

**Analytische Untersuchungen  
zu Polysacchariden aus  
*Viscum album* L.**



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

vorgelegt von  
**Bernadette Margot Herbst**

Kiel 2008

Referent:

Prof. Dr. W. Blaschek

Korreferent:

Prof. Dr. E. Maser

Tag der mündlichen Prüfung:

4.11.2008

Zum Druck genehmigt: Kiel,

4.11.2008

Prof. Dr. Lutz Kipp  
(Dekan)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Mistel .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1.1	Taxonomie und Botanik .....	- 1 -
1.1.2	Historische Einordnung und Verwendung .....	- 4 -
1.1.3	Inhaltsstoffe und ihre Wirkungen .....	- 6 -
1.1.3.1	Polysaccharide.....	- 7 -
1.1.3.2	Lektine.....	- 8 -
1.1.3.3	Viscotoxine.....	- 9 -
1.1.4	Mistelextrakte und deren Anwendung in der adjuvanten Krebstherapie .....	- 10 -
<b>1.2</b>	<b>Arabinogalactan-Proteine .....</b>	<b>- 11 -</b>
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>- 15 -</b>
<b>2.1</b>	<b>Methoden zur Extraktion und Isolierung .....</b>	<b>- 15 -</b>
2.1.1	Extraktherstellung aus Mistelkraut .....	- 15 -
2.1.1.1	Herstellung eines Kaltextrakts .....	- 15 -
2.1.1.2	Herstellung eines Heißextrakts .....	- 16 -
2.1.2	Extraktherstellung aus Mistelbeeren.....	- 16 -
2.1.3	Synthese des $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenzes .....	- 18 -
2.1.4	Fällung der AGPs mit dem $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz .....	- 19 -
2.1.5	Arabinan-Isolierung aus dem Überstand der Yariv-Fällung.....	- 20 -
2.1.5.1	Fraktionierte Arabinan-Isolierung.....	- 20 -
2.1.5.2	Unfraktionierte Arabinan-Isolierung .....	- 21 -
<b>2.2</b>	<b>Methoden der Chemie und Chromatographie .....</b>	<b>- 22 -</b>
2.2.1	Geldiffusionstest.....	- 22 -
2.2.2	Keimzahlbestimmung.....	- 22 -
2.2.3	Antioxidative Testungen.....	- 23 -
2.2.3.1	Lipophile Substanzen.....	- 23 -
2.2.3.2	Hydrophile Substanzen (Rechner, 2004).....	- 24 -
2.2.4	Acetylierung .....	- 25 -
2.2.4.1	Bestimmung des Responsefaktors für die Acetylierung .....	- 26 -
2.2.5	Uronsäure-Bestimmung nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973).....	- 27 -

# Inhaltsverzeichnis

---

2.2.6	Uronsäure-Reduktion nach Taylor und Conrad (1972).....	- 28 -
2.2.7	Konduktometrische Uronsäure-Bestimmung .....	- 28 -
2.2.8	Partialhydrolyse nach Gleeson und Clarke (1979) .....	- 29 -
2.2.9	Methylierungsanalyse nach Harris <i>et al.</i> (1984) .....	- 30 -
2.2.10	Aminosäureanalytik.....	- 33 -
2.2.10.1	Kraut-AGP .....	- 33 -
2.2.10.2	Beeren-AGP .....	- 34 -
2.2.11	Aufarbeitung von Mistellektin zu Vergleichszwecken .....	- 34 -
2.2.12	Gelpermeationschromatographie (GPC) .....	- 35 -
2.2.12.1	Sephacryl S-400 Säule .....	- 35 -
2.2.12.2	PL-GPC-50 plus .....	- 37 -
<b>2.3</b>	<b>Methoden der Immunologie .....</b>	<b>- 39 -</b>
2.3.1	ELISA .....	- 39 -
2.3.1.1	Kompetitiver ELISA .....	- 39 -
2.3.1.2	Indirekter ELISA .....	- 41 -
2.3.2	Entfernung von Endotoxinen.....	- 43 -
2.3.3	Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test .....	- 43 -
2.3.4	Lipopeptid-Entfernung.....	- 44 -
2.3.5	Testung der AGPs auf Kontamination mit Mistellektinen.....	- 44 -
2.3.6	Entfernung von Lektinen in den AGP-Präparationen durch Pronase-Behandlung .....	- 45 -
2.3.7	Aktivitätstestung an Toll-Like-Rezeptoren .....	- 45 -
2.3.8	Immunfluoreszenz-Markierung .....	- 46 -
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>- 50 -</b>
<b>3.1</b>	<b>Isolierung und Analytik .....</b>	<b>- 50 -</b>
3.1.1	Isolierungsgang und Extrakt-Ausbeuten.....	- 50 -
3.1.1.1	Mistelkraut.....	- 50 -
3.1.1.2	Mistelbeeren.....	- 51 -
3.1.2	Geldiffusionstest.....	- 51 -
3.1.2.1	Mistelkraut.....	- 51 -
3.1.2.2	Mistelbeeren.....	- 53 -
3.1.2.3	Vergleich Mistelbeeren und Mistelkraut.....	- 53 -
3.1.3	Keimzahlbestimmung.....	- 54 -
3.1.4	Antioxidative Testungen.....	- 55 -
3.1.4.1	Lipophile Substanzen.....	- 55 -
3.1.4.2	Hydrophile Substanzen.....	- 56 -
3.1.5	Neutralzucker-Zusammensetzung der einzelnen Extrakt-Fractionen.....	- 57 -

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.5.1	Mistelkraut.....	- 57 -
3.1.5.2	Mistelbeeren.....	- 62 -
3.1.6	Neutralzucker-Zusammensetzung der AGPs .....	- 64 -
3.1.6.1	Mistelkraut.....	- 64 -
3.1.6.2	Mistelbeeren.....	- 67 -
3.1.7	Neutralzucker-Zusammensetzung der Überstände der Yariv-Fällungen .....	- 70 -
3.1.7.1	Mistelkraut.....	- 70 -
3.1.7.2	Mistelbeeren.....	- 73 -
3.1.8	Neutralzucker-Zusammensetzung der Arabinane .....	- 75 -
3.1.8.1	Fraktionierte Arabinan-Isolierung aus Mistelkraut .....	- 75 -
3.1.8.2	Unfraktionierte Arabinan-Isolierung .....	- 77 -
3.1.8.2.1	Mistelkraut.....	- 77 -
3.1.8.2.2	Mistelbeeren.....	- 79 -
3.1.9	Uronsäure-Bestimmung nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973).....	- 83 -
3.1.10	Uronsäure-Reduktion nach Taylor und Conrad (1972).....	- 84 -
3.1.10.1	Mistelkraut.....	- 85 -
3.1.10.2	Mistelbeeren.....	- 86 -
3.1.11	Konduktometrische Uronsäure-Bestimmung .....	- 86 -
3.1.12	Partialhydrolyse.....	- 88 -
3.1.12.1	Mistelkraut.....	- 88 -
3.1.12.2	Mistelbeeren.....	- 90 -
3.1.13	Bestimmung der Bindungstypen .....	- 93 -
3.1.13.1	Mistelkraut.....	- 95 -
3.1.13.1.1	AGP und Derivate .....	- 95 -
3.1.13.1.2	Arabinan.....	- 101 -
3.1.13.2	Mistelbeeren.....	- 104 -
3.1.14	Aminosäureanalytik.....	- 114 -
3.1.14.1	Kraut-AGP .....	- 114 -
3.1.14.2	Beeren-AGP .....	- 115 -
3.1.15	Gelpermeationschromatographie.....	- 116 -
3.1.15.1	Sephacryl S-400 Säule .....	- 116 -
3.1.15.2	PL-GPC-50 plus .....	- 118 -
<b>3.2</b>	<b>Immunologie .....</b>	<b>- 122 -</b>
3.2.1	ELISA .....	- 122 -
3.2.1.1	Kompetitiver ELISA .....	- 122 -
3.2.1.1.1	Polyklonale Antikörper .....	- 122 -
3.2.1.1.2	Monoklonaler Antikörper .....	- 124 -
3.2.1.2	Indirekter ELISA .....	- 130 -

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.2	Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test .....	- 131 -
3.2.2.1	Mistelkraut.....	- 131 -
3.2.2.2	Mistelbeeren.....	- 132 -
3.2.3	Testung auf Kontamination mit Mistellektinen .....	- 134 -
3.2.4	Entfernung von Lektinen in den AGP-Präparationen durch Pronase-Behandlung .....	- 135 -
3.2.4.1	Gelpermeationschromatographie der Kraut-AGP-Präparation nach Pronase-Behandlung .....	- 135 -
3.2.4.2	LAL-Test der Kraut-AGP-Präparation nach Pronase-Behandlung .....	- 136 -
3.2.5	Geldiffusionstest vor der Testung an Toll-Like-Rezeptoren.....	- 138 -
3.2.5.1	Kraut-AGP-Präparation vor und nach Pronase-Behandlung.....	- 138 -
3.2.5.2	Kraut-AGP-Präparation vor und nach Pronase-Behandlung, Endotoxin-Entfernung und Lipopeptid-Entfernung.....	- 139 -
3.2.6	Aktivitätstestung an Toll-Like-Rezeptoren .....	- 140 -
3.2.6.1	TLR 4 .....	- 140 -
3.2.6.2	TLR 2 .....	- 143 -
3.2.7	Immunfluoreszenz-Markierung .....	- 146 -
<b>4</b>	<b>DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....</b>	<b>- 153 -</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>- 181 -</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>- 182 -</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>- 183 -</b>

**LEBENS LAUF**

**ERKLÄRUNG**

## Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
AGP	Arabinogalactan-Protein
alk.	alkalisch
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dem.	Aqua demineralisata
Borax	Dinatriumtetraborat
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CLSM	Konfokales-Laser-Raster-Mikroskop
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)-octan
Dim syl-	Dimethylsulfinyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	N,N-Diphenyl-N'-(2,4,6-trinitrophenyl)-hydrazyl
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
EU	Endotoxin-Units (Endotoxin-Einheiten)
FID	Flammenionisationsdetektor
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GLC	Gas-Liquid Chromatography/Chromatogram
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
GPC	Gelpermeationschromatographie/-chromatogramm
HCl	Salzsäure
HEK	Human-Embryonic-Kidney
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC50	Konzentration, bei der eine Hemmung von 50% erfolgt
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
KBE	koloniebildende Einheiten
kDa	Kilo-Dalton
KSE	Kontroll-Standard-Endotoxin
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LPS	Lipopolysaccharid
MALLS	Multi-Angle-Laser-Light-Scattering
ML	Mistellektin

## Abkürzungsverzeichnis

---

MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
MWCO	molecular weight cut off (Molekulargewichtsausschlussgrenze)
NaCl	Natriumchlorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaNO <sub>2</sub>	Natriumnitrit
NaNO <sub>3</sub>	Natriumnitrat
NaOH	Natriumhydroxid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	pathogen associated molecular pattern (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PMAA	partiell methyliertes Alditolacetat
PTH	Phenylthiohydantoin
RI	Refraktionsindex
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEAC	Trolox-Equivalent-Antioxidative-Capacity
TFA	Trifluoressigsäure
TFF	Tangentialflussfiltration
TIC	Totalionenchromatogramm
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
US	Uronsäure
US-Red.	Uronsäure-Reduktion



## Aminosäuren

Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asx	Asparagin/-säure
Cys	Cystein
Glx	Glutamin-/säure
Gly	Glycin
His	Histidin
Hpro	Hydroxyprolin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

## Monosaccharide

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

### Extraktbezeichnungen

K I	Krautextrakt I
K IIa	Heißextrakt von K II
B I	Beerenextrakt I
Fil TFF	Filtrat der Tangentialflussfiltration
Ret TFF	Retentat der Tangentialflussfiltration
Ret Dia	dialysiertes Retentat der Tangentialflussfiltration
YF 1	Yariv-Fällung 1
YF 1 R	Rückstand von YF 1 = AGP
YF 1 Ü	Überstand von YF 1
YF 1 Ü 80 % EtOH R	Rückstand der 80 %igen EtOH-Fällung vom Überstand von YF 1
YF 1 Ü 80 % EtOH Ü	Überstand der 80 %igen EtOH-Fällung vom Überstand von YF 1 = Arabinan
USR	Uronsäure-Reduktion
PR	Partialhydrolyse-Rückstand
PÜ	Partialhydrolyse-Überstand
AGP B	AGP aus Mistelbeeren
AGP E	AGP aus <i>Echinacea purpurea</i>
AGP K	AGP aus Mistelkraut

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Die Mistel

### 1.1.1 Taxonomie und Botanik

Die weißbeerige Mistel (*Viscum album* L.) bzw. die gesamte Gattung *Viscum* wurde früher häufig zusammen mit der Gattung *Loranthus*, zu der die Eichenmistel (*Loranthus europaeus*) zählt, in die Familie der Loranthaceae eingeordnet. Mitte des 19. Jahrhunderts wurde das Zweifamilienkonzept und somit die Trennung in Loranthaceae und Viscaceae vorgeschlagen, das in den Arbeiten von Barlow (1964 und 1981) und Kuijt (1969) wieder aufgenommen wurde und danach auch in Büchern zur Systematik der Pflanzen allgemein akzeptiert wurde (Luther und Becker, 1987; Sitte und Ehrendorfer, 2002). Die Familie der Viscaceae steht jedoch in näherer Verwandtschaft zu den Santalaceae als zu den Loranthaceae (Kirkup *et al.*, 2000). Nach neuesten Erkenntnissen wird daher die Gattung *Viscum* L. in die Familie der Santalaceae eingeordnet, während die Gattung *Loranthus* weiterhin bei den Loranthaceae verbleibt. Beide Familien gehören zur Ordnung der Santalales (Schier, 2006; Schmeil und Fitschen, 2006). Die Gattung *Viscum* L. umfasst etwa 100 Arten, die als immergrüne Halbschmarotzer (eigene Photosynthese) epiphytisch auf den Ästen von Holzpflanzen leben, durch ihre Haustorien in das Xylem der Wirtspflanze eindringen und dieser so Wasser und in diesem vorkommende Substanzen (vor allem Nährsalze) entziehen. Die Art *Viscum album* L. ist in Zentral-Europa (von Nord-Afrika bis Süd-England und Süd-Skandinavien), Südwest- und Ost-Asien bis Japan beheimatet; sie wird wiederum in vier Unterarten gegliedert. Im Folgenden soll nur auf die drei verschiedenen europäischen Unterarten von *Viscum album* L. eingegangen werden. Die vierte Unterart *Viscum album* L. *ssp. coloratum* kommt nur im asiatischen Raum vor und war daher nicht Gegenstand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

Durch ihre Wirtsspezifität werden diese drei europäischen Unterarten wie folgt unterschieden:

- *Viscum album* L. ssp. *abietis*, die Tannenmistel, nur auf diesen vorkommend;
- *Viscum album* L. ssp. *laxum*, die Kiefern-Mistel, meistens auf Kiefern vorkommend, selten auf Fichte und Lärche;
- *Viscum album* L. ssp. *platyspermum*, Laubholz-Mistel, nur auf Laubhölzern vorkommend.



Abb. 1.1: *Viscum album* L.; oben links: Mistelbusch (weiblich und männlich ineinander verflochten, auf *Malus domestica* im Garten des Pharmazeutischen Instituts der CAU zu Kiel), oben rechts: Teil des weiblichen Mistelbusches mit Beeren, unten links: weibliche Mistelknospe vor der Blüte und Beeren, unten rechts: getrocknetes Kraut

In der pharmazeutischen Industrie erfolgt eine Einteilung nach Wirtsbäumen in z.B. Apfelbaum-Mistel, Eichen-Mistel (nicht zu verwechseln mit *Loranthus europaeus* s.o.), Kiefern-Mistel, Pappel-Mistel etc. (Hänsel *et al.*, 1994).

Für die weißbeerige Mistel sind in Deutschland viele volkstümliche Namen bekannt: Mistel, Vogelmistel, Leimmistel, Affolter, Bocksfutter, Drudenfuá, Elfklatte, Geiákruz, Guomol, Hexenbesen, Hexennest, Immergrüne, Kluster, Marenklatte, Marentaken, Mischgle, Mischgelt, Mispel, Nistle, Uomol, Vogelchrut, Vogelkláb, Vogellim, Wespe, Wintergrün, Wispen, Wäsp (Becker, 2000).

Während der Wintermonate geschieht die Verbreitung der Mistelsamen vor allem durch Vögel z.B. die Misteldrossel (*Turdus viscivorus*), welche die Beeren frisst und die Samen an Ästen ausscheidet. Die Keimung der Samen beginnt im März/April; der Keimling fixiert sich mit Hilfe einer Haftscheibe und des Wuchses eines Primärsenkers in den Wirt. Erst im 2. Jahr im April treiben die Primärblätter aus und der erste Gabelspross bildet sich im 4. Jahr. Erst ab dem 5. Jahr blüht der Mistelbusch (Februar bis April); nach Bestäubung reifen die Beeren in den Wintermonaten (Nierhaus-Wunderwald und Lawrenz, 1997; Zuber, 2004). Da sich pro Jahr jeweils ein Internodium bildet, kann durch Zählen derselben das Alter des Mistelbusches bestimmt werden.

Der weißbeerige Mistelbusch ist ein diözischer Halbstrauch mit kurzem Stamm und grünbraunen Zweigen, die am Ende jedes Gabelgliedes meistens eine blütentragende Spitze aufweisen; er bildet eine kugelförmige Gestalt aus, die mehr als 1 Meter im Durchmesser erreichen kann. Die beiden am Nodium entspringenden Blätter werden bis zu 2 Jahre alt; sie sind äquifazial und enthalten zahlreiche Oxalatkristalle (Becker, 2000).

Die Beeren von *Viscum album* L. (Scheinbeeren, da unter Beteiligung der Blütenachse gebildet) bestehen aus einem weißen Exokarp, einem dicken Mesokarp mit einer schleimartigen Substanz und einem dünnen Endokarp, an welchem der Samen festhängt, der meist ein bis zwei chlorophyllhaltige Embryonen enthält, die in das stärkehaltige grüne Endosperm eingebettet sind (Becker, 1986).

Mistelkraut (*Visci albi herba*) ist als Droge im DAB 2007 gelistet, in der Monographie von 1999 (aktuell gültig) wird das Kraut unter anderem wie folgt beschrieben: Die Zweige sind bräunlichgelb oder gelblichgrün, zylindrisch, längsrunzelig und wiederholt gabelästig verzweigt. Die Internodien sind etwa 30 bis 50 mm lang und

2 bis 5 mm dick. An den Verzweigungsstellen sind sie verdickt und haben hier Abbruchstellen von gegenständigen Blättern sowie von Blüten und Früchten. Der Querschnitt zeigt außen die grüne Rinde und innen den weißlichen, strahligen Holzkörper. Die Laubblätter sind bräunlichgrün oder gelblichgrün, etwa 20 bis 60 mm lang und 10 bis 20 mm breit, ungestielt, lanzettlich bis spatelförmig, ganzrandig, lederartig-steif und runzelig. Auf der Blattunterseite tritt die nahezu parallel verlaufende Nervatur mehr oder weniger deutlich hervor. Die Blüten sind gelblichgrün, unscheinbar, zweihäusig und stehen in der Achsel kleiner Hochblätter, wobei 3 bis 5 Blüten eine Trugdolde bilden. Die männlichen Blüten sind größer als die weiblichen und haben ein vierzähliges Perigon, das am Grunde zu einer kurzen Röhre verwachsen ist. Die vier Staubblätter sind mit dem Perigon vollständig verwachsen. Die Innenseite der Perigonblätter erscheint siebartig durchbrochen. Die weiblichen Blüten tragen teilweise vier sehr kleine, eiförmige Kelchblätter. Der Fruchtknoten ist unterständig und trägt eine sitzende Narbe. Kleine, grüne oder erbsengroße, weißliche, bräunliche oder rötliche, klebrige und stark geschrumpfte Früchte können vereinzelt vorhanden sein.

### **1.1.2 Historische Einordnung und Verwendung**

Die Nennung und Anwendung der Mistel geht auf die griechische und germanische Mythologie zurück. In der nordischen Mythologie wird in der Edda der „junge zarte Baumspross Misteltein“ zum tödlichen Geschoss. Die Göttin Frigga hatte denselben, weil er ihr so schwach und unbedeutend vorkam, nicht in Eid genommen, ihrem und Odins Sohn Baldur nicht zu schaden. So stiftet der neidische Loki Baldurs blinden Bruder Hödur an, Baldur mit einem aus einem Mistelzweig geschnitzten Pfeil zu töten. Dies ist der Beginn der Götterdämmerung (Vollmar, 1874).

Im Mythos galt die Mistel aber nicht nur als unheilvoll, sie galt auch als Wunder- und Heilpflanze. Hippokrates (466-377 v. Chr.) soll sie gegen Milzsucht empfohlen haben, Theophrast (371-286 v. Chr.) berichtet über die Mistel, dass diese als immergrüne Pflanze auf Bäumen vorkommt und durch Vögel verbreitet wird. Besondere Bedeutung kam der seltenen Eichenmistel (*Loranthus europaeus*) zu. So berichtete Plinius (23-79 n. Chr.) über die keltischen Druiden, bei denen die Mistel heilig war, weil am Ende des Winters, wenn die Zweige der Eichenbäume kahl waren, die Mistel (wahrscheinlich *Loranthus europaeus* und nicht *Viscum album* L.)

noch grün und blühend auf diesen saß, ohne Wurzeln zu haben. Die Mistelzweige wurden mit goldenen Sichel am sechsten Tag nach Neumond von den Eichenbäumen geschnitten; angewendet wurden diese als Antidot gegen Gifte, zur Steigerung und Erhaltung der Fruchtbarkeit und als Omnia sanans. Hildegard von Bingen (1098-1179) schrieb unter anderem Abhandlungen über die Verwendung von Heilpflanzen; dort wurde die Mistel zur Behandlung von Krankheiten der Leber und Milz erwähnt. Im Mittelalter, so berichtete unter anderem Paracelsus (1493-1541), wurde die Mistel vor allem bei Epilepsie eingesetzt, da sie selbst nie zu Boden fällt (Büssing, 2000a; Luther und Becker, 1987). Gaultier (1907) berichtete von blutdrucksenkenden Eigenschaften und Madaus (1938) vom Einsatz der Mistel bei Frauenleiden. Steiner (1985) empfahl in seinen Vorträgen 1920 erstmals die Verwendung von speziell hergestellten Mistelextrakten durch Mischung von Sommer- und Wintersäften der Mistel zur Behandlung von Neoplasien, die von der Ärztin Ita Wegmann erstmals eingesetzt wurden (Büssing, 2000a; Kienle und Kiene, 2003a). Heutzutage werden Mistelextrakte als Parenteralia in der adjuvanten Krebstherapie eingesetzt (siehe 1.1.4). Für die perorale Anwendung von Fertigarzneimitteln aus Mistelextrakten (Dragees, Tabletten, Tees, Tropfen) oder Mistel-Presssäften („Präparate zur traditionellen Anwendung“) als Antihypertonika, Kardiotonika oder Antiarteriosklerotika gibt es keine überzeugenden, wissenschaftlich gesicherten Erkenntnisse (Frohne, 2006). Indikationen nach Kommission E für die Misteltherapie (*Viscum album* L.) sind degenerativ-entzündliche Gelenkerkrankungen (intrakutane Injektionen) und die Palliativtherapie im Sinne einer unspezifischen Reiztherapie bei malignen Tumoren (Schilcher *et al.*, 2007).

### 1.1.3 Inhaltsstoffe und ihre Wirkungen

Aus der Mistel, bzw. aus Mistelextrakten (mit der Bezeichnung Mistel ist im Weiteren immer *Viscum album* L. gemeint) konnten folgende in Tabelle 1.1 aufgeführte Inhaltsstoffe isoliert werden.

Tab. 1.1: Inhaltsstoffe der Mistel (Übersichtsartikel siehe Becker und Scher, 2005; Blaschek, 2004; Kienle und Kiene, 2003a; Pfüller, 2000)

<b>Stoffklassen</b>	<b>Nachgewiesene Verbindungen</b>
Glykoproteine	Mistellektin I, II, III (ML I, II, III), Chitin-bindendes Lektin (siehe 1.1.3.2)
Polypeptide	Viscotoxine (siehe 1.1.3.3)
Polysaccharide	Pektine, Arabinogalactane (1.1.3.1)
Amine	Cholin, Acetylcholin, $\beta$ -Phenylalanin, Tyramin, Histamin
Freie Aminosäuren	Arginin, $\gamma$ -Aminobuttersäure, Valin, Asparagin u.a.
Flavonoide	Quercetin, Mono-, Di-, Trimethylether des Quercetins, z.T. als Glycoside u.a.
Phenolcarbonsäuren	Anissäure, Ferulasäure, Gentisinsäure, Kaffeesäure, Protocatechusäure, Shikimisäure, Sinapinsäure, Syringasäure, Vanillinsäure
Phenylpropane	Syringosid
Sterine und Triterpene	$\beta$ -Sitosterol, $\beta$ -Amyrin, Betulinsäure, Oleanolsäure, Ursolsäure
Zuckeralkohole	Mannitol, Inositol, Viscumitol, Quebrachitol, Pinitol

Die Gehalte der Mistelinhaltsstoffe unterliegen starken jahreszeitlichen Schwankungen und sind auch von den jeweiligen Wirtsbäumen abhängig (Escher *et al.*, 2004; Scheffler *et al.* 1996). Im Folgenden sollen nur die Inhaltsstoffgruppen näher beschrieben werden, denen eine Beteiligung an den immunmodulatorischen Wirkungen in Mistelpräparaten zugeschrieben wird, und der Fokus soll auf die Mistelpolysaccharide gerichtet werden, deren Untersuchung Thema der vorliegenden Arbeit ist.



### 1.1.3.1 Polysaccharide

Polysaccharide sind hochmolekulare Zuckerpolymeren, die aus Monosacchariden aufgebaut sind. Erste histochemische und papierchromatographische Untersuchungen des Schleims von Mistelbeeren wurden von Mangenot *et al.* (1948) durchgeführt. Als Monosaccharide konnten nach Hydrolyse Glucose, Galactose, Arabinose und auch Uronsäuren nachgewiesen werden. Von Müller (1962) wurde eine Polysaccharid-Fraktion, die Galactose, Arabinose und Uronsäuren enthielt, zum Patent angemeldet; diese zeigte in Studien an Mäusen eine Tumorstimmung. Krzaczek (1976) beschrieb neben den bereits genannten Zuckern erstmals das Vorkommen von Galacturonsäure, Xylose und Rhamnose.

Jordan (1985) isolierte aus den Stängeln und Blättern der Mistel ein hoch verestertes (1→4)- $\alpha$ -D-Galacturonan, neben geringen Anteilen eines nicht näher charakterisierten Arabinogalactans (Jordan und Wagner, 1986). Aus den Mistelbeeren konnten Arabinogalactane isoliert und charakterisiert werden (Jordan 1985; Jordan und Wagner, 1986), die immunologische Eigenschaften aufwiesen; so konnte *in vitro* eine Aktivierung des alternativen Wegs des Komplementsystems bestimmt werden (Wagner und Jordan, 1988). Auch Edlund *et al.* (2000) isolierten Arabinogalactane aus Mistelbeeren; durch Fraktionierung wurden neben einem neutralen Arabinogalactan drei saure Fraktionen erhalten. Die sauren Arabinogalactan-Fraktionen zeigten Ähnlichkeit mit den von Wagner und Jordan (1988) beschriebenen Arabinogalactanen. Die sauren Arabinogalactan-Fraktionen wiesen ein Rhamnose-Galacturonsäure-Grundgerüst mit hochverzweigten Arabinose-Galactose-Seitenketten auf und unterschieden sich nur im Grad der Substitution und der Länge der Seitenketten. Untersuchungen der immunstimulatorischen Eigenschaften *in vitro* ergaben für ein saures Arabinogalactan aus *Viscum album* L. eine Steigerung der Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (CD: cluster of differentiation) und eine gesteigerte Freisetzung von Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin 6 (IL-6) (Stein *et al.*, 1999a).

In Mistelpräparaten (Iscador<sup>®</sup>) verschiedener Wirtsbäume und auch in frischen Mistelextrakten konnten als Polysaccharide Rhamnogalacturonane nachgewiesen werden (Mueller und Anderer, 1990a). Die Rhamnogalacturonane führten zu einer Zunahme der Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Lymphokinaktivierten Killerzellen (LAK-Zellen) (Hamprrecht *et al.*, 1987; Mueller und Anderer,

1990b; Zhu *et al.*, 1994). Diese Zunahme der Zytotoxizität war bedingt durch eine Brückenbildung zwischen Tumorzellen und NK-Zellen (Mueller *et al.*, 1989). Für Oligosaccharide aus dem Mistelextrakt Helixor-M<sup>®</sup> wurde gezeigt, dass diese *in vitro* die Freisetzung von IFN- $\gamma$  aus Lymphozyten und die Freisetzung von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) aus Monocyten/Makrophagen stimulierten. Die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  konnte als ausschlaggebend für den Anstieg der Zytotoxizität der NK-Zellen nachgewiesen werden (Mueller und Anderer, 1990c).

### 1.1.3.2 Lektine

Lektine sind zuckerbindende Proteine oder Glykoproteine pflanzlicher, tierischer oder bakterieller Herkunft, die nach spezifischer Bindung an bestimmte Kohlenhydratstrukturen diese nicht chemisch verändern und keine Antikörperfunktion besitzen (Pfüller, 2000).

In den 70er und Anfang der 80er Jahre konnten Glykoproteine mit einem Kohlenhydrat-Anteil von 11 % aus der Mistel isoliert werden; diese wurden als Lektine charakterisiert. Weitere strukturelle Untersuchungen ergaben drei verschiedene Lektine, die als Mistellektin (ML) I, II, III bezeichnet wurden (Franz *et al.*, 1981; Franz, 1986; Luther *et al.*, 1980; Übersicht siehe: Luther und Becker; 1987). Von anderen Arbeitsgruppen wurden die Lektine auch als Viscum-album-Agglutinin (VAA) oder als Viscumin bezeichnet (Olsnes *et al.*, 1982; Samtleben *et al.*, 1985). Für Mistelblätter konnte gezeigt werden, dass die Lektine in den Zellvakuolen vorkommen (Neumann *et al.*, 1986). Die Mistellektine I, II und III gehören zu den Typ-2-Ribosomen-inhibierenden Proteinen (RIB), die aus zwei Ketten bestehen, wobei die B-Kette (Haptomer) die Zuckerbindung und damit den Kontakt mit der Zytoplasmamembran herstellt, und die A-Kette (Toxomer) die Proteinbiosynthese der Zelle hemmt. A- und B-Kette sind über eine Disulfidbrücke verknüpft. ML II (MG ca. 60 kDa) und ML III (MG ca. 50 kDa) liegen als Monomere vor, ML I als Gemisch von Monomeren (MG ca. 60 kDa) und nebivalent verknüpften Dimeren (MG ca. 115 kDa) (Übersichten siehe: Becker und Scher, 2005; Blaschek, 2004; Pfüller, 2000). ML I zeigt Zuckerspezifität für D-Galactose-Reste, ML III für N-Acetyl-D-galactosamin-Reste und ML II für beide (Franz *et al.*, 1981); neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass ML I auch an Sialinsäure bindet (Mikeska *et al.* 2005; Müthing *et al.*, 2004). In weiteren Untersuchungen über den Aufbau von ML I konnten die

kompletten Aminosäuresequenzen der A- und B-Kette, Informationen zur Verknüpfung des Kohlenhydrat-Anteils über Glycosylierungsstellen mit der A- und B-Kette und ein Molekularmodell bzw. die Kristallstruktur erhalten werden (Eschenburg *et al.*, 1998; Krauspenhaar *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2008; Soler *et al.*, 1998; Soler *et al.*, 1996; Stoeva *et al.*, 1999). In jüngster Vergangenheit konnten drei weitere Chitin-bindende Mistellektine isoliert werden (Voelter *et al.*, 2005).

Die direkte Zytotoxizität der MLs durch Apoptose-induzierende Eigenschaften wurde *in vitro* und *in vivo* vielfach beschrieben (Büssing und Schietzel, 1999; Janssen *et al.*, 1993; Scheffler *et al.*, 1993; Seifert *et al.*, 2008; Valentiner *et al.*, 2002)

Neben der beschriebenen Zytotoxizität als Typ-2-RIP fungieren die MLs in viel geringerer Konzentration auch als Immunmodulatoren. Mistellektine binden vorrangig an Monozyten/Makrophagen (Hostanska *et al.*, 1999) und führen zu einer Phagozytosesteigerung der Makrophagen (Metzner *et al.*, 1987). Die Mistellektine können *in vitro* aus Makrophagen/Monozyten die Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) und CD25 induzieren (Hajtó *et al.*, 2005; Hajtó *et al.*, 1997; Heinzerling *et al.*, 2006; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1996). *In vivo* führte die Gabe von Mistellektinen ebenfalls zum Anstieg und zur Aktivierung von Makrophagen (Beuth *et al.*, 1994; Hajtó *et al.*, 1998). MLs wirken vor allem auf das unspezifische Immunsystem (wie oben beschrieben), dennoch werden auch T-Lymphozyten aktiviert und *in vitro* die Lymphozytenproliferation stimuliert (Fischer *et al.*, 1996). Außerdem steigern MLs die Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Baxevanis *et al.*, 1998) und führen über eine NK-Zell-Aktivierung zur verstärkten Zytotoxizität (Hajtó *et al.*, 2005). Neuere Übersichten zu den vielfältigen *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen von immunologischen Eigenschaften der MLs finden sich bei Büssing (2000b), Kienle und Kiene (2003b) und bei Klein (2005).

### 1.1.3.3 Viscotoxine

Bei den Viscotoxinen handelt es sich um amphipathische, stark basische Polypeptide mit einem Molekulargewicht um 5 kDa. Sie sind nahe verwandt mit einer Gruppe von basischen Peptiden, die als Thionine bezeichnet werden. Insgesamt werden sechs Isoformen in der Mistel beschrieben: A1, A2, A3, B, B2 1-PS (Becker und Scher, 2005). Als onkologisch relevante Wirkungen der Viscotoxine werden die Zytotoxizität

(hier v.a. Zellmembranlyse), möglicherweise auch Apoptose-Induktion (Büssing *et al.*, 1999a), sowie die Hemmung der RNA-, DNA-Synthese und der Proteinsynthese genannt. Aufgrund ihres amphiphilen Charakters können Viscotoxine mit Zellmembranen interagieren und somit ihre toxische Wirkung entfalten. Aber auch die Viscotoxine zeigen neben der zytotoxischen Aktivität immunmodulierende Wirkungen (Kahle *et al.*, 2005). So aktivieren Viscotoxine Granulozyten (Stein *et al.*, 1999b; Stein *et al.*, 1999c) und steigern die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen. Des Weiteren führen sie zur Freisetzung von IL-6 (Büssing *et al.*, 1999b), evtl. stimulieren sie die Lymphozytenproliferation (Übersicht siehe: Kienle und Kiene, 2003b).

### **1.1.4 Mistelextrakte und deren Anwendung in der adjuvanten Krebstherapie**

Viele *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen wurden mit Mistelextrakten oder Handelspräparaten und nicht mit isolierten Inhaltsstoffen durchgeführt, so dass die gemessenen zytotoxischen und immunstimulierenden Eigenschaften nicht ohne Weiteres bestimmten Mistelinhaltsstoffen zugeordnet werden können und teilweise auch nur durch Kombination der Inhaltsstoffe zustande kommen. Außerdem ist zu beachten, dass sich die einzelnen Wirkkomponenten in den Extrakten gegenseitig beeinflussen. So können z.B. durch Bindung von Polysacchariden an MLs die zytotoxischen Eigenschaften der MLs herabgesetzt werden (Doser *et al.*, 1989; Knoepfel-Sidler *et al.*, 2005). Übersichten zu Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen und der Studien für Mistelgesamtextrakte und für die verschiedenen Handelspräparate finden sich bei Blaschek (2004), Kienle und Kiene (2007), Kienle und Kiene (2003c,d) und Büssing (2000b).

In der adjuvanten Tumorthherapie eingesetzte Mistelpräparate werden in Präparate der Phytotherapie und der anthroposophischen Therapierichtung differenziert. Die phytotherapeutischen Präparate stellen Injektionslösungen dar, die durch wässrige oder ethanolisch-wässrige Extraktion aus frischem Mistelkraut oder getrocknetem Drogenmaterial gewonnen wurden. Die Präparate sind entweder auf einen bestimmten Gehalt an ML I normiert oder durch den Vergleich der Wirkstärken der Extrakte zu ML I standardisiert. Im Handel befinden sich die Präparate Cefalektin<sup>®</sup>, EURIXOR<sup>®</sup> und Lektinol<sup>®</sup> (Rote Liste, 2008), die beiden letzteren enthalten einen

definierten Gehalt an Mistellektinen, bezogen auf ML I. Die Präparate der anthroposophischen Therapierichtung werden aus frischem oder fermentiertem Presssaft oder aus wässrigen Auszügen aus *Viscum album* L. hergestellt. Sie werden zur subkutanen Injektion, teilweise auch zur Infusionsbehandlung oder zur direkten Instillation in Körperhöhlen eingesetzt (Blaschek, 2004). Bei den anthroposophischen Mistelpräparaten wird nach dem Wuchs auf verschiedenen Wirtsbäumen unterschieden, die als Kürzel nach dem Präparatnamen angegeben werden. Auch unterscheidet sich der Herstellungsprozess zu den Phytotherapeutika durch z.B. starkes Verdünnen (Potenzieren) oder die Vermischung von Sommer- und Wintersaft (Erntezeitpunkt) in speziellen Apparaturen. Auf dem Markt befinden sich folgende Präparate der anthroposophischen Therapierichtung: abnobaViscum<sup>®</sup>, Helixor<sup>®</sup>, Iscador<sup>®</sup>, Iscucin<sup>®</sup> (Rote Liste, 2008), die in verschiedenen Wirkstärken, von verschiedenen Wirtspflanzen und teilweise in Kombination mit Silber-, Quecksilber- und Kupfersalzen (Iscador<sup>®</sup>) vorliegen (Blaschek, 2004). Bei diesen Präparaten wird eine Prozessstandardisierung durchgeführt, um vergleichbare Chargen herzustellen. Die anthroposophischen Präparate sind nicht vergleichbar und erfordern eine individuelle Erfahrung des Verordners (Schilcher *et al.*, 2007).

### 1.2 Arabinogalactan-Proteine

Ein Hauptteil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Isolierung und Strukturaufklärung sowie den immunologischen Eigenschaften von Arabinogalactan-Proteinen (AGPs) aus *Viscum album* L.; daher soll im folgenden Abschnitt ein kurzer Überblick über die Struktur und die Eigenschaften der AGPs gegeben werden.

Die AGPs gehören zur Klasse der Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine und kommen ubiquitär im Pflanzenreich vor. Sie sind aus einem großen Kohlenhydrat-Anteil (über 90 %) und einem kleinen Protein-Anteil (1-10 %) aufgebaut (früher als Proteoglykan bezeichnet) (Clarke *et al.*, 1979). Die Bezeichnung des Kohlenhydrat-Anteils als Arabinogalactan bedeutet für den Galactan-Teil, dass ein Polysaccharid-Grundgerüst vorliegt, in dem Galactosyl-Reste eine Hauptkomponente darstellen. Der Arabino-Teil im Namen steht für Arabinosyl-Reste, die entweder als Substituenten an das Galactose-Grundgerüst angeknüpft sind oder innerhalb des Grundgerüsts vorliegen (Nothnagel, 1997). Nach Aspinall (1973) erfolgt eine Einteilung der Arabinogalactane in Typ I und II. Die Typ I-Arabinogalactane bestehen aus einem linearen

(1→4)- $\beta$ -D-Galactan-Grundgerüst mit Arabinose-Oligosacchariden als Seitenketten. Typ II-Arabinogalactane weisen ein hochverzweigtes Grundgerüst auf bestehend aus einem (1→3)- $\beta$ -D-Galactan-Rückgrat mit (1→6)- $\beta$ -D-Galactan-Seitenketten, die über das C 6 einiger der Galactose-Einheiten des Rückgrats angeknüpft sind. Arabinose-Seitenketten, sowie terminale Arabinose und terminale Galactose kommen neben geringen Mengen anderer Monosaccharid-Bausteine vor (Bacic *et al.*, 2000). Nur Typ II-Arabinogalactane liegen in kovalenter Verknüpfung mit einem Proteinteil als AGPs vor. Der Protein-Anteil im AGP ist meist reich an den Aminosäuren Hydroxyprolin, Prolin, Alanin, Serin und Threonin (Clarke *et al.*, 1979; Nothnagel, 1997). Häufig werden durch O-Glykosylierung von einem oder mehreren Hydroxyprolin-Resten Proteinteil und Kohlenhydratteil miteinander verknüpft (Clarke *et al.*, 1983; Kieliszewski und Lampert, 1987; McNamara und Stone, 1981). Aber auch die O-glycosidische Verknüpfung von Serin mit dem Polysaccharid-Anteil des AGPs ist beschrieben (Baldwin, *et al.*, 1993). Nach Gaspar *et al.* (2001) wurde eine Einteilung in „klassische“ und „nicht-klassische“ AGPs in Bezug auf die Zusammensetzung des Protein-Anteils vorgenommen. „Klassische“ AGPs weisen vor allem die bereits oben genannten, häufig vorkommenden Aminosäuren auf, während in „nicht-klassischen“ AGPs größere Mengen nicht typischer Aminosäuren vorkommen und teilweise Hydroxyprolin sogar ganz fehlt.

Für Typ II-AGPs sind vor allem zwei Strukturmodelle bekannt: das „wattle blossom“-Modell und das „twisted hairy rope“-Modell (Bacic *et al.*, 2000). Das „wattle blossom“-Modell beschreibt kugelförmige Arabinogalactan-Ketten, die in Abständen an das Protein-Core über O-glycosidische Bindung an Hydroxyprolin angeknüpft sind (Fincher *et al.*, 1983). Das „twisted hairy rope“-Modell besitzt eher Flaschenbürsten-ähnliche Gestalt. Hierbei sind an das Protein-Core über O-glycosidische Bindung in wiederholter Abfolge Blöcke aus kurzen Arabinose-Ketten (3 Monomere) neben langen Glucuronorhamnoarabinogalactan-Ketten geknüpft. Das Glucuronorhamnoarabinogalactan besitzt vermutlich ein Galactan-Rückgrat mit Glucuronsäure-, Rhamnose- und Arabinose-Seitenketten (Qi *et al.*, 1991).

Viele AGPs können mit künstlichen Kohlenhydratantigenen spezifisch gefällt und somit isoliert werden. Bei diesen Kohlenhydratantigenen handelt es sich um Phenylazoderivate, die O-glycosyliert vorliegen (siehe auch 2.1.3); sie werden auch als Yariv-Reagenzien bezeichnet (Yariv *et al.* 1967). Speziell das  $\beta$ -glucosyl-Yariv-

Reagenz wird häufig zur Isolierung, aber auch zur Untersuchung der physiologischen Funktionen der AGPs verwendet (Nothnagel, 1997). Durch seine rote Färbung eignet es sich auch zur mikroskopischen Lokalisierung von AGPs in pflanzlichen Gewebetypen bzw. Zellen (Putoczki *et al.*, 2007).

AGPs weisen Funktionen in vielen physiologischen Pflanzenprozessen auf (Majewska-Sawka und Nothnagel, 2000; Seifert und Roberts, 2007; Showalter, 2001). So ist beschrieben, dass sie an der Embryogenese (van Hengel *et al.*, 2002), an der Zellproliferation (Langan und Nothnagel, 1997; Serpe und Nothnagel, 1994), dem Zellwachstum (Willats und Knox, 1996) und der Xylemdifferenzierung und Xylementwicklung (Gao und Showalter, 2000; Motose *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003) beteiligt sind. Des Weiteren werden den AGPs Funktionen beim programmierten Zelltod (Gao und Showalter, 1999) und beim Pollenschlauchwachstum (Wu *et al.*, 2000) zugeschrieben. Auch bei Interaktionen mit Mikroorganismen spielen AGPs eine Rolle (Gaspar *et al.*, 2004).

Für AGPs, insbesondere von *Echinacea*, wurden verschiedene immunstimulierende Eigenschaften wie die Aktivierung von Makrophagen (Luettig *et al.*, 1989) und die Aktivierung des Komplementsystems (Alban *et al.*, 2002) *in vitro* bestimmt. Außerdem wurden die immunmodulierende Wirkung von AGPs aus *Echinacea* und *Baptisia* auf die Proliferation und IgM-Produktion von Maus-Lymphozyten sowie die Nitrit- und IL-6-Produktion von Maus-Macrophagen *in vitro* untersucht (Classen *et al.*, 2006).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Polysaccharide aus Mistelkraut und Mistelbeeren sollten näher charakterisiert werden. Neben Untersuchungen der wässrigen Extrakte aus Kraut und Beeren von *Viscum album* L. sollten aus der hochmolekularen Polysaccharid-Fraktion dieser Extrakte Arabinogalactan-Proteine und Arabinane gewonnen werden.

#### Arabinane

Die isolierten Arabinane sollten hinsichtlich ihrer Zuckerkomponenten und ihres strukturellen Aufbaus charakterisiert werden. Es sollten Testungen der Arabinane auf Kreuzreaktivität mit monoklonalen Antikörpern, die gegen verschiedene Kohlenhydratepitope generiert worden waren, durchgeführt werden.

#### Arabinogalactan-Proteine

Die AGPs waren durch Fällung mit dem für sie spezifischen  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz zu fällen. Die Zusammensetzung des Polysaccharid- und Protein-Anteils der isolierten AGPs sollte bestimmt werden und eine Strukturanalyse der Kohlenhydrat-Anteile erfolgen. Es sollten Rückschlüsse von der Kreuzreaktivität mit monoklonalen Antikörpern, die gegen AGPs aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* gerichtet sind, auf die chemische Struktur der Mistel-AGPs getroffen werden.

Mistelextrakte werden seit langer Zeit in der adjuvanten Krebstherapie eingesetzt; neben den Mistellektinen wurden auch für die Polysaccharide aus der Mistel immunstimulatorische Wirkungen nachgewiesen. Da für AGPs insbesondere aus *Echinacea* immunmodulatorische Wirkung *in vitro* beschrieben wurden, sollten auch die AGPs aus *Viscum album* L. auf immunstimulatorische Eigenschaften hin untersucht werden. Dazu sollten Testungen an speziellen Rezeptoren, die eine wichtige Funktion in der angeborenen Immunantwort aufweisen, durchgeführt werden.

Eine Lokalisation von AGPs und von Lektinen in den Zellen von Mistelsprossen sollte durch Anfärbung mit jeweils spezifischen Antikörpern und Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung ermöglicht werden.



## 2 Experimenteller Teil

### 2.1 Methoden zur Extraktion und Isolierung

#### 2.1.1 Extraktherstellung aus Mistelkraut

##### 2.1.1.1 Herstellung eines Kaltextrakts

Das verwendete Mistelkraut (*Visci albi herba conc.*, nach DAB 1999 geprüft) wurde von der Firma Caelo, Hilden bezogen. 1 kg Droge wurde mit einem Mixer (Typ KF 1600 EP 550 W Electronic, Fa. De Longhi, Treviso, Italien oder 3-Stufenmixer, Fa. Braun, Kronsberg) zerkleinert. Anschließend wurde die zerkleinerte Droge durch ein Sieb der Maschenweite 800 µm gesiebt. Der Siebrückstand – überwiegend stark verholzte Teile – wurde abgetrennt und nicht weiter verwendet. Der Siebdurchgang wurde 1:10 mit Aqua dem. versetzt und 16 h unter Bewegung bei 5 °C mazeriert. Feste Bestandteile wurden bei Krautextrakt I (K I) abzentrifugiert (5.000 U/min., 10 min.). Bei Krautextrakt II und IV wurde mit einer Hochdruck-Tinkturenpresse (Fa. Hafico, Düsseldorf) bei einem Druck von 300 kg/cm<sup>3</sup> und zwei übereinanderliegenden Filtern (Schleicher & Schüll Rundfilter, Ø 15 cm, Rf.No. 10311612, Fa. Whatman, Dassel) ausgepresst. Danach wurde der Extrakt in Portionen von jeweils 50 ml für 10 min. im Wasserbad auf 90 °C erhitzt, um Proteine durch Denaturierung zu entfernen. Die Portionen wurden im Eisbad abgekühlt und die gefällten Proteine durch Zentrifugation (5.000 U/min., 10 min.) abgetrennt. Der noch nicht klare Überstand wurde über Unterdruck filtriert (Büchnertrichter, Ø 15 cm, Fa. Haldenwanger, Waldkraiburg; Schleicher & Schüll Rundfilter, Ø 15 cm, Rf.No. 10311612, Fa. Whatman, Dassel; Vakuüm-(Wasserstrahl)pumpe, Fa. Leybold, Köln). Das klare Filtrat wurde in zwei Teile von jeweils ca. 4 Litern geteilt, jeder Teil wurde einer ca. 70 h andauernden Tangentialflussfiltration mit einer Ausschlussgrenze von 30.000 Da bei 5 °C unterworfen, um niedermolekulare Bestandteile von den höhermolekularen abzutrennen. Um die niedermolekularen Bestandteile besser auszuspülen, wurden ca. 1,5 Liter Aqua dem. dem Extrakt hinzugefügt. Das Filtrat der Tangentialflussfiltration wurde am Rotationsverdampfer einrotiert und anschließend gefriergetrocknet. Das Retentat der Tangentialflussfiltration wurde am Rotationsverdampfer auf je ca. 300 ml eingeeengt und einer fünftägigen Dialyse

gegen Aqua dem. bei 5 °C zur weiteren Aufreinigung unterworfen. Die Molekulargewichtsausschlussgrenze (MWCO) der Dialyse betrug 12-14.000 Da. Das Retentat der Dialyse wurde gefriergetrocknet, es ist das Ausgangsmaterial zur weiteren AGP-Isolierung.

Tangentialflussfiltration:

Filtereinheit: Minitan<sup>®</sup> System Stainless Steel,  
Fa. Millipore, Billerica, MA, USA

Pumpe: Easy-load<sup>®</sup> Masterflex

Filter: Minitan<sup>®</sup> Filter Plates 4/PK 30.000 MWCO  
High-Flux Biomax Polysulfone Membrane (hydrophilic)

### **2.1.1.2 Herstellung eines Heißextrakts**

Der Pressrückstand aus der Hochdruck-Tinkturenpresse von Krautextrakt II (ca. 930 g) (siehe 2.1.1.1) wurde zur Gewinnung eines Heißextrakts verwendet (Krautextrakt IIa). Für Krautextrakt IIIa wurde 1 kg zerkleinertes und gesiebtes Mistelkraut (genaue Durchführung siehe unter 2.1.1.1) genutzt. Das Pflanzenmaterial wurde in drei Portionen aufgeteilt, im Verhältnis 1:5 mit Aqua dem. versetzt und 30 min. unter Rühren bei 100 °C (unter Verwendung eines Heizrührers) extrahiert. Der Heißextrakt wurde mit einer Hochdruck-Tinkturenpresse (Fa. Hafico, Düsseldorf) bei einem Druck von 300 kg/cm<sup>3</sup> und 2 übereinanderliegenden Filtern (Schleicher & Schüll Rundfilter, Ø 15 cm, Rf.No. 10311612 Fa. Whatman, Dassel) ausgepresst. Zur vollständigen Entfernung fester Bestandteile wurde zentrifugiert (5.000 U/min., 10 min.). Der noch nicht klare Überstand wurde über Unterdruck filtriert (Büchnertrichter Ø 15 cm, Fa. Haldenwanger, Waldkraiburg; Schleicher & Schüll Rundfilter, Ø 15 cm, Rf.No. 10311612, Fa. Whatman, Dassel; Vakuum-(Wasserstrahl)pumpe, Fa. Leybold, Köln). Das klare Filtrat (ca. 3,5 Liter) wurde wie unter 2.1.1.1 beschrieben aufgearbeitet (Tangentialflussfiltration mit anschließender Dialyse des Retentats).

### **2.1.2 Extraktherstellung aus Mistelbeeren**

Die für den Beerenextrakt (B I) verwendeten Mistelbeeren kamen von Misteln, die auf Apfelbäumen (*Malus domestica* var. *domestica*) als Wirtspflanzen wuchsen. Die Beeren stammen aus dem Botanischen Garten der CAU zu Kiel und dem Garten des

Pharmazeutischen Instituts der CAU zu Kiel. Die Beeren wurden im reifen Zustand von Hand gepflückt, manuell von Blättern und Sprossbestandteilen gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. 500 g Beeren wurden mit einem Mixer (Typ KF 1600 EP 550 W Electronic, Fa. De Longhi, Treviso, Italien, Stufe 6) zerkleinert, 1:10 mit Aqua dem. versetzt und 16 h unter Bewegung bei 5 °C mazeriert. Das Mazerat wurde mit einer Hochdruck-Tinkturenpresse (Fa. Hafico, Düsseldorf) bei einem Druck von 300 kg/cm<sup>3</sup> und einem Leinentuch als Filter ausgepresst. Danach wurde der als Filtrat gewonnene Rohextrakt in Portionen von jeweils 50 ml für 10 min. im Wasserbad auf 90 °C erhitzt, um Proteine durch Denaturierung zu entfernen. Die Portionen wurden im Eisbad abgekühlt und die gefällten Proteine durch Zentrifugation (5.000 U/min., 10 min.) abgetrennt. Der noch nicht klare Überstand wurde über Unterdruck filtriert (Büchnertrichter, Ø 15 cm, Fa. Haldenwanger, Waldkraiburg; Schleicher & Schüll Rundfilter, Ø 15 cm, Rf.No. 10311612, Fa. Whatman, Dassel; Vakuüm-(Wasserstrahl)pumpe, Fa. Leybold, Köln). Das klare Filtrat wurde in zwei Teile von jeweils ca. 2,5 Litern geteilt. Jeder Teil wurde einer ca. 70 h andauernden Tangentialflussfiltration mit einer Ausschlussgrenze von 30.000 Da bei 5 °C unterworfen, um niedermolekulare Bestandteile von den höhermolekularen abzutrennen. Um die niedermolekularen Bestandteile besser auszuspülen, wurden dem Extrakt ca. 5 Liter Aqua dem. hinzugefügt und es wurde erschöpfend filtriert bis zum Erhalt eines klaren, nicht mehr klebrigen Filtrats. Das Filtrat der Tangentialflussfiltration wurde am Rotationsverdampfer einrotiert und anschließend gefriergetrocknet. Das Retentat der Tangentialflussfiltration wurde am Rotationsverdampfer auf je ca. 500 ml eingeeengt und einer fünftägigen Dialyse gegen Aqua dem. bei 5 °C zur weiteren Aufreinigung unterworfen. Die MWCO der Dialyse betrug 12-14.000 Da. Das Retentat der Dialyse wurde gefriergetrocknet, es ist das Ausgangsmaterial zur weiteren AGP-Isolierung.

### Tangentialflussfiltration:

Filtereinheit: Minitan<sup>®</sup> System Stainless Steel,  
Fa. Millipore, Billerica, MA, USA

Pumpe: Easy-load<sup>®</sup> Masterflex

Filter: Minitan<sup>®</sup> Filter Plates 4/PK 30.000 MWCO  
High-Flux Biomax Polysulfone Membrane (hydrophilic)

### 2.1.3 Synthese des $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenzes

Mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz können Arabinogalactan-Proteine (AGP) spezifisch gefällt werden. Die Synthese erfolgt nach Yariv *et al.* (1962), Synthese-Schema siehe Abbildung 2.1.

488,34 mg p-Aminophenyl- $\beta$ -D-glucose (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) (1) wurden in 10,8 ml 0,5 M Salzsäure (HCl) (Verdünnung aus HCl 37-39 %, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) bei 0 °C gelöst und 124,2 mg Natriumnitrit (NaNO<sub>2</sub>) (p.a., Fa. Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim) hinzugefügt, es entstand das Diazoniumsalz (2). 56,74 mg Phloroglucin (p.a., Fa. Merck, Darmstadt) (3) wurden in 22,5 ml Aqua dem. gelöst. Die Diazoniumsalzlösung wurde tropfenweise zur gekühlten Phloroglucinlösung gegeben, wobei der pH-Wert durch Zutropfen einer 0,5 M Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung (Verdünnung aus NaOH p.a., Fa. Roth, Karlsruhe) bei pH 9 gehalten wurde. Nach Zugabe wurde der pH-Wert noch weitere 2 h konstant bei pH 9 gehalten. Zur Lösung wurde das gleiche Volumen an Methanol (HPLC Gradient Grade, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) zur Fällung des  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenzes (4) zugegeben und über Nacht im Kühlraum bei 5 °C gelagert. Zur Aufreinigung wurde die Fällung zentrifugiert (5.000 U/min., 15 min.), der Rückstand in 40 ml Aqua dem. gelöst, wiederum mit dem gleichen Volumen Methanol (s.o.) gefällt und für 2 h bei 5 °C aufbewahrt. Nach erneutem Abzentrifugieren und Trocknen im Trockenschrank bei 50 °C wurde der Rückstand gewogen; die Ausbeute betrug ca. 330 mg.

Reaktion:

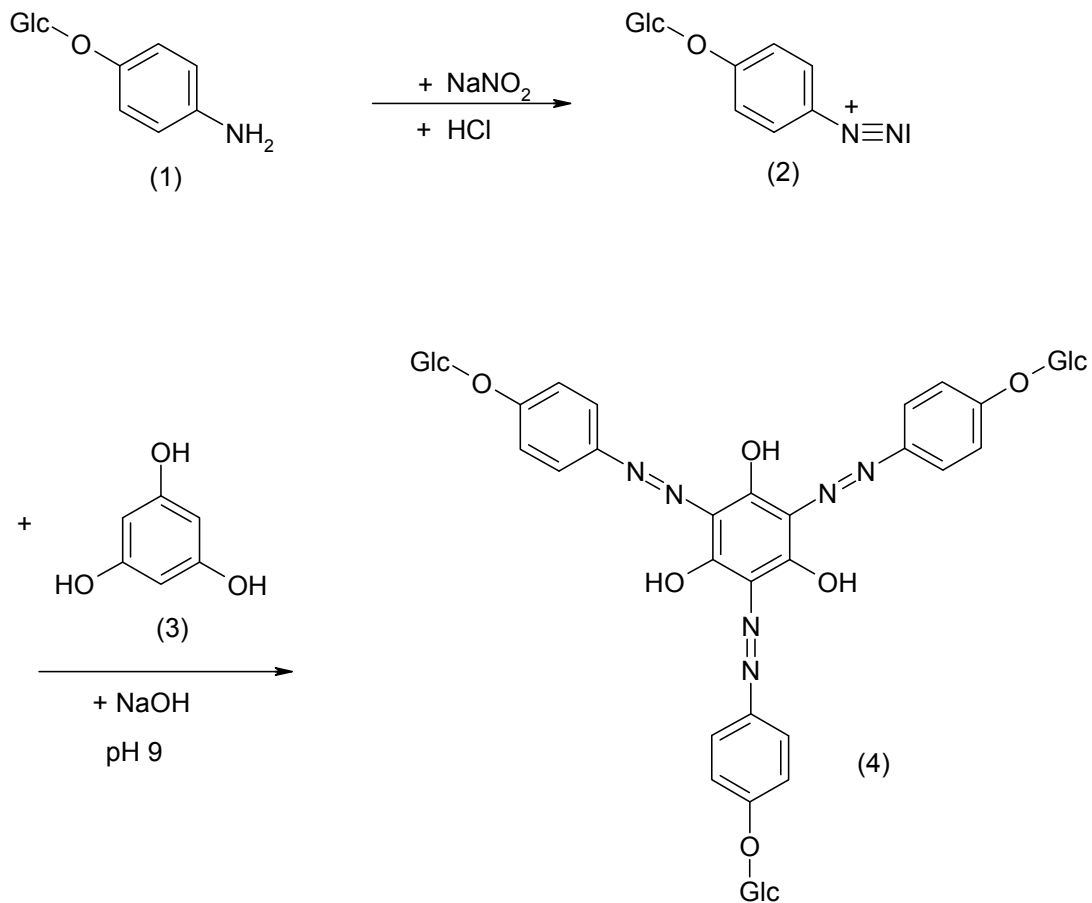


Abb. 2.1: Schema für die Yariv-Synthese

### 2.1.4 Fällung der AGPs mit dem $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz

Bei einer 1:1 Fällung von AGPs mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz erhält man nach Kreuzer und van Holst (1995) die höchste Ausbeute. Die Menge an Arabinose und Galactose im dialysierten Retentat wurde durch eine Acetylierungsanalyse mit anschließender gaschromatographischer Messung (GLC) siehe Methode 2.2.4 aus dem erhaltenen Chromatogramm berechnet. Die berechnete Menge an Arabinose und Galactose entspricht ungefähr der Menge an AGP. Es wurde eine Lösung mit der Konzentration 1 mg/ml an  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz und eine Lösung aus dem dialysierten Retentat der Tangentialflussfiltration (RetDia) mit einer Arabinose- und Galactose-Konzentration von zusammen 1 mg/ml in Aqua dem. hergestellt, die Lösungen wurden vereinigt. Durch Zusatz von 0,15 M Kochsalzlösung ( $\text{NaCl}$ ) (p.a., Fa. Merck, Darmstadt) wurde der AGP-Yariv-Komplex ausgefällt. Die Lösung wurde

zur möglichst quantitativen Ausfällung des AGP-Yariv-Komplexes über Nacht bei 5 °C im Kühlraum gelagert. Der ausgefallene Komplex wurde abzentrifugiert (10.000 g, 15 min., 5 °C) und in der gleichen Menge Aqua dem. gelöst, in der man das dialysierte Retentat gelöst hatte. Die Lösung wurde mit Hilfe eines Heizrührers auf 50 °C erhitzt, das  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz wurde durch Zugabe von Natriumdithionit (techn., Sigma-Aldrich, Steinheim) bis zu einer 2 %igen Konzentration zerstört; die Lösung entfärbte sich. Die entfärbte Lösung wurde 5 Tage bei 5 °C gegen Aqua dem. dialysiert (MWCO 12-14 kDa), um überschüssiges Natriumdithionit, evtl. noch vorhandenes  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz und NaCl zu entfernen. Anschließend wurde die Lösung gefriergetrocknet. Die Yariv-Fällungen wurden mit YF abgekürzt und für jeden Extrakt mit arabischen Ziffern durchnummeriert, so dass z.B. K I YF 1 für die erste Yariv-Fällung von Krautextrakt I steht. Als z.B. K I YF 1 Ü wird der Überstand der entsprechenden Yariv-Fällung bezeichnet.

### **2.1.5 Arabinan-Isolierung aus dem Überstand der Yariv-Fällung**

Für die Arabinan-Isolierung wurde absoluter Ethanol (EtOH) der Firma J.T. Baker, Deventer, Holland verwendet, bzw. verdünnt benutzt.

#### **2.1.5.1 Fraktionierte Arabinan-Isolierung**

Bei der Yariv-Fällung wurde nach Abzentrifugieren des ausgefallenen AGPs die überstehende Lösung zur Isolierung eines Arabinans verwendet. Der Überstand nach dem Abzentrifugieren des AGP-Yariv-Komplexes (siehe 2.1.4) wurde auf 50 °C erhitzt und mit Natriumdithionit (techn., Sigma-Aldrich, Steinheim) bis zur Entfärbung und somit zur Zerstörung des  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenzes behandelt. Der Überstand wurde anschließend 5 Tage bei 5 °C gegen Aqua dem. dialysiert (MWCO 12-14 kDa) und gefriergetrocknet. Ca. 400 mg des gefriergetrockneten Überstandes wurden in Aqua dem. gelöst und mit EtOH und Aqua dem. zu einem Endvolumen von 100 ml mit einer Konzentration von 40 % EtOH V/V ergänzt. Die Lösung wurde über Nacht bei 5 °C im Kühlraum gelagert, danach wurden feste Bestandteile bei 5 °C abzentrifugiert (20.000 g, 30 min.). Dieser Rückstand (R) wurde nach dem Abdampfen des Ethanol gefriergetrocknet. Der Überstand wurde im Vakuum eingengt und in Aqua dem. gelöst. Die Lösung wurde auf 60 % V/V Ethanol-Gehalt (Endvolumen 100 ml) gebracht und wiederum bei 5 °C über Nacht gelagert. Der

Prozess zum Gewinnen von Rückstand und Überstand vom Vortag wurde wiederholt. Der Überstand wurde auf 80 % V/V Ethanol-Gehalt (Endvolumen 100 ml) gebracht und es wurde genau wie bei den beiden vorherigen Lösungen weiter verfahren. Der Überstand (Ü) der 80 %igen EtOH-Lösung wurde nach Entfernen des Ethanols am Rotationsverdampfer in wenig Aqua dem. aufgenommen und gefriergetrocknet; diese Fraktion enthielt das Arabinan.

### **2.1.5.2 Unfraktionierte Arabinan-Isolierung**

Bei der Yariv-Fällung wurde nach Abzentrifugieren des ausgefallenen AGPs die überstehende Lösung zur Isolierung des Arabinans verwendet. Der Überstand nach dem Abzentrifugieren des AGP-Yariv-Komplexes (siehe 2.1.4) wurde auf 50 °C erhitzt und mit Natriumdithionit (techn., Sigma-Aldrich, Steinheim) bis zur Entfärbung und somit zur Zerstörung des  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenzes behandelt. Der Überstand wurde anschließend 5 Tage bei 5 °C gegen Aqua dem. dialysiert (MWCO 12-14 kDa) und gefriergetrocknet. Eine Menge von 400-500 mg des gefriergetrockneten Überstandes wurde in Aqua dem. gelöst und mit EtOH und Aqua dem. zu einer Konzentration von 80 % EtOH V/V ergänzt, so dass eine Konzentration des Überstandes von 4 mg/ml in EtOH 80 % V/V entstand. Die Lösung wurde über Nacht bei 5 °C im Kühlraum gelagert, danach wurden feste Bestandteile bei 5 °C abzentrifugiert (20.000 g, 30 min.). Dieser Rückstand (R) wurde nach dem Abdampfen des Ethanols gefriergetrocknet. Der Überstand (Ü) wurde im Vakuum (Rotationsverdampfer) eingeeengt, in Aqua dem. aufgenommen und gefriergetrocknet.

## 2.2 Methoden der Chemie und Chromatographie

### 2.2.1 Geldiffusionstest

Es wurde ein Agarosegel aus 1 % Agarose (Fa. Merck, Darmstadt) in 10 mM Tris-HCl-Puffer (> 95 %, Fa. Merck, Darmstadt) pH 7,3 mit 0,9 % Natriumchlorid (p.a., Fa. Merck, Darmstadt) und 1 mM Calciumchlorid (rein, Fa. Merck, Darmstadt) hergestellt. Das Gel wurde autoklaviert und unter Laminar Flow (Sterilbank) 20 ml davon mit einer autoklavierten Messpipette in eine sterile Petrischale (Ø 9 cm, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) gegossen. Anschließend wurden in das Gel fünf Löcher (Ø 4 mm) gestanzt. Die Löcher hatten dabei eine Anordnung wie die Zahl fünf auf einem Würfel. In das mittlere Loch wurden 20 µl einer Yariv-Lösung (siehe Methode 2.1.3) der Konzentration 1 mg/ml pipettiert, die umliegenden Kavitäten wurden mit 20 µl der Proben in unterschiedlichen Konzentrationen gefüllt. Yariv-Lösung und die Proben diffundieren aufeinander zu, es bilden sich je nach Konzentration des vorhandenen AGPs in den Proben unterschiedlich deutliche Präzipitationsbanden.

### 2.2.2 Keimzahlbestimmung

50 g Mistelkraut (Fa. Caelo, Hilden) und zum Vergleich 50 g *Echinacea pallida*-Wurzel (Fa. Alfred Gahlke, Gittelde) wurden mit je 500 ml Aqua dem. 18 h unter Rühren bei 5 °C mazeriert. Feste Bestandteile wurden abzentrifugiert (5000 U/min., 10 min.). Von den erhaltenen Extrakten wurden Verdünnungsreihen erstellt. Dazu wurde 1 ml des jeweiligen Extrakts 1:10 mit autoklavierter, gepufferter Natriumchlorid-Pepton-Bouillon (hergestellt von der Abteilung Pharmazeutische Technologie der CAU zu Kiel) verdünnt bis zu einer Endkonzentration von  $10^{-5}$ . Es wurde ein Nährmedium mit Caso-Agar (Fa. Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 15 g/500 ml Aqua dem. hergestellt. Das Nährmedium wurde autoklaviert und für die erste Testung wurden 20 ml davon unter Laminar Flow (Sterilbank) mit einer autoklavierten Messpipette in eine sterile Petrischale (Ø 9 cm, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) gegossen. 0,1 ml des jeweiligen Extrakts bzw. der Extrakt-Verdünnung wurden mit einer Pipette mit steriler Pipettenspitze pipettiert und mit Hilfe eines sterilen Glasspatels auf das Nährmedium aufgebracht. Für die zweite Testung wurde in leere Petrischalen (Ø 9 cm, s.o.) 1 ml des jeweiligen Extrakts bzw. der Extrakt-Verdünnung mit einer Pipette mit steriler Pipettenspitze pipettiert und 20 ml des ca.



45 °C warmen noch flüssigen Nährmediums mit einer autoklavierten Messpipette dazugegeben (Sterilbank). Die Petrischalen wurden für 48 h im Brutschrank bei 21 °C inkubiert, anschließend wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) gezählt.

### **2.2.3 Antioxidative Testungen**

Für die antioxidativen Testungen wurden ein frischer Mistelkraut- und ein frischer Mistelbeerenextrakt in kleinem Maßstab hergestellt in Anlehnung an die unter 2.1.1.1 und 2.1.2 genannten Extraktionsverfahren. Hierzu wurden 10 g Mistelkraut (Fa. Caelo, Hilden) und 5 g Mistelbeeren (Herkunft siehe unter 2.1.2) mit einem Mixer (Typ KF 1600 EP 550 W Electronic, Fa. De Longhi, Treviso, Italien, Stufe 6) zerkleinert. Die zerkleinerten Mistelbeeren wurden direkt 1:10 mit Aqua dem. versetzt und 16 h unter Bewegung bei 5 °C mazeriert. Das zerkleinerte Mistelkraut wurde durch ein Sieb der Maschenweite 800 µm gesiebt. Der Siebdurchgang wurde 1:10 mit Aqua dem. versetzt und 16 h unter Bewegung bei 5 °C mazeriert. Feste Bestandteile wurden abzentrifugiert (20.000 g, 15 min., RT). Der noch nicht klare Überstand wurde über Unterdruck filtriert (Büchnertrichter, Ø 15 cm, Fa. Haldenwanger, Waldkraiburg; Schleicher & Schüll Rundfilter, Ø 15 cm, Rf.No. 10311612, Fa. Whatman, Dassel; Vakuum-(Wasserstrahl)pumpe, Fa. Leybold, Köln). Die erhaltenen Rohextrakte wurden gefriergetrocknet und als Proben für die folgenden beiden Tests eingesetzt.

#### **2.2.3.1 Lipophile Substanzen**

Das antioxidative Potential lipophiler Substanzen wurde nach der N,N-Diphenyl-N`-(2,4,6-trinitrophenyl)-hydrazyl-(DPPH)-Methode bestimmt (Molyneux, 2004). Dabei reagiert das DPPH-Radikal (1) mit der antioxidativen Substanz zu einem Hydrazinderivat (DPPH-H) (2); der hierbei verursachte Farbwechsel wird photometrisch bestimmt (siehe Abb. 2.2). Die Proben wurden in absolutem Ethanol (Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) gelöst und evtl. mit diesem verdünnt. Davon wurden 900 µl Probe mit 100 µl DPPH-Lösung (≥ 85%, Fa. Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim) der Konzentration 1 mM versetzt und 30 min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 517 nm in einer Mikroküvette (Schichtdicke 1 cm) gegen den Reagenzienleerwert mit einem Photometer vermessen.

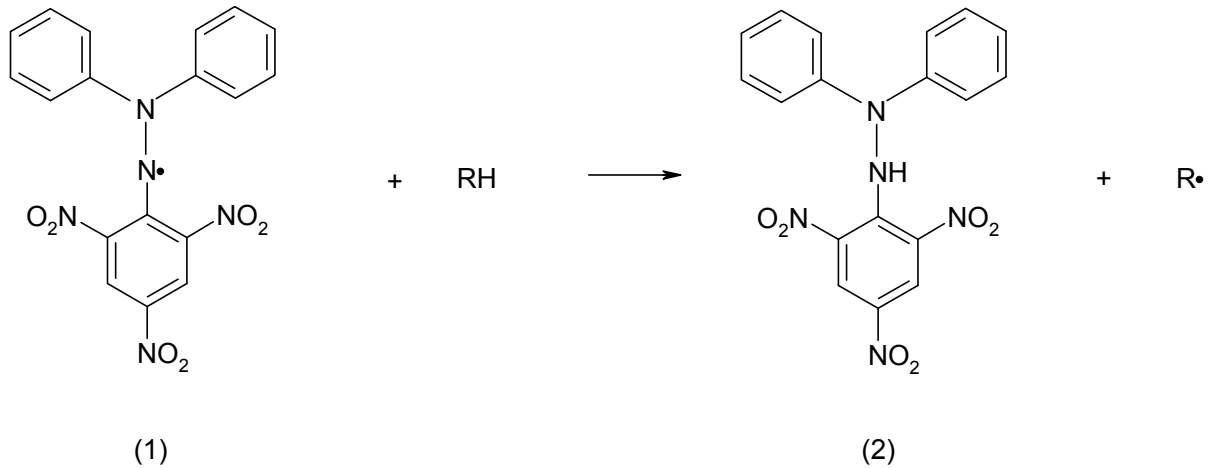


Abb. 2.2: Reaktionsschema der DPPH-Methode

### 2.2.3.2 Hydrophile Substanzen (Rechner, 2004)

Bei diesem Test wird die Hemmung der Bildung des Radikalkations von 2,2-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) über die Reduktion des Ferrylmyoglobinradikals bestimmt, das in wässriger Lösung durch die Oxidation von Metmyoglobin durch Wasserstoffperoxid gebildet wird (Miller *et al.*, 1993). Zum Erstellen der ABTS-Arbeitslösung wurden eine 500  $\mu\text{M}$  ABTS-Lösung (ABTS p.a., Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) in phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), Metmyoglobinlösung, die 200  $\mu\text{M}$  Myoglobin (Myoglobin from horse skeletal muscle  $\geq 90\%$ , Fa. Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim) und 370  $\mu\text{M}$  Kaliumhexacyanoferrat III (p.a., Fa. Merck, Darmstadt) in PBS enthält, und PBS im Verhältnis von 6:1:8 gemischt. Die Trolox-Equivalent-Antioxidative-Capacity-(TEAC)-Testlösung besteht wiederum aus 750  $\mu\text{l}$  ABTS-Arbeitslösung und 100  $\mu\text{l}$  6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure-(Trolox)-Standard (purum, Fa. Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim) oder Probe (bzw. deren Verdünnungen) in PBS. Diese wurde genau 6 min. bei RT inkubiert, mit 200  $\mu\text{l}$  450  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxidlösung (Wasserstoffperoxid 30%, Fa. Roth, Karlsruhe) versetzt und sofort wurde die Absorption mit einem Photometer als Kinetik über einen Zeitraum von 10 min. bei 734 nm gemessen. Für den Reagenzienleerwert wurde statt Probenlösung PBS eingesetzt.

PBS:	Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	0,714 g
	Kaliumdihydrogenphosphat	0,123 g
	NaCl	8,766 g
	(alle drei p.a., Fa. Merck, Darmstadt)	
	Aqua bidest. ad 1 Liter	

### 2.2.4 Acetylierung

Die Acetylierung erfolgte nach Blakeney *et al.* (1983). Die Probe (1-10 mg) wurde mit 0,5 mg myo-Inositol (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) als internem Standard versetzt. Es wurde 1 ml 2 M Trifluoressigsäure (TFA) (Verdünnung aus TFA p.a., Merck, Darmstadt) hinzugefügt und bei 121 °C und 2 bar 1 h im Bioblock in einem Wheaton-Gefäß hydrolysiert. Die erhaltenen Monosaccharide wurden in einen Spitzkolben überführt und dreimal mit jeweils 5 ml Aqua dem. zur Trockne einrotiert. Die einrotierte Probe wurde in 200 µl 1 M Ammoniak (Verdünnung aus Ammoniak 25 %, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) unter Schütteln aufgenommen. Durch Zugabe von 1 ml Natriumborhydrid (98 % Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) in Dimethylsulfoxid (DMSO) (getrocknet, Fa. Merck, Darmstadt) (20 g/l) wurden die Monosaccharide zu Alditolen reduziert (bei 40 °C im Trockenschrank, 90 min.). Danach wurden 100 µl Essigsäure (Suprapur<sup>®</sup>, Fa. Merck, Darmstadt) hinzugefügt und geschüttelt, um die Reaktion zu stoppen. Als Katalysator für die Acetylierung wurden 200 µl Methylimidazol (zur Synthese, Fa. Merck, Darmstadt) hinzugegeben und 2 ml Acetanhydrid (Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) als Acetylierungsagens hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde 20 min. bei Raumtemperatur (RT) stehengelassen. Anschließend wurden zum Ansatz 10 ml Aqua dem. dazugegeben, um die Acetylierung zu stoppen. Nach Zugabe von 1 ml 0,1 M Schwefelsäure (Verdünnung aus Schwefelsäure 95-97 %, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) konnten die Alditolacetate mit 1 ml Dichlormethan (LiChrosolv<sup>®</sup>, Fa. Merck, Darmstadt) ausgeschüttelt werden. Die Dichlormethanphase wurde abpipettiert und unter Stickstoff eingeengt. 1 µl der acetylierten Probe wurde gaschromatographisch (GLC) vermessen.

Gaschromatograph:	HP 5890 Series II, Fa. Hewlett Packard, USA oder HP 6890, Fa. Hewlett Packard, USA
Säule:	WCOT-Kapillarsäule (fused Silica), Optima -225-0,25 µm 25 m*0,25 mm, Fa. Macherey & Nagel, Düren
Trägergas:	GC HP 5890: Stickstoff GC HP 6890: Helium
Flussrate:	1 ml/min.
Injektionsvolumen:	1 µl
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]

#### **2.2.4.1 Bestimmung des Responsefaktors für die Acetylierung**

Je 100 mg L-Rhamnose (> 99 %, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim), D(+)-Fucose (98 %, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim), L(+)-Arabinose (98 %, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim), D(+)-Xylose (>99 %, Fa. Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim), D(+)-Mannose (>99,5 %, Fa. Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim), D(+)-Galactose (≥ 99,5 %, Fa. Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim) und D(+)-Glucose (wasserfrei, Fa. Merck, Darmstadt) wurden in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit Aqua dem. auf 100 ml aufgefüllt. In zehn Spitzkolben wurde je 1 ml der Zuckerlösung pipettiert und es wurden jeweils 100 µl einer myo-Inositol-Stammlösung (myo-Inositol, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) der Konzentration 1 g/100 ml als interner Standard hinzugefügt. Es wurde jeweils zur Trockne am Rotationsverdampfer eingengt. Danach folgten die Reduktion und die Acetylierung (siehe 2.2.4). Die zehn Proben wurden anschließend gaschromatographisch (GLC) vermessen (Parameter siehe 2.2.4) und relative Retentionszeiten bezogen auf myo-Inositol berechnet. Nach Korrektur der für die Probe erhaltenen Peakflächen und Integration mit der Software wurden die prozentualen Massenanteile der Monosaccharide berechnet.

Tab. 2.1: Responsefaktoren verschiedener Monosaccharide für die GLC bezogen auf myo-Inositol

Monosaccharid	Responsefaktor	relative Retentionszeit
Rhamnose (Rha)	1,562	0,341
Fucose (Fuc)	1,321	0,357
Arabinose (Ara)	1,098	0,417
Xylose (Xyl)	1,165	0,489
Mannose (Man)	1,212	0,839
Galactose (Gal)	1,175	0,908
Glucose (Glc)	1,424	0,965
Inositol (Ino)	1,000	1,000

### 2.2.5 Uronsäure-Bestimmung nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973)

Zur Quantifizierung von Uronsäuren wurden ca. 5 mg Probe mit 4 %iger Schwefelsäure (Verdünnung aus Schwefelsäure 95-97 %, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) in einem Wheaton-Gefäß bei 121 °C und 2 bar 1 h im Bioblock hydrolysiert. Nach Inkubation der Probe mit 1,2 ml Borax (Dinatriumtetraborat-10-hydrat p.a., Fa. Merck, Darmstadt, 2,9 g/l in Schwefelsäure konz. (s.o.)) für 5 min. im kochenden Wasserbad und anschließend für 10 min. im Eisbad wurden 20 µl 0,15 %ige 3-Hydroxybiphenyllösung (3-Hydroxybiphenyl 90 %, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) in 0,5 %iger NaOH (p.a., Fa. Roth, Karlsruhe) bzw. reine 0,5 %ige NaOH (Blindwert) zugegeben und nach exakt 10 min. Reaktion die Absorption der rot gefärbten Probenlösung bei 520 nm mittels Photometer bestimmt. Eine Eichgerade wurde mit einer Mischung aus D-Glucuron- und D-Galacturonsäure (beide: purum, Fa. Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim) im Verhältnis 1:1 erstellt und der Uronsäure-Gehalt der Probe über die Geradengleichung ermittelt. Mit dieser Methode konnte nicht zwischen den einzelnen Uronsäuren differenziert werden; es wurde nur der Gesamturonsäure-Gehalt bestimmt.

### **2.2.6 Uronsäure-Reduktion nach Taylor und Conrad (1972)**

20 mg Polysaccharid wurden in 20 ml Aqua dem. gelöst. Unter Rühren wurden 216 mg N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-methylmorpholino)-ethyl]-carbodiimid-4-toluolsulfonat (Fa. Merck, Darmstadt) zugegeben; der pH-Wert wurde durch Zugabe von 0,01 M HCl (Verdünnung aus HCl 37-39 %, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) für 4 h konstant bei pH 4,75 gehalten. Aus den im Polysaccharid vorhandenen Uronsäuren entstehen Lactone. Durch Zutropfen von 4 ml 1 M, 5 ml 2 M und 5 ml 4 M Natriumbordeuteridlösung (98 % deuteriert, Fa. Isotec, Miamisburg, OH, USA) unter Rühren wurden die Lactone reduziert und es entstehen die zu den Uronsäuren korrespondierenden Neutralzucker. Die Zugabe von 1-2 Tropfen Octanol (Fa. Merck, Darmstadt) verhinderte zu starkes Schäumen bei der Reduktion, der pH-Wert wurde durch Titration mit 2 M HCl (s.o.) unter Rühren für 4 h konstant auf 7 gehalten. Aus der Carboxylgruppe am C 6 wurde eine zweifach deuterierte Hydroxylgruppe. Zuletzt wurden wenige Tropfen Essigsäure (Suprapur<sup>®</sup>, Fa. Merck, Darmstadt) bis zu einem pH-Wert von 6,5 zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde 4 Tage gegen Aqua dem. dialysiert (MWCO 12-14 kDa) und anschließend gefriergetrocknet. Zur vollständigen Reduktion der Uronsäuren wurde der Prozess ein zweites Mal mit dem Produkt durchgeführt.

### **2.2.7 Konduktometrische Uronsäure-Bestimmung**

Mittels Konduktometrie können Sulfat- und Carboxylgruppen in Polysacchariden bestimmt werden (Casu und Gennaro, 1975). 5-10 mg Probe wurden in Aqua bidest. gelöst (Konzentration 1 mg/ml); zur Befreiung von störendem Kohlendioxid und zum vollständigem Lösen der Probe wurde diese 10 min. im Ultraschallbad belassen. 5 ml der auf 20 °C temperierten Probe wurden über eine Entsalzersäule (s.h.) gegeben und es wurde mit 10 ml Aqua bidest. nachgespült. Amberlite als Ionenaustauschermaterial (s.h.) wurde mit HCl 1,37 N (Verdünnung aus HCl 37-39 %, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) (1 ml pro g Amberlite) 30 min. konditioniert, es wurde mit Aqua bidest. gespült, bis die Leitfähigkeit von reinem Aqua bidest. (zuvor bestimmt) erreicht war. Die Ionenaustauschersäule wurde mit zuvor konditioniertem Amberlite befüllt (5 cm Füllhöhe). Die entsalzte Probe (15 ml) wurde über die Austauschersäule gegeben und es wurde mit 35 ml Aqua bidest. nachgespült, so dass eine

Endkonzentration von 5 mg/50 ml Aqua bidest. erreicht wurde. Es wurde die Änderung der Leitfähigkeit der Probe bei Zugabe von 0,01 N NaOH (p.a., Fa. Roth, Karlsruhe) gemessen.

Entsalzersäule: PD-10 Desalting Column,  
Material: Sephadex™ G-25 M,  
GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden

Konduktometer: Konduktometer Seven Easy, Fa. Mettler Toledo,  
Schwerzenbach, Schweiz

Elektrode: Inlab® 730, NTC, 0,01-1000 µS/cm -5 °C -100 °C,  
Fa. Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz

Ionenaustauscher-  
material: Amberlite IR-120, Fa. Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim

### **2.2.8 Partialhydrolyse nach Gleeson und Clarke (1979)**

Für die Fällungen bei der Partialhydrolyse wurde absoluter Ethanol der Firma J.T. Baker, Deventer, Holland benutzt, bzw. verdünnt verwendet. 20-30 mg Probe wurden in ein verschließbares Reaktionsgefäß aus Pyrex-Glas eingewogen und mit 2 ml 12,5 mM Oxalsäure (Oxalsäure-Dihydrat reinst, Fa. Merck, Darmstadt) mit Hilfe des Ultraschallbades gelöst. Die Probe wurde 5 h bei 100 °C im Bioblock hydrolysiert. Nach Abkühlen der Probe wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation entfernt (6.000 U/min., 5 min.). Der Überstand wurde mit absolutem Ethanol versetzt, bis eine 80 %ige Ethanolkonzentration entstand. Über Nacht bei 4 °C ausgefallene Polymere wurden abzentrifugiert (20.000 g, 10 min., 6 °C); die Mono- bis Oligo-saccharide fanden sich im Überstand. Das Zentrifugat wurde mit 4 ml 80 %igem EtOH gewaschen und es wurde erneut zentrifugiert (20.000 g, 10 min., 6 °C); der Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt. Der Überstand und die Waschlösungen wurden vereinigt, zur Trockne einrotiert, in 1 ml Aqua dem. aufgenommen und gefriergetrocknet. Der Restalkohol der Fällung wurde durch Föhnen entfernt, die Fällung in 2 ml Aqua dem. gelöst und gefriergetrocknet.

### 2.2.9 Methylierungsanalyse nach Harris *et al.* (1984)

#### Herstellung einer Dimethylsulfinyl-(Dimethyl-)Kalium-Lösung:

1 g Kaliumhydrid-Suspension (35 %ig in Öl, zur Synthese, Fa. Merck, Darmstadt) wurde in ein verschraubbares Reagenzglas mit Seitenansatz eingewogen und fünf Mal mit je 4 ml n-Hexan (95 %, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) (Lagerung über Molekularsieb 4 Å, Fa. Merck, Darmstadt) ölfrei gewaschen. Pro g reinem Kaliumhydrid (unter Argon trocken geblasen) wurden 13 ml DMSO (getrocknet, Fa. Merck, Darmstadt) (Lagerung über Molekularsieb 4 Å, Fa. Merck, Darmstadt) unter Argonbegasung zugetropft; starkes Schäumen wurde gegebenenfalls durch Eiskühlung unterbunden. Nach 30 min. Rühren wurde die Lösung für die Methylierung eingesetzt.

#### Methylierung

1-5 mg Probe wurden in einem verschraubbaren Reagenzglas mit Seitenansatz 24 h gefriergetrocknet und in 460 µl DMSO (s.o.) im Ultraschallbad gelöst. Danach wurden abwechselnd folgende Mengen an Dimethyl-Kalium-Lösung und Methyljodid (stabilisiert mit Silber, zur Synthese, Fa. Merck, Darmstadt) unter Rühren und Argonschutzbegasung zupipettiert:

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

Die methylierte Probe wurde in ein verschraubbares Zentrifugenglas mit einer Mischung aus 2 ml Chloroform (LiChrosolv<sup>®</sup>, Fa. Merck, Darmstadt) und 1 ml Methanol (HPLC Gradient Grade, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) überführt und fünf Mal mit je 2 ml Aqua dem. gewaschen. Jedes Mal wurde zentrifugiert (250 g, 5 min.) und die wässrige Oberphase ohne Verletzung der Interphase abgenommen. Die organische Unterphase wurde nach dem letzten Zentrifugieren mit 2 ml 2,2-Dimethoxypropan (zur Synthese, Fa. Merck, Darmstadt), 20 µl Essigsäure



(Suprapur<sup>®</sup>, Fa. Merck, Darmstadt) und Siedeperlen versetzt und im Bioblock (90 °C) vorsichtig erhitzt, bis das Restwasser vollständig entfernt war. 2,2-Dimethoxypropan setzte Restwasser in Aceton und Methanol um. Die Probe wurde durch Argonbegasung in einem Wheaton-Gefäß vollständig eingeeengt.

### **Hydrolyse**

Die methylierte Probe wurde mit 1 ml 2 M TFA (Verdünnung aus TFA p.a., Merck, Darmstadt) 1 h bei 121 °C und 2 bar hydrolysiert, in einen Spitzkolben überführt und die TFA bei 40 °C im Wasserbad unter Stickstoff abgeblasen.

### **Reduktion**

Die Reduktion der partiell methylierten Monosaccharide erfolgte mit 2 ml einer frisch hergestellten Lösung von 0,5 M Natriumborhydrid (98 %, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) in 2 M Ammoniak (Verdünnung aus Ammoniak 25 %, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) 1 h bei 60 °C im Trockenschrank. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml Aceton (LiChrosolv<sup>®</sup>, Fa. Merck, Darmstadt) gestoppt und das Lösungsmittel bei 40 °C im Wasserbad unter Stickstoff abgeblasen.

### **Acetylierung**

Der viskose Rückstand wurde durch Zugabe von 200 µl Essigsäure (s.o.), 1 ml Ethylacetat (LiChrosolv<sup>®</sup>, Fa. Merck, Darmstadt), 3 ml Acetanhydrid (Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) (Lagerung über Molekularsieb 4 Å, Fa. Merck, Darmstadt) und 100 µl Perchlorsäure (70 % m/V, Fa. Merck, Darmstadt) als Katalysator 5 min. acetyliert. Anschließend wurde auf Eis gekühlt und überschüssiges Acetanhydrid durch 10 ml Aqua dem. und 200 µl 1-Methylimidazol (zur Synthese, Fa. Merck, Darmstadt; katalysiert die Umwandlung zu Essigsäure) zersetzt. Die partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) wurden mit 1 ml Dichlormethan (LiChrosolv<sup>®</sup>, Fa. Merck, Darmstadt) ausgeschüttelt, unter Stickstoff eingeeengt und für die gaschromatographische Trennung mit anschließender massenspektrometrischer Analyse eingesetzt (TIC) oder ausgewertet durch den FID.

**GLC:**

**TIC-Methode**

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

**GLC:**

**FID-Methode**

Gaschromatograph: HP 5890 Series II, Fa. Hewlett Packard, USA  
HP 6890, Fa. Hewlett Packard, USA  
Säule: WCOT-Kapillarsäule (fused Silica), Permabond  
OV-1701, L 25 m, ID 0,25 mm  
Fa. Macherey & Nagel, Düren  
Trägergas: HP 5890: Stickstoff  
HP 6890: Helium  
Injektionsvolumen: 1 µl  
Splitverhältnis: 1:30  
Flussrate: 1 ml/min.  
Temperaturprogramm: HP 5890: 2 min. 170 °C, 1 °C/min. auf 210 °C, 10 min.  
210 °C isotherm, Injektor 250 °C, FID-Detektor 240 °C  
HP 6890: 3 min. 120 °C, 8 °C/min. auf 170 °C, 1 °C/min.  
auf 200 °C, 10 min. 200 °C isotherm, Injektor 250 °C,  
FID-Detektor 240 °C  
Software: Programm HP GC Chemstation, Rev. A.06.03 [509]

Die Identifizierung der PMAAs erfolgte durch Vergleich ihrer relativen Retentionszeiten im Totalionenchromatogramm (TIC), durch Analyse der zugehörigen Massenspektren und Vergleich dieser mit bekannten PMAA-Spektren einer in der Arbeitsgruppe erstellten Bibliothek.

### **2.2.10 Aminosäureanalytik**

20 mg Probe wurden in ein verschließbares Reaktionsgefäß aus Pyrex-Glas eingewogen, mit 2 ml 6 N HCl (Verdünnung aus HCl 37-39 %, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) versetzt und 22 h bei 110 °C im Bioblock hydrolysiert. Die abgekühlte Probe wurde mehrfach zentrifugiert (10.000 g, 20 min.), um Pyrolyseprodukte des Polysaccharid-Anteils zu entfernen. Der Überstand wurde zur Trockne einrotiert, in 6 ml Aqua dem. aufgenommen und gefriergetrocknet.

#### **2.2.10.1 Kraut-AGP**

Der gefriergetrocknete Überstand (s.o.) wurde in 20 % Acetonitril in einer Konzentration von 1 mg/150 µl gelöst. Ein Aliquot von 15 µl (100 µg Trockengewicht) wurde der Konversion zu den entsprechenden Phenylthiohydantoinderivaten (PTH-Derivaten) unterworfen und über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Cystein (Cys) und Tryptophan (Trp) konnten aus methodischen Gründen nicht bestimmt werden (Stabilität). Diese Testung wurde von der WITA GmbH, Teltow durchgeführt.

### **2.2.10.2 Beeren-AGP**

Der gefriergetrocknete Überstand wurde mittels eines Aminosäureanalyzers beruhend auf Kationenaustauscherchromatographie, Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin und photometrischer Zwei-Wellenlängendetektion bestimmt.

Amino-Acid-Analyser:	Biochrom 30, Fa. Biochrom, Cambridge, England
Säule:	FG0369
Eluent:	Puffersystem physiologisches Programm P25 Lithiumacetat-Puffer mit pH-Werten von pH 2,95- pH 10,3, Fa. Onken, Gründau-Breitenhorn
Detektion:	Photometrisch nach Anfärben mit Ninhydrin-Farbreagenz, Fa. Onken, Gründau-Breitenhorn bei den Wellenlängen 440 nm und 570 nm Detektor: PCB, Fa. Biochrom, Cambridge, England

Diese Testung wurde vom Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der CAU zu Kiel durchgeführt.

### **2.2.11 Aufarbeitung von Mistellektin zu Vergleichszwecken**

Lektinsuspensionen von Mistellektin I (ML I), Mistellektin II (ML II) und Mistellektin III (ML III) von je 10 mg/ml in 3 M Ammoniumsulfatlösung wurden uns von Prof. Dr. U. Pfüller (Universität Witten/Herdecke, Witten) zur Verfügung gestellt. Für die Versuche wurde die benötigte Menge ML zentrifugiert (20.000 g, 10 min.), der Überstand verworfen und der Rückstand in Puffer (für die GPC in Elutionspuffer, siehe Methode 2.2.12.2, für die Aktivitätstestung an Toll-like Rezeptoren in Equilibrierungspuffer, siehe Methode 2.3.7) zu einer Konzentration von 1 mg/ml aufgenommen.

## 2.2.12 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Gelpermeationschromatographie ist eine Methode zur Trennung von Makromolekülen nach ihrem hydrodynamischen Volumen.

### 2.2.12.1 Sephacryl S-400 Säule

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Volumens wurde eine Probe in Elutionsmittel (0,1 %ige NaCl-Lösung) gelöst (Konz. 1 mg/ml), filtriert und auf die Säule (Sephacryl S-400) gegeben. Die Kalibrierung erfolgte mit Pullulanen (langen Ketten aus  $\alpha$ -1,6-verknüpften Maltotrioseeinheiten aus *Aureobasidium pullulans*, Fa. Shodex, Tokio, Japan) verschiedener Größen.

Tab. 2.2: Pullulan-Standards und deren mittlere Molekulargewichte (Herstellerangaben)

Pullulan-Standard	MW (Da)
P-10	12.200
P-20	23.700
P-50	48.000
P-100	100.000
P-200	186.000
P-400	380.000
P-800	853.000

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden die oben in der Tabelle aufgeführten Pullulan-Standards zu je ca. 1 mg eingewogen, in Aqua bidest. 12 h unter Schütteln vorgequollen und gelöst (Konz. 1 mg/ml). Die Standards wurden wie die Probe filtriert und über eine Dosierschleife (Volumen 1 ml) auf die Säule aufgetragen. Die tatsächliche Flussrate wurde vor dem Einspritzen der Standards und der Probe genau gemessen und berücksichtigt. Es wurde eine Kalibriergerade durch halblogarithmisches Auftragen der angegebenen Molekulargewichte der Pullulane gegen die ermittelten Elutionsvolumina erstellt (Peakmaximum im Refraktionsindex-(RI)-Detektor). Über die erhaltene Geradengleichung konnten die Molekulargewichte der einzelnen Peaks der Probe bestimmt werden.

## Experimenteller Teil

---

Säule:	Sephacryl S-400 HR, XK 16/60 Material: hydrophile Dextran-/Bisacrylamid-Matrix Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden Trennbereich für globuläre Proteine: 20.000 – 8 Mio. Dalton Trennbereich für Dextrane: 10.000 – 2 Mio. Dalton
Eluent:	0,1 %ige NaCl-Lösung (NaCl p.a., Firma Merck, Darmstadt) filtriert (Spritzenfilter Filtropur S 0,45, Poren-Ø 0,45 µm, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) und entgast (Ultraschallbad)
Pumpe:	HPLC-Pumpe Millipore 501, Fa. Waters, Milford, MA, USA
Flussrate:	0,5 ml/min.
Injektionseinheit:	V7-Valve, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden
Injektionsvolumen:	1 ml
Detektor:	RI-Detektor ERC-7515 A, Fa. ERMA CR INC., Tokio, Japan
Software:	ASTRA for Windows 4.73.04

### 2.2.12.2 PL-GPC-50 plus

Bei dieser Methode wurde das hydrodynamische Volumen mit dem Gerät PL-GPC-50 plus gemessen. Zur Bestimmung des hydrodynamischen Volumens wurde die jeweilige Probe in Elutionspuffer (s.u.) gelöst (Konz. 1 mg/ml), filtriert und auf die Säule gegeben. Mit Mistellektin I (ML I) (siehe 2.3.7) gespikete Proben wurden durch Lösen von ML I in Elutionspuffer, der 0,05 M Galactose enthielt, in einer Konzentration von 1 mg/ml und anschließendem Versetzen mit der entsprechenden Probe in gleichen Teilen (Konz. von ML I und Probe somit 0,5 mg/ml) erstellt. Die Eichung erfolgte mit Pullulanen (langen Ketten aus  $\alpha$ -1,6-verknüpften Maltotrioseeinheiten aus *Aureobasidium pullulans*) verschiedener Größen.

Tab. 2.3: Pullulan-Standards und deren mittlere Molekulargewichte (Herstellerangaben)

Pullulan-Standard	MW (Da)
P-5900	5.900
P-11800	11.800
P-22800	22.800
P-47300	47.300
P-112000	112.000
P-212000	212.000
P-404000	404.000
P-788000	788.000

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden die in der Tabelle aufgeführten Pullulan-Standards zu je ca. 1 mg eingewogen, im Elutionspuffer (0,1 M NaNO<sub>3</sub>; 0,05 % NaN<sub>3</sub>) 12 h unter Schütteln vorgequollen und gelöst (Konz. 1 mg/ml). Die Standards wurden über eine Dosierschleife (Volumen 0,1 ml) auf die Säule aufgetragen. Die tatsächliche Flussrate wurde vor jedem Einspritzen genau gemessen und berücksichtigt. Für die Auswertung mit dem MALLS-Detektor wurden durch logarithmische Auftragung der gemessenen hydrodynamischen Volumina gegen die vom Hersteller angegebenen Molekulargewichte Kalibriergeraden erstellt. Die hydrodynamischen Volumina der Probenpeaks wurden über die Geradengleichungen dieser Kalibriergeraden und auch durch direkte Softwareberechnung ermittelt.

## Experimenteller Teil

---

Gerät:	PL-GPC-50 plus, integrated GPC system, Polymer Laboratories, Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA (inklusive Pumpe und RI-Detektor) RI-Konstante: $2,2227 \times 10^{-5}$
Detektor:	Mult-Angle-Laser-Light-Scattering-(MALLS)-Detektor: Mini Dawn, Fa. Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, USA; MALLS-Konstante: $9,3151 \times 10^{-6}$
Software:	ASTRA for Windows 4.73.04
Säulen:	3 Säulen (hintereinander geschaltet): PL aquagel-OH Mixed 8 $\mu\text{m}$ 300 x 7,5 mm P/N: 1149-6800 Polymer Laboratories, Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA
Vorsäule:	PL aquagel-OH Guard 8 $\mu\text{m}$ 50 x 7,5 mm P/N: 1149-1840 Polymer Laboratories, Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA
Eluent:	für die Standards: 0,1 M $\text{NaNO}_3$ (p.a., Fa. Roth, Karlsruhe) und 0,05 % $\text{NaN}_3$ (reinst, Fa. Merck, Darmstadt) in Aqua bidest. filtriert (Spritzenfilter Filtropur S 0,45, Poren- $\emptyset$ 0,45 $\mu\text{m}$ , Fa. Sarstedt, Nümbrecht) und entgast (Ultraschallbad) für die Proben: Eluent für die Standards mit 0,05 M D(+)-Galactose ( $\geq 99,5$ %, Fa. Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim) in Aqua bidest., filtriert und entgast (s.o.)
Flussrate:	0,7 ml/min.
Delay:	0,207 ml
Druck:	0-13 MPa
Ofentemperatur:	35 °C
Injektionsvolumen:	0,1 ml
dn/dc (Brechungsindex- Inkrement):	Polysaccharide: 0,150 Lektin: 0,181
Pullulan – Standards:	Polysaccharide Standard Kit SAL-10, P/N: 2090-0100 Polymer Laboratories, Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA



## 2.3 Methoden der Immunologie

### 2.3.1 ELISA

#### Benutzte Geräte/Chemikalien

Brutschrank:	Elektronisch geregelter Wärmeschrank Modell BE 200, Fa. Memmert, Schwabach	
ELISA-Platten:	96-well Nunc Immuno <sup>®</sup> Plates Maxisorp <sup>®</sup> Surface Cert., Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark	
Washer:	Tecan <sup>®</sup> M8/4R Columbus plus, Fa. Tecan Group Ltd, Maennedorf, Schweiz	
Reader:	Tecan <sup>®</sup> Spectra III Thermo, Fa. Tecan Group Ltd, Maennedorf, Schweiz	
Shaker:	Modell ZLE 164, Amersham, England	
PBS pH 7,4:	Dinatriumphosphat-Dihydrat	5,82 g
	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	0,95 g
	NaCl	16,30 g
	(alle drei p.a., Fa. Merck, Darmstadt)	
	Kaliumchlorid (p.a., Fa. Roth, Karlsruhe)	0,40 g
	Aqua bidest. ad 2 Liter	
Wasch-PBS pH 7,4:	PBS pH 7,4 2 Liter + 1 g Tween 20 (Fa. Roth, Karlsruhe)	

#### 2.3.1.1 Kompetitiver ELISA

ELISA-Platten wurden mit 100 µl AGP aus *Echinacea purpurea* Presssaft (5 µg/ml in PBS) pro Kavität beschichtet und über Nacht bei 36 °C im Brutschrank mit offenem Deckel unter Eintrocknen inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS mit Tween (Wasch-PBS) wurden freie Bindungsstellen auf der Platte mit 200 µl 1 %iger boviner Serumalbumin (BSA)-Lösung (Albumin Fraktion V, Fa. Roth, Karlsruhe) pro Kavität abgesättigt (1 h, 36 °C). Die Platte wurde zum Entfernen von überschüssiger BSA-Lösung mit Wasch-PBS gewaschen. Verschiedene Konzentrationen an Antigen (0,5-100 µg/ml) in PBS wurden hergestellt und davon jeweils 100 µl der Lösungen mit 100 µl monoklonalem Antikörper (Verdünnung 1:500 in PBS) bzw. polyklonalen Antikörpern (Verdünnung 1:1000 in PBS) im Brutschrank bei 36 °C 1 h inkubiert. Pro

Kavität wurden 50 µl Antigen-Antikörper-Mischung aufgetragen (Doppelbestimmung). Die Platte wurde geschüttelt und inkubiert (1 h, 36 °C). Nach erneutem Waschen mit Wasch-PBS wurden 100 µl Detektorantikörper pro Kavität zupipettiert und 1 h bei 36 °C inkubiert. Die Platte wurde mit Wasch-PBS gewaschen und pro Kavität wurden 100 µl Substratlösung zugegeben und unter Lichtausschluss ca. 1 h bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde die Absorption bei 405 nm gegen 690 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Absorption ist umgekehrt proportional zur Reaktivität des Antigens mit dem Antikörper.

monoklonaler Antikörper: 4B8D3 aus Mäusen;  
Verdünnung 1:500 in PBS pH 7,4,  
gerichtet gegen AGP aus *Echinacea purpurea*  
(Classen *et al.*, 2004), isoliert aus dem Presssaft  
von oberirdischen Pflanzenteilen (Classen *et al.*,  
2000)

polyklonale Antikörper: aus Kaninchen, Ch. 639, Anti-AGP Elution Q,  
Verdünnung 1:1000 in PBS pH 7,4,  
gerichtet gegen AGP aus *Echinacea purpurea*  
(Classen *et al.*, 2005), isoliert aus dem Presssaft  
von oberirdischen Pflanzenteilen (Classen *et al.*,  
2000)

Antigene: AGP aus *Echinacea purpurea* Presssaft  
AGP aus Mistelkraut  
AGP aus Mistelbeeren  
AGP aus Mistelkraut nach Uronsäure-Reduktion  
nach Taylor und Conrad  
AGP aus Mistelbeeren nach Uronsäure-Reduktion  
nach Taylor und Conrad  
AGP aus Mistelkraut nach Partialhydrolyse  
(Rückstand)  
AGP aus Mistelbeeren nach Partialhydrolyse  
(Rückstand)

Detektorantikörper für den  
monoklonalen Antikörper:

polyklonal, aus der Ziege,  
gerichtet gegen Maus IgG,  
markiert mit alk. Phosphatase,  
Verdünnung 1:500 in PBS pH 7,4,  
Fa. Sigma-Aldrich, USA

Detektorantikörper für die  
polyklonalen Antikörper:

polyklonal, aus der Ziege,  
gerichtet gegen Kaninchen IgG,  
markiert mit alk. Phosphatase,  
Verdünnung 1:500 in PBS pH 7,4,  
Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim

Substrat:

Sigma Fast™ p-Nitrophenylphosphate Tablet Sets,  
zwei Tabletten in Aqua dem. gelöst ergeben 20 ml  
Substratlösung, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim

### **2.3.1.2 Indirekter ELISA**

ELISA-Platten wurden mit 100 µl Antigen (5 µg/ml in PBS) pro Kavität beschichtet und über Nacht bei 36 °C im Brutschrank mit offenem Deckel inkubiert. Nach dem Waschen mit Wasch-PBS wurden freie Bindungsstellen auf der Platte mit 200 µl 1 %iger BSA-Lösung (Albumin Fraktion V, Fa. Roth, Karlsruhe) pro Kavität abgesättigt (1 h, 36 °C). Die Platte wurde zum Entfernen von überschüssiger BSA-Lösung mit Wasch-PBS gewaschen. Verschiedene Konzentrationen an monoklonalem Antikörper in PBS wurden hergestellt und davon jeweils 100 µl pro Kavität aufgetragen (Doppelbestimmung). Die Platte wurde geschüttelt und im Brutschrank bei 36 °C 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Wasch-PBS wurden 100 µl Detektorantikörper pro Kavität zupipettiert und 1 h bei 36 °C inkubiert. Die Platte wurde mit Wasch-PBS gewaschen und pro Kavität wurden 100 µl Substratlösung zugegeben und unter Lichtausschluss ca. 1 h bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde die Absorption bei 405 nm gegen 690 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Absorption ist proportional zur Reaktivität des Antigens mit dem Antikörper.

Antigene:	AGP aus Mistelkraut Arabinan aus Mistelkraut AGP aus <i>Echinacea purpurea</i> Presssaft
monoklonale Antikörper:	
LM2 aus der Ratte:	gerichtet gegen Arabinogalaktan-Proteine ( $\beta$ -verknüpfte-GlcA im AGP) (Smallwood <i>et al.</i> , 1996), dialysiert gegen PBS pH 7,4
LM6 aus der Ratte:	spezifisch gegen lineare Ketten von (1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Arabinan gerichtet (Willats <i>et al.</i> , 1998) und gegen AGP (Lee <i>et al.</i> , 2005), dialysiert gegen PBS pH 7,4
JIM8 aus der Ratte:	gerichtet gegen Arabinogalaktan-Proteine (Glykan) (Knox, 1997; Pennell <i>et al.</i> , 1991; Pennell <i>et al.</i> , 1992), dialysiert gegen PBS pH 7,4
JIM13 aus der Ratte:	gerichtet gegen Arabinogalaktan-Proteine (Glykan) (Knox, 1997; Yates <i>et al.</i> , 1996), dialysiert gegen PBS pH 7,4
JIM14 aus der Ratte:	gerichtet gegen Arabinogalaktan-Proteine (Glykan) (Knox, 1997; Yates <i>et al.</i> , 1996), dialysiert gegen PBS pH 7,4
MAC207 aus der Ratte:	gerichtet gegen Arabinogalaktan-Proteine (Glykan) (Knox, 1997; Rasmussen <i>et al.</i> , 1996), dialysiert gegen PBS pH 7,4
Detektorantikörper für die monoklonalen Antikörper:	polyklonal, aus der Ziege, gerichtet gegen Ratten IgG, markiert mit alk. Phosphatase, Verdünnung 1:1000 in PBS pH 7,4, (Produkt Number: A8438; LOT: 065K6006), Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Substrat:	Sigma Fast <sup>TM</sup> p-Nitrophenylphosphate Tablet Sets, zwei Tabletten in Aqua dem. gelöst ergeben 20 ml Substratlösung, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim

### **2.3.2 Entfernung von Endotoxinen**

Zur Entfernung von in den Proben enthaltenen Endotoxinen mittels Affinitätschromatographie wurde das Produkt Endo Trap<sup>®</sup> red 5/1 (Fa. Profos, Regensburg) verwendet. Es handelt sich dabei um mit Agarosekügelchen gefüllte Säulen (Volumen 1 ml), an die spezifische Bakteriophagenproteine gebunden sind. Diese Proteine binden an die innere Kernregion von Endotoxinen. Die verwendeten Puffer wurden von der Firma mitgeliefert. Die Säule wurde mit je 6 ml Regenerierungspuffer (Natriumphosphatpuffer pH 7,4) und Equilibrierungspuffer (Dinatriumhydrogenphosphat / Natriumdihydrogenphosphat 10 mM, NaCl 80 mM, pH 7,4) gespült. Die Probe wurde in Equilibrierungspuffer gelöst (Konz. 1 mg/ml), steril filtriert (Spritzenfilter Filtropur S 0,2, Poren-Ø 0,2 µm, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) und auf die Säule gegeben (maximal 17 ml). Danach wurde mit 3 ml Equilibrierungspuffer gespült. Das Eluat und die Spüllösung wurden in endotoxinfreien Gefäßen aufgefangen. Die Säule wurde mit weiteren 3 ml Equilibrierungspuffer und anschließend mit 20 %igem Ethanol m/V (Verdünnung aus absolutem Ethanol, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) gespült. Nach Gebrauch erfolgte die Lagerung der Säulen in 20 %igem Ethanol m/V (s.o.).

### **2.3.3 Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test**

Dieser Test wurde unter Laminar Flow (Sterilbank) durchgeführt. Das Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) (Pyrotell<sup>®</sup>, Fa. Pyroquant, Mörfelden-Walldorf) wurde gemäß Gebrauchsinformation mit pyrogenfreiem Wasser (Acila<sup>®</sup> LRW, Fa. Acila, Mörfelden) rekonstituiert. Die Aktivität der Kontroll-Standard-Endotoxin-Charge gegenüber der verwendeten Lysat-Charge war aus dem Analysenzertifikat zu entnehmen. Das Kontroll-Standard-Endotoxin (KSE) (Fa. Pyroquant, Mörfelden-Walldorf) wurde gemäß der mitgelieferten Gebrauchsanweisung rekonstituiert. Es wurde eine Verdünnungsreihe (1:2) des KSE hergestellt und zusätzlich zum Test eine Doppelbestimmung von je zwei Werten durchgeführt, die über und unter der angegebenen Nachweisgrenze (Herstellerangabe) lagen. Alle für den LAL-Test verwendeten Glasgeräte wurden durch Hitzebehandlung (30 min., 250 °C) im Trockenschrank entpyrogenisiert. Für die Verdünnungsreihen wurde pyrogenfreies Wasser (s.o.) verwendet. Zur Durchführung des LAL-Tests wurden 0,1 ml der

Probensubstanz nach Entfernung von Endotoxinen (siehe 2.3.2) in ein 10 mm x 75 mm großes, pyrogenfreies Reaktionsröhrchen gegeben und mit dem gleichen Volumen rekonstituiertem LAL versetzt. Die Reaktionslösung wurde gründlich gemischt (Vortex) und 60 min.  $\pm$  2 min. bei 37 °C  $\pm$  1 °C erschütterungsfrei im Wasserbad inkubiert. Nach Inkubation wurde das Röhrchen aus dem Wasserbad entnommen und um 180 ° gedreht. Der Test wurde als positiv bewertet, wenn sich ein Gel gebildet hatte, das unbeschadet am Röhrchenboden haftete. Alle anderen Zustände bedeuteten ein negatives Testergebnis.

### **2.3.4 Lipopeptid-Entfernung**

Diese Methode wurde in Anlehnung an Hashimoto *et al.*, 2006 durchgeführt. In ein pyrogenfreies Reagenzglas mit Glasstopfen wurden 40 mM Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (Fa. Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim) vorgelegt, dazu wurde 1,0 mg Lipoproteinlipase (aus *Pseudomonas sp.*, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) eingewogen und 5 ml Probe, nach Entfernung von Endotoxinen (Methode 2.3.2) und bei einigen Proben auch nach zusätzlicher Lektin-Entfernung durch Pronase-Behandlung (Methode 2.3.6) in Equilibrierungspuffer (siehe Methode 2.3.2) gelöst, hinzupipettiert. Zusätzlich wurde eine Blindwertlösung (Puffer) wie oben beschrieben erstellt, die anstatt der Probe nur Equilibrierungspuffer enthält. Es wurde bei 37 °C für 16 h im Trockenschrank inkubiert. Anschließend wurden die Proben gemischt (Vortex), in pyrogenfreie Gefäße zu je 1 ml pipettiert und bis zur weiteren Testung bei -20 °C eingefroren.

### **2.3.5 Testung der AGPs auf Kontamination mit Mistellektinen**

1,2 mg Mistelkraut-AGP wurden in 120  $\mu$ l reduzierendem Probenpuffer aufgenommen, 4 min. im Wasserbad gekocht und zentrifugiert. Es entstand ein unlöslicher Rest; der Überstand wurde zur Elektrophorese verwendet. 1,0 mg Mistelbeeren-AGP wurde in 100  $\mu$ l reduzierendem Probenpuffer aufgenommen, 4 min. im Wasserbad gekocht und zentrifugiert. Hierbei blieb kein unlöslicher Rest, die gesamte Lösung wurde somit zur Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) verwendet. Die Lektine wurden durch Sodiumdodecylsulfat (SDS)-PAGE nach steigenden Molekulargewichten aufgetrennt. Die aufgetrennten Lektine wurden auf Nitrocellulosemembranen übertragen (Blot) und mit polyklonalem Anti-

Mistellektinantikörper detektiert. Diese Testung wurde vom Arbeitskreis Prof. Dr. U. Pfüller, Universität Witten/Herdecke, Witten durchgeführt.

### **2.3.6 Entfernung von Lektinen in den AGP-Präparationen durch Pronase-Behandlung**

20 mg AGP-Präparation wurde in 0,1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (> 95 %, Fa. Merck, Darmstadt) (Tris)-HCl-Puffer pH 7,5, dem 0,5 % Natriumdodecylsulfat (SDS  $\geq$  85 %, Fa. Merck, Darmstadt) zugefügt worden war, zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst (Ultraschallbad 30 min.). 1 mg Pronase aus *Streptomyces griseus* (CAS-Nr.: 9036-06-0, Fa. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) wurde hinzugefügt und der Ansatz bei 37 °C für 48 h inkubiert (An *et al.*, 2003). Anschließend wurde das Enzym durch zehnmünütige Behandlung bei 100 °C denaturiert und durch Zentrifugation (20.000 g; 20 min.) und anschließende Filtration (Schleicher & Schüll Rundfilter, Ø 7 cm, Rf.No. 10311608, Fa. Whatman, Dassel), abgetrennt. Der Überstand wurde 72 h gegen Aqua bidest. dialysiert (MWCO 12-14 kDa) und gefriergetrocknet.

### **2.3.7 Aktivitätstestung an Toll-Like-Rezeptoren**

Diese Testung wurde von Prof. Dr. A. J. Ulmer vom Research Center, Borstel durchgeführt. Für die Testung wurden Human-Embryonic-Kidney (HEK)293-Zellen transfiziert und stimuliert. Die Transfektion der HEK293-Zellen wurde mit dem Transfektionsreagenz Polyfect (Fa. Qiagen, Hilden) in Anlehnung an die Herstelleranweisung mit pREP9Flag-TLR2- u. -TLR4/MD2/CD14-Expressions-Plasmiden durchgeführt, um HEK293-TLR2-Zellen, die auf Lipopeptide ansprechen, und um HEK293-TLR4/MD2/CD14-Zellen, die auf Lipopolysaccharide (LPS) ansprechen, zu erhalten. Nach Inkubation (6 h) wurden die Zellen gewaschen und 24 h mit Lipopeptid (Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub>, Positivkontrolle für TLR2), LPS (Positivkontrolle für TLR4) oder den AGP-Präparationen, den AGP-Präparationen nach Endotoxin-Entfernung (Methode 2.3.2), den AGP-Präparationen nach Endotoxin- und Lipopeptid-Entfernung (Methode 2.3.2 und 2.3.4), den AGP-Präparationen nach Lektin- und Endotoxin-Entfernung (Methode 2.3.6 und 2.3.2) und Mistellektin I, II, III (Methode 2.2.11) je 1 mg/ml in Equilibrierungspuffer (siehe Methode 2.3.2) aktiviert.

Außerdem wurde die Aktivität der reinen Pufferlösung getestet. Bei einigen Testungen wurde auch die Aktivierung durch TNF- $\alpha$  als Kontrolle bestimmt und zusätzlich der Wert unstimulierter Zellen gemessen. Der Interleukin (IL)-8-Gehalt in den Überständen der Kulturen wurde durch ELISA (Fa. Biosource, Camarillo, CA, USA) vermessen.

### **2.3.8 Immunfluoreszenz-Markierung**

1-jährige Mistelsprosse wurden in Gewebe-Gefrier-Medium (Fa. Jung, Nussloch) eingebettet und mit dem Frigocut 2800E (Fa. Jung, Nussloch) geschnitten. Die Schnitte wurden auf SuperFrost Plus<sup>®</sup> Objektträger (Fa. Menzel, Braunschweig) aufgebracht und bei -20 °C gelagert. Diese Schnitte wurden in der Zentralen Mikroskopie der CAU zu Kiel angefertigt. Zum Auftauen wurden die Schnitte in Aceton (LiChrosolv<sup>®</sup>, Fa. Merck, Darmstadt) -20 °C überführt und 30 min. bei Raumtemperatur gelagert und anschließend 5 min. bei 37 °C getrocknet. Die Schnitte wurden 30 min. mit PBS (siehe Methode 2.3.1) und 1 h mit Blockierpuffer behandelt. Anschließend wurden diese 90 min. mit  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz (siehe Methode 2.1.3, ein Tropfen pro Schnitt), das in der Konzentration 0,4 mg/ml in Aqua bidest. unter Zusatz von 0,15 M NaCl (p.a., Fa. Merck, Darmstadt) gelöst worden war, in einer selbstgebauten Feuchtkammer unter leichtem Schütteln inkubiert (nur für die AGP-Markierung). Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte 1 h mit dem entsprechenden Primär-Antikörper (ein Tropfen pro Schnitt, Kontrolle ohne den Antikörper) in der Feuchtkammer inkubiert. Es wurde mit PBS gewaschen und 2 Mal für 5 min. mit Verdünnungspuffer (ein Tropfen pro Schnitt) in der Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit dem jeweiligen Sekundär-Antikörper (ein Tropfen pro Schnitt) 1 h in der Feuchtkammer gelagert. Nach mehrmaligem Waschen der Schnitte mit Wasch-PBS (siehe Methode 2.3.1) und Aqua bidest. wurden diese in Mowiol-DABCO-Reagenz eingebettet (1 Tropfen pro Deckglas) und bis zur weiteren Untersuchung bei 5 °C unter Lichtausschluss gelagert. Die Fluoreszenz-markierten Schnitte wurden mit einem Konfokalen-Laser-Raster-Mikroskop (CLSM) (Fa. Leica, Wetzlar) untersucht und fotografiert.



## Experimenteller Teil

---

- Blockierpuffer:** Es wurden 50 ml 0,2 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-carbonat (Fa. Roth, Karlsruhe) und 30 ml 5 M NaCl (p.a., Fa. Merck, Darmstadt) ad 1000 ml Aqua bidest. hergestellt; 0,3 % BSA (Albumin Fraktion V, Fa. Roth, Karlsruhe) und 0,1 % Tween 20 (Fa. Roth, Karlsruhe) wurden hinzugefügt.
- Verdünnungspuffer:** Es wurden 50 ml 0,2 M Tris-carbonat (s.v.) und 30 ml 5 M NaCl (s.v.) ad 1000 ml Aqua bidest. hergestellt; 3 % BSA (s.v.) wurden hinzugefügt.
- Mowiol-DABCO-Reagenz:** Herstellung: 6 g Glycerol (p.a., Fa. Merck, Darmstadt), 2,4 g Mowiol 4-88 (Calbiochem # 475904, über Fa. Merck, Darmstadt), 6 ml Aqua bidest., 12 ml 0,2 M Tris-carbonat (s.v.) und 0,1 % 1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)-octan (DABCO, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden gemischt und für 4-12 h gerührt. Die Lösung wurde 10 min. bei 50 °C im Wasserbad erwärmt und anschließend zentrifugiert (5.000 g, 15 min.). Der Überstand wurde in Aliquots zu 1 ml abgefüllt und bei -20 °C gelagert.  
Anwendung: Ein Aliquot wurde aufgetaut und ein kleiner Tropfen des Reagenzes wurde auf einen Objektträger (Fa. Menzel, Braunschweig) gegeben, das Deckgläschen (Fa. Menzel, Braunschweig) wurde mit einer Pinzette ohne Druck auf den Tropfen gelegt. Vor dem Mikroskopieren musste mindestens 1 h gewartet werden, erst nach 12 h war das Reagenz vollständig auspolymerisiert.
- AGP-Markierung:**
- Primär-Antikörper:** Anti-Yariv-Antikörper Elution Q (1:25), polyklonal, Fa. Squarix GmbH, Marl
- Sekundär-Antikörper:** Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-markierter Anti-Kaninchen-Antikörper IgG (whole molecule) (1:100), monoklonal aus der Ziege, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim

Lektin-Markierung:

Primär-Antikörper: Anti-Mistellektin-I-(A-Kette 5H8)-Antikörper 0,1 mg/ml,  
monoklonal aus der Maus, Ch.-B. 010404, Fa. Sifin, Berlin

Sekundär-Antikörper: ALEXA FLUOR<sup>®</sup> 594 Anti-Maus-Antikörper (IgG H+L)  
10 µg/ml, monoklonal aus der Ziege, Fa. Invitrogen,  
Karlsruhe

### Allgemein verwendete Geräte

Autoklav: Webeco, Fabriknr. 77807, Fa. Webecke, Bad Schwartau

Autotitrator: 719 S Titrino, Fa. Metrohm, Herisau, Schweiz

Bioblock: Bioblock Scientific Code 92607, Fa. Thermolyne Corp.,  
Barnstedt International, Dubuque, IA, USA

Brutschrank: Modell 200, Fa. Memmert, Schwabach

Dialyseschläuche: Spectra/Por<sup>®</sup> 4 Regenerated Cellulose membrane,  
Ø 20 mm, MWCO 12.000-14.000 Da, Fa. Spectrum  
Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA

Gefriertrocknung: Beta 1-8K, Fa. Christ, Osterode am Harz

Heizrührer: IKAMAK<sup>®</sup> RH, RET oder RET basic, Fa. IKA<sup>®</sup> Works,  
Wilmington, NC, USA

pH-Meter: 761 Calimatic, Fa. Knick, Berlin

Photometer: Cary 50 Scan, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA

Rotationsverdampfer: Rotavapor RE 120, Fa. Büchi, Flawil, Schweiz  
mit Membranvakuumpumpe, Fa. Vacuubrand, Wertheim  
oder Laborota 4000-efficient, Fa. Heidolph, Schwabach  
mit Vakuummembranpumpe CVC 2000 II,  
Fa. Vacuubrand, Wertheim

## Experimenteller Teil

---

Schüttler:	Schüttler SM, Fa. Edmund Bühler, Tübingen
Sterilbank:	antair ZKB 4, Fa. Mahl, Trendelburg
Trockenschrank:	Typ T 6060, Fa. Heraeus Instruments, Hanau
Ultraschallbad:	Sonorex Super 10P Digital oder Sonorex Super RK 1028BH, beide Fa. Bandelin, Berlin
Vortex	Genie 2 <sup>TM</sup> , Fa. Bender & Hobein, Zürich, Schweiz MS2 Minishaker, Fa. IKA <sup>®</sup> Works, Wilmington, NC, USA
Waagen:	Analysenwaagen: Modell Genius ME 215 S-OCE oder BP 1109 Laborwaage: Typ L 2200 P alle drei Fa. Sartorius, Göttingen
Wasserbad:	temperierbares Wasserbad Typ 1002, Fa. GFL, Burgwedel
Wheaton-Gefäße:	Fa. Wheaton, Millville, NJ, USA
Zentrifugen:	Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Hanau Ultrazentrifuge Sigma 3K 30, Fa. Sigma, Osterode am Harz

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Isolierung und Analytik

#### 3.1.1 Isolierungsgang und Extrakt-Ausbeuten

##### 3.1.1.1 Mistelkraut

Mistelkraut wurde nach Methode 2.1.1.1 und 2.1.1.2 isoliert. Die hergestellten Extrakte wurden mit römischen Ziffern durchnummeriert und z.B. mit K I für den ersten Krautextrakt bezeichnet; Heißextrakte nach Methode 2.1.1.2 wurden mit einem kleinen a hinter der Ziffer bezeichnet. Wasserunlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bzw. Auspressen mit einer Tinkturenpresse abgetrennt. Proteine wurden durch das Erhitzen auf 90 °C denaturiert und konnten wiederum durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die Tangentialflussfiltration (TFF) teilte den Extrakt in eine niedermolekulare Fraktion (Filtrat) (Fil TFF) und eine hochmolekulare Fraktion (Retentat). Das Retentat der Tangentialflussfiltration (Ret TFF) wurde durch die Dialyse weiter aufgereinigt und als dialysiertes Retentat (Ret Dia) bezeichnet.

Aus 1 kg Droge (Trockengewicht) als Ausgangsmaterial wurden für die Extrakte die in Tabelle 3.1 aufgeführten Ausbeuten erhalten. Der Gehalt an extrahiertem AGP lag bei den Kaltextrakten zwischen 0,05 und 0,1 % bezogen auf das Trockengewicht. Der Heißextrakt IIa enthielt aufgrund des schon für den Kaltextrakt verwendeten Materials deutlich weniger AGP, da dieses zum größten Teil schon kalt extrahiert wurde. Der Heißextrakt IIIa, bei dem die Droge direkt heiß extrahiert wurde, enthielt mit 0,07 % bezogen auf das Trockengewicht vergleichbare Mengen an AGP wie die Kaltextrakte.

Tab. 3.1: Ausbeuten der einzelnen Extrakt-Fractionen bezogen auf 1 kg Ausgangsdroge

\*Ergebnisse unter Vorbehalt, da Verluste bei der Dialyse

	<b>K I</b>	<b>K II</b>	<b>K IIa</b>	<b>K IIIa*</b>	<b>K VI</b>
Fil TFF	113,27 g	138,18 g	19,25 g	56,61 g	156,12 g
Ret Dia	8,41 g	15,32 g	5,45 g	12,06 g	8,84 g
AGP	ca. 0,05 %	ca. 0,1 %	ca. 0,01 %	ca. 0,07 %	ca. 0,05 %

### 3.1.1.2 Mistelbeeren

Mistelbeeren wurden nach Methode 2.1.2 isoliert; der hergestellte Extrakt wurde mit B I (Beerenextrakt I) bezeichnet. Wasserunlösliche Bestandteile wurden durch Auspressen mit einer Tinkturenpresse abgetrennt. Proteine wurden durch das Erhitzen auf 90 °C denaturiert und konnten durch Zentrifugation abgetrennt werden. Es waren jedoch deutlich weniger Proteine enthalten als im Krautextrakt. Die erschöpfende Tangentialflussfiltration, bis zum Erhalt eines wässrigen Filtrats, teilte den Extrakt in eine niedermolekulare Fraktion (Filtrat) (Fil TFF) und eine hochmolekulare Fraktion (Retentat). Das Retentat der Tangentialflussfiltration (Ret TFF) wurde durch die Dialyse von noch vorhandenen niedermolekularen Bestandteilen befreit und als dialysiertes Retentat (Ret Dia) bezeichnet.

Das Trockengewicht der Mistelbeeren betrug 23 % vom Frischgewicht. Frische Mistelbeeren enthielten ca. 0,1 % AGP. Aus 500 g Mistelbeeren (Frischgewicht) als Ausgangsmaterial wurden folgende Ausbeuten (Tab. 3.2) erhalten:

Tab. 3.2: Ausbeuten der einzelnen Extrakt-Fractionen bezogen auf 500 g Frischgewicht

Extrakt-Fraktion	B I
Frischgewicht	500,0 g
Trockengewicht	115,6 g
Fil TFF	49,5 g
Ret Dia	13,1 g
AGP	ca. 0,13 %

### 3.1.2 Geldiffusionstest

#### 3.1.2.1 Mistelkraut

Mit dem Geldiffusionstest (Methode 2.2.1) wurde auf Anwesenheit von AGPs getestet. Hierbei wird die spezifische Fällung von AGPs mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz unter Entstehung einer charakteristischen roten Präzipitationsbande ausgenutzt. Es wurden verschiedene Konzentrationen des Ret Dia von drei verschiedenen Krautextrakten und das Fil TFF von K I getestet. Das Filtrat der TFF

## Ergebnisse

zeigte bei keiner Konzentration eine Präzipitationsbande, somit enthielt es kein AGP und wurde nicht weiter untersucht. Das dialysierte Retentat von K I zeigte bei einer Konzentration ab 1 mg/ml Präzipitationsbanden, bei K II war eine Bande erst bei 2 mg/ml zu erkennen. Im Heißextrakt K IIa fand sich deutlich weniger AGP.

Tab. 3.3: Ergebnisse der Gelddiffusionstests für Mistelkraut (+: Präzipitationsbandenbildung, -: keine Präzipitationsbandenbildung)

mg/ml	Filtrat der TFF (Fil TFF)		Retentat der Dialyse (Ret Dia)	
	K I Bande	K I Bande	K II Bande	K IIa Bande
0,01	-	-	-	-
0,02	-	-	-	-
0,05	-	-	-	-
0,1	-	-	-	-
1,0	-	+	-	-
2,0	-	+	+	-
5,0	-	+	+	+
10,0	-	+	+	+

Die Abbildung 3.1 zeigt zwei Ausschnitte der Agarosegelplatten.

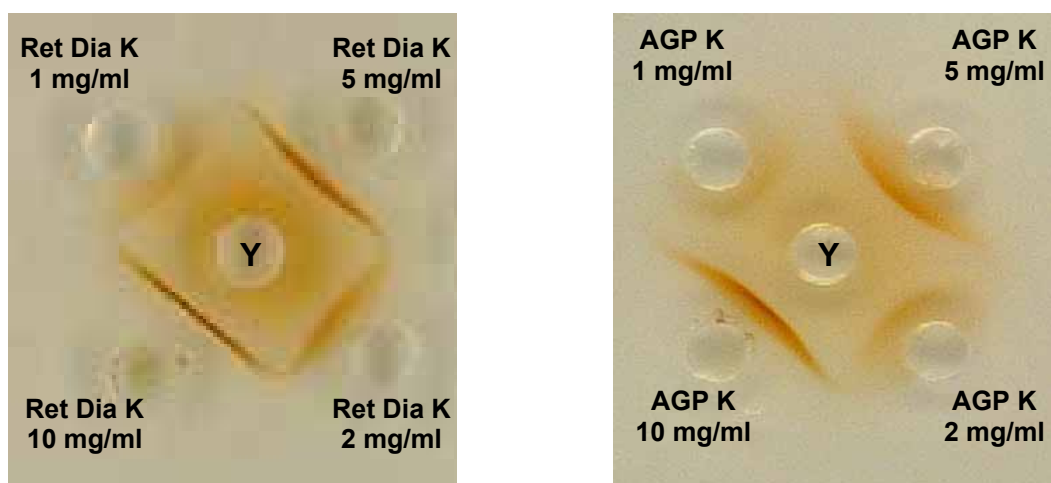


Abb. 3.1: Gelddiffusionstest unterschiedlicher Konzentrationen des dialysierten Retentats (Ret Dia K) und von AGP (AGP K) von K I mit Yariv-Reagenz 1 mg/ml (Y)

Auf dem linken Ausschnitt sind deutliche Präzipitationsbanden beim Auftrag des dialysierten Retentats von Krauttextakt I ab einer Konzentration von 1 mg/ml erkennbar. AGPs wurden nach Methode 2.1.4 isoliert, bei der das  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz als spezifisches Fällungs-Reagenz verwendet wurde. Zur Kontrolle der Fällung wurde nochmals ein Geldiffusionstest des isolierten AGPs mit Yariv-Reagenz durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.1 auf der rechten Seite dargestellt und zeigt wiederum die charakteristischen Präzipitationsbanden.

### 3.1.2.2 Mistelbeeren

Das Mistelbeeren-AGP wurde genau wie das Kraut-AGP nach Methode 2.1.4 gewonnen. Zur Überprüfung der spezifischen Fällung wurde ein Geldiffusionstest mit Mistelbeeren-AGP durchgeführt; nur bei Konzentrationen von 5 mg/ml und 10 mg/ml konnte eine Präzipitationsbande erhalten werden. Die Abbildung 3.2 zeigt den entsprechenden Ausschnitt der Agarosegelplatte.

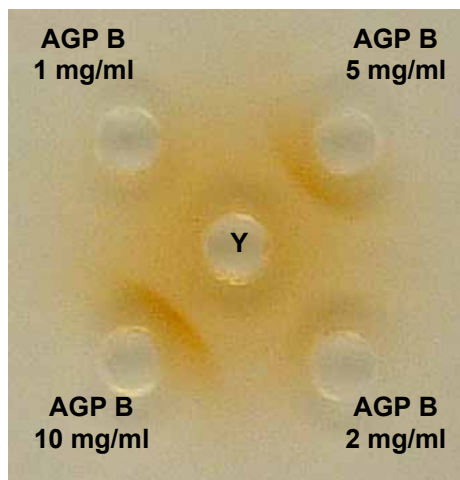


Abb. 3.2: Geldiffusionstest unterschiedlicher Konzentrationen von Beeren-AGP (AGP B) von B I mit Yariv-Reagenz 1 mg/ml (Y)

### 3.1.2.3 Vergleich Mistelbeeren und Mistelkraut

Kraut-AGP zeigte im Geldiffusionstest deutlich stärkere Präzipitationsbanden als Beeren-AGP. Um die zwei verschiedenen AGPs besser vergleichen zu können, wurden beide auf einer Agarosegelplatte getestet. Es wurden hohe Konzentrationen von 10 mg/ml und 20 mg/ml AGP gewählt, um die Unterschiede der Reaktivität beider AGPs mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz deutlich zu machen. In

Abbildung 3.3 sind die Ergebnisse dargestellt: auf dem rechten Ausschnitt der Agarosegelplatte ist zu erkennen, dass das Kraut-AGP aufgrund der hohen Konzentration (20 mg/ml) keine scharfe Präzipitationsbande mehr bildete. Kraut-AGP reagierte deutlich stärker mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz als Beeren-AGP.

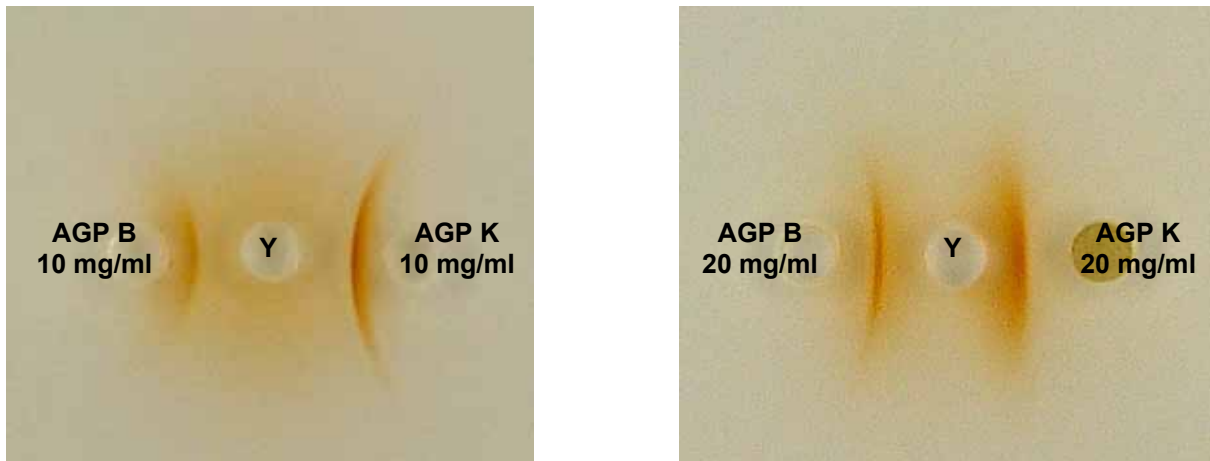


Abb. 3.3: Geldiffusionstest unterschiedlicher Konzentrationen von Beeren-AGP (AGP B) von B I und von Kraut-AGP (AGP K) von K I mit Yariv-Reagenz 1 mg/ml (Y)

### 3.1.3 Keimzahlbestimmung

Bei der vergleichenden Keimzahlbestimmung (Methode 2.2.2) eines Mistelkrautextrakts mit einem Wurzelextrakt aus *Echinacea pallida* (beide gleich hergestellt nach Methode 2.2.2) wurden die inkubierten Platten nach 48 h ausgezählt. Bei der Aufgabe von 0,1 ml Extrakt auf die fertig gegossene Platte zeigte der Mistelkrautextrakt eine Verkeimung von  $10^4$  KBE/ml. Der *Echinacea pallida*-Wurzelextrakt enthielt nur  $10^1$  KBE/ml. Bei dem Verfahren mit Aufgabe von 1 ml Extrakt und Zugabe des flüssigen Nährbodens enthielt der Mistelkrautextrakt  $10^3$  KBE/ml, der *Echinacea pallida*-Wurzelextrakt  $10^2$  KBE/ml. Der Mistelkrautextrakt war somit deutlich stärker mit aeroben und auch mit anaeroben Keimen belastet als ein Wurzelextrakt. Eigentlich wäre zu erwarten gewesen, dass ein Wurzelextrakt aufgrund der Herkunft des Drogenmaterials eine stärkere Verkeimung aufweist als ein Krautextrakt.



### 3.1.4 Antioxidative Testungen

Für die antioxidativen Testungen wurde nach Methode 2.2.3 jeweils ein Mistelbeeren- und ein Mistelkrautrohextrakt hergestellt. Es wurde auf antioxidative Kapazität lipophiler (durch wässrige Extraktion kaum enthaltener) und hydrophiler Inhaltsstoffe getestet.

#### 3.1.4.1 Lipophile Substanzen

Bei diesem Test wird die antioxidative Kapazität (Methode 2.2.3.1) durch die Reduktion des DPPH-Radikals zu einem Hydrazinderivat bestimmt. Die Ergebnisse des DPPH-Tests wurden in Prozent der Inhibition der Oxidation des Hydrazinderivats angegeben. Es wurde die prozentuale Inhibition gegen die Konzentration der Probe in mg/100 ml aufgetragen und die Konzentration, bei der eine Hemmung von 50 % erfolgt (IC<sub>50</sub>), berechnet. Es konnten nur Ergebnisse für den Mistelbeerenrohextrakt (Abb. 3.4) ermittelt werden, da der gefriergetrocknete Mistelkrautrohextrakt nicht in für die Messung ausreichender Konzentration in EtOH gelöst werden konnte.

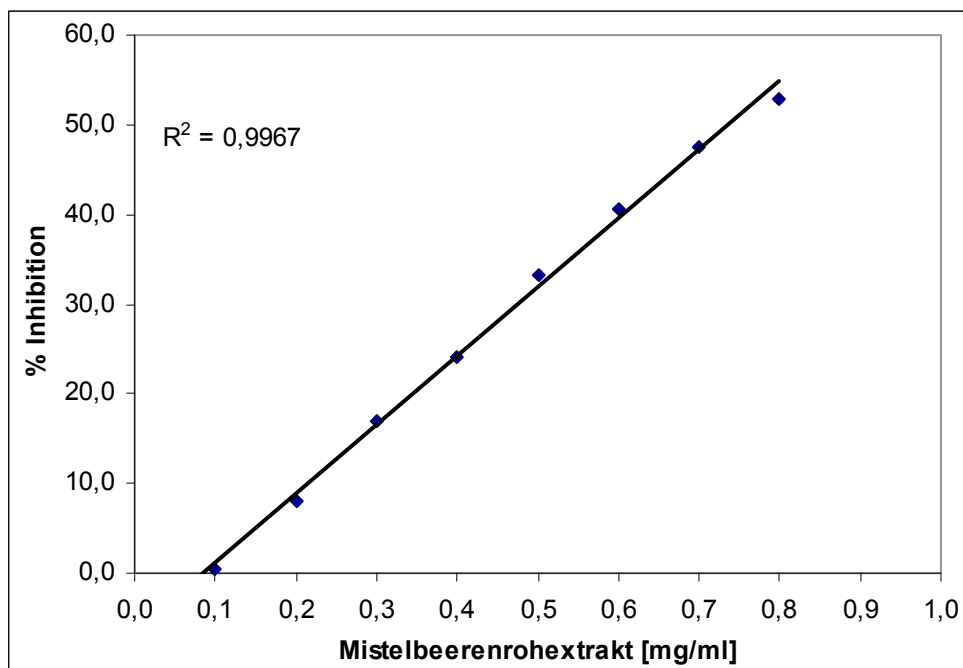


Abb. 3.4: Antioxidative Potenz von Mistelbeerenrohextrakt

Die IC<sub>50</sub> von Mistelbeerenrohextrakt beträgt 0,71 mg/ml.

### 3.1.4.2 Hydrophile Substanzen

Trolox ist ein wasserlösliches Vitamin-E-Derivat, welches bei der Messung der antioxidativen Kapazität als Standard eingesetzt wird. Die antioxidative Kapazität wurde mit der TEAC-Methode (Methode 2.2.3.2) bestimmt. Dazu wurde eine Kalibriergerade (Abb. 3.5) mit den Messdaten des Troloxstandards erstellt und anschließend die Probe vermessen. Der Reaktionsverlauf folgt einer Kinetik 1. Ordnung. Die Antioxidantien verzögern die linear ansteigende Farbreaktion. Die Messwerte (TEAC-Werte) geben die antioxidative Kapazität in Bezug auf die Aktivität einer 1 mM Trolox-Lösung an.

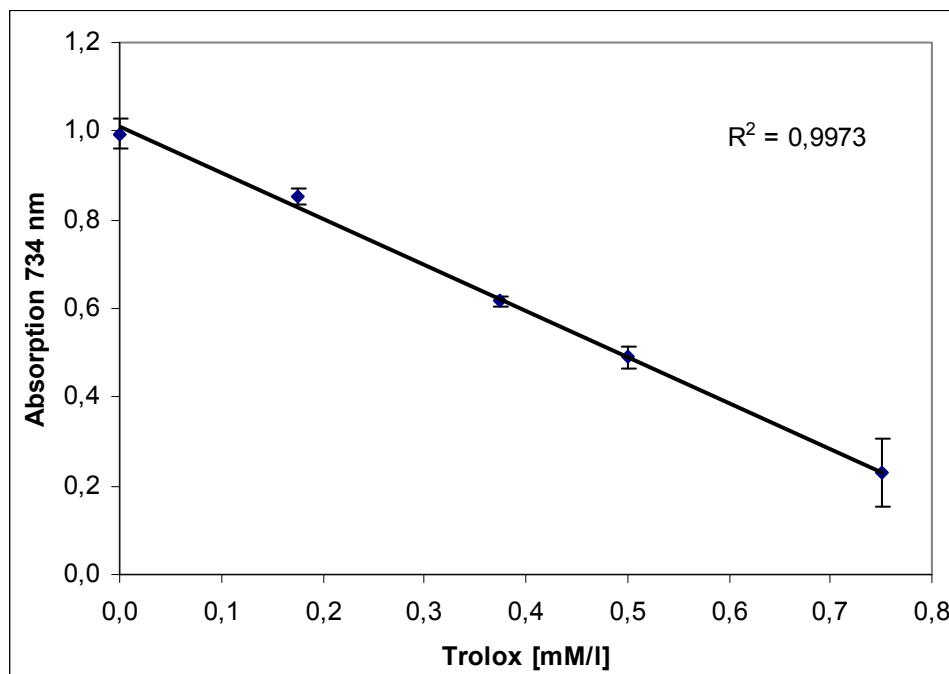


Abb. 3.5: Kalibriergerade für die Messung der antioxidativen Kapazität nach der TEAC-Methode

Für Mistelbeerenrohextrakt in einer Konzentration von 1 mg/ml wurde eine antioxidative Kapazität von 0,07 Trolox [mM/l], für Mistelkrautrohextrakt (Konz. 1 mg/ml) wurde eine antioxidative Kapazität von 0,21 Trolox [mM/l] bestimmt.

### 3.1.5 Neutralzucker-Zusammensetzung der einzelnen Extrakt-Fractionen

Durch Acetylierungsanalyse (Methode 2.2.4) wurden die Monosaccharid-Zusammensetzungen in den einzelnen Fraktionen der Kraut- und Beerenextrakte bestimmt. Bei dieser Methode werden nur Neutralzucker erfasst, keine Uronsäuren. Vorteil der Methode ist, dass jedes Monosaccharid bei der GLC-Analyse nur einen Peak liefert.

#### 3.1.5.1 Mistelkraut

Die folgenden Abbildungen 3.6 und 3.7 zeigen ein Chromatogramm des Rohextrakts und ein Chromatogramm des Filtrats der TFF von Krautextrakt I nach der Acetylierung. Bei der Acetylierungsanalyse dieser beiden Fraktionen wurden zusätzlich zu den bestimmten sieben Monosacchariden (Rha, Fuc, Ara, Xyl, Man, Gal, Glc; interner Standard Ino) bei einer relativen Retentionszeit von 0,57, 0,70 und 0,72 sowie vor dem Mannose-Peak bei 0,80 und 0,82 Peaks gemessen, die keinem der als Standard verwendeten Zucker zugeordnet werden konnten.

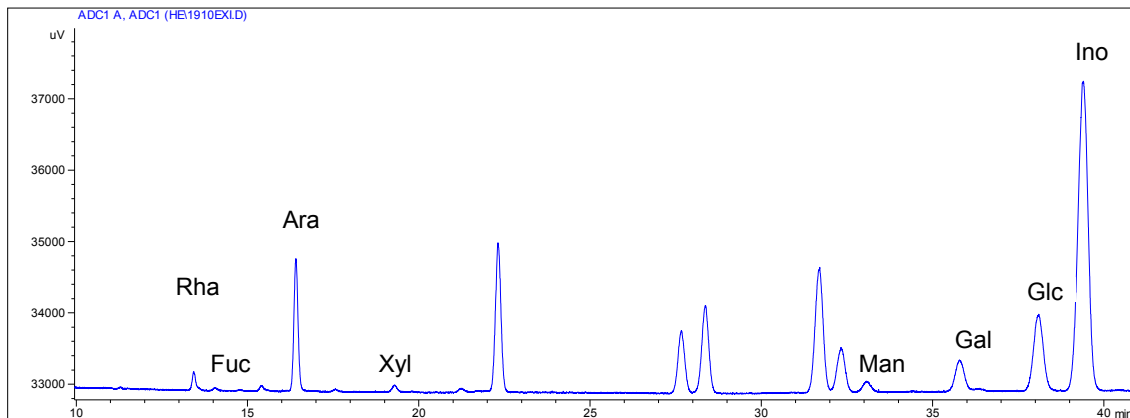


Abb. 3.6: GLC der acetylierten Monosaccharide des Rohextrakts von K I

## Ergebnisse

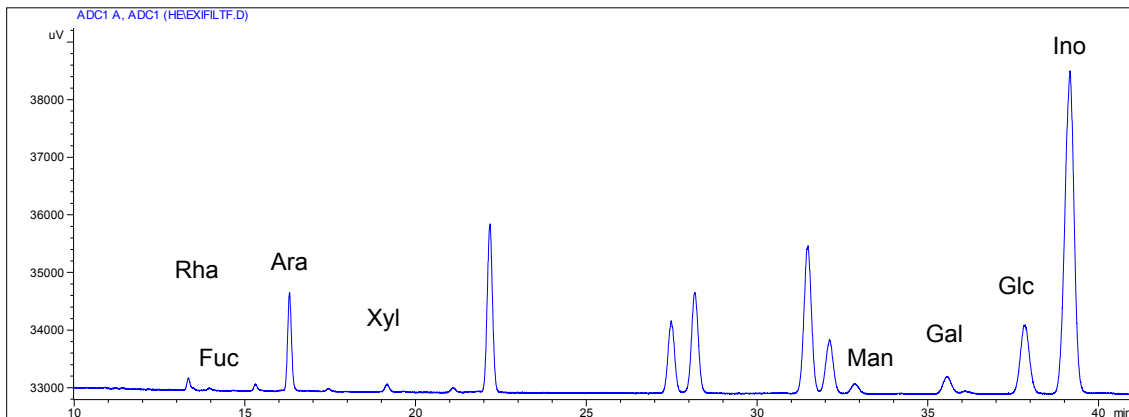


Abb. 3.7: GLC der acetylierten Monosaccharide des Filtrats der TFF von K I

In Tabelle 3.4 sind die Monosaccharid-Zusammensetzungen des Rohextrakts von K I und des Filtrats der TFF für alle hergestellten Krautextrakte dargestellt. Glucose stellte mit 50 % das dominierende Monosaccharid. Zu beachten ist die geringe Ausbeute, teilweise unter 10 % Neutralzucker bei der Acetylierung, die durch noch vorhandene Begleitstoffe der Extraktion bedingt war.

Tab. 3.4: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des Rohextrakts und des Filtrats der TFF aus Mistelkraut

Monosaccharid	Rohextrakt		Filtrat der TFF (Fil TFF)			
	K I	K I	K II	K IIa	K IIIa	K IV
Rhamnose	4,6	3,9	3,7	3,2	3,5	4,0
Fucose	0,8	0,7	0,7	0,9	0,5	0,7
Arabinose	27,1	24,9	21,7	23,6	11,8	22,7
Xylose	1,5	2,3	2,7	2,6	1,7	2,3
Mannose	4,0	5,3	5,8	7,0	28,2	3,8
Galactose	13,9	9,3	7,7	6,3	5,8	14,2
Glucose	48,1	53,6	57,7	56,4	48,5	52,3
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,5	1: 0,4	1: 0,4	1: 0,3	1: 0,5	1: 0,6
Ausbeute [%]	10,38	13,30	8,83	7,15	11,67	10,09

Durch die TFF konnte schon ein Teil der Glucose und Mannose, zugunsten eines höheren Gehalts an Arabinose und Galactose entfernt werden. Die Werte der Monosaccharid-Zusammensetzungen des hochmolekularen Retentats in den

## Ergebnisse

verschiedenen Krautextrakten sind in Tabelle 3.5 dargestellt. Das Retentat der TFF von K I wurde komplett der Dialyse unterworfen, so dass hier keine Werte bestimmt werden konnten.

Tab. 3.5: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des Retentats der TFF aus Mistelkraut

Monosaccharid	Retentat der TFF (Ret TFF)			
	K II	K IIa	K IIIa	K IV
Rhamnose	7,3	3,2	4,3	4,8
Fucose	4,8	0,9	0,7	0,7
Arabinose	24,2	50,0	28,9	35,4
Xylose	3,0	1,2	1,9	1,7
Mannose	16,4	4,2	15,4	7,8
Galactose	18,6	13,1	12,7	19,9
Glucose	25,7	31,4	36,1	29,7
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,8	1: 0,3	1: 0,4	1: 0,6
Ausbeute [%]	21,00	32,21	18,50	19,04

Das Chromatogramm des dialysierten Retentats von K I in Abbildung 3.8 zeigt, dass durch die TFF und die anschließende Dialyse die nicht identifizierten Substanzen des Rohextrakts abgetrennt werden konnten.

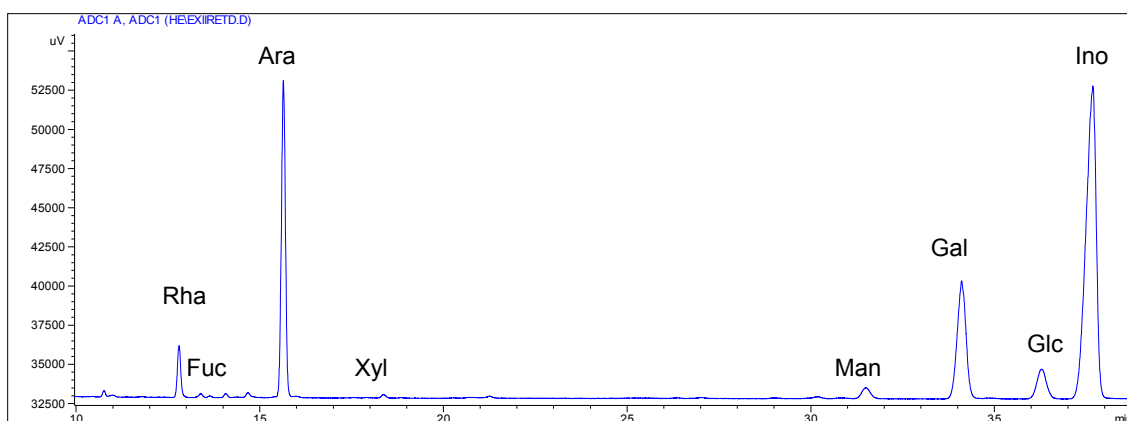


Abb. 3.8: GLC der acetylierten Monosaccharide des dialysierten Retentats von K I

## Ergebnisse

Im dialysierten Retentat lag der Neutralzucker-Anteil deutlich höher, die genauen Werte sind in Tabelle 3.6 dargestellt. Über 40 % der Neutralzucker waren Arabinose; Galactose lag zu ca. 30 % vor. K IIa ist gesondert zu betrachten, da für die Heißextraktion der Pressrückstand von K II verwendet wurde und somit kaltwasserlösliche Zucker schon extrahiert worden waren. Die Neutralzucker-Zusammensetzung von K IIa ließ auf weitere heißwasserlösliche Polysaccharide schließen, die viel Glucose und Arabinose enthielten. K IIIa, bei dem das Ausgangsmaterial nur mittels Heißwasser extrahiert wurde, enthielt weniger Arabinose und Galactose als die kalt extrahierten Extrakte K I und K IV. Dies könnte sowohl am Ausgangsmaterial, da eine andere Charge Mistelkraut verwendet wurde, oder an der Extraktionstechnik liegen.

Tab. 3.6: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des dialysierten Retentats aus Mistelkraut

<b>dialysiertes Retentat der TFF (Ret Dia)</b>					
Monosaccharid	<b>K I</b>	<b>K II</b>	<b>K IIa</b>	<b>K IIIa</b>	<b>K IV</b>
Rhamnose	7,5	8,0	3,3	4,3	8,3
Fucose	0,2	0,6	0,7	0,5	0,6
Arabinose	43,3	40,5	47,2	41,7	49,0
Xylose	0,5	0,6	1,2	1,2	0,5
Mannose	3,5	3,3	4,1	5,3	2,5
Galactose	36,0	35,2	12,9	23,6	28,3
Glucose	9,0	11,8	30,6	23,4	10,8
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,8	1: 0,9	1: 0,3	1: 0,6	1: 0,6
Ausbeute [%]	27,82	23,39	34,94	52,71	45,83

In Abbildung 3.9 wurden die einzelnen Extrakt-Fractionen verglichen. Auch die Heißextrakte wurden in diese Darstellung mit einbezogen. Bei diesem direkten Vergleich wird die Aufkonzentrierung von Arabinose und Galactose und die weitere Abtrennung von Glucose vom Rohextrakt über das Ret TFF bis zum Ret Dia durch die Dialyse deutlich. Das Filtrat der TFF enthielt umso mehr Glucose.

## Ergebnisse

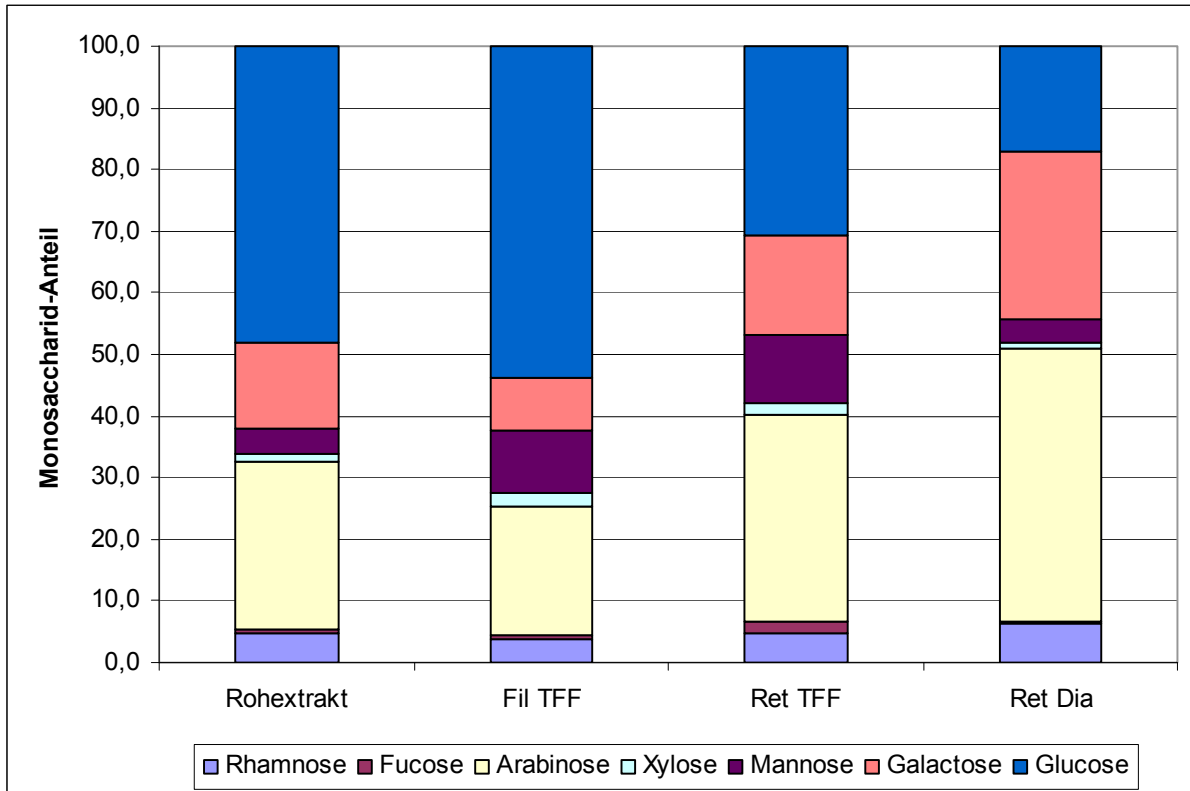


Abb. 3.9: Graphische Darstellung der Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] der Krautextrakt-Fractionen (bei Fil TFF, Ret TFF und Ret Dia jeweils Darstellung der Mittelwerte)

### 3.1.5.2 Mistelbeeren

Die Monosaccharid-Zusammensetzungen der einzelnen Fraktionen des Mistelbeerenextrakts B I sind in Tabelle 3.7 wiedergegeben. Das Filtrat der TFF enthielt überwiegend (ca. 95 %) Mannose und Glucose; insgesamt waren ca. 15 % Neutralzucker enthalten. Im dialysierten Retentat lag der Neutralzucker-Anteil deutlich höher, von diesen waren ca. 90 % Arabinose und Galactose.

Tab. 3.7: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] in den einzelnen Fraktionen aus Mistelbeeren

Monosaccharid	Filtrat der TFF	Retentat der TFF	dialysiertes Retentat der TFF	
	(Fil TFF)	(Ret TFF)	(Ret Dia)	
	B I Teil 1	B I Teil 2	B I Teil 1	B I Teil 2
Rhamnose	0,4	3,2	2,5	2,8
Fucose	0,1	0,1	0,1	0,1
Arabinose	1,0	49,5	40,8	43,5
Xylose	1,1	1,2	0,9	0,9
Mannose	49,1	0,3	0,0	0,3
Galactose	2,5	41,2	52,8	50,1
Glucose	45,8	4,5	2,9	2,3
Verhältnis Ara:Gal	1: 2,5	1: 0,8	1: 1,3	1: 1,2
Ausbeute [%]	15,19	53,00	50,64	54,87

In der Abbildung 3.10 ist ein Beispielchromatogramm für das Ret Dia des Beerenextrakts gegeben; an diesem kann der hohe Arabinose- und Galactose-Gehalt durch die entsprechenden Peaks verdeutlicht werden, die anderen Monosaccharide zeigten nur sehr kleine Peaks.



## Ergebnisse

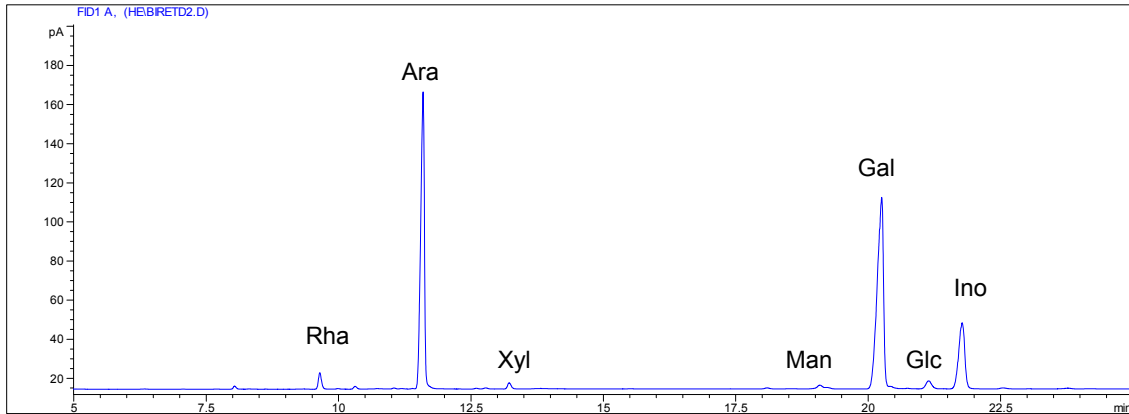


Abb. 3.10: GLC der acetylierten Monosaccharide des dialysierten Retentats von B I

Bei einem Vergleich von Fil TFF, Ret TFF und Ret Dia in Abbildung 3.11, ist gut zu erkennen, dass hauptsächlich Mannose und Glucose durch die TFF abgetrennt wurden und somit in das Filtrat gelangten. Durch Dialyse wurde eine Anreicherung an Galactose unter Verlust von niedermolekularer Arabinose erreicht; dies wird durch das sich umkehrende Verhältnis beider Zucker zueinander verdeutlicht. Weiterhin wurde bei der Dialyse Glucose auf ca. die Hälfte reduziert.

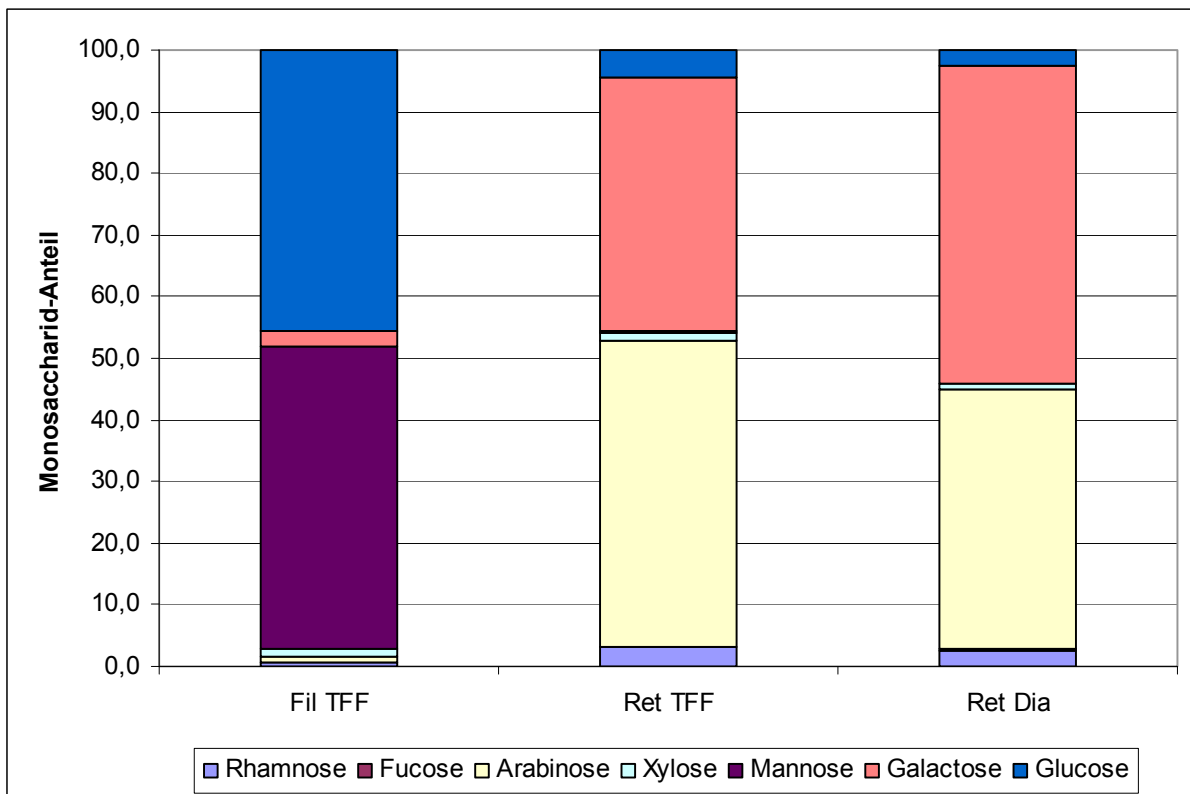


Abb. 3.11: Graphische Darstellung der Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] der Beerenextrakt-Fractionen (bei Ret Dia Darstellung des Mittelwerts)

### 3.1.6 Neutralzucker-Zusammensetzung der AGPs

Als Ausgangsprodukt für die Fällung der AGPs wurde das dialysierte Retentat eingesetzt (siehe Methode 2.1.4). Durch die spezifische Fällung der im Ret Dia enthaltenen AGPs mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz und anschließender Dialyse erhielt man nach Gefriertrocknung eine aufgereinigte AGP-Fraktion. In dieser wurden mittels Acetylierungsanalyse (Methode 2.2.4) die vorhandenen Neutralzucker untersucht.

#### 3.1.6.1 Mistelkraut

Aus dem Chromatogramm des acetylierten AGPs (Abb. 3.12) wird ersichtlich, dass Arabinose und Galactose die dominierenden Monosaccharide darstellen. Weiterhin liegen geringe Mengen an Rhamnose, Mannose und Glucose vor, Fucose und Xylose kommen nur in Spuren vor.

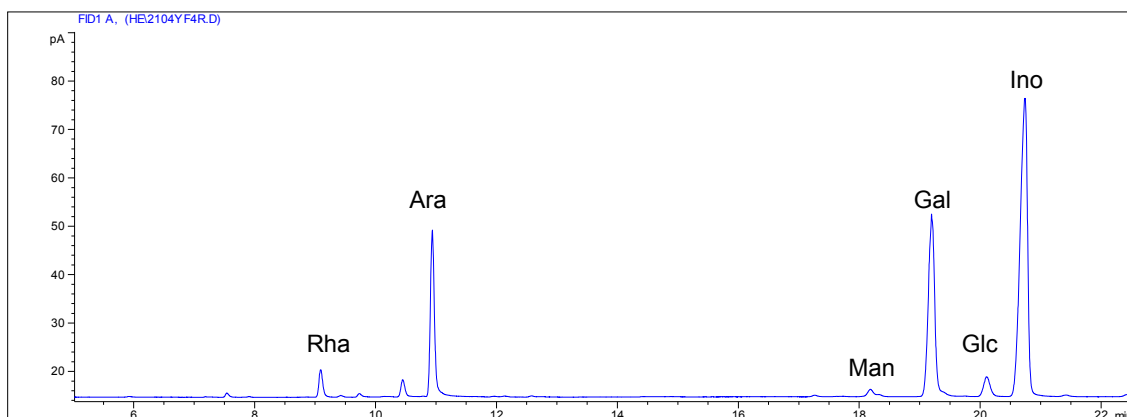


Abb. 3.12: GLC der acetylierten Monosaccharide des AGPs von K I

Die Ergebnisse der Monosaccharid-Zusammensetzungen der einzelnen Yariv-Fällungen (YF) der jeweiligen Extrakte sind in der Tabelle 3.8 für K I und in der Tabelle 3.9 für K II-IV dargestellt. Es ist erkennbar, dass K I sehr homogene YF 1-6 lieferte. Bei K IV ist bei YF 1 der Glucose-Gehalt viel höher als bei YF 2 und 3, die wiederum vergleichbar sind. Das Verhältnis von Arabinose zu Galactose differiert in diesen AGPs von 1:1,5-2,0 (ohne K IIa und K IIIa). Die Heißextrakte K IIa und IIIa müssen wieder gesondert betrachtet werden; hier liegt das Verhältnis zugunsten der Arabinose verschoben. Die Ergebnisse lassen auf unterschiedlich zusammengesetzte AGPs in den Kalt- und Heißextrakten schließen.

## Ergebnisse

Tab. 3.8: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des AGPs von Krautextrakt I

Monosaccharid	AGP der Yariv-Fällungen						Mittelwert
	K I 1	K I 2	K I 3	K I 4	K I 5	K I 6	
Rhamnose	6,6	6,8	7,3	6,5	6,3	6,1	6,6
Fucose	0,3	0,3	0,4	0,2	1,3	0,1	0,4
Arabinose	28,9	31,0	33,0	29,4	31,2	28,1	30,3
Xylose	0,0	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2
Mannose	3,2	1,8	2,0	2,6	1,3	3,6	2,4
Galactose	54,2	54,1	50,1	53,8	53,3	54,1	53,3
Glucose	6,8	5,7	6,9	7,3	6,3	7,8	6,8
Verhältnis Ara:Gal	1: 1,9	1: 1,7	1: 1,5	1: 1,8	1: 1,7	1: 1,9	1: 1,8
Ausbeute [%]	16,84	22,85	24,76	30,47	26,81	22,00	24,0

Tab. 3.9: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des AGPs der Krautextrakte II-IV

Monosaccharid	AGP der Yariv-Fällungen					
	K II 1	K IIIa 1	K IIIa 1	K IV 1	K IV 2	K IV 3
Rhamnose	8,0	2,9	4,0	9,8	7,0	6,2
Fucose	0,7	0,3	0,2	0,6	1,0	1,5
Arabinose	23,2	37,0	26,1	22,9	30,6	31,9
Xylose	3,4	0,5	0,3	0,4	0,3	2,3
Mannose	3,4	2,1	1,5	1,2	0,8	2,0
Galactose	37,2	7,5	30,3	46,3	55,6	50,9
Glucose	24,1	49,7	37,6	18,8	4,7	5,2
Verhältnis Ara:Gal	1: 1,6	1: 0,2	1: 1,2	1: 2,0	1: 1,8	1: 1,6
Ausbeute [%]	7,01	18,48	29,42	25,47	47,21	63,82

Die graphische Darstellung der Ergebnisse der Neutralzucker-Zusammensetzungen des AGPs in den einzelnen Extrakten in Abbildung 3.13 verdeutlicht noch einmal die Homogenität der YF 1-6 von K I (Angabe der Standardabweichung durch Fehlerbalken).

## Ergebnisse

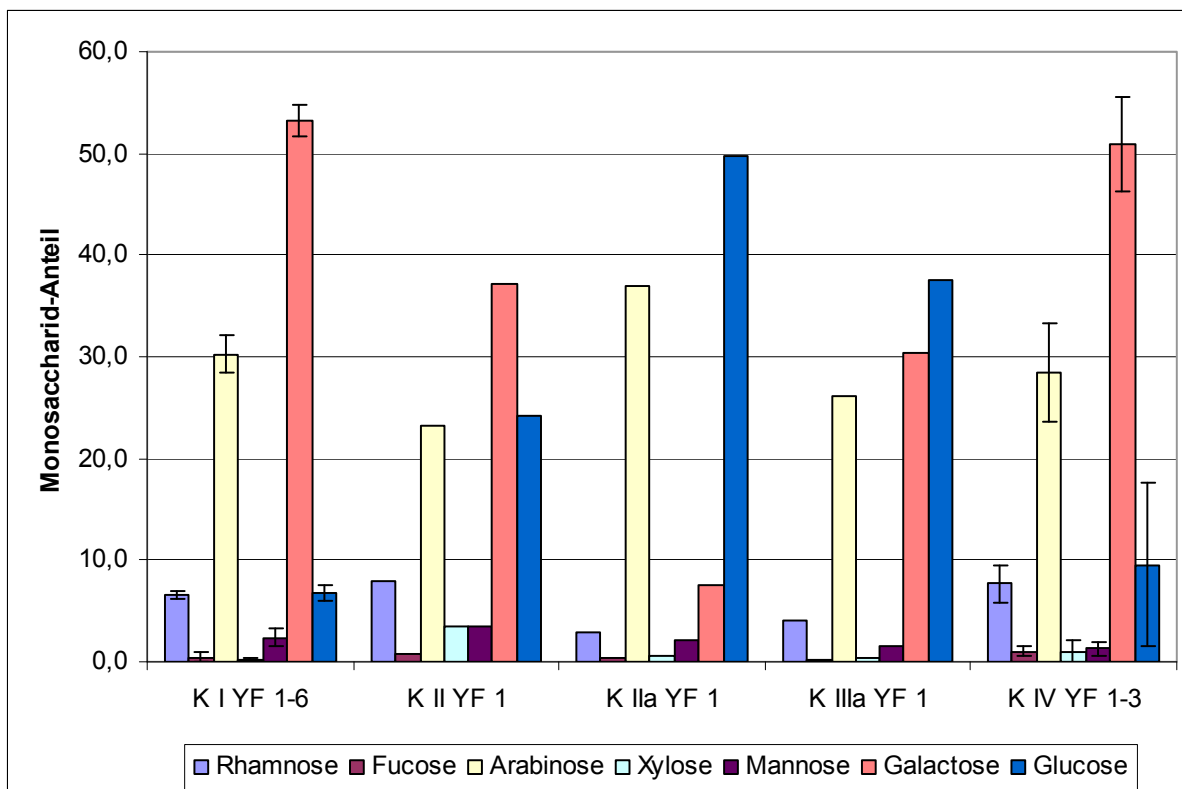


Abb. 3.13: Graphische Darstellung der Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des AGPs der verschiedenen Krautextrakte (bei K I und K IV jeweils Darstellung der Mittelwerte der Yarif-Fällungen)

Extrakt IV war bedingt durch die YF 1 inhomogener, deutlich an den größeren Fehlerbalken erkennbar. Bei K IV YF 2 und 3 wurde nach Lösen von Ret Dia in Aqua dem. zentrifugiert (20.000 g, 15 min), um nicht lösliche Verunreinigungen abzutrennen, bevor die Fällung mit dem Yarif-Reagenz durchgeführt wurde. Diese Aufreinigung wurde durch den geringeren Glucose-Gehalt und die deutlich erhöhte Ausbeute (47-63 %, statt ca. 25 %) bestätigt. Extrakt II zeigte einen viel geringeren Galactose-Gehalt und auch einen verminderten Arabinose-Gehalt im Vergleich zu den Extrakten I und IV. Das AGP der YF 1 von Extrakt II wurde aufgrund seiner abweichenden Zusammensetzung im Vergleich zu K I und K IV nicht für die folgenden Untersuchungen und Aufreinigungen verwendet; daher wurde auch keine weitere YF durchgeführt. Auch die beiden Heißextrakte IIa und IIIa, die als Hauptmonosaccharid Glucose enthielten, wurden aufgrund der anderen Neutralzucker-Zusammensetzung nicht für weitere Untersuchungen verwendet.

Für die weiteren Untersuchungen wurde AGP der YF 1-6 von K I bzw. der YF 2-3 von K IV eingesetzt, die Ergebnisse dieser Yariv-Fällungen sind noch einmal in Abbildung 3.14 zusammengefasst.

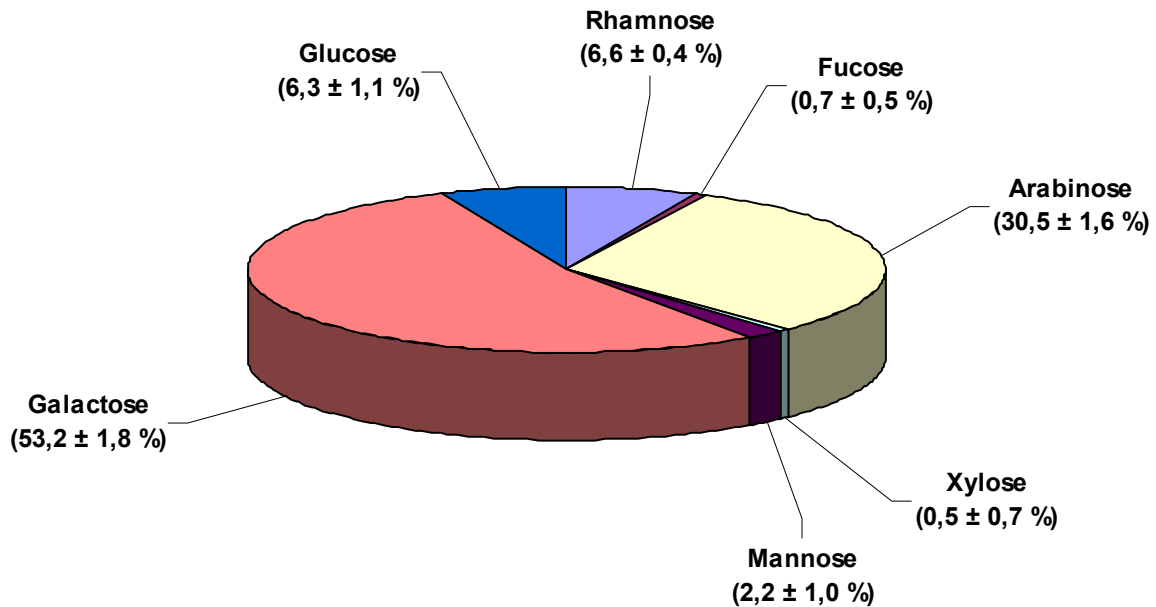


Abb. 3.14: Graphische Darstellung der Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des AGPs der Yariv-Fällungen 1-6 von K I und der Yariv-Fällungen 2-3 von K IV (in Klammern Angabe der Mittelwerte und der Standardabweichung)

### 3.1.6.2 Mistelbeeren

Bei den Yariv-Fällungen aus Mistelbeeren Ret Dia ist zu beachten, dass bei YF 1 und YF 2 ein Verhältnis von Ret Dia zu Yariv-Reagenz von 4:1 eingesetzt wurde, ab YF 3 ein Verhältnis von 10:1. Des Weiteren wurde ab YF 2 nach Lösen von Ret Dia in Aqua dem. zentrifugiert (20.000 g, 15 min.), um nicht lösliche Verunreinigungen abzutrennen, bevor die Fällung mit dem Yariv-Reagenz durchgeführt wurde. Die Abbildung 3.15 zeigt ein typisches Chromatogramm des Beeren-AGPs mit dem großen Arabinose-Peak; Galactose ist in etwas geringer Konzentration enthalten. Weiterhin kommen geringe Mengen an Glucose, Rhamnose, Mannose, Xylose und Fucose in abnehmender Menge vor.

## Ergebnisse

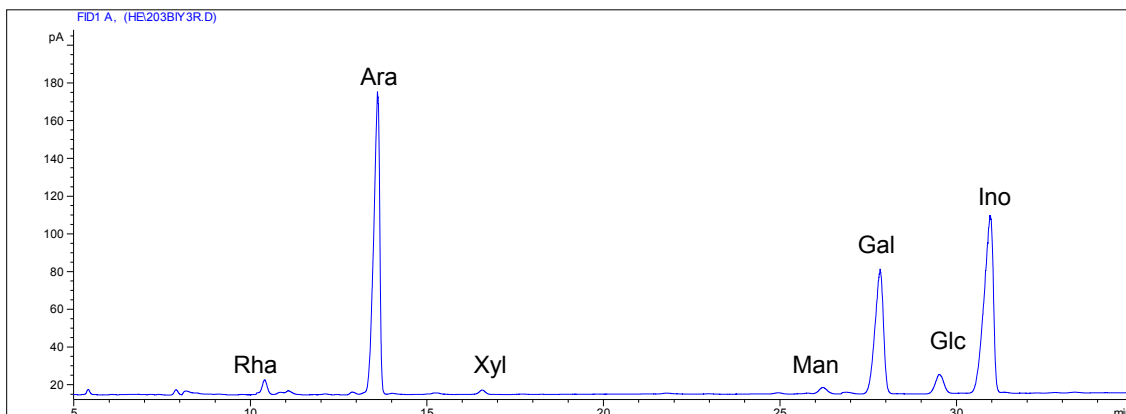


Abb. 3.15: GLC der acetylierten Monosaccharide des AGPs von B I

Die genauen Monosaccharid-Anteile sind in Tabelle 3.10 dargestellt. Das Verhältnis von Arabinose zu Galactose differierte im AGP von 1:0,6 bis 1:0,7 und war somit gegensätzlich demjenigen im Kraut-AGP. Durch die Zentrifugation des gelösten Ret Dia vor der Yariv-Fällung konnten vermehrt Mannose und Glucose zugunsten einer Erhöhung von Arabinose abgetrennt werden. Für diese drei Monosaccharide liegen deshalb die Standardabweichungen in der graphischen Darstellung in Abb. 3.16 etwas höher. Für die immunologischen Testungen (außer ELISA) wurde deshalb Beeren-AGP der YF 3-5 verwendet. Die Abbildung der YF 1-5 von B I verdeutlicht auch noch einmal, dass Arabinose mit ca. 50 % das Hauptmonosaccharid darstellt.

Tab. 3.10: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des AGPs aus Mistelbeeren

Monosaccharid	AGP der Yariv-Fällungen					Mittelwert
	B I 1	B I 2	B I 3	B I 4	B I 5	
Rhamnose	2,8	3,0	3,3	4,4	3,0	3,3
Fucose	0,9	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5
Arabinose	43,7	47,9	54,4	50,6	54,1	50,1
Xylose	2,3	1,0	0,8	0,9	1,9	1,4
Mannose	7,3	4,0	1,6	2,4	2,6	3,6
Galactose	30,0	33,2	33,4	36,2	30,1	32,6
Glucose	13,0	10,6	6,2	5,0	7,8	8,5
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,7	1: 0,7	1: 0,6	1: 0,7	1: 0,6	1: 0,7
Ausbeute [%]	8,57	18,45	32,38	21,92	14,56	19,2

## Ergebnisse

---

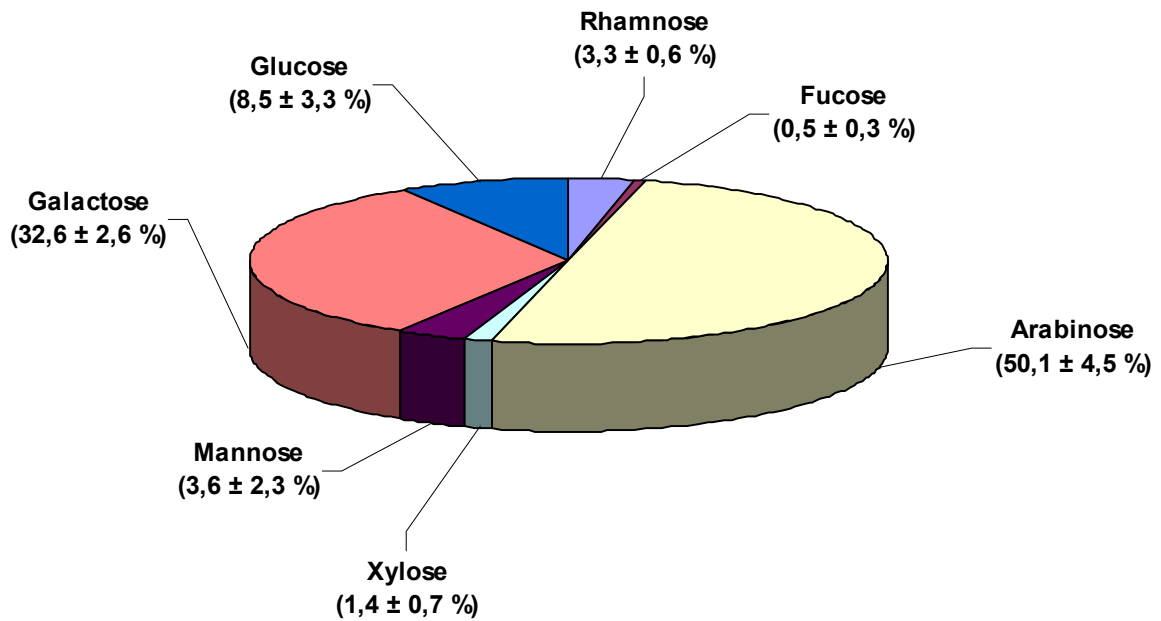


Abb. 3.16: Graphische Darstellung der Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des AGPs der Yarrowia-Fällungen 1-5 des Beerenextrakts (in Klammern Angabe der Mittelwerte und der Standardabweichung)

### 3.1.7 Neutralzucker-Zusammensetzung der Überstände der Yariv-Fällungen

Da die Überstände der Yariv-Fällungen das Ausgangsmaterial für die Arabinan-Isolierung (Methode 2.1.5) darstellen, wurde bei diesen komplett, wie auch für das entsprechende AGP die Monosaccharid-Zusammensetzung mittels Acetylierungsanalyse (Methode 2.2.4) bestimmt.

#### 3.1.7.1 Mistelkraut

Anhand des in Abbildung 3.17 gezeigten Chromatogramms des Überstands der Yariv-Fällung 3 von K IV ist exemplarisch zu sehen, dass Arabinose das Hauptmonosaccharid darstellt, das heißt, es liegt ein umgekehrtes Arabinose- zu Galactose-Verhältnis im Vergleich zum Kraut-AGP vor. In abnehmender Menge kommen dann Galactose, Glucose, Rhamnose, Mannose, Fucose und Xylose vor, die letzten beiden nur in Spuren.

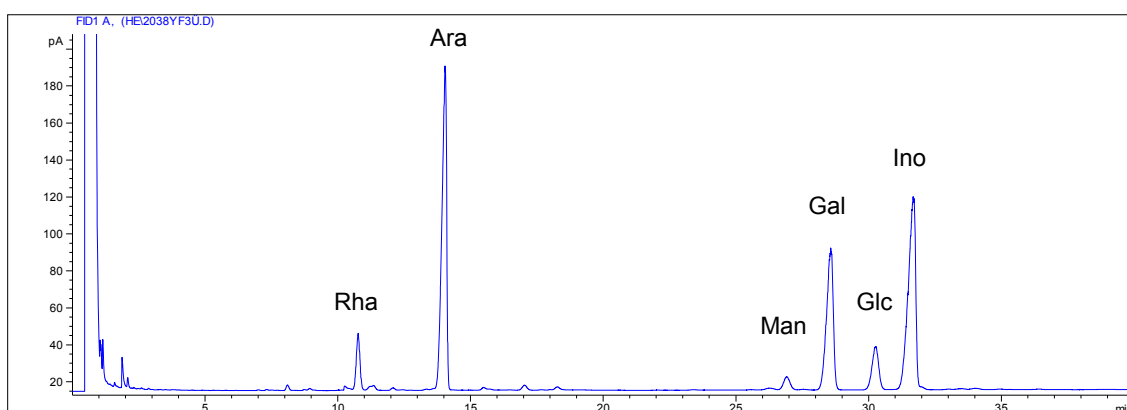


Abb. 3.17: GLC der acetylierten Monosaccharide des Überstands der Yariv-Fällung (K IV YF 3 Ü)

In den Tabellen 3.11 und 3.12 sind die Monosaccharid-Anteile der gesamten Yariv-Überstände (YF Ü) wiedergegeben. Die YF Ü wiesen für K I, K II und K IV ein sehr konstantes Arabinose- zu Galactose-Verhältnis auf. Die hohe Arabinose-Konzentration ließ ein Arabinan im Yariv-Überstand vermuten. Die Extrakte K IIa und K IIIa wiesen wiederum eine im Vergleich zu den anderen Extrakten abweichende Neutralzucker-Zusammensetzung auf.



## Ergebnisse

Tab. 3.11: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] der Überstände der Yariv-Fällungen von K I

<b>Überstände der Yariv-Fällungen</b>							
Monosaccharid	<b>K I 1</b>	<b>K I 2</b>	<b>K I 3</b>	<b>K I 4</b>	<b>K I 5</b>	<b>K I 6</b>	<b>Mittelwert</b>
Rhamnose	7,0	5,9	5,4	5,2	6,7	10,0	6,7
Fucose	0,3	0,4	2,2	1,1	0,0	0,8	0,8
Arabinose	45,9	47,2	49,1	48,9	54,2	50,9	49,3
Xylose	0,4	0,5	0,5	0,5	0,0	0,6	0,4
Mannose	3,0	3,1	3,2	3,2	1,5	1,9	2,7
Galactose	37,1	37,1	34,5	35,1	34,6	30,4	34,8
Glucose	6,3	5,8	5,1	6,0	3,0	5,4	5,3
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,8	1: 0,8	1: 0,7	1: 0,7	1: 0,6	1: 0,6	1: 0,7
Ausbeute [%]	42,22	43,98	49,86	39,79	58,44	63,17	49,6

Tab. 3.12: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des Überstände der Yariv-Fällungen von K II-IV

<b>Überstände der Yariv-Fällungen</b>						
Monosaccharid	<b>K II 1</b>	<b>K IIa 1</b>	<b>K IIIa 1</b>	<b>K IV 1</b>	<b>K IV 2</b>	<b>K IV 3</b>
Rhamnose	7,2	4,9	4,0	6,8	8,3	8,6
Fucose	0,3	0,6	0,5	0,4	0,5	0,5
Arabinose	47,6	44,1	55,5	46,5	49,9	45,8
Xylose	0,5	2,5	1,3	0,5	0,7	0,7
Mannose	2,8	5,9	4,5	2,6	2,6	2,7
Galactose	34,5	21,9	21,9	31,8	28,4	30,6
Glucose	7,1	20,1	12,3	11,4	9,6	11,1
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,7	1: 0,5	1: 0,4	1: 0,7	1: 0,6	1: 0,7
Ausbeute [%]	28,7	21,08	44,65	38,26	49,57	42,02

## Ergebnisse

Die graphische Darstellung der Überstände der Yariv-Fällungen in Abbildung 3.18 verdeutlicht noch einmal die konstante Neutralzucker-Zusammensetzung von K I und K IV durch die geringe Standardabweichung. Auch K II wies in diesem Fall das gleiche Arabinose- zu Galactose-Verhältnis auf. Die Yariv-Überstände der Heiß-extrakte K IIa und IIIa wichen deutlich in ihrem Arabinose- zu Galactose-Verhältnis von den anderen Krautextrakten ab, sie enthielten weniger Galactose, dafür mehr Glucose.

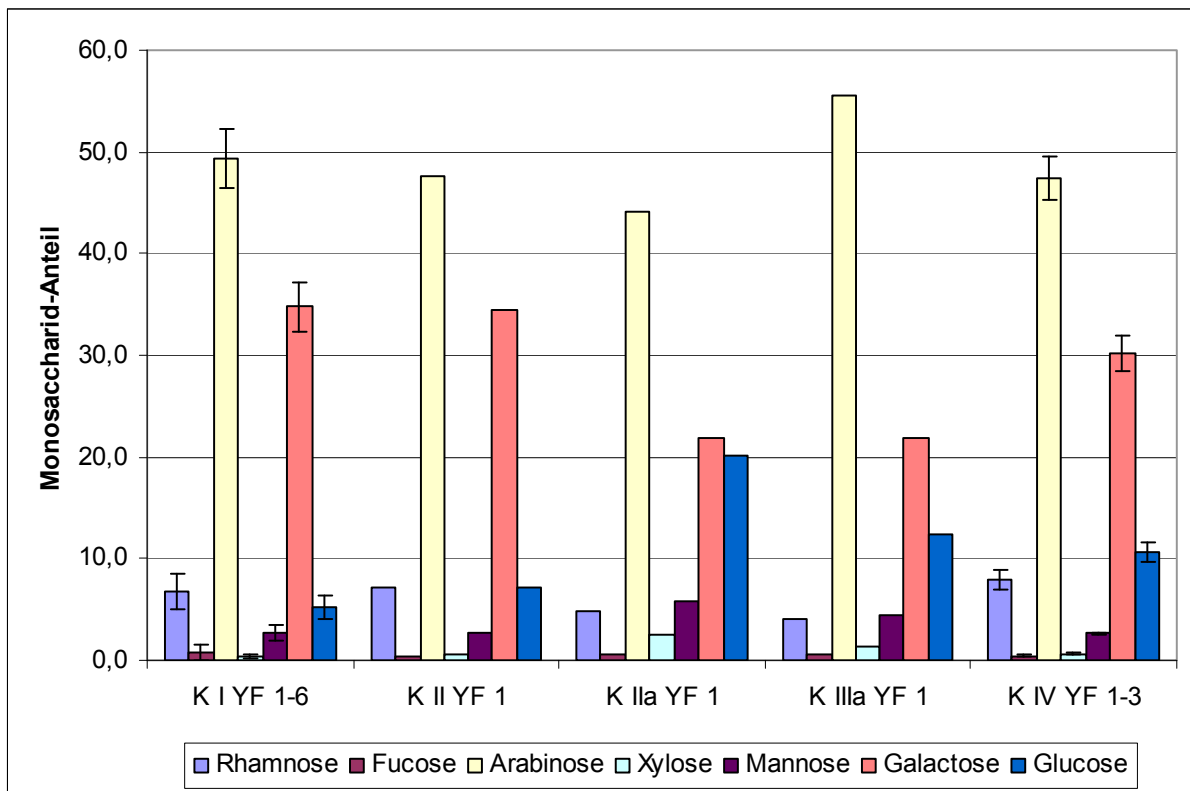


Abb. 3.18: Graphische Darstellung der Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] der Überstände nach Yariv-Fällung der verschiedenen Krautextrakte (bei K I und K IV jeweils Darstellung der Mittelwerte der Yariv-Fällungen)

Die Arabinan-Isolierung wurde, mit dem Ziel ein möglichst einheitliches Arabinan zu erhalten, nur mit den Überständen der Yariv-Fällungen 1-6 aus K I durchgeführt (siehe Abb. 3.19).

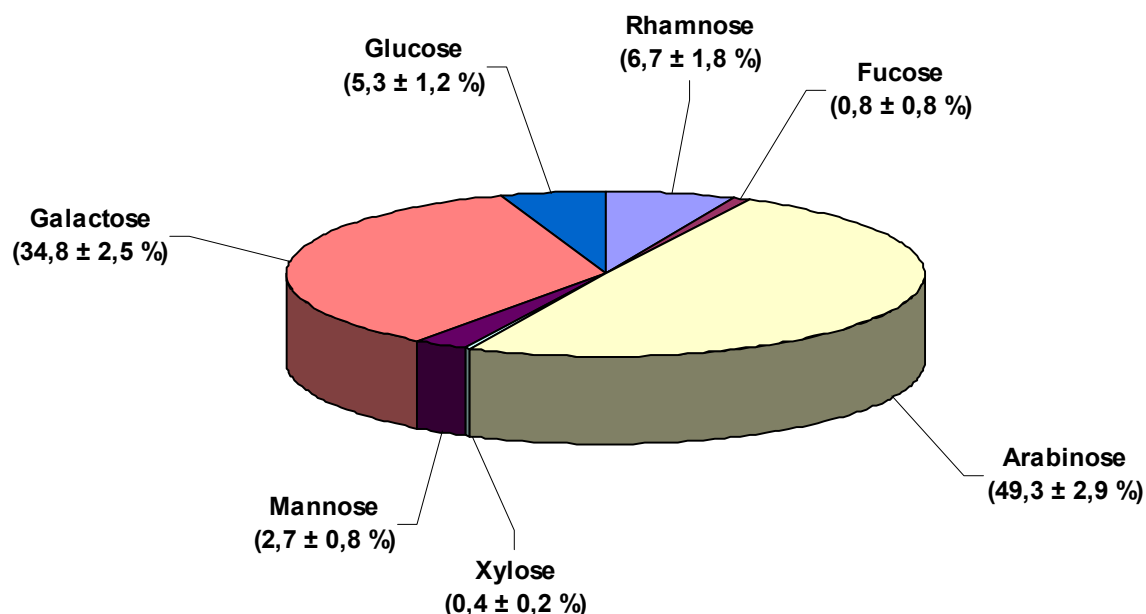


Abb. 3.19: Graphische Darstellung der Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] der Überstände der Yariv-Fällungen 1-6 von K I (in Klammern Angabe der Mittelwerte und der Standardabweichung)

### 3.1.7.2 Mistelbeeren

Die Überstände der Yariv-Fällungen der Beeren wiesen durchschnittlich das gleiche Arabinose- zu Galactose-Verhältnis auf wie das Beeren-AGP. Allerdings war der Zucker-Anteil (Ausbeute bei der Acetylierung) im Yariv-Überstand mit ca. 80 % viel höher als im Beeren-AGP mit ca. 20 %. In Tabelle 3.13 sind die einzelnen Werte der durchgeführten Acetylierungsanalysen aufgeführt. In der graphischen Darstellung der Neutralzucker-Zusammensetzung in Abbildung 3.20 ist der Mittelwert der Neutralzucker-Zusammensetzung der Überstände der Yariv-Fällungen 1-5 mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt. Die Überstände der Yariv-Fällungen 1 und 2 wurden als Ausgangsmaterial zur Arabinan-Isolierung verwendet.

## Ergebnisse

Tab. 3.13: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] der Überstände der Yariv-Fällungen aus B I

<b>Überstände der Yariv-Fällungen</b>						
Monosaccharid	<b>B I 1</b>	<b>B I 2</b>	<b>B I 3</b>	<b>B I 4</b>	<b>B I 5</b>	<b>Mittelwert</b>
Rhamnose	3,7	3,7	4,2	4,1	3,9	3,9
Fucose	0,7	0,9	1,4	0,8	0,7	0,9
Arabinose	54,9	53,0	54,7	51,5	54,2	53,7
Xylose	1,7	1,1	0,9	1,0	0,9	1,1
Mannose	1,9	0,5	0,6	0,5	0,4	0,8
Galactose	35,4	38,7	36,0	40,1	38,3	37,7
Glucose	1,7	2,1	2,2	2,0	1,6	1,9
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,6	1: 0,7	1: 0,7	1: 0,8	1: 0,7	1: 0,7
Ausbeute [%]	67,13	77,21	84,82	83,06	81,93	78,8

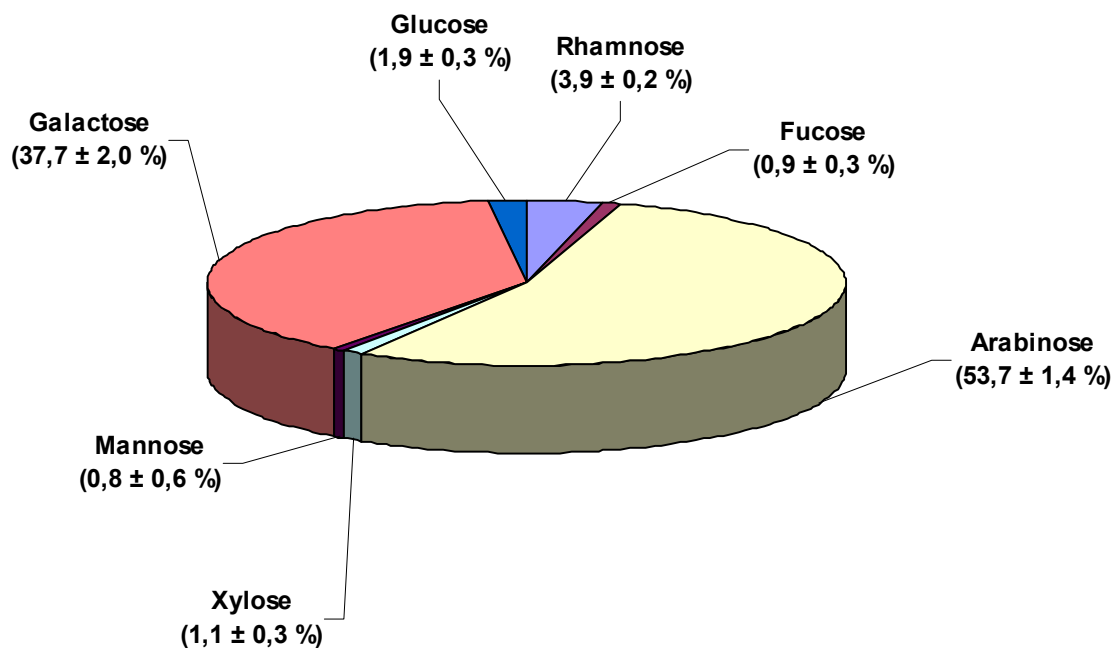


Abb. 3.20: Graphische Darstellung der Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] der Überstände der Yariv-Fällungen 1-5 des Beerenextrakts (in Klammern Angabe der Mittelwerte und der Standardabweichung)

### 3.1.8 Neutralzucker-Zusammensetzung der Arabinane

Da Arabinane im Gegensatz zu anderen Polysacchariden in hochprozentigem Ethanol (EtOH) löslich sind, wurde nach diesem Prinzip die Arabinan-Isolierung bzw. Aufreinigung durchgeführt.

#### 3.1.8.1 Fraktionierte Arabinan-Isolierung aus Mistelkraut

Als erster Versuch wurde eine fraktionierte Arabinan-Isolierung mit steigenden EtOH-Konzentrationen durchgeführt. Um Informationen über den Arabinan-Gehalt in den einzelnen Fraktionen zu erhalten, wurde jeweils in den einzelnen Fraktionen die Neutralzucker-Zusammensetzung durch Acetylierungsanalyse (Methode 2.2.4) bestimmt. Abbildung 3.21 zeigt das Chromatogramm der Arabinan-Isolierung des 80 %igen EtOH-Überstands mit dem dominierenden Arabinosepeak (über 70 %).

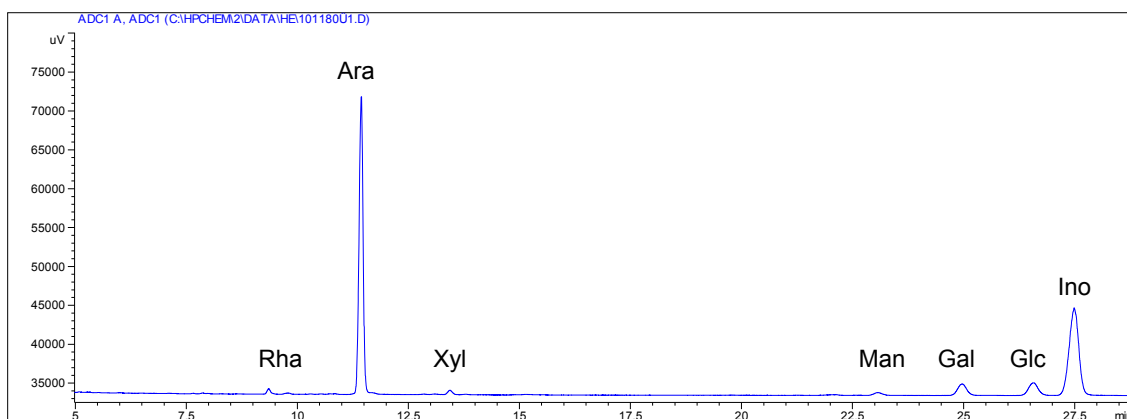


Abb. 3.21: GLC der acetylierten Monosaccharide des Arabinans (K I YF 1 Ü 80 % EtOH Ü)

In Tabelle 3.14 sind für den Überstand von Yariv-Fällung I, in Tab. 3.15 für den Überstand von Yariv-Fällung II des Krautextrakts I die Ergebnisse der Neutralzucker-Bestimmung der einzelnen Fraktionen der Arabinan-Isolierung dargestellt. Die Überstände der 40 und der 60 %igen EtOH-Fällung wurden komplett für die Fällung mit der nächst höheren EtOH-Konzentration eingesetzt, um die Ausbeute nach Gefriertrocknung berechnen zu können. Für diese Fraktionen lagen deshalb keine Ergebnisse der Neutralzucker-Zusammensetzung vor. Die Ergebnisse beider Isolierungen waren recht homogen. Im Überstand der 80 %igen EtOH-Fällung war der Arabinose-Gehalt mit ca. 70 % am höchsten.

## Ergebnisse

Tab. 3.14: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] der Yariv-Überstände in den einzelnen EtOH-Fractionen aus K I YF 1

<b>Krautextrakt I Yariv-Fällung 1</b>					
	<b>Yariv-Fällung</b>	<b>40 % EtOH</b>	<b>60 % EtOH</b>	<b>80 % EtOH</b>	<b>80 % EtOH</b>
Monosaccharid	<b>Überstand</b>	<b>Rückstand</b>	<b>Rückstand</b>	<b>Rückstand</b>	<b>Überstand</b>
Rhamnose	7,0	8,5	11,4	8,1	1,8
Fucose	0,3	1,5	0,8	0,2	0,6
Arabinose	45,9	36,1	35,2	37,7	77,3
Xylose	0,4	1,5	1,2	0,3	1,4
Mannose	3,0	5,8	3,2	3,2	1,6
Galactose	37,1	29,0	42,4	46,6	7,1
Glucose	6,3	17,6	5,8	3,9	10,2
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,8	1: 0,8	1: 1,2	1: 1,2	1: 0,1
Ausbeute [%]	42,22	15,65	31,11	56,58	36,35

Tab. 3.15: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] der Yariv-Überstände in den einzelnen EtOH-Fractionen aus K I YF 2

<b>Krautextrakt I Yariv-Fällung 2</b>					
	<b>Yariv-Fällung</b>	<b>40 % EtOH</b>	<b>60 % EtOH</b>	<b>80 % EtOH</b>	<b>80 % EtOH</b>
Monosaccharid	<b>Überstand</b>	<b>Rückstand</b>	<b>Rückstand</b>	<b>Rückstand</b>	<b>Überstand</b>
Rhamnose	5,9	6,5	11,4	9,3	3,4
Fucose	0,4	1,0	0,8	0,3	0,2
Arabinose	47,2	32,7	33,2	36,6	70,3
Xylose	0,5	1,4	0,8	0,3	0,5
Mannose	3,1	16,8	6,7	3,2	1,5
Galactose	37,1	24,7	39,0	46,6	15,3
Glucose	5,8	16,9	8,1	3,7	8,8
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,8	1: 0,8	1: 1,2	1: 1,3	1: 0,2
Ausbeute [%]	43,98	24,36	32,12	53,42	38,41

## Ergebnisse

In Tabelle 3.16 sind die bei der fraktionierten Isolierung nach Gefriertrocknung erhaltenen Rückstandsmengen und die Menge des isolierten Arabinans (80 % EtOH-Überstand) dargestellt. An der hohen 80 %igen EtOH-Rückstandsmenge wird ersichtlich, dass hier die beste Abtrennung von den anderen Polysacchariden und Begleitstoffen gelang.

Tab. 3.16: Ergebnisse der fraktionierten Arabinan-Isolierung

	K I Yariv-Fällung 1 Überstand		K I Yariv-Fällung 2 Überstand	
	mg	% der Ausbeute	mg	% der Ausbeute
Einwaage	398,00	100,00	399,80	100,00
40 % EtOH-Rückstand	16,83	5,66	17,34	5,80
60 % EtOH-Rückstand	36,88	12,40	21,95	7,35
80 % EtOH-Rückstand	155,80	52,38	153,34	51,31
80 % EtOH-Überstand	87,94	29,56	106,22	35,54
Gesamtausbeute	297,45	74,74	298,85	74,75

### 3.1.8.2 Unfraktionierte Arabinan-Isolierung

Bei der fraktionierten Isolierung (Methode 2.1.5.1) wurde die beste Arabinan-Aufreinigung durch Fällung mit 80 %igem EtOH erzielt. Die weiteren Arabinan-Isolierungen wurden daher direkt nach Methode 2.1.5.2 durch Fällung mit 80 %igem EtOH hergestellt.

#### 3.1.8.2.1 *Mistelkraut*

In Tab. 3.17 sind die Neutralzucker-Zusammensetzungen für die Arabinan-Isolierung der Yariv-Fällungen 1-6 des Krautextrakts I dargestellt. Um die Güte der Abtrennung des Arabinans besser beurteilen zu können, wurde auch von den Rückständen der Arabinan-Isolierung die Neutralzucker-Zusammensetzung bestimmt. Die Arabinan-Isolierung der Yariv-Fällungen 1 und 2 wurde fraktioniert durchgeführt (s.o.); die Ergebnisse sind zu Vollständigkeits- und Vergleichszwecken noch einmal in den folgenden Tabellen 3.17 und 3.18 aufgeführt. Der Arabinan-Anteil aller Fällungen lag durchschnittlich bei 74 % bei einer Ausbeute von ungefähr 45 %.

## Ergebnisse

Tab. 3.17: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des Arabinans von K I (Ergebnisse von YF 1 und 2 stammen aus der fraktionierten Arabinan-Isolierung)

<b>Krautextrakt I Yariv-Fällung Überstand 80 % EtOH-Fällung Überstand</b>							
Monosaccharid	YF 1	YF 2	YF 3	YF 4	YF 5	YF 6	Mittelwert
Rhamnose	1,8	3,4	3,2	2,9	2,7	2,1	2,7
Fucose	0,6	0,2	0,3	0,7	0,3	0,4	0,4
Arabinose	77,3	70,3	72,9	69,3	74,2	79,3	73,9
Xylose	1,4	0,5	0,6	1,0	0,7	0,6	0,8
Mannose	1,6	1,5	1,4	1,5	1,1	0,9	1,3
Galactose	7,1	15,3	14,0	16,2	10,8	8,5	12,0
Glucose	10,2	8,8	7,6	8,4	10,2	8,2	8,9
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,1	1: 0,2	1: 0,2	1: 0,2	1: 0,1	1: 0,1	1: 0,2
Ausbeute [%]	36,35	38,41	53,58	47,00	44,32	53,09	45,5

Tab. 3.18: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des Rückstands der Arabinan-Isolierung von K I (Ergebnisse von YF 1 und 2 stammen aus der fraktionierten Arabinan-Isolierung)

<b>Krautextrakt I Yariv-Fällung Überstand 80 % EtOH-Fällung Rückstand</b>							
Monosaccharid	YF 1	YF 2	YF 3	YF 4	YF 5	YF 6	Mittelwert
Rhamnose	8,1	9,3	6,2	7,7	8,0	8,3	7,9
Fucose	0,2	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4
Arabinose	37,7	36,6	39,4	36,1	36,3	36,9	37,2
Xylose	0,3	0,3	0,5	0,4	0,5	0,4	0,4
Mannose	3,2	3,2	4,7	4,1	3,9	3,7	3,8
Galactose	46,6	46,6	43,2	46,6	45,8	45,5	45,7
Glucose	3,9	3,7	5,6	4,6	5,1	4,8	4,6
Verhältnis Ara:Gal	1: 1,2	1: 1,3	1: 1,1	1: 1,3	1: 1,3	1: 1,2	1: 1,2
Ausbeute [%]	56,58	53,42	48,16	50,64	48,19	48,77	51,0

In der graphischen Darstellung in Abbildung 3.22 sind der Yariv-Überstand, das Arabinan und der Rückstand der Arabinan-Isolierung einander gegenübergestellt, um die Aufreinigung des gewonnenen Arabinans noch einmal zu verdeutlichen. Anhand der geringen Standardabweichung im Diagramm konnte gezeigt werden, dass die



Arabinan-Isolierung nach Methode 2.1.5.2 zu homogenen Ergebnissen führt. Die Zunahme des Arabinose-Gehalts auf über 70 % unter starker Verringerung des Galactose-Anteils war gut erkennbar. Der Rückstand der Arabinan-Isolierung enthielt dagegen mehr Galactose als Arabinose. Wahrscheinlich lag hier noch bei der Yariv-Fällung nicht gefälltes AGP vor neben geringeren Mengen an Arabinan, welches an andere mit 80 %igem EtOH fällbare Polysaccharide gebunden war.

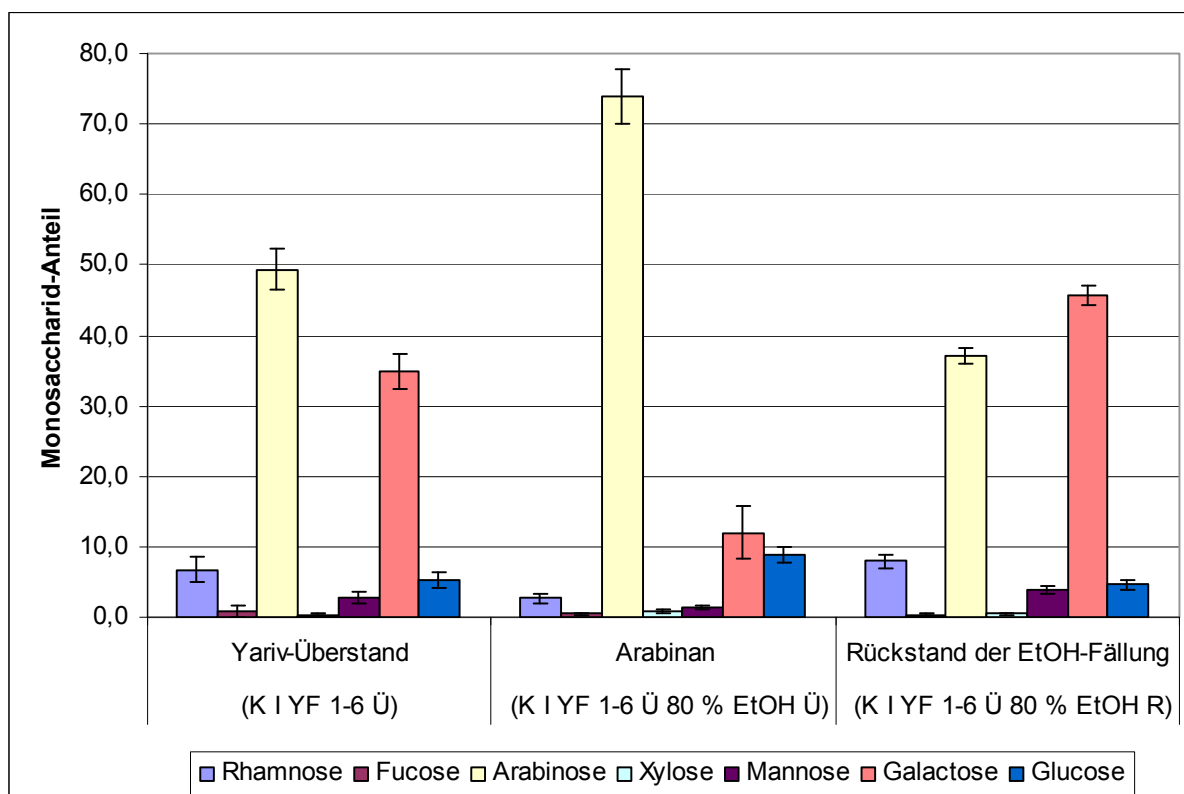


Abb. 3.22: Graphische Darstellung des Vergleichs der Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] der Überstände der Yariv-Fällungen, des daraus gewonnenen Arabinans und des verbleibenden Rückstands bei der Arabinangewinnung als Mittelwerte von K I Y F 1-6

### 3.1.8.2.2 Mistelbeeren

Arabinan aus Mistelbeeren wurde nach Methode 2.1.5.2 unfractioniert isoliert. Das GLC der Abbildung 3.23 zeigt das typische Abbild der Zuckeranalyse eines Arabinans aus Mistelbeeren mit dem großen Arabinose-Peak, auch im Vergleich zum Inositol, dies verdeutlicht die hohe erzielte Ausbeute.

## Ergebnisse

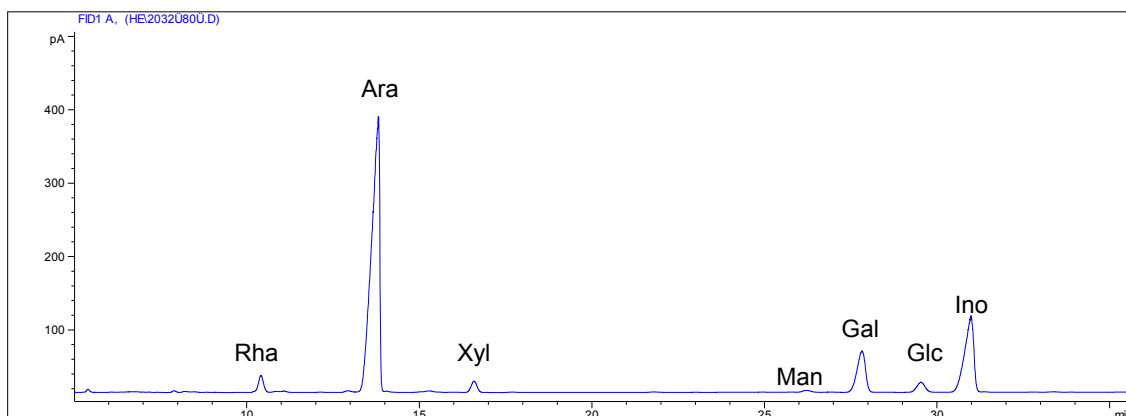


Abb. 3.23: GLC der acetylierten Monosaccharide des Arabinans aus Mistelbeeren (B I YF 2 Ü 80 % EtOH Ü)

Die Ergebnisse der Arabinan-Isolierung aus Mistelbeeren sind für die Yariv-Fällungen 1 und 2 in Tabelle 3.19 dargestellt und weisen für den Überstand (Arabinan), trotz unterschiedlicher Ergebnisse für die AGP-Isolierung, ähnliche Werte im Vergleich zum Mistelkraut auf. Der Arabinose-Anteil lag bei ungefähr 76 % bei einem Zucker-Anteil von etwa 60 %. In Tabelle 3.20 sind die Rückstände der Arabinan-Isolierung für die Yariv-Fällungen 1 und 2 aufgeführt. In diesen befanden sich zu fast 100 % in 80 % EtOH nicht lösliche Polysaccharide (Ausbeute 98,7 %).

Tab. 3.19: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des Arabinans aus B I

Monosaccharid	Beeren I Yariv-Fällung Überstand 80 % EtOH-Fällung Überstand		
	Yariv-Fällung 1	Yariv-Fällung 2	Mittelwert
Rhamnose	4,2	4,2	4,2
Fucose	0,0	0,2	0,1
Arabinose	76,1	76,5	76,3
Xylose	1,8	2,4	2,1
Mannose	0,5	0,5	0,5
Galactose	14,1	12,7	13,4
Glucose	3,3	3,5	3,4
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,2	1: 0,2	1: 0,2
Ausbeute [%]	59,93	62,28	61,1

## Ergebnisse

Tab. 3.20: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des Rückstands der Arabinan-Isolierung aus B I

<b>Beeren I Yariv-Fällung Überstand 80 % EtOH-Fällung Rückstand</b>			
Monosaccharid	Yariv-Fällung 1	Yariv-Fällung 2	Mittelwert
Rhamnose	4,5	4,3	4,4
Fucose	0,7	0,7	0,7
Arabinose	49,1	53,1	51,1
Xylose	0,9	0,9	0,9
Mannose	3,4	0,6	2,0
Galactose	36,1	38,7	37,4
Glucose	5,3	1,7	3,5
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,7	1: 0,7	1: 0,7
Ausbeute [%]	100,00	97,44	98,7

Die Abtrennung des Arabinans von anderen vorhandenen Polysacchariden wird mit der graphischen Darstellung (Abb. 3.24) deutlich. Hier werden der Yariv-Überstand, das Arabinan und der Rückstand der Arabinan-Isolierung miteinander verglichen. Das Arabinose- zu Galactose-Verhältnis lag beim Yariv-Überstand bei 1:0,7 (siehe Tab. 3.13), beim Arabinan bei 1:0,2 (siehe Tab. 3.19), im Rückstand der Arabinan-Isolierung wiederum bei 1:0,7 (siehe Tab. 3.20). Dieser Rückstand könnte, entsprechend zum Rückstand der Arabinan-Isolierung des Kraut-AGPs, bei der Yariv-Fällung nicht mitgefälltes AGP enthalten.

## Ergebnisse

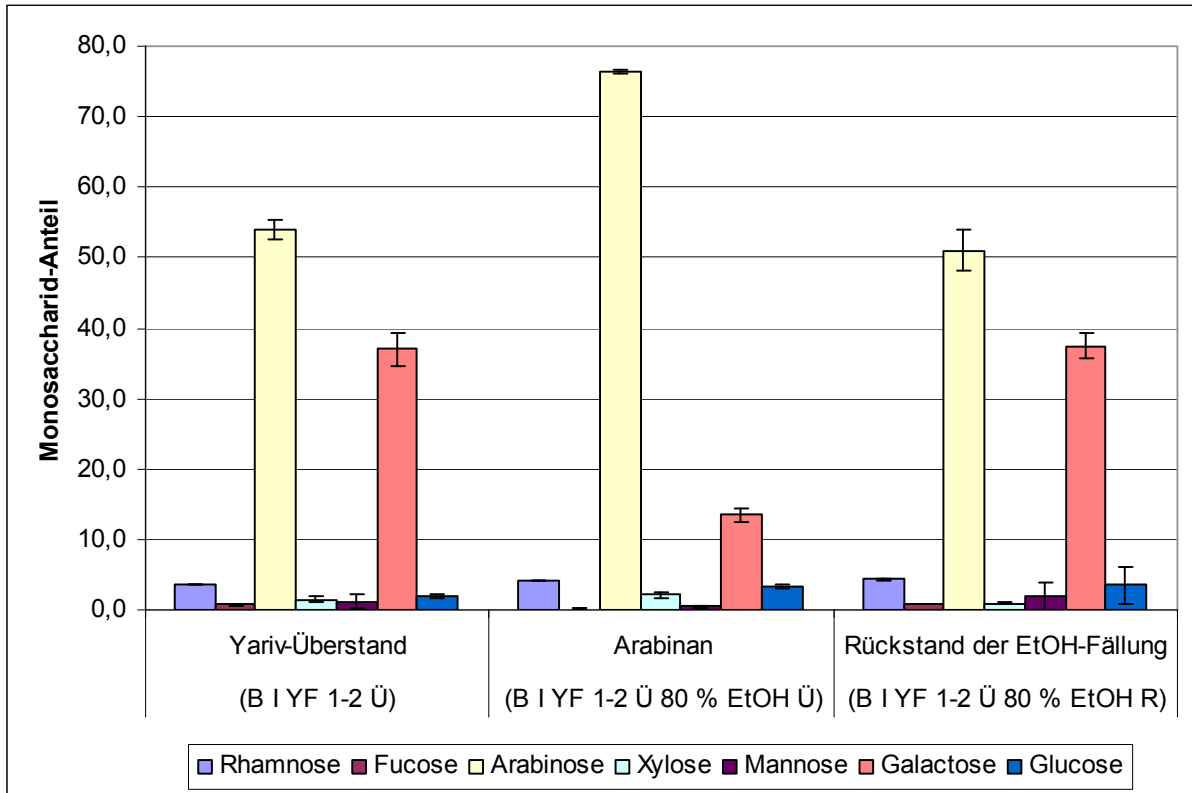


Abb. 3.24: Graphische Darstellung des Vergleichs der Monosaccharid-Zusammensetzung (m/m) der Überstände der Yariv-Fällungen, des daraus gewonnenen Arabinans und des verbleibenden Rückstands bei der Arabinangewinnung als Mittelwerte von B I YF 1-2

### 3.1.9 Uronsäure-Bestimmung nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973)

Bei dieser kolorimetrischen Gesamturonsäure-Bestimmung (Methode 2.2.5) werden Uronsäuren mit Schwefelsäure/Borax und meta-Hydroxydiphenyl in Chromogene umgewandelt, die dann bei einer Wellenlänge von 520 nm vermessen werden. Vorteil der Methode ist ihre hohe Robustheit; andere Monosaccharide verfälschen das Ergebnis nicht. Nachteilig ist die fehlende Differenzierung zwischen den einzelnen Uronsäuren.

Um den Uronsäure-Gehalt in einer Probe bestimmen zu können, wurde vorher eine Kalibriergerade mit einer Stammlösung aus gleichen Teilen Glucuron- und Galacturonsäure erstellt. Die Abbildung 3.25 zeigt eine Kalibriergerade mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9962.

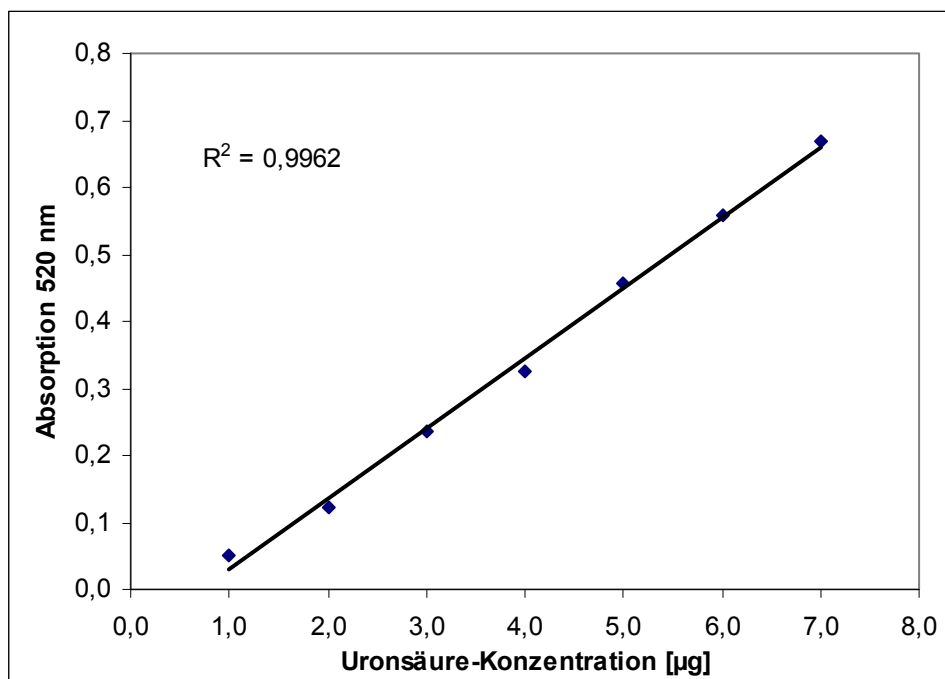


Abb. 3.25: Kalibriergerade mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9962 zur Bestimmung des Gesamturonsäure-Gehalts

Über die Kalibriergerade wurde der Uronsäure-Gehalt im Mistelkraut-AGP und -Arabinan, sowie im Mistelbeeren-AGP und -Arabinan bestimmt, die jeweiligen Uronsäure-Gehalte sind in Tabelle 3.21 wiedergegeben. Mistelkraut enthielt nach

## Ergebnisse

dieser Methode mit 4 % am meisten Uronsäuren, gefolgt vom Beeren-Arabinan. Beeren-AGP und Kraut-Arabinan enthielten nur knapp 1 % Uronsäuren.

Tab. 3.21: Gesamturonsäure-Gehalte in den einzelnen Mistel-Fractionen

<b>Kraut-AGP</b>	<b>Beeren-AGP</b>	<b>Kraut-Arabinan</b>	<b>Beeren-Arabinan</b>
4,0 %	0,9 %	0,7 %	3,9 %

Für Mistelkraut-AGP wurde von AGP aus drei verschiedenen Yariv-Fällungen der Uronsäure-Gehalt bestimmt, die Ergebnisse mit Mittelwert sind in Tabelle 3.22 dargestellt.

Tab. 3.22: Gesamturonsäure-Gehalte in den einzelnen AGP-Fractionen aus Mistelkraut

<b>K I Y F 1 AGP</b>	<b>K I Y F 2 AGP</b>	<b>K I Y F 6 AGP</b>	<b>Mittelwert</b>
2,8 %	4,1 %	5,2 %	4,0 %

Die Werte schwanken zwischen 2,8 % und 5,2 %, um genauere Ergebnisse zu erhalten, wurden weitere Methoden zur Uronsäure-Bestimmung durchgeführt (Methoden 2.2.6 und 2.2.7).

### **3.1.10 Uronsäure-Reduktion nach Taylor und Conrad (1972)**

Bei der Uronsäure-Reduktion (Methode 2.2.6) werden die Uronsäuren zuerst reduziert und anschließend zweifach deuteriert. Durch die Reduktion zu den korrespondierenden Neutralzuckern werden diese der Acetylierungsanalyse (Methode 2.2.4) zugänglich gemacht. In der Neutralzucker-Zusammensetzung kommt es daher zu einer Erhöhung derjenigen Monosaccharide, die vorher die Carboxylgruppe trugen. Durch Acetylierungsanalyse können die deuterierten Neutralzucker nicht von den anderen Neutralzuckern unterschieden werden, dies ist nur durch Bindungstypanalyse nach Methylierung möglich (Methode 2.2.9). Die Ergebnisse der Bindungstypanalyse werden unter 3.1.13 dargestellt.

**3.1.10.1 Mistelkraut**

Mistelkraut-AGP von K I YF 2 und 3 wurde vor und nach Uronsäure-Reduktion acetyliert und die Neutralzucker-Zusammensetzung mittels GC bestimmt. Zum Vergleich musste unter Berücksichtigung der Ausbeute die absolute Galactose- und Glucose-Konzentration [%] vor und nach der Uronsäure-Reduktion berechnet werden. Die Ergebnisse in Tabelle 3.23 zeigen, dass Kraut-AGP sowohl Galacturon- als auch Glucuronsäure enthielt.

Tab. 3.23: Vergleich der Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des AGPs aus Mistelkraut vor und nach Uronsäure-Reduktion

Monosaccharid	K I YF 2 AGP		K I YF 5 AGP	
	vor US-Red.	nach US-Red.	vor US-Red.	nach US-Red.
Rhamnose	6,8	4,0	6,3	6,1
Fucose	0,3	0,2	1,3	0,3
Arabinose	31,0	33,1	31,2	32,1
Xylose	0,3	0,6	0,3	0,3
Mannose	1,8	2,0	1,3	1,9
Galactose	54,1	48,9	53,3	46,6
Glucose	5,7	11,2	6,3	12,7
Verhältnis Ara:Gal	1: 1,7	1: 1,5	1: 1,7	1: 1,5
Ausbeute [%]	22,85	29,15	26,81	40,82
Galactose [% absolut]	12,34	14,25	14,26	19,02
Glucose [% absolut]	1,30	3,26	1,69	5,18

### 3.1.10.2 Mistelbeeren

Der Anstieg der absoluten Menge an Galactose und Glucose im Mistelbeeren-AGP, dargestellt in Tabelle 3.24, war nach der Uronsäure-Reduktion nur sehr gering ausgeprägt. Die weitere Untersuchung der Proben über GLC-MS (3.1.13.2) sollte eindeutigere Ergebnisse zeigen.

Tab. 3.24: Vergleich der Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des AGPs aus Mistelbeeren vor und nach der Uronsäure-Reduktion

Monosaccharid	B I Y F 4 AGP	
	vor US-Red.	nach US-Red.
Rhamnose	4,4	5,8
Fucose	0,5	0,5
Arabinose	50,6	46,0
Xylose	0,9	0,7
Mannose	2,4	2,6
Galactose	36,2	37,6
Glucose	5,0	6,8
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,7	1:0,8
Ausbeute [%]	21,92	22,97
Galactose [% absolut]	7,94	8,64
Glucose [% absolut]	1,10	1,56

### 3.1.11 Konduktometrische Uronsäure-Bestimmung

Mittels Konduktometrie (siehe Methode 2.2.7) können Sulfat- und Carboxylgruppen in Polysacchariden bestimmt werden (Casu und Gennaro, 1975). Da in Mistelpolysacchariden keine Sulfatgruppen vorhanden sind, werden mit der Methode nur die vorhandenen Carboxylgruppen bestimmt. In der Probe vorhandene Säuregruppen werden zunächst protoniert und im Anschluss mit Natronlauge (NaOH) titriert. Ein Äquivalent NaOH entspricht einer Säuregruppe in der Probe. Die Leitfähigkeit der Lösung sinkt solange, bis keine Säuregruppen mehr vorhanden sind. Danach steigt die Leitfähigkeit wieder an, da überschüssiges NaOH vorhanden ist. Die Uronsäure-Konzentration ist dem Verbrauch an 0,01 N NaOH am



Wendepunkt der Leitfähigkeitskurve proportional. Die Abbildung 3.26 zeigt die nach der Messung verschiedener Galacturonsäure-Konzentrationen ermittelte Kalibriergerade.

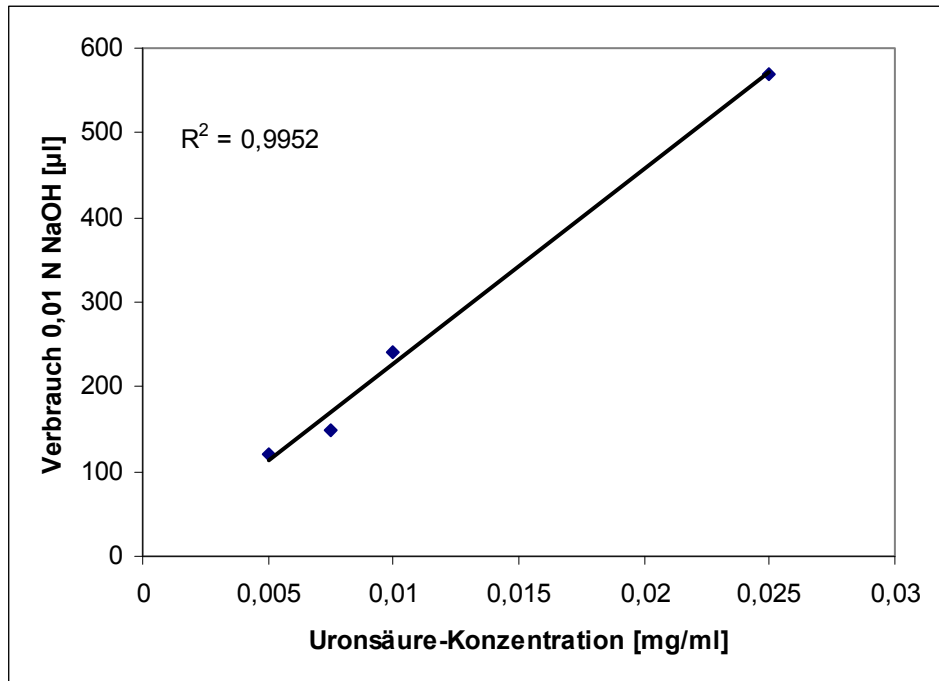


Abb. 3.26: Kalibriergerade mit Galacturonsäure für die Konduktometrie

Die Bestimmung des Uronsäure-Gehalts in den einzelnen Fraktionen lieferte die in Tabelle 3.25 aufgeführten Ergebnisse.

Tab. 3.25: Ergebnisse der konduktometrischen Uronsäure-Bestimmung der einzelnen Fraktionen aus Mistelkraut

<b>Fraktion</b>	<b>Uronsäuren [%]</b>
<b>AGP (K I YF 3 + 4 R)</b>	22,84
<b>Arabinan (K I YF 1 Ü 80% EtOH Ü)</b>	12,06
<b>Partialhydrolyse-Rückstand des AGPs (K I YF 2 R PR)</b>	36,68

Die Ergebnisse der konduktometrischen Uronsäure-Bestimmung zeigen um ein Vielfaches höhere Uronsäure-Gehalte als die photometrische Methode nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) und die Uronsäure-Reduktion nach Taylor und Conrad (1972). Da die beiden letzteren Methoden in Relation zu einander

passende Werte ergaben, sind die Ergebnisse der konduktometrischen Methode unter Vorbehalt zu betrachten.

### **3.1.12 Partialhydrolyse**

Die Partialhydrolyse wurde nach Methode 2.2.8 durchgeführt. Bei der Partialhydrolyse wird ausgenutzt, dass durch Einwirkung schwacher Säuren (Oxalsäure 12,5 mM) furanosidische Bindungen im AGP abgespalten werden. Somit erhält man durch die Ergebnisse der Partialhydrolyse wichtige Informationen über den strukturellen Aufbau des AGPs.

Nach Säurebehandlung wurde die Probe zentrifugiert, um den unlöslichen Rest abzutrennen. Anschließend wurden aus der Lösung hochmolekulare Bestandteile mit 80 %igem Ethanol gefällt, während abgespaltene Mono- und Oligosaccharide in 80 %igem Ethanol gelöst blieben und somit in den Überstand gelangten. Die Neutralzucker-Zusammensetzung der Fraktionen wurde durch Acetylierung (Methode 2.2.4) bestimmt. Die Ergebnisse der Bindungstypanalyse werden unter 3.1.13 abgehandelt.

#### **3.1.12.1 Mistelkraut**

In Tabelle 3.26 sind die Ergebnisse der Neutralzucker-Bestimmung aufgeführt. Der Überstand der Partialhydrolyse wurde jeweils einmal nach Methode 2.2.4 acetyliert und einmal modifiziert ohne vorangehende TFA-Hydrolyse, um nur die im Überstand vorliegenden Monosaccharide zu erfassen. Im Vergleich zum Ausgangs-AGP befand sich im Rückstand der Ethanol-Fällung vor allem Galactose. Der Überstand enthielt fast 70 % Arabinose, auch der Gehalt an Rhamnose zeigte einen Anstieg. Ungefähr die Hälfte der im Überstand vorliegenden Neutralzucker lag als Monosaccharid vor (siehe Überstand ohne Hydrolyse). Die dominierenden Neutralzucker waren dort Arabinose und in geringerer Menge Rhamnose.

Die vergleichende graphische Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 3.27 zeigt noch einmal auf einen Blick die sich ändernden Monosaccharid-Zusammensetzungen in den vier verschiedenen Fraktionen.

## Ergebnisse

Tab. 3.26: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des Kraut-AGPs nach Partialhydrolyse (K I YF 2)

K I YF 2				
Monosaccharid	AGP	Rückstand	Überstand	Überstand ohne Hydrolyse
Rhamnose	6,8	3,9	10,2	8,0
Fucose	0,3	0,1	0,5	0,7
Arabinose	31,0	3,8	67,0	84,5
Xylose	0,3	1,7	0,2	0,1
Mannose	1,8	2,1	1,0	0,2
Galactose	54,1	85,2	17,4	5,4
Glucose	5,7	3,2	3,7	1,1
Verhältnis Ara:Gal	1: 1,7	1:22,4	1:0,3	1:0,06
Ausbeute [%]	22,85	40,53	42,67	23,04

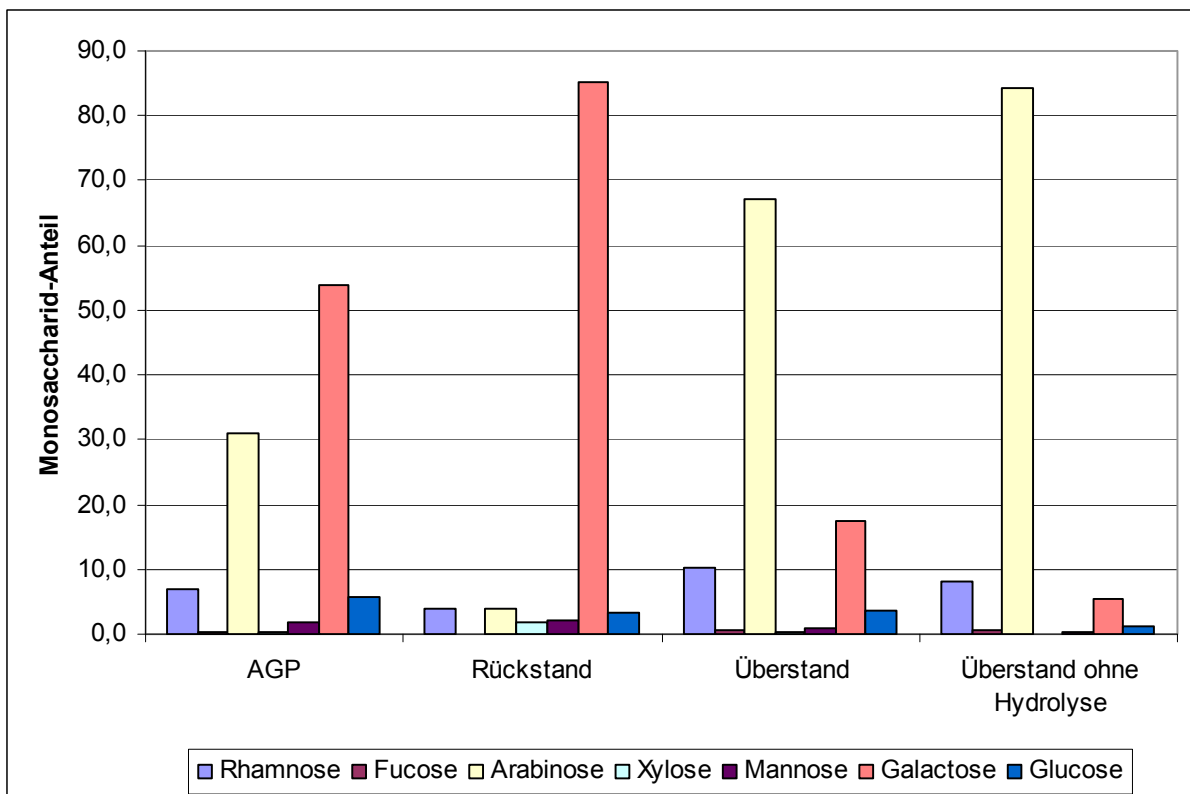


Abb. 3.27: Graphische Darstellung der Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des Kraut-AGPs nach Partialhydrolyse (K I YF 2)

### 3.1.12.2 Mistelbeeren

Bei der Partialhydrolyse von Mistelbeeren-AGP wurde im Vergleich zu Mistelkraut zusätzlich der unlösliche Rest nach der Partialhydrolyse vor der Ethanol-Fällung auf seine Monosaccharid-Zusammensetzung hin untersucht. In Tabelle 3.27 sind die Ergebnisse der Acetylierungsanalyse der vier Fraktionen dargestellt.

Tab. 3.27: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des Beeren-AGPs nach Partialhydrolyse (B I Y F 4)

Monosaccharid	B I Y F 4			
	AGP	unlöslicher Rest	Rückstand	Überstand
Rhamnose	4,4	2,9	6,1	1,4
Fucose	0,5	0,4	1,4	0,4
Arabinose	50,6	30,0	14,8	83,6
Xylose	0,9	5,4	0,5	1,0
Mannose	2,4	9,6	1,2	1,8
Galactose	36,2	38,2	73,2	8,2
Glucose	5,0	13,5	2,8	3,6
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,7	1:1,3	1:4,9	1:0,1
Ausbeute [%]	21,92	6,32	50,18	27,92

Die graphische Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 3.28 veranschaulicht die unterschiedliche Zusammensetzung der Fraktionen. Der unlösliche Rest enthielt im Verhältnis zum Ausgangs-AGP viel Xylose, Mannose und Glucose, bei denen es sich wahrscheinlich um Verunreinigungen des AGPs handelte. Der Rückstand nach Partialhydrolyse enthielt zu über 70 % Galactose und nur ca. 15 % Arabinose. Der Überstand zeigte ein umgekehrtes Arabinose- zu Galactose-Verhältnis mit über 80 % Arabinose, die einzelnen Werte der weiteren Monosaccharide lagen unter 10 %.

## Ergebnisse

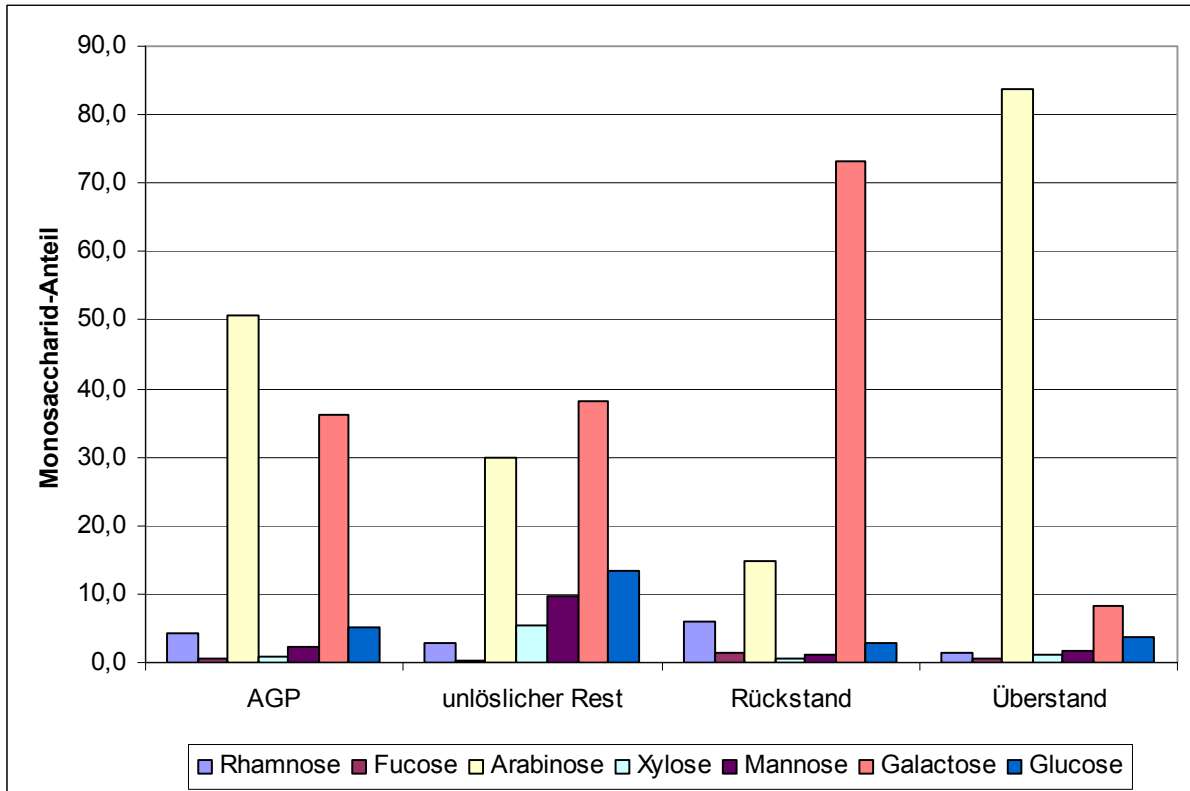


Abb. 3.28: Graphische Darstellung der Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des Beeren-AGPs nach Partialhydrolyse (B I YF 4)

Ein weiteres AGP einer anderen Yariv-Fällung wurde ebenfalls der Partialhydrolyse unterworfen, der Rückstand wurde im Anschluss nach Methode 2.2.6 uronsäure-reduziert. Aufgrund des hohen Galactose-Anteils im Partialhydrolyse-Rückstand waren hier die Uronsäuren zu vermuten. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tabelle 3.28 dargestellt. An der im Vergleich zum Rückstand der Partialhydrolyse von B I YF 4 höheren Glucose- und Galactose-Konzentration, obwohl das Ausgangs-AGP bei YF 3 sogar weniger Galactose und Glucose als YF 4 enthielt, konnte deutlich gemacht werden, dass die Uronsäuren im Rückstand der Partialhydrolyse zu finden waren. Diese Ergebnisse wurden durch die Bindungstypanalyse (siehe 3.1.13.2) überprüft. Die Ergebnisse der Überstände der Partialhydrolyse von B I YF 3 und 4 zeigen bis auf eine erhöhte Glucose-Konzentration bei YF 3 vergleichbare Werte.

## Ergebnisse

Tab. 3.28: Monosaccharid-Zusammensetzung [m/m] des Beeren-AGPs nach Partialhydrolyse (B I YF 3), der Rückstand wurde anschließend uronsäurereduziert

<b>B I YF 3</b>			
Monosaccharid	<b>AGP</b>	<b>Rückstand nach US-Red.</b>	<b>Überstand</b>
Rhamnose	3,3	5,0	0,8
Fucose	0,3	1,1	0,0
Arabinose	54,4	9,8	84,3
Xylose	0,8	0,3	0,6
Mannose	1,6	0,8	0,6
Galactose	33,4	76,8	6,2
Glucose	6,2	6,2	7,5
Verhältnis Ara:Gal	1: 0,6	1:7,8	1:0,1
Ausbeute [%]	32,38	65,09	31,11

### 3.1.13 Bestimmung der Bindungstypen

Die Bindungstypen im Polysaccharid-Anteil wurden durch Methylierungsanalyse nach Harris *et al.* (1984) (Methode 2.2.9) bestimmt. Freie OH-Gruppen des Polysaccharids wurden in Methylether überführt. Die partiell methylierten Polysaccharide wurden hydrolysiert, reduziert und anschließend die zum Zeitpunkt der Methylierung aufgrund der glykosidischen Bindung und der Halbacetalbindung nicht zugänglichen OH-Gruppen der Monosaccharide acetyliert. Die erhaltenen partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs) wurden gaschromatographisch getrennt. Die Retentionszeit ist zur eindeutigen Identifizierung der PMAAs nicht ausreichend; daher wurde die Auswertung der PMAAs in Kombination mit einem Massenspektrometer über die Retentionszeit und das Massenspektrum vorgenommen. Hierbei ist auch die Bestimmung der Ringgröße des Monosaccharids [furanosidisch (f) oder pyranosidisch (p)] möglich. Des Weiteren können PMAAs, die vormals Uronsäuren trugen, von Neutralzuckern differenziert werden. Dazu wurde bei der Uronsäure-Reduktion (Methode 2.2.6) zweifach deuteriert. Für diese PMAAs ergab sich also ein um zwei Da erhöhtes MW. Die Zuordnung der PMAAs erfolgte mit Hilfe einer im Arbeitskreis angelegten Spektrenbibliothek. In Tabelle 3.29 sind die für die Auswertung der vorkommenden PMAAs benötigten Parameter dargestellt. Durch die Zuordnung des gemessenen Spektrums wurden die PMAAs identifiziert, anhand derer man auf den Monosaccharid-Bindungstyp schließen konnte. Um das molare Verhältnis der einzelnen Monosaccharid-Bindungstypen zueinander bestimmen zu können, wurde außer dem MW noch ein Korrektur-Faktor (Carpita und Shea, 1989) benötigt, da aufgrund der eindeutigeren Spektren die Auswertung über das FID-Chromatogramm vorgenommen wurde.

## Ergebnisse

Tab. 3.29: Parameter für die Bestimmung der Bindungstypen und deren Anteile nach Methylierungsanalyse  
\* zweifach deuteriert

Monosaccharid- Bindungstyp	partiell methyliertes Alditolacetat (PMAA)	MW PMAA	Korrektur- Faktor
1-Ara (f)	1,4-Di-Acetyl-2,3,5-Tri-Methyl-Pentose	278,139	0,60
1-Rha (p)	1,5-Di-Acetyl-2,3,4-Tri-Methyl-Desoxy-Hexose	292,151	0,70
1-Ara (p)	1,5-Di-Acetyl-2,3,4-Tri-Methyl-Pentose	278,139	0,61
1,2-Ara (p)	1,2,5-Tri-Acetyl-3,4-Di-Methyl-Pentose	306,130	0,66
1,2-Ara (f)	1,2,4-Tri-Acetyl-3,5-Di-Methyl-Pentose	306,130	0,65
1,3-Ara (f)	1,3,4-Tri-Acetyl-2,5-Di-Methyl-Pentose	306,130	0,65
1,2-Rha (p)	1,2,5-Tri-Acetyl-3,4-Di-Methyl-Desoxy-Hexose	320,146	0,75
1,5-Ara (f)	1,4,5-Tri-Acetyl-2,3-Di-Methyl-Pentose	306,130	0,66
1,2-Xyl (p)	1,2,5-Tri-Acetyl-3,4-Di-Methyl-Pentose	306,130	0,66
1-GlcA (p)	1,5-Di-Acetyl-2,3,4,6-Tetra-Methyl-Hexose*	324,161	0,70
1-Hexose (p)	1,5-Di-Acetyl-2,3,4,6-Tetra-Methyl-Hexose	322,161	0,70
1-Glc (p)	1,5-Di-Acetyl-2,3,4,6-Tetra-Methyl-Hexose	322,161	0,70
1-Gal (p)	1,5-Di-Acetyl-2,3,4,6-Tetra-Methyl-Hexose	322,161	0,70
1,3,5-Ara (f)	1,3,4,5-Tetra-Acetyl-2-Mono-Methyl-Pentose	334,125	0,70
1,2,4-Rha (p)	1,2,4,5-Tetra-Acetyl-3-Mono-Methyl-Desoxy-Hexose	348,141	0,79
1,2-Hexose (p)	1,2,5-Tri-Acetyl-3,4,6-Tri-Methyl-Hexose	350,156	0,74
1,2-Glc (p)	1,2,5-Tri-Acetyl-3,4,6-Tri-Methyl-Hexose	350,156	0,74
1,3-Hexose (p)	1,3,5-Tri-Acetyl-2,4,6-Tri-Methyl-Hexose	350,156	0,74
1,3-Gal (p)	1,3,5-Tri-Acetyl-2,4,6-Tri-Methyl-Hexose	350,156	0,74
1,4-GalA (p)	1,4,5-Tri-Acetyl-2,3,6-Tri-Methyl-Hexose*	352,156	0,74
1,4-Hexose (p)	1,4,5-Tri-Acetyl-2,3,6-Tri-Methyl-Hexose	350,156	0,74
1,6-Hexose (p)	1,5,6-Tri-Acetyl-2,3,4-Tri-Methyl-Hexose	350,156	0,75
1,6-Gal (p)	1,5,6-Tri-Acetyl-2,3,4-Tri-Methyl-Hexose	350,156	0,75
1,4,6-Hexose (p)	1,4,5,6-Tetra-Acetyl-2,3-Di-Methyl-Hexose	378,151	0,80
1,3,6-Gal (p)	1,3,5,6-Tetra-Acetyl-2,4-Di-Methyl-Hexose	378,151	0,80



### 3.1.13.1 Mistelkraut

#### 3.1.13.1.1 AGP und Derivate

Es wurden die Monosaccharid-Bindungstypen mittels Methylierungsanalyse im Mistelkraut-AGP bestimmt. Abbildung 3.29 zeigt ein typisches FID-Chromatogramm des AGPs, die einzelnen Werte sind in Tabelle 3.30 dargestellt.

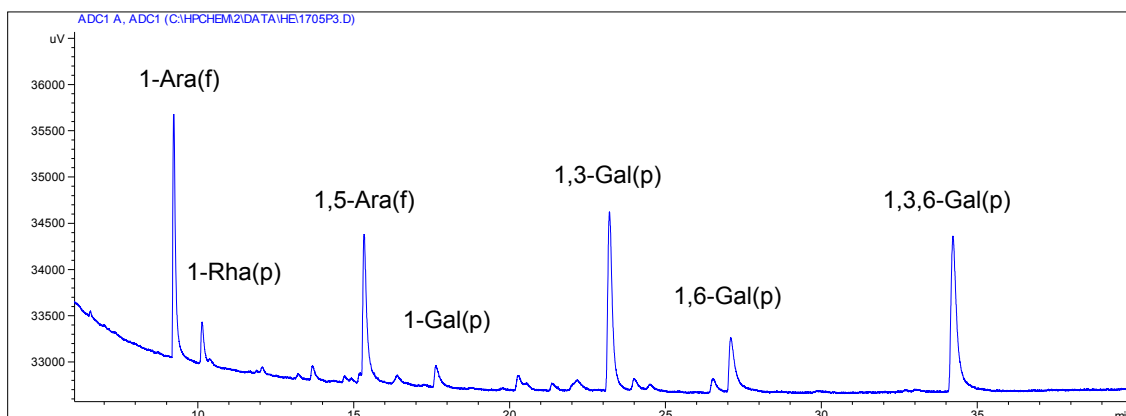


Abb. 3.29: FID-Chromatogramm der PMAAs des Kraut-AGPs (K I YF 2 AGP)

Tab. 3.30: Ergebnisse der Bindungstypanalyse des Kraut-AGPs (K I YF 2 AGP) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil [mol %]	Verhältnis
1-Ara (f)	9,2	21,6	11
1-Rha (p)	10,1	3,4	2
1,5-Ara (f)	15,3	18,2	9
1-Gal (p)	17,6	3,0	2
1,3,5-Ara (f)	20,3	1,9	1
1,3-Gal (p)	23,2	22,1	11
1,6-Gal (p)	27,1	7,7	4
1,3,6-Gal (p)	34,2	22,1	11

Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen = 1:0,9

Der Polysaccharid-Anteil im AGP bestand hauptsächlich aus Galactose und Arabinose, zu je ca. 22 % lagen 1,3,6-Gal, 1,3-Gal und terminale Arabinose vor. 1,5-verknüpfte Arabinose stellte mit 18,2 % einen weiteren großen Anteil. In geringer

## Ergebnisse

Menge waren 1,6-Galactose (7,7 %), terminale Rhamnose (3,4 %) und Galactose (3,0 %) sowie hochverzweigte 1,3,5-verknüpfte Arabinose (1,9 %) enthalten. Die Ergebnisse der Acetylierungsanalysen konnten in etwa bestätigt werden. Glucose konnte in dieser Analyse genau wie auch die nach Acetylierungsanalyse in Spuren enthaltenen Monosaccharide Fucose, Xylose und Mannose nicht nachgewiesen werden. Ein Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen von 1:0,9 bei einem Arabinose- zu Galactose-Verhältnis von 1:1,3 könnte für falsch zu hoch bestimmte terminale Arabinose bei der Bindungstypanalyse sprechen.

Des Weiteren wurden die Bindungstypen des Rückstands des partialhydrolysierten AGPs (AGP PR) bestimmt (Tab. 3.31).

Tab. 3.31: Ergebnisse der Bindungstypanalyse des Rückstands nach Partialhydrolyse des Kraut-AGPs (K I YF 2 AGP PR) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil [mol %]	Verhältnis
1-Ara (f)	9,2	2,7	1
1-Rha (p)	10,1	3,3	1
1-Gal (p)	17,5	11,9	4
1,3-Hexose (p)	21,9	3,7	1
1,3-Gal (p)	23,1	26,5	9
1,6-Gal (p)	26,9	31,0	10
1,3,6-Gal (p)	34,1	20,9	7

Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen = 1:1,2

Nach Partialhydrolyse (Methode 2.2.8), bei der nur furanosidische Bindungen, da diese labiler sind, gespalten wurden (siehe auch Ergebnisse der Partialhydrolyse 3.1.12), fand sich im Rückstand hauptsächlich Galactose, die nach abnehmenden Anteilen 1,6-, 1,3-, 1,3,6- und terminal verknüpft vorlag. Diese Ergebnisse lassen auf ein Grundgerüst aus 1,3-verknüpfter Galactose schließen, an dem Seitenketten aus 1,6-verknüpfter Galactose über 6-Verknüpfung der Galactose-Monomere des Grundgerüsts angeknüpft sind. Geringe Mengen an terminal verknüpfter Arabinose und Rhamnose kamen vor.

## Ergebnisse

Die Tabelle 3.32 zeigt die Ergebnisse der Bindungstypanalyse des Überstands nach der Partialhydrolyse (AGP PÜ).

Tab. 3.32: Ergebnisse der Bindungstypanalyse des Überstands nach Partialhydrolyse des Kraut-AGPs (K I YF 2 AGP PÜ) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil [mol %]	Verhältnis
1-Ara (f)	9,3	57,2	7
1-Rha (p)	10,2	8,5	1
1-Ara (p)	10,8	18,1	2
1,5-Ara (f)	15,4	16,2	2

Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen = 1:0,0

Der Überstand nach Partialhydrolyse enthielt hauptsächlich terminale und 1,5-verknüpfte Arabinose, der Anteil an pyranosidisch verknüpfter Arabinose kam durch Umlagerung nach der Abspaltung zustande. Über 1,5-verknüpfte Arabinose sind die Arabinose-Seitenketten an das Galactose-Grundgerüst angeknüpft, die Seitenketten schließen mit terminaler Arabinose oder Rhamnose ab. Da Rhamnose im Ausgangs-AGP und auch nach Partialhydrolyse nur pyranosidisch vorlag, konnte die Bindung nicht selbst gespalten werden, sondern lag im Überstand der Partialhydrolyse an 1,5-Arabinose gebunden vor.

Das AGP wurde nach der Uronsäure-Reduktion (Methode 2.2.6) der Methylierungsanalyse unterworfen, die Ergebnisse sind in Tabelle 3.33 dargestellt. Das uronsäurereduzierte AGP enthielt terminale Glucuronsäure (4,1 %) und 1,4-Galacturonsäure (7,8 %), die Ergebnisse lagen höher als die der kolorimetrischen Uronsäure-Bestimmung (3.1.9) und auch etwas höher als die Ergebnisse der Acetylierung (3.1.10.1). Jedoch konnte schon bei der Acetylierung nachgewiesen werden, dass sowohl Galacturonsäure als auch Glucuronsäure im AGP vorkamen. Des Weiteren kamen Spuren an 1,3-verknüpfter Arabinose im Gegensatz zum AGP vor, die aufgrund der geringen Menge (1,2 %) im AGP wahrscheinlich bedingt durch die vielen Reaktionsschritte nicht mehr nachweisbar war.

## Ergebnisse

Tab. 3.33: Ergebnisse der Bindungstypanalyse des uronsäurereduzierten Kraut-AGPs (K I YF 2 AGP USR) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil [mol %]	Verhältnis
1-Ara (f)	9,3	17,1	11
1-Rha (p)	10,1	4,7	3
1,3-Ara (f)	13,7	1,2	1
1,5-Ara (f)	15,4	15,6	10
1-GlcA (p)	16,3	4,1	3
1-Gal (p)	17,7	1,2	1
1,3,5-Ara (f)	20,3	1,6	1
1,3-Gal (p)	23,3	12,6	8
1,4-GalA (p)	23,9	7,8	5
1,6-Gal (p)	27,1	10,4	7
1,3,6-Gal (p)	34,3	23,7	16
Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen = 1:0,9			

Tab. 3.34: Ergebnisse der Bindungstypanalyse des uronsäurereduzierten Rückstands nach Partialhydrolyse des Kraut AGPs (K I YF 4 AGP PR USR) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil [mol %]	Verhältnis
1-Ara (f)	6,9	4,5	5
1-Rha (p)	7,5	4,6	5
1,5-Ara (f)	11,8	0,6	1
1-GlcA (p)	12,5	14,2	14
1-Gal (p)	13,6	5,6	6
1,3-Hexose (p)	17,3	2,3	2
1,3-Gal (p)	18,4	15,4	15
1,4-GalA (p)	19,0	6,3	6
1,6-Gal (p)	21,8	28,7	29
1,3,6-Gal (p)	28,3	17,8	18
Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen = 1:0,6			

## Ergebnisse

Um eine Aussage über die Lage der Uronäuren im Polysaccharidteil des AGPs treffen zu können, wurde auch mit dem Rückstand des partialhydrolysierten AGPs eine Uronsäure-Reduktion durchgeführt (AGP PR USR) und diese Probe untersucht (Tab. 3.34). Beide Uronsäuren fanden sich im partialhydrolysierten Rückstand. Der Anteil an terminaler Glucuronsäure stieg im Vergleich zum uronsäurereduzierten AGP um mehr als das Dreifache an, der Anteil 1,4-verknüpfter Galacturonsäure blieb ungefähr gleich.

Zum besseren Vergleich der Ergebnisse des Kraut-AGPs und seiner Derivate werden diese in der folgenden Tabelle 3.35 nebeneinander aufgelistet und in der Abbildung 3.30 sind die verschiedenen Monosaccharid-Bindungstypen noch einmal farblich differenziert in einem Balkendiagramm dargestellt.

Tab. 3.35: Vergleich der molekularen Zusammensetzung der Bindungstypen des Kraut-AGPs und dessen Derivaten (AGP USR: AGP nach Uronsäure-Reduktion; AGP PR USR: Rückstand des partialhydrolysierten AGPs nach Uronsäure-Reduktion; AGP PR: Rückstand des partialhydrolysierten AGPs; AGP PÜ: Überstand des partialhydrolysierten AGPs) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	AGP	AGP USR	AGP PR	AGP PR USR	AGP PÜ
1-Ara (f)	21,6	17,1	4,5	2,7	57,2
1-Rha (p)	3,4	4,7	4,6	3,3	8,5
1-Ara (p)	-	-	-	-	18,1
1,3-Ara (f)	-	1,2	-	-	-
1,5-Ara (f)	18,2	15,6	0,6	-	16,2
1-GlcA (p)	-	4,1	14,2	-	-
1-Gal (p)	3,0	1,2	5,6	11,9	-
1,3,5-Ara (f)	1,9	1,6	-	-	-
1,3-Hexose (p)	-	-	2,3	3,7	-
1,3-Gal (p)	22,1	12,6	15,4	26,5	-
1,4-GalA (p)	-	7,8	6,3	-	-
1,6-Gal (p)	7,7	10,4	28,7	31,0	-
1,3,6-Gal (p)	22,1	23,7	17,8	20,9	-

## Ergebnisse

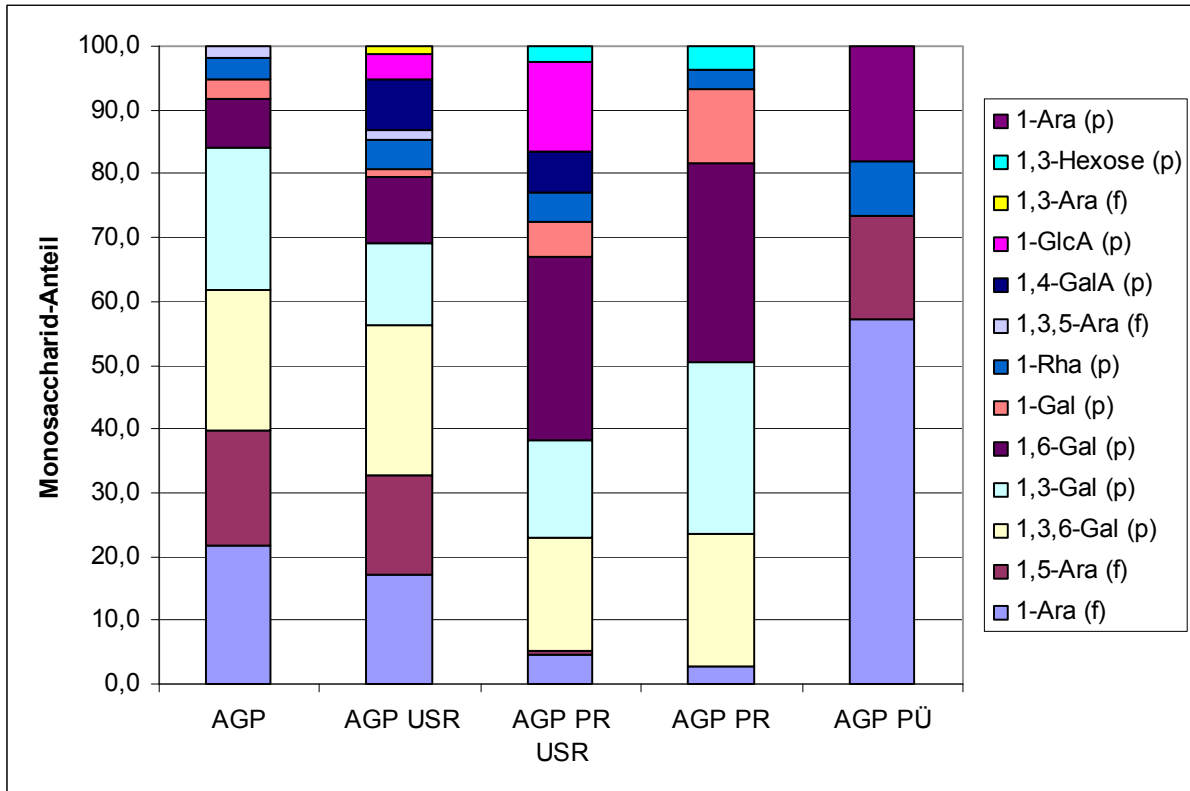


Abb. 3.30: Graphische Darstellung der molekularen Zusammensetzung der Bindungstypen von AGP, AGP USR, AGP PR USR, AGP PR und AGP PÜ aus Mistelkraut ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Folgende Aussagen über den strukturellen Aufbau des Mistelkraut-AGPs nach der Bindungstypanalyse können zusammenfassend getroffen werden.

1. Es liegt ein AGP bestehend aus den Hauptmonosacchariden Arabinose und Galactose neben Glucuron- und Galacturonsäure sowie geringen Mengen Rhamnose vor.
2. Das Grundgerüst des Polysaccharid-Anteils des AGPs ist aus 1,3-verknüpften Galactose-Einheiten aufgebaut, Seitenketten aus 1,6-verknüpfter Galactose sind über das C 6 von Galactose-Einheiten der Hauptkette angeknüpft.
3. Seitenketten aus 1,5-verknüpfter Arabinose sind an die 1,6-Galactose-Seitenketten über das C 3 der 1,6-Galactose-Einheiten angeknüpft, die Seitenketten schließen mit terminaler Arabinose oder Rhamnose ab.

4. Terminale Glucuronäure und 1,4-verknüpfte Galacturonsäure sind an das Galactose-Grundgerüst angeknüpft.

### 3.1.13.1.2 *Arabinan*

Kraut-Arabinan, das nach Methode 2.1.5.2 isoliert worden war und sich im Überstand der 80 %igen Ethanol-Fällung befand, wurde mittels Bindungstypanalyse untersucht. Auch der Rückstand der 80 %igen Ethanol-Fällung wurde untersucht, um die Ergebnisse der Neutralzucker-Zusammensetzung, dass es sich beim Rückstand um nicht mitgefälltes AGP handelt, zu bestätigen. In den Tabellen 3.36 und 3.37 sind die Ergebnisse der Methylierungsanalysen dargestellt.

Tab. 3.36: Ergebnisse der Bindungstypanalyse des Kraut-Arabinans (K I YF 2 Ü 80 % EtOH Ü) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil [mol %]	Verhältnis
1-Ara (f)	9,2	31,8	32
1-Rha (p)	10,3	3,0	3
1,2-Ara (f)	13,1	1,0	1
1,3-Ara (f)	13,6	2,8	3
1,5-Ara (f)	15,2	35,6	36
1-Hexose (p)	16,2	3,7	4
1,3,5-Ara (f)	20,1	13,8	14
1,2-Glc (p)	21,2	3,8	4
1,2-Hexose (p)	22,0	4,5	5
Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen = 1:0,4			

## Ergebnisse

Die Abbildung 3.31 zeigt das FID-Chromatogramm des Kraut-Arabinans.

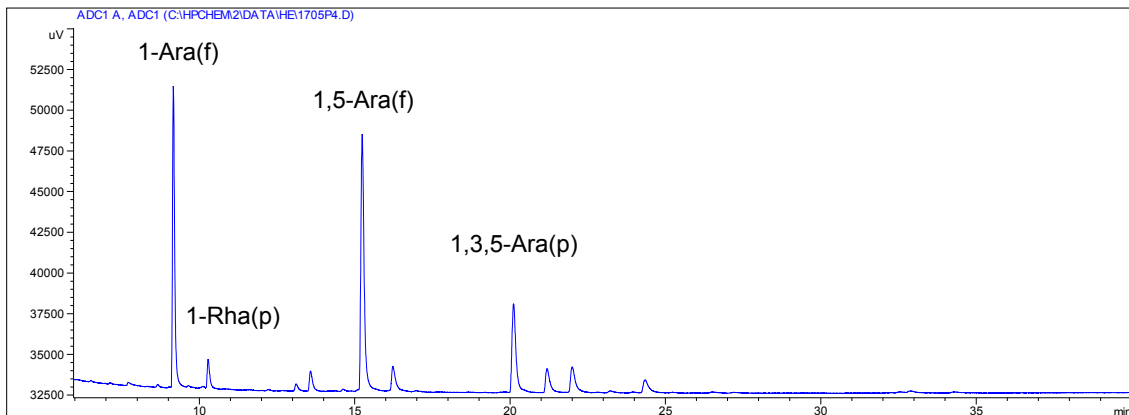


Abb. 3.31: FID-Chromatogramm der PMAAs des Kraut-Arabinans (K I YF 2 Ü 80 % EtOH Ü)

Tab. 3.37: Ergebnisse der Bindungstypanalyse des Rückstandes der 80 % EtOH-Fällung (K I YF 2 Ü 80 % EtOH R) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil [mol %]	Verhältnis
1-Ara (f)	9,2	27,4	14
1-Rha (p)	10,1	2,6	1
1,2-Rha (p)	14,7	1,4	1
1,5-Ara (f)	15,3	18,3	9
1-Gal (p)	17,6	2,9	2
1,3,5-Ara (f)	20,3	1,6	1
1,2,4-Rha (p)	20,5	3,3	2
1,3-Gal (p)	23,3	6,2	3
1,6-Gal (p)	27,1	14,2	7
1,4,6-Hexose (p)	32,9	3,1	2
1,3,6-Gal (p)	34,3	19,0	10

Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen = 1:0,8

Das Arabinan bestand hauptsächlich aus terminaler (31,8 %), 1,5-verknüpfter (35,6 %) und 1,3,5-verknüpfter (13,8 %) Arabinose. Geringe Mengen an terminaler oder 1,2-verknüpfter nicht genauer bestimmbarer Hexosen kamen vor. Das Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen lag bei 1:0,4 und war somit wieder zu den Endgruppen verschoben.



## Ergebnisse

Der Rückstand der Arabinan-Isolierung wies ähnliche PMAAs auf wie das AGP. Lediglich der Anteil an 1,3-verknüpfter Galactose fiel deutlich geringer aus. Es könnte sich daher auch um ein anders aufgebautes AGP handeln. Außerdem kamen geringe Anteile an 1,2-Rhamnose (1,4 %), 1,2,4-Rhamnose (3,3 %), 1,3,5-Arabinose (1,6 %) und einer nicht eindeutig bestimmbar 1,4,6-Hexose (3,1 %) vor.

In Tabelle 3.38 sind die Ergebnisse der Bindungstypanalyse für das Arabinan und den Rückstand der Arabinan-Isolierung vergleichend nebeneinander dargestellt. Hiermit kann die Vollständigkeit der Abtrennung verunreinigender Monosaccharide bei der EtOH-Fällung verdeutlicht werden, nur 4 der 16 verschiedenen Monosaccharid-Bindungstypen kommen in beiden Fraktionen vor.

Tab. 3.38: Vergleich der molekularen Zusammensetzung der PMAAs im Yariv-Überstand aus Mistelkraut nach 80 %iger EtOH-Fällung (Ü: Überstand; R: Rückstand) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	80 % EtOH Ü	80 % EtOH R
1-Ara (f)	31,8	27,4
1-Rha (p)	3,0	2,6
1,2-Ara (f)	1,0	-
1,3-Ara (f)	2,8	-
1,2-Rha (p)	-	1,4
1,5-Ara (f)	35,6	18,3
1-Hexose (p)	3,7	-
1-Gal (p)	-	2,9
1,3,5-Ara (f)	13,8	1,6
1,2,4-Rha (p)	-	3,3
1,2-Glc (p)	3,8	-
1,2-Hexose (p)	4,5	-
1,3-Gal (p)	-	6,2
1,6-Gal (p)	-	14,2
1,4,6-Hexose (p)	-	3,1
1,3,6-Gal (p)	-	19,0

Zusammenfassend bleibt festzuhalten:

1. Es konnte ein Arabinan, das hauptsächlich aus terminaler, 1,5- und 1,3,5-verknüpfter Arabinose besteht, isoliert werden.
2. Der Rückstand der Arabinan-Isolierung weist eine AGP-ähnliche Zusammensetzung auf.

### 3.1.13.2 Mistelbeeren

Die Monosaccharid-Bindungstypen wurden für das Beeren-AGP, die AGP-Derivate und das Beeren-Arabinan durch Methylierungsanalyse bestimmt und werden im folgenden Abschnitt abgehandelt.

In Abbildung 3.32 ist das FID-Chromatogramm des AGPs abgebildet, die einzelnen Anteile der verschiedenen Monosaccharid-Bindungstypen sind in Tabelle 3.39 wiedergegeben.

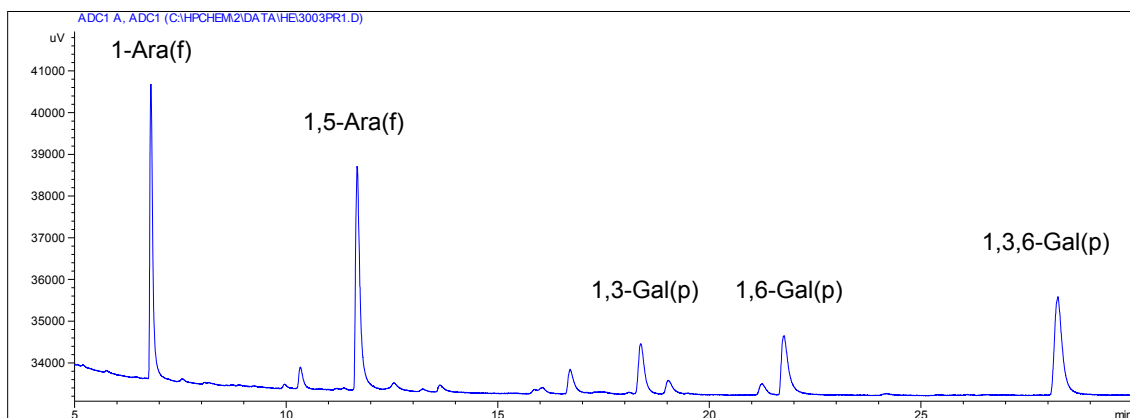


Abb. 3.32: FID-Chromatogramm der PMAAs des Beeren-AGPs (B I YF 3 AGP)

## Ergebnisse

Tab. 3.39: Ergebnisse der Bindungstypanalyse des Beeren-AGPs (B I YF 3 AGP) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil [mol %]	Verhältnis
1-Ara (f)	6,8	26,7	27
1,2-Ara (f)	10,0	0,4	1
1,3-Ara (f)	10,3	2,4	2
1,5-Ara (f)	11,7	27,7	28
1-Glc (p)	12,5	1,0	1
1-Gal (p)	13,6	1,0	1
1,2,4-Rha (p)	16,1	0,9	1
1,2-Hexose (p)	16,7	3,3	3
1,3-Gal (p)	18,4	7,2	7
1,4-Hexose (p)	19,0	2,0	2
1,6-Gal (p)	21,8	9,9	10
1,3,6-Gal (p)	28,2	17,5	18

Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen = 1:0,6

Der Polysaccharidteil des Beeren-AGPs war hauptsächlich aus terminaler (26,7 %) und 1,5-verknüpfter Arabinose (27,7 %) sowie aus 1,3,6-verknüpfter Galactose (17,5 %) aufgebaut. Außerdem kamen größere Mengen an 1,6- (9,9 %) und 1,3-verknüpfter (7,2 %) Galactose vor. Weitere PMAAs waren nur in geringen Anteilen unter 4 % enthalten. Im Gegensatz zum Kraut-AGP wies das Beeren-AGP ein Arabinose- zu Galactose-Verhältnis von 1:0,6 auf. Für Beeren-AGP konnten daher die Ergebnisse der Acetylierungsanalyse (3.1.6.2) bei der Bindungstypanalyse in etwa bestätigt werden.

Das Beeren-AGP wurde, um mehr über den strukturellen Aufbau des Polysaccharidteils zu erfahren, partialhydrolysiert. Die Ergebnisse für den Rückstand sind in Tabelle 3.40, die für den Überstand in Tabelle 3.41 dargestellt.

## Ergebnisse

Tab. 3.40: Ergebnisse der Bindungstypanalyse des Rückstands nach Partialhydrolyse des Beeren-AGPs (B I YF 3 AGP PR) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil [mol %]	Verhältnis
1-Ara (f)	6,9	10,7	5
1,5-Ara (f)	11,9	4,3	2
1-Glc (p)	13,3	1,8	1
1-Gal (p)	13,7	10,8	5
1,2,4-Rha (p)	16,2	1,7	2
1,3-Gal (p)	18,6	8,8	4
1,4-Hexose (p)	19,2	3,0	2
1,6-Hexose (p)	21,5	1,5	1
1,6-Gal (p)	22,0	44,5	22
1,3,6-Gal (p)	28,5	12,9	7

Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen = 1:0,6

Der Rückstand nach Partialhydrolyse (Methode 2.2.8) des AGPs enthielt als Hauptmonosaccharid 1,6-verknüpfte Galactose (44,5 %). Zu ca. je 10 % kommen 1,3,6-Galactose, 1,3-Galactose, terminale Galactose und terminale Arabinose vor. Der viel höhere Anteil an 1,6-Galactose und der geringere Anteil an 1,3,6-Galactose im Vergleich zum Kraut-AGP sprechen für ein anders aufgebautes Polysaccharid-Grundgerüst des Beeren-AGPs. Der für den Rückstand nach milder Säurehydrolyse recht hohe Gehalt an terminaler Arabinose könnte wiederum ein Indiz für einen methodischen Fehler in der Bestimmung sein, oder die Hydrolyse führte zu keiner vollständigen Spaltung aller furanosidischen Bindungen. Außerdem lag zu 4,3 % 1,5-Arabinose vor; dies spricht entweder für geringe Mengen an Arabinose im Galactose-Grundgerüst oder wiederum für eine unvollständige Reaktion.

## Ergebnisse

Tab. 3.41: Ergebnisse der Bindungstypanalyse des Überstands nach Partialhydrolyse des Beeren-AGPs (B I YF 3 AGP PÜ) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil [mol %]	Verhältnis
1-Ara (f)	6,8	40,6	41
1-Rha (p)	7,5	0,3	1
1-Ara (p)	7,9	20,8	21
1,2-Ara (f)	9,9	3,0	3
1,3-Ara (f)	10,3	2,6	3
1,5-Ara (f)	11,7	22,0	22
1-Glc (p)	12,5	3,3	3
1-Gal (p)	13,6	0,8	1
1,3,5-Ara (f)	15,8	0,4	1
1,2-Hexose (p)	16,7	1,2	1
1,3-Gal (p)	18,4	0,7	1
1,4-Hexose (p)	19,0	0,6	1
1,6-Gal (p)	21,8	3,2	2
1,3,6-Gal (p)	28,3	0,5	1
Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen = 1:0,0			

Im Überstand der Partialhydrolyse konnten über 60 % terminale Arabinose bestimmt werden, wobei wiederum die pyranosidisch verknüpfte Arabinose durch Umlagerung nach der Abspaltung entstand. 1,5- verknüpfte Arabinose lag zu 22 % neben geringen Mengen an 1,2- und 1,3-Arabinose und 1,3,5-Arabinose vor, diese wurden bei der Partialhydrolyse nicht vollständig hydrolysiert und lagen als Oligosaccharide vor. Außer terminaler Arabinose konnten terminale Glucose (3,3 %), Galactose (0,8 %) und Rhamnose (0,3 %) bestimmt werden. Geringe Anteile an 1,6- (3,2 %) und 1,3-Galactose (0,7 %), sowie an nicht genauer bestimmbareren 1,2- und 1,4-verknüpften Hexosen lassen eine nicht ganz reine Fraktionierung in Überstand und Rückstand der Partialhydrolyse vermuten.

## Ergebnisse

Die folgende Tabelle (Tab. 3.42) zeigt die Ergebnisse der Bindungstypanalyse nach Uronsäure-Reduktion des AGPs.

Tab. 3.42: Ergebnisse der Bindungstypanalyse des uronsäurereduzierten Beeren-AGPs (B I YF 4 AGP USR) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil [mol %]	Verhältnis
1-Ara (f)	7,0	29,8	20
1,3-Ara (f)	10,5	2,1	1
1,5-Ara (f)	11,9	26,6	18
1-GlcA (p)	12,7	2,9	2
1-Gal (p)	13,8	1,3	1
1,2-Hexose (p)	16,9	3,8	3
1,3-Gal (p)	18,6	8,4	6
1,4-Hexose (p)	19,2	3,7	3
1,6-Gal (p)	22,0	8,1	5
1,3,6-Gal (p)	28,5	13,3	9

Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen = 1:0,4

Die Bindungstypanalyse nach Uronsäure-Reduktion (Methode 2.2.6) ergab für Beeren-AGP 2,9 % terminale Glucuronsäure, der Wert lag genau wie beim Kraut-AGP höher als nach kolorimetrischer Bestimmung (Ergebnisse siehe unter 3.1.9). Die Acetylierungsanalyse nach Uronsäure-Reduktion (3.1.10.2) zeigte sehr geringe Mengen an Galacturon- und Glucuronsäure, die aber aufgrund von Schwankungen des Galactose- und Glucose-Gehalts in den einzelnen Proben zustande gekommen sein könnten.

## Ergebnisse

Um genauere Aussagen über die Lage der terminalen Glucuronsäure machen zu können, wurde der Rückstand nach der Partialhydrolyse uronsäurereduziert (Tab. 3.43).

Tab. 3.43: Ergebnisse der Bindungstypanalyse des uronsäurereduzierten Rückstands nach Partialhydrolyse des Beeren-AGPs (B I YF 3 AGP PR USR) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil [mol %]	Verhältnis
1-Ara (f)	6,9	9,6	10
1,5-Ara (f)	11,9	3,9	4
1-GlcA (p)	12,6	2,2	2
1-Glc (p)	13,4	1,0	1
1-Gal (p)	13,7	8,8	9
1,2,4-Rha (p)	16,2	2,8	3
1,3-Gal (p)	18,6	11,5	12
1,4-Hexose (p)	19,2	2,5	3
1,6-Hexose (p)	21,5	1,2	1
1,6-Gal (p)	22,0	42,7	43
1,3,6-Gal (p)	28,5	13,8	14
Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen = 1:0,8			

Es wurden 2,2 % terminale Glucuronsäure mittels Bindungstypanalyse bestimmt. Da der Anteil an 1,3-Galactose im Vergleich zum nicht reduzierten Partialhydrolyse-Rückstand um 2,7 % zunahm, könnte die Glucuronsäure an diese im Grundgerüst angeknüpft sein.

In Abbildung 3.33 sind die Monosaccharid-Anteile des AGPs und seiner Derivate graphisch zur Verdeutlichung dargestellt. Auf die Darstellung des Überstands nach Partialhydrolyse wird aus Übersichtlichkeitsgründen verzichtet (hohe Anzahl verschiedener PMAAs mit nur geringem Anteil an der Gesamtzusammensetzung).

## Ergebnisse

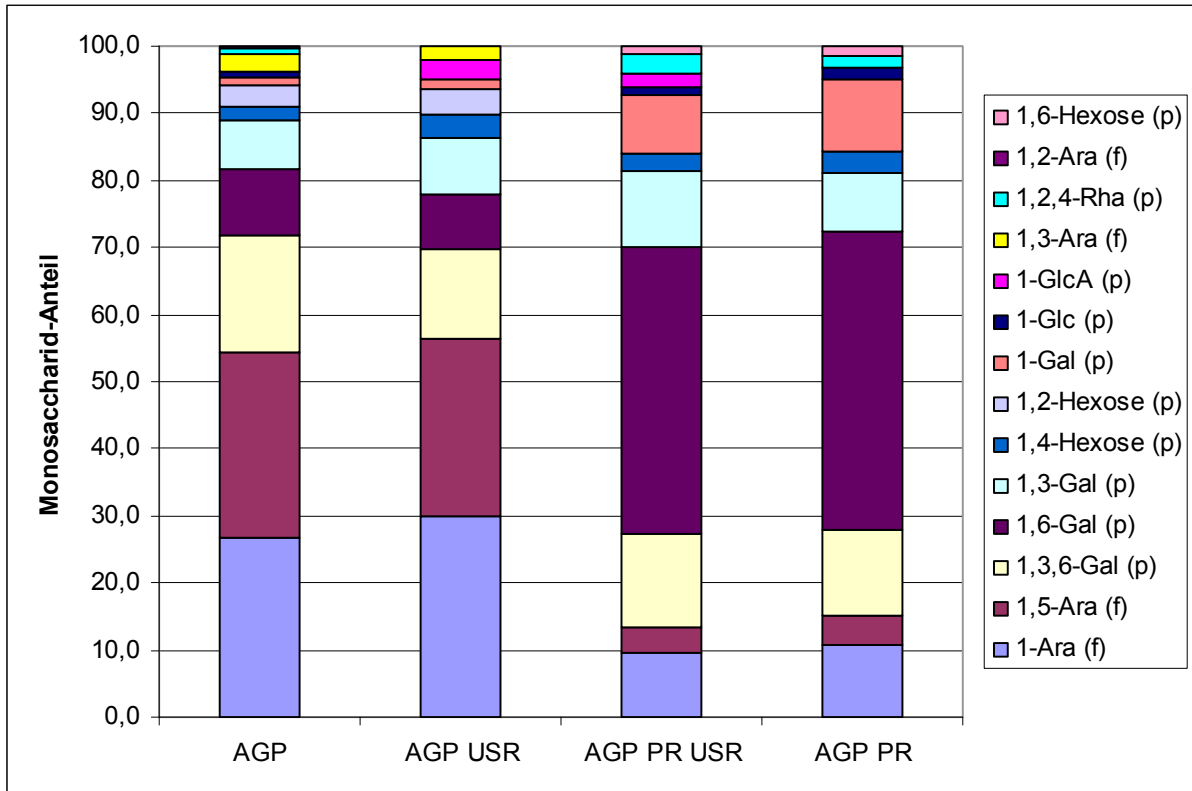


Abb. 3.33: Graphische Darstellung der molekularen Zucker-Zusammensetzung der Bindungstypen von AGP, AGP USR, AGP PR USR und AGP PR aus Mistelbeeren ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Auch aus Mistelbeeren wurde nach Methode 2.1.5.2 ein Arabinan isoliert und dessen Monosaccharid-Bindungstypen bestimmt. Das FID-Chromatogramm ist in Abbildung 3.34 wiedergegeben, die genaue Zusammensetzung der PMAAs wird in Tabelle 3.44 gezeigt.

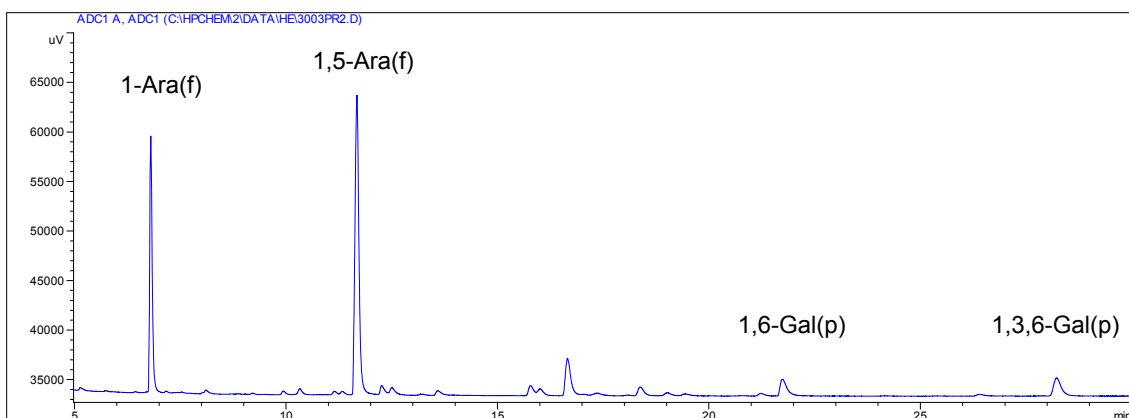


Abb. 3.34: FID-Chromatogramm der PMAAs des Beeren-Arabinans (B I YF 2 Ü 80 % EtOH Ü)



## Ergebnisse

Tab. 3.44: Ergebnisse der Bindungstypanalyse des Beeren-Arabinans (B I YF 2 Ü 80 % EtOH Ü) ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid-Bindungstyp	Retentionszeit	Anteil [mol %]	Verhältnis
1-Ara (f)	6,8	27,7	28
1-Ara (p)	8,1	0,6	1
1,2-Ara (p)	9,2	0,1	1
1,2-Ara (f)	9,9	0,5	1
1,3-Ara (f)	10,3	1,0	1
1,5-Ara (f)	11,7	47,3	47
1,2-Xyl (p)	12,3	1,5	2
1-Glc (p)	12,5	1,4	1
1-Gal (p)	13,6	0,9	1
1,3,5-Ara (f)	15,8	1,9	2
1,2,4-Rha (p)	16,0	1,3	1
1,2-Hexose (p)	16,7	7,1	7
1,3-Hexose (p)	17,4	0,5	1
1,3-Gal (p)	18,4	1,7	2
1,4-Hexose (p)	19,0	0,6	1
1,6-Gal (p)	21,7	3,9	4
1,4,6-Hexose (p)	26,4	0,4	1
1,3,6-Gal (p)	28,2	1,6	2

Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen = 1:0,2

Das Mistelbeeren-Arabinan war zu knapp 50 % aus 1,5-Arabinose aufgebaut. Terminale Arabinose lag zu ca. 28 % vor. Da das Verhältnis nicht-reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen 1:0,2 war, könnte diese wiederum zu hoch bestimmt worden sein. Das Beeren-Arabinan war im Vergleich zum Kraut-Arabinan weniger stark verzweigt, was durch den geringeren Gehalt an 1,3,5-Arabinose (1,9 %) verdeutlicht wurde. Außerdem kamen im Vergleich zum Kraut-AGP mehr Anteile verschiedener zum Teil nicht näher bestimmbarer Hexosen vor.

## Ergebnisse

Die folgende Tabelle 3.45 zeigt noch einmal den Vergleich aller aus Mistelbeeren isolierter Fraktionen und der gewonnenen Derivate.

Tab. 3.45: Vergleich der molekularen Zusammensetzung der Bindungstypen des Beeren-AGPs und dessen Derivaten (AGP USR: AGP nach Uronsäure-Reduktion; AGP PR USR: Rückstand des partialhydrolysierten AGPs nach Uronsäure-Reduktion; AGP PR: Rückstand des partialhydrolysierten AGPs; AGP PÜ: Überstand des partialhydrolysierten AGPs;) und Beeren-Arabinan ermittelt aus dem FID-Chromatogramm

Monosaccharid- Bindungstyp	AGP	AGP USR	AGP PR USR	AGP PR	AGP PÜ	Arabinan
1-Ara (f)	26,7	29,8	9,6	10,7	40,6	27,7
1-Rha (p)	-	-	-	-	0,3	-
1-Ara (p)	-	-	-	-	20,8	0,6
1,2-Ara (p)	-	-	-	-	-	0,1
1,2-Ara (f)	0,4	-	-	-	3,0	0,5
1,3-Ara (f)	2,4	2,1	-	-	2,6	1,0
1,5-Ara (f)	27,7	26,6	3,9	4,3	22,0	47,3
1,2-Xyl (p)	-	-	-	-	-	1,5
1-GlcA (p)	-	2,9	2,2	-	-	-
1-Glc (p)	1,0	-	1,0	1,8	3,3	1,4
1-Gal (p)	1,0	1,3	8,8	10,8	0,8	0,9
1,3,5-Ara (f)	-	-	-	-	0,4	1,9
1,2,4-Rha (p)	0,9	-	2,8	1,7	-	1,3
1,2-Hexose (p)	3,3	3,8	-	-	1,2	7,1
1,3-Hexose (p)	-	-	-	-	-	0,5
1,3-Gal (p)	7,2	8,4	11,5	8,8	0,7	1,7
1,4-Hexose (p)	2,0	3,7	2,5	3,0	0,6	0,6
1,6-Hexose (p)	-	-	1,2	1,5	-	-
1,6-Gal (p)	9,9	8,1	42,7	44,5	3,2	3,9
1,4,6-Hexose (p)	-	-	-	-	-	0,4
1,3,6-Gal (p)	17,5	13,3	13,8	12,9	0,5	1,6

Zu den aus Mistelbeeren gewonnenem AGP und seinen Derivaten und zum Arabinan kann Folgendes zusammengefasst werden:

1. Das Polysaccharid-Grundgerüst des AGPs wird aus 1,3-, 1,6- und 1,3,6-Galactose aufgebaut. Der Gehalt an 1,3-Galactose fällt mit 7,2 % deutlich geringer als beim Kraut-AGP aus. Das Beeren-AGP zeigt somit Unterschiede im Aufbau zum Kraut-AGP.
2. Der Arabinose-Anteil im AGP liegt bei knapp 60 %. Jede zweite Arabinose ist 1,5-verknüpft. Dieses spricht für viele kurze Seitenketten. Die Seitenketten sind nur sehr selten durch 1,3,5-Arabinose verzweigt. Geringe Anteile an 1,2- und 1,3- verknüpfter Arabinose kommen vor.
3. Das Beeren-AGP enthält als einzige Uronsäure zu ca. 2-3 % terminale Glucuronsäure, die wahrscheinlich an die 1,3-Galactose des Arabinogalactan-Grundgerüsts angeknüpft ist.
4. Mistelbeeren-Arabinan wird zu ca. der Hälfte aus 1,5-Arabinose und zu ca. einem Drittel aus terminaler Arabinose aufgebaut, es ist im Vergleich zum Kraut-Arabinan weniger stark verzweigt und enthält mehr Hexosen.

### 3.1.14 Aminosäureanalytik

#### 3.1.14.1 Kraut-AGP

Die Aminosäure-Zusammensetzung wurde nach Entfernung des Kohlenhydrat-Anteils durch Umwandlung der Aminosäuren in die korrespondierenden Phenylthiohydantoinderivate und Messung per HPLC bestimmt (Methode 2.2.10 bzw. 2.2.10.1). Der Gesamtprotein-Anteil im Kraut-AGP betrug 12,5 %, die einzelnen Massen-Anteile der Aminosäure-Zusammensetzung zeigt die Tabelle 3.46.

Tab. 3.46: Ergebnisse der Aminosäureanalytik [m/m %] des Protein-Anteils im Kraut-AGP (K I YF 3)

Aminosäure	Gehalt (m/m %)
glx	13,1
asx	11,2
leu	9,7
ala	8,5
val	7,5
arg	7,3
pro	6,8
thr	6,1
gly	5,9
ile	5,8
phe	5,7
ser	5,1
tyr	2,8
his	2,2
met	2,0
hpro	0,3
lys	0,0

Der geringe Hydroxyprolin-Anteil ist untypisch für ein AGP, da normalerweise über Hydroxyprolin der Proteinteil mit dem Kohlenhydratteil verknüpft wird. Vergleicht man die Aminosäure-Zusammensetzung im Kraut-AGP mit der, die für Mistellektin I

(ML I) bestimmt wurde (Luther und Becker, 1987), so ergibt sich eine Ähnlichkeit.

### 3.1.14.2 Beeren-AGP

Für Beeren-AGP wurde die Bestimmung der einzelnen Aminosäuren nach Abtrennung des Kohlenhydratanteils durch Derivatisierung mittels Ninhydrin und anschließende photometrische Messung durchgeführt (Methode 2.2.10.2). Die einzelnen Massen-Anteile der Aminosäure-Zusammensetzung des Beeren-AGPs sind in Tabelle 3.47 aufgeführt.

Tab. 3.47: Ergebnisse der Aminosäureanalytik des Protein-Anteils [m/m %] im Beeren-AGP (B I YF 5)

Aminosäure	Gehalt (m/m %)
glx	11,6
asx	11,0
leu	10,7
lys	7,3
val	7,2
ala	6,5
arg	6,3
phe	6,0
thr	5,7
ile	5,5
ser	5,4
gly	5,3
pro	4,6
tyr	3,3
his	2,3
cys	0,5
hpro	0,5
met	0,3

Es ergaben sich mit Ausnahme von Lysin ähnliche Werte wie beim Kraut-AGP, nur insgesamt lag der Protein-Anteil mit 5,9 % deutlich geringer als im Kraut-AGP.

### **3.1.15 Gelpermeationschromatographie**

Bei der Gelpermeationschromatographie werden Makromoleküle durch die unterschiedlichen Porengrößen in der Gelmatrix voneinander getrennt. Hochmolekulare Glykoproteine eluieren vor niedermolekularen Glykoproteinen, da sie aufgrund ihrer Größe schlechter in die Poren hinein diffundieren können. Lineare Moleküle einer bestimmten Größe und Molekülmasse werden allerdings nach dem gleichen Volumen eluiert wie verzweigte Moleküle mit der gleichen Größe, aber höherer Molekülmasse. Es kann über Kalibrierung mit Standards nur die relative, nicht die absolute Molekülmasse bestimmt werden. Bestimmt wird also das hydrodynamische Volumen, welches stark vom Bindungstyp, vom Verzweigungsgrad und von der Ladung des Moleküls abhängt. Die Konformation und die Größe der Hydrathülle sind somit die entscheidenden Parameter.

#### **3.1.15.1 Sephacryl S-400 Säule**

Die Bestimmung des hydrodynamischen Volumens erfolgte nach Methode 2.2.12.1 mit einer Sephacryl S-400 Säule über Detektion mit einem RI-Detektor. Es wurde eine Kalibriergerade mit Pullulanen erstellt. Um bei der Auswertung über den RI-Detektor eine Geradengleichung zu erhalten, wurde der Logarithmus der Molekulargewichte gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Das Molekulargewicht der hierzu verwendeten Pullulane betrug 12.200 Da (P-10) bis 853.000 Da (P-800). In Abbildung 3.35 ist die ermittelte Kalibriergerade der Standard-Pullulane wiedergegeben. Anhand des hohen Korrelationskoeffizienten ( $R^2 = 0,9934$ ) ist zu erkennen, dass die Säule die verwendeten Pullulane gut getrennt hat. Es ist zu beachten, dass die Probenkonzentration nicht mit der Peakfläche korreliert, da der verwendete Brechungsindexdetektor sensibler auf kleine Moleküle reagiert.

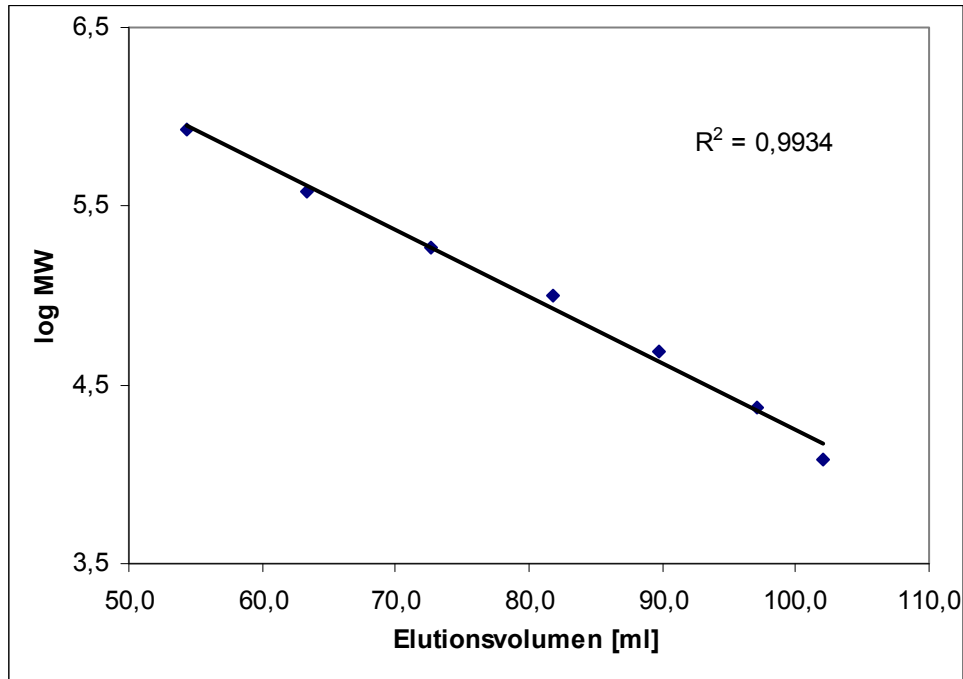


Abb. 3.35: Kalibriergerade der Pullulan-Standards mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9934

Bei der Bestimmung des hydrodynamischen Volumens aus Mistelkraut-AGP ergaben sich zwei Peaks. Das Peakmaximum des ersten Peaks lag bei 50,0 ml und entsprach somit einem hydrodynamischen Volumen von  $1,29 \times 10^6$  Da. Der zweite Peak eluierte bei 82,5 ml, dies entsprach einem hydrodynamischen Volumen von  $7,94 \times 10^4$  Da. Das Ergebnis bedeutet, dass das AGP ein heterogenes Gemisch darstellt, das aus zwei verschiedenen Fraktionen besteht. Die eine Fraktion hat ein hydrodynamisches Volumen von ca. 40.000 Da, während die andere bei ca. 1,3 Mio Da liegt.

### 3.1.15.2 PL-GPC-50 plus

Bei der Messung der Proben mit einem PL-GPC-50 plus Gerät wurde das hydrodynamische Volumen mit einem MALLS-Detektor nach Methode 2.2.12.2 bestimmt. Die Auswertung erfolgte zum einen direkt über Softwareberechnung nach Konstanten-Einstellung (siehe 2.2.12.2), zum anderen, um die Einflüsse durch die verschiedenen Volumina besser berücksichtigen zu können, über eine anschließende Korrektur mit Hilfe einer Kalibriergeraden mit Pullulanen. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden die vom Hersteller angegebenen Molekulargewichte (MW soll) gegen die gemessenen hydrodynamischen Volumina (ist) logarithmisch aufgetragen (Abb. 3.36). Die Molekulargewichte der Pullulane betragen 5.900 Da bis 788.000 Da.

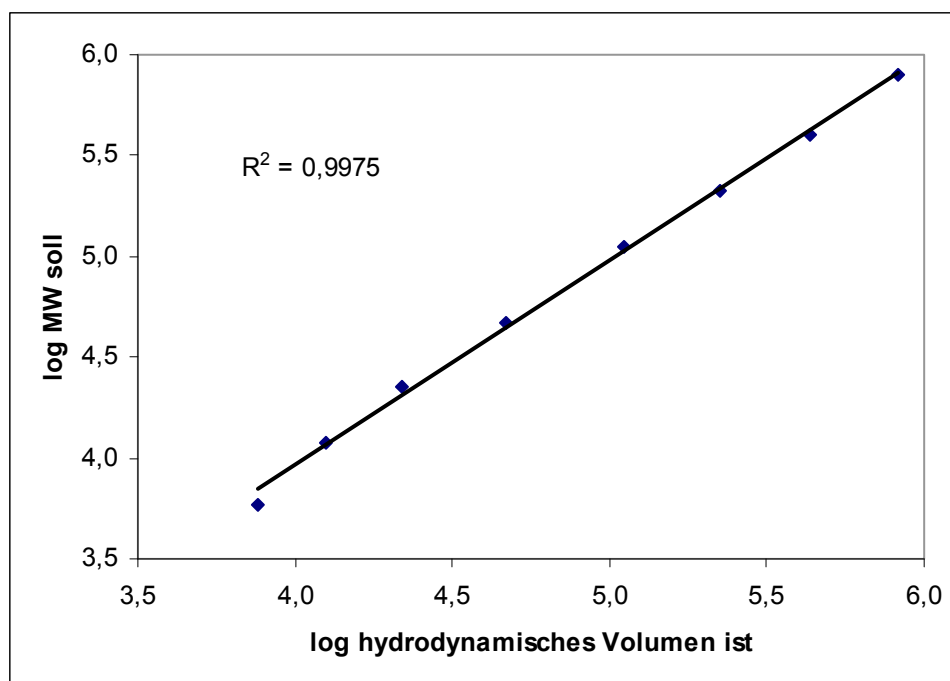


Abb. 3.36: Kalibriergerade der Pullulan-Standards bestimmt über den MALLS-Detektor in der logarithmischen Darstellung mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9975

Es wurden sowohl Mistelkraut-AGP und Mistelbeeren-AGP (isoliert nach Methode 2.1.4), sowie die entsprechenden Arabinane (isoliert nach Methode 2.1.5.2) als auch ML I (aufgearbeitet nach Methode 2.2.11) vermessen. Durch Messung von ML I sollte auf Anwesenheit von Lektinen in den AGP-Proben geprüft werden. Die mit ML I gespickten AGP-Proben sollten zeigen, ob AGPs Lektine binden und sich somit deren



## Ergebnisse

---

hydrodynamisches Volumen erhöht. Da, wie sich zeigte, ML I an das verwendete Säulenmaterial band und nicht eluiert werden konnte, wurde dem Fließmittel 0,05 M Galactose zugesetzt. Diese bindet selbst an ML I und verhindert dadurch die Bindung an das Säulenmaterial, allerdings bindet die Galactose evtl. auch an das AGP.

In den folgenden Tabellen sind die durch Software berechneten und die über Berechnung mit anschließender Korrektur über die Pullulan-Kalibrierung bestimmten hydrodynamischen Volumina (hydr. Vol.) wiedergegeben. Für Kraut-AGP (Tab. 3.48) ergaben sich zwei Fraktionen mit einem hydrodynamischen Volumen um 300.000 Da und um 35.000 Da. Das hydrodynamische Volumen der größeren Fraktion lag deutlich unter dem, des mit der Sephacryl-S 400 Säule bestimmten. Tabelle 3.49 zeigt die Ergebnisse für Kraut-AGP nach Zusatz von ML I. Durch dieses erhöhte sich das hydrodynamische Volumen der kleineren Fraktion um ca. 65.000 Da. Reines ML I (Tab. 3.50), lieferte hingegen ein hydrodynamisches Volumen von ca. 120.000 Da; dieses entspricht dem MW des Dimers des ML I. Die Erhöhung von 65.000 Da in der Kraut-AGP-Probe nach Zusatz von ML I könnte demnach der Bindung von ML I-Monomeren an niedermolekulare AGPs zugeschrieben werden.

Tab. 3.48: Auswertung der GPC-Daten für Kraut-AGP

	Peak 1 [Da]	Peak 2 [Da]
hydr. Vol. (Software)	306.300	34.050
log hydr. Vol.	5,486	4,532
hydr. Vol. (Pullulan-Kalibrierung)	315.688	36.283

Tab. 3.49: Auswertung der GPC-Daten für Kraut-AGP + Mistellektin I (ML I)

	Peak 1 [Da]	Peak 2 [Da]
hydr. Vol. (Software)	314.800	98.860
log hydr. Vol.	5,498	4,995
hydr. Vol. (Pullulan-Kalibrierung)	324.314	103.653

## Ergebnisse

Tab. 3.50: Auswertung der GPC-Daten für ML I

	Peak 1 [Da]
hydr. Vol. (Software)	114.400
log hydr. Vol.	5,058
hydr. Vol. (Pullulan-Kalibrierung)	119.681

Beeren-AGP (Tab. 3.51) enthielt zwei Fraktionen: eine mit einem hydrodynamischen Volumen um 1,4 Mio. Da, die andere um 200.000 Da. Durch Zugabe von ML I wurden drei Fraktionen enthalten, die Ergebnisse sind in Tabelle 3.52 aufgeführt. Der dritte Peak entsprach reinem ML I mit ca. 115.000 Da; der zweite Peak lag bei knapp 300.000 Da und stellte wohl ML I-bindendes AGP des ursprünglich bei ca. 200.000 Da liegenden Peaks dar. Das hydrodynamische Volumen des ersten Peaks verdoppelte sich durch ML I Zugabe fast auf ca. 2,3 Mio. Da; dieser Peak lag allerdings oberhalb des Ausschlussvolumens.

Tab. 3.51: Auswertung der GPC-Daten für Beeren-AGP

	Peak 1 [Da]	Peak 2 [Da]
hydr. Vol. (Software)	1.357.000	202.500
log hydr. Vol.	6,133	5,306
hydr. Vol. (Pullulan-Kalibrierung)	1.367.374	210.021

Tab. 3.52: Auswertung der GPC-Daten für Beeren-AGP + ML I

	Peak 1 [Da]	Peak 2 [Da]	Peak 3 [Da]
hydr. Vol. (Software)	2.272.000	283.300	109.300
log hydr. Vol.	6,356	5,452	5,039
hydr. Vol. (Pullulan-Kalibrierung)	2.271.543	292.329	114.424

Bei der Messung des Kraut-Arabinans (Tab. 3.53) ergab sich eine Fraktion oberhalb des Ausschlussvolumens (ca. 24 Mio. Da) und eine Fraktion um 8.000 Da. Beeren-Arabinan (Tab. 3.54) enthielt auch zwei Fraktionen: eine mit ca. 1,2 Mio. Da und eine mit ungefähr 150.000 Da.

## Ergebnisse

---

Tab. 3.53: Auswertung der GPC-Daten für Kraut-Arabinan

	Peak 1 [Da]	Peak 2 [Da]
hydr. Vol. (Software)	24.600.000	8.169
log hydr. Vol.	7,391	3,912
hydr. Vol. (Pullulan-Kalibrierung)	23.722.348	8.895

Tab. 3.54: Auswertung der GPC-Daten für Beeren-Arabinan

	Peak 1 [Da]	Peak 2 [Da]
hydr. Vol. (Software)	1.168.000	150.500
log hydr. Vol.	6,067	5,178
hydr. Vol. (Pullulan-Kalibrierung)	1.179.609	156.794

Die Berechnung über die Software lieferte im Messbereich (5.900 Da-788.000 Da) zu kleine hydrodynamische Volumina; die Korrektur der berechneten Werte mittels Kalibriergerade liefert genauere Ergebnisse und sollte bei jeder Messung durchgeführt werden.

## 3.2 Immunologie

### 3.2.1 ELISA

#### 3.2.1.1 Kompetitiver ELISA

Es wurde auf Kreuzreaktivität eines monoklonalen Antikörpers und polyklonaler Antikörper, generiert gegen ein AGP aus *Echinacea purpurea*, nach Methode 2.3.1.1 getestet. Als Antigene wurde AGP und Arabinan aus Mistelkraut und Mistelbeeren, sowie das uronsäurereduzierte AGP (Methode 2.2.6) und der Rückstand des partialhydrolysierten AGPs (Methode 2.2.8) aus Mistelkraut und Mistelbeeren verwendet. Die Bindungsaffinität eines Antikörpers zu einem Epitop ist in diesem Ansatz umgekehrt proportional zur Höhe der Absorption bei der Messung. Es wurde die Bindungsaffinität unterschiedlicher Konzentrationen der Mistelkraut-Antigene mit AGP aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* als Antigen verglichen.

##### 3.2.1.1.1 Polyklonale Antikörper

Die polyklonalen Antikörper aus Kaninchen wurden mit AGP aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* als Antigen hergestellt. Die Abbildungen 3.37 und 3.38 zeigen die Ergebnisse der Messung von Mistelkraut-AGP (Kraut-AGP), welches im Vergleich zu *Echinacea purpurea*-AGP (AGP E. p.) in geringer Konzentration deutlich schwächer reagierte. Mistelkraut-AGP nach Uronsäure-Reduktion (Kraut-AGP UR) reagierte nicht mit dem Antikörper. Nach Partialhydrolyse des Mistelkraut-AGPs und Verwendung des Rückstands (Kraut-AGP PR), an welchem die Arabinose-Seitenketten abgespalten wurden, trat schon in geringer Konzentration eine verstärkte Kreuzreaktivität mit den Antikörpern auf.

## Ergebnisse

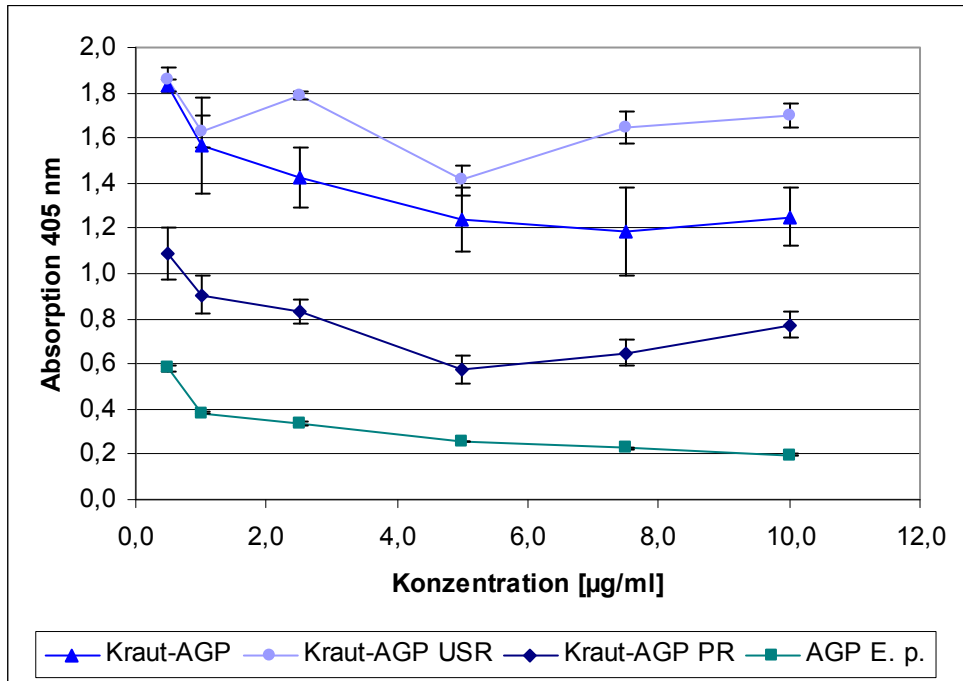


Abb. 3.37: Kreuzreaktivität des Mistelkraut-AGPs und seiner Derivate in niedriger Konzentration mit polyklonalen Antikörpern und *Echinacea purpurea*-AGP als Vergleich

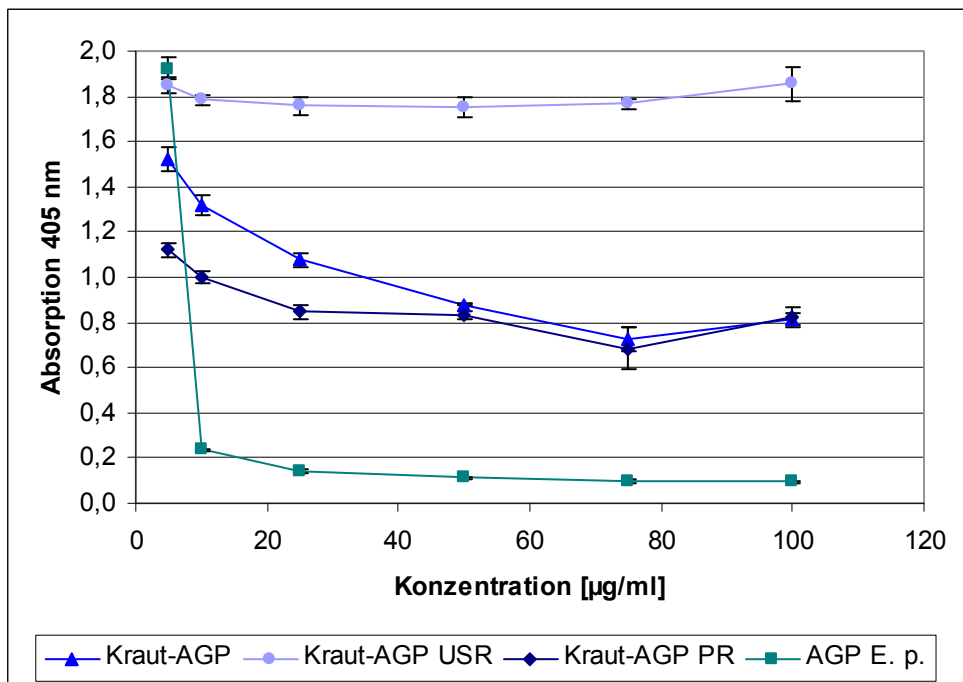


Abb. 3.38: Kreuzreaktivität des Mistelkraut-AGPs und seiner Derivate in hoher Konzentration mit polyklonalen Antikörpern und *Echinacea purpurea*-AGP als Vergleich

### 3.2.1.1.2 Monoklonaler Antikörper

#### AGPs und deren Derivate als Antigene

Der verwendete monoklonale Antikörper 4B8D3 aus der Maus ist gegen ein AGP aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* gerichtet. In den Abbildungen 3.39 und 3.40 sind die Ergebnisse der vergleichenden ELISAs zwischen Mistelkraut-AGP (Kraut-AGP), Mistelbeeren-AGP (Beeren-AGP) und *Echinacea purpurea*-AGP (AGP E. p.) dargestellt. *Echinacea purpurea*-AGP und Kraut-AGP zeigten ähnliche Kreuzreaktivität, die erst bei Einsatz höherer Konzentrationen (10-100 µg/ml) deutlich wurde. Diese unerwartet schwache Reaktion von *Echinacea purpurea*-AGP kann damit begründet werden, dass dieses AGP aus einer anderen Charge stammte, als das für die Antikörperproduktion verwendete. Vergleicht man die Fraktionen aus Mistelkraut und Mistelbeeren, so wird deutlich, dass das Beeren-AGP eine höhere Affinität zum Epitop aufwies als Kraut-AGP und auch als das *Echinacea purpurea*-AGP. Das Beeren-AGP reagierte schon in geringer Konzentration stark mit dem monoklonalen Antikörper.

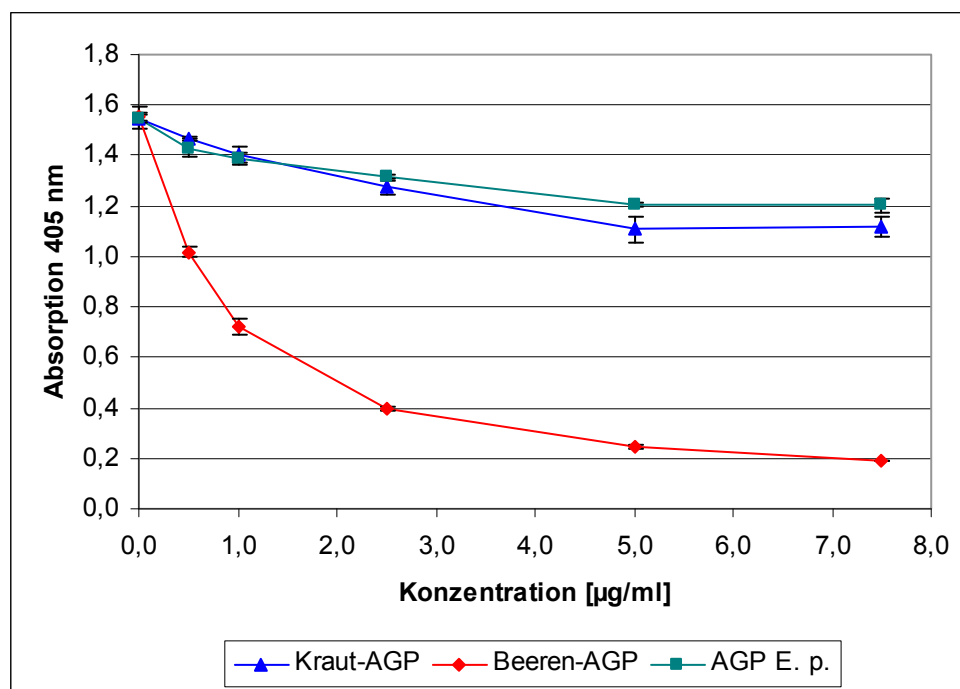


Abb. 3.39: Kreuzreaktivität von Mistelkraut-AGP und Mistelbeeren-AGP in niedriger Konzentration mit einem monoklonalen Antikörper und *Echinacea purpurea*-AGP als Vergleich

## Ergebnisse

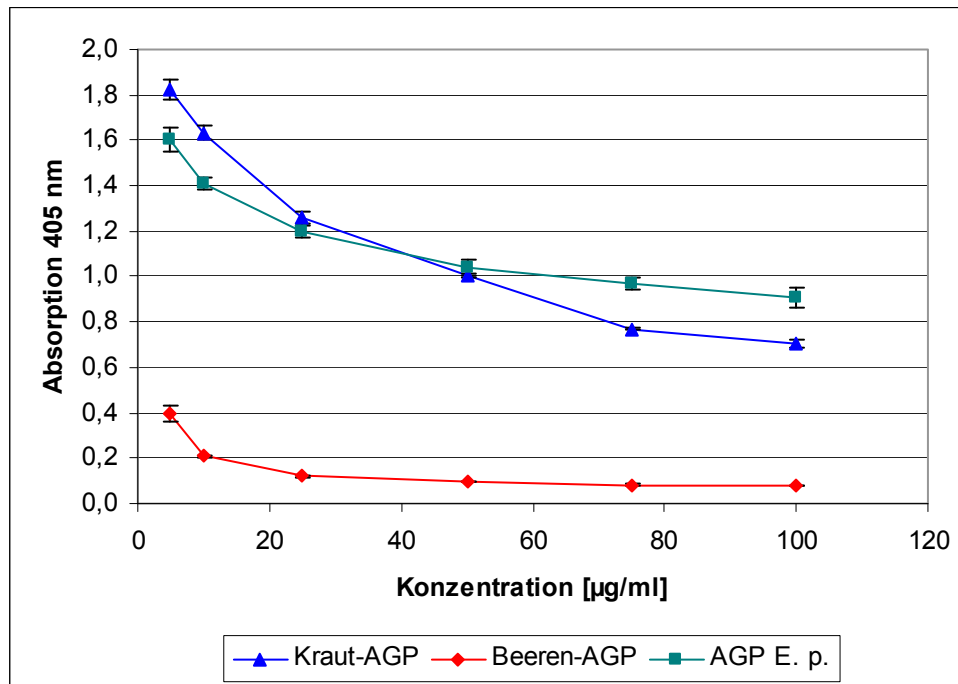


Abb. 3.40: Kreuzreaktivität von Mistelkraut-AGP und Mistelbeeren-AGP in hoher Konzentration mit einem monoklonalen Antikörper und *Echinacea purpurea*-AGP als Vergleich

Aus den beiden folgenden Abbildungen 3.41 und 3.42 sind die Kurven der Kreuzreaktivität des Kraut-AGPs, des uronsäurereduzierten Kraut-AGPs (Kraut-AGP UR) und des partialhydrolysierten Kraut-AGPs (Kraut-AGP PR) in zwei verschiedenen Konzentrationsbereichen mit dem monoklonalen Antikörper zu entnehmen. Das uronsäurereduzierte Mistelkraut-AGP reagierte ähnlich wie das Ausgangs-AGP, während der Rückstand der Partialhydrolyse des Kraut-AGPs die stärkste Affinität zum Antikörper zeigte, da schon beim Einsatz geringer Konzentrationen (1-10 mg/ml) eine stark abfallende Absorptionskurve erreicht wurde.

## Ergebnisse

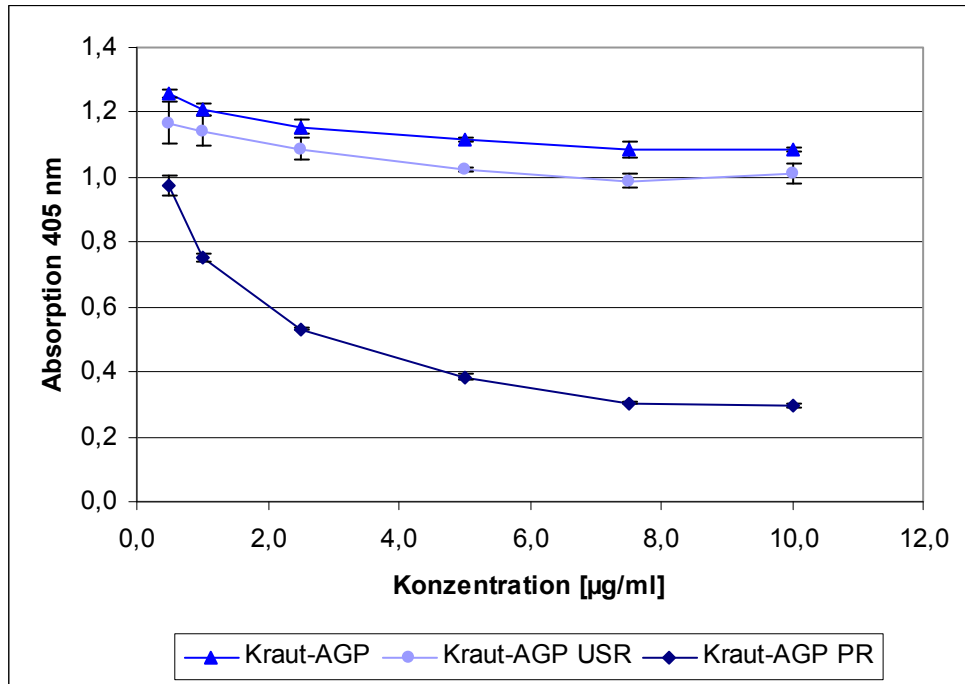


Abb. 3.41: Kreuzreaktivität des Mistelkraut-AGPs und seiner Derivate in niedriger Konzentration mit einem monoklonalen Antikörper generiert gegen *Echinacea purpurea*-AGP

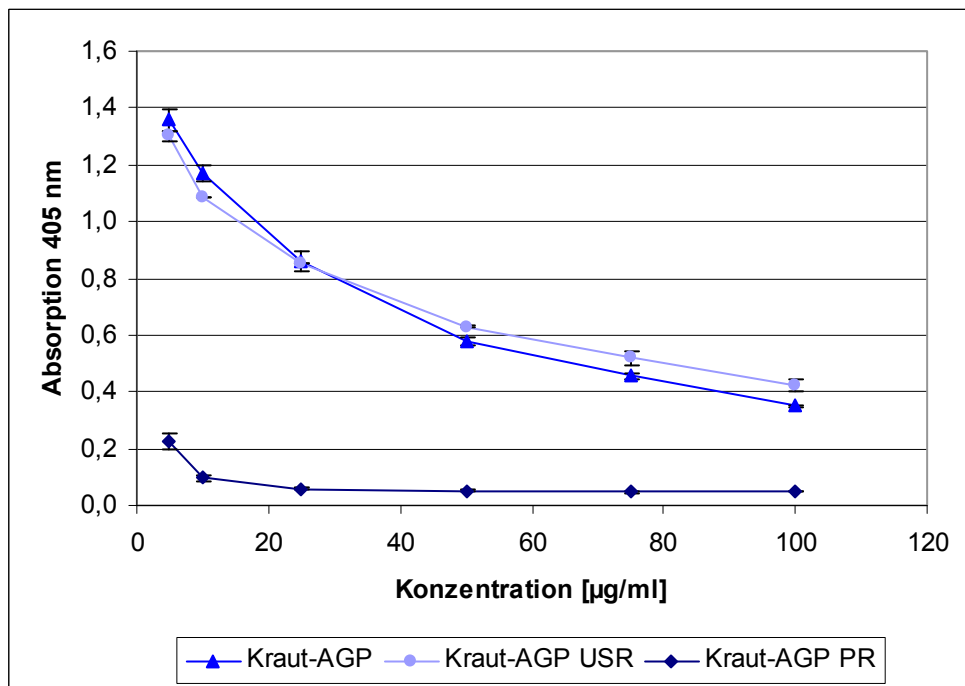


Abb. 3.42: Kreuzreaktivität des Mistelkraut-AGPs und seiner Derivate in hoher Konzentration mit einem monoklonalen Antikörper generiert gegen *Echinacea purpurea*-AGP



## Ergebnisse

Es wurden vergleichende ELISAs von Mistelbeeren-AGP (Beeren-AGP), dem uronsäurereduzierten Mistelbeeren-AGP (Beeren-AGP USR) und dem partialhydrolysierten Mistelbeeren-AGP (Beeren-AGP PR) durchgeführt. Die Ergebnisse in den untenstehenden Abbildungen 3.43 und 3.44 zeigen, dass das uronsäurereduzierte Beeren-AGP vergleichbar mit dem gleichen Derivat aus Mistelkraut und auch dem Mistelkraut-AGP reagierte. Die starke Reaktivität des Mistelbeeren-AGPs konnte wiederum bestätigt werden. Die stärkste Kreuzreaktivität mit dem Antikörper zeigte das partialhydrolysierte Mistelbeeren-AGP, das schon bei geringsten Konzentrationen (0,5 µg/ml) fast vollständig mit dem Antikörper reagierte. Die Testung bei Einsatz hoher Konzentrationen des partialhydrolysierten Beeren-AGPs wurde aus diesem Grund nicht mehr durchgeführt.

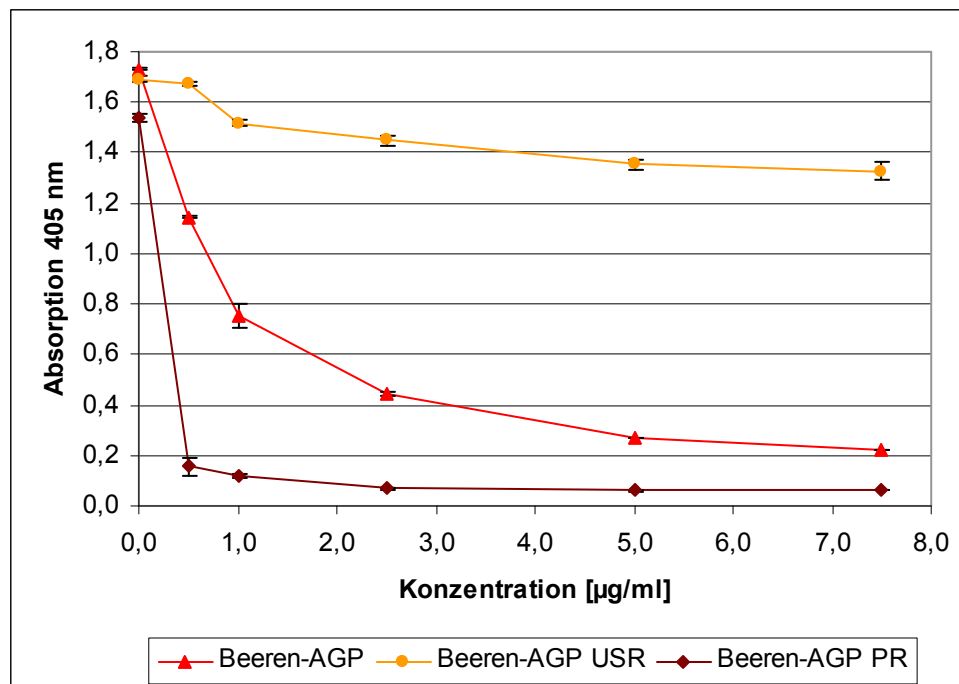


Abb. 3.43: Kreuzreaktivität des Mistelbeeren-AGPs und seiner Derivate in niedriger Konzentration mit einem monoklonalen Antikörper generiert gegen *Echinacea purpurea*-AGP

## Ergebnisse

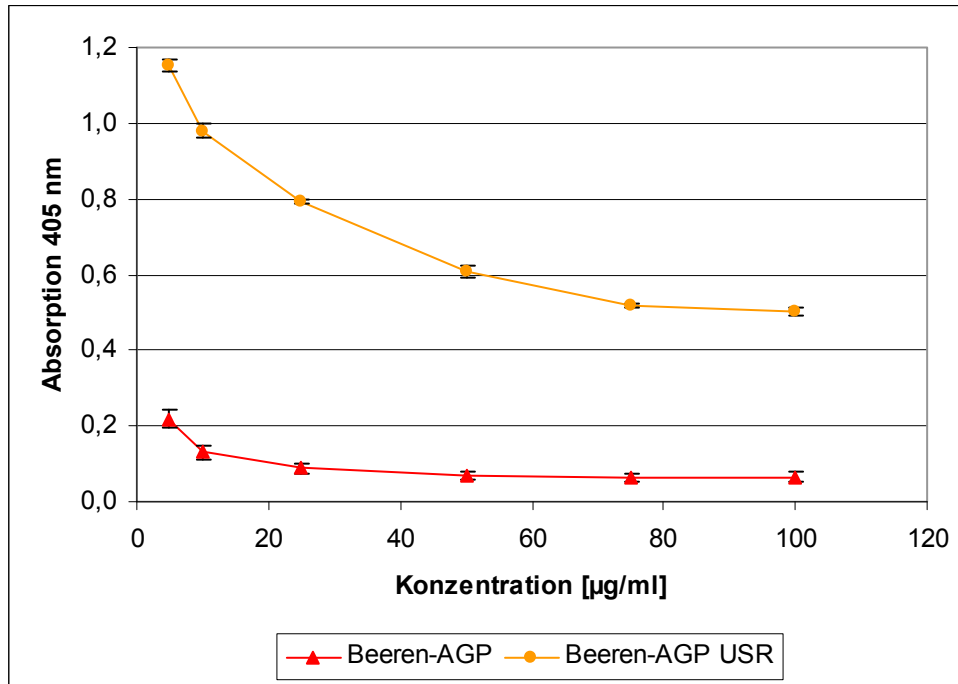


Abb. 3.44: Kreuzreaktivität des Mistelbeeren-AGPs und seiner Derivate in hoher Konzentration mit einem monoklonalen Antikörper generiert gegen *Echinacea purpurea*-AGP

### Arabinan als Antigen

Anhand der folgenden Abbildung 3.45 kann verdeutlicht werden, dass nur das Beeren-Arabinan mit dem monoklonalen Antikörper 4B8D3 eine Kreuzreaktivität zeigte, Kraut-Arabinan reagierte nicht mit dem Antikörper. Auch beim Einsatz hoher Konzentrationen an Kraut-Arabinan zeigte sich keine Reaktivität (Ergebnisse nicht dargestellt).

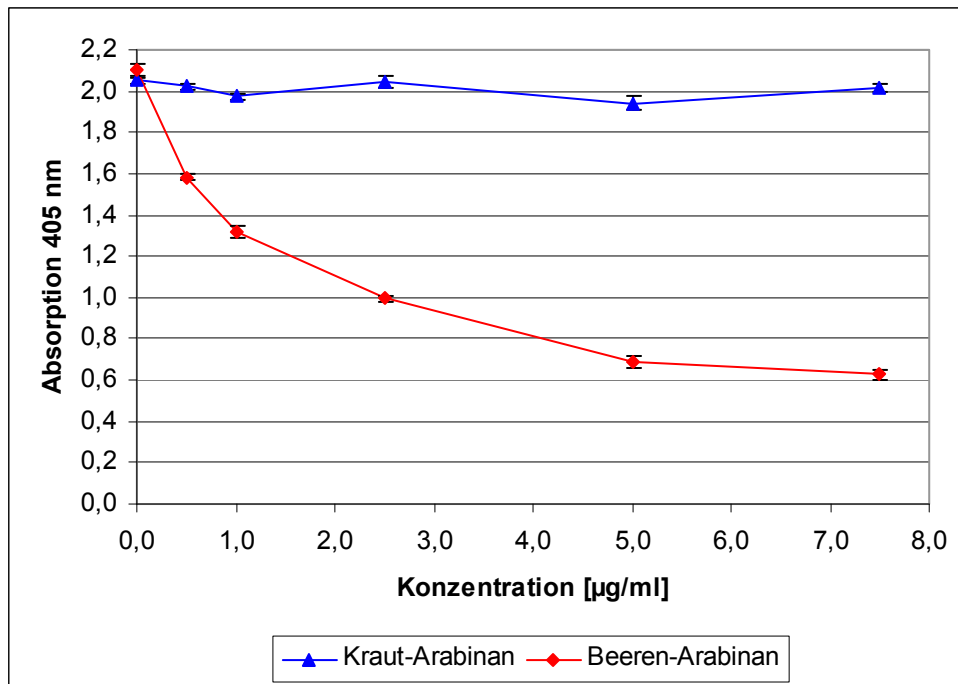


Abb. 3.45: Kreuzreaktivität des Mistelkraut- und Mistelbeeren-Arabinans mit einem monoklonalen Antikörper generiert gegen *Echinacea purpurea*-AGP

### 3.2.1.2 Indirekter ELISA

Die Kreuzreaktivität sechs verschiedener monoklonaler Antikörper, generiert in der Ratte, wurde nach Methode 2.3.1.2 getestet. Als Antigene wurden AGP und Arabinan aus Mistelkraut (Kraut-AGP, Kraut-Arabinan) sowie als Vergleichsantigen AGP aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* (AGP E. p.) verwendet. Die Bindungsaffinität eines Antikörpers zu einem Epitop ist in diesem Versuch proportional zur Höhe der Absorption bei der Messung. In Tabelle 3.55 sind die Ergebnisse der verschiedenen ELISAs zusammengefasst wiedergegeben.

Tab. 3.55: Reaktivität von Mistelkraut-AGP und Mistelkraut-Arabinan mit weiteren monoklonalen Antikörpern im Vergleich zu *Echinacea purpurea*-AGP (++: starke Kreuzreaktivität, +: Kreuzreaktivität, -: keine messbare Kreuzreaktivität)

Antikörper	Kraut-AGP	Kraut-Arabinan	AGP E. p.
LM2	++	-	++
LM6	+	-	+
JIM8	-	-	-
JIM13	++	+	++
JIM14	++	-	++
MAC207	+	-	+

Die Bindungsaffinität mit den getesteten Antikörpern war bei Mistelkraut-AGP und *Echinacea purpurea*-AGP vergleichbar, mit Ausnahme des Antikörpers JIM8 war eine messbare Reaktion vorhanden. Mistelkraut-Arabinan reagierte nur mit JIM13, nicht aber mit LM6, obwohl dieser monoklonale Antikörper spezifisch gegen (1→5)- $\alpha$ -L-Arabinan gerichtete Epitope generiert worden war.

### 3.2.2 Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test

Mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) nach Methode 2.3.3 wurden die AGP-Proben aus Mistelkraut und Mistelbeeren auf Kontamination mit Bakterienendotoxinen getestet. In den Proben vorhandene Endotoxine wurden entfernt (Methode 2.3.2) und es wurde erneut getestet, um die in der Literatur beschriebene Eigenaktivität von AGPs im LAL-Test zu überprüfen (Zager, 2006).

#### 3.2.2.1 Mistelkraut

Die folgende Tabelle 3.56 zeigt die Ergebnisse der Testung des Kontroll-Standard-Endotoxins (KSE) bzw. dessen Verdünnungen (jeweils Doppelbestimmung), die vom Hersteller angegebene Lysatempfindlichkeit (0,06 EU/ml) konnte bestätigt werden. Die Negativkontrolle Aqua bidest. fiel wie erwartet negativ aus.

Tab. 3.56: Ergebnisse der Testung (+: Gelbildung, -: keine Gelbildung) des KSE (Empfindlichkeit 0,06 EU/ml) und H<sub>2</sub>O

Endotoxin-Konzentration		Ansatz 1	Ansatz 2
0,25000 EU/ml	25,000 pg/ml	+	+
0,12500 EU/ml	12,500 pg/ml	+	+
0,06250 EU/ml	6,250 pg/ml	+	+
0,03125 EU/ml	3,125 pg/ml	-	-
Blindwert Aqua bidest.		-	-

Es wurde Mistelkraut-AGP vor und nach Endotoxin-Entfernung überprüft, dazu wurde von zwei Ansätzen je eine Verdünnungsreihe erstellt und getestet, die Ergebnisse sind in Tabelle 3.57 dargestellt. Die Grenze zur Auslösung einer Koagulation lag zwischen 0,1 ng/ml und 1 ng/ml. Das Ergebnis des Tests nach der Endotrap-Säule differiert um eine Zehnerpotenz zum Ausgangs-AGP, die Grenze der Koagulation lag zwischen 1 ng/ml und 10 ng/ml. Somit konnten im Kraut-AGP enthaltene Endotoxine entfernt werden und das AGP zeigte danach trotzdem Aktivität im LAL-Test.

## Ergebnisse

Tab. 3.57: Ergebnisse der Testung (+: Gelbildung, -: keine Gelbildung) von Mistelkraut-AGP (K I) vor und nach der Reinigung über die Endotrap-Säule

Konzentration des AGPs	vor Endotoxin-Entfernung		nach Endotoxin-Entfernung	
	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 1	Ansatz 2
1000 ng/ml	+	+	+	+
500 ng/ml	+	+	+	+
250 ng/ml	+	+	+	+
100 ng/ml	+	+	+	+
10 ng/ml	+	+	+	+
1 ng/ml	+	+	-	-
0,1 ng/ml	-	-	-	-
0,01 ng/ml	-	-	-	-

### 3.2.2.2 Mistelbeeren

Bei der Überprüfung der vom Hersteller angegebenen Lysatempfindlichkeit (0,06 EU/ml) zeigte das KSE erst bei 0,125 EU/ml eine Koagulation; die Lysatempfindlichkeit konnte somit nicht bestätigt werden. Aqua bidest. (Negativkontrolle) führte zu keiner Koagulation des LAL-Reagenzes (siehe Tab. 3.58).

Tab. 3.58: Ergebnisse der Testung (+: Gelbildung, -: keine Gelbildung) des KSE (Empfindlichkeit 0,06 EU/ml) und H<sub>2</sub>O

Endotoxin-Konzentration		Ansatz 1	Ansatz 2
0,25000 EU/ml	25,000 pg/ml	+	+
0,12500 EU/ml	12,500 pg/ml	+	+
0,06250 EU/ml	6,250 pg/ml	-	-
0,03125 EU/ml	3,125 pg/ml	-	-
Blindwert Aqua bidest.		-	-

## Ergebnisse

---

Aus Tabelle 3.59 ist für Mistelbeeren-AGP eine Grenze zur Auslösung der Koagulation zwischen 10 ng/ml und 100 ng/ml zu entnehmen. Das Ergebnis des Tests nach der Reinigung über die Endotrap-Säule zur Endotoxin-Entfernung zeigte die gleichen Werte. Es war somit anzunehmen, dass Mistelbeeren-AGP eine Eigenaktivität im LAL-Test aufwies (siehe auch Zager, 2006).

Tab. 3.59: Ergebnisse der Testung (+: Gelbildung, -: keine Gelbildung) von Mistelbeeren-AGP vor und nach der Reinigung über die Endotrap-Säule

Konzentration des AGPs	vor Endotoxin-Entfernung		nach Endotoxin-Entfernung	
	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 1	Ansatz 2
1000 ng/ml	+	+	+	+
500 ng/ml	+	+	+	+
250 ng/ml	+	+	+	+
100 ng/ml	+	+	+	+
10 ng/ml	-	-	-	-
1 ng/ml	-	-	-	-
0,1 ng/ml	-	-	-	-
0,01 ng/ml	-	-	-	-

### 3.2.3 Testung auf Kontamination mit Mistellektinen

Um den Verdacht einer ML-Kontamination des AGPs, der bei der Aminosäureanalytik (siehe 3.1.14) aufgekommen war, zu bestätigen, wurde Kraut- und Beeren-AGP nach elektrophoretischer Trennung auf ML getestet.

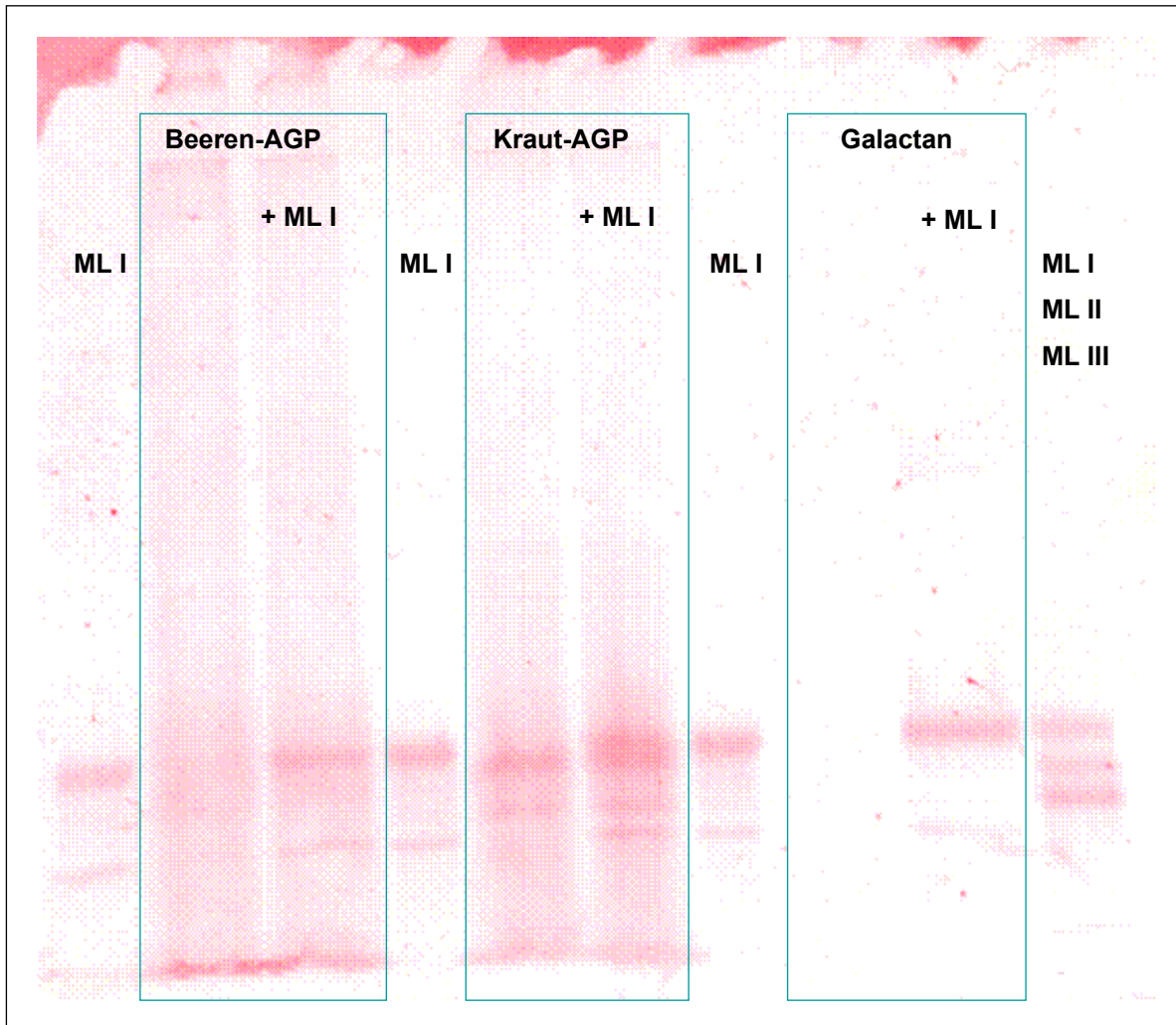


Abb. 3.46: Ergebnisse des Lektinblots nach SDS-PAGE von Beeren-AGP, Kraut-AGP und als Vergleich von ML I-III, sowie Galactan als Negativkontrolle

Die Ergebnisse der Immuno-Blots (Abb. 3.46) mit polyklonalem Anti-Mistellektin-antikörper zeigten für Beeren-AGP Spuren, für Kraut-AGP deutlichere Banden im ML-Kettenbereich. Die AGPs banden somit Mistellektine und konnten folglich nicht selektiv mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz gefällt werden. Daher wird im Folgenden nicht mehr der Begriff AGP, sondern AGP-Präparation verwendet.



### 3.2.4 Entfernung von Lektinen in den AGP-Präparationen durch Pronase-Behandlung

Aus drei verschiedenen Yariv-Fällungen erhaltene AGP-Präparationen wurden mit Pronase aus *Streptomyces* (Methode 2.3.6) behandelt, um in den Proben vorhandene Lektine zu zerstören und mittels Dialyse abtrennen zu können. Nach Gefriertrocknung wurden die in Tabelle 3.60 genannten gereinigten Mengen an AGP-Präparation erhalten.

Tab. 3.60: AGP-Ausbeuten nach Pronase-Behandlung

\*Ergebnisse unter Vorbehalt, da Verluste bei der Dialyse

	K I YF 5	K IV YF 2	K IV YF 3
eingesetzte AGP-Präparation [mg]	22,28	31,35	17,71
aufgereinigte AGP-Präparation [mg]	8,34*	27,00	12,75
Ausbeute [%]	37	86	72

Die Pronase-behandelte Kraut-AGP-Präparation wurde mittels GPC (siehe 3.2.4.1), im LAL-Test (3.2.4.2) und in Geldiffusionstests (siehe 3.2.5) auf mögliche Zersetzung und veränderte Reaktivität des AGPs im Vergleich zur Ausgangs-Kraut-AGP-Präparation getestet.

#### 3.2.4.1 Gelpermeationschromatographie der Kraut-AGP-Präparation nach Pronase-Behandlung

Das hydrodynamische Volumen der Kraut-AGP-Präparation nach Pronase-Behandlung ist in Tabelle 3.61 wiedergegeben. Der Peak 1 veränderte sich durch die Pronase-Behandlung nur um ca. 20.000 Da (vgl. Tabelle 3.48), das heißt es fand kaum Abbau des AGPs statt, der zweite Peak der Kraut-AGP-Präparation, der im MALLS-Detektor nur schwach sichtbar war, konnte nach Pronase-Behandlung nicht mehr gefunden werden. Dafür trat ein zusätzlicher Peak bei ca. 4.000 Da auf, der allerdings für den MALLS-Detektor nicht mehr sichtbar war. Der Peak konnte nur über den RI-Detektor ausgewertet werden und ist deshalb nicht in der Tabelle mit aufgeführt. Dieser Peak könnte für die Zersetzung des niedermolekularen Fragments, das eine Kette eines Lektin-Monomers darstellen könnte, durch die

## Ergebnisse

Pronase-Behandlung verantwortlich sein. Der Peak könnte aber auch ein Artefakt darstellen, da die Pronase-behandelte AGP-Präparation gegen Aqua bidest. dialysiert (MWCO 12-14 kDa) worden war (siehe Methode 2.3.6).

Tab. 3.61: Auswertung der GPC-Daten für die Kraut-AGP-Präparation nach Lektin-Entfernung durch Pronase-Behandlung

	Peak 1 [Da]
hydr. Vol. (Software)	296.800
log 10 hydr. Vol.	5,472
hydr. Vol. (Pullulan-Kalibrierung)	265.047

### 3.2.4.2 LAL-Test der Kraut-AGP-Präparation nach Pronase-Behandlung

Es wurde Mistelkraut-AGP-Präparation (K IV) vor und nach Lektin-Entfernung durch Pronase-Behandlung (Methode 2.3.6) jeweils vor und nach Endotoxin-Entfernung (Methode 2.3.2) auf Reaktivität im LAL-Test untersucht, da aus der Literatur bekannt war, dass sowohl Mistellektine (Scheer, 1993a) als auch Mistelpolysaccharide (Scheer, 1999) eine Eigenreaktivität im LAL-Test zeigen. Die vom Hersteller angegebene Lysatempfindlichkeit (0,06 EU/ml) wurde in dieser Testreihe des KSE mit 0,125 EU/ml überschritten (siehe Tabelle 3.62). Die Probe der Negativkontrolle Aqua bidest hingegen fiel wie erwartet negativ aus.

Tab. 3.62: Ergebnisse der Testung (+: Gelbildung, -: keine Gelbildung) des KSE (Empfindlichkeit 0,06 EU/ml) und H<sub>2</sub>O

Endotoxin-Konzentration		Ansatz 1	Ansatz 2
0,25000 EU/ml	25,000 pg/ml	+	+
0,12500 EU/ml	12,500 pg/ml	+	+
0,06250 EU/ml	6,250 pg/ml	-	-
0,03125 EU/ml	3,125 pg/ml	-	-
Blindwert Aqua bidest.		-	-

## Ergebnisse

In der folgenden Tabelle 3.63 sind die Ergebnisse des LAL-Tests der Kraut-AGP-Präparation wiedergegeben.

Tab. 3.63: Ergebnisse der Testung (+: Gelbildung, -: keine Gelbildung) der Kraut-AGP-Präparation (K IV) vor und nach der Pronase-Behandlung jeweils vor und nach der Reinigung über die Endotrap-Säule als Mittelwerte der Doppelbestimmungen

Konzentration des AGPs	vor Pronase-Behandlung		nach Pronase-Behandlung	
	vor Endotoxin- Entfernung	nach Endotoxin- Entfernung	vor Endotoxin- Entfernung	nach Endotoxin- Entfernung
250 ng/ml	+	+	+	-
100 ng/ml	+	+	+	-
10 ng/ml	+	-	+	-
1 ng/ml	-	-	-	-
0,1 ng/ml	-	-	-	-

Bei der Testreihe der AGP-Präparation von Krautextrakt IV vor Pronase-Behandlung lag die Grenze zur Auslösung einer Koagulation zwischen 10 ng/ml und 100 ng/ml. Die Differenz von einer Zehnerpotenz zur Testreihe des Krautextrakts I (siehe unter 3.2.2.1) könnte auf die unterschiedliche Lyseempfindlichkeit des KSE zurückzuführen sein. Das Ergebnis des Tests nach der Endotrap-Säule zeigte den Grenzwert der Koagulation bei 10 ng/ml, der Grenzwert verschob sich also wie bei Krautextrakt I um eine Zehnerpotenz zur höheren Konzentration. Die Testreihe des AGPs nach Pronase-Behandlung zeigte die gleiche Grenze zur Auslösung einer Koagulation wie die ursprüngliche AGP-Präparation. Nach der Endotoxin-Entfernung ließ sich jedoch bei dem Pronase-behandelten AGP bis zu einer Konzentration von 250 ng/ml keine Reaktivität durch Koagulation des LAL-Reagenzes nachweisen.

### 3.2.5 Geldiffusionstest vor der Testung an Toll-Like-Rezeptoren

#### 3.2.5.1 Kraut-AGP-Präparation vor und nach Pronase-Behandlung

Anhand der beiden unten abgebildeten Geldiffusionstests (Abb. 3.47) der Kraut-AGP-Präparationen, die sowohl vor als auch nach der Pronase-Behandlung gleiche Lage und Stärke der Präzipitationsbanden aufwiesen, war zu erkennen, dass das Kraut-AGP durch die Pronase-Behandlung im Hinblick auf die Reaktivität mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz nicht verändert worden war.

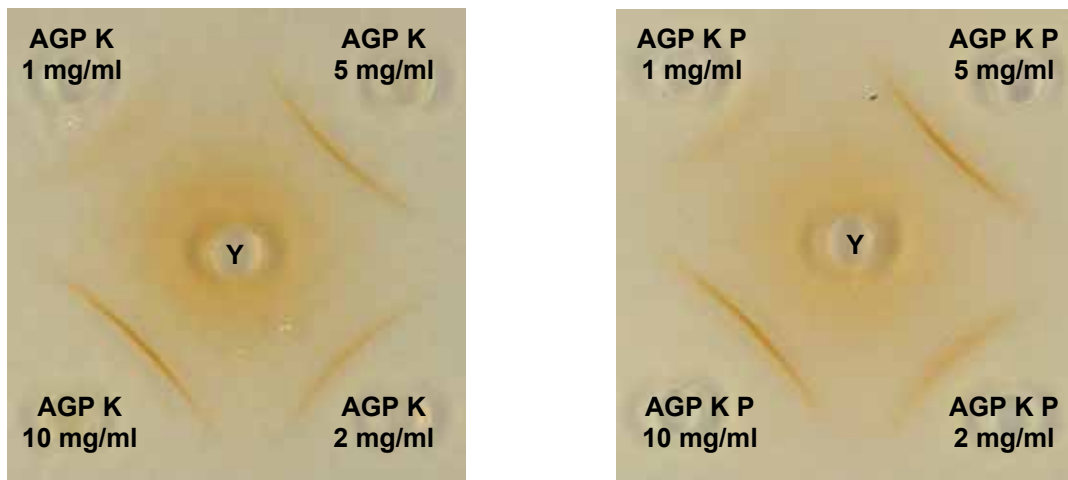


Abb. 3.47: Geldiffusionstests unterschiedlicher Konzentrationen der Kraut-AGP-Präparation (AGP K) und dieser nach Pronase-Behandlung (AGP K P) mit Yariv-Reagenz 1 mg/ml (Y)

### 3.2.5.2 Kraut-AGP-Präparation vor und nach Pronase-Behandlung, Endotoxin-Entfernung und Lipopeptid-Entfernung

Um für die biologischen Testungen zu belegen, dass in den einzelnen Proben unverändertes AGP (mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz fällbar) vorlag, wurden Gelddiffusionstests mit diesen Proben durchgeführt. Die beiden Ausschnitte der Agarosegelplatten in der untenstehenden Abbildung 3.48 zeigen die positive Reaktion aller Proben. Es konnte somit von unverändert vorliegendem AGP für die Testungen ausgegangen werden.

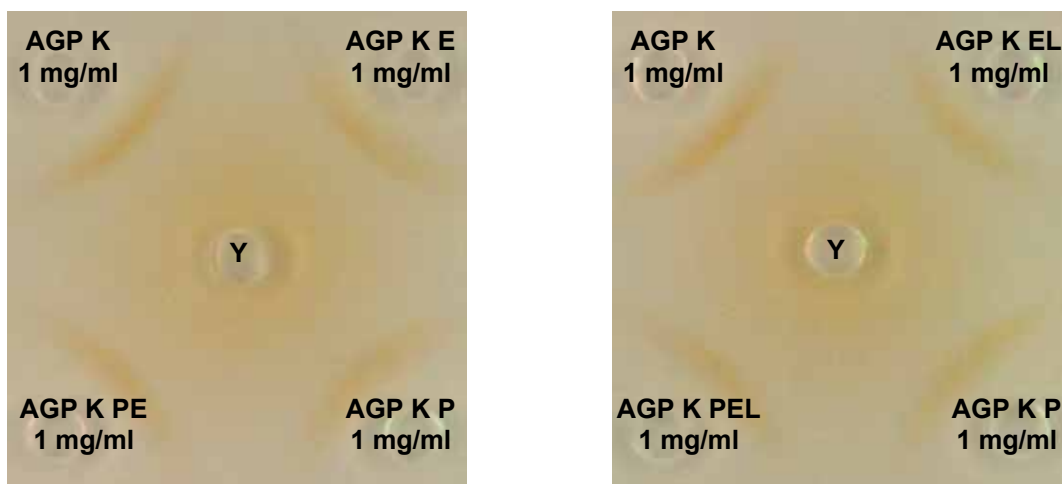


Abb. 3.48: Geldiffusionstests der Kraut-AGP-Präparation (AGP K), der Kraut-AGP-Präparation nach Pronase-Behandlung (AGP P) und dieser jeweils nach Endotoxin-Entfernung (AGP K E, AGP K PE), sowie jeweils nach zusätzlicher Lipopeptid-Entfernung (AGP K EL, AGP K PEL) mit Yariv-Reagenz; Proben-Konzentration jeweils 1 mg/ml (Y)

### 3.2.6 Aktivitätstestung an Toll-Like-Rezeptoren

#### 3.2.6.1 TLR 4

Mit dieser Testung wurde die Aktivierung von TLR4/MD2/CD14-transfizierten-HEK-Zellen zur Zytokinausschüttung durch Mistelkraut- und Mistelbeeren-AGP-Präparationen mittels Messung der IL-8-Konzentration (Methode 2.3.7) bestimmt. Der TLR4 wird z.B. durch Lipopolysaccharide (LPS) aktiviert (Akira und Takeda, 2004); aus diesem Grund wurde LPS als Positivkontrolle verwendet. Eine Kraut-AGP-Präparation wurde nach Endotoxin-Entfernung durch Affinitätschromatographie (Methode 2.3.2) auf ihre Aktivität am TLR4 untersucht und zeigte eine Aktivierung des Rezeptors zur Zytokinausschüttung (Abb. 3.49). Lipopeptid diente als Negativkontrolle.

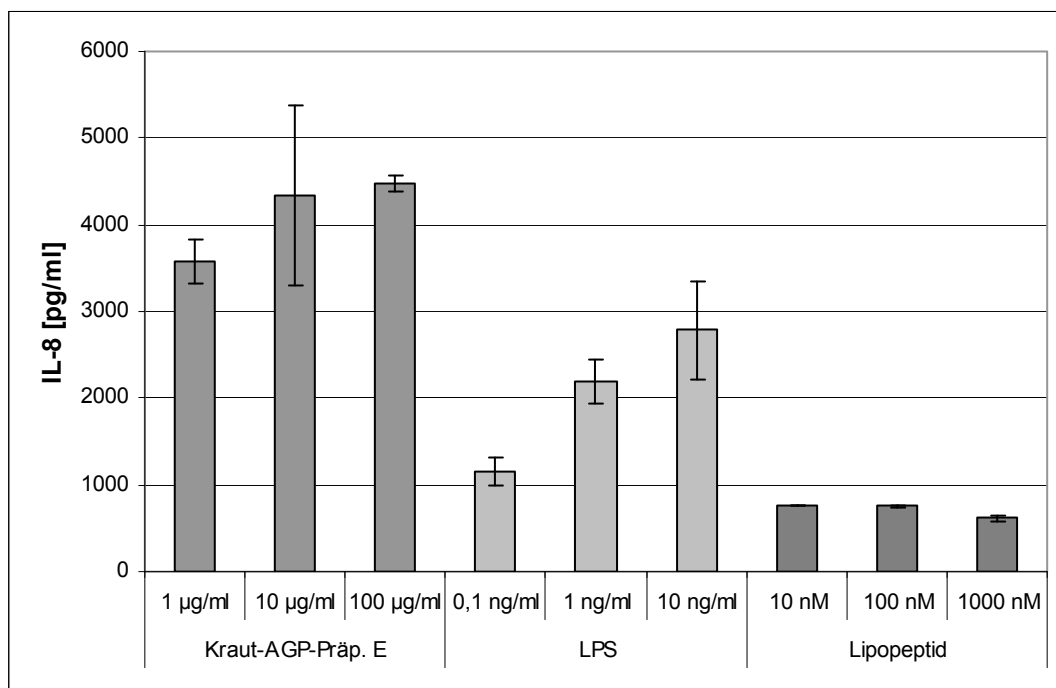


Abb. 3.49: Aktivität der Kraut-AGP-Präparation nach Endotoxin-Entfernung (Kraut-AGP-Präp. E) im Vergleich zu LPS (Positivkontrolle) und Lipopeptid (Negativkontrolle) am TLR4/MD2/CD14

## Ergebnisse

Aufgrund dieses positiven Ergebnisses wurden weitere Testungen sowohl von Kraut-AGP-Präparationen als auch von Beeren-AGP-Präparationen durchgeführt. Diese wurden jeweils vor und nach Endotoxin-Entfernung getestet, um zu prüfen, wie sich die Endotoxin-Entfernung auf die Testwerte auswirkt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.50 dargestellt.

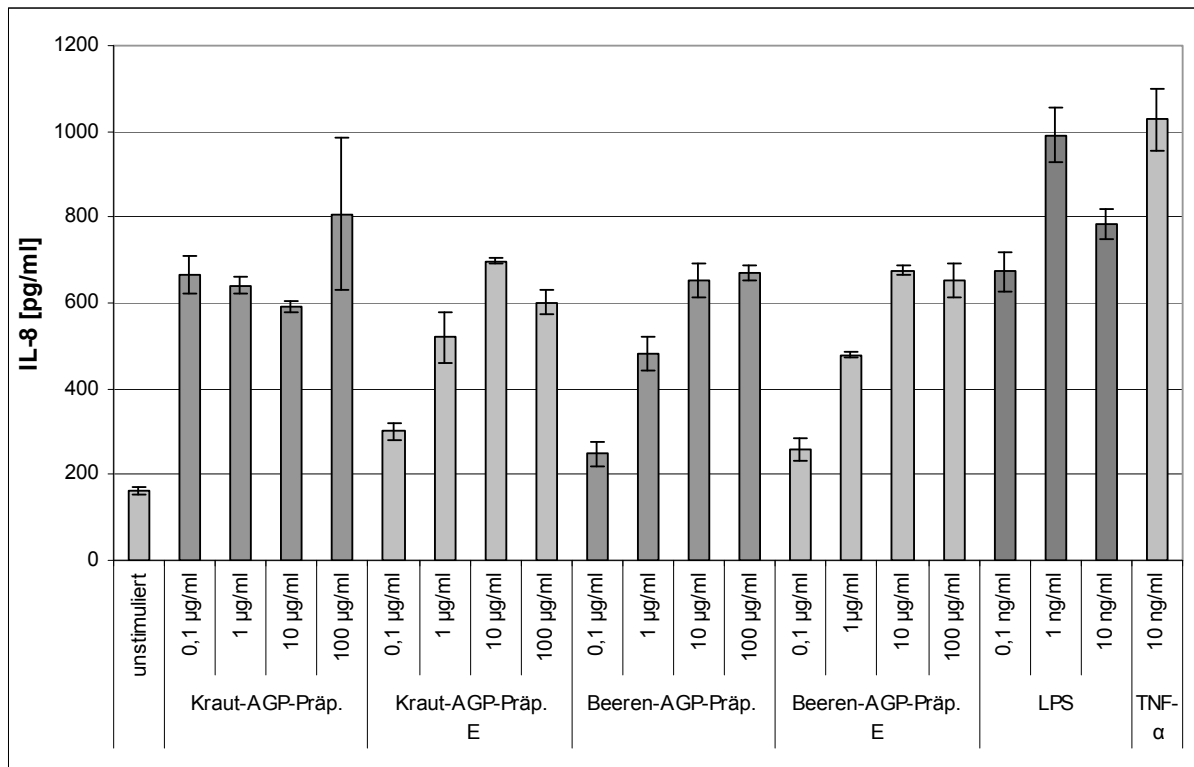


Abb. 3.50: Aktivität der Kraut-AGP-Präparation vor und nach Endotoxin-Entfernung (Kraut-AGP-Präp., Kraut-AGP-Präp. E) sowie der Beeren-AGP-Präparation vor und nach Endotoxin-Entfernung (Beeren-AGP-Präp., Beeren-AGP-Präp. E) am TLR4/MD2/CD14 mit LPS als Positivkontrolle

Die Kraut-AGP-Präparation zeigte nach Endotoxin-Entfernung eine konzentrationsabhängige Zunahme der Werte (höchste Konzentration ausgenommen); sie war mit LPS belastet, was bei der Ausgangs-AGP-Präparation zu konzentrationsunabhängigen Werten führte. Es konnten somit die Daten des LAL-Tests bestätigt werden. Für die Beeren-AGP-Präparation ergaben sich vergleichbare Werte vor und nach Endotoxin-Entfernung, wie nach dem LAL-Test zu erwarten war. Um herauszufinden, welche der beiden Komponenten in den AGP-Präparationen, AGP oder Lektin, die Stimulation der Zellen auslöste, wurden ML I, II und III mitgetestet.

## Ergebnisse

Die Mistellektine führten in den getesteten Konzentrationen zum Absterben der TLR4/MD2/CD14-transfizierten-HEK-Zellen; somit konnte keine Auswertung erfolgen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Es wurde mit der Kraut-AGP-Präparation eine Pronase-Behandlung (Methode 2.3.6) durchgeführt, um in der Kraut-AGP-Präparation vorhandenes Lektin zu entfernen. Die folgende Abbildung 3.51 zeigt die Daten der Untersuchungen der Kraut-AGP-Präparation vor und nach der Pronase-Behandlung und jeweils nach anschließender Endotoxin-Entfernung. Die Fähigkeit, die TLR4/MD2/CD14-transfizierten-HEK-Zellen zur Zytokinausschüttung zu stimulieren, blieb nach reiner Pronase-Behandlung bestehen. Die Endotoxin-Entfernung in der AGP-Präparation führte wie bei der vorherigen Testung (Abb. 3.48) zu einer etwas geringeren Stimulation der Zellen. Die Kombination beider Methoden (Kraut-AGP-Präp. P E) führte allerdings dazu, dass die Zellen nicht mehr aktiviert werden konnten (vgl. Wert unstimuliert).

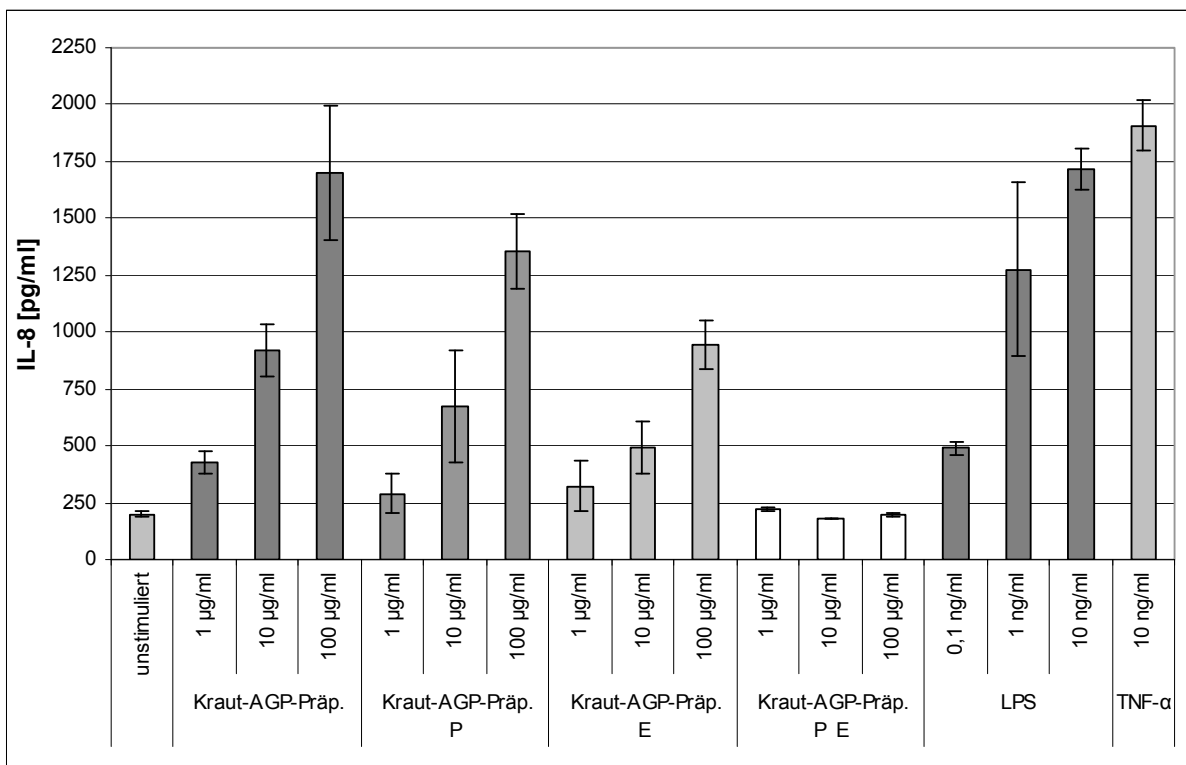


Abb. 3.51: Aktivität der Kraut-AGP-Präparation vor und nach Pronase-Behandlung (Kraut-AGP-Präp., Kraut-AGP-Präp. P) sowie beider jeweils nach Endotoxin-Entfernung (Kraut-AGP-Präp. E, Kraut-AGP-Präp. P E) am TLR4/MD2/CD14 mit LPS als Positivkontrolle



### 3.2.6.2 TLR 2

Es wurde die Aktivierung von TLR2-transfizierten-HEK-Zellen zur Zytokinausschüttung durch eine Kraut-AGP-Präparation mittels Messung der IL-8-Konzentration (Methode 2.3.7) bestimmt. Der TLR2 wird z.B. durch Lipopeptide (Hashimoto *et al.*, 2006) aktiviert. Mit dem Lipopeptid Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> wurde eine Positivkontrolle durchgeführt. LPS zeigt keine Aktivität am TLR2 und wurde deshalb als Negativkontrolle verwendet. Die Kraut-AGP-Präparation wurde nach Endotoxin-Entfernung (E) durch Affinitätschromatographie (Methode 2.3.2) auf ihre Aktivität am TLR2 untersucht und zeigte eine Aktivierung des Rezeptors (Abb. 3.52).

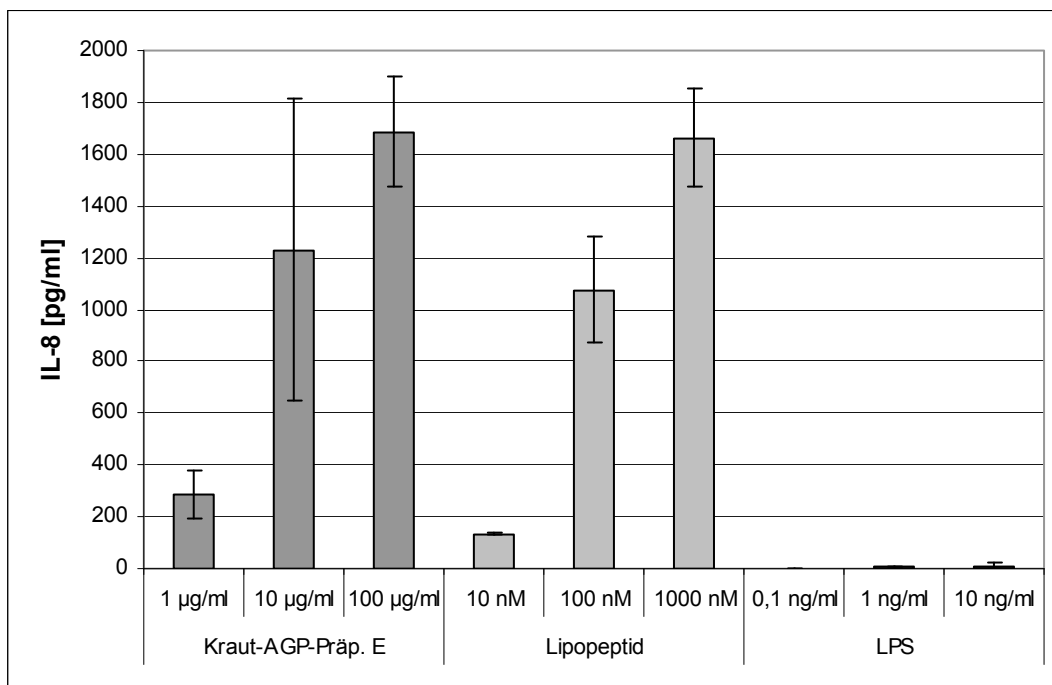


Abb. 3.52: Aktivität der Kraut-AGP-Präparation nach Endotoxin-Entfernung (Kraut-AGP-Präp. E) im Vergleich zu Lipopeptid (Positivkontrolle) und LPS (Negativkontrolle) am TLR2

Es wurden weitere Testungen sowohl einer Kraut-AGP-Präparation als auch einer Beeren-AGP-Präparation durchgeführt; diese wurden sowohl vor als auch nach Endotoxin-Entfernung getestet. Es sollte noch einmal bestätigt werden, dass die Endotoxin-Entfernung (LPS) keinen Einfluss auf die Aktivierung des TLR2 ausübt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.53 dargestellt.

## Ergebnisse

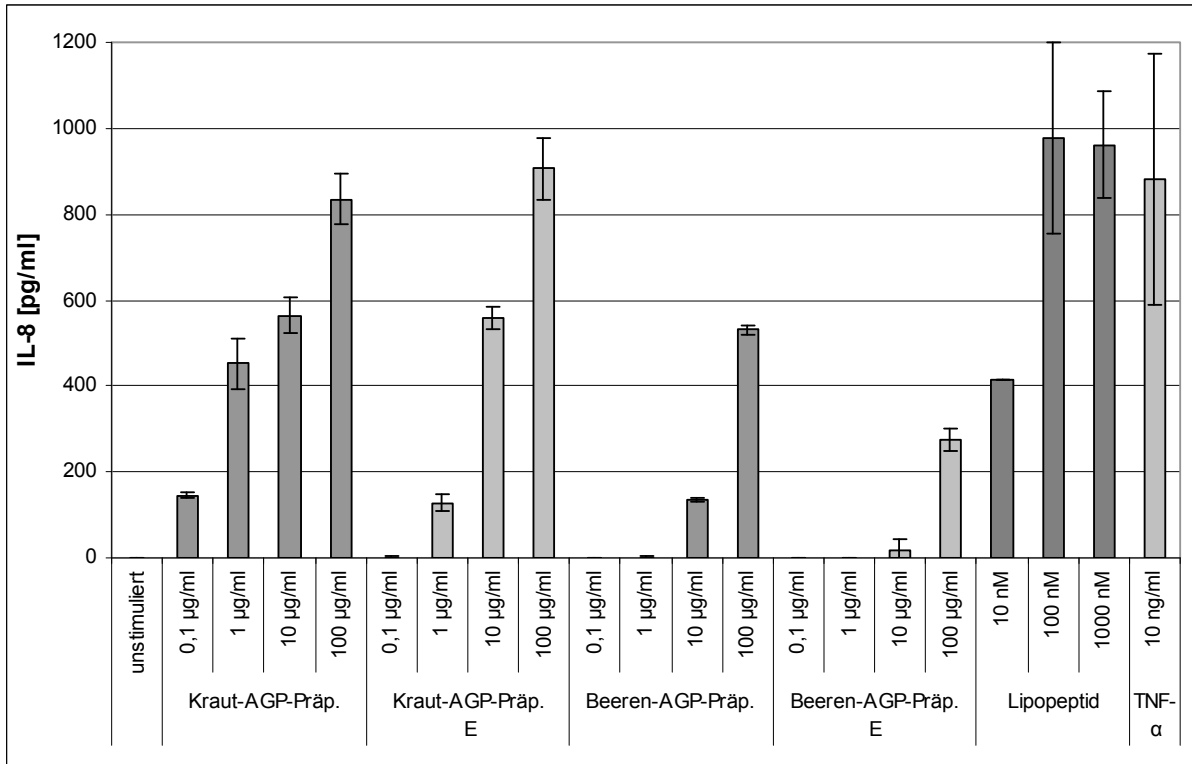


Abb. 3.53: Aktivität der Kraut-AGP-Präparation vor und nach Endotoxin-Entfernung (Kraut-AGP-Präp., Kraut-AGP-Präp. E) sowie der Beeren-AGP-Präparation vor und nach Endotoxin-Entfernung (Beeren-AGP-Präp., Beeren-AGP-Präp. E) am TLR2 mit Lipopeptid als Positivkontrolle

Die Kraut-AGP-Präparation stimulierte die Zellen konzentrationsabhängig; nach Endotoxin-Entfernung war die Aktivierung nur im unteren Konzentrationsbereich etwas geringer. Die Beeren-AGP-Präparation zeigte eine geringere Stimulierung.

Durch diese unterschiedliche Reaktivität der Kraut- und Beeren-AGP-Präparation kam der Verdacht auf, dass diese nicht durch eine Eigenaktivität der Präparationen verursacht war, sondern die AGP-Präparationen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Lipopeptiden verunreinigt sein könnten. In den beiden AGP-Präparationen nach der Endotoxin-Entfernung wurden daher Lipopeptide entfernt (Methode 2.3.4) und alle vier Präparationen wurden auf Aktivierung der TLR2-transfizierten-HEK-Zellen zur IL-8-Ausschüttung getestet. Die folgende Abbildung 3.54 zeigt die Ergebnisse der Testung.

## Ergebnisse

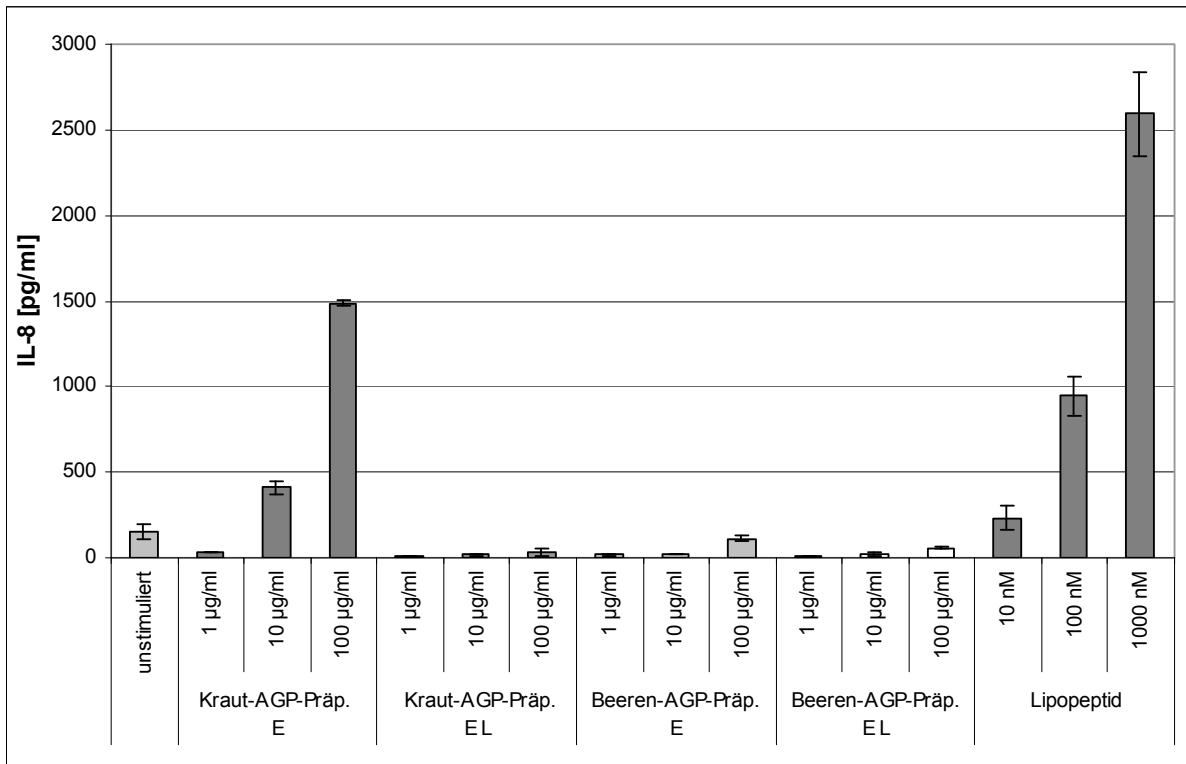


Abb. 3.54: Aktivität der Kraut-AGP- und der Beeren-AGP-Präparation nach Endotoxin-Entfernung (Kraut-AGP-Präp. E, Beeren-AGP-Präp. E) sowie beider jeweils nach Lipopeptid-Entfernung (Kraut-AGP-Präp. E L, Beeren-AGP-Präp. E L) am TLR2 mit Lipopeptid als Positivkontrolle

Nur die Mistelkraut-AGP-Präparation E zeigte vor Lipopeptid-Entfernung eine Eigenaktivität, die aber nach Lipopeptid-Entfernung verschwand. Die Aktivierung des TLR2 wurde somit durch Verunreinigung der Probe mit Lipopeptiden verursacht. Die Mistelbeeren-AGP-Präparation E zeigte bei dieser Testreihe schon vor der Lipopeptid-Entfernung so geringere IL-8 Konzentrationen, dass diese unter denen des unstimulierten Kontrollwertes lagen.

### **3.2.7 Immunfluoreszenz-Markierung**

Wie die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, konnte keine reinen AGPs bei der Fällung mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz erhalten werden, sondern es fanden sich auch Lektine. Um eine genauere Vorstellung von der Lokalisation von AGP und Lektin in der pflanzlichen Zelle zu bekommen, wurde mit 1-jährigen Mistelsprossen eine Immunfluoreszenz-Markierung (Methode 2.3.8) durchgeführt. Hierbei wurde vorhandenes AGP mit dem sekundären FITC-markierten monoklonalen Antikörper grün-fluoreszierend angefärbt und Lektin mit dem sekundären monoklonalen ALEXA FLUOR<sup>®</sup>-Antikörper rot-fluoreszierend angefärbt. Die verschieden angefärbten Schnitte wurden nun mittels Konfokalem-Laser-Raster-Mikroskop (CLSM) untersucht und fotografiert. Es wurde zu jedem Bild jeweils eine Aufnahme der Transmission und der Fluoreszenz-Anregung gemacht und anschließend durch Nachbearbeitung eine Überlagerung beider Bilder vorgenommen. In den Abbildungen 3.55 bis 3.58 sind diese drei Aufnahmen des gleichen Bildausschnitts jeweils untereinander angeordnet. Es wurden für beide Färbungen Negativkontrollen durchgeführt (AGP-Färbung: ohne Yariv-Antikörper, Lektin-Färbung: ohne Lektin-Antikörper, siehe auch 2.3.8), bei einer Signalverstärkung des Lasers von 700 V für die AGP-Markierung und von 1000 V für die Lektin-Markierung war bei keiner der Negativkontrollen eine Fluoreszenz sichtbar, so dass diese Signalverstärkungen für die Vermessung der positiv Fluoreszenz-gefärbten Schnitte verwendet wurden.

#### **AGP-Markierung**

Die in Abbildung 3.55 auf beiden Seiten und in Abbildung 3.56 auf der linken Seite dargestellten Bilder der AGP-Markierung zeigen, dass sich die Zellwände vor allem von ausdifferenzierten Zellen (Xylem, Sklerenchym) mit dem AGP-Antikörper markieren ließen. In der Abbildung 3.55 ist auf der linken Seite ein vollständiges Leitbündel eines 1-jährigen Mistelsprosses in der Übersicht dargestellt. Das oberste Bild zeigt die Transmission. Von unten links (außen) nach oben rechts (innen) sind innerhalb dieses Bildes folgende Gewebetypen zu differenzieren: Rindenparenchym, Sklerenchymkappe, Phloem, Kambium, Xylem, kleine Sklerenchymkappe und Markparenchym. Die Bilder der Fluoreszenz-Anregung (Abb. 3.55 linke Seite Mitte, bzw. überlagertes Bild unten) zeigen eine starke Markierung des Xylems und etwas schwächer die Markierung der äußeren und inneren Sklerenchymkappe. Die drei

Bilder in der Abbildung 3.55 auf der rechten Seite stellen einen vergrößerten Xylembereich dar. Anhand dieser Bilder kann sehr gut verdeutlicht werden, dass die Fluoreszenz-Färbung die verdickte Zellwand ausdifferenzierter Xylemzellen anfärbte und nur sehr schwach die dünnwandigen Parenchymzellen bzw. dort die Plasmamembran. Die Vergrößerung des Bereichs der inneren Sklerenchymkappe ist auf den drei Bildern in der Abbildung 3.56 auf der linken Seite gezeigt. Es ließ sich nur die äußere und schwächer die innere Begrenzung der Zellwand anfärben (siehe Fluoreszenz-Anregung bzw. überlagertes Bild). AGPs befanden sich folglich zum größten Teil in den Zellwänden ausdifferenzierter Xylemzellen und im äußeren Teil der Zellwand der Sklerenchymzellen.

### **Lektin-Markierung**

Die Ergebnisse der Aufnahmen der Lektin-Markierung sind in der Abbildung 3.56 auf der rechten Seite und in den Abbildungen 3.57 und 3.58 dargestellt. In den drei Bildern der Abbildung 3.56 auf der rechten Seite ist ein Viertel eines Sprossquerschnitts dargestellt. Im Transmissionsbild (oben) liegen von außen (im linken Bildteil) nach innen (im rechten Bildteil) folgende Gewebetypen: Epidermis mit Cuticula, Rindenparenchym, Sklerenchymkappe, Phloem, Kambium, Xylem, kleine Sklerenchymkappe und Markparenchym. An den beiden Bildern darunter (Fluoreszenz-Anregung und überlagertes Bild) wird deutlich, dass das Rindenparenchym die stärkste Färbung aufwies, gefolgt von den Sklerenchymkappen. Das Xylem wurde nur leicht angefärbt und auch im Bereich des sekundären Phloems war eine sehr schwache Färbung zu erkennen. Die Abbildung 3.57 zeigt zwei Detailaufnahmen unterschiedlicher parenchymatischer Bereiche, bei denen die Cytoplasmamembranen stark rot angefärbt sind. Im mittleren und unteren Bild (Fluoreszenz-Anregung und überlagertes Bild) auf der linken Seite der Abbildung 3.57 sind noch viele Reste des Cytoplasmas, die sicherlich auch die Tonoplastenmembran beinhalten, stark rot angefärbt. Die drei Bilder auf der linken Seite der Abbildung 3.58 zeigen eine Detailaufnahme der Sklerenchymkappe; es färbte sich die innere und äußere Begrenzung der Zellwand (siehe Fluoreszenz-Anregung bzw. überlagertes Bild). Im Unterschied zur AGP-Markierung, bei der sich die äußere Begrenzung der Zellwand stärker färbte (Abb. 3.56 linke Seite), färbte sich bei der Lektin-Färbung die innere Begrenzung der Zellwand (Reste der abgestorbenen

Cytoplasmamembran) viel stärker rot. Des Weiteren ist eine Oxalatdruse (Abb. 3.58 linke Seite) in einer Parenchymzelle links neben der Sklerenchymkappe zu erkennen, die unspezifisch mitgefärbt wurde. Auf der rechten Seite der Abbildung 3.58 sind auf dem oberen Bild (Transmission) ein vergrößerter Xylembereich (im linken Bildteil) und ein Teil der inneren Sklerenchymkappe (im rechten Bildteil) zu erkennen. Teile des Xylems konnten schwach rot angefärbt werden (siehe Fluoreszenz-Anregung bzw. überlagertes Bild), wobei im Gegensatz zur AGP-Färbung (siehe Abb. 3.55 rechte Seite) nicht alle ausdifferenzierten Xylemzellen angefärbt wurden, dafür aber auch einige noch nicht ausdifferenzierte Zellen. Es kann zusammengefasst werden, dass Lektin vor allem im Parenchym im Bereich der Cytoplasmamembran, bzw. der nach Präparation der Schnitte noch vorhandenen Cytoplasmareste, sowie an der Innenwand der Sklerenchymzellen nachgewiesen werden konnte.

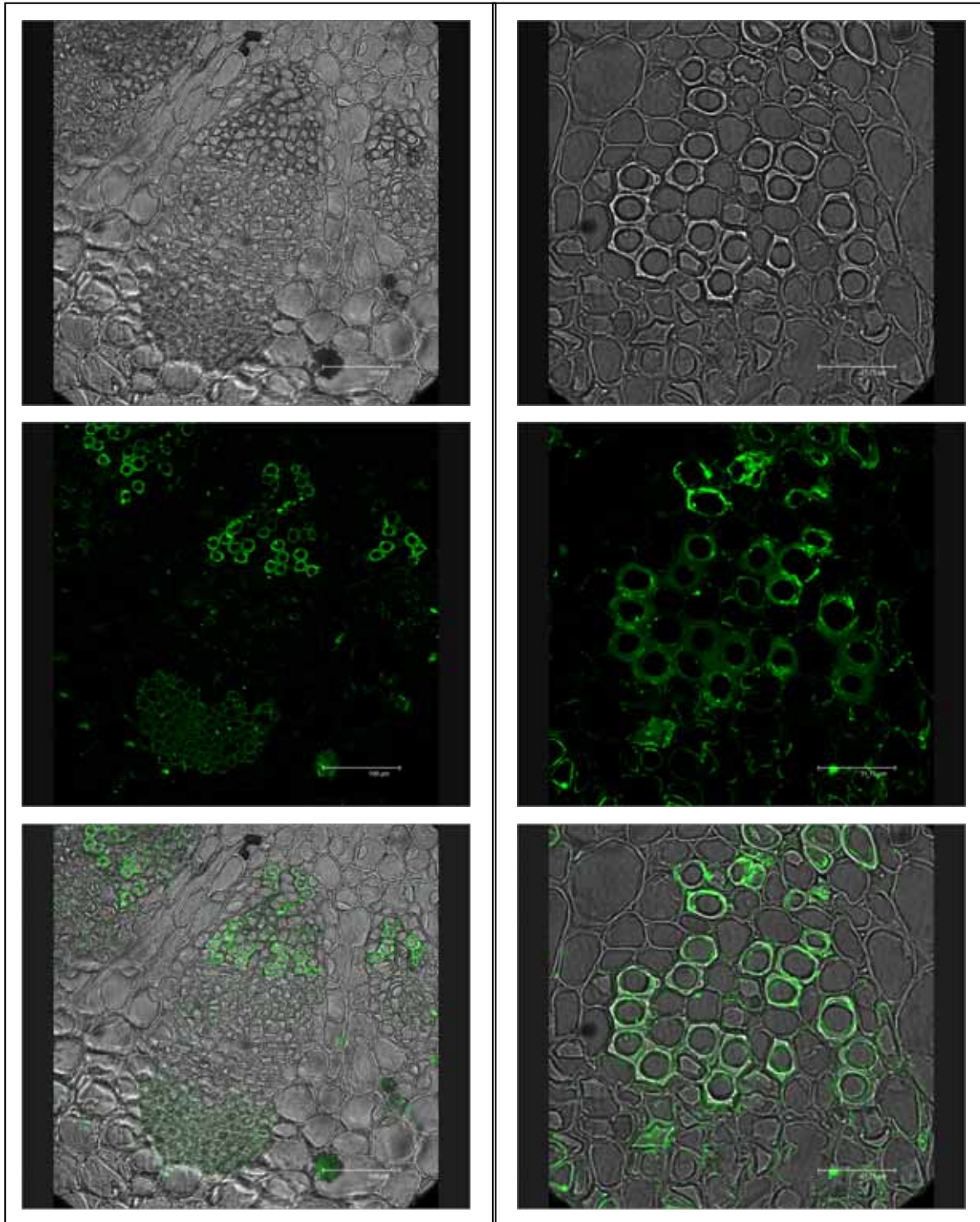


Abb. 3.55: AGP-markierte (grün) Querschnitte aus 1-jährigen Mistelsprossen; oben: Transmission, Mitte: Fluoreszenz-Anregung, unten überlagertes Bild; links Leitbündel im Querschnitt 30 µm; rechts: Xylem im Querschnitt 10 µm

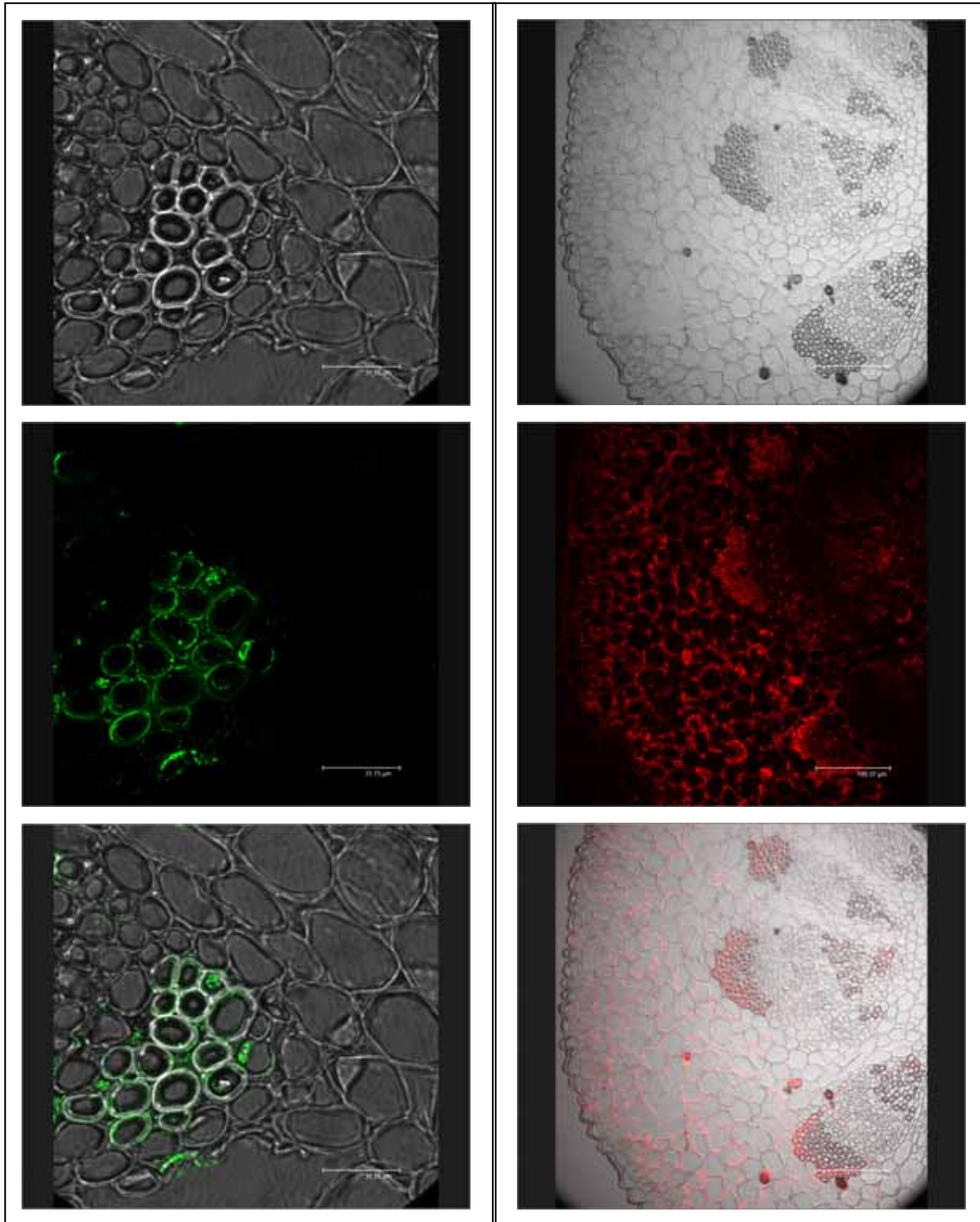


Abb. 3.56: Querschnitte aus 1-jährigen Mistelsprossen; oben: Transmission, Mitte: Fluoreszenz-Anregung, unten überlagertes Bild; links AGP-markierte (grün) Sklerenchymkappe im Querschnitt 20  $\mu\text{m}$ ; rechts: Lektin-markierte (rot) Übersicht im Querschnitt 10  $\mu\text{m}$



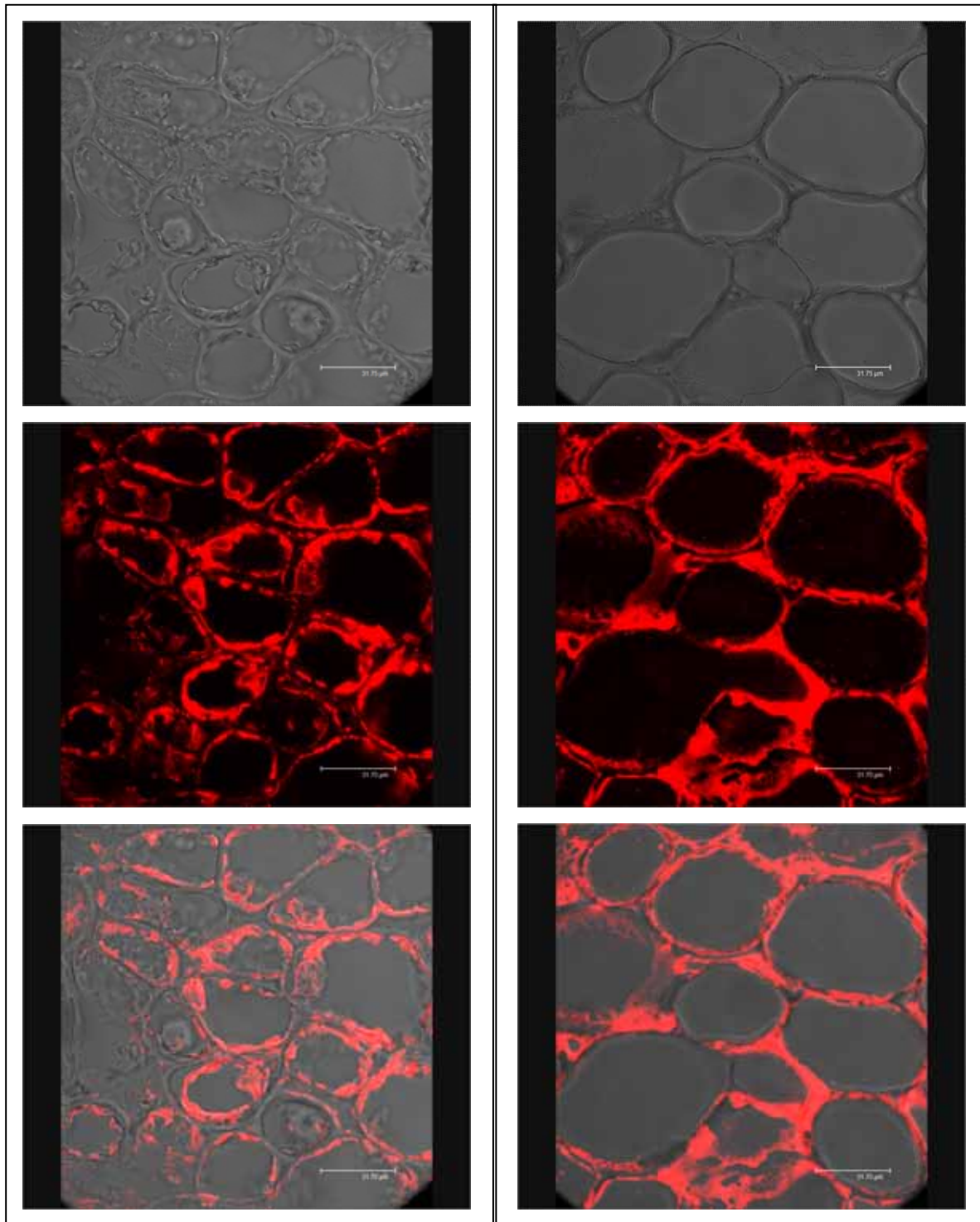


Abb. 3.57: Lektin-markierte (rot) Querschnitte (10 µm) aus 1-jährigen Mistelsprossen; oben: Transmission, Mitte: Fluoreszenz-Anregung, unten überlagertes Bild; links und rechts jeweils Parenchymbereiche

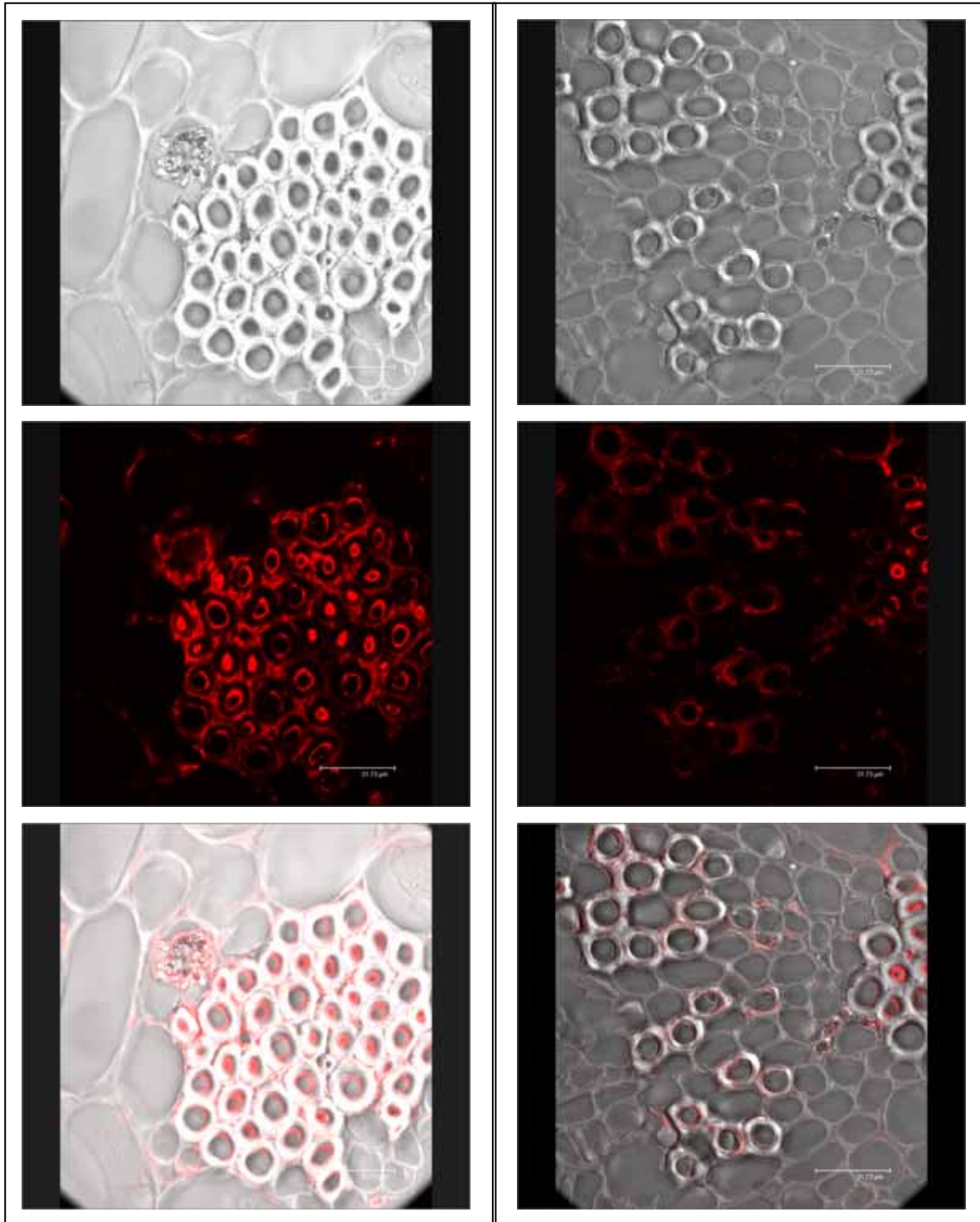


Abb. 3.58: Lektin-markierte (rot) Querschnitte (10 µm) aus 1-jährigen Mistelsprossen; oben: Transmission, Mitte: Fluoreszenz-Anregung, unten überlagertes Bild; links Sklerenchymkappe; rechts: Xylembereich

## 4 Diskussion der Ergebnisse

Die Grundlage dieser Arbeit stellt die Isolierung und Untersuchung von Polysacchariden aus *Viscum album* L. dar. Es konnten Arabinogalactan-Proteine und Arabinane sowohl aus Mistelkraut als auch aus Mistelbeeren isoliert werden. Diese wurden strukturell charakterisiert und die AGPs auf ihre immunologischen Wirkungen hin untersucht.

Um die hydrophile Polysaccharid-Fraktion zu erhalten, wurde wässrig extrahiert (Aspinall, 1982). Die wässrigen Rohextrakte wurden auf antioxidative Eigenschaften getestet. Die antioxidative Kapazität hydrophiler Substanzen nach der TEAC-Methode ergab für Mistelkrautrohextrakt mit 0,21 mM/l Trolox-Äquivalent nur sehr geringe antioxidative Eigenschaften; der Wert lag für den Mistelbeerenrohextrakt mit 0,07 mM/l Trolox-Äquivalent noch viel geringer. Im Vergleich zu anderen Pflanzenextrakten, die Werte von 1,2 (Karottensaft) bis zu 55 (Holundersaft) mM/l Trolox-Äquivalenten zeigten (Rechner, 2000), ist die antioxidative Kapazität für die hergestellten Mistelextrakte zu vernachlässigen. Für die antioxidativen Eigenschaften sind unter anderem Polyphenole und Flavonoide verantwortlich (Re *et al.*, 1999; Keyhanian und Stahl-Biskup, 2007); diese scheinen somit in den Mistelextrakten nur in geringem Umfang enthalten zu sein. Die antioxidativen Eigenschaften lipophiler Substanzen wurden mit dem DPPH-Test bestimmt. Da die wässrige Extraktion aufgrund des Ziels der Isolierung der Polysaccharide gewählt worden war, waren hier nur geringe Aktivitäten zu erwarten. Nur für den Mistelbeerenrohextrakt konnte eine IC<sub>50</sub> von 0,71 mg/ml bestimmt werden. Die antioxidativen Eigenschaften lipophiler methanolischer Mistelextrakte lagen deutlich höher (Önay-Uçar *et al.*, 2006), genau wie bei Extrakten anderer Pflanzen mit zunehmender Lipophilie des Extraktionsagenses, bei sehr viel geringeren Extraktkonzentrationen, die IC<sub>50</sub> ermittelt werden konnte (Hsieh *et al.*, 2008; Piccolella *et al.*, 2008).

Der Mistelkrautrohextrakt zeigte eine starke Belastung sowohl mit anaeroben als auch mit aeroben Bakterien und Pilzen, die aufgrund der ledrigen Beschaffenheit der Blätter und Stängel nicht erwartet worden war. Diese Voruntersuchung war im Hinblick auf die immunologischen Testungen von Bedeutung und soll dort ausführlicher diskutiert werden.

Proteine wurden im Mistelkraut- und Mistelbeerenrohextrakt durch Hitze-Denaturierung ausgefällt. Die Fraktion der niedermolekularen Polysaccharide wurde durch Tangentialflussfiltration und anschließende Dialyse entfernt (Blaschek, 1991).

### **Mistelpolysaccharide**

Die Acetylierungsanalyse des Mistelkrautrohextrakts lieferte in abnehmender Reihenfolge Glucose, Arabinose, Galactose, Rhamnose, Mannose, Xylose und Spuren an Fucose. Bei der Tangentialflussfiltration gelangte vor allem Glucose neben geringeren Anteilen an Arabinose in das niedermolekulare Filtrat. Das Retentat wurde durch die Dialyse weiter aufgereinigt und enthielt als Hauptmonosaccharid Arabinose mit über 40 % am Gesamtzucker-Anteil und einem Arabinose- zu Galactose-Verhältnis für die Kaltextrakte von durchschnittlich 1:0,8. Durch die Heißextraktion wurden andere Polysaccharid-Fractionen extrahiert und es wurden somit andere Polysaccharide in den einzelnen Extrakt-Fractionen erhalten (Aspinall, 1982), dies bestätigte sich in der abweichenden Neutralzucker-Zusammensetzung. Beim Mistelbeerenextrakt konnte nach der Tangentialflussfiltration ein an Mannose und Glucose reiches Filtrat abgetrennt werden; im Retentat waren Arabinose und Galactose enthalten und andere Monosaccharide kamen jeweils nur in Spuren vor. Durch die Dialyse verschob sich das Arabinose- zu Galactose-Verhältnis im Retentat zugunsten der Galactose. Vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse mit den Literaturdaten, so ergeben sich Übereinstimmungen, denn Untersuchungen des Schleims der Mistelbeeren wiesen als Monosaccharide Galactose, Arabinose und Uronsäuren (Mangenot *et al.*, 1948) auf. Neben diesen wurden Rhamnose, Glucose, Mannose und Xylose in *Viscum album* L. Kraut und Beeren nachgewiesen (Krzaczek, 1976; Jordan und Wagner 1986; Wagner und Jordan, 1988; Edlund *et al.*, 2000).

In der Literatur sind die Mistelpolysaccharide für die Blätter und Stängel hauptsächlich als Rhamnogalacturonane charakterisiert, nur zu geringen Anteilen konnte ein Arabinogalactan isoliert werden, und in Mistelbeeren wurden saure Arabinogalactane nachgewiesen (Edlund *et al.*, 2000; Jordan, 1985; Jordan und Wagner, 1986; Stein *et al.*, 1999a; Wagner und Jordan, 1988). Arabinogalactane, die kovalent mit einem Proteinteil verknüpft sind und als Arabinogalactan-Proteine

(AGPs) bezeichnet werden, kommen ubiquitär im Pflanzenreich vor. Ihnen werden vielfältige physiologische Eigenschaften in der Pflanze, und auch immunmodulatorische Eigenschaften (siehe Einleitung) zugeschrieben. Im folgenden Abschnitt werden die erhaltenen AGPs und die Ergebnisse der Analytik des Polysaccharid-Anteils im AGP diskutiert, da nachgewiesen werden konnte, dass es sich bei den isolierten Strukturen um Arabinogalactan-Proteine und keine reinen Arabinogalactane handelte.

### **Arabinogalactan-Proteine**

AGPs sind eine Untergruppe der Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine (Seifert und Roberts, 2007). Die AGPs sind zum großen Teil mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz fällbar; dieses eignet sich daher zur Isolierung der AGPs aus Pflanzenextrakten. Die positiven Geldiffusionstests der aufgereinigten Polysaccharid-Fractionen (dialysiertes Retentat) aus Mistelkraut und -beeren zeigten das Vorkommen der AGPs in *Viscum album* L.. Das Yariv-Reagenz reagiert nur mit nach Aspinall (1973) definierten Typ II-Arabinogalactanen (Nothnagel, 1997). Daraus kann geschlossen werden, dass Mistelkraut und Mistelbeeren AGPs enthalten, deren Polysaccharid-Anteil aus einem Typ II-Arabinogalactan besteht. Nach der Isolierung der AGPs (Kreuger und van Holst, 1995) zeigte sich, dass das Kraut-AGP deutlich stärker mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz reagierte als das Beeren-AGP. Der genaue Reaktionsmechanismus des  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenzes mit AGP ist noch weitgehend unbekannt. Untersuchungen zeigten unterschiedliche Ergebnisse, und es bleibt unklar, ob der Polysaccharid- oder der Proteinteil oder beide für eine positive Reaktion essentiell sind (Gleeson und Jermyn, 1979; Gleeson und Clarke, 1979; Komalavilas *et al.*, 1991; Saulnier *et al.*, 1992), somit sollte die Analytik von Polysaccharid- und Proteinteil klären, inwiefern sich Kraut- und Beeren-AGP bezüglich ihrer Struktur unterscheiden.

### **Polysaccharid-Anteil der AGPs**

Die Neutralzucker-Zusammensetzung des Kraut-AGPs ergab für den Krautextrakt I durchschnittlich 83,6 % Arabinose und Galactose (Verhältnis 1:1,8), 6,8 % Glucose, 6,6 % Rhamnose. Mannose, Fucose und Xylose kamen nur in Spuren vor und werden im Folgenden nicht weiter berücksichtigt, da sie bei der für die

Monosaccharid-Verknüpfungen wichtigen Methylierungsanalyse nicht mehr nachweisbar waren. Das Kraut-AGP aus Krautextrakt II enthielt hohe Konzentrationen an Glucose (24,1 %) und nur 23,2 % Arabinose und 37,2 % Galactose (Verhältnis 1:1,5). Zur Herstellung des Krautextrakts II wurde Mistelkraut einer anderen Charge verwendet. Da die Zucker-Zusammensetzung wie auch die anderen Inhaltsstoffe der Mistel starken jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen (Escher *et al.*, 2004; Scheffler *et al.*, 1996), besteht die Möglichkeit, dass die zwei Chargen Mistelkraut zu verschiedenen Jahreszeiten geerntet wurden. Zum anderen zeigt sich eine Abhängigkeit der Zucker-Zusammensetzung vom Wirtsbaum (Escher *et al.*, 2004). Bei dem von der Firma Caelo bezogenen Mistelkraut wurden keine Angaben zu den Wirtsbäumen bzw. zum Erntezeitpunkt gemacht, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die einzelnen Chargen in ihrer Inhaltsstoff-Zusammensetzung variieren. Krautextrakt IV, der wiederum aus einer anderen Charge an Ausgangsmaterial gewonnen worden war, zeigte bis auf einen erhöhten Glucose-Gehalt (YF 1), der durch Zentrifugation des gelösten dialysierten Retentats vor der Yariv-Fällung abgetrennt werden konnte (YF 2-3), eine vergleichbare Neutralzucker-Zusammensetzung. Wie schon bei den zuvor diskutierten Monosaccharid-Gehalten der Extrakt-Fractionen zeigten auch die AGP-Fractionen der Heißextrakte von den Kaltextrakten abweichende Ergebnisse. Krautextrakt IIa, bei dem das zuvor für Mistelkrautextrakt II (K II) verwendete Material noch einmal heiß extrahiert wurde, lieferte als Hauptmonosaccharid Glucose (49,7 %). Das AGP enthielt nur geringe Mengen Galactose (7,5 %) bei einem Arabinose- zu Galactose-Verhältnis von 1:0,2. Der hohe Glucose-Anteil und der verminderte Galactose-Anteil, lassen auf nur geringe Mengen an isoliertem AGP, das mit Glucose und Arabinose verunreinigt ist, schließen. Auch aus dem direkt heiß extrahierten Mistelkraut von K IIIa konnte nur ein AGP isoliert werden, dessen Neutralzucker-Zusammensetzung als Hauptmonosaccharid Glucose enthielt. Der Anteil an Arabinose und Galactose lag mit 56,4 % (Verhältnis 1:1,2) jedoch deutlich höher als bei K IIa; auch näherte sich das Verhältnis von Arabinose zu Galactose dem der Kaltextrakte an. Die Heißextraktion lieferte dennoch nicht wie gewünscht eine erhöhte AGP-Ausbeute, sondern vor allem nur erhöhte Glucose-Konzentrationen. Die erhöhte Glucose-Konzentration könnte durch Stärke bedingt sein, die zum Teil schon bei der Heißextraktion in Lösung ging und nicht erst bei enzymatischer Spaltung (Blaschek,

1991). Die Kaltmazeration stellt somit die beste Methode zur Isolierung der AGPs aus der Mistel dar. Daher wurde für die weitere Strukturaufklärung und die immunologischen Testungen auf die Untersuchung der Mistelkrautheißextrakte verzichtet und nur das homogene Material von K I und K IV YF 2-3 verwendet.

Es konnten somit erstmals aus Mistelkraut Arabinogalactan-Proteine isoliert werden. Jordan (1985), der sich im Rahmen seiner Dissertation ausführlich mit Polysacchariden aus *Viscum album* L. beschäftigte, isolierte aus den Stängeln und Blättern hauptsächlich eine pektinartige Fraktion, die er als (1→4) $\alpha$ -D-Galacturonan mit einem Molekulargewicht von ca. 42.000 Da charakterisierte. Nur in geringer Menge konnte ein Arabinogalactan von ihm nachgewiesen werden.

Aus den Mistelbeeren konnte ein AGP isoliert werden, dessen Neutralzucker-Anteil insgesamt zu 82,7 % aus Arabinose und Galactose (Verhältnis 1:0,7) besteht. Bezogen auf die Hauptmonosaccharide ergibt sich somit ein umgekehrtes Verhältnis für Kraut- und Beeren-AGP. Die unterschiedliche Reaktivität im Geldiffusionstest lässt sich somit erklären. Des Weiteren wurden Glucose (8,5 %), Mannose (3,6 %), Rhamnose (3,3 %) und Spuren an Xylose (1,4 %) und Fucose (0,5 %) im Neutralzucker-Anteil bestimmt.

Durch die Methode nach Blakeney *et al.* (1983) sind in den AGPs vorhandene Uronsäuren der Acetylierung nicht zugänglich; erst durch die Uronsäure-Reduktion nach Taylor und Conrad (1972) werden sie als Neutralzucker erfasst. Anhand der Zunahme einzelner Neutralzucker im Vergleich zum Ausgangs-AGP können die Uronsäuren bestimmt werden. Im Kraut-AGP ließen sich in zwei unterschiedlichen Proben 1,9-4,8 % Galakturonsäure und 2,0-3,5 % Glucuronsäure nachweisen. Die Beeren-AGP-Probe lieferte mit 0,7 % Galakturonsäure und 0,5 % Glucuronsäure keine eindeutigen Ergebnisse. Die kolorimetrische Uronsäure-Bestimmung nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) ergab durchschnittlich 4 % Gesamturonsäuren für das Kraut-AGP und 0,9 % Gesamturonsäuren für das Beeren-AGP. Da sich diese etwas geringeren Werte auf das gesamte AGP beziehen und nicht nur auf den Polysaccharid-Anteil wie bei der Uronsäure-Reduktion, lieferten beide Methoden in etwa vergleichbare Werte. Die konduktometrische Uronsäure-

Bestimmung wurde in Anlehnung an die Sulfat- und Carboxylgruppenbestimmung in Polysacchariden nach Casu und Gennaro (1975) durchgeführt. Diese Methode stellte sich als nicht geeignet für die Bestimmung von Uronsäuren in AGPs heraus, da sich im Vergleich zu den anderen beiden Methoden viel zu hohe Werte ergaben. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass aufgrund der geringen Uronsäurekonzentration im Unterschied zur Literaturmethode mit stärker verdünnter NaOH gearbeitet werden musste.

Die Partialhydrolyse nach Gleeson und Clarke (1979) wurde durchgeführt, um erste Anhaltspunkte der Anordnung der Neutralzucker im AGP zu erhalten. Der mit Ethanol fällbare Rückstand bestand im Kraut-AGP hauptsächlich aus Galactose (85,2 %), während im Überstand Arabinose dominierte. Für die Struktur des Kraut-AGPs kann geschlussfolgert werden, dass ein Rückgrat des Polysaccharid-Anteils aus pyranosidisch verknüpften Galactose-Einheiten vorliegt, während Arabinose vor allem an der Peripherie des Polysaccharid-Anteils lokalisiert ist. Galactose als Oligosaccharid gelangt somit in den Überstand, diese war dort zu 17,4 % der Neutralzucker nachweisbar. Es ist eher unwahrscheinlich, dass es sich um ein Grundgerüst aus Galactose-Oligosacchariden, die durch furanosidisch verknüpfte Arabinosen verbunden sind, handelt. Es könnte vermutet werden, dass die Galactose-Oligosaccharide im Überstand durch Spaltung von 1,3-Bindungen des Rückgrats entstanden sind, da diese labiler als andere pyranosidische Verknüpfungen sind (Blaschek, 1991). Des Weiteren enthielt der Überstand in größeren Konzentrationen Arabinose (67,0 %) und Rhamnose (10,2 %). Bei der Neutralzucker-Bestimmung ohne vorangegangene TFA-Hydrolyse werden so nur Monosaccharide bestimmt. Der Galactose-Anteil nahm deutlich ab, somit lag Galactose vor allem als Oligosaccharid vor. Der Rhamnose-Gehalt nahm etwas ab, so dass auch Oligosaccharide vorzuliegen scheinen, die ein Indiz für pyranosidisch verknüpfte Oligosaccharide an den Arabinose-Seitenketten sein könnten. Der Arabinose-Gehalt nahm im Vergleich zur Analyse ohne TFA-Hydrolyse deutlich zu, so dass Arabinose noch teilweise als Oligosaccharid nach der Partialhydrolyse vorlag.



Im Beeren-AGP enthielt der Rückstand nach Partialhydrolyse 73,2 % Galactose, als Galactose-Oligosaccharide konnten 8,2 % der Neutralzucker-Zusammensetzung des Überstands nachgewiesen werden. Somit gelangte ein im Vergleich zum Kraut-AGP deutlich geringerer Teil an Galactose in den Überstand. Jedoch enthielt der Rückstand deutlich nachweisbare Anteile an Arabinose (14,8 %) und Rhamnose (6,1 %), dies würde bedeuten, dass im Galactose-Rückgrat Arabinose und Rhamnose vorkommen würden. Eine andere Erklärung wäre, dass die Partialhydrolyse nicht vollständig abgelaufen ist und somit nicht alle furanosidischen Bindungen gespalten wurden. An das Rückgrat sind zum größten Teil furanosidisch vorliegende Arabinosen geknüpft, die mit 83,6 % der Neutralzucker im Überstand der Partialhydrolyse nachgewiesen werden konnten.

Erst durch die Bindungstypanalyse nach Harris *et al.* (1984) konnten die genauen Bindungstypen in den einzelnen AGP-Fractionen bestimmt werden. Im Gegensatz zu den Acetylierungsanalysen waren häufig die bei dieser nur in geringen Konzentrationen oder Spuren vorkommenden Monosaccharide der Zucker-Zusammensetzungen nicht mehr nachweisbar. Durch die vielen Reaktionsschritte bei der Bindungstypanalyse (mehrfaches Einengen der Proben unter Begasung) könnten einzelne Monosaccharid-Derivate entfernt worden sein. Die Flüchtigkeit betrifft jedoch vor allem die terminalen Monosaccharide, deren korrespondierende PMAAs die meisten Methylgruppen tragen. Da terminale Arabinosen jedoch bei einigen Analysen überrepräsentiert waren, kann nicht von einer erhöhten Flüchtigkeit ausgegangen werden.

Für das Kraut-AGP konnte mittels Bindungstypanalyse ermittelt werden, dass die Galactose-Fraktion des Polysaccharids zu gleichen Anteilen aus 1,3- und 1,3,6-Galactose besteht (22,1 %); 1,6-Galactose (7,7 %) und terminale Galactose (3 %) liegen zu deutlich geringeren Anteilen im AGP vor. Nach der Partialhydrolyse des AGPs und Bestimmung der PMAAs im Rückstand blieb der molare Anteil an 1,3,6-Galactose gleich; da aber der Arabinose-Anteil sank, bedeutet dies auch insgesamt einen Abfall an 1,3,6-Galactose unter starker Zunahme an 1,6-Galactose. Aus diesem steigenden Anteil an 1,6-Galactose um 23,3 % im Rückstand nach Partialhydrolyse im Vergleich zur AGP-Fraktion kann gefolgert werden, dass über

das C 3 der 1,6-Galactosen furanosidische Arabinose-Seitenketten angeknüpft sind, die durch die Partialhydrolyse abgespalten werden. Die Arabinose-Seitenketten, die einen hohen Anteil im AGP ausmachen, sind nicht direkt an das Galactose-Rückgrat angeknüpft, sondern knüpfen an Galactose-Seitenketten, da es zu keinem Anstieg der 1,3-Galactose im Rückstand nach der Partialhydrolyse kommt. Im Hinblick auf einen Strukturvorschlag kann daher vermutet werden, dass ein Rückgrat aus 1,3-verknüpfter Galactose vorliegt; ein Teil der 1,3-Galactose-Einheiten ist über das C 6 mit 1,6-Galactose-Seitenketten verknüpft. Das Vorkommen von 1,6-Galactose im Galactose-Rückgrat ist jedoch nicht auszuschließen. Nur ca. jede vierte der 1,6-Galactosen in den Seitenketten lag nicht verzweigt vor; dies ergab sich aus den unterschiedlichen Verhältnissen im AGP (7,7 %) im Vergleich zum Rückstand nach Partialhydrolyse (31,0 %). Geringe Mengen an terminaler pyranosidischer Rhamnose (3,3 %) befanden sich im Rückstand; diese waren an die Galactose-Ketten angeknüpft. Die Partialhydrolyse scheint nicht ganz vollständig abgelaufen zu sein, da noch Spuren furanosidischer terminaler Arabinose (2,7 %) detektiert wurden. Bei der Wahl der Hydrolysebedingungen ist zu beachten, dass bei schwächeren Bedingungen ein Teil der furanosidisch verknüpften Arabinosen nicht von den Galactose-Ketten abgespalten wird, bei zu starker Hydrolyse es jedoch zur Spaltung von 1,3-Galactose-Bindungen kommt. Nach Uronsäure-Reduktion des AGPs konnten 7,8 % 1,4-Galacturonsäure und 4,1 % terminale Glucuronsäure ermittelt werden. Der Anstieg an 1,6-Galactose und 1,3,6-Galactose nach Uronsäure-Reduktion lässt den Rückschluss zu, dass die Uronsäuren an diese Bausteine des Galactose-Gerüsts geknüpft sind. Die Uronsäure-Reduktion des Rückstands nach Partialhydrolyse bestätigte die Ergebnisse, da beide Uronsäuren nachgewiesen werden konnten. Die terminale Glucuronsäure stieg auf 14,2 %. Dieser ermittelte Wert lag trotz des abgespaltenen Arabinose-Anteils zu hoch und deckte sich auch nicht mit den Ergebnissen nach Blumenkrantz und denen der Acetylierungsanalyse. Im Gegensatz dazu nahm der Gehalt an 1,4-Galacturonsäure im Rückstand nach Partialhydrolyse im Vergleich zum Gesamt-AGP ab. Vergleicht man die PMAAs des Rückstands der Partialhydrolyse vor und nach Uronsäure-Reduktion, so ergab sich für alle Galactose-Bausteine eine Abnahme, im Gegensatz zur starken Zunahme an terminaler Glucuronsäure, die sich nicht erklären lässt. Das AGP besteht zu 41,7 % aus furanosidischer Arabinose, der Wert liegt um ca. 10 % höher als nach der

Acetylierungsanalyse. Insgesamt ist auffällig, dass die Arabinose-Konzentration in den methylierten Proben im Vergleich zu den acetylierten Proben zu hoch liegt. Des Weiteren konnten in den methylierten Proben häufig zu viele nicht-reduzierende Endgruppen (terminale Arabinose) im Verhältnis zu den Verzweigungen bestimmt werden. Dies könnte ein Hinweis auf einen methodischen Fehler bei der Analytik sein; die Methode müsste im Hinblick auf die terminale Arabinose neu validiert werden und ein neuer Korrekturfaktor bestimmt werden. Im AGP lagen ungefähr gleiche molare Anteile an terminaler und 1,5-verknüpfter Arabinose vor, für die Struktur des AGPs ergaben sich somit meist kurze Arabinose-Seitenketten, die über das C 3 der Galactose an die 1,6-Galactose-Seitenketten angeknüpft waren. Geringe Mengen an 1,3,5-Arabinose lassen auf Verzweigungen innerhalb der Arabinose-Seitenketten schließen. 1,3-Arabinose war zu 1,2 % nur im uronsäurereduzierten AGP nachweisbar; im Ausgangs-AGP lag sie unterhalb der Bestimmungsgrenze. Es kann somit angenommen werden, dass an das C 3 der 1,3,5-verzweigten Arabinose entweder terminale oder 1,3-verknüpfte Arabinosen angeknüpft sind. Im Überstand der Partialhydrolyse fanden sich 91,5 % Arabinose. Der Anteil an terminaler pyranosidischer Arabinose (18,1 %) begründet sich in der Gleichgewichtseinstellung zwischen furanosidischer und pyranosidischer Arabinose zu 4,5:95,5 % (Lehmann, 1996), wenn diese vor der Methylierung als Monosaccharide vorliegen; durch die Einführung der Substituenten zu den PMAAs verschiebt sich das Gleichgewicht wieder etwas, jedoch nicht vollständig, zur furanosidischen Form hin. Ein Teil der furanosidischen Arabinosen (16,2 %) konnte, wie schon die Acetylierungsanalyse des Überstands mit und ohne TFA-Hydrolyse gezeigt hatte, durch die Partialhydrolyse nicht vollständig in Monosaccharide gespalten werden, sondern lag auch im Überstand als Oligosaccharide vor. Terminale pyranosidische Rhamnose fand sich mit 8,5 % im Überstand der Partialhydrolyse und müsste demnach hauptsächlich an die Arabinose-Seitenketten und nur zu einem geringen Teil an das Galactose-Grundgerüst geknüpft sein. Das Verhältnis von terminaler Arabinose zu terminaler Rhamnose im AGP liegt bei ca. 6:1; somit ergab sich für die Struktur der Seitenketten, dass ca. jedes siebte terminale Monosaccharid Rhamnose ist.

Die Bindungstypanalyse des Beeren-AGPs ergab ein Arabinose- zu Galactose-Verhältnis von 1:0,6; dieses Ergebnis stimmt in etwa mit der Acetylierungsanalyse

überein (1:0,7). Bei der Auswertung der verschiedenen AGP-Fractionen konnten einige Spektren von Hexosen nicht eindeutig zugeordnet werden, es konnte nur die Verknüpfung bestimmt werden. Da diese nur in geringen Konzentrationen vorkamen, soll auf sie in der folgenden Diskussion nicht näher eingegangen werden; die postulierten Strukturfragmente sind dadurch aber unter leichtem Vorbehalt zu betrachten. Es müssten noch genauere Untersuchungen folgen, ob es sich bei den Hexosen um Strukturfragmente des AGPs oder um Bestandteile anderer mitisolierter Polysaccharide handelt.

Der Polysaccharid-Anteil ist im Beeren-AGP hauptsächlich aus 1,5-Arabinose (27,7 %), terminaler Arabinose (26,7 %) und 1,3,6-Galactose (17,5 %) zusammengesetzt. 1,3- (7,2 %), 1,6- Galactose (9,9 %) und terminale Galactose (1,0 %) bildeten zusammen nur die Hälfte des Galactose-Anteils. Nach Partialhydrolyse und Charakterisierung des Rückstands ergab sich für den Anteil an 1,3,6-Galactose eine Abnahme; somit sind an einen Teil der 1,3,6-Galactose furanosidische Arabinosen gebunden. Der gleichzeitige starke Anstieg der molaren Konzentration an 1,6-Galactose im Rückstand mit 44,5 % bedeutet, dass vor allem eine starke Verknüpfung dieser Galactose-Einheiten über das C 3 mit furanosidischen Arabinosen vorlag. Für die Konzentration an 1,3-Galactose fand sich nur eine geringfügige Zunahme, so dass nur ein geringer Anteil derselben mit Arabinosen verknüpft sein könnte. Für die Struktur des Polysaccharid-Anteils des Beeren-AGPs kann gefolgert werden, dass eine 1,3-Galactose-Kette vorliegt, an die über das C 6 1,6-Galactose-Seitenketten angeknüpft sind. Das Grundgerüst schließt mit terminaler Galactose und zu geringen Anteilen auch mit terminaler Glucose ab. Pyranosidische 1,2,4-Rhamnose (1,7 %) kommt im Grundgerüst ca. alle 10 Galactose-Monomere vor. Die 1,6-Galactose-Seitenketten sind über das C 3 mit furanosidischen 1,5-Arabinose-Seitenketten verbunden. Im Gegensatz zum Polysaccharid-Anteil im Kraut-AGP ergibt sich für die Struktur des Polysaccharid-Anteils im Beeren-AGP ein höherer Anteil an 1,6-Galactose-Seitenketten und eine stärkere Verzweigung derselben mit Arabinose-Seitenketten. Auch die 1,6-Galactose-Seitenketten des Beeren-AGPs schließen hauptsächlich mit terminaler Arabinose oder Arabinose-Seitenketten ab, ersichtlich am Anstieg an terminaler Galactose im Rückstand nach Partialhydrolyse (+ 9,8 %). Die Arabinose-Seitenketten bestehen hauptsächlich aus

1,5-Arabinose und nur zu sehr geringen Anteilen aus 1,2- und 1,3-Arabinose. Der hohe Gehalt an terminaler Arabinose (26,7 %) im AGP spricht für kurze Arabinose-Seitenketten aus nur zwei Monomeren oder für viele terminale Arabinosen direkt an den 1,6-Galactose-Seitenketten. Im Unterschied zum Kraut-AGP konnten im Rückstand der Partialhydrolyse deutlich höhere Konzentrationen an terminaler (10,7 %) und 1,5-Arabinose (4,3 %) gemessen werden, die entweder auf eine unvollständig abgelaufene Hydrolyse furanosidischer Bindungen hinweisen, die an den 1,6-Galactose-Seitenketten nicht vollständig abhydrolysiert wurden, oder es liegen Arabinose-Einheiten im Galactose-Grundgerüst vor. Der höhere Anteil an terminaler Arabinose würde dann darauf hindeuten, dass das Galactose-Grundgerüst durch 1,5-Arabinosen unterbrochen wäre. Nach der Partialhydrolyse fänden sich dann aber keine Bruchstücke des Galactose-Grundgerüsts im Rückstand, da diese in 80 %igem EtOH löslich wären und somit in den Überstand gelangen würden. Der hohe Anteil an Arabinose-Oligosacchariden im Überstand nach Partialhydrolyse unterstützt wiederum die These der unvollständigen hydrolytischen Spaltung aller furanosidischen Bindungen. Terminale Glucose (3,3 %) im Überstand der Partialhydrolyse deutet entweder auf diese in den Arabinose-Seitenketten hin oder ein Teil der pyranosidischen Verknüpfungen der Glucose mit dem Galactose-Gerüst wurde hydrolysiert. Im Beeren-AGP konnten 2,9 % terminale Glucuronsäuren detektiert werden, nach Partialhydrolyse und Bindungstypanalyse des Rückstands ergaben sich 2,2 % terminale Glucuronsäure. Da sich die 1,3-Galactose im Rückstand nach Partialhydrolyse nach der Uronsäure-Reduktion um 2,7 % erhöhte, kann postuliert werden, dass die Glucuronsäure zum Teil den Abschluss des 1,3-Galactose-Grundgerüsts bildet. Genau wie beim Kraut-AGP ergaben sich nach Uronsäure-Reduktion und Bindungstypanalyse höhere Werte als nach der kolorimetrischen Gesamturonsäure-Bestimmung. Durch die geringe Abnahme des Uronsäure-Anteils im Rückstand der Partialhydrolyse im Vergleich zum Ausgangs-AGP kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch der Überstand geringe Mengen an Glucuronsäuren enthält.

Vergleicht man die Struktur der Polysaccharid-Anteile des Mistelkraut- und Mistelbeeren-AGPs mit den in der Literatur vorliegenden Ergebnissen für die Struktur von Arabinogalactanen aus der Mistel, so ergeben sich einige neue Erkenntnisse

bezogen auf die Neutralzucker, Uronsäure-Gehalte und Verknüpfungen der Monosaccharid-Bausteine. Wie oben bereits erwähnt, isolierte Jordan (1985) durch Ethanol-Fällung und Anreicherung über Ultrafiltration hochmolekulare Polysaccharid-Fractionen aus Mistelstängeln und -blättern sowie aus den Beeren. Für Mistelstängel und -blätter erhielt er neben dem bereits erwähnten sauren Rhamnogalacturonan ein Arabinogalactan mit einem Molekulargewicht von ca. 110.000 Da, das aufgrund der geringen Menge nicht näher charakterisiert werden konnte. Aus Mistelbeeren konnte Jordan genügend Material an Arabinogalactan nach Abtrennung der Pektinfraktion gewinnen, um eine Strukturuntersuchung durchzuführen. Das isolierte Arabinogalactan wies ein Arabinose- zu Galactose-Verhältnis von 1:0,7 auf, dies entspricht in etwa dem in dieser Arbeit untersuchten Polysaccharid-Anteil des AGPs aus Mistelbeeren. Der Uronsäure-Gehalt des Polysaccharid-Anteils aus Kraut- und Beeren-AGP liegt deutlich unter den von Jordan ermittelten 12 % Uronsäuren (Jordan, 1985; Jordan und Wagner, 1986). Edlund *et al.* (2000) isolierten ebenfalls aus Mistelbeeren ein neutrales und ein saures Arabinogalactan, die Fraktionen des sauren Arabinogalactans enthielten bis zu 23 % Uronsäuren. Beide detektierten jedoch nur 1,4-Galacturonsäure und keine terminale Glucuronsäure. Zu beachten ist, dass bei Jordan (1985) und Edlund *et al.* (2000) im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit keine spezifische Fällung erfolgte, so dass die isolierten AGPs in der Mistel einen geringeren Anteil ausmachen, als die in den oben genannten Arbeiten isolierten Arabinogalactane, bzw. könnten letztere auch mit Pektin verunreinigt sein.

Durch die Bindungstypanalyse wurden in der vorliegenden Arbeit im Unterschied zu Jordan und Wagner (1986) aus Mistelkraut und -beeren Typ II-Arabinogalactan-Proteine isoliert (Clarke *et al.*, 1979), deren Polysaccharid-Anteil aus einem 1,3-Galactose-Grundgerüst besteht, welches teilweise am C 6 mit 1,6-Galactose-Seitenketten verknüpft ist, die wiederum über das C 3 mit Arabinose-Seitenketten substituiert sind. Jordan und Wagner (1986) beschrieben eine Arabinogalactanhaltige Fraktion, die aus einem Grundgerüst aus 1,4-Galacturonsäure und 1,2-Rhamnose, letztere war über das C 4 mit 1,6-Galactose-Seitenketten verknüpft, besteht. Die 1,6-Galactose-Seitenketten waren über das C 3 mit Arabinose-Seitenketten verknüpft (Arabinogalactan). Für die Galactose-Seitenketten ergab sich somit eine Übereinstimmung in der Struktur mit den Daten der vorliegenden Arbeit.

Die Arabinose-Seitenketten waren jedoch im Unterschied dazu teilweise 1,2,5-verknüpft. Wagner und Jordan (1988) beschrieben das von ihnen isolierte Arabinogalactan als untypisches Arabinogalactan mit fast ausschließlich 1,6-Galactose-Grundgerüst. Arabinogalactane mit ähnlichem Aufbau konnten auch in anderen Pflanzen nachgewiesen werden (Capek und Kardošová, 1995), im Gegensatz zu den so genannten häufiger vorkommenden Arabino-3,6-galactanen (Clarke *et al.*, 1979). Wagner und Jordan (1988) wollten jedoch nicht ausschließen, dass es sich doch um ein Typ II-Arabinogalactan handeln könnte. So bezeichneten auch Edlund *et al.* (2000) das von ihnen isolierte neutrale Arabinogalactan als Typ II-Arabinogalactan mit einem Grundgerüst aus 1,3-verknüpfter Galactose, die in Position C 6 mit 1,6-Galactose-Seitenketten substituiert ist. Die Bindungstypanalyse ergab keine 1,3-Galactose, dennoch nahmen Edlund *et al.* (2000) diese einmal unsubstituiert in ihren Strukturvorschlag auf, bei insgesamt nur drei Galactose-Einheiten. Im Gegensatz dazu konnten in der vorliegenden Arbeit Kraut- und Beeren-AGPs isoliert werden, deren Galactose-Grundgerüst neben am C 6 verzweigter 1,3-Galactose auch unsubstituierte 1,3-Galactose enthält, und somit konnte die These, dass in der Mistel Typ II-Arabinogalactane vorkommen, bestätigt werden. Das Grundgerüst der von Edlund *et al.* (2000) ermittelten drei sauren Arabinogalactan-Fractionen entsprach dem von Jordan und Wagner (1986) ermittelten, wobei in den isolierten Fractionen nur der Substitutionsgrad und die Länge der Seitenketten variierten. In der vorliegenden Arbeit sowohl für Mistelkraut als auch für Mistelbeeren bestimmte 1,5-Arabinose-Seitenketten konnten von Edlund *et al.* (2000) nur in viel geringerer Menge detektiert werden, dafür konnten größere Mengen an 1,3,5-Arabinose (9 %) und 1,2,5-Arabinose (8 %) nachgewiesen werden, erstere fand sich in der vorliegenden Arbeit nur in Spuren, letztere konnte überhaupt nicht nachgewiesen werden. Die 1,5-Arabinose-Seitenketten waren bei in dieser Arbeit isoliertem Kraut- und Beeren-AGP somit länger und nicht so stark verzweigt im Vergleich zu Edlund *et al.* (2000). Auch Wagner und Jordan (1988) postulierten für das von ihnen isolierte saure Arabinogalactan kurze Arabinose-Seitenketten und viele terminale Arabinosen direkt an den 1,6-Galactose-Ketten.

Vergleicht man die aus Mistelkraut und Mistelbeeren isolierten Polysaccharid-Anteile der AGPs unter Berücksichtigung, dass die Arabinogalactane aus Mistelbeeren schon als immunologisch aktiv charakterisiert worden sind (Wagner und Jordan, 1988; Stein *et al.*, 1999a), nur mit anderen Polysaccharid-Anteilen immunologisch aktiver AGPs, so ergeben sich grundlegende Übereinstimmungen. AGPs aus *Echinacea sp.* (Classen *et al.*, 2000; Thude und Classen, 2005) und aus *Baptisia tinctoria* (Wack *et al.*, 2005) konnten alle Typ II-Arabinogalactanen zugeordnet werden. In der Zusammensetzung der PMAAs differieren sie jedoch untereinander; selbst AGPs aus *Echinacea* und *Baptisia* und deren Zellkulturen der entsprechenden Art zeigten Strukturunterschiede (Classen, 2007; Wack, 2004). Daher scheint auch nicht verwunderlich, dass in Mistelkraut und Mistelbeeren AGPs mit differierender Struktur gefunden wurden. Auffällig bleibt allerdings, dass im Vergleich zu allen anderen in diesem Abschnitt genannten AGPs, die als einzige Uronsäure terminale Glucuronsäure aufwiesen, nur das Mistelkraut-AGP noch zusätzlich 1,4-Galacturonsäure enthielt.

### **Protein-Anteil der AGPs**

Arabinogalactan-Proteine stellen eine Untergruppe der Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine dar, wobei Überlappungen zwischen den AGPs und anderen Untergruppen bestehen (Seifert und Roberts, 2007). Der Proteinteil im AGP ist meist reich an den Aminosäuren Hydroxyprolin, Prolin, Alanin, Serin und Threonin und nimmt ca. 1-10 % des AGPs ein (Clarke *et al.*, 1979; Fincher *et al.*, 1983; Nothnagel, 1997). Häufig werden durch O-Glykosylierung von einem oder mehreren Hydroxyprolin-Resten Proteinteil und Kohlenhydrateil miteinander verknüpft (Fincher *et al.*, 1983; Kieliszewski und Lamport, 1987; McNamara und Stone, 1981). Neben den vielfach charakterisierten typischen Hydroxyprolin-reichen AGPs (u.a. Classen *et al.*, 2005; Gleeson *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 2008) sind aber auch Lysin-reiche AGPs (Yang *et al.*, 2007; Yang und Showalter, 2007) und Hydroxyprolin-arme AGPs (Gleeson und Clarke, 1979), sowie AGPs ohne Hydroxyprolin (Baldwin *et al.*, 1993) bekannt.



Der Gesamtprotein-Anteil im AGP lag für Mistelkraut-AGP mit 12,5 % untypisch hoch für ein AGP, für Mistelbeeren-AGP ergaben sich 5,9 %. Glutamin/-säure und Asparagin/-säure waren in beiden AGPs mit über 10 % enthalten und beide wiesen nur einen sehr geringen Hydroxyprolin-Gehalt auf (Kraut: 0,3 %; Beeren 0,5 %). Die anderen in AGPs häufig vorkommenden Aminosäuren Prolin, Alanin, Serin und Threonin waren sowohl im Kraut- als auch im Beeren-AGP deutlich vorhanden (Kraut: Pro 6,8 %, Ala 8,5 %, Ser 5,1 %, Thr 6,1 %; Beeren: Pro 4,6 %, Ala 6,5 %, Ser 5,4 %, Thr 5,7 %). Der geringe Hydroxyprolin-Gehalt in den aus *Viscum album* L. isolierten AGPs spricht evtl. für eine O-glycosidische Verknüpfung von Serin mit dem Polysaccharidteil, die für AGPs anderer Pflanzen schon beschrieben wurde (Baldwin *et al.*, 1993; Kieliszewski *et al.*, 1992). Für ein AGP aus *Phaseolus vulgaris* L. wurden Bindungen zwischen Kohlenhydratteil und Serin, Threonin und Hydroxyprolin gefunden (van Holst und Klis, 1981); ob es sich bei dem Kohlenhydrat um hochmolekulare Arabinogalactane oder nur um Mono- oder Oligosaccharide handelt, blieb jedoch offen. Allerdings sind auch AGPs bekannt, die hohe Anteile an Glutamin/-säure und Asparagin/-säure enthalten (Osman *et al.*, 1995), sowie ein AGP ohne Hydroxyprolin aus *Daucus carota*, das vergleichbar hohe Anteile an Glutamin/-säure und Asparagin/-säure (Baldwin *et al.*, 1993) wie das Mistelkraut- und Beeren-AGP enthält. Vor diesem Hintergrund könnte vermutet werden, dass auch N-glycosidische Bindungen zwischen Protein- und Polysaccharidteil im AGP vorkommen könnten.

Bei dem Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzung des Protein-Cores von Mistelkraut- und Mistelbeeren-AGP mit derjenigen von ML I (Luther und Becker, 1987) ergaben sich Übereinstimmungen. Somit konnte angenommen werden, dass die Hitzedegradation der Proteine mit anschließender Zentrifugation nicht zur vollständigen Abtrennung aller Lektine führte, die daher in das hochmolekulare dialysierte Retentat gelangen konnten. Da der Proteingehalt mit ca. 90 % im Mistellektin das 9-90 fache im Vergleich zum AGP einnimmt, hat auch eine geringe Menge an mitisolierten Lektinen einen großen Einfluss auf die Aminosäure-Zusammensetzung des AGPs.

### Lektine

Durch den positiven Immuno-Blot des Mistelkraut- und des Mistelbeeren-AGPs konnte bewiesen werden, dass die beiden Fraktionen keine reinen AGPs enthalten, sondern auch Mistellektine. Lektine sind als Glykoproteine zu definieren, die spezifisch Kohlenhydratstrukturen binden können. Im Gegensatz zu den AGPs aus *Viscum album* L. liegt der Kohlenhydrat-Anteil der Mistellektine bei ca. 11 % (Blaschek, 2004). Clarke *et al.*, (1975) zeigten, dass bestimmte Lektine mit dem Yariv-Reagenz (s.o.) gefällt werden konnten. Weitere Lektine verschiedenster Pflanzen konnten somit charakterisiert werden und wurden, da die Bindung des Lektins an das Yariv-Reagenz über  $\beta$ -glycosidische Bindungen erfolgt, als  $\beta$ -Lektine bezeichnet (Clarke *et al.*, 1978; Jermyn *et al.*, 1975). In der vorliegenden Arbeit konnte wahrscheinlich erstmals gezeigt werden, dass neben hauptsächlich AGPs (siehe Verhältnis Polysaccharid-Anteil zu Protein-Anteil) auch Mistellektine mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz gefällt und somit auch isoliert werden konnten. Jedoch ist auch bekannt, dass AGPs an Lektine binden (Gleeson *et al.*, 1979). Reaktionen von Arabinogalactanen mit Lektinen aus *Viscum album* L. sind beschrieben (Luther *et al.*, 1980). Des Weiteren konnten Arabinogalactane aus Mistelbeeren durch Affinitätschromatographie an Säulen, an die Lektin von *Ricinus communis* gebunden war, in verschiedene Fraktionen getrennt werden (Wagner und Jordan, 1988). Die Autoren postulierten, dass es sich um eine spezifische Bindung handelt, die durch einen erhöhten Arabinose-Gehalt im Verhältnis zur Galactose unterbunden wird. Diese Ergebnisse stimmen mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Daten überein, da Kraut-AGP, welches deutlich weniger Arabinose als Beeren-AGP enthält, im Immuno-Blot höhere Mistellektin-Gehalte aufwies. So ist bekannt, dass die B-Kette von ML I ein Galactose- und/oder Sialinsäure-spezifisches Lektin mit mehreren Zuckerbindungsstellen darstellt (Mikeska *et al.*, 2005; Müthing *et al.*, 2004). Ziska und Franz (1981) schlossen aus Bindungsstudien zwischen ML I und verschiedenen D-Galactose-Derivaten, dass freie Hydroxylgruppen am C 2, C 3 und C 4 der D-Galactopyranose für die Bindung essentiell sind. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass ML I gute Bindungskapazitäten für 1,3,6-, 1,3- sowie vor allem für 1,6-verknüpfte Galactose-Oligomere aufweist (Classen *et al.*, 2007), welche die Grundstruktur des Polysaccharid-Anteils vieler AGPs bilden, so auch von Mistelkraut- und Mistelbeeren-AGP. Auch die Ergebnisse der Gelpermeationschromatographie

zeigten nach Zusatz von Mistellektin I erhöhte hydrodynamische Volumina für Mistelkraut- und Mistelbeeren-AGP, die auf die Bindung an die AGP-Fraktionen schließen lassen. Es konnte allerdings nicht immer eine Bindung des Dimers von ML I bestimmt werden, da unter den Versuchsbedingungen, wie schon in der Literatur beschrieben (Luther und Becker, 1987), teilweise das Monomer vorlag. Im Vergleich dazu konnten Edlund *et al.* (2000) nur für die von ihnen isolierten sauren Arabinogalactane Wechselwirkungen mit ML I mittels GPC feststellen, nicht jedoch für das neutrale Arabinogalactan. Es bleibt zu untersuchen, ob die Mitfällung der Mistellektine bei der Isolierung durch Bindung an das  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz, durch Bindung an die AGPs oder durch beides zustande kommt. Im Folgenden wurden daher die Bezeichnungen Mistelkraut-AGP-Präparation und Mistelbeeren-AGP-Präparation verwendet, um zu verdeutlichen, dass es sich um keine reinen AGPs handelt. Eine Abtrennung der Mistellektine konnte erst durch ihren enzymatischen Verdau erfolgen (siehe unter Diskussion der Testungen an den Toll-Like-Rezeptoren).

### **Arabinane**

Arabinane sind den Zellwandpolysacchariden zuzuordnen; sie liegen häufig assoziiert mit Galactanen und Pektinen vor. Trotz der schwierigen Isolierung von Arabinanen in nicht degradierter Form konnten sie aus vielen verschiedenen Pflanzenteilen und Pflanzen gewonnen werden (Aspinall, 1982). Aus Mistelkraut wurde in der vorliegenden Arbeit ein Arabinan isoliert; durch Bindungstypanalyse konnten vor allem 1,5- (35,6 %), terminale (31,8 %) und 1,3,5-Arabinose (13,8 %) bestimmt werden. Des Weiteren wurden geringe Mengen 1,2- und 1,3-verknüpfter Arabinose gefunden. Als terminale Zucker wurden neben der hauptsächlich vorkommenden terminalen Arabinose geringere Mengen Rhamnose und Hexose gefunden, letztere kam auch in 1,2-Verknüpfung z.T. als 1,2-Glucose vor. Der im Verhältnis zu den Verzweigungen viel zu hohe Anteil an terminalen Arabinosen im Kraut-Arabinan spricht für eine teilweise Degradation des Arabinans während der Aufarbeitung, diese Bruchstücke wären dann noch besser in 80 %igem Ethanol löslich. Als Struktur kann eine Hauptkette aus 1,5-verknüpfter Arabinose postuliert werden, die am C 3 hauptsächlich mit terminaler Arabinose, aber auch mit 1,2- und 1,3-Arabinose substituiert ist. Ein dem Mistelkraut-Arabinan sehr ähnliches Arabinan,

bis auf das Fehlen an 1,2-Arabinose, konnte aus *Echinacea pallida* durch identische Isolierung erhalten werden (Thude, 2005; Thude und Classen, 2005). Im Vergleich zum Kraut-Arabinan enthielt das Beeren-Arabinan deutlich höhere Anteile an 1,5-Arabinose (47,3 %), terminale Arabinose lag etwas niedriger (27,7 %). Das Beeren-Arabinan zeigt jedoch eine deutlich weniger verzweigte Struktur als das Kraut-Arabinan, da nur 1,9 % 1,3,5-Arabinose bestimmt werden konnten. Auch das Beeren-Arabinan scheint bei der Isolierung in Bruchstücke gespalten worden zu sein, da das Verhältnis nicht reduzierender Endgruppen zu Verzweigungen bei 1:0,2 lag. Es sind zahlreiche Arabinane aus Rapssamen (Eriksson *et al.*, 1996; Siddiqui und Wood, 1974), aus Kohl (Stevens und Selvendran, 1980), aus der Silberweide (Karácsonyi *et al.*, 1975) und aus dem Eibisch (Capek *et al.*, 1983) bekannt, die sich teilweise im Verzweigungsgrad unterscheiden, generell aber im Aufbau dem Mistelkraut- und Mistelbeeren-Arabinan ähneln. Im Beeren-Arabinan konnten 3,9 % Uronsäuren bestimmt werden. Da auch geringe Mengen an 1,2,4-Rhamnose und 1,4-verknüpfter Hexose durch Bindungstypanalyse identifiziert werden konnten, könnte vermutet werden, dass geringe Anteile des Beeren-Arabinans auch an Pektine geknüpft in den Zellwänden der Beeren zu finden sind. Pektine bestehen aus 1,4-verknüpften Rhamnogalacturonanen, an die, oft über das C 2 der Rhamnose, weitere Polysaccharid-Ketten angeknüpft sind. Arabinan-reiche pektinartige Polysaccharide sind, wie erwähnt, eine der beiden Möglichkeiten für die Assoziation der Arabinane mit anderen Zellwandpolysacchariden und für verschiedene Pflanzen beschrieben (Cardoso *et al.*, 2007; Dourado *et al.*, 2004; Zykwinska *et al.*, 2007). Da die Pektin-Anteile im Beeren-Arabinan jedoch einen sehr geringen Anteil ausmachen und Pektine nicht löslich in 80 %igem Ethanol sind, handelt es sich wahrscheinlich eher um eine Verunreinigung des Arabinans. Für das Beeren-Arabinan konnten durch Gelpermeationschromatographie zwei Fraktionen – eine um 1,2 Mio. Da und eine bei ca. 150.000 Da – ermittelt werden. Es kann vermutet werden, dass die größere Fraktion ca. 7-8 Bausteine der kleinen Fraktion enthält. Für das Kraut-Arabinan wurden nur 0,7 % Uronsäuren bestimmt; durch Methylierungsanalyse konnte kein Hinweis auf die Verknüpfung mit Rhamnogalacturonan-Bausteinen erhalten werden. Das Vorkommen von Rhamnogalacturonanen in Mistelbeeren und auch in den Stängeln und Blättern der Mistel ist allerdings beschrieben (Edlund *et al.*, 2000; Jordan und Wagner, 1986). Für das Kraut-Arabinan lag das bei der

Gelpermeationschromatographie ermittelte hydrodynamische Volumen deutlich oberhalb des Ausschlussvolumens und nur ein sehr kleiner Baustein um 8.000 Da konnte bestimmt werden. Es kann vermutet werden, dass das Kraut-AGP als Homoglykan und nicht an andere Polysaccharide gebunden vorliegt.

### **ELISA**

Antikörper, die gegen spezifische Merkmale von Zellwand-Bestandteilen generiert worden sind, werden unter anderem im ELISA und in der Mikroskopie verwendet, um Erkenntnisse über den strukturellen Aufbau und die Regulation der Entwicklung derselben zu erhalten (Knox, 1997). Um weitere Informationen über den strukturellen Aufbau der aus *Viscum album* L. Kraut und Beeren isolierten AGPs zu erhalten, wurde daher im ELISA die Kreuzreaktivität gegen polyklonale und monoklonale Antikörper getestet. Um Vergleiche zu immunmodulatorisch aktiven und strukturell ähnlich aufgebauten AGPs zu ziehen, wurden für die Testungen im kompetitiven ELISA polyklonale (Classen *et al.*, 2005) und ein monoklonaler Antikörper (Classen *et al.*, 2004) verwendet, die gegen AGP aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea*-AGP generiert worden waren (Classen *et al.*, 2000). *Echinacea purpurea*-AGP zeigte, wie erwartet, die stärkste Reaktivität mit den polyklonalen Antikörpern. Die Mistelkraut-AGP-Präparation zeigte deutlich schwächere Aktivität, die sich durch den unterschiedlichen Feinbau beider Typ II-AGPs erklären lässt. Die partialhydrolysierte Kraut-AGP-Präparation, bei der die Arabinosen abgespalten wurden, zeigte vor allem in geringeren Konzentrationen eine stärkere Kreuzreaktivität als die nicht-hydrolysierte Kraut-AGP-Präparation; die Kraut-AGP-Präparation nach Uronsäure-Reduktion reagierte nicht mit den polyklonalen Antikörpern. Diese, für die Kraut-AGP-Derivate erhaltenen Ergebnisse stehen in Diskrepanz zu denen von *Echinacea purpurea*-AGP. Dieses zeigte nach Uronsäure-Reduktion nur schwach verminderte Aktivität und reagierte nach Partialhydrolyse kaum noch (Classen *et al.*, 2005). Daher konnte Arabinose als ein Schlüsselepitop des Antigens herausgestellt werden. Die verstärkte Aktivität der Kraut-AGP-Präparation nach der Partialhydrolyse könnte durch Freilegen weniger nach Partialhydrolyse noch vorhandener und gut dem Antikörper zugänglicher Arabinose-Reste zustande kommen. Da polyklonale Antikörper immer als Gemisch mehrerer, gegen verschiedene Epitope der Antigene gerichteter Antikörper vorkommen, ist es schwer, direkte Rückschlüsse zur Struktur,

gegen die die Antikörper gerichtet sind, zu ziehen. Daher wurden weiterführende Testungen von Mistelkraut- und Mistelbeeren-AGP-Präparationen mit einem gegen *Echinacea purpurea*-AGP generierten monoklonalen Antikörper durchgeführt (Classen *et al.*, 2004). *Echinacea purpurea*-AGP und die Mistelkraut-AGP-Präparation zeigten eine vergleichbare Kreuzreaktivität mit dem monoklonalen Antikörper. Da das für die Testung verwendete AGP aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* aus einer anderen Charge stammte als das für die Antikörperherstellung verwendete, lässt sich folglich erklären, dass das *Echinacea purpurea*-AGP nicht stärker reagierte. Classen *et al.* (2004) zeigten, dass mit Abnahme der Galactose-Konzentration bei anderen AGPs im Vergleich zum *Echinacea purpurea*-AGP aus Presssaft (64 %) es auch zu einer Abnahme der Kreuzreaktivität kam. Die Mistelbeeren-AGP-Präparation reagierte, trotz des viel geringeren Galactose-Gehalts (32,5 %) im Vergleich zur Mistelkraut-AGP-Präparation (53,3 %) und zum *Echinacea purpurea*-AGP (s.o.), viel stärker mit dem monoklonalen Antikörper. Nach partialhydrolytischer Abspaltung der Arabinose zeigte sowohl die Mistelkraut- als auch die Mistelbeeren-AGP-Präparation verstärkte Reaktivität im ELISA, so dass wie beschrieben (Classen *et al.*, 2004) die Arabinose keinen essentiellen Bestandteil des Epitops darstellen kann. Dort wurde auch beschrieben, dass terminale Glucuronsäure im AGP nicht an der Antikörperbindung beteiligt ist. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen reagierte die Kraut-AGP-Präparation vor und nach der Uronsäure-Reduktion ähnlich stark, so dass auch die 1,4-Galacturonsäure keine Beteiligung an der Epitopstruktur hat. Die Mistelbeeren-AGP-Präparation reagierte hingegen nach der Uronsäure-Reduktion deutlich schwächer als vorher, obwohl nur geringe Anteile ausschließlich an terminaler Glucuronsäure vorhanden waren. Abschließend betrachtet ergaben sich somit bei der Untersuchung im kompetitiven ELISA für Kraut-AGP und *Echinacea purpurea*-AGP Stukturähnlichkeiten in Bezug auf Kohlenhydratepitope. Für Mistelbeeren-AGP muss eine abweichende Struktur angenommen werden, bei der trotz des höheren Arabinose-Gehalts mehr gleiche Epitop-Strukturmerkmale pro Molekül vorliegen als in der Mistelkraut-AGP-Präparation und an denen interessanterweise auch die terminalen Glucuronsäuren einen Anteil haben. Da allerdings auch Beeren-Arabinan eine deutliche Kreuzreaktivität mit dem Antikörper zeigte, welches neben hauptsächlich Arabinose nur geringe Anteile an Galactose enthält, konnte zumindest

für Mistelpolysaccharide keine Korrelation des Galactose-Gehalts mit einer Zunahme der Kreuzreaktivität festgestellt werden.

Die Strukturähnlichkeiten von Mistelkraut-AGP mit *Echinacea purpurea*-AGP wurden mittels indirektem ELISA mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern getestet, die gegen unterschiedliche Strukturmerkmale von AGPs generiert worden waren. Der monoklonale Antikörper LM2 ist gerichtet gegen  $\beta$ -Glucuronsäure im AGP und reagiert mit verschiedenen AGPs (Saare-Surminski *et al.*, 2000; Smallwood *et al.*, 1996; Yates *et al.*, 1996). Da die beiden untersuchten AGPs dieses Strukturmerkmal aufwiesen, war die starke Kreuzreaktivität beider AGPs mit dem Antikörper zu erwarten gewesen. LM6 hingegen wurde von Willats *et al.* (1998) als monoklonaler Antikörper spezifisch gegen lineare Ketten aus (1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-Arabinan charakterisiert und zeigte gute Reaktivität mit verschiedenen Polysacchariden, die dieses Strukturmerkmal aufwiesen (McCartney *et al.*, 2000; Orfila *et al.*, 2001; Orfila und Knox, 2000), aber auch mit AGPs aus Moos (Lee *et al.*, 2005). Mistelkraut-AGP und *Echinacea purpurea*-AGP, die Seitenketten mit diesem Strukturmerkmal besaßen, reagierten mit dem Antikörper. Allerdings reagierte Mistelkraut-Arabinan, welches einen deutlich höheren 1,5-Arabinose-Gehalt aufwies, nicht mit dem Antikörper. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass LM6 doch gegen ein anderes Epitop gerichtet ist. Keine Reaktivität zeigten Mistelkraut- (Präparation) und *Echinacea purpurea*-AGP mit dem Antikörper JIM8, der gegen den Glykanteil von AGPs gerichtet ist und auch gut mit sauren Rhamnogalacturonanen reagiert (Gollotte *et al.*, 1995; Kjellbom *et al.*, 1997; Knox, 1997; Osman *et al.*, 1993). *Echinacea purpurea*-AGP enthält weder Rhamnose noch Galacturonsäure (Classen *et al.*, 2004). Die fehlende Reaktivität für die Mistelkraut-AGP-Präparation, die beide Monosaccharide enthält, könnte durch den geringen Gehalt beider Komponenten bedingt sein. Die drei weiteren getesteten monoklonalen Antikörper JIM13, JIM14 und MAC207 sind gegen den Glykanteil in AGPs gerichtet und die Reaktivität verschiedener AGPs mit diesen ist beschrieben (Knox, 1997; Rasmussen *et al.*, 1996; Yates *et al.*, 1996). Beide getesteten AGPs zeigten mit diesen drei Antikörpern wie erwartet eine Kreuzreaktivität. Kraut-Arabinan reagierte bei der Testung der verschiedenen monoklonalen Antikörper nur mit JIM13, der auch mit anderen AGPs, deren Arabinose-Anteil im AGP sehr hoch war, reagierte (Smallwood *et al.*, 1996), so dass

vermutlich Arabinose-haltige Strukturen an der Antikörperbindung beteiligt sind. Es bleibt festzuhalten, dass die monoklonalen Antikörper, die gegen Glykan-Epitope von AGPs gerichtet sind, nicht spezifisch für ein AGP sind, da verschiedene AGPs gleiche Glykan-Strukturen aufweisen. Diese Antikörper eignen sich somit gut zum Nachweis und Vergleich von AGPs mit gleichen Strukturelementen im Polysaccharid-Anteil. Um eine Reaktivität von Antikörpern hinsichtlich des Protein-Cores im AGP zu erreichen, wurde erstmals von Gao *et al.* (1999) ein Antikörper gegen den Proteinteil eines AGPs hergestellt.

### **LAL-Test**

In der Therapie eingesetzte Mistelpräparate werden normalerweise als Injektion verabreicht. Das Europäische Arzneibuch (5. Ausgabe, 2005) schreibt für Injektionszubereitungen eine Prüfung auf Bakterienendotoxine vor. Bei diesem Test wird auf Anwesenheit von Lipopolysacchariden, die Zellwand-Bestandteile von gramnegativen Bakterien darstellen, getestet. Bakterienendotoxine bewirken im Organismus Reaktionen von Fieber bis hin zum Schock oder sogar Tod (Scheer, 1984). Daher ist es für die Standardisierung von Mistelextrakten von großer Bedeutung, auf Kontamination mit LPS zu testen. Von Blaschek (2006) und Zager (2006) wurde für AGPs aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* eine Eigenaktivität im LAL-Test gezeigt, die sich konzentrationsabhängig auch nach Endotoxin-Entfernung zeigte und die auch nicht durch Glukane verursacht war, welche auch zu einer Aktivierung des LAL-Reagenzes führen können (Blaschek *et al.*, 1992).

Die Mistelkraut-AGP-Präparation ergab einen positiven Test auf Bakterienendotoxine, die aufgrund der starken bakteriellen Kontamination des Mistelkrautrohextrakts auch zu erwarten gewesen war. Durch Endotoxin-Entfernung verschob sich die Grenze zur Auslösung der Koagulation um eine Zehnerpotenz von 0,1-1 ng/ml auf 1-10 ng/ml; somit konnte auch nach Endotoxin-Entfernung noch eine deutliche Aktivität im LAL-Test nachgewiesen werden. Die Mistelbeeren-AGP-Präparation zeigte gleiche Reaktivität vor und nach Endotoxin-Entfernung; es ist zu vermuten, dass durch die Reinigung und die Lagerung bei -20 °C der Mistelbeeren oder aber durch die glatte Oberfläche der Beeren weniger mikrobielle Kontamination



vorhanden war. Der Wert für die Beeren-AGP-Präparation lag nach Endotoxin-Entfernung um eine Zehnerpotenz höher als für die Kraut-AGP-Präparation, wahrscheinlich auch bedingt durch die geringere Empfindlichkeit des LAL-Reagenzes. Die Eigenaktivität für Mistellektine und Mistelpolysaccharide im LAL-Test ist beschrieben (Scheer, 1993a; Scheer, 1999). Nach ML-Entfernung führte die Mistelkraut-AGP-Präparation (bzw. hier wieder als Mistelkraut-AGP zu bezeichnen) im getesteten Bereich zu keiner Koagulation des LAL-Reagenzes. Somit war die Eigenaktivität im LAL-Test durch Mistellektine bedingt.

### **Immunologische Aktivität und Testung an Toll-Like-Rezeptoren**

Für verschiedene AGPs sind immunmodulatorische Eigenschaften *in vitro* beschrieben (Classen *et al.*, 2006, Thude *et al.*, 2006). Mistelextrakte besitzen aufgrund ihrer vielfältigen immunstimulatorischen und zytotoxischen Eigenschaften einen festen Stellenwert in der adjuvanten Krebstherapie (Übersichten über die Eigenschaften siehe bei Berg und Stein (2001), Büssing (1999), Klein (2005) sowie in der Einleitung). Als immunmodulatorische Eigenschaften werden unter anderem die Zunahme der Phagozytose-Aktivität von Granulozyten, der Anstieg an NK-Zellen, die Induzierung spezifischer T-Helfer-Zellen durch Reaktion der Mistelextrakte mit Monocyten/Makrophagen, die als Antigen-präsentierende Zellen fungieren, die Zytokinfreisetzung von z.B. IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$  und die Expression kostimulatorischer Moleküle beschrieben (Hajtó, 1986; Hajtó *et al.*, 1997; Heinzerling *et al.*, 2006; Stein und Berg, 1998; Stein und Berg, 1994; Stein *et al.*, 1999d; Stein *et al.*, 1998, Stein *et al.*, 1996). In Bezug auf die Zytotoxizität wurde für Mistellektine *in vitro* eine Korrelation der Apoptose-induzierenden Eigenschaften in Abhängigkeit vom ML-Gehalt (Büssing und Schietzel, 1999) gefunden. Untersuchungen zeigen jedoch, dass außer ML auch andere Inhaltsstoffe aus Mistelextrakten für die Zytotoxizität verantwortlich sein müssen (Eggenschwiler *et al.*, 2007). Da die Zytotoxizität der Mistellektine bedingt durch die Bindung an Polysaccharide abnehmen kann (Doser *et al.*, 1989; Knoepfel-Sidler *et al.*, 2005), wird deutlich, dass die einzelnen Substanzen in den Extrakten sich gegenseitig beeinflussen können. So konnten viele immunmodulierende Wirkungen nicht allein den Lektinen zugesprochen werden. Für die Polysaccharide aus *Viscum album* L., speziell für die Rhamnogalacturonane, wurde eine Zunahme der Zytotoxizität von

NK-Zellen und LAK-Zellen gefunden (Mueller und Anderer, 1990b) und für Oligosaccharide aus dem Mistelextrakt Helixor-M<sup>®</sup> wurde gezeigt, dass die Aktivierung der NK-Zellen durch die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  stimuliert wurde (Mueller und Anderer 1990c). Das aus Mistelbeeren isolierte Arabinogalactan zeigte eine Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, eine Erhöhung von INF- $\gamma$  und eine Stimulation von IL-6 (Stein *et al.*, 1999a). Wagner und Jordan (1988) berichteten über eine *in vitro* Aktivierung des alternativen Wegs des Komplement-Systems durch das von ihnen isolierte saure Arabinogalactan. Auch für die AGPs aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* ist eine Aktivierung sowohl des klassischen als auch des alternativen Wegs des Komplement-Systems bekannt (Alban *et al.*, 2002). Um die immunologischen Eigenschaften der isolierten Mistelkraut- und Mistelbeeren-AGP-Präparationen zu untersuchen bzw. spezifische Rezeptoren zu finden, wurden Testungen auf die Aktivierung von Toll-Like-Rezeptor-transfizierten-HEK-Zellen durchgeführt.

Toll-Like-Rezeptoren sind signalgebende Rezeptoren, die eine wichtige Funktion vor allem im angeborenen Immunsystem zur Pathogenabwehr haben. Als transmembranäre Glykoproteine erkennen sie bestimmte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP). Die Stimulation der verschiedenen TLRs induziert ein bestimmtes Muster der Genexpression, durch die das angeborene Immunsystem aktiviert wird, jedoch kommt es durch die Induktion bestimmter Moleküle auch zur Aktivierung der erworbenen Immunantwort (Dingermann und Vollmar, 2005). TLR2 und TLR4 sind in der äußeren Zellmembran von zahlreichen Immunzellen wie Monozyten/Makrophagen, NK-Zellen und dendritischen Zellen lokalisiert (Kiemer, 2008) und für die Erkennung verschiedener Liganden (siehe Tab. 4.1) verantwortlich (Takeuchi *et al.*, 1999). Nach der Bindung an TLR2 oder 4 wird der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert; dadurch wird die Expression von Zytokinen ausgelöst (Akira und Takeda, 2004). Um herauszufinden ob die Mistelkraut- und Mistelbeeren-AGP-Präparationen das Immunsystem über die Bindung an den TLR2 und/oder 4 von immunkompetenten Zellen aktivieren, wurde auf Aktivierung von TLR2- und TLR4/MD2/CD14-transfizierten-HEK-Zellen, deren Stimulation zur IL-8-Ausschüttung führte, getestet.

## Diskussion der Ergebnisse

---

Tab. 4.1: mögliche Rezeptorliganden für TLR2 und TLR4 nach Akira und Takeda (2004)

Rezeptor	Ligand
TLR2	Lipoproteine/Lipopeptide
	Peptidoglykan
	Lipoteichonsäure
	Lipoarabinomannan
	Phenol-lösliches Modulin
	Glycoinositolphospholipide
	Glycolipide
	Porine
	Atypische Lipopolysaccharide
	Zymosan
TLR4	Lipopolysaccharide
	Taxol
	Fusionsproteine

Es konnte gezeigt werden, dass die Mistelkraut- und Mistelbeeren-AGP-Präparationen genau wie das als Positivkontrolle verwendete LPS eine Stimulation der TLR4-Zellen auslösten. Für die Kraut-AGP-Präparation ergab sich vor Endotoxin-Entfernung eine konzentrationsunabhängige Stimulation, die durch den Gehalt an LPS in der Probe bedingt war. Nach der LPS-Entfernung zeigte die Probe genau wie die Beeren-AGP-Präparation eine konzentrationsabhängige Reaktion. Da die reinen MLs zum Absterben der Zellen führten, wurde eine Pronase-Behandlung (An *et al.*, 2003) durchgeführt, um MLs aus den Kraut-AGP-Präparationen enzymatisch zu verdauen, damit eine Aussage, welche der beiden Komponenten der Präparation – AGP oder Mistellektin – für die Stimulation verantwortlich ist, getroffen werden kann. Durch Geldiffusionstests nach der Endotoxin-Entfernung und der Pronase-Behandlung konnte gezeigt werden, dass unverändert mit dem Yariv-Reagenz fällbares AGP vorlag (ML würde bei der Mitfällung nur einen geringen Teil ausmachen, siehe Analytik). Nach dem Lektin-Verdau (Pronase-Behandlung) zeigte die Kraut-AGP-Präparation eine Stimulation der TLR4-Zellen, die jedoch nicht durch

das AGP, sondern nur durch Endotoxine bedingt war, da nach der Endotoxin-Entfernung keine Reaktion am TLR4 nachweisbar war. Diese Ergebnisse deuten auf keine Aktivierung der TLR4-Zellen durch die Mistel-AGPs, sondern auf die Aktivierung durch Mistellektine hin. Somit zeigte sich übereinstimmend mit den parallel durchgeführten LAL-Tests, dass dieser wie auch die TLR4-Zellen nicht nur auf LPS, sondern auch auf Mistellektine anspricht.

Der TLR2 wird vor allem durch Lipopeptide aktiviert, die häufig bakteriellen Ursprungs sind (Aliprantis *et al.*, 2001; Aliprantis *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2006; Schwandner *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2005). Eine Stimulation von TLR2-Zellen wurde auch bei den Testungen der Mistelkraut- und Mistelbeeren-AGP-Präparationen nur durch Verunreinigung der AGP-Präparation mit Lipopeptiden verursacht. Die Untersuchung zeigt, dass es von essentieller Bedeutung bei biologischen Testungen ist, bakterielle Kontaminationen als Ursache einer Aktivierung der Testsysteme ausschließen zu können. In diesem Zusammenhang wird von PAMP-Kontamination gesprochen und es wird davon ausgegangen, dass einige der potentiellen TLR-Liganden-Bindungen nicht durch die postulierten Liganden, sondern durch Kontamination mit LPS, Lipopeptiden oder anderen mikrobiologischen Komponenten verursacht wurden. So ist beschrieben, dass Oligosaccharide von Hyaluronsäure, Polysaccharid-Fragmente von Heparansulfat, Fibrinogen und auch Hitze-Schock-Proteine möglicherweise nur durch mikrobielle Kontamination bedingt eine Reaktion am TLR4 (für letztere auch TLR2) auslösten (Akira und Takeda, 2004; Tsan und Gao, 2007).

### **Immunfluoreszenz-Markierung**

Die Markierung von AGPs und Lektinen im Mistelspross sollte Erkenntnisse über das Vorliegen beider Naturstoffe in den Sprossgeweben liefern. Für AGPs stellt die Detektion innerhalb der pflanzlichen Gewebe mit monoklonalen Antikörpern eine bekannte Methode zur Untersuchung der physiologischen Funktionen der AGPs und der Lokalisation derselben in den einzelnen pflanzlichen Geweben dar (Knox, 1997; Knox, 2008). Um die Rolle der AGPs in der pflanzlichen Entwicklung zu studieren, wird häufig das Yariv-Reagenz eingesetzt; so können z.B. durch spezifische Fällung der AGPs pflanzliche Entwicklungsprozesse unterbunden werden, die dann

Rückschlüsse auf die biologischen Funktionen der AGPs zulassen (Übersicht siehe Seifert und Roberts, 2007). Um möglichst alle AGPs im Sprossquerschnitt fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen, wurde bei den durchgeführten Untersuchungen dieser Arbeit nicht mit einem monoklonalen AGP-Antikörper, sondern mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz, polyklonalen Antikörpern gegen das  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz und einem sekundären monoklonalen FITC-markierten Antikörper gearbeitet. Bei der Verwendung des  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenzes muss allerdings bedacht werden, dass evtl. auch die Mistellektine an dasselbe binden können; so ist eine vergleichende Betrachtung im Hinblick auf die Bindung der Lektine einmal an den polyklonalen Mistelantikörper, zum anderen an das Yariv-Reagenz unabdingbar (s.h.). Im Sprossquerschnitt konnten Mistel-AGPs vor allem in den sekundär verdickten Zellen des Xylems gefunden werden; in der Literatur wurde über AGPs aus Kiefern-Arten in sich differenzierenden Xylemzellen und in neu gebildeten Tracheiden vor allem in der Mittellamelle berichtet (Loopstra *et al.*, 2000; Putoczki *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2003). Ein AGP aus der Tomate konnte in Tracheen des sekundären Xylems lokalisiert werden (Gao und Showalter, 2000). Als Funktionen der AGPs im Xylem wird über eine Beteiligung an der Xylogenese, der Sekundärwandbildung in Xylemzellen und der Tracheidenentwicklung als Basis für die Holzbildung berichtet (Motose *et al.*, 2004; Putoczki *et al.*, 2007). In Zellen der Sklerenchymkappen des Mistelsprosses ließen sich vor allem im äußeren Bereich der Zellwand AGPs nachweisen. AGPs in Sklerenchymzellen wird eine Beteiligung an der Sekundärwandbildung zugesprochen (Ito *et al.*, 2005).

Zur Detektion von Mistellektin in den Sprossquerschnitten wurden ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der gegen einen Bereich der A-Kette von ML I gerichtet ist, und ein rot-fluoreszierend markierter monoklonaler Anti-Maus-Antikörper verwendet. Der Gehalt an Mistellektinen unterliegt jahreszeitlichen Schwankungen und liegt im Winter am höchsten (Neumann *et al.*, 1986; Scheer, 1993b); daher wurden die für die Immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen verwendeten 1-jährigen Mistelsprosse Anfang Februar geerntet. Die Anfärbung der Lektine zeigte vor allem ein Vorkommen in den Parenchymzellen. Aufgrund der Präparationstechnik kann nicht ausgeschlossen werden, dass viele Zellen zerstört wurden und deren Zellinhalt ausgelaufen ist. Für Mistellektine, vor allem für ML I, wurde vorgeschlagen, dass sie

in den Vakuolen der Zellen vorkommen (Neumann *et al.*, 1986). Die physiologische Funktion der Lektine, die zu den Ribosomen-inaktivierenden Proteinen zählen, ist in der Pflanze unter anderem die Abwehr von Pathogenen und Fraßschutz. Nach Bildung der Lektine im endoplasmatischen Retikulum werden diese mit Hilfe des Golgi-Apparats in die Vakuole transportiert. Einer der Mechanismen, die verhindern, dass die Lektine nicht die Ribosomen der eigenen Pflanze inaktivieren, ist die Bindung an Peptid-Linker; erst nach dem Transport in das Speicherorgan Vakuole wird der Peptid-Linker abgespalten und die Lektine liegen in aktiver Form vor (Übersichten siehe Nielson und Boston, 2001; Rüdiger und Gabius, 2001). Die Detailaufnahmen des parenchymatischen Bereichs der Rinde lassen vermuten, dass sich nur noch Teile des Cytoplasmas in den Zellen befinden und zumindest die Tonoplastenmembran zerstört wurde. ML I liegt somit nach Auslaufen des Vakuoleninhalts frei im Cytoplasma vor. So wäre die stark rote Fluoreszenz-Färbung vor allem an Cytoplasma-Resten zu erklären, die ausgehend vom Plasmalemma in das Zelllumen hineinragen. Die AGP-Färbung mit dem Yariv-Reagenz zeigte für die Parenchymzellen nur eine sehr schwache Fluoreszenz. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch eine Bindung von Mistellektinen an das Yariv-Reagenz stattfand, die jedoch nur sehr viel schwächer ausgeprägt ist als die der AGPs. Die xylematischen Bereiche zeigten nach Lektin-Anfärbung eine sehr viel schwächer ausgeprägte Fluoreszenz als die AGP-Färbung. Die Lektine lagen auch nicht nur in Zellen mit sekundär-verdickten Zellwänden, sondern auch in parenchymatischen Zellen innerhalb des Xylems vor. Deutlich mehr Lektin ließ sich in den Sklerenchymkappen nachweisen. Die Lektine waren jedoch im Gegensatz zum AGP an der Begrenzung der Zellwand nach innen lokalisiert. Somit kann vermutet werden, dass die Lektine nach Ausdifferenzierung zu Sklerenchymzellen (Absterben der Zelle) sich an die Zellwand anlagerten. Abschließend betrachtet konnte durch Immunfluoreszenz-Färbung erstmals das Vorkommen von AGPs vor allem im Zellwand-Bereich von ausdifferenzierten Xylemzellen gezeigt werden. ML I konnte vor allem in Rindenparenchymzellen lokalisiert werden und befindet sich in denselben wahrscheinlich in der Vakuole. Genuin in der Pflanze liegen AGPs und Mistellektine somit hauptsächlich in unterschiedlichen Gewebetypen und auch in unterschiedlichen Zellkompartimenten vor.

## 5 Zusammenfassung

AGPs konnten aus der hochmolekularen Gewichtsfraction wässriger Mistelkraut- und Mistelbeerenextrakte nach spezifischer Fällung mit dem  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz gewonnen werden. Die Bindungstypanalyse des Kohlenhydrat-Anteils der Kraut- und Beeren-AGPs ergab ein Grundgerüst aus 1,3-Gal(p); einige der 1,3-Gal(p)-Einheiten sind über das C 6 mit 1,6-Gal (p)-Seitenketten verknüpft, an die über das C 6 dieser Seitenketten wiederum Seitenketten hauptsächlich bestehend aus 1,5-Ara(f) und abschließend mit 1-Ara(f) angeknüpft sind. Kraut-AGP wies ein Ara:Gal-Verhältnis von 1:1,8; Beeren-AGP hingegen von 1:0,7 auf. Aus der hochmolekularen Polysaccharid-Fraktion der Mistelkraut- und Mistelbeerenextrakte wurden Arabinane isoliert, die hauptsächlich aus 1-Ara(f), 1,5-Ara(f) und 1,3,5-Ara(f) aufgebaut sind, wobei das Kraut-Arabinan bedingt durch den höheren Gehalt an 1,3,5-Ara(f) stärker verzweigt ist. Mistelkraut-AGP und *Echinacea*-AGP zeigten im kompetitiven ELISA unter Verwendung monoklonaler Antikörper ähnliche Reaktivität; dies beweist die Existenz von vergleichbaren Kohlenhydratepitopen in beiden AGPs. Das Mistelbeeren-AGP wies eine im Vergleich zum Mistelkraut- und *Echinacea*-AGP veränderte Reaktivität auf. Aufgrund der Analytik des Protein-Anteils und des Nachweises von Lektinen in den AGP-Präparationen durch SDS-PAGE mit anschließendem Immuno-Blot wurde auf eine Verunreinigung der AGPs mit Mistellektinen geschlossen. Mistellektine waren somit zusammen mit den AGPs isoliert worden, hauptsächlich durch die Bindung der Mistellektine an AGPs, aber wahrscheinlich auch in geringem Anteil durch Mitfällung von Mistellektinen durch das  $\beta$ -glucosyl-Yariv-Reagenz. Die Mistelkraut- und Mistelbeeren-AGP-Präparationen aktivierten nach vorheriger Endotoxin-Entfernung konzentrationsabhängig TLR4-transfizierte-HEK-Zellen zur IL-8-Ausschüttung. Die fehlende IL-8-Ausschüttung nach enzymatischem Lektin-Verdau deutet jedoch auf keine AGP-, sondern auf eine Mistellektin-Aktivität hin. Eine Stimulation von TLR2-Zellen durch die Mistelkraut-AGP-Präparation wurde nur durch Verunreinigung derselben mit Lipopeptiden verursacht. Durch Immunfluoreszenz-Markierung nach unterschiedlicher Anfärbung von AGPs und Lektinen in 1-jährigen Mistelsprossen konnte gezeigt werden, dass Lektine vor allem in parenchymatischem Gewebe, AGPs hingegen in sekundär verdickten Zellwänden des Xylems und des Sklerenchyms vorkommen.

## 6 Abstract

AGPs could be isolated from the high molecular weight fraction of aqueous extracts from *Viscum album* L. herb and berries after precipitation with  $\beta$ -glucosyl-Yariv-reagent. Linkage analysis of the carbohydrate moiety of AGPs from herb and berries revealed a 1,3-Gal(p) backbone, branched at C 6 to 1,6-Gal (p) side chains. These 6-linked Gal(p) residues are mainly substituted with 1,5-Ara(f) side chains ending with 1-Ara(f). AGP from herb showed an Ara:Gal ratio of 1:1.8; whereas AGP from berries had an Ara:Gal ratio of 1:0.7. Arabinans from mistletoe herb and berries purified from the high molecular weight polysaccharide fraction consist of 1-Ara(f), 1,5-Ara(f) and 1,3,5-Ara(f), whereby the arabinan from mistletoe herb is more branched proven by its higher amount of 1,3,5-Ara(f). The competitive ELISA performed with monoclonal antibodies showed similar reactivity of AGP from mistletoe herb and *Echinacea*-AGP, demonstrating the existence of comparable epitope regions on both AGPs. AGP from mistletoe berries showed different reactivity in comparison with the AGPs from mistletoe herb and *Echinacea*. The characterization of protein components and the detection of lectins in the AGP-preparations by SDS-PAGE demonstrated a contamination of AGPs with mistletoe lectins. Mistletoe lectins were isolated together with AGPs, mainly because of their binding to the AGPs. To a smaller extent, they might be precipitated directly by  $\beta$ -glucosyl-Yariv-reagent. AGP-preparations from mistletoe herb and berries after endotoxin removal enhanced dose-dependently the IL-8 release of TLR4-transfected-HEK-cells. A lack of cytokine release after lectin-removal indicates that not AGP but lectins are responsible for the *in vitro* activity. A stimulation of TLR2-cells by the AGP-preparation of mistletoe herb was due to lipopeptide contamination. Different immunofluorescence labelling of AGPs and lectins in one year old shoots of *Viscum album* L. showed that lectins are mainly located in parenchyma cells, whereas AGPs could be detected in the secondary cell walls in the area of xylem and sclerenchyma.



## 7 Literaturverzeichnis

- Akira, S. und Takeda, K. (2004): Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, 4: 499-511.
- 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.
- Aliprantis, A. O., Weiss, D. S., Radolf, J. D., Zychlinsky, A. (2001): Release of Toll-like receptor-2-activating bacterial lipoproteins in *Shigella flexneri* culture supernatants. *Infect. Immun.*, 69: 6248-6255.
- Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P., Zychlinsky, A. (1999): Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*, 285: 736-739.
- An, H. J., Peavy, T. R., Hedrick, J. L., Lebrilla, C. B. (2003): Determination of N-glycosylation sites and site heterogeneity in glycoproteins. *Anal. Chem.*, 75: 5628-5637.
- Aspinall, G. O. (1973): Carbohydrate polymers of plant cell walls. In: Loewus, F. (Hrsg.): *Biogenesis of plant cell wall polysaccharides*, Academic Press, New York, 95-115.
- Aspinall, G. O. (1982): Isolation and fractionation of polysaccharides. In: Aspinall, G. O. (Hrsg.): *The polysaccharides*, Vol. 1, Academic Press, New York
- Bacic, A., Currie, G., Gilson, P., Mau, S.-L., Oxley, D., Schultz, C., Sommer-Knudsen, J., Clarke, A. E. (2000): Structural classes of arabinogalactan-proteins. In: Nothnagel, E. A., Bacic, A., Clarke, A. E. (Hrsg.): *Cell and developmental biology of arabinogalactan-proteins*, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, 11-23.
- Baldwin, T. C., McCann, M. C., Roberts, K. (1993): A novel hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein secreted by suspension-cultured cells of *Daucus carota* – purification and partial characterization. *Plant Physiol.*, 103: 115-123.
- Barlow, B. (1964): Classification of the Loranthaceae and Viscaceae. *Proc. Linn. Soc. N S W*, 89: 268-272.
- Barlow, B. (1981): The Loranthaceae mistletoes in Australia. In: Keast, A. (Hrsg.): *Ecological biogeography of Australia*, Vol. 1, Junk, The Hague.
- Baxevanis, C. N., Voutsas, I. F., Soler, M. H., Gritzapis, A. D., Tsitsilonis, O. E., Stoeva, S., Voelter, W., Arsenis, P., Papamichail, M. (1998): Mistletoe lectin I-induced effects on human cytotoxic lymphocytes. I. Synergism with IL-2 in the induction of enhanced LAK cytotoxicity. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 20: 355-372.

- Becker, H. (2000): European mistletoe: taxonomy, host trees, parts used, physiology. In: Büssing, A. (Hrsg.): Mistletoe – The Genus *Viscum*, Vol. 16, harwood academic publishers, Amsterdam, 31-43.
- Becker, H. (1986): Botany of European mistletoe (*Viscum album* L.). *Oncology*, 43 Suppl 1: 2-7.
- Becker, H. und Scher, J. M. (2005): Kurzer Überblick über die Inhaltsstoffe der Mistel (*Viscum album* L.). In: Scheer, R., Bauer, R., Becker, H., Fintelmann, V., Kemper, F. H., Schilcher, H. (Hrsg.): Fortschritte in der Misteltherapie – Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung, KVC Verlag, Essen, 3-11.
- Berg, P. A. und Stein, G. M. (2001): Einfluss einer Misteltherapie auf die Tumorabwehr – Eine kritische immunologische Analyse. In: Scheer, R., Bauer, R., Becker, H., Berg, P. A., Fintelmann, V. (Hrsg.): Die Mistel in der Tumorthherapie – Grundlagenforschung und Klinik, KVC Verlag, Essen, 95-107.
- Beuth, J., Ko, H. L., Tunggal, L., Buss, G., Jeljaszewicz, J., Steuer, M. K., Pulverer, G. (1994): Immunaktive Wirkung von Mistlektin I in Abhängigkeit von der Dosierung. *Arzneim.-Forsch.*, 44: 1255-1258.
- 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. (2004): Mistelpräparate. In: Bruhn, H. D., Fölsch, U. R., Kneba, M., Löffler, H. (Hrsg.): *Onkologische Therapie*, Schattauer, Stuttgart, 130-140.
- Blaschek, W. (1991): Isolierung und Analytik von Polysacchariden. In: Franz, G. (Hrsg.): *Polysaccharide*, Springer Verlag, Berlin, 17-47.
- Blaschek, W., Zager, A., Classen, B., Ulmer, A. J. (2006): Stimulation of LAL-test by LPS-free arabinogalctan-protein preparations from *Echinacea pupurea*. *Planta Med.*, 72: 1051.
- Blaschek, W., Döll, M., Franz, G. (1992): Activation of *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) by  $\beta$ -glucans. *Pharm. Pharmacol. Lett.*, 1: 118-122.
- Blumenkrantz, N. und Asboe-Hansen, G. (1973): New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, 54: 484-489.
- Büssing, A. (2000a): Introduction: History of mistletoe uses. In: Büssing, A. (Hrsg.): Mistletoe – The Genus *Viscum*, Vol. 16, harwood academic publishers, Amsterdam, 1-6.
- Büssing, A. (2000b): Biological and pharmacological properties of *Viscum album* L. – From tissue flask to man. In: Büssing, A. (Hrsg.): Mistletoe – The Genus *Viscum*, Vol. 16, harwood academic publishers, Amsterdam, 123-182.

- Büssing, A. (1999): Biologische Wirkungen der Mistel. *Z. Onkol.*, 31: 35-43.
- Büssing, A. und Schietzel, M. (1999): Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Res.*, 19: 23-28.
- Büssing, A., Stein, G. M., Wagner, M., Wagner, B., Schaller, G., Pfüller, U., Schietzel, M. (1999a): Accidental cell death and generation of reactive oxygen intermediates in human lymphocytes induced by thionins from *Viscum album* L.. *Eur. J. Biochem.*, 262: 79-87.
- Büssing, A., Stein, G. M., Stumpf, C., Schietzel, M. (1999b): Release of interleukin-6 in cultured B-chronic lymphocytic leukaemia cells is associated with both activation and cell death via apoptosis. *Anticancer Res.*, 19: 3953-3959.
- Capek, P. und Kardošová, A. (1995): Polysaccharides from the flowers of *Malva mauritiana* L.: structure of an arabinogalactan. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 60: 2112-2118.
- Capek, P., Toman, R., Kardošová, A., Rosík, J. (1983): Polysaccharides from the roots of the marsh mallow (*Althaea officinalis* L.): structure of an arabinan. *Carbohydr. Res.*, 117: 133-140.
- Cardoso, S. M., Ferreira, J. A., Mafra, I., Silva, A. M., Coimbra, M. A. (2007): Structural ripening-related changes of the arabinan-rich pectic polysaccharides from olive pulp cell walls. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 7124-7130.
- Carpita, N. C. und Shea, E. M. (1989): Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In: Biermann, C. J., McGinnis, G. D. (Hrsg.): *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 157-216.
- Casu, B. und Gennaro, U. (1975): A conductimetric method for the determination of sulphate and carboxyl groups in heparin and other mucopolysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 39: 168-176.
- Clarke, A. E., Anderson, R. L., Stone, B. A. (1979): Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry*, 18: 521-540.
- Clarke, A. E., Gleeson, P. A., Jermyn, M. A., Knox, R. B. (1978): Characterization and localization of  $\beta$ -lectins in lower and higher plants. *Aust. J. Plant Physiol.*, 5: 707-722.
- Clarke, A. E., Knox, R. B., Jermyn, M. A. (1975): Localization of lectins in legume cotyledons. *J. Cell Sci.*, 19: 157-167.
- Classen, B. (2007): Characterization of an arabinogalactan-protein from suspension culture of *Echinacea purpurea*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 88: 267-275.

- Classen, B., Herbst, B., Blaschek, W., Pfüller, K., Pfüller, U. (2007): Interaction of lectin from *Viscum album* L. with arabinogalactan-proteins from *Echinacea purpurea* L. Moench. *Phytomedicine*, 14 SVII: 46.
- Classen, B., Thude, S., Blaschek, W., Wack, M., Bodinet, C. (2006): Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from *Baptisia* and *Echinacea*. *Phytomedicine*, 13: 688-694.
- 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: 59-66.
- Classen, B., Csávás, M., Borbás, 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., Witthohn, K., Blaschek, W. (2000): Characterization of an arabinogalactan-protein isolated from pressed juice of *Echinacea purpurea* by precipitation with the  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent. *Carbohydr. Res.*, 327: 497-504.
- Deutsches Arzneibuch (DAB) 2007: Monographie: Mistelkraut – Visci herba, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag, Eschborn.
- Dingermann, T. und Vollmar, A. (2005): Immunologie – Grundlagen und Wirkstoffe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 20-23.
- Doser, C., Doser, M., Hülsen, H., Mechelke, F. (1989): Influence of carbohydrates on the cytotoxicity of an aqueous mistletoe drug and of purified mistletoe lectins tested on human T-leukemia cells. *Drug Res.*, 39: 647-651.
- Dourado, F., Madureira, P., Carvalho, V., Coelho, R., Coimbra, M. A., Vilanova, M., Mota, M., Gama, F. M. (2004): Purification, structure and immunobiological activity of an arabinan-rich pectic polysaccharide from the cell walls of *Prunus dulcis* seeds. *Carbohydr. Res.*, 339: 2555-2566.
- Edlund, U., Hensel, A., Fröse, D., Pfüller, U., Scheffler, A. (2000): Polysaccharides from fresh *Viscum album* L. berry extract and their interaction with *Viscum album* agglutinin I. *Drug Res.*, 50: 645-651.
- Eggenschwiler, J., von Balthazar, L., Stritt, B., Pruntsch, D., Ramos, M., Urech, K., Rist, L., Simões-Wüst, A. P., Viviani, A. (2007): Mistletoe lectin is not the only cytotoxic component in fermented preparations of *Viscum album* from white fir (*Abies pectinata*). *BMC Complement Altern. Med.*, 7: 14.
- Eriksson, I., Andersson, R., Westerlund, E., Andersson, R., Åman, P. (1996): Structural features of an arabinan fragment isolated from the water-soluble fraction of dehulled rapeseed. *Carbohydr. Res.*, 281: 161-172.

- Eschenburg, S., Krauspenhaar, R., Mikhailov, A., Stoeva, S., Betzel, C., Voelter, W. (1998): Primary structure and molecular modeling of mistletoe lectin I from *Viscum album*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247: 367-372.
- Escher, P., Eiblmeier, M., Hetzger, I., Rennenberg, H. (2004): Seasonal and spatial variation of carbohydrates in mistletoes (*Viscum album*) and the xylem sap of its hosts (*Populus x euamericana* and *Abies alba*). *Physiol. Plant.*, 120: 212-219.
- Europäisches Arzneibuch 5. Ausgabe, Band 1 Allgemeiner Teil (2005): Prüfung auf Bakterienendotoxine, 201-211, Parenteralia, 851-854, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag, Eschborn.
- Fincher, G. B., Stone, B. A., Clarke, A. E. (1983): Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 34: 47-70.
- Fischer, S., Scheffler, A., Kabelitz, D. (1996): Reaktivität von T-Lymphozyten gegenüber Mistelinhaltsstoffen. In: Scheer, R., Becker, H., Berg, P. A. (Hrsg.): *Grundlagen der Misteltherapie – Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung*, Hippokrates Verlag, Stuttgart, 213-223.
- Franz, H. (1986): Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology*, 43 Suppl 1: 23-34.
- Franz, H., Ziska, P., Kindt, A. (1981): Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.). *Biochem. J.*, 195: 481-484.
- Frohne, D. (2006): *Viscum album* L. – Mistel. In: *Heilpflanzenlexikon*, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 524-528.
- Gao, M. und Showalter, A. M. (2000): Immunolocalization of LeAGP-1, a modular arabinogalactan-protein, reveals its developmentally regulated expression in tomato. *Planta*, 210: 865-874.
- Gao, M. und Showalter, A. M. (1999): Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant J.*, 19: 321-331.
- Gao, M., Kieliszewski, M. J., Lamport, D. T. A., Showalter, A. M. (1999): Isolation, characterization and immunolocalization of a novel, modular tomato arabinogalactan-protein corresponding to the LeAGP-1 gene. *Plant J.*, 18: 43-55.
- Gaspar, Y. M., Nam, J., Schultz, C. J., Lee, L.-Y., Gilson, P. R., Gelvin, S. B., Bacic, A. (2004): Characterization of the *Arabidopsis* lysine-rich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (rat1) that results in a decreased efficiency of *Agrobacterium* transformation. *Plant Physiol.*, 135: 2162-2171.

- Gaspar, Y., Johnson, K. L., McKenna, J. A., Bacic, A., Schultz, C. J. (2001): The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Mol. Biol.*, 47: 161-176.
- Gaultier, M. R. (1907): Action hypotensive de l'extrait aqueux de gui. *La Semaine Médicale*, 43: 513.
- Gleeson, P. A. und 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. und Jermyn, M. A. (1979): Alteration in the composition of  $\beta$ -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.
- Gleeson, P. A., Jermyn, M. A., Clarke, A. E. (1979): Isolation of an arabinogalactan protein by lectin affinity chromatography on tridacnin-sepharose 4B. *Anal. Biochem.*, 92: 41-45.
- Gollotte, A., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. (1995): Immunodetection of infection thread glycoprotein and arabinogalactan protein in wild type *Pisum sativum* (L.) or an isogenic mycorrhiza-resistant mutant interacting with *Glomus mosseae*. *Symbiosis*, 18: 69-85.
- Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H., Schneider, G. (Hrsg.) (1994): *Viscum*. In: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Drogen P-Z, Springer Verlag, Berlin, 1160-1183.
- Hajtó, T. (1986): Immunomodulatory effects of Iscador: a *Viscum album* preparation. *Oncology*, 43 Suppl 1: 51-65.
- Hajtó, T., Hostanska, K., Berki, T., Pálinkás, L., Boldizsár, F., Németh, P. (2005): Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (*Viscum album* agglutinin-I): overview of recent results from *in vitro* experiments and *in vivo* animal models, and their possible relevance for clinical applications. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 2: 59-67.
- Hajtó, T., Hostanska, K., Weber, K., Zinke, H., Fischer, J., Mengs, U., Lentzen, H., Saller, R. (1998): Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Immun.*, 16: 34-46.
- Hajtó, T., Hostanska, K., Fischer, J., Saller, R. (1997): Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity. *Anticancer Drugs*, 8 Suppl 1: 43-46.

- Hamprecht, K., Handgretinger, R., Voetsch, W., Anderer, F. A. (1987): Mediation of human NK-activity by components in extracts of *Viscum album*. Int. J. Immunopharmac., 9: 199-209.
- 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.
- Hashimoto, M., Tawaratsumida, K., Kariya, H., Aoyama, K., Tamura, T., Suda, Y. (2006): Lipoprotein is a predominant Toll-like receptor 2 ligand in *Staphylococcus aureus* cell wall components. Int. Immunol., 18: 355-362.
- Heinzerling, L., von Baehr, V., Liebenthal, C., von Baehr, R., Volk, H. D. (2006): Immunologic effector mechanisms of a standardized mistletoe extract on the function of human monocytes and lymphocytes *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo*. J. Clin. Immunol., 26: 347-359.
- Hostanska, K., Hajt6, T., Fischer, J., Mengers, U., Weber, K., Lentzen, H., Saller, R. (1999): Selective modulation of phosphatidylserine exposure on subpopulations of human peripheral blood lymphocytes by a plant lectin, *Viscum album* agglutinin (VAA)-I and its recombinant form (rVAA) *in vitro*. Cancer Detect. Prev., 23: 511-523.
- Hsieh, M.-C., Shen, Y.-J., Kuo, Y.-H., Hwang, L. S. (2008): Antioxidative activity and active components of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flower extracts. J. Agric. Food Chem., 56: 7010-7016.
- Ito, S., Suzuki, Y., Miyamoto, K., Ueda, J., Yamaguchi, I. (2005): AtFLA11, a fasciclin-like arabinogalactan-protein, specifically localized in sclerenchyma cells. Biosci. Biotechnol. Biochem., 69: 1963-1969.
- Janssen, O., Scheffler, A., Kabelitz, D. (1993): *In vitro* effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins – Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). Drug Res., 43: 1221-1227.
- Jermyn, M. A., Yeow, Y. M., Woods, E. F. (1975): A class of lectins present in the tissues of seed plants. Aust. J. Plant Physiol., 2: 501-531.
- Jordan, E. (1985): Chemische und immunologische Untersuchungen von Polysacchariden und anderen hochmolekularen Inhaltsstoffen aus *Viscum album* (L.). Dissertation, München.
- Jordan, E. und Wagner, H. (1986): Structure and properties of polysaccharides from *Viscum album* (L.). Oncology, 43 Suppl 1: 8-15.

- Kahle, B., Debreczeni, J. É., Sheldrick, G. M., Zeeck, A. (2005): Vergleichende Zytotoxizitätsstudien von Viscotoxin-Isoformen und Röntgenstruktur von Viscotoxin A3 aus Mistelextrakten. In: Scheer, R., Bauer, R., Becker, H., Fintelmann, V., Kemper, F. H., Schilcher, H. (Hrsg.): Fortschritte in der Misteltherapie – Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung, KVC Verlag, Essen, 83-97.
- Karácsonyi, S., Toman, R., Janeček, F., Kubačková, M. (1975): Polysaccharides from the bark of the white willow (*Salix alba* L.): structure of an arabinan. Carbohydr. Res., 44: 285-290.
- Keyhanian, S. und Stahl-Biskup, E. (2007): Phenolic constituents in dried flowers of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis*) and their *in vitro* antioxidative capacity. Planta Med., 73: 599-602.
- Kieliszewski, M. und Lamport, D. T. A. (1987): Purification and partial characterization of a hydroxyproline-rich glycoprotein in a graminaceous monocot. *Zea mays*. Plant Physiol., 85: 823-827.
- Kieliszewski, M. J., Kamyab, A., Leykam, J. F., Lamport, D. T. A. (1992): A histidine-rich extensin from *Zea mays* is an arabinogalactan protein. Plant Physiol., 99: 538-547.
- Kiemer, A. K. (2008): Toll-like-Rezeptoren eröffnen Zugang zu neuen Therapieoptionen. Pharm. Ztg., 153: 188-194.
- Kienle, G. S. und Kiene, H. (2007): Complementary cancer therapy: a systematic review of prospective clinical trials on anthroposophic mistletoe extracts. Eur. J. Med. Res., 12: 103-119.
- Kienle, G. S. und Kiene, H. (2003a): Mistelpflanze und Misteltherapie – eine Einleitung. In: Die Mistel in der Onkologie – Fakten und konzeptionelle Grundlagen, Schattauer, Stuttgart, 4-9.
- Kienle, G. S. und Kiene, H. (2003b): Teil I Präklinische Mistelforschung. In: Die Mistel in der Onkologie – Fakten und konzeptionelle Grundlagen, Schattauer, Stuttgart, 11-123.
- Kienle, G. S. und Kiene, H. (2003c): Teil II Tumorummunologie und Mistelforschung. In: Die Mistel in der Onkologie – Fakten und konzeptionelle Grundlagen, Schattauer, Stuttgart, 125-332.
- Kienle, G. S. und Kiene, H. (2003d): Teil V Wirksamkeitsbeurteilung der Misteltherapie – Klinische Studien. In: Die Mistel in der Onkologie – Fakten und konzeptionelle Grundlagen, Schattauer, Stuttgart, 491-607.
- Kirkup, D. W., Polhill, R. M., Wiens, D. (2000): *Viscum* in the context of its family, Viscaceae, and its diversity in Africa. In: Büssing, A. (Hrsg.): Mistletoe – The Genus *Viscum*, Vol. 16, harwood academic publishers, Amsterdam, 7-29.



- Kjellbom, P., Snogerup, L., Stöhr, C., Reuzeau, C., McCabe, P. F., Pennell, R. I. (1997): Oxidative cross-linking of plasma membrane arabinogalactan proteins. *Plant J.*, 12: 1189-1196.
- Klein, R. (2005): Effekte von Mistelextrakten auf immunkompetente Zellen *in vitro* und *in vivo* und ihre mögliche Bedeutung für die Therapie von Tumorerkrankungen und andere klinische Entitäten. In: Scheer, R., Bauer, R., Becker, H., Fintelmann, V., Kemper, F. H., Schilcher, H. (Hrsg.): Fortschritte in der Misteltherapie – Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung, KVC Verlag, Essen, 207-221.
- Knoepfel-Sidler, F., Viviani, A., Rist, L., Scheer, R., Hensel, A. (2005): *In vitro*-Untersuchungen zur Zytotoxizität verschiedener Mistelpräparate gegenüber humanen Tumorzellen und Zelllinien. In: Scheer, R., Bauer, R., Becker, H., Fintelmann, V., Kemper, F. H., Schilcher, H. (Hrsg.): Fortschritte in der Misteltherapie – Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung, KVC Verlag, Essen, 317-331.
- Knox, J. P. (2008): Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11: 308-313.
- Knox, J. P. (1997): The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *Int. Rev. Cytol.*, 171: 79-120.
- 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: 15956-15965.
- Krauspenhaar, R., Eschenburg, S., Perbandt, M., Kornilov, V., Konareva, N., Mikailova, I., Stoeva, S., Wacker, R., Maier, T., Singh, T., Mikhailov, A., Voelter, W., Betzel, C. (1999): Crystal structure of mistletoe lectin I from *Viscum album*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257: 418-424.
- Kreuger, M. und van Holst, G.-J. (1995): Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, 197: 135-141.
- Krzaczek, T. (1976): Pharmacobotanical research on the sub-species *Viscum album* L. II. Saccharides (author's translation). *Ann. Univ. Mariae Curie Sklodowska*, 31: 281-290.
- Kuijt, J. (1969): The Mistletoes. In: *The biology of parasitic flowering plants*, Univ. of California Press, Berkeley, Los Angeles, 13-52.
- Langan, K. J. und Nothnagel, E. A. (1997): Cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to cell proliferation and viability. *Protoplasma*, 196: 87-98.
- Lee, K. J. D., Sakata, Y., Mau, S.-L., Pettolino, F., Bacic, A., Quatrano, R. S., Knight, C. D., Knox, J. P. (2005): Arabinogalactan proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell.*, 17: 3051-3065.

- Lehmann, J. (1996): Kohlenhydrate – Chemie und Biologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 69-70.
- Loopstra, C. A., Puryear, J. D., No, E.-G. (2000): Purification and cloning of an arabinogalactan-protein from xylem of loblolly pine. *Planta*, 210: 686-689.
- Luettig, B., Steinmüller, C., Gifford, G. E., Wagner, H., Lohmann-Matthes, M.-L. (1989): Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81: 669-675.
- Luther, P. und Becker, H. (1987): Die Mistel – Botanik, Lektine, medizinische Anwendung. Springer Verlag, Berlin, 1-188.
- Luther, P., Theise, H., Chatterjee, B., Karduck, D., Uhlenbruck, G. (1980): The lectin from *Viscum album* L. – Isolation, characterization, properties and structure. *Int. J. Biochem.*, 11: 429-435.
- Madaus, G. (1938): Lehrbuch der biologischen Heilmittel. Bd. III. Georg Thieme, Leipzig, 1885-2864.
- Majewska-Sawka, A. und Nothnagel, E. A. (2000): The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol.*, 122: 3-9.
- Mangenot, G., Rebiffe, J., Roudier, A. (1948): Sur le mucilage du gui. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, 227: 439-441.
- McCartney, L., Ormerod, A. P., Gidley, M. J., Knox, J. P. (2000): Temporal and spatial regulation of pectic (1→4)-β-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. *Plant J.*, 22: 105-113.
- McNamara, M. K. und Stone, B. A. (1981): Isolation, characterization and chemical synthesis of a galactosyl-hydroxyproline linkage compound from wheat endosperm arabinogalactan-peptide. *Lebensm.-Wiss. U. Technol.*, 14: 182-187.
- Metzner, G., Franz, H., Kindt, A., Schumann, I., Fahlbusch, B. (1987): Effects of lectin I from mistletoe (ML I) and its isolated A and B chains on human mononuclear cells: mitogenic activity and lymphokine release. *Pharmazie*, 42: 337-340.
- Meyer, A., Rypniewski, W., Szymanski, M., Voelter, W., Barciszewski, J., Betzel, C. (2008): Structure of mistletoe lectin I from *Viscum album* in complex with the phytohormone zeatin. *Biochim. Biophys. Acta*, doi:10.1016/j.bbapap.2008.07.010.
- Mikeska, R., Wacker, R., Arni, R., Singh, T. P., Mikhailov, A., Gabdoulkhakov, A., Voelter, W., Betzel, C. (2005): Mistletoe lectin I in complex with galactose and lactose reveals distinct sugar-binding properties. *Acta Cryst.*, 61: 17-25.

- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, 84: 407-412.
- Molyneux, P. (2004): The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26: 211-219.
- Motose, H., Sugiyama, M., Fukuda, H. (2004): A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. *Nature*, 429: 873-878.
- Motose, H., Sugiyama, M., Fukuda, H. (2001): An arabinogalactan protein(s) is a key component of a fraction that mediates local intercellular communication involved in tracheary element differentiation of zinnia mesophyll cells. *Plant Cell Physiol.*, 42: 129-137.
- Mueller, E. A. und Anderer, F. A. (1990a): Chemical specificity of effector cell/tumor cell bridging by a *Viscum album* rhamnogalacturonan enhancing cytotoxicity of human NK cells. *Immunopharmacology*, 19: 69-77.
- Mueller, E. A. und Anderer, F. A. (1990b): Synergistic action of a plant rhamnogalacturonan enhancing antitumor cytotoxicity of human natural killer and lymphokine-activated killer cells: chemical specificity of target cell recognition. *Cancer Res.*, 50: 3646-3651.
- Mueller, E. A. und Anderer, F. A. (1990c): A *Viscum album* oligosaccharide activating human natural cytotoxicity is an interferon  $\gamma$  inducer. *Cancer. Immunol. Immunother.*, 32: 221-227.
- Mueller, E. A., Hamprecht, K., Anderer, F. A. (1989): Biochemical characterization of a component in extracts of *Viscum album* enhancing human NK cytotoxicity. *Immunopharmacology*, 17: 11-18.
- Müller, J. (1962): Verfahren zur Gewinnung eines Arzneimittels. Deutsches Patentamt, Auslegeschrift 11 30 113 der Ciba AG, Basel.
- Müthing, J., Meisen, I., Bulau, P., Langer, M., Witthohn, K., Lentzen, H., Neumann, U., Peter-Katalinić, J. (2004): Mistletoe lectin I is a sialic acid-specific lectin with strict preference to gangliosides and glycoproteins with terminal Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc residues. *Biochemistry*, 43: 2996-3007.
- Neumann, D., zur Nieden, U., Ziska, P., Franz, H. (1986): Are the mistletoe lectins storage proteins? *Lectins*, 5: 67-73.
- Nielsen, K. und Boston, R. S. (2001): Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52: 785-816.
- Nierhaus-Wunderwald, D. und Lawrenz, P. (1997): Zur Biologie der Mistel. *Merkbl. Prax.*, 28: 1-8.

- Nothnagel, E. A. (1997): Proteoglycans and related components in plant cells. *Int. Rev. Cytol.*, 174: 195-291.
- Önay-Uçar, E., Karagöz, A., Arda, N. (2006): Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia*, 77: 556-560.
- Olsnes, S., Stirpe, F., Sandvig, K., Pihl, A. (1982): Isolation and characterization of viscummin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). *J. Biol. Chem.*, 257: 13263-13270.
- Orfila, C. und Knox, J. P. (2000): Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp. *Plant Physiol.*, 122: 775-781.
- Orfila, C., Seymour, G. B., Willats, W. G. T., Huxham, I. M., Jarvis, M. C., Dover, C. J., Thompson, A. J., Knox, J. P. (2001): Altered middle lamella homogalacturonan and disrupted deposition of (1→5)- $\alpha$ -L-arabinan in the pericarp of *Cnr*, a ripening mutant of tomato. *Plant Physiol.*, 126: 210-221.
- Osman, M. E., Menzies, A. R., Martin, B. A., Williams, P. A., Phillips, G. O., Baldwin, T. C. (1995): Characterization of gum arabic fractions obtained by anion-exchange chromatography. *Phytochemistry*, 38: 409-417.
- Osman, M. E., Menzies, A. R., Williams, P. A., Phillips, G. O., Baldwin, T. C. (1993): The molecular characterization of the polysaccharide gum from *Acacia senegal*. *Carbohydr. Res.*, 246: 303-318.
- Pennell, R. I., Janniche, L., Scofield, G. N., Booij, H., de Vries, S. C., Roberts, K. (1992): Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. *J. Cell. Biol.*, 119: 1371-1380.
- Pennell, R. I., Janniche, L., Kjellbom, P., Scofield, G. N., Peart, J. M., Roberts, K. (1991): Developmental regulation of a plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oilseed rape flowers. *Plant Cell*, 3: 1317-1326.
- Pfüller, U. (2000): Chemical constituents of European Mistletoe (*Viscum album* L.) – Isolation and characterisation of the main relevant ingredients: lectins, viscotoxins, oligo-/polysaccharides, flavonoids, alkaloids. In: Büssing, A. (Hrsg.): Mistletoe – The Genus *Viscum*, Vol. 16, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 101-122.
- Piccolella, S., Fiorentino, A., Pacifico, S., D'Abrosca, B., Uzzo, P., Monaco, P. (2008): Antioxidant properties of sour cherries (*Prunus cerasus* L.): role of colorless phytochemicals from the methanolic extract of ripe fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 1928-1935.
- Putoczki, T. L., Pettolino, F., Griffin, M. D. W., Möller, R., Gerrard, J. A., Bacic, A., Jackson, S. L. (2007): Characterization of the structure, expression and function of *Pinus radiata* D. Don arabinogalactan-proteins. *Planta*, 226: 1131-1142.

- Qi, W., Fong, C., Lamport, D. T. A. (1991): Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope – A new model based on O-galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site. *Plant Physiol.*, 96: 848-855.
- Rasmussen, U., Johansson, C., Renglin, A., Petersson, C., Bergman, B. (1996): A molecular characterization of the *Gunnera-Nostoc* symbiosis: comparison with *Rhizobium*- and *Agrobacterium*-plant interactions. *New Phytol.*, 133: 391-398.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26: 1231-1237.
- Rechner, A. (2000): Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und antioxidative Kapazität von Apfel- und Beerenobstsäften. Dissertation, Giessen.
- Riberéau-Gayon, G., Dumont, S., Muller, C., Jung, M.-L., Poindron, P., Anton, R. (1996): Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett.*, 109: 33-38.
- Rote Liste 2008: Mistelpräparate, Rote Liste® Service, Frankfurt/Main, 86001-86009.
- Rüdiger, H. und Gabius, H.-J. (2001): Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj. J.*, 18: 589-613.
- Saare-Surminski, K., Preil, W., Knox, J. P., Lieberei, R. (2000): Arabinogalactan proteins in embryogenic and non-embryogenic callus cultures of *Euphorbia pulcherrima*. *Physiol. Plant.*, 108: 180-187.
- Samtleben, R., Kiefer, M., Luther, P. (1985): Characterization of the different lectins from *Viscum album* (mistletoe) and their structural relationships with the agglutinins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. *Lectins*, 4: 617-626.
- Saulnier, L., Brillouet, J.-M., Moutounet, M., Hervé du Penhoat, C., Michon, V. (1992): New investigations of the structure of grape arabinogalactan-protein. *Carbohydr. Res.* 224: 219-235.
- Scheer, R. (1999): Einsatz des LAL-Tests bei der Qualitätssicherung pflanzlicher Arzneimittel. *Swiss Pharma*, 21: 17-23.
- Scheer, R. (1993a): Beeinflussung des Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests durch Mistel-Lektine. *Arzneim.-Forsch.*, 43: 795-800.
- Scheer, R. (1993b): Zur Standardisierung von Mistelpräparaten. *Erfahrungsheilkunde*, 42: 332-337.
- Scheer, R. (1984): Pyrogene und der Limulustest. *Pharm. Unserer Zeit*, 13: 137-146.
- Scheffler, A., Fiebig, H. H., Kabelitz, D., Metelmann, H. R. (1993): Zur direkten Zytotoxizität von Mistelpräparaten. *Erfahrungsheilkunde*, 42: 338-345.

- Scheffler, A., Richter, C., Beffert, M., Errenst, M., Scheer, R. (1996): Differenzierung der Mistelinhaltsstoffe nach Zeit und Ort. In: Scheer, R., Becker, H., Berg, P. A. (Hrsg.): Grundlagen der Misteltherapie – Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung, Hippokrates Verlag, Stuttgart, 49-76.
- Schier, W. (2006): Mistel und Eichenmistel. DAZ, 146: 5462-5464.
- Schilcher, H., Kammerer, S., Wegener, T. (2007): Mistelkraut (*Visci albi herba*). In: Leitfaden Phytotherapie, Urban & Fischer Verlag, München, 183-185.
- Schmeil, O. und Fitschen, J. (2006): Flora von Deutschland und angrenzender Länder, Quelle & Meyer, Wiebelsheim.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., Kirschning, C. J. (1999): Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. J. Biol. Chem., 274: 17406-17409.
- Seifert, G., Jesse, P., Laengler, A., Reindl, T., Lüth, M., Lobitz, S., Henze, G., Prokop, A., Lode, H. N. (2008): Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia *in vivo* and *in vitro*. Cancer Lett., 264: 218-228.
- Seifert, G. J. und Roberts, K. (2007): The biology of arabinogalactan proteins. Annu. Rev. Plant Biol., 58: 137-161.
- Serpe, M. D. und Nothnagel, E. A. (1994): Effects of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. Planta, 193: 542-550.
- Shimizu, T., Kida, Y., Kuwano, K. (2005): A dipalmitoylated lipoprotein from *Mycoplasma pneumoniae* activates NF- $\kappa$ B through TLR1, TLR2, and TLR6. J. Immunol., 175: 4641-4646.
- Showalter, A. M. (2001): Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. Cell. Mol. Life Sci., 58: 1399-1417.
- Siddiqui, I. R. und Wood, P. J. (1974): Structural investigation of oxalate-soluble rapeseed (*Brassica campestris*) polysaccharides – Part III. An arabinan. Carbohydr. Res., 36: 35-44.
- Sitte, P. und Ehrendorfer, F. (2002): Strasburger – Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 824.
- Smallwood, M., Yates, E. A., Willats, W. G. T., Martin, H., Knox, J. P. (1996): Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. Planta, 198: 452-459.
- Soler, M. H., Stoeva, S., Voelter, W. (1998): Complete amino acid sequence of the B chain of mistletoe lectin I. Biochem. Biophys. Res. Commun., 246: 596-601.

- Soler, M. H., Stoeva, S., Schwamborn, C., Wilhelm, S., Stiefel, T., Voelter, W. (1996): Complete amino acid sequence of the A chain of mistletoe lectin I. *FEBS letters*, 399: 153-157.
- Stein, G. M. und Berg, P. A. (1998): Flow cytometric analyses of the specific activation of peripheral blood mononuclear cells from healthy donors after *in vitro* stimulation with a fermented mistletoe extract and mistletoe lectins. *Eur. J. Cancer*, 34: 1105-1110.
- Stein, G. und Berg, P. A. (1994): Non-lectin component in a fermented extract from *Viscum album* L. grown on pines induces proliferation of lymphocytes from healthy and allergic individuals *in vitro*. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 47: 33-38.
- Stein, G. M., Edlund, U., Pfüller, U., Büssing, A., Schietzel, M. (1999a): Influence of polysaccharides from *Viscum album* L. on human lymphocytes, monocytes and granulocytes *in vitro*. *Anticancer Res.*, 19: 3907-3914.
- Stein, G. M., Schaller, G., Pfüller, U., Schietzel, M., Büssing, A. (1999b): Thionins from *Viscum album* L.: influence of the viscotoxins on the activation of granulocytes. *Anticancer Res.*, 19: 1037-1042.
- Stein, G. M., Schaller, G., Pfüller, U., Wagner, M., Wagner, B., Schietzel, M., Büssing, A. (1999c): Characterisation of granulocyte stimulation by thionins from European mistletoe and from wheat. *Biochim. Biophys. Acta*, 1426: 80-90.
- Stein, G. M., Pfüller, U., Schietzel, M. (1999d): Viscotoxin-free aqueous extracts from European mistletoe (*Viscum album* L.) stimulate activity of human granulocytes. *Anticancer Res.*, 19: 2925-2928.
- Stein, G. M., Schietzel, M., Büssing, A. (1998): Mistletoe in immunology and the clinic (short review). *Anticancer Res.*, 18: 3247-3249.
- Stein, G. M., Meink, H., Durst, J., Berg, P. A. (1996): Release of cytokines by a fermented lectin-1 (ML-1) free mistletoe extract reflects differences in the reactivity of PBMC in healthy and allergic individuals and tumour patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 51: 247-252.
- Steiner, R. (1985): *Geisteswissenschaft und Medizin (GA 312)*. 13. Vortrag 2. April 1920, Rudolf Steiner Verlag, Dornach, 252-255.
- Stevens, B. J. H. und Selvendran, R. R. (1980): Structural investigation of an arabinan from cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata). *Phytochemistry*, 19: 559-561.
- Stoeva, S., Maier, T., Soler, M. H., Voelter, W. (1999): Carbohydrate chains and their binding sites in mistletoe lectin I. *Polish J. Chem.*, 73: 125-133.

- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. (1999): Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11: 443-451.
- Taylor, R. L. und Conrad, H. E. (1972): Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry*, 11: 1383-1388.
- Thude, S. (2005): Strukturelle und immunpharmakologische Untersuchungen zu Arabinogalactan-Proteinen und einem Arabinan aus *Echinacea* sp..Dissertation, Kiel.
- Thude, S. und Classen, B. (2005): High molecular weight constituents from roots of *Echinacea pallida*: an arabinogalactan-protein and an arabinan. *Phytochemistry*, 66: 1026-1032.
- Thude, S., Classen, B., Blaschek, W., Barz, D., Thude, H. (2006): Binding studies of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* to leucocytes. *Phytomedicine*, 13: 425-427.
- Tsan, M.-F. und Gao, B. (2007): Pathogen-associated molecular pattern contamination as putative endogenous ligands of Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.*, 13: 6-14.
- Valentiner, U., Pfüller, U., Baum, C., Schumacher, U. (2002): The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cell lines *in vitro*. *Toxicology*, 171: 187-199.
- van Hengel, A. J., van Kammen, A., de Vries, S. C. (2002): A relationship between seed development, arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiol. Plant.*, 114: 637-644.
- van Holst, G. J. und Klis, F. M. (1981): Hydroxyproline glycosides in secretory arabinogalactan-protein of *Phaseolus vulgaris* L.. *Plant. Physiol.*, 68: 979-980.
- Voelter, W., Wacker, R., Tsitsilonis, R., Stoeva, S., Franz, M. (2005): Struktur und Funktion chitinbindender Mistellektine. In: Scheer, R., Bauer, R., Becker, H., Fintelmann, V., Kemper, F. H., Schilcher, H. (Hrsg.): Fortschritte in der Misteltherapie – Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung, KVC Verlag, Essen, 55-68.
- Vollmer, W. (1874): Wörterbuch der Mythologie. Hoffmann'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 95-96.
- Wack, M. (2004): Isolierung und Charakterisierung von Arabinogalactan-Proteinen aus *Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis*. Dissertation, Kiel.



- Wack, M., Classen, B., Blaschek, W. (2005): An acidic arabinogalactan-protein from the roots of *Baptisia tinctoria*. *Planta Med.*, 71: 814-818.
- Wagner, H. und Jordan, E. (1988): An immunologically active arabinogalactan from *Viscum album* `berries`. *Phytochemistry*, 27: 2511-2517.
- Willats, W. G. T. und Knox, J. P. (1996): A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 9: 919-925.
- Willats, W. G. T., Marcus, S. E., Knox, J. P. (1998): Generation of monoclonal antibody specific to (1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -L-arabinan. *Carbohydr. Res.*, 308: 149-152.
- Wu, H.-M., Wong, E., Ogdahl, J., Cheung, A. Y. (2000): A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein. *Plant J.*, 22: 165-176.
- Xu, J., Tan, L., Lamport, D. T. A., Showalter, A. M., Kieliszewski, M. J. (2008): The O-Hyp glycosylation code in tobacco and *Arabidopsis* and a proposed role of Hyp-glycans in secretion. *Phytochemistry*, 69: 1631-1640.
- Yang, J. und Showalter, A. M. (2007): Expression and localization of AtAGP18, a lysine-rich arabinogalactan-protein in *Arabidopsis*. *Planta*, 226: 169-179.
- Yang, J., Sardar, H. S., McGovern, K. R., Zhang, Y., Showalter, A. M. (2007): A lysine-rich arabinogalactan protein in *Arabidopsis* is essential for plant growth and development, including cell division and expansion. *Plant J.*, 49: 629-640.
- Yariv, J., Lis, H., Katchalski, E. (1967): Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochem. J.*, 105: 1C-2C.
- 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.
- Yates, E. A., Valdor, J.-F., Haslam, S. M., Morris, H. R., Dell, A., Mackie, W., Knox, J. P. (1996): Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology*, 6: 131-139.
- Zager, A. (2006): Kontamination von Arabinogalaktan-Proteinen mit Lipopolysacchariden – Untersuchungen mit Hilfe des LAL-Tests. Diplomarbeit, Kiel.
- Zhang, Y., Brown, G., Whetten, R., Loopstra, C. A., Neale, D., Kieliszewski, M. J., Sederoff, R. R. (2003): An arabinogalactan protein associated with secondary cell wall formation in differentiating xylem of loblolly pine. *Plant Mol. Biol.*, 52: 91-102.

- Zhu, H. G., Zollner, T. M., Klein-Franke, A., Anderer, F. A. (1994): Enhancement of MHC-unrestricted cytotoxic activity of human CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> natural killer (NK) cells and CD3<sup>+</sup> T cells by rhamnogalacturonan: target cell specificity and activity against NK-insensitive targets. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 120: 383-388.
- Ziska, P. und Franz, H. (1981): Studies on the interaction of the mistletoe lectin I with carbohydrates. *Experientia*, 37: 219.
- Zuber, D. (2004): Biological flora of Central Europe: *Viscum album* L. *Flora*, 199: 181-203.
- Zykwinska, A., Thibault, J.-F., Ralet, M.-C. (2007): Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged. *J. Exp. Bot.*, 58: 1795-1802.

## Danksagung

---

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. W. Blaschek für die herzliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Bereitstellung des interessanten und sehr vielseitigen Themas. Seine in zahlreichen Diskussionen gebotenen fachlichen Anregungen haben sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Weiterhin möchte ich mich bei Ihm und seiner Frau Heidi Blaschek für viele schöne Treffen, Tagungsabende und die Schaffung einer sehr familiären Atmosphäre bedanken.

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

Für die ausführliche Einführung in das Thema möchte ich mich herzlich bei Frau PD Dr. Birgit Classen bedanken. Mit unermüdlicher Diskussionsbereitschaft und fachlicher Unterstützung stand sie mir während der gesamten Zeit zur Seite.

Frau Prof. Dr. S. Alban danke ich für die Unterstützung im Hinblick auf das Mistelsymposium.

Herrn Dr. Ulrich Girreser danke ich für die Aufnahme der GC-MS-Spektren.

Für die Unterstützung und Einführung in die analytischen Methoden gerade in der Anfangszeit meiner Dissertation danke ich Frau Dr. Maren Wack.

Herrn Dr. Rainer-Bertram Volk danke ich für die Hilfe bei fachlichen Fragen und beim Fotografieren der Mistel.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Helle Lund für die Durchführung der spektrophotometrischen Untersuchungen und für die unzähligen motivierenden Teepausen.

Bei Frau Frauke Rodde möchte ich mich besonders für die Durchführung der Methylierungsanalysen und die perfekte Praktikumsvorbereitung bedanken.

Herrn Kalle Bock danke ich für die Wartung und sofortige Reparatur defekter Geräte.

Frau Kirsten Signus gebührt Dank für das hartnäckige Säubern und Spülen der Laborutensilien.

## Danksagung

---

Den Institutsgärtnern Herrn Carsten thor Straten, Herrn Dietrich Christiansen und dessen Nachfolger Herrn Henning Jahn danke ich für das liebevolle Heranzüchten und Pflegen der Mistel.

Allen Mitarbeitern der Pharmazeutischen Biologie, besonders meinen Mitdoktoranden Jana und Andreas Bossy, Ulrich Breit, Marie Göllner, Inken Groth, Niels Grünewald und Susanne Lühn danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Bei Herrn Andreas Bossy bedanke ich mich für die Overlays der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

Frau Regina Krehl danke ich für die Bereitstellung von autoklavierten Nährmedien.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. habil. M. Mulisch von der Zentralen Mikroskopie der CAU zu Kiel für die Durchführung der Kryoschnitte und die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie.

Herrn Prof. Dr. A. J. Ulmer vom Research Center Borstel danke ich für die Durchführung der Testungen auf immunologische Aktivität.

Für die Überlassung der Mistellektine und die Lektintestung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. U. Pfüller von der Universität Witten/Herdecke recht herzlich bedanken.

Bei Frau Stefanie thor Straten vom Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der CAU zu Kiel möchte ich mich für die Durchführung der Aminosäureanalytik bedanken.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Bernadette Margot Herbst
Geburtsdatum	11. Juli 1979
Geburtsort	Hildesheim
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

1986 – 1990	Grundschule Diekholzen
1990 – 1992	Orientierungsstufe Ost/Hildesheim
1992 – 1999	Scharnhorstgymnasium Hildesheim Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulausbildung

1999 – 2003	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
8/2001	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/2003	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
12/2003 – 5/2004	Pharmaziepraktikum Wülfing Pharma GmbH, Gronau
6/2004 – 11/2004	Pharmaziepraktikum Lornsen Apotheke, Kiel
12/2004	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

### Berufliche Tätigkeit und Weiterbildung

1/2005 – 3/2005	Anstellung als Apothekerin Lornsen Apotheke Kiel
seit 4/2005	Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Blaschek
5/2008	Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik

**Erklärung zu § 10 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung**

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, 23.09.2008

---

Bernadette Margot Herbst