

Isolierung, Charakterisierung und  
Lokalisierung von  
Arabinogalactan-Proteinen aus  
*Echinacea purpurea*



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

vorgelegt  
von  
**Andreas Bossy**  
Kiel, 2008



Referentin: PD. Dr. B. Classen

Korreferent: Prof. Dr. W. Blaschek

Tage der mündlichen Prüfungen: 22.01.2009, 27.01.2009, 02.02.2009

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 22.01.2009

Prof. Dr. Lutz Kipp  
(Dekan)

Für Janne und Dominik

## I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis .....	I
II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	V
III Abkürzungsverzeichnis .....	XI
<b>1. Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. <i>Echinacea purpurea</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2. Inhaltsstoffe .....</b>	<b>14</b>
1.2.1. Niedermolekulare Inhaltsstoffe .....	14
1.2.2. Hochmolekulare Inhaltsstoffe .....	16
1.2.2.1. Polysaccharide.....	16
1.2.2.2. Glykoproteine.....	16
<b>1.3. Arabinogalactan-Proteine .....</b>	<b>17</b>
1.3.2. Aufbau von Arabinogalactan-Proteinen.....	19
1.3.3. Eigenschaften und Funktionen von Arabinogalactan-Proteinen.....	21
<b>1.4. Pharmakologische Bedeutung von <i>Echinacea</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>1.5. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>26</b>
<b>2. Experimenteller Teil .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Verwendetes Drogenmaterial.....</b>	<b>27</b>
2.1.1. Extrakterstellungen .....	27
2.1.2. Aufreinigung des Retentats für die Yariv-Fällung.....	30
2.1.3. Isolierungen der Arabinogalactan-Proteine.....	30
2.1.3.1. Synthese des Yariv-Reagenzes .....	31
2.1.3.2. Yariv-Fällung und Isolierung des AGPs .....	32
<b>2.2. Chemische und chromatographische Methoden .....</b>	<b>33</b>
2.2.1. Charakterisierung des Kohlenhydrat-Anteils.....	33
2.2.1.1. Herstellung von Alditolacetaten.....	33
2.2.1.2. Uronsäurereduktion.....	33
2.2.1.3. Partialhydrolyse.....	34
2.2.1.4. Partialhydrolyse mit anschließender Reduktion.....	35
2.2.1.5. Methylierungsanalyse .....	35
2.2.1.6. Gaschromatographie .....	38

# INHALTSVERZEICHNIS

2.2.1.7. Gaschromatographie / Massenspektrometrie .....	39
2.2.2. Charakterisierung des Protein-Anteils .....	40
2.2.2.1. Aminosäurezusammensetzung .....	40
2.2.2.2. Gehaltsbestimmung von Hydroxyprolin im AGP .....	40
2.2.2.3. Alkalische Hydrolyse .....	41
2.2.3. Gelpermeationschromatographie .....	42
<b>2.3. Immunologische Methoden .....</b>	<b>43</b>
2.3.1. Herstellung von polyklonalen $\beta$ GlcY-Antikörpern .....	43
2.3.2. ELISA .....	44
<b>2.4. Mikroskopie .....</b>	<b>46</b>
2.4.1. Cryo-Schnitte sekundärer Wurzeln .....	46
2.4.2. Cryoschnitte von Keimlingen von <i>Echinacea purpurea</i> .....	46
2.4.3. Mikrotom-Schnitte .....	46
2.4.4. Pufferlösungen .....	47
2.4.5. Herstellung Mowiol-DABCO .....	47
2.4.6. Immunmarkierung der AGPs am Cryoschnitt .....	47
<b>2.5. Andere Methoden .....</b>	<b>49</b>
2.5.1. Geldiffusionstest .....	49
2.5.2. Antioxidative Kapazität / Trolox Test .....	49
<b>3. Analytische Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1. Ausbeuten .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2. Charakterisierung des Kohlenhydratanteils .....</b>	<b>50</b>
3.2.1. Ermittlung der relativen Retentionen und der Response-Faktoren .....	50
3.2.2. Neutralzuckerzusammensetzungen von Retentat und Filtrat .....	51
3.2.2.1. Retentat I .....	52
3.2.2.2. Retentat II .....	53
3.2.2.3. Retentat III .....	55
3.2.2.4. Retentat IV .....	57
3.2.2.5. Filtrat .....	58
3.2.2.6. Retentatgemisch .....	60
3.2.2.7. Vergleich aller Neutralzuckeranalysen .....	62
3.2.3. Neutralzuckerzusammensetzungen der AGPs .....	63
3.2.3.1. Arabinogalactan-Protein aus Retentat I .....	63

# INHALTSVERZEICHNIS

3.2.3.2. Arabinogalactan-Protein aus Retentat II .....	65
3.2.3.3. Arabinogalactan-Protein aus Retentat III.....	66
3.2.3.4. Arabinogalactan-Protein aus Retentat IV.....	68
3.2.3.5. Arabinogalactan-Protein aus Retentatgemisch .....	70
3.2.3.6. Arabinogalactan-Protein aus aufgereinigtem Retentatgemisch .....	72
3.2.3.7. Vergleich aller Neutralzuckeranalysen der Arabinogalactan-Proteine .....	73
3.2.4. Bindungstypanalysen .....	75
3.2.4.1. Analyse der PMAAs des nativen AGPs.....	78
3.2.4.2. Analyse der PMAAs des uronsäurereduzierten AGPs.....	80
3.2.4.3. Analyse der PMAAs des partialhydrolysierten AGPs .....	82
3.2.4.4. Analyse der PMAAs des uronsäurereduzierten und partialhydrolysierten AGPs .....	85
3.2.4.5. Vergleich der Methylierungsanalysen des AGPs bzw. seiner Fraktionen .....	87
<b>3.3. Charakterisierung des Proteinanteils.....</b>	<b>90</b>
3.3.1. Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils des AGPs.....	90
3.3.2. Hydroxyprolinbestimmung .....	91
3.3.3. Alkalische Hydrolyse .....	92
<b>3.5. Molekulargewichtsbestimmung.....</b>	<b>93</b>
<b>4. Mikroskopische Lokalisierung der AGPs.....</b>	<b>95</b>
<b>4.1. ELISA.....</b>	<b>95</b>
<b>4.2. Immunlokalisierung der Arabinogalactan-Proteine.....</b>	<b>96</b>
4.2.1. Lokalisierung mittels polyklonaler Antikörper gegen AGP .....	96
4.2.1.1. Mikroskopische Aufnahmen .....	97
4.2.2. Entwicklung einer neuen Methode zur Lokalisierung aller yarivbindenden AGPs mittels $\beta$ GlcY und Antikörper gegen $\beta$ GlcY .....	98
4.2.2.1. Kontrollen .....	99
4.2.2.2. Konzentrationsfindung.....	100
4.2.2.3. Mikroskopische Aufnahmen der Keimwurzel .....	101
4.2.2.4. Mikroskopische Aufnahmen der sekundären Wurzel.....	102
<b>5. Sonstige Ergebnisse.....</b>	<b>112</b>
<b>5.1. Geldiffusionstest .....</b>	<b>112</b>

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>5.2. Antioxidative Kapazität.....</b>	<b>113</b>
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>115</b>
<b>6.1. Isolierung und Charakterisierung des Arabinogalactan-Proteins .....</b>	<b>116</b>
6.1.1. Isolierung des Arabinogalactan-Proteins .....	116
6.1.2. Charakterisierung und Struktur des Arabingalactan-Proteins.....	118
6.1.2.1 Charakterisierung des Kohlenhydratanteils .....	119
6.1.2.2. Charakterisierung des Proteinanteils.....	125
<b>6.2. Lokalisierung und mögliche Funktionen der Arabinogalactan-Proteine</b> <b>.....</b>	<b>127</b>
<b>7. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>134</b>
<b>8. Bibliographie.....</b>	<b>137</b>
IV. Abstract .....	CLII
V Danksagung und Lebenslauf.....	CLIV
VI Ehrenwörtliche Erklärung zu §10 Absatz 2 Nr. 2 der Promotionsordnung .....	CLVII



## II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1: <i>Echinacea purpurea</i> (L.) MOENCH .....	13
Abbildung 1.2: Struktur des Kaffeesäurederivates Echinacosid.....	15
Abbildung 1.3: Struktur der Cichoriensäure .....	15
Abbildung 1.4: Struktur des <i>Echinacea</i> -Alkamids Dodeca-2E, -4E, -8Z, -10Z- Tetraensäure-isobutylamid .....	16
Abbildung 1.5: Strukturausschnitt eines Typ I-AGs nach Clarke et al., 1979.....	18
Abbildung 1.6: Strukturausschnitt eines Typ II Lärchen-AGs .....	18
Abbildung 1.7: links: Aufbau eines AGPs nach dem „wattle-blossom“-Modell nach Fincher, 1983; rechts: Akazienblüte als Namensgeber (Internet <sup>1</sup> ).....	19
Abbildung 1.8: Aufbau eines AGPs nach dem „twisted hairy rope“-Modell. Bacic, 2003 nach Qi, 1991 .....	20
Abbildung 1.9: Aufbau eines AGPs aus Gummi arabicum. Sanchez et al., 2008 .....	20
Abbildung 1.10: Struktur des Anandamids .....	25
Abbildung 2.1: Isolierungsweg vom Ausgangsmaterial zum AGP .....	28
Abbildung 2.2: Synthese des (β-D-Glc) <sub>3</sub> Yariv-Phenylglycosids.....	31
Abbildung 2.3: Reaktionsschema zur Herstellung von Alditolacetaten .....	33
Abbildung 2.4: Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad.....	34
Abbildung 2.5: Reaktionsschema der Methylierungsanalyse .....	35
Abbildung 2.6: Aufbau ELISA .....	44
Abbildung 2.7: Pipettierschema ELISA für AGP .....	45
Tabelle 3.1: Relative Retentionen und Response-Faktoren der Zucker nach Derivatisierung zu Alditolacetaten und Vermessung im Gaschromatographen	51
Abbildung 3.1: Gaschromatogramm der Alditolacetate aus Retentat I .....	52
Tabelle 3.2: Massenprozentuale Zusammensetzung der Neutralzucker aus Retentat I .....	52
Abbildung 3.2: Neutralzuckerzusammensetzung: Retentat I.....	53
Abbildung 3.3: Gaschromatogramm der Alditolacetate aus Retentat II.....	54
Tabelle 3.3: Massenprozentuale Zusammensetzung der Neutralzucker aus Retentat II .....	54
Abbildung 3.4: Neutralzuckerzusammensetzung: Retentat II .....	55
Abbildung 3.5: Gaschromatogramm der Alditolacetate aus Retentat III.....	55

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.4: Massenprozentuale Zusammensetzung der Neutralzucker aus Retentat III .....	56
Abbildung 3.6: Neutralzuckerzusammensetzung: Retentat III .....	56
Abbildung 3.7: Gaschromatogramm der Alditolacetate aus Retentat IV .....	57
Tabelle 3.5: Massenprozentuale Zusammensetzung der Neutralzuckeranalyse aus Retentat IV .....	57
Abbildung 3.8: Neutralzuckerzusammensetzung: Retentat IV .....	58
Abbildung 3.9: Gaschromatogramm der Alditolacetate aus Filtrat I .....	59
Tabelle 3.6: Massenprozentuale Zusammensetzung der Neutralzucker von Filtrat I .....	59
Abbildung 3.10: Neutralzuckerzusammensetzung: Filtrat I .....	60
Abbildung 3.11: Gaschromatogramm der Alditolacetate aus dem Retentatgemisch .....	60
Tabelle 3.7: Massenprozentuale Zusammensetzung der Neutralzucker des Retentatgemisches .....	61
Abbildung 3.12: Neutralzuckerzusammensetzung des Retentatgemisches .....	61
Abbildung 3.13: Vergleich aller Neutralzuckeranalysen .....	62
Abbildung 3.14: Gaschromatogramm des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat I .....	63
Tabelle 3.8: Massenprozentuale Neutralzuckerzusammensetzung des AGPs aus Retentat I .....	64
Abbildung 3.15: Neutralzuckerzusammensetzung des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat I .....	64
Abbildung 3.16: Gaschromatogramm des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat II .....	65
Tabelle 3.9: Massenprozentuale Neutralzuckerzusammensetzung des AGPs aus Retentat II .....	65
Abbildung 3.17: Neutralzuckerzusammensetzung des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat II .....	66
Abbildung 3.18: Gaschromatogramm des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat III .....	67
Tabelle 3.10: Massenprozentuale Neutralzuckerzusammensetzung des AGPs aus Retentat III .....	67

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 3.19: Neutralzuckerzusammensetzung des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat III .....	68
Abbildung 3.20: Gaschromatogramm des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat IV .....	68
Tabelle 3.11: Massenprozentuale Neutralzuckerzusammensetzung des AGPs aus Retentat IV .....	69
Abbildung 3.21: Neutralzuckerzusammensetzung des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat IV .....	69
Abbildung 3.22: Gaschromatogramm des Arabinogalactan-Proteins aus dem Retentatgemisch .....	70
Tabelle 3.12: Massenprozentuale Neutralzuckerzusammensetzung des AGPs aus dem Retentatgemisch .....	70
Abbildung 3.23: Neutralzuckerzusammensetzung des Arabinogalactan-Proteins aus dem Retentatgemisch .....	71
Abbildung 3.24: Gaschromatogramm des Arabinogalactan-Proteins aus dem aufgereinigten Retentatgemisch .....	72
Tabelle 3.13: Massenprozentuale Neutralzuckerzusammensetzung des AGPs aus dem aufgereinigten Retentatgemisch .....	72
Abbildung 3.25: Neutralzuckerzusammensetzung des Arabinogalactan-Proteins aus dem aufgereinigten Retentatgemisch .....	73
Abbildung 3.26: Vergleich aller Neutralzuckeranalysen der Arabinogalactan-Proteine .....	74
Tabelle 3.14: Vergleich der Neutralzuckerzusammensetzungen der yarivgefällten AGPs .....	74
Abbildung 3.27: Beispielhafte Auswertung der ersten beiden Peaks im TIC mit den jeweiligen Massenspektren von 1-Araf und 1,5-Araf .....	77
Abbildung 3.28: Gaschromatogramm der PMAAs des nativen AGPs .....	78
Tabelle 3.15: Gehalt (mol/mol) der identifizierten PMAAs im nativen AGP; tr = traces <2% .....	79
Tabelle 3.16: Gehalt der Neutralzucker im AGP nach der Acetylierungs- bzw. Methylierungsanalyse; tr = traces <2% .....	79
Abbildung 3.29: Neutralzuckerzusammensetzung des AGPs nach der Acetylierungs- bzw. Methylierungsanalyse .....	80

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 3.30: Gaschromatogramm der PMAAs des reduzierten AGPs.....	81
Tabelle 3.17: Gehalt (mol/mol) der identifizierten PMAAs im uronsäurereduzierten AGP; tr = traces <2%.....	81
Tabelle 3.18: Gehalt der Neutralzucker im AGP nach der Acetylierungs- bzw. Methylierungsanalyse; tr = traces <2%.....	82
Abbildung 3.31: Gaschromatogramm der PMAAs des partialhydrolysierten AGPs .....	83
Tabelle 3.19: Gehalt (mol/mol) der identifizierten PMAAs im partialhydrolysierten AGP; tr = traces <2%.....	83
Tabelle 3.20: Gehalt der Neutralzucker im partialhydrolysierten AGP nach der Acetylierungs- bzw- Methylierungsanalyse.....	84
Abbildung 3.32: Neutralzuckerzusammensetzung des partialhydrolysierten AGPs nach der Acetylierungs- bzw- Methylierungsanalyse.....	84
Abbildung 3.33: Gaschromatogramm der PMAAs des uronsäurereduzierten und partialhydrolysierten AGPs .....	85
Tabelle 3.21: Gehalt (mol/mol) der identifizierten PMAAs im uronsäurereduzierten und partialhydrolysierten AGP; tr = traces <2%.....	86
Tabelle 3.22: Summe der jeweils identifizierten Zucker der PMAAs des uronsäurereduzierten und partialhydrolysierten AGPs. tr = traces <2%.....	86
Abbildung 3.34: Vergleich der Chromatogramme der PMAA-Analysen .....	87
Abbildung 3.35: Vergleich der PMAA-Zusammensetzung des AGPs bzw. seiner Fraktionen .....	89
Tabelle 3.23: Werte der PMAA-Zusammensetzung des AGPs bzw. seiner Fraktionen .....	89
Abbildung 3.36: Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils des AGPs (mol/mol).....	90
Abbildung 3.37: Kalibriergerade der photometrischen Hydroxyprolin-Bestimmung mit eingetragenen Probenwert (rot) .....	91
Abbildung 3.38: Ergebnisse der Aminosäureanalytik der alkalischen Hydrolyse.....	92
Abbildung 3.39: Kalibriergerade #1 von Pullulan-Standards, Auswertung über den MALLS-Detektor .....	93
Abbildung 3.40: Kalibriergerade #2 von Pullulan-Standards, Auswertung über den MALLS-Detektor .....	94

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 4.1: Auswertung ELISA.....	95
Abbildung 4.2: Schaubild der Immunlokalisierung von AGPs mit Hilfe polyklonaler Antikörper .....	96
Abbildung 4.3: AGP-FITC-Markierung im Blattstiel von <i>E. purpurea</i> mittels polyklonaler Antikörper gegen AGP (Zentrale Mikroskopie, Universität Kiel).....	97
Abbildung 4.4: Schaubild der Immunlokalisierung von yarivbindenden AGPs mit Hilfe von $\beta$ GlcY und einem Anti- $\beta$ GlcY-Antikörper .....	98
Abbildung 4.5: Negativkontrollen der Immunmarkierung .....	99
Abbildung 4.6: Ermittlung der optimalen Konzentration an $\beta$ GlcY.....	100
Abbildung 4.7: Immunmarkierung der AGPs an einer siebentägigen Keimwurzel .....	101
Abbildung 4.8.1: Immunmarkierungen von AGPs in der sekundären Wurzel von <i>Echinacea purpurea</i> .....	103
Abbildung 4.8.2: Immunmarkierungen von AGPs in der sekundären Wurzel von <i>Echinacea purpurea</i> .....	104
Abbildung 4.9: Vergrößerung der Abbildung 4.8.1, Bild 1b .....	106
Abbildung 4.10: Vergrößerung der Abbildung 4.8.1, Bild 2b .....	107
Abbildung 4.11: Vergrößerung der Abbildung 4.8.2, Bild 3b .....	108
Abbildung 4.12: Vergrößerung der Abbildung 4.8.2, Bild 4b .....	109
Abbildung 4.13: Ausschnitt aus dem xylematischen Gewebe .....	110
Abbildung 4.14: Eine weitere Vergrößerung vermutlich tracheidaler Elemente.....	111
Abbildung 5.1: Geldiffusionstest AGP (1mg/ml respektive 5mg/ml) gegen Yariv-Lösung (1mg/ml).....	112
Tabelle 5.1: Erstellung der Trolox-Kalibrierreihen, Absorption bei 734 nm. ....	113
Abbildung 5.2: Kalibriergeraden zur Ermittlung des TEAC-Wertes.....	113
Tabelle 5.2: mittlere Absorption des ABTS <sup>+</sup> -Kations unter AGP-Zusatz bei 734 nm .....	114
Tabelle 5.3: TEAC des AGPs .....	114
Tabelle 6.1: Vergleich der Ausbeuten von AGP verschiedener Ausgangsmaterialien .....	118
Abbildung 6.1: Vergleich der Zuckerzusammensetzung des untersuchten AGPs zu anderen AGPs.....	119

ABBILDUNGSVERZEICHNIS  
TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 6.2: Strukturvorschlag eines Ausschnittes des Polysaccharidteils, basierend auf den molaren Verhältnissen der einzelnen Zuckerbausteine.....	123
Abbildung 6.3: Variante des Strukturvorschlags .....	123
Abbildung 6.4: Zusammensetzung des Proteinanteils verschiedener AGPs .....	126
Abbildung 6.5: Beispiel einer Glykosylierung des Protein-Rückgrats mit AGs vom Typ II, X=Ser, Thr, Ala.....	126
Abbildung 6.6: Beispiel einer Glykosylierung des Protein-Rückgrats mit kurzen Araf-Ketten.....	127
Abbildung 6.7: Vergleich einer Anfärbung von Handschnitten von <i>Pinus radiata</i> .....	128
Abbildung 6.8: Vorschlag eines Plasmamembran-Aufbaus unter Einbeziehung eines AGPs .....	130

### III Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
AFM	Atomic Force Microscopy
AG	Arabinogalactan
$\alpha$ GalY	( $\alpha$ -D-Gal) <sub>3</sub> Yariv-Phenylglycosids
AGP	Arabinogalactan-Protein
aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
aqua dem.	demineralisiertes Wasser
AK	Antikörper
Ala	Alanin
Ara	Arabinose
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
$\beta$ GlcY	( $\beta$ -D-Glc) <sub>3</sub> Yariv-Phenylglycosid
BSA	Rinderserumalbumin
CB1	Cannabinoid Rezeptor Typ I
CB2	Cannabinoid Rezeptor Typ II
Ch.	Charge
CLSM	Konfokales Laser-Raster Mikroskop
Cys	Cystein
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)-octan
Dimethyl-	Dimethylsulfinyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
<i>f</i>	furanosidisch
Fa.	Firma
FID	Flammenionisationsdetektor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Gal	Galactose
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe
GC	Gaschromatographie / Gaschromatograph
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GPC	Gelpermeationschromatographie
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRGP	hydroxyprolinreiches Glykoprotein
Hyp	Hydroxyprolin
IgG	Immunglobulin G
Ile	Isoleucin

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

iZ	innere Zellwand
KFA	Komplettes Freund Adjuvans
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
L.	Linnaeus
LAF	Laminar Air Flow
Laser	Light Amplification through Stimulated Emission of Radiation
LDL	low density lipoprotein
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MALLS	Multi-Angle-Laser-Light-Scattering
MALT	Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe
Man	Mannose
Met	Methionin
ML	Mittellamelle
MS	Massenspektrometrie / Markstrahl
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewichtsausschlussgrenze
NZW	New Zealand White
OT	Objektträger
<i>p</i>	pyranosidisch
PBS	Phoshat gepufferte Salzlösung
Phe	Phenylalanin
PMAA	permethyliertes Alditolacetat
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
Pro	Prolin
PRP	Prolinreiches-Protein
pX	primäres Xylem
Rha	Rhamnose
RT	Raumtemperatur
SEC	Größenausschlusschromatographie
Ser	Serin
Sk	Sklerenchym
sX	sekundäres Xylem
TBS	Tris Buffered Saline
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidative Capacity
TEM	Transmissions Elektronen Mikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
TFF	Tangentialflussfiltration
Thr	Threonin
TIC	Totalionenchromatogramm
Tk	Tüpfelkanäle
Tr	Tracheidales Gefäß
tr	traces
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tyr	Tyrosin
US	United States
Val	Valin
WCOT	Wall Coated Open Tubular
Xyl	Xylose



### 1. Einleitung und Zielsetzung



Abbildung 1.1: *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH

#### 1.1. *Echinacea purpurea*

*Echinacea purpurea* (L.) MOENCH, Asteraceae (siehe Abbildung 1.1), ist eine 60-180 cm hohe, ausdauernde Pflanze mit kräftiger, aufrechter und verzweigter Sprossachse. Diese ist schwach rauhaarig, die Grundblätter sind eiförmig bis eiförmig-lanzettlich, zugespitzt und grob oder scharf gesägt. Der Blattstiel ist bis zu 25 cm lang. Die Blattspreite ist bis zu 20 cm lang und 15 cm breit, zur Basis hin etwas schmaler und oft herzförmig. Die Stängelblätter sind unten gestielt und oberwärts sitzend, 7-20 cm lang, 1,5-8 cm breit, grob gesägt bis ganzrandig und beidseitig rau. Die Hüllblätter sind lineal-lanzettlich, verschmälert, ganzrandig bis grob gesägt und an der Außenseite behaart. Am Rand sind sie gewimpert und sie gehen in die Spreublätter über. Die Zungenblüten sind 1,5-3 cm lang, 5-10 mm breit und purpurn. Die Spreublätter sind 9-13 mm lang. Die Länge der Röhrenblüten beträgt 4,5-5,5 mm. Die Pollenkörner sind gelb mit einem Durchmesser von 19-21  $\mu\text{m}$  und weisen eine warzige Exine auf (McGregor, 1968). Als besonderes Merkmal gilt, dass die Spreublätter der Röhrenblüten diese wie Igelstacheln überragen,

weshalb die Pflanzengattung umgangssprachlich auch als „Igelkopf“ bezeichnet wird.

### **1.2. Inhaltsstoffe**

Die Kenntnis der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe ist im Sektor der pflanzlichen Arzneimittel häufig nicht gegeben. So gibt es zahlreiche pflanzliche Präparate, von denen der Gesamtextrakt als pharmakologisch aktiv gilt, warum und auf welche Weise dieser Extrakt eine pharmakologische Wirkung hat, ist oft unbekannt. Auch die Zuordnung des aktiven immunmodulierenden Prinzips von Arzneimitteln aus *Echinacea* zu einem ihrer Inhaltsstoffe ist bis heute nicht gelungen und wird weiterhin diskutiert (Blaschek et al., 1998). Zum besseren Verständnis möglicher Wirkungsweisen ist die Charakterisierung der Inhaltsstoffe von *Echinacea* der erste Schritt.

#### **1.2.1. Niedermolekulare Inhaltsstoffe**

Neben den näher untersuchten Glykoproteinen (s.u.) findet sich ein großes Spektrum an niedermolekularen Inhaltsstoffen in der Gattung *Echinacea*. So wurden Kaffeesäurederivate wie das Echinacosid (Stoll et al., 1950; Bauer et al., 1987) und die Cichoriensäure (Bauer et al., 1988), Flavonoidderivate wie Quercetin und Kämpferol (Malonga-Makosi, 1983), Polyacetylene (Bohlmann, 1973) und Alkamide, in erster Linie vom Typ des Dodecatetraensäureisobutylamids (Bauer et al. 1988), nachgewiesen. Echinacosid (siehe Abbildung 1.2) als Kaffeesäurederivat wurde hierbei in relativ hohen Konzentrationen von 1-3% (m/m) in den getrockneten Wurzeln von *E. pallida* und *E. angustifolia* nachgewiesen, wogegen es in den Extrakten der Wurzel von *E. purpurea* nur in Spuren auftritt (Schulz et al., 2002).

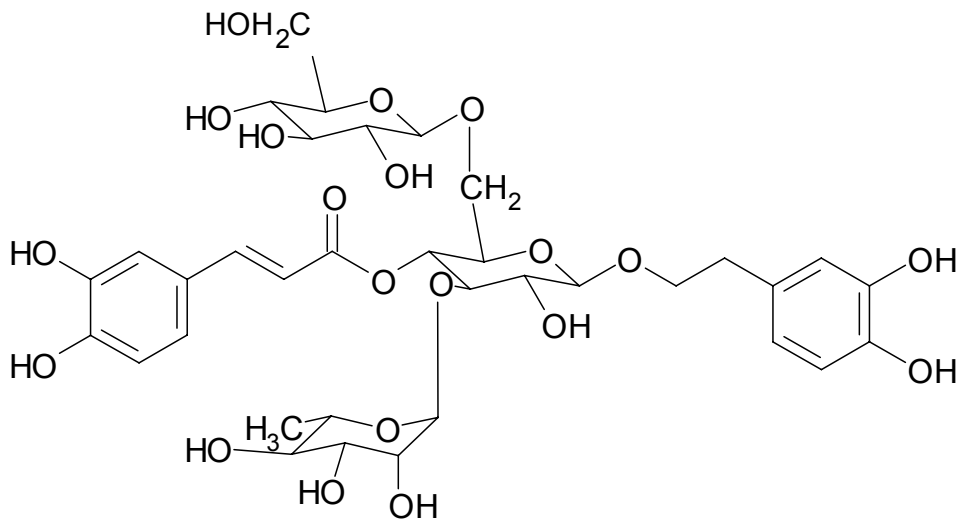


Abbildung 1.2: Struktur des Kaffeesäurederivates Echinacosid

Der Gehalt an Alkamiden (siehe Abbildung 1.4) in *E. purpurea* liegt bei circa 0,5% und der der Cichoriensäure (siehe Abbildung 1.3) zwischen 0,5% und 1%. Sie sind jedoch stark abhängig von den Wachstumsbedingungen und Erntezeitpunkten. So ist der Alkamidgehalt in den zweijährigen Wurzeln signifikant höher als in den dreijährigen Wurzeln. Darüber hinaus erhöht eine Trockenperiode während der einsetzenden Blütezeit den Gehalt an Cichoriensäure (Gray et al., 2003). Dieser ist in *E. purpurea*, verglichen mit anderen Arten, am höchsten (Binns et al., 2002).

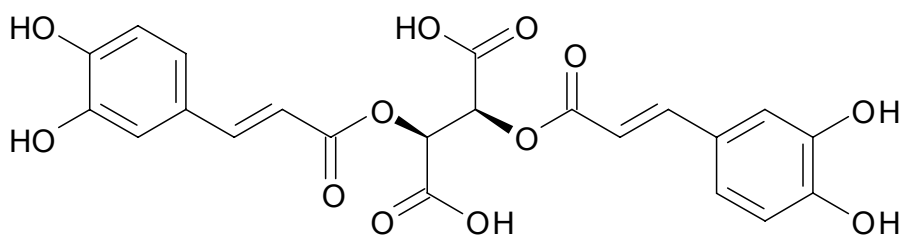


Abbildung 1.3: Struktur der Cichoriensäure

Während der Lagerung der getrockneten Wurzeln unterliegt insbesondere der Alkamidgehalt großen Schwankungen, wobei die Abnahme des Gehaltes in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur und Aufbewahrungszeit zu sehen ist (Perry et al., 2000).

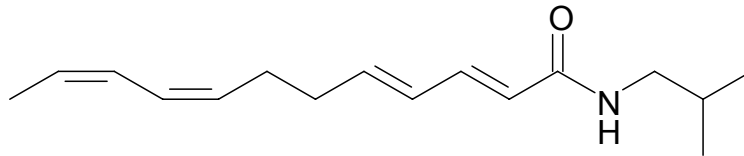


Abbildung 1.4: Struktur des *Echinacea*-Alkamids Dodeca-2E, -4E, -8Z, -10Z-Tetraensäureisobutylamid

### 1.2.2. Hochmolekulare Inhaltsstoffe

#### 1.2.2.1. Polysaccharide

Neben den niedermolekularen Inhaltsstoffen konnten bereits zahlreiche hochmolekulare Heteroglykane isoliert werden. So wurden bereits ein pektinartiges Polysaccharid (Bauer, 1990) und eine Polysaccharidfraktion mit Arabinogalactanen im Presssaft oberirdischer Teile beschrieben (Blaschek et al., 1998). Außerdem fand man bereits ein 4-O-Methyl-Glucuronoarabinoxylan, ein Arabinorhamnogalactan (Wagner et al., 1985) und ein Xyloglucan (Stuppner, 1985).

#### 1.2.2.2. Glykoproteine

Als weitere hochmolekulare Fraktion finden sich die sogenannten Hydroxyprolinreichen-Glykoproteine (HRGPs) in *Echinacea*. Sie werden weiter unterteilt in Extensine (Showalter, 1993; Kieliszewski und Lamport, 1994), Prolinreiche-Proteine (PRPs) (Johnson et al., 2003) und Arabinogalactan-Proteine (AGPs). Während Extensine durch einen großen Kohlenhydratanteil von circa 50% charakterisiert sind, der hauptsächlich aus kurzen Arabino-Oligosacchariden am Hydroxyprolin und einzelnen Galactoseresten am Serin besteht, sind die PRPs nur schwach glycosyliert (Nothnagel, 1997). Die Arabinogalactan-Proteine besitzen im Vergleich dazu einen sehr hohen Kohlenhydratanteil von 90% und mehr und wurden

bereits im Presssaft von *Echinacea purpurea* sowie in den Wurzeln von *Echinacea pallida* nachgewiesen (Classen et al., 2000; Thude et al., 2005).

### 1.3. Arabinogalactan-Proteine

Der Kohlenhydratanteil der AGPs besteht hauptsächlich aus Arabinose und Galactose. Als weitere Monosaccharide können unter anderem Rhamnose, Mannose, Glucose und Uronsäuren vorhanden sein (Du et al., 1996). Des Weiteren bestehen sie aus einem meist hydroxyprolinreichen Proteinanteil von bis zu 10%, der das Rückgrat bildet. Neben Hydroxyprolin sind Prolin, Serin, Threonin und Alanin die wichtigsten Aminosäuren (Bacic et al., 1999). Je nach Aufbau des jeweiligen Proteins kann man zwischen „klassischen“ und „nicht klassischen“ AGPs differenzieren. Klassische AGPs zeichnen sich durch eine N-terminale Sequenz aus, die typisch für Produkte ist, welche sekretiert werden. Daneben findet sich eine zentrale Domäne, welche reich an Prolin und Hydroxyprolin ist. Am C-terminalen Ende ist eine hydrophobe Domäne lokalisiert, welche als Signal für eine Kopplung an einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI-) Anker dienen kann (Youl et al., 1998, Svetek et al., 1999). Nicht-klassische AGPs besitzen atypische Regionen mit Asparagin und Cystein als dominierende Aminosäuren neben kleineren Prolin- und Hydroxyprolin-reichen Regionen. Ihnen fehlt auch die hydrophobe Region, welche für die vermutliche Bindung an einen GPI-Anker verantwortlich gemacht wird. Die nicht-klassischen AGPs sind grundsätzlich heterogener als die klassischen AGPs (Gaspar et al., 2001). Innerhalb der Arabinogalactane (AGs) kann man zwischen Typ I AGs (siehe Abbildung 1.5) und Typ II AGs (siehe Abbildung 1.6) differenzieren (Aspinall et al., 1982). So werden Typ I AGs von einer 1,4- $\beta$ -D-Galactose-Hauptkette, die in Position 3 kurze  $\alpha$ -L-Arabinose-Seitenketten trägt, gekennzeichnet. Sie kommen in pektinischen Komplexen, zum Beispiel in Samen, Knospen und Blättern vor. Bisher wurde keine kovalente Bindung an Proteine nachgewiesen.

# 1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

---

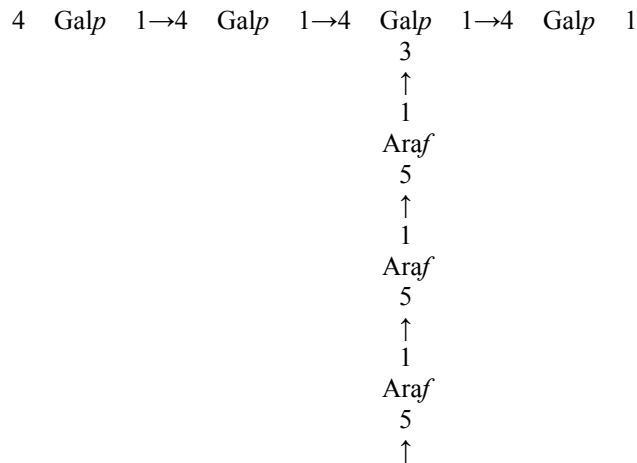


Abbildung 1.5: Strukturausschnitt eines Typ I-AGs nach Clarke et al., 1979

Typ II AGs hingegen werden durch eine 1,3-β-D-Galactose-Hauptkette charakterisiert, welche 1,6-Galactopyranose-Reste an C<sub>6</sub> trägt. Diese können noch weiter glykosyliert sein, vornehmlich durch L-Rhamnopyranose, L-Arabinofuranose, D-Galactopyranose oder D-Glucuronsäure. Bis heute ist nicht abschließend geklärt, ob Typ II AGs Teile von Pektinen darstellen können (Seifert, 2007). In AGPs sind sie kovalent an den Proteinteil gebunden und sind Hauptbestandteil des Kohlenhydratanteils.

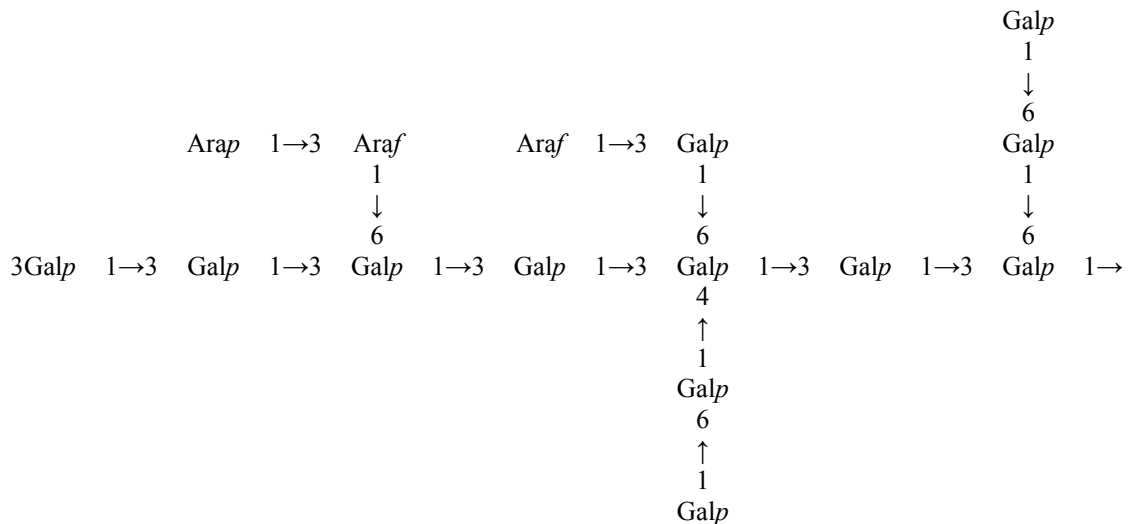
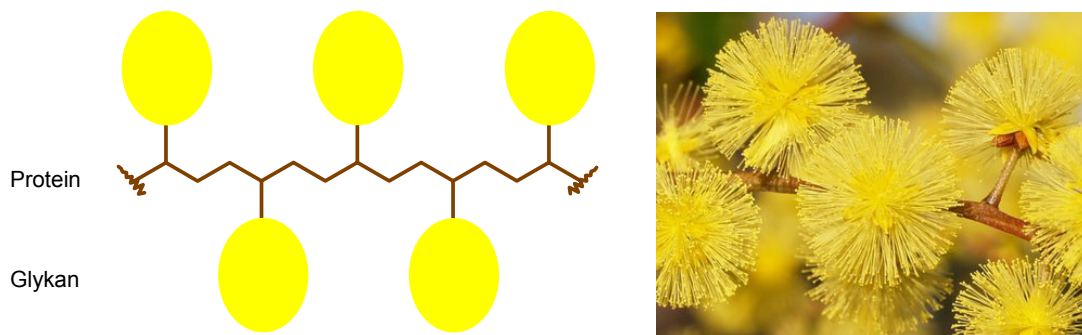


Abbildung 1.6: Strukturausschnitt eines Typ II Lärchen-AGs

## 1.3.2. Aufbau von Arabinogalactan-Proteinen

Bislang wurden 3 AGP-Modelle vorgeschlagen, deren molekularer Aufbau in den folgenden Illustrationen vorgestellt werden soll. Fincher stellte 1983 mit dem so genannten „wattle-blossom“ Modell den Aufbau eines AGPs aus *Acacia senegal* L. (engl. „wattle“) vor, welcher ihn an den Blütenstand eben jener Pflanze erinnerte. Er ist gekennzeichnet durch ein Protein-Rückgrat, welches AG-Seitenketten trägt. Diese bekommen durch ihre „knotige“ Struktur (engl. „kinked region“) eine sphärische Form; vergleichbar mit den Blüten der Akazie (siehe Abbildung 1.7).



**Abbildung 1.7:** links: Aufbau eines AGPs nach dem „wattle-blossom“-Modell nach Fincher, 1983; rechts: Akazienblüte als Namensgeber (Internet<sup>1</sup>)

Acht Jahre später beschrieb Qi nach elektronenmikroskopischer Untersuchung den Aufbau eines AGPs als eher stabförmig, ähnlich einem „verdrellten, haarigen Seil“, bei dem Kohlenhydratseitenketten aus ca. 30 Zuckern über Hydroxyprolin mit dem Protein verbunden sind (siehe Abbildung 1.8). Des Weiteren werden hier kurze Arabinose-Seitenketten beschrieben, die ebenfalls über Hydroxyprolin O-glykosidisch an das Protein-Rückgrat gebunden sind.

# 1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

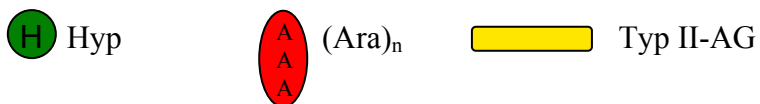
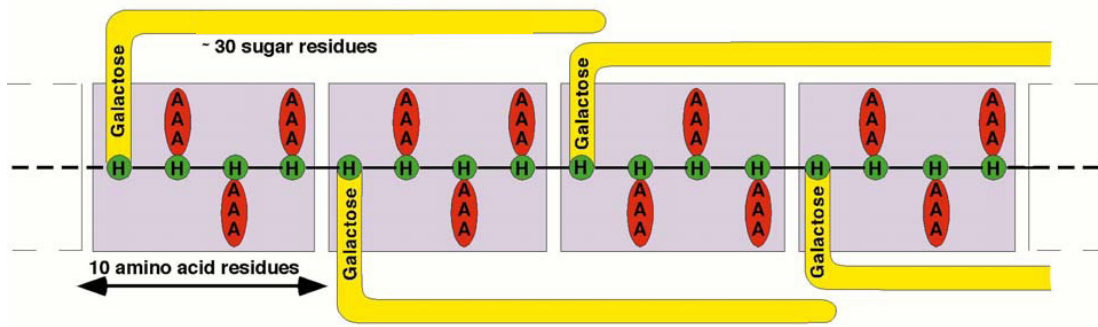


Abbildung 1.8: Aufbau eines AGPs nach dem „twisted hairy rope“-Modell. Bacic, 2003 nach Qi, 1991

Neueste Untersuchungen unter anderem mit Hilfe der Transmissions Elektronen Mikroskopie (TEM) und der Rasterkraftmikroskopie (AFM) von Sanchez et al. (2008) an Gummi arabicum ergaben, dass die Tertiärstruktur des enthaltenen AGPs einer spheroidalen, scheibenförmigen Struktur gleichkommt (siehe Abbildung 1.9).



Abbildung 1.9: Aufbau eines AGPs aus Gummi arabicum. Sanchez et al., 2008

Diese Scheibe habe einen Durchmesser von ~20 nm und eine maximale Dicke von 2 nm.



### 1.3.3. Eigenschaften und Funktionen von Arabinogalactan-Proteinen

Arabinogalactan-Proteine binden an einen synthetischen „Kohlenhydrat-Antikörper“, das  $(\beta\text{-D-Glc})_3$  Yariv-Phenylglycosid ( $\beta\text{GlcY}$ ) (Yariv et al., 1962; Fincher et al., 1983) und lassen sich so aus einem wässrigen Extrakt fällen und isolieren. Voraussetzung für die Funktion von Yarivs-Reagenz ist die  $\beta$ -Verknüpfung von D-Zuckern oder die  $\alpha$ -Verknüpfung von L-Zuckern. Zusätzlich muss die Hydroxylfunktion an C<sub>2</sub> in der D-Gluco-Konfiguration vorliegen. Außerdem muss die Diazo-Gruppe des Phenylrestes in para-Stellung liegen (Jermyn and Yeow, 1975; Jermyn 1978). Statt Glucose kann so auch  $\beta$ -D-Galactose oder  $\alpha$ -L-Fucose gebunden sein, wobei die Stabilität des resultierenden Yariv-AGP-Komplexes in Abhängigkeit vom untersuchten AGP variiert. Mit  $\beta$ -D-Mannose und  $\alpha$ -D-Galactose als Zuckerkomponente erfolgt keine Reaktion (Nothnagel 1997). Das in dieser Arbeit beschriebene Glucosyl-Yariv-Reagenz wird zur Isolierung von AGPs am häufigsten eingesetzt.

Die Funktionen von Arabinogalactan-Proteinen innerhalb der pflanzlichen Zelle sind nicht vollständig geklärt und werden diskutiert. Dennoch lassen sich aufgrund chemischer Beschaffenheit, Aufbau und Lokalisierung innerhalb der Pflanzen Aussagen über mögliche physiologische Funktionen der AGPs treffen. Verschiedene Studien zeigen eine Assoziation der AGPs mit Wachstum und Entwicklung einschließlich der Embryogenese (Kreuger und van Holst, 1995; Hu et al., 2006), Zellteilung, Elongation und Proliferation (Serpe und Nothnagel, 1994), des programmierten Zelltods (Gao und Showalter, 1999; Guan und Nothnagel, 2004) sowie der Interaktion zwischen Pflanze und Mikroben (Majewska-Sawka und Nothnagel, 2000; Seifert und Roberts, 2007). Die Lokalisierung der AGPs in der Extrazellulärmatrix (Youl et al., 1998) sowie die Verankerung der klassischen AGPs in der Plasmamembran der Zelle über einen GPI-Anker deuten auf eine Mediatorfunktion zwischen Zellwand, Plasmamembran und Cytoplasma hin (Seifert und Roberts, 2007). Die meisten dieser Studien basieren auf elektronen- oder fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen. Hierbei werden monoklonale Antikörper eingesetzt, welche gegen spezifische Kohlenhydratepitope der AGPs gerichtet sind (Knox, 1997; Knox, 2008; Blake et al., 2008) und so hervorragend

geeignet sind, bestimmte AGPs innerhalb der Pflanze zu lokalisieren. Neben Lokalisierungsversuchen mit den monoklonalen Antikörpern wurden Untersuchungen durchgeführt, welche darauf zielten, alle AGPs mit  $\beta$ GlcY anzufärben, und so die AGP-Verteilung innerhalb eines pflanzlichen Gewebes lichtmikroskopisch zu bestimmen (Putoczki et al., 2007). Dadurch sollte es erstmals möglich sein, die Verteilung aller AGPs im pflanzlichen Präparat zu zeigen. Die Färbung fällt jedoch aufgrund der geringen Konzentration an AGPs vergleichsweise schwach aus. Darüber hinaus stört in der Lichtmikroskopie die Eigenfärbung mikroskopischer Präparate. Die so gewonnenen mikroskopischen Bilder besitzen dadurch nur wenig Aussagekraft.

### **1.4. Pharmakologische Bedeutung von *Echinacea***

#### **Historische Bedeutung**

Der Ursprung der medizinischen Anwendung von *Echinacea* findet sich in der traditionellen Anwendung bei den Indianern Nordamerikas (Gilmore, 1919; Smith, 1928). Als Anwendungsgebiet zitiert Hobbs die Aufschrift einer Tüte aus einer Sammlung Gideon Lincecums mit Wurzeln von *Echinacea purpurea*: „*The tincture of the roots of this plant has been used with success in bad cough, and dyspepsia attended with bad cough... The Choctaws use it for the above purposes, by chewing and swallowing the saliva. They keep a small piece of the root in the mouth nearly all the time, continuing its use for a long time.*” (Hobbs, 1989). Auch beschreibt Hobbs, dass das Verbreitungsgebiet von *Echinacea angustifolia* sehr gut mit dem Siedlungsgebiet der *Echinacea*-verwendenden Indianerstämme übereinstimmt. Neben den genannten Indikationsgebieten werden noch weitere beschrieben. So deckten die verschiedenen *Echinacea* Arten (*E. angustifolia*, *E. pallida*, *E. purpurea*) ein ganzes Spektrum von Indikationsgebieten ab, welches von Mumps über Zahnschmerzen bis zu Schlangenbissen reichte (Moerman, 1986).

### **Rationale Phytotherapie**

Während es seit 1934 bereits eine Monographie für *Echinacea angustifolia* im HAB gibt, findet man in den aktuellen Monographien des Europäischen Arzneibuches als Arzneidrogen sowohl die Purpur-Sonnenhut-Wurzel als auch das Purpur-Sonnenhut-Kraut (Echinaceae purpureae radix, Echinaceae purpureae herba), die Wurzel des Blassfarbenen Sonnenhuts (Echinaceae pallidae radix) und die Schmalblättrige-Sonnenhut-Wurzel (Echinaceae angustifoliae radix). Die Kommission E (1989) sowie die ESCOP und der Kommentar des Europäischen Arzneibuchs nennen für Echinaceae purpureae herba die unterstützende Behandlung rezidivierender Infekte im Bereich der Atemwege und der ableitenden Harnwege als innerliches Anwendungsgebiet. In der Monographie der ESCOP für Echinaceae purpureae radix fehlen Harnwegsinfekte als Indikationsgebiet.

### **Klinische Studien**

Heute wird die Wirksamkeit von *Echinacea*-Präparaten als Immunostimulans kontrovers diskutiert, wobei Erkältungskrankheiten als häufigste Erkrankung in der westlichen Welt allein in Amerika jährlich direkte medizinische Kosten von mehr als 16,8 Milliarden US \$ verursachen (Fendrick et al., 2001), und daher das Interesse an einem wirksamen Immunostimulans sehr groß ist. Gerade Studien, die *Echinacea* jegliche Eigenschaften jenseits eines Placebo-Produktes absprechen, werden von der Presse aufgegriffen und verschaffen den Produkten einen schweren Stand. Eine im Sommer 2005 im New England Journal of Medicine veröffentlichte Studie erlangte in diversen Testberichten hierbei einen besonderen Stellenwert und wurde gerade von der Laienpresse vielfach zitiert (Internet<sup>2</sup>). In der besagten Studie wurde der Effekt von 3 Extrakten (überkritisches CO<sub>2</sub>, 60% Ethanol v/v, 20% Ethanol v/v) der Wurzel von *Echinacea angustifolia* auf eine Rhinovirus-Infektion getestet. Hierbei wurden „keine klinisch signifikanten Effekte“ unter *Echinacea*-Prophylaxe festgestellt (Turner et al., 2005).

Eine weitere kritische Studie besagt, dass der am häufigsten beschriebene pharmakologische Effekt -die Immunomodulation- bisher nur zum Teil verstanden ist. Der Nutzen, der aus *Echinacea*-Präparaten als Präventiv-Maßnahme für

## 1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

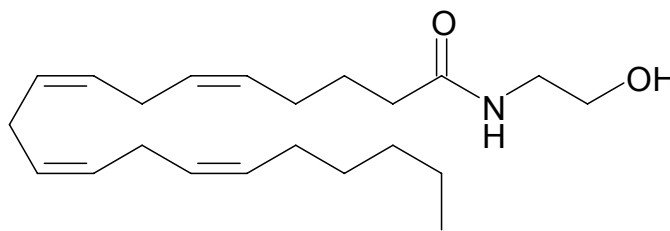
---

Erkältungskrankheiten gezogen werden kann, wird in dieser Studie als „marginal“ beschrieben (Barrett, 2003) und bestätigt damit eine dreiarmlige, randomisierte, placebokontrollierte Doppelblind-Studie von 1998, in der nicht gezeigt werden konnte, dass die beiden untersuchten *Echinacea*-Extrakte, verglichen mit einem Placebo, eine bessere Wirkung als Präventivmaßnahme gegen Infekte der oberen Atemwege besitzen (Melchart, 1998).

Auf der anderen Seite findet man neben Studien, die *Echinacea* eine unspezifische immunstimulierende Wirkung zur Behandlung von Erkältungskrankheiten zuschreiben (Hoheisel et al., 1997), Meta-Analysen mit Forest Plots zur Auswertung von Literaturstellen, die sich mit der Behandlung von Erkältungskrankheiten mit Hilfe von *Echinacea*-Präparaten beschäftigen. So wählen Schoop et al. (2006) aus 234 Artikeln 3 geeignete Studien mit einer Jadad-Score von 4-5 aus und bewerten diese mit statistischen Mitteln. Neben 2 anderen findet sich hier auch die Turner Studie von 2005 wieder. Die Autoren kommen hier zum Ergebnis, dass standardisierte *Echinacea*-Extrakte verglichen mit Placebo durchaus effektiv zur Vorbeugung einer Erkältung eingesetzt werden können. Sie berichten, dass sich weniger Studienteilnehmer unter *Echinacea* nach klinischer Inokulation von Rhinoviren erkälteten, darüber hinaus wurde eine signifikant kürzere Dauer der Erkrankung beobachtet. Eine weitere Meta-Analyse führten Shah et al., 2007 durch. Sie nahmen in ihre Analyse 14 Studien auf, unter anderem auch die bereits zitierten Turner-, Barrett- und Melchart-Studien. Als Resultat wird aufgeführt, dass *Echinacea* die Wahrscheinlichkeit eines Patienten, an einer Erkältung zu erkranken, um bis zu 58% verringern kann. Des Weiteren wird die Dauer einer Erkältung um 1,4 Tage verkürzt. Auch wird die Turner-Studie dahingehend kritisiert, dass als Placebo ein Alfalfa-Extrakt (*Medicago sativa* L., Fabaceae) gegeben wurde, welcher seinerseits immunstimulierende Effekte haben könnte (Millea, 2003). Beide Meta-Analysen führen jedoch auch an, dass weitere Studien notwendig seien, bevor *Echinacea* zum Standard für Erkältungsprophylaxe gemacht werden kann.

### ***In vitro* Untersuchungen**

Neben den klinischen Studien gibt es vielseitige Untersuchungen über die pharmakologischen Wirkungen von Inhaltsstoffen aus *Echinacea in vitro*. Nach aktuellen Untersuchungen können zum Beispiel Alkamide (Struktur siehe Abbildung 1.4), welche körpereigenen Anandamiden (siehe Abbildung 1.10) strukturell ähnlich sind, wie diese *in vitro* als Ligand an CB1 und CB2 binden (Wölkart et al., 2005; Raduner et al., 2006).



**Abbildung 1.10: Struktur des Anandamids**

Daneben wurden in geringen Mengen Ätherische Öle und Pyrrolizidinalkaloide vom Typ des Tussilagins gefunden (Heinzer et al., 1988; Röder et al., 1984). Hierzu wurden antioxidative Eigenschaften des Ätherischen Öls aus *Echinacea purpurea* beschrieben (Ryan et al., 2008).

Einer hydrophilen Polysaccharidfraktion aus *Echinacea* konnte zugeschrieben werden, dass sie die antitumorale und antimetastatische Aktivität von Cyclophosphamid erhöht (Razina et al., 2007). Bei einer oligomeren Fraktion oxidierten Lärchen-AGs wurde eine antiinflammatorische Wirkung, vergleichbar mit jener von Voltaren® gefunden. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass das AG eine signifikante Anti-Ulkus-Aktivität besitzt (Mudarisova et al., 2005). An Maus-Lymphozyten wurde gezeigt, dass AGPs aus *Echinacea* sowohl eine konzentrationsabhängige Produktionssteigerung von IgM, als auch eine erhöhte Produktion von IL6 in Maus-Makrophagen verursachen (Classen et al., 2006). Die ist eventuell dadurch bedingt, dass AGPs an die Zelloberfläche von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten binden können (Thude et al., 2006). Des Weiteren

zeigte ein AGP aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* aktivierende Eigenschaften auf das Komplementsystem (Alban et al., 2002).

### **1.5. Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit war die qualitative und quantitative Charakterisierung der AGPs aus der Wurzel des Purpursonnenhutes (*Echinaceae purpureae radix*). Nach der Charakterisierung sollte ein Vergleich mit AGPs aus den oberirdischen Teilen und der Zellkultur derselben Art angeschlossen werden, da diese Daten im Arbeitskreis bereits vorlagen. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Lokalisierung von Arabinogalactan-Proteinen in pflanzlichen Geweben. Hierzu wurde eine neue Methode entwickelt, um mit Hilfe von polyclonalen Antikörpern gegen  $\beta$ GlcY selektiv alle yarivbindenden Arabinogalactan-Proteine im pflanzlichen Präparat zu lokalisieren.

## 2. Experimenteller Teil

### 2.1. Verwendetes Drogenmaterial

Pulverisierte Purpursonnenhutwurzel (Echinaceae purpureae rad. pulv., Ch./Lot:5890) wurde von der Firma Alfred Galke (Gittelde) bezogen. Diese wurde hergestellt aus *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH. Die Gattung *Echinacea* gehört zur Familie der Compositae (Asteraceae), und wird hier eingereiht in die Tribus Heliantheae, die nach Robinson (1981) in 35 Subtriben unterteilt wird. *Echinacea* findet sich hier in der Subtribus der Ecliptinae wieder.

#### 2.1.1. Extraktherstellungen

##### Extrakte I-III

Zunächst wurden 800 bzw. 1000 g pulverisierte Wurzel von *Echinacea purpurea* mit demineralisiertem Wasser (Aqua dem.) im Verhältnis 1:8 (6,4 l Aqua dem., respektive 8 l Aqua dem.) bei 4°C angesetzt und über acht Stunden bewegungsmazeriert. Der Extrakt wurde mit Hilfe einer Hafico-Hochdruck-Tinkturenpressen bei einem Druck von 300 kg/cm<sup>3</sup> und 2 übereinanderliegenden Filtern (Schleicher & Schüll Rundfilter Ø 15 cm Rf.No. 10311612) von dem festen Drogenrückstand getrennt. Nach dem Abpressen verblieben 5,4 l (bzw. 6,8 l) Mazerat. Um feinere Drogenpartikel aus dem Extrakt zu entfernen, schloss sich eine 10 minütige Zentrifugation (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments) bei 5000 U/min an. Der gewonnene Extrakt wurde in Portionen zu ca. 50 ml für 10 min auf 95°C gebracht und so eine Denaturierung der Proteine gewährleistet. Die Proben wurden im Eisbad abgekühlt und über Nacht bei 4°C gelagert. Die gefällten Proteine wurden bei 5000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Tangentialflussfiltration (TFF; Molekulargewichtsausschlussgrenze (MWCO) 30000 Da) in Filtrat und Retentat getrennt (siehe Abbildung 2.1).

## 2. EXPERIMENTELLER TEIL

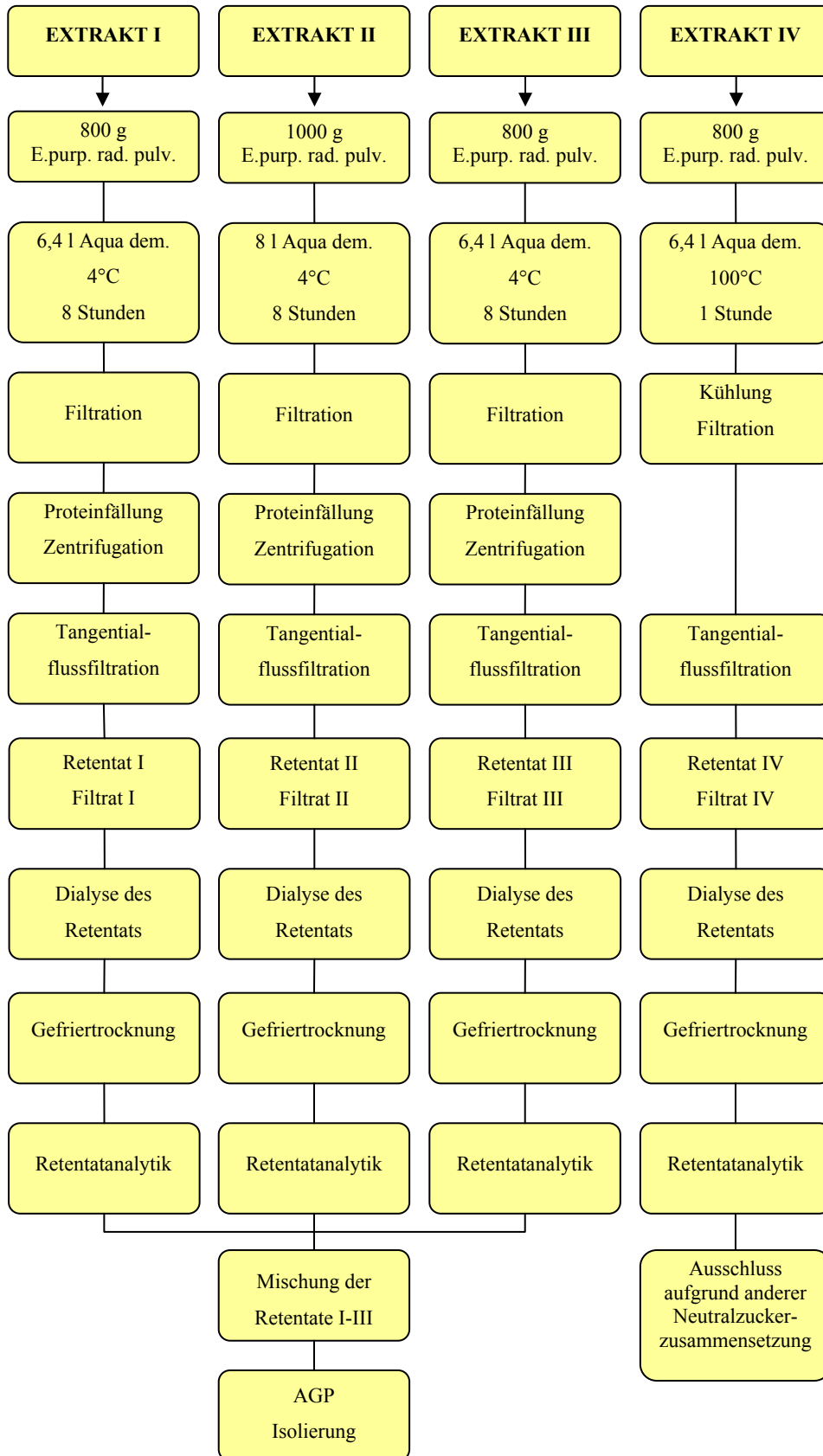


Abbildung 2.1: Isolierungsweg vom Ausgangsmaterial zum AGP



### **Extrakt IV**

Parallel dazu wurden 800 g Drogenmaterial mit 6,4 l Aqua dem. über 1 h bei 100°C heiß extrahiert. Eine Proteinfällung musste bei dieser Methode nicht angeschlossen werden. Auch hier schloss sich eine siebentägige Tangentialflussfiltration an.

### **Tangentialflussfiltration**

Filtereinheit: Minitan® System Stainless Steel Fa. Millipore, Billerica, MA, USA  
Pumpe: Easy-load® Masterflex  
Filter: Minitan® Filter Plates 4/PK 30.000 NMWL  
High-Flux Biomax Polysulfone Membrane (hydrophilic)

Um zu gewährleisten, dass die verwendeten Filter nicht verstopfen, wurden während der Tangentialflussfiltrationen jeweils insgesamt 3 l Aqua dem. hinzugegeben. Bei dem Heissextrakt IV konnte auf diese Zugabe verzichtet werden, da der Extrakt diesmal klarer und freier von Schwebstoffen war. Nach der Tangentialflussfiltration lagen niedermolekulares Filtrat und hochmolekulares Retentat im Volumenverhältnis von ca. 5:1 vor. Das Filtrat wurde auf ca. 800 ml und das Retentat auf ca. 500 ml im Rotationsverdampfer bei 35°C eingeeengt.

### **Dialyse**

Das Retentat wurde in [Spectra/Por® 4 Regenerated Cellulose membrane, Ø 20 mm, MWCO 12.000-14.000 Da, Fa. Spectrum Laboratories Inc.]-Dialyseschläuche aufgeteilt. Es schloss sich eine siebentägige Dialyse bei 4°C unter konstantem Wasserfluss an, welche Monosaccharide und andere niedermolekularen Bestandteile abtrennte. Das dialysierte Retentat wurde eingefroren und gefriergetrocknet (Beta 1-8K, Fa. Christ, Freeze Dry System Lymph-Lock 6, Fa. Labconco). Am Ende der Extraktionen lagen also 4 Retentate vor, aus denen anschließend AGP isoliert und charakterisiert werden konnte.

### **Mischung der Retentate**

Nach der Analyse der Neutralzuckerzusammensetzung der Retentate I-III, wurden zunächst jeweils 100 mg dieser Retentate miteinander gemischt und das Gemisch analysiert. Zur Fällung der AGPs wurden daraufhin die kompletten Retentate I-III zusammen in Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Auf diese Weise wurden 40,0 g eines Retentatgemisches gewonnen, welches als Ausgangsretentat für die AGP-Isolierung benutzt wurde. Retentat IV wurde aufgrund der veränderten Extraktionsweise nicht berücksichtigt.

### **2.1.2. Aufreinigung des Retentats für die Yariv-Fällung**

Bei Lösung des Retentates in Wasser ergab sich keine klare Lösung sondern eine Suspension, die eine niedrige Konzentration an AGP und einen hohen Glucosegehalt in diesem verursachte. Die Suspension wurde daher zentrifugiert (15 min., 5000 g), und der Überstand für die Yarivfällung verwendet.

### **2.1.3. Isolierungen der Arabinogalactan-Proteine**

Arabinogalactan-Proteine binden spezifisch an das  $(\beta\text{-D-Glc})_3$  Yariv-Phenylglycosid ( $\beta\text{GlcY}$ ). Es muss selbst synthetisiert werden, da es kommerziell nicht erhältlich ist. Mit Hilfe dieses synthetischen Phenylglycosids ist es möglich, AGPs auszufällen.

### **Geräte und Chemikalien**

*Gerät:*

S-Titrino 719 (Metrohm)

*Verwendete Chemikalien:*

p-Aminophenyl- $\beta$ -D-Glucose aus p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucose

Natriumnitrit

Phloroglucin in zweifach destilliertem Wasser (Aqua bidest.)

### 2.1.3.1. Synthese des Yariv-Reagenzes

Das Yariv-Reagenz wird aus diazotierten para-Aminophenyl-Glycosiden und Phloroglucin nach dem in Abbildung 2.2 gezeigten Reaktionsschema hergestellt. Im ersten Schritt wurde p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucose zu p-Aminophenyl- $\beta$ -D-Glucose reduziert. Dieser Schritt geschah durch eine Hydrierung mit elementarem Wasserstoff unter Palladium-Katalyse (Zusatz von Hydrierkatalysator Palladium / Aktivkohle, Pd 10%, Fa. Merck). Danach wurde eine Lösung aus 488,34 mg des Produktes und 10,8 ml HCl 0,5 M (0°C) hergestellt und mit 124,2 mg Natriumnitrit versetzt. Diese Mischung wurde auf 0°C gekühlt. Das diazotierte Glycosid wurde zu einer Lösung von 56,74 mg Phloroglucin in 22,5 ml Aqua bidest. gegeben, was unter Einhaltung von pH 9 mithilfe eines Autotitrators (0,5 N NaOH) und unter ständigem Rühren geschah. Danach wurde der Reaktionsansatz mit 0,1 N NaOH für 2 h konstant auf pH 9 gehalten. Hierbei kam es zu einer Azokupplung zum Yariv-Reagenz, welches mit Methanol bei 4°C gefällt wurde. Nachdem das Produkt abzentrifugiert worden war (15 min bei 5000 U/min), konnte es bei 50°C über Nacht im Trockenschrank getrocknet werden.

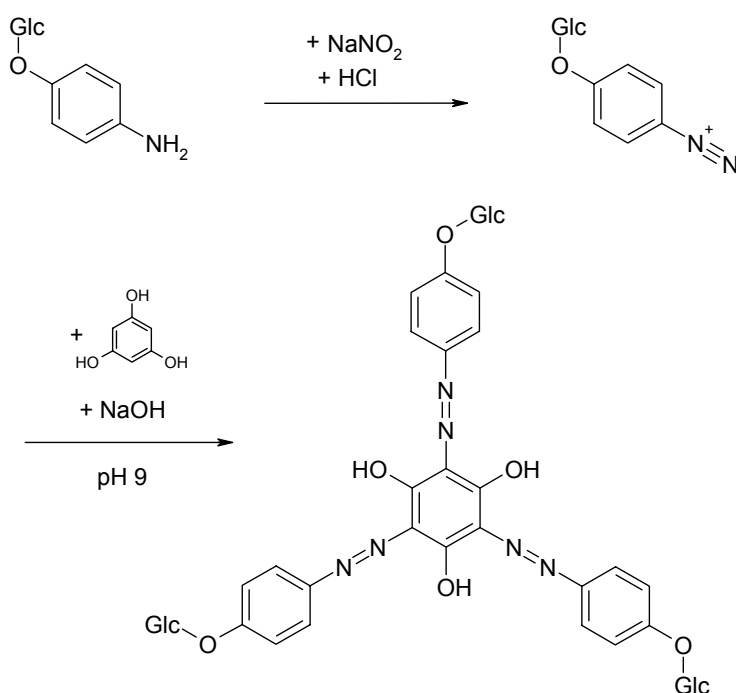


Abbildung 2.2: Synthese des ( $\beta$ -D-Glc)<sub>3</sub> Yariv-Phenylglycosids

### **2.1.3.2. Yariv-Fällung und Isolierung des AGPs**

Die Isolierung des AGPs folgt unter der Annahme, dass der Massenanteil Arabinose plus Galactose des Retentates durch den Gehalt an AGP bestimmt wird. Da eine optimale Ausbeute an AGP im Verhältnis von 1:1 (AGP:Yariv) erwartet wird, kann die benötigte Menge an Yariv-Reagenz anhand des Gehaltes an Arabinose und Galactose im Retentat abgeschätzt werden. Retentat und Yariv-Reagenz wurden in einer Konzentration von je 1 mg/ml in eine 0,15 molare NaCl-Lösung gegeben. Am nächsten Tag wurden die bei 4°C gefällten AGP-Yariv-Komplexe abzentrifugiert (15 min, 10000 g, 4°C) und wieder in der Menge Wasser gelöst, die zur Herstellung der Yarivlösung benutzt wurde. Diese Lösung wurde nun unter ständigem Rühren auf 50°C gebracht und der tiefrote Yarivkomplex unter Hinzugabe von Natriumdithionit (Endkonzentration 2%) zerstört. Die nun nur noch leicht gräulich-gelbe Lösung wurde für fünf Tage dialysiert (MWCO 12000-14000 Dalton) und so von Abbauprodukten des Yarivreagenz sowie von Resten an NaCl und Natriumdithionit befreit. Die resultierende AGP-Lösung wurde gefriergetrocknet.

## 2.2. Chemische und chromatographische Methoden

### 2.2.1. Charakterisierung des Kohlenhydrat-Anteils

#### 2.2.1.1. Herstellung von Alditolacetaten

10 mg des gefriergetrockneten Retenats bzw. 10 mg des gefriergetrockneten Filtrats wurden zusammen mit 0,5 mg Myo-Inositol als internem Standard mit 1 ml 2 M Trifluoressigsäure (TFA) für 1 h bei 120°C im Bioblock hydrolysiert. Die saure hydrolysierte Lösung wurde in Spitzkolben überführt und am Rotationsverdampfer dreimal mit jeweils 5 ml H<sub>2</sub>O bis zur Trockene abrotiert. Die abrotierte Probe wurde zunächst mit 200 µl 1 M NH<sub>3</sub> versetzt und darauf 90 min lang mit 1 ml Natriumborhydridlösung 2% bei 40°C reduziert. Das überschüssige Natriumborhydrid wurde daraufhin durch Zusatz von 100 µl Eisessig zerstört und die entstandenden Alditole mit 200 µl Methylimidazol als Katalysator und 2 ml Acetanhydrid (wasserfrei) für 20 min bei Raumtemperatur acetyliert (siehe Abbildung 2.3). Die daraufhin vorliegenden Alditolacetate wurden nach Zugabe von 10 ml Aqua dem. mit 1 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Zur Aufkonzentrierung der Alditolacetate wurde nun die Dichlormethanphase unter N<sub>2</sub> eingengt. Von dieser Lösung wurden 1-2 µl gaschromatographisch vermessen.

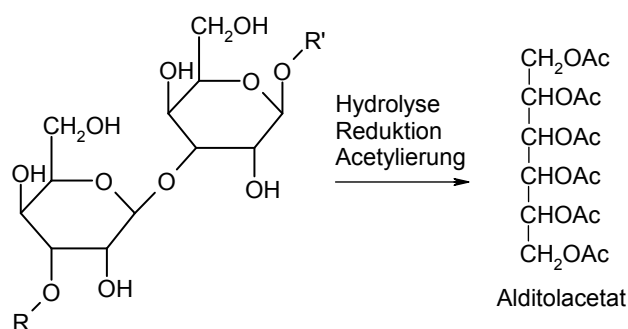


Abbildung 2.3: Reaktionsschema zur Herstellung von Alditolacetaten

#### 2.2.1.2. Uronsäurereduktion

Die Carboxylgruppen der Uronsäuren wurden nach Taylor und Conrad (1972) mit Natriumbordeuterid zu zweifach deuterierten Neutralzuckern reduziert (siehe Abbildung 2.4). 20 mg AGP wurden in 30 ml Aqua dem. gelöst. Unter Rühren wurden 216 mg N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-methylmorpholino)-ethyl]-carbodiimid-4-

## 2. EXPERIMENTELLER TEIL

toluolsulfonat zugegeben. Hierbei reagiert das Carbodiimid mit der Carbonsäure zu einem O-Acylisoharnstoff, dessen Reaktivität im Vergleich zur freien Säure erhöht ist. Während der Reaktion wurde der pH-Wert per Autotitrator (719 S Titrino, Fa. Metrohm) für 4 h mit Hilfe einer 0,01 M HCl konstant auf 4,75 gehalten. Nach dieser Aktivierung wurden die Uronsäuren durch langsames Zutropfen von Natriumbordeuterid-Lösung (4 ml 1 M, 5 ml 2 M und 5 ml 4 M) zu Neutralzuckern reduziert; die Carboxylfunktion an C6 wird dabei zur zweifach deuterierten Hydroxylfunktion. Der Autotitrator hielt durch das Gegentitrieren mit 2 M HCl den pH-Wert konstant auf 7, da im Sauren das Natriumbordeuterid zersetzt wird und im Basischen das Gleichgewicht zwischen aktivierter Uronsäure und Uronsäure zur Seite der Uronsäure verschoben ist. Hinzupipettiertes Oktanol verhinderte während der gesamten Prozedur ein zu starkes Schäumen. Nach der Reduktion wurde der pH-Wert mit Essigsäure auf 6,5 eingestellt.

Nach fünf Tagen Dialyse (MWCO 12000-14000 Da) wurde das anschließend gefriergetrocknete Produkt erneut reduziert, um eine vollständige Reduktion der Probe zu gewährleisten, da nach einmaliger Reduktion erst ca. 95% der Uronsäuren reduziert vorliegen (Taylor und Conrad, 1972).

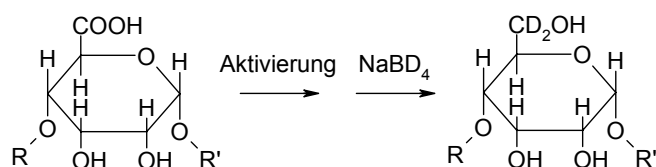


Abbildung 2.4: Uronsäurereduktion nach Taylor und Conrad

### 2.2.1.3. Partialhydrolyse

Die Partialhydrolyse wurde nach Gleeson und Clarke (1979) durchgeführt. Hierzu wurden 20 mg Probe in 2 ml 12,5 mM Oxalsäure gelöst. Anschließend wurden die Proben bei 100°C 5 h lang hydrolysiert, um labile Glykosidbindungen zu spalten. Nach dieser milden Hydrolyse wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (5 min bei 6000 U/min) und der Überstand mit Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 80% versetzt. Über Nacht wurden die Polymere gefällt und am nächsten Tag bei 6°C und 20000 g 10 min lang abzentrifugiert. Die Fällung wurde noch dreimal mit

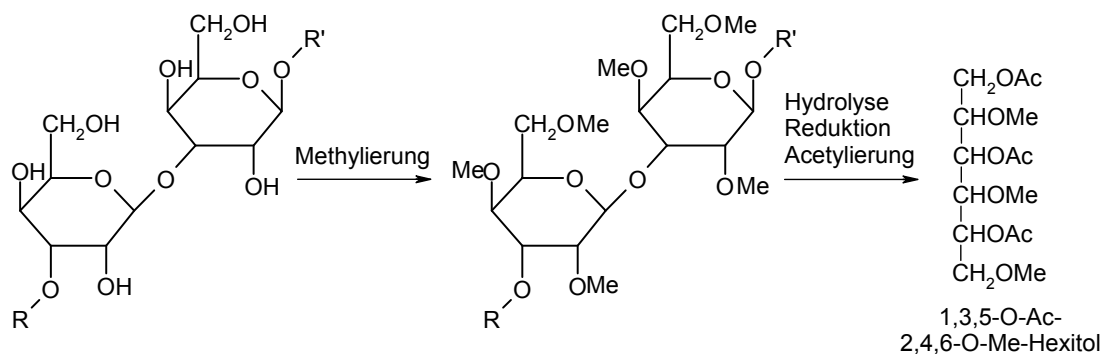
80% Ethanol gewaschen und jeweils erneut abzentrifugiert. Das gereinigte Polymer wurde in 2 ml Aqua dem. aufgenommen und gefriergetrocknet, die Waschlösungen mit den enthaltenen Mono- und Oligomeren am Rotationsverdampfer eingengt, ebenfalls in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

### 2.2.1.4. Partialhydrolyse mit anschließender Reduktion

Um festzustellen, ob die Uronsäuren in dem AGP an labilen Seitenketten sitzen, welche bereits bei einer milden Hydrolyse abgespalten werden, wurde bei einer weiteren Probe eine Partialhydrolyse nach Gleeson und Clarke durchgeführt (siehe 2.2.1.3.). Diese Probe wurde im Anschluss einer Reduktion mit Natriumbordeuterid (siehe 2.2.1.2.) unterworfen.

### 2.2.1.5. Methylierungsanalyse

Die Methylierungsanalyse wurde nach Harris et al. (1984) durchgeführt. Hierbei werden die Verzweigungstypen der beteiligten Monomere eines Polysaccharids charakterisiert. Des Weiteren lassen sich furanosidische von pyranosidischen Zuckern unterscheiden. In einem ersten Schritt erfolgt die Methylierung aller freien Hydroxylgruppen und solcher, die mit leicht abspaltbaren Gruppen substituiert sind. Nach der Methylierung folgen eine Hydrolyse und eine Reduktion der vorher glykosidischen Bindungen zu freien Hydroxylgruppen. Diese werden in einem dritten Schritt mit Acetanhydrid unter Katalyse durch Methylimidazol (siehe 2.2.1.1.) zu partiell methylierten Alditolacetaten (PMAAs) acetyliert (siehe Abbildung 2.5) und gaschromatographisch vermessen.



**Abbildung 2.5:** Reaktionsschema der Methylierungsanalyse

### **Herstellung der Dimethylsulfinyl-Kalium-Lösung**

In ein Reagenzglas mit Schraubverschluss und Seitenansatz wurde 1 g einer öligen Kaliumhydrid-Suspension eingewogen und insgesamt fünfmal mit jeweils 4 ml trockenem n-Hexan gewaschen. Das jetzt ölfreie Kaliumhydrid wurde unter Argon getrocknet, ausgewogen und in 13 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) pro Gramm KH unter Argonbegasung gelöst. Eine Eiskühlung verminderte das starke Aufschäumen. Nach 30-minütigem Rühren war das KH komplett gelöst und konnte für die Methylierung verwendet werden.

### **Methylierung**

In einem Reagenzglas mit Schraubverschluss und Seitenansatz wurden 5 mg Probe gefriergetrocknet und anschließend mit Hilfe eines Ultraschallbades in 460 µl DMSO gelöst. Unter Argon Schutzbegasung wurden nun alternierend Methyljodid und Dimethylsulfinyl-Kalium-Lösung (Dimsyl-Kalium-Lösung) nach folgendem Schema hinzupipettiert:

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

Nach der Methylierung wurde die Probe unter Zugabe von 2 ml Chloroform und 1 ml Methanol in ein Zentrifugenglas überführt. Anschließend wurde die Probe fünfmal mit Wasser gewaschen und jeweils die obere, wässrige Phase nach Zentrifugation (5 min, 250 g) verworfen. Nach Beendigung der Waschschriffe wurden 2 ml 2,2-Dimethoxypropan, 20 µl Essigsäure und einige Glasperlen in die gewaschene Phase gegeben und auf 90°C erwärmt, um das Wasser zu entfernen. Die Probe wurde nun in ein Wheatongefäß überführt und unter Argon bis zur Trockne eingeengt.



### **Hydrolyse**

Die jetzt methylierte Probe wurde im Wheatongefäß unter Zugabe von 1 ml 2 M TFA bei 121°C für 1 h im Bioblock hydrolysiert und anschließend in einen Spitzkolben überführt. Die TFA wurde sodann mit Stickstoff bei 40°C im Wasserbad eingeengt.

### **Reduktion**

Nach der Hydrolyse lagen unvollständig methylierte Monosaccharide vor, welche zunächst durch Zugabe einer frisch hergestellten Natriumborhydrid-Lösung (0,5 mol in 2 mol Ammoniak) im Trockenschrank bei 60°C 1 h lang reduziert wurden. Die Reaktion wurde durch 0,5 ml Aceton gestoppt, welches im Anschluss mit Stickstoff im Wasserbad bei 40°C eingeengt wurde.

### **Acetylierung zu PMAAs**

Der Rückstand wurde nun mit 200 µl Eisessig, 1 ml Ethylacetat, 3 ml trockenem Acetanhydrid und 100 µl Perchlorsäure (70% m/V; als Katalysator) versetzt. Nach 5-minütiger Acetylierung der partiell methylierten und reduzierten Monosaccharide wurde das im Überschuss hinzugegebene Acetanhydrid durch Zugabe von 10 ml Aqua dem. und 200 µl 1-Methylimidazol als Katalysator inaktiviert. Die entstandenen PMAAs wurden im Anschluss dreimal mit je 1 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und unter Stickstoff eingeengt. So aufbereitet konnten die Proben für die Gaschromatographie mit anschließender Massenspektrometrie verwendet werden.

### 2.2.1.6. Gaschromatographie

#### Bestimmung des Korrekturfaktors

Da das Response-Verhalten eines Flammenionisationsdetektors (FID) von Substanz zu Substanz unterschiedlich sein kann, wurden in regelmäßigen Abständen Korrekturfaktoren für die Messungen am GC bestimmt. Hierzu wurden 100 mg Rhamnose, Fucose, Arabinose, Xylose, Mannose, Galactose und Glucose 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 jeweils 1 mg Myo-Inositol als interner Standard hinzugefügt. Daraufhin wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Danach folgten eine Reduktion und eine Acetylierung (siehe 2.2.1.1.). Die zehn Proben wurden anschließend gaschromatographisch vermessen und relative Retentionszeiten bezogen auf Myo-Inositol berechnet. Nach Integration der erhaltenen Peaks konnten aus den Durchschnittsflächen die Korrekturfaktoren der jeweiligen Substanz bezogen auf Myo-Inositol als internen Standard berechnet werden.

#### Geräteparameter

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

## 2. EXPERIMENTELLER TEIL

---

Die Identifizierung der Alditolacetate erfolgte über die Retentionszeiten. Die durch die GC-Software ermittelten integrierten Flächen wurden mit Hilfe des Korrekturfaktors korrigiert und so die jeweiligen Massenanteile der verschiedenen Monosaccharide berechnet.

### 2.2.1.7. Gaschromatographie / Massenspektrometrie

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  
Splitverhältnis: 1:35  
Flussrate: 0,7 ml/min  
Temperaturprogramm: 3 min 120°C, 8°C / min auf 170°C, 1°C / min auf 200°C,  
12°C / min auf 280°C  
Injektor: 320°C  
Detektor (TIC): EI-MS: HP MS Engine 5898 A; Fa. Hewlett Packard, USA  
Detektor  
(Quantifizierung): Flammenionisationsdetektor (FID)  
Software: HP G 1034 C-Software für MS Chemstation  
Resp. HP GC Chemstation, Rev. A.06.03 [509]

Die Identifizierung der PMAAs erfolgte durch Vergleich ihrer relativen Retentionszeiten im Total-Ionen-Chromatogramm (TIC) sowie durch Analyse und Abgleich ihrer Massenspektren mit einer in der Arbeitsgruppe etablierten Spektrenbibliothek bekannter PMAAs. Die Quantifizierung der im TIC identifizierten Peaks erfolgte über die Integration der Flächen des FID-Chromatogramms.

### **2.2.2. Charakterisierung des Protein-Anteils**

#### **2.2.2.1. Aminosäurezusammensetzung**

6,3 mg des AGPs wurden mit 2 ml 6 N HCl 22 h bei 110°C im Bioblock hydrolysiert. Das Produkt wurde zentrifugiert (dreimal 20 min., 10000 g) und der Überstand getrocknet. Die Probensubstanz wurde in Acetonitril (20%) zu einer Konzentration von 1 mg / 150 µl aufgelöst. 15 µl wurden dann der Konversion zu den Phenylthiocarbamyl-Derivaten unterworfen und die Aminosäurezusammensetzung per Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) analysiert (PicoTag 3.9 x 150 mm Säule, Fa. Wita).

#### **2.2.2.2. Gehaltsbestimmung von Hydroxyprolin im AGP**

Da bei der Charakterisierung eines HRGP besonderes Augenmerk auf Hydroxyprolin liegt, wurde zusätzlich das photometrische Verfahren nach Stegemann und Stalder (1967) hinzugezogen, um die Ergebnisse der HPLC-Analytik (siehe 2.2.2.1.) zu bestätigen. Hierzu wurden 10,0 mg AGP in 1 ml 6 N HCl 22 h bei 110°C unter N<sub>2</sub> hydrolysiert. Der Überstand wurde nach Abkühlen und Abzentrifugieren (5000 g, 10 min) am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt, da die Salzsäure die spätere photometrische Messung stören würde. Zur Herstellung des benötigten Puffers pH 6,8 wurden 5,2 g Citronensäure-Monohydrat, 2,8 g NaOH und 15,6 g Natriumacetat in 100 ml Aqua bidest. gelöst. Nach Zugabe von 20 mg Natriumethylmercuritthiosalicylat wurden 50 ml 1-Propanol hinzugefügt und auf 200 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt. Zur Herstellung des Farbreagenzes wurden 10 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in 35 ml 60% Perchlorsäure gelöst und 65 ml Isopropanol hinzugegeben. Die Aminosäuren wurden in 1 ml Aqua dem. aufgenommen und 100 µl dieser Lösung auf 4 ml verdünnt. Zu dieser Lösung wurden 2 ml Oxidationsreagenz (1,4 mg Chloramin T in 100 ml Pufferlösung pH 6,8) gegeben und das Hydroxyprolin 20 min bei Raumtemperatur (RT) oxidiert. Mit 2 ml Farbreagenz bildete das Hydroxyprolin bei 60°C innerhalb einer Viertelstunde eine rotgefärbte Verbindung. Die Lösung wurde nach den 15 min für 3 min unter fließendem Wasser gekühlt und nach weiteren 30 min bei RT photometrisch bei 558 nm vermessen. Die Extinktion der Lösung ist dem Gehalt an Hydroxyprolin direkt proportional. Für die Kalibrierung wurde zuvor eine

Verdünnungsreihe mit reinem Hydroxyprolin hergestellt und durch Zweifachmessung eine Kalibriergerade erstellt. Als Blindwert wurde die Reaktion mit Aqua dem. durchgeführt.

### **2.2.2.3. Alkalische Hydrolyse**

Um die Bindung zwischen Protein- und Kohlenhydratanteil im AGP näher zu charakterisieren, wurde eine alkalische Hydrolyse des AGP durchgeführt. Hierbei wird der Proteinanteil zerstört und es resultieren Oligo- bzw. Polysaccharidseitenketten mit noch einer Aminosäure, die für die Verbindung von Zucker zu Protein verantwortlich ist. Hierzu wurden 30 mg AGP in 6 ml 0,6 N NaOH aufgenommen und auf 2 Wheatongefäße verteilt. Über 18 h wurde die Probe bei 105°C nun hydrolysiert. Die auf RT abgekühlten Proben wurden daraufhin mit 0,1 N HCl neutralisiert und anschließend auf wenige Milliliter am Rotationsverdampfer bei 35°C eingengt. Danach wurde der Reaktionsansatz auf ein Endvolumen von 100 ml 80% (v/v) Ethanol gebracht. Die Polysaccharide wurden bei 4°C über Nacht gefällt und der Niederschlag am nächsten Tag bei 4°C für 20 min bei 10000 g abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem Ethanol (80% v/v) wurde der Niederschlag mit wenig Aqua bidest. aufgenommen und einer fünftägigen Dialyse (MWCO 6000-8000 Da) unterzogen. Nach Gefriertrocknung schloss sich eine 22-stündige saure Hydrolyse mit 6 N HCl bei 110°C an. Nach einer Zentrifugation (dreimal 20 min., 10000 g) wurde der Überstand am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und in wenig Wasser aufgenommen und erneut gefriergetrocknet. Das trockene Produkt wurde erneut in wenig Wasser aufgenommen und in ein vorher austariertes Eppendorf-Gefäß gegeben, eingefroren und in diesem gefriergetrocknet.

Nun konnten verbliebene Aminosäuren per HPLC analysiert werden (Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der CAU Kiel). Hierzu wurde als Fließmittel ein Lithiumacetat-Puffer mit wechselnden pH-Werten von 2,95 bis 10,3 benutzt. Die Aminosäuren wurden nach einer Derivatisierung mit Ninhydrin-Reagenz photometrisch bei 440 und 570 nm detektiert (Gerät: Oncen, Biochrom 30, Säule: FGO369).

### 2.2.3. Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) wird eingesetzt, um das hydrodynamische Volumen beziehungsweise das absolute Molekulargewicht von Makromolekülen zu bestimmen. Es handelt sich dabei um eine Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography = SEC). Hierbei treten durch die Porengrößen der stationären Phase verschieden große Verbindungen unterschiedlich stark in Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial. Niedermolekulare Verbindungen wechselwirken stärker mit den Poren und werden somit stärker zurückgehalten als hochmolekulare Verbindungen. Die Detektion erfolgte mit einem Vielwinkel-Streulichtdetektor (MALLS = Multi-Angle-Laser-Light-Scattering-Detector), der das absolute Molekulargewicht durch Messung des Streulichtes in Abhängigkeit von Molekülform und Molekülgröße misst.

Zur Überprüfung der Methode wurden Pullulane verwendet (PL Polysaccharide Standard Kit SAC-10, Fa Varian). Bei ihnen handelt es sich um linear aufgebaute Polymaltotriosen, die aus *Aureobasidium pullulans* gewonnen werden. Aufgrund des linearen Charakters stellen die Pullulane jedoch keinen idealen Standard im Hinblick auf die eher kugeligen AGPs dar (Fincher et al., 1983; Qi et al, 1991). Es wurde 1 mg Standard pro ml Eluent eingewogen und über Nacht bei 4°C quellen gelassen. Vor der Injektion erfolgte eine Filtration der Lösung (NALGENE® Syringe Filters, Porengröße 0,45 µm, Celluloseacetat). Anschließend wurden 100 µl der Lösung auf die Säule aufgetragen.

Säulen: 1x PL Aquagel-OH Guard 8µm, 50x7,5mm  
3x PL Aquagel-OH MIXED 8µm, 300x7,5mm  
MW Operating Range 100-10.000.000,  
Fa. Polymer Laboratories GmbH, Darmstadt, Deutschland

Eluent: 0,2M NaNO<sub>3</sub>, 0,01M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% NaN<sub>3</sub>, pH8, filtriert

Filtrations-  
einheit: Satorius 0,1 µm Filter und entgast (Ultraschallbad)

Gerät: PL-GPC 50 Plus Fa. Polymer Labs GmbH, Darmstadt, Deutschland

Flussrate: 1,0 ml/min

Injektionsvolumen: 100  $\mu$ l  
Detektoren: MALLS-Detektor miniDAWN  
Fa. Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, USA  
Software: ASTRA for Windows 4.70.07

### 2.3. Immunologische Methoden

#### 2.3.1. Herstellung von polyklonalen $\beta$ GlcY-Antikörpern

##### Verwendete Chemikalien und Geräte

**Chemikalien:** KLH (keyhole limpet haemocyanin, Firma Fluka MW~350kDa)

NaHCO<sub>3</sub> 50 mmol/l (210,03 mg auf 50 ml Aqua bidest, pH 8,5)

Yariv-Reagenz

Natriumperjodat

Natriumcyanoborhydrid

Essigsäure

Harnstoff

PBS-Puffer, pH 7,4

**Geräte:** Ultrafiltrationskonzentratoren (z.B. Fa Millipore, BSA 10kDa, für KLH 50kDa und 30 KDa)  
pH-Meter

##### Durchführung

Zunächst wurde Schlüssellochschnecken-Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin = KLH) gegen NaHCO<sub>3</sub> Puffer (50 mM, pH 8,5) dialysiert und auf eine Konzentration von ca. 10 mg/ml gebracht. Zusätzlich wurde  $\beta$ GlcY in Aqua bidest. gelöst (10 mg/ml) und für 1 h bei RT mit Natriumperiodat (0,95 mol / mol  $\beta$ GlcY) behandelt. Dieser Reaktionsansatz wurde daraufhin zum KLH gegeben und 5 h bei RT inkubiert. Nach der Zugabe eines Überschusses an Natriumcyanoborhydrid (10 mol / mol  $\beta$ GlcY) wurde der Ansatz mit Essigsäure auf pH 4 eingestellt und erneut

## 2. EXPERIMENTELLER TEIL

12 h bei RT inkubiert. Es folgte eine Ultrafiltration der Reaktionsmischung bei 20°C mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa (Eluent: 3 M Harnstofflösung) zur Entfernung von ungekoppeltem  $\beta$ GlcY. Die Reaktionslösung wurde in PBS pH 7,4 (1 mg/ml) aufgenommen und filtriert (0,2  $\mu$ m, Fa. Squarix, Marl). Diese Lösung wurde zur Verstärkung der Immunantwort zum gleichen Teil mit komplettem Freund-Adjuvans (KFA) viermal in zwei NZW-Kaninchen subcutan injiziert (0,3 mg gekoppeltes  $\beta$ GlcY pro Injektion und Tier, Charles River, Kiblegg).

Das gewonnene Antiserum wurde mit Ammoniumsulfat präzipitiert, in PBS gelöst und gegen PBS mit 0,05% Azid dialysiert. Die mit IgG angereicherte Fraktion wurde per Affinitätschromatographie durch Kopplung von Yariv an die Säule aufgereinigt.

### 2.3.2. ELISA

Der indirekte ELISA wurde nach folgendem Schema durchgeführt (siehe Abbildung 2.6).

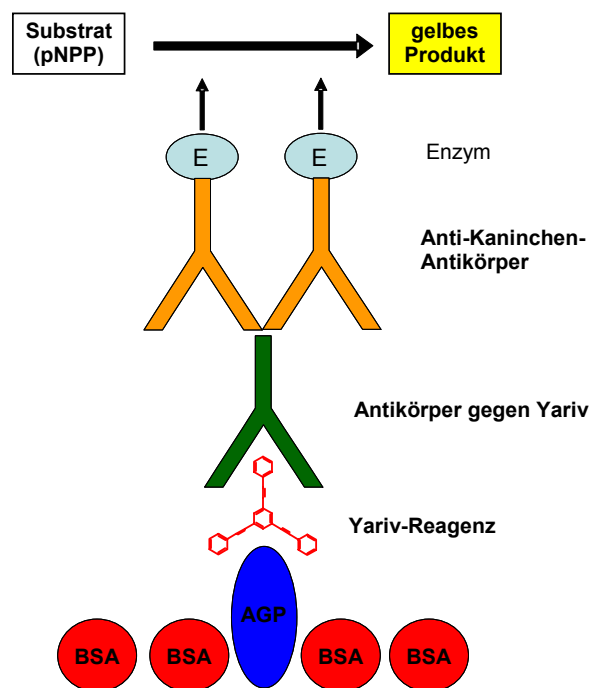


Abbildung 2.6: Aufbau ELISA

Mikrotiterplatten wurden mit 100  $\mu$ l AGP aus der Wurzel von *Echinacea purpurea* (in steigender Konzentration nach unten aufgeführtem Schema) pro Kavität



## 2. EXPERIMENTELLER TEIL

beschichtet und über Nacht bei 36°C im Brutschrank mit offenem Deckel gelagert. Nach dem Waschen mit PBS-Waschpuffer wurden freie Bindungsstellen auf der Platte mit je 200 µl 1-prozentiger BSA-Lösung abgesättigt (1 h, 36°C) und erneut mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden pro Kavität 100 µl Yariv-Lösung (0,1 mg/ml in 0,15 molarer NaCl, 1 h, 36°C) hinzugegeben (Blindwert ausgenommen). Nach weiterem Waschen wurde in jede Kavität 100 µl Anti-Yariv-AK (Reihe 3-5 in einer Verdünnung von 1:100 und Reihe 6-8 in einer Verdünnung von 1:200) einpipettiert und inkubiert (1 h, 36°C). Nach dem Waschen wurde der Detektorantikörper (Anti-Kaninchen IgG AK, Verdünnung 1:500, 100 µl pro Kavität, markiert mit alkalischer Phosphatase) zugegeben und 1 h bei 36°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 µl Substrat (Sigma Fast™ p-Nitrophenylphosphate Tablet Set, Fa. Sigma-Aldrich, USA) zugegeben und die Platte bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gelagert. Zur Herstellung des Substrats wurde eine Tablette in 20 ml TRIS-Puffer gelöst. Gemessen wurde die Absorption nach 5 min, 10 min und 15 min bei 405 nm gegen 690 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>A</b>									
<b>B</b>		<b>Blind</b>	<b>5 µg/ml</b>	<b>5 µg/ml</b>	<b>5 µg/ml</b>	<b>5 µg/ml</b>	<b>5 µg/ml</b>	<b>5 µg/ml</b>	
<b>C</b>		<b>Blind</b>	<b>10 µg/ml</b>	<b>10 µg/ml</b>	<b>10 µg/ml</b>	<b>10 µg/ml</b>	<b>10 µg/ml</b>	<b>10 µg/ml</b>	
<b>D</b>		<b>Blind</b>	<b>25 µg/ml</b>	<b>25 µg/ml</b>	<b>25 µg/ml</b>	<b>25 µg/ml</b>	<b>25 µg/ml</b>	<b>25 µg/ml</b>	
<b>E</b>		<b>Blind</b>	<b>50 µg/ml</b>	<b>50 µg/ml</b>	<b>50 µg/ml</b>	<b>50 µg/ml</b>	<b>50 µg/ml</b>	<b>50 µg/ml</b>	
<b>F</b>		<b>Blind</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	
<b>G</b>									
<b>H</b>									

Abbildung 2.7: Pipettierschema ELISA für AGP

### 2.4. Mikroskopie

#### 2.4.1. Cryoschnitte sekundärer Wurzeln

Zur Durchführung einer Immunmarkierung der AGPs am Pflanzenschnitt wurden ca. 3-5 mm lange Abschnitte frischen Wurzelmaterials in 8% Methanol überführt und für 10 min evakuiert. Das Wurzelmaterial wurde dann in Tissue Freezing Medium (Fa. Jung) eingefroren und am Frigocut 2800E (Fa. Jung) in 10-20 µm dünne Scheiben geschnitten, welche bei -20°C auf SuperFrost®Plus Objektträgern (OTs) eingefroren wurden.

#### 2.4.2. Cryoschnitte von Keimwurzeln von *Echinacea purpurea*

Samen von *Echinacea purpurea* wurden 8 min in Ethanol (96% v/v), und nach dem Abfiltrieren 7 min in Aqua bidest. geschwenkt. Zur Herstellung von Keimlingen wurden vorher alle benötigten Materialien autoklaviert und alle weiteren Arbeiten unter der LAF-Bench (Antair ZKB, Fa. Mahl) durchgeführt. Eine 10-prozentige Mischung von Natriumhypochlorit, Natriumhydroxid und nichtionischen Tensiden diente einer 30-minütigen äußerlichen Desinfektion der Samen auf dem Schüttler. Danach wurden die Samen dreimal mit sterilem Wasser gewaschen. Filterpapier in gläsernen Petrischalen wurde vollständig mit sterilem Wasser befeuchtet und es wurden jeweils 6 Samen in jeder Petrischale ausgelegt. Die Glaspetrischalen wurden im temperierten Dunkelraum gelagert und täglich auf Wachstum und eventuellen Pilzbefall kontrolliert. Pilzbefallene Samen konnten so unter dem LAF entfernt werden. Die Wurzeln der so hergestellten Keimlinge wurden nach 7-10 Tagen in 3-5 mm lange Abschnitte zerschnitten und, wie unter 2.4.1. beschrieben, Cryostat-Präparate daraus hergestellt.

#### 2.4.3. Mikrotom-Schnitte

Zusätzlich zu den Cryostat-Präparaten wurden frisches Wurzelmaterial und angezüchtete Keimwurzeln am Mikrotom geschnitten. Daraus resultierten mikroskopische Präparate mit einer Dicke von ca. 20 µm.

### 2.4.4. Pufferlösungen

#### Herstellung TBS-Puffer

50 ml 0,2 M TRIS und 30 ml 5 M NaCl wurden mit Aqua bidest auf 100 ml verdünnt.

#### Herstellung Verdünnungspuffer

TBS-Puffer wurde mit 0,3% BSA und 0,1% Tween 20 versetzt.

#### Herstellung Blockierpuffer

TBS-Puffer wurde mit 3% BSA versetzt.

### 2.4.5. Herstellung Mowiol-DABCO

Zur Herstellung des Reagenzes zur Fluoreszenz-Verzögerung wurden 6 g Glycerol (analytical grade) mit 2,4 g Mowiol 4-88 (Calbiochem # 475904), 6 ml Aqua bidest, 12 ml 0,2 M TRIS pH 8 und 0,1% DABCO versetzt und über Nacht auf dem Magnetrührer gerührt. Die resultierende Suspension wurde bei RT für 2 h ruhen gelassen und anschließend für 10 min bei 50°C im Wasserbad erwärmt. Danach wurde die Lösung bei 5000 g für 15 min zentrifugiert und der Überstand wurde aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -20°C eingefroren.

### 2.4.6. Immunmarkierung der AGPs am Cryoschnitt

#### Verwendung von Antikörpern gegen *Echinacea* AGP

Zur Immunmarkierung der Cryoschnitte wurden die tiefgefrorenen OTs mit den Schnitten in -20°C Aceton überführt und dann 30 min bei RT langsam aufgetaut. Zur Immunmarkierung der frischen Präparate wurden die Objektträger bei RT für 30 min zur Fixierung in Aceton gegeben. Danach schlossen sich jeweils eine 5-minütige Trocknung bei 37°C und eine 30-minütige Aufbewahrung in PBS-Puffer an. Nach

## 2. EXPERIMENTELLER TEIL

---

einer einstündigen Behandlung auf dem Schüttler mit Blockierpuffer wurde auf die Schnitte jeweils ein Tropfen mit polyklonalem Antikörper (hergestellt im Kaninchen gegen *Echinacea* AGP) in einer 1:50 Verdünnung (mit Verdünnungspuffer) gegeben und 1 h in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach der Inkubation wurde der AK im PBS-Bad für dreimal 5 min abgewaschen. In der Feuchtkammer wurden nun zweimal für 5 min Verdünnungspuffer in Tropfen auf die Schnitte gegeben. Es folgte der FITC-markierte Sekundär-Antikörper (FITC-Anti-Kaninchen IgG 1:100 verdünnt), welcher ebenfalls in Tropfen aufgegeben wurde. Nach 1 h wurde der Sekundär-Antikörper mit PBST-Puffer dreimal für 5 min abgewaschen und der Objektträger wurde mehrmals kurz in Wasser getaucht, um überschüssigen Puffer zu entfernen. Parallel wurden Kontrollpräparate angefertigt, bei denen der polyklonale Antikörper gegen das AGP durch einfachen Verdünnungspuffer ersetzt wurde.

### **Einbettung in Mowiol-DABCO**

Aus einem aufgetauten Aliquot Mowiol-DABCO wurde zur Fluoreszenz-Verzögerung ein kleiner Tropfen auf den mikroskopischen Schnitt gegeben. Auf diesen Tropfen wurde mit einer Pinzette vorsichtig und ohne Druck ein Deckgläschen aufgebracht. Nach ca. 12 h war das Mowiol auspolymerisiert und der Schnitt konnte unter dem CLSM betrachtet werden.

### **Verwendung von Antikörpern gegen $\beta$ GlcY**

Tiefgefrorene OTs mit den Schnitten wurden in  $-20^{\circ}\text{C}$  Aceton überführt und 30 min bei RT langsam aufgetaut. Danach wurden sie 5 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet und 30 min in PBS-Puffer gegeben. Nach einer einstündigen Behandlung auf dem Schüttler mit Blockierpuffer wurde nun, abweichend von der ersten Reihe, auf die Schnitte jeweils ein Tropfen Yariv-Lösung (1 mg/ml in 0,15 M NaCl) gegeben und 1,5 h inkubiert. Nach drei 5-minütigen Waschschritten mit PBS-Puffer wurde für 1 h ein polyklonaler Antikörper gegen  $\beta$ GlcY (1:25 siehe 2.3.1.) auf die Yariv-behandelten Schnitte gegeben. Nach erneutem Spülen mit PBS und Behandlung mit Verdünnungspuffer (2x5 min in Tropfen in einer Feuchtkammer) wurde zuletzt ebenfalls ein FITC-markierter Anti-Kaninchen-Antikörper (Goat Anti-Rabbit IgG FITC Conjugate, Fa. Sigma-Aldrich, USA) in einer 1:100 Verdünnung (mit

Verdünnungspuffer) auf die Schnitte gegeben und 1 h in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach der Inkubation wurde der AK im PBST-Bad für dreimal 5 min abgewaschen und der Objektträger mehrmals kurz in Wasser getaucht, um überschüssigen Puffer zu entfernen. Parallel wurden Kontrollpräparate angefertigt, bei denen zum einen der Anti-Yariv-Antikörper und zum anderen das Yariv-Reagenz durch einfachen Verdünnungspuffer ersetzt wurde.

### **2.5. Andere Methoden**

#### **2.5.1. Geldiffusionstest**

Mit dem aufgereinigten AGP wurde ein Geldiffusionstest durchgeführt. Hierzu wurden 20 ml eines autoklavierten Agarosegels (1% in 10 mM Tris-Puffer pH 7,3 mit NaCl 0,9% und 1 mmol CaCl<sub>2</sub>) in eine 9 cm-Petrischale gegossen. Nach dem Aushärten wurden in das Gel 5 Löcher (4 mm Durchmesser) gestanzt. In die mittlere Kavität wurden 20 µl Yariv-Lösung (1 mg/ml) einpipettiert, in die Kavitäten links je 20 µl einer AGP-Lösung (1 mg/ml) und in die Kavitäten rechts je 20 µl einer höher konzentrierten AGP-Lösung (5 mg/ml).

#### **2.5.2. Antioxidative Kapazität / Trolox Test**

Im Reagenzgefäß wurde mit Hilfe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein oxidatives Milieu geschaffen, in welchem aus dem ABTS-Reagenz (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) das stabile, grün gefärbte ABTS<sup>+</sup>-Kation entstand, das photometrisch bei 734 nm vermessen wurde. Das Prinzip der Messung basiert darauf, dass Antioxidantien die Bildung des ABTS<sup>+</sup>-Kations hemmen. Zur Korrelation des antioxidativen Potentials von Substanzen wird der sogenannte TEAC-Wert (Trolox equivalent antioxidant concentration) bestimmt, welcher als die Konzentration einer Trolox-Lösung mit der gleichen antioxidativen Aktivität wie eine 1mM Lösung des untersuchten Antioxidants definiert ist. Trolox ist ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat, bei dem es sich um α-Tocopherol mit einer Carbonsäuregruppe anstelle der Phythylseitenkette handelt. Zur Messung des TEAC-Wertes wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils eine Trolox-Kalibrierreihe erstellt und das AGP in zwei verschiedenen Konzentrationen (1 mg/ml und 3 mg/ml) vermessen.

## **3. Analytische Ergebnisse**

### **3.1. Ausbeuten**

Nach 2.1.1. wurden insgesamt 4 Extrakte der Wurzel von *Echinacea purpurea* hergestellt (siehe Abbildung 2.1). Da die Arabinogalactan-Proteine wasserlöslich sind, finden sie sich in einem wässrigen Extrakt wieder. Nach einer Proteinfällung wurde der Extrakt in ein niedermolekulares Filtrat und in ein hochmolekulares Retentat per Tangentialflussfiltration aufgeteilt. Um letzte Mono- und Oligosaccharide sowie sonstige niedermolekulare Bestandteile aus dem Retentat zu entfernen, schloss sich die Dialyse an. Das dialysierte Retentat wurde gefriergetrocknet, analysiert und zur Isolierung der AGPs eingesetzt. Der Gehalt an AGP in der getrockneten Droge wird beispielhaft anhand des Mischretentats berechnet.

Aus insgesamt 2600 g Droge wurden 40,0 g hochmolekulares Retentat (also 1,54% m/m) gewonnen, welches jedoch nicht komplett wasserlöslich war. Dispergierte man 200 mg in Aqua dem. und zentrifugierte den wasserunlöslichen Teil ab, verblieben vom Retentat 32,3 mg, oder 16,2% m/m (respektive 0,25% m/m der Ausgangsdroge) in Lösung. Von diesen 0,25% konnten 50,5% (m/m) als AGP identifiziert werden. Das entspricht einem Gehalt von 0,13% AGP in der Droge.

### **3.2. Charakterisierung des Kohlenhydratanteils**

#### **3.2.1. Ermittlung der relativen Retentionen und der Response-Faktoren**

Eine Zuckerstandard-Lösung wurde in regelmäßigen Abständen gaschromatographisch vermessen und die relativen Retentionszeiten bezogen auf Myo-Inositol berechnet (siehe 2.2.1.6.). Mit Hilfe der ermittelten Retentionszeiten erfolgte die Identifizierung der Zucker bei der Neutralzuckeranalyse. Mit Hilfe der Response-Faktoren wurden die Ergebnisse der automatisierten Integrationen korrigiert. Es

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

---

ergaben sich für die Neutralzucker folgende relative Retentionen und Response-Faktoren (siehe Tabelle 3.1).

<b>Zucker</b>	<b>Relative Retentionszeit</b>	<b>Response-Faktor</b>
Rhamnose	0,342	1,562
Fucose	0,357	1,321
Arabinose	0,417	1,098
Xylose	0,490	1,165
Mannose	0,839	1,212
Galactose	0,909	1,175
Glucose	0,966	1,424
Inositol	1,000	1,000

**Tabelle 3.1: Relative Retentionen und Response-Faktoren der Zucker nach Derivatisierung zu Alditolacetaten und Vermessung im Gaschromatographen**

#### **3.2.2. Neutralzuckerzusammensetzungen von Retentat und Filtrat**

Da Arabinogalactanproteine zum großen Teil aus Arabinose und Galactose bestehen, wurden zunächst die Neutralzuckerzusammensetzungen der erhaltenen Fraktionen mit speziellem Augenmerk auf diese beiden Zucker hin untersucht. Hierzu wurde eine Acetylierungsanalyse nach Blakeney durchgeführt (siehe 2.2.1.1.), wobei die nach einer sauren Hydrolyse entstandenen Monomere reduziert und zu den korrespondierenden Alditolacetaten derivatisiert wurden. Diese Methode hat sich als gut reproduzierbar herausgestellt. Jedes Monosaccharid ist über einen einzelnen Peak durch die Retentionszeit identifizierbar. Die Messung der Zucker am Gaschromatographen erfolgte jeweils gegen Myo-Inositol als inneren Standard. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Bindungen von Uronsäuren schwer hydrolysierbar sind und es zur Freisetzung von Aldobiuronsäuren kommt. So werden die Uronsäuren und ein Teil der mit den Uronsäuren verknüpften Neutralzucker bei der Analytik nicht erfasst.

### 3.2.2.1. Retentat I

Nach der Gefriertrocknung lagen 8,73 g Retentat vor, also 1,1% der eingesetzten Droge. Zur Analytik von Retentat I wurden 9,6 mg Probe acetyliert und gaschromatographisch vermessen (siehe 2.2.1.6.).

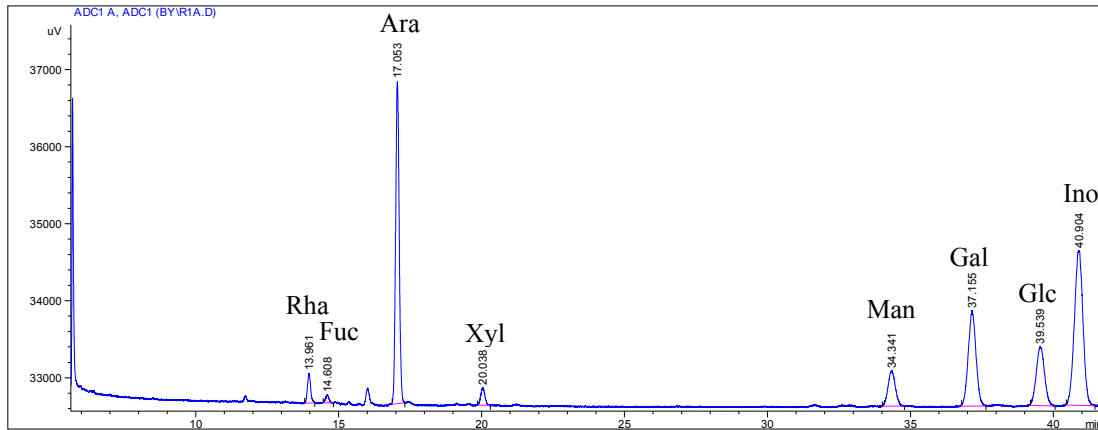


Abbildung 3.1: Gaschromatogramm der Alditolacetate aus Retentat I

Bei einer Ausbeute von 13,4% ergab die Neutralzuckeranalyse von Retentat I folgende Werte:

Zucker	% (m/m)
Arabinose	37,2
Galactose	25,4
Glucose	20,4
Mannose	9,2
Rhamnose	4,3
Xylose	2,5
Fucose	1,0

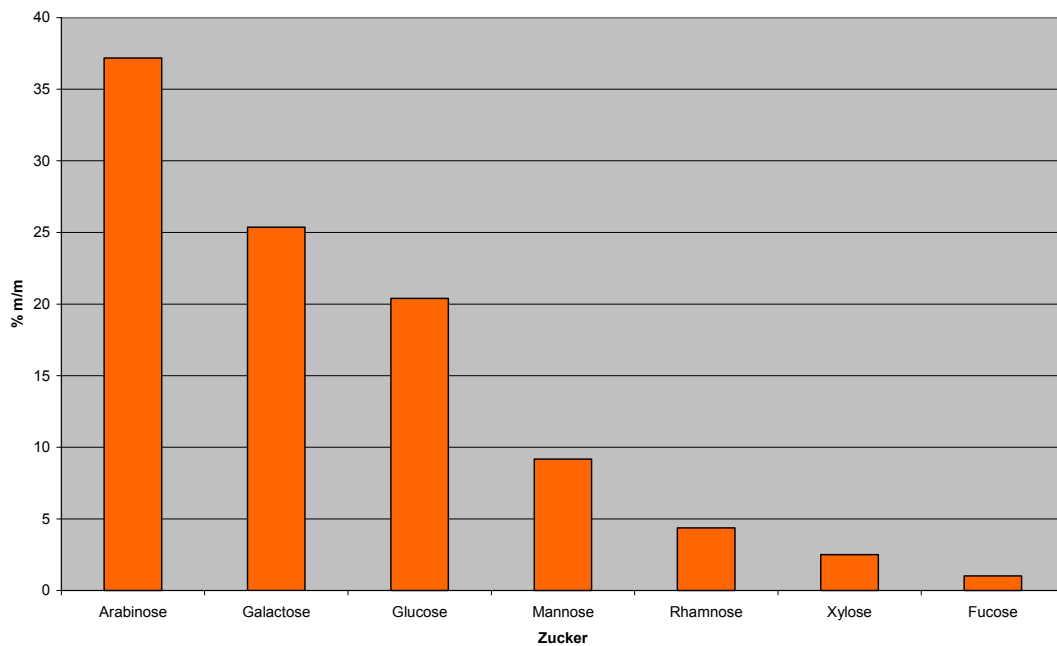
Tabelle 3.2: Massenprozentuale Zusammensetzung der Neutralzucker aus Retentat I



### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

---

Auffällig ist der erwartete hohe Gehalt an Arabinose und Galactose mit 37,2% und 25,4%, also 62,6% der Ausbeute (siehe Abbildung 3.2). Ein hoher Gehalt an Glucose lässt vermuten, dass relativ viel Stärke aus den Wurzeln mit extrahiert wurde. Die Ausbeute an Neutralzuckern von 13,4% von den eingesetzten 9,6 mg ist sehr gering. Es zeigt, dass die Probe nicht nur aus Zuckern besteht, was auch die tiefbraune Farbe des gefriergetrockneten Retentats noch unterstreicht. In der folgenden Abbildung ist die Neutralzuckerzusammensetzung grafisch dargestellt.



**Abbildung 3.2: Neutralzuckerzusammensetzung: Retentat I**

#### 3.2.2.2. Retentat II

Aus Retentat II ergaben sich gefriergetrocknet 14,1 g, also 1,4% der eingesetzten Ausgangsdroge. Die Zuckeranalytik wurde wie zuvor mit 9,7 mg Probe durchgeführt (siehe Abbildung 3.3).

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

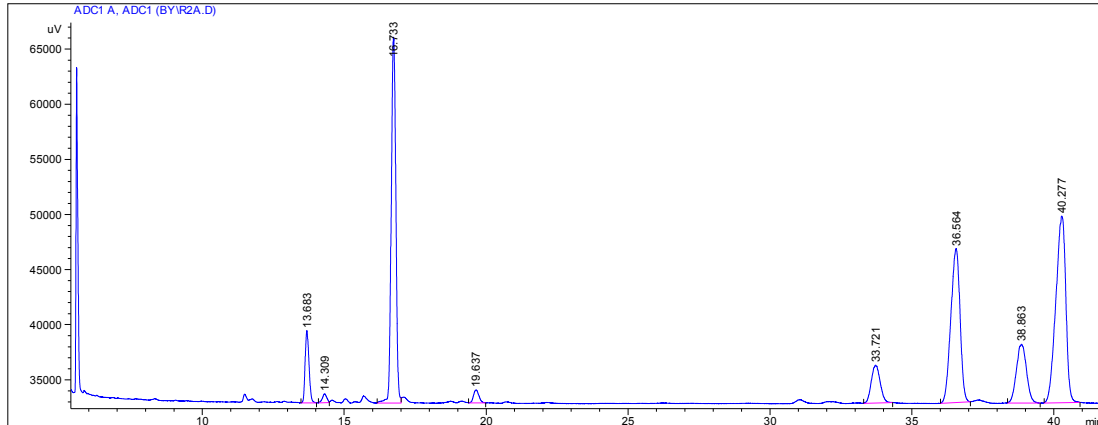


Abbildung 3.3: Gaschromatogramm der Alditolacetate aus Retentat II

Die Ausbeute an Zuckern lag bei Retentat II bei 16,8%, also etwas höher als bei Retentat I. Die exakten Werte werden in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Zucker	% (m/m)
Arabinose	30,5
Galactose	27,5
Glucose	14,0
Mannose	6,7
Rhamnose	7,2
Xylose	13,2
Fucose	0,9

Tabelle 3.3: Massenprozentuale Zusammensetzung der Neutralzucker aus Retentat II

Auffällig ist der überraschend hohe Gehalt an Xylose im Retentat, ansonsten ist die Neutralzuckerzusammensetzung vergleichbar mit der des Retentats I. Arabinose und Galactose machen auch hier mit 30,5% und 27,5% den höchsten Gehalt mit zusammengerechnet 58% aus. Grafisch stellt sich die Neutralzuckerzusammensetzung wie folgt dar:

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

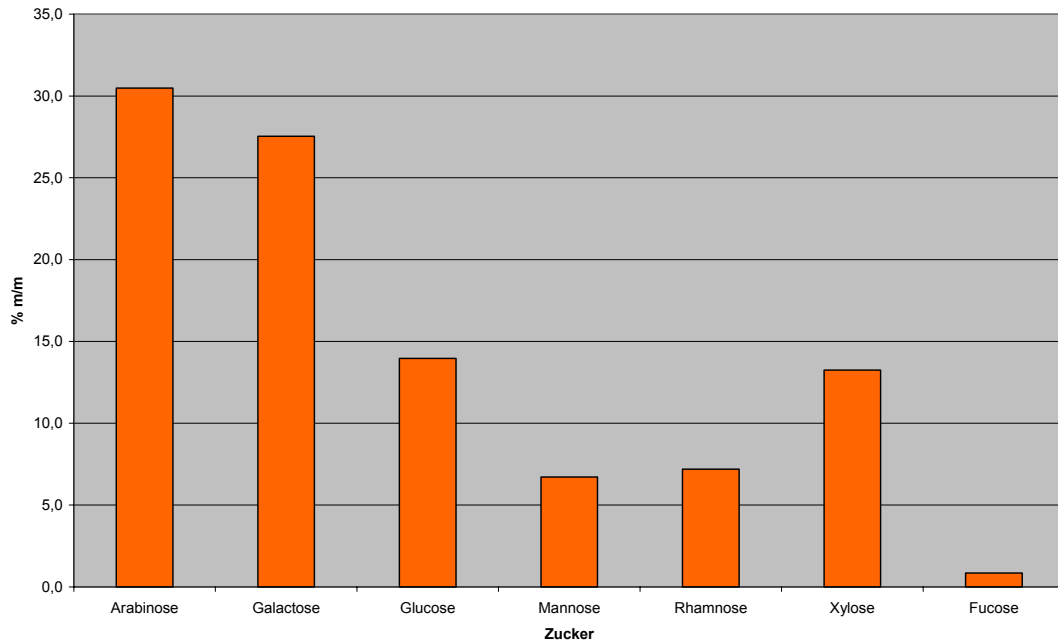


Abbildung 3.4: Neutralzuckerzusammensetzung: Retentat II

#### 3.2.2.3. Retentat III

Aus Retentat III ergab sich nach Gefriertrocknung 18,82 g, was mit 2,4% den höchsten Gehalt ausgehend von der eingesetzten Droge darstellt. Bei der Analytik von 19,2 mg Probe ergab sich folgendes Chromatogramm:

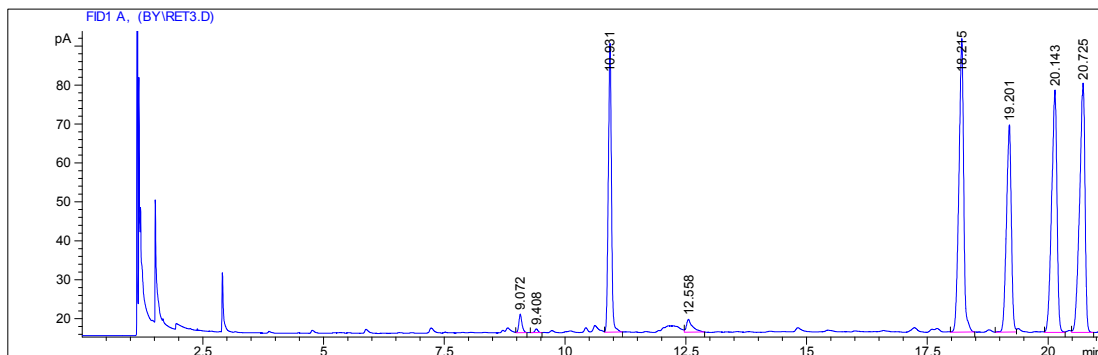


Abbildung 3.5: Gaschromatogramm der Alditolacetate aus Retentat III

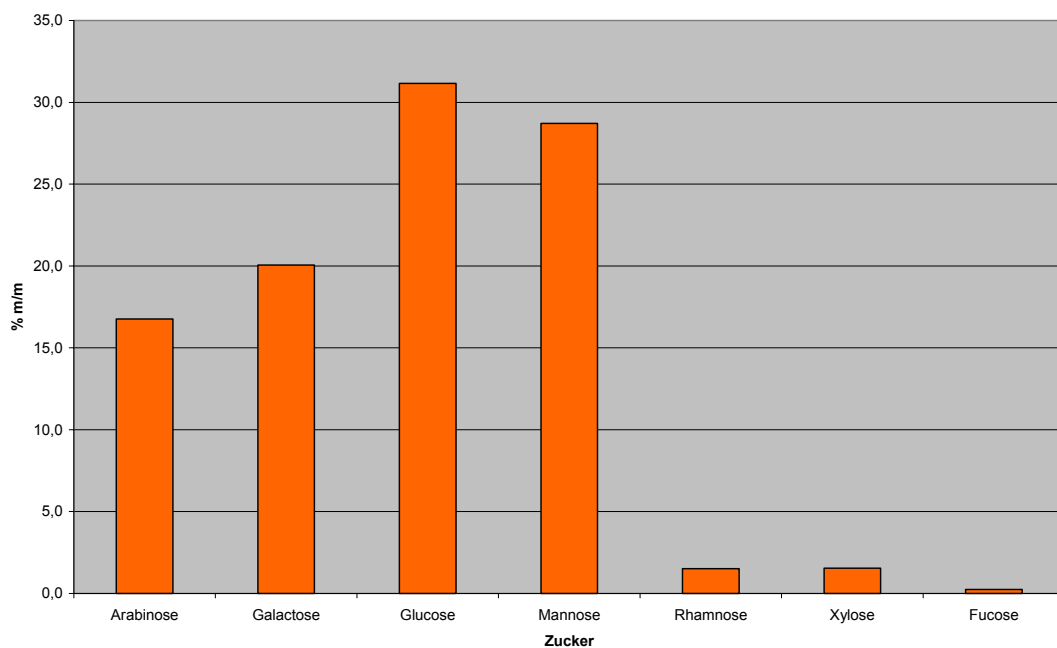
Die Ausbeute an Neutralzuckern von Retentat III lag bei 11,4%. Tabelle 3.4 zeigt die Neutralzuckerzusammensetzung.

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

Zucker	% (m/m)
Arabinose	16,8
Galactose	20,1
Glucose	31,2
Mannose	28,7
Rhamnose	1,5
Xylose	1,5
Fucose	0,2

**Tabelle 3.4: Massenprozentuale Zusammensetzung der Neutralzucker aus Retentat III**

Die Neutralzuckerzusammensetzung von Retentat III weicht von den Zusammensetzungen der anderen Retentatfraktionen ab. Nicht Arabinose und Galactose stellen hier mit 16,8% und 20,1% Massenprozentual den größten Anteil, sondern Glucose und Mannose mit 31,2%, respektive 28,7%. Dies lässt sich eventuell durch eine ungenügende Dialyse erklären.



**Abbildung 3.6: Neutralzuckerzusammensetzung: Retentat III**

### 3.2.2.4. Retentat IV

Aus Retentat IV ergaben sich nach Gefriertrocknung 9,51 g, oder 1,2% bezogen auf das Ausgangsmaterial. 17,9 mg Probe wurde acetyliert und gaschromatographisch vermessen (siehe Abbildung 3.7).

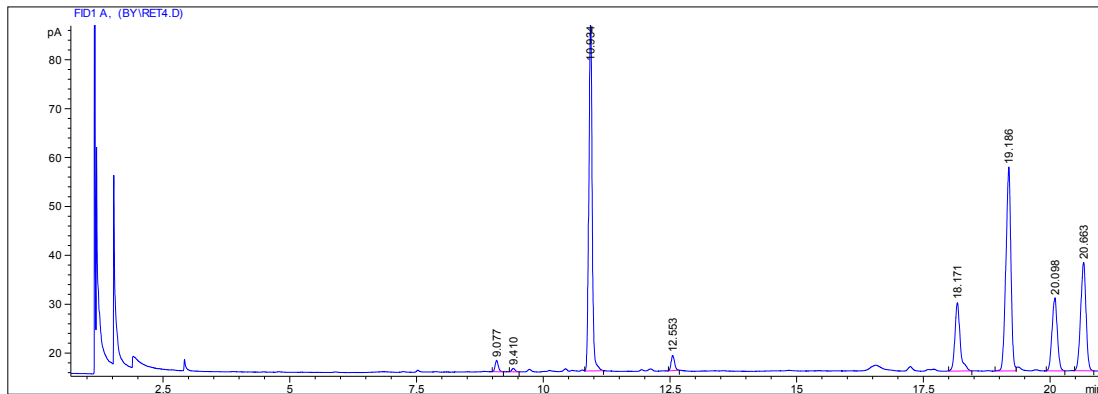


Abbildung 3.7: Gaschromatogramm der Alditolacetate aus Retentat IV

Die Ausbeute an Zuckern war mit 17,4% höher als bei den anderen Retentaten, was aufgrund der Extraktion bei erhöhter Temperatur nicht verwunderlich ist. Die massenprozentuale Zusammensetzung stellte sich wie folgt dar:

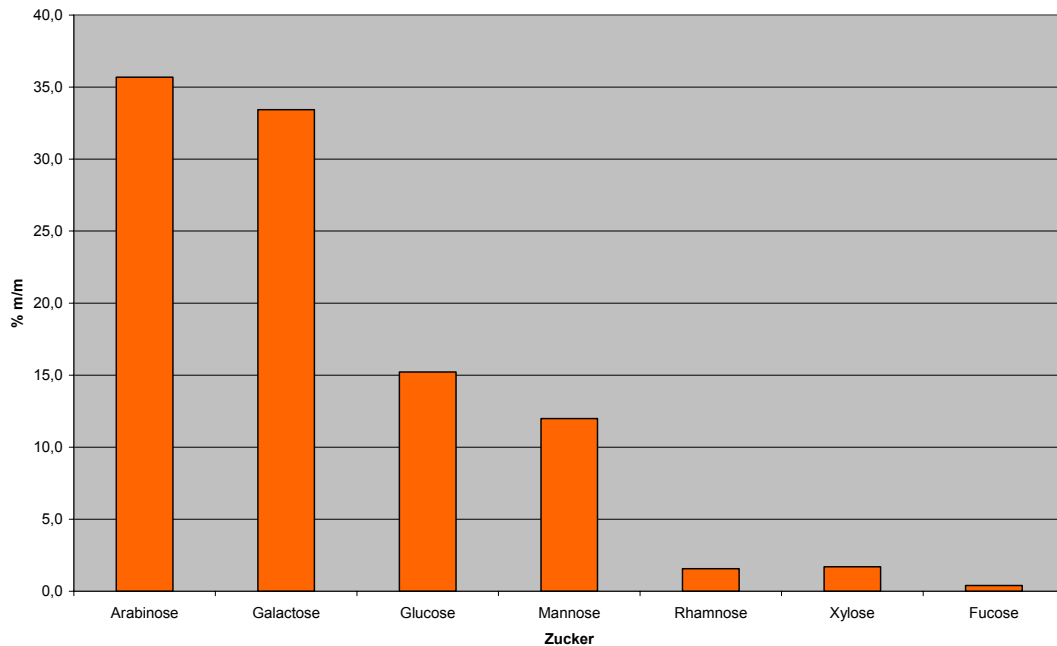
Zucker	% (m/m)
Arabinose	35,7
Galactose	33,4
Glucose	15,2
Mannose	12,0
Rhamnose	1,6
Xylose	1,7
Fucose	0,4

Tabelle 3.5: Massenprozentuale Zusammensetzung der Neutralzuckeranalyse aus Retentat IV

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

---

Die Neutralzuckerzusammensetzung des Heißextraktes ist vergleichbar mit der Zusammensetzung von Retentat I und II. Arabinose und Galactose stellen mit 35,7%, respektive 33,4% den höchsten Gehalt. Mit 69,1% der Ausbeute ist der zusammengerechnete Gehalt der beiden Zucker im Heißextrakt am höchsten (siehe Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8: Neutralzuckerzusammensetzung: Retentat IV**

#### 3.2.2.5. Filtrat

Von dem eingefrorenen Filtrat, das aus der Tangentialflussfiltration gewonnen wurde, wurde eine Probe gefriergetrocknet und 13 mg davon einer Neutralzuckeranalytik unterzogen. Im Filtrat der Tangentialflussfiltration werden alle mono- und oligomeren Zucker des pflanzlichen Extraktes erwartet: Die Ausschlussgrenze des Filters lag bei 30000 Da.

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

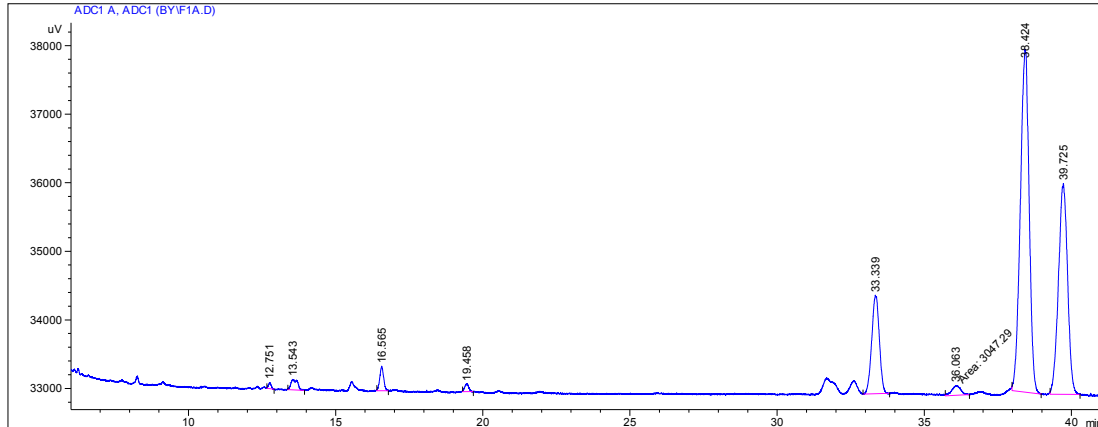


Abbildung 3.9: Gaschromatogramm der Alditolacetate aus Filtrat I

Mit 11.1% der Masse des Filtrats war die Ausbeute an Zuckern auch hier eher gering. Im Einzelnen stellte sich die Zusammensetzung der Zucker wie folgt dar:

Zucker	% (m/m)
Arabinose	1,8
Galactose	1,9
Glucose	77,2
Mannose	16,3
Rhamnose	0,4
Xylose	0,7
Fucose	1,7

Tabelle 3.6: Massenprozentuale Zusammensetzung der Neutralzucker von Filtrat I

Auffällig ist der immens hohe Anteil von Glucose im Filtrat (77,2%). Mannose stellt mit 16,3% den zweithäufigsten Neutralzucker. Dies lässt sich durch die eventuelle Anwesenheit von Fructanen erklären, die sich bei einer Größe von unter 30.000 Dalton nach der TFF im Filtrat wieder finden (siehe Abbildung 3.10).

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

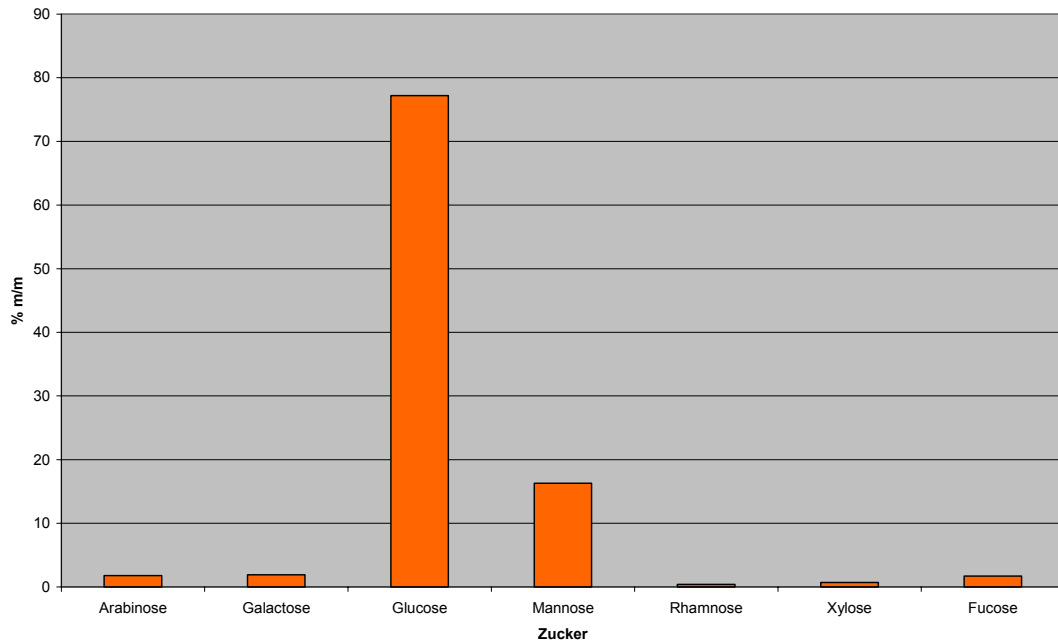


Abbildung 3.10: Neutralzuckerzusammensetzung: Filtrat I

#### 3.2.2.6. Retentatgemisch

Nach der Analytik der Retentate wurde ein Retentatgemisch der Fraktionen I-III hergestellt, indem jeweils 100 mg gemischt, in Wasser gelöst und wieder gefriergetrocknet wurden. Dieses Retentatgemisch wurde gaschromatographisch nach der Acetylierung untersucht (siehe Abbildung 3.11).

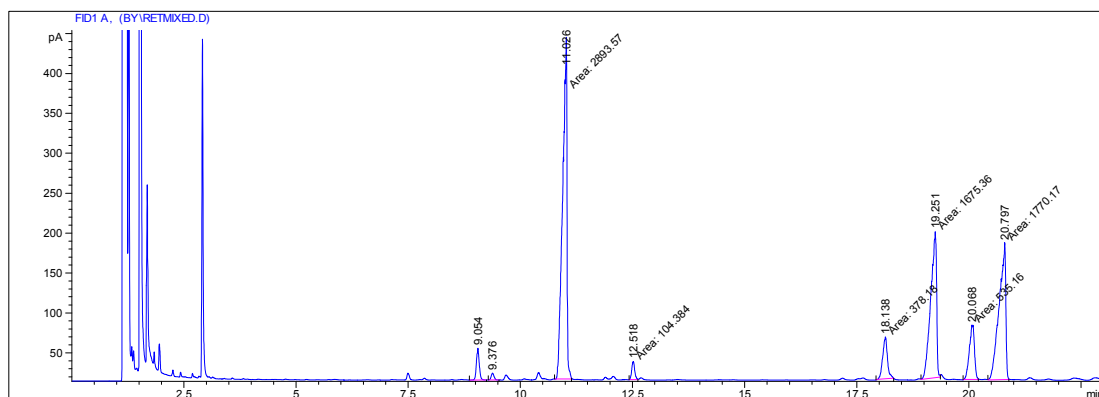


Abbildung 3.11: Gaschromatogramm der Alditolacetate aus dem Retentatgemisch

10,2 mg des Retentatgemisches wurden untersucht. 18,9% Ausbeute wurden erreicht. Folgende Tabelle veranschaulicht die Zusammensetzung der einzelnen Zucker.

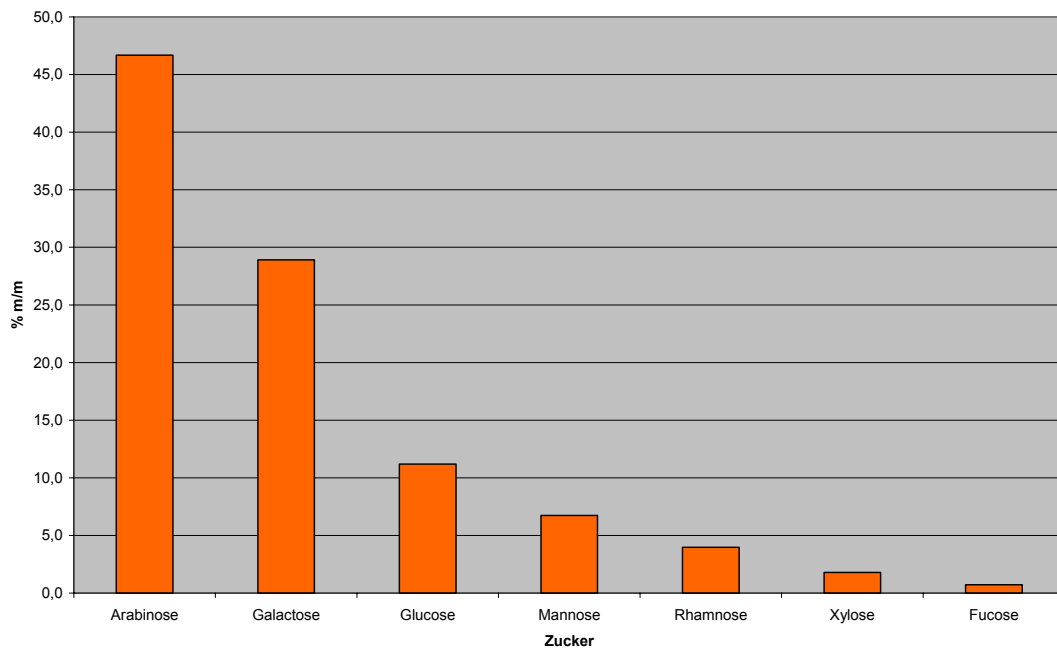


### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

Zucker	% (m/m)
Arabinose	46,7
Galactose	28,9
Glucose	11,2
Mannose	6,7
Rhamnose	4,0
Xylose	1,8
Fucose	0,7

**Tabelle 3.7: Massenprozentuale Zusammensetzung der Neutralzucker des Retentatgemisches**

Nach Analyse der Fraktionen Retentat I-III, erwartete man in deren Gemisch aus je 100 mg einen geringeren Gehalt an Arabinose sowie einen höheren Gehalt an Glucose und Mannose, in erster Linie bedingt durch die Neutralzuckerzusammensetzung von Retentat III. Das Gemisch ähnelt jedoch am ehesten Retentat I. Arabinose und Galactose stellen mit 46,7% und 28,9% den größten Anteil (siehe Abbildung 3.12). Zur Isolierung der AGPs wurden nun die kompletten Retentate I-III gemischt (siehe 2.1.1.).



**Abbildung 3.12: Neutralzuckerzusammensetzung des Retentatgemisches**

### 3.2.2.7. Vergleich aller Neutralzuckeranalysen

Abbildung 3.13 veranschaulicht die Zuckerzusammensetzung der Retentate I-IV im Vergleich zum Filtrat und zum Retentatgemisch. Bis auf Retentat II sind die Retentate sowie das Retentatgemisch alle ähnlich beschaffen. Das Filtrat fällt in der Grafik durch den hohen Glucosegehalt auf. Unter den Retentaten zeigt Retentat III auffällig hohe Mengen an Glucose und Mannose. Dies kann eventuell durch eine unvollständige Dialyse nach der Tangentialflussfiltration bedingt sein.

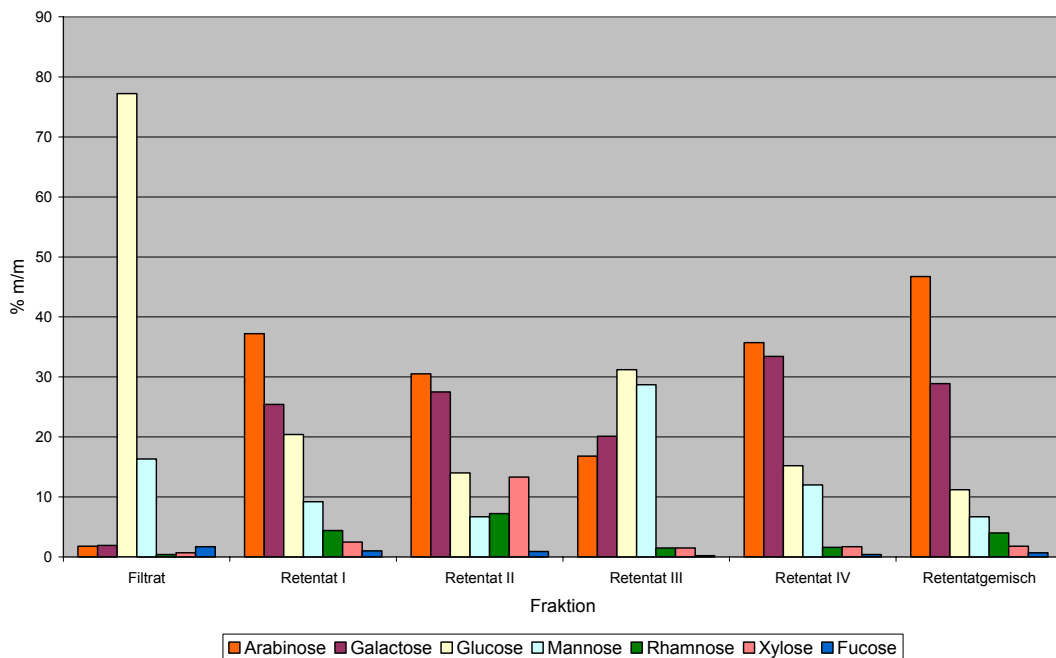


Abbildung 3.13: Vergleich aller Neutralzuckeranalysen

#### 3.2.3. Neutralzuckerzusammensetzungen der AGPs

Mit allen 4 Retentaten wurde eine Yarivfällung durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Neutralzuckeranalyse der yarivgefällten Arabinogalactan-Proteine aus den einzelnen Retentaten vorgestellt.

##### 3.2.3.1. Arabinogalactan-Protein aus Retentat I

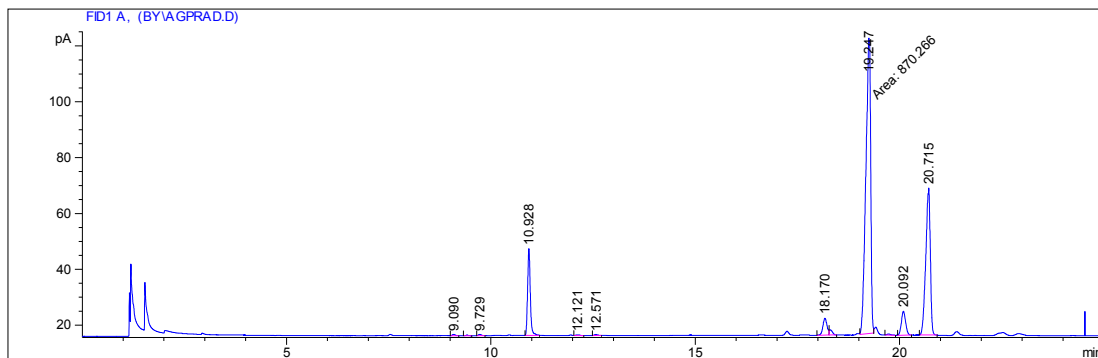


Abbildung 3.14: Gaschromatogramm des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat I

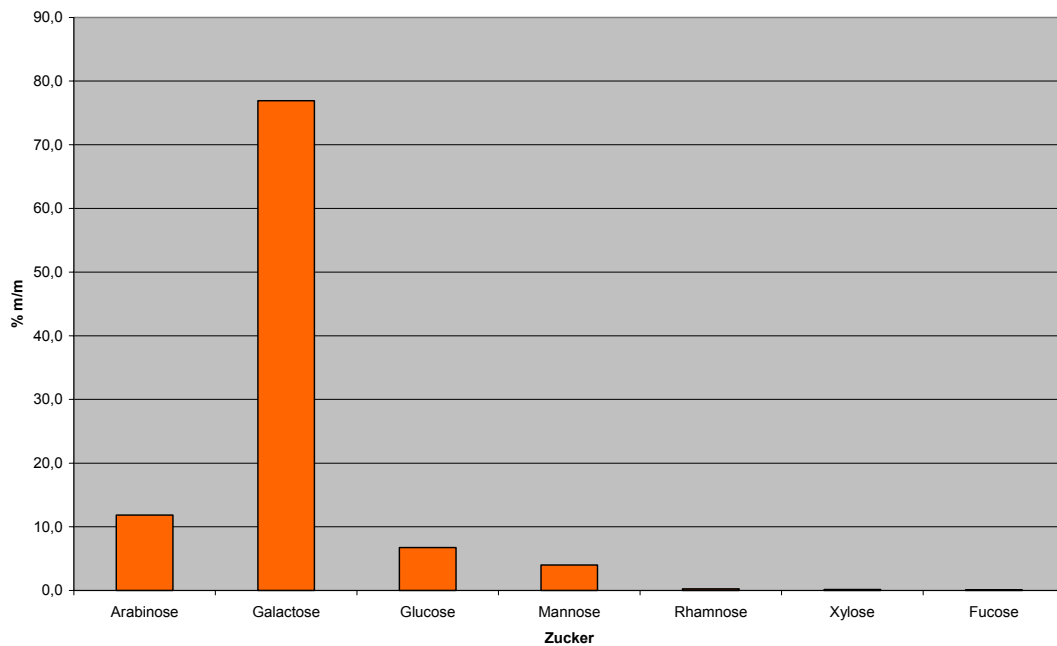
Bei der Neutralzuckeranalyse von 7,7 mg des AGPs aus Retentat I wurde eine massenprozentuale Ausbeute von 21,1% erzielt. In der Tabelle 3.8 werden die Ergebnisse im Einzelnen veranschaulicht.

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

Zucker	% (m/m)
Arabinose	11,9
Galactose	76,9
Glucose	6,7
Mannose	4,0
Rhamnose	0,2
Xylose	0,2
Fucose	0,1

**Tabelle 3.8: Massenprozentuale Neutralzuckerzusammensetzung des AGPs aus Retentat I**

Das yarivgefällte Arabinogalactan-Protein besteht wie erwartet zu einem großen Teil aus Arabinose (11,9%) und Galactose (76,9%), mit zusammengekommen 88,8% der Ausbeute (siehe Abbildung 3.15). Glucose und Mannose finden sich als zweitgrößte Fraktion mit etwas über 10% wieder. Rhamnose, Xylose und Fucose sind nur in Spuren vorhanden.



**Abbildung 3.15: Neutralzuckerzusammensetzung des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat I**

### 3.2.3.2. Arabinogalactan-Protein aus Retentat II

9,7 mg des AGPs aus Retentat II wurden acetyliert und gaschromatographisch vermessen (siehe Abbildung 3.16).

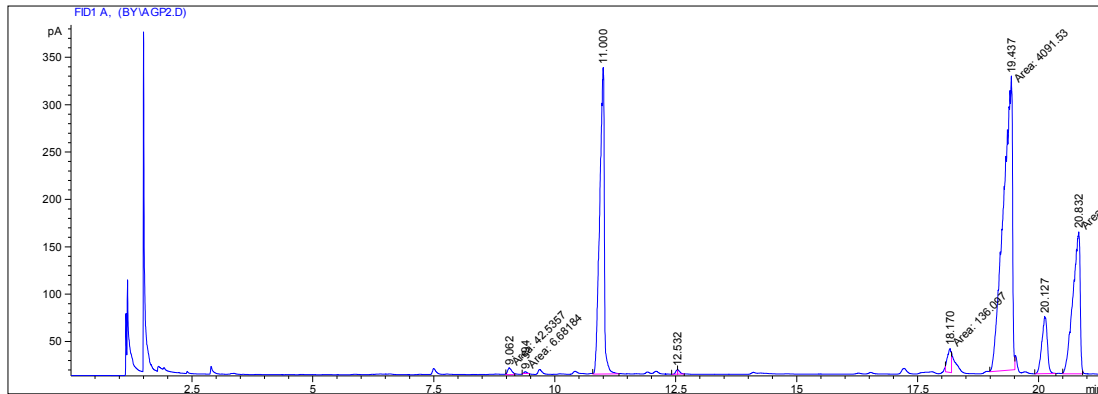


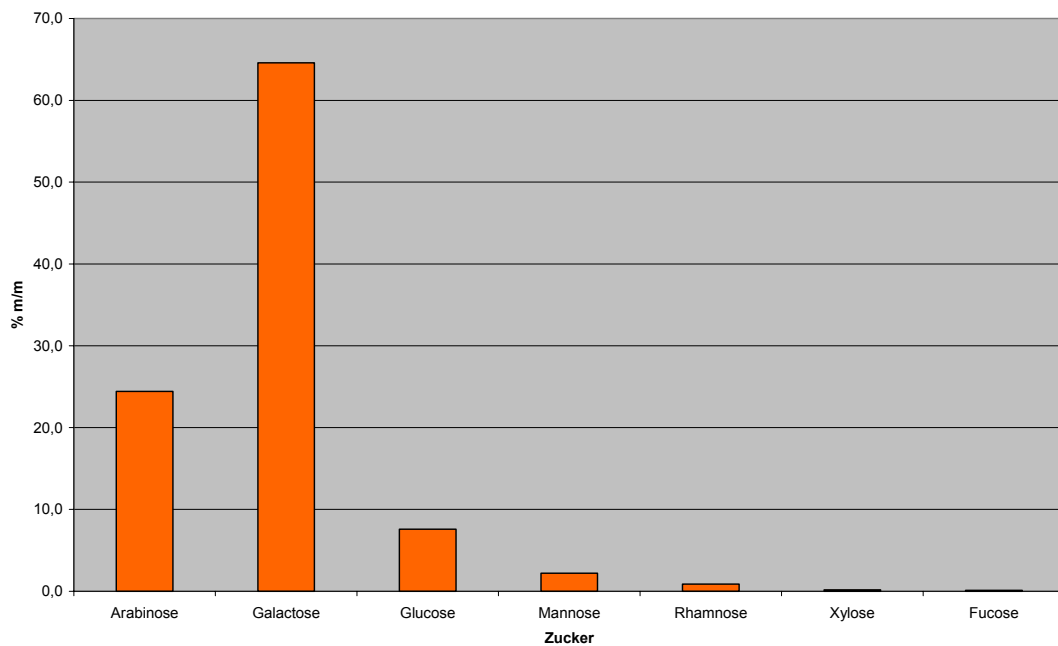
Abbildung 3.16: Gaschromatogramm des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat II

Bei einer massenprozentualen Ausbeute von 24,7% wurde folgende Neutralzuckerzusammensetzung festgestellt:

Zucker	% (m/m)
Arabinose	24,4
Galactose	64,6
Glucose	7,6
Mannose	2,2
Rhamnose	0,9
Xylose	0,2
Fucose	0,1

Tabelle 3.9: Massenprozentuale Neutralzuckerzusammensetzung des AGPs aus Retentat II

Der im Retentat gefundene hohe Gehalt an Xylose wurde im gefällten Arabinogalactan-Protein nicht wiedergefunden. Stattdessen stellen Arabinose und Galactose auch hier 89% der Ausbeute (siehe Abbildung 3.17), wobei das Verhältnis gegenüber des AGPs aus Retentat I zugunsten der Arabinose verschoben ist. Der Gehalt an Glucose und Mannose ist vergleichbar mit den AGPs aus Retentat I.

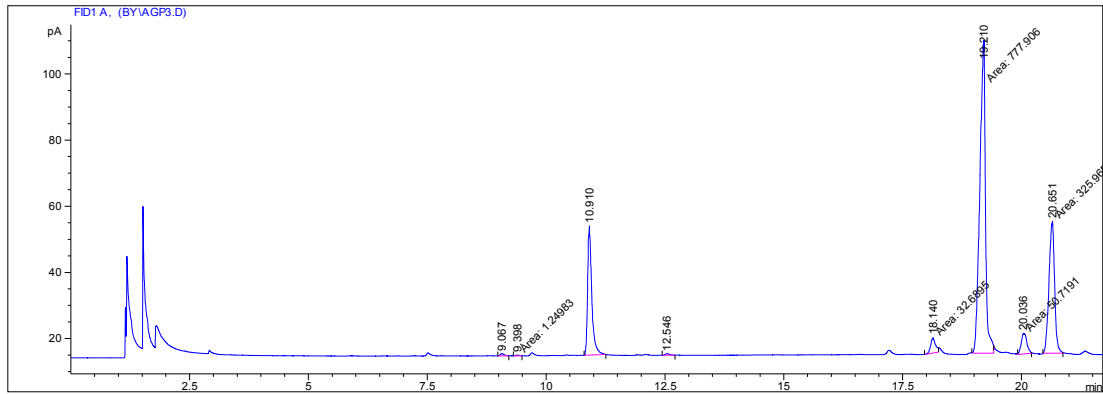


**Abbildung 3.17: Neutralzuckerzusammensetzung des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat II**

#### **3.2.3.3. Arabinogalactan-Protein aus Retentat III**

Die Neutralzucker von Retentat III waren etwas anders zusammengesetzt als die der Retentate I und II. 10,8 mg von Retentat III wurden acetyliert und gaschromatographisch vermessen (siehe Abbildung 3.18).

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE



**Abbildung 3.18: Gaschromatogramm des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat III**

Bei einer Ausbeute von 18,5% war das gefällte AGP trotz des anders zusammengesetzten Ausgangsretentats vergleichbar mit den AGPs aus Retentat I und II.

Zucker	% (m/m)
Arabinose	19,9
Galactose	70,7
Glucose	5,6
Mannose	3,1
Rhamnose	0,4
Xylose	0,2
Fucose	0,1

**Tabelle 3.10: Massenprozentuale Neutralzuckerzusammensetzung des AGPs aus Retentat III**

Arabinose und Galactose machen knapp über 90% der Zuckerzusammensetzung aus. Der Gehalt von Glucose und Mannose ist mit 5,6% respektive 3,1% ebenfalls gut vergleichbar mit dem Gehalt dieser Zucker in den AGPs der anderen Retentate.

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

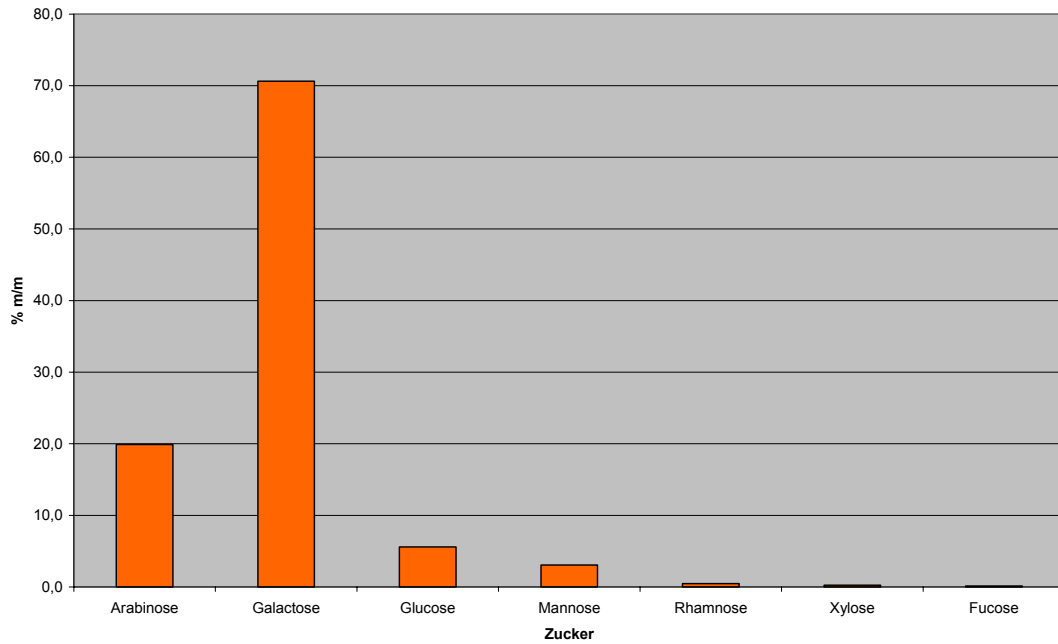


Abbildung 3.19: Neutralzuckerzusammensetzung des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat III

#### 3.2.3.4. Arabinogalactan-Protein aus Retentat IV

9,5 mg des Retentats des Heißextraktes wurden acetyliert und analysiert (siehe Abbildung 3.20).

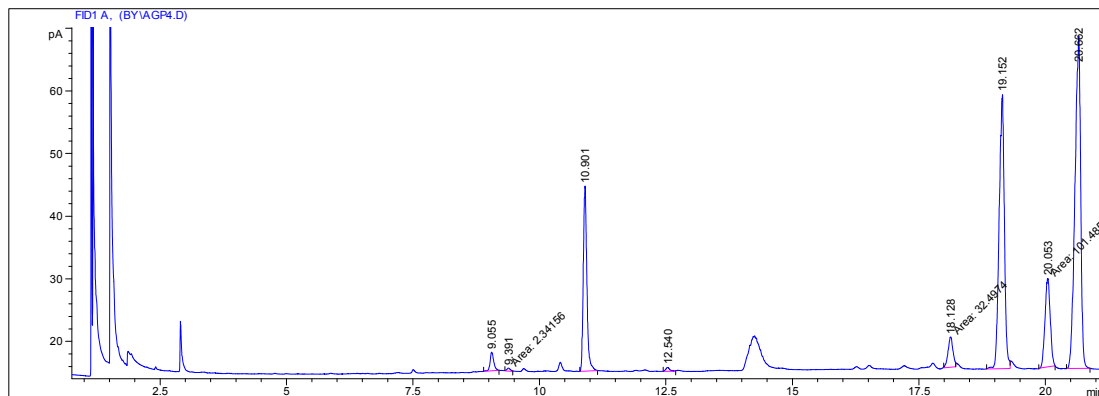


Abbildung 3.20: Gaschromatogramm des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat IV



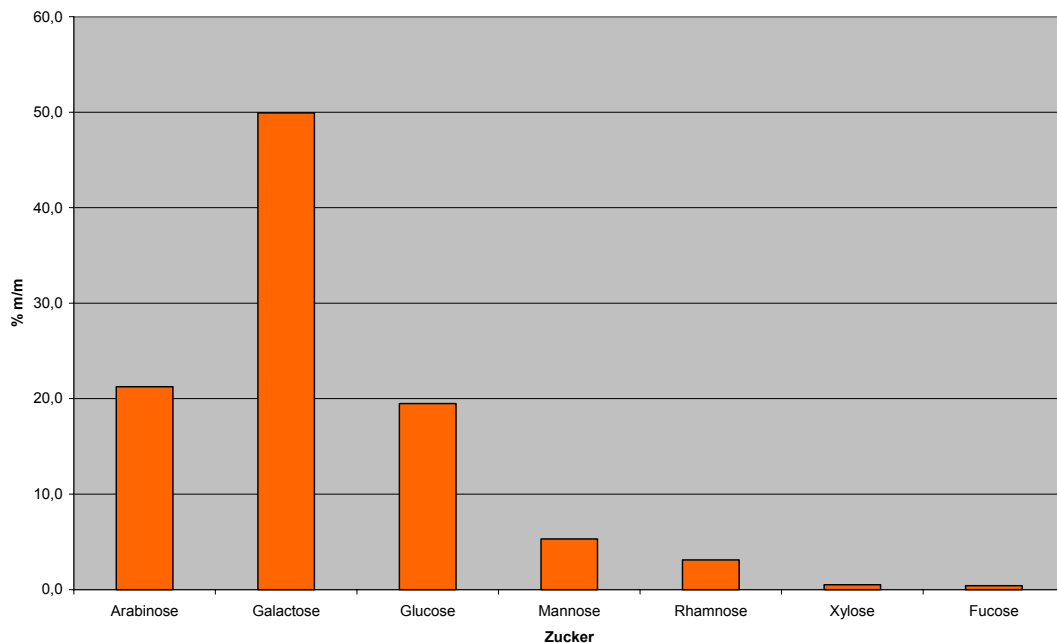
### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

Die Ausbeute von 9,4% war verglichen mit den vorhergehenden Analysen sehr gering. Auch war das AGP deutlich anders zusammengesetzt. Die genauen Werte finden sich in folgender Tabelle:

Zucker	% (m/m)
Arabinose	21,2
Galactose	49,9
Glucose	19,5
Mannose	5,3
Rhamnose	3,1
Xylose	0,5
Fucose	0,4

**Tabelle 3.11: Massenprozentuale Neutralzuckerzusammensetzung des AGPs aus Retentat IV**

Auffällig ist der hohe Gehalt an Glucose mit annähernd 20%. Arabinose und Galactose stellen mit insgesamt circa 71% der Ausbeute auch einen geringeren Anteil als in den AGPs der anderen Fraktionen (siehe Abbildung 3.21).



**Abbildung 3.21: Neutralzuckerzusammensetzung des Arabinogalactan-Proteins aus Retentat IV**

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

Nach der Analytik der AGPs aus den verschiedenen Retentaten wurde entschieden, dass das Retentat IV von einer weitergehenden Analytik ausgeschlossen wird, und ein Gemisch der Retentate I-III als Ausgangsmaterial zur Isolierung genutzt wird. Hierzu wurden die Retentate zusammen in Aqua bidest. dispergiert, tiefgefroren und gefriergetrocknet.

#### 3.2.3.5. Arabinogalactan-Protein aus Retentatgemisch

Nach einer Gefrierd Trocknung wurde das Mischretentat zur Fällung von weiterem AGP genutzt. Das AGP wurde acetyliert und gaschromatographisch vermessen.

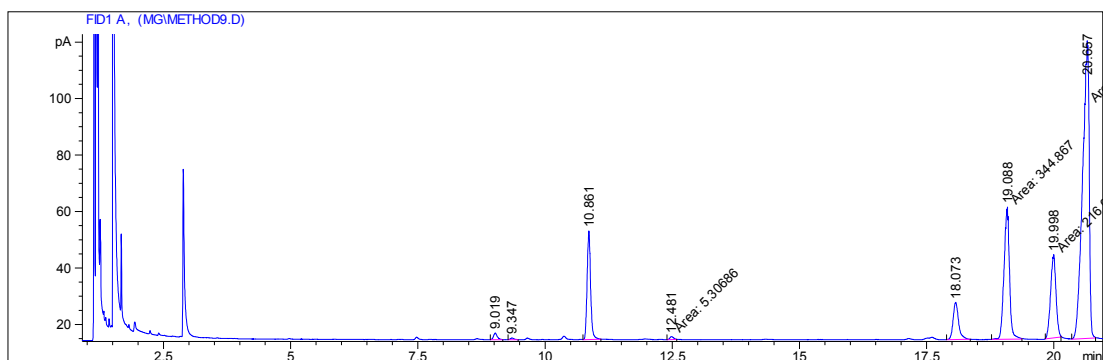


Abbildung 3.22: Gaschromatogramm des Arabinogalactan-Proteins aus dem Retentatgemisch

Bei der Analytik von 9 mg Probe wurde nur eine Ausbeute von 6,2% erreicht. Dabei wurde folgende Neutralzuckerzusammensetzung festgestellt:

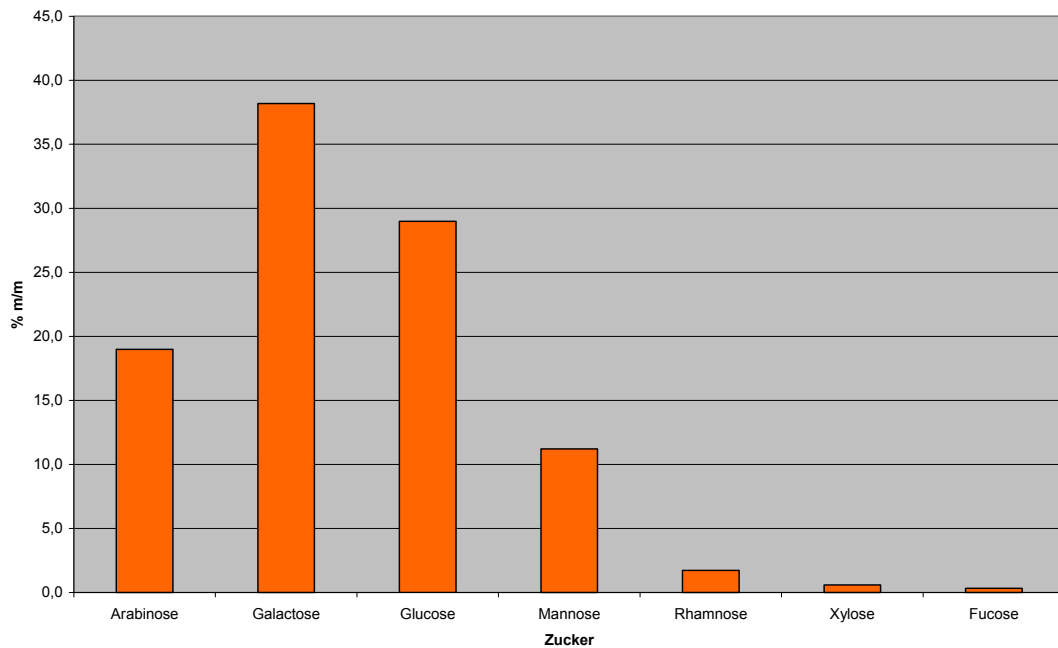
Zucker	% (m/m)
Arabinose	19,0
Galactose	38,2
Glucose	29,0
Mannose	11,2
Rhamnose	1,7
Xylose	0,6
Fucose	0,3

Tabelle 3.12: Massenprozentuale Neutralzuckerzusammensetzung des AGPs aus dem Retentatgemisch

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

---

Auffällig sind zum einen der unerwartet hohe Gehalt an Glucose, der mit fast 30% nicht ausschließlich vom AGP verursacht werden konnte, und zum anderen der nur geringe Gehalt an Arabinose und Galactose mit insgesamt nur 57% (siehe Abbildung 3.23). Der hohe Gehalt an Glucose lässt sich eventuell mit einer ungenügenden Dialyse erklären, wodurch Reste des Yariv-Phenylglycosids in der Fällung verblieben.



**Abbildung 3.23: Neutralzuckerzusammensetzung des Arabinogalactan-Proteins aus dem Retentatgemisch**

Bei der Analytik fiel bereits auf, dass sich das Lyophilisat nicht komplett im Wasser löste und das AGP nach der Dialyse noch schmutzig-gelb gefärbt war. Um diese schwer wasserlöslichen Bestandteile abzutrennen, wurde vor der Yariv-Fällung eine Zentrifugation durchgeführt und der daraufhin klare Überstand zur Gewinnung des AGPs eingesetzt.

### 3.2.3.6. Arabinogalactan-Protein aus aufgereinigtem Retentatgemisch

Das AGP, welches aus dem durch Zentrifugation aufgereinigten Retentatgemisch gewonnen wurde, war nach der Gefriertrocknung nicht mehr schmutzig-gelb, sondern hellbeige gefärbt. Die Neutralzuckeranalyse wurde mit 5,2 mg des AGPs durchgeführt (siehe Abbildung 3.24).

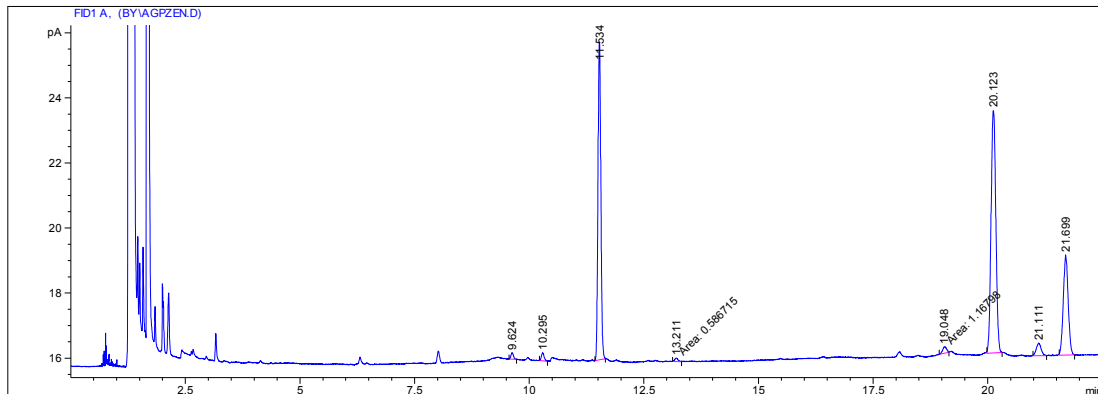


Abbildung 3.24: Gaschromatogramm des Arabinogalactan-Proteins aus dem aufgereinigten Retentatgemisch

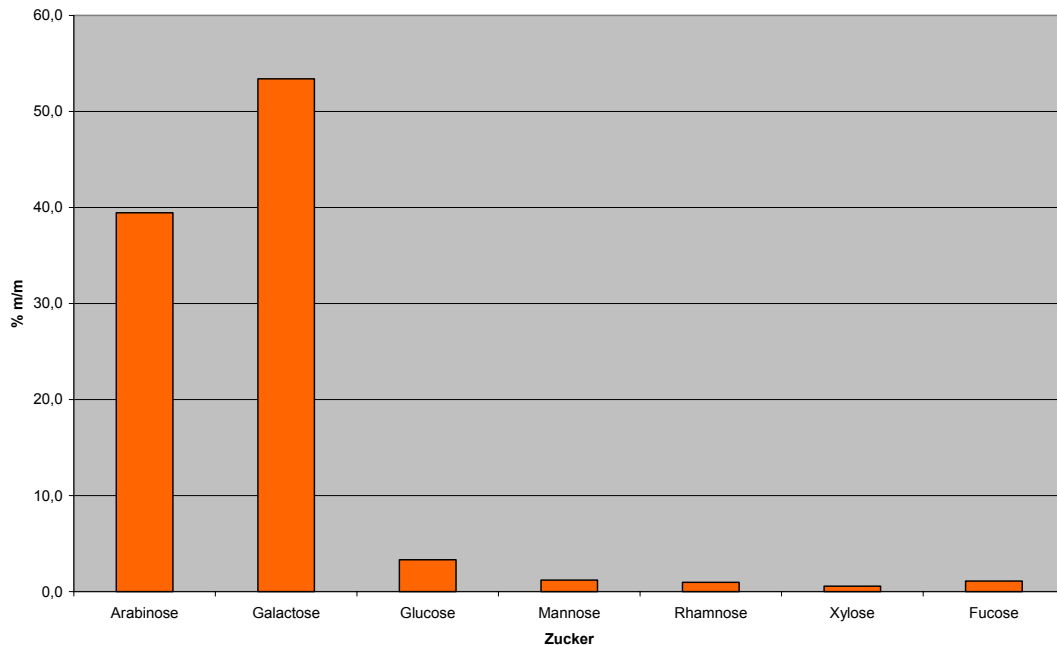
Die Ausbeute an Zucker konnte durch diesen Aufreinigungsschritt von den vormals erreichten 6,2% auf 50,5% gesteigert werden. Die Ergebnisse lassen sich folgender Tabelle entnehmen.

Zucker	% (m/m)
Arabinose	39,4
Galactose	53,4
Glucose	3,3
Mannose	1,2
Rhamnose	1,0
Xylose	0,6
Fucose	1,1

Tabelle 3.13: Massenprozentuale Neutralzuckerzusammensetzung des AGPs aus dem aufgereinigten Retentatgemisch

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

Arabinose mit 39,4% und Galactose mit 53,4% machen mit insgesamt 92,8% den Großteil der Ausbeute an Zuckern aus (siehe Abbildung 3.25).



**Abbildung 3.25: Neutralzuckerzusammensetzung des Arabinogalactan-Proteins aus dem aufgereinigten Retentatgemisch**

#### **3.2.3.7. Vergleich aller Neutralzuckeranalysen der Arabinogalactan-Proteine**

In den AGPs aller Fraktionen dominiert Galactose. Mit Ausnahme des AGPs aus dem Heißextrakt sowie des AGPs aus dem nicht-aufgereinigten Retentatgemisch liegt der aufsummierte Gehalt von Arabinose und Galactose bei circa 90% (siehe Abbildung 3.26). Die Ausbeute bei der Acetylierungsanalyse ist beim aufgereinigten Retentatgemisch mit 50,5% am höchsten. Das AGP aus dem unbehandelten Retentatgemisch hat eine leicht abweichende Zusammensetzung gegenüber den anderen AGPs, welche miteinander gut vergleichbar sind. Das Ara:Gal-Verhältnis des aufgereinigten Retentatgemisches ist gegenüber den anderen AGPs etwas zugunsten der Arabinose verschoben.

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

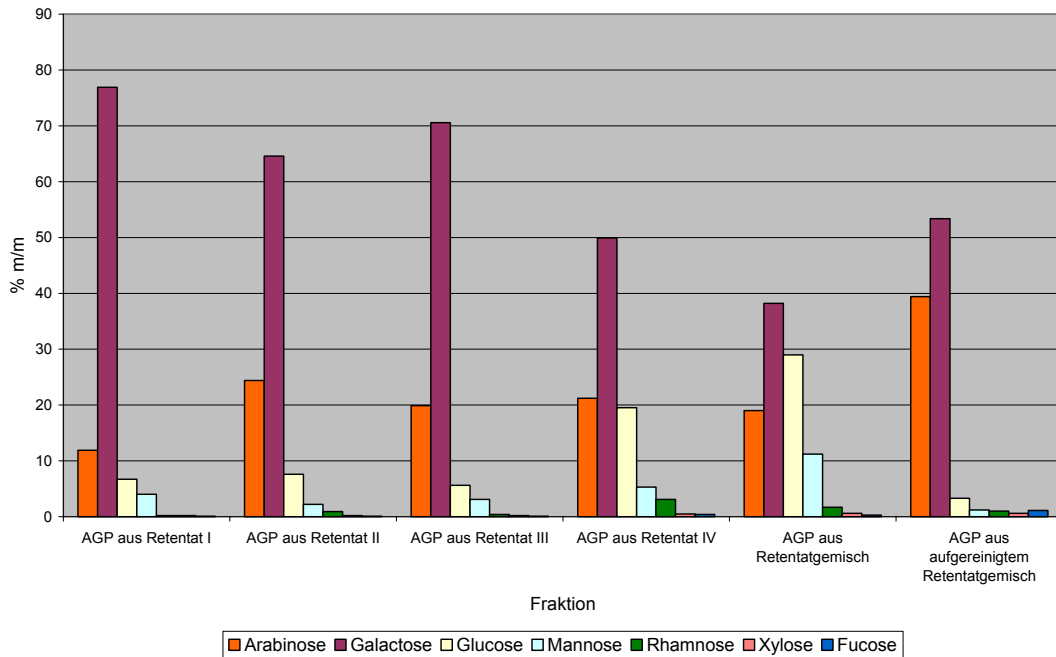


Abbildung 3.26: Vergleich aller Neutralzuckeranalysen der Arabinogalactan-Proteine

Zucker	AGP aus Retentat I	AGP aus Retentat II	AGP aus Retentat III	AGP aus Retentat IV (Heiß-extrakt)	AGP aus Gemisch der Retentate I-III	AGP aus aufgereinigtem Retentatgemisch
Arabinose	11,9	24,4	19,9	21,2	19,0	39,4
Galactose	76,9	64,6	70,6	49,9	38,2	53,4
Glucose	6,7	7,6	5,6	19,5	29,0	3,3
Mannose	4,0	2,2	3,1	5,3	11,2	1,2
Rhamnose	0,2	0,9	0,4	3,1	1,7	1,0
Xylose	0,2	0,2	0,2	0,5	0,6	0,6
Fucose	0,1	0,1	0,1	0,4	0,3	1,1

Tabelle 3.14: Vergleich der Neutralzuckerzusammensetzungen der yarivgefällten AGPs

Betrachtet man die Werte in Tabelle 3.14, so bestätigt sich die Ähnlichkeit der AGPs aus den Retentaten I-III, obgleich die Retentat-Fractionen der hergestellten Extrakte bezüglich ihrer Neutralzuckerzusammensetzung zum Teil relativ unterschiedlich waren. Das AGP aus dem Heißextrakt fällt etwas heraus und weist einen erhöhten Glucose-Gehalt und einen verminderten Galactose-Gehalt auf. Erstaunlicherweise erkennt man eine deutliche Abweichung zwischen den AGP-Fractionen I-III und deren Gemisch, vermutlich verursacht durch Reste des  $\beta$ GlcY, welches durch eine unvollständige Dialyse in der Fällung verblieb. Im Gemisch ließ sich so ein deutlich erhöhter Glucose-Anteil nachweisen, ähnlich wie er im AGP des Retentats IV aufgetaucht war, obwohl diese Heißextrakt-Fraktion nicht mit in das Retentatgemisch eingeflossen ist. Die Aufreinigung erbrachte, dass zum einen der Glucose-Anteil von 29% auf 3,3% absank und dass zum anderen die Ausbeute von 6,2% auf 50,5% anstieg. Des Weiteren sank der Mannose-Gehalt von 11,2% auf 1,2%. Das Ara:Gal-Verhältnis beläuft sich beim AGP-Gemisch auf 1:2, die Aufreinigung verschiebt dieses Verhältnis zugunsten der Arabinose auf 1:1,4.

#### **3.2.4. Bindungstypanalysen**

Zur Analyse der Bindungstypen der im Polysaccharid enthaltenen Monosaccharide wurden die freien Hydroxylgruppen im Polysaccharid methyliert, und dieses daraufhin zu den Monomeren hydrolysiert. Die nun freigewordenen Hydroxylfunktionen wurden acetyliert, so dass die vorher an der glykosidischen Bindung, beziehungsweise am Ringschluss beteiligten OH-Gruppen einen Acetylrest trugen und die Zucker so nach Bindungstyp differenziert werden konnten (siehe 2.2.1.5.). Folgende Proben wurden mit Hilfe dieser Methylierungsanalyse untersucht:

- Natives AGP
- AGP nach Uronsäurereduktion
- AGP nach Partialhydrolyse
- AGP nach Uronsäurereduktion und Partialhydrolyse

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

---

Durch die Reduktion mit NaBD<sub>4</sub> nach vorheriger Aktivierung mit Carbodiimid können Uronsäuren erfasst werden, die sich in anderen Analysemethoden einer Analytik entziehen. Durch eine milde Säurehydrolyse können labile glykosidische Bindungen gespalten werden. Durch die Kombination der Ergebnisse der verschiedenen Methylierungsanalysen ist es möglich, Aussagen über den strukturellen Aufbau des AGPs zu treffen.

Zur Analyse der Bindungstypen wurden die Total-Ionen-Chromatogramme (TICs) aufgenommen und die Massenspektren der erhaltenen Peaks mit einer im Arbeitskreis etablierten Datenbank von PMAAs abgeglichen (siehe Abbildung 3.27). So konnten die einzelnen Zucker identifiziert und anhand des Methylierungs- und Acetylierungsmusters der Bindungstyp des entsprechenden Monosaccharids im AGP ermittelt werden.



### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

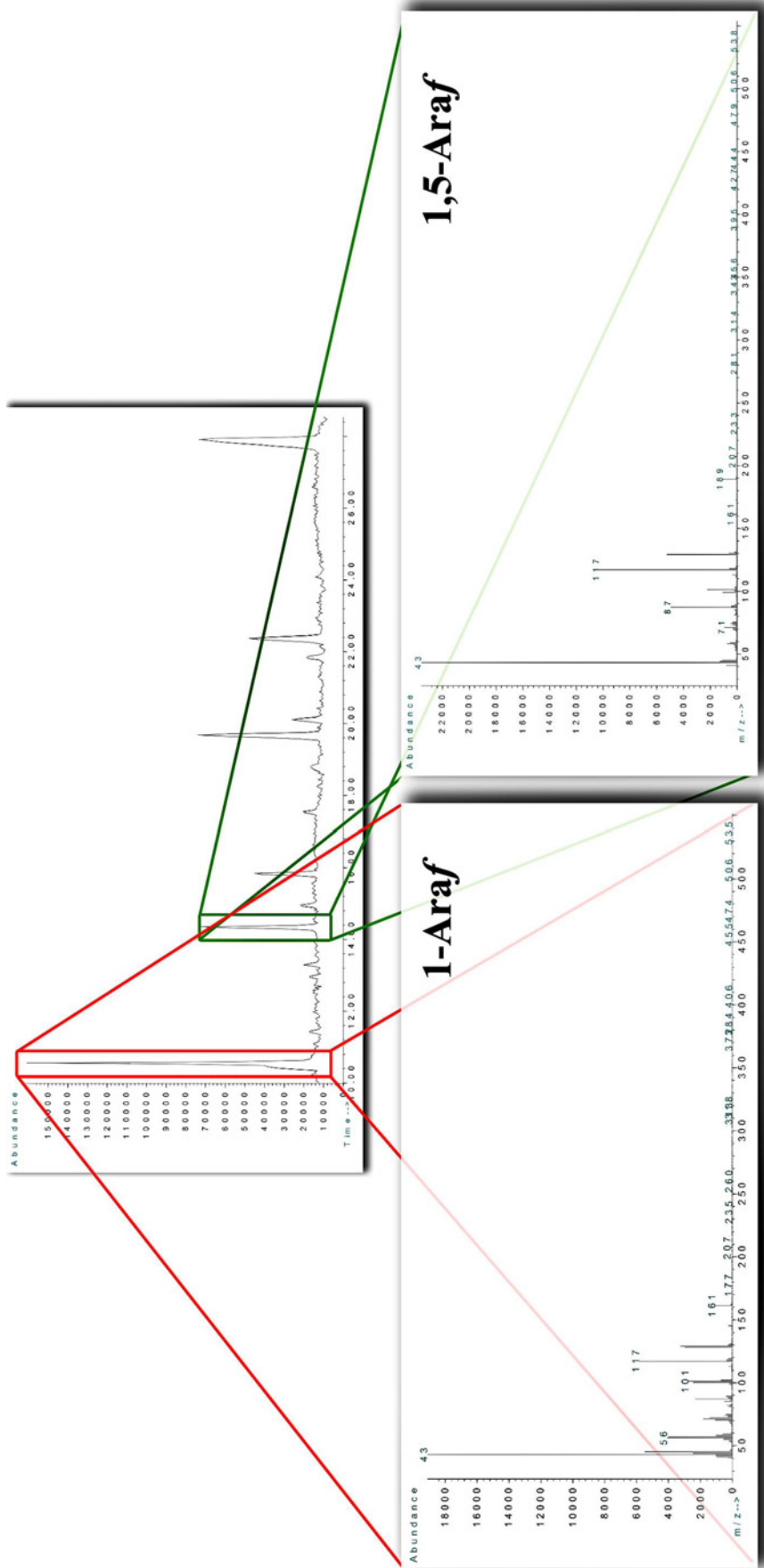


Abbildung 3.27: Beispielhafte Auswertung der ersten beiden Peaks im TIC mit den jeweiligen Massenspektren von 1-Araf und 1,5-Araf

### 3.2.4.1. Analyse der PMAAs des nativen AGPs

Das native AGP wurde einer Methylierungsanalyse unterworfen und zunächst zur Quantifizierung gaschromatographisch vermessen und per FID detektiert. Daraufhin wurde das TIC aufgenommen und die Zucker identifiziert (siehe Abbildung 3.27).

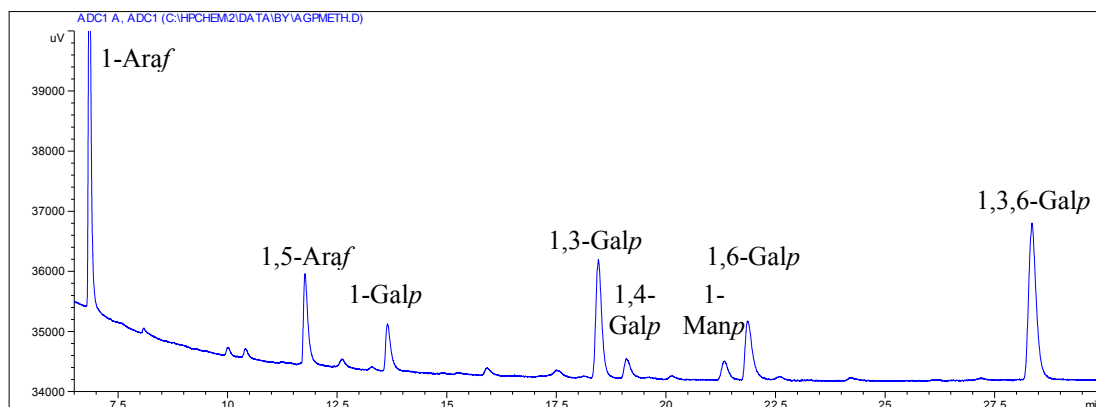


Abbildung 3.28: Gaschromatogramm der PMAAs des nativen AGPs

Im FID-Chromatogramm findet sich bei circa 7 min. furanosidische 1-Arabinose (1-Araf), der nächste Peak bei 11,75 min. wurde als furanosidische 1,5-Arabinose (1,5-Araf) identifiziert. Es folgt pyranosidische 1-Galactose (1-Galp) bei 13,75 min., 1,3-Galactose (1,3-Galp) und 1,4-Galactose (1,4-Galp) bei 18,5 und 19,25 min sowie 1,6-Mannose (1,6-Manp) und 1,6-Galactose (1,6-Galp) bei 21,25 und 22 min. Das Chromatogramm zeigt als zuletzt eluierten Peak bei 28,5 min. pyranosidische 1,3,6-Galactose (1,3,6-Galp).

Die Tabelle 3.15 zeigt die Werte nach der Integration der Flächen und Umrechnung in % (mol/mol).

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

Zucker	Gehalt in % (mol/mol)
1-Ara(f)	30,6
1,5-Ara(f)	11,2
1,3-Ara(f)	tr
1,3,4-Ara(p)	tr
1-Gal(p)	5,3
1,3-Gal(p)	14,0
1,4-Gal(p)	2,6
1,6-Gal(p)	8,5
1,3,6-Gal(p)	21,9
1,6-Man(p)	2,6
1Glc(p)	tr

**Tabelle 3.15:** Gehalt (mol/mol) der identifizierten PMAAs im nativen AGP; tr = traces <2%

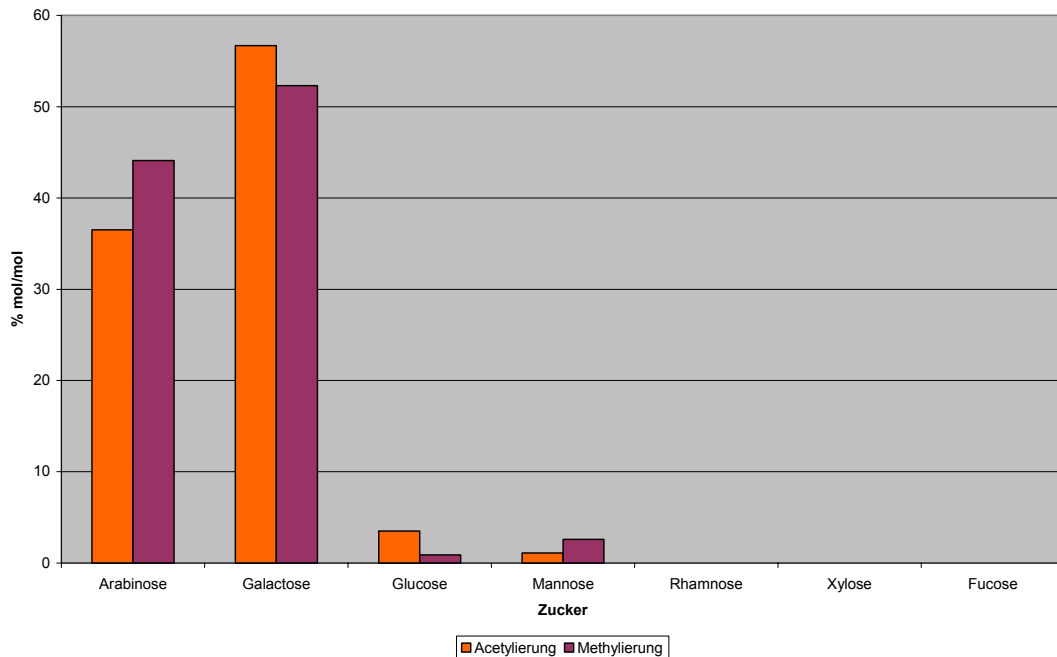
Vergleicht man die bei der Acetylierung ermittelten und in Molprozent umgerechneten Werte mit den aufsummierten Werten der Analyse der PMAAs ergeben sich folgende Werte:

	Acetylierung % (mol/mol)	Methylierung % (mol/mol)
Arabinose	36,5	44,1
Galactose	56,7	52,3
Glucose	3,5	0,9
Mannose	1,1	2,6
Rhamnose	tr	-
Xylose	tr	-
Fucose	tr	-

**Tabelle 3.16:** Gehalt der Neutralzucker im AGP nach der Acetylierungs- bzw. Methylierungsanalyse; tr = traces <2%

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

Grafisch dargestellt ergibt sich aus den vorhergehenden Werten folgendes Schaubild:



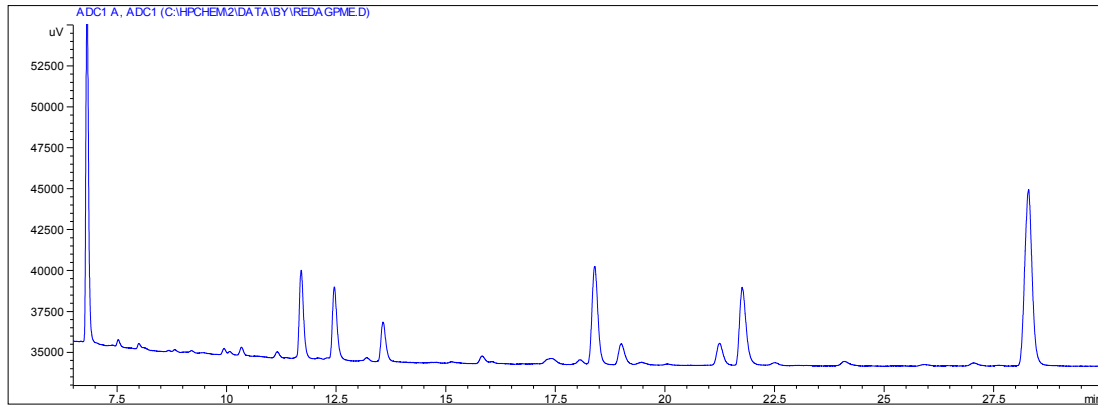
**Abbildung 3.29: Neutralzuckerzusammensetzung des AGPs nach der Acetylierungs- bzw. Methylierungsanalyse**

Die Ergebnisse aus Acetylierung und Methylierung sind gut miteinander vergleichbar. Die Abweichungen beschränken sich auf wenige Prozent: bei der Methylierung ist das Ara:Gal-Verhältnis leicht zugunsten der Arabinose verschoben.

#### 3.2.4.2. Analyse der PMAAs des uronsäurereduzierten AGPs

Vor der Methylierungsanalyse wurden die im AGP enthaltenen Uronsäuren mit Natriumbordeuterid nach vorheriger Aktivierung mit Carbodiimid zum zweifach deuterierten Neutralzucker reduziert. Durch die Deuterierung konnte die ehemalige Uronsäure nach der Methylierungsanalyse durch eine im Vergleich zum entsprechenden Neutralzucker erhöhte Masse identifiziert werden.

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE



**Abbildung 3.30: Gaschromatogramm der PMAAs des reduzierten AGPs**

Bereits im Chromatogramm (siehe Abbildung 3.30) fällt die Ähnlichkeit zum nativen AGP auf, mit der Ausnahme eines zusätzlichen Peaks bei 12,5 min., der im TIC als zweifach deuteriertes PMAA identifiziert wurde, ursprünglich also eine Uronsäure war. Die als pyranosidische Glucuronsäure identifizierte Uronsäure macht einen molprozentualen Anteil von 7,3% aus.

Zucker	Gehalt in % (mol/mol)
1-Ara(f)	26,1
1,5-Ara(f)	9,9
1,3-Ara(f)	tr
1,3,4-Ara(p)	tr
1-Gal(p)	4,3
1,3-Gal(p)	11,4
1,4-Gal(p)	2,6
1,6-Gal(p)	10,0
1,3,6-Gal(p)	23,8
1,6-Man(p)	2,7
1GlcA(p)	7,3

**Tabelle 3.17: Gehalt (mol/mol) der identifizierten PMAAs im uronsäurereduzierten AGP; tr = traces <2%**

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

---

Aufsummiert und verglichen mit den Daten aus der Acetylierungsanalyse ergeben sich die folgenden gut übereinstimmenden Monosaccharidanteile:

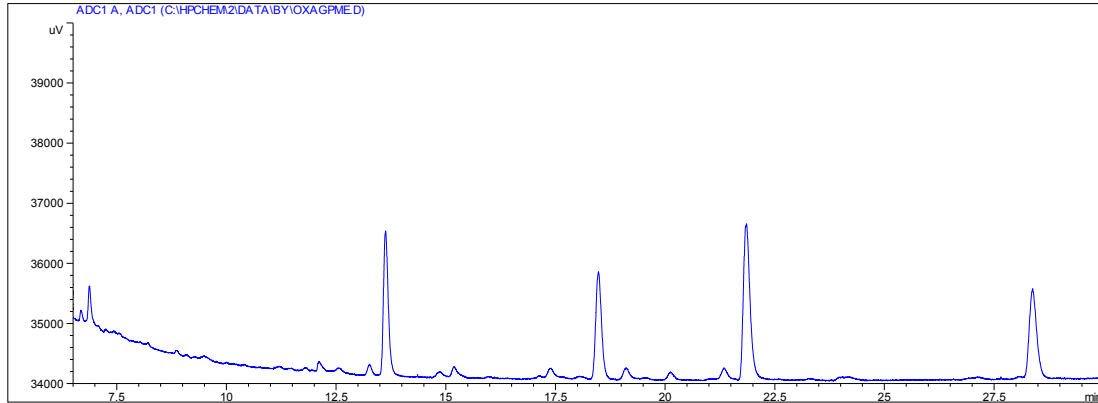
	Acetylierung % (mol/mol)	Methylierung % (mol/mol)
Arabinose	32,5	37,9
Galactose	57,6	52,1
Glucose bzw. Glucuronsäure	5,6	7,3
Mannose	tr	2,7
Rhamnose	tr	-
Xylose	tr	-
Fucose	tr	-

**Tabelle 3.18:** Gehalt der Neutralzucker im AGP nach der Acetylierungs- bzw. Methylierungsanalyse; tr = traces <2%

#### 3.2.4.3. Analyse der PMAAs des partialhydrolysierten AGPs

Durch eine milde Säurehydrolyse mittels Oxalsäure können labile Glykosidbindungen gespalten und Aussagen über die Positionen einzelner Zucker getroffen werden. So findet sich im durch Ethanol fällbaren hochmolekularen Rückstand nur noch wenig Arabinose. Daraus lässt sich schließen, dass sich Arabinose mit seinen labileren Bindungen hauptsächlich in der Peripherie des Kohlenhydratanteils befindet.

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE



**Abbildung 3.31: Gaschromatogramm der PMAAs des partialhydrolysierten AGPs**

Im Chromatogramm (siehe Abbildung 3.31) erkennt man bereits, dass die Peaks der PMAAs von 1-Ara $f$  und 1,5-Ara $f$  nahezu verschwunden sind. Des Weiteren haben die Peaks der PMAAs von 1,4-Gal $p$  und 1,6-Man $p$  etwas abgenommen. Für das partialhydrolysierte AGP ergeben sich folgende Werte:

Zucker	Gehalt in % (mol/mol)
1-Ara(f)	4,5
1,5-Ara(f)	-
1,3-Ara(f)	-
1,3,4-Ara(p)	-
1-Gal(p)	23,0
1,3-Gal(p)	18,9
1,4-Gal(p)	2,5
1,6-Gal(p)	31,0
1,3,6-Gal(p)	18,1
1,6-Man(p)	2,0

**Tabelle 3.19: Gehalt (mol/mol) der identifizierten PMAAs im partialhydrolysierten AGP; tr = traces <2%**

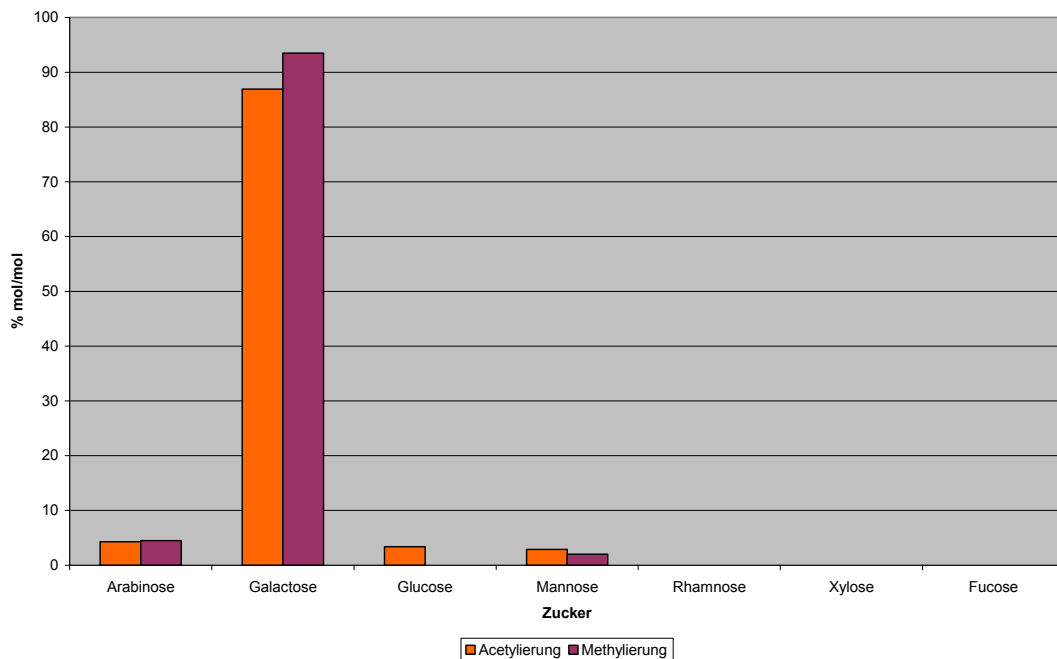
### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

Der Gehalt an Arabinose hat von insgesamt 44,1% (mol/mol) im nativen AGP auf 4,5% (mol/mol) abgenommen. Nahezu der gesamte Zuckeranteil wird nun mit 93,5% (mol/mol) von der Galactose gestellt.

	Acetylierung	Methylierung
Arabinose	4,3	4,5
Galactose	86,9	93,5
Glucose	3,4	-
Mannose	2,9	2,0
Rhamnose	tr	-
Xylose	tr	-
Fucose	tr	-

**Tabelle 3.20: Gehalt der Neutralzucker im partialhydrolysierten AGP nach der Acetylierungs- bzw- Methylierungsanalyse.**

Im Vergleich zu den Daten aus der Acetylierungsanalyse (siehe Tabelle 3.20 resp. Abbildung 3.32) erkennt man auch hier, dass beide Datensätze gut miteinander korrelieren.

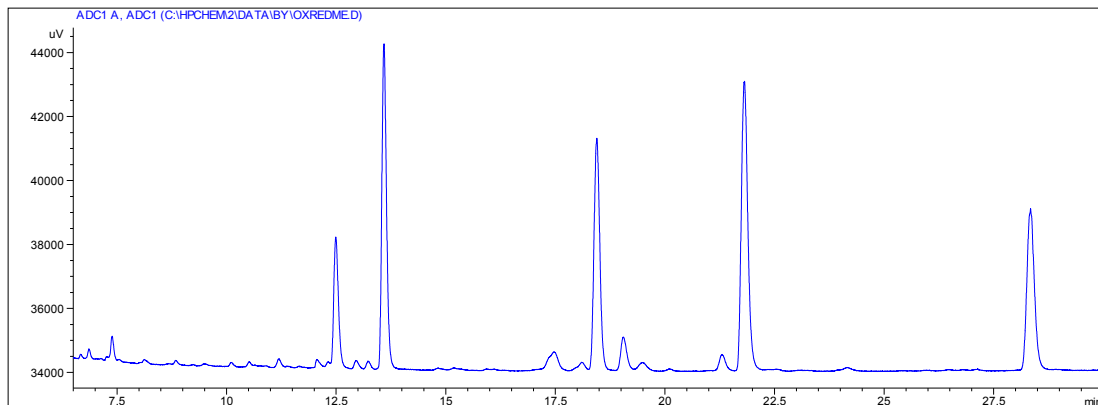


**Abbildung 3.32: Neutralzuckerzusammensetzung des partialhydrolysierten AGPs nach der Acetylierungs- bzw- Methylierungsanalyse.**



#### 3.2.4.4. Analyse der PMAAs des uronsäurereduzierten und partialhydrolysierten AGPs

Eine Probe AGP wurde einer Uronsäurereduktion unterzogen. Nach der Uronsäurereduktion wurden durch eine milde Säurehydrolyse die labilen Bindungen im Kohlenhydratanteil des AGPs gespalten. Dadurch können Aussagen über die Positionen der Glucuronsäuren im AGP getroffen werden.



**Abbildung 3.33: Gaschromatogramm der PMAAs des uronsäurereduzierten und partialhydrolysierten AGPs**

Im Chromatogramm (siehe Abbildung 3.33) erkennt man erneut die Abwesenheit der Arabinose, die bei der milden Säurehydrolyse abgespalten worden sein muss. Erkennbar ist auch der Peak der terminalen Glucuronsäure. Nach quantitativer Auswertung zeigt sich, dass neben einem Uronsäureanteil von circa 10% fast der gesamte Polysaccharidanteil von Galactose ausgemacht wird (siehe Tabelle 3.21).

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

Zucker	Gehalt in % (mol/mol)
1-Ara(f)	tr
1,5-Ara(f)	-
1,3-Ara(f)	tr
1,3,4-Ara(p)	-
1-Gal(p)	23,5
1,3-Gal(p)	19,0
1,4-Gal(p)	2,8
1,6-Gal(p)	26,7
1,3,6-Gal(p)	15,9
1,6-Man(p)	tr
1GlcA(p)	9,8

**Tabelle 3.21:** Gehalt (mol/mol) der identifizierten PMAAs im uronsäurereduzierten und partialhydrolysierten AGP; tr = traces <2%

Nach der Addition der einzelnen Zuckerfraktionen wird dieses Bild noch deutlicher (siehe Tabelle 3.22). Nach der Reduktion und der Partialhydrolyse besteht der Polysaccharidanteil des AGPs fast ausschließlich aus Galactose und Glucuronsäure.

Zucker	Gehalt in % (mol/mol)
Arabinose	tr
Galactose	87,9
Glucuronsäure	9,8
Mannose	tr
Xylose	-

**Tabelle 3.22:** Summe der jeweils identifizierten Zucker der PMAAs des uronsäurereduzierten und partialhydrolysierten AGPs. tr = traces <2%

### 3.2.4.5. Vergleich der Methylierungsanalysen des AGPs bzw. seiner Fraktionen

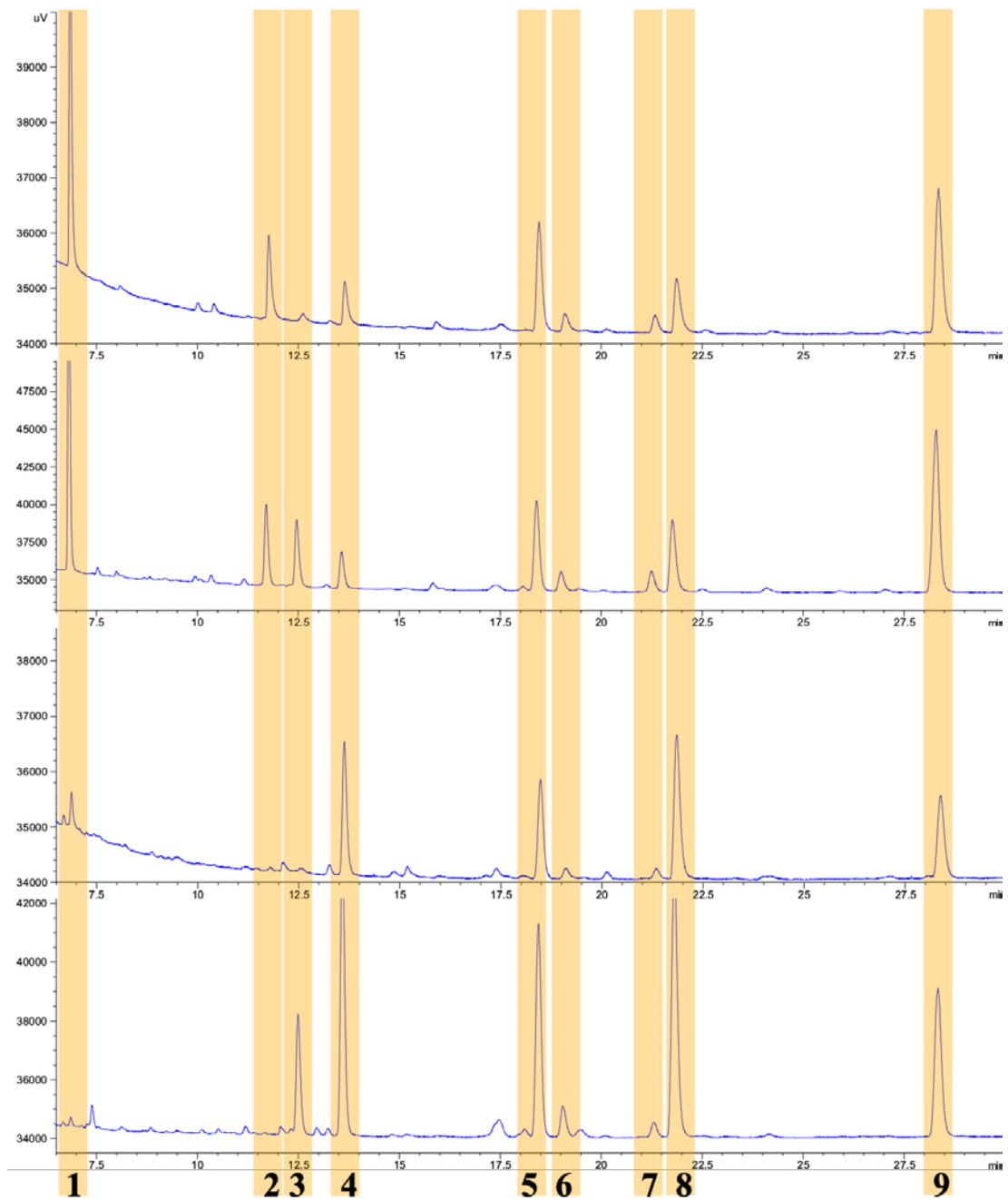


Abbildung 3.34: Vergleich der Chromatogramme der PMAA-Analysen

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

---

Abbildung 3.34 zeigt von oben nach unten das native AGP, das uronsäurereduzierte AGP, das partialhydrolysierte AGP und das uronsäurereduzierte und partialhydrolysierte AGP. Die farbigen, durchnummerierten Balken kennzeichnen die relevanten PMAAs, die als folgende Zucker identifiziert werden konnten:

- 1: 1-Araf
- 2: 1,5-Araf

Die Arabinosen fehlen in den unteren beiden Chromatogrammen der partialhydrolysierten Proben fast vollständig.

- 3: 1-GlcAp

Die Glucuronsäure ist nur in den uronsäurereduzierten Proben identifizierbar. Der Gehalt im AGP liegt bei 7,3% (mol/mol).

- 4: 1-Galp
- 5: 1,3-Galp
- 6: 1,4-Galp
- 7: 1,6-Manp
- 8: 1,6-Galp
- 9: 1,3,6-Galp

Vergleicht man die Ergebnisse der Analysen der PMAAs des uronsäurereduzierten AGPs mit denen des uronsäurereduzierten und partialhydrolysierten AGPs, so wird deutlich, dass durch die milde Säurehydrolyse die Arabinose vom Kohlenhydrat-Anteil abgespalten wird. Diese Spaltung hat jedoch keine Auswirkung auf den Gehalt an Uronsäuren. Sie liegen also nicht an die Arabinose gebunden vor. Besonders auffällig ist zusätzlich, dass eine Zunahme von 1-Galp und 1,6-Galp zu verzeichnen ist, der Gehalt an 1,3,6-Galp jedoch abnimmt.

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

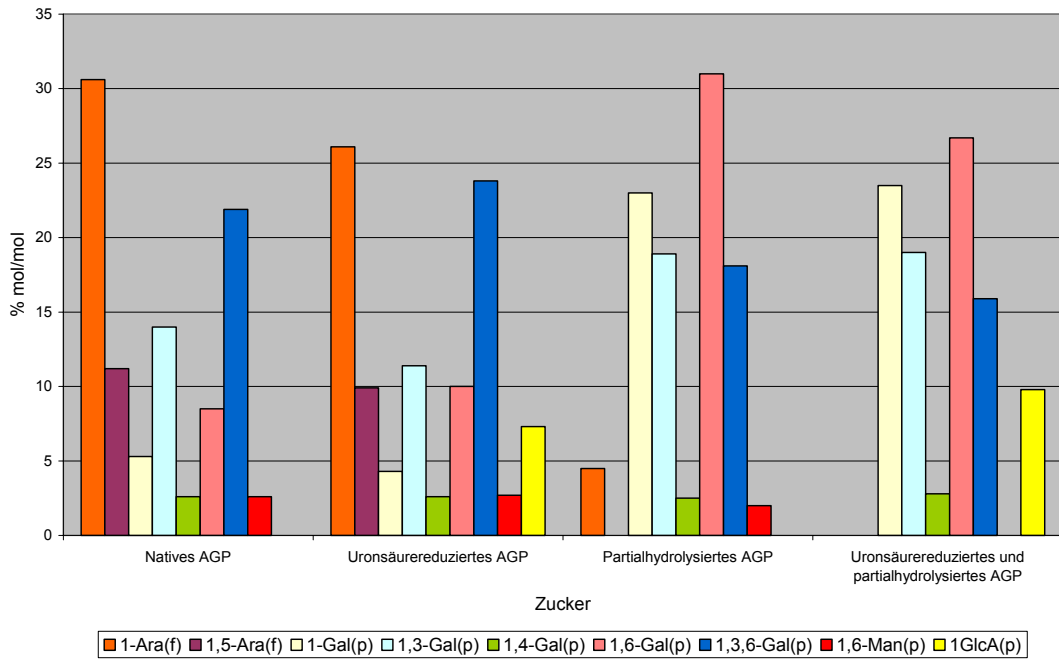


Abbildung 3.35: Vergleich der PMAA-Zusammensetzung des AGPs bzw. seiner Fraktionen

Zum besseren Vergleich wurden die Mengen der einzelnen Zuckerarten aufaddiert und gegenübergestellt (siehe Abbildung 3.35, Tabelle 3.23).

	Natives AGP	Uronsäure-reduziertes AGP	Partial-hydrolysiertes AGP	Uronsäure-reduziertes und partial-hydrolysiertes AGP
1-Ara(f)	30,6	26,1	4,5	tr
1,5-Ara(f)	11,2	9,9	-	-
1-Gal(p)	5,3	4,3	23,0	23,5
1,3-Gal(p)	14,0	11,4	18,9	19,0
1,4-Gal(p)	2,6	2,6	2,5	2,8
1,6-Gal(p)	8,5	10,0	31,0	26,7
1,3,6-Gal(p)	21,9	23,8	18,1	15,9
1,6-Man(p)	2,6	2,7	2,0	tr
1GlcA(p)	nd	7,3	nd	9,8
Sonstige	3,3	tr	-	2,3

Tabelle 3.23: Werte der PMAA-Zusammensetzung des AGPs bzw. seiner Fraktionen. nd = nicht detektiert, tr = traces <2%

### 3.3. Charakterisierung des Proteinanteils

Die meisten Arabinogalactan-Proteine bestehen aus bis zu 10% Protein, an welches die Zucker kovalent geknüpft sind (siehe 1.3.). Um den Proteinanteil näher zu charakterisieren, wurde zunächst der Kohlenhydratanteil vom Protein-Rückgrat durch eine saure Hydrolyse abgespalten. Die verbleibenden Aminosäuren wurden zu Phenylthiocarbamyl-Derivaten umgewandelt und per HPLC analysiert (Fa. Wita). Da beim AGP als HRGP Hydroxyprolin von besonderem Interesse ist, wurde zusätzlich eine photometrische Hydroxyprolinbestimmung nach Stegemann und Stalder durchgeführt, um die zuvor gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen. Außerdem wurde eine alkalische Hydrolyse durchgeführt, die Polysaccharidbruchstücke erzeugte, an welche noch die für die kovalente Bindung verantwortliche Aminosäure geknüpft war. Hiermit lässt sich feststellen, welche Aminosäure für die Bindung des Kohlenhydratanteils verantwortlich ist.

#### 3.3.1. Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils des AGPs

Die Analyse erbrachte folgende Zusammensetzung des Proteinanteils bei einer Ausbeute von 4,8% (g/g) Protein im AGP.

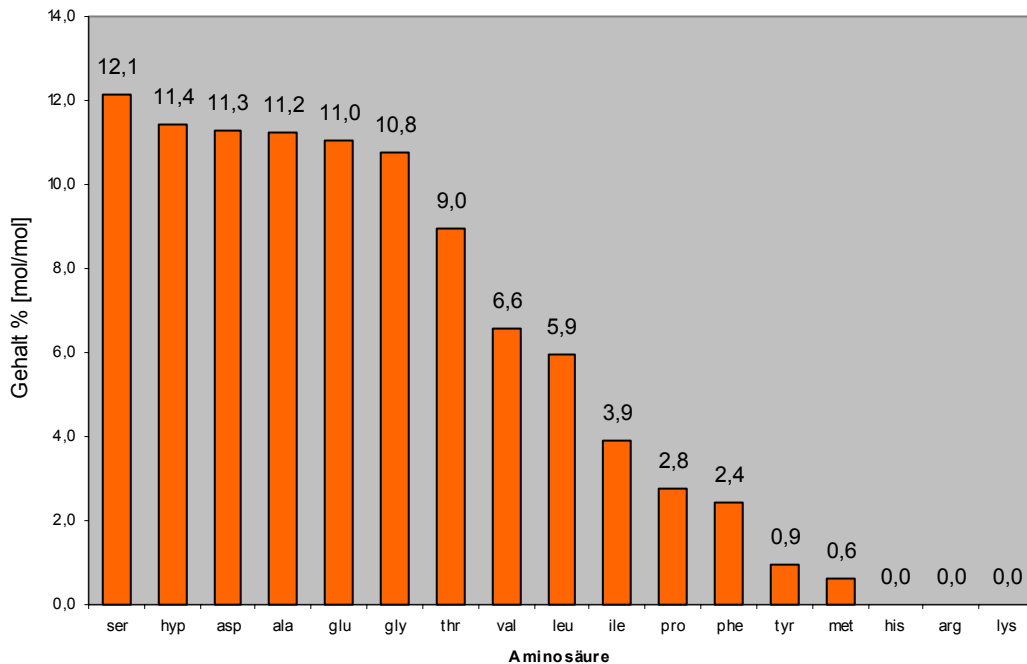


Abbildung 3.36: Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils des AGPs (mol/mol)

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

Bei der HPLC-Analyse ergibt sich ein Hydroxyprolinegehalt von 11,4% (mol/mol) bzw. 12,7% (g/g) im Proteinanteil des Radix-AGP. Der Proteinanteil des Wurzel-AGPs besteht in erster Linie zu etwa gleichen Teilen aus Serin, Hydroxyprolin, Asparagin bzw. Asparaginsäure, Alanin, Glutamin bzw. Glutaminsäure und Glycin. Weitere Aminosäuren sind Threonin, Valin, Leucin und Isoleucin. Um den Gehalt an Hydroxyprolin zu bestätigen, wurde im Folgenden eine photometrische Hydroxyprolinbestimmung durchgeführt.

#### 3.3.2. Hydroxyprolinbestimmung

Für die Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe mit reinem Hydroxyprolin hergestellt und durch Zweifachmessung eine Kalibriergerade erstellt. Die Probe wurde vermessen und der Gehalt mittels der Gleichung der Kalibriergerade berechnet. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,9993.

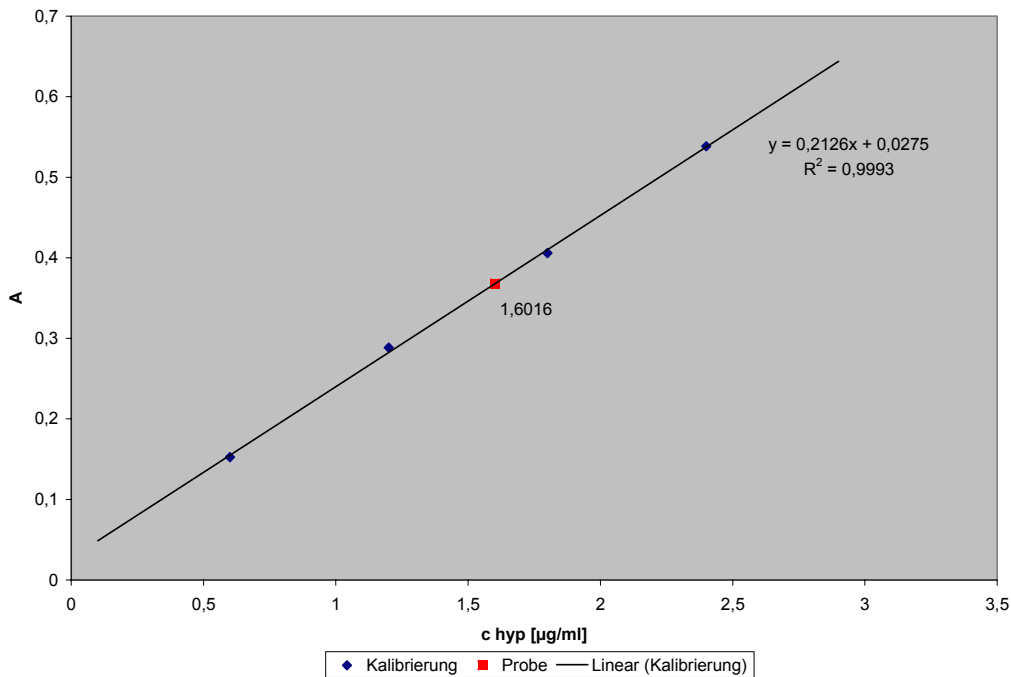


Abbildung 3.37: Kalibriergerade der photometrischen Hydroxyprolin-Bestimmung mit eingetragenem Probenwert (rot)

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE

Für die Probe ergab sich eine Absorption von 0,368. Nach x aufgelöst resultiert eine

Geradengleichung der Kalibrierung von 
$$x = \frac{y - 0,0275}{0,2126} - \frac{0,0275}{0,2126}$$

Es ergibt sich ein Wert von 1,60 µg/ml. Rechnet man die Verdünnungsschritte zurück, kommt man auf einen Gehalt von 64,06 µg Hydroxyprolin in den ursprünglich eingesetzten 10,0 mg AGP. Bei einem Proteingehalt von 4,8% (siehe HPLC-Analytik) im AGP kommt man so auf einen prozentualen Anteil von 13,4% Hydroxyprolin im Proteinanteil des AGP gegenüber dem Wert der HPLC-Analytik mit 12,7%.

#### 3.3.3. Alkalische Hydrolyse

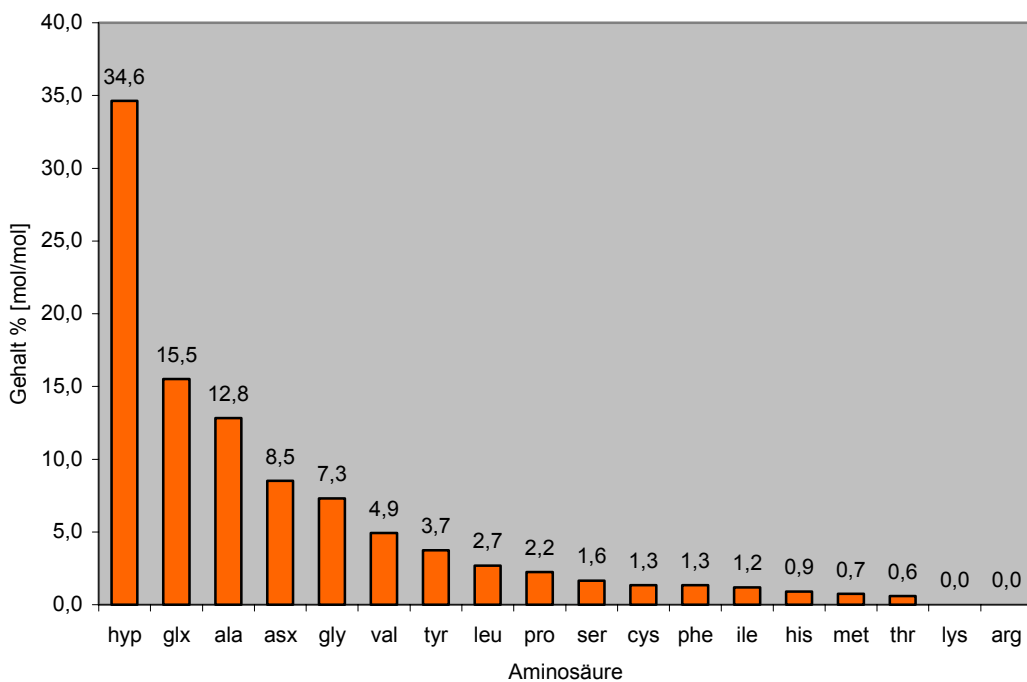


Abbildung 3.38: Ergebnisse der Aminosäureanalytik der alkalischen Hydrolyse

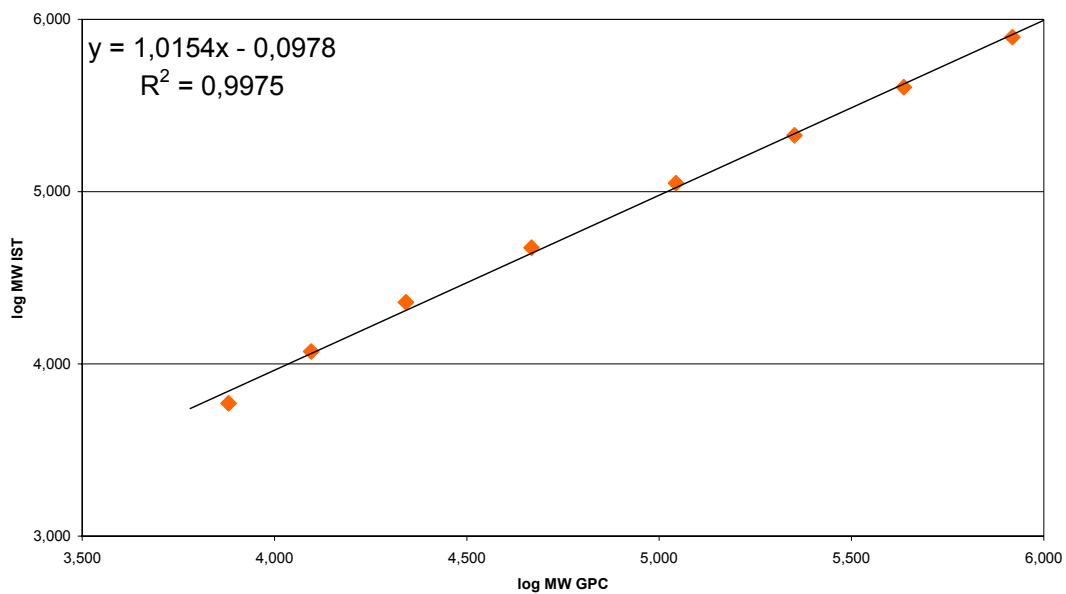
Nach der alkalischen Hydrolyse verbleibt Hydroxyprolin mit 34,6% (mol/mol) als dominierende Aminosäure. Daraus lässt sich schließen, dass die Polysaccharid-Einheiten des AGPs hauptsächlich über Hydroxyprolin an das Protein gebunden vorliegen. Neben einem hohen Gehalt an Hydroxyprolin zeigen sich auch geringere



Mengen nahezu aller anderen Aminosäuren (siehe Abbildung 3.38), was eventuell darauf hindeutet, dass die Hydrolyse nicht vollständig war.

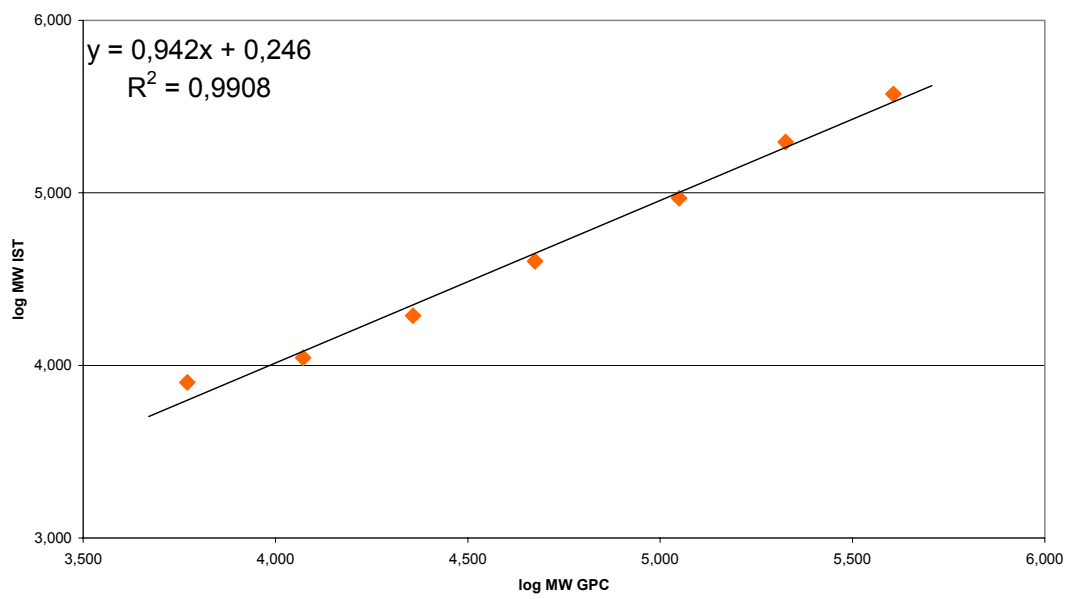
#### 3.5. Molekulargewichtsbestimmung

Von zwei unabhängig voneinander gefällten AGPs aus dem aufgereinigten Retentatgemisch wurde das Molekulargewicht bestimmt. Die Messungen erfolgten im Abstand von circa 8 Monaten. Es wurde bei beiden Messungen jeweils eine Pullulan-Kalibriergerade von Pullulan-Standards mit bekannten Molekulargewichten ermittelt. Über die Kalibrierung konnte nun das Molekulargewicht des AGPs berechnet werden.



**Abbildung 3.39: Kalibriergerade #1 von Pullulan-Standards, Auswertung über den MALLS-Detektor**

### 3. ANALYTISCHE ERGEBNISSE



**Abbildung 3.40: Kalibriergerade #2 von Pullulan-Standards, Auswertung über den MALLS-Detektor**

Das ermittelte Molekulargewicht betrug in der ersten Messung 226 kDa, in der zweiten Messung 215 kDa.

## 4. Mikroskopische Lokalisierung der AGPs

### 4.1. ELISA

Um die Funktionalität der Antikörper gegen  $\beta$ GlcY für eine Immunlokalisierung zu testen, wurde ein ELISA durchgeführt. Hierbei wurden Verdünnungsreihen von AGP auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht und mit  $\beta$ GlcY komplexiert. Daraufhin wurde der Yariv-Antikörper in 2 Verdünnungen hinzupipettiert und mit Hilfe des Sekundärantikörpers detektiert. Die AGP-Konzentration sollte hierbei direkt proportional zur auftretenden Färbung sein.

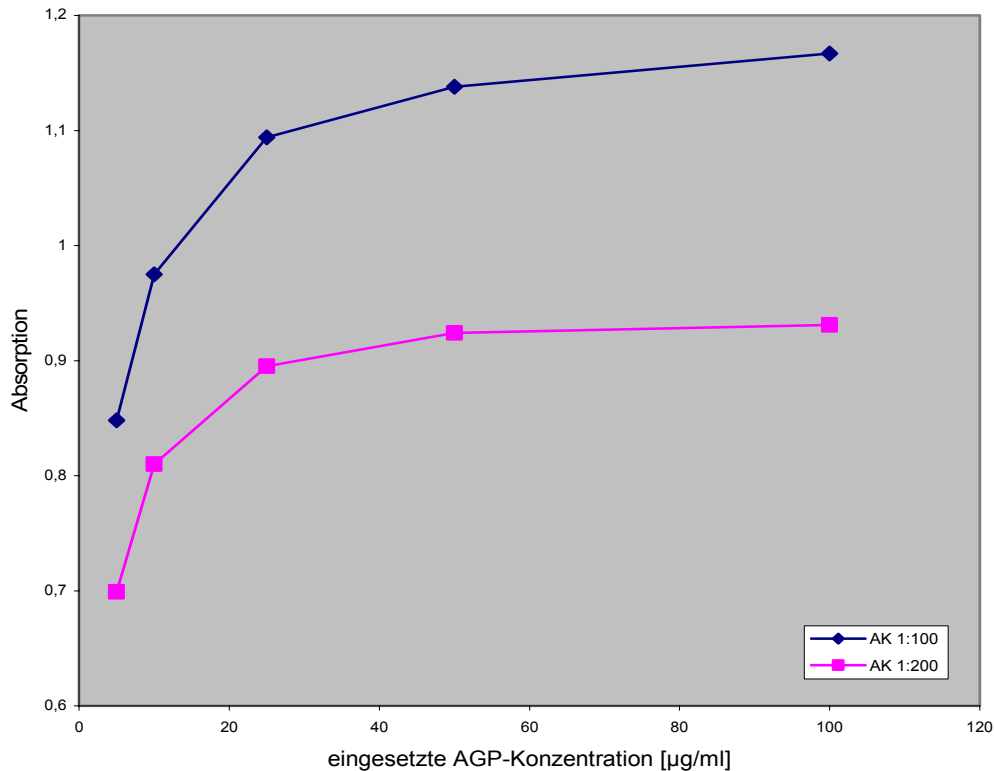


Abbildung 4.1: Auswertung ELISA

Die erhaltenen Kurven zeigen eine direkte Proportionalität der auftretenden Absorption zur Menge der eingesetzten AGPs (siehe Abbildung 4.1), wodurch gezeigt wird, dass der hergestellte Antikörper in den verwendeten Konzentrationen gut an das Yariv-Reagenz bindet.

### 4.2. Immunlokalisierung der Arabinogalactan-Proteine

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Immunlokalisierung der Arabinogalactan-Proteine. Die Kenntnis über die Lokalisierung ermöglicht Diskussionsraum bezüglich potentieller Aufgaben der AGPs innerhalb der Pflanzen. In früheren Arbeiten anderer Autoren wurden AGPs mittels monoklonaler Antikörper, welche gegen sehr spezifische Epitope einzelner AGPs gerichtet sind, lokalisiert. Eine gleichzeitige Lokalisierung aller yarivbindenden AGPs im pflanzlichen Präparat war bisher nur in der Lichtmikroskopie mittels Yarivs-Reagenz möglich.

#### 4.2.1. Lokalisierung mittels polyklonaler Antikörper gegen AGP

Zur Lokalisierung von AGPs in der Pflanze wurden Cryostatschnitte eines Blattstiels mit einer Schnittdicke von 10µm angefertigt, und diese zunächst mit polyklonalen Antikörpern gegen ein AGP aus Presssaft von *Echinacea purpurea* behandelt. Ein FITC-markierter Sekundärantikörper wurde zur Markierung der Anti-AGP-Antikörper eingesetzt.

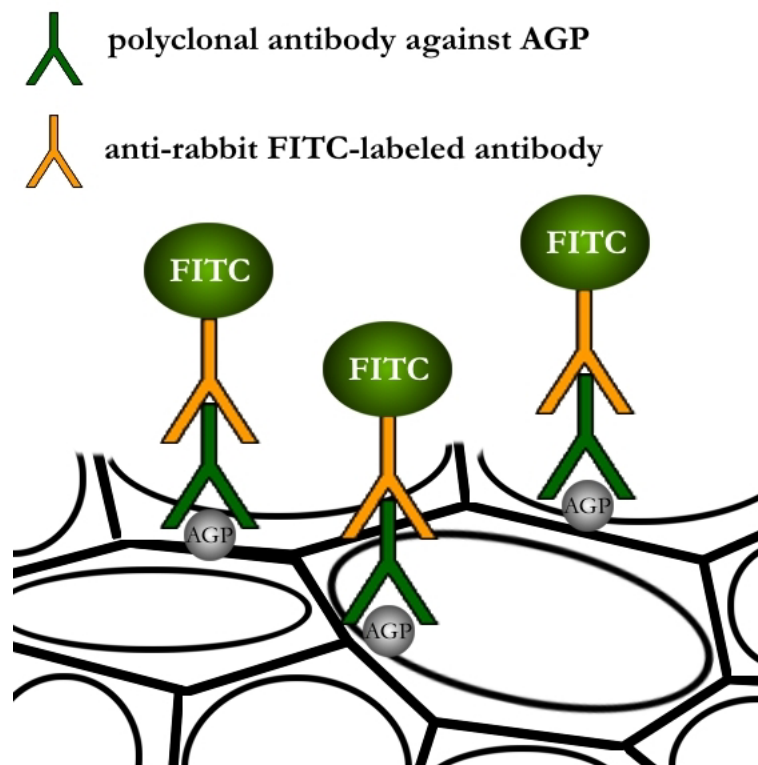
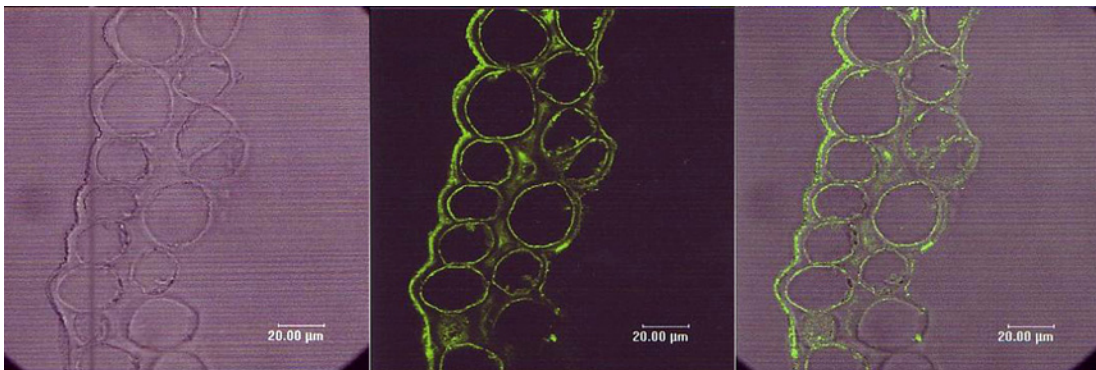


Abbildung 4.2: Schaubild der Immunlokalisierung von AGPs mit Hilfe polyklonaler Antikörper

Zur Negativkontrolle wurde der polyklonale Antikörper gegen das AGP weggelassen. Die mikroskopischen Aufnahmen der Schnitte wurden mit einem Konfokalen Laser-Rastermikroskop angefertigt. Hierbei regt ein Laser in einer definierten Ebene des Cryostatschnittes das Fluorochrom an, welches nach der Färbung indirekt an das AGP gekoppelt vorliegt. Die emittierte Fluoreszenz kann aufgenommen werden.

### 4.2.1.1. Mikroskopische Aufnahmen



**Abbildung 4.3:** AGP-FITC-Markierung im Blattstiel von *E. purpurea* mittels polyklonaler Antikörper gegen AGP (Zentrale Mikroskopie, Universität Kiel). Links: Transmissionsaufnahme, Mitte: FITC-Anregung, Rechts: Overlay

Abbildung 4.3 zeigt im linken Teil eine Transmissionsaufnahme, der mittlere Bereich zeigt die FITC-Anregung und im rechten Teil befindet sich ein Overlay aus den beiden anderen Bildern. Die Aufnahmen wurden von der Zentralen Mikroskopie der CAU Kiel angefertigt und zeigen, dass die Antikörper, die gegen ein Presssaft AGP generiert wurden, erwartungsgemäß an ein AGP im Blattstiel von *Echinacea purpurea* binden. Neben der Autofluoreszenz der Cuticula kam es in erster Linie zu einer Markierung im Bereich der Epidermis und der Rinde. Neben einer diffusen Markierung der Zellwand ist hier besonders der Bereich der Plasmamembran markiert.

#### 4.2.2. Entwicklung einer neuen Methode zur Lokalisierung aller yarivbindenden AGPs mittels $\beta$ GlcY und Antikörper gegen $\beta$ GlcY

Ziel war es, eine neue Methode zur Immunlokalisierung aller  $\beta$ GlcY-bindenden AGPs zu entwickeln, um die Verteilung **aller** AGPs im pflanzlichen Schnitt zu studieren. Abbildung 4.4 zeigt den angestrebten Versuchsaufbau.  $\beta$ GlcY bindet an die AGPs im pflanzlichen Präparat. Der hergestellte Antikörper gegen  $\beta$ GlcY (siehe 2.3.1.) bindet an  $\beta$ GlcY und wird vom sekundären Anti-Kaninchen IgG Antikörper detektiert. Die Markierung mit FITC wird durch eine Anregung mit Laserlicht unter dem CLSM sichtbar gemacht.

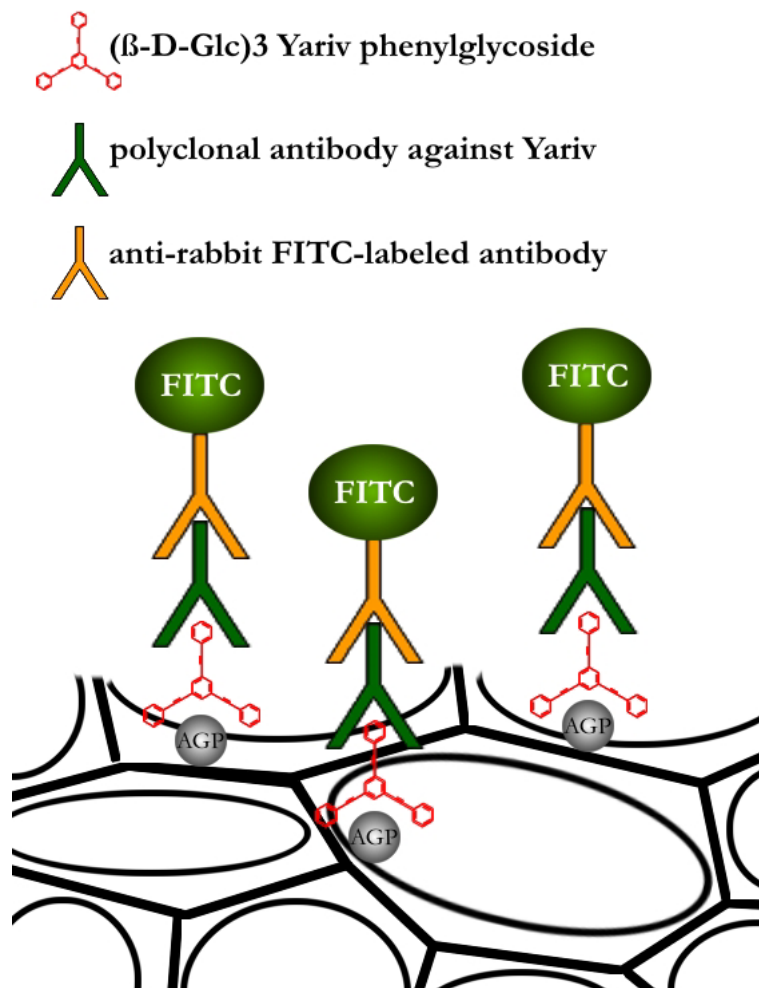


Abbildung 4.4: Schaubild der Immunlokalisierung von yarivbindenden AGPs mit Hilfe von  $\beta$ GlcY und einem Anti- $\beta$ GlcY-Antikörper.

### 4.2.2.1. Kontrollen

Es wurden bei jeder mikroskopischen Untersuchung Kontrollen angefertigt, um einerseits Autofluoreszenz ausschließen zu können und um andererseits die gelungene Markierung zu erkennen. Hierzu wurde zunächst die Kontrolle mikroskopiert. Die erhaltene Fluoreszenz konnte durch Verstärkung des Lasers intensiviert und der Laser so eingestellt werden, dass in der Negativkontrolle keine Autofluoreszenz sichtbar war. Diese Parameter wurden dann während der Untersuchungen beibehalten und die markierten Präparate konnten mikroskopiert werden. Zur Kontrolle, ob der polyklonale Antikörper gegen  $\beta$ GlcY unspezifisch an das Präparat bindet und so einen Angriffspunkt für den Detektorantikörper liefert, wurde während der ersten Negativkontrolle das  $\beta$ GlcY durch normalen Puffer ersetzt. Um ebenfalls auszuschließen, dass der Detektorantikörper unspezifisch an das Präparat oder an  $\beta$ GlcY bindet, wurde in einer zweiten Kontrolluntersuchung der polyklonale Antikörper gegen  $\beta$ GlcY durch Puffer ersetzt. Während dieser Kontrolluntersuchungen wurden folgende Aufnahmen gemacht.

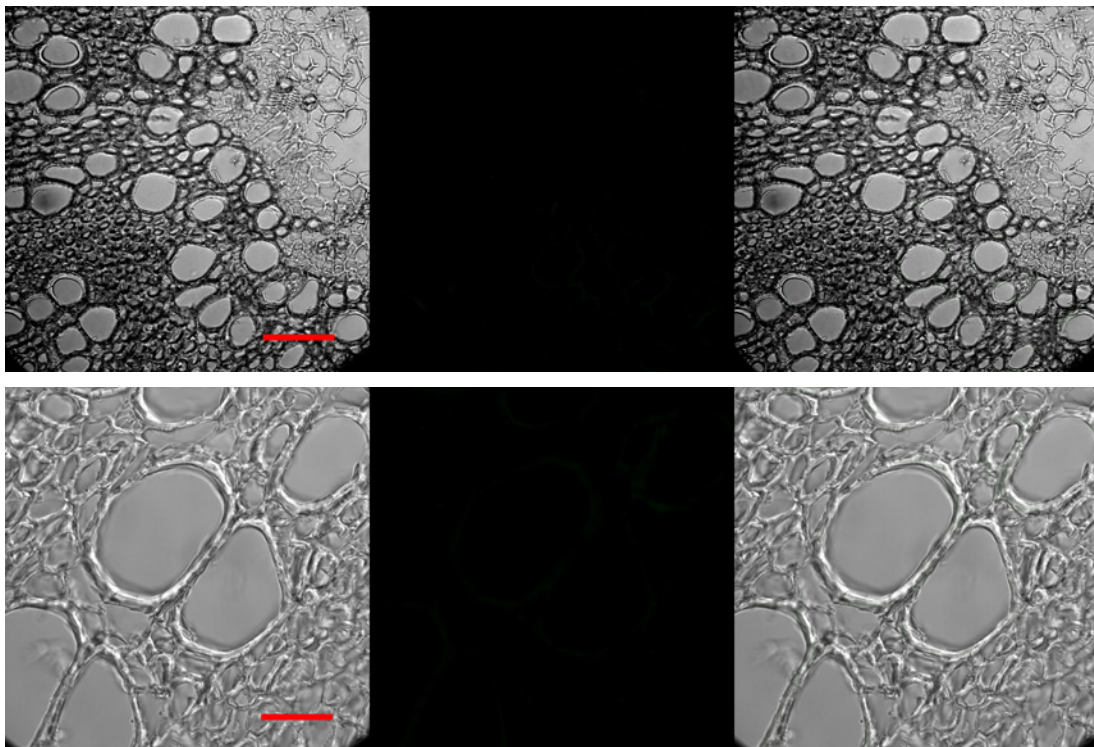


Abbildung 4.5: Negativkontrollen der Immunmarkierung

## 4. MKROSKOPISCHE LOKALISIERUNG

Abbildung 4.6 zeigt jeweils links eine Transmissionsaufnahme, mittig die FITC-Anregung mit dem Laser des CLSMs und rechts ein Overlay der beiden Bilder. Im oberen Bild ist die Negativkontrolle gezeigt, in der das  $\beta$ GlcY durch Puffer ersetzt wurde (Skala = 100  $\mu$ m), im unteren Bild wurde zur Kontrolle der polyklonale Primär-Antikörper mit Puffer ausgetauscht (Skala = 30  $\mu$ m). Man erkennt keine oder nur sehr geringe Autofluoreszenz. Unspezifische Bindungen können somit ausgeschlossen werden.

### 4.2.2.2. Konzentrationsfindung

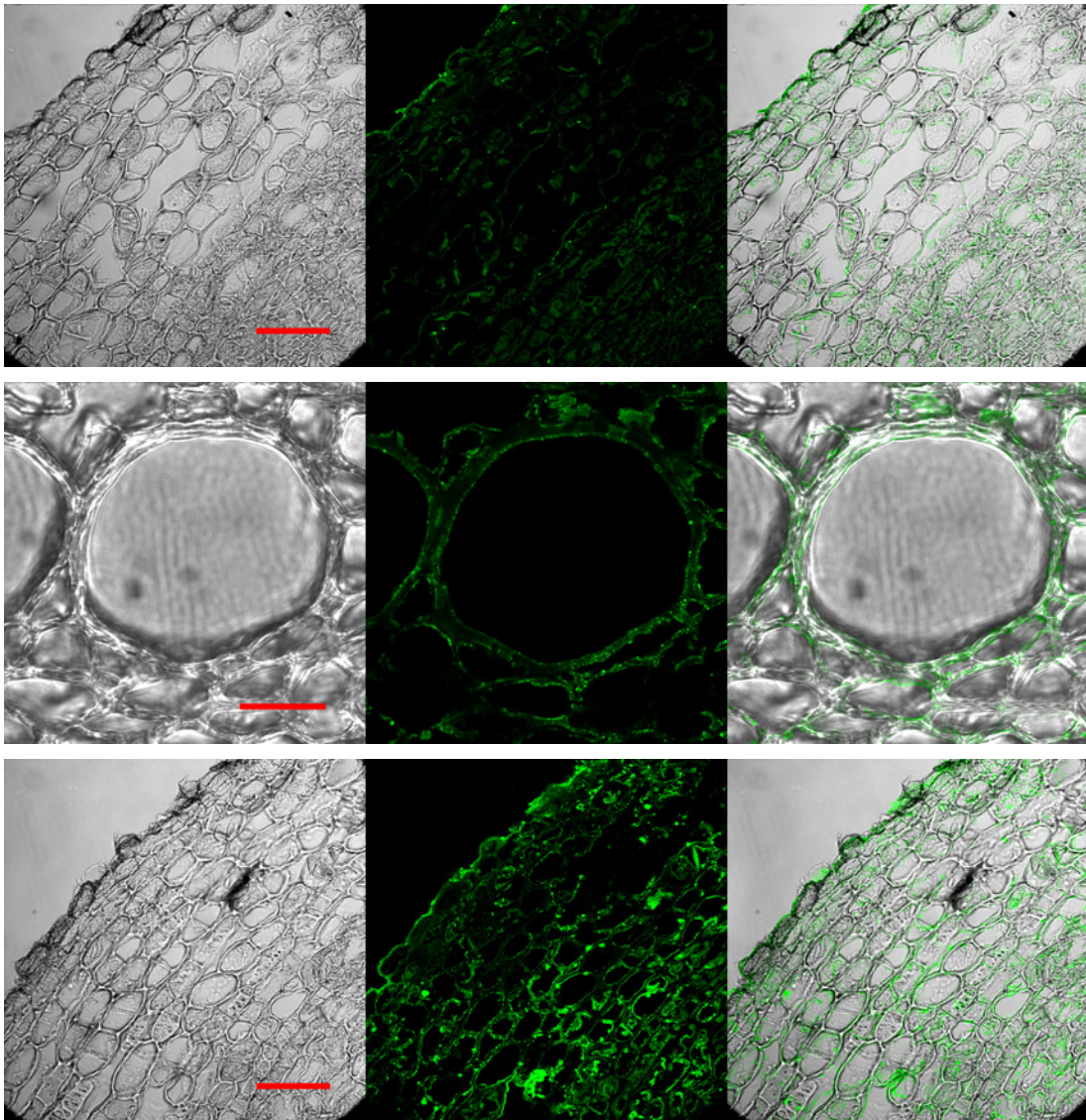


Abbildung 4.6: Ermittlung der optimalen Konzentration an  $\beta$ GlcY



## 4. MIKROSKOPISCHE LOKALISIERUNG

---

Im zweiten Schritt der durchgeführten Untersuchungen wurden während der Immunmarkierungen verschiedene  $\beta$ GlcY-Konzentrationen eingesetzt, um die optimale Konzentration zu finden. Hierzu wurden Schnitte mit Yarıvlösungen der Konzentrationen 200  $\mu$ g/ml, 400  $\mu$ g/ml, 1000  $\mu$ g/ml und 1500  $\mu$ g/ml behandelt. In den mikroskopischen Aufnahmen sieht man in der oberen Reihe die geringste Konzentration (Skala = 100  $\mu$ m), in der mittleren Reihe wurde mit 400  $\mu$ g/ml angefärbt (Skala = 20  $\mu$ m) und in der unteren Reihe mit 1000  $\mu$ g/ml (Skala = 100  $\mu$ m). Diese Konzentration stellte sich als zu hoch heraus, da die Waschschrirte nicht ausreichten, um letzte Reste von  $\beta$ GlcY zu entfernen. Dies spiegelt sich in den klumpigen, FITC-markierten Bereichen der Aufnahmen wider. Bei den weiter durchgeführten Immunmarkierungen wurde fortan mit einer  $\beta$ GlcY-Konzentration von 400  $\mu$ g/ml angefärbt.

### 4.2.2.3. Mikroskopische Aufnahmen der Keimwurzel

Ziel war es, die Verteilung der AGPs in einem sehr frühen Stadium der Wurzel zu bestimmen.

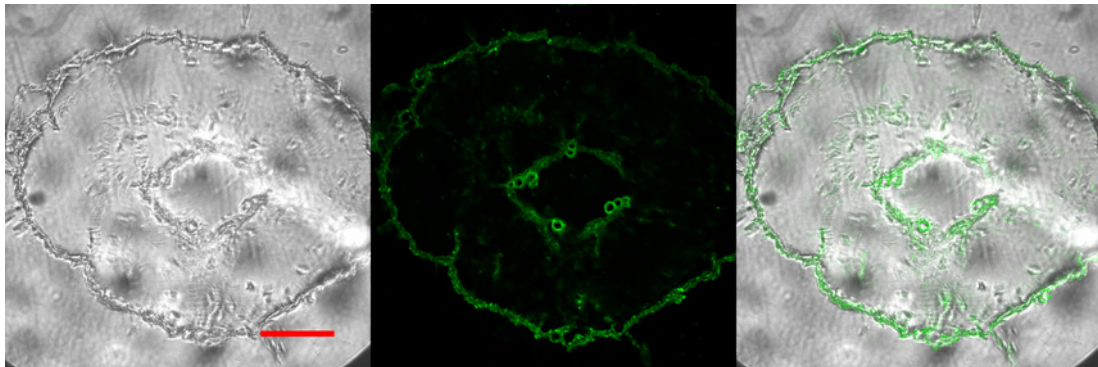


Abbildung 4.7: Immunmarkierung der AGPs an einer siebentägigen Keimwurzel

Die angezüchteten Keimlinge von *E.purpurea* waren am Hand-Mikrotom jedoch nicht zu schneiden. Auch die Cryostatschnitte der zarten, sieben Tage alten Keimwurzel waren sehr zerrissen, die Aufnahmen zeigen jedoch eine deutlich erhöhte AGP-Exprimierung im Bereich der ersten gebildeten Gefäße. Auch im Bereich der jungen Rhizodermis kann eine Markierung vermutet werden.

### **4.2.2.4. Mikroskopische Aufnahmen der sekundären Wurzel**

Die pflanzlichen Gewebe in Cryostatschnitten sind naturgemäß sehr zerrissen, was zu keinen aussagekräftigen Aufnahmen führte, da durch die Präparationsartefakte eine eindeutige Zuordnung der Immunmarkierung zu bestimmten Geweben oder Zellen respektive Zellbereichen nur schwer möglich war. Aus diesem Grund wurden Handschnitte am Mikrotom angefertigt.

Wie bei den Abbildungen zuvor befindet sich im linken Teil der Aufnahmen die Transmissionsaufnahme, um den Ausschnitt des Pflanzenpräparats zu verdeutlichen. In der Mitte befindet sich jeweils die Aufnahme, in der der Laser das FITC des Sekundärantikörpers zur Fluoreszenz anregt. Im rechten Teil befindet sich ein Overlay beider Aufnahmen.

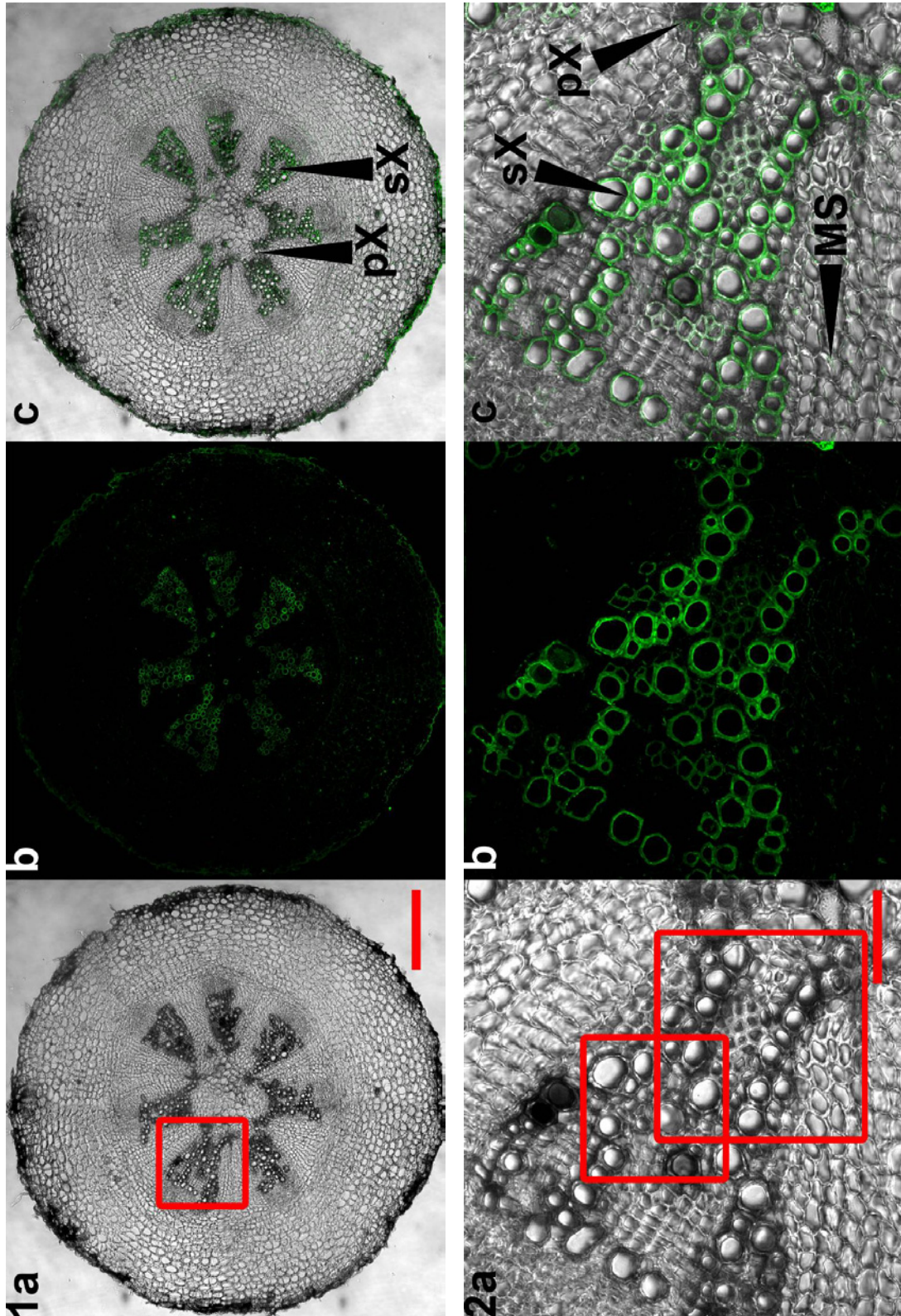


Abbildung 4.8.1: Bild 1-2 stellen Immunmarkierungen von AGPs in der sekundären Wurzel von *Echinacea purpurea* dar. pX = primäres Xylem, sX = sekundäres Xylem, MS = Markstrahl, a=Transmission, b=FITC-Anregung, c=Overlay

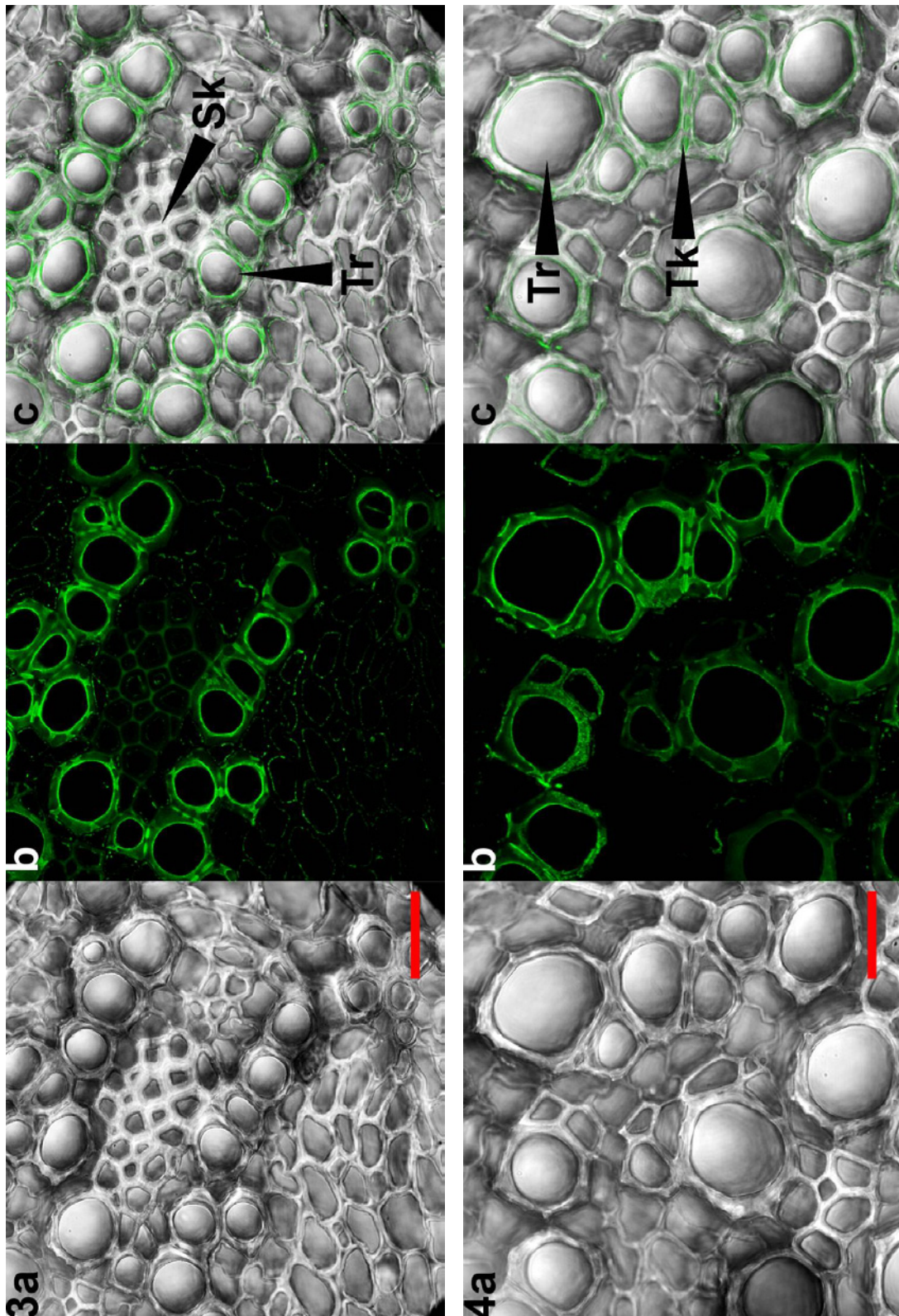


Abbildung 4.8.2: Bild 3-4 stellen Immunmarkierungen von AGPs in der sekundären Wurzel von *Echinacea purpurea* dar. Sk = Sklerenchym, Tr = Trachee bzw. Tracheide, Tk = Tüpfelkanäle, a=Transmission, b=FITC-Anregung, c=Overlay

### Legende

#### Abbildung 4.8.1

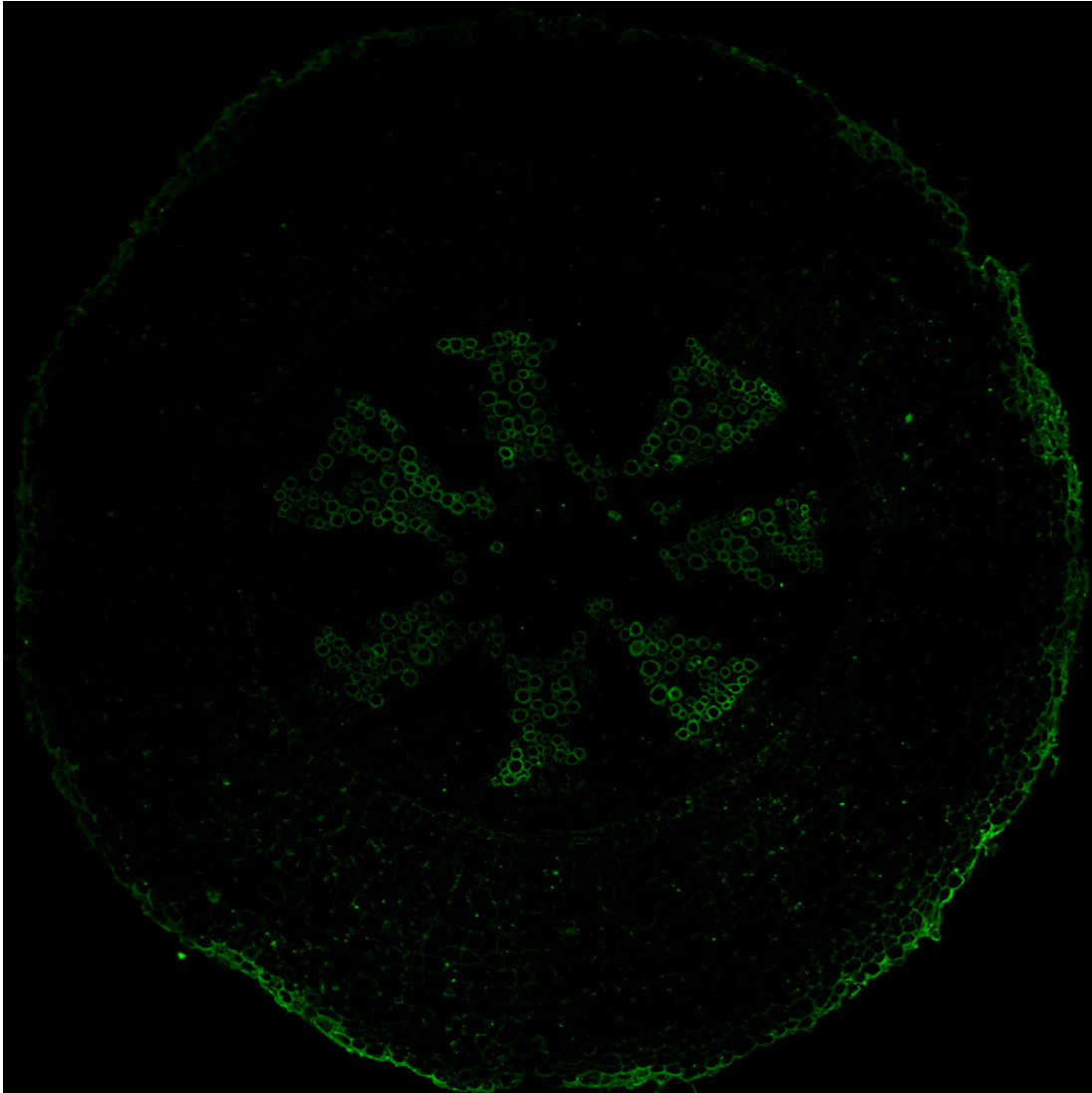
Bild 1: Immunlokalisierung der AGPs in der sekundären Wurzel (Skala = 300  $\mu\text{m}$ ). Querschnitt durch die gesamte Wurzel im Stadium des frühen sekundären Dickenwachstums. Der Schnitt zeigt von außen nach innen das Abschlussgewebe (Rhizo- oder Exodermis), Rinde, Endodermis, Perizykel und Zentralzylinder mit heptarchem Leitbündel. Besonders im Bereich des primären und sekundären Xylems (pX/sX) konnte eine hohe AGP-Konzentration festgestellt werden. Die Markierung des Abschlussgewebes war auch in abgeschwächter Form in der Kontrolle zu beobachten, könnte also zumindest zum Teil durch Autofluoreszenz bedingt sein.

Bild 2: Ausschnittsvergrößerung aus Bild 1 (rot markiert, Skala = 60  $\mu\text{m}$ ). Im Leitbündelbereich erkennt man eine deutliche Immunmarkierung des primären und sekundären Xylems (pX/sX). Hauptsächlich sind die Zellwände der ausdifferenzierten Tracheen und Tracheiden und sklerenchymatischen Bereiche markiert. Des Weiteren ist eine schwache Markierung im parenchymatischen Bereich des Markstrahls erkennbar.

#### Abbildung 4.8.2

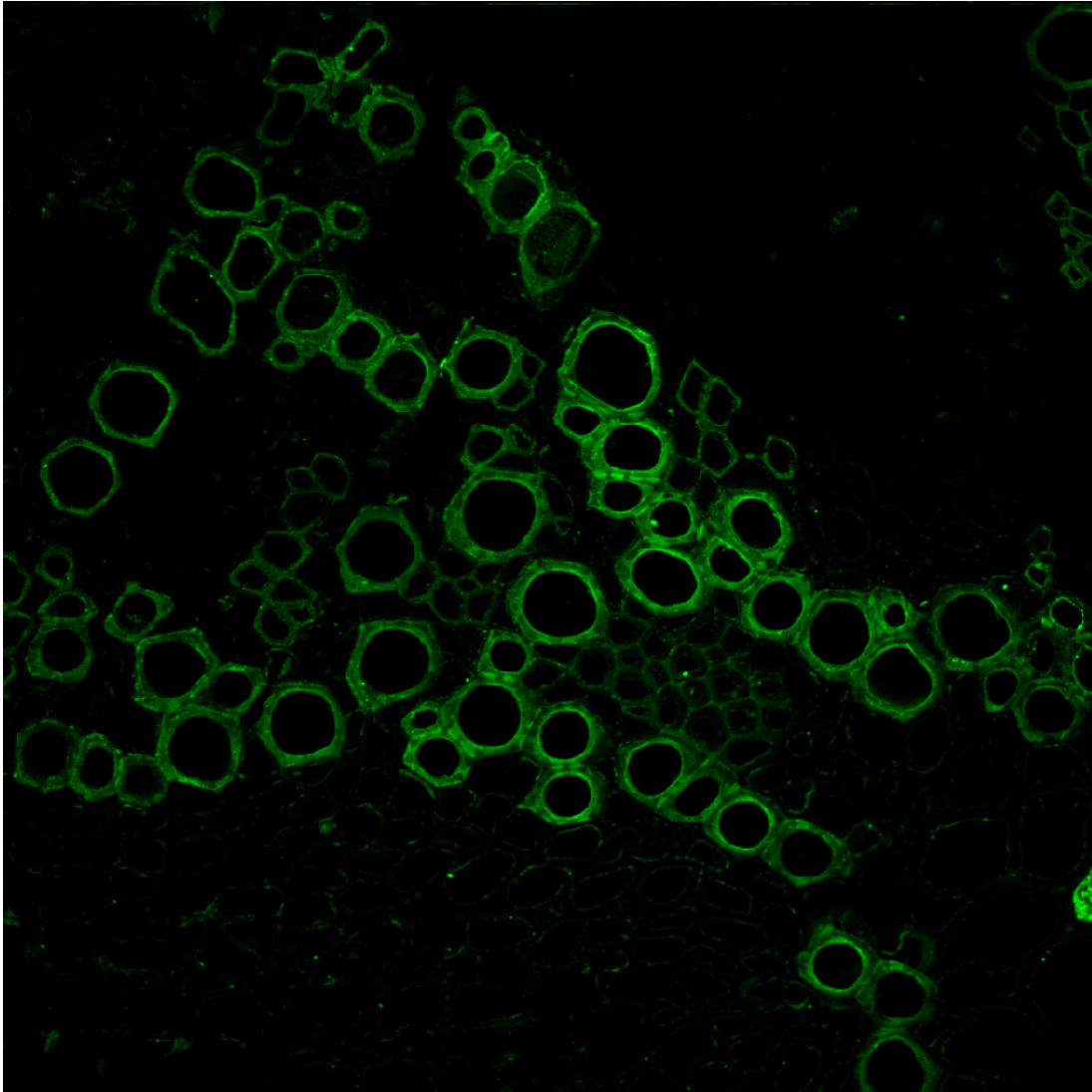
Bild 3: Ausschnittsvergrößerung aus Bild 2 (größerer roter Bereich, Skala = 30  $\mu\text{m}$ ). In diesem Vergrößerungsbereich erkennt man Unterschiede in der Immunmarkierung verschiedener Zelltypen. Bei Gefäßen und Tracheiden (Tr) erkennt man eine starke Markierung, die sich über die gesamte Zellwand erstreckt. Im sklerenchymatischen Gewebe (Sk) ist der Bereich der Mittellamelle markiert. Das Markstrahl-Parenchym zeigt eine Markierung an der inneren Zellwand, wo die Plasmamembran zu vermuten ist.

Bild 4: Ausschnittsvergrößerung aus Bild 2 (kleinerer roter Bereich, Skala = 20  $\mu\text{m}$ ). Die Markierung der Tracheen und Tracheiden (Tr) taucht verstärkt im inneren Bereich der Zellwand auf. Des Weiteren erkennt man eine starke Markierung der Tüpfelkanäle; hier insbesondere im Bereich der Mittellamelle.



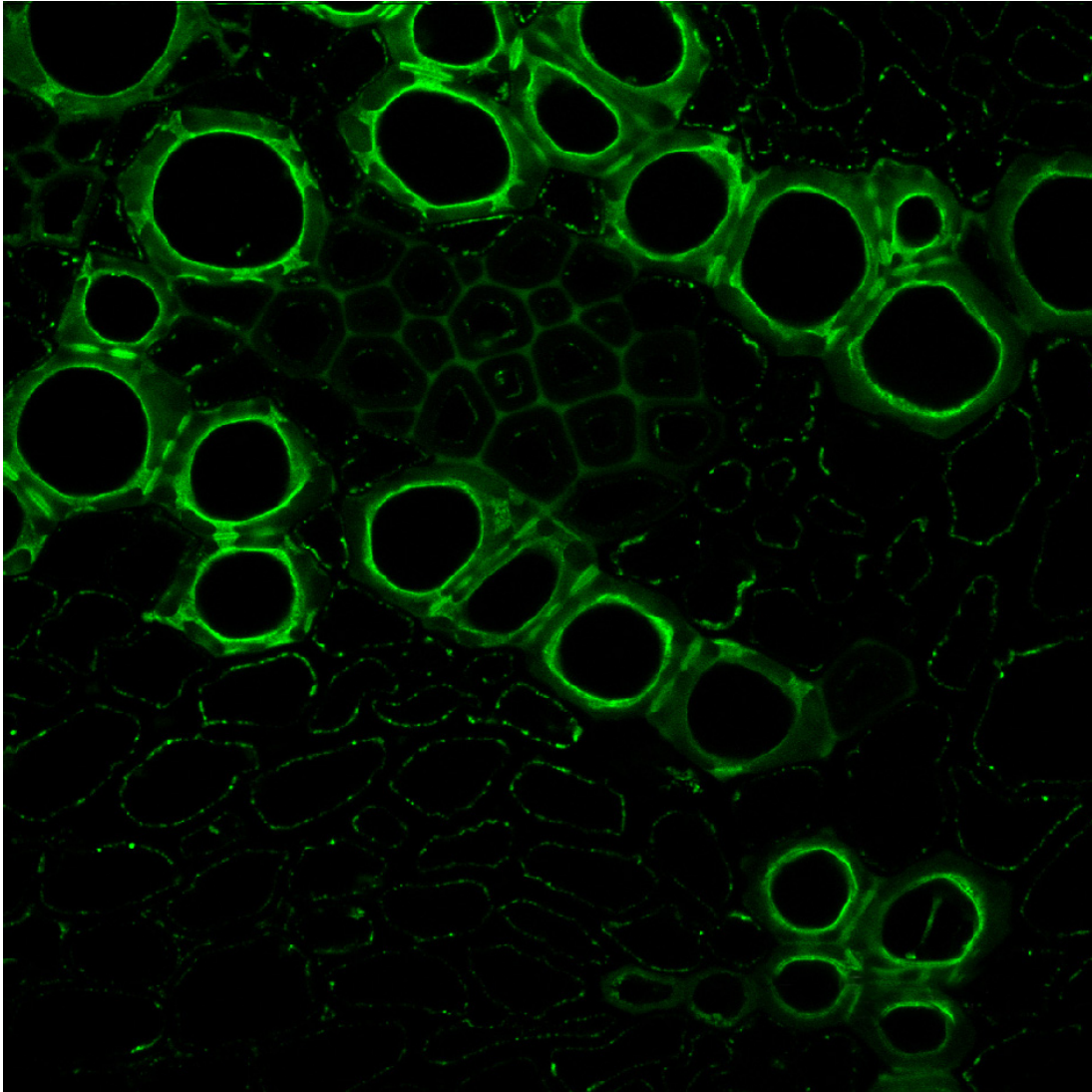
**Abbildung 4.9: Vergrößerung der Abbildung 4.8.1, Bild 1b**

Abbildung 4.9 zeigt eine Vergrößerung der Abbildung 4.8.1, Bild 1b. Unter der Epidermis liegt das Rindenparenchym, welches durch eine primäre Endodermis nach innen hin begrenzt wird. Der Perizykel schließt den Zentralzylinder mit seinem heptarchen Leitbündel ein. Ausgehend vom Kambium hat hier bereits das sekundäre Dickenwachstum eingesetzt und man kann das primäre vom sekundären Xylem abgrenzen. Die deutlichste Immunmarkierung findet sich hier im Zentralzylinder. Die Rinde erscheint nur wenig markiert. In den Kontrollen konnte man eine leichte Fluoreszenz des Abschlussgewebes erkennen, welches mit seinen Suberineinlagerungen zur Autofluoreszenz neigt und somit als Artefakt der Methode gedeutet werden muss.



**Abbildung 4.10: Vergrößerung der Abbildung 4.8.1, Bild 2b**

Abbildung 4.10 zeigt eine Vergrößerung der Abbildung 4.8.1, Bild 2b. Man erkennt aufgrund der stärkeren Vergrößerung eine Akkumulation der AGPs in den Zellwänden der ausdifferenzierten Tracheen und Tracheiden. Eine Markierung der Tracheiden und der sklerenchymatischen Bereiche ist ebenfalls auszumachen. Eine leichte Markierung scheint außerdem im parenchymatischen Gewebe vorzuliegen, was bei dieser Vergrößerung jedoch schwer zu beurteilen ist. In anderen Bereichen scheint die Mittellamelle markiert zu sein.



**Abbildung 4.11: Vergrößerung der Abbildung 4.8.2, Bild 3b**

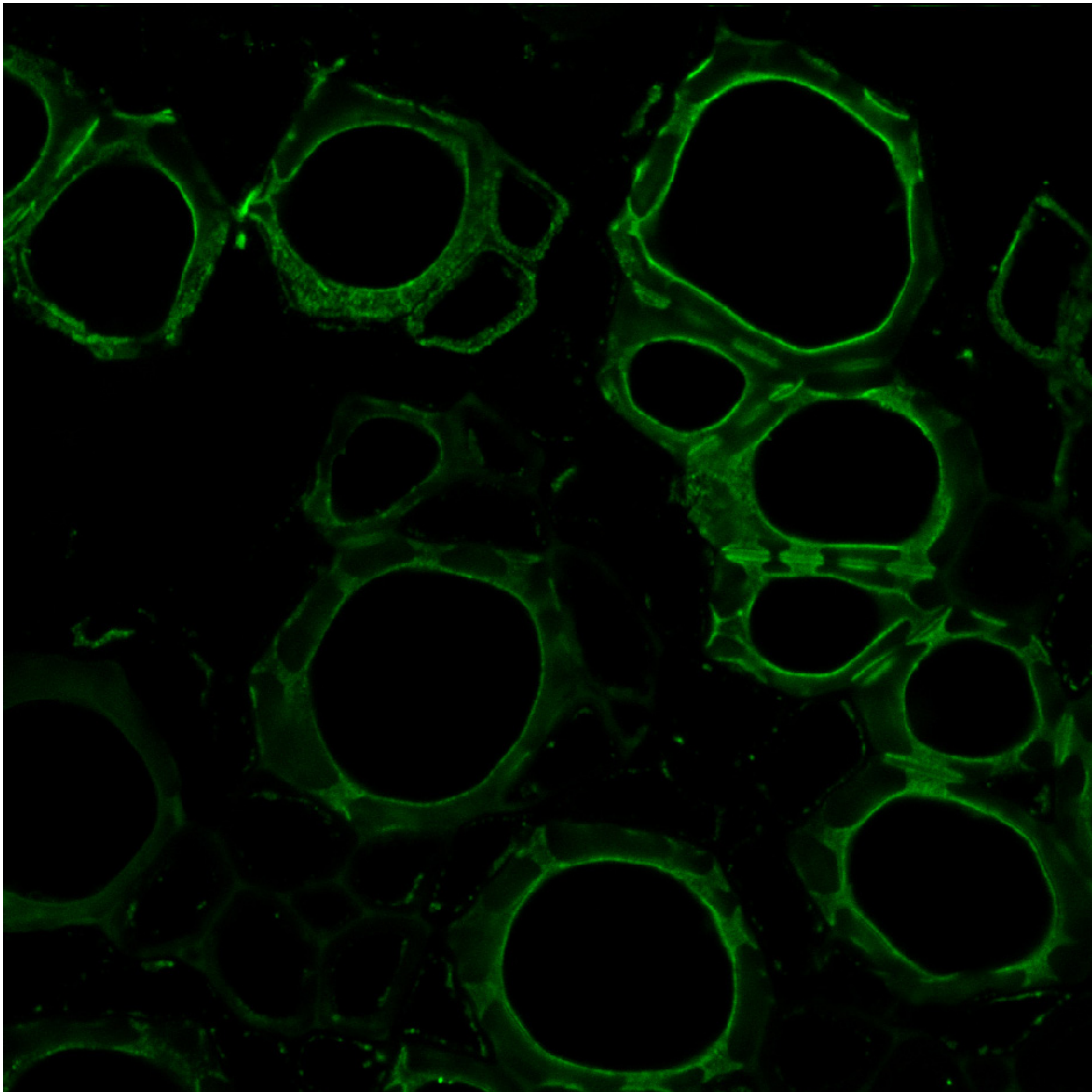
Abbildung 4.11 zeigt eine Vergrößerung der Abbildung 4.8.2, Bild 3b. In Tracheen und Tracheiden ist die gesamte Zellwand markiert, was auf eine Rolle der AGPs bei der Ausdifferenzierung und beim sekundären Dickenwachstum hindeuten könnte. Auffällig ist ebenfalls die verstärkte Markierung im Bereich der inneren Zellwand hin zum Lumen, als sei die Zelle an der Grenze Zellwand-Lumen mit AGPs ausgekleidet. Da diese Markierung in den Kontrollen nicht auftaucht, handelt es sich hierbei auch nicht um ein Artefakt der Anfärbung. Diese Markierung erstreckt sich über die gesamte Zelle, in manchen Bereichen scheint sie besonders intensiv zu sein. Die Zellwände im sklerenchymatischen Bereich sind deutlich weniger stark markiert. Umso stärker ist in diesem Gewebe dafür die Markierung der Mittellamelle. Im



#### 4. MIKROSKOPISCHE LOKALISIERUNG

---

parenchymatischen Bereich sind die AGPs nur an der inneren Zellwand im Bereich der Plasmamembran lokalisiert.



**Abbildung 4.12: Vergrößerung der Abbildung 4.8.2, Bild 4b**

Abbildung 4.12 zeigt eine Vergrößerung der Abbildung 4.8.2, Bild 4b. In der stärksten Vergrößerung der Reihe wird ein weiteres interessantes Detail der Markierung der AGPs deutlich. So sind neben der hohen Konzentration an AGPs im Bereich der inneren Zellwand xylematisch verdickter Zellen auch die Tüpfelkanäle deutlich markiert. In der Zone der Mittellamelle, in der die Tüpfelkanäle zweier benachbarter Zellen aufeinandertreffen, ist ebenfalls eine verstärkte Markierung zu beobachten.

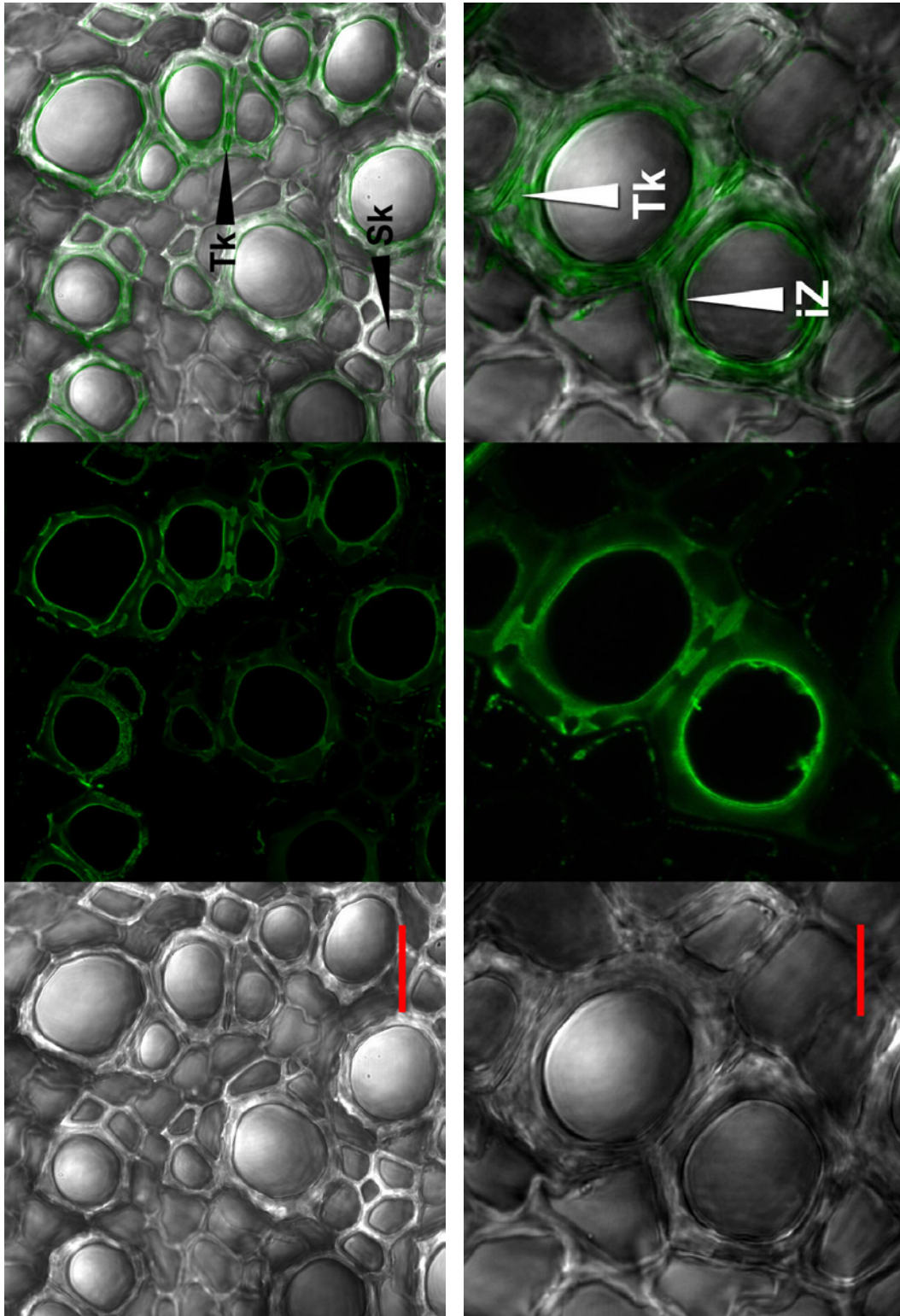
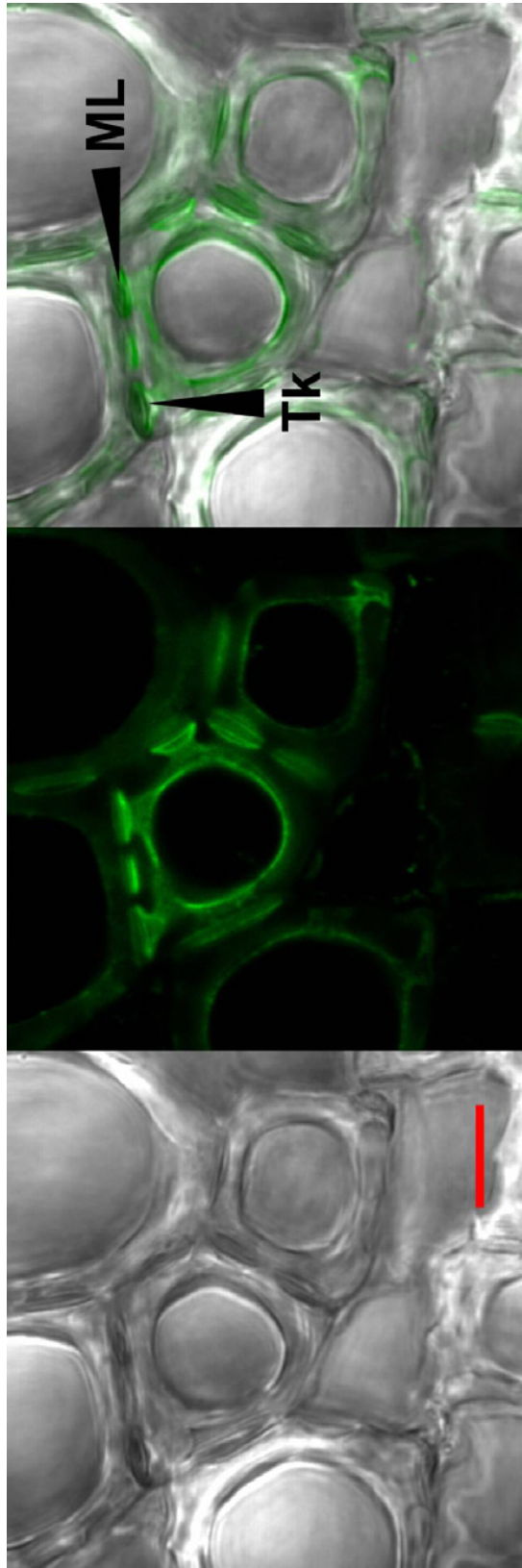


Abbildung 4.13: Die Bilder zeigen einen Ausschnitt aus dem xylematischen Gewebe (Skala links = 20 µm, rechts = 10 µm). Die Immunmarkierung zeigt ein ähnliches Bild wie zuvor. Sekundär verdickte Wände sind komplett markiert mit einer verstärkten Markierung im inneren Bereich der Zelle im Bereich der einstigen Plasmamembran. Die Markierung zeigt sich verstärkt an der Innenseite der Zellwand und zieht sich bis in die Tüpfelkanäle hinein. Sk = Sklerenchym, iZ = innere Zellwand, Tk = Tüpfelkanäle



**Abbildung 4.14:** Eine weitere Vergrößerung vermutlich tracheidaler Elemente (Skala = 7  $\mu\text{m}$ ). Auch hier erkennt man den charakteristischen Saum verstärkter Markierung an der inneren, sekundär verdickten Zellwand. Die Tüpfel sind ebenfalls stark markiert mit einer besonders intensiven Markierung im Bereich der Mittellamelle. Tk = Tüpfelkanal, ML = Bereich der Mittellamelle

## 5. Sonstige Ergebnisse

### 5.1. Geldiffusionstest

Mit dem aufgereinigten AGP wurde ein Geldiffusionstest durchgeführt. In die mittlere Kavität wurden 20  $\mu$ l Yariv-Lösung (1 mg/ml) einpipettiert, in die Kavitäten links je 20  $\mu$ l der AGP-Lösung (1 mg/ml) und in die Kavitäten rechts je 20  $\mu$ l einer höher konzentrierten AGP-Lösung (5 mg/ml). Nach 24 h Inkubation haben sich konzentrationsabhängig deutliche Präzipitationsbanden aus AGP-Yariv-Komplex gebildet (siehe Abbildung 5.1).

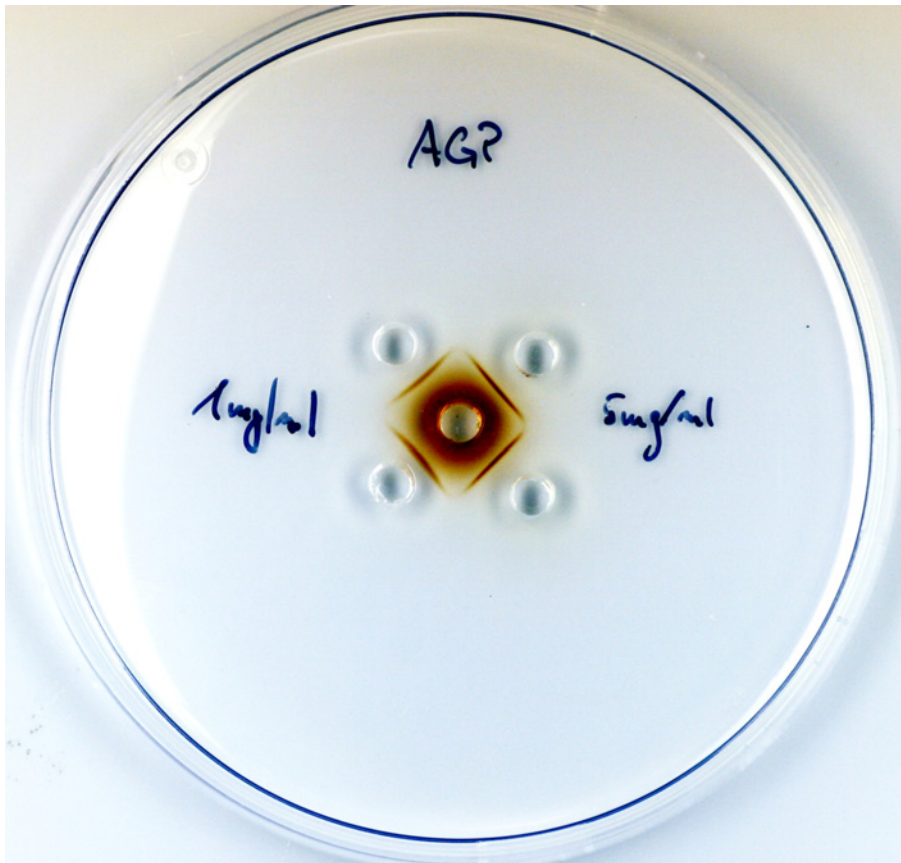


Abbildung 5.1: Geldiffusionstest AGP (1mg/ml respektive 5mg/ml) gegen Yariv-Lösung (1mg/ml)

Die Präzipitationsbanden gegen das niedriger konzentrierte AGP auf der linken Seite sind deutlich schwächer ausgeprägt als die Banden auf der rechten Seite. Der Abstand zur Yariv-Kavität ist bei der niedrigeren AGP-Konzentration deutlich größer, da die Fällung bevorzugt bei gleicher Konzentration von Yariv und AGP stattfindet.

## 5.2. Antioxidative Kapazität

Zur Ermittlung der antioxidativen Kapazität des AGPs wurden Verdünnungsreihen von Trolox hergestellt und diese an zwei aufeinander folgenden Tagen vermessen. Die resultierende Färbung verhält sich dabei umgekehrt proportional zur eingesetzten Trolox-Konzentration, da Trolox die Oxidation zum grün gefärbten ABTS<sup>+</sup>-Kation hemmt. Folgende Absorptionen wurden gemessen:

Trolox mmol/L	Tag A	Tag B
0,000	1,085	0,994
0,175	0,923	0,855
0,375	0,715	0,616
0,500	0,595	0,491
0,750	0,275	0,230

Tabelle 5.1: Erstellung der Trolox-Kalibrierreihen, Absorption bei 734 nm.

Es ergeben sich folgende Kalibriergeraden:

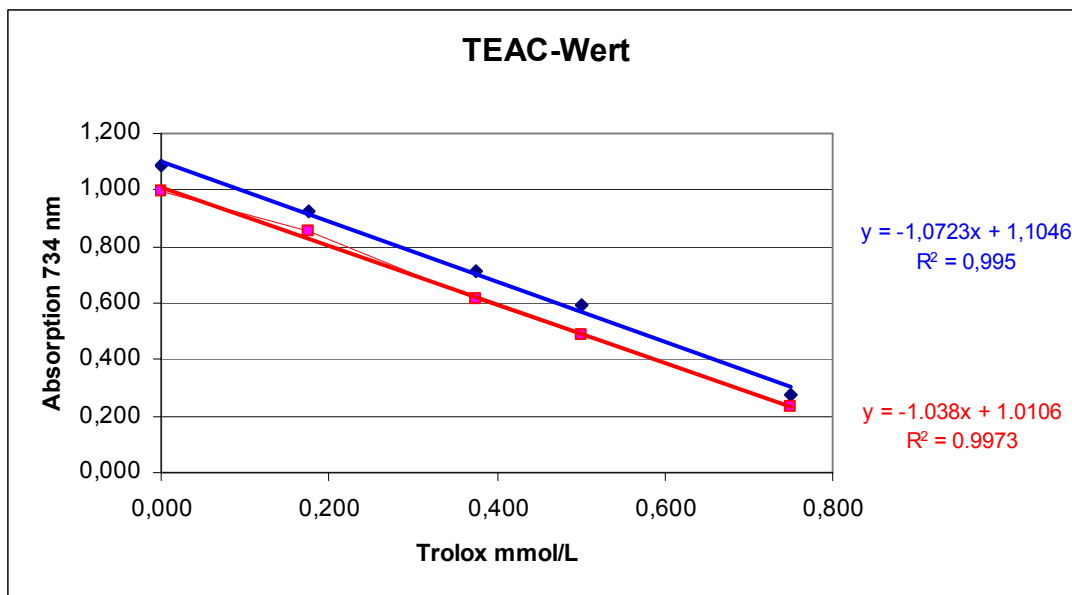


Abbildung 5.2: Kalibriergeraden zur Ermittlung des TEAC-Wertes

## 5. SONSTIGE ERGEBNISSE

---

Zu der Untersuchungslösung wurden die beiden AGP-Lösungen (jeweils zweimal) gegeben und die Absorptionen an Tag A und Tag B gemessen. Es ergaben sich folgende Werte:

<b>Probe</b>	<b>mittlerer Messwert</b>
AGP 1 mg/ml, Tag A	0,7518
AGP 3 mg/ml, Tag A	0,26
AGP 1 mg/ml, Tag B	0,633
AGP 3 mg/ml, Tag B	0,149

**Tabelle 5.2:** mittlere Absorption des ABTS<sup>+</sup>-Kations unter AGP-Zusatz bei 734 nm

Daraus resultieren als Trolox-Äquivalente

<b>Probe</b>	<b>TEAC</b>
AGP 1 mg/ml, Tag A	0,33
AGP 3 mg/ml, Tag A	0,79
AGP 1 mg/ml, Tag B	0,36
AGP 3 mg/ml, Tag B	0,83

**Tabelle 5.3:** TEAC des AGPs

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man sagen, dass das AGP über keine nennenswerte antioxidative Kapazität verfügt (zum Vergleich: Grüner Tee bewegt sich im Bereich TEAC 6-9), was auch als Nachweis für die Reinheit des AGPs in Bezug auf phenolische Pflanzeninhaltsstoffe angesehen werden kann.

### 6. Diskussion

Wie bereits einleitend erwähnt, verursachen Erkältungskrankheiten immense Kosten. Ein volkstümliches Sprichwort besagt bereits, dass eine medikamentenbehandelte Erkältung sieben Tage und ohne Medikamente eine Woche dauere. Dies bringt zum Ausdruck, dass ein wirksames Mittel zur Prävention von Erkältungskrankheiten auch in den Augen der Bevölkerung fehlt. Pflanzliche Präparate mit immunstimulierender Wirkung sind auf dem Markt daher sehr gefragt, sei es, weil „pflanzlich“ häufig mit „gesund“ assoziiert wird oder weil in einer breiten Bevölkerungsschicht noch immer eine gewisse Angst vor chemisch klar definierten Arzneimitteln vorherrscht. Betrachtet man die auf dem Markt befindlichen pflanzlichen Immunstimulantien, so sind in einer Vielzahl von Präparaten Extrakte beziehungsweise Presssäfte von *Echinacea* vorhanden, was zweifelsohne auf den volksmedizinischen Hintergrund der Pflanze zurückzuführen ist, wie es bei pflanzlichen Präparaten oft der Fall ist. Auch wissenschaftlich steht *Echinacea* schon seit einiger Zeit im Fokus zahlreicher Untersuchungen, um durch Evidenz-basierte medizinische Erkenntnisse die Wirksamkeit der Pflanze zu be- oder zu widerlegen. Auf der Suche nach den Inhaltsstoffen mit einer Wirkung auf das Immunsystem liegt, je nach Arbeitsgruppe, der Schwerpunkt der Untersuchungen entweder auf den niedermolekularen Inhaltsstoffen oder auf der hochmolekularen Fraktion. Diese Arbeit beschäftigte sich mit einer hochmolekularen Glykoproteinfraktion, deren Beschaffenheit im Folgenden diskutiert werden soll. Zunächst wird dabei näher auf die Struktur eingegangen, danach werden die Lokalisierung der AGPs innerhalb der Pflanze und die damit in Verbindung stehenden potentiellen Funktionen diskutiert.

### **6.1. Isolierung und Charakterisierung des Arabinogalactan-Proteins**

#### **6.1.1. Isolierung des Arabinogalactan-Proteins**

Aus *Echinacea purpurea* wurden bereits mehrere hochmolekulare Fraktionen näher charakterisiert. Dabei handelte es sich häufig um Inhaltsstoffe aus oberirdischen Teilen der Pflanze, aus dem Presssaft der Pflanze oder um Inhaltsstoffe, die in Zellkulturen in das Medium abgegeben wurden (siehe 1.2.) und naturgemäß als mannigfaltiges Substanzgemisch vorliegen. Die erste Aufgabe war also die Isolierung der gewünschten wasserlöslichen Polysaccharid-/Glykoprotein-Fraktion. Durch die wässrige Extraktion konnten bereits im Vorfeld alle lipophilen Bestandteile abgetrennt werden. Nach der Filtration blieb ein tiefbrauner Extrakt mit würzigem Geruch zurück, in dem nieder- und hochmolekulare hydrophile Substanzen vorlagen. Der Extrakt wurde nun erhitzt, um die Proteine, welche sich in dem Extrakt befanden, zu denaturieren. Die Tatsache, dass die Arabinogalactan-Proteine, welche bis zu 10% aus Protein bestehen, nicht von der Hitze-Denaturierung betroffen sind, wird einer schützenden Funktion der sterisch großen Kohlenhydratreste zugesprochen, die das kovalent gebundene Protein-Rückgrat vor einer Denaturierung bewahrt.

Die gefällten Proteine wurden abzentrifugiert und der Extrakt, der nun noch sowohl niedermolekulare als auch hochmolekulare, hydrophile Bestandteile enthielt, wurde einer Tangentialflussfiltration unterzogen. Bei der Tangentialflussfiltration strömt die zu filtrierende Flüssigkeit quer an einer Membran mit einer definierten Porengröße vorbei. Durch die Querströmung wird ein Verstopfen der Poren weitgehend verhindert, wodurch sich das Verfahren besonders zur Filtration von Flüssigkeiten mit einem hohen Gehalt an Trüb- und Schwebstoffen eignet. Das Filtrat, welches die Anlage verlässt, enthält - je nach Porengröße - die niedermolekularen Bestandteile des Extraktes. Die hochmolekularen Inhaltsstoffe werden im Retentat deutlich aufkonzentriert. Letzte niedermolekulare Bestandteile wie Mono- und kleinere Oligosaccharide werden bei der folgenden Dialyse gegen Aqua dem. entfernt. Es blieb die hochmolekulare Fraktion zurück, die gefriergetrocknet wurde. Die Retentate der auf diese Art hergestellten Extrakte wurden vereinigt. Sie enthielten unter anderem die Trüb- und Schwebstoffe, die bei der ersten Filtration zur Trennung von Extrakt und Drogenrückstand nicht abgetrennt wurden und schließlich bei der



## 6. DISKUSSION

---

Tangentialflussfiltration im Retentat aufkonzentriert wurden. Durch eine Zentrifugation wurden diese Trüb- und Schwebstoffe daher aus der wasserlöslichen Fraktion entfernt. Der klare Überstand wurde nun eingesetzt, um daraus das AGP zu isolieren.

Hierzu wurde das synthetische Phenylglycosid ( $\beta$ -D-Glc)<sub>3</sub> Yariv-Phenylglycosid eingesetzt, das spezifisch an Arabinogalactanproteine bindet und diese präzipitiert. Der genaue Mechanismus, wie und warum  $\beta$ GlcY mit den Arabinogalactan-Proteinen wechselwirkt, ist noch weitgehend unbekannt. Als sicher gilt, dass  $\beta$ GlcY in wässriger Lösung Komplexe aus bis zu 50 Molekülen bildet, die sich durch die planare Struktur des Phenylglycosids geldrollenartig aufeinanderstapeln (Woods et al., 1978). Bekannt ist außerdem, dass nicht alle Zucker am Phenylrest des Yariv-Reagenzes zu einer Bindung an AGPs führen (siehe 1.3.3.). Grundsätzlich gelten hier als Voraussetzungen die  $\beta$ -Verknüpfung von D-Zuckern oder die  $\alpha$ -Verknüpfung von L-Zuckern, sowie die para-Stellung der Diazo-Gruppe des Phenylrestes. Auch ist die strukturelle Voraussetzung des AGPs nicht vollständig geklärt, welche dazu führt, dass es von  $\beta$ GlcY reversibel komplexiert werden kann. So verliert ein AGP nach Abspaltung peripherer Zuckerreste einen Großteil der Präzipitationsfähigkeit durch  $\beta$ GlcY (Komalavilas et al., 1991). Im Gegensatz dazu wird ein AGP nach Abspaltung eines Großteils des Protein-Rückgrats weiterhin von  $\beta$ GlcY präzipitiert (Gleeson und Jermyn, 1979). Die Kombination dieser Ergebnisse lässt die Rückschlüsse zu, dass dieser synthetische „AGP-Antikörper“ periphere Zuckerreste als Epitope besitzt. Dagegen stehen Untersuchungen, die besagen, dass ein AGP aus *Gladiolus gandavensis* nach der enzymatischen Abspaltung terminaler Arabinosen die Präzipitationsfähigkeit durch Yariv behält (Gleeson und Clarke, 1979) und ein AGP aus *Acacia senegal* nach einer alkalischen Hydrolyse, welche das Protein-Rückgrat abspaltet, aber die glykosidischen Bindungen intakt lässt, die Reaktionsfähigkeit mit Yariv verliert (Akiyama et al., 1984). Die strukturelle Voraussetzung der reversiblen Bindung von  $\beta$ GlcY an AGP ist also bisher ebenfalls nicht geklärt. Die Untersuchungen lassen aber zumindest auf eine Beteiligung sowohl des Protein-Rückgrats als auch des Kohlenhydrat-Anteils schließen. Nach der Fällung der AGPs durch das  $\beta$ GlcY konnte die reversible Bindung durch Zugabe von Natriumdithionit gespalten werden. Es schloss sich eine Dialyse an, durch die

## 6. DISKUSSION

---

überschüssiges  $\beta$ GlcY und Natriumdithionit entfernt werden konnte. Das gelöste AGP wurde gefriergetrocknet und konnte weiter analysiert werden.

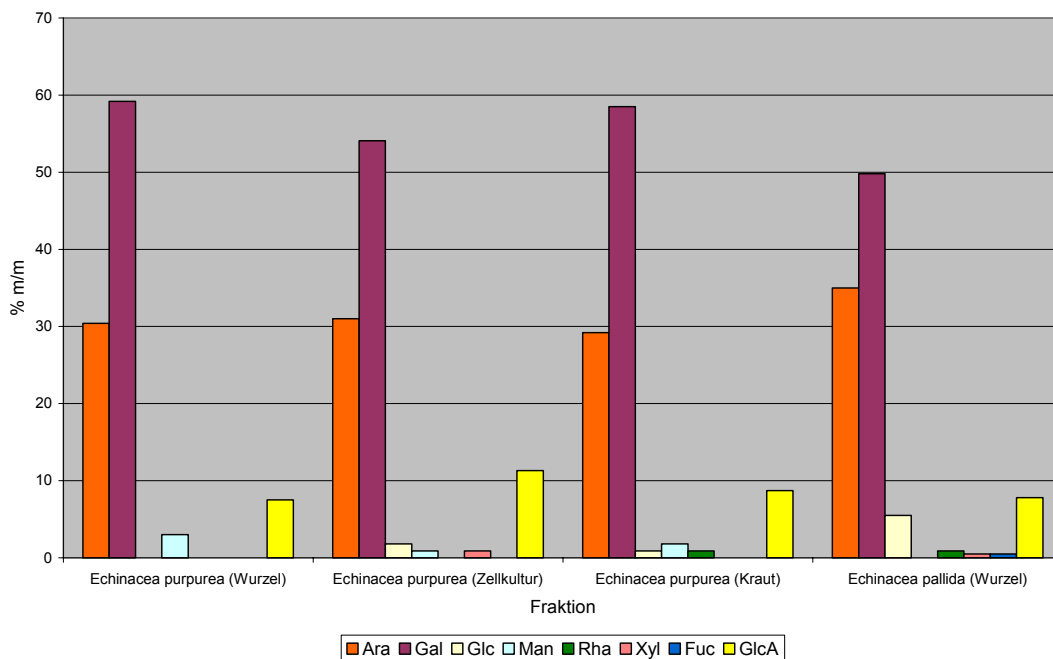
Der Gehalt an AGP in der Wurzel ist, verglichen mit den Ausbeuten aus oberirdischen Teilen oder aus Zellkulturen, relativ gering, wie Tabelle 6.1 verdeutlicht.

<b>Pflanze + Material</b>	<b>AGP-Ausbeute % (m/m)</b>
<i>Echinacea purpurea</i> Wurzel	0,13
<i>Echinacea purpurea</i> Presssaft oberirdischer Teile	0,40
<i>Echinacea purpurea</i> Zellkulturmedium	0,40-0,80

Tabelle 6.1: Vergleich der Ausbeuten von AGP verschiedener Ausgangsmaterialien

### 6.1.2. Charakterisierung und Struktur des Arabingalactan-Proteins

Vergleicht man die Zuckerzusammensetzung des AGPs aus der Wurzel von *Echinacea purpurea* mit anderen AGPs aus *Echinacea*, die in der Literatur beschrieben wurden (Classen et al., 2000; Classen, 2007; Thude und Classen, 2005), so fallen große Ähnlichkeiten auf.



**Abbildung 6.1: Vergleich der Zuckerzusammensetzung des untersuchten AGPs zu anderen AGPs**

Die AGPs von *Echinacea purpurea* ähneln sich untereinander sehr stark in ihrer Zuckerzusammensetzung mit dem Unterschied, dass das AGP aus der Zellkultur einen leicht erhöhten Uronsäuregehalt hat. Das AGP aus *Echinacea pallida* ist ebenfalls sehr ähnlich zusammengesetzt und unterscheidet sich vom untersuchten AGP nur marginal in ihrem Gehalt an den Monosacchariden (siehe Abbildung 6.1)

### 6.1.2.1 Charakterisierung des Kohlenhydratanteils

Die Bindungstypanalyse ermöglichte einen Einblick in die genauere strukturelle Zusammensetzung des AGPs (siehe 3.2.4.5.). So zeigte das native AGP einerseits einen hohen Gehalt an 1,3-Galactose, 1,6-Galactose und 1,3,6-Galactose sowie andererseits einen hohen Gehalt an terminaler und 1,5-verknüpfter Arabinose. Durch die durchgeführte Partialhydrolyse, bei der bevorzugt labile glykosidische Bindungen gespalten werden, wurde der Gehalt an Arabinose um circa 40% auf 4,5% (mol/mol) reduziert. Im hochmolekularen mit Ethanol fällbaren Rückstand verblieb hauptsächlich Galactose mit einem Gehalt von 93,5% (mol/mol, siehe 3.2.4.3.). Durch diese Tatsache lässt sich schlussfolgern, dass die Arabinose vornehmlich peripher in Seitenketten gebunden ist, das Rückgrat des Kohlenhydratanteils also aus

## 6. DISKUSSION

---

alternierenden 1,3-Galactose und 1,3,6-Galactose-Einheiten aufgebaut ist, von dem wiederum Seitenketten aus 1,6-Galactose und 1,3,6-Galactose-Einheiten abgehen, an denen terminale Arabinose beziehungsweise Arabinose-Oligosaccharide gebunden sind. Die Uronsäurereduktion mit anschließender massenspektrometrischer Untersuchung zeigte einen Gehalt an Glucuronsäure von 7,3% (mol/mol). Möchte man eine Aussage zur Lokalisierung der Uronsäuren innerhalb des Kohlenhydrat-Anteils treffen, bietet sich eine Kombination aus Uronsäurereduktion und milder Säurehydrolyse an. Wenn der Gehalt an Uronsäuren nach der Analytik per GC/MS verglichen mit einer Probe, die nicht hydrolysiert wurde, abnimmt, ist dies ein Hinweis darauf, dass die Uronsäuren im AGP an Arabinose gebunden vorliegen. Die durchgeführte Analyse zeigte jedoch keine Abnahme im Uronsäuregehalt. Die enthaltenen Uronsäuren sind also nicht peripher an Arabinose gebunden, sondern müssen mit Galactose verknüpft sein.

Die Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass es sich bei dem Kohlenhydratanteil des  $\beta$ GlcY-gefällten AGPs um Typ-II Arabinogalactane handelt (Aspinall, 1982). Bei dieser Klassifizierung liegt ein 1,3-Galactose / 1,3,6-Galactose-Rückgrat vor, das 1,6-Galactose-Seitenketten mit terminaler Arabinose trägt. Der hohe Gehalt an 1,5-Arabinose sowie das Vorkommen terminaler Glucuronsäure sind auffällig für das hier isolierte *Echinacea*-AGP. Die 1,5-verknüpfte Arabinose wird in der Regel mit neutralen Arabinanen assoziiert (Willats et al., 2001), wurde aber bereits ebenfalls in anderen AGPs, zum Beispiel aus *Acacia senegal* (Mollard und Basile, 2000) *Physcomitrella patens* (Lee et al., 2005) oder *Pinus radiata* (Putoczki et al., 2007) gefunden. Vergleicht man die AGPs der Wurzel von *Echinacea purpurea* mit AGPs der oberirdischen Teile von *Echinacea purpurea* (Classen et al., 2000) und der Wurzeln von *Echinacea pallida* (Thude and Classen, 2005), so fällt auf, dass die Zusammensetzung des Kohlenhydratanteils in allen AGPs sehr ähnlich ist. Das Ara:Gal-Verhältnis der *E. pallida* Wurzeln und der *E. purpurea* Wurzeln ist mit 1:1,4 identisch. Auch das Ara:Gal-Verhältnis der oberirdischen Teile von *E. purpurea* ist ähnlich. Alle drei AGP-Fractionen sind durch die typische Zusammensetzung eines Typ-II AGs charakterisiert, alle drei besitzen außerdem einen ähnlich hohen Gehalt an Uronsäuren und 1,5-Arabinose. Betrachtet man die Peripherie von AGPs, so wird in der Literatur eine große Bandbreite von möglichen Zuckermodifikationen beschrieben. So können in den Seitenketten L-Fucose, L-

## 6. DISKUSSION

---

Rhamnose, D-Xylose und andere Zucker vorliegen (Clarke et al., 1979, Nothnagel, 1997). Auch wurden große Mengen an terminaler 3-O-Methyl-L-Rhamnose in *Physcomitrella patens* beschrieben (Fu et al., 2007). In dem untersuchten AGP konnten diese Modifikationen aber ebenso wenig gefunden werden wie in den AGPs der oberirdischen Teile respektive den AGPs aus *E. pallida*. Die Ähnlichkeiten der AGPs aus den verschiedenen *Echinacea*-Arten könnten durchaus gattungsbedingt sein. Innerhalb der Gattung treten hier augenscheinlich auch große Ähnlichkeiten von Organ zu Organ auf. Solche Ähnlichkeiten können durchaus auch von taxonomischem Interesse sein (Knox, 1997). Isoliert man AGPs aus Suspensionskulturen von *E. purpurea* durch  $\beta$ GlcY-Präzipitation, so erkennt man innerhalb der Zusammensetzung der Neutralzuckeranalyse ebenfalls eine große Übereinstimmung. Betrachtet man jedoch die Analyse der Bindungstypen der einzelnen Zucker, so fallen Diskrepanzen zwischen den AGPs auf, die sich in erster Linie in der im Zellkultur-AGP nur in Spuren auftretenden 1,5-Arabinose widerspiegeln.

Generiert man polyklonale Antikörper gegen AGPs aus dem Kraut von *E. purpurea*, die gegen ein Epitop mit Arabinose-Resten gerichtet sind, zeigen diese nur eine äußerst geringe Reaktivität gegen AGPs aus Zellkulturen im ELISA, was die Ergebnisse aus der Bindungstyp-Analyse untermauert (Classen et al., 2005). In der Suspensionskultur werden große Mengen AGP in das Medium sekretiert. Dass sich die Unterschiede in deren Aufbau mit einer modifizierten Biosynthese des AGPs in der Zellkultur, verglichen mit der Biosynthese des AGPs in der Pflanze, erklären lässt, bleibt Spekulation. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass gerade die Unterschiede in den Seitenketten der AGPs in Zusammenhang mit ihren biologischen Funktionen stehen.

Alles in allem erkennt man an den Ergebnissen, dass die untersuchten Glykoproteine die drei wesentlichen Kriterien eines AGPs erfüllen. Sie besitzen ein Hydroxyprolin-reiches Protein-Rückgrat, an das kovalent Typ-II-AG-Ketten geknüpft sind. Außerdem besitzen sie die Fähigkeit, reversibel an  $\beta$ GlcY zu binden.

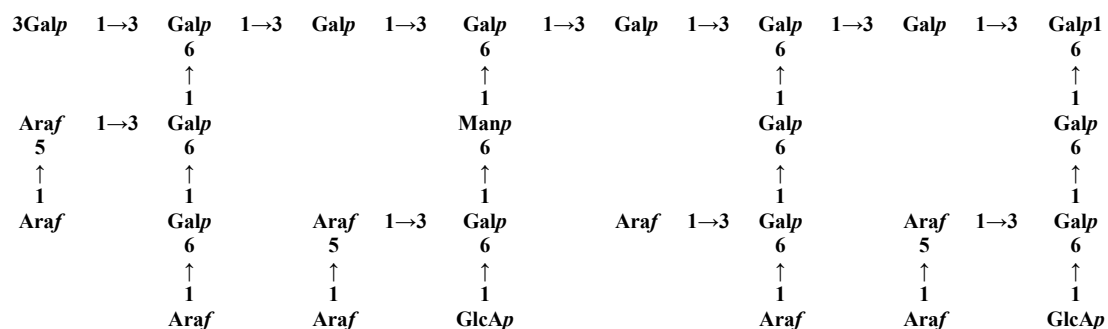
### Strukturvorschlag

Aus den oben gezeigten Resultaten lassen sich folgende Überlegungen für einen Strukturvorschlag des Polysaccharid-Teils des AGPs ableiten.

- Die Partialhydrolyse entfernt einen Großteil der Arabinose, die peripher gebunden ist.
  
- Der Gehalt an Glucuronsäure nimmt durch die Partialhydrolyse nicht ab, die Glucuronsäure ist also nicht peripher an Arabinose, sondern terminal an die 1,6-Galactose-Seitenketten gebunden.
  
- 1,6-Mannose nimmt nur eine sehr untergeordnete Rolle im AGP ein. Der Gehalt nimmt nach der Partialhydrolyse nicht ab, sondern bleibt über alle Fraktionen hinweg nahezu konstant. Es ist anzunehmen, dass in den 1,6-Galactose-Seitenketten die Galactose in seltenen Fällen durch eine 1,6-Mannose ersetzt ist.
  
- Der Gehalt an 1,3,6-Galactose nimmt bei der Partialhydrolyse ab. Die entfernten Arabinosen sind also aller Wahrscheinlichkeit nach an diese 1,3,6-Galactose gebunden. Da nach der Partialhydrolyse der Gehalt an 1,6-Galactose stärker zunimmt als der Gehalt an 1,3-Galactose, liegt die Vermutung nahe, dass die Arabinosen bevorzugt an C<sub>3</sub> der Galactose-Seitenketten gebunden vorliegen.
  
- Der Kohlenhydratanteil besteht aus AG-Ketten vom Typ II, das Rückgrat des Kohlenhydrats besteht also aus 1,3-Galactose mit intermittierenden 1,3,6-Galactose Einheiten, von denen wiederum 1,6-Galactose-Einheiten als Verzweigungen abgehen, in denen auch 1,3,6-Galactose vorkommt, an denen die labilen Arabinose-Seitenketten sitzen.

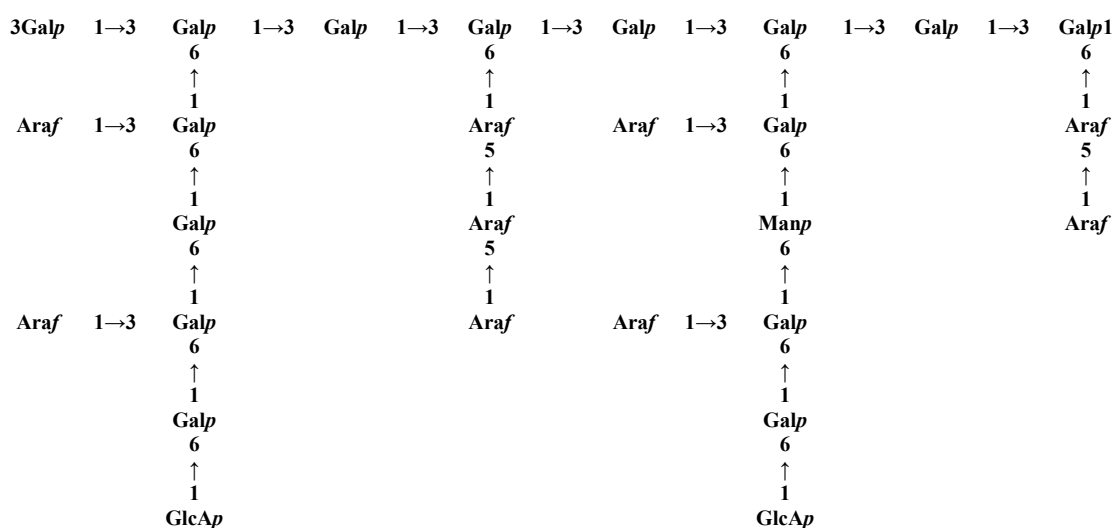
## 6. DISKUSSION

Durch Berücksichtigung dieser Überlegungen und unter Einbeziehung der molaren Verhältnisse lässt sich folgender Strukturvorschlag ableiten, welcher auf das „Wattle Blossom“-Modell zutreffen würde.



**Abbildung 6.2:** Strukturvorschlag eines Ausschnittes des Polysaccharidteils, basierend auf den molaren Verhältnissen der einzelnen Zuckerbausteine

Dieses Modell erscheint wahrscheinlicher als das „Twisty-hairy-rope“-Modell, da weder Rhamnose noch zweifach verknüpfte Uronsäuren gefunden wurden (Gaspar, 2001). Eine weitere Möglichkeit wäre ein modifiziertes „Wattle Blossom“-Modell mit kleineren Oligoarabinan-Seitenketten am 1,3-Galactose Grundgerüst, welches für andere AGPs bereits beschrieben wurde (Showalter, 2001).



**Abbildung 6.3:** Variante des Strukturvorschlags eines Ausschnittes des Polysaccharidanteils, basierend auf den molaren Verhältnissen der einzelnen Zuckerbausteine

## 6. DISKUSSION

---

Beide Varianten erscheinen möglich. Der Gehalt an 1,3-Galactose nimmt nach der Partialhydrolyse leicht und der Gehalt an 1,6-Galactose etwa doppelt so stark zu. Ein Teil der Arabinose muss also über 1,3,6-Galactose an der 1,3-Galactose Grundstruktur gebunden vorliegen. Pro Bindung dieses Typs treten im Vergleich zwei Bindungen in den 1,6-Galactose-Seitenketten über 1,3,6-Galactose auf. Dies spricht für einen Aufbau des AGPs, wie er in Abbildung 6.3 dargestellt ist. Zur genaueren Aufklärung könnten hier neu geklonte Enzyme wie *exo-β-1,3-Galactanasen* oder *endo-β-1,6-Galactanasen* beitragen, die bereits zur Degradierung und damit zur Strukturaufklärung von AGPs eingesetzt wurden (Ichinose et al., 2008).

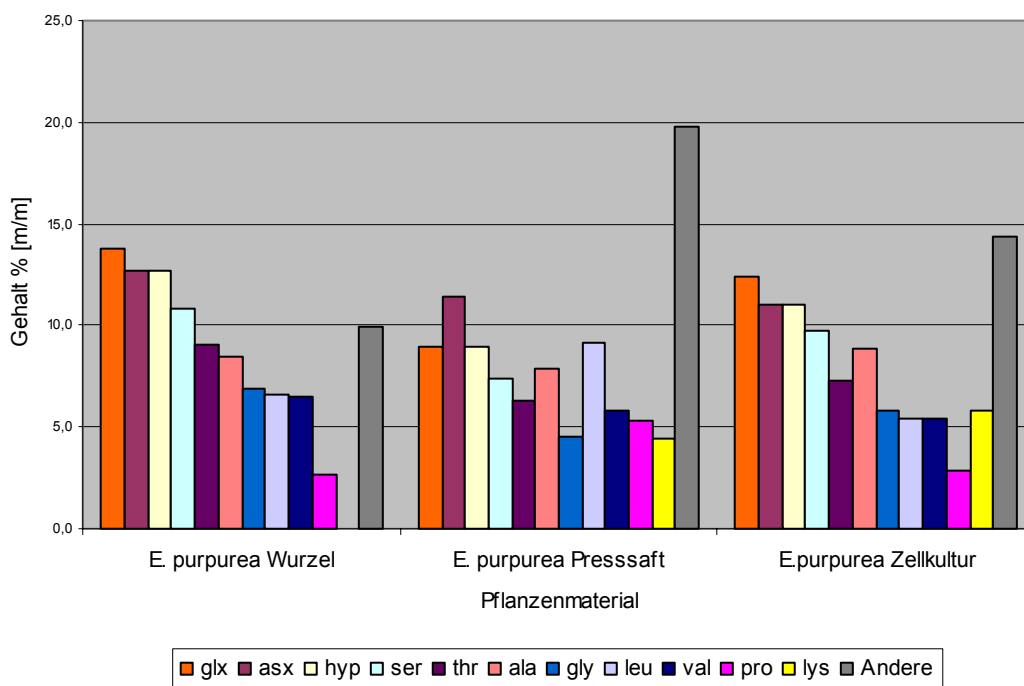


### 6.1.2.2. Charakterisierung des Proteinanteils

Die Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung zeigt hohe Mengen an Glx, Hyp, Asx, Ser, Thr, Ala und Gly. Zur Gehaltsbestimmung der Aminosäuren wurde das Protein sauer hydrolysiert, was eine Transformation von Gln zu Glu und von Asn zu Asp nach sich zog. Daher ist es nicht möglich zu entscheiden, welche der beiden Aminosäuren im nativen Protein vorlag. Klassische AGPs zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Hyp, Ala, Ser, Thr und Gly im Protein aus (Showalter, 2001; Johnson et al., 2003). In mehreren Literaturstellen finden sich Angaben darüber, dass Hyp verantwortlich für die Bindung zwischen Protein und den AG-Einheiten ist, wobei es sich um eine O-glykosidische Bindung handelt (Bacic et al., 2000). Die alkalische Hydrolyse deutet darauf hin, dass auch im untersuchten AGP ein Großteil der Protein-Zucker-Verknüpfung durch Hydroxyprolin bedingt ist, da der Gehalt an Hydroxyprolin stark ansteigt. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass das Kohlenhydrat zum Teil über Serin oder Threonin gebunden ist (Tan et al., 2003) oder eine N-glykosidische Bindung über Asn vorliegt (Volk et al., 2007). Die Detektion nahezu aller Aminosäuren, wenn auch zum Teil nur in Spuren, könnte darauf hindeuten, dass die Hydrolyse unvollständig war. Betrachtet man erneut die Aminosäuren-Zusammensetzung des nativen AGPs, so fallen außerdem die hohen Anteile von Asx und Glx auf, welche auch in anderen AGPs beschrieben werden. Man findet sie in AGPs aus Gummi arabicum (Osman et al., 1995), *Linum* (Girault et al., 2000) und auch in den Wurzeln von *E. pallida* (Thude et al., 2005) sowie im Kraut und der Zellkultur von *E. purpurea* (Classen et al., 2000; Classen 2007). Der wesentliche Unterschied zwischen dem Protein-Teil der AGPs aus Pflanzenteilen und dem Protein-Teil der AGPs aus der Zellkultur ist der, dass der relative Gehalt an Protein beim AGP aus der Suspensionskultur etwa doppelt so hoch ist, was unter anderem durch einen geringeren Glykosylierungsgrad erklärt werden könnte.

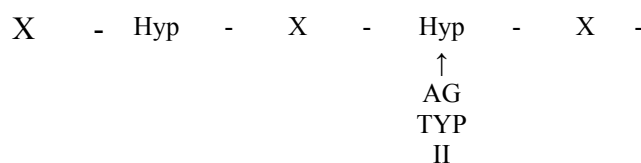
In Abbildung 6.4 werden die massenprozentualen Aminosäure-Zusammensetzungen von AGPs aus verschiedenen Ausgangsmaterialien von *Echinacea purpurea* miteinander verglichen, wobei alle AGPs ähnliche Aminosäurezusammensetzungen aufweisen. Das AGP aus der Wurzel weist besonders starke Übereinstimmungen mit dem AGP aus der Zellkultur auf.

## 6. DISKUSSION



**Abbildung 6.4: Zusammensetzung des Proteinanteils verschiedener AGPs**

Betrachtet man die Glykosylierung des Protein-Rückgrats, so gibt es verschiedene Vorschläge, auf welche Art und Weise die verschiedenen Zuckerreste an das Protein geknüpft sein können (Goodrum et al., 2000; Kieliszewski und Shpak, 2001; Shpak et al., 2001). Die Glykosylierung scheint davon abhängig zu sein, ob das für die Bindung verantwortliche Hydroxyprolin in alternierenden Sequenzen oder in zusammenhängenden Blöcken auftritt.

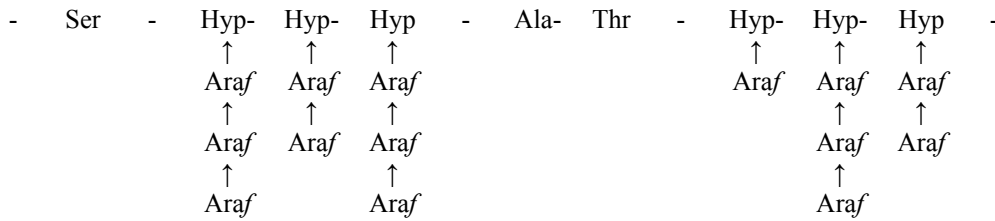


**Abbildung 6.5: Beispiel einer Glykosylierung des Protein-Rückgrats mit AGs vom Typ II, X=Ser, Thr, Ala**

Im oben gezeigten Beispiel ist eine mögliche Glykosylierung des Protein-Rückgrats dargestellt. In alternierenden Sequenzen von Hydroxyprolin mit Serin, Threonin oder Alanin soll es präferiert zur Glykosylierung mit großen Arabinogalactanen vom Typ II kommen (Nothnagel, 1997).

## 6. DISKUSSION

---



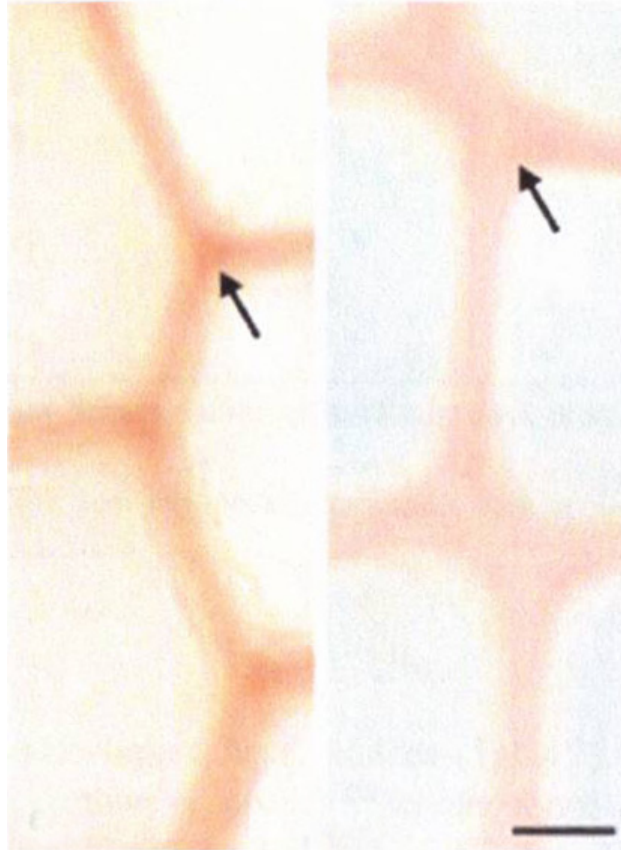
**Abbildung 6.6: Beispiel einer Glykosylierung des Protein-Rückgrats mit kurzen Araf-Ketten**

In dem in Abbildung 6.6 gezeigten Beispiel ist die mögliche Glykosylierung der im AGP-Proteinteil auftretenden, zusammenhängenden Hydroxyprolin-Blöcke dargestellt. Treten drei oder vier Hydroxyprolin-Reste nebeneinander auf, soll es gehäuft zu Glykosylierungen mit kurzen Araf-Seitenketten kommen (Goodrum et al., 2000).

Gegen diese Hypothesen spricht, dass im AGP aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* keine Arabinose-Oligosaccharide an Hydroxyprolin gebunden sind, obwohl die Sequenzierung des Proteinteils zeigte, dass Hydroxyprolin hier in Blöcken zu 3-4 Einheiten vorkommt (Classen et al., 2005).

### **6.2. Lokalisierung und mögliche Funktionen der Arabinogalactan-Proteine**

Um Aussagen über mögliche Funktionen von AGPs in Pflanzen treffen zu können, ist es unerlässlich zu wissen, wo diese lokalisiert sind. Um dies herauszufinden, wurden mikroskopische Schnitte der jungen Wurzel von *Echinacea purpurea* angefertigt und mit  $\beta$ GlcY angefärbt.  $\beta$ GlcY als mikroskopisches Färbemittel für AGPs wird häufig eingesetzt und ist bereits etabliert (Putoczki et al., 2007). Die so erhaltenen mikroskopischen Aufnahmen haben sich aber als nicht sehr aussagekräftig herausgestellt (siehe Abbildung 6.7).



**Abbildung 6.7:** Vergleich einer Anfärbung von Handschnitten von *Pinus radiata*: links die Anfärbung einer Mittellamelle mit  $\beta$ GlcY, rechts dazu im Vergleich die Anfärbung mit  $\alpha$ GalY (Putoczki et al., 2007)

Da die Konzentration an AGPs in pflanzlichen Geweben vergleichsweise niedrig ist, fällt die Färbung in der Regel schwach aus. Hinzu kommt die Eigenfärbung pflanzlicher Präparate, welche eine Interpretation lichtmikroskopischer Aufnahmen zusätzlich erschwert. Ziel war es, die Aussagekraft einer Anfärbung mit dem Yariv-Phenylglycosid zu maximieren. Hierzu wurde die Methode einer Antikörpermarkierung mit einem Antikörper gegen  $\beta$ GlcY in Kombination mit sekundären FITC-markierten Detektorantikörpern etabliert (siehe 4.2.2.). Die Funktionalität der eingesetzten polyklonalen Antikörper gegen  $\beta$ GlcY wurde im ELISA bestätigt (siehe 4.1.), wo die Antikörper eine konzentrationsabhängige Bindung an das Antigen zeigten.

Aufgrund der spezifischen Wechselwirkungen mit allen typischen AGPs werden  $\beta$ GlcY und  $\beta$ GalY standardmäßig zur Aufreinigung dieser Substanzen eingesetzt. Darüber hinaus wird  $\beta$ GlcY häufig dazu verwendet, die Rolle der AGPs in

## 6. DISKUSSION

---

biologischen Prozessen zu analysieren, wobei das Reagenz häufig pflanzlichen Suspensionskulturen zugesetzt wird (Serpe und Nothnagel, 1994; Willats und Knox, 1996; Thompson und Knox, 1998; Gao und Showalter, 1999; Chaves et al., 2002; Guan und Nothnagel, 2004; Hu et al., 2006; Putoczki et al., 2007).

Andere sehr nützliche und spezifische Werkzeuge zur Lokalisierung von AGPs in pflanzlichen Geweben sind monoklonale Antikörper, die mit spezifischen Kohlenhydratepitopen bestimmter AGPs interagieren können (Classen et al., 2004; Knox, 1997, 2008; Blake et al., 2008), welche aber zum Teil nur wenig charakterisiert sind (Yates et al., 1996). Indem viele unterschiedliche monoklonale Antikörper eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass verschiedene AGPs an der Plasmamembran auftreten (Serpe und Nothnagel, 1999; Penell et al., 1989). Daneben wurden AGPs auch in der Zellwand (Basile und Basile, 1988), insbesondere in sekundär verdickten Zellwänden und in der Mittellamelle (Putoczki et al., 2007), im Xylem (Putoczki et al., 2007; Motose et al., 2004) und im Phloem (Battaglia et al., 2007) nachgewiesen.

Mit dem Ziel, die zelluläre Verteilung der AGPs über das Wurzelpräparat in ihrer Gesamtheit zu erfassen, wurde die beschriebene Methode der Immunmarkierung mit Hilfe der polyklonalen Antikörper gegen  $\beta$ GlcY etabliert. Schon andere Autoren haben eine Beteiligung von AGPs an der Wurzelentwicklung in Betracht gezogen (Knox et al., 1991; Dolan und Roberts, 1995; Casero et al., 1998; van Hengel und Roberts, 2003). Die Untersuchungen zeigen nun anhand der Wurzel von *Echinacea purpurea*, dass die  $\beta$ GlcY bindenden AGPs am häufigsten im xylematischen Bereich auftreten, was mit Untersuchungen übereinstimmt, in denen mithilfe monoklonaler Antikörper in *Arabidopsis* xylematisches Gewebe markiert werden konnte (Dolan und Roberts, 1995, Dolan et al., 1995). Dies wurde auch erfolgreich in *Daucus*, *Raphanus*, *Pisum* (Casero et al., 1998) sowie in *Pinus* (Zhang et al., 2003) erreicht.

Interessanterweise zeigen die verschiedenen Zelltypen im Bereich des Xylems in den *Echinacea*-Wurzeln eine unterschiedliche Markierung. Es ist wahrscheinlich, dass dies mit den unterschiedlichen Aufgaben der Gewebe assoziiert werden kann.

### Lokalisierung im Bereich der Plasmamembran

Dass einige AGPs Plasmamembran-assoziiert sind, wurde bereits 1983 von Samson et al. beschrieben. Die in der Echinacea-Wurzel auftretende Markierung im Bereich zwischen Plasmamembran und Zellwand im Markstrahlparenchym untermauert die Hypothese, dass die dort lokalisierten AGPs einen GPI-Anker tragen mit dem sie in der Plasmamembran verankert sind. Auch beschreiben Vaughn et al. (2007) in epidermalen Zellen von *Vicia faba*, dass die Berührungsfläche von Plasmamembran zu Zellwand deutlich von Anti-AGP-Antikörpern markiert wird. Hier besitzen sie eventuell auch signalübertragende Ligandenfunktionen und stehen so in Verbindung zum Cytoskelett (Sardar et al., 2006; siehe Abbildung 6.8). Dass viele AGPs einen GPI-Anker tragen, ist bekannt (Youl et al., 1998; Seifert und Roberts, 2007). Auch wurde bereits beschrieben, dass die GPI-verankerten AGPs durch die Beweglichkeit ihrer hydrophilen 1,6-verknüpften Oligosaccharid-Ketten Wasser zurückhalten und so eine Pufferschicht ausbilden können (Kieliszewski, 2001).

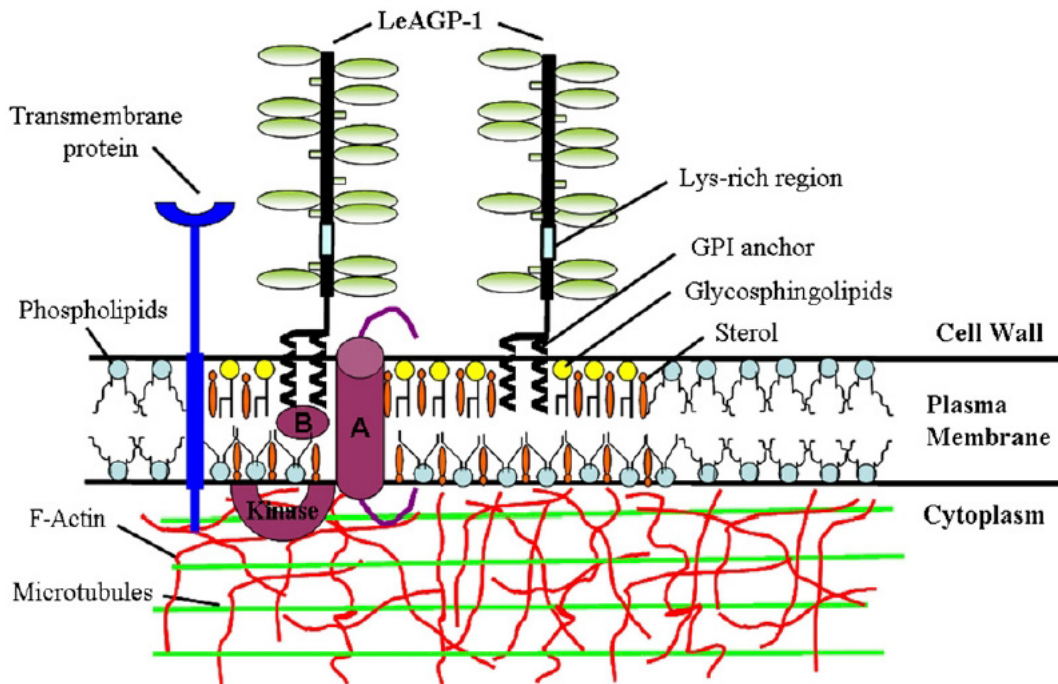


Abbildung 6.8: Vorschlag eines Plasmamembran-Aufbaus unter Einbeziehung eines AGPs (Sardar et al., 2006). Danach sind AGPs im Bereich bestimmter Lipid-Schollen mit der Plasmamembran verankert und stehen über drei mögliche Interaktionsmechanismen in Verbindung zu den Mikrotubuli. Zum einen ist es möglich, dass das AGP als Ligand an ein Transmembranprotein in der Phospholipid-Doppelschicht bindet. Als zweite Möglichkeit einer Signalübertragung wird eine Bindung an einen Transmembranrezeptor (A) diskutiert. Als dritte Variante wäre es möglich, dass es zu einer Ligand/Rezeptor-Komplex induzierten Translokalisierung eines Signalmoleküls (B) kommt, die die Aktivierung einer Kinase auf der Cytoplasmaseite zur Folge hat.

Auch Nguema-Ona et al. (2007) beschrieben, dass AGPs die Mikrotubuli-Organisation beeinflussen.

### **Lokalisierung im sklerenchymatischen Gewebe**

Die AGPs in sklerenchymatischen Zellen sind innerhalb der Wände im Bereich der Mittellamelle lokalisiert. AGPs wurden bereits im Sklerenchym verschiedener Pflanzen nachgewiesen. Hier scheinen sie eine Rolle in der sekundären Zellwandverdickung zu übernehmen (Girault et al., 2000; Ito et al., 2005; Roach und Deyholos, 2007; Blake et al., 2008). Die gleiche Aufgabe scheint ebenfalls einem AGP in den differenzierenden Tracheiden von *Pinus taeda* zuzukommen (Zhang et al., 2003). Die Anwesenheit von AGPs in der Mittellamelle von *Pinus radiata* wurde von Putoczki et al. (2007) so gedeutet, dass die AGPs hier adhäsive Aufgaben von Zelle zu Zelle besitzen. Auch wurde vermutet, dass AGPs an Pektine gebunden sein können (Immerzeel et al., 2006; Baldwin et al., 2001), welche im Bereich der Mittellamelle vorkommen. Coimbra et al. (2007) spekulieren, dass AGPs als eine Art „Zellwandverflüssiger“ fungieren, welche die Pektinmatrix aufquellen lassen und so eine Verdickung der Zellwand und damit eine Ausdehnung der Zellen ermöglichen.

### **Lokalisierung in der Zellwand xylematischer Gefäße**

In den xylematischen Gefäßen sind, wie bereits erwähnt, die Zellwände der Tracheen und Tracheiden vollständig markiert, was zeigt, dass eine sehr hohe Konzentration an AGPs im inneren Bereich der Zellwand hin zum Zelllumen vorliegt. Hierbei spielt es keine Rolle, ob es sich um primäres oder sekundäres Xylem handelt. Mit monoklonalen Antikörpern ist der Nachweis gelungen, dass sich bestimmte AGP-Epitope zeitlich und räumlich mit der Differenzierung des Xylems korrelieren lassen, was zu der Annahme führte, dass AGPs eine Rolle bei der Differenzierung von Gefäßen spielen (Dolan et al., 1995; Schindler et al., 1995; Stacey et al., 1995; Gao und Showalter, 2000; Loopstra et al., 2000; Yang et al., 2005; Liu und Mehdy, 2007). Nach den vorliegenden Untersuchungen scheint es der Fall zu sein, dass die deutliche Markierung an der Innenseite der Zellwand durch AGPs verursacht wird, welche ursprünglich zu Lebzeiten der Zelle durch einen GPI-Anker an die

Plasmamembran gebunden waren. Ein Zusammenhang zwischen der Verbindung von Zellwand, Plasmamembran und Cytoplasma sowie der Produktion und Anlagerung sekundären Wandmaterials erscheint wahrscheinlich. In *Zinnia elegans* wurde nachgewiesen, dass ein GPI-verankertes AGP für die netzförmige Anlage sekundärer Wandverdickungen xylematischer Elemente verantwortlich ist (Dahiya et al., 2006). Darüber hinaus wurde im Zugholz von *Populus* mit Hilfe monoklonaler Antikörper die Region der Plasmamembran an der inneren Zellwand markiert (Lafarguette et al., 2004). Eine Rolle der AGPs in Verbindung mit dem Wiederaufbau der Zellwand nach einer Zellteilung wird ebenfalls diskutiert (Shibaya und Sugawara, 2007).

### **Lokalisierung in den Tüpfelkanälen**

Die Lokalisierung hoher AGP-Konzentration in Tüpfelkanälen taucht in der Literatur bisher nicht auf. Da Tüpfel von der Plasmamembran durchzogen sind, könnten AGPs eine entscheidende Rolle in der Ausbildung der Tüpfel während der Ausdifferenzierung des Xylems spielen. Im Bereich der Mittellamelle, wo die Plasmodesmen zweier benachbarter Tracheen oder Tracheiden aufeinander treffen, ist die Markierung besonders intensiv. Dies führt zu der Annahme, dass die AGPs eine Rolle bei der Bildung von Plasmodesmen spielen beziehungsweise an der Kommunikation zwischen benachbarten Zellen beteiligt sind. Im Pericarp von Tomaten konnte durch LM6, einen monoklonalen Antikörper gegen 1,5-verknüpfte Arabinane, eine Anreicherung des Epitops an der inneren Zellwand um die Tüpfel herum nachgewiesen werden (Orfila und Knox, 2000). LM6 detektiert allerdings auch AGPs mit entsprechenden Arabinan-Seitenketten (Blake et al., 2008). Motose et al. (2004) zeigten, dass ein AGP, welches sie „Xylogen“ nannten, in Zellkulturen von *Zinnia* für die zur Differenzierung xylematischer Zellen nötige Kommunikation verantwortlich ist. Auf dieser Annahme basieren auch Studien von Qin und Zhao (2007), die ergaben, dass Xylogen für die Ausbildung der Gefäßnervatur in den Kotyledonen verantwortlich sein könnte.

Mit Hilfe der Markierung mit Antikörpern gegen das Yariv-Phenylglycosid, welche in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, verfügt man nun über eine Methode,



## 6. DISKUSSION

---

in einem pflanzlichen Präparat alle Yariv-bindenden Arabinogalactan-Proteine gleichzeitig nachzuweisen und sich somit einen Überblick über die Verteilung der AGPs zu verschaffen. Die Unterschiede der Verteilung in den verschiedenen Gewebstypen deuten darauf hin, dass die AGPs nicht nur eine, sondern viele verschiedene Funktionen innerhalb der Pflanzen erfüllen.

### 7. Zusammenfassung und Ausblick

Der Bedarf an wirksamen Immunstimulantien steigt kontinuierlich an. Im Sektor der pflanzlichen Präparate treten *Echinacea*-haltige Mono- beziehungsweise Kombinationspräparate oft in Erscheinung. Als Substanzen, die für eine immunregulatorische Wirkung in *Echinacea* verantwortlich sein könnten, werden Kaffeesäurederivate, Alkamide und auch die höhermolekularen Arabinogalactan-Proteine diskutiert. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde die wasserlösliche, hochmolekulare Glykoprotein-Fraktion aus Wurzeln von *Echinacea purpurea* L. MOENCH charakterisiert. Hierzu wurde ein wässriger Extrakt durch Mazeration hergestellt. Durch Proteinfällung, Tangentialflussfiltration und Dialyse wurden die niedermolekularen Substanzen abgetrennt. Aus dem hochmolekularen Retentat wurde durch das synthetische Yariv-Phenylglykosid eine Glykoprotein-Fraktion, die so genannten Arabinogalactan-Proteine präzipitiert und isoliert. Hierbei handelte es sich um Glykoproteine mit einem MW von circa 230 kDa und einem Proteinanteil von 4,8% (m/m). Die Analyse des Kohlenhydrat-Anteils ergab, dass sich das Polysaccharid in erster Linie aus Galactose (59,2% m/m) und Arabinose (30,4% m/m) zusammensetzt. Der Uronsäuregehalt lag bei 7,5% (m/m). Daneben wurden geringe Mengen an Mannose (3% m/m) gefunden. Die durchgeführte Bindungstypanalyse erbrachte, dass der Kohlenhydratanteil des AGPs aus Arabinogalactanen vom Typ II besteht, welche durch eine 1,3- $\beta$ -D-Galactose Hauptkette charakterisiert sind, die 1,6-Galactopyranose-Reste an C6 tragen. Diese pyranosidischen 1,6-Galactosen können noch kurze Arabinoseketten tragen. Der Proteinteil besteht zu 12,7% (m/m) aus Hydroxyprolin, was sowohl per HPLC-Analytik aller Aminosäuren als auch photometrisch bestimmt wurde. Daneben kommen in erster Linie Glx, Asx, Ser, Thr und Ala vor. Eine alkalische Hydrolyse lässt vermuten, dass die Glykosylierung des Proteins hauptsächlich über Hydroxyprolin erfolgt.

Neben den strukturellen Untersuchungen wurde eine neue Methode zur Immunlokalisierung von AGPs am pflanzlichen Schnitt etabliert. Hierzu wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ GlcY hergestellt und auf seine Funktionalität getestet. Daraufhin

wurden mikroskopische Schnitte mit dem Yariv-Phenylglycosid inkubiert, welches im pflanzlichen Präparat an die Arabinogalactan-Proteine bindet und damit als Epitop für den neu hergestellten Antikörper fungiert. Nach FITC-Markierung durch einen Sekundärantikörper wurden die Präparate unter einem CLSM betrachtet und die resultierende Fluoreszenz aufgenommen. Die so lokalisierten AGPs befanden sich im Querschnitt der Wurzel in erster Linie im xylematischen Bereich. Hier waren vor allem die Zellwände von Tracheen und Tracheiden markiert. Insbesondere erfolgte eine starke Markierung im inneren Zellwandbereich, die sich auch über die Tüpfelkanäle ausdehnte. Im sklerenchymatischen Bereich des Xylems war das AGP an anderer Stelle lokalisiert. Hier konnte es im Bereich der Mittellamelle nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte im Parenchym der Markstrahlen eine Markierung im Bereich zwischen Plasmamembran und Zellwand nachgewiesen werden. Diese Markierung mit Hilfe von Antikörpern gegen das Yariv-Phenylglycosid wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Sie bietet die Möglichkeit, in einem pflanzlichen Präparat alle Yariv-bindenden Arabinogalactan-Proteine gleichzeitig nachzuweisen und sich somit einen Überblick über die Verteilung der AGPs in den verschiedenen Gewebetypen zu verschaffen.

Jede Antwort bringt immer neue Fragen hervor. So ist das Thema der Analytik und Charakterisierung der AGPs aus *Echinacea purpurea* sowie deren Lokalisierung, ihrer Funktionen in der Pflanze und der möglichen pharmakologischen Wirkungen trotz einiger anderer Arbeiten auf diesem Gebiet noch lange nicht abgeschlossen. Das Ziel künftiger Studien könnte sich zum Beispiel zunächst darauf fokussieren, die Verteilung der AGPs in Abhängigkeit von Wachstum, Differenzierung und Pflanzenorgan zu studieren. Des Weiteren können sich Studien zur Ermittlung der Proteinsequenz des AGPs aus der Wurzel von *Echinacea purpurea* anschließen. Auch ist der genaue Mechanismus, durch den die AGPs durch das  $\beta$ GlcY präzipitiert werden, noch unbekannt. Die Kenntnis des Reaktionsmechanismus zwischen Phenylglycosid und AGPs sowie die genaue Charakterisierung des „synthetischen Antikörpers“ könnte helfen, die Immunlokalisierung mit Hilfe der anti- $\beta$ GlcY-Antikörper zu verfeinern. Auf dem pharmakologischen Sektor könnte eventuell die Fragestellung gelöst werden, inwiefern die AGPs Einfluss auf das menschliche Immunsystem nehmen können. Denkbar ist hier eine Aufnahme über M-Zellen, die

als hochspezialisierte Zellen des Schleimhaut-assoziierten, lymphatischen Gewebes (MALT) beziehungsweise des Darm-assoziierten, lymphatischen Gewebes (GALT) in den Peyerschen Plaques im Dünndarm sitzen und auf die Absorption antigener und immunogener Substanzen spezialisiert sind. Auf diese Weise könnten Arabinogalactan-Proteine in den menschlichen Körper aufgenommen werden und mit dem Immunsystem interagieren. Dies könnte ebenfalls mit Hilfe einer Immunmarkierung am lebenden Gewebe nachgewiesen werden. Die Technik hierzu konnte in dieser Arbeit etabliert werden.

## 8. Bibliographie

**Abreu I; Oliveira M (2004)**

Immunolocalisation of arabinogalactan proteins and pectins in *Actinidia deliciosa* pollen  
Protoplasma 224(1-2), 123-128

**Akiyama Y, Eda S, Kato K (1984)**

Gum arabic is a kind of arabinogalactan-protein  
Agricultural and Biological Chemistry 48(1), 235-237

**Alban S, Classen B, Brunner G, Blaschek W (2002)**

Differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin  
Planta Medica 68, 1118-1124

**Aspinall GO (1982)**

Chemical characterization and structure determination of polysaccharides  
Polysaccharides 1, 35-131

**Bacic A (2003)**

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

**Bacic A, Currie G, Gilson P, Mau SL, Oxley D, Schultz C, Sommer-Knudsen J, Clarke AE (2000)**

Structural classes of arabinogalactan - proteins  
In: Cell and developmental biology of arabinogalactan-proteins, Nothnagel EA, Bacic A, Clarke AE (Editors) 11-23

**Baldwin TC, Domingo C, Schindler T, Seetharaman G, Stacey N, Roberts K (2001)**

DcAGP1, a secreted arabinogalactan-protein, is related to a family of basic proline-rich proteins  
Plant Molecular Biology 45, 421-435

**Barcz E, Sommer E, Nartowska J, Balan BJ, Chorostowska-Wynimko J, Skopinska-Rozewska E (2007)**

Influence of *Echinacea purpurea* intake during pregnancy on fetal growth and tissue angiogenic activity  
Folia Histochemica et Cytobiologica 45(Suppl. 1), 35-39

**Barrett B (2003)**

Medicinal properties of *Echinacea*: a critical review  
Phytomedicine 10(1), 66-86

## 8. BIBLIOGRAPHIE

---

**Basile DV, Basile MR (1988)**

The occurrence of cell wall-associated arabinogalactan proteins in the *Hepaticae*  
Bryologist 90, 401-404

**Battaglia M, Solorzano RM, Hernandez M, Cuellar-Ortiz S, Garcia-Gomez B, Marquez J, Covarrubias AA (2007)**

Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings  
Planta 225, 1121-1133

**Bauer R, Khan IA, Wray V, Wagner H (1987)**

Two acetylenic compounds from *Echinacea pallida* roots  
Phytochemistry 26(4), 1198-1200

**Bauer R, Remiger P, Wagner H (1988)**

*Echinacea*. Comparative TLC and HPLC analysis of herbal drugs from *Echinacea purpurea*, *E. pallida* and *E. angustifolia*. Part 3  
Deutsche Apotheker Zeitung 128(4), 174-180

**Bauer R (1990)**

*Echinacea* – Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler.  
Stuttgart: Wiss. Verlagsgesellschaft; 1990: 84

**Binns AE, Livesey JF, Arnason JT, Baum BR (2002)**

Phytochemical variation in *Echinacea* from roots and flowerheads of wild and cultivated populations  
Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 3673-3687

**Blake AW, Marcus SE, Copeland JE, Blackburn RS, Knox JP (2008)**

In situ analysis of cell wall polymers associated with phloem fibre cells in stems of hemp, *Cannabis sativa* L.  
Planta 228, 1-13

**Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ, Stone BA (1983)**

A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis  
Carbohydrate Research 113, 291-299

**Blaschek W, Döll M, Franz G (1998)**

*Echinacea* Polysaccharide  
Z. Phytother. 19, 255-262

**Bohlmann F (1973)**

Naturally occurring acetylenes  
Phytochemistry 3, 112-131

**Burgalassi S, Nicosia N, Monti D, Falcone G, Boldrini E, Chetoni P (2007)**

Larch arabinogalactan for dry eye protection and treatment of corneal lesions: investigations in rabbits  
Journal of ocular pharmacology and therapeutics: the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics 23(6), 541-550

**Casero PJ, Casimiro I, Knox JP (1998)**

Occurrence of cell surface arabinogalactan-protein and extensin epitopes in relation to pericycle and vascular tissue development in the root apex of four species  
*Planta* 204, 252-259

**Chaves I, Regalado AP, Chen M, Ricardo CP, Showalter AM (2002)**

Programmed cell death induced by ( $\beta$ -D-galactosyl)<sub>3</sub> Yariv reagent in *Nicotiana tabacum* BY-2 suspension-cultured cells  
*Physiologia Plantarum* 116, 548-553

**Clarke AE, Anderson RL, Stone BA (1979)**

Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins  
*Phytochemistry* 18(4), 521-540

**Classen B, Witthohn K, Blaschek W (2000)**

Characterization of an arabinogalactan-protein isolated from pressed juice of *Echinacea purpurea* by precipitation with the  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent  
*Carbohydrate Research* 327, 497-504

**Classen B, Mau, SL, Bacic A (2005)**

The arabinogalactan-proteins from pressed juice of *Echinacea purpurea* belong to the "hybrid" class of hydroxyproline-rich glycoproteins  
*Planta Medica* 71(1), 59-66

**Classen B, Thude S, Blaschek W, Wack M, Bodinet C (2006)**

Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from *Baptisia* and *Echinacea*  
*Phytomedicine* 13(9-10), 688-694

**Classen B (2007)**

Characterization of an arabinogalactan-protein from suspension culture of *Echinacea purpurea*  
*Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88, 267-275.

**Coimbra S, Almeida J, Junqueira V, Costa ML, Pereira LG (2007)**

Arabinogalactan proteins as molecular markers in *Arabidopsis thaliana* sexual reproduction  
*Journal of Experimental Botany* 58(15/16), 4027-4035

**Dahiya P, Findlay K, Roberts K, McCann MC (2006)**

A fasciclin-domain containing gene, ZeFLA11, is expressed exclusively in xylem elements that have reticulate wall thickenings in the stem vascular system of *Zinnia elegans* cv Envy  
*Planta* 223, 1281-1291

**Dalby-Brown L, Barsett H, Landbo AKR, Meyer AS, Molgaard P (2005)**

Synergistic antioxidative effects of alkamides, caffeic acid derivatives, and polysaccharide fractions from *Echinacea purpurea* on *in vitro* oxidation of human low-density lipoproteins  
*Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(24), 9413-9423

## 8. BIBLIOGRAPHIE

---

**Dolan L, Roberts K (1995)**

Secondary thickening in roots of *Arabidopsis thaliana* – anatomy and cell-surface changes.

New Phytologist 131, 121-128

**Dolan L, Linstead P, Roberts K (1995)**

An AGP epitope distinguishes a central metaxylem initial from other vascular initials in the *Arabidopsis* root

Protoplasma 189, 149-155

**Du H, Clarke, AE, Bacic A (1996)**

Arabinogalactan-proteins: a class of extracellular matrix proteoglycans involved in plant growth and development

Trends in Cell Biology 6(11), 411-414

**Fendrick AM, Monto AS, Sarnes M (2001)**

The economic burden of viral respiratory infection in the United States.

ISPOR 4<sup>th</sup> Annual European Congress

Contributed Presentation Abstracts. Value Health 4, 412

**Fincher GB, Stone BA, Clarke AE (1983)**

Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function

Annual Review of Plant Physiology 34, 47-70

**Fu H, Yadav MP, Nothnagel EA 2007)**

*Physcomitrella patens* arabinogalactan proteins contain abundant terminal 3-O-methyl-L-rhamnosyl residues not found in angiosperms

Planta 226(6), 1511-1524

**Gao M, Showalter AM (1999)**

Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement

The Plant Journal 19, 321-331

**Gao M, Showalter AM (2000)**

Immunolocalization of LeAGP-1, a modular arabinogalactan-protein, reveals its developmentally regulated expression in tomato

Planta 210, 865-874

**Gaspar Y, Johnson KL, McKenna JA, Bacic A, Schultz CJ (2001)**

The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function

Plant Molecular Biology 47(1-2), 161-176

**Gilmore MR (1919)**

Uses of plants by the indians of the Missouri River region

Smithsonian Institution: Bureau of American Ethnology Annual Report No. 33



## 8. BIBLIOGRAPHIE

---

**Girault R, His I, Andeme-Onzighi C, Driouich A, Morvan C (2000)**  
Identification and partial characterization of proteins and proteoglycans encrusting the secondary cell walls of flax fibres  
*Planta* 211, 256-264

**Gleeson PA, Clarke AE (1979)**  
Structural studies on the major component of *Gladiolus* style mucilage, an arabinogalactan-protein  
*Biochemical Journal* 181(3), 607-621

**Gleeson PA, Jermyn MA (1979)**  
Alteration in the composition of  $\beta$ -lectins caused by chemical and enzymic attack  
*Australian Journal of Plant Physiology* 6, 25-38

**Goodrum LJ, Patel A, Leykam JF, Kieliszewski MJ (2000)**  
Gum arabic glycoprotein contains glycomodules of both extensin and arabinogalactan-glycoproteins  
*Phytochemistry* 54(1), 99-106

**Gray DE, Pallardy SG, Garrett HE, Rottinghaus GE (2003)**  
Acute drought stress and plant age effects on alkamide and phenolic acid content in purple coneflower roots  
*Planta Medica* 69, 50-55

**Groman EV, Enriquez PM, Jung C, Josephson L (1994)**  
Arabinogalactan for hepatic drug delivery  
*Bioconjugate chemistry* 5(6), 547-556

**Guan Y, Nothnagel EA (2004)**  
Binding of arabinogalactan proteins by Yariv phenylglycoside triggers wound-like responses in *Arabidopsis* cell cultures  
*Plant Physiology* 135, 1346-1366

**Guiotto P, Wölkart K, Grabnar I, Voinovich D, Perissutti B, Invernizzi S, Granzotto M, Bauer R (2008)**  
Pharmacokinetics and immunomodulatory effects of phytotherapeutic lozenges (bonbons) with *Echinacea purpurea* extract  
*Phytomedicine* 15(8), 547-554

**Hall H, Fahlman MM, Engels HJ (2007)**  
*Echinacea purpurea* and mucosal immunity  
*International Journal of Sports Medicine* 28(9), 792-796

**Harris PJ, Henry RJ, Blakeney AB, Stone BA (1984)**  
An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides.  
*Carbohydrate Research* 127, 59-73

## 8. BIBLIOGRAPHIE

---

**Heinzer F, Chavanne M, Meusy JP, Maitre HP, Giger E, Baumann TW (1988)**  
Classification of the therapeutically used species of the genus *Echinacea*  
*Pharmaceutica Acta Helvetiae* 63(4-5), 132-136

**Hobbs CR (1989)**  
The *Echinacea* Handbook  
Eclectic Medical Publications, Portland

**Hoheisel O, Sandberg M, Bertram S, Bulitta M, Schäfer M (1997)**  
Echinagard treatment shortens the course of the common cold: a double-blind, placebo-controlled clinical trial  
*European Journal of Clinical Research* 9, 261–268

**Hu Y, Qin Y, Zhao J (2006)**  
Localization of an arabinogalactan protein epitope and the effects of Yariv phenylglycoside during zygotic embryo development of *Arabidopsis thaliana*  
*Protoplasma* 229, 21-31

**Ichinose H, Kotake T, Tsumuraya Y, Kaneko S (2008)**  
Arabinogalactan-proteins degrading enzymes  
*Journal of Applied Glycoscience* 55(2), 149-155

**Immerzeel P, Eppink MM, de Vries SC, Schols HA, Voragen AGJ (2006)**  
Carrot arabinogalactan proteins are interlinked with pectins  
*Physiologia Plantarum* 128(1), 18-28

**Internet<sup>1</sup>**  
<http://bluemountainsjournal.blogspot.com/2007/06/wattle-up-close.html>

**Internet<sup>2</sup>**  
<http://www.oekotest.de/cgi/ot/otgs.cgi?doc=38136>

**Ito S, Suzuki Y, Miyamoto K, Ueda J, Yamaguchi I (2005)**  
AtFLA11, a fasciclin-like arabinogalactan-protein, specifically localized in sclerenchym cells  
*Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 69, 1963-1969

**Jermyn MA, Yeow YM, Woods EF (1975)**  
Class of lectins present in the tissues of seed plants  
*Australian Journal of Plant Physiology* 2(4), 501-531

**Jermyn MA (1978)**  
Comparative specificity of concanavalin A and the  $\beta$ -lectins  
*Australian Journal of Plant Physiology* 5(5), 687-696

**Johnson K, Jones B, Schultz CJ, Bacic A (2003)**  
Non-enzymic cell wall (glyco)proteins  
In: Rose, J. (Ed.), *The Plant Cell Wall*, Blackwell Publishing, UK, pp. 111-154

## 8. BIBLIOGRAPHIE

---

**Kieliszewski MJ, Lamport DTA (1994)**

Extensin: Repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny  
The Plant Journal 5(2), 157-72

**Kieliszewski MJ (2001)**

The latest hype on Hyp-*O*-glycosylation codes  
Phytochemistry 57, 319-323

**Kieliszewski MJ, Shpak E (2001)**

Synthetic genes for the elucidation of glycosylation codes for arabinogalactan-proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins  
Cellular and molecular life sciences 58(10), 1386-1398

**Knox JP, Linstead PJ, Peart J, Cooper C, Roberts K (1991)**

Developmentally regulated epitopes of cell-surface arabinogalactan proteins and their relation to root-tissue pattern-formation  
The Plant Journal 1, 317-326

**Knox JP (1997)**

The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls  
International Review of Cytology 171, 79-120

**Knox JP (2008)**

Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls  
Current Opinion in Plant Biology 11, 308-313

**Komalavilas P, Zhu JK, Nothnagel EA (1991)**

Arabinogalactan-proteins from the suspension culture medium and plasma membrane of rose cells  
The Journal of Biological Chemistry 266, 15956-15965

**Kreuger M, van Holst GJ (1995)**

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

**Lafarguette F, Leple JC, Dejardin A, Laurans F, Costa G, Lesage-Descauses MC, Pilate G (2004)**

Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood  
New Phytologist 164, 107-121

**Lee K, Sakata Y, Mau S, Pettolino F, Bacic A, Quatrano R, Knight C, Knox JP (2005)**

Arabinogalactan proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomitrella patens*  
The Plant Cell 17, 3051-3065

## 8. BIBLIOGRAPHIE

---

**Liu C, Mehdy MC (2007)**

A nonclassical arabinogalactan protein gene highly expressed in vascular tissues, AGP31, is transcriptionally repressed by methyl jasmonic acid in *Arabidopsis*  
Plant Physiology 145, 863-874

**Loopstra CA, Puryear JD, No EG (2000)**

Purification and cloning of an arabinogalactan-protein from xylem of loblolly pine  
Planta 210, 686-689

**Luettig B, Steinmuller C, Gifford GE, Wagner H, Lohmann-Matthes ML (1989)**

Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*  
Journal of the National Cancer Institute 81(9), 669-675

**Majewska-Sawka A, Nothnagel EA (2000)**

The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development  
Plant Physiology 122, 3-9

**Malonga-Makosi JP (1983)**

Untersuchung der Flavonoide von *Echinacea angustifolia* DC und *Echinacea purpurea* MOENCH  
Dissertation, Universität Heidelberg

**McGregor RL (1968)**

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

**Melchart D, Walther E, Linde K, Brandmaier R, Lersch C (1998)**

*Echinacea* root extracts for the prevention of upper respiratory tract infections: a double-blind, placebo-controlled randomized trial  
Archives of Family Medicine 7(6), 541-5

**Millea PJ (2003)**

*Echinacea* for the common cold  
Annals of Internal Medicine 139(7), 601

**Moerman DE (1986)**

Medicinal Plants of Native America  
Research Report Ethnobotany, Contribution 2, University of Michigan Museum of Anthropology Technical Reports No. 19

**Mollard M, Basile D (2000)**

*Acacia senegal* cells cultured in suspension secrete a hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein  
Plant Physiology and Biochemistry 32, 703-709

**Motose H, Sugiyama M, Fukuda H (2004)**

A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development  
Nature 429, 873-878

## 8. BIBLIOGRAPHIE

---

- Mударисова RK, Shirokova EN, Badykova LA, Borisov IM, Tolstikova TG, Sorokina IV, Dolgikh MP, Monakov YB (2005)**  
Synthesis and pharmacological activity of the oxidized fractions of arabinogalactan from siberian larch (*Larix sibirica* L.)  
Pharmaceutical Chemistry Journal 39(8), 418-421
- Nguema-Ona E, Bannigan A, Chevalier L, Baskin TI, Driouich A (2007)**  
Disruption of arabinogalactan proteins disorganizes cortical microtubules in the root of *Arabidopsis thaliana*  
The Plant Journal 52(2), 240-251
- Nothnagel EA (1997)**  
Proteoglycans and related components in plant cells  
International review of cytology 174 195-291
- Orfila C, Knox JP (2000)**  
Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp  
Plant Physiology 122, 775-781
- Osman ME, Menzies AR, Albo MB, Williams PA, Phillips GO, Baldwin TC (1995)**  
Characterization of gum arabic fractions obtained by anion exchange chromatography  
Phytochemistry 38, 409-417
- Pennell RI, Knox JP, Scofield GN, Selvendran RR, Roberts K (1989)**  
A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants  
Journal of Cell Biology 108, 1967-1977
- Perry NB, van Klink JW, Burgess EJ, Parmenter GA (2000)**  
Alkamide Levels in *Echinacea purpurea*: Effects of Processing, Drying and Storage  
Planta Medica 66, 54-56
- Putoczki TL, Pettolino F, Griffin MDW, Moeller R, Gerrard JA, Bacic A, Jackson SL (2007)**  
Characterization of the structure, expression and function of *Pinus radiata* D. Don arabinogalactan-proteins  
Planta 226, 1131-1142
- Qi W, Fong C, Lamport DTA (1991)**  
Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope. A new model based on O-galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site  
Plant Physiology 96(3), 848-55
- Qin Y, Zhao J (2007)**  
Localization of arabinogalactan-proteins in different stages of embryos and their role in cotyledon formation of *Nicotiana tabacum* L.  
Sexual Plant Reproduction 20(4), 213-224

## 8. BIBLIOGRAPHIE

---

**Raduner S, Majewska A, Chen JZ, Xie XQ, Hamon J, Faller B, Altmann KH, Gertsch J (2006)**

Alkylamides from *Echinacea* are a new class of cannabinomimetics  
Journal of Biological Chemistry 281 (20), 14192-14206

**Razina TG, Lopatina KA, Zueva EP, Gur'ev AM, Krylova SG, Amosova EN (2007)**

Effect of *Echinacea purpurea* tincture and its polysaccharide complex on the efficacy of cytostatic therapy of transferred tumors  
Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya 70(3), 33-35

**Roach MJ, Deyholos MK (2007)**

Microarray analysis of flax (*Linum usitatissimum* L.) stems identifies transcripts enriched in fibre-bearing phloem tissues  
Molecular Genetics and Genomics 278, 149-165

**Robinson H (1981)**

A Revision of the tribal and subtribal limits of the *Heliantheae* (Asteraceae)  
Smithsonian Contributions to Botany 51, 1-102

**Röder E, Wiedenfeld H, Hille T, Britz-Kirstgen R (1984)**

Pyrrolizidines in *Echinacea angustifolia* DC. and *Echinacea purpurea* M  
Deutsche Apotheker Zeitung 124, 2316-2318

**Ryan K, Raner GM, Chen WY, Bahawdory M, Mack T (2008)**

Production and characterization of *Echinacea purpurea* essential oil: Exploring potential anti-oxidant properties  
Abstracts, 60th Southeast Regional Meeting of the American Chemical Society, Nashville, TN, United States, November 12-15

**Samaj J, Braun M, Baluska F, Ensikat HJ, Tsumuraya Y, Volkmann D (1999)**

Specific localization of arabinogalactan-protein epitopes at the surface of maize root hairs  
Plant and Cell Physiology 40(8), 874-883

**Samson MR, Klis FM, Sigon CAM, Stegwee D (1983)**

Localization of arabinogalactan proteins in the membrane system of etiolated hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* L.  
Planta 159(4), 322-328

**Sanchez C, Schmitt C, Kolodziejczyk E, Lapp A, Gaillard C, Renard D (2008)**

The acacia gum arabinogalactan fraction is a thin oblate ellipsoid: a new model based on small-angle neutron scattering and ab initio calculation  
Biophysical Journal 94(2), 629-639

**Sardar HS, Yang J, Showalter AM (2006)**

Molecular interactions of arabinogalactan proteins with cortical microtubules and F-actin in bright yellow-2 tobacco cultured cells  
Plant Physiology 142(4), 1469-1479

**Schindler T, Bergfeld R, Schöpfer P (1995)**

Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extensin growth  
The Plant Journal 7, 25-36

**Schöpfer P (1991)**

Cytochemical identification of arabinogalactan protein in the outer epidermal wall of maize coleoptiles  
Planta 183(1), 139-42

**Schoop R, Klein P, Suter A, Johnston SL (2006)**

*Echinacea* in the prevention of induced rhinovirus colds: A meta-analysis  
Clinical Therapeutics 28 (2), 174-183

**Schulz H, Pfeffer S, Quilitzsch R, Steuer B, Reif K (2002)**

Rapid and non-destructive determination of the echinacoside content in *Echinacea* roots by ATR-IR and NIR spectroscopy  
Planta Medica 68, 926-929

**Seifert GJ, Roberts K (2007)**

The biology of arabinogalactan proteins  
Annual Review of Plant Biology 58, 137-161

**Serpe MD, Muir AJ, Driouich A (2002)**

Immunolocalization of  $\beta$ -D-glucans, pectins, and arabinogalactan-proteins during intrusive growth and elongation of nonarticulated laticifers in *Asclepias speciosa* Torr.  
Planta 215(3), 357-370

**Serpe MD, Nothnagel EA (1994)**

Effects of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation  
Planta 193(4), 542-550

**Serpe MD, Nothnagel EA (1999)**

Arabinogalactan-proteins in the multiple domains of the plant cell surface  
Advances in Botanical Research 30, 207-289

**Shah SA, Sander S, White CM, Rinaldi M, Coleman CI (2007)**

Evaluation of *Echinacea* for the prevention and treatment of the common cold: a meta-analysis  
The Lancet Infectious Diseases 7(7), 473-480

**Shibaya T, Sugawara Y (2007)**

Involvement of arabinogalactan proteins in the regeneration process of cultured protoplasts of *Marchantia polymorpha*  
Physiologia Plantarum 130(2), 271-279

## 8. BIBLIOGRAPHIE

---

**Showalter AM (1993)**

Structure and function of plant cell wall proteins  
The Plant cell 5(1), 9-23

**Showalter AM (2001)**

Arabinogalactan - proteins: Structure, expression and function  
Cellular and Molecular Life Sciences 58(10), 1399-1417

**Shpak E, Barbar E, Leykam JF, Kieliszewski MJ (2001)**

Contiguous hydroxyproline residues direct hydroxyproline arabinosylation in  
*Nicotiana tabacum*  
The Journal of Biological Chemistry 276(14), 11272-11278

**Smith HH (1928)**

Ethnobotany of the Meskwaki Indians  
Bulletin of the Public Museum of Milwaukee 4, 175-326

**Sommer-Knudsen J, Lush WM, Bacic A, Clarke AE (1998)**

Re-evaluation of the role of a transmitting tract-specific glycoprotein on pollen tube  
growth  
The Plant Journal 13(4), 529-535

**Stegemann H, Stalder KH (1967)**

Determination of hydroxyproline  
Clinica Chimica Acta 18, 267-273

**Stacey NJ, Roberts K, Carpita NC, Wells B, McCann MC (1995)**

Dynamic changes in cell surface molecules are very early events in the  
differentiation of mesophyll cells from *Zinnia elegans* into tracheary elements  
The Plant Journal 8, 891-906

**Stimpel M, Proksch A, Wagner H, Lohmann-Matthes ML (1984)**

Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified  
polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*  
Infection and Immunity 46(3), 845-9

**Stoll A, Renz J, Brack A (1950)**

Antibacterial materials VI  
Isolation and constitution of echinacoside, a glycoside from the roots of *Echinacea*  
*angustifolia* D. C.  
Helvetica Chimica Acta 33, 1877-1893

**Stuppner H (1985)**

Chemische und immunologische Untersuchung von Polysacchariden aus der  
Gewebekultur von *Echinacea purpurea* L. MOENCH  
Dissertation München



## 8. BIBLIOGRAPHIE

---

**Svetek J, Yadav MP, Nothnagel EA (1999)**

Presence of a glycosylphosphatidylinositol lipid anchor on rose arabinogalactan proteins

The Journal of Biological Chemistry 274(21), 14724-14733

**Tan L, Leykam JF, Kieliszewski MJ (2003)**

Glycosylation motifs that direct arabinogalactan addition to arabinogalactan-proteins

Plant Physiology 132, 1362-1369

**Taylor RL, Conrad HE (1972)**

Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl group

Biochemistry 11, 1383-1388

**Thompson HJM, Knox JP (1998)**

Stage-specific responses of embryogenic carrot cell suspension cultures to arabinogalactan protein-binding  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent

Planta 205, 32-38

**Thude S, 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(6),425-427

**Turner RB, Bauer R, Wölkart K, Hulsey TC, Gangemi JD (2005)**

An Evaluation of *Echinacea angustifolia* in experimental rhinovirus infections

The New England Journal of Medicine 353, 341-348

**Van Hengel AJ, Roberts K (2003)**

AtAGP30, an arabinogalactan-protein in the cell walls of the primary root, plays a role in root regeneration and seed germination

The Plant Journal 36, 256-270

**Valnes K, Brandtzaeg P (1985)**

Retardation of immunofluorescence fading during microscopy

Journal of Histochemistry and Cytochemistry 33, 755-761

**Vaughn KC, Talbot MJ, Offler CE, McCurdy DW (2007)**

Wall ingrowths in epidermal transfer cells of *Vicia faba* cotyledons are modified primary walls marked by localized accumulations of arabinogalactan proteins

Plant and Cell Physiology 48(1), 159-168

## 8. BIBLIOGRAPHIE

---

- Volk RB, Blaschek W, Classen B (2007)**  
Characterization of an arabinogalactan protein from the pressed juice of *Echinacea purpurea*: investigations into the type of linkage between the protein and polysaccharide moieties  
Journal of Natural Medicines 61(4), 397-401
- Wack M, Classen B, Blaschek W (2005)**  
An acidic arabinogalactan-protein from the roots of *Baptisia tinctoria*  
Planta Medica 71, 814-818
- Wagner H, Proksch A, Riess-Maurer I, Vollmar A, Odenthal S, Stuppner H, Jurcic K, Le Turdu M, Fang JN (1985)**  
Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglykane) aus höheren Pflanzen  
Arzneimittel-Forschung 35: 1069-1075
- Willats W, Knox JP (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*  
The Plant Journal 9, 919-925
- Willats W, McCartney L, Mackie W, Knox JP (2001)**  
Pectin: cell biology and prospects for functional analysis  
Plant Molecular Biology 47, 9-27
- Wisniewska E, Majewska-Sawka A (2007)**  
Arabinogalactan-proteins stimulate the organogenesis of guard cell protoplasts-derived callus in sugar beet  
Plant Cell Reports 26(9), 1457-1467
- Wölkart K, Xu W, Pei Y, Makriyannis A, Picone RP, Bauer R (2005)**  
The endocannabinoid system as a target for Alkamides from *Echinacea angustifolia* roots  
Planta Medica 71(8), 701-705
- Woods EF, Liley GG, Jermyn MA (1978)**  
The self-association of glycosyl phenylazo dyes (Yariv antigens)  
Australian Journal of Chemistry 31, 2225-2238
- Yang SH, Wang H, Sathyan P, Stasolla C, Loopstra CA (2005)**  
Real-time RT-PCR analysis of loblolly pine (*Pinus taeda*) arabinogalactan protein and arabinogalactan protein-like genes  
Physiologia Plantarum 124, 91-106
- Yariv J, Rapport MM, Graf L (1962)**  
The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides  
The Biochemical Journal 85, 383-388

## 8. BIBLIOGRAPHIE

---

**Yates EA, Valdor JF, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Mackie W, Knox JP (1996)**

Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactanprotein monoclonal antibodies  
Glycobiology 6, 131–139

**Youl J J, Bacic A, Oxley D (1998)**

Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 95(14), 7921-7926

**Zhang Y, Brown G, Whetten R, Loopstra CA, Neale D, Kieliszewski MJ, Sederoff RR (2003)**

An arabinogalactan protein associated with secondary cell wall formation in differentiating xylem of loblolly pine  
Plant Molecular Biology 52, 91-102

## IV. Abstract

### Deutsch

Aus dem wässrigen Extrakt der Wurzeln von *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH wurde eine hochmolekulare Fraktion, die Arabinogalactan-Proteine (AGPs) isoliert und aufgereinigt. Die AGPs wurden hinsichtlich ihres Proteinanteils und der Zusammensetzung des Kohlenhydratanteils charakterisiert. Das Proteoglykan enthielt 4,8% (m/m) Protein, wobei Glx, Hyp, Asx, Ser, Thr und Ala die dominierenden Aminosäuren darstellten. Der stark verzweigte Kohlenhydratanteil zeigte in der Bindungstyp-Analyse den Aufbau eines typischen AGPs mit einem 1,3-, 1,6- und 1,3,6-verknüpften pyranosidischen Galactosegrundgerüst, welches furanosidische Arabinosereste trägt. Diese traten als terminale oder 1,5-verknüpfte Arabinose auf. Des Weiteren wurden terminale Glucuronsäurereste gefunden.

Neben der Strukturaufklärung wurde eine neue Methode der Lokalisierung von AGPs in pflanzlichen Geweben entwickelt. Das synthetische ( $\beta$ -D-Glc)<sub>3</sub> Yariv Phenylglykosid ( $\beta$ GlcY) bindet spezifisch an AGPs. Zur Immunlokalisierung wurde ein polyklonaler Antikörper gegen  $\beta$ GlcY generiert. Mit diesem wurden mikroskopische Schnitte der sekundären Wurzel von *Echinacea purpurea* behandelt, die vorher mit  $\beta$ GlcY inkubiert wurden. Nach dem Zusatz von FITC-markierten Sekundärantikörpern wurden die Schnitte durch eine Konfokale Laser-Raster Mikroskopie (Confocal Laser Scanning Microscopy = CLSM) analysiert. Die AGPs wurden vornehmlich im Xylembereich des Zentralzylinders detektiert. Die Zellwände von Tracheen und Tracheiden sowie die Tüpfelkanäle waren deutlich markiert, insbesondere zum Zelllumen hin.

## ABSTRACT

### Englisch

From the high molecular weight fraction of an aqueous extract from roots of *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH, arabinogalactan-proteins (AGPs) were purified and characterized with regard to amino acid composition and structure of the polysaccharide moiety. The protein content of the AGP was 4.8% (w/w) with the dominating amino acids Glx, Hyp, Asx, Ser, Thr and Ala. The highly branched polysaccharide moiety shows a linkage composition typical of AGPs with 1,3-, 1,6- and 1,3,6-linked galactopyranosyl residues and arabinofuranosyl residues predominantly as terminal and 1,5-linked residues. Terminal units of glucuronopyranose acid were also detected.

Furthermore, a new method of localization of AGPs in plant tissue has been developed. The synthetic ( $\beta$ -D-Glc)<sub>3</sub> Yariv phenylglycoside ( $\beta$ GlcY) is known to bind specifically to AGPs. For immunolocalization, polyclonal  $\beta$ GlcY-antibodies have been generated and were used to label Yariv-treated thin sections of roots from *E. purpurea*. After addition of the FITC-conjugated secondary antibody, the sections were analyzed by confocal laser scanning microscopy. AGPs were mainly detected in the area of the xylem of the central cylinder. Cell walls of vessels and tracheids are strongly labeled, especially at the inner area of the wall. Furthermore, there was an intense labelling of the pit canals.

DANKSAGUNG  
LEBENS LAUF

## V Danksagung und Lebenslauf

### DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von

Frau PD Dr. Birgit Classen

am Institut für Pharmazeutische Biologie der CAU Kiel angefertigt.

Meiner „Mutter“ im akademischen Sinne danke ich in erster Linie für die tolle Zeit während meiner universitären Laufbahn, begonnen mit der Einstellung zum studentischen Mitarbeiter bis hin zum Überlassen des unerschöpflichen Themas dieser Arbeit. Die fröhliche Art, nicht nur während der Betreuung der Arbeit, sondern auch während zahlreicher Exkursionen, Praktikabetreuung, Kongressen und wichtigen „Rot oder Weiss?“-Fragen wird mir stets in guter Erinnerung bleiben. Ohne ihr enormes Fachwissen wären viele Fragen unbeantwortet geblieben.

Herrn Professor Blaschek danke ich herzlich nicht nur für die Übernahme des Koreferats, sondern auch für viele interessante Gespräche, die sein enormes Fachwissen nicht im Ansatz prüfen konnten. Seine Anregungen während der Arbeit waren ein steter Ansporn und brachten immer neue Ideen mit.

Frau Heidi Blaschek danke ich für viele schöne Stunden beim Zubereiten diverser Vögel, für die familiäre Atmosphäre, die sie stets vermittelte und für ihren grenzenlosen Optimismus, der den gesamten Arbeitskreis voranbringt.

Meinen guten Freunden Marie und Suse danke ich für... nun ja, das würde diese Arbeit sprengen. Ihr wisst schon.

Meinen lieben Kollegen Inken, Simone, Bernadette, Niels und Ul(l)e danke ich für viel Hilfe bei der praktischen Arbeit und eine meist gelungene gemeinsame Zusammenarbeit und Studentenbetreuung während diverser Praktika. Ich verdanke

## DANKSAGUNG LEBENS LAUF

Euch viele tolle Momente bei Exkursionen, Betriebsausflügen, Feiern, kaltgestellten Indianern und in anderen Situationen.

Der Bio-Stammesbesatzung Kirsten, Helle, Dana, Claudia, Frauke und Kalle, sowie den Gärtnern Carsten, Henning und Dietrich danke ich für die vielen kleinen Annehmlichkeiten, die die Arbeit oft unendlich erleichtert haben, sowie für diverse Synthesen und Analysen, deren Früchte mit in diese Dissertation eingeflossen sind.

Der „Kochrunde“ danke ich für viele interessante Rezepte und leckere Mahlzeiten.

Frau Dr. Maria Mulisch danke ich für die freundliche Einweisung in das CLSM und die stets beantworteten Fragen zur Bedienung desselben. Herrn Dr. Uli Girresser bin ich für die professionelle GC/MS-Analytik zu Dank verpflichtet.

Last not least danke ich meiner Familie. Meinen Eltern und Schwiegereltern, die mich in jeglicher Hinsicht in meinem bisherigen Werdegang unterstützten, meinen Geschwistern und Schwägerinnen, die mich immer auf dem Boden behielten, über mich staunten und mich zum Staunen brachten und natürlich meiner Frau für unendlich viel Liebe und Verständnis, Zuspruch und Vertrauen.

DANKSAGUNG  
LEBENS LAUF

**Curriculum Vitae**

---

***Persönliche Daten***

Name: Andreas Bossy  
Geburtsdatum: 17.11.1978  
Geburtsort: Kiel  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

---

***Promotion***

04/2005-heute Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am  
Pharmazeutischen Institut der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von  
PD Dr. Birgit Classen

---

***Hochschulausbildung***

1999-2003 Pharmaziestudium an der Christian-Albrechts-Universität zu  
Kiel  
Abschluss: 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
2003 Praktisches Jahr:  
Pharmaziepraktikum Lornsen Apotheke, Kiel  
Aufbaustudium „Diplom“  
Abschluss: 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
01/2005 Approbation zum Apotheker  
02/2005 Akademischer Grad „Diplom-Pharmazeut“

---

***Zivildienst***

1998-1999 AWO Kita, Schönberg

---

***Schulausbildung***

1989-1998 Heinrich-Heine-Gymnasium Heikendorf

---



## **VI Ehrenwörtliche Erklärung zu §10 Absatz 2 Nr. 2 der Promotionsordnung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die im Fachbereich Pharmazie Kiel eingereichte Arbeit zum Zwecke der Promotion im Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Abteilung Pharmazeutische Biologie, unter Leitung von Frau PD Dr. Birgit Classen, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der vorliegenden Arbeit angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit bisher weder der Math.-Nat. Fakultät der CAU noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht habe.

Kiel, den