

# Skopolamiinia tuottavien karvajuurien metabolinen stabiilisuus 16 vuoden ylläpidon jälkeen

---

→ **Suvi T. Häkkinen\***

Erikoistutkija, TKT  
VTT, PL 1000 Tietotie 2,  
02044 VTT, Espoo  
suvi.hakkinen@vtt.fi

→ **Kirsi-Marja Oksman-Caldentey**

Tutkimuspäällikkö, Dos. (Farm.)  
VTT, PL 1000 Tietotie 2,  
02044 VTT, Espoo

\*Kirjeenvaihto

---

## TIIVISTELMÄ

Kasvit ovat yksi tärkeimmistä uusien lääkeaineiden, niin sanottujen lead-yhdisteiden ja hienokemikaalien lähteitä. Kasvien soluviljelmät taas ovat mielenkiintoinen väline kasvien pienyhdisteaineenvaihdunnan tutkimiselle ja mahdollistavat arvokkaiden yhdisteiden suuren mittakaavan tuottamisen. Esimerkiksi syöpälääkkeenä käytetty paklitakseli, jota valmistetaan soluviljelytekniikkaa käyttäen, on kaupallisessa käytössä. Usein rajoitteena erilaistumattomien kasvisoluviljelmien käytössä pidetään niiden geneettistä labiiliutta. Lisäksi viljelmien tuottokapasiteetti usein ajan mittaan heikentyy. Karvajuuret ovat kasvien tuumorikudosta, joka syntyy luonnossa esiintyvän Agrobakteeri-infektion tuloksena. Karvajuuret ovat hyvä vaihtoehto kasvien pienyhdisteiden tuottamiselle, koska ne jakaantuvat nopeasti, eivät tarvitse kasvihormoneja kasvaakseen ja ovat yleisesti stabiilimpia kuin erilaistumattomat viljelmät. Vaikka tämä geneettinen ja metabolinen stabiilius on yleisesti tunnettu karvajuurten ominaisuus, kirjallisuudessa on vain muutama esimerkki pitkään viljeltyjen karvajuurten tuottokapasiteeteista. Tässä tutkimuksessa karvajuuria, jotka tuottavat suuria määriä tropaalkaloideja, seurattiin 16 vuoden ajan laboratorio-olosuhteissa. Villikaalin (*Hyoscyamus muticus L.*) karvajuurille kehitettiin myös pakastusmenetelmä, jolla voidaan välttää työläs jatkuva siirrostaminen. Vaikka pakastuksen jälkeinen elävyys jäi heikoksi, siirtogeenin ilmentyminen pysyi muuttumattomana pakastetuissa soluissa. Tässä tutkimuksessa osoitettiin, että vaikka karvajuurten tuotossa tapahtuu vaihtelua ajan mittaan, jopa erittäin pitkäaikainen siirrostaminen ei aiheuttanut merkittävää alenemistä metabolisessa aktiivisuudessa.

**Avainsanat:** Kasvisoluviljelelmä, karvajuuuri, hyoskyamiini 6β-hydroksylaasi, skopolamiini, stabiilius, pakastaminen

## JOHDANTO

Kasvit tarjoavat valtavan suuret määrät mahdollisuuksia erilaisten ihmisille mielenkiintoisten sovellusten suhteen uusina lääkeaineina, biopolymeereinä, arvokkaina kemiallisina yhdisteinä, ravintona ja rehuna. Koska kasvit ovat ”täysin vihreitä”, ne tarjoavat lähtökohtaisesti ympäristöystävällisen ja kestävän tuotantomahdollisuuden. Sen sijaan, että viljeltäisiin kokonaisia kasveja, kasvisoluja voidaan viljellä synteettisellä ravintoalustalla, jolloin ne mahdollistavat käytön erilaisissa bioteknisissä sovelluksissa. Soluviljelmien etuina on solubiomassan tai metaboliittien tuotto kontrolloiduissa olosuhteissa. Laboratoriossa tai bioreaktoreissa viljely mahdollistaa tuottoprosessit, jotka ovat riippumattomia ilmasto-olosuhteista, ja toisaalta mahdollistavat erilaisten tuottoparametrien optimoinnin.

Karvajuuret ovat kasvien luonnossa esiintyvä sairaus, joka johtuu *Agrobacterium rhizogenes* -maabakteerin infektiosta (Sevón ja Oksman-Caldentey, 2002). Tämä bakteeri kantaa Ri-plasmidia (Root inducing), jonka avulla se siirtää osan plasmidi-DNA:staan kasvisolun tumaan. Erittäin monimutkaisen geneettisen järjestelmän tuloksena infektiokohtaan syntyy karvajuuuri. Jokainen erillinen karvajuuuri on oma klooninsa, ja juuret voidaan irrottaa kasvista jatkoviljelyä varten. Tässä työssä villikka (*Hyoscyamus muticus*) infektoitiin *Agrobacterium rhizogenes* -bakteerilla, joka kantaa hyoskyamiini 6 $\beta$ -hydroksylaasia (*h6h*). Tämä geeni on eristetty *H. niger* -kasvista, ja se koodaa entsyymiä, joka muuttaa hyoskyamiinin skopolamiiniksi kaksivaiheisessa prosessissa. Tämä H6H -entsyymiin hydroksylaasiaktiivisuus tuottaen 6 $\beta$ -hydroxyhyoskyamiinia on paljon korkeampi kuin epoksidaasiaktiivisuus, joka muuttaa 6 $\beta$ -hydroxyhyoskyamiinin skopolamiiniksi (Yun ym., 1992). Kymmenien vuosien tutkimustyö on johtanut tämän karvajuurituumorin käyttöön erilaisissa arvokkaissa bioteknisissä sovelluksissa (Georgiev ym., 2007; Häkkinen ym., 2014; Vasilev ym., 2014). Karvajuuria on saatu indusoitua monissa eri kasveissa, ja niitä on käytetty pienyhdisteiden kaupalliseen tuotantoon soveltuvassa mittakaavassa. Lisäksi karvajuuret kasvattavat nopeasti biomassaa ja niillä on yksinkertaiset ravintoalustavaatimukset (Jouhikainen ym., 1999; Guillon ym., 2006; Srivastava ja Srivastava, 2007; Häkkinen ym., 2005). Esimerkki kaupallisesta toimijasta on ranskalainen Samabriva (entinen Root Lines Technology) ([www.samabriva.com](http://www.samabriva.com)).

Joissakin tapauksissa pienyhdisteiden tuotto rajoittuu erityisiin solukoihin ja erilaistumattomissa

soluissa tuotto on vähäistä. Tämä ilmiö tunnetaan myös tropa-alkaloidien osalta. Luultavasti taustalla on tropa-alkaloidien biosynteesigeenien ilmenemisen lokalisaatio, joka tapahtuu juurissa ja joista tropa-alkaloidit kuljetetaan kasvin muihin osiin (Hashimoto ym., 1986). Geneettinen stabiilius on liitetty myös kromosomaalitasolle (Weber ym., 2008; Weber ym., 2010; Dehghan ym., 2012). Lisäksi sillä, että karvajuuria viljellään ilman kasvihormoneja, on merkitystä. Kun erilaistunut solukko joutuu kosketuksiin kasvihormonien kanssa, usein havaitaan muutoksia kromosomiluvussa ja somaklonaalinen vaihtelu lisääntyy (Baíza ym., 1999). Kuitenkin myös erilaisia tuloksia on raportoitu. Guivarc’h ym. (1999) havaitsivat, että porkkanan (*Daucus carota*) karvajuuret olivat hyvin epästabiileja sekä fenotyypiltään että kyvyltään ilmentää siirtogeeniä kahden vuoden seurannan aikana. Samoin Mano ym. (1986) havaitsivat, että tropa-alkaloidien tuotto oli epätasaista *Scopolia japonican* karvajuurissa, tosin varsin lyhyellä kahden kuukauden seuranta-ajalla, joka vastaa viljelyolosuhteiden muutoksiin vaadittavaa adaptaatioaikaa. Pitkäaikaisista seuranta-ajasta karvajuurien tuotokyvystä on julkaistu vain muutamassa tutkimuksessa. Peebles ym. (2009) raportoivat 5-vuotistutkimuksen punatalvion (*Catharanthus roseus*) laboratorio-olosuhteissa viljellyillä karvajuurilla, jotka osoittautuivat olevan sekä geneettisesti että metabolisesti stabiileita tutkittuna aikana. Samoin Maldonado-Mendoza ym. (1993) analysoivat tropa-alkaloidien tuottoa *Datura stramonium* -karvajuurilla viiden vuoden ajan ja osoittivat sekä kasvunopeuden että alkaloidituoton pysyneen stabiilina. Tässä työssä osoitamme ensimmäistä kertaa geneettisen ja metabolisen aktiivisuuden seurannan siirtogeenisillä karvajuurilla, joita on viljelty laboratoriossa jatkuvalla siirrostamisella 16 vuoden ajan. Sen jälkeen kun tämä karvajuurilinja pystytettiin 16 vuotta sitten (Jouhikainen ym., 1999), sen tuotokapasiteettia on tutkittu kerran vuonna 2005 (Häkkinen ym., 2005) ja vastikään (Häkkinen ym., 2016).

Soluviljelmien pystyttäminen ja ylläpito on aikaa vievää ja työlästä. Pakastus eli kryosäilöntä on menetelmä, jossa soluja tai solukkoja säilötään ultra-alhaisissa lämpötiloissa, usein nestetyypessä (-196 °C), joka pysäyttää kaikki metaboliset prosessit ja näin mahdollistaa solujen säilymisen muuttumattomina. Kuitenkin pakastus on kasvisolujen osalta vielä varsin empiiristä testausta ja onnistuneen menetelmän pystyttäminen on työlästä, kun jokaiselle solulinjalle vaaditaan erillinen optimointiprosessi. Eräs tärkeimmistä tekijöistä on solunsisäisen veden mää-

rän optimointi, koska kasvisolujen tilavuudesta jopa 90 prosenttia voi olla vettä. Solunsisäinen neste laajenee kiteytyessään lämpötilan laskiessa, ja tämä saattaa rikkoa solunsisäisiä kalvorakenteita. Solunsisäisen nesteen määrää voidaan vähentää monin eri tavoin. Osmoottinen esikäsitely tapahtuu usein sokereiden tai sokerialkoholien avulla, jotka kuivattavat solua. Kuivattaminen voi tapahtua myös hitaalla pakastamisella. Vaihtoehtoisesti solut voidaan suojata muun muassa algiinaatilla ja kuivaus voi tapahtua silikageelin tai ilmapinnan avulla. Vitrifikaatiotekniikassa solunsisäisen nesteen määrää vähennetään voimakkaiden osmoottisten ja kryoprotektanttiliuosten avulla. Vaikka useille kasvisolulinjoille on pystytty kehittämään onnistunut pakastusmenetelmä, menetelmän kehittäminen vaatii aina paljon kokeellista työtä ja optimointia (Reed 2008). Kirjallisuudesta löytyy menetelmiä *Beta vulgaris* ja *Nicotiana rustica* (Yoshimatsu ym., 1996), *Artemisia annua* (Teoh ym., 1996), *Eruca sativa* ja *Gentiana macrophylla* (Xue ym., 2008), *Panax ginseng* (Yoshimatsu ym., 1996), *Armoracia rusticana* (Phunchindawan ym., 1997; Hirata ym., 1998), *Maesa lanceolata* ja *Medicago truncatula* (Lambert ym., 2009) karvajuurten pakastukselle, mutta tähän mennessä villikaalille ei ole raportoitu menetelmää. Tässä työssä kehitimme helpon vitrifikaatioon perustuvan pakastusmenetelmän villikaalin karvajuurille. Menetelmä ei vaadi erityistä pakastuslaitteistoa. Lisäksi ensimmäistä kertaa osoitamme, kuinka skopolamiinia tuottavat karvajuurat säilyttävät metabolisen aktiivisuutensa 16 vuoden seurantaajakson aikana, kun niitä on ylläpidetty siirrostamalla laboratoriossa.

## AINEISTO JA MENETELMÄT

### Kasvisolut ja niiden viljely

Villikaalin (*Hyoscyamus muticus* L. strain Cairo) karvajuurikloonin KB7 (aiemmin 13A7) aloitettiin käyttäen *A. rhizogenes* LBA9402 pLAL21 kantaa (jossa on 35S-*h6h*) (Jouhikainen ym., 1999). Karvajuurilinjaa viljeltiin siirrostamalla neljän viikon välein kiinteälle modifoidulle Gamborg B5 -kasvatusalustalle (Oksman-Caldentey ym., 1991; Jouhikainen ym., 1999). Karvajuurien ympäristössä oli 100 mg ± 5 mg (tuorepainoa) 20 ml:ssa kasvatusalustaa ja kasvatus tapahtui 100 ml:n erlenmeyer -pullossa ravistelija (100 rpm, +25 °C, 8h/16h pimeä/valosykli). Analyysit PCR ja RT-PCR -reaktioita sekä kemiallisia analyysejä varten tehtiin 28 vuorokauden ikäisistä nestekasvatetuista juurista. Siirtogeneeni (*h6h*) sekä karvajuurifenotyypistä vastaava *rolB* geenit varmis-

tettiin PCR-reaktioilla (Häkkinen ym., 2005; Sevón ym., 1995). Karvajuurien puhtaus varmistettiin *virD*:n poissaololla Hamill ym. (1991) kuvaavilla alukkeilla ja reaktio suoritettiin seuraavasti: denaturaatio 95 °C, 1 min, 35 sykliä (denaturaatio 95 °C, 30 s, anniilauus 59 °C, 1 min, ekstensio 72 °C, 1.5 min, jonka jälkeen lopuekstensio 72 °C, 7 min.

### RT-PCR

Karvajuurinäytteiden kokonais-RNA:n eristystä varten juuret kerättiin ja upotettiin nestetyypeen, jonka jälkeen ne säilöttiin -80 °C:een. RNA eristettiin käyttäen ARNzol kittiä (REAL, Valencia, Spain). cDNA valmistettiin käänteis-transkriptiolla käyttäen SuperScript II Reverse Transcriptase -entsyymiä (Invitrogen, Carlsbad, CA). Aluke-sekvenssit *r8S* geeniä varten olivat 5'-ATGATAACTCGACGGATCGC-3' ja 5'-CTTGGATGTGGTAGCCGTTT-3' (Zhang, 2007). Aluke-sekvenssit *h6h* geeniä varten olivat 5'-ACATCTGTGAAGGACTTGGGGC-3' ja 5'-GAACTTGGGTCTGGGCATGG-3' ja ne suunniteltiin BT1 Gene Tool Lite (1.0.0.1 version) ohjelmaa käyttäen. RT-PCR suoritettiin käyttäen SYBR Green PCR Mastermix (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) seosta ja reaktiot tehtiin 384- kaivoissa (LightCycler 480 Instrument; Roche Applied Science). Kontrollina käytettiin *r8S*-geeniä. Datan analysointiin käytettiin LightCycler480 1.5.0 SP3 -ohjelmaa (Roche). Tilastollinen analyysi tehtiin R-ympäristössä (R Core Team, 2013). Tilastolliseen vertailuun käytettiin t-testiä ja merkitsevyytasoksi valittiin *P*-arvo < 0.05.

### Tropa-alkaloidien uutto ja analyysi

Tropa-alkaloidit skopolamiini, hyoskyamiini ja 6β-hydroksyhyoskyamiini uutettiin 28 päivän ikäisistä villikaalin karvajuurista aiemmin kuvatulla menetelmällä (Häkkinen ym., 2005). Analyysit tehtiin käyttäen Agilent 7890A kaasukromatografia yhdistettynä 5975C massadetektorin (MSD) käyttäen Rtx<sup>®</sup>-5MS silica-kapillaari-kolonnia (15 m, 0.25 mm i.d., 0.25 μm faasinpaksuus) (Restek, Bellefonte, PA, USA). Uunin lämpötila nostettiin 70 °C:sta 270 °C:een 10 °C min<sup>-1</sup>. Heliumia käytettiin kantajakaasuna vakiovirtausnopeudella 1.2 mL min<sup>-1</sup>. Injektion, ionilähteen ja interfacen lämpötilat olivat 250 °C, 230 °C ja 240 °C, ja split-suhde 25:1. Näytteet (1 μL) injisoitiin käyttäen Gerstel Maestro MPS2 automaattista näytteenannostelijaa (Gerstel GmbH & Co. KG, Müllheim an der Ruhr, Germany). MSD toimi elektroni-impakti-taajuudella (EI) 70 eV ja kokonaisskannaus (m/z 40-600) tehtiin käyttäen nopeutta 2.6 skannausta s<sup>-1</sup>. Yhdis-

teiden identifiointi tehtiin käyttäen standardiyhdisteitä l-hyoskyamiini (Merck 3031407), (-)-skopolamiini hydrobromidi (Sigma S1875) sekä retentioaikoja, massaspektrikirjastoa ja kirjallisuutta. Sisäisenä standardina käytettiin DL-homatropiinia (Sigma H-0126). Kromatografinen data kerättiin ja käsiteltiin käyttäen Chemstation -ohjelmistoa (Agilent Technologies, USA).

### Pakastus (kryosäilytys)

Useita eri pakastusmenetelmiä tutkittiin villikaalin karvajuurten pitkäaikaissäilytystä varten. Kokeellinen suunnitelma on esitetty **Kuvassa 1**.

## TULOKSET

### Karvajuurten geneettinen stabiilius

#### PCR ja RT-PCR -tulosten valossa

PCR:n avulla voitiin osoittaa, että sekä siirtogeeni *h6h* että karvajuurifenotyypistä vastaava *rolB* -alue olivat säilyneet villikaalin karvajuurissa, joita oli viljelty 16 vuoden ajan siirrostamalla laboratorioissa (**Kuva 2A**). Odotetusti *virD* -amplifiointi, joka osoittaa mahdollisen bakteerialaisen perimän läsnäolon, oli negatiivinen. RT-PCR osoittaen *h6h*-geenin ilmentymisen tehtiin käyttäen alkuperäistä KB7 sekä pakastettua linjaa (**Kuva 2B**). *h6h*:n ilmentymisessä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa alkuperäisen ja pakastetun välillä ( $P=0.8538$ ).

### Karvajuurten kasvu ja metaboliittituoton stabiilius

Villikaalin KB7-linja perustettiin vuonna 1998 (Jouhikainen ym., 1999), ja linjaa on ylläpidetty siirrostamalla sen jälkeen 4 viikon välein laboratorioissa. Kuten kuvattiin 16 vuotta sitten, karvajuurret ovat edelleen vaaleita, ja niillä on korkea kasvunopeus – niiden biomassasta monistuu 65–67-kertaiseksi 28 päivässä.

**Taulukossa 1** on esitetty tropa-alkaloidien esiintyminen sekä kasvu 16 vuoden seurannan aikana. Ensimmäinen tutkimus KB7-linjasta julkaistiin vuonna 1999 (Jouhikainen ym., 1999), jolloin tuotot olivat 125 mg/l hyoskyamiinille ja 14 mg/l skopolamiinille. Tuolloin hyoskyamiini analysoitiin käyttäen radioimmunomääritystä ja skopolamiini käyttäen entsyymilinkattua immunosorbenttimenetelmää (ELISA). Välituotetta 6β-hydroksihyoskyamiinia ei analysoitu. Kuusi vuotta myöhemmin julkaisimme tutkimuksen, jossa verrattiin tupakan (*Nicotiana tabacum*) ja villikaalin karvajuurten konversiokapasiteettia, kun molempiin oli yliekspressoitu sama *h6h* geeni. Myös KB7 karvajuurilinja analysoitiin. Vaikka kasvunopeus ja hyoskyamiinin tuottonopeus olivat pysyneet samana, skopolamiinin tuotto oli yli kaksinkertaistunut verrattuna ensimmäiseen julkaistuun arvoon. Tämä tulos osoittaa, että jostain syystä H6H-entsyymin aktiivisuus oli noussut. Lopulta viimeisimmässä tutkimuksessamme sekä kasvu että alkaloidien tuotto olivat hieman matalampia kuin edeltävällä kerralla (**Taulukko 1**). Verrattu-

#### PAKASTUS I

(mukaillen Teoh et al., 1996)



##### Sulatus I

- Kryoprotektantti laimennetaan 6-vaiheisesti
- Juurenpäät kiinteälle alustalle steriiliin suodatinpaperin päälle

##### Sulatus II

- Juurenpäät kiinteälle alustalle steriiliin suodatinpaperin päälle
- Uudelle alustalle ilman suodatinpaperia 3 vrk:n kuluttua

##### Sulatus III

- Juurenpäät kiinteälle alustalle steriiliin suodatinpaperin päälle
- Uudelle alustalle ilman suodatinpaperia 3 vrk:n kuluttua

##### Sulatus IV

- Juurenpäät pestään kasvatusalustalla
- Uudelle alustalle ilman suodatinpaperia

#### PAKASTUS II

(Panis et al., 2005)



##### Menetelmä I

- Juurenpäät PVS2-kuplan sisällä folion päällä
- Upotus nestetyypeen
- 

##### Menetelmä II

- Juurenpäät PVS2-liuoksessa kryoputkiin
- Upotus nestetyypeen

#### PAKASTUS III

(Schmale et al., 2006)



#### PAKASTUS IV

(Ogawa et al., 2012)



**Kuva 1. Kryopakastuskokeet. Muutokset alkuperäiseen menetelmään on merkitty laatikoihin. Menetelmät, joiden avulla saavutettiin sulatuksen jälkeinen kasvu, on merkitty tummennetulla laatikolla.**

na alkuperäiseen tulokseen hyoskyamiinitasot olivat 80 prosenttia alkuperäisestä, kun taas skopolamiinitasot olivat pysyneet samoina. Kuitenkin kun tarkastellaan vain solukohtaista tuottokapasiteettia (ilmaistaan mg/g kuivapainoa kohden), havaitaan, että ensimmäisen ja viimeisen mittauksen välissä ei ole eroa (Kuva 3). On selvää, että Taulukossa 1 esitetty alempi tuotavuus (ilmaistaan mg/l) johtuu alemmasta kasvusta.

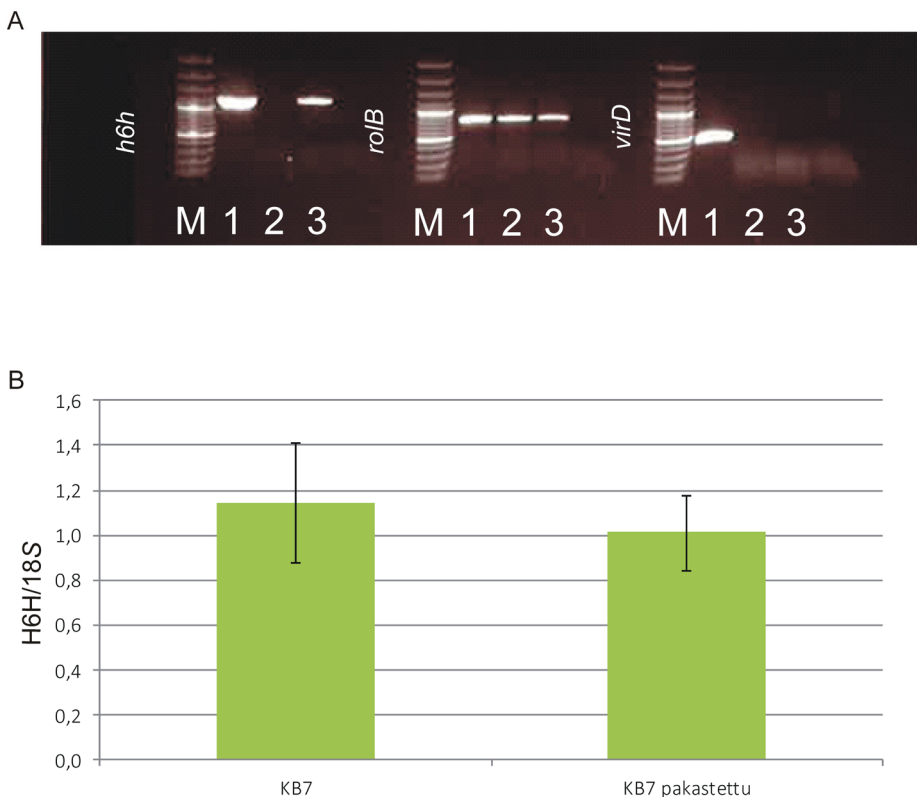
### Karvajuurten pakastus

Karvajuuret pakastettiin onnistuneesti käyttäen hidasta pakastusta (Pakastus I). Juurenpäät, jotka oli sulatettu neljännellä (Sulatus IV) menetelmällä, osoittivat kasvua kaksi viikkoa sulatuksen jälkeen, tosin kasvavien juurten osuus oli suhteellisen pieni (10 %). Samoin vitrifikaation (Pakastus IV) jälkeen kahden viikon kuluttua sulatuksesta juurissa havaittiin kasvua, mutta edellistä alemmal-

la osuudella (2 %). Sulatuksen jälkeen kasvanneet juuret viljeltiin kiinteällä alustalla ja *h6h*:n ilmentyminen analysoitiin 21 vuorokauden kuluttua (Kuva 4). Odotetusti pakastetuissa soluissa ei havaittu muutoksia H6H:n ilmentymisessä, niin kuin Kuvassa 3 esitetään. Tämän johdosta voidaan sanoa, että kryopakastus on hyvä keino säilöä biologista materiaalia.

### POHDINTA

Usein siirtogeenisten soluviljelmien haasteena on geenien hiljentyminen, joka useimmiten johtuu transkriptionaalisesta inaktivaatiosta tai transkription jälkeisistä tapahtumista (Guivarç'h ym., 1999). On mielenkiintoista, että vaikka *h6h*-geeni, jota käytettiin tässä tutkimuksessa, on alkuperältään eristetty samasta kasvipiperheestä kuin isäntäkasvi *Hyoscyamus*, geenin hiljentymistä ei havaittu 16 vuoden seurannan aika-



**Kuva 2 (A)** Kuva geelistä, jolla näkyy villikaalin (*H. muticus*) karvajuurten ja Agrobakteerin PCR-reaktion tulos: *h6h* (1150 bp), *roIB* (780 bp) ja *virD* (450 bp). 1: *A. rhizogenes* pLAL21 jossa *h6h*; 2: *H. muticus* kontrollikarvajuuri; 3: *H. muticus* karvajuurilinja KB7 jossa *h6h*; M: molekyylimarkkeri (Gene Ruler 100 bp Plus), (B) Suhteelliset RT-PCR ekspressiotasot geeneistä *h6h* ja *18S* alkuperäisessä ja kryopakastetussa KB7-linjassa. Kuvassa esitetty keskiarvot kolmesta analyttisestä rinnakkaisesta sekä keskihajonta.

**Taulukko 1. Villikaalin karvajuurinjan KB7 tuottamat tropa-alkaloidipitoisuudet 16 vuoden seurannan aikana. Datassa huomioitu kolme rinnakkaista biologista näytettä  $\pm$ SD; \*n=3, \*\*n=9.**

Vuosi	Hyoskyamiini (mg/l)	6 $\beta$ -hydroksyhyoskyamiini (mg/l)	Skopolamiini (mg/l)	Kasvu (g/l kuivap.)	Viite
1999*	125 $\pm$ 12.0	NA	14 $\pm$ 1.3	17	Jouhikainen ym. 1999
2005*	124 $\pm$ 6.2	38 $\pm$ 1.9	37 $\pm$ 1.9	17	Häkkinen ym. 2005
2016**	99 $\pm$ 17.7	14 $\pm$ 3.3	12 $\pm$ 2.3	14	Häkkinen ym. 2016

NA: ei analysoitu.

na. Kun viiden eri Solanaceae-heimoon kuuluvan lajin, joilla kaikilla on endogeeninen *h6h*-geeni, nukleotidisevnssejä verrattiin *H. niger* -kasvin *h6h*-geeniin, samankaltaisuus vaihteli korkeimman 99,2 prosentin (*Brugmansia candida*) ja 84,9 prosentin (*Datura stramonium*) välillä (Liite 1). On huomioitavaa, että korkein yhtenevyys proteiinitasolla havaittiin *B. candidan* kanssa (100 %), kun taas toinen *Hyoscyamus* -laji *H. senescensin* kanssa yhtenevyys oli jokseenkin alhaisempi, 96,5 prosenttia. *H. muticus* -kasvin *h6h* geenin sekvenssi ei ole tiedossa, mutta muiden sukulaiskasvien tiedon perusteella on oletettavaa, että yhtenevyys on korkeaa, joten mahdollisuus homologiaan perustuvalla hiljentyemiselle on olemassa.

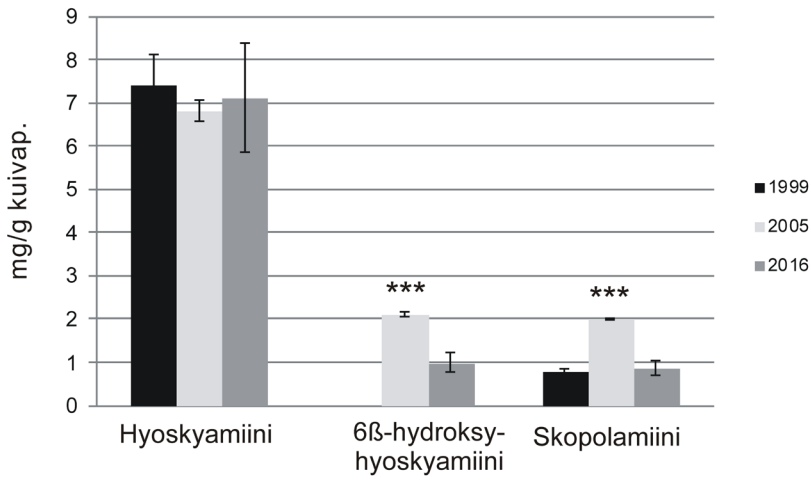
Alkaloideja – koska ovat kasvien pienyhdisteitä – tuotetaan usein pieniä määriä, ja tuotto on epästabiilia erilaistumattomissa soluissa. Pienyhdistetuotto korreloi usein erilaistumiseen (Sevón ym. 1998), ja tämän vuoksi niin kuin tässä työssäkin havaittiin, karvajuurisolukko on lupaava systeemi bioteknologiselle alkaloidituotolle. Tässä työssä, ensimmäistä kertaa, laboratoriossa ylläpidettyjen ja siirrostettujen karvajuurten geneettinen sekä metabolinen stabiilius osoitettiin 16 vuoden seurannan aikana. Alkaloidituotto määritettiin vuosina 1999, 2005 ja 2016. Ensimmäiset analyysit tehtiin käyttäen immunologia määrittäminen menetelmiä, kun taas myöhemmin alkaloideja analysoitiin GC-MS:llä. Vaikka kokeellista dataa näiden kahden analyttisen menetelmän korrelaatiosta ei ole, on hyvä huomioida, että sekä EIA/RIA ja GC-MS ovat erittäin spesifisiä ja herkkiä näille analysoiduille metaboliiteille, joten molemmista saatu data vertautuu hyvin tuloksiin.

Vaikka aiempia raportteja kryopakastetuista karvajuurista on julkaistu, tähän mennessä villikaalin karvajuurien pakastusta ei ole julkaistu. Karvajuurten pakastuksen ja sulatuksen jälkeinen kasvuosuus

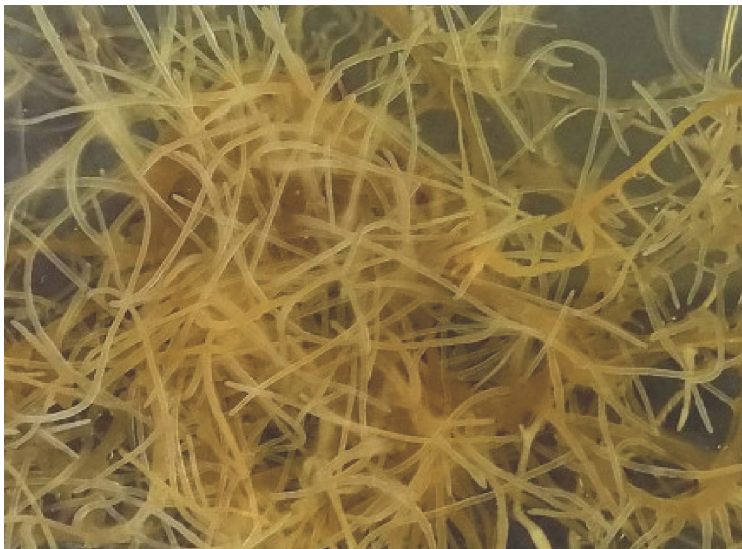
on vaihdellut 6 prosentin (Xue ym. 2008) ja 90 prosentin (Lambert ym., 2009) välillä, riippuen lajista ja käytetystä menetelmästä. Kuten Xue ym. (2008) raportoivat, menetelmä, joka oli kutakuinkin toimiva *Eruca sativa* (73 % pakastuksenjälkeinen elävyys) ja *Astragalus membranaceus* (6 % pakastuksenjälkeinen elävyys) -viljelmille, ei toiminut *Gentiana macrophylla* -karvajuurille. Tämä ilmiö tunnetaan hyvin kasvisolujen ja -solukkojen pakastuksen yhteydessä, ja sen vuoksi sopivan pakastusmenetelmän löytäminen vaatii usein järjestelmällistä empiiristä kokeilua.

## JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän tutkimuksen perusteella voidaan sanoa, että *H. muticus* karvajuurten kryopakastus on erittäin haastavaa. Saatujen tulosten perusteella ei vielä voida luoda luotettavaa teolliseen tuotantoon soveltuvaa pakastusohjeistusta. Menetelmän pystyttäminen on hyvin empiiristä, ja usein tulokset eivät suoraan näytä suuntaa, mihin optimoinnissa tulisi edetä. Kuten useat alan tutkijat ovat todenneet, ongelmat toistettavuudessa rajoittavat kryopakastuksen rutiinikäyttöä (Panis ym., 2005; Reed ym. 2001). Työläs leikkaaminen ja käsittely herkkien solukoiden, kuten karvajuurten apikaalisten meristeemien osalta, on selkeä este high-throughput-testaukselle. Tässä työssä kuitenkin osoitimme, että kryopakastus itsessään ei estä siirtogeenin toimintaa kyseisessä solukossa. Sikäli kuin mahdollista, kryopakastus on paras vaihtoehto kasvien solujen ja solukoiden pitkäaikaissäilytykselle. Pakastamalla vältetään jatkuvasta siirrostamisesta johtuvat kontaminaatoriskit ja sillä voidaan parantaa prosessin tuottavuutta. Toisaalta niin kuin tässä työssä osoitimme, karvajuurten jatkuva siirrostaminen jopa hyvin pitkän ajan kuluessa ei vähentänyt merkittävästi entsyymaattista tai metabolistä aktiivisuutta.



**Kuva 3. Solunsisäiset alkaloidimäärät (mg/g kuivapainoa kohden) eri vuosina. Tähdet ilmaisevat tilastollisesti merkitseviä eroja (t-testi, (\*\*\*)  $P < 0.001$ ).**



**Kuva 4. Pakastetut karvajuurit 21 vrk sulatuksen jälkeen.**



## SUMMARY

### Exploring the metabolic stability of engineered hairy roots after 16 years maintenance

#### → Suvi T. Häkkinen\*

Senior Scientist, PhD(Tech)  
VTT Technical Research Centre of Finland,  
P.O.Box 1000, Tietotie2, FI-02044-VTT, Espoo  
suvi.hakkinen@vtt.fi

#### → Kirsi-Marja Oksman-Caldentey

Research Manager, Docent  
VTT Technical Research Centre of Finland, P.O.Box  
1000, Tietotie2, FI-02044-VTT, Espoo

\*Correspondence

**Keywords:** plant cell culture, hairy roots, hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase, scopolamine, stability, cryopreservation

**Kiitokset:** Kiitämme Elisabeth Moyanoa ja Rosa M. Cusidóa erinomaisesta yhteistyöstä. Kiitämme Tuulikki Seppänen-Laaksoa analyttisestä osaamisesta ja Siv Matomaata ja Airi Hyrkästä teknisestä avusta.

Plants remain a major source of new drugs, leads and fine chemicals. Cell cultures deriving from plants offer a fascinating tool to study plant metabolic pathways and offer large scale production systems for valuable compounds – commercial examples include compounds such as paclitaxel. The major constraint with undifferentiated cell cultures is that they are generally considered to be genetically unstable and cultured cells tend to produce low yields of secondary metabolites especially over time. Hairy roots, a tumour tissue caused by infection of *Agrobacterium rhizogenes* is a relevant alternative for plant secondary metabolite production for being fast growing, able to grow without phytohormones, and displaying higher stability than undifferentiated cells. Although genetic and metabolic stability has often been connected to transgenic hairy roots, there are only few reports on how a very long-term subculturing effects on the production capacity of hairy roots. In this study, hairy roots producing high tropane alkaloid levels were subjected to 16 -year follow-up in relation to genetic and metabolic stability. Cryopreservation method for hairy roots of *H. muticus* was developed to replace laborious subculturing, and although the post-thaw recovery rates remained low, the expression of transgene remained unaltered in cryopreserved roots. It was shown that although displaying some fluctuation in the metabolite yields, even an exceedingly long-term subculturing was successfully applied without significant loss of metabolic activity.

## KIRJALLISUUS

B Baíza A, Quiroz-Moreno A, Ruíz J, Loyola-Vargas V: Genetic stability of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 59: 9–17, 1999

Benson EE, Hamill JD: Cryopreservation and post freeze molecular and biosynthetic stability in transformed roots of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 24: 163–172, 1991

Dehghan E, Häkkinen ST, Oksman-Caldentey KM, Ahmadi FS: Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and *in vitro* hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 110: 35–44, 2012

Georgiev MI, Pavlov AI, Bley T: Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 1175–1185, 2007

Guillon S, Trémouillaux-Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantet P: Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Curr Opin Plant Biol* 9: 341–346, 2006

Guivarc'h A, Boccara M, Prouteau M, Chriqui D: Instability of phenotype and gene expression in long-term culture of carrot hairy root clones. *Plant Cell Rep* 19: 43–50, 1999

Häkkinen ST, Moyano E, Cusidó RM, Oksman-Caldentey K-M: Exploring the metabolic stability of engineered hairy roots after 16 years maintenance. *Front Plant Sci* 7: 1486, 2016

Häkkinen ST, Moyano E, Cusidó RM, Palazón J, Piñol MT, Oksman-Caldentey KM: Enhanced secretion of tropane alkaloids in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing heterologous hyoscyamine-6 $\beta$ -hydroxylase. *J Exp Bot* 56: 2611–2618, 2005

Häkkinen ST, Raven N, Henquet M, ym.: Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody. *Biotechnol Bioeng* 111: 336–346, 2014

Hamill JD, Rounsley S, Spencer A, Todd G, Rhodes MJC: The use of the polymerase chain reaction in plant transformation studies. *Plant Cell Rep* 10: 221–224, 1991

Hashimoto T, Yamada Y: Hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, in alkaloid-producing root cultures. *Plant Physiol* 81: 619–625, 1986

Hirata K, Goda S, Phunchindawan M, Ishio M, Sakai A, Miyamoto K: Cryopreservation of horseradish hairy root cultures by encapsulation-dehydration. *J Ferment Bioeng* 86: 418–420, 1998

Jouhikainen K, Lindgren L, Jokelainen T, Hiltunen R, Teeri TH, Oksman-Caldentey KM: Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering. *Planta* 208: 545–551, 1999

Moriuchi H, Okamoto C, Nishihama R, Yamashita I, Machida Y, Tanaka N: Nuclear localization and interaction of RolB with plant 14-3-3 proteins correlates with induction of adventitious roots by the oncogene rolB. *Plant J* 38: 260–275, 2004

Ogawa Y, Sakurai N, Oikawa A, Kai K, Morishita Y, Mori K, ym.: High-throughput cryopreservation of plant cell cultures for functional genomics. *Plant Cell Physiol* 53: 943–952, 2012

Oksman-Caldentey KM, Kivelä O, Hiltunen R: Spontaneous shoot organogenesis and plant regeneration from hairy root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Sci* 78: 129–136, 1991

Panis B, Piette B, Swennen R: Droplet vitrification of apical meristems: A cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Sci* 168: 45–55, 2005

Peebles CAM, Sander GW, Li M, Shanks J V., San KY: Five year maintenance of the inducible expression of anthranilate synthase in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol Bioeng* 102: 1521–1525, 2009

Reed BM: *Plant cryopreservation: A practical guide*. 2008

Schmale K, Rademacher T, Fischer R, Hellwig S: Towards industrial usefulness - cryo-cell-banking of transgenic BY-2 cell cultures. *J Biotechnol* 124: 302–311, 2006.

Sevón N, Oksman-Caldentey KM, Hiltunen R: Efficient plant regeneration from hairy root-derived protoplasts of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell Rep* 14: 738–742, 1995

Sevón N, Oksman-Caldentey KM: *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: Root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med* 68: 859–868, 2002

Srivastava S, Srivastava AK: Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Crit Rev Biotechnol* 27: 29–43, 2007

Teoh KH, Weathers PJ, Cheetham RD, Walcerz DB: Cryopreservation of transformed (hairy) roots of *Artemisia annua*. *Cryobiology* 33: 106–117, 1996

Vasilev N, Schmitz C, Dong L, ym.: Comparison of plant-based expression platforms for the heterologous production of geraniol. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 117: 373–380, 2014

Weber J, Georgiev V, Haas C, Bley T, Pavlov A: Ploidy levels in *Beta vulgaris* (red beet) plant organs and *in vitro* systems. *Eng Life Sci* 10: 139–147, 2010

Weber J, Georgiev V, Pavlov A, Bley T: Flow cytometric investigations of diploid and tetraploid plants and *in vitro* cultures of *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger*. *Cytom Part A* 73: 931–939, 2008

Yoshimatsu K, Yamaguchi H, Shimomura K: Traits of *Panax ginseng* hairy roots after cold storage and cryopreservation. *Plant Cell Rep* 15: 555–560, 1996

Yun D-J, Hashimoto T, Yamada Y: Metabolic engineering of medicinal plants: Transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Appl Biol Sci* 89: 11799–11803, 1992

**Liite1. Viiden Solanaceae -heimoon kuuluvan lajin h6h -geenien sekvenssit.**

H.niger -----TACTAAGAGTGTTCCTCGAAAGCTTTATAGCACCA  
A.luridus -----  
D.stramonium -----GGTCTACAAACAATGTCTCTGAAAGCTTTATAGCACCA  
A.belladonna ATGGCTACTCTTTGCTCAAATTTGGTCTACAAACAATGTTCTGAAAGCTTTTATAGCACCA  
B.candida -----ACCA  
H.senecionis ATGGCTACTTTTGTCTCAAATTTGGTCTACTAAGAGTGTACTGAAAGCTTTATAGCACCA

H.niger TTACAGAAAAGAGCAGAAAAAGATGTTCCCGTAGGAAATGATGTCCTATTATTGATCTC  
A.luridus -----GGGCAGAAAAGGAAGTTCCCTTAGGAAATGATGACCCATCATTGATCTC  
D.stramonium TTAGAGAAAAGGGCAGAAAAGGATGTTGCTTTAGGAAATGATGTCCTATTATTGATCTC  
A.belladonna TTAGAGAAAAGGGCAGAAAATGATGTTCCCTTAGGAAATGATGTCCTATTATTGATCTC  
B.candida TTACAGAAAAGAGCAGAAAAAGATGTTCCCGTAGGAAATGATGTCCTATTATTGATCTC  
H.senecionis TTACAGAAAAGAGCAGAAAAAGATGTTCCCATAGGAAATGTTGTCCTATTATTGATCTC  
\* .\*\*\*\*\* \*\*.\* \*\* \* \*\*\*\*\*. \*\*: \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

H.niger CAACAACATCATCTTCTTGTTCACAAATCACCAGCTTGTCAAGATTTTGGTCTC  
A.luridus CAACAAGATCACCATTTTGTGTTTCAACAAATCACCAGCTTGTAAAGATTTTGGTCTC  
D.stramonium CAACAAGATCACCTTCTTATTGTTTCAACAAATCACCAGCTTGTCAAGATTTTGGTCTC  
A.belladonna CAACAAGATCACCTTGTGTTTGTTCACAAATCACCAGCTTGTCAAGATTTTGGTCTC  
B.candida CAACAACATCATCTTCTTGTTCACAAATCACCAGCTTGTCAAGATTTTGGTCTC  
H.senecionis CAACAACACCATCATCTTCTTGTTCACAAATCACCAGCTTGTCAAGATTTTGGTCTC  
\*\*\*\*\* \* \* \* . \* \* \* \* \* \*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

H.niger TTTCCAGGTGATCAATCATGGATTTCCAGAGAACAATGTTAGAGACAATGGAAGTGTGC  
A.luridus TTTCCAGGTGATCAACCATGGATTTCCAGAAAACCTAATGGCAGAGACAATGAAATTTGTGC  
D.stramonium TTTCCAGGTGATCAATCATGGAGTCCAGAAAAGCTAATGGTAGAGCAATGGAAGTGTGC  
A.belladonna TTTCCAGGTGATCAACCATGGATTTCCAGAAAAGCTGATGGCAGAAAACAATGGATGTGTGC  
B.candida TTTCCAGGTGATCAATCATGGATTTCCAGAGAAGCTAATGTTAGAGACAATGGAAGTGTGC  
H.senecionis TTTCCAGGTGATCAATCATGGATTTCCAGAGAACAATGTTAGAAAACAATGGAGGTATGC  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \* \* . \* \* \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \*

H.niger AAAGAGTTCCTTGCCTGCTGAGGAAAAGGAAAAGTTAAGCCAAAAGGAGAGGCA  
A.luridus AAAGAGTTTTTGCCTGCTGAGGAAAAGGAAAAGCTTCCAGCCAAAAGGAAAGCCA  
D.stramonium AAAGAGTTTTTGCCTGCTGAGGAAAAGGAAAAGTTTCCAGCCAAAAGGAGAGCCA  
A.belladonna AAAGAGTTTTTGCCTGCTGAGGAAAAGGAAAAGCTTCCAGCCAAAAGGAGAGCCA  
B.candida AAAGAGTTCCTTGCCTGCTGAGGAAAAGGAAAAGTTAAGCCAAAAGGAGAGGCA  
H.senecionis AAAGAGTTCCTTGCCTGCTGAGGAAAAGGAAAAGTTAAGCCAAAAGGAGAGGCA  
\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

H.niger GCTAAATTTGAACCTTCTTGTGAGCAGAAAAGCAAGCTATATGTTGAAGGAGAACAACCT  
A.luridus GCTAAATTTGAACCTTCTTGTGAGCAGAAAAGCAAGCTATATATTGAAGGAGAACAACCT  
D.stramonium GCTAAATTTGAACCTTCCACTTGTGAGCAGAAAAGCAAACTCTATGTTGAAGGGAAACGACGC  
A.belladonna GCTAAATTTGAGCTTCCACTTGTGAGCAGAAAAGCAAGCTTATGTTGAAGGAGAACAACCT  
B.candida GCTAAATTTGAACTTCCCTTGTGAGCAGAAAAGCAAGCTATATGTTGAAGGAGAACAACCT  
H.senecionis GCTAAATTTGAACCTTCCCTTGTGAGCAGAAAAGCAAGCTATATATTGAAGGAGAACAACCT  
\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

H.niger TCTAACGAGGAGTTCCTTACTGGAAAGACACTTTGGCTCATGGTTGTCATCCCTCTTGTAT  
A.luridus TCTAACGATGAGTTCCTTACTGGAAAGACACTTTGGCTCATGGTTGTCATCCCTCTTGTAT  
D.stramonium TGTAATGAGGAGTTCCTTACTGGAAAGACACTTTGGCTCATGGTTGTTATCTCTCTTCTCAT  
A.belladonna TCTGATGAGGAGTTCCTTACTGGAAAGACACTTTGGCTCATGGTTGTCATCCCTCTTGTAT  
B.candida TCTAACGAGGAGTTCCTTACTGGAAAGACACTTTGGCTCATGGTTGTCATCCCTCTTGTAT  
H.senecionis TCTAACGAGGAGTTCCTTACTGGAAAGACACTTTGGCTCATGGTTGTCATCCCTCTTGTAT  
\* . \* \* \* . \*

H.niger CAAGACTTAGTCAATTCCTGGCCTGAAAAACCAGCAAAATATAGAGAGGTGGTTGCTAAA  
A.luridus GAAGAGTTAGTCAACTCCTGGCCTGAAAAACCAACAACCTATAGAGAGGTGGCGGCTAAA  
D.stramonium GAAGACTTAGTCAACTCCTGGCCTGAAAAACCAGCAAAATATAGAGATGTTGATAGCTAAA  
A.belladonna GAAGAGTTAGTCAACTCCTGGCCTGAAAAACCAGCAAAATATAGAGAGGTGGTTGCTAAA  
B.candida CAAGACTTAGTCAATTCCTGGCCTGAAAAACCAGCAAAATATAGAGAGGTGGTTGCTAAA  
H.senecionis CAAGACTTAGTCAATTCCTGGCCTGAAAAACCAGCAAAATATAGAGAGGTGGTTGCTAAA  
\*\*\*\* \*

H.niger TATTTCAGTAGAAGTGGGAAAGTTGACCATGAGGATGCTGGACTACATCTGTGAAGGACTT  
A.luridus TATTTCAGTGAAGCGGAGGAAAGTTGACCATGAGGATGCTGGACTACATCTGTGAAGGACTT  
D.stramonium TATTTCAGTGAAGTGGGAAAGTTGACCATGAGGATGCTGGACTACATCTGTGAAGGACTT  
A.belladonna TATTTCAGTGAAGTGGGAAAGTTGACCATGAGGATGCTGGACTACATCTGTGAAGGACTT  
B.candida TATTTCAGTAGAAGTGGGAAAGTTGACCATGAGGATGCTGGACTACATCTGTGAAGGACTT  
H.senecionis TATTTCAGTAGAAGTGGGAAAGTTAACTATGAGGATGCTGGACTACATCTGTGAAGGACTT  
\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

H.niger GGGCTTAAATTTGGGCTACTTTGATAATGAACTTAGCCAAATTCAGATGATGCTGACTAAC  
A.luridus GGGCTTAAATTTGGGCTACTTTGATAATGAGCTTAGCCAAATTCAGATGATGCTGACTAAC  
D.stramonium GGGCTTAAATTTGGGCTACTTTGATAATGAGCTTAGCCAAATTCAGATGATGCTGACTAAC  
A.belladonna GGGCTTAAATTTGGGCTACTTTGATAATGAGCTTAGCCAAATTCAGATGATGCTGACTAAC  
B.candida GGGCTTAAATTTGGGCTACTTTGATAATGAACTTAGCCAAATTCAGATGATGCTGACTAAC