

Pflanzenbiotechnologie

Molecular Pharming – Produktion von Biopharmazeutika in Pflanzen

PAUL ALEXANDER NIEDERAU, RALF RESKI
PFLANZENBIOTECHNOLOGIE, UNIVERSITÄT FREIBURG

The moss *Physcomitrella* is a promising production platform for green biopharmaceuticals. To further increase production yields of this platform, we identified terminator sequences to be used in future applications. In addition, we investigated which attributes make a terminator a good choice for biomanufacturing. Overall, our results improve plant-based biotechnology platforms and further our understanding of how terminators influence gene expression in plants in general.

DOI: 10.1007/s12268-024-2174-1
© Die Autoren 2024

■ Der Markt für die Produktion von Biopharmazeutika hat ein prognostiziertes Potenzial von 3 Billionen US-Dollar in den Jahren 2030–2040 [1]. Darüber hinaus hat die COVID-19-Pandemie die Notwendigkeit für innovative und vielseitige Forschung im Bereich der Biotechnologie vor Augen geführt. Während der Großteil der Produktion in Mikroben oder Säugetierzellen erfolgt,

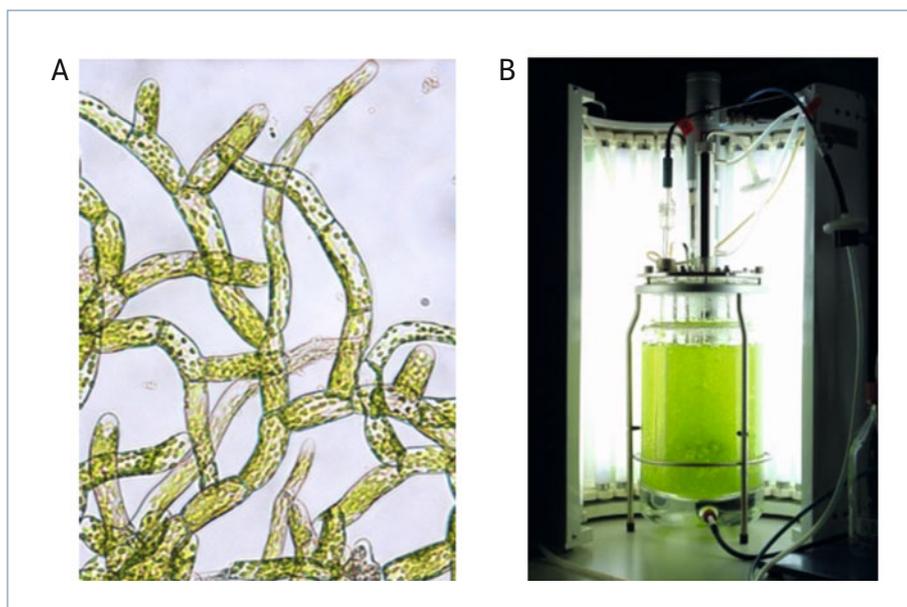
sind Pflanzen eine attraktive Alternative für die Produktion von eukaryotischen Proteinen [2].

Pflanzenbasierte Produktionssysteme operieren bei niedrigen Kosten, besitzen hohe Skalierbarkeit und sind frei von für den Menschen gefährlichen Pathogenen und Endotoxinen [3]. Ein populäres Pflanzensystem ist das Laubmoos *Physcomitrella* (*Physcomi-*

trium patens). Die Produktion in *Physcomitrella* findet in dem haploiden Entwicklungsstadium, dem Protonema, statt, das durch sein fädiges Wachstum gekennzeichnet ist (**Abb. 1A**). Der einfache Chromosomensatz sowie die hohe Rate für homologe Rekombination erlauben das präzise Ausschalten und Einbringen von Genen [4]. Dies erleichtert die Veränderung der pflanzenspezifischen Glykosylierung von rekombinanten Proteinen zu einer humanspezifischen Glykosylierung [5]. Diese Anpassung der posttranslationalen Modifikationen von Proteinen in *Physcomitrella* ist essenziell für die Effizienz und Wirksamkeit von in Pflanzen produzierter Biopharmazeutika. Das Protonema wird in Photobioreaktoren kultiviert (**Abb. 1B**). Diese funktionieren ähnlich wie bei Mikroben oder Säugetierzellen, jedoch besteht die Energiequelle aus Licht, das über Photosynthese zu Zuckern umgewandelt wird. Den Moosbioreaktoren werden keine Antibiotika oder tierischen Produkte zugefügt, sodass die so produzierten Pharmazeutika als vegan angesehen werden können, selbst wenn es sich um Proteine des Menschen handelt. Die Kultivierung von *Physcomitrella* in Photobioreaktoren ist konform mit den Vorschriften der Guten Herstellungspraxis (GMP) und entspricht damit den gesetzlichen Standards für die Produktion von Medikamenten. Das erste im Moos hergestellte Protein wurde von den Behörden zur Testung an Menschen zugelassen und hat in einer klinischen Studie bereits sehr erfolgreich die erste klinische Phase absolviert [6].

Der Terminator – ein essenzielles Element der Proteinbiosynthese

Die Proteinbiosynthese beschreibt die Synthese von Proteinen und besteht aus zwei Schritten. Während der Transkription wird die DNA, die für ein bestimmtes Protein codiert, abgelesen und eine Kopie erstellt, die Boten-RNA (mRNA). In der Translation wird der Code der mRNA übersetzt und das entsprechende Protein synthetisiert. Diesen Prozess macht man sich in der Biotechnologie zunutze indem man Zellen, z. B. Bakterien, Hefen oder auch Pflanzenzellen, nutzt,



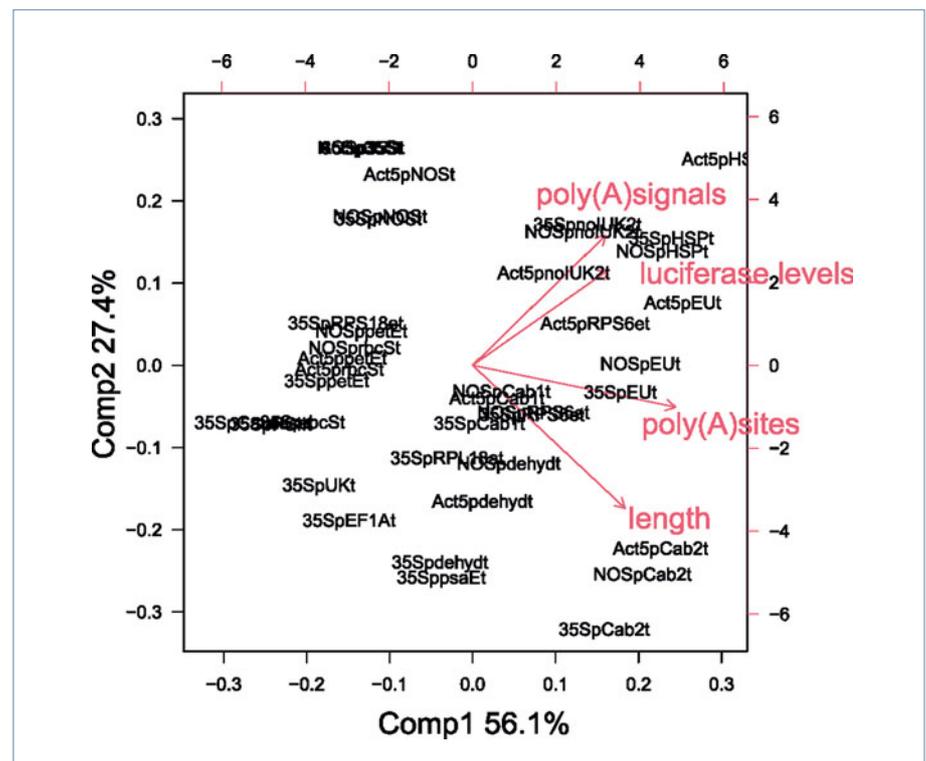
▲ **Abb. 1:** Das Laubmoos *Physcomitrella*. **A,** Die Protonemazellen des Mooses *Physcomitrella* wachsen als fädiges Geflecht und weisen einen haploiden Chromosomensatz auf. **B,** Die Mooszellen werden in 5-L-Photobioreaktoren kultiviert. Das LED-Licht und CO₂ werden über Photosynthese in Zucker umgewandelt und dienen dem Moos als Energiequelle.

um Proteine für verschiedenste Anwendungen zu produzieren. Dieser Prozess ist komplex und wird von einer Reihe unterschiedlicher Faktoren beeinflusst. Diese Faktoren zu kennen und zu verstehen, ermöglicht uns, diesen Prozess effizienter zu gestalten und vielfältige Produkte herzustellen [7].

Terminatoren sind ein wichtiges Element zur Steuerung der Proteinbiosynthese und folgen auf die Protein-codierende Sequenz eines Gens [8]. Während der Transkription geben sie das Ende des Ableseprozesses vor und leiten die Spaltung der mRNA ein. Polyadenylierungssignale im Terminator leiten das Anfügen von >20 Adenin-Basen an die Schnittstelle ein, die Polyadenylierung, und stabilisieren die entstandene mRNA [9]. Bei der anschließenden Translation rekrutieren der Poly-A-Schwanz und andere genetische Elemente die notwendigen Enzyme für das Ablesen der mRNA und die Synthese des Proteins. Neben den Promotoren – der funktionalen Einheit eines Gens, das die Transkription initiiert – gehören Terminatoren zu grundlegenden genetischen Elementen der Genexpression. Trotzdem wurde ihr Potenzial zur Verbesserung der Produktion rekombinanter Proteine lange vernachlässigt.

Multifaktorielle Analyse von Terminatoren in *Physcomitrella*

In unserer aktuellen Studie [10] haben wir 14 neue Terminatoren aus den über 53.000 Kandidaten des Moosgenoms selektiert. Die Auswahl erfolgte anhand verschiedener Kriterien, z. B. der Abundanz der entsprechenden mRNA, der Funktion des codierten Proteins und der Länge des Terminators. Im Anschluss testeten wir den Effekt der ausgewählten Kandidaten auf die Proteinbiosynthese in *Physcomitrella*. Dazu kombinierten wir die Terminatoren mit einem Luciferase-Gen und schleusten die Luciferase-Terminatorsequenzen in Mooszellen ein. Die translatierten Luciferaseproteine geben ein starkes Lichtsignal von sich, die Biolumineszenz, das wir auslesen können und das uns ermöglicht, Rückschlüsse auf den verwendeten Terminator zu ziehen. Der Vergleich mit viel genutzten Terminatoren ergab, dass neun der 14 Terminatoren die gleichen Expressionsstärken erzielten und somit interessant für die weitere biotechnologische Anwendung sind. Zur Validierung wurden die Terminatoren mit zwei anderen Promotoren kombiniert und abermals getestet. Das Ergebnis bestätigte zwar die positiven Effekte



▲ **Abb. 2:** Die Hauptkomponentenanalyse veranschaulicht komplexe Zusammenhänge mehrerer Faktoren. Spitze Winkel zwischen zwei Vektoren deuten auf einen starken Zusammenhang der Faktoren hin. Winkel von ca. 90° deuten auf einen fehlenden Zusammenhang hin. Unsere Daten zeigen, dass die Anzahl der Poly-A-Signale einen starken Effekt auf die Höhe der gemessenen Luciferase-Signale hat.

der ausgewählten Terminatoren, zeigte jedoch auch, dass Promotoren in *Physcomitrella* wesentlich stärkere Modulatoren der Proteinbiosynthese sind als Terminatoren. In einem weiteren Experiment testeten wir Doppelterminatoren bestehend aus zwei gleichen oder unterschiedlichen Einzelterminatoren. Das Ergebnis zeigt, dass Doppelterminatoren das Potenzial haben, die Produktausbeute weiter zu steigern. Obwohl die Mechanismen der Doppelterminatoren noch nicht vollständig geklärt sind, weisen unsere Daten auf funktionelle Interaktionen zwischen einzelnen Terminatoren hin. Einige Terminatorpaare verhielten sich unterschiedlich in *Physcomitrella* im Vergleich zu anderen Pflanzensystemen, z. B. *Arabidopsis* und Tabak [11, 12]. Dies deutet auf evolutionäre Unterschiede in der Regulierung von Genexpression durch Terminatoren in Samenpflanzen und Moosen hin. Abschließend ermittelten wir, welche Attribute der Terminatoren maßgeblich deren positiven Effekt auf die Genexpression bestimmen. Die durchgeführte Hauptkomponentenanalyse zeigt, dass die Anzahl an Polyadenylierungssignalen und Polyadenylierungsstellen eines

Terminators maßgeblichen Einfluss auf dessen Effekt auf die Genexpression haben (**Abb. 2**). Die Attribute „Terminatorlänge“ sowie „mRNA-Abundanz“ haben lediglich einen geringen Einfluss.

Im Rahmen dieser Studie haben wir 14 neue Terminatoren aus *Physcomitrella* beschrieben, mit breitem Anwendungspotenzial innerhalb der Pflanzenbiotechnologie. Darüber hinaus bestimmten wir Attribute für die Selektion von Terminatoren mit großem Effekt auf die Genexpression. Beobachtete Unterschiede zwischen Samenpflanzen und Moosen sind ein Hinweis auf unterschiedliche Regulierung der Genexpression durch Terminatoren.

Danksagung

Wir danken allen weiteren Autoren unserer Publikation: Pauline Eglé, Sandro Willig, Juliana Parsons, Sebastian N.W. Hoernstein und Eva L. Decker. Zudem danken wir Agnes Novakovic für ihre Unterstützung im Labor sowie Anne Katrin Prowse für ihre Hilfe bei der Korrektur des Manuskripts. Wir danken besonders der Studienstiftung des deutschen Volkes für ihre finanzielle Unterstützung. ■

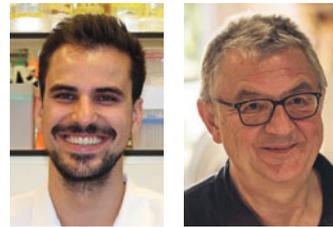
Literatur

- [1] Chui M, Evers M, Manyika J et al. (2020) The Bio Revolution: Innovations transforming economies, societies, and our lives. Online: www.mckinsey.com/mgi
- [2] He W, Baysal C, Lobato Gómez M et al. (2021) Contributions of the international plant science community to the fight against infectious diseases in humans—part 2: Affordable drugs in edible plants for endemic and re-emerging diseases. *Plant Biotech J* 19: 1921–1936
- [3] Twyman RM, Stoger E, Schillberg S et al. (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotech* 21: 570–578
- [4] Reski R, Parsons J, Decker EL (2015) Moss-made pharmaceuticals: from bench to bedside. *Plant Biotech J* 13, 1191–1198
- [5] Lomonosoff GP, D'Aoust M A (2016) Plant-produced bio-pharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment. *Science* 353: 1237–1240
- [6] Hennermann JB, Arash-Kaps L, Fekete G et al. (2018) Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of moss agalactosidase A in patients with Fabry disease. *Mol Genet Metab* 123: S61–S62
- [7] Decker EL, Reski R (2020) Mosses in biotechnology. *Curr Op Biotech* 61: 21–27
- [8] Zhong V, Archibald B N, Brophy JAN (2023) Transcriptional and post-transcriptional controls for tuning gene expression in plants. *Curr Op Plant Bio* 71: 102315

- [9] Liu W, Brooks EG, Elorriaga E et al. (2023) Plant promoters and terminators for high-precision bioengineering. *BioDesign Res*, DOI: <https://doi.org/10.34133/bdr.0013>
- [10] Niederau PA, Eglé P, Willig S et al. (2024) Multifactorial analysis of terminator performance on heterologous gene expression in *Physcomitrella*. *Plant Cell Rep* 43: 43
- [11] Damos AG, Mason HS (2018) Chimeric 3' flanking regions strongly enhance gene expression in plants. *Plant Biotech J* 16: 1971–1982
- [12] Yamamoto T, Hoshikawa K, Ezura K et al. (2018) Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants. *Sci Rep* 8: 4755

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Paul Alexander Niederau (links) und Ralf Reski

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Ralf Reski
Pflanzenbiotechnologie
Fakultät für Biologie
Universität Freiburg
Schänzlestraße 1
D-79 104 Freiburg
Ralf.reski@biologie.uni-freiburg.de