

Regionale Wertschöpfung mit Medizinalpflanzen im Rheinischen Revier

Von Dr. Lena Grundmann

Kräuter, Heil- und Medizinalpflanzen sind eine nahezu unerschöpfliche Quelle für pharmazeutisch-nutzbare Substanzen in Phytopharmaka und weisen ein hohes Wertschöpfungspotenzial in der Agrar, Kosmetik und Lebensmittelindustrie auf. Dieses Potenzial soll als ein Baustein genutzt werden, um im Rheinischen Revier eine Modellregion für Bioökonomie zu etablieren und so zur Bewältigung des Strukturwandels beitragen.

Von den weltweit rund 50.000 Medizinalpflanzen werden lediglich 900 Arten kultiviert. Aktuell importiert Deutschland 90 Prozent der benötigten Menge. Zudem entstammt der Großteil der Rohware für Phytopharmaka aus Wildsammlungen. Dies ist weder nachhaltig noch ökologisch sinnvoll, das Nagoya-Protokoll schränkt daher Wildsammlungen stark ein. Weiterhin schwankt der Wirkstoffgehalt in Wildpflanzen zum Teil erheblich und führt so oftmals zu inakzeptablen Qualitätseinbußen. Daher widmen wir uns in der Abteilung »Funktionelle und Angewandte Genomik« zusammen mit unseren Partnern – Fraunhofer UMSICHT und Forschungszentrum Jülich – im BMBF geförderten Projekt »Circular PhytoREVIER« der zukunftsfähigen Erzeugung ausreichender Mengen an hochqualitativen Heil- und Medizinalpflanzen. Wir fokussieren unsere Aktivitäten auf den Aufbau und die Verstärkung einer hocheffizienten und wirtschaftlich-tragfähigen Prozesskette: Von der Züchtung ertragsoptimierter Pflanzen über die Entwicklung neuer und schlagkräftiger Anbau- und Erntetechnologien bis hin zur effizienten Extraktion und Bereitstellung der Wirkstoffgemische aus der Rohware. Schwerpunkte unserer FuE-Arbeiten sind wertgebende Heil- und Medizinalpflanzen durch Selektion und moderne Pflanzenzüchtung (inkl. proof-of-concept Studien mittels Genomeditierung) in landwirtschaftlich angepasste Nutzpflanzen zu überführen sowie innovative Verfahren zur gezielten Steuerung und Erhöhung des Wirkstoffgehalts durch biotische und abiotische Stressgabe zu entwickeln.

Fokuspflanze Arnika

Eine der Fokuspflanzen ist die seit Jahrhunderten genutzte Heilpflanze *Arnica montana* L.. Deren leuchtend gelben Blütenköpfe finden in einer Vielzahl von phytopharmazeutischen Zubereitungen Verwendung. Für die Anwendung auf der Haut werden sie zu Tinkturen sowie in Salben, Cremes oder Gelen verarbeitet. Das Hauptanwendungsgebiet liegt bei stumpfen

Verletzungen wie Prellungen, Schwellungen, Stauchungen und Blutergüssen. Die pharmakologischen Eigenschaften der Blütenköpfe werden in erster Linie den Sesquiterpenlactonen Helenalin und Dihydrohelenalin sowie deren Derivaten zugeschrieben. In der Natur dienen diese den Arnika-Pflanzen als Fraßschutz gegen Herbivoren und der Abwehr von Mikroorganismen.

Es ist bekannt, dass sowohl die Zusammensetzung als auch der Gehalt der Sesquiterpenlactone (SLs) von einer Vielzahl unterschiedlicher abiotischer und biotischer Faktoren abhängen, die deren Biosynthese und Akkumulation steuern. In Blüten schwankt der SL-Gehalt zwischen 0,3 und 1 g pro 100 g Trockenmasse. Das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur. 11.0 Arnikablüten Nr. 1386) fordert einen Mindestgehalt an Sesquiterpenlactonen von 0,4 g pro 100 g in der getrockneten Droge *Arnicae flos* (Arnikablüten). Je nach Herkunft unterscheidet man zwei verschiedene Chemotypen, die sich in ihrer SL-Zusammensetzung deutlich abgrenzen: *Arnica montana* subsp. *montana* mitteleuropäischer Herkunft besitzt hauptsächlich Helenalin/-ester und *A. montana* subsp. *atlantica* spanischer Herkunft Dihydrohelenalin/-ester als Hauptsesquiterpenlactone (Abb. 1A).



Die Sesquiterpenlacton-Biosynthese in Arnika: Erste Schritte entschlüsselt

Die Kenntnis der Biosynthese der gewünschten Produkte ist für die innovative Züchtung ertragsoptimierter Pflanzen ein essentieller Baustein. Für *Arnica montana* ist die Biosynthese der Sesquiterpenlactone (SLs) noch nicht aufgeklärt. Anhand von Untersuchungen in naheverwandten Arten gehen Forschende davon aus, dass die initialen Schritte der Biosynthese in der

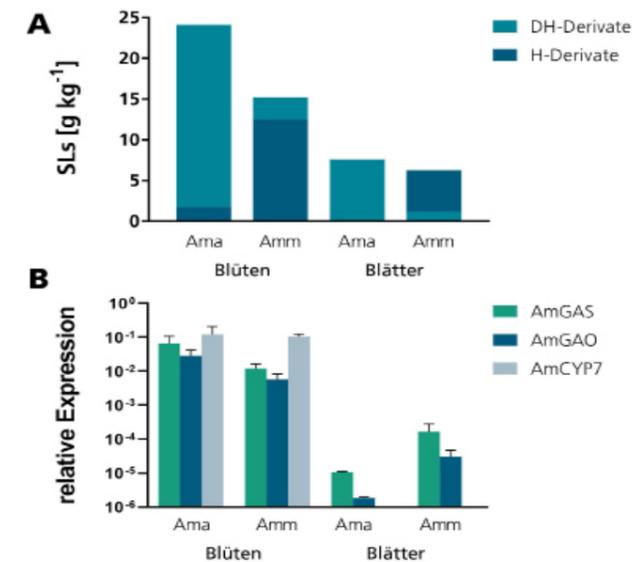


Abb. 1: Der SL-Gehalt in Blüten und Blättern von zwei Arnika-Chemotypen: *A. montana* subsp. *montana* (Amm) hauptsächlich Helenalin-Derivate, *A. montana* subsp. *atlantica* (Ama) hauptsächlich Dihydrohelenalin-Derivate (A). Vergleichende Expressionsanalyse potenzieller SL-Biosynthesegene AmGAS, AmGAO, AmCYP7 in Blüten und Blättern (B).

Familie der Asteraceae konserviert sind, das heißt sie laufen identisch bis zum Zwischenprodukt Germacren-A-Säure (GAA) ab. Für Arnika sind die hierfür verantwortlichen Gene noch nicht beschrieben und charakterisiert und es liegen auch keine genomischen Sequenzen von Arnika in öffentlichen Datenbanken vor. Daher nutzen wir auch hier die Sequenzdaten naheverwandter Arten wie beispielsweise der Sonnenblume, um die entsprechende Gene aus Arnika abzuleiten. Auf diese Weise generierten und sequenzierten wir zunächst Fragmente der entsprechenden Gene. Mit Hilfe verschiedener PCR-Techniken gelang im nächsten Schritt die Vervollständigung der Gensequenzen. So identifizierten wir in beiden Chemotypen sieben Gene, die für Schlüsselenzyme der Terpenbiosynthese, und zehn Kandidaten-Gene, die möglicherweise für Enzyme der Helenalinbiosynthese kodieren.

Sowohl in Blüten als auch in Blättern der Arnika Pflanzen können wir SLs nachweisen, wobei der Gehalt in Blüten höher liegt (Abb. 1A). Diese Ergebnisse lassen sich durch Biosynthese in beiden Organen und/oder einem Transport zwischen den Organen erklären. Zur Überprüfung führten wir Expressionsanalysen durch: In Blüten werden die Gene *AmGAS*, *AmGAO* und *AmCYP7* mehr als 100-fach stärker exprimiert als in Blättern (Abb. 1B). Die Schlussfolgerung: Die SLs Biosynthese erfolgt verstärkt in der Blüte, allerdings findet sie auch im Blatt

statt, zusätzlich könnten die SLs auch vom Blatt in die Blüte transportiert werden.

Für die Kandidatengene wurde mit Hilfe von Expressions-Studien auch die genaue Art der Beteiligung des Gens bzw. des Gen-Produktes am Biosyntheseweg geklärt. Forschende bedienen sich für diese Analysen meist heterologer Expressionssysteme wie beispielsweise der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Das Fraunhofer IME in Münster verfügt über einen Hefeproduktionsstamm, der speziell für die Biosynthese von ausgewählten Sekundärmetaboliten entwickelt wurde. Die codierenden Sequenzen der Kandidatengene wurden jeweils einzeln oder in Kombination stabil in das Hefegenom integriert, einige Tage nach Induktion erfolgte die Ernte der Kulturen, die Extraktion potenzieller Biosyntheseprodukte sowie die GC/MS Analyse. So konnte *AmGAS1* als funktionale Germacrensynthase identifiziert und darauf aufbauend ebenfalls *AmGAO1* als funktionale Germacren A-Oxidase charakterisiert werden (Abb. 2).

Erste Schritte der SL-Biosynthese hin zu GAA in Arnika konnten somit erfolgreich aufgeklärt werden und dienen als Grundlage für die Charakterisierung weiterer identifizierter Kandidatengene (*AmCYPs*) für die folgenden Schritte hin zu den wirksamen Helenalin- und Dihydrohelenalin-Derivaten sowie für die Etablierung einer Zellkultur-basierten Wirkstoff-Produktionsplattform.

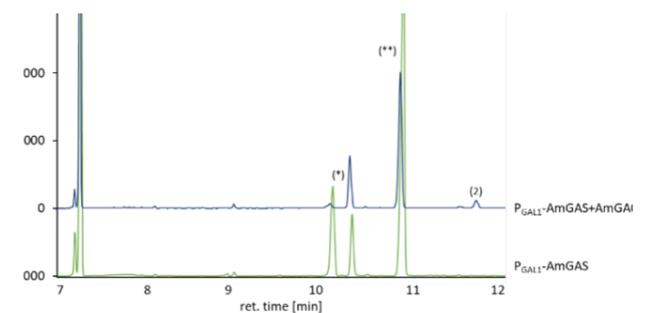


Abb. 2: Per GC/MS-Analyse konnte in *AmGAS* und *AmGAS-AmGAO* exprimierenden Hefekulturen eine erste Vorstufe (Germacren A, peak (1)) der SL-Biosynthese identifiziert werden. Entsprechend des zusätzlich vorhandenen *AmGAO*-Gens in *AmGAS-AmGAO* exprimierenden Hefekulturen wurde hier ein weiterer Peak (2) detektiert, der für Germacren-A-Säure (GAA) charakteristisch ist.



Kontakt
Dr. Lena Grundmann
lena.grundmann@ime.fraunhofer.de

