

# **Abschlussbericht für das Max-Buchner-Forschungsstipendium zum Thema “Biomonitoring pflanzlicher Zellkulturen zur Optimierung der Synthese pflanzlich relevanter Triterpene“**

## **Einleitung**

Zielstellung war die Etablierung einer leistungsfähigen Zell- und Gewebekultur von Salbei und Ginseng und die verfahrenstechnische Optimierung hinsichtlich der Produktion von Oleanol- und Ursolsäure. Die beiden Triterpensäuren Oleanol- und Ursolsäure (OA, UA) zeichnen sich durch ihre positiven Effekte im Bereich der Hepatoprotektion, der Entzündungshemmung, der Antihyperlipidemie und der Tumorbekämpfung als interessante Ausgangsstoffe für die pharmazeutische Industrie aus [Dzubak et al. 2006]. Der Einsatz pflanzlicher Zell- und Gewebekulturen kann eine kontinuierliche Produktion der genannten Triterpene von gleich bleibend hoher Qualität und Quantität erlauben, unabhängig von äußeren (Umwelt) Einflüssen. Da unterschiedliche Zelllinien eine enorme Varianz in ihrem Metabolismus aufwiesen, ist es erforderlich ihre Metabolitprofile und ihr Wachstum genau zu charakterisieren, um auf Grundlage dieser Informationen die Effektivsten zu selektieren.

## **Durchführung und Ergebnisse**

### Erzeugung von *in vitro* Kulturen

Wie im Zwischenbericht erläutert, wurden erfolgreich undifferenzierte Kallus- bzw. Zellkulturen von verschiedenen Salbeiarten (*S. officinalis*, *S. triloba* und *S. virgata*) unter Verwendung von drei Auxinen (2,4-Dichlorophenoxyessigsäure, Naphtylessigsäure, Picloram) und drei Cytokinin (N<sup>6</sup>-Benzyladenine, Kinetin, Zeatin) in 66 verschiedenen Kombinationen erzeugt. Diese Hormone sind zur Induktion von Kalluskulturen notwendig und müssen jeweils auf die entsprechende Pflanze bzw. Pflanzengewebe abgestimmt werden. Vom Ginseng wurden nur einige wenige Kalluslinien erhalten, die jedoch aufgrund der geringen Sterilität der erworbenen Pflanzen kontaminiert waren. *S. officinalis* sprach insgesamt besser auf die Hormonkombinationen an als *S. virgata* oder *S. triloba*. Besonders geeignet waren Kombinationen von 2,4-D und Kinetin sowie 2,4-D und Zeatin, auf diesen Kombinationen fand gutes Kalluswachstum bei allen 3 Salbeiarten statt. Hairy Root bzw. Wurzelhaar-Kulturen wurden nur in geringer Anzahl erhalten. Die erzeugten Hairy Root Linien wiesen eine ungeeignete Physiologie (Neigung zur Kallusbildung, vermindertes Wachstum) auf, weswegen sich die folgenden Arbeiten ausschließlich auf die Kalluskulturen konzentrierten. Ein Vorteil hiervon ist, dass Kalluskulturen leichter an herkömmliche Bioreaktorsysteme angepasst werden können als Hairy Root Kulturen.

### Screening der Kalluskulturen nach den Zielmetaboliten

Nach einer ersten Selektion nach Wachstum wurden die OA- und UA-Gehalte in den verbleibenden Kalluslinien mit Hilfe einer HPLC-Methode bestimmt. Die folgende Tabelle zeigt die minimalen, maximalen und medianen Konzentrationen von OA und UA in Kalluslinien der verschiedenen Pflanzen. Rechts sind die prozentualen Anteile an Kalluslinien dargestellt, die OA und UA in einem bestimmten Konzentrationsbereich produzieren.

**Tabelle 1 Maximale und minimale Gehalte von OA und UA in den Kalluslinien, sowie deren Konzentrationsverteilung**

Species	Nr. of Lines	Min [µg/g DW]		Median [µg/g DW]		Max [µg/g DW]		% - Portions of Lines in the Groups [µg/g DW]					
		OA	UA	OA	UA	OA	UA	0-200		200,1-800		>800	
								OA	UA	OA	UA	OA	UA
<i>S. officinalis</i>	57	0	0	80	215	1901	4294	75	40	19	44	5	18
<i>S. virgata</i>	33	47	33	318	245	1359	1050	36	36	58	58	6	6
<i>S. triloba</i>	6	279	408	-	-	825	2425	0	0	83	33	17	67
<i>P. ginseng</i>	4	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0

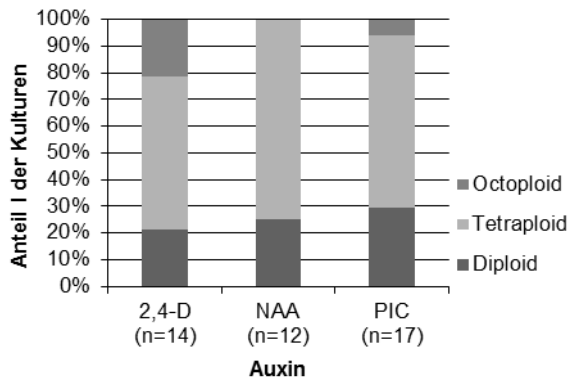
In den Kalli spiegeln sich die Konzentrationsverhältnisse der Ursprungspflanzen wider. *S. triloba* enthält von Natur aus mehr von den Triterpensäuren als *S. officinalis* oder *S. virgata* dementsprechend produzieren auch die Kalli die Zielmetabolite in höheren Konzentrationen. In *S. officinalis* und *S. triloba* wird in den Pflanzen, als auch in den Kalli, mehr UA gebildet als OA. *S. virgata* produziert OA und UA etwa zu gleichen Teilen bzw. etwas mehr OA und UA. Dies trifft sowohl auf Pflanzen als auch auf Kalli zu. Die Kalli von *P. ginseng* enthielten keine freie OA und UA und wurden aufgrund ihrer Kontamination verworfen. Das Screening verdeutlicht die große Varianz der Kalluslinien hinsichtlich Produktbildung und die daraus erwachsende Notwendigkeit von Selektion und Optimierung.

Ziel der Arbeit war es daher auch die genetische Stabilität und Ploidie der Kalluslinien mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu untersuchen.

### Einsatz der Durchflusszytometrie zum DNA-Profilung von verschiedenen Kalluslinien

Nach erfolgreicher Entwicklung eines Zellkernextraktionsprotokolls (Pufferauswahl, Aufschlussmethode) wurde der DNA-Gehalt der Kalluslinien von *S. officinalis* vermessen. Dabei werden die extrahierten Zellkerne zusammen mit einem Standard (z.B. Zellkerne der

Erbse) gemessen und so die Genomgröße und damit die Ploidie bzw. das DNA-Profil der Kalli bestimmt.



**Bild 1 Die prozentuale Verteilung von di-, tetra- und octoploiden Kalluslinien in Abhängigkeit des verwendeten Auxins**

Bild 1 zeigt, dass die Ploidieverteilungen nicht so stark vom eingesetzten Auxin abhängig sind. Insgesamt sind nur noch 25,6 % der untersuchten Kalli diploid, während 65,1 % der Kalli tetraploid sind und 9,3 % sogar octoploid. Da die Kalli von einer diploiden Pflanze stammen, fanden erhebliche Veränderungen in der Kopienanzahl der Chromosomensätze statt. Die Messungen wurden etwa 9 Monate nach der Kallusinduktion durchgeführt. Die Stabilität der Linien in Bezug auf die Ploidie ist also eher gering. Untersuchungen in längeren Zeitabständen könnten klären wann und ob dieser Prozess zum Erliegen kommt. Obwohl beschrieben wird, dass Gewebe bzw. Zellen mit höherer Ploidie langsamer wachsen als diploide Gewebe oder Zellen [De Jesus-Gonzales und Weathers, 2003], wurden keine nennenswerten Unterschiede im Wachstumsverhalten von di-, tetra- oder octoploiden Kalluslinien festgestellt. Untersuchungen über die Produktivität von OA und UA in den unterschiedlichen Kalli werden zum Zeitpunkt der Berichterstattung noch durchgeführt. Dabei soll geklärt werden, inwieweit sich die Produktivitäten in Kalluslinien unterschiedlicher Ploidie variieren und ob ein Zusammenhang zwischen der Bildung von OA und/oder UA und der Ploidie gefunden werden kann.

Die Kalluslinien zur Suspensionserzeugung wurden vor allem an Hand des Wachstumsverhaltens und der Gehalte an OA und UA ausgewählt. Von den neun Kalli die zur Etablierung von Suspensionskulturen eingesetzt wurden sind 5 tetraploid und 4 octoploid. Von den fünf Suspensionen, die erfolgreich etabliert werden konnten, sind 4 tetraploid. Von Linien, deren Wachstum im flüssigen Medium unzureichend und instabil war, sind hingegen 3 von 4 octoploid. Daraus ergibt sich eine leichte Tendenz zu schlechterem Wachstum von Kulturen mit höherer Ploidie. Bei den beiden vorhandenen *S.-virgata*-

Suspensionen produziert die octoploide Kultur wesentlich mehr als die tetraploide Kultur (1,36 mg OA+UA/(l·d) vs. 0,03 mg OA+UA/(l·d)), zeigt jedoch auch ein besseres Wachstum (1,1 g/(l·d) vs. 0,88 g/(l·d)). Für die *S.-officinalis*- sowie die *S.-triloba*-Suspensionen liegen jeweils nur zwei bzw. eine tetraploide Kultur vor.

Die vorliegenden Daten scheinen darauf hinzuweisen, dass die tetraploiden Suspensionskulturen ein besseres Wachstum zeigen als die octoploiden. Allerdings zeichnen sich die octoploiden Kulturen durch ein höheres Potenzial zur Produktion von OA und UA aus. Um allgemeine Aussagen treffen zu können ist die Datenlage zu gering.

Um die Proliferationsaktivitäten einzelner Zellen in der gesamten Population zu ermitteln, sollte die 2-parametrische Zellzyklusanalyse herangezogen werden. Neben dem DNA-Gehalt wird dabei der Einbau eines Thymidinanalogon bei der DNA-Synthese mit Hilfe von gefärbten Antikörpern detektiert. Bei diesem Protokoll sind verschiedene Zentrifugierungsschritte der empfindlichen Zellkerne nötig, die bezüglich Länge und Beschleunigung erfolgreich optimiert wurden. Leider gibt es im Protokoll zur Detektion des Thymidinanalogons Probleme mit unspezifischen Antikörperbindungen, die noch beseitigt werden müssen. Nach erfolgter Etablierung des Protokolls, wird die Methode auf die selektierte Suspension angewendet. So können Daten über einzelne Zellen in der Kultur und ihr Teilungsverhalten erhalten werden und damit die Prozessführung besser angepasst werden.

#### Auswahl von Zelllinien zur Suspensionserzeugung sowie deren Screening und Optimierung

Anhand der Quantifizierung von OA und UA durch die HPLC (siehe Tabelle 1) und die eindeutige Identifizierung mit der GC-MS wurden 9 Kalluslinien ausgewählt, die durch ihre Morphologie und Physiologie für die Etablierung einer Suspensionskultur geeignet sind. Die Etablierung von Suspensionskulturen kann unter Umständen schwierig sein und eine Änderung der Hormonkonzentration und –kombination erfordern. Deshalb wurde das Medium auf LS (Medium nach Linsmaier und Skoog) umgestellt und nur noch das Auxin 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure in einer Konzentration von 0,2 mg/l verwendet.

Sieben Linien wurden erfolgreich in Suspension etabliert und im RAMOS (Respiratory Activity MOnitoring System) untersucht. Es erlaubt die Online-Messung der Sauerstofftransferraten im Schüttelkolben. Mit Hilfe des RAMOS erhält man schneller umfangreichere Daten zum Wachstumsverhalten der Kulturen und durch Beprobung auch Daten zur Produktbildung. Tabelle 2 zeigt pro Salbeiart eine Suspension und ihre ermittelten Wachstums- sowie Produktbildungseigenschaften.

**Tabelle 2 Suspensionskulturen der 3 verwendeten Salbeiarten und ihre Produktivitäten**

Kultur, Tag d. Probenahme	OA-Produktivität [mg/(l*d)]	UA-Produktivität [mg/(l*d)]	Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ [g <sub>BM</sub> /g <sub>Zucker</sub> ]	Biomaseproduktivität [g/(l*d)]
<i>S. officinalis</i> (S1M5), Tag 11	1,668	1,924	0,476	1,334
<i>S. virgata</i> (S3M17), Tag 4	1,911	2,996	0,284	1,026
<i>S. triloba</i> (S5M17), Tag 9 *	1,817	4,127	0,394	0,970

\* in Kallusinduktionsmedium mit 2,4-D und Zeatin

Die Biomasseproduktivitäten sind gut und mit anderen Suspensionskulturen vergleichbar [Yanpaisan et al. 1998; Haas et al. 2008]. Die maximalen OA und UA-Gehalte in der Trockensubstanz liegen bei 1,1 - 1,4 mg/g bzw. 1,0 – 3,3 mg/g für die Suspensionen und sind vergleichbar mit anderen Suspensionskulturen zur Produktion von OA oder UA oder sogar besser [Bolta et al. 2000, Wang et al. 2004, Wiktorowska et al. 2010]. Im Vergleich zu den eingesetzten Ursprungspflanzen produzieren die Salbeisuspensionen jedoch nur 1/6 bis 1/10 der Konzentrationen.

Dabei ist jedoch darauf hinzuweisen, dass noch keinerlei Optimierungen vorgenommen wurden. Geplant sind die Optimierung des Mediums und der Einsatz von Elicitoren, die künstlich Stress in den Zellen verursachen und somit geeignet sind, die Produktion von Sekundärmetaboliten zu erhöhen. Nach Überführung in den Bioreaktor können weitere Parameter wie Sauerstoffeintrag, Fütterungsregime usw. angepasst werden.

Aus allen gesammelten Daten der RAMOS-Versuche können Bilanzen aufgestellt werden, die für eine nachfolgende Modellierung des Prozesses genutzt werden.

Die GC-MS Methode zur eindeutigen Identifizierung von OA und UA wurde angepasst und das Temperaturprogramm erweitert, um neben den Triterpensäuren weitere interessante bioaktive Pflanzenstoffe zu identifizieren. Die Aufnahme der Spektren erfolgte im simultanen SIM-Scan-Modus. Die erhaltenen MS-Spektren der Scan-Daten wurden mit Spektren der Datenbanken NIST und Wiley verglichen.

Auf diese Weise wurden ethanolische Extrakte der Suspensionen untersucht. Dabei wurden vor allem in einer Kultur von *S. virgata* höhere Mengen von Rosmarinsäure gefunden, welche für ihre antioxidativen Eigenschaften bekannt ist. Weiterhin wurde in allen Proben  $\beta$ -Sitosterol nachgewiesen, welches die Resorption von Cholesterol im Magen-Darm-Trakt

hemmt und so pharmakologisch interessant ist. Weitere zum Zeitpunkt der Berichtserstattung nachgewiesene Inhaltsstoffe waren Kaffee- und Ferulasäure sowie Derivate der Oleanolsäure.

### **Fazit und Ausblick**

Es wurden erfolgreich Kalluskulturen aus Salbei erzeugt, auf Zielmetabolite hin untersucht und geeignete zur Etablierung von Suspensionen ausgewählt. Durchflusszytometrische Analysen bestätigten die Neigung von *in vitro* Kulturen unter dem Einfluss von Hormonen zur Polyploidie. Untersuchungen an den Suspensionen zeigten aber auch die verbesserte Produktbildung von Kulturen mit höherer Ploidie. Mit Hilfe der GCMS wurden weitere Inhaltsstoffe mit biologisch interessanten Eigenschaften identifiziert. Die Ergebnisse von Screening und Analytik der Kallus- sowie Suspensionskulturen wurden bzw. werden als Posterbeitrag auf internationalen Konferenzen („Terpenist“, Sep. 2010 Istanbul; „GA 2011“, Sep. 2011 Antalya) vorgestellt.

### **Referenzen**

Bolta I, Bari evi D, Bohanec B, Andrenek S. A preliminary investigation of ursolic acid in cell suspension culture of *Salvia officinalis*. *Plant Cell Tissue Organ Cul.* 2000; 62(1): 57-63.

De Jesus-Gonzales L, Weathers PJ. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Rep.* 2003; 21: 809-813.

Haas C, Weber J, Ludwig-Müller J, Deponte S, Bley T, Georgiev M. Flow Cytometry and Phytochemical Analysis of a Sunflower Cell Suspension Culture in a 5-L Bioreactor. *Z. Nat.forsch.* 2008; 63c: 699-705.

Wang JW, Xia ZH, Chu JH, Tan RX. Simultaneous production of anthocyanin and triterpenoids in suspension cultures of *Perilla frutescens*. *Enzyme Microb. Technol.* 2004; 34(7): 651-656.

Wiktorowska E, Dlugosz M, Janiszowska W. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Enzyme Microb. Technol.* 2010; 46(1): 14-20.

Yanpaisan W, King NJC, Doran PM. Analysis of Cell Cycle Activity and Population Dynamics in Heterogeneous Plant Cell Suspensions Using Flow Cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* 1998; 58(5): 515-528.