

# Sinteza encima $\beta$ -glukozidaze v semenih transgenega riža za nadomestno zdravljenje dedne Gaucherjeve bolezni

## *The synthesis of the $\beta$ -glucosidase enzyme in the transgenic rice seeds for replacement therapy of the heritable Gaucher disease*

Zlata Luthar

Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

---

**Povzetek:** Pridobivanje aktivnih sestavin za zdravila, predvsem cepiva s transgenimi rastlinami se je začelo pred 25 leti. Zaradi določenih prednosti sinteze učinkovin s transgenimi rastlinami, v primerjavi z obstoječim pridobivanjem, se vse bolj uveljavljajo optimizirani transformacijski in ekspresijski sistemi ter njihova uporaba. Do sedaj je bilo v ospredju pridobivanje učinkovin za preventivo in zdravljenje številnih nalezljivih človeških in živalskih bolezni. V zadnjem obdobju je vse več primerov pridobivanja rekombinantnih proteinov za zdravljenje avtoimunskih in genetskih obolenj. Med temi je tudi zelo redka Gaucherjeva bolezen, pomanjkanje encima glukocerebrozidaze, ki jo lahko zdravimo z nadomestnim encimom  $\beta$ -glukozidazo. Transgeni riž uspešno sintetizira in nalaga  $\beta$ -glukozidazo v endosperm v obdobju formiranja in zorenja semen.

**Ključne besede:** transgeni riž,  $\beta$ -glukozidaza, Gaucherjeva bolezen, sproščanje v okolje, tveganje, zakonodaja.

**Abstract:** Production of active ingredients for pharmaceuticals, especially vaccines with transgenic crops, began 25 years ago. Due to certain advantages of the synthesis of active transgenic crops ingredients, in comparison with the current production, the optimized transformation expression systems and their application are gaining ground. Until now, the focus has been on sourcing agents for preventing and treating a variety of infectious human and animal diseases. In recent years, there is an increasing number of cases including the acquiring of recombinant proteins for the treatment of autoimmune and genetic diseases, including the very rare Gaucher disease (lack an enzyme glucocerebrosidase), which can be treated with replacement enzyme  $\beta$ -glucosidase. Transgenic rice successfully synthesized and imposes  $\beta$ -glucosidase in the endosperm during the period of formation and maturation of seeds.

**Keywords:** transgenic rice,  $\beta$ -glucosidase, Gaucher disease, release into the environment, risk, legislation.

---

## 1. Uvod

Transgeni oz. gensko spremenjeni organizmi (GSO) so pridobljeni na način, ki v naravi ni možen. Njihovi produkti se že desetletja uporabljajo v medicini za proizvodnjo biofarmaceutikov, kjer so vključeni GS mikroorganizmi in evkarionske celične linije. GSO se uporabljajo tudi v drugih vejah gospodarstva, predvsem v prehranski industriji, varovanju okolja (čistilne naprave) in kmetijstvu. GS rastline, uporabne v kmetijstvu zajemajo veliko število rastlinskih vrst in lastnosti, ki so povezane s kvantiteto in kvaliteto pridelka, odpornostjo na bolezni (bakterijske, glivne, virusne) in škodljivce ter tolerantnostjo na biotske in abiotske strese (Ahmad in sod., 2011; Sarwat in sod., 2012). Izsledki sodobne biotehnologije so uporabni v genski terapiji, ki se ukvarja in poskuša nadomestiti manjkajoče ali okvarjene gene. V devedesetih letih prejšnjega stoletja se je začel razvoj in pridobivanje učinkovin za proizvodnjo zdravil, predvsem cepiv s transgenimi rastlinami (Kumar in sod., 2005; Pelosi in sod., 2012; Ahmad in sod., 2012).

Prve transgene rastline so bile sposobne sinteze učinkovin za preventivo in zdravljenje številnih nalezljivih človeških in živalskih bolezni. V zadnjih petih letih je bilo opravljenih veliko študij na optimizaciji ekspresijskih sistemov za povečanje sinteze antigenov, predvsem za zdravljenje nalezljivih bakterijskih in virusnih bolezni, ki imajo široke razsežnosti in niso omejene samo na države v razvoju (Kant in sod., 2011; Vianna in sod., 2011; Yoshida in sod., 2011; Sharma in Sood, 2011; Twyman in sod., 2012). Nalezljive bolezni so glavni vzrok umrljivosti in obolevnosti po vsem svetu, približno ena tretjina smrti je povzročena zaradi njih. Cepiva za preprečevanje in zdravljenje teh bolezni so imunsko biološke snovi, ki se uporabljajo za posebno varstvo pred nalezljivimi in nenalezljivimi boleznimi in tudi za zdravljenje (Ahmad in sod., 2012; Twyman in sod., 2012).

Največji napredki so bili doseženi pri boleznih, kot so virus prašičjega respiratornega in reproduktivnega sindroma, virus goveje virusne diareje, virus parkljevke, G protein virusa stekline, virus atipične kokošje kuge, rotavirus, površinski antigen hepatitisa B, plaščni protein Norwalk virusa, sev ptičje gripe H5N1, temperaturno nestabilna B podenota enterotoksina *Escherichia coli*, kolera toksin B, HIV, ebola in antraks (Bhoo in sod., 2011; Zhang in sod., 2011; Aguirreburualde in sod., 2013; Lai in sod., 2013; Tang in Page, 2013; Loc in sod., 2014; Lindh in sod., 2014; Gorantala in sod., 2014; Uribe-Campero in sod., 2015; Rukavtsova in sod., 2015; Singh in sod., 2015; Pera in sod., 2015; Firsov in sod., 2015; Soh in sod., 2015). Z

uporabo optimiziranih transformacijskih metod in ekspresijskih vektorjev, ki omogočajo izražanje antiteles v posameznih celičnih organelih, kot so plastidi, endoplazmatski retikulum in škrobne celice ter primernim izborom rastlinskih vrst, so bila dosežena značilna izboljšanja sinteze posameznih učinkovin (Kumar in sod., 2005; Ahmad in sod., 2012; Pelosi in sod., 2012). V zadnjem obdobju je poudarek na pridobivanju učinkovin za zdravljenje nekaterih avtoimunskih obolenj, kot so diabetes tipa 1, arterioskleroza, revmatski artritis in multipla skleroza ter tudi sinteza rekombinantnih proteinov, encimov za zdravljenje genskih bolezni (Salazar-Gonzales in sod., 2014).

Ena od teh je tudi zelo redka recesivna Gaucherjeva bolezen, ki prizadene približno 40.000 prebivalcev na svetu, 3.000 v Evropi, v Sloveniji je trenutno registriranih 19 bolnikov tipa 1 od treh poznanih. Pri tipu 1 je zmanjšana encimska aktivnost, znaki so anemija, trombocitopenija, levkopenija, povečana jetra in vranica ter v odrasli dobi se lahko pojavi zmanjšanje kostne mase. Pri tipu 2 se poleg povečanja jeter in vranice pojavijo še okvare centralnega živčnega sistema, zaradi česar bolniki redko živijo več kot dve leti. Pri tipu 3 so znaki podobni kot pri tipu 1, prisotne so tudi nevrološke motnje, ki se z leti večajo. Pri vseh treh oblikah je prisotno pomanjkanje encima glukocerebrozidaze, kar se odraža v nepravilni razgradnji maščobe glukocerebrozida, ki je produkt odmrlih rdečih in belih krvnih celic (Benedik-Dolničar in Kitanovski, 2003). Zelo pomembno je, da se zdravljenje začne čimprej v otroštvu (Grabowski in sod., 1998). Terapija z injekcijami, ki nadomeščajo pomanjkanje encima, je za pacienta nujna in doživljenjska ter draga (Grabowski in sod., 1995; Benedik-Dolničar in Kitanovski, 2003). Zaradi visokih stroškov je terapija nedosegljiva pacientom iz številnih afriških, azijskih, južnoameriških, srednjevzhodnih in evropskih držav. Zato se iščejo načini za nadomestno zdravljenje.

GS oz. transgeni riž ima sposobnost sinteze in nalaganja rekombinantnega encima  $\beta$ -glukozidaze v endospermu semen, ki se lahko uporablja za nadomestno zdravljenje Gaucherjeve bolezni. V Italiji je bila opravljena transformacija riža in gojenje v rastlinjaku ter predklinična testiranja zdravila (Patti in sod., 2012). Dvoletno poskusno gojenje na prostem je bilo zaupano Sloveniji, vendar sta bila občinski sklep in pravilnik Sklada kmetijskih zemljišč in gozdov RS močnejša od nacionalnega Zakona o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi - ZRGSO (Ur. l. RS 23/2005 in 21/2010) in preprečila gojenje. ZRGSO in trije

Pravilniki (Ur. l. RS 45/2004; Ur. l. RS 4/2006; Ur. l. RS 13/2006) ter Uredba (Ur. l. RS 71/2011) urejajo delo z GSO v zaprtih sistemih, namerno sproščanje GSO v okolje in dajanje GSO oz. njihovih izdelkov na trg ter določajo ukrepe za preprečevanje in zmanjševanje možnih škodljivih vplivov na okolje in zdravje ljudi ter živali.

Uporaba GSO in njihovih produktov, tako kot drugih, lahko pomeni tudi potencialne nevarnosti za okolje ter zdravje ljudi in živali. Te nevarnosti izhajajo iz predpostavke, da GSO pomenijo novost v naravi in niso bili podvrženi naravni selekciji in evoluciji, kar ima za posledico negotovost glede njihovih kratkoročnih in dolgoročnih vplivov na okolje ter zdravje ljudi in živali. Zaradi kompleksnosti ni mogoče predvideti in utemeljiti vseh negotovosti, ki so povezane z obnašanjem organizmov in bioloških sistemov, katerih del so (Wheelis in sod., 1998).

V Evropi in tudi v Sloveniji je zato uveljavljeno načelo previdnosti pri ravnanju in uporabi proizvodov moderne biotehnologije. Zato sta uporaba in delo z GSO regulirana z evropskimi uredbami in direktivami, ki jih imajo na nacionalni ravni v svojo zakonodajo vključene tudi ostale članice. Zakonodaja, kot bistveni del, zahteva oceno tveganja, ki bi ga lahko novonastali GSO predstavljali za okolje, zdravje ljudi in živali ter upravljanje s tveganjem, to je izvajanje ukrepov, ki zmanjšujejo tveganje na najnižjo možno raven (Direktiva 2001/18/EC, 2001; ZRGSO, Ur. l. RS 23/2005 in 21/2010). V primerih, kjer so bile z opravljenimi laboratorijskimi raziskavami in okoljskimi študijami na osnovi trenutnega stanja znanosti izključene potencialne nevarnosti in so upoštevani varnostni mehanizmi, ki preprečujejo nenamerno širjenje, je nepreverjeno načelo proti nesprejemljivo.

V prispevku je prikazana metoda vnosa *GCasi* transgena za sintezo  $\beta$ -glukozidaze v genom riža, spremljanje izražanja transgena v semenih, opravljena analiza biološke varnosti, gojenje transgenih rastlin v rastlinjaku in možnosti varnega sproščanja v okolje oz. gojenje transgenega riža v Sloveniji za pridobivanje zdravila za zdravljenje Gaucherjeve bolezni.

## 2. Material in metode dela

### 2.1 Rastlinski material

Predmet transformacije je bila italijanska industrijska sorta riža CR W3. Sorta je bila prvotno požlahtnjena v namene industrijskega pridobivanja škroba, ima okrogla semena, je zelo rana in na boleznih odporna sorta, predvsem na rjo. Zaradi majhne vsebnosti amiloze, slabe konsistentnosti in velikega indeksa lepljivosti, voščen (vaxy) tip endosperma je

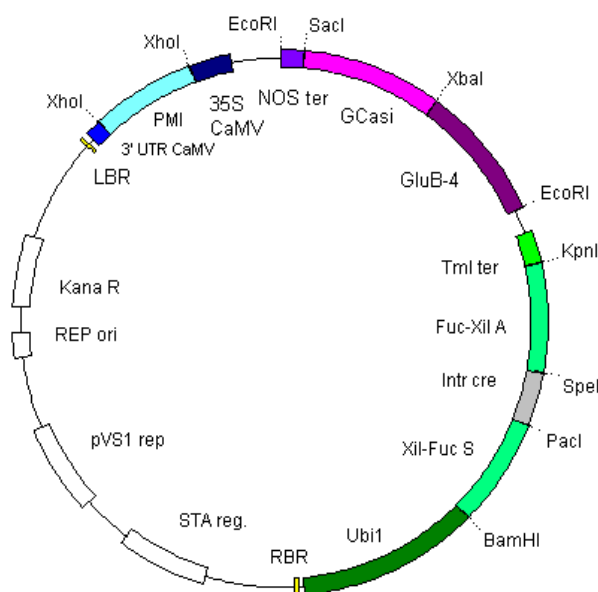
popolnoma neprimerna za prehrano. Semena popolnoma razpadejo po 10 do 15 minutnem kuhanju, postanejo lepljiva in neuporabna.

### 2.2 Genska sprememba in vektorski sistem

Gensko spremembo so opravili prof. dr. Stefano Marchetti in sodelavci na Univerzi v Udinah in podjetju Transactiva v Italiji (Patti in sod., 2012). V embriogeni kalus riža sorte CR W3 so s posredno metodo z vektorskim sistemom *Agrobacterium tumefaciens*, sev EHA 105 in plazmidom pTRS\_GCasi po modificirani metodi Hiei in sod. (1994) vnesli T-DNA s tremi genskimi konstrukti PMI, GCasi ter Fuc-Xil A in S. Genski konstrukt PMI vsebuje selekcijski gen *manA*, odgovoren za sintezo encima fosfomanozne izomeraze, ki omogoča selektivno odpornost transformiranih celic in rastlin na povečano koncentracijo manoze v gojišču. Genski konstrukt GCasi ima vključen *GCasi* gen, odgovoren za sintezo encima  $\beta$ -glukozidaze ter Fuc-Xil A in S genski konstrukt, odgovoren za sintezo interferenčne RNA, za utišanje endogenih riževih encimov, ki bi lahko vplivali na cepitev glikanskih verig  $\beta$ -glukozidaze (slika 1).

#### 2.2.1 Plazmid

Plazmid pTRS\_GCasi je razvilo italijansko podjetje Transactiva s spremembo komercialnega plazmida pCAMBIA-1300, št. GenBank AF234296 (NCBI, 2016). Za zamenjavo in vključitev treh genskih konstruktov so bila uporabljena specifična restriksijska mesta, prisotna znotraj T-DNA, ki so prikazana na sliki 1.



**Slika 1.** Plazmid pTRS\_GCasi z barvno poudarjenimi tremi genskimi konstrukti PMI, GCasi in Fuc-Xil A in S ter

ustreznimi promotorji, geni in terminatorji znotraj leve in desne mejne sekvence LBR-RBR, ki omejujejo T-DNA:

- PMI-seleksijski gen *manA*, odgovoren za encim fosfomanozno izomerazo odpornost transformiranih celic in rastlin na povečano koncentracijo manoze v gojišču,
- GCasi-gen *GCasi*, odgovoren za encima  $\beta$ -glukozidaze
- Fuc-Xil A in S – gen *Fuc-Xil A in S*, odgovoren za interferenčno iRNA, utišanje endogenih encimov  $\alpha$  (1,3)-fukoziltransferaze in  $\beta$  (1,2)-ksiloziltransferaze, ki bi lahko vplivali na cepitev glikanskih verig  $\beta$ -glukozidaze. S vključitvijo iRNA se je pridobilo bioekivalenten farmacevtski protein s človeškim, ki se ga lahko varno uporablja v kontinuirani terapiji pacientov z Gaucherjevo boleznijo (Patti in sod., 2012).

### 2.3 Potrditev uspešnosti transformacije

Uspešnost transformacije je bila potrjena na genotipskem in fenotipskem nivoju. Transformirane rastline riža so nastale iz transformiranih celic embriogenega kalusa na seleksijskem gojišču s povečano koncentracijo manoze. Iz delov listov je bila izolirana DNA. Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in s parom začetnih oligonukleotidov: GCasi forward 5'- CGT GTG CAA TGC CAC CTA C -3' in GCasi reverse 5'- AAT GGC CCA GGT GGT AGA AC -3' so se namnožili fragmenti DNA, značilni za *GCasi* gen, ki je odgovoren za sintezo  $\beta$ -glukozidaze. S parom začetnih oligonukleotidov: PMI forward 5'- CTC GAG ATG CAA AAA CTC ATT AAC T -3' in PMI reverse: 5'- CTC GAG TTA CAG CTT GTT GTA AAC A -3' so se namnožili fragmenti značilni za *manA* gen, odgovoren za sintezo fosfomanozne izomeraze. Z agarozno gelsko elektroforezo je bila potrjena njihova prisotnost. Nukleotidno zaporedje fragmentov značilnih za transgena je bilo določeno s Sangerjevo metodo, aplicirano na obe verigi DNA. Število vgrajenih kopij T-DNA je bilo določeno s Southern blot analizo z uporabo probe označene z dioksigeninom (DIG).

### 2.3 Aklimatizacija

Vitalne transgene rastline z dvema listoma in z več kot tremi koreninami ter vgrajeno eno kopijo T-DNA so bile presajene v substrat in v postopku aklimatizacije ostale približno tri tedne. Na začetku je bila v gojitvenem prostoru velika zračna vlaga, več kot 90 %, nato pa se je s pogostejšim in vedno daljšim prezračevanjem postopno zmanjševala do konca tretjega tedna, ko so bile rastline izpostavljene razmeram v rastlinjaku vse do zrelosti semen. Vmes med rastno dobo je bila opravljena analiza prisotnosti produktov vključenih transgenov, ocena biološke varnosti ter test toksičnosti oz. alergičnosti.

### 2.4 Prisotnost in funkcionalnost $\beta$ -glukozidaze v semenih

Prisotnost in funkcionalnost  $\beta$ -glukozidaze je bila dokazana z ustreznimi molekulskimi in biokemičnimi analizami: PCR, eno- in dvodimenzionalno SDS-PAGE elektroforezo, določeno je bilo aminokislinsko zaporedje, Western blot in fluorimetrični preizkus encimatske aktivnosti.

### 2.5 Analiza biološke varnosti

Za oceno biološke varnosti sistema je bil iz semen in tudi iz ostalih delov rastlin ekstrahiran encim fosfomanozna izomeraza, kot produkt vnešenega seleksijskega *manA* gena. Čisti encimski ekstrakti iz različnih rastlinskih delov so bili uporabljeni za analizo glikoproteinskega profila ter analizo alergenosti in toksičnosti. Opravljena je bila tudi analiza stabilnosti endogenih agronomskih lastnosti transgenih rastlin riža, koruze in pese v primerjavi z netransgenimi rastlinami.

#### 2.5.1 Analiza glikoproteinskega profila

Določen je bil glikoproteinski profil, ker je produkt *manA* gena, encim fosfomanozna izomeraza, vključen v metabolizem manoze in njene spojine manoze 6-fosfat, ki sta bistvena sestavna dela glikanskih verig, prisotnih v glikoproteinih. Preverjen je bil stranski učinek *manA* gena v glikoproteinih transgenih celic riža. Študija je bila opravljena na transgenem in netransgenem rižu ter koruzi in pesi, ki sta predstavnici eno- in dvokaličnic. Uporabljeni so bili proteinski izvlečki iz bakterie *Escherichia coli*, kot standard in primerjani z izvlečki transgenih in netransgenih rastlin. Celotni glikoproteini so bili izolirani s pomočjo kromatografske podobnosti na konkavalin A lektin, ki lahko veže omenjene proteine preko ostankov monoksida in glukoze v N-glikanskem vzorcu.

#### 2.5.2 Analiza alergičnosti in toksičnosti

Za ocenitev potencialne alergičnosti in toksičnosti encima fosfomanozne izomeraze so bile opravljene analize na treh ravneh: 1) primerjava nukleotidnega zaporedja rekombinantnega encima z zapisi znanih toksinov/alergenov v podatkovnih bazah (GenBank EMBL, 2016); 2) opravljeni so bili *in vitro* poskusi prebavljivosti gastričnih tekočin, ki vsebujejo pepsin ter črevesnih tekočin, ki vsebujejo pankreatin in 3) na miših je bil opravljen test akutne oralne toksičnosti. Očiščena fosfomanozna izomeraza iz bakterije *E. coli* in transgenega riža je bila pripravljena v slani raztopini in z gastrično sondico vnešena v želodec 13 belim mišim v tolikšni količini, da je fosfomanozna izomeraza

ustrezala 5,05 g/kg telesne teže. Vzporedno je bila kontrolni skupini živali vnešena le slana raztopina. Miši so bile po skupinah spremljane 14 dni.

### 2.5.3 Analiza stabilnosti endogenih agronomskih lastnosti

Analiza stabilnosti nekaterih agronomskih lastnosti po transformaciji je bila opravljena na transgenih rastlinah riža in koruze v primerjavi z netransgenimi rastlinami. V analizo so bile vključene lastnosti: kalivost in kalilna energija semen, trdnost in prožnost bili oz. stebila, odpornost na poleganje, rast in razraščanje, oblika in višina rastlin, višina storža na rastlini koruze, velikost storža, pridelek semen, odstotek vlage ob spravilu semen. Poleg tega so bile opravljene še vzporedne analize sestave semen na vsebnost vlaken, maščob, proteinov, pepela, škroba, b-karotena in fotosintetičnih pigmentov. Enaka opazovanja so bila opravljena tudi na potomcih prve generacije.

### 2.6 Testiranje učinkovine za pripravo zdravila

V Italiji je bilo opravljeno gojenje v rastlinjaku in pridobivanje oz. ekstrakcija encima  $\beta$ -glukozidaze na manjšem vzorcu semen ter čiščenje in priprava zdravila za predklinična testiranja.

### 2.7 Namerno sproščanje GS riža v okolje

Po zakonu (ZRGSO 23/2005, 21/2010) in direktivi (Directive 2001/18/EC) je namerno sproščanje GSO v okolje vsak nameren vnos, ki zagotavlja veliko stopnjo varnosti ob upoštevanju in izvajanju zadrževalnih ukrepov, ki omejujejo stik GSO z okoljem, ljudmi in živalmi. V primeru namernega sproščanja GSR v okolje je to potrebno z vlogo prijaviti na Ministrstvo za okolje in prostor (MOP) (Luthar, 2015).

GS riž smo želeli posejati na 0,2 ha njivo, ki je znotraj 16 ha kompleksa in zavarovano z ograjo. Sorta riža CR W3 se seje v nepoplavno površino, ob cvetenju in napolnjevanju semen z asimilati je nujno zalivanje. Setvena razdalja v vrstah naj bil bila 0,1 m in medvrstna razdalja 0,5 m, kar je približno 40.000 rastlin oz. 20 rastlin/m<sup>2</sup>. Taka setev naj bi omogočila lažje posege in nadzor rasti.

## 3. Rezultati in razprava

### 3.1 Regeneracija in gojenje rastlin v laboratorijskih in vitro razmerah

Transgene rastline so nastale v *in vitro* razmerah z regeneracijo transformiranih kalusnih celic riža na selekcijskem gojišču z veliko koncentracijo manoze in primerno sestavo hranil za nastanek poganjkov in

korenin. Sistem selekcije z manozo predstavlja alternativo tradicionalnim sistemom, osnovanim na antibiotski odpornosti. Ti so z evropsko direktivo (Direktiva ES 18/2001) za rastline, ki so namenjene namarnemu sproščanju v okolje, po 31. decembru 2008 prepovedani, zaradi varnosti okolja, človeka in živali. Iz listov vitalnih rastlin se je izoliralo celokupno DNA za molekulske analize, na podlagi katerih se je naredil izbor rastlin primernih za aklimatizacijo in gojenje v rastlinjaku.

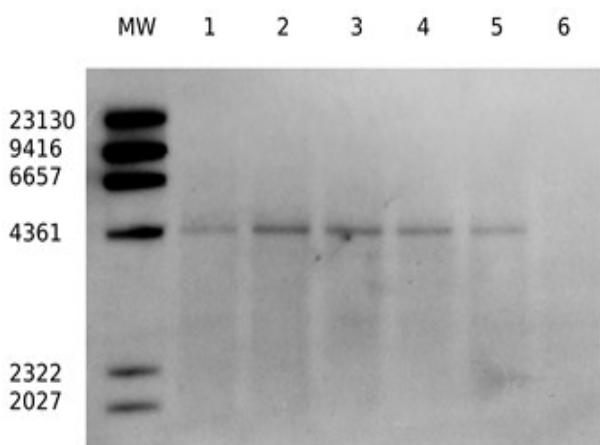
### 3.2 Uspešnost transformacije

Na DNA nivoju se je na izbranih rastlinah s PCR metodo in ustreznim parom začetnih oligonukleotidov potrdila prisotnost namnoženih fragmentov, značilnih za vnešena transgena *GCasi* in *manA*. Fenotipsko izražanje gena *manA* v transformiranih celicah in rastlinah je bilo potrjeno s selektivno prednostjo v razvoju in rasti na gojišču z dodano manozo. Transformirane rastline so sposobne sprejeti manozo iz gojišča in jo uporabiti kot vir energije in ogljika, medtem ko so povišane koncentracije manoze toksične za netransformirane rastline, pri katerih prihaja do fosforilacije v manozo 6-fosfat s pomočjo endogene ezokinaze. Manoz-6-fosfat se kopiči v celicah in moti proces glikolize, kar ima za posledico zaostanek v rasti in propad. Metabolična prednost rastlin, ki imajo vgrajen *manA* gen, se izraža izključno *in vitro* ob prisotnosti velikih koncentracij manoze. V normalnih razmerah oz. brez prisotnosti manoze v gojiščih so z omenjenim genom spremenjene rastline fenotipsko enake kontrolnim rastlinam sorte CR W3. Sistem selekcije, osnovan na manozni je bil v preteklosti temeljito proučen glede aktivnosti in biovarnosti (Bojsen in sod., 1994; Joersbo in sod. 1998; Hansen in Wright, 1999).

Z vključitvijo tehnologije interferenčne RNA (Fire in sod., 1998; Cox in sod., 2007) se je želelo utišati ekspresijo endogenih riževih encimov a(1,3)-fukosiltransferaze in b(1,2)-ksilosiltransferaze. Encima sta odgovorna za vezavo glukoznih ostankov a(1,3) fukoze in b(1,2)ksiloz v glikanske verige proteinov. S tem se je preprečila aktivnost a(1,3)fukoze in b(1,2)ksiloz na glikanske verige b-glukozidaze, sintetizirane v rastlini. Tako se je pridobilo bioekvivalenten farmacevtski encim b-glukozidazo v primerjavi z naravnim človeškim, ki se ga lahko varno uporablja v kontinuirani infuzni terapiji pacientov z Gaucherjevo boleznijo.

S Southern blot analizo je bila potrjena prisotnost T-DNA integrirane v genom riža, ki je bila dolga 11634 bp. Proba, označena z dioksigeninom je bila specifična za nukleotidno zaporedje gena *GCasi*. Fragment

značilen za transgene rastline je bil dolg približno 4360 bp (rastline z oznako 1-5 na sliki 2). S Southern blot analizo so bile izbrane rastline z vgrajeno eno kopijo T-DNA in presajene v substrat za aklimatizacijo.



**Slika 2.** Southern blot analiza DNA izolirane iz transformiranih rastlin riža in netransformirana kontrola:

- MW z dioksinom označen molekularni marker;
- od 1 do 5 DNA iz naključno izbranih transgenih rastlin;
- 6 negativna kontrola (DNA izolirana iz netransformirane CR W3 rastline) (Patti in sod., 2012).

### 3.3 Aklimatizacija

Vitalne rastline so bile približno tri tedne v postopku aklimatizacije, kjer je bila možna regulacija relativne zračne vlage in zračenja. S postopnim zniževanjem relativne vlage se je vzpostavilo odpiranje in zapiranje listnih rež, utrdila se je kutikula in nastala je voskasta prevleka. Vse to je potrebno, da rastlina lahko na prostem preživi in asimilira s pomočjo fotosinteze. Po končani aklimatizaciji so bile rastline presajene v rastlinjak v *in vivo* razmere. Če ne bi bile transgene, bi lahko bile presajene na polje v naravno okolje.

### 3.4 Spremljanje izražanja *GCasi* transgena - $\beta$ -glukozidaze

V rastlinjaku so rastline oblikovale semena, v katerih se je izrazil *GCasi* transgen, ki je odgovoren za sintezo  $\beta$ -glukozidaze. *GCasi* transgen je pod kontrolo riževega promotora GluB-4 (odgovoren za izražanje glutelina 4), ki tkivno specifično in stabilno usmerja nalaganje encima  $\beta$ -glukozidaze v endosperm riževih semen v fazi razvoja med 7. in 30. dnevom po opravitvi. Prisotnost  $\beta$ -glukozidaze v endospermu semen je bila potrjena z Western blot analizo na surovih proteinskih izvlečkih, ekstrahiranih iz semen v različnih fazah razvoja in zorenja. V ostalih delih rastlin ni bila potrebna prisotnost  $\beta$ -glukozidaze. Transgene rastline,

ki so po fenotipu in količini naložene  $\beta$ -glukozidaze ustrezale zastavljenemu ideotipu, so bile razmnožene v rastlinjaku z namenom pridobiti primerno količino semen za pripravo in predklinična testiranja zdravila.

### 3.5 Biološka varnost

Analize biološke varnosti, ki so bile opravljene, na več nivojih, predvsem zaradi vnosa selekcijskega *manA* gena, so potrdile predvidevanja, da je zasnovana transformacija in pridobivanje encima  $\beta$ -glukozidaze s pomočjo GS riža varno, kot je bilo to potrjeno na drugih rastlinskih vrstah v preteklosti (Bojsen in sod., 1994; Joersbo in sod. 1998; Hansen in Wright, 1999).

#### 3.5.1 Glikoproteinski profil

Potrditev nespremenjenega glikoproteinskega profila transgenih rastlin je pomembno, ker tako ne obstaja nevarnost za pojav nezaželenih proteinov. Različno stanje glikozilacije, ki nastane po transformaciji z *manA* genom, bi lahko povzročilo nastanek potencialno alergene proteina. Ne pri transformiranem rižu kot tudi ne pri koruzi in pesi ni bilo ugotovljenih razlik v glikoproteinskih profilih v primerjavi z netransformiranimi rastlinami. S tem je bila potrjena odsotnost nezaželenih učinkov na proces glikozilacije v rastlinah, ki so bile spremenjene z *manA* genom.

#### 3.5.2 Alergenost in toksičnost

Alergenost oz. toksičnost je bila preverjana na treh nivojih. 1) Primerjava z dokumentiranimi zapisi v javnih podatkovnih bazah (GenBank EMBL) ni potrdila homologij med katerikoli znanim toksinom oz. alergenom in izraženim rekombinantnim encimom fosfomanozno izomerazo in potencialno novim proteinom kot posledica *manA* gena. 2) Opravljeni poskusi prebavljivosti *in vitro* so pokazali, da pepsin in pankreatin hitro razgradita fosfomanozno izomerazo. Znano je, da so običajno alergeni proteini odporni na encimsko razgradnjo, kar povzroča bolezenske težave (Taylor in sod., 1992; Franck-Oberaspach in Keller, 1997). 3) Test akutne oralne toksičnosti opravljen na miših, v 14 dnevnom opazovalnem obdobju, ni potrdil opaznih znakov toksičnosti in negativnih učinkov na rast ali pojav anomalij v razvoju organov.

#### 3.5.3 Stabilnost endogenih agronomskih lastnosti transgenega riža

V opazovanih lastnostih med transgenimi in netransgenimi rastlinami riža v primerjavi s koruzo ni bilo razlik. Omenjena študija je potrdila, da prisotnost transgenov in njihove lastnosti niso vplivale na rast, niti ne na nobeno drugo agronomsko lastnost rastlin in tudi

ne na lastnosti semen. Enaki rezultati so bili doseženi tudi pri potomcih prve generacije. S tem je bilo potrjeno, da sistem transformacije omogoča zelo ciljno delo s posameznimi geni in da je preostali endogeni del riževega genoma ostal nespremenjen.

### 3.6 Gojenje transgenega riža v rastlinjaku in predklinično testiranje $\beta$ -glukozidaze

V Italiji je bilo opravljeno gojenje transgenega riža v rastlinjaku, razmnožene so bile tudi zadostne količine semen za predklinično testiranje. Te preliminarne študije in raziskave so pokazale, da je sintetizirana in naložena  $\beta$ -glukozidaza v semenih zelo čista in zato enakovredna oz. primernejša za nadomestno zdravljenje, kot pridobljena z do sedaj uveljavljenim postopkom. Prvi klinični poskusi encimske terapije so se pojavili sredi 70. let, v splošni uporabi pa je ta terapija od leta 1991. Encim so sprva pridobivali iz človeških placent. Od leta 1994 je na voljo tudi biotehnoški proizvod, pridobljen iz tkivne kulture, rekombinantne celične linije ovarijev kitajskih hrčkov, v katere je bil vnešen človeški gen za glukocerebrozidazo. Leta 2012 je ameriška administracija za hrano in zdravila (FDA) odobrila pridobivanje encima s celično linijo gensko spremenjenega korenja (Morrow, 2012). Za klinično testiranje na večjem vzorcu in za pridobitev registracije zdravila ter potrditev stabilnosti izražanja lastnosti v okoljskih razmerah ter za pripravo tehnološke platforme za širitev setvenih površin bi bilo potrebno opraviti vsaj dveletno poskusno gojenje na prostem.

### 3.7 Namerno sproščanje GS riža v okolje in obstoječe ovire

Namerno sproščanje GSR v okolje je zaradi negativnega javnega mnenja v Evropi, ki je proti sproščanju GSO v okolje in zaradi dolgih postopkov pridobitve dovoljenja za gojenje na prostem, v nekaterih evropskih državah zelo oteženo oz. nemogoče izpeljati. Za primer, v Italiji postopek traja 2 do 3 leta, v Španiji je krajši in traja 6 do 8 mesecev, v Sloveniji je najkrajši, traja le 1,5 do 2 meseca. To je bil eden od razlogov, zakaj smo poskušali z gojenjem na prostem v Sloveniji. Drugi razlog je bil ta, ker se riž pri nas ne prideluje, nima generativno kompatibilnih divjih sorodnikov ter ni gojenih vrst, s katerimi bi se lahko križal. Najbližja pridelava riža je v sosednji Italiji, ki je od izbrane lokacije oz. polja oddaljeno približno 70 km. Zaradi omenjenih razlogov smo se s kolegi iz Italije odločili za poskusno dvoletno gojenje v Sloveniji. Vloga na 145 straneh, po zahtevah III. poglavja ZRGSO, Ur. l. RS 23/2005 in 21/2010, je bila temeljito

pripravljena in oddana v pregled na MOP, kjer je bila pozitivno ocenjena.

Manjkal ji je samo katastrski izpis za izbrano njivo. Preden smo zaprosili za katastrski izpis, smo o nameri seznanili občino v kateri se nahaja njiva. Večina slovenskih občin je podpisala peticijo Inštituta za trajnostni razvoj proti gojenju GSR na njihovem ozemlju. Izbrana lokacija je v eni od teh občin in v lasti Sklada kmetijskih zemljišč in gozdov RS, katerega smo tudi obvestili, da nameravamo gojiti GS riž na njihovi njivi. Z obeh strani smo dobili odklonilni odgovor. S pogovori na MOP in prisotnimi iz Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano ter po veljavnem nacionalnem Zakonu o ravnanju z GSO nismo uspeli, saj je bil močnejši občinski sklep in pravilnik Sklada kmetijskih zemljišč in gozdov RS.

## 4. Zaključek

Transgeni riž je izključno namenjen farmakološki pridelavi učinkovine  $\beta$ -glukozidaze za medicinske potrebe oz. zdravljenje dedne Gaucherjeve bolezni in ne za prehrano, saj že osnovne lastnosti sorte CR W3 tega ne omogočajo. To je velik razlog, da do pomote in zamenjave v prehranske namene ne more priti. Dvoletno poskusno gojenje na prostem v Sloveniji ni uspelo, kljub temu da riž pri nas nima sorodnih vrst, s katerimi bi se križal. Približno 7 kg GS riža sintetizira in naloži v endospermu semen zadostno količino encima  $\beta$ -glukozidaze za letošnje intravenozno zdravljenje enega bolnika, kar bi bistveno pocenilo trenutne stroške zdravljenja, ki znašajo približno 200.000 evrov in povečalo dostopnost zdravila v optimalni koncentraciji večjemu številu pacientov z Gaucherjevo boleznijo tipa 1.

## Literatura

1. Aguirreburualde M.S.P., Gomez M.C., Ostachuk A., Wolman F., Albanesi G., Pecora A., Odeon A., Ardila F., Escibano J.M., Dus Santos M.J., Widgorovitz A. 2013. Efficacy of a BVDV subunit vaccine produced in alfalfa transgenic plants. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 151: 315- 324.
2. Ahmad P., Ashraf M., Younis M., Hu X., Kumar A., Akram N.A., Al-Qurainy F. 2012. Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. *Biotechnology Advances* 30(3): 524-540.
3. Ahmad P., Nabi G., Jaleel C.A., Umar S. 2011. Free radical production, oxidative damage and antioxidant defense mechanisms in plants under abiotic stress. In: *Oxidative stress: Role of antioxidants in Plants*, P. Ahmad, S. Umar (ed.). Studium Press Pvt. Ltd. New Delhi, India: 19-53.

4. Benedik-Dolničar M., Kitanovski L. 2003. Obravnavna bolnikov z Gaucherjevo boleznijo tip 1. Zdravstveni vestnik 72: 701-704.
5. Bhoo S.H., Lai H., Ma J., Arntzen C.J., Chen Q., Mason H S. 2011. Expression of an immunogenic ebola immune complex in *Nicotiana benthamiana*. Plant Biotechnology Journal 9(7): 807-816.
6. Bojsen K., Donaldson I., Haldrup A., Joersboe M., Kreiberg J.D., Nielsen J., Okkels F.T., Petersen S.G. 1994. Phosphomannose isomerase, a novel plant selection system. PCT Application No WO 94/20627.
7. Cox K.M., Sterling J.D., Regan J.T., Gasdaska J.R., Frantz K.K., Peele C.G., Black A., Passmore D., Moldovan-Loomis C., Srinivasan M., Cuisson S., Cardarelli P.M., Dickey L.F. 2007. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. Nature Biotechnology 24: 1591-1597.
8. Directive 2001/18/EC of the European Parliament & of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms & repealing Council Directive 90/220/EEC
9. European Molecular Biology Laboratory (EMBL). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
10. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391: 806-811.
11. Firsov A., Tarasenko I., Mitouchkina T., Ismailova N., Shaloiko L., Vainstein A., Dolgov S. 2015. High-yield expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in transgenic duckweed plants. Molecular Biotechnology 57: 653-661.
12. Franck-Oberaspach S.L., Keller B. 1997. Consequences of classical and biotechnological resistance breeding for food toxicology and allergenicity. Plant Breeding 116: 1-17.
13. Gorantala J., Grover S., Rahi A., Chaudhary P., Rajwanshi R., Sarin N.B., Bhatnagar R. 2014. Generation of protective immune response against anthrax by oral immunization with protective antigen plant-based vaccine. Journal of Biotechnology 176: 1-10.
14. Grabowski G.A., Barton N.W., Pastores G., Dambrosia J.M., Banerjee T.K., McKee M.A., Parker C., Schiffmann R., Hill S.C., Brady R.O. 1995. Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. Annals of Internal Medicine 122: 33-39.
15. Grabowski G.A., Leslie N., Wenstrup R. 1998. Enzyme therapy for Gaucher disease: the first 5 years. Blood Reviews 12: 115-133.
16. Hansen G., Wright M.S. 1999. Recent advances in the transformation of plants. Trends Plant Science 4: 226-231.
17. Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. 1994: Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. The Plant Journal 6: 271-282.
18. Joersbo M., Donaldson I., Kreiberg J., Petersen S.G., Brunstedt J., Okkels F.T. 1998. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. Molecular Breeding 4: 111-117.
19. Kant A., Reddy S., Shankraiah M.M., Venkatesh J.S., Nagesh C. 2011. Plant made pharmaceuticals (PMP's) - A protein factory: A Overview. Pharmacology online 1: 196-209.
20. Kumar G.B., Ganapathi T.R., Revathi C.J., Srinivas L., Bapat V.A. 2005. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. Planta 222(3): 484-493.
21. Lai K.S., Yusoff K., Mahmood M. 2013. Functional ectodomain of the hemagglutinin-neuraminidase protein is expressed in transgenic tobacco cells as a candidate vaccine against Newcastle disease virus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 112: 117-121.
22. Lindh I., Brave A., Hallengard D., Hadad R., Kalbina I., Strid A., Andersson S. 2014. Oral delivery of plant-derived HIV-1 p24 antigen in low doses shows a superior priming effect in mice compared to high doses. Vaccine 32: 2288-2293.
23. Loc N.H., Long D.T., Kim T.G., Yang M.S. 2014. Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 50(1): 26-31.
24. Luthar Z. 2015. Namerno sproščanje gensko spremenjenih rastlin v okolje v Sloveniji. Acta agriculturae Slovenica 105(2): 345-353. [http://aas.bf.uni-lj.si/september2015/18\\_Luthar.pdf](http://aas.bf.uni-lj.si/september2015/18_Luthar.pdf).
25. Morrow T. 2012. Gaucher's disease treatment option rides on carrot cells' biologic power. Manag Care 21 (6): 45-46.
26. National Center for Biotechnology Information (NCBI). U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore?term=pCAMBIA-1300>.
27. Patti T., Bembi B., Cristin P., Mazzarol F., Secco E., Pappalardo C., Musetti R., Martinuzzi M., Versolato S., Cariati R., Dardis A., Marchetti S. 2012. Endosperm-specific expression of human acid beta-



- glucosidase in a waxy rice. *Rice* 5(34): 1-15.
28. Pelosi A., Shepherd R., Walmsley A.M. 2012. Delivery of plant - made vaccines and therapeutics. *Biotechnology Advances* 30(2): 440- 448.
  29. Pera F.F.P.G., Mutepfa D.L.R., Khan A.M., Els J.H., Mbewana S., Van Dijk A.A.A., Rybicki E.P., Hitzeroth I.I. 2015. Engineering and expression of a human rotavirus candidate vaccine in *Nicotiana benthamiana*. *Virology Journal* 12(205): 1-11.
  30. Pravilnik o oceni tveganja za dajanje izdelka, ki vsebuje gensko spremenjene organizme, na trg. Uradni list RS, št. 13/2006.
  31. Pravilnik o oceni tveganja za delo z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu. Uradni list RS, št. 45/2004.
  32. Pravilnik o oceni tveganja za namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje. Uradni list RS, št. 4/2006.
  33. Rukavtsova E.B., Rudenko N.V., Puchko E.N., Zakharchenko N.S., Buryanov Y.I. 2015. Study of the immunogenicity of hepatitis B surface antigen synthesized in transgenic potato plants with increased biosafety. *Journal of Biotechnology* 203: 84-88.
  34. Salazar-Gonzales J.A., Rosales-Mendoza S., Romero-Maldonado A., Monreal-Escalante E., Uresti-Rivera E.E., Banuelos-Hernandez B. 2014. Production of a plant-derived immunogenic protein targeting ApoB100 and CETP: toward a plant-based atherosclerosis vaccine. *Molecular Biotechnology* 56: 1133-1142.
  35. Sarwat M., Ahmad P., Nabi G., Hu X. 2013. Ca<sup>2+</sup> signals: the versatile decoders of environmental cues. *Critical Reviews in Biotechnology* 33(1): 97-109.
  36. Sharma M., Sood B. 2011. A banana or a syringe: journey to edible vaccines. *World Journal of Microbiology and Biotechnolog* 27(3): 471-477.
  37. Singh A., Srivastava S., Chouskey A., Panwar B. S., Verma P.C., Roy S. Singh P.K., Saxena G. Tuli R. 2015. Expression of rabies glycoprotein and ricin toxin B chain (RGP-RTB) fusion protein in tomato hairy roots: a step towards oral vaccination for rabies. *Molecular Biotechnology* 57: 359-370.
  38. Soh H.S., Chung H.Y., Lee H.H., Ajjappala H., Jang K., Par J.H., Sim J.S., Lee G.Y., Lee H.J., Han Y.H., Lim J.W., Choi I., Chung I.S., Hahn B.S. 2015. Expression and functional validation of heat-labile enterotoxin B (LTB) and cholera toxin B (CTBčšpppé ) subunits in transgenic rice (*Oryza sativa*). *Springerplus* 4, 148: 1-14.
  39. Tang W., Page M. 2013. Inducible expression of Norwalk virus capsid protein gene in plant cell suspension cultures. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 49: 129-136.
  40. Taylor S.L., Nordlee J.A., Bush R.K. 1992. Assessment of the Allergenicity of Foods Produced through Agricultural Biotechnology. In: *Food Safety Assessment*, J.W. Ginley, S.F. Robinson, and D.J. Armstrong, (eds.). ACS Symposium Series 484, American Chemical Society, Washington, DC: 316–329.
  41. Twyman R.M., Schillberg S., Fischer R. 2012. The production of vaccines and therapeutic antibodies in plants. In: *Molecular farming in plants: Recent advances and future prospects*, A. Wang, S. Ma (ed.). Springer Science+Business Media, New York: 145-159.
  42. Uredba o merilih za uvrstitev dela z gensko spremenjeni organizmi v zaprtem sistemu v varnostni razred in zadrževalnih ter drugih varnostnih ukrepih za posamezen varnostni razred (Uradni list RS, št. 71/2011).
  43. Uribe-Campero L., Monroy-García A., Durán-Meza A.L., Villagrana-Escareño M.V., Ruíz-García J., Hernández J., Núñez-Palenius H.G., Gómez-Lim M.A. 2015. Plant-based porcine reproductive and respiratory syndrome virus VLPs induce an immune response in mice. *Research in Veterinary Science* 102: 59- 66.
  44. Vianna G.R., Cunha N.B., Murad A.M., Rech E.L. 2011. Soybeans as bioreactors for biopharmaceuticals and industrial proteins. *Genetics and molecular research* 10: 1733-1752.
  45. Wheelis M., Kapuscinski A.R., Spielman A., Istock C., Regal P.J., Ingham E., Ellstrand N., Letourneau D., Bhargava P.M., Klinger T., Akabas S. 1998. *Manual for assessing ecological and human health effects of genetically engineered organisms*. Edmunds Institute, Edmunds, Washington: 245 p.
  46. Yoshida T., Kimura E., Koike S., Nojima J., Futai E., Sasagawa N., Watanabe Y., Ishiura S. 2011. Transgenic rice expressing amyloid β-peptide or oral immunization. *International Journal of Biological Sciences* 7(3): 301-307.
  47. Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (Uradni list RS, št. 23/2005 – uradno prečiščeno besedilo, 21/2010).
  48. Zhang S.Z., Zhang G.L., Rong T.Z., Pan L., Zhou P., Zhang Y.G. 2011. Transformation of two VPI genes of O- and Asia 1-type foot-and-mouth disease virus into maize. *Agricultural Sciences in China* 10(5): 661-667.