

Taxol (Paclitaxel)

Subota, Kristian

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:642009>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Kristian Subota

Taxol (Paclitaxel)

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Kristian Subota

Taxol (Paclitaxel)

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Biologija na zavodu za biokemiju, kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Marka Močiboba.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Taxol (Paclitaxel)

Kristian Subota

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Taxol (Paclitaxel), tetraciklički diterpen, je sekundarni metabolit biljnog porijekla s antitumorskim svojstvima kojeg sintetiziraju stabla roda *Taxus*. Prvi put je izoliran iz kore biljke *Taxus baccata* početkom druge polovice 20. stoljeća, skoro nijedan drugi lijek nije zaplijenio pažnju javnosti kao paclitaxel. Njegov uspjeh u tretmanu mnogo vrsta tumora je od velike važnosti. Veže se na β -tubulin i ometa dinamiku mikrotubula inhibirajući njihovu depolimerizaciju, za razliku od ostalih agensa koji djeluju na mikrotubule, poput vinkristina i vinblastina koji onemogućuju polimerizaciju. Apoptozu stanica uzrokuje inhibicijom staničnog ciklusa, no i sekundarnim genetskim mehanizmima. Njegova ekstremno niska prirodna zastupljenost primorala je na traženje alternativnih puteva proizvodnje poput kulture stanica, bakterijskih kultura, endofita, kompletne sinteze i polusinteze. Taxol posjeduje vrlo kompleksnu biosintezu koja uključuje više od 19 koraka, i do danas nisu svi enzimi koji sudjeluju u potpunosti okarakterizirani. Uz to, glavni izazovi za buduća istraživanja su pronalazak ekonomski isplativog puta proizvodnje Taxola mikroorganizmima i povećanje biodostupnosti lijeka nanotehnologijom bez negativnih utjecaja na zdravlje pacijenata.

Ključne riječi: antineoplastik, mikrotubuli, apoptoza, karcinom, biosinteza, biotehnologija
(30 stranica, 6 slika, 0 tablica, 79 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: doc. dr. sc. Marko Močibob

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Taxol (Paclitaxel)

Kristian Subota

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Taxol (Paclitaxel), a tetracyclic diterpene, is a secondary metabolite of plant origin with antitumoral activity. It is synthesized by trees of the genus *Taxus* and it was first extracted from the bark of *Taxus baccata* in the 1960s, no other drug attracted so much media attention since. Its success in the treatment of a variety of cancers is of great importance. It binds to β -tubulin and disrupts the microtubular dynamics through inhibition of their depolymerization, unlike other microtubule targeting agents like vinblastine and vincristine which disable the polymerization. Cell apoptosis is caused by the arrest of the cell cycle but also by exerting effects on gene expression. Its extremely low natural occurrence in the yew bark forced the search for alternative production sources such as harvesting it from cell culture, bacterial cultures, endophytes, total synthesis and semi-synthesis routes. Taxol has an extremely complicated biosynthesis pathway which has over 19 steps in total, and still today some of the enzymes involved have not been characterized. Besides that, main challenges for the future development and research include finding an economically viable microbial way of production, increasing bioavailability of the drug by nanotechnology without adverse effects on patients health.

Keywords: antineoplastic, microtubules, apoptosis, cancer, biosynthesis, biotechnology
(30 pages, 6 figures, 0 tables, 79 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: doc.dr.sc. Marko Močibob

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Kemija paclitaxela.....	3
3. Biosinteza paclitaxela	4
3.1. Analiza ekspresije gena biosintetskog puta	6
4. Mehanizmi djelovanja paclitaxela.....	8
4.1. Mikrotubuli	8
4.2. Genetski mehanizmi.....	9
4.3. Oksidativni stres.....	11
5. Mehanizmi rezistencije na paclitaxel	12
5.1. ATP-binding cassette	12
5.2. Toll-like receptor 4	12
5.3. Receptori tirozin-kinaze	12
5.4. Txr1.....	13
5.5. Forkhead protein	13
5.6. Metabolički putevi rezistencije	13
5.7. Mitogen-aktivirane protein-kinaze.....	13
6. Nanotehnološke formulacije s paclitaxelom	15
7. Biotehnologija i sintetska biologija paclitaxela	17
7.1. Kultura stanica	17
7.2. Citokrom P450 hidroksilaze.....	18
7.3. Taksadien-sintaza.....	19
7.4. 10-deacetylbaaccatin III-10-O-acetiltransferaza.....	19
8. Zaključak	23
9. Literatura.....	24
10. Životopis.....	30

1.Uvod

Taxol (Paclitaxel) je biljni sekundarni metabolit s antineoplastičnim citostatskim svojstvima, prvi je otkriveni agens koji hiperstabilizira mikrotubule. Interagira s β -tubulinom i onemogućuje depolimerizaciju mikrotubula.

Taxol je prvi identificirao Dr. Jonathan L. Hartwell koji je 1960ih u sklopu ustanove „National Cancer Institute“ Sjedinjenih Američkih Država provodio testiranje molekula biljnog porijekla za antitumorske agense. Proizvodnja lijeka je postala skupa za državu i odlučilo se prodati prava na lijek privatnom sektoru, 1991. godine tvrtka Bristol-Myers-Squibb je preuzela prava i stavljen je zaštitni znak na ime Taxol, od tad je generički naziv paclitaxel.

Taxoidi su ciklički diterpeni koji sadržavaju u svojoj strukturi karakteristični taksadienski kostur. Paclitaxel se nalazi u biljkama roda *Taxus* te je prvi put izoliran iz vrste *Taxus baccata* L. Ima ekstremno značajnu ulogu u medicini, koristi se u liječenju više tipova karcinoma. Iako je vrlo uspješan u kliničkoj primjeni ima i neželjenih karakteristika, poput razvitka rezistencije stanica na paclitaxel, ili vrlo male topljivosti u vodi, te skupe i komplicirane proizvodnje lijeka.

Biosinteza paclitaxela ima bar 19 koraka, počinje mevalonatnim ili metil-eritrol-fosfatnim putem kojima se sintetizira geranilgeranil-pirofosfat, zatim taksadien-sintaza katalizira sintezu kostura paclitaxela, taksadiena. Slijedi hidroksilacija taksadiena na C10, C1, C2, C4, C7 i C13 citokrom P450 hidroksilazama. Zatim 2-debenzoiltaksan prolazi benzoilaciju do 10-deacetilbaccatina III na koji se pripaja acilna skupina i nastaje baccatin III. Slijedi pripajanje fenilalanin deriviranog lanca na C13 poziciji za nastanak fenilalanil baccatina III koji prolazi još jednu hidroksilaciju i jednu benzoilaciju na bočnom lancu (Liu i ostali, 2016). Paclitaxel inducira apoptozu putem zaustavljanja staničnog ciklusa u G2/M fazi (Giannakakou i ostali, 2001) i djelujući na ekspresiju i aktivnost pro-apoptotskih i anti-apoptotskih proteina (Whitaker & Placzek, 2019).

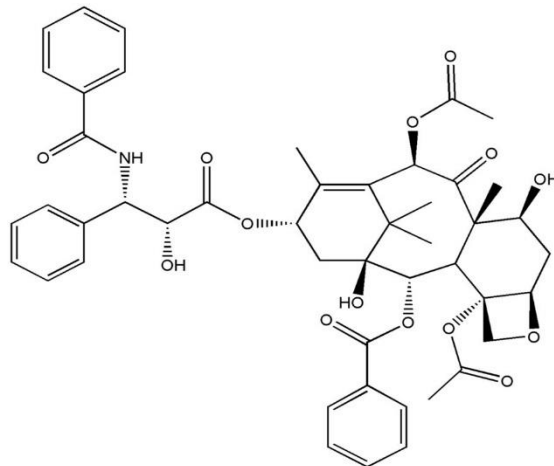
Ekstrahiranje paclitaxela iz kore tise, gdje mu je udio svega 0,069%, u vrijeme otkrića lijeka je devastiralo prirodne populacije tih stabala i dovelo tisu do ugroženosti. Takav način proizvodnje

nije bio dugoročno održiv te je sve veća potražnja za paclitaxelom prisilila na potragu za alternativnim načinima proizvodnje (Sabzehzari i ostali, 2020).

Loša topljivost paclitaxela u vodi dovela je do potrebe za nanotehnološkim rješenjima poput konjugacije paclitaxela na proteine ili RNA i punjenje membranskih liposoma lijekom (Ong i ostali, 2016). Glavni cilj trenutnih i budućih istraživanja je optimizacija i razvitak ekološki prihvatljivih biotehnoloških rješenja za proizvodnju paclitaxela i minimizacija rezistencije koju razvijaju mnoge stanice tretirane paclitaxelom (Gallego-Jara i ostali, 2020).

2. Kemija paclitaxela

Paclitaxel je jedan od najkompleksnijih sekundarnih metabolita izoliranih iz biljaka čija struktura mu daje antineoplastična svojstva. Empirijska formula paclitaxela je $C_{47}H_{51}NO_{14}$, molekularne mase 853,9 g/mol. Prema IUPAC nomenklaturi ime taxola je (2 α ,4 α ,5 β ,7 β ,10 β ,13 α)-4,10-bis(acetiloksi)-13-[[[(2R,3S)-3-(benzoilamino)-2-hidroksi-3-fenilpropanoil]oksi]-1,7-dihidroksi-9-okso-5,20-epoksitaks-11-en-2-il benzoat. Molekularna struktura paclitaxela prikazana je na slici 1. Paclitaxel ima 11 kiralnih atoma ugljika, sastoji se od dva dijela, taksanski prsten na kojem se nalazi postrani četveročlani oksetanski prsten pozicioniran na C4 i C5 ugljikovim atomima i bočni homokiralni esterski lanac pozicioniran na C13 ugljikovom atomu (Kampan i ostali, 2015).

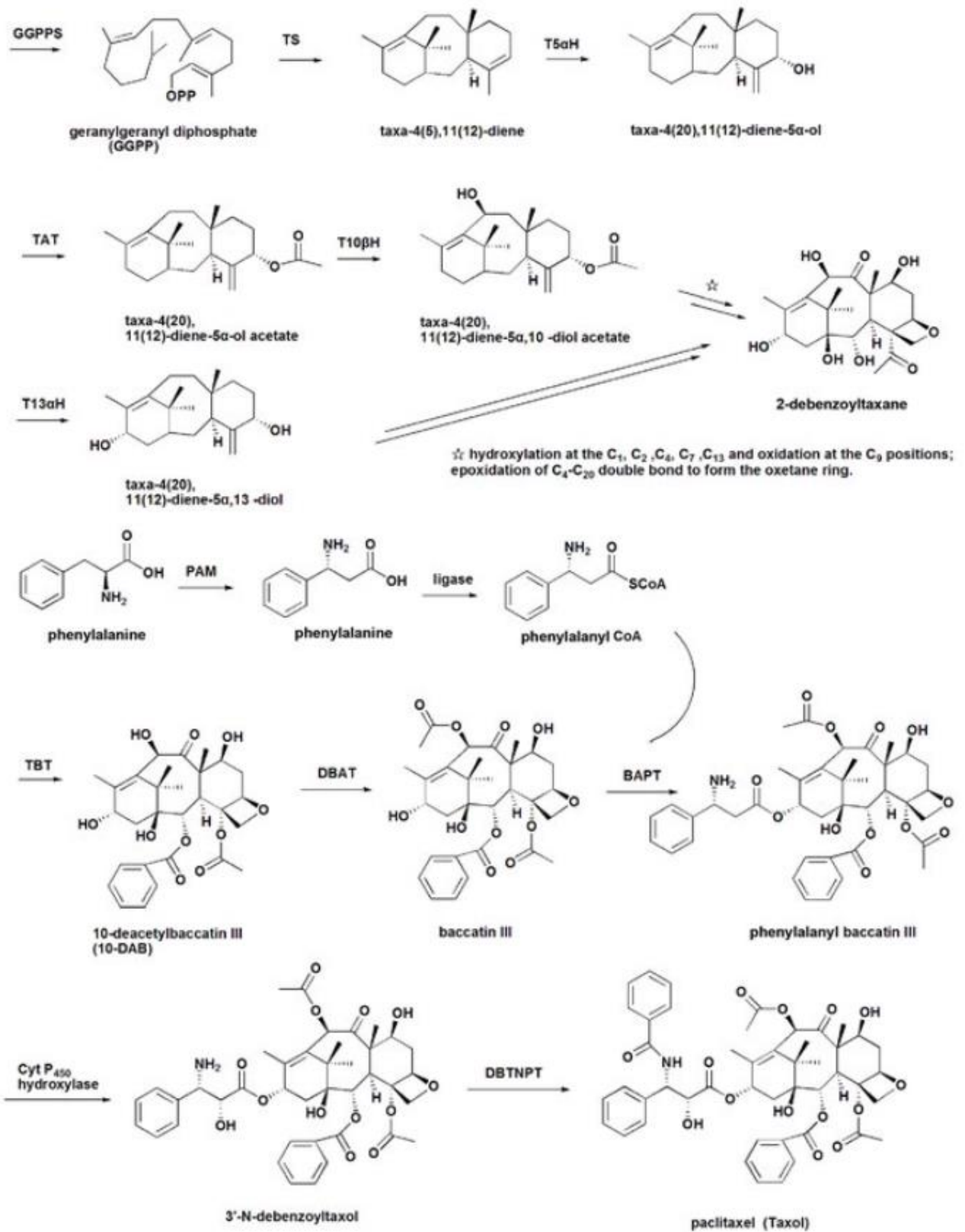


Slika 1: Molekularna struktura paclitaxela preuzeto od C.-P. Yang & Horwitz, 2017

Čisti paclitaxel je bijeli kristalični prah topiv u dimetil sulfoksidu (Stierle i ostali, 1993) (50 mg/cm^3) i metanolu (50 mg/cm^3). Topljivost u vodi je oko $0,4 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$. U kiselim uvjetima dođe do degradacije molekule, na primjer u koncentriranoj klorovodičnoj kiselini. Etanska kiselina (0,1%) dodana otopini metanola pospješuje stabilnost molekula paclitaxela u otopini, usporava degradaciju i do 7 dana na sobnoj temperaturi, omogućuje i skladištenje lijeka na $4 \text{ } ^\circ\text{C}$, do 3 mjeseca. Također, paclitaxel je topljiv u etanolu i acetonitrilu. Najmanje razine degradacije molekula Taxola su uočene pri pH 3-5. Otopine (pripremljene injekcije) paclitaxela (1 mg/mL) su ostale aktivne do 3 dana u 5% dekstrozi pri temperaturi od 22°C te pri 32°C u 0,9% otopini natrijeva klorida. Temperatura raspada je pri $200\text{-}220 \text{ } ^\circ\text{C}$ (Nikolic i ostali, 2011).

3. Biosinteza paclitaxela

Biosinteza Taxola počinje, kao i kod ostalih diterpenskih metabolita, od geranilgeranil-difosfata čiji se prekursori sintetiziraju mevalonatnim putem ili putem metil-eritrol-fosfata. Mevalonatni sintetski put podrazumijeva sintezu prekursora geranilgeranil-difosfata, izopentenil-pirofosfata i dimetilalil-pirofosfata iz tri molekule acetil-CoA, dok u putu metil-eritrol-fosfata se izopentenil-pirofosfat i dimetilalil-pirofosfat sintetiziraju kondenzacijom piruvata i gliceraldehid-3-fosfata (Bach i ostali, 1999). Nadalje izopentenil-pirofosfat i dimetilalil-pirofosfat su supstrati enzima geranil-pirofosfat-sintaze koja sintetizira geranil-pirofosfat te nakon toga farnezil-pirofosfat koji je dalje supstrat enzimu geranilgeranil-pirofosfat-sintazi (GGPP-sintaza). U posljednja dva desetljeća je izolirano i klonirano trinaest gena čiji produkti sudjeluju u biosintetskom putu paclitaxela. Geni koji kodiraju za GGPP-sintazu, taksadien-sintazu, šest enzima iz obitelji citokrom P450 i tri acetiltransferaze. Formiranje geranilgeranil-difosfata je katalizirano GGPP-sintazom, geranilgeranil-difosfat dalje prolazi ciklizaciju kataliziranu taksadien-sintazom da bi se sintetizirao taksa-4(5),11(12)-dien (Croteau i ostali, 2006). Nakon slijedi niz hidroksilacija i acilacija taxanske jezgre u kojima sudjeluju enzimi taksan 2 α -O-benzoiltransferaza, taksadien-5 α -ol-O-acetil transferaza, taksoid-2 α -hidroksilaza, taksoid-5 α -hidroksilaza, taksoid-7 β -hidroksilaza, taksoid-10 β -hidroksilaza i taksoid-13 α -hidroksilaza (Jiang i ostali, 2021). U nekim istraživanjima je pronađeno da je konverzija 10-deacetilbaccatin III u baccatin III provođena enzimom 10-deacetilbaccatin III-10-O-acetiltransferazom ograničavajući korak u biosintetskom putu (Nasiri i ostali, 2016). Fenilalanin-aminomutaza katalizira konstrukciju fenilalanin deriviranog bočnog lanca na C13 koji se pripaja na baccatin III aktivnošću enzima baccatin III-3-amino,3-fenilpropanoiltransferaze (Jennewein, Wildung, i ostali, 2004). Posljednja dva koraka u biosintezi paclitaxela kataliziraju jedna od citokrom P450 hidroksilaza i 3'-N-debenzoil-2'-deoksitaxol-N-benzoiltransferaza (Kashani i ostali, 2018). Na slici 2. prikazana je biosinteza paclitaxela.



Slika 2. Biosintetski put paclitaxela: Prvi korak gdje se ireverzibilno posvećuje biosintezi paclitaxela je ciklizacija GGPP do taksadiena enzimom taksadien-sintazom, nakon čega slijedi 8 citokrom P450 posredovanih hidrosilacija, dvije acilacije, jedna benzoilacija, nastajanje oksetanskog prstena i oksidacija na C9 do baccatina III, na čiji se C13 atom pripaja fenilalanin deriviran bočni lanac da bi se došlo do finalnog produkta paclitaxela (B.-J. Li i ostali, 2017). Preuzeto od Liu i ostali, 2016 .

No neki od gena u biosintetskom putu još ostaju neistraženi, potrebno je identificirati enzime taxoid-1 β -hidrosilazu, taksoid-9-keto-oksidadu, β -fenil-alanoil-CoA-ligazu, te one odgovorne za epoksidaciju na C4 i C5 i formaciju oksetanskog prstena (Y. Li i ostali, 2015).

3.1. Analiza ekspresije gena biosintetskog puta

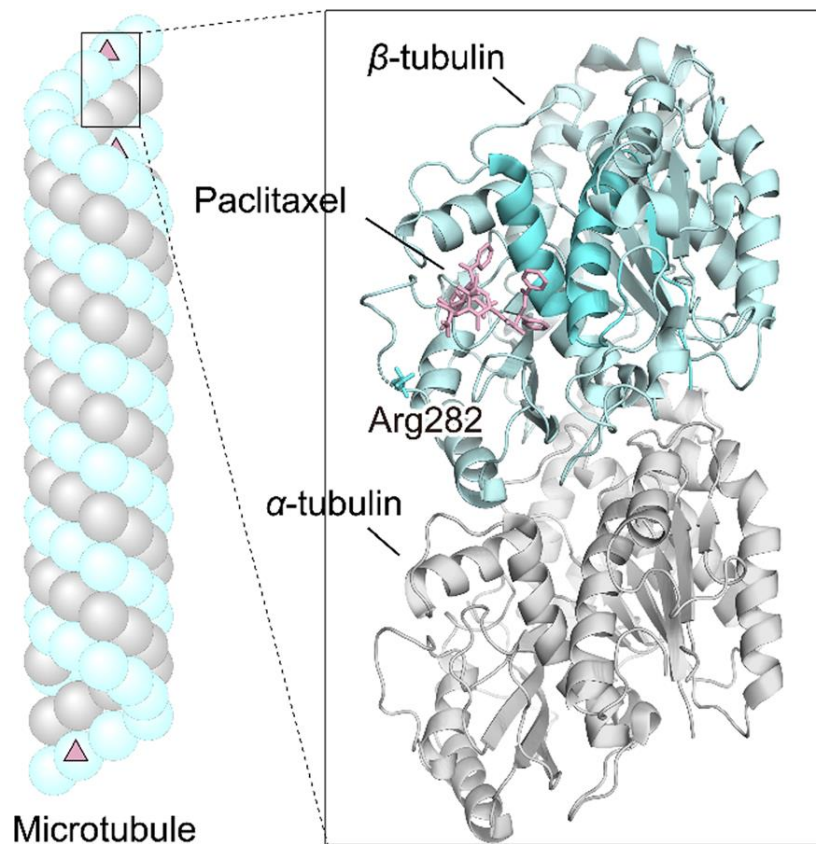
Bioinformatičkim analizama promotorskih regija poznatih ključnih biosintetskih enzima za sintezu Taxola (GGPP-sintaza, taksadien-sintaza, taksan 2 α -O-benzoiltransferaza, taksadien-5 α -ol-O-acetil-transferaza, taksoid-2 α -hidrosilaza, taksoid-5 α -hidrosilaza, taksoid-7 β -hidrosilaza, taksoid-10 β -hidrosilaza, taksoid-13 α -hidrosilaza, fenilalanin-aminomutaza, baccatin III-3-amino,3-fenilpropanoil-transferaza, 10-deacetilbaccatin III-10-O-acetiltransferaza, 3'-N-debenzoil-2'-deoksitaxol-N-benzoil-transferaza), pronađena je prisutnost određenih cis-elemenata. Osmam gena povezanih s biosinteziom taxola su imali osnovne elemente poput G-boxa (osim baccatin III-3-amino,3-fenilpropanoil-transferaze), komponente odgovorne za reakcije na hormone poput elementa za odgovor na auksin, ABA-u, giberelin (P-box, TATC-box), metil-jasmonat (CGTCA-motiv i TGACG-motiv) i salicilnu kiselinu. Uz ovo pronađeni su i elementi za odgovore na abiotičke stresne uvjete poput suše, niske temperature i visoke temperature. Također, programom Plant-MPloc napravljena su predviđanja za substaničnu lokalizaciju ovih proteina (koji ima uspješnost predviđanja od 63,7% (Chou & Shen, 2010)), P450 hidrosilazni proteini su lokalizirani u endoplazmatskom retikulumu, dok su acetil-transferaze u citoplazmi, a fenilalanin-aminomutaza u jezgri, GGPP-sintaza u kloroplastu i plastidima dok taksadien-sintaza u kloroplastu. Analizirana je ekspresija određenih gena RNA-seq metodom u različitim stresnim uvjetima i u prisutnosti određenih hormona. Pri niskim temperaturama ekspresija taksadien-sintaze, GGPP-sintaze, 10-deacetilbaccatin III-10-O-acetiltransferaze, taksoid-10 β -hidrosilaze, taksoid-5 α -hidrosilaze, i taksadien-5 α -ol-O-acetil-transferaze je bila povećana, dok je hladnoća

suprimirala transkripciju taksoid-2 α -hidroksilaze, taksan 2 α -O-benzoil-transferaze, taksoid-7 β -hidroksilaza i fenilalanin-aminomutaze. Nakon tretmana s GA₃ uočilo se povećanje ekspresije 11 od 13 gena, razina ekspresije taksoid-10 β -hidroksilaze i taksoid-7 β -hidroksilaze nije se promijenila. Transkripcija svih 13 gena se značajno povećala nakon tretmana s metil jasmonatom. Također, većina gena je bila pozitivno regulirana nakon izlaganja suši, povišenom salinitetu i koronatinu. Ove analize transkripcije gena za biosintezu paclitaxela mogu uputiti na obrambenu ulogu paclitaxela od stresnih uvjeta (Jiang i ostali, 2021).

4. Mehanizmi djelovanja paclitaxela

4.1. Mikrotubuli

Paclitaxel je agens koji stabilizira mikrotubule, veže se u hidrofobni džep na β -tubulinu. Hiperstabilizacijom tubulinskih polimera, to jest ojačavanjem lateralnih interakcija između tubulinskih protofilamenata (H. Li i ostali, 2002) utječe na dinamiku mikrotubula i vodi apoptozi. Mikrotubuli imaju mnogo bitnih uloga u stanici, sudjeluju u pravilnoj segregaciji kromosoma u mitozu, održavaju oblik stanice, djeluju u kontrakcijama i pokretljivosti stanice te transportu organela i makromolekula unutar same stanice. Na slici 3. je prikazan mikrotubul i vezno mjesto paclitaxela na β -tubulinu koje je istraživano primjenom analoga paclitaxela s fotoreaktivnim grupama na točno definiranim pozicijama molekule.



Slika 3. Mikrotubul i vezno mjesto paclitaxela: Plavom bojom su prikazani β -tubulini, a sivom α -tubulinski proteini, Taxol je obojan rozom bojom i na desnoj slici prikazan štapićastim modelom dok je na lijevoj slici prikazan kao rozi trokut. Također prikazan je i bočni lanac arginina na 282.

Poziciji koji je ključan za interakciju paclitaxela s β -tubulinom. Preuzeto od Tong i ostali, (2022) i uređeno.

4.2. Genetski mehanizmi

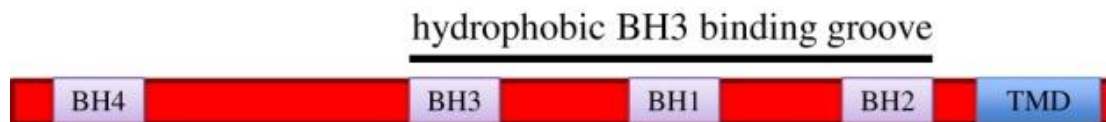
Paclitaxel inducira apoptozu na više načina, uzrokuje zastoj u staničnom ciklusu, utječe na ekspresiju gena poput JNK (Jo i ostali, 2016), p38-MAPK (Fan i ostali, 2020; Shen i ostali, 2017), NF κ B, TNF α (Janes i ostali, 2014) i gene iz obitelji Bcl-2 koji su povezani su apoptotskim putevima te inducira apoptotski put ovisan o kalciju (Whitaker & Placzek, 2019).

Paclitaxel izaziva zastavljanje staničnog ciklusa u G2/M fazi što uzrokuje apoptozu (Giannakakou i ostali, 2001), no neke stanice mogu probati izbjeći apoptozu bijegom iz mitoze. Takve stanice postanu polinuklearne i genom im nije stabilan. Negativnom regulacijom ekspresije Bcl-2 proteina te fosforilacijom (inaktivacijom) istih, paclitaxel inducira inhibiciju njihovih anti-apoptotskih djelovanja u stanici (Blagosklonny i ostali, 1996; Ren i ostali, 2018). Bcl-2 proteine možemo podijeliti na pro-apoptotske i anti-apoptotske koje dalje možemo podijeliti prema količini homolognih domena s Bcl-2, na one s više homolognih domena, efektorske proteine i samo s jednom Bcl-2 homolognom domenom (BH3), BH3 proteine, prikazano na slici 4. Fizičke interakcije između ovih pro-apoptotskih i anti-apoptotskih proteina su ključne u zaštiti stanice od unutarnjeg / mitohondrijski posredovanog puta apoptoze. Strukturne studije su pokazale da BH1, BH2 i BH3 domene zajedno formiraju hidrofobni džep kojim anti-apoptotski Bcl-2 proteini interagiraju sa svojim pro-apoptotskim rođacima kojima amfipatska α -zavojnica (BH3 domena) djeluje kao ligand. Održavanje ravnoteže ovih interakcija osigurava pravilan apoptotski odgovor na razvojne i stresorske signale (Campbell & Tait, 2018). Inaktivacijom anti-apoptotskih Bcl-2 proteina povećava se količina efektorskih BAX, BAK, BOK proteina, te to promovira oligomerizaciju istih. Aktivacija efektorskih proteina povećava permeabilnost vanjske membrane mitohondrija i aktivira, to jest otvara transmembranski protein mPTP na mitohondrijskoj membrani koji ispušta citokrom C iz mitohondrija u citosol što započinje kaskadu apoptotskog odgovora, vodeći do formacije apoptosoma i aktivacije kaspaza (Jo i ostali, 2016). Kod nekih staničnih linija poput karcinoma jajnika i leukemije pronađeno je da je Bcl-2 fosforilacija posredovana paclitaxelom neovisna o aktivaciji JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinaza/Stres Aktivirana Protein-Kinaza) (Attalla i ostali, 1998) puta dok drugi dokazi ukazuju da je paclitaxel posredovana inaktivacija anti-

apoptotskih Bcl-2 proteina ovisna o JNK/SAPK kaskadi, uobičajeno paclitaxel će aktivirati JNK, što će dovesti do fosforilacije Bcl-2 proteina i njegove disocijacije s BAX koji će migrirati u mitohondrij i inducirati mPTP posredovan izlazak citokroma C u citosol (Jo i ostali, 2016).

pro-survival

BCL2-like proteins—BCL2, MCL-1, BCLXL, BFL1/A1, BCLW



pro-apoptotic

effector proteins—BAX, BAK, BOK



BH3-only proteins — BIM*, BAD, BID, NOXA, PUMA, BMF, HRK*, BIK*



Slika 4. Bcl-2 obitelj proteina: sastoji se od anti-apoptotskih i pro-apoptotskih proteina, međusobno pro-apoptotske možemo dalje podijeliti prema broju Bcl-2 homolognih (BH) regija gdje efektorski proteini BAX, BAK, BOK imaju 3 BH regije dok BH3-only proteini imaju samo jednu, BH3 regiju. Efektorski proteini i neki BH3-only proteini (BIM, BIK, HRK) imaju transmembransku domenu koja im omogućuje pričvršćivanje u membrani. Preuzeto od Campbell i Tait, 2018.

Zabilježena je i indukcija senescencija-asocirane β -galaktozidaze u stanicama fibroblasta i vaskularnog endotela koje su izložene paclitaxelu, te povišena ekspresija p53 i p21 inhibitora staničnog ciklusa, koji sudjeluju u apoptozi uzrokovanoj senescencijom stanica dok je u stanicama vaskularnog endotela detektirana smanjena ekspresija endotelne NO sintaze (Peiris-Pagès, Sotgia, i ostali, 2015a) (Ota i ostali, 2009).

Stanice fibroblasta su pod tretmanom paclitaxelom pokazale i povećanu produkciju upalnih pokazatelja interleukina-6 i chemokin-ligand 5 (Peiris-Pagès, Smith, i ostali, 2015; Peiris-Pagès, Sotgia, i ostali, 2015). Paclitaxel je prepoznat kao jedan od uzročnika upale u leđnoj moždini gdje je pri kemoterapiji s paclitaxelom uočena proizvodnja ceramida i ceramid sfingozin-1-fosfata koji su dalje djelovali na S1P receptor podtip 1-ovisne neuroinflamatorne reakcije poput: aktivacije NF- κ B, ERK i MAP-kinaza, nakon čega je uslijedila povećana sinteza TNF α i IL-1 β (Janes i ostali, 2014).

4.3. Oksidativni stres

U mnogim istraživanjima paclitaxel je doveo stanice fibroblasta pod oksidativni stres tj. povećanu proizvodnju ROS (eng. *reactive oxygen species*) (Peiris-Pagès, Sotgia, i ostali, 2015) također je primjećena znatno snižena ekspresija anti-oksidativnih enzima poput superoksid-dismutaza i glutation-peroksidaza (Peiris-Pagès, Smith, i ostali, 2015). Također bitno za istaknuti je da većina ROS-ova generirana karcinogenim stanicama tretiranima paclitaxelom se nakuplja van stanica i tako dovodi i stanice u lokalnoj okolini do apoptoze (Alexandre i ostali, 2007).

5. Mehanizmi rezistencije na paclitaxel

5.1. ATP-binding cassette

Najčešći mehanizam rezistencije na paclitaxel uključuje proteine MDR-1 i P-glikoprotein. Oba proteina su članovi ATP-binding cassette obitelji proteina koji iskorištavanjem ATP-a translociraju mnoge supstrate preko membrana, u ovom slučaju translociraju paclitaxel van stanice (Ezrahi i ostali, 2019). Paclitaxel se veže na oba transportera s visokim afinitetom što uzrokuje smanjenu koncentraciju lijeka u stanicama i jaku rezistenciju na paclitaxel (Němcová-Fürstová i ostali, 2016; Szakács i ostali, 2006). Dakle nužno je koristiti inhibitore ovih proteina za efektivnu kemoterapiju, poput myricetina, ili G-quadruplex oligonukleotida koji snižavaju ekspresiju P-glikoproteina i MDR-1 te induciraju apoptozu stanica (Wang i ostali, 2015; Zheng i ostali, 2017).

5.2. Toll-like receptor 4

Paclitaxel se veže na MD-2 protein na staničnoj membrani (Zimmer i ostali, 2008), koji prenosi signal na toll-like receptor 4 inače odgovoran za obranu stanice od bakterijskog endotoksina, lipopolisaharida i puteve preživljavanja, tako i kod paclitaxel inducirane kaskade toll-like receptor 4 koja okida MyD88-ovisne odgovore tj. inducira aktivaciju više pro-onkogenih faktora, NF- κ B te transkripciju inflamatornih citokina i njihovih specifičnih receptora (Rajput i ostali, 2013). Ovo ukazuje na potrebu inhibicije toll-like receptor 4 signalnog puta za uspješnije rezultate kemoterapije.

5.3. Receptori tirozin-kinaze

Receptori tirozin-kinaze koji uključuju proteine EGFR, HER2, HER3, HER4, bitna je obitelj proteina za karcinogenezu, uloga receptora tirozin-kinaza je aktiviranje kaskade intracelularnih puteva preko ATP-posredovane autofosforilacije (Hynes & MacDonald, 2009). Mucin-1, transmembranski glikoprotein prekomjerno eksprimiran u stanicama karcinoma cerviksa uzrokuje kemorezistenciju na paclitaxel na EGFR-ovisan način. Tretman EGFR-inhibitorom Erlotinibom pokazao se kao učinkovit način senzitivizacije stanica karcinoma cerviksa na paclitaxel (Lv i ostali, 2019). Dok je druga studija (Gupta i ostali, 2019) pokazala povišenu ekspresiju HER2 i β -kateninskih signalnih puteva u metastatskim stanicama dojke rezistentnim na paclitaxel,

tretman Penfluoridolom suprimirao je spomenute signalne puteve i snizio rezistenciju na paclitaxel.

5.4. Txr1

Txr1 je transkripcijski faktor koji regulira ekspresiju thrombospondin 1 proteina koji dokazano regulira osjetljivost stanica na spojeve taksanske strukture (Lih i ostali, 2006).

5.5. Forkhead-protein

U stanicama karcinoma jetre pokazano je sudjelovanje *Forkhead*-proteina 1 u stvaranju rezistencije na paclitaxel preko signalnog puta koji uključuje povišenu ekspresiju prohibitin 1 proteina i aktivaciju FoxM1/PHB1/RAF-MEK-ERK kaskade (Huang i ostali, 2019). U recentnom istraživanju pokazano je da Aurora kinaza A dodatno stabilizira protein Fox-M1 u stanicama karcinoma dojke rezistentnim na paclitaxel te je obećavajuća meta za razvitak inhibitornih lijekova (N. Yang i ostali, 2019).

5.6. Metabolički putevi rezistencije

Povećana ekspresija enzima laktat-dehidrogenaza A je povezana s rezistencijom na paclitaxel. Selektivnim utišavanjem gena putem siRNA i koristeći ne-kompetitivni inhibitor laktat-dehidrogenaze, oxamat, uočeno je povećanje osjetljivosti stanica na paclitaxel. Ovime se laktat-dehidrogenaza pokazala kao obećavajuća meta za istraživanje poboljšanja kemoterapije (Zhou i ostali, 2010). Uz laktat-dehidrogenazu A još jedan enzim bitan u regulaciji glikolize i oksidativne fosforilacije se pokazao značajnim u indukciji rezistencije na paclitaxel: kinaza 2 piruvat-dehidrogenaze u stanicama karcinoma pluća. Utišavanjem ekspresije enzima putem siRNA i korištenjem PDK-2 inhibitora dikloroacetata postignuto je smanjenje rezistencije prema paclitaxelu (Sun i ostali, 2017).

5.7. Mitogen-aktivirane protein-kinaze

Mitogen-aktivirane protein-kinaze su se pokazale kao jedan od sudionika u razvijanju rezistencije na paclitaxel. Tema određenih istraživanja je inhibicija mitogen-aktiviranih protein-kinaza kod stanica tretiranih paclitaxelom što je bitno za poboljšanje efikasnosti kemoterapije. Octreotid se pokazao učinkovitim u inhibiciji fosforilacije p38-mitogen-aktivirane protein-kinaze te se uočilo

povećanje broja stanica koje su prošle apoptozu nakon tretmana s paclitaxelom u kombinaciji s octreotidom (Fan i ostali, 2020; Shen i ostali, 2017).

6. Nanotehnološke formulacije s paclitaxelom

Paclitaxel je molekula lipofilne prirode loše topljiva u vodi što otežava administraciju lijeka pacijentima. Taxol je formulacija lijeka paclitaxela s Cremophor EL (primarno konjugati polietilen glikola i etoksilirani glicerol) komponentom (Gelderblom i ostali, 2001), iako učinkovit u tretmanu raznih karcinoma, njegova terapijska upotreba je ograničena uslijed toksičnih efekata Cremophor EL-a koji nije biološki inertan: zabilježene su nuspojave poput anafilaktičkih hipersenzitivnih reakcija, hiperlipidemije, abnormalnih lipoproteinskih pojava i periferalne neuropatije. Preferabilna zamjena (van Zuylen i ostali, 2001) Taxolu je Abraxan gdje je paclitaxel vezan na albumin, no daljnji napredak se može postići kombiniranjem paclitaxela s nanonosaićima. Benefiti ovoga su održivo donošenje visokih koncentracija lijeka na ciljano tkivo, pasivno ciljanje tumorskog tkiva povećanim EPR (poboljšana permeabilnost i retencija) efektom (Acharya & Sahoo, 2011), smanjenje u ozbiljnosti i kolićini toksićnih ućinaka, prevencija biotransformacije lijeka u optićajnom sustavu.

Uspješno su napravljene nanoćestice od membrana makrofaga (Cao i ostali, 2020). Noviji pristup samo-sastavljajućim nanoćesticama pokazali su Feng i ostali, (2020), napravili su kombinaciju indocijanin zelene i paclitaxela sa 100% "utovarom" lijeka na sintetizirane nanoćestice bez ekscipijenata. Formulirane su nanoćestice koristeći RNA, sintetizirane su ćtverostrane RNA nanoćestice u obliku križa na koje se moglo kovalentno vezati 24 molekule paclitaxela. RNA nanoćestice su se zatim konjugirale s anti-EGFR aptamerima koji se selektivno vežu na stanice karcinoma dojke koje pretjerano ekspimiraju EGFR, postignuta je specifićna inhibicija tih stanica bez djelovanja na okolna tkiva (Feng i ostali, 2020). Površinsko modifiziranje nanoćestica potiće preciznije ciljanje željenih tkiva, takoder poboljšava vrijeme poluraspada nanoćestica (Madan i ostali, 2013; Zununi Vahed i ostali, 2018). Ciljanje tkiva se mođe postići konjugiranjem antitijela, aptamera ili peptida na površinu nanoćestica koji se specifićno vežu na visoko ekspimirane receptorske mete na stanicama (Fay & Scott, 2011; Ruoslahti, 2012). Testirani su i ućinci nanoćestićnih formulacija paclitaxela s poli(laktat-co-glikol) kiselinom na stanićnim linijama MCF-7 i Hep-G2, IC₅₀ koeficićjent poli(laktat-co-glikol)-paclitaxel nanoćestica je bio znaćajno niži od IC₅₀

samog paclitaxela, što znači da je ova nanočestična formulacija učinkovita. Također je primjećena snižena ekspresija gena koji sudjeluje u razvijanju rezistencije na paclitaxel Txr1 (Diab i ostali, 2020). Problem kod kancerogenih tkiva je njihova heterogenost u ekspresiji genoma, čemu se prišlo konjugiranjem dvaju antitijela, Trastuzumab (za HER2 receptor) i Panitumumab (za EGFR receptor), na polietilenglikol-poli(laktat-co-glikol) nanočestice (Houdaihed i ostali, 2020).

Formulacija nanočestica za kontrolirano otpuštanje aktivne tvari u ciljnim tkivima se može dobiti i na druge načine osim modifikacije površine nanočestica. Vanjski i unutarnji stimulusi se koriste za indukciju otpuštanja lijeka na nekom mjestu. Vanjski stimulusi koji mogu utjecati na otpuštanje lijeka u ciljnim tkivima su magnetno polje, ultrazvuk, zračenje itd., a unutarnji stimulusi pH ili redoks potencijal. Tumorska tkiva imaju jedinstven redoks-gradijent gdje je okolina visoko oksidativna uslijed velike količine otpuštenih ROS dok je citoplazma vrlo reduktivna zbog puno glutationa (Thakkar i ostali, 2020). Chen i ostali, (2018) dizajnirali su tioketal-nanočestice koje su bile reaktivne na ROS i glutation u okolini tumora, dok su Ganipineni i ostali, (2019) sintetizirali superparamagnetične Fe_3O_4 poli(laktat-co-glikol) nanočestice s paclitaxelom koje su otpuštale lijek u prisutnosti eksternog magnetnog polja (Ganipineni i ostali, 2019).

7. Biotehnologija i sintetska biologija paclitaxela

Od otkrića paclitaxela, glavni način proizvodnje ovog lijeka koji godišnje generira i do milijardu USD, bio je izolacija iz kore vrsta roda *Taxus*: *Taxus baccata*, *Taxus chinensis*, *Taxus brevifolia*, *Taxus canadensis* i *Taxus cuspidata*. Udio paclitaxela u kori ovih stabala je ekstremno nizak, do 0,069%, skoro 10000 kg kore stable roda *Taxus* potrebno je za proizvodnju 1 kg paclitaxela (Liu i ostali, 2016). Sazrijevanje kore tise je iznimno dugotrajan proces, stoga se tijekom zadnjih desetljeća okrenulo novim putevima dobivanja paclitaxela. Potpuna sinteza je također jedan od neisplativih i neodrživih načina proizvodnje uslijed visoke cijene reaktanata, velike količine toksičnih produkata reakcija i zbog opsežnog broja reakcija, čak 25-40, te teške kontrole uvjeta istih (Holton i ostali, 1994). Ovakav način proizvodnje još uvijek nije dosegao isplativost (Zhu & Chen, 2019). Trenutno se najviše paclitaxela i njegovog polusintetskog prekursora 10-deacetylbaaccatin III ekstrahira iz listova tj. bodlji i grančica *T. chinensis* i *Taxus × media*, vrsta dobivena hibridizacijom elitnih kultivara. Ovim putem ekstrakcija ne ubija biljku i omogućuje dugoročno održivu proizvodnju. Djelomična sinteza je drugi najvažniji oblik proizvodnje paclitaxela i podrazumijeva spajanje 10-deacetylbaaccatina III ili baaccatin III (Zhu & Chen, 2019) koji se simultano pojavljuje s paclitaxelom u biljci i jedan je od njegovih krajnjih prekursora i bočnog fenilalanin deriviranog lanca čiju pripremu opisuju Borah i suradnici (2007). Djelomična sinteza se može izvesti na primjer: Diels-Alder reakcijom, asimetričnim epoksidacijskim putem, enol-imin kondenzacijom i asimetričnom dvostrukom hidrosilacijom među ostalima (Zhu & Chen, 2019).

Potencijalni biotehnološki putevi koji su zanimljivi zadnjih godina za istraživanje su dobivanje paclitaxela iz kulture biljnih stanica, sintetskom biologijom, iz bakterijskih kultura i produkcija endofitskim gljivama.

7.1. Kultura stanica

Dobivanje paclitaxela iz kulture stanica ima mnoge prednosti, poput sterilnih uvjeta bez opasnosti od kontaminacije, neovisnost o povoljnim klimatskim uvjetima, kontinuitet u kvaliteti proizvoda te ekološke prihvatljivosti i dugoročne održivosti. Od najranijih pokušaja koji su davali prinose od 1-3 mg/L (AA Christen, 1989) napredovalo se u posljednjim godinama do 77,5-153 mg/L (Howat i

ostali, 2014). Optimizirani su mnogi parametri, poput osmotskog tlaka, izvora ugljikohidrata, sadržaja medija, koncentracije plinova, korištenja pojačivača produkcije kao metil-jasmonata, koronatina (Jiang i ostali, 2021), ekstrakta gljivičnih kultura, salicilne kiseline, vanadil sulfonata, chitosana, squalestatina i etilena (Chandran i ostali, 2020; Cusido i ostali, 2014). Zanimljiva je spoznaja istraživača Zhao i suradnika, 2016 koji su eksperimentirali s razinom otopljenog kisika medijima staničnih kultura gdje su metabolomičkim i transkriptomičkim profiliranjima vidjeli da se u niskim koncentracijama otopljenog kisika povećala produkcija paclitaxela i njegovih prekursora i do 3,4 puta u odnosu na srednju i visoku koncentraciju otopljenog kisika, također i putevi primarnog metabolizma su bili inducirani, glikolitički put glukoze-6-fosfat i fruktoze-6-fosfat do piruvata i mevalonatni put terpeneske sinteze. Također pod niskim koncentracijama otopljenog kisika povisile su se ekspresije citokrom P450 hidroksilaza.

Sintetska biologija se okreće uvođenju gena koji sudjeluju u biosintezi paclitaxela u heterologe sustave poput organizama *Escherichia coli* (Ajikumar i ostali, 2010), *Saccharomyces cerevisiae* (DeJong i ostali, 2006), *Arabidopsis thaliana* (Besumbes i ostali, 2004), čak i dijatomeje *Haslea ostrearia* (Athanasakoglou i ostali, 2019).

7.2. Citokrom P450 hidroksilaze

U bakteriji *E. coli* uspješno su prekomjerno ekspimirani geni za taksadien-sintazu, GGPP-sintazu i izopentenil-pirofosfat-izomerazu da bi se postigla sinteza taksadiena i do 1,2 mg/L, dodatni napredak je tada zaustavljen problemima u ekspresiji citokrom P450 hidroksilaza u mikroorganizmima uslijed čestih grešaka u smatanju proteina, translaciji i ugradnji u staničnu membranu te ovisnosti o njihovim reduktaznim partnerima. Biggs i ostali, (2016) su uspjeli u optimizaciji ekspresije i funkcionalnosti te su postigli visoke razine produkcije oksigeniranih diterpena (570 mg/L). Citokrom P450 hidroksilaze tipa 2 kao CYP725A4 istraživana ovdje, zahtjevaju donaciju 2 NADPH derivirana elektrona od njihovih reduktaznih partnera. S obzirom da se ova citokrom P450 hidroksilaza / reduktazni partner interakcija odvija u membrani endoplazmatskog retikuluma to predstavlja problem jer prokarioti takve strukture nemaju. Ovi proteini na svom N-terminalnom kraju imaju slijed lipofilnih aminokiselina koje ih usmjeruju na lokalizaciju u prethodno spomenut membranski sustav, prvo rješenje je bilo modifikacija određenog broja aminokiselina N-terminalnog kraja u nastajanje hidrofilnog repa što je povećalo

topljivost u vodi i spriječilo nastajanje inkluzija i gubitak funkcionalnosti proteina u heterolognom sustavu. Ekspresija ovog metaboličkog puta isključivo putem plazmida se pokazala problematičnom, s dvama plazmidima sustav je vjerovatno bio preopterećen. Rješenje se našlo u kromosomskoj integraciji velikog dijela puta, u dva zasebna modula dizajnirana u operone. Prvi „metil-eritrol-fosfat“ modul bio je sagrađen od gena koji kodiraju za izopentenil-pirofosfat-producirajuće enzime puta metil-eritrol-fosfata. Drugi modul je sadržavao taksadien-sintazu i GGPP-sintazu, također za oba modula je pokazao se optimalnim jak T7 promotor. Za citokrom P450 hidroksilazni modul se plazmid u pet kopija pod slabim Trc promotorom pokazao optimalan jer ga ne koriste ostali geni od interesa na kromosomu (Biggs i ostali, 2016).

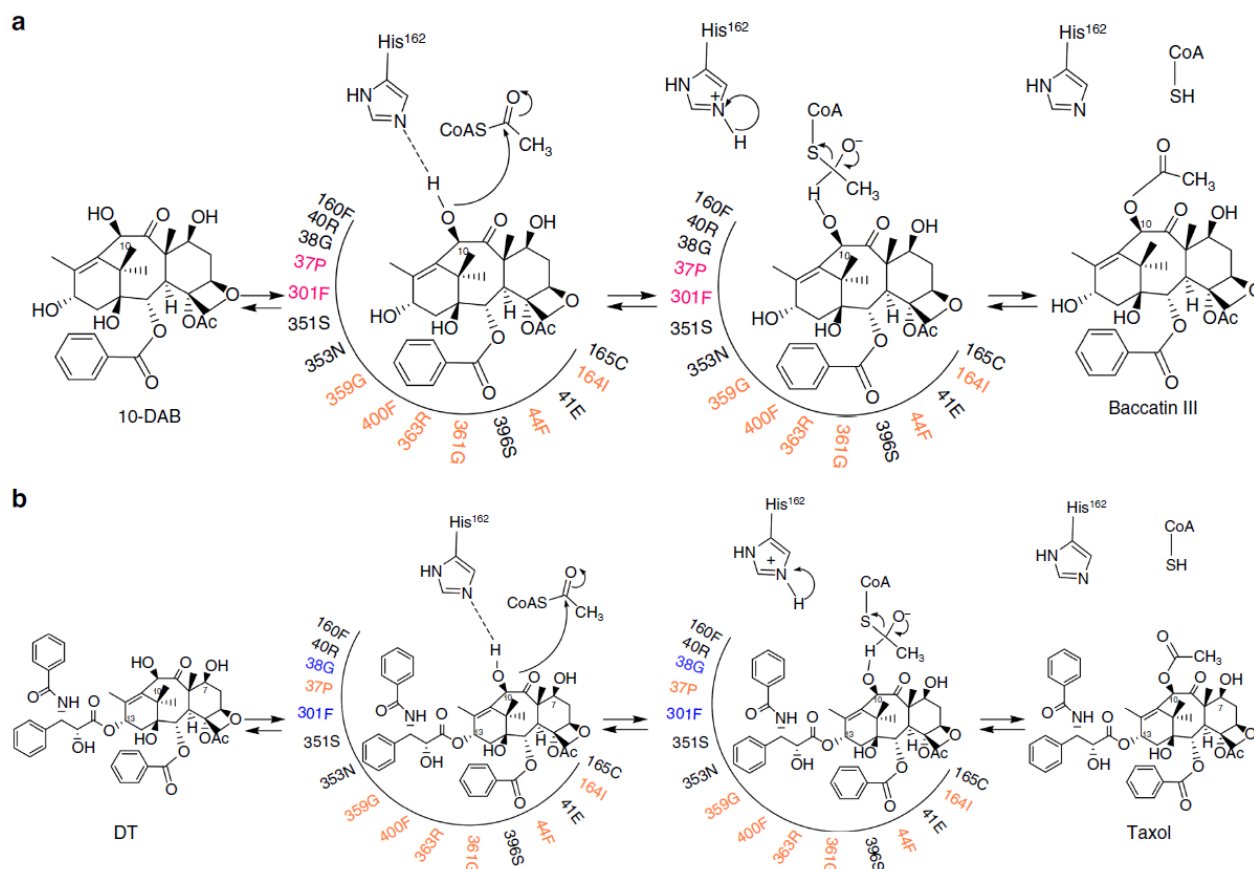
7.3. Taksadien-sintaza

Napredak je postignut i u području taksadien-sintaze i taksoid-5 α -hidroksilaze, taksadien-sintaza u bakterijskoj kulturi producira taksadien (92%) i izo-taksadien (8%) (Edgar i ostali, 2017), taksoid-5 α -hidroksilaza uzima za supstrat taksadien i izo-taksadien (Jennewein, Long, i ostali, 2004) no produkti se razlikuju u ovisnosti o supstratu. Željeni produkt je taksa-4(5),11(12)-dien-5 α -ol koji nastaje kada taksoid-5 α -hidroksilaza za supstrat ima izo-taksadien, no glavni produkti u bakterijskoj kulturi su 5(12)-oksa-3(11)-ciklotaksan i 5(11)-oksa-3(11)-ciklotaksan koji nastaju kada taksoid-5 α -hidroksilaza za supstrat ima taksadien. Pokazalo se da je ovo posljedica nespecifične konverzije epoksidnog intermedijera, a ne same taksoid-5 α -hidroksilaze. Izo-taksadien posredovanjem taksoid-5 α -hidroksilaze postaje u potpunosti željeni taksa-4(5),11(12)-dien-5 α -ol, dok taksadien u taksoid-5 α -hidroksilazi stvara nestabilni epoksidni intermedijer pa niz neželjenih produkata. Ovakvo ponašanje supstrata u taksoid-5 α -hidroksilazi dovodi do potrebe za optimizacijom taksadien sintaze tj. ciljanom mutagenezom kojom će se ostvariti bolji profil produkata, manje taksadiena, više izo-taksadiena. Edgar i ostali, (2017) uspješno su predstavili Y688L varijantu gdje je tirozin mutiran u leucin na aktivnom mjestu, time se pomakla ravnoteža nastajanja u smjeru izo-taksadiena, te postignuto i povećanje u prinosu taksa-4(5),11(12)-dien-5 α -ola od 2.4 puta.

7.4. 10-deacetilbaccatin III-10-O-acetiltransferaza

U kori tise nalazi se mnogo paclitaxelovih analoga poput 7- β -ksilozil-10-deacetiltaxol, 10-deacetilbaccatin III, 7-ksiloziltaxol i cephalomannin. Od ovih spojeva najveću zastupljenost ima 7-

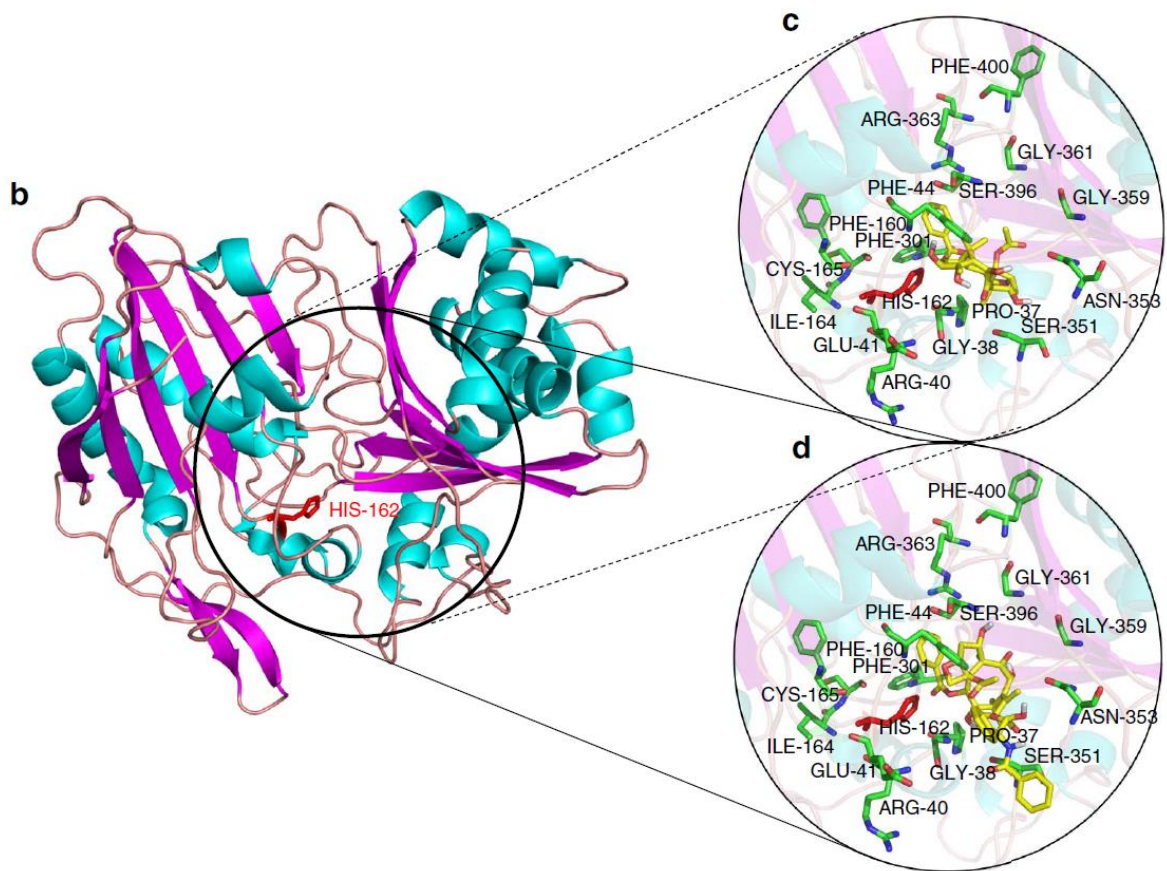
β -ksilozil-10-deacetiltaxol s čak 0,5% udjela u težini kore dok je, prisjetimo se, udio paclitaxela 0,069%. Ovaj spoj nije međuprodukt u prirodnoj sintezi paclitaxela no može se transformirati u paclitaxel de-glikozilacijom i acetilacijom. Uspješno je modificiran enzim 10-deacetilbaccatin III-10-*O*-acetiltransferaza čija je bioinformatička predikcija strukture prikazana na slici 5. zajedno sa simulacijama pristajanja supstrata u aktivno mjesto. 10-deacetilbaccatin III-10-*O*-acetiltransferaza može imati za supstrat i 10-deacetilbaccatin III, njegov prirodni supstrat u biosintetskom putu i deacetil-taxol koji se dobije deglikozilacijom 7- β -ksilozil-10-deacetil-taxola. Identificiran je His na poziciji 162 kao katalitička baza jer su mutanti bez istog izgubili svu katalitičku moć, na slici 6. prikazan je mehanizam djelovanja 10-deacetilbaccatin III-10-*O*-acetiltransferaze prema supstratima od interesa gdje katalitički His aktivira hidroksilnu skupinu supstrata i omogućava nukleofilni napad iste na karbonilni ugljik acilne skupine.



Slika 6. Mehanizam katalize 10-deacetilbaccatin III-10-*O*-acetiltransferaze: a) Prikaz acilacije 10-deacetilbaccatina III b) Prikaz acilacije deacetil-taxola. Narančastom bojom su prikazane

najvažnije aminokiseline za katalitičku aktivnost enzima. His¹⁶² djeluje kao baza, te deprotonira i aktivira hidroksilnu skupinu supstrata. Prvi korak je nukleofilni napad hidroksilne skupine na karbonilni ugljik acetil-koenzima A, donora acilne skupine. Nastane tetraedarski intermedijer, čiji kolaps u idućem koraku oslobađa koenzim A i aciliran produkt (B.-J. Li i ostali, 2017).

Budući je Arg hidrofилniji od Gly, mutacija G38R je odgovorna za izlaganje 38. aminokiseline na površinu proteina iz unutrašnjosti, što je vrlo vjerovatno jedan od glavnih razloga povećanja K_m 10-deacetilbaccatin III-10-O-acetiltransferaze^{G38R} u odnosu na 10-deacetilbaccatin III-10-O-acetiltransferazu za oba supstrata od interesa deacetil-taxol i 10-deacetilbaccatin III. Phe³⁰¹ se nalazi u unutrašnjosti aktivnog mjesta i svojim volumenom (131,1 Å³) ometa dublji ulaz deacetil-taxola u 10-deacetilbaccatin III-10-O-acetiltransferazu. Mutacija u Val čiji je volumen znatno manji 98,71 Å³, ne samo da smanjuje sterička ometanja nego i zadržava originalnu hidrofobnost. Kreiran je dvostruki mutant 10-deacetilbaccatin III-10-O-acetiltransferaza^{G38R/F301V} i njegova aktivnost prema deacetil-taxolu je bila veća u odnosu na 10-deacetilbaccatin III-10-O-acetiltransferaza^{G38R} i skoro dvostruko manja prema njegovom prirodnom supstratu 10-deacetilbaccatinu III. Uzevši sve u obzir ova varijanta enzima favorizira deacetil-taxol, tj. voluminozniji supstrat dok manji 10-deacetilbaccatin III vjerojatno otiđe predaleko u enzim i time se poremeti njihova prirodna interakcija (B.-J. Li i ostali, 2017).



Slika 5. Bioinformatička 3D predikcija izgleda 10-deacetylbaicatin III-10-O-acetiltransferaze dobivena homolognim modeliranjem: b) Model 10-deacetylbaicatin III-10-O-acetiltransferaze s zaokruženim područjem od 5 Å oko pozicije supstrata, katalitički His¹⁶² je prikazan crvenom bojom. c) Uvećani pogled molekularnog pristajanja 10-DAB u 10-deacetylbaicatin III-10-O-acetiltransferazu. d) Uvećani pogled molekularnog pristajanja deacetyl-taxola u 10-deacetylbaicatin III-10-O-acetiltransferazu (B.-J. Li i ostali, 2017).

8. Zaključak

Karcinomi su jedan od vodećih uzroka smrti danas i borba protiv raka vjerojatno nikad neće prestati. Učinkovitost lijekova, istraživanje i ulaganje u postojeće i nove lijekove povećava se iz godine u godinu te su paclitaxel i njegovi derivati imali veliku ulogu u tome. Spasivši mnoge živote paclitaxel je sigurno ostavio svoj trag u povijesti, no obilježio je sigurno i životne puteve mnogih znanstvenika koji su svojim otkrićima doprinijeli napretku znanosti iza paclitaxela. No još mnogo toga ostaje neistraženo, proizvodnja je skupa i dugoročno neodrživa i ciljne stanice često razvijaju otpornost prema paclitaxelu. Mikrobi su obećavajuća alternativa koja bi mogla nadmašiti ekstrakciju iz biljaka i kemijsku sintezu. Obećavajuć način dobivanja paclitaxela je transformacija njegovih analoga kojih ima u izobilju u biljci, kao što se vidi na primjeru 7- β -ksilozil-10-deacetylaxola i enzima 10-deacetylaccatin III-10-*O*-acetyltransferaze. Sintetska biologija je dovela do velikog napretka u heterolognoj ekspresiji enzima biosintetskog puta paclitaxela, kao i u poboljšanju katalitičke sposobnosti taksadien-sintaze, citokrom P450-hidroksilaza i 10-deacetylaccatin III-10-*O*-acetyltransferaze pružajući čvrstu podlogu za daljnji razvoj. Također još signalnih puteva na koje utječe paclitaxel ostaju neokarakterizirani, kao i mehanizmi rezistencije s kojima se potrebno obračunavati za uspješnu kemoterapiju.

9. Literatura

- AA Christen, J. B. D. G. (1989). Cell culture as a means to produce taxol. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 30, 566.
- Acharya, S., & Sahoo, S. K. (2011). PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 170–183.
- Ajikumar, P. K., Xiao, W. H., Tyo, K. E. J., Wang, Y., Simeon, F., Leonard, E., Mucha, O., Phon, T. H., Pfeifer, B., & Stephanopoulos, G. (2010). Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 330(6000), 70–74.
- Alexandre, J., Hu, Y., Lu, W., Pelicano, H., & Huang, P. (2007). Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer Research*, 67(8), 3512–3517.
- Athanasakoglou, A., Grypioti, E., Michailidou, S., Ignea, C., Makris, A. M., Kalantidis, K., Massé, G., Argiriou, A., Verret, F., & Kampranis, S. C. (2019). Isoprenoid biosynthesis in the diatom *Haslea ostrearia*. *New Phytologist*, 222(1), 230–243.
- Attalla, H., Westberg, J. A., Andersson, L. C., Adlercreutz, H., & Mäkelä, T. P. (1998). 2-Methoxyestradiol-Induced Phosphorylation of Bcl-2: Uncoupling from JNK/SAPK Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(3), 616–619.
- Bach, T. J., Boronat, A., Campos, N., Ferrer, A., & Vollack, K.-U. (1999). Mevalonate Biosynthesis in Plants. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 34(2), 107–122.
- Besumbes, Ó., Sauret-Güeto, S., Phillips, M. A., Imperial, S., Rodríguez-Concepción, M., & Boronat, A. (2004). Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis* for the production of taxadiene, the first committed precursor of Taxol. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(2), 168–175.
- Biggs, B. W., Lim, C. G., Sagliani, K., Shankar, S., Stephanopoulos, G., de Mey, M., & Ajikumar, P. K. (2016). Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated Taxol precursor synthesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(12), 3209–3214.
- Blagosklonny, M. v, Schulte, T., Nguyen, P., Trepel, J., & Neckers, L. M. (1996). Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Research*, 56(8), 1851–1854.
- Borah, J. C., Boruwa, J., & Barua, N. C. (2007). Synthesis of the C-13 Side-Chain of Taxol. *Current Organic Synthesis*, 4(2), 175–199.

- Campbell, K. J., & Tait, S. W. G. (2018). Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biology*, 8(5), 180002.
- Cao, X., Tan, T., Zhu, D., Yu, H., Liu, Y., Zhou, H., Jin, Y., & Xia, Q. (2020). Paclitaxel-Loaded Macrophage Membrane Camouflaged Albumin Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 1915–1928.
- Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., & Sharma, K. (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports*, 26, e00450.
- Chen, D., Zhang, G., Li, R., Guan, M., Wang, X., Zou, T., Zhang, Y., Wang, C., Shu, C., Hong, H., & Wan, L. J. (2018). Biodegradable, Hydrogen Peroxide, and Glutathione Dual Responsive Nanoparticles for Potential Programmable Paclitaxel Release. *Journal of the American Chemical Society*, 140(24), 7373–7376.
- Chou, K.-C., & Shen, H.-B. (2010). Plant-mPLOC: A Top-Down Strategy to Augment the Power for Predicting Plant Protein Subcellular Localization. *PLoS ONE*, 5(6), e11335.
- Croteau, R., Ketchum, R. E. B., Long, R. M., Kaspera, R., & Wildung, M. R. (2006). Taxol Biosynthesis and Molecular Genetics. *Phytochemistry Reviews*, 5(1), 75–97.
- Cusido, R. M., Onrubia, M., Sabater-Jara, A. B., Moyano, E., Bonfill, M., Goossens, A., Angeles Pedreño, M., & Palazon, J. (2014). A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1157–1167.
- DeJong, J. H. M., Liu, Y., Bollon, A. P., Long, R. M., Jennewein, S., Williams, D., & Croteau, R. B. (2006). Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(2), 212–224.
- Diab, T., Alkafaas, S. S., Shalaby, T. I., & Hessien, M. (2020). Paclitaxel Nanoparticles Induce Apoptosis and Regulate TXR1, CYP3A4 and CYP2C8 in Breast Cancer and Hepatoma Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 20(13), 1582–1591.
- Edgar, S., Li, F. S., Qiao, K., Weng, J. K., & Stephanopoulos, G. (2017). Engineering of Taxadiene Synthase for Improved Selectivity and Yield of a Key Taxol Biosynthetic Intermediate. *ACS Synthetic Biology*, 6(2), 201–205.
- Ezrahi, S., Aserin, A., & Garti, N. (2019). Basic principles of drug delivery systems - the case of paclitaxel. *Advances in Colloid and Interface Science*, 263, 95–130.
- Fan, L. L., Chen, X., Zhang, X. Y., Li, Z. M., Fan, X. M., & Shen, Y. (2020). Octreotide-Paclitaxel Conjugate Reverses Paclitaxel Resistance by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signaling Pathway in A2780/Taxol Human Ovarian Cancer Cells. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 26, e922612-1.

- Fay, F., & Scott, C. J. (2011). Antibody-targeted nanoparticles for cancer therapy. *Immunotherapy*, 3(3), 381–394.
- Feng, B., Niu, Z., Hou, B., Zhou, L., Li, Y., & Yu, H. (2020). Enhancing Triple Negative Breast Cancer Immunotherapy by ICG-Templated Self-Assembly of Paclitaxel Nanoparticles. *Advanced Functional Materials*, 30(6), 1906605.
- Gallego-Jara, J., Lozano-Terol, G., Sola-Martínez, R. A., Cánovas-Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2020). A Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges. *Molecules*, 25(24), 5986.
- Khan, M., Sherwani, S., Khan, S., Alouffi, S., Alam, M., Al-Motair, K., & Khan, S. (2021). Insights into Multifunctional Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems for Glioblastoma Treatment. *Molecules*, 26(8), 2262.
- Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., & Sparreboom, A. (2001). Cremophor EL: The drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer*, 37(13), 1590–1598.
- Giannakakou, P., Robey, R., Fojo, T., & Blagosklonny, M. v. (2001). Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity. *Oncogene*, 20(29), 3806–3813.
- Gupta, N., Gupta, P., & Srivastava, S. K. (2019). Penfluridol overcomes paclitaxel resistance in metastatic breast cancer. *Scientific Reports 2019 9:1*, 9(1), 1–14.
- Holton, R. A., Somoza, C., Kim, H. B., Liang, F., Biediger, R. J., Boatman, P. D., Shindo, M., Smith, C. C., Kim, S., Nadizadeh, H., Suzuki, Y., Tao, C., Vu, P., Tang, S., Zhang, P., Murthi, K. K., Gentile, L. N., & Liu, J. H. (1994). First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *Journal of the American Chemical Society*, 116(4), 1597–1598.
- Houdaihed, L., Evans, J. C., & Allen, C. (2020). Dual-Targeted Delivery of Nanoparticles Encapsulating Paclitaxel and Everolimus: a Novel Strategy to Overcome Breast Cancer Receptor Heterogeneity. *Pharmaceutical Research*, 37(3), 1–10.
- Howat, S., Park, B., Oh, I. S., Jin, Y. W., Lee, E. K., & Loake, G. J. (2014). Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. *New Biotechnology*, 31(3), 242–245.
- Huang, C., Zhang, X., Jiang, L., Zhang, L., Xiang, M., & Ren, H. (2019). FoxM1 Induced Paclitaxel Resistance via Activation of the FoxM1/PHB1/RAF-MEK-ERK Pathway and Enhancement of the ABCA2 Transporter. *Molecular Therapy Oncolytics*, 14, 196–212.
- Hynes, N. E., & MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), 177–184.
- Janes, K., Little, J. W., Li, C., Bryant, L., Chen, C., Chen, Z., Kamocki, K., Doyle, T., Snider, A., Esposito, E., Cuzzocrea, S., Bieberich, E., Obeid, L., Petrache, I., Nicol, G., Neumann, W. L., &

- Salvemini, D. (2014). The development and maintenance of paclitaxel-induced neuropathic pain require activation of the sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 21082–21097.
- Jennewein, S., Long, R. M., Williams, R. M., & Croteau, R. (2004). Cytochrome P450 taxadiene 5 α -hydroxylase, a mechanistically unusual monooxygenase catalyzing the first oxygenation step of taxol biosynthesis. *Chemistry and Biology*, 11(3), 379–387.
- Jennewein, S., Wildung, M. R., Chau, M., Walker, K., & Croteau, R. (2004). Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(24), 9149–9154.
- Jiang, L., Zhang, K., Lü, X., Yang, L., Wang, S., Chen, D., Yang, Y., & Qiu, D. (2021). Characterization and expression analysis of genes encoding Taxol biosynthetic enzymes in *Taxus* spp. *Journal of Forestry Research*, 32(6), 2507–2515.
- Jo, H., Ahn, H. J., Lee, J. H., & Min, C. K. (2016). Roles of JNK and P53 in Taxol-Induced Apoptotic Signaling in SKOV3 Human Ovarian Cancer Cells. *Elyns Journal of Cancer Research*, 01(01).
- Kampan, N. C., Madondo, M. T., McNally, O. M., Quinn, M., & Plebanski, M. (2015). Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *BioMed Research International*, 2015, 1–21.
- Kashani, K., Jalali Javaran, M., Sabet, M. S., & Moieni, A. (2018). Identification of rate-limiting enzymes involved in paclitaxel biosynthesis pathway affected by coronatine and methyl- β -cyclodextrin in *Taxus baccata* L. cell suspension cultures. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(2), 129–142.
- Li, B.-J., Wang, H., Gong, T., Chen, J.-J., Chen, T.-J., Yang, J.-L., & Zhu, P. (2017). Improving 10-deacetylbaccatin III-10- β -O-acetyltransferase catalytic fitness for Taxol production. *Nature Communications*, 8(1), 15544.
- Li, H., DeRosier, D. J., Nicholson, W. v., Nogales, E., & Downing, K. H. (2002). Microtubule Structure at 8 Å Resolution. *Structure*, 10(10), 1317–1328.
- Li, Y., Zhang, G., & Pfeifer, B. A. (2015). Current and emerging options for Taxol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 148, 405–425.
- Lih, C. J., Wei, W., & Cohen, S. N. (2006). Txr1: a transcriptional regulator of thrombospondin-1 that modulates cellular sensitivity to taxanes. *Genes & Development*, 20(15), 2082–2095.
- Liu, W. C., Gong, T., & Zhu, P. (2016). Advances in exploring alternative Taxol sources. *RSC Advances*, 6(54), 48800–48809.
- Lv, Y., Cang, W., Li, Q., Liao, X., Zhan, M., Deng, H., Li, S., Jin, W., Pang, Z., Qiu, X., Zhao, K., Chen, G., Qiu, L., & Huang, L. (2019). Erlotinib overcomes paclitaxel-resistant cancer stem cells by

- blocking the EGFR-CREB/GR β -IL-6 axis in MUC1-positive cervical cancer. *Oncogenesis* 2019 8:12, 8(12), 1–12.
- Madan, J., Pandey, R. S., Jain, V., Katare, O. P., Chandra, R., & Katyal, A. (2013). Poly (ethylene)-glycol conjugated solid lipid nanoparticles of noscapine improve biological half-life, brain delivery and efficacy in glioblastoma cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(4), 492–503.
- Nasiri, J., Naghavi, M. R., Alizadeh, H., & Moghadam, M. R. F. (2016). Seasonal-based temporal changes fluctuate expression patterns of TXS, DBAT, BAPT and DBTNBT genes alongside production of associated taxanes in *Taxus baccata*. *Plant Cell Reports*, 35(5), 1103–1119.
- Němcová-Fürstová, V., Kopperová, D., Balušíková, K., Ehrlichová, M., Brynychová, V., Václavíková, R., Daniel, P., Souček, P., & Kovář, J. (2016). Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 310, 215–228.
- Nikolic, V., Savic, I., Savic, I., Nikolic, L., Stankovic, M., & Marinkovic, V. (2011). Paclitaxel as an anticancer agent: isolation, activity, synthesis and stability. *Open Medicine*, 6(5), 527–536.
- Ong, S. G. M., Chitneni, M., Lee, K. S., Ming, L. C., & Yuen, K. H. (2016). Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics*, 8(4).
- Ota, H., Eto, M., Ako, J., Ogawa, S., Iijima, K., Akishita, M., & Ouchi, Y. (2009). Sirolimus and everolimus induce endothelial cellular senescence via sirtuin 1 down-regulation: therapeutic implication of cilostazol after drug-eluting stent implantation. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(24), 2298–2305.
- Peiris-Pagès, M., Smith, D. L., Gyorffy, B., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2015). Proteomic identification of prognostic tumour biomarkers, using chemotherapy-induced cancer-associated fibroblasts. *Aging*, 7(10), 816–838.
- Peiris-Pagès, M., Sotgia, F., & Lisanti, M. (2015). Chemotherapy induces the cancer-associated fibroblast phenotype, activating paracrine Hedgehog-Gli signalling in breast cancer cells. *Oncotarget*, 6(13), 10728–10745.
- Rajput, S., Volk-Draper, L. D., & Ran, S. (2013). TLR4 is a novel determinant of the response to paclitaxel in breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(8), 1676–1687.
- Ren, X., Zhao, B., Chang, H., Xiao, M., Wu, Y., & Liu, Y. (2018). Paclitaxel suppresses proliferation and induces apoptosis through regulation of ROS and the AKT/MAPK signaling pathway in canine mammary gland tumor cells. *Molecular Medicine Reports*, 17(6), 8289–8299.
- Ruoslahti, E. (2012). Peptides as Targeting Elements and Tissue Penetration Devices for Nanoparticles. *Advanced Materials*, 24(28), 3747–3756.

- Sabzehzari, M., Zeinali, M., & Naghavi, M. R. (2020). Alternative sources and metabolic engineering of Taxol: Advances and future perspectives. *Biotechnology Advances*, 43.
- Shen, Y., Zhang, X. Y., Chen, X., Fan, L. L., Ren, M. L., Wu, Y. P., Chanda, K., & Jiang, S. W. (2017). Synthetic paclitaxel-octreotide conjugate reverses the resistance of paclitaxel in A2780/Taxol ovarian cancer cell line. *Oncology Reports*, 37(1), 219–226.
- Stierle, A., Strobel, G., & Stierle, D. (1993). Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. *Science*, 260(5105), 214–216.
- Sun, H., Zhu, A., Zhou, X., Wang, F., Sun, H., Zhu, A., Zhou, X., & Wang, F. (2017). Suppression of pyruvate dehydrogenase kinase-2 re-sensitizes paclitaxel-resistant human lung cancer cells to paclitaxel. *Oncotarget*, 8(32), 52642–52650.
- Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C., & Gottesman, M. M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(3), 219–234.
- Thakkar, S., Sharma, D., Kalia, K., & Tekade, R. K. (2020). Tumor microenvironment targeted nanotherapeutics for cancer therapy and diagnosis: A review. *Acta Biomaterialia*, 101, 43–68.
- Tong, Y., Luo, Y. F., & Gao, W. (2022). Biosynthesis of paclitaxel using synthetic biology. *Phytochemistry Reviews*, 21(3), 863–877.
- van Zuylen, L., Verweij, J., & Sparreboom, A. (2001). Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Investigational New Drugs*, 19(2), 125–141.
- Wang, B., Li, S., Meng, X., Shang, H., & Guan, Y. (2015). Inhibition of mdr1 by G-quadruplex oligonucleotides and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Tumor Biology*, 36(8), 6433–6443.
- Whitaker, R. H., & Placzek, W. J. (2019). Regulating the BCL2 Family to Improve Sensitivity to Microtubule Targeting Agents. *Cells*, 8(4), 346.
- Yang, C.-P., & Horwitz, S. (2017). Taxol®: The First Microtubule Stabilizing Agent. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8)
- Yang, N., Wang, C., Wang, J., Wang, Z., Huang, D., Yan, M., Kamran, M., Liu, Q., & Xu, B. L. (2019). Aurora kinase A stabilizes FOXM1 to enhance paclitaxel resistance in triple-negative breast cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(9), 6442–6453.
- Zhao, C., Song, G., Fu, C., Dong, Y., Xu, H., Zhang, H., & Yu, L. J. (2016). A systematic approach to expound the variations in taxane production under different dissolved oxygen conditions in *Taxus chinensis* cells. *Plant Cell Reports*, 35(3)
- Zheng, A. W., Chen, Y. Q., Zhao, L. Q., & Feng, J. G. (2017). Myricetin induces apoptosis and enhances chemosensitivity in ovarian cancer cells. *Oncology Letters*, 13(6), 4974–4978.

- Zhou, M., Zhao, Y., Ding, Y., Liu, H., Liu, Z., Fodstad, O., Riker, A. I., Kamarajugadda, S., Lu, J., Owen, L. B., Ledoux, S. P., & Tan, M. (2010). Warburg effect in chemosensitivity: Targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes Taxol-resistant cancer cells to Taxol. *Molecular Cancer*, 9(1), 1–12.
- Zhu, L., & Chen, L. (2019). Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 24(1), 1–11.
- Zimmer, S. M., Liu, J., Clayton, J. L., Stephens, D. S., & Snyder, J. P. (2008). Paclitaxel binding to human and murine MD-2. *Journal of Biological Chemistry*, 283(41), 27916–27926.
- Zununi Vahed, S., Fathi, N., Samiei, M., Maleki Dizaj, S., & Sharifi, S. (2019). Targeted cancer drug delivery with aptamer-functionalized polymeric nanoparticles. *Journal of drug targeting*, 27(3), 292–299.

10. Životopis

Rođen sam 20.4.2000. u Splitu. Završio sam Osnovnu školu kneza Trpimira i srednju školu V. Gimnaziju Vladimir Nazor. Upisao sam Prirodoslovno-matematički fakultet 2019. godine. Radio sam od 2015. do 2018. godine u ACI Marini Trogir, Ultra Sailing Croatia - Yacht charter & sailing school. Od 7. mjeseca 2022. godine radim u medicinsko-regulatornom odjelu firme Marti Farm d.o.o. koja se bavi farmakovigilancijskim aktivnostima u farmaceutskoj industriji.