

Biotechnologische Produktion biogener Wirkstoffe

Wurzelkulturen als Produktionssystem

MICHAEL WINK, BERNHARD WETTERAUER
INSTITUT FÜR PHARMAZIE UND MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE,
UNIVERSITÄT HEIDELBERG

A number of plant natural products are of commercial interest for pharmacy, medicine, agriculture, or nutrition. A challenge for biotechnology is the production of such compounds *in vitro*. Whereas callus and suspension cultures of plants mostly fail as production systems, differentiated root cultures provide a better platform. We established normal and transformed root cultures of *Ophiorrhiza mungos*, which produce the anti-cancer drug camptothecin in yields, which are similar to differentiated plants.

DOI: 10.1007/s12268-019-1073-3
© Springer-Verlag 2019

■ Die Natur liefert ein weites Spektrum an biogenen Wirkstoffen, die von wirtschaftlicher Bedeutung sind. Sie werden in der Pharmazie, Medizin, Landwirtschaft, Technik und Ernährung eingesetzt. Bekannte Beispiele für niedermolekulare Wirkstoffe sind Antibiotika, Vitamine und essenzielle Nahrungsstoffe. Pflanzen produzieren eine große chemische Diversität von Naturstoffen, auch pflanzliche Sekundärstoffe genannt, die von den Pflanzen seit Jahrmillionen zur Verteidigung gegen Pflanzenfresser und Mikroorganismen, aber auch zur Kommunikation (z. B. bestäubende Insekten) eingesetzt werden. Da diese Substanzen für das Überleben der Pflanzen wichtig sind, wurden ihre Strukturen im Verlauf der Jahrmillionen durch Selektion so optimiert, dass sie mit wichtigen Targets in Tieren und Mikroorganismen interagieren können. Daher liegen diese Naturstoffe als biologisch aktive Substanzen vor [1, 2].

Traditionell wurden Pflanzen von unseren Vorfahren als Heilpflanzen eingesetzt, um Infektionen, Entzündungen und andere Gesundheitsstörungen zu behandeln. Aus der traditionellen Medizin gingen Wirkstoffe hervor, die als isolierte Naturstoffe auch heute noch in der Medizin eingesetzt werden (**Tab. 1**). Daneben setzt die Phytotherapie Extrakte zur Behandlung von Krankheiten ein, z. B. Extrakte aus *Ginkgo biloba* gegen Demenzerkrankungen und Durchblutungsstörungen, Extrakte aus Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) gegen Depression oder

Extrakte aus Weißdorn (*Crataegus monogyna*) gegen Herzinsuffizienz [1, 2].

Viele Naturstoffe zeigen eine antibiotische Wirkung. Unter den pflanzlichen Sekundärstoffen sind dies vor allem einige Alkaloide wie Sanguinarin, Berberin, Isothiocyanate, Polyphenole und Terpene (Monoterpene, Sesquiterpene, Saponine) [1, 2]. Viele Pro- und Eukaryoten produzieren außerdem kleine antimikrobielle Peptide (AMPs), die schnell zum Tod von Bakterien führen können. AMPs werden seit Jahren als Ersatz oder Ergänzung der Antibiotika erforscht, um neue Mittel gegen multi-resistente Bakterien zu entwickeln [3–6].

Tab. 1: Pflanzliche Naturstoffe (Auswahl), die als isolierte Substanzen medizinisch eingesetzt werden (nach [1]).

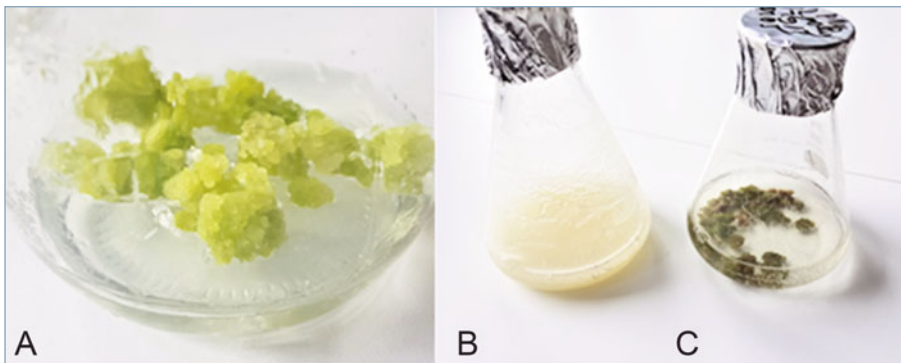
Substanz	Herkunft	Target	Verwendung
Vinblastin, Vincristin	<i>Catharanthus roseus</i>	Mikrotubuli	Krebstherapie
Paclitaxel	<i>Taxus spec.</i>	Mikrotubuli	Krebstherapie
Camptothecin	<i>Camptotheca acuminata</i> u. a.	DNA-Topoisomerase I	Krebstherapie
Morphin	<i>Papaver somniferum</i>	Endorphinrezeptor	Schmerztherapie
Codein	<i>Papaver somniferum</i>	Hustenzentrum	Hustentherapie
Galanthamin	<i>Galanthus nivalis</i>	Acetylcholinesterase	Alzheimer-Therapie
Herzglykoside	<i>Digitalis spec.</i>	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Herzinsuffizienz
Pilocarpin	<i>Pilocarpus jaborandi</i>	Acetylcholinrezeptor	Glaukomtherapie
Podophyllotoxin/Etoposid	<i>Podophyllum spec.</i>	Mikrotubuli/DNA-Topoisomerase	Krebstherapie
Reserpin	<i>Rauvolfia serpentina</i>	Transportprotein für Wiederaufnahme von Neurotransmittern	Hypertonie

Produktion pflanzlicher Naturstoffe

Viele der genannten Naturstoffe sind von wirtschaftlichem Interesse. Daher stellt sich die Frage nach einer verlässlichen und ökonomischen Produktion. Da die Stereochemie vieler Naturstoffe sehr komplex ist, gibt es häufig keine ökonomischen chemischen Totalsynthesen, sodass die biologische Produktion im Vordergrund steht. Viele Arzneipflanzen werden heute weltweit als Spezialkulturen angebaut. Nach der Ernte erfolgt ein aufwendiges *downstream processing*, an dessen Ende ein Spezialextrakt oder ein isolierter Naturstoff steht.

Für die Biotechnologie stellt sich die Herausforderung, den Produktionsprozess in das Labor zu überführen und wertvolle Naturstoffe *in vitro* zu produzieren, so wie dies heute schon bei der Produktion von Antibiotika oder Vitaminen der Fall ist.

Grundsätzlich eignen sich Pflanzen hervorragend für *in vitro*-Prozesse, da man von vielen Arten leicht *in vitro*-Kulturen anlegen kann. Setzt man geeignete Kulturmedien ein, so kann man aus differenzierten Geweben (Blätter, Spross, Samen) undifferenzierte Kallus- und Suspensionskulturen (**Abb. 1**) etablieren. Suspensionskulturen lassen sich leicht auf Schüttlern oder im Fermenter kultivieren – diese Technologie ist bereits seit 40 Jahren im Einsatz. Anfangs wurde große



▲ **Abb. 1:** Bilder von Kallus- und Suspensionskulturen. **A**, Kalluskultur von *Lupinus polyphyllus*. **B**, Suspensionskulturen: feinzellige Kultur von *Nicotiana tabacum* (links) und ergrünte Aggregatkultur von *Lupinus polyphyllus* (rechts).

Hoffnung darauf gesetzt, in Suspensionskulturen wertvolle Sekundärstoffe zu produzieren, da einige Kulturen durchaus in der Lage waren, diverse Polyphenole, Betalaine oder Farbstoffe zu synthetisieren. Leider war es jedoch nicht möglich, in diesen Kulturen ökonomisch wertvolle Substanzen wie Morphin, Vinca-Alkaloide oder Camptothecin überhaupt oder in nennenswerten Mengen zu produzieren. Der Grund liegt wahrscheinlich darin, dass in den undifferenzierten Suspensionskulturen viele Gene abgeschaltet werden, unter ihnen viele Gene des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels [7, 8].

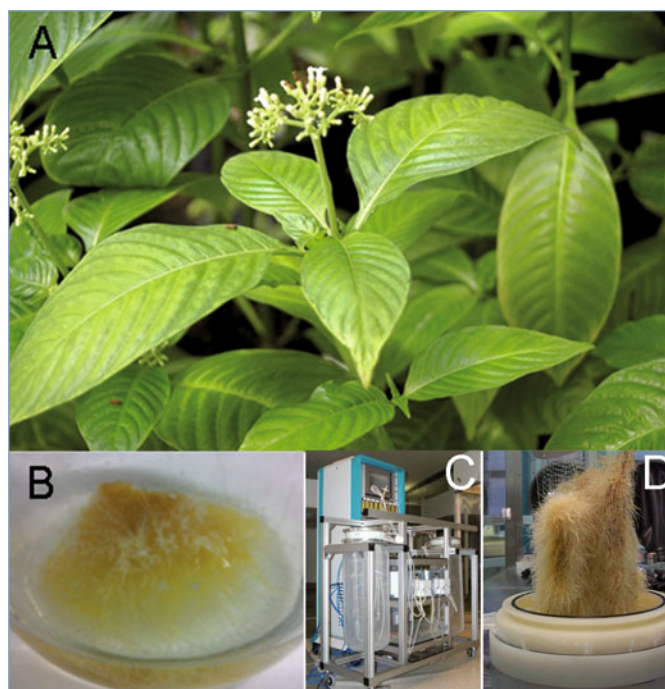
Aus den undifferenzierten Zellkulturen kann man wiederum differenzierte Spross-, Blatt- und Wurzelkulturen etablieren, die man teilweise auch in Fermentern kultivieren kann. Wurzelkulturen kann man zudem durch den Einsatz von *Agrobacterium rhizogenes* etablieren. Als Ergebnis des Transformationsprozesses bilden die infizierten Gewebe Wurzeln (*hairy roots*) aus, die ohne Zugabe von Phytohormonen kultivierbar sind. Erfreulicherweise kann man in normalen und in transformierten Wurzelkulturen (**Abb. 2**) solche Sekundärstoffe produzieren, deren Biosynthese normalerweise in der Wurzel erfolgt. Beispiele für pflanzliche Sekundärstoffe, die in Wurzelkulturen gebildet werden, sind Tropan-, Chinolin-, Morphinan-, Indol- und Steroidalkaloide, Anthrachinone und Thiophene [7–10]. Auch sind die Ausbeuten oft so hoch, dass man Wurzelkulturen durchaus für eine biotechnologische Produktion nutzen könnte.

An dieser Stelle möchten wir ein System für die Produktion von Camptothecin (CPT) erläutern, das wir in unserem Labor erfolgreich etablieren konnten. CPT ist ein Monoterpenindolalkaloid, das die DNA-Topoisomerase I und damit die Zellteilung hemmt, und zur Chemotherapie diverser Tumoren klinisch eingesetzt wird. CPT wird durch Extraktion aus Pflanzen, z. B. aus dem Chinesischen Glücksbaum (*Camptotheca acuminata*) gewonnen. Dieser Baum wird im tropischen China und in den USA (z. B. Louisiana, Texas, Kalifornien) in großen Plantagen angebaut, und das CPT wird aus drei Jahre alten Bäumen extrahiert [11]. Da die Kultivierung und Extraktion aufwendig sind, lag der Preis 2013 für ein Kilogramm CPT bei mindestens 3.500 Euro (Übersicht in [12]). Da Wurzelkulturen aus *C. acuminata* kaum CPT produzieren, haben wir eine andere Pflanzenart, nämlich *Ophiorrhiza mungos*, gewählt, die in den Wurzeln CPT synthetisiert. Während Kallus- und Zellsuspensions-

kulturen nur geringe Mengen CPT enthalten, konnten wir zeigen, dass nicht-transformierte („normale“) und transformierte Wurzelkulturen CPT in nennenswerten Mengen produzieren und sowohl intrazellulär speichern als auch in das Kulturmedium abgeben. Wie man der **Tabelle 2** entnehmen kann, sind die Ausbeuten an CPT *in vitro* gleich hoch oder sogar höher als in der differenzierten Pflanze. In Zusammenarbeit mit der Start-up-Firma Rootec gelang es uns, ein Fermentersystem für Wurzelkulturen aufzubauen (**Abb. 2**, [7, 12]), in dem die Wurzeln kontinuierlich kultiviert werden und das ausgeschiedene CPT aus dem Medium gewonnen werden kann. Leider gelang es uns jedoch nicht, einen industriellen Partner zu finden, der das funktionierende biotechnologische Produktionssystem hätte übernehmen wollen. Offenbar sprachen ökonomische Gründe dagegen. Da CPT einen der hochpreisigsten pflanzlichen Naturstoffe darstellt, sollte man eine realistische Erwartungshaltung für die *in vitro*-Produktion anderer pflanzlicher Sekundärstoffe entwickeln.

Die Biosynthesewege, die zu den wichtigen Naturstoffen führen, sind teilweise schon komplett untersucht und die beteiligten Gene identifiziert. Hier stellt sich die biotechnologische Herausforderung, diese Gene parallel in einem Mikroorganismus (*E. coli*, Hefe) zu exprimieren. Für die Biosynthesewege, die zu Flavonoiden, Morphin, Berberin, Paclitaxel und Artemisinin führen, ist dies teilweise grundsätzlich gelungen [13]. Bislang blieben

fermentersystem hätte übernehmen wollen. Offenbar sprachen ökonomische Gründe dagegen. Da CPT einen der hochpreisigsten pflanzlichen Naturstoffe darstellt, sollte man eine realistische Erwartungshaltung für die *in vitro*-Produktion anderer pflanzlicher Sekundärstoffe entwickeln.



◀ **Abb. 2:** *Ophiorrhiza mungos*. **A**, Pflanze. **B**, **D**, Wurzelkultur. **C**, Fermentersystem für Wurzelkulturen [7].

Tab. 2: Produktion von Camptothecin (CPT) im Vergleich Pflanze und Organkultur (aus [12]).

Art	Organ/Kultur	CPT-Produktion (mg/kg FG)	CPT-Produktion (mg/kg TG)
<i>Camptotheca acuminata</i>	Samen		943
	Blätter		100–482
	Äste		40–240
	Rinde		120–620
	Wurzeln (Pflanze)	63 ± 3	375 ± 20
	Kallus	0,18 ± 0,1 (m. H.)	43 ± 0,2 (m. H.)
	Suspensionskulturen	3,5 ± 0,4 (m. H.); 9,9 ± 0,2 (o. H.)	55,2 ± 6 (m. H.); 103 ± 2 (o. H.)
	Transformierte Wurzelkulturlinien (Platte)	5,5 ± 1	45 ± 4
<i>Ophiorrhiza mungos</i>	Samen		103
	Wurzeln (Pflanze)	432 ± 3	1.853 ± 13
	Kallus	0,45 ± 0,2 (m. H.)	7,3 ± 3 (m. H.)
	Suspensionskulturen	0,3 ± 0,1 (m. H.); 22 ± 1 (o. H.)	4 ± 2 (m. H.); 122 ± 3 (o. H.)
	Normale Wurzelkultur	220 ± 20	2.500 ± 250

FG = Frischgewicht, TG = Trockengewicht, m. H. = mit Hormonen, o. H. = ohne Hormone

die Ausbeuten jedoch weit hinter denen der differenzierten Pflanzen zurück, sodass diese rekombinanten Systeme aktuell noch keine biotechnologische Alternative darstellen.

Wurzel- und Suspensionskulturen eignen sich außerdem zur Produktion von rekombinanten Proteinen. Wir konnten dies am Beispiel von Thaumatin [14] und Erythropoietin [15] demonstrieren.

Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind kleine, gencodierte Peptide, die von vielen Organismen produziert werden. Sie sind oft membranaktiv und können die Biomembranen von Mikroorganismen lysieren. Daher wirken sie bakterizid und die Wirkung erfolgt innerhalb einer Stunde. Die AMPs sind demnach grundsätzlich interessant zur Therapie von Sepsis und von Infektionen mit Pathogenen, die resistent gegen Antibiotika sind. Denn viele AMPs greifen auch MDR(*multi drug resistance*)-Pathogene an. Um diese AMPs untersuchen zu können, muss man sie zunächst herstellen, denn sie sind meist kommerziell nicht erhältlich [3–5].

Zur Produktion kommt die Peptidsynthese [6], aber auch die Produktion in rekombinanten Systemen (Bakterien, Hefen, Suspensions- und Wurzelkulturen) infrage [3–5, 16].

Da die AMPs biologisch aktiv sind, kann man sie rekombinant nicht direkt produzieren, denn sie würden die Wirtszellen abtöten. Stattdessen exprimiert man sie als Fusionsprotein, das nicht membranaktiv ist, und schneidet nach der Produktion das AMP gezielt durch Proteasen heraus. Nach der Aufreinigung kann es dann direkt getestet werden. Wir konnten diese biotechnologischen Verfahren am Beispiel von Ranalexin, IbAMP4, Snakin und Afusin in unserem Labor etablieren [3–5, 16]. Die rekombinanten AMPs waren biologisch hoch aktiv und unterschieden sich nicht von den nativ gebildeten. Antimikrobielle Peptide sind also spannende Kandidaten zur Behandlung von MDR-Pathogenen und könnten auch eingesetzt werden, um Kulturpflanzen gegen Infektionen zu stärken.

Danksagung

Die Autoren danken der DFG und BMFT für finanzielle Unterstützung, ferner Heidi Staudter für die Kultivierung vieler Pflanzen sowie früheren Mitarbeitern (N. Bich Pham, P. Gurusamy, C. Dziggel, M. Distl, K. Sesterhenn, R. Aleinein, V. Herbel, A. Contreras, C. Domhan, X. Fan) und Kollegen der Rootec GmbH (E. Wildi, P. Ripplinger) für die erfolgreiche Zusammenarbeit. ■

Literatur

- [1] van Wyk B-E, Wink C, Wink M (2015) Handbuch der Arzneipflanzen. 3. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- [2] van Wyk B-E, Wink M (2015) Phytomedicines, Herbal drugs and Poisons. Cambridge University Press, Cambridge
- [3] Aleinein R, Hamoud R, Schäfer H et al. (2013) Molecular cloning and expression of ranalexin, a bioactive antimicrobial peptide from *Rana catesbeiana*, in *Escherichia coli* and assessment of its biological activities. *Appl Microbiol Biotech* 97:3535–3543
- [4] Herbel V, Wink M (2016) Mode of action and membrane specificity of the antimicrobial peptide snakin-2. *PeerJ* 4:e1987
- [5] Contreras AG, Braun M, Schäfer H et al. (2018) Recombinant afusinC, an anionic fungal CSAß defensin from *Aspergillus fumigatus*, exhibits antimicrobial activity against gram-positive bacteria. *PLoS One* 13:e0205509
- [6] Domhan C, Uhl P, Zimmermann S et al. (2018) A novel tool against multiresistant bacterial pathogens – lipopeptide modification of the natural antimicrobial peptide ranalexin for enhanced antimicrobial activity and improved pharmacokinetics. *Int J Antimicrob Agents* 52:52–62
- [7] Wink M, Alfermann AW, Franke R et al. (2005) Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant *in vitro* cultures: anticancer agents. *Plant Gen Res* 3:90–100
- [8] Kolewe ME, Gaurav V, Roberts SC (2008) Pharmacologically active natural products synthesis and supply via plant cell culture technology. *Mol Pharm* 5:243–256
- [9] Srivastava S, Srivastava AK (2007) Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Crit Rev Biotech* 27:29–43
- [10] Guillon S, Trémoullaux-Guiller J, Pati PK et al. (2006) Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends Biotechnol* 24:403–409
- [11] Li S, Adair KT (1994) Xi Shu, a promising anti-tumor and anti-viral tree for the 21st century. *ScholarWorks, Book 12*, <http://scholarworks.sfasu.edu/ebooks/12>
- [12] Wetterauer B, Wildi E, Wink M (2018) Production of the anticancer compound camptothecin in root and hairy root cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. In: Nitish K (Hrsg) *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants – Conservation, Genetic Improvement and Utilization*. Springer, Singapore, S 303–341
- [13] Bich Pham N, Schäfer H, Wink M (2012) Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures. *Biotech J* 7:537–545
- [14] Gurusamy PD, Schäfer H, Siva R et al. (2017) Biologically active recombinant human erythropoietin expressed in hairy root cultures and regenerated plantlets of *Nicotiana tabacum*. *PLoS One* 12:e0182367
- [15] Dziggel C, Schäfer H, Wink M (2016) Production of valuable plant secondary metabolites in recombinant microorganisms. *Biotech J* 12, doi: 10.1002/biot.201600145
- [16] Aleinein RA, Schäfer H, Wink M (2015) Rhizosecretion of the recombinant antimicrobial peptide ranalexin from transgenic tobacco hairy roots. *Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences*, e-ISSN:2320-0189



Michael Wink (li) und Bernhard Wetterauer

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Michael Wink
Institut für Pharmazie und Molekulare
Biotechnologie
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 364
D-69120 Heidelberg
Tel.: 06221–544880
wink@uni-heidelberg.de