEK

Vse bolj razširjena težava s katero se ljudje soočajo so alergije na določeno hrano. Gre za netoksične neugodne učinke hrane, simptomi pa se razvijejo le pri posameznikih, katerih imunski sistem pretirano reagira ob izpostavljenosti alergogenu. Alergogeni so običajno proteini, ki jih prepoznajo IgE protitelesa in sprožijo alergijsko reakcijo. Posamezniki, ki se soočajo z alergijo na posamezno hrano se morajo le tej preposto izogibati. S pomočjo genskega modificiranja pa se lahko pridobi tudi rastline, ki alergogenov ne vsebujejo oz. je njihova vsebnost zmanjšana in tako predstavljajo varnejšo alternativo tudi za občutljive posameznike. Kot najbolj uporabna metoda za utišanje izražanja genov, ki nosijo zapis za alergogene proteine se kaže RNA interferenca. Ta metoda je bila uspešno uporabljena na paradižniku za utišanje izražanja Lyc e 1 (profilin) in Lyc e 3 (nsLTP – nespecifični proteinski prenašalec lipidov), ki sta dva najpogostejša alergogena v paradižniku. Z utišanjem so povezane tudi določene težave, ki so povezane predvsem z izgubo funkcije utišanih proteinov, vsebnostjo več različnih alergogenov znotraj ena rastlinske vrste in druge težave, ki bi se jih morda lahko rešilo s pomočjo bodočih raziskav.

Ključne besede: transgene rastline, hrana, alergogeni, RNA interferenca, hipoalergen paradižnik, profilin, nespecifičen proteinski prenašalec lipidov

Reduction of allergene content in plant based food using RNA interference

ABSTRACT

Food allergies are widespread problem that many people face with. Food allergy is non-toxic adverse effect of food, therefore only individuals whose immune system overreacts upon exposure to the allergen, face with their symptoms. Allergens are usually proteins that are recognized by IgE antibodies and trigger an allergic reaction. Individuals who have allergy to certain food have to avoid it. Genetic modification of plants offers a possibility to produce hypoallergenic plants that contain reduced quantity of allergens and therefore represent a safer alternative for sensitive individuals with allergies. RNA is the most useful method for silencing the expression of genes encoding allergenic proteins. This method was successfully used in the case of tomato to silence the expression of Lyc e 1 (profilin) and Lyc e 3 (nsLTP – nonspecific lipid transfer protein), that represent two most common allergens in tomato. There are also certain problems associated with silencing, which are mainly related to the loss of function of the silenced proteins, the content of several different allergens within one plant species and other problems that can be solved by future research.

Key words: transgenic plants, food, allergens, RNA interference, hypoallergenic tomato, profilin, nonspecific lipid transfer protein

1 UVOD

Velik del človeške prehrane predstavlja hrana rastlinskega izvora, predvsem sadje in zelenjava, pa tudi nekatere stročnice, žita itd. Za večino ljudi je taka prehrana dobra, saj predstavlja vir mnogih zdravju prijaznih in neobhodnih hranil ter drugih komponent, kot so vitamini, minerali, vlaknine, ... (Vanga in sod., 2018). Za določeno manjšo skupino ljudi pa so nekatere komponente, ki so rastlinskega izvora in se pojavljajo v naši prehrani lahko zdravju škodljive, v skrajnih primerih pa celo smrtno nevarne, zaradi pojava alergijskih reakcij ali celo anafilaktičnega šoka (Burks in sod., 2012).

2 ALERGIJE

Alergija na hrano označuje neželjen pretiran imunski odziv ob stiku z določeno snovjo, ki je sicer za večino ljudi nenevarna (Sicherer in Sampson, 2010). Povzročitelji alergijske reakcije so alergogeni, najpogosteje so to določeni proteini. Pomembno je razlikovati med alergijo in intoleranco na določeno komponento v hrani. Pri alergiji gre za hitro preobčutljivostno reakcijo. Odziv na izpostavitve alergenu nadzira imunski sistem preko specifičnih protiteles: imunoglobulinov razreda E (IgE). Intoleranca pa predstavlja reakcijo, ki ni imunsko posredovana in se običajno razvije po daljšem času od izpostavljenosti kot pri alergiji (Mills in sod., 2003).

Zdravila za alergijo še niso razvita, se pa uporabljajo nekatere terapije, mnoge obetavne terapije pa so še v razvoju. Zaenkrat je še vedno edini najučinkovitejši način, da se občutljivi posamezniki izogonejo alergijski reakciji ta, da se popolnoma izogibajo alergogenom v hrani, ki pri njih izzove alergijsko reakcijo in jo popolnoma umaknejo iz svojega jedilnika (Riascos in sod., 2010).

3 ZMANJŠEVANJE VSEBNOSTI ALERGOGENOV

Pogoste so alergije, ki jih izzove hrana rastlinskega izvora. S pomočjo različnih metod obdelave obstaja možnost spreminjanja fizikalno-kemijskih lastnosti posameznih pridelkov, predvsem preko spreminjanja sekundarne in terciarne zgradbe alergogenih proteinov, kar lahko rezultira tudi v zmanjšani alergogenosti samega pridelka. Izvedenih je bilo več raziskav s katerimi so preverjali vpliv različnih tretmajev na alergogenost posameznega sadja ali zelenjave (Vanga in sod., 2018).

Za zmanjšanje alergogenosti je ključno, da se s pomočjo različnih postopkov alergogeni proteini spremenijo, povsem odstranijo ali pa jim vsaj spremenimo njihova prepoznavna mesta, da jih imunski sistem preko IgE ni več zmožen prepoznati (Mills in sod., 2003).

Uspešnost takih obdelav je odvisna predvsem od stabilnosti alergogenega proteina v različnih pogojih. Uporablja se lahko obdelava pod vplivom visoke temperature, encimska obdelava in nekateri novejši pristopi kot so HPP (angl. *'high-pressure processing'*), obdelava z visokim pritiskom in PEF (angl. *'pulsed electric field'*) obdelava v električnem polju. Posamezna tretiranja niso povsem učinkovita pri zmanjševanju alergogenosti predvsem zaradi stabilnosti ali odpornosti nekaterih alergogenov na stresne pogoje, ki jih s temi tretiranjem ustvarjamo, se pa

lahko uporablja tudi kombinacija več različnih pristopov kar nekoliko poveča uspešnost. Za ireverzibilno spreminjanje strukture je pomembno tudi okolje, predvsem pH, v katerem poteka poteka (Vanga in sod., 2018).

Na alergogenost posameznega pridelka ali izdelka vpliva še veliko drugih dejavnikov, ki se razlikujejo med posameznimi rastlinskimi vrstami. Pri jabolku se vsebnost alergogenov razlikuje med sortami, vpliv pa imajo tudi stresni pogoji, razmere pri katerih se jabolka skladiščijo, polifenol oksidazna aktivnost in vsebnost polifenolnih spojin. Tudi pri kiviju se alergogenost lahko razlikuje glede na sorte in čas pobiranja plodov (Vanga in sod., 2018; Siekierzynska in sod., 2021).

4 SPREMINJANJE IN UTIŠANJE GENOV

Ker imajo prej opisane metode nekaj pomanjkljivosti in pogosto niso povsem učinkovite, se kot alternativna možnost uporablja genski inženiring, s katerim se lahko utiša izražanje nezaželenih genov, ki vodijo do nastanka alergogenih proteinov. Zelo uspešno se lahko zmanjša vsebnost alergogenov z vnosom nasprotnosmiselnega gena za alergogen protein. Najpogosteje uporabljena tehnika za pridobivanje takih rastlin je RNA interferenca, s pomočjo katere so pridobili že več hipoalergogenih rastlinskih vrst, kot so: soja, arašidi, jabolko in paradižnik. V ospredje pa vse bolj prihaja tudi CRISPR/Cas tehnologija za tarčno utišanje genov in zmanjšanja vsebnosti alergogenih proteinov (Moseley, 2001; Riascos in sod., 2010).

4.1 RNA INTERFERENCA

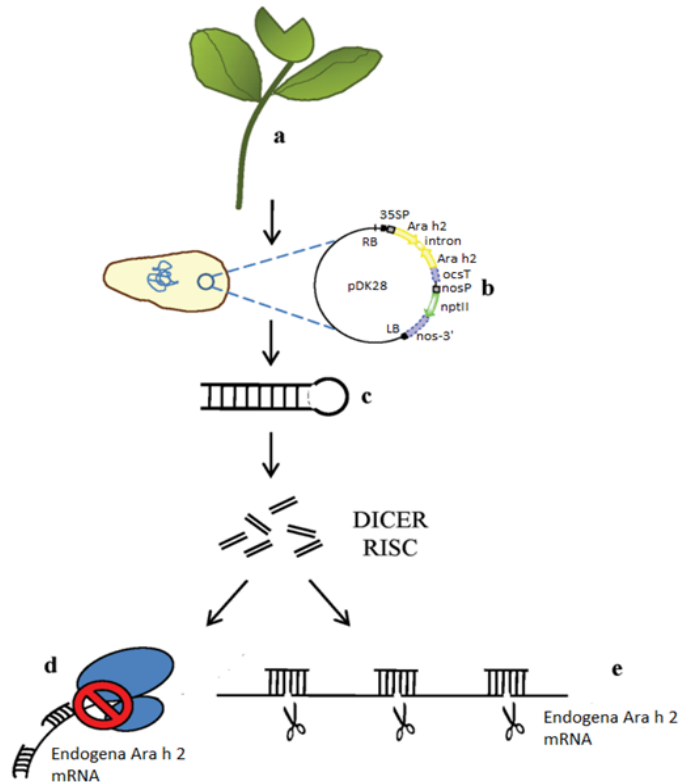
RNA interferenca (RNAi) je sistem, naravno prisoten v več evkariontskih organizmih, tudi v rastlinah in služi kot epigenetski dejavnik za uravnavanje izražanja endogenih genov in posledično zagotavljanje stabilnosti genoma, je pa tudi zaščita pred vstopom tujih (npr. virusnih) nukleotidnih zaporedij (Billmyre in sod., 2013; Kumar in sod., 2022). Ta mehanizem pa je tudi zelo uporaben za pridobivanje transgenih rastlin, predvsem za utišanje izražanja določenih genov (Jin in Guo, 2015).

Utišanje se najpogosteje sproži tako, da se z *Agrobacterium tumefaciens* ali pa drugim vektorskim sistemom, uporabnim za transformacijo rastlin vnese sekvenco, ki zapisuje bodisi invertirano tarčno zaporedje in tvori dvoverižno RNA, umetno miRNA ali pa nasprotnosmiselno zaporedje tarčnega gena (Slika 1) (Jin in Guo, 2015).

Rastlinska celica zazna dvoverižno RNA (ds RNA) s pomočjo encima DICER. DICER in njemu podobni proteini (DCL) so RNAaze, ki prepoznajo dsRNA in jo razrežejo v krajše miRNA ali siRNA (Slika 1) (Kumar in sod., 2022).

Ko se krajše RNA (siRNA ali miRNA) povežejo z Argonaut proteini (AGO) skupaj tvorijo RISC kompleks (angl. 'RNA induced silencing complex'), ki na podlagi komplementarnosti prepozna tarčno mRNA in povzroči njegovo razgradnjo (Slika 1) (Jin in Guo, 2015).

Utišanje izražanja genov z RNA interferenco deluje bodisi preko transkripcijskega utišanja genov (TGS) z metilacijo DNA molekule ali promotorja. Drugi način je posttranskripcijsko utišanje genov (PTGS) preko razreza mRNA molekule ali pa preprečitve translacije mRNA v protein (Slika 1) (Jin in Guo, 2015; Kumar in sod., 2022).



Slika 1: Transformacija z *Agrobacterium tumefaciens* in binarnim vektorskim sistemom hpRNA za posttranskripcijsko utišanje genov PTGS Ara h 2 (Riascos in sod., 2010)

5 PARADIŽNIK

Paradižnik (*Lycopersicon esculentum*) je široko uporabljena zelenjadnica, ki vsebuje veliko snovi, ki imajo pozitiven vpliv na zdravje, zato je razširjena po celem svetu. Vsebuje antioksidante, karatenoide, likopen, vitamine, polifenolne spojine, itd. Vse te snovi imajo pozitivne učinke na zdravje. Ima pa paradižnik visoko vsebnost potencialno alergogenih proteinov, kot sta Lyc e 1 (profilin) in Lyc e 3 (nespecifičen proteinski prenašalec lipidov – nsLTP) (Vanga in sod., 2018).

5.1 ZMANJŠANJE VSEBNOSTI PROFILINA (Lyc e 1)

Profilin je protein, ki ima pomembno funkcijo v vseh evkariontskih celicah, saj ima vlogo v normalnem delovanju citoskeleta in polimerizaciji aktina. Je pogost alergogen prisoten tudi v cvetnem prahu in je zato pogosto vključen tudi v navzkrižne alergijske reakcije. Le in sod. (2006a) so za utišanje profilina v paradižniku (Lyc e 1) uporabili RNA interferenco. Za transformacijo so uporabili paradižnik *Lycopersicon esculentum*, sorto 'MicroToM'. S pomočjo *Agrobacterium tumefaciens* so v kotiledonske izsečke vnesli z intronom ločeno smiselno in

nasprotnosmiselno cDNA zaporedje gena za Lyc e 1 pod konstitutivnim promotorjem cvetačnega mozaika CaMV 35S.

V analize uspešnosti so vključili ekstrakte proteinov iz rdečih plodov paradižnikov. Z njimi so izvedli ELISA test, Western blot analizo (vsebnost proteinov) ter kožni vbodni test SPT (angl. '*skin prick test*'). Z Northern blot analizo pa so preverjali tudi vsebnost RNA.

Vse te analize so pokazale, da so bili pri zmanjševanju vsebnosti Lyc e 1 alergogenega proteina raziskovalci uspešni, saj se je pokazala tako zmanjšana vsebnost v plodu kot tudi manjši alergijski potencial in manjša vezava z IgE v pacientih pri SPT.

Ob uspešnem utišanju izražanja alergogena pa se je kot negativna lastnost pokazala slabša oz. zavrtta rast transgenih paradižnikov. Zaradi ključne vloge profilina za normalno delovanje celic, so bili transformirani paradižniki od 1,5 do 3x nižji v primerjavi s kontrolo (netransformiran paradižnik, sorta 'MicroToM') in imeli so tudi manj plodov in zakasnjeno cvetenje (Slika 2).



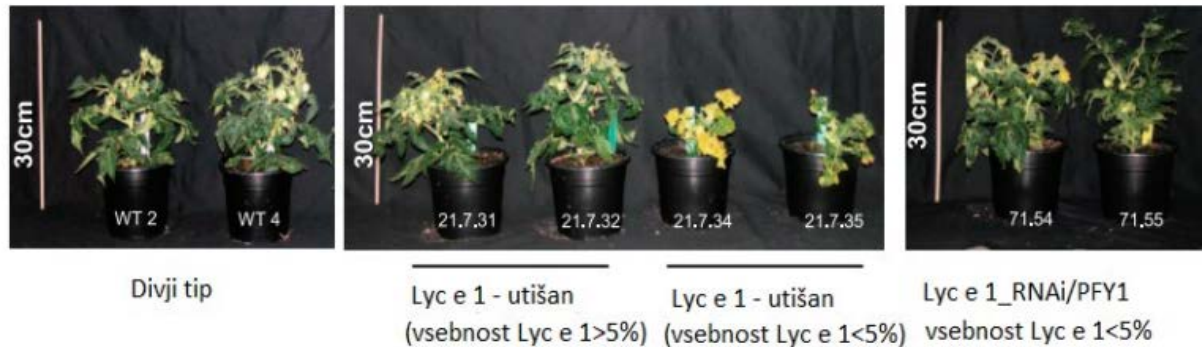
Slika 2: Slabša rast transgenih linij paradižnika 11, 32 in 39 z utišanim profilinom Lyc e 1 v primerjavi s kontrolo WT (Le in sod., 2006a)

Za pridobivanje hipoalergogenega paradižnika bi bilo zato potrebno nadomestiti pomanjkanje profilina, da bi se lahko rastlina normalno razvijala. Zato so Le in sod. (2010) nadaljevali z raziskavo in pomanjkanje Lyc e 1 skušali nadomestiti s profilinom PFY1 iz kvasovke.

Profilin rastlinskega izvora je pogosto alergogen, a nujno potreben za normalno delovanje celic, zato je njegovo pomanjkanje v hipoalergenem paradižniku potrebno nadomestiti. Profilin pa se nahaja v vseh evkariontskih celicah, med katere uvrščamo tudi kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*, katere profilin (PFY1) naj ne bi izzval alergijske reakcije. PFY1 lahko tako nadomesti funkcijo Lyc e 1 v hipoalergenem paradižniku hkrati pa ne poveča njegovega alergijskega potenciala (Le in sod., 2010).

S pomočjo *Agrobacterium tumefaciens* so Le in sod. (2010) transformirali kotiledone paradižnika in pridobili paradižnike z utišanim Lyc e 1, kar so dosegli s pomočjo RNAi po prej opisanem postopku, hkrati pa so ti paradižniki izražali tudi PFY1 profilin iz kvasovk. Analiza je pokazala da PFY1 res ne reagira z IgE, kar nakazuje, da naj pacienti z alergijo na Lyc e 1 ne bi kazali alergijske reakcije ob stiku s PFY1. To so pokazala tako *in vitro* testiranja kot SPT na pacientih.

Z merjenjem zelene biomase so preverjali ali lahko profilin iz kvasovke povrne normalno rast paradižniku, z zmanjšano vsebnostjo Lyc e 1 (Slika 3).



Slika 3: Spremenjen fenotip transgenih paradižnikov z utišanim Lyc e 1 in vnesenim PFY1 v primerjavi s kontrolo (Le in sod., 2010)

Slika 3 prikazuje primerjavo fenotipa paradižnikov glede na njihov genotip. Prva dva paradižnika sta služila kot kontrola (WT 2 in 4), drugi del slike prikazuje paradižnike, ki imajo zaradi RNAi zmanjšano vsebnost Lyc e 1, zadnji del slike pa prikazuje paradižnika z utišanim genom za Lyc e 1 in vnesenim PFY1 iz kvasovke. Kot je razvidno iz slike je PFY1 transgenim paradižnikom povrnili primerljivo rast s kontrolo (Le in sod., 2010).

5.2 ZMANJŠANJE VSEBNOSTI NESPECIFIČNEGA PROTEINSKEGA PRENAŠALCA LIPIDOV - nsLTP (Lyc e 3)

Še en pogost alergogen v paradižniku je Lyc e 3, ki je nespecifičen proteinski prenašalec lipidov. S pomočjo RNA interference so Le in sod. (2006b) zmanjšali njegovo vsebnost v paradižniku. Z *Agrobacterium tumefaciens* so transformirali kotiledonske izsečke in vanje s plazmidom vnesli hpRNA kaseto, ki sta jo sestavljala smiselno in nasprotnosmiselno zaporedje genov *LTPG1* in *LTPG2*. Ločena sta bila z intronom in pod vplivom konstitutivnega promotorja CaMV3S. Z Western in Northern blot analizo so preverili vsebnost tarčnega proteina in RNA v transgenih paradižnikih v primerjavi s kontrolo, ki jo je predstavljal divji tip. Ugotovili so, da je prišlo do uspešnega zaviranja izražanja Lyc e 3 proteina po utišanju z RNAi. S pomočjo testa s histaminom so potrdili, da je tudi zmanjšan alergijski potencial za Lyc e 3 v transgenih paradižnikih.

Podobno raziskavo so izvedli tudi Lorenz in sod. (2006). Uporabili so transformacijo z *Agrobacterium tumefaciens* in z njo na podoben način kot Le in sod. (2006b) transformirali izsečke paradižnika *Lycopersicon esculentum*, sorta 'MicroToM'. Pridobili so T0 generacijo paradižnikov, ki je vsebovala manjšo akumulacijo Lyc e 3 proteina od kontrole – divjega tipa. Izvedli so Western blot analizo na T0 in T1 generaciji, ki ni pokazala prisotnega Lyc e 3. S temi rastlinami so izvedli tudi test s histaminom, ki je pokazal da so potrebne 10 do 100x večje količine ekstrakta proteinov iz transgenih linij v primerjavi z divjim tipom, da je zaznan odziv testa, kar nakazuje uspešno zmanjšanje alergijskega potenciala transgenih rastlin. Izvedli so tudi SPT test, ki je tudi *in vivo* pokazal, da se je alergijski potencial v transgenih paradižnikih zmanjšal,

je pa v prihodnosti potrebno izvesti še teste, ki bi raziskali alergijski potencial teh rastlin tudi po zaužitju.

Pomembna ugotovitev te raziskave je bila, da se hipoalergenost deduje tudi v naslednjo generacijo T1, saj je tudi ta kazala zmanjšano vsebnost Lyc e 3 v primerjavi s kontrolo. Vzpodbudna je bila tudi ugotovitev, da utišanje izražanja Lyc e 3 ni imelo drugih neželenih posledic na fenotip rastlin niti v T0 niti T1 generaciji (Lorenz in sod., 2006). To je tudi prednost utišanja Lyc e 3 v primerjavi s prej opisanim Lyc e 1, ki so ga izvedli Le in sod. (2006a).

6 TEŽAVE PRI UTIŠANJU IZRAŽANJA ALERGOGENIH PROTEINOV

Alergeni proteini imajo v rastlinah pogosto pomembne funkcije. Z njihovim utišanjem se lahko te funkcije izgubijo in jih mora zato nadomestiti nek drug protein. V nasprotnem primeru pa to lahko privede do hudih posledic in motenega delovanja rastlinske celice oz. rastline kot celega organizma. Dober primer tega je pri utišanju izražanja profilina v paradižniku, kjer se to odraža na zmanjšani rasti pa tudi zakasnjem cvetenju in manjši vsebnosti plodov (Le in sod., 2006a).

Posamezna rastlinska vrsta običajno vsebuje več kot le en alergen, zato je nujeno potrebno hkratno utišanje izražanje vseh alergenov, ki bi potencialno lahko izzvali alergijsko reakcijo, da bi bile hipoalergene rastline primerne za uživanje za vse posameznike z različnimi alergijami (Lorenz in sod., 2006). Poleg tega je potrebno oceniti dejansko vsebnost alergenih proteinov, v kolikšni meri je bila zmanjšana njihova vsebnost in ali se rezultati pridobljeni s SPT lahko prenesejo tudi na nivo uživanja teh rastlin (Lorenz in sod., 2006).

Obe prej omenjeni težavi je že mogoče odpraviti ali pa bodo prihodnje raziskave še ponudile rešitve, je pa največje omejitev za pridobivanje takih rastlin dejstvo, da se rastline pridobljene s postopki preurejanja genoma oziroma sodobne mutageneze, v katero sodi tudi RNA interferenca, uvrščajo v strogo regulativo gensko spremenjenih organizmov. Poleg tega take rastline s strani širše javnosti predvsem v Evropi niso pozitivno sprejete, še posebej kadar posegajo na področje prehrane.

7 ZAKLJUČEK

Alergije na posamezno hrano predstavljajo velik problem tako pri otrocih kot pri nekaterih odraslih posameznikih. Da se izognejo težavam, se morajo ti ljudje povsem odpovedati hrani, ki bi pri njih lahko izzvala alergijsko reakcijo, kar je lahko težavno tako za njih kot za njihove družine, ki morajo prilagoditi prehrano. Zato bi bile hipoalergene rastline dobra možnost za izboljšanje kvalitete življenja teh ljudi.

Vsebnost alergenov se lahko zmanjša z različnimi postopki obdelave hrane, bolj učinkovito pa je pridobivanje hipoalergenih rastlin s postopki genskega inženiringa in utišanja izražanja alergenih genov. Najpogosteje uporabljena tehnika je uporaba RNA interference, v zadnjem času pa v ospredje prihaja tudi CRISPR/Cas tehnologija.

Plodovi paradižnika vsebujejo veliko snovi, ki pozitivno vplivajo na zdravje. Za mnoge posameznike z alergijo na posamezen alergogen iz paradižnika pa njegovo uživanje ni priporočljivo. Z RNAi so uspeli pridobiti paradižnike, ki imajo utišano izražanje glavnih alergogenov v paradižniku Lyc e 1 ali Lyc e 3.

Take paradižnike je mogoče pridobiti, saj so raziskave pokazale zmanjšan alergijski potencial tako v *in vitro* kot v *in vivo* razmerah, jih pa kljub temu še vedno ni mogoče dobiti na trgu zaradi stroge regulative in nesprejemanja gensko spremenjenih organizmov v javnosti.

Področje pa je kljub temu zanimivo, zato bi z raziskavami v prihodnje lahko rešili probleme povezane s pridobivanjem hipoalergogenih rastlin in tudi širšo javnost prepričali v smiselnost pridobivanja takih rastlin.

8 VIRI

- Billmyre R. B., Calo S., Feretzaki M., Wang X., Heitman J. 2013. RNAi function, diversity, and loss in the fungal kingdom. *Chromosome Research*, 21: 561-572, <https://doi.org/10.1007/s10577-013-9388-2>
- Burks A. W., Tang M., Sicherer S., Muraro A., Eigenmann P. A., Ebisawa M., Fiocchi A., Chiang W., Beyer K., Wood R., Hourihane J., Jones S. M., Lack G., Sampson H. A. 2012. ICON: Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129, 4: 906-920, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.001>
- Jin Y., Guo H. S. 2015. Transgene-induced gene silencing in plants. V: *Plant Gene Silencing: Methods and Protocols*, Kirankumar S. Mysore K.S., Senthil-Kumar M. (ur.). New York, Springer Science and Business Media: 105-117, <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2453-0>
- Kumar M., Tripathi P. K., Ayzenshtat D., Marko A., Forotan Z., Bocobza S. E. 2022. Increased rates of gene-editing events using a simplified RNAi configuration designed to reduce gene silencing. *Plant Cell Reports*, 41, 10: 1987-2003, <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02903-9>
- Le L. Q., Mahler V., Lorenz Y., Scheurer S., Biemelt S., Vieths S., Sonnewald U. 2006a. Reduced allergenicity of tomato fruits harvested from Lyc e 1-silenced transgenic tomato plants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118, 5: 1176-1183, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.06.031>
- Le L. Q., Lorenz Y., Scheurer S., Fötisch K., Enrique E., Bartra J., Biemelt S., Vieths S., Sonnewald U. 2006b. Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression. *Plant Biotechnology Journal*, 4, 2: 231-242, <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00175.x>
- Le L. Q., Mahler V., Scheurer S., Foetisch K., Braun Y., Weigand D., Enrique E., Lidholm J., Paulus K. E., Sonnewald S., Vieths S., Sonnewald U. 2010. Yeast profilin complements profilin deficiency in transgenic tomato fruits and allows development of hypoallergenic tomato fruits. *The FASEB Journal*, 24, 12: 4939-4947, <https://doi.org/10.1096/fj.10.163063>
- Lorenz, Y., Enrique E., LeQuynh L., Fötisch K., Retzek M., Biemelt S., Sonnewald U., Vieths S., Scheurer S. 2006. Skin prick tests reveal stable and heritable reduction of allergenic potency of gene-silenced tomato fruits. *Journal of allergy and clinical immunology*, 118, 3: 711-718, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.05.014>

- Mills E. N. C., Madsen C., Shewry P. R., Wichers H. J. 2003. Food allergens of plant origin - their molecular and evolutionary relationships. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 4: 145-156, [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(03\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(03)00026-8)
- Moseley B. E. 2001. How to make foods safer—genetically modified foods. *Allergy*, 56, 61-63, <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2001.00100.x-i1>
- Riascos J. J., Weissinger A. K., Weissinger S. M., Burks A. W. 2010. Hypoallergenic legume crops and food allergy: factors affecting feasibility and risk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1: 20-27, <https://doi.org/10.1021/jf902526y>
- Sicherer S. H., Sampson H. A. 2010. Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 2: 116-125, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.028>
- Siekierzynska A., Piasecka-Kwiatkowska D., Myszka A., Burzynska M., Sozanska B., Sozanski T. 2021. Apple allergy: Causes and factors influencing fruits allergenic properties—Review. *Clinical and Translational Allergy*, 11, 4, <https://doi.org/10.1002/clt2.12032>
- Vanga S. K., Jain M., Raghavan V. 2018. Significance of fruit and vegetable allergens: Possibilities of its reduction through processing. *Food Reviews International*, 34, 2: 103-125, <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1239208>

SINTEZA TERAPEVTSKIH BELJAKOVIN S TRANSGENIMI RASTLINAMI ZA ZDRAVLJENJE NALEZLJIVIH IN AVTOIMUNSKIH BOLEZNI

Kaja Tori

IZVLEČEK

Monoklonska protitelesa so visoko specifična in so zato še posebej primerna zdravljenje nalezljivih in avtoimunskih bolezni. Njihovo pridobivanje s pomočjo komercialnih bakterijskih in glivnih sistemov ne more slediti povpraševanju, poleg tega lahko tako pridobljene beljakovine izzovejo neželen imunski odziv. Dobra alternativa so rastlinski ekspresijski sistemi, ki s številnimi prednostmi ponujajo možnost stroškovno ugodnejšega, učinkovitejšega in varnejšega pridobivanja terapevtskih beljakovin. V primeru večjega povpraševanja je možno rastlinsko pridelavo enostavno povečati. Zaradi velikih stroškov epidemij in pandemij na zdravstvo in gospodarstvo držav je večje zanimanje usmerjeno na področje nalezljivih bolezni. Masovno cepljenje s pomočjo uživanja transgenih rastlin omogoča hitro imunizacijo in preprečevanje širjenja bolezni. Poleg izbruhov nalezljivih bolezni se je v zadnjih letih povečalo tudi število avtoimunskih bolezni in zanje obolelih posameznikov. Učinkovitih zdravil ni, obstajajo le zdravila za lajšanje simptomov. V rastlinah izražena monoklonska protitelesa bi zaradi svoje visoke specifičnosti in možnosti ustrezne glikozilacije omogočala tudi učinkovito zdravljenje avtoimunskih bolezni. Vendar sama kompleksnost avtoimunskih bolezni, neznani vzroki zanje in nepripravljenost farmacevtske industrije za prehod na rastlinske proizvodne sisteme nekoliko otežujejo proučevanja in podporo novim raziskavam. K temu doprinesejo tudi pomisleki javnosti glede gensko spremenjenih rastlin in izzivi na področju izolacije in nadaljnje obdelave rekombinantnih proteinov. Izzivi se uspešno rešujejo, kar potrjuje vedno več uspešnih primerov in tudi aplikacij.

Ključne besede: transgene rastline, monoklonska protitelesa, zdravljenje, nalezljive bolezni, avtoimunske bolezni

Synthesis of therapeutic proteins using transgenic plants for the treatment of infectious and autoimmune diseases

ABSTRACT

Monoclonal antibodies are highly specific and are therefore particularly suitable for the treatment of infectious and autoimmune diseases. Their production by commercial bacterial and fungal systems cannot keep up with demand, and the proteins produced in this way may provoke an unwanted immune response. Plant expression systems are a good alternative, with many advantages that offer the possibility of obtaining therapeutic proteins more cost-effectively, efficiently and safely. If demand increases, crop production can easily be increased. The high cost of epidemics and pandemics on countries' health systems and economies has led to increased interest in the field of infectious diseases. Mass vaccination through the consumption of transgenic plants allows rapid immunisation and prevents the spread of disease. In addition to outbreaks of infectious diseases, the number of autoimmune diseases and the number of individuals affected by them has increased in recent years. There are no effective cures, only

medicines to relieve the symptoms. Plant-expressed monoclonal antibodies could also provide an effective treatment for autoimmune diseases due to their high specificity and the possibility of appropriate glycosylation. However, the sheer complexity of autoimmune diseases, their unknown causes and the unwillingness of the pharmaceutical industry to switch to plant-based production systems make it somewhat difficult to study and support new research. Public concerns about genetically modified plants and the challenges in isolating and further processing recombinant proteins also contribute to this. Challenges are being tackled successfully, as evidenced by a growing number of successful cases and applications.

Key words: transgenic plants, monoclonal antibodies, treatment, infectious diseases, autoimmune diseases

1 UVOD

Skozi zgodovino je veliko pandemij močno vplivalo na takratno družbo, zato si jih je le-ta želela odpraviti ali se vsaj zaščititi pred nalezljivimi boleznimi. Tako so se začela razvijati različna cepiva in zdravila, med katerimi so nekatera omogočila izkoreninjenje zelo nalezljivih bolezni ali pa vsaj zmanjšanje števila obolelih in preprečevanje hudega poteka bolezni, da le-te ne bi ogrožale preživetja posameznikov in oslabitev družb. Do sedaj je bilo z razvojem cepiv izkoreninjenih veliko zelo nalezljivih bolezni, poleg tega je danes v mnogih državah po svetu predpisan program obveznega cepljenja proti določenim boleznim, s katerim se preprečuje ponoven izbruh le-teh in njihov vpliv na družbo.

Pojav odpornost nalezljivih patogenov na aktivne komponente obstoječih zdravil je v zadnjih desetletjih vplival na ponovni porast nekaterih nalezljivih bolezni. Zaradi tega je vse več raziskav usmerjenih k uporabi transgenih rastlin, ki bi bile sposobne učinkovite sinteze terapevtskih beljakovin. S pomočjo metode transformacije se v rastlini sprožijo mehanizmi sinteze ustreznih proteinov, ki se jih lahko neposredno uporabi za zdravljenje bolezni, saj so v primerjavi z drugimi ekspresijskimi sistemi enostavnejši in poceni, njihovo varnost pa zagotavlja odsotnost človeških in živalskih patogenov ter toksinov (Ko in Koprowski, 2005).

Danes vse več raziskav temelji na proučevanju ustreznih terapevtskih proteinov za zdravljenje nekaterih razširjenih nalezljivih bolezni kot za zdravljenje avtoimunskih bolezni, ki prizadenejo posameznika. V zadnjih letih se je namreč število obolelih za avtoimunskimi boleznimi povečalo. Tako bi bile transgene rastline zaradi izražanja majhnih količin specifičnih beljakovin tudi ekonomsko upravičene in ustrezne za peroralno uporabo majhnih odmerkov avtoantigenov, vezanih na posamezne primere, ki dokazano sprožijo tolerance pri več avtoimunskih boleznih, kot so artritis, kolitis, multipla skleroza, miastenija gravis, tiroiditis, diabetes tipa 1 in uveitis (Carter III in Langridge, 2002).

2 RASTLINSKI EKSPRESIJSKI SISTEMI

Rastlinski ekspresijski sistemi so sposobni kompleksnih posttranslacijskih modifikacij, hkrati pa v rastlinah niso prisotni toksini in živalski patogeni. Poleg tega je rastline lažje gojiti, saj niso potrebni dragi objekti za gojenje celic ali bioreaktorji. Pridelava velikih količin je

optimizirana in splošno uveljavljena za določeno pridelovalno območje in jo je enostavno povečati, tradicionalne kmetijske prakse in nekvalificirana delovna sila pa zadostuje za gojenje in spravilo transgenih rastlin. Transgene linije se hranijo kot seme ali ostali deli, zato ni potrebe po vzdrževanju matične črede kot pri transgenih živalih. Omenjeni dejavniki omogočajo tudi stroškovno učinkovito sintezo biofarmaceutskih proteinov, kar je ugodno tudi za države v razvoju. Rastlinski ekspresijski sistemi so tako primerni in pomembni za razvoj monoklonskih protiteles, ki imajo sposobnost specifične vezave antigena in so zato uporabna za diagnosticiranje, zdravljenje in preprečevanje bolezni. Za proizvodnjo rekombinantnih bioloških zdravil učinkovit rastlinski sistem zahteva ustrezen heterologni ekspresijski sistem, ki vključuje optimalno kombinacijo regulatornih elementov transgena, nadzor posttranslacijske obdelave rekombinantnih produktov in učinkovite metode čiščenja (Preglednica 1) (Fischer in sod., 2003; Ko in Koprowski, 2005; Damos in sod., 2020).

Preglednica 1: Primerjava različnih ekspresijskih sistemov za rekombinantne farmacevtske proteine (povzeto po Ko in Koprowski, 2005).

Lastnosti	Bakterije	Kvasovke	Rastlinske celične kulture	Transgene rastline	Sesalske celične kulture	Transgene živali
Proizvodni stroški	nizki	srednji	srednji	nizki	visoki	visoki
Čas pridobivanja	kratek	srednji	srednji	kratek	dolgi	zelo dolgi
Razmnoževanje	enostavno	enostavno	enostavno	zelo enostavno	srednje enostavno	srednje enostavno
Distribucija	težka	težka	težka	enostavna	zelo težka	enostavna
Kakovost	nizka	srednja	visoka	visoka	visoka	visoka
Varnost	nizka	visoka	visoka	visoka	nizka	nizka
Glikozilacija v primerjavi s človeško	neppravilna	neustrezna	večje razlike	večje razlike	manjše razlike	manjše razlike
Enostavnost glikozilacije	zelo težka	srednja	enostavna	enostavna	težka	zelo težka

Stabilna transformacija s pomočjo *Agrobacterium tumefaciens* ali uporaba začasnega izražanja prek agroinfiltracije oziroma sistema rastlinskih virusnih vektorjev omogoča pridobivanje ustreznih proteinov za proizvodnjo biofarmaceutskih izdelkov. Transformacija je metoda, pri kateri s pomočjo *Agrobacterium tumefaciens* prenesemo tuje gene v genom rastline, le-ti pa omogočajo ustrezno signalizacijo, ki omogoči nastanek želenega protitelesa. Pred stabilno transformacijo rastlin za obsežno proizvodnjo je agroinfiltracija uporabljena za testiranje aktivnosti in učinkovitosti ekspresijski konstruktov. *In vitro* tkivna kultura ali mikropropagacija omogoča stabilno vstavljanje genov in enostavno razmnoževanje transgenih rastlin, kar ima za posledico stabilno izražanje transgenov in predstavlja biofarming oziroma molekulske kmetovanje, torej množično proizvodnjo molekul visoke vrednosti, med katere sodijo tudi terapevtski proteini, encimi in cepiva. Po regeneraciji transgenih rastlin s stabilnim izražanjem transgena sledi karakterizacija produkta in povečanje proizvodnje (Peeters in sod., 2001; Fischer in sod., 2003; Ko in Koprowski, 2005; Damos in sod., 2020).

Transgene rastline so bile leta 1989 prvič uporabljene za sintezo protiteles, ki se lahko aplicirajo peroralno, lokalno ali parentalno (Venkataraman in sod., 2021).

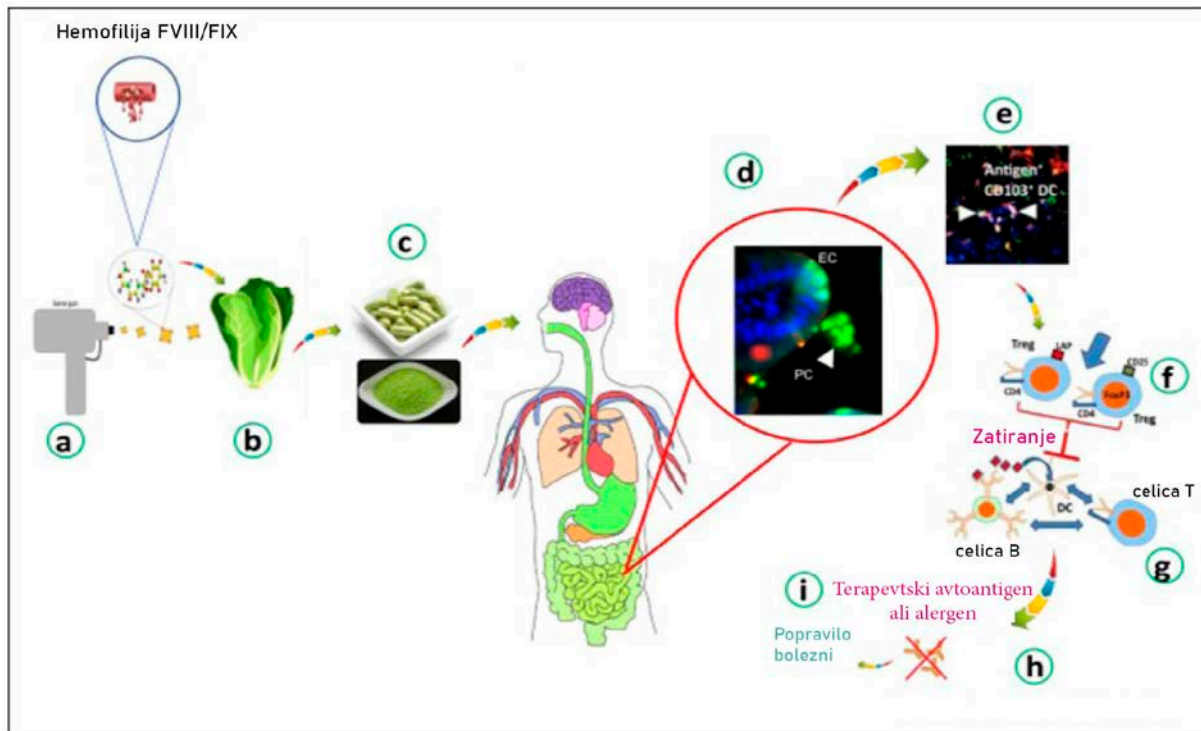
Optimizacija od vnosa transgena v rastlinsko celico do čiščenja rekombinantnega proteina je pomembna, saj je od količine ciljnega produkta odvisna uspešnost uporabe rastlin kot ekspresijskih sistemov za pridobivanje terapevtskih beljakovin. Študija, v kateri so uporabili optimizirane rastlinske ekspresijske vektorje BeYDV, je dokazala, da je z uporabo teh vektorjev mogoče iz enega samega rastlinskega lista pridobiti miligramske količine treh različnih monoklonskih protiteles (mAb) (Diamos in sod., 2020).

2.1 MONOKLONSKA PROTITELESA IN GLIKOINŽENIRING

Specifičnost monoklonskih protiteles omogoča njihovo široko uporabnost, ki se je v zadnjih letih usmerila v zdravljenje različnih bolezni. Monoklonska protitelesa so zaradi svoje visoke specifičnosti popolnoma revolucionirala farmacevtsko industrijo (Nelson in sod., 2000; Chen, 2022).

V rastlinah so bili uspešno proizvedeni sekretorni IgA (imunoglobulini A) in pentamerni IgM (imunoglobulini M), ki so inkapsulirani znotraj rastlinske celične stene in s tem zaščiteni pred kislinami in encimi v želodcu, kar jim omogoča vstop v lumen črevesja, kjer jih encimsko sproščajo črevesne komezalne bakterije. Zaradi bioinkapsulacije je možen oralen vnos terapevtskih beljakovin z užalnimi rastlinskimi deli, ki tako ponujajo možnost zdravljenja virusnih bolezni gastrointestinalnega trakta. Pomembno je, da se beljakovinska zdravila sproščajo pravočasno in na kraju samem ter dosežejo črevesni epitelij, za kar so bili razviti številni nosilci. Mednje sodita CTB (podenota B toksina kolere) in PTD (domena za prenos beljakovin), ki pomembno vplivata na ustrezen privzem proteinskega zdravila preko črevesnega epitelija. Najbolj primerna za pridobivanje rastlinskih užalnih cepiv za direktno izražanje sta banana in paradižnik, medtem ko sta riž in koroza primerna po termični obdelavi (Slika 1) (Khan in Daniell, 2021; Venkataraman in sod., 2021; Chen, 2022).

Razvoj glikoinženiranja gostiteljskih rastlin je omogočil zaustavitev ekspresije določenih rastlinskih specifičnih glikanskih genov ali vstavljanje sesalskih glikozilacijskih genov, vse skupaj pa odpravlja skrb glede imunogenosti in morebitnih neželenih učinkov. Poleg tega je v primerjavi z mešanico več glikanov v enakih protitelesih, pridobljenih iz CHO (celice jajčnikov kitajskega hrčka), v rastlinah pridobljenih monoklonskih protitelesih običajno prisotna homogenejša (< 90 %) *N*-glikanska struktura. Poleg tega so s pomočjo tehnike CRISPR/Cas9 pridobili novo celično linijo tobaka brez glikozilacije beljakovin rastlinskega tipa, ki vključuje rastlinsko specifične ostanke $\beta(1,2)$ -ksiloze in $\alpha(1,3)$ -fukoze. Tako je bilo razvitih več rastlinskih linij, od katerih vsaka sintetizira monoklonska protitelesa (mAbs) z edinstveno *N*-glikoformo sesalcev (Zagorskaya in Deineko, 2021; Chen, 2022).



Slika 1: Mehanizem inducirane tolerance s peroralnim vnosom antigenov, bioinkapsuliranih v rastlinskih celicah: (a) Genska pištola, s katero se v rastlinske celice izstreljujejo zlati delci, obdani s transgeni; (b) Solata, regenerirana iz kloroplastov po selekciji in izražanju antigenov; (c) Liofilizirani deli listov v prahu in kapsulah; (d) Od prebave zaščitene in nepoškodovane rastlinske celice (PC) z izraženim GFP proteinom, in črevesne epitelne celice (EC) po lizi rastlinskih celic in prevzemu proteina GFP; (e) Antigen, ki ga spremljajo tolerogeni CD103 in DC (bele puščice); (f) Indukcija za antigen specifičnih regulatornih celic T; (g) Inducirani tregi zavirajo odzive celic B in T proti antigenu; (h in i) Preprečevanje bolezni s peroralno toleranco avtoimunskih bolezni (prirejeno po Xiao in sod., 2016; Khan in Daniell, 2021).

2.2 MOLEKULSKO KMETOVANJE

Za molekulsko kmetovanje se zaradi številnih prednosti največkrat uporabljata tobak (*Nicotiana tabacum*) in repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*). Slednji ima kratek življenjski cikel, majhno velikost genoma, relativno učinkovito transformacijo in visoke ravni skupnih topnih beljakovin (TSP), tobak pa omogoča visok pridelek biomase in sposobnost sinteze monoklonskih protiteles po celotni rastlini (Song in sod., 2018).

Molekulsko kmetovanje vključuje gojenje rastlin s stabilno ekspresijo transgenov za obsežno sintezo proteinov v daljšem obdobju, uporabo prehodne ekspresije za hitro sintezo proteinov v kratkem času in uporabo rastlinskih celic ali tkiv, gojenih v bioreaktorjih (Zagorskaya in Deineko, 2021).

Prvi korak pridobivanja transgenih celičnih linij so metode transformacije, kot sta transformacija s pomočjo *Agrobacterium* ali pa biolistike. Sledi indukcija transgenih celic ali kalusa, po transformaciji pa nastala celična kultura predstavlja heterogeno maso genetsko in epigenetsko različnih celic, ki kažejo različne stopnje izražanja. Vendar pa je rekombinantne proteine sposoben v zadostni količini sintetizirati le majhen del transformiranih celic in zato je potrebno izbrati celice z optimalno ekspresijo (Zagorskaya in Deineko, 2021).

Za obsežno sintezo rekombinantnih proteinov je idealen rastlinski sistem s hitro rastjo, enostavno genetsko transformacijo, visoko stopnjo proizvodnje ciljnih proteinov, zagotovljeno stabilnostjo rekombinantnega tarčnega proteina med sintezo v celici in njegovim sproščanjem znotraj celic in nizko koncentracijo sekundarnih metabolitov, saj le-ti vplivajo na strukturne in biološke lastnosti proteina in/ali motijo postopke izolacije in čiščenja. Poleg tega so pomembne tudi ustrezne posttranslacijske modifikacije, vključno z glikozilacijo in končnim zvijanjem beljakovin ter homogenost celične suspenzije (Zagorskaya in Deineko, 2021).

Sledita izolacija in čiščenje rekombinantnih beljakovin iz surove biomase, kar predstavlja 80 % stroškov celotne proizvodnje. Tako se v industriji večinoma poslužujejo celičnih linij korenja in riža, ker ne vsebujejo znatnih količin sekundarnih metabolitov, ki bi lahko ovirali čiščenje. Uporablja se tudi linija tobaka BY-2, ki ne vsebuje nikotina (Zagorskaya in Deineko, 2021).

V transgenih rastlinah sintetizirana protitelesa so stabilna, kopičijo se v visokih koncentracijah (<100 mg/l) in jih lahko s pomočjo afinitetne kromatografije enostavno ločimo od gojišč ali celičnih ekstraktov s pomočjo afinitetne kromatografije (Zagorskaya in Deineko, 2021).

3 PRIMERI RASTLINSKIH TERAPEVTSKIH PROTEINOV PROTI NALEZLJIVIM BOLEZNIM

Epidemije in pandemije različnih nalezljivih bolezni zaradi njihovega hitrega širjenja in visoke umrljivosti obolelih zahtevajo veliko pozornost zdravstva in državnih oblasti, saj predstavljajo veliko zdravstveno in gospodarsko breme za državo, kar še posebej občutijo v državah v razvoju. Vendar pa je v teh primerih industrija cepiv in bioloških zdravil nemočna zaradi številnih omejitev, kot so visoki stroški, omejeno vzpostavljanje in povečanje tradicionalnih proizvodnih platform, ki temeljijo na mikrobni in živalski celici, zahtevne distribucije in skladiščenja, še posebej v regijah brez popolne hladne verige. Ugodno rešitev predstavlja molekulska kmetovanje, ki se osredotoča na užitne transgene rastline, ki izražajo rekombinantne proteine za peroralno zdravljenje bolezni. V tem primeru dragi postopki čiščenja niso potrebni, prav tako ni potrebna hladna veriga, zato je distribucija enostavnejša (Slika 1) (He in sod., 2021).

Proizvedeni so bili že številni biofarmaceutski izdelki proti več človeškim virusnim boleznim, kar kaže na napredek proizvodnje visoko kakovostnih rekombinantnih proteinov s pomočjo molekulskega kmetovanja. Obetom na živalskih modelih so sledila uspešna klinična preizkušanja (Venkataraman in sod., 2021).

Ugodna rešitev za obvladovanje nalezljivih bolezni je mukozno cepljenje, ki lahko inducira humoralne in celično posredovane odzive. Tovrsten vnos cepiv je zaradi hitre imunizacije in nizkih stroškov potencialna oblika zdravljenja oziroma preprečevanja razširjanja nalezljivih bolezni. Poleg tega rastlinska celična stena ščiti mukozno vnesen antigen pred kislim okoljem v želodcu in tako antigenu omogoča vstop v limfoidno tkivo, povezano s črevesjem. Kljub številnim prednostim mukoznih cepiv se omenjena tehnologija srečuje z nekaterimi izzivi, ki pa se jih že rešuje. Skrb lahko predstavljata imunogenost cepiv in njihova nadaljnja obdelava. Na neželjeno imunogenost lahko vpliva drugačna glikozilacija v rastlinskih celicah, kot je tista

v sesalskih celicah. Sodobne tehnologije omogočajo različne glikoinženirske pristope, kjer se uporabljata RNAi in *in vitro* deglikozilacija. Slednja je primerna za odstranjevanje glikanov iz ciljnih biofarmaceutskih beljakovin (Salyaev in sod., 2014; Arevalo-Villalobos in sod., 2016).

3.1 VIRUS HEPATITISA B (HBV)

Virus hepatitisa B predstavlja veliko breme za ljudi po vsem svetu, saj povzroča resno bolezen jeter z jetrno cirozo in hepatocelularnim karcinomom, ki letno povzroči 887.000 smrti. Cepivo proti HBV je eno najuspešnejših in hkrati dragih cepiv. Rekombinantni rastlinski sistemi omogočajo proizvodnjo cepiv za oralno uporabo, kar je ugodnejše, saj čiščenje antigenov ni potrebno, ker se rastlinska biomasa neposredno uporabi za pridobitev imunosti (Venkataraman in sod., 2021).

Peroralno dodajanje HBsAg (površinski antigen HBV) mišim je zboljšalo serumske ravni IgA in mukozne titre IgA v blatu v primerjavi s parenteralno uporabljenim komercialnim Recombivaxom. Užito cepivo je omogočilo dolgotrajno imunost, ki so jo ocenili s podaljšanim serumskim IgA ter fekalnim IgA. Dolgotrajna imunost je bila zagotovljena tako na ravni sluznice kot sistemske, zaradi česar bi peroralno cepivo lahko delovalo kot dodatna zaščitna plast za spolno prenosljive okužbe, ki se prenašajo preko sluznice, kot je pri bolezni HBV (Venkataraman in sod., 2021).

V eni od raziskav je bilo poročano tudi o povečani ravni visoko ekspresijskih linij v primeru izražanja antigena preS2-S v korenju z uporabo signalov za translokacijo in zadrževanje v endoplazemskem retikulumu v primerjavi s preS2-S, lokaliziranim v citosolu. Biofarmacijo cepiva je prva vzpostavila raziskovalna skupina Arizona Biodesig Institute, ki je predstavila uspešno pridobivanje M proteina HBsAg v rastlinah, njegovo vbrizgavanje v miši pa je vzbudilo močnejši imunski odziv B-celic kot pri proteinu S, na katerem temelji konvencionalno cepivo (Venkataraman in sod., 2021).

3.2 VIRUS GRIPE

Virus gripe predstavlja velik zdravstveni in gospodarski problem po celem svetu, ki lahko vodi tudi v smrt. Cepivo proti gripi je potrebno vsako leto na novo nadgrajevati. Poleg tega se cepiva pridobivajo v kokošjih jajcih, zaradi česar proizvodnja traja dalj časa. Tako so rastline kot biološke tovarne za množično pridobivanje nizkocenovnih rekombinantnih cepiv proti gripi veliko obetavnejše, saj omogočajo nadgradnjo proizvodnje cepiv, hkrati pa jih je mogoče zlahka prilagoditi potrebam. Poleg tega se hemaglutinin virusa gripe, ki je glavni dejavnik nevtralizacije in edina obvezna komponenta cepiv, dobro izraža in pravilno zvija v rastlinah (Venkataraman in sod., 2021).

3.3 VIRUS HUMANE IMUNSKE POMANJKLJIVOSTI (HIV)

HIV zaradi velikega števila obolelih predstavlja eno najpomembnejših zdravstvenih vprašanj po vsem svetu. Zdravila in cepiva ni, obstaja le protiretrovirusno zdravljenje (ART), ki je tudi zelo drago. Združevanje manjšega števila protiteles in s tem nizkocenovno proizvodnjo trajnega

izdelka proti HIV je omogočilo odkritje široko nevtralizirajočih protiteles (bNAbs), testiranih v majhni skupini bolnikov. Primer je široko nevtralizirajoče protitelo N6, ki lahko nevtralizira 98 % izolatov HIV-1 in je zato zelo obetaven terapevtski kandidat (Moore in sod., 2021).

V *Nicotiana benthamiana* je potekala sinteza bNAb N6, ki so ga nato karakterizirali in očistili ter primerjali z enakim protitelesom, proizvedenim s konvencionalnim sistemom izražanja HEK-293T celic sesalcev (Moore in sod., 2021).

Izkazalo se je, da izražanje IgG mAb v liniji Δ XF *N. benthamiana* obnovi interakcijo z receptorjem Fc γ RIIIa in ima tako kar osemkrat večjo afiniteto do Fc γ RIIIa kot različica, izražena s celicami HEK. To omogoča pomembno izboljšanje aktivacije efektorskih celic v testu ADCC, ki poveča uničevanje z virusom okuženih celic. Ravno nepoškodovane efektorske funkcije pa so ključne za največjo moč bNAbs, zato je tudi visoka aktivnost ADCC povezana s počasnim napredovanjem bolezni. Tako ima pN6 kot zelo učinkovit terapevtik proti HIV velik potencial za izboljšanje in pocenitev zdravljenja. Njegova uporaba bi lahko zmanjšala število drugih protiteles v tej mešanici protiteles, kar omogoča znižanje stroškov na minimum in s tem tudi razvoj proizvodnje v državah z nizkim in srednjim dohodkom, hkrati pa dopolnjuje terapijo ART in preprečuje prenos z matere na otroka (Moore in sod., 2021).

Koruza, riž in tobak prav tako omogočajo izražanje nevtralizirajočih protiteles HIV 2G12 in 2F5 v velikem obsegu. Protitelesa HIV 2G12, sintetizirana v tobaku, so napredovala v prvo fazo kliničnih preizkušanj na ljudeh (Venkataraman in sod., 2021).

3.4 PAPILOMA VIRUS (HPV)

Rak materničnega vratu je na četrtem mestu glede na pojavnost pri ženskah in v razvitih državah so danes poznana tri profilaktična cepiva proti HPV na osnovi VLP (virusom podobni delci). Kljub učinkovitosti in varnosti je njihova proizvodnja draga, stroške pa predstavlja tudi neprekinjena hladna veriga, kar onemogoča široko uporabo cepiva v državah v razvoju, kjer je večja incidenca okužbe s HPV. Tako so rastline zaradi dobre izkoristka, varnosti in naravne sposobnosti vključevanja posttranslacijskih modifikacij ter olajšanja sestavljanja tujih beljakovin stroškovno učinkovita alternativa za proizvodnjo cepiv proti HPV (Venkataraman in sod., 2021).

Kandidati iz proteina HPV L2, zlasti peptidov 17-36, 56-81 in 108-120, so lahko uspešni kandidati za cepivo proti HPV. Za proizvodnjo himer L1:L2 je bil vsak od peptidov L2 substituiran v zanki DE proteina L1 HOV-16 na položaju 131 ali C-koncu L1 na položaju 431. Himere so bile začasno izražene v *N. benthamiana*, nato pa so jih uporabili za imunizacijo miši, kjer so poleg protiteles proti HPV-16 pokazale navzkrižno nevtralizirajoča protitelesa proti drugim tipom HPV, kot so HPV-11, 18 in 58 (Venkataraman in sod., 2021).

3.5 SARS-CoV-2 (Covid 19)

Bolezen Covid 19 je prizadela okoli 84 milijonov posameznikov ter povzročila 1,8 milijona smrti. SARS-CoV-2 povzroči okužbo dihal, prebavil in celo možganov (Venkataraman in sod., 2021).

Proti SARS-CoV-2 je danes v razvoju rastlinsko cepivo, ki ga razvija podjetje British American Tobacco (BAT) in njegova ameriška biotehnološka podružnica Kentucky Bio-Processing (KBP). Cepivo pridobivajo s tobakom, v katerem so izražene proteinske podenote proti SARS-CoV-2, kjer sta bila kot kandidata za cepivo uporabljena polipeptid S1 ali manjši RBD znotraj S1. Cepivo je napredovalo v fazo I/2 kliničnih testiranj pri ljudeh (Venkataraman in sod., 2021).

Rekombinantna protitelesa bi lahko omogočila tudi pasivno imunoterapijo, saj upočasnijo virusno okužbo in tako telesu zagotovijo dovolj časa, da se njegov imunski odziv aktivira še pred začetkom poteka bolezni Covid 19. Pomembno in obetavno je, da terapevtska protitelesa v zadostnih količinah lahko zavirajo citokinsko nevihto po okužbi s SARS-CoV-2, navzkrižno reagiranje protiteles proti SARS-CoV-1 in SARS-CoV-2 pa bi lahko omogočilo uporabo monoklonskih protiteles proti SARS-CoV-1 tudi proti okužbi s SARS-CoV-2 (Venkataraman in sod., 2021).

Za razvoj uspešnega rastlinskega cepiva proti SARS-Cov-2 tekmuje mnogo podjetij po celem svetu. Dolgoročni cilj je pridobiti peroralne poživitvene injekcije cepiv za imunost sluznice z uporabo užitnih rastlin z jedrno transformacijo. Tako proizvedena rastlinska cepiva proti SARS-CoV-2 bi omogočala enostavno uporabo in pocenila proizvodnjo varnih in učinkovitih cepiv za zajezitev virusa SARS-CoV-2 (Venkataraman in sod., 2021).

3.6 VIRUS HERPES SIMPLEKS (HSV)

Po celem svetu sta zelo razširjena virus herpes simpleks 1 (HSV-1) in virus herpes simpleks 2 (HSV-2), ki se prenašata s tesnim stikom in povzročata vseživljenjsko okužbo. Okužbe s HSV povzročajo mrzlico, genitalni herpes, herpes stromalni keratitis (HSK), herpetični ekcem, meningitis in herpes simpleks encefalitis (HSE) (Zhu in Viejo-Borbolla, 2021).

Za prepoznavo virusa herpes simpleks 2 (HSV-2) je bil v transgeni soji izražen humaniziran IgG (imunoglobulin G) polne dolžine. Lokalni vnos protitelesa pri mišjem modelu bolezni je preprečil vaginalni prenos HSV-2 pri miših. Poleg tega je bilo monoklonsko protitelo proizvedeno v rastlinah tako *in vitro* kot *in vivo* enako protitelesu, pridobljenemu iz celične kulture (Fischer in sod., 2003).

3.7 STEKLINA

Steklina spada med najbolj smrtonosne patogene organizme, saj letno zanjo umre približno 55 000 ljudi po vsem svetu, stopnja smrtnosti po okužbi pa se približuje sto odstotkom (Wu in sod., 2017; Song in sod., 2018).

Dokazano je bilo, da lahko transgene rastline *N. tabacum* izrazijo velike količine nevtralizirajočega mišjega protitelesa MAb E559 v njegovi humanizirani obliki IgG kot tudi v mišji različici, ki se lahko sestavita skupaj in sta tako po aktivnosti enakovredna MAbs, proizvedenim v hibridomih. Prednost v rastlinah izraženega humaniziranega protitelesa je večja učinkovitost kot jo ima komercialno dostopno humano cepivo proti steklini (HRIG; Rabigam) (Venkataraman in sod., 2021).

4 PRIMERI RASTLINSKIH TERAPEVTSKIH PROTEINOV PROTI AVTOIMUNSKIM BOLEZNIM

Med avtoimunske bolezni (AB) je uvrščenih 80 različnih obolenj, ki prizadenejo milijone ljudi po vsem svetu in vplivajo na njihovo kakovost življenja. So posledica imunskega napada, ki predstavlja zlom imunološke samotolerance. Nastanek avtoimunskih bolezni naj bi povzročale napake serijskih kontrolnih točk, odgovornih za čiščenje limfocitov B in T avtoreaktivnih klonov oziroma njihovo preusmeritev v nekonvencionalne limfocitne linije (Avesani in sod., 2014; Shakya in sod., 2023).

V zadnjih letih se je število avtoimunskih bolezni in zbolelimi zanje povečalo, na kar vpliva veliko različnih dejavnikov, zato točnega vzroka za njihov razvoj ne vemo. Tako zaradi interakcij med specifičnimi polimorfizmi, ki uravnavajo delovanje imunskega sistema, in delovanjem okolja, predstavljajo kompleksne bolezni. Genetsko dovzetnost za razvoj AB predstavlja sistem humanega levkocitnega antigena (HLA), medtem ko drugi geni, med katerimi so *CTLA-4*, *MICA*, *PTPN22*, *CIITA*, *PADI4* in *STAT4*, poleg nepojasnjenih dejavnikov okolja vplivajo na klinično manifestacijo avtoimunskih motenj (Avesani in sod., 2014).

Učinkovitih zdravil za avtoimunske bolezni ni, trenutne terapije in zdravila zgolj zdravijo simptome bolezni s pomočjo imunosupresije. Razvita so že biološka zdravila, ki pa lahko povzročijo razne življenjsko nevarne zaplete. Tako je za spodbujanje tolerance proti avtoantigenom ustrezna antigen-specifična imunoterapija (ASI). Omenjena oblika zdravljenja je zaradi visoke specifičnosti najbolj varna oblika zdravljenja za posamezno avtoimunske bolezni. Gre namreč za antigen, identificiran kot tarčo avtoimunskega vnetnega napada, ki je uporabljen za oblikovanje cepiva. Terapija zahteva večkratno izpostavljenost imunskega odziva specifičnemu antigenu, kar vodi do stanja tolerance (Ma in Jevnikar, 2011; Shakya in Nandakumar, 2018).

Za sintezo ustreznih monoklonskih protiteles tudi za zdravljenje avtoimunskih bolezni so zaradi mnogih prednosti čedalje bolj zanimivi rastlinski ekspresijski sistemi. V primerjavi s komercialnimi sistemi celic sesalcev in bakterij imajo namreč številne prednosti, med katerimi je tudi možnost oralnega vnosa transgenih rastlin, ki izražajo rekombinantna protitelesa. Poleg tega je že več monoklonskih protiteles, izraženih v transgenih rastlinah, zaradi obetajočih rezultatov v predkliničnih testiranjih na živalskih modelih napredovalo v različne stopnje kliničnih preizkušanj na ljudeh (Ma in Jevnikar, 2011).

4.1 REVMATOIDNI ARTRITIS

Revmatoidni artritis (RA) spada med avtoimunske bolezni, ki prizadene približno 1 % svetovne populacije, in se zdravi s protivnetnimi zdravili, ki lajšajo simptome in zmanjšujejo uničenje tkiva. Danes so v uporabi imunosupresivna biološka sredstva, ki pa so draga, neučinkovita znatnemu deležu bolnikov, pogosto imajo stranske učinke, kot sta povečano tveganje za okužbe in razvoj raka (Hansson in sod., 2015).

CTA1(R7K) je mutantni del fuzijskega proteina in izhaja iz podenote A1 toksina kolere (CT), vendar nima encimske aktivnosti zaradi zamenjave ene aminokisljine. Za uspešno ciljanje na celice, ki predstavljajo antigen, je bila molekula CTA1(R7K) genetsko spojena z dimerom fragmenta D proteina A *Staphylococcus aureus*. Tako je potekala raziskava na področju tolerogenega fuzijskega proteina CTA1 (R7K)-COL-DD, ki se je izrazil v *Arabidopsis thaliana* in omogočil peroralno zdravljenje RA. S transgenimi rastlinami so hranili miši, ki so imele s kolagenom povzročeni artritis (CIA). Zdravljenje je vplivalo na zmanjšanje števila obolelih miši, na nižjo stopnjo uničenja sklepov, nižje celotno uničenje tkiva, zmanjšanje vnetnih biomarkerjev, antikolagenskega odziva IgG in CD4⁺ ter odzivov celic T v vranici in drenažnih bezgavkah (Hansson in sod., 2015).

Študija je potrdila uspešno uporabo transgene rastline za zdravljenje RA, kajti miši, hranjene s transgeno *A. thaliana*, so izražale tolerogen CTA1(R7K)-COL-DD, kar je preprečilo CIA pri 10 – 20 % miši, prizadete miši pa so imele bistveno blažje simptome, medtem ko so kontrolne miši razvile hudo obliko CIA. Na podlagi rezultatov študije se porajajo možnosti za zdravljenje bolnikov z RA neposredno s hranjenjem z užitnimi rastlinami, kot je na primer solata. Pomemben dejavnik je tudi stroškovno učinkovita in varna uporaba užitnih rastlin za dostavo tolerogenov za zdravljenje avtoimunskih bolezni. Vendar obstajajo omejitve, saj se lahko bolniki tovrstnega zdravljenja poslužijo ob pojavu izrazitih simptomov in napredovani bolezni (Hansson in sod., 2015).

4.2 DIABETES TIPA 1

Izguba samotolerance na celice β v otočjih trebušne slinavke, ki proizvajajo insulin, povzroči oslABLJENO homeostazo in s tem kronično avtoimunsko bolezen – sladkorno bolezen tipa 1 (T1D). Pojavijo se avtoprotitelesa, ki prepoznajo antigene otočnih celic, kot so insulin, dekarboksilaza glutaminske kisline (GAD) in znotrajcelična domena IA-2ic (intracelularna domena proteina tirozin fosfatze-2). Trenutno se za zdravljenje uporablja insulin, ki se uporablja za imunsko modulacijo (preprečevanje). Na svetu je vse več posameznikov s sladkorno boleznijo, zato je povpraševanje po rekombinantnem proteinu veliko. Komerzialna proizvodnja za izražanje rekombinantnega humanega proteina se sooča z izzivom, ali bodo v prihodnje glede na povečane potrebe na razpolago zadostne količine zdravila (Ma in Jevnikar, 2011; Avesani in sod., 2014).

Uspešna alternativa so rastlinski ekspresijski sistemi, s pomočjo katerih se je človeški insulin sintetiziral v semenih repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) z usmerjanjem molekule na podcelične organele, znane kot oljna telesa. Fuzija oleozina omogoči usmerjanje molekule insulina v oljna telesa, ki se nato lahko ločijo od drugih semenskih komponent z ločevanjem faz med tekočino in tekočino. Postopek je preprost in cenovno ugoden, zrelo seme pa predstavlja naravno skladišče za kopičenje beljakovin vse do pridobitve končnega izdelka (Avesani in sod., 2014).

Insulin je bil po enaki strategiji ciljanja na oljna telesa izražen tudi v žafraniki. Klinično preskušanje insulina faze I/II je pokazalo bioekvivalenco rastlinskega rekombinantnega proteina s komercialnim rekombinantnim humulinom (Avesani in sod., 2014).

Tretji primer uspešnega izražanja avtoantigena T1D, IA-2ic, je potekalo s pomočjo agroinfiltracije v listih *Nicotiana benthamiana* (Avesani in sod., 2014).

V rastlinah je bil izražen tudi GAD, prav tako znani avtoantigen T1D, ki ima velik potencial kot pomemben marker za diagnozo T1D in razvoj novih antigen specifičnih terapij za zdravljenje bolezni. Pri človeškem GAD65, izraženem v rastlinah tobaka in korenja, ravni izražanja sprva niso zadostovale za študijo peroralne tolerance na živalskih modelih. Ravni ekspresije imunoreaktivnega rekombinantnega proteina so se zvišale do 0,02 % ob spremembi človeškega GAD65 za specifično ciljanje na citosol rastlinske celice z zamenjavo N-terminale domene z ustrezno regijo podganjega GAD67 (GAD67/65). Raven izražanja se je nadalje povečala s pomočjo encimsko mutirane oblike encima (GAD65mut). Katalitične lastnosti divjega tipa GAD65 namreč motijo metabolizem rastlinskih celic in tako zatrejo sintezo proteina, kar vpliva na njegov slab donos. Mutant GAD65 kljub encimski neaktivnosti ohranja imunogenost in veže avtoprotitelesa GAD65 v serumu bolnikov s T1D (Avesani in sod., 2014).

Za izražanje GAD65 so uporabili tudi transplastomske mikroalge. Mednje sodi tudi v študiji uporabljena *Chlamydomonas reinhardtii*, ki ima številne prednosti, kot sta hitro razmnoževanje in hitra rast, stabilne transplastomske linije pa je mogoče pridobiti v treh tednih. Ravni kopičenja rekombinantnega imunoreaktivnega hGAD65 v mikroalgah so bile od 0,25 do 0,3 % TSP (skupnih topnih beljakovin) (Avesani in sod., 2014).

4.2 UVEITIS

Okužbe, avtoimunski mehanizmi in izpostavljenost toksinom povzročajo uveitis, intraokularno vnetno motnjo, ki ogroža vid. Da bi lahko ozdravili vnetne očesne bolezni, se danes za oceno primerne učinkovitosti terapevtikov uporabljata dva primerna modela *in vivo*, in sicer sta to z endotoksinom povzročen uveitis (EIU) in eksperimentalni avtoimunski uveoretinitis (EAU) (Shil in sod., 2014).

Tehnologija bioinkapsulacije terapevtskih proteinov znotraj rastlinskih celičnih sten omogoča oralen vnos materiala, pri čemer se bioinkapsulirane beljakovine, ki gredo skozi želodec, s pomočjo komenzalnih bakterij sprostijo v črevesju. Ob spojitvi z netoksično podenoto B kolera toksina (CTB) kot transmukoznega nosilca se terapevtski proteini sprostijo v krvni obtok.

Uporaba CTB omogoči močno vezavo terapevtskih proteinov na monosialotetraheksozilgangliozični receptor (GM1) in s tem olajšan prenos proteinov v krvni obtok. Učinkovit vnos fuzijskega proteina CTB v možgane in celice mrežnice je omogočen tudi zaradi tega, ker je ravno v živčnem sistemu in mrežnici veliko število gangliozičnih receptorjev (Shil in sod., 2014).

Preučevano je bilo protivnetno delovanje ACE2 (angiotenzinska konvertaza 2) in Ang-(1-7) ter zmožnost prehoda CTB skozi epiteljsko pregrado, kar olajša prevzem v nevrone ob peroralnem vnosu ACE2 in Ang-(1-7), spojenima z inkapsuliranim CTB v rastlinskih celicah (Shil in sod., 2014).

Terapevtski geni so bili spojeni s CTB in klonirani v transformacijski vektor kloroplasta. Transgene rastline, pridobljene z bombardiranjem vektorja za transformacijo kloroplasta, so izražale *CTB-ACE2* in *CTB-Ang-(1-7)*. Western blot analiza *CTB-Ang-(1-7)* je potrdila stabilnost med liofilizacijo in podaljšanim shranjevanjem pri sobni temperaturi. Fuzijski protein je bil pod optimiziranimi pogoji liofilizacije pravilno izražen, zvit in sestavljen v kloroplastih. Liofilizirani listi so bili zdrobljeni in kapsulirani ter tako primerni za peroralno uporabo. Terapevtski protein je omogočil okrepitev sistemske in lokalne aktivnosti osi RAS (renin-angiotenzin) in s tem zaščito pred vnetjem očesa. Peroralni vnos *CTB-ACE2* in *CTB-Ang-(1-7)*, ki so bili bioinkapsulirani v rastlinskih celicah, je tako zmanjšal očesno vnetje v modelih EIU in EAU (Shil in sod., 2014).

4.3 CHRONOVA BOLEZEN IN ULCEROZNI KOLITIS

V porastu je tudi vnetna črevesna bolezen (KVČB), ki povzroča vnetje sluznice in poškodbe debelega ter tankega črevesa. Imunološka poškodba sluznice je značilnost tako Chronove bolezni kot tudi ulceroznega kolitisa, obe pa sta glavni obliki KVČB. Ulcerozni kolitis se opazi v debelem črevesu, Chronova bolezen pa v celotnem prebavnem traktu (Daniell in sod., 2019).

Medtem ko se v tobaku izražen in prečiščen hIL-10 zaradi kislinke labilnosti lahko razgradi v pogojih nizkega pH, je IL-10, zaščiten s pomočjo rastlinskega tkiva, odporen na razgradnjo v črevesju, kar predstavlja ključno prednost za oralno uporabo transgenih rastlin, ki izražajo omenjen interlevkin. Oralna uporaba bi tako omogočila vnos IL-10 neposredno na mesto vnetja v črevesju in v tem primeru dodatna predelava rastlinskega materiala ne bi bila potrebna. Poleg tega kljub peroralnemu vnosu IL-10 na površini sluznice ne pride do sistemskega učinka, zato je možnih manj stranskih učinkov kot pri sistemskega vnosa (Menassa in sod., 2006).

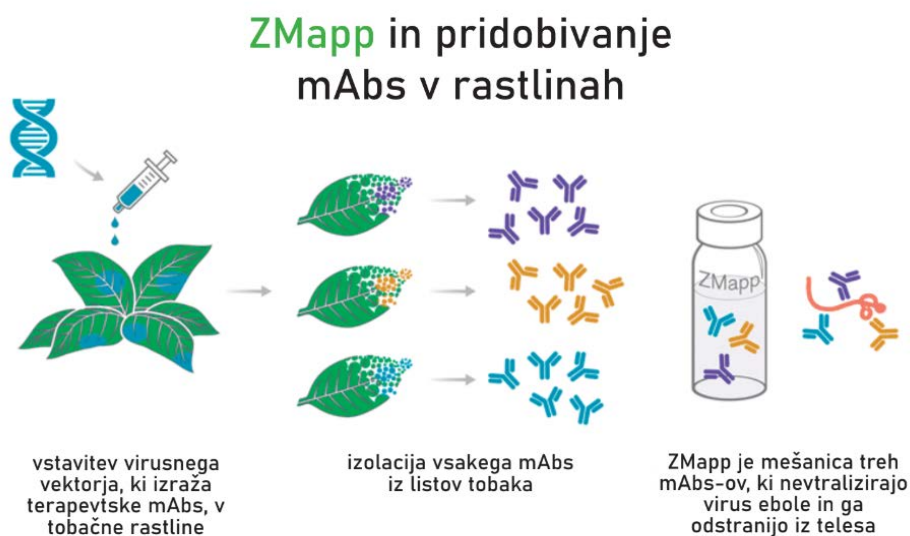
Rezultati proučevanja so pokazali, da je peroralni vnos tkiva tobaka, ki izraža humani interlevkin-10, zmanjšal resnost kolitisa na mestih vnetja pri miših. IL-10 je vplival na nižji nivo izražanja mRNA TNF- α v tankem črevesu in zvišanje ravni mRNA IL-2 in IL-1 β , vse skupaj pa je vplivalo na manjše vnetje črevesja. Velika prednost IL-10, izraženih v rastlinskem matriksu, je tudi njihova biološka aktivnost in povečana odpornost na razgradnjo v prebavilih, kar rastlinskim ekspressijskim sistemom daje velike prednosti pred trenutnim lajšanjem simptomov pri KVČB (Menassa in sod., 2006).

5 ZAKLJUČEK

Monoklonska protitelesa so visoko specifična, zaradi česar so uporabna v mnogih aplikacijah, kot na primer terapevtske beljakovine za zdravljenje bolezni. Za pridobivanje le-teh se zaradi številnih prednosti pred drugimi ekspresijskimi sistemi čedalje več študij osredotoča na rastlinske, ki z izražanjem ustreznih farmacevtskih beljakovin omogočajo zdravljenje nalezljivih in avtoimunskih bolezni. S transformacijo pridobljene transgene rastline izražajo monoklonska protitelesa, ki so v dosedanjih proučevanjih privedla do obetavnih rezultatov.

Kljub spodbujajočim rezultatom na kliničnih preizkušanjih še vedno obstajajo izzivi, kot so optimizacija odmerka, pravilno oblikovanje antigena, neustrezna aktivacija imunskega sistema in izolacija monoklonskih protiteles, ki ovirajo napredovanje terapevtikov do uporabe. V primerjavi s celicami sesalcev rastline monoklonska protitelesa (mAbs) izločajo v apoplast, kar zahteva razgradnjo tkiv in celic za sproščanje proteinov v krvni obtok. Izziv se rešuje s pomočjo več faz ekstrakcije, čiščenja in koncentracije, kar se imenuje integrirana metoda, ali pa z izolacijo mAbs neposredno iz apoplastične tekočine s centrifugiranjem in s pomočjo rahljanja celične stene s kelatorji, pektinazami, celulazami, kar omogoči ekstrakcijo mAbs polne dolžine. Poleg izzivov na področju pridobivanja in izolacije v rastlinah izraženih mAbs na počasnejši razvoj le-teh vplivajo tudi pomisleki javnosti glede gensko spremenjenih rastlin in pomanjkanje zanimanja industrije in velikih farmacevtskih podjetij. (Chen, 2022; Shakya in sod., 2023).

Šele klinični razvoj ZMapp (mešanica monoklonskih protiteles proti eboli, slika 2) in 2G12 (široko nevtralizirajoče monoklonsko protitelo proti HIV) je sprostil regulativno pot, kar bi lahko omogočilo komercialno pridobivanje v rastlinah izraženih mAbs, lažjo odobritev le-teh, ki so se v kliničnih preizkušanjih na ljudeh izkazala za varna, in povečalo zanimanje velikih farmacevtskih podjetij za biološka zdravila rastlinskega izvora (Zagorskaya in Deineko, 2021; Chen, 2022).



Slika 2: Proizvodnja ZMapp v rastlinah tobaka (prirejeno po Lai in Chen, 2015)

Obetaven primer predstavlja tudi rekombinantni humani insulin, izražen v žafraniki, saj se je po zaključeni fazi I/II preizkušanj pokazalo, da je bioekvivalent komercialnemu standardu. Vsak dosežek prispeva tudi k zaupanju ljudi in njihovem sprejemanju transgenih rastlin kot novih in varnih sistemov za pridobivanje terapevtskih beljakovin za zdravljenje bolezni (Avesani in sod., 2014; Zagorskaya in Deineko, 2021).

Glede na število raziskav, predkliničnih in kliničnih testiranj je več raziskav usmerjenih v zdravljenje bolezni, ki se pogosteje pojavljajo v obliki epidemij. Smernice za prihodnost so zdravila rastlinskega izvora, ki so se na nivojih preizkušanja izkazala kot varna in učinkovita in bi tako lahko zapolnila velike vrzeli pri zdravljenju avtoimunski bolezni in ciljni uporabi bioloških zdravil (Salyaev in sod., 2014).

Kljub počasnejšemu razvoju je v teku mnogo proučevanj, nekateri biofarmaceutski izdelki pa so v predkliničnih ali kliničnih testiranjih ali pa so celo odobreni za uporabo v medicini. Rastlinski ekspresijski sistemi za pridobivanje aktivnih komponent za zdravila imajo veliko prihodnost in se izkazujejo kot enakovredni obstoječim sistemom (Zagorskaya in Deineko, 2021).

6 VIRI

- Arevalo-Villalobos J. I., Rosales-Mendoza S., Zarazua S. 2016. Immunotherapies for neurodegenerative diseases: current status and potential of plant-made biopharmaceuticals. *Expert Review of Vaccines*, 16, 2: 151-159, <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1229602>
- Avesani L., Bortesi L., Santi L., Falorni A., Pezzoti M. 2014. Plant-made pharmaceuticals for the prevention and treatment of autoimmune diseases: where are we?. *Expert Review of Vaccines*, 9, 8: 957-969, <https://doi.org/10.1586/erv.10.82>
- Carter III J. E. in Langridge W. H. R. 2002. Plant-Based Vaccines for Protection Against Infectious and Autoimmune Diseases. *Critical Reviews in Plant Science*, 21, 2: 93-109, <https://doi.org/10.1080/0735-260291044197>
- Chen Q. 2022. Development of plant-made monoclonal antibodies against viral infections. *Current Opinion in Virology*, 52: 148-160, <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.12.005>
- Daniell H., Kulis M., Herzog R. W. 2019. Plant cell-made protein antigens for induction of Oral tolerance. *Biotechnology Advances*, 37, 7:107413, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.012>
- Diamos A. G., Hunter J. G. L., Pardhe M. D., Rosenthal S. H., Sun H., Foster B. C. ... 2020. High Level production of Monoclonal Antibodies Using an Optimized Plant Expression System. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00472>
- Fischer R., Twyman R. M., Schillberg S. 2003. Production of antibodies in plants and their use for global health. *Vaccine*, 21, 7-8. 820-825, [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00607-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00607-2)
- Hansson C., Schön K. Kalbina I., Strid Å., Andersson S., Bokarewa M. I., Lycke N. Y. 2015. Feeding transgenic plants that express a tolerogenic fusion protein effectively protects against arthritis. *Plant Biotechnology Journal*, <https://doi.org/10.1111/pbi.12479>

- He W., Baysal C., Lobato Gómez M., Huang X., Alvarez D., Zhu C. ... 2021. Contributions of the international plant science community to the fight against infectious diseases in humans-part 2: Affordable drugs in edible plants for endemic and re-emerging diseases. *Plant Biotechnology Journal*, 19: 1921 – 1936, <https://doi.org/10.1111/pbi.13658>
- Ko K. in Koprowski H. 2005. Plant biopharming of monoclonal antibodies. *Virus Research*, 111, 1: 93-100, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.03.016>
- Khan I. in Daniell H. 2021. Oral delivery of therapeutic proteins bioencapsulated in plant cells: Preclinical and clinical advances. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 54: 101452, <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101452>
- Lai H. in Chen Q. S. 2015. Protein Expression: The growing potential of plant-made monoclonal antibodies. *Drug Target Review*, 4, <https://www.drugtargetreview.com/article/8059/protein-expression-the-growing-potential-of-plant-made-monoclonal-antibodies/>
- Ma S. in Jevnikar A. M. 2011. Induction of Oral Tolerance to Treat Autoimmune and Allergic Diseases by Using Transgenic Plants. *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*: 21-35. Springer, Dordrecht, https://doi.org/10.1007/978-94-007-2217-0_2
- Menassa R., Du C., Yin Z. Q., Ma S., Poussier P., Brandle J., Jevnikar A. M. 2006. Therapeutic effectiveness of orally administered transgenic low-alkaloid tobacco expressing human interleukin-10 in mouse model of colitis. *Plant Biotechnology Journal*, <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00214.x>
- Moore C. M., Grandits M., Grünwald-Gruber C., Altmann F., Kotouckova M., Teh A. Y. H., Ma J. K. C. 2021. Characterisation of a highly potent and near pan-neutralising anti-HIV monoclonal antibody expressed in tobacco plants. *Retrovirology* 18, 17, <https://doi.org/10.1186/s12977-021-00560-6>
- Nelson P. N., Reynolds G. M., Waldron E. E., Ward E., Giannopoulos K., Murray P. G. 2000. Monoclonal antibodies. *Molecular Pathology*, 53, 3: 111-117, <https://mp.bmj.com/content/53/3/111>
- Peeters K., De Wilde C., De Jaeger G., Angenon G., Depicker A. 2001. Production of antibodies and antibody fragments in plants. *Vaccine*, 19, 17-19: 2756-2761, [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00514-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00514-4)
- Salyaev R. K., Rigano M. M., Rekoslavskaya N. I. 2014. Development of plant-based mucosal vaccines against widespread infectious diseases. *Expert Review of Vaccines*, 9, 8: 937-946, <https://doi.org/10.1586/erv.10.81>
- Shakya A. K., Mallick B., Nandakumar K. S. 2023. A Perspective on Oral Immunotherapeutic Tools and Strategies for Autoimmune Disorders. *Vaccines*, 11, 6: 1031, <https://doi.org/10.3390/vaccines11061031>
- Shakya A. K. in Nandakumar K. S. 2018. Antigen-Specific Tolerization and Targeted Delivery as Therapeutic Strategies for Autoimmune Diseases, 36, 7: 686-699, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.02.008>
- Shil P. K., Kwon K. C., Zhu P., Verma A., Daniell H., Li Q. 2014. Oral Delivery of ACE2/Ang-(1-7) Bioencapsulated in Plant Cells Protects against Experimental Uveitis and Autoimmune Uveoretinitis. *Molecular Therapy*, 22, 12: 2069-2082, <https://doi.org/10.1038/mt.2014.179>

- Song I., Park S. A., Han D., Lee H. K., An H. J., Ko K. 2018. Expression, glycosylation, and function of anti-rabies virus monoclonal antibody in tobacco and Arabidopsis plants. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 59: 285-292, <https://doi.org/10.1007/s13580-018-0031-1>
- Venkataraman S., Hefferon K., Makhzoum A., Abouhaidar M. 2021. Combating Human Viral Diseases: Will Plant-Based Vaccines Be the Answer?. *Vaccines*, 9, 7:761, <https://doi.org/10.3390/vaccines9070761>
- Wu G., Selden D., Fooks A. R., Banyard A. 2017. Inactivation of rabies virus. *Journal of Virological Methods*, 243: 109-112, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.02.002>
- Xiao Y., Kwon K. C., Hoffman B. E., Kamesh A., Jones N. T., Herzog R. W., Daniell H. 2016. Low cost delivery of proteins bioencapsulated in plant cells to human non-immune or immune modulatory cells. *Biomaterials*, 80: 68-79, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.051>
- Zagorskaya A. A. in Deineko E. V. 2021. Plant-Expression Systems: A New Stage in Production of Biopharmaceutical Preparations. *Russia Journal of Plant Physiology*, 68: 17-30, <https://doi.org/10.1134/S1021443721010210>
- Zhu S. in Viejo-Borbolla A. 2021. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence*, 12, 1: 2670-2702, <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1982373>

IMUNOTERAPIJA RAKA

Andraž Pangerc

IZVLEČEK

Poleg tradicionalnih načinov zdravljenja raka, kot so operacije, kemoterapija in radioterapija, se danes vedno več uporablja imunoterapijo. Imunoterapija, ki se uporablja za zdravljenje v sodobni medicini, je drastično izboljšala položaj bolnikov za rakom, znižuje se smrtnost in s tem se imunoterapija uveljavlja kot novi steber zdravljenja raka. Cilj imunoterapije je okrepiti ali usmeriti imunski sistem pacienta, da se bori proti raku. V tem preglednem članku je predstavljena primerjava med pasivno in aktivno imunoterapijo. Predstavljene so metode imunoterapije, ki se danes raziskujejo ali uporabljajo v zdravstvu.

Ključne besede: zdravljenje raka, pasivna imunoterapija, aktivna imunoterapija, Nobelova nagrada 2018, monoklonska protitelesa, vakcina, onkolitični virus, citokininska terapija

Cancer immunotherapy

ABSTRACT

Besides traditional types of treating cancer, including surgery, chemotherapy and radiotherapy, immunotherapy is on the rise. Immunotherapy, which is used in today's medicine, has drastically improved cancer treatments. Mortality is lowering and immunotherapy is establishing itself as a new pillar for treating cancer. The ultimate goal of immunotherapy is to harness or enhance the immune system of a patient, to fight cancer. This review article presents the comparison between passive and active immunotherapy. It presents methods of immunotherapy used or researched in today's medicine.

Key words: treating cancer, passive immunotherapy, active immunotherapy, 2018 Nobel Prize, tumor antigens, monoclonal antibodies, vaccine, oncolytic viruses, cytokine therapy

1 UVOD

Za razliko od tradicionalnih načinov zdravljenja raka, kot sta radioterapija in kemoterapija, je imunoterapija inovativen način zdravljenja, ki dinamično modulira imunski sistem, da napade rakave celice. Imunoterapija se uporablja predvsem za krepitev imunskega sistema z uravnavanjem imunskega mikrookolja, tako da lahko imunske celice napadejo in odstranijo tumorske celice na več pomembnih mestih. Število raziskav za protirakave učinkovine se hitro povečuje, prav tako pa narašča število uspešnih terapij v praksi (Tan in sod., 2020). Ta pregledni članek podrobno predstavlja vse oblike imunoterapije in analizira literaturo, povezano s tumorsko imunostjo, da bi razkril skrivnostno tančico imunoterapije.

Leta 2018 je bila podeljena Nobelova nagrada James P. Allisonu in Tasuku Honji za odkritje terapije za zdravljenje raka z inhibicijo negativne imunske regulacije. Allison je proučeval citotoksičen T-limfocitni antigen-4 (ang. cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4) kot zavoro na T celicah. Sintetiziral je protiteleso, ki se je lahko vezalo na CTLA-4 in ideja je bila,

da bi z blokiranjem receptorja prekinil inhibicijo T celičnega odziva, ter aktiviral imunski odgovor proti raku. Miši na katerih je izvajal poskus so ozdravele za rakom. Tasuku Honjo pa se je ukvarjal s proučevanjem proteina programirane celične smrti 1 (ang. programmed cell death protein 1, protein PD-1), ki je prav tako izražen na površini T-celic. Odkril je mehanizem delovanja proteina in njegovo vlogo pri zaviranju imunskega odgovora. Hitro se je pokazala terapevtska možnost uporabe obeh odkritij (Allison in Honjo, 2018).

Pridobivanje terapevtikov z rastlinskimi produkcijskimi sistemi

Število in količina terapevtikov, ki izvirajo iz rastlinskih produkcijskih sistemov, se je v zadnjih letih drastično povečalo. Največkrat se rastlinski sistemi uporabljajo pri sintezi monoklonskih protiteles, kjer so se izkazali za učinkovito in poceni alternativo sesalskim celicam. Težave s katerimi so se srečali pri uporabi protiteles v sesalskih sistemih so visoki stroški proizvodnje, možne kontaminacije s človeškimi patogeni in omejitve pri deljenju celic. Skozi čas se je pojavila alternativa v uporabi bakterij, kvasovk in rastlin. Rastline so se pokazale, kot najcenejši vir pridobivanja monoklonskih protiteles in ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) je že odobrila nekaj kliničnih testiranj. Prednosti rastlinskih sistemov so visoka produktivnost, poceni pridelava, dokaj enostavna izolacija in izogibanje etičnim pomislekom v primerjavi z mikrobnimi in živalskimi proizvodnjimi sistemi. V Evropi pa je prisotno negativno mnenje javnosti in stroga regulativa glede gensko spremenjenih rastlin. Glavni rastlinski sistem sinteze monoklonskih protiteles predstavlja tobak, pojavljajo pa se še krompir, soja, alfalfa, riž in koruza. Prednost tobaka, zakaj se največ uporablja za pridobivanje protiteles, je njegova sposobnost hitre rasti in velika možnost eprodukcije biomase. Tobak je sposoben rekombinantne terapevtske proteine proizvajati v celotni rastlinski biomasi, kar izredno poceni produkcijo. Težava lahko nastopi z nikotinom in ostalimi toksičnimi alkaloidi, ki potrebujejo dodaten izolacijski postopek (Nessa in sod., 2020). Dent in Matoba (2020) navajata, da se poleg protiteles lahko v rastlinah pridobiva več vrst proteinov uporabljenih v imunoterapevtskih vakcinah proti raku. Avtorja sta mnenja, da bomo kmalu prišlo do naraščajočega trenda pri uporabi rastlinskih sistemom za pridobivanje rekombinantnih proteinov. Ključno pa bo kako se bodo raziskovalci soočili s težavami, ki jih predstavljajo optimalne rastne razmere gojenja rastlin, regulacija transgene ekspresije, postranslacijske modifikacije in izolacija produkta oziroma aktivne snovi.

2 TUMORSKI ANTIGENI

Danes vemo, da lahko s terapevtskim posegom manipuliramo imunski sistem, ki prepozna razvijajočega raka in sprožimo boj proti tumorskim celicam. Sposobnost, da se pri nekaterih bolnikih pokažejo dolgoročni odzivi, se delno pripisuje celicam T, ki lahko: neposredno uničujejo tumorske celice, organizirajo različne protitumorske imunske odzive, kažejo dolgotrajen spomin in kažejo izjemno specifičnost za beljakovine, ki izhajajo iz tumorja. Ta specifičnost izhaja iz temeljnih razlik med rakavimi celicami in njihovimi normalnimi vrstnicami, saj prve razvijejo mutacije, ki spreminjajo beljakovine, ter doživijo epigenetske in genetske spremembe, kar povzroči nenormalno izražanje beljakovin. Ti dogodki lahko povzročijo nastanek tumorskih antigenov. Identifikacija mutiranih in nenormalno izraženih

tumorskih antigenov je bila v preteklosti dolgotrajna in zamudna, vendar napredek na področju sekvenciranja naslednje generacije in napovedovanja epitopov zdaj omogoča hitro identifikacijo mutiranih tumorskih antigenov (Gubin in sod., 2015).

Bourre (2019) je tumorske antigene uvrstil v dveh skupini:

- tumor specifični antigeni (ang. tumor-specific antigens, TSA), ki so značilni samo za tumorske celice in
- antigeni, povezani s tumorjem (ang. tumor-associated antigens, TAA), ki jih tumorske celice izražajo v večji meri kot zdrave celice

TSA so antigeni, ki niso kodirani v normalnem genomu gostitelja in lahko predstavljajo bodisi onkogene virusne beljakovine bodisi beljakovine, ki nastanejo kot posledica somatskih mutacij (neoantigeni). Med nastankom in napredovanjem raka tumorske celice pridobijo mutacije, ki spreminjajo beljakovine in so bodisi odgovorne za transformacijo (ang. driver mutation), bodisi so stranski produkt genomske nestabilnosti, ki spremlja celično transformacijo (ang. passenger mutation). Nekatere od teh sprememb lahko povzročijo izražanje mutiranih beljakovin, ki jih imunski sistem dojema kot tuje beljakovine. Ta razred antigenov je verjetno manj dovzeten za mehanizme imunološke tolerance in zato predstavlja vidnejše tarče za imunski nadzor nad rastjo tumorjev (Gubin in sod., 2015).

Antigeni, povezani s tumorjem (TAA) vključujejo beljakovine, kodirane v genomu osebkov in so lahko normalni diferenciacijski antigeni ali antigeni, ki se v celici prekomerno izražajo. Diferenciacijski antigeni so pridobljeni iz beljakovin, ki se izražajo v določeni vrsti tumorja in primerljivem zdravem tkivu (Vigneron, 2015). Posttranslacijske modifikacije proteinov, kot je fosforilacija, lahko vodijo do nastanka TAA. Ker so TAA telesu lastni proteini, je njihova aktivacija imunskega odziva odvisna od nenormalnih ravni izražanja in zmožnosti zaobiti mehanizme imunskega odziva. V skladu s tem imajo TAA v primerjavi s TSA ali tujimi antigeni običajno manjšo afiniteto do T celičnih receptorjev (TCR). TSA so za razliko od TAA redkejši in jih ni mogoče najti pri vseh tumorjih, zato so bolj primerni za imunoterapiji (Gubin in sod., 2015).

Poznamo pasivno in aktivno obliko imunoterapije. Aktivna vključuje aktiviranje imunskega odgovora gostitelja proti rakastim celicam, medtem ko pasivna vključuje imunske molekule, ki jih pacientu primanjkuje ali jih sam ne proizvaja. Aktivna imunoterapija je lahko specifična in v laboratoriju naredimo terapijo, ki cilja točno določen antigen na tumorski celici, ali pa je nespecifična in okrepi imunski sistem gostitelja. Pasivna terapija predstavlja injiciranje pacientu v naprej pripravljenih imunskih kompleksov, ki pomagajo pri zdravljenju bolezni. Pod aktivno spadajo inhibitorji imunskih kontrolnih točk, imunoterapevtske vakcine proti raku, onkolitični virusi in citokinska terapija; pod pasivno pa spadajo monoklonska protitelesa, CAR-T (ang. chimeric antigen receptor T cells) celična terapija, terapija s tumor infiltrirajočimi limfociti in adaptivno celično zdravljenje (SEER Training Modules, 2023).

3 MONOKLONSKA PROTITELESA

V zadnjih letih se je uspešno razširila uporaba monoklonskih protiteles (mAb) za zdravljenje raka, najpogosteje v kombinaciji z imunoterapijo. Pri razvoju terapevtskih mAb je potrebno poznati heterogenost tumorja, intra-tumorske dejavnike, proteinski inženiring in interakcijo med rakavimi in imunskimi celicami. mAb danes ciljajo specifične antigene na rakavih celicah in inhibirajo signalno pot za razraščanje tumorja. Za proizvodnjo mAb se uporabljajo hibridomi, ki so pridobljeni z združevanjem mielomskih celic človeka s celicami B, ki najpogosteje izvirajo iz miši. Tri tipi mAb se uporabljajo pri terapiji: (1) gola mAb niso konjugati z nobenim radioaktivnim materialom ali drugo vrsto terapevtika, (2) konjugirana mAb, ozančena mAb z kemijsko ali radioaktivno označko, (3) bispecifična mAb, ki je sestavljena iz delov dveh različnih vezavnih fragmentov Ab in je sposobna vezave na dva antigena ali dva epitopa znotraj enega antigena. Gola mAb delujejo z vezavo na celico in s tem pomaga gostiteljevemu imunskemu sistemu pri boju z rakom. Te vrste protiteles se uporabljajo tudi pri zgoraj omenjeni terapiji z inhibitorji imunskih kontrolnih točk. Konjugirana mAb ima poleg vezave na antigen in blokiranje signalov, tudi vlogo dostavljanja zdravljenja direktno do tumorske celice, saj nosi označko. Bispecifična mAb pa se uporablja pri leukemiji, saj združi rakavo in celico T, ter pripelje do aktivacije citotoksičnega efekta (Kumar in sod., 2021).

4 CAR-T CELIČNA TERAPIJA

Odkritje celičnega zdravljenja s himernimi antigenskimi receptorji T (ang. chimeric antigen receptor T cells, CAR-T) je bilo revolucionarno, saj je omogočilo izjemno učinkovite in dolgotrajne klinične odzive. CAR so sintetični receptorji, ki delujejo tako, da limfocite, najpogosteje celice T, preusmerijo v prepoznavanje in odstranjevanje celic, ki izražajo določen ciljni tumorski antigen. Vezava CAR na ciljne tumorske antigene, izražene na celični površini, je neodvisna od receptorja MHC (ang. major histocompatibility complex), kar povzroči močno aktivacijo celic T in močan protitumorski odziv. Zaradi izjemnega uspeha terapije s celicami anti-CD19 CAR-T proti malignomom celic B, jo je leta 2017 odobrila FDA. Vendar pa obstajajo velike omejitve takega zdravljenja, ki jih je še vedno treba odpraviti, vključno z življenjsko nevarno toksičnostjo, omejeno učinkovitostjo pri trdnih tumorjih, zaviranjem in odpornostjo pri malignomih celic B, uhajanjem antigena, omejeno obstojnostjo, slabim transportom in prodiranjem v tumor ter imunosupresivnim mikrookoljem. Poleg tega se mora osebe prilagoditi potrebam tega rastočega in razvijajočega se področja z razvojem izobraževalnih programov za usposabljanje delovne sile. Predlagani so bili številni pristopi, vključno s kombiniranjem celične terapije CAR-T z drugimi protirakavimi terapijami ali uporabo inovativnih strategij inženiringa CAR za izboljšanje protitumorske učinkovitosti, razširitev klinične učinkovitosti in omejitev toksičnosti (Marofi in sod., 2021).

5 TERAPIJA S TUMOR INFILTRIRAJOČIMI LIMFOCITI

Tumorska stroma je sestavljena iz številnih celic, vključno s celicami T, limfociti B, makrofagi, naravnimi celicami ubijalkami in dendritičnimi celicami, ki jih skupaj imenujemo tumor infiltrirajoči limfociti (TIL). Ta mešanica celic je pretežno sestavljena iz poliklonskih,

večinoma tumorsko specifičnih celic CD8⁺ in CD4⁺ T, ki se lahko vežejo na več tumorskih antigenov ter premagajo heterogenost tumorja in pobeg antigena. Zaradi imunosupresivnega mikrookolja tumorja te celice izgubijo sposobnost napadanja tumorja, vendar se ob odvzemu iz tumorja in ekspanziji *ex vivo* reaktivirajo, da napadejo tumorske celice. Uporabnost avtologne terapije s TIL kot učinkovitega protirakavega zdravljenja so Rosenberg in sod. (1988) prvič dokazali pri bolnikih z metastatskim melanomom. Odvzeli so TIL iz bolnikovega tumorja in jih namnožili *in vitro*. Krioprezervirane celice so vrnili nazaj bolnikom z izčrpanimi limfnimi celicami. Bolniki so nato v intenzivni negi prejeli več odmerkov imunske modulacije z IL-2 na osnovi telesne teže. Regresija tumorjev je bila opažena pri 11 od 20 zdravljenih bolnikov v tem preskušanju, kar je bilo več od stopnje objektivnega odgovora, doseženega s samim dajanjem IL-2 ali z limfokini aktiviranih celic ubijalk. To je napovedalo obdobje razvoja in optimizacije zdravljenja s TIL pri drugih vrstah raka, vključno z rakom jajčnikov, pljuč, materničnega vratu in dojk (Katiyar in sod. 2023).

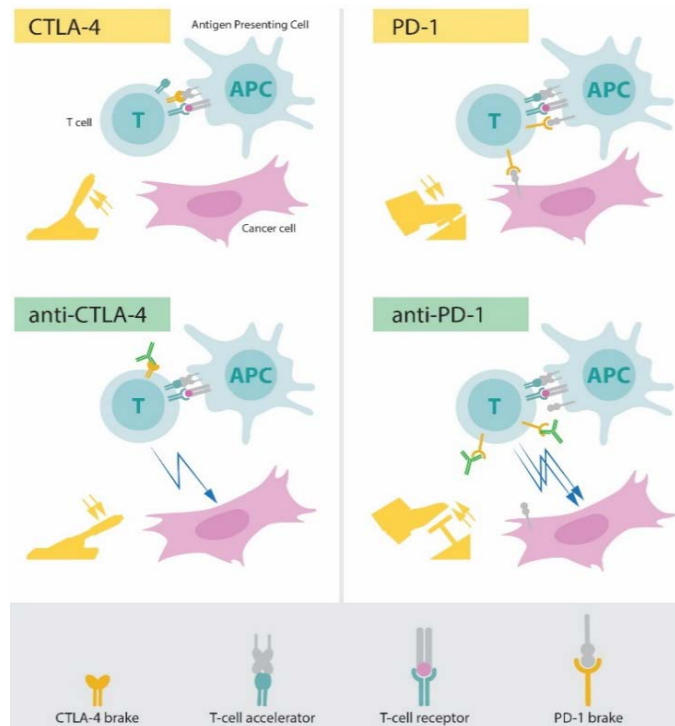
5.1 ADAPTIVNO CELIČNO ZDRAVLJENJE (ACT)

Cilj adaptivnega celičnega zdravljenja je generirati robustni antitumorski odgovor z vračanjem *ex vivo* manipuliranih T celic. Za izvedbo te terapije je prvo potrebna izolacija T celic iz TIL mase in nato generiranje specifičnih T celic, ki napadajo celice željenega tumorja. Modifikacija T celic pripelje do izražanja T celičnega receptorja (TCR) ali CAR, ki je sposoben specifične prepoznave tumorske celice (Met in sod., 2019).

6 INHIBITORJI IMUNSKIH KONTROLNIH TOČK

Inhibitorji imunskih kontrolnih točk (ICI) so imunoterapevtiki proti raku, ki pomagajo telesu pri boju proti raku s ciljanjem imunskih receptorjev na površini limfocitov T. ICI so postali nova oblika zdravljenja raka z izdajo zdravila ipilimumab, ki je revolucioniral področje zdravljenja raka. Za razliko od drugih metod zdravljenja, ICI deluje na imunski sistem gostitelja, da se bori proti raku. Prednost te terapije je tudi daljše obdobje delovanja in nižja raven toksičnosti. Največ se uporabljajo protitelesa, ki ciljajo inhibitorne receptorje CTLA-4, PD-1 in PD-L, njihov mehanizem pa je predstavljen na sliki 1 (Shiravand in sod., 2022).

Poleg tega lahko rakave celice razvijejo različne mehanizme, s katerimi se izognejo imunskemu sistemu, kar privede do napredovanja bolezni. Imunske kontrolne točke so eden od mehanizmov, s katerimi se rakave celice prikrijejo v telesu. Je negativni regulator imunskega sistema, ki preprečuje avtoimunost. Ta mehanizem tumorske celice pogosto izkoristijo, da se izognejo imunskemu odgovoru. Razumemo ga lahko tudi kot omejevalno in zaviralno pot v imunskem sistemu, ki lahko zniža delovanje imunskega sistema, spodbuja delovanje regulatornih imunskih celic ter proizvaja imunosupresivne citokine in kemokine. Limfociti T (imenovani tudi celice T) so jedro celično posredovane imunosti. Aktivirane celice T lahko izločajo veliko število citokinov za aktivacijo imunskih kontrolnih točk. Tumorske celice zavirajo aktivacijo celic T z aktivacijo nekaterih proteinov imunskih kontrolnih točk, kar na koncu privede do povečane imunske odpornosti tumorskih celic (Yin in sod., 2023).



Slika 1: Mehanizem aktivacije T celic in napada na rakave celice - zgoraj levo: aktivacija T-celic zahteva, da se T-celični receptor veže na strukture na drugih imunskih celicah, ki so prepoznane kot telesu tuje. Za aktivacijo celic T je potreben protein, ki deluje kot pospeševalec celic T. CTLA- 4 deluje kot zavora celic T, ki zavira delovanje tega pospeševalnika. Spodnji levi del: Protitelesa (zeleni) proti CTLA-4 blokirajo delovanje zavore, kar povzroči aktivacijo celic T in napad na rakave celice. Zgoraj desno: PD-1 je še ena zavora celic T, ki zavira aktivacijo celic T. Spodnja desna: Protitelesa proti PD-1 zavirajo delovanje zavore, kar vodi do aktivacije celic T in zelo učinkovitega napada na rakave celice (Allison in Honjo, 2018).

7 IMUNOTERAPEVTSKE VAKCINE PROTI RAKU

Imunoterapevtske vakcine proti raku se lahko razlikujejo po antigenu, ki ga ciljajo, adjuvansih uporabljenih in po načinu vnosa. Načini vnosa so peptidi/proteini, cele tumorske celice, rekombinantni vektorji, dendritične celice (DC), gangliozidi in geni. Vsak ima svoje prednosti in slabosti. Najpogostejši način vnosa vakcine so peptidi/proteini. Razvoj teh vakcin je razmeroma preprost in ekonomičen. Preprostost platforme se lahko izkaže za problematično, če njeno kratko aminokislinsko zaporedje ne kodira dovolj antigeneskega materiala, ki bi povzročil imunski odziv. Peptidna cepiva iz tega razloga običajno potrebujejo imunski adjuvans. Zaradi večjega aminokislinskega zaporedja so beljakovinska cepiva dražja kot peptidna cepiva, vendar lahko izzovejo močnejši odziv. Tako peptidna kot beljakovinska cepiva so omejena zaradi potrebe po ujemanju s človeškimi levkocitnim antigenom (HLA). Cepiva s celimi tumorskimi celicami, ki se delijo na avtologna (telesu lastne celice) ali alogena (celice pridobljene iz donorja ali *ex vivo*), lahko predstavljajo veliko paleto različnih tumorskih antigenov. To pomanjkanje specifičnosti lahko oslabi imunski odgovor, potrebna pa je tudi

dodatna stimulacija s granulocito makrofagne kolonije stimularijočim faktorjem (GM-CSF) ali bacillusom Calmette-Gue´rin (BCG). Avtologna cepiva, prvič preizkušena leta 1978 običajno potrebujejo adjuvans, prav tako pa zahtevajo tudi pridobitev tumorja od bolnika, kar ni vedno mogoče. DC so profesionalne antigen predstavitvene celice, ki skozi glavni histokompatibilni kompleks (MHC) aktivirajo limfocite T. Za predstavitev na MHC je potrebno tumorski antigen spraviti v dendritično celico, da lahko proti njemu sproži imunski odziv, to pa lahko storimo na veliko različnih načinov, kot so pulziranje s peptidi, infekcija z vektorji, fuzije, izpostavljanje tumorskim lizatom idr. Gangliozidi so tip glikolipidov in so antigeni, ki se na površini tumorskih celic prekomerno izražajo. Vakcina skuša sprožiti imunski odgovor proti tem antigenom in s tem uničiti tumor. Genetske vakcine uporabljajo plazmidne ali viralne vektorje za transfekcijo DNA ali RNA v gostitelja, ki neposredno proizvaja željen antigen, proti kateremu se sproži imunski odgovor (DeMaria in Bilusic, 2019).

8 ONKOLITIČNI VIRUSI

Onkolitični virusi so organizmi, ki so sposobni identificirati, okužiti in lizirati različne celice v tumorskem okolju, s tem pa ustaviti napredovanje tumorja. Virus se injicira v telo pacienta, ker virus prepozna tumorsko celico in jo okuži. Z uporabo svojih mehanizmov se umeša v delovanje tumorske celice, kar privede do avtofagije same celice. Po smrti celice pa novo nastali virusi napadajo še ostale tumorske celice. Druga možnost uporabe virusa pa je zajetje virusa s strani antigen predstavitvene celice (APC). Kasneje pride do izražanja glavnega histokompatibilnostnega kompleksa razreda 2 skupaj z virusnimi beljakovinami na površini celic, kar ustvari ugodno okolje za predstavitev antigenov, ter posledično aktivacijo in stimulacijo celic CD4⁺ T in celic CD8⁺ T. Cilj je napad tumorske celice s strani imunskega sistema. Celična smrt tumorja sprosti antigene, ki jih lahko imunski sistem zazna in se proti njim bojuje (Santos Apolonio in sod., 2021).

9 CITOKINSKA TERAPIJA

Citokini so regulatorji različnih vrst celic in celičnih dejavnosti, zlasti v imunskem sistemu. Glavni razredi citokinov, ki sodelujejo v celični komunikaciji med homeostazo in boleznijo, vključujejo interleukine, interferone, nekatere vrste tumorskega nekroznega faktorja (TNF), kemokine (kemotaktične citokine) in rastne faktorje. Citokini običajno delujejo na ravni parakrinega in/ali avtokrinega delovanja s strogo nadzorovano proizvodnjo. Citokini imajo ključno vlogo pri celičnem komuniciranju znotraj tumorskega mikrookolja (TME). Citokini navadno prispevajo k protitumorskemu odzivu, vendar težavo predstavlja neregulirano/moteno izločanje citokinov s strani malignih celic, imunskih celic in stromalnih celic v TME. Terapevtski potencial predstavlja izkoriščanje pozitivnih učinkov citokinov in nevtralizacija njihovega delovanja, ko je neregulirano/moteno. Poznamo tudi citokine, ki so vključeni v samo napredovanje tumorja in induciranje onkogenih sprememb v zdravih celicah. Citokini so kot terapija odobreni s strani FDA in se jih uporablja v sodobni imunoterapiji (Propper in Balkwill 2022).

10 ZAKLJUČEK

V zadnjem desetletju opažamo ogromen porast zdravil proti raku in imunoterapija je ena vodilnih metod, ki nakazujejo prihodnost tega zdravljenja. V tem članku so predstavljene različne oblike zdravljenja in večina od njih vključuje personalizirano terapijo. Novodobne oblike zdravljenja nakazujejo pomen personalizirane medicine in nakazujejo, da se bolezni med posamezniki razlikujejo. Cilj današnjih raziskovalcev je z sodobnejšimi orodji odkriti veliko število antigenov, da lahko sestavijo terapijo, ki je specifična proti samemu antigenu in določenemu raku. Z napredkom v tehnologiji sekvenciranja in boljšim razumevanjem imunskega sistema človeka, lahko pričakujejo nadaljnje izboljšave v tej terapiji v prihodnosti. Izboljševanje tehnologije mora iti v smer pocenitve procesa pridobivanja terapevtikov, tu se pojavlja možnost uporabe rastlinskih proizvodnih sistemov, ki imajo veliko prednosti, v glavnem pa so cenovno bolj ugodni od sesalskih celičnih linij.

11 VIRI

- Allison J. P., Honjo T. 2018. The 2018 Nobel Prize in Physiology or Medicine-Press release, press_eng_Final (nobelprize.org)
- Bourre L. 2019. Targeting Tumor-Associated Antigens and Tumor-Specific Antigens. Crown Bioscience, <https://blog.crownbio.com/targeting-tumor-associated-antigens-and-tumor-specific-antigens> (4. sep. 2023)
- DeMaria P. J., Bilusic M. 2019. Cancer Vaccines. Hematology/Oncology Clinics of North America 33, 2: 199–214, <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.12.001>
- Dent M., Matoba N. 2020. Cancer biologics made in plant. Current Opinion in Biotechnology, 61: 82-88, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.11.004>
- Gubin M. M., Artyomov M. N., Mardis E. R., Schreiber R. D. 2015. Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy. The Journal of Clinical Investigation, 125, 9: 3413–21, <https://doi.org/10.1172/JCI80008> Katiyar, Vatsala,
- Katiyar V., Chesney J., Kloecker, G. 2023. Cellular Therapy for Lung Cancer: Focusing on Chimeric Antigen Receptor T (CAR T) Cells and Tumor-Infiltrating Lymphocyte (TIL) Therapy. Cancers 15, 14: 3733, <https://doi.org/10.3390/cancers15143733>
- Kumar M., Thangavel C., Becker R. C., Sadayappan S.. 2021. Monoclonal Antibody-Based Immunotherapy and Its Role in the Development of Cardiac Toxicity. Cancers 13, 1: 86, <https://doi.org/10.3390/cancers13010086>
- Marofi F., Tahmasebi S., Rahman H. S., Kaigorodov D., Markov A., Yumashev A. V., Shomali N., Chartrand M. S., Pathak Y., Mohammed R. N., Jarahian M., Motavalli R., Motavalli Khiavi F. 2021. Any closer to successful therapy of multiple myeloma? CAR-T cell is a good reason for optimism. Stem cell research & therapy, 12, 1: 217, <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02283-z>
- Met Ö., Jensen K. M., Chamberlain C. A., Donia M., Svane I. M. 2019. Principles of adoptive T cell therapy in cancer. Seminars in immunopathology, 41, 1, 49–58, <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0703-z>

- Nessa U. M., Rahman M. A., Kabir Y. 2020. Plant-Produced Monoclonal Antibody as Immunotherapy for Cancer. *BioMed Research International*. 3038564, <https://doi.org/10.1155/2020/3038564>
- Propper D. J., Balkwill F. R. 2022. Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 19, 4: 237–253, <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00588-9>
- Santos Apolonio J., Lima de Souza Gonçalves V., Cordeiro Santos M. L., Silva Luz M., Silva Souza J. V., Rocha Pinheiro S. L., de Souza W. R., Sande Loureiro M., de Melo F. F. 2021. Oncolytic virus therapy in cancer: A current review. *World Journal of Virology* 10, 5: 229–55, <https://dx.doi.org/10.5501/wjv.v10.i5.229>
- SEER Training Modules. Types of Biological Therapy. U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute <https://training.seer.cancer.gov/treatment/biotherapy/types.html> (5. sep. 2023)
- Shiravand Y., Khodadadi F., Kashani S. M. A., Hosseini-Fard S. R., Hosseini S., Sadeghirad H., Ladwa R., O'Byrne K., Kulasinghe A. 2022. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Current oncology*, 29, 5: 3044–3060, <https://doi.org/10.3390/curroncol29050247>
- Tan S., Li D., Zhu X. 2020. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 124: 109821, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109821>
- Vigneron N. 2015. Human tumor antigens and cancer immunotherapy. *BioMed research international*, 948501, <https://doi.org/10.1155/2015/948501>
- Yin Q., Wu L., Han L., Zheng X., Tong R., Li L., Bai L., Bian Y. 2023. Immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a review. *Frontiers in immunology*, 14: 1167975, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1167975>