



# VII Śląskie Farmaceutyczne Spotkanie Naukowe Od Nauki do Pacjenta



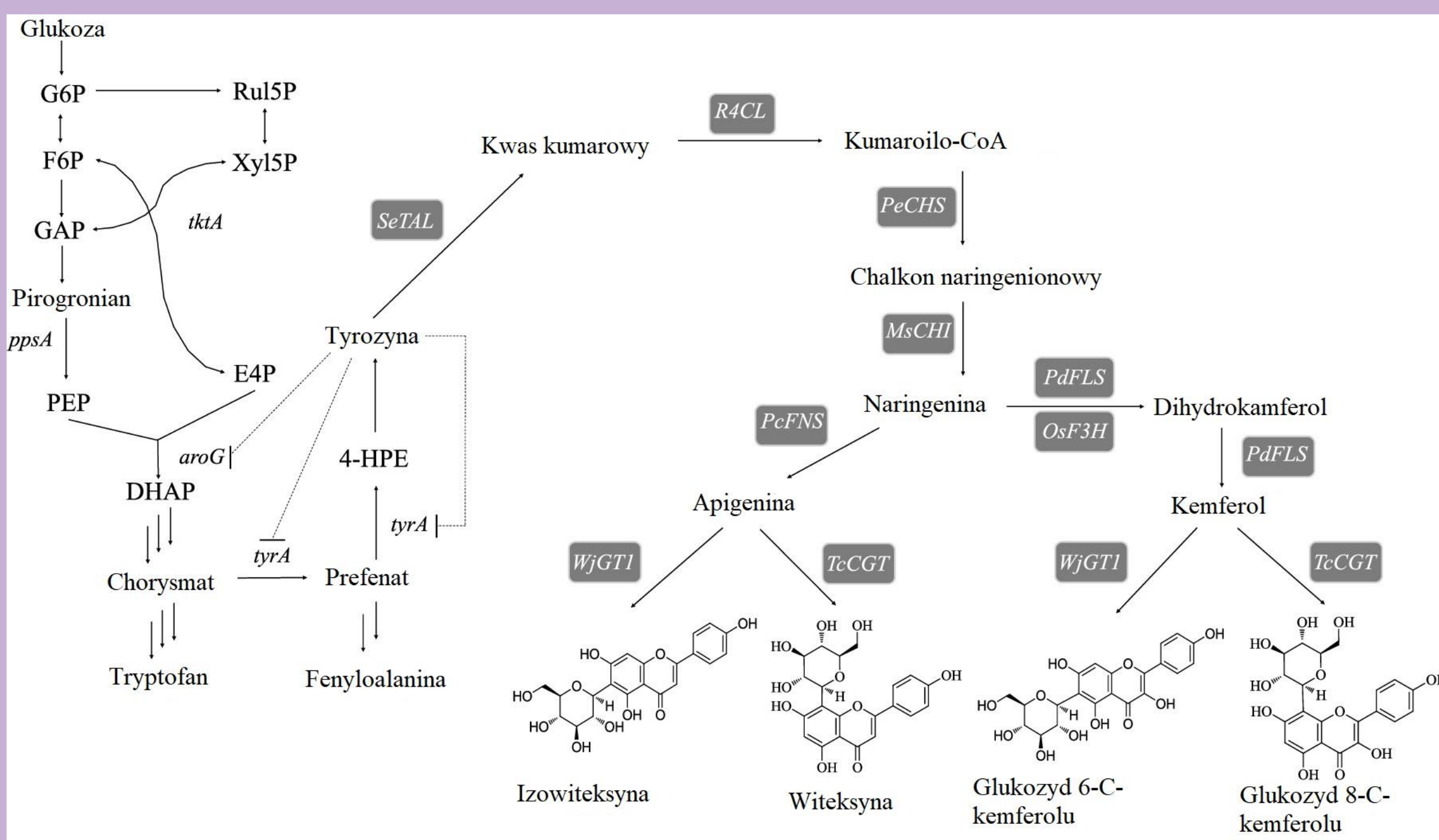
## Produkcja roślinnych flawonoidów w transgenicznym szczepie *Escherichia coli*

Anna Szczotka<sup>1</sup>, Radosław Pudętko<sup>1</sup>, Sabina Gałka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, <sup>2</sup>Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec

Flawonoidy to naturalnie występujące w roślinach związki polifenolowe, które wykazują szereg właściwości prozdrowotnych, działają m.in. przeciwzapalnie, przeciwalergicznie, przeciwutleniająco, przeciwnowotworowo, neuroprotekcynie, hepatoprotekcynie, przeciwbakteryjnie, przeciwwirusowo i przeciwbólowo. Pozytywnie oddziałują również na układ sercowo-naczyniowy poprzez obniżenie ciśnienia tętniczego krwi, wzmocnienie naczyń krwionośnych i działanie przeciwmiażdżycowe. Poza tym udowodniono, że niektóre flawonoidy hamują działanie oksydazy ksantynowej – enzymu, który prowadzi do zwiększenia poziomu kwasu moczowego w surowicy, co jest szczególnie przydatne w leczeniu dny moczanowej, czy też kamieni nerkowych. Dodatkowo flawonoidy łagodzą objawy niedoboru estrogenów, szczególnie u kobiet w okresie menopauzalnym [1,2].

Do grupy flawonoidów zaliczamy obecnie ponad 6 tysięcy związków, z których coraz więcej jest syntetyzowanych w systemach mikrobiologicznych, np. witeksynę, izowiteksynę, 6 i 8-C-glukozyd kemferolu uzyskano z transgenicznym szczepem *Escherichia coli*. Do tego celu skonstruowano pięcio- lub sześćoetapowy szlak metaboliczny do syntezy aglikonów flawonoidowych z tyrozyny i wykorzystano dwie regioselektywne flawonoidowe C-glikozylotransferazy z Chrzanu japońskiego (*Wasabia japonica* (Ryc.1) [3], WjGT1) i Pełnika chińskiego (*Trollius chinensis* (Ryc.2.) [4], TcCGT), używając glukozy jako substratu wyjściowego. Dodatkowo w tym badaniu przeanalizowano kilka modułów genowych dla szlaku szikimowego i wskazano najefektywniejszy do syntezy każdego z tych czterech flawonoidów C- glikozydowych. W sumie w badaniu wykorzystano 15 plazmidów i 20 szczepów *E.coli* (Ryc.3), a do dwóch z nich wklonowano po 5 genów syntezy prekursorów flawonoidów (SeTAL- tyrozynowa aminolizaza z *Saccharothrix espanaensis*; R4CL ligaza 4-kumaroyl-CoA z *Oryza sativa*; syntaza chalkonu z *Populus euramericana*; MsCHI, izomeraza chalkonu z *Medicago sativa*; OsF3H, flawanono 3-hydroksylaza z *O. sativa*; PdFLS, syntaza flawonolu z *P. deltoidea*; PcFNS, syntaza flawonu z *Petroselinum crispum*) (Ryc.3,4) [2].

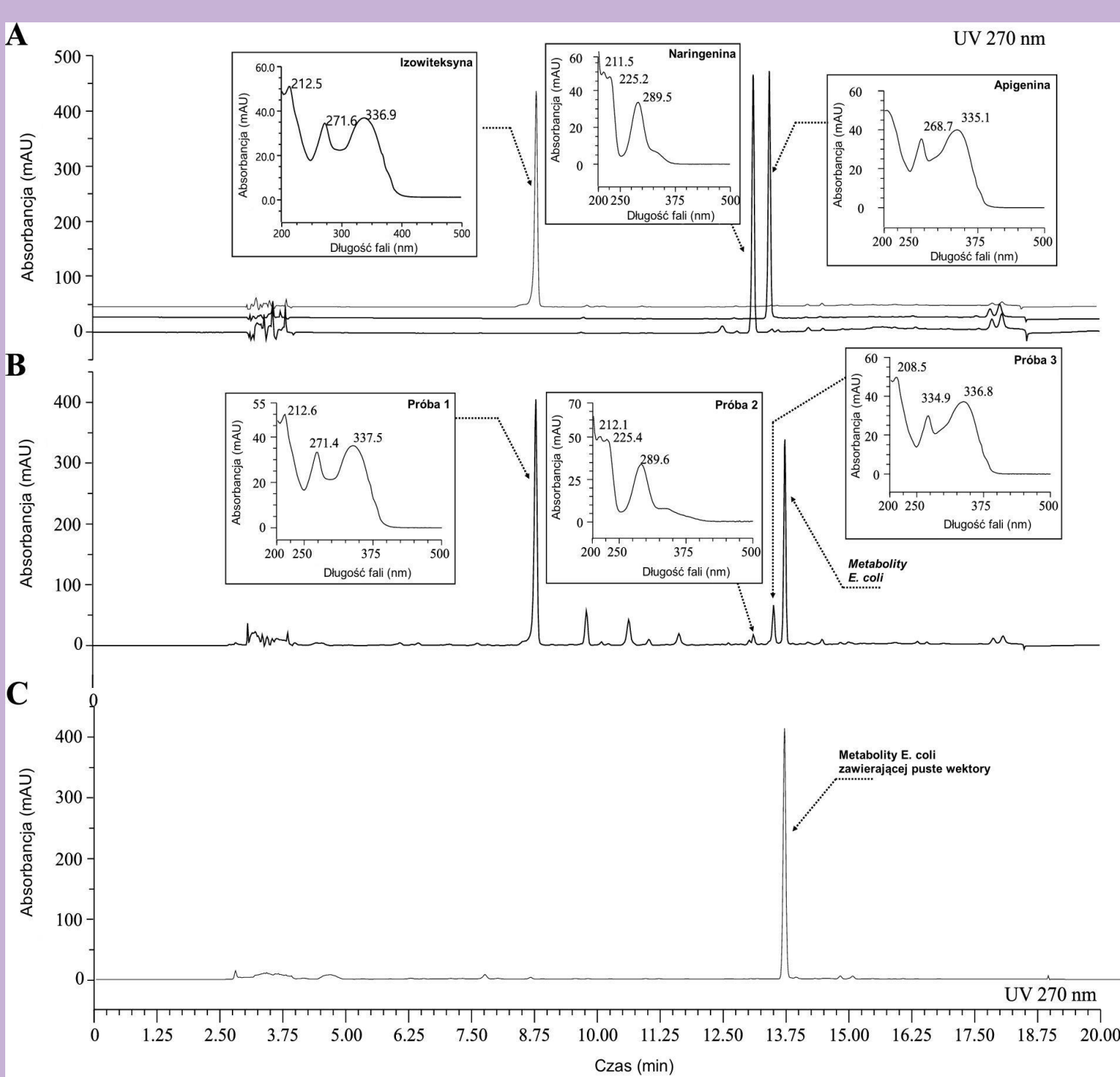


**Ryc.4.** Schematyczna ścieżka syntezy C-glikozydów flawonoidowych z glukozy w transgenicznej *E. coli*. G6P, glukozo-6-fosforan; F6P, fruktozo-6-fosforan; GAP, gliceraldehydo-3-fosforan; PEP, fosforenolopirogronian; Ru5P, rybulozo-5-fosforan; Xyl5P, ksylozo-5-fosforan; E4P, erytrozo-4 fosforan; DHAP, 7-fosforan-3-deoksy-D-arabinoheptulozonianu; 4-HPE, 4-hydroksyfenolopirogronian; ppsA, syntaza fosfoenolopirogronianu; tktA, transketolaza1; aroG, syntaza 7-fosforan-3-deoksy-D arabinoheptulozonianu; tyrA, mutaza chorysmatowa/dehydrogenaza preferatowa. Geny syntezy prekursorów flawonoidów wprowadzone do *E. coli* oznaczono w szarym polu [2].

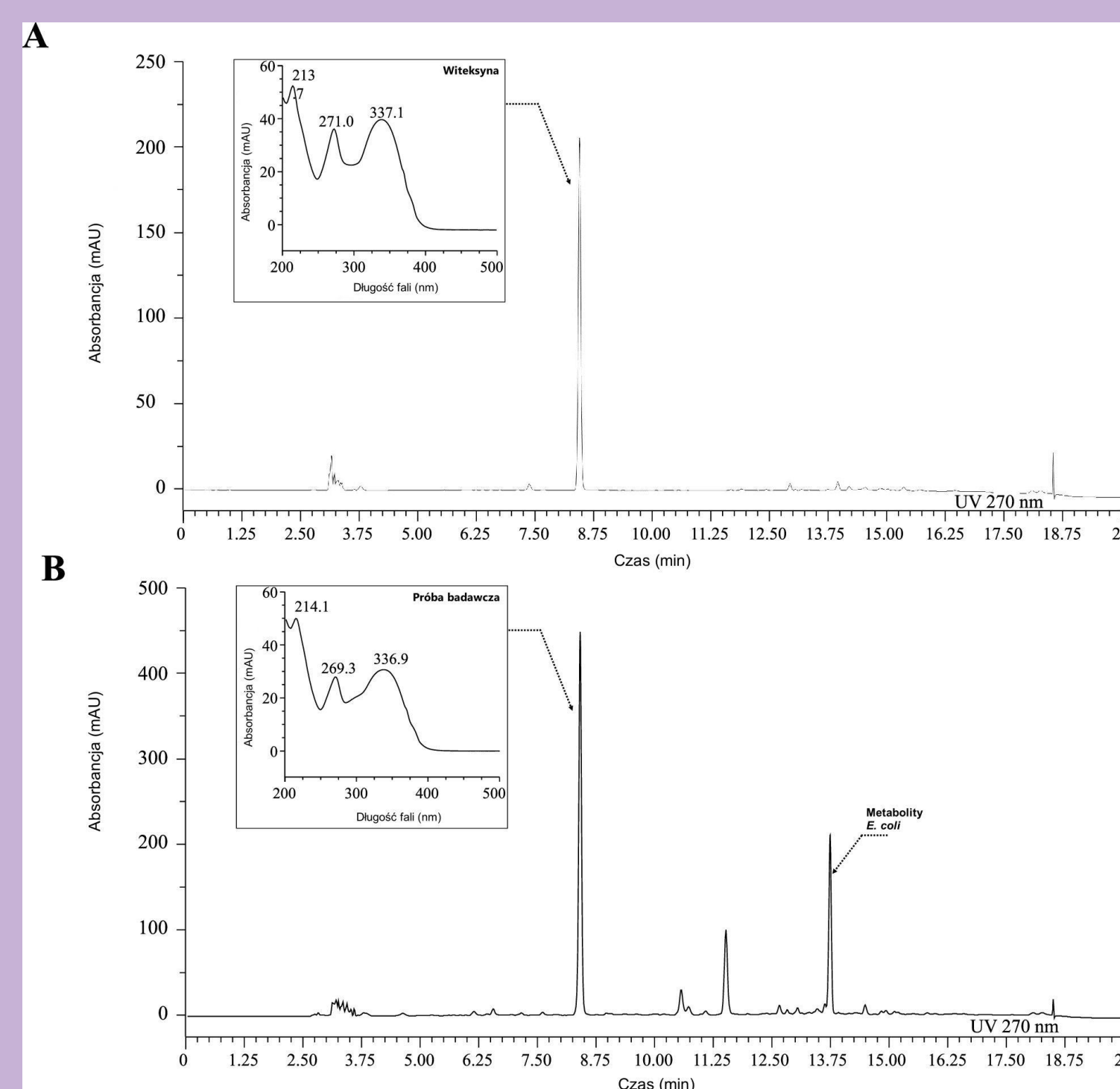
plasmid or <i>E. coli</i> strains	relevant properties or genetic marker
plasmids	F1 ori, Amp <sup>r</sup>
pETDuet-1	CDF ori, Sm <sup>r</sup>
pCDFDuet-1	P15A ori, Cm <sup>r</sup>
pACYCDuet-1	pETDuet-1 carrying GT1 from <i>W. japonica</i>
pE-WjGT1	pETDuet-1 carrying GT1 from <i>W. japonica</i> , FNS from <i>Petroselinum crispum</i>
pE-WjGT1-PcFNS	pETDuet-1 carrying GT1 from <i>W. japonica</i> , and FLS from <i>Populus deltoides</i>
pE-WjGT1-PdFLS	pETDuet-1 carrying CGT1 from <i>Trollius chinensis</i> , FLS from <i>Populus deltoides</i>
pE-TcCGT	pETDuet-1 carrying CGT1 from <i>Trollius chinensis</i> , FNS from <i>Petroselinum crispum</i>
pE-TcCGT-PcFNS	pETDuet-1 carrying CGT1 from <i>Trollius chinensis</i> , FLS from <i>Populus deltoides</i> , F3H from <i>Oryza sativa</i> .
pE-TcCGT-PdFLS	pETDuet-1 carrying CGT1 from <i>Trollius chinensis</i> , FLS from <i>Populus deltoides</i> , F3H from <i>Oryza sativa</i> .
pE-OsF3H-PdFLS-TcCGT	pCDFDuet-1 carrying CHS from <i>P. euramericana</i> , 4CL from <i>Oryza sativa</i> and CHI from <i>Medicago sativa</i>
pC-PeCHS-R4CL-MsCHI	pACYCDuet-1 carrying TAL from <i>Saccharothrix espanaensis</i>
pA-SeTAL-aroG-tyrA	pACYCDuet-1 carrying TAL from <i>S. espanaensis</i> , aroG and tyrA from <i>E. coli</i>
pA-SeTAL-aroG <sup>trc</sup> -tyrA <sup>trc</sup>	pACYCDuet-1 carrying TAL from <i>S. espanaensis</i> , aroG <sup>trc</sup> and tyrA <sup>trc</sup> from <i>E. coli</i>
pA-SeTAL-aroG <sup>trc</sup> -tyrA <sup>trc</sup> -ppsA-tktA	pACYCDuet-1 carrying TAL from <i>S. espanaensis</i> , aroG <sup>trc</sup> , tyrA <sup>trc</sup> , tktA and ppsA from <i>E. coli</i>
strains	
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>g</sub> (r <sup>m</sup> m <sup>+</sup> ) gal dcm lon (DE3)
B-11	BL21 harboring pE-WjGT1
B-12	BL21 harboring pA-SeTAL, pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-WjGT1-PcFNS
B-13	BL21 harboring pA-SeTAL-aroG-tyrA, pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-WjGT1-PcFNS
B-14	BL21 harboring pA-SeTAL-aroG <sup>trc</sup> -tyrA <sup>trc</sup> , pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-WjGT1-PcFNS
B-15	BL21 harboring pA-SeTAL-aroG <sup>trc</sup> -tyrA <sup>trc</sup> -ppsA-tktA, pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-WjGT1-PcFNS
B-K6G1	BL21 harboring pA-SeTAL, pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-WjGT1-PdFLS
B-K6G2	BL21 harboring pA-SeTAL-aroG-tyrA, pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-WjGT1-PdFLS
B-K6G3	BL21 harboring pA-SeTAL-aroG <sup>trc</sup> -tyrA <sup>trc</sup> , pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-WjGT1-PdFLS
B-K6G4	BL21 harboring pA-SeTAL-aroG <sup>trc</sup> -tyrA <sup>trc</sup> -ppsA-tktA, pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-WjGT1-PdFLS
B-V1	BL21 harboring pE-TcCGT
B-V2	BL21 harboring pA-SeTAL, pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-TcCGT-PcFNS
B-V3	BL21 harboring pA-SeTAL-aroG-tyrA, pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-TcCGT-PcFNS
B-V4	BL21 harboring pA-SeTAL-aroG <sup>trc</sup> -tyrA <sup>trc</sup> , pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-TcCGT-PcFNS
B-V5	BL21 harboring pA-SeTAL-aroG <sup>trc</sup> -tyrA <sup>trc</sup> -ppsA-tktA, pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-TcCGT-PcFNS
B-K8G1	BL21 harboring pA-SeTAL, pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-TcCGT-PdFLS
B-K8G2	BL21 harboring pA-SeTAL, pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-OsF3H-PdFLS-TcCGT
B-K8G3	BL21 harboring pA-SeTAL-aroG-tyrA, pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-OsF3H-PdFLS-TcCGT
B-K8G4	BL21 harboring pA-SeTAL-aroG <sup>trc</sup> -tyrA <sup>trc</sup> , pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-OsF3H-PdFLS-TcCGT
B-K8G5	BL21 harboring pA-SeTAL-aroG <sup>trc</sup> -tyrA <sup>trc</sup> -ppsA-tktA, pC-PeCHS-R4CL-MsCHI and pE-OsF3H-PdFLS

**Ryc. 3.** Plazmidy i transgeniczne szczepy *E. coli* wykorzystane do produkcji witeksyny, izowiteksyny, 6 i 8-C-glukozydu kemferolu [2].

Strukturę, wyprodukowanych w transgenicznym szczepie *E. coli*, flawonoidów potwierdzono na podstawie skręcalności optycznej przy użyciu polarymetru. Syntezę witeksyny, izowiteksyny, 6 i 8-C-glukozydu kemferolu w transgenicznym szczepie *E. coli* oznaczono jakościowo i ilościowo za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (Ryc.5,6) i wykazano ich produkcję odpowiednio na poziomie 93,9; 30,2; 14,4 i 38,6 mg/l [2].



**Ryc.1.** Chrzan japoński (*Wasabia japonica*) [3].



**Ryc.2.** Pełnik chiński (*Trollius chinensis*) [4].

**Ryc.5.** Analiza HPLC (A) substancji wzorcowych: izowiteksyny, naringeniny i apigeniny, (B) produktów wyizolowanych z transgenicznym *E.coli* (WjGT1): trzy próby badawcze zidentyfikowano kolejno jako izowiteksynę, naringeninę i apigeninę, (C)- metabolity *E.coli* zawierającej puste wektory [2].

**Ryc.6.** Analiza HPLC (A) substancji wzorcowej – witeksyny, (B) produktu wyizolowanego z transgenicznym *E.coli* (TcCGT) - próbę badawczą zidentyfikowano jako witeksynę [2].

### Wnioski:

- Genetycznie zmodyfikowane szczepy *E.coli* mogą produkować roślinne flawonoidy.
- W transgenicznym hodowlach mikrobiologicznych do syntezy złożonych flawonoidów można, jako substratu, zastosować cukier prosty – glukozę, co znacznie ułatwi ich masową produkcję.
- Modyfikacje genetyczne mogą służyć do poznania i zrozumienia wieloetapowych szlaków metabolicznych, np. biosyntezy flawonoidów.

### Literatura:

- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. Journal of Nutritional Science. 2016;5:e47. doi:10.1017/jns.2016.41.
- Yoojin Chong, Bong-Gyu Kim, Yeo-Jin Park, Yuri Yang, Shin-Won Lee, Youngshim Lee, and Joong-Hoon Ahn. Production of Four Flavonoid C-Glucosides in Escherichia coli. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2023 71 (13), 5302-5313 DOI: 10.1021/acs.jafc.3c00297.
- MacDonald, Jesse & Punja, Zamir. (2017). Occurrence of botrytis leaf blight, anthracnose leaf spot, and white blister rust on Wasabia japonica in British Columbia. Canadian Journal of Plant Pathology. 39. 60-71. 10.1080/07060661.2017.1304021.
- Sererbyanyi, Michael & Серебряный, М. (2020). Towards a taxonomic revision of the genus Trollius (Ranunculaceae) in the Asian part of Russia. I. Trollius chinensis: taxonomic and geographical reconsiderations. Novitates Systematicae Plantarum Vascularium. 50. 101-114. 10.31111/novitates/2019.50.101.