

**Strukturelle und immunpharmakologische
Untersuchungen zu Arabinogalactan-Proteinen und
einem Arabinan aus *Echinacea sp.***



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

vorgelegt von
Sebastian Thude
Kiel 2005

Referent:	Prof. Dr. W. Blaschek
Korreferent:	Prof. Dr. E. Maser
Tag der mündlichen Prüfung:	26.04.2005
Zum Druck genehmigt:	Kiel, den 04.05.2005

Prof. Dr. J. Grotemeyer
(Dekan)

Für meine Familie

1.	Einleitung und Zielsetzung	
1.1	Echinacea - von der traditionellen Anwendung bis zur rationellen Phytotherapie	1
1.2	Botanische Beschreibung und Abgrenzung der Art <i>Echinacea pallida</i>	2
1.3	Typische Inhaltsstoffe der Art <i>Echinacea pallida</i>	4
1.4	Unterscheidung von <i>Echinacea</i>-Arten	5
1.5	Klinische Studien zur immunstimulierenden Wirkung	6
1.6	Immunologisch wirksame Bestandteile in Echinaceazubereitungen	7
1.7	Arabinogalactan-Proteine (AGPs)	9
1.8	Zielsetzung der Arbeit	13
2.	Experimenteller Teil	
2.1	Methoden zur Extraktion und Isolierung	14
2.1.1	Extraktherstellung und Aufreinigung einer hochmolekularen Fraktion	14
2.1.2	Yariv-Synthese	15
2.1.3	Fällung der AGPs mit dem Yarivreagenz	16
2.1.4	Isolierung des Arabinans aus dem Überstand der Yarivfällung.....	17
2.2	Chemische und chromatographische Methoden	
2.2.1	Bestimmung der neutralen Monosaccharide (Blakeney et al., 1983)	17
2.2.2	Gelpermeationschromatographie (GPC).....	19
2.2.3	Uronsäurebestimmung nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen, 1973.....	20
2.2.4	Uronsäurebestimmung nach Taylor und Conrad, 1972	20
2.2.5	Uronsäurebestimmung nach Fontaine et al., 1994	21
2.2.6	Partialhydrolyse nach Gleeson und Clarke, 1979	21
2.2.7	Methylierungsanalyse nach Harris et al., 1984	22
2.2.8	Qualitative und quantitative Aminosäurenbestimmung per GC	25
2.2.9	Qualitative und quantitative Aminosäurenbestimmung per HPLC.....	27
2.2.10	Photometrische Hydroxyprolinbestimmung	28
2.3	Pharmakologische und immunologische Methoden	
2.3.1	Lymphozyten-Proliferationstest (LPT)	29
2.3.2	Bestimmung der IgM-Produktion	30

2.3.3	Cytokininduktion (IL-1, IL-6, TNF- α , GM-CSF und IFN- γ).....	30
2.3.4	Bestimmung der NO ₂ -Produktion	31
2.3.5	Kompetitiver ELISA	31
2.3.6	Durchflusszytometrie	33
2.3.6.1	Durchführung indirekte Fluoreszenzmarkierung	33
2.3.6.2	Kompetitive direkte Fluoreszenzmarkierung.....	34
2.4	Andere Methoden	
2.4.1	Geldiffusionstest.....	35
2.4.2	NMR-Spektroskopie.....	36
2.5	Allgemein genutzte Geräte	37
3.	Ergebnisse des analytischen Teils	
3.1	Isolierungsgang und Neutralzuckerzusammensetzungen von Zwischen- und Endprodukten	
3.1.1	Extraktion und Isolierung von Retentat und Filtrat.....	38
3.1.2	Neutralzuckerzusammensetzung von Retentat und Filtrat.....	39
3.1.3	Geldiffusionstest von Retentat und Filtrat	41
3.1.4	Neutralzuckerzusammensetzung AGP	42
3.1.5	Aufreinigung Arabinan	44
3.1.6	Neutralzuckerzusammensetzung Arabinan.....	45
3.2	Gelpermeationschromatographie	47
3.2.1	Chromatogramm AGP.....	48
3.2.2	Chromatogramm Arabinan.....	48
3.3	Ausbeuten von AGP und Arabinan	49
3.4	Quantifizierung und Charakterisierung von Uronsäuren im AGP	
3.4.1	Gesamturonsäurebestimmung nach Blumenkrantz.....	50
3.4.2	Neutralzuckerzusammensetzung nach Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad	51
3.4.3	Neutralzuckerzusammensetzung nach Uronsäurereduktion nach Fontaine	52

3.5	Neutralzuckerzusammensetzung der Produkte nach Partialhydrolyse des AGPs	53
3.5.1	Neutralzuckerzusammensetzung des Rückstandes	53
3.5.2	Neutralzuckerzusammensetzung des Coreanteils	54
3.5.3	Neutralzuckerzusammensetzung des Überstandes	54
3.5.4	Vergleich der Neutralzuckerzusammensetzungen	55
3.6	Bestimmung der Zucker-Bindungstypen im AGP	56
3.6.1	Glykosidische Bindungstypen im AGP	56
3.6.2	Glykosidische Bindungstypen der Produkte nach Partialhydrolyse	57
3.6.3	Glykosidische Bindungstypen nach Uronsäureduktionen	59
3.6.3.1	Bindungstypen von FUron und TUron im Vergleich zum AGP	59
3.6.3.2	Bindungstypen im uronsäureduzierten Core im Vergleich zum Core und AGP	60
3.7	Bestimmung der Bindungspositionen im Arabinan	62
3.8	NMR-Spektroskopie	63
3.8.1	¹³ C-NMR des AGPs	63
3.8.2	¹³ C-NMR des Arabinans	65
3.9	Charakterisierung des Proteinanteils im AGP	
3.9.1	Bestimmung von Aminosäuren per GC	66
3.9.1.1	Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Pepsin	67
3.9.1.2	Qualitative Zusammensetzung des Proteinanteils im AGP	68
3.9.2	Bestimmung von Aminosäuren per HPLC	69
3.9.3	Bestimmung von Hydroxyprolin	70
3.10	Yarivreaktionen mit modifiziertem AGP und Arabinan	71
3.11	Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen AGPs und Arabinan	71
3.11.1	Kreuzreaktivität eines monoklonalen Antikörpers	72
3.11.2	Kreuzreaktivität eines polyklonalen Antikörpers	73
4.	Ergebnisse Immunologie	
4.1	Milzzellenproliferation	74
4.1.1	Proliferation von Milzzellen in NMRI-Mäusen	75

4.1.2	Proliferation von Milzzellen in Balb/c Mäusen	76
4.1.3	Proliferation von Milzzellen in C3H/HeJ-Mäusen.....	77
4.1.4	Vergleich der Stimulationsindex(SI)-Werte von verschiedenen Milzzellen.....	78
4.2	IgM-Proliferation	79
4.3	Nitritproduktion in alveolären Maus-Makrophagen-Kulturen.....	80
4.4	Cytokininduktion in Mauszellen.....	81
4.4.1	IL-1 β Produktion in alveolären Maus-Makrophagenkulturen	82
4.4.2	IL-6 Produktion in alveolären Maus-Makrophagenkulturen	83
4.4.3	TNF- α Produktion in Maus-Peritonealmakrophagenkulturen	84
4.4.4	IFN- γ Produktion in Milzzellkulturen von NMRI-Mäusen	85
4.4.5	GM-CSF Produktion in Milzzellkulturen von NMRI-Mäusen	86
4.5	Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen	87
4.5.1	Bindung von AGP an die Zelloberflächen verschiedener Leukozyten	87
4.5.2	Konzentrationsabhängige Bindung von AGP an die Zelloberflächen verschiedener Leukozyten.....	90
4.5.3	Ergebnisse der kompetitiven direkten Fluoreszenzmarkierung	92
5.	Diskussion der Ergebnisse	95
5.1	Diskussion – Strukturaufklärung	95
5.2	Diskussion – immunologische Tests.....	113
5.3	Zielstrukturen von AGPs auf menschlichen Leukozyten.....	118
6.	Zusammenfassung.....	121
	Bisherige wissenschaftliche Tätigkeit	123
7.	Literaturliste	124
	Danksagung und Lebenslauf.....	135

Abkürzungsverzeichnis

AG	Arabinogalactan
AGP	Arabinogalactan-Protein
aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
aqua dem.	demineralisiertes Wasser
AK	Antikörper
Ala	Alanin
Asp	Asparaginsäure
Ara	Arabinose
Arg	Arginin
BSA	Rinderserumalbumin
Con A	Concanavalin A
cpm	gezählte Einheiten pro Minute
Cys	Cystein
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence Associated Cell Sorter
FI	Fluoreszenzintensität
FID	Flammenionisationsdetektor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC-H	Vorwärtsstrulicht
Gal	Galactose
GalA	Galacturonsäure
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
GPC	Gelpermeationschromatographie
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRGP	hydroxyprolinreiches Glykoprotein
Hyp	Hydroxyprolin
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin

Abkürzungsverzeichnis

Man	Mannose
Met	Methionin
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewichtsausschlussgrenze
NIR	nahe Infrarotspektroskopie
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NO	Stickstoffoxid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
Phe	Phenylalanin
PMAA	permethyliertes Alditolacetat
Pro	Prolin
Rha	Rhamnose
SSC-H	Seitwärtsstreulicht
SEC	Größenausschlusschromatographie
Ser	Serin
SI	Stimulationsindex
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
TIC	Totalionenchromatogramm
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
Xyl	Xylose

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 *Echinacea* - von der traditionellen Anwendung bis zur rationellen Phytotherapie

Erste Berichte über die Anwendungen von Pflanzen der Gattung *Echinacea* stammen aus dem 18. Jahrhundert (Wedel, 1936). In Nordamerika nutzten Medizinmänner verschiedener Indianerstämme diese Pflanzen gegen viele Krankheiten und Leiden. So ist überliefert, dass *Echinacea* unter anderem innerlich bei Vergiftungen durch Schlangenbisse oder Insekten, Magenkrämpfen, Masern, Mumps, Husten und Rachenentzündungen verabreicht wurde. Auch äußerlich wurde *Echinacea* als Analgetikum bei Nackenschmerzen und Zahnschmerzen, gegen Furunkel und zur „Rauchtherapie“ bei Infektionen der oberen Atemwege bei Pferden, der sogenannten Druse, angewandt (Gilmore, 1919; Hart, 1981; Bauer und Wagner, 1990). Durch die häufige Verwechslung von *Echinacea* Arten, besonders von *Echinacea pallida* und *Echinacea angustifolia*, kann man nachträglich nur noch aus den ursprünglichen Verbreitungsgebieten oder archäologischen Funden dieser Pflanzen mit Sicherheit sagen, welche Drogen bei den Indianerstämmen eingesetzt wurden. Durch das überlieferte Wissen der Indianer kamen auch die ersten Siedler aus Europa im 18. Jahrhundert in Kontakt mit *Echinacea*. Armeemärkte und Forscher setzten die Pflanzen gegen Vergiftungen durch Klapperschlangenbisse, Syphilis und Sattelwunden bei Pferden ein (Schöpf, 1787; Hayden, 1859).

Größere Bedeutung erlangte *Echinacea* Mitte des 19. Jahrhunderts durch die Eklektiker, eine Gruppe von Ärzten, die auf die Wirkung von Heilpflanzen vertrauten und *Echinacea* bekannt

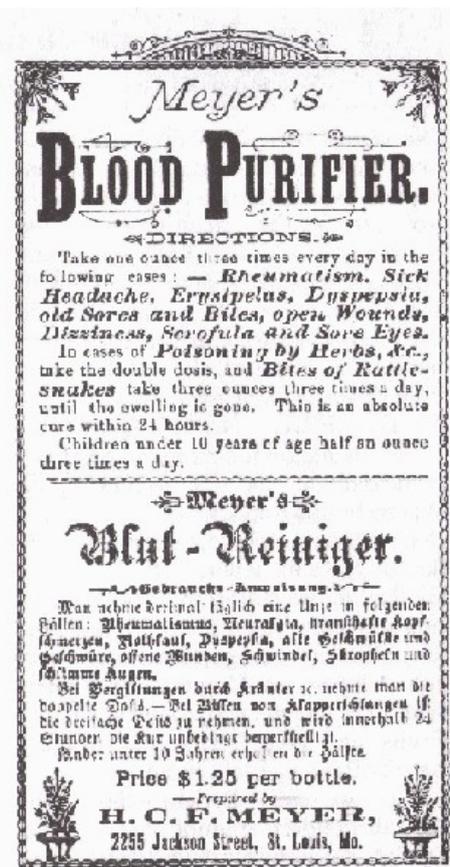


Abb. 1.1: Etikett des ersten *Echinacea*-Präparates um 1880 (aus Bauer und Wagner, 1990)

machten (King und Newton, 1852). Ein Deutscher namens H.C.F Meyer vertrieb um 1880 das erste *Echinacea*-Präparat (Abb. 1.1) aus *Echinacea angustifolia* als „Blut-Reiniger“ gegen verschiedene Infektionen. Um 1894 stellten die Gebrüder LLoyd industriell die erste Tinktur aus *Echinacea* her, die große Akzeptanz fand. Gute Heilerfolge und die Verbreitung nach Europa steigerten den Umsatz bis zu seinem Höhepunkt um 1920 (Lloyd, 1904 und 1917).

Mangelnde wissenschaftlichen Grundlagen, Verfälschungen und die immer noch nicht eindeutige systematische Einteilung der einzelnen *Echinacea*-Arten führten zu einem Nachlassen des *Echinacea*-Booms in Amerika, so dass Mitte der 30er Jahre kaum noch Artikel über *Echinacea* erschienen.

Trotzdem waren *Echinacea*-Präparate weiterhin von Bedeutung, vor allem in der Homöopathie. Mitte der 30er Jahre wurde von Madaus *Echinacea purpurea* versehentlich nach Europa eingeführt und aufgrund unerwartet guter Heilerfolge gleichberechtigt zu *Echinacea angustifolia* angesehen (Bauer und Wagner, 1990).

Das Interesse an *Echinacea* ist ungebrochen. Der Suchbegriff „*Echinacea*“ ergibt im Internet bei der Suchmaschine „Google™“ ca. 1,3 Mio Treffer, *Echinacea pallida* 28.000 Treffer.

Heute gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen zu *Echinacea*; so findet man in Datenbanken ca. 1400 Artikel über *Echinacea* allgemein, 118 Artikel speziell über *Echinacea pallida*. Besonders der Arbeitskreis Wagner und Bauer hat Mitte bis Ende der 80er Jahre zahlreiche Artikel zum Thema *Echinacea* veröffentlicht. Neben einer Vielzahl von Präparaten aus dem Reformhaus führt die „Rote Liste“ 22 Präparate (Stand Februar 2005), in denen Pflanzen der Gattung *Echinacea* als Monopräparat oder in Kombination als „pflanzliche Immunstimulanzien“ aufgeführt sind. Die Kommission E (1992) bewertet das frische Kraut von *Echinacea purpurea* und die Wurzeln von *Echinacea pallida* positiv und empfiehlt die Anwendung zur „unterstützenden Therapie“ bei grippeartigen Infekten.

1.2 Botanische Beschreibung und Abgrenzung der Art *Echinacea pallida*

Da sich diese Arbeit überwiegend mit Inhaltsstoffen aus den Wurzeln vom blassfarbenen Sonnenhut (*Echinacea pallida*) beschäftigt, soll diese Art näher beschrieben werden.

Die Art *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt gehört zur Gattung *Echinacea* MOENCH, zur Familie der Asteraceae und zur Ordnung Asterales (U.S.D.A., 1982). Der Begriff *Echinacea* leitet sich vom griechischen echinos ab, das bedeutet „großer Igel“, während *pallida* (lat.) blass bedeutet.

Es handelt sich um eine ausdauernde Pflanze von 40-90cm Höhe mit länglich-lanzettlichen, ganzrandigen, dreinervigen, dunkelgrünen Blättern, die beiderseits behaart sind. Die Grundblätter sind 10-35cm lang, 1-4cm breit, spitz, unten kurz gestielt und oben sitzend. Die Hüllblätter sind lanzettlich bis schmal länglich, 8-17mm lang und 2-4mm breit. Die 4-9cm langen Zungenblüten sind zurückgebogen, 5-8mm breit und purpurn, rosa oder weiss. Die artspezifischen Merkmale von *Echinacea pallida* zur Unterscheidung von *Echinacea angustifolia* sind die Chromosomenzahl von $2n = 44$, die größere Wuchshöhe, die weisse Farbe der Pollenkörner, die Länge der Zungenblüten und das Auftreten von Ölgängen im Mark und der Rinde des Stengels (nach Bauer und Wagner, 1990). Der morphologische Bestimmungsschlüssel nach McGregor (1968) für Pflanzen der Gattung *Echinacea* berücksichtigt viele dieser Merkmale.



Abb. 1.2: Pflanzen und Wurzeldrogen der Art *Echinacea pallida* (aus Wichtl et al., 2002)

1.3 Typische Inhaltsstoffe der Art *Echinacea pallida*

Die wichtigsten Inhaltsstoffklassen dieser Pflanze sind Kaffeesäurederivate, Flavonoide, ätherisches Öl, Polyacetylene und Polysaccharide. Der jeweilige Gehalt schwankt unter anderem in Abhängigkeit vom untersuchten Pflanzenteil und dem Erntezeitpunkt. Als hauptsächliches Kaffeesäurederivat findet sich Echinacosid (0,4-1,7% vom Trockengewicht) (Bauer und Wagner, 1987), aber auch Verbascosid, 2-O-Caffeoylsäure und Chlorogensäure (Remiger, 1989) wurden identifiziert. Im Kraut von *Echinacea pallida* finden sich Flavonoide (0,38% m/m), vor allem Rutin (Bauer und Wagner, 1988). Der Gehalt an ätherischem Öl in den Wurzeln beträgt 0,2-2,0% (Heinzer et al., 1988). Viele Polyacetylene (berechnet auf luftgetrocknete Wurzeln 2%), vor allem Ketoalkene und Ketoalkine sind typisch für *Echinacea pallida*. Von diesen instabilen Verbindungen, die durch Luftsauerstoff oxidationsanfällig sind, konnten neben anderen Tetradeca-8Z-en-11,13-diin-2-on, Pentadeca-8Z-en-11,13-diin-2-on und Pentadeca-8Z,13Z-dien-11-in-2-on identifiziert werden (Bauer et al., 1988). Polysaccharide und Glykoproteine unbekannter Struktur, die nach Hydrolyse Arabinose, Galactose und Rhamnose liefern, kommen auch vor. Folgende Polysaccharide wurden aus *Echinacea purpurea* isoliert: aus dem Kraut 4-O-Methylglucuronoarabinoxylan, Arabinorhamnogalacturonan und verschiedene Pektine, aus Gewebekulturen Arabinogalactane (50.000 Dalton) und Fucogalactoxylane sowie aus dem Presssaft ein Arabinogalactan-Protein (1,2 Mio Dalton). Ob diese Polymere in gleicher oder ähnlicher Form in *Echinacea pallida* vorkommen, lässt sich nur vermuten. Neben diesen Inhaltsstoffklassen finden sich in *Echinacea pallida* noch ungesättigte Fettsäuren, Alkane und Spuren von Alkaloiden (Bauer und Wagner, 1990; Frohne, 2002; D'Amelio, 1999).

1.4 Unterscheidung von *Echinacea*-Arten

Folgende Tabelle zeigt die wichtigsten Unterschiede der Inhaltsstoffzusammensetzung verschiedener medizinisch genutzter *Echinacea*-Arten:

	<i>E. pallida</i> Wurzeln	<i>E. purpurea</i> Kraut	<i>E. angustifolia</i> Wurzeln
Kaffeesäurederivate	Echinacosid - Spuren von Cich. Caftarinsäure Spuren von Chlorogens.	- - Cichoriensäure Caftarinsäure Chlorogensäure	Echinacosid Cynarin Spuren von Cich. - Spuren von Chlorogens.
äth. Öl	0,2 -2,0 %	max. 0,6%	weniger 0,1%
Polyacetylene	Ketoalkenine	-	-
Alkylamide	-	einfach ungesättigt	doppelt ungesättigt
Flavonoide	-	Rutin	-

Tab. 1.1: typische Inhaltsstoffe verschiedener *Echinacea*-Arten und ihr Vorkommen

Die spezifische Zusammensetzung der Inhaltsstoffe ist ein wichtiger Faktor zur Identifizierung der jeweiligen *Echinacea*-Art. So nutzt die Industrie eine spezielle dünnschichtchromatografische Methode auf der Basis der lipophilen Bestandteile (Schicke et al., 2004) zur Identifizierung von Wurzeln aus *Echinacea pallida*. Eine HPLC-Methode und eine NIR-Methode (NIR: nahe Infrarotspektroskopie) wurden entwickelt, um anhand von Alkamiden und Kaffeesäurederivaten die in Tab. 1.1 genannten *Echinacea*-Arten und eine Verfälschung (*Parthenium integrifolium*) zu identifizieren (Laasonen et al., 2002).

Eine Alternative zur Bestimmung der *Echinacea*-Arten ist die genetische Charakterisierung durch die RAPD-Analyse (Random Amplified Polymorphic DNA). Spezies spezifische Marker zeigen genetische Unterschiede und ermöglichen die Identifizierung der drei *Echinacea*-Arten (Nieri et al., 2003).

1.5 Klinische Studien zur immunstimulierenden Wirkung

Aus einer Vielzahl von klinischen Studien sollen hier nur einige aufgezählt werden:

So zeigt eine randomisierte, placebo-kontrollierte Studie (Dorn, 1989), dass eine sechstägige Gabe des Kombinationspräparates Resistan® verschiedene aufgeführte Erkältungssymptome (Husten, Halsschmerzen etc.) bei 100 Patienten mit akuten Infekten der oberen Atemwege signifikant mildern konnte. Eine weitere placebokontrollierte Doppelblindstudie (609 Teilnehmer) mit dem gleichen Medikament im Rahmen einer Erkältungsprophylaxe senkte das Auftreten von Erstinfekten um 15%, das Auftreten von Rezidivinfekten um 27% in der Verumgruppe gegenüber Placebo (Schmidt et al., 1990).

120 Patienten erhielten in einer GCP-konformen Doppelblindstudie mit beginnender Erkältung max. 10 Tage lang oder bis zum Abklingen der Symptome Echinacin® (Presssaft aus *Echinacea purpurea*). Sowohl das Ausmaß des Krankheitsbildes als auch die Dauer der Erkältung (Durchschnitt: Placebo 10 Tage; Echinacin® 5 Tage) konnten unter Echinacin® gegenüber Placebo signifikant vermindert werden (Hoheisel et al., 1997).

In einer weiteren randomisierten dreiarmligen Doppelblindstudie wurden 246 Patienten mit Erkältungssymptomen entweder mit 3 x 2 Tabletten Echinaforce® (6,78mg Echinacea-purpurea-Trockenextrakt, 95% Kraut und 5% Wurzel), mit einem Echinacea-Konzentrat (47,27mg gleicher Extrakt), mit einem *Echinacea purpurea* Spezialextrakt (29,6mg Wurzel) oder mit Placebo behandelt (Brinkeborn et al., 1999). Echinaforce und der konzentrierte Extrakt erwiesen sich gegenüber dem Echinacea-Spezialextrakt und Placebo signifikant überlegen.

Das Mischpräparat Esberitox® (*Thuja occidentalis*, *Baptisia tinctoria*, *Echinacea purpurea* und *pallida*) wurde bei 263 akut erkälteten Patienten über 7 bis 9 Tage in der Dosierung 3 x 3 Tabletten mit Placebo verglichen. Es ergab sich eine signifikante Verbesserung verschiedener Parameter (Rhinitis-Score, Bronchitis-Score, allgemeines Wohlbefinden etc.) mit der Einnahme von Esberitox gegenüber Placebo, besonders bei frühzeitiger Einnahme des Präparates (Hentschel et al., 2000).

Eine doppelblinde randomisierte Studie mit 128 Teilnehmern zeigte, dass eine auf Cichoriensäure, Alkamide und Polysaccharide standardisierte Formulierung aus *Echinacea purpurea* (Echinilin®) für eine schwächere Ausbildung von Erkältungssymptomen sorgte,

wenn das Präparat bei beginnender Erkältung eingenommen wurde. Die Symptome wurden in einem Punkteschema gemessen und waren im Verum gegenüber Placebo um 23,1% erniedrigt.

Eine monozentrische dreiarmlige placebokontrollierte Studie (180 Teilnehmer) ergab für einen ethanolischen Extrakt (55% V/V) aus *Echinacea purpurea* (DEV 1: 5) bei einer Gabe von 450mg pro Tag keine Vorteile gegenüber der Placebogruppe. Bei einer Dosierung von 900mg zeigte der Extrakt eine signifikante Überlegenheit gegenüber Placebo, gemessen an verschiedenen Parametern (Bräunig et al., 1992).

In einer doppelblinden randomisierten Studie mit 407 Kindern zwischen 2 und 11 Jahren konnten mit *Echinacea purpurea* (keine Angaben zur Arzneiform) keine Vorteile gegenüber Placebo nachgewiesen werden. So wurden mit eingesetzter Dosierung weder Dauer noch Symptome der Erkältung gegenüber Placebo vermindert. Unter Gabe des Verums kam es vermehrt zu Hautausschlägen durch Korbblütlerallergie (Taylor et al., 2003).

Die orale Gabe eines Presssafts aus frischem *Echinacea purpurea* Kraut bewirkte bei 40 Teilnehmern im Durchschnitt weder vermehrte Phagozytoseaktivität von Leukozyten noch kam es zu einer vermehrten Cytokinausschüttung (TNF- α , IL-1) (Schwarz et al., 2002).

Diese zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Studien zeigen, dass es Probleme mit dem Wirksamkeitsnachweis von *Echinacea*-Zubereitungen gibt. So sind die Ergebnisse der Studien unter anderem abhängig von der Art der verwendeten Zubereitung, insbesondere des Extraktionsmittels, dem extrahierten Drogenteil und der Verwendung von standardisierten Extrakten. Hinzu kommen die Schwierigkeiten der objektiven Beurteilung von subjektiven Erkältungssymptomen in Kombination mit Parametern, die bei Studien generell wichtig sind (z.B. Teilnehmerzahl, Art der Durchführung, Definition von Zielgrößen etc.).

Trotzdem kann für eine Reihe von pflanzlichen echinaceahaltigen Arzneispezialitäten eine klinische Wirksamkeit belegt werden. Es wird eine Einnahme dieser Präparate bei den ersten Anzeichen einer Erkältung und nicht länger als 8 bis 10 Tage empfohlen (Dingermann und Loew, 2003).

1.6 Immunologisch wirksame Bestandteile in Echinaceazubereitungen

Es existieren viele Veröffentlichungen zur immunologischen Wirksamkeit von Extrakten und Inhaltsstoffen aus *Echinacea*-Arten. Besonders in älteren Experimenten zur immunologischen Wirkung wurden keine standardisierten Extrakte mit definierter chemischer Zusammensetzung verwendet, häufig ist sogar unklar, welche Pflanzen getestet wurden. Auch bei neueren Studien wurden Extrakte unbekannter chemischer Zusammensetzung oder Mischextrakte verschiedener Pflanzen getestet, was die Identifizierung wirksamer Komponenten erschwert. Die genaue Kenntnis der wirksamen Bestandteile sowie der Unterschiede in der Wirkung der Echinaceapflanzen ist erstrebenswert, denn nur dann können im Sinne einer rationellen Phytotherapie auf die wirksamen Inhaltsstoffe standardisierte Extrakte eingesetzt werden.

Viele Studien zeigen ähnliche Ergebnisse wie die hier aufgeführten:

Bauer et al. demonstrierten in mehreren Versuchen mit ethanolischen Wurzelextrakten aus drei Echinaceaarten eine Steigerung der Phagozytoseaktivität mit guten *in-vitro/in-vivo* Korrelationen. Der ethanolische Wurzelextrakt aus *Echinacea purpurea* zeigte die höchste Aktivität. Der ethanolische Extrakt wurde in eine lipophile und eine hydrophile Fraktion getrennt, wobei die hydrophile Fraktion aufgrund der vorherigen Ethanolextraktion kaum Polysaccharide enthielt.

Pflanze	Extraktauftrennung	überw. Bestandteil	Phagozytoseaktivität
<i>Echinacea purpurea</i>	lipophil	Alkylamide	↑↑
	hydrophil	Cichoriensäure	↑
<i>Echinacea pallida</i>	lipophil	Polyine, Polyene	↑↑
	hydrophil	Echinacosid	-
<i>Echinacea angustifolia</i>	lipophil	Alkylamide	↑
	hydrophil	Echinacosid, Cynarin	-

Tab. 1.2: Inhaltsstoffe verschiedener *Echinacea*-Arten und ihr Potenzial, die Phagozytoseaktivität zu steigern

Die Versuche wurden mit Ethanolextrakten aus dem Kraut der drei *Echinacea*-Arten wiederholt. Hier zeigte der Extrakt aus *Echinacea pallida* die höchste Aktivität.

Bauer et al. kamen zu dem Schluss, dass es sich nicht um ein singuläres Wirkprinzip handeln kann, sondern eine Kombination von Wirkprinzipien. Anteil an der Wirkung haben Alkylamide, Cichoriensäure und Polysaccharide, über das immunologische Potenzial von in den Pflanzen enthaltenen Polysacchariden konnte hier allerdings keine Aussage gemacht werden (Bauer et al., 1988; Bauer et al., 1989; Wagner et al., 1985).

Beuscher et al. prüften hochmolekulare Retentate (>10.000Da) aus drei *Echinacea*-Arten, die überwiegend Polysaccharide und Glykoproteine enthielten, auf ihre biologische Aktivität. Der Extrakt aus *Echinacea purpurea* zeigte die höchste Aktivität, was auch mit dem höheren Gehalt von Polysacchariden und Glykoproteinen gegenüber *Echinacea pallida* und *angustifolia* gut korreliert. Gemessen wurde die antivirale Aktivität, Induktion von Interferon- α , Mitogenstimulation, die Produktion von IgM und bestimmten Cytokinen (Beuscher et al., 1995).

Ein isoliertes Arabinogalactan-Protein aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* zeigte komplement-aktivierende Eigenschaften (Alban et al., 2002).

Mehrfach ungesättigte Alkamide aus *Echinacea angustifolia* inhibieren *in vitro* in Abhängigkeit von der Struktur die Cyclooxygenase und die 5-Lipoxygenase (Muller-Jakic et al., 1994). Beide Enzyme spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der körpereigenen Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen.

Neueste Untersuchungen zeigen, dass Alkamide aus Echinaforce® (Extrakt aus Kraut und Wurzeln von *Echinacea purpurea*) über den Cannabinoidrezeptor CB2 die de novo Synthese von TNF- α -mRNA induzieren (Gertsch et al., 2004).

1.7 Arabinogalactan-Proteine (AGPs)

Ein großer Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der strukturellen Charakterisierung und der immunologischen Aktivität von AGPs aus *Echinacea*. Daher sollen diese nun näher beschrieben werden.

AGPs sind pflanzliche Glykoproteine (früher Proteoglykane), wobei der Polysaccharidanteil mindestens 90% ausmacht und der Proteinanteil mit 1-10% wesentlich kleiner ist. Viele AGPs besitzen Arabinogalactanseitenketten und ein hydroxyprolinreiches Proteinerückgrat. Somit gehören sie zur Familie der hydroxyprolinreichen Glykoproteine (HRGP), wobei nicht

klar ist, ob Mitglieder dieser Familie (z.B. Lektine und Extensine) genetisch gleichen Ursprungs sind oder ob es sich um zufällige Gemeinsamkeiten handelt (Nothnagel et al., 1997).

Ein weiteres Merkmal vieler AGPs ist die Fähigkeit, eine Bindung mit dem Yariv Reagenz einzugehen. Hierbei handelt es sich um einen synthetischen Farbstoff, ein Phenylazoderivat, der ursprünglich als „Antigen“ zur Detektion von Monosacchariden entwickelt wurde (Yariv et al., 1962). Jermyn und Yeow entdeckten 1975 die Fähigkeit des Farbstoffs, mit vielen AGPs zu interagieren.

Genauere Analysen der hochverzweigten Polysaccharidstrukturen führten zu einer Einteilung in Typ I und II (Aspinall et al., 1982). So charakterisiert Typ I Arabinogalactane (AGs) eine Hauptkette aus 1,4- β -D-Galactose mit Verzweigungen in Position 6 und kurzen Seitenketten aus α -L-Arabinose. Bisher hat man keine Typ I Arabinogalactane gefunden, die mit einem Protein kovalent verknüpft sind. Typ I AGs kommen als Untereinheiten von Pektinen (z.B. Rhamnogalacturonanen) vor. Typ II AGs hingegen sind durch eine 1,3- β -D-Galactan-Hauptkette charakterisiert, die ebenfalls häufig an Position 6 O-glykosidisch mit einer Seitenkette aus 1,6- β -D-Galactose verknüpft ist. Die Seitenketten können über C3 O-glykosidisch verknüpft in terminale Pentosen und Hexosen, vor allem furanosidische Arabinosen (Ara), enden (Bacic et al., 1987). Typ II AGs können auch Teile von Pektinen oder mit einem Protein kovalent verknüpft sein und damit zu AGPs werden.

Der Proteinteil besteht häufig zu großen Teilen aus Hyp, Pro, Ser, Thr und Ala. Über alkalistabile O-glykosidische Verbindungen zwischen β -D-Galactose und Hydroxyprolin, aber auch zwischen α -L-Arabinose und Hydroxyprolin, sowie β -D-Galactose und Serin bzw. Threonin, sind Proteinanteil und Polysaccharidteile miteinander verbunden (Chen et al., 1993).

Zur räumlichen Darstellung von AGPs gibt es zwei Theorien. Die „Wattle-Blossom“ Theorie (Abb. 1.3) stellt das gesamte Molekül kugelförmig dar. Bildlich vorgestellt entspricht die Gestalt dem Blütenstand eines Kirsch- oder Apfelbaumes, wobei die verholzten Teile das Proteinbackbone bilden, die Stiele zu den einzelnen Blüten die O-glykosidische Bindung zwischen Hyp und Gal darstellen und die Blüten den in Wirklichkeit viel größeren kugeligen Arabinogalactanseitenketten entsprechen. Das Modell „Twisted hairy rope“ hingegen stellt das AGP in länglicher Form als eine Art Flaschenbürste dar, bei der die einzelnen Borsten ineinander verdreht sind (Abb. 1.4).

Bacic, 1995; Zhu et al., 1993). AGPs sind Hauptkomponenten von Gummen (z. B. Gummi arabicum) und anderen Exkreten (Akiyama et al., 1984; Gleeson et al., 1989).

Die Funktionen von AGPs in der Pflanze sind noch nicht ganz aufgeklärt, besonders die Funktionen unterschiedlicher AGPs in der gleichen Pflanze sind noch nicht bekannt.

Es gibt Hinweise auf die Beteiligung von AGPs am Wachstum und an der Differenzierung von Zellen.

So konnten Serpe und Nothnagel (1994) zeigen, dass das Behandeln von Rosen-Zellkulturen mit Yariv Reagenz zu einer Hemmung des Wachstums führt. Ähnliche Experimente mit Yariv Reagenz führten z.B. zu einer Hemmung des Wachstums von Pollensäcken in *Lilium longiflorum* (Roy et al., 1998) oder einer Hemmung des Wurzelwachstums von *Arabidopsis* (Willats und Knox, 1996). Dass AGPs auch in der somatischen Embryogenese eine Rolle spielen, haben Kreuger und van Holst (1996) durch die Entdeckung von AGP-Epitopen auf pflanzlichen Zellen und durch externe Zugabe von AGP bewiesen. Andere Studien zeigen die Mitwirkung von AGP am programmierten Zelltod (Schindler et al., 1995).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Zubereitungen von Pflanzen der Gattung *Echinacea* werden als Arzneimittel zur „Immunstimulation“ verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die in einem wässrigen Extrakt der Wurzeln von *Echinacea pallida* enthaltenen hochmolekularen Arabinogalactan-Proteine (AGP) und verwandte Polysaccharide isoliert und charakterisiert werden. Ferner sollte die These überprüft werden, dass Glykoproteine bzw. Polysaccharide an der immunologischen Wirkung von *Echinacea*-Arten beteiligt sind. Im Detail handelte es sich um folgende Untersuchungen:

Charakterisierung der isolierten Arabinogalactan-Proteine und Polysaccharide :

- Molekulargewichtsbestimmung
- chemische Zusammensetzung des Kohlenhydrat- und Proteinanteils
- Strukturanalyse der Kohlenhydratanteile
- Reaktivität mit spezifischen Antikörpern
- Darstellung von Gemeinsamkeiten und Unterschieden zu verwandten Polymeren

Immunologisches Potenzial von Arabinogalactan-Proteinen und Polysacchariden:

- Testung der isolierten Substanzen in verschiedenen *in vitro* Modellen
- Suche nach möglichen Zielstrukturen eines aus *Echinacea purpurea* isolierten AGPs auf der Zelloberfläche immunkompetenter menschlicher Zellen

2. Experimenteller Teil

2.1 Methoden zur Extraktion und Isolierung

2.1.1 Extrakterstellung und Aufreinigung einer hochmolekularen Fraktion

Zerkleinerte Wurzeln des blassfarbenen Sonnenhutes (*Echinaceae pallidae radix*) wurden von der Firma Alfred Galke (Gittelde) bezogen. Die Droge wurde mit einer Pulvermühle pulverisiert und 16h lang mittels Bewegungsmazeration mit demineralisiertem (dem.) Wasser in einem Verhältnis von 1:5 extrahiert. Feste Bestandteile wurden dann abzentrifugiert (5.000U/min, 10min). Anschließendes Erhitzen des Extraktes in Portionen von 50ml im Wasserbad bei 95°C für 10min sorgte für eine Denaturierung von Proteinen, die nach Abkühlen im Eisbad abzentrifugiert (5.000U/min, 10min) wurden.

Eine siebentägige Tangentialflussfiltration bei 4°C teilte die Inhaltsstoffe des Extraktes in eine hoch- und niedermolekulare Fraktion. Die verwendeten Filter hatten eine Molekulargewichts-Ausschlußgrenze (MWCO) von 30.000Da. Das niedermolekulare Filtrat wurde gefriergetrocknet und auf die Anwesenheit von AGPs untersucht. Das hochmolekulare Retentat wurde weiter aufgereinigt. Eine fünftägige Dialyse bei 4°C in Dialyseschläuchen mit einem MWCO von 12.000-14.000Da trennte Monosaccharide und andere niedermolekulare Bestandteile unter konstantem Wasserfluss ab. Danach wurde das Retentat gefriergetrocknet und als Ausgangsmaterial für die Isolierung von AGP und Arabinan verwendet.

Tangentialflussfiltration

Filtereinheit : Minitan® System Stainless Steel Fa. Millipore, Billerica, MA, USA

Pumpe : Easy-load® Masterflex

Filter: Minitan® Filter Plates 4/PK 30.000 NMWL

High-Flux Biomax Polysulfone Membrane (hydrophilic)

2.1.2 Yariv-Synthese

AGPs können spezifisch mit dem β -D-Glucosyl-Yarivreagenz gefällt werden. Dieses Reagenz ist kommerziell nicht erhältlich und muss selbst synthetisiert werden. Die Synthese wurde in Anlehnung an Yariv et al. (1962) durchgeführt.

Reaktion

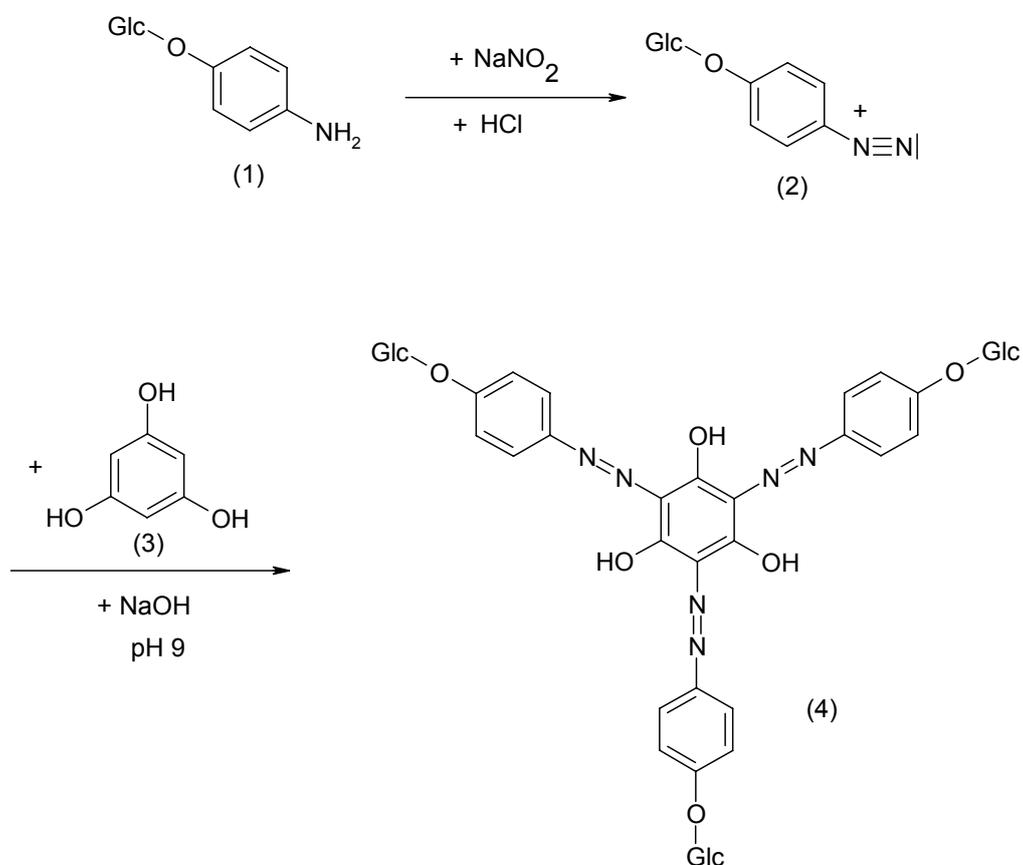


Abb. 2.1: Reaktionsschema der Synthese des Yarivreagenzes

Lösung 1 : 488,34mg p-Aminophenyl- β -D-Glucose (1) in 10,8ml HCl (0°C)

Reagenz 1 : 124,2mg Natriumnitrit

Lösung 2 : 56,74mg Phloroglucin (3) in 22,5ml Wasser

Durchführung:

Zunächst wurde Lösung 1 mit Reagenz 1 versetzt und auf 0°C abgekühlt. Es entstand das in Abb. 2.1 dargestellte Diazoniumsalz (2). Unter Einhaltung von pH 9 mit einem Autotitrator (0,5N NaOH) wurde langsam bei 0°C Lösung 2 unter ständigem Rühren zum Reaktionsansatz pipettiert. Mit 0,1N NaOH wurde der pH-Wert nach vollständiger Hinzugabe von Lösung 2 zwei Stunden lang konstant gehalten und sollte danach stabil bleiben. Das Produkt wurde mit Methanol gefällt und 12h im Kühlschrank (4°C) gelagert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (5.000U/min, 15min) und das entstandene β -D-Glucosyl-Yariv-Reagenz (4) im Trockenschrank über Nacht bei 50°C getrocknet.

2.1.3 Fällung der AGPs mit dem Yarivreagenz

Eine optimale Ausbeute an AGP ist bei einem Massenverhältnis von Yarivreagenz zu AGP im Verhältnis 1:1 zu erwarten (Kreuger und van Holst, 1995). Die ungefähr benötigte Menge an Retentat wurde aus den gaschromatographischen Analysen (Massenanteil Arabinose plus Galactose) berechnet (siehe 3.1.4).

Die errechneten Mengen Retentat und Yarivreagenz (1mg/ml) wurden jeweils in gleichen Mengen dem. Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden vereinigt und NaCl zur Stabilisierung des AGP-Yarivkomplexes bis zu einer 0,15 molaren Konzentration zugegeben. Der über Nacht bei 4°C ausgefallene AGP-Yarivkomplex wurde abzentrifugiert (10.000g, 15min bei 4°C) und in der Menge dem. Wasser gelöst, die man ursprünglich für das Retentat benötigte. Zur Zerstörung des roten AGP-Yarivkomplexes wurde bei 50°C Natriumdithionit bis zu einer Konzentration von 2% ergänzt. Eine anschließende Dialyse der fast farblosen Lösung bei 4°C für fünf bis sechs Tage bei einem MWCO von 12.000-14.000 Dalton (Dialyseschläuche siehe 2.1) trennte niedermolekulare Bestandteile wie z.B. Abbauprodukte des Yarivreagenzes, NaCl und Natriumdithionit ab. Das dialysierte Produkt wurde gefriergetrocknet.

2.1.4 Isolierung des Arabinans aus dem Überstand der Yarivfällung

Nach dem Abzentrifugieren des AGP-Yarivkomplexes (siehe 2.1.3) wurde aus dem Überstand das Arabinan isoliert. Zunächst wurde der Überstand wie die Yarivfällung mit Natriumdithionit behandelt, dialysiert und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Produkt wurde in 80%igem Ethanol gelöst, über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert und zentrifugiert. Im Überstand der 80%igen Ethanollösung fand sich das Arabinan. Verunreinigungen fielen aus und wurden abgetrennt. Die 80%ige Ethanollösung wurde im Vakuum eingeengt, das Arabinan in dem. Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

2.2 Chemische und chromatographische Methoden

2.2.1 Bestimmung der neutralen Monosaccharide (Blakeney et al., 1983)

1-5mg Probe wurden zusammen mit 0,5mg Myo-Inositol als internem Standard bei 121°C und 2bar in einem Wheaton-Gefäß im Bioblock 1h lang mit 1ml 2M Trifluoressigsäure (TFA) hydrolysiert und anschließend drei mal mit jeweils 5ml dem. Wasser am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt. Die hydrolysierte Probe wurde mit 200µl 1M Ammoniak aufgenommen und mit 1ml 2%iger Natriumborhydridlösung für 90min bei 40°C reduziert. Nach Zusatz von 100µl Eisessig wurde überschüssiges Natriumborhydrid zerstört, die entstandenen Alditole mit 200µl Methylimidazol (Katalysator) und 2ml wasserfreiem Acetanhydrid 20min lang bei Raumtemperatur acetyliert. Nach Hinzugabe von 10ml dem. Wasser und 1ml 0,1M Schwefelsäure wurden die lipophilen Alditolacetate mit 1ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Dichlormethanphase wurde unter Stickstoffbegasung etwas eingeengt und 1µl dieser Lösung gaschromatographisch vermessen.

Experimenteller Teil

Gaschromatograph:	HP 5890 Series II; Fa. Hewlett Packard, USA oder HP 6890 Plus Series; Fa Hewlett Packard USA
Säule:	WCOT-Kapillarsäule (fused Silica), Permabond OV-225-0.25; L 25m, ID 0,25mm Fa. Macherey & Nagel, Düren
Trärgas:	GC HP 5890: Stickstoff GC HP 6890: Helium
Flussrate:	1ml/min
Splitverhältnis:	1:30
Temperaturprogramm:	230°C isotherm; Injektor und Detektor 240°C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID)
Software:	Programm HP GC Chemstation, Rev. A.06.03 [509]

Zur Identifizierung der Alditolacetate wurden Zuckerstandards eingewogen (1mg/ml), nach der beschriebenen Methode derivatisiert, gaschromatographisch vermessen und relative Retentionszeiten bezogen auf Inositol ermittelt. Zur Quantifizierung dienten mit den Standards ermittelte Responsefaktoren, ebenfalls bezogen auf Inositol. Nach Korrektur der in der Probe enthaltenen Peakflächen und Integration mit der Software wurden die prozentualen Massenanteile der Monosaccharide errechnet.

Zucker	rel. Ret.	Faktor
Rhamnose	0,340	1,303
Fucose	0,355	1,162
Arabinose	0,415	1,015
Xylose	0,488	1,069
Mannose	0,837	1,082
Galactose	0,905	1,097
Glucose	0,965	1,164
Inositol	1,000	1,000

Tab. 2.1: relative Retentionszeiten und Korrekturfaktoren von Monosacchariden bezogen auf Inositol

2.2.2 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Volumens wurde eine Probe im Elutionsmittel (0,1%ige NaCl-Lösung) gelöst (ca. 1mg/ml), filtriert (Porendurchmesser 0,45µm, Celluloseacetat-Spritzenfilter, Fa. Nalgene, USA) und auf die Säule gegeben. Die Eichung erfolgte mit Pullulanen (Polymaltotriose aus *Aureobasidium pullulans*, Fa. Shodex, Japan) verschiedener Größen:

Pullulan	nominelles MW (Da)
P100	100.000
P200	186.000
P400	380.000
P800	853.000

Tab. 2.2: Pullulan-Standards zur Erstellung einer Kalibriergeraden

Zur Herstellung der Eichlösungen wurden jeweils 0,5-1mg des jeweiligen Pullulans pro ml Elutionsmittel eingewogen, über Nacht zum Vorquellen im Kühlschrank gelagert und dann filtriert (s.o.).

Säule: Sephacryl S-400 HR, XK 16/60
 Material: hydrophile Dextran-/Bisacrylamid-Matrix;
 Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden
 Länge 60cm, Durchmesser 1cm
 Trennbereich für globuläre Proteine: 20.000 – 8 Mio Da
 Trennbereich für Dextrane: 10.000 – 2 Mio. Dalton

Eluent: 0,1%ige NaCl-Lösung, filtriert (s.o) und entgast (Ultraschallbad)

Pumpe: Millipore 501, Fa. Waters, USA

Flussrate: 1ml/min

Injektionseinheit: V7-Valve; Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden

Injektionsvolumen: 1ml

Detektor: MALLS-Detektor miniDAWN
 Fa. Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, USA

Software: ASTRA for Windows 4.70.07

Die Eichgerade wurde durch halblogarithmisches Auftragen der Molekulargewichte der Pullulane gegen die ermittelten Elutionsvolumina erstellt. Die tatsächliche Flussrate wurde vor dem Einspritzen der Standards und Proben genau gemessen und berücksichtigt. Über die erhaltene Geradengleichung konnte das Molekulargewicht der jeweiligen Probe errechnet werden.

2.2.3 Uronsäurebestimmung nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen, 1973

Zur Quantifizierung von Uronsäuren wurden ca. 5mg Probe mit 4%iger Schwefelsäure in einem Wheaton-Gefäß bei 120°C 1h lang bei 2bar im Bioblock hydrolysiert. Nach Inkubation der Probe mit 1,2ml Borax/Schwefelsäure (5min kochendes Wasserbad, 10min Eisbad) wurden 20µl Reagenz (0,15%ige Meta-hydroxy-diphenyllösung in 0,5%iger NaOH) bzw. reine 0,5%ige NaOH (Blindwert) zugegeben und nach exakt 10min Reaktion die Absorption der rot gefärbten Probenlösung bei 520nm bestimmt. Eine Eichgerade wurde mit einer Mischung aus Glucuron- und Galacturonsäure im Verhältnis 1:1 erstellt und der Gesamturonsäuregehalt der Probe über die Geradengleichung ermittelt.

2.2.4 Uronsäurebestimmung nach Taylor und Conrad, 1972

Zur Aktivierung der Carboxylgruppen der Uronsäuren wurden 20mg Probe in 30ml dem. Wasser gelöst und unter Rühren 216mg N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-methylmorpholino)-ethyl]-carbodiimid-4-toluolsulfonat zugegeben. Mit Hilfe eines Autotitrators wurde der pH-Wert 4h lang durch Titration mit 0,01M HCl konstant auf 4,75 gehalten. Die Hinzugabe von 1-2 Tropfen Oktanol verhinderte starkes Schäumen während der anschließenden Reduktion des entstandenen Lactons. Durch langsames Zutropfen von 4ml 1M, 5ml 2M und zuletzt 5ml 4M wässriger Natriumborodeuteridlösung wurden die Uronsäuren zu den entsprechenden Neutralzuckern reduziert. Aus der Carboxylgruppe an C-6 wurde eine zweifach deuterierte Hydroxylgruppe. Bei der Reduktion (ca. 4h) wurde der pH-Wert durch Titration mit 2M HCl unter Rühren konstant auf 7 gehalten. Zuletzt erfolgte eine Hinzugabe von Eisessig bis zu

einem pH-Wert von 6,5 und eine fünftägige Dialyse (MWCO 12.000-14.000 Da). Nach der Gefriertrocknung wurde das Endprodukt zur vollständigen Reduktion der Uronsäuren der Prozedur ein zweites Mal unterworfen.

2.2.5 Uronsäurebestimmung nach Fontaine et al., 1994

10-20mg Probe wurden in das äußere Gefäß eines Diazomethan-Generators (Fa. Sigma-Aldrich, USA) eingewogen und 5ml DMSO und 0,5ml Methanol zugegeben. Unter Rühren wurden 200mg 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin und 400µl dem. Wasser addiert und der Generator geschlossen. Durch ein Septum erfolgte die Zugabe von 450µl 5N NaOH, und der Ansatz reagierte unter Rühren im Wasserbad bei 15°C 2h lang. Während dieser Zeit wurden die Carboxylgruppen der Uronsäuren mit Methylgruppen verestert. Das Produkt wurde fünf Tage dialysiert und gefriergetrocknet. 5mg des gefriergetrockneten Produktes wurden in 1ml 1M Imidazol/HCl Puffer gelöst. Bei 0°C unter Zusatz von 1-2 Tropfen Oktanol reduzierte man die veresterten Uronsäuren mit 200mg Natriumborodeuterid zum korrespondierenden Neutralzucker. Das Endprodukt wurde fünf Tage dialysiert und gefriergetrocknet.

2.2.6 Partialhydrolyse nach Gleeson und Clarke, 1979

20-60mg Probe wurden 5h lang bei 100°C im Bioblock mit 2ml 12,5mM Oxalsäure hydrolysiert. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (6000U/min, 5min). Der Überstand wurde mit abs. Ethanol versetzt, bis eine 80%ige Ethanolkonzentration entstand. Über Nacht bei 4°C ausgefallene Polymere wurden abzentrifugiert (20.000g, 10min, 6°C), die Mono- bis Oligosaccharide fanden sich im Überstand. Das Zentrifugat wurde dreimal mit 80%igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert, zuletzt in 2ml dem. Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Waschlösungen und der Überstand wurden vereinigt, im Vakuum einrotiert, in 2ml dem. Wasser aufgenommen und ebenfalls gefriergetrocknet.

2.2.7 Methylierungsanalyse nach Harris et al., 1984

Herstellung der Dimethylsulfinyl- (Dimsyl-) Kalium-Lösung

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

Methylierung

1-5mg Probe wurden 24h in einem verschraubbaren Reagenzglas mit Seitenansatz gefriergetrocknet und unter leichtem Erwärmen und Ultraschallbadbehandlung in 460µl DMSO gelöst. Danach wurden abwechselnd folgende Mengen an Dimsyl-Kalium-Lösung und Methyljodid unter Rühren und Argon-Schutzgasung zupipettiert:

1. 40µl Dimsyl-Kalium-Lösung, 10 min. Reaktion
2. 10µl eisgekühltes Methyljodid, 5 min. Reaktion
3. 120µl Dimsyl-Kalium-Lösung, 10 min. Reaktion
4. 30µl eisgekühltes Methyljodid, 5 min. Reaktion
5. 400µl Dimsyl-Kalium-Lösung, 30 min. Reaktion
6. 300µl eisgekühltes Methyljodid, 10 min. Reaktion

Die methylierte Probe wurde in ein verschraubbares Zentrifugenglas mit einer Mischung aus 2ml Chloroform und 1ml Methanol überführt und fünfmal mit je 2ml dem. Wasser gewaschen. Jedes Mal wurde zentrifugiert (250g, 5min) und die wässrige Oberphase ohne Verletzung der Interphase abgenommen. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde die organische Phase mit 2ml 2,2-Dimethoxypropan, 20µl Eisessig und einigen Siedeperlen versetzt und solange bei 90°C erwärmt, bis das Dimethoxypropan das restliche Wasser umgesetzt hatte und dann in einem Wheaton-Gefäß unter Argonbegasung vollständig eingeeengt.

Hydrolyse

Die methylierte Probe wurde mit 1ml 2M TFA 1h bei 121°C und 2bar hydrolysiert, in einen Spitzkolben überführt und die TFA bei 40°C im Wasserbad unter Stickstoff abgeblasen.

Reduktion

Die partiell methylierten Monosaccharide wurden mit 2ml einer frisch hergestellten Lösung von 0,5mol Natriumborhydrid in 2mol Ammoniak 1h bei 60°C im Trockenschrank reduziert. Nach dem Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 0,5ml Aceton wurde das Lösungsmittel unter Stickstoff bei 40°C im Wasserbad abgeblasen.

Acetylierung

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

Die partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) wurden dreimal mit je 1ml Dichlormethan ausgeschüttelt, unter Stickstoff eingengt und für die gaschromatographische Trennung mit anschließender massenspektroskopischer Analyse eingesetzt.

TIC-Methode

Gaschromatograph:	HP 5890 Series II; Fa. Hewlett Packard, USA
Säule:	WCOT-Kapillarsäule (fused Silica), Permabond OV-1701; L 25m, ID 0,25mm Fa. Macherey & Nagel, Düren
Trärgas:	Helium
Splitverhältnis:	1:35
Flussrate:	0,7ml/min
Temperaturprogramm:	2min 170°C, 1°C/min auf 210°C, 10min 210°C isotherm Injektor 250°C
EI-MS:	HP MS Engine 5898 A; Fa. Hewlett Packard
Software:	HP G 1034 C-Software für MS Chemstation

FID-Methode

Gaschromatograph:	HP 6890; Fa. Hewlett Packard, USA
Säule:	WCOT-Kapillarsäule (fused Silica), Permabond OV-1701; L 25m, ID 0,25mm Fa. Macherey & Nagel, Düren
Trärgas:	Helium
Splitverhältnis:	1:30
Flussrate:	1ml/min
Temperaturprogramm:	3min 120°C isotherm, mit 8°C/min auf 170°, 1°C/min auf 200°C 10min, 10min 200°C isotherm Injektor 250°C, FID-Detektor 240°C
Software:	Programm HP GC Chemstation, Rev. A.06.03 [509]

Die Identifizierung der PMAA erfolgte durch Vergleich ihrer relativen Retentionszeiten im Totalionenchromatogramm (TIC), durch Analyse ihrer Massenspektren und Vergleich dieser Spektren mit denen bekannter PMAA aus einer in der Arbeitsgruppe erstellten Bibliothek. Zur Unterscheidung und Quantifizierung von nicht deuterierten und deuterierten PMAA, ehemals Uronsäuren (siehe 2.2.4 und 2.2.5), wurden entsprechende Peaks im SIM-Modus (selected ion monitoring, Fox et al., 1989) aufgenommen. Dabei wurde das Massenspektrometer so eingestellt, dass nur die benötigten Massen erfasst wurden (z.B. 1-Glucose/1-Glucuronsäure 205/207). Aus den Mengenanteilen der Fragmente konnte das Verhältnis von Zucker zu Uronsäure im jeweiligen Peak berechnet werden. Zur quantitativen Auswertung der molaren Verhältnisse der PMAA wurde die FID-Methode gewählt, da die hier erhaltenen Chromatogramme eine bessere Trennung und weniger Grundlinienrauschen als im TIC aufwiesen.

2.2.8 Qualitative und quantitative Aminosäurenbestimmung per GC

Die Derivatisierung der einzelnen Aminosäuren erfolgte mit Hilfe des EZ:faast®Kits der Firma Phenomenex. Die Aufarbeitung der Probe nach Hydrolyse besteht aus einer Festphasenextraktion der Aminosäuren, gefolgt von einem patentierten Derivatisierungsprozess und einem Flüssigextraktionsschritt (EZ:faast® Protein Hydrolysate Kit manual). Die derivatisierten Proben wurden gaschromatographisch vermessen. Die qualitative Bestimmung erfolgte über den Vergleich von Retentionszeiten der Probe zu denen von mitgelieferten und auch selbst hergestellten Standards. Korrekturfaktoren für einzelne Aminosäuren, bezogen auf den internen Standard Norvalin, wurden auch über verschiedene Konzentrationen des mitgelieferten und/oder selbst hergestellten Standards ermittelt.

Durchführung:

5mg AGP wurden in 1ml 6M Salzsäure unter Stickstoff hydrolysiert (22h, 110°C). Nach dem Abkühlen der Probe wurden die verkohlten Kohlenhydrate abzentrifugiert (5.000g, 10min). Der Überstand wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne einrotiert. Das einrotierte AGP-Hydrolysat wurde in 100µl dem. Wasser aufgenommen und mit 200µl Reagenz 2 auf einen pH-Wert von 1-2 eingestellt. 25µl dieser Lösung wurden mit 100µl Reagenz 1 gemischt. Die Lösung wurde langsam mindestens 1min durch eine mit unbekanntem Trennmateriale gefüllte Pipettenspitze gezogen, an das die vorhandenen Aminosäuren adsorbierten. Das Trennmateriale wurde mit 200µl dem. Wasser gewaschen und anschließend mit 200µl einer 3:2-Mischung von Reagenz 3a und 3b aus der Pipette gespült. Mit dem Mikrodispenser wurden 50µl Reagenz 4 zur Probe gegeben und 5-8s mit Hilfe des Vortexers emulgiert. Die Probe wurde 2min stehen gelassen und erneut 5s durchmischt. 100µl Reagenz 5 wurden mit dem Mikrodispenser zugegeben, die Mischung 5s durchmischt und 1min stehen gelassen. 100µl Reagenz 6 wurden zugegeben und 5s durchmischt. Die Lösung trennte sich in eine hydrophile und eine organische Phase. Die organische Phase wurde abgetrennt und 2,5µl in den GC-Probeneinlass injiziert.

Reagenzien, Materialien und Geräte

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 (Konz. der Aminosäuren: je 200µmol/l, Pro und Hyp je 1mmol/l)

Pipettenspitzen mit Trennmaterial (Adsorbens)

Mikrodispenser (20-100µl)

Spritzen 0,6ml und 1,5ml

GC:	HP 6890 Plus Series Fa. Hewlett Packard, USA
Splitinjektor:	Splitverhältnis 1:15, 250°C, 2,5µl injiziert
Säule:	Zebtron® ZB-HAAC Amino Acid Column; 10m x 0,25mm Fa. Phenomenex, Torrance, USA
Trärgas:	Helium
Trärgasgeschwindigkeit:	60kPa
Temperaturprogramm:	110°C 3min, 30°C/min auf 320°C, 1min halten
Detektor:	FID, 320°C
Software:	Programm HP GC Chemstation, Rev. A.06.03 [509]

2.2.9 Qualitative und quantitative Aminosäurenbestimmung per HPLC

5mg Probe wurden in 1ml 6mol Salzsäure im Bioblock hydrolysiert (22h bei 110°C unter Stickstoff). Verkohlte Kohlenhydrate wurden abzentrifugiert (5000U/min, 10min) und der Überstand am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die einrotierte Probe wurde in Pufferlösung aufgenommen und 30min stehen gelassen, damit nicht gelöste Bestandteile sedimentierten, und der Überstand für die Bestimmung verwendet. Diese Aminosäurenbestimmung wurde von der Firma Amino Sys® (Berlin) durchgeführt.

Gerät:	Aminosäuren-Analysator A100 (K-044-02)
Trennsäule:	TS 56
Vorsäule:	V51
Flussrate:	0,2ml/min
Injektionsvolumen:	20µl
Detektionsmethode:	Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin Detektion bei 560 und 440nm
Software:	aminoPeak 2.09
Standard:	interner Standard 100 nmol/ml Norleucin

Die Bildung eines blauvioletten Farbstoffes, in dem der Amino-Stickstoff der Aminosäuren eingebaut wurde, führte in Abhängigkeit von der Menge und Retentionszeit der jeweiligen Aminosäuren zu einem Peak. Die Identifizierung der Aminosäuren erfolgte über den internen Standard Norleucin, die Quantifizierung über externe Standards.

2.2.10 Photometrische Hydroxyprolinbestimmung

Diese quantitative Hydroxyprolinbestimmung wurde nach Anleitung aus den amtlichen Sammlungen von Untersuchungsverfahren nach §35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetz (LMBG) durchgeführt.

10mg Probe wurden wie in 2.2.8 beschrieben hydrolysiert, zentrifugiert und eingengt. Die einrotierte Probe wurde in 1ml dem. Wasser gelöst und davon jeweils 50, 80, 100 und 200µl auf 4,0ml Puffer verdünnt. Nach Zugabe von 2ml Oxidationsreagenz wurde 20min gewartet, dann 2ml Farbreagenz addiert und 15min bei 60°C im Wasserbad stehen gelassen. Das oxidierte Hydroxyprolin reagierte mit dem Farbreagenz innerhalb von 15min zu einem roten Produkt, die Lösung wurde unter fließendem Wasser 3min gekühlt und bis zur Messung 30min bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Absorption wurde photometrisch bei 558nm gemessen und war direkt proportional zur Hydroxyprolin-Konzentration. Eine Kalibrierung mit einer Verdünnungsreihe von reinem Hydroxyprolin diente zur Gehaltsbestimmung.

UV/Vis-Gerät:	Photometer Hitachi U-1100 Spectrophotometer	
Puffer pH 6,8:	Zitronensäure-Monohydrat	5,2g
	Natriumhydroxid-Plätzchen	2,8g
	Natriumacetat (wasserfrei)	15,6g
	Thiomersal	0,02g
	in ca. 100ml dem. Wasser lösen	
	1-Propanol	50,0ml
	dem. Wasser	ad 200,0ml
Oxidationsreagenz:	Chloramin T	1,4g
	Puffer pH 6,8	ad 100,0ml
Farbreagenz:	4-Dimethylaminobenzaldehyd	10,0g
	Perchlorsäure 60%	35,0ml
	2-Propoanol	65,0ml

2.3 Pharmakologische und immunologische Methoden

2.3.1 Lymphozyten-Proliferationstest (LPT)

Durch den Einbau von ³H-markiertem Thymidin in neu synthetisierte DNA wurde die Proliferationsrate von Milzzellen aus C3H/HeJ-, NMRI- und Balb/c-Mäusen ermittelt. Dazu wurden den durch CO₂-Inhalation getöteten Testmäusen unter aseptischen Bedingungen die Milzen entnommen. Nach dem Dispergieren und der Übernahme auf ein Kulturmedium wurden die Zellen auf eine definierte Dichte eingestellt. Die Testung erfolgte auf einer Mikrotiterplatte in vier parallelen Ansätzen. Die Zellen wurden mit Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen bzw. mit Referenzmitogenen [Lipopolysaccharide (LPS, 30µg/ml), Concanavalin A (ConA, 2µg/ml), Phytohämagglutinin (PHA, 10µg/ml)] 48h inkubiert (Brutschrank 37°C, 5% CO₂), anschließend mit ³H markiertem Thymidin versetzt und weitere 24 Stunden inkubiert. Nach der Ernte der Milzzellen und dem Auswaschen des nicht eingebauten Thymidins wurde die Radioaktivität (cpm) im Szintillationszähler gemessen. Die Menge des eingebauten Thymidins ist direkt proportional zu der im Markierungszeitraum erfolgten DNA-Synthese und damit zur Proliferationsrate der Zellen (Shevach, 1997). Aus den cpm-Werten der Vierfachbestimmungen wurde der arithmetische Mittelwert berechnet und der Stimulationsindex (SI) (Abb. 2.3) als Maß für die immunstimulatorische Aktivität nach folgender Formel berechnet (Bodinet, 1999).

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

Abb. 2.3: Formel zur Berechnung des Stimulationsindices (SI) für die immunstimulierende Wirkung einer Probe

2.3.2 Bestimmung der IgM-Produktion

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

2.3.3 Cytokininduktion (IL-1, IL-6, TNF- α , GM-CSF und IFN- γ)

Maus-Makrophagen können durch Inkubation mit einem Aktivator zur vermehrten Cytokinausschüttung aktiviert werden (Beuscher et al., 1989). Die Milzen von ca. 30g schweren Mäusen wurden nach Standardvorschrift (Schaper und Brümmer GmbH) aufgearbeitet und auf $7,5 \times 10^6$ c/ml in Zellkulturmedium eingestellt. Anschließend wurden die Zellen in 24er Zellkulturplatten ausgesät (1ml/well) und mit jeweils 1ml AGP-Lösung versetzt (4 Parallelmessungen). Als Positivkontrolle wurde LPS (30µg/ml) bzw. LPS (30µg/ml) plus ConA (2µg/ml) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente das Zellkulturmedium ohne weitere Zusätze. Nach 24 bzw. 48h Inkubation bei 5% CO₂ und 37°C wurden die Überstände abgenommen, vereinigt, abzentrifugiert und eingefroren. Die Aktivität der Cytokine IL-6, TNF- α , GM-CSF und IFN- γ wurde im Kulturüberstand mit Hilfe spezifischer Bioassays (ELISA-Kits, Duo-Set R&D) bestimmt (Bodinet, 1999).

2.3.4 Bestimmung der NO₂-Produktion

Zur Testung wurden alveoläre Maus-Makrophagen (MH-S) in Zellkulturmedium auf eine Dichte von 1×10^6 c/ml eingestellt (Bodinet, 1999). Je 100 µl Suspension wurden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert und 2h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde mit je 100 µl AGP-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen 48h 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+1ng/ml). Anschließend wurde in den Zellkulturüberständen die Konzentration des stabilen Oxidationsproduktes Nitrit mit Hilfe des Griess-Assays (Green et al., 1997) bestimmt.

2.3.5 Kompetitiver ELISA

Mikrotiterplatten wurden mit 100 µl AGP aus *Echinacea purpurea* (5 µg/ml in PBS-Puffer) pro Kavität beschichtet und über Nacht bei 36°C im Brutschrank mit offenem Deckel gelagert. Nach dem Waschen mit PBS-Waschpuffer wurden freie Bindungsstellen auf der Platte mit 1%iger BSA-Lösung abgesättigt (2h, 36°C). Verschiedene Konzentrationen an Antigen (0,1-10 µg/ml) wurden hergestellt und jeweils 100 µl dieser Lösungen mit 100 µl monoklonalem Antikörper (Verdünnung 1:500 in PBS-Puffer) bzw. polyklonalem Antikörper (Verdünnung 1:1000 in PBS-Puffer) im Brutschrank bei 36°C 1h inkubiert. Pro Kavität wurden 50 µl Antigen-Antikörper-Mischung aufgetragen (Doppelbestimmung), die Platte kurz geschüttelt und inkubiert (1h, 36°C). Nach dem Waschen wurde der Detektorantikörper (Verdünnung 1:1000, 100 µl pro Kavität) zugegeben und 1h bei 36°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 µl Substrat zugegeben und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss 45min gelagert. Die gemessene Absorption bei 405nm gegen 690nm ist umgekehrt proportional zur Kreuzreaktivität des Antigens mit dem Antikörper.

polyklonaler Antikörper: aus Kaninchen, Ch. 639, Anti-AGP Elution Q;
Verdünnung 1:1000 in PBS Puffer pH7,4, gerichtet
gegen AGP aus *Echinacea purpurea* (Classen et al.,

monoklonaler Antikörper:	2005), isoliert aus dem Presssaft von oberirdischen Pflanzenteilen (Classen et al., 2000) aus Mäusen Verdünnung 1:500 in PBS Puffer pH7,4, gerichtet gegen AGP aus <i>Echinacea purpurea</i> (Classen et al., 2004), isoliert aus dem Presssaft von oberirdischen Pflanzenteilen (Classen et al., 2000)
Antigene:	AGP aus <i>Echinacea purpurea</i> AGP aus <i>Echinacea pallida</i> Arabinan aus <i>Echinacea pallida</i>
Detektorantikörper für den monoklonalen Antikörper:	monoklonal, aus der Ziege, gerichtet gegen Anti-Maus IgG, markiert mit alk. Phosphatase Verdünnung 1:1000 in PBS-Puffer Fa. Sigma-Aldrich, USA
Detektorantikörper für den polyklonalen Antikörper:	monoklonal, aus der Ziege, gerichtet gegen Anti-Kaninchen IgG, markiert mit alk. Phosphatase Verdünnung 1:1000 In PBS Puffer Fa. Sigma-Aldrich, USA
Substrat:	Sigma Fast™ p-Nitrophenylphosphate Tablet Sets zwei Tabletten in dem. Wasser gelöst ergeben 20ml Substratlösung, Fa. Sigma-Aldrich, USA

2.3.6 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ließen sich Zellpopulationen aufgrund von Größe und Granularität und der Expression von Oberflächenmarkern untersuchen. Hierzu dienten verschiedene Parameter, wie Fluoreszenz und Lichtstreuung. Beim Passieren des Laserstrahls gab jede Zelle ein charakteristisches Streuungssignal ab und bei Bindung eines fluorochrombeladenen Antikörpers ein zusätzliches Fluoreszenzsignal. Durch Vorgabe bestimmter Messbereiche („Gates“) war es möglich, nur solche Zellen zu analysieren, die mit ihren Messdaten in dieses Fenster fielen.

2.3.6.1 Durchführung indirekte Fluoreszenzmarkierung

Vollblut von gesunden Spendern (n=8) der Uniklinik Jena wurde mit Na-EDTA ungerinnbar gemacht. Erythrozyten in 100µl Vollblut wurden mit „FACS-Lysing solution“ (Becton Dickinson, USA) zerstört. Nach Zentrifugation (5.500U/min, 5min) trennte man die als Pellet vorliegenden Leukozyten vom Überstand ab, indem dieser verworfen wurde. Das Pellet wurde mit einem Vortexer aufgelöst und die Leukozyten mit PBS-Puffer (pH 7,2) gewaschen. Nach Hinzugabe von 100µl AGP aus *Echinacea purpurea* (Konzentration 0,01-100µg/ml) wurde 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Waschschrift schloss sich an: Nach Zugabe von 1ml PBS-Puffer wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Ein primärer Antikörper (100µl, Verdünnung 1:100 in PBS-Puffer) wurde zugegeben, 30min bei Raumtemperatur inkubiert und gewaschen (s.o.). Der Vorgang wurde mit einem fluorochrommarkierten Sekundärantikörper (10µl, Verdünnung 1:100) wiederholt. Nach dem Waschvorgang wurde der Rückstand in 1ml Puffer gelöst, davon 200µl in ein Röhrchen überführt und die Messungen durchgeführt. In der Regel wurden 20.000 Signale aufgenommen, die Fluoreszenzintensität (Anregungswellenlänge mit Argonlaser bei 488nm) gemessen und per Software im Histogramm („dot plot“) analysiert.

Ein Kontrollwert auf normale Zellpopulation wurde aufgenommen, indem statt AGP und Antikörper jeweils die gleiche Menge Puffer verwendet wurde.

Ein weiterer Kontrollwert auf die optimale Sekundärantikörperkonzentration wurde durchgeführt. Hierbei wurde statt des AGPs und primären Antikörpers jeweils die gleiche Menge Puffer verwendet. Bei einem optimal „ausitrierten“ Sekundärantikörper sollte die

Fluoreszenzintensität der meisten Zellen unter 10^1 liegen und damit ein Optimum an Empfindlichkeit der Messung erreicht werden.

Ein Blindwert wurde ebenfalls bestimmt. Statt AGP wurde die gleiche Menge Puffer zugegeben. Die Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität von prim. + sek. Antikörper zu den Fluoreszenzintensitäten der Messwerte mit AGP zeigte das Maß der AGP-Bindung, ausgedrückt in prozentualer Steigerung.

2.3.6.2 Kompetitive direkte Fluoreszenzmarkierung

Die Versuche wurden jeweils mit Leukozyten aus dem Blut eines Spenders ähnlich durchgeführt wie in 2.3.6.1, es wurde nur zusätzlich im ersten Schritt zum AGP noch jeweils ein fluorochrommarkierter Antikörper gegen CD4 und gegen CD8 hinzugefügt, dann 30min bei Raumtemperatur inkubiert, gewaschen und wie oben beschrieben (2.3.6.1) fortgefahren.

Blindwerte wurden hier bestimmt, indem nur jeweils die Antikörper gegen CD4 und CD8 zugegeben wurden, in allen anderen Schritten wurde Puffer verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten der Blindwerte verglichen mit denen der Messwerte mit AGP zeigten den Grad der Verdrängung der CD4 bzw. CD8 Antikörper durch das AGP, gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 488nm (Argonlaser).

Geräte und Reagenzien von 2.3.6.1 und 2.3.6.2

Durchflusszytometer:	FACSCalibur (Becton Dickinson, USA)
Software:	cell quest (Becton Dickinson, USA)
primärer Antikörper:	polyklonal, aus Kaninchen, Anti-AGP Elution Q; in PBS Puffer; gerichtet gegen AGP aus <i>Echinacea purpurea</i> (Classen et al., 2004), isoliert aus dem Presssaft von oberirdischen Pflanzenteilen (Classen et al., 2000)
sekundärer Antikörper:	monoklonal, aus Ratten, markiert mit Phycoerythrin, gerichtet gegen Kaninchen IgG (H+L), Fa. Caltag, USA

- CD4 Antikörper: monoklonal, markiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), BD Biosciences Heidelberg, Tier, Epitop gerichtet gegen D1-Domäne des CD4-Antigens
- CD8 Antikörper: monoklonal, markiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), BD Biosciences Heidelberg, gerichtet gegen α -Untereinheit des CD8-Antigens

2.4 Andere Methoden

2.4.1 Geldiffusionstest

Es wurde ein Agarosegel folgender Zusammensetzung hergestellt:

1% Agarose in 10mM Tris-Puffer pH 7,3 mit 0,9% NaCl und 1mmol Calciumchlorid.

Das Gel wurde autoklaviert und 20ml davon mit einer autoklavierten Messpipette in eine sterile Petrischale (Durchmesser 9cm) gegossen. Anschließend wurden in das Gel fünf Löcher (Durchmesser 4mm) gestanzt. Die Löcher hatten dabei eine Anordnung wie die Zahl fünf auf einem Würfel. In das mittlere Loch wurden 20 μ l einer Yariv-Lösung (1mg/ml) pipettiert, die umliegenden Kavitäten wurden mit 20 μ l unterschiedlichen Probe und Konzentrationen gefüllt. Es bildete sich eine mehr oder weniger deutliche Präzipitationsbande zwischen den Löchern in Abhängigkeit von Anwesenheit und Konzentration von AGP in der Probe.

2.4.2 NMR-Spektroskopie

Ca. 20mg Probe wurden in 1ml deuteriertem Wasser gelöst (Ultraschallbad), unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (10.000U/min, 10min) und als Standard 0,5µl Dioxan hinzugefügt. Die Auswertung der Proben erfolgte über Vergleich der Spektren mit Literaturdaten.

Gerät: Kernresonanzspektrometer ARX 300

Fa. Bruker, Rheinstetten

Temperatur: 300 K (thermostatisiert)

¹³C-NMR Spektroskopie: Messfrequenz 75,47MHz

CPD (composite pulse decoupling = Protonen entkoppelt)

Chemische Verschiebungen wurden relativ zum Standard Dioxan bei 66,5ppm berechnet.

¹H-NMR-Spektroskopie Messfrequenz: 300,13MHz

2.5 Allgemein genutzte Geräte

Autoklav:	Dampfsterilisator VST 40/60 S, Fa. Zirbus
Autotitrator:	719 S Titrino, Fa. Metrohm
Bioblock:	Bioblock Scientific Code 92607, Fa. Thermolyne Corp.
Dialyseschläuche:	Spectra/Por 4 Regenerated Cellulose membrane, Ø 20mm, MWCO 12.000 -14.000Da, Fa. Spectrum Laboratories Inc.
Gefriertrocknung:	BETA 1-8K, Fa. Christ Freeze Dry System Lyph-Lock 6, Fa. Labconco
Sterilbank:	antair ZKB, Fa. Mahl
Trockenschrank:	Typ T 6060, Fa. Heraeus Instruments
Brutschrank:	Modell 200, Fa. Memmert
Ultraschallbad:	Sonorex Super 10P Digital, Fa. Bandelin
Zentrifugen:	Megafuge 1.0, Heraeus Instruments Ultrazentrifuge Sigma 3K 30, Fa. Sigma CS-15 Centrifuge, Fa. Beckman Biofuge pico, Fa. Heraeus Instruments

3. Ergebnisse des analytischen Teils

3.1 Isolierungsgang und Neutralzuckerzusammensetzungen von Zwischen- und Endprodukten

3.1.1 Extraktion und Isolierung von Retentat und Filtrat

Es wurden nach Methode 2.1.1 pro Ansatz 400g Droge in 2 Liter dem. Wasser extrahiert. AGPs sind in Wasser gut löslich, wasserunlösliche Bestandteile (z.B. Cellulose oder Zelltrümmer) konnten abzentrifugiert werden. Die Hitzestabilität der AGPs in Wasser erlaubte ein Aufkochen des Extraktes, um Proteine zu denaturieren. Diese fielen dann aus und konnten abzentrifugiert werden. Nieder- und hochmolekulare Bestandteile wurden durch Tangentialflussfiltration getrennt, der hochmolekulare Anteil mittels Dialyse weiter aufgereinigt.

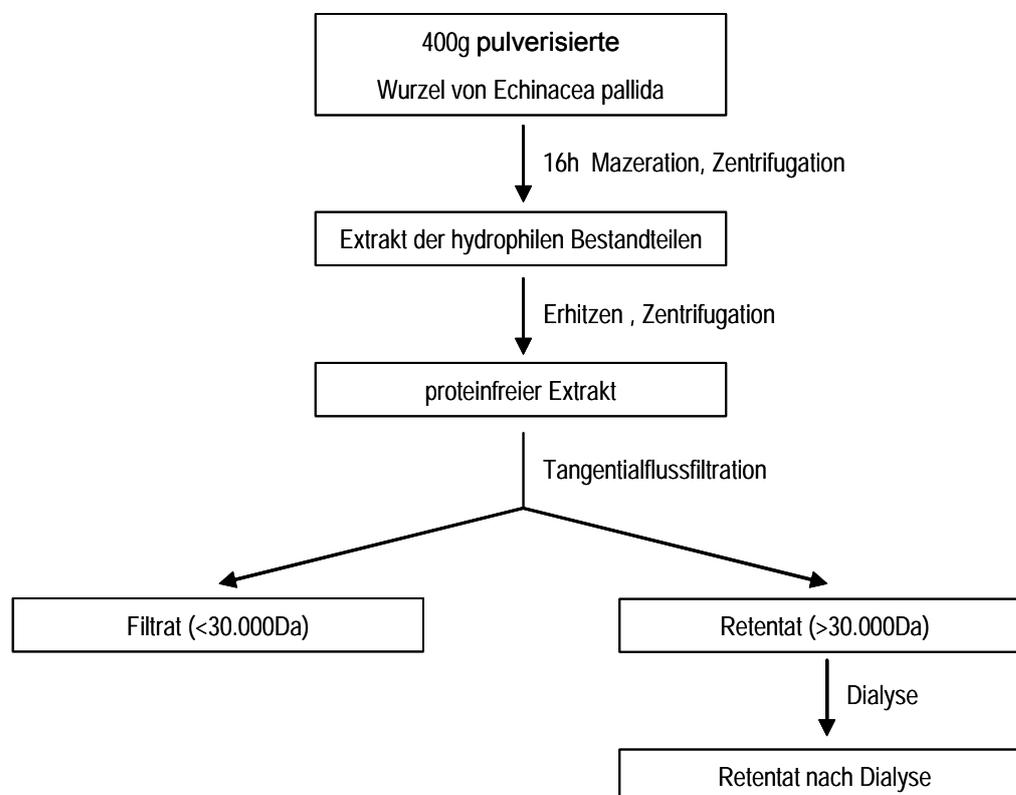


Abb. 3.1: Isolierungsweg von der Droge bis zum Retentat und Filtrat

3.1.2 Neutralzuckerzusammensetzung von Retentat und Filtrat

Um die qualitative und quantitative Zusammensetzung der neutralen Monosaccharide innerhalb der Fraktionen zu bestimmen, wurde eine Acetylierung nach Blakeney (siehe 2.2.1) durchgeführt. Vorteile dieser Methode sind die gute Reproduzierbarkeit, jedes Monosaccharid erzeugt nur einen Peak im Chromatogramm, und die geringen Korrekturfaktoren, die bezogen auf Inositol nur knapp über 1 liegen. Nachteilig ist die fehlende Erfassung von Uronsäuren und den damit direkt verknüpften Zuckern.

Exemplarisch sind die Ergebnisse der Trennung und Aufreinigung von Retentat und Filtrat für Extrakt I dargestellt.

Zucker	Filtrat	Retentat vor Dialyse	Retentat nach Dialyse
Rhamnose	0,0	2,5	8,0
Arabinose	20,7	25,0	50,6
Mannose	10,3	20,0	4,9
Galactose	5,2	9,6	21,8
Glucose	63,8	42,9	14,6
Zuckerausbeute (% m/m)	10,5	34,8	29,8
Gesamtausbeute (mg)	500	1080	470

Tab. 3.1: prozentuale Zusammensetzung (m/m) der neutralen Monosaccharide der Produkte aus Abb. 3.1 des Extraktes I

Das Filtrat enthält überwiegend Glc und insgesamt wenig Neutralzucker. Der Ara- und Gal-Gehalt ist sehr gering.

Das Retentat dagegen enthält mehr Neutralzucker und vor allem mehr Ara und Gal. Deutlich zu sehen ist auch eine Aufkonzentrierung von Ara und Gal nach der Dialyse (von 34,6% auf 72,4%), während der Glc-Anteil wesentlich geringer wurde. Die Gesamtausbeute wurde durch den Aufreinigungsschritt Dialyse halbiert. Insgesamt wurden auf diese Art und Weise sieben Extrakte hergestellt (Tab. 3.2). Die Masse der Gesamtausbeute bezieht sich nicht auf Zuckermassen, sondern auf das Gewicht der Retentate nach Dialyse und Gefriertrocknung. Die Ausbeute von Retentat I war sehr gering, da hier im Gegensatz zu den anderen Ansätzen die Wurzeln vor der Extraktion nicht pulverisiert wurden.

Zucker	I	II	III	V	VI	VII	Ø
Rhamnose	8,0	6,5	7,8	5,7	8,0	5,3	6,9
Fucose	0,0	1,1	0,0	0,3	0,0	0,0	0,2
Arabinose	50,6	60,9	50,1	57,9	59,2	55,2	55,7
Xylose	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,1
Mannose	4,9	0,0	4,1	4,2	0,0	0,0	2,2
Galactose	21,8	19,7	20,0	18,7	20,9	20,7	20,3
Glucose	14,6	11,8	17,9	12,6	11,9	18,8	14,6
Gal / Ara	0,4 : 1	0,3 : 1	0,4 : 1	0,3 : 1	0,35 : 1	0,4 : 1	0,35 : 1
Anteil Ara+Gal	72,4	80,6	70,1	76,6	80,1	75,9	76,0
Gesamtausbeute (mg)	470	1420	700	758	2300	1600	1208

Tab. 3.2: prozentuale Zusammensetzung (m/m) der neutralen Monosaccharide aller Retentate und deren Durchschnittswerte

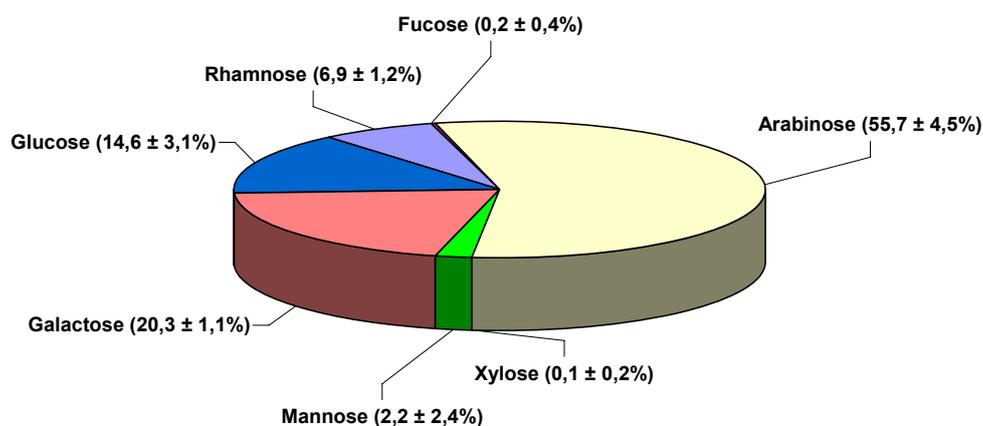


Abb. 3.2: grafische Darstellung der durchschnittlichen Neutralzuckerzusammensetzung der Retentate mit Standardabweichungen in % (m/m)

Die Neutralzucker der einzelnen Retentate zeigen eine konstante Zusammensetzung, was sich in geringen Standardabweichungen widerspiegelt (Tab. und Abb. 3.2). Dies gilt besonders unter der Berücksichtigung, dass es sich um ein Naturprodukt aus der Gruppe der Polysaccharide handelt.

3.1.3 Geldiffusionstest von Retentat und Filtrat

Um die Anwesenheit von AGP zu überprüfen, wurde ein Geldiffusionstest (2.4.1) von Filtrat und Retentat durchgeführt. Bei Anwesenheit von AGP bildete sich eine Präzipitationsbande im Gel zwischen den Löchern.

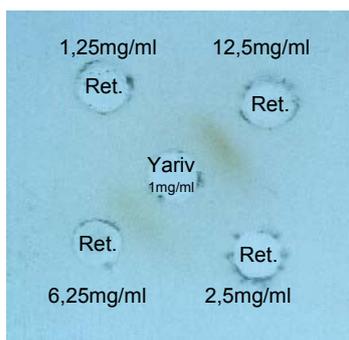


Abb. 3.3: Darstellung eines Geldiffusionstests mit dem Retentat des ersten Extraktes in unterschiedlichen Konzentrationen

Retentat		Filtrat	
mg/ml	Bande	mg/ml	Bande
12,5	+	100,0	-
6,25	+	50,0	-
2,5	-	20,0	-
1,25	-	10,0	-

Tab. 3.3: Retentat und Filtrat des ersten Extraktes im Geldiffusionstest

Bis zu einer Konzentration von 6,25mg/ml waren im Retentat AGPs per Bandenbildung nachzuweisen. Das Filtrat zeigte auch in der höchsten Konzentration von 100mg/ml keine Präzipitationsbanden.

Das Filtrat enthält keine oder nur Spuren von AGP und hatte somit keine Bedeutung mehr für diese Arbeit und wurde auch in weiteren Extrakten nicht mehr untersucht.

3.1.4 Neutralzuckerzusammensetzung AGP

Das Retentat wurde als Ausgangsprodukt für die Fällung von AGP mit dem Yarivreagenz verwendet (2.1.3). Da bei einem Massenverhältnis Yarivreagenz zu AGP von 1:1 die höchste Ausbeute an AGP zu erwarten war, wurde der Gehalt an Ara und Gal addiert und die theoretische Einwaage an Retentat bzw. Yarivreagenz vor jeder Fällung neu berechnet.

Zucker	I	Ia	II	Ila	IIb	Ilc	III	Va	Vb	III/IV	VI	Ø
Rhamnose	6,3	1,4	0,0	0,0	1,0	3,1	5,0	0,0	6,2	5,5	2,8	2,8
Fucose	0,9	1,1	0,0	1,8	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
Arabinose	33,2	32,8	40,3	38,1	38,8	38,8	31,6	40,6	37,5	36,2	38,2	37,0
Xylose	1,6	2,4	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5
Mannose	0,0	0,0	3,5	0,0	0,0	1,3	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
Galactose	35,1	51,6	34,7	53,1	55,4	52,8	47,1	55,2	46,2	45,3	52,1	51,0
Glucose	23,0	10,7	21,5	7,0	2,9	3,1	13,7	4,1	10,1	12,9	6,9	7,9
Gal / Ara	1,1 : 1	1,6 : 1	0,9 : 1	1,4 : 1	1,4 : 1	1,4 : 1	1,5 : 1	1,4 : 1	1,2 : 1	1,3 : 1	1,4 : 1	1,4 : 1
Anteil Ara+Gal	68,3	84,4	75,0	91,2	94,2	91,6	78,6	95,8	83,7	81,5	90,3	87,9
Ausbeute (% m/m)	59,6	58,0	47,3	74,5	48,0	29,8	55,0	43,4	85,0	75,0	145,5	68,2
Ret/Yariv	4,7 : 1	4,5 : 1	4,5 : 1	4,5 : 1	8,0 : 1	4,5 : 1	8,8 : 1	5,6 : 1	10,0 : 1	110,0 : 1	110,0 : 1	7,3 : 1

Anmerkung zur Bezeichnung der Fällungen: römische Ziffer = Fällung aus entsprechendem Retentat

Tab. 3.4: Neutralzuckerzusammensetzung und Durchschnittswerte in % (m/m) aller Yarivfällungen

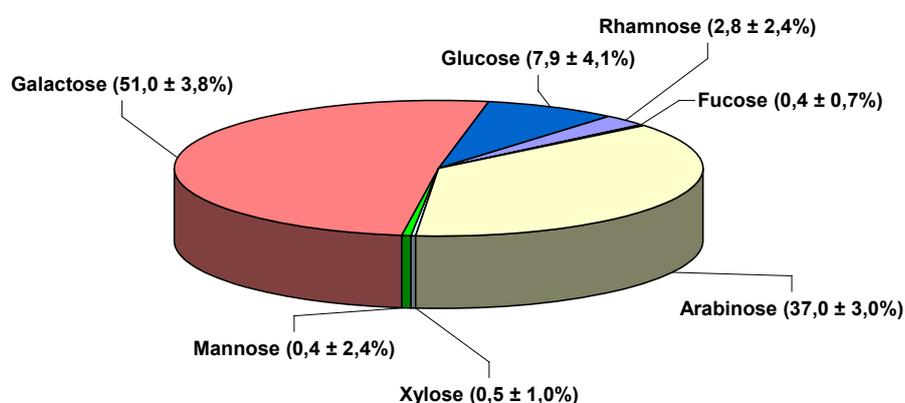


Abb. 3.4: Neutralzuckerzusammensetzung (Ø) der Yarivfällungen mit Standardabweichungen in % (m/m)

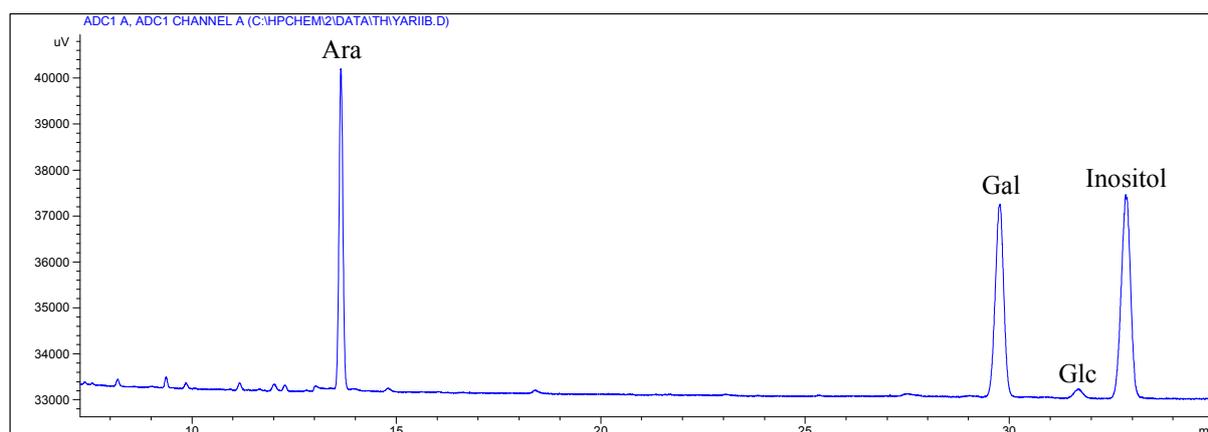


Abb. 3.5: typisches Gaschromatogramm bei der Analyse der Neutralzuckerzusammensetzung eines Yariv-gefällten AGPs (Iib)

Bei der Berechnung der Durchschnittswerte wurden die Fällungen I und II nicht berücksichtigt, da die Glc-Anteile ungewöhnlich hoch und die Verhältnisse von Gal/Ara sehr niedrig im Gegensatz zu den anderen Fällungen sind.

Die Ausbeuten in % beziehen sich auf die eingesetzte Menge Yariv (100% Ausbeute = mg Yariv). Die Ausbeuten schwanken stark und sind bei einem kleinen Verhältnis von Retentat zu Yariv eher gering, die letzten Fällungen mit einem Verhältnis von 10:1 haben höhere Ausbeuten (Fällung VI: 145% !).

Im Durchschnitt ist der Massenanteil von Ara+Gal im Vergleich zum Retentat von 76,0 auf 87,9% gestiegen, die anderen Zuckeranteile gesunken, so dass Rha, Fuc, Xyl und Man nur noch in Spuren vorkommen. Lediglich Glc ist mit im Durchschnitt 6,9% noch etwas stärker vertreten. Bemerkenswert ist die Umkehr des Verhältnisses Gal/Ara von im Durchschnitt 0,35 : 1 im Retentat auf 1,4 : 1 nach der Fällung.

3.1.5 Aufreinigung Arabinan

Große Teile der Arabinose wurden mit dem Yarivreagenz nicht gefällt, mussten also im Überstand der Yarivfällung verblieben sein. Nach Aufarbeitung der Überstände (2.1.4) wurde deren Monosaccharidzusammensetzungen (2.2.1) bestimmt.

Zucker	Ia	II	IIb	IIc	III	Va	Vb	Ø
Rhamnose	8,8	7,6	8,4	7,0	7,3	12,6	6,2	8,3
Arabinose	63,4	62,4	66,2	70,3	64,7	58,1	56,2	63,0
Mannose	0,0	2,5	0,0	2,2	2,4	1,7	3,3	1,7
Galactose	18,4	17,5	15,2	13,2	16,2	14,3	16,3	15,9
Glucose	9,4	10,0	10,2	7,3	9,4	13,3	18,0	11,0
Ausbeute (mg)	122	93	134	115	122	n.b.	n.b.	117,2

Tab. 3.5: Neutralzuckerzusammensetzung und Durchschnittswerte in % (m/m) aller Überstände

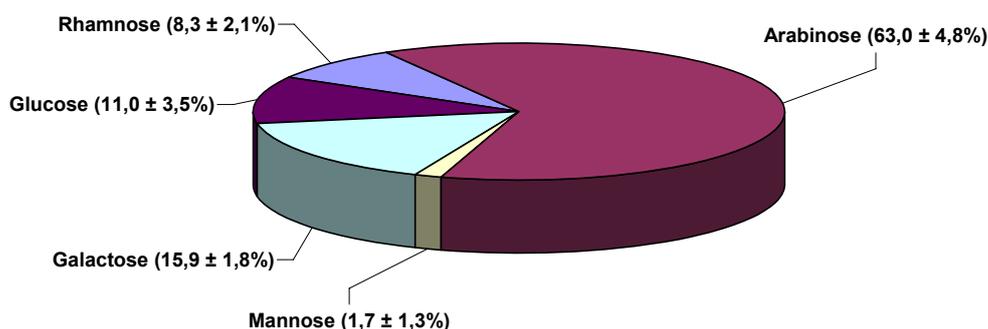


Abb. 3.6: Neutralzuckerzusammensetzung (Ø) der Überstände mit Standardabweichung in % (m/m)

Hauptzucker der Überstände ist erwartungsgemäß Arabinose mit 63,0%. Die Ergebnisse deuteten auf ein Polysaccharid vom Typ der Arabinane hin. Da dies Arabinan entsprechend der Anwesenheit anderer Zucker (Glc, Gal und Rha) wahrscheinlich noch relativ unrein war, wurde eine fraktionierte Fällung mit Ethanol in Anlehnung an Methode 2.1.4 durchgeführt. Hierbei wurden die Fällungen bei der jeweiligen Ethanolkonzentration abzentrifugiert, einrotiert, in dem. Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Die Überstände wurden mit reinem Ethanol bis zur nächst höheren Konzentration (Massenprozent) aufgefüllt. Tabelle 3.6 zeigt die Ergebnisse der Analyse der Neutralzuckerzusammensetzung der Fraktionen in Massenprozent.

Zucker	Überstand IIb	Fällung 40%	Fällung 60%	Fällung 80%	Überstand 80%
Rhamnose	8.4	4.6	13.9	6.8	3.9
Arabinose	66.2	57.7	42.8	44.1	85.4
Galactose	15.2	12.3	11.4	26.0	1.4
Glucose	10.1	20.1	23.8	13.5	5.7
andere*	0.1	5.3	8.1	9.6	3.6
Ausbeute (mg)	130,0 eingesetzt	3.3	10.2	43.1	18.5

* Fuc, Xyl und Man kamen nur in Spuren vor und wurden der Übersicht halber zusammengefasst

Tab. 3.6: Zuckerzusammensetzung der Fraktionen nach Fällung des Yarivüberstandes IIb mit EtOH

Bei den Fällungen mit 40, 60 und 80% EtOH ergibt sich eine recht inhomogene Neutralzuckerzusammensetzung. Zwar dominiert Arabinose, aber im Vergleich zum Überstand IIb ist Ara geringer vertreten. Der größte Massenanteil fiel bei 80% EtOH aus (33,2% der Einwaage), mit besonders viel Gal.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich im Überstand der 80%igen Ethanol fällung (14% der Einwaage) ein Polysaccharid findet, welches überwiegend aus Arabinose besteht. In diesem Arabinan findet man Spuren von Glc, Rha und Gal. Die gute Ethanol löslichkeit im Gegensatz zu vielen anderen Polysacchariden ist typisch für Arabinane (Blaschek, 1991) und wurde als Aufreinigungsschritt genutzt. Die Methode wurde vereinfacht, indem die Yarivüberstände nur noch in 80%igem EtOH gelöst wurden (2.1.4).

3.1.6 Neutralzuckerzusammensetzung Arabinan

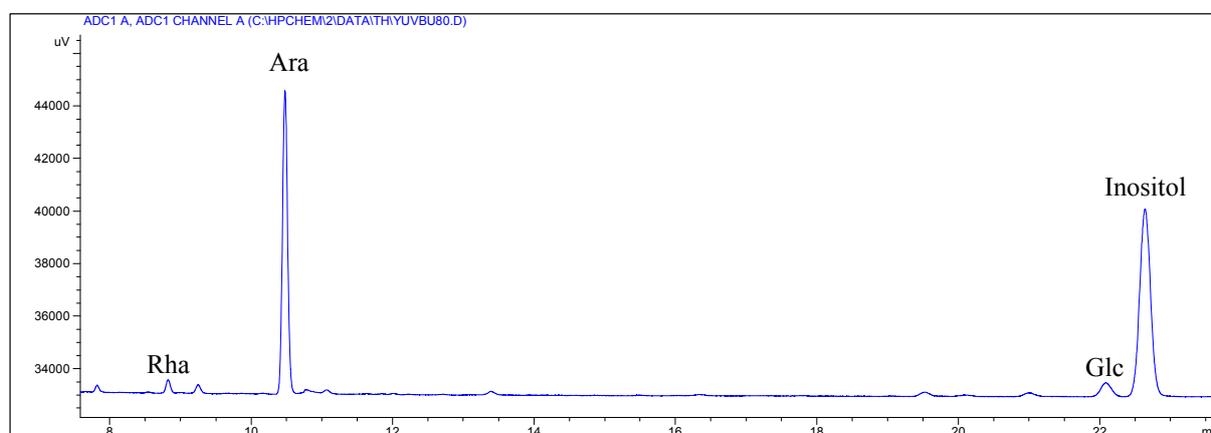


Abb. 3.7: typisches Gaschromatogramm bei der Analyse der Neutralzuckerzusammensetzung eines Arabinans (Vb)

Zucker	IIb	IIc	Vb	Vb2	Durchschnitt
Rhamnose	3,9	7,2	3,8	3,9	4,7
Arabinose	85,4	83,8	80,6	85,8	83,9
Galactose	1,4	4,1	2,1	1,4	2,3
Glucose	5,7	4,8	8,9	7,7	6,8
andere	3,7	0,0	4,7	1,2	2,4

Tab. 3.7: Zuckerszusammensetzung der Arabinane aus den Überständen der Yarivfällungen, aufgereinigt mit EtOH 80%

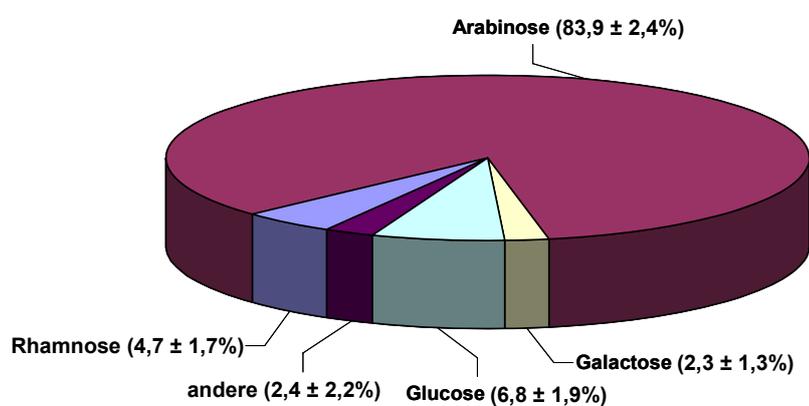


Abb. 3.8: Neutralzuckerzusammensetzung (Ø) der Überstände mit Standardabweichungen in % (m/m)

Alle isolierten Arabinane zeigen eine ähnliche Neutralzuckerzusammensetzung mit geringen Standardabweichungen (Tab. 3.7 und Abb. 3.8).

3.2 Gelpermeationschromatographie

Mit Hilfe der GPC, speziell der Größenausschlußchromatographie (SEC), kann man einerseits das hydrodynamische Volumen von Polymeren bestimmen, andererseits zeigt das Chromatogramm die Homogenität der Probe in Bezug auf das Molekulargewicht.

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Volumens wurde eine Kalibriergerade mit Pullulanen erstellt (2.2.2). Um eine Geradengleichung zu erhalten, wurde auf der Y-Achse der natürliche Logarithmus der Molekulargewichte aufgetragen. Die Masse der Pullulane betrug 100.000 Da (P100) bis 853.000 Da (P800). Proben mit großem MG eluieren aufgrund geringerer Diffusionen in das Säulenmaterial früher als kleinere. Grundvoraussetzung für eine gute Trennung ist die richtige Wahl des Säulenmaterials. Anhand der geringen negativen Steigung der Geraden und des hohen Korrelationskoeffizienten ist zu erkennen, dass die Säule die verwendeten Pullulane gut getrennt hat.

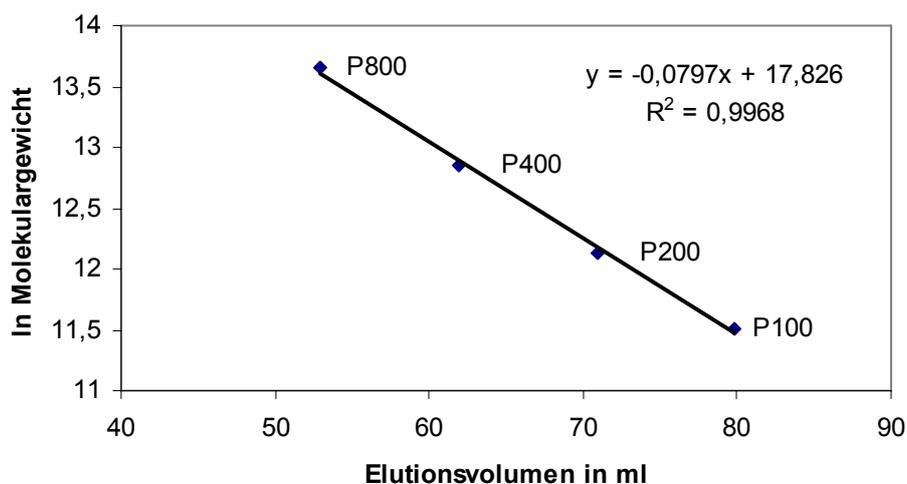


Abb. 3.9: Mit Pullulanen erstellte Kalibriergerade mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9968

3.2.1 Chromatogramm AGP

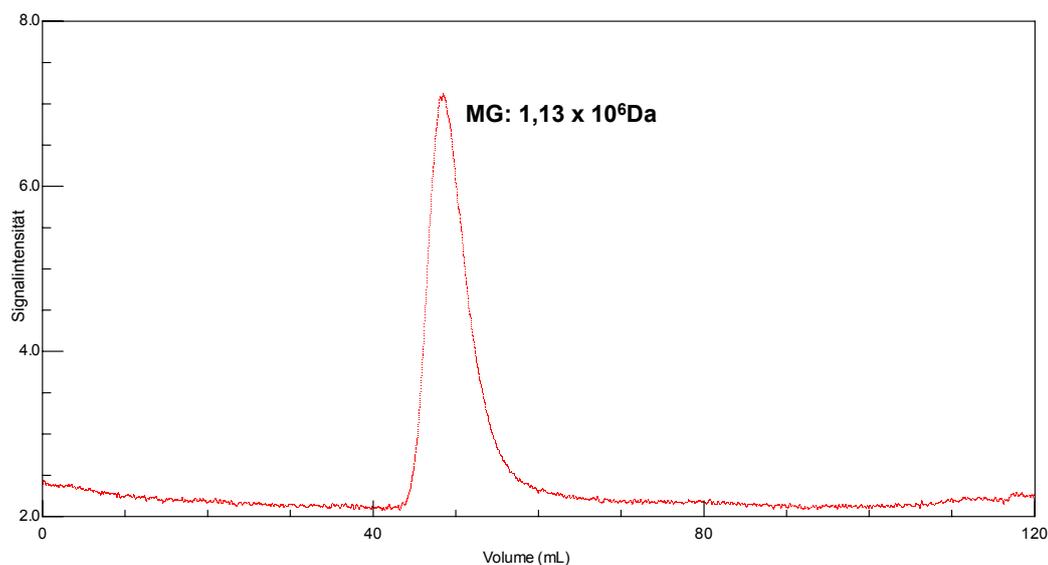


Abb. 3.10: Beispiel eines SEC-Chromatogramms der Yarivfällung III

Das Chromatogramm zeigt einen Peak mit tailing. Somit besteht die Yarivfällung aus einer fast homogenen Fraktion, die eine gewisse Polydispersität aufweist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich aber nur um ein AGP mit dem hydrodynamischen Volumen von ca. $1,13 \times 10^6$ Da.

3.2.2 Chromatogramm Arabinan

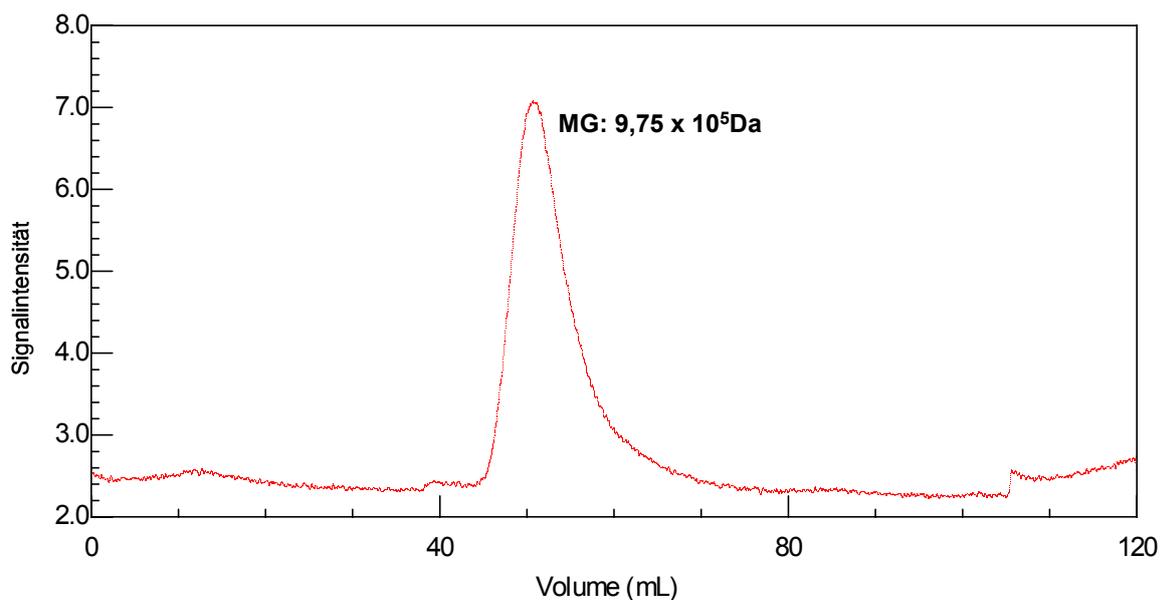


Abb. 3.11: Beispiel eines SEC-Chromatogramms des Arabinans IIc

Das Arabinan zeigt wie das AGP auch nur einen Peak mit tailing. Es besteht aus einer Fraktion mit einer gewissen Polydispersität. Das Arabinan besitzt ein hydrodynamisches Volumen von ca. $9,7 \times 10^5$ Da.

3.3 Ausbeuten von AGP und Arabinan

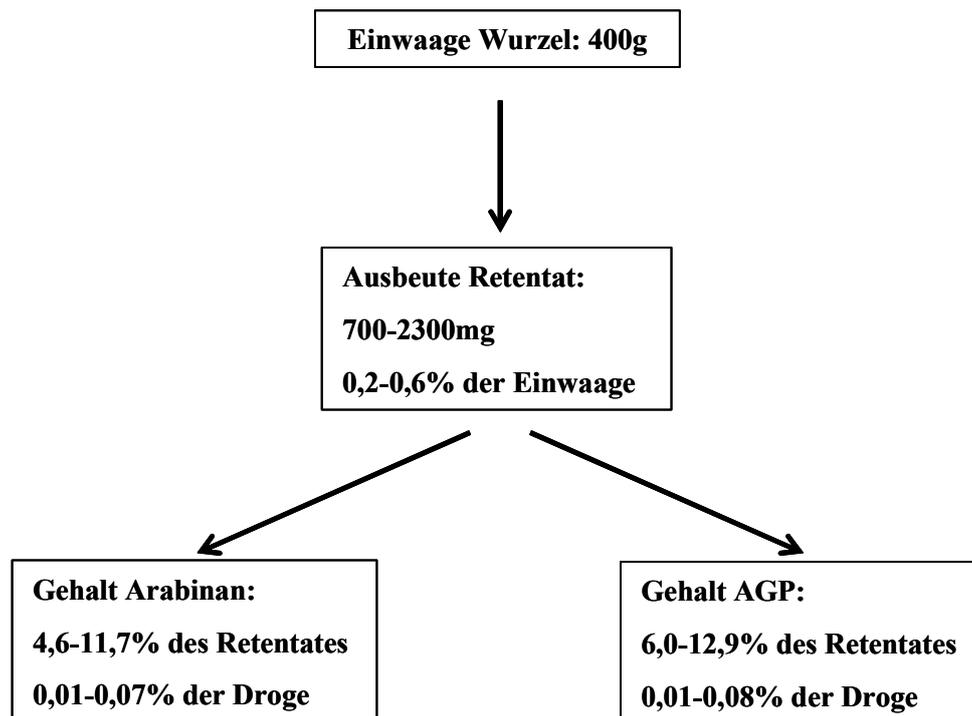


Abb. 3.12: Auf das Retentat und die Gesamtdroge bezogene Ausbeuten von Arabinan und AGP

Die Ausbeuten von AGP und Arabinan aus den Wurzeln von *Echinacea pallida* mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden sind fast gleich groß.

3.4 Quantifizierung und Charakterisierung von Uronsäuren im AGP

3.4.1 Gesamturonsäurebestimmung nach Blumenkrantz

Mit dieser kolorimetrischen Methode werden Uronsäuren mit Schwefelsäure/Borax und meta-Hydroxydiphenyl in Chromogene umgewandelt. Diese werden photometrisch vermessen. Vorteil der Methode ist eine hohe Robustheit, denn andere Monosacharide verfälschen das Ergebnis nicht (Blumenkrantz und Asboe-Hansen, 1973). Nachteilig ist die fehlende Differenzierung zwischen verschiedenen Uronsäuren.

Zur Bestimmung des Uronsäuregehaltes in einer Probe wurde vorher eine Eichgerade mit einer Stammlösung aus gleichen Teilen Glucuron- und Galacturonsäure erstellt. Folgende Abbildung 3.13 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer solchen Kalibrierung:

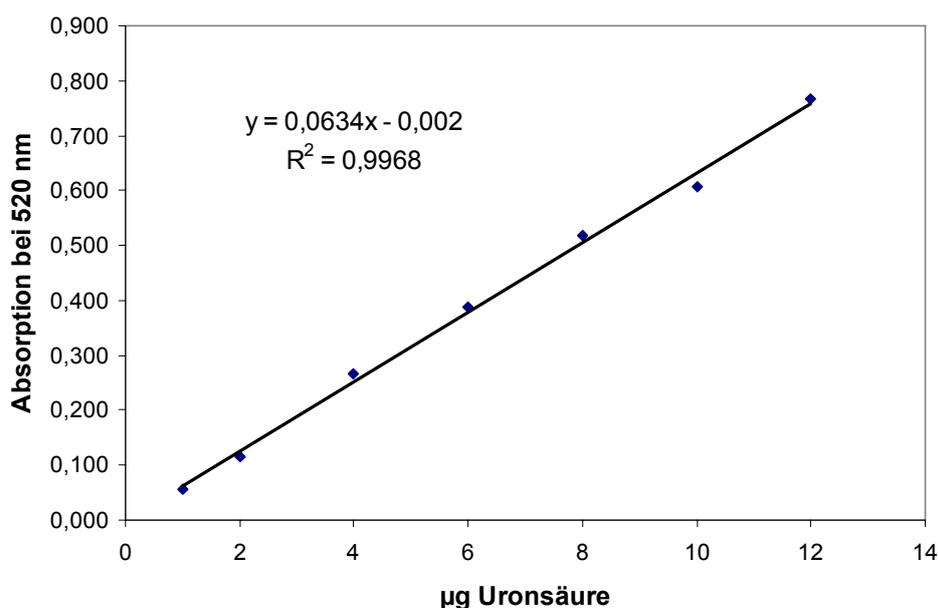


Abb. 3.13: Beispiel einer Eichgeraden mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9968 zur Bestimmung des Uronsäuregehaltes

Die Gesamturonsäurebestimmung nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen ergab im Durchschnitt einen Gehalt von 6,2% (m/m) Uronsäuren im AGP.

3.4.2 Neutralzuckerzusammensetzung nach Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad

Diese Uronsäurebestimmung wurde mit AGP Ia und VI durchgeführt. Das gefriergetrocknete Produkt wurde nach Reduktion zunächst hinsichtlich der Monosaccharidzusammensetzung nach Blakeney (2.2.1) analysiert und später wurde eine Methylierungsanalyse nach Harris (2.2.7) durchgeführt. Bei der Hydrolyse wurden nun auch die glykosidischen Bindungen zwischen ursprünglichen Aldobiuronsäuren gespalten.

Die Carboxylgruppen der Uronsäuren wurden durch Lactonbildung aktiviert und durch anschließende Reduktion zu den korrespondierenden Neutralzuckern der Blakeney-Methode zugänglich gemacht. Wegen der geringen Stabilität des Lactons und der damit verbundenen eventuell mangelhaften Reduktion wurde die Prozedur pro Probe 2x durchgeführt.

Zucker	Yariv Ia	TUron Ia	Yariv VI	TUron VI
Rhamnose	1,4	6,9	2,8	0,0
Fucose	1,1	4,2	0,0	0,0
Arabinose	32,8	32,3	38,2	39,0
Xylose	2,4	0,0	0,0	0,0
Galactose	51,6	41,5	52,1	55,2
Glucose	10,7	15,0	6,9	5,8

Tab. 3.8: Monosaccharidzusammensetzung zweier Yarivfällungen vor und nach Reduktion der Uronsäuren

Ob Galacturon- und/oder Glucuronsäure im AGP vorkommen, lässt sich durch die widersprüchlichen Ergebnisse dieser Analyse nicht klären. Neben den aus den Uronsäuren entstandenen korrespondierenden Neutralzuckern müssten auch prozentual die mit der ursprünglichen Uronsäure verknüpften Monosaccharide zunehmen. Andere Zucker müssten prozentual abnehmen. Ergebnisse der Fällung und Reduktion Ia deuten auf Glucuronsäure (Zunahme Glc um 4,3%), Ergebnisse VI auf Galacturonsäure (Zunahme Gal um 3,1%).

3.4.3 Neutralzuckerzusammensetzung nach Uronsäurereduktion nach Fontaine

Vorhandene Uronsäuren werden genauso wie nach Taylor und Conrad mit Natriumbordeuterid reduziert, nur die vorherige Aktivierung der Carboxylgruppe geschieht über eine Veresterung. Dies hat nach Fontaine et al. (1994) den Vorteil, dass die Uronsäuren im Gegensatz zur Methode nach Taylor und Conrad vollständig reduziert werden.

Zucker	Yariv VI	FUron VI
Rhamnose	2,8	0,0
Arabinose	38,2	34,4
Galactose	52,1	55,5
Glucose	6,9	10,0

Tab. 3.9: Monosaccharidzusammensetzung der Yarivfällung VI vor und nach Reduktion der Uronsäuren

Die Konzentration an Ara nimmt ab, sowohl Gal (+3,4%) als auch Glc (+3,1%) nehmen nach der Reduktion zu, dies deutet auf Galacturon- und/oder Glucuronsäure hin, verknüpft mit Glc bzw. Gal.

Zucker	Yariv VI	FUron VI	TUron VI
Rhamnose	2,8	0,0	0,0
Arabinose	38,2	34,4	39,0
Galactose	52,1	55,5	55,2
Glucose	6,9	10,0	5,8

Tab. 3.10: Monosaccharidzusammensetzung der Yarivfällung VI vor und nach Reduktion der Uronsäuren mit den Methoden jeweils nach Fontaine (FUron VI) und Taylor (TUron VI) im Vergleich

Einzigste Gemeinsamkeit der Ergebnisse ist die Zunahme von Gal nach der Reduktion. Ara und Glc nehmen je nach Methode entweder zu oder ab. Genauere Aussagen über Identität der Uronsäuren sind nach Auswertung der Massenspektren der Methylierungsanalyse (3.6.3) möglich.

3.5 Neutralzuckerzusammensetzung der Produkte nach Partialhydrolyse des AGPs

Durch eine Partialhydrolyse mit 12,5mmol Oxalsäure (2.2.6) werden bevorzugt glykosidische Bindungen von Furanosen gespalten (Adams, 1965), im AGP also überwiegend Bindungen zwischen Arabinosen bzw. Arabinosen und anderen Neutralzuckern.

Ausgefallene Bestandteile nach der Hydrolyse wurden abzentrifugiert. Hochmolekulare Bestandteile wurden mit Ethanol 80% gefällt, abgespaltene Mono- und Oligosaccharide lösten sich im 80%igen Ethanol. Die Oxalsäurehydrolyse wurde mit den Yarıv-fällungen IIa, IIb und IIc durchgeführt.

3.5.1 Neutralzuckerzusammensetzung des Rückstandes

Zucker	Rückstand IIa	Rückstand IIb
Rhamnose	3,9	0,0
Arabinose	36,0	35,6
Galactose	46,3	45,3
Glucose	13,9	19,1
Gal / Ara	1,3 : 1	1,3 : 1

Tab. 3.11: Monosaccharidzusammensetzung (% m/m) der abzentrifugierten Rückstände nach Hydrolyse

Der unlösliche Rückstand besteht überwiegend aus Gal und Ara. Die Zuckerzusammensetzung lässt vermuten, dass es sich um Reste des AGPs handelt. Rückstand IIc konnte wegen zu geringer Ausbeute nicht analysiert werden. Die insgesamt geringen Ausbeuten ließen weitere Analysen nicht zu.

3.5.2 Neutralzuckerzusammensetzung des Coreanteils

Zucker	Core IIa	Core IIb	Core IIc	Ø	Stabw.
Rhamnose	3,7	1,3	0,4	1,8	1,7
Arabinose	6,0	3,8	2,8	4,2	1,6
Galactose	90,3	93,0	95,5	92,9	2,6
Glucose	0,0	1,9	1,3	1,1	1,0
Gal / Ara	15,0 : 1	24,4 : 1	34,2 : 1	24,5 : 1	

Tab. 3.12: Monosaccharidzusammensetzung (% m/m) der ethanolunlöslichen Polymere (Core) des Hydrolysats

Das ethanolunlösliche Polymer des Hydrolysats besteht zu über 90% aus Gal. Nach allen drei Hydrolysen haben die Restpolymere fast die gleiche Monosaccharidzusammensetzung, was für eine gute Reproduzierbarkeit der Methode spricht. Geringe Mengen an Ara zeigen, dass nicht alle glykosidischen Bindungen der Furanosen gespalten werden.

3.5.3 Neutralzuckerzusammensetzung des Überstandes

Zucker	mit TFA-Hydrolyse			ohne TFA-Hydrolyse
	Überstand IIa	Überstand IIc	Ø von IIa und IIc	Überstand IIb
Rhamnose	1,4	1,6	1,5	0,7
Fucose	0,0	0,0	0,0	3,1
Arabinose	70,2	68,0	69,1	82,6
Mannose	2,6	0,0	1,3	0,0
Galactose	20,7	25,8	23,3	2,1
Glucose	5,1	4,6	4,9	11,5
Gal / Ara	0,3 : 1	0,4 : 1	0,35 : 1	0,025 : 1

Tab. 3.13: Monosaccharidzusammensetzung in % (m/m) der ethanollöslichen Fraktion (Überstand) des Hydrolysats

Nach der milden sauren Hydrolyse setzt sich der ethanollösliche Teil überwiegend aus Ara zusammen. Auch Gal findet sich im Überstand. Um eine Aussage über die glykosidischen Verknüpfungen im abgespaltenem Teil machen zu können, wurde der Überstand IIb ohne TFA-Hydrolyse nach Blakeney acetyliert. Im Gegensatz zur Analyse mit TFA-Hydrolyse

werden nur Monosaccharide erfasst, keine Di- und Oligosaccharide. Die Ergebnisse zeigen, dass Ara im Überstand fast nur als Monosaccharid vorliegt (13,5% mehr ohne TFA-Hydrolyse). Das gleiche gilt für Glc (6,6% mehr ohne TFA-Hydrolyse). Gal dagegen liegt als Di- oder Oligosaccharid vor, denn der Gehalt an Gal im Überstand nimmt mit TFA-Hydrolyse um 21,2% zu.

3.5.4 Vergleich der Neutralzuckerzusammensetzungen

Zucker	Ø Yarivfällung	Ø Core	Ø Überstand
Rhamnose	2,8	1,8	1,5
Fucose	0,4	0,0	0,0
Arabinose	37,0	4,2	69,1
Xylose	0,5	0,0	0,0
Mannose	0,4	0,0	1,3
Galactose	51,0	92,9	23,3
Glucose	7,9	1,1	4,9
Gal / Ara	1,4 : 1	24,5 : 1	0,35 : 1

Tab. 3.14: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung (% m/m) von AGP und Produkten der Partialhydrolyse

Ein Vergleich der Yarivfällung mit den Produkten der Oxalsäurehydrolyse zeigt, dass das innere Rückgrat des AGPs aus Gal besteht, während Ara und Glc überwiegend in der Peripherie zu finden sind. Dies spiegelt sich auch in den Verhältnissen von Gal zu Ara wider. Die Di- und/oder Oligosaccharidanteile von Gal im Überstand könnten abgespaltene Coreanteile sein oder Gal-haltige Seitenketten, über Ara mit dem Rückgrat verknüpft.

3.6 Bestimmung der Zucker-Bindungstypen im AGP

Eine genaue Bestimmung der Bindungstypen im Polysaccharidteil lässt sich mit der Methylierungsanalyse nach Harris et al. (1984) (2.2.7) durchführen. Freie OH-Gruppen des Polysaccharids werden in Methylether überführt, anschließend wird hydrolysiert, reduziert und die zum Zeitpunkt der Methylierung blockierten OH-Gruppen acetyliert. Das reduzierende C-Atom (C1) wird aufgrund energetischer Eigenschaften immer acetyliert. Die entstandenen partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) werden gaschromatographisch vermessen und in Kombination mit einem Massenspektrometer über Retentionszeit und Massenspektrum identifiziert. Eine im Arbeitskreis angelegte Bibliothek mit Spektren diente als Referenz.

3.6.1 Glykosidische Bindungstypen im AGP

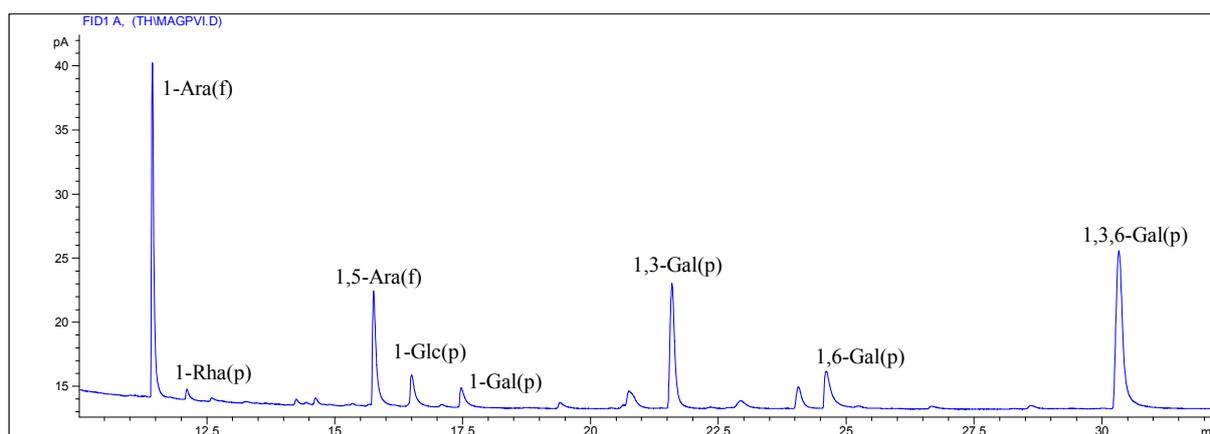


Abb. 3.14: Typisches Gaschromatogramm furanosidisch (f) und pyranosidisch (p) vorliegender PMAAs im AGP VI (FID-Auswertung)

Zuckerrest	Verknüpfung	mol%
Ara(f)	terminal	29,4
	5-	14,2
Gal(p)	terminal	2,5
	3-	16,5
	6-	6,3
	3,6-	26,9
Glc(p)	terminal	4,2
Rha(p)	terminal	Spuren

Tab. 3.15: molare Zusammensetzung der PMAAs im AGP

Das AGP besteht überwiegend aus Gal und Ara, wenig Glc und Spuren von Rha. Die Ergebnisse der Acetylierungsanalyse werden somit bestätigt. Der hohe Anteil an 3,6-verknüpfter Gal deutet auf ein hoch verzweigtes Polysaccharid hin, viele terminale Arabinosen deuten wie auch die Neutralzuckerzusammensetzung des Überstandes nach Partialhydrolyse (3.5.3) auf eine Ara-haltige Peripherie des Polymers hin.

3.6.2 Glykosidische Bindungstypen der Produkte nach Partialhydrolyse

Zuckerrest	Verknüpfung	AGP VI	Core VI	Überstand VI
Ara(f)	terminal	29,4	3,5	33,7
Ara(p)	terminal	0,0	0,0	28,0
	5-	14,2	0,0	6,8
Gal(p)	terminal	2,5	17,6	0,0
	3-	16,5	17,8	0,0
	6-	6,3	43,5	11,4
	3,6-	26,9	17,1	0,0
Glc(p)	terminal	4,2	0,4	20,1
Rha(p)	terminal	Spuren	0,0	0,0

Tab. 3.16: furanosidisch (f) und pyranosidisch (p) vorliegende PMAAs der Produkte der Partialhydrolyse im Vergleich zum AGP in mol %

Mit Teilen der Yarivfällung VI wurde eine Oxalsäurehydrolyse (2.2.6) durchgeführt, die Produkte wurden nach Harris methyliert. Der Coreanteil besteht fast nur aus Gal, besonders C3-verknüpfte Gal(p). Ara ist der dominierende Zucker des Überstandes, besonders terminale Ara (61,7%). Pyranosidische Ara findet sich nur im Überstand. Endständige Glc(p) findet sich auch in der Peripherie, denn das Rückgrat des Polysaccharids enthält kaum Glc, der Überstand umso mehr. Einzig nachweisbare Gal im Überstand ist C3-verknüpft.

Ein Vergleich aller Galactosebausteine des Coreanteils und aller Arabinosebausteine des Überstandes jeweils untereinander im Vergleich zu denen des AGPs macht die Zu- und Abnahme einzelner PMAAs deutlicher.

Zuckerrest	Verknüpfung	AGP VI	Core VI	Differenz
Gal(p)	terminal	4,8	18,3	13,5
	3-	31,6	18,5	-13,1
	6-	12,1	45,3	33,2
	3,6-	51,5	17,8	-33,7

Tab. 3.17: Vergleich prozentualer Anteile einzelner Gal-Bausteine zwischen AGP und Core

3,6-verknüpfte Gal nimmt im Core stark ab, 6-Gal nimmt um fast den gleichen Betrag zu, genauso nehmen 3-Gal ab und terminale Gal zu. Dies deutet auf Verknüpfungen der Gal an C3 und C6 hin, die mit der Partialhydrolyse gespalten wurden. Es muss sich dabei um glykosidische Bindungen mit furanosidisch vorliegenden Arabinosen handeln.

Zuckerrest	Verknüpfung	AGP VI	Überstand VI	Differenz
Ara	terminal	67,4	90,1	22,7
	5-	32,6	9,9	-22,6

Tab. 3.18: Vergleich prozentualer Anteile einzelner Ara-Bausteine zwischen AGP und Überstand

Im Überstand nimmt terminale Ara stark zu, 5-verknüpfte ab. Das bedeutet, dass die glykosidische Verbindung am C5 der Ara durch die Hydrolyse mit Oxalsäure überwiegend gespalten wurde.

3.6.3 Glykosidische Bindungstypen nach Uronsäurereduktionen

Da sich terminale Glc und Glucuronsäure (GlcA) aufgrund gleicher Retentionszeiten mit dieser Methode nicht trennen lassen, erfolgt die Unterscheidung über die Massenspektren. Alle C6-Bruchstücke der reduzierten Uronsäuren haben eine um zwei erhöhte Masse gegenüber den Bruchstücken der Neutralzucker, da zwei Deuteriumatome bei der Reduktion der Carboxylfunktion in das Molekül eingebaut wurden. Mit Hilfe der Spektrenbibliothek wurde als einzige Uronsäure 1-GlcA gefunden. Die Aufnahme der Bruchstücke 205 und 207, charakteristisch für 1-Glc bzw. 1-GlcA zeigt das Verhältnis von 1-Glc zu 1-GlcA in einem Peak. Dies Verhältnis wurde bei der Berechnung der molaren Prozente berücksichtigt.

3.6.3.1 Bindungstypen von FUron und TUron im Vergleich zum AGP

Die aufgeführten auch schon acetylierten Uronsäurereduktionen (3.4) nach Fontaine (FUron) bzw. Taylor (TUron) ergeben nach der Methylierung folgende Ergebnisse:

Zuckerrest	Verknüpfung	AGP VI	FUron VI	TUron VI
Ara(f)	terminal	29,4	29,3	31,4
	5-	14,2	12,7	13,1
Gal(p)	terminal	2,5	2,4	2,4
	3-	16,5	13,0	11,1
	6-	6,3	9,2	9,2
	3,6-	26,9	18,1	24,8
Glc(p)	terminal	4,2	8,9	2,9
GlcA(p)	terminal	nicht bestimmt	6,3	5,0
Rha(p)	terminal	Spuren	0,0	0,0

Tab. 3.19: furanosidisch (f) und pyranosidisch (p) vorliegende PMAAs (% mol) verschiedener Uronsäurereduktionen im Vergleich zum AGP

Bei beiden Reduktionen bleiben die Konzentrationen an Ara-Bausteinen im Vergleich zum AGP nahezu gleich. Auch terminale Gal bleibt gleich, 6-Gal nimmt zu, 3,6-Gal nimmt ab. FUron VI hat einen höheren, TUron VI einen niedrigeren terminalen Glc-Gehalt als das AGP

VI. Der ermittelte GlcA-Gehalt ist fast gleich. Auffällig ist, dass die Verhältnisse von Glc/GlcA im SIM-Modus große Unterschiede aufweisen. So ergibt sich nach TUrön VI eine Peakzusammensetzung aus 36,5% 1-Glc und 63,5% 1-GlcA (0,57:1), bei FUrön VI eine Peakzusammensetzung von 58,3% 1-Glc und 41,7% 1-GlcA (1,4:1). Dies erklärt auch den nach beiden Methoden nahezu gleich errechneten 1-GlcA-Gehalt, obwohl in der Neutralzuckerzusammensetzung (3.4.3) nach Reduktion die Glc bei FUrönVI prozentual wesentlich stärker zugenommen hat.

Die Zunahme der 6-Gal wird mit folgender Tabelle noch deutlicher. 1-GlcA muss mit diesem Baustein über C6 glykosidisch verknüpft sein:

Zuckerrest	Verknüpfung	AGP VI	FUrön VI	TUrön VI
Gal(p)	terminal	4,8	5,6	5,1
	3-	31,6	30,4	23,4
	6-	12,1	21,5	19,4
	3,6-	51,5	42,4	52,2

Tab. 3.20: Vergleich prozentualer Anteile der Gal-Bausteine zwischen AGP und Reduktionen

3.6.3.2 Bindungstypen im uronsäurereduzierten Core im Vergleich zum Core und AGP

Die Zunahme von C6 verknüpfter Gal nach beiden Reduktionen in 3.6.3.1 deutet auf eine Bindung der 1-GlcA an diesen Galactosebaustein. Um dies zu überprüfen, wurde eine Partialhydrolyse nach Gleeson und Clarke (2.2.6) durchgeführt und anschließend eine Urönsäurebestimmung nach Taylor und Conrad (2.2.4) des ethanolunlöslichen Restpolymers durchgeführt. Dieser urönsäurereduzierte Coreanteil (TUrön Core) wurde nach Harris (2.2.7) methyliert.

Zuckerrest	Verknüpfung	AGP VI	TUron Core VI	Core VI
Ara(f)	terminal	29,4	2,1	3,5
	5-	14,2	0,0	0,0
Gal(p)	terminal	2,5	10,8	17,6
	3-	16,5	14,8	17,8
	6-	6,3	42,7	43,5
	3,6-	26,9	16,1	17,1
Glc(p)	terminal	4,2	1,4	0,4
1-GlcA(p)	terminal	nicht bestimmt	12,1	nicht bestimmt
Rha(p)	terminal	Spuren	0,0	0,0

Tab. 3.21: PMAAs des uronsäurereduzierten Coreanteils im Vergleich zum AGP VI und Core VI

TUron Core enthält 12,1% Uronsäuren, ein Beweis, dass die 1-GlcA mit der Galactose des Coreanteils verbunden ist. Um deutlich zu machen, welcher Galactosebaustein glykosidisch mit der Uronsäure verknüpft ist, werden nur Gal-Bausteine miteinander verglichen:

Zuckerrest	Verknüpfung	Core VI	TUron Core VI	Differenz
Gal(p)	terminal	18,3	12,8	-5,5
	3-	18,5	17,5	-1,0
	6-	45,3	50,6	5,3
	3,6-	17,8	19,1	1,3

Tab. 3.22: Vergleich prozentualer Anteile einzelner Gal-Bausteine zwischen TUron Core und CoreVI

Die beiden Bausteine (6- und 3,6-verknüpfte Gal), die prozentual zunehmen, können mit der 1-GlcA verknüpft sein. Die C6 verknüpfte Gal ist am wahrscheinlichsten, denn diese nimmt prozentual am stärksten zu und bestätigt damit die Ergebnisse der Methylierung von TUron und FUron (3.6.3.1).

3.7 Bestimmung der Bindungspositionen im Arabinan

Auch die Bindungstypen der Neutralzucker des in 3.1.5 isolierten Arabinans wurden bestimmt.

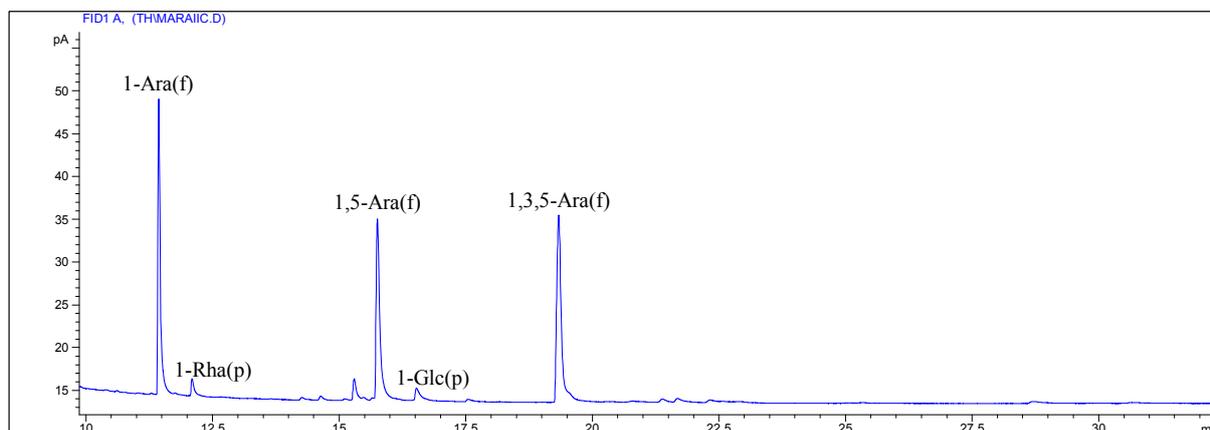


Abb. 3.15: Typisches Gaschromatogramm bei der Analyse der Neutralzuckerzusammensetzung eines Arabinans (Vb) (FID-Auswertung)

Zuckerrest	Verknüpfung	Arabinan IIb	Arabinan Vb
Ara(f)	terminal	26,2	34,0
	5-	29,6	28,4
	3,5-	41,4	33,3
Glc(p)	terminal	2,8	2,0
Rha(p)	terminal	Spuren	2,3

Tab. 3.23: molare Anteile einzelner Bausteine im Arabinan IIb und Vb

Das Arabinan Vb besteht überwiegend aus drei fast gleich großen Anteilen an 1-, 5- und 3,5-verknüpfter Ara. Spuren von 1-Glc und 1-Rha kommen vor. Arabinan IIb enthält prozentual mehr 3,5-Ara und weniger 1-Ara. Da die partiell weniger methylierten Zucker flüchtiger sind, kam es hier vielleicht beim Einengen der Lösungen (2.2.7) zu Verlusten an 1-Ara.

Die hohen Anteile der 3,5-Ara deuten auf ein hoch verzweigtes Polysaccharid hin, welches in terminalen Arabinosen und eventuell ab und zu in terminaler Glc oder Rha endet.

Eine Partialhydrolyse macht aufgrund vieler energetisch gleicher Bindungen (furanosidische Arabinosen) im Molekül keinen Sinn. Eine komplette Spaltung des Arabinans wäre die Folge.

3.8 NMR-Spektroskopie

Die Resonanzpektroskopie der ^{13}C -Kerne liefert wichtige Daten zur Strukturaufklärung von niedermolekularen Substanzen oder Homopolysacchariden. Bei hochmolekularen Heteropolysacchariden ist das Vorhandensein von sich wiederholenden Einheiten (repeating units) essentiell für eine genügend große Signalstärke der einzelnen C-Atome. Die chemische Verschiebung (ppm) gibt Informationen über Substituenten und Konfiguration der C-Atome.

3.8.1 ^{13}C -NMR des AGPs

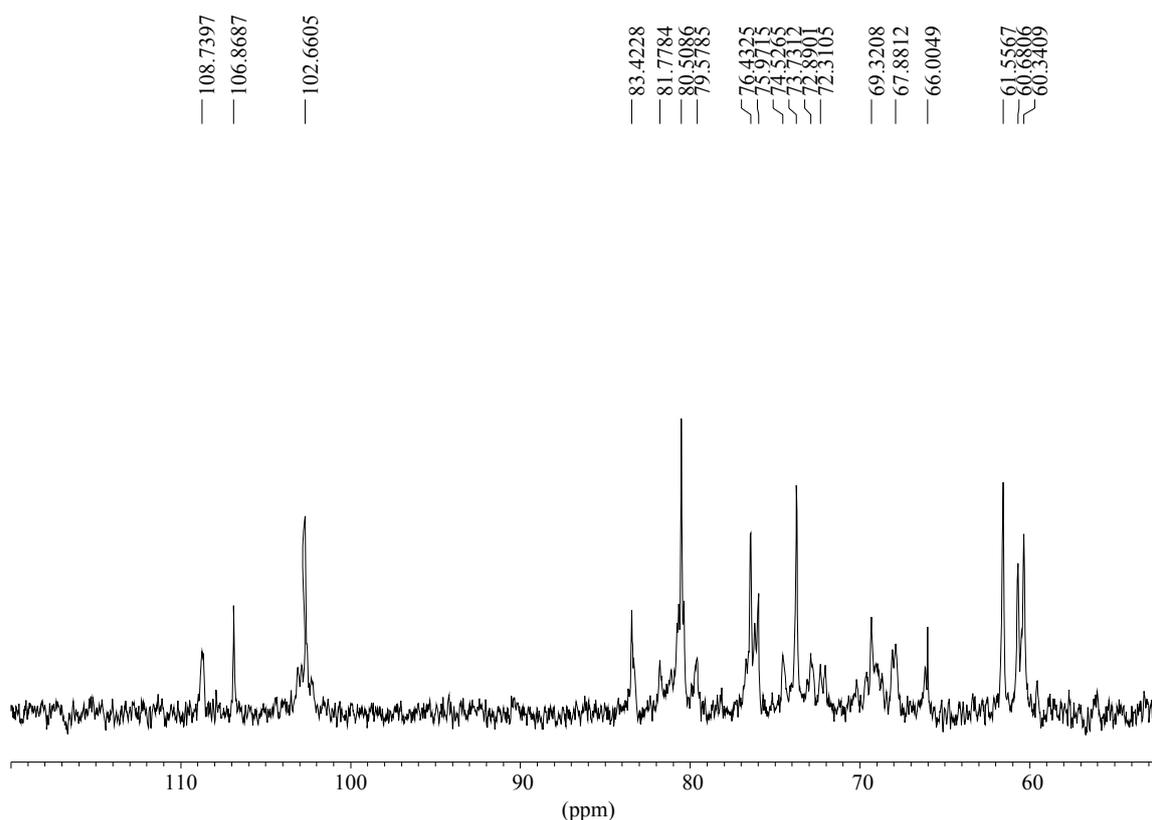
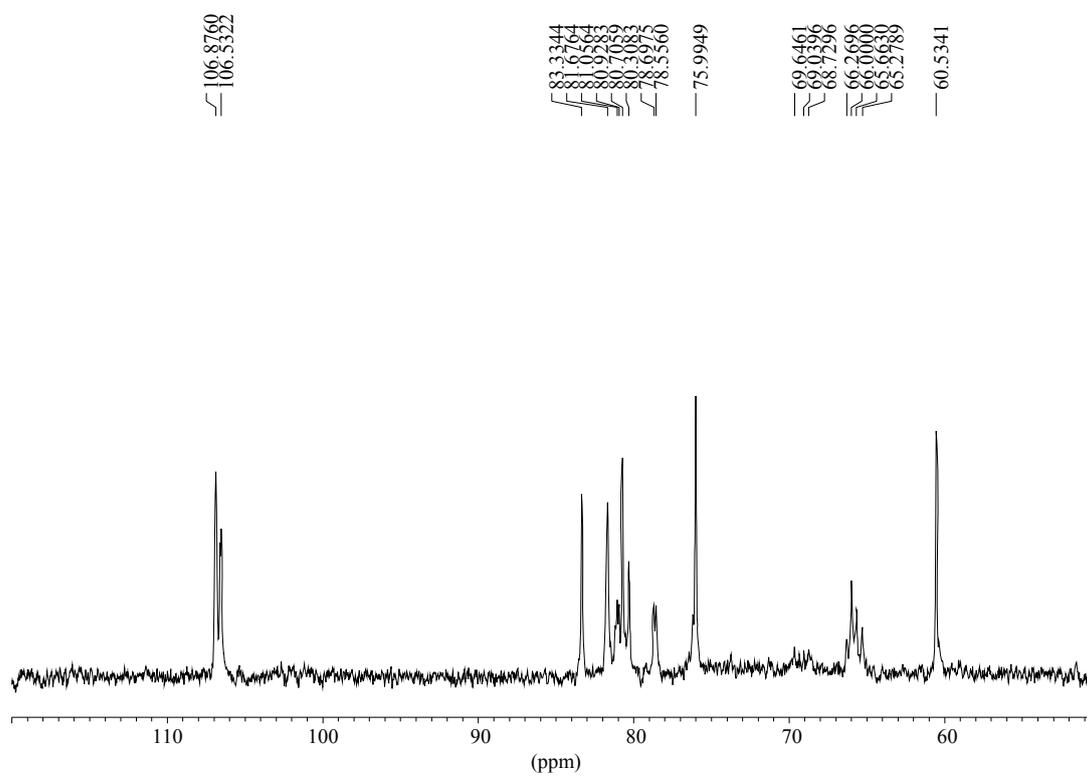


Abb. 3.16: ^{13}C -NMR Spektrum des AGPs

glykosidische Bindung	chemische Verschiebung in ppm					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
terminal α -L-Ara	108,7	80,7	76,0	83,4	60,3	
5- α -L-Ara	106,9	80,3	76,0	81,8	66,1	
3- β -D-Gal	103,1	69,7	80,9	68,0	74,3	60,6
6- β -D-Gal	103,1	70,2	72,3	68,0	72,9	68,6
3,6- β -D-Gal	103,1	69,4	80,9	68,0	72,9	68,6

Tab. 3.24: Summe aller zugeordneten chemischen Verschiebungen der ^{13}C -Atome im AGP

Die Auswertung erfolgte über Vergleich mit den Daten der Methylierungsanalyse (3.6) und Referenzspektren aus der Literatur (Classen et al., 2000; Gane et al., 1995; Tan et al., 2004). Alle Arabinosen, denen Signale zugeordnet wurden, liegen in der alpha-Form vor, alle Galactosen in der beta-Form. Am weitesten ins tiefe Feld verschoben sind die ^{13}C Kerne der Carboxylgruppen der Uronsäuren. Diese müssten bei ca. 175ppm ein Signal geben, dies war aber aufgrund der geringen Uronsäureanteile nicht zu erkennen. Die anomeren C1-Atome von Gal und Ara sind auch weit ins tiefe Feld verschoben, denn die Elektronendichte in diesen Kernen ist gering. Die C1 Atome der Gal ergeben keine getrennten Signale, sie bilden ein Cluster von Signalen bei ca. 103,1ppm. Charakteristische Signale von C-Atomen aus dem Ring von Arabinosen (C2 - C4) sind bei 76,0 bis 83,4ppm zu sehen. Die Signale der Arabinosen sind viel schärfer als die der Galactosen, die sich aufgrund eingeschränkter Mobilität nicht gut anregen lassen. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass sich Gal im Inneren des AGPs befindet, während Ara einen großen Teil der Peripherie bildet.

3.8.2 ^{13}C -NMR des ArabinansAbb. 3.17: ^{13}C -NMR Spektrum des Arabinans

glykosidische Bindung	chemische Verschiebung in ppm				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
terminal α -L-Ara	107,4	81,2	76,5	83,8	61,0
5- α -L-Ara	107,4	80,8	76,5	82,2	66,2
3,5- α -L-Ara	107,0	81,2	79,1	82,2	65,8

Tab. 3.25: Summe aller zugeordneten chemischen Verschiebungen der ^{13}C -Atome im Arabinan

Die Auswertung erfolgte über Vergleich mit den Daten der Methylierungsanalyse (3.7) und Referenzspektren aus der Literatur (Navarro et al., 2001; Swamy and Salimath, 1990). Die Daten zeigen, dass alle Arabinosen in der alpha-Form vorliegen. Wie beim AGP sind die Signale der anomeren C1-Atome am weitesten ins tiefe Feld verschoben. Signale der Ringkohlenstoffe (C2 - C4) sind bei 76,5 - 83,8ppm zu finden. Substituierte C3-Atome sind gegenüber unsubstituierten ins tiefere Feld verschoben (79,1 und 76,5ppm). Das gleiche gilt für substituierte und unsubstituierte C5-Atome (ca. 66,0 und 61,0ppm).

3.9 Charakterisierung des Proteinanteils im AGP

3.9.1 Bestimmung von Aminosäuren per GC

Mit dem Aminosäureanalyse-Kit EZ:faast[®] von Phenomenex (2.2.9) wurden Korrekturfaktoren für einzelne Aminosäuren ermittelt (interner Standard Norvalin). Hierzu wurde das mitgelieferte AS-Standardgemisch in drei Konzentrationen mehrfach vermessen. Als sich entweder Ergebnisse mit sehr hohen Faktoren und/oder großen Standardabweichungen ergaben, wurden Standards aus verschiedenen Aminosäuren selbst hergestellt. Die Durchschnittswerte aller Messungen sind in Tabelle 3.26 dargestellt.

Aminosäure	Abkürzung	Korrekturfaktor	Standardabweichung
Alanin	Ala	1,222	0,208
Glycin	Gly	1,273	0,041
Valin	Val	1,002	0,025
Leucin	Leu	0,741	0,047
Isoleucin	Ile	0,919	0,035
Threonin	Thr	0,000	0
Serin	Ser	0,000	0
Prolin	Pro	0,945	0,038
Asparaginsäure*	Asp	1,203	0,045
Methionin	Met	0,820	0,039
4-Hydroxyprolin	Hyp	2,876	0,445
Glutaminsäure*	Glu	2,707	0,461
Phenylalanin	Phe	0,480	0,007
Lysin	Lys	1,317	0,426
Histidin	His	1,268	0,104
Hydroxylysin	Hyl	2,390	0,112
Tyrosin	Tyr	0,501	0,007

*Asparagin und Glutamin werden durch die Hydrolyse komplett in Asp und Glu umgewandelt

Tab. 3.26: Korrekturfaktoren und Standardabweichungen der mit dem Kit bestimmten Aminosäuren

Man erkennt bei zwei Aminosäuren sehr hohe Standardabweichungen (Ala und Lys), bei Hyl einen sehr hohen Faktor, bei Hyp und Glu sogar beides. Für Thr und Ser konnten aufgrund zu kleiner Peakflächen bei allen Konzentrationen gar keine Faktoren ermittelt werden. Diese Tatsachen spiegeln eine schlechte Reproduzierbarkeit der Methode wider.

3.9.1.1 Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Pepsin

Um zu überprüfen, wie genau die ermittelten Faktoren aus 3.9.1 sind, wurde Pepsin, ein Protein mit bekannter Zusammensetzung, nach dieser Methode analysiert.

Aminosäure	Abkürzung	Zusammensetzung		
		errechnet	theoretisch	Differenz
Alanin	Ala	5,5	4,1	1,4
Glycin	Gly	5,2	8,1	-2,9
Valin	Val	5,0	7,1	-2,1
Leucin	Leu	8,4	10,4	-2,0
Isoleucin	Ile	5,3	10,0	-4,7
Threonin**	Thr	9,5	9,5	n.b.
Serin**	Ser	13,3	13,3	n.b.
Prolin	Pro	3,8	4,9	-1,1
Asparaginsäure*	Asp	0,8	16,6	-15,8
Methionin	Met	0,8	2,0	-1,2
4-Hydroxyprolin	Hyp	1,4	0,1	1,4
Glutaminsäure*	Glu	11,7	11,3	0,4
Phenylalanin	Phe	4,6	6,7	-2,1
Lysin	Lys	15,8	14,1	1,7
Histidin	His	0,8	3,8	-3,0
Hydoxylysin	Hyl	5,6	0,0	5,6
Tyrosin	Tyr	2,6	3,3	-0,7

* Asparagin und Glutamin werden durch die Hydrolyse komplett in Asp bzw. Glu umgewandelt

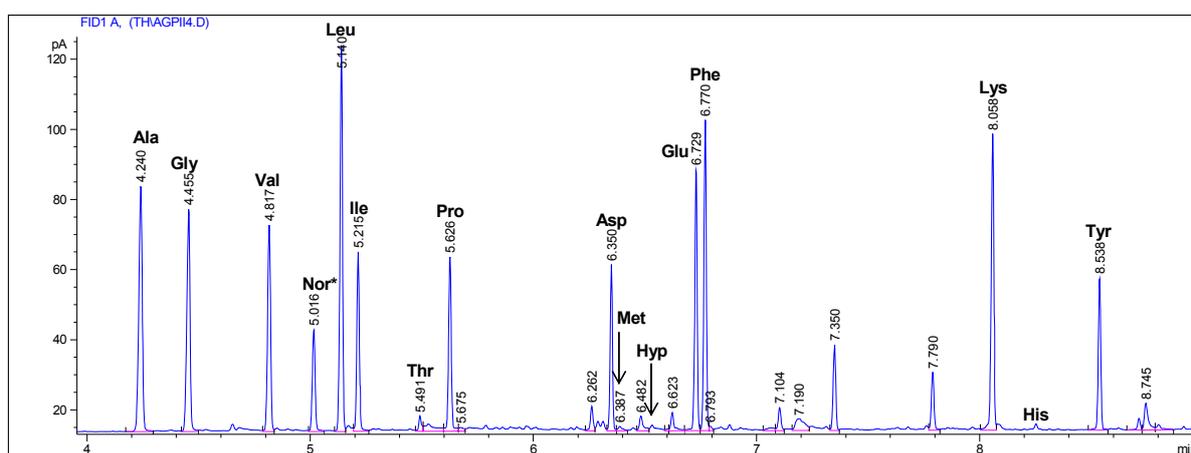
** für Thr und Ser wurden mangels Faktoren die theoretischen Werte eingesetzt

Tab. 3.27: errechnete und theoretische Aminosäurezusammensetzung von Pepsin % (m/m)

Pepsin besteht zu 100% aus Aminosäuren, der mit dem Kit errechnete Anteil waren nur 17%. Größte Differenzen zwischen theoretischen und praktisch ermittelten Gehalten gibt es bei Asp, Hyl und Ile. Die Ergebnisse zeigen, dass eine quantitative Auswertung mit dem Kit sehr ungenau, die qualitative Auswertung aber möglich ist (Ausnahme Hyl!).

3.9.1.2 Qualitative Zusammensetzung des Proteinanteils im AGP

Hydrolyse, Derivatisierung und gaschromatographische Auswertung eines AGPs ergab folgende Aminosäurezusammensetzung:



* Nor = interner Standard Norvalin

Abb. 3.18: Gaschromatogramm der Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils im AGP

Ohne genaue quantitative Aussagen zu machen, kann man aus dem Chromatogramm unter Einbeziehung der Peakflächen und der ermittelten Korrekturfaktoren folgendes ableiten: Der Proteinanteil des AGPs besteht laut dieser Analyse überwiegend aus Glu, Lys, Leu und Ala. Val, Gly, Asp, Ile, Phe, Pro und Tyr kommen auch vor. In Spuren finden sich His, Hyp, Thr und Met. Ser und Hyl kommen im AGP nicht vor.

3.9.2 Bestimmung von Aminosäuren per HPLC

Da die quantitative Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils mit der GC-Methode nicht bestimmt werden konnte, wurde dies per HPLC durchgeführt. Nach Hydrolyse, Probenvorbereitung und HPLC-Lauf mit Nachsäulenderivatisierung (2.2.9) ergab sich folgende Zusammensetzung des Proteinteils vom AGP:

Aminosäure	Abkürzung	% (m/m)
Alanin	Ala	9,6
Glycin	Gly	7,0
Valin	Val	5,6
Leucin	Leu	3,9
Isoleucin	Ile	2,4
Threonin	Thr	8,9
Serin	Ser	11,4
Prolin	Pro	3,4
Asparaginsäure*	Asp	7,3
Methionin	Met	0,6
4-Hydroxyprolin	Hyp	17,3
Glutaminsäure*	Glu	8,6
Phenylalanin	Phe	2,0
Lysin	Lys	4,2
Histidin	His	3,1
Tyrosin	Tyr	1,3
Arginin	Arg	2,8
Cystin		0,1
Cysteinsäure		0,4

*Asparagin und Glutamin werden durch die Hydrolyse komplett in Asp bzw. Glu umgewandelt

Tab. 3.28: errechnete Aminosäurezusammensetzung vom AGP in % (m/m)

Der errechnete Proteinanteil des AGPs beträgt 3,9%. Hauptaminosäuren sind Hyp, Ser, Ala, Thr, Glu, Asp und Gly. Weniger häufig vorkommende Aminosäuren sind Val, Lys, Leu und Pro. Spuren von Ile, Met, Phe, His, Tyr und Arg wurden auch detektiert.

3.9.3 Bestimmung von Hydroxyprolin

Mit einer photometrischen Methode wurde der Hydroxyprolingehalt im Proteinteil des AGPs bestimmt. Nach Hydrolyse des AGPs und Oxidation des Hydroxyprolins reagierte dies mit einem Farbreagenz. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde Hydroxyprolin als Standard in verschiedenen Konzentrationen eingewogen, derivatisiert und photometrisch vermessen (siehe 2.2.10). Andere Aminosäuren störten die quantitative Bestimmung von Hydroxyprolin nicht.

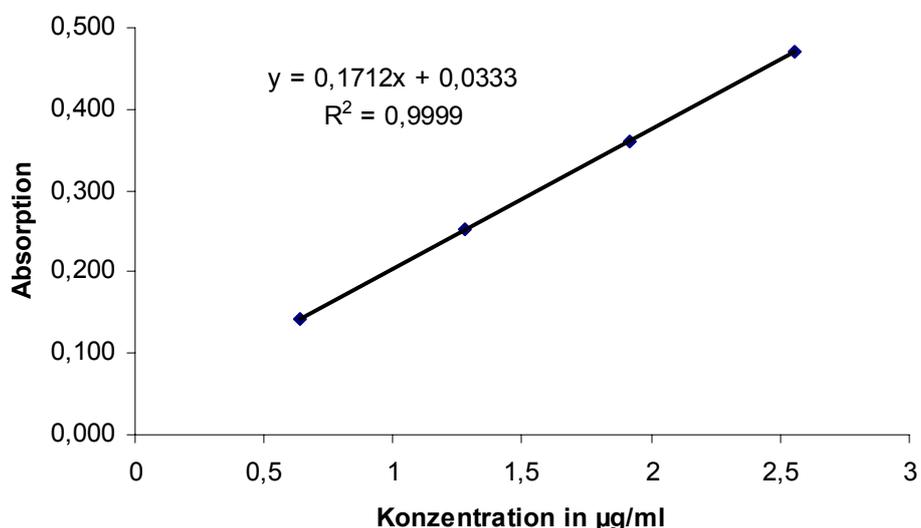


Abb. 3.18a: Gaschromatogramm der Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils im AGP

Der anhand der Kalibriergeraden in Abb. 3.18a errechnete Hydroxyprolingehalt beträgt im Durchschnitt 0,65% (m/m). Dieser Gehalt korreliert gut mit dem per HPLC ermittelten Gehalt (siehe 3.9.2), der bezogen auf das gesamte AGP dort bei 0,67% lag.

3.10 Yarivreaktionen mit modifiziertem AGP und Arabinan

Ein Geldiffusionstest (2.4.1) wurde mit folgenden Proben (Konzentration 10mg/ml) durchgeführt:

Probe	Bande
Yarivfällung	+
Uronsäurereduktion	+
Core	-
Arabinan	-

Tab. 3.29: verschiedene Proben und ihre Reaktivität mit dem Yarivreagenz

Yarivfällung und das uronsäurereduzierte AGP nach Taylor und Conrad (TUron) bilden eine Präzipitationsbande mit dem Yarivreagenz (1mg/ml), das von peripheren Arabinose-Resten befreite Rückgrat nach Partialhydrolyse (Core) und das Arabinan hingegen nicht.

3.11 Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen AGPs und Arabinan

Die Kreuzreaktivität zweier verschiedener Antikörper, generiert in Maus bzw. Kaninchen gegen ein AGP aus *Echinacea purpurea*, wurde getestet. Dazu diente ein kompetitiver ELISA (2.3.5). Es handelt sich dabei um eine immunologische Methode, bei der die Kreuzreaktivität auch Hinweise zur Strukturaufklärung und zu ähnlichen Strukturen in vergleichbaren Polymeren gibt. Daher werden die Ergebnisse dieser Versuche den analytischen Ergebnissen zugeordnet. Die Bindungsaffinität eines Antikörpers zu einem Epitop ist in diesem Versuch umgekehrt proportional zur Höhe der Absorption bei der Messung.

3.11.1 Kreuzreaktivität eines monoklonalen Antikörpers

Dieser monoklonale Antikörper aus der Maus ist ursprünglich gegen ein AGP aus dem Presssaft von *E.purpurea* gerichtet. Nach ELISA-Versuchen zur Reaktivität des Antikörpers mit uronsäureduziertem *E.purpurea*-AGP und dem von peripheren Arabinose-Resten befreitem Rückgrat des *E.purpurea*-AGPs konnten periphere Ara und GlcA als Bestandteile des Epitops ausgeschlossen werden (Classen et al., 2004).

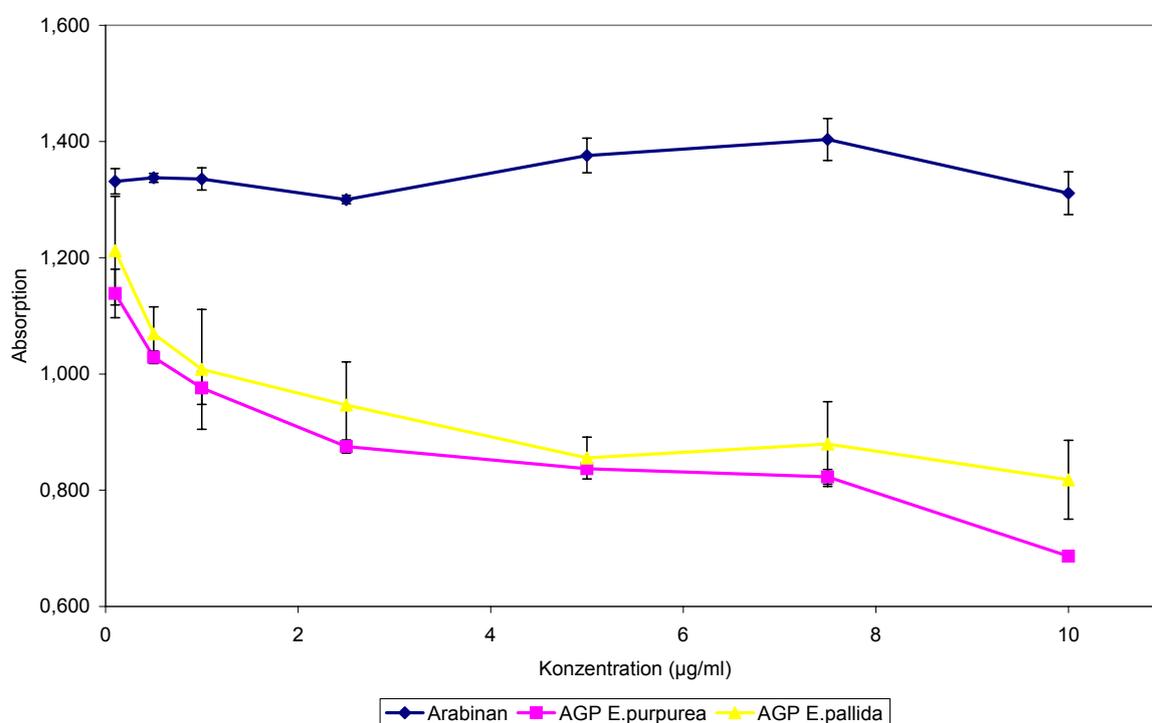


Abb. 3.19: Kreuzreaktivität eines monoklonalen Antikörpers

Die fast parallel zur X-Achse verlaufende Reaktivität des Arabinans mit hohen Absorptionen macht deutlich, dass der monoklonale AK keine Reaktivität mit dem Arabinan zeigt. Deutliche Kreuzreaktivität besteht zum AGP aus *E.pallida*. Die Kurve verläuft fast parallel zu der des ursprünglichen Antigens, dem AGP aus *E.purpurea*. Die im Schnitt etwas niedrigeren Absorptionswerte des *E.purpurea* AGPs zeigen, dass die Affinität des Antikörpers zum *E.purpurea* AGP höher ist als zum *E.pallida* AGP.

3.11.2 Kreuzreaktivität eines polyklonalen Antikörpers

Diese Antikörper, generiert in Kaninchen, wurden mit AGP aus dem Presssaft von *E.purpurea* als Antigen etabliert. Als ein wichtiger Teil des Bindungsepitops wurden furanosidische Arabinosereste identifiziert (Classen et al., 2005).

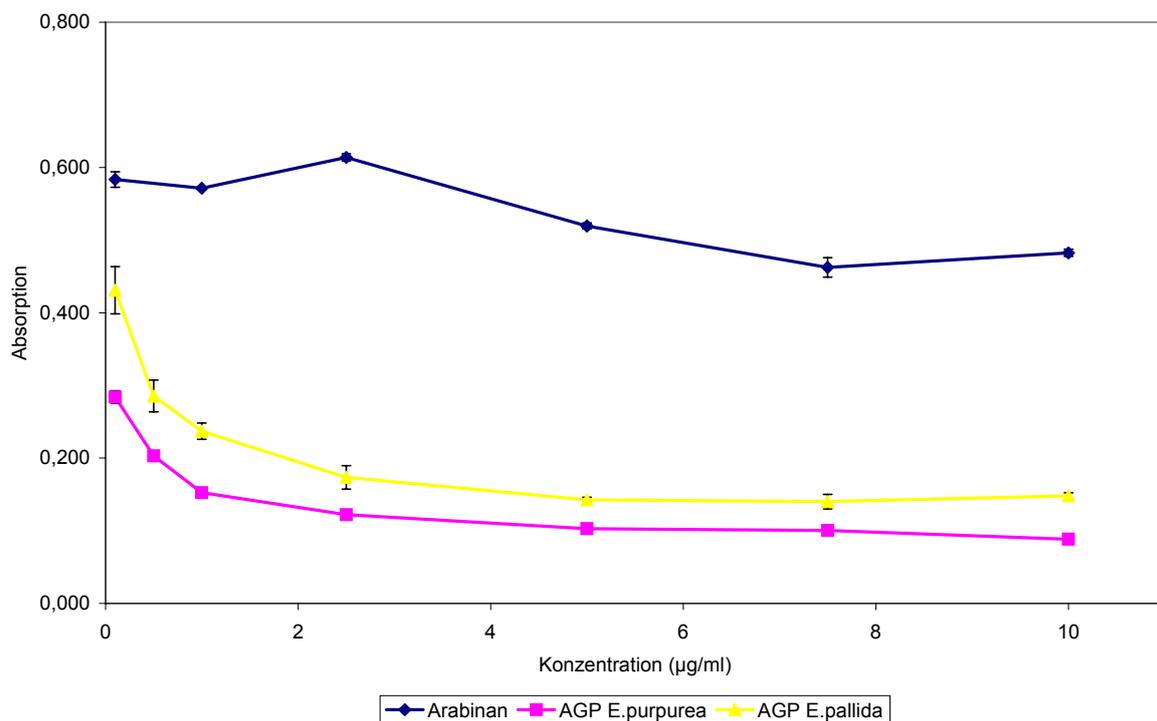


Abb. 3.20: Kreuzreaktivität eines polyklonalen Antikörpers

Die hohen Absorptionswerte der Arabinanreihe zeigen, dass das Arabinan keine Epitope besitzt, an die der polyklonale AK bindet. Es besteht also wie beim monoklonalem AK keine Kreuzreaktivität. Die Kurven beider AGPs dagegen verlaufen wieder parallel, es ist also Kreuzreaktivität vorhanden. Wie in Abb. 3.19 sind die Werte des ursprünglichen Antigens ein wenig niedriger, so dass die Affinität des Antikörpers zum AGP aus *E.purpurea* größer ist als zum AGP aus *E.pallida*.

4. Ergebnisse des immunologischen Teils

4.1 Milzzellproliferation

Die Milz ist ein peripheres lymphatisches Organ mit direktem Kontakt zum Blutkreislauf. Man unterscheidet die rote Pulpa, in der Phagozytose stattfindet (Makrophagen) und rote Blutkörperchen abgebaut werden, und die weiße Pulpa, die Antigene aus dem Blut aufnehmen kann. Die weiße Pulpa gliedert sich in eine PALS-Region (periarteriolat lymphoid sheath), die T-Lymphozyten und antigentragende dendritische Zellen enthält, und Lymphfollikel, die B-Lymphozyten enthalten. Von der Proliferation von in der Milz vorkommenden Zellen in den nächsten Versuchen sind also überwiegend Lymphozyten und Makrophagen betroffen.

Die verwendeten Referenzmitogene ConA und PHA sind Lektine aus *Phaseolus vulgaris* (Gartenbohne) bzw. *Canavalia ensiformis* (Schwertbohne). Lektine binden an den CD2-Rezeptor reifer T-Lymphozyten und lösen eine Mitose aus (van den Tweel et al., 1999). LPS ist ein aus der Zellwand von *Escherichia coli* gewonnenes Lipopolysaccharid, welches unter anderem B-Lymphozyten über den CD14-Rezeptor zur Mitose anregt.

Der gemessene Wert (cpm = counts per minute) entspricht dem Einbau von ³H-markiertem Thymidin und ist direkt proportional zur Proliferation (2.3.1).

4.1.1 Proliferation von Milzzellen in NMRI-Mäusen

Bei NMRI-Mäusen handelt es sich um einen häufig verwendeten Stamm mit großer genetischer Heterogenität. Der Stamm gilt als „immun-normal“.

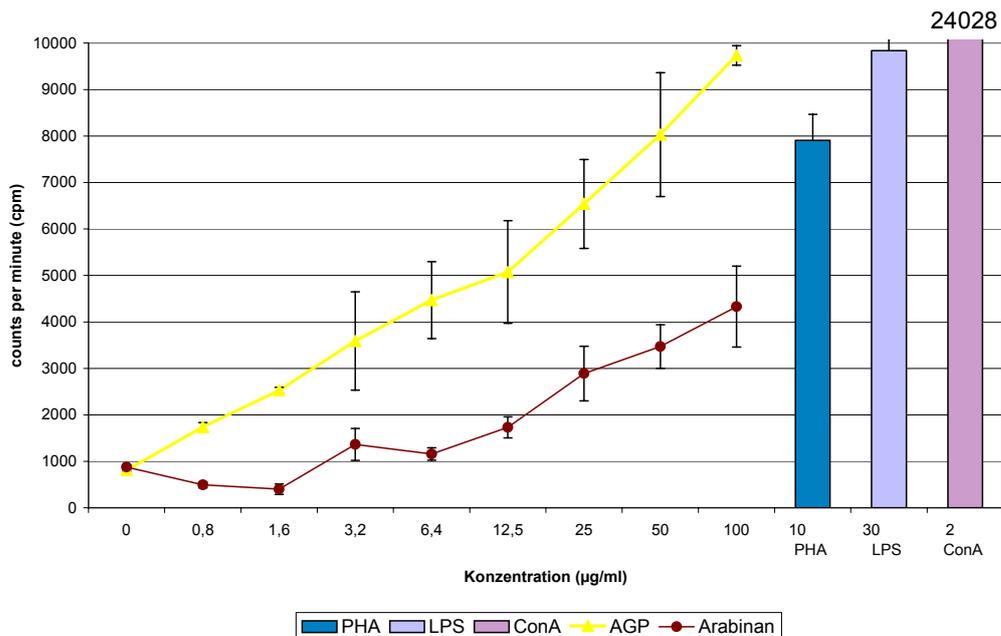


Abb. 4.1: Proliferation von Milzzellen in NMRI-Mäusen

Es ist eine dosisabhängige Steigerung der Proliferation über den gesamten Konzentrationsbereich des AGPs zu erkennen. Diese ist beim AGP ausgeprägter und höher als beim Arabinan, bei dem eine dosisabhängige Steigerung erst ab 6,4µg/ml zu erkennen ist. Die Kontrollmitogene erreichen erwartungsgemäß hohe Werte (PHA = 7905cpm; LPS = 9837cpm; ConA = 24028cpm)

4.1.2 Proliferation von Milzzellen in Balb/c Mäusen

Bei Balb/c-Mäusen handelt es sich um einen häufig verwendeten Albinostamm, der sich durch hohe Fruchtbarkeit auszeichnet. Der Mausstamm gilt ebenfalls als „immun-normal“.

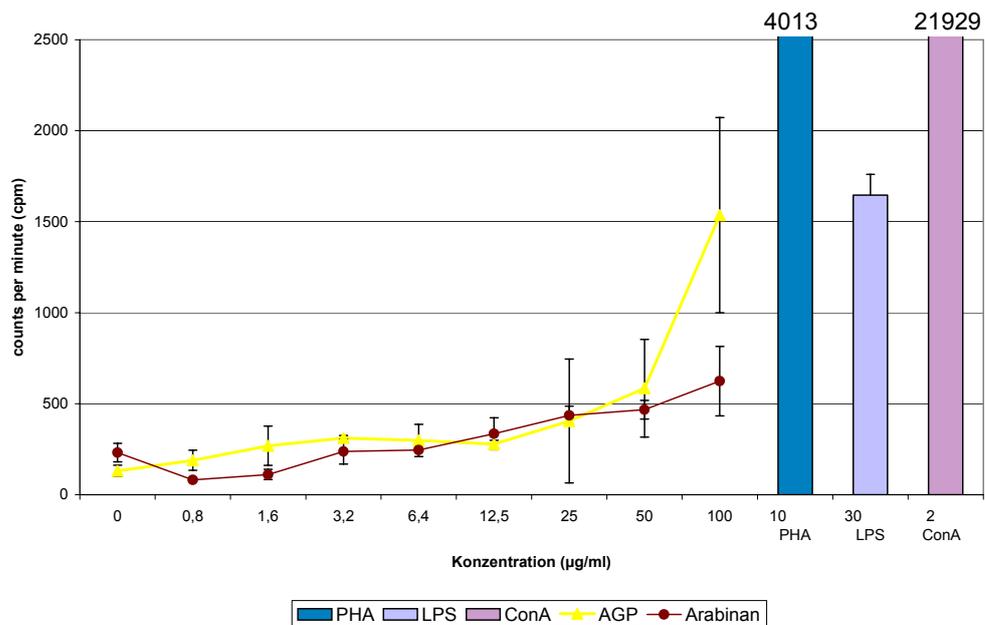


Abb. 4.2: Proliferation von Milzzellen in Balb/c-Mäusen

Es ist nur eine sehr schwache Stimulation der Proliferation von Milzzellen in Balb/c Mäusen zu erkennen. Die Werte von AGP und Arabinan sind fast gleich niedrig, lediglich bei einer Konzentration von 100µg/ml konnte mit dem AGP eine erhöhte Proliferation erreicht werden, die auf dem Niveau der LPS-Stimulation (1646 cpm) liegt. PHA (4013 cpm) und ConA (21929 cpm) erreichen deutlich höhere Werte.

4.1.3 Proliferation von Milzzellen in C3H/HeJ-Mäusen

Bei diesen Mäusen handelt es sich um einen Stamm, der auf LPS-Stimulation nur schwach oder gar nicht reagiert (Glode et al, 1976). Ursachen hierfür liegen in einer Punktmutation, die die Expression des Toll-like Rezeptors-4 (Tlr4) verhindert (Beutler, 2004).

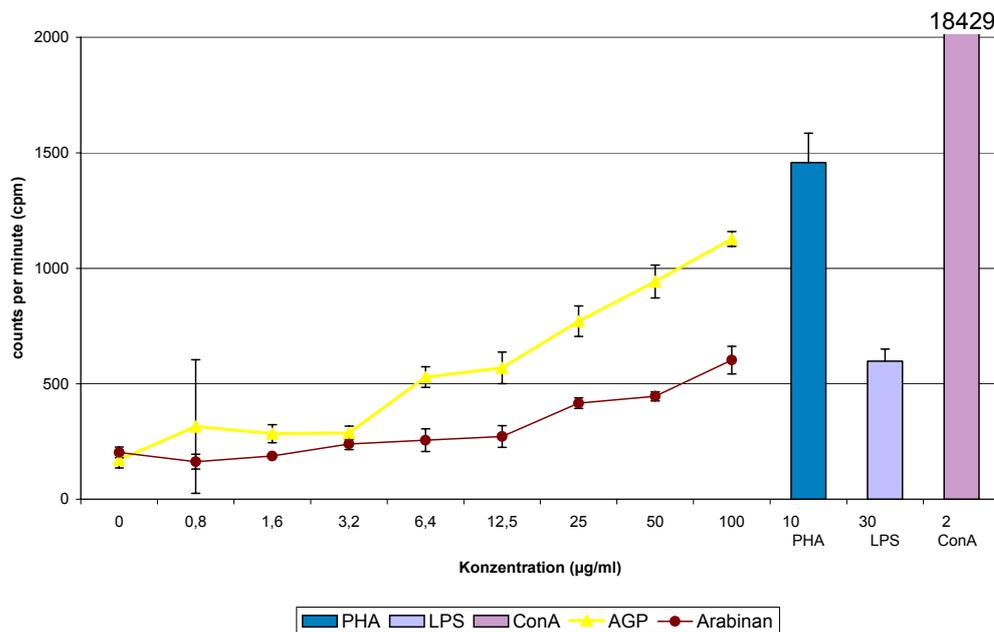


Abb. 4.3: Proliferation von Milzzellen in C3/HeJ-Mäusen

AGP und Arabinan bewirken ab 3,2µg/ml eine dosisabhängige Proliferation von Milzzellen des C3/HeJ-Stammes. Diese ist beim Arabinan schwächer ausgeprägt als beim AGP. Dennoch liegen die Werte bei 100µg/ml über dem Niveau von LPS. Das AGP erreicht bei einer Konzentration von 6,4µg/ml die gleiche Proliferationsrate wie LPS und steigert diese danach noch erheblich.

4.1.4 Vergleich der Stimulationsindex(SI)-Werte von verschiedenen Milzzellen

AGP Konz. (µg/ml)	SI des AGPs		
	NMRI	Balb/c	C3/HeJ
0,8	2,1	1,4	1,8
1,6	3,1	2,1	1,7
3,2	4,4	2,4	1,7
6,4	5,5	2,3	3,1
12,5	6,2	2,1	3,3
25	8,0	3,1	4,5
50	9,9	4,5	5,5
100	11,9	11,7	6,6

Tab. 4.1: Vergleich von mit AGP stimulierten Milzzellen aller drei Mausstämme über SI-Werte

Der SI-Wert ist der Quotient aus gemessenen Werten (cpm) von behandelten zu unbehandelten Kulturen, also ein relatives Maß für die immunstimulierende Aktivität.

Die maximalen SI-Werte sind bei NMRI- und Balb/c-Mäusen fast identisch, der Maximalwert ist bei C3/HeJ-Mäusen halb so hoch. Alle drei Mausstämme haben den höchsten SI-Wert bei der höchsten vermessenen Konzentration von 100µg/ml. Im Durchschnitt werden die höchsten SI-Werte bei den NMRI-Mäusen erreicht, Balb/c und C3/HeJ sind bis auf den letzten Wert vergleichbar. Insgesamt stimuliert das AGP also deutlich die Proliferation der Milzzellen aller drei Mausstämme.

Arabinan Konz. (µg/ml)	SI des Arabinans		
	NMRI	Balb/c	C3/HeJ
0,8	0,6	0,4	0,8
1,6	0,5	0,5	0,9
3,2	1,6	1,0	1,2
6,4	1,3	1,1	1,3
12,5	2,0	1,5	1,3
25	3,3	1,9	2,0
50	4,0	2,0	2,2
100	4,9	2,7	3,0

Tab. 4.2: Vergleich von mit Arabinan stimulierten Milzzellen aller drei Mausstämme über SI-Werte

Ebenso wie beim AGP werden die höchsten SI-Werte bei der höchsten Konzentration an Arabinan (100µg/ml) erreicht. Zwar wird der höchste SI-Wert auch mit den NMRI-Mäusen erreicht, aber die Werte liegen bei allen drei Stämmen dichter zusammen und sind durchgehend geringer als beim AGP. Erstaunlich sind alle Werte bis zu einer Arabinankonzentration von 1,6µg/ml. Die SI-Werte liegen unter 1, was eventuell auf eine Immunsuppression hindeuten würde. Höhere Arabinankonzentrationen mit SI-Werten über 1 deuten auf eine Stimulation hin, die aber deutlich schwächer ausgeprägt ist als beim AGP.

4.2 IgM-Proliferation

IgM ist ein Bestandteil der fünf Hauptimmunglobuline. Es kann Pentamere und Hexamere bilden. IgM erkennt häufig repetitive Epitope, wie sie z.B. Glykanstrukturen auf bakteriellen Zellwänden darstellen. Dies geschieht allerdings mit geringer Affinität, also recht unspezifisch. Die Bildung von IgM erfolgt in einer frühen Phase der Immunantwort (Frühantikörper). IgM aktiviert unter anderem den klassischen Weg des Komplementsystems (Janeway et al., 2002). In diesem Versuch wird die Bildung von IgM durch die in den Milzzellen vorhandenen B-Lymphozyten (NMRI-Mäuse) nach Aktivierung mit AGP mittels ELISA gemessen (2.3.2). Als Vergleich dient ein Arabinogalactan aus der Lärche, welches kommerziell erhältlich ist (Sigma, Steinheim).

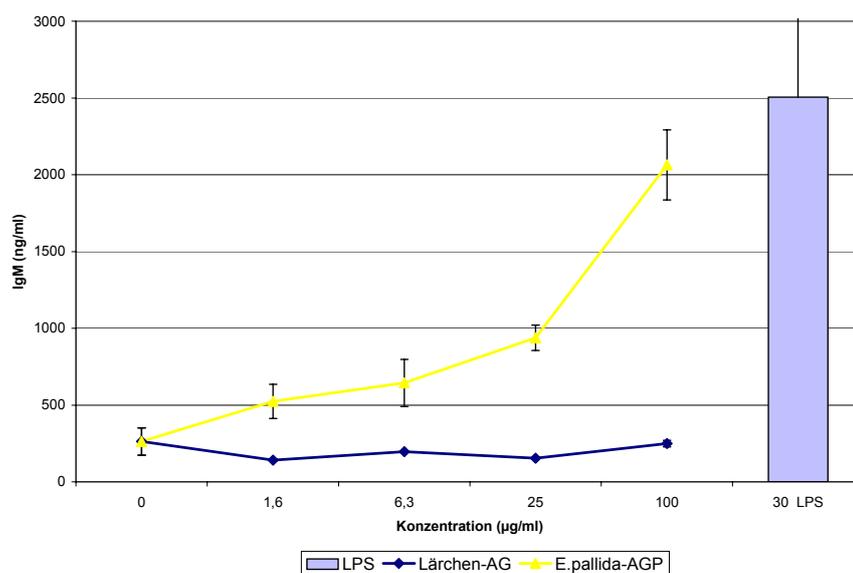


Abb. 4.4: IgM Produktion von Milzzellen im NMRI-Mausstamm

Abbildung 4.4 zeigt eine Steigerung der IgM Produktion mit steigender AGP Konzentration. Es muss sich also um eine direkte oder indirekte Stimulation der B-Lymphozyten handeln. Das AG aus der Lärche dagegen verändert den IgM-Gehalt nicht, zeigt also keine biologische Aktivität in diesem Versuch.

4.3 Nitritproduktion in alveolären Maus-Makrophagen-Kulturen

Makrophagen sind große, einkernige, phagozytierende Zellen. Sie haben Bedeutung als antigenpräsentierende Zellen und als Effektorzellen bei humoralen und zellulären Immunreaktionen. Eine Aktivierung der Makrophagen geschieht durch Bindung von Bakterien oder deren Bestandteilen an verschiedene spezifische Rezeptoren (z.B. CD14 für LPS). Vor der nun beginnenden Phagozytose schütten Makrophagen Cytokine und Entzündungsmediatoren wie Nitrit aus. Diese toxischen Stoffe sollen den Fremdkörper zerstören. Diese angeborene Makrophagenreaktion schädigt auch körpereigene Zellen und bedarf einer strengen Regulation. T-Helferzellen aktivieren Makrophagen unter anderem durch Ausschüttung von IFN- γ . Deshalb wird dem Referenzmitogen LPS (5ng/ml) in diesem Versuch IFN- γ (1ng/ml) zugesetzt.

Die Nitritproduktion von aktivierten Makrophagen wird in den Zellkulturüberständen durch den Griess-Assay (Green et al., 1997) bestimmt (2.3.4.).

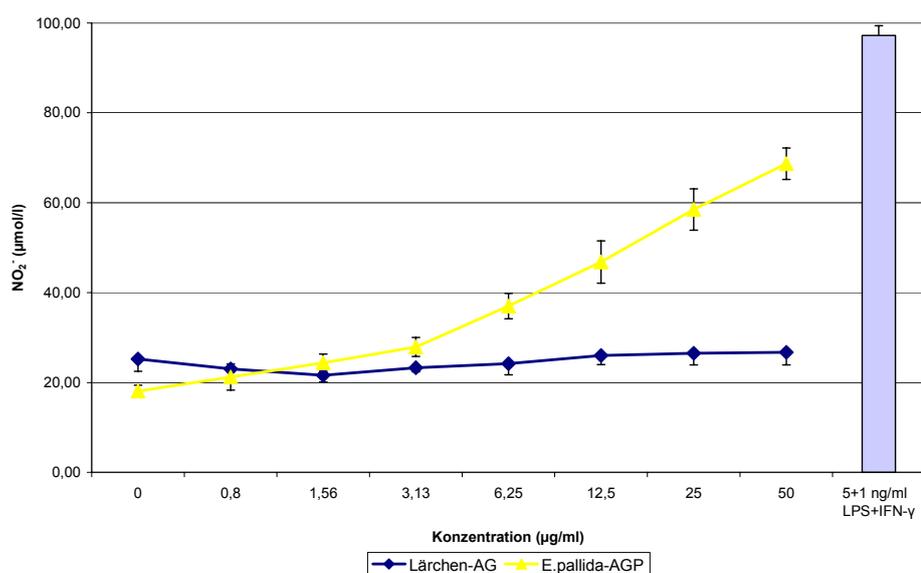


Abb. 4.5: Nitritproduktion in alveolären Maus-Makrophagen-Kulturen

Höchste Aktivität zeigt eine Kombination aus LPS mit IFN- γ . Auch das AGP zeigt eine dosisabhängige Steigerung der Nitritproduktion, dies allerdings auch ohne Aktivierung durch IFN- γ , da T-Zellen in der Zellkultur nicht vorhanden sind. Das Lärchen-Arabinogalactan zeigt keine Aktivität.

4.4 Cytokininduktion in Mauszellen

Cytokine werden von verschiedenen Zellen des Körpers freigesetzt, meist als Reaktion auf einen Aktivierungsreiz. Sie können autokrin, parakrin oder endokrin wirken. Autokrin bedeutet, dass das Verhalten der Cytokin freisetzenden Zelle selbst beeinflusst wird, parakrin wirkende Cytokine beeinflussen benachbarte Zellen und endokrin wirkende weit entfernte Zellen. Cytokine sind Proteine und können in drei Gruppen eingeteilt werden, die Hämatoetin-Gruppe (z.B. viele Interleukine, GM-CSF), die TNF-Gruppe und die Chemokingruppe (z.B. IL-8) (Janeway et al., 2002).

Die folgenden Cytokine wurden aus entsprechenden Zellkulturüberständen gewonnen und mit speziellen Bioassays bestimmt (2.3.3).

4.4.1 IL-1 β Produktion in alveolären Maus-Makrophagenkulturen

IL-1 β wird von aktivierten Makrophagen ausgeschüttet und aktiviert lokal das Gefäßendothel und Lymphozyten. Es kommt zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, damit Effektorzellen einen verbesserten Zugang haben. IL-1 β löst systemisch Fieber sowie die Produktion von IL-6 aus (Janeway et al., 2002).

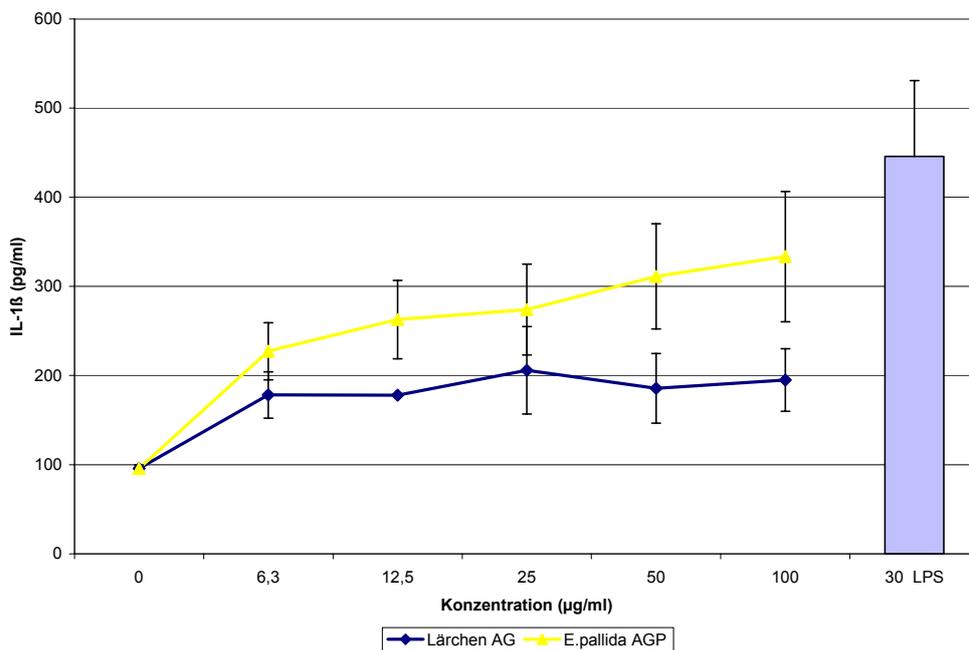


Abb. 4.6: IL-1 β Produktion in alveolären Maus-Makrophagen-Kulturen

LPS (30 $\mu\text{g/ml}$) bewirkt die stärkste IL-1 β Freisetzung. AGP und Lärchen-Arabinogalactan erreichen die stärkste Zunahme von IL-1 β im unteren Konzentrationsbereich (6,3 $\mu\text{g/ml}$), danach steigt die IL-1 β Freisetzung nur noch schwach bzw. gar nicht an. Die Stimulation durch das Lärchen-Arabinogalactan fällt insgesamt schwächer aus.

4.4.2 IL-6 Produktion in alveolären Maus-Makrophagenkulturen

IL-6 gehört zu den hämatopoetischen Cytokinen und wird von Makrophagen und T-Zellen ausgeschüttet. Von Makrophagen abgegeben, werden auf lokaler Ebene Lymphozyten aktiviert, besonders B-Lymphozyten, welche auf Aktivierung durch IL-6 mit einer erhöhten Antikörperproduktion (vor allem von IgA) reagieren. Systemisch kommt es unter IL-6 zu Fieber und einer vermehrten Synthese von Akute-Phase-Proteinen in der Leber. Außerdem werden das Wachstum und die Differenzierung von T- und B-Lymphozyten beschleunigt (Janeway et al., 2002).

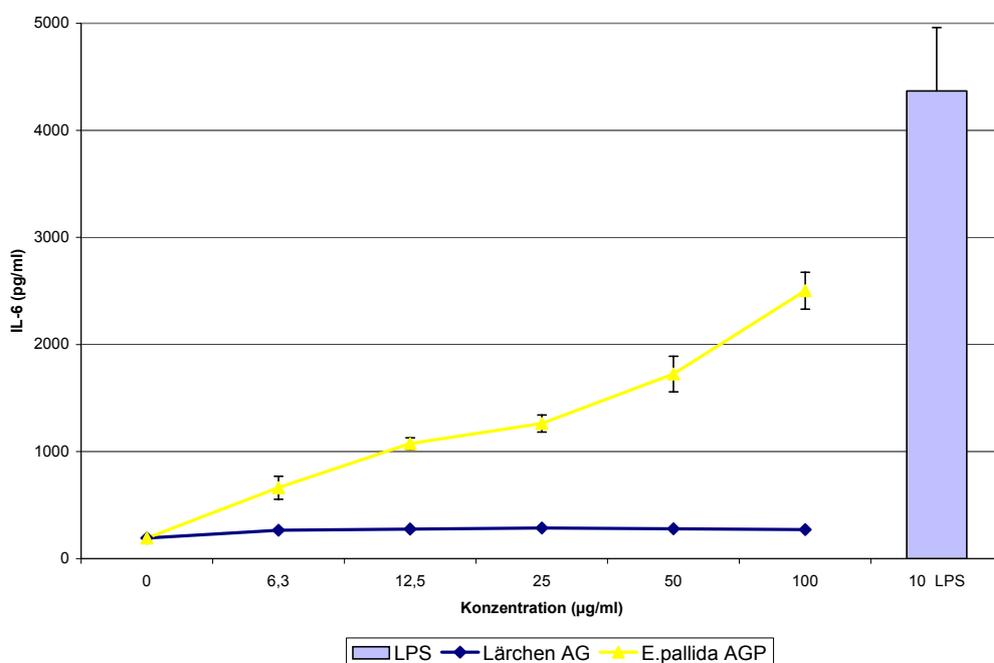


Abb. 4.7: IL-6 Produktion in alveolären Maus-Makrophagen-Kulturen

LPS (30µg/ml) bewirkt die stärkste IL-6 Freisetzung. Das Lärchen-Arabinogalactan zeigt keinen Einfluss auf die IL-6 Sekretion. Eine dosisabhängige Steigerung der IL-6 Produktion wird durch das AGP verursacht.

4.4.3 TNF- α Produktion in Maus-Peritonealmakrophagenkulturen

TNF- α wird von Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen produziert, besonders als Reiz auf ein LPS-tragendes Pathogen (gram-negative Bakterien). Lokal stimuliert das Cytokin TNF- α Entzündungsreaktionen, wobei es eine Aktivierung des Gefäßendothels und eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwände bewirkt. Dadurch können IgG, Komplement und Zellen besser ins Gewebe eindringen. TNF- α verhindert auf diesem Weg also die Ausbreitung einer lokalen Infektion. Systemisch löst eine TNF- α -Ausschüttung als Reaktion auf pyrogene Endotoxine im Blutkreislauf (LPS) Fieber aus und es kommt zu einer Mobilisierung von Metaboliten in der Leber (z.B. Komplementfaktoren und Akute-Phase-Proteine). Wenn TNF- α systemisch in zu großer Menge als Reaktion auf viel LPS freigesetzt wird, vor allem durch Makrophagen in der Leber, kann es zu einem Schock kommen (besonders bei einer Blutvergiftung: septischer Schock) (Janeway et al., 2002; van den Tweel et al., 1999).

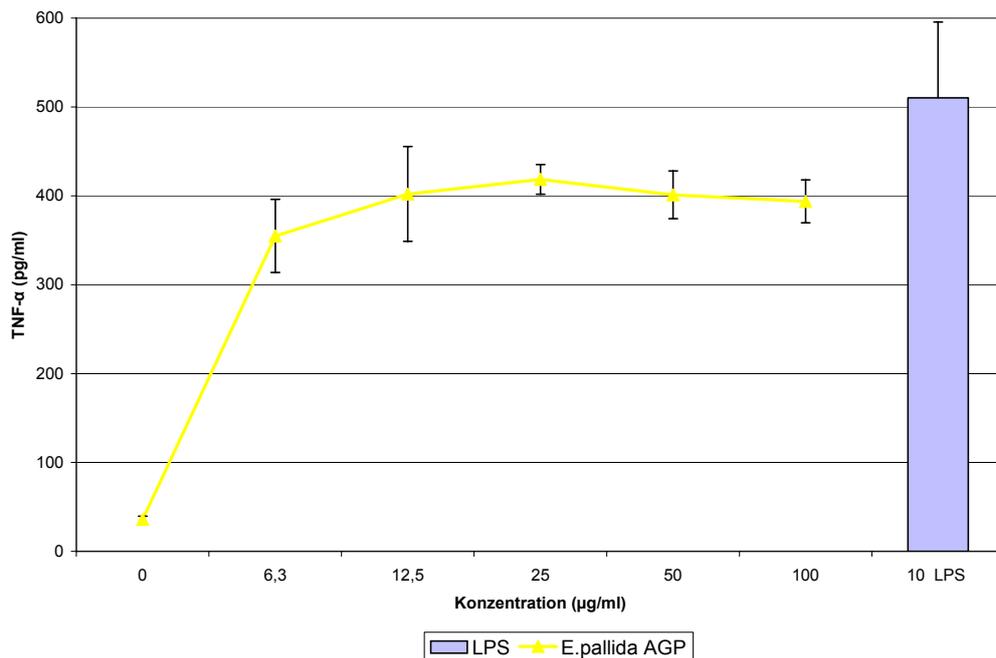


Abb. 4.8: TNF- α Produktion in Maus-Peritonealmakrophagenkulturen

LPS (30 $\mu\text{g/ml}$) bewirkt die stärkste TNF- α Freisetzung. Der Einfluss des AGPs auf die Sezernierung von TNF- α ist schon bei geringen Konzentrationen sehr stark. Die Freisetzung erreicht schon bei 6,3 $\mu\text{g/ml}$ AGP hohe Werte und steigt dann nur noch geringfügig an.

4.4.4 IFN- γ Produktion in Milzzellkulturen von NMRI-Mäusen

Interferon- α und - β wirken antiviral, indem sie die Reproduktion von Viren in körpereigenen Zellen unterbinden. IFN- γ wird von T-Helferzellen und NK-Zellen ausgeschüttet und hat neben dem schon erwähnten Effekt der Makrophagenaktivierung auch eine erhöhte Expression von MHC-Molekülen zur Folge. Zusätzlich kommt es zu einem Ig Klassenwechsel von IgM zu IgG (Janeway et al., 2002).

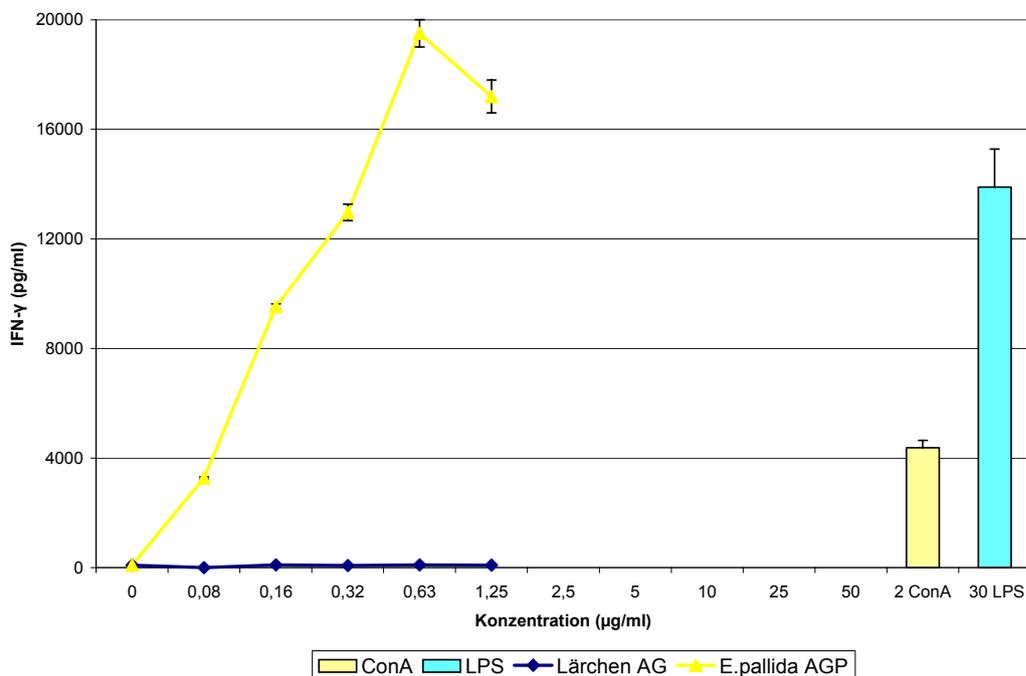


Abb. 4.9: IFN- γ Produktion in Maus-Peritonealmakrophagenkulturen

Das AGP induziert konzentrationsabhängig eine starke IFN- γ Ausschüttung schon bei niedrigeren Konzentrationen von bis zu 0,63µg/ml. Ob bei höheren Konzentrationen eine Sättigung in der IFN- γ Ausschüttung erreicht wird, kann wegen des einzigen vorhandenen Messwerts bei 1,25µg/ml AGP nicht klar ausgesagt werden. Das Lärchen-Arabinogalactan zeigt wiederum keine Aktivität. LPS (30µg/ml) und ConA (2µg/ml) erreichen niedrigere IFN- γ Titer als das AGP.

4.4.5 GM-CSF Produktion in Milzzellkulturen von NMRI-Mäusen

Der Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierende Faktor ist ein hämatopoetisches Cytokin und wird von Makrophagen und T-Zellen produziert. GM-CSF bewirkt die Proliferation von Knochenmarkstammzellen und eine Differenzierung zu Makrophagen und Granulozyten. Vorläuferzellen des Knochenmarks entwickeln sich durch GM-CSF-Stimulation zu dendritischen Zellen, die unter anderem als Verstärker von T-Zellreaktionen dienen (Janeway et al., 2002).

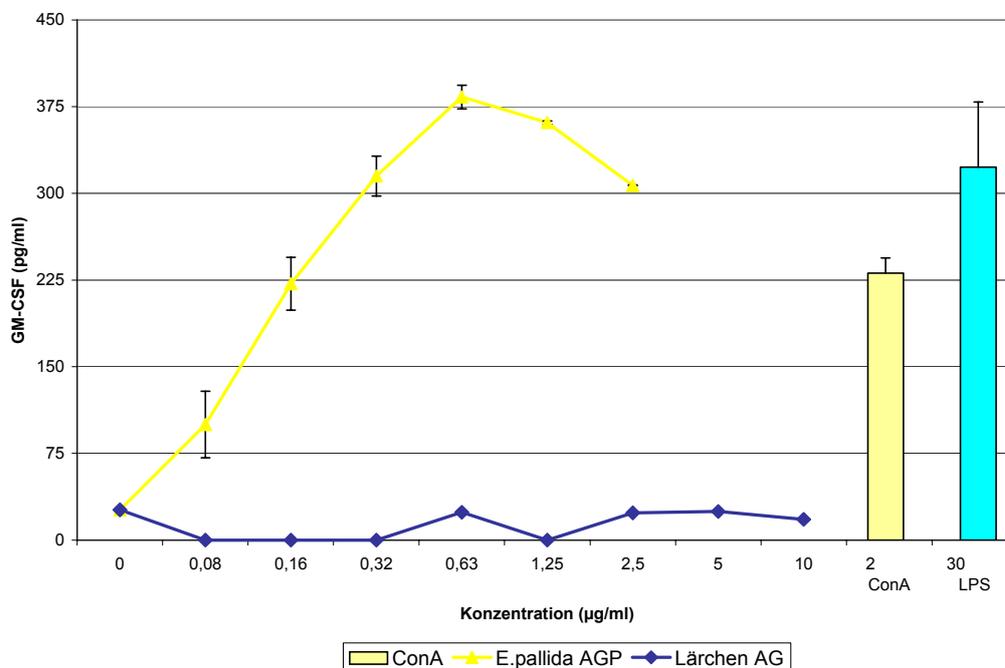


Abb. 4.10: GM-CSF Produktion in Maus-Milzzellkulturen

Ähnlich wie in Abb. 4.9 bei der IFN- γ Ausschüttung zeigt das AGP einen starken Anstieg der GM-CSF Ausschüttung bis zu einer Konzentration von 0,63 $\mu\text{g/ml}$. Danach fällt die Kurve ab. LPS (30 $\mu\text{g/ml}$) und ConA (2 $\mu\text{g/ml}$) zeigen schwächere Stimulation und das Lärchen-Arabinogalactan zeigt keine Aktivität.

4.5 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen

Nach den positiven Ergebnissen der immunologischen Tests (4.1-4.4) sollten diese Untersuchungen zeigen, ob AGPs in der Lage sind, an Zelloberflächen von immunkompetenten Zellen zu binden und dadurch entsprechende Stimuli auszulösen. Die Versuche wurden mit einem AGP aus *E.purpurea* (Classen et al., 2000) und gegen das AGP gerichteten polyklonalen Antikörpern (Classen et al., 2005) (siehe auch ELISA 2.3.5) durchgeführt. Die Wahl des prim. AKs fiel auf den polyklonalen AK, da dieser bevorzugt Epitope erkennt, an denen Arabinosereste beteiligt sind. Ara kommt auf der Glykocalyx von tierischen Zellen nicht vor. Damit ist das Risiko eines falsch positiven Ergebnisses minimiert worden, da eine Kreuzreaktion dieses AKs mit menschlichen Zelloberflächenstrukturen unwahrscheinlich ist. Der gegen den prim. AK gerichtete sek. AK ist mit dem Fluorochrom Phycoerythrin (PE) beladen, dessen Fluoreszenz gemessen wird.

4.5.1 Bindung von AGP an die Zelloberflächen verschiedener Leukozyten

In diesem Versuch (2.3.6.1) sollte gezeigt werden, ob das AGP aus *E.purpurea* an die Oberfläche von Leukozyten eines gesunden Blutspenders bindet. Für diese generelle Einschätzung wurde eine hohe Konzentration an AGP (100µg/ml) gewählt, um eventuelle Wechselwirkungen von AGP mit den Zelloberflächen sicher ermitteln zu können. Nach dem jeweiligen Abwaschen von ungebundenem AGP und ungebundenen Antikörpern ergibt sich bei eventuell auf der Zelloberfläche gebundenem AGP für den Bindungsnachweis folgender schematischer Aufbau:

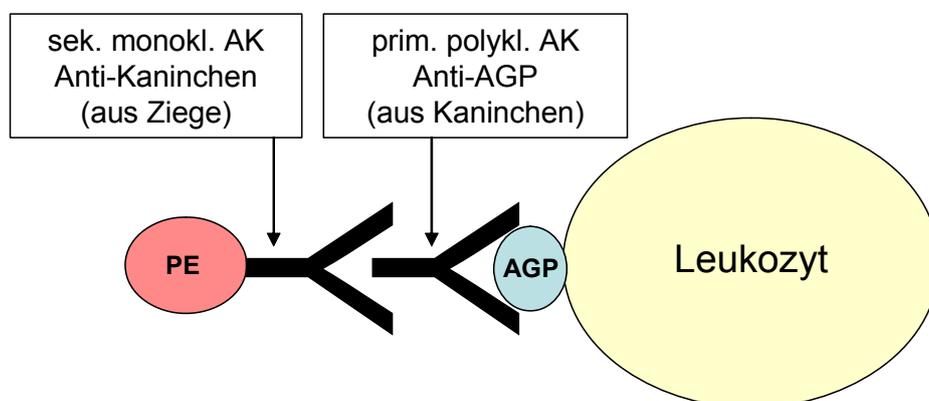


Abb. 4.11: schematischer Aufbau bei einem auf der Zelloberfläche gebundenem AGP

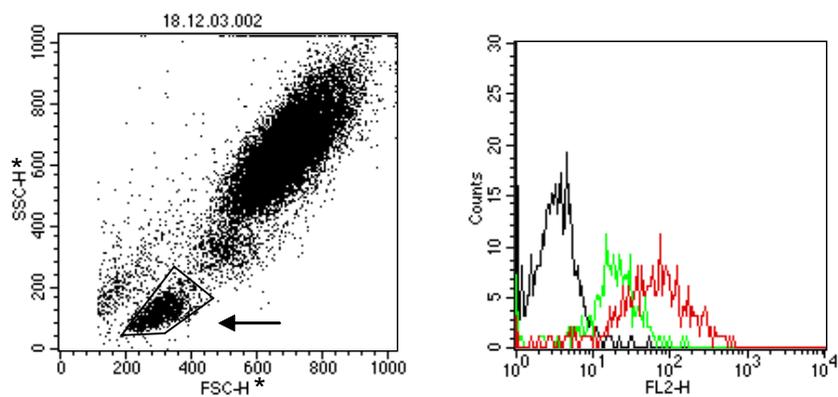


Abb. 4.12: Fluoreszenzintensitäten von markierten **Lymphozyten** (gated)
*SSC-H = Seitwärtslichtstreuung; FSC-H = Vorwärtslichtstreuung

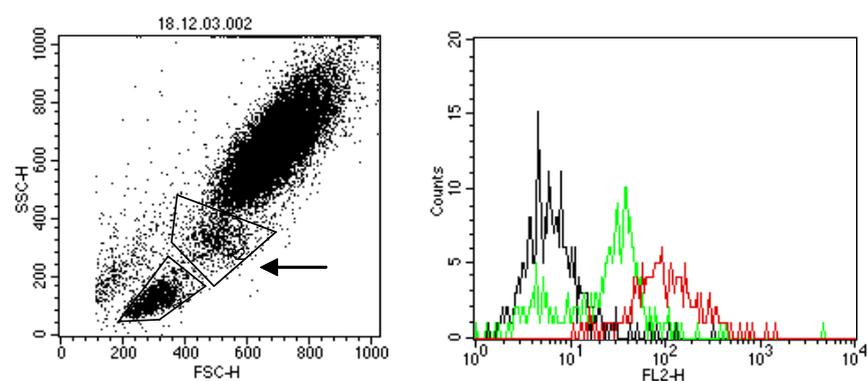


Abb. 4.13: Fluoreszenzintensitäten von markierten **Monozyten** (gated)

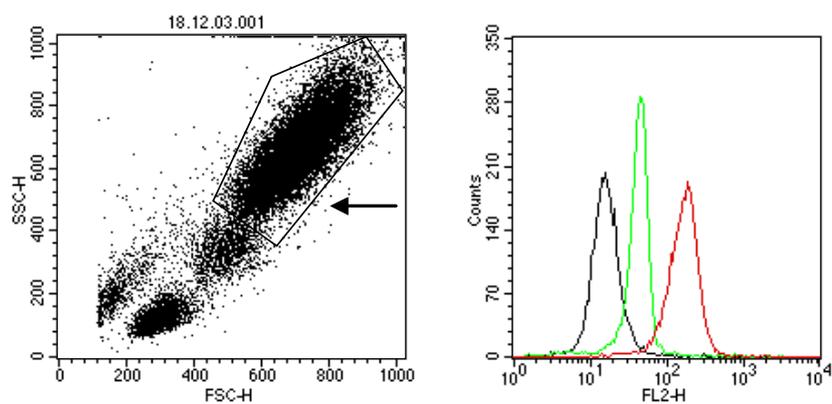


Abb. 4.14: Fluoreszenzintensitäten von markierten **Granulozyten** (gated)

Die Pfeile im dot plot (Abb. 4.12-14 links) zeigen auf die markierten Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, die sich aufgrund ihrer Granularität und Größe unterscheiden lassen. Durch die Messung des Vorwärtsstreulichts (FSC-H) kann die Größe von Zellen gemessen werden. Von den Leukozyten sind Granulozyten im Durchschnitt am größten, gefolgt von Monozyten und den kleinsten Leukozyten, den Lymphozyten. Mit dem Seitwärtsstreulicht (SSC-H) lässt sich die Granularität eines Leukozyten ermitteln. Die Reihenfolge nach sinkender Granularität ergibt Granulozyten vor Monozyten und Lymphozyten. In einem zweidimensionalen dot plot, in dem FSC-H gegen SSC-H aufgetragen wird, werden die Koordinaten der vermessenen Zellen entsprechend ihrer Granularität und Größe wiedergegeben und es ergeben sich typische Verteilungen für die jeweilige Leukozytenart (Raffael et al., 1994). So ist es entsprechend der jeweils linken Abbildungen in Abb. 4.12-4.14 möglich, durch ein markiertes Fenster („gated“) die gemessene Fluoreszenzintensität (FI) nur eines Zelltyps in den jeweils rechten Abbildungen darzustellen. In der jeweils rechten Abbildung wird die Anzahl der Zellen (bei jedem Ansatz insgesamt 20.000) gegen die FI als Verteilungsmuster (im Idealfall Gauss'sche Normalverteilung) dargestellt. Von den drei Kurven ist die linke Verteilungskurve (schwarz) das Ergebnis der FI des Ansatzes nur mit sek. AKs. Man erkennt, dass die meisten Zellen eine FI unter 10^1 (keine Einheit) haben, der sek. AK also gut austitriert ist. Eine Ausnahme bilden die Granulozyten, an deren Oberfläche allgemein AK besser binden können, aber auch in Abb. 4.14 ist die Verteilungskurve des sek. AKs (schwarz) diejenige mit der im Durchschnitt geringsten FI pro Zelle (links). Die mittlere Gaussglocke (grün) stellt die FI vom Ansatz prim.+sek. AK dar. Sie ist ein Maß für die unspezifische Bindung des prim. und sek. AKs an die Zelloberflächen (Blindwert). Die am weitesten nach rechts verschobene Kurve (rot) stellt in allen drei Abbildungen der Ansatz AGP+prim.+sek. AK dar. Je weiter die Verteilung insgesamt nach rechts verschoben ist, desto größer ist die durchschnittlich gemessene FI pro Zelle. Bei allen drei Abbildungen ist die durchschnittliche FI der mit AGP behandelten Zellen am größten. Die Differenz der durchschnittlichen FI von prim.+sek. AK zu AGP+prim.+sek. AK gilt als Maß für die Bindung des AGPs an die Zelloberfläche, ausgedrückt in prozentualer Steigerung. Die in Abb. 4.12-14 dargestellten Ergebnisse ergeben in Zahlen berechnet folgende Werte:

Versuchsansatz	Zelltyp (Ø FI pro Zelle)		
	Lymphozyten	Monozyten	Granulozyten
sek. AK	3,7	7,8	16,9
prim.+sek. AK	21,0	37,5	43,4
AGP+beide AK	85,3	121,9	167,8
Zunahme der FI	64,3	84,4	124,4
Steigerung in %	306,9	224,8	286,8

Tab. 4.3: Maß der AGP Bindung pro Zelltyp, ausgedrückt in prozentualer Steigerung der FI

Eine deutliche Steigerung der FI-Werte ist bei allen Zelltypen zu erkennen. Folglich bindet das AGP an die Zelloberflächen von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten.

4.5.2 Konzentrationsabhängige Bindung von AGP an die Zelloberflächen verschiedener Leukozyten

Nach der Erkenntnis aus Kapitel 4.5.1, dass das untersuchte AGP aus *E.purpurea* an Zelloberflächen von Leukozyten bindet, sollte in diesem Versuchsansatz die konzentrationsabhängige Bindung von AGP an die Zelloberfläche von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten untersucht werden. Hierzu wurde AGP aus *E.purpurea* in verschiedenen Konzentrationen (0,01-100µg/ml) eingesetzt. Die Bindungsstudien wurden mit isolierten Leukozyten aus dem Blut von acht gesunden Spendern der Uniklinik Jena durchgeführt (siehe 4.5.1). Pro Spender wurde die Steigerung der Fluoreszenzintensität (FI) von Ansatz prim.+sek. AK zu Ansatz AGP+prim.+sek. AK bei jeweiliger AGP-Konzentration gemessen. In Abb. 4.15 sind die durchschnittlichen Steigerungen der FI der acht Spender bei jeweiliger AGP-Konzentration mit Standardabweichungen dargestellt.

Die absolute Leukozytenanzahl, die jeweils aus dem Blut (100µl) der Spender isoliert wurde, ist unterschiedlich. Daher wurde als Einheit auf der Y-Achse die prozentuale Steigerung der FI (siehe Tab. 4.3) gewählt. Dies hat den Vorteil, eine schwankende Anzahl von Leukozyten pro Spender (x Leukozyten in 100µl Blut) auszugleichen.

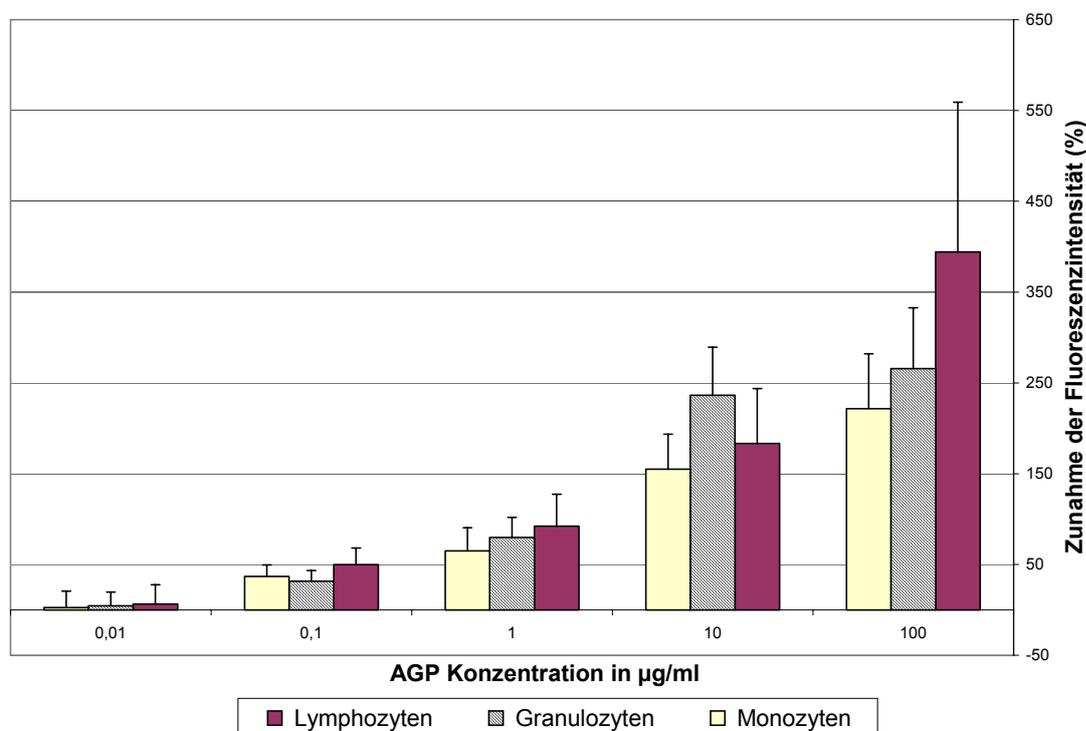


Abb. 4.15: Zunahme der FI bei verschiedenen AGP Konzentrationen und Zelltypen

Das AGP zeigt eine dosisabhängige Bindung an die Zelloberfläche von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Lymphozytenoberflächen scheinen das AGP am besten binden zu können (Ausnahme 10µg/ml AGP: Granulozyten höher), gefolgt von Granulozyten und Monozyten, wobei die Unterschiede allerdings recht klein sind. Das Ergebnis aus 4.5.1 konnte also bestätigt werden. Auch bei sehr niedrigen Konzentrationen kann eine Bindung von AGP an die Zelloberflächen von Leukozyten nachgewiesen werden.

AGP Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Faktor der Fluoreszenzzunahme bei jeweiligem Zelltyp		
	Monozyten	Lymphozyten	Granulozyten
0,01 \rightarrow 0,1	14,0	7,6	7,0
0,1 \rightarrow 1,0	1,8	1,9	2,5
1,0 \rightarrow 10,0	2,4	2,0	3,0
10,0 \rightarrow 100,0	1,4	2,2	1,1

Tab. 4.4: Faktoren der Zunahme der Fluoreszenz zwischen den angegebenen AGP Konzentrationen

Tabelle 4.4 stellt die Zunahmen der Fluoreszenzintensitäten als Faktoren zwischen den einzelnen AGP Konzentrationen der in Abb. 4.15 dargestellten Ergebnisse dar. Die Faktoren der Zunahme der Fluoreszenz ist bei allen Zelltypen zwischen 0,01 und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ AGP am größten: Faktor 7,0-14,0 entspricht einer sieben- bis vierzehnfachen Zunahme der Menge an gebundenem AGP. Besonders auffällig ist der hohe Faktor 14 bei den Monozyten. Bei höheren Konzentrationen sind die Faktoren der Zunahme bei allen Zelltypen wesentlich niedriger (1,1 - 3,0).

4.5.3 Ergebnisse der kompetitiven direkten Fluoreszenzmarkierung

Nachdem die Ergebnisse 4.5.1 und 4.5.2 zeigen, dass das AGP an die Zelloberflächen von immunkompetenten Zellen bindet, stellt sich die Frage, welche Zielstrukturen auf der Zelloberfläche daran beteiligt sind. Da Lymphozyten besonders gute AGP-Bindung zeigen, wurden Strukturen auf Subtypen der Lymphozyten, nämlich CD4- und CD8-Oberflächenmarker, als potenzielle Bindungspartner für das AGP getestet. Eine Bindung von AGP an CD4 und/oder CD8 könnte immunologische Effekte nach sich ziehen.

Der CD4-Rezeptor kommt unter anderem auf einer Gruppe von T-Lymphozyten vor, den T-Helferzellen, die etwa zwei Drittel der peripheren T-Zellen ausmachen. Eine Untergruppe der T-Helferzellen sind die T_H1 -Zellen, die über ihren CD4-Rezeptor einen Komplex aus MHC-II und Antigenpeptiden erkennen, den infizierte Makrophagen exprimieren. Eine Bindung zwischen CD4-Rezeptor und MHC-II-Antigen-Komplex bewirkt eine Ausschüttung von Cytokinen (z.B. $\text{IFN-}\gamma$) durch die T_H1 -Zelle mit dem Ziel, andere Makrophagen anzulocken. Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung des Makrophagen, der die phagozytierten Erreger dann durch Verschmelzung von Lysosomen mit den Vesikeln zerstört.

Eine andere Untergruppe von T-Lymphozyten, die T_H2 -Zellen, aktivieren B-Lymphozyten, die daraufhin proliferieren, zu Plasmazellen differenzieren und vermehrt Antikörper produzieren. Die Aktivierung erfolgt ebenfalls über eine Bindung vom CD4-Rezeptor der T_H2 -Zelle an einen MHC-II-Antigen-Komplex des B-Lymphozyten. Zusätzlich schüttet die T_H2 -Zelle Cytokine (z.B. IL-4 und IL-5) aus. Über die Differenzierung von CD4-positiven Zellen zu T_H1 - und T_H2 -Zellen kann der Körper das Verhältnis von humoraler zu zellulärer Immunität steuern.

Ein anderer Subtyp von T-Zellen sind die CD8-positiven cytotoxischen T-Zellen. Mit diesem Rezeptor erkennt eine cytotoxische T-Zelle virusinfizierte körpereigene Zellen, die an ihrer Oberfläche Fragmente von viralen Proteinen über einen Komplex aus viralem Protein und MHC-I-Molekülen präsentieren. Eine Bindung von cytotoxischen T-Zellen an diesen Komplex führt durch DNA-Abbau in der Zelle zur Zerstörung der infizierten Zelle und des Virus (Janeway et al., 2002).

Nach dem Austitrieren der mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten CD4- bzw. CD8-Antikörper wurde wie in 2.3.6.2 beschrieben der Versuch durchgeführt. CD4- und CD8-Antikörper wurden bei allen Versuchen in der gleichen Konzentration eingesetzt. Bei einem Wettbewerb zwischen AGP und CD4- bzw. CD8-Antikörper um das gleiche Epitop auf der Zelloberfläche würde das AGP mit steigender Konzentration (0-100 μ g/ml) den Antikörper verdrängen. Durch die Verdrängung würde die Anzahl der gebundenen CD4- bzw. CD8-Antikörper pro Zelle sinken, also auch die gemessene Fluoreszenzintensität.

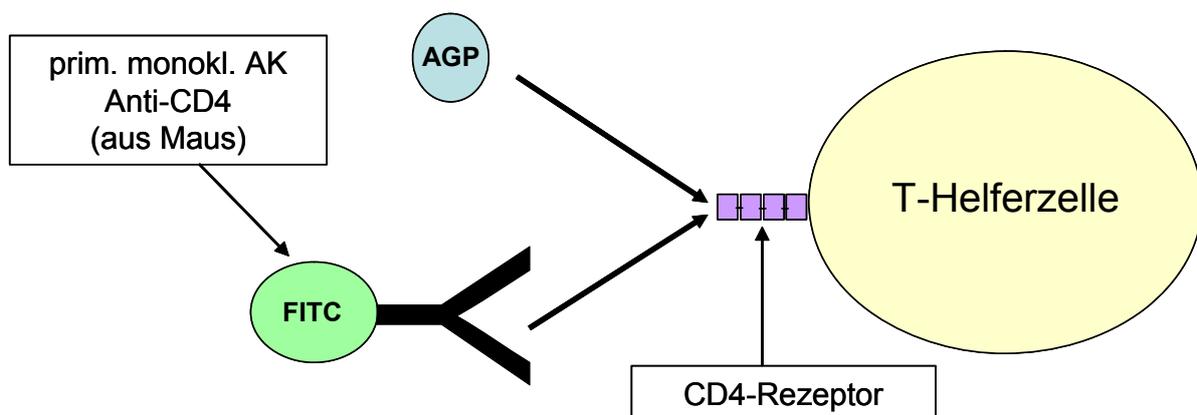


Abb. 4.16: Schematische Darstellung der kompetitiven Bindung von AGP und Antikörper am Beispiel des CD4-Rezeptors einer T-Helferzelle

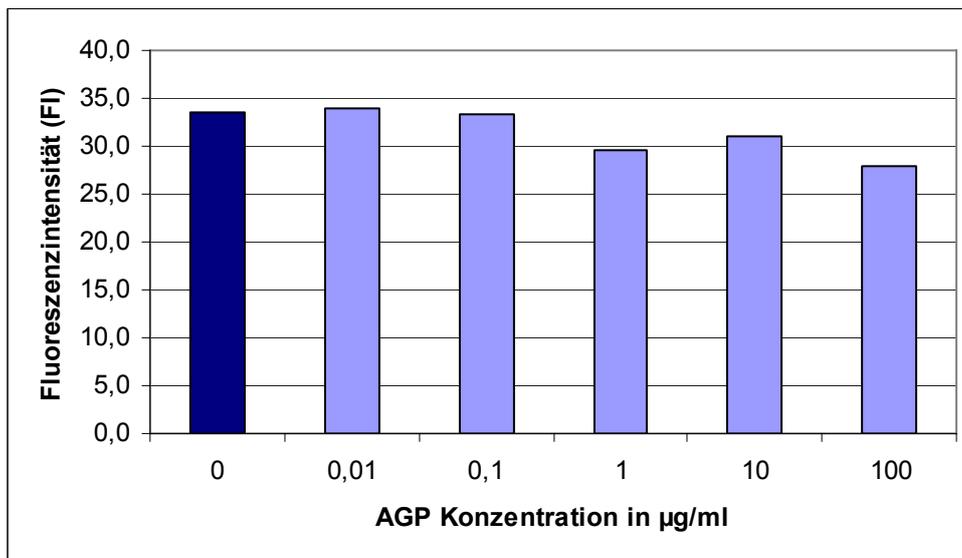


Abb. 4.17: FI von FITC-markierten CD4-Antikörpern auf Lymphozyten mit steigenden Konzentrationen an AGP

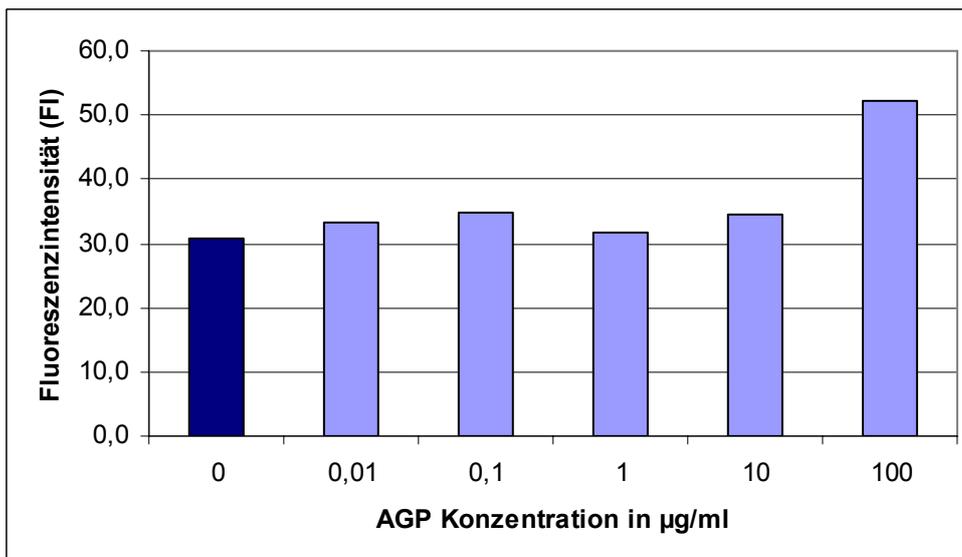


Abb. 4.18: FI von FITC-markierten CD8-Antikörpern auf Lymphozyten mit steigenden Konzentrationen an AGP

Die FI von sowohl CD4- als auch CD8-Antikörpern bleibt trotz steigender Konzentrationen an AGP annähernd gleich. Auch bei hohen AGP-Konzentrationen binden pro Zelle etwa gleich viele Antikörper an das entsprechende Epitop. Das bedeutet, dass AGP die Antikörper nicht aus ihren Bindungen verdrängt und somit also nicht selbst an die entsprechenden Epitope bindet.

5. Diskussion der Ergebnisse

Pflanzliche Immunstimulanzien enthalten häufig Extrakte der Pflanzengattung *Echinacea*. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Glykoproteine und Polysaccharide, die als wirksamkeitsmitbestimmende Komponenten diskutiert werden, aus den Wurzeln von *Echinacea pallida* isoliert und strukturell charakterisiert. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die *in vitro* Testung auf immunmodulatorische Aktivität der isolierten Substanzen. Außerdem wurde ein isoliertes Glykoprotein aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* auf die Fähigkeiten zur Bindung an menschliche Leukozytenoberflächen getestet.

Die folgende Diskussion gliedert sich in drei Teile. Im ersten Teil wird eine Strukturaufklärung des isolierten Arabinogalactan-Proteins (AGP) und des Arabinans auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit und bekannter Literaturdaten vorgenommen. Im zweiten Teil werden die immunmodulatorischen Potenziale der isolierten Substanzen diskutiert und durch Vergleich der Feinstrukturen und immunologischen Aktivitäten nah verwandter Polymere mögliche Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt. Schließlich werden im dritten Teil mögliche Zielstrukturen auf immunkompetenten Zellen diskutiert.

5.1 Diskussion - Strukturaufklärung

Isolierung, Yarivreaktion und Reinheit von AGP und Arabinan

Die Isolierung, Trennung und Aufreinigung von hochmolekularen Glykoproteinen und Polysacchariden aus der pflanzlichen Zellwand ist ein komplexer Vorgang. Besondere Schwierigkeiten bestehen in der Trennung von ähnlich aufgebauten Polymeren. Zwar ist eine Trennung über z.B. unterschiedliche Löslichkeiten, Molekulargewichte (z.B. Filtration oder SEC) oder über Ladungen (z.B. Ionenaustauschersäulen) möglich, aber der Nachweis, dass es sich bei der isolierten Substanz um ein einzelnes reines Polymer handelt, bleibt meist schwierig. In dieser Arbeit wurden zunächst die üblichen Methoden zur Aufreinigung gewählt: wasserunlösliche Bestandteile (z.B. Cellulose) wurden durch Extraktion mit Wasser, Proteine durch Aufkochen und niedermolekulare Bestandteile durch Filtration und Dialyse abgetrennt. Ein großer Vorteil der weiteren Vorgehensweise war die Möglichkeit der

selektiven Fällung von AGPs aus einem verbleibenden hochmolekularen Substanzgemisch. Die Aufkonzentrierung der hochmolekularen Substanzen im Retentat machte eine selektive Fällung der meisten enthaltenen AGPs mit dem β -D-Glucosyl-Yarivreagenz möglich. Der Reaktionsmechanismus dieser Interaktion ist noch weitgehend unbekannt. Yarivmoleküle bilden in Wasser Komplexe aus 10-50 Molekülen, wobei die planaren Yarivmoleküle sich geldrollenartig zusammenlagern (Woods et al., 1978). Dieser Komplex reagiert bevorzugt mit AGPs. Es gibt bestimmte strukturelle Voraussetzungen, die das Yarivreagenz für eine Reaktion mit vielen AGPs erfüllen muss. Die Addition von β -D-Galactosyl-, β -D-Glucosyl- oder α -L-Fucosyl-Resten an das Phenylazoderivat (Yarivreagenz) ergibt eine positive, die Addition von β -D-Mannosyl- und α -L-Galactosyl-Resten eine negative Reaktion mit vielen AGPs (Nothnagel, 1997). Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit wird das β -D-Glucosyl-Yarivreagenz am häufigsten verwendet. Zur strukturellen Voraussetzung des AGPs für die Bindung mit β -D-Glucosyl-Yarivreagenz gibt es widersprüchliche Aussagen: Komalavilas et al. (1991) zeigten, dass eine Partialhydrolyse (Abspaltung der äußeren Zucker) eines AGPs aus Suspensionskulturen der Rose zu einer stark verminderten Reaktion mit dem Yarivreagenz führte. Andererseits reagierten ein isoliertes AGP aus dem Griffel von *Gladiolus* (Gleeson und Clarke, 1979) und ein AGP aus der Weintraube (Saulnier et al. 1992) nach dem enzymatischen Entfernen von α -L-Arabinofuranosylresten nach wie vor mit dem Yarivreagenz. Ein AGP aus den Samen von *Raphanus sativus* (Radieschen oder Rettich) reagierte mit dem Yarivreagenz trotz Abspaltung der L-Arabinofuranosylreste und Uronsäurereduktion (Tsumuraya et al., 1987). Eigene Untersuchungen in Form des Geldiffusionstests (siehe 3.1.3) zeigen, dass AGPs aus *Echinacea pallida* generell mit dem Yarivreagenz reagieren. Nach Reduktion der Uronsäuren im AGP gibt es weiterhin eine positive Reaktion mit dem Yarivreagenz, nach dem Entfernen von peripheren Arabinose-resten jedoch nicht mehr. Das ebenfalls aus *Echinacea pallida* isolierte Arabinan reagiert ebenfalls nicht mit dem Yarivreagenz (siehe 3.10). Auch der Proteinteil des AGPs alleine scheint nicht für die positive Reaktion mit dem Yarivreagenz verantwortlich zu sein, denn nach Entfernen von 78% des Proteinteils eines AGPs aus *Alocasia macrorrhizos* reagierte dies fast genauso gut mit dem Yarivreagenz wie vor der Abspaltung (Gleeson und Jermyn, 1979). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass weder der Proteinteil das für die Bindung entscheidende Epitop bildet noch der Kohlenhydratteil alleine für das Bindungsvermögen entscheidend ist. Denkbar wäre, dass strukturelle Voraussetzungen, die sich aus der

Kombination von Protein- und Polysaccharidteil (z.B. Tertiärstrukturen) für die Reaktion entscheidend sind.

Die Homogenität der gefällten AGPs zeigt sich in den reproduzierbaren Neutralzuckerzusammensetzungen mit geringen Standardabweichungen bei verschiedenen Yarivfällungen (siehe Ergebnisse Tab. und Abb. 3.4). Ein weiteres Indiz für die homogene Zusammensetzung der Fraktion liefert das Chromatogramm der SEC (size exclusion chromatography), in dem nur ein Peak einer fast homogenen Fraktion zu erkennen ist. Somit ist anzunehmen, dass es sich bei dem yarivgefällten Material um ein AGP mit überwiegend homogener chemischer Zusammensetzung handelt. Dass es Unterschiede in der Feinstruktur von eigentlich gleichen AGPs geben kann, bedingt die Biosynthese in den Pflanzen. Im Gegensatz zur Biosynthese von Proteinen, deren individuelle Struktur durch die Prozesse der Transkription und Translation immer die gleiche Aminosäuresequenz (Matrizenmechanismus) aufweist, ist die Synthese des Kohlenhydratanteils der AGPs von Enzymen abhängig, die aus Monomeren und Oligomeren das AGP aufbauen. Zwar sind diese Enzyme (z.B. Glucosyltransferasen) relativ substratspezifisch und bauen den Kohlenhydratanteil fast immer gleich auf („repeating units“), können aber auch vereinzelt ähnliche Zuckersubstrate für die Synthese des AGPs nutzen, so dass Unterschiede in der Feinstruktur zustande kommen können (Hashimoto, 2000; Classen et al., 2005). Solche minimalen Unterschiede sind für diese Arbeit nicht von Interesse, denn in Fertigarzneimitteln sind diese AGPs auch nicht getrennt. Daher wurden in dieser Arbeit strukturelle Gemeinsamkeiten aller gefällten AGPs untersucht, sowie deren immunologische Aktivität und das Bindungsvermögen an Leukozytenoberflächen getestet.

Aus dem Überstand des yarivgefällten Materials wurde ein Arabinan mit 80%igem EtOH isoliert. Die Selektivität der Arabinanfällung besteht darin, dass zum einen ein großer Teil der im Retentat enthaltenen Arabinogalactan-Proteine durch die Yarivfällung abgetrennt wurde, zum anderen erlaubt die experimentell ermittelte gute Löslichkeit von Arabinanen (Tab. 3.6) in 80%igem EtOH eine Trennung von restlichem AGP und den übrigen Polymeren, die nicht in Ethanol löslich sind (Blaschek, 1991). Ein Beweis dafür ist ein Vergleich der Neutralzuckerzusammensetzungen der Yarivüberstände und der Arabinane (Tab. 3.5 und 3.7): Es findet eine Aufkonzentrierung von Arabinose statt (von 63,0 auf 83,9% m/m). Dass es sich dabei um ein relativ reines Arabinan handelt, beweist die konstante Zuckerzusammensetzung mit geringen Standardabweichungen aller isolierten Arabinane (Tab. 3.7 und Abb. 3.8). Auch

das Chromatogramm der SEC zeigt, dass das isolierte Arabinan nur aus einer Fraktion mit einer gewissen Polydispersität besteht. Es handelt sich wahrscheinlich also nur um ein Arabinan, welches ähnlich wie das isolierte AGP Unterschiede in der Feinstruktur aufweisen kann.

Molekulargewichtsbestimmung von AGP und Arabinan

Über eine Kalibrierreihe mit Pullulanen wurde das hydrodynamische Volumen über die Methode der GPC (Gelpermeationschromatographie), speziell der Größenausschlusschromatographie, von AGP und Arabinan bestimmt (siehe 3.2). Um einer Assoziation von Molekülen vorzubeugen, wurde als Fließmittel 0,1%iger wässrige NaCl-Lösung als Strukturbrecher eingesetzt. Zwar wären höhere Salzkonzentrationen oder andere Strukturbrecher (z.B. Harnstoff) effektiver gewesen, aber sie führten zu einem starken Rauschen der Basislinie und waren daher nicht verwendbar. Assoziationen von Molekülen sind aufgrund der Ergebnisse eher unwahrscheinlich, denn es ist in jedem Chromatogramm nur ein Peak zu erkennen. Es ergab sich ein MG von $1,13 \times 10^6$ Da für das AGP und von $9,7 \times 10^5$ Da für das Arabinan. Von den für die Erstellung der Kalibriergeraden verwendeten Pullulanen hatte das größte ein Molekulargewicht von $8,53 \times 10^5$ Da. Somit liegen die für die Substanzen ermittelten Werte im extrapolierten Bereich, also außerhalb der experimentellen Bestimmungsgrenze. Die Hydrathülle eines Polymers ist abhängig vom verwendeten Fließmittel, so dass das absolute hydrodynamische Volumen in Abhängigkeit vom Lösungsmittel schwanken kann. Ein weiteres Problem ergibt sich beim Vergleich der räumlichen Strukturen von Pullulanen und AGPs bzw. Arabinanen. Pullulane sind unverzweigte lineare Polymere, während sowohl AGPs als auch Arabinan hochverzweigt sind und damit eine eher globuläre Gestalt annehmen. Dies führt aufgrund jeweils anderer räumlicher Struktur zu unterschiedlichen Diffusionen bei theoretisch gleichen Molekulargewichten in das Säulenmaterial und damit zu unterschiedlichen Elutionsvolumina, so dass das über die Eichgerade (auf der x-Achse: Elutionsvolumina!) errechnete hydrodynamische Volumen zweifelhaft ist. Dennoch hat diese Methode ihre Berechtigung, denn in vielen Veröffentlichungen werden hydrodynamische Volumina verzweigter Polysaccharide aufgrund mangelnder Alternativen zu dieser Methode genauso ermittelt, so dass es eine bedingte Vergleichbarkeit gibt.

Die ermittelte Größe des AGPs aus *Echinacea pallida* von $1,13 \times 10^6$ Da entspricht der eines AGPs aus *Echinacea purpurea* mit $1,2 \times 10^6$ Da (Classen et al., 2000) und eines AGPs aus einer Zellkultur von *Malva sylvestris* ($1,3 \times 10^6$ Da) (Classen und Blaschek, 2002). Ähnlich groß mit 9×10^5 Da sind ein AGP-Pektin aus *Diospyros* (Duan et al., 2003) und verschiedene AGP-haltige Gummen aus *Prosopis juliflora* und *Acacia senegal* (*Gummi arabicum*) mit 2,8 bis $14,5 \times 10^5$ Da (Goycoolea et al., 2000).

Die ermittelte Größe des Arabinans von $9,7 \times 10^5$ Da hingegen ist ungewöhnlich. Viele andere isolierte Arabinane sind wesentlich kleiner, z.B. zwei isolierte Arabinane aus *Cajanus Cajan* mit 14.000 bzw. 20.000Da (Swamy und Salimath, 1991) oder ein Arabinan aus Ginkgoblättern mit 23.000Da (Kraus, 1991). Häufig sind Arabinane Seitenketten von Galactanen oder Rhamnogalacturonanen (Pektinen) und werden abgespalten, so dass sich entsprechende kleinere Arabinane ergeben (Aspinall, 1982) als das hier isolierte Arabinan. Pektine sind in 80%igem EtOH im Gegensatz zu dem hier isolierten Arabinan nicht löslich (Blaschek, 1991). Diese beiden Tatsachen lassen den Schluss zu, dass es sich bei dem isolierten Arabinan aus *Echinacea pallida* um ein nicht mit Pektinen assoziiertes Polysaccharid handelt.

Strukturaufklärung des Arabinans und Vergleich mit anderen Arabinanen

Das Arabinan besteht im Durchschnitt aus Ara (83,9%, m/m), Glc (6,8%), Rha (4,7%) und 4,6% anderen Zuckern, die für die Struktur nicht berücksichtigt werden. Die Methylierungsanalyse nach Harris et al. (1983) lieferte 1-Ara, 1,5-Ara und 1,3,5-Ara in fast equimolaren Mengen sowie in geringen Mengen terminale Glc und Gal. Im ^{13}C -NMR-Spektrum wurden ausschließlich alpha-glykosidisch gebundene L-Arabinosen gefunden. Leider ist mit dem Arabinan keine Partialhydrolyse möglich, da die alpha-glykosidischen Bindungen der furanosidisch vorliegenden L-Arabinosen energetisch fast gleich sind. Man würde also je nach Hydrolysebedingungen entweder alle oder gar keine Bindungen spalten. Damit wären keine zusätzlichen Rückschlüsse auf die Struktur möglich. Eine andere Möglichkeit zu weiteren Strukturkenntnissen wäre der Einsatz substratspezifischer Arabinosidasen, die mit hoher Präferenz z.B. 1,5-glykosidische Ara-Bindungen spalten. Eine endo-1,5-alpha-L-arabinase wurde aus *Aspergillus niger* isoliert (Flippi et al., 1993). Diese Enzyme sind kommerziell kaum erhältlich. Bei der Firma „New England Biolabs®“ kann man eine 1,3-β-

Charakterisierung und Lage der Monosaccharide im Polysaccharidteil des AGPs

Das mit dem Yarivreagenz gefällte AGP besteht im Durchschnitt zu 87,9% (m/m) aus Gal und Ara (Verhältnis 1,4 : 1), 7,9% Glc und Spuren von Rha, Fuc, Xyl und Man. Die zuletzt genannten in Spuren vorkommenden Zucker werden für den Strukturvorschlag nicht berücksichtigt, da keiner dieser Zucker in allen gefällten AGPs vorkommt (siehe Tab. 3.4).

Um erste Rückschlüsse auf die Anordnung der Neutralzucker im Molekül zu bekommen, wurde eine Partialhydrolyse nach Gleeson und Clarke (1979) durchgeführt und die Neutralzuckerzusammensetzung der Produkte bestimmt. Vorhandene Uronsäuren wurden durch die Methode von Blakeney et al. (1983) nicht erfasst, eine Bestimmung der Uronsäuren nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) ergab einen Gehalt von 6,2% (m/m) im AGP. Durch eine Reduktion der Uronsäuren zu den korrespondierenden Neutralzuckern mit zwei Methoden (Taylor und Conrad, 1972; Fontaine et al., 1994) wurden diese und damit verknüpfte Zucker der Acetylierungsanalyse nach Blakeney et al. (1983) zugänglich gemacht. Ein Vergleich der Neutralzuckerzusammensetzungen von AGP mit Hydrolyseprodukten nach Partialhydrolyse (Tab. 3.14) und AGP mit uronsäurereduziertem AGP lässt folgende Schlussfolgerungen zu:

1. Das ethanolunlösliche Restpolymer („Core“) nach der Partialhydrolyse besteht überwiegend aus Gal (92,9%). Das AGP besitzt also ein polymeres Rückgrat aus untereinander verknüpften Gal-Einheiten (Tab 3.12).
2. Die abgespaltenen Anteile nach der Partialhydrolyse (Überstand) bestehen aus monomer vorliegenden Ara- und Glc-Bausteinen. Dass diese als Monomere vorliegen, beweist die Zusammensetzung des Überstandes IIb (Tab 3.13), die ohne TFA-Hydrolyse ermittelt wurde, also nur als Monomere vorliegende Zucker im Überstand erfasste. Daraus lässt sich ableiten, dass Bindungen zwischen furanosidischer Ara und pyranosidischer Glc vorliegen müssen, die energetisch instabiler als reine pyranosidische Bindungen sind und daher bevorzugt bei der Partialhydrolyse gespalten werden. Die Tatsache, dass es nach der Partialhydrolyse noch ein polymeres ethanolunlösliches Rückgrat gibt, obwohl viele Ara- und Glc-Bindungen gespalten wurden, lässt den Schluss zu, dass Ara und Glc die Peripherie

des Moleküls bilden. Würde der Polysaccharidteil des AGPs aus abwechselnd Gal und Ara bestehen, hätte man nach der Hydrolyse kein ethanolunlösliches Rückgrat mehr, sondern viele Oligo- und/oder Monosaccharide, die in 80%igem EtOH löslich wären.

3. Trotzdem findet man in den Überständen IIa und IIc (Tab 3.13), in denen die Neutralzuckerzusammensetzungen nach TFA-Hydrolyse bestimmt wurde, noch Oligosaccharide aus Gal. Beweis dafür ist ein Anstieg der Gal um 21,2% im Gegensatz zur Neutralzuckerzusammensetzung des Überstandes ohne TFA-Hydrolyse (Überstand IIb). Diese Oligosaccharide müssen überwiegend aus Gal bestehen, denn Glc und Ara nehmen prozentual ab: Eine Spaltung von z.B. einem Oligosaccharid aus zwei Ara- und zwei Gal-Bausteinen hätte keinen so großen Abfall der Ara-Konzentration in den Überständen mit TFA-Hydrolyse zur Folge. Die Oligosaccharide aus Gal können entweder Teil des Rückgrats sein, was zeigen würde, dass durch die Partialhydrolyse auch vereinzelt energetisch stärkere Bindungen gespalten werden, oder dass Oligosaccharide aus Gal über Ara mit dem Rückgrat verbunden sind.
4. Durch die Reduktion von Uronsäuren zu den korrespondierenden Neutralzuckern und die Erfassung von ursprünglich vorliegenden Aldobiuronsäuren lassen sich Rückschlüsse auf die Art der Uronsäure und den mit ihr verknüpften Zuckern ziehen. Diese Zucker müssten im Vergleich der Neutralzuckerzusammensetzung vor und nach Reduktion prozentual erhöht sein. Bei der Methode von Taylor und Conrad nimmt nach Reduktion von Yarivfällung Ia Glc zu, nach Reduktion von Fällung VI Gal. Die Ara-Konzentration bleibt in beiden Fällen nahezu gleich (Tab. 3.8). Nach Reduktion der Uronsäuren nach der Methode von Fontaine et al. (1994) nehmen sowohl Gal als auch Glc zu. Diese Ergebnisse deuten also auf GlcA und/oder GalA hin, die Identität der mit den Uronsäuren verknüpften Zucker bleibt unklar.

Kurz zusammengefasst und schematisch dargestellt kann nach den Acetylierungsanalysen ein erstes Modell des Polysaccharidteils des AGPs erstellt werden:

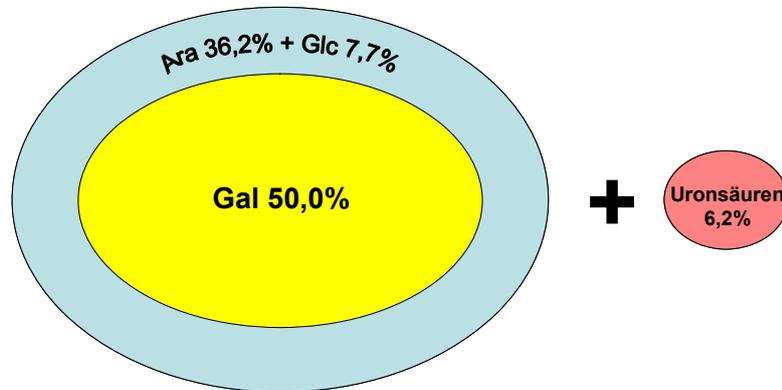


Abb. 5.2: Modell des Polysaccharidanteils des AGPs auf der Basis der Neutralzuckerzusammensetzungen des AGPs im Vergleich zu denen der Partialhydrolyseprodukte und der uronsäurereduzierten AGPs

Das „+“ in der Abbildung soll deutlich machen, dass die Uronsäuren zum AGP gehören, eine Einschätzung der räumlichen Anordnung (Peripherie oder Rückgrat) innerhalb des Polysaccharidteils durch diese Auswertung alleine aber nicht möglich ist.

Da diese Aussagen oberflächlich sind und nur erste Hinweise auf die Struktur geben, wurde eine Bindungstypanalyse nach Harris et al. (1984) mit dem AGP, den verschiedenen Partialhydrolyseprodukten und den uronsäurereduzierten AGPs durchgeführt.

Charakterisierung der Bindungstypen im Polysaccharidteil des AGPs

Freie OH-Gruppen im Polysaccharidteil des AGPs werden methyliert, das Polysaccharid hydrolysiert und anschließend die OH-Gruppen, die ursprünglich O-glykosidisch verknüpft waren, acetyliert. Die partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs) wurden gaschromatographisch vermessen und in Kombination mit einem Massenspektrometer charakterisiert und quantifiziert. Durch den Vergleich der molaren Verhältnisse der PMAAs im AGP, den Partialhydrolyseprodukten und den uronsäurereduzierten AGPs lassen sich Rückschlüsse auf Zuckerverknüpfungen und Art der Uronsäuren im Polysaccharidteil des AGPs schließen. Das AGP besteht überwiegend aus Gal, Ara und Glc und Spuren von Rha.

Der hohe Anteil an 1,3,6-verknüpfter Gal (26,9%) deutet auf ein hoch verzweigtes Rückgrat hin. Die Peripherie besteht überwiegend aus Ara und Glc, denn diese kommen terminal [Ara(f) 29,4%; Glc(p) 4,2%] häufig vor. Das in Abb. 5.2 erstellte Modell wird durch die Ergebnisse der Methylierung bestätigt und dient als Grundlage für weitere Interpretationen.

Zunächst soll das Galactan-Rückgrat näher charakterisiert werden. Ein Vergleich aller Gal-Bausteine (Tab. 3.17) zeigt eine Abnahme von 1,3,6-Gal (-33,7%) und 3-Gal (-13,1%) im nach Partialhydrolyse entstandenen Core (Rückgrat). 1,6-Gal (+33,2%) und terminale Gal(p) (+13,5%) nehmen jeweils um den fast gleichen Betrag zu. Das bedeutet, dass die Gal über Position drei überwiegend eine hydrolyselabile glykosidische Bindung mit einem furanosidischen alphasständigen Zucker eingehen muss, in diesem Fall also mit Ara. Das Rückgrat könnte unter Berücksichtigung des in der Einleitung vorgestellten „Wattle-Blossom-Modells“ (Abb. 1.3) folgende Struktur haben:

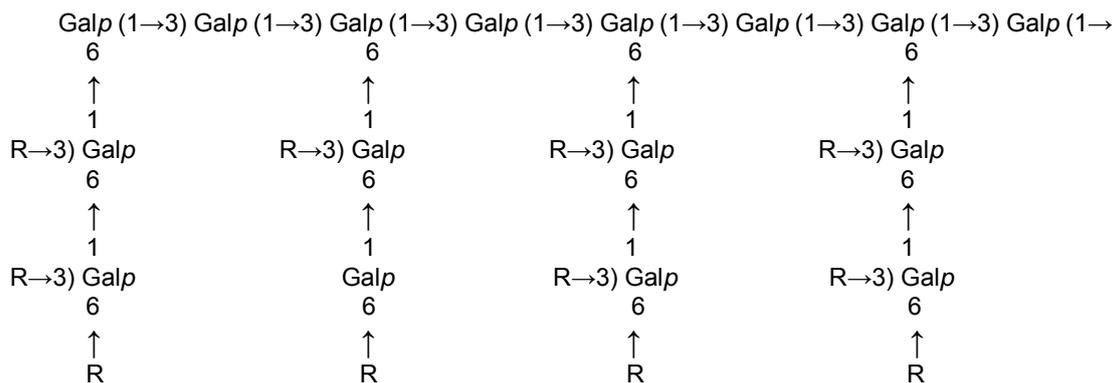


Abb. 5.3: Aus den Daten der Bindungstypanalyse erstelltes Modell des Galactan-Rückgrats des AGPs (R = periphere Zuckerreste)

Das Modell berücksichtigt in etwa die errechneten molaren Verhältnisse der Gal-Bausteine im AGP und im Core. Voraussetzung für die Richtigkeit der molaren Verhältnisse im Modell ist, dass die meisten peripheren Reste (R) durch die Partialhydrolyse abgespalten werden. Im Gegensatz zum „Wattle-Blossom-Modell“ in der Einleitung besteht das Rückgrat aus einer Kette von 1,3,6- und 1,3-verknüpfter Gal. Von dieser Kette gehen weitere 1,3,6-verknüpfte Gal-Bausteine ab, die überwiegend über die Position drei mit weiteren, die Peripherie bildenden Zuckern, verknüpft sind. 1,6-Gal und 1,3,6-Gal sind in den Seitenketten 1,6-glykosidisch miteinander verknüpft. Dieses Modell erklärt nicht die Abnahme (-13,1%) von 1,3-Gal im Core. Theoretisch müsste der Anteil an 1,3-Gal sogar steigen. Eine mögliche

Erklärung dafür ist, dass die glykosidische Verknüpfung zwischen Position 1 und 3 von den pyranosidisch vorliegenden Gal-Resten die hydrolyselabilste ist (Blaschek, 1991). Es könnten auch Gal-Dimere durch die Partialhydrolyse mit Oxalsäure gespalten worden sein. Ein Beweis dafür ist die Anwesenheit von 6-verknüpfter Gal (11,4%) im Überstand. Aus den Ergebnissen der Neutralzuckerzusammensetzungen der Überstände nach Oxalsäurehydrolyse ist bekannt, dass Gal fast nur als Oligosaccharid vorliegt. Die Gal-Bausteine müssen untereinander hydrolysestabil 1,6-glykosidisch verbunden sein. Nur so kann es zu diesem hohen Anteil an 1,6-verknüpfter Gal im Überstand kommen. Folgendes Modell erklärt eine mögliche Spaltung 1,3-glykosidischer Gal-Bindungen und die Abnahme von 1,3-Gal im Core:

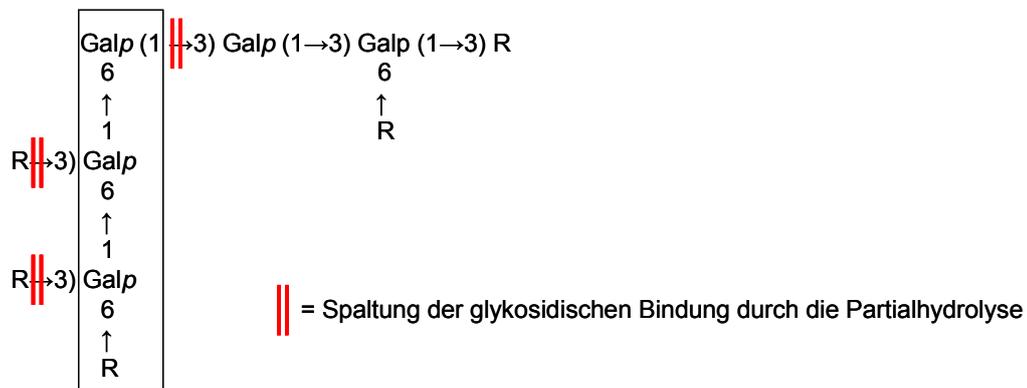


Abb. 5.4: Modell für die Erklärung der Abspaltung von Gal-Oligosacchariden bei der Partialhydrolyse

Grundlage des Modells ist eine Spaltung der energetisch labilsten Gal-Bindungen im AGP, nämlich der 1,3-glykosidischen Bindung zwischen 1,6-Gal und 1,3-Gal an der Peripherie des Polysaccharidteils. Die 1,3-glykosidischen Bindungen zwischen 1,3-Gal und 1,3,6-Gal im Rückgrat sind weitestgehend nicht gespalten worden, denn ethanolunlösliches hochmolekulares Core aus Gal konnte nach der Partialhydrolyse nachgewiesen werden. Durch die Spaltung der in Abb. 5.4 dargestellten glykosidischen Bindungen kommt es zu einer Abspaltung der beschriebenen 1,6-Gal-haltigen Oligosaccharide (im Rechteck in Abb. 5.4 markiert), die sich im Überstand finden. Auch die Verminderung des 1,3-Gal-Anteils im Core, der sich dort als terminale Gal findet, erklärt sich durch die Spaltung der Bindung. Beide Tatsachen wurden in dem Modell (Abb. 5.3) berücksichtigt.

Nach der Beschreibung des inneren Rückgrats des Polysaccharidteils des AGPs sollen nun die Zucker der Peripherie und ihre Bindungen beschrieben werden. Dies gestaltet sich einfacher, da sich vorerst ohne Berücksichtigung von Uronsäuren nur 1-Ara, wenig 1-Glc und 1-Gal sowie 1,5-Ara finden. Große Teile der terminalen Ara finden sich im Überstand nach Partialhydrolyse (Tab. 3.16). Es bildet sich nur dann ein Gleichgewicht zwischen pyranosidischer (96%) und furanosidischer (4%) Arabinose (Lehmann, 1976), wenn diese vor der Methylierungsanalyse im Überstand als Monomere vorliegen. Durch die eingefügten Substituenten im Rahmen der Methylierungsanalyse (Entstehung von PMAAs) verschiebt sich das Gleichgewicht wieder in Richtung der energetisch günstigeren furanosidischen Form. Glykosidisch verknüpfte Arabinose liegt ausschließlich in furanosidischer Form vor (Tab. 3.16). Glc und Gal liegen sowohl als Monomer wie auch glykosidisch gebunden fast ausschließlich in pyranosidischer Form vor. Da sich im Überstand überhaupt keine terminale Gal findet, muss diese mit anderen Gal-Bausteinen verbunden sein, wahrscheinlich über die energetisch stabilste 1,6-Verknüpfung. Dagegen werden große Teile der terminalen Glc bei der Partialhydrolyse abgespalten und finden sich im Überstand. Dies ist ein Indiz für eine labile glykosidische 1,5-Bindung zwischen 1,5-Ara und 1-Glc. Ebenso könnten zwei Arabinosen 1,5 glykosidisch verknüpft sein. Für beide Theorien spricht die Abnahme von 1,5-Ara um 7,4% vom AGP zum Überstand hin. Bei einem ausschließlichen Vergleich der Arabinosen nimmt die 1,5-Arabinose sogar um 22,6% im Überstand ab. Allerdings könnte die 1-Glc auch mit anderen Gal-Bausteinen verbunden sein, vermutlich über eine relativ säurelabile 1,3-Verknüpfung. Aus diesen Schlussfolgerungen lassen sich folgende Zuckerstrukturen für die Peripherie des Polysaccharidteils des AGPs ableiten:

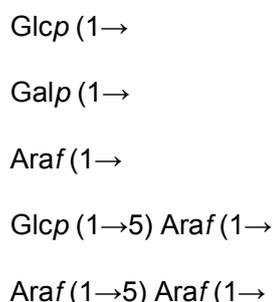


Abb. 5.5: Charakterisierung der peripheren Zuckerstrukturen des Polysaccharidteils des AGPs, in Abbildung 5.3 als R bezeichnet

Die Uronsäuren fanden bisher noch keine Berücksichtigung bei den Strukturvorschlägen, da wegen mangelnder Spaltung ihrer glykosidischen Bindungen weder die Uronsäure selbst noch der benachbarte Zucker erfasst wurden. Dies soll nun über einen Vergleich der Zusammensetzung der PMAAs vom AGP und den beiden nach zwei verschiedenen Uronsäurereduktionen erhaltenen PMAAs geschehen. In beiden uronsäurereduzierten AGPs konnte nur terminale GlcA detektiert werden. Durch die Reduktion der Carboxylgruppe und den Einbau von zwei Deuteriumatomen wurden die ursprünglichen GlcA zu terminaler Glc umgewandelt. Da sich Glc und zweifach deuterierte Glc im Gaschromatogramm nicht trennten, wurde die Fläche des entsprechenden Peaks durch Aufnahme charakteristischer Bruchstücke, zweifach deuterierte Glc weist um zwei Masseneinheiten größere Bruchstücke auf, im SIM-Modus (single ion monitoring) des Massenspektrums prozentual der Glc und der zweifach deuterierten Glc zugeordnet. Nach der Uronsäurereduktion nach Fontaine et al. (FUron) ergibt sich ein Gehalt von 6,3 mol % GlcA, nach Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad (TUron) ein Gehalt von 5,0 mol %. Diese mol % beziehen sich nur auf den Polysaccharidteil, so dass der nach Blumenkrantz berechnete Gesamturonsäuregehalt mit 6,2 Massenprozent, bezogen auf das gesamte AGP, ein wenig höher ist. Ursachen hierfür könnten eine unvollständige Reduktion bei TUron und FUron sein oder aber falsch positive Ergebnisse bei der Reduktion nach Blumenkrantz.

Bei dem Neutralzucker, der mit der terminalen GlcA verknüpft ist, muss es sich um eine 1,6-Gal handeln. Dies ist der einzige Zuckerbaustein, der prozentual bei TUron und FUron nach Reduktion im Vergleich zum AGP zunimmt (Tab 3.19). Diese beiden über C1 und C6 O-glykosidisch verknüpften Zucker werden bei der Partialhydrolyse nicht abgespalten. Ein Beweis dafür ist der hohe Anteil (12,1%) an 1-GlcA im uronsäurereduziertem Core (TUron Core) in Tab. 3.21.

Ein weiteres Indiz für die Richtigkeit der bis hierhin aufgestellten Theorien liefert das ^{13}C -NMR-Spektrum des AGPs. Alle Arabinosen liegen wie auch im Arabinan als alpha-glykosidisch gebundene L-Arabinosen vor. Die Galactosen liegen als β -D-Galactosen vor. Die Signale der Arabinosen sind wesentlich schärfer als die der Galactosen. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die These, dass die Gal-Einheiten sich eher im Inneren des Moleküls befinden, dadurch ziemlich starr sind, während frei drehbare Ara-Bausteine überwiegend die Peripherie des AGPs bilden (Gane et al., 1995).

Nach dieser Diskussion lässt sich ein Modell für die Gesamtstruktur des Polysaccharidteils des AGPs erstellen:

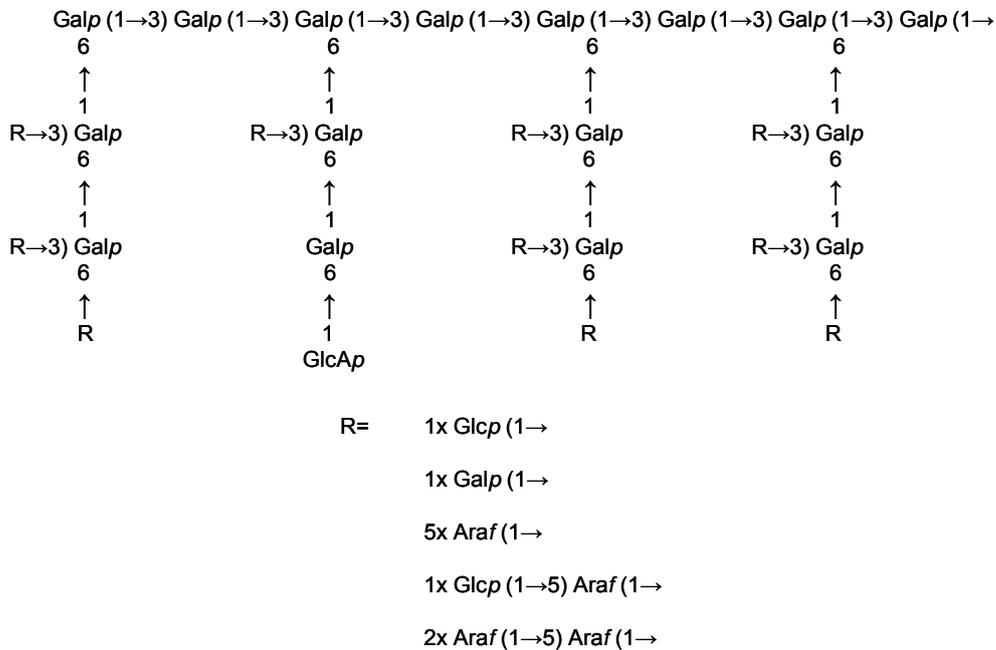


Abb. 5.6: Strukturvorschlag des Polysaccharidteils des AGPs unter Berücksichtigung molarer Verhältnisse der einzelnen Zucker

Das Modell zeigt ein stark verzweigtes Polysaccharid, das eine innere Hauptkette aus 1,3,6- und 1,3-Gal bildet, die in einer 1,6-Gal mündet. Von dieser Hauptkette gehen verzweigte Seitenketten aus, überwiegend 1,3,6-Gal, aber auch vereinzelt 1,6-Gal. Die Peripherie bildende Zucker an Verzweigungspunkten der Seitenketten bestehen aus 1-Ara, 1,5-Ara, 1-GlcA, 1-Glc und 1-Gal. Es handelt sich aufgrund der fehlenden 1,4-verknüpften Gal-Bausteine, dem hohen Anteil an 1,3,6-Gal und dem vorhandenen Proteinteil um ein Typ II-Arabinogalactan (Aspinall, 1982; Bacic 2003). Nach dem AGP-Modell „Wattle Blossom“ (Abb. 1.3) ist die ganz rechts dargestellte 1,3-Gal terminal O-glykosidisch mit dem Proteinteil verbunden. Es ist denkbar, dass mehrere der dargestellten Polysaccharidstrukturen mit dem Proteinteil jeweils kovalent verknüpft sind und so die postulierte Gesamtstruktur des in dem Modell dargestellten AGPs zustande kommt.

Das in der Einleitung vorgestellte AGP-Modell „Twisted hairy rope“ (Abb. 1.4) ist für das hier dargestellte AGP aus *Echinacea pallida* eher unwahrscheinlich, denn weder Rhamnose noch zweifach verknüpfte Glucuronsäure wurden gefunden. Auch das Vorkommen von

reinen Arabinanseitenketten ist aufgrund der relativ geringen Menge an 1,5-Ara unwahrscheinlich.

Charakterisierung des Proteinteils des AGPs

Der Proteinteil macht 3,9% (m/m) des AGPs aus und bewegt sich im üblichen Rahmen von ca. 1-10% (Nothnagel et al., 2000). Große Anteile am Proteinteil des AGPs aus *Echinacea pallida* haben Hyp (17,3% m/m), Ser (11,4%), Thr (8,9%), Glu (8,6%), Asp (7,3%) und Gly (7,0%). Diese Aminosäuren sind typisch für AGPs. Eine Einteilung des Proteinbackbones in „klassisch“ und „nicht klassisch“ kann aufgrund der fehlenden Aminosäuresequenz nicht vorgenommen werden. Ein AGP aus *Echinacea purpurea* zeigt Charakteristika „klassischer Proteinbackbones“, nämlich Pro-Hyp-Regionen, Ser-Hyp und Thr-Hyp Bindungen (Classen et al., 2005).

Typischerweise sind der Protein- und Polysaccharidteil O-glykosidisch miteinander verbunden. Dies kann über Hyp, Ser und Thr geschehen (Nothnagel, 1997). Unter der Annahme, dass die prozentual am seltensten vorkommende Aminosäure, die bisher in AGPs gefunden wurde (Met 0,6%), mindestens einmal vorkommt, ergibt sich insgesamt ein ca. 26.000Da großer Proteinteil des AGPs. Die drei isolierten Proteinbackbones im *Echinacea purpurea*-AGP hatten eine Größe von ca. 15.900 – 16.800Da. Die in Abb. 5.6 vorgeschlagene Polysaccharidseitenkette hat unter Berücksichtigung der molaren Verhältnisse von Hexosen (ca. 180Da) zu Pentosen (ca. 150Da) von 3:1 ein Molekulargewicht von insgesamt ca. 5175Da. Wenn man weiterhin annimmt, dass jedes im Protein vorkommende Molekül Hyp (34x), Ser (28x) und Thr (20x) O-glykosidisch mit einer Polysaccharidseitenkette verbunden ist, ergibt sich ein Molekulargewicht von $5175 \times 82 = 424.350\text{Da}$ für den Polysaccharidteil plus 26.000Da für den Proteinteil. = ca. 460.000Da für das gesamte AGP. Dieser Wert liegt zwar deutlich unter dem per SEC ermittelten hydrodynamischen Volumen, welches aber aufgrund der mit vermessenen Hydrathülle um das AGP auch größer erscheinen kann. Mit der Annahme, dass Met 2x im Proteinteil vorkommt, nähert man sich dem per SEC ermittelten Volumen von $1,1 \times 10^6\text{Da}$ schon ziemlich an. Diese Rechnungen sind rein theoretischer Natur und sehr spekulativ. Der Polysaccharidteil kann auch pro Seitenkette wesentlich größer sein, Met kann häufiger vorkommen und nicht jede OH-Gruppe tragende Aminosäure muss O-

glykosidisch mit dem Polysacharidteil verknüpft sein. Dennoch bekommt man mit diesem Modell einen Gesamteindruck von dem komplex aufgebauten AGP.

Strukturvergleich zwischen dem isolierten AGP und AGPs aus anderen Pflanzen

Aus einer Vielzahl von isolierten und charakterisierten AGPs aus verschiedenen Pflanzen werden für einen Strukturvergleich nur einige herangezogen. Die Wahl fiel auf AGPs, denen eine immunologische Wirkung nachgesagt wird. Einige der in der Tabelle vorgestellten AGPs wurden in den gleichen *in vitro* Mausmodellen wie das AGP aus *Echinacea pallida* auf immunologische Aktivität getestet. Zunächst sollen Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Strukturen diskutiert werden, um dann aufgrund unterschiedlicher biologischer Aktivitäten Rückschlüsse auf die für die Wirkung wichtigen Strukturelemente ziehen zu können (siehe 5.2). Die Werte der dargestellten AGPs wurden alle mit den gleichen Methoden ermittelt. Daher ist eine gute Vergleichbarkeit gegeben (Classen und Blaschek, 2000; Nemetz, 2004; Wack, 2004).

Monosaccharide in % (m/m)	<i>Echinacea pallida</i> Wurzeln	<i>Echinacea purpurea</i> Kraut	<i>Rudbeckia hirta</i> Kraut	<i>Baptisia tinctoria</i> Wurzeln
Rhamnose	2,8	1,2	4,1	3,5
Fucose	0,4	Spuren	0,5	0,0
Arabinose	37,0	32,1	23,0	30,7
Xylose	0,5	0,0	1,0	0,0
Mannose	0,4	2,0	1,2	1,1
Galactose	51,0	63,5	63,8	58,7
Glucose	7,9	1,1	6,3	5,9
Verhältnis Gal:Ara	1,4 : 1	2,0 : 1	2,8 : 1	1,8 : 1
Uronsäure % (m/m)	6,2	8,7	7,4	6,8
Hydroxyprolin	0,7	0,8	0,7	1,2

Tab. 5.1: strukturelle Charakteristika verschiedener AGPs

Alle AGPs zeigen einen hohen Anteil an Ara und Gal (zusammen mindestens 88%). Andere Zucker wie Fuc, Xyl und Man kommen nur in geringen Mengen vor. Unterschiede gibt es in der Glc-Konzentration, die von 1,1% im *E.purpurea*-AGP bis zu 7,9% im *E.pallida*-AGP reicht. Auch der Rha-Gehalt schwankt von 1,2% im *E.purpurea*-AGP bis zu 4,1% im *Rudbeckia*-AGP. Unterschiede gibt es auch im Verhältnis von Gal zu Ara, das von 1,4 : 1 im *E.pallida*-AGP bis zu 2,8 : 1 im *Rudbeckia*-AGP reicht. Der Uronsäuregehalt nach

Blumenkrantz ist bei allen aufgeführten AGPs recht ähnlich. Das gleiche gilt für den Hydroxyprolinegehalt, nur im *Baptisia*-AGP ist er mit 1,2% höher als bei den anderen AGPs (0,7-0,8%).

Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass es Unterschiede im Aufbau von AGPs aus verschiedenen Pflanzen gibt, auch phylogenetisch nahe Pflanzen wie *E.purpurea* und *E.pallida* (beide *Asteraceae*) produzieren unterschiedlich aufgebaute AGPs, wahrscheinlich auch in Abhängigkeit vom Pflanzenteil. Um genauere Unterschiede in der Feinstruktur darzustellen, werden die Ergebnisse der Bindungstypanalysen nach Harris miteinander verglichen:

Zuckerbaustein in mol %	<i>Echinacea pallida</i> Wurzeln	<i>Echinacea purpurea</i> Kraut	<i>Rudbeckia hirta</i> Kraut	<i>Baptisia tinctoria</i> Wurzeln
1-Rha(f)	Spuren	0,0	2,7	1,7
1-Ara(f+p)	29,4	24,8	13,6	35,1
1,3-Ara(f)	0,0	0,0	3,3	1,7
1,5-Ara(f)	14,2	11,7	7,1	9,4
1-Glc(p)	4,2	0,0	4,9	0,0
1,3-Glc(p)	0,0	0,0	4,8	0,0
1-Gal(p)	2,5	2,3	3,6	3,6
1,3-Gal(p)	16,5	12,7	18,5	16,7
1,6-Gal(p)	6,3	15,4	10,2	5,8
1,3,6-Gal(p)	26,9	31,8	24,8	24,2
andere	0,0	1,3	6,5	1,8

Tab. 5.2: molare Anteile der Zuckerbausteine in verschiedenen AGPs

Zusätzlich zu den dargestellten Ergebnissen wurden in allen AGPs ausschließlich terminale GlcA-Reste gefunden. Bei allen AGPs handelt es sich um Typ-II AGPs nach der Klassifizierung von Aspinnall. Die dunkel markierten Zeilen entsprechen den Zuckerbausteinen, die in allen AGPs den größten Teil der jeweiligen Polysaccharidstruktur ausmachen. Unterschiede gibt es aber im Verhältnis dieser Bausteine zueinander. Das *Rudbeckia*-AGP besteht aus wesentlich weniger terminaler Ara als die anderen AGPs, auch 1,5-Ara kommt seltener vor. Auffällig ist der hohe Anteil an 1,6-Gal im *E.purpurea*-AGP. Die unterschiedlichen Verhältnisse der Gal-Bausteine deuten auf etwas verschieden aufgebaute Gal-Backbones hin. Unterschiede gibt es auch bei den Zuckern 1-Rha und 1,3-Ara, die nur im *Rudbeckia*-AGP und im *Baptisia*-AGP vorkommen. 1-Glc findet sich nur im

Rudbeckia-AGP und im *E.pallida*-AGP. 1,3-Glc kommt ausschließlich im *Rudbeckia*-AGP vor. Diese Bausteine kommen zwar nur in geringen Mengen vor, aber gerade die terminalen Zucker können aufgrund ihrer peripheren Lage im Molekül eine bedeutende Rolle als Teile möglicher Epitope spielen. Auch Diallo et al. (2003) zeigten, dass terminale Arabinosen für die komplementmodulierenden Eigenschaften eines Pektins mit AG-Seitenketten wichtig sind.

Weitere Beweise für die unterschiedlichen Strukturen liefern die Ergebnisse der ELISA-Versuche auf Kreuzreaktivität (siehe 3.11.1 und 3.11.2). Ein monoklonaler Antikörper, der gegen das *E.purpurea*-AGP gerichtet ist, erkennt ein weitgehend unbekanntes Epitop. Als Bestandteile des Epitops werden periphere Ara und GlcA ausgeschlossen. Das Bindungsepitop, das ein polyklonaler Antikörper erkennt, der ebenfalls gegen das *E.purpurea*-AGP gerichtet ist, besteht unter anderem aus furanosidischen Arabinoseresten. Beide Antikörper reagieren zwar mit dem *E.pallida*-AGP, besitzen aber eine höhere Affinität zum *E.purpurea*-AGP (Abb. 3.19 und Abb. 3.20). Diese Ergebnisse deuten wie die Ergebnisse der Methylierungsanalysen auf Unterschiede in der Feinstruktur hin. Erstaunlicherweise besitzt der polyklonale Antikörper insgesamt eine höhere Spezifität als der monoklonale, was sich durch eine größere Absorptionsdifferenz zwischen hohen und niedrigen AGP-Konzentrationen zeigt.

Noch deutlicher werden die Unterschiede in den Feinstrukturen bei einem Vergleich der Affinitäten beider Antikörper mit mehreren AGPs, geordnet nach fallender Affinität des Antikörpers (Classen et al., 2004 und 2005).

monokl. AK: *E.purpurea*-AGP > *Rudbeckia*-AGP > *Baptisia*-AGP > *E.pallida*-AGP

polykl. AK: *E.purpurea*-AGP > *Baptisia*-AGP > *Rudbeckia*-AGP > *E.pallida*-AGP

Beide Antikörper zeigen die schwächste Kreuzreaktivität mit dem *E.pallida*-AGP, obwohl sich *E.purpurea* und *E.pallida* phylogenetisch am nächsten sind; beide gehören zur Familie der *Asteraceae*. Der monoklonale AK zeigt die beste Kreuzreaktivität mit dem *Rudbeckia*-AGP (Familie *Asteraceae*). Die gute Kreuzreaktivität könnte darauf beruhen, dass das *E.purpurea*- und das *Rudbeckia*-AGP aus dem Kraut isoliert wurden. Die beiden anderen

AGPs wurden aus der Wurzel isoliert. Dies gilt allerdings nur für den monoklonalen Antikörper. Erstaunlich ist die gute Affinität des polyklonalen AKs zum *Baptisia*-AGP aus der Wurzel, denn *Baptisia tinctoria* gehört zur Familie der *Fabaceae*.

5.2 Diskussion – immunologische Tests

Diskussion der immunologischen Testergebnisse unter Berücksichtigung der Mausstämme

Um eine bessere Übersicht zu bekommen, werden die umfangreichen *in vitro* Testergebnisse mit dem *E.pallida*-AGP noch einmal kurz in einer Tabelle zusammengefasst:

Testparameter	AGP (µg/ml)	SI-max
Lymphozytenproliferation in NMRI-Mäusen	100,0	11,9
Lymphozytenproliferation in Balb/c-Mäusen	100,0	11,7
Lymphozytenproliferation in C3H/HeJ-Mäusen	100,0	6,6
IgM-Proliferation in Milzzellen (NMRI)	100,0	7,8
Nitrit-Produktion in Makrophagen (NMRI)	50,0	3,8
IL1-β Produktion in Makrophagen (NMRI)	100,0	3,5
IL-6 Produktion in Makrophagen (NMRI)	100,0	13,0
TNF-α Produktion in Makrophagen (NMRI)	25,0	11,6
IFN-γ Produktion in Makrophagen (NMRI)	0,6	212,0
GM-CSF Produktion in Milzzellen (NMRI)	0,6	14,7

Tab. 5.3: SI-max Werte bei jeweiliger AGP-Konzentration

In der Tabelle werden die maximalen Stimulationsindices (SI = Werte der behandelten Zellen geteilt durch Werte der unbehandelten Zellen) der Ergebnisse 4.1-4.4 dargestellt. Da auch die AGP-Konzentrationen, bei denen die maximalen SI-Werte erreicht wurden, wichtig für die Beurteilung des immunologischen Potenzials sind, wurden diese mit aufgeführt. Ungewöhnlich hoch sind die Proliferationswerte für Lymphozyten des „LPS-low responder“-Mausstamms (C3H/HeJ) nach Gabe von LPS (Abb. 4.3). Ursache hierfür ist eine Proteinverunreinigung von 3,4% des verwendeten LPS. Auf diese Verunreinigung reagieren die Milzzellen des C3H/HeJ-Stammes unter anderem mit verstärkter Proliferation. Da durch

das Aufkochen des Extraktes und anschließendes Abzentrifugieren von denaturierten Proteinen eine Kontamination von AGP mit Protein ausgeschlossen werden kann, ist dies ein weiteres Indiz dafür, dass die verstärkte Proliferation der Milzzellen bei diesem Mausstamm auf das AGP zurückzuführen ist. Der im Inneren des AGPs befindliche Proteinteil des AGPs wird durch den großen Polysaccharidteil vor Denaturierung geschützt. Die max. SI-Werte für den LPS-insensitiven Mausstamm (C3H/HeJ) sind bei einer Konzentration von 100µg/ml zwar nur halb so hoch wie für die beiden anderen LPS-sensitiven Mausstämme (Tab. 5.3), aber das AGP erreicht bei einer Konzentration von 12,5µg/ml ähnlich hohe Werte wie LPS bei 30µg/ml, was gegen eine nennenswerte Kontamination mit LPS spricht. Ebenfalls gegen eine Kontamination sprechen die hohen Werte des AGPs bei der IFN- γ und GM-CSF-Produktion. Das AGP erreicht bei einer Konzentration von 0,63µg/ml fast doppelt so hohe Werte der Produktion von IFN- γ , bei GM-CSF gleich hohe Werte wie LPS bei einer fast 50fach höheren LPS-Konzentration (30µg/ml). Zumindest diese Effekte können also nicht auf einer LPS-Kontamination beruhen. Die Stimulation der Proliferation von Lymphozyten bei allen drei Mausstämmen ist entweder auf eine direkte oder indirekte Stimulation zurückzuführen. Da die Präparation der Milzzellen B- und T-Lymphozyten, aber auch Makrophagen enthält, die miteinander durch z.B. Cytokine kommunizieren können, ist aus den Testergebnissen nicht direkt zu erkennen, welcher Mechanismus für die Proliferation verantwortlich ist. Die starke Aktivierung der Makrophagen durch das AGP spricht für eine zentrale Rolle dieses Zelltyps auch bei der Proliferation der anderen Leukozyten. Aktivierte Makrophagen sezernieren Cytokine wie z.B. IL-6 und GM-CSF, die das Wachstum von Lymphozyten fördern. Die gemessenen hohen max. SI-Werte der Cytokine sprechen für eine vermehrte Proliferation von Lymphozyten, indirekt induziert über eine Makrophagenaktivierung.

Mögliche Auswirkungen der Testergebnisse auf das Immunsystem

In allen Tests stimuliert das AGP den jeweiligen Messparameter, so dass vielfältige Wirkungen zustande kommen könnten. In der Annahme, dass dieses AGP *in vivo* die gleichen Effekte auslösen würde, könnten Viren und Bakterien auf verschiedene Arten bekämpft werden. Die verbesserte unspezifische Abwehr der humoralen Immunität, also der erhöhte IgM-Titer und die größeren Konzentrationen an Komplementfaktoren und akute Phase-

Proteinen, die durch den erhöhten IL-6 und TNF- α Titer in der Leber vermehrt produziert werden, könnten eine bessere Reaktion auf Bakterien ermöglichen. Die Makrophagenstimulation, gemessen durch die Cytokinausschüttungen, könnte zu einer verbesserten unspezifischen zellulären Immunität durch vermehrte Phagozytoseaktivität, Interferon- und NO-Ausschüttung führen. Als Schnittstelle zwischen spezifischer und unspezifischer Immunabwehr würde die Ausschüttung von Cytokinen durch aktivierte Makrophagen eine Aktivierung von Lymphozyten durch die IL-1 β -Produktion, eine erhöhte Antikörperproduktion (vor allem IgA) der B-Lymphozyten, einen Ig Klassenwechsel von IgM zu IgG und eine vermehrtes Auftreten von dendritischen Zellen durch hohe GM-CSF Titer bewirken können.

Diese Betrachtungen sind spekulativ, denn es wird nicht berücksichtigt, dass die einzelnen Bestandteile des komplexen Immunsystems sich gegenseitig beeinflussen und verschiedene Regulationsmechanismen wie z.B. T-Regulatorzellen Einfluss auf den Zustand des Immunsystems haben. Diese Regulation ist für den Körper als Eigenschutz wichtig, denn sonst kann es durch Komponenten des Immunsystems zu schädigenden Wirkungen kommen. Als Beispiele hierfür seien hohes Fieber (z.B. durch TNF- α), starke Entzündungen (z.B. durch NO) oder Überreaktionen (z.B. Asthma oder andere Allergien) genannt.

Weitere immunologische Untersuchungen mit AGPs aus ausschließlich *E.pallida* sind nicht bekannt. Untersuchungen mit hochmolekularen Mischextrakten aus *Echinacea pallida* und verwandten Pflanzen und Untersuchungen mit AGPs aus verwandten Pflanzen bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit.

So konnten Beuscher et al. (1988) eine vermehrte Antikörperproduktion und erhöhte Interferon-Titer in Mäusen nachweisen, die mit hochmolekularen Extrakten behandelt wurden, welche aus *Baptisia tinctoria* und *Echinacea angustifolia* stammten und AGPs enthielten. Hochmolekularen Wurzelextrakten aus *E.purpurea*, *E.pallida* und *E.angustifolia* wurde eine antivirale Wirkung sowie eine Stimulation von IgM und verschiedenen Cytokinen, nachgewiesen (Beuscher et al., 1995). Alban et al. (2002) zeigten komplementaktivierende Eigenschaften eines AGPs aus *E.purpurea*. Eine Aktivierung von Makrophagen durch ein saures Arabinogalactan (75.000Da) aus Zellkulturen von *E.purpurea* wiesen Lohmann-Matthes und Wagner (1988) nach. Polysaccharide aus den gleichen Zellkulturen induzierten nach i.v.-Gabe eine Zunahme der peripheren Blutleukozyten und eine Zunahme und Aktivierung der Makrophagen in Milz und Knochenmark. Die vermehrte Proliferation war

auf eine vermehrte Produktion von koloniestimulierenden Faktoren zurückzuführen (Roesler et al., 1991).

Bioverfügbarkeit und Dosierung

Wichtig wäre es, die richtige Dosierung für eine Immunstimulation zu finden, die je nach Immunstatus des Patienten unterschiedlich sein könnte. Einige Parameter des Immunsystems werden schon bei kleinen Konzentrationen (0,6µg/ml) stark beeinflusst (IFN-γ), andere (IL-1β) werden erst in hohen Konzentrationen (100µg/ml) beeinflusst. Eine Vorhersage, was insgesamt bei welcher Dosierung passiert, ist durch diese Tests nicht möglich und bedarf noch zahlreicher weiterer Untersuchungen. Sinnvolle Dosierungen von AGP zur Immunstimulation müssten empirisch ermittelt werden. Prinzipiell ist auch jeder Immunstimulator ein potenzieller Immunsuppressor, denn bei zu hohen eingesetzten Konzentrationen des Stimulators kann dieser auch durch Umkehreffekte indirekt zum Immunsuppressor werden. Daher wird anstelle des Begriffes Immunstimulator häufig der Begriff Immunmodulator benutzt (Bodinet, 1999). Die in der Einleitung vorgestellten klinischen Studien beweisen aber, dass es durch orale Gabe von *Echinacea*-Präparaten zu positiven *in vivo* Effekten kommen kann.

Ein wichtiger Punkt für die Wirksamkeit von AGPs ist der Nachweis, dass die Substanzen nicht verdaut werden, ehe sie resorbiert werden können. Versuche an einem Verdauungsmodell lieferten erste Hinweise, dass dies nicht geschieht. Nach Simulation einer Magen-Darmpassage reagierte ein AGP aus *Rudbeckia hirta* unverändert gut mit dem Yariv-Reagenz. Das ist ein Indiz dafür, dass der Polysaccharidteil des AGPs nicht vollständig gespalten wurde und der Proteinteil aufgrund seiner Lage im Inneren des Moleküls wahrscheinlich nicht angegriffen wurde (Nemetz, 2004).

Eine passive Aufnahme in den Körper bei oraler Gabe ist aufgrund der Größe des AGPs sehr unwahrscheinlich. Es gibt aber Bereiche im Darm (Peyer'schen Plaques), die in direktem Kontakt mit dem Lymphsystem stehen. Spezialisierte Epithelzellen des Darms, die man M-Zellen nennt, nehmen auch große Moleküle per Endozytose aus dem Darm auf und präsentieren diese den Lymphozyten und Makrophagen des lymphatischen Gewebes (Gebert et al., 1996). Untersuchungen liefern erste Hinweise auf eine Resorption von hochmolekularen Polysacchariden. Ein hochmolekularer Mischextrakt, unter anderem auch

mit *E.pallida*, bewirkte eine gesteigerte Antikörperproduktion von Peyer'schen Plaque-Zellen gegen Schafserythrozyten (Bodinet et al., 2004). Pektine unbekannter Größe aus *Bupleurum falcatum* wurden nach oraler Gabe in der Leber und Peyer'schen Plaques von Mäusen mittels Antikörpern wiedergefunden (Sakurai et al., 1996). Eine verbesserte Funktion der Peyer'schen Plaque-Zellen wiesen Kiyohara et al. (2002) *in vitro* und *in vivo* mit einem Pektinmischung mit Arabinogalactanseitenketten nach.

Vergleich der immunologischen Aktivität verschiedener AGPs und Rückschlüsse auf Struktur-Wirkungsbeziehungen

Die in Tab. 5.3 aufgeführten Tests wurden auch mit den in Tab. 5.2 aufgeführten AGPs durchgeführt. In vielen Tests zeigte das AGP aus *Rudbeckia hirta* die größte Aktivität. Das Arabinogalactan aus der Lärche (*Larix*) zeigte keine bis nur sehr geringe Aktivität. Kurz zusammengefasst ergibt sich folgende Polymer-Reihe, geordnet nach fallenden immunologischen Aktivitäten:

Rudbeckia-AGP > *Baptisia*-AGP = *E.pallida*-AGP >> *E.pallida*-Arabinan > *Larix*-AG

Das Lärchen AG ist ein Typ-II AG mit zwei unterschiedlich großen Polymeren (ca. 16.000 und 100.000Da), deren Polysaccharidteile prinzipiell ähnlich aufgebaut sind wie die der anderen AGPs (Aspinall, 1982). Ein großer Unterschied ist der fehlende Proteinteil, der die Gesamtstruktur des Moleküls beeinflusst und somit vielleicht eine wichtige Rolle für das immunologische Potenzial dieser Moleküle spielt. Auch das wahrscheinlich proteinlose Arabinan zeigt kaum immunologische Aktivität. Strukturelle Besonderheiten des *Rudbeckia*-AGPs sind das Vorkommen von 1,3-Glc, 1,3-Ara, 1-Rha und 1-Glc. Diese Zucker kommen zwar relativ selten vor, aber als endständige Zucker an der Peripherie des Moleküls in dieser Kombination nur im *Rudbeckia*-AGP. Möglicherweise bilden diese Zuckerbausteine Epitope, die der entscheidende Grund für das höhere immunologische Potenzial dieses AGPs sind. Auch Unterschiede in der Zusammensetzung des Proteinteils könnten eine Rolle spielen, wobei die Bildung von nach außen gerichteten Epitopen aufgrund der Lage des Proteinteils im Inneren des AGPs schwer vorzustellen ist. Weitere Untersuchungen an AGPs mit bekannter Struktur könnten diese Thesen stützen. Es müssten verschiedene AGPs mit

bekannten Strukturen in gleichen Testsystemen untersucht werden, damit eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben ist.

5.3 Zielstrukturen von AGPs auf menschlichen Leukozyten

Nach den positiven Ergebnissen der AGPs der immunologischen Testreihe stellte sich die Frage, ob und auf welche Art AGPs mit immunkompetenten Zellen interagieren.

Hierzu wurde mit einem AGP aus *Echinacea purpurea* per Durchflusszytometrie die Bindungsaffinität an menschliche Leukozytenoberflächen gemessen. Zur Messung der Affinität wurden polykl. AK eingesetzt, generiert in Kaninchen gegen das AGP, und gegen Kaninchen gerichtete Antikörper, die mit einem Fluorochrom beladen waren. Die Ergebnisse dieser indirekten Fluoreszenzmarkierung zeigen, dass es eine konzentrationsabhängige Bindung des AGPs an die Zelloberflächen von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten gibt (siehe 4.5). Durch die Bindung von AGP an die Oberfläche könnten immunmodulatorische Effekte ausgelöst werden.

Auffällig sind die Faktoren der Fluoreszenzzunahme (7-14) bei allen Leukozyten bis 0,1µg/ml (Tab. 4.4). Die Faktoren beschreiben, wie viel mal mehr AGP bei Erhöhung der eingesetzten AGP-Konzentration um den Faktor 10 an die Oberfläche der Leukozyten bindet. Die Zunahme des gebundenen AGP ist bei kleinen AGP-Konzentrationen bis 0,1µg/ml AGP um ein vielfaches höher als bei höheren AGP-Konzentrationen. Bei niedrigen Konzentrationen bindet das AGP 7-14 mal besser an die Zelloberflächen, während mit AGP-Konzentrationen größer 0,1µg/ml eine fast konstante Steigerung um den Faktor 1-3 erreicht wird. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass es Strukturen auf allen Leukozyten geben muss, die mit hoher Präferenz und einer hohen Affinität das AGP binden können. Wenn alle Strukturen dieser Art besetzt sind, werden andere Strukturen mit geringerer Affinität besetzt. Ein Beispiel für eine Struktur mit hoher Affinität könnten z.B. Rezeptoren sein, ein Beispiel für Strukturen mit geringerer Affinität die Glykocalyx der Leukozyten. Diese Rezeptoren müssten auf allen Leukozyten exprimiert sein, besonders häufig auf Monozyten, denn hier wurde mit einer 14fachen Zunahme der gebundenen AGPs die größte Zunahme gemessen. In einem Modell könnte das Bindungsverhalten der AGPs so aussehen:

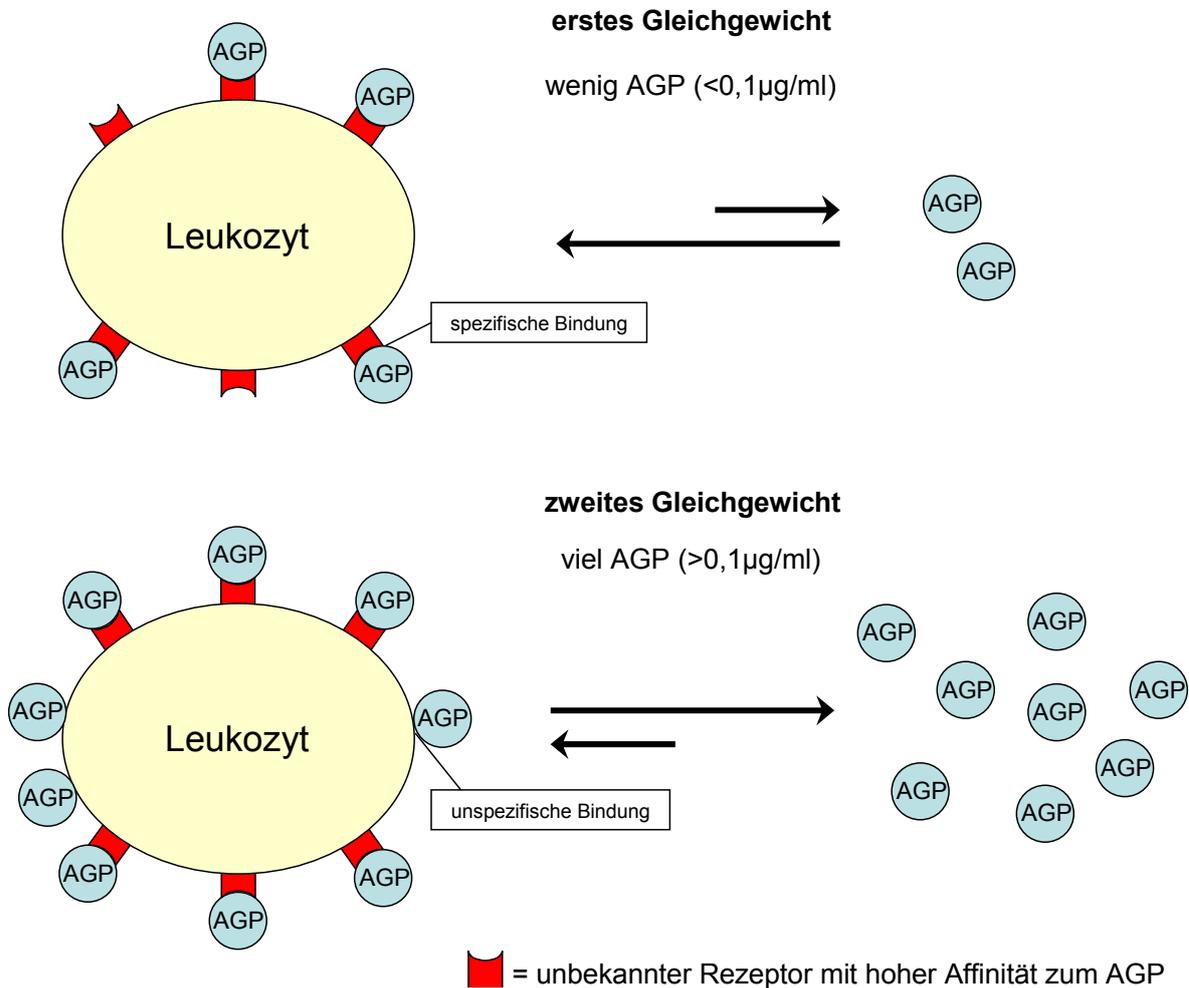


Abb. 5.7: schematische Darstellung des Bindungsverhaltens von AGP auf Leukozytenoberflächen

In der Literatur sind hochmolekulare Polysaccharide beschrieben, die an Zelloberflächen immunkompetenter Zellen binden. Ein sulfatiertes Polymannuronguluronat aus Algen bindet an CD4-Rezeptoren von menschlichen Lymphozyten und befindet sich in klinischen Studien zur Zulassung als AIDS-Medikament (Miao et al., 2004). Otterlei et al. (1993) wiesen eine Bindung von Polymeren aus 1,4-verknüpften Mannuronsäuren (200.000Da) an Monozyten nach und eine dadurch induzierte TNF- α Produktion. Es wurde durch kompetitive Messungen nachgewiesen, dass es sich bei dem Bindungsrezeptor um den gleichen wie für LPS handelt. Hochmolekulare Lektine, das sind pflanzliche Glykoproteine von 25.000 bis 300.000Da, wie

Phytohämagglutinin und Concanavalin A (nur Protein), die zu 5-50% Polysaccharid enthalten und die in den immunologischen Tests dieser Arbeit verwendet wurden, binden an den CD2-Rezeptor reifer T-Lymphozyten und lösen dadurch eine Mitose aus. LPS löst über einen Komplex mit LPS-bindendem Protein und Bindung an den CD14-Rezeptor mit anschließender Tlr4 Interaktion eine Proliferation von B-Lymphozyten aus. Mistellektine sind Glykoproteine mit 11% Kohlenhydratanteil, die in niedrigen Dosen immunmodulierend wirken, wobei die induzierte Freisetzung von Cytokinen eine zentrale Rolle spielt (Blaschek, 2004). Diese Beispiele zeigen, dass es (pflanzliche) Polymere gibt, die spezifisch an Rezeptoren immunkompetenter Zellen binden. Da die Ergebnisse der kompetitiven Fluoreszenzmarkierung CD4- und CD8-Rezeptoren auf Lymphozyten als mögliche Ziele des AGPs ausschließen, müssen weitere Untersuchungen zeigen, welche Rezeptoren oder Strukturen von Leukozyten bevorzugt AGP binden.

Als Fazit der immunologischen Tests und der Bindungsstudien bleibt festzuhalten, dass AGPs großen Anteil an der immunologischen Wirkung von Extrakten aus *Echinacea* haben dürften. Besonders stark aktiviert werden Makrophagen, die durch Sezernierung von Cytokinen die zelluläre und humorale Immunität verbessern. Strukturen, die AGP binden, befinden sich auf allen Leukozyten. Für die Zukunft gilt es, aufgestellte Theorien zur Struktur-Wirkungsbeziehung zu beweisen und Rezeptoren für die AGP-Bindung zu finden.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit empfiehlt sich für immunstimulierende *Echinacea*-Präparate eine Herstellung von AGP-reichen Extrakten und eine Standardisierung der Extrakte auf AGPs.

6. Zusammenfassung

Pflanzliche Immunstimulanzien enthalten häufig Extrakte der Pflanzengattung *Echinacea*. Als wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe werden neben niedermolekularen Kaffesäurederivaten und Alkamiden hochmolekulare Polysaccharide und Glykoproteine diskutiert.

In dieser Arbeit wurden aus den Wurzeln von *Echinacea pallida* Arabinogalactan-Proteine (AGPs) und ein Arabinan isoliert und strukturell charakterisiert. Das immunologische Potenzial dieser Verbindungen wurde *in vitro* an Mausmodellen getestet. Ein AGP aus *Echinacea purpurea* wurde auf die Fähigkeit zur Bindung an Leukozytenoberflächen getestet.

Aus einem wässrigen Extrakt der getrockneten Wurzeln von *Echinacea pallida* wurde ein hochmolekulares Substanzgemisch gewonnen. Niedermolekulare Bestandteile wurden durch Filtration und Dialyse abgetrennt, Proteine durch Aufkochen des Extraktes und anschließende Zentrifugation entfernt. Aus diesem hochmolekularen Substanzgemisch wurden AGPs mit dem β -D-Glucosyl-Yarivreagenz gefällt und isoliert, aus dem Überstand der Yarivfällung ein Arabinan.

Strukturelle Untersuchungen ergaben, dass es sich um ein hochmolekulares Glykoprotein (hydrodynamisches Volumen: ca. $1,1 \times 10^6$ Da) mit einem großen Polysaccharidteil (ca. 96%) und einem kleinem Proteinteil (4%) handelt. Eine Hydrolyse des AGPs mit 2M TFA, Reduktion, Acetylierung und anschließender gaschromatographischer Analyse zeigte, dass der Polysaccharidteil überwiegend aus Arabinose (37% m/m), Galactose (51%) und in kleineren Mengen Glc (7,9%) sowie anderen Zuckern (4,1%) besteht. Dabei nicht erfasste Uronsäuren des AGPs ergaben mit einer anderen Methode 6,2% (m/m).

Eine Bindungstypanalyse des AGPs mit anschließender gaschromatographischer Analyse, gekoppelt mit einem Massenspektrometer, zeigte, dass der Polysaccharidteil des AGPs hochverzweigt ist und aus terminaler Araf (29,4 mol%), 1,3,6-Galp (26,9%), 1,3-Galp (16,5%), 1,5-Araf (14,2%), 1,6-Galp (6,3%), 1-Glcp (4,2%) und 1-Galp (2,5%) besteht. Als Uronsäure wurde 1-GlcA identifiziert, O-glykosidisch mit 1,6-Gal verknüpft. Das innere „Backbone“ des Polysaccharidteils besteht wahrscheinlich aus einer Kette von 1,3-Gal, die mit einer 1,6-Gal endet. Von jeder zweiten 1,3-Gal zweigen in Position 6 Seitenketten ab, die aus 1,3,6-Gal und 1,6-Gal bestehen, die in 1,5-Ara und den aufgeführten terminalen Zuckern münden. 1-Glc-A, 1,5-Ara und die terminalen Zucker bilden die Peripherie des Moleküls.

Eine HPLC-Bestimmung mit Nachsäulenderivatisierung ergibt eine Zusammensetzung des Proteinteils aus hauptsächlich Hyp (17,3%), Ser (11,4%), Ala (9,6%), Thr (8,9%), Glu (8,6%), Asp (7,3%) und Gly (7,0%). Über Hyp, Ser und Thr könnte der Proteinteil mit den Polysaccharidketten verknüpft sein.

Das isolierte Arabinan hatte ein hydrodynamisches Volumen von $9,7 \times 10^5$ Da. Eine Bestimmung der Neutralzuckerzusammensetzungen ergab einen Anteil von 85,4% Arabinose. Die Bindungstypanalyse ergab, dass 1-Ara, 1,5-Ara und 1,3,5-Ara in fast equimolaren Mengen sowie terminale Glucose und Rhamnose in kleinen Mengen vorkamen. Es könnte sich um ein verzweigtes Arabinan mit einer Kette von 1,3-Ara handeln, wobei jede zweite Arabinose in Position 5 O-glykosidisch mit den genannten terminalen Zuckern verknüpft ist.

Immunpharmakologische Untersuchungen mit dem AGP zeigten eine verstärkte Proliferation von Milzzellen verschiedener Mausstämme sowie eine vermehrte IgM- und GM-CSF-Produktion. Besonders stark aktiviert wurden Maus-Makrophagen durch AGP, gemessen durch hohe Titer an Cytokinen (IL-1, IL-6, IFN- γ und TNF- α). Das Arabinan zeigte wesentlich schwächere Aktivität. Ein Vergleich der Aktivitäten von verschiedenen AGPs und verwandten Polymeren zeigte Unterschiede in der immunologischen Wirkung. Ein Vergleich der verschiedenen Strukturen ließ den Schluss zu, dass der Proteinteil sowie bestimmte terminale Zucker zur Stärke der immunologischen Wirkung der AGPs beitragen.

Als Zielstrukturen von AGPs wurden menschliche Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten ausgemacht. Durchflusszytometrische Untersuchungen mit einem AGP aus *Echinacea purpurea* und dagegen gerichteten Antikörpern zeigten eine konzentrationsabhängige Bindung des AGPs an die Zelloberflächen der genannten immunkompetenten Zellen. Dabei werden wahrscheinlich zunächst Strukturen mit hoher Affinität besetzt, bei höheren Konzentrationen kommt es zu einer unspezifischeren Bindung auf der Zelloberfläche. Als mögliche Rezeptoren für die Bindung konnten CD4 und CD8 ausgeschlossen werden.

Als Fazit dieser Arbeit bleibt festzuhalten, dass das strukturell erstmalig genau beschriebene AGP aus der Wurzel großen Anteil an der immunologischen Wirkung von Extrakten aus *E.pallida* hat. Auf zellulärer Ebene konnten Wechselwirkungen mit Leukozyten nachgewiesen werden. Die Interaktion könnte der Grund für die immunologische Aktivität sein. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, an welche Strukturen oder Rezeptoren das AGP bindet.

Bisherige wissenschaftliche Tätigkeit:

Publikationen:

Classen B., Nemetz J., Thude S., Wack M., Blaschek W., 2005:
Arabinogalactan-Proteine als Immunstimulanzien
DAZ 145(1), 53-56

Thude S., Classen B., 2005:
High molecular constituents from roots of *Echinacea pallida*:
An arabinogalactan-protein and an arabinan
Phytochemistry, akzeptiert

Thude S., Classen B., Blaschek W., Barz D., Thude H., 2005:
Binding studies of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea*
to leucocytes
Phytomedicine, akzeptiert

Thude S., Classen B., Blaschek W., Wack M., Bodinet C., 2005:
Immunomodulating effects of arabinogalactan-proteins from
Baptisia and *Echinacea*
Planta Med., eingereicht

Abstracts:

Thude S., Classen B., Wack M., Blaschek W., 2002:
Characterization of the protein-core of an arabinogalactan-protein from the roots of *Echinacea pallida* by a new gaschromatographic method
Barcelona 08.-12.09.2002, Society for Medicinal Plant Research, 50th Annual con-gress,
Revista de Fitoterapia 2, Supl.1, Sept. 2002, 222

Thude S., Wack M., Classen B., Bodinet C., 2003:
Stimulation of the cytokine and nitrite production in mouse macrophages:
A drug mixture versus different purified arabinogalactan-proteins
Kiel 31.08-04.09.2003, Society for Medicinal Plant Research, 51st Annual
congress, Book of Abstracts 147

Thude S., Wack M., Classen B., Bodinet C., 2003:
Stimulation von Zytokin- und Nitritproduktion: eine Drogenmischung gegen aufgereinigte
Arabinogalactan-Proteine
Würzburg, 08.10-11.10.2003, DPhG-Jahrestagung, Kurzfassungen
der Beiträge 115

7. Literaturliste

Adams G.A., 1965:

in: Whistler et al.: Methods in Carbohydrate Chemistry Vol.5
Academic Press, London, 209-276

Akiyama Y., Eda S., Kato K., 1984:

Gum arabic is a kind of arabinogalactan-protein
Agric. Biol. Chem. 48, 235-237

Alban S., Classen B., Brunner G., Blaschek W., 2002:

Differentiation Between the Complement Modulating Effects of an Arabinogalactan-Protein
from *Echinacea purpurea* and Heparin
Planta Med. 68, 1118-1124

Aspinall G.O., 1982:

Chemical characterization and structure determination of polysaccharides
In: Aspinall G.O., (Ed.): The polysaccharides Vol. 1, Academic Press, New York

Bacic A., Churms S.C., Stephen A.M., Cohen P.B., Fincher G.B., 1987:

Fine structure of the arabinogalactan-protein from *Lolium multiflorum*
Carbohydr. Res. 162, 85-93

Bacic A., 2003:

Herbal Arabinogalactan-(Proteins): Structure, Biosynthesis & Biological Function, Plant
Development and Industrial Use
51st Annual congress of the Society for Medical Plant Research, Kiel, Plenary Lecture

Bauer R., Wagner H., 1987:

Neue Ergebnisse zur Analytik von *Echinacea*-Wurzeln
Sci. Pharm. 55, 159-161

Bauer R., Jurcic K., Puhmann J., Wagner H., 1988:

Immunologische in vivo- und in vitro-Untersuchungen mit *Echinacea*-Extrakten
Drug Res. 38, 276-281

Bauer R., Khan I.A., Wagner H., 1988:

TLC and HPLC Analysis of *Echinacea pallida* and *Echinacea angustifolia*
Planta Med. 54, 426-430

Bauer R., Remiger P., Wagner H., 1988:

Echinacea – Analyse der Herba-Drogen
DAZ 128, 174-180

Bauer R., Remiger P., Jurcic K., Wagner H., 1989:

Beeinflussung der Phagozytose-Aktivität durch *Echinacea*-Extrakte
Z. Phytotherapie 10, 43-48

Bauer R., Wagner H., 1990:

Echinacea – Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

Beuscher N., Kopanski L., Ernwein C., 1988:

Modulation of Immune Response by Polymeric Substances from *Baptisia tinctoria* and
Echinacea angustifolia
Adv. Biosci. 68, 329-336

Beuscher N., Scheit K.H., Bodinet C., Kopanski L., 1989:

Immunologisch aktive Glykoproteine aus *Baptisia tinctoria*
Planta Med. 55:358-363

Beuscher N., Bodinet C., Willigmann I., Egert D., 1995:

Immunmodulierende Eigenschaften von Wurzelextrakten verschiedener *Echinacea*-Arten
Z. Phytotherapie 16, 157-166

Beutler B.A., 2004:

Wie Säugetiere Infektionen spüren: die zukunftsweisende genetische Analyse der
angeborenen Immunität
Robert-Koch-Vorlesung, Verleihung des Robert-Koch Preises, Berlin

Blakeney A.B., Harris P.J., Henry R.J., Stone B.A., 1983:

A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis.
Carbohydr. Res. 113, 291-299

Blaschek W., 1991:

Isolierung und Analytik von Polysacchariden.
In: Franz (Ed.): Polysaccharide. Springer-Verlag, New York.

Blaschek W., 2004:

Mistelpräparate
In: Bruhn, H.D., Fölsch U.R., Kneba M., Löffler H.; (Eds.): Onkologische Therapie
Schattauer, Stuttgart

Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G., 1973:

New method for quantitative determination of uronic acids.
Anal. Biochem. 54, 484-489

Bodinet C., 1999:

Immunpharmakologische Untersuchungen an einem pflanzlichen Immunmodulator
Dissertation, Greifswald

Bodinet C., Lindequist U., Teuscher E., Freudenstein J., 2004:

Influence of Peroral Application of the Antibody Production of Peyer's Patches Cells
Drug Res. 54(2), 114-18

Bräunig B., Dorn M., Knick E., 1992:

Echinaceae purpureae radix: zur Stärkung der körpereigenen Abwehr bei grippalen Effekten
Z. Phytotherapie 12, 7-13

Brinkeborn R.M., Shad D.V., Degenring F.H., 1999:

Echinaforce and other Echinacea fresh plant preparations in the treatment of the common cold
Phytomedicine 6(1), 1-5

Chen C.G., Mau S.L., Clarke A.E., 1993:

Nucleotide sequence and style-specific expression of a novel proline-rich protein gene from
Nicotiana glauca
Plant. Mol. Biol. 21, 391-395

Clarke A.E., Anderson R.L., Stone B.A., 1979:

Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins
Phytochemistry 18, 521-540

Classen B., Witthohn K., Blaschek W., 2000:

Characterization of an arabinogalactan-protein isolated from pressed juice of *Echinacea purpurea* by precipitation with the β -glucosyl Yariv reagent.
Carbohydr. Res. 327, 497-504

Classen B., Blaschek W., 2002:

An Arabinogalactan-Protein from Cell Culture of *Malva sylvestris*
Planta Med. 68, 232-236

Classen B., Csavas M., Borbas A., Dingermann T., Zündorf I., 2004:

Monoclonal antibodies against an Arabinogalactan-Protein from pressed juice of *Echinacea purpurea*
Planta Med. 70, 861-865

Classen B., Mau S-L., Bacic A., 2005:

The arabinogalactan-proteins from pressed juice of *Echinacea purpurea* belong to the "hybrid" class of hydroxyproline-rich glycoproteins.
Planta Med. 71, 1-8

D'Amelio F.S., 1999:

Botanicals – A Phytocosmetic Desk Reference
CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, 95-99

Diallo D., Paulsen B.S., Liljeback T.H., Michaelsen T.E., 2003:

The malian medicinal plant *Trichilia emetica*: studies on polysaccharides with complement fixing ability.
J. Ethnopharmacol. 84, 279-287

Dingermann T., Loew D., 2003:

Phytopharmakologie
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart mbH, 195-201

Dorn M., 1990:

Milderung grippaler Effekte durch ein pflanzliches Immunstimulans
Natur- und Ganzheitsmedizin 2, 314-319

Fincher G.B., Stone B.A., Clarke A.E., 1983:

Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function
Annu. Rev. Plant Physiol. 34, 47-70

Flippi M.J., Panneman H., van der Veen P., Visser J., de Graaff L.H., 1993:

Molecular cloning, expression and structure of the endo-1,5-alpha-L-arabinase gene of
Aspergillus niger
Appl. Microbiol. Biotechnol. 40(2-3), 318-326

Fontaine T., Fournet B., Karamanos Y., 1994:

A new procedure for the reduction of uronic acid containing polysaccharides.
J. Microbiol. Methods 20, 149-157

Fox A., Morgan S.L., Gilbert J., 1989:

Preparation of alditol acetates and their analysis by gas chromatography (GC) and mass
spectrometry (MS)
In: Biermann C.J., Mc Ginnis G.D. (eds): Analysis of carbohydrates by GLC and MS CRC
Press, Boca Raton

Frohne, D., 2002:

Heilpflanzenlexikon, 7.Auflage
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Gane A.M., Craik D., Munro S.L., Howlett G.J., Clarke A.E., Bacic A., 1995:

Structural analysis of the carbohydrate moiety of arabinogalactan-proteins from stigmas and
styles of *Nicotiana glauca*.
Carbohydr. Res. 277, 67-85

Gebert A., Rothkötter H.J., Pabst R., 1996:

M cells in Peyer's patches of the intestine
Int. Rev. Cytol. 167, 91-159

Gertsch J., Schoop R., Kuenzle U., Suter A., 2004:

Echinacea alkylamides modulate TNF- α gene expression via cannabinoid receptor CB $_1$ and
multiple signal transduction pathways
FEBS Letters 577(3), 563-569

Gilmore M.R., 1919:

Uses of Plants by the Indians of the Missouri River Region
Bureau of American Ethnology, Annual report 33

Gleeson P.A., Clarke A.E., 1979:

Structural studies on the major component of Gladiolus style mucilage, an arabinogalactan-protein
Biochem. J. 181, 607-621

Gleeson P.A., Jermyn M.A., 1979:

Alteration in the composition of β -lectins caused by chemical and enzymic attack
Aust. J. Plant Physiol. 6, 25-38

Gleeson P.A., McNamara M., Wettenhall R.E., Stone B.A., Fincher G.B., 1989:

Characterization of the hydroxyproline-rich protein core of an arabinogalactan-protein secreted from suspension-cultured *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass) endosperm cells.
Biochem. J. 264, 857-862

Glode L.M., Scher I., Osborne B., Rosenstreich D.L., 1976:

Cellular mechanism of endotoxin unresponsiveness in C3H/HeJ mice
J. Immunol. 116(2), 454-461

Goel V., Lovlin R., Barton R., Lyon M.R., Bauer R., Lee T.D.G., Basu T.K., 2004:

Efficacy of a standardized Echinacea preparation (Echinilin) for the treatment of the common cold: a randomized, double-blind, placebo controlled trial
J.Clin. Pharm. and Therap. 29(1), 75-83

Goycoolea F.M., Calderon de la Barca A.M., Hernandez G., Valenzuela J.R., Balderrama J.R., 2000:

Immunochemical, Structural and Functional Properties of Mesquite Gum Compared with Gum Arabic
in: Nothnagel E.A., Bacic A., Clarke A.E., (Eds): Cell and Developmental Biology of Arabinogalactan-Proteins, 263-276, Kluwer Academic

Green S.J., Aniagolu J., Raney J.J., 1997:

Current Protocols in Immunology
Coligan J.E., Kruisbeck A.M., Margulies D.H., Shevach E.M., Stroeber E., (Eds.), John Wiley & Sons, New York , 14.5.1-14.5.11

Harris P.J., Henry R.J., Blakeney A.B., Stone B.A., 1984:

An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides.
Carbohydr. Res. 127, 59-73

Hart J.A., 1981:

The Ethnobotany of the Northern Cheyenne Indians of Montana
J. Ethnopharmacy 4, 1-55

Hashimoto Y., 2000:

Structure and Biosynthesis of L-Fucosylated Arabinogalactan-Proteins in Cruciferous Plants
in: Nothnagel E.A., Bacic A., Clarke A.E., (Eds): Cell and Developmental Biology of Arabinogalactan-Proteins, 51-60, Kluwer Academic

Hayden F.V., 1859:

Botany
Report of Secretary of War 738

Heintzer F., Chavanne M., Meusy J.-P., Maitre H.-P., Giger E., Baumann T.W., 1988:

Ein Beitrag zur Klassifizierung der therapeutisch verwendeten Arten der Gattung *Echinacea*
Pharm. Acta Helv. 63, 132-136

Hentschel C., Schnitker J., Kohnen R., Köhler G., Lindauer I., Henneicke-von Zeppelin H.H., 2000:

Akute virale Atemwegsinfekte: Wirksamkeit und Sicherheit eines phytotherapeutischen Kombinationspräparats in der Erkältungsbehandlung
Fortschritte der Medizin 118, 25-33

Hoheisel O., Sandberg M., Bertram S., Bulitta M., Schäfer M., 1997:

Echinagard treatment shortens the course of common cold: a double blind placebo controlled clinical trial
Eur. J. Clin. Res. 9, 261-268

Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M., 2002:

Immunologie, 5.Auflage
Spektrum, Akad. Verlag

Jermyn M.A., Yeow Y.M., 1975:

A class of lectins present in the tissues of seed plants
Aust. J. Plant Physiol. 2, 501-531

Jones L., Milne J.L., Ashford D., McQueen-Mason J., 2003:

Cell wall arabinan is essential for guard cell function
Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 11783-11788

King J., Newton R.S., 1852:

The Eclectic Dispensatory of the United States
H.W. Derby and Co, Cincinnati, 351

Komalavilas P., Zhu J.K., Nothnagel E.A., 1991:

Arabinogalactan-proteins from the suspension culture medium and plasma membrane of rose cells
J. Biol. Chem. 266, 15956-65

Kraus J., 1991:

Water soluble Polysaccharides from *Ginkgo biloba* leaves
Phytochemistry 30(9), 3017-3020

Kreuger M., van Holst G.J., 1995:

Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L.
Planta 197, 135-141

Kreuger M., van Holst G.J., 1996:

Arabinogalactan-proteins and plant differentiation
Plant mol. Biol. 30, 1077-1086

Laasonen M., Harmia-Pulkkinen T., Simard, C.L., Michiels E., Raesanen M., Vuorela H., 2002:

Fast identification of *Echinacea purpurea* dried roots using near-infrared spectroscopy
Anal. Chem. 74(11), 2493-2499

Laasonen M., Wennberg T., Harmia-Pulkkinen T., Vuorela H., 2002:

Simultaneous analysis of alkalamides and caffeic acid derivatives for the identification of *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia*, *Echinacea pallida* and *Parthenium integrifolium* roots.
Planta Med. 68(6), 572-574

Lehmann J., 1976:

Chemie der Kohlenhydrate – Monosaccharide und Derivate
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 55

Lloyd J.U., 1904:

The History of *Echinacea angustifolia*
Pharm. Review 22, 9-14

Lloyd J.U., 1917:

A Treatise on *Echinacea angustifolia*
Drug Treatise No. XXX

Lohmann-Matthes M.L., Wagner H., 1989:

Aktivierung von Makrophagen durch Polysaccharide aus Gewebekulturen von *Echinacea purpurea*
Z. Phytotherapie 10, 52-59

Mc Gregor R.L., 1968:

The Taxonomy of the Genus *Echinacea* (Compositae)
The University of Kansas Science Bulletin 48, 113-142

Miao B., Geng M.J., Li J., Li F., Chen H., Guan H., Ding J., 2004:

Sulfated polymannuronate, a novel anti-acquired immune deficiency syndrome (AIDS) drug candidate, targeting CD4 in lymphocytes
Biochem. Pharmacol. 68(4), 641-649

Muller-Jakic B., Breu W., Probstle A., Redl K., Greger H., Bauer R., 1994:

In vitro inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase by alkalamides from *Echinacea* and *Achillea* species
Planta Med. 60(1), 37-40

Navarro A.D., Cerezo A.S., Stortz C.A., 2002:

NMR spectroscopy and chemical studies of an arabinan-rich system from the endosperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*.
Carbohydr. Res. 337, 255-263

Nieri P., Adinolfi B., Morelli I., Breschi M.C., Simoni G., Martinotti E., 2003:

Genetic characterization of the three medicinal Echinacea species using RAPD analysis
Planta Med. 69(7), 685-686

Nemetz J., 2004:

Untersuchungen zu Inhaltsstoffen von *Rudbeckia hirta* sowie zu deren immunmodulatorischer Wirkung und Bioverfügbarkeit
Dissertation, Kiel

Nothnagel E.A., Bacic A., Clarke A.E., 1997:

Cell and Developmental Biology of Arabinogalactan-Proteins
Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York

Nothnagel, E. A., 1997:

Proteoglycans and related components in plant cells
Int. Rev. Cyt. 174, 195-291

Otterlei M., Sundan A., Skjak-Braek G., Ryan L., Smidrod O., Espevik T., 1993:

Similar mechanism of action if defined polysaccharides and lipopolysaccharides: characterization of binding and tumor necrosis factor alpha induction
Inf. Immun. 61(5), 1917-1925

Oxley D., Bacic A., 1999:

Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an Arabinogalactan-protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 14246-14251

Raffael A., Nebe Th., Valet G., 1994:

Grundlagen der Durchflusszytometrie
In: Schmitz G., Rothe G., (Eds.), Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik
Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart

Remiger P., 1989:

Zur Chemie und Immunologie neuer Alkylamide und anderer Inhaltsstoffe aus *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* und *Echinacea pallida*
Dissertation, München

Roesler J., Steinmüller C., Kiderlein A., Emmendorffer A., Wagner H., Lohmann Matthes M.L., 1991:

Application of purified Polysaccharades from Cell cultures of the Plant *Echinacea purpurea* to mice mediates Protection against systemic infections with *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans*
Int. J. Immunopharmac. 13(1), 27-37

Roesler J., Emmendörffer A., Steinmüller C., Luettig B., Wagner H., Lohmann Matthes M.L., 1991:

Application of purified Polysaccharides from Cell cultures of the Plant *Echinacea purpurea* to Test subjects mediates Activation of the Phagocyte System

Int. J. Immunopharmacol. 13(7), 931-941

Roy S., Jauh G.Y., Hepler P.K., Lord E.M., 1998:

Effects of Yarov phenylglycosides on cell wall assembly in the lily pollen tube

Planta 204, 450-458

Sakurai M.H., Matsumoto, T., Kiyohara H., Yamada H., 1996:

Detection and tissue distribution of anti-ulcer pectic polysaccharides from *Bupleurum falcatum* by polyclonal antibody

Panta Med. 62(4), 341-346

Saulnier L., Brillouet J.M., Moutounet M., du Penhoat C.H., Michon V., 1992:

New investigations of the structure of grape arabinogalactan-proteins

Carbohydr. Res. 224, 219-235

Schicke B., Hagels H., Freudenstein J., Waetzig H., 2004:

A sensitive TLC method to identify Echinaceae pallidae radix

Pharmazie 59(8), 608-611

Schindler T., Bergfeld R., Schopfer P., 1995:

Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth

Plant J. 7, 25-36

Schmidt U., Albrecht M., Schenk N., 1990:

Pflanzliches Immunstimulans senkt Häufigkeit grippaler Effekte

Natur- und Ganzheitsmedizin 3, 277-281

Schöpf J.D., 1787:

Materia medica americana potissimum regni vegetabilis

Erlangen, 127

Schwarz E., Metzler J., Diedrich J.P., Freudenstein J., Bode C., Bode J.C., 2002:

Oral administration of freshly expressed juice of *Echinacea purpurea* herbs fail to stimulate the nonspecific immune response in healthy young men: results of a double-blind, placebo-controlled crossover study

J. Immunotherapy 25(5) 413-420

Serpe M.D., Nothnagel E.A., 1994:

Effects of Yarov phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation

Planta 193: 542-550

Shevach E.M., 1997:

Current Protocols in Immunology

Coligan J.E., Kruisbeck A.M., Margulies D.H., Shevach, E.M., Stroeber W., (Eds.)
John Wiley & Sons, New York, S. A.3D.1

Siddiqui I.R., Emery, J.P., 1990:

Studies on vegetables. Investigation of an arabinan from parsnik (*Pastinica sativa*)
J. Agric. Food Chem. 38, 387-389.

Sims I.M., Bacic A., 1995:

Extracellular polysaccharides from suspension cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*
Phytochemistry 38, 1397-1405

Stevens B.J., Selvendran R.R., 1980:

Structural investigation of an arabinan from cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*)
Phytochemistry 19, 559-561

Swamy N.R., Salimath P.V., 1991:

Arabinans from *Cajanus* *Cajan* cotyledon.
Phytochemistry 30, 263-265

Tan L., Qiu F., Lamport D.T., Kieliszewski M.J., 2004:

Structure of a Hydroxyproline (Hyp)-Arabinogalactan Polysaccharide from
Repetitive Ala-Hyp Expressed in Transgenic *Nicotiana tabacum*,
J. Biol. Chem. 279, 13156-13165

Taylor R.L., Conrad H.E., 1972:

Stoichiometric depolymerisation of polyuronides and glycosamino-glycuronans to
monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups.
Biochemistry 11, 1383-1388

Taylor J.A., Weber W., Standish L., Quinn H., McGann M., Calabrese C., 2003:

Efficacy and safety in treating upper respiratory tract infections in children. A randomized
trial
J. American Medical Association 290(21), 2823-2830

Tsumuraya Y., Hashimoto Y., Yamamoto S., 1987:

An L-arabino-D-galactan and an L-arabino-D-galactan containing proteoglycan from radish
(*Raphanus sativus*) seeds
Carbohydr. Res. 161, 113-126

U.S.D.A. 1982:

National List of Scientific Plant names
Vol. 1, Wahington

van den Tweel J.G., 1999:

Immunologie-Das menschliche Abwehrsystem
Spektrum, Akad. Verlag

Wack M., 2004:

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

Wagner H., Proksch A., Riess-Maurer I., Vollmar A., Odenthal S., Stuppner H., Jurcic K., Le Turdu M., Fang I.N., 1985:

Immunstimulierend wirkende Polysaccharide aus höheren Pflanzen
Drug Res. 35, 1069-1075

Wedel W.R., 1936:

An Introduction to Pawnee Archeology
Bureau of American Ethnology, Bulletin 112, 59

Wichtl et al., 2002:

Teedrogen und Phytopharmaka, 4.Auflage
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Willats W.G., Knox J.P., 1996:

A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of β -glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*
Plant J. 9, 919-925

Woods E.F., Liley G.G., Jermyn M.A., 1978:

The self-association of glycosyl phenylazo dyes (Yariv antigens)
Aust. J. Chem. 31, 2225-2238

Yamada H., Ra K.S., Kiyohara H., Cyong J.C., Otsuka Y., 1988:

Characterization of anti-complementary neutral polysaccharides from the roots of *Bupleurum falcatum*
Phytochemistry 27, 3163-3168

Yariv J., Rapport M.M., Graf L., 1962:

The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides.
Biochem. J. 85, 383-388

Zhao Q.C., Kiyohara H., Yamada H., 1994:

Anti-complementary neutral polysaccharides from leaves of *Artemisia princeps*
Phytochemistry 35, 73-77

Zhu J.K., Bressan R.A., Hasegawa P.M., 1993:

Loss of arabinogalactan-proteins from the plasma membrane of NaCl-adapted tobacco cells
Planta 190, 221-226

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. W. Blaschek
am Institut für Pharmazeutische Biologie der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel angefertigt.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W. Blaschek, danke ich für das Überlassen des interessanten und unerschöpflichen Themas sowie für die Freiheit, am Institut uneingeschränkt und selbständig arbeiten zu können. Seine kritische Denkweise und wissenschaftliche Hilfestellung haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. E. Maser danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. Birgit Classen für die ausführliche Einführung in das Thema, ihre Hilfsbereitschaft und kompetente Unterstützung beim Schreiben der Veröffentlichungen.

Meinen Kollegen und Freunden Jörn, Kathrin und Maren danke ich für die an Kompetenz nicht zu überbietenden Fachgespräche über Fußball, eine schöne Münchenfahrt, etliche zusammen gewonnene Fußballspiele, abendliche Diskussionen über den (Un)Sinn der Promotion, gemeinsame Depressionen und Highlights des Doktorandendaseins und nette Pausen in der Teeküche.

Herrn Kalle Bock danke ich für die vorbildliche Wartung und Reparatur der Laborgeräte und seine verlässlichen Auskünfte, welcher Fisch gerade wo am besten zu fangen ist.

Für die Blumenkrantzbestimmungen danke ich Helle Lund. Ihre Freundlichkeit und Fürsorge wird mir in guter Erinnerung bleiben.

Frauke Rodde danke ich für die fleißige Unterstützung im Praktikum und die erheiternden Gespräche im und über das Praktikum.

Frau Kirsten Signus danke ich für die stets glänzenden Laborutensilien.

Den Gärtnern Carsten thor Straten und Dietrich Christiansen danke ich für die fachkundigen botanischen Auskünfte während der Entspannungsspaziergänge im Garten.

Frau Dr. Cornelia Bodinet, Mitarbeiterin der Firma Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG, möchte ich für die Durchführung der immunologischen Testungen danken.

Herrn Dr. Uli Girresser danke ich für die Aufnahme von GC-MS- und NMR-Spektren. Trotz großen Misstrauens gegenüber dem „Klebszeug“ war er immer sehr hilfsbereit.

Dem Arbeitskreis und Frau Heidi Blaschek danke ich für die freundliche Aufnahme und die familiäre Atmosphäre. Unvergessen werden die Weihnachtsfeiern, Betriebsausflüge und die Sommerabende bei einem leichten Weißwein bleiben.

Besonders danken möchte ich auch meiner Familie:

Meinem Bruder Hansjörg danke ich für viele inspirierende Gespräche und die vermittelte Begeisterung für die Naturwissenschaften. Die gemeinsam erzielten Ergebnisse aus Jena bilden einen zentralen Teil der Arbeit. Meiner Schwester Christiane danke ich dafür, dass sie mir immer wieder zeigt, dass es weitaus wichtigere Dinge als die Pharmazie gibt. Meiner Frau Marina danke ich für ihre Liebe, ihre Geduld und ihr Verständnis. Für die großzügige Unterstützung in allen Lebenslagen, die mir unter anderem das Studium ermöglicht hat, danke ich meinen Eltern ganz herzlich.

Persönliche Daten:

Name: Sebastian Thude
Geburtsdatum: 01.01.1975
Geburtsort: Hannover
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

1987- 1994 Gymnasium Misburg

Zivildienst:

1994 -1995 Blindenverband Niedersachsen

Hochschulausbildung:

1995- 2000 Pharmaziestudium an der Christian-Albrechts-Universität zu
Kiel
Abschluss: 2.Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2000 -2001 Pharmaziepraktikum
Allgemeines Krankenhaus St. Georg, Hamburg
Brunnenapotheke, Hamburg
Abschluss: 3.Abschnitt der Pharmazeutische Prüfung
08/2001 Approbation als Apotheker

Promotion:

seit 09/2001 Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter 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 zu 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.

Kiel, den 10.03.2005

Sebastian Thude