

# **Abschlussbericht**

August 2016

**„Pharmakologisch aktive Oliven-Polyphenole aus *Olea europaea* Zellkulturen – Alternative Technologieplattform zur Vermeidung von Lösungsmittlextraktion aus hochwertigen Lebensmittelölen“**

**OleoCell**

**Aktenzeichen: AZ 32456/01**

**Verfasser:** Prof. Dr. Heribert Warzecha, Katja Berscht

**Firma/Institution:** TU Darmstadt, N-Zyme BioTec GmbH

**Projektbeginn:** 01.03.2015

**Projektlaufzeit:** 18 Monate

Darmstadt, 21.11.2016

**Projektkennblatt**  
der  
**Deutschen Bundesstiftung Umwelt**



Az	<b>32456</b>	Referat	<b>32</b>	Fördersumme	<b>124.323 €</b>
<b>Antragstitel</b>		„Pharmakologisch aktive Oliven-Polyphenole aus <i>Olea europaea</i> Zellkulturen – Alternative Technologieplattform zur Vermeidung von Lösungsmittelextraktion aus hochwertigen Lebensmittelölen“			
<b>Stichworte</b>					
Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)		
<b>18 Monate</b>	<b>01.03.2015</b>				
Zwischenberichte	Dez. 2015				
<b>Bewilligungsempfänger</b>	N-Zyme BioTec GmbH Haasstraße 9 64293 Darmstadt			Tel	06151-3912765
				Fax	06151-3912779
				Projektleitung Dr. Jens Zotzel	
				Bearbeiter Katja Berscht	
<b>Kooperationspartner</b>	1) Technische Universität Darmstadt Fachbereich Biologie, AG Plant Biotechnology/Metabolic Engineering Prof. Dr. H. Warzecha Schnittspahnstraße 4 64287 Darmstadt				
<b>Zielsetzung und Anlass des Vorhabens</b>					
<p>Olivenöle können eine Vielzahl phenolischer Verbindungen enthalten, wobei die höchsten Mengen in Extra Virgine Olivenöl (EVOO) gefunden werden. Eine große Zahl von epidemiologischen und wissenschaftlichen Untersuchungen belegen pharmakologische und gesundheitsförderliche Effekte dieser Olivenöl-Polyphenole. Die industrielle Gewinnung bestimmter Polyphenole erweist sich jedoch als schwierig. Weder die organische Lösungsmittelextraktion aus EVOO, noch die Extraktion aus Reststoffströmen der olivenverarbeitenden Industrie oder die chemische Synthese gefolgt von mehreren Reinigungsschritten führten zu ökonomisch und ökologisch vertretbaren Prozessen. Innerhalb des Projektvorhabens soll die Machbarkeit der Verwendung von pflanzlichen Olivenzellkulturen zur Lösung des genannten Problems untersucht werden.</p>					
<b>Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden</b>					
<p>Im Projektvorhaben soll erstmalig die Machbarkeit zur Herstellung von Olivenöl-Polyphenolen durch gezielte molekularbiologische Veränderungen im Sekundärstoffwechsel von Oliven und Kultivierung von Olivenzellen (<i>Olea europaea</i>) gezeigt werden. Von verschiedenen Olivensorten werden Zellkulturen angelegt und das Polyphenol-Metabolitspektrum mittels DAD-RP-HPLC analysiert. Parameter für ein optimales Zellwachstum sollen ermittelt werden. Mittels molekularbiologischer Methoden sollen die aussichtsreichsten Zelllinien hinsichtlich spezifischer Anreicherung von Metaboliten optimiert werden. Dafür sollen moderne Techniken wie <i>deep sequencing</i> und ein <i>Data-Mining</i> aus den derzeit öffentlich zugänglichen Genom- und Transkriptom-Daten sowie Daten zur Metabolitenverteilung in verschiedenen Geweben herangezogen werden. Anschließend sollen durch selektive enzymatische Biotransformation aus den Vorläufermolekülen, die gewünschten Zielmoleküle im Labormaßstab hergestellt und mittels moderner DSP-Methoden gereinigt werden.</p>					
Deutsche Bundesstiftung Umwelt ● An der Bornau 2 ● 49090 Osnabrück ● Tel 0541/9633-0 ● Fax 0541/9633-190 ● <a href="http://www.dbu.de">http://www.dbu.de</a>					

## **Ergebnisse und Diskussion**

Aus unterschiedlichen Varietäten von *Olea europaea* L. wurden Zellkulturen angelegt und die Kultivierung durch Optimierung von Medium und Kulturbedingungen insbesondere Passagezeiten etabliert. Homogene Zellsuspensionen ließen sich mit *Olea europaea* L. cv. Chemlali und Coratina als Dauerkulturen erstellen und damit wurde das primäre Ziel erreicht.

Die Polyphenolanalyse mittels RP-HPLC der Zellinhaltsstoffe nach methanolischen Zellaufschluss zeigte, dass es sich bei der Hauptsubstanz in Kallus sowie Zellsuspension um ein Phenylpropanoid handelt, welches über sämtliche Kultivierungsphasen in großen Mengen (bis 100 mg/g Trockengewicht) und hoher Reinheit vorliegt. Dieses ist ein Hydroxytyrosol-Derivat mit pharmakologischen Wirkungen, das sich im Biosyntheseweg von Secoiridoiden, zu denen Oleuropein gehört, unterscheidet. Entgegen der durch Literaturdaten gestützten Erwartungen ließ sich Oleuropein nicht steuerbar bilden. In frischen Zellkulturen, konnte Oleuropein nachgewiesen werden, in älteren Kulturen jedoch nicht mehr. Die eingesetzten Elicitoren Methyljasmonat, Salicylsäure und Hefeextrakt führten nicht zu der gewünschten Beeinflussung einer gesteigerten Oleuropeinbildung.

Zur Identifikation eines Enzymsystems, welches für eine putative Ligstrosid-3-Hydroxylase verantwortlich ist, wurden potentielle Zielensequenzen identifiziert, aus Gewebe isoliert und kloniert sowie in Hefezellen exprimiert und daraus Mikrosomenpräparationen erstellt. In deren anschließenden Charakterisierung mit polyphenolischen Substraten konnte jedoch keine Hydroxylierungsreaktion dieser Substrate bestätigt werden. Allerdings konnte mit Zelllysaten sowie einer Mikrosomenpräparation aus Olivenzellen die Hydroxylierung von Tyrosol zu Hydroxytyrosol gezeigt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Biosyntheseweg von Oleuropein bzw. Ligstrosid noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Entgegen der Literatur wäre nach diesen Ergebnissen statt der Hydroxylierung von Ligstrosid auch eine Bildung von Oleuropein aus Hydroxytyrosol und Oleurosid-11-methylester möglich.

Das vorliegende Enzymsystem, welches Tyrosol hydroxyliert, ist vermutlich membranständig, kann durch EDTA inhibiert werden und zeigt keine Abhängigkeit von NADPH. Diese Eigenschaften sind nicht eindeutig einer Monooxygenase zu zuordnen, sondern könnten auch auf eine Beteiligung einer Phenoloxidase hinweisen.

## **Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation**

Bisher wurden noch keine Daten veröffentlicht.

## **Fazit**

Die Implementierung von Zellkulturen aus *Olea europaea* L. konnte erfolgreich umgesetzt werden und außerdem stabile Zellsuspensionen etabliert werden. Trotz Schwankungen bei den Polyphenolgehalten, konnte ein pharmakologisch interessantes Hydroxytyrosol-Derivat über sämtliche Kultivierungsstadien reproduzierbar in großen Mengen nachgewiesen werden. Da dieses ähnliche Eigenschaften hat wie Oleuropein, sollte der Produktionsprozess weiter verfolgt werden, um so die gewonnen Ergebnisse mit einer zusätzlichen Substanz kommerziell zu nutzen.

Die identifizierten Enzymsysteme zeigten keine Aktivität als Ligstrosid-3-Hydroxylase und auch mittels Zelllysaten/Olivenmikrosomen konnte nur die Hydroxylierung von Tyrosol nachgewiesen werden. Daher wird es zunächst nötig sein, die Biosynthese der Polyphenole Oleuropein/Ligstrosid besser zu verstehen, um dann gezielt metabolisch/ genetisch eingreifen zu können. Denkbar wäre auch, dass aufgrund der ähnlichen Zellschutzwirkung zunächst die Synthese von Phenylpropanoiden gehemmt werden muss, um eine signifikante Bildung der Zielmoleküle zu generieren.

## Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis.....	5
2	Tabellenverzeichnis.....	6
3	Zusammenfassung.....	7
4	Anlass und Zielsetzung des Projektes .....	9
5	Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden .....	9
5.1	Etablierung von Keimlingen und Kallus- sowie Zellsuspensionskulturen von <i>Olea europaea</i> .....	9
5.2	Herstellung von Zellkulturen von <i>Ligustrum sp.</i> .....	12
5.3	Induktionsexperimente zur Steigerung des Polyphenolgehalts in Zellkulturen....	12
5.4	Zellanalyse.....	12
5.5	Klonierungsarbeiten und Produktion rekombinanter Proteine .....	13
5.5.1	Isolierung von RNA und cDNA Synthese .....	13
5.5.2	Klonierung der Zielsequenzen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	13
5.5.3	Induktion der Genexpression und Herstellung von Hefemikrosomen .....	13
5.5.4	Herstellung von Pflanzenmikrosomen .....	13
5.6	Herstellung von Ligstrosid.....	14
5.7	Enzymanalyse.....	14
6	Ergebnisse .....	15
6.1	Optimierte Wuchsbedingungen.....	15
6.2	Wahl der Zellaufschlussmethode.....	17
6.3	Zellanalysen.....	18
6.4	Liguster Kallus .....	21
6.5	Induktionsversuche Olivenblätter.....	21
6.6	Induktionsversuche Zellsuspensionen .....	23
6.7	Induktionsversuche Kalli .....	24
6.8	Klonierung des Kandidatengens für die Ligstrosid-3-Hydroxylase (L3H).....	25
6.9	Expression der Zielsequenz in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
6.10	Verwendung von Olivenzelllysaten zur Hydroxylierung von Tyrosol-Derivaten ...	30
6.11	Mikrosomenanalyse.....	31
6.12	Inhibierung der Hydroxylierung von Tyrosol-Derivaten .....	32
6.13	Biotransformation von Ligstrosid zu Oleocanthal .....	33
7	Diskussion.....	35
7.1	Inwieweit wurden die verfolgten Ziele erreicht? .....	35
7.2	Woraus ergeben sich die Abweichungen der erhaltenen Ergebnisse (aufgetretene Probleme, Veränderungen bezüglich Strategie oder angewandter Methoden)? .....	37
7.3	Wie gestaltete sich die Arbeit mit den unterschiedlichen Kooperationspartnern (Institute, Firmen, Kommunen, Länder)? .....	39
8	Öffentlichkeitsarbeit .....	39
9	Fazit .....	39
9.1	Hat sich die Vorgehensweise bewährt (evtl. veränderte Lösungsansätze, Ideen...)?	39
9.2	Werden Änderungen der Zielsetzung notwendig? .....	40
10	Literaturangaben.....	41
11	Anlagen/Anhang.....	42

## 1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Olea europaea</i> Kallus Kulturen. Während das linke Bild das sogenannte „Browning“ anhand eines Seedeo Kallus verdeutlicht, ist auf dem rechten Bild ein locker wachsender, grüner Kallus der Varietät Chemlali zu sehen. ....	15
Abbildung 2: Suspensionskultur der Varietät <i>O. europaea</i> L. cv. Chemlali.....	16
Abbildung 3: Kultivierung von <i>Olea europaea</i> cv. Chemlali in gerührtem Glasfermenter Minifors, 5 d nach Animpfen.....	16
Abbildung 4: Polyphenolspektrum nach methanolischer bzw. wässriger, heißer Extraktion von grüner Kalluskultur .....	17
Abbildung 5: Polyphenolspektrum nach methanolischer Extraktion im Vergleich zum optimierten methanolischen Verfahren von Suspensionskultur.....	18
Abbildung 6: RP-HPLC-Analyse bei 240 nm eines Zellaufschlusses von Kalluszellen von <i>Olea europaea</i> Seedeo mit Spektrumvergleich Oleuropein.....	19
Abbildung 7: RP-HPLC-Analyse bei 240 nm eines Zellaufschlusses von Kalluszellen von <i>Olea europaea</i> Chemlali mit Spektrumvergleich Oleuropein.....	20
Abbildung 8: RP-HPLC-Analyse bei 240 nm eines Zellaufschlusses Suspensionszellen von <i>Olea europaea</i> .....	20
Abbildung 9: Vergleich von RP-HPLC-Analysen bei 240 nm von Zellaufschlüssen aus Kallus von <i>Olea europaea</i> Chemlali (blau) mit Liguster (rot) .....	21
Abbildung 10: Induktion Olivenblätter mit Methyljasmonat durch Eintauchen der Blätter in Lösung .....	22
Abbildung 11: Induktion Olivenblätter mit Methyljasmonat durch Infiltrieren der Blätter....	23
Abbildung 12: Induktion Olivenblätter mit Salicylsäure durch Infiltrieren der Blätter .....	23
Abbildung 13: Vergleich der Reaktionen von Phenolester-3'-Hydroxylase (oben) und der putativen Ligstrosid-3-Hydroxylase (unten).....	25
Abbildung 14: 1%iges Agarosegel mit PCR-Produkt nach cDNA-Synthese. M, Marker; 1, <i>O. europaea</i> Seedeo Kallus; 2, <i>O. europaea</i> Seedeo Blätter; 3 <i>O. europaea</i> Dürr Blätter .....	26
Abbildung 15: Schema der Variationsmöglichkeiten des pGreG-Vektors sowie Klonierungsschema zur Expression der putativen L3H in Hefe .....	29
Abbildung 16: Chromatogrammausschnitt zur Hydroxylierung von Tyrosol mittels Zellen aus <i>Olea europaea</i> Chemlali .....	30
Abbildung 17: Chromatogramm zur Hydroxylierung von Tyrosol mittels Mikrosom aus <i>Olea europaea</i> Chemlali .....	31
Abbildung 18: Chromatogrammausschnitt zur Hydroxylierung von Tyrosol mittels Zellen aus <i>Olea europaea</i> Chemlali unter Zugabe potentieller Inhibitoren .....	32
Abbildung 19: Chromatogrammausschnitt zur Hydroxylierung von Tyrosol mittels Zellen aus <i>Olea europaea</i> Chemlali unter Zugabe 1-10 mM EDTA als Inhibitor .....	33
Abbildung 20: RP-HPLC-Chromatogramm der enzymatischen Biotransformation von Ligstrosid aus Ligusterblättern (braun) zu Oleocanthal (rot).....	34
Abbildung 21: Beschriebene Biosynthesewege von Oleuropein, Ligstrosid und Verbascosid von Alagna <i>et al.</i> (2012) .....	36
Abbildung 22: Hypothetische Synthesewege von Oleuropein .....	38

## 2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Medienzusammensetzung "Rugini Olive Medium including vitamins" (Duchefa Biochemie B.V., Niederlande) .....	10
Tabelle 2: "Gamborg B5 Medium including vitamins" (Duchefa Biochemie B.V., Niederlande) .....	11
Tabelle 3: Übersicht der verschiedenen Verfahren zum Zellaufschluss .....	12
Tabelle 4: Induktion von Zellsuspensionen mit Methyljasmonat bzw. Salicylsäure.....	24
Tabelle 5: Induktion von Zellsuspensionen mit Hefeextrakt .....	24
Tabelle 6: Induktion von Kalli mit Methyljasmonat .....	25

### 3 Zusammenfassung

Um die Anwendbarkeit der Olivenzellkulturen für die Produktion von Olivenphenolen zu untersuchen, wurden erfolgreich aus Keimlingen von verschiedenen Olivenvarietäten Zellkulturen (Kallus- und Suspensionskulturen) erzeugt. Sowohl Medienzusammensetzung als auch Wachstumsbedingungen wurden optimiert, so dass reproduzierbar Zellen ohne „Browning-Effekt“ kultiviert werden können. Des Weiteren wurden reproduzierbare Extraktionsmethoden für Oliven-Zellkulturgewebe getestet und etabliert, um verlässlich das Inhaltsstoffspektrum mittels RP-HPLC zu analysieren.

Die Analysen zeigten, dass es sich bei der Hauptsubstanz in Kallusgewebe und auch in Suspensionskulturen um Verbascosid (Syn. Acteosid, Kusaginin) handelt, ein Hydroxytyrosol-Derivat mit verschiedenen pharmakologischen Wirkungen. Die Bildung dieses Phenylpropanoids erfolgte stabil über sämtliche Kultivierungsphasen in sehr hohen Mengen (bis zu 100 mg Verbascosid/g Zelltrockengewicht).

Eine konstante Bildung von Oleuropein durch Zellkulturen war nach aktuellem Stand leider nicht steuerbar. Da nur unregelmäßig geringe Mengen Oleuropein gebildet wurden, konnten keine geeigneten Kultivierungsbedingungen zur Synthese dieses Secoiridoids identifiziert werden. Auch war keine Korrelation zur Verbascosidbildung ableitbar.

Versuche zur Steigerung des Gehalts an phenolischen Verbindungen durch verschiedene Elicitoren führten nicht zu einer signifikanten Erhöhung von Oleuropein oder auch Verbascosid.

Ligstrosid wird in der Literatur als Vorläufermolekül für die Biosynthese von Oleuropein beschrieben (Damtoft *et al.*, 1993, 1995). Dies würde bedeuten, dass Ligstrosid hydroxyliert wird, weshalb im Zuge des Projektes eine potentielle Ligstrosid-3-Hydroxylase gesucht wurde. Das Ziel war, durch Stillschaltung dieser putativen Ligstrosid-3-Hydroxylase Ligstrosid zu akkumulieren. Für dieses Enzym wurden auch potentielle Zielensequenzen identifiziert, aus Zellkultur- und Blattgewebe isoliert und kloniert. Die cDNA wurde anschließend erfolgreich in Hefezellen exprimiert und Mikrosomenpräparationen gewonnen. Die funktionelle Charakterisierung der Enzympräparationen wurde mit polyphenolischen Substraten durchgeführt. Eine erwartete Hydroxylierung des Tyrosolrestes konnte durch die verschiedenen Mikrosomenpräparate unter den verwendeten Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen liegen in einer unzureichenden Substratspezifität der identifizierten Enzyme. Weiterhin deuten die bisherigen Ergebnisse der Untersuchungen darauf hin, dass die Biosynthese von Oleuropein *in planta* noch nicht konkret aufgeklärt ist. Entgegen der bisherigen Auffassung - der Hydroxylierung von Ligstrosid - wäre jedoch auch ein anderer Syntheseweg möglich, nämlich die direkte Bildung von Oleuropein aus Elenolsäure und Hydroxytyrosol.

In einem variierten Assay war es möglich, unter Verwendung von aufgeschlossenen Olivenzellen die Hydroxylierung von Tyrosol zu Hydroxytyrosol zu beobachten. Gleiches konnte für eine Präparation von Mikrosomen aus Olivenzellen beobachtet werden. Eine vermutliche Membranassoziiierung sowie eine Hemmung der genannten Reaktion durch EDTA

unterstützen die Vermutung, dass ein P450-Enzym oder eine Polyphenoloxidase für die Hydroxylierungsreaktionen von Tyrosol zu Hydroxytyrosol verantwortlich ist. Jedoch war NADPH als ein typischer Cofaktor für P450 Enzyme für die Hydroxytyrosolbildung nicht essentiell.

Die enzymatische Herstellung von Oleocanthal aus Ligstrosid konnte gezeigt werden, jedoch musste Ligstrosid dabei aufwändig aus Ligusterblättern extrahiert werden, da es nicht über Zellkultivierung von *Olea europaea* L. gebildet wurde.



## 4 Anlass und Zielsetzung des Projektes

Olivenöle enthalten eine Vielzahl phenolischer Verbindungen, deren gesundheitsfördernde Wirkung in verschiedenen Untersuchungen belegt wurde (Health Claim: EFSA Journal 2011; 9 (4): 2033). Eine dieser bedeutenden Substanzen ist das Molekül Oleocanthal, welches vergleichende Eigenschaften zum Wirkstoff Ibuprofen besitzt und durch diese positiven entzündungshemmenden Eigenschaften chronischen Erkrankungen vorbeugen kann. Durch steigendes Interesse an diesem Wirkstoff werden auch kostengünstige und ressourcenschonende Herstellungsverfahren benötigt, die aktuell nicht vorhanden sind.

Mit Hilfe der Pflanzenbiotechnologie ist es möglich, sekundäre Inhaltsstoffe aus Pflanzen in einer bioaktiven Form zu gewinnen. Umwelteinflüsse spielen dabei keine Rolle, wodurch stabile Prozesse entwickelt werden können.

Im Projektvorhaben sollen daher Pflanzenzellkulturen von *Olea europaea* etabliert werden, welche die benötigten Vorläufersubstanzen des Biosyntheseweges von Oleocanthal - insbesondere Ligstrosid - akkumulieren (Damtoft *et al.*, 1993). Beschrieben wurde, dass Olivenzellen das Polyphenol Oleuropein synthetisieren, welches sich von Ligstrosid nur um eine Hydroxylgruppe unterscheidet. Von der Arbeitsgruppe wurde ein „plausibler Biosyntheseweg über Oleosid-11-methylester, 7 $\beta$ 1D-Glucopyranosyl-11-methyloleosid und Ligstrosid zu Oleuropein“ (Damtoft *et al.*, 1993) beschrieben. Die gezielte Inaktivierung des Enzyms, welches die Hydroxylierung von Oleuropein zu Ligstrosid katalysiert, soll eine Anreicherung von Ligstrosid bewirken. Abschließend soll durch eine gezielte Biotransformation aus Ligstrosid das pharmakologisch interessante Oleocanthal hergestellt werden.

## 5 Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

### 5.1 Etablierung von Keimlingen und Kallus- sowie Zellsuspensionskulturen von *Olea europaea*

Grundlage für alle geplanten Arbeiten war die Etablierung von Zellkulturen unterschiedlicher Olivenvarietäten als Kalluskulturen sowie als Zellsuspension. Auf diese Weise sollte eine homogene, konstant verfügbare Biomasse an Pflanzenzellen gewährleistet werden.

Ausgangsmaterialien für die Etablierung der Zellkultur zu Projektbeginn waren Olivenkerne der Saatguthändler „Seedeo Marianne Koch, Münster“ und „Dürr Samen“. Da es sich hierbei um Saatgut undefinierter Varietäten handelte, wurden die daraus hervorgehenden Zellkulturen unter den Bezeichnungen „Seedeo“ und „Dürr“ geführt. Im weiteren Verlauf des Projektes konnten zusätzlich Olivenkerne verschiedener, definierter Varietäten (*O. europaea* L. cv. Chemlali, *O. europaea* L. cv. Gemlik, *O. europaea* L. cv. Memecik, *O. europaea* L. cv. Tsounates, *O. europaea* L. cv. Koroneiki, *O. europaea* L. cv. Coratina, *O. europaea* L. cv. Canino, *O. europaea* L. cv. Leccino) über Kontakte der Firma N-Zyme BioTec und der Arbeitsgruppe Warzecha (TU-Darmstadt) organisiert und in Kultur gebracht werden.

Um den Keimvorgang der Kerne zu beschleunigen, wurden die Pflanzenembryonen aus den Kernhüllen präpariert. Nach 20-minütiger Sterilisierung mittels Natriumhypochlorit (5 %

Natriumhypochlorit, 1 % Tween-20) und anschließendem Waschen mit sterilem ddH<sub>2</sub>O, wurden die Pflanzenembryos in Petrischalen mit „Rugini Oliven Medium“ (Tabelle 1) transferiert (Rugini, 1984). Auf die Verwendung von Phytohormonen wurde hierbei zunächst verzichtet. Der Keimprozess sowie alle weiteren Kultivierungsschritte fanden bei 26°C mit einer Luftfeuchtigkeit von 60 % und einem 12-Stunden Tag-Nacht-Zyklus statt. Weitere Schritte erfolgten, sobald die Keimblätter frei lagen.

Für das Heranziehen junger Olivenbäumchen entsprechender Varietäten wurden Keimlinge auf frisches Rugini Oliven Medium (OM) in Einmachgläser (Mindesthöhe von 10 cm) transferiert. Nach dem Bilden von mindestens 2 weiteren Blättern wurden die Pflänzchen in Erde umgetopft und im Gewächshaus weiter kultiviert. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass frisches Blattmaterial definierter *O. europaea* Varietäten für spätere Analysen und gegebenenfalls Nukleinsäure-Extraktionen zur Verfügung steht.

Zum Generieren von Kallus Kulturen hingegen wurden die Keimblätter mittels eines sterilen Skalpells in kleinere Blattstücke zerteilt und dann mit der Blattunterseite auf Kallus induzierendes Medium transferiert. Während für die ersten Ansätze hierzu vor allem Rugini Oliven Medium mit Indol-3-buttersäure (9.84 µM; IBA) und Kinetin (2.32 µM) verwendet wurden, wurde im späteren Verlauf parallel das sogenannte „Callus-inducing Medium“ (CIM; Tabelle 2) verwendet.

Auf beiden Medien war bereits nach 2 Wochen die Bildung von Kallus an den Schnittstellen der Blattstücke erkennbar. Dieser wurde vom Blattrest entfernt und auf frischem Medium weiterkultiviert.

Anknüpfend an die Etablierung der Kalluskulturen sollten auch Suspensionskulturen etabliert werden. Hierzu wurde locker bzw. bröckelig wachsender Kallus in Flüssigmedium gleicher Zusammensetzung überführt und bei 100 rpm kultiviert.

**Tabelle 1: Medienzusammensetzung „Rugini Olive Medium including vitamins“ (Duchefa Biochemie B.V., Niederlande)**

Mikro Elemente	mg/l	µM
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.11
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.25	1.00
FeNaEDTA	36.70	100.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12.40	200.55
KI	0.83	5.00
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.90	100.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	1.03
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	14.30	49.75
Makro Elemente	mg/l	mM
CaCl <sub>2</sub>	332.16	2.99

Mikro Elemente	mg/l	µM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	416.92	2.54
KCl	500.00	6.71
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	340.00	2.50
KNO <sub>3</sub>	1100.00	10.88
MgSO <sub>4</sub>	732.60	6.09
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	412.00	5.15
Vitamine	mg/l	µM
Biotin	0.05	0.20
Folsäure	0.50	1.13
Glycin	2.00	26.64
myo-Inositol	100.00	554.94
Nicotinsäure	5.00	40.62
Pyridoxin HCl	0.50	2.43
Thiamin HCl	0.50	1.48

**Tabelle 2: "Gamborg B5 Medium including vitamins" (Duchefa Biochemie B.V., Niederlande)**

Mikro Elemente	mg/l	µM
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.11
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.10
FeNaEDTA	36.70	100.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.00	48.52
KI	0.75	4.52
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10.00	59.16
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	1.03
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.00	6.96
Makro Elemente	mg/l	mM
CaCl <sub>2</sub>	113.23	2.99
KNO <sub>3</sub>	2500.00	24.73
MgSO <sub>4</sub>	121.56	1.01
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	130.44	1.09
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134.00	1.01
Vitamine	mg/l	µM
myo-Inositol	100.00	554.94
Nicotinsäure	1.00	8.12
Pyridoxin HCl	1.00	4.86
Thiamin HCl	10.00	29.65

## 5.2 Herstellung von Zellkulturen von *Ligustrum sp.*

Zusätzlich zu den im Antrag beschriebenen Arbeiten wurden ebenfalls Zellkulturen von Liguster (*Ligustrum sp.*) angelegt, da diese Gattung auch der Familie der *Oleaceae* angehört. Hier sollte untersucht werden, ob diese Kulturen als alternative Quelle für Ligstrosid herangezogen werden können. Anlage und Optimierung erfolgten nach der Vorgehensweise für Olive.

## 5.3 Induktionsexperimente zur Steigerung des Polyphenolgehalts in Zellkulturen

Um eine differentielle Produktion von Olivenpolyphenolen zu erreichen, wurden verschiedene Elicitoren eingesetzt (Namdeo, 2007). Wie in der Literatur beschrieben (Gentile & Uccella, 2014), sollte die Zugabe von Methyljasmonat zur Zellkultur zu einer erhöhten Bildung von Oleuropein führen. Nach dem erfolgreichen Etablieren von Suspensionskulturen, sollten diese die Basis für Elicitor-Experimente darstellen. In einem ersten Ansatz wurden hierfür Methyljasmonat (0,1 mM) oder Natriumsalicylat (0,5 mM) zu Suspensionskulturen hinzugefügt und diese dann für 5 Tage inkubiert. Weiterhin wurde Hefeextrakt als Elicitor getestet. Hierfür wurde 0,4 mg/mL Endkonzentration eingesetzt. Nach erfolgter Elicitierung wurden die Suspensionskulturen filtriert und die Zellen aufgeschlossen. Der Gehalt an Secoiridoiden wurde mittels RP-HPLC bei N-Zyme BioTec analysiert (Kapitel 6.6).

## 5.4 Zellanalyse

Die beim Projektpartner TUD unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen hergestellten verschiedenen Zellkulturen wurden bei N-Zyme BioTec auf ihre Polyphenolzusammensetzung analysiert. Für das bei N-Zyme BioTec etablierten Analyseverfahrens mittels RP-HPLC mussten im Vorgang die Zellen aufgeschlossen werden.

Zunächst wurden hierzu verschiedene Methoden überprüft, um abhängig vom Zellmaterial ein geeignetes Verfahren zu bestimmen. Diese sind in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Übersicht der verschiedenen Verfahren zum Zellaufschluss**

<b>Extraktionsmethode</b>	<b>Vorgehen</b>
<b>Kalluskulturen</b>	
Methanolextraktion	Kallusgewebe mit Methanol mörsern
Heißwasserextraktion	Kalluskultur mit Reinstwasser für 30 min bei 90 °C im Thermoblock inkubieren, anschließend kurz abkühlen lassen
Stickstoffaufschluss	Kalluszellen wurden unter Flüssigstickstoff pulverisiert, Pulver in Methanol 10 min bei RT inkubiert
Methanolextraktion dispergiert	Kallusgewebe mit Methanol dispergieren bis zur Homogenität
<b>Zellsuspensionen</b>	
Methanolextraktion	Filtrierte Zellen mit Methanol mörsern

90 % Methanolextraktion	1 Teil Zellsuspension mit 9 Teilen Methanol gemischt und 10 min bei RT inkubiert
Heißwasserextraktion	Zellsuspension zentrifugiert, Pellet in Reinstwasser aufgenommen, 30 min bei 90 °C im Thermoblock inkubiert, kurz abkühlen gelassen
Zellaufschluss mit Lyophilisation	Zellsuspension eingefroren, über Nacht lyophilisiert, Sediment in Methanol resuspendiert und 1 h bei RT unter Wippen gemischt
Methanolextraktion dispergiert	Filtrierte Zellen mit Methanol dispergieren bis zur Homogenität
<b>Olivenblätter/Ligusterblätter</b>	
Heißwasserextraktion	Frische Blätter 30 min in Wasser kochen, danach Blätter mittels Mörsern zerkleinern
Methanolextraktion	Frische Blätter mit Methanol mörsern

## 5.5 Klonierungsarbeiten und Produktion rekombinanter Proteine

### 5.5.1 Isolierung von RNA und cDNA Synthese

Um die Volllänge cDNA zu erhalten, wurde aus Kalluskulturen sowie Blättern RNA isoliert. In Stickstoff schockgefrorene Zellen wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert und 100 mg Gewebe mit TriFast Reagenz (PeqLab) versetzt. Gesamt-RNA wurde nach Herstellerangaben isoliert. Die RNA-Integrität wurde über denaturierende Agarosegele überprüft, bevor die RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt wurde. Klonierung erfolgte in den Vektor PCR-blunt nach Angaben des Herstellers (Life-Technologies).

### 5.5.2 Klonierung der Zielsequenzen in *Saccharomyces cerevisiae*

Wie in der Literatur beschrieben wurden die Zielsequenzen mittels Drag&Drop System in Hefen kloniert (Jansen *et al.*, 2005). pGREG505 diente als Expressionsvektor, WAT11 (Urban *et al.*, 1997) wurde als Expressionsstamm gewählt.

### 5.5.3 Induktion der Genexpression und Herstellung von Hefemikrosomen

Alle Experimente wurden wie bei Gavira *et al.*, 2013, beschrieben durchgeführt mit den folgenden Modifikationen:

- Optimierung der Kulturbedingungen mit doppeltem Volumen (up-scaling, ×2), um ausreichend hohe Zelldichten zu erreichen (Pompon *et al.*, 1996)
- Gerätebedingt eine Anpassung der Zentrifugationsbedingungen: 24,000 rpm für eine Stunde

### 5.5.4 Herstellung von Pflanzenmikrosomen

Suspensionskulturen von *O. europaea* cv. Chemlali wurden am siebten Tag nach Umsetzen auf frisches Medium geerntet (~100 g) und nach der Methode von Schmidt und Stöckigt (1995) prozessiert.

## 5.6 Herstellung von Ligstrosid

Um Ligstrosid als Substrat in den Enzymanalysen nutzen zu können und nicht über die Zellkulturen generiert werden konnte, musste es aus Ligusterblättern hergestellt werden. Dazu erfolgte eine Extraktion der Blättern mittels Methanol oder Ethylacetat. Dieser gewonnene Extrakt musste konzentriert werden und anschließend nach Identifizierung eines geeigneten Lösungsmittelgemisches mittels *Centrifugal partition chromatography* (CPC) gereinigt werden. Ligstrosid konnte im mg-Maßstab mit einer Reinheit > 80 % gewonnen werden.

## 5.7 Enzymanalyse

Ausgewählte Gene wurden nach Induktion und Herstellung von Mikrosomen in einem Assay auf ihre Hydroxylierungsfähigkeit von Ligstrosid überprüft. In Anlehnung an Gavira et al. (2013) sollte unter Anwesenheit von NADPH die Substratumsetzung getestet werden. Mit der Zugabe von Mikrosomen sollte überprüft werden, ob eine Umwandlung von Ligstrosid zu Oleuropein stattfindet. Der Nachweis der Substanzen erfolgte auch hier mittels RP-HPLC.

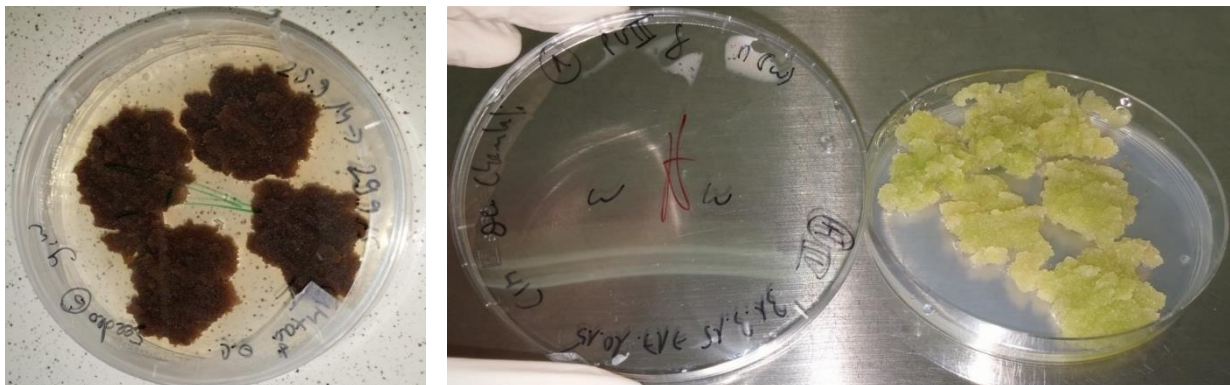
Zusätzlich wurde die enzymatische Aktivität von Olivenzellen auf ihre Umsetzung verschiedener Substrate überprüft. Dabei wurden Zellen/ Zellbruchstücke/ Zellextrakte in Substratlösungen in wässriger Umgebung inkubiert und die Umsetzung der Substrate mittels RP-HPLC überprüft.

Außerdem wurde ein bei N-Zyme BioTec standardisiertes Enzymsystem für Oleuropein eingesetzt, um dessen Wirksamkeit für die Biotransformation Ligstrosid zu Oleocanthal zu bestätigen.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Optimierte Wuchsbedingungen

Die anfänglichen Passagierzeiten von 3 Wochen führten zunächst zu einem verstärkten bräunlichen Verfärben der Kalluskulturen, sowie des Mediums (Abbildung 1). Dieses sogenannte „Browning“ ist vor allem bei Gehölzpflanzen zu beobachten und ist auf die Produktion phenolischer Substanzen zurückzuführen. Bei diesen Polyphenolen handelte es sich jedoch nicht um die gewünschten Substanzen. Die Braunfärbung der Olivenzellen wirkt sich sowohl auf das Wachstum, als auch die Vitalität des Kallus aus (Mangal *et al.*, 2014). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass dieses Phänomen auf Rugini Oliven Medium mit entsprechenden Phytohormonen deutlich ausgeprägter ausfiel. Neben einer Supplementierung des Mediums mit 100 mg/l Ascorbinsäure (Mangal *et al.*, 2014), konnte ein Verkürzen der Passagierzeiten auf 14 Tage das Problem des „Brownings“ deutlich reduzieren.



**Abbildung 1:** *Olea europaea* Kallus Kulturen. Während das linke Bild das sogenannte „Browning“ anhand eines Seedeo Kallus verdeutlicht, ist auf dem rechten Bild ein locker wachsender, grüner Kallus der Varietät Chemlali zu sehen.

Im Rahmen des Projektes gelang es, Kalluszellen in eine Flüssigkultur zu transferieren. Durch das konstante Schütteln der Suspensionskulturen konnten die Zellen vereinzelt bzw. zu kleineren Aggregaten separiert werden, so dass eine weitgehend homogene Suspensionskultur entstand (Abbildung 2). Während diese Prozedur mit Kalluskulturen der Varietät Chemlali problemlos funktionierte und zu einer farblosen Zellsuspension führte, endeten Versuche mit Kallus Kulturen von Seedeo nach 10-14 Tagen mit einer braunen Zellsuspension. Ebenfalls die Varietät Coratina ließ sich in Zellkultur überführen, die Wachstumsrate ist derzeit allerdings noch gering.

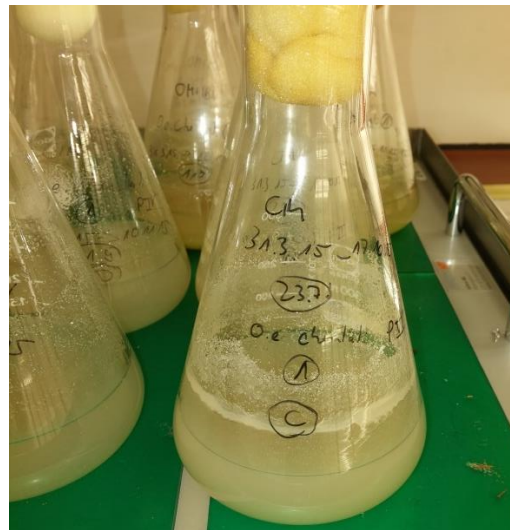


Abbildung 2: Suspensionskultur der Varietät *O. europaea* L. cv. Chemlali.

Zusätzlich wurden im Projektzeitraum erste Versuche zur Kultivierung von Zellsuspensionen in Bioreaktoren durchgeführt (Abbildung 3). Dabei wurden sowohl Kalluszellen, als auch Zellsuspensionen zum Animpfen eingesetzt. Trotz langer Kultivierungsdauer (bis 14 d) liefen die gerührten Fermentationen kontaminationsfrei.

Für eine potentielle industrielle Nutzung müssen noch geeignete Fermentationsmethoden und -bedingungen identifiziert werden. Dazu gehören Optimierungen im Bereich des Gasdurchsatzes, der Rührergeschwindigkeit und -geometrie, um die Austragung der Zellen zu verringern und die Nährstoffverteilung zu gewährleisten, sowie Optimierungen im Bereich der Animpfbedingungen, insbesondere das Zellmaterial (Kalluszellen oder Suspensionszellen), die Zellmenge oder das Zellalter.



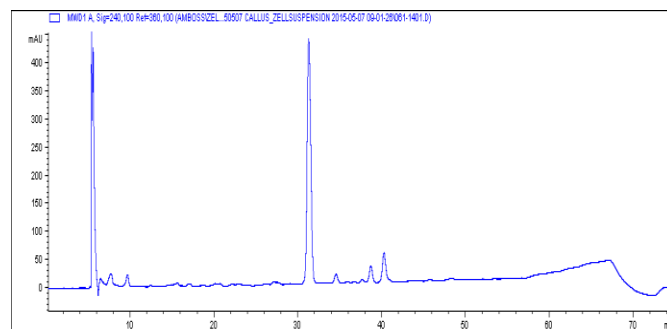
Abbildung 3: Kultivierung von *Olea europaea* cv. Chemlali in gerührtem Glasfermenter Minifors, 5 d nach Animpfen



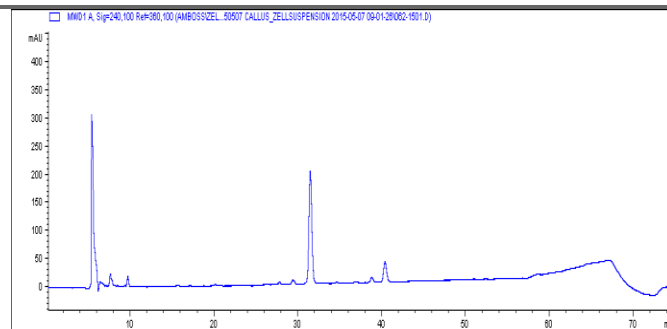
## 6.2 Wahl der Zellaufschlussmethode

Die verschiedenen Extraktionsmethoden von Zellgewebe zeigten in der RP-HPLC-Analyse ein weitgehend übereinstimmendes Peakspektrum, jedoch mit unterschiedlicher Ausprägung. Dies zeigt Abbildung 4 im Vergleich von methanolischer Extraktion mittels Mörsern und Heißwasserextraktion. Beide Extraktionen liefen übereinstimmende Peakspektren, jedoch ist die extrahierte Konzentration im Aufschluss mit Methanol höher.

Kallus  
methanolische Extraktion  
mittels Mörser



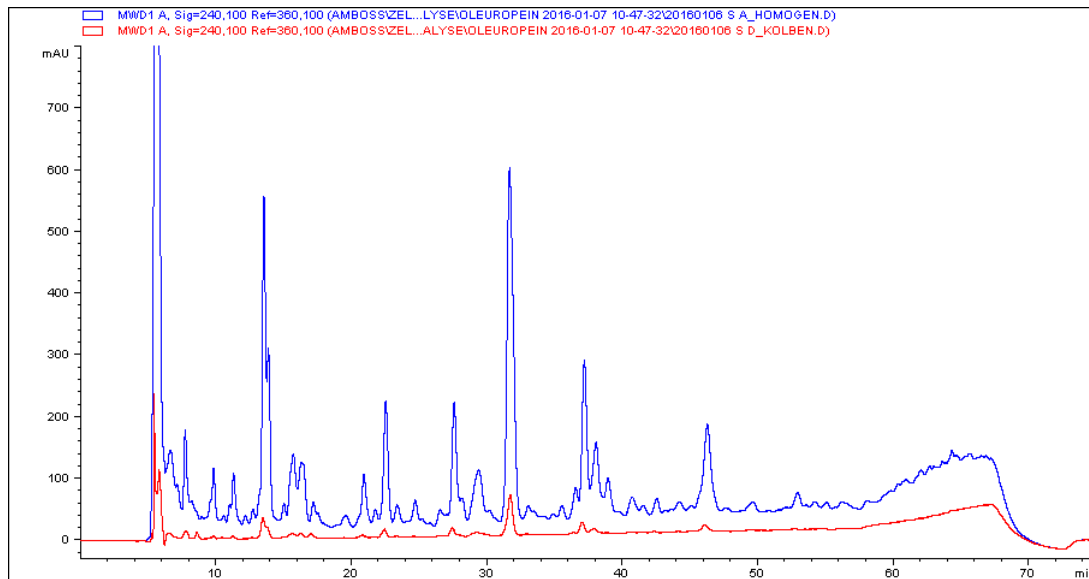
Kallus  
Heißwasserextraktion



**Abbildung 4: Polyphenolspektrum nach methanolischer bzw. wässriger, heißer Extraktion von grüner Kalluskultur**

Zur Extraktion wurden Kalluszellen in Methanol gemörsert oder in Heißwasser bei 98 °C aufgeschlossen. Die Analyse des Aufschlusses erfolgte mittels RP-HPLC über C18-Material mit Laufmittelzusammensetzung Methanol/Trifluoressigsäure und Detektion bei 240 nm.

Nachdem sich in der ersten Projekthälfte die Extraktion der Zellkulturen mit Methanol als geeignet herausgestellt hatte, wurde diese Methode weiter optimiert. Statt eines Aufschlusses mittels Mörsern wurde für weitere Analysen das Zellmaterial in Methanol dispergiert. Dadurch konnten größere Zellmengen eingesetzt werden, wodurch die Sensitivität der HPLC-Analyse deutlich erhöht wurde (siehe Abbildung 5). Die Verwendung eines Dispergierwerkzeuges ermöglichte außerdem eine bessere Standardisierung des Zellaufschlusses als es mittels Mörsern möglich war. Dies war für den Vergleich der Ergebnisse und für eine mögliche Identifikation geringer Konzentrationen bedeutend.



**Abbildung 5: Polyphenolspektrum nach methanolischer Extraktion im Vergleich zum optimierten methanolischen Verfahren von Suspensionskultur**

Zur Extraktion wurden Zellen aus einer Suspension abfiltriert und in Methanol gemörsert oder in Methanol mittels Dispergierwerkzeug aufgeschlossen und der Zellaufschluss konzentriert. Die Analyse des Aufschlusses erfolgte mittels RP-HPLC über C18-Material mit Laufmittelzusammensetzung Methanol/Trifluoressigsäure und Detektion bei 240 nm.

Für den Zellaufschluss von frischen Blättern war die Heißwassermethode am besten geeignet, da hier die Zellen besser gemörsert werden konnten und durch die heiße Inkubation keine störenden Enzymreaktionen stattfanden. Aufgrund der Blattstruktur war ein Dispergieren entsprechend des Kallusaufschlusses nicht möglich.

### 6.3 Zellanalysen

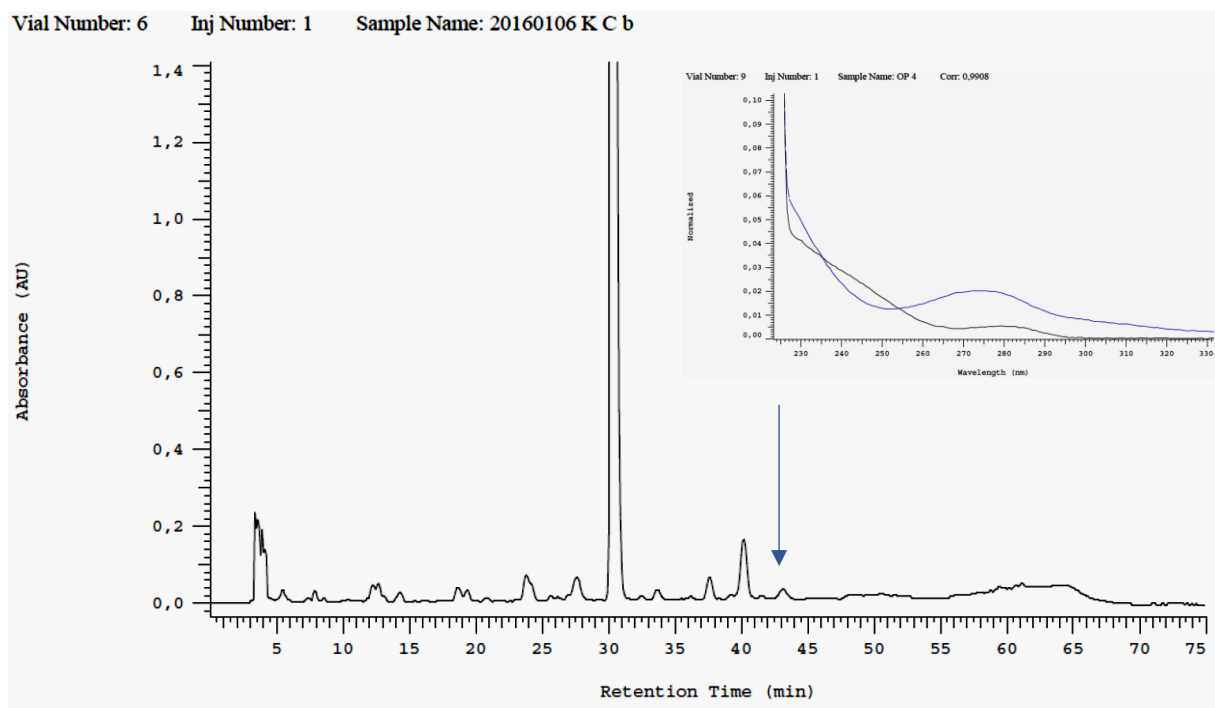
Verbascosid war in den Zellaufschlüssen die dominierende Substanz. Dies ist stark abweichend von bisher bei N-Zyme BioTec durchgeführten Analysen des Polyphenolspektrums von Olivenblättern, in denen Verbascosid üblicherweise in einem deutlich geringeren Anteil (ca. 1 mg/g Frischblatt) als Oleuropein (bis zu 60 mg/g Frischblatt) vorliegt.

Der Einfluss der Zelltextur wurde bei Chemlali-Kalli der Zelllinie (1) überprüft. Festes Wachstum oder weiches Wachstum aus einer gleichen Zelllinie beeinflusste nach dieser Analyse den Gehalt an Polyphenolen nicht signifikant.

Der Einfluss der verschiedenen Medien (CIM und OM+IBA inklusive deren Abwandlungen) auf die Polyphenolbildung wurde bei verschiedenen Zelllinien überprüft. Die Schwankungen der Polyphenolgehalte waren jedoch sehr groß. Ein signifikanter Einfluss konnte nicht zugeordnet werden.

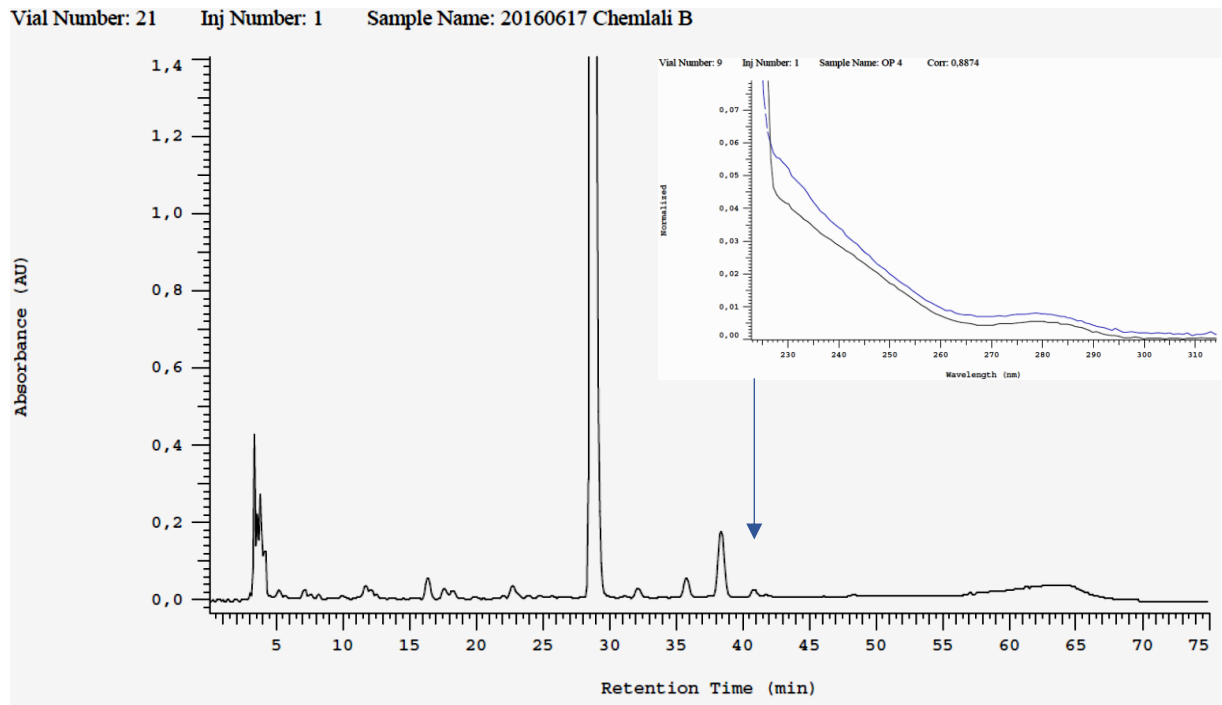
Zwar wurde anfänglich in neu etablierten Oliven-Zelllinien Oleuropein gefunden, nach längerer Kulturzeit und stabiler Etablierung von Suspensionszellen konnten jedoch in keiner Linie signifikante Mengen an Oleuropein oder verwandten Polyphenolen detektiert werden. Das anfängliche Einhalten kurzer Passagierzeiten zur Bildung von Oleuropein bestätigte sich in Folgeversuchen nicht mehr. Demgegenüber wurde die konstant hohe Bildungsrate von Verbascosid in allen Zelllinien und nach allen Kulturphasen erreicht.

Eine typische Analyse von Olivenzell-Kalli ist in Abbildung 6 und Abbildung 7 dargestellt. Der deutliche Peak bei 31 min entspricht Verbascosid. Die ältere Kultur (Abbildung 6) zeigt im Spektrumvergleich, dass es sich bei dem nach Retentionszeit erwarteten Peak für Oleuropein jedoch nicht um Oleuropein handelt. Die junge Kultur (Abbildung 7) zeigt hingegen im Spektrumvergleich, dass Oleuropein in geringen Mengen vorliegt. In Flüssigkultivierung wurde das Polyphenolspektrum fast vollständig auf Verbascosid reduziert. Die methanolischen Zellaufschlüsse von Suspensionszellen enthielten nach RP-Analyse hohe Mengen Verbascosid mit bereits hoher Reinheit. Ein typisches Chromatogramm bei 240 nm zeigt Abbildung 8.



**Abbildung 6: RP-HPLC-Analyse bei 240 nm eines Zellaufschlusses von Kalluszellen von *Olea europaea* Seedeo mit Spektrumvergleich Oleuropein**

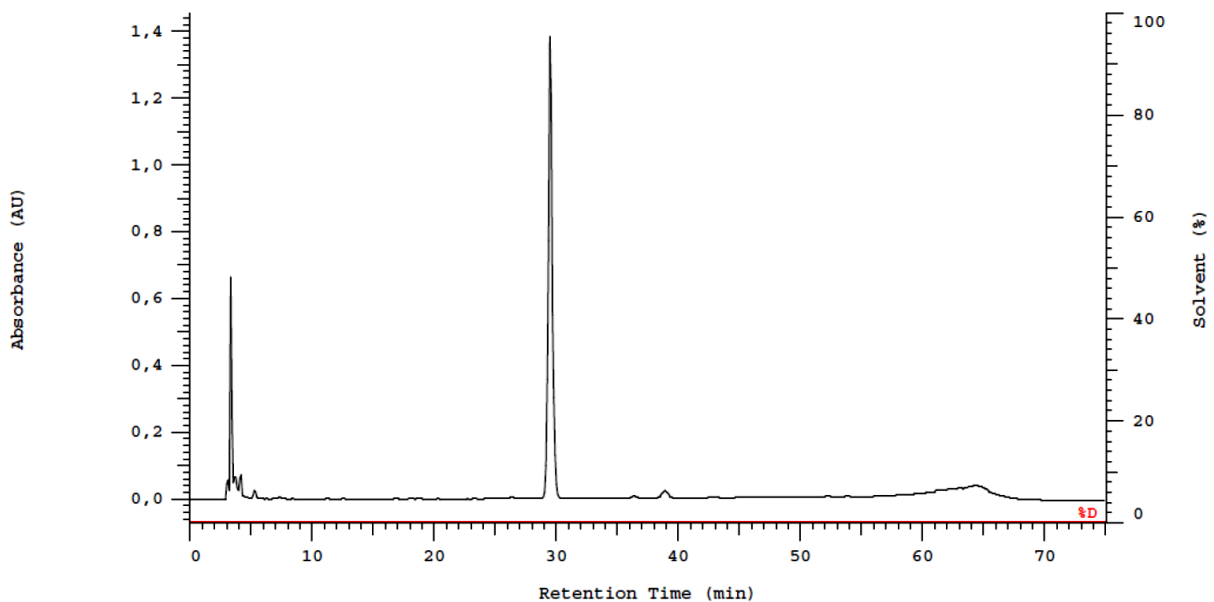
Aufschluss einer älteren Kalluskultur in Methanol mit RP-HPLC-Analyse. Den Vergleich des Peaks zur Retentionszeit von Oleuropein (hier 43 min) mit Oleuropein zeigt die kleine Grafik (schwarz: Oleuropein-Referenz, blau: Zellaufschluss).



**Abbildung 7: RP-HPLC-Analyse bei 240 nm eines Zellaufschlusses von Kalluszellen von *Olea europaea* Chemlali mit Spektrumvergleich Oleuropein**

Aufschluss einer jungen Kalluskultur in Methanol mit RP-HPLC-Analyse. Den Vergleich des Peaks zur Retentionszeit von Oleuropein (hier 41 min) mit Oleuropein zeigt die kleine Grafik (schwarz: Oleuropein-Referenz, blau: Zellaufschluss).

Vial Number: 43 Inj Number: 1 Sample Name: 0701 Susp B



**Abbildung 8: RP-HPLC-Analyse bei 240 nm eines Zellaufschlusses Suspensionszellen von *Olea europaea* Chemlali**

Aufschluss einer Suspensionskultur in Methanol mit RP-HPLC-Analyse.

Insgesamt zeigte die Analyse von Kalluszellen eine komplexere Verteilung von Polyphenolen als Zellsuspensionen. Der dominierende Inhaltsstoff, Verbascosid, zeigt in Suspensionen allerdings eine bemerkenswerte Reinheit, die schon nach einem einfachen Zellaufschluss und Extraktion erreicht werden konnte.

#### 6.4 Liguster Kallus

Von Liguster wurde aufgrund dessen Familienzugehörigkeit zu den Oleaceae (wie Olive) ebenfalls Kalluskulturen generiert und analysiert. In dieser Analyse lag ähnlich wie bei den verschiedenen Olivenvarietäten Verbascosid als Hauptbestandteil des Aufschlusses vor. Dies zeigt Abbildung 9. Ligstrosid und Oleuropein waren nicht nachweisbar.

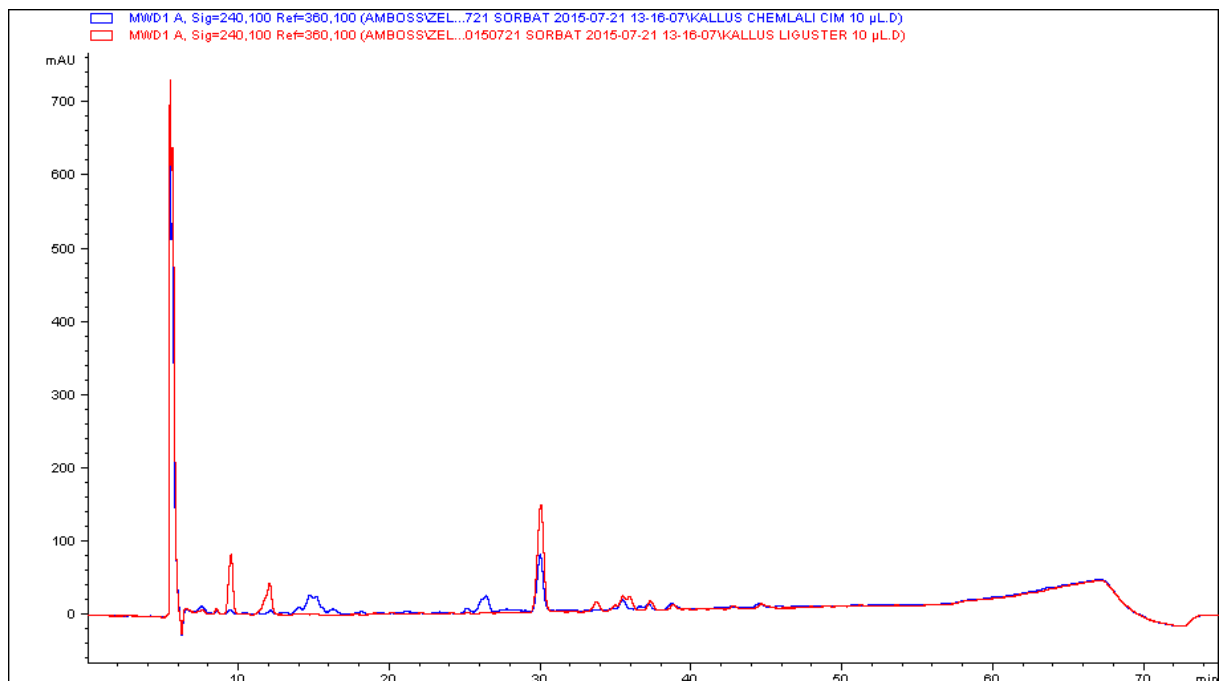
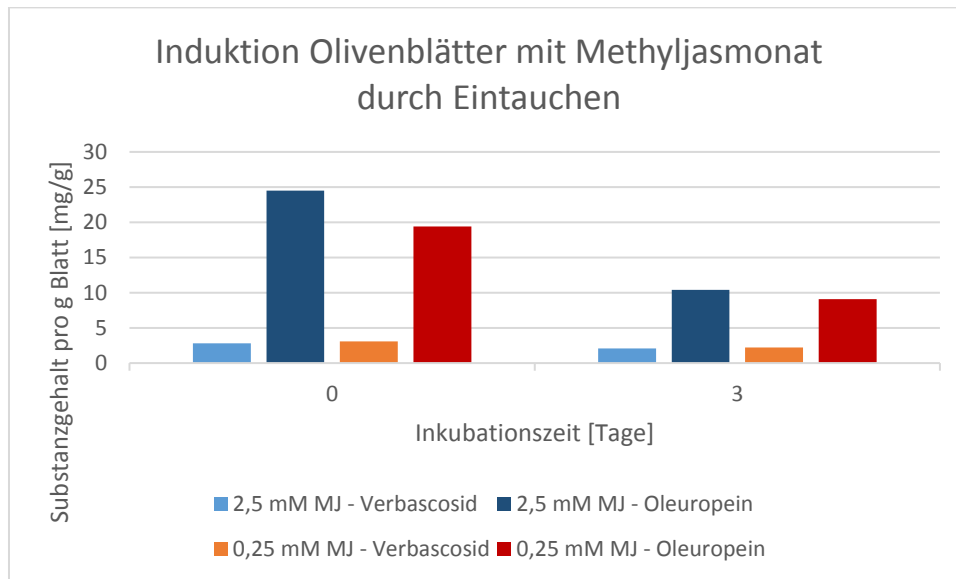


Abbildung 9: Vergleich von RP-HPLC-Analysen bei 240 nm von Zellaufschlüssen aus Kallus von *Olea europaea* Chemlali (blau) mit Liguster (rot)

#### 6.5 Induktionsversuche Olivenblätter

Zur Überprüfung der Induktion einer Polyphenolsynthese von Olivenzellen wurden Olivenblätter eines lebenden Baumes mit Methyljasmonat (MeJA/MJ) bzw. Salicylsäure (S) behandelt. MeJA hat sich in anderen Systemen (*Catharanthus*) als potenter Induktor der Secoiridoidsynthese erwiesen (Miettinen, 2014).

Im ersten Versuch wurden die Blätter in eine Methyljasmonatlösung getaucht und die Blätter dann am Ast in einer Tüte für 3 Tage inkubiert. Hierbei zeigte sich eine deutliche Abnahme von Oleuropein über die dreitägige Inkubation, der Anteil an Verbascosid verringerte sich ebenfalls leicht (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: Induktion Olivenblätter mit Methyljasmonat durch Eintauchen der Blätter in Lösung**

Eine weitere Messreihe wurde durch Infiltration der Substanzen Methyljasmonat und Salicylsäure in die Blätter durchgeführt. Dabei wurden die Spaltöffnungen in der Blattunterseite genutzt, um mittels einer Spritze ohne Kanüle die Substanzen in die Blätter zu infiltrieren. Für keine Substanz zeigten sich eine signifikante Steigerung der Polyphenole oder eine Variation der detektierten Polyphenole (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12). Im Trend lag mit Salicylsäure ein etwas höherer Anteil an Oleuropein nach 5 bzw. 8 Tagen nach Infiltration vor. Die Behandlung mit Methyljasmonat zeigte einen negativen Trend über den Inkubationsverlauf.

Aufgrund dieser Schwankungen der Frischblattanalyse innerhalb der Messreihen und der Unterschiede zwischen den Messreihen, wurden die Induktionsversuche der Olivenblätter nicht weiter verfolgt.

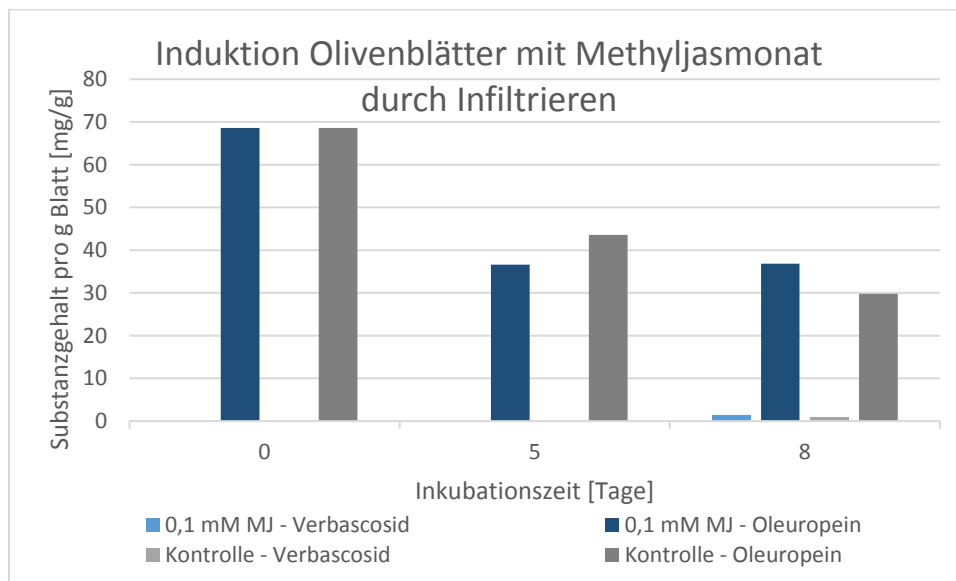


Abbildung 11: Induktion Olivenblätter mit Methyljasmonat durch Infiltrieren der Blätter

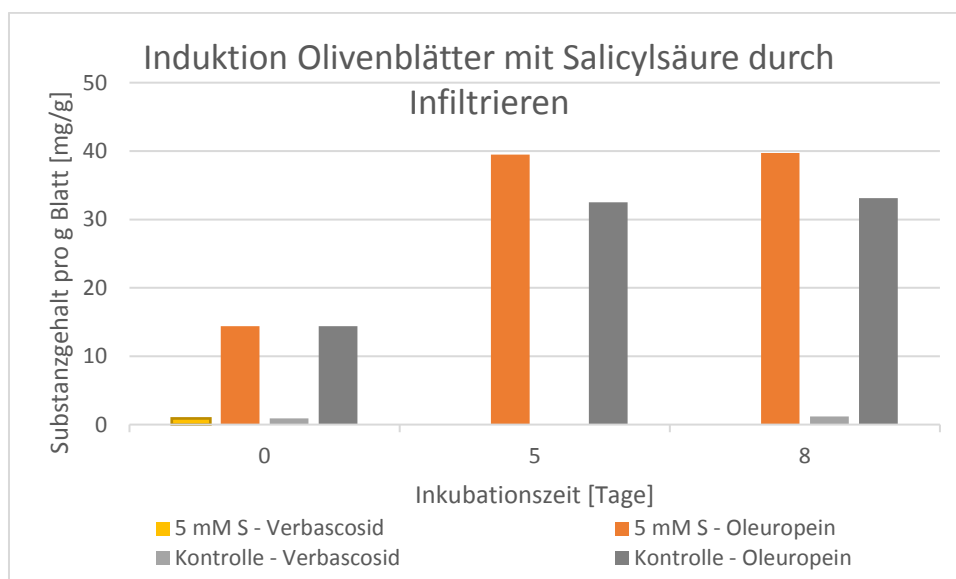


Abbildung 12: Induktion Olivenblätter mit Salicylsäure durch Infiltrieren der Blätter

## 6.6 Induktionsversuche Zellsuspensionen

Die Induktion von Zellsuspension aus Chemli-Zellen erfolgte mit Methyljasmonat, Salicylsäure bzw. Hefeextrakt im Medium. Parallel wurden Kontrollen ohne die Substanzen kultiviert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 dargestellt. Der Kultivierungsansatz 0,1 mM MeJA verlief bezüglich der Konzentrationen an Verbascosid und Oleuropein vergleichbar zur unbehandelten Kontrolle, ebenso wie die Kontrolle des Ansatzes mit Salicylsäure. Jedoch zeigte die MeJA-Kontrolle eine deutlich höhere Verbascosid-Konzentration und der Induktionsansatz Salicylsäure zeigte keine Polyphenole im Zellaufschluss, was sehr wahrscheinlich auf das bereits eingesetzte Browning der Kulturen zurückgeführt werden konnte.

**Tabelle 4: Induktion von Zellsuspensionen mit Methyljasmonat bzw. Salicylsäure**

Kultur	Medium		Zielsubstanz	Konzentration [mg/g Trockensubstanz]
Chemlali	CIM	-	Verbascosid	7,7
			Oleuropein	0,4
Chemlali	CIM	0,5 mM Salicylsäure	Verbascosid	0
			Oleuropein	0
Chemlali	CIM	Kontrolle Salicylsäure	Verbascosid	5,8
			Oleuropein	0
Chemlali	CIM	0,1 mM MeJA	Verbascosid	9,2
			Oleuropein	0,5
Chemlali	CIM	Kontrolle MeJA	Verbascosid	33,1
			Oleuropein	0,4

Hefeextrakt zeigte keine Beeinflussung der Polyphenolbildung im Vergleich zur Kontrolle (Tabelle 5). Der insgesamt höhere Polyphenolgehalt dieser Messreihe im Vergleich zur Reihe mit MeJA/Salicylsäure zeigt die insgesamt stark schwankenden Ergebnisse der verschiedenen Zellanalysen. Eine Standardisierung der Ergebnisse ist bezüglich der Substanzmengen pro Gramm Trockengewicht schwierig, jedoch zeigten keine Versuche mit Elicitoren signifikante Ergebnisse, die auf eine mögliche Steuerung der Polyphenolbildung hinweisen würden.

**Tabelle 5: Induktion von Zellsuspensionen mit Hefeextrakt**

Kultur	Medium		Zielsubstanz	Konzentration [mg/g Trockensubstanz]
Chemlali	CIM	0,04 mg/mL Hefeextrakt	Verbascosid	20,4
			Oleuropein	0,7
Chemlali	CIM	Kontrolle Hefeextrakt	Verbascosid	23,6
			Oleuropein	1,3

## 6.7 Induktionsversuche Kalli

Bei den Induktionsversuchen von Kallus zeigte sich in den Kulturen, die mit Methyljasmonat behandelt wurden, eine höhere Verbascosid-Konzentration als in den Kontrollen, die aufgrund des Lösemittels von MeJA nur mit Ethanol behandelt wurden. Derselbe Effekt lag für Oleuropein nur bei Seedeo-Kulturen auf OM+IBA vor. Bei Chemlali auf CIM war der Oleuropeingehalt mit Methyljasmonat etwas geringer. Die geringen Mengen an Oleuropein ließen keine eindeutigen Aussagen bezüglich einer Induktion zu. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

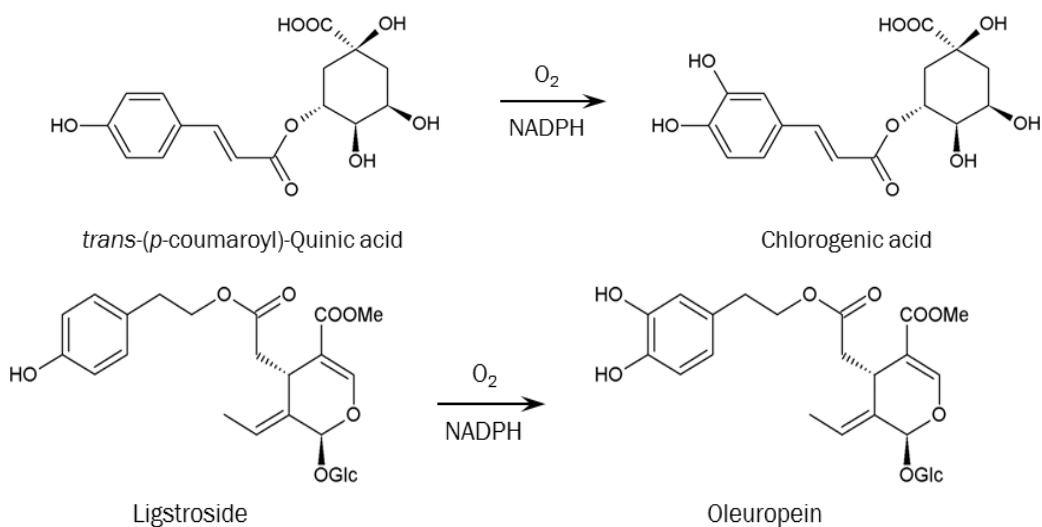


**Tabelle 6: Induktion von Kalli mit Methyljasmonat**

Kultur	Medium		Zielsubstanz	Konzentration [mg/g Trockensubstanz]
Seedeo	OM+IBA	EtOH 100 µL	Verbascosid	48,1
			Oleuropein	1,3
Seedeo	OM+IBA	MeJA 14.8. 100 µL 50 mM	Verbascosid	64,5
			Oleuropein	2,0
Seedeo	CIM	EtOH 14.8. 100 µL	Verbascosid	85,9
			Oleuropein	0
Seedeo	CIM	MeJA 14.8. 100 µL 50 mM	Verbascosid	126
			Oleuropein	0
Seedeo	CIM	EtOH 14.8. 100 µL direkt aufgegeben	Verbascosid	75,4
			Oleuropein	0
Seedeo	CIM	MeJA 14.8. 100 µL 50 mM direkt aufgegeben	Verbascosid	91,4
			Oleuropein	0
Chemlali	CIM	EtOH 100 µL	Verbascosid	22,9
			Oleuropein	1,9
Chemlali	CIM	MeJA 14.8. 100 µL 50 mM	Verbascosid	43,3
			Oleuropein	1,2

### 6.8 Klonierung des Kandidatengens für die Ligstrosid-3-Hydroxylase (L3H)

Wie im Antrag beschrieben konnte eine Sequenz aus Oliventranskriptomdaten identifiziert werden, welche hohe Homologie zu Phenolester-3'-Hydroxylase aus *Arabidopsis thaliana* (CYP98A3) aufweist (Schoch *et al.*, 2001). Ein Vergleich dieser Reaktion zu einer putativen Reaktion mit Ligstrosid ist in Abbildung 13 dargestellt.



**Abbildung 13: Vergleich der Reaktionen von Phenolester-3'-Hydroxylase (oben) und der putativen Ligstrosid-3-Hydroxylase (unten)**

Darüber hinaus wurden im Verlauf des Projektes weitere Kandidatengene identifiziert. Ein zweites Kandidatengem mit Homologien zu Phenolester-3'-Hydroxylase wurde ausgewählt:

*Oe058679.1* (81% Sequenzidentität, 90% Sequenzähnlichkeit) putative L3'H1  
*Oe031803.1* (34% Sequenzidentität, 76% Sequenzähnlichkeit) putative L3'H2

Die Klonierung der Kandidatengene erfolgte per RT-PCR aus RNA, die von verschiedenen Zellkulturen oder Pflanzenmaterialien gewonnen wurde.

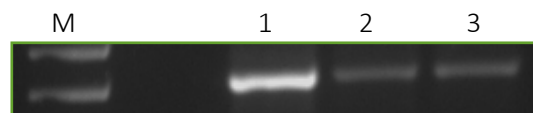
RT-PCR Primer:

putative L3'H1	<i>OeL3'H1</i> 101	5'-ATGTCTCTCTATATTCCTTATCACTTTACAG-3'
	<i>OeL3'H1</i> 201	5'-TTACATGTCAACAGCCACACGTTTGTAC-3'
putative L3'H2	<i>OeL3'H2</i> 101	5'-ATGGAGTTGCTGACAATTTTTCTTGTAG-3'
	<i>OeL3'H2</i> 201	5'-CTATGACATTTTGATGGGGAAAGCC-3'

Pflanzenmaterial, aus dem jeweils cDNA gewonnen wurde:

putative L3'H1	<i>O. europaea</i> Seedeo Kallus
	<i>O. europaea</i> Seedeo Blätter
	<i>O. europaea</i> Dürr Blätter
putative L3'H2	<i>O. europaea</i> Seedeo Kallus
	<i>O. europaea</i> Seedeo Blätter
	<i>O. europaea</i> Chemlali Kallus
	<i>O. europaea</i> Chemlali Blätter

Aus diesen Geweben konnten PCR-Produkte erhalten werden (beispielhaft in Abbildung 14 dargestellt). Diese wurden in den pCR-Blunt Vektor (Life-Technologies) sub-kloniert und sequenziert (Eurofins).



**Abbildung 14:** 1%iges Agarosegel mit PCR-Produkt nach cDNA-Synthese. M, Marker; 1, *O. europaea* Seedeo Kallus; 2, *O. europaea* Seedeo Blätter; 3 *O. europaea* Dürr Blätter

Die Sequenzierungsergebnisse ergaben Abweichungen von den Sequenzen aus den Transkriptomdaten, vor allem bei putative L3'H2. Bei putative L3'H1 lag ein V462A in allen sequenzierten Klonen aus unterschiedlichen Quellen vor. Damit ist zu erwarten, dass hier eine Fehlannotation in den Transkriptomdaten vorliegt. Deshalb wurde mit der einen Sequenz

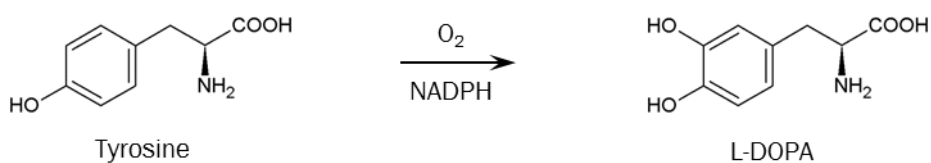
weitergearbeitet. Bei putative L3'H2 war das Bild sehr heterogen, je nach Ausgangsmaterial, aus dem die Sequenz isoliert wurde:

- O. europaea* Seedeo Blätter, Klone 1 & 2: L11S, P14L, V55L, V244I, I300L, I313T, N320D, S325L, H372R, Y383H, V395I, E466D, V476I, T491K
- O. europaea* Seedeo Blätter, Klon 3: P14L, V55L, V244I, I313T, N320D, 325L, H372R, Y383H, V395I, E466D, V476I, T491K
- O. europaea* Chemlali Kallus, Klon 1: V341I, S344T, V476I, T491K
- O. europaea* Chemlali Kallus, Klone 2 & 3: I247K, V341I, I346V, V476I, T491K
- O. europaea* Chemlali Blätter, Klon 1: E49- (deletion), N50F<sub>49</sub>, V341I<sub>340</sub>, T491K<sub>490</sub>
- O. europaea* Chemlali Blätter, Klon 3: V341I, T491K

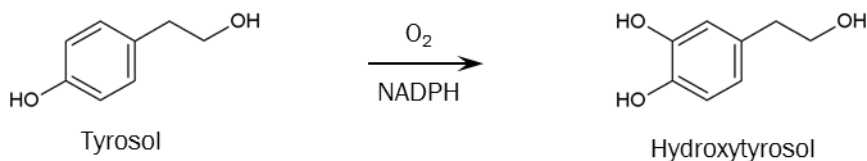
Für die Expressionsexperimente wurden die folgenden Klone (mit neuer Bezeichnung) verwendet:

- |                |   |             |
|----------------|---|-------------|
| putative L3'H1 | <i>O. europaea</i> Seedeo Blätter, Klon 2   | OeL3'H1-SI2 |
| putative L3'H2 | <i>O. europaea</i> Chemlali Blätter, Klon 3 | OeL3'H2-CI3 |

Im Fortgang des Projektes wurde ein weiteres pflanzliches Enzym aus *Beta vulgaris* identifiziert, welches Tyrosin zu L-DOPA hydroxyliert (BvCYP76AD6, Polturak *et al.*, 2015).



Da es sehr plausibel ist, dass seine ähnliche Aktivität, welche Tyrosol zu Hydroxytyrosol umwandelt (Tyrosol-3-Hydroxylase) ebenfalls in Oliven vorkommt, wurde ein weiterer Homologievergleich zu den Transkriptomdaten durchgeführt.



Als vielversprechende Sequenz wurde Oe021851.1 erhalten (51% Sequenzidentität, 73% Sequenzähnlichkeit), welche im Weiteren als putative T3H1 bezeichnet.

Für die Klonierung wurden wiederum verschiedene Gewebe von unterschiedlichen Olivenvarietäten verwendet, RNA isoliert und mittels spezifischer Primer cDNA amplifiziert.

RT-PCR Primer:

putative T3H1	<i>OeT3H1</i> 101	5'-ATGGATTCCTCACAATTGTCTTAGG-3'
	<i>OeT3H1</i> 201	5'-TTACAATGGAGTAGGGACAGCTC-3'

Pflanzenmaterial als Quelle für Gesamt- RNA:

putative T3H1 *O. europaea* Seedeo Kallus  
*O. europaea* Seedeo Blätter  
*O. europaea* Chemlali Kallus  
*O. europaea* Chemlali Blätter

Amplifikation, Subklonierung und Sequenzierung erfolgte wie vorher.

Auch bei diesem Kandidatengenen ergaben sich Abweichungen von der Transkriptomsequenz. Allerdings waren die Variabilitäten der Sequenzen auch innerhalb derselben Olivenvarietät vorhanden.

Sequenzierungsergebnisse im Vergleich mit Transkriptomdaten-Sequenz:

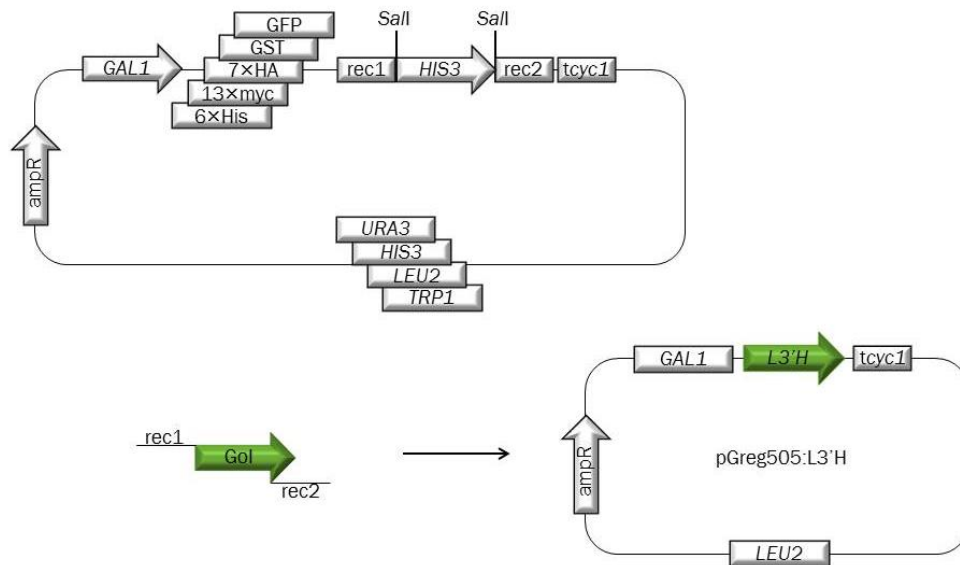
putative T3H1 <i>O. europaea</i> Seedeo Blätter, Klon 4:	R26S, M259K, K322R
<i>O. europaea</i> Seedeo Blätter, Klon 6:	R26S, M259K, K322R, M352I
<i>O. europaea</i> Chemlali Blätter, Klon 2:	100% Identität
<i>O. europaea</i> Chemlali Blätter, Klon 3:	H44Q

Diese Abweichungen könnten zum einen daher rühren, dass im Zuge der Amplifikation Fehler durch die Polymerase erzeugt wurde. Diese Fehlermöglichkeit wurde allerdings durch den Einsatz einer High-Fidelity Polymerase (*Pfu*-Polymerase) minimiert. Des Weiteren könnten in verschiedenen Varietäten sehr homologe Isoenzyme vorliegen. Für das weitere Vorgehen wurden deshalb die folgenden Klone zur Klonierung und Expression in Hefe weiterverwendet:

putative T3H1 <i>O. europaea</i> Chemlali Blätter, Klon 2	<i>OeT3H1</i> -Cl2
<i>O. europaea</i> Chemlali Blätter, Klon 3	<i>OeT3H1</i> -Cl3

## 6.9 Expression der Zielsequenz in *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Expression pflanzlicher Cytochrom P450 Monooxygenase wurden die Stämme WAT11 und WAT21 ausgewählt (Urban *et al.*, 1997). Diese tragen jeweils eine pflanzliche P450 Reduktase und sind somit gut geeignet für die funktionelle Charakterisierung der pflanzlichen P450 Enzyme. Als Expressionsvektor wurde der sogenannte „Drag&Drop“ Expressionsvektor pGgreg505 gewählt, weil hier eine einfache Klonierung in eine multifunktionelle Plattform möglich ist (Jansen *et al.*, 2005)(Abbildung 15).



**Abbildung 15: Schema der Variationsmöglichkeiten des pGreg-Vektors sowie Klonierungsschema zur Expression der putativen L3H in Hefe**

Nach erfolgreicher in-vitro Rekombination wurden die Vektoren wieder isoliert, sequenziert und anschließend in die zu verwendenden WAT-Stämme transformiert.

Nach Galaktose-Induktion wurden aus den Hefezellen Mikrosomen präpariert (Gavira et al., 2013).

Die folgenden Mikrosomenpräparationen wurden bereit gestellt:

<i>OeL3'H1-SI2</i>	Zwei Batches Hefemikrosomen
<i>OeL3'H2-CI3</i>	awaiting final sequencing results (post-transformation into yeast)
<i>OeT3H1-CI2</i>	Hefemikrosomen
<i>OeT3H1-CI3</i>	Hefemikrosomen

Um die Funktionalität des Hefeexpressionssystems zu testen, wurde ein P450-Gen mit bekannter Proteinfunktion (humanes P450 3A4) ebenfalls mittels drag-and-drop in den Hefeexpressionstamm kloniert. Nach Mikrosomenisolierung und Aktivitätsassay mit Loratadin als Substrat konnte die Funktionalität bestätigt werden. Somit ist das Hefesystem grundsätzlich zur funktionellen Expression der P450-Gene geeignet.

Darüber hinaus wurden in einer Projekterweiterung Mikrosomenpräparationen aus Olivenzellkulturen hergestellt, um die Aktivität des Enzyms im Zielgewebe zu analysieren.

Die Gesamtprotein-Konzentration der Präparation (*OeC-m*) lag bei ~5 mg/mL.

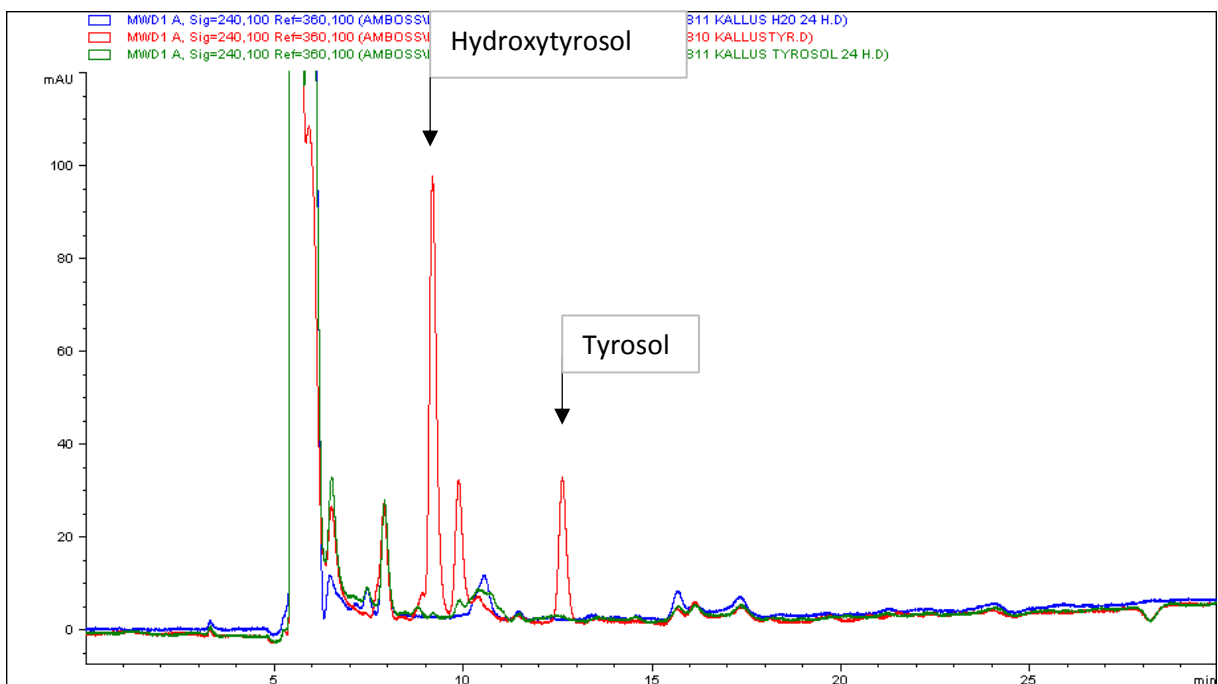
<i>OeC-m</i>	Pflanzenmikrosomen
--------------	--------------------

## 6.10 Verwendung von Olivenzelllysaten zur Hydroxylierung von Tyrosol-Derivaten

Zusätzlich zur Überprüfung von Mikrosomen mit putativer L3H-Aktivität, wurden lyophilisierte Zellen eingesetzt, um zu überprüfen, ob darin vorhandene Enzyme Hydroxylierungen verschiedener Substrate durchführen.

Verschiedene Inkubationszeiten zeigten die enzymatische Umsetzung der Substrate durch Zelllysate. Für Ligstrosid, Oleuropein und Hydroxytyrosol zeigten sich Abbauprodukte, Hydroxylierungen konnten für diese Substrate jedoch nicht nachgewiesen werden.

Bei Verwendung von Tyrosol wurde über die Inkubationszeit die Bildung von Hydroxytyrosol beobachtet, wobei der Tyrosolgehalt gleichzeitig verringert wurde. Das nach 1 h gebildete Hydroxytyrosol nahm dann allerdings über 24 h ebenfalls vollständig ab (siehe Abbildung 16, weitere Peaks sind Substanzpeaks aus dem verwendeten Zellmaterial). Dies weist darauf hin, dass in Zellen von *Olea europaea* ein Mechanismus zur Hydroxylierung von Tyrosol vorhanden ist.



**Abbildung 16: Chromatogrammausschnitt zur Hydroxylierung von Tyrosol mittels Zellen aus *Olea europaea* Chemlali**

Rot: Tyrosol + Zellen *O.e.* Chemlali, Inkubation 1 h RT

Grün: Tyrosol + Zellen *O.e.* Chemlali, Inkubation 24 h RT

Blau: Zellen + Wasser, Inkubation 24 h RT

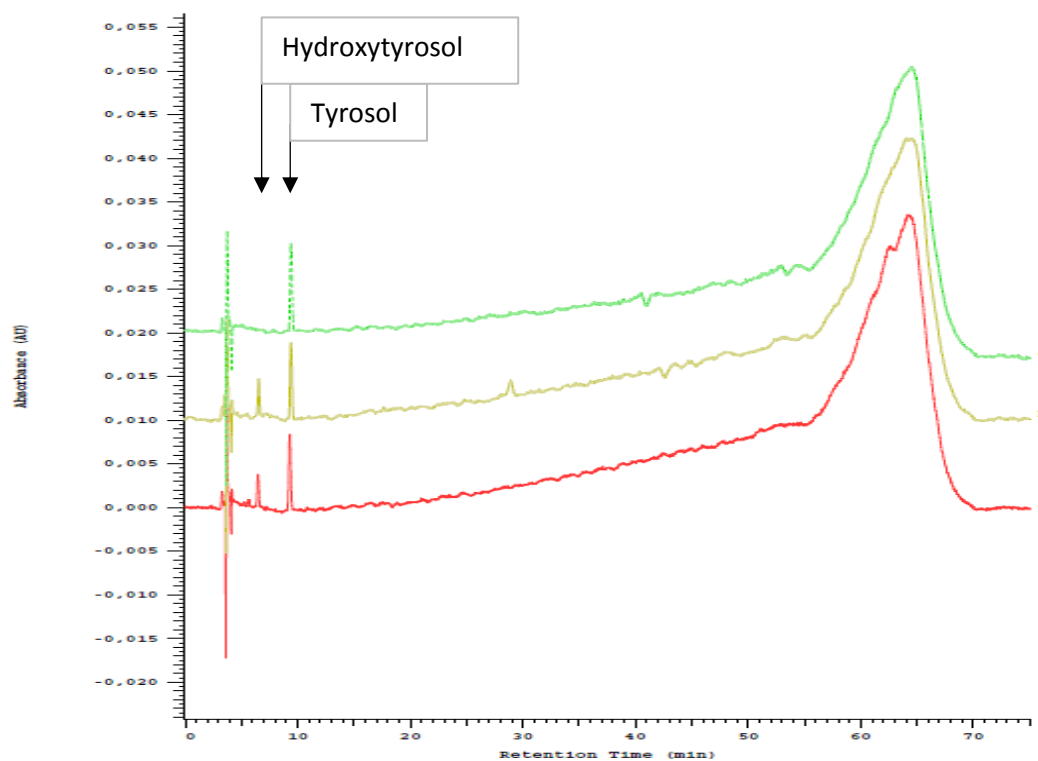
Die enzymatische Umsetzung von Tyrosol wurde jedoch nicht erreicht, wenn statt des gesamten Zellmaterials nur der klare Überstand nach Aufschluss und Zentrifugation eingesetzt wurde. Dies weist auf eine Membranassoziiierung der enzymatischen Aktivität hin.

## 6.11 Mikrosomenanalyse

Die verschiedenen Mikrosomen, hergestellt aus Hefen, welche unterschiedliche Gene exprimierten, wurden in einem Assay bei pH 6,8 mit NADPH als Cofaktor auf ihre Hydroxylierungsaktivität überprüft. Als Substrate wurden dabei Tyrosol und Ligstrosid eingesetzt.

Unter den angegebenen Reaktionsbedingungen zeigte keine Mikrosomenformulierung mit putativer L3H-Aktivität die gewünschte Hydroxylierungsreaktion (Test von 4 verschiedenen Chargen, je mit Mikrosomenkontrolle ohne Transgen). Weder in Reaktionsansätzen mit Ligstrosid noch solchen mit Tyrosol entstanden unter verschiedenen Inkubationszeiten (1 bis 24 h) die entsprechenden hydroxylierten Derivate.

Die Formulierung OeC-m des Pflanzenmikrosoms von *Olea europaea* Chemlali war in der Lage, Tyrosol zu Hydroxytyrosol zu hydroxylieren (siehe Abbildung 17). Diese Reaktion war unabhängig vom Cofaktor NADPH. Allerdings war diese Reaktion nach 24 h nicht abgeschlossen. Zwischen 3 h und 24 h war kein starker Anstieg des Hydroxytyrosolgehaltes mehr zu verzeichnen ebenso erfolgte keine weitere starke Abnahme des Tyrosolgehaltes.



**Abbildung 17: Chromatogramm zur Hydroxylierung von Tyrosol mittels Mikrosom aus *Olea europaea* Chemlali**

Rot: Tyrosol + Mikrosom *O.e.* Chemlali, Inkubation 3 h 28°C

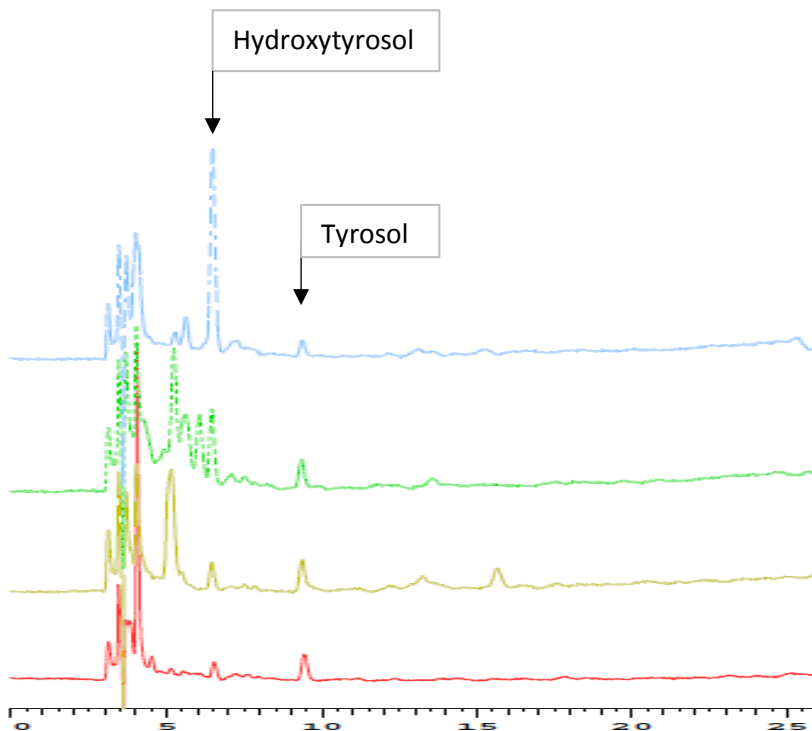
Braun: Tyrosol + Mikrosom *O.e.* Chemlali + NADPH, Inkubation 3 h 28°C

Grün: Tyrosol + NADPH, Inkubation 3 h 28°C

## 6.12 Inhibierung der Hydroxylierung von Tyrosol-Derivaten

In weiteren Versuchen mit *Olea europaea* Chemlali-Zelllysaten und Tyrosol wurden verschiedene Substanzen auf eine potentielle inhibitorische Wirkung überprüft. Dafür wurden EDTA, Natriummetabisulfit, Cystein und Glutathion ausgewählt, die als Inhibitoren für Polyphenoloxidasen und Monooxygenasen beschrieben sind (BRENDA Enzyme Database für „unspecific monooxygenase“ und „Catechol Oxidase“, Ünal *et al.* (2011)), und in Konzentrationen von 1-100 mM eingesetzt.

Cystein, Glutathion und Natriummetabisulfit zeigten keine inhibierende Wirkung auf die Hydroxylierung von Tyrosol. Allerdings wurde, wie in Abbildung 18 dargestellt, die Hydroxylierung unter Vorhandensein dieser Substanzen deutlich beeinflusst und es entstanden zusätzlich bisher unbekannte Substanzen.



**Abbildung 18: Chromatogrammausschnitt zur Hydroxylierung von Tyrosol mittels Zellen aus *Olea europaea* Chemlali unter Zugabe potentieller Inhibitoren**

Ein 3 mL Ansatz mit 1,4 mg Tyrosol und 50 mg lyophilisiertes Zellmaterial wurde 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert.

Rot: Tyrosol + Zellen *O.e.* Chemlali + 10 mM Na-Metabisulfit

Braun: Tyrosol + Zellen *O.e.* Chemlali + 10 mM Cystein

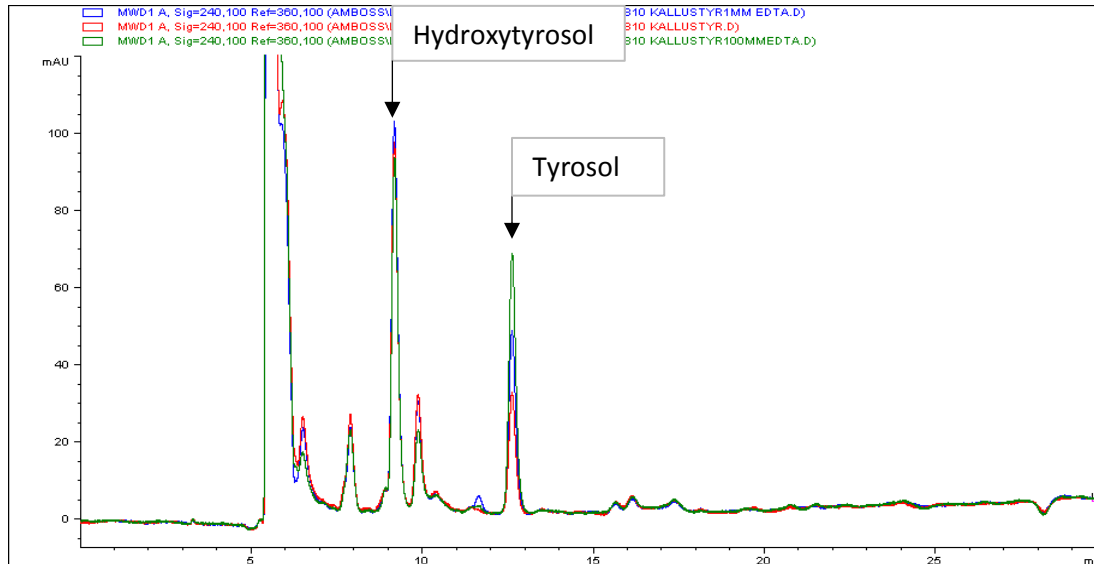
Grün: Tyrosol + Zellen *O.e.* Chemlali + 10 mM Glutathion

Blau: Tyrosol + Zellen *O.e.* Chemlali

Durch Zugabe von EDTA zum Reaktionsgemisch konnte eine Hemmung der Hydroxylierung von Tyrosol gezeigt werden (siehe Abbildung 19, weitere Peaks sind Substanzpeaks aus dem verwendeten Zellmaterial). Ohne EDTA lag nach einer Inkubationszeit von 1 h die geringste Menge Tyrosol vor, je mehr EDTA im Ansatz vorhanden war (1-10 mM), desto höher war die



restliche verbleibende Menge Tyrosol. Auch mit 100 mM EDTA konnte die Hydroxylierung nicht vollständig inhibiert werden (Daten nicht dargestellt).



**Abbildung 19: Chromatogrammausschnitt zur Hydroxylierung von Tyrosol mittels Zellen aus *Olea europaea* Chemlali unter Zugabe 1-10 mM EDTA als Inhibitor**

Ein 3 mL Ansatz mit ca. 1,4 mg Tyrosol und 200 mg lyophilisiertes Zellmaterial wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen EDTA inkubiert.

Rot: Tyrosol + Zellen *O.e.* Chemlali

Blau: Tyrosol + Zellen *O.e.* Chemlali + 1 mM EDTA

Grün: Tyrosol + Zellen *O.e.* Chemlali + 10 mM EDTA

### 6.13 Biotransformation von Ligstrosid zu Oleocanthal

Die enzymatische Biotransformation von Oleuropein zu Oleacein wird bei N-Zyme BioTec als Standardverfahren eingesetzt. Die Zielsetzung des Projektes liegt jedoch in der Herstellung von Ligstrosid mit anschließender Biotransformation zu Oleocanthal, welches sich nur um eine Hydroxylgruppe von Oleacein unterscheidet. Da über die Zellkulturen noch keine Ligstrosid zur Verfügung gestellt werden könnte, wurde es über eine aufwendige Extraktion von Ligstrosid aus Ligusterblättern mit anschließender Reinigung über *Centrifugal partition chromatography* (CPC) hergestellt. Ligstrosid konnte anschließend im bekannten Enzymsystem erfolgreich zu Oleocanthal transformiert werden (siehe Abbildung 20).

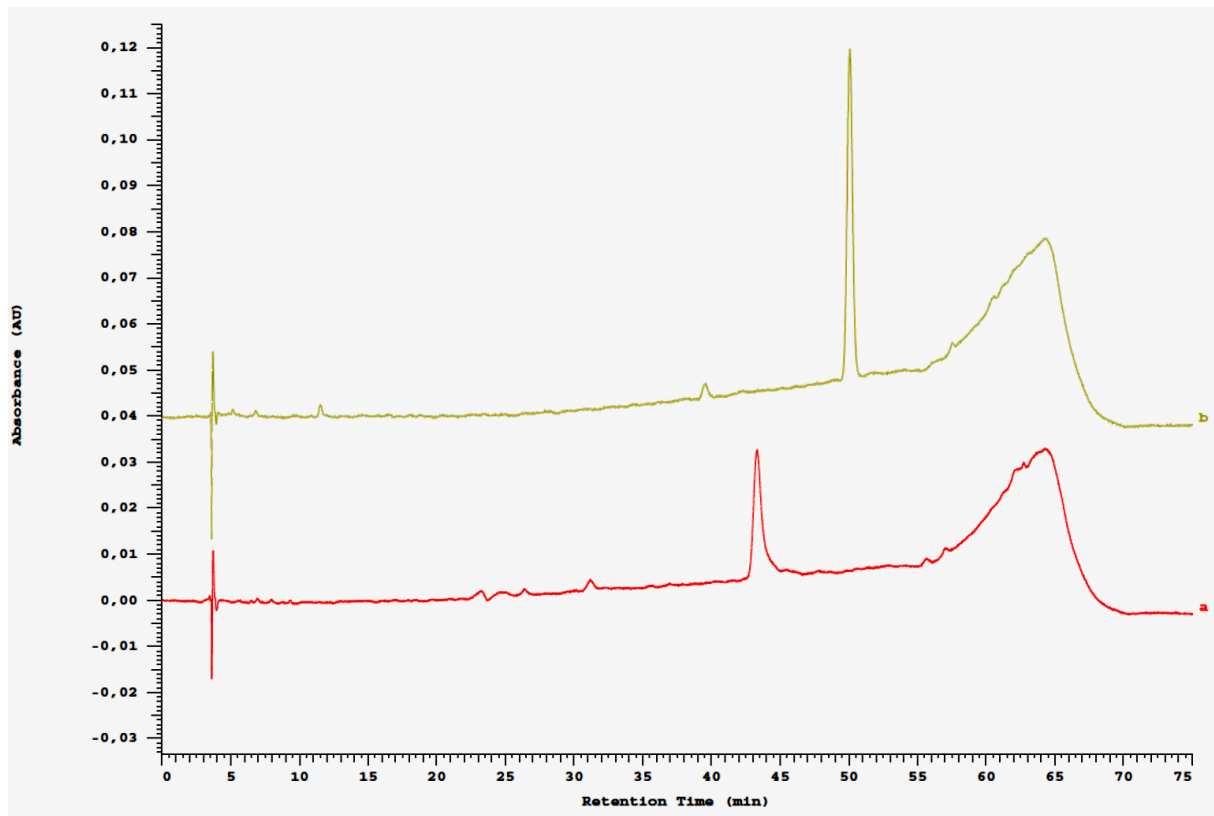


Abbildung 20: RP-HPLC-Chromatogramm der enzymatischen Biotransformation von Ligustrosid aus Ligusterblättern (braun) zu Oleocanthal (rot)

## 7 Diskussion

### 7.1 Inwieweit wurden die verfolgten Ziele erreicht?

Das primäre Ziel bestand in der Etablierung von Zellkulturen zur Produktion relevanter, pharmakologisch wirksamer Olivenphenole. Wie im Antrag beschrieben wurden erfolgreich Zellsuspensionskulturen und Kalli von unterschiedlichen Olivenvarietäten etabliert. Die Untersuchung von verschiedenen Kulturbedingungen und Medienzusammensetzungen führte zu einer gegenüber den bisherigen Literaturangaben deutlich verbesserten Performance der Zellkulturen. Das in der Literatur beschriebene und meist verwendete OM-Medium für Olivenzellkulturen hat sich gegenüber dem hier etablierten CIM-Medium als deutlich unterlegen erwiesen.

Während die Analysen von frisch etablierten Kalluskulturen abhängig von der Varietät noch geringe Mengen Oleuropein zeigten, konnte die Oleuropeinbildung in Dauerkulturen nicht mehr bestätigt werden. Allerdings wurde eine weitere phenolische Substanz, Verbascosid, in sehr hohen und reproduzierbaren Mengen in den Kulturen aufgefunden. Dies steht im eindeutigen Gegensatz zum Inhaltsstoffspektrum von Olivenblättern, wo Verbascosid nur in geringen Mengen vorkommt.

Verbascosid ist ebenso wie Oleuropein ein Hydroxytyrosol-Derivat. Während Oleuropein aus den Bausteinen Elenolsäure und Hydroxytyrosol besteht, weist Verbascosid neben Hydroxytyrosol noch Glucose, Rhamnose und Kaffeesäure auf. Demnach wird es wahrscheinlich über den Phenylpropanweg synthetisiert, während der iridoide Anteil von Oleuropein aus dem Terpenstoffwechsel kommt. Damit unterschieden sich die beiden Bildungswege dieser Substanzen (siehe Abbildung 21).

Goulas *et al.* (2012) beschreiben in ihrer Zusammenfassung zur Klassifizierung und Biotransformation von Olivenpolyphenolen einen Zusammenhang von Oleuropein und Verbascosid während der Reifung. Während der Gehalt an Oleuropein mit zunehmendem Reifestadium abnimmt, steigt der Gehalt an Verbascosid an. Möglicherweise könnten durch diese Beobachtung auch Rückschlüsse auf die erzielten Ergebnisse der Zellsuspensionen und Kalluskulturen gezogen werden, wenn diese Zellen mit einem solchen, späteren Reifestadium vergleichbar wären.

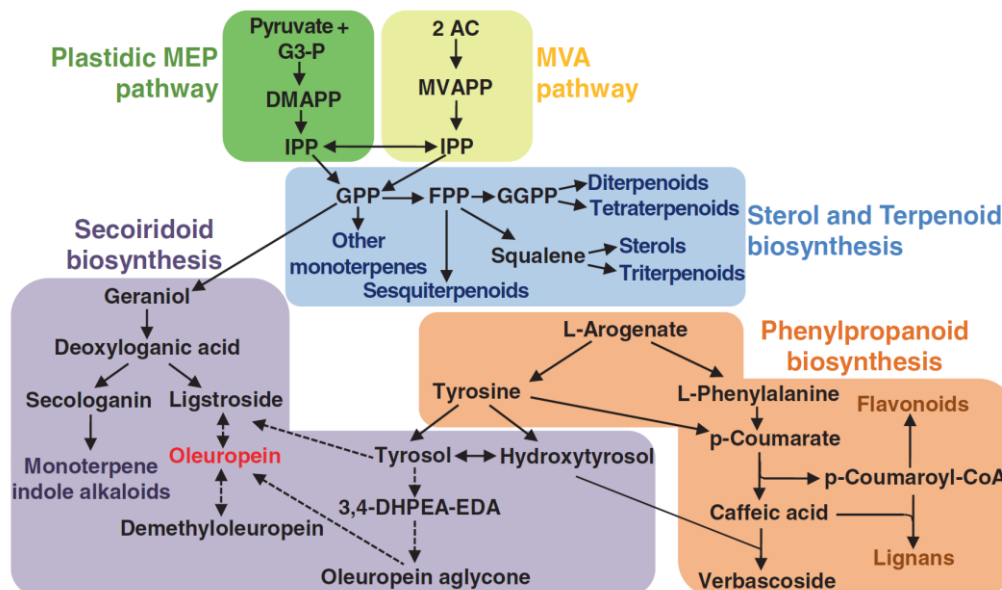


Abbildung 21: Beschriebene Biosynthesewege von Oleuropein, Ligstroside und Verbascosid von Alagna *et al.* (2012)

Anders als in der Literatur beschrieben (Gentile & Uccella, 2010), fiel der Oleuropein-Gehalt im Verlauf der Kultivierung ab und konnte mit keinen den getesteten Elicitoren gesteigert werden. Verbascosid konnte jedoch über den gesamten Projektzeitraum in verschiedenen Varietäten und Kultivierungszeiten stabil gebildet werden. In Zellsuspensionen war die Reinheit nach methanolischem Zellaufschluss besonders hervor zu heben, die ohne weitere Reinigungsschritte bereits bei ca. 55 % (nach RP-HPLC 240 nm) lag.

In vitro konnte eine enzymatische Umsetzung von Tyrosol zu Hydroxytyrosol mit Olivenzellpräparationen gezeigt werden. Diese wurde sowohl mit lyophilisierten Olivenzellen als auch mit Mikrosomen aus Olivenkallus bestätigt. *Olea europaea* besitzt demnach wie vermutet ein enzymatisches System zur Durchführung von Hydroxylierungsreaktionen. Durch EDTA, einem typischen Inhibitor für Monooxygenasen (BRENDA Enzyme Database für „unspecific monooxygenase“), wird die Hydroxylierung inhibiert. Sie wird aber durch NADPH nicht beeinflusst, obwohl dieses der typische Cofaktor für P450 Enzyme ist und damit ein Hinweis sein könnte, dass die Hydroxylierung durch ein anderes Enzymsystem erfolgt. EDTA fungiert auch als Inhibitor für Polyphenoloxidasen (syn.: Catechol Oxidase, EC 1.10.3.1), deren Kupfer-Bindungsstelle direkt in der Oxidationsreaktion beteiligt ist (BRENDA Enzyme Database für „catechol oxidase“). Außerdem handelt es sich vermutlich um ein membranassoziiertes System, wie es bei Monooxygenasen häufig der Fall ist, wie die Versuche mit Mikrosomen aus Olivenzellen sowie die Verwendung von löslichen Komponenten der Zellen (hierbei keine Umsetzung) zeigte. Eine weitere Isolierung oder Charakterisierung dieses neuen Enzyms konnte im Zuge des Projektes jedoch nicht durchgeführt werden.

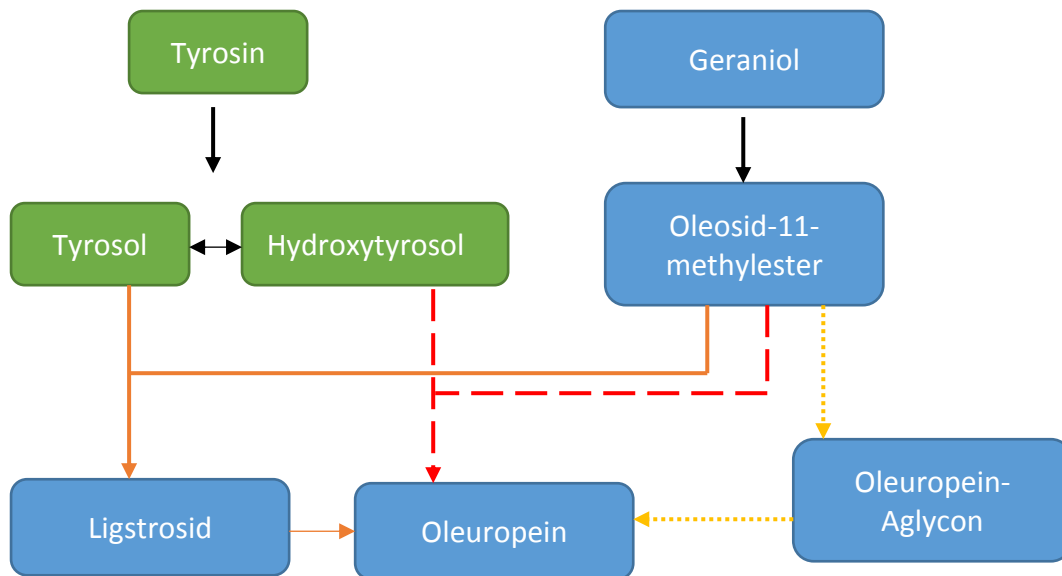
## 7.2 Woraus ergeben sich die Abweichungen der erhaltenen Ergebnisse (aufgetretene Probleme, Veränderungen bezüglich Strategie oder angewandter Methoden)?

Oleuropein konnte über die verschiedenen Kultivierungssysteme (mehrere Varietäten, variable Kultivierungsbedingungen, Elicitoren) nicht reproduzierbar in signifikanten Mengen gebildet werden. Das Polyphenolspektrum der Zellkulturen wurde weitgehend über Phenylpropanoide (Verbascosid und Derivate) abgebildet. Dies war ein deutlicher Unterschied zum anfänglich bekannten Polyphenolspektrum in Olivenblättern, welches von Oleuropein dominiert wird. In der vorgegebenen Projektzeit konnte die Bildung von Oleuropein in Zellkulturen nicht positiv beeinflusst werden. Die aus der verfügbaren wissenschaftlichen Literatur abgeleitete Hypothese, dass Oleuropein direkt aus der Vorstufe Ligstrosid gebildet wird, konnte mit den in diesem Projekt gefundenen Ergebnissen ebenfalls nicht zur Deckung gebracht werden. Weder eine direkte Hydroxylierung von Ligstrosid noch die Akkumulation von Oleuropein in Zellkulturen konnte bestätigt werden.

Mit diesen beiden genannten Punkten war es leider nicht möglich, Ligstrosid durch eine Unterbrechung der Oleuropeinbiosynthese zu akkumulieren, wie es als Projektziel geplant war.

Dennoch konnten in der kurzen Projektlaufzeit wertvolle Erkenntnisse und Grundlagen für weitere Untersuchungen gewonnen werden. So wurden erfolgreich fünf Gene für P450 Monooxygenasen aus Oliven kloniert und heterolog exprimiert. Auch wenn keine Aktivität gegen Ligstrosid und Tyrosol detektierbar war, können nun weitere Untersuchungen zur Funktionalität durchgeführt werden. Untersuchungen mit löslichen Substraten und Membranfraktionen von Olivenzellen legen den Schluss nahe, dass die Biosynthese von Oleuropein anders verlaufen könnte, als in der Literatur beschrieben. Alagna *et al.* (2012 und 2015) diskutieren zwei mögliche Synthesewege von Oleuropein über Geraniol und Ligstrosid bzw. über Oleuropeinaglycon, in beiden Fällen wird jedoch vermutet, dass Tyrosol eingebaut wird, und ergänzen, dass alternative Biosynthesewege existieren könnten, da derzeit noch viele Reaktionen unverstanden oder hypothetisch sind. Als weitere Alternative wäre es denkbar, dass an Oleosid-11-methylester (eine Vorstufe von Ligstrosid) statt Tyrosol ein Hydroxytyrosolrest integriert wird. Diese drei hypothetischen Bildungswege von Oleuropein sind in Abbildung 22 dargestellt.

Eine Route, in der Hydroxytyrosol zuerst gebildet wird und anschließend an Elenolsäure geknüpft wird, ist durchaus plausibel und mit den von uns gewonnenen Daten zumindest im Einklang. Hierauf weist die gefundene Tyrosol-hydroxylierende Aktivität der Olivenzell-Membranfraktion hin. Schließlich deuten die Ergebnisse darauf hin, dass auch eine nicht-P450-Aktivität, z.B. Polyphenoloxydase, an der Hydroxylierung von Tyrosol beteiligt sein kann. Für die Entwicklung eines Produktionsprozesses von Ligstrosid in Zellkulturen wäre die Aufklärung des Biosyntheseweges von Ligstrosid bzw. Oleuropein von großer Bedeutung.



**Abbildung 22: Hypothetische Synthesewege von Oleuropein**

(—): nach Damtoft *et al.* (1993), (1995)

(- -): nach Alagna *et al.* (2012)

(····): dritte Variante unter Berücksichtigung von Hydroxylierungsfähigkeit der Olivenzellen von Tyrosol zu Hydroxytyrosol

Auch wenn diese Ergebnisse interessante und wertvolle Einblicke in die Biosynthese der Olivenpolyphenole geben, kann mit dem derzeitigen Wissensstand eine gerichtete Modulation des Metabolitenspektrums der Olivenzellkultur nicht erreicht werden. Als sehr interessante Entdeckung muss aber gewertet werden, dass sämtliche Olivenzellkulturen den industriell interessanten Metaboliten Verbascosid bilden, und zwar in sehr hoher Menge und Reinheit über lange Zeiträume.

Dieses Phenylpropanoid besitzt ähnliche pharmakologische Eigenschaften wie Oleuropein und wird als antioxidative, antimikrobielle, antiinflammatorische und neuroprotektive Substanz beschrieben (Vertuani *et al.* (2011), Peng *et al.* (2015), Alipieva *et al.* (2014)). Zellbasierte Untersuchungen zeigen bezüglich der antioxidativen Wirkung von Verbascosid positive Ergebnisse insbesondere als Schutz vor ROS (*reactive oxygen species*) sowie zum Schutz von *low density* Lipoproteinen (Cardinali *et al.*, 2012). Außerdem zeigte sich Verbascosid als aussichtsreich in Untersuchungen zur Inhibierung von Prostaglandin D2 Synthase und damit zur Behandlung von Haarverlust (Fong *et al.*, 2015). Die Wirkung von Verbascosid auf UV-sensitive Signalwege in HEK-Zellen wurde von Kostyuk *et al.* (2013) untersucht und eine inhibierende Wirkung identifiziert, die möglicherweise für den chemopräventiven Einsatz gegen Hautkrebs nutzbar wäre. Besonders positiv hervorzuheben ist die hohe Reinheit dieser Substanz, die im methanolischen Zellaufschluss ohne weitere Reinigungsschritte erreicht wurde. Nach einer Etablierung eines geeigneten Fermentationsprozesses könnte ein aus Zellkulturen gewonnenes Verbascosid beispielsweise in kosmetischen Anwendungen eingesetzt werden.

### 7.3 Wie gestaltete sich die Arbeit mit den unterschiedlichen Kooperationspartnern (Institute, Firmen, Kommunen, Länder)?

Die Projektpartner befanden sich in einem steten und regen Austausch. Das betraf den Austausch von Probenmaterial und Referenzsubstanzen als auch den Ideenaustausch. Regelmäßige Projektmeetings wurden vor allem durch die räumliche Nähe der Projektpartner begünstigt.

Eine weitere Fortführung des Projektes wird aktuell geplant. Außerdem werden gemeinsam die Möglichkeiten zur fermentativen Produktion von Verbascosid bewertet.

## 8 Öffentlichkeitsarbeit

Nicht anwendbar.

## 9 Fazit

### 9.1 Hat sich die Vorgehensweise bewährt (evtl. veränderte Lösungsansätze, Ideen...)?

Die Etablierung eines Kultivierungssystems für Olivenzellen konnte erfolgreich umgesetzt werden. Es konnte ein stabiles System zur Kultivierung verschiedener Olivenvarietäten in Suspension getestet und implementiert werden.

Der Nachweise der Polyphenole war nach Optimierung des Zellaufschlusssystems gewährleistet. Schwankungen bezüglich der Konzentrationen von Polyphenolen konnten zwar nicht eindeutig etwaigen Unterschieden im Zellwachstum oder dem Zellaufschluss zugeordnet werden, allerdings machte das Zellaufschlusverfahren einen konstanten Nachweis von hohen Mengen Verbascosid möglich. Auch andere, bisher nicht identifizierte Polyphenole konnten detektiert werden.

Die Beeinflussung des Sekundärmetabolitspektrums - insbesondere die Bildung von Ligstrosid oder Oleuropein - konnte mit den verwendeten Elicitoren nicht gezeigt werden. Dies trifft sowohl auf Zellsuspensionskulturen als auch Blätter und junge Zweige zu.

Die Bildung von Mikrosomen mit verschiedenen Monooxygenasen aus Olive war erfolgreich. Auch war es möglich, die grundsätzliche Machbarkeit der Vorgehensweise im Experiment zu bestätigen. Hierfür wurde ein bekanntes P450 Enzym (humanes P450 3A4) im Hefesystem exprimiert und funktionell getestet. Aktivität gegen das Substrat Loratadin konnte mit aus diesen Zellen gewonnenen Mikrosomen bestätigt werden.

Zusätzlich zu den bisher identifizierten Kandidaten für eine potenzielle Hydroxylierung von Ligstrosid wurden im Laufe des Projektes Kandidaten für eine Tyrosol-Hydroxylierung identifiziert. Diese wurden aufgrund von Homologien zu kürzlich beschriebenen Tyrosin-Hydroxylasen aus *Beta vulgaris* identifiziert, kloniert und im Hefesystem exprimiert. Auch hier konnte keine der gesuchten Aktivitäten gemessen werden.

Die Unterstützung der Enzymsuche durch Versuche mit Zellmaterial statt Mikrosomen war hilfreich. Hiermit konnte zumindest ein Enzymsystem zur Hydroxylierung von Tyrosol

identifiziert werden, welches durch EDTA beeinflusst wird. Dieses zellwandassoziierte System wurde auch durch Mikrosomenpräparationen von Olivenkallus bestätigt. Da hier keine Abhängigkeit von NADPH gezeigt werden konnte, kann die Enzymaktivität nicht eindeutig einer Monooxygenase zugeordnet werden. Denkbar wäre, dass einen Polyphenoloxidase an dieser Reaktion beteiligt ist.

## 9.2 Werden Änderungen der Zielsetzung notwendig?

Im Projektzeitraum war es nicht möglich, Ligstrosid mittels Zellkultivierung von *Olea europaea* zu produzieren. Die Zellkultivierung konnte zwar im Labormaßstab etabliert werden, allerdings wurde dabei nicht wie erwartet Oleuropein gebildet. Außerdem wurde noch kein Enzym identifiziert, welches Ligstrosid am Tyrosolrest hydroxyliert.

Überraschend hohe Mengen von Verbascosid konnten jedoch stabil über die Kultivierung verschiedener Varietäten von *Olea europaea* generiert werden. Dies eröffnet neue Möglichkeiten zur kommerziellen Nutzung der gewonnenen Erkenntnisse aus dem Projekt. Da Verbascosid in seinen Eigenschaften denen des Oleuropeins als sehr ähnlich beschrieben wird, liegt es nahe, diese Substanz und deren Produktionsprozess weiter zu untersuchen.

Das ursprüngliche Ziel eines Produktionsprozesses von Ligstrosid soll weiter verfolgt werden. Dazu wird es aber in weiteren Schritten zunächst nötig sein, die Biosynthese von Ligstrosid besser zu verstehen, um dann gezielt metabolisch/ genetisch eingreifen zu können. Gegebenenfalls muss auch die Synthese von Phenylpropanoiden gehemmt werden, um eine signifikante Bildung von Oleuropein oder Ligstrosid zu generieren.



## 10 Literaturangaben

- Alanga *et al.* BMC Plant Biology (2012) 12:162.
- Alanga *et al.* JBC (2015) doi: 10.1074/jbc.M115.701276.
- Alipieva *et al.* Biotechnology Advances (2014) 32, 1065-1076.
- BRENDA, Catechol Oxidase EC 1.10.3.1 <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.10.3.1> [Stand 20.09.2016, 14.00 MESZ]
- BRENDA, Unspecific Monooxygenase EC 1.14.14.1 <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.14.14.1> [Stand 20.09.2016, 14.00 MESZ]
- Cardinali *et al.* J Agric. Food Chem. (2012) 60, 1822-1829.
- Damtoft *et al.* Phytochemistry (1995) 40, 3, 773-784.
- Damtoft *et al.* Phytochemistry (1993) 34, 5, 1291-1299.
- EFSA Journal (2011) 9(4):2033
- Fong *et al.* J Ethnopharmacol. (2015) 175, 470-480.
- Gavira *et al.*, Metabolic Engineering 18 (2013) 25-35.
- Geissler *et al.* Planta (in press)
- Gentile & Uccella Food Res. Int. (2010) 55, 128-136
- Gentile & Uccella, Food res. Int. (2014) 55, 128-136)
- Guengerich *et al.* Nature Protocols (2009) 4, 1245 - 1251.
- Jansen *et al.* Gene 344 (2005) 43-51.
- Kostyuk *et al.* Curr Med Chem. (2013) 20 (7), 869-879.
- Mangal *et al.* Indian J Exp Biol 52 (2014) 912-916.
- Miettinen, K. *et al.*, Nat. Commun. 5 (2014) 3606
- Namdeo, Pharmacognosy Rev. (2007) 1, 69-79
- Polturak *et al.*, New Phytol. (2016) 210(1):269-83
- Pompon *et al.*, Methods Enzymol. (1996) 272:51-64.
- Rugini, Scientia Horticulturae 24 (1984) 123-134.
- Schmidt and Stöckigt Planta Med (1995)
- Schoch *et al.* J. Biol. Chem. 276 (2001) 36566-74.
- Sipahi *et al.* 2016
- Ünal *et al.* GIDA 36(4) (2011) 185-192
- Urban *et al.* J. Biol. Chem. 272 (1997) 19176-86.
- Vertuani *et al.* Molecules 16 (2011), 7068-7080.

## 11 Anlagen/Anhang

Keine Anlagen vorhanden.