APLICAÇÃO DE *HAIRY ROOTS* PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Gabriella Lopes Ricardo Januzzi, Vívian Caiafa Ferreira Paiva, Marcelo de Oliveira Santos

Universidade Federal de Juiz de Fora - Campus Universitário, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - São Pedro, Juiz de Fora - MG, 36036-900, gabijanuzzi10@gmail.com, vivian.caiafa@hotmail.com, marcelo.santos@ufjf.br.

Resumo

As *Hairy Roots* representam uma plataforma promissora para a produção de proteínas recombinantes e outros compostos de interesse biotecnológico, sendo especialmente relevantes no contexto da *Plant Molecular Farming*. Este estudo teve como objetivo revisar as principais inovações e aplicações dessa técnica, com ênfase na produção de proteínas recombinantes. A revisão identificou 17 estudos com aplicações abrangentes, como a produção de hormônios, vacinas, antimicrobianos, anticorpos e proteínas de uso industrial e médico. Concluiu-se que, embora ambas as formas de transformação, direta e indireta, sejam relatadas na literatura, a transformação indireta frequentemente proporciona maior rendimento de proteínas recombinantes. Além disso peptídeos sinais desempenham papéis cruciais no direcionamento e acúmulo dessas proteínas.

Palavras-chave: Proteínas heterólogas. Hairy Root. Transformação.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas – Genética.

Introdução

O sistema de *Hairy Root* é uma metodologia que utiliza da infecção de plantas com a bactéria *Agrobacterium rhizogenes/Rhizobium rhizogenes.* Posteriormente a infecção, as raízes da planta são caracterizados por um crescimento rápido e altamente ramificado, podendo ser mantidas em culturas de tecidos vegetais por longos períodos (GUTIERREZ *et al*., 2020). As raízes em *hairy root* são induzidas pela bactéria devido à presença do plasmídeo bacteriano Ti, que, durante a infecção, transfere segmentos de DNA (T-DNA) para o genoma da planta a partir da expressão de genes *rol* (rolA, rolB e rolC). Com a integração desses genes, existe uma indução a produção de hormônios vegetais, como auxinas e citocininas que induzem o crescimento de raízes (GANTAIT; MUKHERJEE, 2021).

O uso da plataforma de *Plant Molecular Farming* para a produção de proteínas heterólogas ou de outros compostos de interesse comercial apresenta como principal vantagem a produção em massa com um baixo custo, entretanto, questões de biossegurança limitam a implementação dessa plataforma (LUCHT, 2015). Nesse contexto, as *hairy roots* surgem como uma solução promissora, permitindo a produção segura e controlada de proteínas recombinantes em ambientes laboratoriais, mitigando os riscos associados à disseminação de organismos geneticamente modificados no ambiente. Diante disso, objetivou-se realizar uma revisão de literatura acerca das inovações com o uso de *hairy roots* para a produção de proteínas recombinantes.

Metodologia

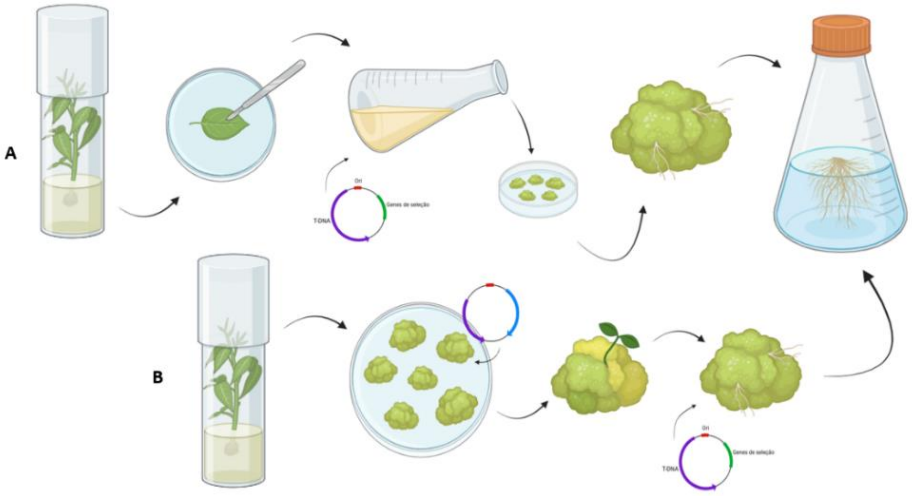
Realizou-se análise de dados secundários por meio de revisão de literatura, sendo Pubmed – MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*), *Science Direct*, NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e Periódicos Capes as plataformas de base de dados científicos relevantes utilizadas para a pesquisa de artigos relacionados à produção heteróloga em *hairy roots*. Os filtros de pesquisa foram ajustados para datas de publicação para os últimos 20 anos. Com a combinação de palavras-chave “hairy root”, “cultura”, “proteína recombinante”, “anticorpo” e “transformação” e seus correspondentes em inglês, foi possível realizar a coleta de dados, usando

como critério de inclusão a indexação nas bases de dados citadas anteriormente, revisão por pares e de conteúdo na íntegra, assim como aqueles que possuíam maior relação com o objetivo proposto para estudo e resultados satisfatórios.

Resultados

A partir de pesquisas sistematizadas sobre inovações em *hairy roots* voltadas para a produção de proteínas recombinantes e outros derivados, os resultados dos estudos que destacam os efeitos dos compostos produzidos estão apresentados na Tabela 1, detalhando os fragmentos expressos, suas funções específicas, o método de transformação, sendo ele direto e indireto (Figura 1), a abordagem de cultura, seu peptídeo sinal, e as referências bibliográficas que suportam os dados apresentados. Estes dados incluem, por exemplo, a produção de alguns fragmentos de anticorpos monoclonais, como scFvFc-2G8 e scFvFc-CD20 produzidas em *Nicotiana benthamiana*, ambos os fragmentos possuem funções, transformações, cultura e peptídeos distintos. O 2G8 age como um antimicrobiano contra a *Candida albicans*, sua transformação ocorre de forma direta e a cultura das raízes é através de frascos erlenmeyer. Já o CD20 está relacionado com regulação da ativação e proliferação de células do sistema imune B, sua transformação é indireta e a cultura das suas raízes é através de biorreatores. Estes dois exemplos, demonstram o quão amplo é a cultura de *hairy roots* para a produção de hormônios, fragmentos de anticorpos, vacinas, antimicrobianos e peptídeos.

Figura 1. Ilustração esquemática dos dois métodos abordados de indução de Hairy Root. Em (A) Transformação direta, em que discos de folhas são cocultivados com *Rhizobium rhizogenes*, realizando a inserção do T-DNA juntamente com a sequência do transgene; (B) Transformação indireta, na qual os discos foliares são previamente transformados por outro método, e então cocultivados com *R. rhizogenes* selvagem.



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 1 – Produção de proteínas recombinantes em *Hairy Root* via diferentes métodos de expressão (continua).

Fragmento expresso	Função do Composto	Planta Modelo	Transformação	Peptídeo Sinal	Abordagem da Cultura	Fonte
M1-IgG	Influencia a hemostasia e a malignidade do tumor	*Nicotiana tabacum*	Indireta	-------	Biorreator	MADEIRA *et al.*, 2016
scFvFc CD20	Atua na regulação da ativação e proliferação das células B	*Nicotiana benthamiana*	Indireta	Faseolina	Biorreator	MOORE *et al.*, 2023

Tabela 1 – Produção de proteínas recombinantes em *Hairy Root* via diferentes métodos de expressão (conclusão).

Fator de Crescimento Epidérmico (hEGF)	Proteína reguladora de ciclo celular	*Nicotiana tabacum*	Indireta	Derivado de AP24 osmotina	Frascos de agitação	PARSONS *et al*., 2010
Dermaseptin B1 (C2-B1)	Antimicrobiano	*Nicotiana tabacum*	Direta e Indireta	AVR4	Biorreator	VARASTEH-SHAMS *et al*., 2020
Proteína Globular adiponectina (gAd)	Proteína tipo adipocina de uso farmacêutico	*Withania somnifera*	Direta	Calreticulina	Frascos de agitação	DEHDASHTI *et al*., 2020
Antígeno de Superfície da Hepatite B (HBsAg)	Vacina	Batata var. Kufri Bahar	Direta	KDEL (ER-retention signal)	Frascos de agitação	KUMAR *et al*., 2006
Miraculina	Substituto de adoçantes artificiais	*Nicotiana tabacum*	Direta	--------	Frascos de agitação	HONG *et al*., 2020
Taumatina I	Substituto de adoçantes artificiais	*Nicotiana tabacum*	Direta	Calreticulina (ER-retention signal)	Frascos de agitação	PHAM *et al*., 2011
Eritropoietin a (rhEPO)	Influência a produção de eritrócitos	*Nicotiana tabacum*	Direta	Calreticulina (ER-retention signal)	Frascos de agitação	GURUSAMY *et al*., 2017
Lactoferrina	Atua na defesa de infecções microbianas	*Nicotiana tabacum*	Direta	KDEL (ER-retention signal)	Frascos de agitação	CHAHARDOLI *et al*., 2017
scFvFc 2G8	Fragmento de anticorpo contra *Candida albicans*	*Nicotiana benthamiana*	Direta	Imunoglobulin a embrionária derivada	Frascos de agitação	CATELLANI *et al*., 2020
IgG1 cadeia única	Fragmento de anticorpo (sem alvo informado)	*Nicotiana tabacum*	Transferência de rol genes	Sequência Calreticulina	Frascos de agitação	KOMARNYTSKY *et al*., 2006
Cepropina A	Peptídeo antimicrobiano (AMP)	*Nicotiana tabacum*	Direta	KDEL (ER-retention signal)	Frascos de agitação	HASHEMI *et al*., 2020
H10	Anticorpo contra tenascina C associada a tumor	*Nicotiana benthamiana*	Direta	Imunoglobulin a embrionária derivada	Frascos de agitação	LONOCE *et al*., 2016
Ácido Hialurônico (HÁ)	Produtor de ácido hialurônico humano	*Nicotiana tabacum*	Direta	KDEL (ER-retention signal)	Frascos de agitação	NAZERI *et al*., 2021

Fonte: Elaborado pelo autor.

Discussão

A técnica *Plant Molecular Farming* (PMF) é uma abordagem biotecnológica rápida, barata e de fácil manuseio para produzir proteínas recombinantes (SCHILLBERG *et al*., 2021). A cultura de *Hairy root*s tem sido uma das plataformas de PMF emergentes de expressão recombinante em plantas, com avanço nas últimas décadas principalmente em plantas medicinais e aromáticas para a obtenção de metabólitos secundários mais econômicos, visto serem significativamente importantes por suas propriedades etnobotânicas e farmacológicas (AWERE *et al*., 2024). A revisão contou com 15 estudos de raízes "*hairy roots*" (Tabela 1). Constatou-se que apenas duas espécies de *Nicotiana* foram utilizadas para implementação de raízes cabeludas nos artigos, *Nicotiana tabacum* (principalmente cv. Xanthi) e *Nicotiana benthamiana*. Embora a diversidade de espécies usadas seja limitada, as produções de proteínas recombinantes relatadas na literatura diferem significativamente umas das outras, como por exemplo o uso de *Withania somnifera* para produção de proteínas tipo gAd (DEHDASHTI *et al*., 2020) e a batata para produção de vacina (HBsAg) (KUMAR *et al*., 2006).

Constatou-se diferentes métodos de transformação genética em plantas, como vetores virais, protoplastos, biolística e transferência genética com cepas bacterianas de *Rhizobium*. Independentemente do protocolo de inserção de genes, a transformação de *hairy roots* requer que os genes rol sejam transferidos para a planta em algum momento (ARAGÃO *et al*., 2023). Dessa forma, analisamos dois métodos que proporcionam rendimentos e gastos distintos, para estabelecer essas raízes recombinantes, a primeira é a via indireta, onde uma *Rhizobium rhizogenes* selvagem transfere os genes rol para uma planta transgênica (Figura 1). A segunda é a forma direta, na qual genes de *Rhizobium rhizogenes* contendo o vetor plasmidial medeiam a inserção do T-DNA, incluindo os genes rol, juntamente com a sequência do transgene (FALLAH *et al*., 2018). Na maioria dos artigos, segue-se somente um protocolo, porém Varasteh-Shams (2020) comparou as duas técnicas de transformação, indicando que *hairy roots* no método indireto produzem maior teor de proteína do que no método direto. Segundo Fallah (2018), apesar de ser um processo de cultura de tecido mais longo, o método de indução indireta de raízes peludas é o método mais adequado para atingir maior expressão de proteína recombinante.

Os peptídeos sinal desencadeiam mudanças no crescimento da biomassa, nas propriedades da cultura do meio e no rendimento de proteína recombinante (GURUSAMY *et al*., 2017). Os autores geralmente escolhem entre dois peptídeos para a produção de *hairy roots* em *Nicotiana*, o KDEL, um sinal de retenção C-terminal que resulta no acúmulo de proteína no lúmen do retículo endoplasmático (CHAHARDOLI *et al*., 2017). E a calreticulina N-terminal, que promove o acúmulo no meio de cultura ou seja, resulta em um aumento de proteína recombinante rizosecretada (KOMARNYTSKY *et al*., 2006). Além destes peptídeos, os autores Catellani (2020) e Lonoce (2016) utilizaram uma sequência de peptídeo de sinal derivada de um gene de codificação de imunoglobulina de camundongo embrionário, usada para direcionar o anticorpo recombinante para o caminho secretor.

Culturas de *hairy roots*, quando otimizadas para culturas líquidas, podem ser cultivadas em biorreatores em escala industrial, fornecendo uma fonte conveniente, abundante e sustentável de produtos (VARASTEH-SHAMS *et al*., 2020). Devido à sua facilidade de propagação e crescimento em ambientes confinados, começaram a serem usadas na síntese de proteínas terapêuticas recombinantes, especialmente aquelas que têm sido desafiadoras para expressar em bactérias, leveduras e sistemas de expressão de mamíferos (ONO *et al.,* 2011). Está revisão constatou a produção de hormônios, vacinas, antimicrobianos, anticorpos, proteínas de uso industrial e médica e peptídeos. Essa gama de compostos que podem ser produzidos na técnica de *hairy roots*, demonstra sua vasta aplicabilidade na *Plant Molecular Farming*.

Conclusão

Concluiu-se que a técnica de *Hairy Roots* possui uma vasta aplicabilidade na produção de compostos heterólogos em plantas, com importância industrial, comercial e médica.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Juiz de Fora e à Fapemig pelo apoio.

Referências

ARAGÃO, M. M. *et al*. Nicotiana hairy roots for recombinant protein expression, where to start? A systematic review. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 5, p. 4587-4604, 2023.

AWERE, C. O. *et al*. Hairy-Root Technology: A Metabolic Engineering Tool and Specialized Metabolite Pathway Elucidation and production of Secondary Metabolites. A Review. **Results in Engineering**, p. 102697, 2024.

BOCCIA, E. *et al.* Plant hairy roots for the production of extracellular vesicles with antitumor bioactivity. ***Commun Biol*** 5, 848 (2022).

CATELLANI, M. *et al.* Optimised production of an anti-fungal antibody in *Solanaceae* hairy roots to develop new formulations against *Candida albicans*. ***BMC Biotechnol*** 20, 15 (2020).

CHAHARDOLI, M; *et al*. Recombinant production of bovine Lactoferrin-derived antimicrobial peptide in tobacco hairy roots expression system. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 123, p. 414-421, 2018.

DEHDASHTI, S. M. *et al*. Production of pharmaceutical active recombinant globular adiponectin as a secretory protein in Withania Somnifera hairy root culture. **Journal of Biotechnology**, v. 323, p. 302-312, 2020.

FALLAH, A. *et al*. Production of recombinant LSC protein in Nicotiana tabacum hairy root: direct vs. indirect, a comparison. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2018.

GANTAIT, Saikat; MUKHERJEE, Eashan. Hairy root culture technology: applications, constraints and prospect. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 35-53, 2021.

GIANG, N. T. *et al*. Enhanced expression of recombinant miraculin, a tasting modifying protein, in Nicotiana tabacum hairy roots using 18.2 heat shock protein promoter and terminator. **Vietnam Journal of Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 349-358, 2021

GURUSAMY, P. D. *et al*. Biologically active recombinant human erythropoietin expressed in hairy root cultures and regenerated plantlets of Nicotiana tabacum L. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. e0182367, 2017.

GUTIERREZ-VALDES, N. *et al*. Hairy root cultures—a versatile tool with multiple applications. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 33, 2020.

HASHEMI, S. *et al*. Successful use of Nicotiana tabacum hairy roots for the recombinant production of Cecropin A peptide. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 3, p. 876-886, 2022.

JEZIOREK M. *et al*. Hairy Root Cultures for the Production of Anti-cancer Naphthoquinone Compounds. **Curr Med Chem**. 2018;25(36):4718-4739. doi: 10.2174/0929867324666170821161844. PMID: 28828978.

JIN, U. H. *et al*. Sesame hairy root cultures for extra-cellular production of a recombinant fungal phytase. **Process biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3754-3762, 2005.

KOMARNYTSKY, S. *et al*. Cosecretion of Protease Inhibitor Stabilizes Antibodies Produced by Plant Roots, ***Plant Physiology***, Volume 141, Issue 4, August 2006, Pages 1185–1193.

Li C, Wang M. Application of Hairy Root Culture for Bioactive Compounds Production in Medicinal Plants. **Curr Pharm Biotechnol**. 2021;22(5):592-608. doi: 10.2174/1389201021666200516155146. PMID: 32416672.

LIU, C. *et al*. Production of mouse interleukin-12 is greater in tobacco hairy roots grown in a mist reactor than in an airlift reactor. **Biotechnology and bioengineering**, v. 102, n. 4, p. 1074-1086, 2009.

LIU, L. *et al*. An efficient genetic transformation system mediated by Rhizobium rhizogenes in fruit trees based on the transgenic hairy root to shoot conversion. **Plant Biotechnol J**. 2024.

LUCHT, Jan M. Public acceptance of plant biotechnology and GM crops. **Viruses**, v. 7, n. 8, p. 4254-4281, 2015.

LONOCE, C. *et al*. Enhancing the secretion of a glyco-engineered anti-CD20 scFv-Fc antibody in hairy root cultures. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 3, p. 1800081, 2019.

MADEIRA, L. M. *et al*. High-yield production of a human monoclonal IgG by rhizosecretion in hydroponic tobacco cultures. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 2, p. 615-624, 2016.

NAZARI, A. *et al*. Heterologous production of hyaluronic acid in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing a human hyaluronan synthase 2. *Sci Rep* **11**, 17966 (2021).

ONO, Nadia N.; TIAN, Li. The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities. **Plant Science**, v. 180, n. 3, p. 439-446, 2011.

PARSONS, J. *et al*. Production of human epidermal growth factor (hEGF) by in vitro cultures of Nicotiana tabacum: effect of tissue differentiation and sodium nitroprusside addition. 2010.

PHAM, N. B. *et al*. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures. **Biotechnology journal**, v. 7, n. 4, p. 537-545, 2012.

SCHILLBERG, S., FINNERN, R. Plant molecular farming for the production of valuable proteins - Critical evaluation of achievements and future challenges. **J Plant Physiol** 258–259:153359. (2021)

VARASTEH-SHAMS, M. *et al*. The direct and indirect transformation methods on expressing a recombinant Dermaseptin peptide in tobacco transgenic hairy root clones. **Current Plant Biology**, v. 24, p. 100177, 2020.

ZHU, Yutao *et al*. Plant hairy roots: Induction, applications, limitations and prospects. **Industrial Crops and Products**, v. 219, p. 119104, 2024.