مروری بر تولید تاکسول به روش‌های بیوتکنولوژیک

محمد مجیدی[1]*، علیرضا تاری‌نژاد[2]

۱- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
* آدرس مکاتبه: کیلومتر ۳۵ جاده تبریز- مراغه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، کدپستی: ۵۳۷۵۱۷۱۳۷۹
تلفن: ۳۴۳۲۷۵۲۰ (۰۴۱)، نمابر: ۳۴۳۲۷۵۲۲ (۰۴۱)
پست الکترونیک: mmajidi82@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۳ **تاریخ تصویب:** ۹۶/۸/۲۲

چکیده

تاکسول داروی ضد سرطانی بسیار مهمی است که برای اولین بار از گیاه سرخدار (*Taxus* spp.) به دست آمد. با این وجود، تهیه دارو از طریق استخراج از منابع طبیعی دارای محدودیت‌های بسیاری است و نمی‌تواند پاسخگوی نیاز کنونی بازار باشد. بنابراین استفاده از روش‌های تولیدی جایگزین ضروری به نظر می‌رسد. تولید تاکسول از طریق فناوری‌های زیستی یکی از گزینه‌های اصلی مورد استفاده است و دارای مزایایی از قبیل مستقل بودن تولید از شرایط جغرافیایی و محیطی، سرعت تولید بیشتر و سهولت استخراج می‌باشد. مقاله حاضر مروری دارد بر تعدادی از مهم‌ترین روش‌های مورد استفاده در تولید بیوتکنولوژیک تاکسول. مطالب اصلی مقاله در پنج بخش طبقه‌بندی شده‌اند: (۱) بیوسنتز تاکسول و ژن‌های مربوط به آن، (۲) فاکتورها و راهبردهای مؤثر بر تولید تاکسول از طریق کشت‌های سلولی گیاهی سرخدار، (۳) استراتژی‌های مبتنی بر دست‌ورزی ژنتیکی گیاه سرخدار به منظور تولید تاکسول، (۴) استفاده از سیستم‌های هترولوگ در تولید تاکسان‌ها، و (۵) اندوفیت‌های مولد تاکسول و تحقیقات مربوط به آن. همچنین در مورد وضعیت کنونی کاربرد فناوری‌های زیستی و چشم‌اندازهای آینده آن در تولید تاکسول توضیحاتی ارائه شده است.

گل‌واژگان: سرخدار، تاکسول، دست‌ورزی ژنتیکی، فناوری‌های زیستی

مقدمه

تاکسول با نام ژنریک پاکلی‌تاکسل (Paclitaxel)، از نمونه‌های بسیار موفق ترکیبات ضد سرطانی با منشأ گیاهی می‌باشد [۱]. ترکیب مذکور به همراه ترکیبات هم خانواده (معروف به تاکسان‌ها یا تاکسوئیدها) جزء دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهی به نام دی‌ترپنوئیدها طبقه‌بندی می‌شوند [۲]. منبع طبیعی تاکسول گونه‌های جنس سرخدار (*Taxus* spp.) است که گیاهانی بازدانه، کند رشد و دیرزی می‌باشند (شکل شماره ۱) و عمدتاً در عرض‌های معتدله نیمکره شمالی (امریکای شمالی، اروپا، ایران، چین و ژاپن) پراکنده می‌باشند [۵، ۴، ۳].

تاکسول با تثبیت میکروتوبول‌ها و ممانعت از تجزیه آنها، باعث مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود [۶]. هم اکنون این ترکیب به همراه آنالوگ نیمه سنتزی خود یعنی تاکسوتر (Taxotere)، برای درمان طیف وسیعی از سرطان‌ها از قبیل تخمدان، پستان، ریه، مثانه و پروستات مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین تاکسول در درمان بیماری‌های غیرسرطانی مثل پسوریازیس (Psoriasis)، آرتریت روماتوئید، آلزایمر و پارکینسون مرتبط با کروموزوم ۱۷ (FTDP-17) نیز اثربخش می‌باشد [۱].

با وجود موفقیت‌های کلینیکی فراوان، مهمترین مشکل بر سر راه استفاده از تاکسول، تأمین مقادیر کافی از دارو برای درمان بود. خیلی زود مشخص شد که تهیه تاکسول به روش استخراج از پوست گیاه سرخدار، نمی‌تواند جوابگوی نیاز روزافزون بازار باشد [۷، ۵، ۲]. از هر گیاه بالغ سرخدار، حدود ۳۰۰ میلی‌گرم تاکسول حاصل می‌شود، در حالی که هر بیمار برای درمان به ۲/۵ تا ۳ گرم دارو نیاز دارد. با توجه به تعداد بیماران متقاضی و همچنین کمبود منابع طبیعی گیاه سرخدار، روش مذکور نمی‌تواند گزینه‌ای قابل اتکاء و عملی برای تهیه دارو محسوب شود. علاوه بر آن، مشکلات زیست محیطی (از بین رفتن گیاهان موجود در طبیعت) و اقتصادی (پیچیدگی و هزینه بالا) این روش نیز قابل ملاحظه می‌باشد [۹، ۸، ۵، ۱].

شکل شماره ۱- الف- طرح شماتیک از شاخ و برگ، بذر، میوه و گل نر گیاه سرخدار و ب- نمایی نزدیک از گیاه سرخدار.

بررسی روش‌های جایگزین تولید از قبیل سنتز شیمیایی، نیمه سنتز و تولید میکروبی نشان داد که روش‌های مذکور به دلایلی چون هزینه بالا، راندمان پایین و تولید متغیر، گزینه‌های مطلوب و قابل اتکایی برای تولید تاکسول نمی‌باشند. با این وجود، مشخص شد که تولید بیوتکنولوژیک، گزینه مناسبی برای تأمین داروی مذکور می‌باشد [۱۱، ۱۰، ۹، ۵، ۱]. تولید از این طریق مزایای بسیاری دارد که می‌توان به مواردی از قبیل: مستقل بودن تولید از شرایط جغرافیایی و فصلی، کنترل‌پذیری و قابلیت مدیریت فرایند تولید، سرعت بالاتر رشد سلول‌ها، راحتی استفاده از تیمارها و محرک‌های افزاینده تولید، خالص‌سازی آسان‌تر ترکیبات، افزایش مقیاس تولید، قابلیت اتوماسیون و عدم تخریب محیط زیست، اشاره نمود [۱۳، ۱۲، ۱۱].

به طور کلی در روش‌های تولیدی مبتنی بر بیوتکنولوژی، دو فرایند کشت‌های سلولی و دست‌ورزی‌های ژنتیکی نقش‌های محوری را ایفا می‌کنند و در تمامی این راهبردها سعی بر این است که متابولیسم به سمت تولید داروی مورد نظر هدایت شود، در مقابل تولید ترکیبات ناخواسته به حداقل ممکن برسد [۱۳، ۱۱، ۵]. تاکنون استراتژی‌های بیوتکنولوژیک بسیاری برای افزایش تولید تاکسول مورد استفاده قرار گرفته‌اند که برخی از آنها با موفقیت‌های چشم‌گیری همراه بوده‌اند به طوری که امروزه بخش عمده تولید تجاری تاکسول بدین طریق انجام می‌شود [۱۵، ۱۴، ۱۱، ۵، ۱].

با توجه با اهمیت موضوع، مقاله حاضر به تولید تاکسول و ترکیبات هم‌خانواده آن به روش‌های بیوتکنولوژیک می‌پردازد که مطالب در پنج بخش شامل: ۱- چگونگی بیوسنتز تاکسول و ژن‌های مربوطه، ۲- تولید تاکسول از طریق کشت‌های سلولی سرخدار، ۳- دست‌ورزی ژنتیکی گیاه سرخدار به منظور افزایش تولید تاکسول، ۴- استفاده از سیستم‌های هترولوگ برای تولید تاکسان‌ها و ۵- اندوفیت‌های مولد تاکسول، مورد بحث قرار گرفته‌اند.

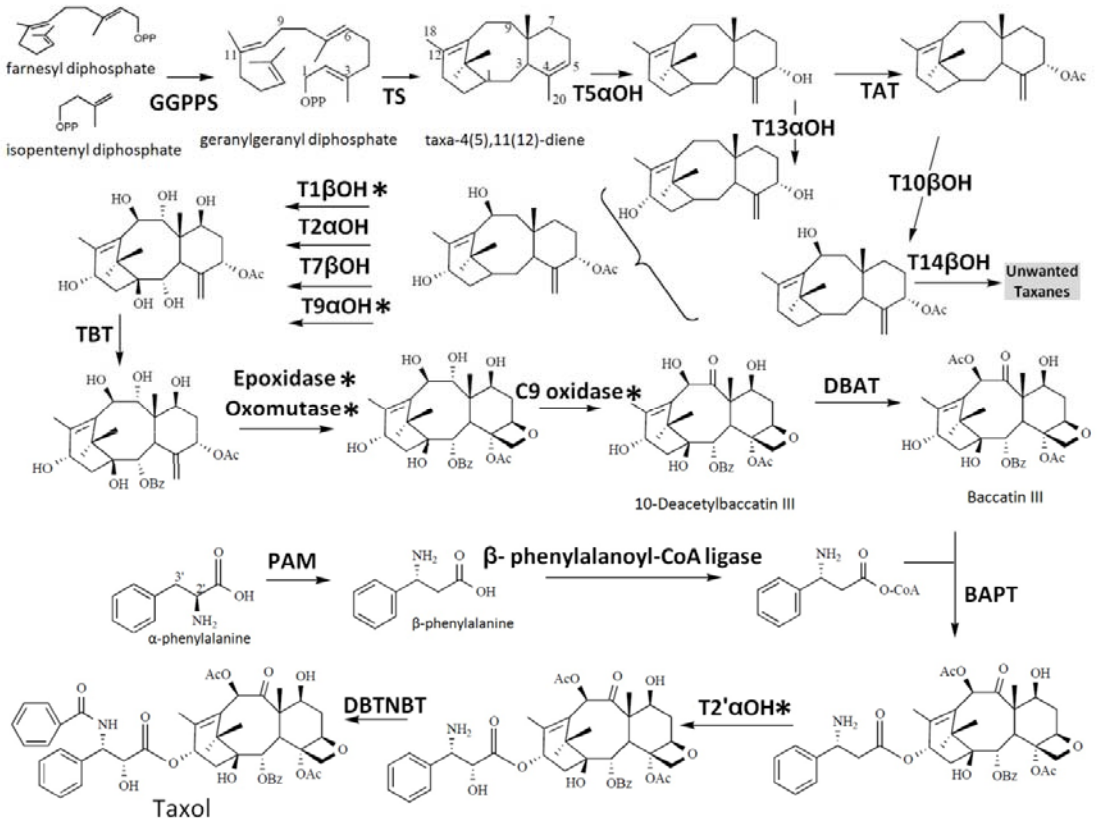
چگونگی بیوسنتز تاکسول و ژن‌های مربوطه

طراحی هوشمندانه سیستم‌های تولیدی بیوتکنولوژیک نیازمند درک عمیق از نحوه بیوسنتز، تنظیم و همچنین شناسایی مراحل کند و محدودکننده مسیر بیوسنتزی می‌باشد. اولین قدم در این زمینه، یافتن یک تصویر جامع از بیوشیمی و ژنتیک مسیر بیوسنتزی تاکسول می‌باشد [۱۷، ۱۶، ۸]. علیرغم تلاش‌های فراوان صورت گرفته در زمینه شناخت مسیر بیوسنتزی تاکسول، هنوز هم تصویر کاملاً روشن و دقیقی از آن در دسترس نمی‌باشد. تنوع بسیار زیاد ترکیبات تاکسانی و شباهت آنها با یکدیگر، غلظت پایین ترکیبات حدواسط و مراحل متابولیکی بسیار، از مهم‌ترین موانع موجود در راه شناخت این مسیر بیوسنتزی هستند. با این وجود محققان با استفاده از ترکیبی از روش‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی موفق شده‌اند تصویر نسبتاً واضحی از این مسیر بیوسنتزی را تهیه کنند [۹، ۸].

در مورد مسیر بیوسنتزی تاکسول، به طور کلی فرض بر این است که ۱۹ مرحله آنزیمی (شکل شماره ۲) وجود دارد [۸]. اولین واکنش مسیر، عبارت است از حلقوی شدن ترکیب دی‌ترپنی ژرانیل‌ژرانیل دی‌فسفات و تولید فراورده تاکسا- ۴ (۵)، ۱۱ (۱۲)- دین، که این واکنش توسط آنزیم تاکسادین سنتاز (Taxadiene synthase: TS یا TXS) که یک آنزیم پلاستیدی است، کاتالیز می‌شود [۱۸].

در ادامه، واکنش‌های هیدروکسیلاسیونی متعددی بر روی تاکسادین انجام می‌شوند (در جایگاه‌های C5، C10، C13، C14، C1، C2، C7 و C9) که نتیجه آن ایجاد تنوع فراوان در تاکسان‌ها می‌باشد [۸]. در این بین مشخص شده است که تاکسان‌های هیدروکسیله در جایگاه C14 از لحاظ دارویی نامطلوب می‌باشند، بنابراین کاهش فعالیت آنزیم مربوطه یعنی تاکسوئید ۱۴ بتا- هیدروکسیلاز (Taxoid 14β-hydroxylase: T14βH) می‌تواند موجب هدایت خزانه تاکسانی به سمت تولید تاکسان‌های مطلوب شود [۱۹].

پس از انجام واکنش‌های هیدروکسیلاسیونی، واکنش‌های دیگری نیز به وقوع می‌پیوندند که می‌توان به استیلاسیون در جایگاه C10 توسط آنزیم ۱۰- داستیل باکاتین III- ۱۰- اُ- استیل ترانسفراز (10- deacetyl- Baccatin III- 10- O-acetyl transferase: DBAT) اشاره نمود، که حاصل آن ایجاد ترکیبی به نام باکاتین III می‌باشد [۲۰].



شکل شماره ۲- مسیر بیوسنتزی تاکسول. علامت ستاره به معنی ژن‌های ناشناخته می‌باشد. اختصارات عبارتند از: GGPP، ژرانیل‌ژرانیل دی‌فسفات سنتاز؛ TS، تاکسادین سنتاز؛ T5αH، تاکسادین ۵ آلفا- هیدروکسیلاز؛ TAT، تاکسادین- ۵ آلفا- اُل- اُ- استیل ترانسفراز؛ T13αOH، تاکسادین ۱۳ آلفا- هیدروکسیلاز؛ T10βH، تاکسوئید ۱۰ بتا- هیدروکسیلاز؛ T14βH؛ تاکسوئید ۱۴ بتا- هیدروکسیلاز؛ T1βOH، تاکسان ۱ بتا- هیدروکسیلاز؛ T9αOH، تاکسان ۹ آلفا- هیدروکسیلاز؛ TBT، تاکسان ۲ آلفا- اُ- بنزوئیل ترانسفراز؛ DBAT، ۱۰- داستیل باکاتین III ۱۰- اُ- استیل ترانسفراز؛ PAM: فنیل آلانین آمینو موتاز؛ BAPT، باکاتین III ۱۳- اُ- فنیل پروپانوئیل ترانسفراز؛ T2'αOH، تاکسان '۲ آلفا- هیدروکسیلاز؛ DBTNBT، دبنزوئیل تاکسول *N*- بنزوئیل ترانسفراز [برگرفته از منبع ۹ با اعمال برخی تغییرات].

بعد از تشکیل باکاتین III، نوبت به اتصال زنجیره جانبی تاکسول می‌رسد. زنجیره جانبی تاکسول از آلفا- فنیل‌آلانین مشتق شده است که در ادامه این ترکیب توسط آنزیم فنیل‌آلانین آمینو موتاز (PAM :Phenylalanine aminomutase) به بتا- فنیل‌آلانین تبدیل می‌شود [۲۱]. واکنش بعدی، اتصال کوآنزیم آ به بتا- فنیل آلانین است که توسط آنزیم بتا- فنیل آلانوئیل کوآ لیگاز انجام می‌شود [۹]. اتصال زنجیره جانبی به باکاتین III، توسط آنزیم باکاتین III ۱۳- اُ- فنیل پروپانوئیل ترانسفراز (-13 Baccatin III O- phenylpropanoyltrasferase :BAPT) کاتالیز می‌شود [۲۲].

پس از اتصال زنجیره جانبی به هسته تاکسانی، چندین واکنش دیگر نیز انجام می‌شوند که درنهایت آخرین واکنش در مسیر سنتز تاکسول، یعنی *N*- بنزوئیلاسیون زنجیره جانبی انجام می‌شود. آنزیم دبنزوئیل تاکسول *N*- بنزوئیل ترانسفراز (debenzoyl Taxol *N*- benzoyl transferase: DBTNBT) کاتالیز واکنش مذکور را برعهده دارد [۲۳].

بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی تاکسول، نشان داده است که ژن‌های مربوط به بخش‌های انتهایی مسیر از قبیل *dbat*، *bapt*، *pam* و *dbtnbt* از عوامل محدودکننده در بیوسنتز تاکسول می‌باشند، از این‌رو به نظر می‌رسد که آنها

اهداف مناسبی برای دست‌ورزی‌های ژنتیکی باشند [۲۶، ۲۵، ۲۴، ۱۶، ۷].

تولید تاکسول از طریق کشت‌های سلولی سرخدار

کشت سلولی یا درون شیشه‌ای (*In vitro*) عنوانی کلی است که شامل کشت‌های سلول، بافت و اندام گیاهی می‌باشد. کشت‌های سلولی در مقایسه با گیاه کامل سرعت رشد بیشتری دارند و همچنین به تیمارهای افزاینده تولید بهتر از گیاه کامل پاسخ می‌دهند، که نتیجه آن تولید بیشتر در زمان کمتر می‌باشد [۲۷، ۱۳، ۱۲]. به دلیل وجود خاصیت توتی‌پتانسی (Totipotency) در گیاهان، می‌توان انتظار داشت که کشت‌های سلولی آنها نیز قادر به تولید تمامی ترکیبات موجود در گیاه کامل باشند [۱۲].

در سیستم‌های تولیدی از طریق کشت‌های سلولی بایستی توجه نمود که تولید نهایی تحت تأثیر دو عامل میزان تولید به ازای هر سلول و اندازه توده سلولی می‌باشد. در اکثر موارد شرایط بهینه موردنیاز برای هریک از این دو عامل در تضاد با دیگری است، زیرا تولید بهینه ترکیباتی از قبیل تاکسول که جزء متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شوند در شرایط تنش افزایش پیدا می‌کند در حالی که تنش‌ها اثرات نامطلوبی بر رشد سلول‌ها دارند. برای حل مشکل مذکور، کشت دو مرحله‌ای (Two-stage system) پیشنهاد می‌شود که در مرحله اول شرایط محیط کشت به نفع رشد سلول‌ها می‌باشد و پس از حصول توده سلولی مناسب، مرحله دوم آغاز می‌شود که شرایط به نفع تولید متابولیت موردنظر می‌باشد [۱۲، ۵، ۲].

شایان ذکر است که در سیستم‌های تولیدی تجاری، از ترکیبی از عوامل افزاینده استفاده می‌شود تا با بهره‌گیری از اثرات سینرژیستی بین آنها، تولید حداکثری حاصل شود. به عبارت دیگر استفاده صرف از یک استراتژی، نمی‌تواند موجب دستیابی به مقادیر بیشینه تولید شود [۱۰، ۵، ۲]. جدول شماره ۱، به برخی از مهمترین عوامل مؤثر بر تولید تاکسول از طریق کشت‌های سلولی گیاه سرخدار اشاره نموده است.

جدول شماره ۱- خلاصه‌ای از مهمترین عوامل موثر بر افزایش تولید تاکسول در کشت‌های سلولی گیاه سرخدار

عوامل موثر بر تولید	توضیحات
استقرار کشت‌های سلولی با سرعت رشد بالا	رشد بهتر سلول‌ها در محیط‌های با غلظت نمک پایین‌تر مثل B5 [۲۸]، اثر مطلوب پیکلورام بر رشد سلول‌ها [۲۶]، کنترل آلودگی‌های داخلی کشت‌ها با استفاده از نمونه‌های جوان‌تر و یا مواد ضدمیکروبی مثل سفوتاکسیم [۲۹]، تأثیر مطلوب عوامل آنتی‌اکسیدانی در ممانعت از قهوه‌ای شدن کشت‌ها [۳۱، ۳۰]، استفاده از افزودنی‌های محیط کشت از قبیل کازئین هیدرولیزات [۲۸] و اسیدهای آمینه [۳۲] در افزایش رشد سلول‌ها
انتخاب لاین‌های سلولی پرتولید	استفاده از آنتی‌بادی‌های مغناطیسی و فلورسنت در گزینش سلول‌های پرتولید [۳۳]
مواد غذایی	تأثیر مثبت فروکتوز بر تولید [۳۴]
تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی	تأثیر منفی پیکلورام بر تولید تاکسول [۳۵]
شرایط فیزیکی محیط کشت	دمای بهینه تولید تاکسول: ۲۹ درجه سانتی‌گراد [۳۶]، تأثیر منفی نور بر تولید تاکسان‌ها [۳۷]
تغذیه با پیش‌سازها	افزایش تولید در صورت استفاده از فنیل‌آلانین به عنوان پیش‌ساز [۳۸]
استفاده از الیسیتورها	مؤثرترین استراتژی افزاینده تولید [۹]، متیل جاسمونات به عنوان متداول‌ترین الیسیتور مورد استفاده [۱۴]، تحریک ترشح تاکسان‌ها و جلوگیری از تخریب آنها در محیط کشت توسط سیکلودکسترین‌ها [۳۹]، افزایش همزمان رشد سلول‌ها و تولید تاکسان‌ها با وانادیوم سولفات [۴۰]

ادامه جدول شماره ۱-

عوامل موثر بر تولید	توضیحات
کشت دوفازه (استفاده از مواد جاذب)	موفقیت فازهای مایع از قبیل دی‌متیل سولفوکسید [۴۱] و دی‌بوتیل فتالات [۴۲] در افزایش تولید تاکسول
افزایش مقیاس کشت‌ها (تولید در بیورآکتورها)	برتری بیورآکتورهای ستون حبابی پنوماتیک و بیورآکتورهای هوا بالابر (Air-lift) در مقایسه با بیورآکتورهای همزن‌دار در تولید تاکسان‌ها [۲]، افزایش تولید تاکسول از طریق فراهم کردن اتیلن، و افزایش غلظت CO_2 و اکسیژن محلول [۴۳]
کنترل تغییرات اپی‌ژنتیکی	کاهش شدت متیلاسیون سلول‌های سرخدار با استفاده از ماده دمتیله کننده ۵- آزا- '۲- داکسی سیتوزین و در نهایت افزایش تولید تاکسول [۴۴]
غیرمتحرک‌سازی سلول‌ها	افزایش سه برابری تولید تاکسول به وسیله تثبیت سلول‌های سرخدار با کلسیم آلژینات [۴۵]
تجدید محیط کشت (تغذیه و الیسیتاسیون متناوب)	در تغذیه متناوب، قند اولیه صرف رشد سلول‌ها می‌شود در حالی که قند بعدی صرف متابولیسم ثانویه می‌شود [۴۶]، همچنین غلظت الیسیتورها در محیط به مرور زمان و در اثر مصرف یا تجزیه کم می‌شود که این مسأله با الیسیتاسیون متناوب جبران می‌گردد [۴۷]
استفاده از سلول‌های مریستمی کامبیومی	این سلول‌ها ذاتا تمایز نیافته هستند و در فرایند استقرار کشت‌های سلولی نیازی به مرحله تمایززدایی ندارند، بنابراین ناپایداری‌های تولیدی در این نوع کشت‌ها کمتر مشاهده می‌شود [۴۸]

دست‌ورزی ژنتیکی گیاه سرخدار به منظور افزایش تولید تاکسول

دست‌ورزی ژنتیکی مسیرهای متابولیکی که به مهندسی متابولیک (Metabolic engineering) نیز معروف است ابزار قدرتمندی برای افزایش تولید متابولیت‌های موردنظر می‌باشد و می‌توان انتظار داشت با استفاده از دست‌ورزی‌های ژنتیکی، توان تولیدی کشت‌های سلولی به طور مضاعفی افزایش پیدا کند. به طور کلی سه هدف عمده در مهندسی متابولیک وجود دارد: ۱- افزایش بیان ژن‌های مطلوب مسیر، ۲- کاهش بیان ژن‌های مسیرهای رقیب یا نامطلوب و ۳- ورود ژن‌های جدید به درون ژنوم یک موجود برای تولید متابولیت جدید [۴۹، ۱۶]. مشخص شده است که استفاده از *Agrobaterium tumefaciens* روش مناسبی برای دست‌ورزی ژنتیکی گیاه سرخدار می‌باشد، زیرا ژن منتقل شده بوسیله آگروباکتریوم به صورت پایدار در کروموزوم میزبان درج می‌شود. مزیت دیگر این سیستم، درج ژن انتقالی به صورت تک‌نسخه‌ای می‌باشد. همچنین مشخص شده است که سلول‌های تراریخته حاصل، قادر به حفظ توانایی بیان ژن خارجی به مدت طولانی می‌باشند [۵۱، ۵۰]. خلاصه‌ای از مهمترین استراتژی‌های مبتنی بر دست‌ورزی‌های ژنتیکی گیاه سرخدار در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

استفاده از سیستم‌های هترولوگ برای تولید تاکسان‌ها

سیستم‌های هترولوگ (Heterologous systems)، موجوداتی هستند که به طور طبیعی ترکیب مورد نظر را تولید نمی‌کنند. به دلیل اینکه سیستم‌های هترولوگ از لحاظ کشت، سرعت رشد و دست‌ورزی‌های ژنتیکی دارای ویژگی‌های مطلوب‌تری می‌باشند، از این‌رو تمایل به استفاده از این موجودات به عنوان سیستم‌های جایگزین تولید وجود دارد [۲۷، ۱]. در مورد تاکسول به دلیل اینکه مسیر بیوسنتزی آن شامل مراحل بسیاری می‌باشد که کاملاً شناخته نشده‌اند، نمی‌توان انتظار داشت در آینده‌ای نزدیک بتوان تاکسان‌های پیشرفته چون تاکسول را در این موجودات تولید نمود، بلکه از آنها می‌توان به عنوان سیستم‌های کمکی برای تولید برخی از تاکسان‌های اولیه مسیر استفاده نمود [۱۱، ۹، ۱].

به طور کلی سیستم‌های هترولوگ مورد استفاده برای تولید تاکسان‌ها شامل دو گروه اصلی هستند: سیستم‌های هترولوگ

گیاهی و سیستم‌های هترولوگ میکروبی [۲۷، ۱۱، ۱]. از آنجایی که دستگاه نسخه‌برداری و ترجمه در موجودات میکروبی و یوکاریوت‌های عالی دارای تفاوت‌های بسیاری می‌باشند، بیان موفق ژن‌های مسیر بیوسنتزی تاکسول در موجودات میکروبی، نیازمند اعمال برخی از تغییرات است که می‌توان به بهینه‌سازی کدون‌ها و استفاده از علائم شروع و خاتمه مناسب سیستم‌های میکروبی اشاره نمود [۶۰، ۵۹]. جدول شماره ۳ به برخی از مهمترین سیستم‌های هترولوگ مورد استفاده در تولید تاکسان‌ها اشاره دارد.

اندوفیت‌های مولد تاکسول

اندوفیت‌ها (Endophytes) موجودات همزیستی هستند که داخل بافت‌های گیاهی زندگی می‌کنند و سودمندی‌هایی را برای میزبان فراهم می‌آورند. برخی از آنها قادر به تولید ترکیبات دارویی نیز می‌باشند که از لحاظ تجاری بسیار مورد توجه می‌باشند [۶۵]. تاکنون حدود ۲۰۰ قارچ اندوفیت مولد تاکسول (متعلق به بیش از ۴۰ جنس مختلف) گزارش شده‌اند [۶۶]. ماهیت میکروبی اندوفیت‌های قارچی مولد تاکسول که

جدول شماره ۲- خلاصه‌ای از مهمترین استراتژی‌های مبتنی بر دست‌ورزی‌های ژنتیکی گیاه سرخدار به منظور افزایش تولید تاکسول

استراتژی	توضیحات
افزایش بیان ژن‌های مطلوب	افزایش بیان ژن‌های *dbat* [۵۲] و *dbtnbt* [۵۳] تحت تأثیر پروموترهای افزاینده موجب افزایش سطوح رونوشت‌های مربوطه و همچنین تولید تاکسول شد
کاهش بیان ژن‌های نامطلوب	کاهش بیان ژن *t14βh* از طریق تکنولوژی آنتی‌سنس موجب کاهش چشم‌گیر (۴۰ تا ۶۰ درصدی) سطوح تاکسان‌های نامطلوب شد [۵۴]
کشت‌های ریشه موئین	تولید تاکسان‌ها در کشت‌های ریشه موئین در مقایسه با سلول‌های والدی بیشتر بود، همچنین سرعت رشد کشت‌های ریشه موئین نیز در مقایسه با سلول‌های غیرتراریخته بیشتر بود [۵۵]
دست‌ورزی ژن‌های غیرتاکسانی	افزایش بیان ژن متعلق به مسیر بیوسنتزی اسید آبسیزیک، موجب افزایش تولید تاکسول شد [۵۶]، افزایش بیان فاکتورهای نسخه برداری مثل TcWRKY1 [۵۷] و TCERF15 [۵۸] نیز موجب افزایش تولید تاکسول شد

جدول شماره ۳- برخی از مهمترین سیستم‌های هترولوگ مورد استفاده برای تولید تاکسان‌ها

نوع سیستم هترولوگ	موجود	توضیحات
گیاهی	*Arabidopsis thaliana*	بیان ژن *ts* به صورت دائمی موجب تولید مقادیر اندک تاکسان در مقایسه با بیان القاءپذیر ژن مذکور شد، ژن انتقالی موجب توقف رشد و کاهش رنگ‌ریزه‌های فتوسنتزی شد که این امر در نتیجه انحراف جریان متابولیکی از سایر مسیرهای ترپنوئیدی به سمت تولید تاکسادین می‌باشد [۶۱]
	Artemisia annua	تولید همزمان دو ماده دارویی ارزشمند (تاکسادین و آرتمیزنین) در یک گیاه از طریق انتقال ژن تاکسادین سنتاز [۶۲]
میکروبی	*Escherichia coli*	تولید فراوان (۵۷۰ میلی‌گرم در لیتر) تاکسان‌های هیدروکسیله از طریق بهینه‌سازی بیان سیتوکروم‌های P450 و ردوکتازهای مربوطه، بهبود برهمکنش بین سیتوکروم‌ها و ردوکتازها، و ایجاد تغییرات در انتهای N آنزیم‌ها [۶۳]
	Saccharomyces cerevisiae	موفقیت اندک در تولید تاکسان‌های هیدروکسیله به دلیل ناکافی بودن پتانسیل ردوکس در سلول‌های مخمر [۶۴]

تولید در مقیاس وسیع آنها را تسهیل می‌کند و همچنین یوکاریوت بودن آنها، مزایایی هستند که برای تولید تاکسان‌ها دارای جذابیت می‌باشند [۶۵].

با وجود مطالعات بسیار صورت گرفته در زمینه تولید تاکسول از طریق اندوفیت‌ها، هنوز تولیدی چشم‌گیر و تجاری از این روش حاصل نشده است. وجود برخی از مسائل از جمله تولید اندک و متغیر و همچنین رشد نامناسب اندوفیت‌ها در شرایط آزاد از سلول میزبان، از مهمترین مشکلات تولید تاکسول توسط اندوفیت‌ها می‌باشند [۶۶]. از طریق بهبود اندوفیت‌ها بوسیله موتاسیون و انتخاب و همچنین مهندسی ژنتیک، می‌توان تا اندازه‌ای بر مشکلات مذکور غلبه نمود [۶۷].

گزارش‌های ضد و نقیضی در مورد توانایی تولید مستقل تاکسول توسط اندوفیت‌ها ارائه شده است، به طوری که برخی از مطالعات تأکید می‌کنند که هیچ‌گونه تولیدی در شرایط غیرهمزیست مشاهده نشده است که این مساله محققان را به سمت سیستم‌های هم‌کشتی (Co-culture) یا تخمیر مرکب سوق داده است [۶۸، ۶۶]. افزایش ۳۸ برابری تولید تاکسول در سیستم هم‌کشتی اندوفیت – سلول گیاهی سرخدار، گزارش شده است [۶۹]. همچنین نتایج مشابهی از سیستم‌های هم‌کشتی اندوفیت – اندوفیت نیز حاصل شده است. به عنوان مثال هم‌کشتی دو قارچ اندوفیت *Paraconiothyrium* strain SSM001 و *Alternaria* منجر به افزایش ۳ برابری تولید تاکسول شد، در حالی که در سیستم هم‌کشتی سه جزئی اندوفیت‌ها (دو قارچ قبلی به همراه *Phomopsis*)، این میزان به ۸ برابر افزایش پیدا نمود [۶۸].

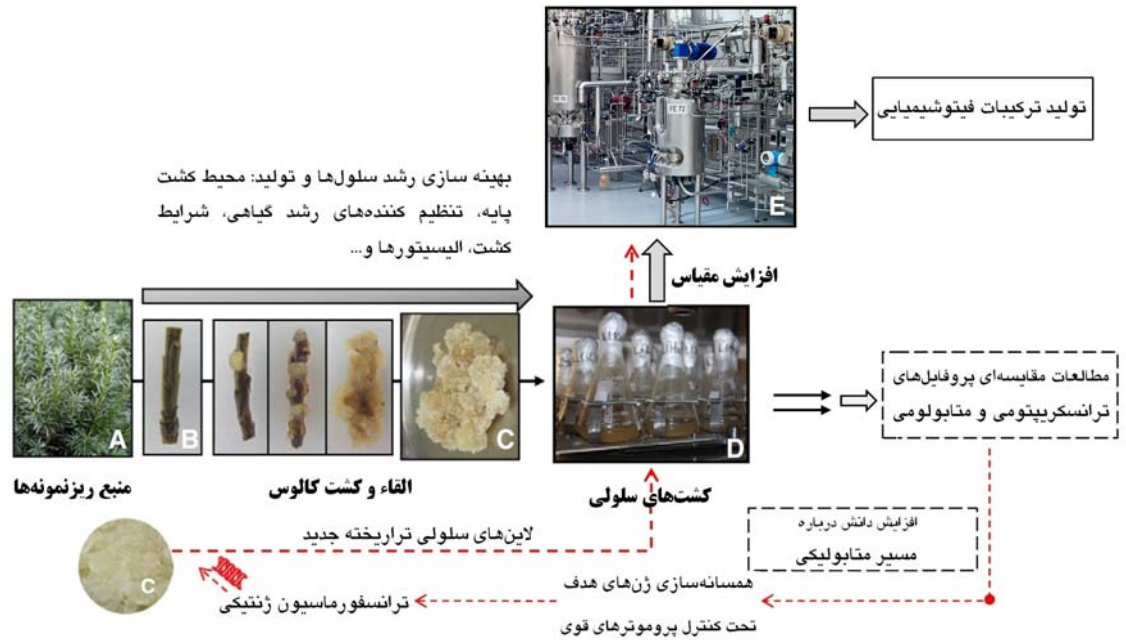
نتیجه‌گیری و چشم‌اندازهای آینده

تولید بیوتکنولوژیک تاکسول، نمادی از پتانسیل عظیم فناوری‌های زیستی در عرصه تأمین ترکیبات دارویی می‌باشد. درنتیجه تلاش‌های بی‌وقفه تعداد بسیاری از محققان و با بکارگیری انبوهی از استراتژی‌های مؤثر، تولید تاکسول به بیش از چندصد برابر اولین گزارش تولید تاکسول در کشت‌های سلولی (۱ میلی‌گرم در لیتر) رسیده است [۷۰]، به گونه‌ای که غلظت‌های ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط‌های آزمایشگاهی [۷۱]، و ۲۹۵ [۱۴] و ۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر [۱۵] در محیط‌های صنعتی گزارش شده‌اند.

در حال حاضر، تولید بیوتکنولوژیک تاکسول مبتنی بر کشت‌های سلولی گیاه سرخدار، مهمترین روش تهیه داروی مذکور می‌باشد و شرکت‌های بزرگ تولیدکننده تاکسول مثل Bristol-Myers-Squibb (ایالات متحده) و Samyang Genex (کره جنوبی) اعلام نموده‌اند که تاکسول را بدین طریق تولید می‌کنند [۱۱، ۵، ۱]. به طور کلی در یک فرایند تولید بیوتکنولوژیک تاکسول از طریق کشت‌های سلولی، از ترکیبی از انواع تیمارهای افزاینده مثل انتخاب لاین‌های سلولی پرتولید، تغذیه با پیش‌سازها، الیسیتاسیون، کشت دوفازه و افزایش مقیاس کشت‌ها استفاده می‌شود (شکل شماره ۳). هم‌اکنون از بیورآکتورهای بزرگی (تا حجم ۷۵/۰۰۰ لیتر) برای تولید تجاری تاکسول استفاده می‌شود، با این وجود، اطلاعات کاملی از جزئیات این فرایندها در دسترس نمی‌باشد [۱۱، ۱].

تولید تاکسول به طریق بیوتکنولوژیک نه تنها از لحاظ تجاری حائز اهمیت است، بلکه در شیمی سبز نیز موفقیتی بزرگ محسوب می‌شود، به گونه‌ای که در سال ۲۰۰۴، آژانس حفاظت از محیط زیست ایالات متحده، جایزه Presidential Green Chemistry Challenge را به دلیل تشخیص، توسعه و استفاده از یک روش دوست‌دار محیط زیست در تولید تاکسول، به شرکت بریستول مایرز اسکوئیب اعطاء نمود [۷۲].

علیرغم موفقیت‌های چشم‌گیر حاصل در زمینه تولید بیوتکنولوژیک تاکسول، چالش‌هایی نیز در این عرصه وجود دارند که می‌توان به مواردی از قبیل نبود اطلاعات بیوشیمیایی و ژنتیکی کافی در مورد بیوسنتز تاکسول و همچنین ناپایداری‌های تولیدی کشت‌های سلولی اشاره نمود. با این وجود به نظر می‌رسد با تکمیل پروژه‌های اومیکس (Omics)، گسترش استفاده از دست‌ورزی‌های ژنتیکی، افزایش دانش در مورد تغییرات اپی‌ژنتیکی و همچنین بکارگیری بیورآکتورهای



شکل شماره ۳- طرح پیشنهادی تولید بیوتکنولوژیک تاکسول از طریق کشت‌های سلولی گیاه سرخدار. مراحل اصلی عبارتند از: تهیه ریزنمونه، القاء و کشت کالوس، کشت سلولی و درنهایت کشت در بیورآکتور (به ترتیب از **A** تا **E**). همچنین مطالعات ترانسکریپتومی، متابولومی و دست‌ورزی‌های ژنتیکی می‌توانند به عنوان عوامل کمکی جهت افزایش تولید مورد استفاده قرار گیرند [برگرفته از منبع ۱۱ با اعمال تغییرات جزئی].

مناسب کشت‌های سلولی گیاه سرخدار در آینده‌ای نزدیک، می‌توان انتظار داشت که بخش زیادی از مشکلات اشاره شده، برطرف شوند که نتیجه آن کاهش هزینه‌های تولیدی و افزایش دسترسی به دارو می‌باشد [۷۳، ۱۱، ۹، ۱]. همچنین تولید تاکسان‌ها در موجوداتی غیر از گیاه سرخدار از قبیل گیاه فندق، اندوفیت‌ها و سیستم‌های هترولوگ، چشم‌انداز روشنی را فراروی تولید بیوتکنولوژیک تاکسول گشوده است [۷۵، ۷۴].

نتیجه‌گیری نهایی

به طور کلی می‌توان انتظار داشت که تولید بیوتکنولوژیک تاکسول همچنان به روند صعودی خود ادامه خواهد داد، زیرا بیوتکنولوژی وارد مرحله نوینی شده است و به جای استفاده از فرایندهای مبتنی بر تجربه و تک فاکتوری، به سمت فرایندهای مبتنی بر منطق و چند فاکتوری گرایش پیدا کرده است که حاصل آن افزایش سرعت و راندمان فرایندهای تولیدی می‌باشد [۷۶، ۲۷، ۱۱]. بهرحال، دانش تولید بیوتکنولوژیک تاکسول مانند یک دایره‌المعارف کامل زیست فناوری است که می‌تواند راهنمای ارزشمندی برای تجاری‌سازی تولید سایر ترکیبات دارویی باشد [۷۶، ۱۱، ۱].

منابع

1. Liu WC, Gong T and Zhu P. Advances in exploring alternative Taxol sources. *Royal Society of Chemistry Advances* 2016; 6: 48800-48809.

2. Zhong JJ. Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2002; 94 (6): 591-599.

3. Cope EA. Taxaceae: the genera and cultivated species. *Botanical Rev*. 1998; 64: 291-322.

4. Hadjiakhoondi A, Pirali-Hamedani M, Verdian-Rizi M and Rezazadeh Sh. Taxane diterpenoids from *Taxus baccata* L. growing in Iran. *Journal of Medicinal Plants* 2009; 8: 39-44.

5. Malik S, Cusido R, Mirjalili M, Moyano E, Palazon J and Bonfil M. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Process Biochem*. 2011; 46: 23-34.

6. Schiff PB, Fant J and Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature Biotechnol*. 1979; 277: 665-7.

7. Jaziri M, Zhiri A, Gue Y and Dupont J. *Taxus* sp. cell, tissue and organ culture as alternative sources for taxoids production: a literature survey. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1996; 46: 59-75.

8. Croteau R, Ketchum REB, Long RM, Kaspera R and Wildung M. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochemistry Reviews* 2006; 5: 75-97.

9. Onrubia M, Cusido RM, Ramirez K, Hernandez-Vazquez L, Moyano E, Bonfill M and Palazon J. Bioprocessing of plant *in vitro* systems for the mass production of pharmaceutically important metabolites: Paclitaxel and its derivatives. *Current Medicinal Chem*. 2013; 20: 880-891.

10. Sabater-Jara AB, Tudela LR and Lopez-Perez AJ. *In vitro* culture of *Taxus* sp.: strategies to increase cell growth and taxoid production. *Phytochemistry Rev*. 2010; 9: 343-356.

11. Cusido RM, Onrubia M, Sabater-Jara AB, Moyano E, Bonfill M, Gossens A, Pedreno MA and Palazon J. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. *Biotechnology Advances* 2014; 32 (6): 1157-1167.

12. Rao SR and Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 2002; 20: 101-153.

13. Fett-Neto AG, Aoyagi H, Tanaka H and Dicosmo F. Antitumor agents: Taxol and taxane production by yew cell culture. In RA Myers. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine. Wiley-VCH, Weinheim. 2004, pp: 415-438.

14. Tabata H. Paclitaxel production by plant cell culture technology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnol*. 2004; 7: 1-23.

15. Bringi V, Kadkade PG, Prince CL and Roach BL. Enhanced production of Taxol and Taxanes by cell cultures of *Taxus* species. 2007; US patent: 7264951.

16. Frense D. Taxanes: perspectives for biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnol*. 2007; 73: 1233-1240.

17. Roberts SC. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biol*. 2007; 3: 387-395.

18. Hezari M, Lewis NG and Croteau R. Purification and characterization of taxa-4(5),11(12)-diene synthase from pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1995; 322: 437-444.

19. Jennewein S, Rithner CD, Williams RM and Croteau R. Taxol metabolism: taxoid 14b-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003; 413: 262-70.

20. Walker K and Croteau R. Molecular cloning of a 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2000; 97 (2): 583-587.

21. Walker K, Klettke K, Akiyama T and Croteau RB. Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in taxol biosynthesis. *Journal of Biological Chem*. 2004; 279: 53947-54.

22. Walker K; Fujisaki S; Long R and Croteau R. Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in taxol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2002; 99 (20): 12715-12720.

23. Walker K, Long R and Croteau R. The final acylation step in Taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2002; 99: 9166-71.

24. Nims E, Dubois CP, Roberts SC and Walker EL. Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metabolic Engineering* 2006; 8: 385-394.

25. Majidi M, Farsi M, Bahrami AR, Behravan J and Marashi SH. Cloning, gene expression analysis, and phylogenic relationship of *dbat* gene from Iranian endemic yew (*Taxus baccata* L.). *Journal of Medicinal Plants* (in Persian). 2013; 12 (48): 91-103.

26. Majidi M, Farsi M, Bahrami AR, Behravan J and Marashi SH. Cloning of *dbat* gene and gene expression profiling of Taxol pathway in response to methyl jasmonate in *Taxus baccata* L. Ph.D. thesis (in Persian). Depeartment of Plant Biotechnology and Breeding. Ferdowsi University of Mashhad. 2013.

27. Gandhi SG, Mahajan V and Bedi YS. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. *Planta* 2015; 241: 303-317.

28. Ketchum REB, Gibson D and Greenspan L. Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1995; 42: 185-193.

29. Majidi M, Farsi M, Bagheri A and Marashi SH. Study on callus cultures and micropropagation of western yew (*Taxus brevifolia*) for Taxol production. M.Sc. thesis (in Persian). Depeartment of Plant Biotechnology and Breeding. Ferdowsi University of Mashhad. 2005.

30. Enaksha RM, Wickremesinhe ERM and Arteca RN. *Taxus* callus cultures: initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1993; 35: 181-93.

31. Donga YS, Fua CH, Sua P, Xua XP,b, Yuana J, Wanga S, Zhanga M, Zhao CF and Yua LJ. Mechanisms and effective control of physiological browning phenomena in plant cell cultures. *Physiologia Plantarum* 2016; 156: 13-28.

32. Alizadeh N, Farsi M, Majidi M and Rasooli Y. Optimization of different compounds of culture media to improving callus growth in common yew (*Taxus baccata*). *Iranian Journal of Field Crops Research* (in Persian). 2012; 9 (4): 573-583.

33. Kawamura M, Shigeoka T, Tahara M, Takami M, Ohashi H, Akita M, Kobayashi Y and Sakamoto T. Efficient selection of cells with high taxol content from heterogeneous *Taxus* cell suspensions by magnetic or fluorescent antibodies. *Seibutsu-kogaku Kaishi*. 1998; 76: 3-7.

34. Khosroushahi AY, Valizadeh M, Ghasempour A, Khosrowshahli M, Naghdibadi H, Dadpour MR and Omidi Y. Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International*. 2006; 30: 262-9.

35. Hirasuna TJ, Pestchanker LJ, Srinivasan V and Shuler ML. Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1996; 44: 95-102.

36. Choi HK, Kim SI, Son JS, Hong SS, Lee HS and Lee HJ. Enhancement of paclitaxel production by temperature shift in suspension culture of *Taxus chinensis*. *Enzyme and Microbial Technol*. 2000; 27: 593-598.

37. Fett-Neto AG, Pennington JJ and DiCosmo F. Effect of white light on taxol and baccatin III accumulation in cell cultures of *Taxus cuspidata*

Sieb and Zucc. *Journal of Plant Physiol*. 1995; 146: 584-590.

38. Fett-Neto AG, Melanson SJ, Nicholson SA, Pennington JJ and DiCosmo E. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotechnology and Bioengineering* 1994; 44: 967-971.

39. Sabater-Jara AB, Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Palazon J, Pedreno MA and Cusido M. Synergistic effect of cyclodextrins and methyl jasmonate on taxane production in *Taxus* × *media* cell cultures. *Plant Biotechnology J*. 2014; 12 (8):1075-84.

40. Cusido RM, Palazon J, Navia-Osorio A, Mallol A, Bonfill M, Morales C and Pinol MT. Production of Taxol® and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. *Plant Science* 1999; 146: 101 - 7.

41. Abbasi Kajani A, Moghim S and Mofid MR. Enhanced taxane production and secretion from *Taxus baccata* cell culture by adding dimethylsulfoxide. *Biotechnology and Applied Biochem*. 2012; 59 (3): 223-227.

42. Wang C, Wu J and Mei X. Enhanced taxol production and release in *Taxus chinensis* cell suspension cultures with selected organic solvents and sucrose feeding. *Biotechnology Progress* 2001; 17: 89-94.

43. Luo J, Mei XG, Liu L and Hu DW. Improved paclitaxel production by fed-batch suspension cultures of *Taxus chinensis* in bioreactors. *Biotechnology Letters* 2002; 24: 561-565.

44. Li LQ, Li XL, Fu CH, Zhao CF and Yu LJ. Sustainable use of *Taxus media* cell cultures through minimal growth conservation and manipulation of genome methylation. *Process Biochem*. 2013; 48: 525-31.

45. Bentebibel S, Moyano E, Palazon J, Cusido RM, Bonfill M and Eibl R. Effects of immobilization by entrapment in alginate and scale-up on paclitaxel and baccatin III production in cell suspension cultures of *Taxus baccata*. *Biotechnology and Bioengineering* 2005; 89: 647-655.

46. Wang C, Wu J and Mei X. Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Applied Microbiology and Biotechnol*. 2001; 55: 404-410.

47. Wang ZY and Zhong JJ. Repeated elicitation enhances taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* in bioreactors. *Biotechnol. Letters* 2002; 24: 445-448.

48. Lee EK, Jin YW, Park JH, YM, Hong SM, Amir R, Yan Z, Kwon E, Elfick A, Tomlinson S, Halbritter F, Waibel T, Yun BW and Loake GJ. Cultured cambial meristematic cells as a source of plant natural products. *Nature Biotechnol*. 2010; 28: 1213-1217.

49. Lu X, Tang K and Li P. Plant metabolic engineering strategies for the production of pharmaceutical terpenoids. *Frontiers in Plant Science* 2016; 7: 1647.

50. Han KH, Fleming P, Walker K, Loper M, Chilton WS, Mocek U, Gordon MP and Floss HG. Genetic transformation of mature *Taxus*: an approach to genetically control the *In-vitro* production of the anticancer drug, Taxol. *Plant Sci*. 1994; 95: 187-196.

51. Ketchum REB, Wherland L and Croteau RB. Stable transformation and long-term maintenance of transgenic *Taxus* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 2007; 26: 1025-1033.

52. Zhang P, Li ST, Liu TT, Fu CH, Zhou PP, Zhao CF and Yu LJ. Overexpression of a 10-deacetylbaccatin III-10 β-O-acetyltransferase gene leads to increased taxol yield in cells of *Taxus chinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2011; 106: 63-70.

53. Zhang P, Li ST, Fu CH, Zhou PP, Song FJ and Yu LJ. Overexpression of a 3′-N-Debenzoyltaxol-N-benzoyltransferase gene promotes Taxol yield in *Taxus chinensis* cells. *Chinese Journal of*

Biochemistry and Molecular Biol. 2014; 30 (4): 377-382.

54. Li FL., Ma XJ, Hu XL., Hoffman A., Da JG., and Qiu DY. Antisense-induced suppression of taxoid 14β- hydroxylase gene expression in transgenic *Taxus* × *media* cells. *African Journal of Biotechnol*. 2011; 10 (44): 8720-8728.

55. Furmanowa M and Syklowska-Baranek K. Hairy root cultures of *Taxus* × *media* var. Hicksii Rehd. as a new source of paclitaxel and 10-deacetylbaccatin III. *Biotechnology Letters* 2000; 22: 683-686.

56. Li ST. Fu CH; Zhang M; Ahang Y; Xie S and Yu LJ. Enhancing taxol biosynthesis by overexpressing a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in transgenic cell lines of *Taxus chinensis*. *Plant Molecular Biology Reporter* 2012; 30: 1125-1130.

57. Zhang LS, Zhang P, Fu C and Yu L. Functional analysis of a WRKY transcription factor involved in transcriptional activation of the dbat gene in *Taxus chinensis*. *Plant Biol*. 2013; 15 (1): 19-26.

58. Zhang M, Li S, Nie L, Chen Q, Xu X. Yu L and Fu C. Two jasmonate-responsive factors, TcERF12 and TcERF15, respectively act as repressor and activator of *tasy* gene of taxol biosynthesis in *Taxus chinensis*. *Plant Molecular Biol*. 2015; 89 (4-5): 463-73.

59. Marienhagen J and Bott M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *Journal of Biotechnol*. 2013; 163: 166-178.

60. Dziggel C, Holger Schafer and Michael Wink. Tools of pathway reconstruction and production of economically relevant plant secondary metabolites in recombinant microorganisms. *Biotechnol. J*. 2017; 12: 1600145.

61. Besumbes O, Sauret-Gueto S, Phillips MA, Imperial S, Rodriguez-Concepcion M and Boronat A. Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis* for the production of taxadiene, the first committed precursor of Taxol. *Biotechnol. and Bioengineering* 2004; 88: 168-175.

62. Li M, Jiang F, Yu X and Miao Z. Engineering Isoprenoid Biosynthesis in *Artemisia annua* L. for the production of Taxadiene: A key intermediate of Taxol. *BioMed. Research International* 2015; Article ID: 504932.

63. Biggs BW, Lim CG, Sagliani K, Shankar S, Stephanopoulos G, De Mey M and Ajikumar PK. Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated Taxol precursor synthesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2016; 113 (12): 3209-14.

64. Dejong JH, Liu Y, Bollon AP, Long RM, Jennewein S, Williams D and Croteau RB. Genetic engineering of Taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. and Bioengineering* 2006; 93: 212-224.

65. Venugopalan A and Srivastava S. Endophytes as *in vitro* production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 2015; 33 (6): 873-887.

66. Kusari S, Singh S and Jayabaskaran C. Rethinking production of Taxol (paclitaxel) using endophyte biotechnology. *Trends in Biotechnol*. 2014; 32 (6): 304-311.

67. Zhang P, Liu TT, Zhou PP, Li ST and Yu LJ. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of a Taxol-producing endophytic fungus, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Current Microbiol*. 2011; 62: 1315-1320.

68. Soliman SSM and Raizada MN. Interactions between co-habitating fungi elicit synthesis of Taxol from an endophytic fungus in host *Taxus* plants. *Frontiers in Microbiol*. 2013; 4: 1-14.

69. Li YC, Tao W and Chen L. Paclitaxel production using co-culture of *Taxus* suspension cells and Paclitaxel-producing endophytic fungi in a co-bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009; 83(2): 233-239.

70. Christen AA, Gibson DM and Bland J. Production of taxol-like compounds in cell culture. 1991; US Patent: 5019504.

71. Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y and Hara Y. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotechnol*. 1996; 14: 1129-1132.

72. Tabata H. Production of paclitaxel and the related taxanes by cell suspension cultures of *Taxus* species. *Current Drug Targets* 2006; 7: 453-461.

73. Wilson SA and Roberts SC. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol. J*. 2012; 10 (3): 249-268.

74. Isah T. Natural sources of Taxol. *British Journal of Pharmaceutical Res*. 2015; 6 (4): 214-227.

75. Gallego A, Malik S, Yousefzadi M, Makhzoum A, Tremouillaux-Guiller J and Bonfill M. Taxol from *Corylus avellana*: paving the way for a new source of this anti-cancer drug. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2017; 129 (1): 1-16.

76. Li Y, Zhang G and Pfeifer BA. Current and emerging options for Taxol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnol*. 2015; 148: 405-25.

A Review on Taxol Production through Biotechnological Approaches

Majidi M (Ph.D.)[1]*, Tarinejad AR (Ph.D.)[1]

1- Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
*Corresponding author: Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Zip Code: 5375171379, Tabriz, Iran
Tel: +98-41-34327520, Fax: +98-41-34327522
E-mail: mmajidi82@yahoo.com

Abstract

Taxol is a very important anticancer drug which was first isolated from Yew plant (*Taxus* spp.). However, Taxol supply by extraction from natural sources, has several limitations, and cannot meet current market's demands. Therefore, it seems necessary to use alternative production methods. Producing Taxol through biotechnological approaches is among the main options which have some advantages such as independency of production from geographical and environmental conditions, higher production rate, and ease of extraction. This paper contains a review on some of the most important approaches used in Taxol biotechnological production. The main body of the paper is divided into five main parts: (1) Taxol biosynthesis and related genes, (2) Factors and strategies influencing the production of Taxol by plant cell cultures of *Taxus* spp., (3) Strategies based on genetic manipulation of *Taxus* spp. for the production of Taxol, (4) Using heterologous systems in taxane production, and (5) Taxol-producing endophytes and related studies. The current status of utilizing biotechnology in producing Taxol and its future outlooks have been also described.

Keywords: ***Taxus*** **spp., Taxol, Biotechnology, Genetic manipulation**