

„Molecular farming”

Mi mindent termelnek a transzgénikus növények?

Tamás László

ELTE, Növényélettani és Molekuláris
Növénybiológiai Tanszék

„Élő Adás,,

ELTE, TTK, Biológiai Intézet

Lágymányos 2013 November 6





Mit termelnek a nem transzgénikus növények?

Elsődleges

Fehérjék

Szénhidrátok

Zsírok, olajok

Vitaminok (A, B-k, C, E, K)

Másodlagos (speciális)

Fenoloidok

Poliketidek

Terpenoidok

Azotoidok

Ásványi anyagok mikro- és makroelemek



Mire használhatók a nem transzgénikus növények?

- élelmiszer (egészséges táplálkozás, rejtett éhezés)
- takarmány (táplálkozástani érték)
- ipari alapanyag (speciális igények)
- gyógyítás (fűben fában orvosság)





Gyógyító Növények

Növényi eredetű gyógyszerek

> 120 gyógyszeripari termék

pl. fakéreg (aszpirin, kinin, taxol)

Taxol: tiszafa (*Taxus brevifolia*)

rákos megbetegedések ellen

1 kg taxol kinyeréséhez 4000 fa kérge
szintetikus molekula?





Mit termelnek a transzgénikus növények?

Elsődleges

Fehérjék

Szénhidrátok

Zsírok, olajok

Vitaminok (A, B-k, C, E, K)

Ásványi anyagok

Másodlagos (speciális)

Fenoloidok

Poliketidek

Terpenoidok

Azotoidok





Mire használhatók a transzgénikus növények?

- élelmiszer (egészséges táplálkozás)
- takarmány (táplálkozástani érték)
- ipari alapanyag (speciális igények)

gyógyítás





Mi a baj a GM növényekkel?

- **Mesterségesen juttatnak be géneket**
 - nem tudjuk hova épülnek be a genomban
- **Idegen eredetű gének használata**
 - gének keverése, szokatlan alkalmazása:
senki nem ismeri ennek kockázatát,
mi lesz az emberrel, állatokkal és a környezettel?
- **Nem lehet megkülönböztetni a GM és nem GM növényt, élelmiszert**
 - fenotípusos jelölés, termék megjelölése





Mi a baj a GM növényekkel?

- **Egészségügyi kockázat**
 - allergia,
 - antibiotikum rezisztencia kialakulása,
 - permetezőszerekkel (peszticidek, herbicidek) szemben rezisztens állatok, növények kialakulása,
 - ma még nem ismert hatások,





Mi a baj a GM növényekkel?

- **Egészségügyi kockázat**
 - Az USA-ban az élelmiszeripar azt állítja, hogy nagyon alapos teszteknek vetik alá a GM élelmiszereket, de mindenki saját tesztjeit végzi
 - Nem agrár- vagy élelmiszeripari szervezetek tesztjei ezzel szemben komoly egészségügyi kockázatokat említenek

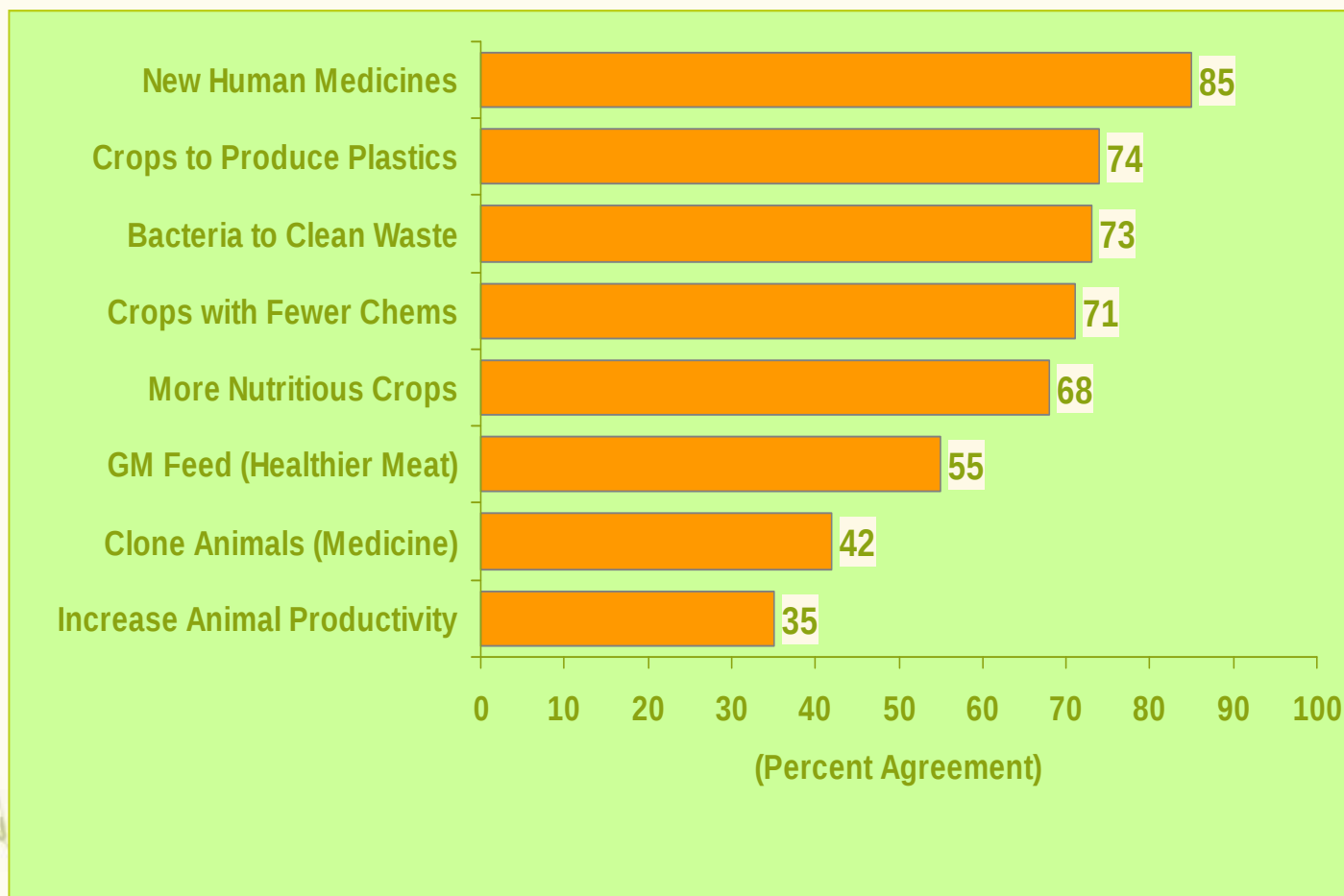
???

- When bad science makes good headlines: *Bt* maize and regulatory bans. *Nature Biotechnology* 31, 386–387 (2013)





Elfogadottság





Mire használhatók a transzgénikus növények?

Élelmiszer ipar

Egészségmegőrzés

- vitamin
- ehető rost
- telítetlen zsírsavak (omega-3)
- adalékanyagok
- szín (astaxantin)
- íz, illat





Mire használhatók a transzgénikus növények?

Élelmiszer ipar

Funkcionális élelmiszerek (biofortifikáció)

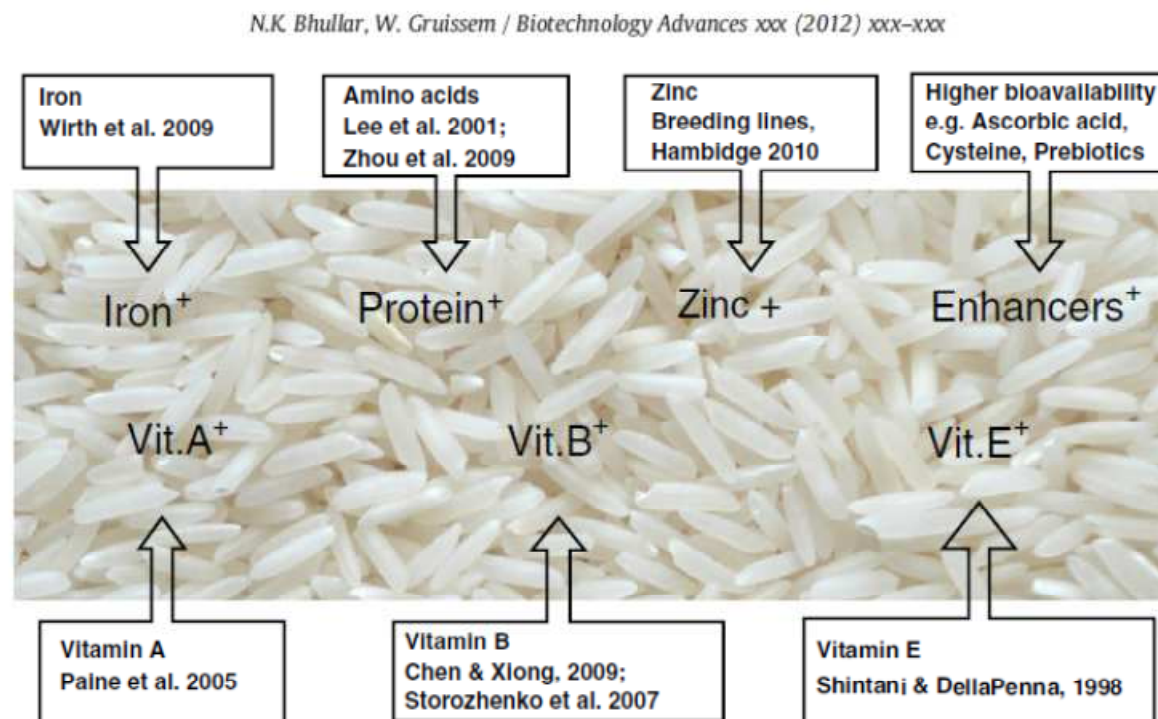


Fig. 3. Integrated efforts towards nutritionally enhanced rice based on current achievements. This figure represents a vision of rice varieties combining higher levels of different micronutrients, metabolites and essential amino acids without altering their agronomic performance and eating qualities.



Egészséges táplálék

GM?! alapanyag?

Előny a fogyasztónál

Table 1

The next generation of GM crops developed recently

Nutrient/trait	Crop	Base level	Max level in GM crop	Main benefits	Reference
β -Carotene	Rice	0 $\mu\text{g/g}$	37 $\mu\text{g/g}$	Vitamin A deficiency causes blindness and increased child mortal	[4]
Iron	Rice	–	Increase > 6 fold	Iron malnutrition causes anaemia or impaired mental development	[5]
Folate	Rice	<1 $\mu\text{g/g}$	17 $\mu\text{g/g}$	To prevent neural tube defects	[6]
Ascorbate	Maize	18 $\mu\text{g/g}$	107 $\mu\text{g/g}$	Ascorbate deficiency causes scurvy in human	[7]
Oleic acid	Soybean	~20%	~80%	To hinder the progression of adrenoleukodystrophy, and reduce blood pressure	[8,9]
Omega-3	Canola	12%	50%	To reduce coronary heart disease and maintain heart health	[10]
Amylose	Wheat	28%	75%	Benefit for some health issues associated with some chronic diseases	[11,12]
Anthocyanin	Tomato	0 $\mu\text{g/g}$	2.83 $\mu\text{g/g}$	To extend the life of cancer-prone mice	[13]



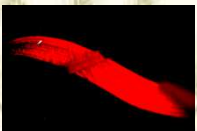
A vitamin

Golden Rice A vitamin hiány ellen
118 országban jelent problémát, 140-250 millió
gyermek, a gyermekek fele meghal

Ingo Potrykus csoportja

- *psy* (phytoene synthase) nárcisz (*Narcissus pseudonarcissus*)
- *crtII* (carotene desaturase) gén talajlakó baktérium *Erwinia uredovora*
- *lyc* (lycopene cyclase) gén nárcisz (*Narcissus pseudonarcissus*)
nem szükséges

metabolic engineering





A vitamin

Golden Rice

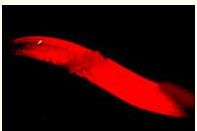
alacsony koncentráció

1,6 - 6,0 $\mu\text{g/g}$ karotin

GR2

karotin 37 $\mu\text{g/g}$, béta-karotin 84%

72 gr rizs 50%-a a szükséges értéknek

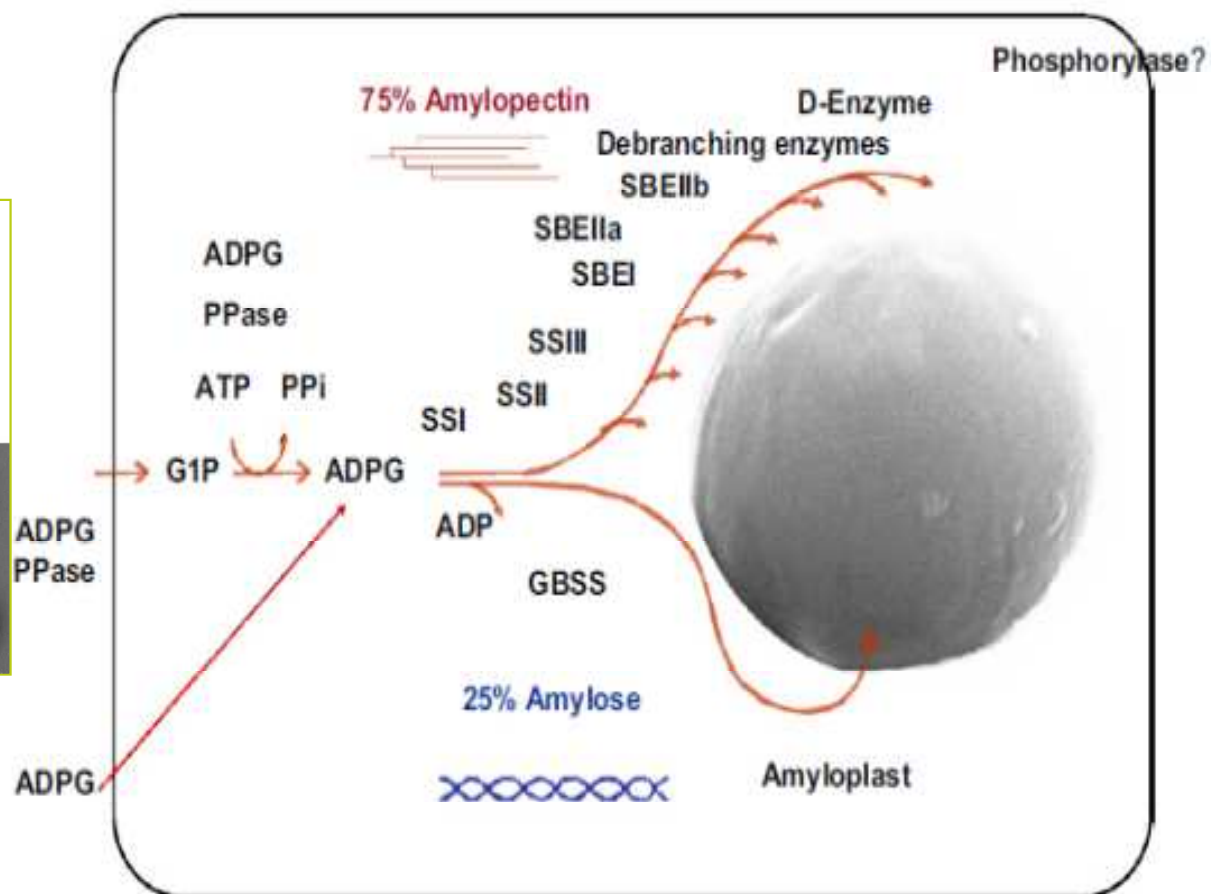
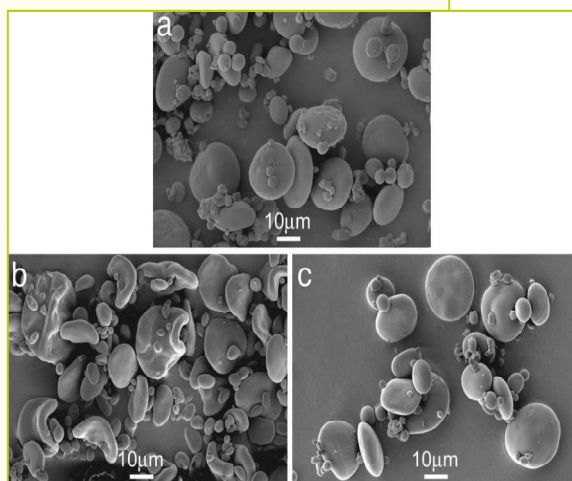




Ehető rost

Egészség

Előny a





Vas és nyomelemek

Alacsony koncentráció

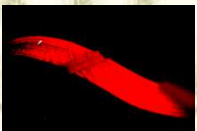
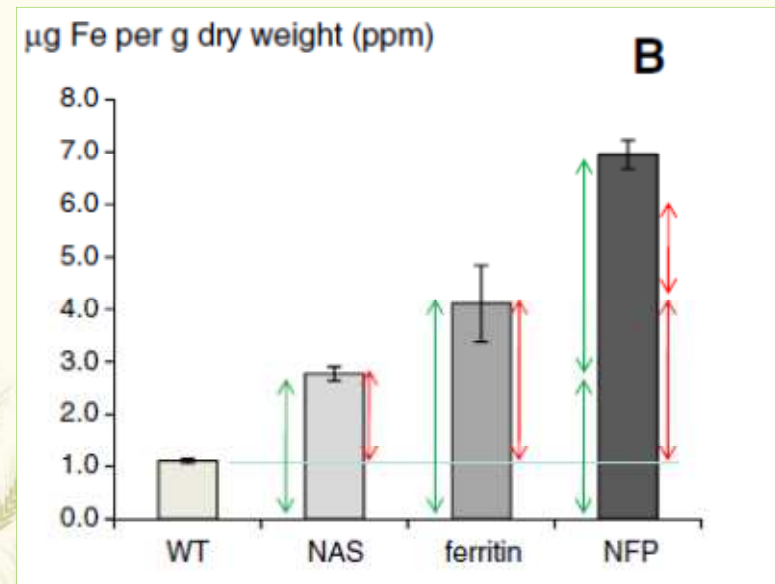
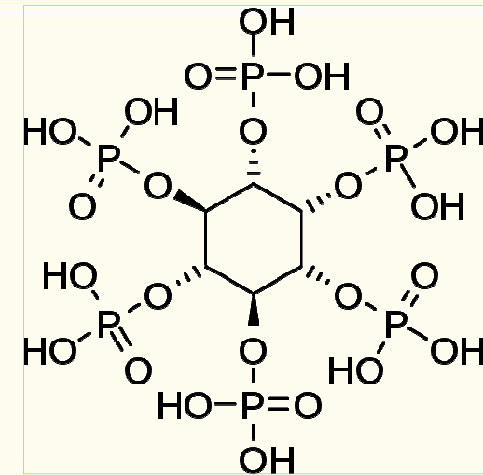
koncentráció növelés

ferritin 4000 Fe atom/fehérje

bioavailability

fitolsav (kelátor antinutritional)

fitáz (*Aspergillus niger*)



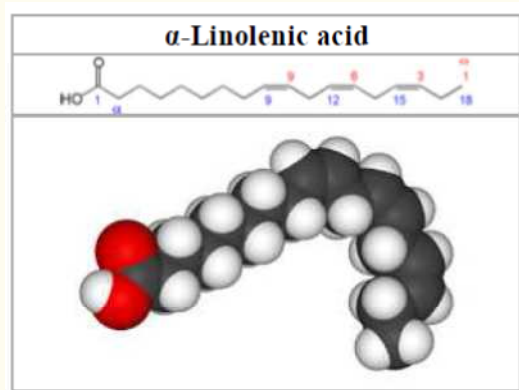


Zsírsavak (F vitamin)

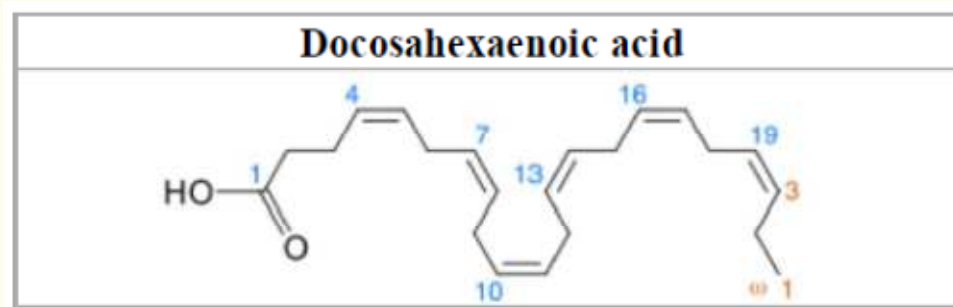
- VLCFA Very long chain fatty acid

többszörösen telítetlen zsírsavak (halolaj, len)

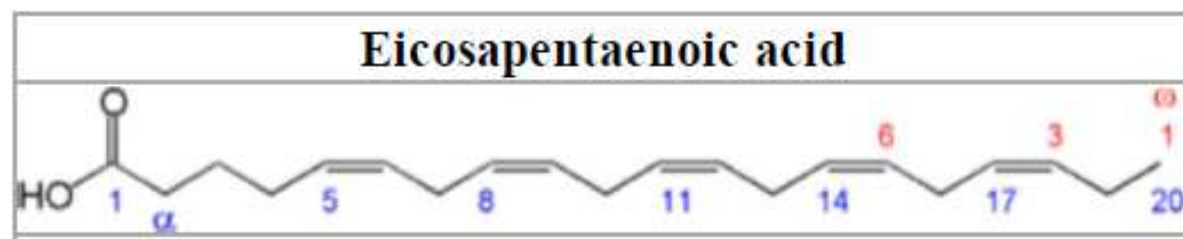
Szív és érrendszeri betegségek ellen $n-3/n-6 \sim 1:3 \ 1:5$



(alfalinolénsav ALA)



DHA dokozahexaénsav



EPA eikozapentaénsav



Mire használhatók a transzgénikus növények?

Ipar

Ipari molekulák

- enzimek
 - gyógyszeripar számára
 - biomassza átalakításában alkalmazható
- fehérjék
 - avidin (diagnosztikai célokra)
- polimerek (környezetbarát)
 - polihidroxialkánok (polihidroxibutirát)
- adalékanyagok





Mire használhatók a transzgénikus növények?

Gyógyszeripar

(gyógyító molekulák)

rekombináns fehérjék

- gyógyászati alapanyagok
fehérjék, enzimek (tripszin, trombin, kollagén)
- antitestek (plantibodies)
- antigének (vakcinák)





Biotechnológiai ipar

rekombináns fehérjék

Biopharmaceutical industry

Lehetséges megoldások

- Fermentációs ipar

- baktérium (*E. coli*) / -interferonok
- élesztő (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*) -hirudin
- emlős sejtek -mon. antitest emlőrák ellen, Herceptin
- tej, tojás -antitrombinIII (2006)

Gyógyszeripari fehérjék értéke 13 ezer milliárd USD

Inzulin 1300 milliárd USD





Növények alkalmazása

Alternatív megoldás

Növényi alapanyag feldolgozása, módosítása
ipari módszerekkel

Növényi biofermentorok

Biofarming
Molecular Farming





Molecular Farming

- nem a növény előállítása, hanem egy jól meghatározható molekula termelése a cél
- új molekulák termelése, módosítása a régieknek, arányok eltolás,
- nagy mennyiség,
- A biotechnológia és agrárgazdaság, (növénytermelés) kombinálása új termékek előállítására





Biopharmaceutical industry

2007: termelési érték 10%-a , elfogadott új molekulák 20%-a

2006: monoklonális antitestek forgalma 80%-os növ.

Roche 20 millió Euro forgalom

Megnövekedett kereslet (meghaladta az igényt)

Új megoldásokra van szükség

Növényi biotechnológiai gyógyszeripar





Természetes fermentorok

GM Növények Csoportosítása

Stabil

- teljes növény (sejtmag) (kukorica, dohány)
- teljes növény (kloroplasztisz)
- transzgénikus növényi sejtek

Tranziens

növényi vírusok alkalmazása





Növényi biofermentor

Előnyök (teljes növény):

I. Technológiai

- 1., természet erőforrásait hasznosítja
- 2., mennyiség, gyorsaság, technológia
- 3., nagy hozzáadott érték
- 4., biogazdálkodás
- 5., környezeti terhelés csökken





Növényi biofermentor

Előnyök (teljes növény):

II. Termék

6., stabilitás

A) fehérje bontó enzimekkel szemben

B) hosszú idejű tárolás

7., posztranszlációs rendszer
(glycoengineering)

8., nincs szennyeződés

emberi és állati kórokozók

prionok, vírusok

toxinok





Növényi biofermentor

Előnyök (teljes növény):

III. gazdaságosság

9., 10–50 x olcsóbb

10., ehető vakcina alkalmazása

- tisztítás nélkül
- injektálás nélkül (hűtés, stressz, környezeti terhelés)
- szakképzett dolgozó (steril körülmények)





Növényi biofermentor példák

uidA gén béta glukuronidáz enzim

Szubsztrátjai:

5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc)

p-nitrophenyl β -D-glucuronide

4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG)

7500 hektár, 1740 tonna

0,015% fehérje tartalom

137 kg 85%-os termék

43 ezer USD/kg – 100000 USD/kg

Stabilitás

10 °C-on 3 hónap

25 °C-on 2 hét

50 °C-on 7 nap





Növényi biofermentor példák

1986: növekedési hormon

1989: immunoglobulin, plantibody (dohány)

jól transzformálható

nagy zöldtömeg

alacsony fehérjetartalom

proteázok

pigment

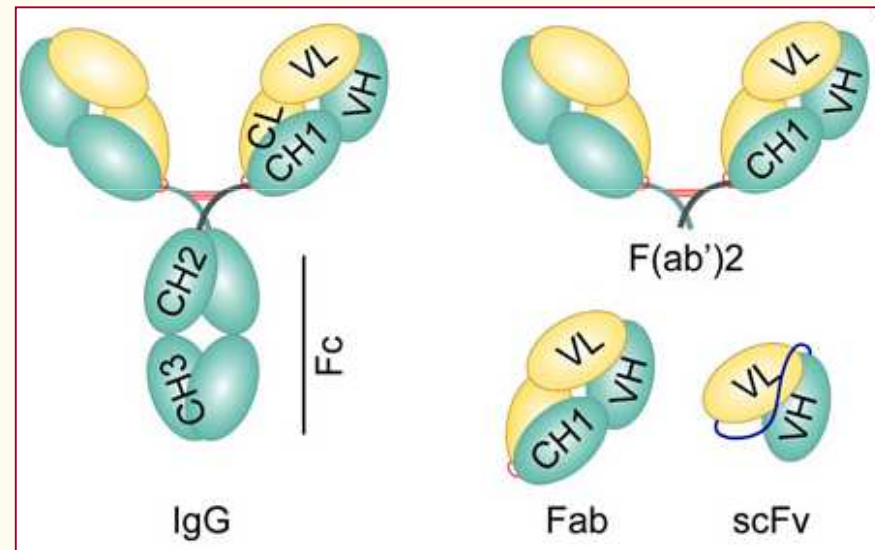
nikotin

polifenol

Alternatíva

burgonya, alma, banán,

Borsó, gabonafélék



Fab, antigen binding fragment;
scFv, single chain antigen binding fragment



Növényi biofermentor (plantibodies)

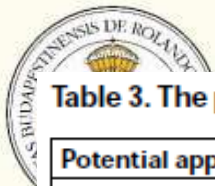
Table 1. Therapeutic and diagnostic plantibodies

Application and specificity	Promoter	Signal sequences	Antibody name or type	Plant	Expression levels	Refs
<u>Dental caries; streptococcal antigen I or II</u>	CaMV 35S	Murine IgG signal peptides	Guy's 13 (SIgA) ^a	<i>Nicotiana tabacum</i>	500 µg/g FW ^b leaves	8,11
<u>Diagnostic; anti-human IgG</u>	CaMV 35S	Murine IgG signal peptides	C5-1 (IgG)	Alfalfa	1.0% TSP ^c	4
<u>Cancer treatment; carcinoembryonic antigen</u>	Maize ubiquitin	Murine IgG signal peptide; KDEL	ScFvT84.66 (ScFv)	Wheat	900.0 ng/g leaves; 1.5 µg/g seed	5
<u>Cancer treatment; carcinoembryonic antigen</u>	Maize ubiquitin	Murine IgG signal peptide; KDEL	ScFvT84.66 (ScFv)	Rice	29.0 µg/g leaves; 32.0 µg/g seed; 3.8 µg/g callus	5,6
<u>Cancer treatment; carcinoembryonic antigen</u>	Enhanced CaMV 35S	Murine IgG signal peptide; KDEL	ScFvT84.66 (ScFv)	Rice	27.0 µg/g leaves	5
<u>Cancer treatment; carcinoembryonic antigen</u>	Enhanced CaMV 35S	TMV Ω leader; murine IgG signal peptides; KDEL	T84.66 (IgG)	<i>Nicotiana tabacum</i> (transiently with <i>Agrobacterium</i> infiltration)	1.0 µg/g leaves	13
<u>B-cell lymphoma treatment; idiotype vaccine</u>	TMV subgenomic coat protein promoter	Rice α-amylase	38C13 (scFv)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	30.0 µg/g leaves	9
<u>Colon cancer; surface antigen</u>	TMV subgenomic promoter U5 CP	Murine IgG signal peptide; KDEL	CO17-1A (IgG)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Not reported	10
<u>Herpes simplex virus 2</u>	CaMV 35S	Tobacco extensin signal peptide	Anti-HSV-2 (IgG)	Soybean	Not reported	3

^aSIgA, secretory IgA.

^bFW, fresh weight.

^cTSP, total soluble protein.



Növényi biofarmenter (Echör)l

Table 3. The production of biopharmaceuticals for human health in transgenic plants

Potential application or indication	Plant host	Protein	Expression levels	Refs ^a
Human proteins				
Anticoagulant	Tobacco	Human protein C	<0.01% TSP ^b	36
Thrombin inhibitor	Canola (<i>Brassica napus</i>)	Human hirudin	0.30% seed protein	36
Neutropenia	Tobacco	Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Not reported	50
Growth hormone	Tobacco	Human somatotropin, chloroplast	7.00% TSP	42
	Tobacco	Nuclear expression	<0.01% TSP	42
Anemia	Tobacco	Human erythropoietin	<0.01 TSP	34
Antihyperanalgesic by opiate activity	<i>Arabidopsis</i>	Human enkephalins	0.10% seed protein	34
Wound repair and control of cell proliferation	Tobacco	Human epidermal growth	<0.01% TSP	36
Hepatitis C and B treatment	Rice, turnip (<i>Brassica rapa</i>)	Human interferon- α	Not reported	36
	Tobacco	Human interferon β	<0.01% fresh weight	34
Liver cirrhosis, burns, surgery	Tobacco	Human serum albumin	0.02% TSP	34
Blood substitute	Tobacco	Human hemoglobin α , β	0.05% seed protein	36
Collagen	Tobacco	Human homotrimeric collagen	<0.01% fresh weight	51
Cystic fibrosis, liver disease and hemorrhage	Rice	Human α -1-antitrypsin	Not reported	50
Trypsin inhibitor for transplantation surgery	Maize	Human aprotinin	Not reported	50
Antimicrobial	Potato	Human lactoferrin	0.10% TSP	52
Non-human proteins				
Hypertension	Tobacco, tomato	Angiotensin-converting enzyme	Not reported	50
HIV therapies	<i>Nicotiana bethamiana</i>	α -Tricosanthin from TMV-U1	2.00% TSP	50
		Subgenomic coat protein		
Gaucher's disease	Tobacco	Glucocerebrosidase	1.00-10.00% TSP	36

^aBecause of space limitation, reviews that cite original citations are provided.

^bTSP, total soluble protein.



Ehető vakcina

- korábban is használt megoldások
- szájon át bevitt antigén

emésztőrendszeren keresztül megy (proteázok)

védekezés:

nagy dózis

molekuláris, fizikai

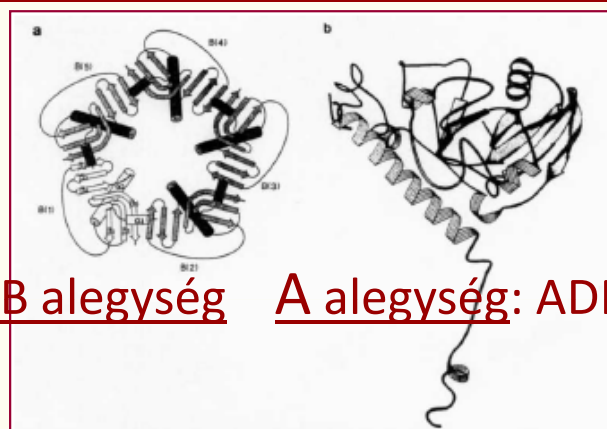
dózirozás





Ehető vakcina

Hazai eredmények LTB, CTB



B alegység

A alegység: ADP riboziláz

fúziós-PEDV

glikoszfinolipid

ganglioizid (GM1, GM3)

Laurdan

fluoreszcens
cholera toxin B

anti-koleszterin
antitest (ACHA)

koleszterin

ero-
folipidek:
E, PS...

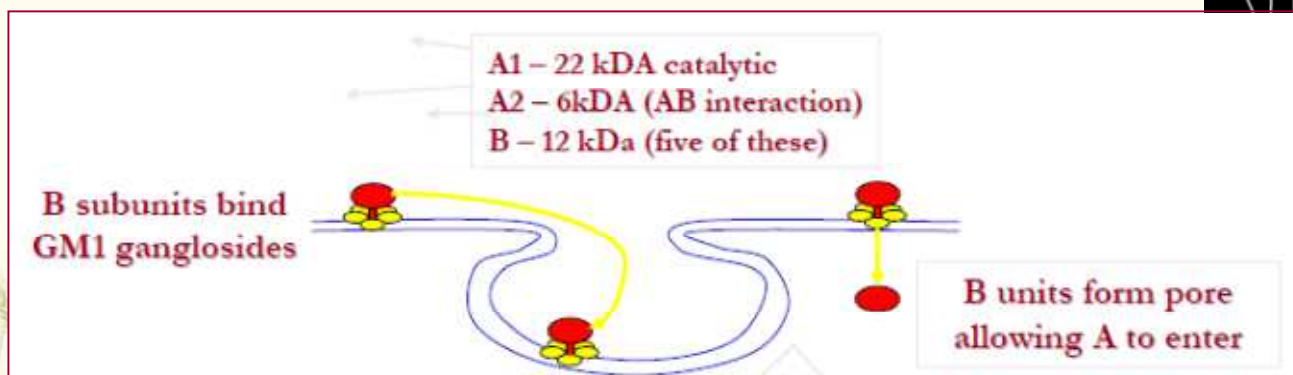




Table 2. Proteins with applications for human or animal vaccines and expressed by transgenic plants

Source of the protein and target species for the vaccine	Protein or peptide expressed	Plant expression system	Maximum recorded expression level in <i>planta</i>	Integrity, immunogenicity and protective capacity of the vaccine	Refs
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (humans)	Heat-labile toxin B-subunit	Tobacco	<0.01% TSP ^a	Intact protein forms multimers and is immunogenic when administered orally	14
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (humans)	Heat-labile toxin B-subunit	Potato	0.19% TSP	Receptor-binding activity and immunogenic and protective when administered orally	14,22,25
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (humans)	Heat-labile toxin B-subunit	Maize	Not given	Immunogenic and protective when administered orally	30
<i>Vibrio cholerae</i> (humans)	Cholera toxin B-subunit	Potato	0.30% TSP	Intact protein forms multimers, has receptor-binding activity and is immunogenic and protective when administered orally	18,19
Hepatitis B virus (humans)	Envelope surface protein	Tobacco	<0.01% TSP	Virus-like particles form and extracted protein is immunogenic when administered by injection	15,23
Hepatitis B virus (humans)	Envelope surface protein	Potato	<0.01% FW ^b	Immunogenic when administered orally	31
Hepatitis B virus (humans)	Envelope surface protein	Lupin (<i>Lupinus</i> spp.)	<0.01% FW	Immunogenic when administered orally	27
Hepatitis B virus (humans)	Envelope surface protein	Lettuce	<0.01% FW	Immunogenic when administered orally	27
Norwalk virus (humans)	Capsid protein	Tobacco	0.23% TSP	Intact protein and virus-like particles form, immunogenic when administered orally	16
Norwalk virus (humans)	Capsid protein	Potato	0.37% TSP	Virus-like particles form and immunogenic when administered orally	16,26
Rabies virus (humans)	Glycoprotein	Tomato	1.00% TSP	Intact protein	17
Human cytomegalovirus (humans)	Glycoprotein B	Tobacco	<0.02% TSP	Immunologically related protein	32
Rabbit hemorrhagic disease virus (rabbits)	VP60	Potato	0.30% TSP	Immunogenic and protective when administered by injection	28
Foot-and-mouth disease virus (agricultural domestic animals)	VP1	<i>Arabidopsis</i>	Not given	Immunogenic and protective when administered by injection	20
Foot-and-mouth disease virus (agricultural domestic animals)	VP1	Alfalfa	Not given	Immunogenic and protective when administered by injection or orally	24
Transmissible gastroenteritis coronavirus (pigs)	Glycoprotein S	<i>Arabidopsis</i>	0.06% TSP	Immunogenic when administered by injection	21
Transmissible gastroenteritis coronavirus (pigs)	Glycoprotein S	Tobacco	0.20% TSP	Intact protein and immunogenic when administered by injection	29
Transmissible gastroenteritis coronavirus (pigs)	Glycoprotein S	Maize	<0.01% FW	Protective when administered orally	30

^aTSP, total soluble protein.

^bFW, fresh weight.

xcina





Ehető vakcina

Növényi részek mint biofermentor Transzgénikus földimogyoró

citoplazma	0,2%	1,5 mg/n	56 g/ha	11 millió
kloroplasztisz	20%	150 mg	5,6 kg	1125 m
mag	1%	156 mg	5,8 kg	1170 m