

University of Groningen

Endophytes as alternative paclitaxel sources

Staniek, Agata Agnieszka

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2010

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Staniek, A. A. (2010). *Endophytes as alternative paclitaxel sources: chemistry and genetics of Taxomyces andreanae and the endophytic flora of Wollemia nobilis*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting

Planten produceren stoffen waarmee ze zich ondermeer beschermen tegen bacteriën en schimmels en tegengaan dat ze worden aangevreten door dieren. Deze stoffen noemen we secundaire metabolieten. Secundaire metabolieten zijn chemisch gezien heel divers en vaak biologisch actief. Hierdoor vormt het plantenrijk een bron voor potentiële nieuwe geneesmiddelen. Ook vindt er via secundaire metabolieten communicatie plaats tussen planten en micro-organismen die met elkaar samenleven, waardoor specifieke en farmaceutisch interessante verbindingen kunnen ontstaan. Endofyten zijn schimmels die van nature in planten voorkomen en met hen een symbiose vormen. Zij zijn in dit opzicht heel interessant en tot nu toe nog weinig onderzocht.

Het onderzoek in dit proefschrift richt zich op de mogelijke vorming van paclitaxel in een aantal endofyten in samenspel met hun gastheerplanten.

Hoofdstuk 2 is een introductie op het onderwerp en geeft een uitgebreid overzicht over onze huidige kennis van endofyten. Hun grote biodiversiteit met tot nu toe onbekende secundaire metabolieten kan uiterst waardevol zijn voor het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen.

Paclitaxel is een diterpeen dat oorspronkelijk afkomstig is uit de bast van *Taxus brevifolia*, en als cytostaticum wordt gebruikt bij bepaalde vormen van kanker. Het is een 'blockbuster' in de farmaceutische industrie. De hoeveelheden paclitaxel die in de taxusboom voorkomen zijn echter laag, en de isolatie en zuivering tijdrovend. Onderzoek naar alternatieve bronnen voor de productie van paclitaxel leidde in de jaren negentig van de vorige eeuw tot publicaties over endofyten die paclitaxel konden produceren. Dit is ronduit controversieel gebleken, ondanks de aanvankelijk positieve berichten in de (wetenschappelijke) media. Momenteel is de taxusboom nog steeds de enige bruikbare bron voor paclitaxel.

Wij onderzochten de endofyt *Taxomyces andreanae* die van nature voorkomt in *Taxus brevifolia*, met het doel de heersende onduidelijkheid weg te nemen (**hoofdstuk 3**). Verder beschrijven we de isolatie en screening van endofyten uit de oeroude conifeer *Wollemia nobilis* en hun vermogen om paclitaxel te synthetiseren (**hoofdstuk 6**).

We gebruikten standaard chromatografische, spectroscopische en enzymimmunologische technieken om de aanwezigheid van paclitaxel in cultures (kweken op laboratoriumschaal) van *Taxomyces andreanae* aan te tonen. We vonden echter geen aanwijzingen dat paclitaxel in de cultures werd gevormd. Daarnaast onderzochten we of de endofyten genen bevatten die betrokken zijn bij de vorming (biosynthese) van paclitaxel. Met behulp van PCR (polymerase chain reaction) richtten we ons op de genen *taxadiene*

synthase en *baccatin III phenylpropanoyl transferase*. Wij konden de aanwezigheid van deze genen in *Taxomyces andreanae* aantonen.

Het is theoretisch mogelijk dat geïsoleerde endofyten paclitaxel maken. Maar toch is het onwaarschijnlijk, aangezien er in de plant ongeveer twintig verschillende genen bij de biosynthese betrokken zijn. Een meer realistische mogelijkheid is het optreden van 'horizontal gene transfer'. Hierbij wordt gedurende de evolutie genetisch materiaal uitgewisseld tussen organismen die met elkaar samenleven. In zo'n ecosysteem zijn de organismen samen verantwoordelijk voor het eindproduct. De specifieke omgeving van de plant is nodig om de genen in de endofyt, die een rol spelen in de biosynthese van paclitaxel, 'aan' te zetten.

Wollemia nobilis, de eerder genoemde conifeer en gastheer van paclitaxel-producerende endofyten, is een interessant object voor wetenschappelijk onderzoek. De plant werd in 1994 ontdekt, nadat men ervan was uitgegaan dat zij al miljoenen jaren geleden was uitgestorven. Zij wordt beschouwd als een levend fossiel. In **hoofdstuk 4** beschrijven we onze pogingen om van de plant callus- en suspensiecultures te maken. Helaas is het ons niet gelukt om celcultures te maken van *Wollemia nobilis* die goed in het laboratorium kunnen groeien. In **hoofdstuk 5** kijken we naar de chemische verbindingen die de plant produceert. We vergeleken de samenstelling van de vluchtige olie uit verschillende organen van de plant, bladeren en twijgjes. De vluchtige olie bestond voornamelijk uit mono-, sesqui- en diterpenen, met de sesquiterpenen 16-kaureen en germacreen D als belangrijkste componenten. Net als paclitaxel zijn deze vluchtige oliebestanddelen gevormd uit isopreen als bouwsteen. De biosyntheseroutes houden dus verband met elkaar.

Uit *Wollemia nobilis* isoleerden wij de endofyten *Phomopsis* sp. and *Cladosporium langeronii*. Met behulp van PCR konden we de aanwezigheid van het gen *taxadiene synthase* in deze endofyten aantonen. Net als in *Taxomyces andreanae* uit *Taxus brevifolia* is de blauwdruk voor de paclitaxel biosynthese ook aanwezig in deze endofyten uit *Wollemia nobilis*.

Het is interessant om na te gaan of verschillende endofyten die paclitaxel kunnen maken ook overeenkomende genclusters bezitten. Zulke kennis vergroot de mogelijkheden om paclitaxel onder gecontroleerde omstandigheden te produceren via zogenaamde combinatoriële biosynthese. Bij combinatoriële biosynthese worden genen van het ene organisme in een ander overgezet, met als doel bepaalde cruciale stappen in de biosynthese gemakkelijker (en rendabeler) te laten verlopen.

Op basis van de resultaten in dit proefschrift concluderen we dat eerdere publicaties die claimen dat endofyten kunnen dienen als alternatief voor de productie van paclitaxel prematuur zijn geweest. Om een toekomstig tekort aan paclitaxel als geneesmiddel te voorkomen en om de oorspronkelijke leverancier *Taxus brevifolia* voor uitsterven te behoeden, zijn absoluut andere en meer rendabele bronnen nodig. De huidige ontwikkelingen op het gebied van genomics en systeembioïologie, in combinatie met de biodiversiteit die de natuur biedt, zullen hiertoe zeker bijdragen.

