



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Untersuchungen zur Taxolproduktion in der Haselnuss“

verfasst von

Victor Shaykhislamov

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Brigitte Kopp

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp, die es mir ermöglichte, auf diesem interessanten Gebiet meine Diplomarbeit zu schreiben, für die persönliche Betreuung und die Begutachtung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Ass.-Prof. Mag. Dr. Christoph Wawrosch, der mir während meiner praktischen Arbeit bei Fragen und Schwierigkeiten immer zur Seite stand.

Weiters möchte ich mich für Durchführung der Analysen und Interpretation der Ergebnisse bei Frau Mag. Dr. Doris Engelmeier und Herrn Univ.-Prof. Dr. Wolfram Weckwerth (Department für Ökogenomik und Systembiologie, Universität Wien) sowie Herrn ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek (Department für Pharmakognosie, Universität Wien) bedanken.

Besonders möchte ich hier Herrn Dr. Hassan Rezadoost (Shahid Beheshti Universität, Iran) für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials und die Einführung in das praktische Arbeiten erwähnen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Mag. Florian Gössnitzer für kompetente technische Betreuung und ein nettes Arbeitsklima.

Hier möchte ich mich vor allem bei meiner Familie bedanken, die mich während des Studiums finanziell und moralisch unterstützte und natürlich bei meinen Freunden und KollegInnen für die schöne und unvergessliche Studienzeit.

Abkürzungen

FG	Frischgewicht
TG	Trockengewicht
LS	Nährmedium nach Linsmaier und Skoog (1965)
MJ	Methyljasmonat
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
ESI-MS/MS	Electrospray Ionisation Tandem Multistage Mass-Spectrometry
nanoHPLC	Nano High Performance Liquid Chromatography

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
1.1. Taxol® (Paclitaxel)	1
1.2. Taxolgewinnung	6
1.4. <i>Corylus avellana</i> L.	12
1.4. Elizitierung	16
1.5. Fragestellung	16
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1. Pflanzenmaterial	18
2.2. Nährmedien, Kulturbedingungen und Sterilität	19
2.3. Wachstumskurve und Elizitierung	21
2.4. Probenaufbereitung und Analytik	24
2.4.1. nanoHPLC-MS	24
2.4.2. UPLC-MS	26
3. ERGEBNISSE	29
3.1. Wachstumskurve	29
3.2. Elizitierung mit Methyljasmonat	31
3.2.1. Analyse mittels nanoHPLC-MS	31
3.2.2. Analyse mittels UPLC-MS	39
4. DISKUSSION	43
5. ZUSAMMENFASSUNG	50
6. SUMMARY	51
7. LITERATURVERZEICHNIS	52
LEBENS LAUF	67

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

1.1. Taxol® (Paclitaxel)

Taxol ist ein komplexes Diterpenoid mit der chemischen Bezeichnung (2 α ,4 α ,5 β ,7 β ,10 β ,13 α) -4,10- Bis (acetyloxy) -13- {[[(2R,3S) -3- (benzoylamino) -2- hydroxy -3- phenylpropanoyl] oxy} -1,7- dihydroxy -9- oxo -5, 20-epoxytax-11-en-2-yl-benzoat (IUPAC), der Summenformel C₄₇H₅₁NO₁₄ und einem Molekulargewicht von 853.9 Da (Panchagnula, 1998). Der Kern von Taxol besteht aus einem A-, B-, und C-Ringsystem, woran unterschiedliche funktionelle Gruppen wie 2 Hydroxy-, eine Benzoyl-, 2 Acetylgruppen und ein Oxetanring gebunden sind. In Position C13 ist (2'R,3'S)-N-benzoyl-3'-phenylisoserin über die Hydroxylgruppe verestert (Malik et al., 2011).

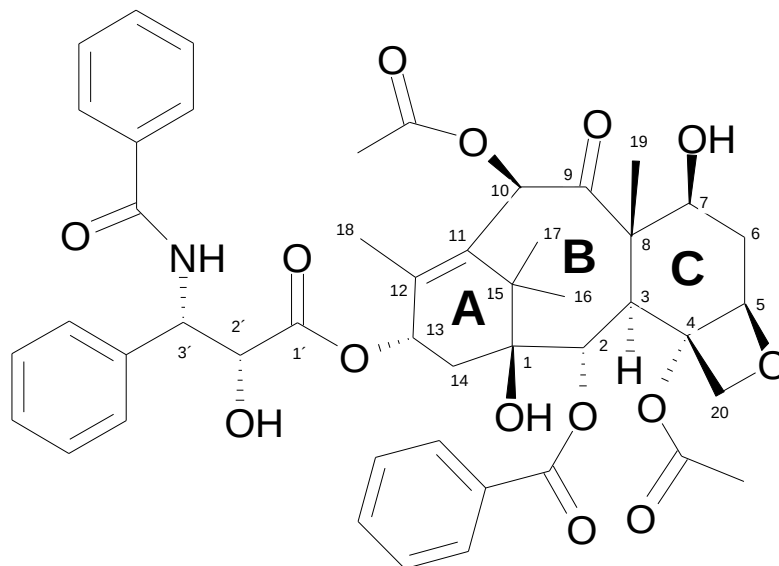


Abbildung 1: Strukturformel von Taxol

Der erste Schritt der Taxolbiosynthese in pflanzlichen Zellen beginnt, wie Abbildung 2 (Seite 3) zeigt, mit der Zyklisierung des Geranylgeranyldiphosphats (GGPP) zu Taxa-(4,5),(11,12)-dien, wobei das GGPP im Laufe der Isoprenbiosynthese aus 3 Isopentenylidiphosphat-Molekülen und einem Dimethylallyldiphosphatmolekül (DMAPP) gebildet wird (Teuscher et al., 2004). Weiters kommt es zur Hydroxylierung in Position C5 des Taxanrings und Ausbildung des Taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol (Jennewein et al., 2004). Im nächsten Schritt spalten sich die Wege der Biosynthese von Taxol auf und aus dem Taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol wird einerseits durch Acetylierung in Position C5 das Taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -yl-acetat gebildet (Walker et al., 2000), oder es entsteht durch Hydroxylierung in Position C13 α ein anderer taxoider Metabolit, das Taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -13 α -diol, welcher für die Biosynthese nicht mehr von Bedeutung zu sein scheint (Jennewein et al., 2001). Das Taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -yl-acetat wird weiterhin in der 10 β -Position hydroxyliert, dabei entsteht das Taxa-4(20),11(12)-dien-5 α ,10 β -diol-5-acetat (Schoendorf et al., 2001). Auch hier gibt es 2 Möglichkeiten, wie die Biosynthese weiterlaufen kann. Aus dem Taxa-4(20),11(12)-dien-5 α ,10 β -diol-5-acetat bildet sich enzymatisch einerseits das hydrophile und nicht mehr für die Taxolsynthese verwendbare Intermediat Taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -acetoxyl-10 β -14 β -diol (Jennewein et al., 2003), oder es entsteht in weiterer Folge durch mehrere Hydroxylierungen in Positionen C1, C2, C4 und C7 eine Oxidation des C9 und durch Ausbildung eines Epoxids aus der Doppelbindung zwischen C4 und C5 und anschließende Wanderung der Acetylgruppe aus der C5 in die C4-Position das 2-Debenzoyltaxan (vgl. Abbildung 2, S. 3). Diese Verbindung wird anschließend durch eine enzymatische Reaktion in 10-Deacetylbaccatin III umgewandelt (Malik et al., 2011). Durch eine Acetylierung der Hydroxylgruppe in Position 10 des 10-Deacetylbaccatin III bildet sich schließlich Baccatin III (Malik et al., 2011). Nun kommt es zum essentiellen Schritt der Taxolbiosynthese. Die Hydroxylgruppe in Position 13 des Baccatin III wird, wie Abbildung 2 (Seite 3) darstellt, mit der β -Phenylalanoyl-CoA-Seitenkette verestert (Walker et al., 2004). Weiters wird die an das Baccatin III gebundene β -Phenylalanoyl-

Seitenkette in Position C2' hydroxyliert, schließlich wird auf die Aminogruppe in Position C3' eine Benzoylgruppe übertragen (Walker et al., 2002).

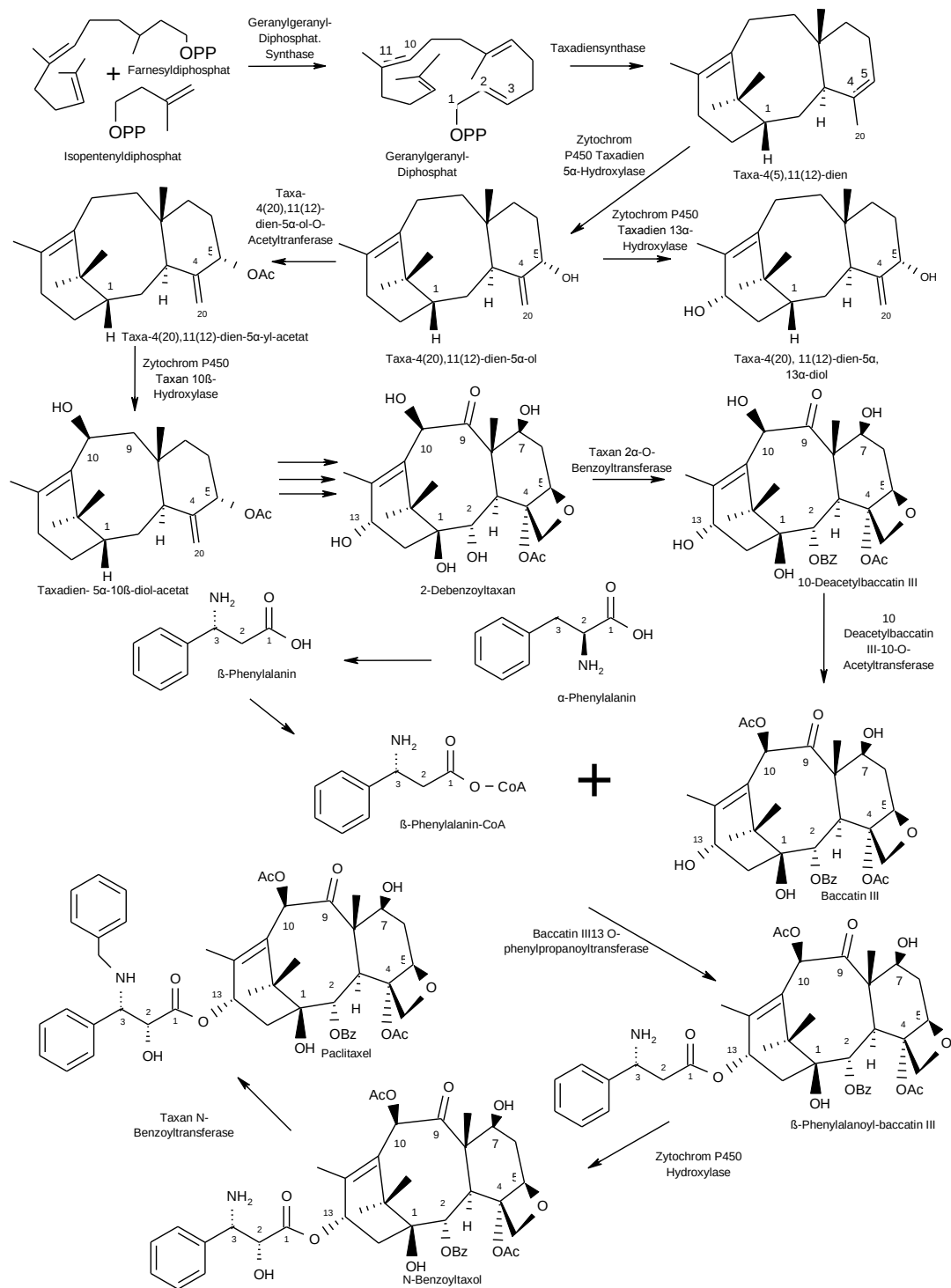


Abbildung 2: Darstellung der Biosynthese von Taxol (nach Malik et al., 2011)

Für die antineoplastische Aktivität von Taxol sind die Seitenkette an C 13, der A-Ring, eine Benzoylgruppe in Position C2 sowie der Oxetanring verantwortlich, wobei die Anwesenheit einer C3'-Aminoacylgruppe in der C13-Seitenkette für die Wirkung vorausgesetzt wird (Kingston, 2000). Die antitumorale Aktivität wird außerdem durch eine Hydroxylgruppe in der C2'-Position verstärkt (Guenard et al., 1993).

Taxol unterdrückt die Zellproliferation, indem der Wirkstoff an die β -Untereinheit des Tubulins bindet, wodurch auch die Polymerisation der Microtubuli auf zellulärer Ebene eingeleitet wird. Cofaktoren, wie Guanosintriphosphat (GTP) und andere Proteine, die sich im Normalfall an der Reaktion beteiligen, sind bei Anwesenheit von Taxol nicht mehr erforderlich (Guenard et al., 1993; Yeung et al., 1999; Kovács et al., 2007).

Microtubuli sind zylinderförmige Strukturen, werden aus Proteinen, vor allem aus dem Tubulin gebildet und sind zuständig für unterschiedliche zelluläre Funktionen, wie zum Beispiel: Bewegung, Nahrungsaufnahme, Kontrolle der Zellform, sensorische Transduktion und Ausbildung der mitotischen Spindel während der Zellteilung (Rowinsky et al., 1990; Horwitz, 1992). Die Microtubuli, die durch Polymerisation des Tubulins entstanden sind, werden anschließend durch das Taxol stabilisiert, wodurch auch deren Depolymerisation verhindert wird (Schiff et al., 1979; Schiff und Horwitz, 1980). In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass auf diese Art und Weise stabilisierte Polymere in der Zelle keine Funktion mehr ausüben können (Rowinsky und Donehower, 1995). Dadurch wird der Übergang der späten G2-Phase in die M-Phase des Zellzyklus durch diesen Wirkungsmechanismus blockiert. Die Zellteilung kann daher nicht mehr stattfinden, daraufhin wird Apoptose eingeleitet und die Zelle geht zu Grunde (Panchagnula, 1998; Horwitz et al., 2006).

Der Wirkstoff Taxol wurde in den 60er Jahren im Laufe eines Screening- und Discoveryprojekts des National Cancer Instituts in den Vereinigten Staaten von Amerika entdeckt.

Im Rahmen dieses Programms wurden zahlreiche Pflanzenextrakte auf eine antitumorale Aktivität geprüft, wobei der Rohextrakt aus der Rinde der Pazifischen Eibe, *Taxus brevifolia* L. Nutt., eine zytotoxische Wirkung in diversen Krebszelllinien zeigte (Panchagnula, 1998).

Die wirksame Verbindung aus diesem Rohextrakt wurde später als Taxol identifiziert (Wani et al., 1971). Seit der Entdeckung von Penicillin weckte kein anderes Chemotherapeutikum so viel Aufmerksamkeit in den fachlichen Kreisen als Taxol, der Grund dafür lag im einzigartigen Wirkungsmechanismus, welcher im Jahre 1979 von Schiff et al. beschrieben wurde.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Verbindung Taxol in der Behandlung gewisser Krebsarten klinisch wirksam ist, dazu gehören das Ovarial- (McGuire et al., 1989), Mamma- (Holmes et al., 1991) und das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (Murphy et al., 1993) sowie der Kopf-Hals-Krebs (Hitt et al., 2005). Außerdem wird Taxol erfolgreich bei AIDS-Patienten in der Therapie gegen Kaposi-Sarkom eingesetzt (Sgadari et al., 2000).

Eine weitere Anwendung kann Taxol in der Behandlung von Krankheiten finden, die nicht im Zusammenhang mit einer Neoplasie auftreten könnten, sondern überall dort, wo eine mikrotubuläre Stabilisation, unterdrückte Zellproliferation und verminderte Angiogenese erforderlich sind. Zu solchen Leiden gehört unter anderem auch Psoriasis (Schuppenflechte), deren Symptome im fortgeschrittenen Stadium durch die Taxolgabe verbessert werden können (Ehrlich et al., 2004). Außerdem wird dieser Arzneistoff weiterhin als Therapeutikum in der Behandlung verschiedener neurodegenerativer Taupathien (Ansammlungen von Tau-Proteinen im Gehirn), wie zum Beispiel die Alzheimer- und die Parkinsonkrankheit, untersucht (Zhang et al., 2005; Duan und Goodson, 2012).

1.2. Taxolgewinnung

Für die Gewinnung von Taxol werden diverse Spezies der Gattung *Taxus* (Familie *Taxaceae*) eingesetzt.

Taxus brevifolia L. Nutt. ist ein langsam wachsender Baum (Wani et al., 1971), der in Alaska, Kalifornien und Britisch-Kolumbien vorkommt (Reichling und Horz, 1994).

Taxus baccata L. (Eibenbaum, Taxus, Kandelbaum oder Ibe) ist ein immergrüner, frostempfindlicher giftiger Strauch oder Baum mit einer Maximalhöhe von rund 17 m. Die Anzahl der Wildbestände ist im 17. und 18. Jahrhundert in Europa stark zurückgegangen. Die Art kommt allgemein in Gebieten mit ozeanischem und subozeanischem Klima vor und ist in Mittel- und Südeuropa, Algerien, Kleinasien, Kaukasus und Nordpersien verbreitet. Wildwachsende Eibenbestände stehen in Deutschland unter Naturschutz. Die Blätter, Folia Taxi, werden volksmedizinisch als Dekokta zur Förderung der Menstruation, gegen Epilepsie, Mandelentzündungen und Diphtherie verwendet. In der Homöopathie wird aus frischen Zweigspitzen ein Auszug bereitet und bei Verdauungsbeschwerden und Hautpusteln eingesetzt (Reichling und Horz, 1994).

Taxus baccata L. ssp. *wallichiana* Zucc., die Himalaja-Eibe, ist in Indien und weiteren Gebieten Ostasiens beheimatet. Eine Zubereitung aus dieser Pflanze, Zarnab, wird im Rahmen des medizinischen Unani-Systems als Sedativum oder zur Behandlung von Bronchitis, Asthma, Epilepsie, Schlangenbisse, Skorpionstiche bzw. als Aphrodisiakum eingesetzt (Rikhari et al., 1998).

Taxus cuspidata Sieb. et Zucc., die Japanische Eibe, ist in Ostasien beheimatet. In der traditionellen chinesischen Medizin werden die Blätter gegen Diabetes und Nierenleiden verwendet (Wang et al., 2007).

Taxus canadensis Marsh. ist ein 2 m Höhe erreichender Strauch und ist von Kentucky bis Neufundland in den nördlichen US-Staaten verbreitet (Senneville et al., 2001).

Zu den Inhaltsstoffen, die von pharmazeutischem Interesse und für die Gattung *Taxus* typisch sind, gehören Taxane, unter anderem das Taxol, Baccatin III, 10-Deacetelybaccatin III und andere taxoide Verbindungen. In Tabelle 1 (Seite 8) sind Gehaltsangaben von Taxol in unterschiedlichen Organen von *Taxus*-Spezies angeführt. Die Konzentration dieser Verbindungen unterliegt natürlichen Schwankungen und ist je nach Spezies und Pflanzenteil (Rinde, Nadeln, Zweige, Holz) unterschiedlich (Jaziri et al., 1996).

Seit der Entdeckung von Taxol gab es zahlreiche Bemühungen, die Arzneistoffgewinnung zu optimieren und die Ausbeute während des Extraktionsverfahrens zu erhöhen, denn der Wirkstoff ist lediglich in einer sehr geringen Konzentration in den natürlichen Quellen enthalten. Sogar in Spezies wie *Taxus brevifolia*, wo Taxol im Vergleich zu anderen *Taxus*-Arten in einer höheren Konzentration gebildet wird, liegt der Taxolgehalt bei 10-800 mg, bezogen auf 1 kg Trockengewicht der pflanzlichen Droge (siehe Tabelle 1, Seite 8).

Für die Extraktion eines Kilogramms dieses Arzneistoffs würden rund 10.000 kg der Rinde der Pazifischen Eibe benötigt, was mit dem Fällen von 3000 Bäumen verbunden wäre (Schippmann, 2001). Für die Behandlung eines Krebspatienten mit Taxol werden im Durchschnitt 2,5 bis 3 g benötigt. Zur Gewinnung müsste dazu die Rinde von 8 Bäumen herangezogen werden (Bedi et al., 1996). Eine Taxolproduktion ausschließlich aus der Rinde der Pazifischen Eibe würde in dem Fall ein großes ökologisches Problem darstellen (Ojima et al., 1992). Außerdem ist die Extraktion des Wirkstoffs sehr aufwändig und erfordert den Einsatz fortgeschrittener und teurer Technologien (Malik et al., 2011).

Spezies	Pflanzenorgan	Gehalt in mg/kg* Trocken- gewicht	Literatur
<i>Taxus brevifolia</i>	Rinde	200	Wani et al., 1971
		100-130	Wheeler et al., 1992
		420-760	Keisey und Vance ,1992
		150	Vidensek et al., 1990
	Nadeln	200	Wani et al., 1971
		60	Witherup et al., 1990
			Keisey und Vance, 1992
		100-110	
	Sprösslinge Zweige	15	Vidensek et al., 1990
		20-230	Wheeler et al., 1992
		70-100	Keisey und Vance, 1992
<i>T. baccata</i>	Zweige mit Nadeln Nadeln	12	Vidensek et al., 1990
		40	Vidensek et al., 1990
		6	Vidensek et al., 1990
	Zweige mit Nadeln Zweige	30	Witherup et al., 1990
		10	Vidensek et al., 1990
<i>T. baccata</i> L. <i>ssp. wallichiana</i> Zucc.	Zweige mit Nadeln Zweige	30	Vidensek et al., 1990
		10	Vidensek et al., 1990
	Zweige mit Nadeln Zweige	10	Vidensek et al., 1990
		6	Vidensek et al., 1990
<i>T. canadensis</i>	Zweige mit Nadeln Nadeln	324-655	Nadeem et al., 2002
<i>T. cuspidata</i>	Zweige mit Nadeln Nadeln	20	Witherup et al., 1990
		90	
	Zweige mit Nadeln Nadeln	40	Witherup et al., 1990
		80	
<i>T. x media</i>	Zweige mit Nadeln Nadeln	350	Fett Neto und DiCosmo, 1992
		6	Vidensek et al., 1990
	Zweige mit Nadeln Nadeln	30-50	Witherup et al., 1990
		20-100	
<i>T. x media</i>	Zweige mit Nadeln Nadeln	800	M van Rozendaal et al., 2000

*Gehaltsangaben in der Originalliteratur wurden der besseren Übersichtlichkeit wegen, wenn nötig, in mg/kg umgerechnet.

Tabelle 1: Taxolgehalt von Vertretern der Gattung *Taxus*

Um letztendlich das Problem der Nachhaltigkeit der natürlichen Quellen zu lösen und die Ausbeute zu verbessern, begann die Suche nach Alternativmethoden zur Taxolgewinnung. Eine Totalsynthese dieses wichtigen Arzneistoffs wurde erfolgreich in der Forschungsgruppe von Holton und Nicolau im Jahre 1994 durchgeführt, allerdings ist das Herstellungsverfahren so komplex, dass der Einsatz dieser Methode zur industriellen Gewinnung von Taxol nicht in Frage kommt.

Eine weitere Möglichkeit ist die semisynthetische Produktion aus den Vorstufen von Taxol (Baccatin III und 10-Deacetylbaccatin III), die verglichen mit dem Wirkstoffgehalt der Rinde in relativ großen Mengen (1 g/kg, bezogen auf das Frischgewicht) in den nachwachsenden Zweigen und Nadeln der Mitteleuropäischen Eibe, *Taxus baccata*, vorkommen (Ojima et al., 1992). Diese Methode wird heutzutage großtechnisch von Bristol Meyers Squibb (BMS) zur Gewinnung eingesetzt: 30.000 kg Ausgangsmaterial könnte in dem Fall 1 kg Taxol liefern (Malik et al., 2011; Nimachow et al., 2010).

Zu anderen Methoden der Taxolgewinnung gehören biotechnologische fermentative Verfahren. Der Wirkstoff kann unter anderem durch in vitro-Kultivierung endophytischer Pilze gewonnen werden (Stierle et al., 1994). Diese Strategie ist allerdings aufgrund der geringen Taxolausbeute (siehe Tabelle 2, Seite 10) zur Zeit im industriellen Bereich nicht einsetzbar, nichtsdestotrotz werden weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet vorgenommen (Yuan et al., 2006). Eine wichtige umweltschonende Alternative stellt die Verwendung von Zellkulturen von *Taxus*-Spezies dar. Im Vergleich zu anderen konventionellen Verfahren der Wirkstoffproduktion bietet diese Strategie viele Vorteile: Die Verbindung Taxol kann in dem Fall unabhängig von Wetterbedingungen und saisonalen Schwankungen gewonnen werden. Außerdem ist die Produktion nicht an einen bestimmten Standort gebunden, sondern kann überall auf der Welt stattfinden (Vongpaseuth und Roberts, 2007).

Spezies	Kulturart	Taxolgehalt	Literatur
<i>Taxus cuspidata</i>	Kallus	200 mg/kg TG 8,3-14,2 mg/kg TG	Fett-Neto et al., 1992 Wickremesinhe und Arteea, 1993
	Immobilisierte Zellen	120 mg/kg TG	
	Zellsuspension	29 mg/L	Ketchum et al., 1999
	Bioreaktor	22 mg/L	Pestchanker et al., 1996
	Bioreaktor	3 mg/L	Son et al., 2000
<i>Taxus canadensis</i>	Zellsuspension	117 mg/L	Ketchum et al., 1999
<i>Taxus chinensis</i>	Zellsuspension	153,3 mg/L	Bringi et al., Patent WO 93/17121, 1993
		26,3 – 78,5 mg/L	Kim et al., 2001
		49.6 - 137,5 mg/L	Choi et al., 2000
<i>Taxus brevifolia</i>	Kallus	5,4-7,0 mg/kg TG	Wickremesinhe und Arteea, 1993
	Zellsuspension	1,43 mg/L 0,5 mg/L	Kim et al., 1995 Yukimune et al., 1996
<i>Taxus baccata</i>	Kallus	2,4 mg/kg TG	Wickremesinhe und Arteea , 1993
	Zellsuspension	48,3 mg/L	Yukimune et al., 1996
<i>Taxus x media</i>	Kallus	1,7-10,6 mg/kg TG	Wickremesinhe und Arteea, 1993
	Zellsuspension	28-110 mg/L	Yukimune et al., 1996
	Bioreaktor	21,1 mg/L	Cusido et al., 2002
<i>Taxomyces adreanae</i>	Zellsuspension	1-2 µg/L	Strobel et al., Patent US005322779A, 1992
<i>Pestalotiopsis microspore</i>	Zellsuspension	60-70 µg/L	Strobel et al., 1996

Tabelle 2: Taxolgehalt diverser Pflanzen- und Pilz-Spezies unter in vitro-Bedingungen.

Die Angaben in mg bzw. µg/L beziehen sich auf den extrazellulären Taxolgehalt, die Angaben in mg/kg Trockengewicht stellen den intrazellulären Taxolanteil dar.

In weitführenden Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, dass der Wirkstoffgehalt noch zusätzlich durch Optimierung der Kulturbedingungen, Selektion von schnell produzierenden Zelllinien sowie Zusatz von Elizitoren oder Präkursoren gesteigert werden kann. Aus den oben genannten Gründen findet der Einsatz von *Taxus*-Zellkulturen auch seine Anwendung im Bereich der Industrie (vgl. Tabelle 2, Seite 10). Der Konzern Python Biotech ist zur Zeit der größte Hersteller von Taxol mit einer Bioreaktorgesamtkapazität von 75.000 Litern (Expósito et al., 2009).

Seit vielen Jahren wird auf dem Gebiet der Taxolproduktion geforscht, zahlreiche Untersuchungen wurden vorgenommen, um die Verfügbarkeit dieses antineoplastischen Agens zu steigern. Es ist jedoch zu erwähnen, dass die neu entwickelten Verfahren zwar eine verminderte Belastung für die Umwelt darstellen, die Taxolgewinnung verbessern und erfolgreich kommerziell eingesetzt werden, doch handelt es sich nach wie vor um technologisch komplexe und teure Verfahren, woraus der hohe Preis des Wirkstoffes resultiert. Aufgrund dieser Tatsache wird weiter nach neuen Quellen für Taxane gesucht.

1.4. *Corylus avellana* L.

Corylus avellana L. (*C. silvestris* Salisb.) bzw. Gewöhnlich-Hasel, Haselnuss, Haselnussstrauch, Gemeine Hasel, Waldhaselstrauch, ist ein rund 1 bis 4 (max. 7) m hoher sommergrüner Strauch oder seltener kleiner Baum aus der Familie der Birkengewächse (*Betulaceae*), kommt häufig in Gebüsch, Wäldern und Hecken vor und ist beheimatet in Europa und Kleinasien (Proksch, 1992). Die nördliche Grenze des natürlichen Verbreitungsgebiets umfasst die Britischen Inseln, Skandinavien und nördliche Regionen Russlands. Im Osten wird die Verbreitung der Pflanze durch das Uralgebirge abgegrenzt. Im Süden verläuft die Grenze durch Spanien, Marokko und Algerien. Im Westen zieht sich diese durch Italien, das Gebiet des ehemaligen Jugoslawiens, Griechenlands und der Türkei sowie im Nordwesten durch den Iran und Transkaukasien (Kasapligil 1972).



Der Gattung *Corylus* sind taxonomisch unter anderem auch *Corylus maxima* Mill. und *Corylus pontica* C. Koch untergeordnet (Erdogan und Mehlenbacher, 2000). Es wird jedoch angenommen, dass die beiden Spezies aufgrund der stark variablen genetischen Ausstattung (Persson et al., 2004) der Art *Corylus avellana* L. angehören (Gökirmak et al., 2009).

Abbildung 3: *Corylus avellana* L., aus Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz (1885)
http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/thome/band2/tafel_005.html

Die Haselnusspflanze wird weltweit angebaut und kultiviert (Proksch, 1992). Zu den Hauptexporteuren von *Corylus maxima* zählt die Türkei mit 58% Marktanteil, gefolgt von Italien mit 17%, den USA mit 4%, Aserbaidschan mit 4%, Georgien mit 4% und China mit 3% der weltweiten Produktion (Faostat, 2011). *Corylus avellana* wird vorwiegend in den Küstenregionen von Oregon und Washington (USA) kultiviert (Faostat, 1995).

Die Samen der Nussfrucht enthalten rund 4,2 % Wasser und 14,1 % Proteine, die reich an Glutamin-, Asparaginsäure und Arginin sind (Alasalvar et al., 2003). Rund 2,3% machen feste Bestandteile in Form von Asche aus (Venkatachalam und Sathe, 2006). Auch 1,4 % lösliche Zucker, wie Saccharose, Stachyose, Raffinose und Glucose (Cristofori et al., 2008), kommen in den Samen vor. Der Hauptanteil der Inhaltsstoffe gehört allerdings mit 61,5 % der Lipidfraktion, die sich aus 83 % Öl-, 7,5 % Linolen-, und 5,7 % Palmitinsäure zusammensetzt, andere Fettsäuren sind nur in geringen Mengen enthalten (Venkatachalam und Sathe, 2006; Alasalvar et al., 2006a). In den Haselnusskernen wurden außerdem Ballast- und Mineralstoffe, Vitamine aus den Gruppen B und E (Açkurt et al., 1999), Phytosterole (β -Sitosterol, Squalen) und antioxidativ wirkende phenolische Verbindungen beschrieben (Alasalvar et al., 2003; 2006a). Die prozentuelle Zusammensetzung der Inhaltsstoffe unterliegt natürlichen Schwankungen, dazu tragen Faktoren wie z. B. geographischer Ursprung, Erntejahr, Klima und die Methode der Kultivierung der Hasel bei (Parcerisa et al., 1995; Pershern et al., 1995).

Weiters stellt das aus den Kernen gewonnene Öl eine mögliche Quelle von Biodiesel dar (Gumus, 2010; Xu und Hanna, 2009; Usta et al., 2006), zur Zeit werden weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet vorgenommen.

In der Rinde, Cortex Coryli avellanae, ist als Triterpen Betulin enthalten. In der Volksmedizin werden Zubereitungen aus der Droge bei fieberhaften Zuständen innerlich und zur Heilungsförderung von Unterschenkelgeschwüren äußerlich eingesetzt. Die Wirksamkeit ist allerdings nicht ausreichend belegt (Proksch, 1992).

Zu den Hauptinhaltsstoffen der Blätter von *Corylus avellana* L. zählen phenolische Verbindungen wie 5-Caffeoylchinasäure, Caffeyolweinsäure, p-Coumarylweinsäure, Myricetin-3-rhamnosid, Quercetin-3-rhamnosid, Quercetin-3-glycosid und Kämpferol-3-rhamnosid (Amaral et al., 2005; Oliveira et al., 2007), wobei das Myricetin-3-rhamnosid den Hauptanteil an den Inhaltsstoffen der phenolischen Fraktion des Extrakts ausmacht (Oliveira et al., 2007).

Die Blätter der Haselnuss werden volkstümlich zur Behandlung von Hämorrhoiden, Krampfadern, Phlebitis und Ödemen der unteren Extremitäten eingesetzt (Valnet, 1992; Fraise et al., 1999). Die Inhaltsstoffe in den Blättern von *Corylus* wirken adstringierend, vasokonstriktisch, vasoprotektiv und antihämorrhagisch (Valnet, 1992; Bruneton, 1993; Fraisse et al., 1999). Die Zubereitungen aus der Droge, Folia Coryli avellanae, werden bei Varizen, varikösen Ulcera, Dermatosen sowie bei Beinschwellungen und als blutstillendes Mittel verwendet (Proksch, 1992).

In den letzten Jahren ist *Corylus avellana* L. auch dafür bekannt geworden, dass diese Pflanze unter Umständen Baccatine als Sekundärstoffe synthetisieren kann, unter anderem auch Taxol (vgl. Tabelle 3, Seite 15), was durch mehrere Untersuchungen bestätigt wurde (Hoffman et al., 1998; Hoffman et al., 2005; Liang 2005; Ottaggio et al., 2008; Hoffman und Shahidi 2009; Qaderi et al., 2012).

Im Rahmen der Arbeit von Hoffman et al. (1998) wurden methanolische Extrakte unterschiedlicher Haselnussarten im Zusammenhang mit einem pathogenen Pilz untersucht. Mittels HPLC-Thermospray Massenspektrometrie-Analyse wurden Taxane, unter anderem auch Taxol, in den Zweigen der Sorte *Corylus avellana* 'Gasaway' identifiziert, allerdings, verglichen mit *Taxus* sp. , nur in 1/10 der Konzentration. Im Laufe weiterer Untersuchungen stellte sich heraus, dass Zellkulturen der Haselnuss auch eine größere Menge (siehe Tabelle 3) an Taxol und dessen Derivaten liefern können (Bestoso et al., 2006).

Die Tatsache, dass die Taxolproduktion unter kontrollierten Bedingungen in Haselnuss-Zellkulturen stattfinden kann, ist auch der Hauptgrund für weitere Untersuchungen. Im industriellen Bereich kann die in vitro-Kultivierung von *Corylus avellana* L. einige Vorteile mit sich bringen, denn diese Pflanze ist in vitro einfacher kultivierbar als *Taxus*-Arten (Bestoso et al., 2006). Außerdem kann die produzierte Menge an Taxol durch die Zugabe von Elizitoren und Präkursoren weiterhin gesteigert werden (Bestoso et al., 2006; Bemani et al., 2012).

<i>Corylus avellana</i> L.	Zellsuspension	1 mg/L	Bestoso et al., 2006
		0,1-0,74 mg/L	Rezaei et al., 2011
		3,3-15,7 mg/kg TG	Bemani et al., 2012
		22,04 mg/kg TG	Bemani et al., 2012
		0,46 mg/L	Safari et al., 2012
	Methanolischer Extrakt aus Blättern und Schalen	1,7-4,66 mg/kg	Ottagio et al., 2008

Tabelle 3: Taxolgehalt der Haselnuss unter in vitro-Bedingungen und in vivo. Die Angaben in mg bzw. µg/L beziehen sich auf den extrazellulären Taxolgehalt, die Angaben in mg/kg Trockengewicht stellen den intrazellulären Taxolanteil dar.

1.4. Elizitierung

Die Resistenzmechanismen von Pflanzen gegen pathogene Angriffe werden in konstitutive und induzierte Abwehrsysteme gegliedert. Eine induzierte Abwehrreaktion kann durch eine Reihe von chemischen Faktoren bzw. physikalischen Stress ausgelöst werden. In der Pflanze kommt es dadurch zu einer physiologischen und/oder morphologischen Antwort. Solche Faktoren werden als Elizitoren bezeichnet (Radman et al., 2003; Angelova et al., 2006). Man unterscheidet zwischen biotischen und abiotischen Faktoren. Die biotischen Elizitoren haben einen biologischen Ursprung, dazu gehören definierte chemische Verbindungen wie Chitosan, Pektin bzw. Alginat oder z.B. Hefeextrakte und Pilzsporen mit unterschiedlicher Zusammensetzung der Oligosaccharide, Lipo- und Glykoproteine. Zu den biotischen Stressfaktoren zählen unter anderem auch endogene Verbindungen der Pflanze, beispielsweise Enzyme, die bei einer Infektion durch pathogene Organismen freigesetzt werden. Die abiotischen Elizitoren haben keinen biologischen Ursprung, in dem Fall spricht man von physikalischen Faktoren, wie z.B. geänderte Osmolarität, Temperatur bzw. Einwirkung von Ultraschall oder unterschiedliche chemische Stoffe, z.B. Schwermetallsalze und oberflächenaktive Verbindungen. In der Biotechnologie wird die Elizitierung als Strategie für eine gesteigerte Produktion sekundärer Metabolite in einer Pflanzenkultur genutzt (Angelova et al., 2006; Vasconsuelo und Boland, 2007).

1.5. Fragestellung

Taxol[®] (Paclitaxel) ist ein sehr wichtiger Arzneistoff im Kampf gegen Krebs. Sein einzigartiger Wirkungsmechanismus macht es möglich, das Fortschreiten einer Neoplasie zu verlangsamen und somit die Überlebensdauer der Patienten signifikant zu erhöhen.

Der weltweite Jahresbedarf an Taxol[®] ist sehr hoch, er beträgt 800-1000 kg und erhöht sich jährlich um 20% (Nimachow et al., 2010). Die Gewinnung erfolgt heutzutage vorwiegend durch fermentative biotechnologische Verfahren aus Zellkulturen von *Taxus*-Spezies. Der Konzern Python Biotech ist zur Zeit der größte Hersteller von Taxol[®] mit einer Bioreaktorgesamtkapazität von 75.000 Litern (Expósito et al., 2009).

Wie bereits erwähnt kommt *Corylus avellana* L. als eine mögliche Alternativquelle der Taxolgewinnung in Frage, denn diese Pflanzenart ist einfacher und schneller in vitro kultivierbar als *Taxus* (Bestoso et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit sollten Zellkulturen der Haselnuss *Corylus avellana* L. cv. ‚Eshkevar‘ bezüglich einer möglichen Taxolproduktion charakterisiert werden. Dazu sollte eine Wachstumskurve erstellt werden, um herauszufinden, zu welchem Zeitpunkt die untersuchte Zelllinie für eine Elizitierung und das Passagieren geeignet ist.

Als Elizitor wurde zu Beginn der praktischen Arbeit Methyljasmonat gewählt, da diese Verbindung bereits in der Arbeit von Bestoso et al. (2006) zur Steigerung der Taxolbiosynthese und Produktion anderer taxoider Derivate führte. Somit schien dieser biotische Elizitor geeignet für die Charakterisierung der von uns eingesetzten Zelllinie.

Die Probenanalysen wurden freundlicherweise in Kooperation mit dem Department für Ökogenomik und Systembiologie (Universität Wien, Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Wolfram Weckwerth) durchgeführt. Die praktische Ausführung erfolgte dankenswerterweise von Frau Mag. Dr. Doris Engelmeier. Die Analysedaten inklusive Abbildungen wurden für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Pflanzenmaterial

Für die vorliegende Arbeit wurden Kalli (siehe Abbildung 4) und Suspensionskulturen (siehe Abbildung 5) von *Corylus avellana* L. cv. ‚Eshkevar‘, einer im Nordiran kultivierten Sorte, freundlicherweise von Dr. Hassan Rezadoost, Shahid Beheshti Universität, Iran, bereitgestellt.

Neue Zellsuspensionskulturen (Abbildung 5) wurden wie folgt hergestellt: Unter Einhaltung aseptischer Bedingungen wurden Kalli auf ein Filterpapierblatt transferiert und mit einem Skalpel in ca. 0,25-0,5 cm große Stücke zerschnitten. Daraufhin folgte die Abtrennung bräunlich gefärbter Aggregate. Ca. 2 g diese Masse wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml LS-Medium (Linsmayer und Skoog, 1965) übergeführt, mit einer Alu-Kappe verschlossen und mit Parafilm® überzogen. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 10-14 Tage. Zur Abtrennung der Aggregate wurde die Zellsuspension durch ein grobmaschiges Sieb gegossen. Die restliche Flüssigkeit mit Zellen wurde auf einem Filterpapier in einer Porzellannutsche gesammelt und das Nährmedium von der Zellmasse abgetrennt. Etwa 2g der abgenutzten Zellen wurden in 50 ml LS-Medium übergeführt. Diese Strategie wurde so lange angewendet, bis feine und einheitliche Suspensionskulturen erhalten wurden, danach erfolgte die Subkultivierung ohne Sieben.



Abbildung 4: Weißlich-gelbe Kalluskultur von *Corylus avellana* L. cv. Eshkevar



Abbildung 5: Zellsuspensionskulturen von *C. avellana* L. cv. Eshkevar

2.2. Nährmedien, Kulturbedingungen und Sterilität

Nährmedien

Als Basismedium zur Kultivierung von Kalli und Zelluspensionen wurde das LS-Medium (Linsmayer und Skoog, 1965; Duchefa Biochemie, P08059.04) in Form einer Fertigmischung verwendet. Zusätzlich wurden 3 mg/L 3-Indolylessigsäure (EGA-Chemie, 1-375-0), 3 mg/L α -Naphthylelessigsäure (Sigma-Aldrich, 201-705-8), 2,5 mg/L Kinetin (Sigma-Aldrich, K-0753) und 30 g/L Saccharose (handelsüblicher Haushaltszucker) beigemischt, wobei der Gehalt an myo-Inosit (Merck) von 100 mg/L auf 200 mg/L erhöht wurde.

Zur Herstellung eines flüssigen Nährmediums wurde die Hälfte des benötigten Wasservolumens in einem Erlenmeyerkolben vorgelegt. Unter Rühren wurden die entsprechenden Mengen an LS-Medium, myo-Inosit und Saccharose zugesetzt. Nach dem Auflösen der Feststoffe wurde das benötigte Volumen an 3-Indolylessigsäure, α -Naphthylelessigsäure und Kinetin aus Stammlösungen entnommen. Das Herstellen der Stammlösungen erfolgte durch Auflösen der Festsubstanzen in destilliertem Wasser. Die Stammlösungen wurden im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt und der pH-Wert durch Zugabe von 0,1 M KOH bzw. 0,1 M HCL auf $5,5 \pm 0,1$ eingestellt. Das flüssige Nährmedium wurde daraufhin zu je 50 ml auf 250 ml Erlenmeyerkolben verteilt und bei 121 °C 20 min lang autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgte im Dunklen bei 5°C.

Die Herstellung eines festen Nährmediums zur Kultivierung von Kalli erfolgte wie beim flüssigen Nährmedium, zusätzlich wurde Agar in einer Konzentration von 8 g/L beigemischt. Das flüssige Nährmedium wurde daraufhin zu je 30 ml auf HIPP®-Gläser (Höhe 65 mm, Ø 55 mm) verteilt und bei 121 °C 20 min lang autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgte im Dunklen bei 5°C.

Zum Überprüfen der Sterilität der Kallus- und Suspensionskulturen wurde der Nähragar zur Züchtung anspruchsvoller Bakterien (Standard I-Agar, Merck) verwendet. Zur Zubereitung wurde das benötigte Volumen an destilliertem heißem Wasser in einer SCHOTT-DURAN® Flasche vorgelegt. Daraufhin wurde der feste Nähragar unter ständigem Rühren zum Teil gelöst. Zur vollständigen Auflösung fester Bestandteile wurde ca. 10 min lang in der Mikrowelle erhitzt, anschließend wurde mit der restlichen Menge an destilliertem Wasser aufgefüllt und der pH-Wert durch Zugabe von 0,1 M KOH bzw. 0,1 M HCL auf $7,5 \pm 0,1$ eingestellt. Die Autoklavierung erfolgte für 20 min bei 121 °C. Danach wurde der Nähragar unter einer sterilen Werkbank in leere Petrischalen ausgegossen. Nach dem Aushärten des Agars wurden die Schalen im Dunklen bei 5 °C für spätere Untersuchungen aufbewahrt.

Kulturbedingungen

Kalluskulturen in HIPP®-Gläsern wurden mit Magentakappen und Parafilm® verschlossen und im Dunklen bei $25 \pm 1^\circ\text{C}$ gehalten. Die Suspensionskulturen wurden in 250ml Erlenmeyerkolben, verschlossen mit einer Alu-Kappe und überzogen mit Parafilm®, auf einem Rotationsschüttler (siehe Abbildung 6) bei 115 Umdrehungen pro Minute im Dunklen bei $25 \pm 1^\circ\text{C}$ Raumtemperatur gehalten.



Abbildung 6: Zellsuspensionskulturen von *Corylus avellana* L. auf dem Rotationsschüttler

Sterilität

Während der Durchführung der praktischen Arbeit wurden Zellkulturen laufend auf Sterilität überprüft. Dabei wurde unter aseptischen Bedingungen der Sterilwerkbank mit Hilfe einer Öse ein Inokulum entnommen und auf Petrischalen mit Nähragar zur Züchtung anspruchsvoller Bakterien verteilt. Die Petrischalen wurden daraufhin mit Parafilm® verschlossen und bei 35 °C 2-3 Tage lang bebrütet. Anschließend erfolgte eine optische Auswertung. Kulturen, bei denen mikrobielles Wachstum festgestellt wurde, wurden autoklaviert und entsorgt.

2.3. Wachstumskurve und Elizitierung

Wachstumskurve

Um den optimalen Zeitpunkt für das Passagieren sowie die spätere Elizitierung zu finden, war es notwendig, eine Wachstumskurve der Zellkulturen zu erstellen. Dafür wurden Zellen unter aseptischen Bedingungen in einer Porzellannutsche gesammelt, nach der Abtrennung der Zellmasse vom Nährmedium wurde möglichst genau je 1g frischer Zellen auf 100 ml Erlenmeyerkolben mit 30 ml LS-Medium verteilt. Die Gefäße wurden daraufhin mit einer Alu-Kappe verschlossen, mit Parafilm® abgedichtet und unter den in Kapitel 2.2. (S. 21) beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die Bestimmung des Frischgewichts erfolgte jeden 2. Tag, wobei die erste Bestimmung an Tag 0 (Kulturstart) durchgeführt wurde. Beim Ermitteln des Frischgewichts wurde der Zellinhalt in einer Porzellannutsche von dem Nährmedium abgetrennt. Die Zellmasse samt Filterpapier wurden abgewogen und zur Bestimmung des Trockengewichts bei 35°C im Trockenschrank 48 Stunden lang getrocknet.

Da die Zellen nicht vollständig vom Filterpapier abgetrennt werden können, wurden vorab jeweils 10 Filter mit Nährmedium befeuchtet und in der Porzellannutsche unter Vakuumanschluss für 3 min. stehen gelassen. Danach wurden die Filter abgewogen, somit wurde das „Frischgewicht“ der

Filter ermittelt. Die Filter wurden anschließend 48 h bei 35°C getrocknet. Nach dem Abwiegen der trockenen Filter wurde der Mittelwert berechnet.

Wie bereits erwähnt erfolgte die Bestimmung des Frischgewichts der Zellen nach deren Abtrennung vom flüssigen Nährmedium. Dafür wird die Zellsuspension durch ein Filterpapier in einer Porzellannutsche gegossen. Daraufhin wird das Vakuum angeschlossen, um die restliche anhaftende Flüssigkeit abzusaugen. Nach dem Abtrennen der anhaftenden Flüssigkeit von den Zellen kann es allerdings durch Verdunstungsprozesse, welche durch das Luftsaugen verstärkt auftreten können, zu einer Austrocknung der Zellmasse kommen. Dadurch verringert sich das Frischgewicht, die Bestimmung wäre in diesem Fall ungenau. Aus diesem Grunde war es notwendig, das Ausmaß der Austrocknung während des Abnutschens zu ermitteln.

Zu diesem Zweck wurde der Wassergehalt der Zellen in einem 8 Minuten andauernden Versuch nach jeder Minute Luftsaugens bestimmt. Die erste Bestimmung erfolgte nach einer Minute, die letzte nach 8 Minuten. Für diesen Versuch wurde eine nicht weiter definierte Zellmenge aus der Suspension in eine Porzellannutsche übergeführt, daraufhin wurde Vakuum für eine definierte Zeit (1 bis 8 min) angeschlossen. Danach wurde das Frischgewicht der Zellen samt Filter bestimmt. Nach der Trocknung bei 35 °C wurde das Endgewicht der Zellen ermittelt. Aus der Differenz zwischen Frisch- und Trockengewicht der Zellen konnte der Wassergehalt in Abhängigkeit von der Dauer des Vakuumanschlusses innerhalb der 8-Minutenspanne festgestellt werden. Alle Bestimmungen erfolgten in einem Triplikat. Bei Bestimmung 3 wurde der Wassergehalt der Zellen bis Minute 10 weiterverfolgt (siehe Abbildung 7, S. 29).

Elizitierung

Aus der Literatur ist bekannt, dass Zellkulturen von *Corylus avellana* L. mit Methyljasmonat (MJ) elizitiert werden können. Dies führt zur Steigerung der Taxolbiosynthese. Es musste daher abgeklärt werden, ob die von uns eingesetzte Zelllinie genauso wie andere Zellkulturen auf MJ reagiert. Dafür wurde Methyljasmonat (Sigma-Aldrich, 101032154) in einer Endkonzentration von 100 µmol/L für die Elizitierung der Suspensionskulturen gewählt (siehe Kap 1.5., S. 18). Der geeignete Zeitpunkt für die Durchführung dieses Versuchs wurde am Tag 8 der Zellkultivierung in der beginnenden exponentiellen Wachstumsphase laut Wachstumskurve festgelegt. Zur Herstellung des Elizitors wurde MJ in 96proz. EtOH auf die benötigte Endkonzentration verdünnt. Für die Kontrolle wurde 96proz. Ethanol verwendet. Bevor der Elizitor und die Kontrolllösung der Zellkultur zugesetzt werden konnten, wurden die Lösungen sterilfiltriert. Nach der Zugabe des Elizitors und der Kontrolllösung wurden die Zellkulturen mit einer Alu-Kappe verschlossen und mit Parafilm® abgedichtet. Die Kultivierung fand unter normalen Bedingungen statt (vgl. Kapitel 2.2., S. 21).

Die Aufarbeitung wurde an Tag 18 durchgeführt. Die Zellmasse wurde dazu mit Hilfe einer Porzellannutsche von Nährmedium abgetrennt, danach wurde 3 Minuten lang Luft durch die Nutsche gesaugt. Das Frischgewicht der Zellen samt Filter wurde bestimmt. Anschließend wurden die Zellen eingefroren und über Nacht lyophilisiert, danach erfolgte die Bestimmung des Trockengewichts und die gefriergetrockneten Zellen wurden bis zur Extraktion im Exsikkator gelagert.

Für die spätere Analyse des extrazellulären Anteils der Inhaltsstoffe wurde das abgetrennte Medium in einer SCHOTT-DURAN®-Flasche gesammelt und im Dunklen bei 5 °C Raumtemperatur gelagert.

2.4. Probenaufbereitung und Analytik

Es ist bekannt, dass in Zellkulturen von *Corylus avellana* L. Taxane gebildet werden und diese sowohl intrazellulär lokalisiert sind als auch in das Nährmedium abgegeben werden (Bestoso et al., 2006; Rezaei et al., 2011). Aus diesem Grunde wurden sowohl die Zellmasse als auch das Nährmedium auf das Vorhandensein von Taxanen untersucht.

2.4.1. nanoHPLC-MS^a

Extraktion extrazellulärer Inhaltsstoffe

Die Extraktion des Nährmediums erfolgte wie bei Rezaei et al. (2011) beschrieben, wobei die modifizierte Methode von Wu und Lin (2003) angewandt wurde. 750 ml des abgetrennten Mediums der elizitierten Zellen und 300 ml des Nährmediums der Kontrolle wurden mit demselben Volumen Dichlormethan dreimal ausgeschüttelt und die organische Phase am Rotavapor bei 40 °C Wasserbadtemperatur zur Trockene gebracht. Der Extrakt wurde für die spätere Analyse im Exsikkator aufbewahrt.

Extraktion intrazellulärer Inhaltsstoffe

Für die Analyse mittels nanoHPLC-ESI-Massenspektrometrie wurden jeweils 500 mg elizitierter Zellen und 500 mg Kontrolle eingesetzt.

Die Extraktion der lyophilisierten Zellen erfolgte wie bei Rezaei et al. (2011) beschrieben, wobei die modifizierte Methode von Wu und Lin (2003) angewandt wurde. Die Zellen wurden in eine Reibschale gegeben und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur mit einem Pistill zerkleinert, daraufhin mit

^a Die Untersuchung der Zellextrakte fand im Rahmen der Kooperation mit dem Department für Ökogenomik und Systembiologie (Universität Wien, Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Wolfram Weckwerth) statt. Die praktische Ausführung der Analyse erfolgte freundlicherweise von Frau Mag. Dr. Doris Engelmeier. Die Analysedaten inklusive Abbildungen wurden für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

Methanol (1:100) versetzt und im Ultraschallbad ca. 40 Minuten extrahiert. Anschließend wurde abfiltriert, das Filtrat zur Trockene eingedampft und in einer Mischung aus Dichlormethan und Wasser (1:1) aufgenommen. Nach dem Ausschütteln (3x) erfolgte 10 Minuten lang eine Zentrifugation bei 4000 g. Die organische Fraktion wurde anschließend abgetrennt und zur Trockene gebracht. Die Extrakte wurden 1 Tag im Exsikkator unter Vakuum getrocknet und bei -18 °C gelagert.

Für die Analyse mittels nanoHPLC-ESI-Massenspektrometrie wurden die extra- und intrazellulären Auszüge der elizitierten Zellen und der Kontrolle in 1 ml Methanol gelöst und 5 Minuten bei 13000 g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 10 µL entnommen und in einer Mischung aus Wasser (89,9 µL) und 0,1 proz. Ameisensäure (0,1 µL) aufgenommen. Das Injektionsvolumen betrug 5 µL. Die Extrakte aus 500 mg elizierter Zellen bzw. Kontrolle und Auszüge aus dem Nährmedium (700ml und 300ml Kontrolle) wurden mit Hilfe der im Folgenden beschriebenen Verfahren analysiert.

Nano High Performance Liquid Chromatography (nanoHPLC)

Zur Auftrennung der Taxane wurde eine Nano High Performance Liquid Chromatography-Anlage (Eksigen, Dublin, Irland) verwendet. Das System war mit einem Autosampler und einer Säule (nano Waters Acquity HSS T3, 1.8µm, 100 µm x100 mm) ausgestattet.

Als mobile Phase A wurde eine Mischung aus 0,1% Ameisensäure und Wasser bereit. Für die mobile Phase B wurde eine Mischung aus 90% Acetonitril, 10% Wasser und 0,1% Ameisensäure hergestellt. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 1 µL/min eluiert. Der Lösungsmittelgradient wurde wie folgt eingestellt: 0-63 Min. Phase A, 0-3 Min. 5% Phase B, 3-25 Min. 20% Phase B., 25-40 Min. 40% Phase B, 40-55 Min. 50% Phase B, 55-63 Min. 95% Phase B.

Als externe Standards wurden Taxol (Sigma-Aldrich, T7402), Baccatin III (Sigma-Aldrich, B8154), Cephalomannin (Sigma-Aldrich, C4991) und 10-Deacetylbaaccatin III (Sigma-Aldrich, D3676) verwendet. Zu Beginn der

Analyse wurden Massenspektren von einzelnen Referenzsubstanzen aufgenommen, danach wurde eine Standardmischung aus Taxol, 10-Deacetylbaccatin, Cephalomannin und Baccatin III (jeweils 0,2 mg) in 5 ml einer Lösung aus Acetonitril und Wasser (8:2) aufgenommen und analysiert.

Electrospray Ionisation Tandem Multistage Mass-Spectrometry (ESI-MS/MS)

Zur Detektion der Taxane wurde das Thermo Electron Linear Trap Quadrupole Orbitrap XL Massenspetrometer mit einer Nano-Electrospray Ionenquelle (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) ausgestattet. Die Steuerung der Ionenquelle erfolgte mit Hilfe der Xcalibur 2.1-Software. Die Analyse wurde im positiven Ionisierungsmodus der Ionenquelle durchgeführt. Der Fourier-Transformer wurde mit den Kalibrierungsstandards des Herstellers so eingestellt, dass die Nachweisgrenze dieses Systems unter 1 ppm lag. Der Scan wurde im Orbitrap bei $r > 30000$ gesammelt und lag für möglichst genaue Detektion bei 150-2000 m/z. Für die Auswertung der Daten wurde das Programm ProtMAX 2 Beta 2.7 (Department für Ökogenomik und Systembiologie, Universität Wien) verwendet.

Massenspektrometrische Parameter:

<i>Internal recalibration with Cyclometricone</i>	<i>m/z= 371.101230</i>
<i>Capillary voltage</i>	4.5 kV
<i>Lens offset</i>	160 V
<i>Capillary temperature</i>	180 °C
<i>Sheath gas</i>	-
<i>Auxiliary gas</i>	-

2.4.2. UPLC-MS

Extraktion intrazellulärer Inhaltsstoffe

Für die Analyse mittels UPLC-Massenspektrometrie wurden 1,9 g elizitierter Zellen eingesetzt. Aufgrund des zu geringen Zellmaterials war keine Kontrollmessung im Rahmen dieses Versuchs möglich. Für diesen Zweck

wurden Analysedaten zur Kontrolle aus der Paralleluntersuchung der gleichen Zelllinie von Schatzl (2012, vgl. S. 27) entnommen.

Die Extraktion der 1,9 g elizitierten Zellen erfolgte wie bei Rezaei et al. (2011) beschrieben, wobei die modifizierte Methode von Wu und Lin (2003) angewandt wurde (siehe Kapitel 2.4.1., S. 24). Die Menge an Extrakt betrug 37 mg. Dieser wurde anschließend in 100 µl Methanol aufgenommen, zentrifugiert und in UPLC-Vials übergeführt.

Für die Untersuchung des Extrakts aus 1,9 g mit Methyljasmonat elizitierten und lyophilisierten Zellen wurde ein UPLC-MS-System verwendet.

Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

Zur Auftrennung der taxoiden Verbindungen in der Probe wurde eine Ultimate 3000 RS UPLC-Anlage (Dionex) verwendet. Das UPLC-System war mit einer C-18 Dionex Acclaim 120 Säule (2,1x150 mm, Vorsäule 2,1x4 mm) ausgestattet. Der lipophile Extrakt wurde bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit der mobilen Phase A, bestehend aus wässriger Ameisensäure (pH 3,54), und der Phase B (Acetonitril) eluiert. Zu Beginn der Analyse wurden 30% Acetonitril verwendet, wobei dessen Konzentration innerhalb von 7 Minuten auf 100% erhöht wurde. Danach wurde die Säule mit 100% Acetonitril 10 Minuten gespült, anschließend mit 30% der mobilen Phase B 15 Minuten äquilibriert. Das Injektionsvolumen betrug 5 µL. Zur externen Standardisierung wurden Taxol, Baccatin III und 10-Deacetylbaccatin III eingesetzt.

Die UPLC-Anlage wurde an ein Massenspektrometrie-System (Sciex API 4000 triple quadrupol MS) gekoppelt, um die Verbindungen nachweisen und in sehr kleinen Mengen quantifizieren zu können.

Massenspektrometrische Parameter:

<i>Quellen-Typ</i>	Turbo Ion Spray = ESI Quelle
<i>Scan-Typ</i>	Multiple Reaktion Monitoring
<i>Polarität</i>	Positive
<i>Software-Version</i>	Analyst 1.5

<i>Software-Application</i>	Dionex Chromatography MS Link
<i>Curtain Gas</i>	10
<i>Gas 1</i>	30
<i>Gas 2</i>	30
<i>Ion Spray Voltage (Needle)</i>	5500
<i>Ion source temperature</i>	400°C
<i>Interface heater</i>	ON
<i>CAD gas</i>	4
<i>Entrance Potential</i>	10
<i>Channel electron multiplier</i>	2100
<i>Deflector Voltage</i>	25

Standardspezifische MS-Parameter:

- Baccatin III

<u>Q1 Mass(Da)</u> <i>Mutterion</i>	<u>Q3 Mass (Da)</u> <i>Tochterion</i>	<u>Dwell (msec)</u>	<u>Parameter</u>	
587,18	405,2	200	Declustering potential	66
			Collision engergy	17
			Collision cell exit potential	18

- 10-Deacetylbaccatin

<u>Q1 Mass(Da)</u> <i>Mutterion</i>	<u>Q3 Mass (Da)</u> <i>Tochterion</i>	<u>Dwell (msec)</u>	<u>Parameter</u>	
545,22	363,1	200	Declustering potential	251
			Collision engergy	19
			Collision cell exit potential	16

- Taxol

<u>Q1 Mass(Da)</u> <i>Mutterion</i>	<u>Q3 Mass (Da)</u> <i>Tochterion</i>	<u>Dwell (msec)</u>	<u>Parameter</u>	
854,3	286,1	200	Declustering potential	61
			Collision engergy	23
			Collision cell exit potential	18

3. ERGEBNISSE

3.1. Wachstumskurve

Wie bereits in Kapitel 2.3. (S. 22) erwähnt, wurden zum Erstellen der Wachstumskurve das Frisch- und Trockengewicht der Zellen verwendet. Beim Bestimmen des Frischgewichtes müssen Zellen vom Nährmedium durch Abnutschen abgetrennt werden, wobei die anhaftende Flüssigkeit durch Luftsaugen entfernt wird. Je länger die Vakuumpumpe angeschlossen bleibt, umso stärker sind Verdunstungsprozesse ausgeprägt. Dadurch kommt es zum Austrocknen der Zellmasse und Verringerung des Frischgewichts. Aus diesem Grunde war es notwendig, einen geeigneten Zeitpunkt für das Abstellen des Vakuums zu finden. Für diesen Zweck wurde der Wassergehalt der abzunutschenden Zellen in Abhängigkeit von der Dauer des Luftsaugens bestimmt. Bestimmung 3 wurde bis Minute 10 weiterverfolgt. In Abbildung 7 lässt sich erkennen, dass der Wassergehalt der Zellen mit zunehmender Zeit des Luftsaugens stärker schwankt und sinkt.

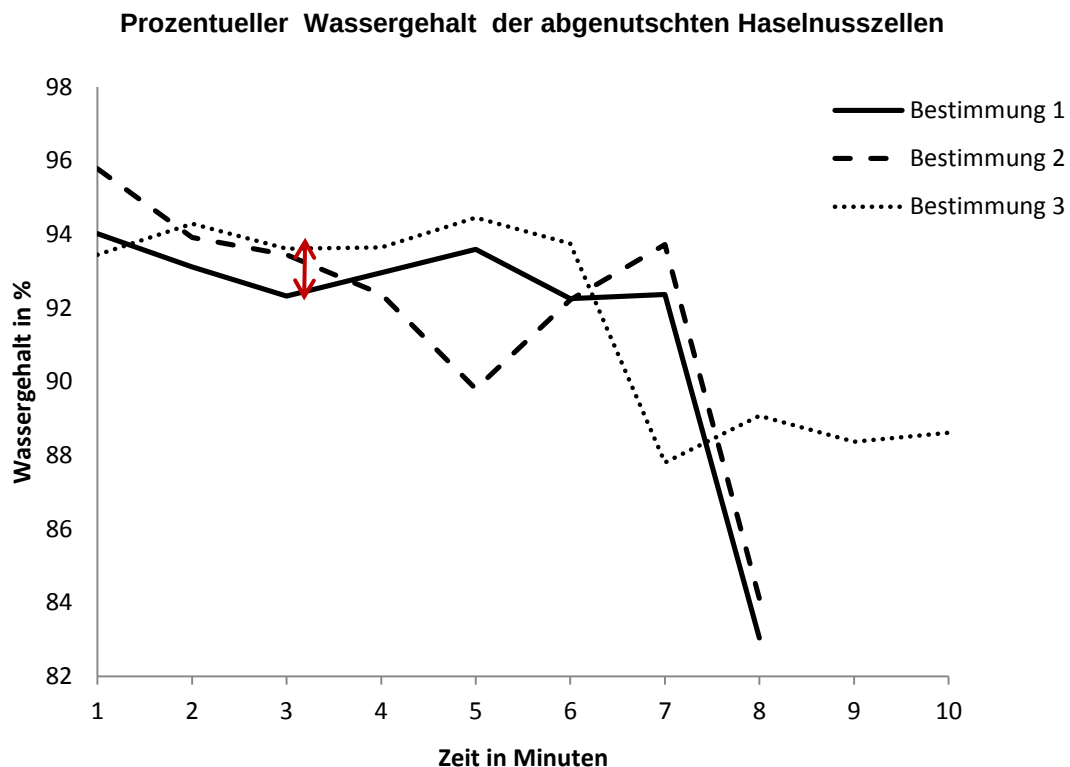


Abbildung 7: Prozentueller Wassergehalt der Haselnusszellen im Laufe von 10 Min. Luftsaugen bei der Abtrennung der Zellmasse vom Nährmedium.

Die Zeit für das Abstellen des Vakuums wurde mit 3 Minuten festgelegt, denn in diesem Bereich waren die Schwankungen hinsichtlich des Wassergehalts am geringsten. Unter Beachten dieses Faktors ließ sich das Frischgewicht der Zellen ohne starke Abweichungen bestimmen.

Um den richtigen Zeitpunkt für Passagieren und Elizitierung der Suspensionskulturen festzulegen, war es notwendig, eine Wachstumskurve zu erstellen. Die Vorgehensweise ist in Kapitel 2.3. (S. 21) beschrieben.

Abbildung 8 stellt den Wachstumsverlauf der Haselnusszellkulturen dar. Im Diagramm ist ersichtlich, dass die Zellen einen logarithmischen Verlauf bezüglich des Wachstums nehmen. In den ersten 2 Tagen der Kultivierung befinden sich die Zellen in einer Ruhephase, am Tag 4 lässt sich der beginnende exponentielle Wachstumsverlauf erkennen. Am Tag 14 endet diese Phase und es kommt zu signifikantem Absterben der Zellen. Anhand dieser Daten wurde der Zeitpunkt für das Passagieren der Suspensionskulturen mit Tag 10 und der Zeitpunkt für die Elizitierung mit Methyljasmonat mit Tag 8 festgelegt.

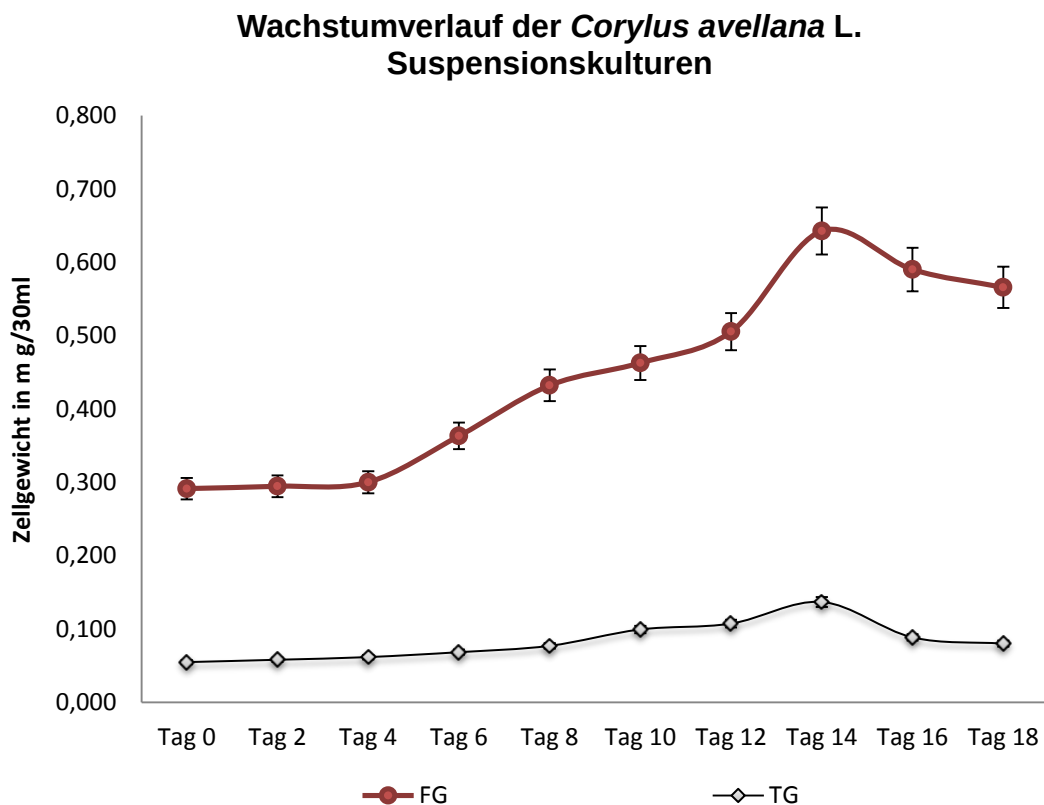


Abbildung 8: Wachstumskurve der Haselnuss-Zellsuspensionskulturen.

3.2. Elizitierung mit Methyljasmonat

3.2.1. Analyse mittels nanoHPLC-MS^b

Zur Detektion der Taxane wurde eine externe Standardisierung mit Taxol, Cephalomannin, Baccatin III und 10-Deacetylbaccatin III vorgenommen. Massenspektren einzelner Standardverbindungen wurden aufgenommen. Zur vollständigen Detektion mussten der gesuchten Molekülmasse Ionen- und Isotopen-fragmente sowie Addukte mit Natrium zugeordnet werden. Natrium-Addukte entstehen bereits durch Aufnahme der Substanz in Lösungsmittel. Die Auftrennung der Fragmente der zu untersuchenden Substanzen nach Ionisierung geschah im Linear Trap Quadrupole. In den folgenden Abbildungen 9 bis 16 (S. 32-35) werden einzelne Massenspektren ionisierter Standardsubstanzen und deren Natrium-Addukte gezeigt.

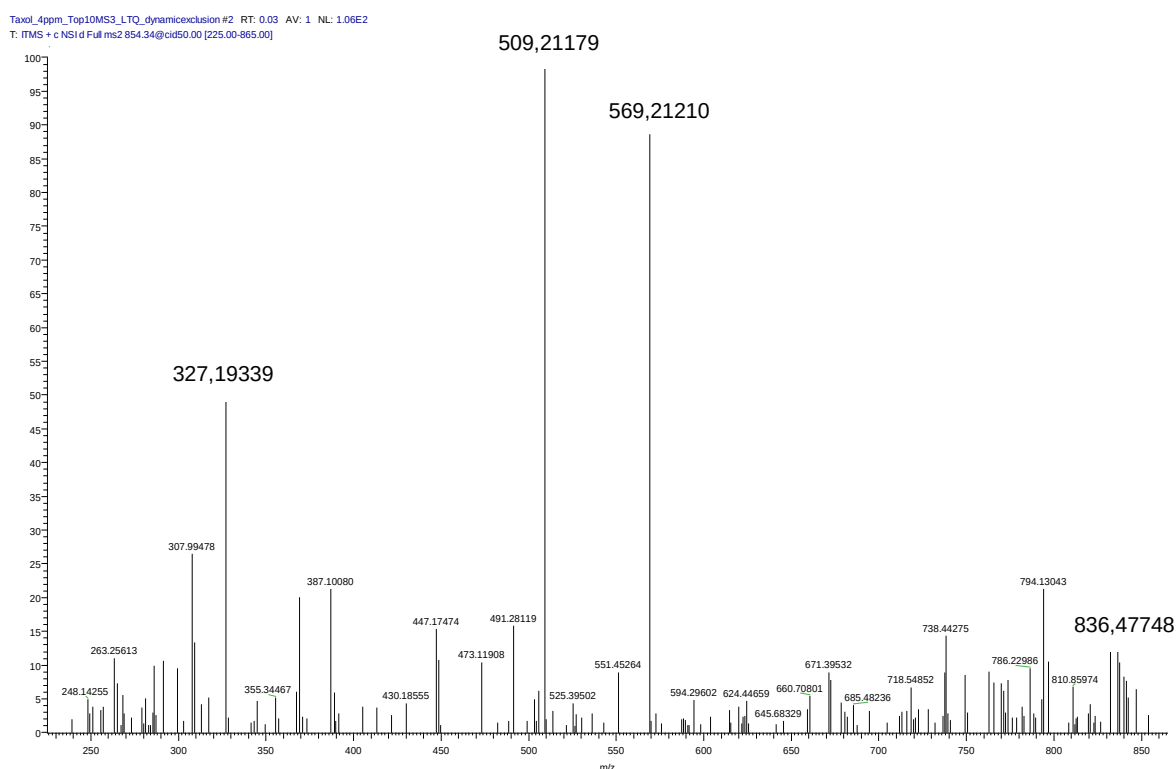


Abbildung 9: Massenspektrum von Taxol (854 Da)

^b Die Untersuchungen mittels nanoHPLC-MS wurden im Rahmen der Kooperation mit dem Department für Ökogenomik und Systembiologie (Universität Wien, Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Wolfram Weckwerth) durchgeführt. Die praktische Ausführung der Analysen erfolgte dankenswerterweise von Frau Mag. Dr. Doris Engelmeier. Die Analysedaten inkl. Abbildungen wurden zur Verfügung gestellt.

Taxol_4ppm_Top10MS3_LTQ_dynamicexclusion #21 RT: 0.35 AV: 1 NL: 3.91E4
T: ITMS + c NSI d Full ms2 876.32@cid50.00 [230.00-890.00]

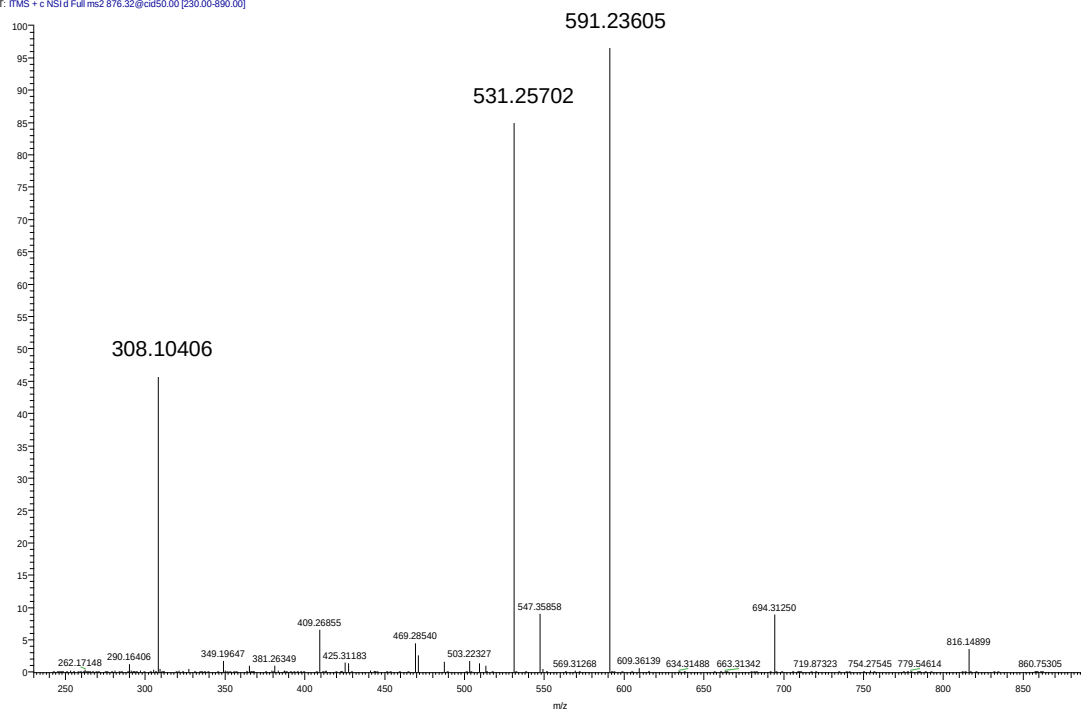


Abbildung 10: Massenspektrum des Natrium-Adduktes von Taxol (876 Da)

Cephalomannine 10ppm_Top10MS3_LTO #2 RT: 0.03 AV: 1 NL: 3.32E1
T: ITMS + c NSI d Full ms2 832.35@cid50.00 [215.00-845.00]

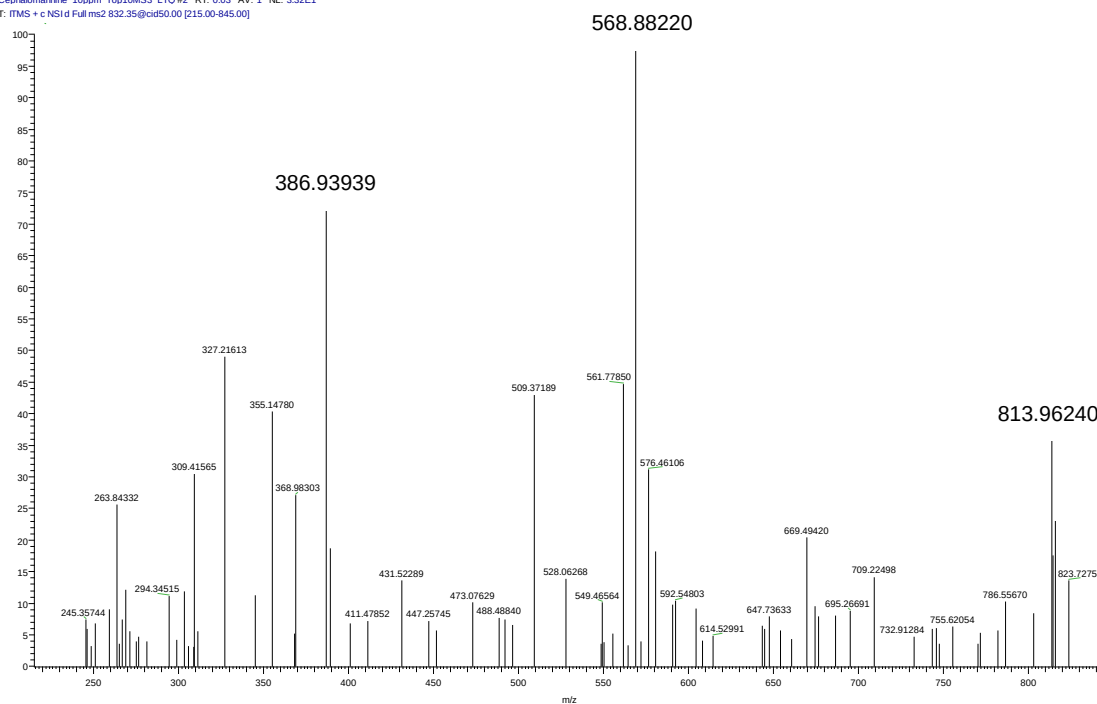


Abbildung 11: Massenspektrum von Cephalomannin (832 Da)

Cephalomannine_10ppm_Top10MS3_LTQ #13 RT: 0.21 AV: 1 NL: 1.27E4
T: ITMS + c NSI d Full ms2 854.34@cid50.00 [225.00-865.00]

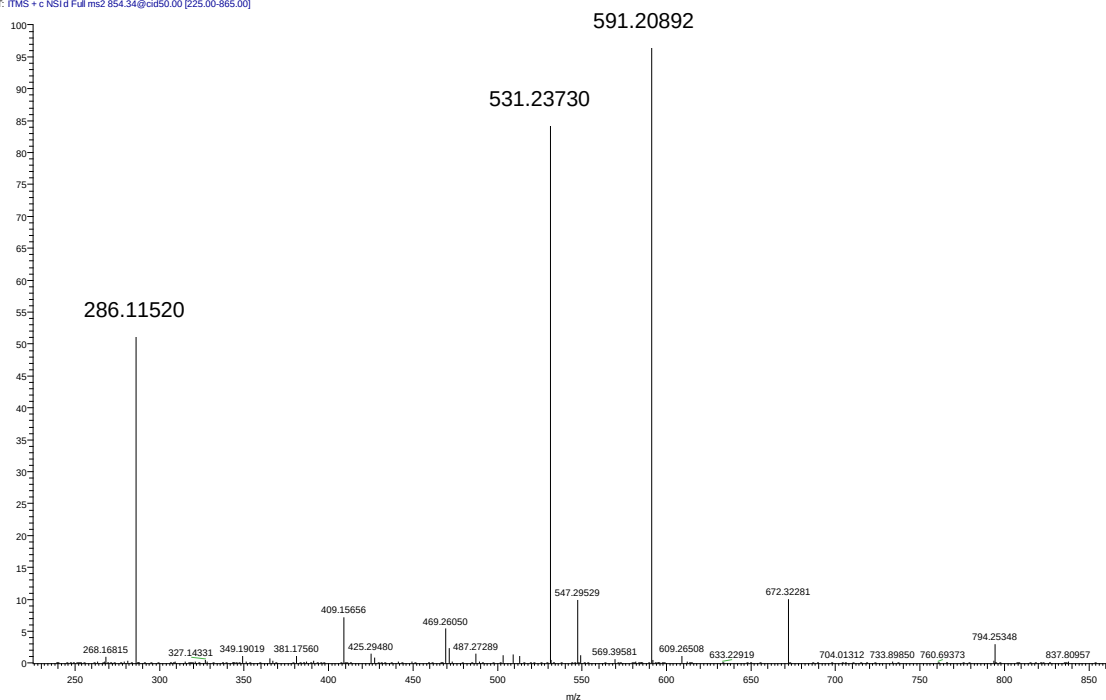


Abbildung 12: Massenspektrum des Natrium-Adduktes von Cephalomannin (854 Da)

Baccatin_7ppm_Top10MS3_LTQ #2 RT: 0.04 AV: 1 NL: 2.95E3
T: ITMS + c NSI d Full ms2 587.25@cid50.00 [150.00-600.00]

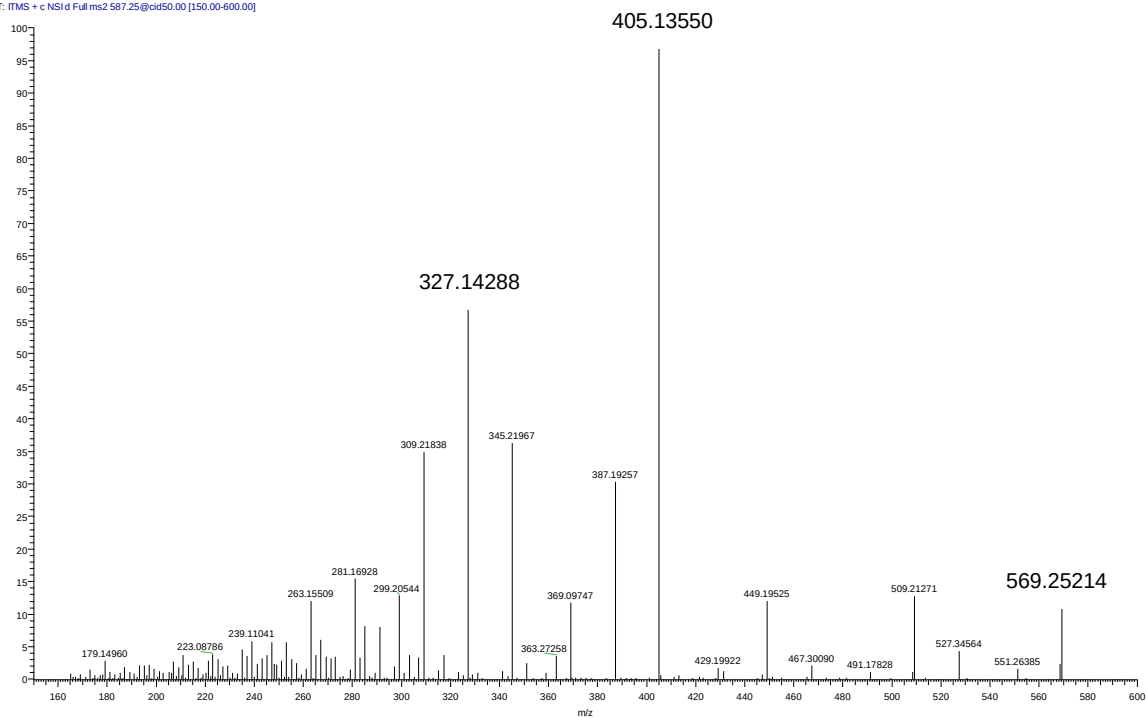


Abbildung 13: Massenspektrum von Baccatin III (587 Da)

Baccatin_7ppm_Top10MS3_LTQ #14 RT: 0.25 AV: 1 NL: 2.94E4
T: ITMS + c NSI d Full ms2 609.23@cid50.00 [155.00-620.00]

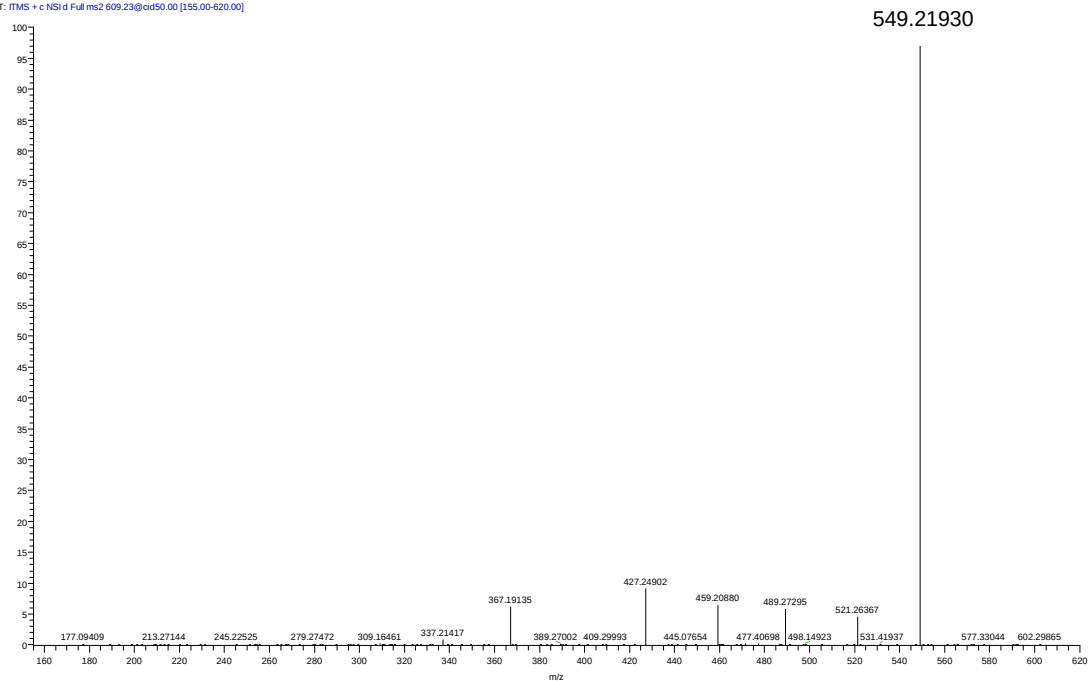


Abbildung 14: Massenspektrum des Natrium-Adduktes von Baccatin III (609 Da)

10_DAB_4ppm_Top10MS3_LTQ #2 RT: 0.03 AV: 1 NL: 6.08E3
T: ITMS + c NSI d Full ms2 545.24@cid50.00 [140.00-560.00]

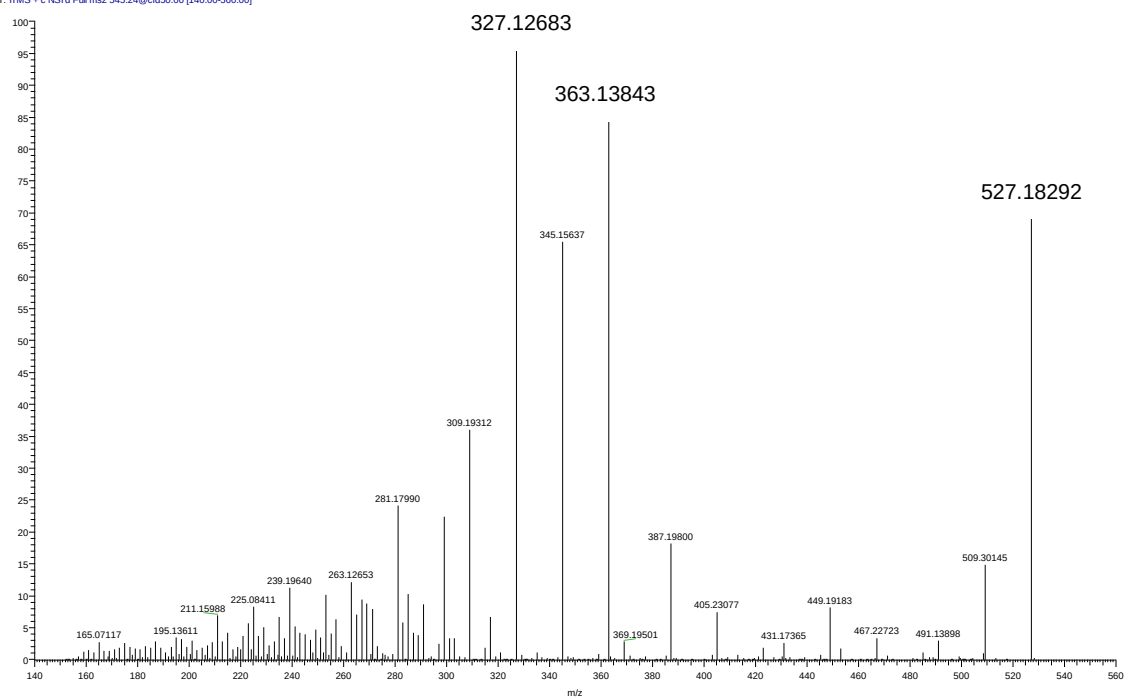


Abbildung 15: Massenspektrum von 10-Deacetylbaccatin III (545 Da)

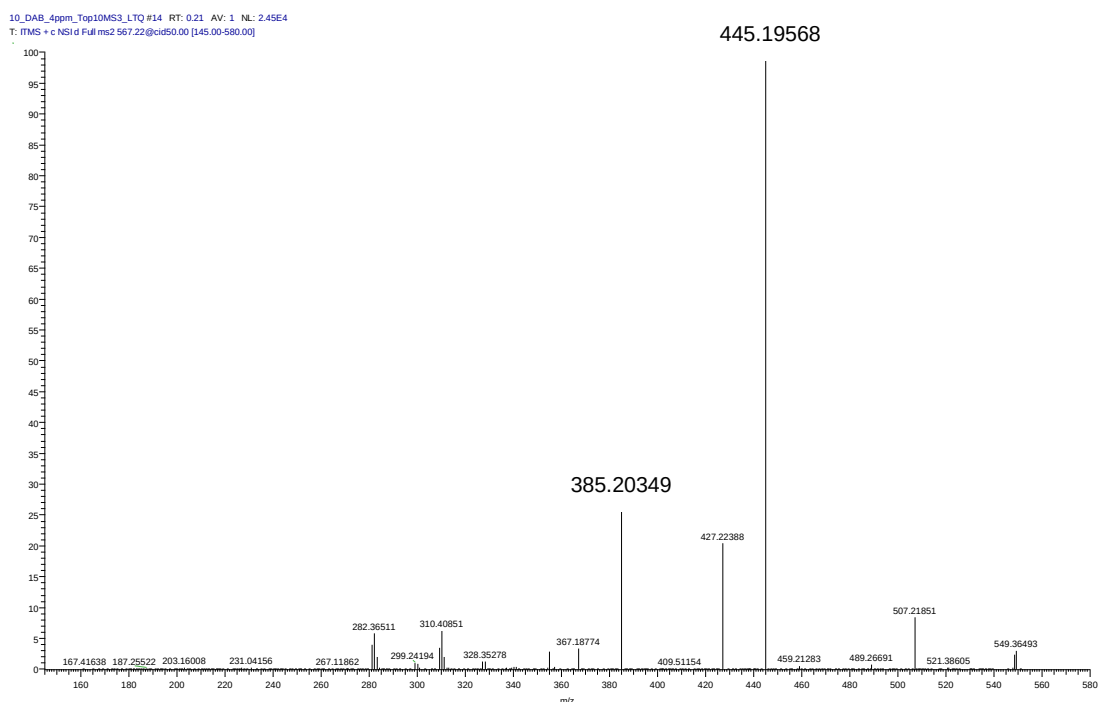


Abbildung 16: Massenspektrum des Natrium-Adduktes von 10-Deacetylbaccatin III (567 Da)

In Abbildung 17 (S. 36) wird ein Massenspektrum einer Mischung aus 4 Referenzsubstanzen (Taxol, 10-Deacetyl-baccatin III, Cephalomannin und Baccatin III) dargestellt.

Abbildung 18 (S. 36) besteht aus mehreren farbig dargestellten Ebenen und zeigt Massenspektren der Referenzsubstanzen in Abhängigkeit von der Retentionszeit. In der ersten Ebene (Schwarz) wird ein Gesamtspektrum der Mischung aus 4 Referenzsubstanzen abgebildet. Weitere Ebenen zeigen das Ergebnis der Suche nach Ionenfragmenten der Standardverbindungen Taxol und 10-Deacetylbaccatin III aus dem Gesamtspektrum (Schwarz). Bei der Retentionszeit von 50 Minuten wird das Fragmentmuster der Referenzsubstanz Taxol (Rot und Blau) und dessen Natrium-Addukt (Grün und Gelb) dargestellt. Das 10-Deacetylbaccatin III (Lila und Grau) und dessen Natrium-Addukt (Meergrün) hatten eine Retentionszeit von 34 Minuten. Cephalomannin und sein Natrium-Addukt wiesen die gleiche Retentionszeit wie Taxol auf (50 Minuten). Baccatin III und sein Natrium-Addukt wurden bei Retentionszeit von 42 Minuten detektiert. Bei der Analyse der Standard-Mischung wurde eine vollständige Detektion erreicht. Sowohl Ionen- und Isotopenfragmente als auch Natrium-Addukte konnten der korrekten Molekülmasse dieser Verbindungen zugeordnet werden.

M_standard_mix2 #4990 RT: 49.94 AV: 1 NL: 5.98E1
F: ITMS + c NSI d w Full ms2 854.34@cid50.00 [225.00-865.00]

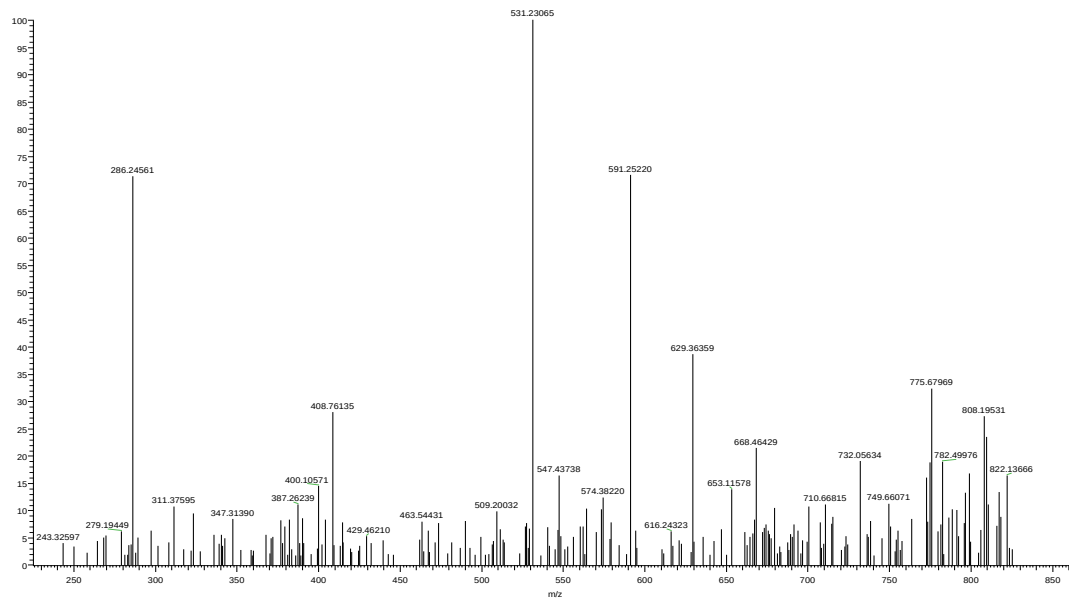


Abbildung 17: Gesamtspektrum der Mischung aus Taxol, 10-Deacetylbaecatin III, Cephalomannin und Baecatin III

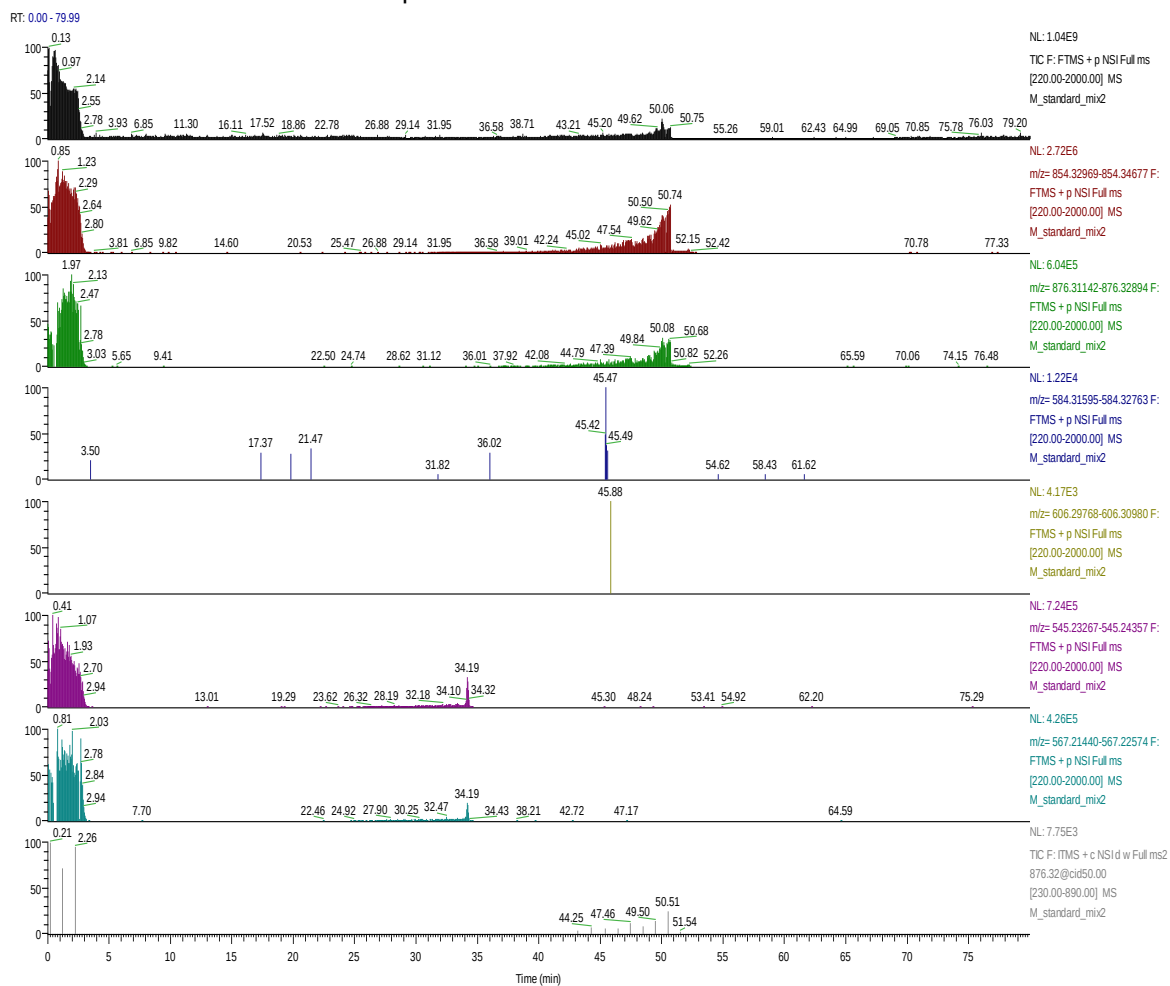


Abbildung 18: Massenspektrum der Standardmischung in Abhängigkeit von Retentionszeit

Elizitierung mit Methyljasmonat

Zellkulturen wurden mit 100 µM Methyljasmonat behandelt, der Kontrollgruppe wurde eine aliquote Menge an Ethanol 96% zugesetzt. Etwaige extrazelluläre Metaboliten wurden aus dem Nährmedium extrahiert, für die Detektion intrazellulärer Inhaltsstoffe wurden Auszüge aus lyophilisierten Zellen bereitet (siehe Kapitel 2.4.1., S. 24-25).

Extrazelluläre Inhaltsstoffe:

In den Nährmedien der Kontrolle und der mit Methyljasmonat elizitierten Kulturen wurden keine Taxane detektiert.

Intrazelluläre Inhaltsstoffe:

In der Kontrollgruppe wurden keine Taxane detektiert.

Im Extrakt der mit Methyljasmonat elizitierten Zellen wurde das Natrium-Addukt von Baccatin III nachgewiesen. In Abbildung 19 (S. 38) wird das Chromatogramm des Zellextrakts dargestellt. Das Chromatogramm besteht aus mehreren unterschiedlich farbig abgebildeten Ebenen. Die erste Ebene (Schwarz) zeigt das Gesamtspektrum des untersuchten Zellextrakts. Farbig hervorgehobene Ebenen stellen die Suche nach Massenfragmenten einzelner Verbindungen dar, dazu gehören Taxol (Rot), das Natrium-Addukt von Paclitaxel (Grün), Cephalomannin (Blau), das Natrium-Addukt von Cephalomannin (Gelb), Baccatin III (Lila) und das Natrium-Addukt von Baccatin III (Meergrün). Wie Abbildung 19 (S. 38) zeigt, lassen sich im Zellextrakt bei einer Retentionszeit von ca. 42 Minuten Fragmente des Natrium-Addukts von Baccatin III erkennen. Die gleiche Retentionszeit besitzt ebenfalls die Standardsubstanz Baccatin III. In Abbildung 20 (S. 38) wird das Massenspektrum des Zellextrakts dem der Standardverbindung Baccatin III gegenübergestellt. Rote Pfeile zeigen Ionenfragmente für Baccatin III (549,2 m/z). Der Ionenpeak von Baccatin III ist im Zellextrakt vorhanden, allerdings fehlen die Isotopenpeaks des Natrium-Addukts, sodass eine 100proz. Zuordnung nicht möglich ist. Möglicherweise war die eingesetzte Menge an Zellmaterial (500 mg) zu gering. Weitere Untersuchungen waren jedoch aus zeitlichen Gründen nicht möglich.

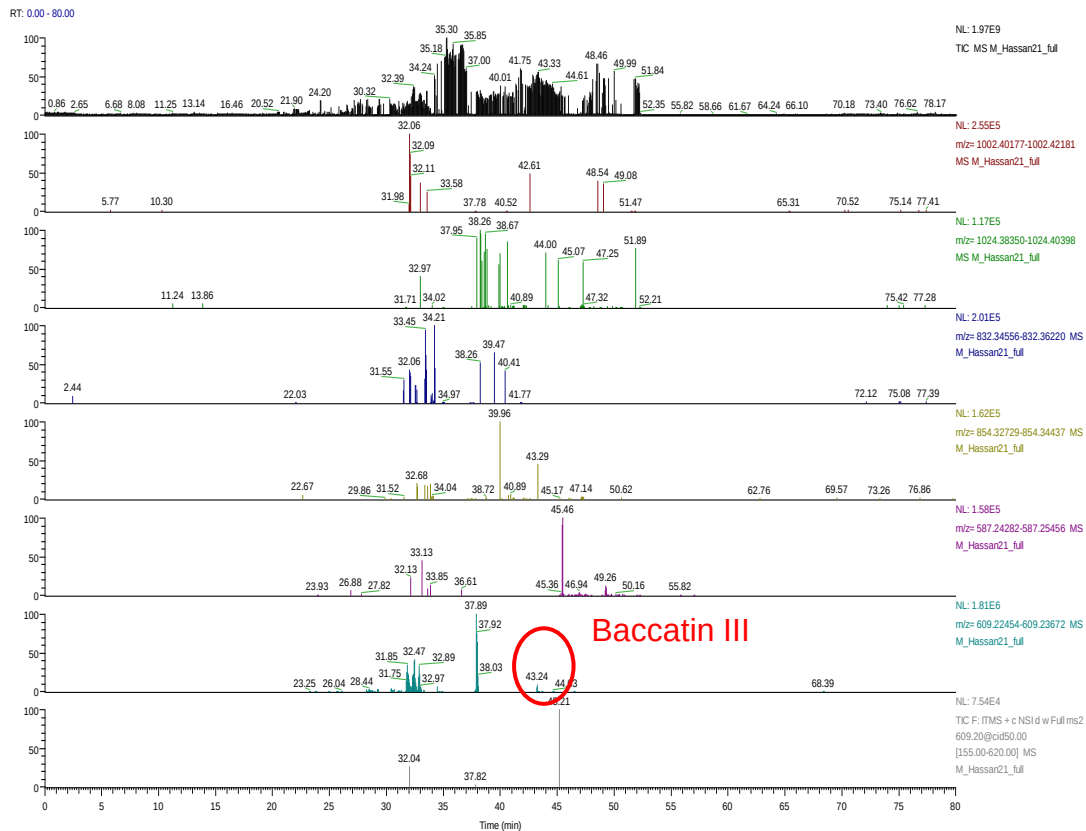


Abbildung 19: Massenspektrum des Zellextrakts

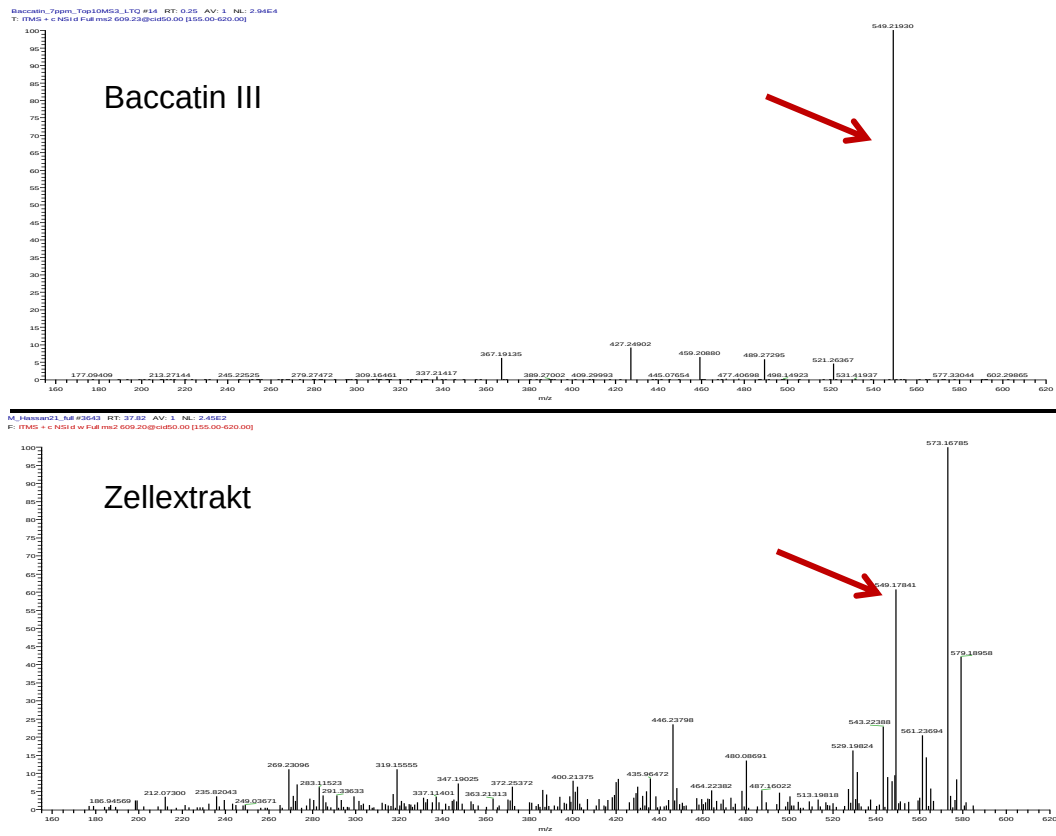


Abbildung 20: Oben das Massenspektrum der Standardverbindung Baccatin III, unten das Fragmentmuster des Zellextrakts (Pfeil: Ionenpeak)

3.2.2. Analyse mittels UPLC-MS^c

Zur Detektion und Quantifizierung der Taxane wurde eine externe Standardisierung mit den drei Referenzsubstanzen Taxol, Baccatin III und 10-Deacetylbaccatin III vorgenommen. Die Eichgeraden^d wurden erstellt, indem die Standards in unterschiedlichen Konzentrationen injiziert wurden.

Totalionenströme (TIC) der Referenzsubstanzen:

Die Retentionszeit des Baccatin III lag bei 3,81 Minuten, die des Taxols bei 5,30 Minuten und die des 10-Desacetylbaccatin III bei 2,75 Minuten. In den Abbildungen 21 sowie 22 und 23 (S. 40) werden Totalionenströme dieser Verbindungen dargestellt.

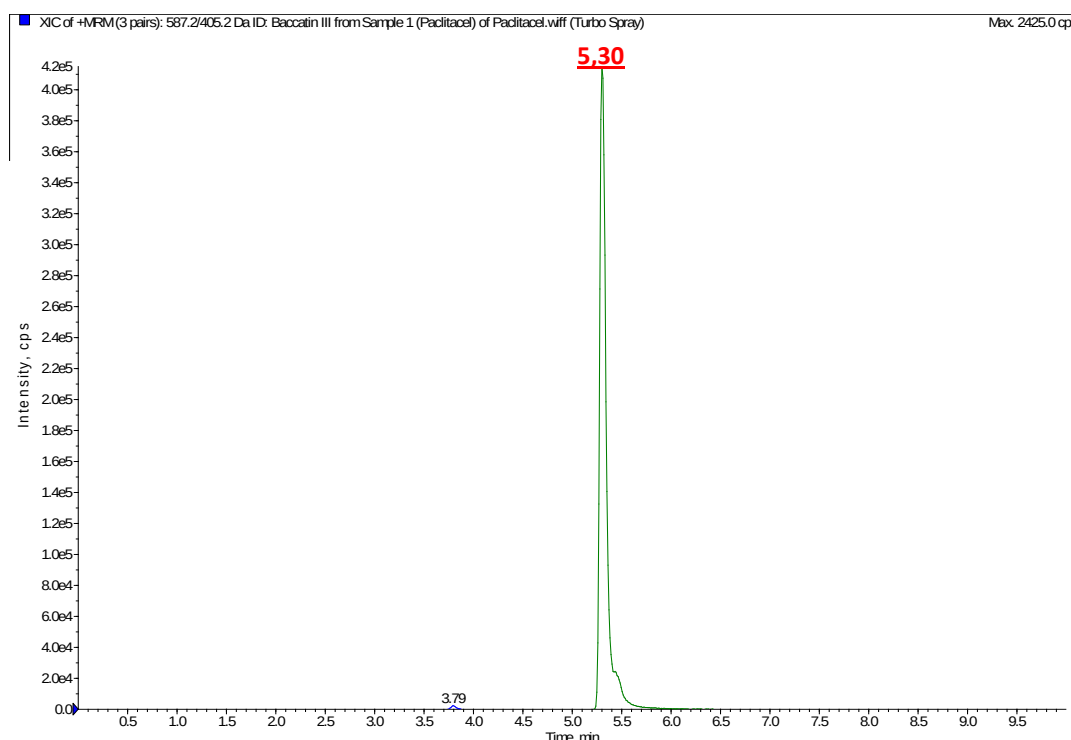


Abbildung 21: Totalionenstrom der Standardverbindung Taxol

^c Die Analyse mittels UPLC-MS wurde freundlicherweise von ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek (Department für Pharmakognosie, Universität Wien) durchgeführt.

^d Die Eichgeraden und Kontrollwerte sind aus der Paralleldiplomarbeit von Schatzl (2012, S. 21-24) zu entnehmen.

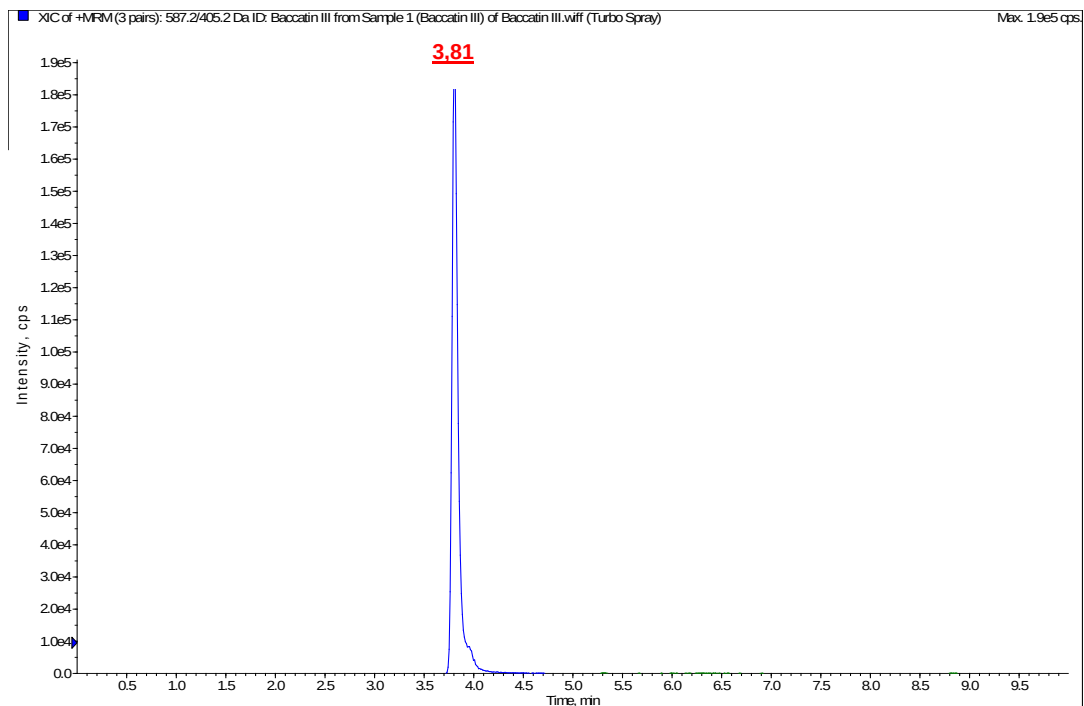


Abbildung 22: Totalionenstrom der Standardverbindung Baccatin III

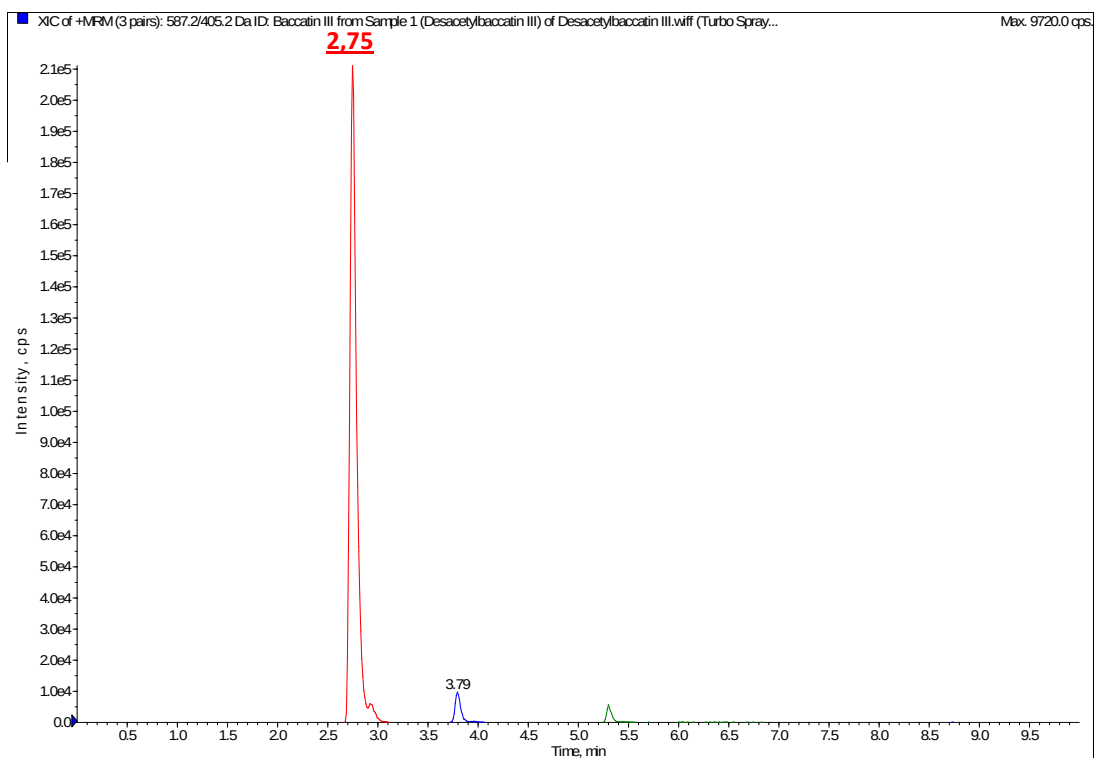


Abbildung 23: Totalionenstrom der Standardverbindung 10-Deacetylbaccatin III

Quantifizierung intrazellulärer Inhaltstoffe des Zellextrakts:

Die erste Analyse mittels nanoHPLC-MS (siehe Kapitel 3.2.1., S. 31) hatte gezeigt, dass der Zellextrakt der mit Methyljasmonat elizitierten Kulturen Baccatin III enthalten könnte. In der Folge wurde eine Quantifizierung dieser Verbindung vorgenommen. Hierfür wurden 1,9 g gefriergetrockneter Zellen extrahiert und der Auszug analysiert (siehe Kapitel 2.4.1., S. 25).

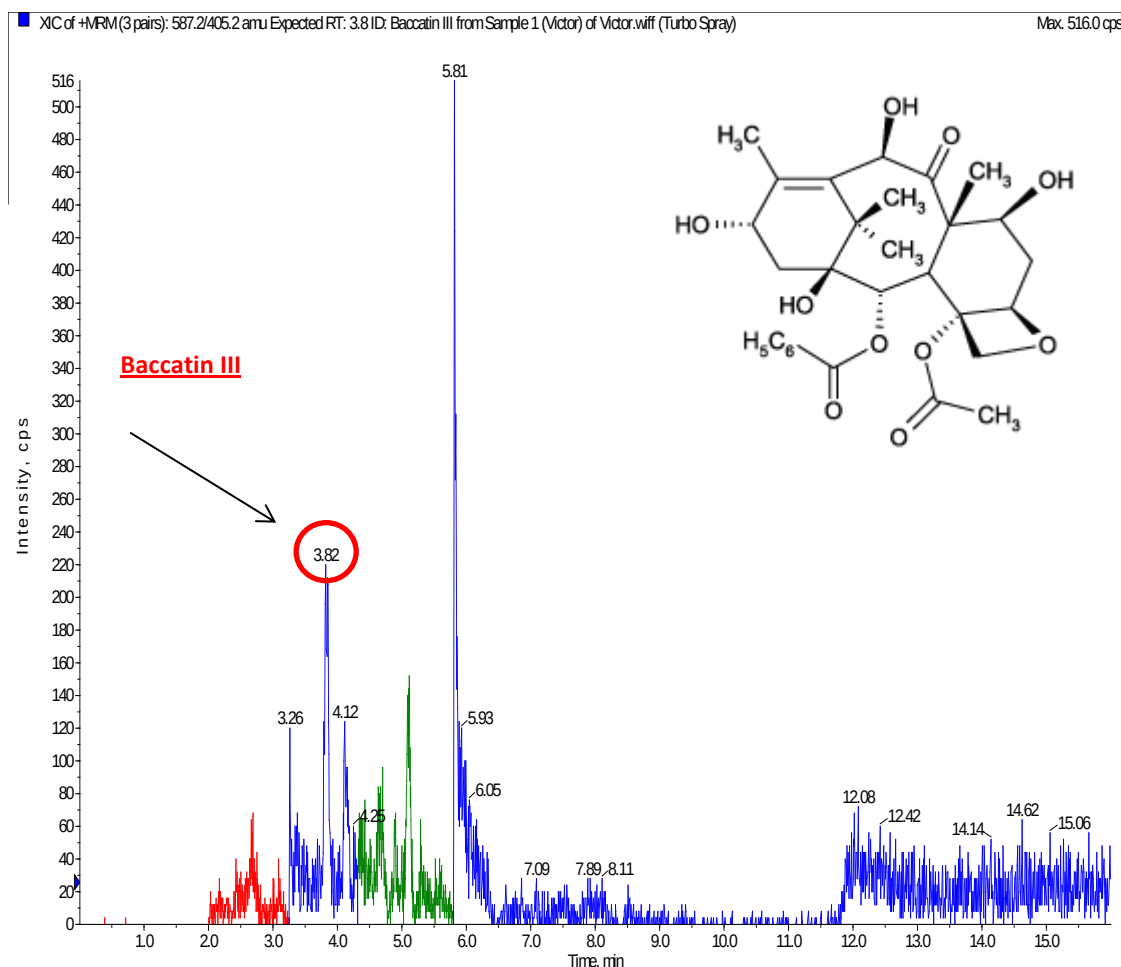


Abbildung 24: Totalionenstrom des Extrakts aus mit Methyljasmonat behandelten Zellen, Baccatin III bei 3,82 Minuten

Der Totalionenstrom dieser Probe (Abb. 24) zeigt die Substanz Baccatin III bei einer Retentionszeit von 3,82 Minuten (vgl. Abb. 22, S. 40). Weder Taxol noch 10-Deacetylbaccatin III konnten mit dieser Methode nachgewiesen werden. Bei einer Retentionszeit von 5,81 Minuten lässt sich ein starkes

Signal erkennen. Diese Verbindung konnte nicht identifiziert werden, vermutlich lag hier eine Verunreinigung vor.

Die Menge an Extrakt aus 9,39 g elizierter Zellen^e (1,9 g nach Gefriertrocknung) betrug 37 mg. Für die Analyse mittels UPLC-MS wurde dieser in 100 µL Methanol aufgenommen. Das Injektionsvolumen betrug 5 µL. Die Quantifizierung des Baccatin III erfolgte in 3 Messungen, es wurden die Peakflächen ermittelt und somit die Konzentration dieser Verbindung kalkuliert. Diese lag rechnerisch bei 0,00000289 mg/kg, bezogen auf das Trockengewicht der mit Methyljasmonat elizierten Zellen. Da aufgrund von Mangel an Zellmaterial keine Wiederholung der Bestimmung durchgeführt werden konnte, lässt sich keine genaue Aussage zum Gehalt an Baccatin III treffen, ausser dass es in Spuren detektierbar war.

Die Probe wurde freundlicherweise von Mag. pharm. Elisabeth Schatzl unter Anleitung von ao.Univ.-Prof. Dr. Gottfried Reznicek (Department für Pharmakognosie, Universität Wien) im Rahmen einer Paralleluntersuchung der gleichen Zelllinie vermessen. Aufgrund der zu geringen Menge an Zellmaterial ist der Kontrollwert für diese Untersuchung aus den Analyseparametern von Schatzl (2012, vlg. S. 35) zu entnehmen. Im Vergleich zu der gemessenen Konzentration dieser Verbindung betrug der Gehalt an Baccatin III in der Kontrolle 0,00071 mg/kg^f, bezogen auf das Trockengewicht der Zellen.

^e Das Frischgewicht der Zellen betrug im Durchschnitt 1,22 g pro Kulturgefäß.

^f Gehaltsangaben in der Originalliteratur wurden der besseren Übersichtlichkeit wegen, wenn nötig, in mg/kg umgerechnet.

4. DISKUSSION

Taxol ist ein wichtiger antitumoraler Wirkstoff und wird in der Therapie von Brust-, Mamma-, Ovarial- und nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen, in der Behandlung von Kopf- und Halskrebs, bei Psoriasis und zur Linderung der Symptome von Kaposi-Sarkom eingesetzt (McGuire et al., 1989; Holmes et al., 1991; Hitt et al., 2005; Sgadari et al., 2000; Ehrlich et al., 2004). In den neuesten Untersuchungen zeigt dieser Arzneistoff auch Wirksamkeit bei Alzheimer- und Parkinsonkrankheit (Zhang et al., 2005; Duan und Goodson, 2012).

Heutzutage wird diese Substanz großtechnisch vorwiegend aus Zellkulturen von *Taxus*-Spezies gewonnen. Die zweite Möglichkeit besteht in der semisynthetischen Herstellung aus den Vorstufen Baccatin III und 10-Deacetylbaccatin III. Diese werden aus Zweigen und Nadeln der Mitteleuropäischen Eibe, *Taxus baccata* L., extrahiert (Malik et al., 2011; Nimachow et al., 2010; Ojima et al., 1992).

Der weltweite Jahresbedarf an Taxol wird mit 800-1000 kg geschätzt und erhöht sich jährlich um 20 % (Nimachow et al., 2010). Aus diesem Grunde werden weiterhin zusätzliche Quellen dieser Verbindung gesucht (Malik et al., 2011). Als eine mögliche Taxolquelle kommt unter anderem die Hasel, *Corylus avellana* L., in Frage.

Hoffman et al. (1998) untersuchten Resistenzmechanismen diverser Haselnuss-Varietäten im Zusammenhang mit *Anisogramma anomala*. Dieser pathogene Pilz ist spezifisch für die Hasel und führt zu Ertragseinbußen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden methanolische Extrakte aus Zweigen unterschiedlicher Varietäten von *Corylus avellana* L. bereitet und mittels HPLC-MS analysiert. Massenspektren diverser Klone der Haselnuss wurden miteinander verglichen, in den Analysedaten konnten Ionenfragmente unter anderem der Verbindung Taxol zugeordnet werden.

Die Konzentration dieser Verbindung wurde dabei auf etwa 1/10 des Taxolgehalts in der Rinde von *Taxus brevifolia* L. Nutt (0,018 %; Wani et al. 1971) geschätzt.

Es wurde am Anfang vermutet, dass die Taxolbiosynthese nur in einer mit Pilz befallenen Pflanze stattfinden kann (Hoffman et al., 1998). Allerdings wurde diese Annahme von Bestoso et al. (2006) widergelegt. Dafür wurden Kalli aus diversen Explantaten der Haselnusspflanze induziert und auf eine mögliche Taxolproduktion untersucht, wobei in den Kalli, in denen Taxane detektiert wurden, keine Hyphen endophytischer Pilze gefunden wurden. Durch diese Untersuchung wurde festgestellt, dass *Corylus avellana* L. alleine im Stande ist, Taxane und unter anderem auch den Wirkstoff Taxol zu synthetisieren. Da der Biosyntheseweg von Taxol sehr komplex ist, wurden Extrakte auch auf das Vorhandensein von Vorstufen (Baccatinen) analysiert.

Durch Elizitierung mit Methyljasmonat und Chitosan stieg der Gehalt an taxoiden Verbindungen signifikant an. Es wurde daher angenommen, dass die Biosynthese von Taxol und dessen Vorstufen durch Zugabe von Elizitoren beeinflusst werden kann (Bestoso et al., 2006).

Aus dem oben genannten Grunde wurde diese Strategie auch in weiteren Untersuchungen angewendet. Von Rezaei et al. (2011) wurde der Einfluss von Salicylsäure und Ultraschall auf die Taxolproduktion in Haselnuss-suspensionskulturen studiert. Die Auswirkung von Ultraschall auf den Sekundärstoffwechsel wurde bereits in unterschiedlichen pflanzlichen Zellkulturen, wie im Beispiel von *Panax ginseng* und *Taxus chinensis*, untersucht (Bohm et al., 2000; Lin et al., 2001). In der Arbeit von Safari et al. (2012) konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der Haselnuss-suspensionskulturen mit Ultraschall für 20 Minuten zu einer Steigerung der Taxolbildung von 0,08 auf 0,46 mg/L führen kann. Salicylsäure kann Abwehrmechanismen in bestimmten Pflanzenarten induzieren, dabei kommt es zur gesteigerten Biogenese sekundärer Inhaltsstoffe, wie zum Beispiel Anthrachinonderivate in *Rubia cordifolia* (Bulgakov et al., 2002) oder Tropanalkaloide (Scopolamin und Hyoscyamin) in „hairy roots“-Kulturen von *Brugmansia candida* (Pitta-Alvarez et al., 2000). Die Untersuchungen von Rezaei et al. (2011) zeigten, dass durch Kombination von Ultraschall und Salicylsäure der Gehalt an Taxol im Nährmedium von 0,05 (Kontrollgruppe) auf 0,75 mg/L stieg, wobei der intrazellulärer Anteil dieses Stoffs im Vergleich zu dessen Konzentration im Medium größer war.

Der Biosyntheseweg von Taxol kann nicht nur durch Elizitierung, sondern auch durch Zusatz von Präkursoren beeinflusst werden. In den neuesten Arbeiten von Bemani et al. (2012) wurde die Auswirkung von Vorstufen auf die Bildung von Taxol untersucht. Hierfür wurden Benzoessäure, Zimtsäure und Phenylalanin verwendet. Benzoessäure ist ein Präkursor von Taxol, durch Zusatz von dieser Substanz war eine gesteigerte Produktion bereits in Zellkulturen von *Taxus cuspidata* beobachtet worden (Fett-Neto et al., 1994). Phenylalanin ist eine Aminosäure, wird im Laufe der Taxolbiosynthese enzymatisch zu β -Phenylalanin-CoA umgesetzt und mit der Hydroxylgruppe in Position 13 des Baccatin III verestert (Jennewein und Croteau, 2001; Walker et al., 2004). Der Einsatz von Phenylalanin als Präkursor konnte unter anderem die Biosynthese von Taxanen in Kalli von *Taxus cuspidata* anregen (Fett-Neto et al., 1994). Zimtsäure agiert in Pflanzen als Vorstufe in der Biosynthese phenolischer Verbindungen (Bemani et al., 2012). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde festgestellt, dass Benzoessäure die Taxolkonzentration um das Vierfache erhöht hat, nämlich auf 15,69 mg/kg, bezogen auf das Trockengewicht der Zellen. Durch Zusatz von Zimtsäure ist der Gehalt auf 5,19 mg/kg gestiegen. Bei Phenylalanin betrug die Konzentration an Taxol 22,04 mg/kg (Bemani et al., 2012).

In dieser Diplomarbeit wurde eine Zelllinie von *Corylus avellana* L. cv. ‚Eshkevar‘ charakterisiert. Zu Beginn der Arbeiten wurden Zellsuspensionskulturen aus Kalli hergestellt und in einem modifizierten LS-Nährmedium nach Linsmaier and Skoog (1965) weiter kultiviert.

Zunächst wurde der Wachstumsverlauf der Zellkulturen untersucht. Dieser Schritt war notwendig, um einen geeigneten Zeitpunkt für Passagieren und Elizitierung zu finden. Zu diesem Zweck wurde eine Wachstumskurve erstellt. Für eine Bestimmung des Frischgewichts der Zellen müssen diese vom Nährmedium abgetrennt werden, die anhaftende Flüssigkeit wird von der Zellmasse durch Luftsaugen entfernt. Im Laufe dieses Prozesses kommt es allerdings zum Austrocknen der Zellen, wodurch sich deren Gewicht verringern kann. Aus diesem Grunde wurde ein geeigneter Zeitpunkt für das vollständige Abtrennen der Zellmasse von der anhaftenden Flüssigkeit des

Nährmediums ermittelt (siehe Kapitel 2.3., S. 22). Die Zeit wurde mit drei Minuten festgelegt.

Beim Erstellen der Wachstumskurve (siehe Kapitel 2.3., S. 21) wurden 1 g frischer Zellen in 30 ml LS-Medium übergeführt. Die Zellen wurden 18 Tage lang kultiviert. Alle 48 h erfolgte die Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts, wobei die erste Bestimmung an Tag 0 durchgeführt wurde. Die Kulturen zeigten einen logarithmischen Wachstumsverlauf: In den ersten 2 Tagen der Kultivierung befanden sich Zellen in einer Ruhephase, an Tag 4 begann die exponentielle Wachstumsphase, welche an Tag 14 endete (siehe Abbildung 8, S. 30).

Elizitoren werden in der Regel in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellkultur zugesetzt, da hier die Bildung sekundärer Inhaltsstoffe am stärksten beeinflusst werden kann (Byun et al., 1992). Bei Bestoso et al. (2006) wurde die Elizitierung an Tag 8 der Wachstumskurve durchgeführt. Bei Rezaei et al. (2011) fand diese im Zeitfenster zwischen Tag 8 und Tag 13 statt. Die von uns eingesetzte Zelllinie von *Corylus avellana* L. wurde an Tag 8 elizitiert. Das Passagieren der Suspensionskulturen erfolgte jeden 10. Tag.

Als biotischer Elizitor wurde Methyljasmonat mit einer Konzentration von 100 µM gewählt, da aus Arbeit von Bestoso et al. (2006) bekannt war, dass diese Verbindung als Elizitor zur Steigerung der Taxolbiosynthese und Produktion anderer taxoider Derivate führte. Methyljasmonat regt die Genexpression und Biosynthese sekundärer Inhaltsstoffe in verschiedenen Pflanzen an. Die Auswirkung dieser Verbindung auf den Sekundärstoffwechsel wurde ebenfalls in Zellkultur von *Taxus canadensis* untersucht: Durch Zusatz von Methyljasmonat ist der Gehalt an Taxol von 0,05 mg/L auf 0,34 mg/L gestiegen (Linden und Phisalaphong, 2000).

In Ergebnissen der Analyse mittels nanoHPLC-MS konnte gezeigt werden, dass Taxol, 10-Deacetylbaecatin und Cephalomannin weder intrazellulär, noch extrazellulär nachweislich gebildet wurden. Bei der Untersuchung des Extrakts aus mit Methyljasmonat elizitierten Zellen wurden der Ionenpeak sowie das Natrium-Addukt der Verbindung Baecatin III detektiert (siehe Kapitel 3.2.1., S. 37), für letzteres fehlten allerdings die korrespondierenden

Isotopenpeaks. Möglicherweise hatten wir mit 500 mg zu wenig Zellmaterial eingesetzt, weitere Untersuchungen waren aus zeitlichen Gründen nicht durchführbar. Eine 100proz. Zuordnung war daher in diesem Versuchsansatz nicht möglich.

In einem weiteren Versuchsansatz (andere Extraktionsmethode) wurde der Nachweis mittels UPLC-MS durchgeführt. Nach Elizitierung mit Methyljasmonat konnten Spuren (0,00000289 mg/kg) von Baccatin III detektiert werden, eine Mehrfachbestimmung war aufgrund des Mangels an Zellmaterial nicht möglich. Die Daten der Kontrolluntersuchung der gleichen Zelllinie wurden dankenswerterweise von Frau Mag. pharm. Elisabeth Schatzl für diese Arbeit zur Verfügung gestellt, die Konzentration an Baccatin III lag hier bei 0,00071 mg/kg TG (Schatzl, 2012). Eine Erklärung für den niedrigen Gehalt in den elizitierten Zellen konnte nicht gefunden werden, möglicherweise kam es durch die mehrmonatige Lagerung der Zellen bzw. des Extrakts zu einem Abbau des Baccatin III.

In Untersuchungen von Bestoso et al. (2006) wurde Baccatin III zwar detektiert, aber nicht quantifiziert, da dessen Gehalt in der Zellkultur sehr niedrig war. Auch von Rezaei et al. (2011) und Benami et al. (2012) wurde keine Quantifizierung dieser Substanz durchgeführt.

Durch Einwirkung von Ultraschall auf Suspensionskulturen von *Corylus avellana* L. wurde eine gesteigerte Biosynthese von Baccatin III mit einem Gehalt von 0,07 mg (0,01 mg/L in der Kontrolle) beobachtet (Safari et al., 2012).

In der Arbeit von Prisching (2013) wurde der Einfluss des biotischen Elizitors Methyljasmonat hinsichtlich der Leoligin-Produktion in „hairy-roots“-Kulturen von *Leontopodium alpinum* L. Cass. studiert. Abhängig von der MJ-Konzentration konnten ein Anstieg oder ein Abfallen des Leoligin-Gehalts beobachtet werden.

In der Diplomarbeit von Schatzl (2012) wurde die von uns eingesetzte Zelllinie von *Corylus avellana* L. cv. ‚Eshkevar‘ weiterhin auf die Baccatin III-Produktion untersucht. Die erste Elizitierung erfolgte mit erhöhten

Saccharosekonzentrationen. Saccharose dient in pflanzlichen Zellkulturen als Kohlenstoffquelle und ist im Nährmedium in der Regel mit 30 g/L enthalten. Durch Steigerung der Saccharosekonzentration wird der osmotische Stress verstärkt und es kommt daher zu einer Änderung der Zellphysiologie (Terashima et al., 1999). Bei Schatzl konnte bei allen Saccharosekonzentrationen (drei, fünf und sieben Prozent) Baccatin III detektiert werden. Die Zellen aus der Kontrollkultur (drei Prozent Saccharose) enthielten 0,00071 mg/kg Baccatin III. Die Sorte ‚Eshkevar‘ ist somit grundsätzlich auch ohne Elizitierung zur Bildung von Baccatin III befähigt. In unserer Arbeit war Baccatin III nach Elizitierung mit Methyljasmonat nur in Spuren nachweisbar. Vermutlich spielten das junge Alter und schnelles Wachstum der Kalli, aus denen Suspensionskulturen angelegt wurden, eine Rolle. Der intrazelluläre Gehalt sank bei Schatzl (2012) bei fünf Prozent Saccharose auf 0,00039 mg/kg ab und stieg bei sieben Prozent Saccharose wieder auf 0,00069 mg/kg. Taxol und 10-Desacetylbaccatin III waren in den eingesetzten Zellkulturen nicht detektierbar.

Eine weitere Elizitierung wurde von Schatzl (2012) mit AgNO₃ durchgeführt. Dabei wurde das Silbernitrat in Konzentrationen von 30 und 60 µmol/L den Zellkulturen an Tag 10 der Kultivierung zugesetzt. Die Analysen erfolgten an Tag 5 und 10 nach der Elizitierung, wobei ebenfalls Baccatin III detektiert wurde. Eine gesteigerte Produktion von Baccatin III durch den Zusatz einer niedrigen Konzentration von Silbernitrat (5 µM) wurde auch von Yuan et al. (2002) festgestellt.

Weiters wurde in der Arbeit von Schatzl (2012) Ammoniumcitrat untersucht. Ammoniumcitrat beeinflusste den Biosyntheseweg zwischen Baccatin III und Taxol in Zellkultur von *Taxus chinensis* (Yuan et al., 2002). Im Gegensatz zu anderen Elizitoren (unterschiedliche Saccharosekonzentrationen und Silbernitrat) führte der Zusatz von Ammoniumcitrat zur stärksten Bildung von Baccatin III. Mit Ammoniumcitrat (100 mg/L) konnte der Gehalt an Baccatin III auf 0,000123 mg/kg gesteigert werden. Vermutlich kam es hier aber auch zum Anstieg der Biomasse, was in den Untersuchungen von Khosroushahi et al. (2006) beschrieben wurde.

In dieser Diplomarbeit wurde die Auswirkung von Methyljasmonat auf die mögliche Taxol-Produktion untersucht. Die Ergebnisse der durchgeführten Analysen zeigten jedoch, dass die vorliegende Zelllinie nachweislich nur Baccatin III bilden kann. Die Biosynthese von Baccatin III kann durch Zusatz unterschiedlicher Elizitoren beeinflusst werden (Schatzl, 2012). Im Vergleich zur Kontrolle⁹ (0,00071 mg/kg) konnte nach Elizitierung mit Methyljasmonat Baccatin III nur in Spuren detektiert werden. In Untersuchungen von Bestoso et al. (2006) wurde Taxol mit einer Konzentration von 1 mg/L auch ohne Elizitierung ins Nährmedium abgegeben. Durch Elizitierung mit 200 µM Methyljasmonat stieg der Gehalt an Taxanen von 1,6 auf 2,2 mg/L.

Methyljasmonat scheint für weitere Untersuchungen an dieser Zelllinie ungeeignet zu sein. Der Zusatz von Ammoniumcitrat in Kombination mit gesteigerter Saccharosekonzentration hinsichtlich der Produktion von Baccatin III könnte vielversprechend sein. Die Auswirkungen von Elizitoren auf die Biomasse sollten weiterhin untersucht werden, denn es ist unklar, in welchem Ausmaß die Zugabe von Elizitoren das Wachstum beeinflusst. Schließlich sollten auch weitere Untersuchungen hinsichtlich der Zusammensetzung des Nährmediums durchgeführt werden.

⁹ E. Schatzl 2012, Untersuchungen zur Synthese von Baccatinen in Zellkulturen von *Corylus avellana* L., Diplomarbeit, Universität Wien, S. 35

5. ZUSAMMENFASSUNG

Taxol® (Paclitaxel) ist ein bewährtes Zytostatikum in der Therapie diverser Krebsarten. In den neuesten Untersuchungen wurde die Wirksamkeit in der Behandlung von Psoriasis, Parkinson- und Alzheimerkrankheit gezeigt. Taxol wurde ursprünglich aus der Rinde der Pazifischen Eibe, *Taxus brevifolia* L. Nutt. isoliert. Die kommerzielle Produktion von Taxol erfolgt heutzutage vorwiegend über Zellkulturen von *Taxus*-Spezies und zum Teil semisynthetisch aus den Vorstufen Baccatin III und 10-Deacetylbaccatin III, welche aus den Zweigen und Nadeln der Mitteleuropäischen Eibe, *Taxus baccata* L., gewonnen werden. Da der Bedarf an diesem Arzneistoff sehr hoch ist, wird nach zusätzlichen Quellen für Produktion gesucht. Der Haselnussstrauch, *Corylus avellana* L., ist im Stande, Taxol und andere Taxane zu synthetisieren. Diese Pflanze ist in vitro einfacher kultivierbar als Zellkulturen von *Taxus*-Spezies. In der Zellkultur der Haselnuss ist der Gehalt an Taxol vergleichbar mit dem der Rinde der Pazifischen Eibe.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Informationen aus Literatur über Eigenschaften, Vorkommen und Möglichkeiten der Gewinnung von Taxol zusammengefasst. Der experimentelle Teil richtete sich auf Charakterisierung einer Zelllinie von *Corylus avellana* L. cv. ‚Eshkevar‘ hinsichtlich des in vitro-Wachstums und einer möglichen Produktion von Taxol und anderen Baccatinen.

Zu diesem Zweck wurden Kallus- und Suspensionskulturen angelegt und eine Wachstumskurve erstellt. Die exponentielle Phase begann am Tag 4 der Zellkultivierung, am Tag 14 erreichte das Wachstum sein Maximum. Eine Elizitierung mit 100 µM Methyljasmonat zeigte, dass diese Zelllinie Baccatin III intrazellulär in Spuren bilden kann. Taxol und weitere Baccatine waren nicht detektierbar.

Weitere Untersuchungen hinsichtlich unterschiedlicher Elizitierungen sowie der Einfluss der Zusammensetzung des Nährmediums könnten zu höherer Produktion von Baccatinen führen.

6. SUMMARY

Taxol[®] (Paclitaxel) is used to treat a variety of cancers. New studies also suggest its activity in the therapy of psoriasis, Alzheimer and Parkinson disease. Taxol has first been isolated from the bark of the Pacific yew, *Taxus brevifolia* L. Nutt. The commercial production of this drug is mainly based on in vitro cultivation of *Taxus* sp. cell cultures, the other method of producing taxol is by semi synthesis from precursors such as baccatin III and 10-deacetylbaaccatin III which are extracted from twigs and needles of *Taxus baccata*.

The worldwide demand for this compound is very high; therefore alternative methods of its production are being studied.

As an alternative source of Taxol[®], *Corylus avellana* L. has shown promising results. Hazelnut is capable of synthesizing taxanes, besides, this plant can be easily cultivated in vitro. The taxol content is comparable with that of the bark of the Pacific yew.

Literature has been reviewed to summarize characteristics, distribution and methods of industrial taxol production. The experimental part of this work was aimed at characterization of a cell line of *Corylus avellana* L. cv. 'Eshkevar' concerning its growth under in vitro conditions and a possible production of taxol and other baccatines. For this purpose callus and cell suspension cultures were established and a growth curve has been created. The cells grew exponentially after day 4 and the maximum was reached at day 14, afterwards the amount of cells started to decrease due to their death.

An elicitation with 100 μ M methyl jasmonate has been performed. The results of the analysis have shown the presence of baccatin III only in traces. No taxol or other baccatines were detectable. Other elicitors and the influence of different contents of nutrient medium ingredients could lead to higher production of this compound.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Açkurt F., Özdemir M., Biringen G., Löker M. (1999), Effects of geographical origin and variety on vitamin and mineral composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey, Food Chemistry **65**: 309-313.

Alasalvar C., Amaral J.S., Shahidi F. (2006), Functional lipid characteristics of Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**: 10177–10183.

Alasalvar C., Shahidi F., Liyana-Pathirana C., Ohshima T. (2003), Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). 1. Composition characteristics, Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**: 3790–3796.

Amaral J.S., Ferreres F., Andrade P. B., Valentão P., Pinheiro C., Santos A., Seabra R. (2005), Phenolic profile of hazelnut (*Corylus avellana* L.) leaves cultivars grown in Portugal, Natural Product Research **19**: 157-163.

Angelova Z., Georgiev S., Roos W. (2006), Elicitation of plants, Biotechnology & Biotechnological Equipment **20**: 72-83.

Bedi Y.S., Ogra R.K., Koul K., Kaul B.L., Kapil R.S. (1996), Yew (*Taxus sp.*). A new look on utilization, cultivation and conservation. In S.S. Handa, M.K. Kaul (Eds.), Supplement to cultivation and utilization of medicinal plants, Regional Research Laboratory, Jammu-Tawi, S. 443–456.

Bemani E., Ghanati F., Rezaei A., Jamshidi M. (2012), Effect of phenylalanine on Taxol production and antioxidant activity of extracts of suspension cultured hazel (*Corylus avellana* L.) cells, Journal of Natural Medicines **67**: 446-451.

- Bemani E., Ghanati F., Yousefzadeh Boroujeni L., Khatami F. (2012), Antioxidant Activity, Total Phenolics and Taxol Contents Response of Hazel (*Corylus avellana* L.) Cells to Benzoic Acid and Cinnamic Acid, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **40**: 69-73
- Bestoso F., Ottaggio L., Armirotti A., Balbi A., Damonte G., Degan P., Mazzei M., Cavalli F., Ledda B., Miele M. (2006), In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes, *BMC Biotechnology* **6**:45
- Bohm H., Anthony P., Davey M. R., Briarty L. G., Power J.B., Lowe K. C., Benes E., Groschl M. (2000), Viability of plant cell suspensions exposed to homogeneous ultrasonic fields of different energy density and wave type, *Ultrasonics* **38**: 629-632.
- Bringi V., Kadkade P., Prince C.L., Schubmehl B. F., Kane E. J. Roach B. (1993), Enhanced production of taxol and taxanes by cell cultures of taxus species, Patent WO1993/017121
- Bruneton J. (1993), *Pharmacogonie phytochimie, plantes médicinales*, Tec. & Doc. Lavoisier, Paris, S. 124
- Bulgakov V. P., Tchernoded G. K., Mischenko N. P., Khodakovskaya M. V., Glaunov V. P., Radchenko S. V. (2002), Effect of salicylic acid, methyl jasmonat, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes, *Journal of Biotechnology* **97**: 213-221.
- Byun S. Y., Kim C., Pedersen H. (1992), Elicitation of Alkaloid Production at Different Growth Stages in Cell Suspensions of *Eschscholtzia californica*; *Plant Tissue Culture Letters* **9**: 164-168
- Choi H-K., Kim S-I., Son J-S., Hong S-S., Lee H-S., Lee H-J. (2000), Enhancement of paclitaxel production by temperature shift in suspension culture of *Taxus chinensis*, *Enzyme and Microbial Technology* **27**: 593-598.

Cristofori V., Ferramondo S., Bertazza G., Bignami C. (2008), Nut and kernel traits and chemical composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**: 1091–1098.

Cusido R. M., Palazon J., Bontlll M., Navia-Osorio A., Morales C., Pinol M. T. (2002), Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*, *Biotechnology Progress* **18**: 413–423.

Duan A. R. und Goodson H. V. (2012), Taxol-stabilized microtubules promote the formation of filaments from unmodified full-length tau in vitro, *Molecular Biology of the Cell* [Epub ahead of print].

Ehrlich A., Booher S., Becerra Y., Borris D.L., Figg W.D., Turner M.L. (2004), Micellar paclitaxel improves severe psoriasis in a prospective phase II pilot study, *Journal of the American Academy of Dermatology* **50**: 533–540

Erdogan V. und Mehlenbacher S. A. (2000), Phylogenetic Relationships of *Corylus* Species (Betulaceae) Based on Nuclear Ribosomal DNA ITS Region and Chloroplast *matK* Gene Sequences, *Systematic Botany* **25**: 727–737.

Expósito O., Bonfill M., Moyano E., Onrubia M., Mirjalili M.H., Cusido R.M. (2009), Biotechnological production of Taxol and related taxoids: current state and prospects, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **9**: 109–121.

Faostat (1995), Edible Nuts,
<http://www.fao.org/docrep/V8929E/v8929e04.htm>, 30.05.2013, 16:45.

Faostat (2011), Top production – Hazelnuts, with shell,
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, 30.05.2013, 16:45.

Fett-Neto A.G. und DiCosmo F. (1992), Distribution and amounts of taxol in different shoot parts of *Taxus cuspidate*, *Planta Medica* **58**: 464–466.

Fett-Neto A.G., DiCosmo F., Reynolds W. F., Sakata K. (1992), Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug Taxol and related taxanes, *Nature Biotechnology* **10**: 1572 – 1575.

Fett-Neto A.G., Melasan S.J., Nicholson S.A. (1994), Improved Taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell culture of *Taxus cuspidate*, *Biotechnology and Bioengineering* **44**: 967-971.

Fraisse D., Carnat A., Carnat A.P., Lamaison J.L. (1999). *Annales Pharmaceutiques Francaises* **57**: 406–409.

Gökirmak T, Mehlenbacher S, Bassil N. (2009), Characterization of European hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars using SSR markers, *Genetic Resources and Crop Evolution* **56**: 147-172.

Guenard D., Gueritte-Voegelein F., Poiter P. (1993), Taxol and taxotere: discovery, chemistry and structure activity relationship, *Accounts of Chemical Research* **26**: 160–167.

Gumus M. (2010), A comprehensive experimental investigation of combustion and heat release characteristics of a biodiesel (hazelnut kernel oil methyl ester) fueled direct injection compression ignition engine, *Fuel* **89**: 2802–2814.

Hitt R., López-Pousa A., Martínez-Trufero J., Escrig V., Carles J., Rizo A., Isla D., Vega E. M., Martí J. L., Lobo F., Pastor P., Valenti V., Belón J., Sánchez M. A., Chaib C., Pallarés C., Antón A., Cervantes A., Paz-Ares L., Cortés-Funes H. (2005), Phase III Study Comparing Cisplatin Plus Fluorouracil to Paclitaxel, Cisplatin, and Fluorouracil Induction Chemotherapy Followed by Chemoradiotherapy in Locally Advanced Head and Neck Cancer, *Journal Of Clinical Oncology* **23**: 8636-8645.

Hoffman A., Edwards M. M., Graziano G. (2005), Paclitaxel synthesis by hazelnut trees in response to spores that cause eastern filbert blight disease, The 229th ACS National Meeting, March 13-17, 2005, <http://oasys2.confex.com/acs/229nm/techprogram/P845283.HTM>, 21.08.2013, 10:56.

Hoffman A. und Shahidi F. (2009), Paclitaxel and other taxanes in hazelnut, *Journal of Functional Foods* **1**: 33-37.

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

Holmes F. A., Walters R. S., Theriault R. L., Forman A. D., Newton L., Raber M.N., Buzdar A. U., Frye D. K., Hortobagyi G. N. (1991), Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer, *Journal of the National Cancer Institute* **83**: 1797-805.

Holton R.A., Somoza C., Kim H.B., Liang F., Biediger R.J., Boatman P.D. (1994), First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring, *Journal of the American Chemical Society* **116**: 1597–1598.

Holton R.A., Somoza C., Kim H.B., Liang F., Biediger R.J., Boatman P.D. (1994), First total synthesis of taxol. 2. Completion of the C and D rings, *Journal of the American Chemical Society* **116**: 1599–1600.

Horwitz S. (1992), Mechanism of action of Taxol, *Trends in Pharmacological Sciences* **13**: 134–136.

Horwitz S. B., Lothstein L., Manfredi J. J., Mellado W., Parness J., Roy S. N., Schiff P. B., Sorbara L.R. Zeheb R. (1986), Taxol: Mechanisms of Action and Resistance, *Dynamic Aspects of Microtubule Biology* **466**: 733–744.

Jaziri M., Zhiri A., Guo Y-W., Dupont J-P., Shimomura K., Hamada H., Vanhaelen M., Homès J. (1996), *Taxus* sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **46**: 59-75.

Jennewein S., Long R.M., Williams R.M., Croteau R. (2004), Cytochrome p450 taxadiene 5 α -hydroxylase, a mechanistically unusual monooxygenase catalyzing the first oxygenation step of Taxol biosynthesis, *Chemistry & Biology* **11**: 379–387.

Jennewein S., Rithner C. D., Williams R. M., Croteau R. B. (2003), Taxol metabolism: taxoid 14b-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **413**: 262–270.

Jennewein S., Rithner C. D., Williams R. M., Croteau R. B. (2001), Taxol biosynthesis: Taxane-b-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 13595–13600.

Jennewein S. und Croteau R. B. (2001), Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications, *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**: 13-19.

Kasapligil B. (1972), A bibliography on *Corylus* (Betulaceae) with annotations, *Annual Report of the Northern Nut Growers Association* **63**: 107–162.

Keisey G. R. and Vance C. N. (1992), Taxol and cephalomannine concentrations in the *Taxus brevifolia* trees foliage and bark of shade-grown and sun-exposed *Taxus brevifolia* trees, *Journal of Natural Products* **55**: 912-917.

Ketchum R. E. B., Gibson D. M., Croteau R. B., Shuler M. L. (1999), The Kinetics of Taxoid Accumulation in Cell Suspension Cultures of Taxus Following Elicitation with Methyl Jasmonate, *Biotechnology and Bioengineering* **62**: 97–105.

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

- Kim S-I., Choi H-K., Kim J-H., Lee H-S., Hong S-S. (2001), Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*, *Enzyme and Microbial Technology* **28**: 202-209.
- Kim J., Yun J., Hwang Y., Byun S.Y., Kim D. (1995), Production of taxol and related taxanes in *Taxus brevifolia* cell cultures: Effect of sugar, *Biotechnology Letters* **17**: 101-106.
- Kingston D.G.I. (2000), Recent advances in the chemistry of taxol, *Journal of Natural Products* **63**: 726–734.
- Kovács P., Csaba G., Pallinger E., Czaker R. (2007), Effects of taxol treatment on the microtubular system and mitochondria of Tetra hymena, *Cell Biology International* **31**: 724–732.
- Liang W. (2005), Extraction of taxol from leaves of *Corylus heterophylla* Fisch., Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu, Patent CN 1566106 A 20050119
- Lihua Z., Lijuan G., Bingchang L. (2003), Extraction of taxol from the skin of hazel in Anshan area, Fujian Fenxi Ceshi **12**: 1765-1766,1778.
- Lin L.D., Wu J.Y., Ho K.P., Qi S.Y. (2001), Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponine) production in *Panax Ginseng* cell cultures, *Ultrasound in Medicine & Biology* **27**: 1147-1152.
- Linden J.C. und Phisalaphong M. (2000), Oligosaccharides potentiate methyljasmonate-induced production of paclitaxel in *Taxus canadensis*, *Plant Science* **158**: 41-51.
- Linsmaier E. M. und Skoog, F. (1965), Organic growth factor requirements of Tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum* **18**: 100.
- M van Rozendaal E. L., Lelyveld G.P., A van Beek T. (2000), Screening of the needles of different yew species and cultivars for paclitaxel and related toxoids, *Phytochemistry* **53**: 383–389.

Malik S., Cusidó R.M., Mirjalili M.H., Moyano E., Palazón J., Bonfill M. (2011), Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review, *Process Biochemistry* **46**: 23–34.

McGuire W.P., Rowinsky E.K., Rosenshein N.B., Grumbine F.C., Ettinger D.S., Armstrong D.K., Donehower R.C. (1989), Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms, *Annals of Internal Medicine* **111**: 273-279.

Murphy W.K., Fossella F.V., Winn R. J., Shin D.M., Hynes H. E., Gross H. M., Davilla E. Leimert J., Dhingra H., Raber M.N. (1993), Phase II study of Taxol in patients with untreated advanced non-small-cell lung cancer, *Journal of the National Cancer Institute* **85**: 384-388.

Nadeem M., Rikhari H.C., Kumar A., Palni L. M.S., Nandi K.S. (2002), Taxol content in the bark of Himalayan Yew in relation to tree age and sex, *Phytochemistry* **60**: 627–631.

Nicolau K.C., Yang Z., Liu J.J. (1994), Total synthesis of Taxol, *Nature Biotechnology* **367**: 630–634.

Nimachow G., Rawat J. S., Dai O. (2010), Status of Himalayan yews in West Kameng district of Arunachal Pradesh, *Current Science* **98**: 1434.

Ojima I., Habus I., Zhao M., Zucco M. , Parr Y. H., Sun C. M., Brigaud T. (1992), New and Efficient Approaches to the Semisynthesis of Taxol and Its C-13 Si de Chain Analogs by Means of β -Lactam Synthon Method, *Tetrahedron* **48**: 6985-7012.

Oliveira I., Sousa A., Valentão P., Andrade P.B., Ferreira I. C.F.R., Ferreres F., Bentoa A., Seabra R., Estevinho L., Pereira J. A. (2007), Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds, *Food Chemistry* **105**:1018–1025.

Ottaggio L., Bestoso F., Armirotti A., Balbi A., Gianluca D. Mazzei M., Sancandia M., Miele M. (2008), Taxanes from shells and leaves of *Corylus avellana*, *Journal of Natural Products* **71**: 58-60.

Panchagnula R. (1998), Pharmaceutical aspects of paclitaxel, *International Journal of Pharmaceutics*, **72**: 1–15.

Parcerisa J., Rafeces M., Castellote A.I., Codony R., Farran A., Garcia J., Lopez A., Romero A., Boatella J. (1995), Influence of variety and geographical origin on the lipid fraction of hazelnuts (*Corylus avellanae* L.) from Spain: III. Oil stability, tocopherol content and some mineral contents, *Food Chemistry* **53**: 71–74.

Pershern A.S., Breene W.M., Lulai E.C., Pershern A.S., Breene W.M., Lulai E.C. (1995), Analysis of factors influencing lipid oxidation in hazelnuts (*Corylus sp.*), *Journal of Food Processing and Preservation* **19**: 9–25.

Persson H., Widén B., Andersson S., Svensson L. (2004), Allozyme diversity and genetic structure of marginal and central populations of *Corylus avellana* L. (Betulaceae) in Europe, *Plant Systematics and Evolution* **244**: 157-179.

Pestchanker L., Roberts S. C., Shuler M. L. (1996), Kinetics of taxol production and nutrient use in suspension cultures of *Taxus cuspidata* in shake flasks and a Wilson-type bioreactor, *Enzyme Microbial Technology* **19**:256-260

Pitta-Alvarez S. I., Spollansky T. C., Giulietti A. M. (2000), The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*, *Enzyme and Microbial Technology* **26**: 252-258.

Prisching S. (2013), Elizitierung von „hairy roots“-Kulturen des Edelweiß` mit biotischen Faktoren, Diplomarbeit, Universität Wien, S 46.

Proksch P. (1992), *Corylus*, in: Hänsel R., Keller K., Rimpler H., Schneider G. (Hrsg.), *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, 5. Auflage, Band 4, Drogen A – D, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 1027-1029.

Qaderi A., Omid M., Etminan A., Oladzad A., Ebrahimi C. D., Mashkani M. R., Mehrafarin A. (2012), Hazel (*Corylus avellana* L.) as a new source of Taxol and taxanes, *Faslnamehi Giyehani Daruyi* **11**: 66-77.

Radman R., Saez T., Bucke C., Keshavarz T. (2003), Elicitation of plants and microbial cell systems, *Biotechnology and Applied Biochemistry* **37**: 91-102.

Reichling J., Horz K.-H. (1994), Taxus, in : Hänsel R., Keller K., Rimpler H., Schneider G. (Hrsg.), *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, 5. Auflage, Band 6, Drogen P – Z, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 904 – 910.

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

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

Rikhari H.C., Palni L.M.S., Sharma S., Nandi S.K. (1998), Himalayan yew: stand structure, canopy damage, regeneration and conservation strategy, *Environmental Conservation* **25**: 334 - 341.

Rowinsky E., Cazenava L.A., Donehower R.C. (1990), Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent, *Journal of the National Cancer Institute* **82**: 1247–1259.

Rowinsky E., Donehower R.C. (1995), Paclitaxel (Taxol), *The New England Journal of Medicine* **332**: 1004–1014.

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

Senneville S., Beaulieu J., Daoust G., Deslauriers M., Bousquet J. (2001), Evidence for low genetic diversity and metapopulation structure in Canada yew (*Taxus canadensis*): considerations for conservation, Canadian Journal of Forest Research **31**: 110-116.

Schatzl E. (2012), Untersuchungen zur Synthese von Baccatinen in Zellkulturen von *Corylus avellana* L., Diplomarbeit, Universität Wien, S. 53-57.

Schiff P., Fant J., Horwitz S. B. (1979), Promotion of microtubule assembly in vitro by Taxol, Nature **277**: 665–667.

Schiff P. und Horwitz S. B. (1980), Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **77**: 1561–1565.

Schippmann U. (2001), Medicinal plants significant trade study (CITES Project S-109), German Federal Agency for Nature Conservation Bonn, Germany.

Schoendorf A., Rithner C. D., Williams R. M., Croteau R. B. (2001), Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 beta-hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**: 1501–1506.

Sgadari C., Toschi E., Palladino C. (2000), Mechanism of paclitaxel activity in Kaposi's sarcoma, Journal of Immunology **165**: 509–517.

Son S. H., Choi S. M., Lee Y. H., Choi K. B., Yun S. R., Kim J. K., Park H. J., Kwon O. W., Noh E. W., Sean, J. H., Park Y. G. (2000), Large-scale growth and taxane production in cell cultures of *Taxus cuspidata* (Japanese yew) using a novel bioreactor, Plant Cell Reports **19**: 628-633.

Stierle A., Stierle D., Strobe G., Bignami G., Grothaus P. (1994), Endophytic fungi of Pacific yew (*Taxus brevifolia*) as a source of taxol, taxanes and other pharmacophores, Bioregulators for Crop Protection and Pest Control **55**: 64-77.

Strobel G. A., Stierle A. A., Stierle D. B. (1992), Taxol Production by *Taxomyces andreanae*, Patent US005322779A

Strobel G.A., Yang X., Sears J., Kramer R., Sidhu R.S., Hess W. M. (1996), Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*, Microbiology **142**: 435-440.

Terashima M., Ejiri Y., Hashikawa N., Yoshida, H. (1999), Effect of osmotic pressure on human alpha 1-antitrypsin production by plant cell culture, Biochem. Eng. J. **4**: 31-36.

Teuscher E., Melzig M. F., Lindequist U. (2004), Biogene Arzneimittel, Ein Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 179-181.

Usta N., Ozturk E., Can O., Conkur E.S., Nas S., Con A.H. (2005), Combustion of biodiesel fuel produced from hazelnut soapstock/waste sunflower oil mixture in a Diesel engine, Energy Convers Manage, **46**: 741–755.

Valnet J. (1992), Phytothérapie: Traitement des maladies par les plantes (sixth ed.). Paris: Maloine, S.473–475.

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

Venkatachalam M. und Sathe S. K. (2006), Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds, Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**: 4705–4714.

Vidensek N., Lim P., Campbell A., Carlson C. (1990), Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig, and seedling from several *Taxus species*, Journal of Natural Products **53**: 1609-1610.

Vongpaseuth, K. und Roberts, S. C. (2007), Advancements in the understanding of paclitaxel metabolism in tissue culture (review), Current Pharmaceutical Biotechnology **8**: 219-236.

Walker K., Klettke K., Akiyama T., Croteau R. B. (2004), Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in Taxol biosynthesis, *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 53947–53954.

Walker K., Long R., Croteau R. B. (2002), The final acylation step in Taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 9166–9171.

Walker K. D., Schoendorf A., Croteau R. B. (2000), Molecular cloning of taxa-4(20),11(12)-dien- 5alpha-ol-O-acetyl-transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*, *Archives of Biochemistry and Biophysic* **374**: 371–380.

Wang Y., Huang J., Hua H., Sun B., Gao H., Wu L. (2007), A new biflavone from the twigs and leaves of *Taxus cuspidata* Sieb et Zucc., *Asian Journal of Traditional Medicine* **2**: 235-238.

Wani M., Taylore H. L., Wall M. E., Coggon P., McPhail A. T. (1971), The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*, *Journal of the American Chemical Society* **93**: 2325–2337.

Wheeler N. C., Jech K., Masters S. (1992), Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on Taxol content in *Taxus brevifolia* and related species, *Journal of Natural Products* **55**: 432-440.

Wickremesinhe E. R. M. und Arteea N. R. (1993), *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **35**: 181-193.

Witherup K. M., Look S. A., Stasko W. M., Ghiorzi J. T., Musch M. G. (1990), *Taxus* Sp. needles contain amounts of Taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia*: Analysis and isolation, *Journal of Natural Products* **53**: 1249-1255.

- Wu J. und Lin L. (2003), Enhancement of Taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction, *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**: 151-155.
- Xu Y. X., und Hanna M. A. (2009), Synthesis and characterization of hazelnut oil-based biodiesel, *Industrial Crops and Products* **29**: 473–479.
- Yeung T. K., Germond C., Chen X., Wang Z. (1999), The mode of action of Taxol: Apoptosis at low concentration and necrosis at high concentration, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **263**: 398–404.
- Yuan J., Jian-Nan B., Bing Y., Xu-Dong Z. (2006), Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of Taxol, *Chinese Journal of Biotechnology* **22**: 1–6.
- Yuan Y. J., Wei Z. J., Miao Z. Q. und Wu J. C. (2002), Acting paths of elicitors on Taxol biosynthesis pathway and their synergistic effect, *Biochemical Engineering Journal* **10**: 77-83.
- Yukimune Y., Tabata H., Higashi Y., Hara Y. (1996), Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and Baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures, *Nature Biotechnology* **14**: 1129 – 1132.
- Zhang B., Maiti A., Shively S., Lakhani F., McDonald-Jones G., Bruce J. (2005), Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 227–231.

LEBENS LAUF

SHAYKHISLAMOV

VICTOR



Fremdsprachen: Englisch, Tschechisch, Russisch

Schul Ausbildung:

Bis 2002: Grundschule Nerudova, Budweis, Tschechien

2002-2004: Bischöfliches Gymnasium, Budweis, Tschechien

2004 – 2006: Bundesoberstufenrealgymnasium, Bad Leonfelden, Matura

Studium:

Seit Oktober 2006 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Oktober 2011 - Juni 2012: Durchführung der praktischen Arbeiten der Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie der Universität Wien