



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Untersuchungen zur Synthese von Baccatinen in Zellkulturen von *Corylus avellana* L.

Verfasserin
Elisabeth Schatzl

angestrebter akademischer Grad
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Diplomstudium Pharmazie
Betreuerin:	Univ.-Prof. Mag. Dr. Brigitte Kopp

DANKSAGUNGEN

Besonders möchte ich mich bei Frau Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp für die Bereitstellung des interessanten Themas, die nette Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Für die kompetente Betreuung während meiner praktischen Arbeitszeit möchte ich mich bei Herrn Ass. Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch recht herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Univ. Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek der sich spontan dazu bereit erklärte, die UPLC-Vermessungen durchzuführen und mir bei der Auswertung hilfreich zur Seite stand.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Florian Gössnitzer, technischer Assistent, bedanken, der mir jederzeit helfend zur Seite stand und mich durch seine lobenden Worte immer wieder ermutigte.

Meinen Eltern möchte ich einen besonders großen Dank für die Ermöglichung des Studiums, für die Unterstützung und die Motivation aussprechen. Danke, dass ihr immer für mich da seid und mich immer unterstützt.

Zuletzt möchte ich mich noch bei allen Verwandten und Freunden bedanken, die mich während meiner Studienzeit begleitet und motiviert haben.

ABKÜRZUNGEN

LS	Linsmaier und Skoog
FDA	Fluoresceindiacetat
FG	Frischgewicht
TG	Trockengewicht
g	Gramm
°C	Grad Celsius
mg	Milligramm
kg	Kilogramm
KOH	Kalilauge
HCl	Salzsäure
µm	Mikrometer
min	Minuten
proz.	prozentig
ESI	Elektrospray-Ionisation
CAD	Collision Activated Decomposition
CYP-450	Cytochrom P-450

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1. Taxol® und Baccatine	1
1.2. <i>Corylus avellana</i> L.....	5
1.3. Elizitierung.....	6
1.4. Fragestellung.....	9
2. Material und Methoden	11
2.1. Pflanzenmaterial	11
2.2. Nährmedien.....	12
2.3. Kulturbedingungen	14
2.4. Elizitierung.....	14
2.5. Extraktion und Analytik.....	16
2.5.1. Extraktion	16
2.5.2. Analytik.....	17
2.6. Vitalitätstests	21
2.7. Sterilität	22
3. Ergebnisse	23
3.1. Elizitierung mit Saccharose.....	27
3.1.1. Intrazelluläre Inhaltsstoffe	27
3.1.2. Extrazelluläre Inhaltsstoffe	30
3.2. Elizitierung mit Silbernitrat.....	32
3.2.1. Intrazelluläre Inhaltsstoffe	32
3.2.2. Extrazelluläre Inhaltsstoffe:	35
3.3. Elizitierung mit Ammoniumcitrat.....	36
3.3.1. Intrazelluläre Inhaltsstoffe	36
3.3.2. Extrazelluläre Inhaltsstoffe	39
3.4. FDA-Test.....	49
3.5. Phenosafranin-Test.....	50
4. Diskussion	51
5. Zusammenfassung	59
6. Summary	61
7. Literaturverzeichnis	63

Lebenslauf

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1. Taxol® und Baccatine

Das National Cancer Institute der USA startete 1962 ein breit angelegtes Screening-Programm zur Auffindung neuer antineoplastischer Stoffe aus der Natur. Dabei stellten sich Extrakte der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia* Nutt.), im Nordwesten der USA und Kanadas beheimatet, als erfolgversprechend heraus. Damit war der Grundstein für die heutige Erfolgsgeschichte des Taxols®, Handelsname des Paclitaxels, gelegt (Frank 1997). 1963 entdeckte Monroe Wall am Research Triangle Institute von North Carolina, dass die Extrakte aus der Eibenrinde gegen mehrere Leukämiezelllinien der Maus wirksam sind (Bartsch 2004). Es folgte die Isolierung des Paclitaxels 1969, Struktur und Wirkung wurden 1971 publiziert (Wani et al. 1971).

Der höchste Paclitaxelgehalt findet sich in der Rinde von *Taxus brevifolia* Nutt. Auch andere *Taxus*-Arten, wie *Taxus baccata* oder *Taxus chinensis*, enthalten Paclitaxel, jedoch in geringeren Mengen. Bis Anfang der 1990er Jahre wurde Paclitaxel direkt aus der Rinde gewonnen. Die Gewinnung von einem Kilogramm Paclitaxel forderte aber die Vernichtung von 2000 bis 3000 Bäumen. Daraus resultierte eine rasche Gefährdung des Bestandes auch deshalb, weil die Eibe ein sehr langsames Wachstum hat (Dingermann et al. 2011).

Die Totalsynthese von Taxol® ist durch Nicolaou (1994) zwar gelungen, jedoch zu komplex und unwirtschaftlich, um den Weltbedarf zu decken.

Als Alternative zeigte sich die partialsynthetische Herstellung aus Baccatin III oder 10-Desacetylbaccatin III, hierbei handelt es sich um Zwischenprodukte in der Biosynthese des Paclitaxels. Baccatin III und 10-Desacetylbaccatin III finden sich in den Nadeln verschiedener *Taxus*-Arten. Aus 3000 kg Nadeln gewinnt man ein Kilogramm 10-Desacetylbaccatin III, das in vier weiteren Schritten zu Paclitaxel umgewandelt wird (Hänsel und Sticher 2010). Dieses Gewinnungsverfahren ermöglicht eine Erhaltung der Pflanze und eine bessere Wirtschaftlichkeit.

Als Meilenstein in der Herstellung des wirksamen Agens Paclitaxel gilt aber die Etablierung von Pflanzenzellkulturen. Vorreiter auf diesem Gebiet ist die Firma Phyton, die Paclitaxel aus Zellkulturen von *Taxus chinensis* in 75.000-Liter-Fermentern herstellt. Durch Zugabe bestimmter Substanzen, auch als Elizitierung bezeichnet, kann die Produktion gesteigert werden. Seit 2002 wird Paclitaxel ausschließlich auf biotechnologischem Wege hergestellt (Dingermann et al. 2011).

Aus verschiedenen *Taxus*-Arten wurden mittlerweile über 550 Taxane aus Blättern, Stängeln, Wurzeln, Rinde, Samen, Ästen und Zweigen isoliert. Die Klassifizierung dieser Naturstoffe erfolgte nach deren Grundgerüst und Substitutionsmustern (Wang et al. 2011).

Die Taxane sind durch ein diterpenoides Grundgerüst mit 20 Kohlenstoffatomen charakterisiert (Abb. 1, 2 und 3 Seite 3). Diese bilden drei miteinander verknüpfte Ringe. Daran sind ein viergliedriger, sauerstoffhaltiger Ring – Oxetanring - sowie eine Esterseitenkette angeschlossen (Bartsch 2004). Paclitaxel ist eine nichtproteinogene Aminosäure – 3-Amino-N-benzoyl-2-hydroxyphenylpropion-säure – welche mit einem trizyklischen Diterpenalkohol verestert ist (Hänsel und Sticher 2010).

Die antineoplastische Wirkung ist vor allem durch die Oxetan - Gruppe und eine Seitenkette am Kohlenstoffatom 13 des Taxanskeletts, bedingt (Frank 1997).

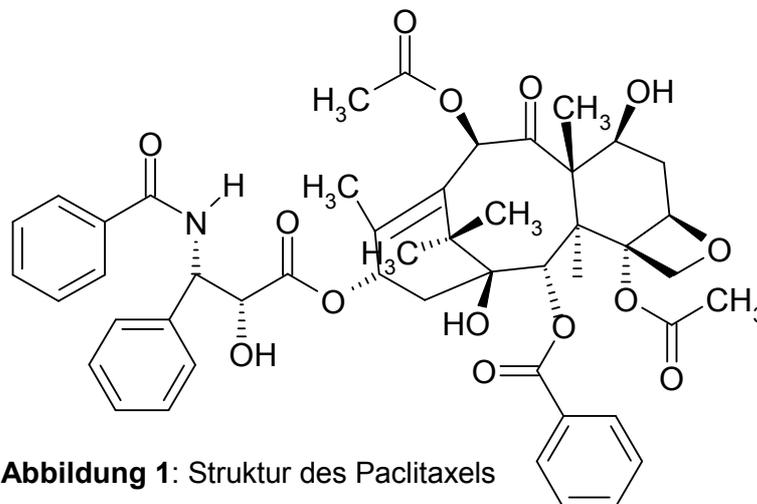


Abbildung 1: Struktur des Paclitaxels

Summenformel: C₄₇H₅₁NO₁₄

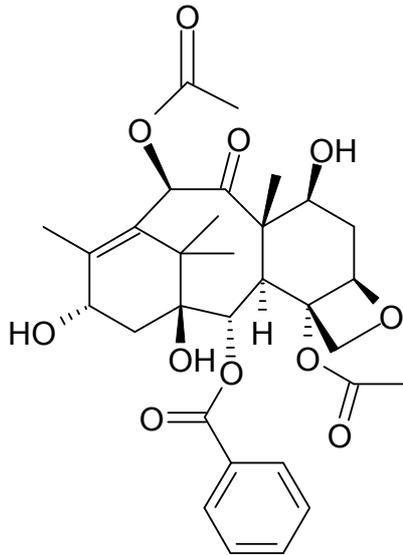


Abbildung 2: Struktur des Baccatin III

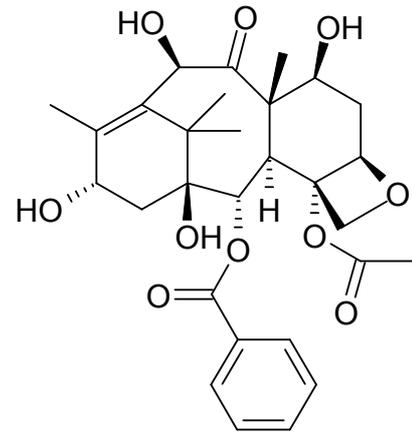


Abbildung 3: Struktur des 10-Desacetylbaccatin III

Der zytotoxische Wirkstoff Paclitaxel ist ein Mitosegift und hat seinen Hauptangriffspunkt an den Mikrotubuli. Mikrotubuli sind röhrenartig aufgebaut, sind wichtige Bestandteile des Spindelapparates und auch für die Zellform verantwortlich (Bartsch 2004). Paclitaxel lagert sich an die Mikrotubuli an, stabilisiert sie dadurch und verhindert deren Depolymerisation. Das Wachstum der Mikrotubuli wird beschleunigt (Schiff und Horwitz 1980).

Durch die Verhinderung der Depolymerisation werden die Mikrotubuli funktionslos und die Mitose kann nicht stattfinden (Kirschner 2001). Die Hauptwirkung von Paclitaxel findet in der späten G-2 und/oder M-Phase des Zellzyklus' statt (Bartsch 2004). Daraus resultiert eine abnormale Zellteilung und die Hemmung vieler Zellfunktionen wie Chemotaxis, Migration und Zellausbreitung (Kirschner 2001).

Gegensätzlich ist die Wirkung anderer Zytostatika, wie zum Beispiel von Vinblastin. Diese basiert auf der Verhinderung des Einbaues von Tubulin in die Mikrotubuli, woraus ein Zerfall der Mitosespindel resultiert.

Taxol[®] wird zur Behandlung des Ovarial-, Mamma-, Bronchial-, und Prostatakarzinoms eingesetzt. Weiters zeigt sich eine klinische Aktivität bei Kopf-, Hals-, Keimzellen-, Ösophagus- und Blasenkarzinomen (Kirschner 2001). Der Einsatz erfolgt meist dann, wenn andere Therapien bereits fehlgeschlagen sind oder der Therapieerfolg nicht zufriedenstellend war. Aber nicht nur in der Krebstherapie zeigt Taxol[®] eine gute Wirksamkeit und daraus resultierend verbesserte Überlebenschancen, sondern es stellt auch eine vielversprechende Alternative zur Behandlung von Psoriasis, Multipler Sklerose und Morbus Alzheimer dar (Hoffman und Shahidi 2009).

Nebenwirkungen äußern sich vor allem in einer hämatologischen und neurologischen Toxizität, Kardiotoxizität und in Überempfindlichkeitsreaktionen (Bartsch 2004). Weiters treten Haarausfall, Übelkeit und Erbrechen auf.

Taxol[®] wird parenteral appliziert. Der Metabolismus erfolgt über CYP-450 Enzyme, weniger als zehn Prozent werden unverändert über die Niere ausgeschieden. Die Plasmahalbwertszeit beträgt drei bis 30 Stunden (Aktories et al. 2009).

Da auch die biotechnologische Herstellung des Paclitaxels über *Taxus*-Zellkulturen ein sehr teures und komplexes Verfahren darstellt, wurde in den 1990er Jahren von Hoffman et al. (1998) ein groß angelegtes Screening von Angiospermen durchgeführt, um neue Taxolquellen zu entdecken. Dabei stellte sich heraus, dass die Haselnuss eine mögliche Alternative zur Eibe sein könnte. Mittels Kopplung von HPLC und Quadrupole-Elektrospray-Spektrometer wurden Paclitaxel, Baccatin III und 10-Desacetylbaccatin III detektiert. Unter anderem gelten die bessere Verfügbarkeit, das schnellere Wachstum *in-vivo* und die leichtere *in-vitro* Kultivierung als wesentliche Vorteile der Haselnuss gegenüber der Eibe. Darüber hinaus kann eine Kallusinduktion direkt aus den Samen erfolgen, dadurch minimiert sich die Gefahr einer Kontamination, weil die Oberflächensterilisation sehr effizient durchgeführt werden kann (Bestoso et al. 2006).

1.2. *Corylus avellana* L.

Die Haselnuss, *Corylus avellana* L. gehört zur Familie der Haselgewächse, den *Corylaceen*. Der mittelhohe (1 - 4 m) Strauch - selten ein Baum - trägt männliche und weibliche Blütenstände und kommt in fast ganz Europa vor. Die Früchte sind zur Reifezeit braune, hartschalige Nüsse. Zum Wachstum benötigt der Haselstrauch nährstoffreiche, lehmige Böden und viel Licht (Aichele und Schwegler 1994). Folgende Abbildung 4 zeigt einen fruchttragenden Strauch.



Abbildung 4: Haselnussstrauch - *Corylus avellana* L.

Durch Pressen der Nüsse erhält man ein fettes Speiseöl, welches auch in der Ölmalerei und in der Parfümerie verwendet wird. Das feine, weiche Holz findet in der Drechslerei und Tischlerei Anwendung (Hegi 1965).

Von der Bevölkerung wird die Haselnuss seit jeher als Fruchtbarkeitssymbol betrachtet, weiters soll die Hasel vor bösem Zauber schützen und Unheil abwehren. In der Landwirtschaft werden die männlichen Blütenstände den Kühen verfüttert, um den Milchertrag zu erhöhen (Hegi 1965).

Zu Beginn der Erforschung der Haselnuss als mögliche Taxolquelle nahm man an, dass Paclitaxel von einem, in der Hasel lebenden endophytischen Pilz produziert wird, und nicht von der Pflanze selbst (Bestoso et al. 2006; Hoffman und Shahidi 2009). Diese Vermutung konnten Bestoso et al. (2006) widerlegen: Die Bildung der Taxane ist keine Konsequenz der Besiedlung

durch den Endophyten, da auch in endophytenfreien *in-vitro* Kulturen von *Corylus avellana*, Taxane detektierbar waren.

Da der Gehalt an Taxol[®] in der Haselnuss mit 0,0018 % aber nur etwa einem Zehntel (Hoffman et al. 1998) des Gehalts in der Eibe entspricht, musste man nach geeigneten, effizienteren Gewinnungsmethoden suchen. Laut Exposito et al. (2009) ist die Zellkultur die vielversprechendste Methode für die Produktion von Taxol[®] und verwandten Taxanen. Wie schon bei den Eibenzellkulturen die Elizitierung zur Erhöhung der Ausbeute etabliert ist, kann diese auch bei den Haselnusszellkulturen angewandt werden.

1.3. Elizitierung

Pflanzen bedienen sich eines weiten Spektrums an Strategien, um pathogene Angriffe abzublocken. Gewisse Abwehrsysteme können dabei über Signalstoffe induziert werden. Elizitoren sind Komponenten, die das pflanzliche Abwehrsystem stimulieren können (Angelova et al. 2006). Sie können zur Bildung von Sekundärstoffen beitragen und spielen so auch eine essentielle Rolle in der pflanzlichen Biotechnologie. Sekundärstoffe sind für das prinzipielle Überleben der Pflanze nicht notwendig, sind aber für den gesamten Organismus in bestimmten Situationen von äußerster Wichtigkeit (Vasconsuelo und Boland 2007).

Elizitierung bedeutet, dass die Pflanze oder auch pflanzlichen Zellkulturen künstlich unter Stress gesetzt werden und darauf mit einer Abwehrreaktion reagieren.

Der pflanzliche Organismus reagiert auf den Befall von Mikroorganismen, wie zum Beispiel Bakterien, Pilzen oder Viren mit Abwehrmechanismen. Dabei werden sogenannte Phytoalexine, reaktive Sauerstoffspezies gebildet und hypersensitive Reaktionen ausgelöst (Angelova et al. 2006). Diese Sekundärstoffe werden als echte Phytoalexine bezeichnet, wenn sie von der pflanzlichen Zelle ausschließlich nach einer Infektion gebildet werden (Präve et al. 1994).

Elizitoren werden aber nicht nur eingesetzt, um die Produktion bestimmter Substanzen zu erhöhen, sondern auch, um die teilweise sehr komplexen

Biosynthesewege und Signaltransduktionswege des pflanzlichen Sekundärmetabolismus´ zu untersuchen (Angelova et al. 2006).

Sekundärstoffe die durch Elizitierung von *in-vitro* Kulturen produziert werden, werden häufig auch ins Medium ausgeschieden (Präve et al. 1994). Dies wurde auch für Suspensionskulturen der Haselnuss gezeigt.

Viele Verbindungen oder Stimulatoren, die zur Produktion von Sekundärstoffen in Pflanzenkulturen führen, sind bereits identifiziert. Die Klassifikation der Elizitoren erfolgt nach deren Herkunft und Molekularstruktur (Vasconsuelo und Boland 2007).

Biotische Elizitoren

Als biotische Elizitoren bezeichnet man Substanzen biologischen Ursprungs. In den 1970ern wurden die ersten biotischen Elizitoren beschrieben (Keen 1975). Selten werden sie auch als endogene Elizitoren bezeichnet (Vasconsuelo und Boland 2007). Beispiele hierfür wären Verbindungen mit einer definierten Zusammensetzung wie Chitosan, Alginate, Pektin oder Chitin. Eine eher komplexere Zusammensetzung besitzen Pilzextrakte oder Hefeextrakte (Vasconsuelo und Boland 2007). Auch andere Klassen wie Polysaccharide, Proteine, Glycoproteine und Fettsäuren wie etwa die Arachidonsäure können herangezogen werden. So wird die Elizitierung mit Proteinen genutzt, um die Funktion von Ionenkanälen in Zellmembranen zu untersuchen. Zum Beispiel führen Glycoproteine zur Bildung von Phytoalexinen (Angelova et al. 2006).

Abiotische Elizitoren

Abiotische Elizitoren haben keinen biologischen Ursprung. Diese Elizitoren werden in chemische, wie zum Beispiel Schwermetallsalze, und physikalische Stressinduktoren, wie thermischer und osmotischer Stress, Ultraschall und UV-Behandlung, untergliedert (Vasconsuelo und Boland 2007).

Der Effekt der Elizitierung hängt unter anderem von der Interaktion des Elizitors mit den pflanzlichen Zellen ab, denn nicht immer führt eine Elizitierung zur entsprechenden Bildung von Sekundärstoffen. Viele Stoffwechselwege können durch eine Elizitierung beeinflusst werden, die Bildung mancher Naturstoffe ist jedoch weder durch biotische noch durch abiotische Elizitoren induzierbar (Präve et al. 1994).

Weiters spielt die Konzentration, in der der Elizitor eingesetzt wird, eine wesentliche Rolle. Sie sollte am besten so gewählt werden, dass die gewünschten Metaboliten gebildet werden, die pflanzlichen Zellen in ihrem Wachstum aber nicht beeinträchtigt sind. So induziert Chitosan bei einer Konzentration von 25 mg/L in Zellkulturen von *Rubia akane* (Jin et al. 1999) eine maximale Bildung von Anthrachinonen, während eine Konzentration von 200 mg/L notwendig ist, um den höchsten Gehalt von Menthol in Zellkulturen von *Mentha piperita* (Chang et al. 1998) zu erzeugen.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist der Zeitpunkt der Zugabe des Elizitors, dieser sollte so gewählt werden, dass sich die Zellen in der exponentiellen Phase ihres Wachstums befinden. Auch die Zusammensetzung des Mediums spielt eine wichtige Rolle. So reagieren Karottenzellen nicht auf einen externen Stimulus, wenn dem Medium kein Auxin zugesetzt ist (Kurosaki et al. 1985).

Durch die Kombination von Elizitoren lassen sich oft synergistische Effekte bezüglich der Bildung von Sekundärstoffen erzielen. So publizierten Wani et al. bereits 1971, dass die Kombination von Methyljasmonat und Ethylen in Suspensionszellkulturen von *Taxus sp.* in einer 18-fach höheren Taxol[®]-Ausbeute resultierte, als die Anwendung eines Elizitors alleine. Choi et al. (1996) stellten aber keinen synergistischen Effekt bei der Verwendung von

Silbernitrat und Ammoniumcitrat in *Taxus*-Zellkulturen fest. Weshalb einige Elizitoren alleine, andere in Kombination besser wirksam sind, ist aufgrund des geringen Verständnisses der Aktionsmechanismen teilweise noch nicht geklärt (Yuan et al. 2002).

1.4. Fragestellung

Krebs ist eine sehr aggressive Erkrankung, die jeden von uns ohne Vorwarnung treffen kann. Sehr häufig gibt es jedoch keine oder nur wenige erfolgsversprechende Therapien. Daher ist es notwendig, dass zumindest jene Arzneistoffe, die eine entsprechende Wirksamkeit aufweisen, in ausreichender Menge zur Verfügung stehen.

Wie bereits im Kapitel 1.1. (Seite 4) erwähnt, gehört Paclitaxel zu den wichtigsten Zytostatika, die die Überlebenschancen signifikant erhöhen. Neueste Forschungen haben ergeben, dass es aber nicht nur in der Krebstherapie hervorragend wirkt, sondern auch zur Behandlung von Psoriasis, Multipler Sklerose und Morbus Alzheimer eingesetzt werden kann (Hoffman und Shahidi 2009). Aus diesem Grund wird der Bedarf an Taxol[®] stetig zunehmen (Miele et al. 2012). Paclitaxel wird derzeit über die Fermentation von *Taxus*-Zellkulturen gewonnen. Diese wird großtechnisch durch die Firma Phyton durchgeführt.

Wie durch Hoffman et al. (1998) in einem groß angelegten Screening von Angiospermen festgestellt wurde, ist auch die Haselnuss fähig, Taxol[®] zu produzieren. Die Vorteile der Haselnuss liegen in einem schnelleren Wachstum und der besseren Kultivierung *in-vitro* (Bestoso et al. 2006).

Somit könnte die Haselnuss als wichtige Zusatzquelle für die Produktion von Paclitaxel dienen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Elizitierung von Haselnusszellkulturen, um die Taxol[®]-Bildung zu induzieren und/oder zu steigern.

Wie bereits von Shaykislamov (Diplomarbeit in Vorbereitung) gezeigt werden konnte, ist eine Elizitierung mit Methyljasmonat geeignet, um die Taxanbildung in Haselnusszellkulturen zu beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit sollten unterschiedliche Konzentrationen von Saccharose, Silbernitrat und Ammoniumcitrat als Elizitoren eingesetzt werden.

Yuan et al. (2002) kamen zu dem Ergebnis, dass eine Elizitierung mit Silbernitrat und Ammoniumcitrat in *Taxus*-Zellkulturen zu einer erhöhten Bildung der gewünschten Taxane führt. So sind diese Elizitoren in der Lage, die Produktion von Baccatin III, dem letzten Zwischenprodukt in der Biosynthese des Paclitaxels, auszulösen.

Zhao et al. (2010) konnten aufzeigen, dass die Tanshinon-Produktion in Zellkulturen von *Salvia miltiorrhiza* durch hyperosmotischen Stress, ausgelöst durch Sorbitol, erhöht werden kann. Als abiotische Elizitoren, führen Zucker zu erhöhtem osmotischen Stress, daher sollten in unseren Untersuchungen unterschiedliche Saccharosekonzentrationen zur Taxol®-Produktion eingesetzt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Pflanzenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden einerseits Zellsuspensionskulturen der Haselnuss aus Kallusgewebe hergestellt. Der Kallus wurde freundlicherweise von Hassan Rezadoost (2012) zur Verfügung gestellt. Die Kallusbildung war an Samen der Kultursorte *Corylus avellana* L. cv. Gerd Eshkevar, heimisch im Nordiran, induziert worden. Bevor die Samen für eine *in-vitro* Kultur genutzt werden konnten, wurden sie einer Oberflächensterilisation unterzogen.

Zellsuspensionskulturen wurden aus weiß-bräunlich gefärbtem Kallusgewebe hergestellt. Dazu wurde der Kallus aus dem Kulturgefäß entnommen und mit einem Skalpell in kleine Stücke zerschnitten. Für die Herstellung einer Zellkultur wurden zwei Gramm Kallus in 50 ml Linsmaier und Skoog-Medium (siehe Kap. 2., Seite 12) übergeführt. Die Subkultivierung erfolgte alle 11 bis 14 Tage. Dies geschah, indem die Zellkultur durch ein feinmaschiges, handelsübliches Teesieb filtriert und anschließend in frisches Medium eingebracht wurde. Für die Ermittlung des besten Zeitpunktes der Subkultivierung war von Shaykhislamov (Diplomarbeit in Vorbereitung) eine Wachstumskurve erstellt worden. Das Ende der exponentiellen Phase liegt bei Tag 14. Somit erwies sich dieser Tag, also bevor die Absterbephase beginnt, zur Subkultivierung als am besten geeignet, wie aus folgender Abbildung 5 ersichtlich ist.

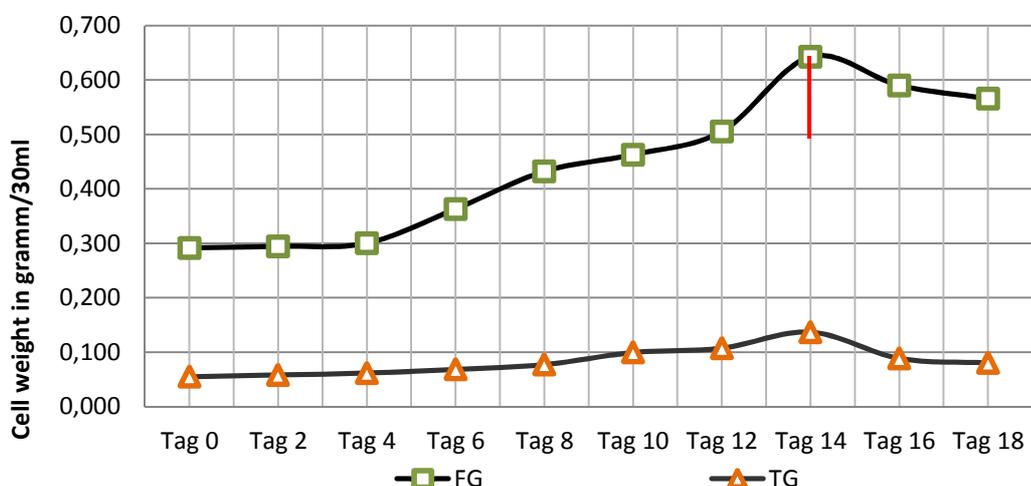


Abbildung 5: Wachstumskurve einer Zellsuspensionskultur von *Corylus avellana*, Ende der exponentiellen Phase an Tag 14 (Shaykhislamov, in Vorbereitung)

Andererseits wurden in der Arbeit schon bestehende Zellsuspensionskulturen verwendet, die von Shaykhislamov (Diplomarbeit in Vorbereitung) zur Verfügung gestellt worden waren. Die folgenden Abbildungen 6 und 7 zeigen Kallusgewebe und eine Zellsuspensionskultur.



Abbildung 6: Kallusgewebe von *Corylus avellana* auf festem Nährmedium



Abbildung 7: Zellsuspensionkultur von *Corylus avellana*

2.2. Nährmedien

Die Medien für Kallus- und Zellkulturen basierten auf der Formulierung von Linsmaier und Skoog (1965).

Allerdings wurde das Medium für die Zellsuspensionskulturen modifiziert. Es wurden 3 mg/L 3-Indolylessigsäure (Sigma-Aldrich) und 3 mg/L α -Naphthylelessigsäure (Sigma-Aldrich), 2,5 mg/L 6-Furfurylaminopurin (Sigma-Aldrich) und 30 g/L Saccharose zugesetzt, weiters erhöhten wir den Gehalt an myo-Inosit (Sigma-Aldrich) auf 200mg/L.

Herstellung:

Es wurde etwa die Hälfte des benötigten destillierten Wassers in einem Erlenmeyerkolben vorgelegt. Anschließend wurden das Basismedium, in Form einer fertigen Mischung (Duchefa Biochemie), myo-Inosit und Saccharose (handelsüblicher Haushaltszucker) unter Rühren beigemischt. Nach Auflösung der Feststoffe wurden die Wachstumsstoffe in Form von Stammlösungen zugesetzt. Für die Herstellung der Stammlösungen wurde die benötigte Menge an Festsubstanz in destilliertem Wasser gelöst und im Kühlschrank aufbewahrt. Zuletzt wurde mit destilliertem Wasser auf die gewünschte Menge aufgefüllt und der pH-Wert mit Hilfe von KOH beziehungsweise HCl auf $5,5 \pm 0,1$ eingestellt. Nach der Abfüllung in 250 ml-Erlenmeyerkolben erfolgte die Sterilisation im Autoklav für 20 Minuten bei 121°C . Die Lagerung fand bei 5°C im Dunkeln statt.

Um die Sterilität der Suspensionskulturen zu bestimmen wurde, ein Nähragar zur Züchtung anspruchsvoller Bakterien eingesetzt.

Herstellung:

In einer SCHOTT DURAN[®] Flasche wurde die entsprechende Menge an destilliertem Wasser vorgelegt, der Nähragar zur Züchtung anspruchsvoller Bakterien (Standard I-Agar, Merck) zugesetzt und unter Rühren größtenteils gelöst. Die vollständige Auflösung erfolgte in der Mikrowelle (etwa 15 Minuten). Danach wurde auf die entsprechende Menge mit destilliertem Wasser aufgefüllt und der pH-Wert auf $7,5 \pm 0,2$ eingestellt – die Autoklavierung erfolgte für 20 Minuten bei 121°C . Nach leichter Abkühlung wurde der Nähragar unter der sterilen Werkbank in Petrischalen ausgegossen, bis zur Aushärtung gewartet, mit Parafilm[®] verschlossen und im Kühlschrank bei 5°C gelagert.

2.3. Kulturbedingungen

Kalluskulturen wurden in Hipp[®]-Gläsern, welche mit Magentakappen und Parafilm[®] verschlossen wurden, kultiviert.

Die Kultivierung der Zellsuspensionskulturen erfolgte in 250 ml-Erlenmeyerkolben, welche mit Alufolie verschlossen wurden. Diese reichte etwa zwei bis drei cm über den Rand. Der Kolbenhals wurde zusätzlich mit Parafilm[®] abgedichtet.

Die Kulturen wurden auf einem Rotationsschüttler bei 125 Umdrehungen pro Minute und einer Raumtemperatur von $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln gehalten.

2.4. Elizitierung

Um die Elizitierung reproduzierbar durchführen zu können, sollte in jedem Kolben etwa die gleiche Menge an Zellmaterial enthalten sein. Hierfür wurden jeweils drei Kolbeninhalte gemeinsam abgenutscht und anschließend drei Minuten lang Luft durchgesaugt. Danach wurden die Zellen vermischt und etwa zwei Gramm in einen neuen Kolben übergeführt. Bis zur Elizitierung erfolgte die Lagerung wie unter Kapitel 2.3. angeführt.

Für die Elizitierung mit unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen (herkömmlicher Haushaltszucker) wurde das Standardmedium mit einer erhöhten Saccharosekonzentration von 50g/L beziehungsweise 70 g/L zubereitet. Die Zellsuspensionskulturen wurden an Tag zehn (in der exponentiellen Phase des Wachstums) in das Medium mit erhöhter Saccharosekonzentration übergeführt (zehn Kulturen pro Behandlung) und weitere zehn Tage am Schüttler gehalten.

Für die Behandlung der Zellen mit Silbernitrat (Merck) wurde eine Stammlösung hergestellt. Dafür wurde die entsprechende Menge an Silbernitrat in einem 100 ml fassenden Kolben mit destilliertem Wasser aufgefüllt und noch am selben Tag verwendet. Bevor die Stammlösung zu den Kulturen zugesetzt wurde, erfolgte eine Filtration durch einen $0,22\ \mu\text{m}$

Sterilfilter. Zehn Kulturen wurden mit einer Konzentration von 30 μmol eliziert, zu zehn weiteren Kulturen wurde die doppelte Konzentration zugesetzt. Die Elizitierung fand an Tag zehn statt, nach weiteren zehn Tagen erfolgte die Ernte.

Die Elizitierung mit Ammoniumcitrat (Sigma-Aldrich) erfolgte ebenfalls mit Hilfe einer Stammlösung. Um eine Konzentration von 50 mg/L und 100 mg/L zu erreichen, wurde die entsprechende Menge an Ammoniumcitrat in einen 100 ml fassenden Kolben übergeführt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Bevor die Lösung den Kulturen zugesetzt wurde, erfolgte eine Filtration durch einen 0,22 μm Sterilfilter. Zehn Suspensionskulturen wurden mit je 100 μl und weitere zehn Kulturen mit 200 μl der Stammlösung versetzt, dies entspricht den oben angeführten Konzentrationen. Die Elizitierung und Ernte erfolgte wie oben angegeben.

Zur Kontrolle für die Elizitierung mit erhöhten Saccharosekonzentrationen diente ein Medium mit der Standardkonzentration von drei Prozent. Zur Kontrolle für die Elizitierung mit Silbernitrat und Ammoniumcitrat wurde, neun Zellkulturen, die entsprechende Menge an destilliertem Wasser zugesetzt.

Die Ernte erfolgte mit Hilfe einer Porzellannutsche. Das Vakuum wurde für drei Minuten angelegt, die Zellen samt Filterpapier entnommen und das Frischgewicht bestimmt. Die Zellmasse wurde über Nacht eingefroren und tags darauf lyophilisiert, anschließend ermittelten wir das Trockengewicht. Bis zur Extraktion wurden die gefriergetrockneten Zellen im Exsiccator gelagert.

Das abgenutzte Medium wurde in SCHOTT-DURAN[®] Flaschen gesammelt und bis zur Extraktion eingefroren.

Da die Zellmasse nicht quantitativ vom Filterpapier zu lösen war, wurden alle oben angeführten Schritte mit dem Papier durchgeführt. Um das exakte Gewicht im Nachhinein bestimmen zu können, wurde der Mittelwert von zehn trockenen Filterpapieren, zehn feuchten Filtern (Befeuchtung mit 50 ml Medium, Durchsaugen von Luft in der Nutsche für drei Minuten) und zehn gefriergetrockneten Filtern bestimmt.

2.5. Extraktion und Analytik

2.5.1. Extraktion:

Sowohl in den Zellen als auch im Medium lassen sich die produzierten Taxane nachweisen. Daher erfolgte eine Extraktion der intra- und extrazellulären Bestandteile.

Extraktion der intrazellulären Bestandteile:

Die Extraktion zur Detektion der intrazellulären Bestandteile erfolgte wie von Rezaei (2011) beschrieben, wobei es sich um eine Modifikation der Methode von Wu und Lin (2003) handelte. 100 mg der gefriergetrockneten Zellen wurden in einer Reibschale mit einem Pistill fünf Minuten bei Raumtemperatur zerkleinert, in zehn ml Methanol aufgenommen und 40 Minuten in das Ultraschallbad gegeben. Das Gemisch wurde filtriert, das Filtrat zur Trockene gebracht und in einer Mischung aus Dichlormethan und Wasser (1:1) aufgenommen. Die organische Phase wurde gesammelt und eingedampft; die von Rezaei et al. (2011) vorgeschlagene Zentrifugation wurde aufgrund guter Phasentrennung nicht durchgeführt. Zur vollständigen Trocknung wurde das Extrakt einen Tag im Exsiccator gelagert und danach bis zur Analyse eingefroren.

Extraktion der extrazellulären Bestandteile:

Hierfür wurde die Methode nach Wu und Lin (2003) angewandt. 100 ml des Mediums wurden drei Mal mit Dichlormethan ausgeschüttelt, die organischen Phasen gesammelt und zur Trockene gebracht. Die Lagerung erfolgte wie oben beschrieben.

Die Extrakte - sowohl intrazellulär als auch extrazellulär - wurden vor der Analyse in 100 µl Methanol aufgenommen, zentrifugiert und in UPLC-Vials überführt.

2.5.2. Analytik:

Ultra performance liquid chromatography (UPLC):

Zur Auftrennung der Taxane wurde eine UPLC-Anlage Ultimate 3000 RS (Dionex) bestehend aus einer Ultimate 3000 RS Pumpe, Autosampler und Column Compartment verwendet. Die UPLC-Anlage war mit einer C-18 Dionex Acclaim 120 Säule (2,1x150 mm, Vorsäule 2,1x4 mm) ausgestattet. Die Temperatur bei Probenentnahme betrug 5°C, die Temperatur im Säulenbereich wurde konstant auf 30°C gehalten. Die Taxane wurden bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit einer Mischung aus destilliertem Wasser/Ameisensäure (pH 3,54, Mobile Phase A) und Acetonitril (Mobile Phase B) eluiert. Dabei wurde mit 30 % Acetonitril gestartet, innerhalb von 7 Minuten auf 100 % erhöht, dies für zehn Minuten beibehalten und danach wieder auf 30 % gesenkt. Das Injektionsvolumen betrug fünf µl. Als externe Standards wurden Paclitaxel (Sigma-Aldrich), Baccatin III (Sigma-Aldrich) und 10-Desacetylbaccatin III (Sigma-Aldrich) verwendet.

Kopplung UPLC und Massenspektrometrie (MS):

Die Massenspektrometrie ist eine gängige Methode, welche zur Strukturaufklärung und Quantifizierung von Substanzen herangezogen wird. Die Probenmoleküle werden in einer Ionenquelle in geladene, gasförmige Teilchen übergeführt. Diese werden danach - gemäß ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) getrennt und analysiert. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde ein „weiches“ Ionisierungsverfahren, Elektrospray-Ionisation (ESI), angewandt. Dabei wird das Eluat von der Flüssigchromatographie, mit Hilfe einer unter Spannung stehenden Nadel, in eine Sprühkammer geleitet. Durch ein Verneblungsgas werden kleine Tröpfchen gebildet, ein zusätzliches Trocknungsgas sorgt für das Verdampfen des Lösungsmittels. Als Resultat erhält man gasförmige Ionen die in das Massenspektrometer geleitet werden.

Zur Quantifizierung von Substanzen gilt die Triple Quadropole-Technologie (QQQ) als bevorzugte Methode, weil sie sehr selektiv und empfindlich ist. In den Abbildungen 8 und 9 ist der apparative Aufbau dargestellt. Nach der Ionisierung gelangen die Ionen in den ersten Quadropole (Q1), wo bestimmte Mutterionen (Precursor Ions) ausgewählt werden (zB. Quasimolekülon der zu quantifizierenden Substanz). Nur diese ausgewählten Ionen können in den zweiten Quadropole (Q2) gelangen, der als Stosszelle fungiert. Hier werden die Moleküle durch Zusammenstoss mit einem Gas (zB. Stickstoff) fragmentiert (CAD = Collision Activated Decompostion). Die dabei entstandenen Fragmentationen können im dritten Quadropole (Q3) analysiert und quantifiziert werden.



Abbildung 8: Triplequad MS – API 4000; (aus Trainingsunterlagen API 4000™ LC/MS/MS System, Applied Biosystems 2009)

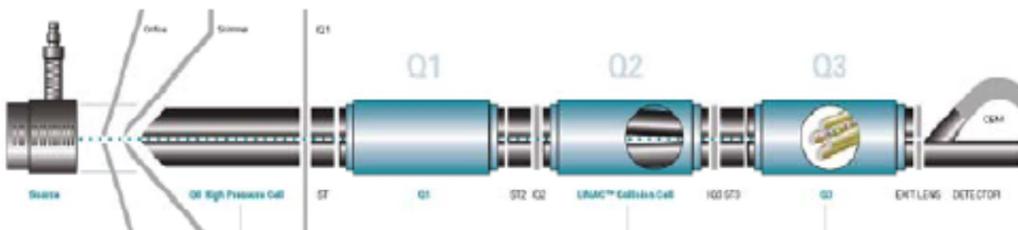


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Triplequad MS API 4000; (aus Trainingsunterlagen API 4000™ LC/MS/MS System, Applied Biosystems 2009)

Um eine selektive und empfindliche Quantifizierung durchführen zu können, müssen die Parameter für jede Substanz optimiert werden. Zum Beispiel wurde für Bacctatin III eine Quasimolekulargewicht von m/z 587,18 erhalten (MG +H⁺, Mutterion).

Q1: Wird so eingestellt, dass nur das Mutterion mit m/z 587,18 passieren und damit im Q2 fragmentiert werden kann. Dadurch wird sehr hohe Selektivität erreicht, weil alle anderen Substanzen ausgeblendet werden.

Q2: Durch CAD wird aus dem Mutterion das typische Tochterion gebildet. Um höchste Empfindlichkeit zu erzielen wird das Tochterion mit der höchsten Intensität beobachtet. Im Falle des Baccatin III war das Tochterion mit der höchsten Intensität bei m/z 405,2.

Q3: Wird so eingestellt, dass nur m/z 405,2 durch kann. Dieses Ion kann nur entstehen, wenn die Mutter m/z 587,18 durch den ersten Quadrupole in die Stosszelle gekommen ist. Dadurch wird höchste Selektivität und Empfindlichkeit erzielt. Die Nachweisgrenze liegt bis unter 0,1 ng/mL.

Abbildung 10 zeigt die Entstehung der spezifischen Ionen.

Multiple Reaction Monitoring (MRM)

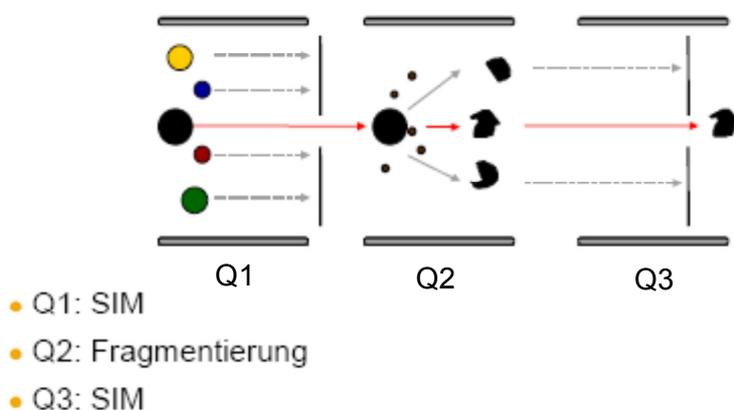


Abbildung 10: Schematische Darstellung eines MRM-Prozesses; (aus Trainingsunterlagen API 4000™ LC/MS/MS System, Applied Biosystems 2009)

Neben Baccatin III wurden auch die Bedingungen für die Standardsubstanzen 10-Desacetylbaccatin III und Paclitaxel optimiert und entsprechende Parameter in die Messmethode aufgenommen (siehe Tabellen 1-3, Seiten 20 und 21).

Jede Probe wurde zwei oder drei Mal vermessen und der Mittelwert aus den erhaltenen Daten berechnet.

Geräteinstellungen:

Quellen-Typ: Turbo Spray = ESI Quelle
 Quellen-Temperatur: 400.0 C
 Scan-Typ: Multiple Reaktion Monitoring
 Polarität: Positive
 Ionenquelle: Turbo Spray
 Software-Version: Analyst 1.5
 Software-Application: Dionex Chromatography MS Link

Standardspezifische MS-Parameter:

Baccatin III

Tabelle 1: Baccatin III: Mutterion bei 587,18; Tochterion bei 405,2

Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell (msec)	Parameter	
587,18	405,2	200	Declustering potential	66
			Collision energy	17
			Collision cell exit potential	18

10-Desacetylbaccatin III

Tabelle 2: 10-Desacetylbaccatin III: Mutterion bei 545,22; Tochterion bei 363,1

Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell (msec)	Parameter	
545,22	363,1	200	Declustering potential	251
			Collision energy	19
			Collision cell exit potential	16

Paclitaxel**Tabelle 3:** Paclitaxel: Mutterion bei 854,3; Tochterion bei 286,1

Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell (msec)	Parameter	
854,3	286,1	200	Declustering potential	61
			Collision energy	23
			Collision cell exit potential	18

Massenspektrometrische Parameter:

Curtain Gas:	10.00
Gas 1:	30.00
Gas 2:	30.00
Ion Spray Voltage (Needle):	5500.00
Temperature:	400.00
Interface heater:	ON
Collision activated decomposition gas:	4.00
Entrance potential:	10.00
Channel electron multiplier:	2100.0
Deflector Voltage:	25.0

2.6. Vitalitätstests

Um vor der Elutierung sicher zu gehen, dass noch genügend lebendes Zellmaterial vorhanden war, wurden der Fluoresceindiacetat-Test (FDA-Test) und der Phenosafranin-Test durchgeführt.

FDA-Test:

Hierfür wurden Stichproben der Zellen gezogen und auf Eis abgekühlt. 0,2 ml einer FDA-Stammlösung (0,5 % in Aceton; Sigma-Aldrich) wurden mit zehn ml gekühltem Medium gemischt und ein Tropfen dieser Lösung mit einem Tropfen Zellsuspension auf einem Objektträger vereint. Nach drei Minuten erfolgte die Beurteilung der Fluoreszenz der Zellen unter UV-Beleuchtung. Dabei wurde ein Nikon DM 510 (B-2A) Filter verwendet. Lebende Zellen zeigen eine ausgeprägte grüne Fluoreszenz, tote Zellen hingegen erscheinen im Mikroskop gelb, ohne Fluoreszenz (Seitz et al. 1985).

Phenosafranin-Test:

Hierfür wurde wiederum eine Phenosafraninstammlösung hergestellt (0,1 % in Kulturmedium; Sigma-Aldrich). Diese wird im Verhältnis 1:1 mit der Zellsuspension auf einem Objektträger vermischt und der Anteil der gefärbten und ungefärbten Zellen bestimmt. Der Farbstoff wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, daher erscheinen tote Zellen im Mikroskop intensiv rot gefärbt (Seitz et al. 1985).

2.7. Sterilität

Während der Durchführung der praktischen Arbeiten wurde auch laufend die Sterilität der Zellkulturen kontrolliert. Hierfür wurde mit Hilfe einer sterilen Pipette ein Aliquot des Mediums und der Zellen unter der sterilen Werkbank entnommen und in eine Keimtestpetrischale übergeführt. Die Petrischale wurde anschließend mit Parafilm[®] verschlossen und bei 35°C zwei bis drei Tage lang bebrütet.

Eine zwischenzeitlich aufgetretene Infektion der Zellen konnte durch mehrmaliges Waschen mit Standardmedium während der Subkultivierung beseitigt werden.

3. ERGEBNISSE

Zur Quantifizierung von Baccatin III, Paclitaxel und 10-Desacetylbaccatin III wurde eine externe Eichung verwendet. Durch Injektion verschiedener Verdünnungen der drei Referenzsubstanzen, Baccatin III, Paclitaxel und 10-Desacetylbaccatin III wurden Eichgeraden erhalten. Die Eichgeraden sind in den folgenden Abbildungen 11, 12 und 13 (Seiten 23 und 24) dargestellt.

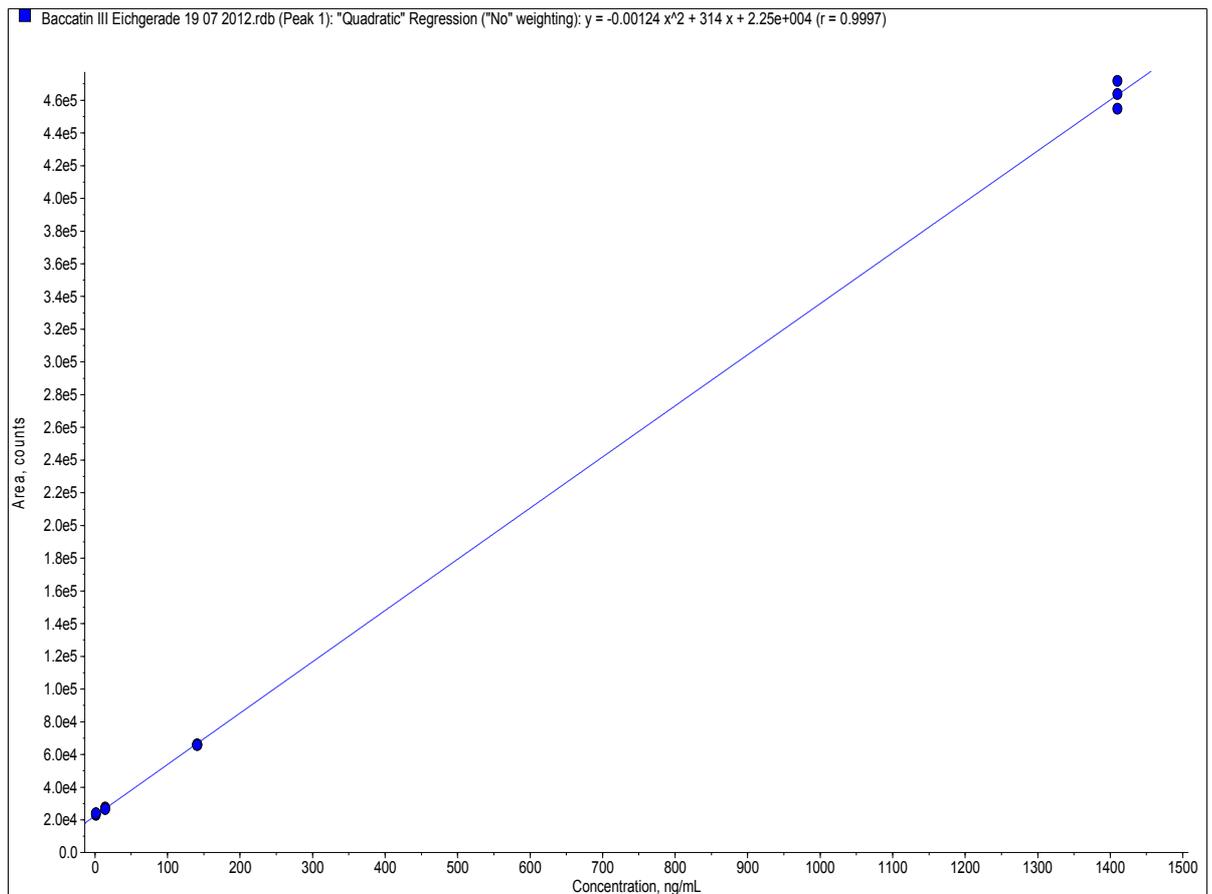


Abbildung 11: Eichgerade für Baccatin III, $r = 0,9997$

Ergebnisse

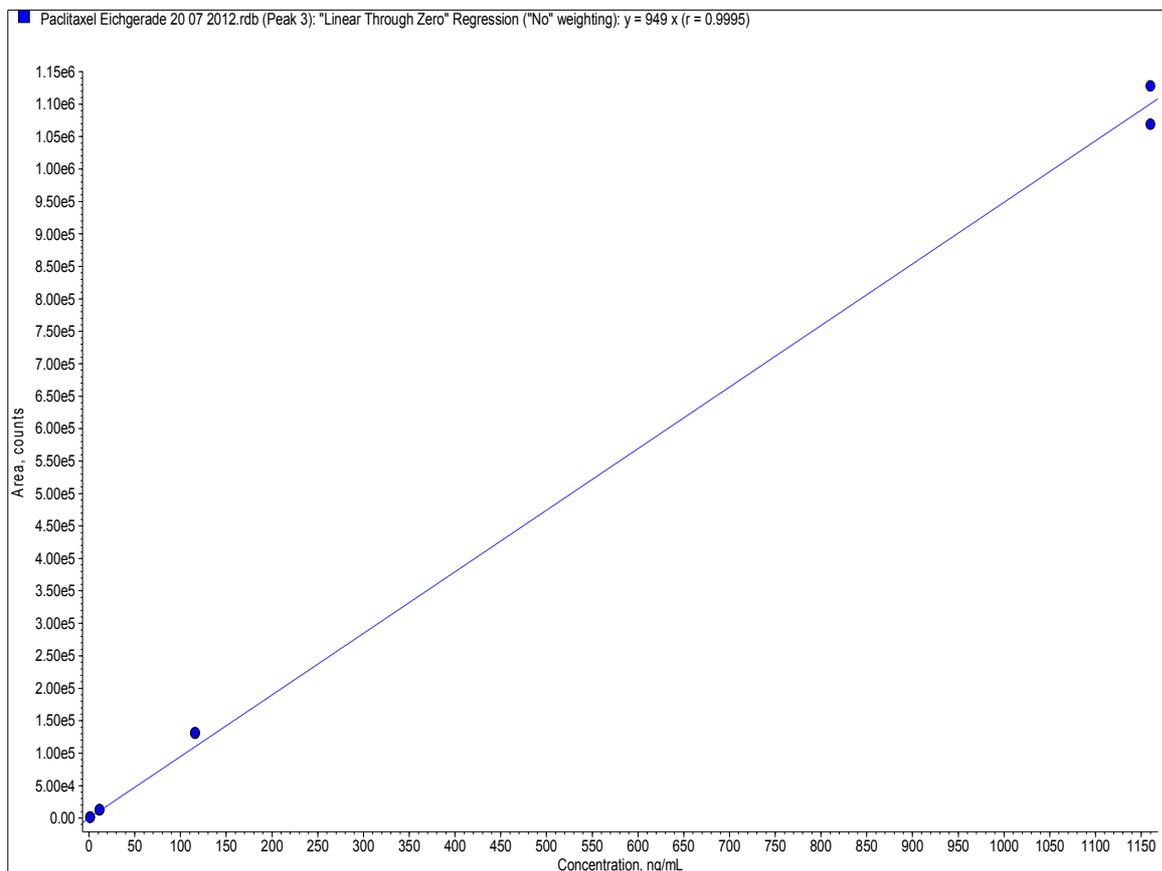


Abbildung 12: Eichgerade für Paclitaxel, $r = 0,9995$

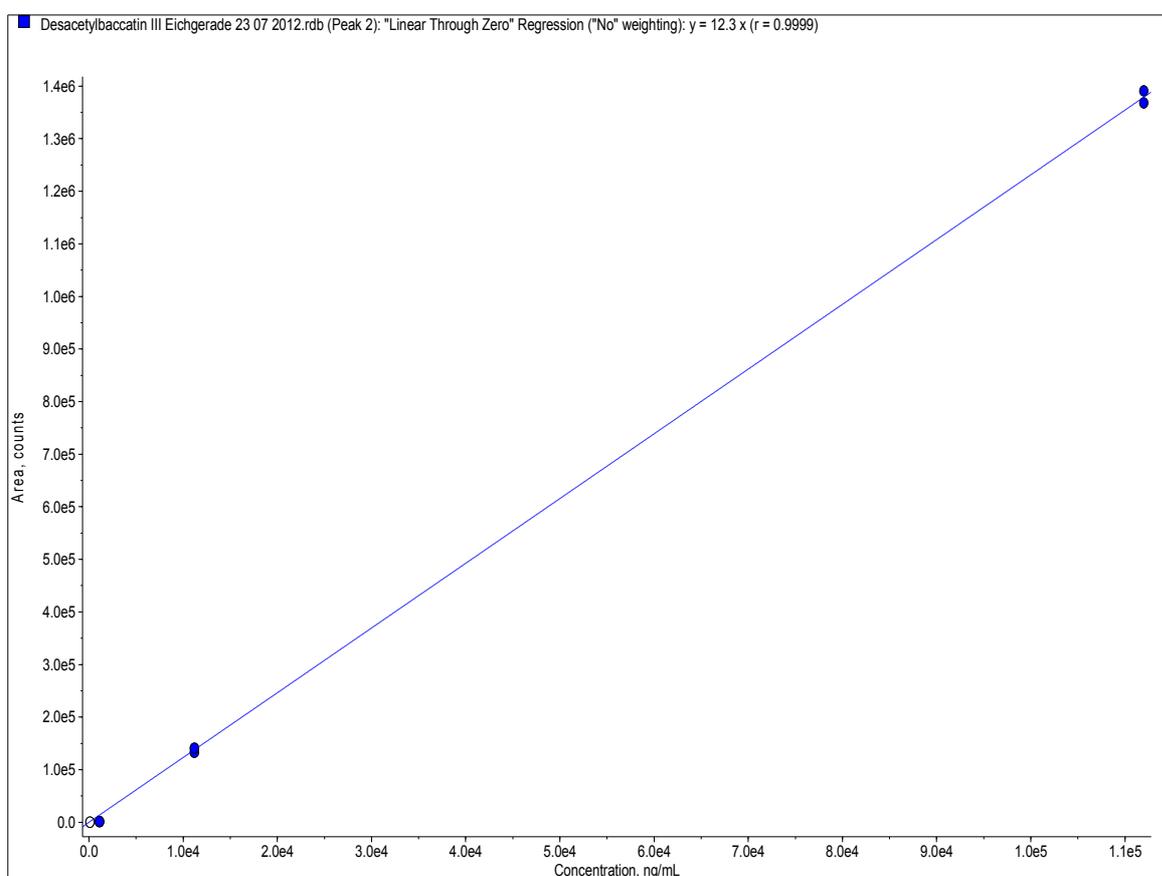


Abbildung 13: Eichgerade für 10-Desacetylbaccatin III, $r = 0,9999$

Der Biosyntheseweg des Paclitaxels ist sehr komplex - von besonderem Interesse sind die letzten drei Schritte. Daher sollte der Elizitor speziell hier den Schwerpunkt seiner Wirksamkeit zeigen. Die wesentlichen Schritte liegen vor dem Umbau des 10-Desacetyl-2-Debenzoylbaccatin III zum 10-Desacetylbaccatin III, zwischen 10-Desacetylbaccatin III und Baccatin III und zwischen Baccatin III und Taxol[®] (Yuan et al. 2002). Daher wurden diese drei Substanzen auch als Referenzen herangezogen.

Die Abbildungen 14, 15 und 16 (Seiten 25 und 26) zeigen die Chromatogramme der Referenzsubstanzen.

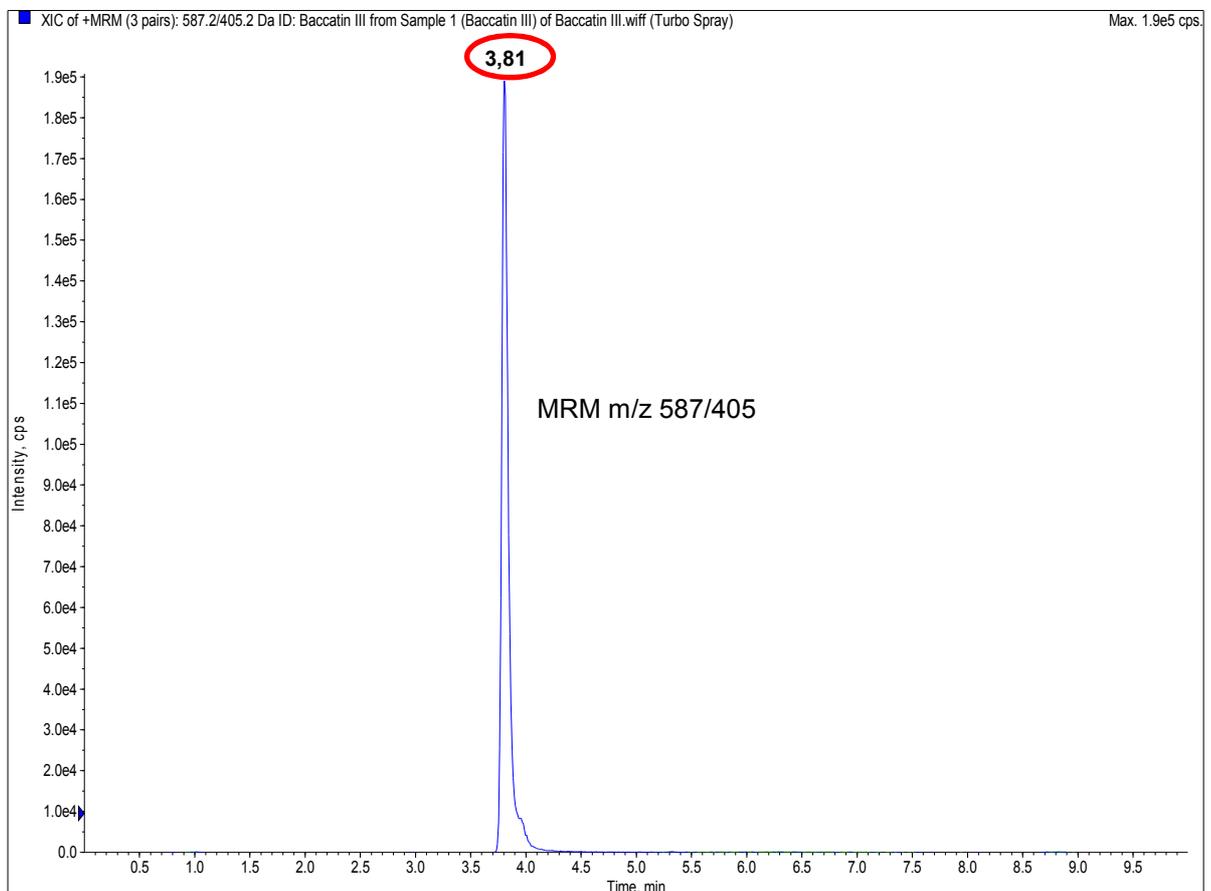


Abbildung 14: Standardpeak-Chromatogramm des Baccatin III bei 3,81 min.

Die Retentionszeit des Baccatin III lag bei 3,81 Minuten, die des Paclitaxels bei 5,30 Minuten und die des 10-Desacetylbaccatin III bei 2,75 Minuten.

Ergebnisse

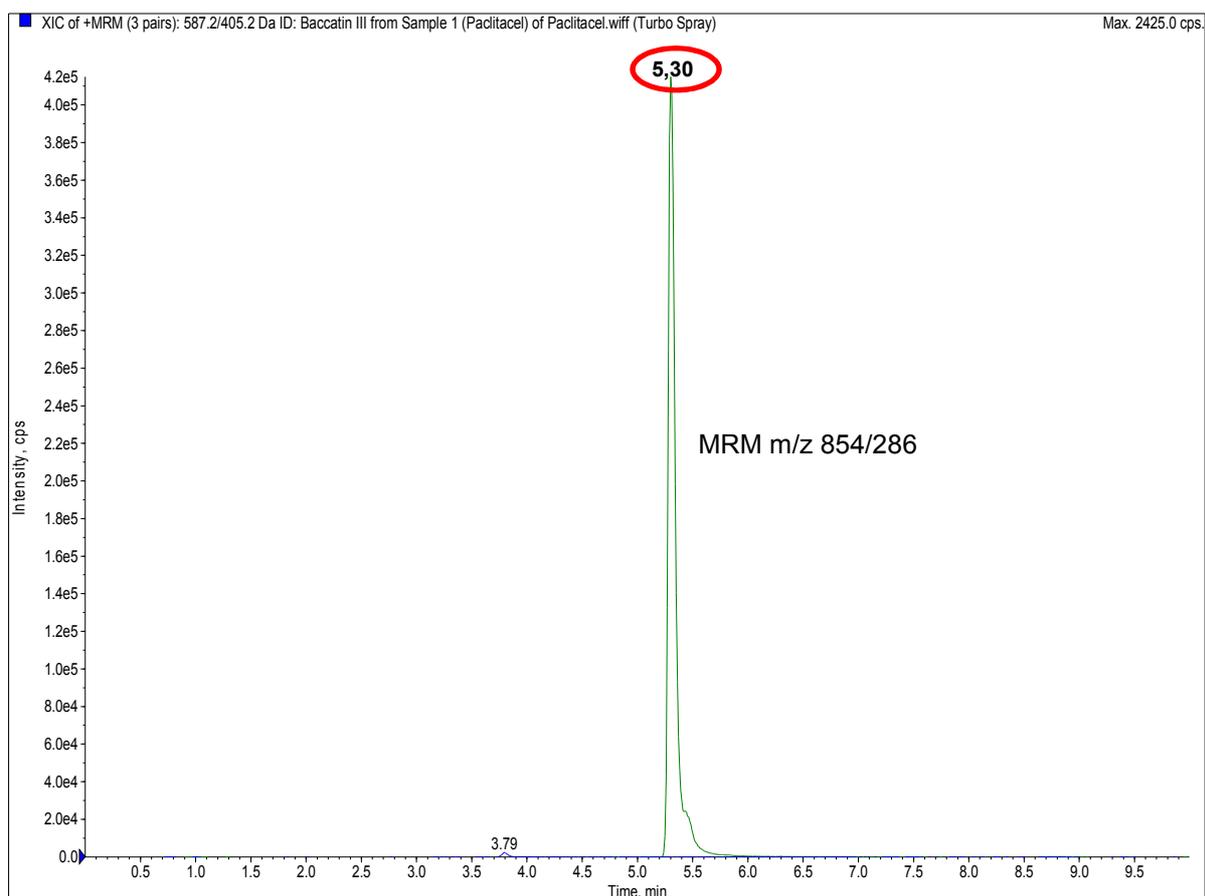


Abbildung 15: Standardpeak-Chromatogramm des Paclitaxels bei 5,30 min.

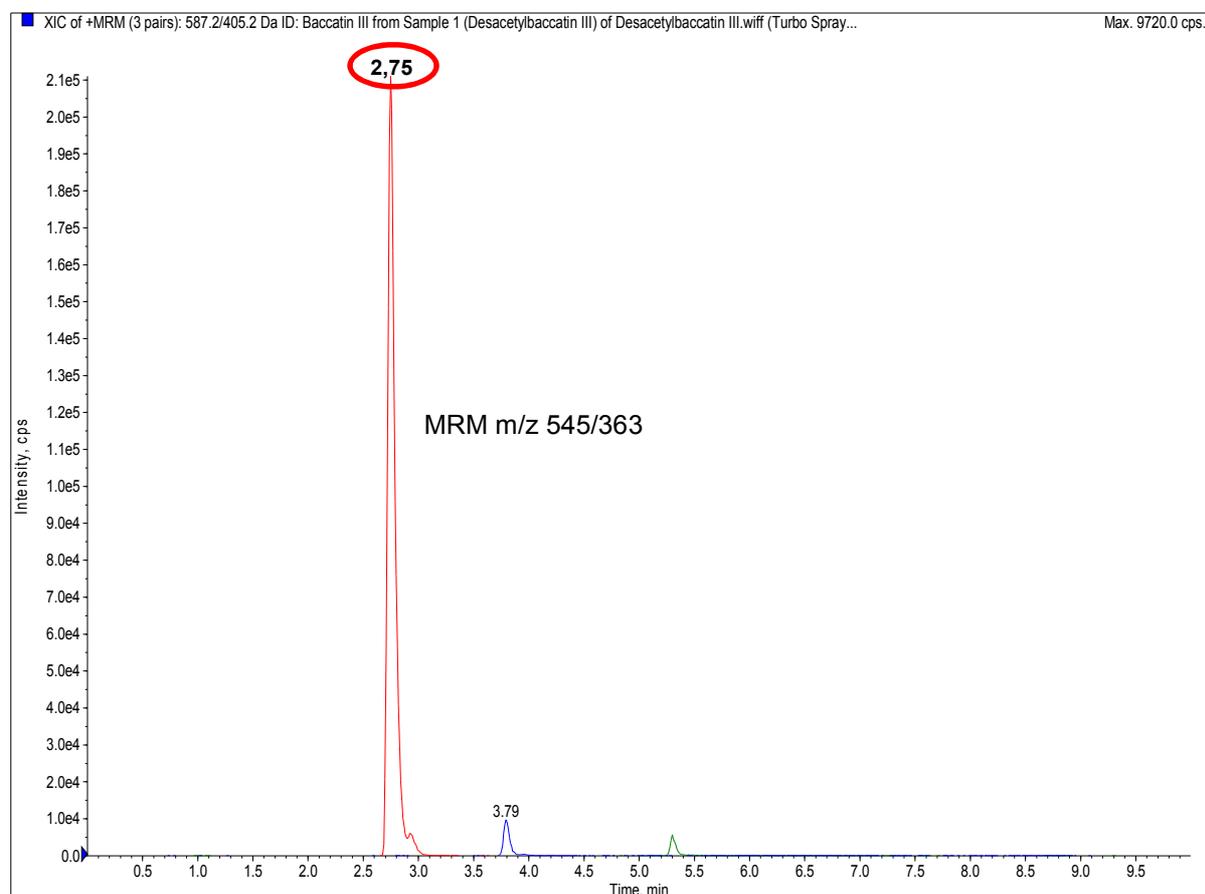


Abbildung 16: Standardpeak-Chromatogramm des 10-Desacetylbaaccatin III bei 2,75 min.

3.1. Elizitierung mit Saccharose

Die Haselnusskulturen wurden mit zwei verschiedenen erhöhten Saccharosekonzentrationen behandelt. Als Kontrolle diente hierbei das 3proz. Standardmedium: Diese Konzentration ist für ein gutes Wachstum notwendig.

Zum Vergleich der Auswirkung der Elizitierung wurden zuerst die Chromatogramme der intrazellulären Bestandteile aufgelistet, anschließend die der extrazellulären. Um den Unterschied graphisch besser hervorzuheben, wurden Diagramme erstellt.

3.1.1. Intrazelluläre Inhaltsstoffe

Saccharose 3 % (Kontrolle):

Der Peak bei 3,84 Minuten weist auf ein eindeutiges Vorhandensein von Baccatin III in den Haselzellen, welche unter normalen Bedingungen kultiviert wurden, hin (Abb.17).

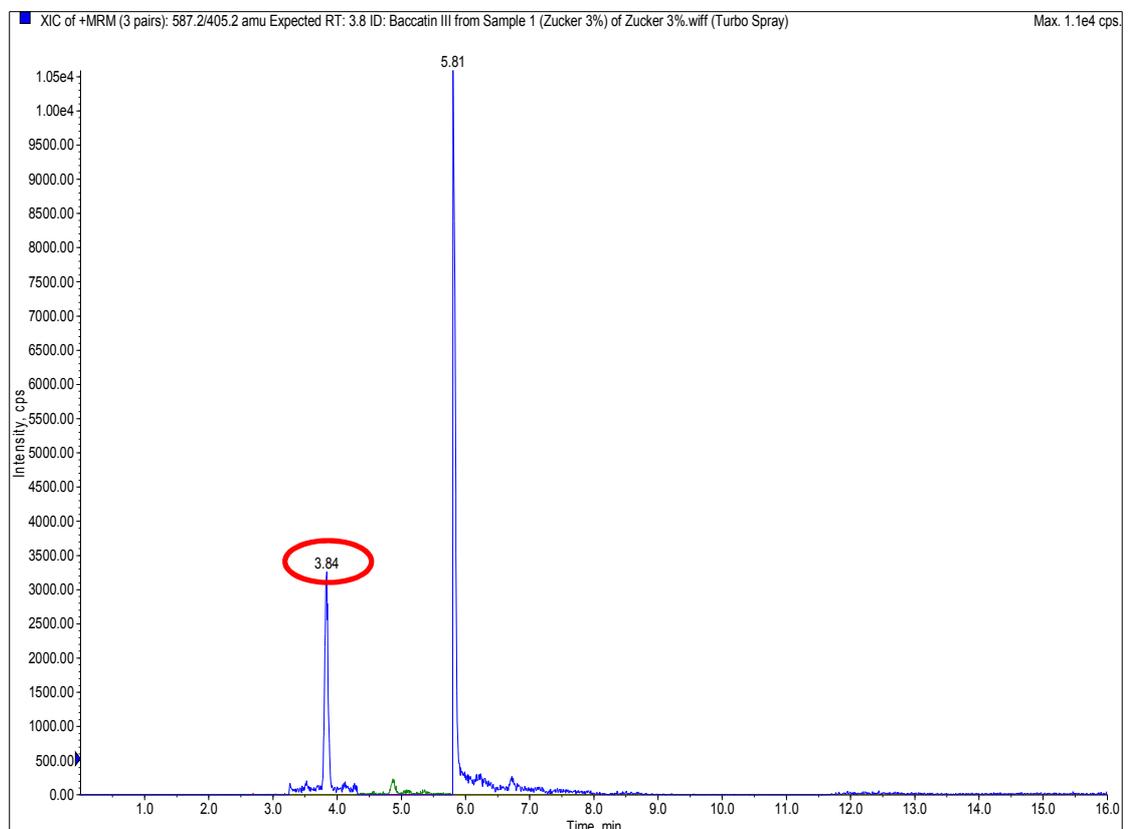


Abbildung 17: Chromatogramm eines Zellextraktes nach Kultivierung im Kontrollmedium mit 3 % Saccharose; Baccatin III bei 3,84 min und eine Verunreinigung bei 5,81 min.

Wie zum Beispiel durch Hofman et al. (1998) und Ottaggio et al. (2008) belegt, bestätigte sich hiermit die Vermutung, dass in der Hasel Paclitaxelvorstufen enthalten sind. Bei dem Peak mit einer Retentionszeit von 5,81 Minuten handelte es sich um eine Verunreinigung, welche unabhängig von der Elizitierung in jedem Zellextrakt auftrat. Die Behandlung der Zellen mit einer erhöhten Saccharosekonzentration führte wohl zu einer Beeinflussung des Taxangehaltes, allerdings nahm der Gehalt an Baccatin III im Vergleich zur Kontrolle ab.

Saccharose 5 %:

In den Zellen, die unter elizitierten Bedingungen kultiviert wurden, war ebenso Baccatin III vorhanden, allerdings in einer niedrigeren Konzentration als in der Kontrolle (Abb. 18).

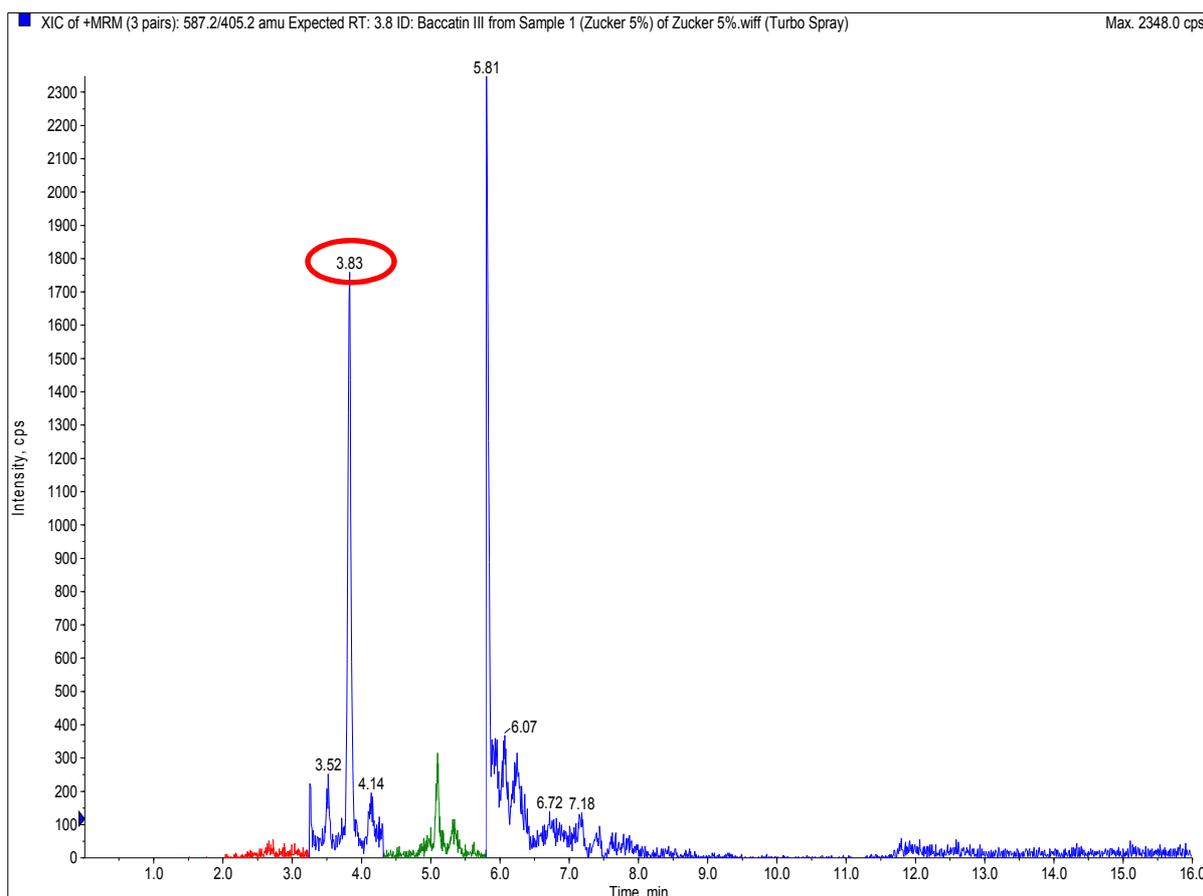


Abbildung 18: Chromatogramm eines Zellextraktes nach Kultivierung im Medium mit 5 % Saccharose, Baccatin III bei 3,83 min und eine Verunreinigung bei 5,81 min.

Saccharose 7 %:

Bei dieser Vermessung wurde Baccatin III detektiert (Abb. 19). Vergleicht man die Intensität der Baccatin III-Peaks (Seite 28 und 29) so bewirkte die 7proz. Saccharosekonzentration im Vergleich zur 5proz. eine eindeutige Erhöhung des Gehalts an Baccatin III. Korreliert man alle Konzentrationen, stellt man allerdings fest, dass der Gehalt an Baccatin III im Kontrollmedium am höchsten war.

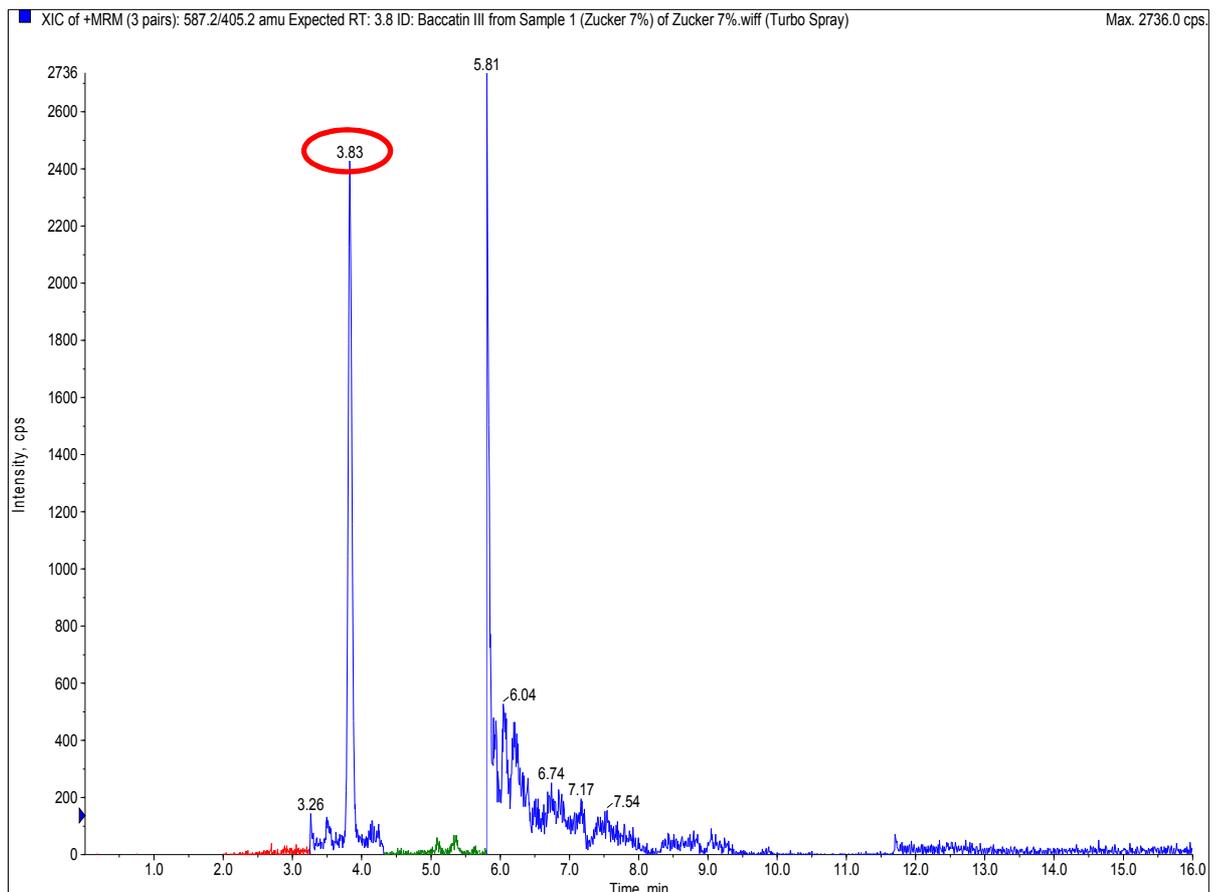


Abbildung 19: Chromatogramm eines Zellextraktes nach Kultivierung im Medium mit 7 % Saccharose, Baccatin III bei 3,83 min und eine Verunreinigung bei 5,81 min.

Diagramm 1 (Seite 30) gibt einen besseren Überblick über die Auswirkung der durchgeführten Elizitierungen. In der Kontrollkultur konnten 0,071 ng/100mg an Baccatin III nachgewiesen werden. Durch die Elizitierung mit fünf Prozent Saccharose sank die Konzentration auf 0,039 ng/100mg ab während die Elizitierung mit sieben Prozent Saccharose zu einem Gehalt von 0,061 ng/100mg führte.

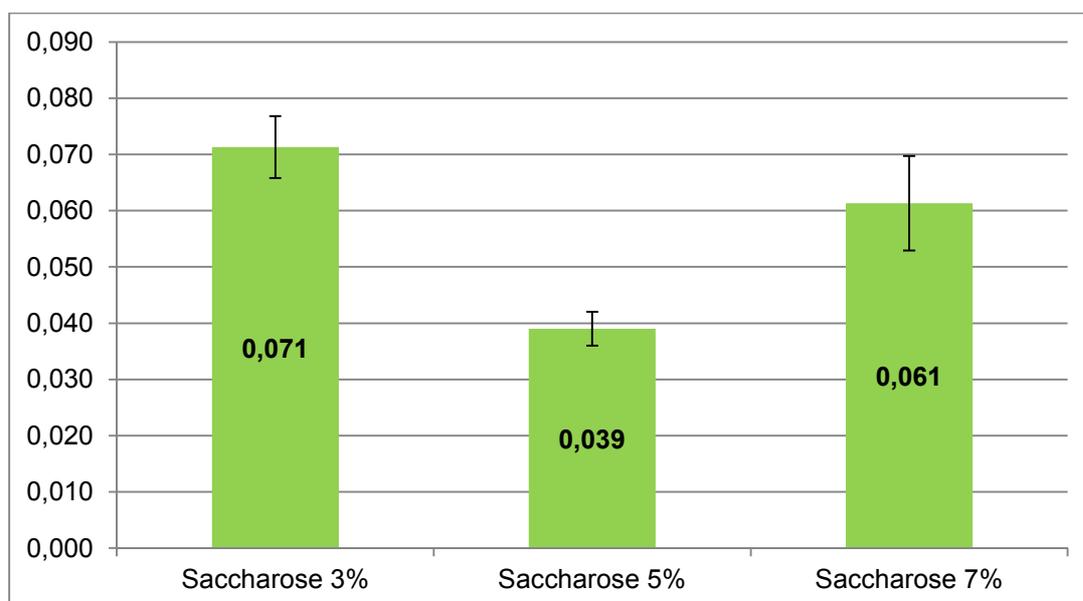


Diagramm 1: Kalkulierte Konzentration in ng/100mg; Vergleich der Auswirkung der Elizitierung auf den Baccatin III-Gehalt der Zellen

3.1.2. Extrazelluläre Inhaltsstoffe

Die Vermessung der extrazellulären Extrakte ergab, dass die Inhaltsstoffe auch ins Medium abgegeben wurden. Sowohl in der Kontrollkultur (drei Prozent Saccharose) als auch in den elizitierten Kulturen (fünf und sieben Prozent Saccharose) war eindeutig Baccatin III enthalten. Abbildung 20 (Seite 33) zeigt beispielhaft ein Chromatogramm des Nährmediums mit fünf Prozent Saccharose. Bei drei beziehungsweise sieben Prozent Saccharose ergab sich ein vergleichbares Bild.

Diagramm 2 (Seite 31) zeigt die kalkulierten Konzentrationen von Baccatin III in den untersuchten Medien. Dabei zeigt sich, dass die abgegebene Menge an Baccatin III in das Medium mit steigender Saccharosekonzentration sinkt. So liegt die Konzentration in dem Kontrollextrakt (drei Prozent Saccharose) bei 0,094 ng/100mL, sinkt in dem Extrakt mit fünf Prozent Saccharose auf 0,068 ng/100mL und liegt unter sieben prozentigen Kulturbedingungen nur noch bei 0,041 ng/100mL.

Ergebnisse

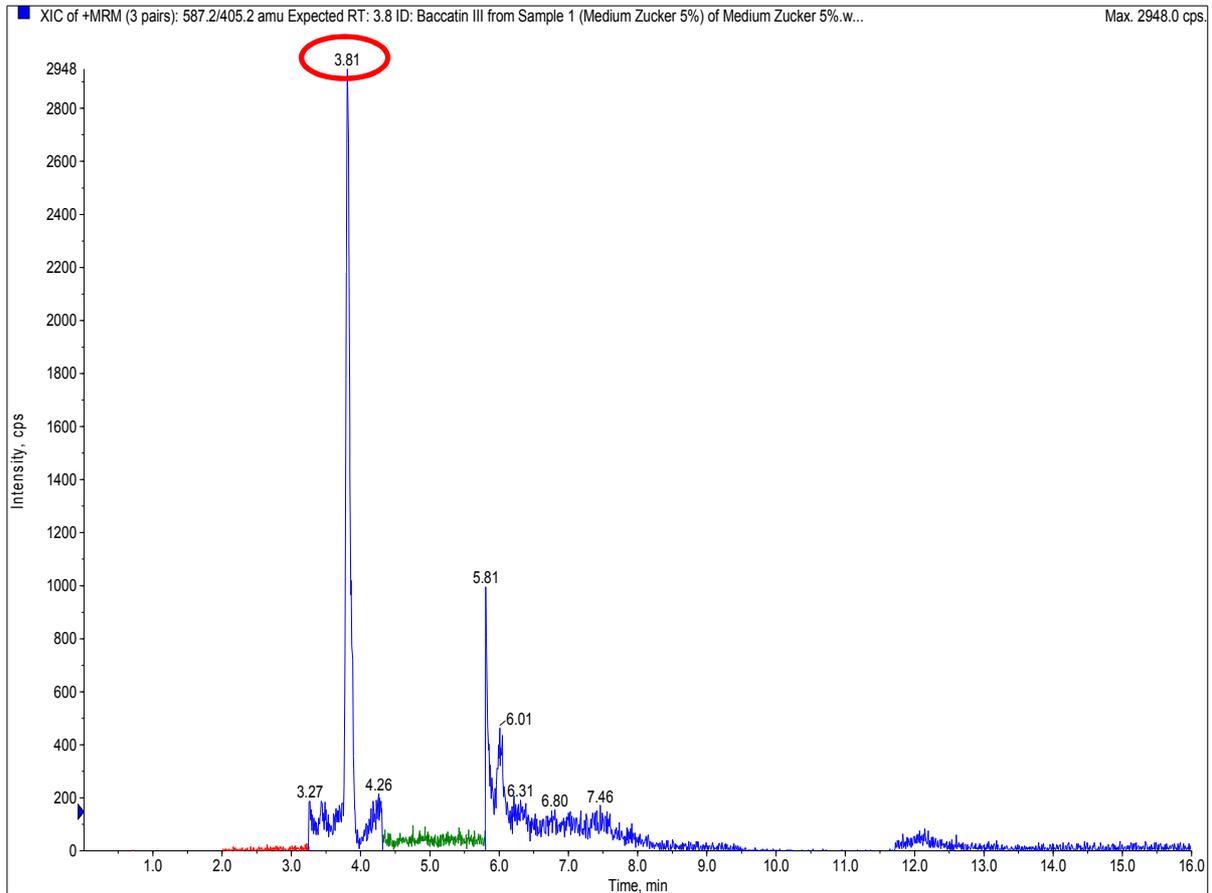


Abbildung 20: Chromatogramm eines Nährmediums mit 5 % Saccharose, Baccatin III bei 3,81 min.

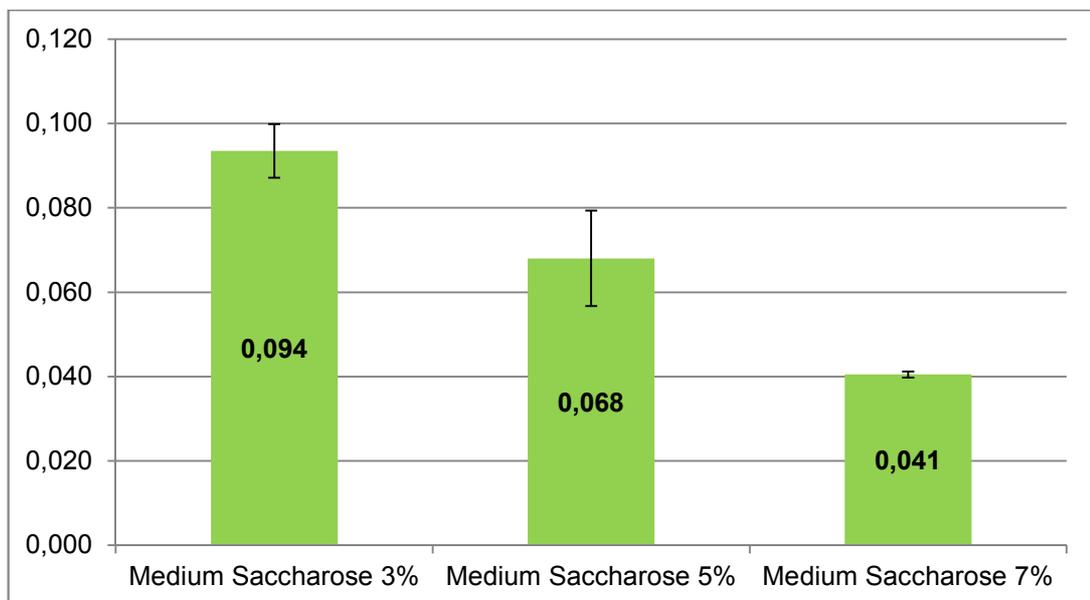


Diagramm 2: Kalkulierte Konzentration in ng/100mL; Vergleich der Auswirkung der Elizitierung auf den Baccatin III-Gehalt des Mediums

3.2. Elizitierung mit Silbernitrat

Bei dieser Versuchsanordnung wurde mit zwei Silbernitratkonzentrationen gearbeitet. Die Elizitierung mit Silbernitrat beeinflusste sowohl den intrazellulären als auch den extrazellulären Gehalt an Baccatin III.

3.2.1. Intrazelluläre Inhaltsstoffe

Silbernitrat 30 µmol/L:

Aus dem folgenden Chromatogramm (Abb. 21) ist deutlich ersichtlich, dass Baccatin III vorherrschend ist. 10-Desacetylbaccatin III und Paclitaxel haben sich durch die vorgenommene Elizitierung nicht gebildet.

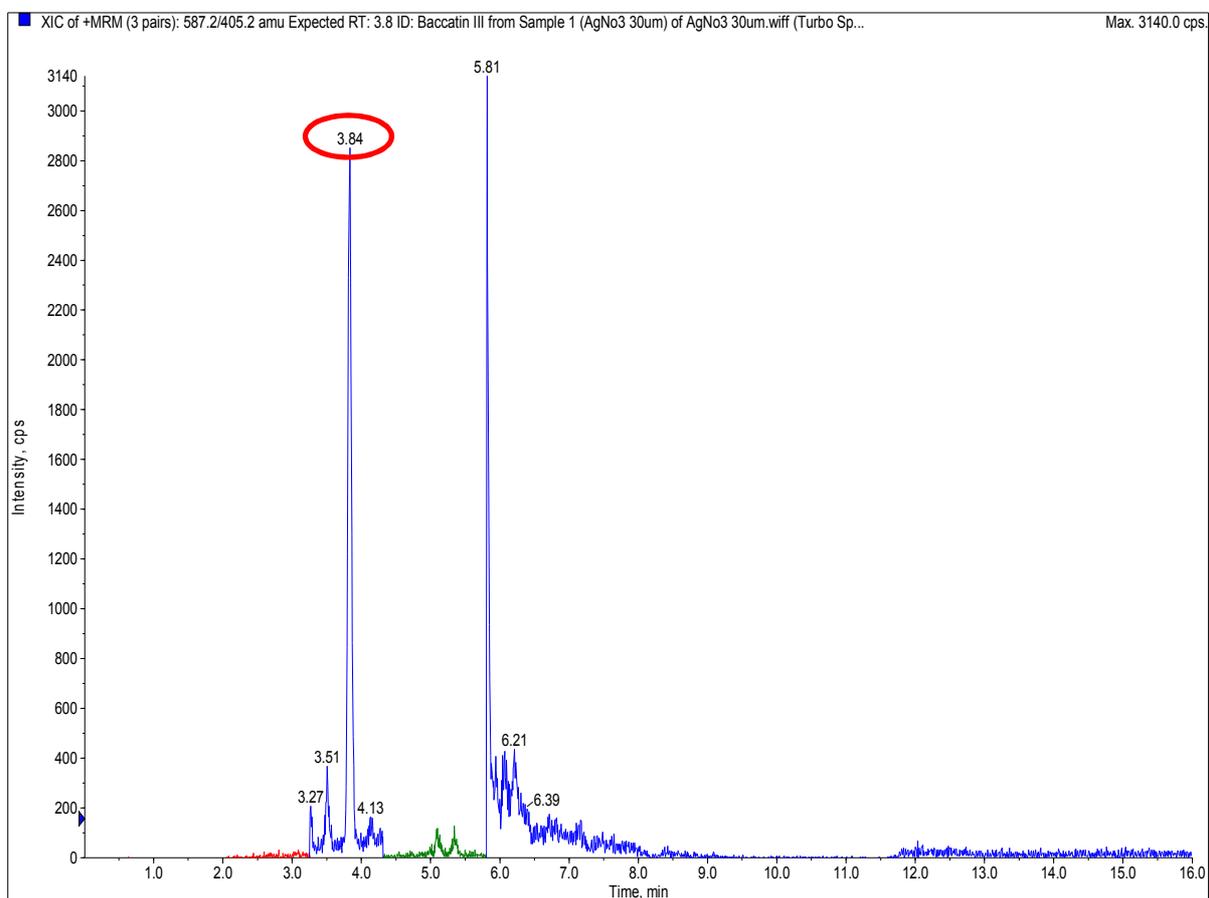


Abbildung 21: Chromatogramm nach Elizitierung mit 30 µmol/L Silbernitrat, Baccatin III bei 3,84 min und eine Verunreinigung bei 5,81 min.

Silbernitrat 60 µmo/L:

Vordergründig ist der Peak von Baccatin III zu erkennen (Abb. 22). Im Gegensatz zur niedrigeren Konzentration an Silbernitrat ist die Intensität etwas höher ausgeprägt. Wie auch bei den anderen Chromatogrammen handelt es sich bei der Substanz mit der Retentionszeit von 5,81 Minuten um eine Verunreinigung.

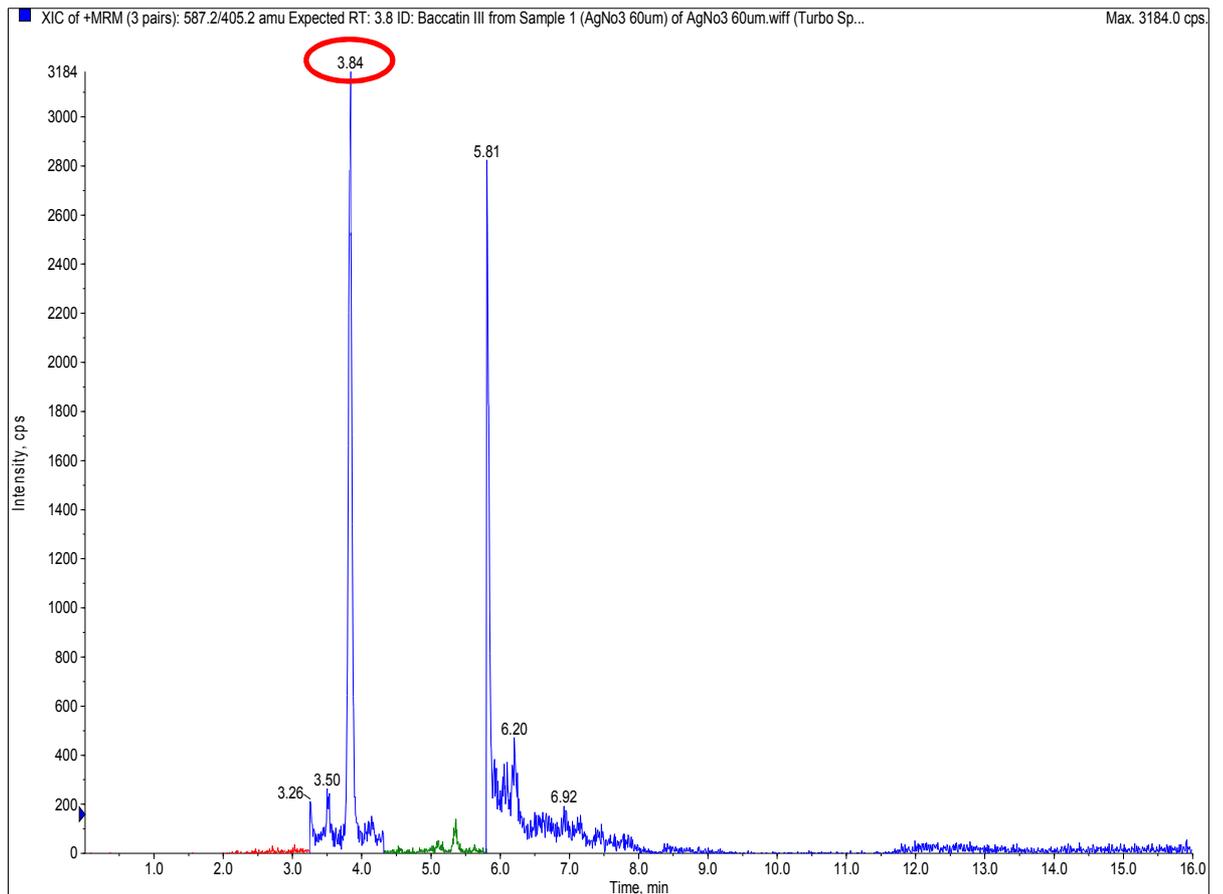


Abbildung 22: Chromatogramm nach Elizitierung mit 60 µmol/L Silbernitrat, Baccatin III bei 3,84 min und eine Verunreinigung bei 5,81 min.

Das folgende Diagramm 3 veranschaulicht den Einfluss der Elizitierung mit AgNO_3 auf den intrazellulären Gehalt an Baccatin III. Unter H_2O -Kontrolle sind jene Kulturen gemeint, zu denen Wasser (das als Lösungsmittel für den Elizitor) zugesetzt worden war.

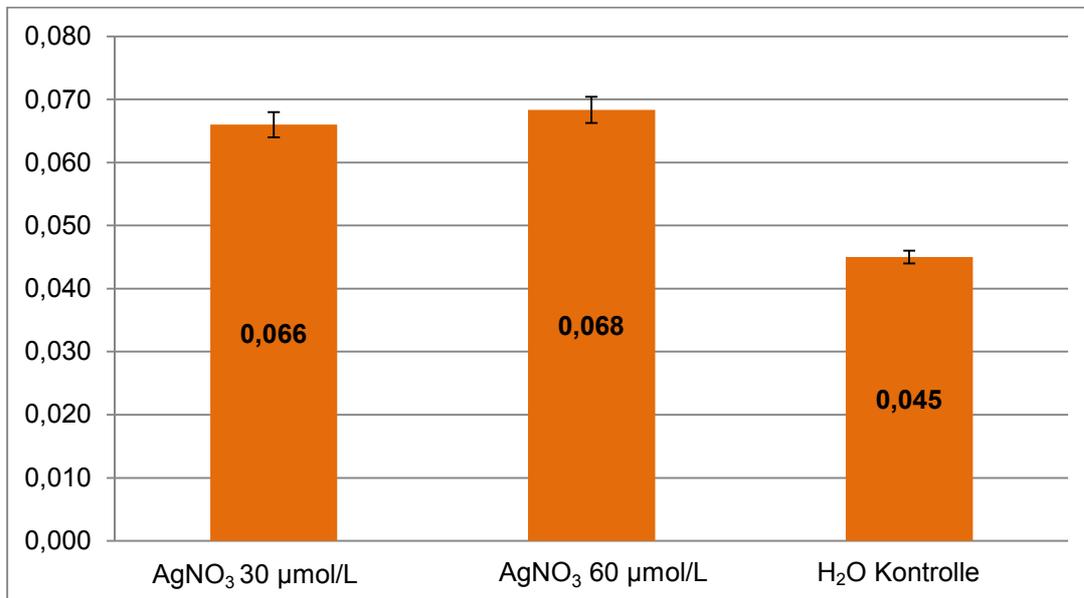


Diagramm 3: Kalkulierte Konzentration in ng/100mg; Vergleich der Auswirkung der Elizitierung auf den Baccatin III-Gehalt der Zellen

Es ist ersichtlich, dass die Elizitierung eine signifikante Steigerung des intrazellulären Gehalt an Baccatin III bewirkte. Jedoch trat kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen an Silbernitrat auf.

3.2.2. Extrazelluläre Inhaltsstoffe:

Hier erfolgte bei beiden AgNO_3 -Konzentrationen eine Abscheidung des Baccatin III ins Medium wie aus der folgenden Abbildung 23 ersichtlich ist.

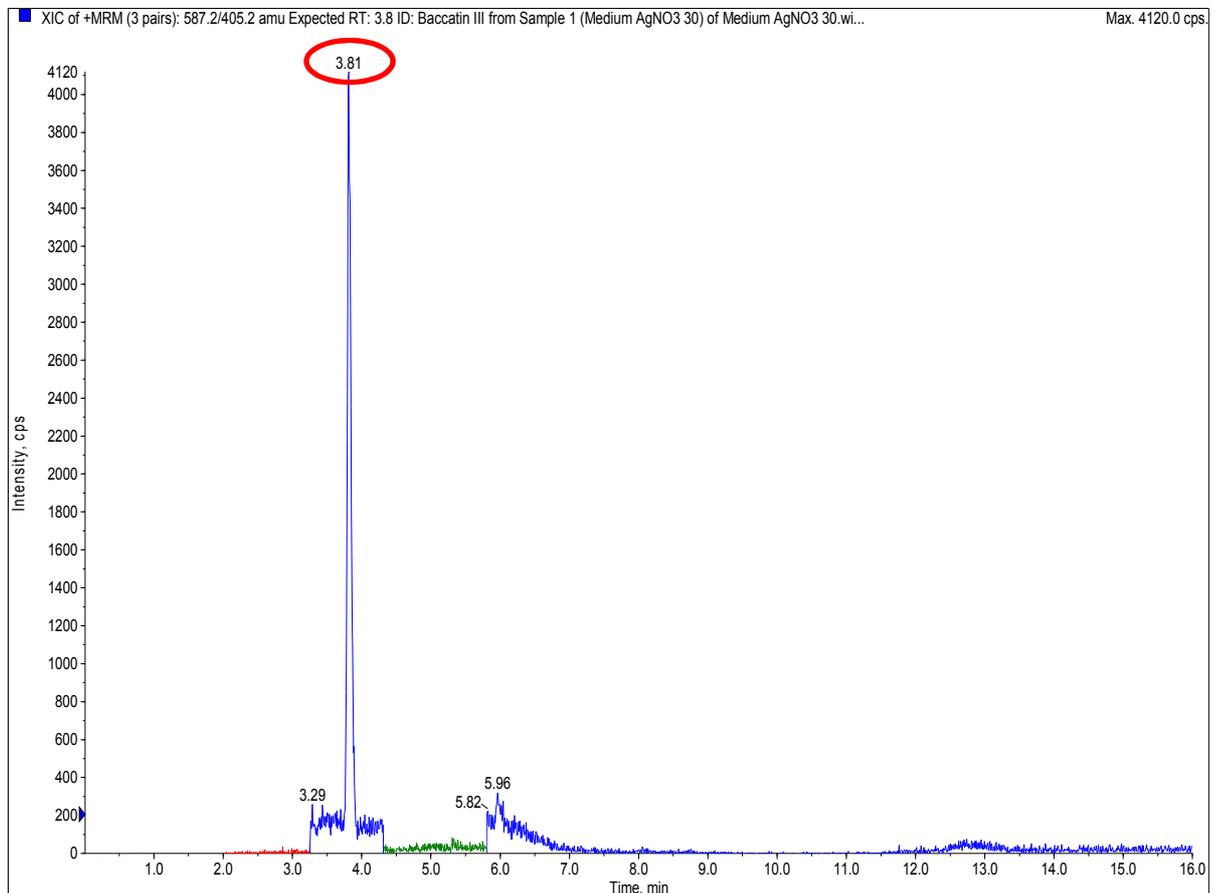


Abbildung 23: Chromatogramm eines Nährmediums nach Eliziterung mit 30 $\mu\text{mol/L}$ Silbernitrat, Baccatin III bei 3,81 min.

In dem nachstehenden Diagramm 4 (Seite 36) wird gezeigt, dass die Menge des abgeschiedenen Baccatin III nach Eliziterung mit 30 $\mu\text{mol/L}$ Silbernitrat höher war als im Medium der Kontrolle. Der Zusatz von 60 $\mu\text{mol/L}$ Silbernitrat resultierte in deutlich weniger Baccatin III.

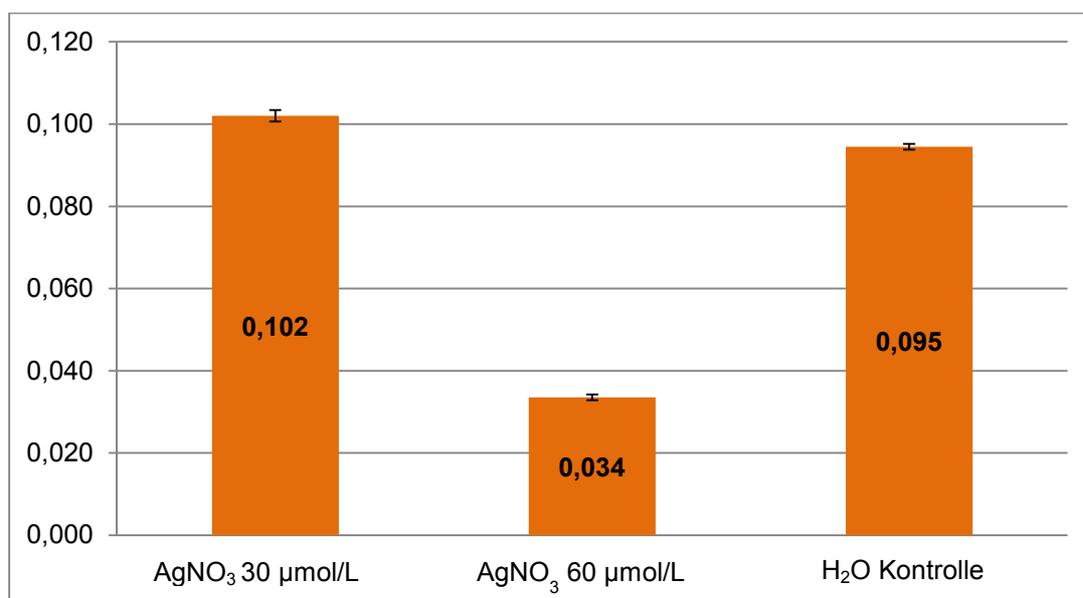


Diagramm 4: Kalkulierte Konzentration in ng/100mL; Vergleich der Auswirkung der Elizitierung auf den Baccatin III-Gehalt des Mediums

3.3. Elizitierung mit Ammoniumcitrat

Die Versuchsreihe zur Elizitierung mit Ammoniumcitrat in zwei verschiedenen Konzentrationen führte zu signifikant erhöhtem intrazellulären Gehalt an Baccatin III. Dabei erwies sich die höhere Konzentration 100 mg/L als besonders geeignet - die niedrigere Konzentration (50 mg/L) nicht im selben Ausmaß. Der Einsatz von Ammoniumcitrat führte zu keiner Bildung von Paclitaxel oder 10-Desacetylbaccatin III.

3.3.1. Intrazelluläre Inhaltsstoffe

Ammoniumcitrat 50 mg/L:

Baccatin III war mit der bisher höchsten Intensität eindeutig vorhanden. Daher lag die Vermutung nahe, dass eine höhere Konzentration zu einem noch besseren Resultat führen würde, wie sich durch die Abbildung 25 (Seite 38) bestätigt.

Ergebnisse

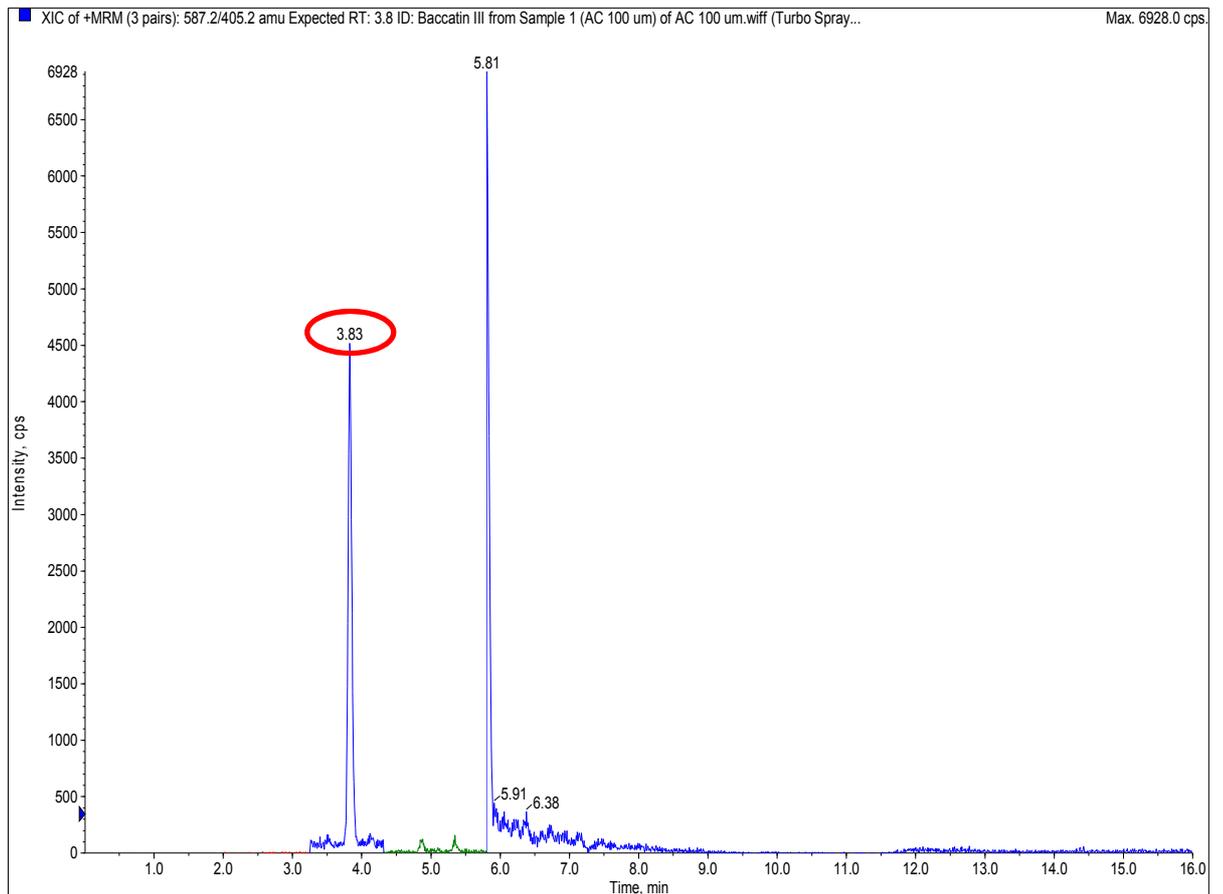


Abbildung 24: Chromatogramm nach Elizitierung mit 50 mg/L Ammoniumcitrat, Baccatin III bei 3,83 min und eine Verunreinigung bei 5,81 min.

Ammoniumcitrat 100 mg/L:

Das eindeutig beste Resultat der durchgeführten Elizitierungen, ist im folgenden Chromatogramm 25 (Seite 38) erkennbar. Die Behandlung der Zellen mit 100 mg/L Ammoniumcitrat führte zu dem höchsten Gehalt an Baccatin III. Paclitaxel und 10-Desacetylbaccatin III wurden nicht gebildet.

Ergebnisse

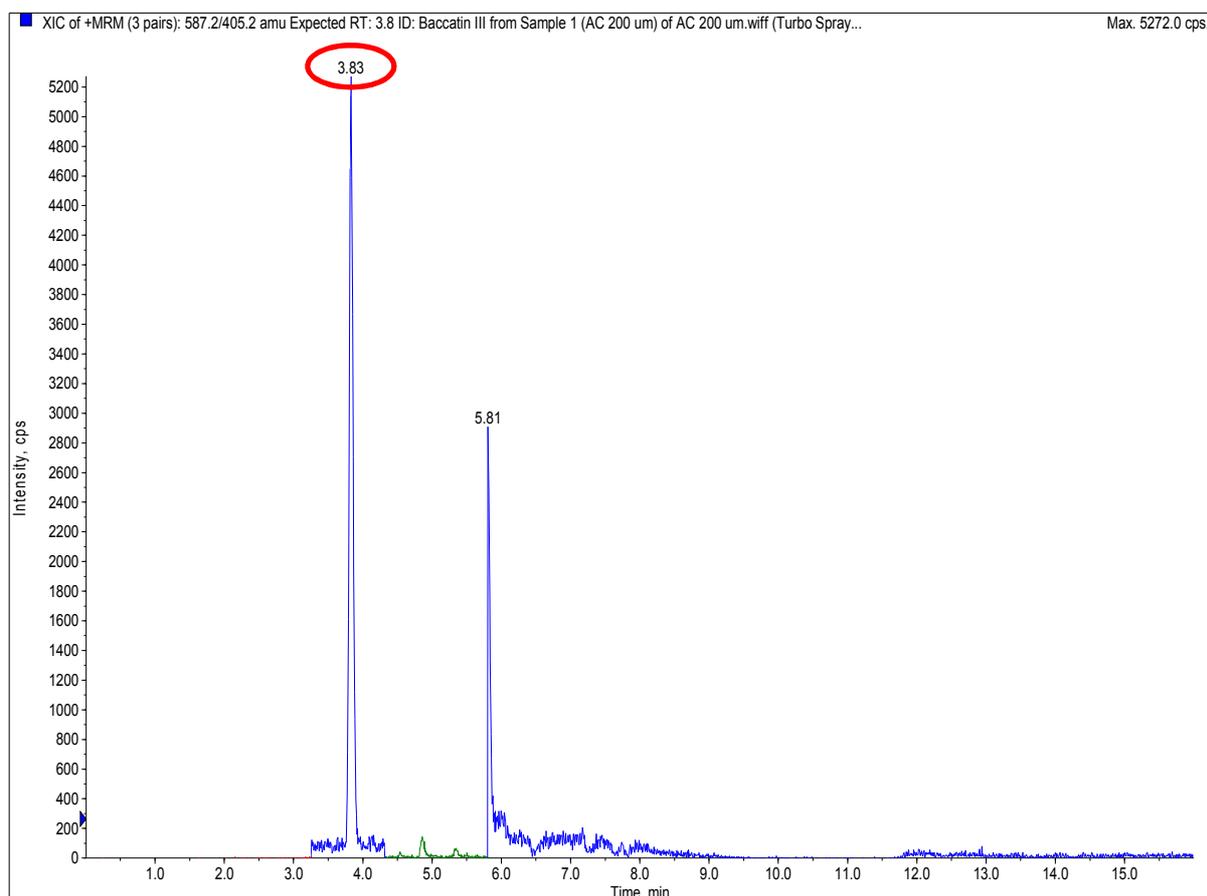


Abbildung 25: Chromatogramm nach Elizitierung mit 100 mg/L Ammoniumcitrat, Baccatin III bei 3,83 min und eine Verunreinigung bei 5,81 min.

Das nun folgende Diagramm 5 (Seite 39) soll zum Vergleich der intrazellulären Menge an Baccatin III dienen. Es ist eindeutig zu sehen, dass der Gehalt an Baccatin III mit steigender Ammoniumcitratkonzentration zunimmt. So ist das Resultat der Kontrolle mit 0,045 ng/100mg am geringsten, steigt bei einer Konzentration von 50 mg/L Ammoniumcitrat auf 0,100 ng/100mg an und erreicht den höchsten Wert von 0,123 ng/100mg durch die Elizitierung mit 100 mg/L Ammoniumcitrat.

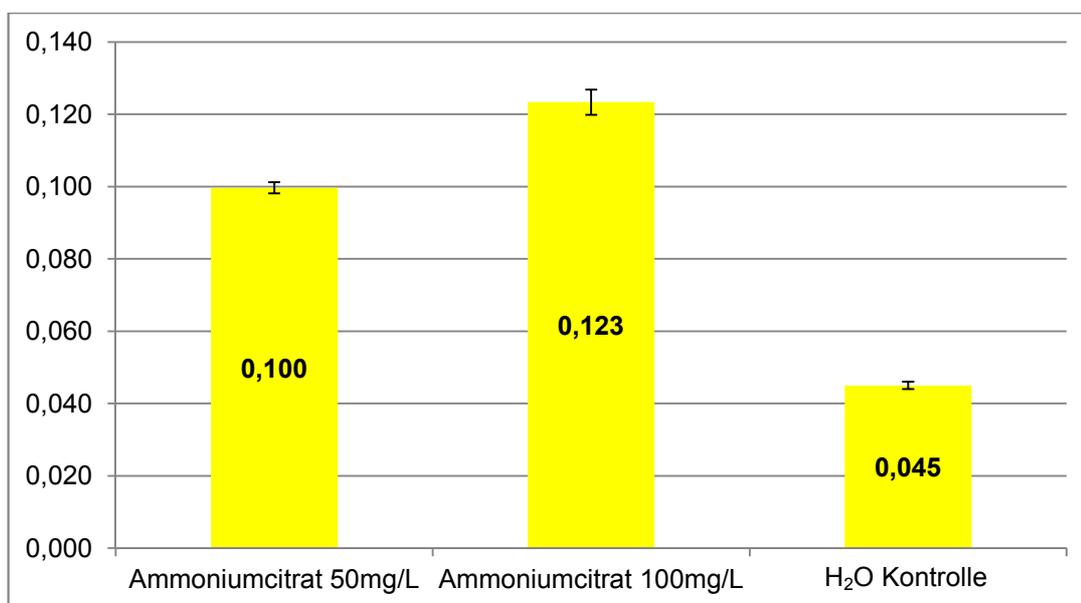


Diagramm 5: Kalkulierte Konzentration in ng/100mg; Vergleich der Auswirkung der Elizitierung auf den Baccatin III-Gehalt der Zellen

3.3.2. Extrazelluläre Inhaltsstoffe

Baccatin III wurde auch ins Medium ausgeschieden, wie aus dem nächsten Chromatogramm 26 (Seite 40) ersichtlich ist. Die Ausscheidung fand bei beiden Elizitor-Konzentrationen statt. Aus dem folgenden Diagramm 6 (Seite 41) kann abgelesen werden, dass Baccatin III im Medium beider Ammoniumcitratelizitierungen in geringerem Ausmaß vorhanden war als in der Wasserkontrolle.

Somit konnte mit Hilfe dieses Elizitors der Gehalt an Baccatin III intrazellulär signifikant gesteigert werden. In das Medium wurde aber wesentlich weniger abgegeben.

Ergebnisse

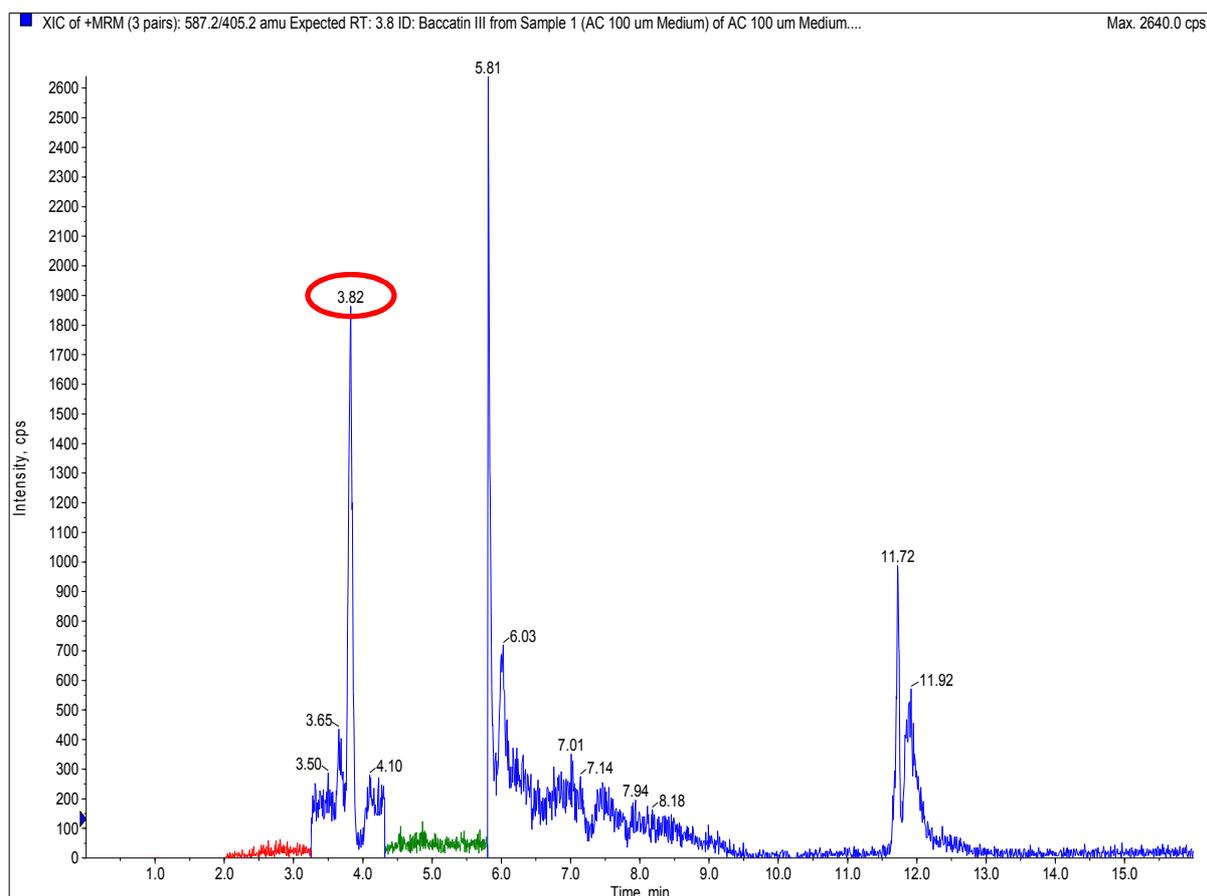


Abbildung 26: Chromatogramm eines Nährmediums mit 50 mg/L Ammoniumcitrat, Baccatin III bei 3,82 min und eine Verunreinigung bei 5,81 min.

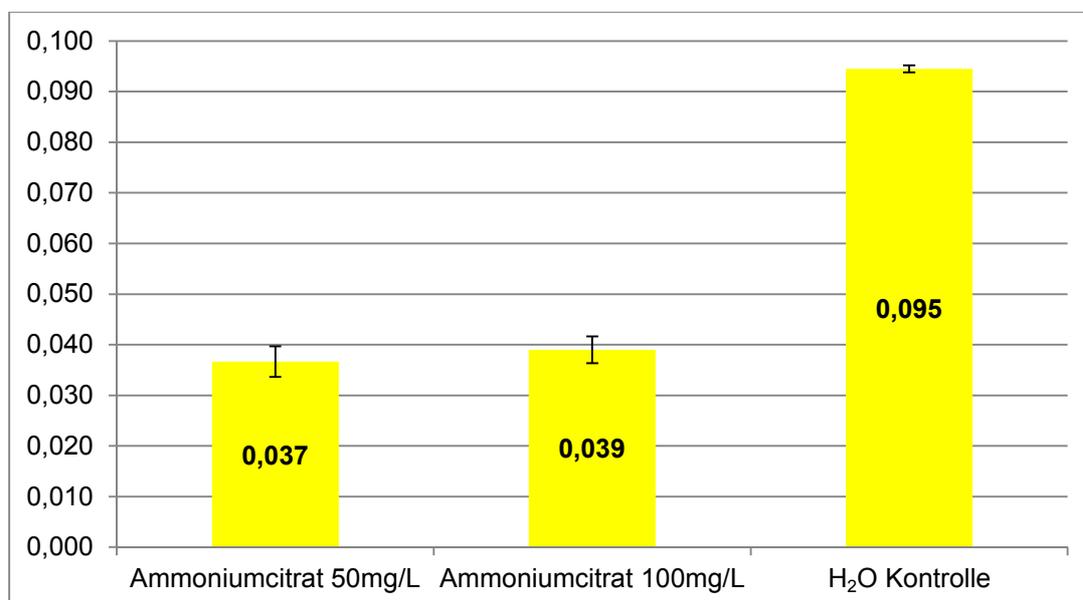


Diagramm 6: Kalkulierte Konzentration in ng/100mL; Vergleich der Auswirkung der Elizitierung auf den Baccatin III-Gehalt des Mediums

Zwischen den einzelnen Messungen wurden immer wieder Reinigungsschritte mit reinem Methanol durchgeführt. Dadurch wird garantiert, dass die Taxane nicht verschleppt wurden. Ein falsch positives Ergebnis kann daher ausgeschlossen werden. Weder Baccatin III noch 10-Desacetylbaccatin III oder Paclitaxel sind im Methanolchromatogramm zu erkennen.

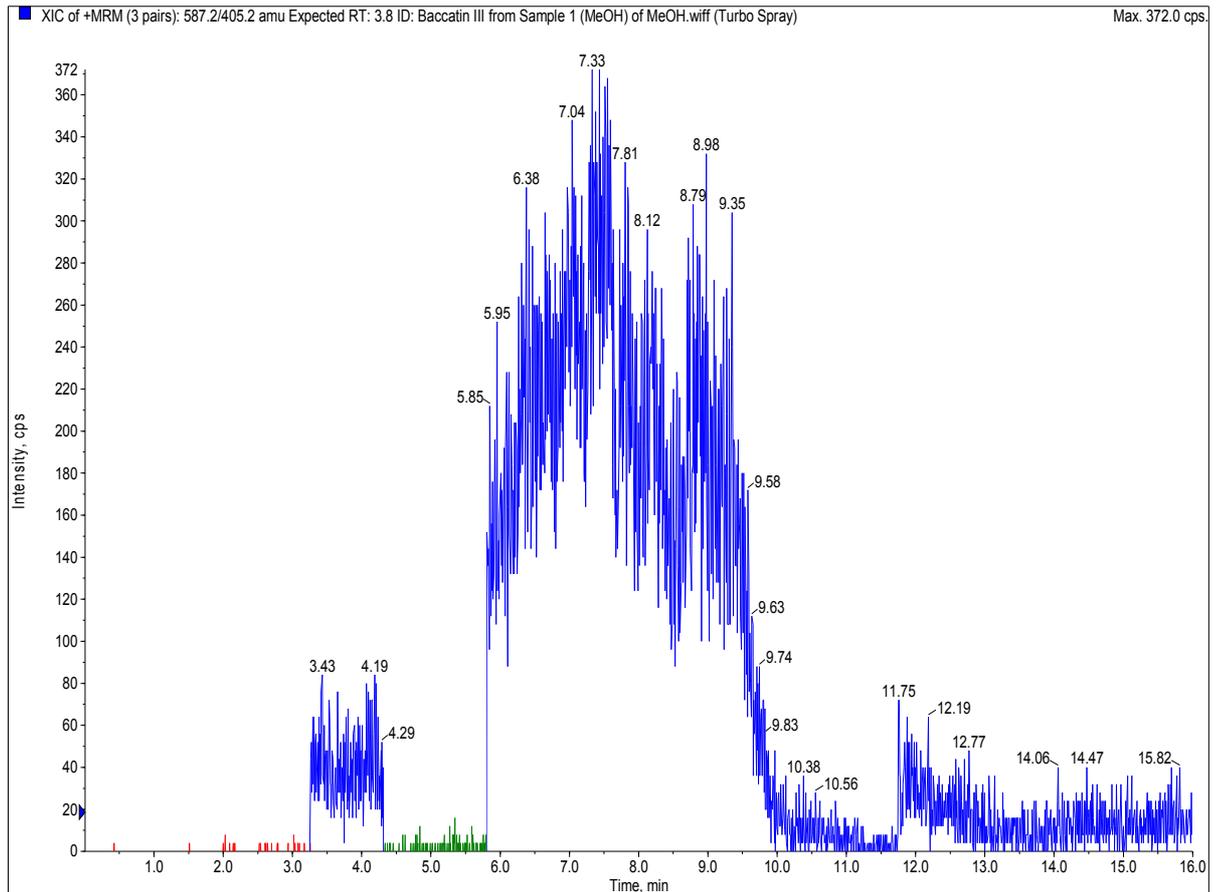


Abbildung 27: Chromatogramm einer Methanolspülung

Abschließend sollen die durchgeführten Elizitierungen verglichen werden (Diagramm 7). Lag die Konzentration von Saccharose bei fünf Prozent, so sank der Baccatin III-Gehalt auf 0,039 ng/100mg. Dieser stieg bei einem Gehalt von sieben Prozent Saccharose auf 0,061 ng/100mg. Bei erhöhten Saccharosekonzentrationen erreichten die Werte von Baccatin III aber nicht den Gehalt von 0,071 ng/100mg wie bei drei Prozent Saccharose.

Betrachtet man die Ergebnisse der Elizitierungsversuche mit Silbernitrat so ist eindeutig erkennbar, dass es zu keiner wesentlichen Steigerung an Baccatin III gekommen ist.

Behandelte man die Zellen jedoch mit Ammoniumcitrat, hat sich der intrazelluläre Baccatin III-Gehalt signifikant erhöht, im speziellen bei der höheren Konzentration von 100 mg/L Ammoniumcitrat.

Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge an destilliertem Wasser zugesetzt, da die Elizitoren in destilliertem Wasser gelöst wurden.

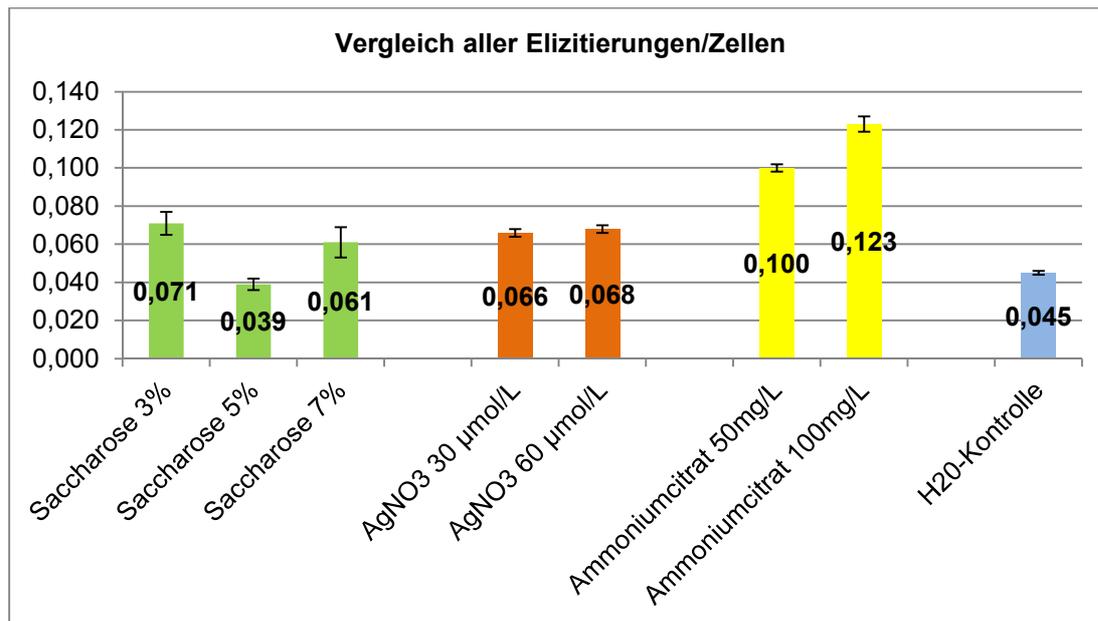


Diagramm 7: Kalkulierte Konzentration in ng/100mg; Darstellung und Vergleich aller Ergebnisse der intrazellulären Inhaltsstoffe

Ein gewisser Anteil der Taxane wurde auch in das Medium abgegeben (Diagramm 8).

Die Abgabe in das Standardmedium, mit drei Prozent Saccharose, war dabei am höchsten und sank mit steigenden Saccharosekonzentrationen.

Auffallend war der Unterschied zwischen den beiden Silbernitratkonzentrationen. Während bei der Zugabe von 30 $\mu\text{mol/L}$ Silbernitrat 0,102 ng/100mL Baccatin III im Medium gefunden werden konnte, waren bei 60 $\mu\text{mol/L}$ Silbernitrat nur 0,034 ng/100mL.

Der Gehalt an Baccatin III im Medium, nach Elizitierung mit Ammoniumcitrat war bei beiden Konzentrationen annähernd gleich.

Ein relativ hoher Anteil ist bei den Kontrollkulturen in das Medium abgegeben worden.

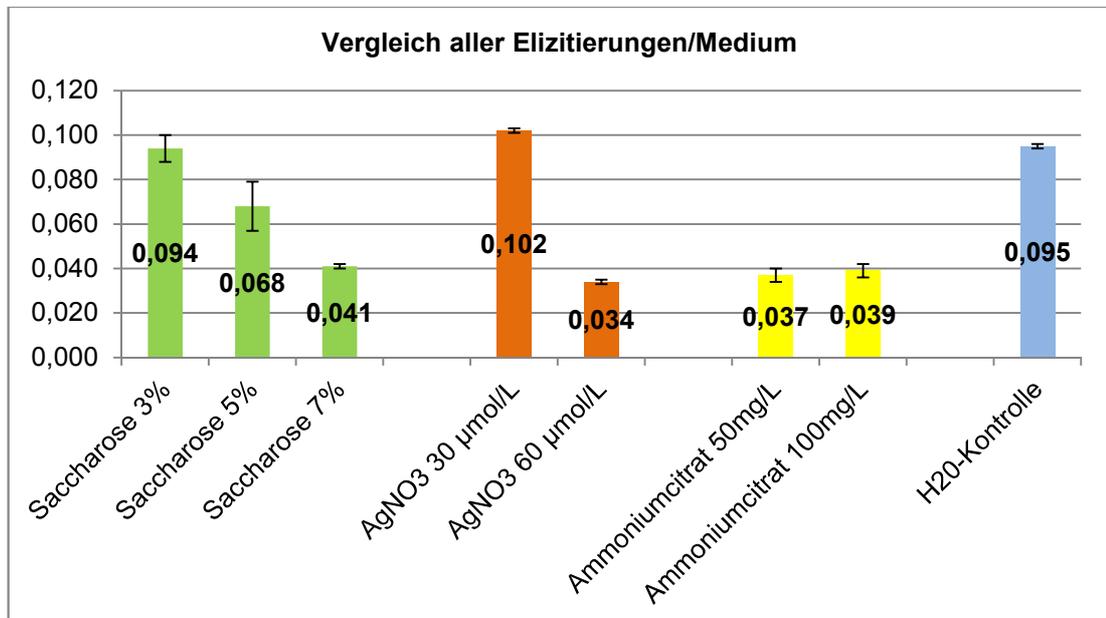


Diagramm 8: Kalkulierte Konzentration in ng/100mL; Darstellung und Vergleich aller Ergebnisse der extrazellulären Inhaltsstoffe

Zuletzt noch eine zusammenfassende Darstellung des Baccatin III-Gesamtgehaltes (Diagramm 9). Hier ist anzumerken, dass die für die H₂O-Kontrolle eingesetzten Zellkulturen älter waren als die für die 3proz. Saccharose-Kontrolle eingesetzten Suspensionen.

Dies war durch das limitierte Untersuchungsmaterial bedingt und sollte bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden. So sollte eher die H₂O-Kontrolle herangezogen werden, diese kann jedoch nicht exakt auf die Saccharoseelizitierungen übertragen werden.

Bei Bezug auf die H₂O-Kontrolle zeigt sich, dass 30 µmol/L Silbernitrat und 100 mg/L Ammoniumcitrat zu einer Steigung des Baccatin III-Gehaltes führten. Die Elizitierung mit fünf oder sieben Prozent Saccharose resultierte hingegen in einer reduzierten Bildung von Baccatin III.

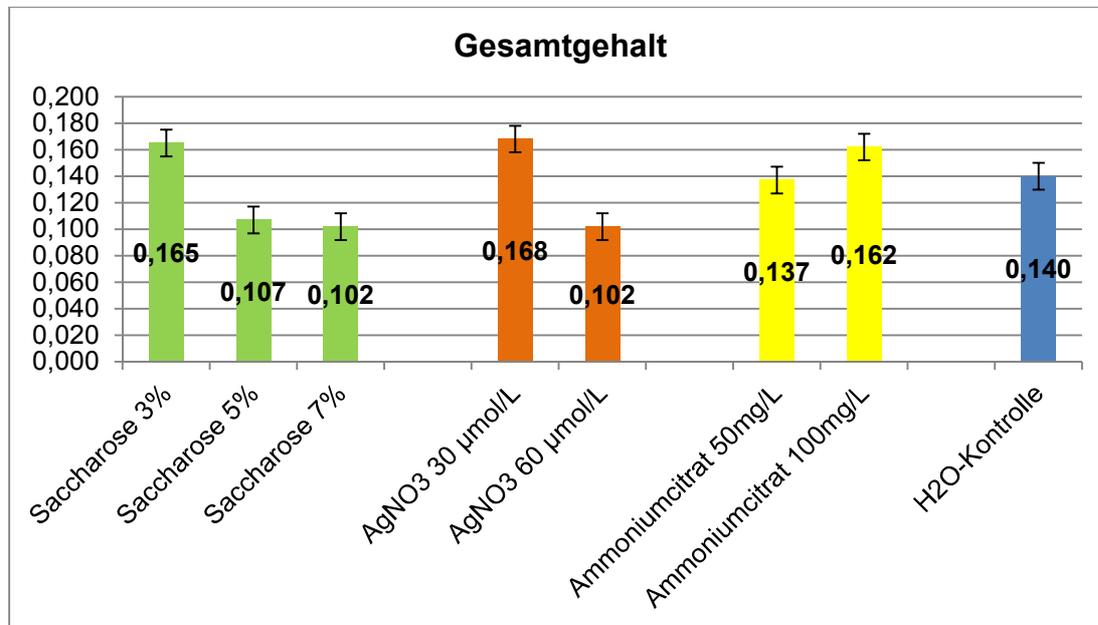


Diagramm 9: Kalkulierte Konzentration in ng/100mg und 100mL; Gesamtgehalt des Baccatin III

In der nachstehenden Tabelle 4 sind alle Proben samt den Peakflächen und der kalkulierten Konzentration angegeben. Jeweils drei beziehungsweise zwei Vermessungen wurden durchgeführt und daraus der Mittelwert berechnet.

In allen Diagrammen wurden die Werte jeweils pro 100 mg oder 100 ml angegeben.

Tabelle 4: Darstellung aller durchgeführten Messungen, mit Peakflächen und kalkulierten Konzentrationen.

Proben-Name	Datei-Name	Analyte Peakfläche (counts)	Kalkulierte Konzentration (ng/mL)	Mittelwert und Standardabweichung
AC 50mg/L Medium	2012 07 23 Proben\AC 100 um Medium.wiff	6.78e+003	0.405	0,369 ±0,003
AC 50mg/L Medium	2012 07 23 Proben\AC 100 um Medium.wiff	6.01e+003	0.359	
AC 50mg/L Medium	2012 07 23 Proben\AC 100 um Medium.wiff	5.75e+003	0.343	
AC 50mg/L Zellen	2012 07 23 Proben\AC 100 um.wiff	1.65e+004	0.983	0,998 ±0,002
AC 50mg/L Zellen	2012 07 23 Proben\AC 100 um.wiff	1.70e+004	1.01	
AC 50mg/L Zellen µl	2012 07 23 Proben\AC 100 um.wiff	1.68e+004	1.00	
AC 100mg/L Medium	2012 07 23 Proben\AC 200 um Medium.wiff	6.98e+003	0.416	0,389 ±0,003
AC 100mg/L Medium	2012 07 23 Proben\AC 200 um Medium.wiff	6.43e+003	0.384	
AC 100mg/L Medium	2012 07 23 Proben\AC 200 um Medium.wiff	6.17e+003	0.368	

Tabelle 4: Fortsetzung

Proben-Name	Datei-Name	Analyte Peakfläche (counts)	Kalkulierte Konzentration (ng/mL)	Mittelwert und Standardabweichung
AC 100mg/L Zellen	2012 07 23 Proben\AC 200 um.wiff	2.06e+004	1.23	1,207 ±0,004
AC 100mg/L Zellen	2012 07 23 Proben\AC 200 um.wiff	2.12e+004	1.27	
AC 100mg/L Zellen µl	2012 07 23 Proben\AC 200 um.wiff	1.88e+004	1.12	
AgNO ₃ 30 µmol Medium	2012 07 23 Proben\Medium AgNO3 30.wiff	1.68e+004	1.01	0,102 ±0,001
AgNO ₃ 30 µmol Medium	2012 07 23 Proben\Medium AgNO3 30.wiff	1.73e+004	1.03	
AgNO ₃ 30 µmol Zellen	2012 07 23 Proben\AgNo3 30um.wiff	1.10e+004	0.654	0,658 ±0,002
AgNO ₃ 30 µmol Zellen	2012 07 23 Proben\AgNo3 30um.wiff	1.13e+004	0.676	
AgNO ₃ 30 µmol Zellen	2012 07 23 Proben\AgNo3 30um.wiff	1.08e+004	0.643	
AgNO ₃ 60 µmol Medium	2012 07 23 Proben\Medium AgNO3 60.wiff	5.76e+003	0.344	0,335 ±0,001
AgNO ₃ 60 µmol Medium	2012 07 23 Proben\Medium AgNO3 60.wiff	5.45e+003	0.326	
AgNO ₃ 60 µmol Zellen	2012 07 23 Proben\AgNo3 60um.wiff	1.15e+004	0.685	0,680 ±0,002
AgNO ₃ 60 µmol Zellen	2012 07 23 Proben\AgNo3 60um.wiff	1.17e+004	0.699	
AgNO ₃ 60 µmol Zellen	2012 07 23 Proben\AgNo3 60um.wiff	1.10e+004	0.655	

Tabelle 4: Fortsetzung

Proben-Name	Datei-Name	Analyte Peakfläche (counts)	Kalkulierte Konzentration (ng/mL)	Mittelwert und Standardabweichung
H ₂ O Kontrolle Zelle	2012 07 23 Proben\H2O Kontrolle.wiff	7.59e+003	0.453	0,451 ±0,001
H ₂ O Kontrolle Zelle	2012 07 23 Proben\H2O Kontrolle.wiff	7.34e+003	0.438	
H ₂ O Kontrolle Zelle	2012 07 23 Proben\H2O Kontrolle.wiff	7.76e+003	0.463	
H ₂ O Medium	2012 07 23 Proben\Medium H2O Kontrolle.wiff	1.59e+004	0,949	0,920 ±0,001
H ₂ O Medium	2012 07 23 Proben\Medium H2O	1.58e+004	0,944	
MeOH	2012 07 23 Proben\MeOH.wiff	6.82e+000	0.000407	0,001672 ±0,002
MeOH	2012 07 23 Proben\MeOH.wiff	1.33e+000	0.0000795	
MeOH	2012 07 23 Proben\MeOH.wiff	1.46e+001	0.000869	
Sacch. 3% Medium	2012 07 23 Proben\Medium Zucker 3%.wiff	1.64e+004	0.978	0,936 ±0,006
Sacch. 3% Medium	2012 07 23 Proben\Medium Zucker 3%.wiff	1.50e+004	0.893	
Sacch. 3% Zellen	2012 07 23 Proben\Zucker 3%.wiff	1.19e+004	0.713	0,715 ±0,006
Sacch. 3% Zellen	2012 07 23 Proben\Zucker 3%.wiff	1.29e+004	0.771	
Sacch. 3% Zellen	2012 07 23 Proben\Zucker 3%.wiff	1.11e+004	0.660	
Sacch. 5% Medium	2012 07 23 Proben\Medium Zucker 5%.wiff	1.27e+004	0.761	

Tabelle 4: Fortsetzung

Proben-Name	Datei-Name	Analyte Peakfläche (counts)	Kalkulierte Konzentration (ng/mL)	Mittelwert und Standardabweichung
Sacch. 5% Medium	2012 07 23 Proben\Medium Zucker 5%.wiff	1.01e+004	0.603	0,682 ±0,011
Sacch. 5% Zellen	2012 07 23 Proben\Zucker 5%.wiff	5.98e+003	0.357	0,390 ±0,003
Sacch. 5% Zellen	2012 07 23 Proben\Zucker 5%.wiff	6.58e+003	0.393	
Sacch. 5% Zellen	2012 07 23 Proben\Zucker 5%.wiff	7.03e+003	0.420	
Sacch. 7% Medium	2012 07 23 Proben\Medium Zucker 7%.wiff	6.60e+003	0.394	0,404 ±0,001
Sacch. 7% Medium	2012 07 23 Proben\Medium Zucker 7%.wiff	6.94e+003	0.414	
Sacch. 7% Zellen	2012 07 23 Proben\Zucker 7%.wiff	1.19e+004	0.711	0,613 ±0,008
Sacch. 7% Zellen	2012 07 23 Proben\Zucker 7%.wiff	9.59e+003	0.572	
Sacch. 7% Zellen	2012 07 23 Proben\Zucker 7%.wiff	9.33e+003	0.557	

3.4. FDA-Test:

Das Prinzip des Fluoresceindiacetat-Tests besteht darin, dass FDA von den Zellen aufgenommen wird und die Acetatreste von Esterasen abgespalten werden. Es erfolgt eine Akkumulierung in lebenden Zellen, da Fluorescein die intakten Membranen nicht durchdringen kann (Seitz et al. 1985). Die lebenden Zellen erscheinen im Fluoreszenzmikroskop leuchtend grün, wie in den folgenden Abbildungen 28 und 29 sichtbar ist, gegensätzlich dazu zeigen tote Zellen keine Fluoreszenz (Widholm 1972). Nachteilig bei diesem Test ist die geringe Stabilität der Färbung.

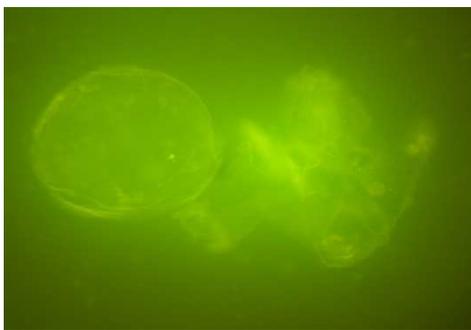


Abbildung 28: Lebende, grün fluoreszierende Zellen im FDA-Test



Abbildung 29: Zellen unter normaler Beleuchtung

Wie aus diesen Abbildungen ersichtlich ist, kann man auf eine eindeutige Vitalität der Zellen schließen. Im Laufe der Subkultivierung nahm die Vitalität der Zellen allerdings stark ab. Es kann daher schwer abgeschätzt werden, wie viel lebendes Zellmaterial zum Zeitpunkt der Elizitierung zu Verfügung stand.

Eine Bestimmung der Zellzahl war nicht möglich, da die Zellen nicht nur einzeln, sondern auch in Aggregaten vorlagen, wie die folgenden Abbildungen 30 und 31 zeigen.



Abbildung 30: Grün fluoreszierende Aggregate im FDA-Test

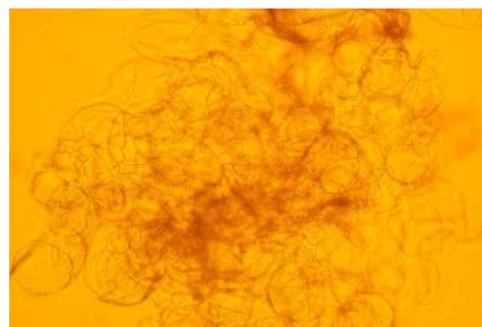


Abbildung 31: Aggregate unter normaler Beleuchtung

3.5. Phenosafranin-Test:

Dieser Test stellt einen Negativ-Test zum FDA-Test dar. Das Prinzip besteht darin, dass der Farbstoff von lebenden Zellen (Abb. 33) ausgeschlossen und nur von den toten Zellen aufgenommen wird. Diese erscheinen im Mikroskop intensiv rot gefärbt, wie in der Abbildung 32 deutlich ersichtlich (Seitz et al. 1985). Vorteile dieses Tests sind die schnellere Durchführbarkeit und die bessere Stabilität.



Abbildung 32: Rotfärbung toter Zellen nach Phenosafranin-Färbung



Abbildung 33: Lebende Zellen nach Phenosafranin-Färbung

Links lässt sich eine eindeutige Rotfärbung der Zellen erkennen, dies bedeutet, dass diese Zellen abgestorben sind. Rechts ist keine Färbung zu erkennen, dies lässt auf lebende Zellen schließen.

4. DISKUSSION

Corylus avellana L. gehört zur Familie der Corylaceen. Die Haselnuss ist in fast ganz Europa heimisch, trägt braune, hartschalige Nüsse und benötigt nährstoffreiche Böden für ein gutes Wachstum (Aichele und Schwegler 1994).

Am 26. August 1996 wurde durch Hoffman et al. (1998) die Bedeutung der Haselnuss aber neu definiert. In Extrakten von Stängeln, der Kultursorte *Corylus avellana* cv. „Gasaway“, wurde Taxol[®] detektiert. Nicht nur eine Kopplung von HPLC und Quadrupole-Elektrospray-Spektrometer diente zur Identifikation, sondern auch andere Methoden. So zeigten zum Beispiel Immunoassays mit Taxol[®]-Antigenen bei vier verschiedenen Endophytenkulturen dieser Haselnusskultur, eine positive Reaktion. Die These, dass allein Endophyten für die Taxan-Bildung verantwortlich sind, konnte durch Bestoso et al. (2006) widerlegt werden. Der Ursprung dieses *Corylus* Kulivars ist nicht bekannt. Die Früchte sind kleine, ovale, flauschige, nicht gut schmeckende Nüsse. Genutzt wurden ausschließlich die Pollen, um bessere Variationen der Hasel hervorzubringen. *Corylus avellana* var. „Gasaway“ schien für Hoffman et al. (1998) die beste Quelle für Paclitaxel zu sein. Dies bestätigte sich auch dadurch, dass in Trazels, Kreuzungen aus *Corylus colurna*, türkischen Ursprungs mit *Corylus avellana*, der Paclitaxel-Gehalt 2/3 oder weniger betrug. Kein Taxol[®] ist in den Sorten Barcelona und Ennis, welche vorwiegend in Oregon (USA) kultiviert werden, entdeckt worden (Hoffman et al. 1998).

Hoffman et al. (1998) wiesen in ihrer Studie darauf hin, dass keine quantitativen Untersuchungen durchgeführt wurden. Sie schätzten den Taxol[®]-Gehalt in der Hasel auf etwa 1/10 des Gehalts in *Taxus brevifolia* Nutt. (0,018 %; Wani et al. 1971). Das bedeutendste Ergebnis ist daher die erstmalige Detektion von Taxanen in Angiospermen (Hoffman et al. 1998).

Ursprünglich wurde in der Studie von Hofmann et al. (1998) nicht auf das Vorhandensein von Taxol[®] in Haselnusskulturen getestet, sondern Massenspektren von Methanolextrakten aus Stängeln statistisch erfasst und

verglichen. Dabei wurden Peaks identifiziert die mit denen von Taxol[®] übereinstimmten.

Paclitaxel (Handelname Taxol[®]) ist ein Sekundärstoff, der zur Klasse der Terpene gehört. Ursprünglich wurde dieses Taxan in *Taxus brevifolia* Nutt. entdeckt. Da die Gewinnung aus der Rinde nicht nachhaltig ist, wird Taxol[®] semisynthetisch aus den Nadeln von *Taxus baccata* und biotechnologisch aus Eibenzellkulturen gewonnen (Hänsel und Sticher 2010; Dingermann et al. 2011).

Taxol[®] ist ein bewährtes Zytostatikum (Bartsch 2004). Neueste Untersuchungen weisen auch auf eine Wirksamkeit bei Psoriasis, Multipler Sklerose und Morbus Alzheimer hin (Hoffman und Shahidi 2009).

Der Ertrag von Paclitaxel und Vorstufen, wie Baccatin III und 10-Desacetylbaccatin III aus der Eibe ist eher gering, wobei es immer schwieriger wird, den Bedarf zu decken. Hoffnung für die zukünftige Verfügbarkeit ist, dass die Produktion von Taxanen auch über Haselkulturen möglich wird (Miele et al. 2012).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Gehalt an Taxanen in Zellkulturen der Haselnuss zu beeinflussen.

Das Hauptaugenmerk lag dabei auf drei durchgeführte Elizitierungen, wobei als Elizitoren Saccharose, Silbernitrat und Ammoniumcitrat eingesetzt wurden. Letztendlich sollte bestimmt werden, durch welchen Elizitor der Taxangehalt am besten zu steigern ist.

In der Vorarbeit von Shaykhislamov (Diplomarbeit in Vorbereitung) wurde bereits eine Elizitierung mit Methyljasmonat durchgeführt. Diese führte zur Bildung von Baccatin III in den Zellen, allerdings in einem sehr niedrigen Ausmaß von 0,055 ng/100mg. Eine Elizitierung mit Methyljasmonat und Methyljasmonat/Chitosan wurde auch von Bestoso et al. (2006) durchgeführt, wobei eine Steigerung der Taxanbildung besonders bei Elizitierung mit Methyljasmonat/Chitosan festgestellt werden konnte.

Aufgrund des eher geringen Gehalts von Baccatin III nach Behandlung mit dem biotischen Elizitor Methyljasmonat wurden für die vorliegende Arbeit die

drei abiotischen Elizitoren, Saccharose, Silbernitrat und Ammoniumcitrat, ausgewählt.

Von Shaykhislamov (Diplomarbeit in Vorbereitung) wurden freundlicherweise einige Zellsuspensionskulturen und Kallusgewebe zur Verfügung gestellt. Somit lag der erste wesentliche Schritt in der Vermehrung und Anlegung neuer Kulturen aus Kallus.

Erster Untersuchungsgegenstand war die Elizitierung mit erhöhten Saccharosekonzentrationen. Saccharose dient in pflanzlichen Zellkulturen als Kohlenstoffquelle und ist im Basismedium mit 30 g/L enthalten. Das verwendete Kohlenhydrat (Saccharose, 30 und 50 mg/L) spielt eine wichtige Rolle bei der Herstellung und Vermehrung von Haselnusszellkulturen. Die Erhöhung der Saccharosekonzentration führt zu einer Steigerung des osmotischen Stresses und damit zu einer drastischen Änderung der Zellphysiologie (Zhong 2002). Haluk et al. (2003) stellten fest, dass durch die Zugabe von Glucose der Gehalt an Tropolonen in Zellkulturen von *Thuja plicata* von 3,15 mg auf 8,1 mg gesteigert werden konnte. In unseren Untersuchungen konnte bei allen Saccharosekonzentrationen (drei, fünf und sieben Prozent), Baccatin III detektiert werden. Dabei enthielten Zellen aus der Kontrollkultur mit drei Prozent Saccharose 0,071 ng/100mg. Die Hasel ist somit grundsätzlich auch ohne Elizitierung zur Bildung von Baccatin III befähigt. Der intrazelluläre Gehalt sank bei fünf Prozent Saccharose auf 0,039 ng/100mg ab und stieg bei sieben Prozent Saccharose wieder auf 0,061 ng/100mg. Paclitaxel und 10-Desacetylbaccatin III wurden in den von uns eingesetzten Zellkulturen nicht gebildet. Paclitaxel konnte aber mit einem Gehalt von 1 mg/L, Baccatin III in Spuren und 10-Desacetylbaccatin III mit 0,5 mg/L ohne Elizitierung von Bestoso et al. (2006) im Medium festgestellt werden.

Wie bereits erwähnt (Kap. 3, Seite 44) waren die für die Kontrolle (drei Prozent Saccharose) eingesetzten Zellkulturen jünger (d.h. weniger oft passagiert) als die elizitierten Kulturen. Dies war durch das knapp bemessene Untersuchungsmaterial bedingt. Möglicherweise nimmt der Baccatin III-Gehalt mit zunehmendem Alter der Kulturen ab. Dies konnte jedoch aus Material- und Zeitmangel nicht weiter untersucht werden.

Bestätigt werden kann, dass durch die verschiedenen Konzentrationen an Saccharose der Gehalt an Baccatin III intra- und extrazellulär unterschiedlich verändert wurde, wobei sich aber der Gesamtgehalt nur minimal unterschied. Kim et al. (2001) testeten Saccharosekonzentration von 20 g/L bis 100 g/L an Zellkulturen von *Taxus chinensis* aus. Der höchste Gehalt an Paclitaxel (78,5 mg/L) wurde dabei mit 60 g/L Saccharose erreicht. Allerdings erfolgte die Ernte der Zellen erst an Tag 35 und nicht nach zehn Tagen, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Es wurde in der Studie auch darauf hingewiesen, dass zu hoher osmotischer Druck bei Zellkulturen von *Taxus chinensis* zu vermindertem Zellwachstum und reduzierter Paclitaxelbildung führte.

Eine Elizitierung mit Saccharose wurde auch von Schmidtbauer (2012) an „hairy roots“ Kulturen von *Leontopodium alpinum* (Cass.) durchgeführt. Ein Saccharosegehalt von sechs Prozent resultierte in einer erhöhten Bildung des Lignan Leoligin.

In den Nährmedien konnte ebenfalls Baccatin III detektiert werden, wie auch schon durch Bestoso et al. (2006) belegt. Im Vergleich zur Kontrolle mit drei Prozent Saccharose (0,094 ng/100mL) nahm der Baccatin III-Gehalt nach Elizitierung mit fünf beziehungsweise sieben Prozent Saccharose ab (0,068 ng/100mL bzw. 0,041 ng/100mL). Das heißt, dass bei der geringeren Konzentration an Saccharose mehr Baccatin III extrazellulär und bei der höheren Konzentration des gleichen Elizitors, mehr intrazellulär vorliegt. Auch hier muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Kontrollkulturen (drei Prozent Saccharose), wie oben erwähnt, jünger waren als die elizitierten Suspensionen.

Zweiter Untersuchungsgegenstand war die Elizitierung mit Silbernitrat. Es ist als Salz der Salpetersäure leicht in Wasser löslich und kann daher relativ einfach den Zellkulturen zugesetzt werden. Silbernitrat greift zwischen Baccatin III und Paclitaxel in den Biosyntheseweg ein (Yuan et al. 2002). Yuan et al. (2002) führten eine Elizitierung mit Silbernitrat an Zellkulturen von *Taxus chinensis* var. *Mairei* durch. Allerdings unterschied sich die durchgeführte Elizitierung dahingehend von unseren Untersuchungen, dass Silbernitrat in einer Konzentration von fünf beziehungsweise zehn $\mu\text{mol/L}$

zugemischt wurde. Die Analysen erfolgten am Tag fünf und zehn nach der Elizitierung. In der vorliegenden Arbeit wurden 30 und 60 $\mu\text{mol/L}$ des Elizitors eingesetzt, die Zellernte erfolgte zehn Tage nach Zusatz.

Yuan et al. (2002) untersuchten weiters die Auswirkung des Silbernitrats auf die Biomasse. Dabei stellten sie fest, dass bei einer Konzentration von fünf $\mu\text{mol/L}$ Silbernitrat ein Maximum an Biomasse resultierte; jedoch bei einer weiteren Erhöhung der Elizitorkonzentration die Biomasse absank. Dies dürfte auf die Toxizität des Silbernitrats bei einer höheren Konzentration zurückzuführen sein. Betrachtet man das Taxanprofil der Kulturen mit fünf $\mu\text{mol/L}$ Silbernitrat am Tag fünf, so konnten kein Taxol[®], aber Baccatin III und 10-Desacetylbaccatin III detektiert werden. Eine mögliche Theorie für das Fehlen von Taxol[®] könnte ein Abbau der Substanz sein, welcher zu einer Erhöhung der Konzentration von Baccatin III und 10-Desacetylbaccatin III geführt hat. Bei einer Zugabe von zehn $\mu\text{mol/L}$ Silbernitrat konnte eine Steigerung des Taxols[®]-Gehaltes und eine Abnahme an Baccatin III und 10-Desacetylbaccatin III festgestellt werden. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Elizitierung führte im Vergleich zur H_2O -Kontrolle zu einem Anstieg an Baccatin III, andere Taxane konnten nicht detektiert werden. Eine Behandlung mit 60 $\mu\text{mol/L}$ Silbernitrat resultierte in einem Absinken des Baccatin III-Gehaltes. Im Gegensatz dazu erzielte die Elizitierung von „hairy roots“ des Edelweiß' mit 60 $\mu\text{mol/L}$ Silbernitrat, den höchsten Leoligengehalt. Getestet wurden dabei Konzentration von 15, 30 und 60 $\mu\text{mol/L}$ (Schmidtbauer 2012). In fortführenden Arbeiten sollten an Haselnusskulturen noch weitere niedrigere Konzentrationen an Silbernitrat getestet werden.

Dritter Untersuchungsgegenstand war eine Elizitierung mit Ammoniumcitrat, welches zu den abiotischen Elizitoren gehört. Als Elizitor greift es in der Biosynthese zwischen Baccatin III und Taxol[®] ein (Yuan et al. 2002; Miao et al. 2004). Ammoniumcitrat wurde bisher noch nicht als Elizitor für Haselnusszellkulturen eingesetzt. Khosroushahi et al. (2006) behandelten eine Zweiphasenkultur von *Taxus baccata* mit Ammoniumcitrat in einer Konzentration von 50 mg/L. Ammoniumcitrat und weitere Zusatzstoffe dienten dabei als Stimulatoren der Biomasse. Ammoniumcitrat wurde auch in Kombination mit Silbernitrat an Suspensionskulturen von *Taxus sp.* durch Choi et al. (1996) getestet. Dabei konnte aber kein synergistischer Effekt auf

die Taxol[®]-Produktion entdeckt werden. Yuan et al. (2002) stellten eine erhöhte Taxol[®]-Produktion bei gleichzeitiger Anwendung von Ammoniumcitrat und Arachidonsäure oder Salicylsäure fest, aber keine Auswirkung bei der Anwendung von Ammoniumcitrat und Methyljasmonat. Ein möglicher Grund dafür könnten die unterschiedlichen Ansatzpunkte im Biosyntheseweg sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde Ammoniumcitrat allein als Elizitor eingesetzt. Wiederrum konnte nur Baccatin III detektiert werden, jedoch in einer weitaus höheren intrazellulären Konzentration als in der Kontrolle und bei Elizitierung mit Saccharose beziehungsweise Silbernitrat. So führte der Einsatz von 50 mg/L Ammoniumcitrat zu einem Baccatin III-Gehalt von 0,100 ng/100mg. Bei Einsatz der doppelten Konzentration erhöhte sich der Gehalt, im Vergleich zur Wasserkontrolle (0,045 ng/100mg), auf 0,123 ng/100mg. Daraus ist eindeutig ersichtlich, dass diese Elizitierung zu einem signifikanten Anstieg geführt hat. Dies lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass Ammoniumcitrat den Biomassezuwachs fördert (Khosroushahi et al. 2006). Bei der Elizitierung mit Ammoniumcitrat fand sich Baccatin III vorwiegend in den Zellen und nicht extrazellulär. Der Gesamtgehalt an Baccatin III war nach Elizitierung mit Ammoniumcitrat 100 mg/L höher als in der H₂O-Kontrolle.

Interessant wäre die gleichzeitige Anwendung von Ammoniumcitrat und Ultraschall. Safari et al. (2012) stellten nämlich fest, dass eine Ultraschallbehandlung für die Dauer von 20 Minuten zu einer drastischen Steigerung des Taxangehaltes in Haselnusszellkulturen führte. So stieg der Taxol[®]-Gehalt von 0,08 mg/L auf 0,46 mg/L, 10-Desacetylbaccatin III erreichte ein Maximum von 0,26 mg/L (0,05 mg/L in der Kontrolle) und Baccatin III einen Wert von 0,07 mg/L (0,01 mg/L in der Kontrolle). Vorteile einer Ultraschallbehandlung sind das Fehlen von negativen Auswirkungen auf Zellvitalität und Zellwachstum, außerdem bleibt die Zellmembran unversehrt (Safari et al. 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Vitalität der Suspensionskulturen getestet. Eine gute Vitalität ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Elizitierung. Dazu können folgende Aussagen getroffen werden: Eine gute

Vitalität konnte bei neu angelegten Kulturen aufgrund hoher Fluoreszenz im FDA-Test festgestellt werden. Je höher das Alter der Zellkulturen, umso weniger vital waren sie. Inwiefern sich bei der von uns eingesetzten Zelllinie eine höhere Vitalität auf den Baccatin III-Gehalt auswirkt, müsste in weiterführenden Untersuchungen überprüft werden.

Abschließend kann die Aussage getroffen werden, dass Baccatin III in der Haselnusszelllinie gebildet wurde und der Gehalt durch Elizitierung beeinflusst werden konnte. Paclitaxel und 10-Desacetylbaccatin konnten nicht detektiert werden. Besonders der Einsatz von Silbernitrat und Ammoniumcitrat hat zu vielversprechenden Ergebnissen geführt. Der geringe Taxangehalt könnte grundsätzlich durch die Zelllinie bedingt sein, aber auch das Basismedium sowie Art und Konzentration von Wuchsstoffen könnten eine Rolle spielen. Diesen Umständen sollte in weiterführenden Studien Rechnung getragen werden und entsprechende Modifikationen des Nährmediums und auch weitere Zelllinien untersucht werden. Der Einsatz weiterer Elizitoren, allein oder in Kombination, könnte zu einer verbesserten Taxanproduktion führen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Paclitaxel (Handelsname Taxol[®]) wurde ursprünglich aus der pazifischen Eibe, *Taxus brevifolia* Nutt., extrahiert und wird heute vorwiegend mit Hilfe von Eibenzellkulturen hergestellt. Taxol[®] ist ein bewährtes Zytostatikum, neueste Untersuchungen zeigen auch eine Wirksamkeit bei Morbus Alzheimer, Multipler Sklerose und Psoriasis. Bei der Suche nach neuen Quellen für Taxane wurden diese auch in Extrakten der Haselnuss-Kultursorte *Corylus avellana* cv. „Gasaway“ gefunden. Ursprüngliche Thesen, dass allein ein Endophyt für die Taxanbildung verantwortlich ist, konnten mit endophytenfreien *in-vitro* Kulturen widerlegt werden. Vorteile der Hasel im Vergleich zur Eibe sind ein schnelleres Wachstum, bessere Verfügbarkeit und einfachere Kulturbedingungen.

Ziel dieser Diplomarbeit war es, in Zellkulturen der Haselnuss den Taxangehalt durch Elizitierung zu steigern, wie es auch routinemäßig an Eibenzellkulturen durchgeführt wird. Es wurden insgesamt drei abiotische Elizitierungen durchgeführt: Die Taxanbildung sollte mit Saccharose, Silbernitrat und Ammoniumcitrat beeinflusst werden. Die eingesetzte Zelllinie produzierte ohne Elizitierung Baccatin III, Paclitaxel und 10-Desacetylbaccatin III wurden nicht detektiert. Die Elizitierung mit erhöhten Saccharosekonzentrationen resultierte in einem verringerten Gehalt an Baccatin III. Eine Behandlung mit 30 µmol/L Silbernitrat führte zu einem Anstieg der Baccatin III-Konzentration, während 60 µmol/L des Elicitors eine verringerte Taxanbildung bewirkten. Auch die Elizitierung mit 100 mg/L Ammoniumcitrat resultierte in einem Anstieg des Baccatin III-Gehaltes.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die drei untersuchten abiotischen Elizitoren die Taxanbildung in der eingesetzten Haselnusszelllinie grundsätzlich beeinflusst werden kann.

6. SUMMARY

Paclitaxel (trade name Taxol[®]) has been originally isolated from the pacific yew, *Taxus brevifolia* Nutt., and is nowadays prepared primarily through yew cell cultures. Taxol[®] is a proven cytostatic drug, and recend studies also showed activity in Alzheimer's disease, multiple sclerosis and psoriasis. In search of novel sources of taxanes these compounds were also found in extracts of the hazel cultivar *Corylus avellana* cv. „Gasaway“. Initial assumptions that an endophyte alone is responsible for taxane formation could be disproved with endophyte-free *in-vitro* cultures. When compared to yew hazel offers the advantage of faster growth, better availability and simplier culture conditions.

The aim of the present diploma thesis was the enhancement of taxane content through elicitation, as performed routinely with yew cell cultures. A total of three abiotic elicitations were carried out to influence taxane formation with sucrose, silver nitrate and ammonium citrate. The investigated cell line constitutively produced baccatin III while paclitaxel and desacetylbaccatin III could not be detected. Elicitation with elevated sucrose concentrations resulted in a reduced content of baccatin III. A treatment with 30 $\mu\text{mol/L}$ silver nitrate led to an increased baccatin III concentration while 60 $\mu\text{mol/L}$ of the elicitor caused reduced taxane formation. Also, elicitation with 100 mg/L ammonium citrate resulted in elevated baccatin III content.

It could be shown that it is generally possible to influence taxane formation in the investigated hazel cell line.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Aichele, D. und Schwegler, H. W. (1994), Die Blütenpflanzen Mitteleuropas, Franckh-Kosmos Verlag, Stuttgart: S. 287.

Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. B. und Starke, K. (2009), Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10. Auflage, Urban und Fischer Verlag, München, S. 955.

Angelova, Z., Georgiev, S. und Roos, W. (2006), Elicitation of Plants, *Biotechnol & Biotechnol Eq* 72-83.

Bartsch, V. (2004), Das Taxol Buch, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 1-33.

Bestoso, F., Ottaggio, L., Armirotti, A., Balbi, A., Damonte, G., Degan, P., Mazzei, M., Cavalli, F., Ledda, B. und Miele, M. (2006), In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes, *BMC Biotechnol* **6**: 45.

Chang, J. H., Shin, J. H., Chung, I. S. und Lee, H. J. (1998), Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*, *Biotechnol Lett* **20**: 1097-1099.

Choi, H. K., Mannyundong, S. K. und Tom, L. (1996), A method for mass production of Taxol by semi-continuous culture, Patent WO 96/34110.

Dingermann, T., Winckler, T. und Zündorf, I. (2011), Gentechnik Biotechnik - Grundlagen und Wirkstoffe, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart, S. 256.

Exposito, O., Bonfill, M., Moyano, E., Onrubia, M., Mirjalili, M. H., Cusido, R. M. und Palazon, J. (2009), Biotechnological production of Taxol and related Taxoids: Current state and prospects, *Anti Can Agents Med Chem* **9**: 109-121.

Frank, M. (1997), Pharmakokinetische Untersuchungen mit den Zytostatika Paclitaxel und Docetaxel, Diplomarbeit, Univ. Wien.

Haluk, J. P. und Roussel-Bousta, C. (2003), Biosynthèse de tropolones dans les cals et les suspensions cellulaires à partir d'ébauches foliaires de plantules de *Thuja plicata* Donn, *Ann For Sci* **60**: 271-276.

Hänsel, R. und Sticher, O. (2010), Pharmakognosie - Phytopharmazie, 9. Auflage, Heidelberg, Berlin, S. 1368-1369

Hegi, G. (1965), Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Band 3, J. F. Lehmann, Wien, S. 71-75.

Hoffman, A., Khan, W., Worapong, W., Storb, G., Griffin, D., Arbogast, B., Barofsky, B., Boone, D., Ning, R., Zheng, P. und Daley, L. (1998), Bioprospecting for taxol in angiosperm plant extracts: Using high performance chromatography-thermospray mass spectrometry to detect the anticancer agent and its related metabolites in filbert trees, *Spectroscopy* **13**: 22-32.

Hoffman, A. und Shahidi, F. (2009), Paclitaxel and other taxanes in hazelnut, *J funct foods* 33-37.

Jin, J. H., Shin, J. H., Kim, J. H., S., C. I. und J., L. H. (1999), Effect of chitosan elicitation and media components on the production of anthraquinone colorants in Madder (*Rubia akane Nakai*) cell culture, *Biotechnol Bioprocess Eng* **4**: 300-304.

Keen, N. T. (1975), Specific elicitors of plant phytoalexin production - determinants of race specificity in pathogens, *Science* **187**: 74-75.

Khosroushahi, A., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghidibadi, H., Dadpour, M. R. und Omid, Y. (2006), Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell cultures of *Taxus baccata*, *Cell Biol Int* **30**: 262-269.

Kim, S. I., Choi, H. K., Kim, J. H., S., L. H. und S, H. S. (2001), Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*, *Enzyme microb Tech* **28**: 202-209.

Kirschner, S. (2001), Pharmakokinetik und Metabolismus von Paclitaxel: Untersuchungen zur Interaktion mit dem Zytotoxikum Amifostine, Diplomarbeit, Univ. Wien.

Kurosaki, F., Futamura, K. und Nishi, A. (1985), Factors affecting phytoalexin production in cultured carrot cells, *Plant Cell Physiol* **24**: 693-700.

Linsmaier, E. M. und Skoog, F. (1965), Organic growth factor requirements of *Tabacco* tissue cultures, *Physiologia Plantarum* **18**: 100.

Miau, Z. Q., Yuan, Y. J., Ren, D. F., Wei, Z. J. und Wu, J. C. (2004), Acting point in Taxol biosynthesis pathway of elicitor in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*, *Acta Botanica Sinica* **46**: 730-737.

Miele, M., Mumot, A. M., Zappa, A., Romano, P. und Ottaggio, L. (2012), Hazel and other sources of paclitaxel and related compounds, *Phytochem Rev* 1-15.

Ottaggio, L., Bestoso, F., Armirotti, A., Balbi, A., Damonte, G., Mazzei, M., Sancandi, M. und Miele, M. (2008), Taxanes from Shells and Leaves of *Corylus avellana*, *J Nat Prod* **71**: 58-60.

Präve, P., Faust, U., Sittig, W. und Sukatsch, D. A. (1994), *Handbuch der Biotechnologie*, 4. Auflage, Oldenbourg Verlag, München, Wien, Oldenbourg, S. 221-222.

Razedoost, H. (2012), New prospecting for presence of Taxanes in *Corylus avellana* L. using PCR amplification and high resolution mass spectrometry, Dissertation, Shahid Beheshti University, in Vorbereitung.

Rezaei, A., Ghanati, F., Behmanesh, M. und Mokhtari-Dizaji, M. (2011), Ultrasound-potentiated salicylic acid-induced physiological effects and production of taxol in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture, *Ultrasound in medicine & biology* **37**: 1938-1947.

Safari, M., Ghanati, F., Hajnoruzi, A., Rzaei, A., Abdmaleki, P. und Mokhtari-Dizaji, M. (2012), Maintenance of membrane integrity and increase of taxanes production in hazel (*Corylus avellana* L.) cells induced by low-intensity ultrasound, *Biotechnol Lett* **34**: 1137-1141.

Schiff, P. B. und Horwitz, S. (1980), Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells, *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 1561-1565.

Schmidtbauer, K. (2012), Elizitierung von "Hairy roots"-Kulturen des Edelweiß mit abiotischen Faktoren, Diplomarbeit, Univ. Wien.

Seitz, H. U., Seitz, U. und Alfermann, W. (1985), *Pflanzliche Gewebekultur - Ein Praktikum*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York: 60-61.

Shaykhislamov, V. (2012), Untersuchungen zur Taxol-Produktion in der Haselnuss, Diplomarbeit in Vorbereitung, Univ. Wien.

Vasconsuelo, A. und Boland, R. (2007), Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants, *Plant Sci* **172**: 861-875.

Wang, Y. F., Shi, Q. W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y. C. und Cong, B. (2011), Natural Taxanes: developments since 1828, *Chem Rev* **111**: 7652-7709.

Wani, M. C., Tayler, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. und McPhail, A. T. (1971), Plant antitumor agents. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*, *J Am Chem Soc* **93**: 2325-2357.

Widholm, J. M. (1972), Use of flourescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant-cells, *Stain Technology* **47**: 189-&.

Wu, J. und Lin, L. (2003), Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction, *Appl Microbio Biot* **62**: 151-155.

Yuan, Y. J., Wei, Z. J., Miao, Z. Q. und Wu, J. C. (2002), Acting paths of elicitors on Taxol biosynthesis pathway and their synergistic effect, *Biochem Eng J* **10**: 77-83.

Zhao, J. L., Zhou, L. G. und Wu, J. Y. (2010), Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures, *Appl Microbiol Biot* **87**: 137-144.

Zhong, J. J. (2002), Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes, *J Biosci Bioeng* **94**: 591-599.

LEBENS LAUF



Persönliche Daten:

Zuname: Schatzl
Vorname: Elisabeth
Familienstand: ledig
Nationalität: Österreich
Geburtsdatum: 04.10.1986
Geburtsort: Gmunden

Bildungsweg:

1993 – 1997 Volksschule Neukirchen bei Altmünster
1997 – 2001 Hauptschule Neukirchen bei Altmünster
2001 – 2006 Höhere Bundeslehranstalt für Sozialmanagement
Bad Ischl
Seit 2006 Studium der Pharmazie an der Fakultät für
Lebenswissenschaften der Universität Wien
März 2012 -
Juli 2012: Durchführung der praktischen Arbeiten der Diplomarbeit
am Department für Pharmakognosie der Universität Wien