

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/29812> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Saiman, Mohd Zuwairi

Title: Terpenoids and terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures

Issue Date: 2014-11-20

Samenvatting

Catharanthus roseus is een waardevolle medicinale plant die belangrijke farmaceutisch actieve terpeen indoolalkaloïden (TIA) produceert, zoals de bloeddrukverlagende verbindingen ajmalicine en serpentine, en de antikanker dimere/bisindool alkaloïden vinblastine en vincristine. De plant produceert zeer lage hoeveelheden van deze dimere verbindingen; hierdoor is de productie bewerkelijk wat leidt tot een hoge marktprijs. Aangezien chemische synthese als productiemethode voor deze verbindingen commercieel niet haalbaar is, vanwege hun complexe chemische structuur en vooral de vele chirale centra, is het van groot belang om een alternatief productieproces te ontwikkelen via een biotechnologische aanpak met plantencel- of orgaanculturen. Celculturen van *C. roseus* zijn al tientallen jaren intensief onderzocht aangaande verschillende aspecten betrokken bij de vorming van de TIA variërend van de genen, hun expressie en de niveaus van metabolieten geassocieerd aan de biosyntheseroute, inclusief het effect van biotische en abiotische factoren daarop. Hierdoor is *C. roseus* een van de best bestudeerde medicinale planten en een belangrijk modelsysteem binnen het plantencel biotechnologisch onderzoek. Desondanks is de TIA productie door *C. roseus* celculturen nog steeds te laag voor commercialisatie in tegenstelling tot andere met celculturen geproduceerde plantenverbindingen, zoals shikonine (*Lithospermum erythrorhizon*), paclitaxel (*Taxus brevifolia*), en ginsenosides (*Panax ginseng*). Dit is het gevolg van het lage biosyntheseniveau van TIA in *C. roseus* celculturen dat door verschillende aspecten beïnvloed wordt, zoals beperkte conversiecapaciteit van enzymen in de biosyntheseroute, de subcellulaire lokalisatie van metabolieten en enzymen met als gevolg daarvan een beperking door inter- en intracellulair transport, en competitie om precursor metabolieten tussen verschillende metabolische routes. Al deze aspecten vereisen diepgaand onderzoek om de specifieke condities en regulatie van processen in de plantencellen als productiefaciliteit te begrijpen. Een aantal van deze aspecten betrokken bij TIA productie zijn daarom tijdens dit promotie onderzoek bestudeerd en beschreven in dit proefschrift.

Het onderzoek begon met de karakterisatie van negen *C. roseus* celculturen die reeds voor verschillende studies binnen de onderzoeksgroep benut waren (**Hoofdstuk 2**). In deze studie werden de niveaus aan TIA inclusief hun monoterpeen precursors, sterolen en carotenoïden geanalyseerd, aangezien zij respectievelijk de metabole groepen van

monoterpenen (C10), triterpenen (C30) en tetraterpenen (C40) vertegenwoordigen, die potentieel in competitie zijn voor dezelfde isopreen (C5) precursor. De resultaten geven aan dat de metabole route naar geranylgeranyl difosfaat (GGPP; C20) en carotenoïde productie limiterend zou kunnen zijn voor TIA biosynthese, aangezien beide routes uitgaan van de precursor geranyl difosfaat (GPP; C10) die via de methylerythritol fosfaat (MEP) route gevormd wordt in de chloroplast. Het metabole vertakkingspunt tussen de C10 en C20 verbindingen lijkt daarom een interessant doel voor metabole en genetische modificatie. Daarnaast zochten we een kandidaat cellijn met een hoge TIA productie capaciteit voor vervolgonderzoek. Van de onderzochte *C. roseus* celculturen bleek de CRPP-type cellijn de beste, TIA-producerende cellijn te zijn.

Er zijn meerdere vertakkingen in de terpeen biosyntheseroute die naar verschillende terpeen groepen leiden en dit zou kunnen betekenen dat er competitie is om de voorraden aan isopreen C5 precursors. Om te bepalen of stimulatie van TIA biosynthese door signaal moleculen een gevolg is van herverdeling van precursors tussen geassocieerde terpeen routes danwel het gevolg van een totale toename aan precursor beschikbaarheid, is het effect van jasmonaat (JA) elicitatie op verschillende terpeen routes in *C. roseus* cellen geanalyseerd. De gehalten van de monoterpenen (TIA; C10), triterpenen (fytosterolen; C30) en tetraterpenen (carotenoiden; C40), en de verdeling van isopreen C5 eenheden zijn geëvalueerd. De resultaten in **Hoofdstuk 3** tonen aan dat de metabolietniveaus van de TIA en de carotenoiden toenamen na JA elicitatie, terwijl het gehalte aan fytosterolen constant bleef. Dit is een indicatie dat de precursors vanuit de MEP route in de chloroplast in verhoogde mate beschikbaar waren. Door de verdeling van isopreen C5 eenheden uit de MEP route te evalueren, bleek, dat de elicitatie de ratio van C5 eenheden tussen de caroteen en de TIA groepen niet lijkt te beïnvloeden. Het zou interessant zijn om de hogere beschikbaarheid aan C5 isopreen eenheden te kanaliseren van de carotenoiden naar de TIA om zo de TIA productie te bevoordelen. Naast de gerichte analyse van terpeen groepen, toonde ¹H-NMR analyse andere metabole veranderingen in JA geëliciteerde cellen aan, waaronder een toename aan strictosidine, barnsteenzuur, fumaarzuur, en appelzuur niveaus en een daling van de suiker niveaus.

Er zijn indicaties dat er een interactie is tussen de isopentenyl difosfaat (IPP) en dimethylallyl difosfaat (DMAPP) voorraden van de cytosolische mevalonaat en de plastidiale MEP routes. De herverdeling van de isopreen C5 precursors geeft aan, dat IPP::DMAPP uit de MEP route “uitlekt” naar de cytosolische terpeen route. In **hoofdstuk 4** is daarom de metabolietstroom tussen verschillende terpeen groepen geëvalueerd met specifieke aandacht

voor de verdeling van isopreen C5 eenheden naar sterolen en triterpenen (C30), carotenoiden (tetraterpenen; C30) en TIA (monoterpenen; C10). Verder is het hypothetische verlies van isopreen C5 eenheden uit de MEP route onderzocht als potentieel competitief element in de verdeling van MEP intermediären ten opzichte van carotenoiden en TIA. Door middel van mevalonaat toevoeging aan celculturen om de cytosolische mevalonaat route te supplementeren, werd verwacht dat de cytosolische terpeen routes gesatureerd zouden worden, waardoor eventuele opname van isopreen eenheden uit de MEP route verminderd zou zijn, zodat verhoudingsgewijs meer isopreen C5 eenheden beschikbaar zouden blijven voor de carotenoïde en TIA biosynthese. De resultaten toonden aan dat het gehalte aan sterolen toenam bij toevoeging van mevalonaat aan de *C. roseus* celculturen tot een lage (0.2 mM) en een hoge (3.3 mM) eindconcentratie, maar dat er geen toename van metabolieten in de MEP route richting TIA en carotenoiden plaatsvond.

Eerdere studies hebben aangetoond dat de beschikbaarheid van geraniol een limiterende factor in de monoterpeen biosynthese zou kunnen zijn. Daarom is onderzocht wat het effect van geraniol op de biosynthese van TIA en monoterpeen precursors zou zijn door geraniol bij verschillende concentraties (0.32 – 1.62 mM) toe te voegen aan de *C. roseus* celculturen van de cellijn CRPP (**Hoofdstuk 5**). Als resultaat werd gevonden dat loganaat en een grote nieuwe piek, zoals waargenomen met HPLC-DAD, accumuleerden op een concentratie- en tijd-afhankelijke wijze. Echter, de productie van strictosidine en downstream TIA leek onveranderd, terwijl catharanthine en tabersonine afnamen bij de hogere geraniol concentraties (1.30 – 1.62 mM). Een combinatie behandeling van geraniol supplementatie (1.62 mM) en JA elicitering (102 µM) op de daaropvolgende dag, resulteerde 72 uur na elicitering in een significant verhoogd strictosidine niveau (68%) ten opzichte van alleen JA elicitering. Desalniettemin had de combinatie behandeling geen additioneel positief effect op productie van serpentine, catharanthine en tabersonine. Deze resultaten tonen aan dat geraniol supplementatie bij *C. roseus* celculturen leidt tot accumulatie van loganaat, terwijl additionele behandeling middels JA elicitering leidt tot verdere conversie naar strictosidine, maar niet naar verdere down-stream TIA. Verder zijn met NMR analyse signalen van geraniol analogen gedetecteerd in de geraniol gesupplementeerde cellen, die mogelijk overeenkomen met de, door middel van HPLC-DAD, waargenomen nieuwe verbindingen.

De beperkte beschikbaarheid van geraniol als upstream precursor voor de monoterpeen route kan veroorzaakt worden door een gelimiteerde productie danwel activiteit van het enzym geraniol synthase en/of een beperking in het transport van geraniol van de

plastide naar het cytosol. **Hoofdstuk 6** beschrijft de overexpressie van het *C. roseus* ' geraniol synthase gen in de plastiden (CrGES) en het cytosol (Δ plCrGES) van *C. roseus* cellen via biolistische transformatie. De overexpressie van CrGES and Δ plCrGES in de *C. roseus* cellijn MP183L, die onder standaard condities geen TIAs of precursors produceert, resulteerde niet in de accumulatie van TIAs of monoterpeen iridoid precursors in getransformeerde cellen. Echter, in vergelijking met de controle cellijnen, getransformeerd met een lege vector, bleken de gehalten aan phenylalanine, tyrosine, valine, en leucine hoger te zijn in de CrGES overexpressie lijnen, terwijl de waarden voor deze metabolieten in de Δ plCrGES overexpressie lijnen lager waren. Daarbij waren de niveaus aan isoleucine en tryptophan hoger in de CrGES dan in de Δ plCrGES overexpressie lijnen. Blijkbaar heeft de overexpressie van CrGES en Δ plCrGES alleen invloed op het primair metabolisme in de specifieke *C. roseus* cellijn gebruikt in deze studie.

Perspectieven

The TIA productie op commerciële schaal met cel-culturen wordt belemmerd door de lage opbrengsten. Het productieproces in de planten-cellen bestaat uit een complex netwerk aan biochemische processen, inclusief transport van betrokken elementen die nodig zijn om de logistiek van de biochemische processen op orde te houden, bijvoorbeeld met betrekking tot het aanvoeren van substraten, co-factoren en energie. Engineering van de metabole routes kan toegepast worden om de flux in de TIA biosynthese route te verhogen en om belemmeringen op te lossen. Dit vereist echter volledige kennis van de regulatie van de biosynthese route, inclusief kennis van de betrokken genen en enzymen, regulatie door transcriptiefactoren, subcellulaire localisatie van de enzymen en het intra- en intercellulaire transport van intermediären.

Het onderzoek heeft zich gericht op de opheldering van het upstream secoiridoid deel van de TIA route, omdat de precursor beschikbaarheid in dit deel van de route als beperkende en snelheidsbepalende stap in de TIA biosynthese beschouwd wordt. De hier beschreven studies hebben aangetoond, dat er in de *C. roseus* celculturen ook een limiterende stap is in het vrijgeven van strictosidine naar de down-stream TIA en dat verder onderzoek nodig is om de regulatie van deze stap op te helderen. Zowel de precursor/substraat beschikbaarheid en expressie van betrokken genen spelen kritische rollen in de TIA productie. Daarbij is de biosynthese route verdeeld tussen verschillende celtypen in de plant en binnen de cellen ook nog in delen uitgesplitst over de verschillende subcellulaire compartimenten, waardoor het vereist is om tot over-expressie gebrachte enzymen correct te lokaliseren.

De TIA productie zou verbeterd kunnen worden als er meer isopreen C5 eenheden naar de TIA biosynthese route gekanaliseerd worden en als de flux naar competitieve routes verlaagd wordt, maar dit zou kunnen interfereren met andere essentiële biochemische processen die de groei en ontwikkeling van de plant beïnvloeden. In plaats van constitutieve repressie van competitieve routes, zou een nieuwe metabole aanpak ontwikkeld moeten worden waarmee temporele repressie gerealiseerd wordt. De beoogde aanpak zou het mogelijk moeten maken om de gewenste metabole routes en het productieproces in de cellen te controleren en de regulatie aan en uit te schakelen op het optimale moment en voor een bepaalde duur om zo specifiek de productie van de beoogde verbindingen te maximaliseren, en groei en productie te scheiden. Transcriptiefactoren spelen een rol als hoofdschakelaar die de expressie van genen in hele of delen van biosynthese routes controleren. Aangezien overexpressie van een enkel biosynthese-gerelateerd gen vaak onvoldoende is om effect te realiseren, terwijl de overexpressie van meerdere genen uit een route meestal lastig is, biedt de overexpressie van een activerende transcriptiefactor een alternatief waarmee algehele expressie binnen een biosynthese route gecontroleerd kan worden, zodat de biosynthese flux en opbrengst van gewenste metabolieten verhoogd kan worden. Een aantal transcriptiefactoren die betrokken zijn bij de regulatie van enkele TIA genen zijn gecloneerd, maar geen van hen controleert alle genen uit de biosynthese route. Derhalve is meer onderzoek nodig om additionele transcriptiefactoren te identificeren die de TIA biosynthese route reguleren.

Verder kan de efficiëntie van de *Catharanthus* cellen (bijvoorbeeld van de CRPP cellijn) om strictosidine te produceren, benut worden. Strictosidine is in verschillende plantensoorten betrokken bij de vorming van veel verschillende alkaloiden; door introductie van heterologe genen naar de *Catharanthus* cellen kan de productiecapaciteit voor alkaloiden enorm uitgebreid worden. Als alternatief kan de strictosidine geïsoleerd worden om als component te dienen voor verdere chemische synthese van alkaloid-derivaten.

Reconstructie van een deel of de hele TIA biosynthese route in een heterologe, plantaardige gastheer of een ander hoogproductief bacterieel of gist model zou een alternatief bieden voor de productie van alkaloiden om de restricties in de productiecapaciteit van plantencellen op te lossen, inclusief de beperkingen met betrekking tot lange generatietijd en lage biomassa productie van plantencellen. Deze alternatieve aanpak vereist de beschikbaarheid van alle structurele biosynthese genen, kennis van de regulatie van de biosynthese route en het vermogen van de gastheer om alle precursors te produceren. Daarbij moet geëvalueerd worden of de gastheer productvorming kan faciliteren en of de

geïntroduceerde route niet onverwacht gehinderd wordt door endogene regulatoire factoren en competitieve routes. Het meest plausibel is, dat in dit scenario niet alleen structurele genen van de TIA route tot overexpressie gebracht of geblokkeerd moeten worden, maar dat ook meerdere regulatoire genen, genen van competitieve routes, of betrokken bij transport en opslag van de producten aangepast moeten worden; kortom het hele productieproces in de cellen moet ge-reset worden in een synthetisch biologische aanpak.