Synthese von Iridoidglykosiden in Pflanzen und Gewebekulturen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Katja Sesterhenn

aus St. Ingbert

2006

Gutachter: Prof. Dr. Michael Wink
Prof. Dr. Jürgen Reichling

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2006

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Michael Wink, danke ich ganz herzlich für die Überlassung dieses interessanten Themas und, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, es in dieser Weise zu bearbeiten. Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie seine Anregungen und Diskussionsbereitschaft haben maßgeblich zu dem Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Professor Dr. Jürgen Reichling danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Mein Dank gilt außerdem allen MitarbeiterInnen und KollegInnen des Instituts für ihre Unterstützung und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Frau Melanie Distl danke ich ganz herzlich für ihre Hilfe bei der Einarbeitung in die HPLC und MS und die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau Heidi Staudter danke ich ganz besonders für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft rund um die Pflanzenkulturen.

Herrn Jürgen Schneele danke ich insbesondere für die Einarbeitung in den COX-Test sowie die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung des LOX-Tests. Herzlichen Dank auch für die Testung der Substanzen auf antiangiogene Wirkung.

Frau Astrid Backhaus und Frau Dr. Sukanya Dej-Adisai danke ich herzlich für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau Maren Möller und Frau Angela Starke danke ich herzlich für die Durchführung der Toxizitätstests für Harpagosid an Jurkat- bzw. CaCo2-Zellkulturen und auch für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herrn Frank Sporer danke ich insbesondere für seine Hilfe während meiner Einarbeitungszeit und, dass er mir Standorte von *S. nodosa* in Heidelberg gezeigt hat.

Herrn Bernhard Wetterauer danke ich ganz besonders für seine Hilfsbereitschaft und stets aufmunternde Art.

Frau Linda Völker danke ich für ihre Hilfestellung bezüglich der Pflanzenkulturen während meiner Einarbeitung.

Frau Jasmin Freund, Frau Astrid Plöger und Frau Maike Lichtenberg danke ich für die Mitarbeit im Rahmen ihres Pflichtpraktikums.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Sesterhenn, K., Distl, M., Wink, M. (2006): Occurence of iridoid glycosides in *in vitro* cultures and intact plants of *Scrophularia nodosa* L. Plant Cell Reports, published online 14 September 2006.

Für Wolfgang

ZUSAMMENFASSUNG ..... **I**

SUMMARY ..... **II**

1 EINLEITUNG **1**

1.1 ALLGEMEINER TEIL 1
1.2 SEKUNDÄRSTOFFE 3
1.2.1 Einteilung und Wirkung *3*
1.2.2 Sekundärstoffproduktion in vitro *4*
1.2.3 Iridoidglykoside *6*
1.2.3.1 Grundlagen 6
1.2.3.2 Wirkung 7
1.3 PFLANZEN 9
1.3.1 Harpagophytum procumbens *9*
1.3.1.1 Systematik 9
1.3.1.2 Botanik und Verbreitung 10
1.3.1.3 Droge und Inhaltsstoffe 11
1.3.1.4 Anwendung und Wirkung 13
1.3.1.5 Toxizität 17
1.3.2 Scrophularia nodosa *17*
1.3.2.1 Systematik 18
1.3.2.2 Botanik und Verbreitung 18
1.3.2.3 Droge und Inhaltsstoffe 19
1.3.2.4 Anwendung und Wirkung 20
1.3.2.5 Toxizität 21
1.3.3 Plantago lanceolata *22*
1.3.3.1 Systematik 22
1.3.3.2 Botanik und Verbreitung 23
1.3.3.3 Droge und Inhaltsstoffe 23
1.3.3.4 Anwendung und Wirkung 24
1.3.3.5 Toxizität 26
1.4 AUFGABENSTELLUNG 27

2 MATERIAL UND METHODEN **28**

2.1 GERÄTE UND CHEMIKALIEN 28
2.2 PFLANZENKULTUREN UND INTAKTE PFLANZEN 32
2.2.1 Allgemeine Vorgehensweise *32*
2.2.2 Herkunft des Pflanzenmaterials *32*
2.2.3 In vitro Pflanzen *34*
2.2.3.1 Etablierung der sterilen Keimpflanzen 34
2.2.3.2 Regeneration und Vermehrung 34
2.2.3.3 Beeinflussung der Sekundärstoffproduktion in den *in vitro* Pflanzen durch Elicitierung mittels Methyljasmonat 35
2.2.4 Kalluskulturen *35*
2.2.5 Wurzelkulturen *35*
2.2.5.1 Charakterisierung des Wachstumsverhaltens 36
2.2.5.2 Charakterisierung des Mediums 36
2.2.5.2.1 pH-Wert und Leitfähigkeit 36
2.2.5.2.2 Quantitative Ammoniumanalyse (Indophenolblau-Nachweis) 36
2.2.5.2.3 Quantitative Nitratanalyse (BRATON-MARSHAL-Reaktion) 37
2.2.5.2.4 Quantitative Phosphatanalyse (nach GOMORRI, 1942) 39
2.2.5.2.5 Wurzelkulturen – Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes* 40

2.2.6 Nährmedien und Kulturbedingungen ... 45
2.3 PHYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER PFLANZENEXTRAKTE ... 48
2.3.1 Probenaufarbeitung ... 48
2.4 QUALITATIVE METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER EXTRAKTE ... 49
2.4.1 Dünnschichtchromatographie ... 49
2.4.2 Massenspektrometrie ... 50
2.5 QUANTITATIVE METHODE ZUR BESTIMMUNG DER INHALTSSTOFFE ... 52
2.5.1 HPLC-Analyse ... 52
2.5.2 Quantifizierung mittels HPLC ... 54
2.5.3 Wiederfindungsrate ... 56
2.6 UNTERSUCHUNGEN ZUR ANTIINFLAMMATORISCHEN WIRKUNG ... 57
2.6.1 Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1) ... 57
2.6.2 Hemmung der Lipoxygenase (LOX) ... 60
2.7 UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG DER ANGIOGENESE ... 67

3 ERGEBNISSE ... 68

3.1 PFLANZENKULTUREN ... 68
3.1.1 In vitro Pflanzen ... 68
3.1.1.1 Etablierung der *in vitro* Pflanzen ... 68
3.1.1.2 Vermehrung ... 70
3.1.1.3 Gehalt an Iridoidglykosiden in den *in vitro* Pflanzen ... 71
3.1.1.3.1 DC-Analyse ... 71
3.1.1.3.2 Harpagosidgehalt der *in vitro* Pflanzen von *H. procumbens* ... 72
3.1.1.3.3 Harpagosid-, Aucubin- und Catalpolgehalt der *in vitro* Pflanzen von *S. nodosa* 73
3.1.1.3.4 Verlauf des Iridoidglykosidgehaltes in intakten Pflanzen von *S. nodosa* während der Wachstumsperiode ... 76
3.1.1.3.5 Aucubin- und Catalpolgehalt in *in vitro* und intakten Pflanzen von *P. lanceolata* ... 81
3.1.1.4 Beeinflussung der Sekundärstoffproduktion in *in vitro* Pflanzen durch Elicitierung mittels Methyljasmonat (MJ) ... 85
3.1.2 Kalluskulturen ... 86
3.1.3 Wurzelkulturen ... 88
3.1.3.1 Etablierung der Wurzelkulturen ... 88
3.1.3.2 Charakterisierung des Ausgangsmediums ... 89
3.1.3.2.1 pH-Wert und Leitfähigkeit ... 89
3.1.3.2.2 Ammonium- und Nitratgehalt ... 90
3.1.3.2.3 Phosphatgehalt ... 91
3.1.3.3 Charakterisierung der Wurzelkulturen von *H. procumbens* ... 91
3.1.3.4 Charakterisierung der Wurzelkulturen von *S. nodosa* ... 93
3.1.3.5 Charakterisierung der Wurzelkulturen von *P. lanceolata* ... 94
3.1.3.6 Gesamtvergleich der Massenproduktion ... 96
3.1.3.7 Wurzelkulturen - Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes* ... 97
3.1.3.8 Iridoidglykosidgehalt in den Wurzelkulturen ... 99
3.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR ANTIINFLAMMATORISCHEN WIRKSAMKEIT ... 99
3.2.1 Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1) ... 99
3.2.2 Hemmung der Lipoxygenase (LOX) ... 100
3.2.3 Beeinflussung der Angiogenese ... 106

4 DISKUSSION ... 108

4.1 PFLANZENKULTUREN UND INTAKTE PFLANZEN ... 108
4.1.1 In vitro Pflanzen ... 108

4.1.1.1 Etablierung und Regeneration der *in vitro* Pflanzen 108
4.1.1.2 Phytochemische Untersuchungen von *in vitro* und intakten Pflanzen 110
4.1.1.3 Harpagophytum procumbens – in vitro Pflanzen 110
4.1.1.3.1 Scrophularia nodosa – in vitro Pflanzen 111
4.1.1.3.2 Scrophularia nodosa - intakte Pflanzen 113
4.1.1.3.3 Plantago lanceolata – in vitro Pflanzen 115
4.1.1.3.4 Plantago lanceolata - intakte Pflanzen 116
4.1.1.3.5 Beeinflussung der Sekundärstoffproduktion in den *in vitro* Pflanzen durch Elicitierung mittels Methyljasmonat (MJ) 118
4.1.2 Kalluskulturen 119
4.1.2.1 Etablierung und Wachstum 119
4.1.2.2 Phytochemische Untersuchung 120
4.1.3 Wurzelkulturen 120
4.1.3.1 Charakterisierung des Ausgangsmediums 120
4.1.3.1.1 pH-Wert und Leitfähigkeit 120
4.1.3.1.2 Ammonium- und Nitratgehalt 121
4.1.3.1.3 Phosphatgehalt 122
4.1.3.2 Charakterisierung der Wurzelkulturen von *H. procumbens* 122
4.1.3.3 Charakterisierung der Wurzelkulturen von *S. nodosa* 123
4.1.3.4 Charakterisierung der Wurzelkulturen von *P. lanceolata* 124
4.1.3.4.1 Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes* 125
4.1.3.4.2 Phytochemische Untersuchung 126
4.1.4 Schlussfolgerungen 127
4.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR ANTIINFLAMMATORISCHEN WIRKSAMKEIT UND ZUR BEEINFLUSSUNG DER ANGIOGENESE 128
4.2.1 Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1) 128
4.2.2 Hemmung der Lipoxygenase (LOX) 129
4.2.3 Beeinflussung der Angiogenese 131
4.2.4 Schlussfolgerungen 132

5 LITERATURVERZEICHNIS 134

Abkürzungen

½ MS-	MS-Medium in halber Konzentration ohne Zuckerzugabe
½ MS3	MS-Medium in halber Konzentration mit 3 % Zuckerzusatz
12-HHT	12-Hydroxy-hepatodecatrienoic Säure
2,4-D	Dichlorphenoxyessigsäure
Abb.	Abbildung
BFGF	basic fibroblast growth factor
CAM	Chorioallantoismembran
COX	Cyclooxygenase
Cys-LT	Cysteinyl-Leukotrien
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ESI	Elektronen-Spray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IC_{50}	Konzentration, die eine halbmaximale Hemmung hervorruft
IES	Indolessigsäure
iNOS	inducible nitric oxide synthase
KG	Körpergewicht
LC	Liquid Chromatography
LC-ESI-MS	Liquid Chromatography-Elektronen-Spray-Ionisation-Massenspektrometrie
LOX	Lipoxygenase
LTC_4	Leukotrien C_4
MDA	Malondialdehyd
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MS	Pflanzenkulturmedium nach Murashige & Skoog (1962)
NDGA	Nordihydroguajaretsäure

Abkürzungen

NN	Pflanzenkulturmedium nach Nitsch & Nitsch (1969)
p. o.	peroral
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDFG	platelet-derived growth factor
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
TBA	Thiobarbitursäure
TG	Trockengewicht
TXB_2	Thromboxan B_2
VEGF	vascular endothelial growth factor
WP	Pflanzenkulturmedium Woody Plant (Lloyd and McCown 1980)
WP-	WP-Medium ohne Zuckerzusatz
WP3	WP-Medium mit 3 % Zuckerzusatz

Zusammenfassung

In vitro Pflanzen von *H. procumbens, S. nodosa* und *P. lanceolata* wurden aus Samen etabliert und dienten als Ausgangsmaterial zur Etablierung von Kallus- und Wurzelkulturen. Ebenfalls erfolgreich war die Vermehrung der Pflanzen *in vitro*. Die Iridoidglykoside Harpagosid, Aucubin und Catalpol wurden mittels LC-ESI-MS identifiziert und ihre Anteile in den verschiedenen Pflanzenorganen durch HPLC-Analyse bestimmt. Zum Vergleich wurden intakte Pflanzen analysiert. Die *in vitro* Pflanzen zeigten unterschiedliche Verteilungsmuster an Iridoidglykosiden. In den *in vitro* Pflanzen von *S. nodosa* wurde mit insgesamt 1,68 % (TG) deutlich mehr Harpagosid produziert als in denjenigen von *H. procumbens*. An Aucubin wurde in den verschiedenen Organen der *in vitro* Pflanzen von *S. nodosa* und *P. lanceolata* ein fast identisches Verteilungsmuster mit einem Gesamtgehalt über 2 % bestimmt. Beim Vergleich mit den intakten Pflanzen wiesen die *in vitro* kultivierten Pflanzen von *S. nodosa* nur etwas niedrigere Werte an detektierbaren Iridoiden auf als die intakten Pflanzen (4,36 % bzw. 4,88 %). Die intakten Pflanzen von *P. lanceolata* zeigten zum Sammelzeitpunkt dagegen einen etwas niedrigeren Iridoidgehalt als die *in vitro* kultivierten auf (3,70 % bzw. 3,48 %). Die Sekundärstoffproduktion der *in vitro* Pflanzen konnte durch Zugabe von Methyljasmonat nicht gesteigert werden, aber in den Wurzeln wurde eine Verschiebung des Iridoidglykosidgehaltes zugunsten von Catalpol bewirkt. Beim Vergleich intakter Pflanzen verschiedener *Plantago*-Arten zeigten sich deutliche Unterschiede bei der Verteilung von Aucubin und Catalpol in den verschiedenen Organen. Kallus- und Wurzelkulturen wurden hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens charakterisiert und auf den Gehalt an Iridoidglykosiden untersucht. Diese waren offensichtlich nicht in der Lage, Iridoidglykoside zu synthetisieren.

Hinsichtlich der pharmakologischen Wirkungen wurde für Harpagosid und *Harpagophytum*-Extrakte *in vitro* keine Hemmung der COX-1 festgestellt. Eine Inhibierung der LOX aus Sojabohnen wurde für die Iridoidglykoside Harpagosid, Aucubin und Catalpol in schwächerem Maße beobachtet als für verschiedene Pflanzenextrakte von *H. procumbens*, *S. nodosa* und *P. lanceolata*. Im *in vivo* CAM-Assay am Hühnerembryo konnte für Harpagosid und Catalpol keine antiangiogene Wirkung nachgewiesen werden.

Summary

In vitro plants of *H. procumbens, S. nodosa,* and *P. lanceolata* were established from seeds. Callus and root cultures were established from these plants and plants were regenerated successfully *in vitro*. Iridoid glycosides, such as harpagoside, aucubin, and catalpol were identified by LC-ESI-MS and their contents determined by HPLC. For comparison intact plants were analysed. The analysis revealed differing patterns of iridoid glycosides in the *in vitro* plants. *In vitro* plants of *S. nodosa* produced remarkably more harpagoside (1.68 %) than those of *H. procumbens*. For aucubin the pattern of distribution in different organs of *in vitro* plants of *S. nodosa* and *P. lanceolata* was nearly identical with an amount of more than 2 %. In *in vitro* plants slightly lower amounts of detectable iridoid glycosides (4.36 %) were determined than in intact plants (4.88 %). Intact plants of *P. lanceolata* contained slightly lower amounts of detectable iridoid glycosides (3.70 %) than *in vitro* cultivated plants (3.48 %) at time of harvest. Elicitation with methyljasmonate in *in vitro* plants did not increase production of iridoid glycosides but induced a decrease of aucubin with a simultaneous increase of catalpol in the roots. The comparison of intact plants of different *Plantago* species revealed remarkable variations in the distribution of iridoid glycosides in the different plant organs. Callus and root cultures were characterised in regard to their growth and analysed for their content of detectable iridoid glycosides. Both were apparently not able to synthesise iridoid glycosides.

Concerning the pharmacological effects of harpagoside and *Harpagophytum* extracts no inhibition of COX-1 could be determined *in vitro*. An inhibition of LOX from soy-beans was achieved by extracts of *H. procumbens, S. nodosa,* and *P. lanceolata* in a stronger manner than by the isolated iridoid glycosides harpagoside, aucubin, and catalpol. The *in vivo* CAM-Assay with chicken embryos revealed no antiangiogenic effects for harpagoside and catalpol.

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Teil

Die in Südafrika als Volksheilmittel verwendeten sekundären Speicherwurzeln der Teufelskralle, *Harpagophytum procumbens* DC. (Pedaliaceae), erfreuen sich in Europa seit längerer Zeit großer Beliebtheit insbesondere zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen. Die Droge stammt auch heute noch fast ausschließlich aus Wildsammlungen. Durch die übermäßige Nachfrage nach Droge wurden die Bestände der langsam nachwachsenden Pflanze in der Kalahari stark reduziert. Aus diesem Grund wurden bereits im Juli 1975 für *H. procumbens* und *H. zeyheri* besondere Schutzbestimmungen vom Administrator Südafrikas erlassen. Die Schwierigkeiten bei der Drogenbeschaffung führten zu ersten Experimenten mit Gewebekulturen der Pflanze. Zum einen sollte eine Methode zur Regeneration neuer Pflanzen gefunden werden. Zum anderen sollte der Stoffwechsel der Iridoide, die mit Harpagosid als Hauptiridoid als wirksame Inhaltsstoffe der Droge diskutiert werden, untersucht werden (Abou-Mandour 1977, Franz et al. 1982). Levieille and Wilson (2001) etablierten ein Verfahren zur *in vitro* Vermehrung von *Harpagophytum*-Pflanzen basierend auf der *in vitro* Regeneration neuer Pflänzchen aus Stängelabschnitten. Nach Akklimatisierung an die Wachstumsbedingungen im Treibhaus entwickelten die auf diese Arte gewonnenen Pflanzen sowohl die typischen Früchte als auch sekundäre Speicherwurzeln. Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Willert (Willert und Schneider 2001) arbeitet an einem Projekt, das sowohl die geregelte und kontrollierte Wildsammlung am natürlichen Standort fördern als auch den kontrollierten Anbau von definiertem und qualitativ hochwertigem Pflanzenmaterial auf Farmen in der Kalahari Südafrikas ermöglichen soll.

Die antiinflammatorische Wirkung der Drogenextrakte von *H. procumbens* wurden dem Harpagosid, Harpagid, Procumbid und Harpagogenin zugeschrieben. Da pflanzliche Extrakte, neben der Teufelskralle Weidenrinde und Pappelblätter (Willert und Schneider 2001), weniger Nebenwirkungen aufweisen als synthetische nichtsteroidale Antirheumatika (NSAD), besteht ein hoher Bedarf an den entsprechenden Pflanzen (Levieille und Wilson 2002, Baghdikian et al. 1997, Chrubasik und Wink 1998). Eine alternative Quelle für Harpagosid könnte somit von großem Interesse sein.

Die Schwierigkeiten bei der Beschaffung der *Harpagophytum*-Droge haben auch zu der Überlegung geführt, sie durch einheimische Arten zu ersetzen. Der Gattung

Harpagophytum botanisch nahestehend sind die Knotige Braunwurz, *Scrophularia nodosa* L., und die Königskerze, *Verbascum thapsiforme*. Beide zählen zur Familie der Scrophulariaceae und wie *Harpagophytum* zur Ordnung der Lamiales. Sie weisen ein ähnliches Iridoidmuster auf (Weiss 1985). Charakteristisch für die Gattung *Scrophularia* ist die Anreicherung von Iridoidglykosiden wie Harpagosid, Aucubin und Catalpol (Pauli et al. 1995). Das Vorkommen dieser drei Iridoidglykoside in der in Europa heimischen Pflanze machen sie zu einem besonders interessanten Forschungskandidaten. Eine weitere interessante Arzneipflanze der Lamiales stellt der Spitzwegerich, *Plantago lanceolata* L. (Plantaginaceae), dar (Frohne und Jensen 1985). Er weist zwar kein Harpagosid auf, dafür aber die Iridoidglykoside Aucubin und Catalpol als typische Inhaltsstoffe.

Um die Wirkung pflanzlicher Arzneimittel verstehen und bewerten zu können, ist es unabdingbar, die Inhaltsstoffe zu identifizieren und deren biologische Wirkungen zu untersuchen (Van Wyk et al. 2004). Die Wirkstoffe eines pflanzlichen Arzneimittels stellen die Sekundärstoffe dar. Eine Pflanze weist häufig eine Vielzahl von Sekundärstoffen auf, wobei die Einzelsubstanzen unterschiedliche Wirkungen zeigen können. Bei der Anwendung eines komplexen Pflanzenextraktes ist es also wahrscheinlich, dass Interaktionen mit verschiedenen Zielstrukturen im Körper stattfinden. Die verschiedenen Sekundärstoffe können dabei nicht nur additiv, sondern auch synergistisch wirken. Nicht umsonst wird betont, dass der Gesamtextrakt den Wirkstoff darstellt.

Großes Interesse gilt der Forschung an pflanzlichen Zell- und Gewebekulturen zur Gewinnung von Sekundärstoffen, die medizinisch von Bedeutung sind. Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen finden allgemein Anwendung:

- zur Partialsynthese und Modifikation von Sekundärstoffen, z. B. Umwandlung von Digitoxin in Digoxin durch *Digitalis* Kulturen oder von Tropin und Tropansäure in Atropin und Scopolamin durch *Datura* Kulturen (Neumann 1995, Alfermann et al. 1985),
- als Ausgangsmaterial zur vegetativen Vermehrung (Verklonung) von genetisch identischen Hochleistungsstämmen von Arzneipflanzen, z. B. *Catharanthus, Dioscorea, Foeniculum*, pyrrolizidinalkaloidfreie *Tussilago* und *Symphytum* Klone (Rao 1987),
- zur Gewinnung und Erhaltung virus- und pilzfreier sowie resistenter Klone, z. B. virusfreier *Digitalis lanata*, *Phytophthora* resistente *Cinchona ledgeriana*,

- in der Pflanzenzüchtung und -vermehrung, z. B. als Ausgangsmaterial haploider und diploider Protoplastenkulturen in der Arzneipflanzenzüchtung oder bei der *in vitro* Vermehrung teilungsfähigen Gewebes von Nahrungs- und Zierpflanzen (z. B. Erdbeeren, Orchideen).

1.2 Sekundärstoffe

1.2.1 Einteilung und Wirkung

Sekundärstoffe sind niedermolekulare Substanzen, die nicht am Primärstoffwechsel der Pflanze beteiligt sind. Sie lassen sich in folgende Gruppen unterteilen: stickstoffhaltige Substanzen, phenolische Substanzen und Terpene (Van Wyk et al. 2004). Vertreten sind sie meist in hoher struktureller Vielfalt in allen höheren Pflanzen (Wink 2003). Sie sind bioaktiv wirksam und zeigen Wechselwirkungen mit Proteinen oder Nukleinsäuren, besitzen antimikrobielle oder insektizide Wirkungen und weisen zahlreiche für die Phytotherapie interessante pharmakologische Eigenschaften auf.

Die von den Pflanzen produzierten Sekundärstoffe können als chemische Abwehr- und Signalstoffe betrachtet werden. Sie dienen zum einen der **Verteidigung** der Pflanze gegen Herbivoren (Insekten, Vertebraten) durch Abwehr, Abschreckung und Toxizität; gegen Mikroben (Bakterien, Pilze, Viren) durch Wachstumshemmung und Toxizität; gegen konkurrierende Pflanzen (Allelopathie) durch Hemmung der Keimung und des Wachstums von Keimlingen. Zum anderen dienen sie der **Anlockung** von bestäubenden und samenverbreitenden Tieren, Wurzelknollen-Bakterien sowie von Organismen, die sich von Herbivoren ernähren. Auch die Stimulation der Eiablage von spezialisierten Insekten kann durch sie hervorgerufen werden. Daneben stellen sie den **UV-Schutz** der Pflanzen (Wink 1999).

Da sie als Mediatoren der Interaktionen zwischen Pflanzen, Pflanzen und Herbivoren sowie Mikroorganismen dienen, tragen sie entscheidend zur Fitness einer Pflanze bei (Wink 1997). Der Sekundärstoff kann in der Pflanze in aktiver Form vorliegen oder als Prodrug und wird dann nach Verletzung, Infektion oder im Körper des Pflanzenfressers aktiviert (Wink 2003). Viele dieser Sekundärstoffe sind für die sie produzierende Pflanze selbst toxisch und müssen daher separat in speziellen Bereichen gespeichert werden. In der Regel werden hydrophile Substanzen (wie z. B. Alkaloide, organische Säuren, Glykoside) in Vakuolen gespeichert, die strategisch günstig positioniert sind. Bei Verletzung der Pflanze kommt der in der Vakuole

gespeicherte Sekundärstoff mit anderen Substanzen in Kontakt und kann so zum aktiven Abwehrstoff metabolisiert werden (Wink 1997).

1.2.2 Sekundärstoffproduktion *in vitro*

Die Organe, Gewebe oder Zellen der Pflanzen werden zu diesem Zweck *in vitro* unter sterilen Bedingungen auf einem chemisch definierten Nährmedium kultiviert. Die Nährmedien müssen neben organisch gebundenem Kohlenstoff Kohlenhydrate (Glucose oder Saccharose), Stickstoff in Form von Nitraten, Phosphor, Kalium, Calcium, Magnesium, Sulfate und Eisen (Chelat) enthalten. Auch die Versorgung mit Vitaminen und Spurenelementen wie Bor, Mangan, Iod, Kupfer, Kobalt und Molybdän erfolgt über das Nährmedium (Reichling 1985, Abou-Mandour 1996, Neumann 1995).

Bei der Organkultur gestaltet sich die Kultivierung isolierter Wurzeln als relativ einfach. Von steril angezogenen Keimlingen werden Wurzelspitzen abgeschnitten und in flüssigem Nährmedium weiter kultiviert. Es können alternativ auch sterilisierte Wurzeln intakter Pflanzen verwendet werden. Kultiviert man Sprossspitzen auf festem Nährmedium, bilden sich meist regelmäßig Wurzelanlagen und man erhält sterile Gesamtpflanzen.

Pflanzliche Gewebe- und Zellkulturen stellen isolierte Pflanzenteile (= Explantate) dar, die unter aseptischen Bedingungen außerhalb des intakten Organismus in einem chemisch definierten Nährmedium kultiviert werden. Als Explantate eignen sich die Organe intakter oder aus Samen angezogener steriler Pflanzen. An den Schnittstellen der Explantate entwickelt sich unter wachstumsfördernden Bedingungen Kallus, ein Wundgewebe, das aus unorganisiert wachsenden Zellen besteht (Neumann 1995). Dieser wird zur Subkultivierung geteilt und auf frisches Medium übertragen. Dem Medium müssen stets Phytohormone zugefügt werden, um zum einen die Kallusbilung zu induzieren und zum anderen einen Wachstumsstillstand oder die Organogenese zu verhindern. Zur Kallusinduktion wird meist ein bestimmtes Verhältnis zwischen IES und Kinetin bzw. BAP verwendet (Abou-Mandour 1996, Sakuta und Komamine 1987). Die Kalli dienen als Ausgangsmaterial für Zell- oder Suspensionskulturen. Der Gewebeverband wird dazu aufgelöst und die Zellen in Flüssigmedium unter ständiger Bewegung kultiviert. Das Zellwachstum erfolgt durch die erhöhte Nährstoffversorgung der einzelnen Zellen schneller als bei der Kalluskultur. Sekundärstoffe könnten so in großem Maßstab auf direktem Weg produziert werden, ohne eine aufwendige Isolierung der

Stoffe aus den entsprechenden Pflanzen. Vorteile der *in vitro* Kultur ist auch die Unabhängigkeit von Faktoren wie Klima, Wetter und Umweltbedingungen sowie Krankheiten oder Fraßfeinden (Reichling 1985). Zur Herstellung werden außerdem keine direkten Nutzflächen benötigt (Abou-Mandour 1996). Die *in vitro* Kulturen können zur kommerziellen Produktion von Sekundärstoffen in Bioreaktoren verwendet werden. Dies kann vorteilhaft sein kann, wenn die Fähigkeit zur Bildung von Sekundärstoffen genetisch und biochemisch stabil ist und hohe Erträge erzielt werden (Wildi und Wink 2002).

Häufig stellt sich jedoch das Problem, dass gut wachsende *in vitro* Zellkulturen die Inhaltsstoffe der intakten Pflanze nicht oder nur in verschwindend geringen Mengen produzieren (Wink et al. 2005, Neumann 1995, Charlwood et al. 1990). Die Sekundärstoffproduktion ist meist an die Differenzierung der Zelle gebunden, d. h. an die Ausbildung bestimmter Merkmale *in vivo* oder *in vitro*, die die Zelle befähigen, spezielle Funktionen auszuüben (Charlwood 1990). Auch kann es zu einer verminderten Stoffproduktion mit zunehmender Kulturdauer kommen, da die Zellen die Fähigkeit zur Bildung bestimmter Sekundärstoffe verlieren (Abou-Mandour 1996, Neumann 1995). So produzierten beispielsweise Suspensionskulturen von *Penstemon serrulatus* zu Beginn der Etablierung bis zu 7,8 % Penstemid sowie 5,1 % Serrulatolosid und nach einem Jahr nur noch 1,0 % Penstemid sowie 0,74 % Serrulatolosid (Wysokinska und Swiatek 1990). Aus kommerzieller Sicht besteht das Hauptproblem somit im Widerspruch zwischen der Wachstums- und Syntheseleistungen der Kulturen. Oft wiegen die vergleichsweise geringen Ausbeuten die hohen Herstellungskosten nicht auf.

Ein erfolgreiches Beispiel für die wirtschaftliche Produktion von Sekundärstoffen ist die Produktion von Rosmarinsäure (5,5 g/l) aus Zellsuspensionskulturen der Buntnessel, *Coleus blumei* Benth. (Lamiaceae) (Ulbrich et al. 1985). Im ostasiatischen Raum als Farbstoff und Wundheilmittel angewendet wird das antibakteriell wirkende Naphtochinonderivat Shikonin; dessen Produktion auf Zellkulturbasis kann auch unter ökonomischen Gesichtspunkten stattfinden. Es wird aus pflanzlichen Zellkulturen von *Lithospermum officinale* var. *erythrorhizon* Sieb. et Zucc. (Boraginaceae) mit einer Ausbeute von 1,5 - 4 g/l gewonnen (Ulbrich et al. 1985, Abou-Mandour 1996, Neumann 1995). Ebenso wird beispielsweise das Isochinolinalkaloid Berberin aus Zellkulturen der Berberitze biotechnologisch hergestellt (Abou-Mandour 1996), und die Produktion von Ginsenosiden durch pflanzliche Gewebekulturen von *Panax*

ginseng wurde durch die Firma Nitto Denko Co. in Japan etabliert (Wildi und Wink 2002). Aufgrund ihrer chemisch komplizierten Struktur werden wichtige antikrebs Wirkstoffe immer noch aus Pflanzen gewonnen und nicht synthetisch hergestellt. Der Wirkstoff Paclitaxel (Taxol®) beispielsweise wird mittels Suspensionskulturen der Gattung *Taxus* in Bioreaktoren im kommerziellen Stil produziert. Auch andere für die Krebstherapie wichtige Substanzen wie Vinblastin, Vincristin, Camptothecin, Podophyllotoxin können in pflanzlichen *in vitro* Kulturen produziert werden (Wink et al. 2005).

1.2.3 Iridoidglykoside

1.2.3.1 Grundlagen

Die Bezeichnung Iridoid leitet sich von der Substanz Iridodial (Abb. 1.1) ab, die im Abwehrsekret der Ameisengattung *Iridomyrmex* gefunden wurde (Hänsel et al. 1999). Früher wurden die Iridoide als Pseudoindikane bezeichnet, da viele iridoidartige Verbindungen durch Enzym- oder Säureeinwirkung in ihre Aglyka gespalten werden, die dann unter Bildung blauer oder schwarzer Stoffe polymerisieren (Frohne und Jensen 1985).

Iridoide weisen ein Cyclopentanpyran-Kohlenstoffgerüst und mindestens zwei *O*-Funktionen im Molekül auf. Biogenetisch lassen sie sich den Monoterpenen zuordnen.

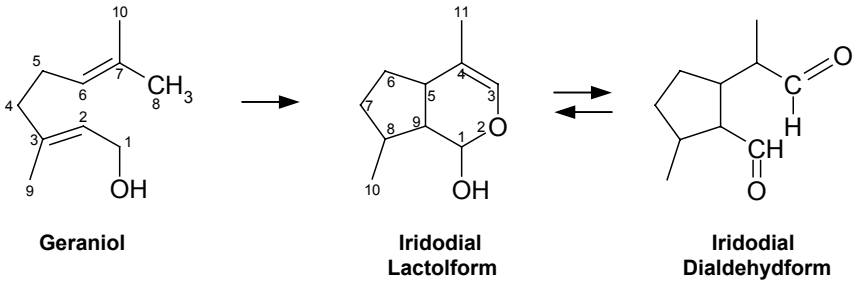

Abb. 1.1 Biosynthese der Iridoide mit Angabe der Bezifferung. Aus Geraniol entsteht das Iridodial, aus dem in getrennten Wegen die Gruppe der 8 ß-*C*-Iridoide (z. B. Loganin, Valepotriate, Secoiridoide) und die Gruppe der 8 α-*C*-Iridoide (z. B. Aucubin, Catalpol) gebildet werden (Rimpler 1999).

Charakteristisch ist das Molekülgerüst aus 10 Kohlenstoffatomen. C_9- und seltener C_8-Iridoide werden durch Eliminierung von Kohlenstoffen, vermutlich als CO_2, gebildet. Durch oxidative Aufspaltung des Cyclopentanrings erhält man die Secoiridoide. Die Iridoide werden in Iridoidglykoside, nichtglykosidische Iridoide und Secoiridoidglykoside unterteilt. Dabei überwiegen die Iridoidglykoside mit ca. 70 %. Die

acetalische OH-Gruppe am C-1 des Grundgerüstes ist bei ihnen glykosidisch mit einem Zucker verbunden. Diese Glykosidierung trägt zur Stabilisierung des Lactolrings bei und verleiht ihnen einen hydrophilen Charakter. Für sie typisch ist unter anderem ein stark bitterer Geschmack und, dass sie durch Säuren oder ß-Glucosidasen in ihre Aglyka gespalten werden, die zu schwarzen Massen polymerisieren (Hänsel et al. 1999).
Die Iridoidglykoside Harpagosid, Aucubin und Catalpol zählen zu den C_9-Iridoiden (Abb. 1.5 und 1.8). Aucubin stellt die biosynthetische Vorstufe von Catalpol dar (Bowers and Stamp 1992).

1.2.3.2 Wirkung

Das Vorkommen der Iridoide ist auf die Unterklasse der Cornidae und Asteridae beschränkt. Sie spielen als bitter schmeckende fraßabwehrende Substanzen gegenüber herbivoren Tieren eine wichtige Rolle (Frohne und Jensen 1985). Dadurch lassen sich auch die zahlreichen pharmakologisch interessanten Wirkungen dieser Stoffe, wie z. B. antimikrobiell, antifungal, antiviral, antiphlogistisch, choleretisch, purgativ, hepatoprotektiv, immunmodulierend, hypoglykämisch, lipidsenkend, molluskizid erklären.
Die Glykoside werden dabei meist als Prodrug angesehen. Durch Einwirkung von ß-Glucosidasen (z. B. menschliche Darmflora oder pflanzeneigene Enzyme) entstehen die wirksamen Aglyka und andere Intermediärprodukte, die ebenfalls wirksam sein können. Die Aglyka sind wie bereits erwähnt instabil und polymerisieren unmittelbar nach Öffnung des Lactolringes. Als Ausnahme gilt hier Verbenalin, das in sein stabiles Aglykon Verbenalol umgewandelt wird (Hänsel et al. 1999).

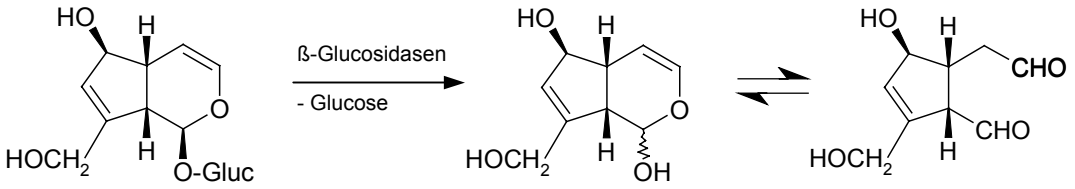

Abb. 1.2 Umwandlung von Aucubin in Aucubigenin durch ß-Glucosidasen (modifiziert nach Davini et al. 1986).

Durch die Öffnung des Lactolrings wird ein reaktiver Dialdehyd gebildet, der mit Proteinen interagieren kann, indem kovalente Bindungen entstehen. Dies könnte die

entzündungshemmenden Eigenschaften von Iridoidglykosiden erklären. Die Metabolite können kovalent an die Enzyme Cyclooxygenase und 5-Lipoxygenase binden, die an der Prostaglandin- und Leukotriensynthse beteiligt sind, wodurch der Entzündungsprozess unterbrochen wird (Van Wyk et al. 2004).

Die Biosynthese der Prostaglandine und Thromboxane erfolgt auf dem sog. Cyclooxygenaseweg, die der Leukotriene auf dem sog. 5-Lipoxygenaseweg der Arachidonsäurekaskade. Die Arachidonsäure (all-cis-5,8,11,14-Eicosatetraensäure) ist Bestandteil von Membranphospholipiden und kommt nur in geringen Mengen frei vor. Wird die Phospholipase A_2 durch bestimmte Reize (z. B. zellschädigende Noxen) aktiviert, bewirkt sie die Freisetzung der Arachidonsäure aus der Zellmembran. Die Cyclooxygenase (COX) (syn. Prostaglandinendoperoxid-Synthase) katalysiert zunächst die Umwandlung der freigesetzten Arachidonsäure zu Prostaglandin-Endoperoxid PGG_2. Über eine Peroxidase geht PGG_2 in Prostaglandin H_2 über. Aus dem PGH_2 werden die Prostaglandine in den verschiedenen Geweben, Thromboxan A_2 in den Thrombozyten und Prostacyclin im Gefäßendothel gebildet (Mutschler 1991). Unterschieden werden zwei Isoformen des Enzyms: COX-1 und COX-2. Die COX-1 kommt im normalen Gewebe vor und ist am Umbau der Arachidonsäure zu Produkten physiologischer Vorgänge beteiligt. Die COX-2 dagegen wird unter pathophysiologischen Bedingungen in Zellen der Immunabwehr gebildet und katalysiert die Produktion von Entzündungsmediatoren (Schneider 1999). Die Prostaglandine sind an der Entstehung von Fieber, Schmerzen und Entzündungen beteiligt. Thromboxane induzieren die Thrombozytenaggregation und die Kontraktion glatter Muskelzellen (Pschyrembel 2002). Bei der Lipoxygenase unterscheidet man zwischen 5-, 12- und 15-Lipoxygenase je nach Angriffsposition des Enzyms an der Arachidonsäure. Die 5-Lipoxygenase kommt in den Leucozyten der Lunge vor und katalysiert die Umwandlung der Arachidonsäure in 5-Hydroperoxy-6,8,11,14-Eicosatetraensäure (5-HPETE). Aus dieser wird das instabile Leukotrien A_4 gebildet, das in die weiteren Leukotriene umgewandelt wird. Sie stellen Mediatoren entzündlicher und allergischer Reaktionen (z. B. bei akutem Asthma) dar (Pschyrembel 2002). Vermutlich spielen sie eine Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf rheumatisch-entzündlicher Reaktionen und sind an der Auslösung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen beteiligt (Schneider 1999).

Spezielle Wirkungen von Harpagosid, Aucubin und Catalpol werden in Kapitel 1.3 bei der Vorstellung der einzelnen Pflanzen unter Anwendung und Wirkungen besprochen.

1.3 Pflanzen

1.3.1 Harpagophytum procumbens

Der Gattungsname *Harpagophytum* leitet sich vom griechischen harpagos (= Enterhaken) ab und bezieht sich auf die mit Widerhaken versehene Frucht (Weiss 1985). Diese wird auch als „Trampelklette“ bezeichnet, da sie sich leicht zwischen die Klauen von Rindern und anderen Tieren eintreten und schwere Verletzungen hervorrufen kann. Daher stammt auch der Trivialname Teufelskralle (Volk 1964). Diese Teufelskralle sollte allerdings nicht mit den in Deutschland heimischen *Phyteuma*-Arten verwechselt werden, die ebenfalls den Namen Teufelskralle tragen, aber keine Arzneipflanzen sind (Weiss 1985). Nach Volk (1964) entdeckte der Farmer G. H. Mehnert die Wurzel während der Hottentottenaufstände 1904, als ein verletzter Hottentotte durch einen Medizinmann mit Hilfe der *Harpagophytum*-Wurzel geheilt werden konnte. Der Medizinmann wollte ihm das Geheimnis der Wurzel nicht verraten, aber Mehnert gelang es, dem Geheimnis auf die Spur zu kommen, und vertrieb die getrocknete Wurzel anschließend unter der Bezeichnung Harpago-Tee (Volk 1964).

1.3.1.1 Systematik

Die systematische Einordnung der südafrikanischen Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens* DC. ex Meissn.) erfolgt nach der Angiosperm Phylogeny Group (www.mobot.org 2006):

Klasse	**Dicotyledoneae**
Unterklasse	**Asteridae**
Ordnung	**Lamiales**
Familie	**Pedaliaceae**
Gattung	***Harpagophytum***
Art	***Harpagophytum procumbens* DC.**

Abb. 1.3 Südafrikanische Teufelskralle mit Blüten, Frucht und sekundären Speicherknollen (Pahlow 2001).

Abb. 1.4 Frucht der Teufelskralle (www.afriplex.co.za 2006).

Nach Frohne und Jensen (1985) umfasst die Familie der Pedaliaceae (Sesamgewächse) 55 Arten. Volk (1964) berichtet von etwa 15 Gattungen mit rund 100 Arten, die schwerpunktmäßig in Afrika vertreten sind. Mabberley (2002) gibt 17 Gattungen mit 85 Arten an. Die Gattung *Harpagophytum* umfasst die beiden Arten *Harpagophytum procumbens* DC. und *Harpagophytum zeyheri* Decne. Von *H. procumbens* werden zwei Unterarten unterschieden: *H. procumbens* ssp. *procumbens*, die hauptsächlich in Namibia und Bechuanaland vorkommt sowie *H. procumbens* ssp. *transvaalensis*, die im nördlichen Transvaal und Südsimbabwe verbreitet ist (Hager 2005, Craib 1999).

1.3.1.2 Botanik und Verbreitung

H. procumbens ist eine ausdauernde, krautige Pflanze. Die bis zu 2 m langen, verzweigten Triebe entspringen der aufrecht wachsenden Primärwurzel und liegen dem Boden an. Zur Trockenzeit sterben die oberirdischen Teile der Pflanze ab und zu Beginn der Regenzeit werden neue Triebe aus der Primärwurzel gebildet. Die gestielten und gebuchteten Laubblätter sind meist gegenständig angeordnet, an den Sprossenden auch wechselständig. Rotviolette, gloxinienähnliche Blüten (4 bis 6 cm) stehen einzeln in den Blattachseln. Die bereits erwähnten charakteristischen verholzten Kapselfrüchte (Trampelkletten) besitzen scharfe, ankerartige Auswüchse (Abb. 1.4). Sie dienen zum einen bei starken Winden der Verankerung im Boden, und zum anderen werden die Samen auf diese Weise durch Tiere, die in die Früchte hineintreten, verbreitet (Wegener 1998). Aus den Trampelkletten werden ca. 50 Samen nach und nach durch Verwitterung freigesetzt. Die länglichen Samen sind etwa

6 bis 8,5 mm lang und von einer schwarzen, anfangs wasserundurchlässigen Schale umgeben (Craib 1999, Ernst 1988). Die Wurzel besteht aus einer Primärwurzel (Hauptwurzel), von der in etwa 30 bis 70 cm Tiefe bis zu 2 m in die Tiefe und 1,5 m zur Seite reichende Sekundärwurzeln (Seitenwurzeln) entspringen (Wegener 1998). Die Primärwurzeln tragen oben vierkantige, 10 bis 20 cm lange und 30 bis 60 cm dicke aufrechte Wurzelhälse, die als orthotrope Rhizome bezeichnet werden. Sie sind von einem 1 bis 2 mm dicken Korkmantel bedeckt und meist durch Insektenfraß ausgehöhlt. An den Sekundärwurzeln werden Speicherorgane gebildet, die bis zu 6 cm dick und 20 cm lang sein können. Sie sind von einem dünnen, längsrissigen Korkmantel umgeben und hell- bis rotbraun gefärbt. Oft werden sie zu mehreren an einer Seitenwurzel gebildet und wiegen frisch bis zu 600 g (Volk 1964).
H. procumbens ist in Afrika endemisch und im Gebiet zwischen dem 15. und 30. südlichen Breitengrad zu finden (Czygan 1977). Sie ist in den sandigen Steppenregionen verbreitet, die an die Kalahari (Botswana) grenzen: Transvaal, Buschmannland, Kapprovinz, Orange-Freistaat, Namibia und der Süden Zimbabwes. Dort wächst sie an lichten Stellen der Baumsavannen, an Wegrändern, Siedlungen und Wasserstellen im Sandboden (Hager 2005).

1.3.1.3 Droge und Inhaltsstoffe

Im Europäischen Arzneibuch ist eine Positivmonographie für die Droge **Harpagophyti radix** zu finden (Ph. Eur. 5.0 2006). Diese besteht danach aus der getrockneten sekundären Speicherwurzel von *H. procumbens* DC. und seit der Ph. Eur. 4.03 auch von *H. zeyheri* Decne. Die beiden Arten sind sich sehr ähnlich und sollen sich lediglich in der Form ihrer Früchte unterscheiden (Ph. Eur. 5.0 2006). Baghdikian et al. (1997) beschäftigten sich mit dieser Thematik und zeigten für wässrige Extrakte beider Drogen ähnliche analgetische und antiinflammatorische Eigenschaften. Die geernteten Speicherwurzeln werden gewaschen, in 0,5 bis 1,5 cm dicke Scheiben geschnitten und in der Sonne getrocknet. Gesammelt werden die Speicherwurzeln von Pflanzen am natürlichen Standort und mittlerweile auch von kultivierten Pflanzen (Ph. Eur. 5.0 2006).

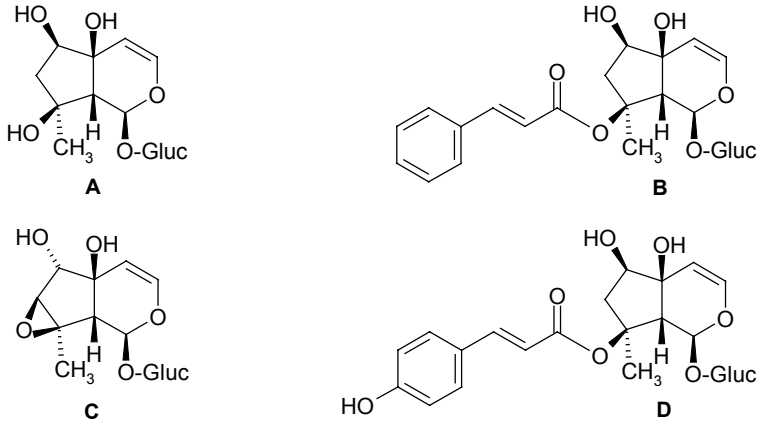

Abb. 1.5 Struktur der in *H. procumbens* vorkommenden Iridoidglykside Harpagid (A), Harpagosid (B), Procumbid (C) und 8-p-Cumaroylharpagid (D).

Die Droge enthält 0,5 bis 3 % Iridoide (mind. 1,2 %), davon hauptsächlich Harpagosid, Harpagid, Procumbid (Abb. 1.5). 8-p-Cumaroylharpagid ist dann in größeren Mengen zu finden, wenn vor allem Wurzeln der zweiten Stammpflanze *H. zeyheri* verwendet wurden. *H. procumbens* weist lediglich einen Gehalt von 2 bis 6 % an 8-p-Cumaroylharpagid bezogen auf die gesamte Iridoidmenge auf, wohingegen der Anteil in *H. zeyheri* 30 bis 60 % betragen kann (Wegener 1998). Qi et al. (2006) isolierten die bisher unbekannten Iridoidglykoside Harprocumbid A und B aus den sekundären Speicherwurzeln.

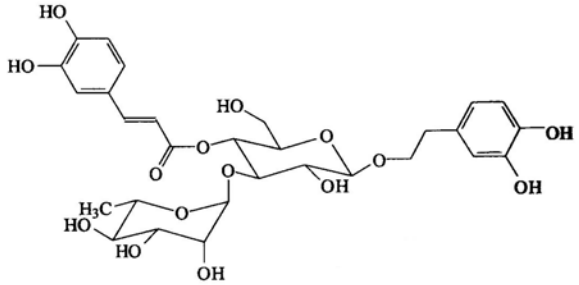

Abb. 1.6 Struktur von Acteosid.

An Kaffeesäurederivaten (Phenylethanoiden/2-Phenylethanolderivate) sind Acteosid, Isoacteosid und verwandte Verbindungen enthalten. Bei bis zu über 60 % der getrockneten Droge handelt es sich um wasserlösliche Substanzen wie Stachyose, Raffinose, Saccharose, Glucose u. a. (Ph. Eur. 5.0 2006). Es kommen etwa 0,018 % Flavone und Flavonole mit Fisetin, Kämpferid, Kämpferol und Luteolin vor (Hager 2005). Aus den Wurzeln wurden die Diterpene Totaran und Abietan isoliert (Clarkson et al. 2003). Auch kleinere Mengen an pentacyclischen Triterpenen konnten in der Droge nachgewiesen werden (Ph. Eur. 5.0 2006, Boje 2002). Weitere Bestandteile

sind Sterole, Alkane, geringe Mengen an Harpagochinon, Fette und Wachse, 1,2 % Gummiharz, 0,03 % ätherisches Öl und freie Säuren (Chlorogensäure, Zimtsäure) (Wegener 1998, Hager 2005, Boje 2002).

1.3.1.4 Anwendung und Wirkung

Als Indikationen gibt das Europäische Arzneibuch die unterstützende Therapie bei degenerativen Erkrankungen des Bewegungsapparates, Appetitlosigkeit und dyspeptische Beschwerden an. In der europäischen Volksmedizin wird die Droge auch bei Stoffwechselerkrankungen, „Blasen-, Nieren- und Leberleiden“, Allergien und allgemeinen Alterserscheinungen verwendet. In Südafrika wird die getrocknete Droge darüber hinaus traditionell zur Herstellung eines Infuses bei Blutkrankheiten und Fieber sowie zur Schmerzstillung bei Schwangerschaftsbeschwerden verwendet. In frischem Zustand wird die Wurzel zur Herstellung einer Salbe genutzt, die der Behandlung von Wunden, Geschwüren (auch krebsartige) und Furunkeln sowie bei zu erwartender schwieriger Geburt dient. Die Wirksamkeit bei diesen Anwendungen ist nicht belegt (Ph. Eur. 5.0 2006, Van Wyk et al. 2004, Volk 1964). Von der Verwendung als Antidiabetikum wird abgeraten (Ph. Eur. 5.0 2006).

Die appetitanregende und choleretische Wirkung der Droge wird dem Gehalt an bitteren Iridoiden, insbesondere Harpagosid, zugeschrieben (Ph. Eur. 5.0 2006). Die Droge besitzt einen Bitterwert von ca. 6000 (Czygan 1977). *In vitro* wurde eine schwache antivirale Wirkung von Harpagosid gegenüber dem vesikulären Stomatitisvirus festgestellt. Keine Wirkung zeigte sich beim Herpes Simplex Virus und dem Poliovirus (Bermejo et al. 2002). Die antirheumatische Wirkung könnte auf schwach analgetischen, antiinflammatorischen und antiarthritischen Eigenschaften der Droge beruhen. Harpagosid und Drogenextrakte sollen die Synthese der Cysteinyl-Leukotriene und der Abbauprodukte von Thromboxanen im menschlichen Blut hemmen (Ph. Eur. 5.0 2006). Wie bereits in Kapitel 1.2.3.2 erwähnt wurde, werden die Glykoside als Prodrug angesehen, die durch Einwirkung von ß-Glucosidasen (z. B. menschliche Darmflora oder pflanzeneigene Enzyme) in die wirksamen Aglyka und andere Intermediärprodukte, die ebenfalls wirksam sein können, gespalten werden.

Die analgetischen und antiinflammatorischen Effekte können anhand von akuten und subakuten Testsystemen untersucht werden (Wegener et al. 2001):

- akute Modelle zur Beobachtung analgetischer Effekte: Krümmreflextest, Hot-plate-Test, Brennstrahltest
- akute Modelle zur Beobachtung antiinflammatorischer und/oder antiphlogistischer Effekte: Rattenpfotenödemtest (Provokator: Carrageenin, Ovalbumin, Formalin)
- subakute Modelle zur Beobachtung antiinflammatorischer und/oder antiphlogistischer Effekte: Arthritis (Provokator: Formaldehyd, Freund'sches Adjuvans), Granuloma-Test

Die Übersichtstabelle (Tab 1.1) von Wegener (1998) zeigt widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Wirkung des Gesamtextraktes und auch von Harpagosid. Die beobachteten Wirkungen sind vom gewählten Untersuchungsmodell, der Applikationsart und des applizierten Wirkstoffs (Extrakt, Reinstoff) abhängig.

Tab. 1.1 Wirkungen von Extrakten aus Teufelskrallenwurzel und von Harpagosid in verschiedenen experimentellen Modellen; p. o. = peroral, i. p. = intraperitoneal, i. v. = intravenös, + = Wirkung, - = keine Wirkung (Wegener 1998, leicht modifiziert, die Quellenangaben sind der Originalarbeit zu entnehmen).

	Wirkung					
	Gesamtextrakt			**Harpagosid**		
Applikation Exp. Modell	**p. o.**	**i. p.**	**i. v.**	**p. o.**	**i. p.**	**i. v.**
Analgesie						
Ohr			-			+
Writhing	-	+		-	+	-
Hot-plate		-			-	
Brennstrahl	+			+		+
Rattenpfotenödem						
Ovalbumin						-
Formalin		-			-	
Carrageenan	-	+		-	-	+
Arthritis						
Formaldehyd	+	+	+			
Adjuvans	-					
UV-Erythem	+			-		-
Granulombeutel	+		+	-	+	+
Sonstige Wirkungen						
Kreislaufsystem	+			+		
Muskeltonus, Darm	+			+		
Immunsystem				+		

Immer noch nicht zweifelsfrei aufgeklärt ist, ob Harpagosid der Hauptwirkstoff ist. Harpagosid scheint eher an der analgetischen als an der antiinflammatorischen Wirkung beteiligt zu sein. Betrachtet man die in Tabelle 1.1 zusammengestellten

Ergebnisse, stellt man fest, dass isoliertes Harpagosid dem Gesamtextrakt in der Wirkung an bestimmten Testsystemen oft unterlegen ist; so z. B. beim UV-Erythem, Granulombeutel und auch dem durch Carrageenan induzierten Rattenpfotenödem. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist allerdings fraglich, da meist genauere Angaben über die phytochemische Zusammensetzung der getesteten Extrakte fehlen. Zu beachten ist auch, dass unterschiedliche Auszugsmittel die inhaltliche Zusammensetzung der Extrakte stark beeinflussen. Eine synergistische Wirkung zusammen mit anderen biologisch aktiven Inhaltsstoffen ist wahrscheinlich. So weisen z. B. auch die in der Droge enthaltenen Substanzen Acteosid, Kämpferol und Luetolin antiinflammatorische Wirkungen auf (Wegener 1998). Für die Phenylethanoide Acteosid und Plantamajosid wurde beispielsweise eine *in vitro* Hemmung der 5-Lipoxygenase gezeigt (Ph. Eur. 5.0 2006).

Von einigen Arbeitsgruppen wurden *in vitro* und Humanuntersuchungen zur Beeinflussung des Arachidonsäuremetabolismus durchgeführt. Loew et al. (2001) zeigte für einen *Harpagophytum*-Spezialextrakt (orale Aufnahme) einen hemmenden Effekt auf die Cysteinyl-Leukotrien-Synthese, der für einen harpagosidfreien Extrakt nicht nachgewiesen werden konnte. Reines Harpagosid zeigte im Vergleich eine weniger stark ausgeprägte Wirkung als der Gesamtextrakt. Weiterhin konnte eine Verringerung der Cysteinyl-Leukotrien-Konzentration im Blut nachgewiesen werden. Es wurde daher ein Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration an Harpagosid und der Hemmung der Leukotrien-Biosynthese vermutet. In einer anderen Untersuchung hemmten zwei Extrakte mit unterschiedlichen Harpagosidgehalten (2,07 % und 7,3 %) konzentrationsabhängig stärker die Cysteinyl-Leukotrien- und Thromboxan B_2-Synthese als reines Harpagosid (Wegener und Winterhoff 2001). Neuere Untersuchungen von Huang et al. (2006) zeigten *in vitro* eine Hemmung der Expression der COX-2 und der induzierbaren Stickoxide (iNOS) durch Harpagosid, wodurch die Bildung von Entzündungsmediatoren wie PGE_2 verhindert wird. Diese Hemmung der Proteinsynthese beruht sehr wahrscheinlich auf einem modulierenden Effekt hinsichtlich der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB.

Es liegen viele klinische Studien über die Wirkung von Zubreitungen aus der Teufelskralle vor. Viele davon sind unkontrolliert und entsprechen nicht dem heute geforderten Prüfdesign. Die nachfolgende Tabelle (Tab. 1.2) von Wegener und Winterhoff (2001) gibt eine Übersicht über die nachvollziehbar unkontrollierten und die GCP-konformen Studien. Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass eine Thera-

pie mit Teufelskralle-Extrakten analgetische und mobilitätsverbessernde Wirkungen zeigt. Somit handelt es sich um eine gut verträgliche Therapie, die bei gleichzeitiger Gabe dazu führen kann, dass die Dosis an nichtsteroidalen Antirheumatika reduziert werden kann.

Als Nebenwirkungen können äußerst selten allergische Reaktionen auftreten. Als allergen wirksam gelten die Inhaltsstoffe Zimtsäure, Harpagochinon, ein Harz, evtl. auch Terpene (Hager 2005). Kontraindiziert ist die Anwendung der Droge bei Ulcus ventriculi und duodeni (Ph. Eur. 5.0 2006).

Tab. 1.2 Übersicht über nachvollziehbar dokumentierte Studien zur klinischen Anwendung der Teufelskralle (Sortierung nach Studienindikation).
Abkürzungen: pl = plazebokontrolliert, uk = unkontrolliert, mk = medikamentöse Vergleichsgruppe, rk = referenzkontrolliert, db = doppelblind, AWB = Anwendungsbeobachtung, D2 = homöopathische Dilution D2, E = Extrakt, Irid. = Menge an Gesamtiridoiden, D = Droge, pulv = pulverisiert, HG = Menge an Harpagosid, AM = Auszugsmittel, R = Referenzmedikation, k. A. = keine Angabe, n. s. = nicht signifikant, NSAR = nichtsteroidale Antirheumatika, V = Verum, P = Plazebo (Wegener und Winterhoff 2001).

Studienart	Patienten (n)	Studiendauer	Dosis/Tag	Beobachtete Wirkung	Quelle
Indikation: Arthrosen und degenerative Erkrankungen					
rk, db	122 (62/60)	16 Wochen	2,6 g pulv D (57 mg HG); R: Diacerhein 100 mg	Verbess. Schmerz und Index	Chantre et al. 2000
AWB	583	8 Wochen	960 mg E (AM 60 % EtOH ; 4,4 – 5 :1)	Verbess. Schmerz und Steifigkeit, Dosis NSAR reduziert	Schendel 2001
pl, db	46	20 Wochen	960 mg E (AM 60 % EtOH ; 4,4 – 5 :1)	Verbess. WOMAC-Gesamt- und Teilscores (Schmerz, Steifigkeit, Funktionseinschränkung)	Frerick et al. 2001
Indikation: Rückenschmerzen					
pl, db	109	4 Wochen	2,8 g E 2,5:1 (6 g D), AM Wasser [50 mg HG], Plazebo	Schmerz verringert, Anzahl schmerzfreier Pat. erhöht, Beweglichkeit unverändert	Chrubasik et al. 1996
AWB	102	6 Wochen	1,8 g E 2,5:1 (4,5 g D), AM Wasser [30 mg HG]	Schmerz verringert, Beweglickeit unverändert	Chrubasik et al. 1997
pl, db	197 (65/66/66)	4 Wochen	600 mg E [50 mg HG]; 1200 mg E [100 mg HG], AM k. A., Plazebo	Dosisabhängig z. T. schmerzfrei (600 mg E: n = 6, 1200 mg E: n = 10, P: n = 3)	Chrubasik et al. 1999
pl, db	65	4 Wochen	960 mg E 4,4-5:1 (4,5 g D), AM 60 % EtOH	Schmerz verringert (V: - 46 %, : + 1 %; p < 0,001), Reduktion schmerzhafter Verspannungen (V: - 29 %, : + 14 %; p < 0,001)	Göbel et al. 1999
uk	130	8 Wochen	960 mg E 4,4-5:1 (4,5 g D), AM 60 % EtOH	Verbesserung der LWS-Beweglichkeit (+ 47 %)	Laudahn 1999
Indikation: Arthritiden					
mk	50 (2 x 25)	28 Tage	1,2 g E 2:1 (2,5 g D), ab 4. Tag 0,8 g (AM Wasser); R: Phenylbutazon (Dos. k. A.)	Symptomatik und Schmerz verbessert	Schrüffler 1980
uk	13	6 Wochen	1,2 g E (2,5 g D) AM Wasser	Subj. und obj. Verbesserung (n. s.), Ritchieindex u. Griffstärke verbessert (n. s.)	Grahame und Robinson 1981
pl, db	89 (44/45)	8 Wochen	2 g pulv D (3 % Irid.); Plazebo	Schmerz verringert (V – 2,8; P – 1,8; p = 0,012), Beweglichkeit verbessert (V – 6; P – 2,3; p = 0,019)	Lecomte und Costa 1992

1.3.1.5 Toxizität

Bei Untersuchungen zur akuten (LD_0 > 4,6 – 13,5 g/kg KG) und subakuten (LD_0 > 7,5 g/kg KG) Toxizität hydrophiler und lipophiler Gesamtextrakte aus der sekundären Speicherwurzel (orale Applikation; Ratten, Mäusen) wurden nur sehr geringe toxische Wirkungen festgestellt (Wegener 1998). Erdös (1978) berichtet über Bauch- und Seitenlage der Versuchstiere sowie tonisch-klonische Krämpfe, Passivität, verminderte Spontanaktivität, verminderter Muskeltonus, abgeschwächte Reflexauslösbarkeit und verengte Lidspalten. Nach Hager (2005) wird die LD_{50} von *H. procumbens* bei Mäusen mit über 13,5 g/kg KG p. o. angegeben. Bei i. p. Gabe (Maus) isolierten Harpagosids bzw. Harpagids wurde ein LD_{50} von etwa 1 g/kg KG für Harpagosid und 3,2 g/kg KG für Harpagid ermittelt (Wegener 1998). *In vitro* zeigten Zellkulturen eine Lebensfähigkeit von 32,1 % bei einer Konzentration von 500 µg/ml für 8-Acetylharpagid und 43,3 % bei 450 µg/ml Harpagosid (Bermejo et al. 2002). Für Harpagosid wurde bei der Testung cytotoxischer Effekte auf CaCo2 Zellen ein IC_{50} von 298 µM (n = 4) bestimmt (A. Starke, IPMB, persönliche Mitteilung). Für Jurkat-Zellen wurde mit Hilfe des MTT-Assays ein IC_{50} von 325 µM (n = 3) ermittelt (M. Möller, IPMB, persönliche Mitteilung).

1.3.2 Scrophularia nodosa

Die knotige Braunwurz *Scrophularia nodosa* L. (Scrophulariaceae) ist eine der über 300 Spezies der Gattung *Scrophularia*, die seit dem Altertum in der traditionellen Medizin angewendet wurden. Die Familienbezeichnung Scrophulariaceae ist auf die unscheinbare Braunwurz zurückzuführen und ihre aus dem Mittelalter überlieferte, damals bedeutende medizinische Anwendung gegen Skrofulose (scrophula = Halsgeschwür) (Pauli et al. 1995). Bei der Bezeichnung Skrofulose handelt es sich um einen historischen Begriff, der früher mit Tuberkulose in Zusammenhang gebracht wurde. In der modernen Medizin betrachtet man die Krankheit als eine sehr seltene Haut- und Lymphknotenerkrankung im Kindesalter auf allergischer Grundlage (Pschyrembel 2002). Heute ist die Anwendung der Pflanze obsolet. Sie zählt aber zu den altgebräuchlichen Arzneipflanzen, deren Hauptinhaltsstoffe (Iridoid- und Triterpenglykoside) mittlerweile durch phytochemische Untersuchungen umfassend charakterisiert sind (Pauli et al. 1995).

1.3.2.1 Systematik

Die systematische Einordnung der Knotigen Braunwurz (*Scrophularia nodosa* L.) erfolgt nach der Angiosperm Phylogeny Group (www.mobot.org 2006):

Klasse	**Dicotyledoneae**
Unterklasse	**Asteridae**
Ordnung	**Lamiales**
Familie	**Scrophulariaceae**
Gattung	***Scrophularia***
Art	***Scrophularia nodosa* L.**

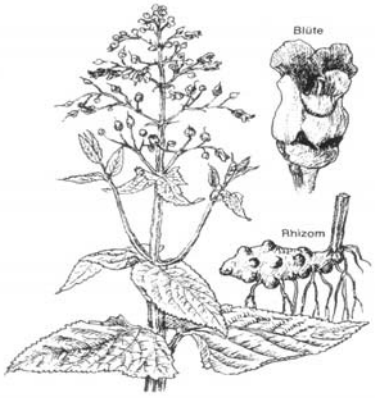

Abb. 1.7 *S. nodosa* mit Blüte und Rhizom (Pahlow 2001), intakte Pflanze (Heidelberg, 2003).

Die Familie der Scrophulariaceae (Rachenblütler) umfasst weltweit etwa 250 Gattungen mit rund 3000 Arten (Pauli et al. 1995). Nach Mabberley (2002) existieren 268 Gattungen mit 5100 Arten. Die Gattung *Scrophularia* ist dabei mit einer Artenzahl von etwa 200 vertreten. In Mitteleuropa gibt es 6 Arten der Gattung *Scrophularia*: *S. vernalis, S. canina, S. scopolii, S. nodosa, S. auriculata, S. umbrosa*. In Asien ist die Gattung mit einer weitaus größeren Artenzahl vertreten (Pauli et al. 1995).

1.3.2.2 Botanik und Verbreitung

S. nodosa ist eine bis zu 1,20 m hohe, ausdauernde Staude mit charakteristischen braunem Wurzelstock, der knollig verdickt und nur wenig verzweigt ist. Im frischen Zustand besitzt die Pflanze einen unangenehmen Geruch. Der Stängel ist vierkantig, aufrecht und kahl (Hager 2005, Wyk et al. 2004, Pahlow 2001, Pauli et al. 1995). Die eiförmig zugespitzten dunkelgrünen Laubblätter sind gegenständig angeordnet, beiderseits kahl und doppelt gesägt. Die Blütezeit reicht von Mai bis September

(Hager 2005, Van Wyk et al. 2004). Rotbraune bis olivgrüne Blüten bilden eine endständige Rispe. Der Kelch ist fünfspaltig und die Blumenkrone wird von einer fast kugeligen Röhre mit zweilippigem Saum gebildet. Bei der Frucht handelt es sich um eine eiförmige, vielsamige, zugespitzte Kapsel mit sehr kleinen schwarzen Samen (Hager 2005, Madaus 1976). *S. nodosa* bevorzugt feuchte, halbschattige Stellen auf mäßig basen- und stickstoffsalzreichen, z. T. auch kalkarmen Ton- und Lehmböden (Hager 2005, Aichele und Golte-Bechtle 1997). Häufig findet man sie mit der Brennessel vergesellschaftet (Räther 1989). Sie kommt in Europa, Ostasien, zerstreut auch in Westasien vor und wurde in die USA und nach Kanada eingeschleppt (Hager 2005).

1.3.2.3 Droge und Inhaltsstoffe

Hager (2005) gibt die Drogen Scrophulariae herba sowie Scrophulariae radix an, für die keine Positivmonographie der Kommission E vorliegen. Eine Anwendung erfolgt in der traditionellen Medizin.

Sowohl Scrophulariae herba als auch radix weisen einen bitteren Geschmack auf. Bei **Scrophulariae herba** handelt es sich um die zur Blütezeit gesammelten und getrockneten oberirdischen Teile der Pflanze. Als Inhaltsstoffe werden die Flavonoide Diosmetin, Diosmin, Acacetinrhamnosid sowie Linarin genannt. An Iridoiden konnten neben Aucubin, Harpagid und 6-α-L-Rhamnopyranosylcatalpol auch Acetylharpagid und Cinnamoylaucubin nachgewiesen werden. Es wird ein vom Standort abhängender Iridoidgehalt zwischen 0,1 und 1,0 % angegeben. Van Wyk et al. (2004) gibt weiterhin die Iridoide Harpagosid, Procumbid und Catalpol als Inhaltsstoffe an. Miyase (1999) berichtet über die Isolierung und Strukturaufklärung von 18 acylierten Iridoidglykosiden und 9 Phenylethanoidglykosiden aus den oberirdischen Teilen. Diese sollen den in Verbascum (Scrophulariaceae) und Buddleja (Buddlejaceae) vorkommenden sehr ähnlich sein. An organischen Säuren sind Zimtsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure, Sinapinsäure, Vanillinsäure, *p*-Cumarsäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Protokatechusäure und 3-Hydroxy-4-Methoxyphenylsäure vertreten. An Zuckern liegen Raffinose, Saccharose, Glucose, Fructose, Dulcitol und Stachyose vor. Daneben gibt es noch Angaben über weitere Inhaltsstoffe wie Saponine, Hesperidin, kardioaktive Glykoside sowie ein Alkaloid (Scrophyllarin) (Hager 2005, Hoppe 1975, Madaus 1976). Allerdings liegen für diese Substanzen keine experimentellen Angaben vor (Hager 2005).

Scrophulariae radix weist das gleiche Iridoidmuster auf wie die oberirdischen Pflanzenteile. Für Juni/Juli wird ein maximaler Iridoidgehalt von etwa 1,2 % angegeben. Auch hier liegen organische Säuren wie Ferulasäure, Isoferulasäure, Kaffeesäure, *p*-Cumarsäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, *p*-Hydroxyphenylessigsäure und Zimtsäure (0,16 %) vor. Auf weitere Inhaltsstoffe wie Saponine und Stachyose wird verwiesen (Hager 2005).

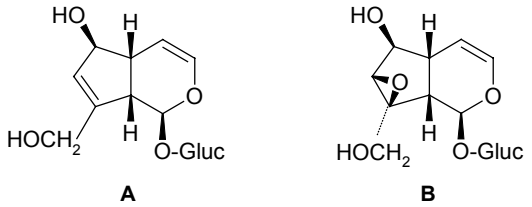

Abb. 1.8 Strukturformeln von Aucubin (A) und Catalpol (B).

Typisch für alle 6 europäischen *Srophularia*-Arten (*S. vernalis, S. canina, S. scopolii, S. nodosa, S. auriculata, S. umbrosa*) ist die Akkumulation von Iridoidglykosiden, vor allem der C9-Iridoide Aucubin und Catalpol. Daneben wurden Harpagid, Harpagosid und 8-O-Acetylharpagid nachgewiesen, die als antiphlogistisch wirksame Bestandteile der Teufelskralle diskutiert werden. Weiterhin sind Phenylpropanglykoside wichtige Inhaltsstoffe, wobei Acteosid (syn. Verbascosid) und Martynosid typische Vertreter dieser Stoffklasse sind. Die Triterpene und Triterpenglykoside vom α- und β-Amyrin-Typ leiten sich überwiegend vom Tetrasaccharid Verbascosaponin ab. Damit stehen für die Gattung glykosidische Verbindungen eindeutig im Vorgergrund (Pauli et al. 1995).

1.3.2.4 Anwendung und Wirkung

Verschiedene Braunwurz-Arten wurden bereits im Altertum medizinisch verwendet. Leonhart Fuchs (1501 - 1566) schreibt im späten Mittelalter über *S. nodosa* und *S. umbrosa*: „Braunwurz bletter, saft und samen allerlei geschwulst, verzeren die herte kröpff und ormützel, heylen die faulen und umb sich fressende geschwür und den krebs.“ (Pauli et al. 1995). Der Signaturenlehre nach ähneln die knotigen Rhizome geschwollenen Lymphknoten. Die Pflanze soll daher gegen Schwellungen und geschwollene Drüsen wirken (Van Wyk et al. 2004). Traditionell wurde die Braunwurz zur Behandlung von Skrofulose, Ekzemen, Wunden, Hüftschmerzen, rheumatischen Beschwerden, Geschwüren und Schwellungen (auch Drüsenschwellungen), Kropf, Krebs, Fisteln und Hämorrhoiden angewendet. Auch die Verwendung

als bitteres Tonikum, Diuretikum und Anthelminikum wird beschrieben (Pauli et al. 1995, Weiß 1985, Pahlow 2001, Stevenson et al. 2002).

Stevenson et al. (2002) berichten über die wundheilenden Eigenschaften der acylierten Iridoidglykoside Scopoliosid A, Scrophulosid A4, Scrovalentinosid (Grundstruktur auf Catalpol basierend) aus den Samenkapseln von *S. nodosa.* Ein negativ dosisabhängiger Effekt konnte bezüglich der Stimulierung des Wachstums menschlicher Hautfibroblasten nachgewiesen werden. Der zugrunde liegende Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Die tonisierende und verdauungsfördernde Wirkung wird der Bitterstoffwirkung der Iridoidglykoside zugeschrieben (Van Wyk et al. 2004).
Eine Übersicht über die biologisch aktiven Inhaltsstoffe der Gattung *Scrophularia* gibt der Review von Galindez et al. (2002).

Tab. 1.3 Übersicht über die von *S. nodosa* hervorgerufenen Wirkungen unter Angabe der Wirkstoffe bzw. wirksamen Pflanzenteile oder Fraktionen (nach Galindez et al. (2002) stark modifiziert).

Wirkung	Aktive Substanzen, Pflanzenteile oder Fraktionen
Antiinflammatorisch:	Iridoide (Aucubosid, Catalpol, Catalposid) und Phenolsäuren (Ferulasäure)
Antibakeriell:	Pflanzenextrakt, Iridoide (z. B. Aucubosid), Phenolsäuren (z. B. Ferulasäure)
Hepatoprotektiv:	Iridoid (Scropoliosid A), Phenolsäure (Ferulasäure)
Cardiovaskulär:	Infusion aus Pflanzenextrakt (evtl. Saponine)
Hemmend auf motorische Aktivität:	Infusion aus Pflanzenextrakt
Diuretisch:	Pflanzenextrakt (evtl. Saponine und Flavonoide)

Als Gegenanzeige wird ventrikuläre Tachykardie genannt. Unerwünschte Wirkungen sind nicht aufgeführt (Hager 2005).

1.3.2.5 Toxizität

Hager (2005) gibt für *S. nodosa* eine akute Toxizität für Schafe und Kühe an. Nach dem Verzehr großer Mengen der Pflanze soll es zu Mattigkeit, Versiegen der Milchsekretion, unsicherem Gang und Durchfall gekommen sein. Für die Wurzel wird auf ein toxisches Alkaloid hingewiesen.

1.3.3 Plantago lanceolata

Plantago lanceolata, der Spitzwegerich, zählt zur Familie der Plantaginaceae. Der Gattungsname *Plantago* leitet sich von dem lateinischen planta (= Fußsohle) ab, da die Laubblätter von *P. major* (Breitwegerich) und anderen Arten einer Fußsohle ähneln. *Lanceolata* (lat. lancea = Lanze, Spieß, Speer) bezieht sich auf die Form der Blätter (Madaus 1976). Verschiedene Wegerich-Arten sollen bereits in der Heilkunde des klassischen Altertums erfolgreich angewendet und von griechischen und römischen Ärzten verschrieben worden sein (Madaus 1976). Auch heute zählt der Spitzwegerich zu den gebräuchlichen Heilpflanzen. Die Indikationen für *P. lanceolata* und *P. major* sind sehr ähnlich, jedoch schreibt man *P. lanceolata* eine größere Wirksamkeit bei der Anwendung zur Stärkung der Schleimhäute und der Haut zu (Madaus 1976). Häufig kommt es zu Verwechslungen von *P. lanceolata* mit *P. media*, dem Mittleren Wegerich (Hager 2005).

1.3.3.1 Systematik

Die systematische Einordnung des Spitzwegerich (*Plantago lanceolata*) erfolgt nach der Angiosperm Phylogeny Group (www.mobot.org 2006):

Klasse	**Dicotyledoneae**
Unterklasse	**Asteridae**
Ordnung	**Lamiales**
Familie	**Plantaginaceae**
Gattung	***Plantago***
Art	***Plantago lanceolata* L.**

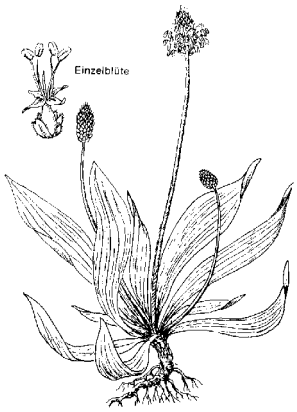

Abb. 1.9 *P. lanceolata* mit Blüten (Pahlow 2001).

Die Familie der Plantaginaceae (Wegerichgewächse) besteht nach Mabberley (2002) aus 3 Gattungen mit 275 Arten. Die Gattung Plantago umfasst alleine ca. 270 Arten. Frohne und Jensen (1985) geben insgesamt 260 Arten für die Gattung Plantago an.

1.3.3.2 Botanik und Verbreitung

Bei *P. lanceolata* handelt es sich um eine bis zu 50 cm hohe ausdauernde, krautige Pflanze mit kurzem, dicken Rhizom (Abb. 1.9) (Hager 2005, Madaus 1976). Die lanzettförmigen, fast kahlen Laubblätter sind in einer grundständigen Rosette angeordnet und meist aufgerichtet. Typisch für die Laubblätter ist die parallel verlaufende Nervatur der Blätter. Die kleinen Blüten stehen in lang gestielten kugeligen oder kurz-walzlichen Ähren. Die Blütezeit reicht von April bis September (Aichele und Golte-Bechtle 1997, Ph. Eur. 5.0 2006). Die 4 weißlichen Staubfäden sind zwei- bis dreimal so lang wie die 2 bis 3 mm lange Blumenkrone, die durch eine bräunliche, kahle Röhre gebildet wird. Die duft- und nektarlosen Blüten sind auf Windbestäubung ausgerichtet (Madaus 1976). Bei der Frucht handelt es sich um eine 3 bis 4 cm lange eiförmige Kapsel mit 2 Samen. Die Samen selbst sind länglich, etwa 2 mm lang, und bräunlich-schwarz gefärbt (Hager 2005).

Der Spitzwegerich ist eine sehr häufige Pflanze, die auf Wiesen, Weiden, an Wegrändern und auf Schuttflächen zu finden ist. Die Pflanze bevorzugt basen- und sticksalzhaltige Lehmböden (Aichele und Golte-Bechtle 1997). Sie ist in kühlgemäßigten Zonen Europas, Nord- und Mittelasien verbreitet und durch Verschleppung auch nach Nordafrika, Nordamerika, Brasilien, Chile, Feuerland, Australien, Neuseeland und Sri Lanka gelangt (Hager 2005).

1.3.3.3 Droge und Inhaltsstoffe

Für **Plantaginis lanceolatae folium** besteht eine Positivmonographie des Europäischen Arzneibuches (2006). Als Droge werden danach die von Juni bis September geernteten und getrockneten oberirdischen Teile der Pflanze verwendet. Die Blüten sind nicht zugelassen, lediglich die Blütenschäfte dürfen in der Droge enthalten sein. Iridoidglykoside sind zwischen 2 bis 3 % in der Droge enthalten, hauptsächlich Aucubin (0,3 - 2,5 %) und Catalpol (0,3 - 1,1 %) (Wichtl 1989, Ph. Eur. 5.0 2006). Asperulosid ist nur in geringen Mengen vorhanden (Hager 2005). Daneben kommen noch Desacetyl-Asperulosidmethylester und Globularin vor. In den Blättern wurden etwa 2 % Gel bildende Polysaccharide (Schleimstoffe) wie Arabinoglactane, Gluco-

mannane und Rhamnoglacturononane nachgewiesen (Hager 2005, Ph. Eur. 5.0 2006). Die Droge enthält 3 bis 8 % an Kaffeesäurederivaten (Phenylethanoide) mit Acteosid (= Verbascosid) als Hauptkomponente (mind. 1,5 %), daneben u. a. Isoacteosid, Plantamajosid, Lavandulifoliosid und Cistanosid F. Weiterhin sind geringe Mengen an Flavonoiden, vor allem Derivate des Apigenins und Luteolins, enthalten. Es konnten geringe Mengen an Phenolcarbonsäuren, die Hydroxyzimtsäuren Chlorogen- und Neochlorogensäure, nachgewiesen werden. Weitere Inhaltsstoffe sind Gerbstoffe (6,5 %), Saponine, Kieselsäure (1,35 %) sowie flüchtige Komponenten (Hager 2005, Ph. Eur. 5.0 2006).

1.3.3.4 Anwendung und Wirkung

Im Mittelalter wurde der Spitzwegerich aufgrund seiner blutstillenden, blutreinigenden, schleimlösenden, fiebervertreibenden und wundheilenden Wirkungen geschätzt. Äußerlich angewendet sollen die verschiedenen *Plantago*-Arten gegen Kopf-, Augen-, Ohren-, Zahnschmerzen und auch gegen Flechten, Fisteln und sogar Krebs wirksam sein. Dem Spitzwegerichtee wurde eine heilende Wirkung bei einer Keuchhustenepidemie zugeschrieben (Madaus 1976). Heute findet der Spitzwegerich nach der offiziellen Monographie Anwendung bei Atemwegskatarrhen und Entzündungen des Mund- und Rachenraums. Äußerlich erfolgt die Anwendung zur Wundbehandlung und bei Entzündungen der Haut (Ph. Eur. 5.0 2006). Nach Hager (2005) liegen diesbezüglich jedoch keine kontrollierten klinischen Studien zur Wirksamkeit der Droge vor. In der traditionellen Medizin wird der Spitzewegerich innerlich bei Erkrankungen der oberen Luftwege und der Lungen, Cystitis, Enuresis, Magenkrämpfen, Diarrhöen und Leberleiden sowie als harntreibendes Mittel eingesetzt. Äußerlich wird er als Hämostyptikum, Wundheilmittel, gegen den Juckreiz nach Insektenstichen oder bei Kontaktdermatitis durch Giftefeu sowie bei Furunkeln und Konjunktivitis angewendet (Hager 2005, Wichtl 1989). Die Wirksamkeit der Droge ist bei diesen Anwendungen nicht belegt (Hager 2005). In der modernen chinesischen Phytotherapie wird *P. lanceolata* bei Erkältung und Grippe angewendet (Van Wyk et al. 2004).

Der Droge werden adstringierende, reizmildernde, antiinflammatorische, antibakterielle, expektorierende, harntreibende Wirkungen zugeschrieben (Van Wyk et al. 2004, Ph. Eur. 5.0 2006). Die expektorierende Wirkung durch eine geringe Viskosi-

tätserhöhung aufgrund der Polysaccharide konnte nicht bestätigt werden (Hager 2005). Eine blutstillende Wirkung wurde für wässrige Extrakte *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Hager 2005). Der Wirkmechanismus für nachgewiesene bronchienerweiternde, blutdrucksenkende und schwach abführende Wirkungen ist noch ungeklärt (Van Wyk et al. 2004). Für wässrige Extrakte soll bei Wunden eine positive Wirkung auf das Epithelwachstum und die Narbenbildung sowie eine Verminderung der Hyperämie beobachtet worden sein (Hager 2005). Auch hier ist der Wirkmechanismus ungeklärt. *In vitro* bewirken die enthaltenen Polysaccharide eine Steigerung der Phagozytoseaktivität von Granulozyten (Ph. Eur. 5.0 2006). *Plantago*-Extrakte scheinen einen schützenden Einfluss gegenüber toxischer Effekte von Cytostatika und Lebernoxen zu haben. Aucubin ab Dosen von 80 mg/kg KG i. p. verabreicht zeigte beispielsweise bei Mäusen nach Gabe von α-Amanitin eine erhöhte Überlebensrate. Dieser schützende Effekt könnte auf einem kompetitiven Verdrängungsmechanismus zwischen Aucubin und den Noxen bei der hepatischen m-RNA-Biosynthese beruhen (Hager 2005). Die antiinflammatorischen Eigenschaften der Droge können zum einen durch die hemmende Wirkung der Iridoidglykoside und deren Metabolite auf die Prostaglandinsynthese erklärt werden. Darüber hinaus wurde für die Phenylethanoide Acteosid und Plantamajosid eine *in vitro* Hemmung der 5-Lipoxygenase gezeigt (Kommentar zur Ph. Eur. 5.0 2006). Gut belegt sind die antibakteriellen Wirkungen von Presssäften und wässrigen Extrakten aufgrund des Aglykons von Aucubin. Für Aucubin ließ sich *in vitro* im Lochtest eine antibakterielle Aktivität gegen *Staphylococcus aureus, Streptococcus β-haemolyticus, Proteus vulgare*, Salmonellen, Shigellen, *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae* und *Bacillus subtilis* nachweisen. Es wurde gezeigt, dass die Hydrolyse des Aucubins zu Aucubigenin durch ß-Glucosidasen die Voraussetzung für die antibakterielle Wirkung ist (Davini et al. 1986, Wichtl 1989, Hager 2005). Aucubin und Polymerisate des Aucubigenins sind nicht wirksam. Gegenüber *Staphylococcus aureus* wurde beispielsweise mit 1 ml einer 2%igen wässrigen Lösung von Aucubin zusammen mit ß-Glucosidase eine Wirkung erzielt, die 600 I. E. Penicillin entsprechen. Da die ß-Glucosidasen bei der Herstellung von Infusen und Dekokten inaktiviert werden, wurden diese Zubereitungsformen ebenfalls als unwirksam betrachtet (Wichtl 1989, Hager 2005). Eine Metabolisierung kann allerdings durch die ß-Glucosidasen der Darmbakterien nach der Aufnahme im Körper erfolgen. Zusätzlich sind in den Blättern noch geringe Mengen eines antimikrobiell wirksamen Saponins (gegen

Micrococcus flavus) enthalten (Wichtl 1989, Hager 2005, Ph. Eur. 5.0 2006). Die adstringierende Wirkung ist auf die in der Droge enthaltenen Gerbstoffe zurückzuführen. Die enthaltenen Schleimstoffe (Polysaccharide) wirken reizmildernd, indem sie eine Schutzschicht um die Schleimhäute legen, und sind möglicherweise auch an der wundheilenden und entzündungshemmenden Wirkung beteiligt (Schneider 1999, Hänsel et al. 1999).

Unerwünschte Wirkungen sowie Gegenanzeigen sind nicht bekannt. Es besteht aber ein Sensibilisierungspotential, da 31 % aller Menschen, die auf Pollen allergisch reagieren, auch auf Wegerichpollen eine allergische Reaktion zeigen (Hager 2005).

1.3.3.5 Toxizität

Für reines Aucubin wurde bei innerlicher Anwendung das Auftreten von Gastroenteritis und zentralen Lähmungserscheinungen berichtet. Da die mit der Droge aufgenommene Menge an Aucubin gering ist, sind bisher keine Vergiftungsfälle aufgetreten. In Tierstudien an Mäusen wurden für Aucubin bis zu einer Dosis von 900 mg/kg KG i. p. keine Todesfälle beobachtet. Bei einer längeren Gabe in Dosen von bis zu 800 mg/kg KG i. p. 4 x pro Woche ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Serumenzyme GOT, GPT, alkalische Phosphatase sowie für die biochemischen Parameter Triglyceride, BUN, Glucose und Gesamteiweiß. In durchgeführten Leberbiopsien wurden keine relevanten Auffälligkeiten festgestellt (Hager 2005).

1.4 Aufgabenstellung

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln ausgeführt wurde, werden die Wirkungen der pharmazeutisch angewendeten Pflanzen *H. procumbens, S. nodosa* und *P. lanceolata* zum Teil den enthaltenen Iridoidglykosiden zugeschrieben. *H. procumbens* enthält hauptsächlich das Iridoidglykosid Harpagosid und kommt nur in Südafrika vor. Die in Europa heimische *S. nodosa* enthält neben Harpagosid auch Aucubin und Catalpol und könnte daher als alternative Quelle für Harpagosid von Interesse sein. Die beiden Iridoidglykoside Aucubin und Catalpol bilden die Hauptiridoidglykoside von *P. lanceolata*. Für *Harpagophytum*-Extrakte wurde in verschiedenen Studien eine Beeinflussung der Arachidonsäurekaskade festgestellt. Harpagosid scheint an der Wirkung beteiligt, jedoch nicht der alleinige Wirkstoff zu sein.

Die Zielsetzungen der Arbeit lassen sich folgendermaßen formulieren:

- Etablierung, Kultivierung und Charakterisierung von *in vitro* Pflanzen, Wurzel- und Kalluskulturen von *H. procumbens, S. nodosa* und *P. lanceolata*
- Überprüfung, ob die Synthese der entsprechenden Iridoidglykoside in den *in vitro* Kulturen erfolgt; Identifizierung und Quantifizierung der gebildeten Iridoidglykoside mittels moderner Analytikmethoden (HPLC, LC-ESI-MS)
- Überprüfung, ob eine Elicitierung mittels Methyljasmonat eine gesteigerte Produktion an Iridoidglycosiden in den *in vitro* Pflanzen induzieren kann
- Quantifizierung der Iridoidglykoside in den Geweben von an ihrem natürlichen Standort gesammelten intakten Pflanzen von *S. nodosa* und *P. lanceolata* zum Vergleich; frisches Pflanzenmaterial von *H. procumbens* wird aufgrund der Beschaffungsschwierigkeiten nicht analysiert
- Untersuchungen zur biologischen Wirkung isolierter Iridoidglykoside und Pflanzenextrakte auf die Lipoxygenase und Cyclooxygenase sowie die Angiogenese

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

Geräte	
Autoklav	Webeco, Lüdenscheid, Deutschland
Zentrifugen	
Heraeus Biofuge pico	Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland
Heraeus Biofuge fresco	
Megafuge 1.0 R	
Gefriertrocknung	
Modell ALPHA I-6	Martin Christ GmbH, Osterode,Deutschland
HPLC-System	
Beckmann System Gold	Beckmann-Coulter, Fullerton, USA
Pumpenmodul 125P	
Autosampler	
Photodiode array detector 168	
Gold Nouveau Chromatography Data System	
Software Version 1.72, 1996	
Säule: LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
RP-18 (5 μm)	
LC-ESI-MS	
HPLC-System	Latek Laborgeräte GmbH, Heidelberg, Deuschland
Säule: LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
RP-18 (5 μm)	
Massenspektrometer	
Micromass VG Quattro II	Waters, Manchester, UK
MassLynx Software Version 4.0	
Stickstoffgenerator	Parker, Etten-Leur, Niederlande
Spectrophotometer Ultrospec Plus 4054 UV/Visible	LKB Biochrom, Cambridge, England
pH Meter MP 120	Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Schweiz
Konduktometer LF 95	
Leitfähigkeitsmesszelle: TetraCon 96	WTW, Weilheim, Deutschland
Schüttler	
Pilot Shake System Kühner	B. Braun, Melsungen, Deuschland
Schüttler	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex RK 514	Bandelin Electronic GmbH, Berlin, Deutschland
Wärmeschrank Typ T20 und T6	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland

Rotationsverdampfer	
Pumpe Vacuum System B-172	Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland
Wasserbad + Rotor VV2000	Heidolph, Schweiz
Rotilabo®-Spritzenfilter steril 0,22 µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Rundfilter ∅ 70 mm, aschefrei	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Vortexer REAX top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Laborwaagen	
Sartorius Universal	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Sartorius Basic	
Glasgeräte	Schott AG, Mainz, Deutschland
Kieselgelplatten 60 F_{254}	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Pipetten	Gilson Inc., Middleton, USA
Kulturgläser	Dosen-Zentrale Zürcher GmbH, Hilden, Deutschland
Deckel für Kulturgläser	Meli, Veurne, Belgien
Universalgerät für UV 254/366 nm und Tages-lichtvisualisation	Desago, Heidelberg, Deutschland
Messgerät zur Bestimmung der Lichtintensität	Arbeitsgruppe Rausch, Botanisches Institut Heidelberg
Leuchtröhren Kulturraum 36 W Weißlicht	Philips, Eindhoven, Holland
Tubes	
PP-test tubes 15 und 50 ml, steril	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Hühnereier	
Lohmanns Selected White Leghorn	LSL-Brüterei, Schaafheim
Chemikalien	
Acetaldehyd p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Aceton puriss. p. a., Reag. ACS	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Acetonitril Chromasolv® für HPLC	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Agar-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
4-Aminobenzolsulfonamid (Sulfanilamid)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Ammoniumheptamolybdat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumnitrat	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Aucubin Rotichrom® HPLC	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bacto™ Agar	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Bacto™ Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Benzaminopurin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
BSA, Albumin Franktion V	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Calcium-Ionophor A23187	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumnitrat-Tetrahydrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Catalpol	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland
Cefotaxim, Claforan ® 2,0	Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH, Frankfurt, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat-3-hydrat p. a.	FERAK Laborat Gmbh, Berlin, Deutschland
D-Mannitol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eisensulfat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethanol 99 %	Theoretikum
Folsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Gelrite®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gibberellinsäure (A_3)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Harpagophyti radix	
Charge 02H0001	Parceval Pharmaceuticals, Wellingtion, Südafrika Caelo, Hilden/Bonn, Deutschland
Harpagosid Rotichrom® HPLC	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hydrazinsulfat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Indol-3-buttersäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Indol-3-essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	GERBU GmbH, Gaiberg, Deutschland
Kaliumnitrat p.a.	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Kaliumsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfat-Pentahydrat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfatpentahydrat p.a.	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Linolsäure (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Lipoxygenase aus *Glycine max* (Sojabohnen) ~9 units/mg	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Mangansulfat-Monohydrat p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol analytical grade	VWR International, Fontenay sous Bois, Frankreich
4-(Methylamino)phenolhemisulfat (Photorex®)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Methyljasmonat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Myo-Inosit	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
N-(1-Naphthyl)ethylendiamindihydrochlorid (Naphthyldiamin)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Theoretikum

Natriumhydroxid	GERBU GmbH, Gaiberg, Deutschland
Natriumhypochlorid (12 %)	Theoretikum
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumsulfit	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
n-Hexan p. a.	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Nicotinamid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
2-Nitrophenol purum	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Nitropussid p. a.	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Nordihydroguaretic acid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
o-Phosphorsäure p.a. 85 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Standard: GeneRuler^{TM}, 100 bp DNA Ladder Plus #SM0323	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Phenol puriss. p. a., Reag. ACS	Riedel-de-Haen, Seelze
pH-Meter Pufferlösungen pH 7,0 und pH 4,0	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Plantaginis lanceolatae herba	
Charge L 41199 A	Alnatura GmbH, Bickenbach, Deutschland
Charge 4271B05020102	Caelo, Hilden/Bonn, Deutschland
Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
rolC forward und reverse (540 bp)	
virC forward und reverse (730 bp)	
Pyridoxin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Saccharose (Haushaltszucker)	Südzucker AG, Mannheim, Deutschland
Salicylsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Schwefelsäure, reinst	Theoretikum
Schweineblut	Schlachthaus Mannheim
Silica Gel Orange, 2-5 mm, Indikator	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
ß-Glucosidase ~6 units/mg	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Thiamin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Thiobarbitursäure	Lancaster, Mühlheim, Deutschland? Oder Fluka
Warburgia salutaris (isibhaha)	Phyto Nova, South Africa
Wasser für HPLC	VWR International, Leuven, Belgien
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

2.2 Pflanzenkulturen und intakte Pflanzen

2.2.1 Allgemeine Vorgehensweise

Aus Samen von *Harpagophytum procumbens, Scrophularia nodosa* sowie *Plantago lanceolata* wurden zunächst sterile Keimlinge angezogen. Diese *in vitro* Pflanzen wurden vermehrt und dienten gleichzeitig als Ausgangsmaterial zur Etablierung von Kallus- und Wurzelkulturen. In Abbildung 2.1 ist die Vorgehensweise am Beispiel von *S. nodosa* schematisch dargestellt.

Für den phytochemischen Vergleich wurden Wildpflanzen von *S. nodosa* und *P. lanceolata* an ihren natürlichen Standorten gesammelt und auf ihren Gehalt an Iridoidglykosiden analysiert. Die Beschaffung von oberirdischem Pflanzenmaterial von *H. procumbens* war nicht möglich.

2.2.2 Herkunft des Pflanzenmaterials

Das Samenmaterial von *P. lanceolata* wurde auf der Wiese im Botanischen Garten Heidelberg und vor dem Gebäude 364 im Neuenheimer Feld im August 2005 gesammelt. Ein Herbarbeleg (P6797) befindet sich im Herbarium des Instituts für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Abteilung Biologie. Von drei verschiedenen *Plantago*-Arten wurden am selben Tag Mitte Mai 2006 intakte Pflanzen an ihrem natürlichen Standort gesammelt. Intakte blühende Pflanzen von *P. lanceolata* und *P. major* (Herbarbeleg P6928) wurden in Kirchheim (Blüten von *P. major* konnten erst zur Blütezeit im Juni geerntet werden) und blühender *P. media* (Herbarbeleg P6929) wurde vor Gebäude 364 im Neuenheimer Feld gesammelt.

Intakte Exemplare von *Scrophularia nodosa* wurden 2004 von Mai bis Oktober in monatlichen Abständen an ihrem natürlichen Standort in Dossenheim ausgegraben. Charakteristisch für den Standort ist Sandboden und eine geringe Sonneneinstrahlung. Die Keimpflanzen wurden aus am selben Standort gesammelten Samen (August 2002) angezogen. Auch hier wurde von den gesammelten Pflanzen ein Exemplar im Herbarium des Instituts für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie hinterlegt (P5442).

Die Keimpflanzen von *Harpagophytum procumbens* wurden aus Samen angezogen, die von Professor Ben-Erik van Wyk in Südafrika gesammelt worden waren (2001).

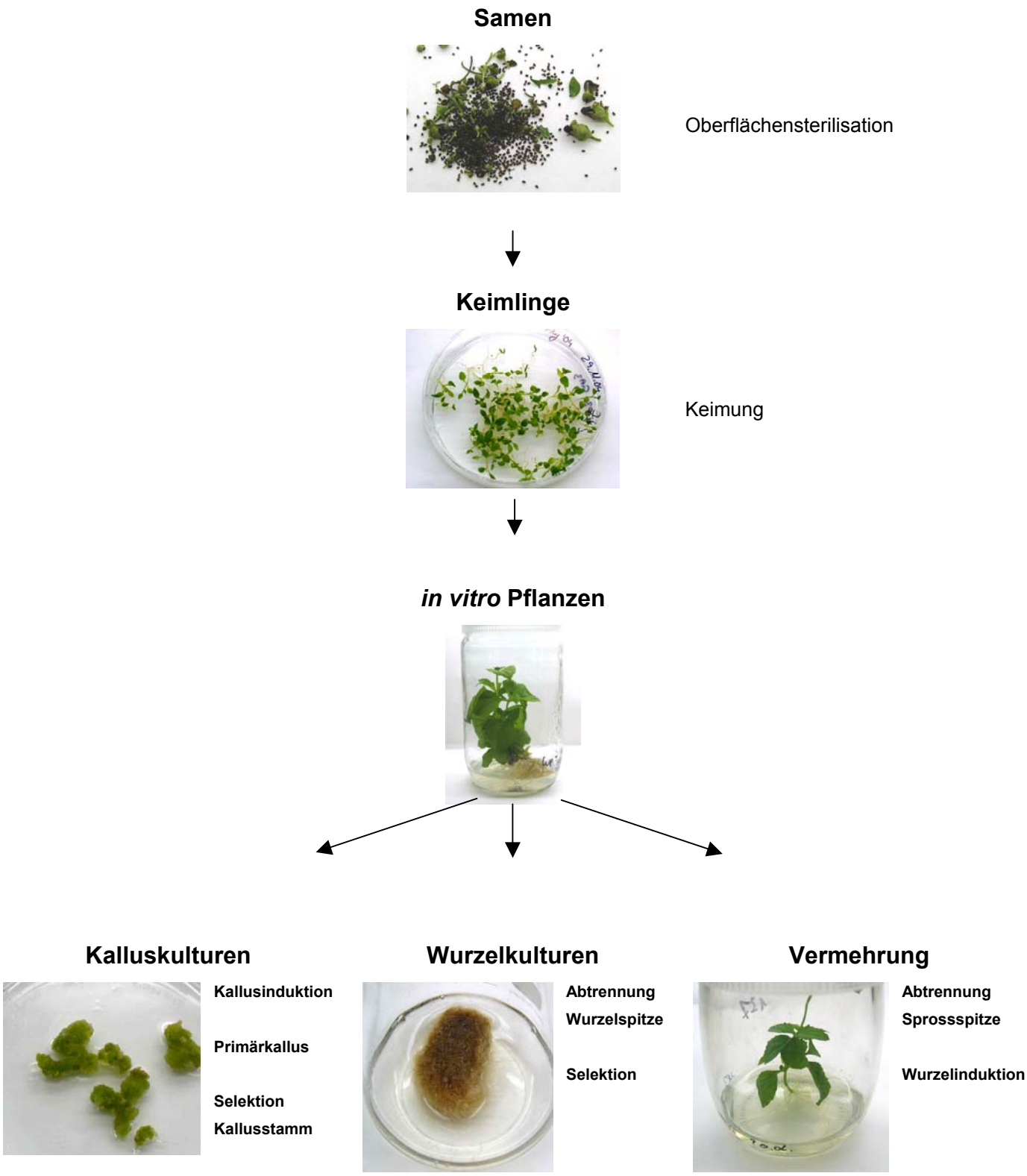

Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Etablierung von *in vitro* Pflanzen, Wurzel- und Kalluskulturen.

2.2.3 *In vitro* Pflanzen

2.2.3.1 Etablierung der sterilen Keimpflanzen

Alle in dieser Arbeit beschriebenen *in vitro* Kulturen stammen von steril angezogenen Keimpflanzen ab. Die Keimversuche wurden mindestens 3 mal wiederholt.

Plantago lanceolata

Die Samen wurden zur Oberflächensterilisierung unter einer sterilen Werkbank 1 Minute in 70 % EtOH gewaschen. Darauf folgte eine 10minütige Behandlung mit 2 % NaOCl und anschließend wurden die Samen mehrfach mit sterilem Wasser abgespült, bevor sie zur Keimung auf festes Medium gegeben wurden.

Scrophularia nodosa

Zur Oberflächensterilisierung wurden die Samen 1 Minute mit 70 % EtOH und anschließend 3 Minuten in 1 % NaOCl gewaschen. Die Samen wurden mit sterilem demineralisiertem Wasser abgespült und aufgrund ihrer geringen Größe mit einer sterilen Pipettenspitze aufgezogen und auf festes Medium gegeben.

Harpagophytum procumbens

Die Oberflächensterilisierung erfolgte wie bei *S. nodosa*, jedoch wurde 5 Minuten in 1 % NaOCl gewaschen. Die Samen wurden zur Beschleunigung der Keimung in einem Falcontube mit etwas sterilem Wasser im Wärmeschrank bei 37 °C für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweite Sterilisation nach der gleichen Methode, bevor die äußere Samenhülle vorsichtig mit einem sterilen Skalpell angeschnitten und die Samen auf festes Medium gegeben wurden.

2.2.3.2 Regeneration und Vermehrung

Zur Regeneration und Vermehrung genetisch identischer Pflanzen wurden bei *S. nodosa* und *H. procumbens* gut entwickelte Sprosse unter aseptischen Bedingungen mit einem Skalpell halbiert. Die Sprossspitzen mit mindestens 2 Blättern wurden anschließend in Wachstumsmedium mit oder ohne Hormonzusatz (s. Kapitel 2.2.6, Tab. 2.6) gesteckt. Bei *P. lanceolata* wurden Blätter an der Basis abgetrennt und ebenfalls in Festmedium gesteckt. Da die Wurzelkulturen von *P. lanceolata* eine sehr schnelle Ausdifferenzierung in Sprosse zeigten, wurden auch diese zur Regeneration neuer Pflanzen auf Festmedium gegeben.

2.2.3.3 Beeinflussung der Sekundärstoffproduktion in den *in vitro* Pflanzen durch Elicitierung mittels Methyljasmonat

Die Beeinflussung der Biosynthese von Iridoidglykosiden durch Methyljasmonat (MJ) wurde am Beispiel der *in vitro* Pflanzen von *P. lanceolata* untersucht. Hierzu wurde auf das Medium von etwa 2 Monate alten *in vitro* Pflanzen MJ in einer Endkonzentration von 10, 50, 100, 200 µM zugegeben. Die verschiedenen Konzentrationen an MJ waren in MeOH gelöst und zum besseren Vergleich so verdünnt worden, dass jeder Pflanze dieselbe Menge an MeOH zugegeben wurde (50 µl). Als Kontrolle dienten unbehandelte Pflanzen sowie Pflanzen, denen nur MeOH zupipettiert wurde. Die Pflanzen wurden nach 24 h geerntet und analysiert.

2.2.4 Kalluskulturen

Zur Kallusinduktion wurden möglichst junge Blatt- und Wurzelstücke aller untersuchten Arten auf kallusinduzierendes Medium gegeben, da Kalluskulturen aus altem Pflanzengewebe nach Lindl (2000) häufig ein langsames und unregelmäßiges Wachstum aufweisen. Nach erfolgreicher Kallusinduktion wurden die Kalli subkultiviert, indem vom Primärkallus mit einem Skalpell definierte Stücke abgetrennt und auf frisches Kallusmedium transferiert wurden. Das Intervall für eine Subkultivierung der Kalli betrug etwa 3 bis 4 Wochen.

Die Wachstumscharakterisierung erfolgte anhand des Wachstumsindex, dem Quotienten aus Auswaage zu Einwaage (Frischgewicht). Hierzu wurde eine definierte Menge an Kallus eingewogen und die Massenzunahme am Ende der Kultivierungsdauer bestimmt. Die Bestimmung des Wachstumsindex erfolgte jeweils über drei Passagen.

Am Ende der 3. Subkultivierung wurden Kallusproben geerntet und auf ihren Iridoidglykosidgehalt hin untersucht.

2.2.5 Wurzelkulturen

Gut entwickelte Wurzelabschnitte von mindestens 5 cm Länge mit Lateralwurzelbildung wurden unter der sterilen Werkbank abgetrennt und in Flüssigmedium auf einem Schüttler kultiviert. Die Charakterisierung der Wurzelkulturen erfolgte anhand einer Wachstumskurve und der Bestimmung von pH-Wert, Leitfähigkeit sowie der Ammonium-, Nitrat- und Phosphatgehalte des Mediums. Alle Wurzelkulturen wurden mittels HPLC-Analyse auf ihren Gehalt an Iridoidglykosiden untersucht.

2.2.5.1 Charakterisierung des Wachstumsverhaltens

Anhand einer Wachstumskurve erfolgte die Bestimmung der Massenproduktion am Beispiel einer gut wachsenden Wurzelkulturlinie. Zu diesem Zweck wurden Kulturgefäße mit frischem Medium abgewogen bevor die unter aseptischen Bedingungen geschnittenen Wurzelstücke in das frische Medium überführt wurden. Durch erneutes Abwiegen nach dem Überführen wurde die Wurzeleinwaage bestimmt. Um Verfälschung bei der Einwaage des Wurzelgewichtes durch in der Wurzel enthaltene Flüssigkeit zu vermeiden, wurden die Wurzeln vor der Überführung in das frische Medium sorgfältig auf sterilem Küchenkrepp abgetrocknet. Die Wurzeln wurden in regelmäßigen Abständen geerntet und das Gewicht nach Trocknung auf Küchenkrepp bestimmt (= Auswaage). Die netto Massenproduktion wurde durch die Formel Massenproduktion = Auswaage - Einwaage berechnet.

2.2.5.2 Charakterisierung des Mediums

Das Medium der geernteten Wurzelkulturen wurde 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert und anschließend wurden pH-Wert und Leitfähigkeit bestimmt. Die quantitative Bestimmung des Ammonium-, Phosphat- und Nitratverbrauchs erfolgte in Anlehnung an die in der Dissertation von Hermann J. Garden (2003) beschriebenen photometrischen Methoden. Die Charakterisierung erfolgte auch für frisches autoklaviertes Medium zur Bestimmung der Ausgangsbedingungen.

2.2.5.2.1 pH-Wert und Leitfähigkeit

Die Eichung des pH-Meters erfolgte mit Eichlösung pH 7 und pH 4. Das Leitfähigkeitsmessgerät wurde mit 0,01 M KCL geeicht.

2.2.5.2.2 Quantitative Ammoniumanalyse (Indophenolblau-Nachweis)

Das Prinzip der Messung beruht auf der Umsetzung von Ammonium zu Amoniak unter alkalischen Bedingungen. Das gebildete Amoniak reagiert mit dem Hypochlorid weiter zu Monochloramin. Hypochlorid wirkt dabei als starkes Oxidationsmittel, während Nitroprussid ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$) als eisenhaltiger Katalysator dient. Das gebildete Monochloramin reagiert mit dem Phenoxid weiter zu blauem Indophenol, das eine charakteristische Absorption bei 570 nm zeigt.

Tab. 2.1 Reagenzien und Versuchsdurchführung zur quantitativen Ammoniumbestimmung (nach Garden 2003, modifiziert).

Lösungen		
Phenol-Reagenz	10,000 g	Phenol
	0,051 g	Nitroprussid
	0,200 g	NaCl
		ad 1000 ml H_2O monodest.
Hypochlorid-Reagenz	0,6 ml	Na-Hypochlorid
	80,0 ml	8 N NaOH
		ad 1000 ml H_2O monodest.
Durchführung		
0,02 ml	Standard, Testmedium	
+ 0,5 ml	Phenol-Reagenz	
+ 0,5 ml	Hypochlorid-Reagenz	
Vortexen und 30 min Inkubation bei 36 °C im Wasserbad		
15 min Inkubation bei Raumtemperatur		
Photometrische Messung bei 570 nm		

Mittels dieser Methode wurde eine Kalibiergerade für Ammoniumnitrat (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16 mM) erstellt.

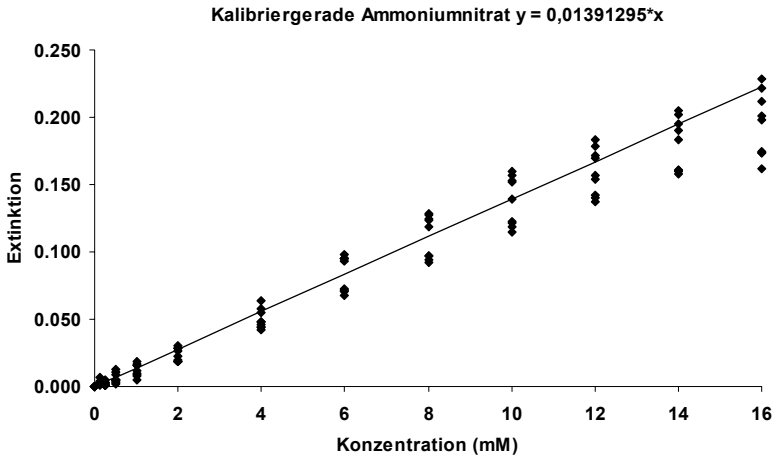

Abb. 2.2 Kalibriergerade für Ammoniumnitrat; Dreiecke symbolisieren Datenpunkte der einzelnen Messreihen (n = 8, r = 0,993); y = Ammoniumkonzentration in mM; x = Extinktion.

2.2.5.2.3 Quantitative Nitratanalyse (BRATON-MARSHAL-Reaktion)

Das Nitrat wird über das Kupfer-Hydrazingemisch zu Nitrit reduziert. Unter sauren Bedingungen bildet das Nitrition mit dem Sulfanilamid eine Diazo-Verbindung, die mit Naphythyldiamin einen roten Azofarbstoff bildet. Das Absorptionsmaximum liegt bei 540 nm.

Tab. 2.2 Reagenzien und Versuchsdurchführung zur quantitativen Nitratbestimmung (nach Garden 2003, modifiziert).

Lösungen			
Kupfersulfat-Lösung	3,94 mM		
Natriumhydroxid-Lösung	0,10 M		alle Lösungen in H_2O
Hydrazinsulfat-Lösung	0,21 %		
Aceton-Lösung	10,00 %		
Diazo-Reagenz	10,00 %	Phosphorsäure	
	4,00 %	Sulfanilamid	
	0,20 %	Naphtyldiamin	

Durchführung	
0,40 ml	Standard, Testmedium verdünnt (3,3 µl auf 2 ml H_2O)
+ 0,02 ml	Kupersulfat-Lösung
+ 0,10 ml	Natriumhydroxid-Lösung
+ 0,02 ml	Hydrazin-Lösung
Vortexen und 30 min Inkubation bei 65 °C im Wasserbad (Wasserverlust vermeiden)	
5 min Abkühlung auf Eis	
+ 0,04 ml	Aceton-Lösung
+ 0,12 ml	Diazo-Reagenz
+ 0,30 ml	H_2O deionisiert
15 min Inkubation bei Raumtemperatur	
Photometrische Messung bei 540 nm	

Mittels dieser Methode wurde eine Kalibiergerade für Kaliumnitrat (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 mM) erstellt (Abb. 2.3). Aufgrund des nichtlinearen Verlaufs bei Nitratkonzentration zwischen 0 und 5 mM ist die Geradengleichung nur zur Bestimmung von Nitratkonzentrationen zwischen 5 und 40 mM geeignet. Da neben Kaliumnitrat z. T. auch Ammonium- und Calciumnitrat in den Medien enthalten sind, wurde eine weitere Kalibriergerade für Ammoniumnitrat (Abb. 2.4) im selben Konzentrationsbereich erstellt.

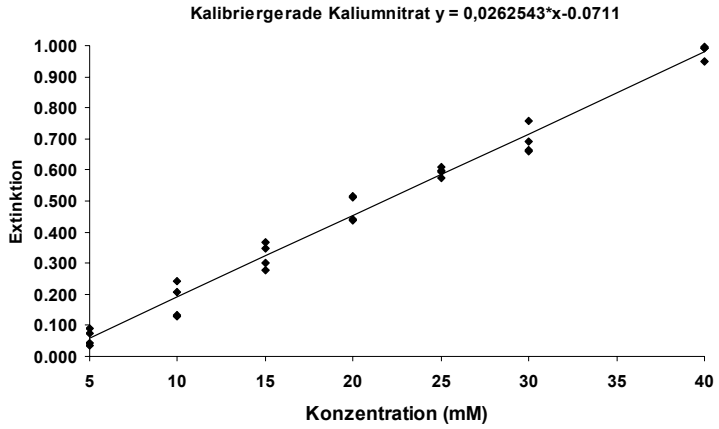

Abb. 2.3 Kalibriergerade Kaliumnitrat linearer Bereich von 5 bis 40 mM (n = 4, r = 0,998); Symbole repräsentieren einzelne Datenpunkte; y = Konzentration Kaliumnitrat in mM; x = Extinktion.

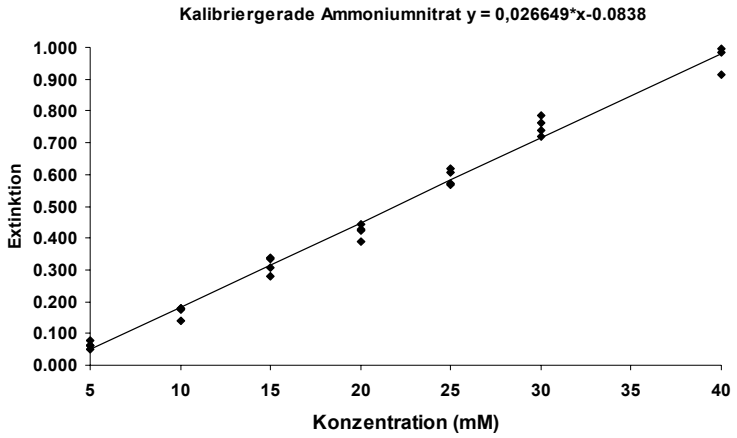

Abb. 2.4 Kalibriergerade Ammoniumnitrat linearer Bereich von 5 bis 40 mM (n = 4, r = 0,995); Symbole repräsentieren einzelne Datenpunkte; y = Konzentration Ammoniumnitrat in mM; x = Extinktion.

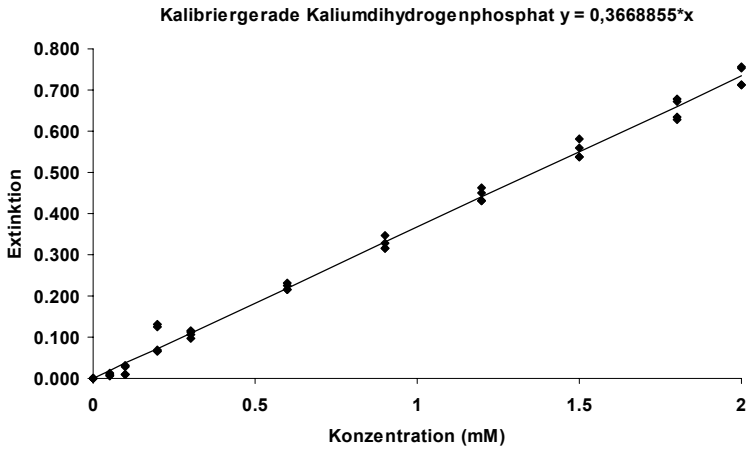

Abb. 2.5 Kalibriergerade Kaliumdihydrogenphosphat (n = 4, r = 0,999); Symbole repräsentieren einzelne Datenpunkte; y = Konzentration Kaliumdihydrogenphosphat in mM; x = Extinktion.

2.2.5.2.4 Quantitative Phosphatanalyse (nach GOMORRI, 1942)

Phosphat reagiert bei niedrigem pH-Wert mit Ammoniummolybdat zu der gelblichen Säure $H_3P(Mo_3O_{10})_4$. Nach Zugabe von Photorex und Natriumsulfit wird die Säure zu Molybdän-Blau ($MoO_{3-x}(OH)_x$) reduziert, welches ein Absorptionsmaximum bei 660 nm besitzt.

Tab. 2.3 Reagenzien und Versuchsdurchführung zur quantitativen Phosphatbestimmung (nach Garden 2003, modifiziert).

Lösungen		
Ammonium-Molybdat-Reagenz	25,0 ml	10 N (5 M) H_2SO_4
	50,0 ml	2,5 % Ammonium-Molybdat-Lösung
		ad 400 ml H_2O
Reduktions-Reagenz	40,0 g	Natriumsulfit
	1,0 g	Photorex
		ad 100 ml H_2O
Durchführung		
0,45 ml	H_2O deionisiert	
+ 0,40 ml	Ammonium-Molybdat-Reagenz	
+ 0,05 ml	Reduktions-Reagenz	
Vortexen		
+ 0,1 ml	Standard, Testmedium	
Vortexen und 30 min Inkubation bei Raumtemperatur		
Photometrische Messung bei 660 nm		

Mittels dieser Methode wurde eine Kalibiergerade für Kaliumdihydrogenphosphat (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2 mM) erstellt (Abb. 2.5).

2.2.5.2.5 Wurzelkulturen – Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes ist ein gram-negatives Bodenbakterium, das die Hairy root Krankheit verursacht. Abhängig vom verwendeten *Agrobacterium*-Stamm wird ein bestimmtes Stück des Bakterienplasmids in das nukleäre Genom der Wirtspflanze transferiert. Diese T-DNA verursacht die Proliferation der Pflanzenzellen, so dass zahlreiche Adventivwurzeln an oder nahe der Infektionsstelle gebildet werden. Die T-DNA enthält u. a. Gene für die Phytohormonsensibilität (Wysokinska und Chmiel 1997) und man geht davon aus, dass die Veränderung des Auxinmetabolismus in den transformierten Zellen eine wichtige Rolle bei der Adventivwurzelbildung spielt (Sevon und Oksman-Caldentey 2002). Die transformierten Gewebe werden durch die T-DNA auch dazu gebracht, ungewöhnliche Metabolite, die als Opine bezeichnet werden, zu produzieren. Sie dienen als spezifische Nährstoffe für die Bakterien. Der Mechanismus der Transformation ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Im folgenden werden die wichtigsten Schritte genannt (Sevon und Oksman-Caldentey 2002):

Mechanismus der
***Agrobacterium* - Pflanzenzellen Interaktion**

↓

Festsetzen des Bakteriums auf der Pflanzenoberfläche

↓

Freisetzung phenolischer Bestandteile (z. B. Acetosyringon) durch Verletzung der Pflanzenzellen

↓

Aktivierung der vir-Region des Bakterienplasmids
(kein Eindringen der Virulenzregion in Pflanzenzelle)

↓

Transfer von T-DNA (rolA – D) in das Genom der Pflanzenzelle

↓

Bildung zahlreicher Adventivwurzeln = Hairy roots

Zur Transformation wurden folgende Stämme von *A. rhizogenes* verwendet: TR105 (Wildtyp), R 1600, LBA 9402, A 4, Atcc 15834. Die Agrobakterien stammen von der Firma Rootec, Heidelberg, oder wurden von Prof. Dr. A. W. Alfermann, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

Für die Transformation wurde YMB-Flüssigmedium mit *A. rhizogenes* beimpft und 24 h auf einem Schüttler bei 25 °C und Dauerbeleuchtung kultiviert. Die zu transformierenden Pflanzenorgane (Wurzeln, Blätter) wurden 30 min in der Bakterienkultur inkubiert, durch Schneiden verletzt und anschließend in Flüssigmedium (Wurzeln) bzw. auf Festmedium (Blätter) gegeben. Zur Hemmung des Bakterienwachstums wurde dem Medium nach einigen Tagen das Antibiotikum Claforan® 2,0 (Wirkstoff Cefotaxim) nach Sterilfiltration (0,22 µm Porengröße) in einer Konzentration von 0,25 g/l Medium zugegeben.

Testung der Bakterienstämme und Nachweis der Transformation

Die verschiedenen Stämme von *A. rhizogenes* wurden vor der Transformation mittels PCR in Anlehnung an die von Yang et al. (2000) beschriebene Methode auf das Vorhandensein der Gene virC und rolC getestet, die u. a. für die Transformation notwendig sind.

PCR-Methode

Die bei 4 °C im Kühlraum gelagerten Bakterien wurden mit einem 3-Ösenausstrich auf dem Medium ausgestrichen, so dass Einzelkolonien wachsen konnten. Von den Einzelkolonien der verschiedenen Stämme wurde mit einer sterilen Pipette Zellmaterial abgenommen und in 50 µl sterilem Wasser resuspendiert. Hiervon wurde jeweils 1 µl zum PCR-Ansatz von 14,8 µl sterilem Wasser pipettiert, dem anschließend 4,2 µl PCR-Mix zugegeben wurden.

Zusammensetzung PCR-Mix:

- 1,0 µl Nukleotidmix
- 0,5 µl Primer forward
- 0,5 µl Primer reverse
- 0,2 µl redTaq (5 units/µl, 1 unit für PCR-Ansatz)
- 2,0 µl PCR-Puffer 10x

  4,2 µl Mix/Probe

Der Nukleotidmix wurde am Institut hergestellt und enthielt A, C, G, T in gleichen Anteilen. Die Endkonzentration in der PCR war 0,1 mM. Der PCR-Puffer wurde ebenfalls am Institut hergestellt und enthielt 15 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCL sowie 5 % Triton X-100. Der pH-Wert wurde auf 8,5 (25 °C) eingestellt.

Primer rolC-DNA (540 bp): 5'-ATGGCTGAAGACGACCTGTGTT-3' und
5'-TTAGCCGATTGCAAACTTGCAC-3'

Primer virC-DNA (730 bp): 5'-ATCATTTGTAGCGACT-3' und
5'-AGCTCAAACCTGCTTC-3'

Nach kurzem Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge wurden auf jede Probe zwei Tropfen Mineralöl gegeben und anschließend unter folgenden Bedingungen in den Biometra-Block gestellt:

Tab. 2.4 Temperaturprogramme zum PCR-Nachweis der Gene virC und rolC.

Temperaturprogramm für virC			Temperaturprogramm für rolC		
Step 1:	96 °C	2 min	Step 1:	96 °C	2 min
Step 2:	94 °C	30 sec	Step 2:	94 °C	30 sec
Step 3:	51 °C	30 sec	Step 3:	60 °C	30 sec
Step 4:	72 °C	2 min	Step 4:	72 °C	2 min
Step 5:	30 x zu Step 2		Step 5:	30 x zu Step 2	
Step 6:	72 °C	15 min	Step 6:	72 °C	15 min
Step 7:	4 °C		Step 7:	4 °C	

Agarosegel-Elektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese identifiziert. Es wurde ein 2 % Agarosegel (in TAE-Puffer) verwendet, dem nach Schmelzen 0,1 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) zugegeben wurden, um die DNA anzufärben. In einer Elektrophoresekammer wurde mit Hilfe eines Kammes ein Gel mit Taschen gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es mit TAE-Puffer bedeckt. Die DNA, sowie eine Verdünnungsreihe von DNA bekannter Konzentration (100 bp DNA-Leiter GeneRuler™) zur eindeutigen Identifikation der Banden, wurden in die Taschen pipettiert und anschließend bei einer Spannung von 85 V aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte anhand des abfotografierten Gels. Es wurde auf das Vorhandensein des virC-Gens (730 bp) und rolC-Gens (Viruleszenzgen, 540 bp) getestet. Die Einzelkolonien der Bakterien, die das rolC und virC Gen besaßen, wurden auf eine frische Platte ausgestrichen (3-Ösen-Ausstrich) und als Arbeitsplatte verwendet. Alle anderen Bakterienkolonien wurden verworfen.

DNA-Isolation und Nachweis der Transformation

Aus den nicht transformierten Pflanzen sowie den daraus gewonnenen Hairy root Kulturen wurde DNA isoliert, um die Transformation nachzuweisen. Der Nachweis der Transformation erfolgte genau wie bei der Austestung der Bakterienstämme mittels PCR. Um zu bestätigen, dass der Nachweis des rolC Gens tatsächlich das Resultat einer Transformation ist und nicht durch Kontamination mit *A. rhizogenes* zustande kommt, wurde auf die Gene rolC und virC geprüft. Das Gen rolC wird in das Pflanzengenom eingebaut, wohingegen das Gen virC zwar für die Transformation notwendig ist, aber nicht in das Pflanzengenom integriert wird. Wird also nur das rolC Gen und nicht das virC Gen in der transformierten Pflanze nachgewiesen, liegt eindeutig eine Transformation vor. Beim Nachweis beider Gene ist die Kultur noch mit

A. rhizogenes kontaminiert, so dass eine Behandlung mit Claforan erfolgen muss, bevor ein erneuter Nachweis stattfinden kann.

DNA-Isolation

Zur DNA-Isolation wurde eine kleine Menge Pflanzenmaterial im Möser mit 20 µl 2 % BSA und 500 µl CTAB gut zermösert und in insgesamt 5 ml CTAB aufgenommen. Die Nucleinsäurelösung wurde anschließend für 10 min bei 50 °C inkubiert. Zur Reinigung wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, bei der die Nucleinsäurelösung mit einem Volumenteil Phenol-Chloroform und einem Volumenteil Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch ausgeschüttelt wurde. Zwischen diesen Schritten wurde jeweils zentrifugiert (4000 rpm / 20 °C) und die obere, wässrige Phase, wurde unter Vermeidung der Interphase in ein neues Gefäß überführt. Die Phenolreste wurden durch Alkoholfällung entfernt. Mit 0,8 Volumenteilen Isopropanol (- 20 °C) wurden die Nucleinsäuren anschließend gefällt und durch Zentrifugation (10000 rpm / 4 °C) pelletiert. Durch Waschen mit 70 % Ethanol wurde die pelletierte DNA von Salz- und Alkoholresten gereinigt. Die Nucleinsäurelösungen wurde in TE-Puffer bei 4 °C aufbewahrt.

Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie

Die Konzentrationen der Nucleinsäurelösungen wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die im Photometer errechnete Konzentration ergab sich aus der OD, der Verdünnung (1:50) und einem für DNA spezifischen Multiplikationsfaktor. Daneben wurde aus dem Verhältnis der OD_{260nm} und der OD_{280nm} die Proteinkontamination der Nucleinsäurelösungen bestimmt.

Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel

Neben der Konzentrationsbestimmung mittels Photometer wurden die DNA-Mengen zusätzlich mit einem Agarosegel quantifiziert. Hierzu wurde Nucleinsäurelösung mit einer Verdünnungsreihe von DNA bekannter Konzentration auf ein 1% Agarosegel mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) aufgetragen und die Konzentration der Nucleinsäuren anhand des Vergleichs der Bandenintensitäten abgeschätzt.

PCR-Methode

Für den Transformationsnachweis wurden außer den transformierten Wurzelproben zusätzlich immer eine DNA-Probe einer nicht transformierten Wurzel sowie 14 µl mit Bakterien beimpftes Wasser als Kontrollen verwendet. Anhand der für die Proben photometrisch bestimmten DNA-Konzentration wurde die einzusetzende Probenmenge (= x µl DNA-Probe) berechnet, um eine Konzentration von 500 ng DNA im PCR-Ansatz zu erhalten. 14,8 µl steriles Wasser abzüglich x µl DNA-Probe und x µl DNA-Probe wurden zusammenpipettiert. Anschließend wurden 5,2 µl PCR-Mix zugegeben.

Zusammensetzung PCR-Mix:

- 1,0 µl Nukleotidmix
- 1,0 µl Primer forward
- 1,0 µl Primer reverse
- 0,2 µl redTaq (5 units/µl, 1 unit für PCR-Ansatz)
- 2,0 µl PCR-Puffer 10x

  5,2 µl Mix/Probe

Die weiteren Schritte bei der PCR sowie die Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte entsprachen denen bei der Testung der Bakterien beschriebenen Methoden.

2.2.6 Nährmedien und Kulturbedingungen

Tabelle 2.5 gibt eine Übersicht über die für die verschiedenen Pflanzen- und Kulturarten verwendeten Nährmedien sowie die zugegebenen Phytohormone.

Für 1 Liter Medium wurden folgende Stammlösungen verwendet:

- 100 ml/l Makroelemente I
- 10 ml/l Mikroelemente II
- 10 ml/l Eisenlösung
- 20 ml/l Kaliumsulfatlösung (nicht bei NN-Medium)
- 1 ml/l Vitamine
- 30 g/l Saccharose (3 %)
- 10 g/l Agar-Agar (für Festmedium)

In der folgenden Tabelle werden die Zusammensetzungen der verschiedenen Stammlösungen angegeben. Alle Stammlösungen wurden mit einfach destilliertem Wasser angesetzt.

Tab. 2.5 Zusammensetzung der Stammlösungen für die verschiedenen Pflanzenkulturmedien.

	NN-Medium (Nitsch & Nitsch 1969)	**WP-Medium (Woody Plant 1980)**	**MS-Medium (Murashige & Skoog 1962)**
Makroelemente I (ad. 1000ml H_2O)			
Kaliumnitrat (KNO_3)	9,50 g	-	19,0 g
Ammoniumnitrat (NH_4NO_3)	7,20 g	4,00 g	16,5 g
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4x7H_2O$)	1,85 g	3,70 g	3,70 g
Calciumchloriddihydrat ($CaCl_2x2H_2O$)	1,66 g	0,96 g	4,4 g
Calciumdinitrat ($Ca(NO_3)_2$)	-	5,56 g	-
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	0,68 g	1,70 g	1,70 g
Mikroelemente II (ad. 250 ml H_2O)			
Mangansulfat-Monohydrat ($MnSO_4xH_2O$)	625,000 mg	557,000 mg	557,00 mg
Borsäure (H_3BO_3)	250,000 mg	155,000 mg	155,00 mg
Zinksulfat-Heptahydrat ($ZnSO_4x7H_2O$)	250,000 mg	215,000 mg	215,00 mg
Kaliumjodid (KI)	-	-	20,80 mg
Kobaltchlorid-Hexahydrat ($CoCl_2$ x 6 H_2O)	-	-	0,65 mg
Natriummolybdat-Dihydrat ($Na_2MoO_4x2H_2O$)	6,250 mg	6,250 mg	6,25 mg
Kupfersulfat-Pentahydrat ($CuSO_4x5H_2O$)	0,625 mg	6,250 mg	0,65 mg
Vitamine (ad. 50 ml H_2O)			
Myo-Inosit	5,0 g	5,0 g	5,0 g
Glycine	100,00 mg	100,00 mg	100,00 mg
Nicotinsäure	250,00 mg	25,00 mg	25,00 mg
Pyridoxin HCl	25,00 mg	25,00 mg	25,00 mg
Thiamin HCl	25,00 mg	50,00 mg	2,50 mg
Folsäure	25,00 mg	-	-
Biotin	2,50 mg	-	-
Eisenlösung (ad. 250 ml H_2O)			
Na_2EDTA	931,25 mg	932 mg	932 mg
Eisensulfat-Heptahydrat ($FeSO_4x7H_2O$)	696,25 mg	695 mg	695 mg
Kaliumsulfatlösung (ad. 250 ml H_2O)			
Kaliumsulfatlösung (K_2SO_4)	-	12,37 g	12,37 g

A. rhizogenes wurde in YMB-Medium kultiviert.

YMB-Medium (ad. 1000 ml H_2O)

- 0,4 g Hefeextrakt
- 0,5 g Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO4)
- 10,0 g Mannitol (Mannit)
- 2,0 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4x7H_2O$)
- 0,1 g Natriumchlorid (NaCl)
- 15,0 g Bactoagar (für festes Medium)
- pH-Wert 7,0

Allen Festmedien wurde 1 % Agar-Agar zugegeben. Die Nährmedien wurden 20 min bei 1200 Hpa und 121 °C autoklaviert. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit KOH auf 5,7 eingestellt. Die Phytohormone Kinetin und 2,4-D wurden dem Medium vor dem Autoklavieren zugegeben. GA_3 und IES wurden dem Medium nach dem Autoklavieren direkt aus einer steril filtrierten Stammlösung zugegeben. Als Kulturgefäße dienten 200 ml Erlenmeyerkolben bzw. Kulturgläser, die 50 ml Nährmedium enthielten. Zur Keimung, Kallusinduktion und Bakterienkultivierung wurde Festmedium in sterilen Petrischalen hergestellt. Die Übernachtkultur von *A. rhizogenes* wurde in 30 ml YMB-Flüssigmedium in 100 ml Erlenmeyerkolben angelegt.

Tab. 2.6 Übersicht über die für die verschiedenen Pflanzenkulturen getesteten Medien sowie die Zugabe an Phytohormonen. WP3 = Woody Plant Medium mit 3 % Zucker, WP- = WP Medium ohne Zucker, ½ MS3 = Medium nach Murashige & Skoog in halber Konzentration mit 3 % Zucker, ½ MS- = ½ MS Medium ohne Zucker, ½ NN- = Medium nach Nitsch & Nitsch ohne Zucker, GA_3 = Gibberellinsäure, 2,4-D = 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure.

	Keimung	***in vitro* Pflanzen**	**Vermehrung**	**Wurzelkultur**	**Kalluskultur**
S. nodosa					
Medium	WP-	WP-	WP3	WP3	WP3
Hormonzusatz	+/- 250 mg/l GA_3		2 mg/l IES		0,1 mg/l Kinetin, 0,5 mg/l 2,4-D
H. procumbens					
Medium	½ NN-	½ NN-, ½ MS-	½ MS3	½MS3,½NN3,½WP3 MS3, NN3, WP3	½ MS3
Hormonzusatz			2 mg/l IES		0,1 mg/l Kinetin, 0,5 mg/l 2,4-D
P. lanceolata					
Medium	WP-	WP-	WP3	WP3	WP3, MS3 ohne NH_4NO_3
Hormonzusatz	+/- 250 mg/l GA_3		2 mg/l IES		0,1 mg/l Kinetin, 0,5 mg/l 2,4-D

Die Kultivierung der *in vitro* Pflanzen und Kalluskulturen erfolgte in einem klimatisierten Raum bei 25 °C +/- 1 °C und Dauerweißlicht mit einer Lichtintensität von 38 μmol m^{-2} s^{-1}. Die Wurzelkulturen wurden im selben Klimaraum auf einer Schüttelmaschine mit 110 U/min im Dauerdunkel kultiviert. *A. rhizogenes* wurde bei + 4 °C kultiviert. Die Glycerin-Stammlösungen der Bakterien wurden bei - 80 °C aufbewahrt.

Die Subkultivierung erfolgte in regelmäßigen Abständen unter aseptischen Bedingungen an einer sterilen Werkbank (Laminar Air Flow):

- Sprosskulturen: alle 4 Wochen
- Kalluskulturen: alle 3 Wochen
- Wurzelkulturen: *S.nodosa*: alle 3 Wochen
  H. procumbens: alle 2 Wochen
- Hairy roots: *S. nodosa*: alle 2 Wochen
- *Agrobacterium*: alle 3 Monate

2.3 Phytochemische Untersuchung der Pflanzenextrakte

2.3.1 Probenaufarbeitung

Zur Untersuchung wurden die frisch geernteten intakten sowie *in vitro* gewachsenen Pflanzen sofort in die verschiedenen Organe (Wurzeln, Stängel, Blätter, Blüten, Samen) aufgeteilt. Diese und die Proben der Wurzel- und Kalluskulturen wurden bei - 20 °C in Aluminiumfolie tiefgefroren und unmittelbar vor der Extraktion gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Proben wurden in einem Mörser fein gemahlen und eingewogen. Die Einwaagen betrugen 50 bis 150 mg, bei Materialknappheit auch weniger, aber mindestens 15 mg. Für die Extraktion wurden 20 ml MeOH zugegeben und die Probe 3 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden die Proben für 30 min auf 50 °C erhitzt und dann über Nacht auf einen Rotationsschüttler gestellt. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation mit 4000 U/min wurde der Überstand in einen Rundkolben filtriert. Der Probenrest wurde zweifach mit 10 ml MeOH gewaschen und ebenfalls zentrifugiert und filtriert. Die vereinigten Überstände wurden an einem Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 2 ml MeOH aufgenommen. Je nach Probe erfolgte eine weitere Verdünnung für die HPLC-Analyse.

Zum Vergleich wurde Drogenmaterial von *H. procumbens* (Parceval, Caelo) und *P. lanceolata* (Alnatura, Caelo) nach derselben Methode aufgearbeitet.

2.4 Qualitative Methoden zur Charakterisierung der Extrakte

2.4.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie diente der Voruntersuchung von Extrakten zum Screening auf das Vorkommen von Iridoidglykosiden.

Stationäre Phase: DC-Aluminiumfolien, 20 x 20 cm, Kieselgel 60 F_{254}, Fa. Merck

Mobile Phase A: (Harpagosid) Ethylacetat / Methanol / Wasser (8 / 15 / 77)

Mobile Phase B: (Aucubin, Catalpol) Ethylacetat / Essigsäure / Wasser (60 / 20 / 20)

Detektion: Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz
0,5 mg Vanillin in 50 ml 96%igem EtOH, Zugabe von 1 ml konzentrierter Schwefelsäure

Standard: Harpagosid, Aucubin (Karl Roth) und Catalpol (Wako) in MeOH

Für die dünnschichtchromatographische Untersuchung wurden 15 µl Extrakt bandenförmig auf die DC-Platte aufgetragen. Die DC-Platten wurden in einer mit Fließmittel gesättigten Kammer entwickelt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels erfolgte die Detektion zunächst unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sowie 366 nm. Anschließend wurden die Platten mit Sprühreagenz besprüht, im Trockenschrank bei 100 °C für 5 bis 10 min erhitzt und dann bei Tageslicht ausgewertet. Durch die auftretenden Farbreaktionen der Stoffe mit dem Sprühreagenz konnten die einzelnen Banden bestimmt und anhand der Referenzsubstanzen (authentische Iridoidglykoside) identifiziert werden.

2.4.2 Massenspektrometrie

Harpagosid, Aucubin und Catalpol wurden mittels LC-ESI-MS im positiven Modus anhand ihrer Natrium-Addukte (Harpagosid m/z 517 $[M+Na]^+$, Aucubin m/z 369 $[M+Na]^+$, Catalpol m/z 385 $[M+Na]^+$) identifiziert. Die Iridoidglykoside in den verschiedenen Pflanzenproben wurden anhand von Stichproben nachgewiesen.

HPLC-Anlage:	Latek Laborgeräte
Stationäre Phase:	Vorsäule: LiChroCART® 4-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm), Merck
	Kartusche: LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm), Merck
Mobile Phase:	A Wasser mit 0,1 % Ameisensäure
	B Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure
	Die Lösungsmittel wurden 30 min im Ultraschallbad entgast.
Flussvolumen:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Gradient:	0 - 15 min, 0 - 10 % B; 16 - 30 min, 10 - 100 % B
Post-flow Splitting:	1:5

Massenspektrometer:	Micromass VG Quattro II
Software:	MassLynx (Version 4.0, Waters)
Standard:	Externer Standard
	Harpagosid, Aucubin (Karl Roth)
	Catalpol (Wako)

Als Nebulisierungs- und Trocknungsgas wurde Stickstoff verwendet, das durch einen Parker Stickstoffgenerator erzeugt wurde. Folgende Parameter wurden eingestellt: Nebulisierungsgasdruck 13 L/h, Trocknungsgasdruck 350 L/h, Kapillarelektrophoresespannung 3.5 kV, HV Linse 0.5 kV, Cone Spannung 50 V, Temperatur der Transferkapillare 120 °C.

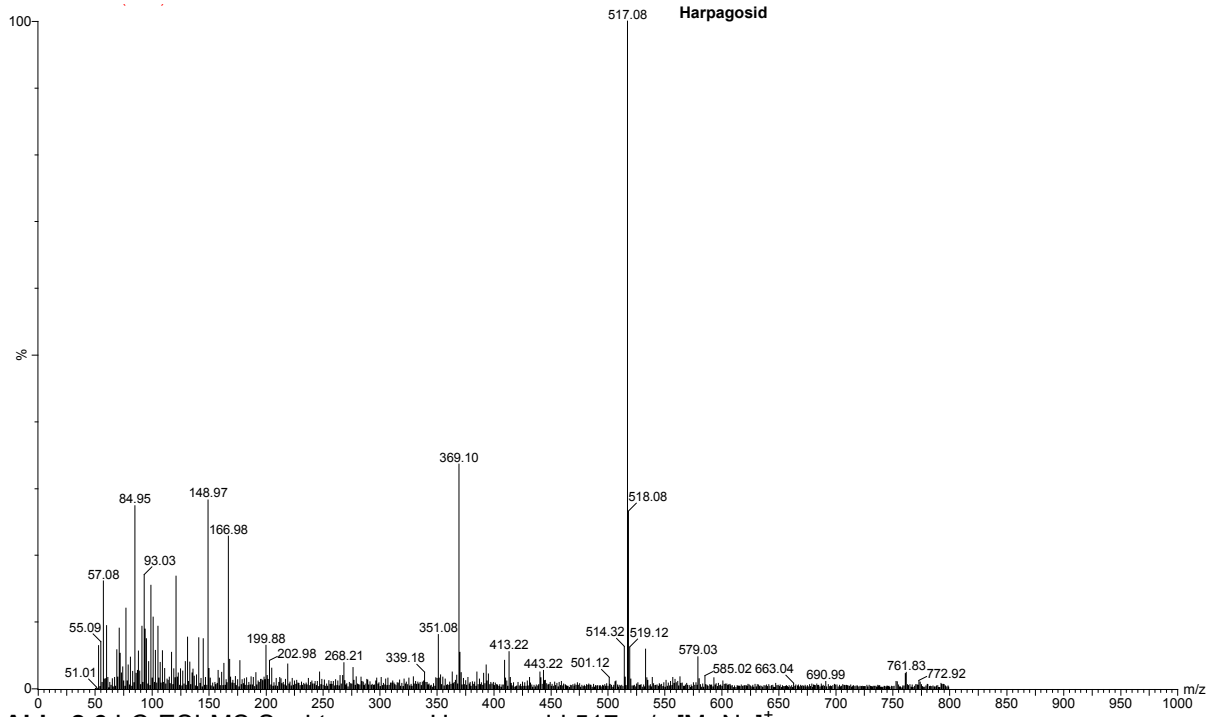

Abb. 2.6 LC-ESI-MS Spektrum von Harpagosid 517 m/z $[M+Na]^+$.

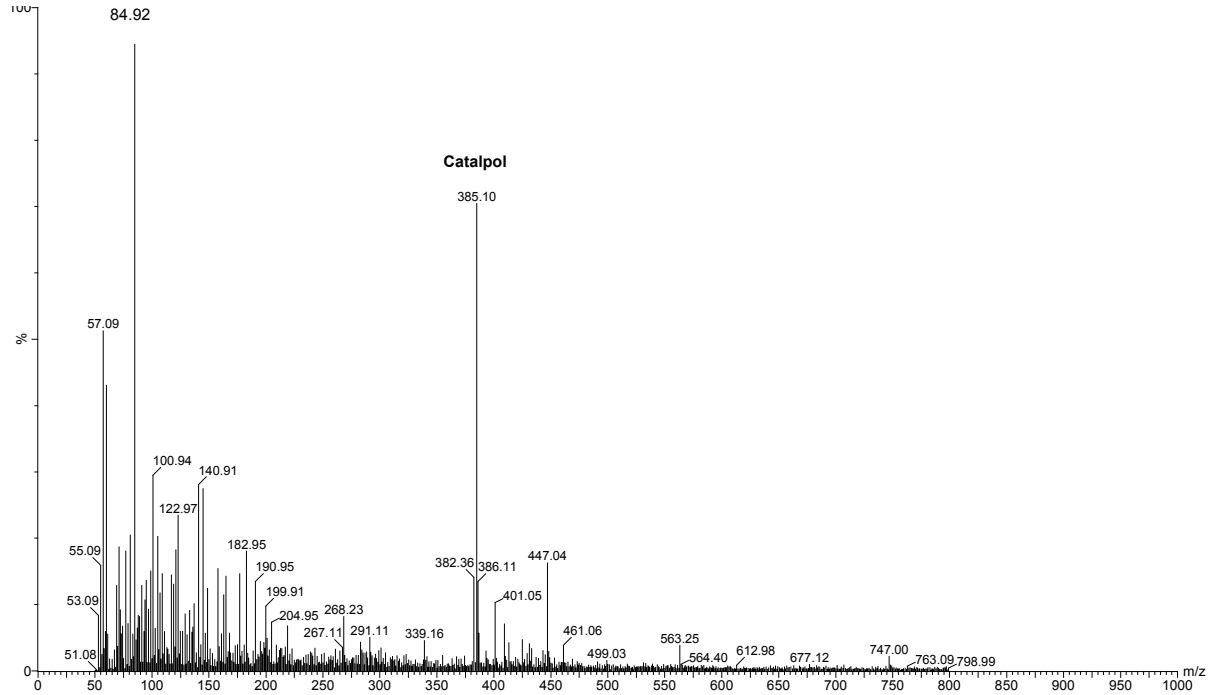

Abb. 2.7 LC-ESI-MS Spektrum von Catalpol 385 m/z $[M+Na]^+$.

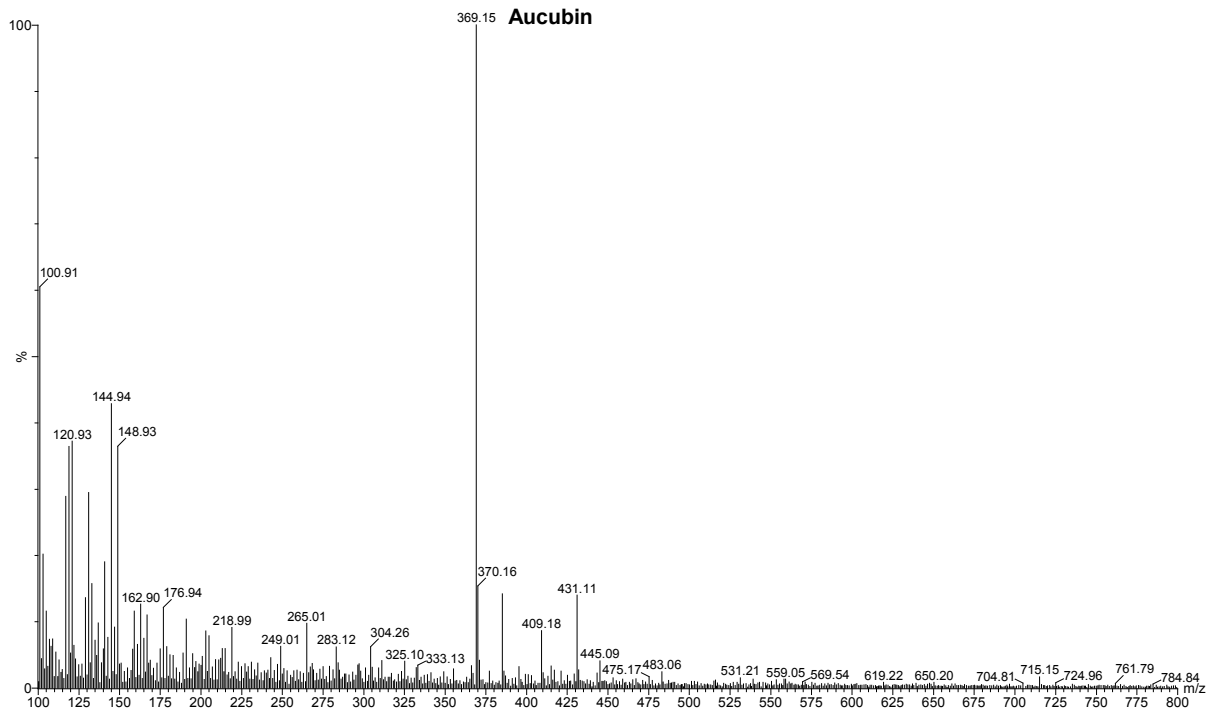

Abb. 2.8 LC-ESI-MS Spektrum von Aucubin 369 m/z $[M+Na]^+$.

2.5 Quantitative Methode zur Bestimmung der Inhaltsstoffe

2.5.1 HPLC-Analyse

Die analytische HPLC Methode diente der Trennung und Quantifizierung der Iridoidglykoside Harpagosid, Aucubin und Catalpol.

Probengeber:	Beckmann Autosampler
Detektor:	Beckmann 168, Photodiode Array Detector
Pumpe:	Beckmann 125 P Solvent Module
Software:	Gold Nouveau Chromatography Data System Version 1.72, 1996, Beckmann Instruments
Stationäre Phase:	Vorsäule: LiChroCART® 4-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Kartusche: LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) beide von Merck
Mobile Phase:	A Wasser mit Phosphorsäure, pH 4 B Acetonitril Die Lösungsmittel wurden 30 min im Ultraschallbad entgast.
Flussvolumen:	1,2 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl

Gradient1: Detektion von Harpagosid

0 - 2 min, 10 % B; 2 - 12 min, 10 - 40 % B; 12 - 22 min, 40 - 100 % B; 22 - 26 min, 100 - 10 % B.

Gradient 2: Detektion von Aucubin und Catalpol

0 - 1 min, 0 % B; 1 - 16 min, 0 - 10 % B; 16 - 17 min, 10 - 100 % B; 17 - 18 min, 100 - 0 % B.

Detektion:

Harpagosid	280 nm
Aucubin	204 nm
Catalpol	204 nm

Standard: Externer Standard

Harpagosid, Aucubin (Karl Roth)

Catalpol (Wako)

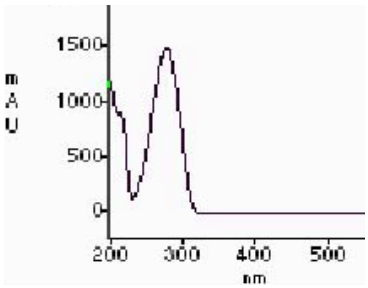

Abb. 2.9 UV-Spektrum von Harpagosid.

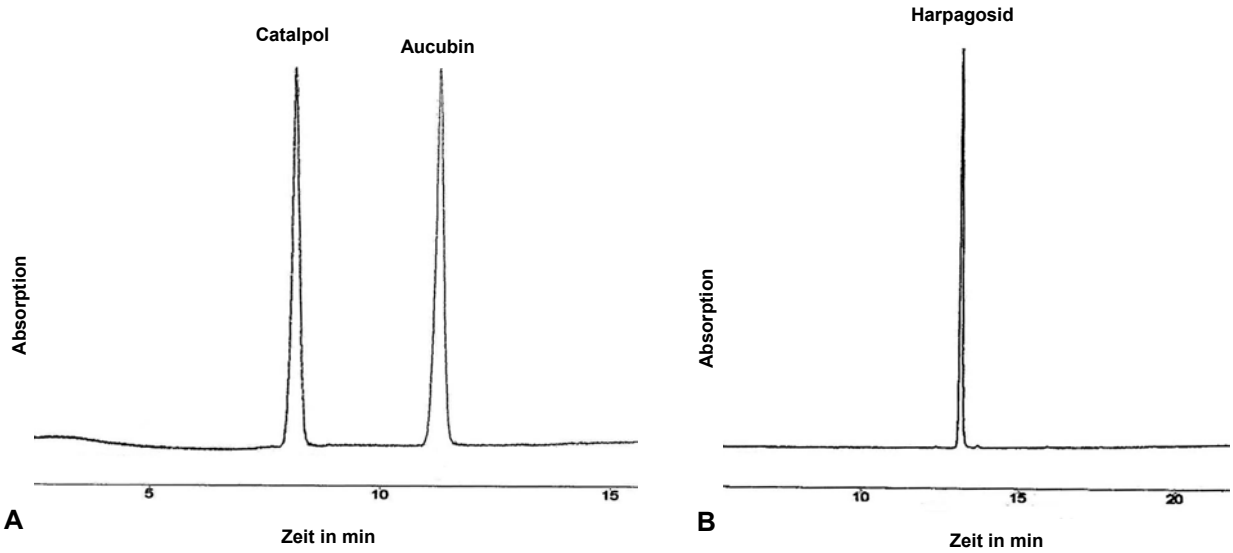

Abb. 2.10 HPLC Profile der Iridoidglykoside Catalpol, Aucubin (links) und Harpagosid (rechts). Catalpol (8,4 min) und Aucubin (11,5 min) wurden mit Gradient 2 bei 204 nm detektiert, Harpagosid (13,2 min) mit Gradient 1 bei 280 nm.

2.5.2 Quantifizierung mittels HPLC

Die Peaks von Harpagosid, Aucubin und Catalpol wurden anhand des Vergleichs mit der Retentionszeit der authentischen Iridoidglykoside (Catalpol 8,4 min; Aucubin 11,5 min; Harpagosid 13,2 min) identifiziert und für Harpagosid erfolgte zusätzlich die Kontrolle des UV-Absorptionsspektrums.

Die ermittelten Peakflächen wurden mit der Software integriert und die entsprechenden Konzentrationen über eine Kalibiergerade berechnet. Die Kalibriergeraden von Harpagosid, Aucubin und Catalpol wurden mit Hilfe der authentischen Iridoidglykoside erstellt und für die Auswertung wurde die Geradengleichung y = ax + 0 zugrunde gelegt. Alle Standardsubstanzen wurden in MeOH gelöst. Für Harpagosid wurde eine Verdünnungsreihe von 0,5 bis 250 μg/ml hergestellt, so dass 10 Kalibrierpunkte gewonnen werden konnten. Die Detektion erfolgte in der Nähe des Absorptionsmaximums bei 280 nm. Die Kalibriergerade für Aucubin wurde anhand von 8 Kalibrierpunkten (7,8 - 1000 μg/ml) gewonnen. Für Catalpol wurde eine Verdünnungsreihe von 15,6 μg/ml bis 500 μg/ml hergestellt, so dass 6 Kalibrierpunkte gewonnen werden konnten. Die Detektion von Aucubin und Catalpol erfolgte bei 204 nm.

Tab. 2.11 Geradengleichungen der Iridoidglykoside Harpagosid, Aucubin und Catalpol.

Substanz	Geradengleichung x in ng/μl	r^2	Konzentrationsbereich (μg/ml)	Stoffmengenbereich (ng)	Wellenlänge (nm)
Harpagosid	y = 41937*x	0,9993	0,5 - 250	9,77 - 5000	280
Aucubin	y = 10222*x	0,9999	7,8 - 1000	156,25 - 20000	204
Catalpol	y = 7821*x	0,9990	15,6 - 500	312,50 - 10000	204

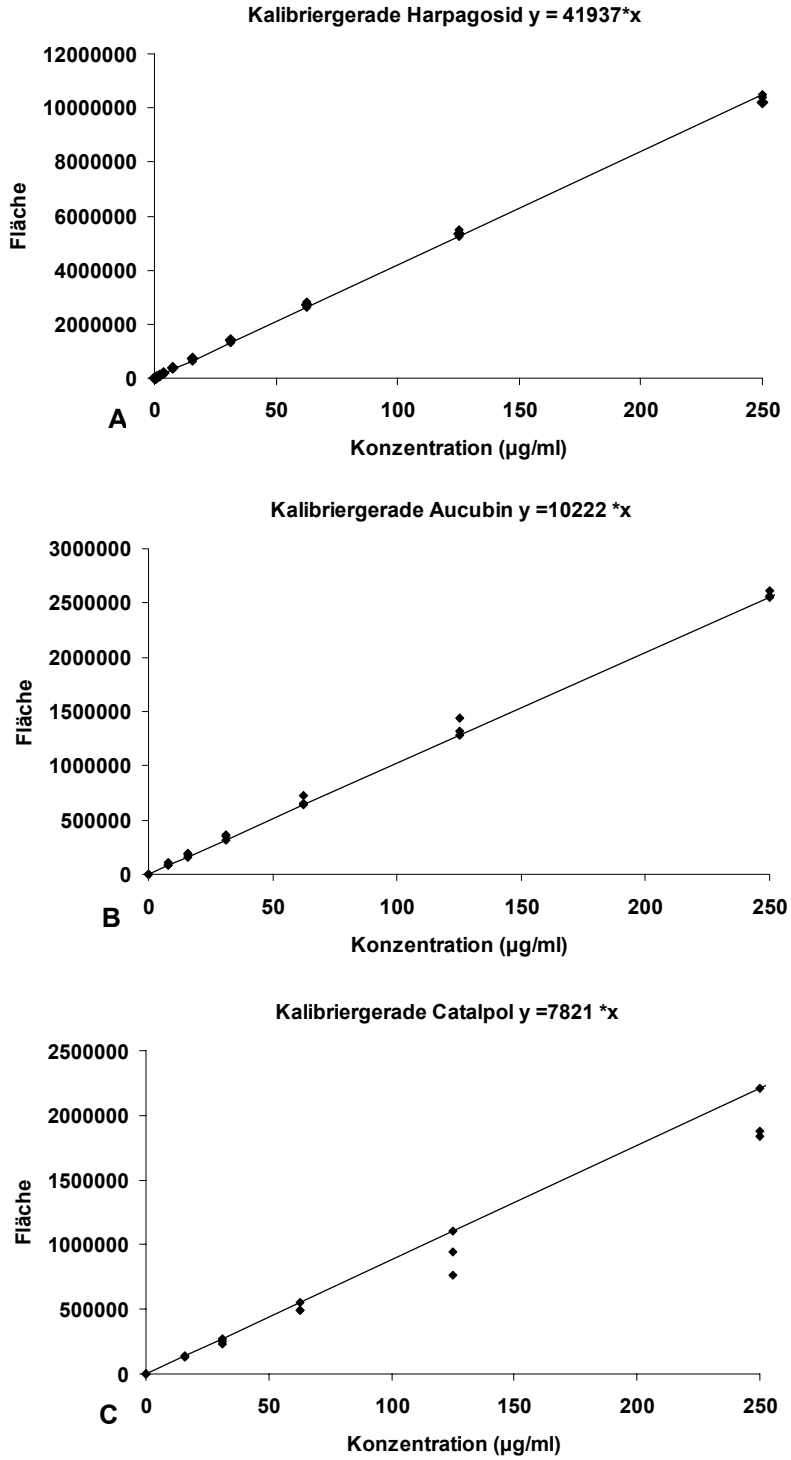

Abb. 2.12 Kalibriergeraden der HPLC Standardsubstanzen Harpagosid (**A**), Aucubin (**B**) und Catalpol (**C**); Symbole stellen einzelne Datenpunkte dar; n = 2.

2.5.3 Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden vier Modellmischungen mit verschiedenen Gehalten der jeweils zu bestimmenden Substanz (Harpagosid, Aucubin, Catalpol) hergestellt. Als Ausgangsmaterial für die Modellmischungen diente zermösertes Blattmaterial, dessen Substanzgehalt zuvor in μg pro mg Blattmaterial bestimmt worden war (Vierfachbestimmung). Zu jeder Modellmischung wurde vor dem Extraktionsprozess eine geeignete Menge an Standardsubstanz zugegeben (50, 100, 150, 200 μg/ml). Der Gesamtgehalt an Standardsubstanz in der Probe wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt und durch Vergleich mit dem berechneten Gesamtgehalt die wiedergefundene Substanzmenge in Prozent berechnet (Wiederfindungsrate). Die Wiederfindungsraten betrugen 101,70 ± 3,13 % für Harpagosid, 99,46 ± 4,70 % für Aucubin und 98,68 ± 6,44 % für Catalpol.

Bei der Bestimmung der Wiederholpräzision zeigte sich bei 6facher Messung der gleichen Probe eine Abweichung von bis zu 4,93 % vom Mittelwert.

2.6 Untersuchungen zur antiinflammatorischen Wirkung

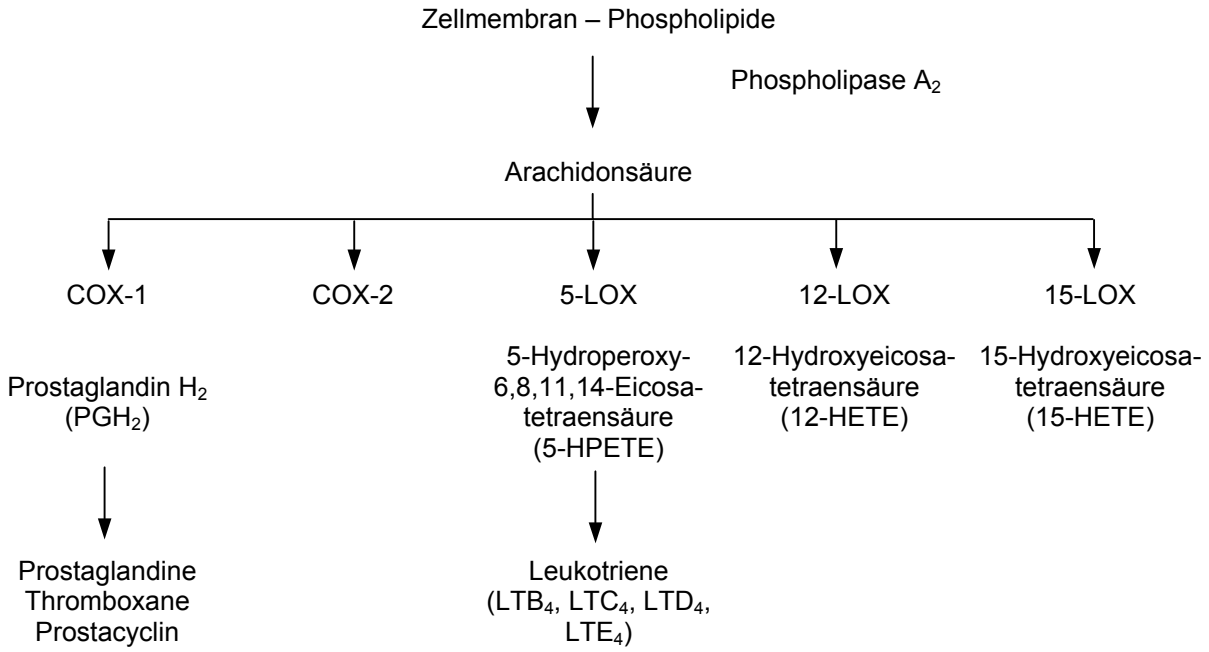

Abb. 2.13 Vereinfachte Übersicht über die Arachidonsäurekaskade.

Phospholipase A_2 katalysiert die Hydrolyse der Esterbindung zwischen einer Fettsäure und der Hydroxylgruppe an Position 2 des Glycerolgrundgerüstes der Phospholipide. Dadurch wird die Fettsäure freigesetzt und ein Lysophospholipid gebildet. Durch die Aktivierung des Enzyms wird Arachidonsäure aus den Membran-Phospholipiden freigesetzt. Die Arachidonsäure kann über die Lipoxygenasen oder die Cyclooxygenasen zu Entzündungsmediatoren umgewandelt werden. Diese Entzündungsmediatoren rufen Symptome wie Fieber, Schmerzen, Schwellungen hervor.

Untersucht wurde die Wirkung von Pflanzenextrakten sowie isolierter Iridoidglykoside auf die COX-1 und Sojabohnen-LOX.

2.6.1 Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1)

Der Test zur spektrofluorimetrischen Quantifizierung von Malondialdehyd (MDA) zur Evaluierung der Cyclooxygenase-1/Thromboxan Synthase Hemmung beruhte auf der von Dannhardt et al. (1998) beschriebenen Methode.

Ausgelöst wird die Arachidonsäurekaskade in isolierten Thrombozyten aus Schweineblut durch Calcium-Ionophor A23187. Das verwendete Calcium-Ionophor A23187 ist ein Calciumcarrier, durch den die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht wird.

Durch die Zugabe wird die Phospholipase A_2 aktiviert und somit die Arachidonsäure-kaskade gestartet. MDA wird in der Arachidonsäurekaskade im Verhältnis 1:1 mit 12-Hydroxy-hepatodecatrienoische Säure (12-HHT) gebildet (Abb. 2.14) und kann nach Reaktion mit TBA spektrofluorimetrisch nachgewiesen werden. Eine reduzierte MDA-Bildung kann aus der Hemmung von 3 verschiedenen Enzymen – Phospholipase A2, Cyclooxygenase-1 oder Thromboxansynthase - resultieren und muss durch weitere Experimente belegt werden.

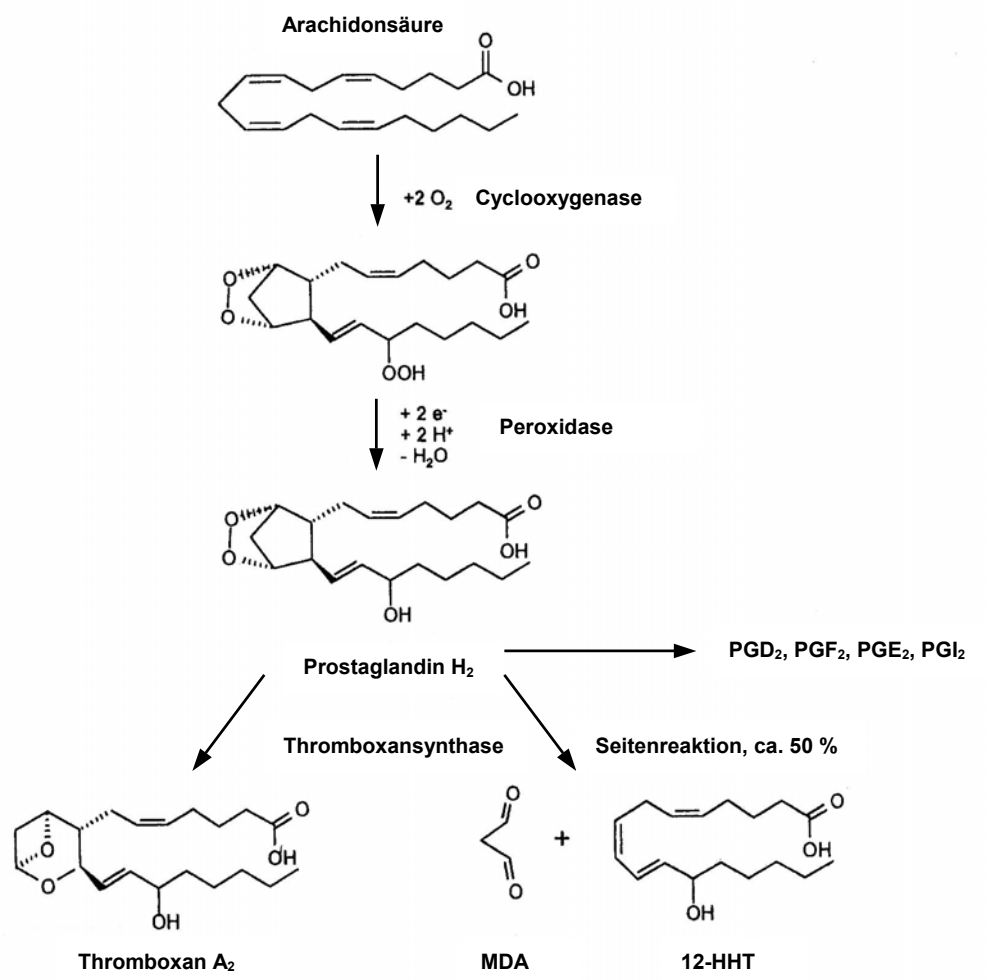

Abb. 2.14 Cyclooxygenaseweg der Arachidonsäurekaskade, aus Prostaglandin H_2 werden durch die Thromboxansynthase neben Thromboxan A_2 etwa im gleichen Verhältnis MDA und 12-HHT gebildet. MDA = Malondialdehyd, 12-HHT = 12- Hydroxy-hepatodecatrienoische Säure.

Tab. 2.12 Lösungen und Durchführung des MDA-Assays (nach Dennhardt et al. 1998).

Lösungen		
EDTA-Lösung	0,077 M	EDTA in 0,2 % NaCl-Lösung
PBS-Lösung pH 7,4	8,00 g	NaCl
	0,20 g	KCl
	1,44 g	Na_2HPO_4
	0,24 g	KH_2PO_4
		ad 1000 ml
Phosphat-Puffer pH 7,4	0,05 M	Na_2HPO_4
	0,01 M	KH_2PO_4
Calcium-Ionophor A23187	8,02 mM	in DMSO, davon
(5 µM Endkonzentration)	8,6 µl	in 891,4 µl Phosphat-Puffer gelöst
A-Minus-Lösung	8,6 µl	DMSO in 891,4 µl Phosphat-Puffer
TCA-Lösung (Trichloressigsäure)	20 %	in 0,6 M HCL
TBA-Lösung (Thiobarbitursäure)	0,53 %	in Phosphat-Puffer
Durchführung		
Isolation der Thrombozyten		
1000 ml Schweineblut + 100 ml EDTA-Lösung zur Gerinnungshemmung		
900 ml dieser Mischung + 420 ml PBS		
Zentrifugieren 209 g/20 min/RT zur Trennung Thrombozyten/Erythrozyten		
Absaugen der Überstände, Zentrifugieren 209 g/20 min/RT		
Zentrifugieren der Überstände 1011 g/15 min/RT, Thrombozytenpellet		
Pellet in sauerstoffgesättigtem PBS resuspendieren (5 min starkes Rühren auf Magnetrührer)		
Einstellen der Endkonzentration auf 8,0 x 10^8 Zellen/ml (OD_{800} = 4,4)		
Inkubation		
	700 µl	Zellsuspension
	+ 10 µl	Inhibitor-Verdünnungen in DMSO
		Positiv- und Negativkontrolle: 10 µl DMSO
		30 min Inkubation bei 37 °C
	+ 50 µl	A23187-Lösung
		Positivkontrolle: 50 µl A23187-Lösung
		Negativkontrolle: 50 µl A-Minus-Lösung
		10 min Inkubation bei 37 °C
	+ 400 µl	TCA-Lösung
		Zentrifugieren 6500 U/min/15 min/3 °C
MDA-Bestimmung		
	700 µl	Überstand
	+ 700 µl	TBA-Lösung
		45 min Inkubation bei 70 °C, Abkühlen auf RT
Spektrofluorimetrische Messung:		λ_{ex} = 533 nm, λ_{em} = 533 nm

Die Inhibition in % wurde durch Subtraktion der spektrofluorimetrisch gemessenen relativen Fluoreszenz von 100 berechnet. Der IC_{50} (50 % Hemmung) wurde nach folgender Gleichung mit der Software Sigmaplot anhand einer nichtlinearen Regression bestimmt:

$$x=-b*\ln(a/(y-y_0)-1)+x_0$$

mit x = Konzentration Inhibitor in µg/ml

y = Hemmung in %

Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt. Getestet wurde reines Harpagosid in Konzentrationen von 0,007 bis 450,7 µg/ml (Endkonzentration). Weiterhin wurden ein wässriger, methanolischer und ethanolischer gefriergetrockneter Extrakt aus *Harpagophytum*-Wurzeldroge (Fa. Caelo) getestet. Für die Extrakte wurde mittels HPLC der Harpagosidgehalt bestimmt. Der wässrige Extrakt wurde in einem Konzentrationsbereich von 3,3 und 6692,5 µg Harpagosid/ml getestet. Für den methanolischen Extrakt lag der Konzentrationsbereich zwischen 5,2 und 10551,9 µg Harpagosid/ml und für den ethanolischen zwischen 12,8 und 6531,7 µg Harpagosid/ml.

An jedem Versuchstag wurde Aspirin in einer Konzentration von 0,007 - 14,1 µg/ml als Positivkontrolle mitgetestet, um sicher zu gehen, dass der Versuch einwandfrei funktioniert hat. Aspirin hemmt die COX und verhindert so die Freisetzung von Prostaglandinen, die an der Entstehung von Entzündungen, Fieber und Schmerzen beteiligt sind (Vane 1987).

2.6.2 Hemmung der Lipoxygenase (LOX)

Gemeinsam mit Herrn Jürgen Schneele wurde am IPMB, Abt. Biologie, ein Assay zum einfachen und schnellen Screening des Potentials von Substanzen zur Inhibition der Lipoxygenase entwickelt. Sircar et al. (1983) testeten bereits die Hemmung von Sojabohnen-Lipoxygenase durch nichtsteroidale Antirheumatika (NSAD) mit Linolsäure als Substrat. Die Sojabohnen-LOX ist ein gut erhältliches, günstiges Material und von den Lipoxygenasen die am gründlichsten untersuchte. Daher stellt die *in vitro* Inhibierung der Sojabohnen-Lipoxygenase ein gutes Modell für das Screening von Substanzen mit antiinflammatorischem Potential dar (Sircar et al. 1983).

Die Sojabohnen-LOX katalysiert die Oxidation ungesättigter Fettsäuren mit 1-4 Dienstruktur. Die Umwandlung von Linolsäure in 13-Hydroperoxy-Linolsäure wurde spektrophotometrisch durch die Bildung eines konjugierten Diens bei 234 nm detektiert. NDGA (Nordihydroguajaretsäure) ist ein bekannter Inhibitor der Lipoxygenase und wurde daher als Positivkontrolle verwendet.

Tab. 2.13 Lösungen und Durchführung des LOX-Assays mit Sojabohnen-LOX. Bei Testung der Iridoidglykoside mit ß-Glucosidase wurde dieselbe Enzymmenge wie für die LOX zugegeben.

Lösungen		
Phosphatpuffer pH 9	0,1 M	K_3PO_4
Enzymstammlösung	1,0 mg	Sojabohnen-LOX (~ 9 untis/mg) in 1 ml Phosphatpuffer frisch ansetzen, auf Eis lagern
Enzymlösung	Stammlösung unmittelbar vor jedem Versuch 1:100 verdünnen	
Substratlösung (Natrium-Linoleat)	62,5 µM	in Phosphatpuffer frisch ansetzen
Durchführung		
Inkubation	750 µl	Enzymlösung
	+ 5 µl	Inhibitorverdünnungen in EtOH abs. Negativkontrolle: 5 µl EtOH Positivkontrolle: 5 µl NDGA in EtOH 10 min Inkubation bei RT in Küvette im Photometer pipettieren
Photometrische Messung: bei 234 nm	+ 25 µl	Substratlösung direkt in Küvette pipettieren und Messung starten, durch mehrmaliges Aufziehen durchmischen und 3 min alle 10 s Messwert aufnehmen

Eine für den Assay geeignete Substratmenge musste zuvor bestimmt werden. Hierzu wurde zunächst der Substratumsatz bei 12 verschiedenen Substratkonzentrationen (7,81; 15,63; 31,25; 40,00; 50,00; 62,50; 75,00; 100,00; 125,00; 250,00; 500,00; 1000,00 µM) nach Versuchsanleitung bestimmt (Abb. 2.15).

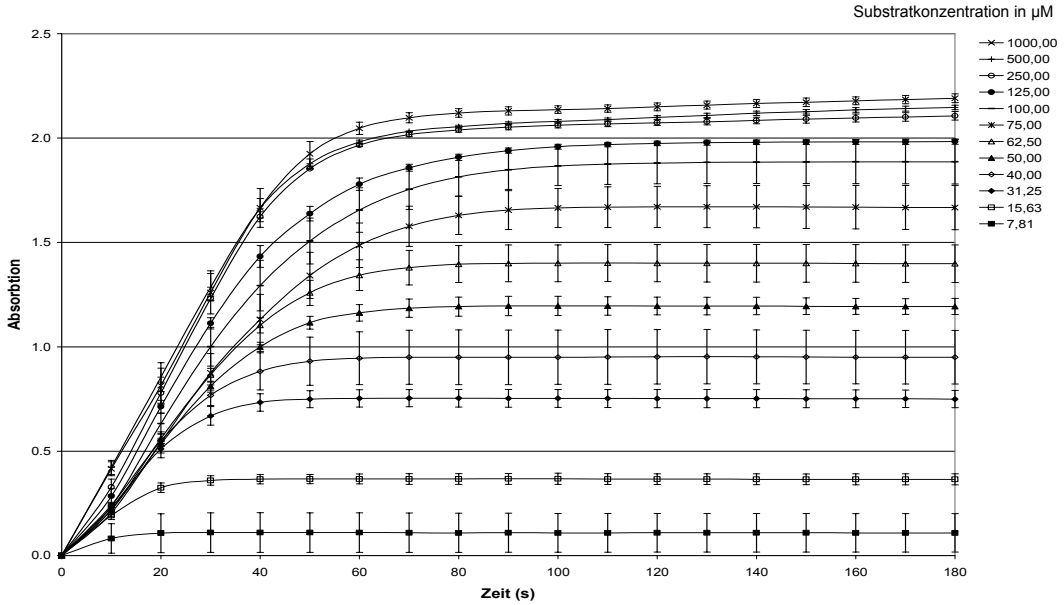

Abb. 2.15 Substratumsatzes bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen; gemessen wurde die Absorption bei 234 nm in Abhängigkeit von der Zeit; Balken geben die Standardabweichung an (n = 3).

Anhand der nachfolgenden Abbildung 2.16 wird deutlich, dass bei Substratkonzentrationen von 250 µM bis 1000 µM eine Sättigung des Enzyms mit Substrat vorlag, da die Steigungen der 3 Kurven fast identisch waren. Aus den jeweiligen Steigungen der quasilinearen Bereiche der einzelnen Kurven (NDGA-Konzentration von 7,81 µM bis 125 µM) wurde die Anfangsgeschwindigkeit v_0 (Substratumsatz pro Zeiteinheit) berechnet. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden anschließend über den Substratkonzentrationen aufgetragen.

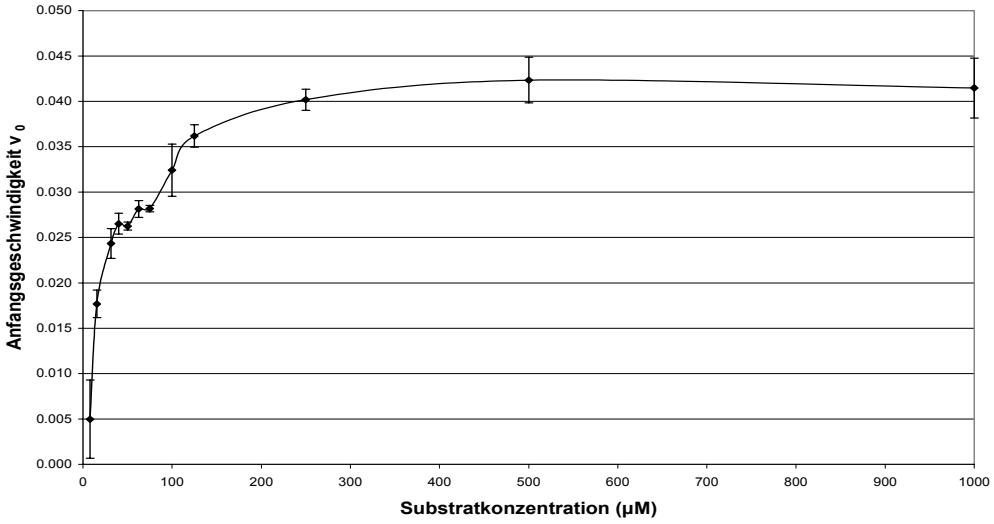

Abb. 2.16 Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten v_0 über der Substratkonzentration (n = 3).

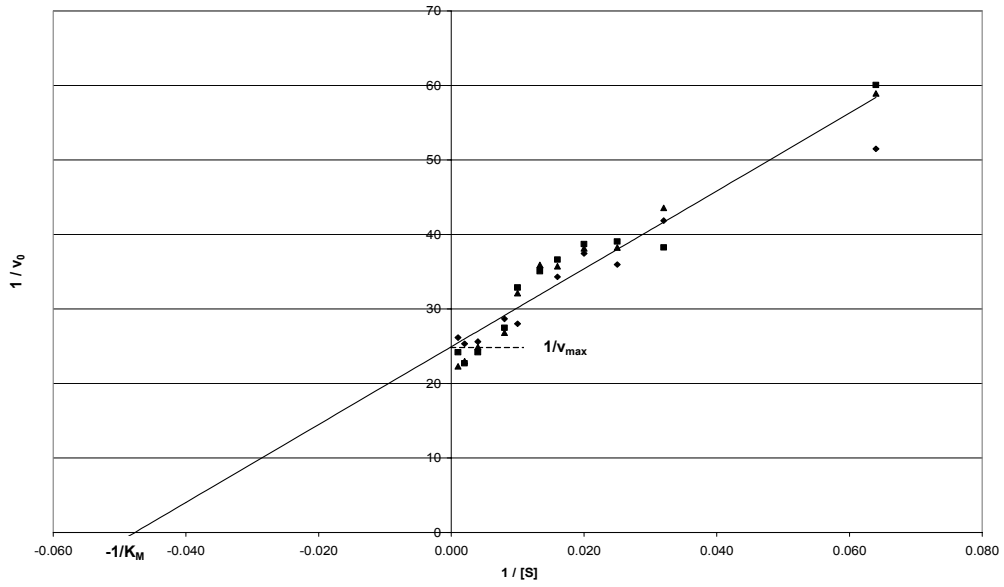

Abb. 2.17 Linearisierte Darstellung nach Lineweaver und Burk; y = 522,62*x+24,93 mit y = $1/v_0$ und x = 1/S (v_0 = Anfangsgeschwindigkeit, S = Substratkonzentration); der Schnittpunkt mit der y-Achse liefert $1/v_{max}$, der Schnittpunkt mit der x-Achse $-1/K_M$; Symbole geben einzelne Datenpunkte an.

Anhand der aus Abb. 2.17 ermittelten Geradengleichung wurden v_{max} = 0,04 µM/s und K_M = 20,96 µM berechnet. Die Michaelis-Konstante K_M gibt die Affinität des Enzyms zum Substrat an: je größer K_M ist, desto höher muss die Substratkonzentration sein damit die Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. Somit ist die Substrataffinität des Enzyms geringer. Wird mit einer Substratkonzentration in der Größenordnung von K_M gearbeitet, kann die eventuell kompetitive Hemmung eines potentiellen Inhibitors erkannt werden. Andererseits ist bei Substratkonzentrationen, die wesentlich größer sind als K_M, die Reaktionsgeschwindigkeit nur noch mit der Enzymkonzentration ($v = v_{max}$) korreliert und nicht mehr von der Substratkonzentration abhängig, da das Enzym mit Substrat gesättigt ist. Daher wurde die Substratkonzentration für den Assay auf 62,5 µM festgelegt.

Um die Stabilität des auf Eis gelagerten Enzyms zu belegen, wurden die Messungen der Negativkontrolle über mehrere Stunden miteinander verglichen (Abb. 2.18). Erst nach 5 h zeigte sich ein Abfallen der Enzymaktivität, so dass mit dem auf Eis gelagerten Enzym 4 h bei gleichbleibender Aktivität gearbeitet werden konnte. Auch ein möglicher Einfluss von ß-Glucosidase auf das Testsystem wurde ausgeschlossen (Abb. 2.19).

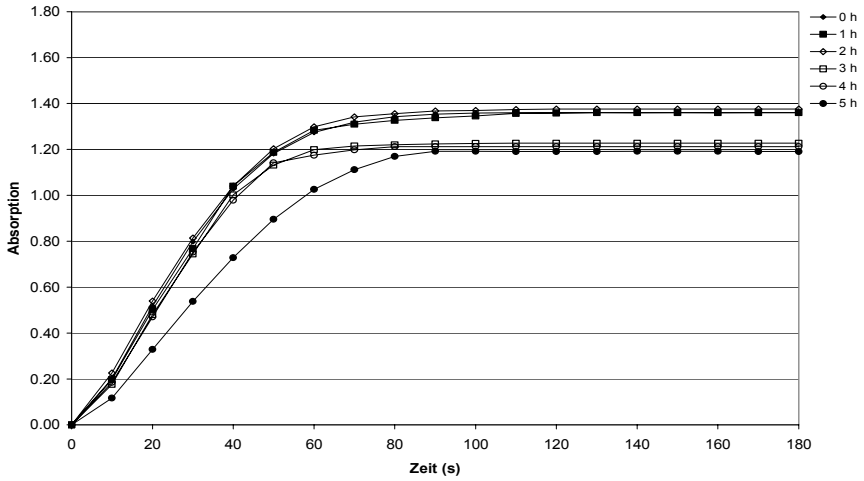

Abb. 2.18 Monitoring der Lagerungsstabilität der LOX-Aktivität.

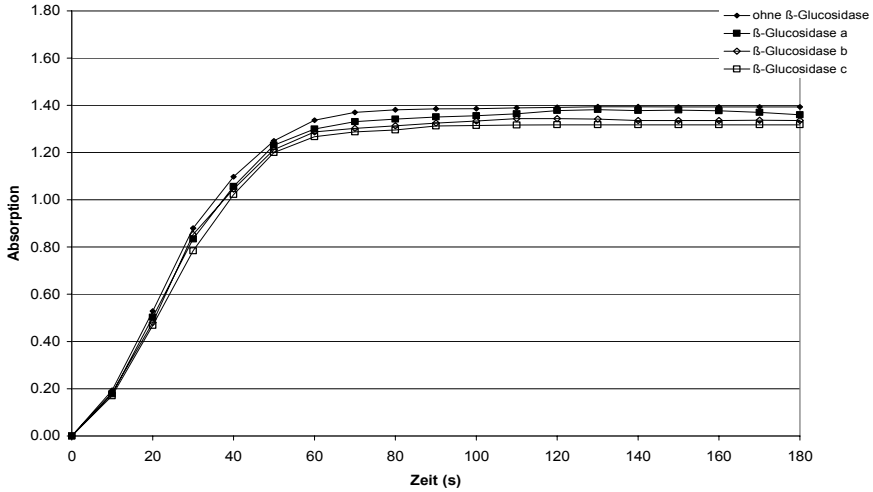

Abb. 2.19 Einfluss von ß-Glucosidase auf die Kinetik.

Anhand der photometrischen Messung wurden die Substratumsätze pro Zeit bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen ermittelt (Abb. 2.20).

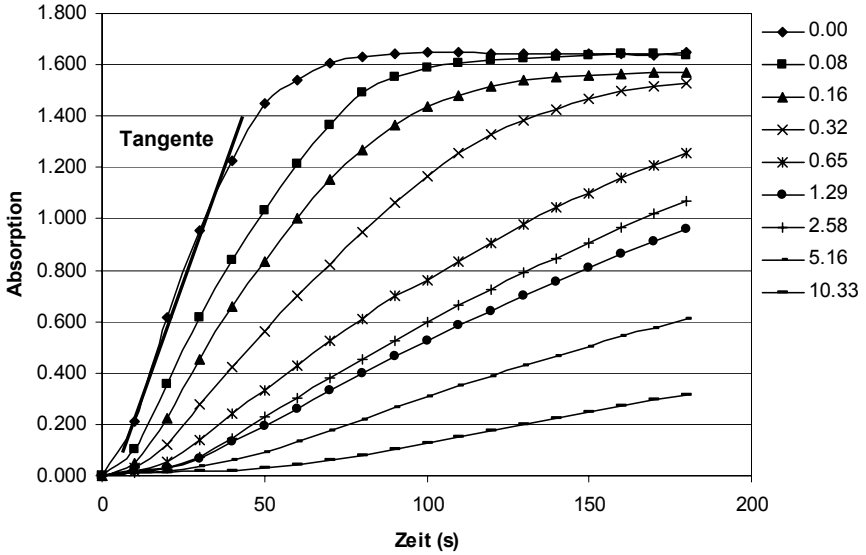

Abb. 2.20 Inhibition der LOX-Aktivität durch NDGA.

Für jede Inhibitorkonzentration wurde die Steigung der Tangente (Abb. 2.20), Absorption pro s, im quasilinearen Anfangsbereich der Kurve berechnet und graphisch über der Inhibitorkonzentration aufgetragen (Abb. 2.21). Mittels einer nichtlinearen Kurvenanpassung (Programm Origin, Version 6.1, Levenberg-Marquardt Algorithmus) wurden die Steigungswerte analysiert. Die Fit-Funktion wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$y = y_0 + A_1 e^{-(x-x_0)/t_1} + A_2 e^{-(x-x_0)/t2}$$

y_0: Offset-Konstante

x_0 : Verschiebung

A_1, A_2: Gewichtungsfaktor 1 + 2

t_1 ,t_2 : Abnahmekonstante 1 + 2

Eine exponentielle Abnahme zweiter Ordnung wurde gewählt, da die Abnahme von der Inhibitorkonzentration und der Zeit abhängig ist und der Verlauf auf eine schnelle und langsame Zeitkomponente hindeutet. Die Fit-Koeffizienten wurden solange optimiert bis die Abweichung der Fehlerquadrate minimal und das Bestimmtheitsmaß r^2 maximal war.

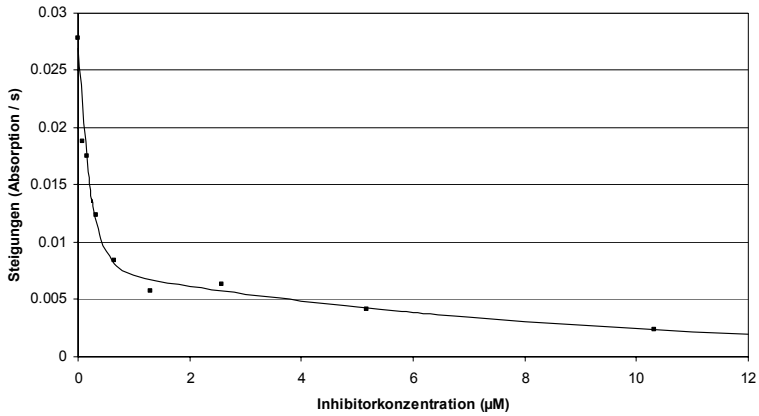

Abb. 2.21 Auftragung der Steigungen (Symbole) der Substratumsatz/Zeit-Kurven über der Inhibitor-konzentration und die Kurvenanpassung der exponentiellen Abnahme zweiter Ordnung am Beispiel von NDGA; mit den Best-Fit-Koeffizienten: y_0 = 0,00; x_0 = -1,01; A_1 = 0,01; t_1 = 8,42; A_2 = 2,11; t_2 = 0,22.

Im Anschluß wurde die gefittete Kurve durch die Division ihres y-Achsenabschnittes, der die maximal zu erwartende Absorption bei minimaler Inhibitorkonzentration

darstellt, normiert. Dieser y-Achsenabschnitt wurde ebenfalls zur Normierung der einzelnen Steigungswerte herangezogen (Abb. 2.22).

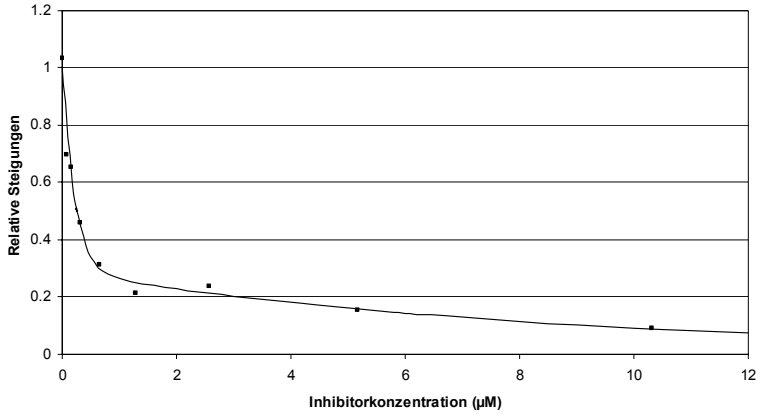

Abb. 2.22 Auftragung der normierten Steigungswerten (Symbole) und der zugehörigen normierten exponentiellen Abnahme (Linie) über der Inhibitorkonzentration am Beispiel von NDGA.

Aus diesen normierten y-Werten wurde die relative Inhibition berechnet: Relative Inhibition = $(1 - y_{normiert})$. Aus der gefitteten Funktion wurde der IC_{50}-Wert für eine 50 %ige Inhibition berechnet (Abb. 2.23).

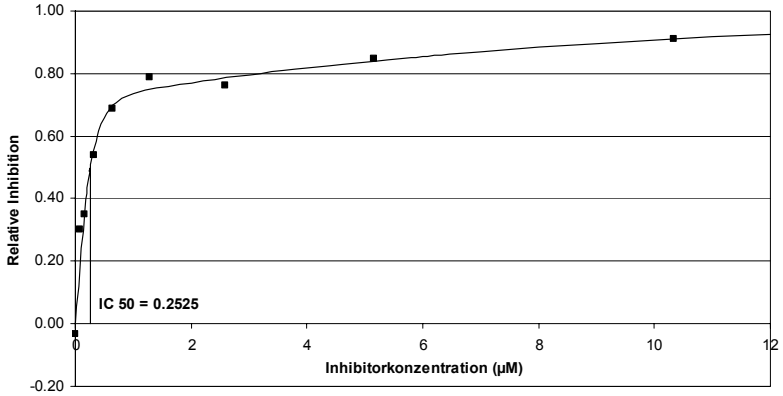

Abb. 2.23 Auftragung der relativen Inhibition über der Inhibitorkonzentration und Berechnung des IC_{50} am Beispiel von NDGA.

Getestet wurden:

- Reinsubstanzen: NDGA, Harpagosid, Aucubin, Catalpol
- Pflanzenextrakte: Blatt- und Wurzelextrakte von *H. procumbens, S. nodosa, P. lanceolata*
- Presstabletten mit je 100 mg Trockenextrakt von *Warburgia salutaris* (isibhaha), die in der traditionellen afrikanischen Medizin zur unterstützenden Behandlung von bakteriellen, Pilz- und Hefeinfektionen eingesetzt wird.

2.7 Untersuchungen zur Beeinflussung der Angiogenese

Der Angiogenese-Hemmtest an der Chorioallantoismembran (CAM) des Hühnerembryos wurde von Herrn Jürgen Schneele, IPMB, Abt. Biologie, durchgeführt. Im Rahmen seiner Testungen wurden die beiden Iridoidglykoside Harpagosid und Catalpol in einer maximalen Konzentration von 100 bzw. 70 µg pro Testpellet mitgetestet. Suramin ist ein bekannter Hemmstoff der Angiogenese in der CAM von Hühnerembryos (Danesi et al. 1993) und wurde daher als Positivkontrolle verwendet.

Tab. 2.14 Substanzen und Durchführung des Angiogenese-Hemmtests mit befruchteten Hühnereiern (Lohmanns Selected White Leghorn).

Substanzen		
Testpellet je 10 µl	100 µl	wässrige Testlösung
	+ 400 µl	Agarosegel heiß (2,5 %)
Positivkontrolle	400 µg	Suramin pro Pellet
Negativkontrolle		Wasser
Durchführung		
Inkubation der Eier		
Vorinkubation der Eier bei 37,8 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit für 72 h		
Entfernen der Eierschale sowie des Luftsackes auf stumpfer Seite, Absaugen von 5 ml Albumin, Abdecken mit Aluminiumfolie, Inkubation bei 37,8 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit für weitere 72 h		
Testung		
Aufbringen des Testpellets auf gebildete CAM		
pro Testsubstanz, Negativ- und Positivkontrolle wurden 15 Eier verwendet		
Auswertung nach 48 h Inkubation		
Auswertung		
Einspritzen einer 1:1-Mischung aus Sahne (30 %) und Wasser unter CAM (besserer Kontrast bei Bildaufnahme)		
Visuelle Bewertung der Angiogenese-Hemmung durch Vergleich mit Kontrollen		

3 Ergebnisse

3.1 Pflanzenkulturen

3.1.1 *In vitro* Pflanzen

3.1.1.1 Etablierung der *in vitro* Pflanzen

Harpagophytum procumbens

Durch das Vorquellen bei 37 °C sowie das Anritzen der Samenschale erfolgte die Keimung bei einigen Samen bereits nach 2 Tagen und dauerte maximal 17 Tage. Es wurde eine Keimrate von etwa 48 % erzielt. Ohne diese Behandlung unterblieb in fast allen Fällen der Keimungsvorgang. Die Pflanzen entwickelten sich unterschiedlich gut und es kam in keinem Fall zur Blütenbildung. Vom Keimmedium (1/2 NN3) wurde auf ½ MS 3 Medium als Wachstumsmedium umgestellt.

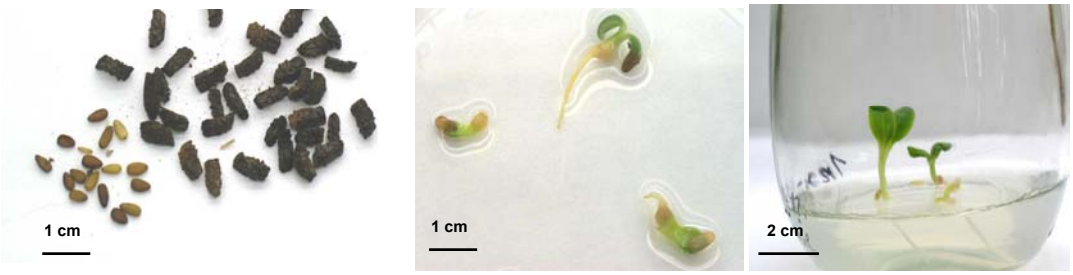

Abb. 3.1 Entwicklung von *H. procumbens*.

Scrophularia nodosa

Die Keimung der sterilisierten Samen erfolgte auf WP-Medium ohne Hormonzugabe nach 5 bis 14 Tagen. Die Keimrate war mit 4,80 % sehr gering. Durch Zugabe von GA_3 konnte sie auf etwa 61 % gesteigert werden. Die Keimlinge wurden anschließend auf hormonfreies WP-Medium umgesetzt. Die jungen Pflanzen entwickelten sich gut und auffällig war die häufige Blütenbildung mit zunehmender Kulturdauer.

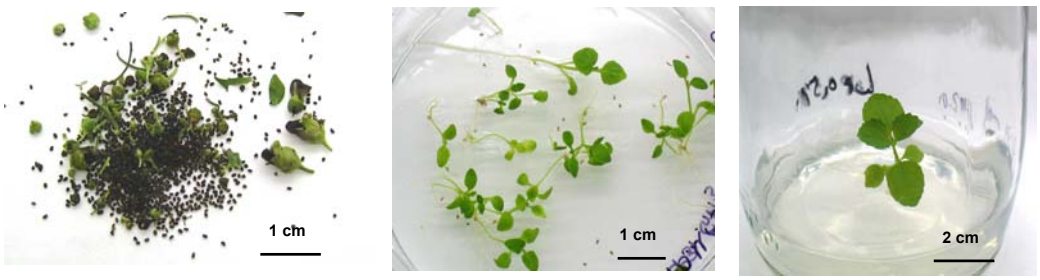

Abb. 3.2 Entwicklung von *S. nodosa*.

Plantago lanceolata

Die Keimung der sterilisierten Samen erfolgte nach 3 bis 8 Tagen mit einer Keimrate von 22,57 +/- 4,58 %. Die Zugabe von Gibberellinsäure (GA_3) führte zu keiner gesteigerten Keimrate und verlängerte die Keimdauer (s. Tab. 3.1). Die Keimlinge entwickelten sich auf dem Keimmedium WP- sehr gut, so dass dieses auch als Wachstumsmedium verwendet werden konnte. Vereinzelt wurden Blüten von einigen *Plantago* Pflanzen ausgebildet.

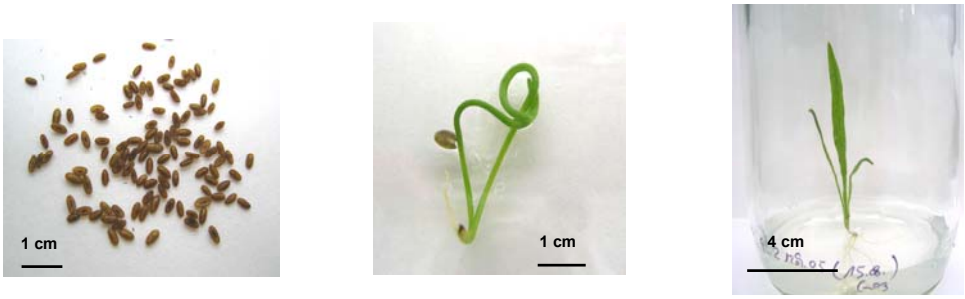

Abb. 3.3 Entwicklung von *P. lanceolata*.

Die folgende Tabelle gibt nochmals eine Übersicht über die Keimraten und die jeweilige Keimdauer für die verschiedenen Pflanzen.

Tab. 3.1 Übersichtstabelle über Keimverhalten mit und ohne Hormonzugabe (nb = nicht bestimmt).

Hormonzugabe	Keimrate und -dauer	*P. lanceolata*	*S. nodosa*	*H. procumbens*
- GA_3	Keimrate in %:	22,57 +/- 4,58	4,80 +/- 4,22	48,03 +/- 13,81
	Keimdauer in Tagen:	5,0 +/- 1,6	6,7 +/- 3,6	7,0 +/- 6,7
+ GA_3 250 mg/l	Keimrate in %:	19,61 +/- 8,88	61,07 +/- 13,87	nb
	Keimdauer in Tagen:	25,5 +/- 7,5	7,3 +/- 0,5	

Abb. 3.4 Blüten der *in vitro* Pflanzen von *S. nodosa* und *P. lanceolata.*

Am häufigsten kam es bei den *in vitro* Pflanzen von *S. nodosa* zur Blütenbildung. Die Pflanzen von *P. lanceolata* zeigten nur vereinzelt Blütenbildung und bei *H. procumbens* wurden keine Blüten entwickelt.

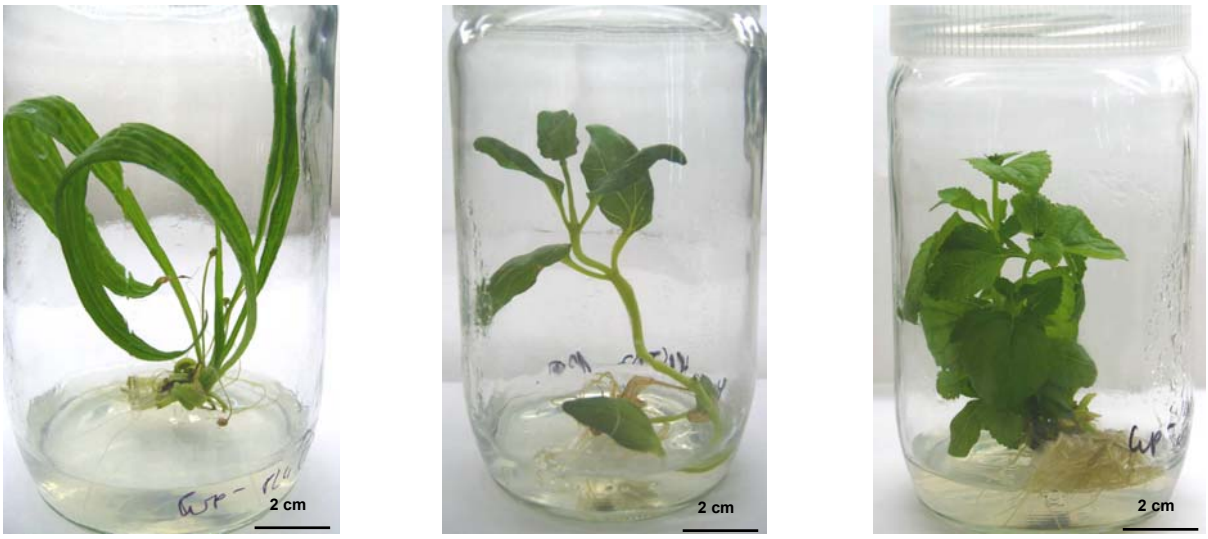

Abb. 3.5 *In vitro* Pflanzen, links: *P. lanceolata* mit Blüten, Mitte: *H. procumbens*, rechts: *S. nodosa* mit Blütenknospen.

3.1.1.2 Vermehrung

Sprossspitzen von *H. procumbens* und *S. nodosa* bildeten ohne Zugabe von Hormonen innerhalb von 1 bis 2 Wochen neue Wurzeln (70 %). Während der Wurzelbildung kam es nicht zur Kallusbildung und bei den Sprossen konnte ein Längenwachstum beobachtet werden. Die auf diese Weise vermehrten Pflanzen entwickelten sich ebenso gut wie diejenigen, die aus Samen herangezogen wurden. Durch Zugabe von IES wurde die Wurzelbildung nicht beschleunigt. Bei isolierten Sprossabschnitten von *H. procumbens* konnte durch Zugabe von 2 mg/l IES eine Wurzelbildung innerhalb 1 - 2 Wochen induziert werden, die ohne Hormonzugabe nicht stattfand (Abb. 3.6). Die Wurzeln bildeten sich auf der apikalen Seite der vertikal im Festmedium orientierten Sprossabschnitte.

Abb. 3.6 Durch IES induzierte Wurzelbildung an einem Stängelabschnitt von *H. procumbens*

Für *P. lanceolata* war die Sprossregeneration aus Wurzelkulturen zu 100 % erfolgreich und auch diese Pflanzen entwickelten sich so gut wie die aus Samen angezogenen. Eine Wurzelbildung aus Blattstücken war hingegen nicht erfolgreich. Von 12 Blättern auf Medium ohne Hormonzusatz entwickelte ein einziges Blatt Wurzelansätze, die jedoch im Laufe der Zeit verkümmerten. Auf Medium mit IES-Zusatz kam es zu keiner Wurzelinduktion.

3.1.1.3 Gehalt an Iridoidglykosiden in den *in vitro* Pflanzen

3.1.1.3.1 DC-Analyse

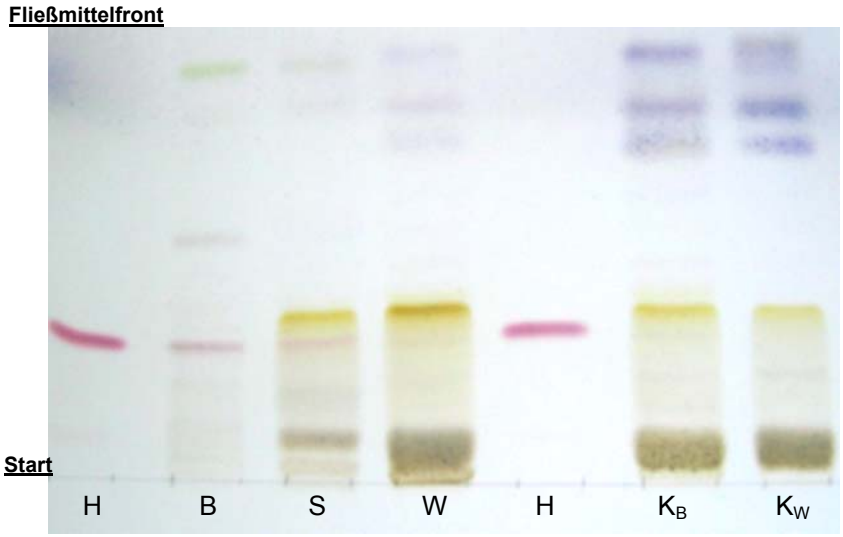

Abb. 3.7 DC verschiedener methanolischer Extrakte der *in vitro* Kulturen von *H. procumbens*:

H: Harpagosid

B: Blätter *in vitro* Pflanzen

S: Stängel *in vitro* Pflanzen

W: Wurzeln *in vitro* Pflanzen

K_B: Blattkallus

K_W: Wurzelkallus

Fließmittel: Ethylacetat/Wasser/MeOH (77/15/7)
Detektion: Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, Auswertung bei Tageslicht

Harpagosid wurde anhand der beschriebenen Methode als rote Bande in der untere Hälfte des Chromatogramms detektiert (R_f-Wert 0,32). Abbildung 3.7 zeigt als Beispiel das Chromatogramm der methanolischen Blatt-, Stängel- und Wurzelextrakte der *in vitro* Pflanzen von *H. procumbens* sowie der Kalluskulturen. Harpagosid konnte als schwache rote Bande im Blatt- und Stängelextrakt detektiert werden.

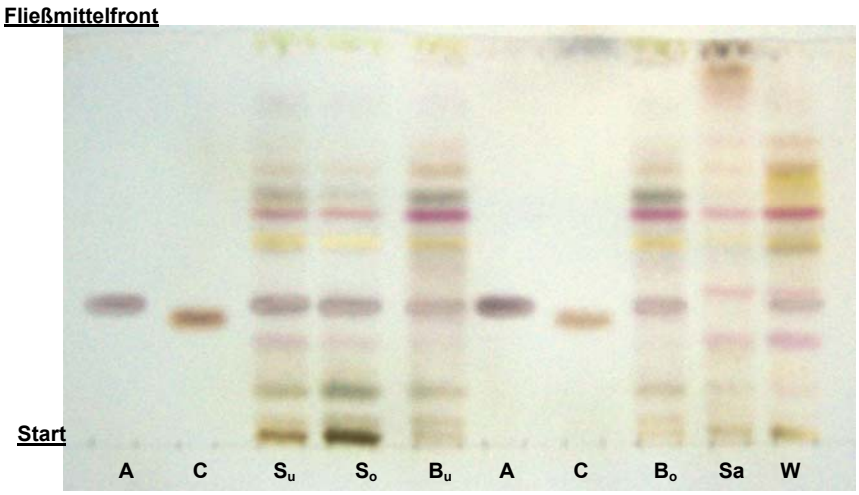

Abb. 3.8 DC verschiedener methanolischer Extrakte intakter Pflanzen von *S. nodosa* (09.2004):

A: Aucubin
C: Catalpol
S_u: unterer Stängel
S_o: oberer Stängel
B_u: untere Blätter
B_o: obere Blätter
Sa: Samen
W: Wurzel

Fließmittel: Ethylacetat/Essigsäure/H_2O (60/20/20)
Detektion: Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, Auswertung bei Tageslicht

Aucubin wurde in der unteren Hälfte des Chromatogramms als lila-braune Bande (R_f-Wert 0,33) direkt oberhalb der Bande von Catalpol (R_f-Wert 0,29) detektiert. Die Catalpol-Bande wies eine braune Färbung auf. Abbildung 3.8 zeigt den Aucubinnachweis in Extrakten aus dem Material intakter Pflanzen von *S. nodosa*. Der Catalpolnachweis war für alle aufgetragene Extrakte negativ.

3.1.1.3.2 Harpagosidgehalt der *in vitro* Pflanzen von *H. procumbens*

Phytochemische Analyse

Die Identifizierung und Quantifizierung von Harpagosid in den *in vitro* Pflanzen von *H. procumbens* erfolgte mit LC-ESI-MS und HPLC (Abb. 3.9 und 3.10).

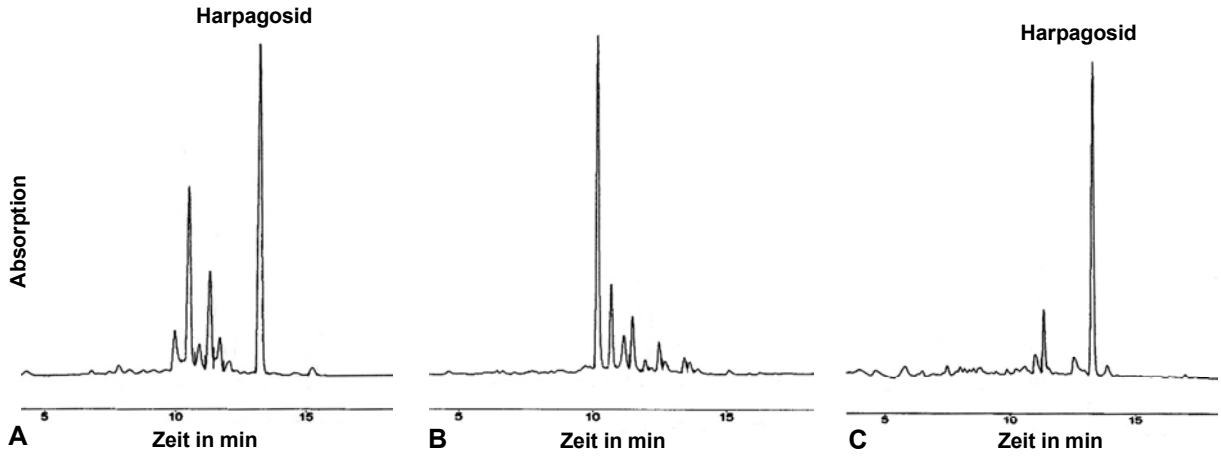

Abb. 3.9 Detektion von Harpagosid (13.2 min, 280 nm) in Wurzeldroge (Harpagophyti radix) (**A**) von *H. procumbens*, Wurzeln (**B**) und Blättern (**C**) der *in vitro* Pflanzen; andere Peaks repräsentieren weitere Inhaltsstoffe, die nicht identifiziert wurden.

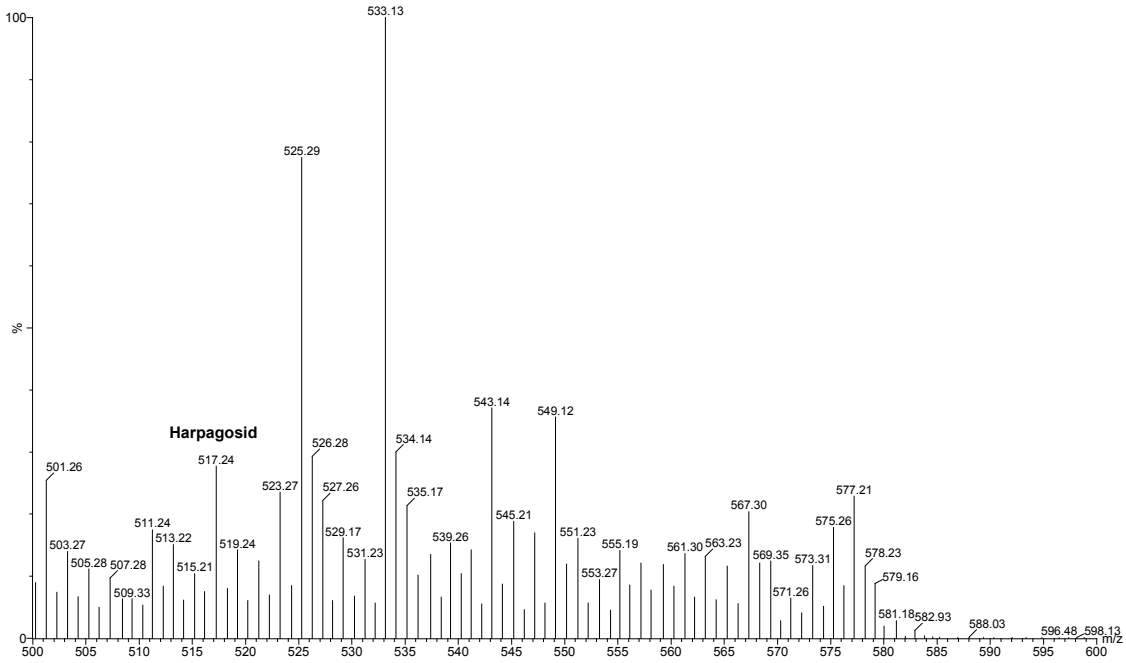

Abb. 3.10 LC-ESI-MS Spektrum eines *Harpagophytum*-Blattextraktes; Harpagosid 517 m/z $[M+Na]^+$.

***H. procumbens* - Gehalt an Iridoidglykosiden**

Bei *H. procumbens* wurden in der gesamten Pflanze lediglich 0,37 % Harpagosid detektiert. Am höchsten war der Gehalt mit 0,22 % in den Stängeln. In den Blättern waren 0,14 % zu finden und in den Wurzeln 0,01 %. In Abb. 3.11 sind die Konzentrationen an Harpagosid in den verschiedenen Organen der *in vitro* Pflanzen von *H. procumbens* und *S. nodosa* im Vergleich dargestellt. In Blättern, Stängeln und Wurzeln von *S. nodosa* ließen sich insgesamt 0,58 % Harpagosid nachweisen. Der Gehalt war im Gegensatz zu *H. procumbens* in den Blättern am höchsten und wie dort auch in den Wurzeln am niedrigsten. Der Harpagosidgehalt für die kommerzielle Harpagophytum-Droge lag zwischen 0,75 ± 0,24 % (Fa. Parceval) und 1,08 ± 0,17 % (Fa. Caelo).

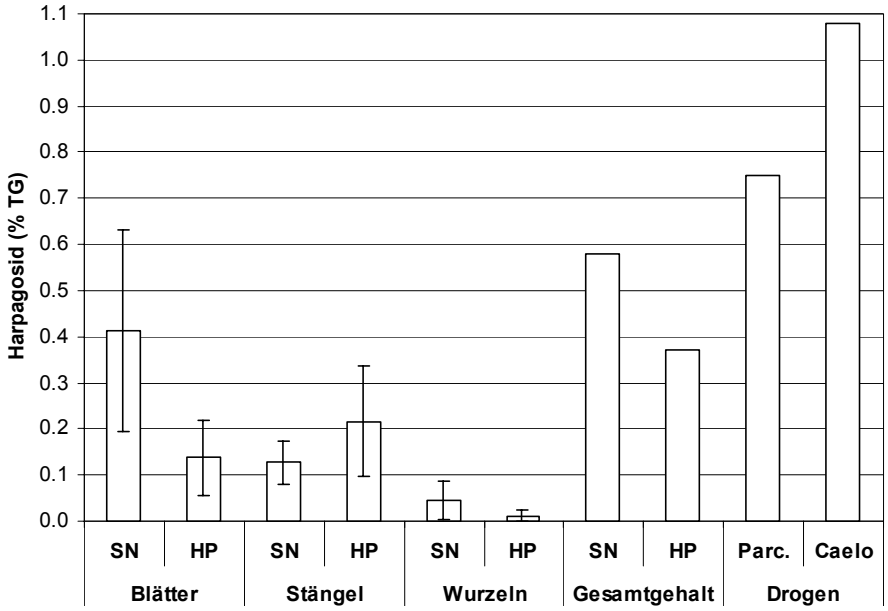

Abb. 3.11 Vergleich des Harpagosidgehaltes der *in vitro* Pflanzen von *H. procumbens* (HP) und *S. nodosa* (SN); HP n = 14, SN n = 20, Droge n = 4; Balken geben die Standardabweichung an; Drogen: Wurzeldroge von *H. procumbens* (Parc. = Fa. Parceval).

3.1.1.3.3 Harpagosid-, Aucubin- und Catalpolgehalt der *in vitro* Pflanzen von *S. nodosa*

Phytochemische Analyse

In den Pflanzen von *S. nodosa* ließen sich Harpagosid und Aucubin nachweisen. Catalpol war lediglich in den Blättern in Spuren zu finden. Die in den *in vitro* kultivierten Pflanzen gefundenen Werte an Iridoidglykosiden wurden mit denjenigen von intakten Pflanzen, die im Juli gesammelt worden waren, verglichen. Auch hier erfolgte die Identifizierung und Quantifizierung von Harpagosid, Aucubin und Catalpol mit LC-ESI-MS und HPLC (Abb. 3.12 und 3.13).

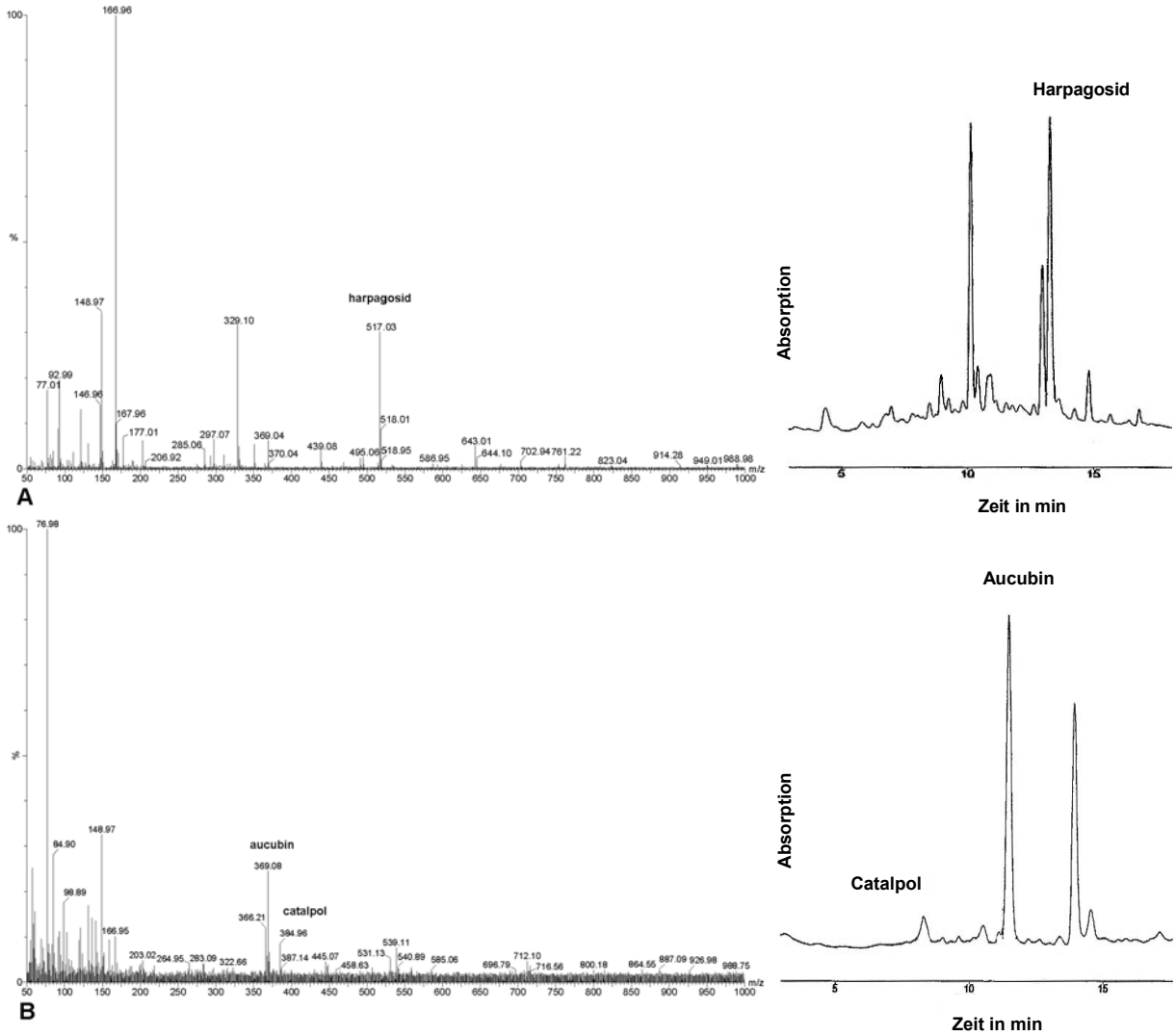

Abb. 3.12 A Harpagosidnachweis, **B** Aucubin- und Catalpolnachweis in einem *S. nodosa* Blattextrakt (*in vitro* Kultur) anhand der MS-Spektren und Chromatogramme.

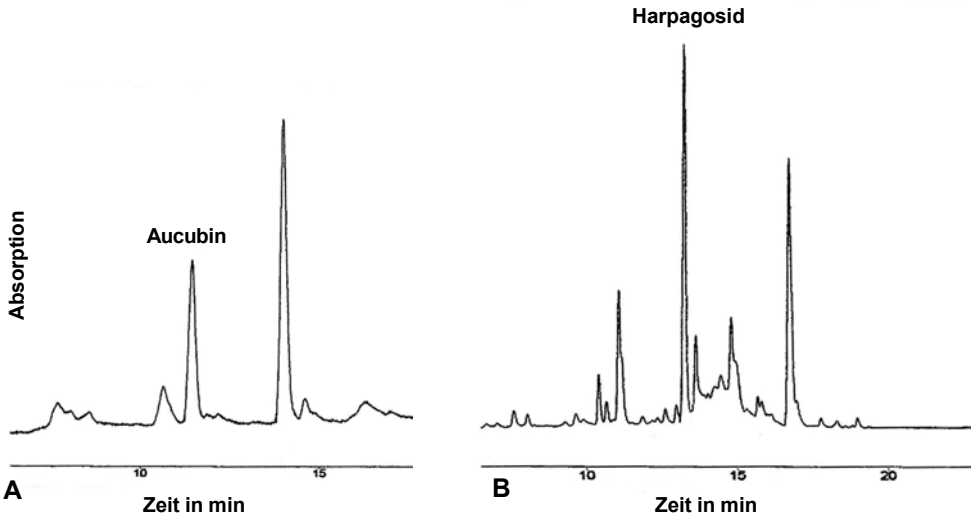

Abb. 3.13 Detektion von (**A**) Aucubin (11.5 min, 204 nm, Gradient 2) und (**B**) Harpagosid (13.2 min, 280 nm, Gradient 1) in den Blüten der *in vitro* Pflanzen von *S. nodosa*; andere Peaks repräsentieren weitere Inhaltsstoffe, die nicht identifiziert wurden.

S. nodosa - Gehalt an Iridoidglykosiden

Die detektierbare Konzentration an Iridoidglykosiden betrug 4,88 % für die intakten Pflanzen und 4,36 % für die *in vitro* kultivierten Pflanzen von *S. nodosa* (Tab. 3.2). Bei den *in vitro* Pflanzen war Aucubin mit 2,68 % in der gesamten Pflanze das häufigste Iridoidglykosid. Im Gegensatz dazu war Harpagosid mit 2,95 % am stärksten in den intakten Pflanzen vertreten. Die genaue Verteilung Aucubin und Harpagosid in den einzelnen Geweben können Abbildung 3.14 entnommen werden.

Tab. 3.2 Vergleich der Konzentration an Iridoidglykosiden in intakten und *in vitro* Pflanzen von *S. nodosa*; Mittelwerte (*in vitro* n = 20, intakt n = 7) ausgedrückt in % TG ± Standardabweichung.

	Harpagosid		Aucubin		Catalpol	
	intakt	***in vitro***	**intakt**	***in vitro***	**intakt**	***in vitro***
Blätter	1.05 ± 0.50	0.41 ± 0.22	0.43 ± 0.26	1.67 ± 0.76	in Spuren	in Spuren
Blüten	1.03 ± 0.34	1.10 ± 0.28	0.41 ± 0.36	0.39 ± 0.20	in Spuren	0
Stängel	0.08 ± 0.05	0.13 ± 0.05	0.65 ± 0.31	0.57 ± 0.36	in Spuren	0
Wurzeln	0.79 ± 0.25	0.04 ± 0.04	0.44 ± 0.33	0.05 ± 0.09	in Spuren	0
Detektierbare Iridoide	2.95	1.68	1.93	2.68	-	-

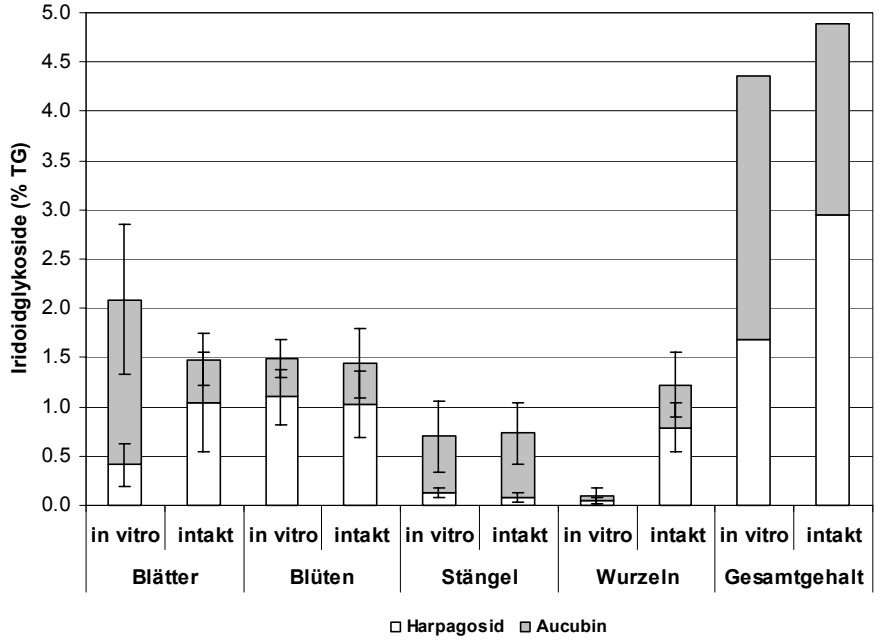

Abb. 3.14 Gehalt der Iridoidglykoside Harpagosid und Aucubin in den verschiedenen Organen von *in vitro* und intakten Pflanzen (gesammelt Juli 2004) von *S. nodosa*. Alle Werte sind Mittelwerte (in vitro n = 20, intakt n = 7) berechnet als % TG, Balken geben die Standardabweichung an.

Beim Vergleich der Aucubingehalte in den *in vitro* Pflanzen von *S. nodosa* und *P. lanceolata* (Abb. 3.15) wurden annähernd gleiche Werte in den verschiedenen Organen detektiert. Mit etwas über 1,5 % war die Aucubinkonzentration in den Blättern am höchsten, während die Blüten und insbesondere die Wurzeln nur geringe Konzentrationen aufwiesen.

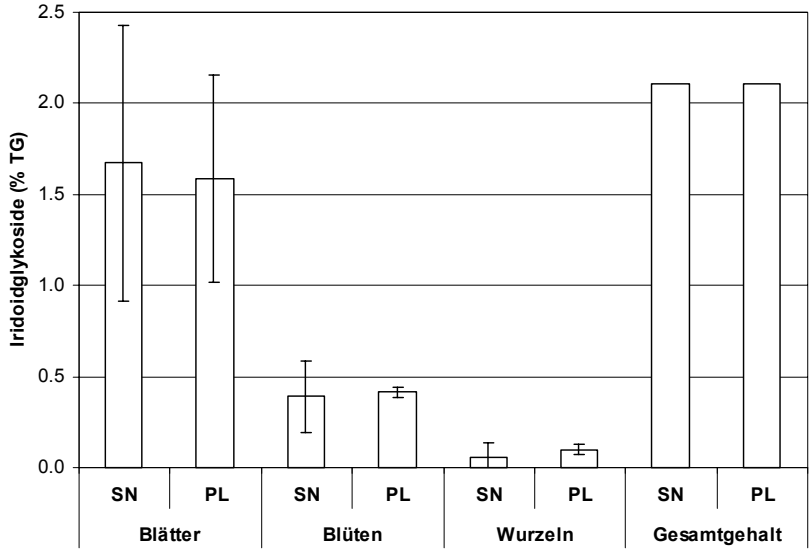

Abb. 3.15 Vergleich des Aucubingehaltes in Blättern, Blüten und Wurzeln der *in vitro* Pflanzen von *S. nodosa* (SN) und *P. lanceolata* (PL); alle Werte sind Mittelwerte (SN n = 20, PL n = 11 (Blüten n = 2)) berechnet als % TG, Balken geben die Standardabweichung an.

3.1.1.3.4 Verlauf des Iridoidglykosidgehaltes in intakten Pflanzen von *S. nodosa* während der Wachstumsperiode

Phytochemische Analyse

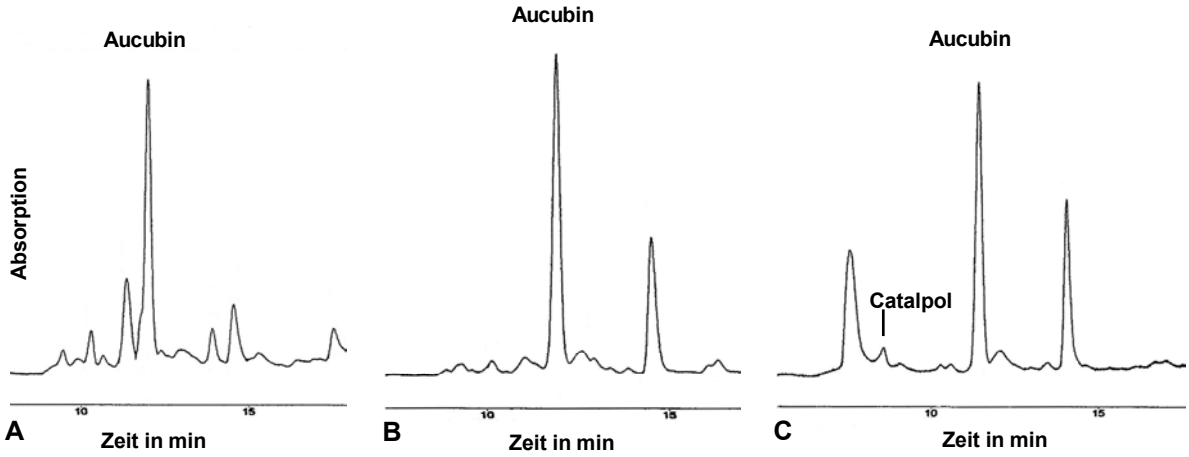

Abb. 3.16 Detektion von Catalpol und Aucubin (8.4 bzw. 11.5 min, 204 nm, Gradient 2) in Blättern (**A**), Stängeln (**B**) und Wurzeln (**C**) in intakten Pflanzen von *S. nodosa*; andere Peaks repräsentieren weitere Inhaltsstoffe, die nicht identifiziert wurden.

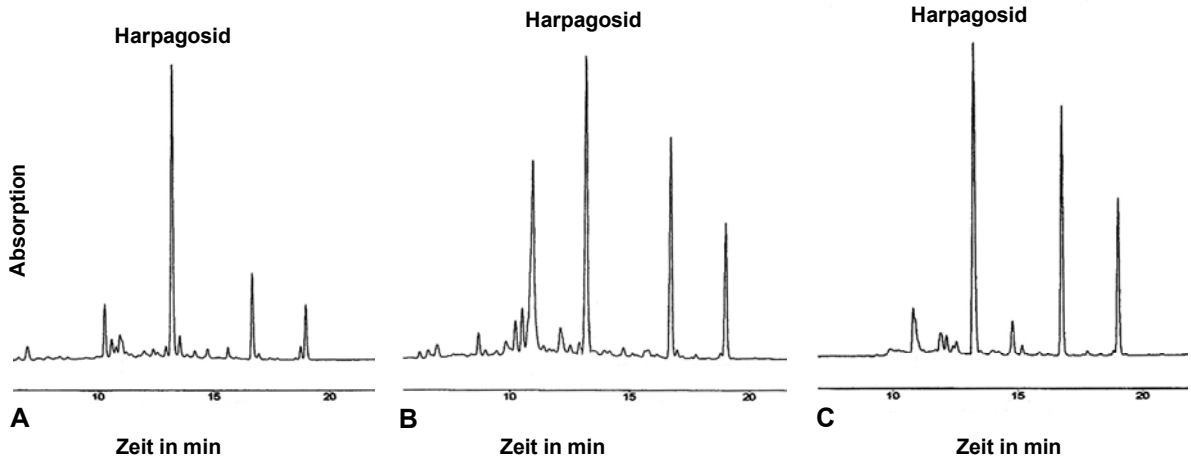

Abb. 3.17 Detektion von Harpagosid (13.2 min, 280 nm, Gradient 1) in Blättern (**A**), Stängeln (**B**) und Wurzeln (**C**) in intakten Pflanzen von *S. nodosa*; andere Peaks repräsentieren weitere Inhaltsstoffe, die nicht identifiziert wurden.

S. nodosa - Gehalt an Iridoidglykosiden

Die Untersuchung der Variation der Iridoidglykoside in intakten Pflanzen von *S. nodosa* zeigte von Juni bis August eine ansteigende Konzentration an Harpagosid und Aucubin (Abb. 3.18). Im August wurde eine maximale Konzentration von 5,97 % (3,43 % Harpagosid und 2,54 % Aucubin) in der gesamten Pflanze erreicht. Im September fiel der Iridoidglykosidgehalt leicht ab und erreichte im Oktober sein absolutes Minimum. Hier wurde in den Pflanzen auch weniger Harpagosid als Aucubin detektiert; in allen anderen Monaten dominierte Harpagosid.

Die im Juni gesammelten Pflanzen blühten fast alle und wiesen nur wenige Fraßspuren auf. Von Juli bis September nahmen die Fraßspuren etwas zu, waren aber erst im Oktober sehr auffällig. Ab August waren neben Blüten zahlreiche reife Samenkapseln an den Pflanzen zu finden und im Oktober waren nur noch reife Samenkapseln vorhanden. Die Größe der gesammelten Pflanzen variierte zwischen 70 bis 100 cm.

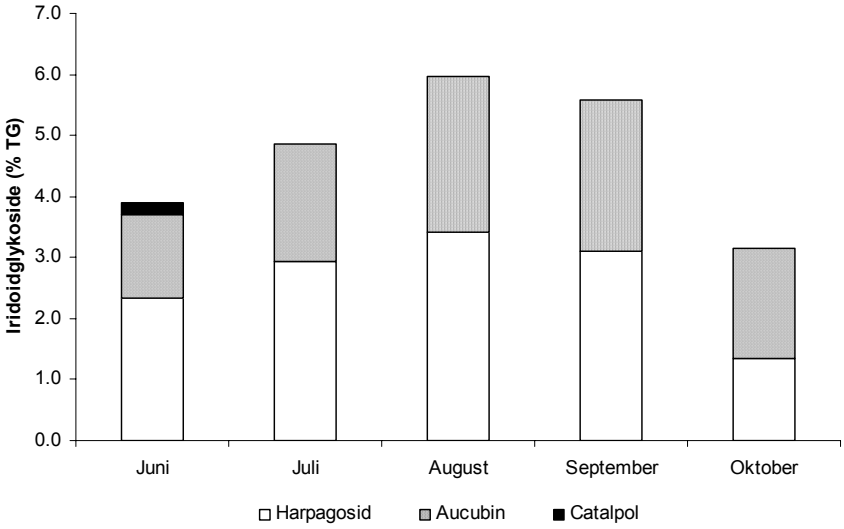

Abb. 3.18 Verlauf des Iridoidglykosidgehaltes intakter *S. nodosa* Pflanzen von Juni bis Oktober; die Werte stellen die Gesamtwerte für die ganze Pflanze dar und wurden aus den monatlich gemittelten Konzentrationen an Iridoidglykosiden in den verschiedenen Pflanzenorganen berechnet, daher ohne Angabe einer Standardabweichung.

In Abbildung 3.19 wurden die Anteile an Harpagosid und Aucubin am Gesamtiridoidgehalt für jeden Monat dargestellt. Catalpol wurde bei dieser Darstellung nicht berücksichtigt, da es lediglich im Juni und Juli in geringen Mengen und eher sporadisch nachgewiesen werden konnte. Die genauen Werte sind Tabelle 3.3 zu entnehmen. Anhand der Darstellung wird deutlich, dass Harpagosid im Vergleich zu Aucubin mengenmäßig vorherrschend und hauptsächlich in Wurzeln, Blättern und Blüten/Samenkapseln vertreten war. Der Harpagosidgehalt in den Stängeln variierte nur leicht über die Monate und war im Vergleich mit den anderen Organen am geringsten. Diese mengenmäßige Verteilung an Harpagosid in den verschiedenen Organen blieb über die gesamte Wachstumsperiode abgesehen von kleineren Schwankungen relativ konstant.

Bei der Verteilung von Aucubin in den verschiedenen Pflanzenorganen zeigte sich im Juni und Juli der höchste Anteil in den Stängeln. Dieser Anteil blieb auch in den folgenden Monaten etwa konstant, jedoch war hier etwas mehr Aucubin in den Blättern und z. T. auch in den Wurzeln zu finden. In Blüten und Samenkapseln war ab August nur noch eine sehr geringe Menge an Aucubin detektierbar.

Tab. 3.3 Verlauf des Iridoidglykosidgehaltes in den verschiedenen Geweben intakter Pflanzen von *S. nodosa;* angegeben sind die Mittelwerte (n = 7) in % TG ± Standardabweichung; bei der Berechnung der detektierbaren Iridoide wurden die Samen nicht berücksichtigt, der Gehalt in Blättern und Stängeln wurde aus den Werten für den oberen und unteren Bereich gemittelt.

	Harpagosid					Aucubin					Catalpol				
	Juni	**Juli**	**August**	**September**	**Oktober**	**Juni**	**Juli**	**August**	**September**	**Oktober**	**Juni**	**Juli**	**August**	**September**	**Oktober**
Blätter unten	0,42 ± 0,16	0,95 ± 0,58	1,07 ± 0,41	1,04 ± 0,33	0,27 ± 0,26	0,21 ± 0,10	0,46 ± 0,28	0,97 ± 0,51	0,98 ± 0,26	0,63 ± 0,32	0,03 ± 0,03	in Spuren	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Blätter oben	1,02 ± 0,60	1,14 ± 0,44	1,47 ± 0,54	1,66 ± 0,24	0,51 ± 0,60	0,21 ± 0,07	0,39 ± 0,26	0,87 ± 0,47	1,03 ± 0,42	0,73 ± 0,32	0,05 ± 0,05	in Spuren	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Blüten/ Samenkapseln	0,74 ± 0,14	1,03 ± 0,34	0,77 ± 0,41	0,39 ± 0,24	0,15 ± 0,17	0,21 ± 0,11	0,41 ± 0,36	0,08 ± 0,07	0,06 ± 0,08	0,04 ± 0,07	0,08 ± 0,05	in Spuren	in Spuren	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Samen	-	-	0,51 ± 0,44	0,17 ± 0,05	0,00 ± 0,00	-	-	0,17 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Stängel unten	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,03	0,14 ± 0,10	0,23 ± 0,10	0,08 ± 0,06	0,55 ± 0,16	0,70 ± 0,32	0,61 ± 0,15	0,72 ± 0,15	0,52 ± 0,30	0,05 ± 0,04	in Spuren	in Spuren	in Spuren	in Spuren
Stängel oben	0,12 ± 0,05	0,10 ± 0,05	0,18 ± 0,14	0,35 ± 0,17	0,11 ± 0,07	0,67 ± 0,24	0,61 ± 0,31	0,79 ± 0,15	0,70 ± 0,21	0,62 ± 0,13	0,07 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	in Spuren	in Spuren
Wurzeln	0,79 ± 0,27	0,79 ± 0,25	1,23 ± 0,45	1,08 ± 0,20	0,73 ± 0,23	0,34 ± 0,29	0,44 ± 0,33	0,84 ± 0,21	0,70 ± 0,39	0,52 ± 0,36	0,01 ± 0,01	in Spuren	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Detektierbare Iridoide	2,34	2,95	3,43	3,11	1,37	1,37	1,94	2,54	2,48	1,81	0,19	-	-	-	-

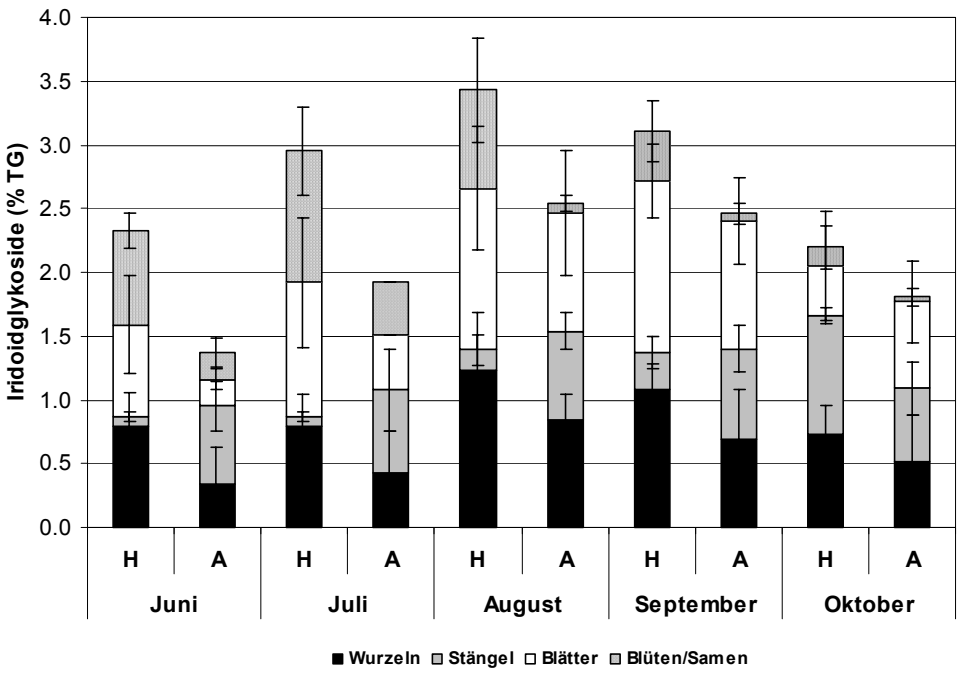

Abb. 3.19 Variation der Aucubin- (A) und Harpagosidkonzentration (H) intakter Pflanzen von *S. nodosa* während der Wachstumsphase; Balken repräsentieren die Standardabweichung, n = 7.

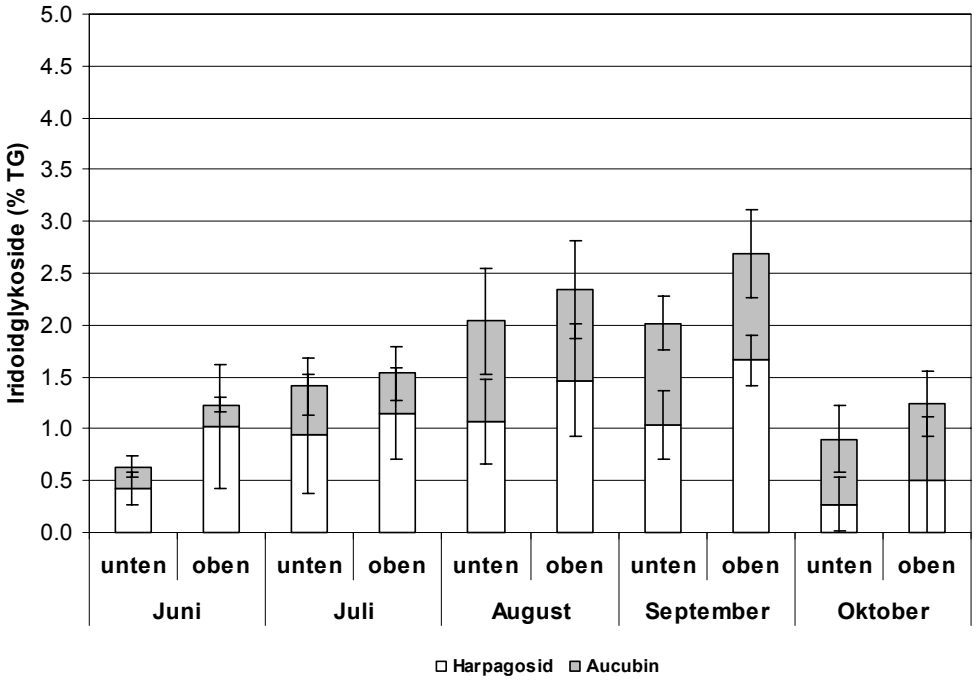

Abb. 3.20 Variation der Aucubin- und Harpagosidkonzentration in den Blättern intakter Pflanzen von *S. nodosa* während der Wachtumsphase, Teilung in der Mitte der Sprossachse; Balken repräsentieren die Standardabweichung, n = 7.

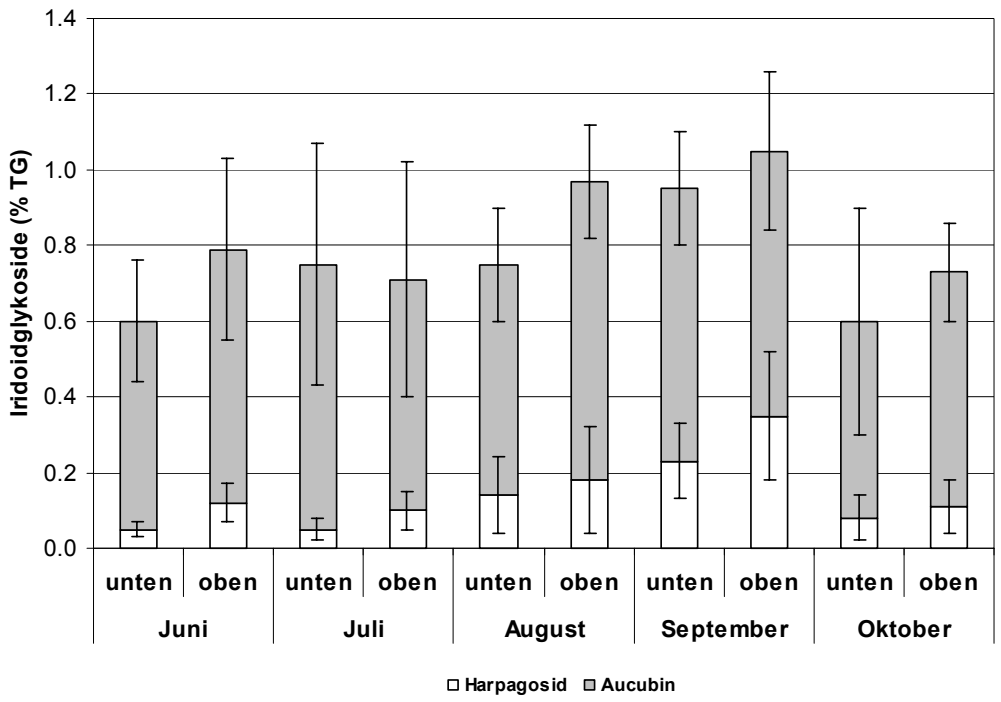

Abb. 3.21 Variation der Aucubin- und Harpagosidkonzentration in oberen und unteren Stängelabschnitten intakter Pflanzen von *S. nodosa* während der Wachstumsphase; Balken repräsentieren die Standardabweichung, n = 7.

Beim Vergleich der Konzentrationen von Aucubin in den oberen und unteren Sprossabschnitten zeigte sich für die oberen Stängel eine etwas erhöhte Konzentration an Aucubin (Abb. 3.21). Für Harpagosid zeigte sich in den oberen Stängelabschnitten gegenüber den unteren Bereichen eine wesentlich stärkere Konzentration. Bei den Blättern spiegelte sich dieses Verteilungsmuster ebenfalls wider wie aus Abbildung 3.20 ersichtlich wird.

3.1.1.3.5 Aucubin- und Catalpolgehalt in *in vitro* und intakten Pflanzen von *P. lanceolata*

Phytochemische Analyse

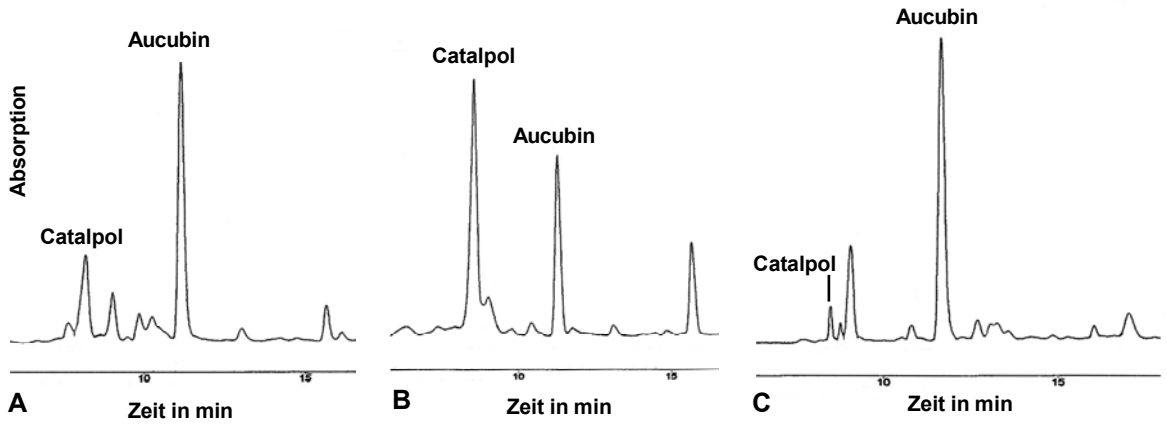

Abb. 3.22 Detektion von Catalpol und Aucubin (8.4 bzw. 11.5 min, 204 nm, Gradient 2) in Blättern von (**A**) *in vitro* Pflanzen, (**B**) intakten Pflanzen von *P. lanceolata* und (**C**) Plantaginis lanceolatae herba (Spitzwegerichkraut); andere Peaks repräsentieren weitere Inhaltsstoffe, die nicht identifiziert wurden.

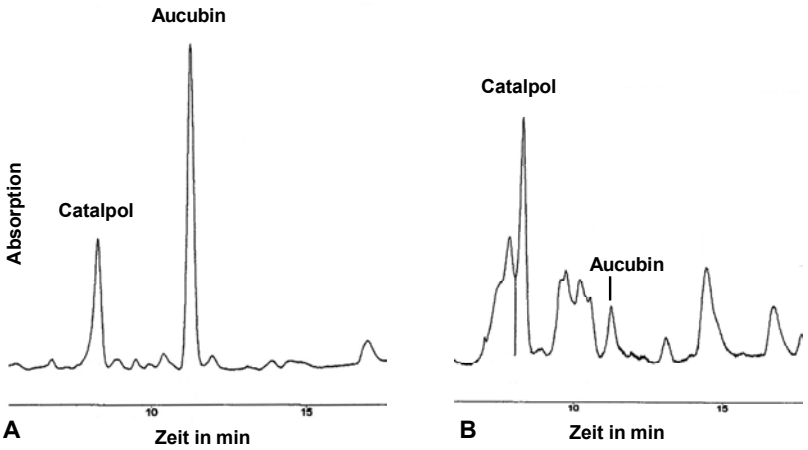

Abb. 3.23 Detektion von Catalpol und Aucubin (8.4 bzw. 11.5 min, 204 nm, Gradient 2) in Wurzeln (**A**) und Blüten (**B**) intakter Pflanzen von *P. lanceolata*; andere Peaks repräsentieren weitere Inhaltsstoffe, die nicht identifiziert wurden.

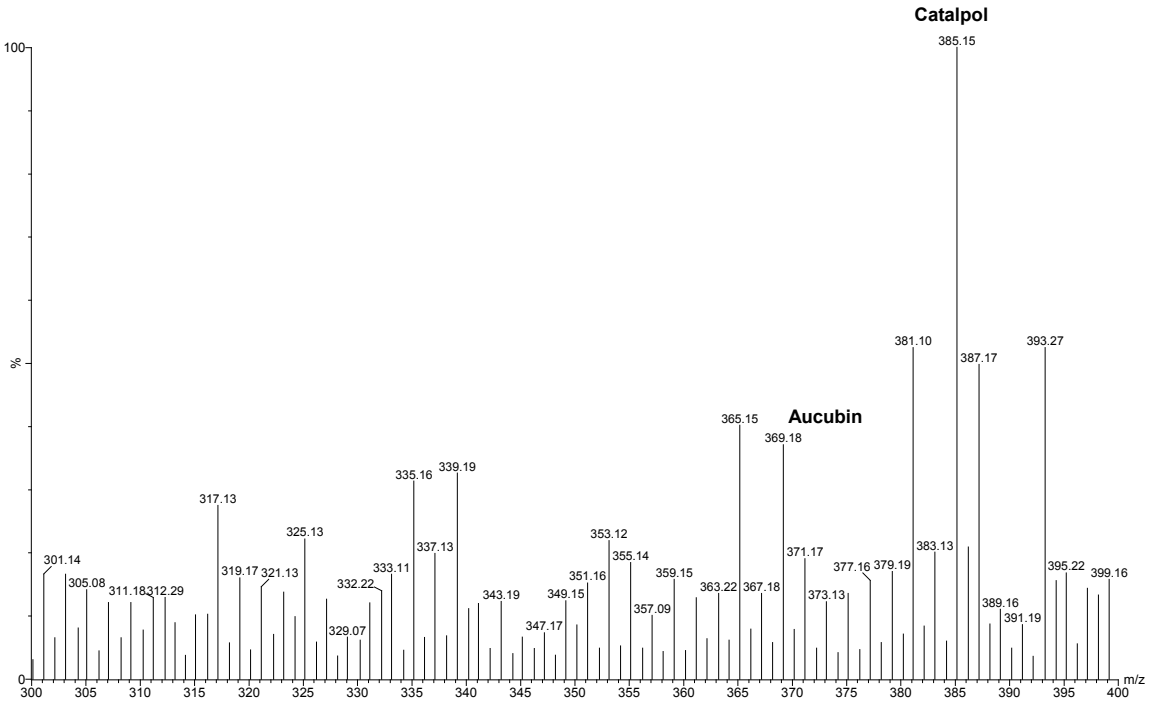

Abb. 3.24 LC-ESI-MS Spektrum eines Blattextaktes von *P. lanceolata*; Aucubin 369 m/z $[M+Na]^+$, Catalpol 385 m/z $[M+Na]^+$.

***P. lanceolata* - Gehalt an Iridoidglykosiden**

Der Aucubingehalt für die kommerzielle Plantago-Droge lag zwischen 1,70 ± 0,01 % (Fa. Alnatura) und 0,75 ± 0,02 % (Fa. Caelo). An Catalpol wurden 0,11 % (Fa. Alnatura) und 0,16 % (Fa. Caelo) detektiert. Bei allen Werten handelt es sich um Doppelbestimmungen.

Für die Blätter der *in vitro* Pflanzen lag insgesamt der höchste Gehalt an Aucubin und Catalpol vor (Abb. 3.25). Der höchste Catalpolgehalt wurde in den Blättern der intakten Pflanzen gefunden, der höchste Aucubingehalt in den Blättern der *in vitro* Pflanzen. Bei den intakten Pflanzen dominierte zum Sammelzeitpunkt Mai Catalpol in den Blättern und Blüten. In den Wurzeln der *in vitro* Pflanzen wurde der geringste Gehalt an Iridoidglykosiden gefunden und es konnte lediglich Aucubin detektiert werden.

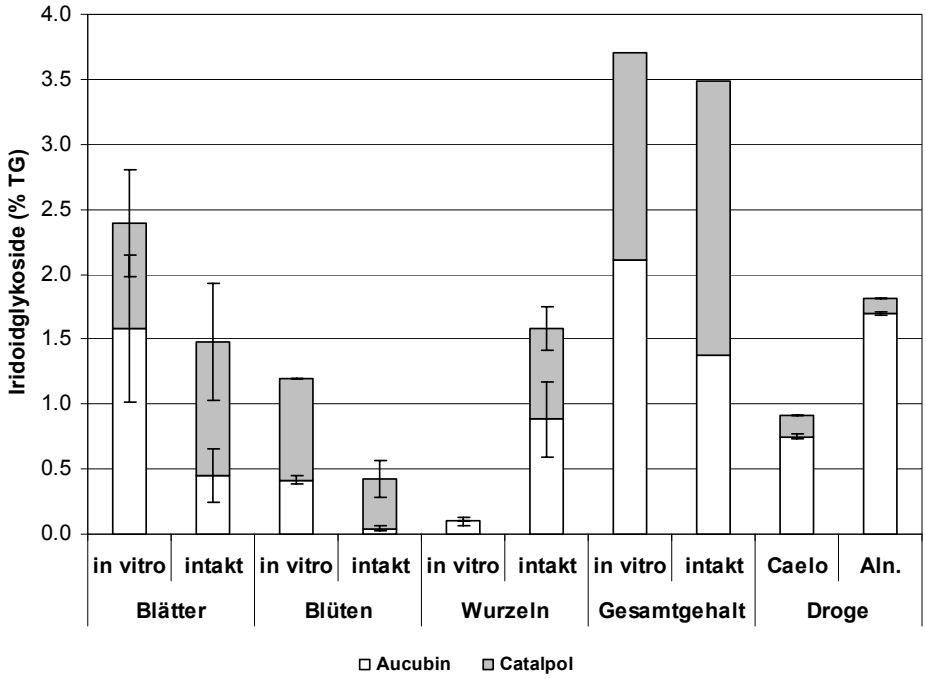

Abb. 3.25 Vergleich des Iridoidglykosidgehaltes in *in vitro* und intakten Pflanzen (gesammelt Mai 2006) von *P. lanceolata*; alle Werte sind Mittelwerte (in vitro n = 11, Blüten n = 2; intakt n = 6, Einzelwerte stammen aus Doppelbestimmungen) berechnet als % TG, Balken geben die Standardabweichung an; Droge: Blattdroge von *P. lanceolata* (Aln. = Fa. Alnatura).

Beim Vergleich der Iridoidglykoside in verschiedenen intakten *Plantago*-Arten zum selben Sammelzeitpunkt zeigten sich deutlich Unterschiede bei der Verteilung von Aucubin und Catalpol in den verschiedenen Organen. Die genauen Werte sind in Tabelle 3.4 wiedergegeben. Lediglich *P. lanceolata* wies in allen Organen einen großen und z. T. überwiegenden Anteil an Catalpol auf. In *P. media* wurde geringe

Mengen an Catalpol in Blättern und Blüten detektiert. *P. major* dagegen enthielt kein Catalpol. Hier wurde auch für die Wurzeln im Vergleich zu den anderen Arten die höchste Konzentration an Aucubin gefunden. Bei den Blüten wies *P. media* mit Abstand den größten Aucubingehalt auf und ebenso bei den Blättern.

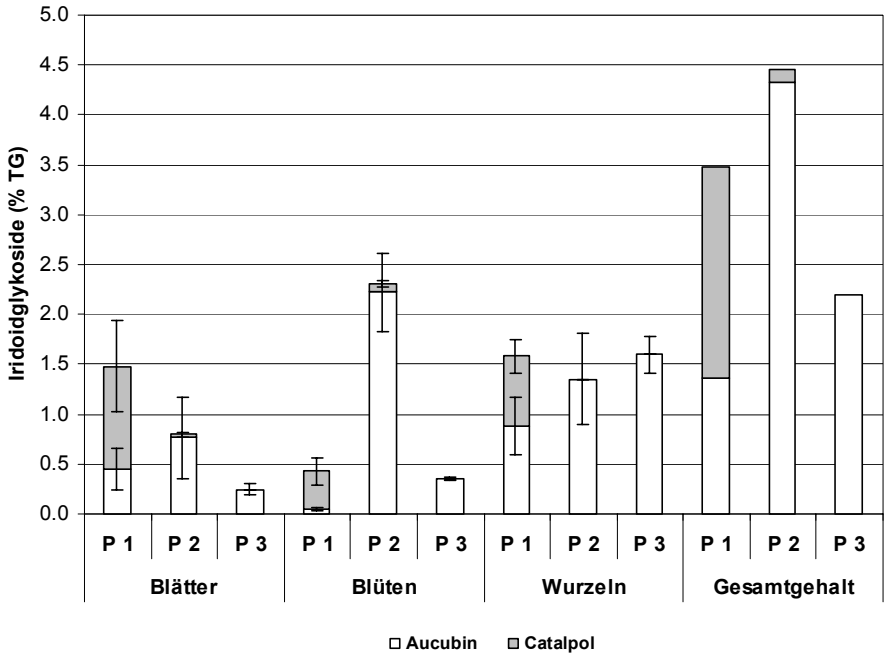

Abb. 3.26 Vergleich des Iridoidglykosidgehaltes in verschiedenen *Plantago*-Arten (intakte Pflanzen); P 1 = *P. lanceolata*, P 2 = *P. media*, P 3 = *P. major*; n = 12 gesammelt Mitte Mai 2006, Blüten *P. major* Juni 2006.

Tab. 3.4 Iridoidglykosidgehalt in *in vitro* kultivierten Pflanzen von *P. lanceolata* und in verschiedenen *Plantago* Arten; *P. lanceolata* (P 1), *P. media* (P 2) und *P. major* (P 3) gesammelt Mai 2006; Mittelwerte in vitro n = 11 (Blüten n = 2), intakt n = 6 (Einzelwerte aus Doppelbestimmungen) (Blüten P 3 = 2) ausgedrückt in % TG ± Standardabweichung.

	Aucubin				Catalpol			
	in vitro	**P1**	**P 2**	**P 3**	**in vitro**	**P1**	**P 2**	**P 3**
Blätter	1,59 ± 0,57	0,45 ± 0,21	0,76 ± 0,40	0,24 ± 0,06	0,81 ± 0,41	1,03 ± 0,45	0,03 ± 0,03	0,00 ± 0,00
Blüten	0,42 ± 0,03	0,04 ± 0,02	2,22 ± 0,39	0,35 ± 0,01	0,78 ± 0,00	0,38 ± 0,14	0,09 ± 0,03	0,00 ± 0,00
Wurzeln	0,10 ± 0,03	0,88 ± 0,29	1,35 ± 0,46	1,60 ± 0,19	0,00 ± 0,00	0,70 ± 0,17	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Detektierbare Iridoide	2,11	1,37	4,33	2,19	1,59	2,11	0,12	0,00

3.1.1.4 Beeinflussung der Sekundärstoffproduktion in *in vitro* Pflanzen durch Elicitierung mittels Methyljasmonat (MJ)

Phytochemische Analyse

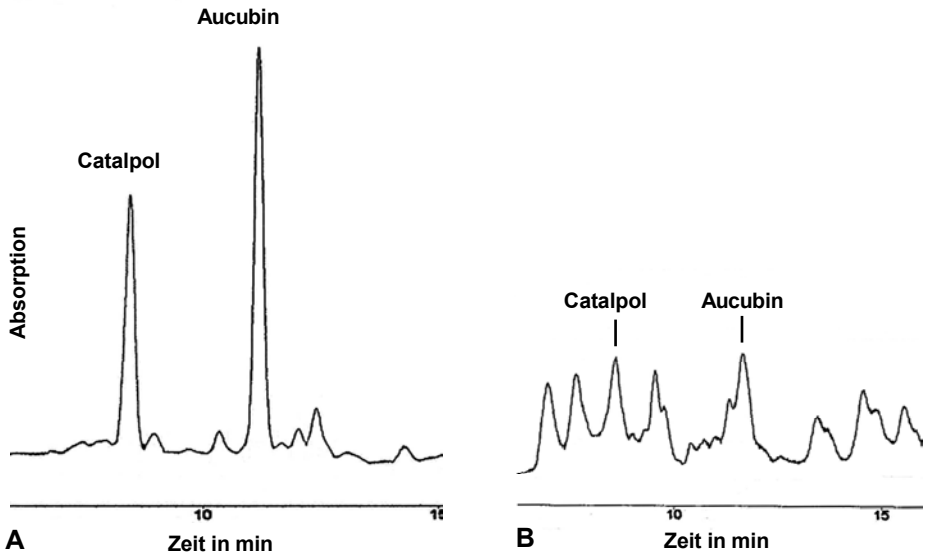

Abb. 3.27 Detektion von Catalpol und Aucubin (8.4 bzw. 11.5 min, 204 nm, Gradient 2) nach Elicitierung mit MJ in Blättern (**A**) und Wurzeln (**B**) der *in vitro* Pflanzen von *P. lanceolata*; andere Peaks repräsentieren weitere Inhaltsstoffe, die nicht identifiziert wurden.

***P. lanceolata* - Gehalt an Iridoidglykosiden nach Elicitierung**

Die 24 h nach Elicitierung ermittelten Gehalte an Aucubin und Catalpol waren in den Blättern der behandelten Pflanzen niedriger als in den unbehandelten Kontrollpflanzen (Abb. 3.28). Lediglich bei einer Konzentration von 200 µM und reinem MeOH lag der Catalpolgehalt etwas über dem der Kontrolle.

Für die Wurzeln zeigte sich nach Behandlung mit MJ zwar eine niedrigere Konzentration an Aucubin im Vergleich zu Kontrolle und reinem MeOH, dafür konnte aber Catalpol im Gegensatz zur Kontrolle in allen Wurzelproben nachgewiesen werden. Die höchste Catalpolkonzentration wurde nach Zugabe von 50 µM MJ erreicht und bereits MeOH induzierte eine Erhöhung des Catalpolgehaltes.

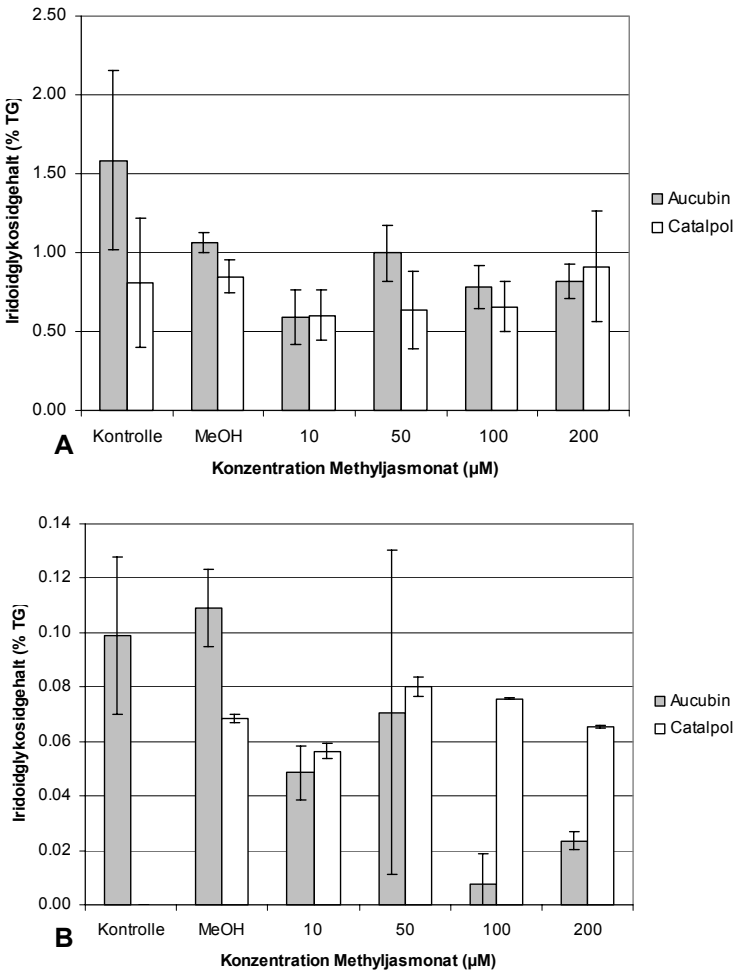

Abb. 3.28 Einfluss von MJ auf den Aucubin- und Catalpolgehalt in Blättern (**A**) und Wurzeln (**B**) der *in vitro* Pflanzen von *P. lanceolata;* Kontrolle: unbehandelte Pflanzen; schwarze Balken stellen die Standardabweichung dar; Wurzeln: n = 2, Blätter: n = 5 - 7.

3.1.2 Kalluskulturen

Bei allen drei Pflanzen erwies sich die Kombination von 0,1 mg/l Kinetin und 0,5 mg/l 2,4-D zur Kallusinduktion und ebenfalls zum Wachstum der Kalli geeignet. Lediglich die Grundmedien unterschieden sich und bei *P. lanceolata* entwickelte sich erst Kallus, wenn dem MS-Medium kein Ammoniumnitrat (NH_4NO_3) zugefügt wurde wie bei Budzianowska et al. (2004) beschrieben.

Abb. 3.29 Bildung von Wundgewebe (Kallus) an Blattstücken von *S. nodosa.*

Anhand von Abbildung 3.30 wird die Verschiedenartigkeit der Kalli deutlich. Bei *S. nodosa* war der Kallus grün gefärbt und zeigte eine festere, bröckelige Struktur.

Der bräunlich gefärbte Kallus von *H. procumbens* zeigte eine lose und eher wässrige Struktur wie auch der Kallus von *P. lanceolata.*

Abb. 3.30 Entwicklung der Kalluskulturen; links: Kallus *S. nodosa* grün, Mitte: *H. procumbens*, rechts: *P. lanceolata*.

Die Wachstumsindices der Kalluskulturen sind in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben.

Tab. 3.5 Wachstumsraten der verschiedenen Kalluskulturen über 3 Passagen.

Passage	Blattkallus	Wurzelkallus
H. procumbens	n = 4	n = 4
1	2,09 ± 0,34	2,18 ± 0,31
2	2,87 ± 0,37	2,81 ± 0,95
3	2,79 ± 0,06	2,63 ± 0,74
S. nodosa	n = 3	n = 6
1	2,31 ± 1,01	1,59 ± 0,62
2	3,55 ± 2,12	2,49 ± 0,67
3	6,10 ± 4,35	3,11 ± 1,29
P. lanceolata	n = 4	n = 6
1	6,88 ± 0,49	7,11 ± 0,56
2	6,97 ± 0,46	7,02 ± 0,30
3	6,85 ± 0,75	7,95 ± 0,59

Am langsamsten wuchs der Kallus von *H. procumbens*. Nach 3 Wochen hatte sich in den meisten Fällen das Frischgewicht im Vergleich zur Einwaage bei Subkultivierung etwas mehr als verdoppelt. Der Kallus von *S. nodosa* zeigte mit zunehmendem Alter ein gesteigertes Wachstum, vor allem des Blattkallus. Vergleichsweise hoch war die Wachstumsrate des Kallus von *P. lanceolata*. Hier wurde innerhalb von 3 Wochen etwa die 7fache Menge des anfänglichen Frischgewichtes produziert.

Phytochemische Analyse

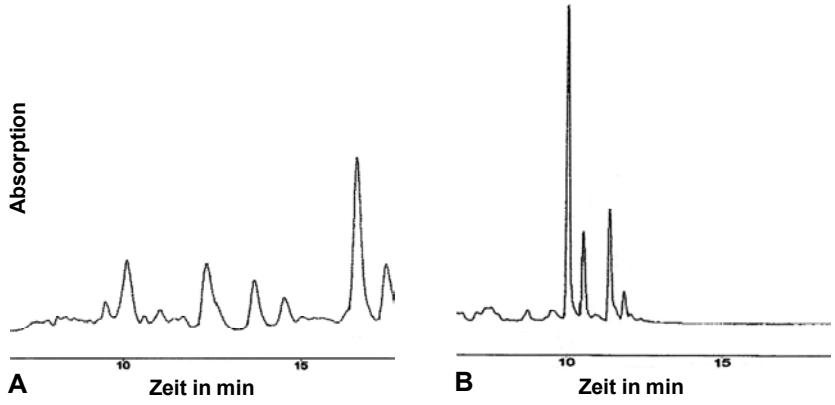

Abb. 3.31 Chromatogramme der Kalluskulturen von (**A**) *S. nodosa* (204 nm, Gradient 2) und (**B**) *H. procumbens* (280 nm, Gradient 1); Aucubin und Catalpol bzw. Harpagosid konnten nicht detektiert werden.

Gehalt an Iridoidglykosiden

In den Kallusproben aller drei Pflanzen konnten die Iridoidgykoside Harpagosid, Aucubin und Catalpol mit der angewandten HPLC-Methode nicht nachgewiesen werden.

3.1.3 Wurzelkulturen

3.1.3.1 Etablierung der Wurzelkulturen

Für *H. procumbens* erwies es sich als äußerst schwierig, Wurzelkulturen zu etablieren. Die meisten Wurzelstücke stellten ihr Wachstum nach kurzer Zeit ein oder die gewachsenen Wurzeln waren sehr weich und zerbröckelten beim Schneiden. Die wenigen Wurzelkulturlinien von *H. procumbens* (Abb. 3.32), die sich etablieren ließen, wiesen eine deutlich lockerere Struktur auf als diejenigen von *S. nodosa* oder *P. lanceolata*. Das Medium zeigte vor der Passage in frisches Medium nach 2 Wochen Kulturdauer eine deutliche Gelbfärbung (Abb. 3.32 rechts).

Abb. 3.32 Etablierung einer Wurzelkultur von *H. procumbens*; links: Wurzel frisch vom Spross abgetrennt in Flüssigmedium, Mitte: Wurzel nach 2 Monaten, rechts: nach 14tägiger Kulturdauer deutliche Gelbfärbung des Mediums.

Auch bei *S. nodosa* erwies sich die Etablierung von Wurzelkulturen aufgrund des langsamen Wachstums der abgetrennten Wurzelstücke als schwierig. Diejenigen, die sich etablieren ließen, wiesen eine feste Struktur auf und ließen sich problemlos subkultivieren. Eine Verfärbung des Mediums trat hier nicht auf.
Relativ einfach gestaltete sich dagegen die Etablierung der Wurzelkulturen von *P. lanceolata*. Die verschiedenen Linien zeigten alle ein sehr gutes Wachstum und ließen sich problemlos subkultivieren. Durch die schnelle Ausdifferenzierung der Wurzeln zu neuen Sprossen mussten die Kulturen allerdings im wöchentlichen Rhythmus umgesetzt und entsprechend geschnitten werden. Bereits zu diesem Kulturzeitpunkt zeigte sich auch eine deutliche Verbräunung des Mediums (Maillard-Reaktion).

Abb. 3.33 Wurzelkulturen von *H. procumbens* (links), *S. nodosa* (Mitte) und *P. lanceolata* (rechts).

3.1.3.2 Charakterisierung des Ausgangsmediums

Der Einfluss des Autoklavierens und des Zuckergehaltes auf den pH-Wert und die Leitfähigkeit des frischen Kulturmediums wurde untersucht. Weiterhin wurden die für das Medium anhand der Zusammensetzung berechneten Ausgangswerte an Ammonium, Phosphat und Nitrat den mit den angewandten Methoden tatsächlich bestimmten Werten gegenübergestellt.

3.1.3.2.1 pH-Wert und Leitfähigkeit

Anhand von Tabelle 3.6 zeigen sich für das Medium ohne Zuckerzusatz nach Autoklavieren nur geringe Abweichungen vom pH-Wert, der vor dem Autoklavieren eingestellt wurde. Bei dem Medium mit 3 % Zuckerzusatz lag der pH-Wert etwa 25 bis 28 % unter dem vor Autoklavieren eingestellten. Auch für die Leitfähigkeit ergaben sich mit Zuckerzusatz etwas geringere Werte als bei dem Medium ohne Zuckerzusatz. Für WP 3 wurde ein um 7 % niedrigerer Wert mit Zuckerzusatz gemessen, für ½ MS 3 betrug die Abweichung vom zuckerfreien Medium etwa 3 %.

Tab. 3.6 pH-Wert und Leitfähigkeit von autoklaviertem Medium in Abhängigkeit des Zuckergehaltes.

Medium	**pH-Wert**			**Leitfähigkeit (mS*cm^{-1})**
	eingestellt	bestimmt	Abweichung in %	bestimmt
WP 3	5,7	4,27 ± 0,25	- 25,09	2,42 ± 0,07
½ MS 3	5,7	4,08 ± 0,10	- 28,42	3,20 ± 0,04
WP - Zucker	5,7	5,17 ± 0,06	- 9,30	2,60 ± 0,01
½ MS - Zucker	5,7	5,44 ± 0,06	- 4,56	3,30 ± 0,00

3.1.3.2.2 Ammonium- und Nitratgehalt

Bei der Bestimmung der Ausgangswerte an Ammonium, die in frisch autoklavierten WP- und MS-Medium enthalten sind, wurden anhand der Methode grundsätzlich wesentlich niedrigere Werte bestimmt als die für das Medium anhand der Zusammensetzung berechneten (Tab. 3.7). Der Vergleich von Medium mit 3 % Zuckerzusatz und ohne Zuckerzusatz zeigte, dass bei Zuckerzusatz in allen Fällen ein deutlich niedrigerer Ammoniumgehalt bestimmt wurde.

Tab. 3.7 Ammoniumgehalte für WP- und ½ MS-Medium (n = 3 für Medium ohne Zucker, n = 6 für Medium mit Zucker)

Medium	**Ammoniumgehalt (mM)**		
	berechnet	bestimmt	Abweichung in %
WP 3	4,997	2,120 ± 0,980	- 57,57
½ MS 3	10,309	5,276 ± 0,753	- 48,82
WP - Zucker	4,997	3,198 ± 0,305	- 35,99
½ MS - Zucker	10,309	6,307 ± 0,076	- 38,82

Da sich für Kalium- und Ammoniumnitrat fast identische Eichgeraden ergaben, konnte sicher gegangen werden, dass bei der Berechnung alle Nitratvorkommen erfasst wurden.

Tab. 3.8 Nitratgehalte für WP- und ½ MS-Medium (n = 3 für Medium ohne Zucker, n = 6 für Medium mit Zucker)

Medium	**Nitratgehalt (mM)**		
	berechnet	bestimmt	Abweichung in %
WP 3	7,351	8,184 ± 0,413	+ 11,33
½ MS 3	19,763	17,699 ± 0,668	- 10,44
WP - Zucker	7,351	8,983 ± 0,202	+ 22,19
½ MS - Zucker	19,763	17,943 ± 0,215	- 9,21

Der bestimmte Nitratgehalt lag beim WP-Medium mit und ohne Zuckergehalt etwas über dem berechneten Wert. Für das ½ MS-Medium lagen die gemessenen Werte etwas unter den berechneten Werten.

3.1.3.2.3 Phosphatgehalt

Für die Phosphatbestimmung wurden beim Vergleich der berechneten und bestimmten Werte die geringsten Abweichungen festgestellt (Tab. 3.9). Beim WP-Medium wurden grundsätzlich etwas zu niedrige Werte bestimmt und beim ½ MS-Medium lagen die gemessenen Werte etwas über den berechneten.

Tab. 3.9 Phosphatgehalte für WP- und ½ MS-Medium (n = 3 für Medium ohne Zucker, n = 6 für Medium mit Zucker)

Medium	**Phosphatgehalt (mM)**		
	berechnet	bestimmt	Abweichung in %
WP 3	1,249	1,149 ± 0,032	- 8,04
½ MS 3	0,625	0,638 ± 0,059	+ 2,08
WP - Zucker	1,249	1,242 ± 0,013	- 0,56
½ MS - Zu-	0,625	0,662 ± 0,023	+ 5,92

3.1.3.3 Charakterisierung der Wurzelkulturen von *H. procumbens*

Das Wachstum der Wurzelkulturen zeigte eine annähernd parallel verlaufende Produktion an Frisch- und Trockengewicht (Abb. 3.34). Die Leitfähigkeit im Medium von *H. procumbens* (Abb. 3.35) fiel über die gesamte Kulturdauer kontinuierlich ab, während der pH-Wert zunächst auf ein Maximum anstieg und sich anschließend auf einem etwas niedrigeren Wert wieder einpendelte. Die Kulturen wiesen einen schnellen Ammoniumverbrauch auf und nach etwa 12 Tagen Kulturdauer war das zur Verfügung stehende Ammonium vollständig aufgebraucht. Der Nitratgehalt dagegen blieb trotz anfänglichen Abfalls über der Nachweisgrenze (5 mM) und wurde nicht vollständig verbraucht (Abb. 3.36). Der Phosphatgehalt im Medium blieb zunächst konstant und nahm erst nach 5 Tagen Kulturdauer rapide ab, wurde aber nicht vollständig aufgebraucht und im weiteren Verlauf kam es zu einem erneuten Anstieg des Phosphatkonzentration im Medium (Abb. 3.37).

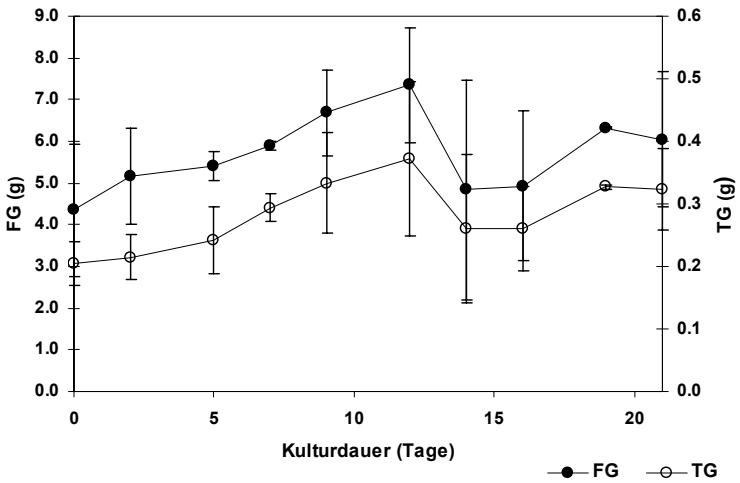

Abb. 3.34 Produktion an Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) der Wurzelkulturen von *H. procumbens* in Abhängigkeit der Kulturdauer; Symbole markieren einzelne Datenpunkte, Balken repräsentieren die Standardabweichung (n = 3).

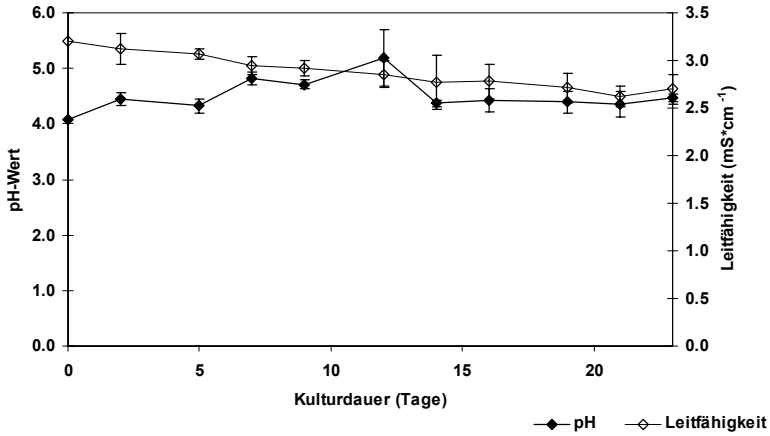

Abb. 3.35 Veränderung von pH-Wert und Leitfähigkeit des Wurzelkulturmediums von *H. procumbens* in Abhängigkeit der Kulturdauer; Balken geben die Standardabweichung an (n = 3).

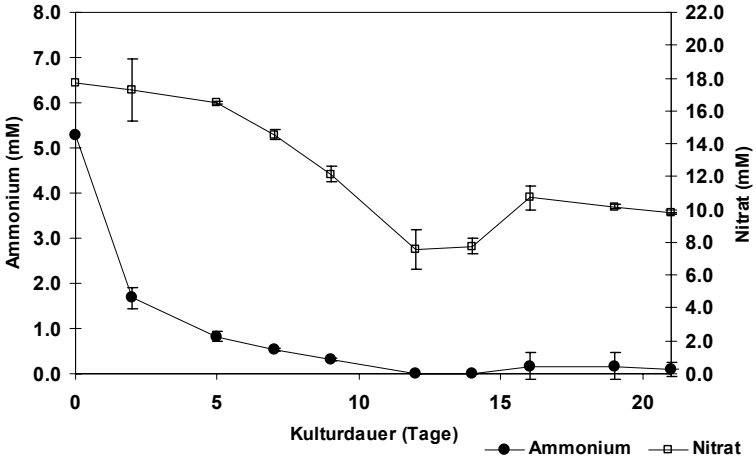

Abb. 3.36 Ammonium- und Nitratverbrauch der Wurzelkulturen von *H. procumbens* in Abhängigkeit der Kulturdauer; Balken geben die Standardabweichung an (n = 3).

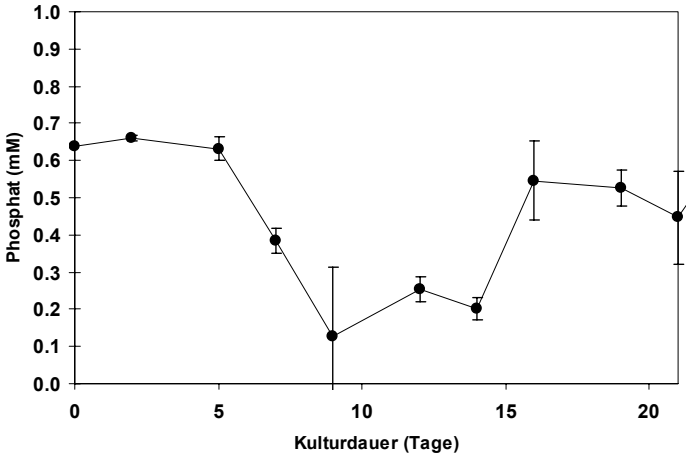

Abb. 3.37 Phosphatverbrauch der Wurzelkulturen von *H. procumbens* in Abhängigkeit der Kulturdauer; Balken geben die Standardabweichung an (n = 3).

3.1.3.4 Charakterisierung der Wurzelkulturen von *S. nodosa*

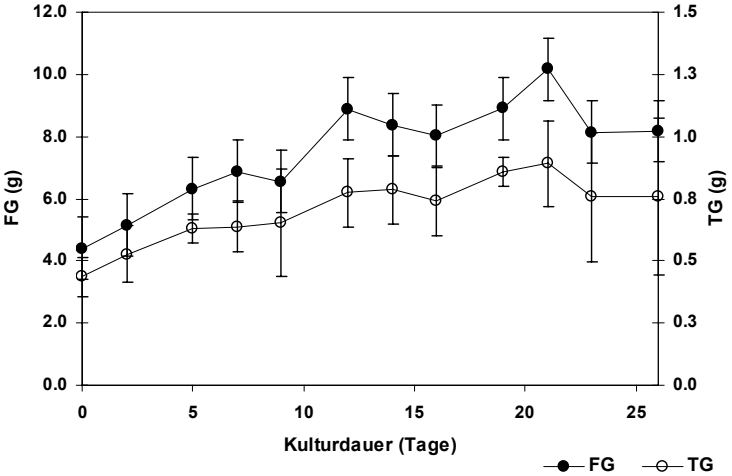

Abb. 3.38 Produktion an Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) der Wurzelkulturen von *S. nodosa* in Abhängigkeit der Kulturdauer; Symbole markieren einzelne Datenpunkte, Balken repräsentieren die Standardabweichung (n = 3).

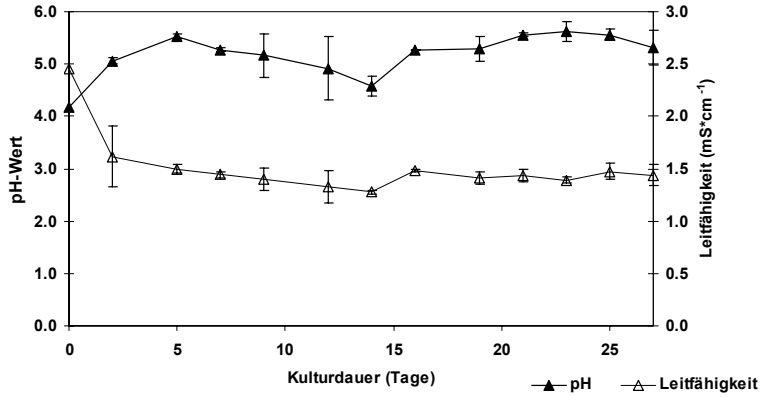

Abb. 3.39 Veränderung von pH-Wert und Leitfähigkeit des Wurzelkulturmediums von *S. nodsa* in Abhängigkeit der Kulturdauer; Balken geben die Standardabweichung an (n = 3).

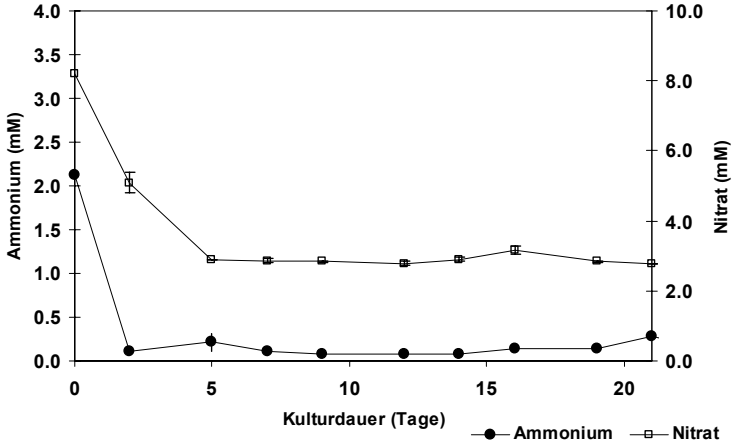

Abb. 3.40 Ammonium- und Nitratverbrauch der Wurzelkulturen von *S. nodosa* in Abhängigkeit der Kulturdauer; Nachweisgrenze der Nitratkonzentration: 5 mM; Balken geben die Standardabweichung an (n = 3).

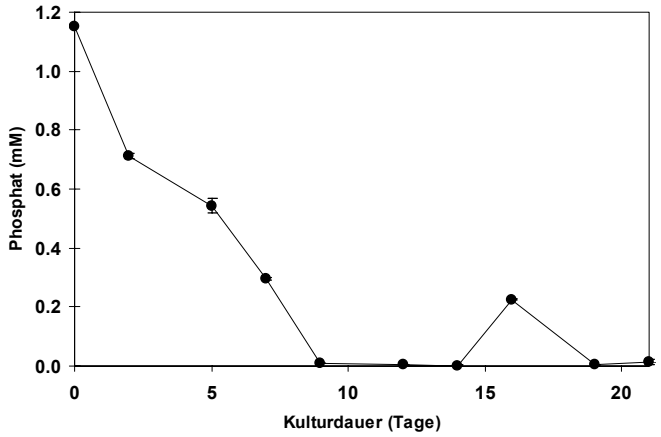

Abb. 3.41 Phosphatverbrauch der Wurzelkulturen von *S. nodosa* in Abhängigkeit der Kulturdauer; Balken geben die Standardabweichung an (n = 3).

Das Wachstum der Wurzelkulturen zeigte ebenfalls eine annähernd parallel verlaufende Produktion an Frisch- und Trockengewicht, wobei das Trockengewicht im gesamten Verlauf etwas weniger stark zunahm als das Frischgewicht (Abb. 3.38). Es traten zwei Maxima bezüglich des pH-Wertes auf und die Leitfähigkeit des Mediums zeigte einen dazu annähernd entgegengesetzten Verlauf (Abb. 3.39). Die Ammoniumaufnahme erfolgte extrem schnell (Abb. 3.40) und bereits 24 h nach Überführung in frisches Medium war der nachweisbare Ammoniumgehalt im Medium fast auf Null abgesunken, wie eine Ammoniumkontrolle in kürzeren Zeitabständen zeigte (Abb. 3.42). Bei der Nitratbestimmung im Kulturmedium fiel der Gehalt schnell unter die Nachweisgrenze von 5 mM ab. Der Verbrauch an Phosphat war im Vergleich zu den anderen Kulturen für *S. nodosa* am stärksten. Nach 9 Tagen Kulturdauer war das gesamte Phosphat verbraucht und lediglich nach etwa 16 Tagen konnte einmalig nochmals eine geringe Phosphatmenge im Medium bestimmt werden.

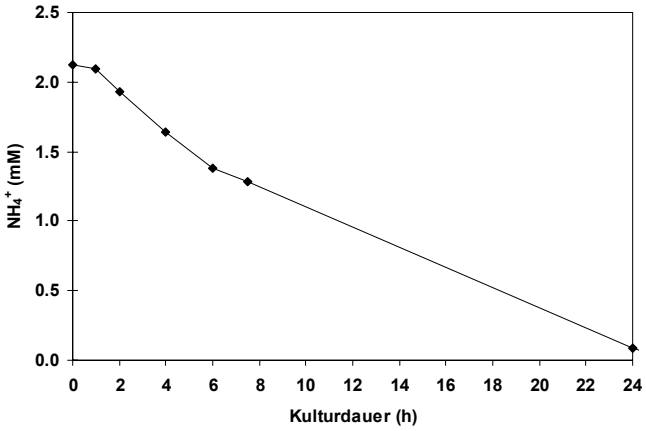

Abb. 3.42 Ammoniumverbrauch der Wurzelkulturen von *S. nodosa* innerhalb der ersten 24 h nach Überführung in frisches Medium; Symbole markieren einzelne Messwerte, Balken repräsentieren die Standardabweichung (n = 2).

3.1.3.5 Charakterisierung der Wurzelkulturen von *P. lanceolata*

Die Zunahme an Trockengewicht erfolgte bei den Wurzelkulturen von *P. lanceolata* schneller als die Zunahme an Frischgewicht (Abb. 3.43). Leitfähigkeit und pH-Wert des Mediums stiegen zunächst leicht an und bei kontinuierlich steigendem pH-Wert nahm die Leitfähigkeit in etwa gleichem Maß ab (Abb. 3.44). Der Ammoniumgehalt im Medium nahm stetig ab, lag bei der nächsten Passage aber noch deutlich über Null. Wie bei *S. nodosa* fiel der Nitratgehalt schnell unter die Nachweisgrenze von 5 mM ab. Das Phosphat wurde von den Wurzeln kontinuierlich verbraucht und war nach 9 Tagen zur Hälfte verbraucht.

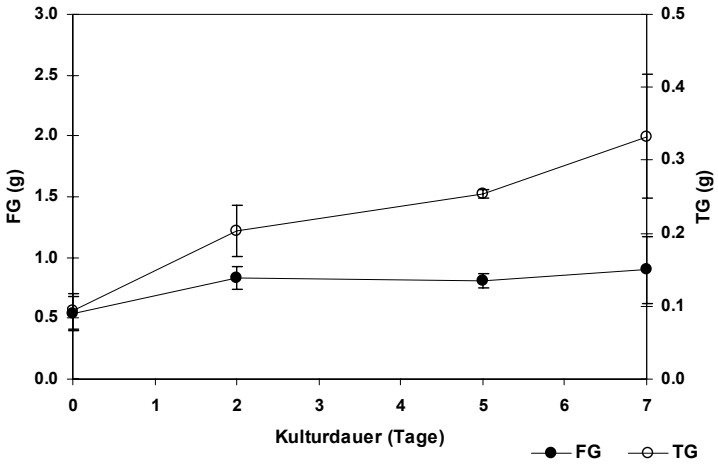

Abb. 3.43 Produktion an Frisch- (FG) und Trockengewicht (TG) der Wurzelkulturen von *P. lanceolata* in Abhängigkeit der Kulturdauer; Symbole markieren einzelne Datenpunkte, Balken repräsentieren die Standardabweichung (n = 3).

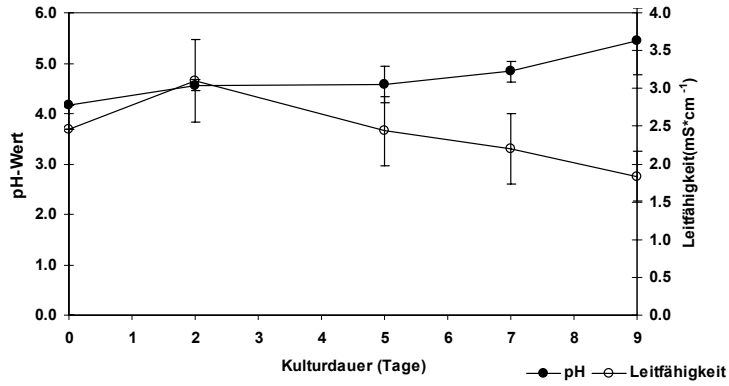

Abb. 3.44 Veränderung von pH-Wert und Leitfähigkeit des Wurzelkulturmediums von *P. lanceolata* in Abhängigkeit der Kulturdauer; Balken geben die Standardabweichung an (n = 3).

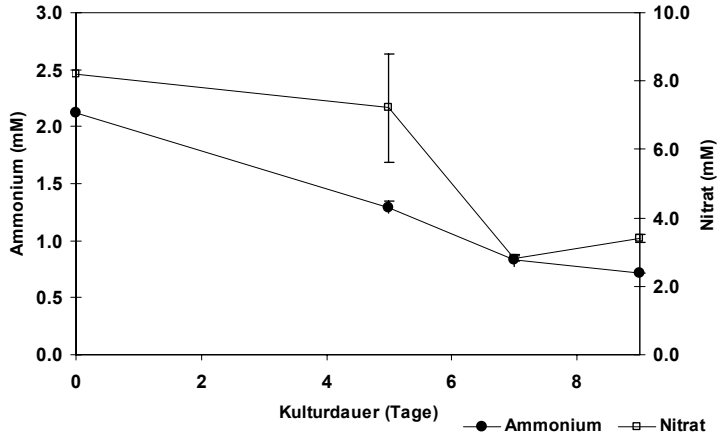

Abb. 3.45 Ammonium- und Nitratverbrauch der Wurzelkulturen von *P. lanceolata* in Abhängigkeit der Kulturdauer; Nachweisgrenze der Nitratkonzentration: 5 mM; Balken geben die Standardabweichung an (n = 3).

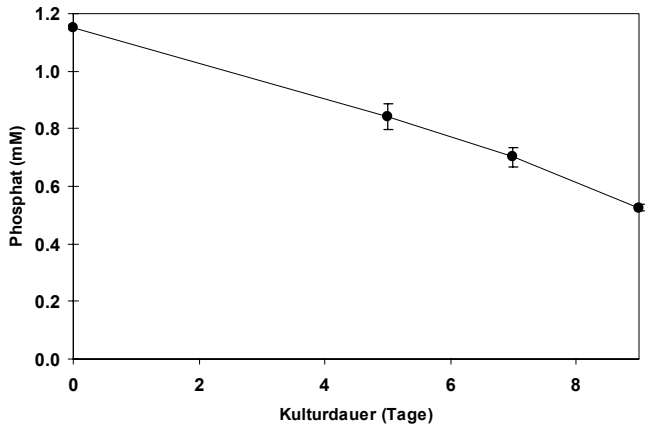

Abb. 3.46 Phosphatverbrauch der Wurzelkulturen von *P. lanceolata* in Abhängigkeit der Kulturdauer; Balken geben die Standardabweichung an (n = 3).

3.1.3.6 Gesamtvergleich der Massenproduktion

Die Wurzelkulturen von *S. nodosa* zeigten die größte Massenproduktion über die gesamte Kulturdauer (Abb. 3.47). Am niedrigsten fiel die Massenproduktion bei *H. procumbens* aus. Hier nahm die Masse nach dem Schneiden durch den Verlust von Wurzelstücken zunächst sogar noch weiter ab. Insgesamt zeigten die Kurven einen ähnlichen Verlauf. Nach einer kontinuierlich ansteigenden Massenproduktion zu Beginn wurde am 14. Kulturtag ein Maximum erreicht. Bei *H. procumbens* fiel die Massenzunahme anschließend rapide ab, während bei *S. nodosa* nach leichtem Abfall das absolute Maximum erreicht wurde. Für *P. lanceolata* konnte die Produktion an Wurzelmasse aufgrund der schnellen Ausdifferenzierung neuer Sprosse nur bis zu einer Woche Kulturdauer bestimmt werden. Diese zeigte einen ansteigenden Verlauf wie bei *S. nodosa*, die Massenproduktion fiel bei *P. lanceolata* jedoch etwas niedriger aus.

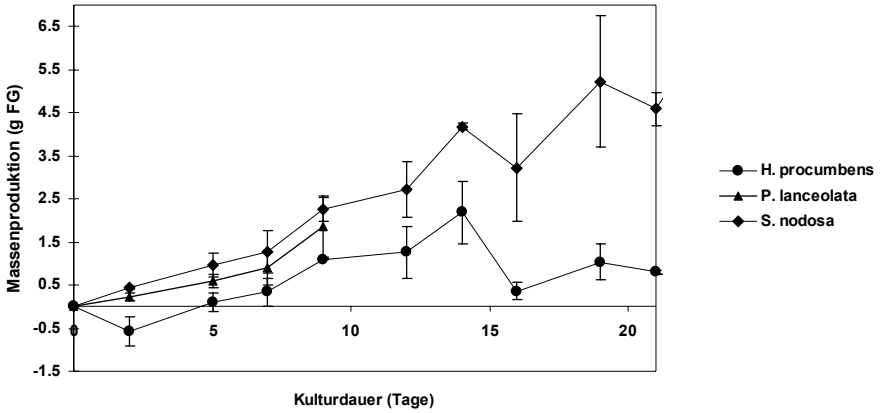

Abb. 3.47 Verlauf der netto Massenproduktion für die Wurzelkulturen von *H. procumbens, S. nodosa* und *P. lanceolata* über einen Zeitraum von 3 Wochen; Symbole markieren einzelne Datenpunkte, Balken repräsentieren die Standardabweichung.

3.1.3.7 Wurzelkulturen - Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes*

Zunächst erfolgte der Nachweis der Gene rolC und virC in verschiedenen Bakterienstämmen von *A. rhizogenes*. Die in Abb. 3.48 auf beide Gene positiv getesteten Einzelkolonien wurden weiterkultiviert und zur Transformation der Pflanzen herangezogen.

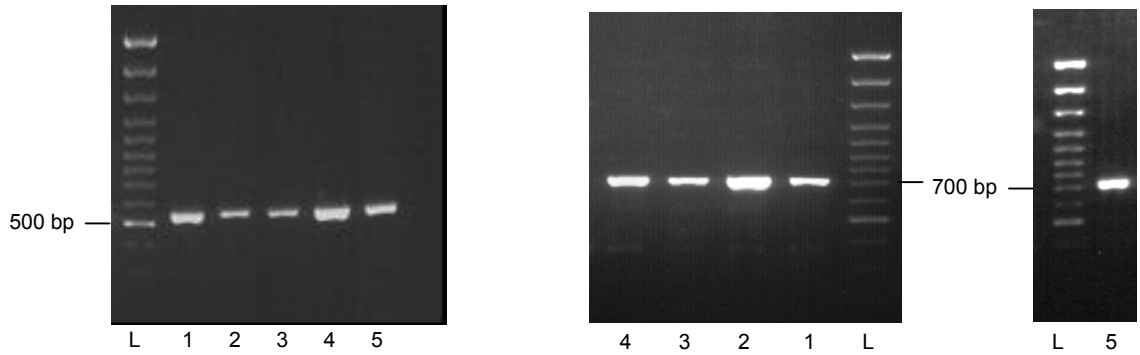

Abb. 3.48 Nachweis der Gene rolC bei 540 bp und virC bei 730 bp in verschiedenen *A. rhizogenes* Stämmen: 1 = A4, 2 = R1600, 3 = LBA9402, 4 = Atcc15834, 5 = TR105, L = DNA-Leiter GeneRuler™, anhand der mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennten PCR-Produkte.

Transformiert werden sollten Wurzeln und Blätter von *H. procumbens, S. nodosa* und *P. lanceolata*. Mehrfache Transformationsversuche mit allen *Agrobacterium*-Stämmen an *H. procumbens* und *P. lanceolata* führten zu keinem positiven Ergebnis. Die Blätter und Wurzeln starben nach einigen Wochen ab und zeigten keinerlei Adventivwurzelbildung. Erfolgreich war die Transformation mit dem Wildtyp TR105 bei *S. nodosa*. Hier konnten Hairy root Kulturen aus den an transformierten Blättern wachsenden Adventivwurzeln angelegt werden.

Abb. 3.49 links: Entwicklung von Adventivwurzeln aus Blättern, die mit *A. rhizogenes* (Stamm TR105) transformiert waren; rechts: Hairy root Kultur von *S. nodosa*.

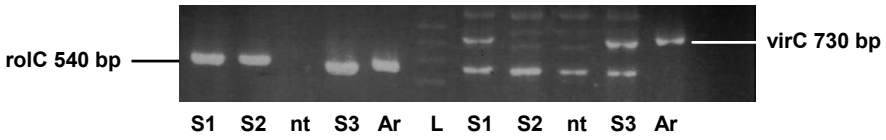

Abb. 3.50 Nachweis der Gene rolC bei 540 bp und virC bei 730 bp in mit *A. rhizogenes* Stamm TR105 transformierten Wurzelkulturen von *S. nodosa*: S1 = transformierte Linie 1, S2 = transformierte Linie 2, S3 = transformierte Linie 3, nt = nicht transformierte Linie, Ar = A. rhizogenes, L = DNA-Leiter GeneRuler™; dargestellt sind die mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennten PCR-Produkte.

In Abbildung 3.50 sind die Nachweise von virC und rolC für drei mit dem *A. rhizogenes* Stamm TR105 transformierte Wurzelkulturlinien von *S. nodosa* dargestellt. Als Standards ebenfalls getestet wurden eine nicht transformierte Wurzelkulturlinie sowie *A. rhizogenes* selbst. Wie erwartet fiel der Nachweis von rolC bei allen Proben außer der nicht transformierten positiv aus. Der virC-Nachweis war für die *A. rhizogenes* Probe sowie zwei der drei transformierten Linien positiv. In diesen auf virC positiv getesteten transformierten Linien musste also zunächst die Kontamination mit *A. rhizogenes* durch Behandlung mit Claforan beseitigt werden. Für die nur auf rolC positiv getestete transformierte Linie (S2, Abb. 3.50) war der Nachweis der Transformation erbracht.

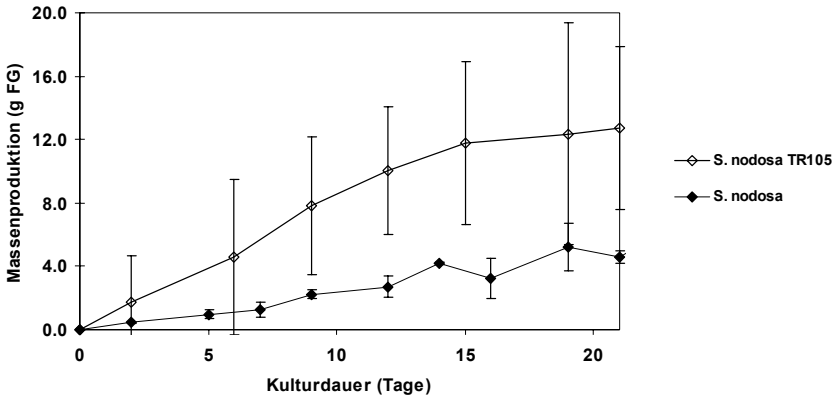

Abb. 3.51 Vergleich der Massenproduktion (FG) einer untransformierten Wurzelkulturlinie von *S. nodosa* mit der einer mit TR105 transformierten Wurzelkultur; Balken symbolisieren die Standardabweichung (n = 3).

Für die Massenproduktion der mit dem *A. rhizogenes* Stamm TR105 transformierten Wurzelkulturlinien ergab sich trotz hoher Standardabweichungen ein wesentlich höherer Zuwachs an Frischgewicht als für die nicht transformierten Wurzelkulturen (Abb. 3.51).

3.1.3.8 Iridoidglykosidgehalt in den Wurzelkulturen

Phytochemische Analyse

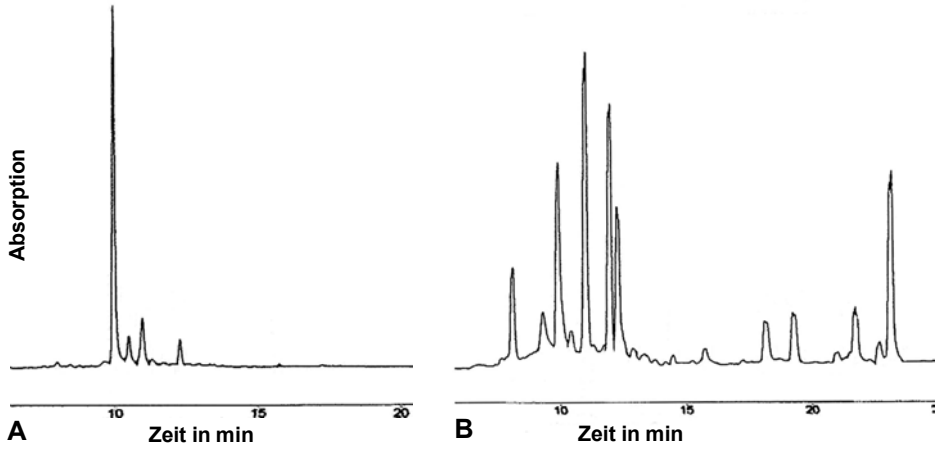

Abb. 3.52 Chromatogramme der Wurzelkulturen von (**A**) *H. procumbens* und (**B**) *S. nodosa* (280 nm, Gradient 1); Harpagosid konnte nicht detektiert werden.

Gehalt an Iridoidglykosiden

In den Wurzel- und Mediumproben der drei Pflanzen konnten die Iridoidgykoside Harpagosid, Aucubin und Catalpol mit der angewandten HPLC-Methode nicht nachgewiesen werden. Auch in den Hairy Root Kulturen von *S. nodosa* ließen sich weder in den Wurzelproben noch im Medium Iridoidglykoside nachweisen.

3.2 Untersuchungen zur antiinflammatorischen Wirksamkeit

3.2.1 Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1)

Anhand der in Sigmaplot berechneten Koeffizienten (a = 284,048; b = 0,149; x_0 = -0,081; y_0 = -184,471) ergab sich für Aspirin ein IC_{50} von 0,15 µg/ml (0,8 µM) (Abb. 3.53).

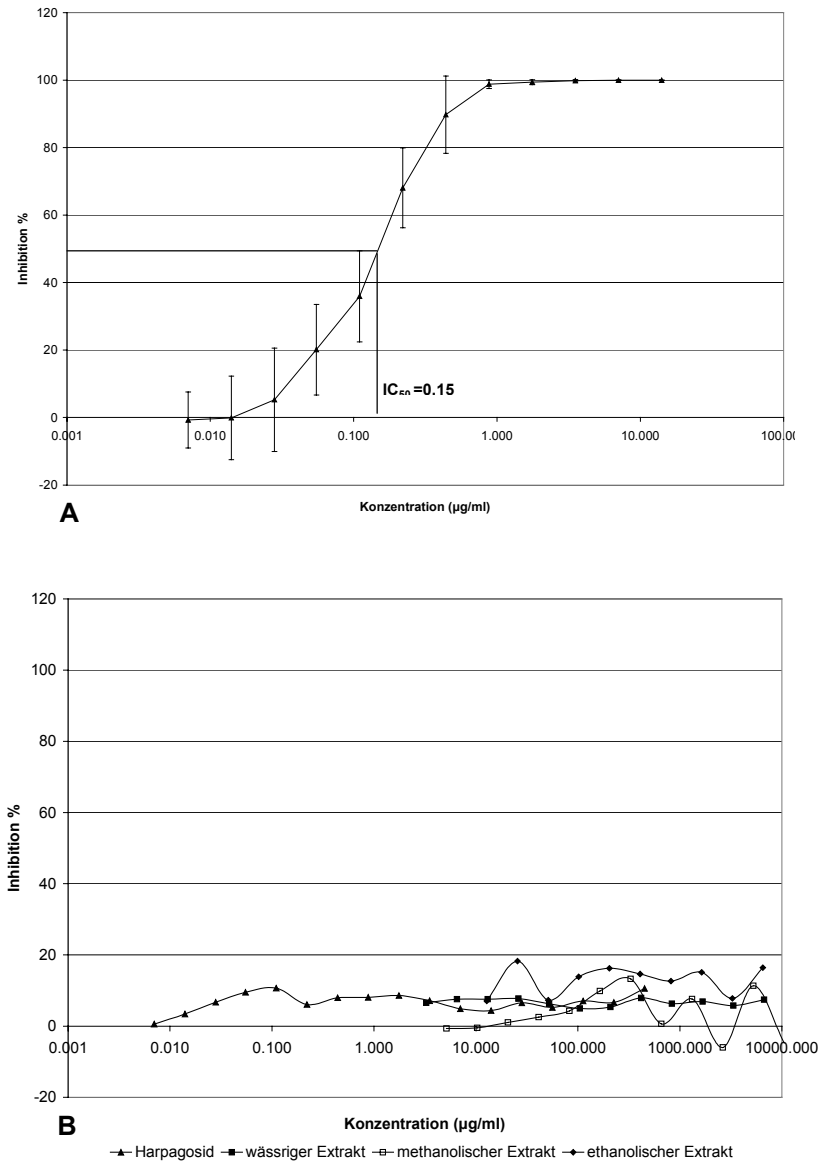

Abb. 3.53 A: Hemmkurve für Aspirin (IC_{50} = 0,151 µg/ml); **B**: keine Hemmung durch Harpagosid und Harpagophytum-Extrakte; logarithmische Skalierung der x-Achse, Symbole geben einzelne Datenpunkte an, Balken die Standardabweichung (wurde bei B aufgrund großer Schwankungen zur besseren Übersichtlichkeit weggelassen).

Für reines Harpagosid sowie die *Harpagophytum*-Extrakte ließ sich keine Hemmung der Cyclooxygenase-1 nachweisen (Abb. 3.53 B).

3.2.2 Hemmung der Lipoxygenase (LOX)

Getestet wurden Pflanzenextrakte, die zuvor mittels HPLC auf ihren Iridoidglykosidgehalt untersucht worden waren. Somit war der Drogengehalt pro ml Testlösung sowie die darin enthaltene Menge an Iridoidglykosiden in µg/ml im Assay bekannt. Die reinen Iridoidglykoside wurden in Konzentrationen von 0,01 bis 0,25 mM getes-

tet. Die bei den Reinglykosiden aufgetretenen Trübungen im Testsystem waren nicht mit einer Abnahme an Iridoidglykosiden verbunden (HPLC-Analyse), könnten die Testergebnisse jedoch beeinflusst haben. Mit ß-Glucosidase ergaben sich die gleichen IC_{50}-Werte wie ohne, so dass kein Einfluss des Enzyms auf die Hemmung der LOX durch Harpagosid, Aucubin und Catalpol festgestellt werden konnte. Anhand einer HPLC-Analyse wurde allerdings gezeigt, dass es unter den Versuchsbedingungen nicht zur vollständigen Hydrolyse der Iridoidglykoside in ihre Aglyka kam. Insgesamt wurde ein Einfluss der getesteten Iridoidglykoside und Pflanzenextrakte (Ausnahme Kamille) auf die LOX aus Sojabohnen beobachtet, wobei für die verschiedenen Pflanzenextrakte eine stärkere Hemmung der LOX bestimmt wurde als für die Reinsubstanzen.

Tab. 3.10 Angabe der berechneten IC_{50}-Werte (n = 3) bei der Hemmung der Sojabohnen-LOX durch reine Iridoidglykoside sowie Pflanzenextrakte.

Reinsubstanzen	**IC_{50}**	
NDGA	0,30 ± 0,09 µM	r^2 = 0,99
Harpagosid	0,10 ± 0,00 mM	r^2 = 0,94
Aucubin	0,26 ± 0,06 mM	r^2 = 0,93
Catalpol	0,35 ± 0,05 mM	r^2 = 1,00
Pflanzenextrakte	**IC_{50}**	
H. procumbens		
Blattextrakt (*in vitro* Pflanzen)	2,12 ± 0,10 mg Droge/ml; (r^2 = 1,00)	0,23 ± 0,01 µg Harpagosid/ml (0,47 µM)
Wurzeldroge (Fa. Caelo)	13,19 ± 1,24 mg Droge/ml; (r^2 = 0,99)	142,76 ± 13,42 µg Harpagosid/ml (288,26 µM)
S. nodosa		
Blattextrakt (Wildpflanzen)	2,68 ± 0,28 mg Droge/ml; (r^2 = 1,00)	23,03 ± 2,41 µg Harpagosid/ml (46,57 µM) 5,40 ± 0,56 µg Aucubin/ml (15,59 µM) 3,78 ± 0,39 µg Catalpol/ml (10,43 µM)
Wurzelextrakt (Wildpflanzen)	2,31 ± 0,07 mg Droge/ml; (r^2 = 0,98)	13,21 ± 0,40 µg Harpagosid/ml (26,71 µM) 5,13 ± 0,16 µg Aucubin/ml (14,81 µM) 0,23 ± 0,00 µg Catalpol/ml (0,64 µM)
P. lanceolata		
Blattextrakt (Wildpflanzen)	0,33 ± 0,38 mg Droge/ml; (r^2 = 0,97)	1,42 ± 1,64 µg Aucubin/ml (4,11 µM) 3,19 ± 3,67 µg Catalpol/ml (8,80 µM)
Wurzelextrakt (Wildpflanzen)	2,74 ± 0,38 mg Droge/ml; (r^2 = 1,00)	28,47 ± 3,95 µg Aucubin/ml (82,20 µM) 17,25 ± 2,39 µg Catalpol/ml (47,61 µM)
Warburgia salutaris (Trockenextrakt)	2,13 ± 0,10 mg Droge/ml (r^2 = 0,98)	
Matricaria recutita (0,03 mg Droge/ml EtOH)	keine Hemmung	

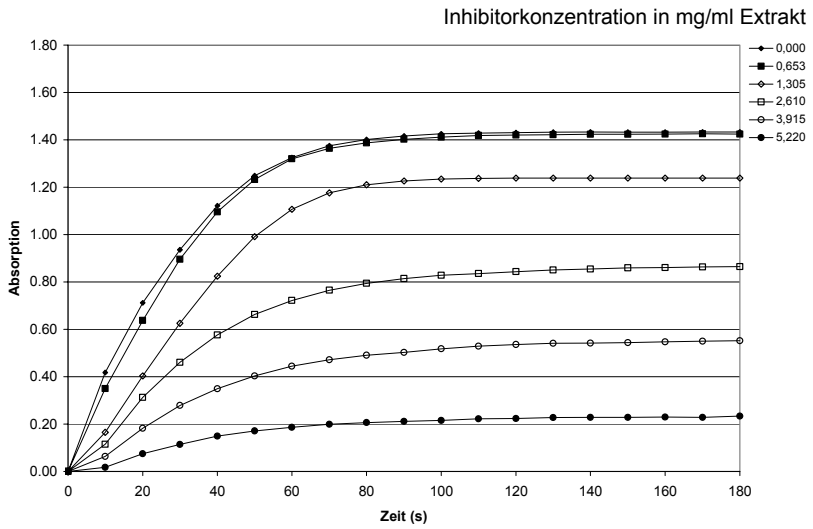

Abb. 3.54 Hemmung der LOX-Aktivität durch einen methanolischen Blattextrakt von *S. nodosa* (intakte Pflanzen); Messung des Substratumsatzes bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

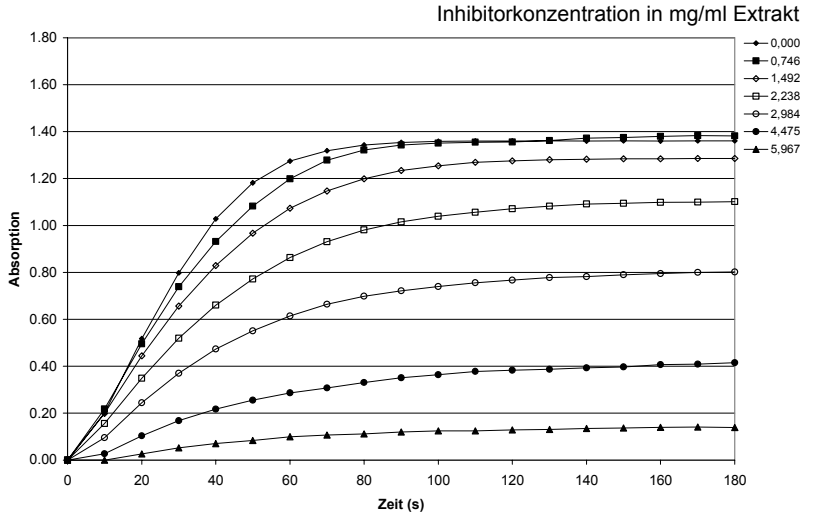

Abb. 3.55 Hemmung der LOX-Aktivität durch einen methanolischen Wurzelextrakt von *S. nodosa* (intakte Pflanzen); Messung des Substratumsatzes bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

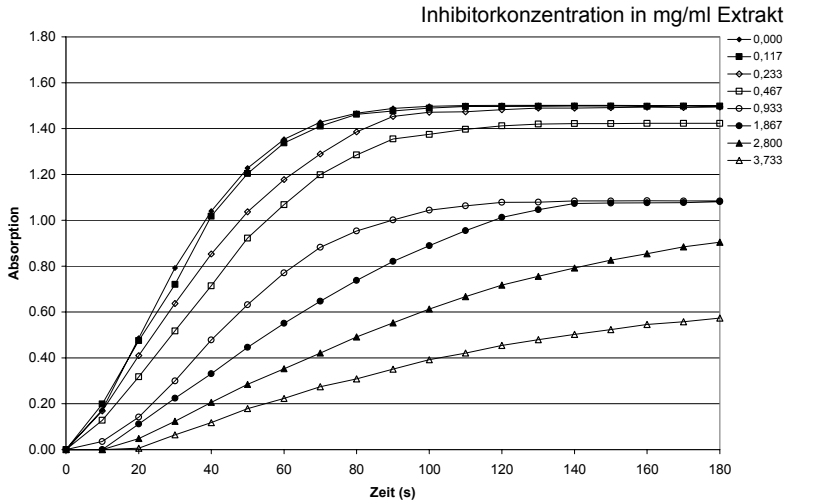

Abb. 3.56 Hemmung der LOX-Aktivität durch einen methanolischen Extrakt von Harpagophyti radix; Messung des Substratumsatzes bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

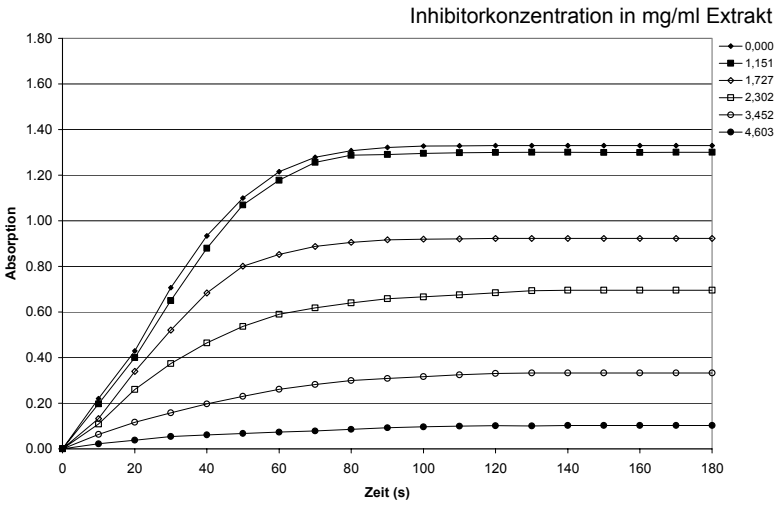

Abb. 3.57 Hemmung der LOX-Aktivität durch einen methanolischen Blattextrakt von *H. procumbens* (*in vitro* Pflanzen); Messung des Substratumsatzes bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

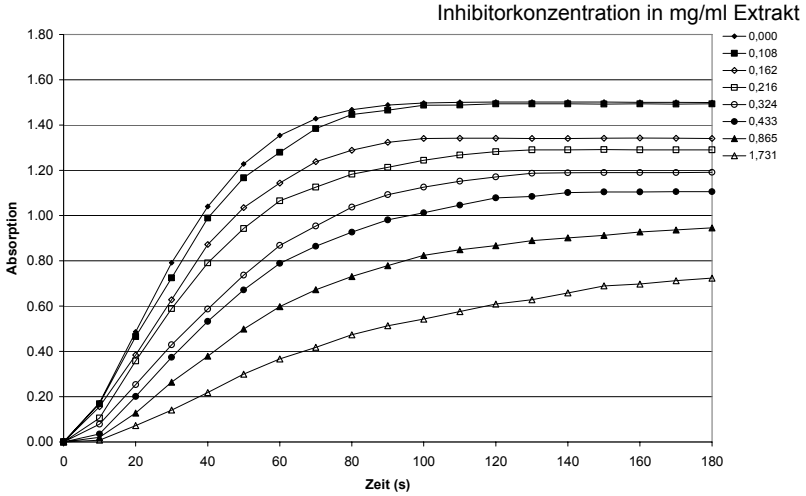

Abb. 3.58 Hemmung der LOX-Aktivität durch einen methanolischen Blattextrakt von *P. lanceolata* (*in vitro* Pflanzen); Messung des Substratumsatzes bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

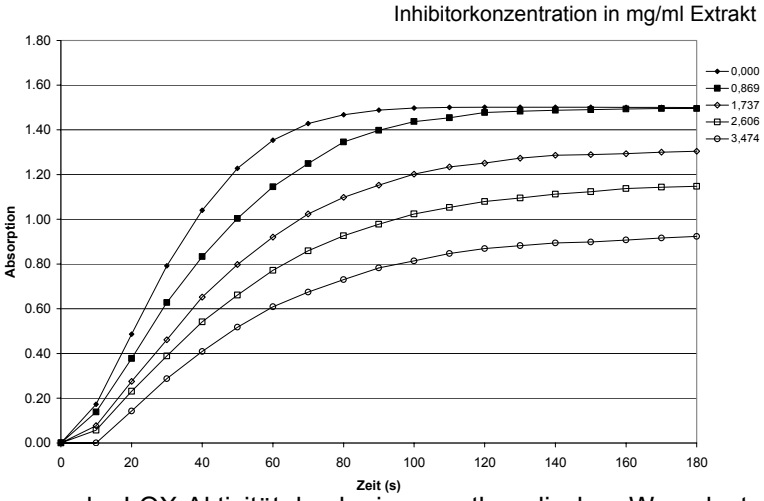

Abb. 3.59 Hemmung der LOX-Aktivität durch einen methanolischen Wurzelextrakt von *P. lanceolata* (*in vitro* Pflanzen); Messung des Substratumsatzes bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

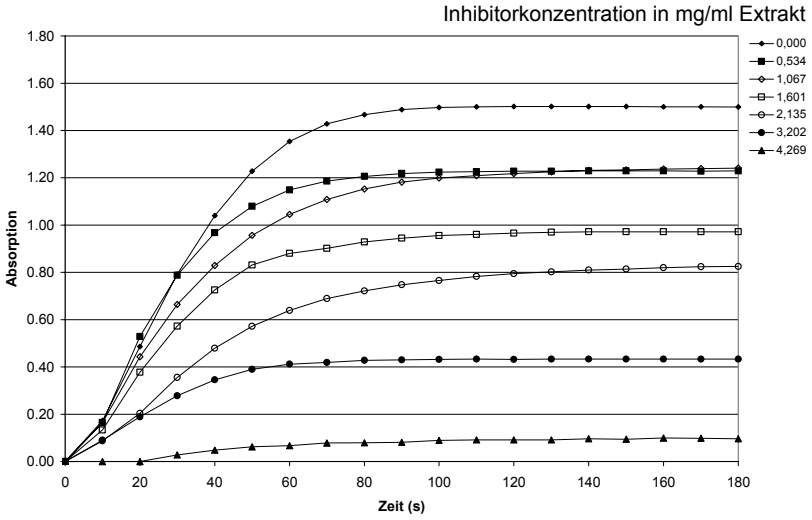

Abb. 3.60 Hemmung der LOX-Aktivität durch einen methanolischen Extrakt aus *Warburgia salutaris* (Presstabletten); Messung des Substratumsatzes bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

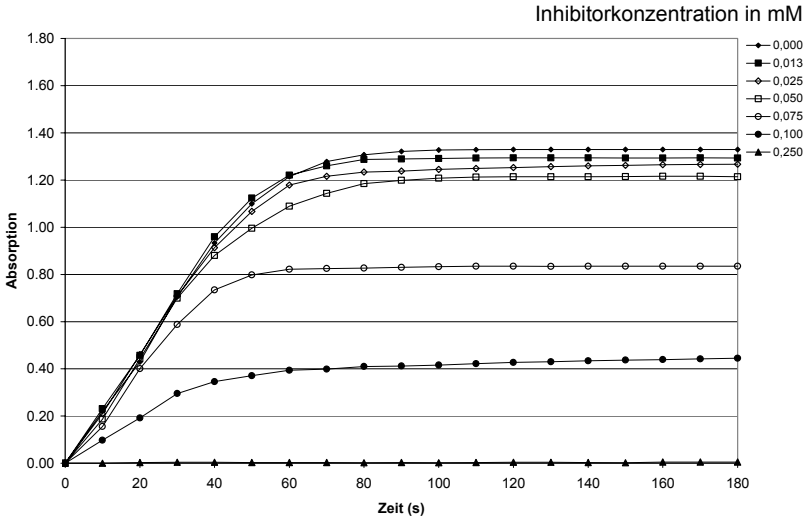

Abb. 3.61 Hemmung der LOX-Aktivität durch Harpagosid; Messung des Substratumsatzes bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

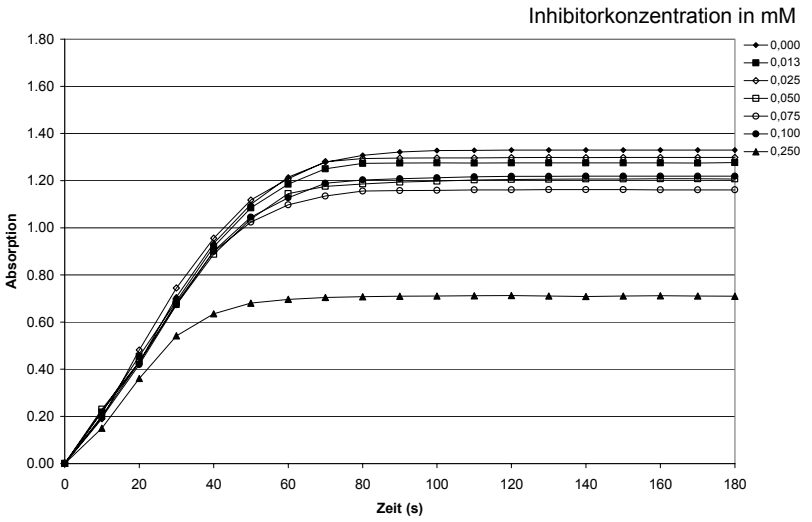

Abb. 3.62 Hemmung der LOX-Aktivität durch Catalpol; Messung des Substratumsatzes bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

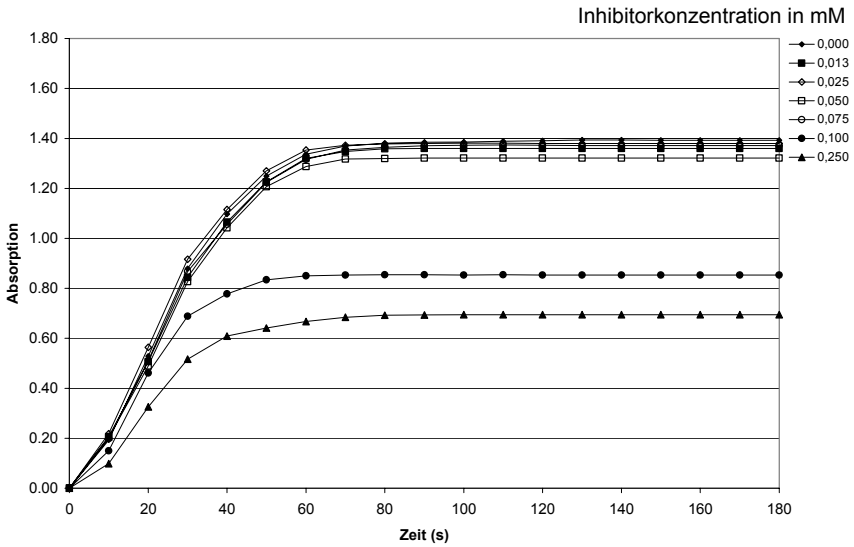

Abb. 3.63 Hemmung der LOX-Aktivität durch Aucubin; Messung des Substratumsatzes bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

3.2.3 Beeinflussung der Angiogenese

Die visuelle Auswertung der Wirkung von Harpagosid und Catalpol auf die Angiogenese im Hühnerei erfolgte im Vergleich mit der Positiv- und Negativkontrolle (Abb. 3.64). Getestet wurden Harpagosid in einer Konzentration von 100, 50, 25 µg pro Testpellet und Catalpol in Konzentrationen von 70, 35, 17.5 µg pro Testpellet.

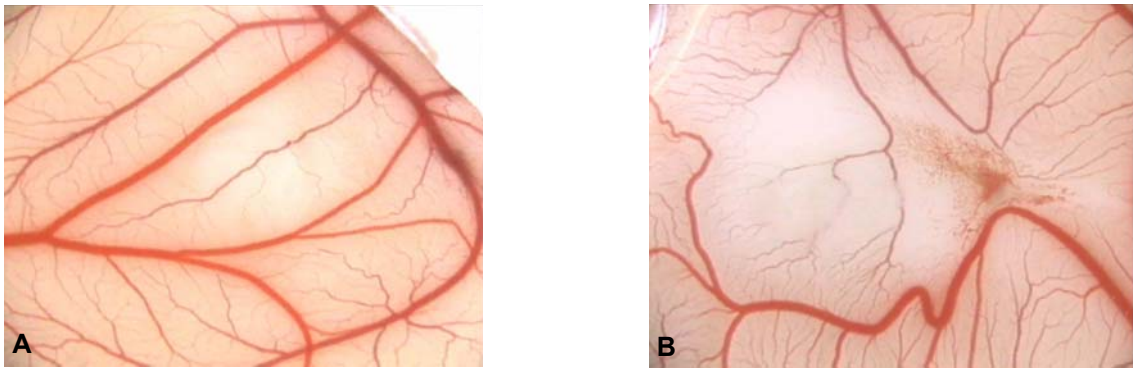

Abb. 3.64 (**A**) Negativkontrolle (Agarosepellet), (**B**) Positivkontrolle (Suramin).

Bei Catalpol zeigte sich auch in der höchsten Konzentration keine Auswirkung auf die Angiogenese (Abb. 3.65). Lediglich bei 1 von 13 Eiern zeigte sich eine ganz leichte Reaktion wie aus Abbildung 3.65 B hervorgeht. Diese Reaktion ist nicht reproduzierbar und kann daher nicht eindeutig auf Catalpol zurückgeführt werden.

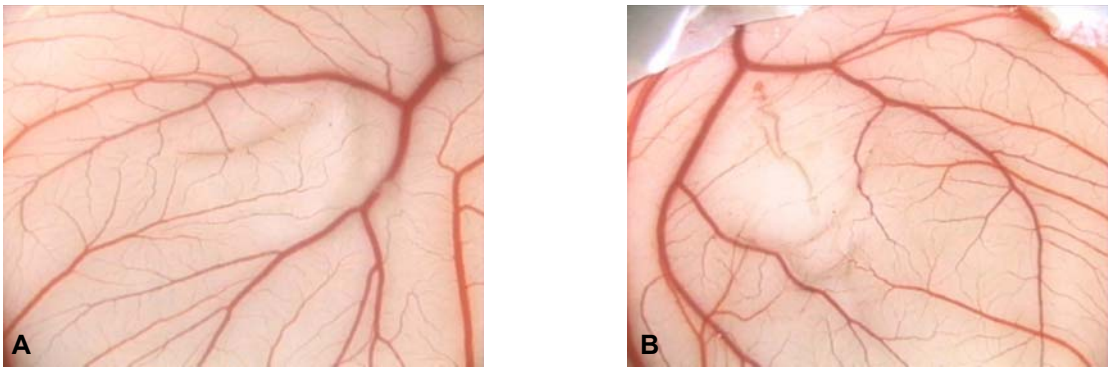

Abb. 3.65 Wirkung von Catalpol auf die Angiogenese: (**A**) keine antiangiogene Wirkung, (**B**) stärkste beobachtete Reaktion.

Auch für Harpagosid, das in etwas höheren Konzentrationen getestet wurde, konnte keine Hemmung der Angiogenese nachgewiesen werden (Abb. 3.66). Lediglich in 2 der 14 getesteten Eier konnte bei der höchsten Konzentration eine ganz geringe Wirkung beobachtet werden.

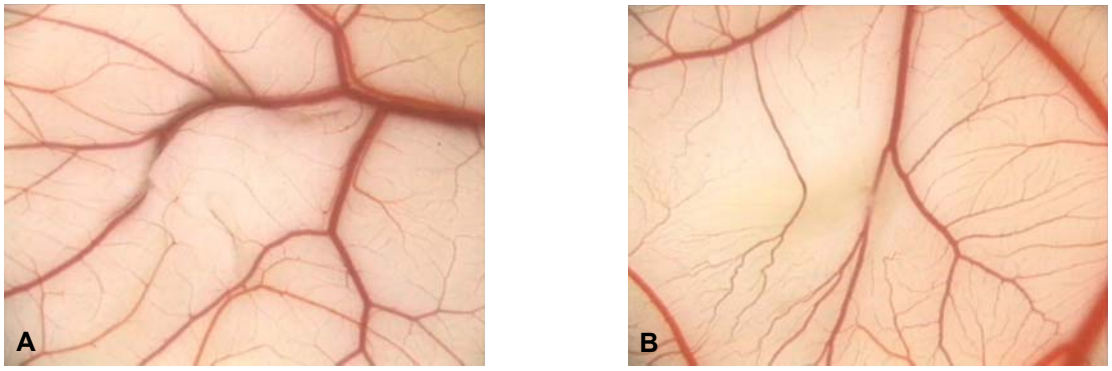

Abb. 3.66 Wirkung von Harpagosid auf die Angiogenese: (**A**) keine antiangiogene Wirkung, (**B**) stärkste beobachtete Reaktion.

Somit konnte im *in vivo* Testsystem kein Effekt von Harpagosid und Catalpol auf die Angiogenese festgestellt werden.

4 Diskussion

4.1 Pflanzenkulturen und intakte Pflanzen

4.1.1 *In vitro* Pflanzen

4.1.1.1 Etablierung und Regeneration der *in vitro* Pflanzen

In vitro Pflanzen von *H. procumbens, S. nodosa* und *P. lanceolata* ließen sich mit Hilfe der angewandten Methoden erfolgreich aus Samen etablieren. Bisher lagen keine anderen Daten zur *in vitro* Etablierung oder Regeneration von *in vitro* Pflanzen von *S. nodosa* vor. Die Zugabe von GA_3 in einer Konzentration von 250 mg/l wirkte sich hierbei vorteilhaft auf die Keimrate aus. Ansonsten erwies sich die Kultivierung dieser *in vitro* Pflanzen als problemlos. Eine Methode zur Etablierung von *in vitro* Kulturen von *P. lanceolata* aus Samen wurde bereits von Budzianowska et al. (2004) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde im Vergleich dazu eine kürzere und schonendere Sterilisation durchgeführt und zur Keimung statt ½ MS-Medium mit 1,5 % Zuckerzusatz WP3-Medium verwendet. Für *H. procumbens* lagen aufgrund des großen Interesses zur Erhaltung der Art und dem kommerziellen Anbau bereits Protokolle zur *in vitro* Vermehrung vor. Levieille und Wilson (2001) regenerierten aus sterilisierten Stängelabschnitten neue Pflanzen, die *in vitro* zur Wurzelbildung angeregt wurden und akklimatisierten die so gewonnen Pflanzen an *ex vitro* Bedingungen. Das von ihnen angewendete Phytohormon IES (2 mg/l) führte auch bei unseren Stängelabschnitten zu einer direkten Bewurzelung und bestätigt somit deren Ergebnisse. Shushu (2001) berichtete ebenfalls über die *in vitro* Regeneration von *Harpagophytum*-Pflanzen durch sterilisierte Sprossspitzen. Es wurde bisher jedoch nicht über die Etablierung von *in vitro* Kulturen aus Samen berichtet, wie in der vorliegenden Arbeit. Willert und Schneider (2001) zogen im Gewächshaus Jungpflanzen aus Samen an. Unter natürlichen Bedingungen zeigen die Samen von *H. procumbens* eine extrem niedrige Keimrate. Die hohe Variabilität der Samenkeimung garantiert dabei das Überleben der Population. Unter experimentellen Bedinungen erfordert diese Variabilität jedoch eine Vorbehandlung der Samen. In Experimenten konnten Ernst et al. (1988) eine leichte Beschleunigung der Keimung durch hohe Temperaturen unter natürlichen Bedingungen erreichen. Unter Laborbedingungen wurde die Keimrate durch Zugabe von Gibberellinsäure (0,05 %) im Vergleich zur Kontrolle um 19 % erhöht. Die Entfernung des Endosperms führte zu einer Erhöhung um 21,5 %. Es wurde gezeigt, dass das Endosperm ebenso wie die Samenschale offensichtlich als mechanische Barriere

wirken, die die Wasseraufnahme behindern. Die Wasseraufnahme der Samen muss nach einem Regenschauer schnell erfolgen wegen der semi-arider Umgebung mit einer hoher Verdunstungsrate aufgrund der sehr geringen relativen Luftfeuchtigkeit. Die Wasseraufnahme alleine führt jedoch nicht zum Brechen der Samenruhe, sondern erst das Entfernen des Endosperms. Die langsame Freisetzung der Samen durch die ausgereiften Früchte garantiert somit die zeitlich versetzte Verbreitung der Samen (im Jahresschnitt erreichen 20 bis 25 % der Samen Bodenkontakt) und die hohe angeborene Samenruhe verhindert die direkte Keimung aller Samen auch unter geeigneten Bodenbedingungen (Ernst et al. 1988). In unseren Versuchen bestätigte sich die positive Auswirkung hoher Temperaturen auf das Keimverhalten der Samen. Das Anritzen der Samenschale ermöglichte dabei gleichzeitig die Wasseraufnahme und unterbrach die Keimruhe durch Verletzung des Endosperms.

Die Regeneration von Pflanzen aus den *in vitro* Pflanzen erwies sich bei *H. procumbens* und *S. nodosa* als unproblematisch und es war keine Hormonzugabe zur Wurzelinduktion notwendig. Die regenerierten Pflanzen entwickelten sich ohne Hormonergänzung genauso gut wie die aus Samen angezogenen. Budzianowska et al. (2004) vermehrten die *in vitro* Pflanzen von *P. lanceolata* durch Induktion der Adventivknospenbildung an Segmenten von Blatt- und Wurzelstücken durch Hormonzugabe. Die so gewonnenen Sprosse wurden durch IES-Zugabe (1 mg/l) bewurzelt. In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich die ausdifferenzierten Sprosse aus den Wurzelkulturen als einfaches Vermehrungssystem. Die Sprosse mussten lediglich voneinander getrennt und zum Wachstum auf hormonfreies Festmedium gegeben werden. Die einfach regenerierten Pflanzen können als experimentelles System zur Erforschung der Biosynthese von Iridoidglykosiden dienen. Die klonale Vermehrung kann gegenüber der Vermehrung mit Samen von Vorteil sein, da große Mengen an homogenen, ertragsreichen oder krankheitsresistenten Pflanzen gewonnen werden können (Lisowska 2000).

Die Entwicklung der verschiedenen Organe wird *in vitro* durch die künstlichen Wachstumsbedingungen beeinflusst. Die Blätter und Stängel der Sprosskulturen insbesondere von *H. procumbens* und *S. nodosa* blieben klein im Vergleich zu den intakten Pflanzen, die Wurzeln aller 3 Pflanzenarten waren nicht in der Lage, einen voll entwickelten Wurzelstock zu bilden. Die bei *S. nodosa* häufig gebildeten Blüten wiesen eine ähnlich Größe wie die der intakten Pflanzen auf. Auch bei *P. lanceolata* kam es vereinzelt zur Bildung kleiner Blütenstände. Diese Blütenbildung könnte

durch die Dauerbeleuchtung induziert worden sein, die einen 24 h Tagesrhythmus vorgab. Taiz und Zeiger (1991) diskutieren wechselwirkende Faktoren wie Kohlenhydrate, Gibberelline und Cytokinine als wichtige Faktoren für den Übergang zur Blütenbildung. Einer der wichtigsten Einflussfaktoren der Umgebung ist dabei die Tageslänge, die den Gibberellinstoffwechsel in der Pflanze beeinflussen kann.

4.1.1.2 Phytochemische Untersuchungen von *in vitro* und intakten Pflanzen

4.1.1.3 *Harpagophytum procumbens – in vitro* Pflanzen

Wenige Untersuchungen liegen zum Harpagosidgehalt der oberirdischen Pflanzenabschnitte von *H. procumbens* vor. Czygan und Krüger fanden 1977 Spuren von Harpagosid in den Blättern. Levieille und Wilson (2002) berichteten über einen Harpagosid- und Harpagidgehalt von 0,1 % in den Blättern *in vitro* vermehrter Pflanzen. In den Speicherknollen dieser Pflanzen fanden sie etwa 1 % Iridoide, was mit den in wild gewachsenen Pflanzen gefundenen Werten übereinstimmt. Sie zogen die Blätter als alternative Iridoidquelle in Betracht, vorausgesetzt, dass diese die selben pharmakologischen Eigenschaften wie die Speicherknollen aufweisen. Willert und Schneider (2001) untersuchten den Harpagosidgehalt in den Knollen wild gewachsener *Harpagophytum*-Pflanzen und fanden zwischen 1,26 % und 2,94 % Harpagosid. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte *Harpagophytum*-Drogenmaterial aus Wurzelknollen wies einen Harpagosidgehalt von 0,75 bis 1,08 % auf.

Die von Levielle und Wilson (2002) gefundenen Werte für die Blätter intakter Pflanzen liegen im Bereich der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *in vitro* Pflanzen, deren Blätter durchschnittlich 0,14 % Harpagosid enthielten. Der etwas höhere Harpagosidgehalt in den Stängeln (0,22 %) könnte durch die besonders gute Entwicklung dicker Sprosse *in vitro* erklärt werden, wohingegen nur verhältnismäßig wenige Blätter gebildet wurden. Der sehr geringe Gehalt in den Wurzeln (0,01 %) lässt sich auf die fehlende Ausbilung von Speicherknollen zurückführen. Die Wurzeln und Speicherknollen scheinen für die Harpagosidsynthese somit keine essentielle Rolle zu spielen. Einen wichtigen Einflussfaktor auf den Harpagosidgehalt stellt für die wildwachsenden Pflanzen das Alter dar (Willert und Schneider 2001) und ist somit auch für die *in vitro* Pflanzen von Bedeutung.

Die Ergebnisse belegen, dass Harpagosid in *in vitro* kultivierten Pflanzen von *H. procumbens* gebildet wird, wenn auch nur in geringen Konzentrationen. Harpagosid ist dabei in allen Pflanzenorganen in unterschiedlich starker Konzentration

nachweisbar. Im Vergleich dazu wurde in den *in vitro* Pflanzen von *S. nodosa* insgesamt etwas mehr Harpagosid gebildet (0,58 %) und der Harpagosidgehalt nahm von den Blättern über den Stängel zur Wurzel hin ab. Somit stellen die *in vitro* Pflanzen von *S. nodosa* den bessern Harpagosidlieferanten dar, denn zusätzlich wurden bei ihnen noch 1,10 % Harpagosid in den Blüten gebildet (s. Kapitel 4.1.1.2.2). Weitere Inhaltsstoffe der Gattungen *Scrophularia* und *Harpagophytum* erweitern das pharmakologische Wirkspektrum der Extrakte. Ob Extrakte von *S. nodosa* ähnliche pharmakologische Eigenschaften wie diejenigen von *H. procumbens* aufweisen, müssen entsprechende Studien belegen.

4.1.1.3.1 *Scrophularia nodosa – in vitro* Pflanzen

Die Pflanzenorgane der *in vitro* kultivierten Pflanzen zeigten eine andere Entwicklung als die der intakten wildgewachsenen Pflanzen. Allerdings war der Anteil an detektierbaren Iridoiden in den *in vitro* gewachsenen Pflanzen (4,36 %) nur geringfügig niedriger als der in den intakten Pflanzen (4,88 %). Im allgemeinen enthalten Organe, die wichtig für das Überleben und die Fortpflanzung sind, die potentesten und den höchsten Gehalt an Sekundärstoffen (Wink 2003). Das könnte erklären, warum ein hoher Iridoidgehalt in den Blüten von *in vitro* und wildgewachsenen Pflanzen gefunden wurde. So kann beispielsweise die Resistenz gegenüber nichtspezialisierten Insekten, die sich von diesen Geweben ernähren, erhöht werden, um die Fortpflanzung zu sichern.

Anhand der Untersuchung wurden Abweichungen der Iridoidglykosidkonzentration zwischen verschiedenen Pflanzen einer Population und zwischen verschiedenen Organen einer bestimmten Pflanze festgestellt. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, wenn man bedenkt, dass die Produktion von Sekundärstoffen einen komplexen Prozess aus Biosynthese, Transport, Speicherung und Abbau in der Pflanze darstellt (Wink 1987, 1989, 1990). Die Anreicherung eines Sekundärstoffes hängt vom Gleichgewicht zwischen diesen Prozessen ab und kann daher in einer gewebe-, organ- und entwicklunsspezifischen Weise variieren (Wink 2003).

Diaz et al. (1998) wiesen Harpagosid in allen oberirdischen Pflanzenabschnitten von *S. scorodonia* nach und Sagare et al. (2001) fanden Harpagosid in den oberirdischen Teilen *in vitro* und wild gewachsener Pflanzen von *S. yoshimuare*. In der vorliegenden Untersuchung war der Iridoidgehalt in den Blättern der intakten und der *in vitro* Pflanzen von *S. nodosa* grundsätzlich höher als derjenige der anderen Pflanzenor-

gane. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass isoliertes Wurzelgewebe und Kalluskulturen offensichtlich nicht in der Lage waren eines der Iridoidglykoside in messbaren Mengen zu synthetisieren. Die Tatsachen, dass die Wurzelkulturen nicht in der Lage waren, die interessierenden Iridoidglykoside zu bilden und, dass der Akkumulationsort einer Substanz nicht unbedingt mit dem der Biosynthese identisch sein muss (Wink 1987), führten zu der Überlegung, dass die Biosynthese der Iridoidglykoside in den Blättern stattfinden könnte. In diesem Fall würde der Transport der Iridoide über die Stängel in andere Organe wie Wurzeln und Blüten erfolgen, um sie dort zu akkumulieren. Daher würde man niedrige Mengen an Iridoidglykosiden in den Stängeln erwarten. Tatsächlich wurde in den intakten Pflanzen der niedrigste Gehalt an Iridoidglykosiden in den Stängeln gefunden. In den *in vitro* Kulturen war der Iridoidgehalt in den Wurzeln am niedrigsten, aber der höhere Gehalt in den Stängeln könnte durch die schlecht entwickelten Wurzeln bedingt sein, die nicht als intaktes Speicherorgan fungieren können. Ein intrazellulärer Transport zum Speicherort könnte über das Phloem oder Xylem stattfinden oder auch apoplastisch oder symplastisch sein. Hydrophile Sekundärstoffe wie Glykoside werden meist in Vakuolen gespeichert. Auch Levieille und Wilson (2002) hinterfragten nach ihrem Nachweis von Harpagosid in den Blättern von *H. procumbens* den Biosyntheseort der Iridoidglykoside in der Pflanze. Um dies zu belegen, sind weitere Untersuchungen über die Biosynthese der Iridoidglykoside notwendig. So wurde beispielsweise für die Bildung von Chinolizidinalkaloiden in Pflanzen und Zellkulturen gezeigt, dass die Biosynthese in den oberirdischen grünen Geweben, insbesondere den Blättern stattfindet; Wurzeln und *in vitro* Wurzelkulturen waren dagegen inaktiv (Wink 1990).

Die Blätter von *S. nodosa* enthielten genauso viel oder sogar mehr Harpagosid (1,05 %) als die sekundären Speicherwurzeln *in vitro* vermehrter Pflanzen von *H. procumbens* (Levieille und Wilson 2002). Sogar die Blätter der *in vitro* kultivierten Pflanzen von *S. nodosa* enthielten immerhin 0,41 % Harpagosid und 1,67 % Aucubin. Verglichen mit den *in vitro* Pflanzen von *P. lanceolata* wurde für die diejenigen von *S. nodosa* eine fast identische Verteilung von Aucubin in den verschiedenen Organen nachgewiesen. *S. nodosa* stellt somit eine reiche und eventuell auch alternative Quelle zur Teufelskralle für die beiden Iridoidglykoside Harpagosid und Aucubin dar.

4.1.1.3.2 *Scrophularia nodosa* - intakte Pflanzen

Bei der Untersuchung der Veränderung des Iridoidglykosidgehaltes in intakten Pflanzen von *S. nodosa* im Verlauf der Vegetationsperiode (Juni bis Oktober) wurden deutliche Unterschiede für die verschiedenen Monate sowie unter und innerhalb der verschiedenen Pflanzen selbst nachgewiesen. Bereits 1972 zeigten Swann und Melville für *S. nodosa* (gesammelt in England von April bis September) den Anstieg des gesamten Iridoidgehaltes in den oberirdischen Teilen auf ein Maxium im Juli und einen anschließenden Abfall. Dies bestätigt die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse; hier wurde ein maximaler Gehalt (5,97 %) im August bestimmt. Der Zeitpunkt dieses Maximums wird sicherlich durch geographisch variierden Wachstumsbedingungen beeinflusst. Somit zeigt sich ein deutlicher Einfluss des Erntezeitpunktes auf den Gehalt an Iridoidglykosiden in der Pflanze.

In anderen *Scrophularia*-Arten wie beispielsweise *S. scorodonia* wurde ein durchschnittlicher Harpagosidgehalt von 2,37 % in den oberirdischen Teilen gefunden, wobei der Hauptanteil auf die Blätter fiel (1,76 %) (Diaz et al. 1998). Für *S. yoshimurae* wurden insgesamt etwa 0,96 % Harpagosid bestimmt (Sagare et al. 2001). Harpagosid war von Juni bis September das vorherrschende Iridoidglykosid in *S. nodosa*, im Oktober dominierte Aucubin. Der Harpagosidgehalt variierte in der gesamten Pflanze über die Monate von 1,37 bis max. 3,43 %, der Aucubingehalt von 1,37 bis max. 2,54 %. Catalpol wurde hauptsächlich im Juni nachgewiesen (0,19 %), jedoch nur in sehr geringen Mengen und eher sporadisch. Im Juli waren nur noch vereinzelt Spuren zu finden und in den folgenden Monaten ließ sich kein Catalpol mehr nachweisen. Das könnte zum einen bedeuten, dass weniger bzw. kein Catalpol mehr gebildet wurde, zum anderen könnte es aber auch schneller abgebaut worden und somit nicht mehr nachweisbar gewesen sein.

Anhand der großen Standardabweichungen wurden deutliche Unterschiede im Iridoidgehalt zwischen den verschiedenen Pflanzen sichtbar, was zum einen auf genetische Unterschiede aber auch auf äußere Einflüsse zurückzuführen ist. Bowers und Stamp (1992) wiesen bei intakten Pflanzen von *P. lanceolata* ebenfalls deutliche Unterschiede im Iridoidglykosidgehalt für verschiedene Genotypen nach. Sie zeigten zusätzlich, dass neben dem Genotyp auch das Blattalter einen signifikanten Einfluss auf den Iridoidglykosidgehalt hat. Die einzelnen Individuen zeigten eine heterogene Verteilung des Iridoidglykosidgehaltes; neue Blätter enthielten im Schnitt doppelt so viele Iridoidglykoside wie reife Blätter. Für *P. lanceolata* war der Catalpolgehalt in

den neuen Blättern meist höher als der Aucubingehalt und mit zunehmendem Blattalter veränderte sich diese Verteilung zugunsten von Aucubin. Auch bei *S. nodosa* nahm der Catalpolgehalt mit zunehmender Reife der Pflanze ab und die Iridoide waren heterogen verteilt. Bei der genaueren Betrachtung der Verteilung der Iridoidglykoside in jüngeren und älteren Pflanzenorganen zeigte sich für Harpagosid ein höherer Gehalt in den jüngeren Stängel- und Blattabschnitten. Bei Aucubin war dieser Unterschied nur geringfügig ausgeprägt, aber dennoch zu beobachten. Somit trifft die von Bowers und Stamp (1992) in *P. lanceolata* nachgewiesene höhere Konzentration an Iridoidglykosiden in den jüngeren Blättern auch auf Blätter und Stängel von *S. nodosa* zu.

Ein Vorteil der Kultivierung *in vitro* ist die Minimierung der Einflüsse von Umweltfaktoren wie schwankende Nährstoffgehalte, Wasseraufnahme, Photosyntheserate oder Pflanzenfraß. Diese Faktoren beeinflussen auch die Sekundärstoffproduktion. Die in *S. nodosa* enthaltenen Flavone und Glykoside scheinen als Fraßabwehrsubstanzen zu dienen; nur einige phytophage Spezialisten wie z. B. *Cionus hortulanus, C. scrophulariae, C. tuberculosus* oder *Cleopus pulchellus* akzeptieren *S. nodosa* als Nahrungsquelle (Räther 1989). Aufgenommene Sekundärstoffe dienen diesen Spezialisten wiederum als Schutz gegen potentielle Feinde. Catalpol beispielsweise scheint Larven und erwachsene Tiere der Gattung *Euphydryas* für Feinde unschmackhaft zu machen (Bowers und Collinge 1992). Speziell Iridoidglykoside wie Aucubin und Catalpol sind toxisch oder wehren nichtspezialisierte Fraßfeinde ab, wobei Catalpol das potentere von beiden hinsichtlich der Abwehr nichtspezialisierter Insekten zu sein scheint (Bowers und Stamp 1992, Jarzomski et al. 2000, Marak et al. 2002). Für Aucubin wurde dagegen eine stärkere Wirkung auf Mikroben nachgewiesen (Marak et al. 2002). Dies könnte u. a. auf strukturelle Unterschiede zurückzuführen sein; Catalpol weist im Gegensatz zu Aucubin eine reaktive Epoxidgruppe auf. So enthielten die im Oktober gesammelten Pflanzen von *S. nodosa* den geringsten Iridoidglykosidgehalt und wiesen alle starke Fraßspuren auf, die in den anderen Monaten nicht beobachtet wurden. Die in der vorliegenden Studie und auch von Bowers und Stamp (1992) beobachtete Veränderung des Iridoidglykosidgehaltes in Abhängigkeit von Genotyp und Blattalter kann für die Anfälligkeit eines bestimmten Genotyps oder eines bestimmten Pflanzenteils gegenüber Pflanzenfraß oder Mikrobenbefall und auch für die sich von der Pflanze ernährenden Insekten selbst somit von großer Bedeutung sein. Der Abwehreffekt könnte zum einen auf den bitteren

Geschmack der Iridoidglykoside zurückzuführen sein. Zum anderen könnte der Effekt auf biochemischen Wechselwirkungen der Aglyka beruhen, die unter schwach sauren Bedingungen oder durch insekteneigene ß-Glucosidasen im Verdauungstrakt gebildet werden (Marak et al. 2002). Der Sekundärstoff kann somit in der Pflanze bereits in aktiver Form oder als Prodrug vorliegen und wird dann nach Verletzung, Infektion oder im Körper des Pflanzenfressers aktiviert (Wink 2003). Viele dieser Sekundärstoffe sind für die sie produzierende Pflanze selbst toxisch und müssen daher separat in speziellen Bereichen gespeichert werden. In der Regel werden hydrophile Substanzen (wie z. B. Alkaloide, organische Säuren, Glykoside) in Vakuolen gespeichert, die strategisch günstig positioniert sind. Bei Verletzung der Pflanze kommt der in der Vakuole gespeicherte Sekundärstoff mit anderen Substanzen in Kontakt und kann zum aktiven Abwehrstoff metabolisiert werden (Wink 1997). So wird beispielsweise das Secoiridoidglycosid Oleuropein in den Blättern von *Ligustrum obtusifolium* durch die Attacke von Fraßfeinden, wodurch die räumliche Trennung der Substanzen aufgehoben wird, mit ß-Glucosidase in Verbindung gebracht. Aus Oleuropein entsteht dadurch ein starkes Protein-Alkylans mit ähnlicher Struktur wie Glutaraldehyd. Aucubin zeigte ähnliche Eigenschaften nach Behandlung mit ß-Glucosidase (Konno et al. 1999).

4.1.1.3.3 *Plantago lanceolata – in vitro* Pflanzen

Die *in vitro* Kulturen waren den Ende Mai gesammelten intakten Pflanzen in der Sekundärstoffproduktion um 0,22 % überlegen. Das Muster der Iridoidverteilung in *in vitro* und intakten Pflanzen wies dabei deutliche Unterschiede auf. Der Iridoidgehalt der *in vitro* Pflanzen nahm von den Blättern zu den Wurzeln hin ab; der höchste Aucubingehalt (1,59 %) wurde in den Blättern gefunden, ebenso wie der höchste Catalpolgehalt (0,81 %). Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Wurzeln intakter Pflanzen als beste Iridoidquelle (1,58 %) mit einer ausgewogenen Verteilung an Aucubin und Catalpol. Somit können die Wurzeln *in vivo* offensichtlich als Speicherorgan fungieren, wohingegen die Wurzeln *in vitro* zu schwach ausgebildet sind, um diese Funktion zu übernehmen.

Auch im Vergleich mit anderen Literaturangaben liegt die Produktion der *in vitro* Kulturen von Aucubin und Catalpol mit insgesamt 2,40 % in den Blättern im Bereich der intakten Pflanzen. Bowers and Stamp (1992) bestimmten einen Iridoidglykosidgehalt von 3,36 bis 5,66 % in den Blättern, Long et al. (1995) fanden über das Jahr verteilt einen Iridoidglykosidgehalt zwischen 0,9 und 4,0 % (Maximum im Juli). Im

Rahmen der Arbeit untersuchte kommerzielle *Plantago*-Blattdrogen wiesen einen Gehalt zwischen 0,91 und 1,81 % auf. Die großen Variationen der Aucubin- und Catalpolgehalte in *P. lanceolata* sind durch Genotyp, Blattalter, Phänologie der Pflanze, atmosphärischem Kohlenstoffdioxidgehalt und Pflanzenfraß bedingt (Jarzomski et al. 2000, Bowers und Stamp 1992). Dass die Akkumulation eines Sekundärstoffes in den Organen vom Gleichgewicht zwischen Biosynthese, Transport, Speicherung und Abbau des Stoffes in der Pflanze abhängt, wurde bereits bei *S. nodosa* diskutiert.

4.1.1.3.4 *Plantago lanceolata* - intakte Pflanzen

Beim Vergleich des Aucubin- und Catalpolgehaltes in intaken Pflanzen der verschiedenen *Plantago*-Arten (*P. lanceolata, P. media, P. major*) wurde deutlich, dass zum Sammelzeitpunkt Ende Mai *P. lanceolata* den größten Iridoidgehalt aufwies, wohingegen *P. major* am wenigsten Iridoidglykoside enthielt. Wie auch bei anderen Untersuchungen war in den eher zu Beginn der Wachstumsperiode untersuchten Blattproben von *P. lanceolata* Catalpol (1,03 %) gegenüber Aucubin (0,45 %) deutlich vorherrschend. Long et al. (1995) bestimmten im April einen Catalpolgehalt von 1,3 % gegenüber einem Aucubingehalt von 0,7 %; im Mai waren die Anteile der Iridoidglykoside fast gleich hoch, bevor sich das Verhältnis zugunsten von Aucubin veränderte. Jahreszeitlich bedingte Veränderungen des Pflanzenstoffwechsels und die aktuelle Wachstumsphase beeinflussen somit eindeutig den Gehalt an Iridoidglykosiden wie bereits bei den intakten Pflanzen von *S. nodosa* gezeigt wurde. Bowers und Stamp (1992) fanden in Übereinstimmung dazu in den jungen Blättern von *P. lanceolata* ebenfalls einen wesentlich höheren Catalpolgehalt und zeigten damit, dass neben verschiedenen anderen Faktoren wie dem Genotyp das Blattalter einen entscheidenden Einfluss auf den Iridoidglykosidgehalt hat. Sie fanden den höchsten Catalpolgehalt in neuen und mittelaltern Blättern von *P. lanceolata*. In den neuen Blättern war der Catalpolgehalt überwiegend höher als der Aucubingehalt. Mit zunehmendem Blattalter kann es zu einer Veränderung der Verteilung von Aucubin zu Catalpol kommen. Der Aucubingehalt nahm auf die Gesamtiridoide bezogen mit dem Blattalter zu. Da Aucubin die biosynthetische Vorstufe von Catalpol darstellt, folgerten sie, dass mit zunehmendem Blattalter (A) weniger Catalpol gebildet wird, (B) es schneller abgebaut wird und/oder (C) es aus dem Blatt abtransportiert wird.

In den Blättern und Blüten von *P. media* ließen sich geringe Mengen an Catalpol nachweisen. Long et al. (1995) wiesen lediglich im Januar Spuren von Catalpol in

Blättern von *P. media* nach. Taskova et al. (2002) konnten zum Sammelzeitpunkt Juni/Juli kein Catalpol in *P. media* nachweisen.

Bei den Blüten war *P. media* mit einem Aucubingehalt von 2,22 % und geringen Mengen an Catalpol den beiden anderen Arten deutlich überlegen. Bei *S. nodosa* wurde bereits darauf hingewiesen, dass die zur Fortpflanzung wichtigen Organe oft die meisten Sekundärstoffe enthalten. Solche starken Unterschiede in der Sekundärstoffproduktion zwischen den verschiedenen Arten sind sicherlich größtenteils genetisch bedingt und werden durch Umweltfaktoren in einem geringeren Maße beeinflusst. In den Blüten von *P. lanceolata* war hauptsächlich Catalpol (0,38 %) zu finden. Da Catalpol als der wirksamere Abwehrstoff betrachtet wird, könnte eine geringere Menge zur Abwehr von Fraßfeinden bereits ausreichen.

Die Wurzeln der verschiedenen Arten zeigten keine großen Abweichungen bezüglich des Gesamtiridoidgehaltes voneinander. Im Vergleich mit den anderen Organen war der Iridoidglykosidgehalt in den Wurzeln mit etwa 1,35 bis 1,60 % am höchsten. Lediglich bei *P. lanceolata* betrug der Catalpolgehalt etwa die Hälfte des Gesamtiridoidglykosidgehaltes, wohingegen in den Wurzeln der anderen Arten kein Catalpol nachgewiesen wurde.

Aucubin ist ein typisches Iridoidglykosid der Gattung *Plantago*, wohingegen Catalpol nur bei bestimmte Arten zu finden ist (Ronsted et al. 2000). Insgesamt wies *P. media* zum Sammelzeitpunkt mit 4,45 % den höchsten Gehalt an Iridoidglykosiden auf, gefolgt von *P. lanceolata* mit 3,48 % und *P. major* mit 2,19 %. Dass in *P. major* kein Catalpol synthetisiert wird und Aucubin das Hauptiridoid darstellt (Handjieva et al. 1991, Taskova et al. 2002, Long et al. 1995), wurde durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt. Die sporadischen Funde von Catalpol in *P. media* in der vorliegenden Arbeit und von Long et al. (1995) sprechen dafür, dass es generell nur in sehr geringem Maße in dieser Pflanzenart gebildet wird und/oder der Abbau so rasch erfolgt, dass es nicht nachgewiesen werden kann. Da bei *P. lagopus* in den oberirdischen Teilen u. a. Catalpol, Harpagosid und Aucubin gefunden wurden (Velazquez-Fiz et al. 2000), ist diese Pflanze ein besonders interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen.

4.1.1.3.5 Beeinflussung der Sekundärstoffproduktion in den *in vitro* Pflanzen durch Elicitierung mittels Methyljasmonat (MJ)

Da bereits in anderen Untersuchungen die Bildung von Sekundärstoffen durch MJ induziert bzw. gesteigert werden konnten, wurde die Wirkung von MJ auf die Synthese von Iridoidglykosiden am Beispiel der *in vitro* Pflanzen von *P. lanceolata* untersucht. Zayed und Wink (2004) konnten beispielsweise die Akkumulation des Alkaloids Hyoscyamin in mit *A. rhizogenes* transformierten Wurzelkulturen von *Brugmansia suaveolens* durch Zugabe von 200 µM MJ um das 25fache gegenüber der unbehandelten Kontrolle steigern. Jasmonsäure und ihr Ester MJ sind wichtige Elemente eines Signalweges, der zur Induktion von Sekundärstoffen führt. Die Sekundärstoffe dienen wie bereits diskutiert als Abwehrsubstanzen gegen Pflanzenfresser und Mikroorganismen, da die Eignung des betroffenen Pflanzensegments als Nahrungsquelle durch den erhöhten Sekundärstoffgehalt verändert wird. Die Biosynthese von Sekundärstoffen kann durch den Angriff von Mikroben oder Herbivoren angekurbelt werden (Wink 2004). In verletzten Pflanzen und in Pflanzen oder Zellkulturen, die mit Elicitoren der Pathogenabwehr behandelt worden waren, wurde die Akkumulation von Jasmonsäure beobachtet (Creelman und Mullet 1997). Die biologischen Eigenschaften der Jasmonate sind vielfältig: Förderung des Schließens der Stomata, Beschleunigung der Blattseneszenz in Hafer und Gerste, der Perikarpseneszenz in Sojabohnen, Induktion der Aufwicklung von Ranken in *Bryonia*, Stimulation des Stängelwachstums und der Wurzeldifferenzierung in Kartoffelpflanzen, Inhibierung der Keimung nicht ruhender Samen und Stimulierung der Keimung ruhender Samen. Offensichtlich werden diese Effekte durch die Kontrolle der Genexpression bewirkt. MJ und auch Salicylsäure induzieren die Transkription biosynthetischer Enzyme, die bei der Bildung von Abwehrsubstanzen in Pflanzen beteiligt sind (Zayed und Wink 2004, Creelman und Mullet 1997). Eine Elicitierung mittels MJ kann daher zur Steigerung der Sekundärstoffproduktion geeignet sein und ist für die biotechnologische Herstellung von Bedeutung.

In der vorliegenden Studie wurde für die untersuchten Blattproben durch die Zugabe von MJ bei allen Konzentrationen eine Verringerung des Aucubingehaltes erzielt. Auch der Catalpolgehalt nahm gegenüber den Kontrollen leicht ab, lediglich bei einer Konzentration von 200 µM MJ war der Catalpolgehalt im Mittel leicht erhöht, wies jedoch eine große Standardabweichung auf. Es konnte somit keine Steigerung der

Produktion von Iridoidglykosiden in den Blättern erzielt werden. Bei den Wurzeln zeigte sich ebenfalls eine Verringerung des Aucubingehaltes gegenüber den Kontrollen. Interessanterweise wurde jedoch eine deutliche Steigerung des Catalpolgehaltes in den Wurzeln erzielt. Diese Steigerung wurde bereits durch reines MeOH erreicht, wodurch der Catalpolgehalt von 0 % bei der unbehandelten Kontrolle auf 0,069 ± 0,002 % stieg. Die höchsten Catalpolgehalte wurden bei MJ-Konzentrationen von 50 µM (0,080 ± 0,004 %) und 100 µM (0,076 ± 0,000 %) detektiert. Somit wurde ein deutlicher Einfluss von MJ auf den Aucubin- und Catalpolgehalt in den Wurzeln der *in vitro* Pflanzen von *P. lanceolata* belegt; während der Aucubingehalt abnahm, wurde die Akkumulation von Catalpol deutlich gesteigert. Da Aucubin die biosynthetische Vorstufe von Catalpol ist (Bowers und Stamp 1992), könnte dies durch eine erhöhte Umwandlung von Aucubin in Catalpol erklärt werden. Daraus leitet sich die Vermutung ab, dass Catalpol eine wirksamerere Substanz zur Abwehr von Schädlingen darstellt. Dies wurde bereits in Kapitel 4.1.1.2.3 diskutiert.

4.1.2 Kalluskulturen

4.1.2.1 Etablierung und Wachstum

Für die Etablierung von Kalluskulturen ist das Verhältnis von Auxinen zu Cytokinen entscheidend, da die Induktion von Kallus eine fortlaufende Zellteilung ohne Differenzierungen voraussetzt (Reichling 1985). Das in der vorliegenden Arbeit gewählte Verhältnis von 0,5 mg/l 2,4-D (2.26 µM) zu 0,1 mg/ml (0.46 µM) Kinetin erwies sich sowohl zur Induktion von Primärkallus als auch zur Subkultivierung des Kallus bei allen Pflanzen als geeignet. Für *P. lanceolata* erwies sich jedoch wie bereits bei Budzianowska et al. (2004) beschrieben das MS-Medium ohne NH_4NO_3 als grundlegend für das Kalluswachstum. Die auf WP-Medium angelegten Kallusproben wuchsen sehr schlecht und zeigten eine starke Dunkelfärbung. Die von Budzianowska et al. (2004) bestimmten Wachstumsraten für Blatt- und Wurzelkallus lagen höher als die in der vorliegenden Arbeit bestimmten. Dies könnte an unterschiedlichen Wachstumsbedingungen liegen wie z. B. der höheren Hormonzugabe (2,4-D 4,52 µM).

Für *S. nodosa* wurde bisher noch nicht über die Etablierung von Kalluskulturen berichtet. Sie zeigten mit einer mittleren relativen Wachstumsrate von 3,2 ein schnelleres Wachstum als die Kalluskulturen von *H. procumbens* und die Wachstumsrate nahm mit dem Alter zu. Von *H. procumbens* wurden bereits 1977 (Abou-Mandour, Franz et al. 1982) Gewebekulturen aus frischen Knollen der

sekundären Speicherwurzel angelegt. Auch hier zeigte sich eine mit der Kulturdauer zunehmende Braunfärbung des Kallus. Diese wurde auf die Bildung von Polyphenolen durch erhöhte Aktivität der Phenoloxidasen zurückgeführt und konnte durch Zugabe von Polyvinylpyrrolidon unterbunden werden. Die Zuwachsraten wurden nach 12wöchiger Kulturdauer unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Sie lagen für MS-Medium mit einer Hormonergänzung von IES (0,2 mg/l), Kinetin (0,3 mg/l), 2,4-D (5 mg/l) und Dauerbeleuchtung bei 3,5. Im Vergleich dazu wurde in der vorliegenden Untersuchung nach 3wöchiger Kulturdauer eine Wachstumsrate von 2,6 erzielt.

4.1.2.2 Phytochemische Untersuchung

Bei der Analyse der Kalluskulturen auf die Iridoidglykoside Harpagosid, Aucubin bzw. Catalpol konnte in keiner der untersuchten Proben mit der angewendeten Methode eine der genannten Substanzen nachgewiesen werden. Das bestätigt die Ergebnisse von Abou-Mandour (1977); in den von ihm etablierten Kalluskulturen konnte kein Harpagosid nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, wenn man berücksichtigt, dass Kalluskulturen mehr oder weniger undifferenziertes Gewebe repräsentieren. Dies beeinflusst die Regulierung der in die Sekundärstoffproduktion involvierten Gene. Wichtige Gene können unterdrückt werden oder die spezifische Kontrolle einiger Gene kann komplett fehlen (Wink 1989, Charlwood et al. 1990). Oft werden Substanzen, die nur in geringen Mengen in undifferenzierten Zellen produziert werden, verstärkt in Wurzelkulturen produziert (Yamada und Hashimoto 1990). Daher sollten organisierte Gewebekulturen wie Wurzelkulturen oder *in vitro* Pflanzen eher zur Produktion bestimmter Sekundärstoffe geeignet sein, insbesondere wenn deren Biosynthese auf diese speziellen Gewebe beschränkt ist. Tatsächlich gibt es Substanzen wie Morphin, Hyoscyamin, Digitalisglykoside oder Lupanin, die nur in differenzierten Gewebekulturen, nicht aber in undifferenzierten Zellsuspensionskulturen gebildet werden (Wink 1989).

4.1.3 Wurzelkulturen

4.1.3.1 Charakterisierung des Ausgangsmediums

4.1.3.1.1 pH-Wert und Leitfähigkeit

Bei der Bestimmung des pH-Wertes von frisch autoklaviertem Medium zeigte sich eine deutliche Verminderung des vor dem Autoklavieren eingestellten pH-Wertes.

Dies wurde bereits von Skirvin et al. (1986) nachgewiesen. In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass durch den anfänglichen pH-Wert die Aufnahme von Nitrat und/oder Ammonium beeinflusst wird. Die Verwendung von NH_4^+ sowie NO_3^- als Stickstoffquelle im Medium führen wiederum zu Veränderungen des pH-Wertes. Ein Anstieg des pH-Wertes im Kulturmedium wird beobachtet, wenn NH_4^+ verbraucht wurde und NO_3^- im Medium der wachsenden Kulturen verbleibt (Staba 1980). Grundsätzlich sollten extreme pH-Schwankunen vermieden werden, da dies die Verfügbarkeit einiger Nährstoffe und damit das Wachstum hemmen kann. Man geht davon aus, dass die Zellen über einen geeigneten Mechanismus verfügen, um den pH-Wert in einem physiologischen Bereich zu halten (Staba 1980).

4.1.3.1.2 Ammonium- und Nitratgehalt

Ammonium und Nitrat sind die wichtigsten Quellen anorganischen Stickstoffes für die Wurzeln der höheren Pflanzen und in diesem Fall für die untersuchten Wurzelkulturen. Damit Nitrat in organischen Strukturen eingebaut werden kann, muss es zuerst durch Enzyme (Nitrat-Reduktase, Nitrit-Reduktase) zu Ammonium reduziert werden. Wurzeln sind im allgemeinen in der Lage zwischen 5 und 95 % des aufgenommenen Nitrats zu reduzieren (Marschner 1995). Während Nitrat in den Vakuolen ohne schädliche Effekte gespeichert werden kann, sind Ammonium und insbesondere Ammoniak bereits ab sehr geringen Konzentrationen toxisch. Durch die Bildung von Aminosäuren, Amiden und verwandten Substanzen werden sowohl Ammonium als auch Ammoniak in nicht toxische Substanzen überführt. Ob eine bestimmte Pflanze Nitrat oder eher Ammonium als Stickstoffquelle bevorzugt, hängt von vielen Faktoren ab. Allgemein gilt aber, dass bei einem kombinierten Angebot beider Stoffe die höchsten Wachstumsraten erzielt werden. Der intrazelluläre pH-Wert kann dann u. a. leichter reguliert werden (Marschner 1995). Die Zellwachstumsleistung wird von der zur Verfügung stehenden Stickstoffart offensichtlich nicht beeinflusst (Neumann 1995). Abhängig von der Pflanzenart, dem Entwicklungsstadium und dem Organ, kann der für das optimale Wachstum benötigte Stickstoffgehalt zwischen 2 und 5 % des TG der Pflanze betragen. Ist die Stickstoffversorgung zu gering, wird das Wachstum verzögert (Marschner 1995).

Neumann (1995), Garden (2003) und andere diskutieren insbesondere Stickstoffform und -konzentration und auch das Phosphatniveau in der Nährlösung als wichtigen Faktor für die Sekundärstoffproduktion. Aufgrund der Tatsache, dass die Iridoidgly-

koside von Interesse in den Wurzelkulturen nicht nachgewiesen werden konnten und eine für die Kulturen adäquate Versorgung mit Stickstoff und Phosphat belegt wurde, war eine Optimierung hinsichtlich der Zusammensetzung des Mediums nicht erforderlich.

4.1.3.1.3 Phosphatgehalt

Anders als Nitrat wird Phosphat in den Pflanzen nicht reduziert und verbleibt in seiner höchsten oxidierten Form. Auch wenn Phosphatester und energiereiche Phosphate nur in geringen Konzentrationen in den Zellen vorhanden sind, stellen sie essentielle Elemente für den Nukleinsäurestoffwechsel und den Energiemetabolismus in der Zelle dar. Der Phosphatbedarf für ein optimales Pflanzenwachstum liegt nach Marschner (1995) im Bereich von 0,3 bis 0,5 % des TG der Pflanze. Eine mögliche Toxizität kann bei Phosphorgehalten, die über 1 % des TG liegen, auftreten. Für die Wurzeln zeigte sich im Gegensatz zu den Sprossen eine geringere Inhibition des Wachstums durch Phosphatmangel (Marschner 1995).

4.1.3.2 Charakterisierung der Wurzelkulturen von *H. procumbens*

Die kultivierten Wurzeln weisen ähnliche Strukturen wie die Wurzeln intakter Pflanzen auf, unterscheiden sich jedoch von ihnen durch das Fehlen des sekundären Dickenwachstums. Somit findet das Wachstum nur in Länge und Breite statt und es kommt nicht zur Verdickung der Wurzel (Hashimoto und Yamada 1991). Nach Cresswell et al. (1989) lässt sich in Zellkultursystem das Wachstum in 3 Phasen unterteilen was sich im Groben auch auf Wurzelkulturen übertragen lässt. In Phase 1 erfolgt die Füllung der Kohlenstoff- und Stickstoffspeicher durch schnelle Aufnahme von Zucker und Stickstoff aus dem Medium. In der zweiten Phase kommt es zur Zellteilung und in Phase 3 erfolgt das Zellwachstum, die Produktion der Sekundärstoffe kann in dieser Phase stattfinden und auch die Mobilisierung von Kohlenhydratquellen bei Kohlenstoff-limitierten Medien. Die Kulturen von *H. procumbens* zeigten trotz Austestung verschiedener Medien keine befriedigende Anpassung an die Kulturbedingungen. Am besten erwies sich MS3-Medium in halber Konzentration für das Wachstum. FG und TG entwickelten sich annähernd parallel und es wurde nach etwa 13 Tagen eine maximale netto Massenproduktion von 2,19 g FG erzielt. Der folgende rapide Wachstumseinbruch könnte durch im Medium gebildete Substanzen bedingt sein, da dieses mit zunehmender Kulturdauer eine extreme Gelbfärbung

aufwies. Es kommt aber auch eine mechanische Abnutzung in Frage, wodurch die Zellen mit der Zeit zerstört wurden. Durch eine solche Zerstörung der Zellen würde sich auch die bei der Nitrat- und Phosphatanalyse beobachtete erneute Freisetzung dieser Substanzen in das Medium erklären. Der bei der reinen Massenproduktion zu Beginn stattfindende Massenverlust wurde durch das Schneiden der Kulturen hervorgerufen und war durch den Verlust von Wurzelmaterial aufgrund der lockeren Struktur bedingt.

Durch den schnelleren Verbrauch von NH_4^+ gebenüber NO_3^- kam zu einer Erhöhung des pH-Wertes. Insgesamt traten keine extremen Schwankungen auf und der pH-Wert lag mit Werten zwischen 4 und 5 etwas unterhalb des optimalen Bereiches. Die Leitfähigkeit als Maß für die im Medium frei zur Verfügbarkeit stehenden Ionen zeigte einen zum pH-Wert entgegengesetzten oder parallelen Verlauf und nahm durch Verbrauch der Ionen aus dem Medium wie erwartet ab.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Ammonium als Stickstoffquelle der Wurzelkulturen von *H. procumbens* deutlich bevorzugt wurde. In verschiedenen anderen Zellkulturen (z. B. *Daucus, Ipomoea*), denen unterschiedliche Stickstoffquellen zur Verfügung standen, wurde eine solche Päferenz ebenfalls beobachtet (Staba 1980). Befindet sich NH_3 gemeinsam mit anderen stärker oxidierten Stickstoffquellen wie NO_3^- im Medium, dann wird NH_3 gewöhnlich bevorzugt verbraucht (Cresswell et al. 1989). Der bei *H. procumbens* über die gesamte Kulturdauer relativ hohe im Medium verbleibende Nitratgehalt spricht für eine ausreichende Versorgung mit Stickstoff.

Durch die verzögert einsetzende Zunahme der netto Massenproduktion blieb bei *H. procumbens* der Phosphatgehalt zunächst konstant. Das in der Wachtumsphase aufgenommene Phosphat lag unter dem im Medium zur Verfügung stehenden Gehalt und deutet somit auf eine ausreichende Phosphatversorgung hin. Das am Ende der Bestimmung erneut freigesetzte Phosphat könnte wie bereits erwähnt auf die Freisetzung aus absterbenden Zellen zurückgeführt werden.

4.1.3.3 Charakterisierung der Wurzelkulturen von *S. nodosa*

Das stärkste Wachstum zeigten die Wurzelkulturen von *S. nodosa*. Die Zunahme an FG erfolgte relativ kontinuierlich bis zum 12. Kulturtag wo der Übergang in eine annähernd stationäre Phase erfolgte, die von einem Maximum an Tag 21 unterbrochen wurde. Das Verhältnis von FG zu TG nahm über die gesamte

Kulturdauer nur leicht zugungsten des FG zu. Die Wurzeln gewannen also deutlich an Biomasse und lagerten nicht nur viel Wasser ein. Es wurde eine maximale netto Massenproduktion von 5,23 g FG bis zum 19. Kulturtag erreicht.

Wie bei *H. procumbens* kam es durch den schnelleren Verbrauch von NH_4^+ gebenüber NO_3^- zu einer Erhöhung des pH-Wertes. Insgesamt traten keine extremen Schwankungen auf und der pH-Wert lag überwiegend im optimalen Bereich zwischen pH 5 und 6. Die Leitfähigkeit als Maß für die im Medium frei zur Verfügbarkeit stehenden Ionen zeigte einen zum pH-Wert annähernd entgegengesetzten oder parallelen Verlauf und nahm durch Verbrauch der Ionen aus dem Medium wie erwartet ab.

Wie bereits beim pH-Wert diskutiert, wurde Ammonium als Stickstoffquelle von den Wurzelkulturen deutlich bevorzugt. Die zunehmenden Wachstumsraten über die Kulturdauer sprechen für eine ausreichende Versorgung mit Stickstoff bis zur nächsten Überführung in frisches Medium.

In den untersuchten Kulturen zeigte sich die schnellste Abnahme des im Medium verfügbaren Phosphates bei *S. nodosa*. Die auch danach stattfindende zunehmende Massenproduktion spricht für eine angemessene Versorgung mit Phosphat über die 3wöchige Kulturdauer.

4.1.3.4 Charakterisierung der Wurzelkulturen von *P. lanceolata*

Ein ähnliches, aber insgesamt etwas geringeres Wachstumsverhalten, wiesen die Kulturen von *P. lanceolata* im Vergleich zu denjenigen von *S. nodosa* auf. Aufgrund der schnellen Ausdifferenzierung neuer Sprosse aus den Wurzeln mussten diese allerdings regelmäßig wöchentlich umgesetzt, geschnitten und neue Sprossansätze entfernt werden. Das FG nahm relativ kontinuierlich zu, eine stationäre Phase wurde innerhalb der kurzen Kultivierungsdauer nicht erreicht. Das TG und somit die Biomasse nahm in der Anfangsphase nicht ganz so stark zu wie das FG, was aber vermutlich durch die zunächst in Phase 1 erfolgende Nährstoffaufnahme bedingt ist. Immerhin wurde nach 9 Tagen eine netto Massenproduktion von 1,85 g FG nachgewiesen.

Es traten keine extremen Schwankungen bezüglich des pH-Wertes auf, der auf einen Wert im optimalen Bereich zwischen pH 5 und 6 anstieg. Die Leitfähigkeit als Maß für die im Medium frei zur Verfügbarkeit stehenden Ionen zeigte einen zum pH-Wert

entgegengesetzten Verlauf und nahm durch Verbrauch der Ionen aus dem Medium wie erwartet ab.

Bei *P. lanceolata* war die für *H. procumbens* und *S. nodosa* beobachtete Präferenz für NH_4^+ gebenüber NO_3^- nicht zu beobachten. Die zunehmenden Wachstumsraten sprechen für eine ausreichende Versorgung mit Stickstoff bis zur nächsten Überführung in frisches Medium.

Aufgrund der durch die schnelle Ausdifferenzierung neuer Sprosse bedingte kurze Kulturdauer der Wurzelkulturen lag eine ausreichende Phosphatversorgung vor.

4.1.3.4.1 Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes*

Hairy root Kulturen sind hinsichtlich der Sekundärstoffproduktion von großem Interesse. Gewöhnlich vereinen sie schnelles Wachstum mit den biochemischen Eigenschaften der Wurzeln nicht transformierter Pflanzen (Wildi und Wink 2002). In den durch Transformation mit *A. rhizogenes* etablierten Hairy root Kulturen von *S. nodosa* wurde eine exzessives Adventivwurzelbildung hervorgerufen. Das gegenüber der nicht transfomierten Wurzelkultur gesteigerte Wachstum wurde anhand des Vergleichs der netto Massenproduktion deutlich. Für die transformierten Gewebe wurde ein veränderter Stoffwechsel nachgewiesen. Zum einen produzieren die transformierten Zellen Opine, die den Bakterien wiederum als Stickstoffquelle dienen. Zum anderen kann auch der Sekundärstoffwechsel beeinflusst werden (Wink 1987b). In solchen Kulturen kann durchaus das für die intakte Pflanze typische Muster an Sekundärstoffen in ähnlichen Konzentrationen gefunden werden, wie z. B. bei *Nicotiana tabacum* (Neumann 1995). Für *S. nodosa* ließ sich durch Transformation mit *A. rhizogenes* (TR105) in den untersuchten Wurzelkulturlinien jedoch keine Produktion von Iridoidglykosiden induzieren. Sauerwein et al. (1992) erreichten eine gesteigerte Produktion des Tropanalkaloids Hyoscyamin in Hairy root Kulturen von *Hyoscyamus albus.* Das Alkaloid wurden auch in normalen Wurzelkulturen gebildet und es ist bekannt, dass die Biosynthese in den Wurzeln stattfindet. Dies trifft auch für Hairy root Kulturen von *N. tabacum* zu, die aus infizierten Stängelabschnitten etabliert wurden. Der Alkaloidgehalt war bis zu 12 mal höher als im normalen Stängelgewebe und die Alkaloide werden normalerweise in der Wurzel gebildet (Wink 1987b). In den normalen Wurzelkulturen von *S. nodosa* wurden offensichtlich keine Iridoidglykoside produziert und wie bei den Wurzelkulturen bereits diskutiert, liegt die Vermutung nahe, dass die Biosynthese der Substanzen in den Blättern stattfindet.

Auf dieser Grundlage ist es nicht überraschend, dass auch in den getesteten Hairy root Kulturen von *S. nodosa* keine Iridoidglykoside gefunden wurden. Eine Manipulation des Sekundärstoffwechsels in Wurzelkulturen durch Transformation mit *A. rhizogenes* erscheint nur dann sinnvoll, wenn die Substanzen auch tatsächlich im Wurzelgewebe synthetisiert werden können.

Die mehrfachen Transformationsversuche mit Blatt- und Wurzelstücken von *H. procumbens* und *P. lanceolata* waren auch mit verschiedenen *Agrobacterium*-Stämmen unter den beschriebenen Bedingungen nicht erfolgreich. In diesem Zusammenhang gibt es einige Berichte über Pflanzenarten, die gegenüber *A. rhizogenes* unempfindlich sind. Ebenfalls nicht erfolgreich waren beispielsweise Transformationsversuche bei einigen Alkaloide produzierenden Arten wie *Cytisus scoparius, Laburnum anagyroides, Thermopsis fabacea* u. a. (Wink 1987b). Das Scheitern der Transformation bei bestimmten Pflanzenarten ist sicherlich auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Zehra et al. (1999) geben an, dass die Art des Bakterienstrangs Einfluss auf die Transformationshäufigkeit hat. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Transformationshäufigkeit und das Produktionspotential an Biomasse nicht nur vom Bakterienstrang abhängen, sondern auch die Wirtspflanze selbst eine entscheidende Rolle spielt. Auch Babaoglu et al. (2004) diskutieren eine unterschiedlich starke Wirkung verschiedener *A. rhizogenes* Stränge auf die Wirtspflanzen.

4.1.3.4.2 Phytochemische Untersuchung

Wie bei den Kalluskulturen konnte bei der Analyse auf Iridoidglykoside in keiner der untersuchten Wurzelproben mit der angewendeten Methode eine der genannten Substanzen nachgewiesen werden. Da in den Wurzelkulturen der Transport von Sekundärstoffen aus der Wurzel in die oberirdischen Organe wie Blätter und Stängel gestört ist, werden z. T. auch Sekundärstoffe in das verbrauchte Medium abgegeben (Hashimoto und Yamada 1991). Auch nach Wink (1994) spielt die Analyse des Mediums bei der Untersuchung des Sekundärstoffwechsels von Pflanzenkulturen eine wichtige Rolle, da das Medium *in vitro* kultivierter Pflanzenzellen zum Teil der externen Aufbewahrung von Ionen und bestimmten Metaboliten dient und somit die Funktionen einer Vakuole übernimmt. Im verbrauchten Medium der Wurzelkulturen wurden jedoch ebenfalls keine Iridoidglykoside detektiert.

Wie bereits bei der Diskussion der Kalluskulturen erwähnt wurde, sollten differenzierte Gewebekulturen wie Wurzelkulturen eher zur Produktion bestimmter Sekundärstoffe geeignet sein, wenn deren Biosynthese auf dieses spezielle Gewebe beschränkt ist. Nach Wink (1987) kann die Biosynthese einer Substanz, die beispielsweise auf das Mesophyll der Blätter beschränkt ist, auch nur in Zellen stattfinden, die sich in die benötigte Zellart ausdifferenzieren können. Folglich sollten Wurzelkulturen von *S. nodosa* in der Lage sein, Iridoidglykoside zu produzieren, wenn dieses Gewebe zur Biosynthese der Substanzen befähigt ist. So werden beispielsweise Valepotriate, die zu den nichtglykosidischen Iridoiden zählen, in den Wurzeln von Pflanzen der Familie Valerianaceae synthetisiert und auch gespeichert. Wurzelkulturen von *Centranthus*-, *Valerianella*- und *Fedia*-Arten reichern diese Sekundärstoffe in ähnlichem Maßstab wie die intakten Pflanzen an (Charlwood et al. 1990). Das Unvermögen der untersuchten Wurzelkulturen von *S. nodosa, H. procumbens* und *P. lanceolata* die Substanzen von Interesse zu bilden und die Tatsache, dass der Akkumulationsort nicht unbedingt mit dem Ort der Biosynthese identisch sein muss (Wink 1987, 2000), führten zu der Überlegung, dass die Biosynthese der Iridoidglykoside in den Blättern und nicht in den Wurzeln der drei Pflanzen stattfinden könnte. Um diesen indirekten Beweis zu belegen sind, wie bereits bei den *in vitro* Pflanzen diskutiert, weitere Untersuchungen über die Biosynthese der Iridoidglydoside erforderlich.

4.1.4 Schlussfolgerungen

Die *in vitro* kultivierten Pflanzen von *S. nodosa* produzierten insgesamt deutlich mehr Harpagosid als diejenigen von *H. procumbens*. Für Aucubin wiesen sie in Blättern, Blüten und Wurzeln ein fast identisches Verteilungsmuster wie die *in vitro* Pflanzen von *P. lanceolata* auf. Der Gehalt an Iridoidglykosiden in den analysierten intakten Pflanzen war etwas höher als in den *in vitro* Pflanzen. *S. nodosa* stellt somit eine reiche und möglicherweise alternative Quelle an Harpgagosid dar. Darüberhinaus könnte *S. nodosa* auch hinsichtlich der Aucubinproduktion von Interesse sein und die *in vitro* Pflanzen von *P. lanceolata* stellen ebenfalls eine reiche Quelle an Aucubin und Catalpol dar. Weitere Inhaltsstoffe der Gattungen *Scrophularia* und *Harpagophytum* erweitern das Wirkungsprofil der Extrakte und zum Vergleich der Wirkungen sind pharmakologische Studien erforderlich.

Da Kallus- und Wurzelkulturen offensichtlich nicht in der Lage waren Iridoidglykoside zu produzieren, liegt die Vermutung nahe, dass die Biosynthese der Iridoidglykoside wie Harpagosid, Aucubin und Catalpol in den Blättern und nicht in den Wurzeln stattfindet. Um diesen indirekten Nachweis zu belegen, sind weitere Untersuchungen zur Biosynthese dieser Iridoidglykoside notwendig. Die Akkumulation der Iridoidglykoside in den verschiedenen Pflanzenorganen wird durch das Gleichgewicht zwischen Biosynthese, Transport, Anreicherung und Abbau beeinflusst und ist u. a. von Jahreszeit, Genotyp, Angriff durch Fraßfeinde und Entwicklungsstadium der einzelnen Pflanzenorgane abhängig.

4.2 Untersuchungen zur antiinflammatorischen Wirksamkeit und zur Beeinflussung der Angiogenese

4.2.1 Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1)

Da in *vivo* Tests meist sehr schwierig, nur unter großem Zeitaufwand und mit hohen Kosten verbunden durchführbar sind, bieten *in vitro* Tests die Möglichkeit, zunächst grundlegende Informationen über das pharmakologische Potential einer Substanz oder Droge zu gewinnen. Eine solche Möglichkeit bietet der durchgeführte Test zur Evaluierung der COX-1/Phospholipase A_2 Hemmung. Diese Ergebnisse lassen sich zwar nicht einfach auf die *in vivo* Wirkungen übertragen, Tierversuche zur Belegung der Wirksamkeit *in vivo* bringen jedoch ethische Einschränkungen mit sich.

Es liegen viele widersprüchliche Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der Beeinflussung der Arachidonsäurekaskade durch Iridoidglykoside vor. So geben beispielsweise Benito et al. (2000) bei der *in vitro* Hemmung der TXB_2-Freisetzung für Aucubin und Harpagosid einen IC_{50} von 12 µM bzw. 10 µM an. Auch Loew et al. (2001) geben einen Effekt auf die Arachidonsäurekaskade durch einen *Harpagophytum*-Extrakt an. Sie bestimmten einen IC_{50} von 49 µmol/l für reines Harpagosid bzw. 0,37 mg/ml (55 µmol/l bezogen auf Harpagosid) für einen Spezialextrakt hinsichtlich der TXB_2-Biosynthese. Huang et al. (2006) zeigten für Harpagosid eine Hemmung der COX-2- und iNOS-Synthese auf der Transkriptions- und Translationsebene, wodurch Entzündungs- und Schmerzbildung verhindert werden. Whitehouse et al. (1983) und Moussard et al. (1992) [zitiert in Boje, 2002] dagegen konnten keine Beeinflussung der Arachidonsäurekaskade durch einen *Harpagophytum*-Extrakt feststellen. Boje (2002) untersuchte aufgrund der widersprüchlichen Literaturangaben im Rahmen einer Dissertation die Hemmung der

Phospholipase A_2 und der 5-Lipoxygenase *in vitro* durch einen phytochemisch untersuchten *Harpagophytum*-Extrakt. Es wurde gezeigt, dass der *Harpagophytum*-Extrakt die Aktivität der Phosplipase A_2 nicht inhibieren konnte. Zu diesem Ergebnis kam auch die vorliegende Studie. Weder für reines Harpagosid noch für die verschiedenen *Harpagophytum*-Extrakte konnte eine Hemmwirkung nachgewiesen werden; eine Hemmung wurde lediglich mit der Positivkontrolle erreicht (Aspirin IC_{50} = 0,8 µM). Da im *in vitro* Testsystem keine Metabolisierung der Iridoidglykoside in ihre Aglyka stattfindet, sprechen diese Ergebnisse für die bereits in der Einleitung diskutierte Theorie, dass die Iridoiglykoside als Prodrugs aufgenommen und erst im Körper durch ß-Glucosidasen im Darmtrakt in ihre wirksamen Aglyka metabolisiert werden. Diese sind aufgrund ihrer Dialdehydform besonders reaktiv und können mit der freien Aminogruppe in Proteinen interagieren. Kim et al. (2000) zeigten *in vitro* und *in vivo*, dass Aucubin selbst nicht kovalent an Proteine bindet, im Gegensatz zu dem durch Zugabe von ß-Glucosidase gebildeten Aglykon Aucubigenin. Diese irreversiblen Proteinbindungen könnten zur biologischen Wirkung der Iridoidglykoside beitragen. Park und Chang (2004) belegten *in vitro* für Aucubigenin einen negativen Effekt auf die Produktion von TNF-α nicht jedoch für Aucubin. Bekannt ist auch die unter Einwirkung von Säuren oder ß-Glucosidasen und gleichzeitiger Anwesenheit einer Ammoniumquelle stattfindende Umwandlung von Iridoidglykosiden zu Pyridinmonoterpen-Alkaloiden (Ghisalberti 1998).
Die Überprüfung der berechtigten Annahme, dass das Aglykon die wirksame Substanz darstellt und nicht das Glykosid, sollte aufgrund der starken Reaktionsfähigkeit der Aglyka und der dadurch bedingten Instabilität *in vivo* erfolgen.

4.2.2 Hemmung der Lipoxygenase (LOX)

Die pflanzliche LOX ist in Vakuolen und Plastiden der Pflanzenzellen zu finden und oxidiert Linolsäure an Position 9 oder 13 zu 9- oder 13-Hydroperoxylinolsäure. Die Rolle der 9-Hydroperoxide und deren Katabolite in Pflanzen ist noch nicht vollständig geklärt. Die LOX spielt für die Biosynthese der Jasmonate eine essentielle Rolle (Creelman und Mullet 1997, Gardner 1991). Durch Verwundung wird die LOX-Aktivität stark erhöht und die Produktion von Substanzen mit wundheilenden Eigenschaften angekurbelt. Andere Produkte der LOX besitzen beispielsweise antifungale Eigenschaften (Gardner 1991). Der pflanzliche Lipoxygenase-Weg ist zwar nicht exakt identisch mit der Arachidonsäurekaskade in Tieren, entspricht ihr aber in

vielerlei Hinsicht. Erstaunlicherweise können die pflanzlichen LOXen die Bildung von Leukotrienen und Lipoxinen aus Arachidonsäure katalysieren, obwohl diese Substanzen nicht im Pflanzenreich vorkommen (Gardner 1991).

Der für die Positivkontrolle (NDGA) ermittelte IC_{50} von 0,30 µM liegt etwas unterhalb der in der Literatur angegebenen Werte zwischen 2,4 und 10 µM (Sircar et al. 1983). Für Harpagosid, Aucubin und Catalpol wurden IC_{50}-Werte zwischen 0,10 und 0,35 mM bestimmt. Diese sind allerdings mit Einschränkungen zu betrachten, da es nach Zugabe höherer Inhibitorkonzentrationen zu leichten Trübungen im Testsystem kam. Es kam durch die Trübungen jedoch nicht zu einer Verringerung des Iridoidglykosidgehaltes wie anhand einer HPLC-Analyse gezeigt wurde. Daher konnten keine höheren Konzentrationen gemessen werden, die jedoch für die genauere Bestimmung des IC_{50}-Wertes erforderlich gewesen wären. Durch Zugabe von ß-Glucosidase konnte im vorliegenden Testsystem keine stärkere Hemmung der LOX hervorgerufen werden. Eine HPLC-Analyse belegte, dass unter den Versuchsbedingungen die Glykoside nur z. T. hydrolysiert wurden. Daher sind weitere Variationen des Testsystems notwendig, damit eine optimale Umsetzung der Glykoside in ihre Aglyka erfolgen kann.
Bei den getesteten Pflanzenextrakten lagen die IC_{50}-Werte bezogen auf den Iridoidglykosidgehalt wesentlich niedriger (Harpagosid 0,51 - 49,87 µM, Aucubin 12,21 - 82,20 µM, Catalpol 0,83 - 47,61 µM). Diese Ergebnisse zeigen eine stärkere Beeinflussung der Sojabohnen-LOX durch die Gesamtextrakte als durch die isolierten Iridoidglykoside, was auf weitere wirksame evtl. synergistisch wirkende Inhaltsstoffe schließen lässt. Auch für einen Pflanzenextrakt aus *Warburgia salutaris*, der vor allem bei Bakterien- und Hefeinfektionen angewendet wird und u. a. das Dialdehyd Warburganal (Sesquiterpen) enthält, ergab sich eine Hemmung der LOX. Keine Hemmung dagegen wurde in der getesteten Konzentration für einen ethanolischen Extrakt aus Matricariae flos beobachtet. Die getestete Konzentration (0,03 g/ml) war allerdings recht niedrig, da die Aufkonzentration des Extraktes aufgrund der flüchtigen Inhaltsstoffe nicht möglich war. Auch für Flavonoide wie Centaureidin wurde eine Hemmung der Sojabohnen-LOX (IC_{50} 20 µM) nachgewiesen (Abad et al. 1995). Für die Positivkontrolle NDGA ergab sich ein IC_{50} von 44 µM. Verwendet wurde eine modifiziertes Testsystem, das ebenfalls auf der von Sircar et al. (1983) beschriebe-

nen Methode beruht. Die Abweichungen in den verwendeten Testsystemen könnten die unterschiedlich hohen IC_{50} Werte für NDGA erklären.
Diese Ergebnisse lassen sich wie bereits diskutiert nicht einfach auf die Arachidonsäurekaskase in Tieren übertragen, geben jedoch einen ersten Hinweis, ob eine Substanz einen Einfluss auf die LOX zeigt. Die vorliegenden Testergebnisse belegen einen schwächeren Einfluss der isolierten Iridoidglykoside auf die LOX als die Pflanzenextrakte. Der Test stellt ein einfaches, reproduzierbares und kostengünstiges Modell zum Screening vieler Substanzen dar. Bei positiven Ergebnissen kann dann eine *in vitro* Testung mit einem Modell erfolgen, das sich an der Arachidonsäurekaskade in Säugetieren orientiert. Verschiedene Iridoidglykoside und auch *Harpagophytum*-Extrakte wurden bereits in solchen Testsystemen untersucht. Benito et al. (2000) bestimmten *in vitro* für Aucubin einen IC_{50} von 72 µM bei der Hemmung der LTC_4 Freisetzung, stellten für Harpagosid dagegen keinen signifikanten Einfluss fest. Loew et al. (2001) testeten *in vitro* die Effekte auf die Cys-LT Biosynthese und geben für Harpagosid und einen *Harpagophytum*-Spezialextrakt einen IC_{50} von 39 µmol/l bzw. 0,06 mg/ml (9,2 µmol/l bezogen auf Harpagosid). Die Literaturangaben sind also auch in Bezug auf die Hemmung der LOX sehr widersprüchlich. Boje (2002) konnte durch *in vitro* Testung keinen hemmenden Einfluss eines *Harpagophytum*-Extraktes auf die 5- und 12-LOX feststellen. Die Testergebnisse sind insgesamt jedoch wegen variierender Versuchsbedingungen und der Verwendung unterschiedlicher Extrakte schwierig miteinander vergleichbar. Wie bei der Hemmung der Phospholipase und der COX diskutiert, gilt hier ebenfalls zu berücksichtigen, dass *in vitro* keine Metabolisierung der Substanzen stattfindet. Dies spielt aber für die Wirksamkeit *in vivo* eine entscheidende Rolle.

4.2.3 Beeinflussung der Angiogenese

Der *in vivo* CAM-Assay am Hühnerembryo zählt zu den etablierten Testsystemen, um die antiangiogene Wirkung von Substanzen zu testen. Die Angiogenese, die Bildung neuer kapillärer Blutgefäße, findet sowohl bei physiologischen Entwicklungsprozessen, als auch bei pathologischen Prozessen wie Tumorwachstum und Metastasenbildung aber auch Entzündungen statt (Auerbach et al. 2003). Bei der rheumatoiden Arthritis treten beispielsweise neue kapilläre Blutgefäße in das Gelenk ein und zerstören den Knorpel (Tufan und Satiroglu-Tufan 2005). Gesteuert wird die Angiogenese gewöhnlich durch den Anstieg proangiogener Wachstumsfaktoren wie

VEGF, bFGF, PDFG und EGF, die wiederum die Phosphorylierung ihrer entsprechenden Rezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen induzieren, was letztlich zur Bildung neuer Blutgefäße führt (Tong et al. 2004).
Sekundärstoffe wie die Isoflavone Genistein (Miura et al. 2002), Tectorigenin und Tectoridin (Jung et al.2003) oder die Bittersäure Humulon (Shimamura et al. 2001) zeigen antiangiogene Wirkungen. Auch die in der chinesischen Volksmedizin zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis verwendete Pflanze *Shiraia bambusicola* enthält eine Substanz (Shiraiachrome A), für die eine antiangiogene Wirkung nachgewiesen wurde (Tong et al. 2004). Da *Harpagphytum*-Extrakte zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt werden, wurde Harpagosid auf antiangiogene Wirkung untersucht. Ebenfalls getestet wurde Catalpol, das aufgrund der Epoxidgruppe reaktiver sein sollte als Aucubin. Für beide Substanzen konnte in den getesteten Konzentrationen keine antiangiogene Wirkung belegt werden. Somit scheint keine Wechselwirkung dieser Substanzen mit pro-angiogenen Wachstumsfaktoren oder sonstigen bei der Angiogenese ablaufenden Prozessen statt zu finden.

4.2.4 Schlussfolgerungen

Harpagosid und *Harpagophytum*-Extrakte zeigen keinen hemmenden Einfluss auf die COX-1. In dem *in vitro* Testsystem findet allerdings keine Metabolisierung dieser Substanzen in ihre reaktiven Aglyka statt, was aber für die Wirksamkeit *in vivo* eine entscheidende Rolle spielt. Eine Wirkung wurde dennoch auf die LOX aus Sojabohnen belegt, wobei eine stärkere Beeinflussung der LOX durch die Gesamtextrakte als durch die verschiedenen isolierten Iridoidglykoside beobachtet wurde. Dies lässt auf weitere wirksame, evtl. synergistisch wirkende Inhaltsstoffe schließen. Der *in vivo* CAM-Assay am Hühnerembryo belegt für die Iridoidglykoside kein antiangiogenes Potential, so dass dieser Wirkmechanismus in Bezug auf die rheumatoide Arthritis ausgeschlossen werden kann.

5 Literaturverzeichnis

A

Abad, M. J., Bermejo, P. & Villar, A. (1995). The activity of flavonoids extracted from *Tanacetum microphyllum* DC. (Compositae) on soybean lipoxygenase and prostaglandin synthetase. General Pharmacology 26, 815-819.

Abou-Mandour, A. (1977). Pharmazeutisch-biologische Untersuchungen der Gattung *Harpagophytum*. 2. Mitteilung: Gewebekulturen von *Harpagophytum procumbens*. Planta Medica 31, 238-244.

Abou-Mandour, A. (1996). Zell- und Gewebekulturen - ihre Bedeutung für die Pflanzenforschung. Biologie in unserer Zeit 26, 35 - 42.

Aichele, D. & Golte-Bechtle, M. (1997). Was blüht denn da? Wildwachsende Blütenpflanzen Mitteleuropas. Kosmos Verlag, Stuttgart.

Alfermann, A. W., Spieler, H. & Reinhard, E. (1985). Biotransformation of cardiac glycosides by *Digitalis* cell cultures in airlift reactors. In: Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Edited by K.-H. Neumann, W. Barz & E. Reinhard. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp. 316-322.

Auerbach, R., Lewis, R., Shinners, B., Kubai, L. & Akhtar, N. (2003). Angiogenesis Assays: A critical overview. Clinical Chemistry 49, 32-40.

B

Babaoglu, M., Davey, M. R., Power, J. B., Sporer, F. & Wink, M. (2004). Transformed roots of *Lupinus mutabilis*: Induction, culture and isoflavone biosynthesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78, 29-36.

Baghdikian, B., Lanhers, M. C., Fleurentin, J., Ollivier, E., Maillard, C., Balansard, G. & Mortier, F. (1997). An analytical study, anti-inflammatory and analgesic effects of *Harpagophytum procumbens* and *Harpagophytum zeyheri*. Planta Medica 63, 171-176.

Baghdikian, B., Guiraud-Dauriac, H., Ollivier, E., Annie, N. G., Dumenil, G. & Balansard, G. (1999). Formation of nitrogen-containing metabolites from the main iridoids of *Harpagophytum procumbens* and *H. zeyheri* by human intestinal bacteria. Planta Medica 65, 164-166.

Bartholomaeus, A. & Ahokas, J. (1995). Inhibition of P-450 by aucubin: Is the biological activity of aucubin due to its glutaraldehyde-like aglycone? Toxicology Letters 80, 75-83.

Benito, P. B., Lanza, A. M. D., Sen, A. M. S., Galindez, J. d. S., Matellano, L. F., Gomez, A. S. & Martinez, M. J. A. (2000). Effects of some iridoids from plant origin on arachidonic acid metabolism in cellular systems. Planta Medica 66, 324-328.

Bermejo, P., Abad, M. J., Diaz, a. M., Fernandez, L., Santos, J. D., Sanchez, S., Villaescusa, L., Carrasco, L. & Irurzun, A. (2002). Antiviral activity of seven iridoids, three saikosaponins and one phenylpropanoid glycoside extracted from *Bupleurum*

rigidum and *Scrophularia scorodonia*. Planta Medica 68, 106-110.

Bhat, S. R., Chandel, K. P. S. & Malik, S. K. (1995). Plant regeneration from various explants of cultivated *Piper* species. Plant Cell Reports 14, 398-402.

Boje, K. (2002). Phytochemische und biopharmazeutische Untersuchungen an *Harpagophytum procumbens* DC. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.

Bowers, M. D. & Stamp, N. E. (1992). Chemical variation within and between individuals of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). Journal of Chemical Ecology 18, 985-995.

Bowers, M. D. & Collinge, S. K. (1992). Fate of iridoid glycosides in different life stages of the buckeye, *Junonia coenia* (Lepidoptera: Nymphalidae). Journal of Chemical Ecology 18, 817-831.

Briskin, D. P., Kobayashi, H., Mehta, A., Gawienowski, M. C., Ainsworth, L. & Smith, M. A. L. (2001). Production of kavapyrones by Kava (*Piper methysticum*) tissue cultures. Plant Cell Reports 20, 556-561.

Budzianowska, A., Skrzypczak, L. & Budzianowski, J. (2004). Phenylethanoid glucosides from in vitro propagated plants and callus cultures of *Plantago lanceolata*. Planta Medica 70, 834-40.

C

Calis, I., Gross, G.-A., Winkler, T. & Sticher, O. (1988). Isolation and structure elucidation of two highly acylated iridoid diglycosides from *Scrophularia scopolii*. Planta Medica 54, 168-170.

Charlwood, B. V., Charlwood, K. A. & Molina-Torres, J. (1990). Accumulation of secondary compounds by organized plant cultures. In: Secondary products from plant tissue culture. Edited by B. V. Charlwood & M. J. C. Rhodes. Clarendon Press, Oxford, pp. 167-200.

Chilton, M.-D. (2001). *Agrobacterium*. A memoir. Plant Physiology 125, 9-14.

Chrubasik, S., Zimpfer, C., Schütt, U. & Ziegler, R. (1996). Effectiveness of *Harpagophytum procumbens* in treatment of acute low back pain. Phytomedicine 3, 1-10.

Chrubasik, S. (1997). Biopharmazeutische Qualität und klinische Wirksamkeit von Zubereitungen aus *Harpagophytum*-Extrakten. In: Rheumatherapie mit Phytopharmaka. Edited by S. Chrubasik & M. Wink. Hippokrates Verlag, Stuttgart, pp. 77-85.

Chrubasik, S. & Wink, M. (1998). Traditional herbal therapy for the treatment of rheumatic pain: Preparations from devil's claw and stinging nettle. Pain Digest 8, 94-101.

Chrubasik, S. & Wink, M. (1998). Treatment of osteoarthritic pain with herbal drugs. 8th World Congress THE PAIN CLINIC, Tenerife, Spain, pp. 507-514.

Chrubasik, S., Junck, H., Breitschwerdt, H., Conradt, C. & Zappe, H. (1999). Effectiveness of *harpagophytum* extract WS 1531 in the treatment of exacerbation of low back pain: A randomized, placebo-controlled, double-blind study. European Journal of Anaesthesiology 16, 118-129.

Chrubasik, S. (2000). Efficacy and safety of *harpagophytum* preparations. In: Herbal medicinal products for the treatment of pain. Edited by S. Chrubasik & B. D. Roufogalis. Southern Cross University Press, Lismore Australia, pp. 67-73.

Chrubasik, S. & Conradt, C. (2000). Wirksamkeit eines *Harpagophytum*-Extrakts bei Patienten mit Rückenschmerzen. In: Phytopharmaka VI. Edited by N. Rietbock. Steinkopff Verlag, Darmstadt, pp. 93-98.

Clarkson, C., Campbell, W. E. & Smith, P. (2003). *In vitro* antiplasmodial activity of abietane and totarane diterpenes isolated from *Harpagophytum procumbens* (Devil's claw). Planta Medica 69, 720-724.

Craib, C. (1999). Zur Ökologie von *Harpagophytum procumbens* ssp. *transvaalense* in der Nord-Provinz Südafrikas. Kakteen und andere Sukkulenten 50, 249-253.

Creelman, R. A. & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48, 355-381.

Cresswell, R. C., Fowler, M. W., Stafford, A. & Stepan-Sarkissian, G. (1989). Inputs and outputs: Primary substrates and secondary metabolism. In: Primary and secondary metabolism of plant cell cultures II. Edited by W. G. W. Kurz, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong, pp. 14-26.

Czygan, F.-C. & Krüger, A. (1977). Pharmazeutisch-biologische Untersuchungen der Gattung *Harpagophytum*. 3. Mitteilung: Zur Verteilung des Iridoid-Glycosids Harpagosid in den einzelnen Organen von *Harpagophytum procumbens* DC und *Harpagophytum zeyheri* Decne. Planta Medica 31, 306-307.

D

Danesi, R., Bianchi, S. D., Soldani, P., Campagni, A., Rocca, R. V. L., Myers, C. E., Paparelli, A. & Tacca, M. D. (1993). Suramin inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. Br. Journal of Cancer 68, 932-938.

Dannhardt, G., Flemmer, L., Hartmann, R. W., Kleber, A. & Schulze, E. (1998). Spectrofluorimetric quantification of malondialdehyde for evaluation of cyclooxygenase-1/thromboxane synthase inhibition. Archiv der Pharmazie 331, 359-364.

Das, D. K., Prakash, N. S. & Bhalla-Sarin, N. (1999). Multiple shoot induction and plant regeneration in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). Plant Cell Reports 18, 691-695.

Davini, E., Iavarone, C., Trogolo, C., Aureli, P. & Pasolini, B. (1986). The quantitative isolation and antimicrobial activity of the aglycone of aucubin. Phytochemistry 25, 2420-2422.

Diaz, A., Fernandez, L., Ollivier, E., Martin, T., Villaescusa, L. & Balansard, G. (1998). Reverse-phase high pressure liquid chromatographic analysis of harpagoside, scorodioside and verbascoside from *Scrophularia scorodonia*: Quantitative determination of harpagoside. Planta Medica 64, 94-95.

E

Erdös, A., Fontaine, R., Friehe, H., Durand, R. & Pöppinghaus, T. (1978). Beitrag zur Pharmakologie und Toxikologie verschiedener Extrakte, sowie des Harpagosids aus *Harpagophytum procumbens* DC. Planta Medica 34, 97-108.

Ernst, W. H. O., Tietema, T., Veenendaal, E. M. & Masene, R. (1988). Dormancy, germination and seedling growth of two Kalaharian prennials of the genus *Harpagophytum* (Pedaliaceae). Journal of Tropical Ecology 4, 185-198.

F

Fleurentin, J. & Mortier, F. (1997). Entzündungshemmende und analgetische Wirkungen von *Harpagophytum procumbens* und *H. zeyheri*. In: Rheumatherapie mit Phytopharmaka. Edited by S. Chrubasik & M. Wink. Hippokrates Verlag, Stuttgart, pp. 68-76.

Fleurentin, J. (2000). Pharmacological studies with *Harpagophytum* extracts. In: Herbal medicinal products for the treatment of pain. Edited by S. Chrubasik & B. D. Roufogalis. Southern Cross University Press, Lismore Australia, pp. 46-55.

Franz, G., Czygan, F.-C. & Abou-Mandour, A. A. (1982). Untersuchungen der Gattung *Harpagophytum*. 4. Mitteilungen: Gehalt an freien Zuckern und Harpagosid in Kalluskulturen und genuinen Wurzelgeweben von *Harpagophytum procumbens*. Planta Medica 44, 218-220.

Frohne, D. & Jensen, U. (1985). Systematik des Pflanzenreichs unter besonderer Berücksichtigung chemischer Mermale und pflanzlicher Drogen, 3. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart New York.

G

Galindez, J. d. S., Lanza, A. M. D. & Matellano, L. F. (2002). Biologically active substances from the genus *Scrophularia*. Pharmaceutical Biology 40, 45-59.

Garden, H. J. (2003). Biotechnological production of podophyllotoxin by *Linum album* suspension cultures. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Gardner, H. W. (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. Biochimica et Biophysica Acta 1084, 221-239.

Ghisalberti, E. L. (1998). Biological and pharmacological activity of naturally occuring iridoids and secoiridoids. Phytomedicine 5, 147-163.

Giner, R. M., Villalba, M. L., Recio, M. d. C., Manez, S., Gray, A. I. & Rios, J. L. (1998). A new iridoid from *Scrophularia auriculata* ssp. *pseudoauriculata*. Journal of Natural Products 61, 1162-3.

Grabias, B., Kurowska, A. & Swiatek, L. (1995). Investigation of chemical composition of *Scrophularia nodosa* L. seeds. Herba Polonica 41, 59-63.

H

HagerROM 2004. Springer Verlag, Heidelberg.

Handjieva, N., Spassov, S., Bodurova, G., Saadi, H., Popov, S., Pureb, O. & Zamjansan, J. (1991). Majoroside, an iridoid glucoside from *Plantago major*. Phytochemistry 30, 1317-1318.

Hashimoto, T. & Yamada, Y. (1991). Organ culture and manipulation. In: Methods in plant biochemistry volume 6, Assays for bioactivity. Edited by K. Hostettmann. Academic Press, London San Diego New York Boston Sydney Tokyo Toronto, pp. 323-350.

Hänsel, R., Sticher, O. & Steinegger, E. (1999). Pharmakognosie - Phytopharmazie. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Heldt, H. W. (1999). Pflanzenbiochemie, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin.

Hohn, B. (1992). Exploration of *Agrobacterium tumefaciens*. In: Development. Edited by V. E. Russo, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 206-216.

Hoppe, H. A. (1975). Drogenkunde. Band 1 Angiospermen, 8. Auflage. Walter de Gruyter, Berlin New York.

Huang, T. H.-W., Tran, V. H., Duke, R. K., Tan, S., Chrubasik, S., Roufogalis, B. D. & Duke, C. C. (2006). Harpagoside suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through inhibition of NF-κB activation. Journal of Ethnopharmacology 104, 149-155.

J

Jafar, S. L. S., Jafar, R., Power, J. B. & Davey, M. R. (1998). Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for black pepper (*Piper nigrum* L.). Acta Horticulturae 461, 349-354.

Jarzomski, Stamp & Bowers (2000). Effects of plant phenology, nutrients and herbivory on growth and defensive chemistry of plaintain, *Plantago lanceolata*. OIKOS 88, 371-379.

Jung, S. H., Lee, Y. S., Lee, S., Lim, S. S., Kim, Y. S., Ohuchi, K. & Shin, K. H. (2003). Anti-angiogenic and anti-tumor activities of isoflavonoids from the rhizomes of *Belamcanda chinensis*. Planta Medica 69, 617-622.

K

Kajimoto, T., Hidaka, M., Shoyama, K. & Nohara, T. (1989). Iridoids from *Scrophularia ningpoensis*. Phytochemistry 28, 2701-2704.

Kammerer, N. & Fiebich, B. (2000). Anti-inflammatory effects of *Harpagophytum* lysates in human monocytes. In: Herbal medicinal products for the treatment of pain. Edited by S. Chrubsik & B. D. Roufogalis. Southern Cross University Press, Lismore Australia, pp. 40-45.

Kim, D.-H., Kim, B.-R., Kim, J.-Y. & Jeong, Y.-C. (2000). Mechanism of covalent adduct formation of aucubin to proteins. Toxicology Letters 114, 181-188.

Koch, E. & Slusarenko, A. (1990). *Arabidopsis* is susceptible to infection by downy mildew fungus. The Plant Cell 2, 437-445.

Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H. & Nakamura, M. (1999). Enzymatic activation of oleuropein: a protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 96, 9159-9164.

L

Lanhers, M.-C., Fleurentin, J., Mortier, F., Vinche, A. & Younos, C. (1991). Anti-inflammatory and analgesic effects of an aqaeous extract of *Harpagophytum procumbens*. Planta Medica 58, 117-123.

Levieille, G. & Wilson, G. (2001). Micropropagation *in vitro* and regeneration of fertile plants of the endangered medicinal species *Harpagophytum procumbens* and *zeyheri*. Acta Horticulturae (ISHS) Proc. IV IS on In Vitro Cult. & Hort. Breeding 560, 445-448.

Levieille, G. & Wilson, G. (2002). *In vitro* propagation and iridoid analysis of the medicinal species *Harpagophytum procumbens* and *H. zeyheri*. Plant Cell Reports 21, 220-225.

Lin, J.-H., Ku, Y.-R., Huang, Y.-S., Wen, K.-C. & Liao, C.-H. (1997). Determination of polar constituents of scrophulariae radix in traditional chinese medicinal prescriptions by high performance liquid chromatography. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 20, 1617-1632.

Lincoln Taiz, E. Z. (1991). Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Redwood City California.

Lindl, T. (2000). Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin.

Lisowska, K. & Wysokinska, H. (2000). *In vitro* propagation of *Catalpa ovata* G. Don. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60, 171-176.

Lloyd, G. & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society 30, 421-427.

Loew, D., Möllerfeld, J., Schrödter, A., Puttkammer, S. & Kaszkin, M. (2001). Investigations on the pharmacocinetic properties of *Harpagophytum* extracts and their effects on eicosanoid biosynthesis *in vitro* and *ex vivo*. Clinical Pharmacology & Therapeutics 69, 356-364.

Long, C., Moulis, C., Stanislas, E. & Fourasté, I. (1995). L'aucuboside et le catalpol dans les feuilles de *Plantago lanceolata* L., *Plantago major* L. et *Plantago media* L. Journal de Pharmacie de Belgique 50, 484-488.

M

Mabberley, D. J. (2002). The plant-book. A portable dictionary of the vascular plants. Cambridge University press.

Madaus, G. (1976). Lehrbuch der biologischen Heilmittel. Band III und Register. Georg Olms Verlag, Hildesheim New York.

Marak, H. B., Biere, A. & Damme, J. M. M. V. (2000). Direct and correlated responses to selection on iridoid glycosides in *Plantago lanceolata* L. Journal of Evolutionary Biology 13, 985-996.

Marak, H. B., Biere, A. & Damme, J. M. M. v. (2002). Two herbivore-deterrent iridoid glycosides reduce the *in vitro* growth of a specialist but not of a generalist pathogenic fungus of *Plantago lanceolata* L. Chemoecology 12, 185-192.

Marak, H. B., Biere, A. & Damme, J. M. M. V. (2002). Systemic, genotype-specific induction of two herbivore-deterrent iridoid glycosides in *Plantago lanceolata* L. in response to fungal infection by *Diaporthe adunca* (Rob.) Niessel. Journal of Chemical Ecology 28, 2429-2448.

Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants, 2. Auflage. Academic Press, London San Diego New York Boston Sydney Tokyo Toronto.

Miura, T., Yuan, L., Sun, B., Fujii, H., Yoshida, M., Wakame, K. & Kosuna, K.-I. (2002). Isoflavone aglycon produced by culture of soybean extracts with basidiomycetes and its anti-angiogenic activity. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 66, 2626-2631.

Miyase, T. & Mimatsu, A. (1999). Acylated iridoid and phenylethanoid glycosides from aerial parts of *Scrophularia nodosa*. Journal of Natural Products 62, 1079-1084.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473-497.

Mutschler, E. (2001). Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

N

Neumann, K. H. (1995). Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen. Eugen Ulmer Verlag GmbH & Co, Stuttgart.

Nitsch, J. P. & Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. Science 163, 85-87.

P

Pahlow, M. (2001). Das große Buch der Heilpflanzen. Gräfe und Unzer Verlag GmbH, München.

Park, K. S. & Chang, I.-M. (2004). Anti-inflammatory activity of aucubin by inhibition of tumor necrosis factor-alpha production in RAW 264.7 cells. Planta Medica 70, 778-779.

Pauli, G. F., Ofterdinger-Daegel, S. & Teborg, D. (1995). *Digitalis, Scrophularia* & Co. Ein pharmazeutischer Streifzug durch die Familie der Braunwurzgewächse. Deutsche Apotheker Zeitung 2, 21-34.

Ph. Eur. 5.0 2006 mit Kommentar

Pungitore, C. R., Ayub, M. J., Garcia, M., Borkowski, E. J., Sosa, M. E., Ciuffo, G., Giordano, O. S. & Tonn, C. E. (2004). Iridoids as allelochemicals and DNA polymerase inhibitors. Journal of Natural Products 67, 357-361.

Q

Qi, J., Chen, J.-J., Cheng, Z.-H., Zhou, J.-H., Yu, B.-Y. & Qiu, S. X. (2006). Iridoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* DC. (devil's claw). Phytochemistry 67, 1372-1377.

Qian, J., Hunkler, D. & Rimpler, H. (1992). Iridoid-related aglycone and its glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. Phytochemistry 31, 905-911.

R

Rao, P. S. (1987). Plant regeneration. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Edited by F. Constabel & I. K. Vasil. Academic Press Inc., San Diego New York Berkeley Boston London Sydney Tokyo Toronto, pp. 229-254

Räther, M. (1989). Notes on four weevils in the tribe Cionini (Coleoptera; Curculionidae) associated with *Scrophularia nodosa* L. (Scrophulariaceae). Part I: Biology and ecology of the weevils. Bonner zoologische Beiträge 40, 109-121.

Recio, M. d. C., Giner, R. M., Manez, S. & Rios, J. L. (1994). Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. Planta Medica 60, 232-234.

Reichling, J. (1985). Pflanzenzellkulturen in Forschung und Praxis – Teil I. GIT Fachz. Lab 5, 388-395.

Rischer, M., Adamczyk, M., Ratz, H., Hose, S., Marchesan, M., Paper, D. H., Franz, G., Wolf-Heuss, E. & Engel, J. (1998). Quantitative determination of the iridoid glycosides aucubin and catalpol in *Plantago lanceolata* L. extracts by HPTLC and HPLC. Journal of Planar Chromatography 11, 374-378.

Rivero, M., Santiago, B., Galindo, M., Brehmer, M. T. & Pablos, J. L. (2002). Cyclooxygnase-2 inhibition lacks immunomodulatory effects on T cells. Clinical and Experimental Rheumatology 20, 379-385.
Ronsted, N., Göbel, E., Franzyk, H., Soren, R. J. & Olsen, C. E. (2000). Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. Phytochemistry 55, 337-348.

S
Saadi, H., Handjieva, N., Popov, S. & Evstatieva, L. (1990). Iridoids from *Plantago media*. Phytochemistry 29, 3938-3939.

Saborio, F., Torres, S. & Gomez, L. (1998). Development of a clean-planting-material production system on tropical root and tuber crops, using *in vitro* propagated plants. Acta Horticulturae 461, 495-499.

Sagare, A. P., Kuo, C.-L., Chueh, F.-S. & Tsay, H.-S. (2001). *De novo* regeneration of *Scrophularia yoshimurae* Yamazaki (Scrophulariaceae) and quantitative analysis of harpagoside, an iridoid glucoside, formed in aerial and underground parts of *in vitro* propagated and wild plants by HPLC. Biological & Pharmaceutical Bulletin 24, 1311-1315.

Sakuta, M. & Komamine, A. (1987). Cell growth and accumulation of secondary metabolites. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Edited by F. Constabel & I. K. Vasil. Academic Press Inc., San Diego New York Berkeley Boston London Sydney Tokyo Toronto, pp. 97-114.

Sauerwein, M., Wink, M. & Shimomura, K. (1992). Influence of light and phytohormones on alkaloid production in transformed root cultures of *Hyoscyamus albus*. Journal of Plant Physiology 140, 147-152.

Schmelz, H., Hämmerle, H. D. & Springorum, H. W. (1997). Analgetische Wirkung eines Teufelskrallenwurzel-Extraktes bei verschiedenen chronisch-degenerativen Gelenkerkrankungen. In: Rheumatherapie mit Phytopharmaka. Edited by S. Chrubasik & M. Wink. Hippokrates Verlag, Stuttgart, pp. 86-89.

Sevon, N. & Oksman-Caldentey, K.-M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: Root cultures as a source of alkaloids. Planta Medica 68, 859-868.

Shimamura, M., Hazato, T., Ashino, H., Yamamoto, Y., Iwasaki, E., Tobe, H., Yamamoto, K. & Yamamoto, S. (2001). Inhibition of angiogenesis by humulone, a bitter acid from beer hop. Biochemical and Biophysical Research Communications 289, 220-224.

Shushu, D. (2001). *In vitro* regeneration of the Kalahari devil's claw, *Harpagophytum procumbens*, an important medicinal plant. South African Journal of Botany 67, 378-380.

Sircar, J. C., Schwender, C. F. & Johnson, E. A. (1983). Soybean lipoxygenase inhibition by nonsteroidal antiinflammatory drugs. Prostaglandins 25, 393-396.

Skirvin, R. M. (1986). Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. Plant Cell Reports 5, 292-294.

Smith, M. A. L., Kobayashi, H., Gawienowski, M. & Briskin, D. P. (2002). An *in vitro* approach to investigate medicinal chemical synthesis by three herbal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70, 105-111.

Staba, E. J. (Edt.) (1980). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press.

Stevenson, P. C., Simmonds, M. S. J., Sampson, J., Houghton, P. J. & Grice, P. (2002). Wound healing activity of acylated iridoid glycosides from *Scrophularia nodosa*. Phytotherapy Research 16, 33-35.

Swann, K. & Melville, C. (1972). Iridoid content of some *Scrophularia* species. Journal of Pharmacy and Pharmacology 24, Suppl.: 170P.

Swiatek, L. (1973). Phenolic acids of underground parts of *Scrophularia nodosa* L. Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy 25, 461-464.

T

Taiz, L. & Zeiger, E. (1991). Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City California.

Tasdemir, D., Güner, N. D., Perozzo, R., Brun, R., Dönmez, A. A., Calis, I. & Rüede, P. (2005). Anti-protozoal and plasmodial FabI enzyme inhibiting metabolites of *Scrophularia lepidota* roots. Phytochemistry 66, 355-362.

Taskova, R., Ljubka, E., Nedjalka, H. & Simeon, P. (2002). Iridoid patterns of genus *Plantago* L. and their systematic significance. Zeitschrift für Naturforschung 57c, 42-50.

Tong, Y., Zhang, X., Zhao, W., Zhang, Y., Lang, J., Shi, Y., Tan, W., Li, M., Zhang, Y., Tong, L., Lu, H., Lin, L. & Ding, J. (2004). Anti-angiogenic effects of shiraiachorme A, a compound isolated from a chinese folk medicine used to treat rheumatoide arthritis. European Journal of Pharmacology 494, 101-109.

Tufan, A. C. & Satiroglu-Tufan, N. L. (2005). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents. Current Cancer Drug Targets 5, 249-266.

U

Ulbrich, B., Wiesner, W. & Arens, H. (1985). Large-scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth. In: Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Edited by K.-H. Neumann, W. Barz & E. Reinhard. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp. 293-303.

Urbina, A. V. O., Martin, M. L., Fernandez, B., Roman, L. S. & Cubillo, L. (1994). *In vitro* antispasmodic activity of peracetylated penstemonoside, aucubin and catalpol. Planta Medica 60, 512-515.

V

Vandermander, J. & Fournie, B. (2000). Treatment of osteoarthritis of the knee and hip with *Harpagophytum procumbens*. In: Herbal medicinal products for the treatment of pain. Edited by S. Chrubasik & B. D. Roufogalis. Southern Cross University Press, Lismore Australia, pp. 63-66.

Vane, J. (1987). The evolution of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. Drugs 33, 18-27.

Velazquez-Fiz, M. P., Diaz-Lanza, A. M. & Fernandez-Matellano, L. (2000). Iridoids from *Plantago lagopus*. Pharmaceutical Biology 38, 268-270.

Volk, O. H. (1964). Zur Kenntnis von *Harpagophytum procumbens* DC. Deutsche Apotheker Zeitung 18, 573-576.

W

Wegener, T. (1998). Die Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens* DC.) in der Therapie rheumatischer Erkrankungen. Zeitschrift für Phytotherapie 19, 284-294.

Wegener, T. & Winterhoff, H. (2001). Zubereitungen aus der südafrikanischen Teufelskralle. Deutsche Apotheker Zeitung 47, 5613-5620.

Weiss, R. F. (1985). Lehrbuch der Phytotherapie, 6. Auflage. Hippokrates-Verlag, Stuttgart.

White, F. F., Ghidossi, G., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1982). Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 79, 3193-3197.

Wichtl, H. M. (1989). Teedrogen, 2. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Wildi, E. & Wink, M. (2002). Biotechnology potential of hairy root culture. In: Recent progress in medicinal plants, Vol. 4 - Biotechnology and genetic engineering. Edited by J.N. Govil, P. Ananda Kumar & V.K. Singh. Sci Tech Pub., USA , pp. 441-454.

Willert, D. v. & Schneider, E. (2001). Teufelskralle - Anbau und Wildsammlung. Deutsche Apotheker Zeitung 6, 55-62.

Wink, M. (1985). Metabolism of quinolizidine alkaloids in plants and cell suspension cultures: Induction and degradation. In: Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Edited by K.-H. Neumann, W. Barz & E. Reinhard. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp. 107-116.

Wink, M. (1985). Composition of spent cell medium. I. Time-course of ethanol formation and the excretion of hydrolytic enzymes into the medium of suspension-cultured cells of *Lupinus polyphyllus*. Journal of Plant Physiology 121, 287-293.

Wink, M. (1987). Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Edited by F. Constabel & I. K. Vasil. Academic Press Inc., San Diego New York Berkeley Boston London Sydney Tokyo Toronto, pp. 17-42

Wink, M. (1987b). Alkaloids in stem roots of *Nicotiana tabacum* and *Spartium junceum* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Zeitschrift für Naturforschung 42c, 69-72.

Wink, M. (1989). Genes of secondary metabolism: Differential expression in plants and *in vitro* cultures and functional expression in genetically transformed microorganisms. In: Primary and secondary metabolism of plant cell cultures II. Edited by W. G. W. Kurz. Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp. 239-251.

Wink, M. (1990). Physiology and secondary product formation in plants. In: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Edited by B. V. Charlwood & M. J. C. Rhodes. Clarendon Press Oxford, pp. 23-41.

Wink, M. (1992). Die chemische Verteidigung der Pflanzen und die Anpassung der Pflanzenfresser. In Tagungsband VDBiol., pp. 41-58.

Wink, M. (1993). The plant vacuole: a multifunctional compartment. Journal of Experimental Biology 44, 231-246.

Wink, M. (1994). The cell culture medium - a functional extracellular compartment of suspension-cultured cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 38, 307-319.

Wink, M. (1997). Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. Advances in Botanical Research 25, 141-169.

Wink, M. (1999). Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In: Biochemistry of plant secondary metabolism, Annual Plant Reviews Vol. 2. Edited by M. W. (ed.). Academic Press and CRC Press Sheffield, pp. 1-16.

Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry 64, 3-19.

Wink, M. (2004). Phytochemical diversity of secondary metabolites. Enzyclopedia of Plant & Crop Science, 915-919.

Wink, M., Alfermann, A. W., Franke, R., Wetterauer, B., Distl, M., Windhövel, J., Krohn, O., Fuss, E., Garden, H., Mohagheghzadeh, A., Wildi, E. & Ripplinger, P. (2005). Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant *in vitro* cultures: anticancer agents. Plant Genetic Resources 3, 90-100.

Wyk, B.-E. v., Wink, C. & Wink, M. (2004). Handbuch der Arzneipflanzen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Wysokinska, H. & Chmiel, A. (1997). Transformed root cultures for biotechnology. Acta Biotechnol. 17, 131-159.

Wysokinska, H. & Swiatek, L. (1990). Production of iridoid glucosides in cell suspension cultures of *Penstemon serrulatus*. Planta Medica 56, 625 626.

Y

Yada, N. S., Postle, K., Saiki, R. K., Thomashow, M. F. & Chilton, M.-D. (1980). T-DNA of a crown gall teratoma is covalently joined to host plant DNA. Nature 287, 458-461.

Yamada, Y. & Hashimoto, T. (1990). Possibilities for improving yields of secondary metabolites in plant cell cultures. In: Progress in plant cellular and molecular biology. Edited by H. J. J. Nijkamp, L. H. W. v. d. Plas & J. v. Aartrijk. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London, pp. 547-600.

Yang, D.-C. & Choi, Y.-E. (2000). Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Panax ginseng*. Plant Cell Reports 19, 491-496.

Z

Zayed, R. & Wink, M. (2004). Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). Zeitschrift für Naturforschung 59c, 863-867.

Zehra, M., Banerjee, S., Sharma, S. & Kumar, S. (1999). Influence of *Agrobacterium rhizogenes* strains on biomass and alkaloid productivity in hairy root lines of *Hyoscyamus muticus* and *H. albus*. Planta Medica 65, 60-63.

Zupan, J. R. & Zambryski, P. (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. Plant Physiology 107, 1041-1047.