



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Elizitierung von „hairy roots“-Kulturen des
Edelweiß` mit abiotischen Faktoren

Verfasserin

Katharina Schmidtbauer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuerin:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Brigitte Kopp

Danksagung

Allen voran möchte ich meiner Betreuerin Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp, die es mir ermöglichte auf diesem interessanten Gebiet meine Diplomarbeit zu schreiben, für die nette Betreuung und die Begutachtung meiner Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Wawrosch, der mir bei meiner praktischen Arbeit immer zur Seite stand und mir stets seine Hilfe anbot. Weiters möchte ich mich bei Herrn Mag. pharm. Dr. Stefan Schwaiger und Herrn Univ.-Prof. Dr. Hermann Stuppner bedanken, welche an der Universität Innsbruck die Analysen meiner Proben vornahmen.

Besonders möchte ich hier auch Florian Gössnitzer erwähnen, der stets ein offenes Ohr für mich hatte und dafür sorgte, dass auch der Spaß im Labor nicht zu kurz kam.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner Ausbildung sowohl finanziell als auch moralisch unterstützten und mir so mein Studium erst ermöglicht haben.

Vor allem möchte ich mich aber bei Michael bedanken. Danke, dass du mich auf diesem Weg immer begleitet, mich so oft ermutigt und mit deiner Liebe immer wieder aufgebaut und zum Lachen gebracht hast.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden und Studienkollegen. Besonders dafür, dass ich mein Studium immer als sehr schöne Zeit in Erinnerung behalten werde.

Abkürzungen

B5	Nährmedium nach Gamborg et al. (1976)
MS	Nährmedium nach Murashige und Skoog (1962)
MS ½	Nährmedium nach Murashige und Skoog (1962) mit halber Konzentration an Makromolekülen
YMB	Nährmedium nach Wright et al. (1930)
MS-Parameter	Massenspektrometer-Parameter
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
DC	Dünnschichtchromatographie
EIC	Extracted Ion Chromatogramm
K30	„hairy roots“ Klonlinie 30
MJ	Methyljasmonat

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1. <i>Leontopodium alpinum</i> (Cass.)	1
1.2. Leoligin	2
1.3. „hairy roots“	5
1.4. Elizitierung	7
1.5. Fragestellung	9
2. Material und Methoden	11
2.1. Pflanzenmaterial	11
2.2. Nährmedien	12
2.3. Kulturbedingungen.....	13
2.4. Elizitierung der „hairy roots“	15
2.5. Analyse der „hairy roots“	16
3. Ergebnisse	21
3.1. Wachstum der „hairy roots“	21
3.2. Vergleich der Inhaltsstoffe von Wurzeln und „hairy roots“	25
3.3. Quantifizierung von Leoligin und Derivaten	30
4. Diskussion	43
5. Zusammenfassung	51
6. Summary	53
7. Literaturverzeichnis	55
Lebenslauf	61

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. *Leontopodium alpinum* (Cass.)

Die Gattung *Leontopodium* (R.Br. ex Cassini) gehört zur Familie der *Asteraceae* und umfasst etwa 30 verschiedene Arten (Blöch et al., 2010). Das Alpen-Edelweiß, *Leontopodium alpinum* (Cass.) oder *Leontopodium nivale* subsp. *alpinum* (Cass) Greuter (Blöch et al., 2010), ist in den Bergregionen Europas beheimatet, vor allem in den Alpen, Karpaten, Pyrenäen, der Tatra und auf den Balkan-Halbinseln (Meusel und Jäger, 1992). Abbildung 1 zeigt *Leontopodium alpinum* (Cass.), das Edelweiß.



Abbildung 1: Edelweiß - *Leontopodium alpinum* (Cass.), Privataufnahme

Weit verbreitete Anwendung findet das Edelweiß in der Volksmedizin. Bereits 1582 gab es erste Aufzeichnungen von Tabernaemontanus über die Anwendung von *Leontopodium*, auch als Löwenfuß oder lat. „Pes leonis“, bezeichnet, zur Behandlung von Durchfall und Ruhr, wobei vor allem die oberirdischen Teile des Edelweiß` angewendet wurden. (Tabernaemontanus, 1582) Auf Grund dieser medizinischen Verwendung ist *Leontopodium alpinum* auch häufig unter dem Namen Ruhrkraut (Speroni et al., 2006) oder Bauchwehblume (Dweck, 2004) bekannt. In Tirol wurde das Edelweiß

Einleitung und Problemstellung

außerdem zur Behandlung von Bronchitis, Angina und Tonsillitis oder als Antipyretikum eingesetzt (Knechtl, 1992; Wieser, 1995; Pickl-Herck, 1995).

Seit 1886 steht das Edelweiß in Österreich unter Naturschutz und auch in Deutschland, Italien und Liechtenstein ist die Pflanze geschützt (Dobner et al., 2004; Hook, 1993).

Zu den Inhaltsstoffen zählen unter anderem Sesquiterpene (Dobner et al., 2003; Comey et al., 1999; Schwaiger et al., 2004; Stuppner et al., 2002), Diterpene (Schwaiger et al., 2004), Lignane (Dobner et al., 2003; Schwaiger et al., 2004), Benzofurane (Dobner et al., 2003), phenolische Strukturen (Schwaiger et al., 2005), Tannine, Flavonoide und Cumarine (Dweck, 2004).

1.2. Leoligin

Die Verbindung Leoligin (IUPAC: [(2S,3R,4R)-4-(3,4-dimethoxybenzyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)tetrahydrofuran-3-yl]methyl(2Z)-2-methylbut-2-enoat) bildet das Hauptlignan in der Wurzel des Edelweiß, welches 2003 erstmals isoliert und identifiziert wurde (Abb. 2). Es handelt sich hierbei um einen sekundären Metaboliten, der in den Wurzeln von *Leontopodium alpinum* und *L. leontopodioides* nachgewiesen werden konnte (Dobner et al., 2003).

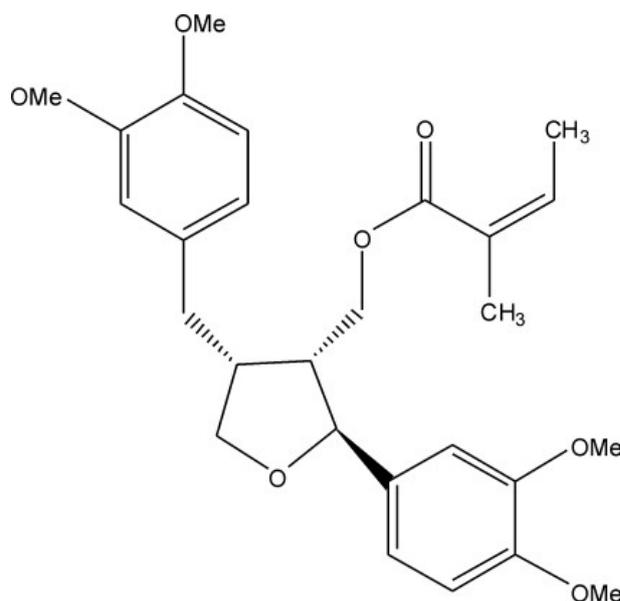


Abbildung 2: Struktur des Lignans Leoligin aus *Leontopodium alpinum* (Cass.)

In darauffolgenden Untersuchungen konnten dieser Substanz eine Reihe von pharmakologischen Wirkungen zugeordnet werden. Es wurde beispielsweise die entzündungshemmende Wirkung von verschiedenen Extrakten des Edelweiß` auf Krotonöl-induzierte Ohrödeme von Mäusen untersucht. Dabei zeigten vor allem mittels Dichlormethan hergestellte Extrakte - sowohl der oberirdischen Teile als auch die der Wurzeln - eine dosisabhängige antiinflammatorische Aktivität. Bei der Untersuchung von einzelnen isolierten Reinstoffen konnte für mehrere Inhaltsstoffe, darunter auch Leoligin, eine antiödematöse Aktivität nachgewiesen werden. Die Ödemreduktionsrate der verschiedenen Stoffe lag dabei zwischen 28% und 50% gegenüber dem unbehandelten Mäuseohr, wobei mit Leoligin in einer Konzentration von $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Reduktion von 49% erreicht werden konnte, welche durchaus mit der Wirkung von Indomethacin (Reduktion von 56% mit $c=100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) vergleichbar ist (Dobner et al., 2004).

Weiters wurde der Einfluss auf die Leukozyteninfiltration im Mäuseohr untersucht, hierbei zeigte Leoligin jedoch keinen signifikanten Effekt. Auch der Einfluss auf die fMLP- (N-Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin) beziehungsweise IL-8 induzierte Chemotaxis wurde betrachtet, wobei einige Inhaltsstoffe Aktivität zeigten, Leoligin allerdings nicht. (Dobner et al., 2004).

In weiterführenden Versuchen mit humanen neutrophilen Granulozyten konnte auch der Effekt von Leoligin auf den Arachidonsäuremetabolismus gezeigt werden, das Lignan führte dabei in einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ zu einer Reduktion der LTB₄-Synthese von $92 \pm 11\%$. Für das Derivat 5-Methoxyleoligin konnte ebenfalls eine Wirkung nachgewiesen werden, allerdings war der gemessene Effekt ($c=25 \mu\text{M}$) mit einer Reduktion von $24 \pm 2\%$ deutlich geringer als jener von Leoligin. 5,5'-Dimethoxyleoligin zeigte nahezu keine Aktivität und auch hatte keine der untersuchten Substanzen einen erkennbaren Effekt auf COX-1 und COX-2 (Schwaiger et al., 2004).

Einleitung und Problemstellung

Vor nicht allzu langer Zeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei Leoligin um eine sehr interessante Substanz für die Behandlung koronarer Gefäßkrankheiten handelt (Reisinger et al., 2009).

Eine Möglichkeit in der Behandlung der koronaren arteriellen Krankheit stellt neben der PTCA (Perkutane transluminale Koronarangioplastik) die koronare Bypassoperation dar. Bei derartigen Eingriffen kommt es jedoch häufig zu Gefäßschäden, verursacht durch den chirurgischen Eingriff oder ischämische Ereignisse, wobei man vermutet, dass dies die Ursache für verschiedene Reparaturprozesse, wie Gefäßremodelling und Intimahyperplasie, und dadurch bedingte Gefäßverengungen ist. Um dies zu verhindern, werden derzeit vor allem Stoffe aus der Krebs- beziehungsweise immunsuppressiven Therapie eingesetzt, welche jedoch häufig schwere Nebenwirkungen haben und außerdem die Regeneration des Endothels beeinträchtigen. Leoligin könnte möglicherweise eine neue Substanz für einen derartigen Einsatz sein. In humanen Organkulturen der Vena saphena führte Leoligin dosisabhängig zu einer Hemmung der Intimahyperplasie, in höherer Dosierung sogar zur Abnahme bereits bestehender Gefäßverdickungen. An einem Mäusemodell konnte diese positive Wirkung auch *in vivo* bestätigt werden. Leoligin verursachte außerdem keine Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion und des Weiteren konnte weder eine prothrombotische Aktivität nachgewiesen werden, noch hatte Leoligin einen (messbaren) toxischen oder zelltodinduzierenden Effekt auf das Endothel (Reisinger et al., 2009). Der genaue Wirkmechanismus der Substanz auf die Regulation des Zellzyklus soll nun weiter erforscht werden und auch die Verwendung von Leoligin und Derivaten in sogenannten „drug eluting stents“, als Wirkstoff auf Bypass-Transplantaten und zur Behandlung von Gefäßwandverdickungen wurde bereits zum Patent angemeldet (Stuppner et al., 2009).

Vor kurzem konnte ein Effekt von Leoligin auf das Cholesteryl-Ester-Transfer-Protein (CETP) nachgewiesen werden. CETP spielt eine entscheidende Rolle im Lipoproteinmetabolismus und gilt als mögliches Target für Arzneistoffe zur Behandlung von Dyslipidämien. Probucol, eine Substanz die für einige Jahre als Lipidsenker am Markt war, senkt beispielsweise die Konzentration und Aktivität von CETP, wodurch vor allem

bei Patienten mit homozygoter familiärer Hypercholesterinämie eine Senkung des Cholesterinspiegels erreicht werden konnte. Auf Grund schwerwiegender Nebenwirkungen ist der Arzneistoff in Europa jedoch nicht mehr am Markt. Auch Leoligin hatte in den von Duwensee et al. (2011) durchgeführten Untersuchungen einen Einfluss auf CETP. So wurde durch nanomolare Leoligin-Konzentrationen die CETP-Aktivität sowohl bei Versuchen *ex vivo* als auch *in vivo* eindeutig erhöht, während in höheren Konzentrationen von 1 mM die CETP-Aktivität gesenkt wurde. Auf Grund der beobachteten Wirkung auf CETP könnte Leoligin eine potenzielle Verbindung zur Behandlung von Dyslipidämien sein, bedarf aber noch ausführlicherer Untersuchungen durch weitere Studien (Duwensee et al., 2011).

1.3. „hairy roots“

Die „hairy-roots-disease“ ist eine Krankheit, die in Pflanzen durch das gram-negative Bodenbakterium *Agrobacterium rhizogenes* verursacht wird. Als Folge dieser Infektion kommt es an der betroffenen Stelle zu vermehrter Wurzelbildung, den sogenannten „hairy roots“ (Dingermann und Zündorf, 1999; Riker et al., 1930). Diese „hairy roots“ produzieren Substanzen, die als Opine bezeichnet werden und dem *Agrobacterium* als Nahrung dienen (Weising und Kahl, 1996).

„Hairy roots“ bilden auch sekundäre Metaboliten und stellen ein sehr viel versprechendes System zur Gewinnung dieser dar (Giri und Narasu, 2000), da sie verglichen mit normalen Wurzelkulturen beziehungsweise undifferenzierten Geweben eine Reihe von Vorteilen aufweisen: Sie haben meist eine höhere Wachstumsrate als normale Wurzeln und können auch auf hormonfreiem Nährmedium kultiviert werden. Im Gegensatz zu normalen Wurzeln produzieren „hairy roots“ häufig über eine längere Periode sekundäre Metaboliten und die transformierten Wurzeln sind hoch differenziert, sowie genetisch stabil. Undifferenzierte Zellkulturen hingegen neigen häufiger zu genetischen Veränderungen (Guillon et al., 2007; Shanks und Morgan, 1999; Hu und Du, 2006).

Einleitung und Problemstellung

Entstehung von „hairy roots“

Wenn Pflanzen verwundet werden, produzieren die verletzten Zellen verschiedene phenolische Substanzen, wie zum Beispiel Acetosyringon (Abb. 3).

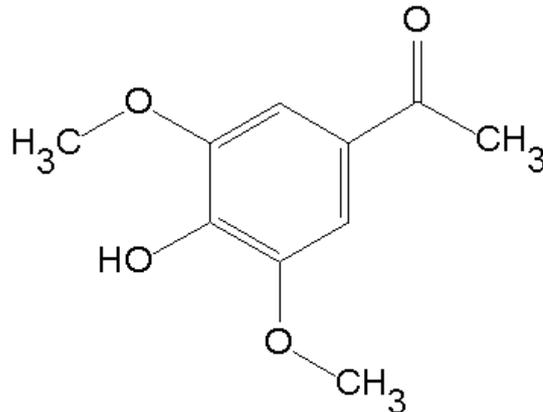


Abbildung 3: Chemische Struktur des chemotaktischen Stoffes Acetosyringon

Das durch die chemotaktische Wirkung dieser Stoffe angelockte *Agrobacterium* dringt in das verletzte Gewebe ein und verursacht in der Folge die „hairy root-disease“. Das große root inducing Plasmid (Ri-Plasmid) des Bakteriums besitzt zwei für die Infektion wichtige Regionen, die vir-Region (=virulence Region) und die T-DNA. Acetosyringon und andere von der Pflanze freigesetzte phenolische Stoffe induzieren die Transkription der vir-Gene des *Agrobacteriums*, diese wiederum codieren für den Transfer der T-DNA vom Plasmid in die verletzte Pflanzenzelle. Die T-DNA wird dann in das Genom der infizierten Pflanze integriert und in der Folge bildet die genetisch veränderte Pflanzenzelle transformierte Wurzeln, die „hairy roots“, aus. In diesen werden, wie bereits beschrieben, neben den sogenannten Opinen, die den Bakterien als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dienen, auch verschiedene sekundäre Metaboliten produziert (Georgiev et al., 2007; Giri und Narasu, 2000).

Um gezielt „hairy roots“ zu generieren, werden zum Beispiel Blattnerven der Pflanzen mit einem Skalpell verletzt und mit *Agrobacterium rhizogenes* inokuliert. Nach der Infektion entstehen an der Infektionsstelle „hairy roots“,

welche dann auf festem oder in flüssigem Medium kultiviert werden (Guillon et al., 2006; Hamill und Lidgett, 1997).

1.4. Elizitierung

Pflanzen weisen viele verschiedene Abwehrmechanismen gegen pathogene Angriffe auf, welche in konstitutive und induzierte Abwehrsysteme eingeteilt werden. Induzierbare Abwehrreaktionen werden dabei durch verschiedene chemische Faktoren, den sogenannten Elizitoren, ausgelöst. Als Elizitoren bezeichnet man also ganz allgemein Substanzen, die in Pflanzen irgendeine Art von Abwehrreaktion hervorrufen (Angelova et al., 2006).

Die Klassifizierung der Elizitoren erfolgt entweder auf Grund ihrer Struktur oder ihrer Herkunft, wobei bezüglich der Herkunft zwischen abiotischen und biotischen Elizitoren unterschieden wird. Biotische Stoffe haben einen biologischen Ursprung und werden manchmal auch als endogene Elizitoren bezeichnet. Diese biotischen Elizitoren wurden bereits in den 1970er Jahren erstmals in der Literatur beschrieben und es kann sich dabei einerseits um chemisch definierte Strukturen handeln, wie zum Beispiel Chitosan, Pektin oder Alginat. Der Elizitor kann allerdings auch eine sehr komplexe Zusammensetzung aus mehreren verschiedenen Molekülklassen haben, wie etwa Hefeextrakte oder Pilzsporen. Abiotische Elizitoren haben keinen biologischen Ursprung und werden eingeteilt in physikalische Faktoren, zum Beispiel thermischer oder osmotischer Stress (z.B. durch erhöhte Saccharosekonzentrationen), und chemische Faktoren, wie etwa Schwermetallsalze (Keen, 1975; Vasconsuelo und Boland, 2007).

Da in dieser Arbeit der Einfluss von abiotischen Faktoren, namentlich Silberionen und Saccharose, auf „hairy roots“ untersucht wurde, sollen ähnliche Versuche an dieser Stelle eingehender erläutert werden.

Mit Silberionen als Elizitor konnte beispielsweise die Produktion von sekundären Metaboliten in „hairy roots“-Kulturen von *Salvia miltiorrhiza* (Bunge) stimuliert werden. Hierbei handelt es sich um eine bekannte chinesische Arzneipflanze, die unter anderem bei menstruellen

Einleitung und Problemstellung

Beschwerden und Entzündungen eingesetzt wird, wobei vor allem Diterpene, die sogenannten Tanshinone, für diese Wirkungen verantwortlich sind. In von Zhang et al. (2004) durchgeführten Versuchen konnte durch unterschiedliche Silberionenkonzentrationen, zugesetzt in Form von $\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3$, die Tanshinonproduktion in den „hairy roots“ gesteigert werden. Elizitiert wurde mit 15 μM , 30 μM oder 45 μM Silberthiosulfatlösung, wobei durch die Elizitierung mit einer Konzentration von 30 μM die Tanshinonbildung am stärksten stimuliert werden konnte. Die hier gemessene Gesamttanshinonkonzentration war zirka 3,5-fach höher als in der Kontrollprobe, welcher keine Silberionen zugesetzt wurden. Die Behandlung mit Silberionen beeinträchtigte jedoch abhängig von der verwendeten Dosis das Wachstum der „hairy roots“ (Zhang et al., 2004).

Ein weiteres Beispiel für den erfolgreichen Einsatz von Silberionen als Elizitor ist ein Versuch zur Steigerung der Silymarinproduktion in „hairy roots“-Kulturen von *Silybum marianum* (L.).

Bei Silymarin handelt es sich um ein Gemisch aus Silybin, Isosilybin, Silydianin, Silycristin und Taxifolin, welches in den Früchten der Mariendistel (*Silybum marianum* L.) enthalten ist und eine wichtige Arznei zur Behandlung von Lebererkrankungen darstellt. Silymarin wird auch in durch Infektion mit *Agrobacterium rhizogenes* generierten „hairy roots“ gebildet und es konnte gezeigt werden, dass durch Elizitierung mit verschiedenen Konzentrationen von Silbernitrat die Produktion von Silymarin in den „hairy roots“ stimuliert wird. Der erzielte Effekt war von der verwendeten Elizitorkonzentration und Dauer der Behandlung abhängig, wobei die höchsten Silymarinwerte 96 Stunden nach der Elizitierung mit 2 mM Silbernitratlösung gemessen werden konnten. Das Wachstum der „hairy roots“ wurde auch in diesem Versuch durch den Elizitor beeinträchtigt, so war das Trockengewicht der nichtbehandelten Kulturen um 120% höher als das der behandelten (Khalili et al., 2010).

Als zweiter Elizitor wurde für diese Arbeit Saccharose ausgewählt. Zucker, beispielsweise Saccharose, führt zu erhöhtem osmotischen Stress und zählt dadurch zu den abiotischen Elizitoren. Auch hier findet man in der Literatur

einige Beispiele dafür, wie die Produktion verschiedener Metaboliten durch hyperosmotischen Stress, unter anderem durch Saccharose beeinflusst wird. Wie bereits beschrieben, konnte die Tanshinon-Bildung in *Salvia miltiorrhiza* (Bunge) durch Elizitierung von „hairy roots“ mit Silberionen stimuliert werden (Zhang et al., 2004). Shi et al. (2007) zeigten, dass die Tanshinon-Produktion in den „hairy roots“ auch durch hyperosmotischen Stress, verursacht durch Sorbitol, gesteigert werden kann.

Sivakumar et al. (2005) untersuchten den Einfluss von unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen auf „hairy roots“-Kulturen von *Panax ginseng* (C.A. Meyer) und konnten dabei zeigen, dass der gemessene Ginsenosidgehalt bei Zusatz von 2-5% Saccharose ins Nährmedium am höchsten ist.

1.5. Fragestellung

Auf Grund der bereits beschriebenen Wirkungen (vgl. Kapitel 1.2., S. 3-5) handelt es sich bei Leoligin um eine sehr vielversprechende und interessante Substanz bezüglich der Behandlung von koronaren Herzkrankheiten. Das Lignan ist in den Wurzeln des Edelweiß` jedoch nur in sehr geringer Konzentration vorhanden. So liegt der natürliche Gehalt von Leoligin in den Wurzeln von Edelweißkultivaren nur bei etwa 0,01 bis 0,03% (vgl. Kapitel 3.3., S. 30 u. 31), weshalb aus zirka 800 g luftgetrockneter Wurzeln durch Extraktion mit Dichlormethan und Methanol auch bloß ca. 40 mg Leoligin isoliert werden konnten (Dobner et al., 2003). Da eine chemische Synthese bislang noch nicht beschrieben wurde, kann Leoligin derzeit ausschließlich durch Isolierung gewonnen werden.

„Hairy roots“ haben häufig eine höhere Wachstumsrate als normale Wurzeln, daher könnten mit diesen Kulturen eventuell größere Mengen an Leoligin in kürzerer Zeit gewonnen werden.

Im Zuge dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob in den durch Infektion mit *Agrobacterium rhizogenes* generierten „hairy roots“ tatsächlich Leoligin enthalten ist, und wenn ja, in welchen Mengen. Weiters sollte das Inhaltsstoffspektrum der „hairy roots“ mit dem der Edelweißwurzel verglichen

Einleitung und Problemstellung

und chemisch analysiert werden, ob in ihnen andere, bisher unbekannte Lignane oder Verbindungen, die in Edelweißwurzeln nicht enthalten sind, gebildet werden.

Zunächst sollten daher die 32 zur Verfügung stehenden „hairy roots“-Klonlinien vermehrt und bezüglich ihres Wachstums beurteilt werden, zudem sollte untersucht werden, ob Leoligin auch ins Nährmedium abgegeben wird und dort nachgewiesen werden kann.

Nach Klärung der Frage, ob Leoligin in den „hairy roots“ tatsächlich enthalten ist, sollte die Auswirkung verschiedener abiotischer Faktoren auf das Inhaltsstoffspektrum untersucht werden. Besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die Veränderung der Leoliginkonzentration gelegt werden.

Wie bereits eingangs (vgl. Kapitel 1.4., S. 7-9) beschrieben, kann durch verschiedene Elizitoren die Produktion von sekundären Metaboliten in Pflanzen angeregt werden. Es sollte geklärt werden, ob auch die Leoliginproduktion in „hairy roots“-Kulturen des Edelweiß` durch Elizitierung stimuliert wird.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

„hairy roots“

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene „hairy roots“-Linien von *Leontopodium alpinum* (Cass.) verwendet.

Diese wurden, wie von Kristina Ondratschek (2012) in ihrer Diplomarbeit „*In vitro* Kultivierung von *Leontopodium alpinum* Cass.“ beschrieben, durch Infektion von Blättern des Edelweiß` mit *Agrobacterium rhizogenes* generiert (Abb. 4).

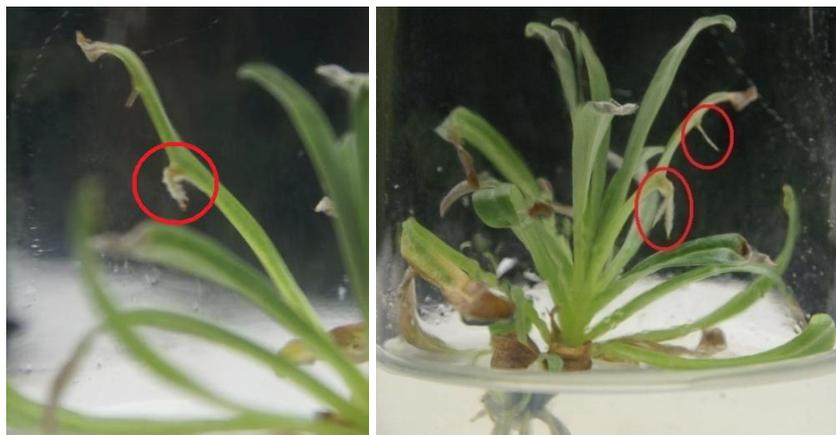


Abbildung 4: Bildung von „hairy roots“ an *Leontopodium alpinum* nach Infektion mit *Agrobacterium rhizogenes* (Ondratschek, 2012)

Von Ondratschek wurden für die vorliegende Arbeit 32 verschiedene „hairy roots“-Klonlinien übernommen, welche jeweils in drei verschiedenen Nährmedien kultiviert worden waren (Abb. 5, S. 12). Als Ausgangsmaterial für die Generierung von Edelweißsprosskulturen verwendete Ondratschek Samen von *Leontopodium alpinum* Cass. der Firma Austro Saat AG (Wien, Österreich) und der Firma Jelitto Staudensamen GmbH (Schwarmstedt, Deutschland). Aus diesen Sprosskulturen entstanden in der Folge durch die Infektion mit drei verschiedenen Stämmen von *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC15834, LBA9402 und TR105) 32 „hairy roots“-Klonlinien (Ondratschek 2012).

Material und Methoden

Von diesen 32 erhaltenen „hairy roots“-Linien wurde schließlich jener Klon mit dem besten Wachstum ausgewählt, welcher im Folgenden als Klon K30 bezeichnet wird. Diese Klonlinie (K30) entstand durch Infektion mit dem Bakterienstamm LBA9402.

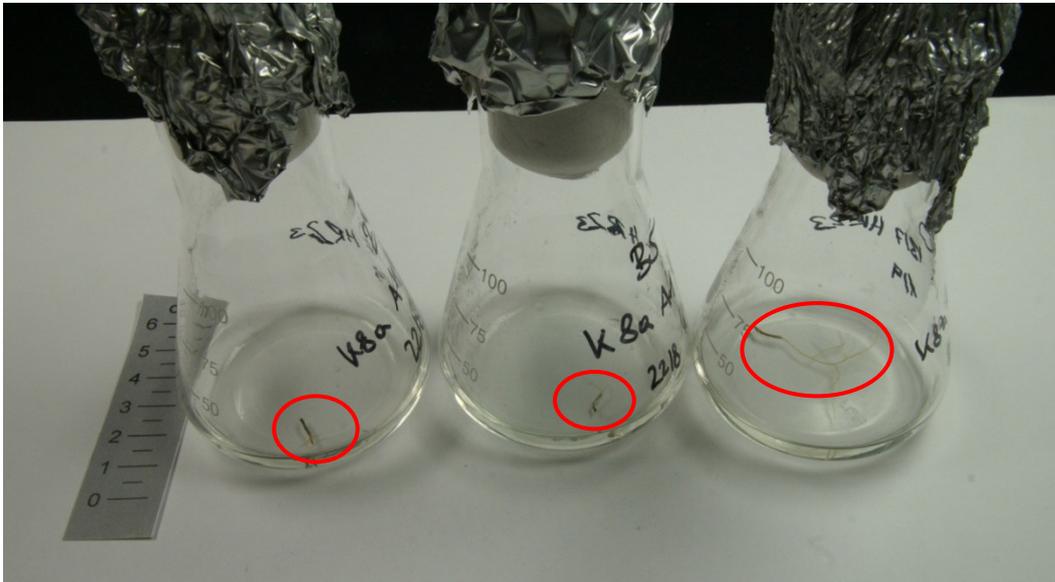


Abbildung 5: Eine von Ondratschek zur Verfügung gestellte „hairy roots“-Klonlinie von *L. alpinum* in den Nährmedien $\frac{1}{2}$ MS, B5 und MS (vgl. Kapitel 2.2.)

Wurzelmaterial

Bei den durchgeführten chemischen Analysen wurden der Gehalt und die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe von „hairy roots“ (Klon K30) und Wurzeln von *Leontopodium alpinum* verglichen. Die verwendeten Wurzeln stammten von Edelweißkultivaren aus Feldkultur (Klon 9 und Klon 44), welche freundlicherweise vom Schweizer Institut Mediplant zur Verfügung gestellt wurden.

2.2. Nährmedien

Die Kultivierung der 32 Wurzelklone erfolgte zunächst in jeweils drei verschiedenen Nährmedien. Verwendet wurden hierbei flüssiges MS-Medium nach Murashige und Skoog (1962) beziehungsweise $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 1% Saccharose und nur halber Konzentration an Makroelementen, sowie das

Medium B5 (Gamborg et al., 1976). Dieses unterscheidet sich nicht nur in seiner Zusammensetzung von den beiden anderen Nährmedien, sondern weist vor allem eine höhere Stickstoffkonzentration auf. In der Folge wurden bloß die in MS-Medium kultivierten „hairy roots“ vermehrt, da diese das beste Wachstum zeigten (vgl. Kapitel 4., S. 44 und 45).

Herstellung der Nährmedien

Etwa ein Drittel der herzustellenden Menge destilliertes Wasser wurde in einem Erlenmeyerkolben mit Makroelementen, Spurenelementen, Vitaminen, Saccharose und Myo-Inosit vermengt. Dabei wurden die Bestandteile in Form von Stammlösungen zugesetzt, welche zuvor durch Auflösen der benötigten Menge an Festsubstanz in destilliertem Wasser hergestellt wurden. Am Ende wurde mit destilliertem Wasser auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und durch Zugabe von HCl beziehungsweise KOH der pH-Wert auf $5,7 \pm 0,1$ eingestellt. Das fertige Nährmedium wurde in Erlenmeyerkolben abgefüllt, diese mit Zellstoffstopfen und Alufolie verschlossen und im Autoklaven bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert. Die Lagerung der abgekühlten Medien erfolgte im Dunklen bei 5°C . Alle verwendeten Bestandteile waren von laborüblichem Reinheitsgrad (p.a. beziehungsweise für biochemische Zwecke), als Kohlenhydratquelle diente handelsüblicher Haushaltszucker.

2.3. Kulturbedingungen

Die „hairy roots“ wurden zu Beginn in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 25 ml Medium kultiviert, später wurden sie auf Grund des Biomassezuwachses in 250 ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 50 ml Nährmedium überimpft und diese mit Zellstoffstopfen und Alufolie verschlossen. Die Kultivierung erfolgte am Rotationsschüttler bei etwa 70 Umdrehungen/Minute im Dunklen und bei einer Temperatur von $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Abb. 6, S. 14).

Material und Methoden

Alle vier Wochen wurden die „hairy roots“ in frisches Medium eingebracht und bei ausreichendem Massenzuwachs weitere Subkulturen generiert.



Abbildung 6: Kultivierung der „hairy roots“ von *L. alpinum* im Dunklen bei 70 Umdrehungen/Minute und 25±1°C

Behandlung mit Antibiotikum

Da einige der übernommenen Kulturen eine Trübung zeigten (Abb. 7, S. 15), lag die Vermutung nahe, dass die zur Infektion verwendeten Agrobakterien trotz der vorangegangenen Antibiotikabehandlung nicht vollständig entfernt werden konnten. Um dies zu überprüfen, wurden mit einer Impföse Stichproben aus den betroffenen Kulturen entnommen und auf festem YMB-Medium (Wright et al., 1930) ausgestrichen, welches aus 0,5 g K_2HPO_4 , 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1g NaCl, 0,4 g Hefeextrakt und 10 g Mannitol in 800 ml Wasser besteht. Zur Herstellung eines Festmediums kann entweder Agar oder Gelrite® verwendet werden, in diesem Fall wurden 7 g/l Agar zugesetzt. Nach Inkubation bei 25°C im Dunklen für zwei Tage zeigte sich tatsächlich eindeutiges Wachstum von Bakterien. Um diese aus den Kulturen zu eliminieren, wurde eine Stammlösung des Antibiotikums Cefotaxim-Natrium (Claforan 1,0 g Trockenstechampullen, Sanofi Aventis, 0,625 g in 5 ml dest. Wasser) hergestellt. Von dieser Lösung wurden jeweils 200 µl zu 50 ml Medium gegeben und die betroffenen „hairy roots“ darin für drei Wochen

kultiviert. Einige der Kulturen zeigten bereits am nächsten Tag eine erneute Trübung und wurden deshalb in frisches antibiotikahaltiges Medium eingebracht.

Nach drei Wochen wurden jene „hairy roots“, welche frei von Bakterien waren, in antibiotikafreies Medium überimpft und in diesem weiterkultiviert.

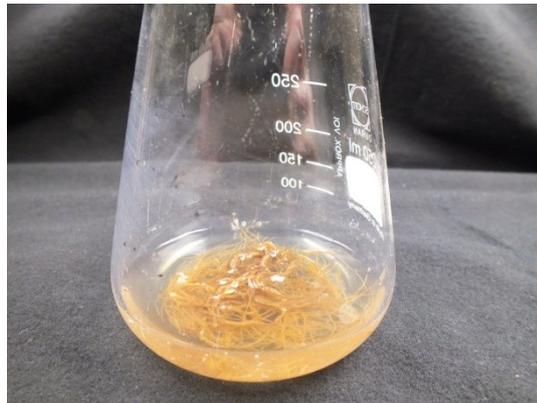


Abbildung 7: Durch eine Infektion getrübe „hairy roots“-Kultur von *L. alpinum*

2.4. Elizitierung der „hairy roots“

Sobald ausreichend Pflanzenmaterial von Klon K30 zur Verfügung stand, konnte mit der Elizitierung begonnen werden, hierbei wurden unterschiedliche Konzentrationen der abiotischen Stoffe Saccharose beziehungsweise Silbernitrat verwendet.

Elizitierung mit Silbernitrat

Durch Lösen von 0,255 g Silbernitrat (AgNO_3 zur Analyse, Bestellnummer A1512, Merck) in 100 ml destilliertem Wasser wurde eine 0,015 molare Stammlösung hergestellt, welche dann in den entsprechenden Konzentrationen dem Nährmedium zugesetzt wurde.

Die Kultivierung der „hairy roots“ erfolgte zunächst in MS-Medium mit einem Animpfgewicht von je 0,7 g. Nach drei Wochen Kultur wurden dann jeweils 50, 100 bzw. 200 μl der Silbernitrat-Stammlösung hinzupipettiert, sodass sich eine Endkonzentration von 15 μmol , 30 μmol beziehungsweise 60 μmol ergab. Die Ernte der „hairy roots“ erfolgte nach einer weiteren Woche Kultur,

Material und Methoden

danach wurden die „hairy roots“ mit Filterpapier trocken getupft, das Frischgewicht bestimmt, bei Raumtemperatur getrocknet und das Trockengewicht ermittelt.

Elizitierung mit Saccharose

Mit handelsüblichem Haushaltszucker wurden MS-Medien mit einer erhöhten Saccharosekonzentration von 5%, 6% beziehungsweise 7% hergestellt. In diese Nährmedien wurden jeweils 0,7 g der „hairy roots“ eingebracht und darin für vier Wochen kultiviert. Danach wurde wiederum das Frischgewicht ermittelt, getrocknet und das Trockengewicht bestimmt.

Für die Elizitierung wurde verglichen mit dem Referenzmaterial (siehe unten) ein höheres Animpfgewicht von 0,7 g gewählt, da durch die zugesetzten Elizitoren eventuell das Wachstum der Kulturen beeinträchtigt werden könnte (Zhang et al., 2004, Khalili et al., 2010). Dadurch sollte sichergestellt werden, dass nach vier Wochen Kultivierung genügend Pflanzenmaterial für eine Analyse vorhanden war.

Referenzmaterial

Als Referenz wurden „hairy roots“, welche auf MS-Medium kultiviert wurden herangezogen, wobei das Animpfgewicht jeweils 0,6 g betrug und die Ernte der „hairy roots“ nach vier Wochen Kultivierung erfolgte.

2.5. Analyse der „hairy roots“

Die folgenden analytischen Untersuchungen wurden freundlicherweise an der Universität Innsbruck am Institut für Pharmazie/Pharmakognosie durch Herrn Dr. Schwaiger durchgeführt:

Vergleich von Wurzeln und „hairy roots“

Ziel der ersten durchgeführten Untersuchungen war ein Vergleich der Inhaltsstoffe von Wurzeln und „hairy roots“ des Edelweiß, *Leontopodium alpinum* (Cass.). Außerdem sollte geklärt werden, ob in den „hairy roots“ von Klon K30 tatsächlich Leoligin beziehungsweise Derivate enthalten sind. Hierfür wurden Dichlormethanextrakte aus beiden Pflanzenteilen hergestellt und mittels HPLC analysiert.

Aufbereitung der „hairy roots“

Etwa 1 g getrocknetes „hairy roots“-Material von Klon K30 wurde in einer Reibeschale mit dem Pistill zerrieben und mit 50,0 ml Dichlormethan versetzt. Diese Mischung wurde in einem Erlenmeyerkolben für 5 Minuten am Ultraschallbad extrahiert, filtriert und danach zur Trockene eingedampft. Der erhaltene Rückstand von 37,6 mg Extrakt - dies entspricht etwa 3,7% der Masse des verwendeten Pflanzenmaterials - wurde in einer entsprechenden Menge Methanol gelöst, um eine Konzentration von 10,00 mg/ml Extrakt zu erhalten. Diese Lösung wurde über Watte filtriert und danach analysiert.

Als Referenz wurde ein tiefgefrorener Dichlormethanextrakt der Wurzeln von *L. alpinum* verwendet. Aus den Edelweißwurzeln wurde durch erschöpfende Mazeration des Pflanzenmaterials ein Extrakt gewonnen aus welchem äquivalent zu den „hairy roots“-Kulturen eine Probenlösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml hergestellt wurde.

Beide Proben wurden mittels DC und HPLC-MS analysiert.

Aufbereitung des Nährmediums

Nach Entnahme der „hairy roots“ für die Analyse wurde das Nährmedium durch Filtration von den Resten der Pflanzen befreit und für die nachfolgende Untersuchung folgendermaßen aufbereitet: Von 150 ml Medium wurden je 50 ml dreimal mit jeweils 50 ml Dichlormethan im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Da jedoch keine optimale Phasentrennung vorlag, wurde

Material und Methoden

nach jedem Ausschüttelungsvorgang 5 Minuten bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert. Die organischen Dichlormethan-Phasen wurden abdekantiert und in einem Erlenmeyerkolben vereinigt. Danach wurde wasserfreies Natriumsulfat zugesetzt, um die letzten Rückstände des Wassers zu eliminieren. Das Natriumsulfat wurde durch Filtration wieder entfernt und die Dichlormethanfraktion am Rotavapor zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 1,00 ml Methanol gelöst und analysiert.

LC-Parameter

Verwendet wurde ein HP 1100 System (Agilent, Waldbronn, Deutschland), ausgestattet mit Autosamplern, Diodenarray-Detektor und Säulenthermostat.

HPLC-Bedingungen: Stationäre Phase: Phenomenex Luna 3 μ C8(2) Säule 100 A (3.00 mm x 150 mm) mit 3 μ m Partikeln; Merck LiChroCART 4-4, LiChrospher 100 RP 18, 5 μ m Vorsäule.

- Flussrate: 0.20 ml/min
- Temperatur: 30°C
- Injektionsvolumen: 5 μ l
- Detektion: UV 205 nm
- Mobile Phase: A = Wasser, B = Acetonitril;
Zusammensetzung: 0 min: 50% A, 50% B; 20 min: 25% A, 75% B;
30 min: 1% A, 99% B; 55 min: Stopp; Posttime: 15 min.

MS-Parameter

Esquire 3000^{plus} (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland); ESI, LC-MS: alternate Modus; HV Kapillare : 4.0 kV, HV end plate offset: -500 V, 350°C; Trockengas: 8.00 l/min; Zerstäuber: 30 psi; Full-Scan-Modus: *m/z* 100-1500.

DC-Parameter

Die DC-Analyse wurde mit Silicagel-60 F254- Platten (VWR Darmstadt, Deutschland) als stationäre Phase durchgeführt.

Als mobile Phase wurde Chloroform verwendet. Die Detektion erfolgte bei UV 254 und 366 nm sowie nach Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz und Erhitzen auf 120°C für 5 Minuten im Vis-Bereich.

Quantifizierung des Leoligins

Für die quantitative Bestimmung von Leoligin und Derivaten in den verschiedenen Proben wurde das Material wie im Folgenden beschrieben aufbereitet und analysiert.

Probenaufbereitung

Das Pflanzenmaterial wurde in der Reibeschale mit einem Pistill zerkleinert, 100 mg Probe wurden in einem Erlenmeyerkolben mit 20.0 ml, gefolgt von 2x 10.0ml Dichlormethan am Ultraschallbad für 10 Minuten extrahiert. Die vereinigten Filtrate wurden am Rotavapor zur Trockene eingedampft und in 1.00 ml Methanol gelöst. Die filtrierte Lösung wurde mittels HPLC analysiert.

LC-Parameter

HP 1100 System (Agilent, Waldbronn, Deutschland), ausgestattet mit Autosampler, Diodenarray-Detektor und Säulenthermostat.

HPLC-Bedingungen: Stationäre Phase: Phenomenex-Luna 3 μ C8(2) 100 A (3.00 mm x 150 mm) mit 3 μ m Partikeln; Merck LiChroCart 4-4, LiChrospher 100 RP 18, 5 μ m Vorsäule.

- Flussrate: 0.30 mL/min
- Temperatur: 30°C
- Injektionsvolumen: 10 μ l
- Detektion: UV 205 nm
- Mobile Phase: A: Wasser; B: Acetonitril;

Material und Methoden

Zusammensetzung: 0 min: 50% A, 50%B; 45 min: 50% A, 50%B

50 min: 1% A, 99%B; 80 min: Stopp; Posttime: 15 min.

Die Quantifizierung der enthaltenen Leoliginmenge erfolgte mittels externen Standards (Abb. 8).

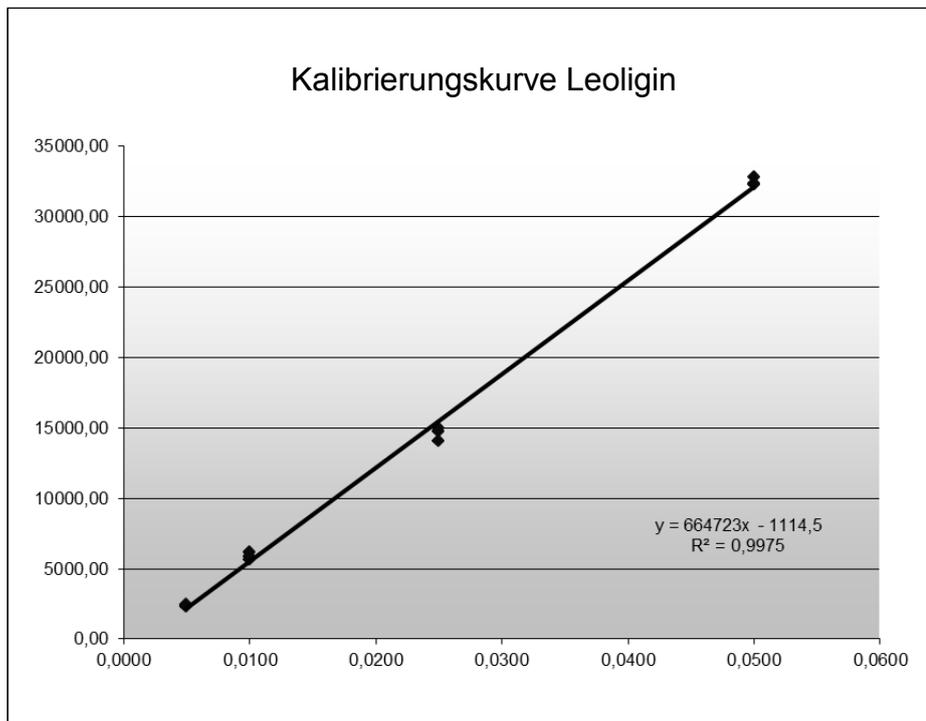


Abbildung 8: Kalibrierungskurve zur Quantifizierung von Leoligin

3. Ergebnisse

3.1. Wachstum der „hairy roots“

Wie bereits beschrieben (Kapitel 2.2., S. 12), wurden zu Beginn 32 verschiedene „hairy roots“-Klonlinien in jeweils drei verschiedenen Nährmedien kultiviert. Da die Kulturen in MS-Medium das beste Wachstum und die höchste Lebendrate aufwiesen, erfolgte die Kultivierung der „hairy roots“ in der Folge nur noch in diesem Nährmedium. Von den ursprünglich 32 Klonlinien wurde schließlich der Klon K30 für die weiterführende Analysen ausgewählt, da von diesem bereits das meiste Material vorhanden und auch das beobachtete Wachstum am stärksten war.

Um den weiteren Versuchsablauf planen zu können beziehungsweise um abzuschätzen, mit welchem Animpfgewicht man welches Endgewicht erhält und wie viel Pflanzenmaterial für die Elizitierung benötigt wird, war es wichtig, den genauen Zuwachs von Klon K30 zu bestimmen. Wie beschrieben (Kapitel 2.3., S. 13 und 14) wurden die „hairy roots“ alle vier Wochen in frisches Nährmedium überimpft, das jeweilige Animpfgewicht lag dabei bei etwa 0,6 g „hairy roots“-Material pro Erlenmeyerkolben. Nach vier Wochen wurde das Frischgewicht aller „hairy roots“-Kulturen ermittelt und aus den erhaltenen Werten der durchschnittliche Biomassezuwachs in Prozent berechnet. Bei Subkultur eins (Abb. 9, S. 22) lag der ermittelte Zuwachs innerhalb von vier Wochen etwas unter 430% vom Animpfgewicht. Aus diesen „hairy roots“ wurden weitere Subkulturen (Abb. 9, S. 22, 2. Subkultur) generiert, erneut mit einem Animpfgewicht von je 0,6 g pro Erlenmeyerkolben. Nach vier Wochen wurde wiederum das Endgewicht bestimmt und ein Zuwachs von durchschnittlich 102% für die zweite Subkultur berechnet. Äquivalent zur zweiten Subkultur wurde die dritte Subkultur gebildet, welche innerhalb von vier Wochen einen Massenzuwachs von ca. 83% des Animpfgewichts zeigte.

Ergebnisse

Wie die folgende Grafik (Abb. 9) nochmals verdeutlicht, war das Wachstum der „hairy roots“ in der ersten Subkultur am größten (etwa 430%). Der ermittelte Massenzuwachs der zweiten Subkultur war deutlich geringer (ca. 102%) und die dritte Subkultur zeigte interessanterweise eine noch geringere Wachstumsrate (etwa 83%). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte einerseits darin liegen, dass die Kulturen zu Beginn in 100 ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 25 ml Nährmedium etabliert, später jedoch in 250 ml Erlenmeyerkolben mit je 50 ml Nährmedium kultiviert wurden. Der dadurch veränderte Gasraum und auch der Unterschied in der Menge des Nährmediums könnte das Wachstum der Kulturen beeinflusst haben. Andererseits musste während der Kultivierung der Standort des Rotationsschüttlers aus organisatorischen Gründen geändert werden, diese äußeren Einflüsse könnten auch eine Ursache für das veränderte Wachstum sein.

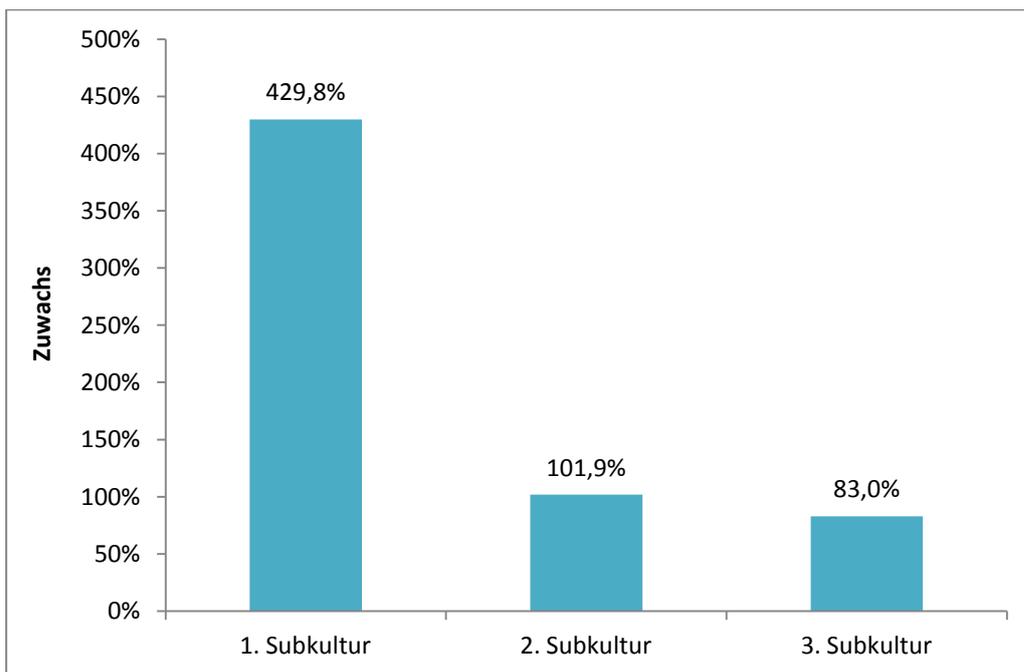


Abbildung 9: Massenzuwachs der „hairy roots“ von *Leontopodium alpinum* in Prozent, nach jeweils vier Wochen Kultur in MS-Medium

Die folgende Abbildung (Abb. 10, S. 23) zeigt Größe und Aussehen der „hairy roots“ zu Beginn dieser Arbeit (Bild links), das rechte Bild zeigt die „hairy roots“ vier Wochen später nach dem Überimpfen in frisches Nährmedium.

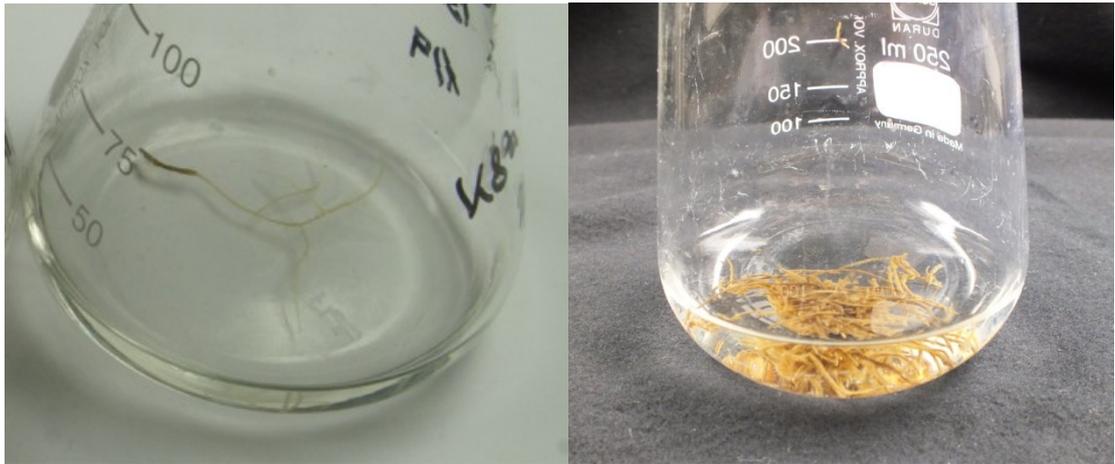


Abbildung 10: „hairy roots“ von *Leontopodium alpinum* zu Beginn der Kultivierung (Bild links) und vier Wochen später nach dem Transfer in frisches Nährmedium (Bild rechts)

Um den Einfluss der verschiedenen Elizitoren auf das Wachstum der „hairy roots“ zu ermitteln, wurde jeweils das genaue Animpfgewicht (ca. 0,7 g) und nach vier Wochen Kultivierung das Frischgewicht und das Trockengewicht bestimmt. Die folgenden Abbildungen zeigen grafisch die Auswirkung der verwendeten Elizitoren auf das Wachstum der „hairy roots“, sowie den Biomassezuwachs der unbehandelten „hairy roots“ in Prozent (Abb. 11, und Abb. 12, S. 24).

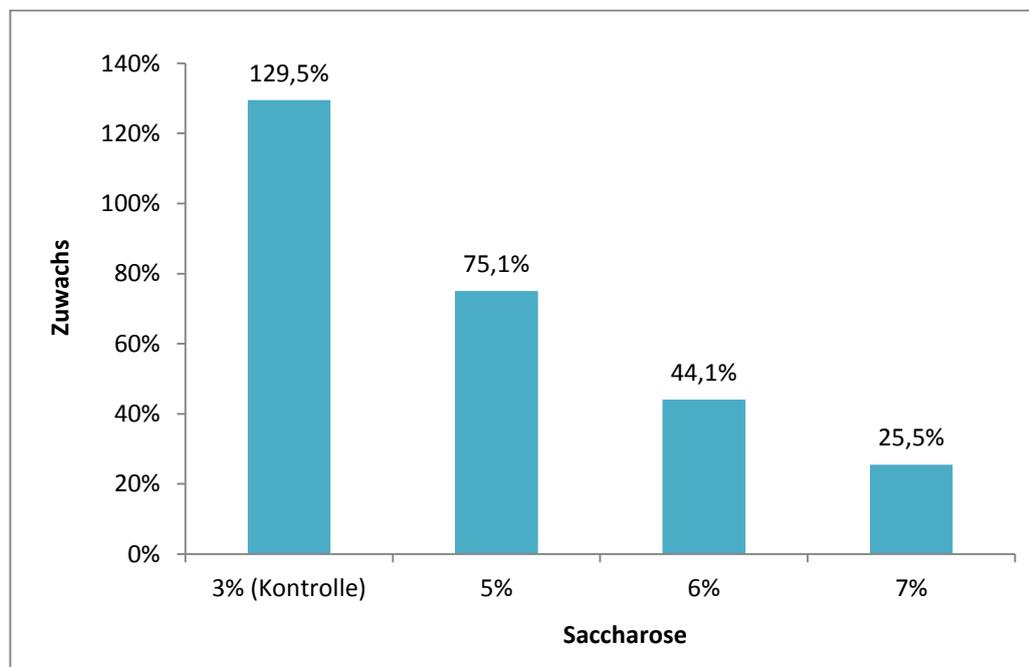


Abbildung 11: Einfluss verschiedener Saccharosekonzentrationen auf das Wachstum der „hairy roots“ von *Leontopodium alpinum*

Ergebnisse

Abbildung 11 (S. 23) veranschaulicht den Einfluss der verwendeten Saccharosekonzentrationen auf das Wachstum der „hairy roots“. Die Grafik zeigt dabei sehr deutlich, dass der Biomassezuwachs innerhalb von vier Wochen umso geringer war, je mehr Saccharose dem Nährmedium zugefügt wurde. So lag der Zuwachs nach Kultivierung in MS-Medium mit 3% Saccharose (Kontrolle) bei etwa 130% vom Ausgangsgewicht, nach der Elizitierung mit 5% Saccharose noch bei 75% und nach der Behandlung mit 6% Saccharose nur noch bei 44%. Jene „hairy roots“, welche in MS-Medium mit 7% Saccharose kultiviert wurden, zeigten mit einem Biomassezuwachs von 26% das geringste Wachstum.

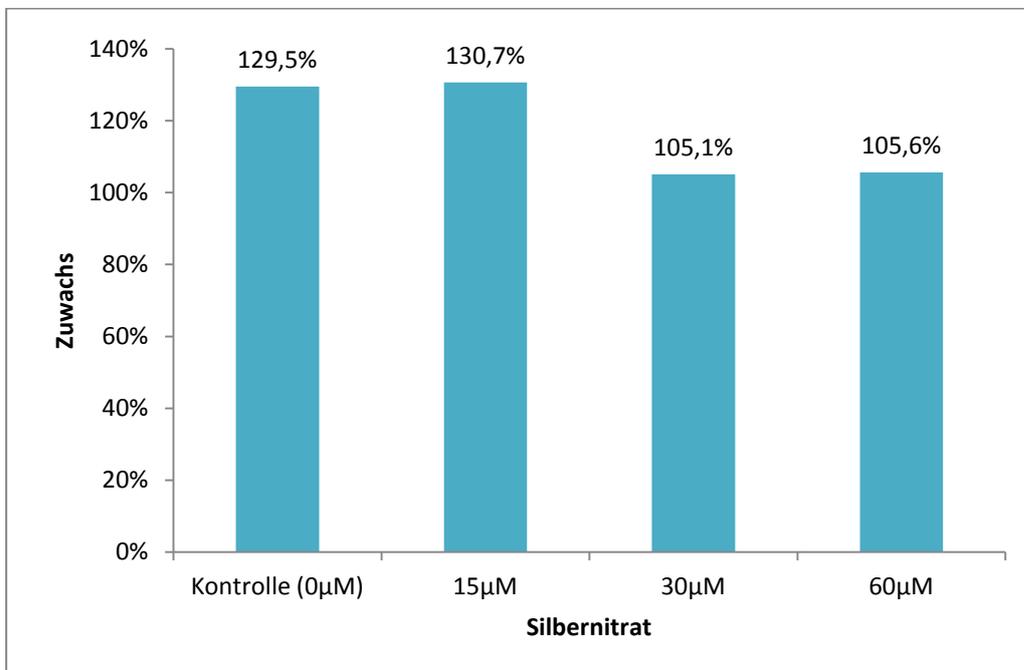


Abbildung 12: Einfluss verschiedener Silbernitratkonzentrationen auf das Wachstum der "hairy roots" von *Leontopodium alpinum*

Der Einfluss der verwendeten Silberionenkonzentrationen auf das Wachstum der „hairy roots“ war nicht so groß wie jener von höheren Mengen Saccharose (Abb. 12). Der beobachtete Zuwachs lag sowohl bei der Kontrolle („hairy roots“ in MS-Medium, unbehandelt) als auch bei jenen Kulturen, welche mit 15 µM Silbernitratlösung behandelt wurden, bei ca. 130%. Mit 30 µM Silbernitratlösung war die Biomassezunahme etwas geringer und lag bei 105%, während die Elizitierung mit 60 µM Silbernitrat zu keiner weiteren Veränderung des Wachstums führte. Der Massenzuwachs,

welcher für diese Kulturen innerhalb von vier Wochen ermittelt wurde, lag ebenfalls bei etwa 105%.

Ein Vergleich der beiden Grafiken (Abb. 11, S. 23 und Abb. 12, S. 24) zeigt, dass das Wachstum von jenen „hairy roots“, welche in Nährmedien mit erhöhter Saccharosekonzentration kultiviert wurden, geringer war als der Zuwachs von jenen Kulturen, denen unterschiedlichen Konzentrationen einer Silbernitratlösung zugesetzt wurden.

3.2. Vergleich der Inhaltsstoffe von Wurzeln und „hairy roots“

Die DC-Analyse (Abb. 13, S. 26) von beiden Extrakten zeigte, dass bei Klon K30 die pink- und blaugefärbten Banden der Referenzprobe (Bild mitte, rechte Bahn) nicht, beziehungsweise nur sehr schwach vorhanden sind. Ursache hierfür könnten einerseits Unterschiede in der Konzentration sein, oder auch die bei Klon K30 angewendete Trocknungsmethode (Lufttrocknung unter dem Abzug), da die verantwortlichen Inhaltsstoffe (Sesquiterpene) wasserdampflich sind.

Interessanterweise zeigte die DC-Analyse von Klon K30 eine markante grau-blaue Bande bei einem R_f -Wert von 78 (Bild rechts, linke Bahn), welche im Chromatogramm des Wurzelextraktes nicht zu erkennen war. Da die entsprechende Bande keine Fluoreszenzlöschung oder Fluoreszenz im UV-Bereich zeigt, handelt es sich, sofern die Bande nicht von einer Verunreinigung stammt, vermutlich um eine terpenoide Struktur.

Ergebnisse

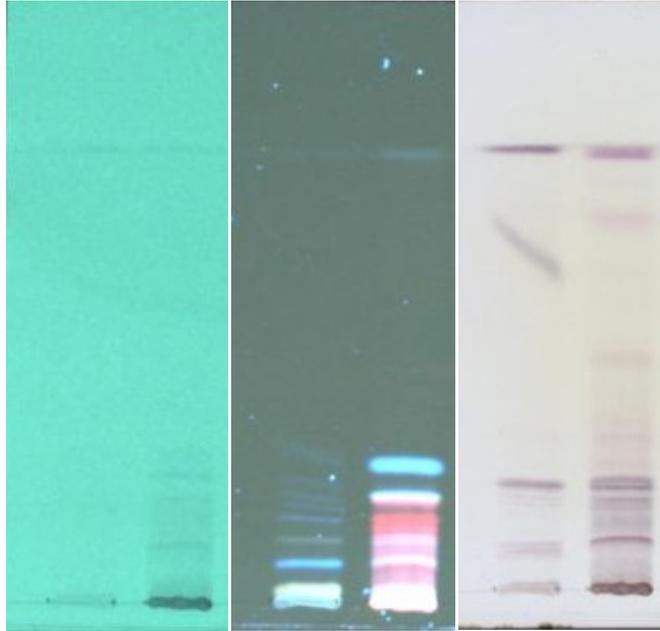


Abbildung 13: DC-Analyse der Extrakte von Klon K30 (linke Bahn) und dem Referenzextrakt (rechte Bahn) von *Leontopodium alpinum* in UV 254 nm, unbehandelt (links), UV 366 nm unbehandelt (Mitte) und nach der Behandlung mit Vanillin-H₂SO₄-Reagenz im Vis-Bereich (rechts)

Der durchgeführte HPLC-Vergleich beider Extrakte (Abb. 14) zeigte weitere Unterschiede:

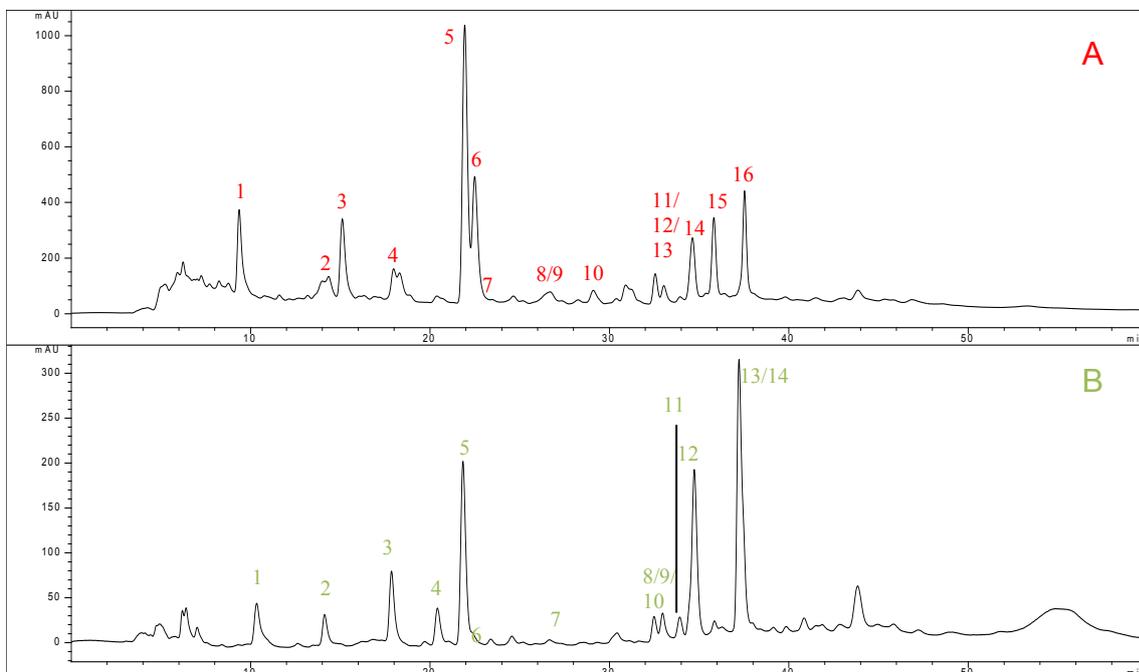


Abbildung 14: Chromatogramm der HPLC-Analyse der Wurzeln von *L. alpinum* (obere Abbildung A) und von Klon K30, „hairy root“-Extrakt (untere Abbildung B), Bedingungen vgl. Kapitel 2.5. (S.19)

Die Peaks, bezeichnet mit den Nummern 1 bis 3 (Abb. 14, S. 26, rot), sind die Cumarine 5-Hydroxyobliquin, 5-Methoxyobliquin und Obliquin welche im Wurzelextrakt von *Leontopodium* enthalten, im Extrakt von Klon K30 jedoch nicht nachweisbar sind. Die Verbindungen 1 und 2 von Klon K30 (Abb. 14, S. 26, grün), welche im positiven Modus bei einem m/z von 251 und 219 detektiert wurden, stimmen mit keinem der bekannten Inhaltsstoffe von *L. alpinum* überein.

Peak 3 von Klon K30 (Abb. 14, S. 26, grün) ist identisch mit dem ersten Teil von Peak 4 (Abb. 14, S. 26, rot) der Referenzprobe, welcher 4-Norleoligin entspricht, während der zweite Teil von Peak 4 (Abb. 14, S. 26, rot) mit 5'-Hydroxy-5-methoxyleoligin korrespondiert.

Die Verbindung 4 von Klon K30 (Abb. 14, S. 26, grün) zeigte ein Signal im positiven Modus bei einem m/z von 381 ($[M+Na]^+$) sowie 397 ($[M+K]^+$) und stimmt mit keinem der bekannten Inhaltsstoffe von *L. alpinum* überein. Dem beobachteten Online-UV-Spektrum zufolge scheint die Substanz zur Klasse der Lignane zu gehören.

Die Peaks 5 und 6 beider Extrakte wurden als Leoligin und 5-Methoxyleoligin identifiziert. Das Lignanderivat 5,5'-Dimethoxyleoligin (Peak 7, Abb. 14, S. 26, rot) konnte ausschließlich im Referenzextrakt nachgewiesen werden.

Da die weiteren Inhaltsstoffe lediglich in geringer Menge vorliegen beziehungsweise um eine Koelution von Inhaltsstoffen auszuschließen, wurden „Extracted Ion Chromatogramme“ (EIC) der bekannten Inhaltsstoffe gemacht und verglichen. Die Resultate werden in den Abbildungen 15 und 16 (S. 28 und 29) gezeigt, wobei dieselbe Nummerierung verwendet wird wie in Abbildung 14, S. 26.

Ergebnisse

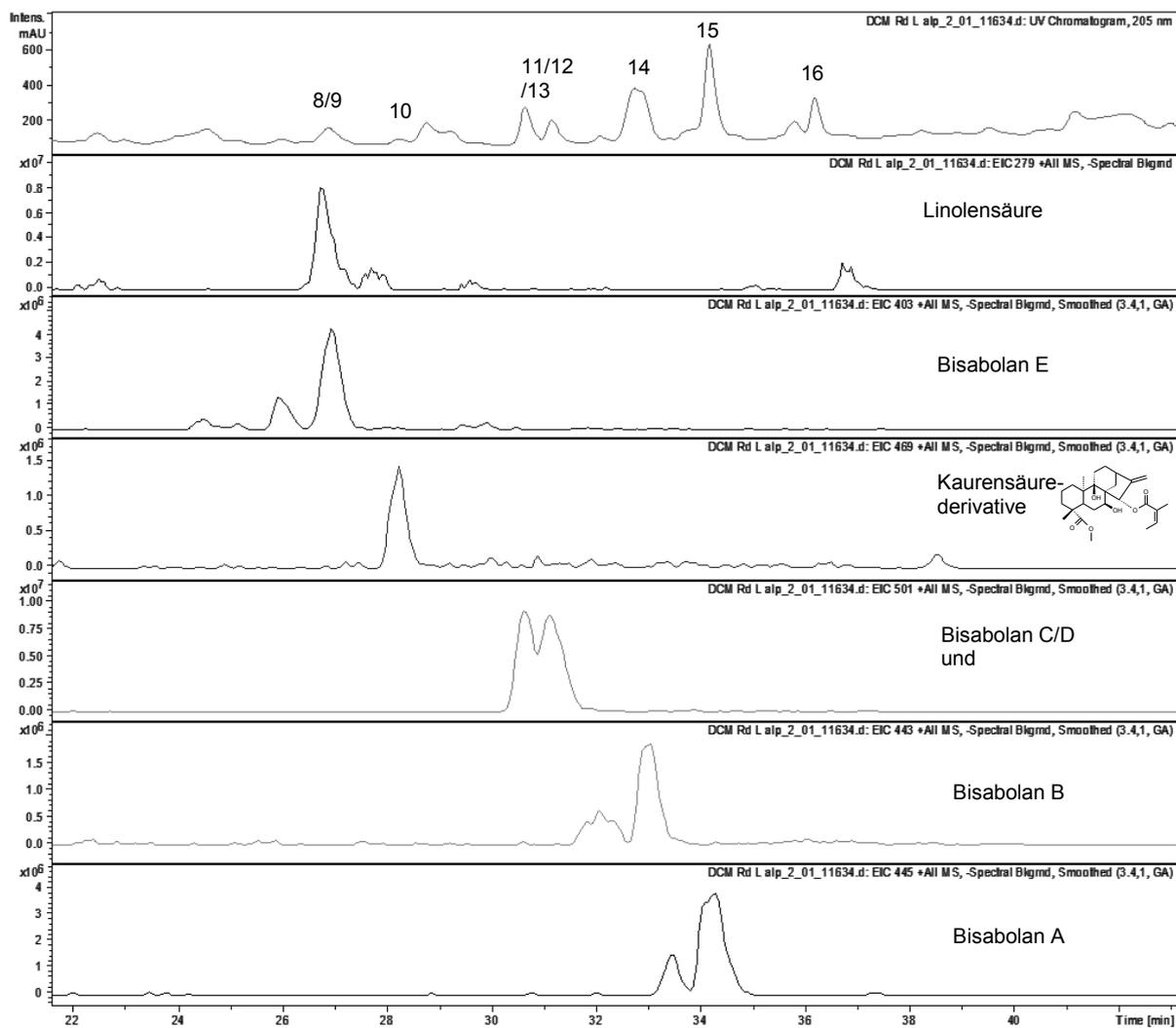


Abbildung 15: UV-Chromatogramm und EIC der LC/MS-Analyse eines Wurzelextrakts von *L. alpinum*. Verbindung 16 zeigte weder Ionisation noch ein spezifisches LC-Online-UV-Spektrum, aber korrespondiert mit den bekannten Sesquiterpenacetaten

Ergebnisse

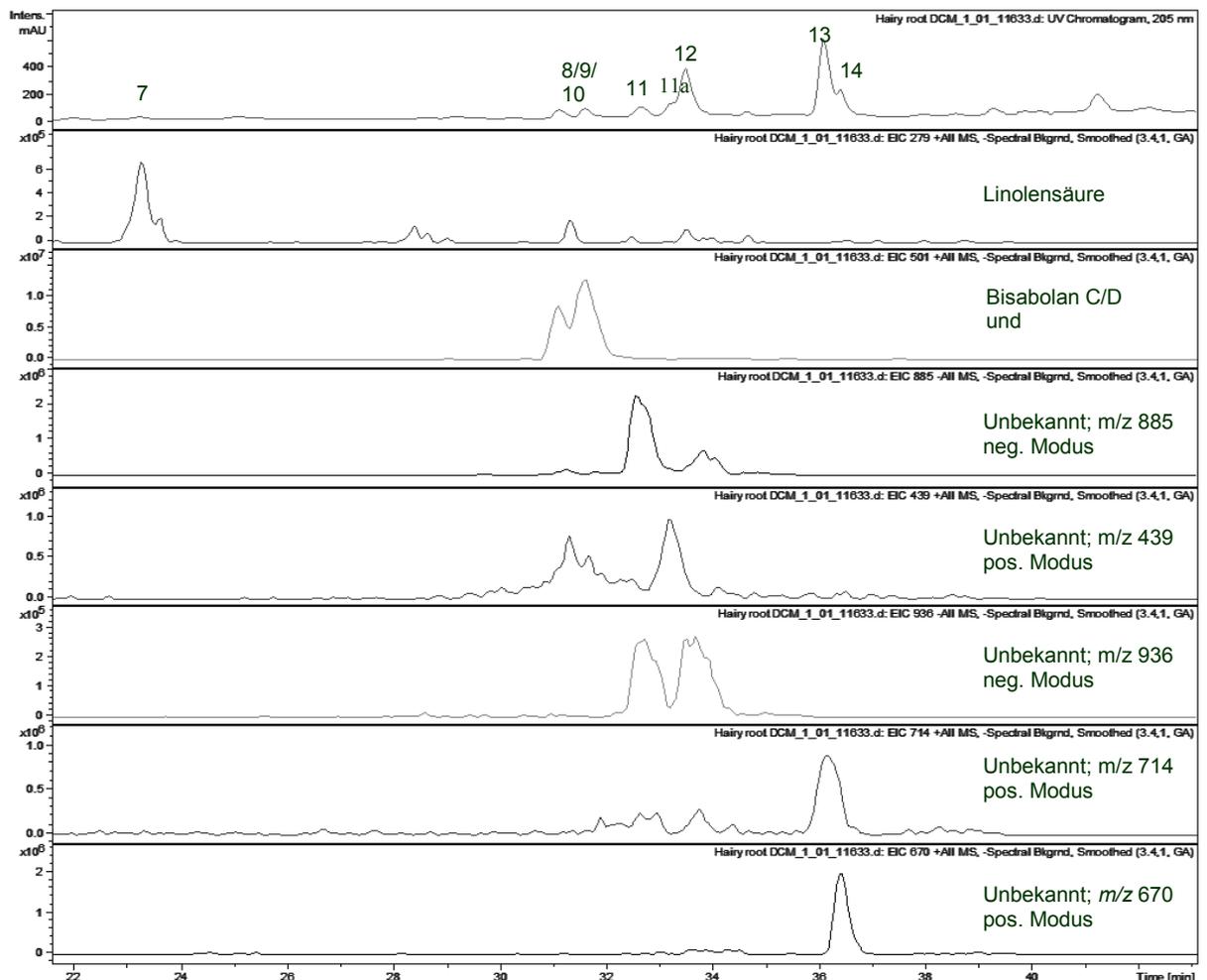


Abbildung 16: UV-Chromatogramm und EIC der LC/MS-Analyse von K30, einem „hairy root“-Extrakt von *Leontopodium alpinum*

Die erhaltenen Ergebnisse zusammenfassend, lässt sich folgendes feststellen: Beide Extrakte enthalten die Lignanderivate 4-Nor-leoligin, Leoligin und 5-Methoxyleoligin, Linolensäure sowie eine Diastomerenmischung von Bisabolan C und D. Interessanterweise fehlen im Extrakt der „hairy roots“ die bekannten Cumarine und Kaurensäurederivate als auch die Bisabolanderivate A, B und E.

Der Unterschied, welcher bezüglich der Lignanderivate 5'-Hydroxy-5-methoxyleoligin und 5,5'-Dimethoxyleoligin beobachtet werden konnte (Abb. 14, S. 26), wurde möglicherweise auch durch Konzentrationsunterschiede in der Wurzel und den „hairy roots“ verursacht. Der Extrakt von Klon K30 enthält außerdem verschiedene zusätzliche Verbindungen, welche in den Wurzeln des Edelweiß nicht enthalten sind

Ergebnisse

(Substanz 1, 2, 4, 11-14). Die Struktur dieser Verbindungen war mit HPLC-MS alleine jedoch nicht bestimmbar.

3.3. Quantifizierung von Leoligin und Derivaten

Als Referenz wurde ein Extrakt aus Wurzelmaterial von *Leontopodium alpinum* herangezogen (Klon 44, vgl. Kapitel 2.1., S. 12). Beim Vergleich des mittels HPLC-UV-Analyse erhaltenen Chromatogramms von Klon 44 mit dem einer Testmischung (Leoligin, 5-Methoxyleoligin und 5,5'-Dimethoxyleoligin) konnte gezeigt werden, dass in diesem Extrakt sowohl Leoligin als auch die Derivate 5-Methoxyleoligin und/oder 5,5'-Dimethoxyleoligin enthalten sind. Eine Trennung dieser beiden Leoliginderivate war mittels der durchgeführten HPLC-UV-Analyse nicht möglich (Abb. 17).

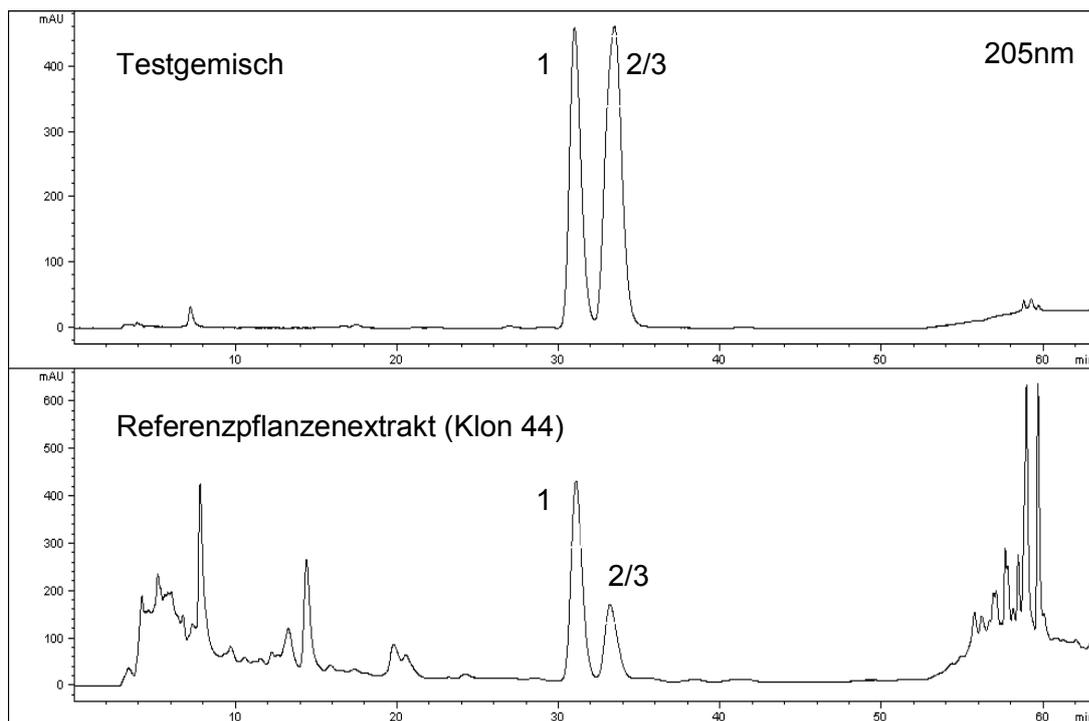


Abbildung 17: Chromatogramme der LC-Analyse eines Testgemisches von Leoligin (1), 5-Methoxyleoligin (2) und 5,5'-Dimethoxyleoligin (3) sowie von Klon 44 von *L. alpinum* als Referenzpflanzenextrakt

Die HPLC-UV-Analyse des Wurzelmaterials eines anderen Edelweißklons (Klon 9) zeigte, dass auch in diesem sowohl Leoligin als auch 5-Methoxyleoligin und/oder 5,5'-Dimethoxyleoligin enthalten sind. Im

Vergleich mit Klon 44 ($c=0,0107\%$) war der Leoligingehalt im Wurzelextrakt von Klon 9 etwa dreifach höher ($c=0,0386\%$) (Abb. 18 und 19).

Der Vergleich der beiden Chromatogramme verdeutlicht, dass sich auch der Leoligingehalt von verschiedenen Edelweißkultivaren stark unterscheiden kann.

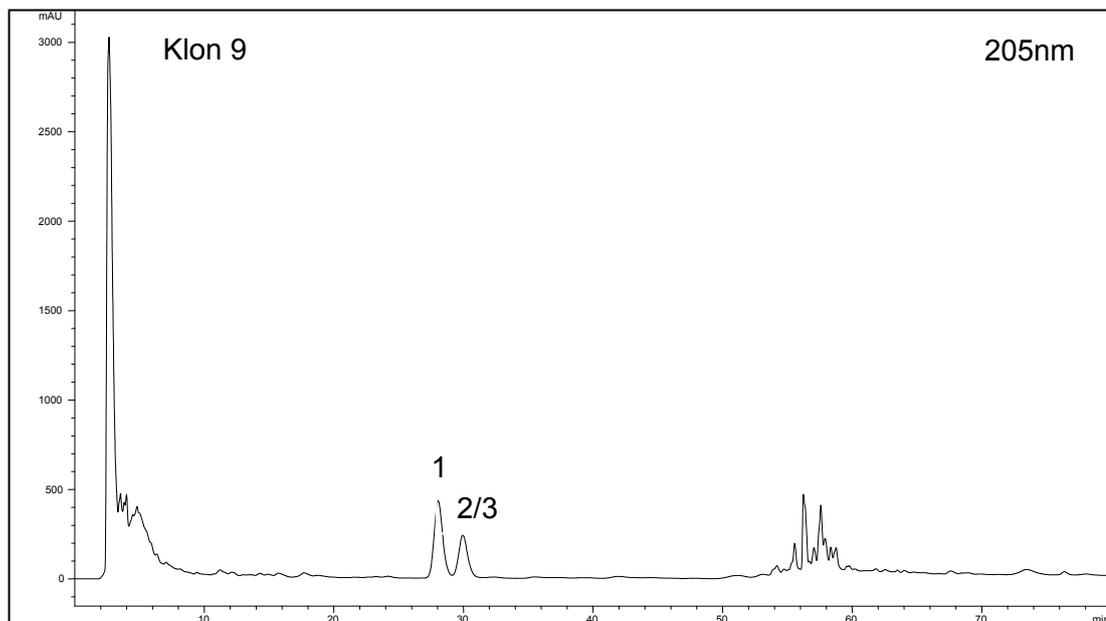


Abbildung 18: Chromatogramm der HPLC-Analyse von Klon 9 von *L. alpinum*; Verbindung 1: Leoligin, Verbindung 2: 5-Methoxyleoligin, Verbindung 3: 5,5'-Dimethoxyleoligin

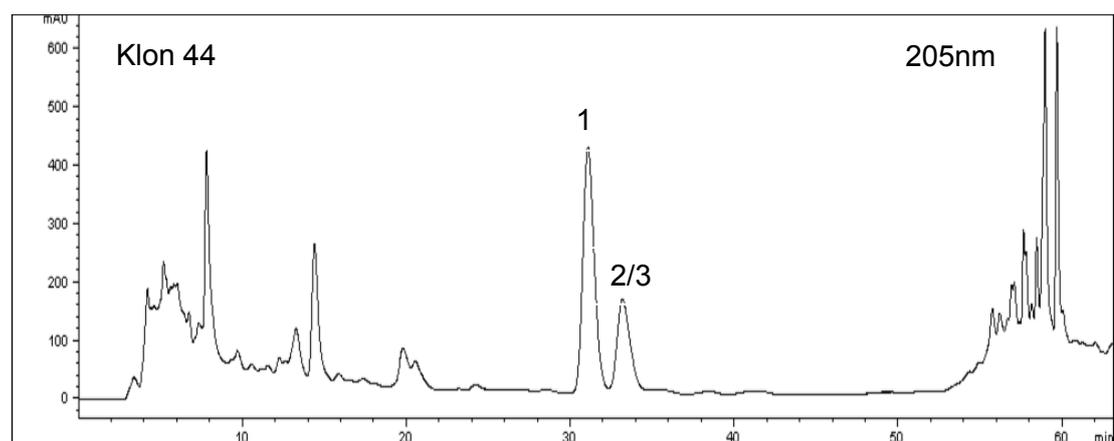


Abbildung 19: Chromatogramm der HPLC-Analyse von Klon 44 von *L. alpinum*; Verbindung 1: Leoligin, Verbindung 2: 5-Methoxyleoligin, Verbindung 3: 5,5'-Dimethoxyleoligin

Ergebnisse

Bei der Analyse des Extraktes von unbehandelten „hairy roots“ der Klonlinie K30 konnte Leoligin detektiert werden, während von 5-Methoxyleoligin und/oder 5,5'-Dimethoxyleoligin kein Peak zu erkennen war (Abb. 20).

Nachdem die „hairy roots“ der Klonlinie K30 über vier Wochen in MS-Medium mit einer erhöhten Saccharosekonzentration von 5% kultiviert wurden, konnte bei der HPLC-UV-Analyse Leoligin detektiert werden. 5-Methoxyleoligin und/oder 5,5'-Dimethoxyleoligin konnten in geringen Mengen ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 21, S. 33).

Die Analyse der „hairy roots“ der Klonlinie K30, welche vier Wochen in MS-Medium mit einer Saccharosekonzentration von 6% kultiviert wurden, zeigte, dass im Extrakt eine quantifizierbare Menge Leoligin enthalten ist. Von 5-Methoxyleoligin und/oder 5,5'-Dimethoxyleoligin war auch hier nur ein sehr kleiner Peak vorhanden (Abb. 22, S. 33).

Nachdem die „hairy roots“ des Klons K30 vier Wochen lang in MS-Medium mit einer Konzentration von 7% Saccharose kultiviert wurden, konnte in der HPLC-UV-Analyse Leoligin detektiert werden, von 5-Methoxyleoligin und/oder 5,5'-Dimethoxyleoligin war kein Peak zu erkennen (Abb. 23, S. 34).

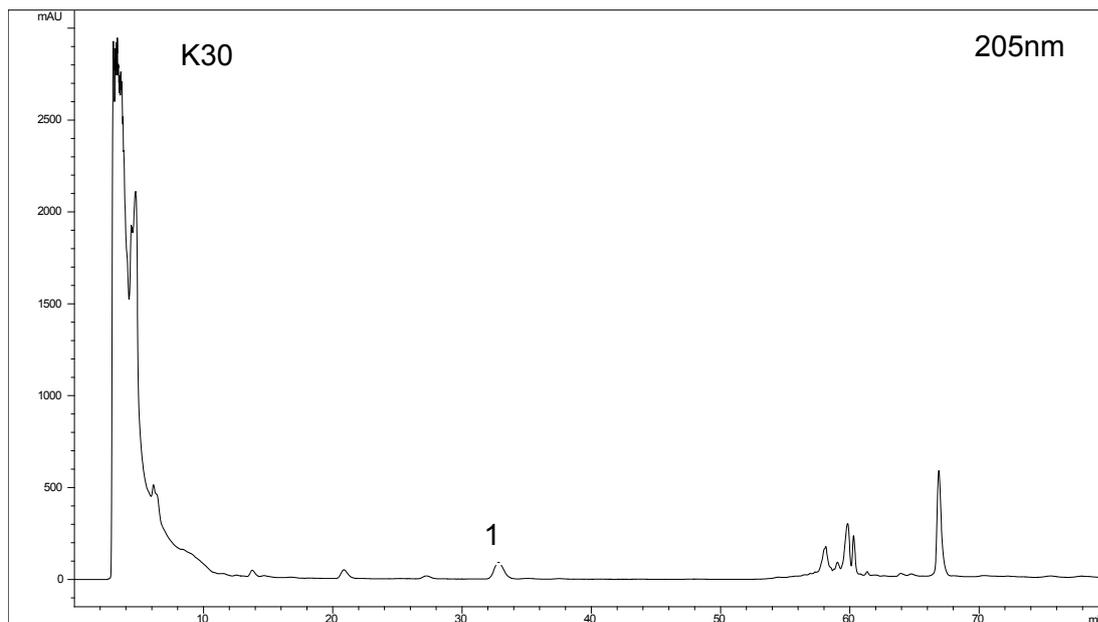


Abbildung 20: Chromatogramm der HPLC-Analyse der „hairy roots“-Linie K30 von *L. alpinum*; Verbindung 1: Leoligin

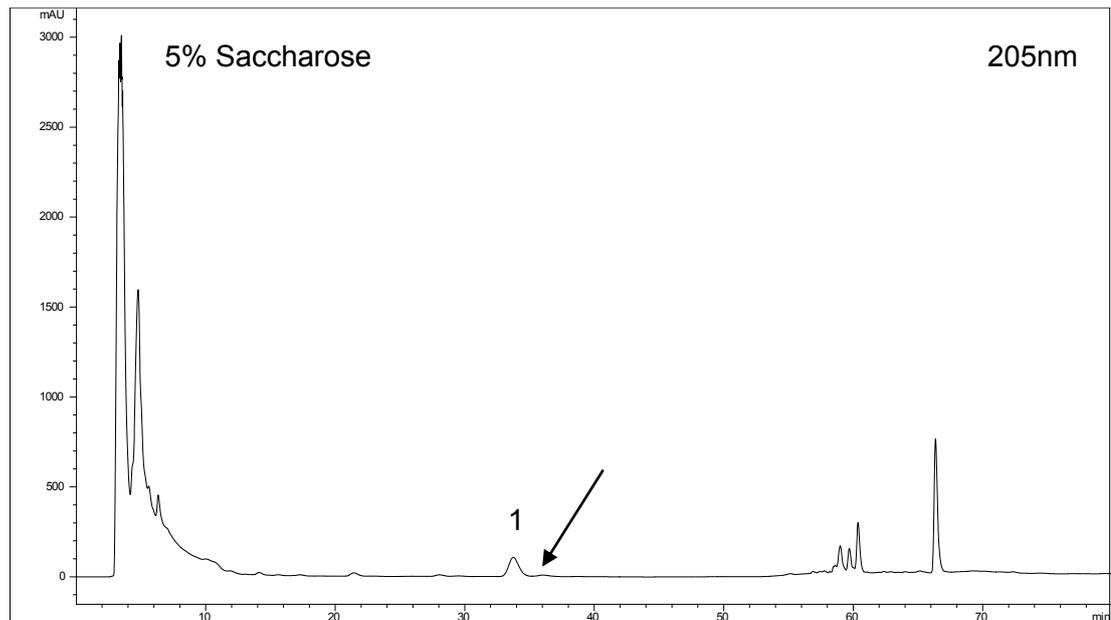


Abbildung 21: Chromatogramm der HPLC-Analyse der „hairy roots“-Linie K30 von *L. alpinum* nach Elizitierung mit 5% Saccharose; Verbindung 1: Leoligin, Pfeil: 5-Methoxyleoligin, 5,5'-Dimethoxyleoligin

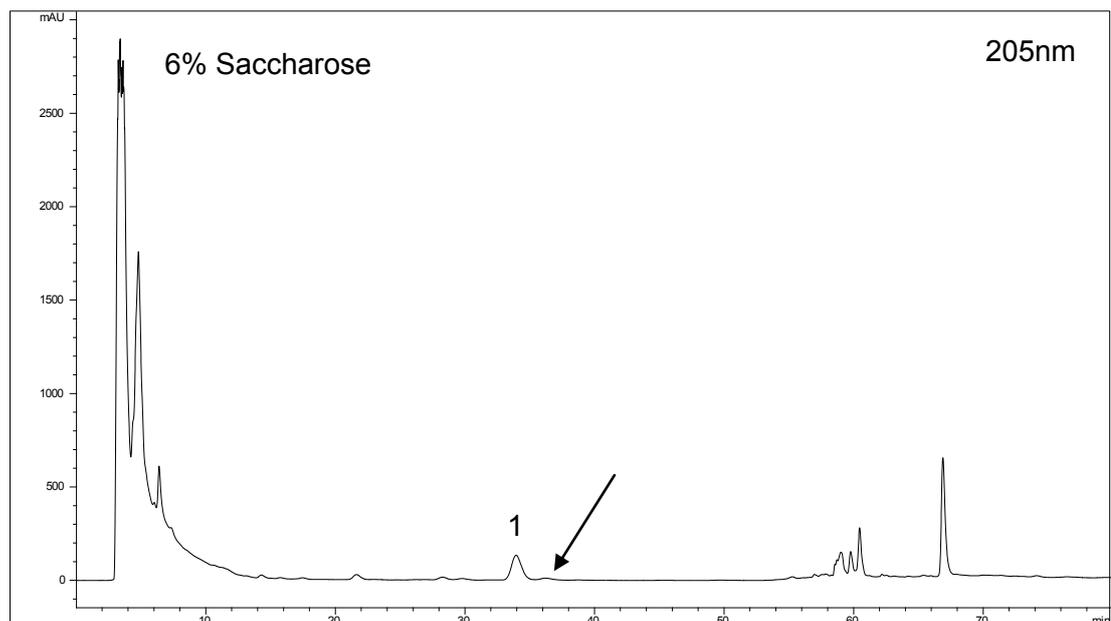


Abbildung 22: Chromatogramm der HPLC-Analyse der "hairy roots"-Linie K30 von *L. alpinum* nach Elizitierung mit 6% Saccharose; Verbindung 1: Leoligin, Pfeil: 5-Methoxyleoligin, 5,5'-Dimethoxyleoligin

Ergebnisse

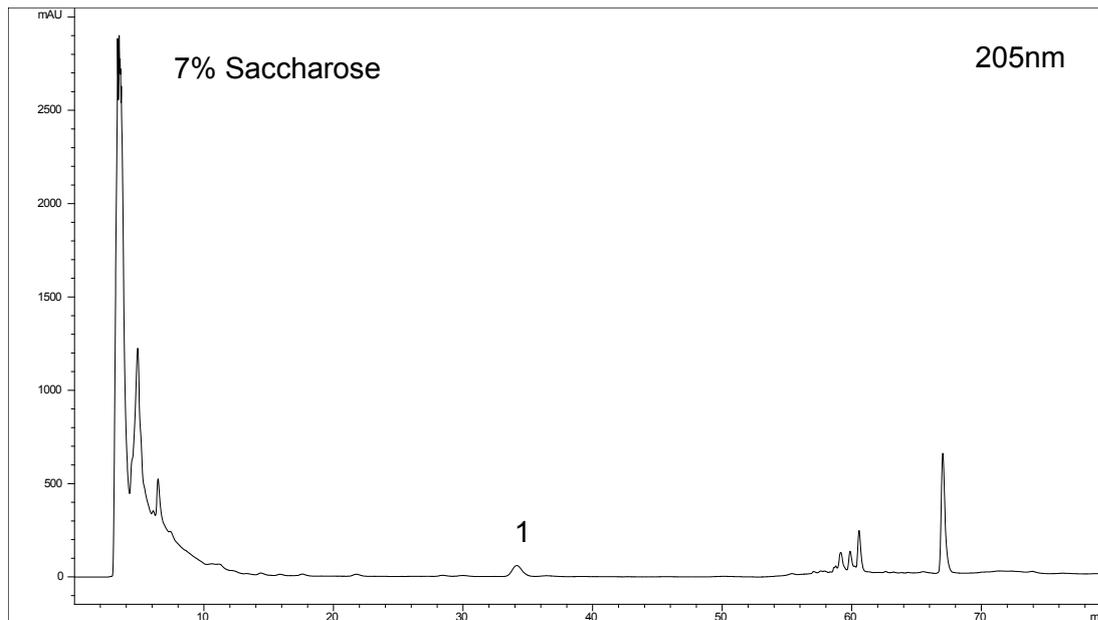


Abbildung 23: Chromatogramm der HPLC-Analyse der „hairy roots“-Linie K30 von *L. alpinum* nach Elizitierung mit 7% Saccharose; Verbindung 1: Leoligin

Jene „hairy roots“, welche mit Silbernitratlösung behandelt werden sollten, wurden zunächst über drei Wochen in normalem MS-Medium kultiviert. Danach wurde Silbernitrat in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt und nach einer weiteren Woche die Kulturen entnommen und analysiert. Bei den „hairy roots“, die in 15 μM AgNO_3 -Lösung kultiviert wurden, konnte bei der HPLC-UV-Analyse Leoligin detektiert werden. Von 5-Methoxyleoligin und/oder 5,5'-Dimethoxyleoligin ist kein Peak erkennbar (Abb. 24, S. 35).

In den „hairy roots“, welche mit 30 μM AgNO_3 -Lösung elizitiert wurden, konnte bei der HPLC-UV-Analyse Leoligin nachgewiesen werden, von 5-Methoxyleoligin und/oder 5,5'-Dimethoxyleoligin ist dagegen auch hier kaum ein Peak zu erkennen. In den untersuchten Kulturen ist jedoch nachweislich Obliquin enthalten. (Peak B, Abb. 25, S. 35, Struktur Abb. 26, S. 36).

Die HPLC-UV-Analyse jener „hairy roots“ von Klon K30, welche eine Woche lang mit 60 μM Silbernitratlösung behandelt wurden, zeigte, dass Leoligin enthalten ist. 5-Methoxyleoligin und/oder 5,5'-Dimethoxyleoligin waren wiederum kaum vorhanden, allerdings konnte auch hier Obliquin nachgewiesen werden (Peak B, Abb. 27, S. 36).

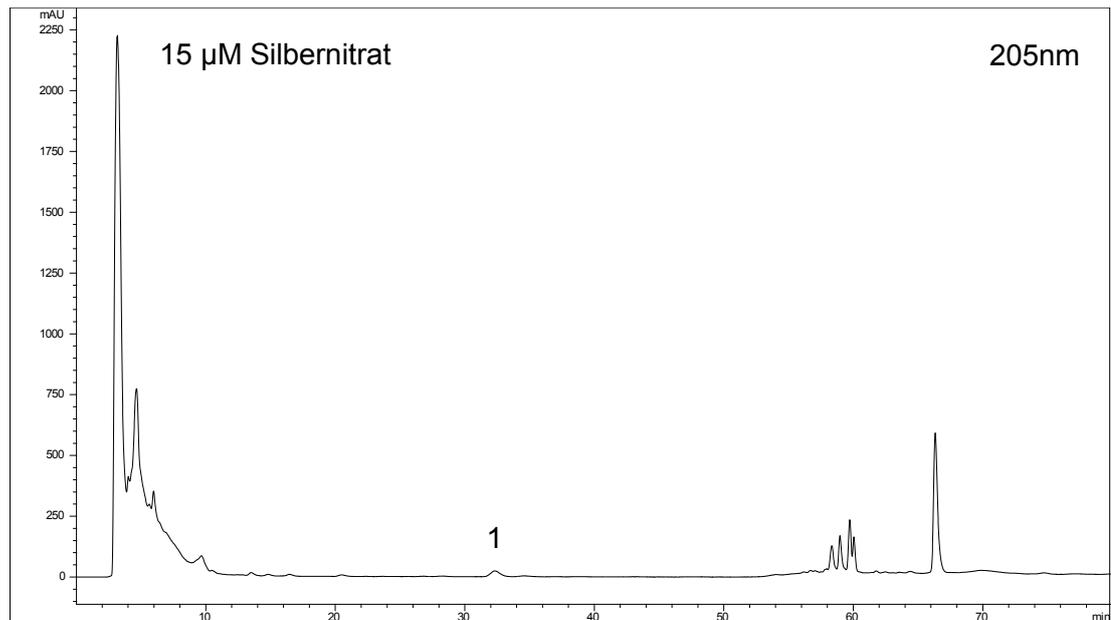


Abbildung 24: Chromatogramm der HPLC-Analyse der „hairy roots“-Linie K30 von *L. alpinum* nach Elizitierung mit 15 µM AgNO₃; Verbindung 1: Leoligin

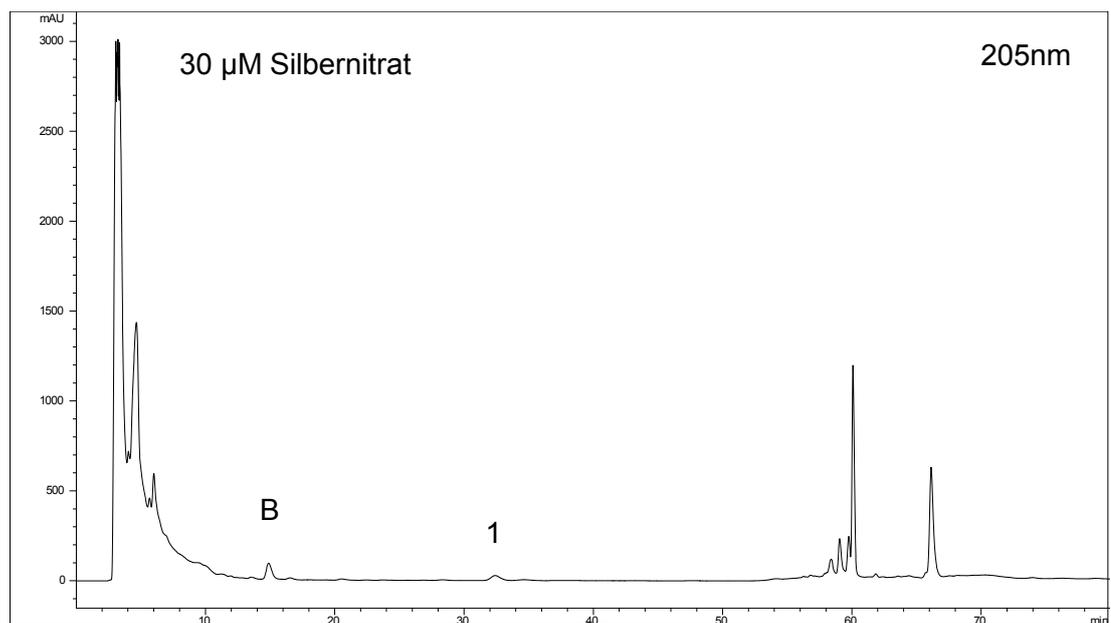


Abbildung 25: Chromatogramm der HPLC-Analyse der „hairy roots“-Linie K30 von *L. alpinum* nach Elizitierung mit 30 µM AgNO₃; Verbindung 1: Leoligin, Verbindung B: Obliquin

Ergebnisse

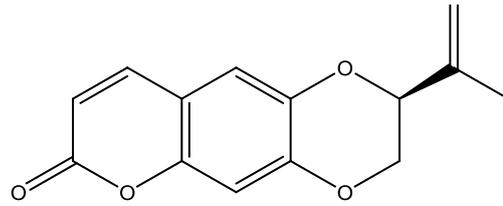


Abbildung 26: Strukturformel der Verbindung B, welche als Obliquin identifiziert werden konnte.

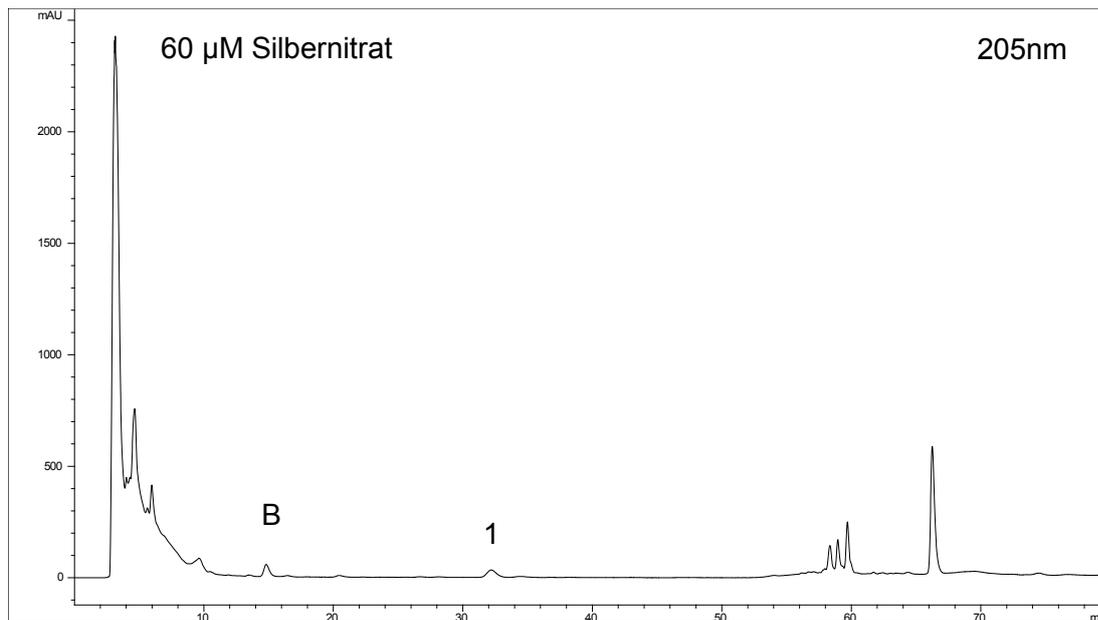


Abbildung 27: Chromatogramm der HPLC-Analyse der „hairy roots“-Linie K30 von *L. alpinum* nach Elizitierung mit 60 µM AgNO₃; Verbindung 1: Leoligin, Verbindung B: Obliquin

Fasst man die erhaltenen Ergebnisse zusammen, lässt sich sagen, dass in den analysierten „hairy roots“-Extrakten vor allem Leoligin nachgewiesen werden konnte. In jenen „hairy roots“, welche zuvor mit höheren Konzentrationen Silbernitrat behandelt wurden (30 µM oder 60 µM), konnte interessanterweise auch die Substanz Obliquin detektiert werden. Die folgenden Abbildungen zeigen die LC-Online-UV-Spektren dieser beiden Verbindungen (Abb. 28 und 29, S. 37).

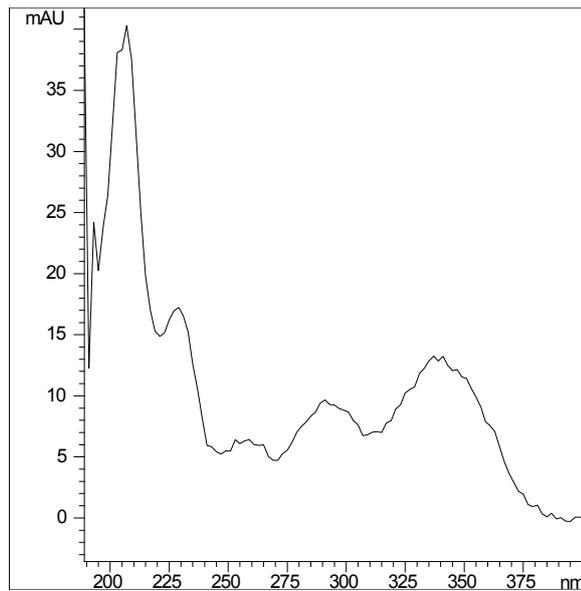


Abbildung 28: LC-Online-UV-Spektrum von Leoligin

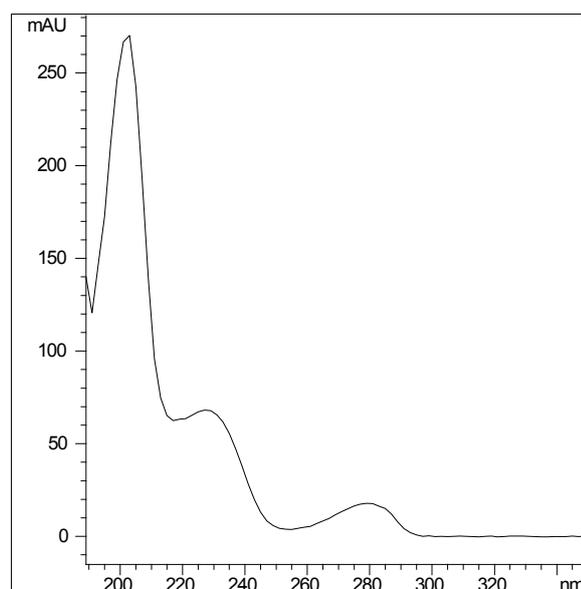


Abbildung 29: LC-Online-UV-Spektrum von Obliquin (Verbindung B)

Wie bereits im Kapitel 2, Material und Methoden (S. 20), beschrieben, erfolgte die Quantifizierung des enthaltenen Leoligins mittels externen Standards. Die solchermaßen bestimmten Leoliginkonzentrationen der verschiedenen Proben sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Tabelle 1, S. 38). Der ermittelte Gehalt ist jeweils das Ergebnis eines hergestellten Extrakts, der dreimal mittels HPLC analysiert wurde.

Ergebnisse

Tabelle 1: Übersicht über den prozentuellen Leoligingehalt in „hairy roots“ von *L. alpinum* vor und nach Eliziterung mit abiotischen Stoffen in unterschiedlichen Konzentrationen (w%: Gewichtsprozent, SD: Standardabweichung)

Probe	Elizitor	Gehalt (w%)	SD
Klon K30		0,0089	0,0003
Nährmedium Klon K30		0,0000	0,0000
Klon K30	5% Saccharose	0,0101	0,0005
Klon K30	6% Saccharose	0,0124	0,0001
Klon K30	7% Saccharose	0,0064	0,0002
Klon K30	15 μM AgNO ₃	0,0036	0,0001
Klon K30	30 μM AgNO ₃	0,0039	0,0001
Klon K30	60 μM AgNO ₃	0,0082	0,0001

Folgende Tabelle (Tabelle 2, S. 39) zeigt zusätzlich den Leoligingehalt der zwei Edelweißkultivare (Klon 9 und Klon 44) aus „normaler Anbauweise“ (Feldkultur) des Schweizer Institutes Mediplant und ermöglicht so auch einen Vergleich mit den natürlichen Gehalten der Wurzeln von Edelweiß. Des Weiteren wird hier der Einfluss verschiedener biotischer Elizitoren auf die Leoliginkonzentration dargestellt, um auch einen Vergleich zwischen abiotischen und biotischen Einflüssen zu ermöglichen. Diese Analysen wurden von Stephanie Prisching im Zuge ihrer Diplomarbeit durchgeführt (Diplomarbeit in Vorbereitung).

Tabelle 2: Ermittelter Leoligengehalt in Edelweißkultivaren und „hairy roots“ vor und nach Elizitierung mit abiotischen oder biotischen Faktoren in unterschiedlichen Konzentrationen (w%: Gewichtsprozent, SD: Standardabweichung)

Probe	Elizitor	Gehalt (w%)	SD
Klon 44		0,0107	0,0005
Klon 9		0,0386	0,0006
Klon K30		0,0089	0,0003
Nährmedium Klon K30		0,0000	0,0000
Klon K30	5% Saccharose	0,0101	0,0005
Klon K30	6% Saccharose	0,0124	0,0001
Klon K30	7% Saccharose	0,0064	0,0002
Klon K30	15 μM AgNO ₃	0,0036	0,0001
Klon K30	30 μM AgNO ₃	0,0039	0,0001
Klon K30	60 μM AgNO ₃	0,0082	0,0001
Klon K30	50 μM MJ*	0,0114	0,0003
Klon K30	100 μM MJ*	0,0049	0,0002
Klon K30	200 μM MJ*	0,0071	0,0001
Klon K30	Kontrolle MJ**	0,0065	0,0001
Klon K30	1 g Hefe	0,0042	0,0003
Klon K30	2 g Hefe	0,0043	0,0000
Klon K30	5 g Hefe	0,0026	0,0001

*MJ: Zusatz einer ethanolischen Lösung von Methyljasmonat

** Zusatz von 125 μl Ethanol

In der folgenden Abbildung (Abb. 30, S. 40) werden die ermittelten Leoliginkonzentrationen graphisch dargestellt, um die unterschiedlichen Einflüsse der Elizitoren besser zu veranschaulichen.

Die höchste Menge Leoligin konnte in jenen „hairy roots“ gemessen werden, welche in MS-Medium mit einer erhöhten Saccharosekonzentration von 6% kultiviert wurden. Die Elizitierung mit 5% Saccharose ergab eine etwas geringere Leoliginkonzentration als mit 6% Saccharose, jedoch war die gemessene Menge höher als bei den unbehandelten „hairy roots“ von Klon K30. Bei jenen Kulturen, die auf MS-Medium mit 7% Saccharose kultiviert wurden, lag die ermittelte Leoliginmenge unter dem Bereich der unbehandelten „hairy roots“. Die Behandlung mit 15 μM und 30 μM

Ergebnisse

Silbernitrat führte zu keiner Steigerung des Leoligingehalts in den „hairy roots“, wobei verglichen mit den unbehandelten Kulturen von Klon K30 die Leoliginproduktion sogar beeinträchtigt wurde. Durch die Elizitierung mit 60 μM Silbernitrat konnte im Vergleich zu den unbehandelten „hairy roots“ von Klon K30 weder eine Steigerung noch ein Rückgang der Produktion von Leoligin beobachtet werden. Im analysierten Nährmedium von Klon K30 war nachweislich kein Leoligin enthalten, die „hairy roots“ geben unter diesen Bedingungen kein Leoligin ins Medium ab.

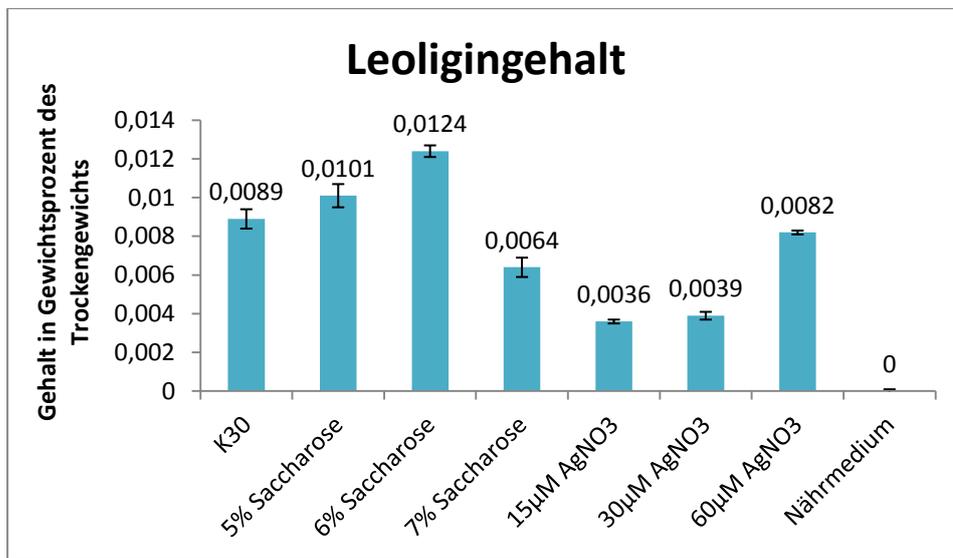


Abbildung 30: Graphische Darstellung der Leoligingehalte der „hairy roots“ von *L. alpinum* vor und nach der Elizitierung mit abiotischen Faktoren in unterschiedlichen Konzentrationen

Vergleicht man den Einfluss verschiedener abiotischer Elizitoren auf den Leoligingehalt mit dem biotischer Stoffe (Abb. 31, S. 41) erhält man unterschiedliche Ergebnisse.

Durch die Elizitierung mit 6% Saccharose konnte die Leoliginproduktion in den „hairy roots“ von Klon K30 am effektivsten stimuliert werden, auch die Behandlung mit 50 μM Methyljasmonat führte zu einer Steigerung der Leoliginkonzentration verglichen mit den unbehandelten „hairy roots“.

Mit 100 μM , 200 μM Methyljasmonat und Hefe in den Mengen 1, 2 und 5 g konnte die Synthese jedoch nicht gesteigert werden. Die hier ermittelten Leoliginmengen waren deutlich geringer als in jenen „hairy roots“, welche mit 5 oder 6% Saccharose oder 60 μM Silbernitrat behandelt wurden. Auch der

Leoligingehalt in den unbehandelten „hairy roots“ war höher als in diesen Kulturen, die ermittelte Leoliginmenge lag jedoch im Bereich jener Kulturen, welche mit 15 μM oder 30 μM Silbernitrat behandelt wurden.

In Summe konnte die Leoliginproduktion durch die Elizitierung mit abiotischen Faktoren, vor allem durch die Behandlung mit Saccharose, stärker angeregt werden als mit biotischen Faktoren. Verglichen mit normalem Wurzelmaterial von *Leontopodium alpinum* lag der Leoligingehalt der „hairy roots“ unter dem von Klon 9, jedoch nach Behandlung mit 6% Saccharose über jenem von Klon 44. Der Vergleich von Klon 9 und Klon 44 zeigt, dass auch der Leoligingehalt in Wurzeln von Edelweißkultivaren stark schwanken kann (Abb. 31).

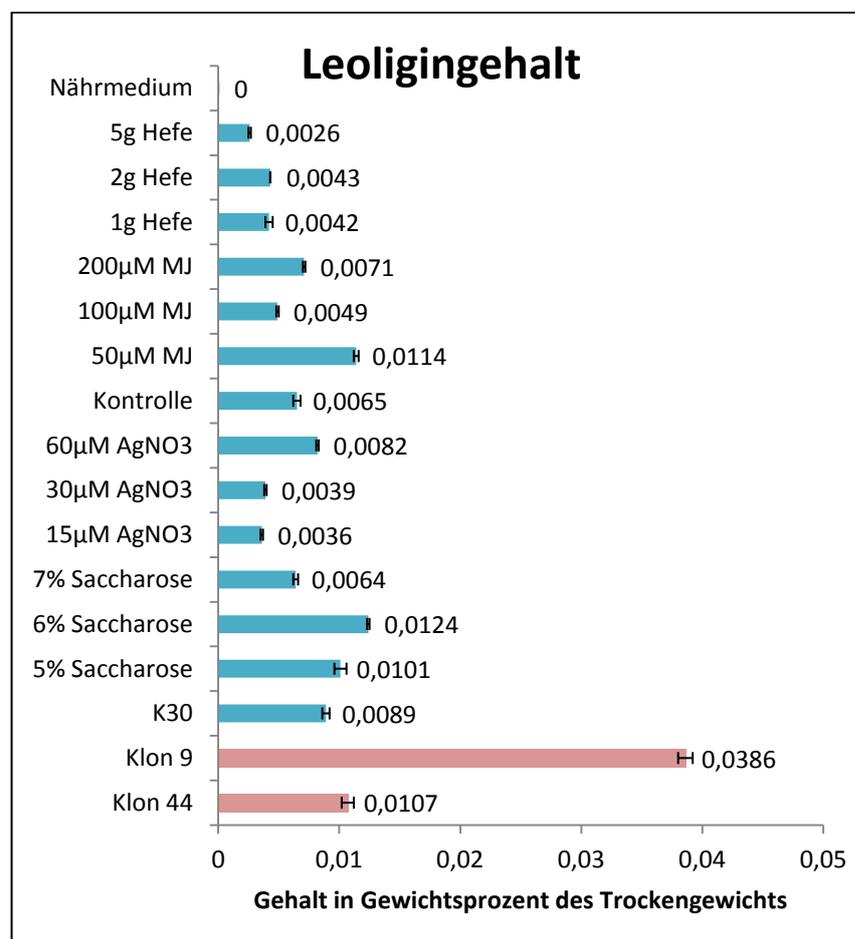


Abbildung 31: Graphische Darstellung der Leoliginkonzentrationen von Wurzeln der Edelweißkultivare (Klon 9 u. 44) und „hairy roots“ von *Leontopodium alpinum* vor und nach Elizitierung mit abiotischen und biotischen Faktoren in unterschiedlichen Konzentrationen

4. Diskussion

Leontopodium alpinum (Cass.), das Edelweiß, gehört zur Familie der Asteraceae und ist in freier Natur auf Berghängen und steinigen Wiesen in einer Höhe zwischen 2200 und 3140 Metern zu finden (Hornick et al., 2008). In der Volksmedizin wurden bislang vor allem die oberirdischen Anteile des Edelweiß` verwendet, zum Beispiel zur Behandlung von Magen-Darm-Erkrankungen oder auch bei Fieber und Bronchitis (Kiene, 1992; Knechtel, 1992).

Im Jahr 2003 wurde erstmals ein bis dahin unbekannter Inhaltsstoff, das Leoligin, aus der Wurzel des Edelweiß` isoliert und identifiziert. Diese Substanz stellt den Hauptinhaltsstoff in den Wurzeln des Edelweiß` dar (Dobner et al., 2003). Leoligin konnten mittlerweile eine ganze Reihe pharmakologischer Wirkungen zugeschrieben werden, wodurch sich interessante Einsatzmöglichkeiten für diese Verbindung ergeben könnten. Es wurde zum Beispiel eine antiinflammatorische Aktivität des Lignans nachgewiesen (Dobner et al., 2004) und es konnte auch gezeigt werden, dass Leoligin Verdickungen der Innenwand von Blutgefäßen reduziert, wodurch sich in Zukunft eine neue Verwendung für diese Substanz zur Behandlung koronarer Gefäßkrankheiten ergeben könnte (Reisinger et al., 2009).

Leoligin ist jedoch in der Wurzel des Edelweiß` nur in sehr geringer Konzentration enthalten. Der Leoliginingehalt in den Wurzeln von Edelweißkultivaren liegt beispielsweise bloß zwischen ca. 0,01 und 0,03% (vgl. Kapitel 3.3., S. 30 u. 31), dadurch können aus 800 g luftgetrockneter Wurzeln auch nur ca. 40 mg des Lignans isoliert werden (Dobner et al., 2003).

Ein sehr vielversprechendes System zur Gewinnung von Pflanzeninhaltsstoffen bilden „hairy roots“, da sie einige Vorteile gegenüber normalen Wurzeln besitzen (Giri und Narasu, 2000). „Hairy roots“ sind genetisch stabil, haben häufig eine höhere Wachstumsrate als Wurzeln und können auf hormonfreiem Nährmedium kultiviert werden (Guillon et al., 2007; Shanks und Morgan, 1999; Hu und Du, 2006). Auch der Sekundärstoffwechsel der Pflanze kann sich durch die Bildung von „hairy

Diskussion

roots“ verändern, dadurch könnte sich zum Beispiel die Menge eines gebildeten Inhaltsstoffes erhöhen oder auch neue Strukturen gebildet werden (Georgiev et al., 2007; Shanks und Morgan, 1999; Souret et al., 2003).

Bereits 1994 konnten erfolgreich „hairy roots“-Kulturen von *Leontopodium alpinum* etabliert werden (Hook, 1994). Die Lignanproduktion in „hairy roots“ wurde unter anderem 1993 an *Linum flavum* untersucht, mit dem Ergebnis, dass die transformierten Kulturen 2 bis 5 mal mehr 5-Methoxypodophyllotoxin als untransformierte Wurzeln und sogar 5 bis 12 mal mehr als Zellsuspensionskulturen von *Linum flavum* produzierten (Ootsdam et al., 1993).

Im Zuge ihrer Diplomarbeit etablierte Ondratschek (2012) „hairy roots“-Kulturen von *Leontopodium alpinum* durch Infektion mit verschiedenen Stämmen von *Agrobacterium rhizogenes* und 32 daraus resultierende Klonlinien wurden in dieser Diplomarbeit für weiterführende Versuche eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die übernommenen „hairy roots“ soweit zu vermehren, dass genügend Material für eine erste chemische Analyse der Inhaltsstoffe zur Verfügung stand. Es sollte geklärt werden, ob in diesen Kulturen tatsächlich Leoligin gebildet wird und ob eventuell auch andere, bisher unbekannte Strukturen nachweislich vorhanden sind. Danach sollte untersucht werden, ob durch verschiedene abiotische Elizitoren der Leoliginegehalt oder die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe beeinflusst wird. Außerdem sollte der Einfluss der Elizitoren auf das Wachstum der „hairy roots“ ermittelt werden.

Zu Beginn der Arbeit waren die „hairy roots“ nur wenige Zentimeter groß und jeder Klon war in jeweils drei verschiedenen Nährmedien (B5, MS und $\frac{1}{2}$ MS) kultiviert. Zunächst wurden die Kulturen auch in diesen drei Medien vermehrt, es zeigte sich jedoch schon bald, dass die Kulturen in B5 kein, beziehungsweise nur sehr geringes Wachstum aufwiesen. Auch von den „hairy roots“ in Medium $\frac{1}{2}$ MS war nur bei wenigen ein Zuwachs zu beobachten. Es gab viele Kulturen, die abstarben oder keinen Fortschritt im Wachstum erkennen ließen. Am besten wuchsen die „hairy roots“ im MS-Medium. Das Nährmedium B5 weist eine höhere Stickstoffkonzentration auf

als die anderen beiden, worin sehr wahrscheinlich die Ursache für das kaum vorhandene Wachstum liegt.

Das $\frac{1}{2}$ MS-Medium enthält nur 1% Saccharose und um die Hälfte weniger Makroelemente als das normale MS-Medium mit 3% Saccharose. Da in der $\frac{1}{2}$ MS-Nährlösung sehr viele Kulturen abstarben, ist eine Konzentration von 1% Saccharose wahrscheinlich zu gering und auch bei der Elizitierung konnte beobachtet werden, dass die „hairy roots“ in Nährmedien mit einer Saccharosekonzentration höher als 3% noch Wachstum zeigen.

Eine weitere Ursache für das anfänglich sehr schlechte Wachstum vieler Klone könnte auch sein, dass sie mit zu geringer Größe bereits auf die drei verschiedenen Nährmedien aufgeteilt wurden. Denn einige „hairy roots“ hatten eine Länge von weniger als einem Zentimeter, als in dieser Arbeit damit begonnen wurde, sie weiter zu kultivieren. Die Aufteilung könnte dazu geführt haben, dass die neuen Subkulturen kaum mehr wuchsen, oder sogar abstarben.

Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass jene Kulturen, die nie auf drei Medien aufgeteilt und zum Erhalt in MS-Medium weiter kultiviert wurden, den bei Weitem größten Zuwachs hatten. Obwohl das Wachstum aller Kulturen anfänglich eher gering war, zeigten die „hairy roots“, nachdem sie eine gewisse Größe erreicht hatten, durchaus eine gute Wachstumsrate. Interessant wäre eventuell auszutesten, wie sich das Wachstum der Wurzeln verhält, wenn sie einem Tag/Nacht-Rhythmus und nicht nur der Dunkelheit ausgesetzt werden (Santos et al., 1998).

Schließlich wurde für weiterführende Untersuchungen der Klon K30 ausgewählt, da dieser eindeutig den größten Massenzuwachs zeigte und es wichtig war, dass möglichst schnell ausreichend Material für eine erste chemische Analyse zur Verfügung stand.

Da anfänglich noch nicht klar war, ob tatsächlich Leoligin in den „hairy roots“ enthalten ist, und wenn, wieviel davon, konnte nur geschätzt werden, welche Mengen für eine Analyse nötig sind. Um sicherzustellen, dass das Material für diverse chemische Analysen ausreicht, sollten für die erste Untersuchung „hairy roots“ mit einem Frischgewicht von etwa 30 g geerntet werden. Daraus sollte sich dann ein Trockengewicht von ca. 3 g ergeben.

Diskussion

Bereits in der durchgeführten DC-Analyse zeigte sich ein erster Unterschied zwischen dem normalen Wurzelextrakt und dem „hairy roots“-Extrakt von *Leontopodium alpinum*: Eine markante grau-blaue Bande, welche nur im Chromatogramm der „hairy roots“ zu sehen war, im UV jedoch keine Fluoreszenzlöschung beziehungsweise Fluoreszenz zeigte.

Bei der durchgeführten LC-Analyse konnten noch weitere Unterschiede zwischen den beiden Extrakten beobachtet werden. Die Lignane 4-Norleoligin, Leoligin und 5-Methoxyleoligin waren in beiden Extrakten nachzuweisen, die Cumarine 5-Hydroxyobliquin, 5-Methoxyobliquin und Obliquin waren jedoch im Extrakt von Klon K30 nicht enthalten. Interessanterweise konnte nach der Elizitierung mit Silbernitrat in einer Konzentration von 30 μM und 60 μM eine erhöhte Obliquinmenge im „hairy roots“-Extrakt nachgewiesen werden. Insgesamt wurden in Klon K30 sieben Verbindungen detektiert, welche in normalen Edelweißwurzeln nicht zu finden sind. Weil diese mit den durchgeführten Analysen (HPLC-MS) jedoch nicht bestimmt werden konnten, wäre es interessant, diese Substanzen in weiterführenden Versuchen genauer zu untersuchen. Bei einer der Verbindungen handelt es sich aber, dem erhaltenen UV-Spektrum zufolge, wahrscheinlich um ein Lignanderivat. Die Bisabolanderivate A, B und E sowie die bekannten Kaurensäurederivate des Edelweiß` konnten in den „hairy roots“ jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die quantitative Bestimmung des Leoligins von Klon K30 ergab einen Wert von 0,0089%, welcher durchaus mit dem Leoliginegehalt von Edelweißkultivaren, wie zum Beispiel jenem von Klon 44 (0,0107%) vergleichbar ist.

Da in den untersuchten „hairy roots“ tatsächlich Leoligin enthalten war, sollte in weiterer Folge der Einfluss verschiedener abiotischer Faktoren auf den Leoliginegehalt untersucht werden.

Als Elizitoren wurden unterschiedliche Konzentrationen von Silbernitrat und Saccharose ausgewählt. Über den erfolgreichen Einsatz dieser Substanzen findet man auch in der Literatur einige Beispiele, so wurde beispielsweise in „hairy roots“-Kulturen von *Salvia miltiorrhiza* die Produktion von Tanshinonen

sowohl durch Silberionen als auch mit Saccharose gesteigert (Zhang et al., 2004; Shi et al., 2007). Bei *Silybum marianum* konnte die Silymarinproduktion von „hairy roots“-Kulturen ebenfalls mit Silberionen angeregt werden (Khalili et al., 2010). In diesen Versuchen beobachtete man den größte Effekt mit 30 μM $\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (*Salvia miltiorrhiza*) und 2 mM AgNO_3 (*Silybum marianum*), allerdings wurde das Wachstum der „hairy roots“ umso stärker beeinträchtigt, je höher die verwendete Dosis war (Zhang et al., 2004; Khalili et al., 2010). Daher fiel die Entscheidung, mit 15 μM , 30 μM und 60 μM Silbernitrat zu elizitieren.

Die stärkste Steigerung der Leoliginsynthese bewirkte eindeutig die Behandlung mit 60 μM Silbernitrat, nach der Elizitierung mit 15 μM und 30 μM war die gemessene Leoliginkonzentration hingegen geringer als in den unbehandelten „hairy roots“ von Klon K30. Es wäre daher interessant, ob durch höhere Silbernitratkonzentrationen ein noch größerer Effekt auf den Leoligingehalt erzielt werden kann, dies zu untersuchen war aber im vorhandenen Zeitraum der Diplomarbeit nicht mehr möglich.

Als zweiter Elizitor wurde Saccharose in unterschiedlichen Konzentrationen ausgewählt. In der Literatur findet man auch hier einige Beispiele für Versuche mit Saccharose als abiotischen Faktor, dabei wurde beispielsweise der Effekt auf das Wachstum und den Alkaloidgehalt der „hairy roots“ von *Hyoscyamus albus* durch erhöhte Saccharosekonzentrationen untersucht. Die Verwendung von Saccharose führte zwar zu keiner gesteigerten Alkaloidsynthese, das Wachstum der „hairy roots“ konnte jedoch angeregt werden, was ein erhöhtes Trockengewicht zur Folge hatte (Sauerwein und Shimomura, 1991). Ein anderer Versuch zeigte, dass in *Hypericum perforatum* abhängig von der verwendeten Saccharosekonzentration die gebildete Hypericin- und Hyperforinmenge steigt (Pavlik et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit 5, 6 und 7% Saccharose elizitiert, die normale Saccharosekonzentration im MS-Medium, in welchem die „hairy roots“ kultiviert wurden, betrug 3%. Daher wurden die verwendeten Saccharosemengen so gewählt, dass sie über diesem Bereich lagen. In der Literatur findet man jedoch Beispiele, wo durch Konzentrationen über 8% das Wachstum der Kulturen gehemmt und die Wurzeln braun wurden (Rothe et

Diskussion

al., 2001). Ausgehend von diesen Beobachtungen wählten wird die Saccharosekonzentrationen 5, 6 und 7% für die folgenden Untersuchungen. Die Behandlung mit 5% Saccharose hatte keinen wesentlichen Einfluss auf den Leoligingehalt, dieser lag im Bereich von jenen „hairy roots“, die in MS-Medium kultiviert wurden. Die Veränderung von 3% auf 5% Saccharose im Nährmedium war möglicherweise zu gering um die Leoliginsynthese wesentlich zu beeinflussen. Das beste Ergebnis konnte mit 6% Saccharose erzielt werden, auch verglichen mit allen anderen eingesetzten biotischen und abiotischen Faktoren konnte durch diese Elizitierung die Leoliginsynthese am effektivsten gesteigert werden. Der Leoligingehalt welcher in diesen Kulturen ermittelt wurde, war höher als in den unbehandelten „hairy roots“ und lag auch leicht über den Leoliginwerten, welche in den Edelweißwurzeln von Klon 44 gemessen werden konnten. Die Elizitierung mit 7% Saccharose bewirkte eine geringere Leoliginproduktion in den „hairy roots“. Zusammenfassend kann man also sagen, dass mit 5% Saccharose kaum ein Effekt erzielt werden konnte und 7% Saccharose bereits zu einer Abnahme des Leoligingehaltes führte. Damit liegt die optimale Saccharosekonzentration zur Steigerung der Leoliginmenge in „hairy roots“ von *Leontopodium alpinum* bei 6%.

Die zugesetzten Elizitoren beeinflussten jedoch nicht nur den Leoligingehalt, sondern auch das Wachstum der „hairy roots“, vor allem die Verwendung von Saccharose verursachte abhängig von der Konzentration, eine Beeinträchtigung des Massenzuwachses. Bei der Elizitierung mit 5% Saccharose lag der Zuwachs bei 75%, mit 7% Saccharose nur noch bei etwa 26%. Auch in der Literatur findet man Beispiele, in denen durch Saccharosekonzentrationen über 8% das Wachstum der Kulturen gehemmt wurde und die Wurzeln sogar eine braune Farbe annahmen (Rothe et al., 2001). In den angeführten Untersuchungen führte jedoch keine der verwendeten Konzentrationen zu einer Braunfärbung der „hairy roots“.

Wie beschrieben konnte die Leoliginproduktion mit 6% Saccharose am meisten gesteigert werden, wobei diese Konzentration jedoch auch zu einer Beeinträchtigung des Wachstums führte und nur ein Gewichtszuwachs von 44% über 4 Wochen ermittelt wurde.

Der Einfluss von Silbernitrat auf den Massenzuwachs der Kulturen war geringer als jener von Saccharose. Für alle verwendeten Konzentrationen (15, 30, 60 μM Silbernitrat) wurde eine Zunahme von über 100% ermittelt.

Bei den unbehandelten „hairy roots“ und mit 15 μM Silbernitrat lag der Zuwachs bei ca. 130%, mit 30 und 60 μM bei etwa 105%. Auch hier gibt es in der Literatur einige Beispiele dafür, wie die Elizitierung mit Silberionen dosisabhängig eine Hemmung des Wachstums von „hairy roots“-Kulturen verursachte (Zhang et al., 2004, Khalili et al., 2010). Durch die Elizitierung mit 60 μM Silbernitrat konnte jedoch keine weitere Beeinträchtigung des Zuwachses im Vergleich zur 30 μM Silberlösung beobachtet werden.

Der Leoligingehalt der unbehandelten „hairy roots“ von Klon K30 lag bereits im Bereich von normalen Edelweißwurzeln und abhängig vom eingesetzten Elizitor konnte die Leoliginsynthese teilweise nochmals gesteigert werden. Die Produktion von Leoligin in „hairy roots“ bringt auch weitere Vorteile im Vergleich zur Gewinnung von Wurzeln aus Feldkultur. Gewebekulturen würden etwa unabhängig von Jahreszeiten und Umwelteinflüssen eine konstante Leoliginproduktion über das ganze Jahr ermöglichen. Auch das aufwendige Umgraben zur Gewinnung der Wurzeln aus der Erde würde entfallen. Durch Upscale und *in vitro*-Kultivierung der „hairy roots“ in Fermentern könnte Leoligin eventuell in noch größerem Maßstab gewonnen werden. Es wäre daher auf jeden Fall zu überlegen, ob die Gewinnung von Leoligin aus Gewebekulturen eine Alternative zum Feldanbau darstellt.

In weiterführenden Versuchen könnte das Inhaltsstoffspektrum und der Leoligingehalt von anderen „hairy roots“-Klonen, welche nicht für diese Arbeit ausgewählt wurden, chemisch analysiert werden. Für die Untersuchungen könnten auch Edelweißwurzeln, die von vornherein mehr Leoligin bilden, als Ausgangsmaterial verwendet und ermittelt werden, ob die daraus hergestellten „hairy roots“ auch einen höheren Leoligingehalt aufweisen. Weiters wäre es interessant, ob sich durch unterschiedliche zur Infektion verwendete Bakterienstämme die Art und Menge der Inhaltsstoffe verändert. Auch der Einfluss von anderen Elizitoren oder höheren Konzentrationen von Silbernitrat könnte zu noch besseren Ergebnissen führen.

5. Zusammenfassung

Leontopodium alpinum (Cass.), das Edelweiß, wird in der Volksmedizin zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen (beispielsweise Bronchitis oder gastrointestinale Erkrankungen) eingesetzt, wobei vor allem die oberirdischen Anteile der Pflanze verwendet werden. Nachdem 2003 ein strukturell neues Lignan, Leoligin, aus den Wurzeln des Edelweiß` isoliert wurde, könnten sich interessante Einsatzmöglichkeiten für diesen pflanzlichen Inhaltsstoff ergeben. In verschiedenen Versuchen konnte für Leoligin bereits eine antiinflammatorische Aktivität nachgewiesen werden, auch gegen Verdickungen der Innenwand von Blutgefäßen zeigt das Lignan Wirkung. Dieser Metabolit liegt jedoch in den Wurzeln von Edelweiß` nur in sehr geringen Konzentrationen vor (0,01 - 0,03%).

Ein etabliertes System zur Gewinnung von sekundären Inhaltsstoffen stellen „hairy roots“ dar. Diese besitzen eine Reihe von Vorteilen gegenüber normalen Wurzeln, außerdem könnte eventuell eine größere Menge Leoligin gebildet werden, oder auch neue, bisher noch unbekannte Lignane. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde zunächst untersucht, ob in den durch Infektion mit *Agrobacterium rhizogenes* gebildeten „hairy roots“ Leoligin oder Derivate enthalten sind. Wir konnten in den Kulturen 4-Nor-leoligin, Leoligin und 5-Methoxyleoligin sowie sieben strukturell neue Verbindungen des Edelweiß` nachweisen. Der Einfluss verschiedener abiotischer Faktoren wie 5, 6, und 7% Saccharose sowie 15, 30 und 60 µM Silbernitrat auf die Bildung von Leoligin brachte unterschiedliche Ergebnisse. Die Elizitierung mit 15 und 30 µM Silbernitrat sowie mit 7% Saccharose führte zu einer Beeinträchtigung der Leoliginproduktion, jene mit 5% Saccharose und 60 µM Silbernitratlösung hatte kaum einen Einfluss auf den Leoliginingehalt. Möglicherweise würde eine noch höhere Silbernitratkonzentration zu einer Steigerung der Leoliginmenge führen. Nach der Elizitierung mit 30 und 60 µM Silbernitratlösung konnte außerdem das Cumarin Obliquin nachgewiesen werden. Am erfolgreichsten war die Kultivierung der „hairy roots“ in MS-Medium mit 6% Saccharose, dies führte zu einer Steigerung des Leoliginingehalts - verglichen mit den unbehandelten „hairy roots“ und auch im Vergleich mit biotischen Faktoren (Hefeextrakt und Methyljasmonat) war die Elizitierung mit 6% Saccharose

Zusammenfassung

effektiver. Zusätzlich wurde der Einfluss der verwendeten Elizitoren auf das Wachstum der „hairy roots“ untersucht.

Der Leoligehalt der unbehandelten „hairy roots“, welche in MS-Medium kultiviert wurden, lag zumindest im Bereich von Edelweißwurzeln. Wenn man von anderen Wurzeln ausgeht, die von vornherein mehr Leoligin bilden, wäre anzunehmen, dass auch in den daraus gebildeten „hairy roots“ ein höherer Leoligehalt vorliegt. Die *in vitro*-Kultivierung würde außerdem eine konstante Leoliginproduktion unabhängig von Jahreszeiten und Umwelteinflüssen ermöglichen, und durch Upscale und Kultivierung in Fermentern wäre eine Leoligingewinnung in noch größerem Maßstab möglich. „Hairy roots“-Kulturen des Edelweiß´ als Alternative zum Feldanbau wären daher auf jeden Fall zu überlegen.

6. Summary

Leontopodium alpinum (Cass.), widely known as Edelweiß, is traditionally used as a remedy against various illnesses and complaints (e.g. bronchitis or gastro-intestinal diseases), where until now especially the aerial parts of *Leontopodium* were applied. In 2003 a new lignan, namely leoligin, was isolated from the roots of Edelweiß and anti-inflammatory properties of leoligin are reported. Leoligin might also represent a novel lead for the treatment of vein graft diseases. However the concentration of this lignan in the roots of Edelweiß is low (0,01 – 0,03%).

Hairy root cultures have been proven to be very efficient in generating secondary metabolites. Hairy roots, which are formed upon transformation by *Agrobacterium rhizogenes*, are highly differentiated and usually exhibit a stable production of secondary metabolites. In the case of Edelweiss they might also produce higher levels of leoligin or even new compounds which cannot be found in normal roots.

In the present diploma thesis the first step was to figure out if hairy roots of *L. alpinum* produce leoligin or one of its derivatives. Indeed 4-nor-leoligin, leoligin and 5-methoxyleoligin as well as seven structurally unknown compounds were detected. Moreover the effect of different abiotic elicitors on the production of leoligin was examined. Hairy roots were cultured in MS-Medium containing 5, 6 and 7% sucrose or alternatively 15, 30, and 60 μM silver nitrate.

With 15 and 30 μM silver nitrate as well as 7% sucrose the leoligin production was reduced. The observed influence of 5% sucrose or 60 μM silver nitrate on leoligin concentration was low.

Furthermore, elicitation with 30 and 60 μM silver nitrate increased the content of obliquin, a known coumarin in roots of Edelweiß. In this study the possible influences of higher concentrations of silver nitrate are not considered but could be of interest for further investigations.

A concentration of 6% sucrose resulted in the highest leoligin concentration, when compared to untreated hairy roots. Elicitation with 6% sucrose was also more efficient than treatment with biotic factors (yeast extract and methyl

Summary

jasmonate). Additionally, the growth rate of the hairy roots was compared with respect to the used elicitors and concentrations.

A comparison of leoligin concentrations in untreated hairy roots and normal roots of Edelweiß indicated that there is no vast difference. It is very likely that hairy roots derived from Edelweiß genotypes with an inherently higher leoligin concentration would produce higher quantities of leoligin. Furthermore *in vitro* cultures would guarantee a stable production of leoligin, regardless of seasonal and environmental influences. With upscaling and cultivation of hairy roots in larger bioreactors an increased leoligin production could be feasible. All this indicates that *in vitro* cultivation of hairy roots from Edelweiß could be an alternative method to field culture.

7. Literaturverzeichnis

Angelova Z., Georgiev S., Roos W. (2006), Elicitation of plants, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **20**: 72-83.

Blöch C., Dickoré W.B., Samuel R., Stuessy T.F. (2010), Molecular phylogeny of the Edelweiss (*Leontopodium*, *Asteraceae* – *Gnaphalieae*), *Edinburgh J. Bot.* **67**: 235-264.

Comey N., Gray A.I., Hook I.L., James P., Sheridan H. (1999), Sesquiterpenes from *Leontopodium alpinum*, *Phytochemistry* **50**: 1057-1060.

Dingermann T., Zündorf I. (1999), Gentechnik, Biotechnik: Prinzipien und Anwendungen in der Pharmazie und Medizin, *Wiss. Verl. Ges., Stuttgart*, S. 213-228.

Dobner M.J., Ellmerer E.P., Schwaiger S., Batsugkh O., Narantuya S., Stütz M., Stuppner H. (2003), New lignan, benzofuran and sesquiterpene derivatives from the roots of *Leontopodium alpinum* and *L. leontopodioides*, *Helv. Chim. Acta* **86**: 733-738.

Dobner, M.J., Sosa S., Schwaiger S., Altinier G., Della Loggia R., Kaneider N.C., Stuppner H. (2004), Anti-inflammatory activity of *Leontopodium alpinum* and its constituents, *Planta Med.* **70**: 502-508.

Duwensee K., Schwaiger S., Tancevski I., Eller K., Van Eck M., Markt P., Linder T., Stanzl U., Ritsch A., Patsch J.R., Schuster D., Stuppner H., Bernhard D., Eller P. (2011), Leoligin, the major lignan from Edelweiss, activates cholesteryl ester transfer protein, *Atherosclerosis* **219**: 109-115.

Dweck A.C. (2004), A review of Edelweiss, *SÖFW-Journal* **130**: 2-4.

Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe T.A., Vasil I.K. (1976), Plant tissue culture media, *In Vitro* **12**: 473-8.

Literaturverzeichnis

Georgiev M.I., Pavlov A.I., Bley T. (2007), Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 1175-1185.

Giri A., Narasu M.L. (2000), Transgenic hairy roots: recent trends and applications, *Biotechnol. Adv.* **18**: 1-22.

Guillon S., Trémouillaux-Guiller J., Pati P.K., Rideau M., Gantet P. (2006), Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era, *Trends. Biotechnol.* **24**: 403-409.

Hamill J.D., Lidgett A.J. (1997), Hairy root cultures – Opportunities and key protocols for studies in metabolic engineering in Doran P.M. (Hrsg.), *Hairy roots Culture and Applications*, Harwood academic publishers, Australia, S.1-29.

Hook I. (1993), *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss): In vitro culture, micropropagation, and the production of secondary metabolites, in Bajaj Y.P.S. (Hrsg), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 21*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 217-232.

Hornick A., Schwaiger S., Rollinger J.M., Vo N.P., Prast H., Stuppner H. (2008), Extracts and constituents of *Leontopodium alpinum* enhance cholinergic transmission: brain ACh increasing and memory improving properties, *Biochem. Pharmacol.* **76**: 236-248

Hu Z., Du M. (2006), Hairy root and its application in plant genetic engineering, *J. Integrat. Plant Biol.* **48**: 121-127.

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

Khalili M. Hasanloo T., Tabar S.K.K. (2010), Ag+ enhanced silymarin production in hairy root cultures of *Silybum marianum* (L .) Gaertn, *Plant Omics* **3**: 109-114.

Kiene K. (1992), *Volksmedizin in verschiedenen Gebieten Vorarlbergs*, Diplomarbeit, Universität Wien.

Knechtl E. (1992), Volksmedizinisch verwendete Heilpflanzen und Hausmittel im Inntal und umgebenden Seitentälern (Tirol), Diplomarbeit, Universität Wien.

Meusel H., Jäger E.J. (1992), Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora, Text u. Karten, Bd. 3., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, S. 235.

Murashige T., Skoog F. (1962), A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.

Ondratschek K. (2012), *In vitro* Kultivierung von *Leontopodium alpinum* Cass., Diplomarbeit, Universität Wien.

Ootsdam A., Mol J.N.M., Van der Plas L.H.W. (1993), Establishment of hairy root cultures of *Linum flavum* producing the lignan 5-methoxypodophyllotoxin, *Plant Cell Reports* **12**: 474-477.

Pavlik M., Vacek J., Klejdus B., Kuban V. (2007), Hypericin and hyperforin production in St. John's Wort in vitro culture: influence of saccharose, polyethylene glycol, methyl jasmonate, and *Agrobacterium tumefaciens*, *J. Agric. Food Chem.* **55**: 6147-6153.

Pickl-Herck W. (1995), Volksmedizinische Anwendung von Arzneipflanzen im Norden Südtirols, Diplomarbeit, Universität Wien.

Prisching S., Diplomarbeit in Vorbereitung, Universität Wien.

Reisinger U., Schwaiger S., Zeller I., Messner B., Stigler R., Wiedemann D., Mayr T., Seger Ch., Schachner T., Dirsch V.M., Vollmar A.M., Bonatti J.O., Stuppner H., Laufer G., Bernhard D. (2009), Leoligin, the major lignan from Edelweiss, inhibits intimal hyperplasia of venous bypass grafts, *Cardiovasc. Res.* **82**: 542-549.

Riker A.J., Banfield W., Wright W., Keitt G., Sagen H. (1930), Studies on infectious hairy root of nursery apple trees, *J. Agr. Res.* **41**: 507-540.

Literaturverzeichnis

Rothe G., Garske U., Dräger B. (2001), Calystegines in root cultures of *Atropa belladonna* respond to sucrose, not elicitation, *Plant Sci.* **160**: 1043-1053.

Santos P.M., Figueiredo A.C., Oliveira M.M., Barroso J.G., Pedro L.G., Deans S.G., Younus A.K.M., Scheffer J.J.C. (1998), Essential oils from hairy root cultures and from fruits and roots of *Pimpinella anisum*, *Phytochemistry* **48**: 455-460.

Sauerwein M., Shimomura K. (1991), Alkaloid production in hairy roots of *Hyoscyamus albus* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*, *Phytochemistry* **30**: 3277-3280.

Schwaiger S., Adams M., Seger Ch., Ellmerer E.P., Bauer R., Stuppner H. (2004), New constituents of *Leontopodium alpinum* and their *in vitro* leukotriene biosynthesis inhibitory activity. *Planta Med.* **70**: 978-985.

Schwaiger S., Cervellati R., Seger C., Ellmerer E.P., About N., Renimel I., Godenir C., André P., Gafner F., Stuppner H. (2005), Leontopodic acid – a novel highly substituted glucaric acid derivative from Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) and its antioxidative and DNA protecting properties, *Tetrahedron* **61**: 4621-4630.

Shanks J.V., Morgan J. (1999), Plant “hairy root” culture, *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 151-155.

Shi M., Kwok K.W., Wu J.Y. (2007), Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **46**: 191-196.

Sivakumar G., Yu K.W., Hahn E.J., Paek K.Y. (2005), Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors, *Curr. Sci.* **89**: 641-649.

Souret F.F., Kim Y., Wyslouzil E. Wobbe K.K., Weathers P.J. (2003), Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression, *Biotechnol. Bioeng.* **83**: 653-667.

Speroni E., Schwaiger S., Egger P., Berger A., Cervellati R., Govoni P., Guerra M.C., Stuppner H. (2006), *In vivo* efficacy of different extracts of Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) in animal models, *J. Ethnopharmacol.* **105**: 421-426.

Stuppner H., Ellmerer E.P., Ongania K.H., Dobner M. (2002), Bisabolane derivatives from *Leontopodium alpinum*, *Helv. Chim. Acta.* **85**: 2982–2989.

Stuppner H., Schwaiger S. (2009):
http://www.uibk.ac.at/ipoint/news/uni_und_forschung/662327.html 19.6.2012.

Tabernaemontanus J.T. (1582), *Das Ander Buch von Kreutern*, in Bauhin H. (Hrsg.), *Tabernaemontanus J.T neu vollkommen Kreuter-Buch*, Reprint Basel, König (1731), Verlag Kölbl, Grünwald bei München (1993), S. 779-782.

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

Weising K., Kahl G. (1996), Natural genetic engineering of plant cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 327-351.

Wieser G. (1995), *Volksmedizinische Verwendung von Heilpflanzen und Hausmitteln im Osttiroler Pustertal mit Seitentälern und im Lesachtal*, Diplomarbeit, Universität Wien.

Wright W.H., Hendrickson A.A., Riker A.J. (1930), Studies on the progeny of single-cell isolations from the hairy-root and crown-gall organisms, *J. Agric. Res.* **41**: 541-547.

Literaturverzeichnis

Zhang C., Yan Q., Cheuk W., Wu J. (2004), Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag⁺ elicitation and nutrient feeding, *Planta Med.* **70**: 147-151.

Lebenslauf

KATHARINA SCHMIDTBAUER



Persönliche Daten

.....

Geburtsdatum	29. März 1988
Geburtsort	Ried im Innkreis
Adresse	Schottenfeldgasse 92/2/23 1070 Wien

Schulbildung

.....

1994 - 1998	Volksschule Mehrnbach
1998 - 2002	Private Mädchenhauptschule Ried im Innkreis
2002 - 2006	Bundesoberstufenrealgymnasium Ried i. I., Matura

Studium

.....

Seit Oktober 2006	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
September 2009	3-wöchige TCM-Ausbildung in China (Traditionelle Chinesische Medizin)

Fremdsprachen

.....

Englisch, Latein

Praktische Erfahrung

.....

Sommer 2009	Central-Apotheke Linz
Februar 2010, 2011	Riedberg-Apotheke Ried i. I.
Sommer 2010, 2011	Riedberg-Apotheke Ried i. I.
Oktober 2011	Beginn des praktischen Teils der Diplomarbeit am Institut für Pharmakognosie, Universität Wien