



# LOG-BOOK



Title of activity : I-COLIN (In Silico Design of Insulin) Production from Transgenic Aloe vera with Agrobacterium tumefaciens as a Vector

Member(s) 1 : Aisyah Rifa Fadhilah

Member(s) 2 : Muhamad Nabil Alhanif

Institution : SMA Kharisma Bangsa

Executor(s) :	Aisyah dan Nabil	Supervisor : Prof. Dr. Satya Nugroho
Date and time	3 Oktober 2020	

## 1. Biopharming

Biopharming adalah usaha tani (farming) yang memanfaatkan tanaman atau hewan ternak untuk menghasilkan protein atau senyawa metabolit tertentu yang bernilai kesehatan atau pengobatan[10]. Biopharming tidak terlepas dari produk rekayasa genetika yang diterapkan pada hewan atau tumbuhan untuk menyisipkan gen dari organisme lain, sehingga hewan atau tumbuhan itu mengekspresikan senyawa tertentu, yang kemudian dapat dipanen hasilnya[11][12].

Produk yang dihasilkan biopharming adalah protein rekombinan ("baru") atau hasil metabolismenya. Bakteri atau cendawan yang menghasilkan protein rekombinan memerlukan bioreaktor untuk dapat digunakan secara komersial sehingga memerlukan investasi yang tinggi. Biopharming menawarkan kelebihan berupa rendahnya biaya karena diintegrasikannya usaha tani sebagai cara menghasilkan tanpa memerlukan infrastruktur yang mahal dan kapasitas produksinya dapat diatur dengan lebih fleksibel.[13]. Permasalahan keamanan lingkungan menjadi isu yang perlu diperhatikan dalam pelaksanaan biopharming.

Tabel 1

## 2. Platform Ekspresi

Comparison of various expression systems for recombinant pharmaceutical proteins (combined from Schillberg et al., 2003; Ma et al., 2003)

Features	Bacteria	Yeast	Plant cell cultures	Transgenic plants	Mammalian cell cultures	Transgenic animals
Production cost	Low	Medium	Medium	Low	High	High
Timescale for production	Short	Medium	Medium	Short	Long	Very long
Propagation	Easy	Easy	Easy	Very easy	Medium	Medium
Distribution	Difficult	Difficult	Difficult	Easy	Very difficult	Easy
Quality	Low	Medium	High	High	High	High
Safety	Low	High	High	High	Low	Low
Glycosylation	Incorrect <sup>a</sup>	Incorrect	Differences	Differences	Minor differences	Minor differences
Ease of glycosylation modification	Very difficult	Medium	Easy	Easy	Difficult	Very difficult

<sup>a</sup> See references, Benz and Schmidt (2002) and Szymanski et al. (2003).

Table 2 Comparison of various expression systems for recombinant pharmaceutical proteins (combined from Schillberg et al., 2003; Ma et al., 2003)

Comparisons	Transgenic Plant	Plant Cell Culture	Bacteria	Yeast	Mammalian Cell Culture	Transgenic Animals
Overall cost	Very low	Medium	Low	Medium	High	High
Scale-up capacity	Very high	Medium	High	High	Very low	Low
Production scale	Worldwide	Limited	Limited	Limited	Limited	Limited
Protein yield	High	High	Medium	High	Medium-High	High
Protein folding accuracy	High	High	Low	Medium	High	High
Glycosylation	Minor differences	Minor differences	None	Incorrect	Correct	Correct
Product quality	High	High	Low	Medium	High	High
Contamination risks	Low	Low	Endotoxins	Low	Virus, Prions, oncogenic DNA	Virus, Prions, oncogenic DNA
Safety	High	Non-specific	Low	Unknown	Medium	High
Storage cost	Inexpensive	Moderate	Moderate	Moderate	Expensive	Expensive

Comparison of different expression platforms for the production of pharmaceuticals (modified from Spök and Karner 2008 [41], European Communities).

Expression System	Advantages	Disadvantages
Bacteria	Easy to manipulate Low cost High expression Ease of scale up Short turnaround time Established regulatory procedures and approval	Improper folding Lack of post-translational modifications which may affect the protein function Endotoxin accumulation
Mammalian Cells	Proper folding and authentic post-translational modifications Existing regulatory approval	High production cost Expensive media and culture condition requirements
Yeast	Rapid growth and scalable Easy to manipulate Simple and inexpensive media requirements and culture conditions Post-translational modifications of recombinant proteins	Difficulty in cell disruption due to the thick and hard cell walls Hyperglycosylation of proteins Limited glycosylation capacity
Insect cells	High expression levels Ability to produce complex proteins including secreted, membrane, and intracellular proteins Proper folding and post-translational modifications	High cost and time consuming Expensive media and culture condition requirements
Plant	Rapid and affordable Optimized growth conditions Free from pathogen and bacterial toxin contaminants Economical Post-translational modification somewhat similar like mammalian system	Regulatory compliance Limited glycosylation capacity

Tabel...(Keuntungan dan kerugian platform ekspresi)

Tanaman adalah sumber biomassa yang murah dan dengan demikian merupakan alternatif menarik sebagai inang ekspresi konvensional untuk Menghasilkan produk biologis dengan klinis, industri, dan penelitian aplikasi (Faye dan Gomord, 2010; Fischer et al., 2012).

Praktik penggunaan tumbuhan untuk produksi protein rekombinan yang bernilai tinggi mulai dari terapi farmasi untuk produk non farmasi seperti antibodi, antigen vaksin, enzim, faktor pertumbuhan, penelitian atau reagen diagnostik, dan bahan kosmetik [14] telah meningkat dari waktu ke waktu dan berkembang secara signifikan dalam beberapa dekade terakhir, yang pada gilirannya menyebabkan paradigma utama pergeseran di sektor farmasi. Teknologi telah berkembang pesat, dan potensi kekurangannya terkait dengan pertanian molekuler tanaman selama tahap awal perkembangan mereka, termasuk kebutuhan untuk tingkat ekspresi protein yang tinggi dan pemrosesan hilir yang efisien, kini telah tercapai. Keuntungan dari platform ekspresi tanaman dikutip dalam beberapa laporan sebelumnya yang menunjukkan head-to-head

perbandingan dengan platform lain yang ada (Tabel 1) [10-18]. Keuntungan utama dari semua nabati sistem budidaya mudah, biaya rendah, beban patogen rendah atau tidak ada, produksi massal cepat protein rekombinan, dan kemampuan tumbuhan untuk menyusun protein kompleks yang mirip eukariotik modifikasi pasca-translasi (PTMs) [24].

Pelipatan protein sangat penting untuk mempertahankan aktivitas biologis terapeutik rekombinan protein. Karena kurangnya kompleks pemrosesan protein dan kapasitas terbatas untuk PTM, protein yang tepat melipat tidak dapat dicapai dalam sistem ekspresi prokariotik [25]. Tanaman memiliki kapasitas untuk merakit dan melakukan PTM protein multimerik besar yang diperlukan untuk fungsi biologisnya aktivitas. Namun, tanaman kekurangan mekanisme pemrosesan N-glikosilasi manusia asli yang dimilikinya

telah diatasi oleh pendekatan glycoengineering menuju sintesis manusia yang ditargetkan dan struktur non-manusia untuk meningkatkan homogenitas, kualitas, dan kuantitas produk [26,27].

## 2.1 Stable Expression

### 2.1.2 Transformasi inti yang stabil (*Nuclear Stable Transformation/Nuclear Expression*)

Transformasi inti merupakan strategi tradisional manipulasi genetika pada tumbuhan untuk memproduksi protein rekombinan. Transgen dalam vektor ekspresi tumbuhan dapat dimasukkan ke dalam planlet yang ditanam secara *in vitro* baik dengan transformasi yang dimediasi oleh *Agrobacterium tumefaciens* atau Penembakan partikel (*particle bombardment/biolistik*). Ekspresi inti melibatkan transkripsi dalam inti dan translasi di dalam sitoplasma. Ini melibatkan ekspresi antigen asing dari genom inti dan garis transgenik yang stabil dapat dikembangkan (Shadid & Daniell 2016). Garis transgenik terbaik untuk memproduksi protein selanjutnya akan diseleksi dari kumpulan garis transgenik yang ada. Dengan metode ini, protein rekombinan dapat diproduksi dalam beberapa generasi berturut-turut, karena transgen telah stabil diintegrasikan ke dalam genom tumbuhan. Model tanaman seperti *Arabidopsis thaliana* dan tembakau lebih banyak digunakan selama tahap awal transformasi genetik untuk mengembangkan transforman yang stabil [29].

Kekurangan dari sistem ini yaitu pembungkaman gen (gene silencing), risiko kontaminasi transgen melalui jaringan reproduktif, dan tingkat ekspresi rendah (Shadid & Daniell, 2016). Kerugian lebih lanjut yaitu perlunya manipulasi genetik yang memakan waktu

prosedur yang membutuhkan silangan balik (backcrosses) dan pemuliaan tanaman untuk ekspresi beberapa gen dan integrasi acak dari gen yang dapat mempengaruhi ekspresi secara negatif. Ini bisa diatasi dengan teknik pengeditan gen seperti CRISPR - Cas9 (Gomes, Oliveira, Vieira, & Duque, 2019; Jaganathan, Ramasamy, Sellamuthu, Jayabalan, & Venkataraman, 2018; Miki, Zhang, Zeng, Feng, & Zhu 2018).

Promotor paling populer untuk digunakan pada dikotil adalah CaMV 35S dari virus mosaik kembang kol (Ma et al., 2003), promotor konstitutif yang kuat yang dapat ditingkatkan dengan menduplikasi *enhancer region* (Kay, Chan, Daly, & McPherson, 1987). Promotor alternatif seperti maize ubiquitin - 1 promoters digunakan secara efektif pada monokotil (Ma et al., 2003; Twyman, Stoger, Schillberg, Christou, & Fischer, 2003). Beragam urutan poliadenilasi dapat digunakan, transkrip *Agrobacterium tumefaciens nos* gen, gen pea ssu dan cauliflower mosaic virus 35s merupakan contoh yang banyak digunakan (Ma et al, 2003).

## 2.13 Transformasi Kloroplast yang Stabil (Chloroplast Stable Transformation/Chloroplast Expression)

Ekspresi kloroplas melibatkan transformasi transgene ke dalam genom kloroplas menggunakan particle gun. Metode ini memiliki beberapa keuntungan daripada transformasi inti. Genom kloroplas lebih mudah dimanipulasi. Jika genom kloroplas sudah diurutkan, *transgene cassette* dapat dibuat untuk menyisipkan gen asing ke dalam *spacer region* diantara gen kloroplas yang fungsional, menggunakan dua *flanking sequences* pada gen kloroplas melalui rekombinasi homolog (Daniell, Lin, Yu, & Chang, 2016; Daniell, Streatfield, Streatfield, & Wycoff, 2001). Target yang presisi ini akan mencegah penempatan gen ke dalam bagian genom yang akan menghasilkan sedikit transkrip, untuk memastikan diperolehnya tingkat ekspresi yang tinggi.

Transformasi ke dalam genom kloroplas lebih sulit daripada transformasi ke inti sel, karena pada kloroplas terdapat dua membran dan kurangnya jumlah virus yang diketahui menginfeksi kloroplas. Sehingga pada transformasi kloroplas lebih lazim digunakan *gene gun* daripada menggunakan infeksi *Agrobacterium tumefaciens*.

*Gene gun* merupakan teknik bombardir jaringan tanaman muda dengan partikel emas atau tungsten dilapisi dengan DNA (Verma, Samson, Koya, & Daniell, 2008).

### 2.1 Trasient Expression

Dengan menggunakan platform ekspresi transien, produksi protein rekombinan dalam tanaman dapat ditingkatkan meningkat dengan cepat, dan jumlah miligram protein dapat diproduksi dalam jangka waktu kurang dari 4 minggu setelah menerima konstruksi gen yang sesuai [5,59,127].

## 2. Keunggulan Tanaman Transgenik

Kemampuan untuk meningkatkan biomassa dengan perawatan dan biaya rendah membuat tanaman transgenik menjadi sarana produksi yang menarik untuk molkules seperti karbohidrat, asam lemak, enzim industri, plastik biodegradable, dan obat-obatan. Untuk produksi

obat-obatan, tanaman memiliki keuntungan tambahan dari minimisasi mencari kontaminan virus potensial seperti human immunodeficiency virus dan hepatitis B (ref. 1–4). Contoh terbaru misalnya produksi antibodi monoklonal pada tanaman transgenik<sup>5,6</sup> dan antigen manusia pada tanaman pangan transgenik yang digunakan untuk imunisasi oral [5]. Kelayakan transformasi kloroplas (transplastomic) teknologi dengan beberapa keuntungan potensial dibandingkan sistem transgenik nuklir yang ada untuk produksi protein terapeutik manusia dalam tanaman non-pangan, tembakau. Lebih lanjut, kami menunjukkan bahwa protein manusia yang disekresikan secara normal dapat diekspresikan dengan baik dalam bentuk yang aktif secara biologis pada tanaman transplastomik.

Untuk transformasi kloroplas pada tumbuhan tingkat tinggi, partikel bombardir (gene gun) digunakan untuk memasukkan transgen ke dalam kloroplas daun dimana integrasi DNA asing diarahkan secara homolog [6-9]. Sehingga lokasi penyisipan transgen dapat diprediksi dan ekspresi gen seragam. Selain itu juga mengurangi kemungkinan efek silencing dan menjaga gen tetap stabil beberapa generasi. Tanaman transplastomik juga memiliki potensi ekspresi protein rekombinan yang sangat tinggi. Selain itu manajemen transplastomik mungkin lebih sederhana daripada nuklear expression. Dalam sistem nuclear transgenic, seringkali memerlukan ekspresi protein yang kompleks dan skema penargetan untuk membatasi konsentrasi ekspresi dan mencegah modifikasi pasca- translasi yang tidak diinginkan oleh protein heterolog. Selain itu, ekspresi nuclear transgenic biasanya melibatkan penyisipan kromosomal acak, yang memerlukan screening sejumlah besar transgenik untuk menemukan garis yang dapat digunakan. Beberapa protein bakteri telah berhasil diekspresikan dalam kloroplas.