

Received: 2014.04.07
Accepted: 2015.08.25
Published: 2016.01.05

Kultury korzeni włosnikowatych źródłem cennych biofarmaceutyków*

Hairy roots culture as a source of valuable biopharmaceuticals

Tomasz Kowalczyk¹, Marta Łucka¹, Janusz Szemraj², Tomasz Sakowicz¹

¹Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

²Zakład Biochemii Medycznej Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Rośliny od wieków są dla człowieka źródłem substancji leczniczych. Zdobyte dzisiejszej nauki, w tym biotechnologii molekularnej, pozwalają w coraz większym stopniu korzystać z ich ogromnego potencjału. Stały się m.in. obiecującą platformą wykorzystywaną do wytwarzania cennych związków o charakterze biofarmaceutyków. Wśród różnych systemów roślinnych stosowanych do tego celu znajdują się również kultury korzeni włosnikowatych, od pewnego czasu wykorzystywane do produkcji rekombinowanych białek i metabolitów wtórnych. Komórki roślinne pochodzące z gatunków do tego przeznaczonych są poddawane procesowi transformacji genetycznej z wykorzystaniem wybranych szczepów *Agrobacterium rhizogenes* będących nośnikiem pożądanego genu. Następnymi etapami prac zmierzają do uzyskania trwałej i wydajnej ekspresji tych genów. Kultury korzeni włosnikowatych wyróżniają wiele cech preferujących je zarówno wobec wielu systemów pro-, jak i eukariotycznych, w tym również innych modeli roślinnych. Ich najważniejszymi zaletami są: relatywnie niskie koszty wytwarzania, łatwość skalowania produkcji związków, typowa dla komórek eukariotycznych obróbka potranslacyjna białek, biologiczne bezpieczeństwo, a w wielu przypadkach również brak konieczności stosowania złożonych technik oczyszczania finalnego produktu. Liczne związki, które z powodzeniem są uzyskiwane za pomocą wspomnianych kultur należą do cennych farmaceutyków. Do grupy tej należą m.in. wybrane cytokiny, antygeny szczepionkowe czy przeciwciała.

Słowa kluczowe:

korzenie włosnikowate • biofarmaceutyki • *Agrobacterium rhizogenes*

Summary

Plants have been exploited as a source of medicinal substances for years. Nowadays, achievements of modern science, including molecular biotechnology, allow their huge potential to be utilized. They have become a promising platform for the production of valuable compounds such as biopharmaceuticals. Among the various plant systems used for this purpose, hairy root cultures are also applied for the production of recombinant proteins and secondary metabolites. For this purpose plant cells of selected species are genetically transformed using different strains of *Agrobacterium rhizogenes* carrying the desired genes. The next steps of this process include stable and efficient expression of these genes. Hairy root cultures exhibit a number

* Praca finansowana z projektu nr 2013/09/B/N27/01019.

	of features which make them attractive compared to various pro- and eukaryotic cell systems including other plant models. Their main advantages are: relatively low production costs, ease of scale-up, production of compounds typical for eukaryotic cells with post-translational modifications, biological safety, and in many cases there is no need for complex purification techniques of the final product. Several compounds that are successfully obtained using this production strategy are valuable pharmaceuticals. This group includes selected cytokines, vaccine antigens and antibodies.
Key words:	hairy roots • biopharmaceutics • <i>Agrobacterium rhizogenes</i>
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1192186
Word count:	3458
Tables:	–
Figures:	–
References:	87

Adres autora: dr hab. Tomasz Sakowicz, prof. nadzw. UŁ, Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, e-mail: tkowal@biol.uni.lodz.pl

WSTĘP

Systemy oparte na wykorzystaniu komórek roślinnych coraz częściej stają się atrakcyjną alternatywą wobec wcześniej stosowanych modeli eukariotycznych i bakteryjnych, wykorzystywanych w wytwarzaniu i pozyskaniu różnorodnych białek. Do grupy tych związków, obok wielu cennych metabolitów wtórnych, zaliczyć można m.in. rekombinowane białka o cechach farmaceutyków. O zaletach roślin w omawianym kontekście decyduje kilka podstawowych czynników. Przede wszystkim; wyróżnia je szybki przyrost biomasy przy stosunkowo niskich kosztach. System produkcyjny, w zależności od potrzeb, można dość łatwo przeskalować, co w kontekście docelowej produkcji na skalę przemysłową jest bardzo istotne. Kolejnymi walorami układów roślinnych są ich pełne możliwości w zakresie potranslacyjnej modyfikacji (często warunkuje ich aktywność i swoistość), typowej dla wielu białek pochodzenia eukariotycznego. Taki sposób wytwarzania białek eliminuje też ryzyko przenoszenia zwierzęcych bądź ludzkich patogenów, czyniąc produkt bardziej bezpieczny. Zapewnia ponadto możliwość wyboru tkanki/organo, w której pożądanemu produktowi ma być kumulowany. Z komercyjnego punktu widzenia wspomnieć należy również o cennej możliwości obniżenia kosztów produkcji niektórych białek wynikającej z braku konieczności stosowania skomplikowanych i kosztownych procedur ich oczyszczania [77].

Kultury korzeni włośnikowatych, obok wymienionych zalet, mają również swoje ograniczenia w porównaniu np. do kultur zawieszonych. Wykazują wolniejszy wzrost, wolniejszy też bywa proces powstawania niektórych białek (np. przeciwciał), ale charakteryzuje je cenna, długo-terminowa stabilność [59].

Wytwarzanie w komórce roślinnej pożądanego białka, poprzedza wprowadzenie do niej stosownego genu, następnie jego integracja z genomem gospodarza i stabilna ekspresja na zadowalającym poziomie. Miejscem docelowej lokalizacji transgenów po transformacji wykonywanej z wykorzystaniem szczepów *Agrobacterium* może być genom jądrowy lub chloroplastowy, a ostateczne efekty w postaci wytwarzania białek mogą wynikać z ekspresji trwałej lub alternatywnej ekspresji przejściowej uzyskiwanej zwykle w wyniku agroinfiltracji. Zaletą tego podejścia jest możliwość uzyskania białka znacznie szybciej niż w przypadku ekspresji trwałej. Inną z transformacji polega na zakażeniu rośliny nietransformowanej wirusem roślinnym, do genomu którego wprowadzono gen odpowiadający za ekspresję wybranego białka. Obok podstawowych modeli transformacji, stosuje się też różnego rodzaju modyfikacje wynikające z indywidualnych cech gatunków wybranych do transformacji, rodzaju tkanki oraz właściwości produkowanego w nich białka [5].

Gatunkiem uznawanym za modelowy w omawianych badaniach jest od lat *Nicotiana tabacum* (tytoń szlachetny) i pokrewny mu *Nicotiana benthamiana*. Bogata wiedza na ich temat w połączeniu z licznymi zaletami tych gatunków sprawiają, że to właśnie one są często stosowane jako swoista platforma do wytwarzania zróżnicowanych białek terapeutycznych. Tytoń jest też gatunkiem, na którym opracowano skuteczne i efektywne metody transformacji genetycznej, regeneracji roślin jak również metody upraw polowych, szklarniowych, warunki hodowli kultur komórkowych, metody ekspresji obcych białek, uzyskiwano też wysoką wydajność biomasy [45,70,73]. Podobnie jak inne komórki roślinne również te mają zdolność pełnej potranslacyjnej obróbki białek, a cenne związki otrzymane były zarówno na drodze ekspresji trwałej, jak

i przejściowej. W pierwszym przypadku transgen integruje się z genomem jądrowym lub chloroplastowym, w drugim jest wprowadzany do komórki z wektorem poprzez agroinfekcję lub infekcję wirusową i nie wbudowuje się w genom gospodarza. Spektrum rekombinowanych białek otrzymanych w tkankach tytoniu jest bardzo szerokie. Na liście tej znajdują się m.in. liczne przeciwciała, różnorodne cytokiny lub antygeny o charakterze szczepionek [5,6,7,13,36]. Ograniczając się jedynie do ostatniej z wymienionych grup, do bardziej spektakularnych osiągnięć zaliczyć można wyprodukowanie w komórkach tytoniu antygeny powierzchniowego HbsAg wirusa hepatitis B, białka kapsydu wirusa Norwalk (NVCP), hemaglutyniny wirusa odry (MV-H), podjednostki B toksyny *Vibrio cholerae* (CTB), białka L1 kapsydu HPV11 (wszystkie w wyniku trwałej ekspresji genomu jądrowego); białka L1 otoczki wirusa HPV brodawczaka ludzkiego, białka HEV E2 wirusa zapalenia wątroby typu E, białka powierzchniowe OspA *Borellia burgdorferi* (ekspresja trwała, genom chloroplastowy); antygeny hemaglutyninowego (AH) wirusa grypy, antygeny wirusa grypy ptasiej H5/HA1, epitopu HPV16 wirusa brodawczaka ludzkiego (wynik ekspresji przejściowej z udziałem wektora, infekcja *Agrobacterium*) czy białka kapsydu rotawirusa, glikoproteiny wirusa wścieklizny, onkoproteiny E7 brodawczaka ludzkiego typu 16 (ekspresja przejściowa wywołana infekcją wirusową) [5].

Powyższe rezultaty uzyskiwano z wykorzystaniem wielu systemów. Jednym z nich jest możliwość tworzenia rekombinowanych białek w kulturach korzeni włośnikowatych (hart root cultures, HR) [80]. Ich potencjał w opisywanym aspekcie został dostrzeżony stosunkowo późno. Wcześniej proces generowania korzeni włośnikowatych był kojarzony głównie ze stratami w uprawach roślin dwuliściennych, powodowanymi infekcjami wywołanymi przez Gram-ujemne bakterie glebowe rodzaju *Agrobacterium*, a wśród nich najlepiej poznane *Agrobacterium rhizogenes*. Oprócz genomowego DNA zawierają one cząsteczki megaplazmidów, których wielkość oscyluje w granicach 150-200 tys. pz, choć zdarzają się i takie, które osiągają 800 tys. pz [18]. W ich strukturze zlokalizowano geny decydujące o szczególnych cechach tych bakterii. W procesie agroinfekcji kluczową rolę odgrywają sekwencje obecne w trzech regionach. Są to: T-DNA, w którym są umieszczone transgeny mające docelowo trafić do komórek rośliny, a także geny odpowiedzialne za wywoływanie symptomów choroby, metabolizm auksyn, cytokin oraz syntezę *vir*; podobnie jak poprzedni zlokalizowany w strukturze plazmidu. Trzeci region istotny dla procesu agroinfekcji to *chv*, obecny w chromosomie bakteryjnym, odpowiada za przytwierdzenie bakterii do powierzchni rośliny [18,75]. Elementy te nadają komórkom *Agrobacterium* cechy pozwalające na ich szerokie wykorzystanie w procesach transformacji genetycznej.

Indywidualne cechy gatunków sprawiają, że niektóre z nich wykazują oporność względem transformacji prowadzonej tym sposobem, ponadto nie każdy szczep bakteryjny cechuje porównywalny stopień wirulencji wobec

określonego gatunku roślin. Dlatego niezwykle istotnym czynnikiem powodzenia eksperymentu jest interakcja na linii roślina-bakteria i wynikająca z niej kwestia właściwego doboru gatunku i szczepu bakteryjnego, wykorzystywanego do agroinfekcji. Pożądana jest więc jego wysoka wirulencja, a jednocześnie, wywołany przez nią swoisty szok w komórkach rośliny nie może prowadzić do zaburzeń prawidłowego przebiegu jej procesów życiowych [32].

SZCZEPY *A. RHIZOGENES* W GENETYCZNEJ TRANSFORMACJI

Podstawą klasyfikacji szczepów *A. rhizogenes* jest rodzaj kodowanych w nich opin. Biorąc powyższe pod uwagę, wyróżnia się szczepy: agropinowe (przedstawiciele to m.in.: A4, 15834, 1855, LBA 9402), indukujące wytwarzanie agropiny, mannopiny i kwasu atropinowego; ponadto szczepy mannopinowe oraz kukumopinowe [4]. Opiny to metabolity pojawiające się w komórkach roślinnych w wyniku ekspresji genów otrzymanych po infekcji *Agrobacterium*. Nie są przyswajane przez roślinę, stanowią natomiast źródło azotu i węgla dla bakterii [75]. Do tej pory brak jednoznacznych danych pozwalających wyjaśnić czy i ewentualnie jaki związek zachodzi między rodzajem wytwarzanej opiny a cechami poszczególnych szczepów bakterii. Wydaje się jednak, że może mieć związek z poziomem ich zjadliwości [35]. W plazmidach szczepów oktopinowych potwierdzono np. obecność genu wirulencji *virF*, którego są pozbawione szczepy nopolinowe i w którym upatruje się wpływu na zjadliwości bakterii wobec testowanych gatunków roślin (znacząco wyższa u oktopinowych).

Geny wirulencji mają zasadniczy wpływ na powodzenie procesu transformacji. Szczepy określane jako superwirulentne (zawierają dodatkowe geny *vir*) transformują rośliny bardziej efektywnie. Ma to szczególne zastosowanie w odniesieniu do roślin jednoliściennych, ogólnie uznawanych za wysoce odporne na transformację z wykorzystaniem *Agrobacterium* [2,43,85]. Wprowadzenie dodatkowych genów wirulencji, np. do szczepu LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* pozwoliło na wysoce wydajną transformację *Vigna unguiculata*, rośliny mało podatnej na transformację z wykorzystaniem wspomnianej bakterii [61].

ZASTOSOWANIE KULTUR HR

Trzy ostatnie dekady to okres większego zainteresowania możliwościami wykorzystywania *Agrobacterium rhizogenes* do szerokich zastosowań. Wśród nich wymienia się badania szlaków biosyntezy i procesów fizjologicznych, wytwarzanie cząsteczek pochodzenia roślinnego, metabolitów wtórnych (m.in. alkaloidów, fenoli, terpenów), zastosowanie do procesów fitoremediacji (np. substancji toksycznych i barwników reaktywnych) oraz do tworzenia w nich rekombinowanych białek (np. interferonu, interleukin) [12,33,38]. Kultury korzeni włośnikowatych są też poddawane regeneracji, w efekcie której można otrzymać odmienny fenotyp, np. rośliny o niewielkich

rozmiarach. Uchodzą one ponadto za przydatny model do badań genetycznego i biochemicznego podłoża licznych szlaków biochemicznych, systemów wiązania azotu, niedoboru żelaza, toksyczności metali czy badania interakcji patogen-gospodarz [42].

Opisywane kultury są również wykorzystywane w procesach biotransformacji rozumianych jako regioselektywne i stereoswoiste chemiczne przekształcenia, katalizowane za pomocą systemów biologicznych przez ich enzymy. Szeroka gama produktów naturalnych może być biotransformowana i wykorzystywana do tworzenia bibliotek związków analogowych przez enzymy komórek roślinnych. W kulturach tych przeprowadza się wiele różnorodnych reakcji chemicznych, w tym: hydroksylacja, glikozylacja, glukozylacja, uwodornienie, hydroliza, acetylowanie, metylacja, izomeryzacja i estryfikacja. Prowadzą one do nadania pożądanych aktywności cennym biologicznie związkom [3].

Korzenie włośnikowate wyróżnia charakterystyczna budowa, która odróżnia je od korzeni fizjologicznie występujących w roślinach, a jednocześnie sprawia, że jej cechy umożliwiają wykorzystanie ich do celów omawianych w prezentowanej pracy. Wśród nich wymienić można plagiotropizm, tj. rodzaj ukierunkowanej reakcji na bodźce oraz rozrost korzeni bocznych. Plagiotropizm podczas prowadzenia tych kultur wynika z większego napowietrzenia w pożywce płynnej oraz związanej z tym szybką akumulacją biomasy [75]. Istotną przewagą korzeni włośnikowatych nad innymi kulturami (np. zawieszinowymi) jest ich wysoka stabilność genetyczna (w innych obserwowana jest np. zmienność somaklonalna), ważna w sytuacjach, kiedy hodowle są prowadzone przez dłuższy czas. Zaletą jest też brak konieczności dodawania do podłoża hormonów wzrostu w trakcie hodowli i możliwość jej prowadzenia w ściśle kontrolowanych warunkach, co zapewnia wytwarzanie rekombinowanych białek zgodnie z wymogami GMP (Dobra Praktyka Produkcyjna) [59]. Dużym ułatwieniem podczas procesu produkcyjnego jest także możliwość sekrecji produktu do podłoża. Rezultaty prac Gaume i wsp. wykazały, że zawartość ludzkiej fosfatazy alkalicznej uzyskiwanej w akumulowanej w kulturach korzeni włośnikowatych i korzeniach przybyszowych *Nicotiana tabacum* była bardzo podobna, za to ilość białka wydzielanego do podłoża w przypadku kultur HR była kilkukrotnie większa [11].

Wytwarzanie rozmaitych związków uzyskiwanych w opisywanych kulturach zwiększa dodatek do podłoża licznych elicytorów, z których kilka wymieniono w tab.1. Należą do nich zarówno związki o charakterze biotycznym, jak i abiotycznym, które indukują wytwarzanie metabolitów wtórnych jako przejaw reakcji obronnej roślin, w wyniku ekspresji genów związanych ze szlakami syntezy produktu [14].

Jednym z kryteriów podziału kultur korzeni włośnikowatych są okoliczności ich powstania, tj. czy wiąże się ono z procesami transformacji genetycznej, czy też nie. Nie-

transformowane kultury korzeni włośnikowatych mogą służyć m.in. jako bogate źródło związków fitochemicznych. Nie w każdej sytuacji transformacja genetyczna przynosi jednak pożądane rezultaty. Wykazano np., że ilość solaniny, cennego związku indukującego apoptozę komórek nowotworowych, wytwarzana w transformowanych i nietransformowanych korzeniach *Solanum nigrum* była podobna [55]. Poszczególne części roślin regenerowanych z korzeni transformowanych wyróżniała ponadto niższa akumulacja tego metabolitu niż w przypadku korzeni nietransformowanych [64]. Podobnie sytuacja wyglądała w przypadku transformacji *Duboisia* z użyciem *A. rhizogenes*, które wytwarzały mniej skopolaminy i hioscyjminy niż rośliny nietransformowane [52]. Przykłady te dowodzą, że transformacja z użyciem *A. rhizogenes* nie zawsze prowadzi do zwiększenia akumulacjiżądanego produktu. Zdecydowana większość opisanych przypadków wskazuje jednak, że korzenie transformowane stają się bardziej wydajne do wytwarzania i pozyskiwania cennej substancji. Przykładem mogą być m.in. kultury *Ajuga reptans*, w których uzyskano 4-krotnie większe stężenie 20-hydroksyekdysteronu (związek zwiększający retencję azotu w organizmie i przyspieszający tempo syntezy białek) w porównaniu do roślin dzikich [75]. Z kolei Wang i wsp. poprzez infekcję za pomocą *A.rhizogenes* wprowadzili do *Catharantus roseus* nowe geny G10H i ORCA3 w celu modyfikacji szlaku syntezy katarantyny, związku, którego pochodne wyróżnia znaczący potencjał przeciwnowotworowy. W transformowanych korzeniach włośnikowatych zanotowano znaczący wzrost jej stężenia, ponad 6,5 razy wyższy wobec kultur niemodyfikowanych [72].

Wyciąg z korzenia dzwonkowca (*Codonopsis lanceolata*) jest źródłem cennych związków o właściwościach farmakologicznych. Wśród nich są m.in. saponiny, związki o bardzo szerokim zakresie działania i możliwościach aplikacyjnych (aktywność przeciwegrybicza, przeciwbakteryjna, przeciwzapalna, a także przeciwnowotworowa) [40,68]. Kultury korzeni włośnikowatych tego gatunku wykorzystywano np. do produkcji saponin triterpenoidowych. Transformacja z wykorzystaniem *A. rhizogenes* (szczep R1000) przyniosła znacząco wyższą syntezę wspomnianych związków w porównaniu do kultur korzeni nietransformowanych. Wobec lancemazydu A, jednego z wyodrębnionych triterpenów, oprócz jego właściwości przeciwzapalnych, wykazano również aktywność przeciwnowotworową [28]. Przykłady te potwierdzają możliwość wykorzystywania transformowanych kultur HR do wytwarzania cennych związków terapeutycznych.

Niekiedy pozytywne efekty przynosi prowadzenie hodowli omawianych kultur w warunkach świetlnych. Klasyczne hodowle są prowadzone w ciemności, co stanowi imitację warunków naturalnych, kiedy korzenie rosną w glebie. Alternatywę wobec tej metody stanowią zielone korzenie włośnikowate, których hodowla jest prowadzona na świetle i może być wykorzystana do produkcji związków syntetyzowanych przez organy zawierające chlorofil. W tym celu wykorzystywane były np. rośliny rodzaju *Asteraceae*, *Solanaceae* i *Cucurbitaceae* czy kultury

korzeni włośnikowatych *Echinacea purpurea*, rośliny bogatej w pochodne kwasu kawowego oraz alkalamidów [75]. Na szczególną uwagę zasługuje kwas cykoriowy wykazujący właściwości antywirusowe, inhibuje integrację HIV-1 oraz replikację tego wirusa. W kulturach HR odnotowano znaczący wzrost akumulacji pochodnych kwasu kawowego w warunkach świetlnych w porównaniu do hodowli prowadzonych w ciemności [1].

REKOMBINOWANE BIAŁKA OTRZYMywane W KULTURACH KORZENI WŁOŚNIKOWATYCH

Wśród licznych i różnorodnych związków produkowanych w systemach HR i znajdujących, bądź mogących znaleźć, zastosowanie w terapii wielu chorób znaczącą pozycję stanowią rekombinowane białka. Można znaleźć wśród nich m.in. przedstawicieli cytokin, przeciwciał, antygenów czy enzymów. Poniżej krótko zaprezentowano wybrane przykłady tego rodzaju cząsteczek, których ekspresję uzyskano w kulturach korzeni włośnikowatych kilku gatunków roślin.

Cytokiny i hormon wzrostu - cytokiny stanowią zróżnicowaną grupę białek biorących udział w takich procesach, jak m.in. proliferacja, różnicowanie i ruch komórek. Zaangażowane są w odpowiedź immunologiczną, hemopoezę, proces gojenia ran czy procesy zapalne, aktywne są także w morfogenezie tkanek [41]. Należą do nich tak cenne związki, jak: interleukiny, hemopoetyny, nadrodzina cząsteczek TNF, interferony [50]. Obecnie, większość cytokin dla przemysłu farmaceutycznego jest wytwarzana w komórkach *E.coli*. Ograniczeniem tego systemu jest jednak brak możliwości glikozylacji związków, modyfikacji kluczowej dla prawidłowej aktywności wielu białek eukariotycznych. Produkcja cytokin, m.in. w związku z koniecznością ich oczyszczania, jest też dosyć kosztowna, a szansa uniknięcia tych problemów upatruje się w zastosowaniu do tego celu systemów roślinnych [70].

Do cytokin są też zaliczane interferony klasyfikowane w trzy podstawowe typy. Typ I jest reprezentowany przez 16 przedstawicieli, w tym interferony α i β , typ II (interferon γ) oraz typ III (rodzina interferonu λ) [16]. Wszystkie stanowią etap odpowiedzi komórki na infekcje wirusowe. Wyróżnia je zdolność indukowania fagocytozy, wpływ na wytwarzanie przeciwciał przez limfocyty B oraz stymulacja proliferacji komórek. Jako terapeutyk są stosowane w leczeniu osób zakażonych wirusem zapalenia wątroby, wirusem HPV oraz podczas leczenia nowotworów nerki, pęcherza, jajnika. Interferon ludzki z powodzeniem jest wytwarzany w kulturach korzeni włośnikowatych. Matvieieva i wsp. przeprowadzili transformację komórek *Cichorium intybus* L. oraz *Lactuca sativa* L. z wykorzystaniem *A. rhizogenes* i uzyskali trwałą ekspresję ludzkiego interferonu $\alpha 2b$. Ekstrakt pozyskany z korzeni włośnikowatych powstałych w wyniku agroinfekcji wykazywał wysoką aktywność przeciwwirusową wobec wirusa pęcherzykowego jamy ustnej (*Vesicular stomatitis virus*, VSV) (1620–5400 IU/g) [38]. Luchakivskaya i wsp. podjęli próbę ekspresji interferonu $\alpha 2b$ w komórkach *Daucus carota* L.

Badania były prowadzone z udziałem kultur zawiesinowych, kalusa oraz korzeni włośnikowatych. Wykazano, że aktywność przeciwwirusowa ma bezpośredni związek z rodzajem wektora stosowanego w transformacji. Jego promotor wyróżniał specyficzność wobec komórek korzenia. Poziom aktywności okazał się znacząco wyższy dla promotora *Mll* niż w przypadku tradycyjnie wykorzystywanego promotora 35S CaMV. Aktywność interferonu w kulturach zawiesinowych była zbliżona i niemal połowę wyższa niż w kulturze kalusa [34].

Natomiast interleukiny są zaangażowane w regulację odpowiedzi immunologicznej, procesy hematopoetyczne, indukcję proliferacji komórek NK, limfocytów T, B [41]. Wykorzystywane są w leczeniu takich schorzeń, jak: zapalenie kości i stawów, choroba Crohna, łuszczyca, astma czy czerniak [50]. W kulturach korzeni włośnikowatych *N. tabaccum* uzyskano trwałą ekspresję mysiej interleukiny-12, która może być stosowana w terapiach przeciwnowotworowych, a także jako rodzaj adiuwanta w szczepionkach. Interleukina-12 jest cytokiną prozapalną działającą na limfocyty B i T oraz komórki NK. Potencjalnie może być też stosowana w leczeniu chorych na raka ze względu na silną inhibicję angiogenezy i tumorogenezy. Wyniki badań Liu i wsp. potwierdziły możliwość wytwarzania interleukin za pomocą kultur korzeni włośnikowatych *N. tabacum* w hodowlach prowadzonych w bioreaktorach, gdzie stosunkowo łatwo zoptymalizować warunki pod kątem wytwarzania białek na szeroką skalę [33].

Hormon wzrostu - w kulturach korzeni włośnikowatych *N. tabacum* uzyskano również ekspresję somatotropiny, hormonu, którego niedobory powodują poważne stany patologiczne, takie jak m.in.: zwolniony wzrost, hipoglikemię czy żółtaczkę [56]. Próba otrzymania tego związku w kulturach korzeni włośnikowatych *N. benthamiana* z wykorzystaniem wektora 30B-hGH (oparty na strukturze wirusa mozaiki tytoniu), przyniosła pozytywne i trwałe rezultaty. W wyniku transformacji osiągnięto zadowalające rezultaty w postaci uzyskania 3-6 mg/kg hormonu wzrostu w świeżej masie [60].

Przeciwciała - przeciwciała monoklonalne o ściśle określonej swoistości, polegającej na łączeniu się z epitopem antygeny, są powszechnie wytwarzane w laboratoriach [57]. Ich celem jest wywołanie działania immunosupresyjnego. Stosowne przeciwciała są wykorzystywane w terapii m.in. nowotworu pęcherza [20], trzustki, glejaka, głowy [63], chorób autoimmunologicznych, astmy czy osteoporozy [47]. Pierwszym gatunkiem roślin wykorzystanym do produkcji pełnego przeciwciała (IgG) był tytoń [23]. Od tego czasu (1988 r.) otrzymano w nim przeciwciała monoklonalne kilku klas - IgG, wydzielnicze IgA (sIgA) oraz fragmentaryczne przeciwciała scFv i VHH są projektowane z myślą o zwalczaniu takich chorób, jak: AIDS, węglik, wścieklizna, próchnica zębów czy licznych postaci nowotworów (raka jelita grubego, płuc, piersi, glejaka). Przeciwciała produkowane w tytoniu mają podobne właściwości jak ich odpowiedniki wytwarzane obecnie w komórkach ssaczy, niemniej wysokie

koszty i ograniczona skala ich produkcji, sprawia intensyfikację starań nad opracowaniem nowych technologii produkcji tych białek, w tym również przeniesienia jej właśnie do komórek roślinnych (głównie *N. tabacum* i *N. benthamiana*) [23].

Pierwsze doświadczenia z bardziej znaczącą produkcją przeciwciał w kulturach korzeni włośnikowatych sięgają lat 90 XX w. Wongsamuth i Doran wykorzystali do tego celu komórki *N. tabacum*, do których z użyciem *A. rhizogenes* wprowadzono gen kodujący mysie przeciwciała monoklonalne IgG₁ i uzyskano w pełni funkcjonalne i stabilne przeciwciała. Obecność w podłożu hodowlanym poliwinylpolidonu i żelatyny pozwoliła podnieść wydajność do poziomu 43% białka w całkowitej puli białek rozpuszczalnych [78].

Prace Sharpa i Dorana dowiodły, że te same przeciwciała otrzymywane w kulturach włośnikowatych tytoniu są kumulowane w ilości 6,5 razy większej niż w kulturach zawiesinowych. Dodatek antybiotyku bacytracyny do obu tych kultur spowodował stymulację tempa wzrostu biomasy o ponad 50% [58]. Efektywność produkcji również innych białek była pobudzana wprowadzaniem do podłoża związków o charakterze stymulatorów oraz takich, które zapewniały ich sekrecję do podłoża.

W tytoniu, w wyniku udanej agroinfekcji, wywołano także ekspresję kolejnego z przeciwciał - M12 wykazującego zdolność wiązania witronektyny, białka osocza krwi zaangażowanego w procesy adhezji i migracji komórek. Wpływa ono na hemostazę nowotworu i jego przerzutów. Autorom badań udało się zwiększyć 30-krotnie efekt sekrecji przeciwciał przez dodanie do podłoża KNO₃, 1-naftalenoctowego oraz poliwinylpolidonu jako środka stabilizującego. Do podłoża wydzielonych zostało ostatecznie 57% przeciwciał z ogólnej puli przeciwciał produkowanych w komórkach (5,9 mg/l) [19].

Antygeny - konsekwencje wirusowego zapalenia wątroby typu B w postaci przewlekłej bywają bardzo poważne, mogą spowodować marskość wątroby, a nawet raka (stosowne statystyki odnotowują 0,5-1 mln zgonów rocznie) [43]. W hodowlach korzeni włośnikowatych ziemniaka opracowano metodę produkcji antygeny powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg), a ekspresja tego białka osiągnęła poziom bliski 100 ng/g świeżej masy [67]. Wspomniany antygen udało się także otrzymać w korzeniach włośnikowatych *N. tabacum* na poziomie 0,01% wszystkich rozpuszczalnych białek [53]. W tytoniu udało się ponadto otrzymać powierzchniowy antygen ochronny, który poddano fuzji z podjednostką B toksyny cholery [30].

Enzymy - wśród nich cholinoesterazy mogą być wykorzystywane w oczyszczaniu organizmu z estrów kwasów fosforowych, co ma znaczenie w terapii osób narażonych na ekspozycję bojowych środków chemicznych oraz pestycydów. W systemach HR *N. benthamiana* uzyskano eks-

presję tego enzymu na poziomie 3,3% wszystkich rozpuszczalnych białek, co stanowiło niemal 3 razy większą produkcję niż uzyskiwana w komórkach osobników rodzicielskich [79].

Innym enzymem, który udało się otrzymać w kulturach korzeni włośnikowatych *N. tabacum* jest fosfataza alkaliczna. We wspomnianych kulturach udało się wytworzyć 280 µg enzymu/g suchej masy [11].

Aktywator ludzkiego tkankowego plazminogenu to polipeptyd biorący udział w fibrynolizie. Przekształca plazminogen w plazminę, a ta rozkłada skrzepy fibryny w naczyńiach krwionośnych. Białko to wyprodukowano w kulturach korzeni włośnikowatych *Cucumis melo*. Skonstruowano do tego celu wektory zawierające zwiokrotniony promotor genu *rolD*, dzięki czemu osiągnięto zadowalający poziom wytwarzania aktywatora plazminogenu (ok. 0,17 µg/mg) [15].

Kultury HR są dziś przede wszystkim wydajnym układem do otrzymywania szerokiej gamy metabolitów wtórnych o charakterze biofarmaceutyków czemu poświęcono wiele odrębnych artykułów [8,44,62]. Na tym polu biotechnologia roślin notuje najbardziej znaczące dokonania. W tabeli 2 przedstawiono przykłady wybranych związków o cechach biofarmaceutyków, które są wytwarzane w systemach hodowli HR uzyskanych z wykorzystaniem do tego celu szczepów *A. rhizogenes*.

PODSUMOWANIE

Na tle znaczących efektów związanych z wykorzystaniem kultur HR do wytwarzania cennych metabolitów wtórnych, skalę produkcji rekombinowanych białek terapeutycznych ciągle należy uznać za stosunkowo niewielką. Niemniej przytoczone w pracy przykłady wskazują, że takie możliwości istnieją, a potencjał jakim omawiane systemy dysponują nie został jeszcze w pełni wykorzystany. Świadczy o tym np. bardzo szerokie spektrum różnorodnych białek, które już udało się wyprodukować dzięki zastosowaniu szczepów *Agrobacterium rhizogenes* do infekcji roślin. Wśród nich wskazać można: szczepionki (np. antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby), przeciwciała (m.in. IgG₁), enzymy (fosfataza alkaliczna, cholinoesteraza), interleukiny (IL-12), hormon wzrostu czy ludzki interferon. Wydaje się też, że coraz bardziej znaczący udział w opisywanych badaniach mogą mieć gatunki inne niż najchętniej wykorzystywane do tego celu *N. tabacum* i *N. benthamiana*. Zalety i bogate doświadczenia wyniesione z prac prowadzonych na tytoniu nadal czynią go najbardziej atrakcyjnym roślinnym modelem w opisywanych badaniach. Jednak niedawne, i co ważne, udane eksperymenty z innymi gatunkami roślin otwierają szersze niż dotychczas możliwości ich stosowania i wskazują, że poszukiwania idące również w tym kierunku stale są podejmowane. W grupie roślin, w których osiągnięto zadowalające rezultaty ekspresji i sekrecji pożądanego białek można wymienić np.: *Cucumis melo* (wytworzenie aktywatora ludzkiego plazminogenu tkankowego), *Dau-*

cus carota (produkcja ludzkiego interferonu $\alpha 2b$), *Cichorium intybus* użyty do wytwarzania tego samego białka czy *Datura metel* do produkcji skopolaminy i hyoscyjminy w kulturach HR.

Koncern Pfizer jako pierwszy wprowadził ludzki terapeutyk produkowany w systemie roślinnym na rynek. Enzym taliglukaraza alfa będzie stosowany w terapii zastępczej choroby Gauchera i jest wytwarzany w komórkach *Daucus carota*. Produkt otrzymał akceptację Agencji Żywności i Leków (Food and Drug Administration, FDA).

Inne tego typu farmaceutyki są na różnych etapach badań klinicznych [80].

Biorąc pod uwagę przytoczone fakty związane z wykorzystaniem systemów korzeni włośnikowatych do produkcji związków o cechach biofarmaceutyków, a także ogólne zalety przypisywane roślinnym systemom ekspresyjnym, można przypuszczać, że ten kierunek prac badawczych nadal będzie rozwijany, czemu towarzyszyć powinno rosnące zainteresowanie ze strony przemysłu farmaceutycznego.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abbasi B.H., Tian C.L., Murch S.J., Saxena P.K., Liu C.Z.: Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. *Plant Cell Rep.*, 2007; 26: 1367-1372
- [2] Azhakanandam K., McCabe M.S., Power J.B., Lowe K.C., Cocking E.C., Davey M.R.: T-DNA transfer, integration, expression and inheritance in rice: effects of plant genotype and *Agrobacterium* super-virulence. *J. Plant Physiol.*, 2000; 157: 429-439
- [3] Banerjee S., Singh S., Ur Rahman L.: Biotransformation studies using hairy root cultures - a review. *Biotechnol. Adv.*, 2012; 30: 461-468
- [4] Bensaddek L., Villarreal M.L., Fliniaux M.A.: Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. *Electron. J. Integr. Biosci.*, 2008; 3: 2-9
- [5] Budzianowski J.: Nowa rola tytoniu - produkcja biofarmaceutyków. *Przegl. Lek.*, 2009; 66: 894-897
- [6] Budzianowski J.: Tytoń - producent rekombinowanych interleukin. *Przegl. Lek.*, 2012; 69: 1060-1062
- [7] Budzianowski J.: Tytoń - producent rekombinowanych przeciwciał monoklonalnych. *Przegl. Lek.*, 2011; 68: 981-986
- [8] Chandra S., Chandra R.: Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochem. Rev.*, 2011; 10: 371-395
- [9] Condori J., Sivakumar G., Hubstenberger J., Dolan M.C., Sobolev V.S., Medina-Bolivar F.: Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: effects of culture medium and growth stage. *Plant Physiol. Biochem.*, 2010; 48: 310-318
- [10] Gangopadhyay M., Dewanjee S., Bhattacharya S.: Enhanced plumbagin production in elicited *Plumbago indica* hairy root cultures. *J. Biosci. Bioeng.*, 2011; 111: 706-710
- [11] Gaume A., Komarnytsky S., Borisjuk N., Raskin I.: Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. *Plant Cell Rep.*, 2003; 21: 1188-1193
- [12] Georgiev M.I., Agostini E., Ludwig-Müller J., Xu J.: Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends Biotechnol.*, 2012; 30: 528-537
- [13] Gils M., Kandzia R., Marillonnet S., Klimyuk V., Gleba Y.: High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnol. J.*, 2005; 3: 613-620
- [14] Goel M.K., Mehrotra S., Kukreja A.K.: Elicitor-induced cellular and molecular events are responsible for productivity enhancement in hairy root cultures: an insight study. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2011; 165: 1342-1355
- [15] Gołąb J., Jakóbsiak M., Zagożdżon R., Obłąkowski P.: Cytokiny. W: *Immunologia*, red.: M. Jakóbsiak, J. Gołąb, W. Lasek, PWN, Warszawa, 2004, 198-224
- [16] González-Navajas J.M., Lee J., David M., Raz E.: Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012; 12: 125-135
- [17] Góra-Sochacka A., Redkiewicz P., Napiórkowska B., Sirko A.: Wykorzystanie systemów roślinnych do produkcji rekombinowanych cytokin. *Postępy Biochem.*, 2009; 55: 85-94
- [18] Haggman H.M., Aronen T.S.: *Agrobacterium rhizogenes* for rooting recalcitrant woody plants. W: *Molecular biology of woody plants*. t.2, red.: S.M. Jain, S.C. Minocha. Springer Netherlands 2000, 47-78
- [19] Häkkinen S.T., Raven N., Henquet M., Laukkanen M.L., Anderlei T., Pitkänen J.P., Twyman R.M., Bosch D., Oksman-Caldentey K.M., Schillberg S., Ritala A.: Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody. *Biotechnol. Bioeng.*, 2014; 111: 336-346
- [20] Han C., Gong Z., Hao L., Yang J., Hu J., Dong B., Fan T., Tang W., Teng G.: Mechanism of monoclonal antibody-coupled *Staphylococcus* superantigen-A induced apoptosis in human bladder cancer cells. *Cell Biochem. Biophys.*, 2011; 61: 679-684
- [21] Hasanloo T., Rahnama H., Sepehrifar R., Shams M.R.: The influence of yeast extract on the production of flavonolignans in hairy root cultures of *Silybum marianum* L. Gaertn. 4th Kuala Lumpur International Conference on Biomedical Engineering. red.: N.A. Osman, F. Ibrahim, W.A. Abas, H.S. Rahman, H.N. Ting. Springer Berlin Heidelberg, Kuala Lumpur, Malaysia 2008, 358-361
- [22] Hasanloo T., Sepehrifar R., Rahnama H., Shams M.R.: Evaluation of the yeast-extract signaling pathway leading to silymarin biosynthesis in milk thistle hairy root culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009; 25: 1901-1909
- [23] Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K.: Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 1989; 342: 76-78
- [24] Hooykaas P.J.: Transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. W: *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*, red.: J.S. Tkacz, L. Lange. Springer US 2004, 41-65
- [25] Huang B., Lin H., Yan C., Qiu H., Qiu L., Yu R.: Optimal inductive and cultural conditions of *Polygonum multiflorum* transgenic hairy roots mediated with *Agrobacterium rhizogenes* R1601 and an analysis of their anthraquinone constituents. *Pharmacogn. Mag.*, 2014; 10: 77-82
- [26] Kai G., Yang S., Zhang Y., Luo X., Fu X., Zhang A., Xiao J.: Effects of different elicitors on yield of tropane alkaloids in hairy roots of *Anisodus acutangulus*. *Mol. Biol. Rep.*, 2012; 39: 1721-1729
- [27] Kang S., Ajjappala H., Seo H.H., Sim J.S., Yoon S.H., Koo B.S., Kim Y.H., Lee S., Hahn B.S.: Expression of the human tissue-plasminogen activator in hairy roots of oriental melon (*Cucumis melo*). *Plant Mol. Biol. Report.*, 2011; 29: 919-926

- [28] Kaplan H.S., Olsson L.: Human-human hybridoma monoclonal antibodies in diagnosis and treatment of neoplastic disease. *Biochem. Biol. Markers Neoplast. Transform.*, 1983; 57: 57-66
- [29] Khojasteh A., Mirjalili M.H., Hidalgo D., Corchete P., Palazon J.: New trends in biotechnological production of rosmarinic acid. *Biotechnol. Lett.*, 2014; 36: 2393-2406
- [30] Kim J.A., Kim Y.S., Choi Y.E.: Triterpenoid production and phenotypic changes in hairy roots of *Codonopsis lanceolata* and the plants regenerated from them. *Plant Biotechnol. Rep.*, 2011; 5: 255-263
- [31] Kim O.T., Bang K.H., Shin Y.S., Lee M.J., Jung S.J., Hyun D.Y., Kim Y.C., Seong N.S., Cha S.W., Hwang B.: Enhanced production of asiaticoside from hairy root cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban elicited by methyl jasmonate. *Plant Cell Rep.*, 2007; 26: 1941-1949
- [32] Ko S., Liu J.R., Yamakawa T., Matsumoto Y.: Expression of the protective antigen (SpA) in transgenic hairy roots of tobacco. *Plant Mol. Biol. Report*, 2006; 24: 251
- [33] Kochan E., Wasiela M., Sienkiewicz M.: The production of ginsenosides in hairy root cultures of American ginseng, *Panax quinquefolium* L. and their antimicrobial activity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 2013; 49: 24-29
- [34] Kuzovkina I.N., Schneider B.: Genetically transformed root cultures - generation, properties and application in plant sciences. W: *Progress in Botany*, t. 67, red.: K. Esser, U. Luttge, W. Beyschlag, J. Murata. Springer Berlin Heidelberg 2006, 275-314
- [35] Lewko W.M., Oldham R.K.: Cytokines. W: *Principles of Cancer Biotherapy*, red.: R.K. Oldham, R.O. Dillman. Springer Netherlands 2009, 155-276
- [36] Liu C., Towler M.J., Medrano G., Cramer C.L., Weathers P.J.: Production of mouse interleukin-12 is greater in tobacco hairy roots grown in a mist reactor than in an airlift reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009; 102: 1074-1086
- [37] Luchakivskaya Y.S., Olevinskaya Z.M., Kishchenko E.M., Spivak N.Y., Kuchuk N. V.: Obtaining of hairy-root, callus and suspension cell cultures of carrot (*Daucus carota* L.) able to accumulate human interferon alpha-2b. *Cytol. Genet.*, 2012; 46: 15-20
- [38] Łucka M., Kowalczyk T., Szymraj J., Sakowicz T.: Rośliny jako alternatywne źródło białek terapeutycznych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 362-373
- [39] Martin K.P., Sabovljevic A., Madassery J.: High-frequency transgenic plant regeneration and plumbagin production through methyl jasmonate elicitation from hairy roots of *Plumbago indica* L. *Crop Sci. Biotechnol.*, 2011; 14: 205-212
- [40] Matvieieva N.A., Kudryavets Y.I., Likhova A.A., Shakhovskij A.M., Bezdenezhnykh N.A., Kvasko E.Y.: Antiviral activity of extracts of transgenic chicory and lettuce plants with the human interferon $\alpha 2b$ gene. *Cytol. Genet.*, 2012; 46: 285-290
- [41] Ming Q., Su C., Zheng C., Jia M., Zhang Q., Zhang H., Rahman K., Han T., Qin L.: Elicitors from the endophytic fungus *Trichoderma atroviride* promote *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone biosynthesis. *J. Exp. Bot.*, 2013; 64: 5687-5694
- [42] Oda K., Matsuda H., Murakami T., Katayama S., Ohgihara T., Yoshikawa M.: Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol. Chem.*, 2000; 381: 67-74
- [43] Ono N.N., Tian L.: The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities. *Plant Sci.*, 2011; 180: 439-446
- [44] Otten L., Burr T., Szegedi E.: Agrobacterium: a disease causing bacterium. W: *Agrobacterium: from biology to biotechnology*, red.: T. Zzfira, V. Citovsky, Springer New York 2008, 1-46
- [45] Pandey R., Krishnasamy V., Kumaravadivel N., Rajamani K.: Establishment of hairy root culture and production of secondary metabolites in coleus (*Coleus forskohlii*). *J. Med. Plants Res.*, 2014; 8: 58-62
- [46] Papatheodoridis G., Buti M., Cornberg M., Janssen H., Mutimer D., Pol S., Raimondo G.: EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.*, 2012; 57: 167-185
- [47] Pistelli L., Giovannini A., Ruffoni B., Bertoli A., Pistelli L.: Hairy root cultures for secondary metabolites production. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010; 698: 167-184
- [48] Pitta-Alvarez S.I., Spollansky T.C., Giulietti A.M.: The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme Microb. Technol.*, 2000; 26: 252-258
- [49] Powroźnik B., Kubowicz P., Pękala E.: Monoclonal antibodies in targeted therapy. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 663-673
- [50] Rahnema H., Razi Z., Dadgar M.N., Hasanloo T.: Enhanced production of flavonolignans in hairy root cultures of *Silybum marianum* by over-expression of *chalcone synthase* gene. *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, 2013; 22: 138-143
- [51] Rao A.V., Sung M.K.: Saponins as anticancerogens. *J. Nutr.*, 1995; 125 (Suppl.): 717S-724S
- [52] Redkiewicz P., Więsyk A., Góra-Sochacka A., Sirko A.: Transgenic tobacco plants as production platform for biologically active human interleukin 2 and its fusion with proteinase inhibitors. *Plant Biotechnol. J.*, 2012; 10: 806-814
- [53] Ritala A., Dong L., Imseng N., Seppänen-Laakso T., Vasilev N., van der Krol S., Rischer H., Maaheimo H., Virkki A., Brändli J., Schillberg S., Eibl R., Bouwmeester H., Oksman-Caldentey K.M.: Evaluation of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) hairy roots for the production of geraniol, the first committed step in terpenoid indole alkaloid pathway. *J. Biotechnol.*, 2014; 176: 20-28
- [54] Roig Celma C., Palazon J., Cusido R.M., Pinol M.T., Keil M.: Decreased scopolamine yield in field-grown *Duboisia* plants regenerated from hairy roots. *Planta Med.*, 2001; 67: 249-253
- [55] Rukavtsova E.B., Abramikhina T.V., Shulga N.Y., Bykov V.A., Bur'yanov Y.I.: Tissue specific expression of hepatitis B virus surface antigen in transgenic plant cells and tissue culture. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2007; 54: 770-775
- [56] Ryad A., Lakhdar K., Majda K.S., Samia A., Mark A., Corinne A.D., Eric G.: Optimization of the culture medium composition to improve the production of hyoscyamine in elicited *Datura stramonium* L. hairy roots using the Response Surface Methodology (RSM). *Int. J. Mol. Sci.*, 2010; 11: 4726-4740
- [57] Saleem T.S., Chetty C.M., Ramkanth S., Alagusundaram M., Gnanaprakash K., Rajan V.S., Angalaparameswari S.: *Solanum nigrum* Linn. - a review. *Pharmacogn. Rev.*, 2009; 3: 342-345
- [58] Schwab M.: *Encyclopedia of Cancer*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009
- [59] Schwab M.: *Encyclopedia of Cancer*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012
- [60] Sharp J.M., Doran P.M.: Effect of bacitracin on growth and monoclonal antibody production by tobacco hairy roots and cell suspensions. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 1999; 4: 253-258
- [61] Sharp J.M., Doran P.M.: Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnol. Prog.*, 2001; 17: 979-992
- [62] Skarjinskaia M., Karl J., Araujo A., Ruby K., Rabindran S., Streatfield S.J., Yusibov V.: Production of recombinant proteins in clonal root cultures using episomal expression vectors. *Biotechnol. Bioeng.*, 2008; 100: 814-819
- [63] Solleti S.K., Bakshi S., Sahoo L.: Additional virulence genes in conjunction with efficient selection scheme, and compatible culture regime enhance recovery of stable transgenic plants in cowpea via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *J. Biotechnol.*, 2008; 135: 97-104

- [64] Srivastava S., Srivastava A.K.: Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2007; 27: 29-43
- [65] Strumberg D., Schultheis B., Scheulen M.E., Hilger R.A., Krauss J., Marschner N., Lordick F., Bach F., Reuter D., Edler L., Mross K.: Phase II study of nimotuzumab, a humanized monoclonal anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody, in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer. *Invest. New Drugs*, 2012; 30: 1138-1143
- [66] Subroto M.A., Tampubolon E., Simanjuntak P.: Changes in solasodine accumulation in regenerated plants of *Solanum nigrum* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15834. *Biotechnology*, 2007; 6: 328-333
- [67] Sudha C.G., Sherina T.V., Anu Anand V.P., Reji J.V., Padmesh P., Soniya E.V.: *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of the medicinal plant *Decalepis arayalpathra* and production of 2-hydroxy-4-methoxy benzaldehyde. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2013; 112: 217-226
- [68] Sun J., Xiao J., Wang X., Yuan X., Zhao B.: Improved cardenolide production in *Calotropis gigantea* hairy roots using mechanical wounding and elicitation. *Biotechnol. Lett.*, 2012; 34: 563-569
- [69] Sunil Kumar G.B., Ganapathi T.R., Srinivas L., Revathi C.J., Bapat V.A.: Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots. *Plant Sci.*, 2006; 170: 918-925
- [70] Sykłowska-Baranek K., Pietrosiuk A., Gawron A., Kawiak A., Łojkowska E., Jeziorek M., Chinou I.: Enhanced production of antitumor naphthoquinones in transgenic hairy root lines of *Lithospermum canescens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2012; 108: 213-219
- [71] Torkamani M.R., Jafari M., Abbaspour N., Heidary R., Safaie N.: Enhanced production of valerenic acid in hairy root culture of *Valeriana officinalis* by elicitation. *Open Life Sci.*, 2014; 9: 853-863
- [72] Tremblay R., Wang D., Jevnikar A.M., Ma S.: Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnol. Adv.*, 2010; 28: 214-221
- [73] Udamsuk L., Jarukamjorn K., Tanaka H., Putalun W.: Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. *Biotechnol. Lett.*, 2011; 33: 369-374
- [74] Wang C.T., Liu H., Gao X.S., Zhang H.X.: Overexpression of *G10H* and *ORCA3* in the hairy roots of *Catharanthus roseus* improves catharanthine production. *Plant Cell Rep.*, 2010; 29: 887-894
- [75] Wang D.J., Brandsma M., Yin Z., Wang A., Jevnikar A.M., Ma S.: A novel platform for biologically active recombinant human interleukin-13 production. *Plant Biotechnol. J.*, 2008; 6: 504-515
- [76] Wang J.W., Zheng L.P., Zhang B., Zou T.: Stimulation of artemisinin synthesis by combined cerebroside and nitric oxide elicitation in *Artemisia annua* hairy roots. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009; 85: 285-292
- [77] Wasilewska A., Królicka A.: Otrzymywanie i charakterystyka kultur korzeni włośnikowatych. *Biotechnologia*, 2005; 4: 173-188
- [78] Wilczańska-Barska A., Królicka A., Głód D., Majdan M., Kawiak A., Krauze-Baranowska M.: Enhanced accumulation of secondary metabolites in hairy root cultures of *Scutellaria lateriflora* following elicitation. *Biotechnol. Lett.*, 2012; 34: 1757-1763
- [79] Wirz H., Sauer-Budge A.F., Briggs J., Sharpe A., Shu S., Sharon A.: Automated production of plant-based vaccines and pharmaceuticals. *J. Lab. Autom.*, 2012; 17: 449-457
- [80] Wongsamuth R., Doran P.M.: Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotechnol. Bioeng.*, 1997; 54: 401-415
- [81] Woods R.R., Geyer B.C., Mor T.S.: Hairy-root organ cultures for the production of human acetylcholinesterase. *BMC Biotechnol.*, 2008; 8: 95
- [82] Xu J., Dolan M.C., Medrano G., Cramer C.L., Weathers P.J.: Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnol. Adv.*, 2012; 30: 1171-1184
- [83] Ya-ut P., Chareonsap P., Sukrong S.: Micropropagation and hairy root culture of *Ophiorrhiza alata* Craib for camptothecin production. *Biotechnol. Lett.*, 2011; 33: 2519-2526
- [84] Zhai D.D., Zhong J.J.: Simultaneous analysis of three bioactive compounds in *Artemisia annua* hairy root cultures by reversed-phase high-performance liquid chromatography-diode array detector. *Phytochem. Anal.*, 2010; 21: 524-530
- [85] Zhang H.C., Liu J.M., Lu H.Y., Gao S.L.: Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of *chalcone isomerase* gene with the elicitation treatment. *Plant Cell Rep.*, 2009; 28: 1205-1213
- [86] Zhou M.L., Zhu X.M., Shao J.R., Wu Y.M., Tang Y.X.: Transcriptional response of the catharanthine biosynthesis pathway to methyl jasmonate/nitric oxide elicitation in *Catharanthus roseus* hairy root culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010; 88: 737-750
- [87] Ziemienowicz A.: *Agrobacterium*-mediated plant transformation: factors, applications and recent advances. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2014; 3: 95-102

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.