

Isolierung und Charakterisierung
von Arabinogalactan-Proteinen aus
Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis



Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Maren Wack
Kiel 2003

Referent: Prof. Dr. W. Blaschek

Korreferent: Prof. Dr. W. Hänsel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.04

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 18.02.04

Prof. Dr. W. Depmeier
(Dekan)

Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung	1
1.	<i>Baptisia tinctoria</i>	1
1.1.	Verbreitung.....	2
1.2.	Traditionelle Anwendung der Droge.....	2
1.3.	Untersuchung der Inhaltsstoffe.....	3
1.4.	Wirkungen und Wirksamkeit.....	3
2.	<i>Baptisia australis</i>	4
3.	Definition von Arabinogalactan-Proteinen (AGPs).....	6
4.	Zielsetzung.....	11
B.	Experimenteller Teil	12
1.	Herstellung des Drogenextraktes.....	12
2.	Synthese des β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenzes.....	13
3.	Fällung von AGPs mit dem β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz.....	14
4.	Chromatographische Methoden.....	15
4.1.	Gelpermeationschromatographie (GPC).....	15
4.1.1.	Fraktionierung von AGPs.....	15
4.1.2.	Entsalzung deglykosylierter AGPs.....	18
4.2.	Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC).....	19
5.	Geldiffusionstest.....	20
6.	Bestimmung von Monosacchariden.....	20
6.1.	Quantitative Bestimmung der Neutralzucker.....	20
6.2.	Quantitative Bestimmung von Uronsäuren.....	22
6.2.1.	Bestimmung nach BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN (1973).....	23
6.2.2.	Bestimmung einzelner Uronsäuren.....	23
7.	Charakterisierung der Bindungstypen im Kohlenhydratanteil von AGPs...	25
7.1.	Oxalsäurehydrolyse.....	25
7.2.	Oxalsäurehydrolyse mit anschließender Uronsäurereduktion.....	25
7.3.	Methylierungsanalysen.....	25

8.	NMR-Spektroskopie	29
9.	Deglykosylierung von AGPs mit HF	30
10.	Bestimmung von Aminosäuren	31
10.1.	Hydrolysebedingungen.....	31
10.2.	Bestimmung von Hydroxyprolin (quantitativ)	31
10.3.	HPLC-Bestimmung von Aminosäuren (quantitativ)	33
10.4.	GC-Bestimmung von Aminosäuren (qualitativ)	33
10.5.	N-terminale Protein-Sequenzierung	35
11.	Zellkulturen.....	36
11.1.	Zellkulturmedien	36
11.2.	Kalluskulturen.....	37
11.3.	Suspensionskulturen	37
11.4.	Isolierung von AGPs aus dem Suspensionsmedium.....	39
12.	Resorptionsversuche an einem Epithelmodell	39
13.	Immunologische Methoden	41
13.1.	ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	41
13.1.1.	Sandwich-ELISA mit polyklonalen Antikörpern	41
13.1.2.	Kompetitiver ELISA mit monoklonalen Antikörpern.....	42
13.2.	Lymphozyten-Proliferationstest (LPT)	43
13.3.	Zytokininduktion (IL-1 β , IL-6, TNF α , GM-CSF)	43
13.4.	Bestimmung der IgM-Produktion in Maus-Lymphozytenkulturen (NMRI)..	44
13.5.	Bestimmung der NO $_2^-$ -Produktion alveolärer Maus-Makrophagen.....	44
13.6.	Induktion von IFN γ in Milzzellkulturen von NMRI-Mäusen	45
	Allgemeine Geräte.....	46
C.	Ergebnisse	48
I.	<i>Baptisia tinctoria</i> Wurzelmaterial	48
I.1.	Geldiffusionstest Retentat und Filtrat	50
I.2.	Neutralzuckerzusammensetzung	51
I.2.1.	Filtrat und Retentat.....	52
I.2.2.	AGPs.....	53
I.3.	Fraktionierung der AGPs.....	55

I.3.1.	Fraktionierung durch GPC.....	55
I.3.2.	Fraktionierung durch RP-HPLC.....	59
I.4.	Bestimmung von Uronsäuren.....	61
I.4.1.	Gesamturonsäure-Gehalt.....	61
I.4.2.	Differenzierte Uronsäurebestimmung.....	62
I.5.	Neutralzuckerbestimmungen nach Oxalsäurehydrolyse	64
I.6.	Geldiffusionstest von AGPs und partiellen Abbauprodukten.....	66
I.7.	Bestimmung der Bindungstypen im Kohlenhydratanteil	67
I.8.	NMR-Spektroskopie	74
I.8.1.	¹³ C-NMR-Spektroskopie.....	75
I.8.2.	¹ H-NMR-Spektroskopie	78
I.9.	Proteinbestimmungen	80
I.9.1.	Hydroxyprolin-Gehalt.....	80
I.9.2.	Qualitative Aminosäure-Bestimmung (GC)	80
I.9.3.	Quantitative Aminosäure-Bestimmung (HPLC)	82
I.9.4.	N-terminale Sequenzierung von AGP-Peptiden	83
I.10.	Resorptionsversuche an einem Epithelmodell	87
I.11.	Immunologische Methoden	89
I.11.1.	ELISA.....	89
I.11.2.	Stimulation der Proliferation von Milzzellen aus C3H/HeJ-, NMRI- und Balb/c-Mäusen	91
I.11.3.	Zytokininduktion (IL-1 β , IL-6, TNF α , GM-CSF)	94
I.11.4.	Stimulation der IgM-Produktion in Milzzellkulturen von NMRI-Mäusen	99
I.11.5.	Einfluss auf die NO ₂ ⁻ -Produktion von alveolären Maus-Makrophagen	100
I.11.6.	Induktion von IFN γ in Milzzellkulturen von NMRI-Mäusen	102
II.	<i>Baptisia tinctoria</i> Zellkultur	103
II.1.	Neutralzuckerzusammensetzung der EtOH-Fällung nach Filtration und des isolierten AGPs	105
II.2.	Bestimmung der Bindungstypen im Kohlenhydratanteil	107
II.3.	Hydroxyprolin-Gehalt.....	108
II.4.	Testung der Kreuzreaktivität mit monoklonalen Antikörpern	109

III.	<i>Baptisia australis</i> Zellkulturen	111
III.1.	Neutralzuckerzusammensetzungen der EtOH-Fällungen nach Filtration und der isolierten AGPs	115
III.2.	Uronsäurebestimmungen (Gesamtgehalt)	118
III.3.	Bestimmung der Bindungstypen in den Kohlenhydratanteilen	119
III.3.1.	Methylierungsanalysen.....	119
III.3.2.	Charakterisierung des AGPs aus ZK 1 nach Oxalsäure-Hydrolyse	123
III.4.	Quantitative Aminosäure-Bestimmung (HPLC)	127
III.5.	Hydroxyprolin-Bestimmung im AGP der ZK 1	128
III.6.	Testung der Kreuzreaktivität mit monoklonalen Antikörpern	128
D.	Diskussion der Ergebnisse	130
E.	Zusammenfassung	158
	Literaturangaben	162

Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
AGP	Arabinogalactan-Protein
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dem.	Aqua demineralisata
AK	Antikörper
BAP	6-Benzylaminopurin
BSA	Rinderserumalbumin (Bovines Serumalbumin)
B-Zellen	Bursa-Äquivalent-abhängige Lymphozyten
Con A	Concanavalin A; Lektin aus <i>Canavalia ensiformis</i>
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
D ₂ O	Deuteriertes Wasser
Da	Dalton (Molekulargewicht)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn/dc	Brechungsindex-Inkrement
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EtOH	Ethanol
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
GPC	Gelpermeationschromatographie
HF	Flusssäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRGP	Hydroxyprolin-reiches Glykoprotein
IFN γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
λ	Lambda / Wellenlänge
LPS	Lipopolysaccharide von <i>Escherichia coli</i>
LPT	Lymphozyten-Proliferationstest
MALLS	Multi-Angle-Laser-Light-Scattering
MS	Murashige und Skoog
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewichts-Ausschlussgrenze
NAA	β -Naphthylessigsäure
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Stickoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit-Ion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PHA	Phytohämagglutinin aus <i>Phaseolus vulgaris</i>
PMAA	Partiell methylierte Alditolacetate
RI	Refraktionsindex
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC (Reversed Phase)
SI	Stimulationsindex
TFA	Trifluoressigsäure
TFF	Tangentialfluss-Filtration
TIC	Totalionenchromatogramm
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T-Zellen	Thymus-abhängige Lymphozyten
ZK	Zellkultur

Monosaccharide

Ara	Arabinose
Gal	Galactose
GalA	Galacturonsäure
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
Ino	myo-Inositol
Man	Mannose
Rha	Rhamnose
Xyl	Xylose

Aminosäuren

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
CysA		Cysteinsäure
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Hyls	HLYS	Hydroxylysin
Hyp	O	Hydroxyprolin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

A. Einleitung

1. *Baptisia tinctoria*

Baptisia tinctoria (Linné) Robert Brown (*Sophora tinctoria* Linné; *Podolyria tinctoria* Michaux) ist eine mehrjährige Staude aus der Familie der Schmetterlingsblütler (Fabaceae) (HOPPE, 1975). Die Pflanze besitzt eine bis zu 1 m hohe Sprossachse von gelblich grüner Farbe, die mehrfach verzweigt ist. Die Blüten sind 8-15 mm lang, gelb und stehen in kleinen, lockeren Trauben (Abb. 1 (a) und (b)). Die Frucht ist eine 8-15 mm lange, blauschwarze Hülse, die mehrere Samen enthält (Abb. 3) (JELITTO et al., 1985).



Abb. 1: (a) Oberirdischer Teil und (b) Blüten von *Baptisia tinctoria*.

1.1. Verbreitung

Baptisia tinctoria ist in Nordamerika beheimatet und wächst dort vor allem in den Bergwäldern im Osten der USA und Kanada. Die Pflanze gedeiht am besten auf trockenen, nährstoffarmen Böden. Sie blüht von Juni bis September. *Baptisia* ist in Amerika auch bekannt unter den Namen wild indigo, false indigo, indigo weed, horsefly weed, yellow broom, clover broom, rattle bush und yellow indigo. Deutsche Bezeichnungen sind Wilder Indigo, Falscher Indigo, Baptisie oder Färberhülse (SALLER et al., 1995). Der Gattungsname *Baptisia* kommt von dem griechischen Wort *baptizein* (eintauchen, taufen) oder *baptein* (tränken, färben) und bezieht sich auf einen blauen Farbstoff ähnlich dem Indigoblau, der beim Trocknen der Blätter entsteht und früher auch zum Färben verwendet wurde. Der Arname *tinctoria* kommt aus dem Lateinischen von *tingere*, was ebenfalls „färben“ bedeutet (GENAUST, 1996). Sowohl Kraut als auch Wurzel finden Verwendung.

Die Wurzeln von *Baptisia tinctoria* sind bis zu 40 cm lang und besitzen einen Durchmesser von bis zu 1 cm. Die Rinde ist meist dunkelbraun, bis zu 2 mm dick, eher schuppig und gesprenkelt mit warzenähnlichen Narben von Seitenwurzeln. Der Bruch ist faserig und lässt einen weißen bis gelbbraunen Holzkörper erkennen. Die Wurzel ist geruchlos und besitzt einen unangenehm scharfen und bitteren Geschmack.

1.2. Traditionelle Anwendung der Droge

Baptisia tinctoria wurde traditionell einerseits zur Gewinnung des blauen Farbstoffs, andererseits zur Heilung von Geschwüren und Infektionen des Hals-Rachen-Raumes und der Lymphknoten verwendet. Schon die Indianer setzten einen Wurzelextrakt zur Behandlung von Wunden ein. Indianer von den Delaware- und Mohikan-Stämmen benutzten einen aus der Wurzel hergestellten Dekokt für Einreibungen bei Wunden, Prellungen und blauen Flecken. Die Creek-Indianer gaben ihren Kindern bei ersten Anzeichen einer Erkrankung einen wässrigen Drogenauszug, die Pawnee-Indianer verwendeten mit Büffelfett verriebene, gepulverte Samen einer *Baptisia*-Art als Einreibung gegen Koliken. Im 19. Jahrhundert wurde die Wurzel bei Diarrhö und

Typhus eingesetzt (SALLER et al., 1995). Im Western Medical Reformer von 1846 wird sie aufgrund der antiseptischen Eigenschaften empfohlen. Wird die Droge in sehr hohen Mengen (30 g) eingenommen, kommt es aufgrund des Gehaltes an Chinolizidinalkaloiden zu Magen-Darm-Störungen wie z.B. starken Durchfällen und Erbrechen.

1.3. Untersuchung der Inhaltsstoffe

Unterschiedliche Substanzen wurden bereits aus den Wurzeln von *Baptisia tinctoria* isoliert. Diese Inhaltsstoffe lassen sich in 4 große Gruppen einteilen: Alkaloide, Cumarine, Flavonoide und Polymere wie Glykoproteine und Polysaccharide (TEGTMEIER, 1997). Fette, Wachse und andere phenolische Komponenten sind nur von geringer Bedeutung. Als Alkaloide werden in der Wurzel und im Rhizom 0,2 % Chinolizidinalkaloide, darunter 0,047 bis 0,081 % Spartein, 0,021 bis 0,087 % N-Methylcytisin und 0,02 % Cytisin (früher Baptitoxin), gefunden. Außerdem enthält die Droge in geringeren Mengen Anagyrin, Acetoxyanagyrin und Formylcytisin (STAESCHE und SCHLEINITZ, 1998). Daneben kommen hauptsächlich die Cumarine Scopoletin und Scopoletin-O-glucosid, die Isoflavonaglyka Baptigenin und Pseudobaptigenin, Maackiain und Formononetin sowie deren Glykoside Baptisin (6 %), Pseudobaptisin (1 %) und Trifolirhizin vor. Für diese Arbeit interessant ist das Vorkommen von polymeren Substanzen wie Glykoproteinen und Polysacchariden (FROHNE, 2002). Es wurde die Isolierung von Arabinogalactan-Proteinen und sauren Heteropolysacchariden beschrieben, die als Zucker vorwiegend Galactose, Arabinose, Glucose, Mannose, Rhamnose und Xylose enthalten (MÜHLAU, 2000). Der saure Charakter der Polymere entsteht durch das Vorkommen von Uronsäuren.

1.4. Wirkungen und Wirksamkeit

Baptisiawurzel soll einerseits die Abwehr stimulieren, andererseits Mikroben abtöten und deren Ausbreitung im Organismus vermindern. Die Droge selbst ist aufgrund der noch nicht hinreichend geklärten Dosierungsprobleme keine Apothekenware. Extrakte von *Baptisia tinctoria* sind Bestandteile von Phytopharmaka, z.B. in

Esberitox® in Kombination mit Rotem Sonnenhut (*Echinacea purpurea*), Schmalblättrigem Sonnenhut (*Echinacea pallida*) und Lebensbaum (*Thuja occidentalis*), und werden zur Beeinflussung des Blutbildes und zur Verbesserung der körpereigenen Abwehrreaktionen eingesetzt (FROHNE, 2002). Klinische Daten zu *Baptisia tinctoria* allein liegen nicht vor, aus Daten der Kombinationspräparate lässt sich nicht ohne weiteres auf die Wirksamkeit von *Baptisia tinctoria* schließen. Baptisiawurzel wird als ein potentiell pflanzliches Immunstimulanz angesehen (HARNISCHFEGER und STOLZE, 1982; WAGNER et al., 1985). Die immunstimulierenden Wirkungen von *Baptisia* werden mit den enthaltenen Glykoproteinen und Polysacchariden in Verbindung gebracht und auf experimentell beschriebene Effekte wie z.B. Steigerung von Phagozytose, Interferonproduktion, Lymphozytenstimulation und Antikörperbildung zurückgeführt. Die Wirksamkeit könnte daher mit der Stimulation von Teilen des antigenunspezifischen wie auch des spezifischen Immunsystems zusammenhängen.

Allgemein wird die Droge innerlich bei Infektanfälligkeit, Erkältungskrankheiten und Infektionskrankheiten des oberen Respirationstraktes, äußerlich bei Aphten, Stomatitis, Gingivitis in Mundwässern und wegen ihrer antiseptischen Wirkung bei entzündlichen Hauterkrankungen angewendet.

Die Homöopathie nutzt Zubereitungen der Baptisiawurzel bei schweren, fiebrigen Infektionen, allgemeiner Blutvergiftung und Verwirrheitszuständen (STAESCHE und SCHLEINITZ, 1998).

2. *Baptisia australis*

Baptisia australis (Linné) Robert Brown (*Sophora australis* Linné) ist ebenfalls in östlichen und südöstlichen Teilen der USA beheimatet, wird aber auch in anderen Erdteilen als Zierpflanze eingesetzt. Sie wird auch als Falscher Indigo, Blauer Indigo oder Indigolupine bezeichnet. Die Pflanze wird bis zu 1,5 m hoch und besitzt 2-3,5 cm große, violettblaue Blüten (Abb. 2 (a) und (b)), die in bis zu 40 cm langen Trauben stehen. Das Aussehen erinnert an Lupinen. Die Hülsen von *Baptisia australis* sind 3-6 cm lang und enthalten zahlreiche Samen (Abb. 3) (JELITTO et al.,

1985). Der Blaue Indigo enthält ebenfalls Cytisin, Methylcytisin und Spartein in der Wurzel.

Verwechslungen oder Verfälschungen der Wurzeln von *Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis* können vorkommen. *Baptisia australis* wird auch als Ersatz für *Baptisia tinctoria* verwendet (STEINEGGER et al., 1992).



Abb. 2: (a) Oberirdischer Teil und (b) Blüten von *Baptisia australis*.

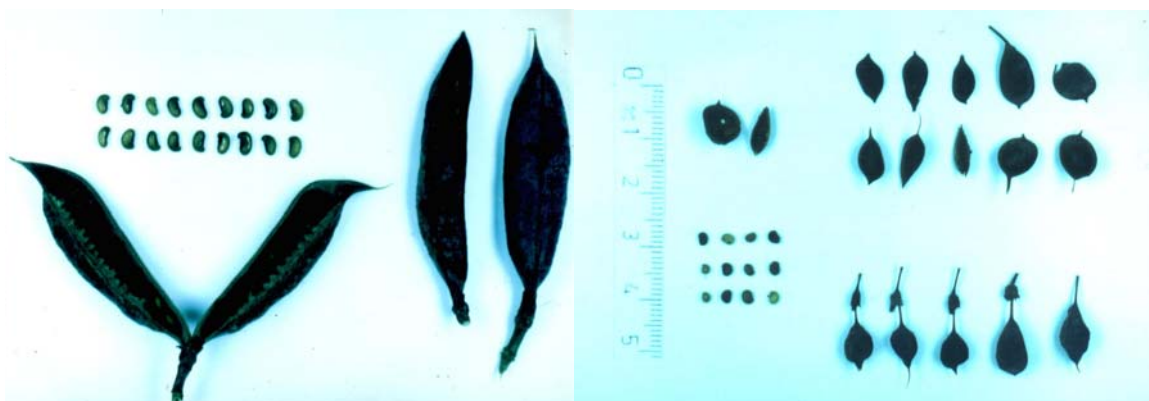


Abb. 3: Hülsen und Samen von *Baptisia australis* (links) und *Baptisia tinctoria* (rechts).

3. Definition von Arabinogalactan-Proteinen (AGPs)

AGPs sind Glykoproteine, die im Pflanzenreich weit verbreitet sind (CLARKE et al., 1979; FINCHER et al., 1983). Sie können in allen Entwicklungsstufen der Pflanze und Pflanzengewebe wie Blättern, Wurzeln, Sprossen, Blüten und Samen vorkommen (JERMYN und YEOW, 1975). Zellkulturen pflanzlicher Gewebe produzieren ebenfalls AGPs und geben diese z.T. an das Zellkulturmedium ab (ASPINALL et al., 1969; HAWES und ADAMS, 1972; KOMALAVILAS et al., 1991).

AGPs sind bereits aus vielen Pflanzengewebe isoliert worden (JERMYN und YEOW, 1975; CLARKE et al., 1978). Die Extraktion erfolgt gewöhnlich mit Wasser, aber auch andere Extraktionsmittel wie verdünnter Alkohol und Aceton werden verwendet. Ihre Isolierung wurde u.a. aus Koniferen (ASPINALL, 1959; TIMELL, 1965), Kaffeebohnen (WOLFROM und PATIN, 1965), Mais (BACIC et al., 1986), Äpfeln bzw. Apfelsaft (KNEE, 1973; BRILLOUET et al., 1996), Rotem Sonnenhut (CLASSEN et al., 2000), Suspensionskulturen von Tomate (LAMPORT, 1970), Rose (KOMALAVILAS et al., 1991) und Reis sowie Karotte (SMALLWOOD et al., 1996) beschrieben.

AGPs sind meist extrazellulär in gelöster Form in Pflanzengewebe lokalisiert (CLARKE et al., 1975 & 1978; JERMYN und YEOW, 1975; SERPE und NOTHNAGEL, 1994), werden daneben gebunden an die Plasmamembran gefunden (KNOX, 1995; PENNELL et al., 1989; NORMAN et al., 1990; KOMALAVILAS et al., 1991) und weniger in cytoplasmatischen Organellen (ANDERSON et al., 1977; van HOLST et al., 1981). Sie sind Hauptkomponenten von Pflanzengummen und anderen Exkreten (AKIYAMA et al., 1984; GLEESON et al., 1989; KOMALAVILAS et al., 1991). Zusätzlich kommen AGPs in Zellkulturmedien vor und können aus diesen isoliert werden, da sie von Zellen in Kultur in das sie umgebende Medium abgegeben werden (ANDERSON et al., 1977; AKIYAMA und KATO, 1981; van HOLST et al., 1981; GIBEAUT und CARPITA, 1991).

Ihre Funktion in Pflanzen ist bis heute nicht vollständig geklärt. Sie scheinen aber an Pflanzenentwicklung, Zellinteraktionen während der Pflanzenentwicklung (KNOX et al., 1989 & 1991; PENNELL und ROBERTS, 1990; DING und ZHU, 1997; MAJEWSKA-SAWKA und NOTHNAGEL, 2000), Wasserretention und an Abwehrmechanismen der Pflanze bei Verwundungen beteiligt zu sein (CLARKE et al., 1979;

FINCHER et al., 1983; SHOWALTER und VARNER, 1989). Vor kurzer Zeit wurde AGPs eine Funktion als Determinante der Zellidentität bei Pflanzenwachstum und Pflanzenentwicklung (PENNELL et al., 1991; KNOX et al., 1991) sowie eine Kontrollfunktion bei der somatischen Embryogenese zugeschrieben (STACEY et al., 1990; KREUGER und van HOLST, 1993 & 1995).

AGPs besitzen einen kleinen Proteinanteil von bis zu 10 % und einen großen Kohlenhydratanteil von über 90 %, wobei Galactose und Arabinose als Hauptzucker vorkommen. Daneben können geringe Mengen an Rhamnose, Glucose, Xylose, Fucose und Mannose sowie Uronsäuren vorhanden sein, woraus eine Ladung des Kohlenhydratanteils resultiert (DU et al., 1996).

ASPINALL (1982) hat eine Einteilung von Polysacchariden vorgenommen, bei der er Arabinogalactane in Typ I und Typ II unterteilt. Typ-I-Arabinogalactane besitzen eine 1,4- β -D-Galactan-Hauptkette mit Verzweigungen in Position 6 und kurzen Seitenketten aus α -L-Arabinose. Typ-I-Arabinogalactane sind nicht kovalent mit einem Protein verbunden, können aber als Untereinheiten in Rhamnogalacturonanen vorkommen. Typ-II-Arabinogalactane hingegen bestehen typischerweise aus einer 1,3- β -D-Galactan-Hauptkette, substituiert an der Hydroxygruppe von C6 mit Seitenketten aus 1,6-verknüpften β -D-Galactosyl-Resten, die terminal hauptsächlich α -L-Arabinose, daneben aber auch geringe Mengen anderer Pentosen oder Hexosen enthalten (BACIC et al., 1987). Diese Typ-II-Arabinogalactane können kovalent mit Proteinen verknüpft sein und damit AGPs darstellen.

Der Proteinanteil von AGPs ist meist reich an Hydroxyprolin, Alanin und Serin (ANDERSON et al., 1977; CLARKE et al., 1979; GLEESON et al., 1989; KOMALAVILAS et al., 1991), wobei aber auch bereits Hydroxyprolin-arme (BALDWIN et al., 1993) sowie Histidin-reiche (KIELISZEWSKI et al., 1992) AGPs isoliert wurden. Kohlenhydratanteil und Proteinanteil sind kovalent miteinander verbunden (CLARKE et al., 1979; FINCHER et al., 1983), wobei bisher nur ein Bindungstyp eindeutig identifiziert wurde, bei dem Hydroxyprolin und β -D-Galactose eine alkalistabile Bindung bilden (STRAHM et al., 1981). Betrachtet man Struktur und Zusammensetzung des Proteinanteils, kann eine Einteilung in „klassische“ AGPs und „nicht-klassische“ AGPs erfolgen (GASPAR et al., 2001). „Klassische“ AGPs besitzen typischerweise überwiegend Hydroxyprolin/Prolin, Alanin und Serin/Threonin mit

alternierender Anordnung des Hydroxyprolins in der Proteinsequenz, während in „nicht-klassischen“ AGPs z.B. größere Mengen untypischer Aminosäuren und Aminosäure-Sequenzen vorkommen.

Die räumliche Struktur dieser Makromoleküle wird einerseits als „wattle blossom“-Modell (Abb. 4) mit eher kugeliger Gestalt (FINCHER et al., 1983) beschrieben. Bei diesem Modell sind Polysaccharide in Form von Arabinogalactan-Ketten O-glykosidisch mit Hydroxyprolin im Proteinanteil verknüpft. Andererseits wurde ein „twisted hairy rope“-Modell (Abb. 5) beschrieben, das mit der Gestalt einer Flaschenbürste verglichen werden kann (QI et al., 1991). Bei diesem Modell sind Galactan-Hauptketten und Arabinose-Oligosaccharid-Ketten ebenfalls O-glykosidisch mit Hydroxyprolin im Proteinanteil verknüpft.

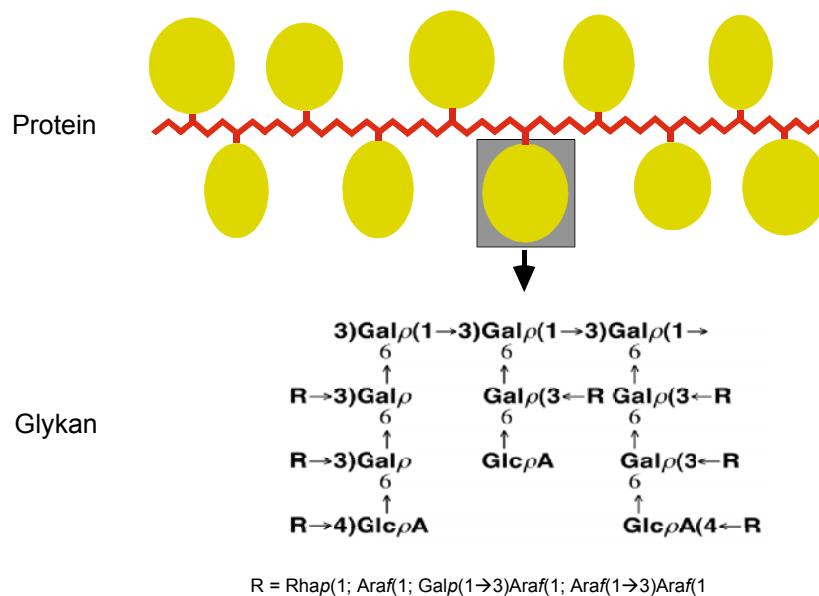


Abb. 4: Vorschlag zum strukturellen Aufbau von AGPs nach dem „wattle blossom“-Modell (BACIC et al., 2000).

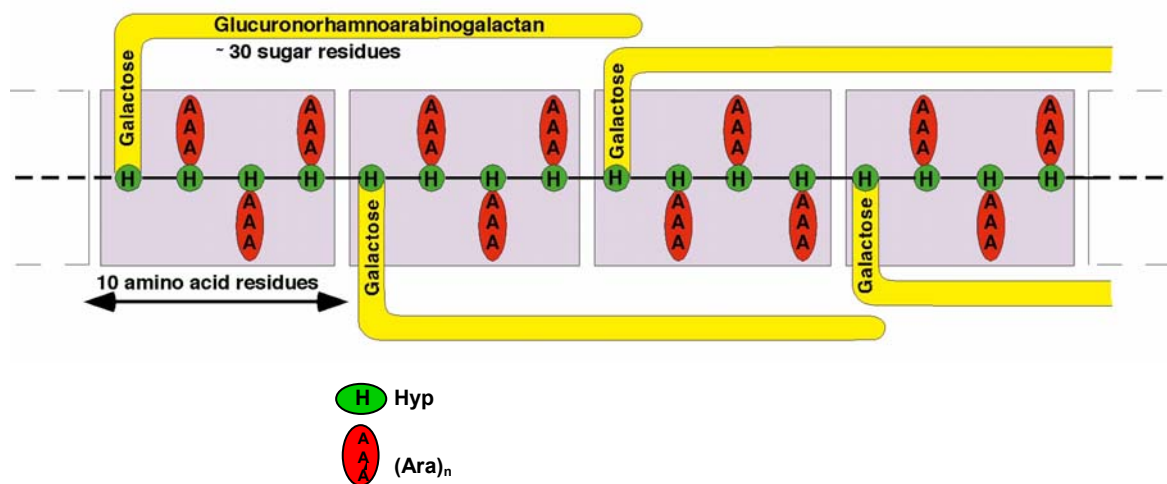


Abb. 5: Vorschlag zum strukturellen Aufbau von AGPs nach dem „twisted hairy rope“-Modell (BACIC et al., 2000).

Die Detektion und Isolierung der AGPs kann auf der Fällung mit künstlichen Kohlenhydratantigenen basieren und wurde erstmals von YARIV et al. (1967) beschrieben. Diese Antigene, die aus diazotierten 4-Aminophenylglykosiden und Phloroglucin hergestellt werden, können hochmolekulare Polymere fällen, die Galactose und Arabinose als überwiegende Zuckerkomponenten enthalten. Jedoch nicht alle AGPs reagieren mit dem Reagenz (FINCHER et al., 1974; SOMMERKNUDSEN et al., 1996).

Das Reagenz muss für die Reaktion bestimmte strukturelle Voraussetzungen besitzen: Handelt es sich bei der Glykosyl-Gruppe am Reagenz um einen D-Zucker, muss die Verknüpfung in β -Konfiguration erfolgt sein. Zusätzlich muss die OH-Gruppe an C2 der Glykosyl-Gruppe die D-Gluco-Konfiguration haben. Eine positive Reaktion gibt das Reagenz mit β -D-Glucosyl-, β -D-Galactosyl- und α -L-Fucosyl-Resten, eine negative mit β -D-Mannosyl- und α -D-Galactosyl-Resten (NOTHNAGEL, 1997). Die Stärke der Bindung variiert je nach AGP. Überwiegend wird das β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz (Abb. 6) verwendet.

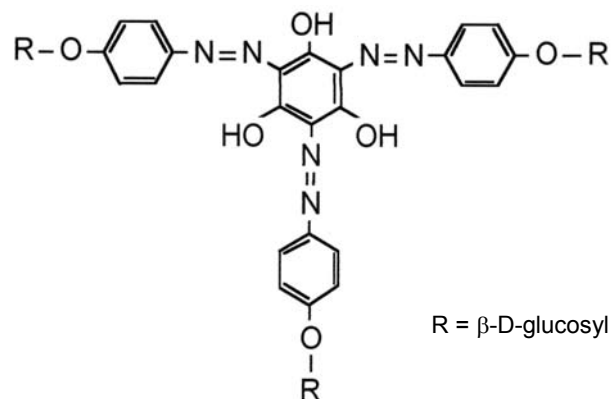


Abb. 6: Strukturformel des für die Fällung von AGPs genutzten β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenzes.

Obwohl der eigentliche Reaktionsmechanismus nicht geklärt ist, ist das β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz ein wichtiges Werkzeug für die Isolierung und Quantifizierung von AGPs, wie auch für deren histochemische Lokalisierung in Pflanzengewebe (CLARKE et al., 1975 und 1978). Zusätzlich können Effekte auf Zellen wie z.B. Quervernetzung der Zellwand-AGPs durch das Reagenz beobachtet werden (SERPE und NOTHNAGEL, 1995; WILLATS und KNOX, 1996).

Für AGPs wurden immunmodulatorische Wirkungen beschrieben. Hierzu zählt die Aktivierung von Makrophagen, die Proliferation von Lymphozyten und eine erhöhte Interleukin-Produktion (LUETTIG et al., 1989; STAESCHE und SCHLEINITZ, 1998).

4. Zielsetzung

Aus einem wässrigen Extrakt der getrockneten Wurzel von *Baptisia tinctoria* waren Arabinogalactan-Proteine durch Fällung mit dem β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz zu isolieren. Diese AGPs sollten bezüglich folgender Eigenschaften näher charakterisiert werden:

- Molekulargewicht
- chemische Zusammensetzung des Kohlenhydrat- und Proteinanteils
- struktureller Aufbau des Kohlenhydratanteils, partielle Sequenz des Proteinanteils
- biologische Aktivität

Zusätzlich sollte die Isolierung von AGPs aus Zellkulturen von *Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis* erfolgen. Gemeinsamkeiten und Unterschiede im strukturellen Aufbau des Kohlenhydratanteils und der Zusammensetzung des Proteinanteils sollten erarbeitet und mit den Eigenschaften des AGPs aus der Wurzel von *Baptisia tinctoria* verglichen werden.

Mono- und polyklonale Antikörper, die gegen AGPs aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* (oberirdische Pflanzenteile) gerichtet sind, standen zur Verfügung, um eine Kreuzreaktivität mit den isolierten Baptisia-AGPs zu untersuchen. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob der Kohlenhydrat- oder der Proteinanteil der AGP-Moleküle an der Reaktion mit den Antikörpern beteiligt ist. Es sollten Rückschlüsse von der chemischen Struktur der einzelnen AGPs auf die Reaktivität mit den Antikörpern gezogen werden.

B. Experimenteller Teil

1. Herstellung des Drogenextraktes

Als Ausgangsmaterial wurde getrocknete und geschnittene Wurzel Droge von der Firma Schaper & Brümmer (Salzgitter) verwendet. Es erfolgte eine wässrige Extraktion der Droge mit einem Verhältnis von Droge zu Extraktionsmittel von 1:10. Die Droge wurde 17 h bei 10 °C im Dunkeln unter ständigem Schütteln mazeriert. Drogenbestandteile wurden abfiltriert (Schwarzband-Rundfilter 589¹, Ø 15 cm, Fa. Schleicher & Schüll) und der entstandene Extrakt in Portionen à 50 ml 10 min auf über 90 °C erhitzt, um Proteine zu fällen. Nach dem Abkühlen wurde zentrifugiert (5.000 U/min, 10 min) und der Überstand direkt weiterverarbeitet oder bei 0 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Der Extrakt wurde durch Tangentialfluss-Filtration (TFF) in eine hochmolekulare und in eine niedermolekulare Fraktion getrennt. Dafür wurden Filter mit einer nominellen Molekulargewichts-Ausschlussgrenze (MWCO) von 30.000 Da eingesetzt. Die hochmolekulare Fraktion wurde zur weiteren Aufreinigung verwendet und im Folgenden als Retentat (Ret) bezeichnet. Obwohl die zu isolierenden Glykoproteine in dieser Fraktion vermutet wurden, wurde auch die niedermolekulare Fraktion, die im Folgenden als Filtrat (Fil) bezeichnet wird, weiter aufgearbeitet, um auf Anwesenheit von AGPs in dieser Fraktion zu prüfen.

Zur vollständigen Abtrennung von niedermolekularen Bestandteilen, v.a. Monosacchariden, wurde im Anschluss an die TFF mit beiden Fraktionen 5 Tage lang eine Dialyse mit einem MWCO von 12-14.000 Da bei 4 °C durchgeführt.

Das Dialysat wurde gefriergetrocknet, das erhaltene Rohmaterial als Retentat nach der Dialyse (RetD) bzw. als Filtrat nach der Dialyse (FilD) bezeichnet und als Ausgangsmaterial für die Fällung von AGPs verwendet.

Tangentialfluss-Filtration:

	Fa. Millipore, Billerica, MA, USA
Gerät:	Minitan [®] System Stainless Steel
Pumpe:	Easy-load [®] Masterflex
Filter:	Minitan [®] Filter Plates 4/PK 30,000 NMWL High-Flux Biomax Polysulfone Membrane (hydrophilic)

2. Synthese des β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenzes

AGPs können spezifisch mit Yariv-Reagenz gefällt werden. Dieses Reagenz wird aus diazotierten 4-Aminophenyl-Glykosiden und Phloroglucin hergestellt. Unterschiedliche Zucker können im Reagenz gebunden sein, wobei Voraussetzung für die Fällung der AGPs eine β -Verknüpfung bei D-Zuckern ist, außerdem die D-Glucokonfiguration der OH-Gruppe an C2. Für die beschriebene Isolierung wurde das β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz verwendet (Abb. 7). Die Synthese erfolgte nach YARIV et al. (1962, 1967).

Das β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz wurde aus einer Lösung von 488,34 mg p-Aminophenyl- β -D-Glucose und 124,2 mg Natriumnitrit in 10,8 ml 0,5 M Salzsäure (0 °C) und 56,74 mg Phloroglucin in 22,5 ml Wasser hergestellt. Die erstgenannte Lösung wurde langsam in die Phloroglucin-Lösung gegeben, wobei der pH-Wert durch Zugabe von Natronlauge mit Hilfe eines Autotitrators auf pH 9 und die Temperatur bei 0 °C gehalten wurde. Zwei Stunden nach Vereinigung der beiden Lösungen sollte der pH-Wert stabil sein. Anschließend wurde zur Fällung des Reagenzes das gleiche Volumen Methanol zur Lösung zugegeben und der Ansatz über Nacht stehen gelassen. Das ausgefällte Yariv-Reagenz wurde abzentrifugiert (3.000 g, 15 min), das Pellet in Wasser gelöst und nochmals mit Methanol gefällt. Das Reagenz wurde erneut abzentrifugiert und bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet.

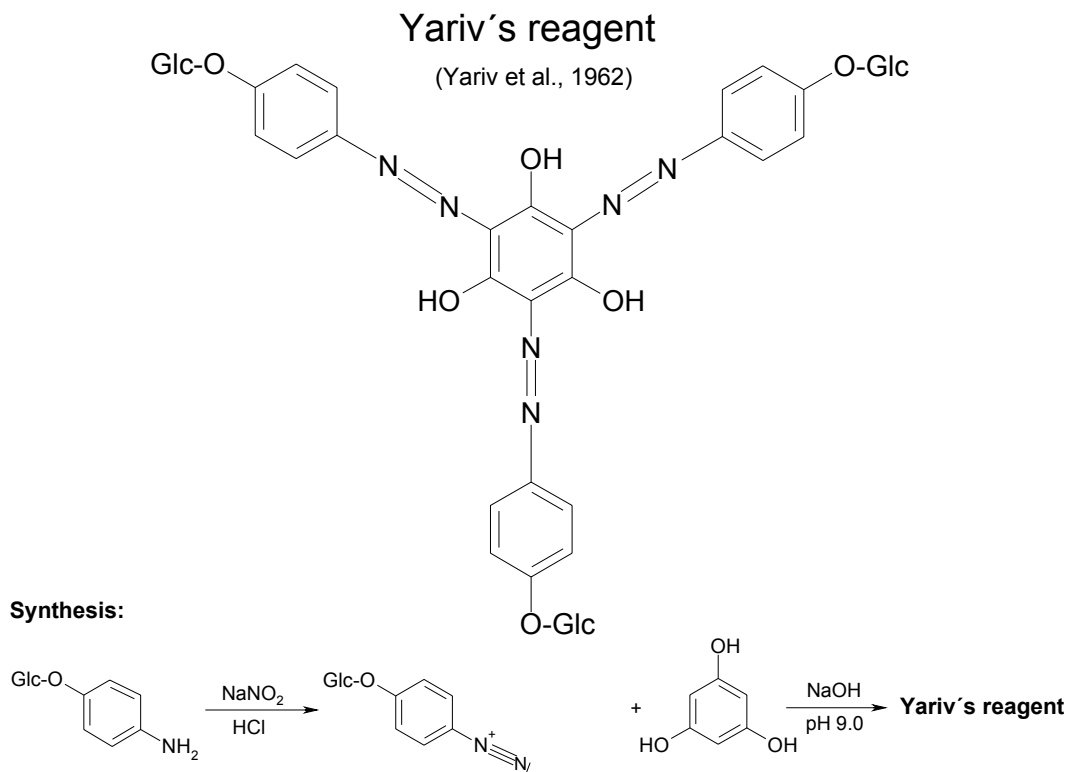


Abb. 7: Struktur und Synthese des für die Fällung der AGPs verwendeten β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenzes.

3. Fällung von AGPs mit dem β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz

Zur Ermittlung der Arabinose- und Galactose-Konzentrationen in den für die Fällung verwendeten Fraktionen wurde eine Acetylierungsanalyse durchgeführt (Kap. 6.1.). Die jeweilige Fraktion wurde anschließend in Wasser gelöst, so dass Arabinose und Galactose insgesamt in ca. 0,1 %iger Konzentration vorlagen. Die Fällung erfolgte unter Zugabe des gleichen Volumens einer 0,1 %igen Yariv-Lösung und Natriumchlorid (Endkonzentration 0,15 M) bei 4 °C über Nacht. Die entstandene Fällung wurde abzentrifugiert (10.000 g, 15 min, 4 °C), in 0,15 M Natriumchlorid-Lösung gewaschen und in ausreichend Wasser gelöst. Zur Zerstörung des AGP-Yariv-Präzipitates wurde Natriumdithionit in einer Endkonzentration von 2 % zur Lösung gegeben und die Lösung auf 50 °C erhitzt, bis sie farblos bis hellgelb wurde. Die Lösung wurde zum Abkühlen stehen gelassen, anschließend 1 Woche lang zur

Abtrennung von Natriumdithionit und Yariv-Abbauprodukten gegen Wasser dialysiert (MWCO 12-14.000 Da) und gefriergetrocknet.

4. Chromatographische Methoden

4.1. Gelpermeationschromatographie (GPC)

4.1.1. Fraktionierung von AGPs

Eine Auftrennung der AGPs erfolgte mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie (GPC). Hierbei werden Makromoleküle durch unterschiedliche Porengrößen in der Matrix des Gelmaterials nach Molekülgröße getrennt. Hochmolekulare Glykoproteine eluieren vor niedermolekularen Glykoproteinen, weil sie aufgrund ihrer Größe schlecht bis gar nicht in die Poren der Matrix hineindiffundieren können.

Lineare Moleküle einer bestimmten Größe und Molekülmasse werden allerdings nach dem gleichen Volumen eluiert wie verzweigte Moleküle mit der gleichen Größe aber höherer Molekülmasse. Deshalb kann über die Kalibrierung mit Standards, die strukturell anders aufgebaut sind als die Probe, keine absolute, sondern nur eine relative Molekülmasse bestimmt werden. Bestimmt wird das hydrodynamische Volumen (HV) des Glykoproteins, welches stark vom Bindungstyp, Verzweigungsgrad und von der Ladung des Moleküls abhängt und das Molekulargewicht nur annähernd beschreibt. Aus diesem Grunde erfolgte für die AGPs eine duale Detektion. Mit einem RI-Detektor wurden die hydrodynamischen Volumina und mit einem Multi-Angle-Laser-Light-Scattering-Detector (MALLS) die absoluten Molekulargewichte (MW) ermittelt. Bei dem letztgenannten Verfahren wird die Ablenkung von eingestrahlem Licht in Abhängigkeit von Molekülgröße und -form zur Berechnung des Molekulargewichtes genutzt (DANISHEFSKY et al., 1970).

Das AGP wurde unter Schütteln bei Raumtemperatur im Eluenten gelöst (0,1 % (m/V)), filtriert (Celluloseacetat-Spritzenfilter, Poren-Ø 0,45 µm, Fa. Nalgene) und auf die Säule aufgetragen.

Die Kalibrierung der Säule zur Ermittlung der hydrodynamischen Volumina der Probefraktionen erfolgte mit Verbindungen bekannter Molekulargewichte. Diese sollten eine möglichst ähnliche Struktur wie die zu untersuchenden Verbindungen

besitzen. Bei der GPC-Analyse der AGPs wurden Pullulane (Polymaltotriosen, gewonnen aus *Aureobasidium pullulans*) verwendet, die im Gegensatz zu AGPs linear gebaut sind und deshalb keinen idealen Standard darstellen (Tab. 1). Verzweigte Polysaccharid-Standards sind leider nicht erhältlich, und Proteine sind noch weniger als Standards für Polysaccharide geeignet.

Tab. 1: Verwendete Pullulan-Standards und ihre mittleren Molekulargewichte.

Pullulan	Molekulargewicht [Da]
P10	12.200
P20	23.700
P100	100.000
P200	186.000
P400	380.000
P800	853.000

Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden je 0,5-1 mg der Pullulane und Glucose eingewogen und mit 1 ml Eluent 12 h bei 4 °C vorgequollen, 30 min leicht geschüttelt, wie das AGP filtriert und anschließend über eine Dosierschleife auf die Säule aufgetragen.

Die Kalibriergerade wurde durch halblogarithmisches Auftragen der Molekulargewichte gegen die ermittelten Elutionsvolumina erstellt. Anschließend wurden die hydrodynamischen Volumina der Probefraktionen über deren Elutionsvolumina ermittelt.

Gelpermeationschromatographie:

Säule:	Sephacryl S-400 HR, XK 16/60 Material: hydrophile Dextran-/Bisacrylamid-Matrix; Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden Länge 60 cm, Ø 1 cm Trennbereich für globuläre Proteine: 20.000 – 8 Mio. Da Trennbereich für Dextrane: 10.000 – 2 Mio. Da
Eluent:	0,1 M Natriumchlorid-Lösung mit 0,05 % Natriumazid; filtriert (Filtrationseinheit Sartorius; 0,1 µm Filter) und entgast (Ultraschallbad und Online-Vakuumentgaser; Fa. Knauer, Bad Homburg)
Pumpe:	HPLC-Pumpe 64 Fa. Knauer, Bad Homburg
Flussrate:	1 ml/min
Injektionseinheit:	V7-Valve Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden
Injektionsvolumen:	1 ml
Detektoren:	RI-Detektor ERC-7515 A Fa. Erma, Tokio, Japan Parameter: Range 2, response slow, Temperatur 40 °C MALLS-Detektor miniDAWN Fa. Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, USA
Software:	ASTRA for Windows 4.70.07 Parameter: $dn/dc = 0,145 \text{ ml/g}$ (GROMAN et al., 1994)

4.1.2. Entsalzung deglykosylierter AGPs

Nach Deglykosylierung der AGPs (Kap. 9.) musste die entstandene Peptidlösung mit Hilfe einer GPC-Säule entsalzt werden, bevor eine chromatographische Trennung der Peptide auf RP-HPLC-Material erfolgen konnte.

Gelpermeationschromatographie:

Säule:	Superdex [®] 75 FPLC Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden 10 mm x 25 cm Material: Dextran-/Agarose-Matrix Trennbereich: 3.000-70.000 Da für Proteine
Eluent:	1 % Natriumchlorid-Lösung in 0,1 % TFA; filtriert (Filtrationseinheit Sartorius; 0,2µm Filter)
Flussrate:	0,5 ml/min
<i>HPLC-Anlage:</i>	Beckman System Gold Fa. Beckman Instruments, Brea, CA, USA
Pumpe:	Programmable Solvent Module 126 125S Solvent Module
Detektoren:	DAD Module 168 168NM Detector $\lambda = 215 \text{ nm}$ und 280 nm
Software:	Version GoldV711

4.2. Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC)

Die RP-HPLC wurde einerseits zur Fraktionierung der AGPs aus *Baptisia tinctoria* Wurzel, andererseits zur Fraktionierung der Protein-Backbones nach Deglykosylierung und Entsalzung der AGPs (Kap. 9.) herangezogen.

Für die Fraktionierung der AGPs wurden 70 mg in 4 ml 0,1 %iger TFA gelöst (30 min, 10 min Ultraschall). Nichtlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (6.000 g, 10 min) entfernt. Die bei der RP-HPLC gewonnenen Fraktionen wurden lyophilisiert. Protein-Backbones wurden vor der Fraktionierung an RP-HPLC-Material im SpeedVac eingengt. Die isolierten Peptid-Fraktionen wurden lyophilisiert.

Hochleistungsflüssigchromatographie:

Säulen:	Aquapore RP-300 7 micron; 2,1 mm x 10 cm (RP-8) Fa. Perkin Elmer, Brownlee® Columns, Boston, USA Luna 5u C18 (2); 4,6 mm x 25 cm (RP-18) Fa. Phenomenex, Torrance, USA
Eluent:	RP-8-Säule: A: 0,1 % TFA B: 80 % Acetonitril in 0,1 % TFA RP-18-Säule: A: 0,1 % TFA B: 0,1 % TFA in Methanol
Flussrate:	1-3 ml/min
HPLC-Anlage:	Beckman System Gold Fa. Beckman Instruments, Brea, CA, USA
Pumpe:	Programmable Solvent Module 126 125S Solvent Module
Detektoren:	DAD Module 168 168NM Detector $\lambda = 215 \text{ nm}$ und 280 nm
Software:	Version GoldV711

5. Geldiffusionstest

Im Geldiffusionstest wurde die Reaktion unterschiedlicher Probenmaterialien mit dem β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz getestet. Dazu wurde ein Agarosegel hergestellt. Jeweils 20 ml des autoklavierten Gels wurden mit einer autoklavierten Messpipette in sterile Petrischalen (\varnothing 9 cm) ausgegossen und zum Erkalten stehen gelassen. In das Gel wurden Löcher mit einem Durchmesser von 4 mm im Abstand von 0,5 cm gestanzt und mit 25 μ l Probelösung in unterschiedlichen Konzentrationen bzw. 25 μ l 1 %iger Yariv-Lösung gefüllt. Probe- und Yariv-Lösungen diffundierten im Gel mindestens 24 h aufeinander zu, und es entstanden bei Anwesenheit von AGPs im Probenmaterial Präzipitationsbanden.

Der Geldiffusionstest diente sowohl zum qualitativen Nachweis von AGPs in Probenmaterialien als auch zur Überprüfung der Reaktion partieller Abbauprodukte von AGPs mit dem Yariv-Reagenz.

Agarosegel:

1 % Agarose in 10 mM Tris-Puffer pH 7,3 mit 0,9 % Natriumchlorid und 1 mmol Calciumchlorid
pH-Einstellung mit 0,2 M Salzsäure

6. Bestimmung von Monosacchariden

6.1. Quantitative Bestimmung der Neutralzucker

Die Identifizierung und quantitative Erfassung der neutralen Monosaccharide in Probenmaterialien erfolgte gaschromatographisch nach BLAKENEY et al. (1983). Nach Hydrolyse des Polysaccharids wurden die entstandenen Monosaccharide reduziert und zu leicht flüchtigen Alditolacetaten derivatisiert.

1-2 mg Probe wurden zusammen mit 0,25-0,5 mg myo-Inositol als internem Standard 1 h bei 121 °C und 2 bar in einem Wheaton-Gefäß im Bioblock mit 1 ml 2 M TFA hydrolysiert. Anschließend wurde dreimal mit Aqua bidest. am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt, um die Säure zu entfernen. Nach Zusatz von 200 μ l 1 M

Ammoniak erfolgte die Reduktion der Aldehydfunktion am C1 und die Ringöffnung mit 1 ml 2 %iger Natriumborhydrid-Lösung in DMSO (wasserfrei) über 90 min bei 40 °C im Trockenschrank. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Eisessig gestoppt, und die entstandenen Alditole wurden mit 200 µl Methylimidazol (Katalysator) und 2 ml Acetanhydrid (wasserfrei) 20 min bei Raumtemperatur acetyliert. Die Acetylierung wurde durch Zugabe von 10 ml Aqua bidest. gestoppt. Nach Zugabe von 1 ml 0,1 M Schwefelsäure wurden die entstandenen Alditolacetate mit 1 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Dichlormethanphase wurde unter Stickstoffbegasung etwas eingeengt und 1 µl dieser Lösung für die gaschromatographische Untersuchung verwendet.

Die Auftrennung der Alditolacetate erfolgte durch die GC, die Identifizierung durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen authentischer Standards. Mit Hilfe der Standards wurden Response-Faktoren für die quantitative Auswertung der einzelnen Neutralzucker ermittelt. Als interner Standard diente myo-Inositol. Nach Korrektur der ermittelten Peakflächen wurden die prozentualen Anteile der Neutralzucker über den internen Standard berechnet.

Tab. 2: Bei der gaschromatographischen Untersuchung verwendete Response-Faktoren für die Ermittlung der Monosaccharidkonzentrationen.

Neutralzucker	Response-Faktor
Rhamnose	1,303
Arabinose	1,015
Xylose	1,069
Mannose	1,082
Galactose	1,097
Glucose	1,164
myo-Inositol	1,000

Die Alditolacetate wurden bei der GC nach steigender Retentionszeit in folgender Reihenfolge getrennt:

Desoxyhexosen:	Rhamnose (Rha)
Pentosen:	Arabinose (Ara), Xylose (Xyl)
Hexosen:	Mannose (Man), Galactose (Gal), Glucose (Glc), myo-Inositol (Ino)

Gaschromatographie:

GC:	HP 5890 Series II; Fa. Hewlett Packard, USA HP 6890 Plus Series; Fa. Hewlett Packard, USA
Säule:	WCOT-Kapillarsäule (Fused Silica); Permabond OV-225-0.25; L 25 m, ID 0,25 mm; Fa. Macherey & Nagel, Düren
Trärgas:	N ₂
Flussrate:	1 ml/min
Injektor:	240 °C, Split 1:30
Injektionsvolumen:	1 µl
Temperaturprogramm:	230 °C (isotherm)
Detektor:	FID 240 °C
Software:	Programm HP 3365 Ser.II Chemstation

6.2. Quantitative Bestimmung von Uronsäuren

Der Uronsäuregehalt kann mit der gaschromatographischen Methode nach BLAKENEY et al. (1983) nicht ermittelt werden, da eine Reduktion der Carbonsäurefunktion unter diesen Bedingungen nicht möglich ist. Zur quantitativen Bestimmung wurde daher einmal die kolorimetrische Methode nach BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN (1973) und als zweites die Massenspektrometrie nach Reduktion der Carbonsäurefunktion mit Natriumbordeuterid zum korrespondierenden an C6

zweifach deuterierten Neutralzucker (nach TAYLOR und CONRAD, 1972) herangezogen.

6.2.1. Bestimmung nach BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN (1973)

Ca. 5 mg AGP wurden mit 4 %iger Schwefelsäure in einem Wheaton-Gefäß 1 h bei 121 °C und 2 bar im Bioblock hydrolysiert. Nach Inkubation der Probe mit 1,2 ml Borax/Schwefelsäure (5 min kochendes Wasserbad, 10 min Eisbad) wurden 20 µl Reagenz (0,15 %ige meta-Hydroxydiphenyl-Lösung in 0,5 %iger Natronlauge) bzw. 20 µl reine 0,5 %ige Natronlauge (Blindwert) zugegeben und nach exakt 10 min Reaktion die Absorption der rot gefärbten Probelösung bei 520 nm bestimmt. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurde eine 1:1-Mischung aus Glucuron- und Galacturonsäure verwendet. Kolorimetrisch kann allerdings nicht zwischen verschiedenen Uronsäuren in der Probe unterschieden werden. Es kann lediglich der Gesamturonsäure-Gehalt berechnet werden.

6.2.2. Bestimmung einzelner Uronsäuren

Ca. 20 mg AGP wurden in 30 ml Aqua dem. gelöst und mit 216 mg N-Cyclohexyl-N`-[2-(N-methylmorpholino)-ethyl]-carbodiimid-4-toluolsulfonat versetzt. Der pH-Wert wurde 4 h mit Hilfe eines Autotitrators durch Titration mit 0,01 M Salzsäure auf pH 4,75 gehalten. Anschließend wurden 3 Tropfen Octanol hinzugefügt, um Schäumen bei der folgenden Reduktion des aktivierten Esters zu vermindern. Durch langsames Zutropfen von 4 ml 1 M, 5 ml 2 M und 5 ml 4 M wässriger Natriumbordeuterid-Lösung wurden die Uronsäuren reduziert, so dass sie in die entsprechenden, am C6 zweifach deuterierten Neutralzucker überführt wurden. Unter ständigem Rühren und Zugabe von 2 M Salzsäure wurde der pH-Wert 4 h lang konstant auf pH 7,0 gehalten. Anschließend erfolgte die Zugabe von Eisessig bis zu einem pH-Wert von 6,5. Die Probe wurde 5 Tage gegen Aqua dem. dialysiert, um Reagenzien zu entfernen, und anschließend gefriergetrocknet.

Im ersten Schritt wird die Uronsäurefunktion mit Carbodiimid bei pH 4,75 aktiviert (O-Acylisoharnstoffderivat), im zweiten Schritt erfolgt die Reduktion mit Natriumbor-deuterid bei pH 7,0. Der pH-Wert muss konstant gehalten werden, da im Sauren das Reduktionsmittel zersetzt wird und im Basischen das Gleichgewicht zwischen Uronsäure und aktivierter Uronsäure zu Ungunsten der aktivierten Gruppe verschoben ist. Die Uronsäurereduktion wurde wiederholt durchgeführt, um eine vollständige Umsetzung der Uronsäuren in die deuterierten Neutralzucker zu gewährleisten, da nach einmaliger Reduktion erst 95 % der Uronsäuren reduziert sind (TAYLOR und CONRAD, 1972). Es folgte eine weitere Dialyse gegen Aqua dem. und Gefriertrocknung.

Die entstandenen reduzierten Glykoproteine wurden einer Methylierungsanalyse unterzogen (Kap. 7.3.), bei der partiell methylierte Alditolacetate entstehen. Die Auswertung erfolgte nach gaschromatographischer Trennung am Massenspektrometer. Zur Qualifizierung und Quantifizierung der Uronsäuren kann die Tatsache ausgenutzt werden, dass alle von ehemaligen Uronsäuren abstammenden Bruchstücke, die das C6 enthalten, zweifach deuteriert sind und damit eine um 2 erhöhte Masse besitzen. Auf die Anwesenheit von Uronsäuren wird also durch Auftreten charakteristischer Massenfragmente im Spektrum hingewiesen (Tab. 3). Aus dem Verhältnis der Massen kann das Verhältnis Uronsäure zu Neutralzucker berechnet werden.

Tab. 3: Massenfragmente von Uronsäuren und ihrer korrespondierenden Neutralzucker.

	Massenfragmente		
1-Glc/1-GlcA	145/147	161/163	205/207
1-Gal/1-GalA	145/147	161/163	205/207
1,3-Gal/1,3-GalA	129/131	161/163	233/235
1,4-Gal/1,4-GalA	129/131	189/191	233/235
1,6-Gal/1,6-GalA	129/131	189/191	233/235
1,3,6-Gal/1,3,6-GalA	129/131	201/203	261/263

7. Charakterisierung der Bindungstypen im Kohlenhydratanteil von AGPs

7.1. Oxalsäurehydrolyse

Bei dieser Hydrolyse handelt es sich um eine milde saure Hydrolyse, bei der labile Glykosidbindungen gespalten werden. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an GLEESON und CLARKE (1979).

Ca. 20 mg AGP wurden mit 3 ml 12,5 mM Oxalsäure 5 h in einem Pyrex-Glas im Bioblock bei 100 °C hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurde der Niederschlag abzentrifugiert (6.000 U/min, 5 min). Der Überstand wurde in Ethanol abs. gegossen, so dass eine Ethanol-Endkonzentration von 80 % entstand. Die Lösung wurde 12 h bei 4 °C gelagert, der entstandene Niederschlag abzentrifugiert (20.000 g, 10 min, 6 °C), dreimal mit 80 %igem Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert, in 2 ml Aqua dem. aufgenommen und gefriergetrocknet. Der Überstand und die Waschlösungen wurden vereinigt, einrotiert, ebenfalls mit 2 ml Aqua dem. aufgenommen und gefriergetrocknet.

7.2. Oxalsäurehydrolyse mit anschließender Uronsäurereduktion

Die Oxalsäurehydrolyse wurde wie in Kapitel 7.1. beschrieben mit 30 mg AGP durchgeführt. Die Ethanol-Fällung wurde lyophilisiert und im Anschluss entsprechend Kapitel 6.2.2. mit Natriumborodeuterid reduziert. Diese beiden Reaktionen wurden hintereinander durchgeführt, um die Position vorhandener Uronsäuren näher zu charakterisieren.

7.3. Methylierungsanalysen

Zur Analyse der Bindungsstellen in Polysacchariden wird häufig die Methylierungsanalyse eingesetzt (HAKOMORI, 1964; BJÖRNDAL et al., 1970; HARRIS et al., 1984; CARPITA und SHEA, 1989; NEEDS und SELVENDRAN, 1993; FONTAINE et al., 1994; LINDBERG, 1981). Bei dieser analytischen Methode können neben Verzweigungstypen auch die Ringgrößen der verschiedenen Monosaccharide bestimmt werden.

Das Polysaccharid wird zunächst vollständig methyliert, wobei alle freien OH-Gruppen und solche, die unter Analysebedingungen leicht abspaltbare Substituenten tragen, in Methylether überführt werden. Nach HARRIS et al. (1984) geschieht dies durch Deprotonierung der Hydroxylgruppen mit Dimethylsulfinyl-Kalium und Permethylierung mit Methyljodid in DMSO. Das methylierte Polysaccharid wird hydrolysiert, die freien partiell methylierten Monosaccharide werden mit Natriumborhydrid reduziert und frei gewordene Hydroxylgruppen mit Acetanhydrid/Methylimidazol acetyliert. Die entstandenen partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs) werden gaschromatographisch getrennt. Die quantitative Auswertung erfolgt nach FID-Detektion über die Peakfläche unter Einbeziehung molarer Response-Faktoren für die einzelnen PMAAs (SWEET et al., 1975). Für die Identifizierung der PMAAs können die Retentionszeiten nur zum Teil herangezogen werden, da sie oft sehr dicht beieinander liegen. Die Retentionszeit steigt von Pentosen über Desoxyhexosen zu Hexosen und innerhalb dieser Reihenfolge mit steigendem Acetylierungsgrad. Reduzierte Uronsäuren zeigen keine andere Retentionszeit als ihre korrespondierenden Neutralzucker.

Eine Identifizierung der PMAAs wird daher über deren Massenspektren durchgeführt. Die Fragmentierung der PMAAs im Elektronenstrahl des Massenspektrometers folgt feststehenden Regeln (BJÖRNDAL et al., 1970; LINDBERG, 1972; ASPINALL, 1982; CARPITA und SHEA, 1989):

1. Primärfragmente entstehen bevorzugt durch Spaltung zwischen methoxylierten C-Atomen, gefolgt von Spaltungen zwischen Methoxy- und Acetoxygruppen tragenden C-Atomen. Im ersten Fall entstehen zwei positiv geladene Fragmente, im zweiten Fall entstehen Kationen nur von dem Fragment mit der Methoxygruppe. Selten sind Spaltungen zwischen zwei C-Atomen, die Acetoxygruppen tragen.
2. Sekundärfragmente werden aus Primärfragmenten bevorzugt durch ein- oder mehrmaliges Abspalten von Essigsäure oder Methanol, in geringerem Maße auch durch Abspaltung von Keten und Formaldehyd gebildet.

So entstehen von einzelnen PMAAs typische Fragmentierungsmuster, die mit Referenz- und Literaturspektren verglichen werden. Zusätzlich erfolgt die Identifizierung über die Retentionszeit, da z.B. Hexosen wie Glucose und Galactose ähnliche Massenspektren ergeben, aber andere Retentionszeiten aufweisen.

Herstellung der Dimethylsulfinyl-(Dimethyl)-Kalium-Lösung:

1 g Kaliumhydrid-Suspension (35 %ig) in Öl wurde in ein verschraubbares Reagenzglas mit Seitenansatz eingewogen und fünfmal mit je 4 ml n-Hexan (Lagerung über Molekularsieb 4 Å) ölfrei gewaschen. Pro g reinem Kaliumhydrid (unter Argon trocken geblasen) wurden dann 13 ml DMSO (Lagerung über Molekularsieb 4 Å) unter Argon zugetropft; starkes Schäumen wurde gegebenenfalls durch Eiskühlung unterbunden. Nach 30 min Rühren wurde die Lösung für die Methylierung eingesetzt.

Methylierung:

1-2 mg AGP wurden 12 h in einem verschraubbaren Reagenzglas mit Seitenansatz gefriergetrocknet und anschließend unter leichtem Erwärmen und 1 min Ultraschallbehandlung in 460 µl DMSO (Lagerung über Molekularsieb 4 Å) gelöst. Danach wurden nacheinander folgende Mengen an Dimethyl-Kalium-Lösung und Methyljodid unter Rühren und Argon-Schutzbegasung zupipettiert:

- 40 µl Dimethyl-Kalium-Lösung, 10 min Reaktion
- 10 µl eisgekühltes Methyljodid, 5 min Reaktion
- 120 µl Dimethyl-Kalium-Lösung, 10 min Reaktion
- 30 µl eisgekühltes Methyljodid, 5 min Reaktion
- 400 µl Dimethyl-Kalium-Lösung, 30 min Reaktion
- 300 µl eisgekühltes Methyljodid, 10 min Reaktion

Das methylierte AGP wurde in ein verschraubbares Zentrifugenglas mit einer Mischung aus 2 ml Chloroform und 1 ml Methanol überführt und fünfmal mit je 2 ml Aqua dem. gewaschen. Jedes Mal wurde 5 min bei 250 g zentrifugiert und die wässrige Oberphase vorsichtig abpipettiert, ohne die Interphase zu verletzen. Die

organische Phase wurde mit 2 ml 2,2-Dimethoxypropan, 20 µl Eisessig und einigen Siedeperlen versetzt und im Bioblock solange bei 90 °C erwärmt, bis das Dimethoxypropan das restliche Wasser umgesetzt hatte. Anschließend wurde die Lösung in einem Wheaton-Gefäß unter Argonbegasung vollständig eingengt.

Hydrolyse:

Das methylierte AGP wurde im Bioblock mit 1 ml 2 M TFA 1 h bei 121 °C und 2 bar hydrolysiert. Die TFA-Lösung wurde in einen Spitzkolben überführt und die TFA bei 40 °C (Wasserbad) unter Stickstoff abgeblasen.

Reduktion:

Die partiell methylierten Monosaccharide wurden mit 2 ml einer frisch hergestellten Lösung von 0,5 mol Natriumborhydrid in 2 M Ammoniak 60 min bei 60 °C reduziert (Trockenschrank). Nach dem Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml Aceton wurde das Lösungsmittel unter Stickstoff bei 40 °C (Wasserbad) abgeblasen.

Acetylierung:

Der viskose Rückstand wurde durch Zugabe von 200 µl Eisessig, 1 ml Ethylacetat, 3 ml Acetanhydrid (Lagerung über Molekularsieb 4 Å) und 100 µl Perchlorsäure (70 % (m/V)) als Katalysator 5 min acetyliert. Danach wurde auf Eis gekühlt und überschüssiges Acetanhydrid durch 5 min Reaktion mit 10 ml Aqua dem. und 200 µl 1-Methylimidazol (Katalysator) zersetzt.

Die PMAAs wurden dreimal mit je 1 ml Dichlormethan ausgeschüttelt, unter Stickstoff eingengt. 0,5 µl dieser Lösung wurden für die gaschromatographische Trennung und massenspektrometrische Analyse eingesetzt.

GC-gekoppelte Massenspektrometrie (GC-MS) der vollständig methylierten Proben:
Die Identifikation der PMAAs erfolgte durch Vergleich ihrer relativen Retentionszeiten im Totalionenchromatogramm (TIC), durch Analyse ihrer Massenspektren und Vergleich dieser Spektren mit denen bekannter PMAAs aus einer in der Arbeitsgruppe erstellten Spektrenbibliothek. Die Auswertung der Spektren wurde mit Hilfe der HP G 1034 C-Software für MS Chemstation durchgeführt.

Gaschromatographie/Massenspektrometrie:

GC:	HP 5890 Series II; Fa. Hewlett Packard, USA
Säule:	Permabond OV-1701 WCOT-Kapillarsäule (Fused Silica) Fa. Macherey & Nagel, Düren L 25 m, ID 0,25 mm
Trägergas:	He
Flussrate:	0,7 ml/min
Splitverhältnis:	1:35
Injektionsvolumen:	0,5-1 µl
Temperaturprogramm:	2 min 170 °C, 1 °C/min auf 210 °C, 10 min 210 °C isotherm Injektor 250 °C
EI-MS:	HP MS Engine 5898A; Fa. Hewlett Packard, USA

8. NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren von Polymeren zeigen meist nicht so eine gute Auflösung wie Spektren kleinerer Moleküle. Im Fall von Heteropolysacchariden kommt die Komplexität durch die Multiplikation und Überlagerung der vielen Signale zustande. Trotz der Vielzahl an chemischen Verschiebungen wird die NMR-Spektroskopie in der Strukturaufklärung von Polysacchariden verstärkt angewendet, und gute Ergebnisse werden mit aufgereinigten Polymeren erzielt. Wichtig ist, dass eine ausreichende Konzentration der Probe im verwendeten Lösungsmittel erreicht wird.

Das Wurzel-AGP wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in D₂O gelöst und 30 min mit Ultraschall behandelt.

Die Auswertung der Spektren erfolgte durch Vergleich der chemischen Verschiebungen mit Literaturdaten (CARTIER et al., 1987; JOSELEAU und CHAMBAT, 1984; SAMUELSEN et al., 1998; GANE et al. 1995; PONDER und RICHARDS, 1997), wobei beachtet werden muss, dass sich eine Verschiebung von ca. 2 ppm ergibt, da die Proben ohne Standard gemessen wurden.

Kernresonanzspektroskopie:

Gerät: Kernresonanzspektrometer ARX 300
Fa. Bruker, Rheinstetten
Temperatur: 300 K (thermostatisiert)

¹³C-NMR-Spektroskopie:

CPD (Protonen entkoppelt)
Messfrequenz: 75,47 MHz

¹H-NMR-Spektroskopie:

Messfrequenz: 300,13 MHz
Interner Standard: Restsignal D₂O ($\delta = 4,7$ ppm)

9. Deglykosylierung von AGPs mit HF

Die Deglykosylierung wurde entsprechend der Methode von MORT und LAMPORT (1977) mit wasserfreier Flusssäure (HF) durchgeführt. HF ist ein potentes Reagenz für die selektive Spaltung O-glykosidischer Bindungen in Polysacchariden und Glykoproteinen. Die Spaltung erfolgt zwischen Neutral-, Amino- und sauren Zuckern in Abhängigkeit von der gewählten Temperatur und Reaktionsdauer, während Peptidbindungen und N-glykosidische Bindungen nicht angegriffen werden. In Glykoproteinen kann somit die Polysaccharid-Komponente selektiv vom Protein gelöst werden. Über 90 % aller neutralen und sauren O-glykosidischen Bindungen werden innerhalb 1 h bei 0 °C gespalten, während N-glykosidische Bindungen eine Reaktionsdauer von 3 h bei 23 °C benötigen (RORRER et al., 1990).

Das AGP aus *Baptisia tinctoria* Wurzel, die Fraktionen 1-8 nach RP-HPLC und die hier ungebundene Fraktion wurden ausgiebig lyophilisiert und in wasserfreiem Methanol zur Verhinderung einer Repolymerisierung von Zuckerfluoriden suspendiert (100 μ l Methanol/1 ml HF). Die Proben wurden sofort in Flüssigstickstoff gekühlt und

in eine geschlossene Apparatur überführt. Nach Anlegen eines Vakuums wurden die Proben mit 1 ml HF versetzt und nach 1 h bei 0 °C erneut in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die enthaltene Säure wurde mit gesättigter Tris-Lösung neutralisiert. Die Protein-Backbones wurden anschließend an Superdex[®]75 entsalzt (Kap. 4.1.2.).

10. Bestimmung von Aminosäuren

10.1. Hydrolysebedingungen

3-10 mg AGP wurden in 1 ml 6 M Salzsäure hydrolysiert (22 h, 110 °C, unter N₂). Die Probe wurde zum Abkühlen stehen gelassen und im Anschluss zur Abtrennung der verkohlten Kohlenhydrate zentrifugiert (5.000 g, 10 min). Der Überstand wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne einrotiert.

10.2. Bestimmung von Hydroxyprolin (quantitativ)

Nach Literaturangaben (FINCHER et al., 1983; BACIC et al., 1996) ist Hydroxyprolin neben Prolin, Alanin und Serin eine in höheren Konzentrationen vorkommende Aminosäure im Proteinanteil von AGPs. Die Detektion dieser Aminosäure über HPLC mit Derivatisierung ist aber immer ein Schwachpunkt der Methoden. Deshalb wurde eine Methode gewählt, bei der selektiv Hydroxyprolin erfasst wird. Es handelt sich um eine photometrische Methode aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG).

Die einrotierten Aminosäuren wurden in 1 ml Aqua dem. aufgenommen. 100 µl dieser Lösung wurden mit Aqua dem. auf 4,0 ml verdünnt und das darin befindliche Hydroxyprolin unter Verwendung von 2 ml Oxidationsreagenz oxidiert (20 ± 1 min bei Raumtemperatur). Das Oxidationsprodukt bildete mit 2 ml Farbreagenz bei 60 ± 0,5 °C innerhalb von 15 min eine rot gefärbte Verbindung. Die Lösung wurde unter fließendem Wasser mindestens 3 min gekühlt und bis zur Messung 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Extinktion der diese Verbindungen enthaltenden Messlösung wurde photometrisch bei 558 nm gemessen. Sie ist der Hydroxyprolin-Konzentration direkt proportional. Für die Kalibrierung wurde eine

Verdünnungsreihe mit reinem Hydroxyprolin (0,6-2,4 µg/ml Aqua dem.) erstellt, als Blindwert wurde die Reaktion mit 4 ml Aqua dem. durchgeführt. Verdünnungen und Blindwert wurden doppelt bestimmt.

UV/VIS-Spektroskopie:

Gerät: Photometer Hitachi U-1100 Spectrophotometer

Reagenzien:

6 M Salzsäure: 87,51 g Salzsäure 25 % in 100,0 ml Aqua dem.

Puffer pH 6,8: Zitronensäure-Monohydrat 5,2 g
Natriumhydroxid-Plätzchen 2,8 g
Natriumacetat (wasserfrei) 15,6 g
in 100 ml Aqua dem. lösen
Thiomersal 20,0 mg
1-Propanol 50,0 ml
Aqua dem. ad 200,0 ml

Oxidationsreagenz: Chloramin T 1,4 g
Puffer pH 6,8 ad 100,0 ml

Farbreagenz: 4-Dimethylaminobenzaldehyd 10,0 g
Perchlorsäure (60 %) 35,0 ml
2-Propanol 65,0 ml

10.3. HPLC-Bestimmung von Aminosäuren (quantitativ)

Das einrotierte Aminosäure-Hydrolysat wurde in Pufferlösung aufgenommen, 30 min stehen gelassen, damit nicht gelöste Partikel sedimentierten, und der Überstand für die Bestimmung verwendet.

Hochleistungsflüssigchromatographie:

Gerät:	Aminosäuren-Analysator A100 (K-044-02)
Trennsäule:	TS 56
Vorsäule:	V51
Flussrate:	0,25 ml/min
Injektionsvolumen:	5 µl
Detektionsmethode:	Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin $\lambda = 570 \text{ nm}$ und 440 nm
Software:	Eurochrom 2000
Quantifizierungsart:	Externe Standardmethode; Berechnung nach der Peakfläche (Doppelbestimmung)
Standard:	Aminosäure-Standard (Kollagen), Sigma #A9531 versetzt mit Cysteinsäure

10.4. GC-Bestimmung von Aminosäuren (qualitativ)

Die Derivatisierung der einzelnen Aminosäuren erfolgte mit Hilfe des EZ:faast[®]Kits (Fa. Phenomenex) für die Aminosäureanalyse. Die Prozedur besteht aus einer Festphasenextraktion der Aminosäuren, gefolgt von dem Derivatisierungsprozess und einem Flüssigextraktionsschritt (HUŠEK und ŠIMEK, 2001). Die derivatisierten Proben wurden gaschromatographisch vermessen. Zur Identifizierung der Aminosäuren wurden die Retentionszeiten der Aminosäuren der Probe mit denen eines im Kit enthaltenen Standardaminosäuregemisches verglichen. Eine quantitative Bestimmung war mit dieser Methode nicht möglich, da weder Korrekturfaktoren für die Peakflächen mit einer akzeptablen Standardabweichung ermittelt werden konnten noch eine Kalibriergerade mit ausreichender Linearität erstellt werden konnte.

Kit-Komponenten:

Reagenzien:

Reagenz 1	Interner Standard (Norvalin, 200 µmol/l)
Reagenz 2	Natriumcarbonat-Lösung
Reagenz 3A	Komponente 1 des Elutionsmediums
Reagenz 3B	Komponente 2 des Elutionsmediums
Reagenz 4	Organische Lösung I
Reagenz 5	Organische Lösung II
Reagenz 6	Saure Lösung
SD	Aminosäure-Standardlösung (Konzentration der Aminosäuren: je 200 µmol/l, Pro und Hyp je 1 mmol/l)

Spezielle Materialien:

Pipettenspitzen mit Trennmaterial (Adsorbens)

Probenvials

Mikrodispenser (20-100 µl)

Spritzen 0,6 ml / 1,5 ml

Das einrotierte AGP-Hydrolysat wurde in 100 µl Aqua dem. aufgenommen und mit 200 µl Reagenz 2 auf einen pH-Wert von 1-2 eingestellt. 25 µl dieser Lösung wurden mit 100 µl Reagenz 1 gemischt. Die Lösung wurde mindestens 1 min durch die Pipettenspitze mit Trennmaterial gezogen, an das die vorhandenen Aminosäuren adsorbierten. Das Trennmaterial wurde mit 200 µl Aqua dem. gewaschen und anschließend mit 200 µl einer 3:2-Mischung von Reagenz 3A und 3B aus der Pipette gespült. Mit dem Mikrodispenser wurden 50 µl Reagenz 4 zur Probe gegeben und 5-8 s mit Hilfe des Vortexers emulgiert. Die Probe wurde 2 min stehen gelassen und erneut 5 s durchmischt. 100 µl Reagenz 5 wurden mit dem Mikrodispenser zugegeben, die Mischung 5 s durchmischt und 1 min stehen gelassen. 100 µl Reagenz 6 wurden zugegeben und 5 s durchmischt. Die Lösung trennte sich in eine hydrophile

und eine organische Phase. Die organische Phase wurde abgetrennt und zur sofortigen Vermessung am GC verwendet.

Gaschromatographie:

Gerät:	HP 6890 Plus Series Fa. Hewlett Packard, USA
Splitinjektor:	Splitverhältnis 1:15, 250 °C, 2,5 µl
Trennsäule:	Zebtron® ZB-HAAC Amino Acid Column; 10 m x 0,25 mm Fa. Phenomenex, Torrance, USA
Trärgas:	Helium
Trärgasgeschwindigkeit:	60 kPa
Temperaturprogramm:	110 °C, 30 °C/min auf 320 °C, 1 min halten
Detektor:	FID, 320 °C
Software:	Programm HP 3365 Ser.II Chemstation

10.5. N-terminale Protein-Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung von Peptiden erfolgte durch automatisierten Edman-Abbau mit Hilfe eines Beckman Sequencers (Modell LF 3400). Die Aufnahme des Aminosäure-Spektrums erfolgte online am Beckman System Gold HPLC-Gerät. Es wurden jeweils 20 Sequenzierungs-Zyklen durchlaufen, so dass maximal 20 N-terminale Aminosäuren identifiziert werden konnten. Die Auswertung einzelner Chromatogramme erfolgte durch Vergleich der Peakhöhen in Chromatogrammen aufeinanderfolgender Zyklen.

11. Zellkulturen

Samen von *Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis* wurden 7 min in 96 %igem Ethanol, 8 min in sterilisiertem Wasser und 30 min in Klorix[®] (Natriumhypochlorit-Lösung; 1:10 mit sterilisiertem Wasser verdünnt) geschüttelt und anschließend dreimal mit sterilisiertem Wasser gewaschen. Die Samen wurden unter der Sterilbank in sterile Petrischalen auf nassem, autoklaviertem Filterpapier zur Keimung ausgelegt.

11.1. Zellkulturmedien

Für *Baptisia australis* wurden drei Medien mit unterschiedlichen Phytohormonen und mit zum Teil unterschiedlichen Konzentrationen der Vitamine und anorganischen Bestandteile eingesetzt (Tab. 4):

- MS-Medium (MURASHIGE und SKOOG, 1962) mit 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D; 0,4 mg/l)
- MS-Medium mit β -Naphthylessigsäure (NAA; 4 mg/l) und Kinetin (0,3 mg/l)
- PC-L2-Medium (PHILLIPS und COLLINS, 1979) mit Picloram (0,06 mg/l) und 6-Benzylaminopurin (BAP; 0,1 mg/l).

Das beste Wachstum der Kalli wurde auf dem MS-Medium mit NAA und Kinetin erzielt, so dass nur dieses Medium für das Anlegen der Zellkulturen von *Baptisia tinctoria* verwendet wurde.

Die Medien wurden vorerst ohne Hormone und Vitamine hergestellt und 30 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Vitamine und Hormone wurden wegen ihrer Temperaturempfindlichkeit nach dem Autoklavieren als wässrige Lösungen sterilfiltriert zugegeben. Der fertige Nährboden wurde in ebenfalls sterilisierte Kunststoffpetrischalen (\varnothing 10 cm) ca. 3 mm hoch ausgegossen und bei 4 °C gelagert.

11.2. Kalluskulturen

Nach 3-5tägiger Keimung wurden ca. 0,5 cm lange Sprossabschnitte aus dem Bereich des Hypokotyls abgeschnitten, auf die Nährmedien überführt und bei 25 °C im Dunkeln kultiviert. Da die Kalli gerade zu Beginn des Wachstums nach kurzer Zeit aufgrund der Bildung phenolischer Substanzen braun wurden und dadurch das Wachstum gehemmt wurde, erfolgte die Überimpfung noch nicht braun gewordener Teile in 1-2wöchigem Abstand. Nach ca. 2 Monaten konnte zu einem 4-8wöchigen Überimpfen übergegangen werden.

11.3. Suspensionskulturen

Die Suspensionskultur-Medien wurden, wie unter 11.1. beschrieben, ohne Agar hergestellt, in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt und autoklaviert. Die Vitamine und Hormone wurden nach dem Abkühlen sterilfiltriert zugegeben, so dass sich ein Endvolumen von 100 ml Nährmedium in jedem Erlenmeyerkolben befand.

Zum Beimpfen wurden Kalli der entsprechenden Agar-Medien in einer Größe von bis zu 0,5 cm verwendet. Die Kultivierung erfolgte weiterhin im Dunkeln bei 25 °C auf einem Horizontalkreisschüttler bei 120 U/min. Je nach Nährmedium und Wachstum wurde in unterschiedlichen Zeitabständen auf frisches Nährmedium überimpft oder zur Gewinnung der AGPs das Nährmedium zentrifugiert (5.000 g, 15 min) und auf $\frac{1}{4}$ seines Volumens einrotiert.

Tab. 4: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien (Angaben in mg/l).

Komponente	MS + 2,4-D	MS + NAA/Kinetin	PC-L2
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1000
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	-	-	85
KNO ₃	1900	1900	2100
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370	370	435
KH ₂ PO ₄	170	170	325
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440	440	600
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,8	27,8	-
FeSO ₄ x 7 H ₂ O (EDTA)	-	-	25
Na ₂ x EDTA	37,3	37,3	-
H ₃ BO ₃	6,20	6,20	5,0
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	22,30	22,30	-
MnSO ₄ x H ₂ O	-	-	15,0
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,60	8,60	5,0
KJ	0,83	0,83	1,0
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25	0,25	0,4
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025	0,025	0,1
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025	0,025	0,1
<i>Vitamine*</i> :			
Thiamin-HCl	0,10	0,10	2,0
Myo-Inositol	100,0	100,0	250,0
Nicotinsäure	0,50	0,50	-
Pyridoxin-HCl	0,50	0,50	0,50
Glycin	2,00	2,00	-
<i>Hormone*</i> :			
2,4-D	0,4	-	-
NAA	-	4,0	-
Kinetin	-	0,3	-
Picloram	-	-	0,06
BAP	-	-	0,1
Sucrose	20000	20000	25000
Agar**	10000	10000	8000

*Vitamine und Hormone wurden aufgrund ihrer Temperaturempfindlichkeit erst nach dem Autoklavieren als wässrige Lösungen sterilfiltriert zugegeben; **nur für Kalluskulturen

11.4. Isolierung von AGPs aus dem Suspensionsmedium

Mit dem Überstand des Suspensionsmediums wurde eine Fällung in 80 %igem Ethanol vorgenommen. Im Pellet befanden sich neben anderen Polysacchariden auch die AGPs. Das Pellet wurde in Wasser suspendiert und 2 h gerührt. Unlösliche Bestandteile wurden abfiltriert (Schwarzband-Rundfilter 589¹, Ø 15 cm, Fa. Schleicher & Schüll). Zur Ermittlung der Galactose- und Arabinose-Konzentrationen für eine anschließende Fällung der AGPs wurde eine Acetylierungsanalyse durchgeführt (Kap. 6.1.). AGPs wurden aus der wasserlöslichen Ethanol-Fällung mit dem Yariv-Reagenz gefällt (Kap. 3.).

12. Resorptionsversuche an einem Epithelmodell

In vitro-Untersuchungen der immunstimulierenden Wirkung oral applizierter pflanzlicher Immunstimulanzien lassen nicht darauf schließen, ob zuvor eine Resorption der an der Wirkung beteiligten Makromoleküle im Körper erfolgt ist. Um Hinweise zu erhalten, ob eine Resorption von AGPs durch Epithelzellen möglich ist, wurden Versuche an einem künstlichen Epithelmodell mit Caco-2 Zellen (Adenokarzinom-Zelllinie) durchgeführt.

Zellkultur:

Caco-2 Zellen (ATCC) wurden in high-Glucose (4,5 g/l) Dulbecco's Modified Eagle Medium mit GlutaMAX (Gibco), 1 % nicht essentiellen Aminosäuren (Gibco), 10 % Hitze-inaktiviertem (30 min, 57 °C) fötalem Kälberserum (Gibco), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,5 µg/ml Amphotericin B (alle Gibco) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen passagiert. Dabei wurden sie zunächst zweimal mit 6 ml PBS-Puffer (Gibco) gewaschen und dann mit 3 ml Trypsin/EDTA (Gibco) zwischen 20-25 min trypsinisiert. Mit jeder Passage wurden jeweils 1-1,5 Millionen Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Filterplatten:

0,5 Millionen Zellen/Insert werden auf eine Transwell 6 Loch Filterplatte ausgesät (Ø 24 mm, Polycarbonat-Membran mit 0,4 µm Porengröße; Costar) und im oben beschriebenen Medium kultiviert. Das Medium wurde während der ersten 10 Tage

jeden 2. Tag, danach jeden Tag gewechselt. Dabei wurden für die apikale Seite 1,5 ml (Donatorseite) und für die basale Seite 2,5 ml (Akzeptorseite) Medium verwendet. Der optimale Versuchstermin wurde mittels Messung des trans-epithelialen elektrischen Widerstands (transepithelial electrical resistance, TEER) mit einem Endohm 24 Gerät (World Precision Instruments) bestimmt. Die Filterplatten wurden verwendet, sobald die TEER-Werte einen Steady State in einem Bereich von ≥ 300 Ohm erreichten (19-24 Tage nach dem Aussäen). Am Versuchstag wurden die Membranen mit Dulbecco's Modified Eagle Medium mit GlutaMAX ohne jegliche Zusätze gründlich gespült. Mit diesem Medium wurden auch die Stammlösungen der Testsubstanzen hergestellt (1 mg/ml). Die Stammlösungen wurden mit dem Medium im Donatorkompartiment vermischt, so dass Versuchskonzentrationen von 50 und 100 ppm entstanden. Nach bestimmten Zeitintervallen (1, 2,5 und 5 h) wurde die Akzeptorflüssigkeit entnommen (= Untersuchungslösung) und durch frisches Medium ersetzt. Für jede Konzentration wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und eine weitere Membran wurde als Blindwert für die ^{14}C -Mannitol Messungen verwendet.

Um die Integrität der verwendeten Membranen während des gesamten Versuchs zu verifizieren, wurde nach dem Versuch wiederum der TEER-Wert bestimmt und anschließend ein Test mit dem hydrophilen Marker ^{14}C -Mannitol (in Methanol, spezifische Aktivität: 3,7 MBq/ μl , NEN) durchgeführt. Mannitol wird nicht (oder nur in sehr geringen Mengen) resorbiert, und ein parazellulärer Transport würde auf undichte bzw. geöffnete tight junctions hinweisen. Für den Mannitoltest wurden 1,5 ml einer Mischung aus 10 ml Transportmedium und 30 μl der ^{14}C -Mannitollösung auf die apikale Seite und 2,5 ml reines Medium auf die basale Seite gegeben. Nach 15, 30, 45 und 60 min wurden 0,5 ml von der basalen Seite entnommen, in 2,5 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und die Aktivität in einem Beckmann LS 6500 Counter gemessen. Nach 0 und 60 min wurde mit 0,1 ml von der apikalen Seite ebenso verfahren (Kontrollmessung). Aus den Werten für die basale Seite wurde die apparente Permeation bestimmt, die einen Grenzwert von 1×10^{-6} nicht überschreiten darf.

13. Immunologische Methoden

13.1. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Im ELISA wurde die Kreuzreaktivität der Baptisia-AGPs gegen Echinacea-AGP-Antikörper (AK) getestet. Hierfür standen sowohl ein monoklonaler AK (4B8D3) als auch eine polyklonale AK-Präparation zur Verfügung.

ELISA:

Brutschrank:	Elektronisch geregelter Wärmeschrank BE 200 Fa. Memmert, Schwabach
ELISA-Platten:	96-well Nunc Immuno [®] Plates Maxisorp [®] Surface Fa. Nunc, Dänemark
Washer:	Tecan [®] Columbus Plus Fa. Tecan Group Ltd, Maennedorf, Schweiz
Reader:	Tecan [®] Spectra Thermo Fa. Tecan Group Ltd, Maennedorf, Schweiz

13.1.1. Sandwich-ELISA mit polyklonalen Antikörpern

Die Mikrotiterplatten wurden mit 100 µl/Kavität AK-Lösung (Anti-AGP Elution Q; Verdünnung 1:1000 in PBS-Puffer pH 7,4) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die beschichteten Platten wurden dreimal mit PBS-Puffer mit 0,5 % Tween 20 gewaschen. Freie Bereiche wurden mit 200 µl/Kavität 1 %iger BSA in PBS-Puffer blockiert (2 h, 36 °C). Ungebundene Anteile wurden durch erneutes Waschen entfernt. Das AGP wurde in Verdünnungen von 1-100 µg/ml hergestellt und je 50 µl dieser Verdünnungen in eine Kavität der Platte pipettiert (Doppelbestimmung). Nach 1,5 h Inkubation bei 36 °C wurden die Platten erneut gewaschen, mit 100 µl/Kavität Anti-AGP Elution Q (Verdünnung 1:250 in PBS, konjugiert mit alkalischer Phosphatase) beschichtet und 1 h bei 36 °C inkubiert. Überschüssiger AK wurde durch Waschen entfernt. Nach Zugabe von 100 µl/Kavität Substratlösung

(p-Nitrophenylphosphat: 0,1 mg/ml in 0,2 M Tris-Puffer) wurde die Absorption bei 405 nm gegen 690 nm nach 30 min gemessen.

13.1.2. Kompetitiver ELISA mit monoklonalen Antikörpern

Die Mikrotiterplatten wurden mit 100 µl/Kavität Baptisia-AGP-Lösung (5 µg/ml in PBS-Puffer pH 7,4) über Nacht bei 36 °C mit offenem Deckel zum Antrocknen beschichtet. Die beschichteten Platten wurden dreimal mit PBS-Puffer mit 0,5 % Tween 20 gewaschen. Freie Bereiche wurden mit 200 µl/Kavität 1 %iger BSA in PBS-Puffer blockiert (2 h, 36 °C), ungebundene Anteile wurden durch erneutes Waschen entfernt. AGP-Lösungen wurden in Konzentrationen von 1-100 µg/ml hergestellt. Je 100 µl dieser Verdünnungen wurden mit 100 µl Lösung der monoklonalen AKs (Verdünnung 1:500 in PBS) gemischt und 2 h bei 36 °C inkubiert. Pro Kavität wurden 50 µl AGP-AK-Mischung eingefüllt (Doppelbestimmung), und die Platte wurde kurz geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h bei 36 °C wurden 100 µl/Kavität Detektorantikörper zugegeben (Anti-Maus-IgG, markiert mit alkalischer Phosphatase, Verdünnung 1:1000 in PBS) und 1 h bei 36 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 µl/Kavität Substrat (p-Nitrophenylphosphat: 0,1 mg/ml in 0,2 M Tris-Puffer) zupipettiert. Die Absorption wurde bei 405 nm gegen 690 nm nach 30 min gemessen.

13.2. Lymphozyten-Proliferationstest (LPT)

Die Bestimmung der Proliferationsrate von Milzzellen aus C3H/HeJ-, NMRI- und Balb/c-Mäusen erfolgte durch Messung des Einbaus von ^3H -markiertem Thymidin in neu synthetisierte DNA. Dazu wurden Milzzellsuspensionen mit AGP-Testlösungen in verschiedenen Konzentrationen bzw. mit Referenzmitogenen (Lipopolysaccharide (LPS, 30 $\mu\text{g/ml}$), Concanavalin A (ConA, 2 $\mu\text{g/ml}$), Phytohämagglutinin (PHA, 10 $\mu\text{g/ml}$)) 48 h inkubiert, anschließend mit ^3H -markiertem Thymidin versetzt und weitere 24 h inkubiert. Die Milzzellen wurden geerntet, und die nicht eingebaute Markierung wurde ausgewaschen. Die Messung der Radioaktivität (cpm) der Zellen erfolgte im Szintillationszähler, wobei die Menge des eingebauten Thymidins direkt proportional zu der im Markierungszeitraum erfolgten DNA-Synthese und damit zur Proliferationsrate der Zellen ist (SHEVACH, 1997).

Es wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt und ein Stimulationsindex (SI) als Maß für die immunstimulatorische Aktivität berechnet (BODINET, 1999):

$$\text{SI} = \frac{\text{cpm behandelte Kulturen}}{\text{cpm unbehandelte Kulturen}}$$

13.3. Zytokininduktion (IL-1 β , IL-6, TNF α , GM-CSF)

Bildung und Freisetzung von Zytokinen sind ein wichtiger Bestandteil der sauerstoffunabhängigen Infektabwehr. Maus-Makrophagen können durch Inkubation mit einem Aktivator zur vermehrten Zytokinausschüttung aktiviert werden (BEUSCHER et al., 1989).

Milzen von ca. 30 g schweren Mäusen wurden nach Standardvorschrift (Schaper und Brümmer GmbH) aufgearbeitet und auf $7,5 \times 10^6$ c/ml in Zellkulturmedium eingestellt. Die Zellen wurden in 24er Zellkulturplatten ausgesät (1 ml/well) und jeweils 1 ml der jeweiligen AGP-Lösung dazugegeben (mindestens 4 Parallelmessungen). Als Positivkontrolle wurde LPS (30 $\mu\text{g/ml}$) bzw. LPS (30 $\mu\text{g/ml}$) sowie ConA (2 $\mu\text{g/ml}$) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente das Zellkulturmedium ohne weitere Zusätze.

Nach 24 h bzw. 48 h Inkubation bei 5 % CO₂ und 37 °C wurden die Überstände abgenommen, gepoolt, abzentrifugiert und eingefroren. Die Aktivität der Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF α und GM-CSF wurde im Kulturüberstand mit Hilfe spezifischer Bioassays (ELISA-Kits, Duo-Set R&D) bestimmt (BODINET, 1999).

13.4. Bestimmung der IgM-Produktion in Maus-Lymphozytenkulturen (NMRI)

Mausmilzzellen wurden auf eine Dichte von $7,5 \times 10^6$ c/ml eingestellt. Je 1 ml Suspension wurde mit 1 ml AGP-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert und 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Positivkontrolle wurde LPS (30 μ g/ml), als Negativkontrolle das entsprechende Volumen an Zellkulturmedium eingesetzt. Der Gehalt an IgM in den Zellkulturüberständen wurde mit Hilfe eines für Maus-IgM spezifischen ELISAs bestimmt (BODINET, 1999).

13.5. Bestimmung der NO₂⁻-Produktion alveolärer Maus-Makrophagen

In Untersuchungen zur Aktivierung sauerstoffabhängiger Abwehrmechanismen kann die Bildung und Freisetzung des mikrobiziden Effektormoleküls NO aus Makrophagen ermittelt werden. Stickoxide schädigen Fremdzellen, wie z.B. auch große Parasiten. Auch das körpereigene Gewebe kann geschädigt werden, so dass eine Regulation erforderlich ist. Diese übernehmen T-Helferzellen, indem sie Makrophagen durch IFN γ stimulieren.

Im Test wurden alveoläre Maus-Makrophagen (MH-S) in Zellkulturmedium auf eine Dichte von 1×10^6 c/ml eingestellt. Je 100 μ l Suspension wurden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert und 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde mit je 100 μ l AGP-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Negativkontrolle wurde nur das Zellkulturmedium verwendet; als Positivkontrolle diente ein Gemisch aus LPS und IFN γ (5 bzw. 1 ng/ml). In den Zellkulturüberständen wurde die Konzentration an NO₂⁻ mit Hilfe des Griess-Assays (GREEN et al., 1997) bestimmt (BODINET, 1999).

13.6. Induktion von IFN γ in Milzzellkulturen von NMRI-Mäusen

Zur Untersuchung zytoprotektiver Effekte wurde die Induktion von IFN γ in Zellkulturüberständen gemessen. Milzen wurden nach Standardvorschrift (BODINET, 1999) aufgearbeitet und auf $7,5 \times 10^6$ c/ml in Zellkulturmedium eingestellt. Die Zellen wurden in 24er Zellkulturplatten ausgesät (1 ml/well) und jeweils 1 ml der jeweiligen AGP-Lösung dazugegeben (4 Parallelmessungen). Als Positivkontrollsubstanzen dienten ConA (2 μ g/ml) sowie LPS (30 μ g/ml). Als Negativkontrolle diente das Zellkulturmedium ohne weitere Zusätze. Die Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO $_2$ inkubiert. Nach 48 h wurden die Zellkulturüberstände geerntet, gepoolt, zentrifugiert und eingefroren. IFN γ wurde im Zellkulturüberstand mit Hilfe eines kommerziellen ELISAs bestimmt (BODINET, 1999).

Allgemeine Geräte

Autoklav:

Dampfsterilisator VST 40/60 S, Fa. Zirbus

Autotitrator:

719 S Titrino, Fa Metrohm

Bioblock:

Bioblock Scientific CODE 92607, Fa. Thermolyne Corp.

Dialyse:

Schläuche: Spectra/Por[®] 4 Regenerated Cellulose Membrane, Ø 20 mm, MWCO
12.000-14.000 Da,
Fa. Spectrum Laboratories Inc.

Gefriertrocknung:

BETA 1-8 K, Fa. Christ

Freeze Dry System Lyph-Lock 6, Fa. Labconco

Schüttler für Zellkulturen:

Horizontalkreisschüttler EB swip

SpeedVac:

Speed Vac[®] Plus SC 110 A, Fa. ThermoSavant

Sterilbank:

antair ZKB, Fa. Mahl

Trockenschrank:

Typ T 6060, Fa. Heraeus Instruments

Ultraschallbad:

Sonorex Super 10P Digital, Fa. Bandelin

Zentrifugen:

Megafuge 1.0, Fa. Heraeus Instruments

Ultrazentrifuge Sigma 3K 30, Fa. Sigma

CS-15 Centrifuge, Fa. Beckman

Biofuge pico, Fa. Heraeus Instruments

C. Ergebnisse

I. *Baptisia tinctoria* Wurzelmaterial

Zur Isolierung von Arabinogalactan-Proteinen (AGPs) aus *Baptisia tinctoria* wurde ein wässriger Extrakt hergestellt, da mit diesem Lösungsmittel eine optimale Löslichkeit der AGPs erreicht wird. In diesem Extrakt war die AGP-Konzentration allerdings zu gering, um eine direkte Fällung mit dem β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz vorzunehmen. Der Extrakt musste in mehreren Schritten aufgereinigt werden, damit eine für die Fällung ausreichende Konzentration an AGPs erreicht wurde (Abb. 8). Im ersten Trennschritt wurde eine Tangentialfluss-Filtration (TFF) mit einer Ausschlussgrenze (MWCO) von 30.000 Da eingesetzt, wodurch eine hochmolekulare Fraktion (Retentat) > 30.000 Da und eine niedermolekulare Fraktion (Filtrat) < 30.000 Da gewonnen wurden. AGPs wurden aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes in der hochmolekularen Fraktion vermutet. Zur vollständigen Abtrennung niedermolekularer Bestandteile wurde im Anschluss an die TFF eine Dialyse (MWCO 12-14.000 Da) mit beiden Fraktionen durchgeführt. Diese Reinigungsschritte reichten bereits aus, die Arabinose- und Galactose-Konzentrationen im Retentat so zu erhöhen, dass eine Fällung mit dem β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz vorgenommen werden konnte. Aber auch im dialysierten Filtrat zeigten sich ausreichende Mengen Arabinose und Galactose, so dass auch hier eine Fällung mit dem Yariv-Reagenz durchgeführt wurde.

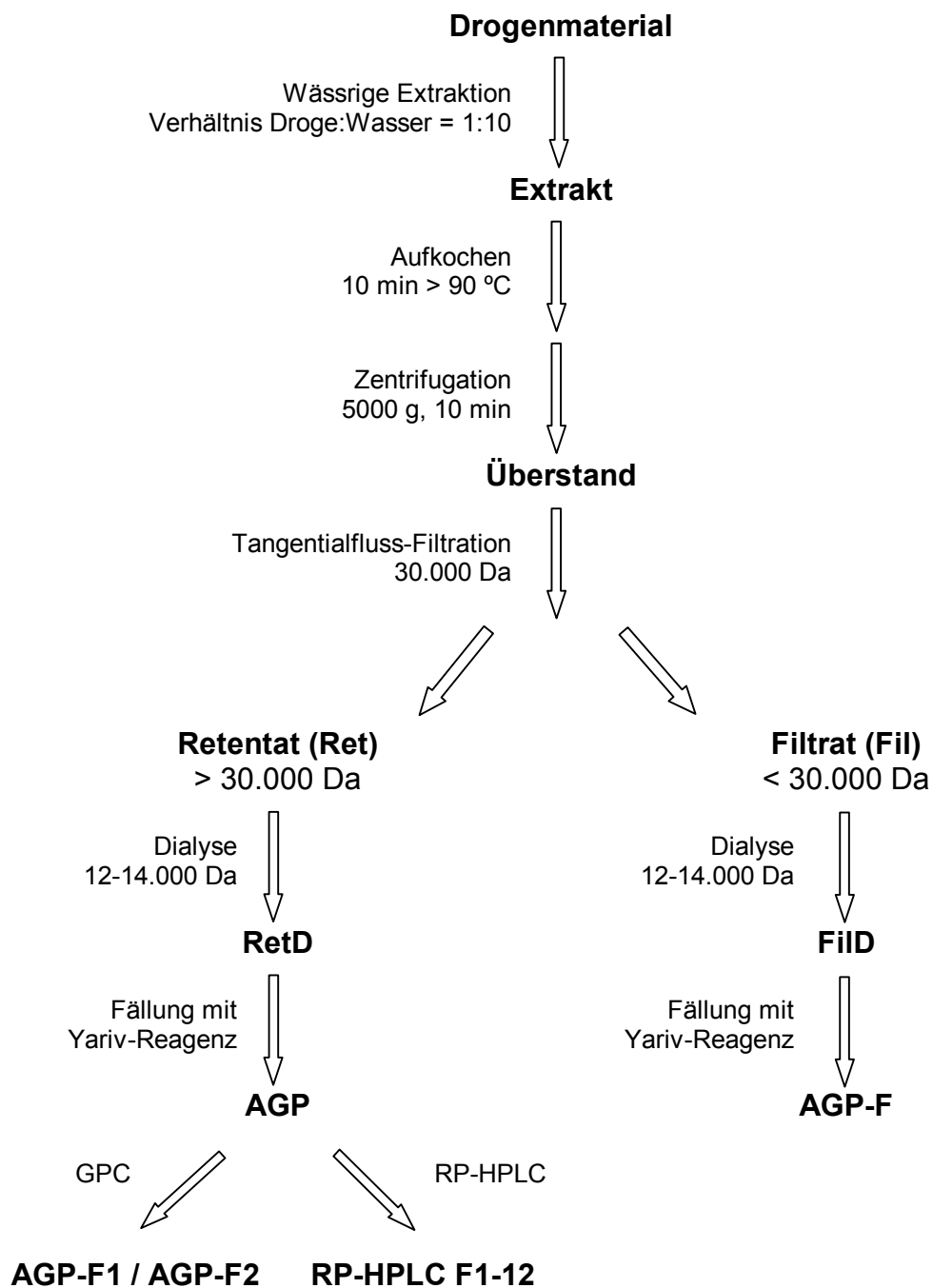


Abb. 8: Schema für den Isolierungsweg von AGPs aus *Baptisia tinctoria* Wurzel.

I.1. Geldiffusionstest Retentat und Filtrat

Es wurde ein Geldiffusionstest mit dem Filtrat nach TFF durchgeführt, um zu kontrollieren, ob auch hier Yariv-fällbare AGPs vorhanden sind. Das Filtrat wurde in Konzentrationen von 10, 20, 50 und 100 µg/ml eingesetzt. Im Test zeigten sich keine Präzipitationsbanden.

Der Test wurde in den gleichen Konzentrationen nach einer Dialyse (12-14.000 Da) des Filtrates wiederholt. Hier zeigten sich deutliche Banden bei den Konzentrationen 50 und 100 µg/ml, während bei den niedrigeren Konzentrationen nur diffuse dunkle Bereiche erschienen (Abb. 9). Auch im Filtrat waren demnach geringe Mengen AGPs vorhanden.

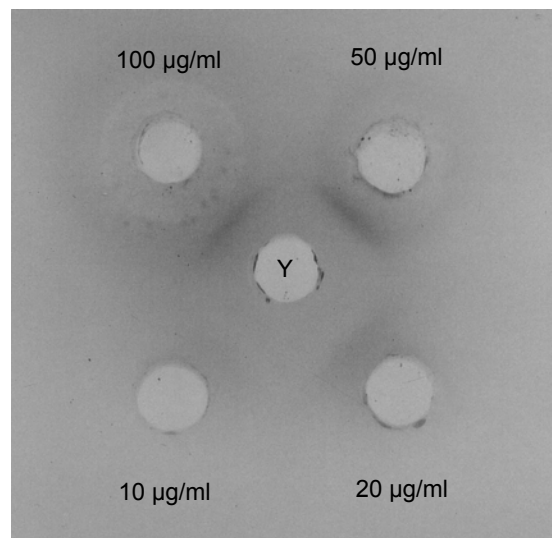


Abb. 9: Geldiffusionstest unterschiedlicher Konzentrationen des dialysierten Filtrats gegen Yariv-Reagenz (Y = 1 mg/ml).

Vom Retentat und dem Retentat nach Dialyse (12-14.000 Da) wurden Lösungen mit den Konzentrationen 1, 2, 5, 10, 20, 50 und 100 µg/ml hergestellt. Im Gel-diffusionstest gab es bei allen Konzentrationen eine Präzipitationsbande, was auf eine im Vergleich zum Filtrat deutlich höhere Konzentration an AGPs schließen lässt (Abb. 10). Die AGP-Konzentrationen waren nach der Dialyse hoch genug, um eine Fällung mit dem Yariv-Reagenz durchzuführen.

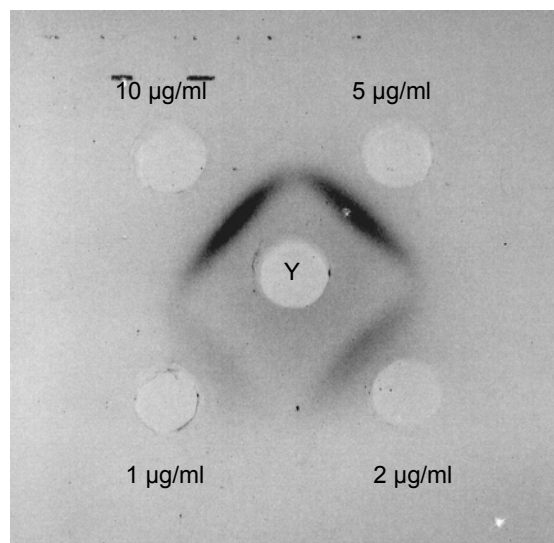


Abb. 10: Geldiffusionstest unterschiedlicher Konzentrationen des dialysierten Retentats gegen Yariv-Reagenz (Y = 1 mg/ml).

I.2. Neutralzuckerzusammensetzung

Um erste Informationen über den molekularen Aufbau der Polymere zu erhalten, müssen diese in Monomere gespalten werden. Die Identifizierung und quantitative Erfassung der neutralen Monosaccharide einzelner Isolierungsstufen erfolgte gaschromatographisch nach BLAKENEY et al. (1983). Uronsäuren werden bei dieser Methode nicht miterfasst, da sie einerseits bei der Hydrolyse des Polysaccharid-Anteils als Aldobiuronsäuren abgespalten werden und andererseits die Carbonsäure-Funktion bei der gewählten Derivatisierungs-Methode nicht reduziert wird.

I.2.1. Filtrat und Retentat

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Acetylierungsanalysen der Aufarbeitungsfractionen Retentat (Ret), Retentat nach Dialyse (RetD), Filtrat (Fil) und Filtrat nach Dialyse (FilD) dargestellt (Tab. 5 / Abb. 11).

In den Fraktionen Fil und Ret nach TFF dominierte Glucose neben Rhamnose als Monosaccharid, in geringeren Mengen kamen Arabinose, Mannose und Galactose vor. Xylose war in Spuren nur in Ret vorhanden. Der Glucosegehalt nahm nach der Dialyse (12-14.000 Da) stark ab. In RetD wurde Galactose neben Arabinose und Glucose zum dominierenden Monosaccharid, während in FilD noch Glucose neben Arabinose und Galactose dominierte. In geringeren Mengen kamen in beiden Dialysaten Rhamnose und Mannose vor.

Tab. 5: Tabellarische Darstellung der Neutralzuckerzusammensetzung einzelner Fraktionen der AGP-Isolierung aus *Baptisia tinctoria* Wurzel nach GC-Analyse der Alditolacetate (Angaben in %(m/m)).

Neutralzucker	Fil	Ret	FilD	RetD
Rha	13,5	15,6	15,2	7,3
Ara	1,2	8,1	27,1	27,6
Xyl	-	0,9	-	-
Man	3,7	1,4	0,6	4,1
Gal	0,7	8,0	23,2	39,3
Glc	80,8	65,9	33,9	21,6
Ara:Gal	1:0,6	1:1,0	1:0,9	1:1,4

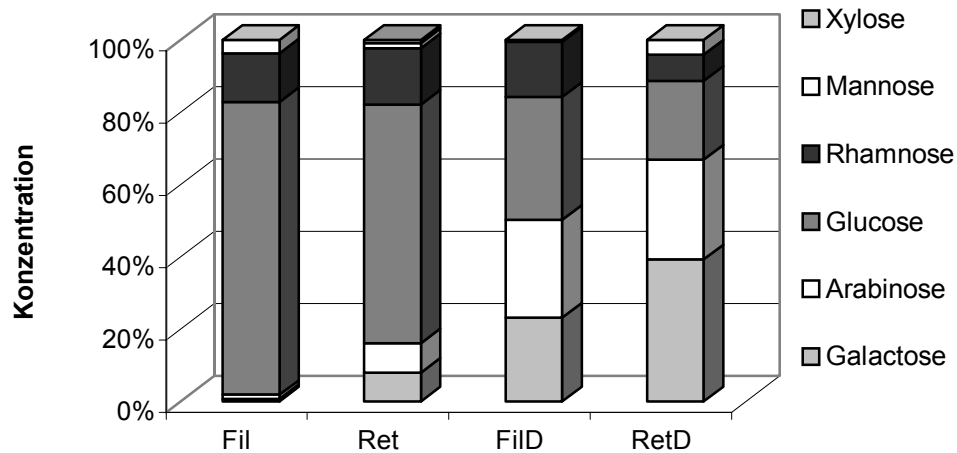


Abb. 11: Graphische Darstellung der Neutralzuckerzusammensetzung einzelner Fraktionen der AGP-Isolierung aus *Baptisia tinctoria* Wurzel nach GC-Analyse der Alditolacetate.

I.2.2. AGPs

Nach Yariv-Fällung aus RetD (AGP) bildeten Galactose und Arabinose mit über 80 % die beiden Hauptzucker (Tab. 6 / Abb. 12). Bei einzelnen Fällungen schwankte der Glucose-Gehalt zwischen 2 und 8 %, was auf eine unzureichende Dialyse und damit Abtrennung der Glucose nach Spaltung des Yariv-Reagenzes zurückzuführen sein dürfte. In geringeren Mengen wurden Mannose und Rhamnose identifiziert.

Auch aus FilD ließen sich durch Fällung mit Yariv-Reagenz AGPs (AGP-F) isolieren, die in ihrer Neutralzuckerzusammensetzung den AGPs aus RetD sehr ähnlich waren. Auffällig anders war das Ara-Gal-Verhältnis, das zugunsten der Arabinose verschoben schien.

Die AGP-Konzentration im Filtrat war allerdings so gering, dass eine Isolierung und weitere Charakterisierung aus diesem Material nicht weiter verfolgt wurde.

Tab. 6: Tabellarische Darstellung der Neutralzuckerzusammensetzung der AGPs aus RetD (AGP) und FilD (AGP-F) nach GC-Analyse der Alditolacetate (Angaben in %(m/m)).

Neutralzucker	AGP	AGP-F
Rha	3,5	4,7
Ara	30,7	36,5
Man	1,1	5,4
Gal	58,7	47,4
Glc	5,9	6,0
Ara:Gal	1:1,9	1:1,3

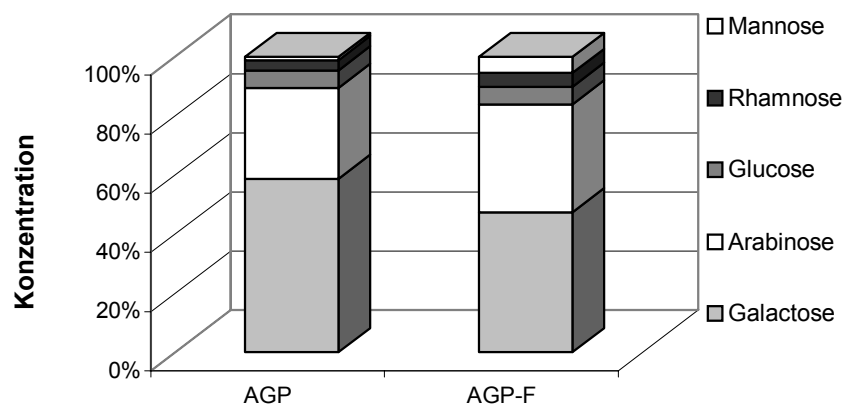


Abb. 12: Graphische Darstellung der Neutralzuckerzusammensetzung der AGPs aus RetD (AGP) und FilD (AGP-F) nach GC-Analyse der Alditolacetate.

I.3. Fraktionierung der AGPs

I.3.1. Fraktionierung durch GPC

Die GPC ermöglicht die Trennung von Polysacchariden nach ihrer Molekülgröße. Durch die duale Detektion mit einem RI-Detektor und einem MALLS-Detektor kann einerseits das hydrodynamische Volumen (HV) und andererseits das genaue Molekulargewicht (MW) bestimmt werden. Voraussetzung für eine optimale Trennung sind Gelmaterialien mit einem idealen Trennbereich sowohl für die Kalibrierung als auch für die Probe. Es wurde eine Sephacryl S-400 HR-Säule eingesetzt, die einen Trennbereich von 20.000-8.000.000 Da für globuläre Moleküle und 10.000-2.000.000 Da für Dextrane aufweist. Mit den Pullulanen P10, P20, P100, P200, P400 und P800 wurde kalibriert (Abb. 13).

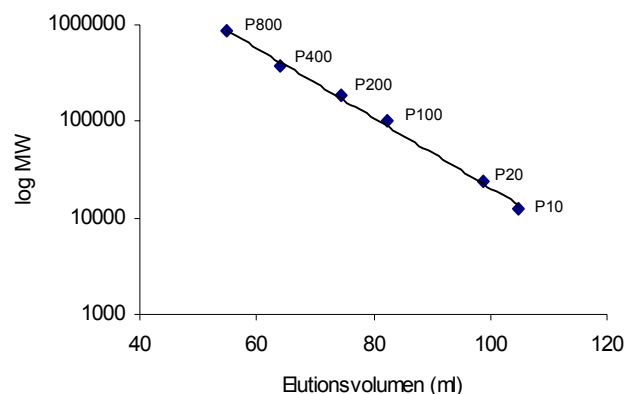


Abb. 13: Kalibriergerade der Sephacryl S-400 HR Säule mit Pullulanstandards zur Bestimmung der HVs der AGPs.

Auf dieser Säule konnte das Wurzel-AGP in zwei Fraktionen mit unterschiedlichen MWs getrennt werden (Abb. 14). Die Ermittlung der HVs über die Pullulan-Kalibrierkurve ergab Werte von $1,2 \times 10^6$ Da (AGP-F1) und 56.000 Da (AGP-F2). Die Bestimmung über den MALLS-Detektor lieferte für die entsprechenden Fraktionen durchschnittliche MWs von 2×10^8 Da und 140.000 Da (Tab. 7). Das Gelmaterial war für eine Bestimmung des HVs der hochmolekularen Fraktion nicht geeignet, da die

Fraktion im Ausschlussbereich der Säule eluiert wurde und das HV nicht mehr im linearen Bereich der Kalibrierkurve lag. Verglichen mit Pullulanen lässt sich also nur sagen, dass das HV über 800.000 Da lag. Außerdem zeigte sich gerade an der MW-Verteilung der hochmolekularen Fraktion (Abb. 14) deutlich, dass eine Trennung von Polysacchariden mit der GPC erschwert sein kann, da sie ein polydisperses MW aufweisen und kein distinktes wie Proteine (BLASCHEK, 1991).

Abb. 14 zeigt das Chromatogramm des Wurzel-AGPs und einzelner Pullulane.

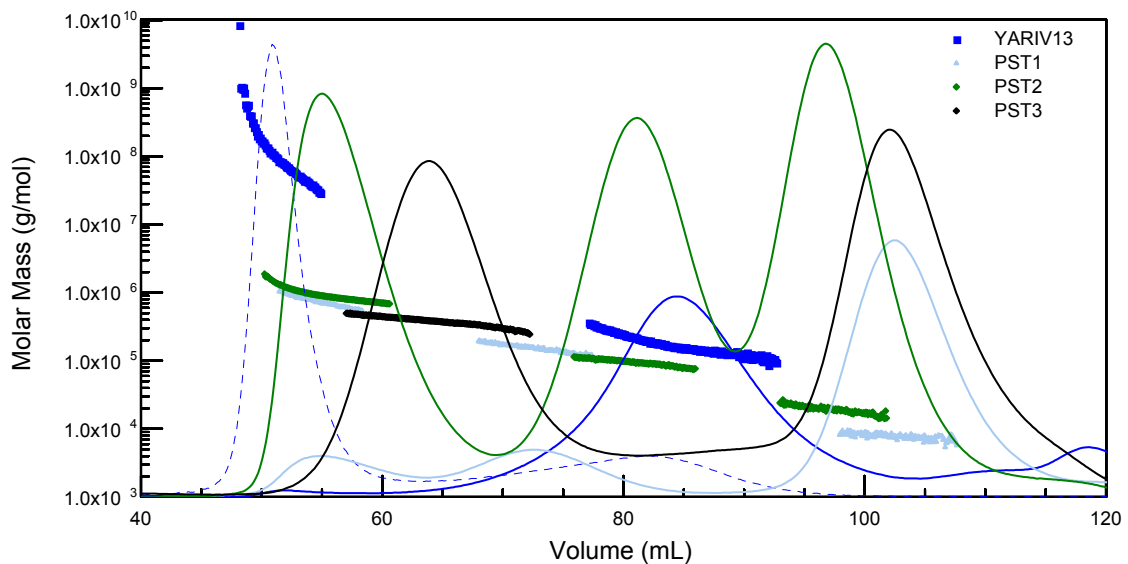


Abb. 14: Chromatogramm von Wurzel-AGP an Sephacryl S-400 HR im Vergleich mit Pullulanen (dunkelblau: AGP; grün: Pullulane 800 kDa, 100 kDa, 20 kDa; hellblau: Pullulane 800 kDa, 200 kDa, 10 kDa; schwarz: Pullulan 400 kDa; gestrichelte Kurve: RI-Detektion des AGPs; durchgezogene Kurven: MALLS incl. Darstellung der über MALLS ermittelten MW-Verteilung für jeden Peak).

Tab. 7: MWs [Da] der Wurzel-AGP-Fractionen bestimmt mit MALLS.

Trennlauf	MW AGP-F1	MW AGP-F2
1	0,9-1,0x10 ⁷	125-130.000
2	1,3-2,6x10 ⁷	125-135.000
3	6,0-7,2x10 ⁶	90-100.000
4	1,8-2,0x10 ⁷	135-160.000
5	2,6-3,1x10 ⁸	105-120.000
6	-	140-180.000
7	-	160-190.000
8	1,0-1,2x10 ⁹	140-150.000
9	0,7-1,1x10 ⁷	150-160.000
10	-	160-170.000
Mittelwert	2,0x10 ⁸	140.000

Die einzelnen Fraktionen der Läufe wurden aufgefangen, dialysiert und zur näheren Charakterisierung der Neutralzucker einer Acetylierungsanalyse unterzogen. Da keine Basislinientrennung der einzelnen Fraktionen vorlag, müssen die Werte vorsichtig interpretiert werden. Es wird stets ein Teil der Fraktion 1 auch in Fraktion 2 miterfasst und umgekehrt. Bei der Trennung der beiden Fraktionen dieser Probe wurde darauf geachtet, dass zwischen beiden Fraktionen im Bereich von 60-70 ml eine dritte Fraktion aufgefangen wurde, um die Trennung der beiden Peakfraktionen zu verbessern.

Nur 55 % der aufgetragenen AGP-Menge konnten nach der GPC wiedergewonnen werden, wobei AGP-F2 mit 90 % hiervon wiederum die größere Fraktion darstellte.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Neutralzuckerbestimmung fiel die Ähnlichkeit der beiden isolierten Fraktionen auf. Es ergab sich eine nahezu identische Zusammensetzung des Kohlenhydratanteils sowohl von AGP-F1 und AGP-F2 als auch vom ursprünglichen AGP (Tab. 8 / Abb. 15). Hauptmonosaccharide waren Galactose und Arabinose neben Glucose, Rhamnose und Mannose.

Sowohl im AGP als auch in AGP-F1 und AGP-F2 konnte Protein nachgewiesen werden, so dass die Substanzen durch die Fällbarkeit mit dem β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz, die Monosaccharid-Zusammensetzung und den Proteinnachweis als Arabinogalactan-Proteine charakterisiert wurden.

Tab. 8: Tabellarische Darstellung der Neutralzuckerzusammensetzung von Wurzel-AGP und den beiden nach GPC-Trennung an Sephacryl S-400 HR erhaltenen Fraktionen AGP-F1 und AGP-F2 nach GC-Analyse der Alditolacetate (Angaben in %(m/m)).

Neutralzucker	AGP	AGP-F1	AGP-F2
Rha	3,5	4,2	3,8
Ara	30,7	27,3	31,1
Man	1,1	5,7	2,4
Gal	58,7	56,4	57,0
Glc	5,9	6,4	5,8
Ara:Gal	1:1,9	1:2,1	1:1,8

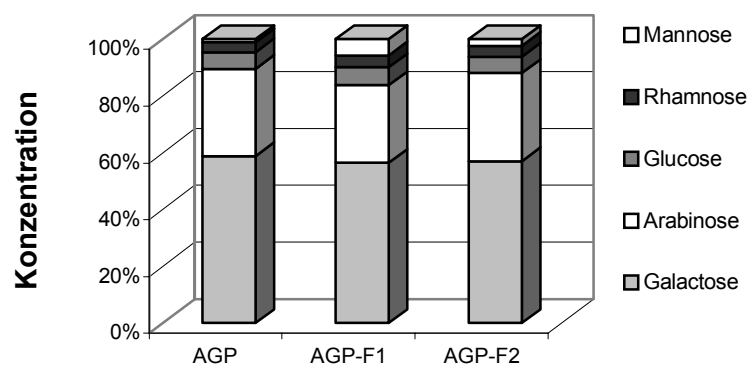


Abb. 15: Graphische Darstellung der Neutralzuckerzusammensetzung von Wurzel-AGP (AGP) und den beiden nach GPC-Trennung an Sephacryl S-400 HR erhaltenen Fraktionen AGP-F1 und AGP-F2 nach GC-Analyse der Alditolacetate.

I.3.2. Fraktionierung durch RP-HPLC

Eine weitere Auftrennung des Wurzel-AGPs konnte mit Hilfe der RP-HPLC erfolgen. Bei RP-HPLC-Säulen handelt es sich um Umkehrphasen-Säulen (reversed phase), deren Trennmittel durch Alkylierung von Normalphasen hergestellt wird, was der Säule mit zunehmender Kettenlänge des Alkylrestes einen hydrophoben Charakter verleiht. Für die Fraktionierung wurden 70 mg Baptisia-AGP in 4 ml 0,1 %iger TFA gelöst, nicht lösliches Material wurde abzentrifugiert. Das AGP konnte an RP-8-Material in zahlreiche Fraktionen aufgetrennt werden, von denen 12 aufgefangen und lyophilisiert wurden. Die Fraktionen 9-12 werden in Abb. 16 nicht dargestellt, da sie erst nach einer Retentionszeit von 30 bis 40 min von der Säule eluierten. Zusätzlich wurde die ungebundene Fraktion (UBF) aufgefangen. Die Fraktionen 1, 2 und 4 bildeten mit 30 % des Ausgangsmaterials die Hauptfraktionen.

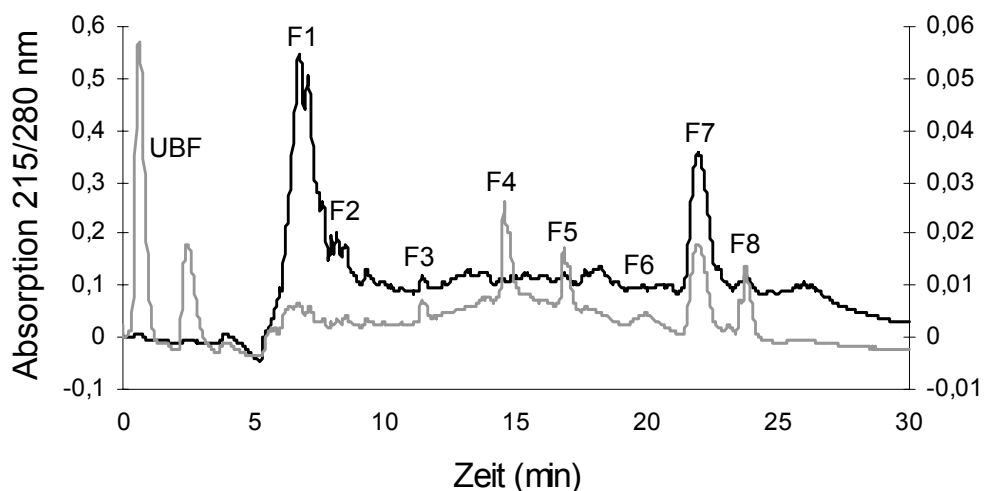


Abb. 16: Chromatogramm von Wurzel-AGP an Aquapore RP-300 (Puffer A: 0,1 % TFA; Puffer B: 80 % Acetonitril in 0,1 % TFA; Gradient: 0-100 % B in 40 min; Flussrate: 3 ml/min; Absorptionsmessung bei 215 nm (schwarz) und 280 nm (grau)).

Ein nachfolgender Geldiffusionstest gegen Yariv-Reagenz fiel positiv für die ersten 8 Fraktionen und die ungebundene Fraktion aus, während in den Fraktionen 9-12 keine AGPs mit diesem Test nachweisbar waren. Anschließende Versuche beschränkten sich daher auf die Yariv-positiven Fraktionen.

Die Neutralzuckerzusammensetzung der Fraktionen RP-HPLC-F1 und RP-HPLC-F2 wurde mit der Acetylierungsanalyse untersucht. Tab. 9 / Abb. 17 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung im Vergleich zum ursprünglichen AGP. In den erhaltenen Fraktionen war Mannose nicht mehr nachzuweisen. Während Rhamnose- und Glucose-Konzentrationen in beiden Fraktionen leicht abnahmen, kam es zu einem Anstieg von Arabinose in RP-HPLC-F2, so dass sich eine nahezu gleiche Konzentration von Arabinose und Galactose in dieser Fraktion ergab. RP-HPLC-F1 entsprach in der Neutralzuckerzusammensetzung dem ursprünglichen AGP.

Beide Fraktionen und zusätzlich Fraktion RP-HPLC-F4 wurden im Anschluss zur Charakterisierung N-terminaler Proteinsequenzen deglykosyliert und die Peptide durch Anwendung chromatographischer Verfahren aufgereinigt.

Tab. 9: Tabellarische Darstellung der Neutralzuckerzusammensetzung von Wurzel-AGP und den beiden nach RP-HPLC-Trennung an Aquapore RP-300 erhaltenen Fraktionen RP-HPLC-F1 und RP-HPLC-F2 nach GC-Analyse der Alditolacetate (Angaben in %(m/m)).

Neutralzucker	AGP	RP-HPLC-F1	RP-HPLC-F2
Rha	3,5	4,1	2,6
Ara	30,7	33,8	45,7
Man	1,1	-	-
Gal	58,7	59,6	49,7
Glc	5,9	2,5	2,0
Ara:Gal	1:1,9	1:1,8	1:1,1

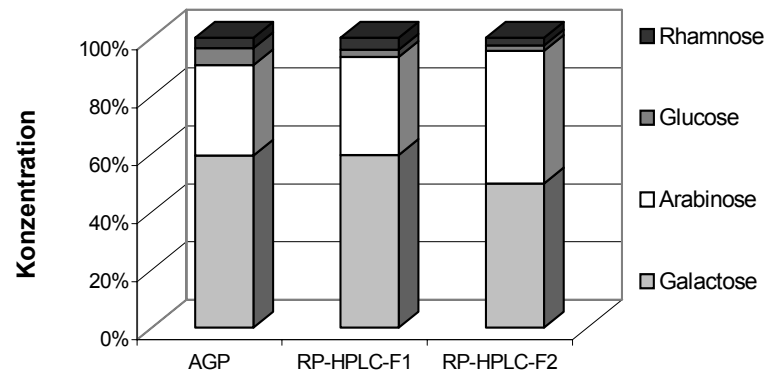


Abb. 17: Graphische Darstellung der Neutralzuckerzusammensetzung von Wurzel-AGP und den nach RP-HPLC-Trennung an Aquapore RP-300 erhaltenen Fraktionen RP-HPLC-F1 und RP-HPLC-F2 nach GC-Analyse der Alditolacetate.

I.4. Bestimmung von Uronsäuren

I.4.1. Gesamturonsäure-Gehalt

In der Literatur sind verschiedene Methoden zur quantitativen Uronsäure-Bestimmung beschrieben. Ohne größeren experimentellen Aufwand finden kolorimetrische Verfahren Anwendung. Nach der Methode von BROWN (1946) mit Orcinol können Neutralzucker miterfasst werden und die Ergebnisse verfälschen (BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN, 1973). DISCHE (1947) beschreibt eine weitere Methode der Uronsäure-Bestimmung unter Verwendung von Carbazol. Diese Methode wird jedoch ebenfalls durch die Anwesenheit von Hexosen gestört (BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN, 1973). Für die quantitative Bestimmung der Uronsäuren in Gegenwart von Neutralzuckern hat die Methode von BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN (1973) den Vorteil der Spezifität. Diese beruht auf der Bildung eines Chromogens, das beim Erhitzen von Uronsäure mit H_2SO_4 / Borax und anschließender Zugabe von meta-Hydroxydiphenyl entsteht. Nach dieser Methode kann allerdings nicht zwischen verschiedenen Uronsäuren differenziert werden.

Die Auswertung erfolgte über eine Kalibriergerade, die aus einer Standardmischung von D-Galacturonsäure und D-Glucuronsäure (1:1) erstellt worden war.

Für das AGP von *Baptisia tinctoria* Wurzelmaterial ergab sich nach photometrischer Messung ein Gesamt-Uronsäuregehalt von 6,8 %(m/m).

I.4.2. Differenzierte Uronsäurebestimmung

Zur Erfassung einzelner Uronsäuren wurden diese vor der gaschromatographischen Bestimmung in die entsprechenden Neutralzucker überführt. Die Methode von TAYLOR und CONRAD (1972) wurde unter Verwendung von Natriumborodeuterid durchgeführt, um die reduzierten Uronsäuren für eine massenspektroskopische Auswertung zu markieren.

In einem Arbeitsgang wurden die Neutralzucker gaschromatographisch vor Reduktion der Uronsäuren bestimmt; in einem weiteren erfolgte die gaschromatographische Bestimmung der Neutralzucker nach Reduktion der Uronsäuren zu den entsprechenden Neutralzuckern (Tab. 10). Durch Differenzbestimmung der Mengenverhältnisse beider Analysen ist der jeweilige Uronsäureanteil als Zunahme des entsprechenden Neutralzuckers zu ermitteln. Bei der verwendeten Probe ist die von vornherein hohe Glucose-Konzentration auffällig, die durch nicht ausreichende Dialyse und Entfernung des Yariv-Reagenzes begründet sein kann.

Tab. 10: Neutralzuckerzusammensetzung von AGP vor und AGP nach Reduktion der Uronsäuren (AGP-U) nach GC-Trennung der Alditolacetate (Angaben in %(m/m)).

Probe	Anteil an Neutralzuckern				
	Rha	Ara	Man	Gal	Glc
AGP	6,3	27,5	2,6	34,2	29,3
AGP-U	3,5	25,2	2,7	32,7	35,8

Insgesamt stiegen der Neutralzuckergehalt und die Glucosekonzentration, nachdem die Uronsäuren reduziert wurden, was auf das Vorkommen von Glucuronsäure hindeutet. Als Differenz ergab sich ein Anteil von 6,5 %(m/m) Glucuronsäure.

Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die Methylierungsanalyse. Hier wurde eine Probe untersucht, in der ohne vorherige Reduktion keine Glucose im TIC nachzuweisen war, nach der Uronsäurereduktion erschien ein Peak, der aufgrund des erhaltenen Massenspektrums und der Retentionszeit eindeutig als Glucuronsäure identifiziert werden konnte (Abb. 18). Es ergab sich nach dieser Analyse ein Anteil von 5,0 % (m/m) Glucuronsäure im Baptisia-AGP.

Die photometrische Bestimmung ergab den höchsten Uronsäure-Gehalt mit 6,8 % (m/m). Eine ähnliche Konzentration (6,5 % (m/m)) ließ sich nach der Acetylierung des reduzierten AGPs ermitteln. Die geringste Konzentration von 5,0 % (m/m) wurde nach der Methylierungsanalyse ermittelt. Die mit den drei Methoden ermittelten Werte stimmten gut überein. Insgesamt ergab sich aus allen drei Analysen ein Durchschnittswert von 6,1 % (m/m) Uronsäuren im AGP. Der Methylierungsanalyse zufolge handelte es sich ausschließlich um Glucuronsäure.

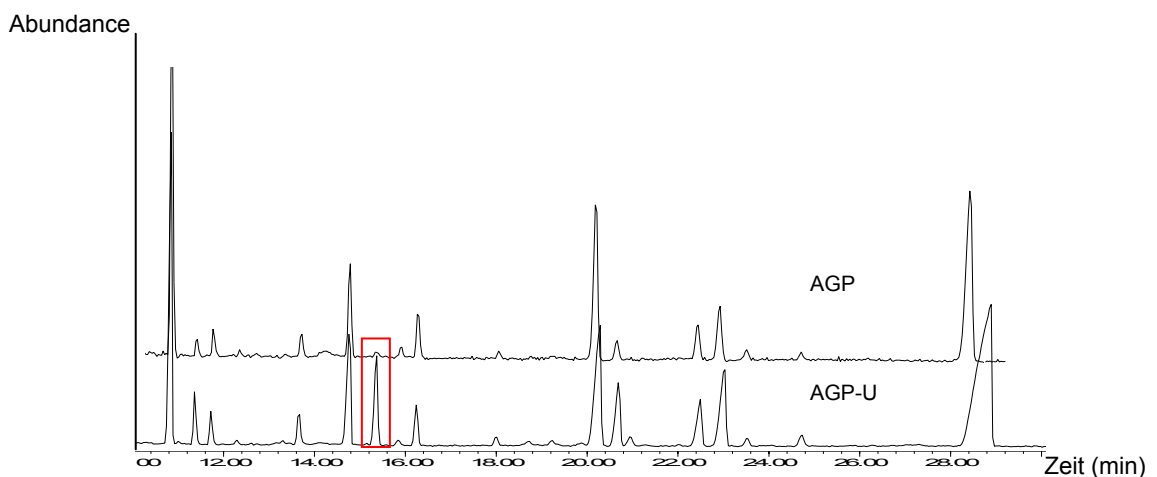


Abb. 18: TIC von Wurzel-AGP vor (AGP) und nach Uronsäure-Reduktion (AGP-U) mit NaBD_4 ; das Kästchen markiert Glucuronsäure nach der Reduktion zum korrespondierenden Neutralzucker.

Die Werte in Tab. 11 zeigen, dass nach milder saurer Hydrolyse mit Oxalsäure hauptsächlich Arabinose abgespalten wurde. Der Galactose-Anteil in der EtOH-unlöslichen Fraktion erhöhte sich dadurch stark, wie auch die Mannosekonzentration. Eine Acetylierung des Überstandes des Hydrolysats, der die abgespaltenen Zucker enthielt, zeigte ohne TFA-Hydrolyse vor der Acetylierung ausschließlich Arabinose-Monomere. Mit TFA-Hydrolyse wurde auch Galactose detektiert, so dass bei der Oxalsäure-Hydrolyse nicht nur Monomere, sondern auch Gal-/Ara-haltige Oligomere abgespalten wurden, über deren genaue Größe sich allerdings nichts sagen lässt.

Tab. 11: Neutralzuckerzusammensetzung von AGP, AGP nach Oxalsäure-Hydrolyse (AGP-O) und des bei der Hydrolyse entstandenen Überstandes ohne (AGP-O-Ü - TFA) und mit TFA-Hydrolyse (AGP-O-Ü + TFA) (Angaben in %(m/m)).

Probe	Rha	Ara	Man	Gal	Glc
AGP	3,5	30,7	1,1	58,7	5,9
AGP-O	1,7	6,6	7,1	81,1	3,5
AGP-O-Ü - TFA	-	100,0	-	-	-
AGP-O-Ü + TFA	-	84,8	-	15,2	-

I.6. Geldiffusionstest von AGPs und partiellen Abbauprodukten

Von AGP sowie AGP-U und AGP-O wurden Lösungen in einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Im Geldiffusionstest gegen Yariv-Reagenz zeigten sich Präzipitationsbanden bei AGP und AGP-U, jedoch nicht oder nur ganz schwach bei AGP-O (Abb. 20). Bei AGP-O wurden durch die Hydrolyse nahezu alle endständige Arabinosereste abgespalten, wodurch die Konzentration endständiger Galactosen zunahm. Da im Geldiffusionstest die Reaktion mit dem Yariv-Reagenz ausblieb, schienen die endständigen Arabinosen im AGP wesentlich an der Reaktion mit dem Reagenz beteiligt zu sein.

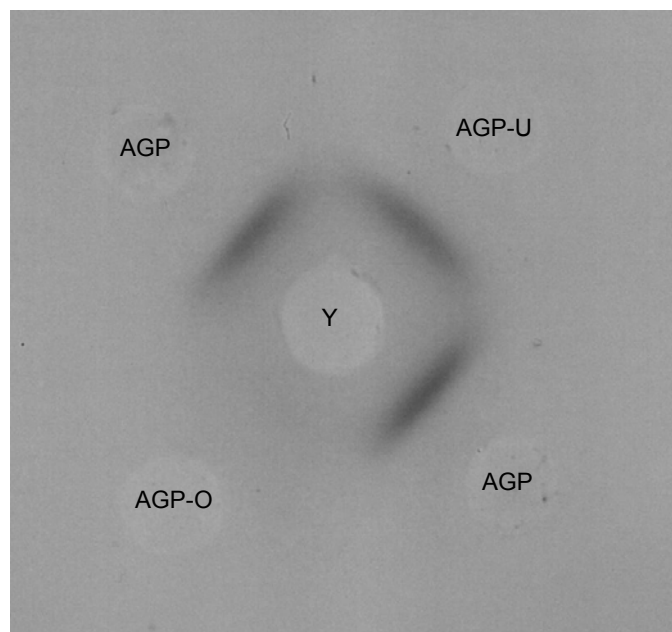


Abb. 20: Geldiffusionstest des Wurzel-AGPs und des AGPs nach Oxalsäure-Hydrolyse (AGP-O) bzw. Reduktion der Uronsäuren (AGP-U) gegen Yariv-Reagenz (Y = 1 µg/ml); Konz. Probelösungen: 1 mg/ml.

I.7. Bestimmung der Bindungstypen im Kohlenhydratanteil

Ein wesentlicher Schritt bei der Aufklärung der Struktur von Polysacchariden ist die Ermittlung der C-Atome, über die mit benachbarten Monosacchariden O-glykosidische Bindungen bestehen. Dieser Einblick ist durch die Methylierungsanalyse zu ermitteln, bei der alle freien OH-Gruppen des Polysaccharids in Methylether überführt werden. Nach Hydrolyse kennzeichnen die freien OH-Gruppen der partiell methylierten Monosaccharide die Verknüpfungsstellen im genuinen Polysaccharid. Bei anschließender Acetylierung entstehen partiell methylierte Alditolacetate (PMAAs), die gaschromatographisch getrennt und durch Kombination mit der Massenspektrometrie identifiziert werden können. Durch die im Gaschromatogramm erhaltenen Flächen ist eine quantitative Auswertung möglich.

AGP aus RetD, die bei der GPC erhaltene Fraktion 2 (AGP-F2), AGP nach Reduktion der Uronsäuren (AGP-U), AGP nach Oxalsäure-Hydrolyse (AGP-O) und AGP nach Oxalsäure-Hydrolyse mit anschließender Uronsäure-Reduktion (AGP-OU) wurden methyliert, hydrolysiert und nach Acetylierung die gaschromatographisch getrennten PMAAs massenspektrometrisch untersucht.

Abb. 21 zeigt die Chromatogramme (TIC) der PMAAs des Wurzel-AGPs, der GPC-Fraktion und der partiellen Abbauprodukte des AGPs. Die sich daraus ergebenden Zuckerverknüpfungen und die Konzentrationen für die molaren Anteile der einzelnen PMAAs, berechnet über die entsprechenden FID-Chromatogramme unter Einbeziehung von Responsefaktoren (SWEET et al., 1975), sind in Tab. 12 bis 16 dargestellt.

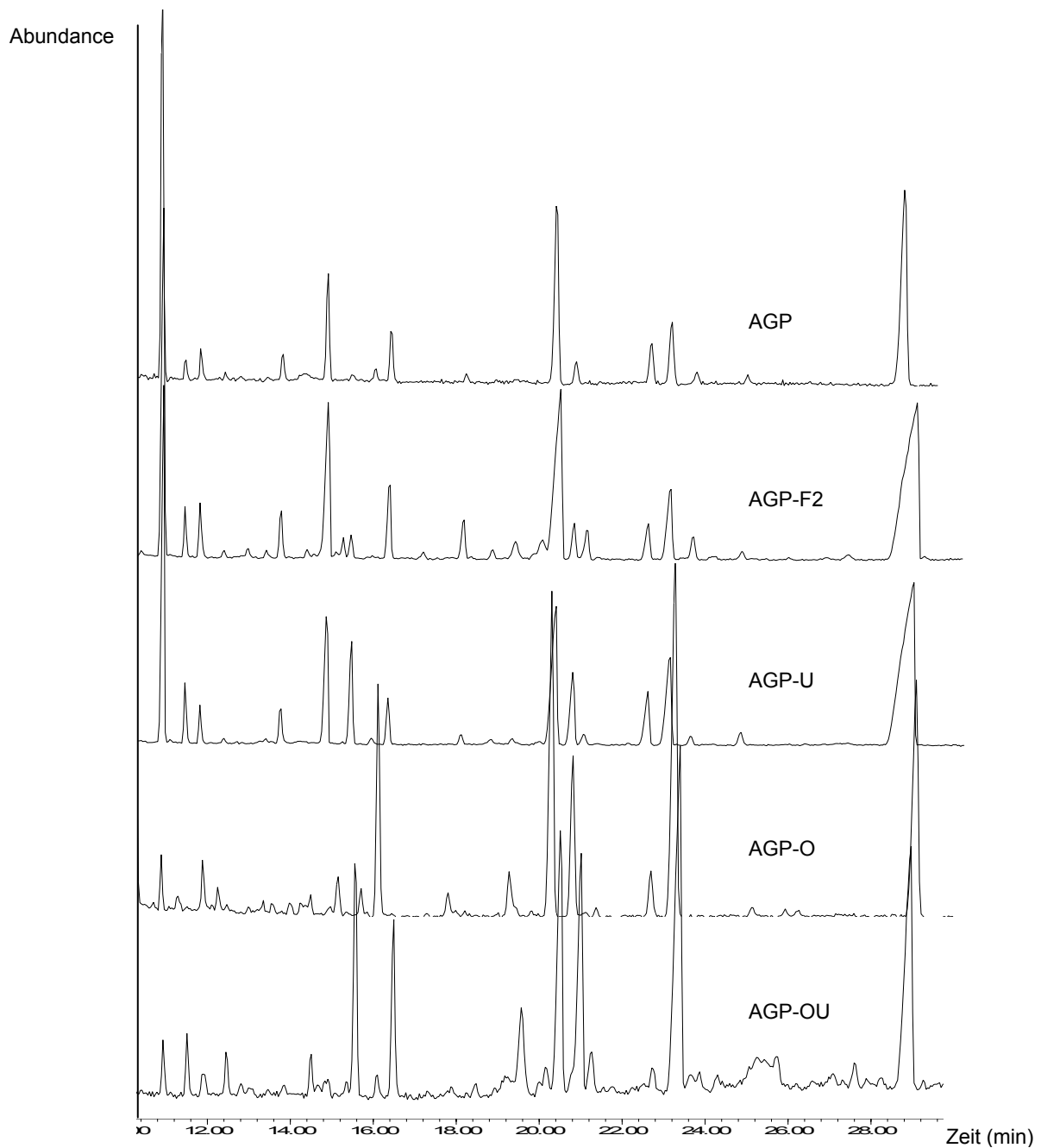


Abb. 21: Darstellung der TICs von Wurzel-AGP, GPC-F2, AGP-U, AGP-O und AGP-OU nach Derivatisierung der Neutralzucker zu PMAAs und GC-Trennung.

Tab. 12: Bindungstyp-Analyse des AGPs aus *Baptisia tinctoria* Wurzel.

Monosaccharid und Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil (mol%)
1-Arabinose(f)	11,0	33,2
1-Arabinose(p)	11,9	1,9
1-Rhamnose(f)	11,6	1,7
1,3-Arabinose(f)	13,9	1,7
1,5-Arabinose(f)	15,1	9,4
1-Galactose(p)	16,6	3,6
1,3-Galactose(p)	20,6	16,7
1,4-Galactose(p)	21,1	1,8
1,6-Galactose(p)	23,5	5,8
1,3,6-Galactose(p)	29,2	24,2
Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungspunkten = 1:0,6		

Tab. 13: Bindungstyp-Analyse des AGPs aus *Baptisia tinctoria* Wurzel nach GPC und Isolierung der niedermolekularen Fraktion (GPC-F2).

Monosaccharid und Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil (mol%)
1-Arabinose(f)	10,9	27,5
1-Arabinose(p)	11,7	2,3
1-Rhamnose(f)	11,4	1,9
1,3-Arabinose(f)	13,7	2,3
1,5-Arabinose(f)	14,8	12,5
1-Galactose(p)	16,3	3,9
1-Glucose(p)	15,4	0,9
1,3-Galactose(p)	20,4	17,1
1,4-Galactose(p)	20,7	1,5
1,6-Galactose(p)	23,0	4,5
1,3,6-Galactose(p)	28,9	25,6
Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungspunkten = 1:0,7		

Tab. 14: Bindungstyp-Analyse des AGPs aus *Baptisia tinctoria* Wurzel nach Reduktion der Uronsäuren mit NaBD₄.

Monosaccharid und Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil (mol%)
1-Arabinose(f)	11,1	22,0
1-Arabinose(p)	11,6	1,7
1-Rhamnose(f)	11,9	2,3
1,3-Arabinose(f)	13,9	1,6
1,5-Arabinose(f)	15,1	8,7
1-Galactose(p)	16,6	2,2
1-Glucose(p)	15,7	1,0
1-Glucuronsäure(p)	15,7	4,0
1,3-Galactose(p)	20,7	11,5
1,4-Galactose(p)	21,2	4,7
1,6-Galactose(p)	23,6	7,6
1,3,6-Galactose(p)	29,5	32,7
Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungspunkten = 1:0,99		

Tab. 15: Bindungstyp-Analyse des AGPs aus *Baptisia tinctoria* Wurzel nach milder saurer Hydrolyse mit 12,5 mmol Oxalsäure.

Monosaccharid und Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil (mol%)
1-Arabinose(f)	11,0	8,5
1-Arabinose(p)	12,6	0,6
1-Rhamnose(f)	11,5	1,5
1,3-Arabinose(f)	13,9	0,2
1,5-Arabinose(f)	15,1	2,2
1-Galactose(p)	16,6	11,7
1-Glucose(p)	15,7	1,5
1,3-Galactose(p)	20,7	19,4
1,4-Galactose(p)	21,2	9,6
1,6-Galactose(p)	23,5	27,4
1,3,6-Galactose(p)	29,1	17,4
Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungspunkten = 1:0,73		

Um eine genauere Aussage über die Position der Uronsäuren machen zu können, wurde eine Uronsäure-Reduktion erst im Anschluss an die Oxalsäure-Hydrolyse durchgeführt. Befinden sich die Uronsäuren an Arabinose-Resten, würden sie vermutlich als Di- oder Oligosaccharide bei der milden Hydrolyse abgespalten werden und in der Ethanol-Fällung nicht nachweisbar sein. Im Falle einer Verknüpfung mit Galactose-Einheiten hingegen würden sie nicht abgespalten werden und in der Ethanol-Fällung nachweisbar sein.

Tab. 16: Bindungstyp-Analyse des AGPs aus *Baptisia tinctoria* Wurzel nach milder saurer Hydrolyse mit 12,5 mmol Oxalsäure und anschließender Reduktion der Uronsäuren mit NaBD₄.

Monosaccharid und Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil (mol%)
1-Arabinose(f)	11,0	2,0
1-Rhamnose(f)	11,5	2,2
1-Galactose(p)	16,5	6,8
1-Glucose(p)	15,6	0,5
1-Glucuronsäure(p)	15,6	11,4
1,3-Galactose(p)	20,5	16,6
1,4-Galactose(p)	21,0	11,1
1,6-Galactose(p)	23,4	29,5
1,3,6-Galactose(p)	29,0	19,9
Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungspunkten = 1:0,87		

Aus Tab. 12 bis 16 ergeben sich gerundet die in Tab. 17 und Abb. 22 wiedergegebenen molekularen Verhältniszahlen für die häufigsten Bausteine des AGPs bzw. bearbeiteter Fraktionen und Derivate.

Tab. 17: Tabellarische Gegenüberstellung der molekularen Verhältnisse einzelner PMAAs in AGP, in AGP-F2 und partiellen AGP-Abbauprodukten.

Monosaccharid und Bindungstyp	AGP	AGP-F2	AGP-U	AGP-O	AGP-OU
1-Arabinose(f)	33	27-28	22	8-9	2
1-Arabinose(p)	2	2	2	1	-
1-Rhamnose(f)	2	2	2	1-2	2
1,3-Arabinose(f)	2	2	2	0	-
1,5-Arabinose(f)	10	12-13	9	2	-
1-Galactose(p)	3-4	3	2	12	7
1-Glucose(p)	0-1	1	1	1-2	1
1-Glucuronsäure(p)	-	-	4	-	11
1,3-Galactose(p)	17	17	11-12	19	17
1,4-Galactose(p)	2	1-2	5	9-10	11
1,6-Galactose(p)	6	4-5	8	27	29-30
1,3,6-Galactose(p)	24	25-26	33	17	20

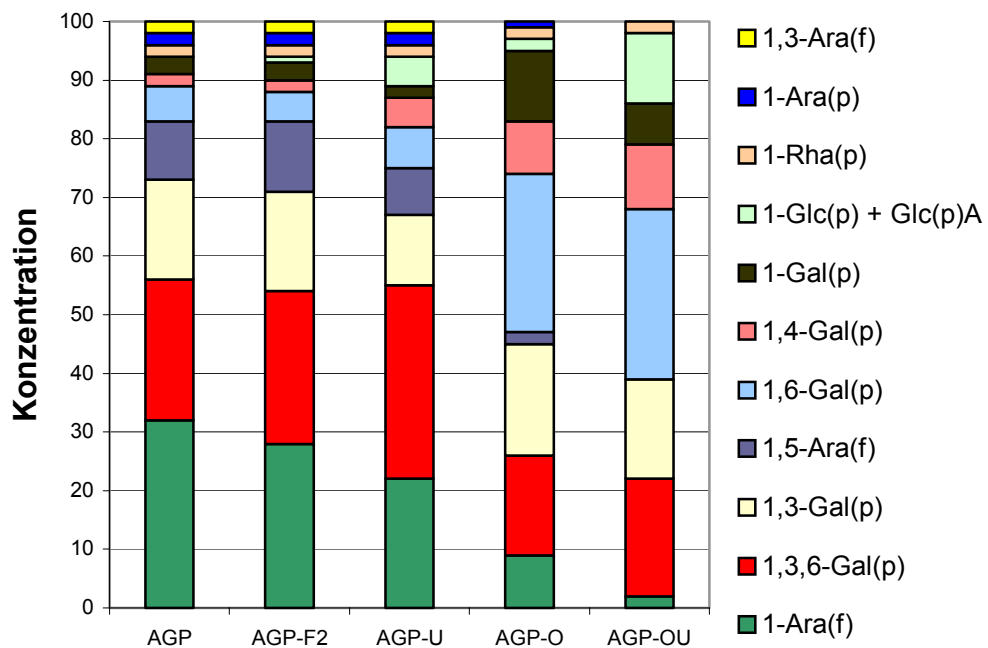


Abb. 22: Graphische Gegenüberstellung der molekularen Verhältnisse einzelner PMAAs in AGP, in AGP-F2 und partiellen AGP-Abbauprodukten.

Für eine Ermittlung der Verknüpfungsstellen wurden zusätzlich die molaren Änderungen der Galactose-Monomere betrachtet (Tab. 18). Ausgehend von AGP befanden sich in AGP-O 5,9 % mehr terminale Galactosen, 7,7 % mehr 1,4-Galactosen und 21,2 % mehr 1,6-Galactosen, während 1,3,6-Galactosen um 23,5 % und 1,3-Galactosen um 11,3 % abnahmen. Die abgespaltenen Arabinose-Mono- und Oligomere befanden sich vermutlich hauptsächlich an Position 3 der 1,3,6-Galactose-Verknüpfungspunkte und 1,3-Galactose-Einheiten, weniger an Position 6 und 1,6-Galactosen.

Tab. 18: Anteile (mol%) einzelner Galactose-Bausteine an der Gesamt-Galactose in AGP, AGP-U und AGP-O.

Neutralsucker	AGP	AGP-U	Differenz	AGP-O	Differenz
1-Gal	7,7	3,7	- 4,0	13,6	+ 5,9
1,3-Gal	34,0	19,6	- 14,4	22,7	- 11,3
1,4-Gal	3,5	8,1	+ 4,6	11,2	+ 7,7
1,6-Gal	10,9	12,9	+ 2,0	32,1	+ 21,2
1,3,6-Gal	43,8	55,8	+ 12,0	20,3	- 23,5

Die Untersuchungen des AGPs und der partiellen Abbauprodukte lassen bezüglich der Verknüpfung einzelner PMAAs folgende Aussagen zu:

1. Hauptmonosaccharide des Wurzel-AGPs sind Galactose und Arabinose. Daneben kommen geringe Mengen Rhamnose, Glucose und Glucuronsäure vor.
2. Das Polysaccharid-Gerüst besteht aus 1,3-Galactose(p)-Einheiten mit Verzweigungspunkten an Position 6. In den Seitenketten überwiegt 1,5-Arabinose(f) neben 1,3-Arabinose(f), 1,6-Galactose(p) und 1,4-Galactose(p). Endständig kommen Arabinose-Reste überwiegend in furanosider, in geringen Mengen aber auch in pyranosider Form neben Rhamnose(p)-, Galactose(p)-, Glucose(p)- und Glucuronsäure(p)-Resten vor.
3. Ein molarer Anteil von 30 % 1,3,6-Galactose(p) lässt auf einen hohen Verzweigungsgrad schließen.

4. Nach Oxalsäure-Hydrolyse fehlen terminale und kettenbildende Arabinosen fast vollständig. Verzweigungspunkte und 1,3-Galactose-Einheiten reduzieren sich durch Abspaltung von Resten an Position 3, so dass die Menge an kettenbildenden 1,6-Galactose-Einheiten und terminalen Galactosen ansteigt. Rhamnose- und Glucose-Menge bleiben unverändert.
5. Nach Uronsäure-Reduktion tritt ein Glucose-Peak im Spektrum auf. Das MS-Spektrum zeigt eindeutig Deuterierungen, so dass es sich ursprünglich um Glucuronsäure gehandelt haben muss. Gleichzeitig steigen in diesem Chromatogramm die Mengen an 1,4-Galactose und 1,3,6-Galactose, so dass eine Verknüpfung der Uronsäuren mit diesen Zuckereinheiten wahrscheinlich ist.
6. Nach Oxalsäure-Hydrolyse und anschließender Uronsäure-Reduktion lässt sich erkennen, dass Glucuronsäure nicht abgespalten wurde und dementsprechend nicht an Arabinose- sondern an Galactose-Einheiten geknüpft sein muss.

Ungewöhnlich für die Methylierungsanalysen waren die erheblich größeren Mengen endständiger PMAAs gegenüber Verzweigungspunkten, denn aufgrund der größeren Flüchtigkeit stärker methylierter Zucker kommt es normalerweise zu einem Überschuss an Verzweigungspunkten.

1.8. NMR-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie liefert wichtige Hinweise bei der Strukturaufklärung von niedermolekularen Polysacchariden, Homopolysacchariden und regelmäßig aufgebauten Heteropolysacchariden mit „repeating units“. Bei komplexen Polysacchariden sind aufgrund der großen Anzahl von Signalen eindeutige Zuordnungen meist nur im Bereich der anomeren C-Atome möglich. Diese weisen eine kleinere Elektronendichte auf als die meisten ^{13}C -Kerne des Moleküls und werden zum tieferen Feld verschoben. In erster Linie liefert das NMR-Spektrum Informationen zur Konfiguration der glykosidischen Bindungsatome (α , β), über die Bindungstypen der Zuckerbausteine sowie über die Anwesenheit etwaiger Substituenten. Die Qualität der aufgenommenen Spektren wurde bei den Proben durch eine nicht vollständige

Löslichkeit erforderlicher Mengen AGP im Lösungsmittel beeinträchtigt, so dass Spektren mit hohem Grundrauschen resultierten (Abb. 23). Zum Teil war eine eindeutige Zuordnung der Signale zu bestimmten C-Atomen nicht möglich. Eine quantitative Auswertung über die Spektren wurde nicht vorgenommen.

I.8.1. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Tab. 19 gibt einen Überblick über die im ^{13}C -NMR Spektrum von Wurzel-AGP (Abb. 23) auftretenden Signale und eine mögliche Zuordnung zu C-Atomen des Makromoleküls.

Tab. 19: Chemische Verschiebungen im ^{13}C -NMR-Spektrum und deren mögliche Zuordnung zu C-Atomen einzelner Bausteine des Wurzel-AGPs.

δ (ppm)	C-Atom	Zuckerkomponente
108,767	C ₁	α -L-Ara(f)
106,951	C ₁	1,5- α -L-Ara(f), 1,3- α -L-Ara(f)
102,735	C ₁	1,3- β -D-Gal(p), 1,6- β -D-Gal(p), 1,3,6- β -D-Gal(p)
\approx 100,3	C ₁	α -L-Rha(p)
83,414	C ₄	α -L-Ara(f)
81,831	C ₄	1,3- α -L-Ara(f), 1,5- α -L-Ara(f)
od.	C ₃	1,3- α -L-Ara(f)
80,857	C ₂	α -L-Ara(f)
od.	C ₃	1,3- β -D-Gal(p), 1,3,6- β -D-Gal(p)
80,419	C ₂	1,5- α -L-Ara(f)
76,062	C ₃	α -L-Ara(f), 1,5- α -L-Ara(f)
\approx 74,3	C ₅	1,3- β -D-Gal(p)
72,899	C ₅	1,6- β -D-Gal(p), 1,3,6- β -D-Gal(p)
72,282	C ₃	1,6- β -D-Gal(p)
70,235	C ₂	1,6- β -D-Gal(p)
\approx 69,7	C ₂	1,3- β -D-Gal(p)
69,396	C ₂	1,3,6- β -D-Gal(p)
\approx 68,6	C ₆	1,6- β -D-Gal(p), 1,3,6- β -D-Gal(p)
67,978	C ₄	1,3- β -D-Gal(p), 1,6- β -D-Gal(p), 1,3,6- β -D-Gal(p)
\approx 66,2	C ₅	1,5- α -L-Ara(f)
60,753	C ₅	α -L-Ara(f), 1,3- α -L-Ara(f)
\approx 60,6	C ₆	β -D-Gal(p), 1,3- β -D-Gal(p)
\approx 16	C ₆	α -L-Rha(p)

Die zum tiefen Feld verschobenen Signale bei 108,77 ppm und 106,95 ppm entsprechen furanosider α -Arabinose, die in der Kette gebunden oder endständig vorliegt. Ein breites Signal bei 102,74 ppm kann pyranosider β -Galactose zugeordnet werden. Es erscheint kein Signal für die Carboxylgruppe der Glucuronsäure bei 175-180 ppm. Verknüpfungen von C-Atomen der β -Galactopyranose in Position 3 und 6 sind an einer Verschiebung der Signale nicht verknüpfter Hydroxygruppen um 8-10 ppm ins tiefe Feld bei 68,6 bzw. 79,7 ppm zu erkennen. Ebenfalls lassen sich bei α -Arabinofuranose Verknüpfungen durch Verschiebung der Signale um 4-5 ppm bei 80,8 und 66 ppm erkennen, die auf eine Glykosidierung der Hydroxygruppen an C3 und C5 schließen lassen. Die Resonanz einer Methylgruppe zeigt sich schwach bei 17 ppm. Aufgrund der in der Methylierungsanalyse ermittelten Zusammensetzung des AGPs lässt sie sich eindeutig dem C6 des geringen Anteils an Rhamnopyranose zuordnen.

Eine Oxalsäure-Hydrolyse wurde nach Vorschrift zur Gewinnung von Ausgangsmaterial für die Aufnahme eines weiteren ^{13}C -NMR-Spektrums durchgeführt. Da überwiegend terminale Arabinose-Einheiten durch die Hydrolyse entfernt wurden, sind in diesem Spektrum die Resonanzen der Galactose-Bausteine und ihre Verknüpfungen besser zu erkennen (Abb. 23). Tab. 20 gibt die chemischen Verschiebungen einzelner C-Atome der Bausteine wieder.

Dieses Spektrum eignet sich zudem für eine bessere Zuordnung der Signale im Spektrum ohne Hydrolyse zu den C-Atomen der Arabinose-Bausteine, da diese Signale nach der Hydrolyse nicht mehr auftreten. Die Vermutung, dass das Signal für die Carboxyl-Gruppe bei 175-180 ppm in diesem Spektrum erscheinen müsste, bestätigt sich nicht, obwohl die Methylierungsanalyse zeigt, dass Glucuronsäure bei der Oxalsäure-Hydrolyse nicht abgespalten wurde.

Tab. 20: Chemische Verschiebungen im ^{13}C -NMR-Spektrum und deren Zuordnung zu C-Atomen der einzelnen Bausteine des Wurzel-AGPs nach Oxalsäure-Hydrolyse.

δ (ppm)	C-Atom	Zuckerkomponente
103,196	C ₁	1,3- β -D-Gal(p), 1,6- β -D-Gal(p)
102,908	C ₁	1,3,6- β -D-Gal(p)
81,133	C ₃	1,3- β -D-Gal(p), 1,3,6- β -D-Gal(p)
74,856	C ₅	1,3- β -D-Gal(p)
73,189	C ₅	1,6- β -D-Gal(p), 1,3,6- β -D-Gal(p)
72,288	C ₃	1,6- β -D-Gal(p)
70,892	C ₂	1,3- β -D-Gal(p), 1,6- β -D-Gal(p), 1,3,6- β -D-Gal(p)
68,983	C ₆	1,6- β -D-Gal(p), 1,3,6- β -D-Gal(p)
68,151	C ₄	1,3- β -D-Gal(p), 1,6- β -D-Gal(p), 1,3,6- β -D-Gal(p)
60,554	C ₆	β -D-Gal(p), 1,3- β -D-Gal(p)

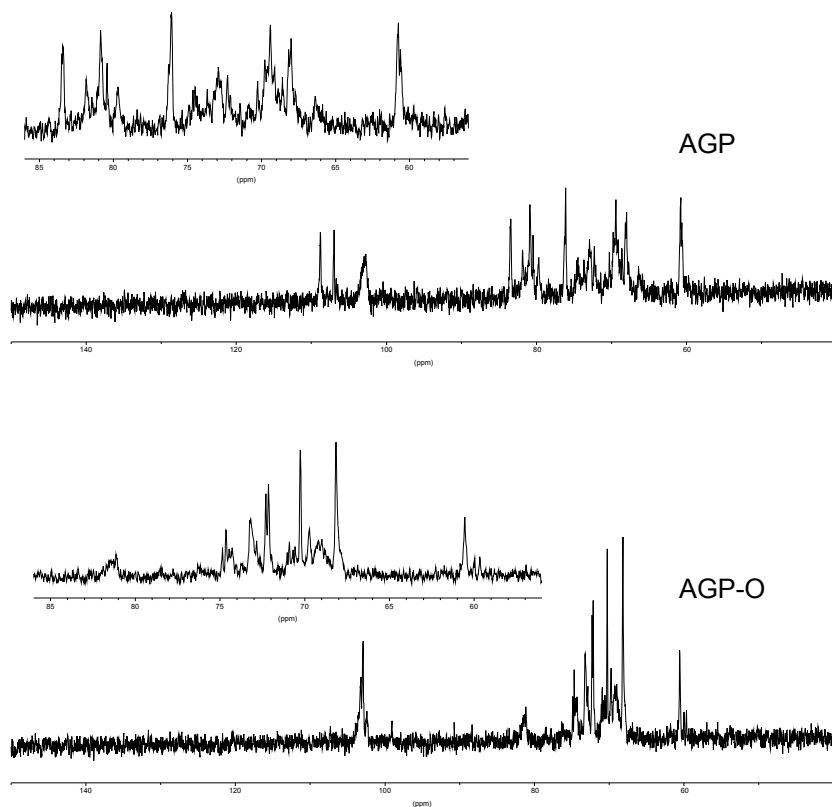


Abb. 23: ^{13}C -NMR-Spektren vom Wurzel-AGP und dem AGP nach Oxalsäure-Hydrolyse (AGP-O).

I.8.2. $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie

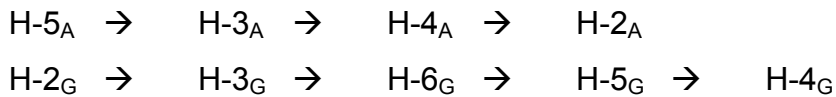
Die Protonenkernresonanzspektren waren aufgrund der breiten und ungegliederten Signale nur beschränkt auswertbar. Eine mögliche Zuordnung der Signale zu H-Atomen des AGPs gibt Tab. 21 wieder.

Tab. 21: Chemische Verschiebungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum und deren Zuordnung zu H-Atomen der einzelnen Bausteine des Wurzel-AGPs.

δ (ppm)	H-Atom	Zuckerkomponente
5,25	H ₁	α -L-Ara(f)
5,12	H ₁	α -L-Ara(f)
5,01	H ₁	β -D-GlcA(p)
4,4-4,5	H ₁	β -D-Gal(p)
3,7-4,2	H ₂₋₅	α -L-Ara(f)
3,9-4,1	H ₄₋₆	β -D-Gal(p)
3,53	H ₂	β -D-Gal(p)

Die Signale der Galactose-Moleküle werden im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des AGPs (Abb. 24) möglicherweise von den Arabinose-Signalen verdeckt, da die Arabinose-Einheiten an der Peripherie des Moleküls eher erfasst werden. Die Signale bei 5,1 und 5,3 ppm können hier dem H1 der α -L-Arabinofuranose zugeordnet werden. Ein schwaches, breites Signal bei 5 ppm könnte für das H-Atom der Carboxylgruppe der Glucuronsäure sprechen. Die Signale für das H1 der β -D-Galactopyranose sind in diesem Spektrum sehr schwach, treten aber im Spektrum nach Oxalsäure-Hydrolyse des AGPs verstärkt auf (Abb. 24). In diesem Spektrum sind die Signale für H1 der Arabinosen nur noch sehr schwach vertreten. Tab. 22 zeigt eine mögliche Zuordnung der Signale zu H-Atomen des AGPs nach Oxalsäurehydrolyse.

Eine eindeutige Zuordnung der Signale im Bereich von 3,5-4,2 ppm zu H-Atomen von Arabinose oder Galactose ist nur schwer möglich. Eine Reihenfolge der chemischen Verschiebungen der H-Atome vom hohen zum niedrigen Feld sieht folgendermaßen aus:



Tab. 22: Chemische Verschiebungen im ^1H -NMR-Spektrum und deren Zuordnung zu H-Atomen der einzelnen Bausteine des Wurzel-AGPs nach Oxalsäure-Hydrolyse.

δ (ppm)	H-Atom	Zuckerkomponente
4,4-4,6	H ₁	β -D-Gal(p)
3,9-4,1	H ₄₋₆	β -D-Gal(p)
3,64-3,66	H ₃	β -D-Gal(p)
3,54-3,57	H ₂	β -D-Gal(p)

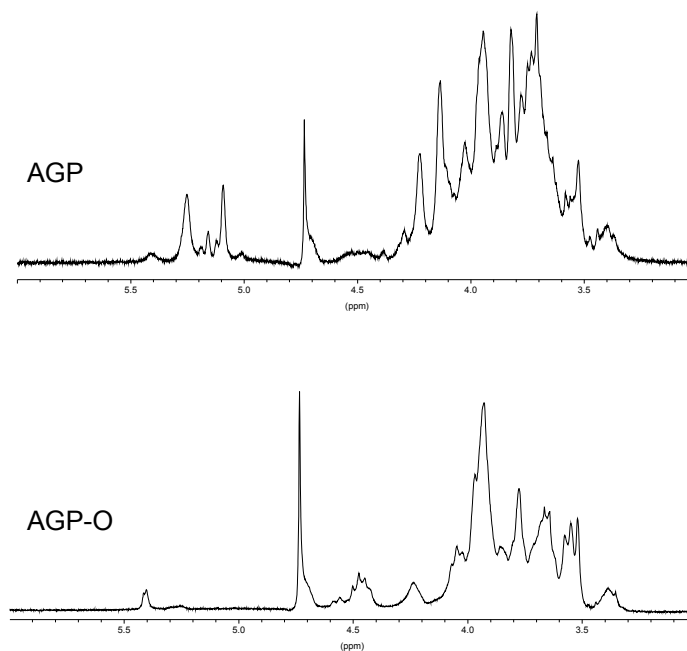


Abb. 24: ^1H -NMR-Spektren vom Baptisia-AGP und dem AGP nach Oxalsäure-Hydrolyse (AGP-O).

I.9. Proteinbestimmungen

I.9.1. Hydroxyprolin-Gehalt

Da ein hoher Hydroxyprolin-Gehalt ein charakteristisches Merkmal von AGPs ist, wurde er hier separat von allen anderen Aminosäuren mit einer photometrischen Methode bestimmt. Hydroxyprolin lässt sich mit einem Oxidationsreagenz und anschließend mit einem Farbreagenz zu einem gefärbten Produkt umsetzen. Für die Bestimmung wurde das ursprüngliche AGP sowie die Fraktionen AGP-F1 und AGP-F2 verwendet. Die Bestimmung von Hydroxyprolin in den beiden GPC-Fraktionen galt in erster Linie nicht der Gehaltsbestimmung, sondern dem Nachweis in diesen Fraktionen und damit von Protein. Für das ursprüngliche AGP ergab sich ein Hydroxyprolin-Gehalt von 1,21 %. In den GPC-Fraktionen AGP-F1 und AGP-F2 konnte Hydroxyprolin zumindest qualitativ nachgewiesen werden.

I.9.2. Qualitative Aminosäure-Bestimmung (GC)

Mit Hilfe des EZ:faast[®]-Aminosäureanalyse-Kits wurden die im AGP-Hydrolysat vorhandenen Aminosäuren derivatisiert. Die qualitative Erfassung erfolgte mit Hilfe der GC. Eine Quantifizierung der Aminosäuren mit dieser Methode war nicht möglich, da eine Kalibrierung über eine im Kit enthaltene Aminosäure-Standardlösung nicht zu verwertbaren Ergebnissen führte und auch das Arbeiten über einen internen Standard keine reproduzierbaren Ergebnisse zuließ.

Abb. 25 (a) und (b) zeigen die Chromatogramme der im Kit enthaltenen Aminosäure-Standardlösung und des AGPs.

Qualitativ ließen sich mit dieser Methode folgende Aminosäuren nachweisen:

1 Ala	2 Gly	3 Val	4 Leu	5 Ile	6 Thr
7 Ser	8 Pro	9 Asp	10 Met	11 Hyp	12 Glu
13 Phe	14 Lys	15 His	16 Tyr		

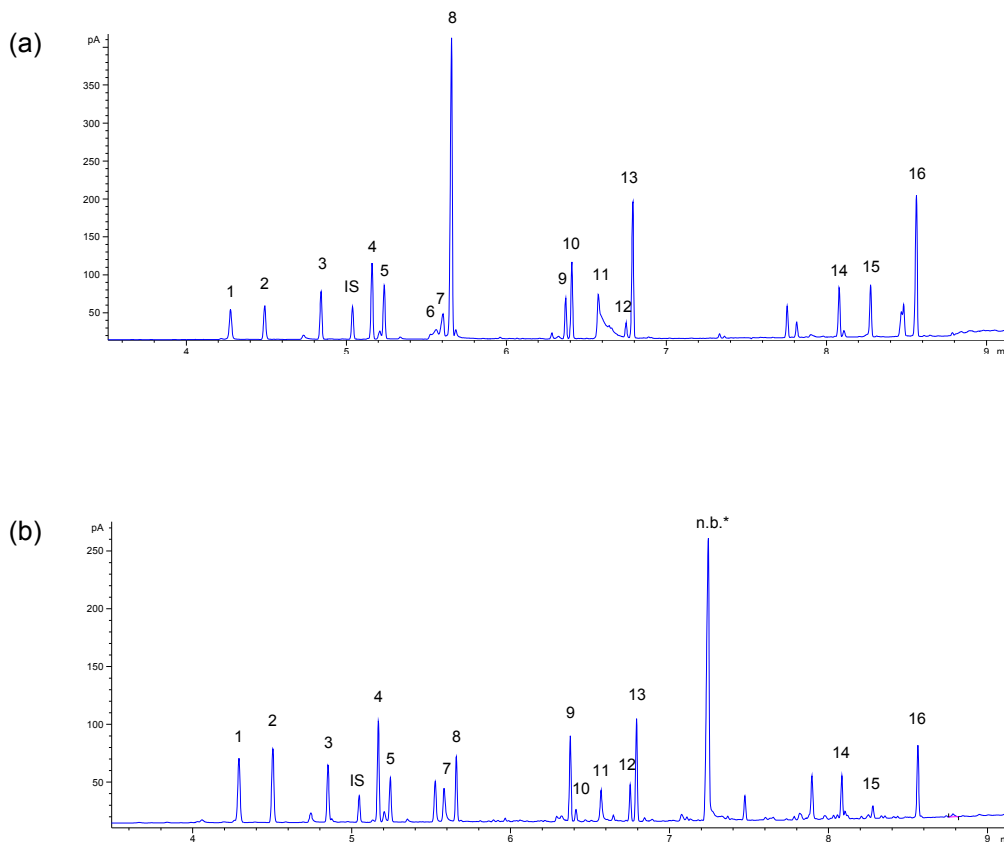


Abb. 25: (a) Gaschromatogramm des derivatisierten AS-Standards (200 µl Standard + 100 µl interner Standard Norvalin (IS)); (b) Gaschromatogramm der derivatisierten Aminosäuren aus Wurzel-AGP (100 µl AGP-Hydrolysat + 100 µl interner Standard Norvalin (IS)).

*n.b. nicht bestimmt

Der im Chromatogramm des AGPs auftretende Peak bei einer Retentionszeit von 7,27 min konnte keiner Aminosäure zugeordnet werden.

I.9.3. Quantitative Aminosäure-Bestimmung (HPLC)

Eine quantitative Bestimmung der Aminosäuren erfolgte im AGP-Hydrolysat mit Hilfe der HPLC. Die Aminosäuren wurden einer Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin unterzogen und anhand einer Kalibrierkurve photometrisch vermessen. Alle Aminosäuren, bis auf Prolin und Hydroxyprolin, konnten bei 560 nm vermessen werden. Prolin und Hydroxyprolin zeigten hier keine Absorption, konnten aber bei 440 nm vermessen werden. Tab. 23 liefert die Massenanteile wie auch prozentualen Anteile der einzelnen Aminosäuren bezogen auf die eingewogene AGP-Masse. Asparaginsäure, Glutaminsäure und Valin waren die Hauptaminosäuren mit einem Gehalt von jeweils ca. 10 %, gefolgt von Serin, Threonin und Alanin mit jeweils ca. 7 %. Hydroxyprolin, als charakteristische Aminosäure von AGPs, und Prolin kamen jeweils mit einem Gehalt von 5 bzw. 4 % vor.

Tab. 23: Quantitative Zusammensetzung des Proteinanteils des Wurzel-AGPs nach HPLC-Trennung, Derivatisierung der Aminosäuren mit Ninhydrin und anschließender photometrischer Messung.

Aminosäure	%(m/m)
CysA	0,6
Asp	10,4
Thr	7,2
Ser	7,8
Glu	10,5
Gly	6,0
Ala	6,9
Cys	-
Val	10,3
Met	0,8
Ile	3,8
Leu	6,3
Tyr	2,5
Phe	5,0
His	3,6
Hyllys	-
Lys	5,0
Arg	4,2
Hyp	5,1
Pro	4,0

I.9.4. N-terminale Sequenzierung von AGP-Peptiden

Nach Deglykosylierung des Wurzel-AGPs und der isolierten RP-HPLC-Fraktionen 1-8 wurden die entstandenen Peptide auf Superdex[®]75 FPLC entsalzt. Bereits hier ergaben sich für alle Proben 2-5 Fraktionen, die unterschiedlich großen Peptiden entsprachen. Im Folgenden wurde nur mit den Peptiden des ursprünglichen AGPs und der Fraktionen 1, 2 und 4 (Abb. 26 (a)-(d)) gearbeitet, da diese die massenmäßig größten Fraktionen darstellten.

Eine weitere Fraktionierung der nach Größe getrennten Peptide dieser Fraktionen erfolgte an RP-HPLC-Material (C-8), bei der wiederum mehrere Fraktionen für jedes Peptid isoliert wurden. Beispielhaft sind in Abb. 26 (e)-(h) die Chromatogramme der hochmolekularen Peptid-Fraktionen dargestellt. Sowohl in der hochmolekularen Peptidfraktion des AGPs als auch in den hochmolekularen Peptid-Fraktionen von F1, F2 und F4 überwog der Peak mit einer Retentionszeit von 4,7 min, dessen Peptid daher näher charakterisiert werden sollte.

Eine N-terminale Sequenzierung der Peak-Fraktion bei 4,7 min aus dem ursprünglichen AGP lieferte folgende, nicht ganz eindeutige Sequenz:

```

S - T - A - O - X - A - X - A - X - X - L - X - A - A - X - S - X - X - A
A  A  T  A  O  O           S      O           S  O  N  T           O
                        T
                        G
                        K

```

Neben Aminosäuren, die aufgrund der Zunahme der Peakhöhe im jeweiligen Chromatogramm mengenmäßig überwogen, ließen sich an einigen Positionen andere mögliche Aminosäuren mit allerdings geringerer Wahrscheinlichkeit identifizieren. In einigen Zyklen war die Identifizierung einer Aminosäure nicht möglich (X).

Eine weitere Aufreinigung dieser Peptid-Fraktion an RP-18-Material (ohne Abb.) mit anschließender Sequenzierung führte zu folgendem Ergebnis:

```

S - T - A - O - A - A - X - A - X - X - L - A - X - X - X - X - X - A
A  A  O  A  O  O      S              S  A  O              S
      S  T  T          T              T
                        G              G
                        K              L

```

Die ermittelte Sequenz zeigt, dass mit diesem Reinigungsschritt keine Verbesserung erreicht werden konnte. Neben den dominierenden Aminosäuren kamen weiterhin Spuren von Nebenkomponenten vor.

Ein ähnliches Ergebnis lieferte die Peptid-Fraktion mit einer Retentionszeit von 4,7 min aus der Fraktion RP-HPLC-F1 nach Aufreinigung an der C-18-Säule:

```

S - T - A - O - A - A - X - A - X - X - L - A - X - X - X - X - X - A
  A  O  A  O      S              S              S
                        T              T
                        G              G
                        K              L

```

In der Annahme, dass auch die Peptid-Fraktion bei einer Retentionszeit von 4,6 min in Fraktion RP-HPLC-F4 eine ähnliche Sequenz aufweisen könnte, wurde diese mit folgendem Ergebnis sequenziert:

```

S - T - A - O - A - A - S - A - X - X - L - A - A - A - X - S - X
                T  S  O  A

```

Man erhielt eine fast eindeutige Sequenz der ersten 17 Aminosäuren, die mit den Ergebnissen der vorherigen Sequenzierungen gut übereinstimmte.

Geht man davon aus, dass es sich bei allen sequenzierten Proben um das gleiche Peptid-Grundgerüst handelt, die einzelnen AGPs sich also nur in der Glykosylierung dieses Protein-Backbones unterscheiden, kommt man zu folgender zusammengefassten Sequenz für das N-terminale Ende eines AGP-Peptids:

S - T - A - O - A - A - S - A - X - X - L - A - A - A - X - S - X - A - A
 T S O O O

Diese Sequenz zeigt einen hohen Gehalt an Alanin. Daneben kommen Serin, Threonin, Hydroxyprolin und Leucin vor. Einige Aminosäuren in der Sequenz konnten nicht identifiziert werden (X). Möglicherweise handelt es sich um Hydroxyprolin, das aufgrund einer nicht ausreichenden Deglykosylierung noch Zuckerreste trägt und dadurch nicht detektiert werden konnte. Dies ist zumindest für diejenigen nicht eindeutig identifizierten Aminosäuren (X) wahrscheinlich, für die an der entsprechenden Position auch Spuren an Hydroxyprolin (X/O) identifiziert werden konnten. Unter Berücksichtigung dieser Annahmen ergibt sich als N-terminale Aminosäure-Sequenz der untersuchten Fraktionen:

S - T - A - O - A - A - S - A - X - O - L - A - A - A - O - S - O - A - A
 T S

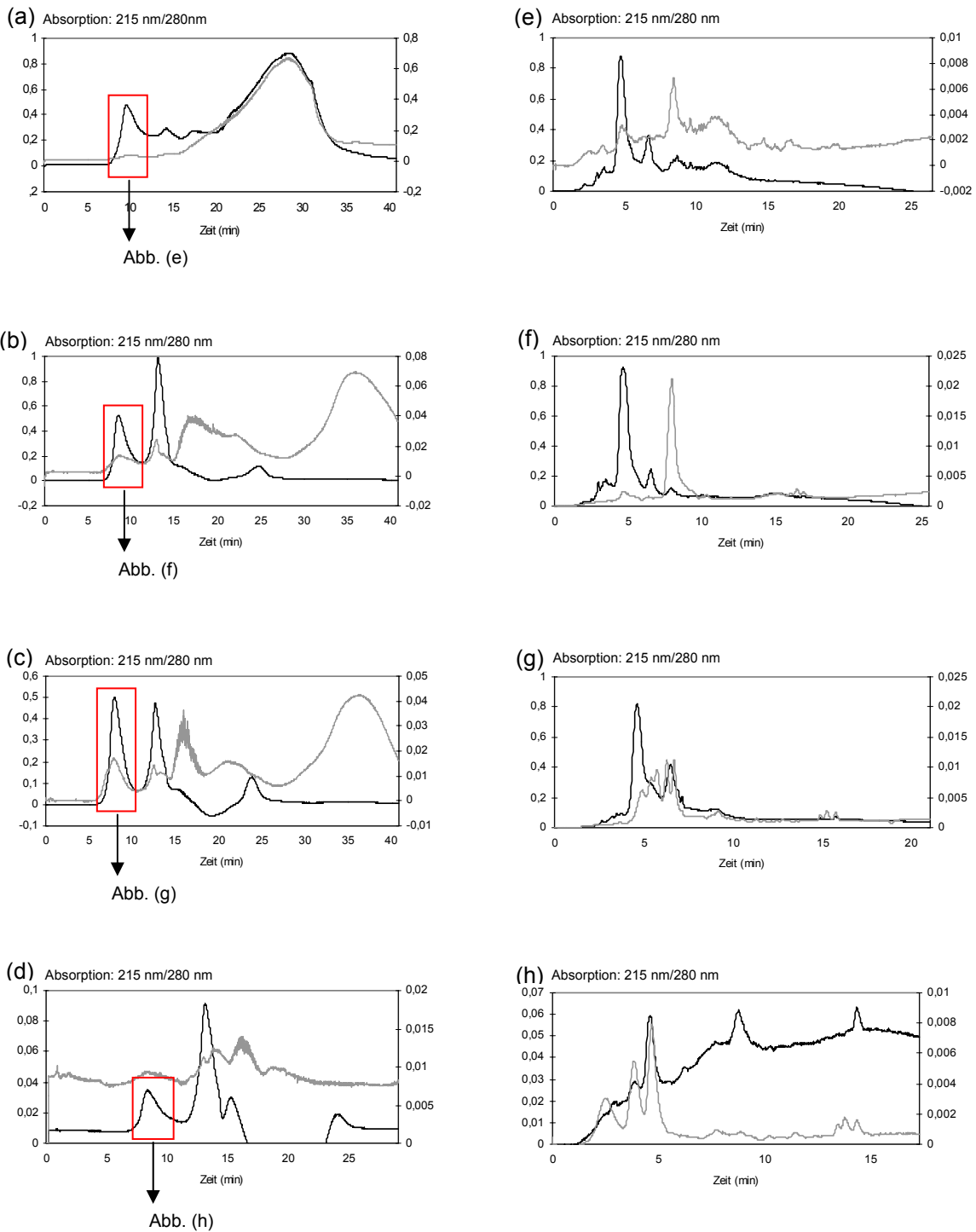


Abb. 26: Entsalzung der AGP-Peptide von Wurzel-AGP (a) und den Fraktionen 1 (b), 2 (c) und 4 (d) von RP-HPLC (s. Abb. 16) an Superdex[®]75 FPLC (Puffer: 1 % NaCl in 0,1 % TFA; Flussrate: 0,5 ml/min; Absorption bei 215 nm (schwarz) und 280 nm (grau)) und jeweilige Fraktionierung der hochmolekularen Peptidfraktion an Aquapore RP-300 (Chromatogramme (e)-(h); Puffer A: 0,1 % TFA; Puffer B: 80 % Acetonitril in 0,1 % TFA; Gradient: 0-100 % B in 30 min; Flussrate: 1 ml/min; Absorption bei 215 nm (schwarz) und 280 nm (grau)).

I.10. Resorptionsversuche an einem Epithelmodell

Für Glykoproteine und Polysaccharide wurden *in vitro* immunmodulatorische Wirkungen nachgewiesen. Die Resorptionsfrage nach oraler Einnahme pflanzlicher Immunstimulanzen ist allerdings noch nicht vollständig geklärt, v.a. die Aufnahme von Makromolekülen durch das Darmepithel scheint aufgrund der Molekülgröße eher unwahrscheinlich. Dennoch gibt es Untersuchungen, dass sich bestimmte Carrier im Epithel -speziell in den M-Zellen (Peyer'sche Plaques)- befinden, die eine Aufnahme der Glykoproteine ermöglichen.

Resorptionsversuche mit Wurzel-AGP wurden für diese Arbeit an einem künstlichen Epithelmodell durchgeführt. Hierfür wurde eine künstliche Adenokarzinom-Zelllinie (Caco-2) gezüchtet und der Transport der Probesubstanz durch eine einschichtige Zelllage untersucht.

Auf der apikalen Seite (Donatorkompartiment) wurden 25 bzw. 50 µg/ml Probenmaterial aufgetragen. Nach 15, 30 und 45 min wurden auf der basalen Seite (Akzeptorkompartiment) Proben entnommen. Am Ende des Versuchs nach zwei Stunden wurden sowohl von der apikalen als auch von der basalen Seite Proben entnommen.

Eine Quantifizierung der AGPs ist bei diesen niedrigen Konzentrationen sehr schwierig, ein qualitativer Nachweis ist aber mit Hilfe des Geldiffusionstests möglich. Die Probelösungen wurden gegen Wasser dialysiert (12-14.000 Da), um Pufferbestandteile zu entfernen, und gefriergetrocknet. Die Lyophilisate wurden in Aqua bidest. gelöst, so dass in den Stammlösungen theoretische Konzentrationen im Bereich von 1-10 mg/ml resultierten, damit deutlich sichtbare Präzipitationsbanden im Gel entstehen konnten. Jeweils 25 µl der Probelösungen und Yariv-Reagenz (1 mg/ml) wurden für den Test verwendet.

Im Donatorkompartiment (DKp) waren sowohl zu Beginn als auch am Ende des Versuches AGPs durch Präzipitationsbanden nachzuweisen (Abb. 27 (a) und (c)), während in den entnommenen Proben des Akzeptorkompartiments (AKp) keine AGPs nachzuweisen waren (Abb. 27 (b)). Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass die AGPs nicht ohne weiteres durch die Epithelzellmembran hindurch diffundieren können, sondern eine Resorption über spezifische Carrier erfolgen müsste.

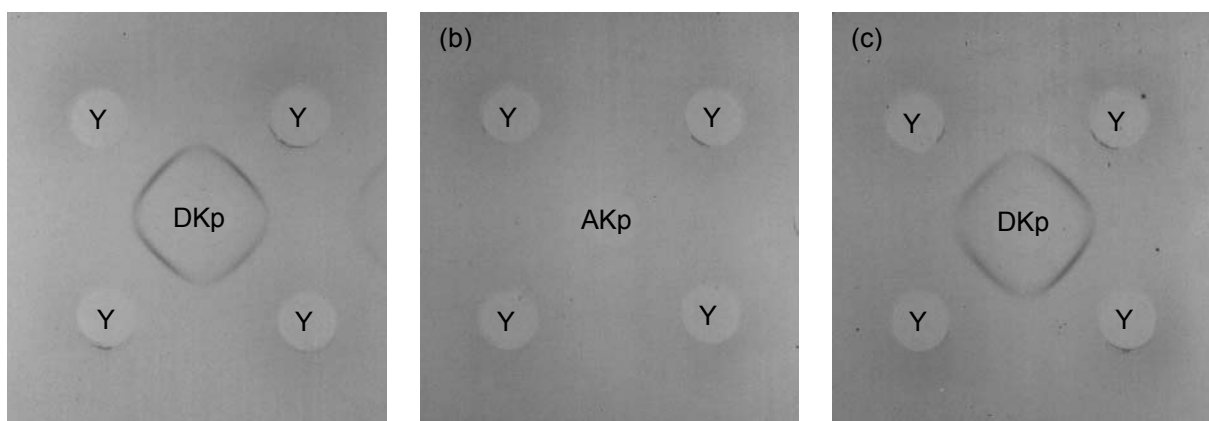


Abb. 27: Geldiffusionstests von Wurzel-AGP gegen Yariv-Reagenz (Y = 1mg/ml): (a) Donatorkompartiment zu Beginn, (b) Akzeptorkompartiment am Ende (2 h) und (c) Donatorkompartiment am Ende (2 h) der Resorptionsversuche.

I.11. Immunologische Methoden

I.11.1. ELISA

Poly- und monoklonale Antikörper gegen *Echinacea purpurea*-AGP aus Presssaft oberirdischer Pflanzenteile wurden aus Kaninchen-Blut isoliert. Die Kreuzreaktivität von *Baptisia tinctoria*-AGP mit den Antikörpern wurde im ELISA getestet. Mit den polyklonalen Antikörpern wurden Sandwich-ELISAs durchgeführt, mit den monoklonalen kompetitive ELISAs.

Testung der Kreuzreaktivität mit polyklonalen Antikörpern

AGP aus *Baptisia tinctoria* zeigte im Sandwich-ELISA eine deutliche Kreuzreaktivität mit den polyklonalen Antikörpern (Abb. 28). Diese Reaktivität war allerdings schwächer als die Reaktivität von *Echinacea purpurea*-AGP aus dem Presssaft. Gummi arabicum zeigte keine Kreuzreaktivität.

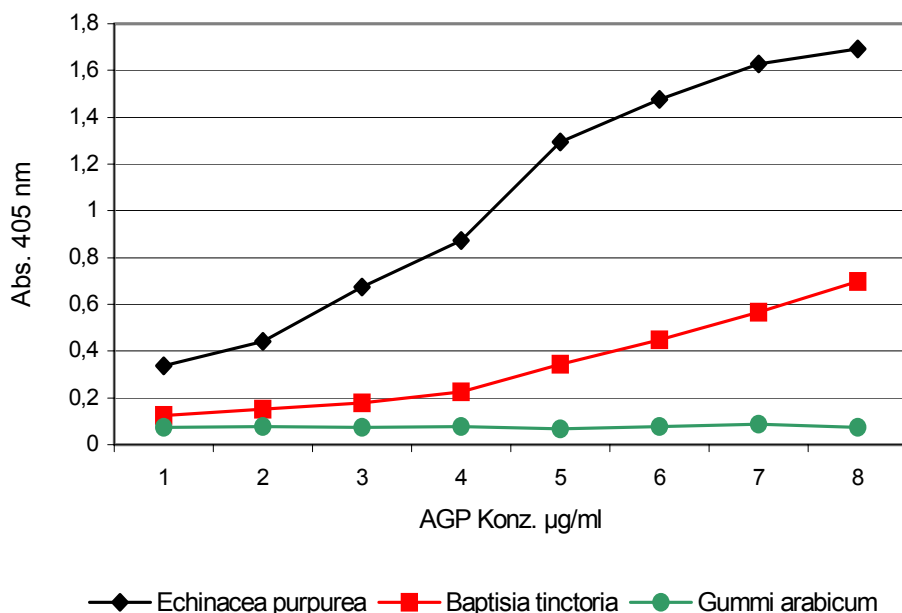


Abb. 28: Kreuzreaktivität von *Baptisia tinctoria*-AGP mit polyklonalen Antikörpern im Sandwich-ELISA.

Testung der Kreuzreaktivität mit monoklonalen Antikörpern

Mit den monoklonalen Antikörpern (4B8D3) zeigte sich im kompetitiven ELISA ebenfalls eine Kreuzreaktivität mit *Baptisia tinctoria*-AGP. Die Reaktivität war wiederum schwächer als mit *Echinacea purpurea*-AGP aus dem Presssaft. Gummi arabicum zeigte auch hier keine Reaktivität (Abb. 29).

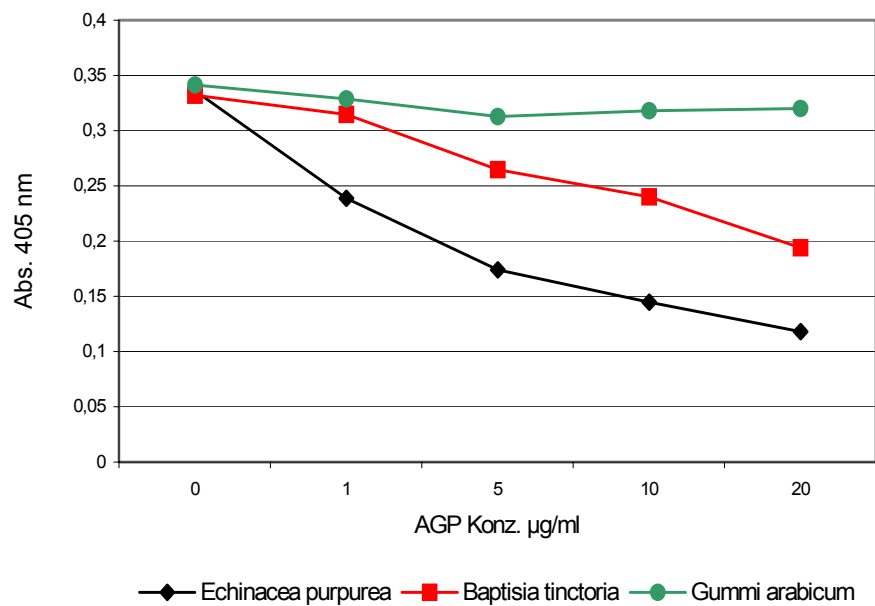


Abb. 29: Kreuzreaktivität von *Baptisia tinctoria*-AGP mit monoklonalen Antikörpern (4B8D3) im kompetitiven ELISA.

Der gleiche Test wurde mit *Baptisia*-AGP und den partiellen Abbau- bzw. Derivatisierungsprodukten durchgeführt. Hier zeigte sich eine verstärkte Kreuzreaktivität mit AGP-O, nachdem durch Oxalsäure-Hydrolyse endständige Arabinosen entfernt worden waren (Abb. 30). Das entstandene Core-Polysaccharid mit einem hohen Galactose-Anteil reagierte stärker als das ursprüngliche AGP. Eine Reduktion der Uronsäuren im AGP (AGP-U) bewirkte eine schwache Abnahme der Kreuzreaktivität.

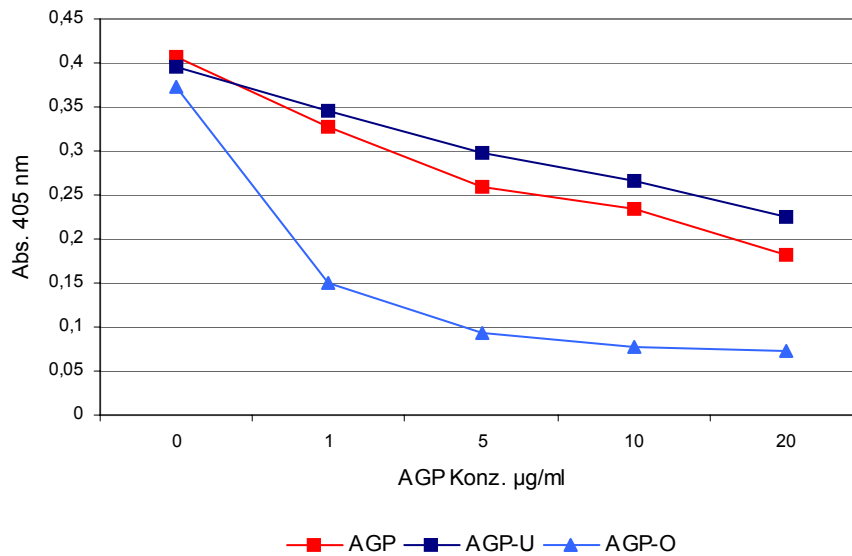


Abb. 30: Kreuzreaktivität von *Baptisia tinctoria*-AGP und partiellen Abbau- bzw. Derivatisierungsprodukten mit monoklonalen Antikörpern (4B8D3) im kompetitiven ELISA.

I.11.2. Stimulation der Proliferation von Milzzellen aus C3H/HeJ-, NMRI- und Balb/c-Mäusen

AGP aus *Baptisia tinctoria* bewirkte eine Steigerung der Proliferationsrate von Milzzellen aus C3H/HeJ-, NMRI- und Balb/c-Mäusen (Abb. 31 bis 33). Je nach Mäusestamm wurde eine schwächere oder stärkere Steigerung der Einbaurate von ^3H -Thymidin im gewählten Konzentrationsbereich von 0,8 bis 100 µg/ml bewirkt.

Ein maximaler Stimulationsindex (SI) von 3,0 für C3H/HeJ-, 8,6 für NMRI- und von 18,3 für Balb/c-Milzzellen konnte bei einer Konzentration von 100 µg/ml AGP erreicht werden. Ein unterschiedlicher Verlauf der SI-Kurven war zu erkennen (Abb. 34). Die Einbaurate von Thymidin in NMRI-Milzzellen wurde bereits durch niedrige AGP-Konzentrationen stark erhöht, während eine erhöhte Einbaurate in Balb/c-Milzzellen erst bei höheren AGP-Konzentrationen erfolgte. Die schwächste Stimulation erfolgte in C3H/HeJ-Milzzellen. Die Ursachen dafür sind im Testsystem selbst begründet (unterschiedlicher Mäusestamm, Nahrung, Gewicht u.a.). Im Gegensatz dazu wurde keine Steigerung der Proliferationsrate der Balb/c-Zellen durch Lärchen-AGP bewirkt. LPS führte als Referenzmitogen in einer Konzentration von 30 µg/ml zu einer starken

Stimulation der Proliferationsraten in NMRI- und Balb/c-Milzzellen, die Milzzellen des LPS-insensitiven Stammes C3H/HeJ wurden, wie erwartet, kaum stimuliert. Die Referenzmitogene PHA und ConA führten in allen Zelllinien zu einer Steigerung der Proliferationsrate, wobei die Stimulation durch ConA einen SI von bis zu 70 erreichte.

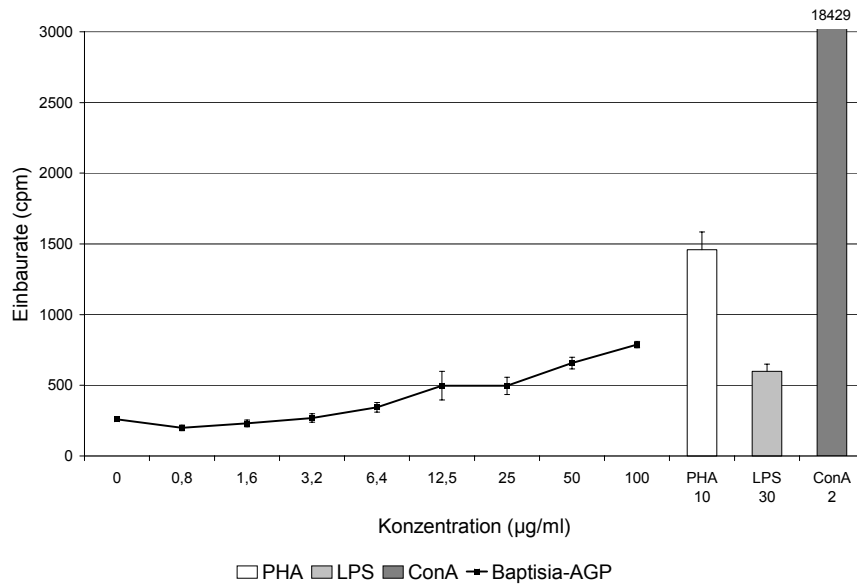


Abb. 31: Steigerung der Proliferationsrate von Milzzellen aus C3H/HeJ-Mäusen durch Baptisia-AGP.

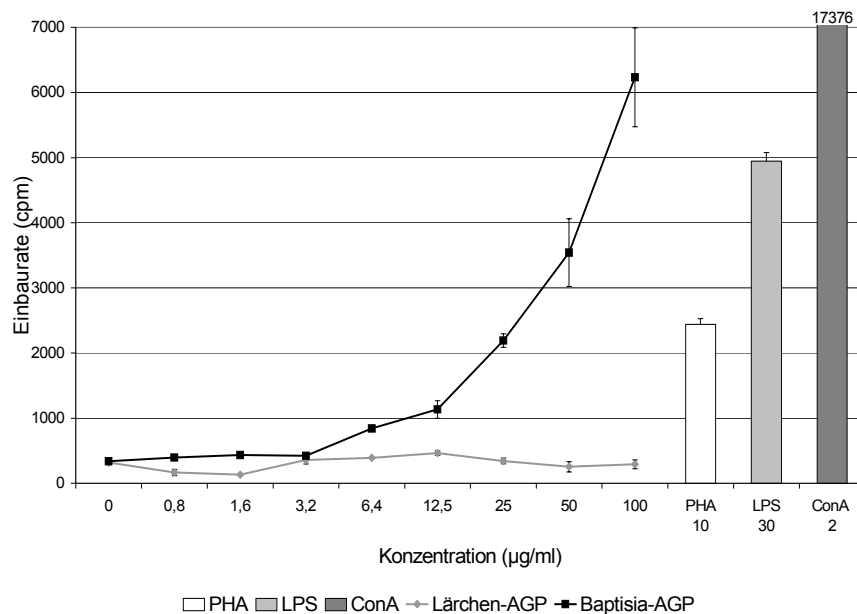


Abb. 32: Steigerung der Proliferationsrate von Milzzellen aus Balb/c-Mäusen durch Baptisia-AGP.

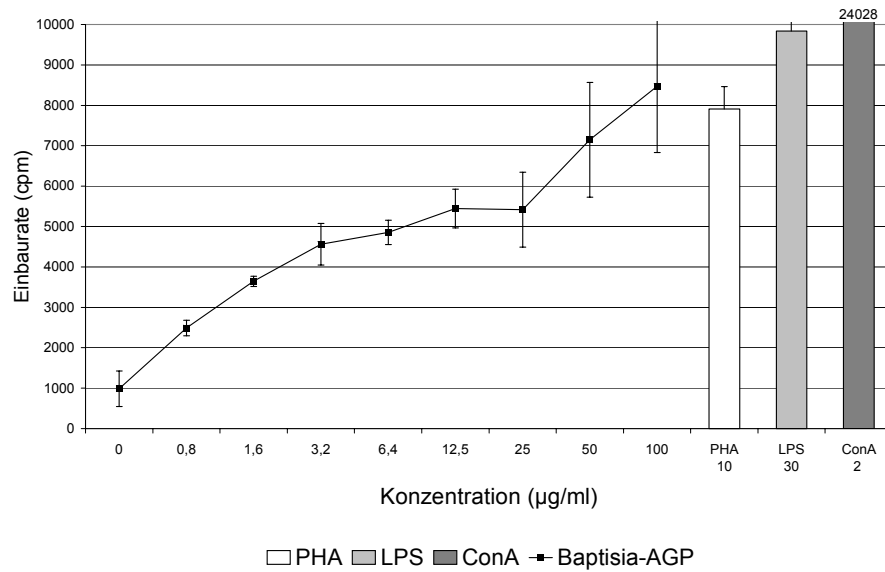


Abb. 33: Steigerung der Proliferationsrate von Milzzellen aus NMRI-Mäusen durch Baptisia-AGP.

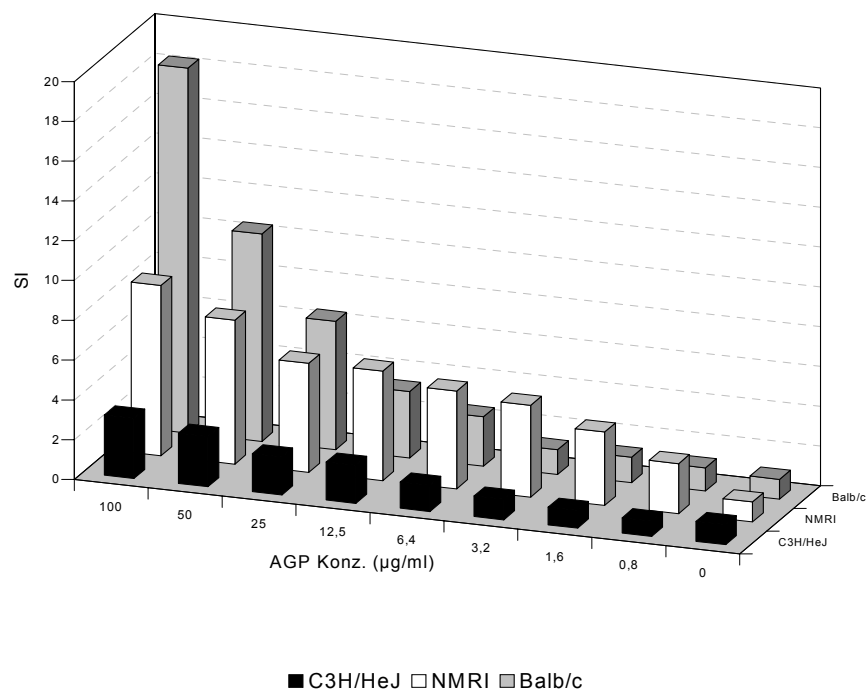


Abb. 34: Stimulationsindizes für die Proliferation von C3H/HeJ-, Balb/c- und NMRI-Milzzellen induziert durch Baptisia-AGP.

I.11.3. Zytokininduktion (IL-1 β , IL-6, TNF α , GM-CSF)

Die Inkubation von Maus-Makrophagen mit 6,3 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ AGP aus *Baptisia tinctoria* führte zu einer erhöhten Ausschüttung der Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF α und GM-CSF im Zellkulturüberstand. Lärchen-AGP zeigte in diesen Testmodellen keine bis schwache Reaktionen. Eine Positivkontrolle der Zytokininduktion wurde mit LPS in einer Konzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ bzw. LPS sowie ConA (2 $\mu\text{g/ml}$) durchgeführt. In allen vier Testsystemen wurde die erwartete Aktivierung gezeigt. Die Negativkontrolle erfolgte mit Zellkulturmedium.

Die Inkubation der Maus-Makrophagen bewirkte eine signifikante Erhöhung der IL-1 β -Titer, wobei über den gemessenen Konzentrationsbereich keine Konzentrationsabhängigkeit erkennbar war (Abb. 35). Im Vergleich zur Negativkontrolle wurden in Anwesenheit von Baptisia-AGP 3,5fach erhöhte Zytokin-Titer bereits bei einer Konzentration von 6,3 $\mu\text{g/ml}$, maximal 4fach erhöhte Zytokin-Titer bei einer Konzentration von 12,5 $\mu\text{g/ml}$ erreicht. Lärchen-AGP zeigte hier eine schwache Aktivität, führte in einer Konzentration von 6,3 $\mu\text{g/ml}$ zu einer 1,8fachen Erhöhung der Zytokin-Titer, in höheren Konzentrationsbereichen allerdings ebenso wie Baptisia-AGP zu einer konzentrationsunabhängigen Stimulation von IL-1 β .

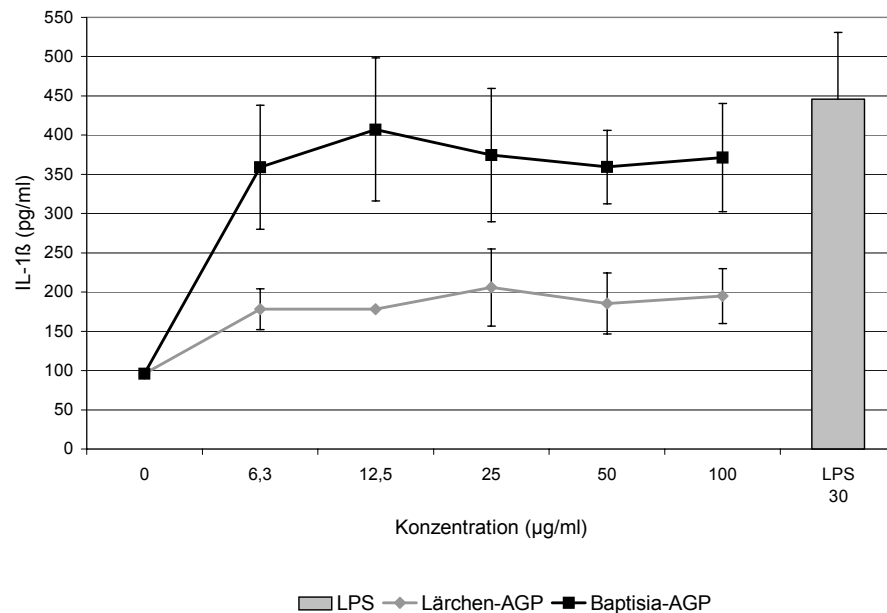


Abb. 35: IL-1 β -Produktion in alveolären Maus-Makrophagenkulturen (MH-S, Zell-Lysate) durch Baptisia- und Lärchen-AGP.

Die Bestimmung von IL-6 erfolgte sowohl in alveolären Maus-Makrophagen als auch in Peritonealmakrophagen. Hinsichtlich der Induktion von IL-6 in alveolären Maus-Makrophagen zeigte Baptisia-AGP eine konzentrationsabhängige Aktivierung im gemessenen Konzentrationsbereich, während Lärchen-AGP zu keiner Stimulation der IL-6-Induktion führte (Abb. 36).

Die Inkubation von Peritoneal-Mausmakrophagen führte zu einer signifikanten, rasch sättigbaren Erhöhung der IL-6-Titer (Abb. 37) für Baptisia-AGP. Bereits bei einer Konzentration von 6,3 µg/ml konnte eine 14fache Erhöhung der IL-6-Titer erreicht werden. Die maximale Konzentration von IL-6 betrug das 16fache im gemessenen Konzentrationsbereich während Lärchen-AGP auch hier wirkungslos war.

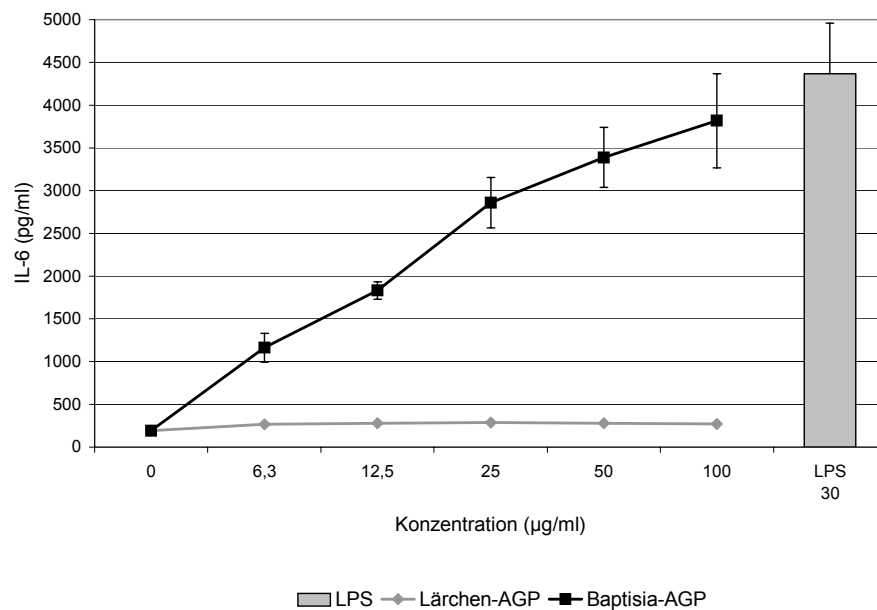


Abb. 36: IL-6-Induktion in alveolären Maus-Makrophagenkulturen (MH-S) durch Baptisia-AGP.

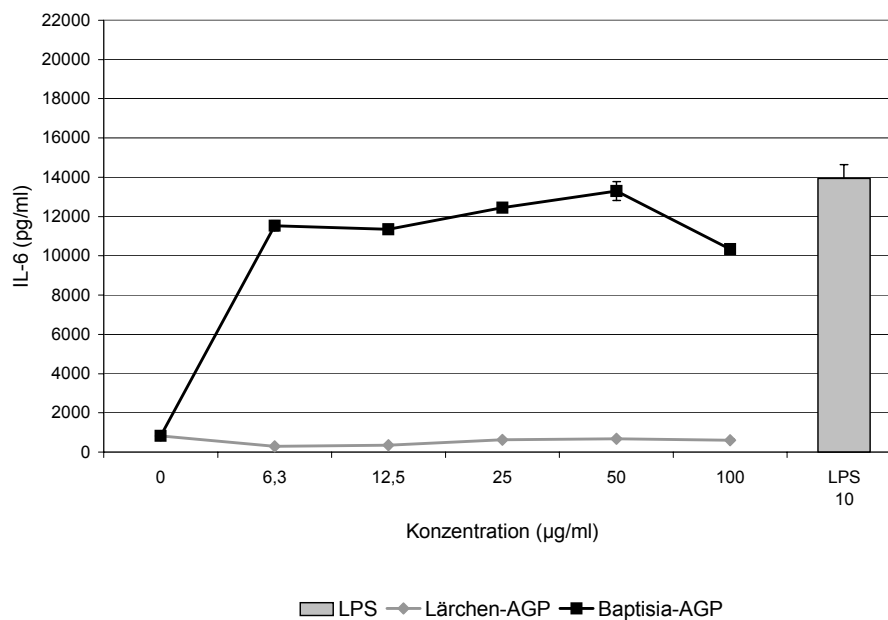


Abb. 37: IL-6-Induktion in Peritoneal-Makrophagenkulturen durch Baptisia-AGP.

Baptisia-AGP führte bereits in sehr niedrigen Konzentrationen zu einer konzentrationsabhängigen Induktion von GM-CSF im Zellkulturüberstand von Mausmilzzellen (Abb. 38). Das Maximum der GM-CSF-Produktion wurde bereits bei einer Konzentration von 0,63 µg/ml erreicht. Höhere Konzentrationen führten im gemessenen Konzentrationsbereich zu keiner weiteren Erhöhung der GM-CSF-Titer. Lärchen-AGP führte auch hier zu keiner Zytokininduktion.

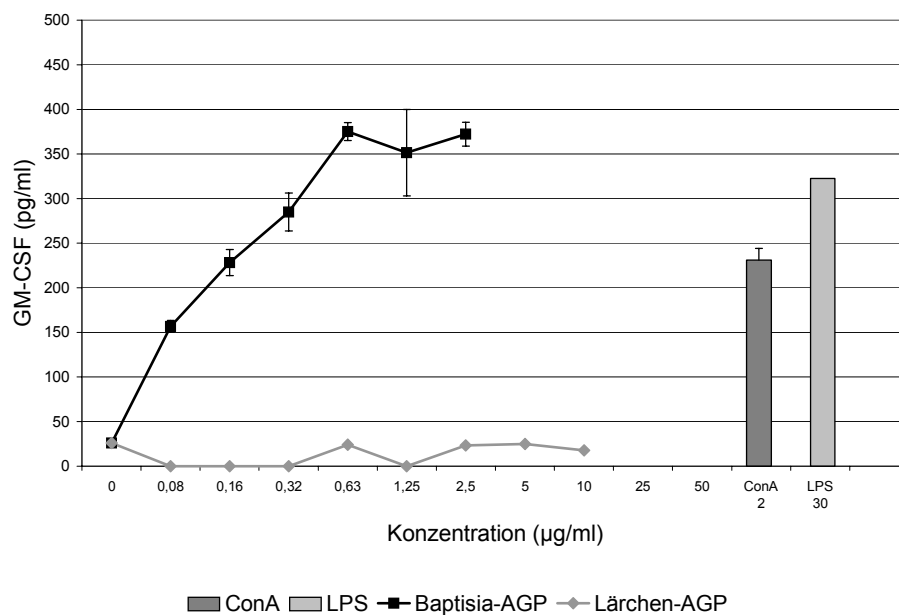


Abb. 38: GM-CSF-Induktion in Maus-Milzzellkulturen (NMRI) durch Baptisia-AGP.

Im Hinblick auf TNF α zeigte Baptisia-AGP eine konzentrationsabhängige Aktivierung in alveolären Maus-Makrophagen im gemessenen Konzentrationsbereich (Abb. 39), während die Aktivierung in Peritoneal-Makrophagenkulturen nur bis zu einer Konzentration von 6,3 µg/ml konzentrationsabhängig um das 12fache zunahm (Abb. 40), so dass im höheren Konzentrationsbereich von einer konzentrationsunabhängigen Stimulation gesprochen werden kann. Lärchen-AGP war in beiden Fällen weitgehend wirkungslos.

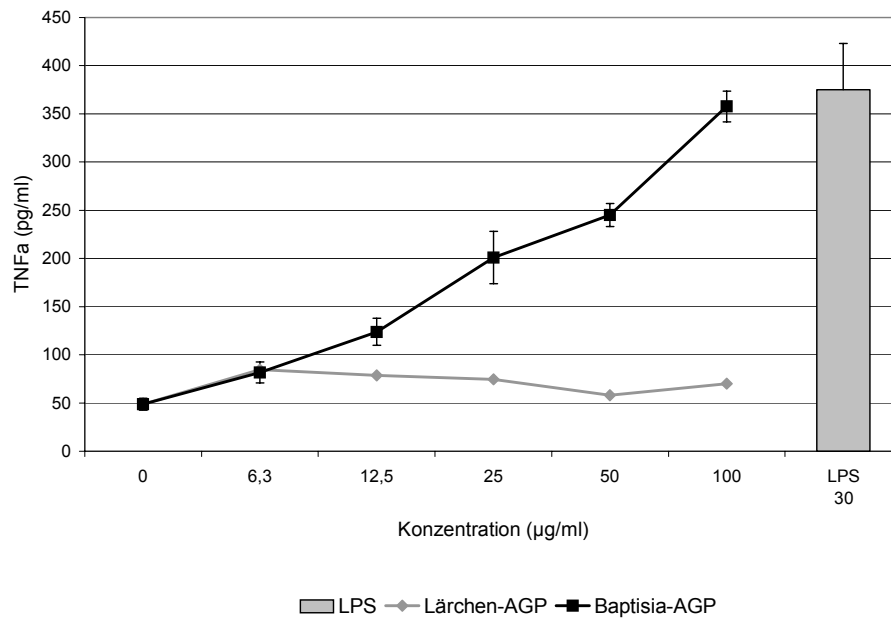


Abb. 39: TNFa-Induktion in alveolären Maus-Makrophagenkulturen (MH-S) durch Baptisia-AGP.

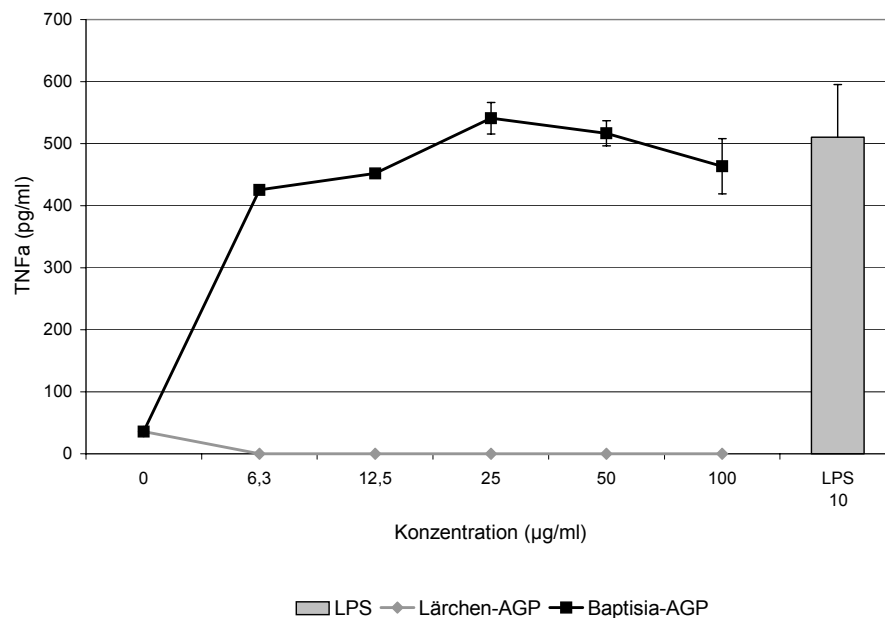


Abb. 40: TNFa-Induktion in Peritoneal-Makrophagenkulturen durch Baptisia-AGP.

I.11.4. Stimulation der IgM-Produktion in Milzzellkulturen von NMRI-Mäusen

Die Inkubation der Mausmilzzellen mit Baptisia-AGP führte zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Konzentration an IgM im Zellkulturüberstand (Abb. 41). Im Kontrollansatz wurde eine Konzentration von 263 ng/ml gemessen, die durch Zugabe von Baptisia-AGP in einer Konzentration von 100 µg/ml auf mehr als das Zehnfache gesteigert wurde (2743 ng/ml). Lärchen-AGP führte zu keiner gesteigerten Bildung von IgM, während das Kontrollmitogen LPS ebenfalls die Bildung von IgM-Antikörpern stimulierte.

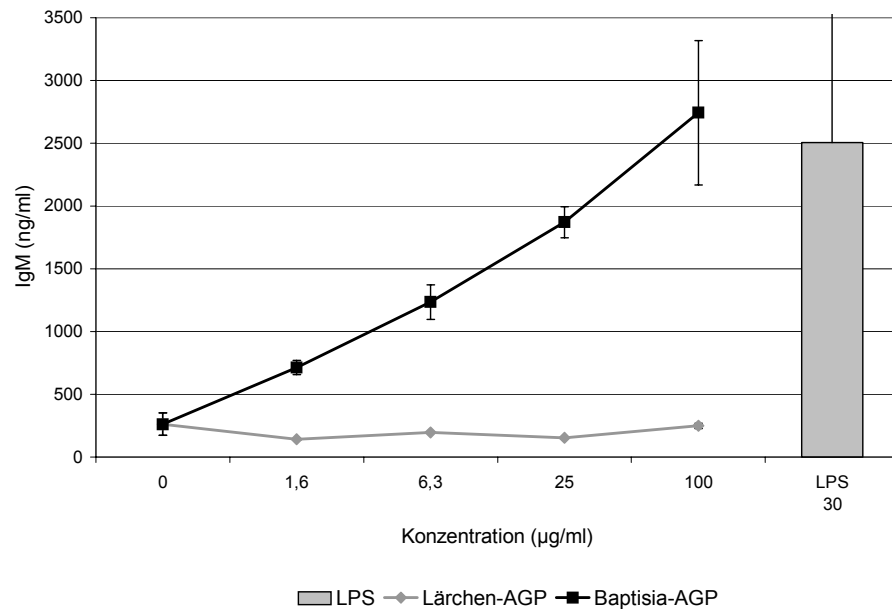


Abb. 41: IgM-Titer in Milzellsuspensionen nach Inkubation mit Baptisia-AGP.

I.11.5. Einfluss auf die NO_2^- -Produktion von alveolären Maus-Makrophagen

Der Einfluss von Baptisia-AGP auf den oxidativen Metabolismus von Makrophagen wurde anhand der NO_2^- -Produktion von MH-S-Zellen bestimmt. Die NO_2^- -Konzentration konnte durch die Inkubation mit 6,25-100 $\mu\text{g/ml}$ Baptisia-AGP von $0,16 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$ auf maximal $63,56 \pm 0,24 \mu\text{mol/l}$ konzentrationsabhängig gesteigert werden (Abb. 42).

Auffällig an dieser Kurve ist der steile Anstieg zwischen der Negativkontrolle und der kleinsten Konzentration von 6,25 $\mu\text{g/ml}$ und die darauf folgende langsame weitere NO_2^- -Stimulation durch stärkere AGP-Konzentrations-Erhöhung. Eine zusätzliche Messung wurde mit mehr Abstufungen im Konzentrationsbereich bis 50 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Es zeigte sich ebenfalls eine konzentrationsabhängige Zunahme der NO_2^- -Produktion (Abb. 43), wobei ein starker Anstieg im niedrigen AGP-Konzentrationsbereich bis 0,8 $\mu\text{g/ml}$ erfolgte.

Die beiden Messungen unterschieden sich in den absoluten Messwerten. In der zweiten Messreihe wurden stets höhere NO_2^- -Konzentrationen gemessen als in der ersten Messreihe, was einerseits darauf beruhte, dass in der zweiten Messreihe die Zellen bereits vor Zugabe des AGPs in geringem Ausmaß stimuliert waren, andererseits mit unterschiedlichen MH-S-Zell-Zubereitungen gearbeitet wurde.

Als Positivkontrolle fungierte in diesem Testsystem die kombinierte Zugabe von IFN γ und LPS (1+5 ng/ml).

Lärchen-AGP induzierte keine Bildung von NO_2^- in MH-S-Zellen.

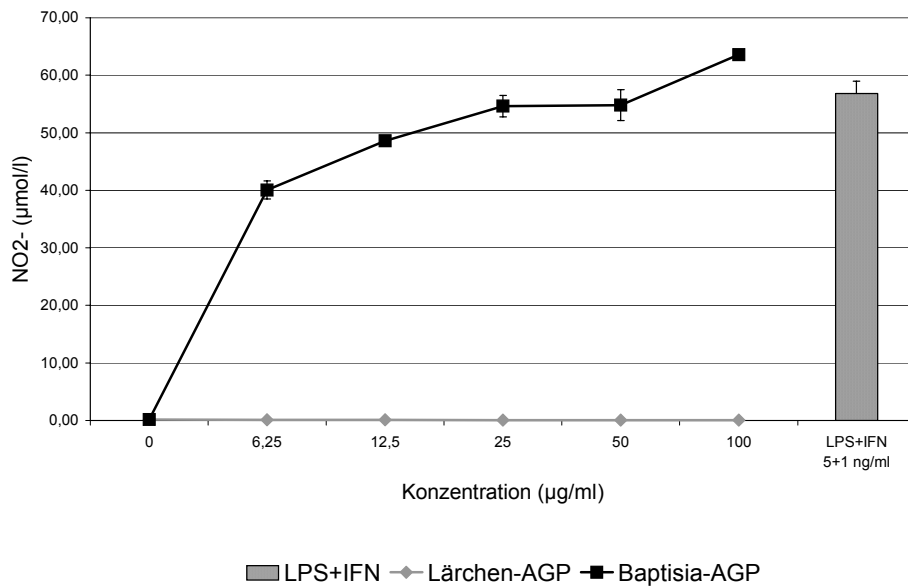


Abb. 42: Steigerung der NO₂⁻-Produktion von MH-S Zellen im Konzentrationsbereich von 6,25 bis 100 µg/ml durch Baptisia-AGP.

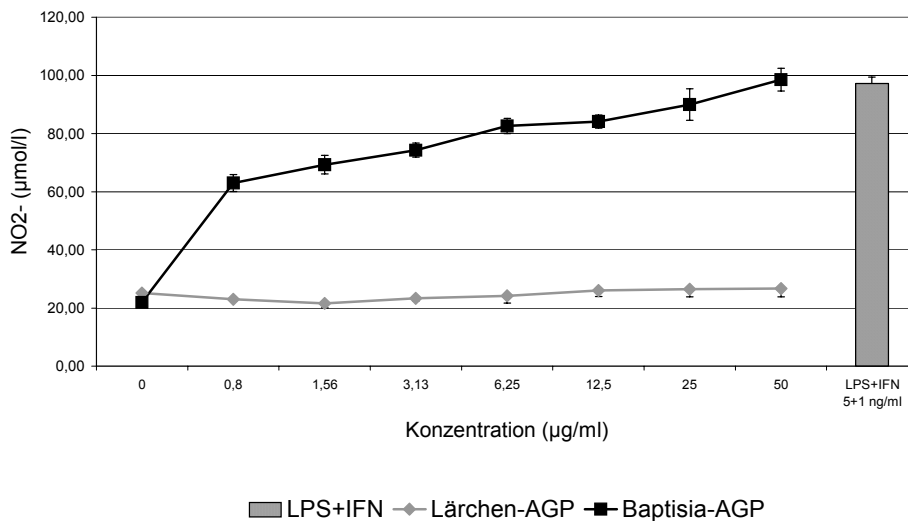


Abb. 43: Steigerung der NO₂⁻-Produktion von MH-S Zellen im Konzentrationsbereich 0,8-50 µg/ml durch Baptisia-AGP.

I.11.6. Induktion von IFN γ in Milzzellkulturen von NMRI-Mäusen

Inkubation von Mausmilzzellen mit Baptisia-AGP bewirkte einen starken Anstieg von IFN γ in den Zellkulturüberständen (Abb. 44). Der Kontrollwert von 91,8 pg/ml konnte im gemessenen Konzentrationsbereich um das 178fache auf maximal 16.388 pg/ml bei einer Konzentration von 1,25 μ g/ml Baptisia-AGP gesteigert werden. Lärchen-AGP zeigte im Gegensatz dazu keine Induktion der IFN γ -Produktion.

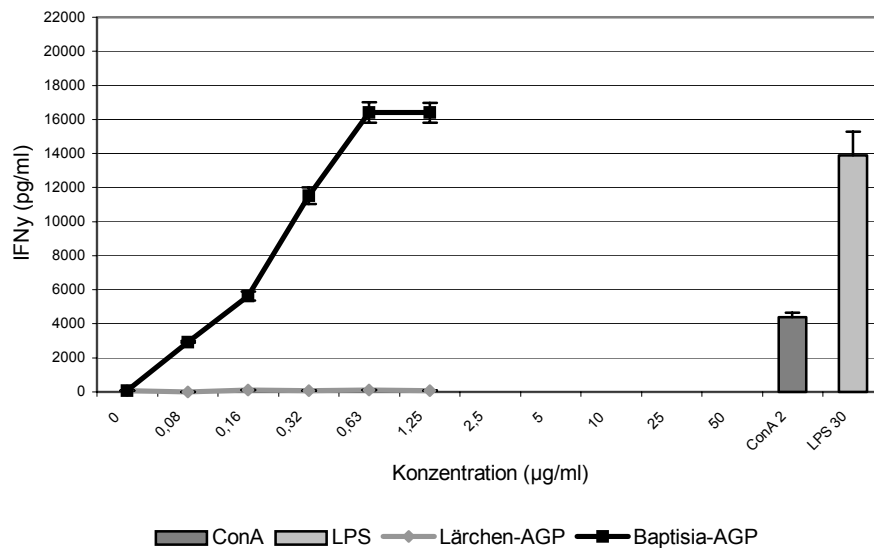


Abb. 44: IFN γ -Induktion in Maus-Milzzellkulturen (NMRI) durch Baptisia-AGP.

II. *Baptisia tinctoria* Zellkultur

Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen sind ein wichtiges Hilfsmittel der Grundlagenforschung und praktischen Pflanzenzüchtung. Die pflanzliche Zelle besitzt Totipotenz und kann sich in Kultur wieder zu der gesamten Pflanze mit allen Geweben entwickeln. Zusätzlich können aus Zellkulturen oder Zellkulturmedien Inhaltsstoffe gewonnen werden, die z.B. in der Nahrungsmittelindustrie oder Medizin Verwendung finden.

Zur Isolierung von AGPs aus der Zellkultur von *Baptisia tinctoria* wurde das MS + NAA/Kinetin-Zellkulturmedium verwendet.

Die Kalluszellen wuchsen auf dem Medium nur sehr langsam und wurden nach wenigen Tagen wie die *Baptisia australis*-Kalli aufgrund der Bildung phenolischer Substanzen braun bis schwarz. Aus diesem Grunde wurden die Kalli am Anfang alle 1-2 Wochen auf neue Medien überimpft. Dies konnte später auf alle 4 Wochen reduziert werden. Die Kalli erreichten nach 3 Monaten eine Größe, die es zuließ, Stücke von bis zu 5 mm Größe auf das entsprechende Suspensionsmedium zu überimpfen (Abb. 45). Auch hier war das Wachstum sehr langsam. 10 ml Suspensionsmedium wurden frühestens alle 8 Wochen in frisches Suspensionsmedium gegeben, um die Zellen ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen.

Zur Isolierung von AGPs wurden die Suspensionen entsprechend dem Abstand der Subkultivierung abgeerntet (Abb. 46). In der EtOH-Fällung des Zellkulturüberstandes war die Konzentration von Arabinose und Galactose allerdings zu gering, um direkt eine Fällung mit dem β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz durchzuführen. Das Pellet wurde in Aqua dem. resuspendiert, und unlösliche Bestandteile wurden abfiltriert. Im Filtrat konnte eine Fällung mit β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz durchgeführt werden. Die AGP-Ausbeute war mit 1,7 % (m/V) gering. Der Isolierungsweg ist schematisch in Abb. 47 dargestellt.

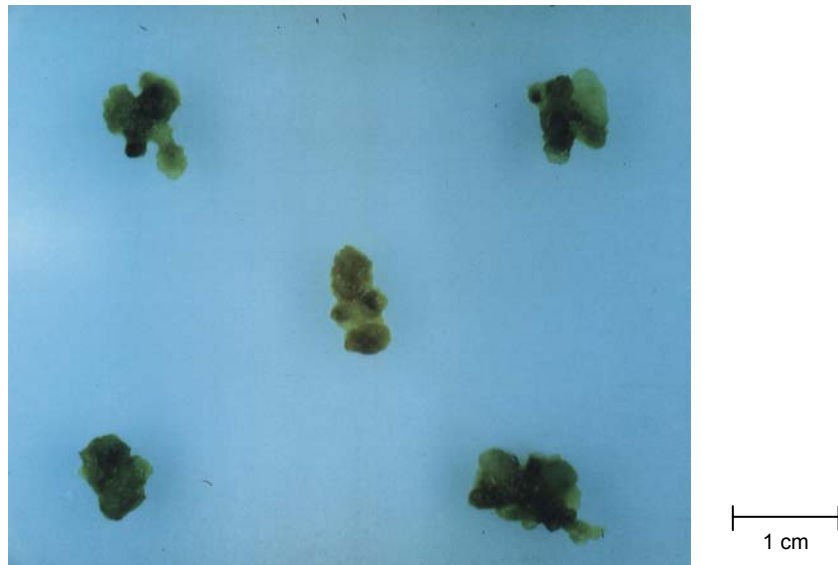


Abb. 45: Kalluskulturen von *Baptisia tinctoria* ZK (MS + NAA/Kinetin).

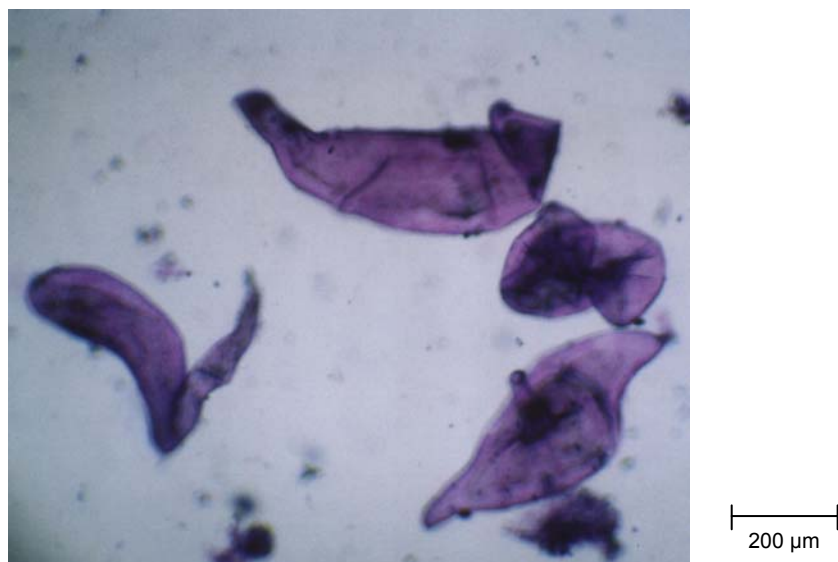


Abb. 46: Suspensionskulturen von *Baptisia tinctoria* ZK (MS + NAA/Kinetin); Anfärbung mit Toluidinblau.

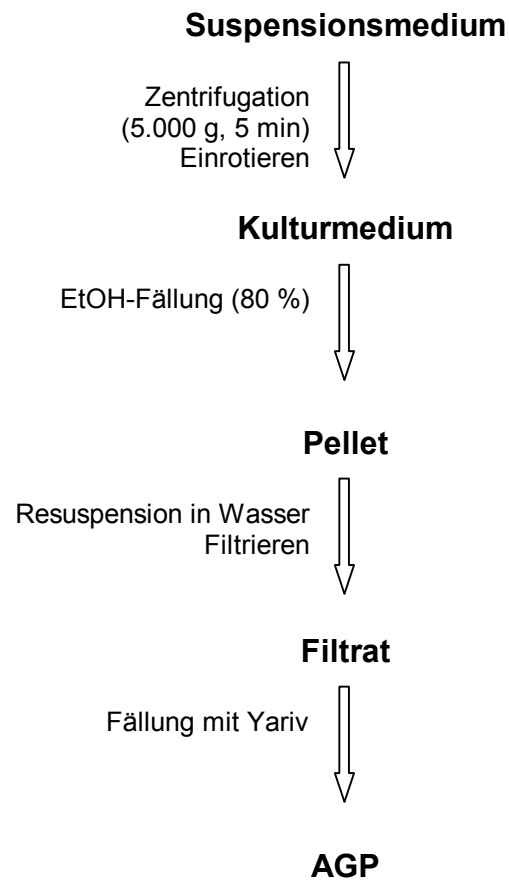


Abb. 47: Schema für den Isolierungsweg von AGPs aus dem Suspensionsmedium der *Baptisia tinctoria* Zellkultur.

II.1. Neutralzuckerzusammensetzung der EtOH-Fällung nach Filtration und des isolierten AGPs

Die Identifizierung und quantitative Erfassung der neutralen Monosaccharide einzelner Isolierungsstufen erfolgte gaschromatographisch nach BLAKENEY et al. (1983). Abb. 48 zeigt das Chromatogramm der derivatisierten Neutralzucker. Die Bestimmung der einzelnen Monosaccharid-Konzentrationen erfolgte über den internen Standard myo-Inositol mit Hilfe von Korrekturfaktoren. Tab. 24 zeigt die Ergebnisse der Acetylierungsanalysen der Ethanol- und Yariv-Fällung.

Tab. 24: Neutralzuckerzusammensetzung einzelner Fraktionen der *Baptisia tinctoria*-AGP-Isolierung aus der Zellkultur nach GC-Analyse der Alditolacetate (Angaben in %(m/m)).

Neutralzucker	ZK EtOH	ZK AGP
Ara	13,1	43,1
Xyl	1,6	-
Man	1,4	-
Gal	9,9	56,9
Glc	74,1	-
Ara:Gal	1:0,8	1:1,3

In der Ethanol-Fällung des Suspensionsmediums dominierte Glucose. Arabinose und Galactose kamen insgesamt in einer Konzentration von 23 % im Verhältnis 1:0,8 vor. Daneben waren geringe Mengen Xylose und Mannose vorhanden. Nach Fällung mit Yariv-Reagenz konnten ausschließlich Arabinose und Galactose als Neutralzucker identifiziert werden. Das Ara-Gal-Verhältnis änderte sich zugunsten der Galactose auf 1:1,3. Die Fällung mit Yariv-Reagenz führte zu einer Abtrennung der AGPs von den übrigen in der Ethanol-Fällung vorhandenen Polysacchariden.

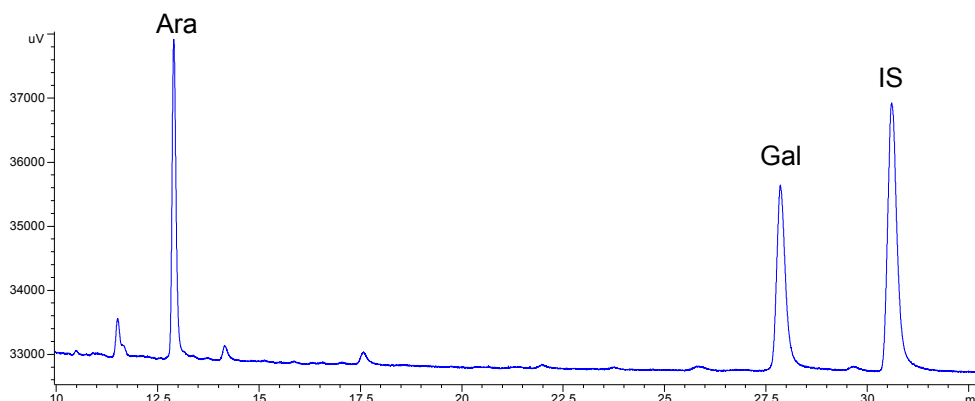


Abb. 48: Gaschromatogramm der acetylierten Neutralzucker des AGPs aus *Baptisia tinctoria* Zellkultur.

II.2. Bestimmung der Bindungstypen im Kohlenhydratanteil

Für die Bestimmung der Bindungsstellen im AGP wurden die Ergebnisse der Methylierungsanalyse herangezogen. Abb. 49 zeigt das Totalionenchromatogramm (TIC) der PMAAs des isolierten *Baptisia tinctoria*-AGPs, Tab. 25 liefert die Werte der quantitativen Auswertung.

Tab. 25: Bindungstyp-Analyse des AGPs aus *Baptisia tinctoria* Zellkultur.

Monosaccharid und Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil (mol%)
1-Arabinose(f)	10,8	10,3
1-Arabinose(p)	11,7	21,5
1,3-Arabinose(f)	13,7	20,0
1,5-Arabinose(f)	14,7	3,3
1-Galactose(p)	16,2	6,0
1,3-Galactose(p)	20,2	9,8
1,4-Galactose(p)	20,9	0,9
1,6-Galactose(p)	22,9	7,9
1,3,6-Galactose(p)	28,5	20,3

Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungspunkten
= 1:0,54

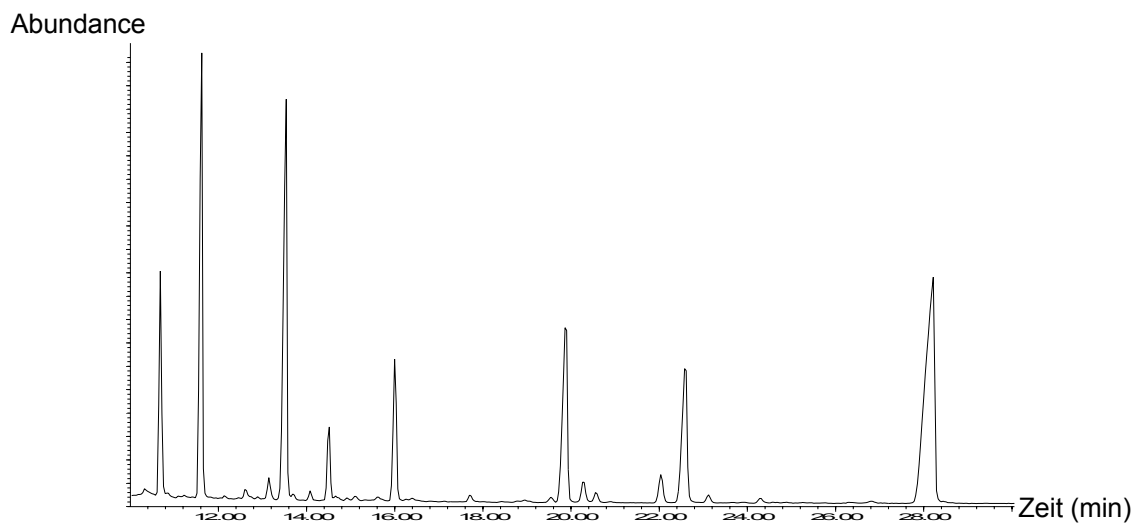


Abb. 49: TIC der PMAAs von *Baptisia tinctoria*-AGP aus der Zellkultur.

Die Untersuchungen des AGPs lassen folgende Aussagen zu:

1. Im AGP aus der Zellkultur von *Baptisia tinctoria* lassen sich sowohl in der Acetylierungs- wie auch in der Methylierungsanalyse ausschließlich Galactose und Arabinose nachweisen.
2. Die Polysaccharid-Hauptkette besteht aus 1,3-Galactose(p) mit Verzweigungspunkten an Position 6, in den Seitenketten überwiegt 1,3-Arabinose(f) neben 1,5-Arabinose(f), 1,6-Galactose(p) und 1,4-Galactose(p). Terminal kommt Arabinose in größerer Menge in pyranosider als in furanosider Form, aber auch Galactose(p) vor.

II.3. Hydroxyprolin-Gehalt

Da ein hoher Hydroxyprolinegehalt ein charakteristisches Merkmal von AGPs ist, wurde er hier separat von allen anderen Aminosäuren mit einer photometrischen Methode bestimmt. Hydroxyprolin lässt sich mit einem Oxidationsreagenz und anschließend mit einem Farbreagenz zu einem gefärbten Produkt umsetzen.

Für die Bestimmung wurden 6 mg AGP aus der Zellkultur verwendet. Für das AGP aus *Baptisia tinctoria* Zellkultur ergab sich ein Hydroxyprolin-Gehalt von 1,50 %.

II.4. Testung der Kreuzreaktivität mit monoklonalen Antikörpern

Die Kreuzreaktivität zwischen *Baptisia tinctoria*-AGP aus der Zellkultur, *Baptisia tinctoria*-AGP aus der Wurzel und *Echinacea purpurea*-AGP aus dem Presssaft oberirdischer Pflanzenteile wurde im kompetitiven ELISA mit monoklonalen Antikörpern (4B8D3) getestet (Abb. 50).

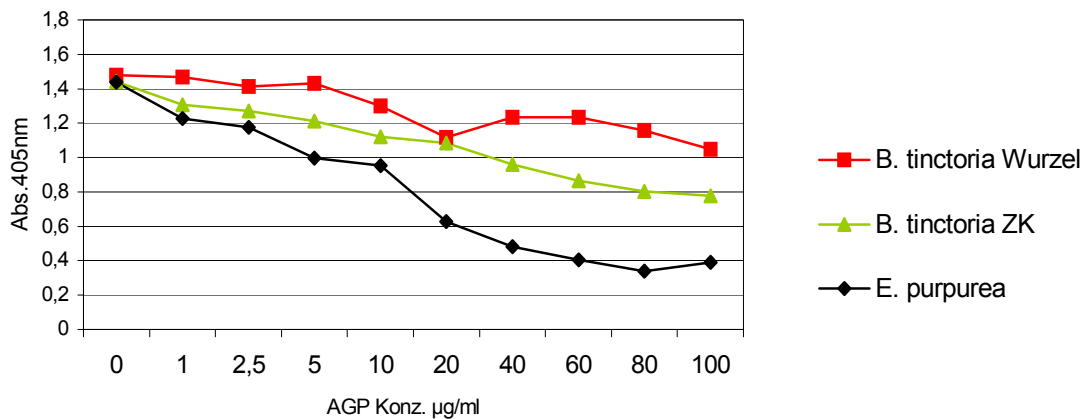


Abb. 50: Kreuzreaktivität von *Baptisia tinctoria*-AGP aus der Zellkultur mit monoklonalen Antikörpern (4B8D3) im kompetitiven ELISA gegen Wurzel-AGP aus *Baptisia tinctoria* und *Echinacea purpurea*-AGP.

Aus der Zellkultur isoliertes AGP zeigte Kreuzreaktivität mit den monoklonalen Antikörpern. Im Vergleich zu AGP aus dem Wurzelmaterial von *Baptisia tinctoria* zeigte AGP aus der Zellkultur eine stärkere Reaktivität. In beiden Fällen ist die Affinität zu den Antikörpern jedoch schwächer als diejenige von *Echinacea purpurea*-AGP.

Vergleicht man die Reaktivitäten zwischen Zellkultur-AGP, Wurzel-AGP und Zellkultur-AGP aus *Baptisia australis* ZK 2, so war die Reaktivität von AGP aus *Baptisia australis* Zellkultur mit den monoklonalen Antikörpern am stärksten, während AGP aus *Baptisia tinctoria* Zellkultur und Wurzel annähernd gleich stark reagierten (Abb. 51).

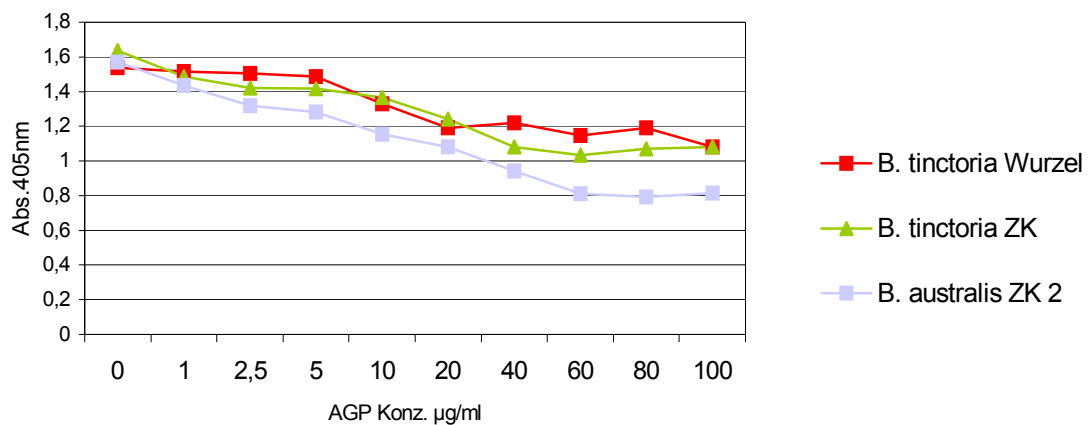


Abb. 51: Kreuzreaktivität von *Baptisia tinctoria*-AGP aus der Zellkultur mit monoklonalen Antikörpern (4B8D3) im kompetitiven ELISA gegen Wurzel-AGP aus *Baptisia tinctoria* und AGP aus ZK 2 von *Baptisia australis*.

III. *Baptisia australis* Zellkulturen

Zur Isolierung von AGPs aus Zellkulturen von *Baptisia australis* wurden drei Zellkulturmedien verwendet:

ZK 1: MS + 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (MS + 2,4-D)

ZK 2: MS + β -Naphthyllessigsäure und Kinetin (MS + NAA/Kinetin)

ZK 3: Picloram-Medium (PC-L2)

Sterilisierte Samen wurden zum Keimen gebracht, aus dem Hypokotyl wurden 2-5 mm lange Stücke herausgeschnitten und für die Bildung von Kalluszellen auf die Nährmedien gebracht. Die Kalli wuchsen auf allen drei Medien nur sehr langsam und wurden zudem nach 6-10 Tagen aufgrund der Bildung phenolischer Substanzen braun. Aus diesem Grunde mussten am Anfang alle 1 bis 2 Wochen kleine Teile der Kalli auf neue Medien überimpft werden. Dies konnte später auf alle 4 Wochen reduziert werden. Die Kalli erreichten nach 2 Monaten eine Größe, die es zuließ, Stücke von bis zu 5 mm Größe auf das entsprechende Suspensionsmedium zu überimpfen (Abb. 52). Auch hier war das Wachstum sehr langsam. 10 ml Suspensionsmedium wurden alle 4-8 Wochen in frisches Suspensionsmedium gegeben, um die Zellen mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen.

Zur Isolierung der AGPs wurden die Suspensionen im Abstand der jeweiligen Subkultivierung abgeerntet (Abb. 53). In der zuerst durchgeführten EtOH-Fällung war die AGP-Konzentration allerdings zu gering, um eine direkte Fällung mit dem β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz durchzuführen. Das Pellet wurde deshalb in Aqua dem. resuspendiert, und unlösliche Bestandteile wurden abfiltriert. Dieser Reinigungsschritt reichte aus, die Arabinose- und Galactose-Konzentrationen so zu erhöhen, dass eine Fällung mit dem Yariv-Reagenz durchgeführt werden konnte (Abb. 54).

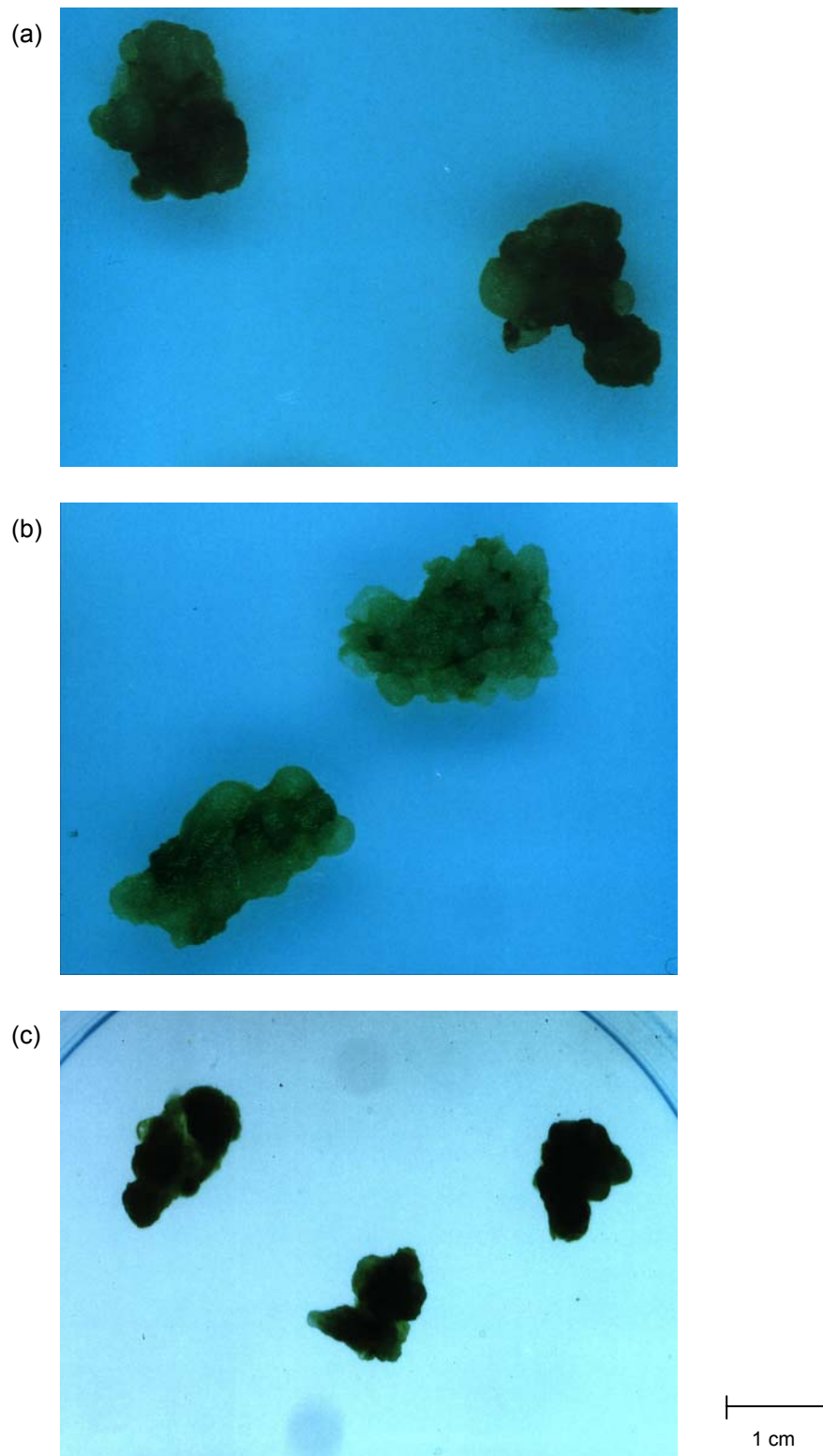


Abb. 52: Kalluskulturen von *Baptisia australis*:

(a) ZK 1: MS + 2,4-D, (b) ZK 2: MS + NAA/Kinetin, (c) ZK 3: PC-L2.

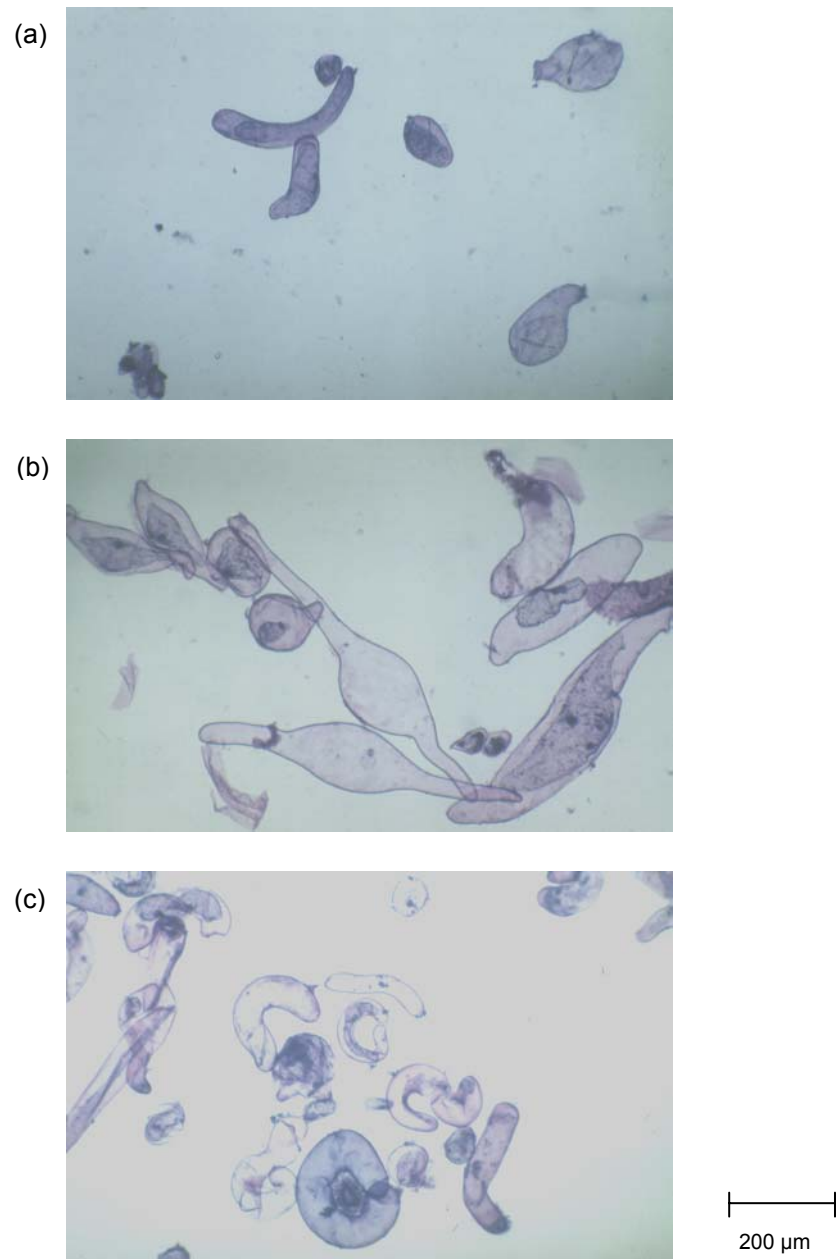


Abb. 53: Suspensionskulturen von *Baptisia australis*:
(a) ZK 1: MS + 2,4-D, (b) ZK 2: MS + NAA/Kinetin, (c) ZK 3: PC-L2; Anfärbung mit Toluidinblau.

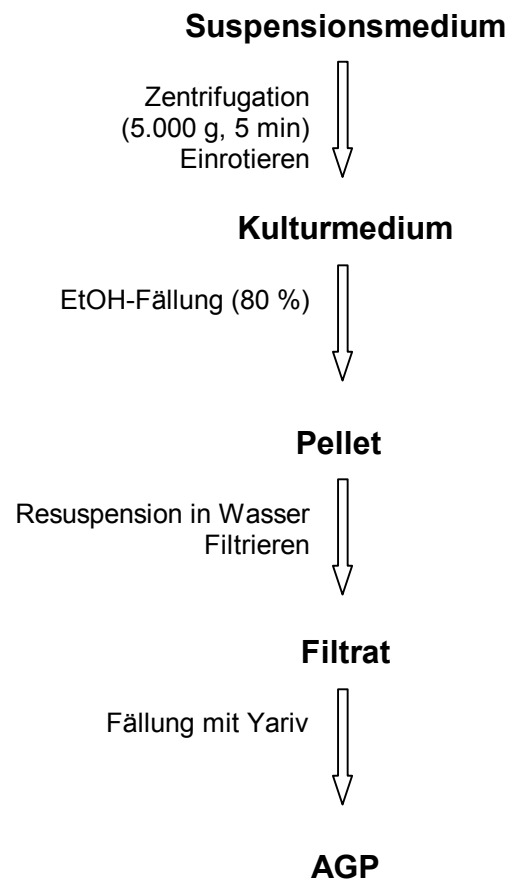


Abb. 54: Schema für den Isolierungsweg von AGPs aus *Baptisia australis* Zellkulturen.

Die AGP-Ausbeuten variierten je nach verwendetem Suspensionsmedium. Die höchste Ausbeute wurde im MS + 2,4-D-Medium mit 5,3 %(m/V) erzielt. Aus dem MS + NAA/Kinetin-Medium konnten 4,7 %(m/V) AGP und aus dem PC-L2-Medium 3,1 %(m/V) AGP isoliert werden.

III.1. Neutralzuckerzusammensetzungen der EtOH-Fällungen nach Filtration und der isolierten AGPs

Die Identifizierung und quantitative Erfassung der neutralen Monosaccharide einzelner Isolierungsstufen erfolgte gaschromatographisch nach BLAKENEY et al. (1983). Nach Hydrolyse des Polysaccharids mit TFA wurden die entstandenen Monosaccharide reduziert, zu leicht flüchtigen Alditolacetaten derivatisiert und die Derivate gaschromatographisch vermessen (Abb. 56). Die Bestimmung der einzelnen Monosaccharid-Konzentrationen erfolgte nach der Methode des internen Standards (myo-Inositol).

In Tab. 26 und Abb. 55 werden die Ergebnisse der Acetylierungsanalysen der Ethanol- und Yariv-Fällungen aus einzelnen Zellkulturen dargestellt.

Tab. 26: Tabellarische Darstellung der Neutralzuckerzusammensetzungen einzelner Fraktionen der AGP-Isolierung aus den Zellkulturen ZK 1, ZK 2 und ZK 3 von *Baptisia australis* (Angaben in %(m/m)).

Neutralzucker	ZK 1 EtOH	ZK 1 AGP	ZK 2 EtOH	ZK 2 AGP	ZK 3 EtOH	ZK 3 AGP
Rha	3,8	-	3,8	-	2,9	-
Ara	26,2	48,4	27,7	37,8	35,2	56,1
Xyl	10,3	-	12,3	2,3	7,2	-
Man	9,5	4,8	4,6	3,5	4,1	2,3
Gal	26,7	44,8	25,0	49,1	33,3	40,1
Glc	23,5	2,0	26,7	7,3	17,4	1,6
Ara:Gal	1:1	1:0,9	1:0,9	1:1,3	1:0,9	1:0,7

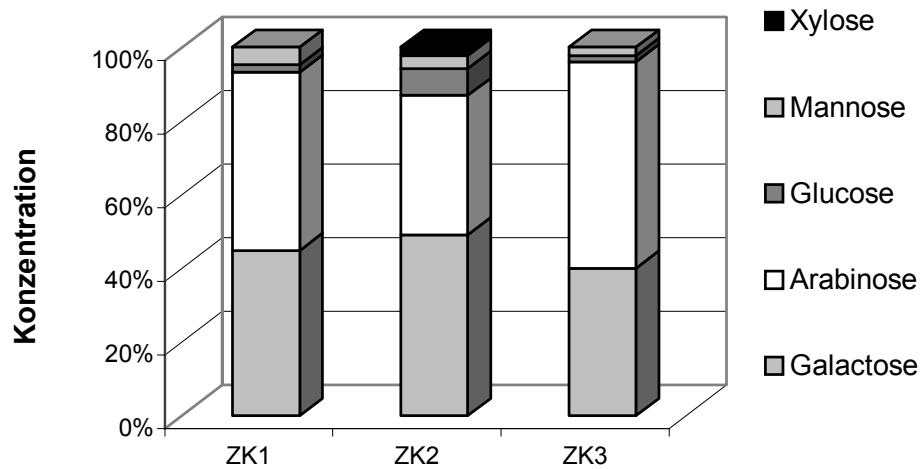
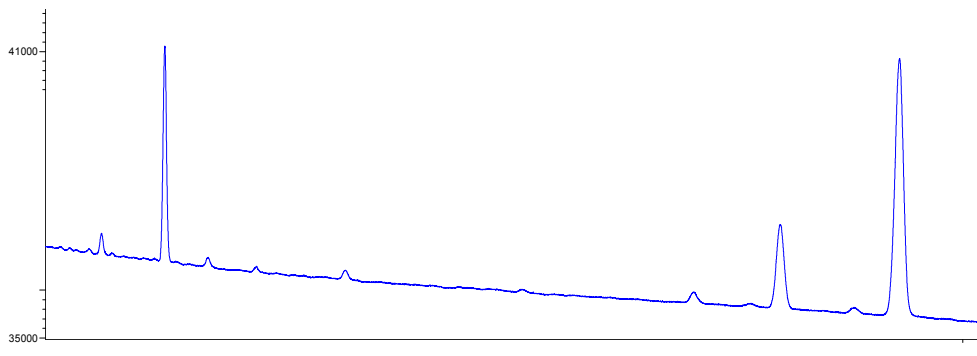


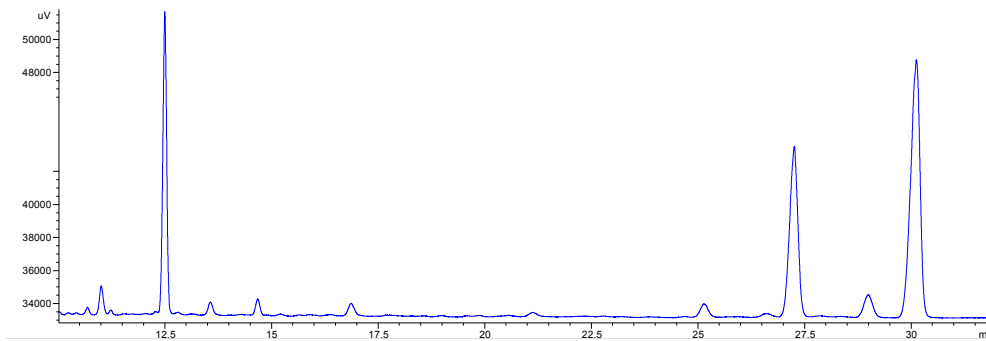
Abb. 55: Graphische Darstellung der Neutralzuckerzusammensetzungen von isolierten AGPs aus den Zellkulturen ZK 1, ZK 2 und ZK 3 von *Baptisia australis*.

In den Ethanol-Fällungen der Suspensionsmedien waren nach der Dialyse Arabinose, Galactose und Glucose die dominierenden Monosaccharide. Arabinose und Galactose kamen im Verhältnis 1:1 bzw. 1:0,9 vor. Daneben waren Xylose, Mannose und Rhamnose vorhanden. Nach Fällung mit Yariv-Reagenz überwogen Arabinose und Galactose mit über 80 bzw. 90 % der Neutralzucker. Die Glucose-Konzentration hatte sich stark verringert, während Xylose nur noch in geringer Konzentration in ZK 2 und Rhamnose gar nicht mehr in den isolierten AGPs vorhanden war. Das Ara-Gal-Verhältnis der drei AGPs unterschied sich, wobei das AGP aus ZK 2 mit einem Verhältnis von 1:1,3 dem *Baptisia tinctoria*-AGP aus der Wurzel am ähnlichsten war.

ZK 1



ZK 2



ZK 3

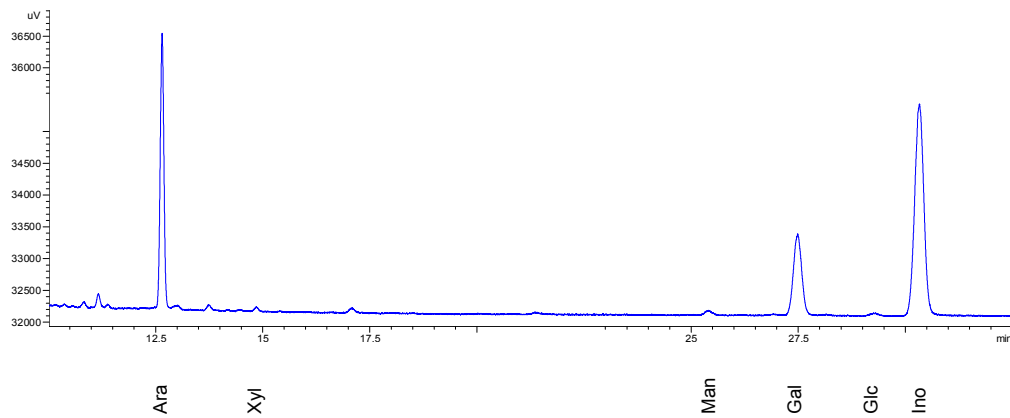


Abb. 56: Gaschromatogramme der AGPs aus *Baptisia australis* ZK 1, ZK 2 und ZK 3 nach Derivatisierung der Neutralzucker zu Alditolacetaten.

III.2. Uronsäurebestimmungen (Gesamtgehalt)

Die Bestimmung des Uronsäuregehaltes erfolgte mit der kolorimetrischen Methode von BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN (1973). Eine Mischung aus gleichen Massenteilen von Galacturon- und Glucuronsäure wurde zur Erstellung einer Kalibriergeraden verwendet. Die Ergebnisse der Bestimmung sind für die einzelnen AGPs in Tab. 27 dargestellt.

Tab. 27: Uronsäuregehalt der AGPs aus den Zellkulturen ZK 1, ZK 2 und ZK 3 von *Baptisia australis*.

Zellkultur	Uronsäuregehalt
ZK 1 (MS + 2,4-D)	9,3 %
ZK 2 (MS + NAA/Kinetin)	5,2 %
ZK 3 (PC-L2)	14,9 %

Den höchsten Uronsäure-Gehalt weist ZK 3 mit 14,9 % auf, gefolgt von ZK 1 mit 9,3 %. Der Uronsäure-Gehalt von ZK 2 liegt mit 5,2 % in der Größenordnung des Uronsäure-Gehaltes von *Baptisia tinctoria*-AGP aus der Wurzel (6,8 %).

III.3. Bestimmung der Bindungstypen in den Kohlenhydratanteilen

III.3.1. Methylierungsanalysen

Für die Bestimmung der glykosidischen Bindungstypen in den AGPs wurden die Ergebnisse der Methylierungsanalysen der isolierten AGPs herangezogen. Abb. 57 zeigt die Totalionenchromatogramme (TIC) der PMAAs der aus Suspensionskulturmedien isolierten *Baptisia australis*-AGPs, die Tab. 28 bis 30 liefern die Werte für die molekularen Anteile der Zuckerbausteine unterschiedlichen Bindungstyps.

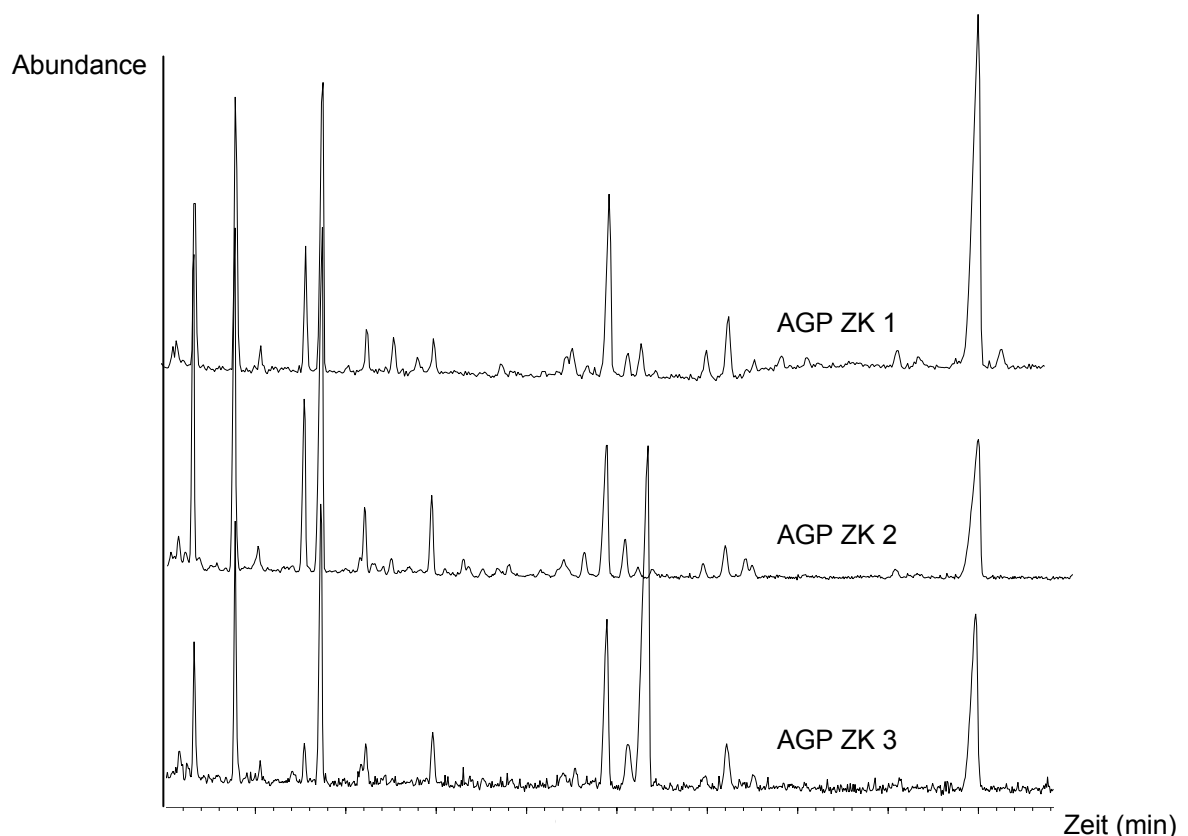


Abb. 57: TICs der PMAAs von *Baptisia australis*-AGPs aus ZK 1, ZK 2 und ZK 3 nach GC-Trennung.

Tab. 28: Bindungstyp-Analyse des AGPs aus *Baptisia australis* ZK 1 (MS + 2,4-D).

Monosaccharid und Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil (mol%)
1-Arabinose(f)	10,8	11,4
1-Arabinose(p)	11,7	19,0
1,2-Arabinose(f)	13,3	6,0
1,3-Arabinose(f)	13,7	21,0
1,5-Arabinose(f)	14,7	2,5
1-Galactose(p)	16,2	1,4
1-Glucose(p)	15,3	1,9
1,3-Galactose(p)	20,2	14,0
1,4-Galactose(p)	20,9	1,2
1,6-Galactose(p)	22,9	3,2
1,3,6-Galactose(p)	28,5	18,4
Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungspunkten = 1:0,54		

Tab. 29: Bindungstyp-Analyse des AGPs aus *Baptisia australis* ZK 2 (MS + NAA/Kinetin).

Monosaccharid und Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil (mol%)
1-Arabinose(f)	10,7	14,6
1-Arabinose(p)	11,6	16,3
1,2-Arabinose(f)	13,13	8,6
1,3-Arabinose(f)	13,5	21,9
1,5-Arabinose(f)	14,5	3,3
1-Galactose(p)	16,0	5,7
1,3-Galactose(p)	19,8	8,0
1,4-Galactose(p)	20,2	2,4
1,6-Galactose(p)	22,4	2,0
1,3,6-Galactose(p)	28,0	17,2
Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungspunkten = 1:0,47		

Tab. 30: Bindungstyp-Analyse des AGPs aus *Baptisia australis* ZK 3 (PC-L2).

Monosaccharid und Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil (mol%)
1-Arabinose(f)	10,7	6,5
1-Arabinose(p)	11,6	13,3
1,2-Arabinose(f)	13,2	2,9
1,3-Arabinose(f)	13,5	17,8
1,5-Arabinose(f)	14,5	2,8
1-Galactose(p)	15,9	4,8
1,3-Galactose(p)	19,8	14,7
1,4-Galactose(p)	20,3	5,9
1,6-Galactose(p)	22,4	5,0
1,3,6-Galactose(p)	27,9	26,4

Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungspunkten
= 1:1,07

Das Chromatogramm des AGPs aus ZK 3 zeigt im Gegensatz zu den anderen Proben einen auffälligen Peak bei einer Retentionszeit von 20,6 min. Eine Auswertung des Massenspektrums lässt auf die Anwesenheit einer großen Menge Penta-Acetyl-Arabinose schließen, die durch eine nicht vollständige Methylierung der Probe entstanden sein muss.

Aus den Tab. 28 bis 30 ergeben sich gerundet die in Tab. 31 aufgeführten molekularen Verhältniszahlen der häufigsten Bausteine der AGPs.

Tab. 31: Molekulare Verhältnisse der PMAAs in den AGPs aus ZK 1, ZK 2 und ZK 3 von *Baptisia australis*.

Monosaccharid und Bindungstyp	AGP-ZK 1	AGP-ZK 2	AGP-ZK 3
1-Arabinose(f)	11	15	7
1-Arabinose(p)	19	16	13
1,2-Arabinose (f)	6	9	3
1,3-Arabinose(f)	21	22	18
1,5-Arabinose(f)	3	3	3
1-Galactose(p)	1	6	5
1-Glucose(p)	2	-	-
1,3-Galactose(p)	14	8	15
1,4-Galactose(p)	1	2	6
1,6-Galactose(p)	3	2	5
1,3,6-Galactose(p)	18	17	26

Die Untersuchungen der AGPs aus Zellkulturmedien lassen folgende Aussagen zu:

1. Hauptmonosaccharide der AGPs aus *Baptisia australis* Zellkulturen sind Galactose und Arabinose. Daneben kommen bei ZK 1 geringe Mengen von Glucose vor.
2. Das Polysaccharid-Gerüst besteht aus 1,3-Galactose(p)-Einheiten mit Verzweigungspunkten in Position 6; in den Seitenketten überwiegt 1,3-Arabinose(f) neben 1,2-Arabinose(f), 1,5-Arabinose(f), 1,6-Galactose(p) und 1,4-Galactose(p). Terminal kommt Arabinose in größerer Menge in pyranosider als in furanosider Form vor, sowie Galactose(p) und Glucose(p) (in ZK 1).
3. Kleine Unterschiede ergeben sich in Abhängigkeit vom Kulturmedium im molekularen Feinbau der isolierten AGPs.

Der Gehalt an 1,2-Arabinose(f) ist in AGP-ZK 2 im Gegensatz zu AGP-ZK 3 erhöht. In AGP-ZK 1 ist die Konzentration terminaler Galactose im Gegensatz zu AGP-ZK 2 und AGP-ZK 3 minimal. Die Konzentration von 1,3-Galactose(p) ist in AGP-ZK 1 und AGP-ZK 3 fast doppelt so hoch wie in AGP-ZK 2.

4. AGP-ZK 3 scheint bei Betrachtung der Werte einen höheren Verzweigungsgrad aufzuweisen als AGP-ZK 1 und AGP-ZK 2. Ein Vergleich des Verzweigungsgrades der einzelnen AGPs ist aufgrund der Tatsache, dass das Verhältnis von Endgruppen und Verzweigungspunkten der AGPs nicht übereinstimmt, jedoch nicht möglich.

III.3.2. Charakterisierung des AGPs aus ZK 1 nach Oxalsäure-Hydrolyse

Mit AGP-ZK 1 wurde eine Oxalsäure-Hydrolyse durchgeführt. Das entstandene Core-Polysaccharid und der Überstand nach Hydrolyse wurden der Methylierungsanalyse unterzogen. Abb. 58 zeigt die erhaltenen Gaschromatogramme der PMAAs. An den entstehenden PMAAs im Überstand kann man erkennen, ob bei der Oxalsäure-Hydrolyse Mono- oder auch Oligosaccharide abgespalten werden: 1-Hexosen und Pentosen entstehen bei Abspaltung eines Monosaccharids am nicht-reduzierenden Ende des Polysaccharid-Anteils, während beim Abspalten von Oligosacchariden auch kettenständige PMAAs wie z.B. 1,3-Hexosen und Pentosen entstehen. Abspaltung von Oligosacchariden am nicht-reduzierenden Ende des Polysaccharids täuschen allerdings kettenständige Zucker vor. Wird also z.B. ein Gal(1→3)Gal-Disaccharid abgespalten entstehen nicht zwei terminale Galactosen, sondern eine terminale und eine 1,3-Galactose. Die Tab. 32 und 33 geben die Ergebnisse der Analysen wieder.

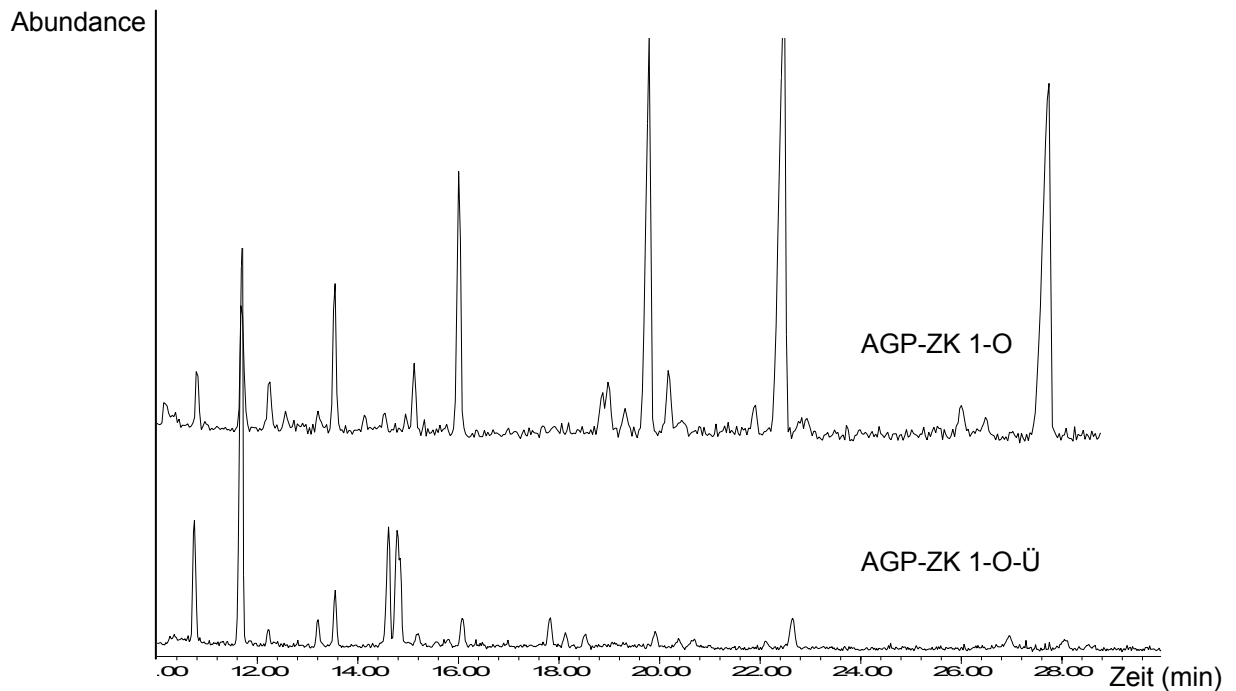


Abb. 58: Darstellung der Methylierungsanalysen von *Baptisia australis*-AGP-ZK 1-O und AGP-ZK 1-O-Ü im TIC .

Tab. 32: Molare Kohlenhydrat-Zusammensetzung des AGPs von *Baptisia australis* aus ZK 1 nach Oxalsäure-Hydrolyse (AGP-ZK 1-O).

Monosaccharid und Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil (mol%)
1-Arabinose(f)	10,9	2,0
1-Arabinose(p)	11,9	4,2
1,3-Arabinose(f)	13,8	4,9
1-Galactose(p)	16,4	9,6
1-Glucose(p)	15,5	1,4
1,3-Galactose(p)	20,4	18,5
1,4-Galactose(p)	20,9	2,2
1,6-Galactose(p)	23,3	31,2
1,3,6-Galactose(p)	28,9	26,1

Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungspunkten
= 1:1,52

Tab. 33: Molare Kohlenhydrat-Zusammensetzung des Überstandes nach Oxalsäure-Hydrolyse des AGPs aus *Baptisia australis* ZK 1 (AGP-ZK 1-O-Ü).

Monosaccharid und Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil (mol%)
1-Arabinose(f)	10,8	14,3
1-Arabinose(p)	11,7	59,5
1,3-Arabinose(f)	13,6	5,2
1,5-Arabinose(f)	14,6	13,6
1-Galactose(p)	16,1	2,7
1,3-Galactose(p)	19,9	1,8
1,6-Galactose(p)	22,7	3,0

Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungspunkten
= 1:0

Nach Oxalsäure-Hydrolyse reduzierte sich im AGP die Menge an terminaler Arabinose sowohl in furanosider als auch in pyranosider Form. 1,2- und 1,5-Arabinose ließen sich im Core-Polysaccharid gar nicht mehr nachweisen. Der Gehalt an 1,3-Arabinose reduzierte sich ebenfalls stark. Diese PMAAs erschienen zum großen Teil im Überstand in höheren Konzentrationen. Durch das Vorkommen von 1,5- und 1,3-Arabinose ließ sich erkennen, dass bei der Oxalsäure-Hydrolyse nicht nur Monosaccharide, sondern auch Oligosaccharide abgespalten wurden. Im Überstand waren zusätzlich geringe Mengen von terminaler, 1,3- und 1,6- Galactose nachzuweisen.

Bedingt durch die Abnahme von Arabinosen in den Seitenketten stiegen die Konzentrationen von terminaler Galactose und 1,6-Galactose im Core-Polysaccharid stark an. 1,4-Galactose blieb nahezu unverändert. Die starke Zunahme von 1,6-Galactose lässt sich durch Abspaltung von Arabinosen in Position 3 aus 1,3,6-Galactose erklären.

Tab. 34: Molare Kohlenhydrat-Zusammensetzung des AGPs aus *Baptisia australis* ZK 1 (AGP-ZK 1), des AGPs nach Oxalsäurehydrolyse (AGP-ZK 1-O) und des entstandenen Überstandes (AGP-ZK 1-O-Ü).

Monosaccharid und Bindungstyp	AGP-ZK 1	AGP-ZK 1-O	AGP-ZK 1-O-Ü
1-Arabinose(f)	11	2	14
1-Arabinose(p)	19	4	60
1,2-Arabinose (f)	6	-	-
1,3-Arabinose(f)	21	5	5
1,5-Arabinose(f)	3	-	14
1-Galactose(p)	1	10	3
1-Glucose(p)	2	1	-
1,3-Galactose(p)	14	19	2
1,4-Galactose(p)	1	2	-
1,6-Galactose(p)	3	31	3
1,3,6-Galactose(p)	18	26	-

Mit dem Überstand der Oxalsäure-Hydrolyse wurde zusätzlich eine Acetylierung durchgeführt. Die Acetylierung erfolgte ohne vorherige Hydrolyse mit TFA.

Es ergab sich eine Konzentration von 93 % Arabinose und 7 % Galactose, was darauf hindeutet, dass durch Oxalsäure nicht nur Arabinose-Monomere sondern zu einem geringen Teil auch Galactose-Monomere abgespalten wurden.

III.4. Quantitative Aminosäure-Bestimmung (HPLC)

Eine quantitative Bestimmung der Aminosäuren erfolgte nach Hydrolyse der AGPs mit Hilfe der HPLC. Die Ergebnisse der Bestimmung sind in Tab. 35 aufgeführt.

Tab. 35: Aminosäure-Gehalt der isolierten AGPs aus *Baptisia australis* Zellkulturen (Angaben in %(m/m)).

Aminosäure	<i>Baptisia australis</i> Zellkultur		
	ZK 1	ZK 2	ZK 3
CysA	5,0	0,7	0,2
Asp	8,1	8,5	9,4
Thr	5,3	5,0	4,7
Ser	8,0	8,2	5,9
Glu	7,0	7,6	6,2
Gly	6,0	4,8	4,2
Ala	5,0	6,3	4,7
Cys	0,1	0,0	0,2
Val	9,2	9,4	9,7
Met	0,4	0,7	0,5
Ile	3,2	2,8	3,3
Leu	5,2	6,2	7,3
Tyr	1,3	2,7	3,3
Phe	3,5	2,9	4,0
His	7,1	4,1	7,7
Hylys	0,0	0,0	0,0
Lys	4,0	4,1	5,5
Arg	2,2	2,6	2,6
Hyp	2,6	7,8	7,5
Pro	4,3	4,6	7,2

Valin war in allen drei AGPs die Aminosäure mit dem höchsten Gehalt (9-10 %). In höheren Konzentrationen kamen in allen Zellkultur-AGPs Asparaginsäure (8-10 %) und Glutaminsäure (6-8 %) vor. Die Serin-Konzentration war in AGP-ZK 3 (5,9 %) auffallend niedriger als in AGP-ZK 1 (8,0 %) und AGP-ZK 2 (8,2 %). Histidin kam in den AGPs von ZK 1 und ZK 3 in größeren Mengen vor (7-8 %), während Hydroxyprolin in Konzentrationen von 7-8 % in ZK 2 und ZK 3 vorhanden war. Auch Leucin und Prolin kamen in ZK 3 in einer Konzentration von ca. 7 % vor.

III.5. Hydroxyprolin-Bestimmung im AGP der ZK 1

Da ein hoher Hydroxyprolinegehalt ein charakteristisches Merkmal von AGPs ist, wurde er separat von allen anderen Aminosäuren mit einer photometrischen Methode bestimmt. Hydroxyprolin lässt sich selektiv mit einem Oxidationsreagenz und anschließend mit einem Farbreagenz zu einem gefärbten Produkt umsetzen.

Für die Bestimmung wurden 12 mg AGP aus ZK 1 verwendet. Für das AGP aus ZK 1 ergab sich mit dieser Bestimmungsmethode ein Hydroxyprolinegehalt von 1,40 %.

III.6. Testung der Kreuzreaktivität mit monoklonalen Antikörpern

Die Kreuzreaktivität zwischen *Baptisia australis*-AGPs aus Zellkulturen, *Baptisia tinctoria*-AGP aus der Wurzel und *Echinacea purpurea*-AGP aus Presssaft oberirdischer Pflanzenteile wurde im kompetitiven ELISA mit monoklonalen Antikörpern (4B8D3) getestet.

Die aus den Zellkulturen isolierten AGPs zeigten Kreuzreaktivität mit den verwendeten monoklonalen Antikörpern (Abb. 59). Dabei reagierte AGP-ZK 2 am stärksten, AGP-ZK 1 und AGP-ZK 3 zeigten eine annähernd identische Reaktivität.

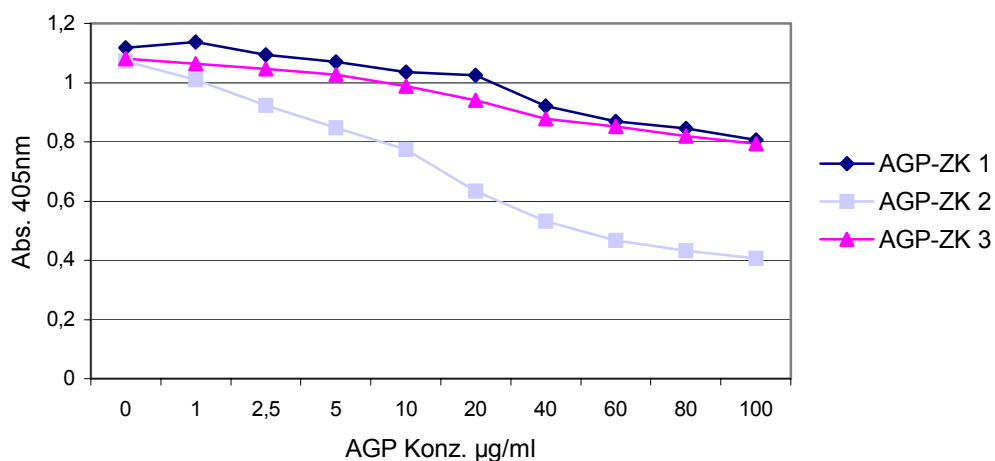


Abb. 59: Reaktivitäten von *Baptisia australis* ZK-AGPs mit monoklonalen Antikörpern (4B8D3).

Im Vergleich mit *Baptisia tinctoria* (Wurzel)- und *Echinacea purpurea*-AGP reagierte *Echinacea purpurea*-AGP am stärksten mit den Antikörpern, AGP-ZK 2 reagierte stärker als *Baptisia tinctoria*-AGP (Abb. 60).

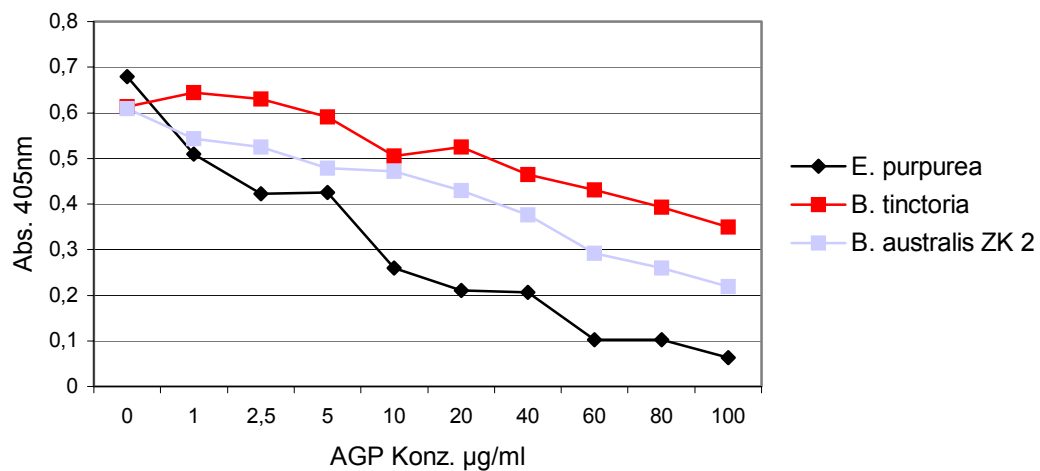


Abb. 60: Reaktivität von *Baptisia australis* ZK2-AGP mit monoklonalen Antikörpern (4B8D3) verglichen mit *Baptisia tinctoria*-AGP (Wurzel) und *Echinacea purpurea*-AGP.

D. Diskussion der Ergebnisse

Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist die Isolierung und Charakterisierung von Arabinogalactan-Proteinen aus getrocknetem Wurzelmaterial von *Baptisia tinctoria* und Suspensionsmedien der Zellkulturen von *Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis*. Zum einen sollte die chemische Zusammensetzung der isolierten Glykoproteine ermittelt werden, wobei der Schwerpunkt auf den Kohlenhydratanteil gelegt wurde, zum anderen eine mögliche Struktur dieser Makromoleküle postuliert werden. Interessant ist dabei, inwieweit die isolierten AGPs aus Wurzel- und Zellkulturmaterial von einer Pflanze und AGPs aus Pflanzen derselben Gattung in ihrem chemischen Aufbau übereinstimmen. Ein weiteres Augenmerk galt der Untersuchung der immunologischen Aktivität der isolierten AGPs aus *Baptisia tinctoria* Wurzelmaterial. Extrakte dieser Pflanze werden in Kombination mit anderen immunstimulierenden Pflanzen wie z.B. Echinacea-Arten als Immunstimulanzien verwendet, wobei nicht nur niedermolekularen, sondern gerade auch den hochmolekularen Polysacchariden und Glykoproteinen eine Beteiligung an der immunologischen Aktivität zugesprochen wird. In diesem Zusammenhang wurde die Kreuzreaktivität von *Baptisia tinctoria*- und *Baptisia australis*-AGPs mit mono- und polyklonalen Antikörpern, die gegen *Echinacea purpurea*-AGP gerichtet sind, getestet.

Im Folgenden werden die für die Drogen erhaltenen Ergebnisse vergleichend diskutiert und bisher veröffentlichten Daten gegenübergestellt.

Gewinnung der AGPs

Pflanzen bilden zahlreiche unterschiedliche Glykoproteine, die u.a. in die Zellwand oder Zellmembran eingebaut oder in Interzellularräume abgegeben werden. Die Isolierung eines Glykoproteins ist aufgrund der Heterogenität dieser Substanzklasse nicht einfach und erfordert zahlreiche Trennschritte. Ein großer Teil der Arabinogalactan-Proteine, die eine Untergruppe der Glykoproteine und dort wiederum der Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine darstellen, hat den Vorteil, dass

sie sich gezielt mit einem Farbstoff, dem Yariv-Reagenz, fällen lassen, soweit sie in ausreichend hoher Konzentration in wässriger Lösung vorliegen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Anreicherung der AGPs aus einem wässrigen Extrakt von *Baptisia tinctoria* Wurzelmaterial durch eine Tangentialfluss-Filtration und anschließende Dialyse des Rohextraktes erreicht, während in den Zellkulturmedien von *Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis* bereits eine Fällung aus dem Suspensionsmedium mit 80 %igem Ethanol mit anschließender Dialyse oder Filtration zu einer ausreichenden AGP-Konzentration für eine Yariv-Fällung führte.

Mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie konnte eine Auftrennung der AGPs aus Wurzelmaterial erreicht werden. Die Auswertung wurde sowohl über einen RI-Detektor als auch über MALLS vorgenommen. MALLS hat den Vorteil, dass durch Messung der Lichtstreuung direkt das absolute Molekulargewicht bestimmt werden kann, während bei Auswertung über den RI-Detektor eine Kalibrierung über Referenzsubstanzen, die meist strukturelle Unterschiede zur untersuchten Substanz aufweisen, nötig ist. Da das Volumen eines Polymers nicht nur von seinem Molekulargewicht, sondern auch von seiner chemischen Zusammensetzung und Molekülstruktur abhängig ist, wird bei der Kalibrierung mit Pullulanen kein absolutes Molekulargewicht erhalten. In diesem Fall wird das hydrodynamische Volumen gemessen, das zusätzlich von experimentellen Parametern wie z.B. dem verwendeten Lösungsmittel abhängig ist.

Für das AGP aus *Baptisia tinctoria* Wurzel wurden zwei Fraktionen erhalten, die individuell aufgefangen und durch Dialyse entsalzt wurden. Fraktion 2 stellte hierbei den überwiegenden Anteil mit 90 % dar, während die hochmolekulare Fraktion 1 nur 10 % des Ausgangsmaterials bildete. Fraktion 1 war polydispers, was die Auswertung durch MALLS zeigte. Das Molekulargewicht nahm von Beginn bis Ende des Peaks über eine Zehnerpotenz ab. Die MALLS-Auswertung ergab einen Durchschnittswert von $2,0 \times 10^8$ Da. Dieser Wert ist um mehr als den Faktor 100 größer als der errechnete Wert über die Pullulan-Kalibrierung. Fraktion 2 ist homogen, die MALLS-Auswertung zeigte ein konstantes Molekulargewicht von 140.000 Da über die gesamte Peakbreite. Für das hydrodynamische Volumen im Pullulan-Vergleich ergab sich ein Molekulargewicht von 56.000 Da. Die Diskrepanz zwischen diesen Messungen lässt sich zumindest teilweise durch die räumliche

Struktur der Moleküle erklären. Die isolierten AGPs sind aufgrund der hochverzweigten Struktur wesentlich kompakter als lineare Pullulane und zeigen somit bei gleichem Elutionsvolumen ein höheres Molekulargewicht.

Eine noch stärkere Auftrennung der AGPs aus Wurzelmaterial wurde auf einer RP-HPLC-Säule erreicht, auf der insgesamt 12 Fraktionen isoliert wurden. Der größte Teil der ursprünglichen AGPs konnte in den ersten beiden Fraktionen wiedergewonnen werden. Das Chromatogramm zeigte deutlich, dass die ersten beiden Fraktionen zusätzlich aus weiteren Unterfraktionen bestanden. Eine weitere Trennung wurde jedoch aufgrund der fehlenden Basislinientrennung nicht als sinnvoll erachtet. Das Trennprinzip für hydrophile Glykoproteine auf dieser Säule ist unklar. Hydrophile bzw. hydrophobe Eigenschaften des Probenmaterials müssen für die Fraktionierung entscheidend sein, wie z.B. Gehalt und Zusammensetzung des Polysaccharid-Anteils oder Vorkommen und Anordnung von Uronsäuren. Die Biosynthese von Polysacchariden läuft nicht nach einem Matrizenmechanismus ab wie die Proteinbiosynthese, was zu kleinen Unterschieden im Polysaccharid-Anteil der einzelnen AGP-Moleküle und somit zu einer entsprechenden Trennung am Säulenmaterial führen kann. Die Neutralzuckerzusammensetzung der beiden ersten Fraktionen zeigte z.B. ein deutlich unterschiedliches Ara-Gal-Verhältnis. Möglicherweise spielen Verzweigungsgrad und Uronsäure-Gehalt des Polysaccharid-Anteils eine wichtige Rolle bei der Auftrennung der beiden Fraktionen.

Eine spezifische Prüfung auf AGP (Reaktion mit Yariv-Reagenz) führte nur in den ersten 8 isolierten Fraktionen zu einer positiven Reaktion. Das Aussehen und die Intensität der im Gel entstandenen Präzipitationsbanden war unterschiedlich. Einerseits kann auf eine unterschiedliche AGP-Konzentration in den Fraktionen geschlossen werden, andererseits können Form und Aussehen der Banden auf voneinander abweichende Strukturen der AGP-Fraktionen zurückgeführt werden.

Für die Isolierung von AGPs aus Zellkulturen von *Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis* wurden Nährmedien verwendet, die sich hauptsächlich durch die verwendeten Phytohormone und Konzentrationen der Vitamine und anorganischen Bestandteile unterscheiden. Phytohormone lassen sich in drei Gruppen einteilen: Auxine, Cytokinine und weitere wie z.B. Gibberellin- und Abscisinsäure (GAMBORG

und PHILLIPS, 1995). Auxine wie 2,4-D und NAA induzieren Zellteilung und fördern Zellwachstum. Sie werden zur Initiierung von Kallusgewebe eingesetzt und ganz speziell auch zur Neubildung von Wurzeln. Picloram, ein Herbizid, hat sich, in entsprechenden Konzentrationen verwendet, speziell bei Fabaceen als effektives Auxin erwiesen (PHILLIPS und COLLINS, 1979). Cytokinine wie Kinetin und BAP stimulieren ebenfalls die Zellteilung. Zusätzlich kommt es zu einer Förderung der Zelldifferenzierung und Sprossbildung. Auxine und Cytokinine werden oft in Kombination verwendet, um gewünschte Effekte zu erzielen. Bei richtiger Kombination und Kultivierung können ganze Pflanzen regeneriert werden. Die verwendeten Aminosäuren haben zusätzlich einen Einfluss auf Wachstum und Differenzierung der Zellen.

In Abhängigkeit von den eingesetzten Phytohormonen und Vitaminen unterschieden sich die Zellen der Kulturen von *Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis* in Form und Größe. Zellen von *Baptisia australis* in MS + 2,4-D-Medium (ZK 1) erreichten eine Größe von bis zu 500 µm und hatten überwiegend eine runde Form neben wenigen langgestreckten Zellen. Zellen in PC-L2-Medium (ZK 3) konnten dieselbe Größe erreichen, waren zum großen Teil aber etwas kleiner (bis zu 300 µm). Diese Zellen waren überwiegend langgestreckt, und es fiel besonders ihre gebogene Form auf. Im MS-Medium mit NAA und Kin (ZK 2) als Wachstumsregulatoren erreichten die Zellen eine Größe von bis zu 1000 µm. Die Zellen besaßen meist einen bauchigen Hauptkörper mit schmalen Fortsätzen an ein oder zwei Enden. Die Zellen von *Baptisia tinctoria* im MS + NAA/Kinetin-Medium entsprachen in Aussehen und Form den *Baptisia australis*-Zellen in dem gleichen Medium, waren generell aber kleiner (bis zu 750 µm). Möglicherweise wird die Ausbildung der verschiedenen Zellformen durch AGPs verursacht, da ihnen eine Beteiligung an der Differenzierung von Zellen zugesprochen wird. Phytohormone sind an der Aktivierung von Genen beteiligt, wobei unterschiedliche Phytohormone möglicherweise unterschiedliche Genabschnitte aktivieren. Eine Aktivierung verschiedener AGP-Genabschnitte könnte zur Bildung strukturell unterschiedlicher AGPs führen, die wiederum einen Einfluss auf die Form der Zelle haben könnten.

Die AGP-Ausbeuten aus den einzelnen Suspensionsmedien korrelierten nicht mit der Zellgröße. Es ist eher anzunehmen, dass ein Zusammenhang zwischen Zellmasse

und AGP-Ausbeute besteht. Das Wachstum der Kulturen wurde allerdings nicht durch Bestimmung der Zellmassen überprüft. Einziges Kriterium zur Beurteilung des Wachstums war der Abstand der Subkultivierung, die aufgrund optischer Parameter bei ZK 1 und ZK 2 von *Baptisia australis* nach 4 Wochen erfolgte, bei ZK 3 von *Baptisia australis* nach 8 Wochen und bei *Baptisia tinctoria* nach frühestens 8 Wochen.

Zusammensetzung und Struktur des Kohlenhydratanteils

Nach Hydrolyse des Polysaccharid-Anteils der AGPs mit TFA wurden die entstandenen Monosaccharide reduziert und zu leicht flüchtigen Alditolacetaten derivatisiert. Mit dieser Hydrolyse-Methode können fast alle glykosidischen Bindungen vollständig gespalten werden, ohne dass dabei säurelabile Zucker wie Furanosen für die Analytik verloren gehen (ALBERSHEIM et al., 1967). Ein Nachteil der Methode ist, dass Aldobiuronsäuren nicht vollständig gespalten werden und sich der nachfolgenden Analytik entziehen. Die anschließende Derivatisierung der Monosaccharide kann durch Überführung in Methylether (BISHOP, 1964), Aldonitrilacetate (DMITRIEV et al., 1971), O-Trifluoracetyl-O-Methyl-Alditole (JANECEK et al., 1979), Trimethylsilylether (KOPP et al. 1981) oder Alditolacetate (BLAKENEY et al., 1983) erfolgen. Gewählt wurde hier die Acetylierungsmethode nach vorheriger Reduktion der Neutralzucker. Die ebenfalls gebräuchliche Derivatisierungsmethode ist die Überführung der Monosaccharide in Trimethylsilylether, die aber den Nachteil hat, dass pro Zucker mehrere Signale durch Bildung der verschiedenen anomeren Formen bei der Reduktion entstehen. Dies führt bei komplexen Zuckergemischen zu Peaküberlagerungen im Chromatogramm. Uronsäuren werden bei der Acetylierungsmethode allerdings nicht miterfasst, da eine Reduktion der Carbonsäurefunktion unter den gegebenen Reduktionsbedingungen der Acetylierungsmethode nicht möglich ist. Die Uronsäuren wurden daher separat mit anderen Methoden erfasst.

Die Monosaccharid-Zusammensetzungen der aus dem Wurzelmaterial von *Baptisia tinctoria* isolierten AGPs, der GPC- und RP-HPLC-Fraktionen sowie der *Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis* Zellkultur-AGPs werden in Tab. 36 vergleichend

aufgeführt. Die Hauptmonosaccharide aller AGPs sind Galactose und Arabinose, wobei das AGP aus der Zellkultur von *Baptisia tinctoria* ausschließlich aus diesen Neutralzuckern besteht. In kleineren Konzentrationen kommen Glucose, Mannose und Rhamnose im Wurzel-AGP vor. Rhamnose fehlt in den *Baptisia australis*-AGPs, zusätzlich kommen hier Spuren von Xylose im AGP der ZK 2 von *Baptisia australis* vor. Ein Vergleich der Ara-Gal-Verhältnisse in den Molekülen zeigt eine hohe Galactose-Konzentration im Wurzel-AGP. Die Ara-Gal-Verhältnisse in den Zellkultur-AGPs von *Baptisia australis* schwanken stark. AGP-ZK 1 zeigt ein ausgeglichenes Ara-Gal-Verhältnis, während Arabinose in AGP-ZK 3 überwiegt. Das Ara-Gal-Verhältnis von AGP-ZK 2 entspricht dem des aus der Zellkultur von *Baptisia tinctoria* isolierten AGPs. Beide AGPs besitzen einen höheren Galactose-Anteil. Zusätzlich ergeben sich Unterschiede im Uronsäure-Gehalt der Zellkultur-AGPs. Man kann erkennen, dass eine geringere Galactose-Konzentration mit einer Zunahme der Uronsäure-Konzentration korreliert. Der Uronsäure-Gehalt des AGPs aus *Baptisia tinctoria* Wurzel entspricht am ehesten dem von AGP-ZK 2 aus *Baptisia australis* Zellkulturen.

Die beiden bei der GPC erhaltenen Fraktionen des aus dem Wurzelmaterial von *Baptisia tinctoria* isolierten AGPs zeigen trotz stark differierender Molekulargewichte chemische Homogenität im Kohlenhydratanteil. Dafür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Betrachtet man die in der Literatur erwähnten möglichen Strukturen von AGPs, so geht man von einem Protein-Backbone aus, an das Oligo- und Polysaccharide kovalent geknüpft sind. Wie die AGP-Biosynthese tatsächlich abläuft, ist nicht geklärt. Geht man davon aus, dass der Proteinanteil das Startermolekül darstellt, können die Zuckerketten im Glykoprotein durch Verknüpfung von Oligo-, Polysacchariden oder auch Monosacchariden einerseits mit dem Protein und auch miteinander entstehen. Die Anzahl der Verknüpfungen kann hierbei variieren, so dass am Ende in beiden Fraktionen das gleiche Protein-Backbone resultieren würde, an das unterschiedlich große Polysaccharid-Anteile geknüpft wären. Beide Fraktionen hätten das gleiche Protein-Backbone, in der hochmolekularen Fraktion wäre der Proteinanteil im Molekül allerdings wesentlich geringer. Strukturell kann der Kohlenhydratanteil in beiden Fraktionen gleich aufgebaut sein. Andererseits können beide Fraktionen unterschiedlich aufgebaute

und in der Größe variierende Proteinanteile besitzen, deren Synthese durch Aktivierung unterschiedlicher Gene codiert wird, wobei beide Proteine wiederum mit einem chemisch homogenen Polysaccharid-Anteil verknüpft sind.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Homogenität des Polysaccharid-Anteils in beiden GPC-Fraktionen wäre, dass die niedermolekulare Fraktion 2 ein Strukturelement der hochmolekularen Fraktion 1 darstellt. Die niedermolekulare GPC-Fraktion könnte einerseits aus Saccharid-Blöcken bestehen, die bei kovalenter Verknüpfung mit dem Protein die hochmolekulare Fraktion bilden, andererseits kann die niedermolekulare Fraktion kleinere AGP-Moleküle darstellen, die durch Aggregation die hochmolekulare Fraktion bilden. Die Polysaccharid-Komponenten bestimmter Larix- und Acacia-Arten zeigen z.B. eine Zusammensetzung aus Fraktionen unterschiedlicher Molekulargewichte, die ein Mehrfaches des Molekulargewichtes eines Grundmoleküls darstellen (PRESCOTT et al., 1995; CHURMS et al., 1977; PONDER und RICHARDS, 1997).

Würde es sich beim Baptisia-AGP bei der niedermolekularen Fraktion um einen Polysaccharid-Baustein des Gesamtmoleküls handeln, müsste dieser proteinfrei sein, während nur die hochmolekulare Fraktion proteinhaltig sein würde. Da eine Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes in beiden Fraktionen zu einem eindeutig positiven Ergebnis führte, scheidet diese Interpretationsmöglichkeit aus. Es ist in diesem Fall also einerseits möglich, dass in beiden Fraktionen entweder das gleiche Protein als Grundgerüst vorkommt oder unterschiedliche Proteine die Backbones bilden. In beiden Fällen wäre aber an das jeweilige Protein ein möglicherweise unterschiedlich großer, aber chemisch homogener Kohlenhydrat-Anteil kovalent gebunden. Als weitere Möglichkeit kann es sich beim Baptisia-AGP trotz dissoziierender Trennbedingungen bei der GPC bei der hochmolekularen Fraktion um einen geringen Anteil an AGP-Aggregaten der niedermolekularen Fraktion handeln. Eine nähere Untersuchung des Proteinanteils der beiden Fraktionen hinsichtlich Proteingehalt, Aminosäurezusammensetzung und -sequenz würde weitere Hinweise zur Klärung der Frage liefern.

Von den bei der RP-HPLC isolierten AGP-Fraktionen wurden nur F1 und F2 hinsichtlich der Neutralzuckerzusammensetzung untersucht. Während F1 dem ursprünglichen AGP in Zusammensetzung und Ara-Gal-Verhältnis entspricht, zeigt

F2 eine deutlich höhere Arabinose-Konzentration, was zu einem ausgeglichenen Ara-Gal-Verhältnis in dieser Fraktion führt. Mit Hilfe der RP-HPLC konnte also eine AGP-Fraktion isoliert werden, die eine abweichende Zusammensetzung vom ursprünglichen AGP und von GPC gewonnene Fraktionen zeigte. Eine Fraktionierung der ursprünglichen AGPs führt dementsprechend je nach Auswahl des Trennverfahrens zu unterschiedlichen AGP-Fraktionen.

Tab. 36: Monosaccharid-Zusammensetzungen der isolierten AGPs aus *Baptisia tinctoria* Wurzel (BT-Wurzel) und Zellkultur (BT-ZK) und *Baptisia australis* Zellkulturen (BA-ZK); Angaben in %(m/m); einzelner Neutralzuckeranteil bezogen auf 100 % Neutralzucker.

Monosaccharid	BT-Wurzel					BT-ZK	BA-ZK		
	AGP	GPC-F1	GPC-F2	RP-HPLC-F1	RP-HPLC-F2		ZK 1	ZK 2	ZK 3
Rhamnose	3,5	4,1	3,8	4,1	2,6	-	-	-	-
Arabinose	30,7	27,1	31,1	33,8	45,7	43,1	48,4	37,8	56,1
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	2,3	-
Mannose	1,1	5,6	2,4	-	-	-	4,8	3,5	2,3
Galactose	58,7	56,2	57,0	59,6	49,7	56,9	44,8	49,1	40,1
Glucose	5,9	6,4	5,8	2,5	2,0	-	2,0	7,3	1,6
Ara:Gal	1:1,9	1:2,1	1:1,8	1:1,8	1:1,1	1:1,3	1:0,9	1:1,3	1:0,7
Uronsäuren	6,8	n.b.*	n.b.*	n.b.*	n.b.*	n.b.*	9,3	5,2	14,9

* nicht bestimmt

Mit Hilfe der Methylierungsanalyse lassen sich die Bindungstypen im Kohlenhydratanteil der AGPs bestimmen. Die Galactose im AGP-Molekül aus Baptisiawurzel kommt demzufolge terminal, in 1,3-, 1,6- und 1,3,6-Verknüpfung vor. Der hohe Gehalt an 1,3,6-Galactose (ca. 30 %) lässt auf einen hohen Verzweigungsgrad der AGPs schließen, so dass Verzweigungspunkte im Molekül auch benachbart sein können (Abb. 61, **4**). Arabinose kommt terminal als nicht-reduzierender Zucker hauptsächlich in furanosider Form, in geringeren Mengen aber auch in pyranosider Form vor (Abb. 61, **1** und **5**). Die Seitenketten enthalten 1,5-

glykosidisch verknüpfte Arabinose in furanosider Form neben 1,3-Arabinose. Geringe Mengen endständiger Rhamnose, Glucose und Glucuronsäure konnten identifiziert werden. Auffallend an den Analysen ist das Verhältnis von terminalen Zuckern zu Verzweigungen, das bei einigen Analysen doppelt so hohe Mengen endständiger Zucker ergibt. In Polysacchariden müsste sich hier ein ausgeglichenes Verhältnis ergeben. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre in der Struktur der AGPs zu suchen. Prinzipiell können Poly- oder Oligosaccharide am Aufbau der AGPs durch kovalente Bindung an das Protein-Grundgerüst beteiligt sein. Je größer der Anteil an unverzweigten Oligosacchariden ist, desto größer wird der Anteil endständiger Gruppen im Verhältnis zu Verzweigungen. Dagegen spricht allerdings im Fall des Baptisia-AGPs, dass nur in zwei der vier Analysen des Wurzel-AGPs ein Überschuss an terminalen Gruppen gefunden wurde (AGP und AGP-O), während in den beiden anderen Analysen einigermaßen ausgeglichene Verhältnisse von terminalen Gruppen und Verzweigungen gefunden wurden (AGP-U und AGP-OU).

Durch milde saure Hydrolyse mit Oxalsäure wurden fast alle endständigen Arabinosen vom Molekül abgespalten, so dass man das Galactan-Grundgerüst nach Fällung in 80 %igem Ethanol erhielt. Einige wenige terminale Arabinosen ließen sich an diesem Gerüst noch nachweisen. Möglicherweise entstanden diese während der Hydrolyse aus kettenständigen 1,5- oder 1,3-glykosidisch verknüpften Arabinosen durch Abspaltung der benachbarten endständigen Arabinosen (Abb. 61, **1** und **2**). Es wird bei AGPs auch das Vorkommen von 1,5-glykosidisch verknüpften Arabinosen in der Galactan-Hauptkette diskutiert neben 1,6-glykosidisch verknüpfter Galactose, deren Bindungen durch Periodat-Oxidation gespalten werden, so dass Galactan-Gerüste mit einem niedrigeren Molekulargewicht resultieren (CHURMS et al., 1981; BACIC et al. 1987; GANE et al., 1995).

Durch die Zunahme terminaler und 1,6-verknüpfter Galactosen nach milder saurer Hydrolyse und gleichzeitige Abnahme von Verzweigungspunkten kann man darauf schließen, dass die Arabinose-Reste hauptsächlich in Position 3, z.T. auch in Position 6 von Verzweigungspunkten sitzen (Abb. 61, **3** und **8**). Die Konzentration an 1,3-glykosidisch verknüpfter Galactose änderte sich durch die partielle Hydrolyse nicht. Im Überstand findet man fast ausschließlich Arabinose als Monomer sowie geringe Mengen an Galactose. Führt man mit dem Überstand einer Oxalsäure-

Hydrolyse eine TFA-Hydrolyse durch, erhöht sich der Galactose-Anteil, so dass nicht nur Arabinose- und Galactose-Monomere, sondern auch Ara-Gal-Oligomere vom Molekül abgespalten werden. Das würde bedeuten, dass unter den gewählten milden Hydrolysebedingungen ein Abbau nicht nur in den Seitenketten, sondern auch in der Galactose-Hauptkette möglich wäre, da nicht nur die labilen, furanosiden Bindungen gespalten werden. So eine Fragmentierung innerer Galactanketten wurde bereits beim Lolium-AGP beobachtet (ANDERSON et al., 1977) und möglicherweise auch bei zahlreichen AGPs aus *Gummi arabicum* (ANDERSON et al., 1968; ANDERSON und MUNRO, 1969) und Weizen (FINCHER et al., 1974). Zusätzlich wurde hier eine starke Abnahme des Molekulargewichtes der Polymere festgestellt.

Eine weitere Möglichkeit, die Detektion von Galactose im Überstand zu erklären, wäre, dass eine geringe Menge Galactan-Grundgerüst in der ethanolischen Lösung löslich wäre und bei einer anschließenden Acetylierungsanalyse miterfasst werden würde.

Da terminale Glucuronsäure wie auch terminale Rhamnose nach Oxalsäure-Hydrolyse am Galactan-Grundgerüst noch nachweisbar sind, kettenbildende Arabinose-Einheiten aber weitestgehend entfernt sind, kann man auf eine Verknüpfung der Uronsäuren und Rhamnosin mit Galactose schließen (Abb. 61, **6** und **7**). Eine eindeutige Zuordnung der Uronsäuren zum Grundgerüst ist allerdings nicht möglich, da sowohl die Mengen von 1,4- und 1,6- als auch von 1,3,6-Galactose nach der Reduktion der Uronsäuren ansteigen, also alle drei Uronsäure-benachbarte Bestandteile sein könnten.

Aufgrund der ermittelten Daten der Methylierungsanalysen, unterstützt durch die Daten der NMR-Spektren, kann das AGP aus *Baptisia tinctoria* Wurzel eindeutig als Typ-II-AGP nach der Einteilung von ASPINALL (1982) beschrieben werden. Dieser AGP-Typ wird durch eine Hauptkette aus 1,3-Galactose, verzweigt über die OH-Gruppe in Position 6 mit 1,6-Galactose-Einheiten, und endständige Arabinosen oder andere Pentosen und Hexosen in geringerer Konzentration charakterisiert. Variationen im Verzweigungsgrad, der Länge der Seitenketten und das Substitutionsmuster terminaler Gruppen können bestehen. Im *Baptisia*-AGP kommen zusätzlich kettenständige Arabinosen vor.

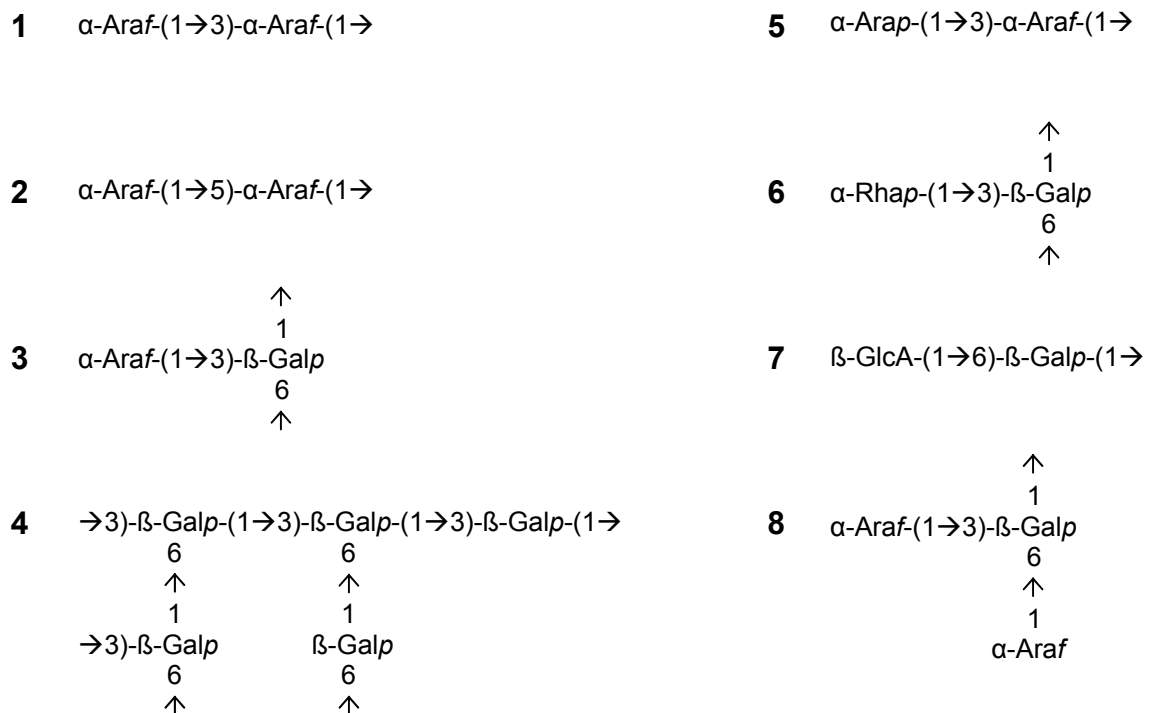


Abb. 61: Strukturmerkmale im Kohlenhydratanteil des Baptisia-AGPs.

Interessanterweise zeigen die partiell abgebauten AGPs nach Abspaltung der Arabinose-Seitenketten und -Endgruppen keine positive Reaktion im Geldiffusionstest gegen β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz. Eine wesentliche Beteiligung der Arabinosen bei der Yariv-Bindung scheint also gegeben zu sein, während die Reduktion der Uronsäuren im Molekül zu keiner verminderten Reaktion mit dem Reagenz führt. Man hat hiermit auch einen Hinweis, dass nicht der Proteinanteil der AGPs, sondern der Kohlenhydratanteil entscheidend für die Reaktion mit dem Reagenz ist. Der genaue Interaktions-Mechanismus bleibt allerdings weiterhin offen. In der Literatur findet man zu diesem Punkt gegensätzliche Aussagen: GLEESON und CLARKE (1979) untersuchten ein AGP aus Pflanzenschleim von *Gladiolus gandavensis*, das trotz Abspaltung terminaler Arabinosen durch α -L-Arabinofuranosidase eine positive Yariv-Reaktion zeigte. Ebenso stellten AKIYAMA et al. (1984) nach Deglykosylierung mit HF und Smith-Abbau eine positive Reaktion mit Yariv-Reagenz fest, während die Reaktion nach alkalischer Hydrolyse der Peptid-Bindungen negativ ausfiel. Sie schlossen daraus, dass der Proteinanteil der AGPs wesentlich für die Präzipitation mit dem Reagenz ist. Im Gegensatz dazu stimmen die hier ermittelten Ergebnisse mit KOMALAVILAS et al. (1991), CLASSEN et al. (2000)

und CLASSEN und BLASCHEK (2002) überein. In diesen Fällen führte die hydrolytische Abspaltung terminaler Arabinosen bzw. größerer Teile des Kohlenhydrat-Anteils zu einer abgeschwächten bzw. fehlenden Reaktion mit Yariv-Reagenz. Die Schlussfolgerung wäre, dass das Yariv-Reagenz sowohl den Protein- als auch den Kohlenhydratanteil von AGPs für die Bindung benötigt (BACIC et al., 2000).

AGPs aus den Zellkulturen von *Baptisia australis* und *Baptisia tinctoria* zeigen grundsätzlich den gleichen Aufbau wie *Baptisia tinctoria* Wurzel-AGP, unterscheiden sich strukturell aber in einigen Merkmalen. Sie besitzen ebenfalls eine Galactan-Hauptkette aus 1,3-Galactose mit Verzweigungen über 1,3,6-Galactose-Gruppen und wenig 1,6-Galactose in Seitenketten (Typ-II-AGP). Die Anzahl der Verzweigungspunkte ist mit ca. 20 % in allen Zellkulturen geringer als im Wurzel-AGP. Auffällige Unterschiede ergeben sich in der Ringform der terminalen Arabinosen, die in den Zellkulturen überwiegend in pyranosider Form vorkommen. Geringe Mengen der pyranosiden Form wurden des Öfteren neben der furanosiden Form detektiert (GOODRUM et al., 2000; CAPEK und KARDOŠOVÁ, 1995). Veröffentlichungen über AGPs mit einem entsprechend hohen Gehalt an terminalen Arabinopyranosen sind aber bisher nicht bekannt.

Arabinose kommt zusätzlich hauptsächlich 1,3-glykosidisch verknüpft vor neben geringeren Mengen an 1,5-Arabinose. AGPs der *Baptisia australis* Zellkulturen wiesen eine nicht unerhebliche Menge an 1,2-glykosidisch verknüpfter Arabinose auf, die in Wurzel-AGPs nicht nachgewiesen werden konnte. Insgesamt ist der Arabinose-Anteil in allen Zellkultur-AGPs höher als in Wurzel-AGPs. Unterschiede zwischen den *Baptisia australis* Zellkulturen ergeben sich durch verschiedene Ara-Gal-Verhältnisse und Uronsäure-Konzentrationen.

Polyklonale und monoklonale Antikörper, die gegen ein AGP aus *Echinacea purpurea* etabliert wurden, zeigten im ELISA eine Kreuzreaktivität mit den aus beiden *Baptisia*-Arten isolierten AGPs. Die Reaktivität des AGPs aus *Baptisia tinctoria* Wurzel mit den polyklonalen Antikörpern war deutlich schwächer als von *Echinacea purpurea*-AGP. Folgende Auswertung bezieht sich auf die Kreuzreaktivität mit dem

monoklonalen Antikörper. Alle aus *Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis* isolierten AGPs zeigten eine deutlich schwächere Reaktivität mit dem monoklonalen Antikörper als Echinacea-AGP. Zusätzlich ergaben sich Unterschiede zwischen den aus den Zellkulturen und der Wurzel isolierten AGPs. Die stärkste Kreuzreaktivität zeigten AGPs aus ZK 2 von *Baptisia australis*, gefolgt von AGPs aus der Zellkultur von *Baptisia tinctoria*. Die Kreuzreaktivität mit dem Wurzel-AGP aus *Baptisia tinctoria* war wiederum stärker als mit denjenigen aus ZK 1 und ZK 3 von *Baptisia australis*. Durch partielle Hydrolyse und Reduktion der Uronsäuren in Wurzel-AGPs konnte die Affinität zum monoklonalen Antikörper verändert werden. Durch partielle Hydrolyse kam es zu einer Abspaltung terminaler Arabinosen mit Reduzierung von Verzweigungspunkten im Molekül und infolgedessen zu einer verstärkten Reaktivität mit dem Antikörper, während eine Reduktion der Uronsäuren zu Neutralzuckern nur eine schwache Abnahme der Reaktivität bewirkte. Der Antikörper erkannte als Epitop folglich nicht den Proteinanteil des Moleküls, sondern den Kohlenhydratanteil. Terminale Uronsäuren schienen letztendlich kein Epitop für den Antikörper darzustellen, während der Verzweigungsgrad und die Zusammensetzung des Kohlenhydratanteils an der Peripherie des Moleküls mitbestimmend zu sein schienen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Typ-II-AGPs im Pflanzenreich weit verbreitet sind (ASPINALL, 1982). Die Art der glykosidischen Bindungen in der Hauptkette ist für die Klassifizierung entscheidend. Trotzdem variieren chemische Eigenschaften von AGPs deutlich. Unterschiede ergeben sich hauptsächlich in der Neutralzucker-Zusammensetzung, Anzahl der Verzweigungen, Zusammensetzung und Länge von Seitenketten, Art der terminalen Zucker, Molekülgröße, im Uronsäure-Gehalt und in der Zusammensetzung des Proteinanteils. Zahlreiche AGPs scheinen bei Anwendung eines Trennverfahrens homogen zu sein, zeigen aber bei Anwendung mehrerer Trennschritte eine Zusammensetzung aus mehreren Unterfraktionen (CHURMS et al., 1978a und 1978b; BLAKE und CLARKE, 1983).

Tab. 37: Gegenüberstellung der Strukturmerkmale im Kohlenhydratanteil von AGPs aus *Echinacea purpurea*, *Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis*.

AGP-Herkunft	<i>Echinacea purpurea</i>		<i>Baptisia tinctoria</i>			<i>Baptisia australis</i>			
	AGP	AGP	AGP-O	AGP-U	AGP-OU	ZK	ZK 1	ZK 2	ZK 3
Ara:Gal	1:1,8	1:1,9	1:12	1:1,9	n.b.	1:1,3	1:1	1:1,3	1:0,7
terminale Ara	23,7%	35,1%	9,1%	23,6%	2,0%	31,8%	30,4%	30,9%	19,8%
terminale Gal	1,9%	3,6%	11,7%	2,2%	6,8%	6,0%	1,4%	5,7%	4,8%
Verzweigungen	30,0%	24,2%	17,4%	32,7%	19,9%	20,3%	18,4%	17,2%	26,4%
Uronsäuren	5,3% ¹	4,0% ¹	11,4% ¹	4,0% ¹	11,4%	n.b.*	9,3% ²	5,2% ²	14,9% ²

¹ bestimmt über Reduktion und Methylierungsanalyse

² photometrische Bestimmung (BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN, 1973)

*nicht bestimmt

MÜHLAU (2000) isolierte eine Reihe von Glykoproteinen aus *Baptisia tinctoria* durch Anwendung chromatographischer Verfahren wie Ionen-, Affinitäts- und Hydrophobe Interaktions-Chromatographie. Darunter waren sechs biologisch aktive Substanzen, die näher charakterisiert wurden. Die ermittelten hydrodynamischen Volumina lagen zwischen 26.000 und 450.000 Da. Proteine wurden mit Hilfe der Elektrophorese und verschiedenen Proteinbestimmungsmethoden nachgewiesen. Der Proteingehalt schwankte aufgrund der verschiedenen Methoden insgesamt sehr stark zwischen 3 und 39 %. Eine Bestimmung einzelner Aminosäuren in drei der isolierten Substanzen führten in zwei Fällen zu hohen Konzentrationen an Glycin, Serin und Lysin, in einem Fall an Methionin, Lysin und Serin. Hydroxyprolin und Prolin wurden in diesen Analysen nicht berücksichtigt. Aufgrund der ermittelten Neutralzucker-Zusammensetzungen mit einem hohen Gehalt an Galactose neben Arabinose und Glucose und des Uronsäure-Gehaltes wurden die isolierten Fraktionen als saure Arabinogalactan-Proteine bezeichnet.

Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit dargestellten Kreuzreaktivität von AGPs aus *Baptisia tinctoria* und *Echinacea purpurea* sowohl mit monoklonalen als auch

polyklonalen Antikörpern lieferten die von EGERT und BEUSCHER (1992) durchgeführten kompetitiven ELISAs Ergebnisse, welche auf keine Kreuzreaktivität mit den jeweiligen Antisera hinwiesen. Die jeweils verwendeten Antikörper müssen demnach unterschiedliche Epitope der AGPs erkennen.

Viele Untersuchungen lassen sich über Zusammensetzung und Aufbau von Gummi arabicum finden. ANDERSON et al. (1966) charakterisierten Gummi arabicum als ein hochverzweigtes saures Polysaccharid mit einem 1,3-/1,6-Galactan-Grundgerüst. Stickstoff wurde von ANDERSON und STODDART (1966) nachgewiesen. YARIV et al. (1967) berichteten über die Fällung dieser Polysaccharide mit dem β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz. Spätere Arbeiten beschäftigten sich mit Kohlenhydrat- und Protein-Zusammensetzung und Verknüpfungen im Kohlenhydrat-Anteil (AKIYAMA et al., 1984). Es konnte eine typische Struktur für Typ-II-AGPs und ein hoher Hydroxyprolin- und Serin-Gehalt nachgewiesen werden. Untersuchungen zur Kohlenhydrat-Protein-Bindung ließen auf eine Beteiligung von Hydroxyprolin und Serin schließen. Zahlreiche chromatographische Trennverfahren zeigten, dass Gummi arabicum eine komplexe Mischung aus mehreren Polysacchariden und Glykoproteinen darstellt. RANDALL et al. (1988, 1989) konnten drei Fraktionen über Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) isolieren. Dabei handelte es sich um eine AGP-reiche Fraktion, ein Arabinogalactan und ein Glykoprotein. OSMAN et al. (1995) fraktionierten Gummi arabicum an einem Anionenaustauscher und erhielten Fraktionen, die eine übereinstimmende Zucker-Zusammensetzung aufwiesen. Die meisten Fraktionen enthielten Hydroxyprolin und Serin als dominierende Aminosäuren, während zwei Fraktionen einen hohen Gehalt an Asparaginsäure, Serin und Glutaminsäure zeigten, womit eine Ähnlichkeit zum Protein-Anteil der Baptisia-AGPs besteht. Alle Fraktionen waren polydispers. Enzymatischer Abbau von Gummi arabicum postulierte das „wattle blossom“-Modell (s. S. 8) als mögliche räumliche Struktur (CONNOLLY et al., 1987 und 1988), während QI et al. (1991) eine Fraktion isolierten, die die „twisted hairy rope“-Struktur (s. S. 9) zeigte. Es schienen in diesem komplexen Gemisch beide Strukturen vorhanden zu sein. Interessanterweise führten alle Fraktionierungstechniken zu unterschiedlichen Fraktionen, und idealerweise müssten alle Techniken kombiniert werden. Das Beispiel Gummi

arabicum zeigt, wie komplex die Zusammensetzung von Glykoproteinen sein kann. Auch die RP-HPLC von *Baptisia tinctoria*-AGP führte zu zahlreichen Fraktionen, deren komplette Isolierung mit Hilfe weiterer chromatographischer Methoden sicherlich möglich wäre.

Baptisia-AGPs zeigen Ähnlichkeiten zu vielen anderen isolierten AGPs. Identische AGPs unterschiedlicher Herkunft sind bis jetzt jedoch noch nicht beschrieben worden. Meist stimmen einige bis mehrere Strukturmerkmale einzelner AGPs überein. Baptisia-AGPs zeigen in ihrer Aminosäure-Zusammensetzung z.B. nicht den sonst häufig typisch hohen Hydroxyprolinegehalt. Auch in einem AGP von *Gladiolus gandavensis* wurden nur Hydroxyprolin-Mengen unter 3 % neben höheren Konzentrationen an Asparaginsäure, Serin, Glutaminsäure und Alanin nachgewiesen (GLEESON und CLARKE, 1979). In einem AGP aus *Daucus carota* konnte wiederum gar kein Hydroxyprolin nachgewiesen werden (BALDWIN et al., 1993).

Hochverzweigte Typ-II-Arabinogalactane wurden u.a. von YAMADA et al. (1987) aus *Angelica acutiloba*, HILLESTAD und WOLD (1977) aus *Cannabis sativa* und BACIC et al. (1987) aus *Lolium multiflorum* isoliert und chemisch charakterisiert.

Protein

Da der Proteinanteil von AGPs üblicherweise typische Merkmale aufweist, wurden Untersuchungen zur quantitativen Zusammensetzung, zum Hydroxyprolinegehalt und zu N-terminalen Aminosäuresequenzen der Baptisia-AGPs aus der Wurzel durchgeführt. AGPs gehören zusammen mit Extensinen und Prolin-reichen Glykoproteinen in die Gruppe der Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine (HRGPs) (SHOWALTER, 1993; KIELISZEWSKI und LAMPORT, 1994; NOTHNAGEL, 1997; GASPAR et al., 2001; FOWLER et al. 1999). Obwohl das gemeinsame charakteristische Merkmal der hohe Hydroxyprolinegehalt ist, existieren zahlreiche Unterschiede in der Zusammensetzung.

AGPs sind wasserlösliche HRGPs mit einem Polysaccharid-Anteil von > 90 % und einem hohen Gehalt an Serin, Alanin, Prolin und Threonin im Protein (FINCHER et al., 1983). Die Hauptmotive in der ursprünglichen N-terminalen Proteinsequenz sind SP, AP und TP, wobei über 80 % des Prolins posttranslational hydroxyliert wird. In

klassischen AGPs lassen sich infolgedessen die Motive SO, AO und TO finden. Hydroxyprolin ist an der kovalenten Bindung zwischen Protein und Kohlenhydrat in AGPs beteiligt (NOTHNAGEL, 1997; SERPE und NOTHNAGEL, 1999), wobei Ara-Gal-Polysaccharide (Typ-II-AG) oder Arabinose-Oligosaccharide O-glykosidisch mit Hydroxyprolin verbunden sind (SHPAK et al., 2001). In der Literatur wird aber auch die Bindung des Kohlenhydratanteils über Serin beschrieben (KIELISZEWSKI et al., 1992; FINCHER et al., 1983). BALDWIN et al. (1993) berichten über ein Hydroxyprolin-armes AGP aus *Daucus carota*, das viel Alanin, Glycin, Asparaginsäure, Glutaminsäure (~10 %), Serin und Valin (~7 %) enthielt. Das Ergebnis stimmte bis auf das fehlende Hydroxyprolin generell mit der Aminosäure-Zusammensetzung von AGPs überein, so dass man zu dem Schluss kam, dass eine Bindung des Kohlenhydratanteils über Serin erfolgt sein musste.

Bei der Fraktionierung der Baptisia-AGPs aus der Wurzel an einer RP-HPLC-Säule wurden mehrere Fraktionen erhalten, die eine positive Reaktion mit Yariv-Reagenz zeigten. Einerseits bedeutet dies, dass sich die AGPs strukturell und damit in ihren hydrophilen Eigenschaften unterscheiden müssen. Andererseits ist damit nicht gesagt, welcher Teil der AGPs, Protein oder Kohlenhydrat, für die Unterschiede verantwortlich ist. Nach Deglykosylierung der AGP-Fraktionen, Entsalzung der Peptide und Fraktionierung an RP-HPLC-Material wurden Peptidfraktionen erhalten, die z.T. in ihrer Retentionszeit übereinstimmten. Diese Fraktionen wurden durch Edman-Abbau am N-terminalen Ende sequenziert. Die aus 2 Fraktionen und dem ursprünglichen AGP erhaltenen Sequenzen von 2 Peptiden mit gleicher Retentionszeit auf der GPC- wie auch auf der RP-HPLC-Säule stimmten weitgehend überein. Es konnte eine Sequenz postuliert werden, die typische AO- und SO-Motive von AGPs aufweist (Abb. 62). Einige Aminosäuren konnten in diesen Sequenzen nicht eindeutig identifiziert werden, was auf eine nicht ausreichende Deglykosylierung zurückzuführen sein kann. Teilweise wurden an diesen Positionen geringe Mengen Hydroxyprolin nachgewiesen. Da die Verknüpfung von Protein- und Kohlenhydratanteil charakteristischerweise über Hydroxyprolin erfolgt, wurde angenommen, dass es sich bei den nicht-identifizierten Aminosäuren z.T. um Hydroxyprolin handelt. Nach KIELISZEWSKI und LAMPORT (1994) hängt die posttranslationale Glykosylierung nicht nur von der Konformation, sondern auch von

Die HPLC-Untersuchung des hydrolysierten Baptisia-AGPs zeigte einen hohen Gehalt an Glutaminsäure, Asparaginsäure und Valin (je ~10 %) und etwas geringere Mengen an Threonin, Serin und Alanin (je ~7 %). Für Hydroxyprolin wurde hier ein unerwartet niedriger Gehalt von 5,1 % im Proteinanteil erhalten. In den Zellkulturen von *Baptisia australis* dominierte Valin neben Asparaginsäure, Serin, Glutaminsäure und z.T. Histidin und Hydroxyprolin. Der Gehalt an Hydroxyprolin lag hier zwischen 2,6 und 7,8 %. Die Zusammensetzung der Proteinanteile ist nicht typisch für übliche AGPs, zeigt aber auch keine typischen Merkmale für andere Glykoproteine. Die photometrische Gehaltsbestimmung von Hydroxyprolin ergab 1,21 % im Wurzel-AGP. Der Gesamt-Proteingehalt wurde nicht experimentell ermittelt. Berechnet man die Proteinkonzentration im Wurzel-AGP über diese beiden ermittelten Werte, kommt man zu einem Proteingehalt von 23,7 % im AGP. Dieser Wert wäre sehr hoch für ein typisches AGP. Geht man davon aus, dass der Proteinanteil im AGP maximal 10 % ausmacht, würde sich eine mit photometrischer Methode ermittelte Hydroxyprolin-Konzentration von > 10 % im Proteinteil des AGPs ergeben. Dieser Hydroxyprolin-Gehalt wäre üblich für AGPs. Die Derivatisierung von Hydroxyprolin mit Ninhydrin und photometrische Bestimmung bei 440 nm wäre in Frage zu stellen. Für eine sichere Aussage zum Gesamtprotein- und Hydroxyprolingehalt des Baptisia-AGPs müssen folglich weitere Analysen durchgeführt werden.

Für Yariv-fällbare AGPs aus Samen anderer Fabaceen, die die Autoren als β -Lectine bezeichneten, wurden z.T. ähnliche Aminosäure-Zusammensetzungen wie für das Baptisia-AGP ermittelt (JERMYN und YEOW, 1975). *Pisum sativum*-Lectin zeigte einen hohen Gehalt an Asparaginsäure, Serin, Glutaminsäure und Alanin (10 %) neben Glycin, Leucin und Valin (8 %). Der Hydroxyprolin-Gehalt lag zwischen 3 und 7 %. Ähnliche Zusammensetzungen zeigten β -Lectine aus *Phaseolus vulgaris* und *Cajanus cajan*.

Immunpharmakologische Wirkung von AGPs aus *Baptisia tinctoria* Wurzel

Im Lymphozyten-Proliferationstest (LPT) induzierten AGPs aus *Baptisia tinctoria* Wurzel in einer Konzentration von 100 µg/ml eine dreifache Steigerung der Proliferationsrate von C3H/HeJ-Zellen. Die mitogene Aktivität dieser Zellen konnte durch LPS, wie erwartet, nicht nennenswert gesteigert werden. Wäre die beobachtete Steigerung der Proliferation durch 100 µg/ml AGP mit einem SI von 3 auf LPS-Kontamination zurückzuführen, müsste die AGP-Präparation 40 µg/ml LPS enthalten und würde nur zu 60 % aus AGPs bestehen, was sicher nicht der Fall ist. Eine nennenswerte, proliferationssteigernde Kontamination der AGPs mit LPS kann demnach weitgehend ausgeschlossen werden. Die Steigerung der Proliferationsrate von Balb/c- und NMRI-Mausmilzzellen durch *Baptisia*-AGPs war vergleichsweise stärker als diejenige von C3H/HeJ-Zellen. Es wurden maximale Stimulationsindizes von 18,3 und 8,6 erreicht. Auch hier kann eine Kontamination mit LPS weitestgehend ausgeschlossen werden, da LPS erst in hoher Konzentration aktivierend wirkte. Es müsste eine Kontamination des AGPs mit LPS zu 30 % vorliegen. Geringe LPS-Konzentrationen mit Beitrag zur proliferationssteigernden Wirkung können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse des LPT zeigen, dass AGPs aus *Baptisia tinctoria* Einflüsse auf zelluläre Bereiche des spezifischen Immunsystems besitzen. Da in diesen Testsystemen mit nicht aufgereinigten Milzzellsuspensionen gearbeitet wurde, um die interzellulären Signaltransduktionen zwischen den Immunzellen aufrecht zu erhalten, waren sowohl T- und B-Zellen als auch Makrophagen in den Präparationen enthalten. Während ConA und PHA die Stimulation der T-Zellen induzieren, stimuliert LPS die Aktivierung der B-Zellen. Welche der Immunzellen durch *Baptisia*-AGPs stimuliert wurden, lässt sich allerdings noch nicht sagen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass es sich nicht um eine direkte Stimulation der B- oder T-Zellen handelt, sondern um eine indirekte, zytokinvermittelte Aktivierung aufgrund der Anwesenheit von Makrophagen im Testsystem.

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss von *Baptisia tinctoria*-AGPs auf die Makrophagenaktivität überprüft. Interleukin-Freisetzung und NO₂⁻-Produktion wurden in verschiedenen Testsystemen bestimmt, da diese Faktoren eine wesentliche Rolle bei

immunologischen Vorgängen im Körper spielen. IL-1 aus Monozyten fördert Teilung und Wachstum von B- und T-Zellen. IL-6 leitet die Akut-Phase-Reaktion ein mit der Folge einer Aktivierung von Komplementfaktoren, wodurch die gesamte Immunantwort verstärkt wird. Der Tumornekrosefaktor α (TNF α) ist für die Aktivierung von Immunzellen mitverantwortlich. GM-CSF wird als hämatopoetischer Wachstumsfaktor von T-Zellen gebildet und stimuliert die Bildung neuer Makrophagen und Granulozyten im Knochenmark, bei denen es sich um unspezifische Effektorzellen der humoralen und zellvermittelten Immunität handelt. Ebenfalls wird die Bildung dendritischer Zellen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks angeregt.

Baptisia-AGPs induzierten eine verstärkte Zytokinausschüttung in alveolären und Peritoneal-Makrophagen wie auch in Mausmilzzellen. Vor allem die Produktion von GM-CSF in Mausmilzzellen und IL-6 bzw. TNF α in Peritonealmakrophagen wurde induziert. IL-6- und TNF α -Induktion erreichten in Peritonealmakrophagen bereits bei einer Konzentration von 6,3 $\mu\text{g/ml}$ Baptisia-AGP Konzentrationen, die durch höhere AGP-Konzentrationen nicht mehr zu steigern waren. In alveolären Makrophagen dagegen kam es im gemessenen Konzentrationsbereich zu einer konzentrationsabhängigen Induktion dieser Zytokine. Auch die Induktion von IL-1 β in alveolären Makrophagen erreichte bei 6,3 $\mu\text{g/ml}$ AGP eine Sättigung. Es ergab sich ein SI von 3,9. Verglichen mit IL-6 (19,8) und TNF α (7,4) fällt er deutlich niedriger aus.

Baptisia-AGPs induzierten darüber hinaus die Bildung von NO durch Stimulation der Expression der induzierbaren NO-Synthase II in Kulturen alveolärer Makrophagen. Dieses Enzym unterscheidet sich von den konstitutiven NO-Synthasen im Körper, da es zu einer Produktion großer Mengen von NO führt, das zytotoxische Wirkungen hat. NO als reaktives Stickoxid ist ein wichtiger Effektormechanismus gegen intrazelluläre Mikroben. Die hohen NO-Konzentrationen blockieren lebenswichtige eisenhaltige Enzyme in den Zielzellen. Als reaktives Molekül schädigt NO nicht selektiv Mikroben, sondern kann auch toxische Wirkungen auf gesunde Zellen haben. Diskutiert wird die Beteiligung von Ansammlungen aktivierter Makrophagen und deren erhöhte NO-Freisetzung bei Autoimmunerkrankungen. Eine hohe NO-Produktion ist deshalb nicht nur vorteilhaft.

NO wird in Gegenwart von Sauerstoff und Wasser schnell zu NO_2^- umgesetzt, das dann mit Hilfe des Griess-Assays bestimmt werden kann. Die Menge an gebildetem NO_2^- ist direkt proportional zur induzierten NO-Menge.

Baptisia-AGPs führten bereits in einer Konzentration von 0,8 $\mu\text{g/ml}$ zu einer Steigerung der NO_2^- -Konzentration von 21,9 $\mu\text{mol/l}$ auf 63,0 $\mu\text{mol/l}$. Höhere AGP-Konzentrationen bewirkten einen weiteren, schwächeren Anstieg der NO_2^- -Konzentration bis zu einer Konzentration von 98,5 $\mu\text{mol/l}$ bei Anwesenheit von 5 $\mu\text{g/ml}$ AGP. Im Vergleich zur Positivkontrolle (IFN γ + LPS) wurden gleich hohe Werte erreicht. Da LPS bei diesem Testsystem in einer sehr niedrigen Konzentration von 5 ng/ml eingesetzt wurde, wäre bei diesem Ergebnis eine Beteiligung in der NO-Stimulation durch eine Kontamination der AGPs mit LPS nicht auszuschließen. Zum großen Teil ist LPS jedoch auf die Co-Stimulation durch IFN γ angewiesen, bewirkt aber in geringem Ausmaß auch ohne Co-Stimulator eine NO-Synthese. Um in diesem Testsystem eine sichere Aussage über die Aktivität der Baptisia-AGPs machen zu können, müsste mit LPS-inaktiviertem Material gearbeitet werden.

Makrophagen scheinen den genannten Ergebnissen zufolge Zielzellen der AGPs aus *Baptisia tinctoria* zu sein, wobei nicht nur eine erhöhte Zytokinausschüttung, sondern auch eine verstärkte Freisetzung antimikrobieller Moleküle erreicht wird.

Als weiterer Parameter für die immunmodulatorische Aktivität des Baptisia-AGPs wurde der Einfluss auf die IFN γ -Produktion von Milzzellen bestimmt. IFN γ wird von TH-1-Lymphozyten sezerniert, wodurch unspezifische Zellen des Immunsystems wie Monozyten/Makrophagen oder Granulozyten zu erhöhter Aktivität stimuliert werden. Zusätzlich ist es ein wichtiger Faktor für Produktion von Antikörpern.

In diesem Testsystem zeigten Baptisia-AGPs in sehr niedriger Konzentration eine positive Wirkung. Eine Steigerung der IFN γ -Produktion erfolgte bereits bei einer Konzentration von 0,63 $\mu\text{g/ml}$ AGP in der Größenordnung, wie sie auch durch die Positivkontrollsubstanz LPS induziert wurde. Damit zeigten Baptisia-AGPs einen nicht unerheblichen Einfluss auf unspezifische Abwehrreaktionen des Immunsystems und könnten therapeutisch bei der Behandlung virusbedingter Infektionen durchaus eine Schlüsselrolle spielen.

Aktivität zeigten Baptisia-AGPs auch hinsichtlich der Steigerung der Antikörperproduktion. Die IgM-Produktion wurde in Maus-Milzzellkulturen durch Baptisia-AGPs in einer Konzentration von 100 µg/ml um das 10fache gesteigert.

Für die Sezernierung von Antikörpern sind B-Zellen verantwortlich. Bei Kontakt mit Antigenen wird zunächst vor allem hochmolekulares IgM gebildet, das besonders gut gegen Infektionserreger wirksam ist, bevor andere Antikörperklassen sezerniert werden. Auch IL-6 aus Makrophagen/Monozyten kann zu einer Stimulation der IgM-Sezernierung führen. Da das Baptisia-AGP auf die IL-6-Produktion einen positiven Einfluss hat, sagt dieses Ergebnis nichts über eine direkte oder indirekte Stimulation der B-Zellen und deren IgM-Produktion durch Baptisia-AGP aus.

Die erzielten Ergebnisse mit Baptisia-AGPs in den getesteten immunpharmakologischen Systemen geben Anlass für weitere Untersuchungen. Zur Absicherung der Abwesenheit von LPS im AGP sollte ergänzend auf jeden Fall eine LPS-Inaktivierung des Materials und erneute Testung in LPS-sensitiven Systemen durchgeführt werden.

Über immunpharmakologische Wirkungen von *Baptisia tinctoria* wurde bereits in anderen Arbeiten berichtet. Zum Teil wurde mit isolierten Glykoprotein- und Polysaccharid-Fractionen gearbeitet. Viele Veröffentlichungen beziehen sich aber auf Gesamtextrakte, hochmolekulare Fractionen aus diesen Extrakten oder Extraktgemische (BODINET und FREUDENSTEIN, 1999; WAGNER und JURCIC, 1991; WÜSTENBERG et al., 1999). Die immunmodulatorischen Wirkungen von *Baptisia tinctoria* werden stets mit Polysacchariden und Glykoproteinen in Verbindung gebracht.

WAGNER et al. (1985) beschreiben die Isolierung von wasserlöslichen, sauren, verzweigt-kettigen Heteroglykanen aus einem wässrig-alkalischen Extrakt von *Baptisia tinctoria*. Das Molekulargewicht des isolierten Polysaccharid-Gemisches lag im Bereich von 300.000 bis 500.000 Da. Als Neutralzucker wurden Glucose, Rhamnose, Galactose, Xylose, Arabinose und Mannose identifiziert. Fraktionierungen des Rohpolysaccharids führten zu einzelnen Polysaccharid-Fractionen, die in

Mäusen eine erhöhte Carbon-Clearance-Rate und eine Steigerung des Phagozytose-Index humaner Granulozyten induzierten.

BEUSCHER und KOPANSKI (1985) isolierten und charakterisierten immunologisch wirksame Substanzen aus einem mit 40 % Aceton zubereiteten Extrakt aus der Wurzel von *Baptisia tinctoria*. Über Säulenchromatographie wurden mehrere Fraktionen erhalten, die als Polysaccharide identifiziert wurden. In Testsystemen wurde eine Proliferation von Lymphozyten und Steigerung der Antikörperproduktion in B-Lymphozyten durch diese Fraktionen festgestellt.

Weitere Arbeiten von BEUSCHER et al. (1988) mittels ^{13}C -NMR bestätigten die Existenz eines Arabinogalactans als Bestandteil der zuvor erhaltenen Polysaccharid-Fraktionen. Des Weiteren konnten aus wässrig-ethanolischen und wässrig-methanolischen Extrakten immunologisch aktive Glykoproteine isoliert werden (BEUSCHER et al., 1989), die chemisch und biologisch näher charakterisiert wurden. Der Kohlenhydratanteil in den Fraktionen lag zwischen 8 und 27 %. Eine Analyse der Aminosäuren ergab hohe Mengen an Asparagin- und Glutaminsäure neben Threonin, Alanin und Leucin. Eine immunologische Wirkung dieser Glykoproteine wurde im Lymphozyten-Proliferationstest sowohl in C3H/HeJ-Mäusen als auch in NMRI-Mäusen nachgewiesen. Die Lymphozytenaktivierung war nicht nur mit vermehrter DNA-Bildung, sondern auch mit gesteigerter Immunglobulin-Synthese (IgM) verbunden.

BEUSCHER et al. (1990) bestätigten die Beteiligung von Arabinogalactanen an immunologischen Prozessen durch Steigerung der Aktivität immunkompetenter Zellen wie z.B. Makrophagen.

BODINET (1999) untersuchte die immunologische Aktivität eines Mischextraktes und der Retentatfraktion aus *Echinaceae purpureae radix*, *Echinaceae pallidae radix*, *Baptisiae tinctoriae radix* und *Thujae herba* und Extrakte der Einzeldrogen *in vitro* und *in vivo*. Für das Extrakt-Retentat aus *Baptisia tinctoria* konnte eine 12fache Steigerung der Einbaurrate von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA von NMRI-Milzzellen gezeigt werden, was auf eine Anreicherung hochmolekularer Substanzen im Retentat zurückgeführt wurde. Eine Kontamination mit LPS wurde ausgeschlossen. Zusätzlich wurde eine verstärkte Zytokinausschüttung in P388C-Makrophagen-Kulturen stimuliert. Vor allem die Induktion von $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 wurde

in vitro verstärkt, weniger diejenige von IL-1. *In vivo* fielen diese Ergebnisse dahingehend anders aus, als dass die TNF α -Ausschüttung nicht so stark war, während bei IL-1 und IL-6 deutlich dosisabhängige Effekte feststellbar waren. Die Retentatfraktion induzierte darüber hinaus *in vitro* die Bildung von antimikrobiellem NO $_2^-$ in Kulturen alveolärer Maus-Makrophagen. In Milzzellen wurde eine Induktion der Produktion von antiviral wirksamem IFN $_{\alpha\beta}$ bewirkt. Eine besonders starke Aktivität wurde in Bezug auf die Antikörperproduktion (IgM) von B-Zellen gezeigt. Zusätzlich wurde in der Arbeit gezeigt, dass Inhaltsstoffe aus *Baptisia tinctoria in vivo* wirken, und es wurde die therapeutische Wirksamkeit nach oraler Einnahme in einem *in vivo*-Testmodell untersucht. Hier wurde eine erhöhte Bildung Antikörperproduzierender Zellen in Zellen der Peyer'schen Plaques festgestellt, womit diesen Zellen eine besondere Bedeutung für die immunologischen Wirkungen hochmolekularer Substanzen zugesprochen werden kann.

Auch die von MÜHLAU (2000) isolierten Glykoproteine aus *Baptisia tinctoria*, die saure Arabinogalactan-Proteine darstellten, zeigten Aktivität im Lymphozyten-Proliferationstest. Durch enzymatischen Abbau des Proteinanteils dieser Substanzen konnte gezeigt werden, dass der Proteinanteil einen untergeordneten bzw. gar keinen Einfluss auf die biologische Aktivität ausübte.

Die immunologische Aktivität von Polysacchariden aus zahlreichen Pflanzen ist bereits beschrieben worden. Man kennt aus dem Bereich der niederen Pflanzen (Pilze, Flechten, Algen) viele Polysaccharide, wie Schizophyllan, Krestin, Lichenan oder Traganth, die vor allem antitumorale und z.T. auch antivirale Wirkungen besitzen (WAGNER und PROKSCH, 1985; WAGNER, 1991, LINDEQUIST et al. 1990, LINDEQUIST, 1998). Diese Wirkungen kommen über eine Stimulierung körpereigener Abwehrreaktionen zustande. Eine Reihe weiterer höherer Pflanzen besitzen Inhaltsstoffe, die in der Lage sind, unterschiedliche Faktoren der Immunabwehr zu stimulieren. Speziell Polysaccharide aus höheren Pflanzen zeigen immunologische Aktivität. Berichte liegen vor über *Eupatorium cannabinum* und *E. perfoliatum*, *Chamomilla recutita*, *Arnica montana*, *Sabal serrulata*, *Eleutherococcus senticosus* (WAGNER et al., 1985), *Calendula officinalis* (VARLJEN et al., 1989) und *Angelica acutiloba* (KUMAZAWA et al., 1982). Von KIYOHARA et

al. (1986) wurde ein Polysaccharid aus *Angelica acutiloba* isoliert, das anti-komplementäre Aktivität zeigte. Das Polysaccharid bestand hauptsächlich aus Arabinose, Galactose, Galacturon- und Glucuronsäure und wurde als Arabinogalactan charakterisiert. Molekulargewichts-Bestimmungen mit Hilfe der GPC zeigten, dass das Polysaccharid zur Aggregatbildung im wässrigen Milieu neigte, so dass der Zusatz von Strukturbrechern wie NaCl zu niedrigeren Werten bei der Messung des Molekulargewichtes führte. Die anti-komplementäre Aktivität des Polysaccharids war abhängig vom Grad der Zusammenlagerung der Moleküle, wobei das hochmolekulare Aggregat in Wasser die höchste Aktivität zeigte. CHINTALWAR et al. (1999) beschrieben die Isolierung eines Arabinogalactans aus *Tinospora cordifolia* mit einer mitogenen Aktivität, die ausschließlich gegen B-Lymphozyten gerichtet war. Das Arabinogalactan war aus Galactose, Arabinose und Galacturonsäure zu gleichen Anteilen zusammengesetzt. Ein von SAMUELSEN et al. (1998) isoliertes Arabinogalactan-Protein aus *Plantago major* konnte mit Hilfe der GPC in zwei Fraktionen getrennt werden, die beide anti-komplementäre Aktivität zeigten. Die Struktur einer Fraktion wurde näher untersucht und zeigt typische Merkmale von Typ-II-AGPs sowohl im Kohlenhydrat- als auch im Protein-Anteil.

Interessant ist die Isolierung immunstimulierend wirkender Polysaccharide und Glykoproteine aus Pflanzen, die bereits in Arzneimittelzubereitungen zur Prophylaxe und Therapie von Infektionskrankheiten verwendet werden, wie z.B. von *Echinacea purpurea* und *angustifolia* (WAGNER et al., 1988; BEUSCHER et al., 1995). Auch aus diesen Pflanzen wurden Arabinogalactane und Arabinogalactan-Proteine isoliert und sowohl chemisch (CLASSEN et al., 2000) als auch pharmakologisch charakterisiert (BEUSCHER et al., 1988 und 1990; BODINET und BEUSCHER, 1991).

Inzwischen wurde gezeigt, dass Monoextrakte immunmodulierender Pflanzen Mischextrakten unterlegen sind. WAGNER und JURCIC (1991) untersuchten hierzu vergleichsweise einen *Echinacea angustifolia*-Monoextrakt, eine Extraktkombination aus *E. angustifolia*, *Eupatorium perfoliatum* und *Baptisia tinctoria* und eine Kombination aus *E. angustifolia*, *E. perfoliatum*, *B. tinctoria* und *Arnica montana*. In

Testsystemen konnte eine Steigerung der Phagozytoserate durch die Dreierkombination um 33 % bzw. die Viererkombination um 50 % gegenüber dem Monoextrakt erreicht werden. Im Carbon-Clearance-Test ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Die Viererkombination bewirkte hier eine Steigerung der Clearance um 35 % gegenüber dem Echinacea-Monoextrakt.

BODINET (1999) zeigte die Überlegenheit einer Mischextraktion von *Echinaceae purpureae radix*, *Echinaceae pallidae radix*, *Baptisiae radix* und *Thujae herba* in immunologischen Testsystemen gegenüber den Monoextrakten der Pflanzen. Selbst durch eine Vereinigung der Monoextrakte zu einem Extrakt konnte trotz gleicher Zusammensetzung der Ausgangsdrogen und Extraktionsmittel nicht der Effekt erreicht werden, den der Mischextrakt erzielte.

Worauf die synergistischen Wirkungen beruhen, ist noch ungeklärt. Entscheidend ist die Tatsache, dass in mehreren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass *Baptisia*-Extrakt nicht nur in Kombination mit anderen pflanzlichen Immunmodulatoren, sondern auch allein eine immunstimulierende Wirkung auf spezifische zelluläre wie auch unspezifische Abwehrmechanismen zeigt. Den in dieser Arbeit isolierten Arabinogalactan-Proteinen kann aufgrund der erhaltenen Ergebnisse zumindest eine Beteiligung an der immunstimulierenden Wirkung zugesprochen werden.

Wie Untersuchungen gezeigt haben (WAGNER und JURCIC, 1991; BODINET, 1999), führt die perorale Applikation pflanzlicher Immunstimulanzien zu einer Steigerung der Phagozytoserate und Vermehrung Antikörper-bildender Immunzellen. Der in dieser Arbeit durchgeführte Resorptionstest an einem künstlichen Darm-Epithelmodell führte erwartungsgemäß nicht zur Resorption der *Baptisia*-AGPs. Aufgrund der Größe der Glykoproteine ist eine passive Resorption auch unwahrscheinlich, und spezielle Transportmechanismen waren in den verwendeten Zellen nicht zu erwarten. Der Wirkungsmechanismus immunologisch aktiver, hochmolekularer Substanzen muss wohl über das Darm- und Rachen-assoziierte Immunsystem erfolgen. Man weiß, dass vor allem von den Peyer'schen Plaques im Dün- und Dickdarm, des Appendix vermiformis und von solitären Lymphfollikeln im Intestinum ein großer Teil körpereigener Abwehrmechanismen ausgeht (GEBERT et al., 2000). Dieses mit Schleimhäuten assoziierte Gewebe findet sich nicht

ausschließlich im Gastro-Intestinal-Trakt, sondern auch in den Mandeln, den oberen und unteren Atemwegen und am Auge (GEBERT und PABST, 1999). Über die darmassoziierten lymphatischen Gewebe können potentielle Antigene aus dem Lumen aufgenommen werden, um eine Immunantwort einzuleiten. Speziell sogenannte M-Zellen, spezialisierte Epithelzellen in den Peyer'schen Plaques, verfügen über diese Eigenschaft (JEPSON und CLARK, 1998). Sie stehen in Kontakt mit intraepithelialen Lymphozyten und können Makromoleküle, Partikel und Mikroorganismen an ihrer apikalen Seite durch Endozytose aufnehmen, zur basolateralen Seite in Vesikeln transportieren und sie dort durch Exozytose in den Interzellularraum abgeben. In den Peyer'schen Plaques erfolgt die Initiierung einer Immunreaktion. YU et al. (1998) beschrieben in diesem Zusammenhang z.B. Polysaccharide aus *Atractylodes lancea*, die eine immunmodulierende Wirkung auf das intestinale Immunsystem zeigten. Aus der Gesamt-Polysaccharidfraktion konnte u.a. ein Arabinogalactan isoliert werden, das über Aktivierung des Darm-assoziierten Immunsystems zu einer erhöhten Produktion von Knochenmarkszellen führte. Das Arabinogalactan hatte ein MW von 74.000 Da und bestand zu 92 % aus Zuckern mit Arabinose und Galactose als Hauptkomponenten neben Spuren von Uronsäuren. Enzymatische Abspaltungen im Kohlenhydratanteil mit Exo- α -L-Arabinofuranosidase und Exo- β -D-(1 \rightarrow 3)-Galactanase reduzierten sowohl die pharmakologische Aktivität wie auch die Reaktivität mit Yariv-Reagenz. Bindung eines Lectins aus *Ulex europaeus* an und Aufnahme in intestinale M-Zellen in vivo wurde von CLARK et al. (1995) beobachtet. BODINET (1999) belegte eine Steigerung der Immunantwort in den Peyer'schen Plaques durch Extrakte aus *Baptisia tinctoria*, wobei keine Aussage über die aktiven Inhaltsstoffe gemacht wurde. Dieser Resorptions-Mechanismus wäre eine mögliche Erklärung für die Wirkung von Polysacchariden und Glykoproteinen, speziell den Arabinogalactan-Proteinen nach oraler Applikation pflanzlicher Immunstimulanzien. Untersuchungen mit Glykoproteinen bezüglich des intestinalen Transportes und des Verhaltens beim Transport durch die Darmwand zeigten, dass hochmolekulare Substanzen in den Peyer'schen Plaques, niedermolekulare Substanzen (< 10.000 Da) in Epithelzellen des Duodenum gefunden wurden (HEYMAN et al., 1987).

E. Zusammenfassung

Arabinogalactan-Proteine sind im Pflanzenreich weit verbreitete Hydroxyprolin-reiche Glykoproteine. Sie bestehen zu über 90 % aus einem Kohlenhydratanteil, daneben aus einem Proteinanteil von maximal 10 %, der kovalent über OH-haltige Aminosäuren wie z.B. Hydroxyprolin und Serin mit dem Kohlenhydrat verknüpft ist. Obwohl es schon einige Untersuchungen zu ihrer Funktion in Pflanzen gibt, ist die Bedeutung für Pflanzen noch nicht vollständig geklärt. Sie kommen im Gewebe z.T. in gebundener, aber auch in gelöster Form vor. Aufgrund ihrer Hydrophilie lassen sich im Gewebe gelöste AGPs leicht aus Pflanzenmaterial extrahieren und können aus dem wässrigen Extrakt nach Aufkonzentrierung hochmolekularer Substanzen spezifisch durch Fällung mit β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz von anderen Polysacchariden und Glykoproteinen abgetrennt werden. Da sie von Zellen in Kultur in das sie umgebende Medium abgegeben werden, können sie auch aus diesem mit Yariv-Reagenz isoliert werden. Eine weitere Aufreinigung und z.T. Fraktionierung ist durch chromatographische Verfahren möglich. AGPs wird wie anderen Glykoproteinen und auch Polysacchariden eine biologische Aktivität zugesprochen. Diese äußert sich durch Stimulation bestimmter Parameter des Immunsystems.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung von AGPs aus Wurzeln und Zellkulturmedium von *Baptisia tinctoria* und Zellkulturmedium von *Baptisia australis*. Extrakte von *Baptisia tinctoria* (Wurzel) werden in Kombinationspräparaten zur Steigerung der körpereigenen Abwehrkräfte und Behandlung von grippalen Infekten eingesetzt. Wurzeln von *Baptisia australis* werden als Ersatz für *Baptisia tinctoria* verwendet. Nach chemischer Charakterisierung der isolierten AGPs sollte die biologische Aktivität des Wurzel-AGPs in immunologischen Testsystemen bestimmt werden. Alternativ sollte die Isolierung von AGPs aus Zellkulturmedien der beiden Pflanzen erfolgen und die Struktur der isolierten Substanzen verglichen werden.

Aus getrockneten und geschnittenen Baptisiawurzeln konnte durch wässrige Extraktion und Fällung mit Yariv-Reagenz ein AGP-Gemisch isoliert werden. In diesem AGP waren Arabinose und Galactose mit ca. 90 % die Hauptzucker neben

geringeren Mengen an Glucuronsäure, Glucose, Rhamnose und Mannose. Eine Analyse der Bindungstypen im Kohlenhydratanteil ergab eine für Typ-II-Arabinogalactane typische Struktur mit einer Hauptkette aus 1,3-Galactose-Resten, verzweigt über die OH-Gruppe an C6. In den Seitenketten kamen 1,6-Galactose-, 1,4-Galactose, 1,3-Arabinose- und 1,5-Arabinose-Reste vor, terminal Arabinose, Galactose, Glucose und Glucuronsäure. Mit einem Anteil von ca. 30 % 1,3,6-Galactosen zeigte der Kohlenhydratanteil einen hohen Verzweigungsgrad. Milde saure Hydrolyse führte zur Abspaltung von 1,3-, 1,5- und terminaler Arabinose, z. T. auch terminaler Galactose. Während die Reduktion der Uronsäuren zu den korrespondierenden Neutralzuckern die Reaktivität mit Yariv-Reagenz nicht beeinträchtigte, blieb die Reaktion nach milder saurer Hydrolyse der AGPs mit Yariv-Reagenz aus. Der Proteinanteil bestand überwiegend aus Glutaminsäure, Asparaginsäure und Valin neben Serin, Threonin und Alanin. Der Hydroxyprolin-gehalt war mit 5,1 % in dieser Bestimmung eher niedrig und damit untypisch für AGPs. Mit einer photometrischen Methode konnte selektiv der Hydroxyprolinegehalt im Gesamt-AGP mit 1,21 % bestimmt werden. Die N-terminale Sequenzierung isolierter AGP-Peptide zeigte typische AGP-Motive in den ermittelten Aminosäuresequenzen mit möglicher Verknüpfung des Protein- und Kohlenhydratanteils über Hydroxyprolin bzw. Serin. Dieses ursprüngliche AGP-Gemisch ließ sich durch GPC bzw. RP-HPLC in mehrere Fraktionen trennen. Die beiden durch GPC isolierten Fraktionen und das ursprüngliche AGP zeigten den gleichen strukturellen Aufbau im Kohlenhydratanteil. Die RP-HPLC lieferte zahlreiche Fraktionen. Von zwei untersuchten Fraktionen zeigte eine wiederum eine dem ursprünglichen AGP entsprechende Neutralzuckerzusammensetzung, während die zweite ein abweichendes Ara-Gal-Verhältnis zeigte. Das ursprüngliche AGP aus der Yariv-Fällung stellte somit ein Gemisch aus mehreren AGP-Fraktionen dar, die durch strukturelle Unterschiede im Kohlenhydratanteil des Moleküls getrennt werden konnten.

Aus den Zellkulturmedien von *Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis* konnten AGPs isoliert werden. Die isolierten AGPs aus *Baptisia australis* unterschieden sich in der Neutralzucker-Zusammensetzung des Kohlenhydrat-Anteils einerseits dahingehend, dass unterschiedlich hohe Konzentrationen an Arabinose und Galactose vorlagen

und sich dadurch verschiedene Ara-Gal-Verhältnisse ergaben. Zusätzlich war die Neutralzucker-Zusammensetzung nicht gleich in den isolierten AGPs. AGPs aus der Zellkultur von *Baptisia tinctoria* bestanden nur aus Arabinose und Galactose. Bei den Zellkultur-AGPs handelte es sich ebenfalls um Typ-II-AGPs. Kleine Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit vom Kulturmedium im molekularen Feinbau der isolierten AGPs aus *Baptisia australis* Zellkulturen und verglichen mit AGPs aus der Zellkultur von *Baptisia tinctoria*. Im Gegensatz zum Wurzel-AGP enthielten alle Zellkultur-AGPs überwiegend terminale Arabinopyranose statt Arabinofuranose, überwiegend 1,3-Arabinose- statt 1,5-Arabinose-Reste, mehr terminale Galactose-Reste und weniger Verzweigungen. Die AGPs der *Baptisia australis* Zellkultur enthielten zusätzlich 1,2-Arabinose-Reste. Der Proteinanteil der *Baptisia australis*-AGPs bestand hauptsächlich aus Valin und Asparaginsäure neben Serin, Glutaminsäure und z.T. Histidin. Der Hydroxyprolinegehalt in den Zellkultur-AGPs war mit 2,6 bis 7,8 % entsprechend den Wurzel-AGPs eher niedrig und damit untypisch für AGPs.

Im ELISA wurde die Kreuzreaktivität der isolierten AGPs gegen mono- und polyklonale Antikörper getestet, die gegen ein AGP aus *Echinacea purpurea* etabliert worden waren. Alle isolierten AGPs zeigten eine schwächere Affinität zum Antikörper als Echinacea-AGP und unterschieden sich zusätzlich untereinander in den einzelnen Affinitäten. Die fast vollständige Entfernung von Arabinose-Resten aus Wurzel-AGP führte zu einer stark erhöhten Affinität zu monoklonalen Antikörpern, während die Reduktion der Uronsäuren zu Neutralzuckern die Reaktion nur unwesentlich beeinflusste.

In immunpharmakologischen Untersuchungen konnte eine Reihe von immunologischen Wirkungen der isolierten AGPs aus der Wurzel von *Baptisia tinctoria* nachgewiesen werden. AGPs führten zu einer Erhöhung der Proliferationsrate von C3H/HeJ-, NMRI- und Balb/c-Milzzellen, einer Steigerung der Zytokininduktion in Maus-Makrophagen (IL-1, IL-6, TNF α , GM-CSF), einer erhöhten IgM-Produktion von Maus-Milzzellen, einer Produktion von NO in alveolären Maus-Makrophagen und einer Induktion von IFN γ in Maus-Milzzellen.

Transportstudien an einer künstlichen Karzinom-Zelllinie zeigten, dass die Aufnahme von AGPs durch Epithelien nicht ohne weiteres möglich ist. Spezielle

Transportmechanismen im Darmepithel sind möglicherweise für eine systemische Wirkung der Makromoleküle verantwortlich.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen überwiegend typische Merkmale in Kohlenhydrat- und Protein-Anteilen der aus *Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis* isolierten AGPs. Für AGPs aus der Wurzel von *Baptisia tinctoria* konnten immunstimulatorische Wirkungen nachgewiesen werden. Für die immunstimulatorische Wirkung der Baptisiawurzel kann den in dieser Arbeit isolierten und charakterisierten AGPs zumindest eine Beteiligung an der Wirkung zugesprochen werden.

- Adams GA, in: *Methods in Carbohydrate Chemistry* Vol. 5 (Whistler RL, BeMiller JN, Wolfrom ML, Hrsg.) Academic Press, London (1965), 209-276
- Akiyama Y und Kato K, *Phytochemistry* 20 (1981), 2507-2510
- Akiyama Y, Eda S und Kato K, *Agric. Biol. Chem.* 48, 1 (1984), 235-237
- Albersheim P, Nevins DJ, English PD und Karr A, *Carbohydr. Res.* 5 (1967), 340-345
- Anderson DMW, Dea ICM und Smith RN, *Carbohydr. Res.* 7 (1968), 320-333
- Anderson DMW, Hirst EV und Stoddart JF, *J. Chem. Soc. C* (1966), 1959-1966
- Anderson DMW und Stoddart JF, *Carbohydr. Res.* 2 (1966), 104-114
- Anderson DMW und Munro AC, *Carbohydr. Res.* 12 (1969), 9-22
- Anderson RL, Clarke AE, Jermyn MA, Knox RB und Stone BA, *Aust. J. Plant Physiol.* 4 (1977), 143-158
- Aspinall GO, *Adv. Carbohydr. Chem.* 14 (1959), 429-468
- Aspinall GO, Molloy JA und Craig JWT, *Can. J. Biochem.* 47 (1969), 1063-1070
- Aspinall GO, in: *The Polysaccharides* Vol. 1 (Aspinall GO, Hrsg.) Academic Press, New York (1982)
- Bacic A, Churms SC, Stephen AM, Cohen PB und Fincher GB, *Carbohydr. Res.* 162 (1987), 85-93
- Bacic A, Currie G, Gilson P, Mau SL, Oxley D, Schultz C, Sommer-Knudsen J und Clarke AE, in: *Cell and Developmental Biology of Arabinogalactan-Proteins* (Nothnagel E, Bacic A, Clarke AE, Hrsg.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2000), 11-23
- Bacic A, He Du, Stone BA und Clarke AE, in: *Essays in Biochemistry* 31 (Apps DK, Hrsg.) Portland Press, London (1996), 91-101
- Bacic A, Moody SF und Clarke AE, *Plant Physiol.* 80 (1986), 771-777
- Baldwin TC, McCann MC und Roberts K, *Plant Physiol.* 103 (1993), 115-123
- Beuscher N, Bodinet C, Willigmann I und Egert D, *Z. Phytother.* 16 (1995), 157-166
- Beuscher N und Kopanski L, *Planta Med.* 5 (1985), 381-384
- Beuscher N, Kopanski L und Ernwein C, *Adv. Biosci.* 68 (1988), 329-336

- Beuscher N, Scheit KH, Bodinet C und Kopanski L, *Planta Med.* 55 (1989), 358-363
- Beuscher N, Scheit KH, Bodinet C und Egert D, in: *Immunotherapeutic Prospects of Infectious Diseases* (Masihi KN, Lange W, Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1990), 59-63
- Bishop CT, *Adv. Carboh. Chem.* 19 (1964), 95-147
- Björndal H, Hellerqvist CG, Lindberg B und Svensson S, *Angew. Chem.* 16 (1970), 643-674
- Blake JD und Clarke ML, *Carbohydr. Res.* 115 (1983), 265-272
- Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ und Stone BA, *Carbohydr. Res.* 113 (1983), 291-299
- Blaschek W., in: *Polysaccharide* (Franz G, Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1991), 17-47
- Blumenkrantz N und Asboe-Hansen G, *Anal. Biochem.* 54 (1973), 484-489
- Bodinet K, Dissertation, Greifswald (1999)
- Bodinet C und Beuscher N, *Planta Med.* 57 Suppl. 2 (1991), A33
- Bodinet C und Freudenstein J, *Planta Med.* 65 (1999), 695-699
- Brillouet JM, Williams P, Will F, Müller G und Pellerin P, *Carbohydrate Polymers* 29 (1996), 271-275
- Brown AH, *Arch. Biochem.* 11 (1946), 269-278
- Capek P und Kardošová A, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 60 (1995), 2112-2118
- Carpita NC und Shea EM, in: *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS* (Biermann CJ und McGinnis GD, Hrsg.) CRC Press, Boca Raton, Florida (1989), 157-216
- Cartier N, Chambat G und Joseleau JP, *Carbohydr. Res.* 168 (1987), 275-283
- Chintalwar G, Jain A, Sipahimalani A, Banerji A, Sumariwalla P, Ramakrishnan R und Sainis K, *Phytochemistry* 52 (1999), 1089-1093
- Churms SC, Merrifield EH und Stephen AM, *Carbohydr. Res.* 55 (1977), 3-10
- Churms SC, Merrifield EH und Stephen AM, *Carbohydr. Res.* 63 (1978a), 337-341
- Churms SC, Merrifield EH und Stephen AM, *Carbohydr. Res.* 64 (1978b), C1-C2

- Churms SC, Stephen AM und Siddiqui IR, *Carbohydr. Res.* 94 (1981), 119-122
- Clark MA, Jepson MA, Simmons NL und Hirst BH, *Cell Tissue Res.* 282 (1995), 455-461
- Clarke AE, Anderson RL und Stone BA, *Phytochemistry* 18 (1979), 521-540
- Clarke AE, Knox RB und Jermyn MA, *J. Cell Sci.* 19 (1975), 157-167
- Clarke AE, Gleeson PA, Jermyn MA und Knox RB, *Aust. J. Plant Physiol.* 5 (1978), 707-722
- Classen B, Witthohn K und Blaschek W, *Carbohydr. Res.* 327 (2000), 497-504
- Classen B und Blaschek W, *Planta Med.* 68 (2002), 232-236
- Connolly S, Fenyo JC und Vandavelde MC, *Food Hydrocoll.* 1 (1987), 477-480
- Connolly S, Fenyo JC und Vandavelde MC, *Carbohydr. Polym.* 8 (1988), 23-32
- Danishefsky, J, Whistler RL, Bettelheim, FA, in: *The Carbohydrates* (Pigman W, Horton D, Hrsg.) Academic Press, New York (1970), 388-391
- Ding L und Zhu JK, *Planta* 203 (1997), 289-294
- Dische Z, *J. Biol. Chem.* 167 (1947), 189-198
- Dmitriev BA, Backinowsky LV, Chizhov OS, Zolotarev BM und Kochetkov NK, *Carbohydr. Res.* 19 (1971), 432-435
- Du H, Clarke AE und Bacic A, *Trends in Cell Biol.* 6 (1996), 411-414
- Egert D und Beuscher N, *Planta Med.* 58 (1992), 163-165
- Fincher GB, Sawyer WH und Stone BA, *Biochem. J.* 139 (1974), 535-545
- Fincher GB, Stone BA und Clarke AE, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34 (1983), 47-70
- Fontaine T, Fournet B und Karamanos Y, *Journal of Microbiological Methods* 20 (1994), 149-157
- Fowler TJ, Bernhardt C und Tierney ML, *Plant Physiol.* 121 (1999), 1081-1091
- Frohne D, *Heilpflanzenlexikon*, 7. völlig neu bearb. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (2002), 130

- Gamborg OL und Phillips GC, in: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Fundamental Methods (Gamborg OL und Phillips GC, Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1995), 21-34
- Gane AM, Craik D, Munro SLA, Howlett GJ, Clarke AE und Bacic A, *Carbohydr. Res.* 277 (1995), 67-85
- Gaspar YM, Johnson KL, McKenna JA, Bacic A und Schultz CJ, *Plant Mol. Biol.* 47 (2001), 161-176
- Gebert A, Göke M, Rothkötter HJ und Dietrich CF, *Z. Gastroenterol.* 38 (2000), 855-872
- Gebert A und Pabst R, *Seminars in Immunology* 11 (1999), 165-170
- Genoust H, *Etymologisches Wörterbuch der botanischen Pflanzennamen*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin (1996), 93 und 646
- Gibeaut DM und Carpita NC, *Plant Physiol.* 97 (1991), 551-561
- Gleeson PA und Clarke AE, *Biochem. J.* 181 (1979), 607-621
- Gleeson PA, McNamara M, Wettenhall REH, Stone BA und Fincher GB, *Biochem. J.* 264 (1989), 857-862
- Goodrum LJ, Patel A, Leykam JF und Kieliszewski MJ, *Phytochemistry* 54 (2000), 99-106
- Green SJ, Aniagolu J und Raney JJ, in: *Current Protocols in Immunology* (Coligan JE, Kruisbeck AM, Margulies DH, Shevach EM, Stroeber W, Hrsg.) John Wiley & Sons, New York (1997), 14.5.1-14.5.11
- Groman EV, Enriquez PM, Jung C und Josephson L, *Bioconjugate Chem.* 5 (1994), 547-556
- Hakomori S, *J. Biochem. (Tokyo)* 55 (1964), 205-208
- Harnischfeger G und Stolze H, *Notabene Medici* 12 (1982), 930-938
- Harris PJ, Henry RJ, Blakeney AB und Stone BA, *Carbohydr. Res.* 127 (1984), 59-73
- Hawes GB und Adams GA, *Phytochemistry* 11 (1972), 1461-1465
- Heyman M, Bonfils A, Fortier M, Crain-Denoyelle AM, Smets P und Desjeux JF, *Int. J. Pharm.* 37 (1987), 33-41
- Hillestad A und Wold JK, *Phytochemistry* 16 (1977), 1947-1951

- Hoppe HA, *Drogenkunde*, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York (1975), 153-154
- Hušek P und Šimek P, *LCGC* 19, 9 (2001), 986-999
- Janecek F, Toman R, Karacsonyi S und Anderle D, *J. Chromatogr.* 173 (1979), 408-411
- Jelitto L, Schacht W und Feßler A, *Die Freiland-Schmuckstauden* (Schacht W, Feßler A, Hrsg.) Verlag Eugen Ulmer (1985), 93-94
- Jepson MA und Clark MA, *Trends in Microbiology* 6, 9 (1998), 359-365
- Jermyn MA und Yeow YM, *Aust. J. Plant Physiol.* 2 (1975), 501-531
- Johnson KL, Jones BJ, Schultz CJ und Bacic A, in: *The Plant Cell Wall*, Annual Plant Reviews 8 (Rose J, Hrsg.) Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK (2003), im Druck
- Joseleau JP und Chambat G, *Physiologie Végétale* 22, 4 (1984), 461-470
- Kieliszewski MJ, Kamyab A, Leykam JF und Lamport DTA, *Plant Physiol.* 99 (1992), 538-547
- Kieliszewski MJ und Lamport DTA, *Plant J.* 5 (1994), 157-172
- Kiyohara H, Yamada H, Cyong JC und Otsuka Y, *J. Pharmacobio-Dyn.* 9 (1986), 339-346
- Knee M, *Phytochemistry* 12 (1973), 1543-1549
- Knox JP, Day S und Roberts K, *Development* 106 (1989), 47-56
- Knox JP, Linstead PJ, Peart J, Cooper C und Roberts K, *Plant J.* 1 (1991), 317-326
- Knox JP, *FASEB J.* 9 (1995), 1004-1012
- Komalavilas P, Zhu JK und Nothnagel EA, *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 15956-15965
- Kopp B, Jurenitsch J und Kubelka W, *J. Chromatogr.* 210 (1981), 291-299
- Kreuger M und van Holst GJ, *Planta* 189 (1993), 243-248
- Kreuger M und van Holst GJ, *Planta* 197 (1995), 135-141
- Kumazawa Y, Mizunoe K und Otsuka Y, *Immunology* 47 (1982), 75-83
- Lamport DTA, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 21 (1970), 235-270

- Lindberg B, *Methods Enzymol.* 28 (1972), 178-195
- Lindberg B, *Chem. Soc. Rev.* 10 (1981), 409-434
- Lindequist U, in: *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, 5. neubearbeitete Auflage, Folgeband 3, Drogen L-Z (Blaschek W, Hänsel R, Keller K, Reichling J, Rimpler H, Schneider G, Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1998), 61-71 und 528-534
- Lindequist U, Teuscher E und Narbe G, *Z. Phytother.* 11 (1990), 139-149
- Luettig B, Steinmüller C, Gifford GE, Wagner H und Lohmann-Matthes ML, *J. Nat. Cancer Inst.* 81, 9 (1989), 669-675
- Majewska-Sawka A und Nothnagel EA, *Plant Physiol.* 122 (2000), 3-9
- Mort AJ und Lamport DTA, *Anal. Biochem.* 82 (1977), 289-309
- Mühlau A, Dissertation, Marburg/Lahn (2000)
- Murashige T und Skoog F, *Physiol. Plant.* 15 (1962), 473-497
- Needs PW und Selvendran RR, *Phytochem. Anal.* 4 (1993), 210-216
- Norman PM, Kjellbom P, Bradley DJ, Hahn MG und Lamb CJ, *Planta* 181 (1990), 365-373
- Nothnagel EA, *Int. Rev. Cyt.* 174 (1997), 195-291
- Osman ME, Menzies AR, Albo Martin B, Williams PA, Phillips GO und Baldwin TC, *Phytochemistry* 38, 2 (1995), 409-417
- Pennell RI, Knox JP, Scofield GN, Selvendran RR und Roberts K, *J. Cell Biol.* 108 (1989), 1967-1977
- Pennell RI und Roberts K, *Nature* 344 (1990), 547-549
- Pennell RI, Janniche L, Kjellbom P, Scofield GN, Peart JM und Roberts K, *Plant Cell* 3 (1991), 1317-1326
- Phillips GC und Collins GB, *Crop Science* 19 (1979), 59-64
- Ponder GR und Richards GN, *J. Carbohydr. Chem.* 16, 2 (1997), 195-211
- Prescott JH, Enriquez P, Jung C, Menz E und Groman EV, *Carbohydr. Res.* 278 (1995), 113-128
- Qi W, Fong C und Lamport DTA, *Plant Physiol.* 96 (1991), 848-855

- Randall RC, Phillips GO und Williams PA, *Food Hydrocoll.* 2 (1988), 131-140
- Randall RC, Phillips GO und Williams PA, *Food Hydrocoll.* 3 (1989), 65-75
- Römpp Chemie Lexikon, 9. erw. Auflage, Bd. 1, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1995), 160-162
- Rorrer GL, Hawley MC, Selke SM, Lamport DTA und Dey PM, in: *Methods in Plant Biochemistry* Vol. 2 (Dey PM, Hrsg.) Academic Press, London, San Diego (1990), 581-606
- Saller R, Reichling J und Hellenbrecht D, *Phytotherapie*, Karl F. Haug-Verlag, Heidelberg (1995), 385-387
- Samuelsen AB, Paulsen BS, Wold JK, Knutsen SH und Yamada H, *Carbohydrate Polymers* 35 (1998), 145-153
- Serpe MD und Nothnagel EA, *Planta* 193 (1994), 542-550
- Serpe MD und Nothnagel EA, *Plant Physiol.* 109 (1995), 1007-1016
- Serpe MD und Nothnagel EA, *Adv. Bot. Res.* 30 (1999), 207-289
- Shevach EM, in: *Current Protocols in Immunology* (Coligan JE, Kruisbeck AM, Margulies DH, Shevach EM, Stroeber W, Hrsg.) John Wiley & Sons, New York (1997), S. A.3D.1
- Showalter AM, *Plant Cell* 5 (1993), 9-23
- Showalter AM und Varner JE, in: *The Biochemistry of Plants* (Marcus A, Hrsg.) Academic Press, New York (1989), 485-536
- Shpak E, Barbar E, Leykam JF und Kieliszewski MJ, *J. Biol. Chem.* 276 (2001), 11272-11278
- Smallwood M, Yates EA, Willats WGT, Martin H und Knox JP, *Planta* 198 (1996), 452-459
- Sommer-Knudsen J, Clarke AE und Bacic A, *Plant J.* 9 (1996), 71-83
- Stacey NJ, Roberts K und Knox JP, *Planta* 180 (1990), 285-292
- Staesche K und Schleinitz H, in: *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, 5. neubearbeitete Auflage, Bd. 4, (Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G, Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1998), 461-467
- Steinegger E und Hänsel R, *Pharmakognosie*, 5. Auflage, Springer-Verlag (1992), 648-649

- Strahm A, Amato R und Neukom H, *Phytochemistry* 20 (1981), 1061-1063
- Sweet DP, Shapiro RH und Albersheim P, *Carbohydr. Res.* 40 (1975), 217-225
- Taylor RL und Conrad HE, *Biochemistry* 11 (1972), 1383-1388
- Tegtmeier M, in: *Angewandte Botanikberichte* 6, (Institut für Angewandte Botanik, Universität Hamburg, Hrsg.) *Baptisia tinctoria* (L.) R. Br. (1997), 30-45
- Timell TE, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 20 (1965), 409-483
- van Holst GJ, Klis FM, de Wildt PJM, Hazenberg CAM, Buijs J und Stegwee D, *Plant Physiol.* 68 (1981), 910-913
- Varljen J, Lipták A und Wagner H, *Phytochemistry* 28, 9 (1989), 2379-2383
- Wagner H, in: *Polysaccharide* (Franz G, Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1991), 117-137
- Wagner H und Jurcic K, *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 41 (II) Nr. 10 (1991), 1072-1076
- Wagner H und Proksch A, in: *Economic and Medicinal Plant Research* Vol.1 (Wagner H, Hikino H, Farnsworth NR, Hrsg.) Academic Press, London (1985), 113-153
- Wagner H, Proksch A, Riess-Maurer I, Vollmar A, Odenthal S, Stuppner H, Jurcic K, Le Turdu M und Fang JN, *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 35 (II) Nr. 7 (1985), 1069-1075
- Wagner H, Stuppner H, Schäfer W und Zenk M, *Phytochemistry* 27 (1988), 119-126
- Willats WGT und Knox JP, *Plant J.* 9 (1996), 919-925
- Wolfrom ML und Patin DL, *J. Org. Chem.* 30 (1965), 4060-4063
- Wüstenberg P, Henneicke-von Zepelin HH, Köhler G und Stammwitz U, *Advances in Therapy* 16, 1 (1999), 51-70
- Yamada H, Kiyohara H, Cyong JC und Otsuka Y, *Carbohydr. Res.* 159 (1987), 275-291
- Yariv J, Rapport MM und Graf L, *Biochem. J.* 85 (1962), 383-388
- Yariv J, Lis H und Katchalski E, *Biochem. J.* 105 (1967), 1-2C
- Yu KW, Kiyohara H, Matsumoto T, Yang HC und Yamada H, *Planta Med.* 64 (1998), 714-719

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Blaschek.

Herrn Prof. Dr. W. Blaschek danke ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des unerschöpflichen Themas und wissenschaftliche Betreuung. Seine Anregungen, Ideen und Denkanstöße haben sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Weiterhin möchte ich mich für die Genehmigung und Unterstützung meines Australien-Aufenthaltes bedanken.

Ich werde mich immer gerne an die harmonische und familiäre Atmosphäre in seinem Arbeitskreis erinnern.

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Dr. Birgit Classen für ihre unermüdliche Unterstützung. Ihre Einführung in das Thema und fachliche Anleitung waren gerade zu Beginn der Arbeit eine große Hilfe. Besonders danke ich ihr dafür, dass sie mir während der ganzen Zeit nicht nur als kompetente Beraterin, sondern auch als Freundin zur Seite stand.

Dr. Uli Girreser danke ich für die Durchführung der GC-MS- und NMR-Analysen. Trotz seines Misstrauens gegenüber biologischen Proben war er stets bereit, über seinen Schatten zu springen und das „Klebszeug“ zu vermessen.

Prof. Dr. A. Bacic und Dr. S.-L. Mau danke ich für die Möglichkeit des produktiven und unvergesslichen Aufenthaltes an der School of Botany der University of Melbourne. Während fünf Wochen praktischer Arbeit in ihrem Labor konnte ich mich verstärkt mit der Komplexität der isolierten Glykoproteine auseinandersetzen.

Dr. Cornelia Bodinet möchte ich, stellvertretend für die Firma Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG, für die Durchführung der immunologischen Testungen und die Bereitstellung des Ausgangsdrogenmaterials danken.

PD Dr. Jörg Heilmann von der ETH Zürich danke ich für die Durchführung der Transportstudien. Hoffentlich werden wir auch weiterhin gesellige und lustige Abende auf diversen Kongressen verbringen.

Nicht zuletzt sei allen Mitarbeitern meines Arbeitskreises, besonders meinen Mit-Doktoranden Jörn, Kathrin, Sebastian und Saskia, Dr. Rainer-Bertram Volk, den Gärtnern Dietrich und Carsten, den zahlreichen helfenden Händen Frauke, Helle, Kirsten, Sandra, Alice und Kalle für drei schöne Jahre freundschaftliche Zusammenarbeit im Praktikum und Labor, Teetrinken mit Diskussionen, Cointreau und zahlreiche Feiern gedankt.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders für die Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotionszeit. Letztendlich danke ich meinen Eltern, meinem Bruder Marcus und meinem Freund Stephan dafür, dass sie da waren, wenn ich sie brauchte, und für das Verständnis, das mir in der teilweise anstrengenden Endphase der Arbeit entgegengebracht wurde.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Maren Wack
Geburtsdatum: 03. November 1971
Geburtsort: Kellinghusen
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung:

08/1978-07/1982 Grundschule Kellinghusen
08/1982-07/1991 Jürgen-Fuhlendorf-Gymnasium Bad Bramstedt
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

08/1991-07/1992 Praktikum Schwan-Apotheke Hamburg
08/1992-01/1995 Ausbildung zur Pharmazeutisch-Technischen Assistentin
Theodor-Litt-Schule Neumünster
Greif-Apotheke Kellinghusen
04/1995-07/1999 Pharmaziestudium an der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel
Abschluss: 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
08/1999-07/2000 Pharmaziepraktikum
G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. Hohenlockstedt
Skarabäus-Apotheke Kiel
Abschluss: 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Promotion:

Seit 10/2000 Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Pharmazeutischen Institut der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung
von Prof. Dr. W. Blaschek

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Kellinghusen, am 15.12.03

Maren Wack