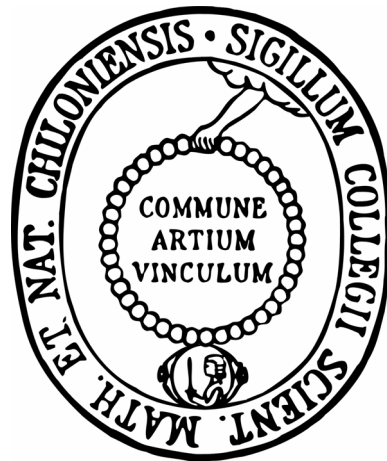


Untersuchungen zu Arabinogalactan-Proteinen aus

Triticum aestivum L., *Secale cereale* L. und

Avena sativa L.



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Esther Marie Göllner

Kiel, 2009

Referent:	Prof. Dr. W. Blaschek
Korreferent:	PD Dr. B. Classen
Tag der mündlichen Prüfung:	13.07.2009
Zum Druck genehmigt:	13.07.2009

Prof. Dr. Lutz Kipp
(Dekan)

Meiner ganzen Familie

A	Einleitung und Zielsetzung.....	1
1	<i>Triticum aestivum</i> L., <i>Secale cereale</i> L. und <i>Avena sativa</i> L.....	1
1.1	Aufbau der Früchte von Weizen, Roggen und Hafer.....	3
2	Inhaltsstoffe.....	5
2.1	Proteine.....	5
2.2	Polysaccharide.....	6
2.2.1	Stärke.....	6
2.2.2	Arabinoxylane.....	6
2.2.3	β -Glucane.....	7
2.3	Arabinogalactan-Proteine.....	7
2.3.1	Aufbau von Arabinogalactan-Proteinen.....	7
2.3.2	Eigenschaften und Funktionen von Arabinogalactan-Proteinen.....	12
3	Zielsetzung der Arbeit.....	16
B	Material und Methoden.....	18
1	Isolierung von AGP.....	18
1.1	Verwendetes Drogenmaterial.....	18
1.2	Isolierung einer hochmolekularen Fraktion.....	18
1.3	Aufreinigung des Extraktes für die β -Yariv-Fällung.....	19
1.4	Yariv-Fällung.....	20
1.4.1	Herstellung des β -Yariv-Reagenzes.....	20
1.4.2	Yariv-Fällung.....	21
2	Geldiffusionstest.....	23
3	Strukturaufklärende Analytik des AGPs.....	23
3.1	Analytik des Kohlenhydratanteils.....	23
3.1.1	Bestimmung der Neutralzucker mittels Acetylierung.....	23
3.1.2	Bestimmung der Neutralzucker und Uronsäuren mittels Silylierung.....	25
3.1.3	Kolorimetrische Quantifizierung von Uronsäuren.....	27
3.1.4	Uronsäure-Reduktion.....	27
3.1.5	Bestimmung der Bindungstypen im KH-Anteil.....	28
3.1.6	Säure-Partialhydrolyse.....	33
3.1.7	Enzymatische Hydrolyse.....	33
3.1.7.1	Bestimmung der freigesetzten Zucker.....	34
3.2	Analytik des Proteinanteils.....	35
3.2.1	Hydrolysebedingungen.....	35
3.2.2	Bestimmung der Aminosäuren per HPLC.....	35
3.2.3	Quantitative Hydroxyprolin-Bestimmung.....	36
3.2.4	Alkalische Hydrolyse.....	37
3.3	Elementaranalyse.....	38
3.4	Gelpermeationschromatographie.....	39
3.5	Infrarot-Spektroskopie.....	41
3.6	^{13}C -NMR-Spektroskopie.....	41

4	Immunologische Methoden	42
4.1	Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Hafer-AGPs.....	42
4.2	Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen β -Yariv-Reagenz	43
4.3	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).....	44
5	FITC-Markierung der AGPs in pflanzlichen Geweben	48
C	Ergebnisse	53
1	Isolierung und Ausbeute	53
2	Geldiffusionstest.....	54
3	Charakterisierung des Kohlenhydratanteils.....	56
3.1	Neutralzuckerzusammensetzungen der hochmolekularen Fraktionen	56
3.2	Neutralzuckerzusammensetzungen der AGPs	60
3.2.1	Neutralzuckerzusammensetzung der Roh-AGPs	60
3.2.2	Neutralzuckerzusammensetzung zweifach gefällter AGPs.....	62
3.2.3	Neutralzuckerzusammensetzung mit Säure partialhydrolysierter AGPs ..	65
3.3	Kolorimetrische Quantifizierung von Uronsäuren.....	66
3.4	Silylierungsanalyse.....	67
3.5	Bestimmung der Bindungstypen im KH-Teil.....	69
3.5.1	Bindungstypanalyse der AGPs	71
3.5.2	Bindungstypanalyse von Uronsäure-reduzierten AGPs	73
3.5.3	Bindungstypanalyse mit Säure partialhydrolysierter AGPs.....	74
3.5.4	Bindungstypanalyse von enzymatisch hydrolysierten Hafer-AGPs	76
3.6	Identifizierung der enzymatisch freigesetzten Mono- und Oligosaccharide..	78
4	Charakterisierung des Proteinanteils	80
4.1	Aminosäurezusammensetzung	81
4.2	Quantitative Hydroxyprolin-Bestimmung	83
4.3	Alkalische Hydrolyse	84
5	Elementaranalyse	85
6	Molekulargewichtsbestimmung	86
7	Infrarotspektroskopie.....	89
8	^{13}C-NMR-Spektroskopie	90
9	Immunmarkierung von AGPs	92
9.1	Immunmarkierung von AGPs im ELISA	92
9.2	Lokalisierung von AGPs in pflanzlichen Geweben.....	99

D	Diskussion	110
1	Isolierung und Charakterisierung des AGPs	111
1.1	Isolierung des AGPs	111
1.2	Charakterisierung des AGPs	115
1.2.1	Charakterisierung des Kohlenhydratanteils	115
1.2.2	Charakterisierung des Proteinanteils	123
1.2.3	Molekulargewichtsbestimmung	124
1.2.4	Strukturvorschlag	125
2	Immunmarkierung von AGPs	132
2.1	Immunmarkierung von AGPs im ELISA	132
2.2	Lokalisierung der AGPs in pflanzlichen Geweben	133
E	Zusammenfassung/Abstract	137
F	Literaturverzeichnis	139
G	Danksagung	154
H	Lebenslauf	156
I	Ehrenwörtliche Erklärung zu §10 Absatz 2 Nr. 2 der Promotionsordnung	158

Abkürzungsverzeichnis

α -Yariv-Reagenz	(α -D-Glc) ₃ -Yariv-Phenylglycosid
ABTS	2,2-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
AG	Arabinogalactan
AGP	Arabinogalactan-Protein
AG-Peptid	Arabinogalactan-Peptid
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Aqua dem.	demineralisiertes Wasser
AK	Antikörper
Ala	Alanin
Ara	Arabinose
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Asx	Asparagin/Asparaginsäure
β -Yariv-Reagenz	(β -D-Glc) ₃ -Yariv-Phenylglycosid
BALB/c	Laborzucht-Albinomäuse-Stamm für Tierversuche
BSA	Rinderserumalbumin
Ch.B.	Chargen-Bezeichnung
CLSM	Konfokales Laser-Raster Mikroskop
Cys	Cystein
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)-octan
Dimethyl-	Dimethylsulfinyl-
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Endgruppe
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
<i>f</i>	furanosidisch
Fa	Firma
FCS	fötales Kälberserum
FID	Flammenionisationsdetektor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FT-IR	Fourier-Transformation-Infrarotspektroskopie
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GB	Groß-Britannien
GC	Gaschromatographie/Gaschromatograph
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin

Abkürzungsverzeichnis

Glx	Glutamin/Glutaminsäure
GPC	Gelpermeationschromatographie
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HAT	Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin
HCl	Salzsäure
His	Histidin
HPAEC-PAD	Hochleistungs-Anionen-Austauscher-Chromatographie gekoppelt mit gepulster amperometrischer Detektion
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRGP	Hydroxyprolin-reiches Glycoprotein
Hyp	Hydroxyprolin
IgG	Immunglobulin G
Ile	Isoleucin
KCl	Kaliumchlorid
KFA	Komplettes Freud Adjuvans
KH	Kohlenhydrat
KHydrid	Kaliumhydrid
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
mAB	monoklonaler Antikörper
MALLS	Multi-Angle-Laser-Light-Scattering
MALT	Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe
mAmDmJumS	mein Andreas, meine Dana, meine Jana und meine Suse
Man	Mannose
Met	Methionin
MS	Massenspektrometrie / Markstrahl
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewichtsausschlussgrenze
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumnitrit
NaNO ₃	Natriumnitrat
<i>p</i>	pyranosidisch
pAB	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglycol
Phe	Phenylalanin
PMAA	permethyliertes Alditolacetat
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
ppm	parts per million
Pro	Prolin

Abkürzungsverzeichnis

P ₂ O ₅	Phosphorpentoxid
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 Elektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
TFF	Tangentialflussfiltration
Thr	Threonin
TIC	Totalionenchromatogramm
Tk	Tüpfelkanäle
Tr	Tracheidales Gefäß
tr	traces
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	Tyrosin
U/min	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von America
V	Verzweigungsgruppe
Val	Valin
v.l.n.r	von links nach rechts
v.o.n.u.	von oben nach unten
WCOT	Wall Coated Open Tubular
Xyl	Xylose

A Einleitung und Zielsetzung

1 *Triticum aestivum* L., *Secale cereale* L. und *Avena sativa* L.

Triticum aestivum L. (Weichweizen), *Secale cereale* L. (Roggen) und *Avena sativa* L. (Saat-Hafer) gehören zur Familie der *Poaceae* (Süßgräser). Sie besitzen stielrunde Achsen (Halme) mit verdickten Internodien. Die zweizeilig angeordneten Blätter umschließen den Halm mit einer meist verwachsenen Scheide und besitzen eine schmale, lange Blattspreite. An dieser Grenze zweier Blattabschnitte ist ein charakteristisches Häutchen (Ligula) ausgebildet, welches gezähnt sein kann. Einzelblüten sind zu sogenannten Ährchen zusammengefasst, die wiederum in Ähren (Weizen, Roggen) oder Rispen (Hafer) angeordnet sind. Die Tragblätter der Einzelblüten werden als Deckspelzen bezeichnet. Diese können an ihrer Spitze eine steife Borste ausbilden: die so genannte Granne (Roggen). In der einsamigen Schließfrucht (Karyopse) liegt der Embryo dem stärkereichen Endosperm seitlich an (BRESINSKY et al., 2008).

Die Früchte von Weizen, Roggen und Hafer dienen den Menschen in weiten Teilen der Welt als kohlenhydrat- und eiweißreiches Nahrungsmittel. Die Gräser sind im Laufe von Jahrhunderten zu Getreidepflanzen herangezüchtet worden. Eigenschaften wie ein größeres Korn, verringerte Brüchigkeit von Ährenspindeln und eine zum Teil leichtere Ablösung aus den Spelzen waren dabei von Interesse (FROHNE und JENSEN, 1998). Heute liegt der Fokus auf der Entwicklung von ertragreichen Sorten, die je nach Bestimmungszweck in Protein- oder Stärkegehalt variieren können. Zudem sollen diese neuen Sorten resistent gegenüber Schädlingsbefall sein und je nach Standort geeignete Eigenschaften aufweisen, wie z.B. Toleranz gegenüber Hitze oder Kälte.

Der unbegrannte Weizen ist heute das weltweit flächenmäßig meist angebaute Getreide. Weizen gilt als anspruchsvoll: Er braucht schwere, nährstoffreiche Böden mit hoher Wasserkapazität. Winterweizen wird im Oktober ausgesät und kann Temperaturen bis -22°C widerstehen. Am hexaploiden Genom von *Triticum aestivum* L. sind mehrere Wildarten beteiligt (LIEBEREI und REISDORFF, 2007). Der Gattungsname *Triticum* leitet sich vom lateinischen *tritrus* (zerquetscht, zerrieben) ab und bezieht sich dabei offensichtlich auf die Verarbeitung der Körnerfrüchte (HILLER und MELZIG, 1999). Das Mehl des Weizens dient hauptsächlich zur Brotherstellung, da es sich wegen seiner Proteinzusammensetzung, dem „Klebereiweiß“ (siehe A 2.1), gut dafür eignet.

Nach LIEBEREI und REISDORFF (2007) ist der Roggen in weltwirtschaftlicher Hinsicht von geringerer Bedeutung im Vergleich zu Weizen und Hafer, was Produktion und Anbaufläche angeht. Doch im nördlichen Europa spielt er mit seiner Winterform (die sich durch geringe Wärmebedürfnisse und Bodenansprüche auszeichnet) als Nahrungspflanze dennoch eine wichtige Rolle. Das dunklere Roggenmehl ist kleberarm aber pentosanreich. Es wird außer als Kaffee-Ersatz zur Kornbranntwein-Herstellung und als Tier-Grünfutter, vor allem aber zur Brotproduktion verwendet.

In den antiken Funden von ackerbaulicher Aktivität wurde Hafer nur als Beimengung entdeckt; wahrscheinlich wuchs er als Unkraut neben Gerste und Weizen auf den Feldern. Ab dem Hochmittelalter war Hafer in Mittelgebirgsgebieten eine bedeutende Feldfrucht, die erst durch die Einführung der Kartoffel ihre Stellung verlor. Noch 1939 rangierte Hafer in der weltweiten Bedeutung nach Weizen und Mais an dritter Stelle der Getreidearten. Heute ist auch im Zuge der Motorisierung und der dadurch zurückgegangenen Haltung von Zugpferden der Haferanbau in Deutschland gegenüber den anderen Getreidearten von untergeordneter Bedeutung. Deshalb rangiert Hafer weltweit

nur noch auf Platz sechs der angepflanzten Getreidesorten. Da Hafer ein feuchtkühles Klima gut verträgt und regelmäßige Wasserversorgung braucht, seine Ansprüche an die Bodenqualität jedoch gering sind, finden sich Haferanbauflächen besonders in der nördlichen gemäßigten Zone Europas. Hafer enthält wenig Kleber, weshalb er sich nicht zur Brotherstellung eignet, jedoch wird Hafer außer als Pferdefutter auch als Haferflocken in der Diätetik als ballaststoffreich und leicht bekömmlich geschätzt (LIEBEREI und REISDORFF, 2007). Der Gattungsname *Avena* leitet sich wohl vom sanskritischen *avi* (Schaf) ab und wurde in der Geschichte als Schafgras oder Futter des Ziegenbockes bezeichnet (HILLER und MELZIG, 1999).

1.1 Aufbau der Früchte von Weizen, Roggen und Hafer

Die einsamige, coenokarpe Nussfrucht der *Poaceae* ist die Karyopse. Da typischerweise die dünne Samenschale (Testa) mit der Fruchtwand (Pericarp) verwachsen ist, erscheint sie äußerlich als Samen, botanisch gesehen ist sie jedoch eine Frucht. So sind die Früchte von Weizen, Roggen und Hafer nach dem gleichen Grundbauplan gestaltet (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2): Die Fruchtschale teilt sich in äußeres und inneres Pericarp auf. Das äußere Pericarp, das Exocarp, besteht aus Epi- und Hypodermis (mikroskopisch als Längszellen sichtbar), das innere Pericarp besteht aus Meso- (mikroskopisch als Querszellen sichtbar) und Endocarp (mikroskopisch als Schlauchzellen sichtbar). Es folgen die Samenschale (Testa) und die Hyalinschicht, letztere auch Nucellarrest genannt. Im Inneren des Samens teilt sich das Endosperm in eine eiweißreiche Aleuronschicht und ein stärkehaltiges Endosperm auf. Der Embryo sitzt dem Endosperm seitlich an.

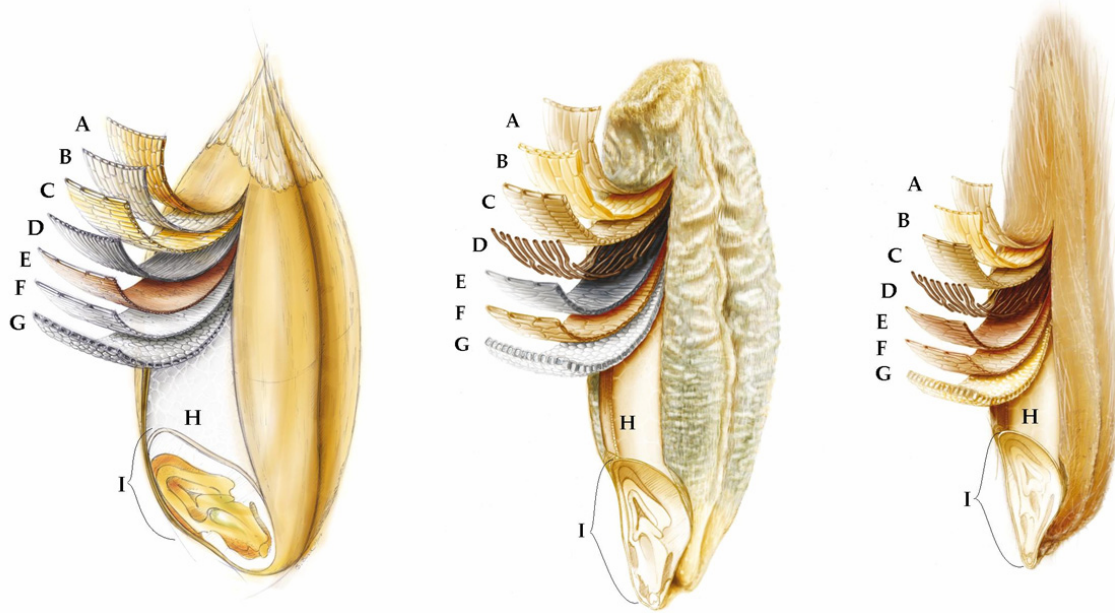


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Früchte von Weizen, Roggen und Hafer (v.l.n.r.):
A Epidermis, B Hypodermis, C Mesocarp, D Endocarp, E Testa, F Nucellarrest, G Aleuronschicht, H stärkehaltiges Endosperm, I Embryo

Bildquelle: Kampffmeyer Food Innovation GmbH

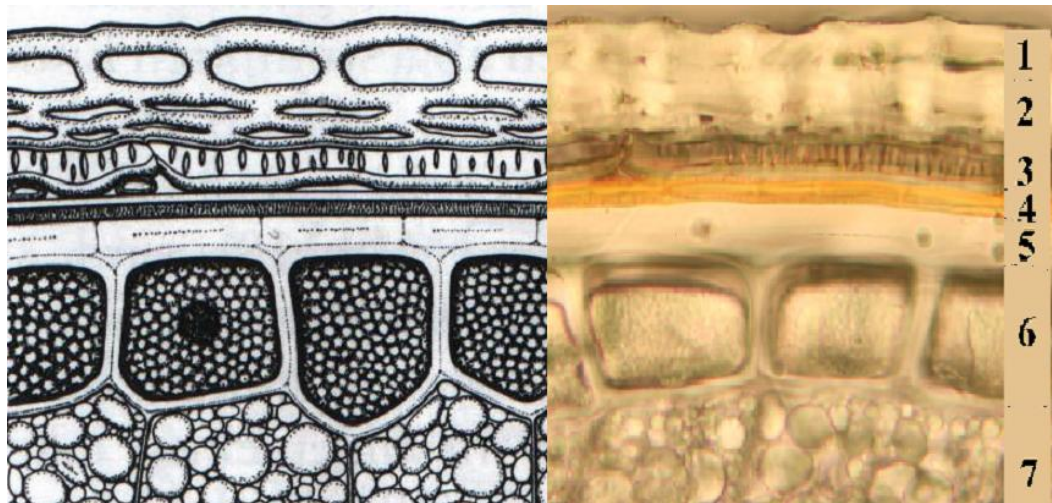


Abbildung 2: Querschnitt durch Außenbereich eines Weizenkorns (v.o.n.u.): 1 Längszellen der Epi- und der Hypodermis, 2 Querzellen des Mesocarps, 3 Schlauchzellen des Endocarps, 4 Testa, 5 Nucellarrest, 6 Aleuronzellen, 7 stärkehaltige Endospermzellen

Bildquelle linke Seite: GASSNER et al., 1989, rechte Seite: eigene Aufnahme

2 Inhaltsstoffe

2.1 Proteine

Die äußere Schicht des Endosperms (Aleuronschicht) enthält etwa 30% Proteine, die hauptsächlich Enzymfunktionen ausführen. In den „protein-bodies“ des Endosperms der Karyopsen kommen hauptsächlich Reserveproteine vor, die in ihrer Gesamtheit oft als Kleber (bei Weizen auch Gluten) bezeichnet werden. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften lassen sie sich in verschiedene Fraktionen aufteilen: Neben Globulinen und Albuminen kommen die für viele Süßgräser charakteristischen Prolamine und Gluteline vor. Gluteline (bei Weizen auch als Glutenine bezeichnet) sind hauptverantwortlich für die Backeigenschaften eines Mehls, da sie während des Backvorgangs vernetzen können. Prolamine (bei Weizen auch oft als Gliadine bezeichnet) können durch eine immunologische Überempfindlichkeit eine als Zöliakie bekannte, schwere Darmerkrankung und damit verbundene Ernährungsstörung auslösen (FROHNE und JENSEN, 1998). Haferfrüchte unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Prolamine von Weizen und Roggen, so dass selbst bei längerer Ernährung von Zöliakie-Patienten auf Haferbasis keine Schäden zu befürchten sind (JANATUINEN et al., 2002). Die Fraktion der Gluteline in Weizen, Roggen und Hafer ist hingegen in ihrer Zusammensetzung etwa gleich.

Erwähnenswert ist das im Weizen vorkommende Lectin Weizenkeimagglutinin, das sich spezifisch an endständige N-Acetylglucosamin-Reste anlagert. Auch N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) ist ein Zielmolekül für Weizenkeimagglutinin, besitzt jedoch eine geringere Affinität. Es gibt Studien, die darauf hinweisen, dass Weizenkeimagglutinin einen membranschädigenden Effekt auf die menschliche Darmwand ausüben kann (PUSZTAI et al., 1993), jedoch erst in solch hohen Konzentrationen, die nicht allein durch die Zufuhr von Lebensmitteln erreicht werden können.

2.2 Polysaccharide

2.2.1 Stärke

Weizenkörner enthalten etwa 60-70% Stärke und haben damit einen höheren Stärkegehalt als Hafer und Roggen. Hier liegt der Stärkegehalt bei 50-60%. Je nach Zuchtform kann der Stärkegehalt innerhalb einer Art auch stark variieren. (TERNES et al., 2005). Die Stärke befindet sich im Endosperm und wird in Form von Amyloplasten gespeichert. Bei Hafer sind diese Stärkekörner aus Untereinheiten zusammengesetzt, bei Weizen und Roggen einfach aufgebaut.

Stärke besteht aus zwei unterschiedlichen Polysacchariden: Amylose und Amylopektin. Amylose ist ein lineares, α -1,4-glycosidisch verknüpftes Glucan mit einem Molekulargewicht von 40-800 kDa, welches eine helikale Schraubenstruktur annimmt. Amylopektin ist ein verzweigtes Polysaccharid mit α -1,4- und α -1,6-glycosidisch verknüpfter Glucose. Es besitzt ein größeres Molekulargewicht von 1600-16.000 kDa. Der Amylopektingehalt in Weizen, Roggen und Hafer ist stets höher als der Gehalt an Amylose (HÄNSEL und STICHER, 2007).

2.2.2 Arabinoxylane

Arabinoxylane stellen die mengenmäßig größte Komponente der Nicht-Stärke-Polysaccharide in Getreidefrüchten dar. Sie bestehen aus β -1,4-verknüpften Xylose-Einheiten, die entweder unsubstituiert oder in Position zwei oder drei mit weiteren Xyloseresten substituiert sein können. Auch eine Substitution an Position zwei oder drei mit Arabinose ist möglich, wobei das Muster der Verknüpfung stark variieren kann. Etwa 25% der Arabinoxylane sind wasserlöslich (BARRON et al., 2006). Arabinoxylane stellen für den

menschlichen Organismus Ballaststoffe dar und werden in der Diätetik eingesetzt.

2.2.3 β -Glucane

Neben Cellulose gehören bei Mitgliedern der Familie der *Poaceae* auch wasserlösliche β -Glucane zur Gruppe der Ballaststoffe. Sie kommen in der Zellwand vor und bestimmen maßgeblich ihren Gel-Charakter mit. Andere übliche Bestandteile der Zellwand, wie Pectine und Xyloglucane, die bei anderen Pflanzenfamilien zu einem hohen Prozentsatz in der Zellwand vorkommen, kommen in der Familie der *Poaceae* nur in geringen Mengen vor. Die β -Glucane bestehen aus einem linearen, unverzweigten (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucan-Gerüst (FINCHER, 2009), ähnlich dem der β -Glucane aus Flechten. Gerade Hafer (3-7%) enthält viel β -Glucan; Roggen (1-2%) und Weizen (<1%) weisen niedrigere Gehalte an β -Glucanen auf (MAZZA, 1998).

2.3 Arabinogalactan-Proteine

2.3.1 Aufbau von Arabinogalactan-Proteinen

Arabinogalactan-Proteine (AGPs) gehören zur Gruppe der Hydroxyprolinreichen Glycoproteine (HRGPs), deren Proteinanteil bis zu 10% ihrer Masse einnimmt und das Rückgrat für den Kohlenhydratanteil bildet. Neben Hydroxyprolin sind auch die Aminosäuren Prolin, Serin, Threonin und Alanin mengenmäßig auffallend (BACIC et al., 2000). Je nach Aufbau des jeweiligen Proteins unterscheidet man zwischen klassischen und nicht-klassischen AGPs. Erstere besitzen eine N-terminale Aminosäure-Sequenz, die typisch für sekretierte Proteine ist. Weiterhin besitzen sie eine zentrale Prolin- und

Typ II AGs können in den Lärchen-Typ (siehe Abbildung 4) und in den Gummi-Arabicum-Typ unterteilt werden. Beide bestehen aus einer 1,3-β-D-Galactose-Hauptkette, welche 1,6-Galactopyranose-Reste in Position 6 trägt. Sie unterscheiden sich aber im weiteren Glycosylierungsmuster der Reste, die vornehmlich aus L-Rhamnopyranose, L-Arabinofuranose, D-Galactopyranose oder D-Glucuronsäure bestehen. Bis heute konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob Typ II AGs Teile von Pektinen darstellen können (SEIFERT et al., 2007). In AGPs sind AGs kovalent an einen Proteinteil gebunden und stellen den Hauptbestandteil des Kohlenhydratanteils dar.

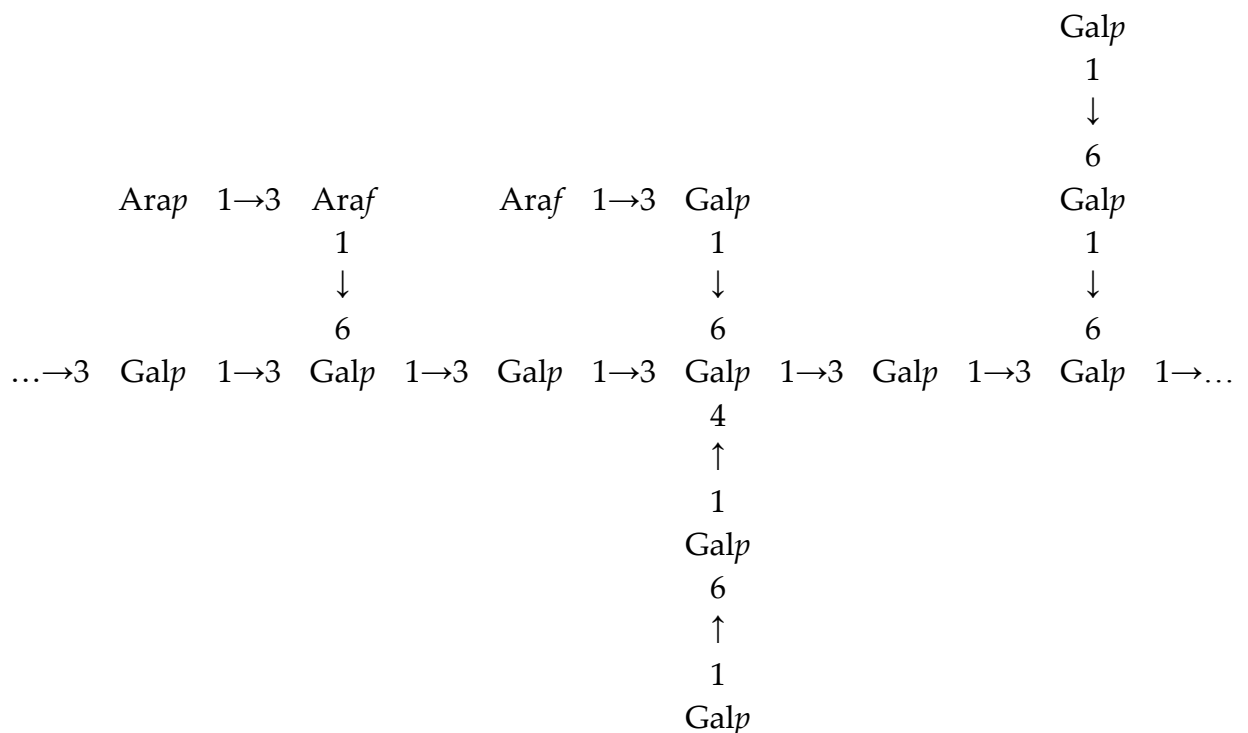


Abbildung 4: Strukturausschnitt eines Typ II Lärchen-AGs

CLARKE et al., 1979 beschreibt einen dritten Typ von AGs, wie er in bereits untersuchten AGPs aus *Lolium*-Arten (*Poaceae*) vorkommt (siehe Abbildung 5). Er besteht aus einem Grundgerüst aus 1,3-Galactopyranosyl-Einheiten, die in Position 6 mit 1,6-Galactopyranosylresten verknüpft sind. An diesen Seitenketten kann in Position 3 furanosidische Arabinose geknüpft sein, an endständiger

Galactose kann an Position 3 und/oder sogar an Position 6 Arabinose geknüpft sein.

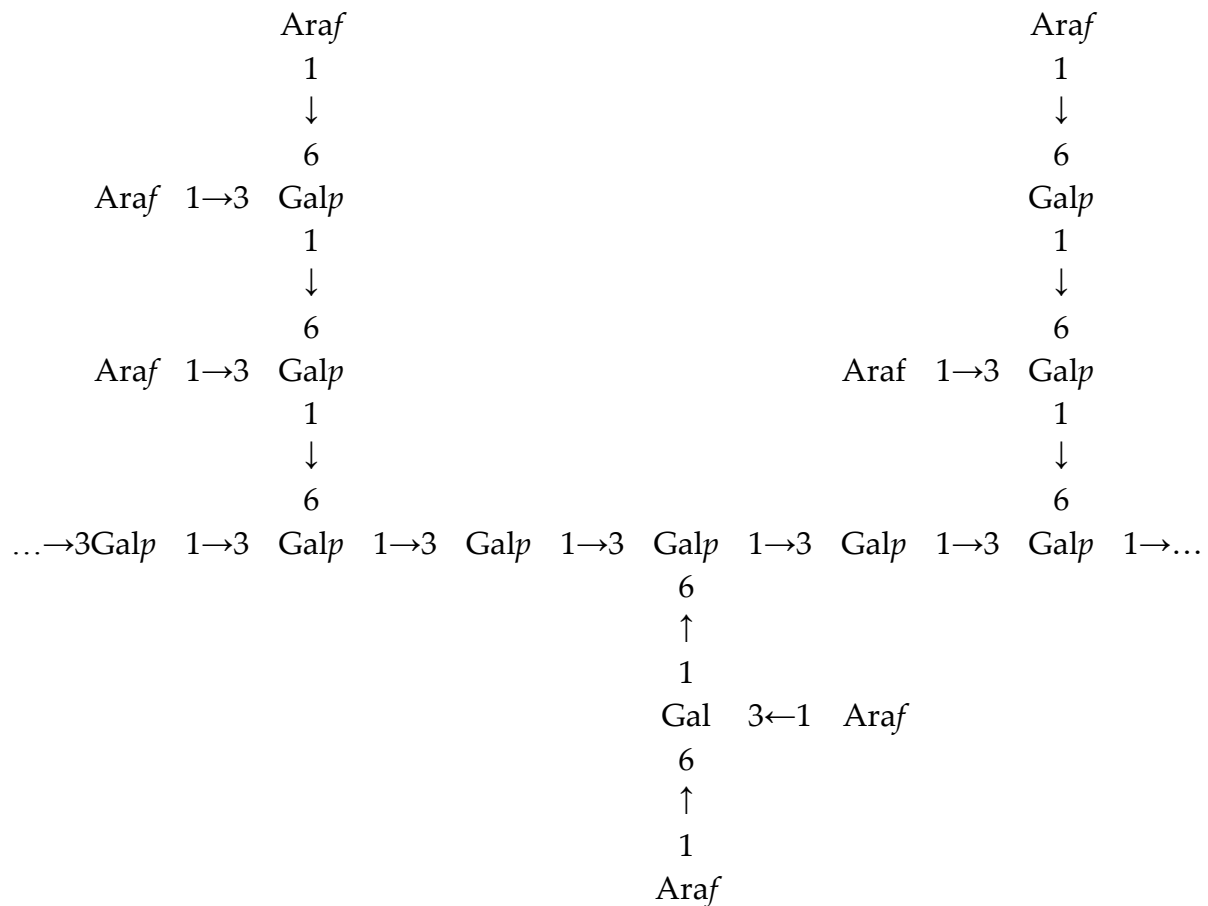


Abbildung 5: Strukturausschnitt eines Typ III *Lolium*-AGs

Die räumliche Struktur, die ein Arabinogalactan-Protein einnehmen kann, wurde zuerst durch FINCHER et al. (1983) beschrieben: Das „wattle-blossom“-Modell (Abbildung 6) ist durch ein Protein-Rückgrat gekennzeichnet, welches in regelmäßigen Abständen AG-Seitenketten trägt. Diese stark verzweigten AGs können durch das 1,3-glycosidisch verknüpfte Galactose-Rückgrat eine helicale Konformation einnehmen (CHANDRASEKARAN und JANASWAMY, 2002), oder das 1,3-glycosidisch verknüpfte Galactose-Rückgrat wird durch Arabinosen oder 1,6-glycosidisch verknüpfte Galactosen unterbrochen, wodurch es einen Knick erhält. Diese Knicke werden als „kinked-regions“ beschrieben (FINCHER

et al., 1983). Beide AG-Modelle nehmen eine sphärische Form an, vergleichbar mit den Blütenständen an einem Akazienzweig.

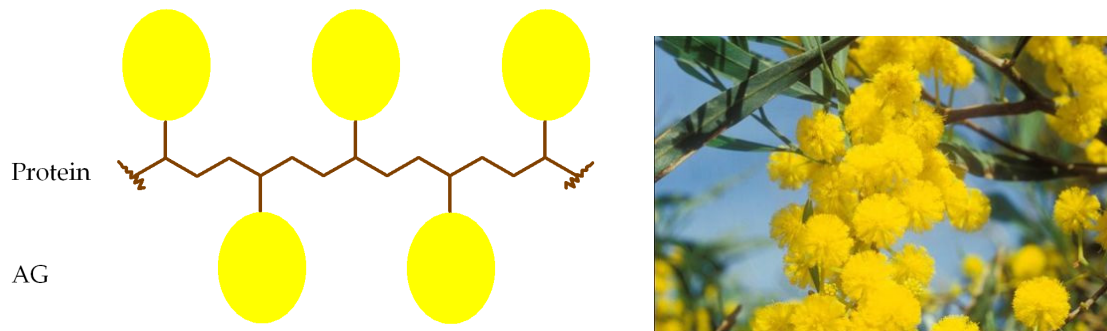


Abbildung 6: Aufbau eines AGPs nach dem „wattle-blossom“-Modell nach FINCHER et al. (1983)

Später wurde ein weiteres Modell durch QI et al. (1991) vorgeschlagen. Das „Twisted-hairy-rope“-Modell (siehe Abbildung 7) beschreibt ein AGP anhand eines Protein-Rückgrats, an welchem über die Aminosäure Hydroxyprolin Kohlenhydratketten von etwa 30 Zuckern (Glucuronsäure, Rhamnose und Arabinose) gebunden sind. Zusätzlich werden noch kurze Arabinose-Ketten beschrieben, die ebenfalls über eine O-glycosidische Bindung an Hydroxyprolinreste des Proteins gebunden sind.

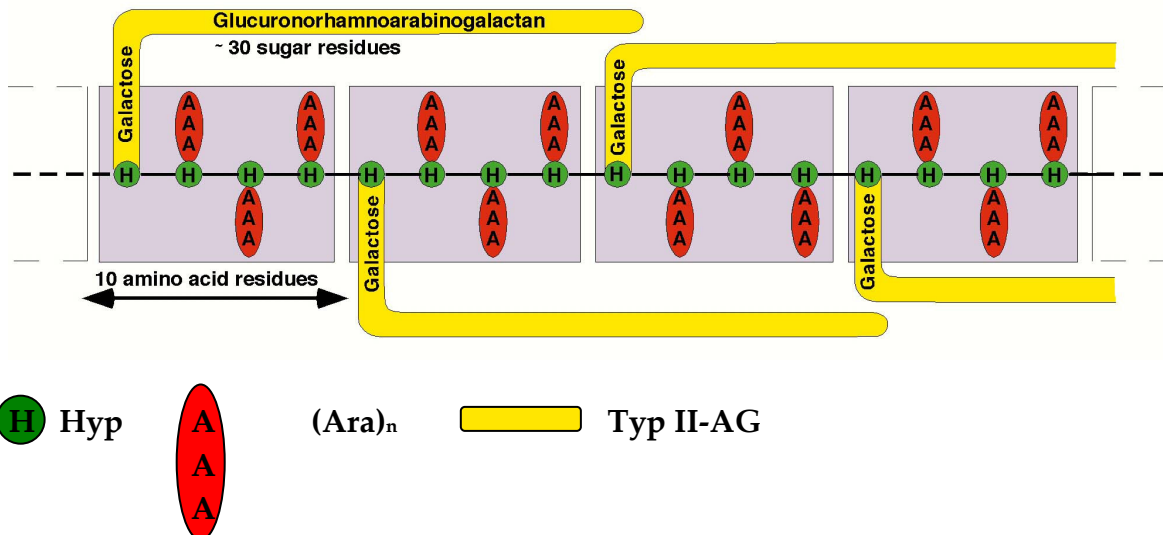


Abbildung 7: Aufbau eines AGPs nach dem „twisted hairy rope“-Modell. BACIC, 2003 nach QI, 1991

SANCHEZ et al. (2008) untersuchte die Tertiärstruktur eines AGs aus Gummi arabicum unter anderem mit Hilfe der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) und der Rasterkraftmikroskopie (AFM) und konnte diese als spheroidale, scheibenförmige Struktur beschreiben. Die Dicke der Scheibe wird auf maximale 2 nm begrenzt, der Durchmesser beträgt etwa 20 nm.

2.3.2 Eigenschaften und Funktionen von Arabinogalactan-Proteinen

Arabinogalactan-Proteine können mit $(\beta\text{-D-Glc})_3\text{-Yariv-Phenylglycosid}$ ($\beta\text{-Yariv-Reagenz}$) präzipitieren (YARIV et al., 1962; FINCHER et al., 1983) und lassen sich so gut aus wässrigen Extrakten fällen und isolieren. Die strukturelle Voraussetzung für die Präzipitation von AGPs ist die β -Verknüpfung von D-Zuckern oder die α -Verknüpfung von L-Zuckern innerhalb eines β -Yariv-Reagenz-Moleküls, wobei die Stabilität des resultierenden Yariv-AGP-Komplexes in Abhängigkeit vom untersuchten AGP variiert. Weiterhin muss die Hydroxylfunktion an C₂ in der D-Gluco-Konfiguration vorliegen. Die Diazo-

Gruppe des Phenylrestes muss in para-Stellung liegen (JERMYN et al., 1975; JERMYN, 1978). Das in dieser Arbeit beschriebene β -Yariv-Reagenz mit β -D-Glucose wird zur Isolierung von AGPs am häufigsten eingesetzt. Eine Negativ-Kontrolle der Reaktion kann z.B. mit einem Derivat des Yariv-Reagenz mit α -D-Glucose durchgeführt werden; hier erfolgt keine Reaktion (NOTHNAGEL, 1997).

Welche verschiedenen Funktionen AGPs innerhalb der pflanzlichen Zelle übernehmen, ist nicht vollständig geklärt und wird diskutiert. Sie zeigen eine Assoziation mit Wachstum und Entwicklung einschließlich der Embryogenese (KREUGER und VAN HOLST, 1995; HU et al., 2006) und sie spielen eine Rolle innerhalb von Prozessen der Zellteilung, Elongation und Proliferation (SERPE und NOTHNAGEL, 1994), des programmierten Zelltods (GAO und SHOWALTER, 1999; GUAN und NOTHNAGEL, 2004) sowie in der Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen (MAJEWSKA-SAWKA und NOTHNAGEL, 2000; SEIFERT und ROBERTS, 2007). Aussagen über mögliche physiologische Funktionen der AGPs werden oft aufgrund einer Lokalisierung innerhalb der Pflanzen getroffen. 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, die gegen spezifische Kohlenhydratepitope von AGPs gerichtet sind (KNOX, 1997; KNOX, 2008; BLAKE et al., 2008). Neben diesen Lokalisierungsversuchen mit monoklonalen Antikörpern wurden Untersuchungen durchgeführt, die darauf zielten, alle AGPs mit β -Yariv-Reagenz anzufärben, um so die gesamte AGP-Verteilung innerhalb eines pflanzlichen Gewebes lichtmikroskopisch zu bestimmen (PUTOCZKI et al.,

2007). Da aufgrund der nur leichten Einfärbung durch β -Yariv-Reagenz und der geringen AGP-Konzentration im pflanzlichen Gewebe keine besonders aussagekräftigen Bilder entstanden, wurde ein Antikörper gegen β -Yariv-Reagenz selbst entwickelt. Es entstanden aussagekräftige fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (BOSSY et al, 2009).

Für AGPs wurden bereits verschiedene immunstimulierende Eigenschaften nachgewiesen, wie zum Beispiel eine Aktivierung des Komplementsystems *in vitro* (ALBAN et al., 2002). Weiterhin gibt es Untersuchungen der immunmodulierenden Wirkung von AGPs aus *Echinacea spec.* und *Baptisia spec.* auf die Proliferation und IgM-Produktion von Maus-Lymphozyten sowie Nitrit- und IL-6-Produktion von Maus-Macrophagen *in vitro* (CLASSEN et al., 2006). Ebenfalls wurde eine Bindung von AGPs an die Oberfläche von Leucozyten nachgewiesen (THUDE et al., 2006).

Über AGPs aus Getreidepflanzen ist nicht viel bekannt. JERMYN und YEOW testeten 1975 beispielhaft Samen von Pflanzen aus 91 unterschiedlichen Familien auf eine Präzipitation mit β -Yariv-Reagenz in einem Geldiffusionstest. Dabei testeten sie auch vier Vertreter der Süßgräser: *Triticum spec.*, *Lolium perenne* L., *Avena sativa* L. und *Hordeum vulgare* L.. Makromoleküle aus den Früchten der Gerste reagierten als Einzige mit β -Yariv-Reagenz. Deshalb ging man dazu über, AGPs aus Weizenmehl ohne β -Yariv-Reagenz zu isolieren und deren chemische Struktur zu analysieren. Man isolierte so Arabinogalactan-Peptide (AG-Peptide) mit einem Molekulargewicht von durchschnittlich 25 kDa und mit einem Proteinanteil von etwa acht Prozent. Auch eine Bindung des Kohlenhydratanteils an den Proteinteil über Hydroxyprolin wurde nachgewiesen. Hydroxyprolin machte 16-20 % des Proteinanteils aus (FINCHER¹ et al., 1974, FINCHER² et al., 1974, STRAHM et al., 1981). Es wurden die AG-Peptide aus 18 verschiedenen Weizensorten verglichen und kleine strukturelle Unterschiede entdeckt. So

variierte stets das Verhältnis Arabinose zu Galactose und auch der Gehalt an 1,6-Gal(*p*) und 1,3,6-Gal(*p*), wobei der Gehalt an 1,3-glycosidisch verknüpfter Galactose etwa gleich blieb (LOOSVELD et al., 1998). Die Aminosäuresequenz der isolierten AG-Peptide aus Weizenmehl war mit dem Grain Softness Protein-1 identisch. So konnten drei mögliche Stellen einer Verknüpfung mit dem Kohlenhydratgerüst über Hydroxyprolin bestimmt werden (VAN DEN BULCK et al., 2002). VAN DEN BULCK et al. (2005) verglichen erstmals Kohlenhydratzusammensetzung und Aminosäurezusammensetzung von AG-Peptiden, isoliert aus unterschiedlichen Getreidespecies: Dinkel, Triticale (eine Kreuzung aus Weizen als weiblichem Partner und Roggen als männlichem Partner), Gerste und erstmals auch Roggen. Obwohl sich Unterschiede in der Zusammensetzung zeigten, konnte ein gemeinsames Strukturmodell für AG-Peptide aus Getreide aufgestellt werden: Alle Kohlenhydratanteile der AG-Peptide bestanden aus einem Rückgrat β -glycosidisch verknüpfter 1,6-Gal(*p*) mit Arabinoseresten in Position 3 oder seltener auch einem Galactoserest, der wiederum einen Arabinoserest an Position 3 trug. Die Verknüpfung des Kohlenhydratanteils mit dem Peptid fand über Hydroxyprolin statt. Über AGPs oder AG-Peptide aus den Früchten von *Avena sativa* L. gibt es bisher keine Veröffentlichungen.

LOOSVELD und DELCOUR (2000) untersuchten den Einfluss von AG-Peptiden aus Weizenmehl auf die Backeigenschaften eines Teigs und fanden heraus, dass sie für gute Agglomerationseigenschaften des Teigs verantwortlich waren und zudem zu einer leichten Erhöhung des Backvolumens führten. Gerade das Verhältnis von AG-Peptiden zu Arabinoxylanen ließ Vorhersagen für Eigenschaften des Teigs und schließlich auch daraus resultierende Eigenschaften des gebackenen Produktes zu (GUTTIERI et al., 2008). Für Weizen wurden Fasciclin-ähnliche AGPs charakterisiert, die sowohl strukturelle Eigenschaften eines Arabinogalactan-Proteins aufweisen aber auch

Eigenschaften, die auf ein Zelladhäsionsmolekül zurückführen. Es wird vermutet, dass diese Moleküle wie Fascilin-Proteine in tierischen Zellen im Zellkontakt und in der Kommunikation zwischen Zellen eine Rolle spielen (FAIK et al., 2006).

3 Zielsetzung der Arbeit

Die Früchte der Getreidepflanzen Weizen, Roggen und Hafer werden schon seit tausenden von Jahren zu Nahrungsmitteln verarbeitet. Dabei spielte vor allem die enthaltene Stärke als Energielieferant eine zentrale Rolle. In der heutigen Zeit liegt der Fokus auf einer gesunden Ernährung. Lebensmittel sollen den menschlichen Körper nicht nur mit Energie und „Bausteinen“ versorgen, sie sollen zudem einen positiven Effekt auf die menschliche Gesundheit ausüben. Zivilisationskrankheiten wie Hypercholesterinämie, Diabetes Typ 2 und auch Krebs soll vorgebeugt werden. Deshalb werden Vollkornprodukte immer beliebter, der Markt des „functional food“ (funktionelle Lebensmittel) wächst. Es bleibt noch zu ermitteln, welche Inhaltsstoffe aus Getreide von Nutzen für die Gesundheit sind und welche nicht.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Isolierung von putativ gesundheitsfördernden Arabinogalactan-Proteinen aus Früchten von Weizen (*Triticum aestivum* L.), Roggen (*Secale cereale* L.) und Hafer (*Avena sativa* L.). Dabei soll überprüft werden, ob durch eine vorhergehende Aufkonzentrierung eines wässrigen Extrakts der Getreidefrüchte eine Isolierung der AGPs mit β -Yariv-Reagenz möglich ist. Zusätzlich sollen die isolierten AGPs hinsichtlich des Kohlenhydratanteils und des Proteinanteils charakterisiert werden, um schließlich einen Strukturvorschlag für die drei AGPs zu erstellen. Mit Hilfe

enzymatischer Degradationen des Kohlenhydratanteils sollen gezielte Informationen zur Feinstruktur von AGPs gewonnen werden.

Arabinogalactan-Proteine spielen eine entscheidende Rolle für Wachstum und Differenzierung in der Pflanze selbst, aber auch für den wichtigen Vorgang der Apoptose. Dabei dienen sie wahrscheinlich als Signalmoleküle, die vermutlich teils in der Zellmembran verankert vorliegen, teils frei im Raum zwischen Zellmembran und Zellwand vorkommen.

Um APGs mikroskopisch in verschiedenen Organen am Beispiel der Haferpflanze zu lokalisieren, sollen monoklonale Antikörper gegen Hafer-AGP produziert werden. So sollen aussagekräftige Bilder durch Fluoreszenz-Markierung der AGPs entstehen und Rückschlüsse auf Funktionen von AGPs in der Haferpflanze gezogen werden.

B Material und Methoden

1 Isolierung von AGP

1.1 Verwendetes Drogenmaterial

Ganze Früchte von Hafer und Weizen wurden von der Firma Galke, Gittelde, bezogen (*Triticum aestivum* Fruct. tot. Ch.B.: 7928 und *Avena sativa* Fruct. tot. Ch.B.: 9694 und 136136), wobei die Früchte des Hafers bespelzt verarbeitet wurden. Das Drogenmaterial des Roggens stammte vom Versuchsgut Lindhof für ökologischen Landbau (Lindhöft, Kiel) aus der Ernte des Jahres 2006.

1.2 Isolierung einer hochmolekularen Fraktion

Die Früchte wurden zunächst gereinigt, indem fremde Pflanzenbestandteile aussortiert wurden. Es folgte eine Wäsche der Droge mit Ethanol 96%. Dazu wurde die Droge mit Ethanol überschichtet und drei Minuten lang ständig geschüttelt. Nach dem Abfiltrieren des Ethanols wurde die Droge auf Filterpapier ausgebreitet und bei 40°C im Trockenschrank getrocknet. Nach der Trocknung wurde die Droge in der Schlagkreuzmühle (550 W Electronic, Fa DeLonghi, Treviso, Italien) zerkleinert und durch ein Sieb der Größe 3 gegeben (Maschenweite 200 µm). Zum Siebdurchgang wurde im Drogen-Extrakt-Verhältnis von 1:10 Aqua bidest. gegeben. Bei 4°C wurde nun 24 Stunden lang unter ständigem Schütteln mazeriert. Größere feste Bestandteile wurden mit einer Tinkturenpresse ($p=300 \text{ kg/cm}^3$, Fa Hafiko, Düsseldorf) entfernt. Als Filtermaterial diente dabei ein Baumwolltuch. Um die noch reichlich vorhandene nicht lösliche Stärke in Form von Stärkekörnern abzutrennen, wurde nach der Zentrifugation bei 13.600 U/min (20°C, 10 min, 3K30, Fa Sigma, Osterode) der Bodensatz verworfen. Um Proteine zu fällen, wurde das Mazerat in kleinen

Portionen zu 100 ml für 10 min auf 90°C erhitzt. Über Nacht wurde der Extrakt dann bei 4°C gelagert. Die denaturierten Proteine wurden nach der Zentrifugation bei 5000 U/min (10 min, Megafuge 1.0, Fa Heraeus Instruments, Hanau) als Bodensatz verworfen. Danach wurden die Extrakte zur enzymatischen Hydrolyse der löslichen Stärke einer α -Amylase-Behandlung unterzogen (α -Amylase aus Schweinepankreas, Fa Sigma-Aldrich, Steinheim). Die zugeführte Menge des Enzyms richtete sich nach dem maximal möglichen Stärkegehalt des Retentats (Berechnung anhand der Glucosekonzentration nach B 3.1.1), wobei 1 mg α -Amylase laut Herstellerinformation 15,4 mg Maltose aus Stärke in drei Minuten bei 20°C, pH 6,9 freisetzen kann. Nach Inkubation des Enzymes wurde der Extrakt zur Denaturierung der Amylase 30 min auf 90°C erhitzt und anschließend bei 5000 U/min 10 min lang abzentrifugiert (Megafuge 1.0, Fa Heraeus Instruments, Hanau).

Der Überstand wurde nun auf etwa ein Zehntel des ursprünglichen Volumens am Rotationsverdampfer eingengt (40°C, 30 mbar) und einer fünftägigen Dialyse gegen Aqua dem. unter kontinuierlichem Wasseraustausch unterworfen (4°C, Dialyseschläuche mit nomineller Ausschlussgrenze von 12-14 kDa, Fa Medicell International, London, GB). Danach wurde das so erhaltene hochmolekulare Retentat gefriergetrocknet (Beta 1-8K, Fa Christ und Freeze Dry System Lymph.Lock 6, Fa Labconco, Kansas City, USA). Das während der Dialyse anfallende Permeat wurde verworfen.

1.3 Aufreinigung des Extraktes für die β -Yariv-Fällung

Das hochmolekulare Retentat wurde in Aqua dem. gelöst und die dabei unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (13.600 U/min, 15 min, 20°C, 3K30, Fa

Sigma, Osterrode). Der klare Überstand wurde für die β -Yariv-Fällung verwendet, der Bodensatz wurde verworfen.

1.4 Yariv-Fällung

1.4.1 Herstellung des β -Yariv-Reagenzes

Das β -Yariv-Reagenz dient der spezifischen Fällung von AGPs. Die Synthese des β -Yariv-Reagenzes wurde in Anlehnung an YARIV et al. (1962) durchgeführt.

Zur Herstellung des β -Yariv-Reagenzes wurde der Ausgangsstoff *p*-Nitrophenyl- β -D-glucose (Formel 1 in Abbildung 8) über eine Hydrierung mit elementarem Wasserstoff zu *p*-Aminophenyl- β -D-Glucose (Formel 2 in Abbildung 8) reduziert. Dies geschah in Anwesenheit eines Palladium-Katalysators (Palladium/Aktivkohle, Pd 10%, Fa Merck, Darmstadt). *p*-Aminophenyl- β -D-Glucose wurde dann in 0,5 M Salzsäure bei 0°C gelöst und Natriumnitrit hinzugefügt, wodurch das entsprechende Diazoniumsalz entstand (Formel 3 in Abbildung 8). Dieser Reaktionsansatz wurde tropfenweise zu einer gekühlten wässrigen Phloroglucin-Lösung (0,02 M, 0°C, Formel 4 in Abbildung 8) gegeben, wobei der pH-Wert durch Zugabe einer 0,5 M Natriumhydroxid-Lösung unter Kühlung bei 9 gehalten wurde. Danach wurde der pH-Wert noch zwei weitere Stunden bei pH 9 konstant gehalten. Es entstand dabei durch eine Azokupplung das braunrote β -Yariv-Reagenz (Formel 5 in Abbildung 8).

Zur Aufreinigung wurde das gleiche Volumen an Methanol zur wässrigen Yariv-Lösung gegeben und so das β -Yariv-Reagenz über Nacht bei 4°C gefällt. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert (5000 U/min, 15 min, Megafuge 1.0, Fa Heraeus Instruments, Hanau). Nach Lösen des Zentrifugations-Rückstands in 40 ml Aqua dem. wurde erneut mit dem gleichen Volumen

Methanol gefällt. Nach zwei Stunden bei 4°C wurde der Niederschlag erneut abzentrifugiert und anschließend bei 50°C getrocknet.

Die Herstellung von α -Yariv-Reagenz, welches als Negativ-Kontrolle benutzt werden kann, wurde ebenso durchgeführt. Dabei wurde jedoch *p*-Nitrophenyl- α -D-glucose als Ausgangssubstanz der Synthese verwendet.

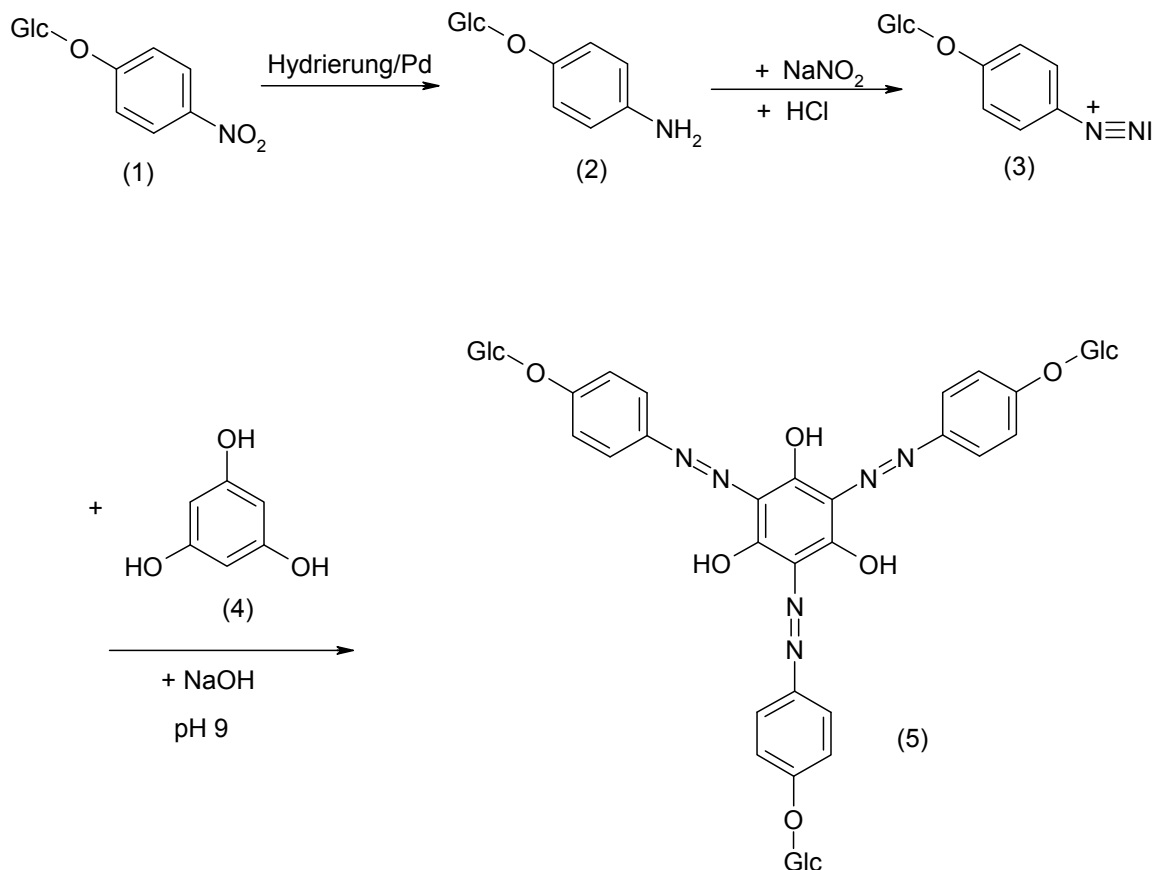


Abbildung 8: Reaktionsgleichung der β -Yariv-Reagenz-Synthese

1.4.2 Yariv-Fällung

AGP und β -Yariv-Reagenz sollten zu gleichen Teilen (m/m) vorhanden sein, damit eine möglichst vollständige Fällung möglich ist (KREUGER and VAN HOLST, 1995). Deshalb wurde zunächst eine Abschätzung der AGP-Menge über den Gehalt an Arabinose und Galactose innerhalb der hochmolekularen Fraktion

mittels Acetylierung und anschließender Gaschromatographie (siehe B 3.1.1) vorgenommen.

Eine Lösung der hochmolekularen Fraktion, die eine theoretische AGP-Konzentration von 1 mg/1 ml Aqua dem. besitzt, wurde zum Erhalt einer klaren Lösung, wie unter B 1.3 beschrieben, aufgereinigt. Das gleiche Volumen einer wässrigen β -Yariv-Reagenz-Lösung (1 mg/ml) mit 0,3 M Natriumchlorid (NaCl) wurde zur Retentat-Lösung gegeben. Über Nacht erfolgte die Fällung bei 4°C, und am nächsten Tag wurde das entstandene Präzipitat bei 16.000 U/min für 15 min bei 6°C abzentrifugiert (Zentrifuge: 3K30, Fa Sigma, Osterode). Der Komplex aus β -Yariv-Reagenz und AGP wurde nun in der Menge Aqua dem. gelöst, in der auch das Retentat gelöst war. Diese Lösung wurde nun unter ständigem Rühren auf 50°C erhitzt. Durch Zugabe von Natriumdithionit im Überschuss wurde das β -Yariv-Reagenz zerstört; dabei entfärbte sich die Lösung. Diese wurde dann innerhalb einer fünftägigen Dialyse gegen kontinuierlichen Aquadem.-Austausch (4°C, Dialyseschläuche mit nomineller Ausschlussgrenze von 12.000-14.000 Da, Fa Medicell International, London, GB) von Natriumdithionit, Bruchstücken des β -Yariv-Reagenz und NaCl befreit. Nach Gefriertrocknung erhielt man das getrocknete Roh-AGP, welches teilweise nochmals einer Yariv-Fällung unterzogen wurde. Als Aufreinigungsschritt folgte dabei nach dem Lösen des Roh-AGPs nach B 1.3 eine Zentrifugation, so dass nur der klare Überstand zur zweiten Yariv-Fällung und so zum Erhalt eines aufgereinigten AGPs genutzt wurde.

2 Geldiffusionstest

Der Geldiffusionstest zeigt anschaulich die spezifische Präzipitation von Bestandteilen der hochmolekularen Fraktion bzw. mit isoliertem AGP mit β -Yariv-Reagenz.

Ein einprozentiges Agarosegel in 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,3) mit 0,9% NaCl und 1 mM Calciumchlorid wurde autoklaviert (121°C, 1 bar Wasserdampfüberdruck, 20 min) und in sterile Kunststoff-Petrischalen (\varnothing 9 cm) ausgegossen. Aus dem erhärteten und erkalteten Gel wurden fünf Löcher mit dem Durchmesser 4 mm ausgestanzt, wobei die Kavität, in welche 20 μ l einer 1 mg/1 ml β -Yariv-Reagenz-Lösung pipettiert wurde, zentral positioniert war. Die anderen vier Löcher waren im jeweils gleichen Abstand darum angeordnet. In die vier freien Kavitäten wurden 20 μ l der Probe in jeweils verschiedenen Konzentrationen gefüllt. Probe und β -Yariv-Reagenz diffundierten aufeinander zu, es bildeten sich je nach Konzentration unterschiedlich deutliche Präzipitationsbanden, wenn Bestandteile der Probe mit dem β -Yariv-Reagenz wechselwirkten.

3 Strukturaufklärende Analytik des AGPs

3.1 Analytik des Kohlenhydratanteils

3.1.1 Bestimmung der Neutralzucker mittels Acetylierung

Die Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung erfolgte nach der Vorschrift von BLAKENEY et al. (1983) und diente der quantitativen und qualitativen gaschromatographischen Bestimmung der Neutralzucker als deren Alditolacetate in einer Probe (Prinzip siehe Abbildung 9).

Dabei wurden etwa 2 mg Probe eingesetzt. Als interner Standard wurde 0,5 mg *myo*-Inositol verwendet. Zunächst wurde 1 ml 2 M Trifluoressigsäure (TFA) hinzugefügt und eine Stunde bei 121°C im Bioblock (Bioblock Scientific, Fa Thermolyne, Illkirch, Frankreich) hydrolysiert. Die so erhaltenen Monosaccharide wurden möglichst vollständig in einen Spitzkolben überführt und dreimal mit jeweils 5 ml Aqua dem. zur Trockne einrotiert, um die TFA zu entfernen. Unter Schütteln mit 200 µl 1 M wässriger Ammoniak-Lösung wurde die Probe dann wieder aufgenommen. Durch Zugabe von 1 ml Natriumborhydrid in Dimethylsulfoxid wurden die Monosaccharide zu Alditolen reduziert (bei 40°C). Die Reduktion wurde nach 90 min mit 100 µl konzentrierter Essigsäure abgestoppt. Als Katalysator für die anschließende Acetylierung wurden 0,2 ml Methylimidazol hinzugegeben. Es folgten 2 ml Acetanhydrid als Acetylierungs-Reagenz. Der Reaktionsansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, und die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Aqua dem. gestoppt. Nach Ansäuerung durch 1 ml 0,1 M Schwefelsäure konnten die Alditolacetate mit 1 ml Dichlormethan ausgeschüttelt werden. Die Dichlormethan-Phase wurde abpipettiert und wenn nötig unter Stickstoff-Begasung eingengt. 1 µl der acetylierten Probe wurde gaschromatographisch vermessen, wobei die Identifizierung der Alditolacetate über die Retentionszeit erfolgte. Die quantitative Auswertung erfolgte über die Berechnung der integrierten Flächen relativ zum internen Standard *myo*-Inositol. Hierbei wurden Korrekturfaktoren berücksichtigt, da der Flammenionisationsdetektor unterschiedlich stark auf die verschiedenen Alditolacetate anspricht.

Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion:

Säule:	WCOT-Kapillarsäule, Optima -225-0,25 µm (L 25 m, ID 0,25 mm), Fa Macherey & Nagel, Düren
Gaschromatograph:	HP 6890 Plus Series; Fa Hewlett Packard, USA
	Detektor: FID
Trägergas:	Helium
Flow:	1 ml/min
Splitratio:	1/30
Temperaturprogramm:	230°C isotherm
Detektor/Injektor:	240°C
Software:	Programm HP GC Chemstation, Rev. A.06.03 [509]

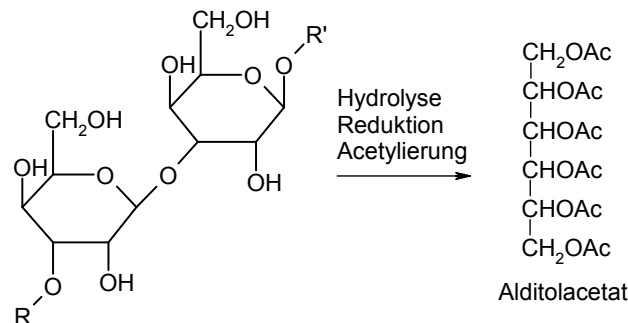


Abbildung 9: Reaktionsschema zur Herstellung von Alditolacetaten

3.1.2 Bestimmung der Neutralzucker und Uronsäuren mittels

Silylierung

Die Silylierung nach INNGJERDINGEN et al. (2005) dient der qualitativen und quantitativen gaschromatographischen Bestimmung von Neutralzuckern und Uronsäuren innerhalb eines Polysaccharides nach dessen Hydrolyse. Sie wurde in Zusammenarbeit mit Professor Dr. Berit Smestad Paulsen der School of Pharmacy, Oslo, Norwegen, durchgeführt.

Herstellung der methanolischen HCl:

500 ml Methanol wurden durch Zugabe von Magnesiumspäne und Iod getrocknet, indem man die Mixtur unter Rückfluss für eine Stunde erhitzte. Das

getrocknete Methanol wurde in ein Behältnis destilliert, durch das so lange getrocknetes HCl-Gas geleitet wurde, bis eine 4M Lösung vorlag.

Herstellung des Trimethylsilyl-Reagenz:

Eine Lösung aus Pyridin, Trimethylchlorsilan und Hexamethyldisilazan (5:1:1 in Volumenanteilen) wurde frisch hergestellt und vor Gebrauch abzentrifugiert.

Etwa 1 mg eines über P_2O_5 getrockneten AGPs wurde einer Methanolyse unterzogen, indem zunächst eine wasserfreie Hydrolyse mit 0,5 ml 4 M methanolischer HCl bei 80°C für 24 h erfolgte. Mannitol diente hierbei als interner Standard. Nach der Methanolyse wurden Salzsäure und Methanol mit Stickstoff abgeblasen und die Methylglycoside im Vakuum über P_2O_5 eine Stunde lang getrocknet. Anschließend erfolgte die Trimethylsilylether-Bildung durch Zugabe von 0,05 ml des Trimethylsilyl-Reagenzes und einer Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand direkt gaschromatographisch vermessen.

Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion:

Säule:	GP 60/80 Carbopack B/5% Carbowax (L 2 m, ID 3 mm), Fa Sigma-Aldrich, Steinheim
Gaschromatograph:	Carbo Erba 6000 Vega Series 2, USA mit ICU 600 Kontrolleinheit Detektor: FID, HP-3396A, Fa Hewlett Packard, USA
Trärgas:	Stickstoff
Flow:	25 ml/min
Temperaturprogramm:	90°C isotherm
Injektor/Detektor:	Headspace 120°C/150°C

3.1.3 Kolorimetrische Quantifizierung von Uronsäuren

Die photometrische Methode nach BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN (1973) diente der quantitativen Bestimmung der Uronsäuren innerhalb einer Probe.

Etwa 1 mg AGP wurde mit 1 ml Schwefelsäure 4% versetzt. Anschließend wurde bei 121 °C eine Stunde lang im Bioblock hydrolysiert (Bioblock Scientific, Fa Thermolyne, Illkirch, Frankreich). Die Probe wurde mit 1,2 ml Borax/Schwefelsäure versetzt und fünf Minuten im kochenden Wasserbad inkubiert und anschließend zehn Minuten lang im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 20 µl des Reagenzes (3-Hydroxybiphenyl-Lösung 0,15% in Natronlauge 0,5%) bzw. 20 µl Natronlauge (0,15%, für den Blindwert) wurde nach genau zehn Minuten die Absorption der rot gefärbten Probe bei 520 nm bestimmt (Cary 50 Scan, Fa Varian, Palo Alto, USA).

Auf dem gleichen Weg wurde eine Kalibriergerade für ein Gemisch gleicher Anteile von Glucuronsäure und Galacturonsäure erstellt, da zwischen den beiden Uronsäuren kolorimetrisch nicht unterschieden werden kann, so dass der Gesamturonsäuregehalt ermittelt wurde.

3.1.4 Uronsäure-Reduktion

Nach TAYLOR und CONRAD (1972) wurden die freien Carboxylgruppen von Uronsäuren mit Natriumbordeuterid zu zweifach deuterierten Neutralzuckern reduziert (siehe Abbildung 10). Durch diese Reduktion zu den korrespondierenden, deuterierten Neutralzuckern wurden die Uronsäuren der Bindungstypanalyse zugänglich gemacht.

20 mg AGP wurde in 30 ml Aqua dem. gelöst. Ein Octanol-Zusatz verhinderte während der gesamten Reaktion Schaumbildung. Unter Rühren wurden 216 mg N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-methylmorpholino)-ethyl]-carbodiimid-4-toluolsulfonat zugegeben. Der pH-Wert des Mediums musste zunächst für 4 h mit Salzsäure (0,01 M) konstant auf 4,75 gehalten werden. Die freie Carbonsäure einer Uronsäure reagierte dabei mit dem Carbodiimid zu einem Acylisoharnstoff, was die Reaktivität im Vergleich zur freien Säurefunktion erhöht. Die so aktivierte Säure wurde durch langsames Zutropfen einer Natriumbordeuterid-Lösung aufsteigender Konzentration (4 ml 1M, 5 ml 2 M, 5 ml 4 M) bei konstanten pH 7 reduziert. Der konstante neutrale pH-Wert während der Reduktion verhinderte eine Zersetzung des Natriumbordeuterids im Sauren und ein Verschieben des Gleichgewichts zwischen aktivierter und nicht aktivierter Uronsäure zu Gunsten der nicht aktivierten im Basischen. Nach der Reduktion wurde mit Essigsäure auf den pH-Wert 6,5 eingestellt, dialysiert (4°C, Dialyseschläuche mit nomineller Ausschlussgrenze von 12-14 kDa, Fa Medicell International, London, GB) und anschließend gefriergetrocknet.

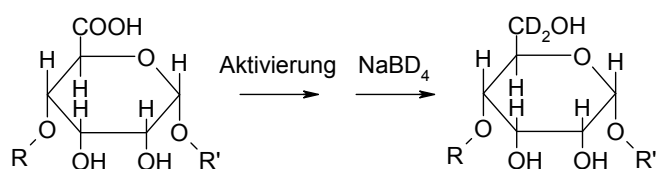


Abbildung 10: Reaktionsschema zur Uronsäure-Reduktion nach Taylor und Conrad

3.1.5 Bestimmung der Bindungstypen im KH-Anteil

Die Methylierungsanalyse dient der Charakterisierung der Verzweigungstypen der an einem Polymer beteiligten Monomere und lässt auch eine Unterscheidung von Furanosen und Pyranosen zu.

Dazu wurden zunächst alle freien Hydroxylgruppen des Polysaccharides in Methylether überführt (nach HARRIS et al. 1984). Dies geschah durch eine Deprotonierung durch Dimethylsulfinyl-Kalium und eine Permethylierung durch Methyliodid. Ebenfalls methyliert wurden hierbei Hydroxylgruppen, die unter den Reaktionsbedingungen durch leicht abspaltbare Substituenten frei wurden. Das so entstandene methylierte Polysaccharid wurde hydrolytisch gespalten, so dass partiell methylierte Monosaccharide entstanden, die mit Natriumborhydrid reduziert wurden. Die durch Hydrolyse freigewordenen, zuvor an der glycosidischen Bindung beteiligten Hydroxylgruppen wurden in einem zweiten Schritt mit Acetanhydrid/Methylimidazol acetyliert. Es folgte eine gaschromatografische Auftrennung der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs), wobei die Identität dieser über ein Massenspektrum in Zusammenhang mit der Retentionszeit bestimmt wurde (mit Hilfe einer Spektrenbibliothek). Die quantitative Verteilung der PMAAs wurde über die Peakflächen des FID-Spektrums ermittelt. Mit Hilfe des Biermann-Faktors (SWEET et al., 1975) wurde das unterschiedliche Ansprechen des FIDs auf die verschiedenen PMAAs ausgeglichen, und gleichzeitig die Umrechnung von Massenprozent in Molprozent vorgenommen.

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

Etwa 0,8 g einer paraffinhaltigen Kaliumhydrid-Suspension (35%) wurde viermal mit je 5 ml trockenem *n*-Hexan ölfrei gewaschen und unter Argon-Begasung getrocknet. Zum getrockneten Kaliumhydrid wurde nun trockenes Dimethylsulfoxid (DMSO) langsam zugetropft (bis zu einer Konzentration von 0,08 g Kaliumhydrid/ml DMSO). Ein Aufschäumen wurde dabei durch Eiskühlung und Vortexen unterbunden. Nach 30 min Rühren ergab das Kaliumhydrid im DMSO eine klare Lösung

Methylierung der Probe:

Etwa 1-2 mg gefriergetrocknete Probe wurde in 460 μl trockenem DMSO gelöst. Unter Argonbegasung wurde nun nach folgendem Schema im Wechsel Dimethyl-Lösung und eisgekühltes Methyljodid (stabilisiert mit Silber) zupipettiert:

+ 40 μl Dimethyl-Lösung	10 min Inkubation
+ 10 μl Methyljodid	5 min Inkubation
+ 120 μl Dimethyl-Lösung	10 min Inkubation
+ 30 μl Methyljodid	5 min Inkubation
+ 400 μl Dimethyl-Lösung	30 min Inkubation
+ 300 μl Methyljodid	10 min Inkubation

Die methylierte Probe wurde mit 3,0 ml einer Chloroform/Methanol-Mischung (2:1, V/V) versetzt. Zum Waschen der Lösung wurden 2,0 ml Aqua dem. hinzugefügt und geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation bei 250 U/min (5 min, Megafuge 1.0, Fa Heraeus Instruments, Hanau), um die Phasen zu trennen. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Nach erneuter Zugabe von 2,0 ml Aqua dem. schlossen sich noch vier weitere Waschgänge an.

Zur organischen Phase wurden 2,0 ml 2,2-Dimethoxypropan, 20 μl Eisessig und 3-4 Siedeperlen hinzugeben und vorsichtig auf 90°C erhitzt, um das restliche Wasser zu entfernen. Die Probe wurde anschließend mit Argon bei 40°C zur Trockne eingeengt.

Hydrolyse:

Die methylierten Proben wurden mit 1,0 ml 2 M TFA versetzt und eine Stunde lang bei 121°C hydrolysiert (Bioblock Scientific, Fa Thermolyne, Illkirch, Frankreich). Anschließend wurde die wässrige TFA-Lösung mit Stickstoff bei 40°C abgeblasen.

Reduktion:

Zu den nun unvollständig methylierten Monosacchariden wurde zur Reduktion je 2,0 ml Natriumborhydrid-Lösung (0,5 M in 2 M wässriger Ammoniak-Lösung) hinzugefügt und eine Stunde bei 60°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,5 ml Aceton abgestoppt und das gesamte Lösungsmittel mit Stickstoff bei 40°C abgeblasen.

Acetylierung zu PMAAs:

Der Rückstand wurde mit 200 µl Eisessig aufgenommen und mit 1,0 ml Ethylacetat und 3,0 ml trockenem Acetanhydrid versetzt. 100 µl Perchlorsäure (70% m/V) wurden als Katalysator der fünfminütigen Acetylierung der partiell methylierten und reduzierten Monosaccharide hinzugefügt. Unter Eiskühlung wurde restliches Acetanhydrid durch Zugabe von 10 ml Aqua dem. und 200 µl Methylimidazol inaktiviert. Die PMAAs konnten nun mit 1 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und gaschromatographisch vermessen werden.

Gaschromatographie mit Massenspektrometrie:

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

Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion:

Säule:	WCOT-Kapillarsäule, Permabond OV-1701; (L 25 m, ID 0,25 mm), Fa Macherey & Nagel, Düren
Gaschromatograph:	HP 6890; Fa Hewlett Packard, USA
Trägergas:	Helium
Flussrate:	0,7 ml/min
Splitverhältnis:	1/35
Temperaturprogramm:	3 min lang 120°C, dann mit 8°C/min auf 170°C, 1 °C/min auf 200°C 10 min 200°C isotherm;
Injektor/Detektor:	250°C/FID 240°C

Die Identifizierung der PMAAs erfolgte durch den Vergleich ihrer relativen Retentionszeiten im Totalionenchromatogramm (TIC) des Massenspektrometers sowie durch die Analyse ihrer Massenspektren und deren Vergleich mit bekannten PMAA-Massenspektren einer in der Arbeitsgruppe etablierten Spektrenbibliothek. Die Quantifizierung der PMAAs erfolgte über die integrierten Peakflächen des FID-Chromatogramms.

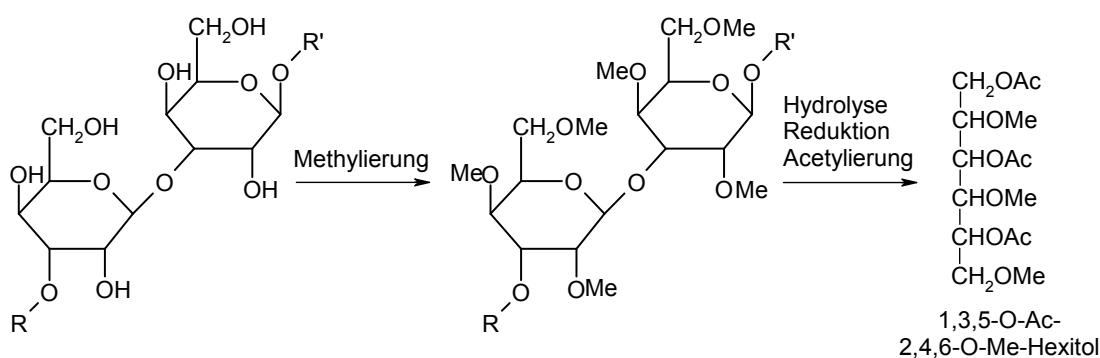


Abbildung 11: Reaktionsschema zur Methylierungsanalyse

3.1.6 Säure-Partialhydrolyse

Die Partialhydrolyse mit Oxalsäure diente dazu, labile glycosidische Bindungen zwischen Kohlenhydrateinheiten zu spalten. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an GLEESON und CLARKE (1979).

Etwa 20 mg der Probe wurden mit 2 ml Oxalsäure (12,5 mM) versetzt. Die Probe inkubierte fünf Stunden bei 100°C im Heizblock (Bioblock Scientific, Fa Thermolyne, Illkirch, Frankreich). Nach dem Abkühlen wurden unlösliche Bestandteile bei 6000 U/min fünf Minuten lang abzentrifugiert (Megafuge 1.0, Fa Heraeus Instruments, Hanau). Der Überstand wurde mit kaltem Ethanol versetzt, so dass eine Ethanol-Konzentration von 80% entstand. Die Lösung wurde über Nacht bei 4°C gelagert, der entstandene Niederschlag am nächsten Tag abzentrifugiert (16.300 U/min, 10 min, 6°C, 3K30, Fa Sigma, Osterode) und noch dreimal mit kaltem Ethanol 80% gewaschen. Der Rückstand mit den gereinigten Makromolekülen wurde schließlich in wenig Aqua dem. aufgenommen und gefriergetrocknet. Überstand und Waschlösungen, welche Mono- und Oligosaccharide enthielten, wurden vereinigt, einrotiert und wie der Niederschlag mit wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

3.1.7 Enzymatische Hydrolyse

Um AGPs zu degradieren, sind besonders Enzyme interessant, die β -1,3- und β -1,6-Galactane spalten können. *Streptomyces avermitilis* ist in der Lage, solche Enzyme zu produzieren. Das entsprechende Gen wurde identifiziert und das rekombinante Protein in *Escherichia coli* exprimiert und charakterisiert (ICHINOSE et al., 2006; ICHINOSE¹ et al., 2008). So konnte aufgereinigtes Hafer-AGP mit Hilfe einer geklonten Exo- β -1,3-Galactanase und einer geklonten Endo- β -1,6-Galactanase enzymatisch hydrolysiert werden. Ebenfalls wurde eine in

Escherichia coli geklonte Exo- α -1,5-Arabinofuranosidase genutzt, um AGP enzymatisch zu degradieren (ICHINOSE² et al., 2008). Die enzymatische Hydrolyse sowie die Analytik der freigesetzten Mono- und Oligosaccharide und die Bestimmung der Hydrolyserate wurde in Kooperation mit der Abteilung „Lebensmittel Biotechnologie“ des Nationalen Lebensmittel Forschungsinstituts in Japan unter Leitung von Dr. Satoshi Kaneko durchgeführt.

Als Reaktionsmedium für die Galactanasen und die Arabinofuranosidase diente McIlvaine-Puffer (0,2 M Na₂HPO₄ und 0,1 M Zitronensäure, pH 5,0), zu dem AGP (0,5% m/V) und das entsprechende Enzym (0,1 Einheiten/ml) hinzugegeben wurden. Nach Inkubation bei 37°C wurden die freigesetzten Zucker bestimmt (siehe B 3.1.7.1), danach wurde die Reaktion abgestoppt, indem die Lösung für 5 min auf 100°C erhitzt wurde. Eine Bestimmung der freigesetzten Zucker wurde nach B 3.1.7.1 vorgenommen.

Die Hydrolyserate der verschiedenen Enzyme wurde dabei über die Anzahl der reduzierenden Zucker nach der Methode von Somogyi-Nelson bestimmt (SOMOGYI, 1952).

Die gefriergetrockneten Reaktionsansätze wurden dreifach mit kaltem 80% Ethanol gefällt und abzentrifugiert (13.600 U/min, 6°C, 15 min, 3K30, Fa Sigma, Osterode). Der Niederschlag wurde in wenig Aqua dem. gelöst und gefriergetrocknet und diente so als Ausgangsmaterial für eine Bindungstyp-Analyse nach B 3.1.5.

3.1.7.1 Bestimmung der freigesetzten Zucker

Die durch die enzymatische Hydrolyse freigesetzten Zucker wurden durch eine Hochleistungs-Anionen-Austausch-Chromatographie gekoppelt mit gepulster

amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD, Fa Dionex, Sunnyvale, USA) aufgetrennt und anhand ihrer Retentionszeit identifiziert. Die Zuordnung erfolgte über die Retentionszeit in Anlehnung an Mono- und Oligosaccharidstandards.

3.2 Analytik des Proteinanteils

3.2.1 Hydrolysebedingungen

Zur vollständigen Hydrolyse des Proteins in die einzelnen Aminosäuren wurden etwa 10 mg Probe mit 2 ml einer 6 N Salzsäure versetzt. Anschließend wurde bei 110°C 22 Stunden im Bioblock (Bioblock Scientific, Fa Thermolyne, Illkirch, Frankreich) hydrolysiert. Nach mehrfachem Abzentrifugieren bei 8.200 U/min (20 min, 3K30, Fa Sigma, Osterode) wurde der durch die Hydrolyse ausgefallene Polysaccharidanteil entfernt. Der gesammelte Überstand mit den freien Aminosäuren wurde zur Trockne einrotiert und in Aqua dem. aufgenommen und gefriertrocknet.

3.2.2 Bestimmung der Aminosäuren per HPLC

Das nach B 3.2.1 hergestellte Hydrolysat wurde über HPLC am Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der CAU Kiel aufgetrennt und detektiert. Das Fließmittel war ein Lithiumacetat-Puffer mit steigendem pH-Wert von 2,95 bis 10,3. Die Aminosäuren wurden mittels einer Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin-Reagenz bei 570 nm (und bei 440 nm für Hydroxyprolin und Prolin) photometrisch bestimmt.

Amino-Acid-Analyser:	Biochrom 30, Fa Biochrom, Berlin
Säule:	FG0369
Eluent:	Puffersystem physiologisches Programm P25 Lithiumacetatpuffer, Fa Onken, Gründau
Detektion:	Photometrisch, Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin, Fa Onken, Gründau 440 und 570 nm Detektor: PCB, Fa Biochrom, Berlin

3.2.3 Quantitative Hydroxyprolin-Bestimmung

Zur selektiven Bestimmung der Aminosäure Hydroxyprolin innerhalb des AGPs wurde nach STEGEMANN und STALDER (1967) eine photometrische Methode aus der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren angewendet.

10 mg AGP wurden dazu 22 Stunden bei 110°C in 2 ml Salzsäure (6N) hydrolysiert. Vom Überstand des Hydrolysates wurden 200 µl bzw. 100 µl entnommen und auf 4,0 ml mit Aqua dem. aufgefüllt. Nach Zugabe von 2,0 ml des Oxidationsreagenzes (siehe unten) inkubierte die Probe 20 min bei Raumtemperatur. Danach wurden 2,0 ml des Farbreagenzes (siehe unten) zugegeben und 15 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Nach 3 min Abkühlung unter fließendem Wasser reagierte die Probe noch 30 min bei Raumtemperatur, bevor bei 558 nm die Extinktion der Probe ermittelt wurde (Photometer Cary 50, Fa Varian, Palo Alto, USA). Als Blindwert diente Aqua dem., das wie die Probe behandelt wurde. Zudem wurde eine Kalibriergerade erstellt (Standards enthielten Hydroxyprolin aufsteigender Konzentration von 0,6-2,4 mg/l).

Puffer pH 6,8:	5,2 g Citronensäure- Monohydrat 2,8 g Natriumhydroxyd- Plätzchen 15,6 g Natriumacetat (wasserfrei) 100 ml Aqua dem. 20,0 mg Natriumethylmercurithiosalicilat (=Thiomersal) 50,0 ml 1-Propanol ad 200,0 ml Aqua dem.
----------------	---

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

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

3.2.4 Alkalische Hydrolyse

Bei der alkalischen Hydrolyse nach VOLK et al. (2007) wird der Proteinanteil des AGPs zerstört und die intakten Oligo- und Polysaccharide mit jeweils einer (für die Kohlenhydrat-Bindung verantwortlichen) Aminosäure isoliert. Auf diese Weise ist eine Charakterisierung der Bindung zwischen Kohlenhydrat- und Proteinanteil der AGPs möglich. Durch die Identifizierung von Oligo- bzw. Polysacchariden kann außerdem eine Zuordnung zu einem der AGP-Modelle vorgeschlagen werden.

Etwa 20 mg des AGPs wurden mit 3 ml einer 0,44 N Natriumhydroxid-Lösung versetzt, um dann 18 Stunden bei 105°C im Bioblock zu inkubieren (Bioblock Scientific, Fa Thermolyne, Illkirch, Frankreich). Nachdem die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde sie mit 0,1 N Salzsäure neutralisiert (pH-Meter 761 Calimatic, Fa Knick, Dannstadt, Schauernheim). Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei 35°C eingengt. Mit Aqua bidest. und absolutem Ethanol wurde auf ein Endvolumen von 100 ml einer 80%igen Ethanollösung (V/V) eingestellt. Die Polysaccharide fielen nun über Nacht bei 4°C aus und wurden am nächsten Tag bei 4°C für 20 min bei 8.200 U/min abzentrifugiert (Sigma 3K30) und noch zweimal mit kaltem Ethanol 80% nachgewaschen. Nach Aufnahme in wenig Aqua bidest. wurde der Niederschlag gefriergetrocknet.

3.3 Elementaranalyse

Für die Elementaranalyse der Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel wurde eine genau bestimmte Masse von etwa 2 mg der zu untersuchenden Substanz in eine Zinnkapsel eingewogen. Die Zinnkapsel mit der Probe fiel dann in einen Ofen, in welchem ein Überschuss Sauerstoff vorgelegt war. Bei etwa 990°C zersetzte sich die Probe in gasförmige Komponenten, wobei Kohlenstoff aufgrund des Sauerstoffüberschusses zu Kohlenstoffmonoxid reagierte. Die vollständige Oxidation der gebildeten Gase garantierte ein Wolframtrioxid-Katalysator, hierdurch bildeten sich Kohlenstoffdioxid, Wasser, Schwefeldioxid und Stickoxide. Das Produktgas strömte über eine Kolonne mit Kupfergranulat, wo bei einer Betriebstemperatur von 500°C der Restsauerstoff gebunden wurde und die Stickoxide zu Stickstoff reduziert wurden. Die Gasmischung enthielt dann die Analytgas Kohlenstoffdioxid, Wasser, Schwefeldioxid und Stickstoff. Es folgte eine gaschromatographische Auftrennung mit einer Detektion über einen Wärmeleitfähigkeitsdetektor. Das Trägergas war Helium. Zur Blindwertbestimmung wurde eine leere Zinnkapsel eingesetzt, zur Kalibrierung des Gerätes wurde Sulfanilamid genutzt. Da bei dieser Messmethode die Reihenfolge der Elemente (jeweils als Peaks detektiert) in einer Probenmessung technisch exakt festgelegt war, erlaubte dies sowohl die eindeutige Identifizierung (qualitative Bestimmung) sowie über die Peakflächen (Integral über die Zeit) der Messsignale auch gleichzeitig die Mengenerfassung (quantitative Bestimmung) der einzelnen Elemente als C, H, N und S. Mit Hilfe der bekannten Einwaage ließ sich dann der jeweilige Massenanteil (in Prozent oder ppm) der Elemente in der analysierten Probe genau berechnen.

Gerät: HEKAtch CHNS Analysator, Fa HEKATECH, Wegberg

3.4 Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) ist eine Methode, Makromoleküle entsprechend ihres hydrodynamischen Volumens aufzutrennen. Die Trennung erfolgt nach dem Prinzip des Größenausschlusses durch verschiedene Porengrößen in der Gelmatrix, wobei hochmolekulare Verbindungen schneller eluieren als niedermolekulare Verbindungen, da die hochmolekularen Verbindungen schlechter bis gar nicht in die Poren hineindiffundieren. So kann mit Hilfe einer Kalibrierreihe mit Molekülen definierten Molekulargewichtes Rückschluss auf das Molekulargewicht der AGPs gezogen werden. Hierbei bleibt zu erwähnen, dass das durch die Retentionszeit ermittelte Molekulargewicht nur ein relatives darstellt, denn ein lineares Molekül eluiert nicht zur gleichen Zeit mit einem kugeligen Molekül des gleichen absoluten Molekulargewichtes. Vielmehr entspricht hier das ermittelte relative Molekulargewicht dem hydrodynamischen Volumen, bei dem Ladung, Bindungstyp und Verzweigungsgrad die Gesamtkonformation und die ausgebildete Hydrathülle des Polymers wesentlich beeinflussen.

Aufgrund dieser Diskrepanz basiert die Ermittlung des Molekulargewichts von AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer auf den Daten des Multi-Angle-Laser-Light-Scattering-Detektors (MALLS-Detektor), der das absolute Molekulargewicht ermittelt (Messung des Streulichtes in Zusammenhang mit Molekülgröße und -form). Die Daten des RI-Detektors lassen dabei eine grobe Einschätzung der quantitativen Verteilung einiger Signale zu, da der MALLS-Detektor zwar gut große Moleküle detektiert, aber kleinere Moleküle nicht korrekt erfasst.

Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden Pullulane verwendet (PL Polysaccharide Standard Kit SAC-10, Fa Varian, Palo Alto, USA, siehe Tabelle 1).

Dies sind linear aufgebaute Polymaltotriosen (α -1,6-verknüpft), gewonnen aus *Aureobasidium pullulans*.

Tabelle 1: Pullulanstandards mit zugehörigem mittleren relativen Molekulargewicht (MW), Angabe laut Hersteller

Standard	MW
20908-3 (Pullulan)	788000
20907-2 (Pullulan)	404000
20906-2 (Pullulan)	212000
20905-2 (Pullulan)	112000
20904-2 (Pullulan)	47300
20903-2 (Pullulan)	22800
20902-2 (Pullulan)	11800
20901-4 (Pullulan)	5900

Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden 2,0 mg Standard pro ml Eluent eingewogen, über Nacht bei 4°C quellen gelassen und vor dem Filtrieren (mit NALGENE® Syringe Filtern, Porengröße 0,45 μ m, Celluloseacetat, Fa Nalgene, Roskilde, Dänemark) geschüttelt. Anschließend wurden 100 μ l der Lösung auf die Säule aufgetragen.

Die Kalibriergerade wurde durch Auftragen der von der Firma vorgegebenen Molekulargewichte gegen die durch die MALLS-Detektor-Software berechneten Molekulargewichte ermittelt.

Das AGP wurde im Fließmittel gelöst (>1 mg/ml) und filtriert. Anschließend wurden 100 μ l der Lösung auf die Säule aufgetragen.

Säulen: 1x PL aquagel-OH Guard 8 μ m, 50x7,5 mm
 3x PL aquagel-OH MIXED 8 μ m, 300x7,5 mm
 MW Trennbereich 100-10.000.000 Da,
 Fa Polymer Laboratories GmbH, Darmstadt

Eluent: 0,1 M NaNO₃, 0,05% NaN₃, filtriert
 Filtrationseinheit: 0,1 μ m Filter, Fa Sartorius, Göttingen
 und entgast (Ultraschallbad),

Flussrate: 1,0 ml/min, 35°C

Gerät:	PL-GPC 50 Plus Fa Polymer Laboratories GmbH
Detektor:	MALLS Detektor mini DAWN Fa Wyatt Technology Corp., Dernbach
Software:	ASTRA for Windows 4.70.07 Parameter: $dn/dc=0,147$ ml/g für Pullulane $dn/dc=0,150$ ml/g für AGPs PL-Instument-Control Fa Polymer Laboratories GmbH

3.5 Infrarot-Spektroskopie

1,5 mg der zu untersuchenden Substanz wurden mit 80 mg Kaliumbromid (für die IR-Spektroskopie, Fa Roth, Karlsruhe) mittels eines Achatmörser fein verrieben. Dann wurde mit einer evakuierbaren Stempelpresse (Graseby, Fa Specac, London, GB) zwei Minuten lang bei 9 bar ein Pressling hergestellt und dieser gegen einen reinen Kaliumbromidpressling vermessen.

Gerät:	16 PC FT-IR
Software:	IR Data Manager Version 3.30 von Fa Perkin-Elmer, Waltham, USA

3.6 ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren von Polysacchariden zeigen keine so gute Auflösung wie Spektren kleinerer, einfach gebauter Moleküle wie z.B. Ibuprofen. Da es sich beim AGP um ein aufgereinigtes Heteropolysaccharid handelt, kommen noch erschwerend Überlagerungen und Multiplikationen von Signalen hinzu. Trotzdem liefert diese Methode weitere Ergebnisse zur Strukturaufklärung von AGPs, da Rückschlüsse über die Konfiguration enthaltener Zucker gezogen werden können.

Es wurde ein ^{13}C -NMR-Spektrum eines Roh-AGPs aus Weizen (T3Y2) aufgenommen (75,47 MHz, 300 K thermostatisiert, Kernresonanzspektrometer ARX300, Fa Bruker, Rheinstetten). Dazu wurden etwa 10 mg/ml der zu untersuchenden Substanz in D_2O gelöst. Das Lösungsmittel enthielt Dioxan in einer Konzentration von 0,01% als Standard, dieser erfuhr eine chemische Verschiebung von 65 ppm. Durch den Vergleich mit Daten der chemischen Verschiebungen aus verschiedenen Literaturquellen konnte das Spektrum ausgewertet werden.

4 Immunologische Methoden

4.1 Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Hafer-AGPs

Für die Immunisierung wurden in Anlehnung an CLASSEN et al. (2004) in Kooperation mit Dr. Ilse Zündorf der Abteilung Pharmazeutische Biologie der Goethe-Universität in Frankfurt am Main etwa 50 μg eines aufgereinigten Hafer-AGPs mit PBS/Freunds unvollständiges Adjuvands zu einem Endvolumen von 200 μl aufgefüllt und intraperitoneal in eine BALB/c Maus alle 2-3 Wochen für 3 Monate injiziert. Eine abschließende Injektion wurde drei Tage vor der Zellpräparation gegeben. Nach Einschläferung der Maus wurde unter sterilen Bedingungen die Milz entnommen. Aus diesem Material wurden die Lymphozyten mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, ein standardisiertes Nährmedium für Zellkultur mit breiter Verwendbarkeit für verschiedene tierische Zellen) ohne fötales Kälberserum (FCS) herausgewaschen und nach einer Zentrifugation (200 g für 5 min) geerntet. Die so erhaltenen Zellen (etwa 10^8) wurden von Erythrozyten durch Zugabe von 1 ml

Ammoniumchlorid in 0,01 M Tris-Puffer (8,3 g/l) zur Durchführung einer Zelllyse befreit und nochmals abzentrifugiert. Die erhaltenen Lymphozyten wurden im Verhältnis 1:1 mit serumfreien, gewaschenen NS-1-Myelomzellen gemischt und erneut abzentrifugiert. Danach wurde 1 ml PEG 4000 tropfenweise zum Zellzentrifugat gegeben, während leicht in einem Wasserbad bei 37°C geschüttelt wurde. Die nun fusionierten Zellen wurden durch eine Wäsche in serumfreiem DMEM und anschließender Zentrifugation (100 g, 5 min bei Raumtemperatur) von PEG befreit. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ in DMEM mit 20% FCS-Zusatz, 10% Hybridoma Enhancing Supplement (Fa Sigma, Osterode), einer Einheit Antibiotics/Antimycotics (Fa Sigma, Osterode) und 0,1% Gentamycin wurden die fusionierten Zellen auf 10 ELISA-96-well-Microtiterplatten verteilt. Die Selektion der Hybridom-Klone wurde am darauf folgenden Tag mit DMEM mit Zusatz von Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin (HAT-Medium, Fa Sigma, Osterode) begonnen und für die nächsten zwei Wochen weitergeführt. Die Überstände der gewachsenen Klone wurde auf eine Antikörperproduktion gegen Hafer-AGP mittels ELISA getestet (siehe B 5.3).

4.2 Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen β -Yariv-Reagenz

Um eine Bildung von Antikörpern gegen ein so kleines Molekül wie das β -Yariv-Reagenz (Hapten) zu ermöglichen, musste β -Yariv-Reagenz zunächst nach BOSSY et al. (2009) an ein Protein gekoppelt werden.

Deshalb wurde Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) zunächst gegen Natriumhydrogencarbonat-Puffer (50 mM, pH 8,5) dialysiert und auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt. Weiterhin wurde eine Lösung von 10

mg/ml β -Yariv-Reagenz für eine Stunde mit Natriumperjodat (0,95 mol/mol β -Yariv-Reagenz) inkubiert. Beide Lösungen wurden vereinigt und fünf Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem Natriumcyanoborhydrid (10 mol/mol β -Yariv-Reagenz) im Überschuss zugegeben wurde, wurde der Reaktionsansatz mit Essigsäure auf pH 4 eingestellt und erneut 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Eine im Anschluss durchgeführte Ultrafiltration bei 20°C mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa mit 3 M Harnstofflösung diente der Entfernung von ungekoppeltem β -Yariv-Reagenz. Das Retentat wurde in PBS-Puffer pH 7,4 aufgenommen (1 mg/ml) und filtriert (0,2 μ m, Fa Squarix GmbH, Marl).

Erst jetzt konnte diese Lösung, zum gleichen Teil mit komplettem Freund-Adjuvands (KFA) versetzt, viermal in zwei New Zealand White Kaninchen subcutan injiziert werden (0,3 mg gekoppeltes β -Yariv-Reagenz pro Injektion und Tier, Charles River, Kießlegg).

Das gewonnene Antiserum wurde mit Ammoniumsulfat präzipitiert, in PBS-Puffer wieder gelöst und schließlich gegen PBS-Puffer mit 0,05% NaN₃ dialysiert. Die IgG-reiche Fraktion wurde anhand einer Affinitätschromatographie durch Kopplung von β -Yariv-Reagenz an der Säule aufgereinigt.

4.3 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Antikörper gegen β -Yariv-Reagenz

Für einen ELISA mit polyklonalen Antikörpern (hergestellt in Kaninchen nach B 5.2) gegen β -Yariv-Reagenz wurden pro Kavität der ELISA-Platte je 100 μ l einer Weizen-, Roggen- oder Hafer-AGP-Lösung (je nach Schema 0,1-5 oder 5-100 μ g/ml in PBS-Puffer) aufgetragen (Dreifachbestimmung). Über Nacht wurde bei 37°C ohne Deckel inkubiert. Die Lösung trocknete so ein, und AGP konnte

maximal am Boden der Platte binden. Am nächsten Tag folgte ein Waschschrift, bei dem die Platte dreimalig mit je 200 µl PBS-Puffer mit Tween gewaschen wurde, um ungebundene Bestandteile zu entfernen. Danach wurden je 200 µl einer 1%igen bovinen Serumalbumin-Lösung (BSA-Lösung) in PBS-Puffer aufgetragen und 1 h bei 37°C inkubiert, um freie potentielle Bindungsstellen auf der Platte zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer mit Tween folgte ein Auftrag von je 100 µl β -Yariv-Reagenz-Lösung (1 mg/ml in 0,15 M NaCl), welche eine Stunde bei 37°C inkubierte. Nach einem Waschschrift wurden nun jeweils 100 µl eines Yariv-Antikörpers (aus Kaninchen, Elution E bzw. Elution Q, Fa Squarix GmbH, Marl) in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde wieder durch Waschen entfernt, bevor je 100 µl eines Anti-Kaninchen IgG mit gekoppelter alkalischer Phosphatase in 1:500 Verdünnung aufgetragen wurde, worauf eine einstündige Inkubation bei 37°C erfolgte. Etwa 15 Minuten vor Gebrauch wurde je eine Tablette des Enzymsubstrats aus dem Sigma-fast Kit (Fa Sigma-Aldrich, USA) in 20,0 ml Aqua bidest. gelöst (*p*-Nitrophenylphosphat: 0,1 mg/ml in 0,2 M Tris-Puffer) und nach Ablauf der Inkubationszeit dann je 100 µl der Substrat-Lösung rasch aufgetragen. Nach erstmals 4 Minuten und dann in weiteren 5-Minuten-Abständen wurde bei 405 nm als Messfilter gegen einen Referenzfilter (690 nm) vermessen.

JIM8, LM2, LM6 als monoklonale Antikörper gegen verschiedene spezifische Kohlenhydrat-Epitope

Für einen indirekten ELISA mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene spezifische Kohlenhydrat-Epitope wurden pro Kavität der ELISA-Platte je 100 µl einer Weizen-, Roggen- oder Hafer-AGP-Lösung (je nach Schema 5-100 µg/ml in PBS-Puffer) aufgetragen (Einfach- und Dreifachbestimmung). Über Nacht wurde bei 37°C ohne Deckel inkubiert. Am nächsten Tag folgte ein Waschschrift, bei

dem die Platte dreimalig mit je 200 μ l PBS-Puffer mit Tween gewaschen wurde. Danach wurden je 200 μ l einer 1%igen BSA-Lösung in PBS-Puffer aufgetragen und eine Stunde bei 37°C inkubiert, um freie Bereiche zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer mit Tween folgte ein Auftrag von je 100 μ l des monoklonalen Antikörpers (JIM8 in der Verdünnung 1:40, LM2 in der Verdünnung 1:80 und LM6 in der Verdünnung 1:40 mit PBS-Puffer (KNOX, 1997, SAMAJ et al., 2000; WILLATS et al., 1998) und nachfolgende einstündige Inkubation bei 37°C. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen entfernt, bevor je 100 μ l eines Anti-Ratten IgG mit alkalischer Phosphatase in 1:500 Verdünnung aufgetragen wurde, der eine Stunde bei 37°C inkubieren musste. Etwa 15 Minuten vor Gebrauch wurde je eine Tablette des Enzymsubstrats des Sigma-fast Kits in 20,0 ml Aqua bidest. gelöst (*p*-Nitrophenylphosphat: 0,1 mg/ml in 0,2 M Tris-Puffer) und nach Ablauf der Inkubationszeit dann je 100 μ l der Substrat-Lösung rasch aufgetragen und nach erstmals 4 Minuten und dann in weiteren 5-Minuten-Abständen bei 405 nm als Messfilter gegen einen Referenzfilter (690 nm) vermessen.

4B8D3 und 639 „Q“ als Antikörper gegen Epitope eines AGPs aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea*

Weiterhin wurde mit eigens gegen Epitope eines AGPs aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* hergestellten Antikörpern (ein monoklonaler Antikörper 4B8D3, 2. Charge [CLASSEN et al., 2004] und ein polyklonaler Antikörper 639 „Q“ 1,8 mg/ml [CLASSEN et al., 2005]) für einen ELISA eine ELISA-Platte pro Kavität mit je 100 μ l Hafer-AGP aufsteigender Konzentrationen von 0,1 mg/ml bis 5 mg/ml beschichtet und über Nacht bei 37°C ohne Deckel inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit PBS-Puffer mit 1% Tween gewaschen, um noch freie Bindungsstellen der Platte mit Hilfe von je 200 μ l pro Kavität einer 1%igen BSA-Lösung in PBS-Puffer besetzen zu lassen. Dazu wurde eine Stunde bei 37°C

inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer mit Tween folgte ein Auftrag von je 100 µl des monoklonalen Antikörpers (Verdünnung 1:100) bzw. des polyklonalen Antikörpers (Verdünnung 1:100) und anschließend eine einstündige Inkubation bei 37°C. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen entfernt, bevor je 100 µl eines Anti-Maus IgG mit alkalischer Phosphatase beim monoklonalen Antikörper bzw. Anti-Ratten IgG mit alkalischer Phosphatase beim polyklonalen Antikörper in einer 1:500 Verdünnung aufgetragen wurden, der eine Stunde bei 37°C inkubieren musste. Etwa 15 Minuten vor Gebrauch wurde je eine Tablette mit Enzymsubstrat aus dem Sigma-fast Kit in 20,0 ml Aqua bidest. gelöst (*p*-Nitrophenylphosphat: 0,1 mg/ml in 0,2 M Tris-Puffer) und nach Ablauf der Inkubationszeit dann je 100 µl des Reagenzes rasch aufgetragen. Nach erstmals einer Minute und dann in weiteren 3-Minuten-Abständen wurde bei 405 nm als Messfilter gegen einen Referenzfilter (690 nm) vermessen.

1B6, 4A1, 7B5, 7B6 und 7E3 als monoklonale Antikörper gegen Epitope des Hafer-AGPs

Für einen indirekten ELISA mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene spezifische Kohlenhydrat-Epitope des Hafer-AGPs wurden pro Kavität der ELISA-Platte je 100 µl einer Hafer-AGPs-Lösung (0,1-5 µg/ml in PBS-Puffer) aufgetragen (Zweifachbestimmung). Über Nacht wurde bei 37°C ohne Deckel inkubiert. Am nächsten Tag folgte ein Waschschrift, bei dem die Platte dreimalig mit je 200 µl PBS-Puffer mit Tween gewaschen wurde. Danach wurden je 200 µl einer 1%igen BSA-Lösung in PBS-Puffer aufgetragen und eine Stunde bei 37°C inkubiert, um freie Bereiche zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer mit Tween folgte ein Auftrag von je 100 µl des monoklonalen Antikörpers (in der Verdünnung 1:10) und nachfolgende einstündige Inkubation bei 37°C. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen entfernt, bevor je 100 µl eines Anti-Maus IgG mit alkalischer Phosphatase in 1:1000 Verdünnung aufgetragen

wurden, der einer Stunde bei 37°C inkubieren musste. Etwa 15 Minuten vor Gebrauch wurde je eine Tablette des Enzymsubstrats des Sigma-fast Kits in 20,0 ml Aqua bidest. gelöst (*p*-Nitrophenylphosphat: 0,1 mg/ml in 0,2 M Tris-Puffer) und nach Ablauf der Inkubationszeit dann je 100 µl des Reagenzes rasch aufgetragen. Nach erstmals 4 Minuten und dann in weiteren 5-Minuten-Abständen wurde bei 405 nm als Messfilter gegen einen Referenzfilter (690 nm) vermessen.

Brutschrank:	Elektronisch geregelter Wärmeschrank BE 200 Fa Memmert, Schwabach
ELISA- Platten:	96-well Nunc Immuno® Plates Maxisorp® Surface Fa Nunc, Langenselbold
Washer:	Tecan® Columbus Plus, Fa Tecan Group Ltd., Männedorf
Reader:	Tecan® Spectra Thermo, Fa Tecan Group Ltd.
PBS-Puffer:	Na ₂ HPO ₄ 5,82 g NaH ₂ PO ₄ 0,95 g NaCl 16,30 g KCl 0,40 g ad 2,0 l mit Aqua bidest., pH 7,4
PBS-Puffer mit Tween:	PBS-Puffer mit Zusatz von 1 g Tween20

5 FITC-Markierung der AGPs in pflanzlichen Geweben

β-Yariv-Reagenz bindet an AGPs in pflanzlichen Präparaten. Polyklonale Anti-Yariv-Antikörper (hergestellt nach B 5.2) binden das β-Yariv-Reagenz und können über FITC-markierte Sekundär-Antikörper durch Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) sichtbar gemacht werden (Schema siehe Abbildung 12). Zur Durchführung einer Immunmarkierung der AGPs am Pflanzenschnitt wurden Querschnitte des Sprosses und der Wurzel von Haferpflanzen im halbautomatischen Mikrotom angefertigt.

TBS-Puffer:

50 ml 0,2 M Tris und 30 ml 5 M NaCl mit H₂O bidest ad 100 ml

Verdünnungspuffer:

TBS-Puffer mit 0,3% BSA und 0,1% Tween20

Blockierpuffer:

TBS-Puffer mit 3% BSA

Mowiol-DABCO:

Zur Herstellung des Reagenzes zur Fluoreszenz-Verzögerung wurden 6 g Glycerol (analytical grade) mit 2,4 g Mowiol 4-88 (Fa Calbiochem, San Diego, USA), 6 ml Aqua bidest., 12 ml 0,2 M Tris, pH 8 und 0,1% 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) versetzt und über Nacht auf dem Magnetrührer gerührt. Die resultierende Suspension wurde bei Raumtemperatur für zwei Stunden 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 aufgeteilt und in kleinen Portionen bei -20°C gelagert.

Die einzelnen Schnitte der Frischpflanzen wurden in -20°C Aceton überführt und wenn nötig, 30 min bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Danach wurden die Objekte 30 min in PBS-Puffer gegeben. Nach einer einstündigen Behandlung auf dem Schüttler mit Blockierpuffer wurde auf die Schnitte jeweils ein Tropfen β -Yariv-Reagenz (1 mg/ml in 0,15 M NaCl wässriger Lösung) gegeben und 1,5 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurde hier eine Lösung α -Yariv-Reagenz gleicher Konzentration eingesetzt. Um nicht gebundenes β -Yariv-Reagenz bzw. α -Yariv-Reagenz zu entfernen, wurde dreimal 5 min mit PBS-Puffer gespült. Danach wurde ein polyklonaler Antikörper gegen KLH-gekoppeltes β -Yariv-Reagenz (1:25 aus Kaninchen, Elution Q) auf die Yariv-behandelten Schnitte gegeben und für eine Stunde in der Feuchtkammer inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Antikörper im PBS-Puffer-Bad dreimal für 5 min abgewaschen. In der Feuchtkammer wurden nun zweimal für 5 min Verdünnungspuffer auf die Schnitte getropft. Es folgte der FITC-markierte Sekundär-Antikörper (FITC-Anti-Kaninchen, 1:100 verdünnt), welcher ebenfalls in Tropfen inkubierte. Nach einer Stunde wurde der Sekundär-Antikörper mit

PBST-Puffer dreimal für 5 min abgewaschen, und die Schnitte kurz mit Aqua dem. gewaschen, um überschüssigen Puffer zu entfernen.

Aus einem aufgetauten Aliquot Mowiol-DABCO wurde zur Fluoreszenz-Verzögerung ein kleiner Tropfen auf den mikroskopischen Schnitt gegeben. Auf diesen Tropfen wurde ein Deckgläschen aufgebracht. Nach ca. 12 h war das Mowiol auspolymerisiert, und das Objekt konnte mit Hilfe der CLSM betrachtet werden.

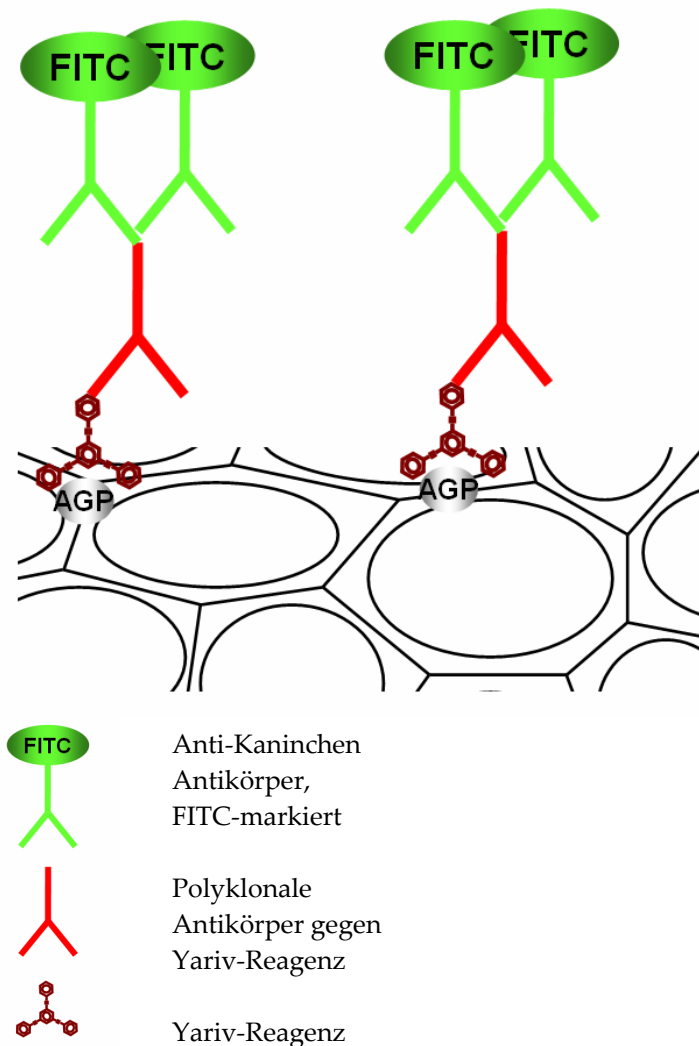


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Immunmarkierung mit Yariv-Reagenz

Zum Vergleich der Immunmarkierung der AGPs mit β -Yariv-Reagenz mit einer Immunmarkierung mit monoklonalen Antikörpern wurde eine Markierung mit dem gegen Hafer-AGP gerichteten monoklonalen Antikörper 4A1 (hergestellt nach B 5.1) durchgeführt.

Dazu wurden die einzelnen Schnitte der Frischpflanzen in -20°C Aceton überführt und bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden die Schnitte 30 min in PBS-Puffer gegeben. Nach einer einstündigen Behandlung auf dem Schüttler mit Blockierpuffer wurden auf die Schnitte jeweils 5 Tropfen des unverdünnten monoklonalen Antikörpers 4A1 gegeben und 1,5 h inkubiert. Als Negativkontrolle ließ man hier den Antikörper 4A1 weg. Um nicht gebundenen Antikörper 4A1 zu entfernen, wurde dreimal 5 min mit PBS-Puffer gespült. In der Feuchtkammer wurden nun zweimal für 5 min Verdünnungspuffer auf die Schnitte getropft. Es folgte der FITC-markierte Sekundär-Antikörper (FITC-Anti-Maus, 1:100 verdünnt), welcher ebenfalls in Tropfen inkubiert. Nach einer Stunde wurde der Sekundär-Antikörper mit PBST-Puffer dreimal für 5 min abgewaschen, und die Schnitte noch einmal mit Aqua dem. gewaschen, um überschüssigen Puffer zu entfernen.

Aus einem aufgetauten Aliquot Mowiol-DABCO wurde zur Fluoreszenz-Verzögerung ein kleiner Tropfen auf den mikroskopischen Schnitt gegeben. Auf diesen Tropfen wurde ein Deckgläschen aufgebracht. Nach ca. 12 h war das Mowiol auspolymerisiert, und das Objekt konnte mit Hilfe der CLSM betrachtet werden.

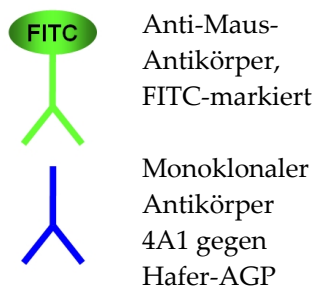
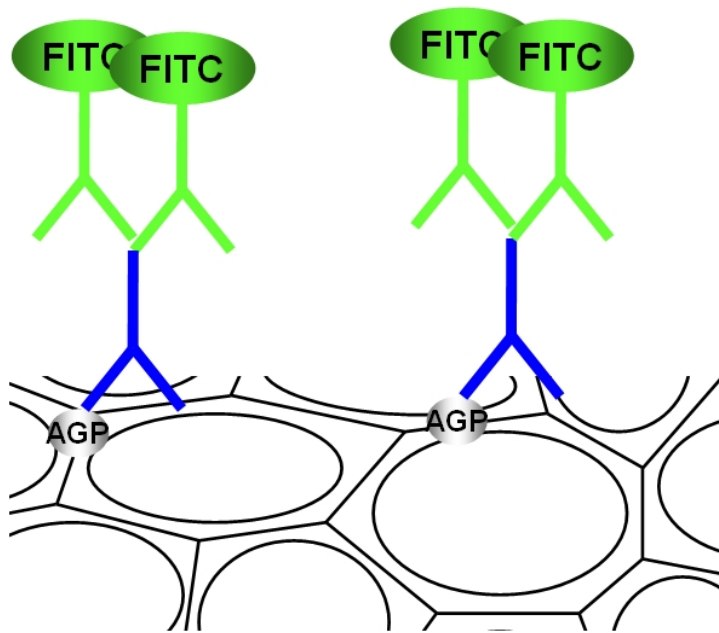


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Immunmarkierung mit den monoklonalen Antikörpern 4A1

Gerät: TCS SP, Fa Leica, Wetzlar
Software: Leica Confocal Software (Lite Version 2611537 zur Nachbearbeitung), Fa Leica, Wetzlar

C Ergebnisse

1 Isolierung und Ausbeute

Die hochmolekularen Retentate wurden nach Methode B 1.2 hergestellt. Das Waschen mit Ethanol 96% soll außen auf der Droge anhaftende Pilze und Bakterien (nebst Lipopolysacchariden), Staub und andere unerwünschte Fremdbestandteile entfernen. AGP selbst ist in Ethanol 96% nicht löslich, sondern löst sich erst bei der wässrigen Mazeration. Die danach eingesetzte Tinkturenpresse soll grobe, feste Bestandteile abtrennen. Die erste Zentrifugation diente der Abtrennung der Stärkekörner, die zweite Zentrifugation der Abtrennung der hitzedenaturierten Proteine. Die hochmolekularen dialysierten Retentate wurden nach dem Anfangsbuchstaben des lateinischen Gattungsnamens bezeichnet. Es folgt eine Ziffer, mit der die Retentate in der Reihenfolge ihrer Entstehung durchnummeriert wurden. Für das aus einem Retentat gewonnene Roh-AGP (also einer einfachen Yariv-Fällung) wurde ein Y angehängt und ebenfalls nach der Reihenfolge ihrer Isolierung durchnummeriert. Für ein aus Roh-AGP gewonnenes aufgereinigtes AGP (also einer zweifachen Yariv-Fällung) wurde nochmals ein Y mit entsprechender Ziffer angehängt. Der Buchstabe S statt einer Ziffer steht für gepoolte Yariv-Fällungen, aus denen dann aufgereinigtes AGP über eine zweite Yariv-Fällung gewonnen werden konnte (so ist z.B. A5YSY1 ein aufgereinigtes AGP, welches aus gepooltem Roh-AGP aus Hafer nochmals gefällt wurde).

Es wurden insgesamt zwei hochmolekulare Retentate aus Roggenfrüchten, fünf Retentate aus Weizenfrüchten und sechs Retentate aus ganzen Haferfrüchten nach B 1.2 hergestellt, die nach Aufreinigung nach B 1.3 als Ausgangsmaterial für Yariv-Fällungen nach B 1.4.2 dienten. Die Ausbeute der hochmolekularen Fraktion aus dem Drogenmaterial betrug durchschnittlich 0,9% bei Weizen, 1,5%

bei Roggen und 0,6% bei Hafer. Dabei war die Ausbeute des ersten Weizenretentats, des ersten Roggenretentats und des ersten Haferretentats mit 1,2%, 2,2% und 1,4% etwas höher, jedoch wurde bei diesen Retentaten auch keine α -Amylase Behandlung durchgeführt. Die Ausbeute der Roh-AGPs berechnet auf das verwendete Drogenmaterial, unabhängig ob aus Weizen, Roggen oder Hafer stammend, lag bei durchschnittlich 0,01%. Nach Durchführung einer erneuten Yariv-Fällung als Aufreinigungsschritt halbierte sich die Ausbeute noch einmal (0,005%).

2 Geldiffusionstest

Anhand des Geldiffusionstests konnte man auf Anwesenheit von mit β -Yariv-Reagenz fällbaren AGPs testen. Bei der höheren Konzentration (100 mg/ml) der hochmolekularen Fraktionen aus Weizen und Hafer zeigen sich nach 24 h Inkubation deutliche Präzipitationsbanden, die hochmolekulare Fraktion aus Roggen lässt nur eine schwache Präzipitationsbande erkennen (Abbildung 14). So sind also mit β -Yariv-Reagenz fällbare AGPs in den hochmolekularen Fraktionen der Getreidefrüchte vorhanden.

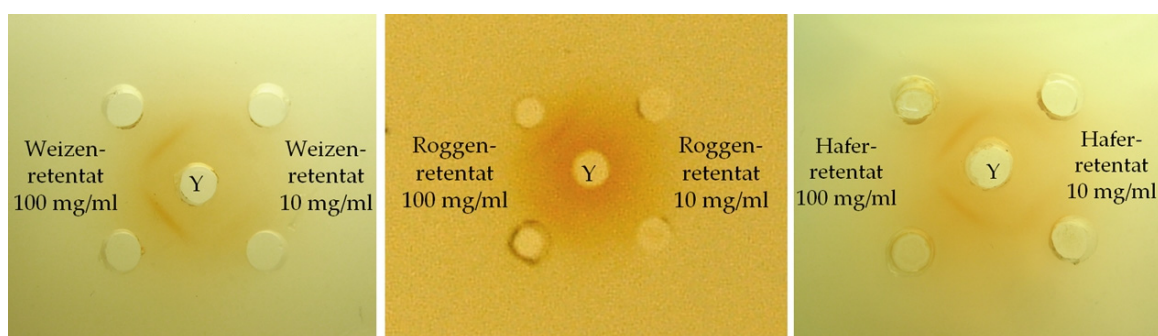


Abbildung 14: Geldiffusionstest der Getreide-Retentate mit β -Yariv-Reagenz (Y, 1mg/ml)

Der Geldiffusionstest mit β -Yariv-Reagenz (1 mg/ml) und den aus den Retentaten isolierten Getreide-AGPs (1 mg/ml) zeigt eine spezifische Reaktion in Abbildung 15 durch orangefarbene Präzipitationsbanden. Dabei ist die Präzipitationsbande des Hafer-AGPs mit β -Yariv-Reagenz stärker ausgeprägt als die Banden des Weizen- und des Roggen-AGPs mit β -Yariv-Reagenz. Auch der Abstand der Banden zur Kavität mit β -Yariv-Reagenz ist beim Hafer-AGP geringer, da die Fällung bevorzugt bei gleicher Konzentration von β -Yariv-Reagenz und AGP stattfindet.

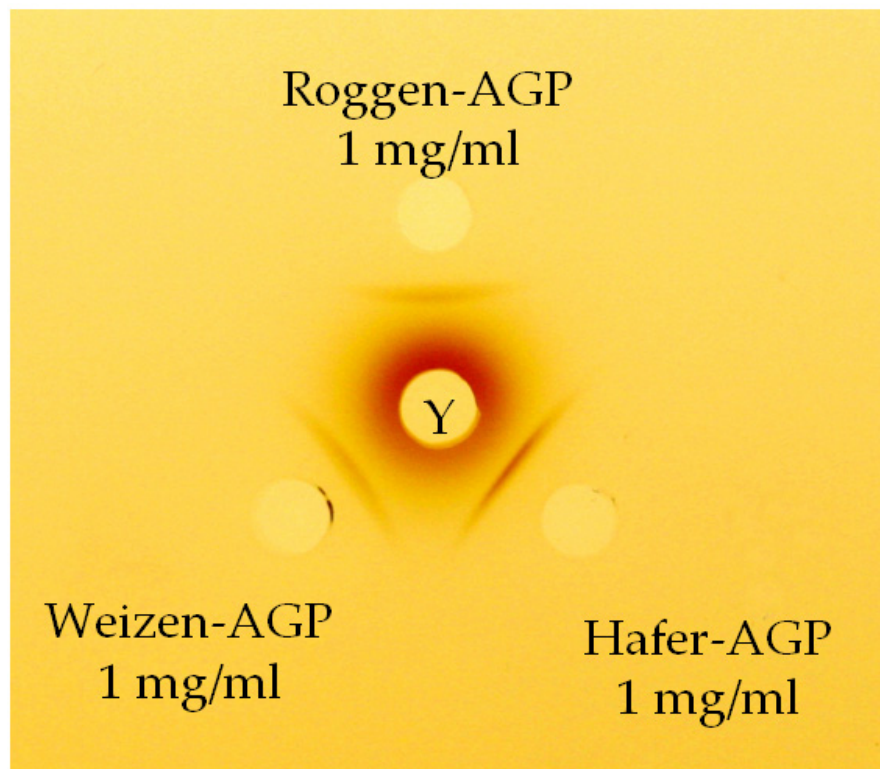


Abbildung 15: Geldiffusionstest mit Getreide-AGPs und β -Yariv-Reagenz (Y, 1mg/ml)

3 Charakterisierung des Kohlenhydratanteils

3.1 Neutralzuckerzusammensetzungen der hochmolekularen Fraktionen

Durch eine Acetylierungsanalyse (siehe B 3.1.1) wurde die Neutralzuckerzusammensetzung in den einzelnen hochmolekularen Fraktionen gaschromatographisch bestimmt. Dies diente u.a. der Ermittlung des Arabinose- und des Galatosegehaltes im Retentat, um anhand dieser Daten den AGP-Gehalt im Retentat abzuschätzen, da eine Präzipitation zur Isolierung des AGPs mit β -Yariv-Reagenz im Verhältnis 1:1 stattfindet. In Abbildung 16 sieht man ein typisches Gaschromatogramm der Acetylierungsanalyse einer hochmolekularen Fraktion aus Weizen, in dem die Signale der Alditolacetate gut aufgetrennt wurden.

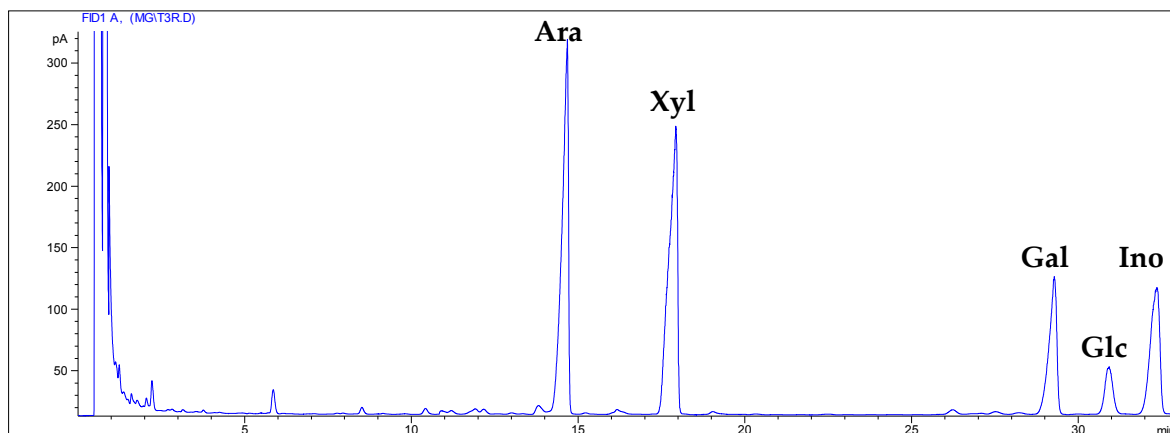


Abbildung 16: Gaschromatogramm der Alditolacetate aus Retentat T3

Die Neutralzuckerzusammensetzung der hochmolekularen Fraktionen gestaltet sich heterogen (siehe Tabelle 2): Die hochmolekularen Fraktionen aus Weizen (T1-T5) zeichnen sich neben schwankenden Gehalten an Arabinose (etwa 30%), Galactose (etwa 23%) und Glucose (etwa 10%) durch einen hohen Xylosegehalt aus (bis 43%, siehe Tabelle 2). Retentat T1 wurde noch keiner Behandlung mit α -Amylase unterzogen; hier liegt der Glucosegehalt deutlich höher als bei den

Ergebnisse

Retentaten T2-T5, weshalb T1 aus der Berechnungsgrundlage für Abbildung 17 herausgenommen wurde. Rhamnose, Fucose und Mannose kommen auch in den gewonnenen hochmolekularen Fraktionen des Weizens vor, jedoch nur bis zu etwa 1%.

Tabelle 2: Neutralzuckerzusammensetzung der Retentate aus Weizenfrüchten

Zucker [% (m/m)]	T1	T2	T3	T4	T5
Rhamnose	0,5	0,2	0,6	0,4	-
Fucose	0,4	0,4	0,7	0,5	-
Arabinose	24,7	29,4	35,5	31,0	25,4
Xylose	23,9	33,0	38,7	24,9	42,9
Mannose	0,9	0,8	0,1	1,4	1,0
Galactose	15,6	19,8	17,0	27,9	25,4
Glucose	34,0	16,4	7,4	13,9	5,2
Ausbeute %	35,4	33,5	58,7	31,9	17,0
Ara/Gal	1/0,6	1/0,7	1/0,5	1/0,9	1/1,0

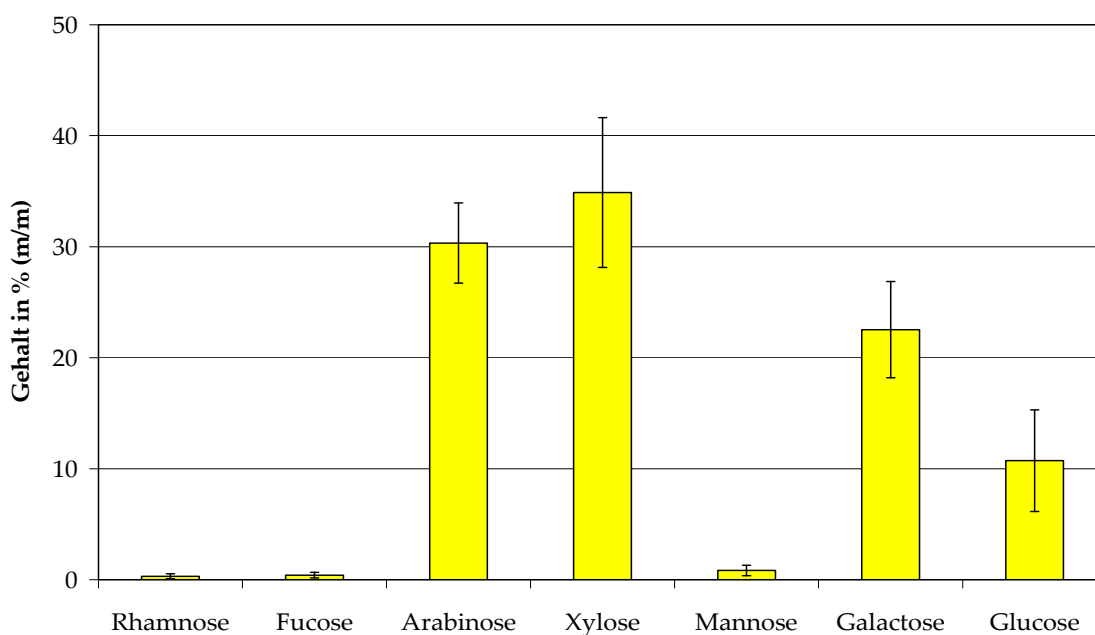


Abbildung 17: Durchschnittliche Neutralzuckerzusammensetzung der hochmolekularen Fraktionen T2-T5 aus Weizenfrüchten

Ähnlicher sind sich die hochmolekularen Fraktionen aus Roggen (S1-S2, siehe Abbildung 18): Hier liegt der Arabinosegehalt bei etwa 30%, Xylose kommt

sogar bis zu 47% vor, wohingegen Galactose nur 5% der Neutralzucker ausmacht. Glucose kommt in der hochmolekularen Fraktion des Roggens bis zu 17% vor. Weiterhin kommen Rhamnose, Fucose und Mannose vor, jedoch eher in geringen Anteilen von bis zu 4%. Der Galactosegehalt in den hochmolekularen Fraktionen von Roggenfrüchten ist geringer als der in den hochmolekularen Fraktionen aus Weizenfrüchten.

Tabelle 3: Neutralzuckerzusammensetzung der Retentate aus Roggensaar

Zucker [% (m/m)]	S1	S2
Rhamnose	0,5	0,2
Fucose	0,3	0,4
Arabinose	30,6	29,0
Xylose	45,7	47,4
Mannose	1,0	3,9
Galactose	5,1	4,6
Glucose	16,8	14,6
Ausbeute %	36,5	43,0
Ara/Gal	1/0,2	1/0,2

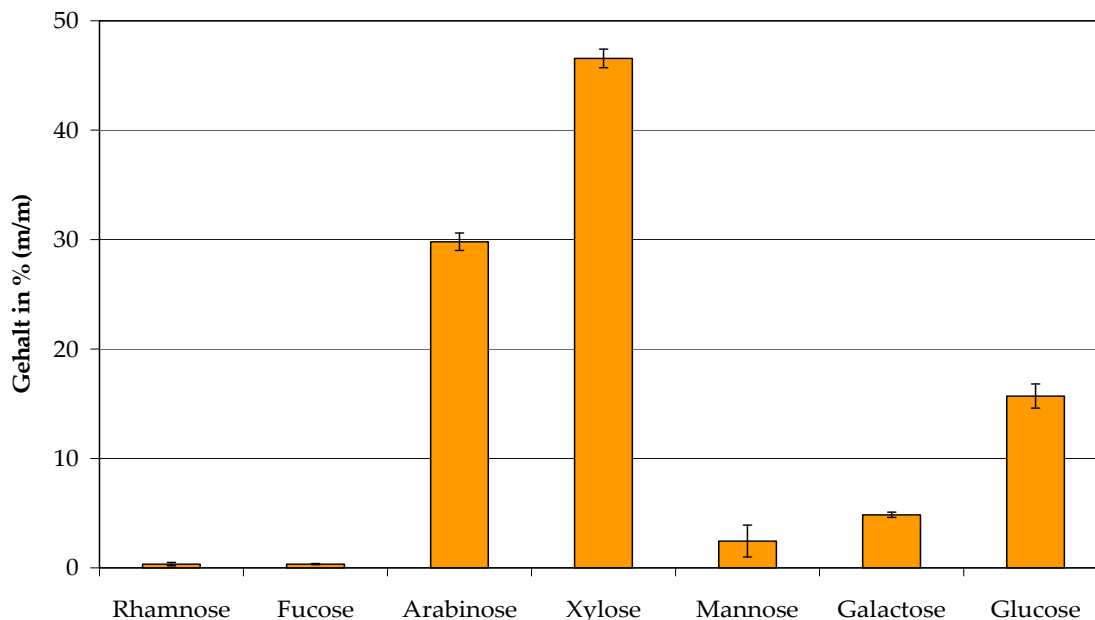


Abbildung 18: Durchschnittliche Neutralzuckerzusammensetzung der hochmolekularen Fraktionen S1 und S2 aus Roggenfrüchten

Den niedrigsten Xylosegehalt mit maximal 15% weisen die hochmolekularen Fraktionen der Haferfrüchte auf (A2-A6, siehe Tabelle 4). Da Retentat A1 noch nicht mit α -Amylase behandelt wurde, weist es mit 76% Glucose einen viel höheren Gehalt auf als die folgenden Retentate mit maximal 21% Glucose. Die mit α -Amylase behandelten Extrakte aus Haferfrüchten zeigen in der Neutralzuckeranalyse einen Arabinosegehalt von bis zu 35% und einen Galactosegehalt von bis zu 38%. Rhamnose, Fucose und Mannose sind in geringeren Mengen zu finden (bis maximal 5%).

Tabelle 4: Neutralzuckerzusammensetzung der Retentate aus Hafersaat

Zucker [% (m/m)]	A1	A2	A3	A4	A5	A6
Rhamnose	0,1	1,2	0,9	0,6	1,0	1,1
Fucose	-	0,3	1,0	0,5	0,6	0,5
Arabinose	7,0	32,1	32,5	32,9	35,4	29,2
Xylose	3,2	14,6	10,7	13,4	12,5	13,4
Mannose	1,0	4,9	4,3	3,6	3,3	3,2
Galactose	13,1	30,6	38,2	32,0	35,2	31,9
Glucose	75,6	16,4	12,4	16,9	12,0	20,6
Ausbeute %	33,9	36,8	42,2	25,5	35,9	37,8
Ara/Gal	1/1,9	1/1,0	1/1,2	1/1,0	1/1,0	1/1,1

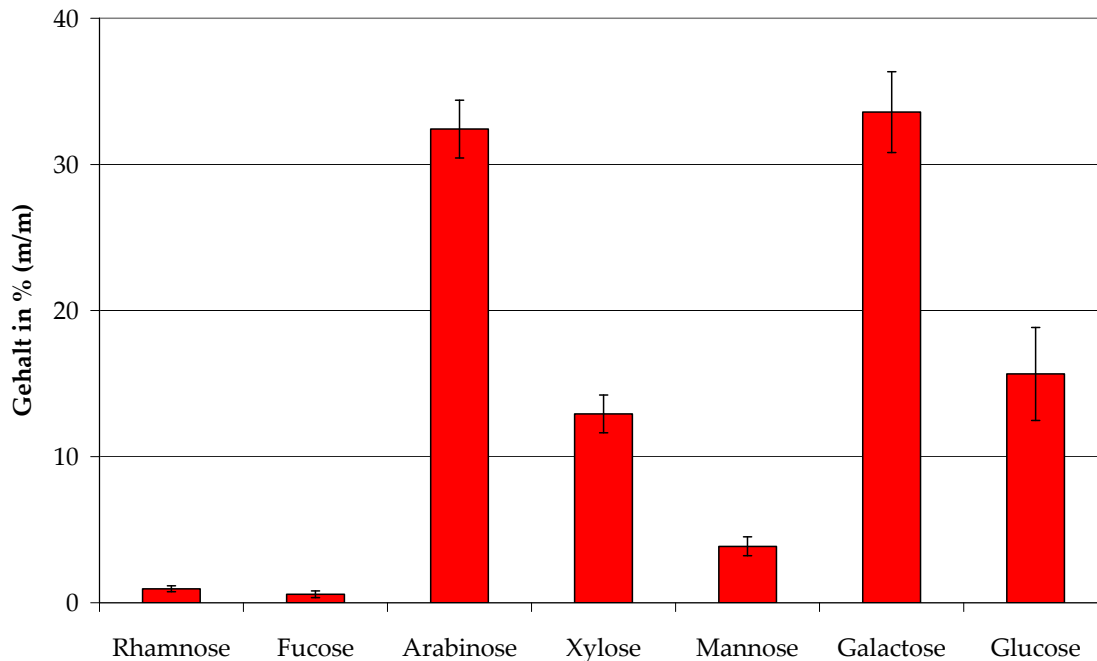


Abbildung 19: Durchschnittliche Neutralzuckerzusammensetzung der hochmolekularen Fraktionen A1-A6 aus Haferfrüchten

3.2 Neutralzuckerzusammensetzungen der AGPs

3.2.1 Neutralzuckerzusammensetzung der Roh-AGPs

Durch eine Acetylierungsanalyse wurden die Neutralzucker der einfach gefällten Roh-AGPs aus Getreide gaschromatographisch bestimmt. Exemplarisch ist in Abbildung 20 ein Gaschromatogramm der Acetylierungsanalyse eines Roh-AGPs aus Weizen dargestellt. Man erkennt deutlich die Signale der Alditolacetate, die aus Arabinose, Xylose, Galactose und Glucose entstanden sind. Inositol diente als interner Standard.

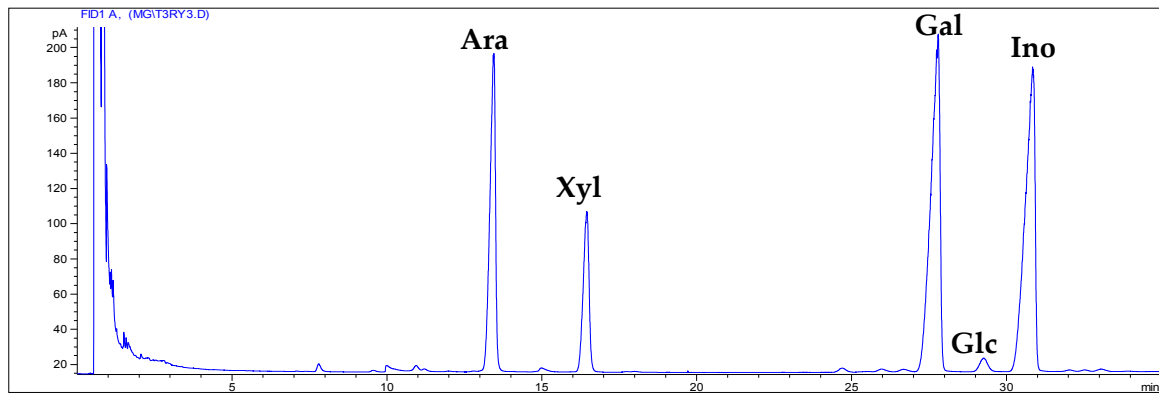


Abbildung 20: Gaschromatogramm der Alditolacetate eines Roh-AGPs aus Weizen (T3Y3)

In Tabelle 5 ist die durchschnittliche Neutralzuckerzusammensetzung der Roh-AGPs dargestellt, die nur über eine einmalige Fällung mit β -Yariv-Reagenz gefällt wurden. Arabinose mit etwa 31% und Galactose mit bis zu durchschnittlich 53% bilden die Hauptbestandteile der analysierten Roh-AGPs. Roh-AGP aus Weizen zeichnet sich außerdem durch einen hohen Xylose-Gehalt aus (16%). Fucose, Rhamnose und Mannose kommen nur in geringen Mengen vor. Das einfach gefällte AGP aus Roggen enthält mit 12% ebenfalls viel Xylose. Beim Roh-AGP aus Hafer liegt der Xylosegehalt mit knapp 3% wesentlich niedriger. Rhamnose, Fucose und Mannose kommen nur in geringen Mengen bis etwa 1% vor. Der Glucosegehalt des einfach gefällten Roggen-AGPs und des einfach gefällten Weizen-AGPs liegt zwischen 8-9%, der des Hafer-AGPs schon etwas höher bei durchschnittlich 14%. Ein Hinweis auf eine ungenügende Aufreinigung der Roh-AGPs durch eine nur einfache Yariv-Fällung ist die Tatsache, dass die isolierten Roh-AGPs aus einer Stamm-pflanze sich bisweilen stark unterscheiden (siehe Abbildung 21). Deshalb wurde das Material, das bei der ersten Yariv-Fällung anfiel, als Ausgangsmaterial für eine zweite Yariv-Fällung genutzt.

Tabelle 5: Durchschnittliche Neutralzuckerzusammensetzung von einfach gefällten AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer

Zucker [% (m/m)]	Ø einfach gefälltes Weizen-AGP, n=10	Ø einfach gefälltes Roggen-AGP, n=7	Ø einfach gefälltes Hafer-AGP, n=9
Rhamnose	0,6	0,4	0,9
Fucose	0,4	0,4	0,4
Arabinose	30,7	28,7	27,3
Xylose	15,7	12,1	2,5
Mannose	0,7	2,4	1,5
Galactose	44,4	47,2	53,0
Glucose	7,5	8,7	14,4

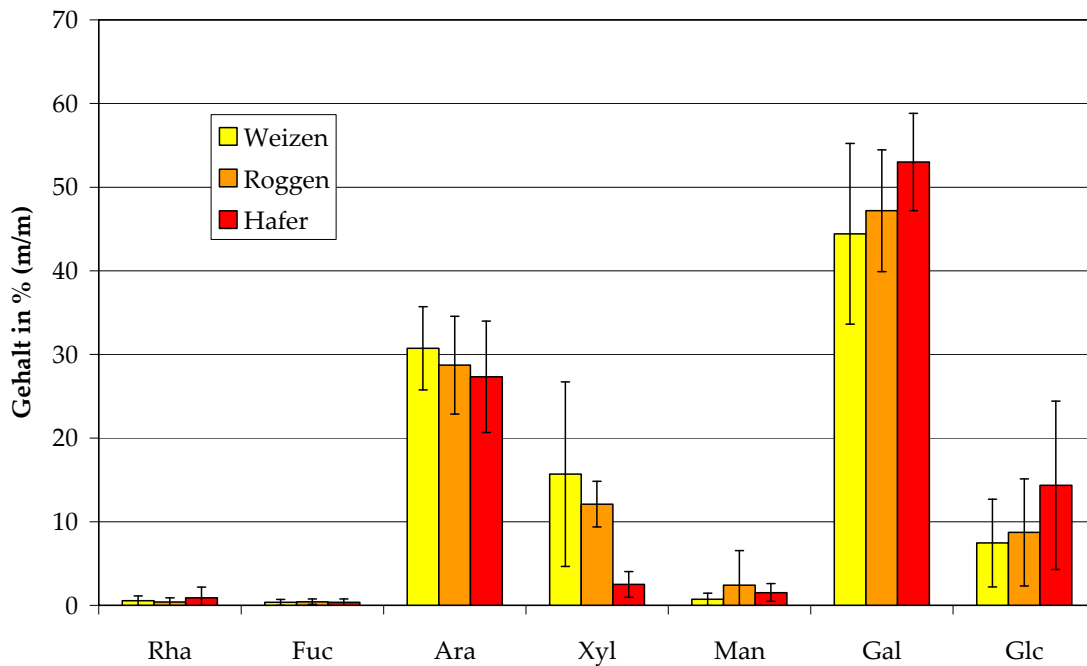


Abbildung 21: Durchschnittliche Neutralzuckerzusammensetzung einfach gefällter Roh-AGPs aus Weizen-, Roggen- und Haferfrüchten

3.2.2 Neutralzuckerzusammensetzung zweifach gefällter AGPs

Tabelle 6 stellt die Neutralzuckerzusammensetzungen von verschiedenen Fraktionen gegenüber, die beim Aufreinigungsschritt einer zweiten Yariv-Fällung aus einem Roggen-Roh-AGP anfielen. Dazu wurde gefriergetrocknetes

Roh-AGP in Aqua dem. gelöst. Da sich nicht alle Bestandteile des Roh-AGPs lösten, wurde die entstandene Suspension zentrifugiert und nur der Überstand als Ausgangsmaterial für eine zweite Yariv-Fällung verwendet. Dabei präzipitiert das aufgereinigte AGP, und im Überstand bleiben nicht mit β -Yariv-Reagenz präzipitierbare Stoffe. Auffällig sind der hohe Glucosegehalt des Zentrifugationsrückstands und der hohe Xylosegehalt im Überstand der zweiten Yariv-Fällung. Übrig blieb ein zweifach gefälltes und damit aufgereinigtes Roggen-AGP, welches zu 97% nur aus Arabinose und Galactose bestand, wobei der Galactosegehalt im Vergleich zum Arabinosegehalt nun höher lag als bei der ersten Yariv-Fällung.

Tabelle 6: Neutralzuckerzusammensetzung von Fraktionen einer zweiten Yariv-Fällung aus Roggen-AGP

Zucker [% (m/m)]	Roh-AGP S2Y5	Zentrifugations- rückstand	Zentrifugations- überstand	Aufgereinigtes AGP S2Y5Y1	Überstand zweifache Yariv- Fällung
Rhamnose	1,4	1,0	1,2	-	1,0
Fucose	0,9	2,9	-	0,6	0,1
Arabinose	34,2	13,5	36,5	33,1	30,0
Xylose	13,0	21,2	11,2	0,5	31,3
Mannose	0,5	5,7	-	-	1,3
Galactose	45,6	25,0	48,3	64,2	27,4
Glucose	4,5	30,6	2,8	1,7	8,9
Ausbeute %	60,0	11,5	85,3	51,2	46,2
Ara/Gal	1/1,3	1/1,8	1/1,3	1/1,9	1/0,9

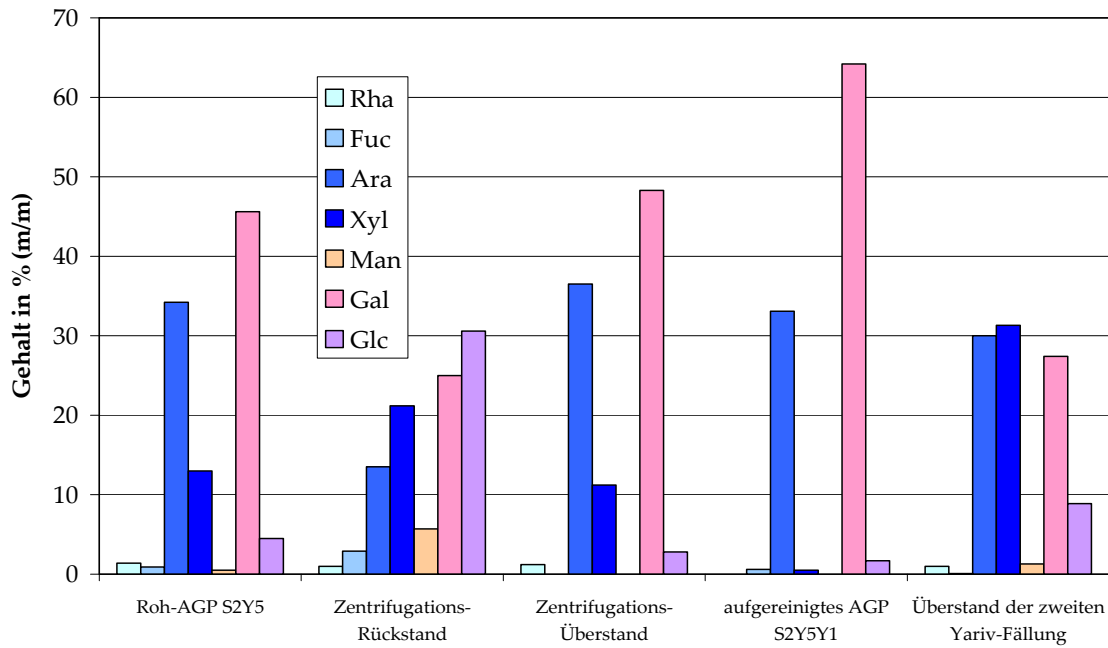


Abbildung 22: Neutralzuckerzusammensetzung verschiedener Fraktionen innerhalb einer zweifachen Yariv-Fällung

Die Ergebnisse der Acetylierungsanalyse der Getreide-AGPs, bei denen eine zweite Yariv-Fällung zur Aufreinigung durchgeführt wurde, werden in Tabelle 7 dargestellt. Alle aufgereinigten AGPs weisen einen Arabinosegehalt von über 30% auf, der Galactosegehalt liegt mit etwa 62% etwa doppelt so hoch. Restliche vorkommende Neutralzucker wie Rhamnose, Fucose, Xylose, Mannose und Glucose liegen im Gehalt immer unter 4%.

Tabelle 7: Neutralzuckerzusammensetzung von aufgereinigten AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer

Zucker [% (m/m)]	T3Y3Y1	S2Y5Y1	A3Y1Y1
Rhamnose	0,9	-	0,4
Fucose	-	0,6	0,8
Arabinose	37,0	33,1	32,0
Xylose	0,7	0,5	-
Mannose	0,3	-	1,3
Galactose	60,2	64,2	61,7
Glucose	0,9	1,7	3,8
Ausbeute %	72,0	51,2	55,7
Ara/Gal	1/1,6	1/1,9	1/1,9

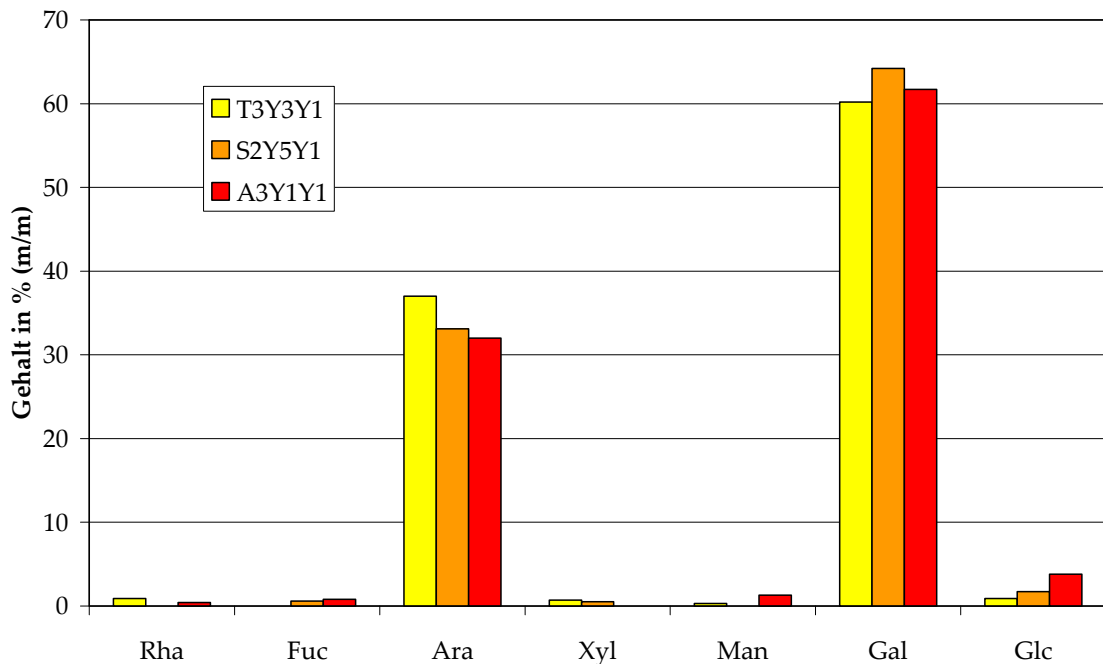


Abbildung 23: Vergleich der Neutralzuckerzusammensetzung zweifach gefällter AGPs aus Weizen-, Roggen- und Haferfrüchten

3.2.3 Neutralzuckerzusammensetzung mit Säure partialhydrolysierter AGPs

Im Zuge einer milden, sauren Hydrolyse nach B 3.1.6 wurden periphere, leicht abspaltbare Furanosen (z.B. im Fall der AGPs Arabinosen) eliminiert. So ist es möglich, zwischen terminal vorkommenden Arabinosen und Arabinosen, die ins Kohlenhydratgerüst mittig eingebaut sind, zu unterscheiden. Bleibt ein großer Rest des Kohlenhydratgerüsts übrig, so lagen terminale Arabinosen vor. Wird das Kohlenhydratgerüst weitestgehend abgebaut, so waren die Arabinosen unter anderem für eine Verknüpfung innerhalb des Kohlenhydratgerüsts verantwortlich. Der Arabinosegehalt der hydrolysierten Roh-AGPs (siehe Tabelle 8) nahm durch die milde Hydrolyse deutlich von etwa 27-31% auf 5-13% ab.

Tabelle 8: Ergebnisse der Neutralzuckeranalyse von partiell hydrolysierten AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer

Zucker [% (m/m)]	Weizen-AGP	Roggen-AGP	Hafer-AGP
Rhamnose	0,9	-	1,0
Arabinose	8,7	5,2	12,6
Xylose	7,6	13,7	1,2
Galactose	79,0	75,9	82,8
Glucose	3,8	5,2	2,5

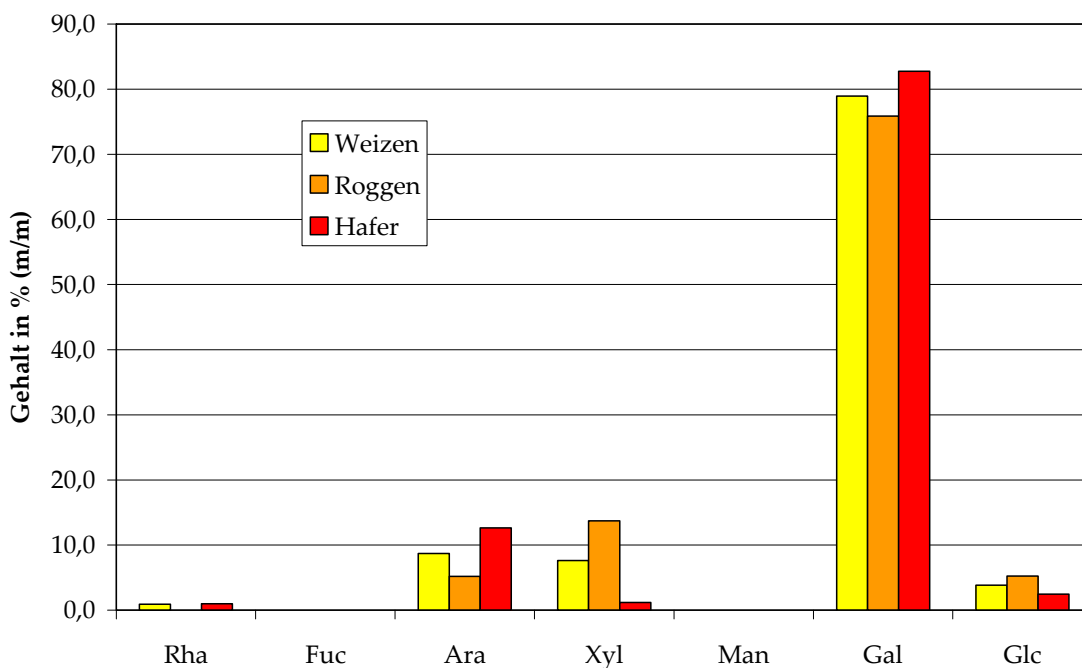


Abbildung 24: Neutralzuckerzusammensetzung von Roh-AGPs aus Weizen-, Roggen- und Haferfrüchten nach milder Säurehydrolyse

3.3 Kolorimetrische Quantifizierung von Uronsäuren

Die Kalibriergeraden dienen zur Berechnung des prozentualen Gehaltes an Uronsäuren. Es kann jedoch nicht zwischen einzelnen Uronsäuren unterschieden werden.

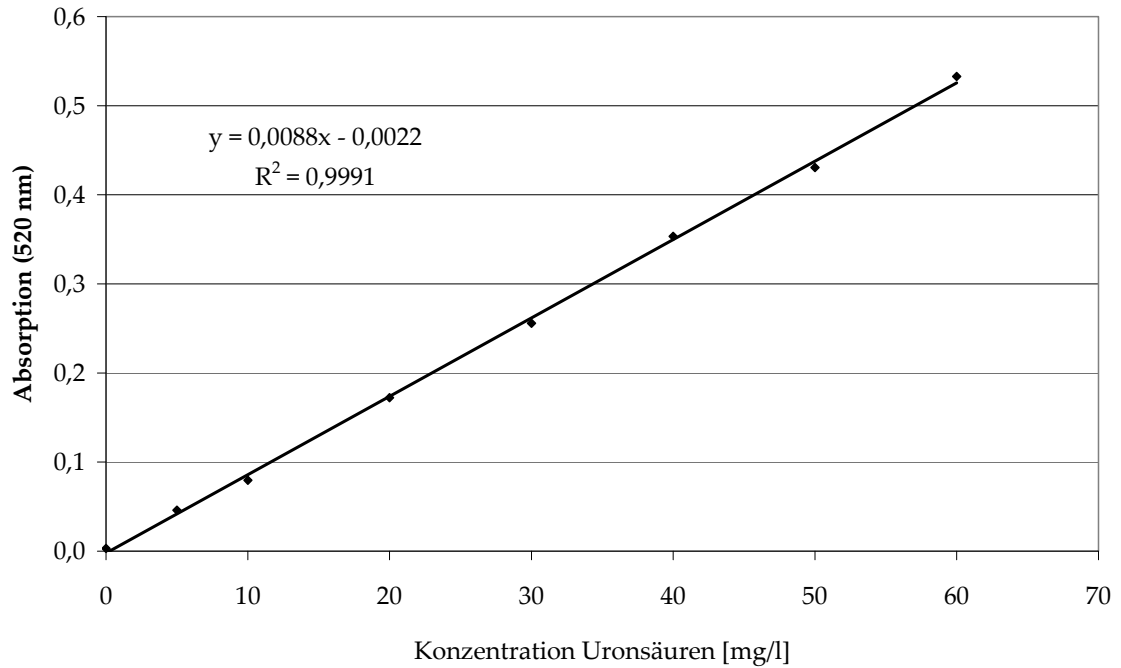


Abbildung 25: Kalibriergerade zur quantitativen Bestimmung der Uronsäuren

Wie aus Tabelle 9 ersichtlich, liegt der Uronsäuregehalt der Roh-AGPs laut dieser colorimetrischen Methode recht niedrig zwischen 1,8- 3,6%.

Tabelle 9: Absorptionswerte und Uronsäuregehalt der einzelnen Proben

Probe	Weizen-AGP T1Y2	Roggen-AGP S2Y2	Hafer-AGP A2Y4
Uronsäuregehalt (% [m/m])	1,8	3,3	3,6

3.4 Silylierungsanalyse

Mittels der Silylierungsanalyse lassen sich neben den Neutralzuckern auch Uronsäuren detektieren. Bei aufgereinigten AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer waren allerdings keine Uronsäuren detektierbar. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zum Ergebnis der colorimetrischen Uronsäurebestimmung, wo bis zu 3,6% Uronsäuren in Roh-AGPs aus Getreide detektiert wurden. Da die

colorimetrische Bestimmung der Uronsäuren allerdings eine ungenauere Methode ist als die Silylierungsanalyse der aufgereinigten AGPs, kann ein Vorkommen von Uronsäuren im Kohlenhydratanteil der AGPs ausgeschlossen werden (siehe auch C 3.5.2). Die zweifach mit β -Yariv-Reagenz gefällten AGPs zeigen darüber hinaus nur einen geringen Gehalt an Mannose und Glucose. Der Gehalt an Arabinose und Galactose beläuft sich zusammen auf etwa 98% und steht im Verhältnis 1/1,7 bis 1/1,9. In Abbildung 26 ist ein Vergleich der Ergebnisse der Silylierungsanalyse und der Acetylierungsanalyse von aufgereinigten AGPs aus Getreide dargestellt (Uronsäuren ausgenommen). Die Methoden liefern beide ähnliche Ergebnisse und sind somit gut vergleichbar.

Tabelle 10: Silylierungsanalyse Getreide-AGPs

Zucker [% (m/m)]	Weizen AGP T4YSY1	Roggen AGP S2YSY1	Hafer AGP A3YSY1
Ara	34,7	36,3	33,6
Man	0,4	0,6	0,7
Gal	62,8	62,2	64,3
Glc	2,2	0,9	1,4

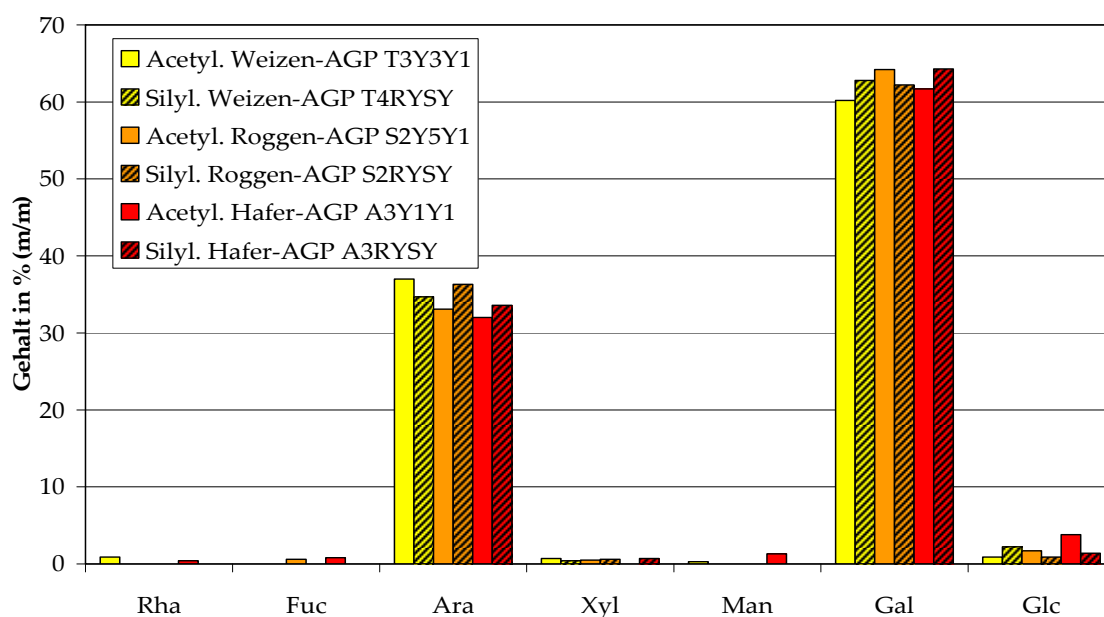


Abbildung 26: Vergleich der Zuckerszusammensetzung von aufgereinigten Getreide-AGPs nach Acetylierungsanalyse (Acetyl.) und Silylierungsanalyse (Silyl.)

3.5 Bestimmung der Bindungstypen im KH-Teil

Um die Bindungstypen der Monosaccharide des Kohlenhydratanteils der AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer zu bestimmen, wurden die freien Hydroxylgruppen des Polysaccharidanteils methyliert, und dieser anschließend sauer hydrolysiert und reduziert. Die so freigewordenen Hydroxylgruppen, die vorher für die glycosidische Bindung der Zucker, bzw. den Ringschluss im Zuckermolekül selbst verantwortlich waren, wurden acetyliert. Zur Erfassung der verschiedenen permethylierten Alditolacetate (PMAAs) wurden nach gaschromatographischer Auftrennung die Massenspektren der erhaltenen Peaks mit einer im Arbeitskreis etablierten Datenbank von PMAAs abgeglichen. So wurden die einzelnen Zuckerderivate identifiziert und mit Hilfe des Methylierungs- und Acetylierungsmusters dem Bindungstyp des entsprechenden Monosaccharids im Kohlenhydratanteil des AGPs zugeordnet. In Tabelle 11 sind Molekulargewichte der Bindungstypen mit korrespondierenden PMAAs und dem FID-Korrekturfaktor aufgelistet. Dabei ist das Signal einer 1,4,5-Tri-O-Acetyl-2,3,6-Tri-O-Methyl-Hexose nicht eindeutig einer Galactose oder einer Glucose zuzuordnen, da die beiden PMAAs auch eine ähnliche Retentionszeit aufweisen. In Abbildung 27 ist das Totalionenchromatogramm (TIC) eines aufgereinigten Hafer-AGPs dargestellt, dessen erstes und letztes Signal in Verbindung mit den jeweiligen Massenspektren dargestellt wird.

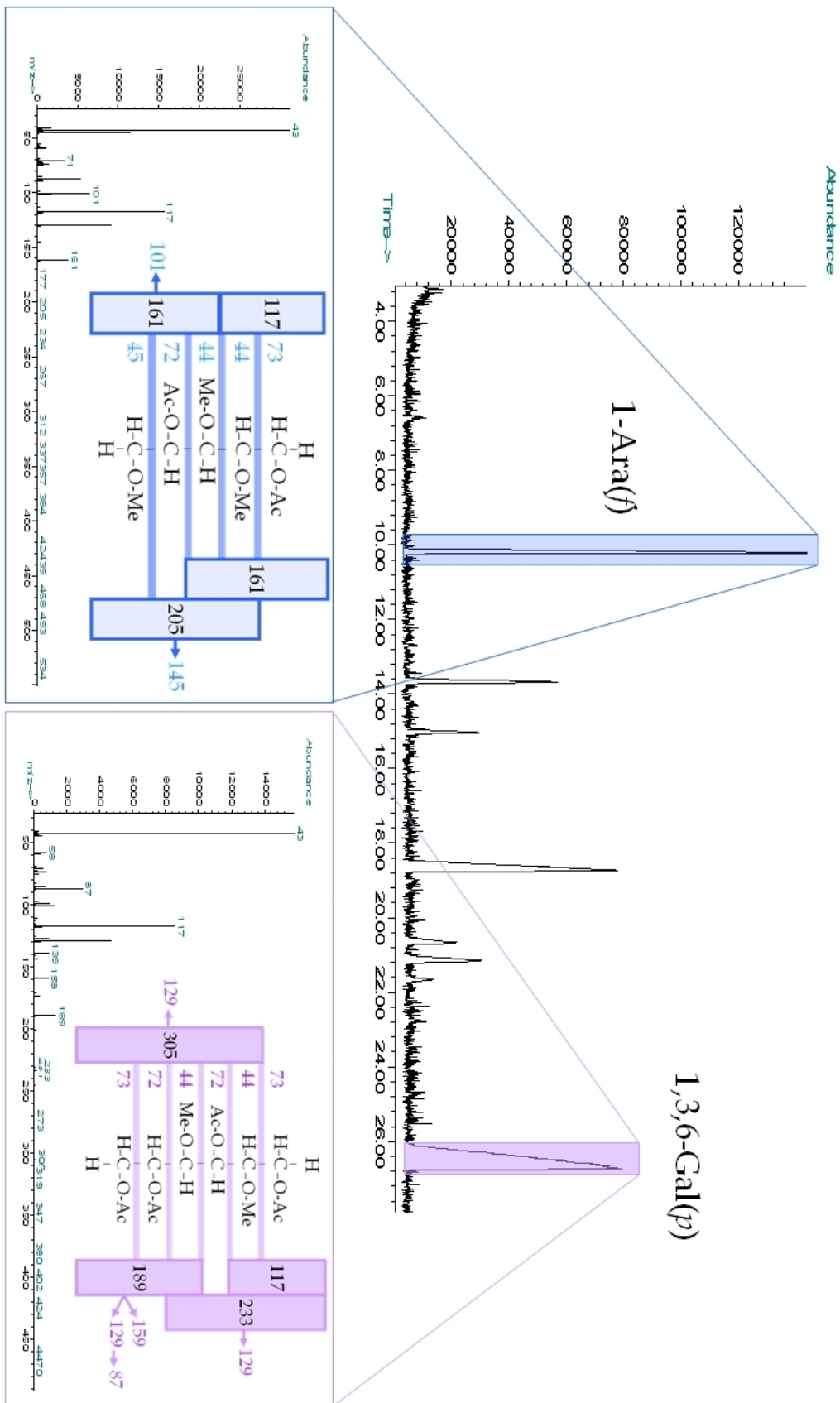


Abbildung 27: TIC eines aufgereinigten Hafer-AGPs mit Darstellung der Massenspektren zweier PMAAs

Tabelle 11: Charakteristika der vorkommenden Bindungstypen

Bindungstyp	PMAA	MW PMAA	Korrektur- faktor
1-Ara(<i>f</i>)	1,4-Di-O-Acetyl-2,3,5-Tri-O-Methyl-Pentose	278,14	0,60
1,5-Ara(<i>f</i>)	1,4,5-Tri-O-Acetyl-2,3-Di-O-Methyl-Pentose	306,13	0,66
1-Gal(<i>p</i>)	1,5-Di-O-Acetyl-2,3,4,6-Tetra-O-Methyl-Hexose	322,16	0,70
1,3-Gal(<i>p</i>)	1,3,5-Tri-O-Acetyl-2,4,6-Tri-O-Methyl-Hexose	350,16	0,74
1,4-Hex(<i>p</i>)	1,4,5-Tri-O-Acetyl-2,3,6-Tri-O-Methyl-Hexose	350,16	0,74
1,6-Gal(<i>p</i>)	1,5,6-Tri-O-Acetyl-2,3,4-Tri-O-Methyl-Hexose	350,16	0,75
1,3,6-Gal(<i>p</i>)	1,3,5,6-Tetra-O-Acetyl-2,4-Di-O-Methyl-Hexose	378,15	0,80

3.5.1 Bindungstypanalyse der AGPs

In Abbildung 28 werden die Ergebnisse der Bindungstypanalyse für aufgereinigte AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer einander gegenübergestellt. Überwiegend bestehen alle drei AGPs aus Arabinose und Galactose. Hierbei kommen hauptsächlich 1-Ara(*f*), 1,3-Gal(*p*) und 1,3,6-Gal(*p*) vor. Zusätzlich sind kleinere Anteile an 1,5-Ara(*f*) und 1,6-Gal(*p*) nachweisbar. Die 1,4-verknüpfte Hexose könnte sowohl 1,4-Gal(*p*) als auch 1,4-Glc(*p*) sein, letztere eventuell Bestandteil von Stärke, Cellulose oder Xyloglucanen, welche die Probe in geringem Maß verunreinigen könnten.

Tabelle 12: Ergebnisse der Bindungstypanalyse der zweifach gefällten AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer

Zucker in % (mol/mol)	Weizen-AGP T3Y3Y1	Roggen-AGP S2Y6Y1	Hafer-AGP A5YSY1
1-Ara(<i>f</i>)	29,9	31,0	25,6
1,5-Ara(<i>f</i>)	8,9	7,5	6,4
1-Gal(<i>p</i>)	1,2	3,2	4,4
1,3-Gal(<i>p</i>)	18,9	13,8	19,5
1,4-Hex(<i>p</i>)	0,8	3,5	-
1,6-Gal(<i>p</i>)	3,0	6,2	5,6
1,3,6-Gal(<i>p</i>)	37,4	34,9	38,5
Endgruppe E	31,0	34,2	29,9
Verzweigungsgr. V	37,4	34,9	38,5
V/E	1,2	1,0	1,3
Ara/Gal	1/1,6	1/1,6	1/2,1

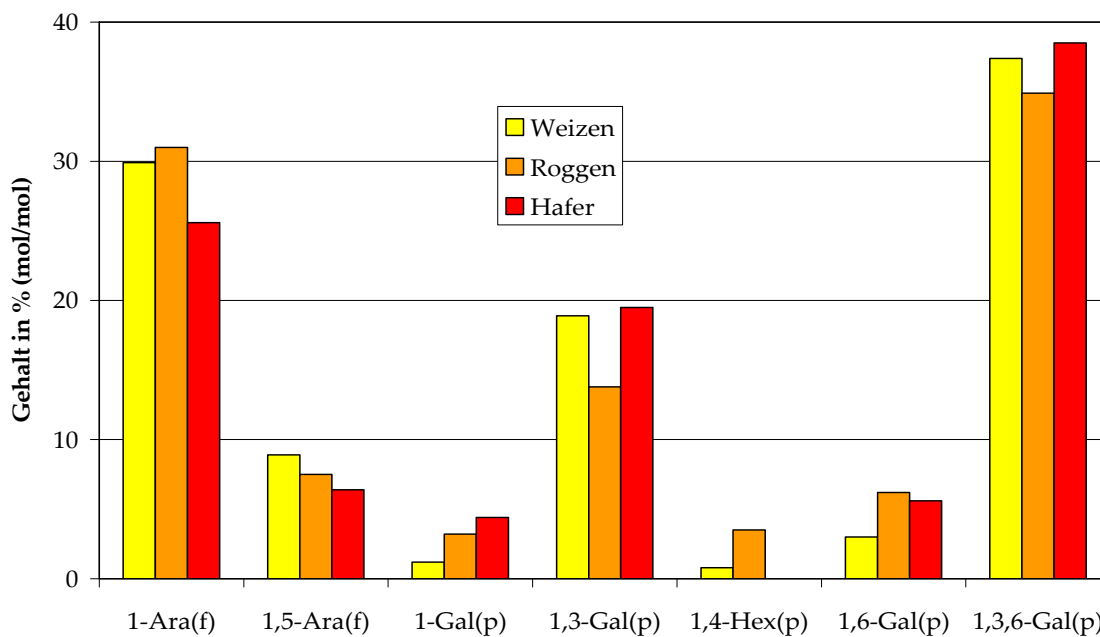


Abbildung 28: Bindungstypanalyse der zweifach gefällten AGPs aus Weizen-, Roggen- und Haferfrüchten

Die Zusammensetzung der aufgereinigten AGPs der einzelnen Isolierungen ist viel homogener als die der einfach gefällten AGPs. Dies belegt der in Abbildung 29 durchschnittliche Gehalt der einzelnen Bindungstypen von drei

unterschiedlichen zweifach gefällten AGPs aus Haferfrüchten (A3Y1Y1, A5YSY1, A6YSY1).

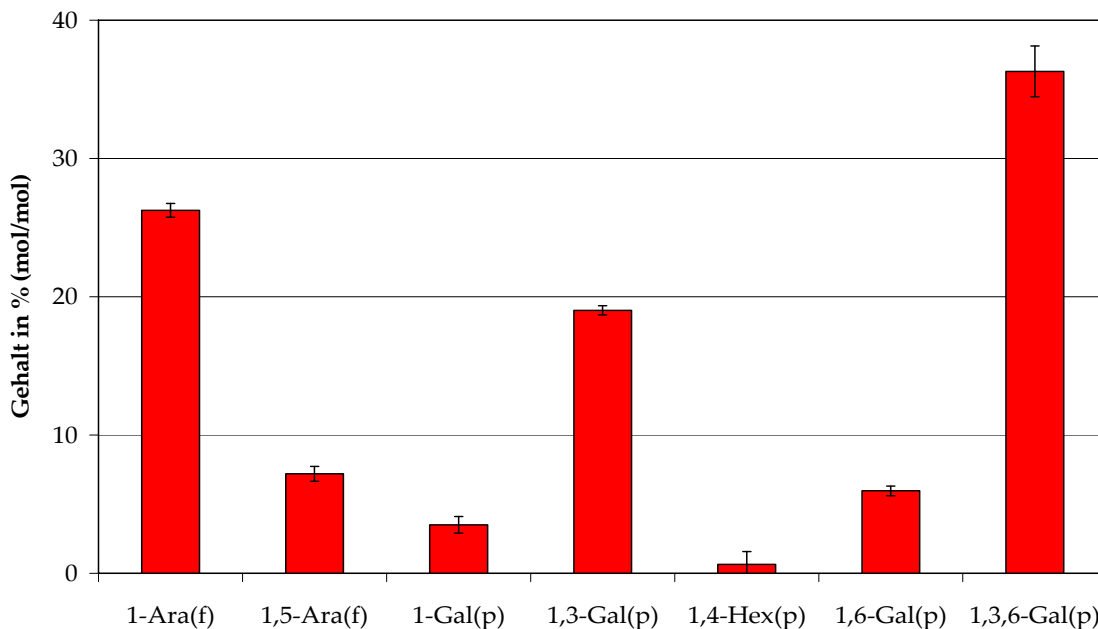


Abbildung 29: Durchschnittliche Verteilung der Bindungstypen von aufgereinigten AGPs aus Haferfrüchten (n=3)

3.5.2 Bindungstypanalyse von Uronsäure-reduzierten AGPs

Beispielhaft soll das Ergebnis der Bindungstypanalyse von Uronsäure-reduziertem AGP aus Roggen dargestellt werden. Laut colorimetrischer Uronsäuredetektion nach C 3.3 liegt der Uronsäure-Gehalt im Roggen-Roh-AGP bei 3,3%, eine Silylierungsanalyse nach C.3.4 ergibt allerdings, dass keine Uronsäuren in aufgereinigtem AGP wiederzufinden sind. Um eine dritte Methode einer möglichen Uronsäuredetektion durchzuführen, wurde ein Roh-AGP aus Roggen einer Reduktion nach B 3.1.4 unterworfen und schließlich nach B 3.1.5 methyliert. Es findet sich jedoch keine Uronsäure (weder Galacturonsäure noch Glucuronsäure) im Chromatogramm wieder. Die Ergebnisse der Uronsäurereduktion sind in Tabelle 13 dargestellt. Der Gehalt an 1,4- und 1,3,4-

glycosidisch verknüpfter Xylose ist auf die noch unzureichende Aufreinigung des nur einfach gefällten Roggen-Roh-AGPs zurückzuführen und stammt evtl. von einem Arabinoxylan.

Tabelle 13: Ergebnisse der Bindungstypanalyse eines einfach gefällten, uronsäurereduzierten Roggen-AGPs

Zucker in % (mol/mol)	Uronsäurereduziertes Roggen AGP S2YR
1-Ara(<i>f</i>)	35,3
1,5-Ara(<i>f</i>)	5,6
1,4-Xyl(<i>p</i>)	11,4
1-GlcA(<i>p</i>)	-
1-GalA(<i>p</i>)	-
1-Gal(<i>p</i>)	3,1
1,3,4-Xyl(<i>p</i>)	3,9
1,3-Gal(<i>p</i>)	8,1
1,4-Hex(<i>p</i>)	3,0
1,6-Gal(<i>p</i>)	5,6
1,3,6-Gal(<i>p</i>)	24,0

3.5.3 Bindungstypanalyse mit Säure partialhydrolysierter AGPs

Mit Hilfe einer milden Säurehydrolyse werden labile glycosidische Bindungen gespalten. Dadurch können Aussagen über die Positionen furanosidischer Zucker (im Falle der AGPs: hauptsächlich Arabinosen) getroffen werden. Je nachdem, wie sich der relative Gehalt der Zuckerderivate ändert, an den die abgespaltenen Arabinosen geknüpft waren, kann man Rückschlüsse auf den groben Bau des Kohlenhydratanteils des AGPs nehmen. Laut Bindungstypanalyse der AGPs (siehe C 3.5.1) lag der Hauptteil der Arabinose in der Peripherie des Kohlenhydratanteils. Nach der milden Hydrolyse der Roh-AGPs war im hochmolekularen, mit Ethanol fällbaren Rückstand der Gehalt an 1-Ara(*f*) stark verringert (von etwa 26-31% auf 5-7%). Auch der Gehalt an 1,5-Ara(*f*) sank signifikant ab. Der relative Gehalt an 1-Gal(*p*) und 1,6-Gal(*p*) nahm deutlich zu, wohingegen der relative Gehalt von 1,3,6-Gal(*p*) deutlich abnahm.

Der relative Gehalt an 1,3-Gal(*p*) nahm nicht zu, sondern etwas ab. Dies weist auf eine Bindung eines großen Teils der terminalen Arabinose im intakten AGP in Position 3 von 1,3,6-Gal(*p*) hin bzw. 1,3-Gal(*p*) hin, so entstand durch Abspaltung der Arabinosen vermehrt 1,6-Gal(*p*) bzw. 1-Gal(*p*). Da der 1,3-Gal(*p*)-Gehalt nur schwach absinkt, wird auch eine Bindung von terminaler Arabinose in Position 6 an 1,3,6-Gal(*p*) vorhanden sein; so entsteht nach Abspaltung der Arabinosen 1,3-Gal(*p*).

Tabelle 14: Ergebnisse der Bindungstypanalyse von partialhydrolysierten AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer

Zucker in % (mol/mol)	Weizen-AGP	Roggen-AGP	Hafer-AGP
1-Ara(<i>f</i>)	6,9	5,4	5,5
1,5-Ara(<i>f</i>)	1,2	-	2,2
1Glc(<i>p</i>)	-	2,4	1,0
1-Gal(<i>p</i>)	6,5	15,0	12,7
1,3-Gal(<i>p</i>)	14,1	9,4	14,6
1,4-Hex(<i>p</i>)	4,0	4,7	1,7
1,6-Man(<i>p</i>)	2,2	-	2,0
1,6-Gal(<i>p</i>)	39,7	41,7	29,7
1,3,6-Gal(<i>p</i>)	25,4	21,3	30,7

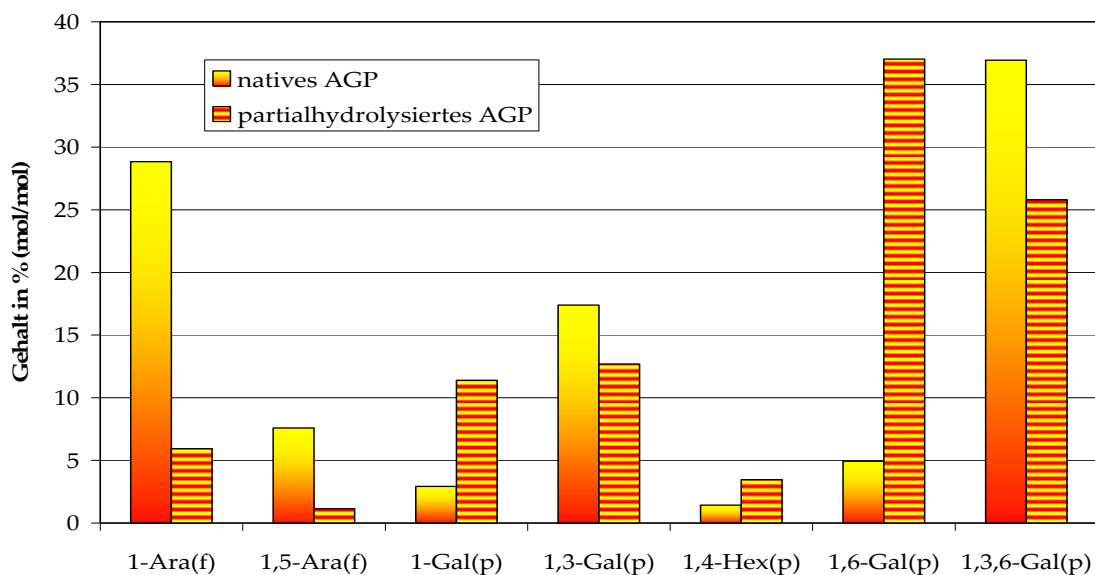


Abbildung 30: Vergleich der durchschnittlichen Bindungstypanalyse von Roh-AGP und partialhydrolysiertem AGP aus Weizen-, Roggen- und Haferfrüchten (Mittelwerte aus Tabelle 14)

3.5.4 Bindungstypanalyse von enzymatisch hydrolysierten Hafer-AGPs

Die Substratspezifität von Enzymen kann ausgenutzt werden, um selektiv bestimmte glycosidische Bindungen zu spalten. Gentechnisch hergestellte Enzyme bergen den großen Vorteil einer guten Isolierbarkeit als reines Endprodukt gegenüber aufgereinigten Enzymen, die aus dem Organismus isoliert werden, von dem ursprünglich auch das Gen für das Enzym stammt. Bei solch einer Enzymaufreinigung wird immer ein Enzymgemisch erhalten, das somit auch andere Aktivitäten als die gewünschte besitzt.

Hydrolyse durch eine Endo-1,6-Galactanase:

Die gentechnologisch hergestellte Endo-1,6-Galactanase kann Bindungen innerhalb eines Moleküls von 1,6-glycosidisch verknüpften Galactosemolekülen selektiv spalten. In der Bindungstypanalyse (siehe Tabelle 15) der Hydrolyseprodukte erkennt man eine leichte Abnahme des Gehalts an 1,6-Gal(*p*) und 1,3,6-Gal(*p*), während 1,3-Gal(*p*) leicht zunimmt.

Hydrolyse durch eine Exo-1,3-Galactanase:

Das Enzym Exo-1,3-Galactanase ist in der Lage, vom Ende des Kohlenhydratgerüsts aus 1,3-glycosidisch verknüpfte Galactose zu hydrolysieren. Die Bindungstypanalyse zeigt eine minimale Abnahme des relativen Gehaltes an 1,3-Gal(*p*), während der Gehalt von 1,3,6-Gal(*p*) zunimmt. Der Gehalt an terminaler Arabinose nimmt von 27% auf 15 % ab, wohingegen 1,5-glycosidisch verknüpfte Arabinosen erhalten bleiben, was ein wichtiger Hinweis auf eventuell vorkommende Oligo-Arabinosen sein könnte.

Hydrolyse durch eine Exo-1,3-Galactanase + Exo-1,5-Arabinofuranosidase:

In Tabelle 15 werden außerdem die Ergebnisse der Bindungstypanalyse dargestellt, welche aus der Hydrolyse eines aufgereinigten Hafer-AGPs mit Hilfe

einer Kombination aus einer Exo-1,3-Galactanase mit einer Exo-1,5-Arabinofuranosidase resultieren. Die Exo-1,5-Arabinofuranosidase kann spezifisch furanosidische Bindungen 1,5-verknüpfter Arabinosen vom Ende eines Kohlenhydratgerüsts her spalten. Der Gehalt an 1,5-Ara(*f*) nimmt deutlich ab. Zusätzlich nimmt der Gehalt an 1,3,6-Gal(*p*) deutlich zu, während der relative Gehalt an 1-Gal(*p*) und 1,3-Gal(*p*) abnimmt.

Tabelle 15: Ergebnisse der Bindungstypanalyse von Hafer-AGP und enzymatisch hydrolysiertem Hafer-AGP

Bindungstypen [% (mol/mol)]	Hafer-AGP	Hafer-AGP + Exo-1,3- Galactanase und Exo-1,5- Arabinofuranosidase		
		Hafer-AGP + Endo-1,6- Galactanase	Hafer-AGP + Exo-1,3- Galactanase	
1-Ara(<i>f</i>)	26,7	29,8	15,0	21,1
1,5-Ara(<i>f</i>)	7,6	7,2	8,5	1,3
1Glc(<i>p</i>)	-	0,9	0,7	-
1-Gal(<i>p</i>)	3,2	2,6	2,9	1,7
1,3-Gal(<i>p</i>)	18,7	20,4	18,3	16,1
1,4-Hex(<i>p</i>)	-	0,9	2,2	2,2
1,6-Man(<i>p</i>)	3,3	3,3	3,2	4,5
1,6-Gal(<i>p</i>)	6,4	3,3	6,0	8,2
1,3,6-Gal(<i>p</i>)	34,0	31,7	43,2	45,0

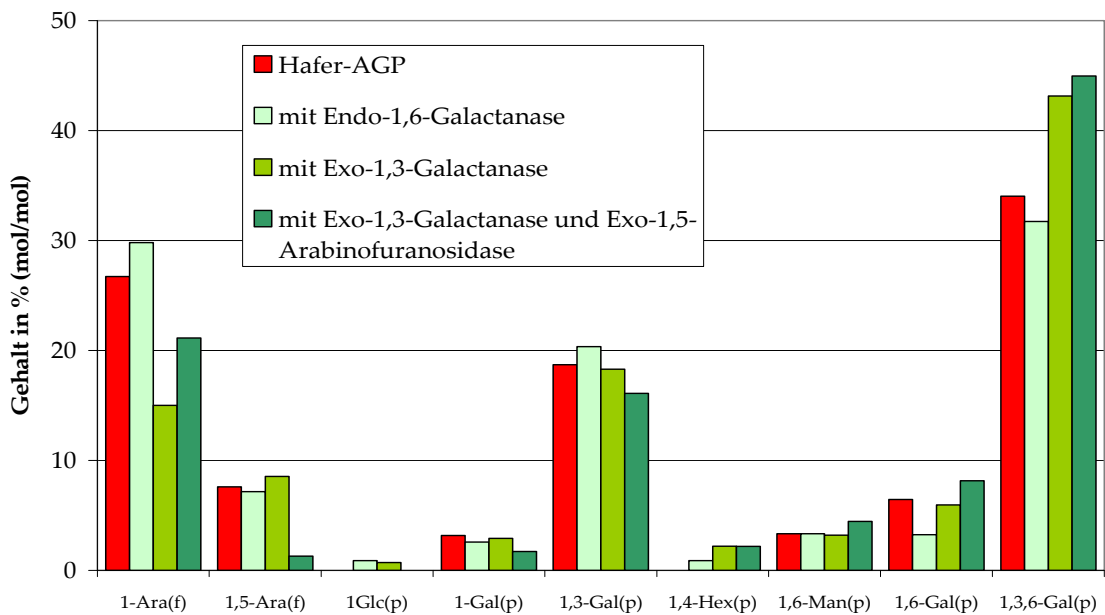


Abbildung 31: Bindungstypanalyse eines aufgereinigten Hafer-AGPs und seiner makromolekularen Produkte der enzymatischen Hydrolyse

3.6 Identifizierung der enzymatisch freigesetzten Mono- und Oligosaccharide

Nach der enzymatischen Hydrolyse des zweifach gefällten AGPs aus Hafer wurden die freigesetzten Oligosaccharide nach B 3.1.7.1 bestimmt. Die Hydrolyserate der Enzyme wurde dabei über die Anzahl der reduzierenden Zucker nach der Methode von Somogyi-Nelson bestimmt (SOMOGYI, 1952).

Für die enzymatische Hydrolyse des Hafer-AGPs mit einer Exo-1,3-Galactanase wurde eine Hydrolyserate von etwa 0,9% bestimmt. Unter den freigesetzten Mono- und Oligosacchariden konnten Galactose und das Trisaccharid L-Ara- α -1,3-Gal- β -1,6-Gal aufgrund gleicher Retentionszeit von Standards identifiziert werden (siehe Abbildung 32). Dazwischen liegt das Signal einer weiteren Zuckerverbindung, die zunächst mit einem Fragezeichen markiert wird. Oligosaccharide mit größerer Retentionszeit als das Trisaccharid L-Ara- α -1,3-Gal- β -1,6-Gal bestehen aus größeren Oligosacchariden, bzw aus mehr Hexosen oder methylierten Zuckern statt der Pentosen. Auch die Art der glycosidischen Verknüpfung beeinflusst die Retentionszeit der Verbindung.

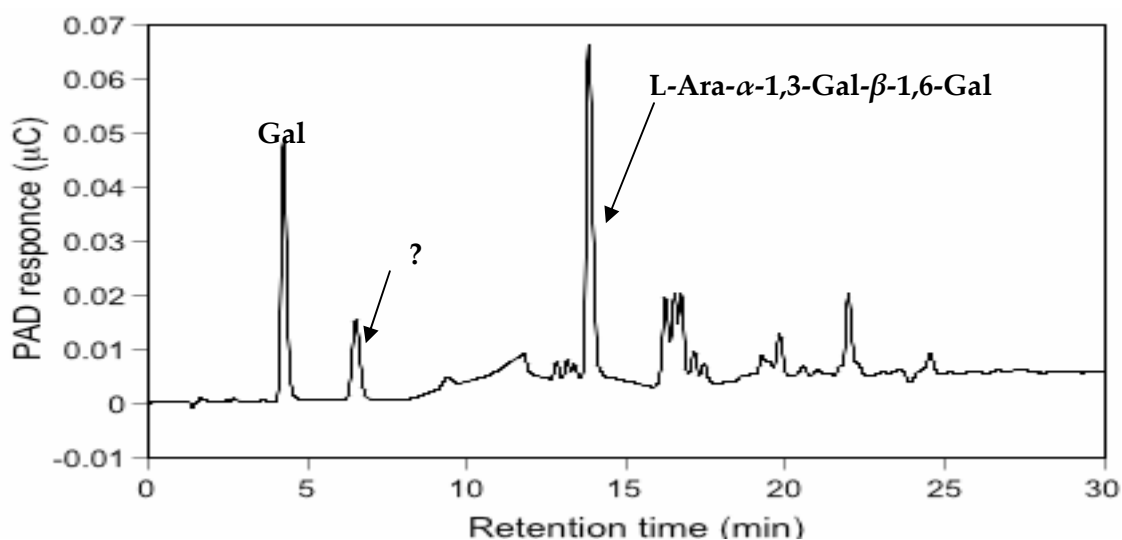


Abbildung 32: HPAEC-PAD-Chromatogramm der freigesetzten Mono- und Oligosaccharide aus Hafer-AGP nach Hydrolyse mit einer Exo-1,3-Galactanase

Das Chromatogramm aus der Hydrolyse des Hafer-AGPs mit einer Endo-1,6-Galactanase zeigt wieder das mit einem Fragezeichen markierte Signal, welches bereits im Chromatogramm der Hydrolyse mit der Exo-1,3-Galactanase zu sehen war. Weiterhin wurden größere Oligosaccharide freigesetzt, die jedoch nicht zugeordnet werden konnten (Abbildung 33). Die Hydrolyserate der Reaktion konnte aufgrund der nur geringen Aktivität des Enzyms nicht berechnet werden.

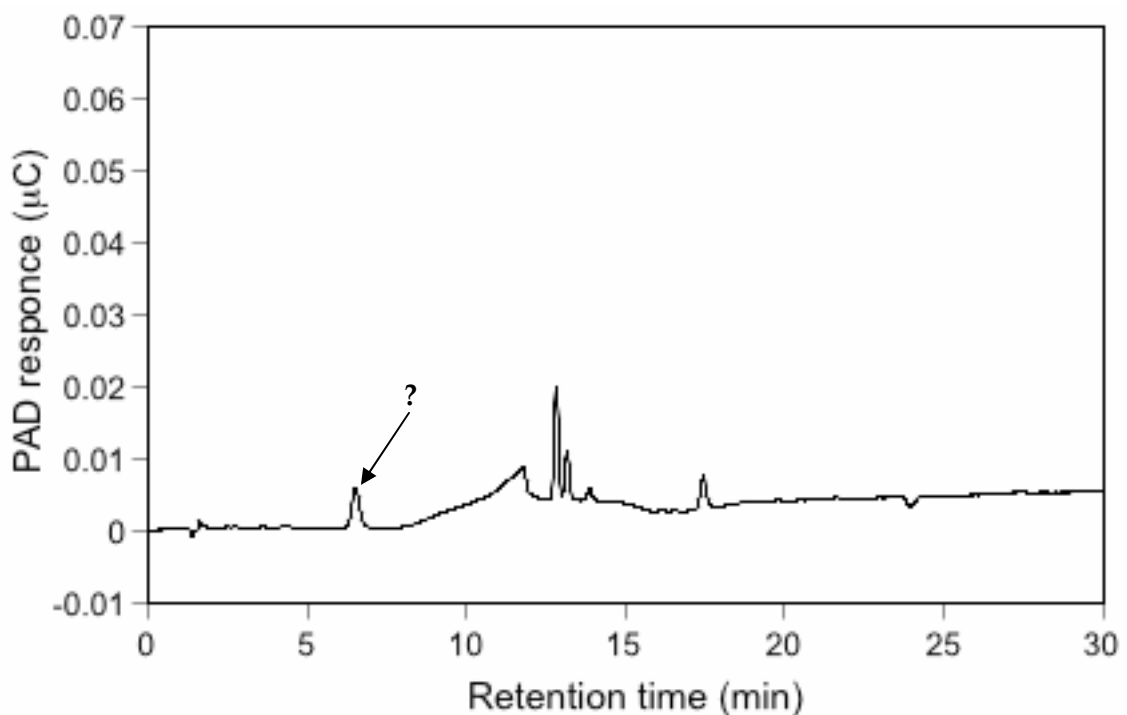


Abbildung 33: HPAEC-PAD-Chromatogramm der freigesetzten Oligosaccharide nach Hydrolyse mit einer Endo-1,6-Galactanase

Die Hydrolyserate der Reaktion einer Exo-1,5-Arabinofuranosidase mit Hafer-AGP betrug 0,2%. Freigesetzt wurde ausschließlich Arabinose (ohne Abbildung).

In einer Kombination einer Exo-1,5-Arabinofuranosidase mit einer Exo-1,3-Galactanase in Reaktion mit Hafer-AGP stieg die Hydrolyserate an. Freigesetzt wurden Arabinose und Galactose als Monosaccharide und weitere unbekannte Oligosaccharide, von denen eines wieder die gleiche Retentionzeit wie die anderen mit dem Fragezeichen versehenen Signale hatte. Wahrscheinlich handelt

es sich dabei um ein Disaccharid, bestehend aus Arabinose und Galactose. Unter den Oligosacchariden konnte eines als das Trisaccharid L-Ara- α -1,3-Gal- β -1,6-Gal identifiziert werden (Abbildung 34).

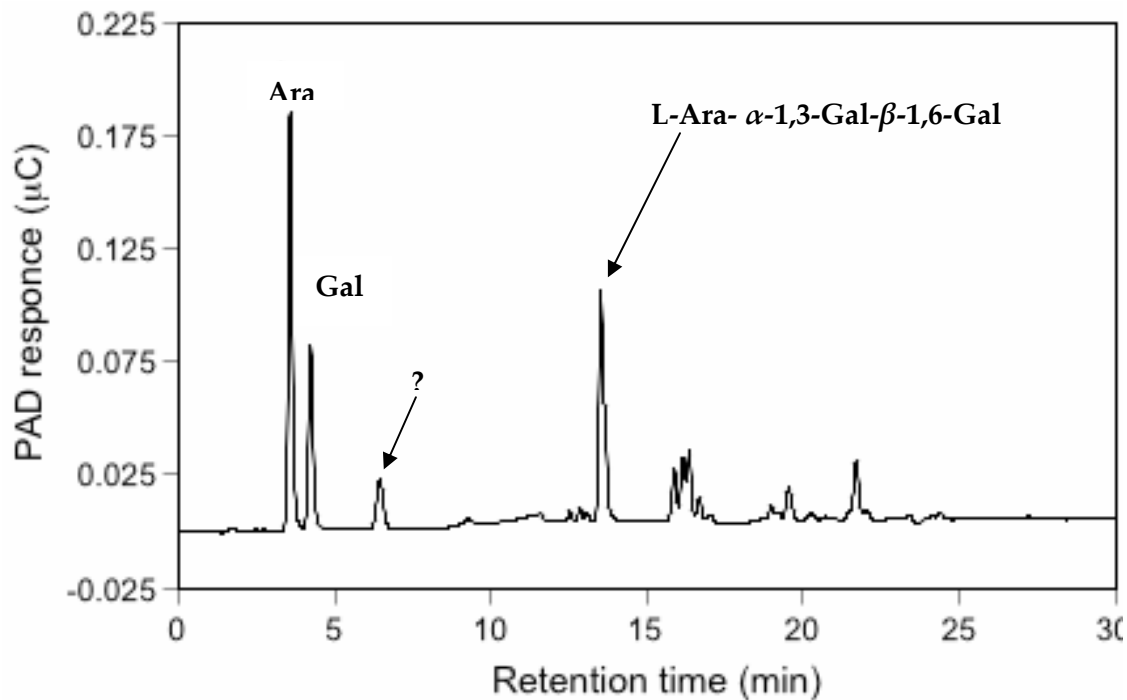


Abbildung 34: HPAEC-PAD-Chromatogramm der freigesetzten Mono- und Oligosaccharide nach Hydrolyse mit einer Kombination einer Exo-1,5-Arabinofuranosidase und einer Exo-1,3-Galactanase

4 Charakterisierung des Proteinanteils

Die meisten AGPs besitzen einen Proteinanteil von bis zu 10%, an welchen die Zucker kovalent geknüpft sind. Zur näheren Charakterisierung des Proteinanteils wurde der Kohlenhydratanteil mittels einer sauren Hydrolyse entfernt, der Proteinanteil dabei in die einzelnen Aminosäuren hydrolysiert (nach B 3.2.1). Die resultierenden freien Aminosäuren wurden per HPLC qualitativ und quantitativ erfasst (nach B 3.2.2). Da die AGPs zur Gruppe der HRGPs gehören, wurde eine photometrische Ermittlung des Hydroxyprolin-Gehaltes durchgeführt, um die Ergebnisse der HPLC-Methode zu bestätigen.

Zudem wurde für Roh-AGP aus Weizen-, Roggen- und Haferfrüchten eine alkalische Hydrolyse nach B 3.2.4 durchgeführt, um diejenigen der Aminosäuren zu ermitteln, die für die kovalente Verknüpfung zum Kohlenhydratanteil verantwortlich war und um das Molekulargewicht der noch intakten, einzelnen Kohlenhydrat-Äste abschätzen zu können.

4.1 Aminosäurezusammensetzung

Die Aminosäure-Zusammensetzung von Roh-AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer ist in Abbildung 35 dargestellt, wobei sich die Abbildung der Übersichtlichkeit halber auf die Aminosäuren größter Konzentration beschränkt. Dabei ist der hohe Gehalt an Glutamin/Glutaminsäure in der Probe des einfach gefällten Weizen-AGPs besonders auffällig, da die anderen beiden einfach gefällten AGPs einen deutlich geringeren Gehalt aufweisen.

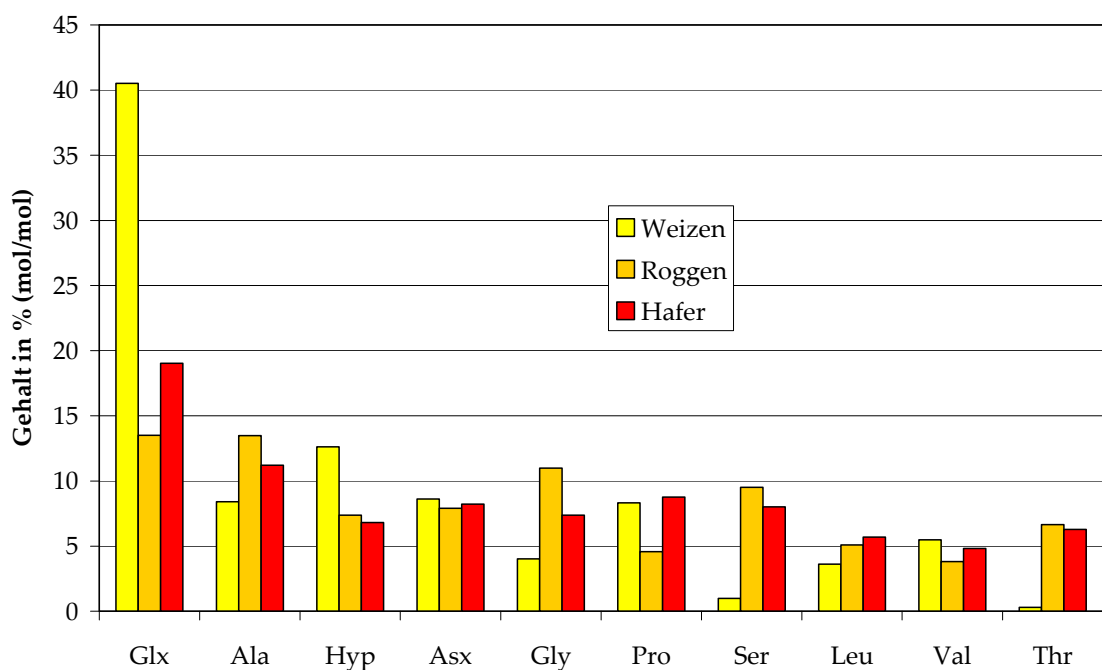


Abbildung 35: Aminosäurezusammensetzung der zehn Aminosäuren größter Konzentration aus Roh-AGPs aus Weizen-, Roggen- und Haferfrüchten

Da dies auf eine Verunreinigung hinweist, wurden auch zweifach gefällte, also aufgereinigte AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer hydrolysiert und deren Aminosäurezusammensetzung analysiert (siehe Abbildung 36). Der Hydroxyprolinegehalt der Proben aus Roggen und Hafer ist deutlich gestiegen. Nun dominieren nicht mehr die Aminosäuren in der Reihenfolge Glx, Ala, Hyp, Asx und Gly, sondern Ala, Hyp, Ser, Gly und Glx. Dabei sind sowohl Hydroxyprolin als auch Serin Aminosäuren, die für eine O-glycosidische Bindung des Kohlenhydratanteils im AGP verantwortlich sein könnten.

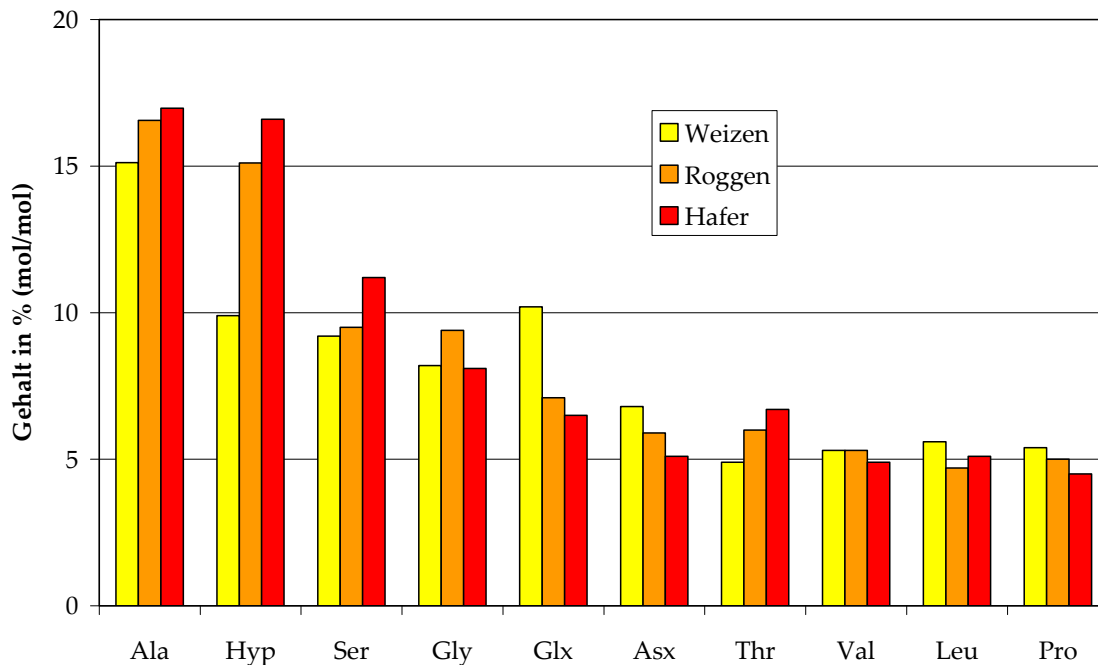


Abbildung 36: Aminosäurezusammensetzung der zehn Aminosäuren größter Konzentration in zweifach gefällten AGPs aus Weizen-, Roggen- und Haferfrüchten

Durch die HPLC-Analytik ergibt sich ein Hydroxyprolinegehalt von 9,9% (mol/mol) [=10,8% (m/m)] bezogen auf den Proteinanteil des Weizen-AGPs. Auffällig ist hier der im Vergleich mit den Ergebnissen der anderen AGPs recht hohe Gehalt an Glutamin bzw. Glutaminsäure. Im Proteinanteil des Roggen-AGPs wurden 15,1% (mol/mol) [=16,7% (m/m)] Hydroxyprolin gefunden. Der Proteinanteil des Hafer-AGPs enthält laut HPLC-Analytik 16,6% (mol/mol)

[=18,3% (m/m)] Hydroxyprolin. Gerade die Aminosäuren Serin und Theronin, die ebenfalls für eine Bindung zum Kohlenhydratanteil des AGPs verantwortlich sein könnten, kommen neben Alanin und Glycin in Hafer-AGP vermehrt vor.

4.2 Quantitative Hydroxyprolin-Bestimmung

Die Kalibriergerade der Hydroxyprolin-Standards zur Bestimmung der Hydroxyprolin-Konzentration in zweifach gefällten AGPs ist in Abbildung 37 dargestellt. Mit Hilfe dieser Kalibriergeraden wurden die Konzentrationen der Proben (Mehrfachbestimmung) nach B 3.2.3 bestimmt und der Gehalt auf den prozentualen Massengehalt an Hydroxyprolin zurückgerechnet. Der Gehalt des einfach gefällten Weizen-AGPs T3Y1 an Hydroxyprolin beträgt demnach 0,40% (m/m). Da jedoch der Proteinanteil von nur einfach gefällten AGPs verunreinigt zu sein scheint, wurden die Hydroxyprolin-Anteile auch an zweifach gefällten, also aufgereinigten AGPs weiter bestimmt. Für eine Probe eines zweifach gefällten Weizen-AGPs (T4YSY1) ergab sich ein Hydroxyprolingehalt von 0,59% (m/m). In Kombination mit dem Ergebnis der Aminosäurezusammensetzung (nach C 4.1) kann ein Gesamtproteingehalt von 5,5% (m/m) für zweifach gefälltes Weizen-AGP berechnet werden. Das zweifach gefällte Hafer-AGP A3YSY1 wies einen Hydroxyprolingehalt von 0,99% (m/m) auf; für zweifach gefälltes Roggen-AGP (S2YSY1) wurde ein Hydroxyprolingehalt von 1,14% (m/m) ermittelt. Roggen- und Hafer-AGP enthalten demnach prozentual mehr Hydroxyprolin als Weizen-AGP. Laut Aminosäurezusammensetzung der Proteinanteile der AGPs enthalten Roggen-AGPs somit 6,3% (m/m) Protein, Hafer-AGPs hingegen 5,4% (m/m).

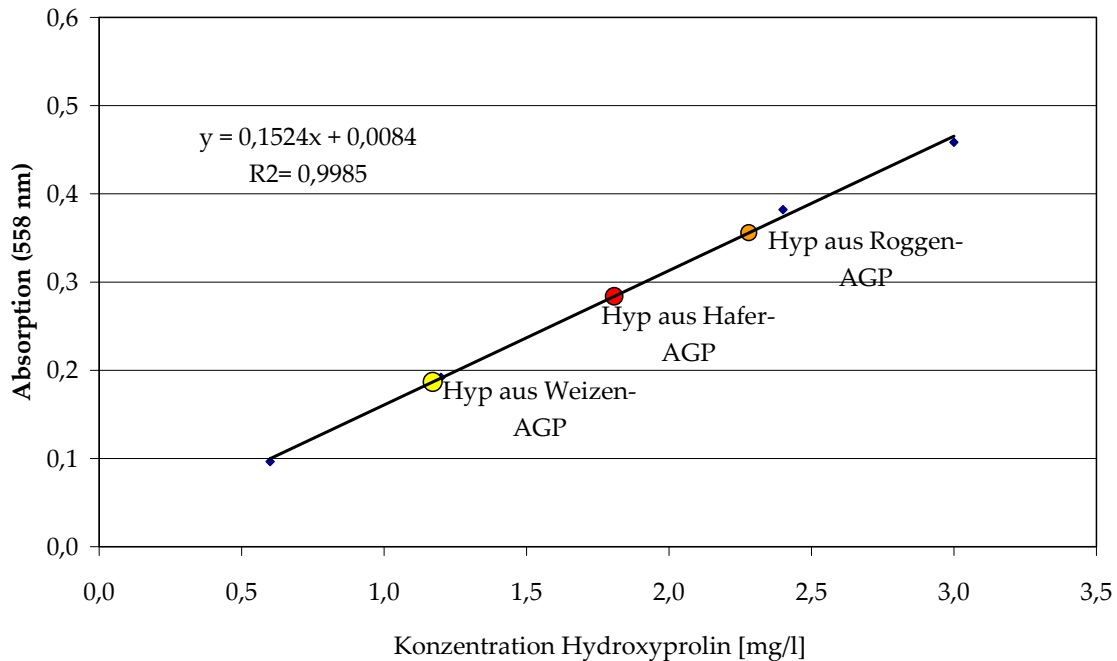


Abbildung 37: Kalibriergerade Hydroxyprolin-Bestimmung

4.3 Alkalische Hydrolyse

Nach der alkalischen Hydrolyse der AGPs (nach B 3.2.4) verblieb der Polysaccharidanteil mit einer für die Bindung zum Protein verantwortlichen Aminosäure. Da die Hydrolyse nur mit Roh-AGP durchgeführt wurde, ist das Ergebnis nicht deutlich. Der relative Hydroxyprolingehalt ist zwar beim alkalisch hydrolysierten Roggen- und Hafer-AGP angestiegen, doch insgesamt hat sich die Aminosäurezusammensetzung des Roh-AGPs zu wenig verändert, als dass eine für die kovalente Bindung zum Kohlenhydratanteil verantwortliche Aminosäure bestimmt werden konnte.

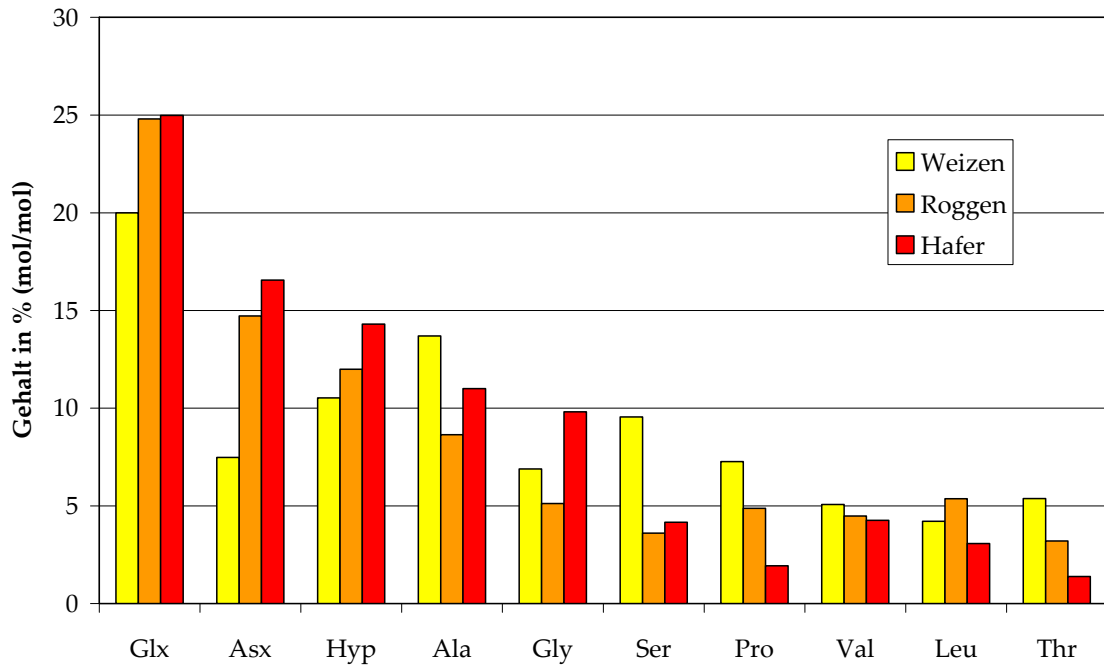


Abbildung 38: Aminosäurezusammensetzung der zehn Aminosäuren größter Konzentration von alkalisch hydrolysierten Roh-AGPs

5 Elementaranalyse

Es wurde eine Elementaranalyse für die Elemente C,H,N und S von 1,42 mg eines aufgereinigten Hafer-AGPs durchgeführt. Tabelle 16 zeigt die prozentualen Ergebnisse bezogen auf die eingesetzte Masse des AGPs.

Tabelle 16: Prozentualer Gehalt der Elemente C, H, N und S des Hafer-AGPs

Element	Gehalt in % (m/m)
N	1,3
C	38,8
H	5,9
S	3,3

Die Elemente C,H,N und S machen 49,3% der Probe aus. Daraus ergibt sich ein ungefähres molekulares Verhältnis von C:H:N:S von 35:63:1:1. Der hohe Gehalt an Kohlenstoff und Wasserstoff erklärt sich dadurch, dass ein AGP-Molekül im

Allgemeinen zu etwa 90% aus Kohlenhydrat besteht. Der Proteinanteil, der bis zu 10% des AGP-Moleküls darstellt, enthält außer Kohlenstoff und Wasserstoff pro Molekül auch mindestens ein Atom Stickstoff. Bezogen auf die Aminosäurezusammensetzung des Hafer-AGPs besitzt die durchschnittliche Aminosäure ein Molekulargewicht von 118,7 g/mol und 1,4 Moleküle Stickstoff. Stickstoff würde in diesem Verhältnis etwa 11,8% (m/m) der Masse der durchschnittlichen Aminosäure ausmachen. Mit einem durch die Elementatanalyse ermittelten Stickstoffgehalt von 1,3% (m/m) kann man so auf einen Proteingehalt des AGPs von 11,0% (m/m) zurückrechnen. Auffällig und auf eine Verunreinigung hindeutend ist der verhältnismäßig hohe Gehalt an Schwefel, so würde auf ein Molekül einer Aminosäure mindestens ein Schwefelatom kommen. Dies ist eher unwahrscheinlich, da die Aminosäureanalytik (siehe C 4.1) dies auch nicht bestätigt. Wahrscheinlicher ist die Anwesenheit von Sulfiten und Sulfaten entstanden durch die Oxidation von Dithionitresten, welches für die Präparation der Yariv-Fällungen genutzt wird (siehe B 1.4.2).

6 Molekulargewichtsbestimmung

Es wurden sowohl die Molekulargewichte der aufgereinigten AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer bestimmt als auch die Molekulargewichte von Getreide-AGPs, die einer milden Hydrolyse (nach B 3.1.6) ausgesetzt waren. Zudem konnte für aufgereinigtes Weizen- und Hafer-AGP das Molekulargewicht des Produktes der alkalischen Hydrolyse bestimmt werden. Auch nach der enzymatischen Hydrolyse mit einer Endo-1,6-Galactanase, einer Exo-1,3-Galactanase und der Kombination einer Exo-1,3-Galactanase mit einer Exo-1,5-Arabinofuranosidase konnte für das Hafer-AGP jeweils das Molekulargewicht ermittelt werden. Bei den Messungen wurde jeweils eine Pullulan-

Kalibriergerade verwendet. Über die Kalibrierung konnte dann das Molekulargewicht der AGPs ermittelt werden.

Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung der aufgereinigten AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer: Sie liegen im Bereich von 83-120 kDa.

Tabelle 17: Absolutes Molekulargewicht von aufgereinigten Getreide-AGPs

	Weizen- AGP T4RYSY	Roggen- AGP S2RYSY	Hafer- AGP A3RYSY
Molekulargewicht [kDa]	120	110	83

Nach milder Hydrolyse durch Oxalsäure unter Abspaltung labiler furanosidischer Bindungen wurde erneut das Molekulargewicht der Getreide-AGPs ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass das Molekulargewicht aller drei AGPs über die Hälfte abnahm. Da der Arabinosegehalt des sauer hydrolysierten Rest-AGP lediglich um mehr als die Hälfte abnahm, kann davon ausgegangen werden, dass nicht alle Arabinosereste abgespalten wurden. Da der Kohlenhydratanteil eines Getreide-AGPs zu nur etwa 35% aus Arabinose bestand, ist die Abnahme des Molekulargewichts stärker als erwartet.

Tabelle 18: Absolutes Molekulargewicht von mild hydrolysierten Getreide-AGPs

	Weizen- AGP T2Y3O	Roggen- AGP S2Y2O	Hafer- AGP A2Y4O
Milde Hydrolyse			
Molekulargewicht [kDa]	28	38	38

Nach alkalischer Hydrolyse, bei der der Proteinanteil des AGPs zerstört und die intakten Oligo- und Polysaccharide mit jeweils einer (für die Bindung

verantwortlichen) Aminosäure isoliert werden, ergibt sich für das resultierende Polysaccharidgerüst aus Weizen AGP ein absolutes Molekulargewicht von etwa 20 kDa. Für das resultierende Polysaccharidgerüst aus Hafer-AGP ergibt sich ein geringeres absolutes Molekulargewicht von etwa 6 kDa. Dieser Wert ist allerdings mit Vorsicht zu betrachten, da er über eine Extrapolation der Kalibriergerade ermittelt wurde.

Nach enzymatischer Hydrolyse wurde das Molekulargewicht des Hafer-AGPs ebenfalls ermittelt. Nach Hydrolyse durch eine Endo-1,6-Galactanase war jedoch keine messbare Minderung des Molekulargewichts festzustellen. Nach Hydrolyse durch eine Exo-1,3-Galactanase sank das Molekulargewicht deutlich auf 75 kDa ab. Durch die Kombination einer Exo-1,3-Galactanase mit einer Exo-1,5-Arabinofuranosidase konnte sogar eine Verringerung des Molekulargewichtes auf 69 kDa festgestellt werden.

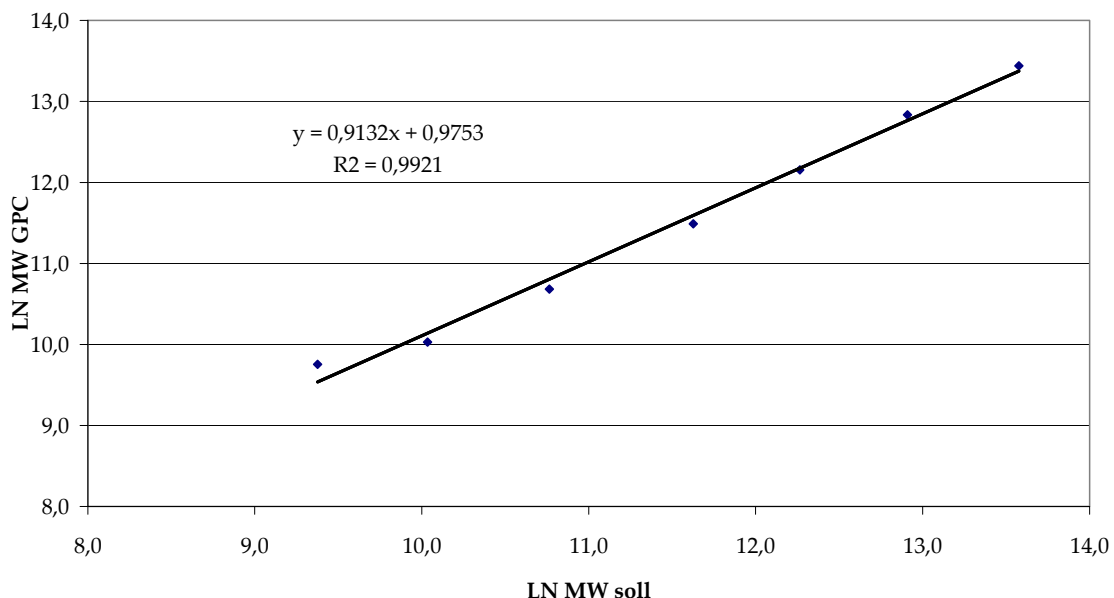


Abbildung 39: Pullulan-Kalibriergerade

Tabelle 19: Absolutes Molekulargewicht von enzymatisch hydrolysiertem Hafer-AGP

	Hafer- AGP A4RYSY	Hafer-AGP+ Endo- 1,6-Galactanase	Hafer-AGP+ Exo-1,3- Galactanase	Hafer-AGP+ Exo-1,3- Galactanase und Exo- 1,5-Arabinofuranosidase
MW [kDa]	83	83	75	69

Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung von Hafer-AGP, welches als Ausgangsmaterial für die enzymatischen Hydrolysen diente sowie die Molekulargewichte der bereits hydrolysierten Hafer-AGPs.

7 Infrarotspektroskopie

Roh-AGP T3Y1 aus Weizenfrüchten wurde mit Kaliumbromid als Pressling vermessen. Abbildung 40 zeigt das IR-Spektrum (Transmission in % gegen Wellenzahl in cm^{-1}):

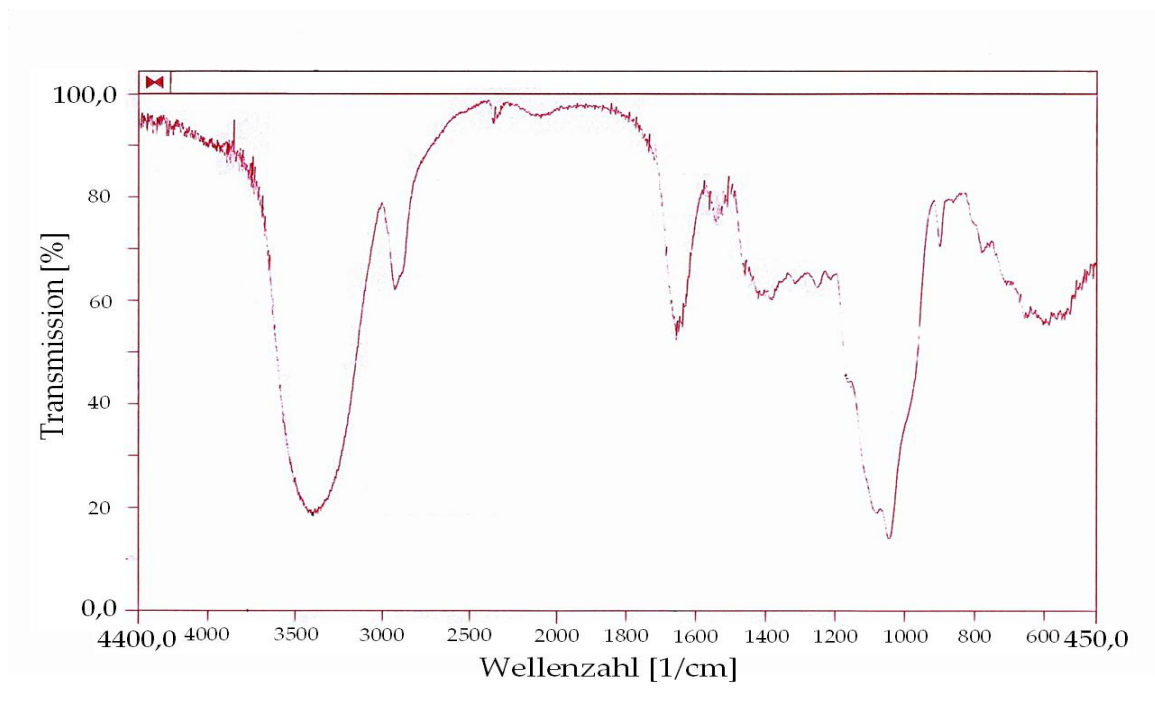


Abbildung 40: IR-Spektrum von Weizen-AGP

Markante Banden entstanden bei 3402 cm⁻¹, 2928 cm⁻¹, 1654 cm⁻¹, 1540 cm⁻¹, 1046 cm⁻¹, 898 cm⁻¹ und 584 cm⁻¹. Die mögliche Bedeutung dieser Banden wird in Tabelle 20 dargestellt (nach LI et al., 2008).

Tabelle 20: Aufschlüsselung der markanten Banden im IR-Spektrum von Weizen-AGP

Wellenzahl in cm ⁻¹	Ausprägung der Bande	Mögliche Bedeutung
3402	Sehr stark	νO-H, sekundäre Alkohole, und Wasser
2928	Mittel	νC-H
1654	Mittel	νC=O, von Amid
1075	Sehr stark	νC-O, Kohlenhydrate
1046	Sehr stark	νC-O, Kohlenhydrate
898	Sehr schwach	Kohlenhydrate
584	Mittel, breit	Etherbindungen

Die Auswertung des IR-Spektrums gibt Hinweise auf Glycoproteine; die Bande bei 1654 cm⁻¹ stammt von den Amid-Bindungen im Proteinanteil des AGPs. Ansonsten ergeben sich viele Banden, die auf Kohlenhydrate hinweisen. Laut ZHOU et al. (2009) kann mit Hilfe eines IR-Spektrums auch schnell eine Qualitätssicherung eines AGPs durchgeführt werden. Gerade die Fingerprint-Region von 1200-800 cm⁻¹ gibt Aufschlüsse über die Zusammensetzung eines AGPs: dabei stehen die charakteristischen Banden bei 1075 und 1045 cm⁻¹ für Galactopyranose im Rückgrat und für Arabinofuranose-Einheiten in den Seitenzweigen des Kohlenhydratanteils des AGPs. Banden bei 1110 und 1081 cm⁻¹ fehlen. Diese würden auf Uronsäuren hinweisen.

8 ¹³C-NMR-Spektroskopie

Aufgrund der komplexen Struktur des AGPs ist es wegen der Vielzahl der erhaltenen Signale nur möglich, Aussagen über die anomeren C-Atome zu treffen. Diese weisen eine geringere Elektronendichte als die meisten der C-

Atome des Heteropolysaccharides auf und erfahren deshalb eine Tieffeldverschiebung. Es lassen sich durch das NMR-Spektrum vorrangig Angaben über die Konfiguration der glycosidischen Bindungsatome (α oder β), über die Bindungstypen der Zuckerbausteine sowie die Anwesenheit eventueller Substituenten machen. Das hohe Grundrauschen in den Spektren ist auf wenig ungelöstes AGP zurück zu führen. Um ein gutes Signal zu erhalten, musste jedoch eine möglichst hohe AGP-Konzentration eingesetzt werden. Eine quantitative Auswertung wurde nicht vorgenommen. Eine mögliche Zuordnung der Signale des ^{13}C -NMR-Spektrums ist in Tabelle 21 dargestellt (JOSELEAU et CHAMBAT, 1984, SAMUELSEN et al., 1998, GANE et al., 1995). Alle Arabinosereste, denen ein Signal zugeordnet werden konnte, liegen in der α -glycosidischen Verknüpfung vor, alle Galactoseeinheiten in der β -glycosidischen Verknüpfung.

Tabelle 21: Chemische Verschiebungen im ^{13}C -NMR-Spektrum und deren mögliche Zuordnung zu C-Atomen einzelner Bausteine des Weizen-AGPs

δ/ppm	C-Atom	Baustein
107,652	C ₁	α -L-Ara(f)
101,633	C ₁	β -D-Gal(p), 1,3- β -D-Gal(p), 1,6- β -D-Gal(p), 1,3,6- β -D-Gal(p)
82,329	C ₄	α -L-Ara(f)
79,765	C ₂	α -L-Ara(f),
	C ₄	1,5- α -L-Ara(f)
75,035	C ₃	α -L-Ara(f)
71,876	C ₅	β -D-Gal(p), 1,3- β -D-Gal(p), 1,6- β -D-Gal(p), 1,3,6- β -D-Gal(p)
68,323	C ₂	β -D-Gal(p), 1,3- β -D-Gal(p), 1,6- β -D-Gal(p), 1,3,6- β -D-Gal(p)
66,932	C ₄	β -D-Gal(p), 1,3- β -D-Gal(p), 1,3,6- β -D-Gal(p)
59,736	C ₅	α -L-Ara(f)

Das ins Tieffeld verschobene Signal bei 107,7 ppm entspricht furanosidischer α -Arabinose, die in der Kette gebunden oder endständig vorliegt. Bei 101,6 ppm kann das Signal einer β -Galaktopyranose zugeordnet werden. Die Signale nicht verknüpfter Hydroxylgruppen von β -Galaktopyranose, deren C-Atome eine Verknüpfung in Position 3 und 6 haben, erfahren eine Tieffeldverschiebung um 8-10 ppm bei 71,9 und 68,3 und 66,9 ppm.

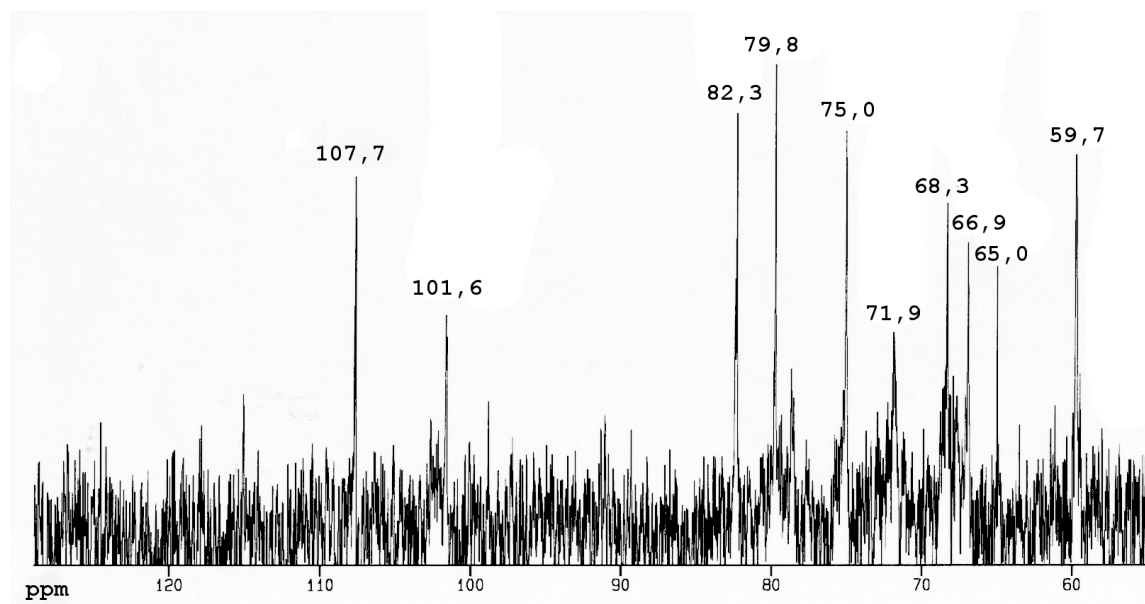


Abbildung 41: ¹³C-NMR-Spektrum von T3Y2 mit Dioxan 0,01% (Dioxan-Signal bei 65,0 ppm)

9 Immunmarkierung von AGPs

9.1 Immunmarkierung von AGPs im ELISA

Sowohl mit den Antikörpern der Elution E als auch mit den Antikörpern der Elution Q, die sich alle gegen β -Yariv-Reagenz richten, wurde ein ELISA durchgeführt. Auch die Reaktivität der monoklonalen Antikörper aus Leeds von Paul Knox (JIM8, LM2, LM6) wurde mit Getreide-AGPs im ELISA getestet. Der monoklonale Antikörper 4B8D3 und die polyklonalen Antikörper 639 „Q“, hergestellt gegen ein AGP aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea*, wurden gegen Hafer-AGPs getestet. Weiterhin wurden extra gegen aufgereinigtes AGP aus Hafer monoklonale Antikörper gewonnen (1B6, 4A1, 7B5, 7B6, 7E3) deren Reaktivität im ELISA dargestellt werden soll.

Tabelle 22: Herkunft und Ziel-Epitope im ELISA genutzter Antikörper

Name des Antikörpers	Quelle	monoklonal/ polyklonal	gerichtet gegen
Elution E	Kaninchen	polyklonal	β -Yariv-Reagenz
Elution Q	Kaninchen	polyklonal	β -Yariv-Reagenz
JIM8	Ratte	monoklonal	AGPs
LM2	Ratte	monoklonal	AGPs mit Glucuronsäureresten
LM6	Ratte	monoklonal	α -1,5-L-Arabinane
4B8D3	Maus	monoklonal	AGPs aus Pressaft von <i>Echinacea purpurea</i>
639 „Q“	Ratte	polyklonal	AGPs aus Pressaft von <i>Echinacea purpurea</i>
1B6	Maus	monoklonal	AGPs aus Haferfrüchten
4A1	Maus	monoklonal	AGPs aus Haferfrüchten
7B5	Maus	monoklonal	AGPs aus Haferfrüchten
7B6	Maus	monoklonal	AGPs aus Haferfrüchten
7E3	Maus	monoklonal	AGPs aus Haferfrüchten

Antikörper gegen Yariv-Reagenz

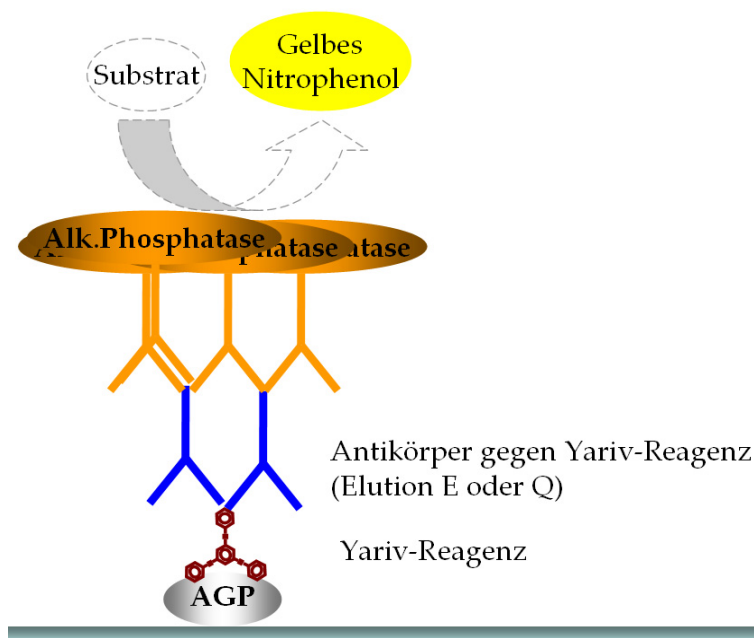


Abbildung 42: Schema des ELISAs gegen Yariv-Reagenz: AGP wurde an die ELISA-Platte gebunden, reagierte mit zugesetztem β -Yariv-Reagenz, und dieses wurde durch Antikörper markiert (Elution E oder Q) und mit Hilfe eines Sekundär-Antikörpers mit alkalischer Phosphatase über die Entstehung gelben Nitrophenols photometrisch detektiert.

Mit β -Yariv-Reagenz markierte AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer und auch AGPs aus *Echinacea purpurea* zeigen eine deutliche Reaktivität mit Antikörpern der Elution E. Die Reaktivität sinkt in der Reihenfolge der AGPs von Weizen, Hafer, Roggen und *Echinacea purpurea* ab (Abbildung 43).

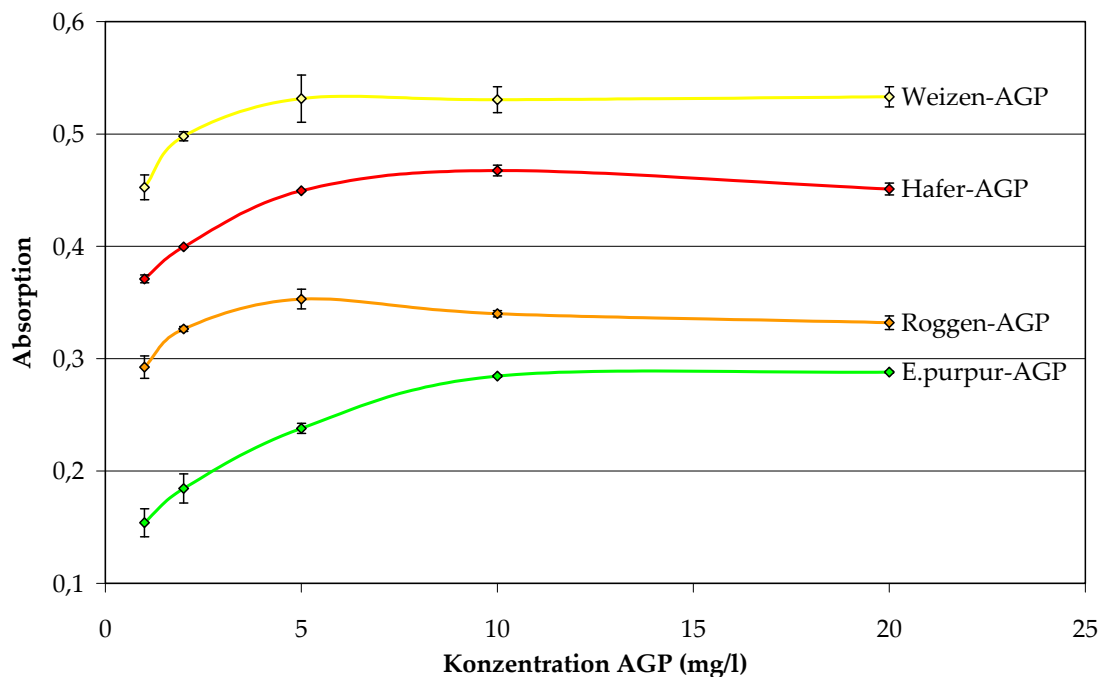


Abbildung 43: Reaktivität von AGPs aus Weizen, Roggen, Hafer und *E.purpurea* gegen β -Yariv-Reagenz mit Antikörpern der Elution E

Die Antikörper der Elution Q zeigen ebenfalls eine deutliche Reaktivität gegenüber mit β -Yariv-Reagenz markierten AGPs (siehe Abbildung 44). Da die Reaktivität der einzelnen AGPs in einer anderen Reihenfolge gestaffelt ist als die Reaktivität gegenüber den polyklonalen Antikörpern der Elution E, wird vermutet, dass die Antikörper der zwei Elutionen gegen unterschiedliche Epitope des Yariv-Reagenzes gerichtet sind. Zur Anwendung der Antikörper für eine fluoreszenzmikroskopische Markierung werden Antikörper der Elution Q gewählt, da AGPs in der Hafer-Pflanze markiert werden sollen, und diese am stärksten mit β -Yariv-Reagenz in Kombination mit Antikörpern der Elution Q reagieren.

Ergebnisse

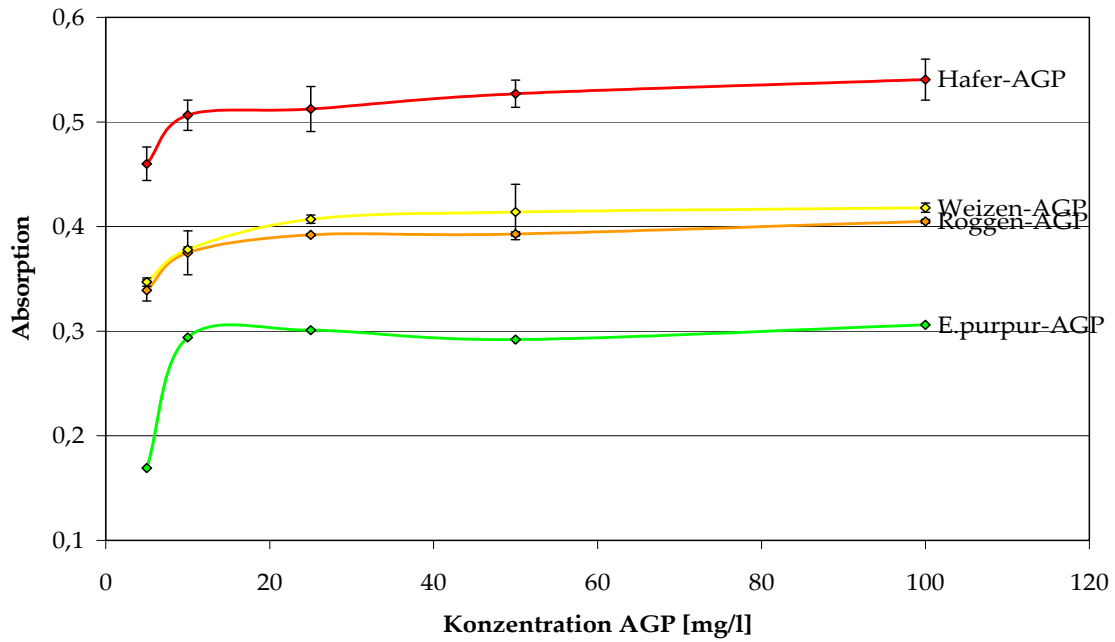


Abbildung 44: Reaktivität von AGPs aus Weizen, Hafer, Roggen und E.purpurea gegen β -Yariv-Reagenz mit polyklonalen Antikörpern der Elution Q

Diese Reaktivität der Yariv-Antikörper der Elution Q gegen das Hafer-AGP wurde zudem auch statistisch ausgewertet, indem Mittelwerte aus zehn Wiederholungen erfasst wurden (Abbildung 45).

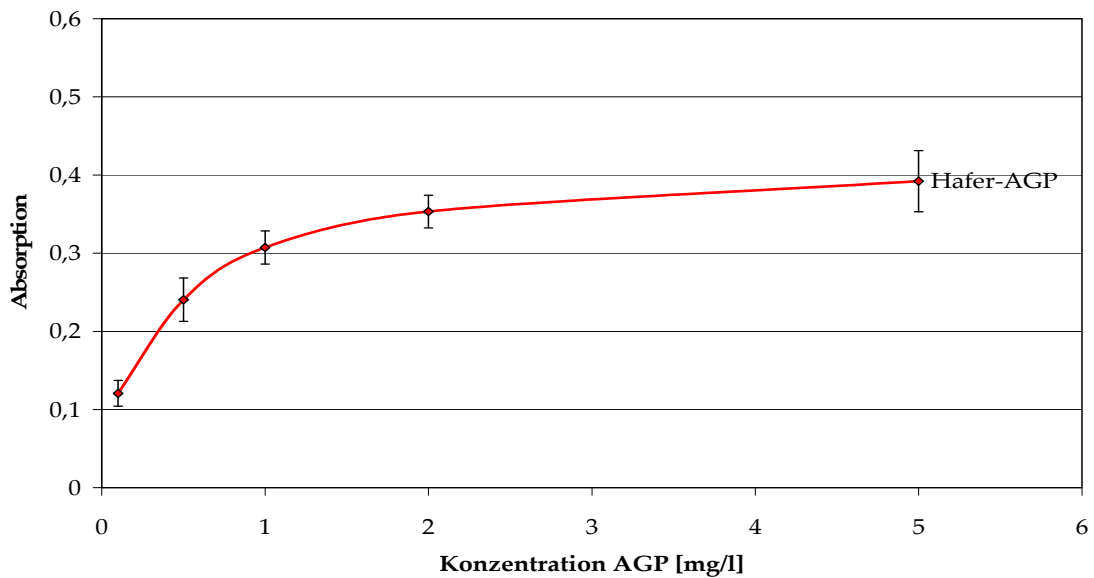


Abbildung 45: Reaktivität von AGPs aus Hafer gegen Yariv-Reagenz mit polyklonalen Antikörpern der Elution Q

Monoklonale Antikörper JIM 8, LM2 und LM6 mit AGPs aus Weizen, Hafer und Roggen

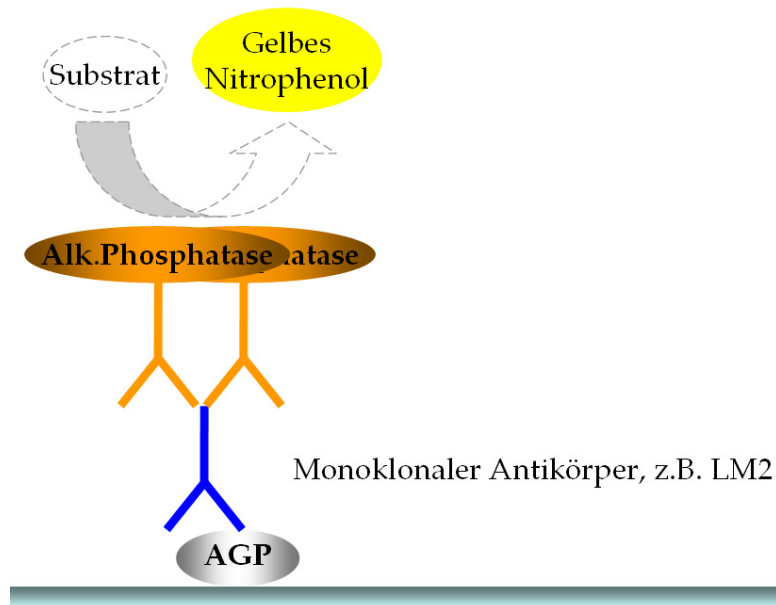


Abbildung 46: Schema des ELISAs mit monoklonalen Antikörpern JIM8, LM2 und LM6: AGP band an der ELISA-Platte, wurde durch Antikörper markiert (LM2, LM6) und mit Hilfe eines Sekundär-Antikörpers mit alkalischer Phosphatase über die Entstehung gelben Nitrophenols photometrisch detektiert.

Mit den monoklonalen Antikörpern LM2 und LM6 zeigte sich bei den verschiedenen AGPs aus Weizen, Hafer und Roggen eine deutliche Reaktivität, wobei die Reaktivität mit LM2 stärker ausfiel als die mit LM6. Beim monoklonalen Antikörper JIM8 zeigte sich bei allen drei isolierten *Poaceae*-AGPs keine Reaktivität.

Antikörper gegen Epitope aus Presssaft aus *Echinacea purpurea* mit AGPs aus Hafer

Es zeigt sich eine Reaktivität des Hafer-AGPs sowohl mit dem Antikörper 4B8D3 als auch mit den Antikörpern 639 „Q“ (siehe Abbildung 47). Alle richten sich ursprünglich gegen Epitope von AGPs aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea*,

reagierten aber offensichtlich auch mit Epitopen von AGPs aus Haferfrüchten. Der monoklonale Antikörper 4B8D3 zeigte eine höhere Aktivität als das Gemisch der polyklonalen Antikörper 639 „Q“.

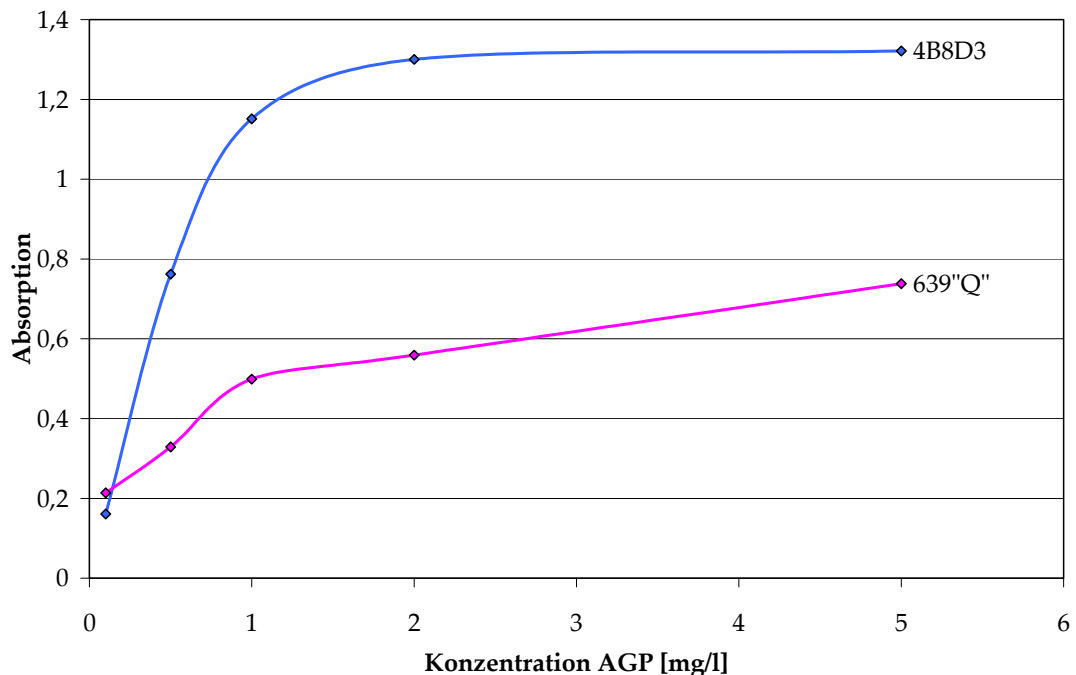


Abbildung 47: Reaktivität von AGP aus Hafer gegen den monoklonalen Antikörper 4B8D3 und gegen den polyklonalen Antikörper 639 „Q“

Antikörper gegen Hafer-AGP

Mit Hilfe der Hybridom Technik wurden nach B 5.1 in Mäusen monoklonale Antikörper gegen Hafer-AGPs hergestellt. Es resultierten fünf stabile, antikörper-produzierende Klone. Mit allen fünf monoklonalen Antikörpern zeigte sich im ELISA eine Reaktivität gegenüber Hafer-AGP. Dabei reagierten die Antikörper 4A1, 1B6, 7B6, 7E3 stärker als der monoklonale Antikörper 7B5 (siehe Abbildung 48). Die Antikörper können auch zur Lokalisierung von AGPs in pflanzlichen Geweben genutzt werden, bzw. zur Strukturanalytik eingesetzt werden, wenn Kenntnis über das Ziel-Epitop des Antikörpers besteht.

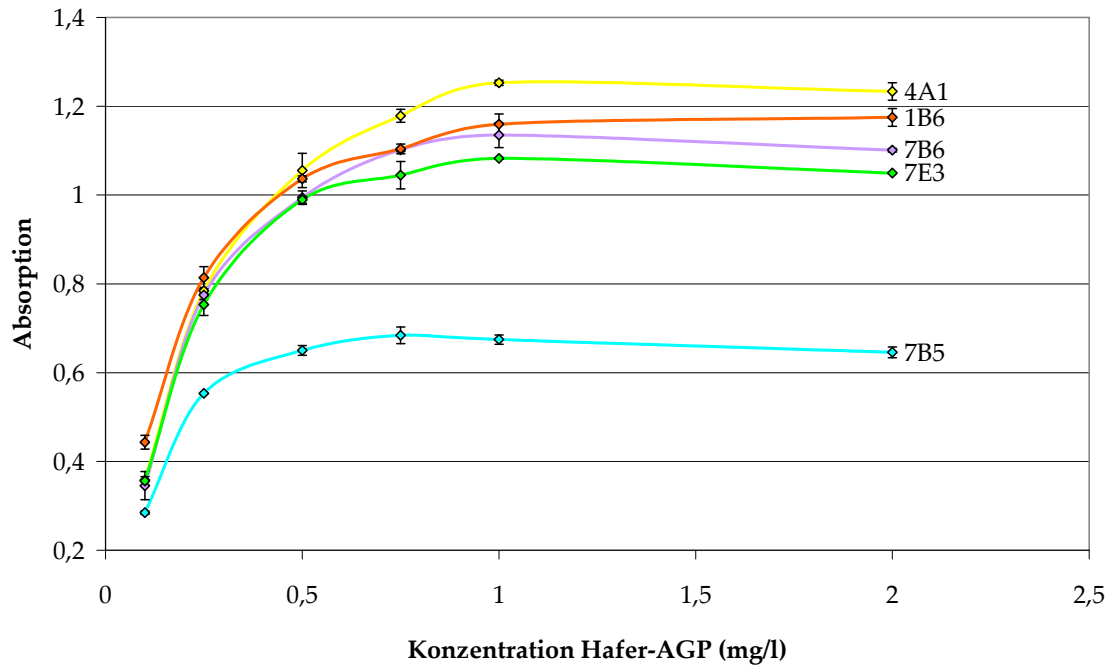


Abbildung 48: Reaktivität von AGP aus Hafer mit den monoklonalen Antikörpern, die gegen Hafer-AGP gebildet wurden

9.2 Lokalisierung von AGPs in pflanzlichen Geweben

Die Lokalisierung von AGPs in pflanzlichen Geweben lässt Rückschlüsse auf mögliche Funktionen der AGPs in der Pflanze selbst zu. Zur besseren Orientierung im pflanzlichen Gewebe dienen zwei Darstellungen: In Abbildung 49 ist ein geschlossen kollaterales Leitbündel einer monokotylen Pflanze dargestellt. Man erkennt das Phloem an dünnen Zellwänden der Siebröhren, das Xylem an den dickeren Zellwänden der Tracheen und Tracheiden. Die funktionalen Bereiche werden als Metaphloem und Metaxylem bezeichnet. Protophloem und Protoxylem sind nicht mehr funktionsfähig und liegen in Abbildung 49 als obliterierte (verschlossene) Gewebe vor (ESAU, 1969). Im Spross des Hafers bildet sich hingegen aus dem Protoxylem im Laufe der Differenzierung eine Lakune durch das zerrissene Protoxylem. Das Xylem wird nach außen hin von zwei großen Tracheen begrenzt. Im Fall der Leitgefäße im Spross des Hafers werden Phloem und Xylem von je einer Sklerenchymkappe unten und oben umgeben. In Abbildung 50 ist ein Ausschnitt im Bereich der Grenze zwischen Rinde und Leitzylinder einer monokotylen Wurzel dargestellt. Zu sehen ist von oben nach unten der Rest des Rindenparenchyms mit anschließender tertiärer Endodermis mit verdickten Seiten- und Innenwänden. Innerhalb des Leitzylinders folgen nach der Zellreihe des teilweise sklerenchymatischen Perizykels Phloem- und Xylemstränge.

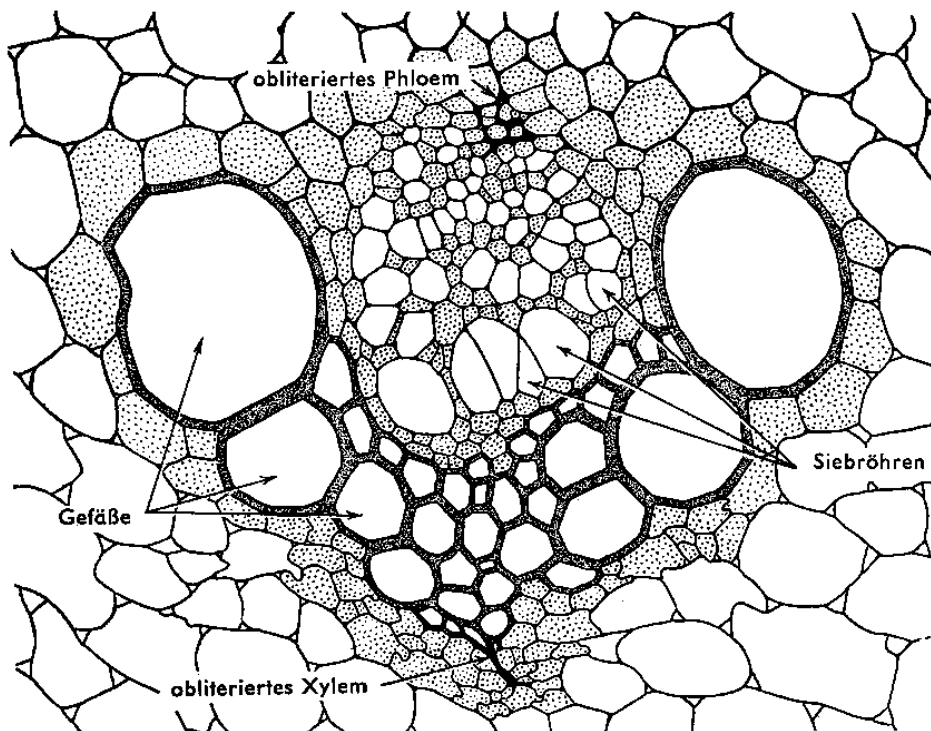


Abbildung 49: Geschlossen kollaterales Leitbündel im Spross einer monokotylen Pflanze (*Asparagus*), Quelle: ESAU, 1969.

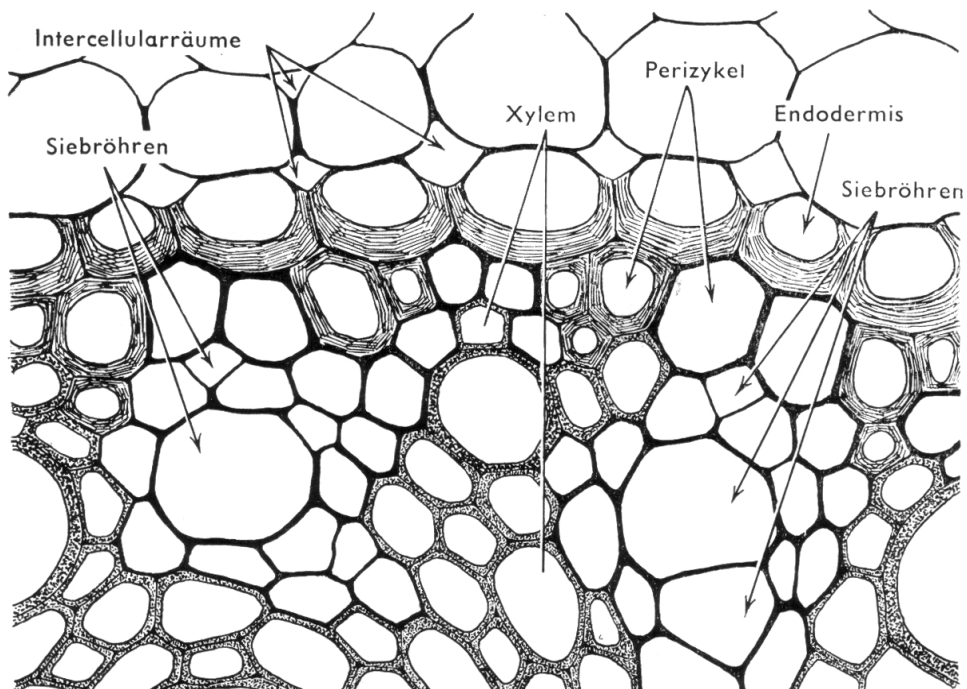


Abbildung 50: Ausschnitt der Grenzregion zwischen Rinde und Leitzylinder von *Zea mays* L., Quelle: ESAU, 1969.

Bei der Markierung von frisch angefertigten Spross- und Wurzelquerschnitten mit β -Yariv-Reagenz, in Kombination mit FITC-markierten Sekundär-Antikörpern mit anschließender fluoreszenzmikroskopischer Detektion, entstehen aussagekräftige Bilder. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass mit β -Yariv-Reagenz alle im Gewebe befindlichen AGPs sichtbar gemacht werden können. Im Unterschied dazu ist die Markierung von AGPs mit monoklonalen Antikörpern eingeschränkter, da Antikörper stets nur mit einem Epitop reagieren, welches bei Kohlenhydraten nur etwa 5-8 Zucker umfasst. Um auszuschließen, dass β -Yariv-Reagenz unspezifisch am Schnitt bindet, wurde zur Negativkontrolle statt β -Yariv-Reagenz das α -Yariv-Reagenz genutzt (eigene Herstellung). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Negativkontrolle von Hafer-Spross und -Wurzel finden sich in Abbildung 51 wieder. Jeweils auf der linken Seite befindet sich die Laser-Anregung des FITC, mittig die Transmissions-Aufnahme und rechts ein Overlay der beiden Bilder. Man erkennt in der Negativkontrolle nur eine sehr geringe Fluoreszenz, wobei in Wurzelschnitten die Autofluoreszenz insgesamt stärker ausgeprägt ist als in Sprosschnitten. So findet man eine sichtbare Autofluoreszenz im Grenzbereich zwischen Leitzylinder und Rinde, sowie die Fluoreszenz von Zellwänden einiger Tracheen. Da die Autofluoreszenz jedoch eher schwach ausfällt, ist es möglich eine Lokalisierung von AGPs über FITC durchzuführen.

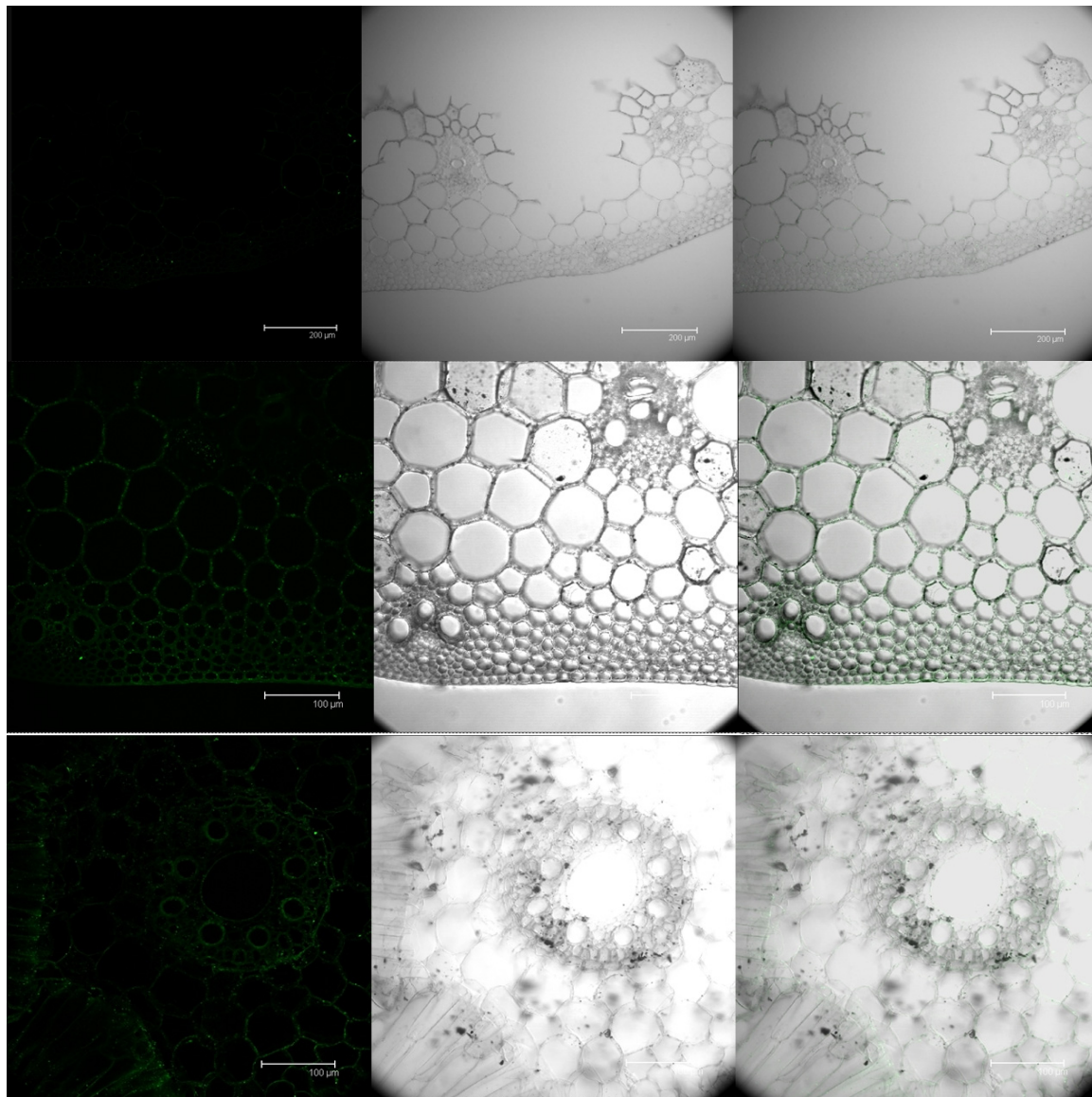


Abbildung 51: Negativkontrolle der Immunmarkierung mit α -Yariv-Reagenz statt β -Yariv-Reagenz am Hafer-Spross und -Wurzel

Bildreihe 1: Negativkontrolle der Immunmarkierung mit α -Yariv-Reagenz im Querschnitt des Hafer-Spross (Skala 200 μm). Von außen nach innen zeigt der Schnitt das Abschlussgewebe (Epidermis), Kollenchym und Parenchym, darin eingebettet geschlossen kollaterale Leitbündel, bestehend aus Phloem, Xylem und Sklerenchymkappen. Es ist eine leichte Fluoreszenz des Abschlussgewebes zu erkennen.

Bildreihe 2: In dieser Abbildung der Negativkontrolle erkennt man eine leichte Markierung der cutinisierten Schichten der Epidermis und der Zellwandbereiche von Epidermis, Kollenchym und Parenchym (Skala 100 μm). Zudem fluoreszieren auch die Zellwände der xylematischen Leitgefäße schwach.

Bildreihe 3: Negativkontrolle der Immunmarkierung mit α -Yariv-Reagenz im Querschnitt der Hafer-Wurzel (Skala 100 μm). Von außen nach innen zeigt der Schnitt das Abschlussgewebe der Wurzel (Rhizodermis) mit anschließendem Rindenparenchym. Dieses wird durch die Endodermis vom inneren Leitzylinder abgegrenzt. Der Leitzylinder wird nach außen von einem Perizykel begrenzt, es folgen in abwechselnder Reihenfolge xylematische und phloematische Bereiche. Eine schwache Markierung findet sich im Bereich der Zellwand von Endodermis, Perizykel und der großen Tracheen des xylematischen Bereichs wieder.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Immunmarkierung von Hafer-Spross und -Wurzel mit β -Yariv-Reagenz finden sich in Abbildung 52 und Abbildung 53 wieder. Auf der linken Seite befindet sich die Aufnahme, in welcher der Laser das FITC des Sekundärantikörpers zur Fluoreszenz anregt, mittig jeweils die Transmissions-Aufnahme und rechts ein Overlay der beiden Bilder. Die Immunmarkierung zeigt eine deutliche Fluoreszenz oberhalb der Autofluoreszenz im Zellwandbereich des Xylems in Spross und Wurzel. Hier sind es besonders die Tüpfelkanäle, deren Wände markiert sind. Besonders stark ist die Fluoreszenz im Bereich der Mittellamelle/Primärwand eines Tüpfels.

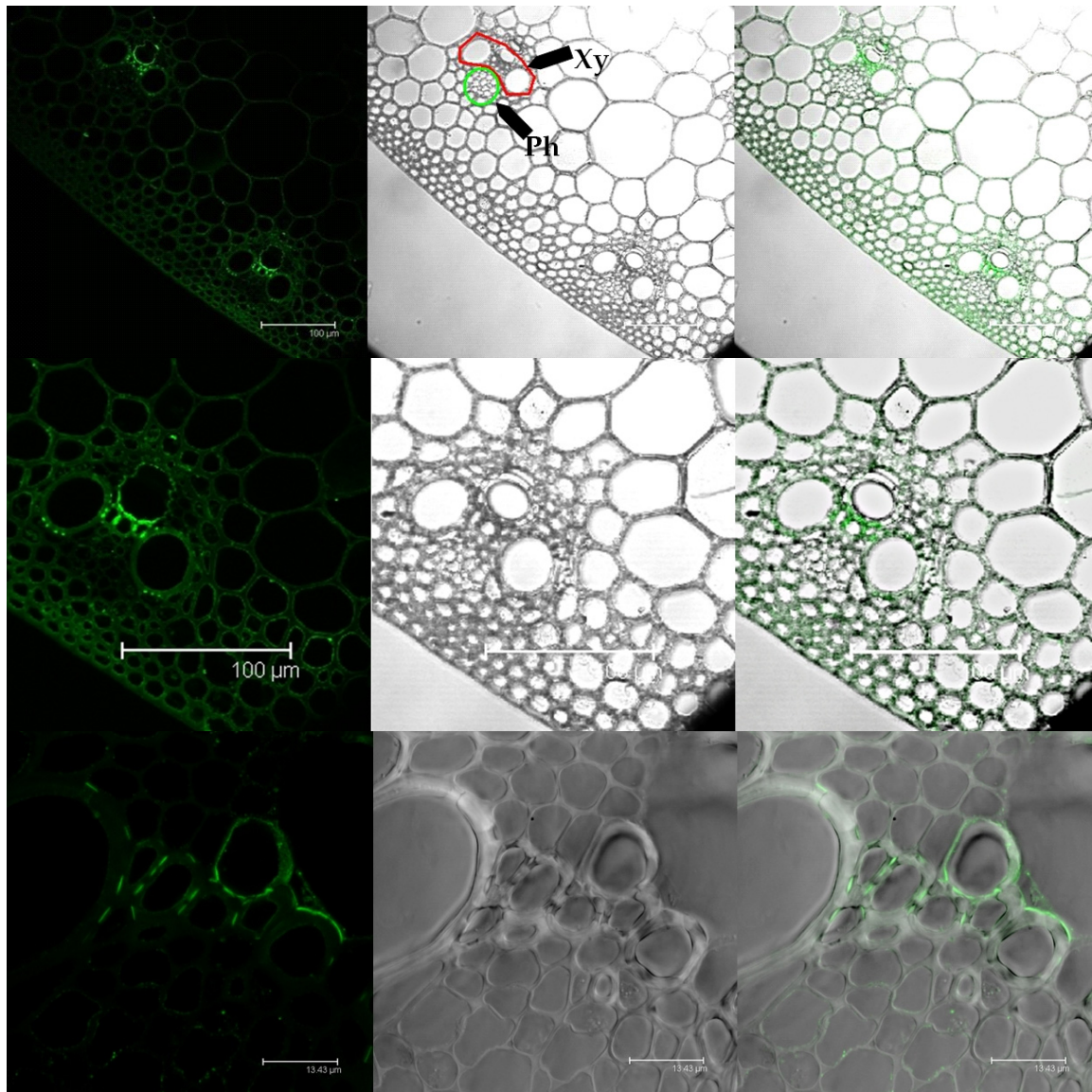


Abbildung 52: Immunmarkierungen von AGPs mit Yariv-Reagenz in Querschnitten an Hafer-Spross

Bildreihe 1: Immunlokalisierung der AGPs mit β -Yariv-Reagenz im Querschnitt des Hafer-Spross (Skala 100 μm). Von außen nach innen zeigt der Schnitt das Abschlussgewebe (Epidermis), Kollenchym und Parenchym, darin eingebettet geschlossen kollaterale Leitbündel, bestehend aus Phloem (Ph), Xylem (Xy) und Sklerenchymkappen. Besonders im Bereich des Xylems konnte eine hohe Konzentration an AGPs lokalisiert werden. Die schwache Markierung der Epidermis, des Kollenchyms und des Parenchym ist auf eine Autofluoreszenz dieser Gewebe im Spross zurückzuführen.

Bildreihe 2: Bildausschnitt aus *Bildreihe 1*. Im Leitbündel erkennt man eine starke Immunmarkierung des Xylems, bei dem hauptsächlich die Zellwände der Tracheen und Tracheiden markiert sind.

Bildreihe 3: In dieser Vergrößerung des xylematischen Bereiches im Spross (Skala 13,43 μm) erkennt man eine schwache Markierung der Zellwand, der Tracheen und Tracheiden und eine deutliche Immunmarkierung der Tüpfelkanäle zwischen den einzelnen Zellen. Gerade in Bereichen der Mittellamelle und Primärwand, in denen Tüpfelkanäle zwei benachbarte Zellen verbinden, ist die Markierung am deutlichsten.

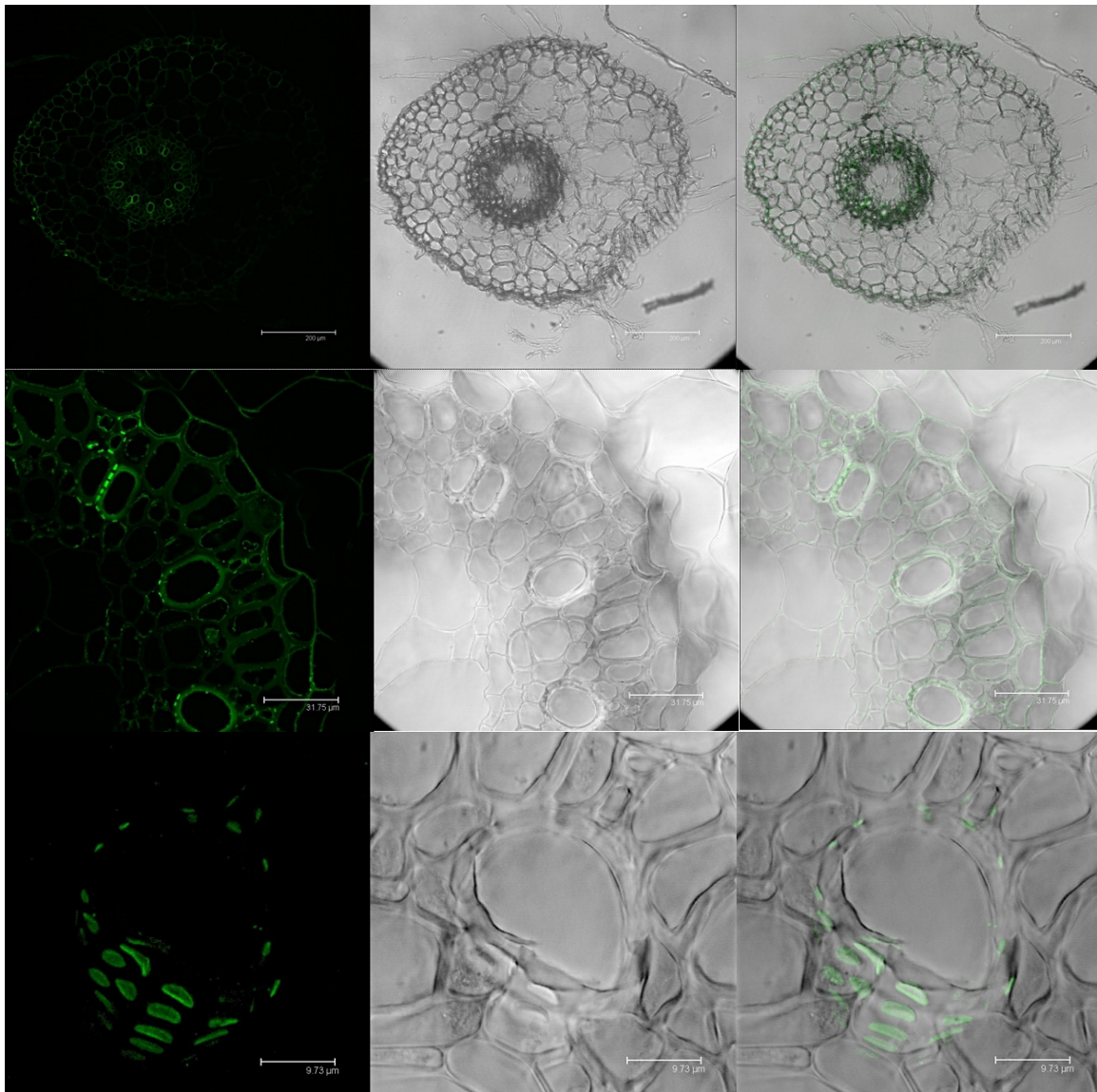


Abbildung 53: Immunmarkierungen von AGPs mit Yariv-Reagenz in Querschnitten an Hafer-Wurzel

Bildreihe 1: Immunlokalisierung der AGPs im Querschnitt der gesamten Hafer-Wurzel (Skala 200 μm). Von außen nach innen zeigt der Schnitt die Rhizodermis mit anschließendem Rindenparenchym, welches durch eine Endodermis vom inneren Leitzyylinder begrenzt wird. Der Leitzyylinder wird nach außen von einem Perizykel begrenzt, es folgen in abwechselnder Reihenfolge xylematische und phloematische Bereiche, wobei die Mitte des Leitzyklinders bei der

untersuchten Wurzel mit parenchymatischem Gewebe ausgekleidet war. Die deutlichste Markierung befindet sich im Leitzylinder im xylematischen Bereich.

Bildreihe 2: Bildausschnitt aus *Bildreihe 4*. Man erkennt eine schwache Fluoreszenz der Endodermis und auch des Perizykels. Die Tracheen des Xylems sind deutlich immunmarkiert. Dort sind es besonders die Tüpfel, die eine hohe Konzentration an AGP aufweisen.

Bildreihe 3: zeigt eine schräg angeschnittene Trachee im Leitzylinder aus dem Querschnitt einer Haferwurzel (Skala 9,73 μm). Man erkennt die spezifische Immunmarkierung im Bereich der Tüpfel, wo die Zellwand nur aus Mittellamelle und Primärwand besteht.

Die Immunmarkierung mit dem monoklonalen Antikörper 4A1, der eigens gegen Hafer-AGP erstellt wurde, wurde nach B 6.1 durchgeführt, wobei bei der Negativkontrolle 4A1 weggelassen wurde. In der Negativkontrolle erkennt man die schwache Autofluoreszenz der Epidermis des Sprosses und eine schwache Autofluoreszenz im Leitgewebe der Wurzel im Bereich der Zellwände von Endodermis, Perizykels und der großen Tracheen (Abbildung 54). Die Immunmarkierung mit dem monoklonalen Antikörper 4A1, der gegen ein Epitop aus Hafer-AGP gerichtet ist, markiert insbesondere Zellwände des Phloems, also dem Teil des Leitgewebes, der die Assimilat-Leitung übernimmt (Abbildung 55).

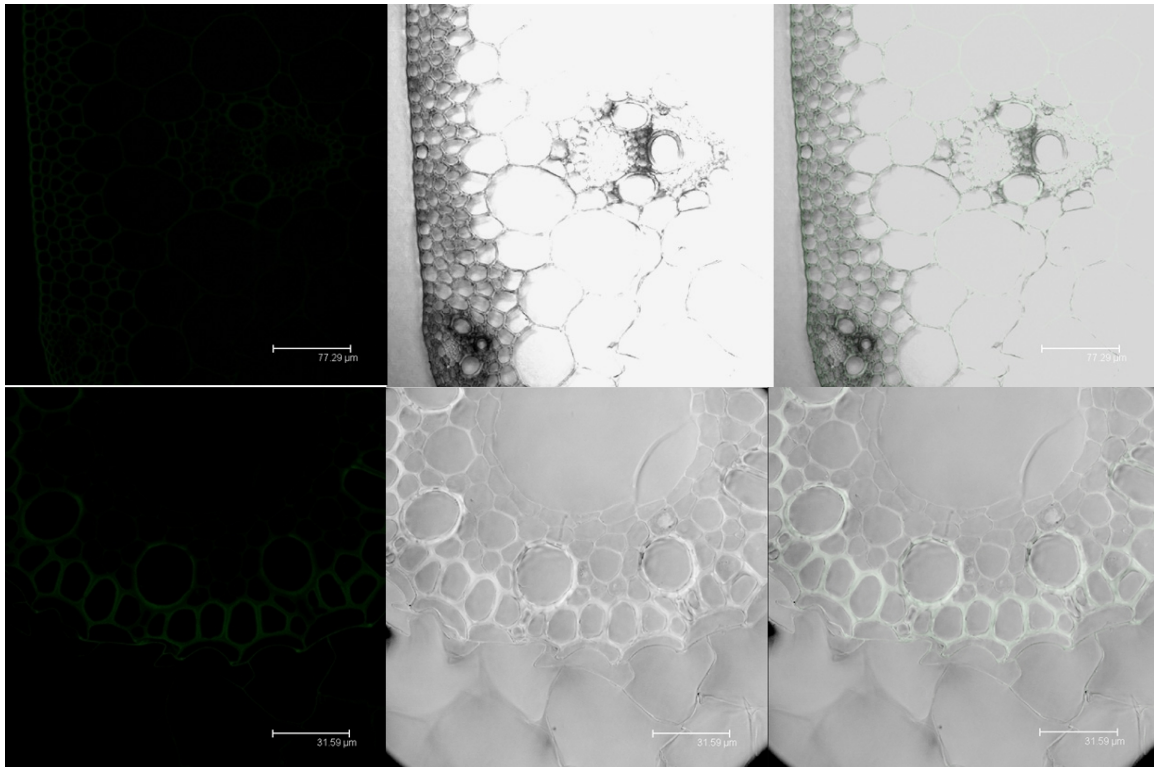


Abbildung 54: Negativkontrolle der Immunmarkierung durch Weglassen von mAB 4A1 an Hafer-Spross und -Wurzel

Bildreihe 1: Negativkontrolle der Immunmarkierung (durch Weglassen des monoklonalen Antikörpers 4A1) im Querschnitt des Hafer-Spross (Skala 77,29 µm). Von außen nach innen zeigt der Schnitt das Abschlussgewebe (Epidermis), Kollenchym und Parenchym, darin eingebettet geschlossen kollaterale Leitbündel, bestehend aus Phloem, Xylem und Sklerenchymkappen. Es ist eine sehr schwache Fluoreszenz der cutinisierten Schichten der Epidermis zu erkennen.

Bildreihe 2: Negativkontrolle der Immunlokalisierung der AGPs im Querschnitt der Hafer-Wurzel im Bereich des Leitzylinders (Skala 31,59 µm). Von außen nach innen zeigt der Schnitt den parenchymatischen Bereich der Rinde, die Endodermis und das Innere des Leitzylinders mit Perizykel, Phloem und Xylem. Eine schwache Fluoreszenz findet sich im Zellwandbereich von Endodermis, Perizykel und den großen Tracheen wieder.

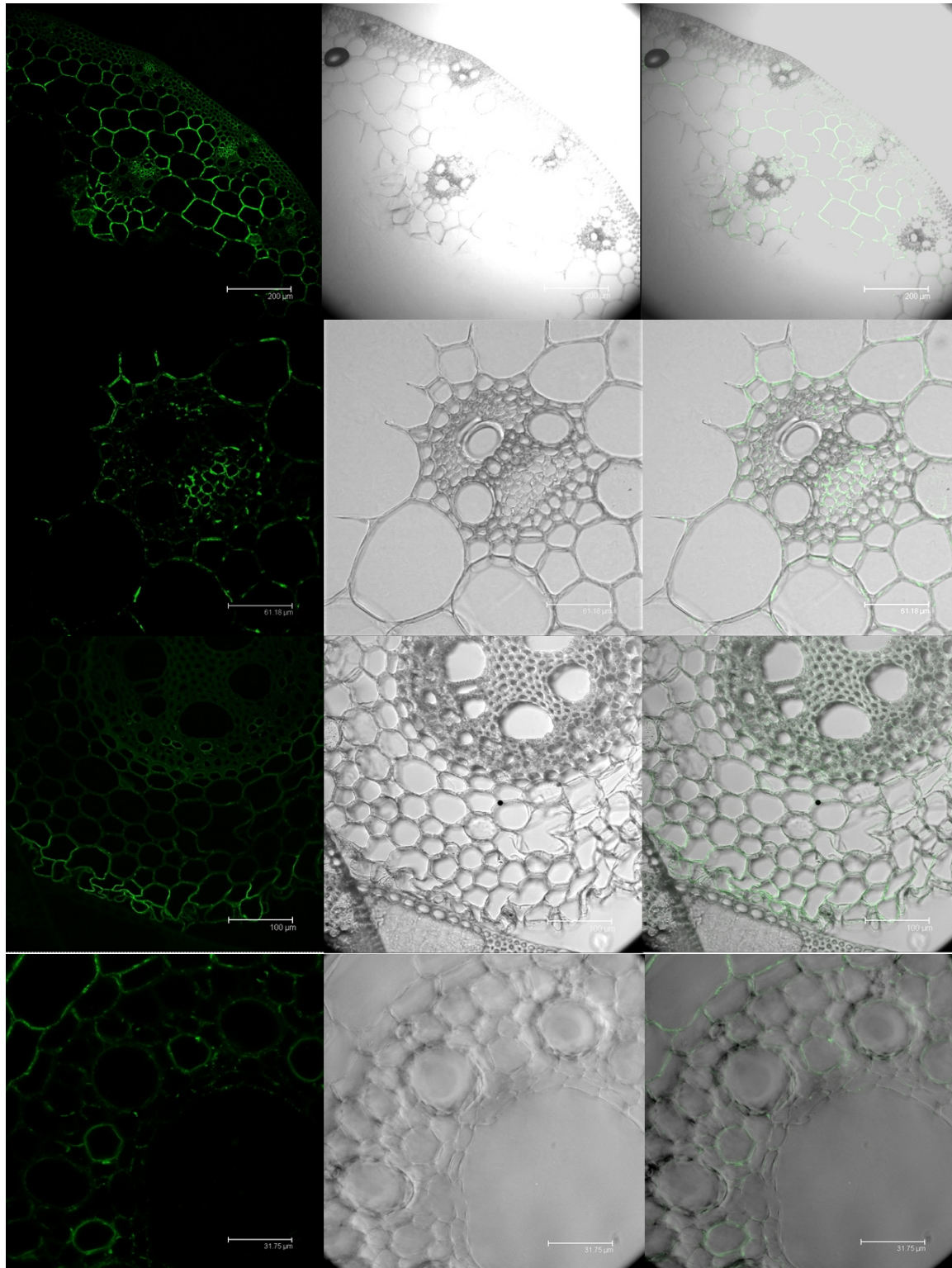


Abbildung 55: Immunmarkierung von AGPs mit dem mAB 4A1 in Querschnitten von Hafer-Spross und -Wurzel

Bildreihe 1: Immunlokalisierung von AGPs mit dem monoklonalen Antikörper 4A1 im Querschnitt des Hafer-Spross (Skala 200 µm). Von außen nach innen zeigt der Schnitt das Abschlussgewebe (Epidermis), Kollenchym und Parenchym, darin eingebettet geschlossen kollaterale Leitbündel, bestehend aus Phloem, Xylem und Sklerenchymkappen. Besonders im Bereich des Phloems

und des Parenchyms konnte eine hohe Konzentration an AGPs lokalisiert werden. Die schwache Markierung der cutinisierten Schichten der Epidermis ist auf Autofluoreszenz zurückzuführen.

Bildreihe 2: Die Aufnahme (Skala 61,18 μm) zeigt einen Querschnitt eines Leitbündels im Spross. Die Immunmarkierung zeigt eine deutliche Fluoreszenz der Zellwände des umgebenden parenchymatischen Bereichs und eine deutliche Fluoreszenz der Zellwände des phloematischen Bereichs.

Bildreihe 3: Immunlokalisierung der AGPs durch den monoklonalen Antikörper 4A1 im Querschnitt der Hafer-Wurzel (Skala 100 μm). Von außen nach innen zeigt der Schnitt die Rhizodermis mit anschließendem Rindenparenchym, welches durch eine Endodermis vom inneren Leitzylinder begrenzt wird. Der Leitzylinder wird nach außen von einem Perizykel begrenzt, es folgen in abwechselnder Reihenfolge xylematische und phloematische Bereiche. Eine schwache Fluoreszenz ist wie in der Negativkontrolle im Bereich der Rhizodermis und des Leitzylinders zu sehen. Zusätzlich tritt jedoch eine Immunmarkierung im Bereich des Phloems auf, hier sind die Zellwände der größeren Siebröhren markiert.

Bildreihe 4: Die Aufnahme zeigt einen Ausschnitt aus dem inneren Bereich der Hafer-Wurzel (Skala 31,75 μm). Man erkennt eine schwache Fluoreszenz des Parenchyms, der Rinde und der Endodermis. Im Inneren des Leitzylinders sind die Zellwände der größeren Siebröhren markiert.

D Diskussion

Zivilisationskrankheiten wie Typ-2-Diabetes, kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs stehen immer mehr im Fokus der Gesellschaft. Allein 2006 wurden etwa 8 Millionen Diabeteskranke in Deutschland registriert. Die Versorgung der betroffenen Patienten belastete die Volkswirtschaft laut CODE-2-Studie 1998 mit rund 16 Millionen Euro, davon trugen private und gesetzliche Krankenkassen 61% der anfallenden Kosten (MASSI-BENEDETTI, 2002). Um diese Kosten zu verringern, ist eine Prävention in der Entstehung dieser Erkrankungen der einfachste Weg. Dazu gehört eine ausgewogene Ernährung. Kohlenhydrathaltige Nahrung macht etwa 40 bis 75% der durch Nahrung aufgenommenen Energie aus und stellt somit die bedeutendste Energiequelle in der Humanernährung dar. Gesünder als Weißmehlprodukte gelten Vollkornprodukte aus Weizen, Roggen und Hafer; sie sind geeignet, schnell Energie zu liefern, diese aber auch über einen längeren Zeitraum aufrecht zu halten. Zusätzlich wird ein positiver Effekt auf die Gesundheit des Gastrointestinaltrakts beschrieben (VITAGLIONE et al., 2008; STEPHEN, 1994). Die „functional food“ auf Vollkorn-Basis können aber auch noch mehr: In Studien zur Behandlung und Prävention oben genannter Erkrankungen durch den Verzehr von Vollkornprodukten statt Weißmehlprodukten werden positive Effekte beschrieben (ANDERSON et al., 2000; LIU et al., 1999; MEYER et al., 2000, LIU et al., 2000; EGEBERG et al., 2008). Bestandteile von Vollkornprodukten sind auch AGs, für die bereits eine präbiotische Wirkung beschrieben wurde (KELLY, 1999). AGPs aus *Echinacea purpurea* zeigen *in vitro* immunmodifizierende Eigenschaften (ALBAN et al., 2002).

In der Pflanze selbst spielen AGPs für das Wachstum und die Differenzierung im Bereich zwischen Zellwand und Zellmembran, aber auch für wichtige Apoptose-Vorgänge eine bedeutende Rolle als Signalmoleküle.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Isolierung und strukturellen Charakterisierung von Arabinogalactan-Proteinen (AGPs) als potentielle Wirkstoffe aus den Früchten von Weizen, Roggen und Hafer mithilfe einer spezifischen Präzipitation mit β -Yariv-Reagenz. Weiterhin wurde eine Lokalisierung der AGPs in verschiedenen Pflanzenorganen der Haferpflanze vorgenommen, um erste Hinweise auf potentielle Funktionen von AGPs in der Pflanze zu erhalten.

1 Isolierung und Charakterisierung des AGPs

1.1 Isolierung des AGPs

Es wurde zunächst aus zerkleinertem Drogenmaterial ein wässriger Extrakt hergestellt, so dass also unter anderem hydrophile Glykoproteine wie AGPs in Lösung gehen konnten. Nach der Filtration blieb ein trüber gelblicher Extrakt, der zentrifugiert wurde, um Amyloplasten bzw. unlösliche Stärke abzutrennen. Der klare Überstand wurde erhitzt, um Proteine zu denaturieren und nach Zentrifugation zu verwerfen. Die Arabinogalactan-Proteine blieben dabei in Lösung. Dies ist auf den großen Kohlenhydratanteil (etwa 90%) zurückzuführen, der das kovalent gebundene Protein vor einer Hitzedenaturierung schützt.

Eine zusätzliche Behandlung des Extrakts mit α -Amylase baute noch vorhandene lösliche Stärke ab. Der Einsatz des Enzyms verhinderte das Vorkommen größerer Anteile von Stärke in der hochmolekularen Fraktion, was zu einer Aufkonzentrierung derselben führte und somit die Fällung von AGPs

mit β -Yariv-Reagenz erleichterte. Das Enzym konnte nach einer Hitzedenaturierung wieder abzentrifugiert werden. Um eine hochmolekulare Fraktion des hydrophilen Extraktes als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der AGPs zu erhalten, wurde nur das Retentat nach einer Dialyse gegen Aqua dem. weiterverwendet. Nach Gefriertrocknung konnte das Retentat bei -20°C gelagert werden. Zur Isolierung von AGPs musste die hochmolekulare Fraktion wieder in Lösung gebracht werden. Hierbei nicht wasserlösliche Bestandteile wurden durch eine Zentrifugation abgetrennt und verworfen. Der klare Überstand wurde zur spezifischen Fällung von AGPs mit β -Yariv-Reagenz genutzt. Die Möglichkeit der spezifischen Fällung eines Glycoproteins aus einem komplexen Gemisch erbringt den Vorteil eines reinen Endproduktes, welches durch herkömmliche Methoden wie z.B. Ausfällungen bei unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen oder dem Versuch einer Auftrennung eines komplexen Substanzgemisches an einer Chromatographiesäule nicht immer erhalten werden kann. Eine Ausnahme bildet hier eine Aufreinigung von AGPs mit Hilfe einer Affinitätschromatographie mittels einem Anti-Galactan Myeloma Protein J539 (ANDREW und STONE, 1983), an welcher unter anderem auch AG-Peptide aus Weizen-Endosperm isoliert wurden.

β -Yariv-Reagenz ist ein synthetisches Phenylglycosid, welches ursprünglich genutzt wurde, um eine besondere Klasse von Lectinen zu fällen (JERMYN et al., 1975), die im Nachhinein als Arabinogalactan-Proteine identifiziert wurden. β -Yariv-Reagenz ist in der Lage, spezifisch an Arabinogalactan-Proteine zu binden und diese zu präzipitieren. Dabei bildet es in wässriger Lösung wahrscheinlich Komplexe aus zehn bis fünfzig Molekülen, die sich wie Münzen einer Geldrolle übereinander stapeln (WOODS et al., 1978). Der Präzipitationsmechanismus mit den AGPs selbst ist unbekannt, jedoch binden nicht alle Varianten des Yariv-Reagenzes an AGPs. Der Zucker am Phenylrest des Reagenzes muss β -D-Galactose, β -D-Glucose oder α -L-Fucose sein, damit das Yariv-Reagenz eine mit

AGPs präzipitieren kann. Bei der Addition von β -D-Mannosyl und α -L-Galactosylresten an das Phenylazoderivat reagiert das Produkt mit vielen AGPs nicht (NOTHNAGEL, 1997). Die Diazogruppe des Phenylrestes muss in *para*-Stellung stehen (JERMYN et al., 1975; JERMYN, 1978).

Auch strukturelle Voraussetzungen für mit β -Yariv-Reagenz fällbare AGPs sind nicht vollständig geklärt, aber lassen auf eine Beteiligung des Proteinrückgrats sowie des Kohlenhydratanteils schließen. GLEESON und JERMYN (1979) beschreiben, dass auch Degradationsprodukte von AGPs, deren Proteinrückgrat größtenteils abgespalten ist, mit β -Yariv-Reagenz präzipitierbar sind. Ein Abspalten peripherer Zuckerreste hingegen führt zum Verlust der Präzipitationsfähigkeit. Rückschließend ließe sich sagen, dass β -Yariv-Reagenz wie ein synthetischer „AGP-Antikörper“ an periphere Zuckerreste als Epitop bindet und mit ihnen ausfällt. Gegen diese Hypothese sprechen die Untersuchungen nach GLEESON und CLARKE (1979), die eine unverminderte Präzipitationsfähigkeit nach Abspaltung der Arabinosen von AGP aus *Gladiolus gandavensis* nachwiesen. Auch die Untersuchung der verschwundenen Präzipitationsfähigkeit von β -Yariv-Reagenz mit AGPs aus *Acacia senegal* nach Spaltung des Proteinrückgrats von AKIYAMA et al. aus dem Jahre 1984 widerspricht der ersten Hypothese. Vielleicht ist es die Tertiärstruktur eines AGPs, die bei der Bindung an β -Yariv-Reagenz eine wesentliche Rolle spielt. So wäre das Protein insofern beteiligt, als dass es die Position der einzelnen Kohlenhydratpartien zueinander regelt, wäre aber selbst kein Teil des Ziel-Epitopes von β -Yariv-Reagenz.

Bisher wurde postuliert, dass AGPs aus Weizen und Roggen nicht mit β -Yariv-Reagenz fällbar seien (JERMYN et al., 1975.). So konzentrierten sich bisherige Anstrengungen auf die Isolierung von AG-Peptiden aus Weizen- und Roggen-Endosperm mittels einer Aufreinigung über eine Chromatographiesäule (VAN

DEN BULCK et al., 2005; LOOSVELD et al., 1998). Mit β -Yariv-Reagenz angefärbte Querschnitte von Weizenfrüchten zeigten jedoch keine Färbung des Endosperms, jedoch eine leichte Färbung des Gewebes der Aleuronschicht (ANDERSON et al., 1977). Mit β -Yariv-Reagenz isolierbare AGPs sind demnach vorhanden, eine Isolierung und Charakterisierung dieser AGPs wurde bis jetzt jedoch noch nicht durchgeführt.

Das abzentrifugierte Präzipitat aus Roh-AGP und β -Yariv-Reagenz wurde mit Natriumdithionit versetzt, welches das β -Yariv-Reagenz zerstörte und damit die Bindung zwischen Reagenz und AGP auch aufhob. Mittels einer Dialyse wurden Bruchstücke des β -Yariv-Reagenzes und Natriumdithionit größtenteils entfernt.

Die resultierende Roh-AGP-Lösung wurde gefriergetrocknet. Bei erneutem Lösen des Roh-AGPs in Aqua dem. fielen unlösliche Bestandteile auf, die abzentrifugiert wurden, so dass nur der klare Überstand zu einer zweiten Yariv-Fällung eingesetzt werden konnte. Dieser Aufreinigungsschritt der zweiten Yariv-Fällung diente der Isolierung eines hochreinen AGPs. Gerade aus Roh-AGPs aus Weizen und Roggen wurden so Verunreinigungen durch xylose- und glucosehaltige Substanzen entfernt. Der Hauptteil der glucosehaltigen Substanz wurde dabei durch den Zentrifugationsschritt als Bodensatz entfernt, der Hauptteil der xylosehaltigen Substanz wurde dabei durch die zweite spezifische Fällung des AGPs mit β -Yariv-Reagenz mit dem Überstand verworfen.

Der AGP-Gehalt der getrockneten Drogen aus Weizen, Roggen und Hafer ist mit etwa 0,005% um etwa eine Zehnerpotenz niedriger im Vergleich zur Ausbeute der AGPs aus der Wurzel von *Echinacea pallida* (0,01-0,08%, THUDE und CLASSEN, 2005). Aus Wurzeln von *Baptisa tinctoria* wurden AGPs isoliert, deren Ausbeute bei 0,02% lag (WACK et al., 2005). Auch der AGP-Gehalt von getrocknetem Mistelkraut liegt im gleichen Bereich bei etwa 0,05% (HERBST et al., 2009). Die Ausbeute von AGP aus Zellkulturmedium von

Suspensionskulturen von *Echinacea purpurea* liegt mit 0,4% schon deutlich höher, was dadurch begründet werden kann, dass es sich um Zellkulturen als Ausgangsmaterial handelte (CLASSEN et al., 2000).

Die Ausbeute von AG-Peptiden, die aus Mehlen verschiedener Getreidesorten gewonnen wurden (VAN DEN BULCK et al, 2005), lag bei etwa 0,01% (m/m) bis maximal 0,12% (m/m). So konnten aus Weizenmehl und aus Hartweizenmehl mehr AG-Peptide isoliert werden als aus Mehl von Triticale, Roggen und Gerste.

1.2 Charakterisierung des AGPs

1.2.1 Charakterisierung des Kohlenhydratanteils

Die zweifach mit β -Yariv-Reagenz gefällten und damit hochaufgereinigten AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer weisen in der Bindungstypanalyse einen hohen Gehalt an terminaler Arabinose, 1,3- und 1,3,6-glycosidisch verknüpfter Galactose auf. Auch 1,5-Ara(*f*) und 1,6-Gal(*p*) kommen in größeren Mengen in den Getreide-AGPs vor (siehe Abbildung 56). Die Ergebnisse der Bindungstypanalyse der isolierten AGPs aus Weizen, Roggen und Haferfrüchten sind sich sehr ähnlich, was auf einen gemeinsamen Bauplan des Kohlenhydratanteils hinsichtlich der Verknüpfung der Zucker untereinander hinweist. Dennoch unterscheiden sich die AGPs im Gesamtmolekulargewicht und im Molekulargewicht der einzelnen Kohlenhydrat-Abschnitte voneinander (s.u.). Dabei weisen die mit β -Yariv-Reagenz isolierten AGPs aus Haferfrüchten einen anderen Aufbau auf als die aus Weizen und Roggen.

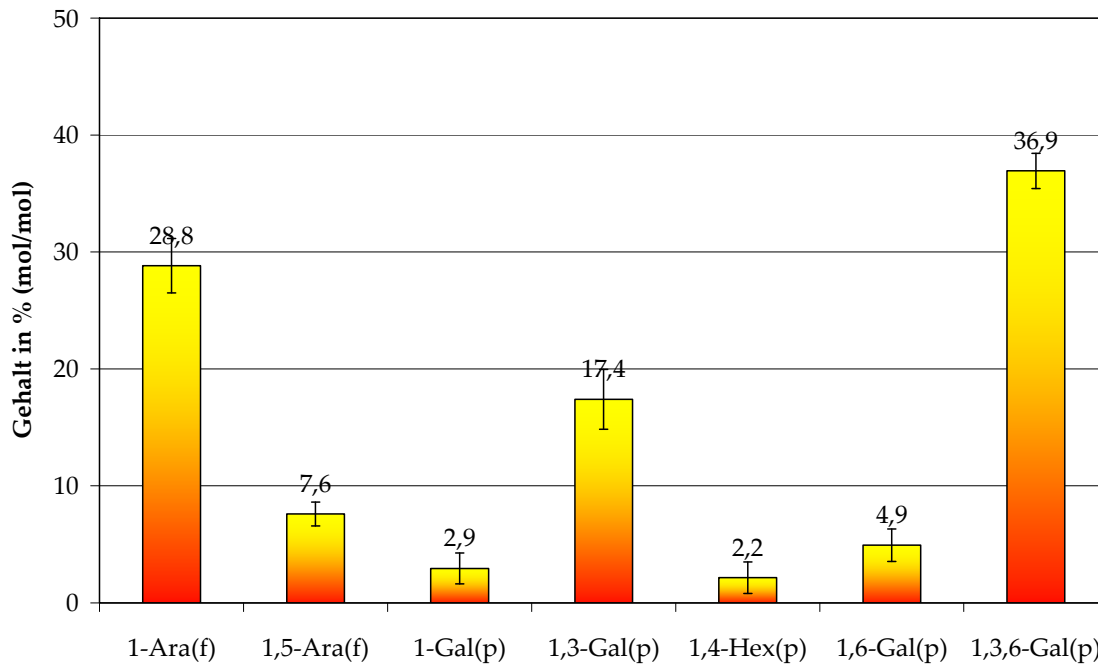


Abbildung 56: Durchschnittliches Ergebnis der Bindungstypanalyse von drei aufgereinigten AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer

Durch eine milde Oxalsäurehydrolyse, durch die labile glycosidische Bindungen gespalten werden, wurden vor allem terminale Arabinosen abgespalten. Übrig blieb ein Grundgerüst, welches reich an Galactose war, wobei der relative Gehalt an 1,6-Galactose deutlich zu- und der an 1,3,6-Galactose abnahm. Auch der relative Gehalt an terminaler Galactose nahm zu, wobei der relative Gehalt an 1,3-Galactose etwas abnahm. Anhand dieser Tatsache lässt sich schlussfolgern, dass Arabinose hauptsächlich in Position 3 der Galactose gebunden war, wenig Arabinose auch in Position 6 von Galactose. Das Rückgrat des Kohlenhydratanteils der Getreide-AGPs besteht somit aus 1,3-glycosidisch verknüpften Galactoseeinheiten, welche in Position 6 kürzere 1,6-Galactose Seitenketten tragen können. Die Galactosereste der Seitenketten können teils in Position 3, teils in Position 6 mit den leicht abspaltbaren Arabinosen substituiert sein. Auch eine direkte Bindung von terminaler Arabinose in Position 6 des 1,3-glycosidisch verknüpften Galactose-Rückgrats ist möglich. Die Beteiligung von Uronsäuren am AGP-Molekül kann ausgeschlossen werden. Mittels der

photometrischen Uronsäuredetektion (nach B 3.1.3) wurde zwar ein Uronsäuregehalt bis 3,3% ermittelt, doch innerhalb der Silylierungsanalyse (nach B 3.1.2) konnte dies nicht bestätigt werden. Auch nach Reduktion nach TAYLOR und CONRAD (1972) konnte massenspektroskopisch keine ursprüngliche Uronsäure in Roggen-AGP nachgewiesen werden.

Schlussfolgernd lassen sich die Kohlenhydratanteile der Getreide-AGPs den Arabinogalactanen Typ II nach ASPINALL et al. (1982) bzw. Typ III nach CLARKE et al. (1979) zuordnen: Bei diesem Arabinogalactan liegt ein 1,3-Gal(*p*)/1,3,6-Gal(*p*)-Rückgrat vor, das in Position 6 kurze 1,6-glycosidisch verknüpfte Galactose-Seitenketten mit terminaler Arabinose in Position 3 oder 6 trägt. Zusätzlich zu diesem Modell kann in den AGPs 1,5-glycosidisch verknüpfte Arabinose wiedergefunden werden (Abbildung 57). Diese wird in der Regel eher mit neutralen Arabinanen assoziiert (WILLATS et al., 2001), wurde aber bereits auch in anderen AGPs, isoliert aus *Acacia senegal* (MOLLARD und BASILE, 2000), *Physcomitrella patens* (LEE et al., 2005), *Pinus radiata* (PUTOCZKI et al., 2007), *Oryza sativa* (YAMAGISHI et al., 1976) oder *Echinacea*-Arten (CLASSEN et al., 2000, THUDE und CLASSEN, 2005) gefunden. Betrachtet man die Peripherie von bereits charakterisierten AGPs, so werden in der Literatur auch Seitenketten mit terminaler L-Fucose, L-Rhamnose, D-Xylose und anderen Zuckern beschrieben (CLARKE et al., 1979, NOTHNAGEL, 1997). FU et al. (2007) finden auch größere Mengen an 3-O-Methyl-L-Rhamnose in AGPs aus *Physcomitrella patens*. In den untersuchten AGPs aus Weizen, Roggen und Hafer ließen sich Seitenketten mit den oben genannten Zuckern jedoch nicht nachweisen. Dass Unterschiede in der Feinstruktur der AGs auftauchen, ist allein schon durch deren Biosynthese bedingt. So kann das Protein eines AGP zwar immer die gleiche Aminosäuresequenz aufweisen, da durch Translation und Transkription als Matrizen-codierter Mechanismus der genetische Code immer in die gleiche Aminosäuresequenz übersetzt wird, aber die Hydroxylierung des

Prolins zu Hydroxyprolin und die Glycosylierung des Proteins werden nicht immer gleich durchgeführt. Obwohl die Enzyme substratspezifisch arbeiten und den Kohlenhydratanteil so fast immer gleich aufbauen können (wiederholende Einheiten), können auch vereinzelt ähnliche Zuckersubstrate für die AG-Synthese genutzt werden (CLASSEN et al., 2005). So kann z.B. statt einer 1,6-Gal(*p*) eine 1,6-Man(*p*) eingebaut werden, was in den isolierten AGPs an einigen Stellen vorgekommen sein könnte und den Gehalt an Mannose in der Neutralzuckeranalyse erklären würde.

Laut den Ergebnissen der ¹³C-NMR-Analyse liegt Galactose im AGP stets in der β -Konfiguration und Arabinose in der α -Konfiguration vor.

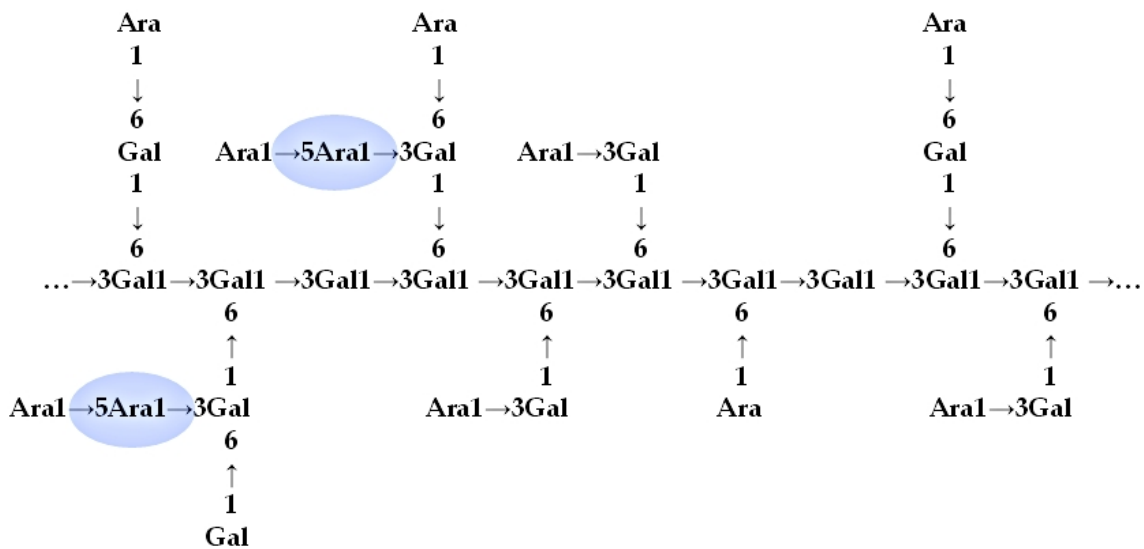


Abbildung 57: Mögliches Strukturmodell 1 des Kohlenhydratgerüsts von AGP aus Weizen, Roggen und Hafer, blau markierte 1,5-Ara(f)

Im Vergleich von Neutralzuckerzusammensetzungen von AG-Peptiden aus Weizen, Dinkel, Roggen und Triticale (VAN DEN BULK et al., 2005) und den mit β -Yariv-Reagenz gefällten AGPs aus Weizen-, Roggen- und Haferfrüchten erkennt man eine ähnliche Zusammensetzung; Arabinose und Galactose sind die Hauptbestandteile, wobei der Arabinosegehalt immer etwas geringer als der

Galactosegehalt ist (Abbildung 58). Zudem kommt in den durch VAN DEN BULCK et al. (2005) isolierten AG-Peptiden auch Xylose in größeren Mengen vor, eventuell ein Hinweis auf eine ungenügende Aufreinigung.

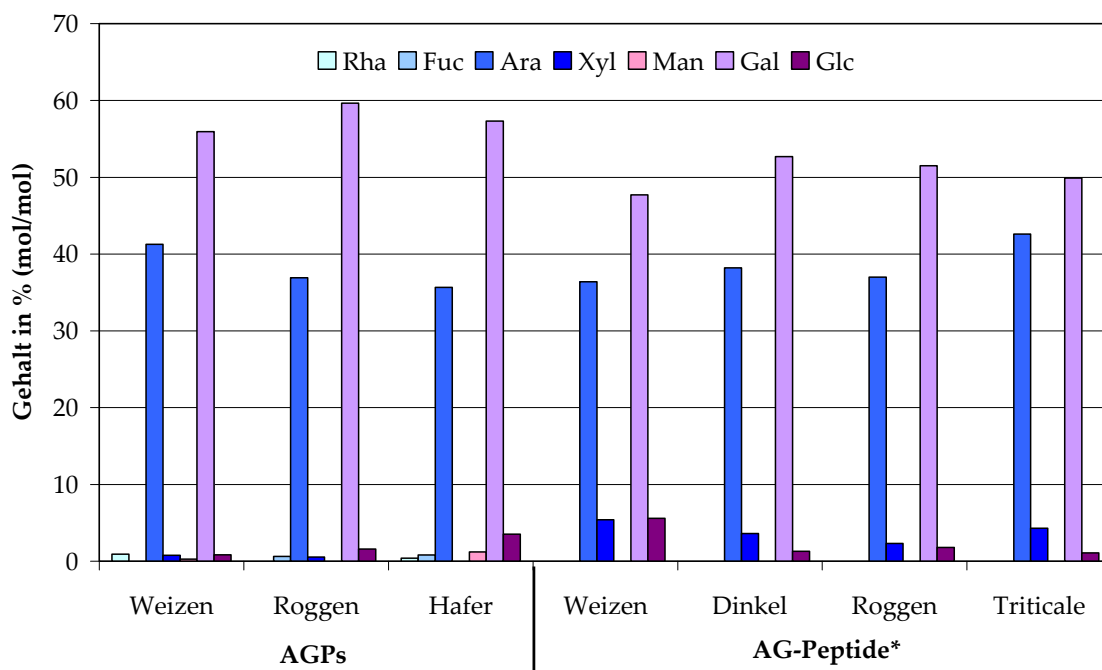


Abbildung 58: Neutralzuckerzusammensetzungen von AGPs und AG-Peptiden aus Getreide (*= Werte aus der Veröffentlichung VAN DEN BULCK et al., 2005).

Weitere Informationen über den Aufbau des Kohlenhydratgerüsts des Hafer-AGPs können anhand der Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse gewonnen werden. Durch die enzymatische Hydrolyse des zweifach gefällten und somit hochreinen Hafer-AGPs mit einer Exo-1,5-Arabinofuranosidase wurde ausschließlich Arabinose als Monosaccharid freigesetzt. Das Enzym konnte kleine Oligo-Arabinoseketten spalten, die 1,5-glycosidisch verknüpft sind, welche am Protein oder am Kohlenhydrat-Rückgrat (in Position 6 einer 1,3-glycosidisch verknüpften Galactose) oder an den Kohlenhydrat-Seitenästen (in Position 3 oder 6 einer Galactose) sitzen könnten. Nach Abspaltung von 1,5-glycosidisch verknüpften Arabinosen in Position 5 bleibt noch je eine einfach verknüpfte Arabinose nach der enzymatischen Hydrolyse übrig. Rein

rechnerisch wurde zwar der Hauptteil, aber nicht alle 1,5-glycosidischen Bindungen von Arabinosen durch die Exo-1,5-Arabinofuranosidase gespalten. Dies mag an einer sterischen Hinderung des Enzyms liegen. Interessant ist die Anwendung einer Exo-1,3-Galactanase im Vergleich mit der Anwendung einer Kombination einer Exo-1,3-Galactanase mit einer Exo-1,5-Arabinofuranosidase. Durch die alleinige Anwendung der Exo-1,3-Galactanase sinkt der 1-Ara(*f*)-Gehalt im Vergleich zum 1,5-Ara(*f*)-Gehalt drastisch ab. So wurden die 1,5-glycosidisch verknüpften Arabinosen durch die Hydrolysetätigkeit der Exo-1,3-Galactanase nicht beeinträchtigt, es kommt aber zu einem Verlust an terminaler Arabinose. Man kann daher vermuten, dass die 1,5-glycosidisch verknüpften Arabinosen nicht direkt am Galactosegerüst homogen verteilt sitzen, sondern kleine Oligo-Arabinoseketten direkt ans Protein gebunden vorliegen. Diese Möglichkeit ist bereits durch SHOWALTER et al. (2001) beschrieben worden. Da allerdings nicht der gesamte Kohlenhydratanteil des Hafer-AGPs durch die Exo-1,3-Galactanase abgebaut wurde (nur etwa 10% (m/m) des AGPs wurde hydrolysiert), kann es auch sein, dass 1,5-glycosidisch verknüpfte Arabinose im proteinnahen Teil des Galactangerüsts sitzt, wo die Exo-1,3-Galactanase das Galactangerüst nicht mehr erreichen konnte. Im Kombinations-Experiment einer Exo-1,3-Galactanase mit einer Exo-1,5-Arabinofuranosidase sank beim Hafer-AGP der 1,5-Ara(*f*)-Gehalt ab, da hier die Exo-1,5-Arabinofuranosidase nun auch die Oligo-Arabinose-Seitenketten hydrolysieren konnte. Das Molekulargewicht des AGPs sank durch die Kombination beider Enzyme sogar um 17% ab. Wahrscheinlich ergänzten sich die beiden Enzyme durch den Abbau sterisch hindernder Substituenten des Kohlenhydratgerüsts gegenseitig. Der steigende Gehalt an 1,3,6-glycosidisch verknüpfter Galactose nach Hydrolyse durch eine Exo-1,3-Galactanase deutet auf ein stärker verzweigtes Kohlenhydratgerüst in Proteinnähe hin (also im nicht-hydrolysierten Teil). Eine Darstellung des Kohlenhydratanteils der Getreide-AGPs ohne 1,5-glycosidisch verknüpfte Arabinose am Galactan-Rückgrat befindet sich in Abbildung 59.

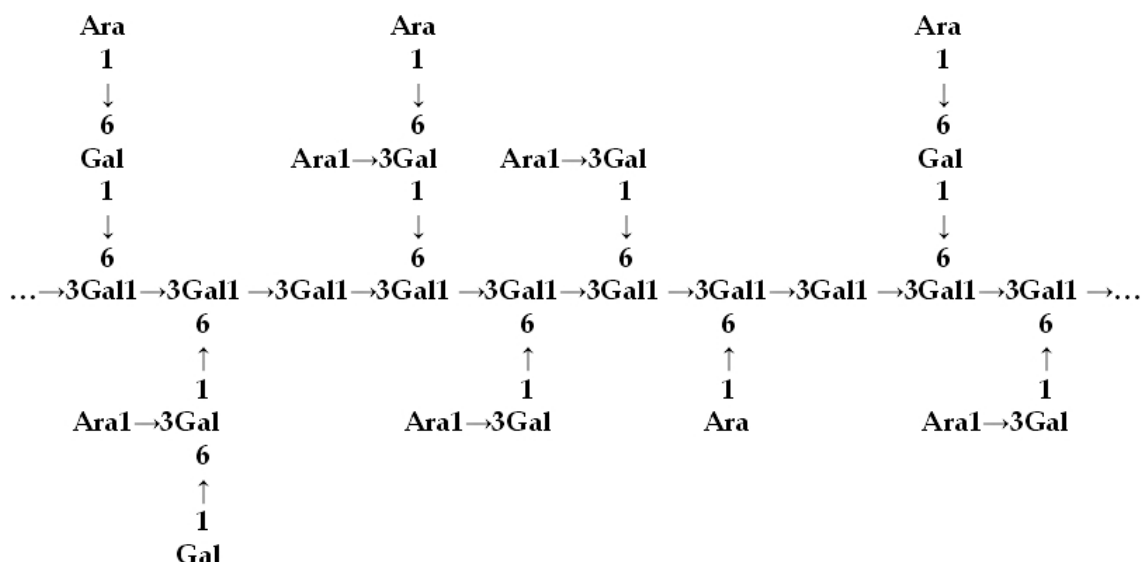


Abbildung 59: Mögliches Strukturmodell 2 für den Kohlenhydratanteil von AGP aus Weizen, Roggen und Hafer (neben 1,5-glycosidisch verknüpften Oligo-Arabinosiden, die direkt ans Protein gebunden vorliegen)

Die Exo-1,3-Galactanase setzt viele Galactose-Monosaccharide frei, weiterhin Disaccharide und Trisaccharide, unter anderem viel α -L-Ara-1,3- β -D-Gal-1,6- β -D-Gal und wenig größere Oligosaccharide, wobei eine quantitative Auswertung nicht möglich ist. Mögliche Hydrolysestellen im postulierten Kohlenhydratgerüst werden in Abbildung 60 dargestellt. Dabei decken sich die nach C 3.6 freigesetzten Oligosaccharide mit denen im Strukturmodell ‚freigesetzten‘ Oligosacchariden.

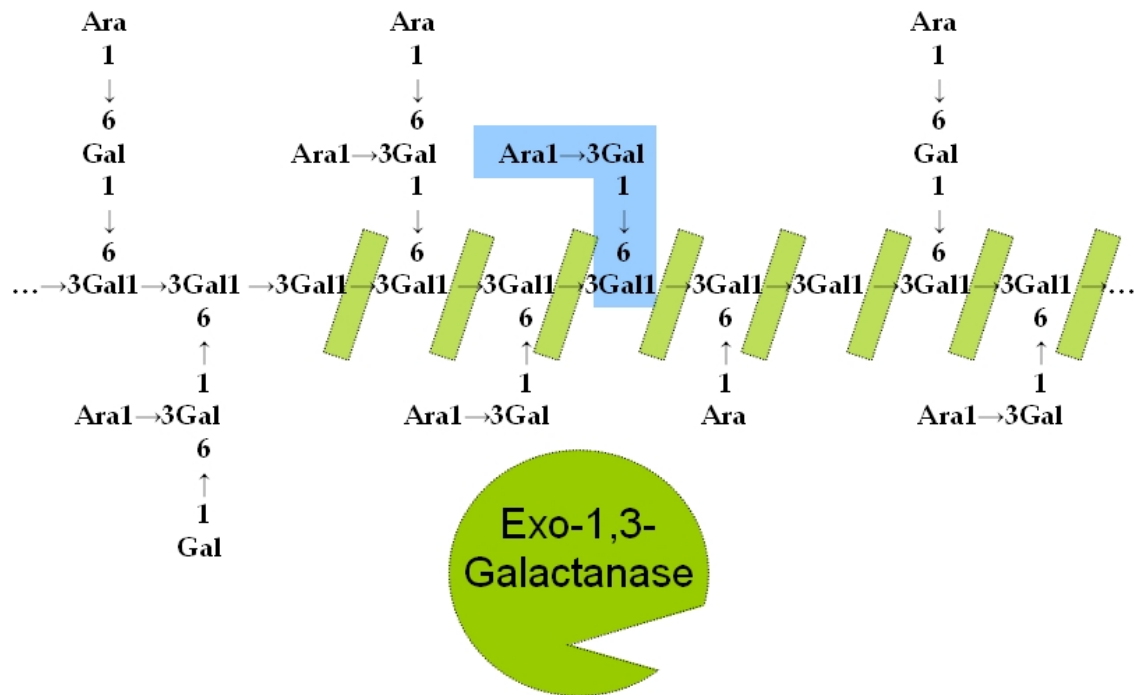


Abbildung 60: Mögliche Zielorte der Exo-1,3-Galactanase im Getreide-AGP (grün markiert), dabei blau markiert: freigesetztes Oligosaccharid α -L-Ara-1,3- β -D-Gal-1,6- β -D-Gal

Durch die Endo-1,6-Galactanase wurden ein unidentifiziertes Di- und verschiedene unidentifizierte Oligosaccharide freigesetzt; die Hydrolyserate blieb dabei allerdings undetektierbar niedrig, womit sich auch das Molekulargewicht des Hafer-AGPs nicht merklich änderte. Die nur geringe Hydrolyserate mag in einer sterischen Hinderung des Enzyms begründet liegen, das als Endo-Enzym nur nicht-randständige Bindungen spalten kann. Der Zugang zur 1,6-glycosidischen Bindung zwischen Galactosemolekülen könnte durch die endständigen Arabinosen verhindert werden. Mögliche Hydrolysestellen im postulierten Kohlenhydratgerüst werden in Abbildung 61 dargestellt.

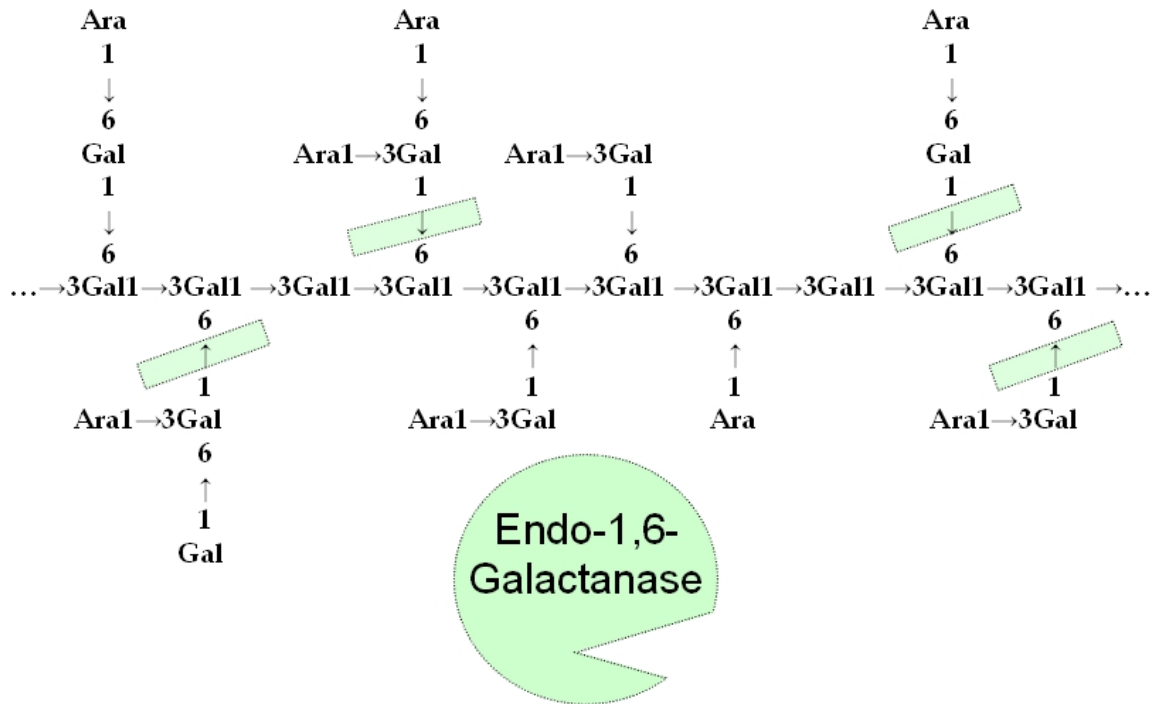


Abbildung 61: Mögliche Zielorte der Endo-1,6-Galactanase im Getreide-AGP (mintfarben markiert)

1.2.2 Charakterisierung des Proteinanteils

Zur Bestimmung der Aminosäuren wurde das AGP hydrolysiert, wobei der Kohlenhydratanteil zerstört wurde und die Aminosäuren des Proteinanteils freigesetzt wurden. Nach chromatographischer Auftrennung konnten die Aminosäuren identifiziert und quantifiziert werden. Durch die saure Hydrolyse wurde Gln zu Glu und Asn zu Asp umgewandelt, deshalb ist es nicht möglich zwischen ihnen zu unterscheiden. Der Proteinanteil der Getreide-AGPs zeigt einen hohen Anteil an Ala, Hyp, Ser, Gly, und Glx. Klassische AGPs zeichnen sich im Allgemeinen durch einen hohen Gehalt an Hyp, Ala, Ser, Thr und Gly im Protein aus (SHOWALTER, 2001; JOHNSON et al., 2003), wobei Hyp oft die für die O-glycosidische Bindung zwischen Proteinanteil und Kohlenhydratanteil verantwortliche Aminosäure ist (BACIC et al., 2000). Laut einer Hypothese von KIELISZEWSKI und SHPAK (2001) und XU et al. (2008) kann dabei einzeln

vorkommendes Hyp im Protein zu einer Glycosylierung mit Arabinogalactan-Polysacchariden führen, und mehrere Hydroxyprolinmoleküle hintereinander im Protein (Kluster) können zu einer Glycosylierung mit kurzen Arabinose-Ketten führen. Bei einer alkalischen Hydrolyse von AGPs wird das Protein zerstört, und nur die für die Bindung des Kohlenhydratanteil ans Protein verantwortliche Aminosäure und der Kohlenhydratteil selbst bleiben erhalten. Je nach Hydrolysebedingungen können O-glycosidische Bindungen und bei stärkeren Bedingungen auch N-glycosidische Bindungen zwischen Aminosäure und Zucker zerstört werden. Als Ausnahme bleibt dabei die stabile Bindung zwischen Hyp und dem Kohlenhydratanteil erhalten. Serin und Threonin werden durch β -Elimination bedingt vermehrt abgespalten (LAMPART und MILLER, 1971). Die alkalische Hydrolyse des Roh-AGPs degradierte das Protein nicht vollständig; der Hyp-Gehalt stieg zwar im Vergleich mit dem nativen Roh-AGP leicht an, doch waren immer noch zu viele Aminosäuren vorhanden, um eine eindeutige Zuordnung zu treffen.

1.2.3 Molekulargewichtsbestimmung

Über eine MALLS-Detektion wurde das absolute Molekulargewicht der zweifach gefällten AGPs von Weizen, Roggen und Hafer bestimmt. Es ergab sich für Weizen-AGP ein Molekulargewicht von 120 kDa, Roggen AGP wies ein Molekulargewicht von 110 kDa auf und Hafer-AGP war mit 83 kDa das Kleinste unter den isolierten AGPs. Der Vergleich mit in der Literatur beschriebenen AGPs gestaltet sich schwierig, weil die dort verwendeten Methoden (meist GPC) zur Molekulargewichts-Bestimmung meist nicht das absolute Molekulargewicht ermitteln konnten, sondern nur z.B. das hydrodynamische Volumen. Das hydrodynamische Volumen einer Substanz wird jedoch maßgeblich durch die räumliche Struktur und die Hydrathülle beeinflusst. Auch die Verwendung von

linearen Pullulanen als Kalibrierstandards ist nicht ideal, da AGPs eher kugelig gebaut sind (FINCHER et al., 1983 und QI et al., 1991).

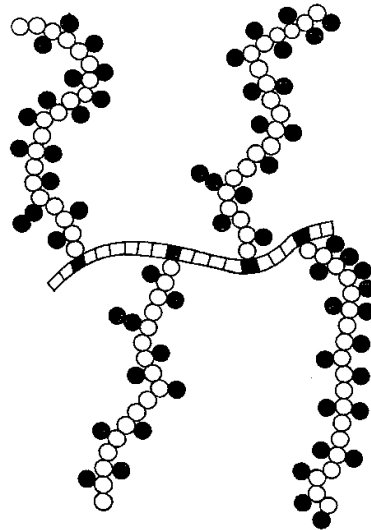
Die aus Endosperm von verschiedenen Weizensorten, Dinkel, Triticale, Roggen und Gerste isolierten AG-Peptide (VAN DEN BULCK et al., 2005) liegen mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 25 kDa weit unter dem ermittelten absoluten Molekulargewicht der AGPs aus Früchten von Weizen, Hafer und Roggen. Ein AGP, welches aus *Lolium multiflorum* mit Hilfe von β -Yariv-Reagenz isoliert wurde, besitzt auch ein eher kleines Molekulargewicht von etwa 25 kDa. Dabei bleibt zu beachten, dass die dort angewandte Messmethode nur das hydrodynamische Volumen ermittelte (ANDERSON et al., 1977). Von SMALLWOOD et al. (1996) wurde ein AGP aus *Oryza sativa* isoliert, dessen Molekulargewicht mit Hilfe einer eindimensionalen SDS-Page-Analytik auf 150 bis 200 kDa eingeschätzt wurde.

Die Molekulargewichtsbestimmung alkalisch hydrolysierter AGPs ergab für Weizen-AGP 20 kDa, für den makromolekularen Rest des alkalisch hydrolysierten Hafer-AGPs ergab sich ein Molekulargewicht von etwa 6 kDa, wobei der Wert nur über eine Extrapolation der Kalibriergerade ermittelt werden konnte.

1.2.4 Strukturvorschlag

FINCHER¹ et al. (1974) isolierte durch fraktionierte Fällungen mit Ammoniumsulfat aus Weizen-Endosperm ein 22 kDa großes hydroxyprolinreiches AG-Peptid, welches einen Kohlenhydratanteil von 92% und einen Peptidanteil von 8% besaß. Der Kohlenhydratanteil bestand hauptsächlich aus Arabinose und Galactose in einem Verhältnis von 1:1,5. Im

vorgeschlagenen Strukturmodell ist ein Peptid von etwa 20 Aminosäuren mit dem Kohlenhydratanteil über Hydroxyprolin verknüpft. Die einzelnen Kohlenhydrat-„Zweige“ werden als unverzweigte Galactoseketten mit Arabinoseresten dargestellt (Abbildung 62).



Proposed model of the arabinogalactan-peptide

Galactose (○); arabinose (●); hydroxyproline (■);
other amino acids (□).

Abbildung 62: Strukturmodell eines AG-Peptides aus Weizen-Endosperm nach FINCHER¹ et al. (1974).

LOOSVELD et al. (1998) isolierte aus verschiedenen Weizenmehlen AG-Peptide und verglich: Das Verhältnis Arabinose zu Galactose schwankte ein wenig, wobei die Elutionsprofile der Gelpermeationschromatographie sich sehr ähnelten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam der Vergleich von AG-Peptiden aus *Triticum durum* L. und *Triticum aestivum* L. (INGELBRECHT et al., 2002).

VAN DEN BULCK et al. (2002) isolierte das Protein aus dem AG-Peptid aus Weizenendosperm und konnte die Aminosäuresequenz des 1,5 kDa schweren Proteins entschlüsseln. Sie war identisch mit der Sequenz des Grain Softness Proteins GSP-1 und wies drei Moleküle Hydroxyprolin im Proteinanteil auf, über die eine Bindung der Kohlenhydratanteile möglich war. In Kombination mit den Ergebnissen der Bindungstyp-Analyse von LOOSVELD et al. (1998) konnte das

Strukturmodell in Abbildung 63 für AG-Peptid aus Weizen-Endosperm aufgestellt werden, welches auch als allgemeines Strukturmodell für isolierte AG-Peptide aus Weizen, Hartweizen, Triticale, Roggen und Gerste diente (VAN DEN BULCK et al., 2005). So wird ein Kohlenhydratanteil dargestellt, der aus einem 1,6-glycosidisch verknüpften Galactose-Rückgrat besteht, das in Position 3 mit einzelnen Arabinoseresten substituiert sein kann, oder mit einzelnen Galactoseresten, die dann meist im Position 3 ebenfalls mit terminaler Arabinose substituiert sind. Dies ist für AGPs eine ungewöhnliche Verknüpfung des Galactose-Rückrats und wurde bisher nicht für AGs beschrieben.

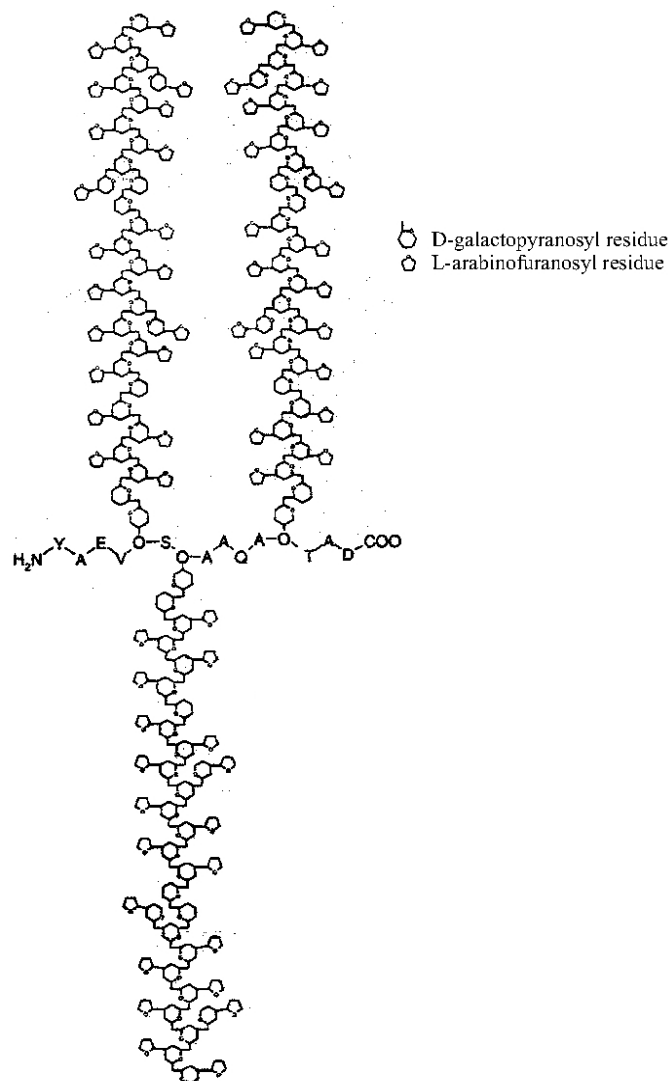


Abbildung 63: Strukturmodell des AG-Peptids aus Weizen-Endosperm nach VAN DEN BULCK et al., 2002

Es wäre denkbar, dass die aus Getreide-Endosperm isolierten kleineren AG-Peptide Bruchstücke der mit β -Yariv-Reagenz isolierten AGPs aus ganzen Getreidefrüchten sein könnten. Eine Präzipitation mit β -Yariv-Reagenz wäre dann durch das nur geringe Molekulargewicht der AG-Peptide verhindert. Da sich mit β -Yariv-Reagenz nur die Aleuronschicht eines Weizenkorns anfärben ließ (ANDERSON et al., 1977) und die AG-Peptide aus dem Endosperm isoliert wurden, ist dies nicht wahrscheinlich. Auch der strukturelle Aufbau des Kohlenhydratgerüsts der AG-Peptide unterscheidet sich von dem der Getreide-AGPs. So ist es möglich, dass β -Yariv-Reagenz nicht bindet, da das Galactose-Rückgrat der AG-Peptide nicht 1,3- sondern 1,6-glycosidisch verknüpft ist.

Im Gegensatz zum AG-Peptid aus Weizen-Endosperm konnten aus Reis-Aleuronzellen (*Oryza sativa* L.) mithilfe von β -Yariv-Reagenz vier verschiedene Glycoproteine isoliert werden (MASHIGUCHI et al., 2004). Alle isolierten Glycoproteine trugen AG-Ketten, unterschieden sich jedoch in ihrer Aminosäuresequenz. Unter ihnen waren laut der Aminosäuresequenz ein klassisches AGP und ein AG-Peptid zu finden, wobei das klassische AGP sich in der Abfolge der Aminosäuresequenz von klassischen AGPs aus dicotylen Pflanzen unterschied. Ebenfalls mit β -Yariv-Reagenz fällbar waren zwei weitere Glycoproteine: ein nicht-spezifisches Lipid-Transfer-Protein(LTP)-ähnliches Protein und ein Early Nodulin (ENOD)-ähnliches Protein. Beide beinhalten ein N-Glycosylierungs-Motiv und ein GPI-Anker-Signal, weisen jedoch wohl eine geringere Glycosylierung auf.

Aus dem Vielblütigen Weidelgras (*Lolium multiflorum* L.) konnte durch eine Präzipitation mit β -Yariv-Reagenz ein AGP isoliert werden (ANDERSON et al., 1977). Für dieses AGP konnte ein 1,3-glycosidisch verknüpftes Galactangerüst mit kurzen 1,6-glycosidisch verknüpften Galactoseketten in Position 6 gefunden werden, die wiederum in Position 3 und 6 mit einzelnen Arabinoseresten

von etwa 6,6 kDa. Das Protein besteht zu etwa 10,8% (m/m) aus Hydroxyprolin, so können rein rechnerisch fünf bis sechs Moleküle Hydroxyprolin im Protein des Weizen-AGPs vorliegen. Verteilt man die Anteile des Kohlenhydratanteils auf fünf oder sechs Moleküle Hydroxyprolin, so ergeben sich einzelne Kohlenhydrat-Partien, die ein Molekulargewicht um 19-22 kDa aufweisen müssten. Dieser Wert deckt sich in etwa mit dem Ergebnis der Molekulargewichtsbestimmung des Makromoleküls von 20 kDa nach alkalischer Hydrolyse des Weizen-AGPs (Modellvorschlag siehe Abbildung 65). Bei dieser Betrachtung fällt allerdings die Möglichkeit einer Bindung von Oligo-Arabinosiden über Hydroxyprolin weg. Eine Zuordnung des Weizen-AGPs zum Strukturmodell der „Wattle-blossom“ nach FINCHER et al. (1983, siehe Abbildung 6) ist denkbar. Für eine Zuordnung des Weizen-AGPs zum Strukturmodell des „Twisted-hairy-rope“ nach BACIC (2003) weisen die Kohlenhydrat-Partien ein zu hohes Molekulargewicht auf und enthalten weder Glucuronsäure noch Rhamnose.

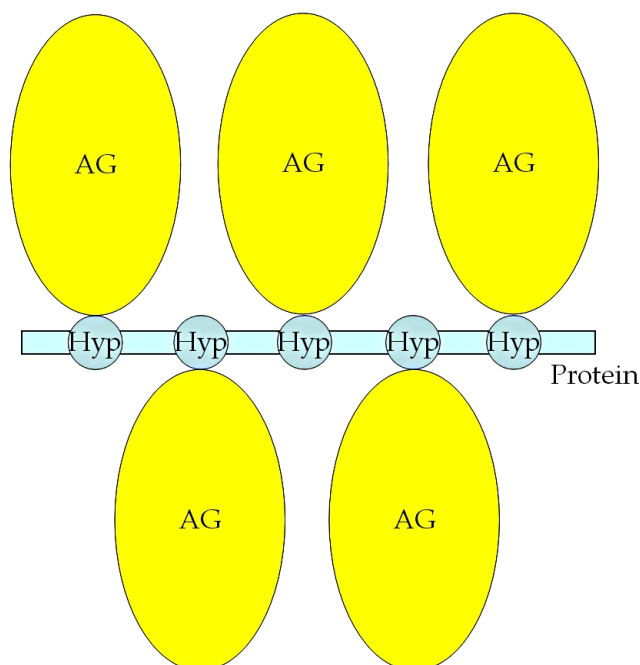


Abbildung 65: Mögliches Strukturmodell des mit β -Yariv-Reagenz gefällten Weizen-AGPs (AG= Arabinogalactan, Hyp= Hydroxyprolin)

Für Hafer-AGP mit einem Molekulargewicht von etwa 83 kDa und einem Proteinanteil von etwa 5,4% ergibt sich ein Protein von etwa 4,5 kDa. Das Protein besteht zu etwa 18,3% (m/m) aus Hydroxyprolin, so können rein rechnerisch sechs Moleküle Hydroxyprolin im Protein des Hafer-AGPs vorliegen. Verteilt man die Gewichtsanteile des Kohlenhydratanteils auf die sechs Moleküle Hydroxyprolin, so ergeben sich einzelne Kohlenhydrat-Partien, die ein Molekulargewicht um 13 kDa aufweisen müssten. Dieser Wert deckt sich nur ungefähr mit dem Ergebnis der Molekulargewichtsbestimmung des Makromoleküls der alkalischen Hydrolyse des Hafer-AGPs (6 kDa), welcher allerdings nur über eine Extrapolation einer Kalibriergeraden ermittelt werden konnte. Zudem wurden für Hafer-AGP aufgrund der Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse Oligo-Arabinose-Seitenketten vorgeschlagen, für die ebenfalls eine Verknüpfung zum Proteinanteil über Hydroxyprolin in Frage kommt. Von Interesse wäre hier eine Ermittlung der Aminosäuresequenz des Hafer-AGP-Proteins. SHOWALTER et al. (2001) beschreiben ein abgewandeltes „wattle-blossom“-Strukturmodell mit Oligo-Arabinose-Seitenketten, die kovalent ans Protein geknüpft sind (Abbildung 66), was auf Hafer-AGP zutreffen könnte.

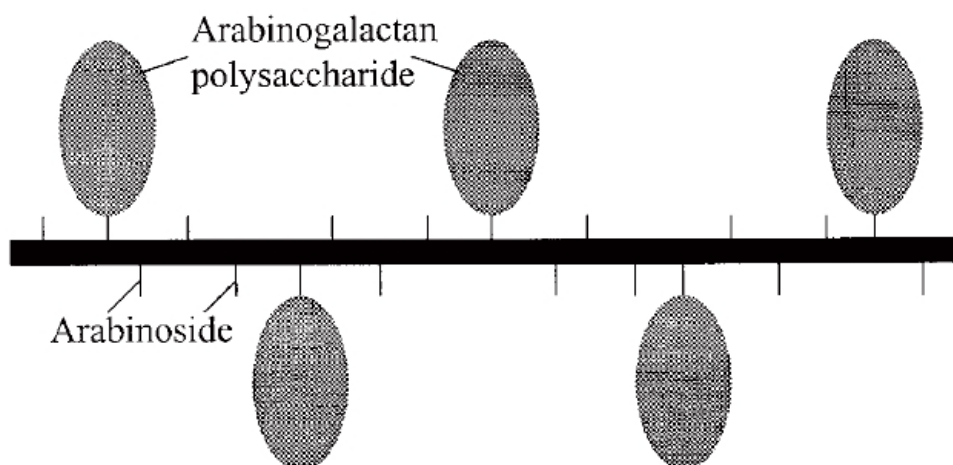


Abbildung 66: Modifiziertes "wattle-blossom"-Strukturmodell nach SHOWALTER et al. (2001)

2 Immunmarkierung von AGPs

2.1 Immunmarkierung von AGPs im ELISA

Im Konzentrationsbereich von 5-100 $\mu\text{g/ml}$ der Getreide-AGPs im ELISA entstanden keine typischen Kurven, sondern tendenziell eher Geraden. Dies mag daran liegen, dass ab diesen hohen Konzentrationen bereits alle Bindungsstellen auf der ELISA-Platte abgedeckt wurden, und diese Signale dann alle gleich hoch ausfallen. Bei Konzentrationen von 0,1-5 $\mu\text{g/ml}$ erhielt man deutliche Konzentrations-Absorptions-Beziehungen.

JIM8 bindet im Allgemeinen an ein Arabinose-, Galactose- und Rhamnogalacturonan-reiches Epitop eines AGPs. Laut TANG et al. (2006) liegt das Epitop co-lokalisiert mit dem Epitop vor, an welches auch β -Yariv-Reagenz bindet. Womöglich bindet JIM8 nur an bestimmte Bereiche eines AGPs, welche beim Getreide-AGP strukturell nicht vorliegen (so z.B. die Rhamnogalacturonane), so dass sich dort keine Reaktivität zeigte. Das Epitop des monoklonalen Antikörpers JIM8 und das Epitop des β -Yariv-Reagenzes sind nicht dieselben, da β -Yariv-Reagenz ja sehr wohl mit dem Getreide-AGPs reagiert. LM6 soll als Epitop ein α -1,5-L-Arabinan binden (CHEN et al. (2006)), davon sind kurze Ketten auch in den Getreide-AGPs enthalten. Eine Bindung ist hier also erklärbar. LM2 soll speziell an Glucuronsäure-haltige Epitope innerhalb eines AGPs binden (KREUGER und VAN HOLST (1995)), und bindet offensichtlich auch an die Getreide-AGPs, obwohl diese keine Uronsäuren besitzen (siehe C 3.5.2). So ist LM2 offensichtlich auch in der Lage, an ein Glucuronsäure-freies Epitop zu binden.

Das Epitop des Antikörpers 4B8D3 (ursprünglich gegen AGPs aus *Echinacea purpurea*) ist vermutlich ein Galactose-haltiges Epitop (CLASSEN et al., 2004). Das Galactose-Rückgrat des Hafer-AGPs zeigte wahrscheinlich mehrere dieser

Gal-Epitope, sie wurden nicht vollständig von Arabinosen abgeschirmt (siehe Strukturvorschlag). Die polyklonalen Antikörper 639 „Q“ bedienten wahrscheinlich mehrere Epitope, von denen einige auch in Hafer-AGP vorkamen. Laut CLASSEN et al. (2005) finden sich die Epitope der polyklonalen Antikörper 639 „Q“ vor allem im Kohlenhydratanteil der AGPs mit vielen terminalen Arabinosen wieder. Auch diese liegen in den Getreide-AGPs zahlreich vor.

Die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Hafer-AGP nach B 5.1 war erfolgreich und ergab fünf stabile Klone, die Antikörper produzierten, die mit AGP aus Haferfrüchten gut reagierten. Diese Antikörper sind ein nützliches Werkzeug bei der Lokalisierung von AGPs in der Haferpflanze.

2.2 Lokalisierung der AGPs in pflanzlichen Geweben

Um aussagekräftige Bilder einer Lokalisierung von AGPs in der Haferpflanze zu erhalten, wurde die in BOSSY et al. (2009) beschriebene Methode einer Markierung mit β -Yariv-Reagenz und dessen Fluoreszenzmarkierung, sowie eine Methode zur Markierung von AGPs mit eigens dafür generierten monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Dabei liegt der Vorteil der Markierung mit β -Yariv-Reagenz in der Erfassung aller mit β -Yariv-Reagenz reagierenden AGPs. Ein monoklonaler Antikörper bindet stets nur an ein Epitop. So können nur die Verbindungen markiert werden, die dieses Epitop auch aufweisen. Wichtig ist bei dieser Methode, dass das Epitop, auf das sich der Antikörper bezieht, spezifisch für die Verbindung ist.

Durch den Einsatz verschiedener monoklonaler Antikörper konnte bereits gezeigt werden, dass unterschiedliche AGPs im Bereich der Plasmamembran auftreten (SERPE und NOTHNAGEL, 1999; PENELL et al., 1989). VAUGHN et al. (2007) beschreiben eine Markierung durch AGP-Antikörper an der

Berührungsfläche zwischen Plasmamembran und Zellwand und ordnen ihnen eine Funktion in der Signalübertragung zu. Diese kann über eine Verbindung mit dem Cytoskelett im Zellinneren bestehen (SADAR et al, 2006). Danach sind AGPs im Bereich bestimmter Lipid-Schollen in der Plasmamembran verankert und stehen über drei mögliche Interaktionsmechanismen in Verbindung zu den Mikrotubuli: AGP kann als Ligand an ein Transmembranprotein in der Plasmamembran binden oder einen transmembranären Rezeptor aktivieren oder eine Translokation eines Signalmoleküls durch einen Liganden/Rezeptor-Komplex induzieren, was eine Aktivierung einer Kinase auf der Cytoplasmaseite zur Folge hat. NGUEMA-ONA et al. (2007) beschreiben ebenfalls eine Beeinflussung der Mikrotubuli-Organisation. Weiterhin 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).

Aber auch an der Zellwand, insbesondere an sekundär verdickten Zellwänden und der Mittellamelle ließen sich bereits mikroskopisch AGPs erfassen. PUTOCZKI et al. (2007) und MOTOSE et al. (2004) wiesen dabei AGPs im Xylem nach. Dabei änderten sich die AGP-Epitope zeitlich und räumlich in Korrelation mit der Differenzierung des Xylems. Dies führte zu der Annahme, dass AGPs in der Gefäßdifferenzierung eine Rolle spielen (GAO und SHOWALTER, 2000; YANG et al., 2005; LIU und MEHDY, 2007). In *Zinnia elegans* wurde nachgewiesen, dass ein GPI-verankertes AGP für die netzförmige Anlage sekundärer Wandverdickungen xylematischer Elemente verantwortlich ist (DAHIYA et al., 2006). SAMAJ et al. (1998) beobachteten, dass in embryonalen Kalluskulturen von Mais sich zwischen Zellklustern AGPs als „Brücken-ähnliche Strukturen“ markieren ließen. In der Haferpflanze wurden die AGPs durch β -Yariv-Reagenz in den Zellwänden der Tracheen und Tracheiden nachgewiesen, hier lag eine besonders hohe Konzentration der Glycoproteine vor. Gerade im

Bereich der Tüpfel von Xylem in Hafer-Spross und -Wurzel war in den mikroskopischen Aufnahmen eine deutliche Markierung der AGPs zu sehen. Das Phänomen der Markierung der Tüpfel in dieser Form ist bisher nur durch BOSSY et al. (2009) am Beispiel xylematischer Bereiche in der Wurzel von *Echinacea purpurea* beschrieben.

Im Pericarp von Tomaten konnte durch LM6, einem 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 in Phloemfaserzellen im Griffel der Hanfblüte (BLAKE et al., 2008). Im ELISA wurde eine Reaktivität zwischen Hafer-AGP und LM6 bereits nachgewiesen, erste Versuche einer fluoreszenzmikroskopischen Markierung mit LM6 zeigen eine Markierung der Zellwand von Tracheen und Tracheiden (Ergebnisse nicht gezeigt), was sich mit den Ergebnissen der AGP-Immunmarkierung durch β -Yariv-Reagenz deckt. MOTOSE et al. (2004) weisen auf ein Glycoprotein hin, das in Zellkulturen von *Zinnia* für die zur Differenzierung xylematischer Zellen nötige Kommunikation verantwortlich ist. Dieses AG-Glycoprotein ist nach MASHIGUCHI et al. (2004) mit β -Yariv-Reagenz fällbar. QIN und ZHAO (2007) beschreiben ein ähnlich aufgebautes Glycoprotein, das für die Ausbildung der Gefäßnervatur in den Kotyledonen verantwortlich sein könnte.

BATTAGLIA et al. (2007) konnten Prolin-reiche Glycoproteine im Phloem markieren, die sich dort anreicherten, wenn die Pflanze unter Wasser-Entzug litt. In der Zellwand des Phloems zeigt auch der gegen Hafer-AGP generierte Antikörper 4A1 eine hohe Konzentration von AGPs an. Vielleicht liegt eine strukturelle Verwandtschaft zum Prolin-reichen Glycoprotein vor (welches auch ein AGP sein könnte). Eine Markierung in xylematischen Bereichen von Hafer-

Spross und -Wurzel durch 4A1 bleibt aus. Es ist möglich, dass der monoklonale Antikörper 4A1 eine Kreuzreaktivität mit anderen Verbindungen aufweist, z.B. AGs. Da die Kreuzreaktivität Epitop-abhängig ist, wäre eine Identifizierung des Epitopes von Interesse.

Künftige Studien könnten sich zum Beispiel zunächst darauf fokussieren, die Verteilung der AGPs im pflanzlichen Gewebe anhand verschiedener Methoden zu vergleichen. Es wurden fünf verschiedene monoklonale Antikörper gegen Hafer-AGP hergestellt. Interessant wäre dabei ein Vergleich der markierten Bereiche in Hafer-Spross und -Wurzel durch die einzelnen monoklonalen Antikörper. Auch ein Vergleich der durch die monoklonalen Antikörper markierten Bereiche im Vergleich zu den Bereichen, die über β -Yariv-Reagenz FITC-markiert wurden, wäre interessant und ein weiterer Schritt, das „Epitop“ des β -Yariv-Reagenzes zu ermitteln. Mikroskopisch wäre auch der Zusammenhang zwischen AGPs und Pathogenabwehr von Interesse, die monoklonalen Antikörper könnten bei der Sichtbarmachung von Nutzen sein. Des Weiteren können sich Studien zur Ermittlung der Proteinsequenz des AGPs aus Haferfrüchten anschließen. Aus pharmakologischer Sicht wäre es interessant, ob und inwiefern die Getreide-AGPs Einfluss auf das menschliche Immunsystem nehmen können. Für AGPs aus *Echinacea purpurea* wurde bereits eine immunmodulatorische Wirkung *in vitro* beschrieben. Denkbar ist eine Aufnahme der AGPs über M-Zellen, hochspezialisierte Zellen des Schleimhaut-assoziierten, lymphatischen Gewebes beziehungsweise des Darm-assoziierten, lymphatischen Gewebes in den Peyerschen Plaques im Dünndarm, die auf die Absorption antigener und immunogener Substanzen spezialisiert sind. Eine Interaktion mit dem Immunsystem wäre auf diese Weise möglich und könnte fluoreszenzmikroskopisch am lebenden Gewebe dargestellt werden.

E Zusammenfassung/Abstract

Deutsch

Aus dem wässrigen Extrakt der Früchte von *Triticum aestivum* L., *Secale cereale* L. und *Avena sativa* L. wurden hochmolekulare Fraktionen isoliert und aus diesen dann erstmals mit $(\beta\text{-D-Glc})_3\text{-Yariv-Phenylglykosid}$ (Yariv-Reagenz) Arabinogalactan-Proteine (AGPs) isoliert. Eine Charakterisierung der AGPs hinsichtlich ihres Kohlenhydrat- und Proteinanteils ergab, dass das Proteoglykan aus Weizen 5,5% (m/m), Roggen-AGP 6,3% (m/m) und Hafer-AGP 5,4% (m/m) Protein enthielt, wobei die Aminosäuren Ala, Hyp, Ser, Gly und Glx die dominierenden Aminosäuren darstellten. Der stark verzweigte Kohlenhydratanteil der Makromoleküle zeigte in der Bindungstyp-Analyse die Grundstruktur eines typischen AGPs mit einem 1,3-, 1,6- und 1,3,6-verknüpften pyranosidischen Galactosegrundgerüst, welches furanosidische Arabinosereste in Position 3 und 6 tragen kann. Diese traten als terminale Arabinose auf. Weiterhin wird die Anwesenheit von 1,5-verknüpften Oligo-Arabinoseketten vermutet. Die Erstellung eines Strukturmodells des AGPs aus Getreide stützt sich zudem auf die freigesetzten Zucker durch eine enzymatische Hydrolyse von Hafer-AGP.

Neben der Strukturaufklärung wurden die AGPs im Weizenkeimling und in der Haferpflanze fluoreszenzmikroskopisch lokalisiert. Dazu wurde das synthetische Yariv-Reagenz, welches spezifisch an AGPs bindet, zur Immunlokalisierung eingesetzt. Es wurden polyklonale Antikörper gegen Yariv-Reagenz generiert, um damit Querschnitte aus der Wurzeln und dem Sproß der Haferpflanze zu inkubieren, die vorher mit Yariv-Reagenz behandelt worden waren. Nach Zusatz von FITC-markierten Sekundäntikörpern wurden die Schnitte durch Konfokale Laser-Raster Mikroskopie (Confocal Laser Scanning Microscopy = CLSM) analysiert. Die AGPs wurden in der Wurzel und im Sproß der Haferpflanze vornehmlich im xylematischen Leitbündelbereich lokalisiert; hier waren Tüpfelkanäle deutlich markiert. Weiterhin wurde eine Immunmarkierung von Hafer-Spross und-Wurzel mit einem monoklonalen Antikörper durchgeführt, der eigens gegen Hafer-AGP generiert wurde. Hier wurden insbesondere in den Zellwänden des Phloems AGPs lokalisiert.

Englisch

From the high molecular weight fraction of aqueous extracts from fruits of *Triticum aestivum* L., *Secale cereale* L. und *Avena sativa* L., arabinogalactan-proteins (AGPs) were isolated by precipitation with $(\beta\text{-D-Glc})_3$ Yariv phenylglycoside (Yariv-reagent) for the first time. Characterization of AGPs with regard to amino acid composition and structure of the polysaccharide moiety resulted in a structural model for cereal AGPs. The protein content of the AGP from wheat was 5,5% (w/w), protein-content of rye-AGP was 6,3% and oat-AGP 5,4% with the dominating amino acids Ala, Hyp, Ser, Gly and Glx. 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 residues in position 3 and 6 of galactose. Short oligo-arabinose-chains seem to be also present in the carbohydrate-part of AGP. Additionally, liberated sugars after enzymatic hydrolyses of oat-AGP gave important conclusions to set a structural model.

Furthermore, localization of AGPs in plant tissue of oat has been accomplished. Yariv-reagent is known to bind specifically to AGPs. For immunolocalization, polyclonal Yariv-reagent-antibodies have been generated and were used to label Yariv-treated thin sections of shoots and roots from oat. After addition of FITC-conjugated secondary antibodies, the sections were analyzed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). AGPs were mainly detected in the area of the xylem, especially there was a strong labelling of the pit canals. Additionally, immunolocalisation was done with a monoclonal antibody generated against oat-AGP. AGPs could be detected in the cell wall of the phloem in shoots and roots of oat via CLSM with a FITC conjugated secondary antibody.

F Literaturverzeichnis

Akiyama Y, Eda S, Kato K;

Gum arabic is a kind of arabinogalactan-protein.

Agricultural and Biological Chemistry, 1984. 48(1): 235-237.

Alban S, Classen B, Brunner G, Blaschek W;

Differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin.

Planta Medica, 2002. 86: 1118-1124.

Anderson JW, Hanna TJ, Peng X, Kryscio RJ;

Whole Grain Foods and Heart Disease Risk.

Journal of the American College of Nutrition, 2000. 19: 291-299.

Anderson RL, Clarke AE, Jermyn MA, Knox RB, Stone BA;

A carbohydrate-binding arabinogalactan-protein from liquid cultures of endosperm from *Lolium multiflorum*.

Australian Journal of Plant Physiology, 1977. 4: 143-158.

Andrew IG, Stone BA;

Affinity Chromatography of Arabinogalactan-Proteins.

Carbohydrate Polymers, 1983. 3: 227-238.

Aspinall GO;

Chemical characterization and structure determination of polysaccharides.

Polysaccharides, 1982. 1: 35-131.

Aspinall GO;

Carbohydrate polymers of plant cell walls.

Biogenesis Plant Cell Wall Polysaccharides, Proc. Symp, 1973. 95-115.

Bacic A, Currie G, Gilson P, Mau SL, Oxley D, Schultz C, Sommer-Knudsen J, Clarke AE;

Structural classes of arabinogalactan-proteins.

Cell and developmental biology of arabinogalactan-proteins from Nothnagel EA, Bacic A, Clarke AE, 2008. 11-23.

Bacic A;

Herbal Arabinogalactan-(Proteins): Structure, Biosynthesis & Biological Function, Plant Development and Industrial Use.

51st Annual congress of the Society for Medical Plant Research, 2003. Kiel, Plenary Lecture

Bacic A, Churms SC, Stephen AM, Cohen PB, Fincher GB;

Finestructure of the arabinogalactan-protein from *Lolium multiflorum*.
Carbohydrate Research, 1987. 162: 85-93.

Barron C, Robert P, Guillon F, Saulnier L, Rouau X;

Structural heterogeneity of wheat arabinoxylans revealed by Raman spectroscopy.
Carbohydrate Research, 2006. 341(9): 1186-1191.

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

Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings.
Planta, 2007. 225: 1121-1133.

Blake AW, Marcus SE, Copeland JE, Blackburn RS, Knox JP;

In situ analysis of cell wall polymers associated with phloem fibre cells in stems of hemp, *Cannabis sativa* L..
Planta, 2008. 228: 1-13.

Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ, Stone BA;

A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis.
Carbohydrate Research, 1983. 113: 291-299.

Blumenkrantz N, AsboeHansen G;

New method for quantitative determination of uronic acids.
Analytical Biochemistry, 1973. 54: 484-489.

Bossy A, Blaschek W, Classen B;

Characterization and immunolocalisation of arabinogalactan-proteins in roots of *Echinacea purpurea*.
Planta Medica, 2009. [e-Publikation vorm Druck]

Bresinsky A, Körner C, Kadereit JW, Neuhaus G, Sonnewald U;

Strasburger, Lehrbuch der Botanik.
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2008. 36. Auflage: p.866.

Clarke AE, Anderson RL, Stone BA;

Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins.
Phytochemistry, 1979. 18(4): 521-540.

Classen B, Thude S, Blaschek W, Wack M, Bodinet C;

Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from *Baptisa* and *Echinacea*.
Phytomedicine, 2006. 13: 668-694.

Classen B, Mau, SL, Bacic A;

The arabinogalactan-proteins from pressed juice of *Echinacea purpurea* belong to the "hybrid" class of hydroxyproline-rich glycoproteins.

Planta Medica, 2005. 71(1): 59-66.

Classen B, Csavas M, Borbas A, Dingermann T, Zuendorf I;

Monoclonal antibodies against an arabinogalactan-protein from pressed juice of *Echinacea purpurea*.

Planta Medica, 2004. 70(9): 861-865.

Classen B, Witthohn K, Blaschek W;

Characterization of an arabinogalactan-protein isolated from pressed juice of *Echinacea purpurea* by precipitation with the β -glucosyl Yariv reagent.

Carbohydrate Research, 2000. 327: 497-504.

Chandrasekaran R, Janaswamy S;

Morphology of Western larch arabinogalactan.

Carbohydrate Research, 2002. 337: 2211-2222.

Chen W, Stoddard FL, Baldwin TC;

Developmental regulation of mannan, arabinogalactan-protein, and pectic epitopes in pistils of *Vicia faba* (faba bean).

International Journal of Plant Sciences, 2006. 167(5): 919-932.

Dahiya P, Findlay K, Roberts K, McCann MC;

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, 2006. 223: 1281-1291.

Du H, Clarke, AE, Bacic A;

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

Trends in Cell Biology, 1996. 6(11): 411-414.

Edge AS, Faltynek CR, Hof L, Reichert LE Jr, Weber P;

Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid.

Analytical Biochemistry, 1981. 118(1): 131-137.

Egeberg R, Olsen A, Loft S, Christensen J, Johnsen NF, Overvad K, Tjoenneland A;

Intake of whole grain products and risk of breast cancer by hormone receptor status and histology among postmenopausal women.

International Journal of Cancer, 2008. 124(3): 745-750.

Esau K;

Pflanzenanatomie.

Gustav Fischer Verlag, 1969.

Faik A, Abouzouhair J, Sarhan F;

Putative fascilin-like arabinogalactan-proteins (FLA) in wheat (*Triticum aestivum*) and rice (*Oryza sativa*): identification and bioinformatics analyses.
Molecular Genetics and Genomics, 2006. 276: 478-494.

Fincher GB;

Exploring the evolution of (1,3;1,4)- β -D-glucans in plant cell walls: comparative genomics can help!
Plant Biology, 2009. 12: 140-147.

Fincher GB, Stone BA, Clarke AE;

Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function.
Annual Review of Plant Physiology, 1983. 34: 47-70.

Fincher¹ GB, Sawyer WH, Stone BA;

Chemical and physical properties of an arabinogalactan-peptide from wheat endosperm.
Biochemical Journal, 1974. 139(3): 535-545.

Fincher² GB, Stone BA;

A Water-soluble arabinogalactan-peptide from wheat endosperm.
Australian Journal of Biological Sciences, 1974. 27(2): 117-132.

Frohne D, Jensen U;

Systematik des Pflanzenreichs : unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen.
Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft, 1998. 5. Ausgabe.

Gane AMW, Jodie A, Bacic A, Harris PJ;

Histochemistry and composition of the cell walls of styles of *Nicotiana glauca* Link et Otto.
Planta, 1994. 195(2): 217-225.

Gao M, Showalter AM;

Immunolocalization of LeAGP-1, a modular arabinogalactan-protein, reveals its developmentally regulated expression in tomato.
Planta, 2000. 210: 865-874.

Gao M, Showalter AM;

Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement.
The Plant Journal, 1999. 19: 321-331.

Gassner G, Hohmann B, Deutschmann F, Bothe F;

Mikroskopische Untersuchung pflanzlicher Lebensmittel.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1989. 5. Auflage.

Gaspar Y, Johnson KL, McKenna JA, Bacic A, Schultz CJ;

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

Plant Molecular Biology, 2001. 47(1-2): 161-176.

Gleeson PA, Clarke AE;

Structural studies on the major component of *Gladiolus* style mucilage, an arabinogalactan-protein.

Biochemical Journal, 1979. 181(3): 607-621.

Gleeson PA, Jermyn MA;

Alteration in the composition of β -lectins caused by chemical and enzymic attack.

Australian Journal of Plant Physiology, 1979. 6: 25-38.

Guan Y, Nothnagel EA;

Binding of arabinogalactan proteins by Yariv phenylglycoside triggers wound-like responses in Arabidopsis cell cultures.

Plant Physiology, 2004. 135: 1346-1366.

Hänsel R, Sticher O;

Pharmakognosie-Phytopharmazie.

Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007. 8. Auflage.

Harris PJ, Henry RJ, Blakeney AB, Stone BA;

An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides.

Carbohydrate Research, 1984. 127(1): 59-73.

Herbst B, Classen B, Blaschek W;

Die Mistel in der Tumorthherapie 2: Charakterisierung von Arabinogalactan-Proteinen aus *Viscum album* L. Beeren und Kraut.

KVC-Verlag, 2009.

Hiller K, Melzig MF;

Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen.

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1999.

Hu Y, Qin Y, Zhao J;

Localization of an arabinogalactan-protein epitope and the effects of Yariv phenylglycoside during zygotic embryo development of *Arabidopsis thaliana*.

Protoplasma, 2006. 229: 21-31.

Ichinose¹ H, Kotake T, Tsumuraya Y, Kaneko S;

Characterization of an exo- β -1,3-D-galactanase from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893 acting on arabinogalactan-proteins.

Bioscience Biotechnology Biochemistry, 2006. 70(11): 2745-2750.

Ichinose² H, Kotake T, Tsumuraya Y, Kaneko S;

Characterization of an endo-beta-1,6-Galactanase from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893.

Applied and Environmental Microbiology, 2008. 74(8): 2379-2383.

Ichinose H, Yoshida M, Fujimoto Z, Kaneko S;

Characterization of a modular enzyme of exo-1,5-alpha-L-arabinofuranosidase and arabinan binding module from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893.

Applied Microbiology and Biotechnology, 2008. 80(3): 399-408.

Ingelbrecht JA, Loosveld AMA, Grobet PJ, Schols H, Bakx E, Delcour JA;

Characterization of the carbohydrate part of arabinogalactan peptides in *Triticum durum* Desf. *Semolina*.

Cereal Chemistry, 2002. 79(2): 322-325.

Inngjerdingen KT, Debes SC, Inngjerdingen M, Hokputsa S, Harding SE, Rolstad B, Michaelsen TE, Diallo D, Paulsen BS;

Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization.

Journal of Ethnopharmacology, 2005. 101(1-3): 204-214.

Janatuinen EK, Kempainen TA, Julkunen RJK, Kosma, VM, Mäki M, Heikkinen M, Uusitupa MIJ;

No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease.

Gut, 2002. 50: 332-335.

Jermyn MA, Yeow YM, Woods EF;

Class of lectins present in the tissues of seed plants.

Australian Journal of Plant Physiology, 1975. 2(4): 501-531.

Jermyn MA;

Comparative specificity of concanavalin A and the β -lectins.

Australian Journal of Plant Physiology, 1978. 5(5): 687-696.

Johnson K, Jones B, Schultz CJ, Bacic A;

Non-enzymic cell wall (glyco)proteins.

The Plant Cell Wall from Rose J (editor), Blackwell Publishing, UK, 2003. 111-154.

Joseleau JP, Chambat G;

C NMR spectroscopy to identify complex polysaccharide fractions from the plant cell wall.

Physiologie Vegetale, 1984. 22(4): 461-470.

Kelly GS;

Larch arabinogalactan: Clinical relevance of a novel immune-enhancing polysaccharide.

Alternative Medicine Review, 1999. 4(2): 96-103.

Kieliszewski MJ;

The latest hype on Hyp-O-glycosylation codes.
Phytochemistry, 2001. 57: 319-323.

Kieliszewski MJ, Shpak E;

Synthetic genes for the elucidation of glycosylation codes for arabinogalactan-proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins.
Cellular and molecular life sciences, 2001. 58(10): 1386-1398.

Knox JP;

The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls.
International Review of Cytology, 1997. 171: 79-120.

Knox JP;

Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls.
Current Opinion in Plant Biology, 2008. 11: 308-313.

Kreuger M, van Holst GJ;

Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L.
Planta, 1995. 197(1): 135-141.

Lamport DTA, Miller, DH;

Hydroxyproline Arabinosides in the Plant Kingdom.
Plant Physiology, 1971. 48: 454-456.

Lee K, Sakata Y, Mau S, Pettolino F, Bacic A, Quatrano R, Knight C, Knox JP;

Arabinogalactan proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomitrella patens*.
The Plant Cell, 2005. 17: 3051-3065.

Li W, Li Z, Jing F, Deng Y, Wei L, Liao P, Yang X, Li X, Pei F, Wang X, Lei H;

Synthesis and evaluation of Gd-DTPA-labeled arabinogalactans as potential MRI contrast agents.
Carbohydrate Research, 2008, 343: 685-694.

Liu C, Mehdy MC;

A nonclassical arabinogalactan protein gene highly expressed in vascular tissues, AGP31, is transcriptionally repressed by methyl jasmonic acid in *Arabidopsis*.
Plant Physiology, 2007. 145: 863-874.

Lieberei R, Reisdorff C;

Nutzpflanzenkunde.
Georg Thieme Verlag, 2007. 7.Auflage.

Liu S, Manson JE, Stampfer MJ, Hu FB, Giovannucci E, Colditz GA, Hennekens CH, Willett WC;

A prospective study of whole grain intake and risk of type 2 diabetes mellitus in U.S. women.

American Journal of Public Health, 2000. 90: 1409–1415.

Liu SM, Stampfer MJ, Hu FB, Giovannucci E, Rimm E, Manson JE, Hennekens CH, Willett WC;

Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses Health Study.

American Journal of Clinical Nutrition, 1999. 70: 412–429.

Loosveld AMA, Delcour JA;

The Significance of Arabinogalactan-Peptide for Wheat Flour Bread-Making.

Journal of Cereal Science, 2000. 32(2): 147-157.

Loosveld AMA, Maes C, Van Casteren WHM, Schols HA, Grobet PJ, Delcour JA;

Structural variation and levels of water-extractable arabinogalactan-peptide in European wheat flours.

Cereal Chemistry, 1998. 75(6): 815-819.

Loosveld AMA, Grobet PJ, Delcour JA;

Contents and Structural Features of Water-Extractable Arabinogalactan in Wheat Flour Fractions.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. 45(6): 1998-2002.

Majewska-Sawka A, Nothnagel EA;

The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development.

Plant Physiology, 2000. 122, 3-9.

Mashiguchi K, Yamaguchi I, Suzuki Y;

Isolation and identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored arabinogalactan proteins and novel β -glucosyl yariv-reactive proteins from seeds of rice (*Oryza sativa*)

Plant and Cell Physiology, 2004. 45(12): 1817-1829.

Massi-Benedetti M;

The cost of Diabetes Type II in Europe: The CODE-2 Study.

Diabetologia, 2002. 45: S1-S4.

Mazza G;

Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects.

Technomic Publishing Company, 1998. 6-10.

Meyer KA, Kushi LH, Jacobs Jr DR, Slavin J, Sellers TA, Folsom AR;

Carbohydrates, dietary fiber, and incident type 2 diabetes in older women.

American Journal of Clinical Nutrition, 2000. 71: 921–930.

Mollard M, Basile D;

Acacia senegal cells cultured in suspension secrete a hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein.

Plant Physiology and Biochemistry, 2000. 32: 703-709.

Mort AJ, Lamport DT;

Anhydrous hydrogen fluoride deglycosylates glycoproteins.

Analytical Biochemistry, 1977. 82(2): 289-309.

Motose H, Sugiyama M, Fukuda H;

A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development.

Nature (GB), 2004. 429(6994): 873-878.

Nguema-Ona E, Bannigan A, Chevalier L, Baskin TI, Driouich A;

Disruption of arabinogalactan proteins disorganizes cortical microtubules in the root of *Arabidopsis thaliana*.

The Plant Journal, 2007. 52(2): 240-251.

Nothnagel EA;

Proteoglycans and related components in plant cells.

International review of cytology, 1997. 174: 195-291.

Nothnagel EA, Bacic A, Clarke AE;

Cell and developmental biology of arabinogalactan-proteins.

Kluwer/Plenum Publication., 2000. 301 pp.

Orfila C, Knox JP;

Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp.

Plant Physiology, 2000. 122: 775-781.

Pennell RI, Knox JP, Scofield GN, Selvendran RR, Roberts K;

A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants.

Journal of Cell Biology, 1989. 108: 1967-1977.

Pusztai A, Ewen SWB, Grant G, Brown DS, Stewart JC, Peumans WJ, Van Damme EJM, Bardocz S;

Antinutritive effects of wheat-germ agglutinin and other N-acetylglucosamine-specific lectins.

British Journal of Nutrition, 1993. 70(1): 313-321.

Putoczki TL, Pettolino F, Griffin MDW, Moeller R, Gerrard JA, Bacic A, Jackson SL;

Characterization of the structure, expression and function of *Pinus radiata* D. Don arabinogalactan-proteins.

Planta, 2007. 226: 1131-1142.

Qi W, Fong C, Lamport, DTA;

Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope: A new model based on O-galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site.

Plant Physiology, 1991. 96(3): 848-855.

Qin Y, Zhao J;

Localization of arabinogalactan-proteins in different stages of embryos and their role in cotyledon formation of *Nicotiana tabacum* L..

Sexual Plant Reproduction, 2007. 20(4): 213-224.

Rorrer GL, Hawley MC, Selke SM, Lamport DTA, Dey PM;

Anhydrous hydrogen fluoride in polysaccharide solvolysis and glycoprotein deglycosylation.

Methods in Plant Biochemistry, 1990. 2: 581-606.

Samaj J, Samajova O, Peters M, Baluska F, Lichtscheidl I, Knox JP, Volkmann D;

Immunolocalization of LM2 arabinogalactan protein epitope associated with endomembranes of plant cells.

Protoplasma, 2000. 212(3-4): 186-196.

Samaj J, Ensikat HJ, Baluska F, Knox JP, Barthlott W, Volkmann D;

Immunogold localization of plant surface arabinogalactan-proteins using glycerol liquid substitution and scanning electron microscopy.

Journal of Microscopy, 1999. 193(2): 150-157.

Samson MR, Klis FM, Sigon CAM, Stegwee D;

Localization of arabinogalactan-proteins in the membrane system of etiolated hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* L..

Planta, 1983. 159(4): 322-328.

Samuelsen A, Paulsen BS, Wold JK, Knutsen, SH, Yamada H;

Characterization of a biologically active arabinogalactan from the leaves of *Plantago major* L.

Carbohydrate Polymers, 1998. 35: 145-153.

Sanchez C, Schmitt C, Kolodziejczyk E, Lapp A, Gaillard C, Renard D;

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, 2008. 94(2): 629-639.

Sardar HS, Yang J, Showalter AM;

Molecular interactions of arabinogalactan proteins with cortical microtubules and F-actin in bright yellow-2 tobacco cultured cells.

Plant Physiology, 2006. 142(4): 1469-1479.

Seifert GJ, Roberts K;

The biology of arabinogalactan proteins.
Annual Review of Plant Biology, 2007. 58: 137-161.

Serpe MD, Nothnagel EA;

Arabinogalactan-proteins in the multiple domains of the plant cell surface.
Advances in Botanical Research, 1999. 30: 207-289.

Serpe MD, Nothnagel EA;

Effects of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation.
Planta, 1994. 193(4): 542-550.

Showalter AM;

Arabinogalactan-proteins: Structure, expression and function.
Cellular and Molecular Life Sciences, 2001. 58(10): 1399-1417.

Smallwood M, Yates EA, Willats WGT, Martin H, Knox JP;

Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot.
Planta, 1996. 198: 452-459.

Somogyi M;

Notes on sugar determination.
Journal of Biological Chemistry, 1952. 195: 19-23.

Stegemann H, Stalder KH;

Determination of hydroxyproline.
Clinica Chimica Acta, 1967. 18: 267-273.

Stephen AM;

Whole grains — impact of consuming whole grains on physiological effects of dietary fiber and starch.
Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1994. 34: 499–511.

Strahm A, Amado R, Neukom H;

Hydroxyproline-galactoside as a protein-polysaccharide linkage in a water soluble arabinogalactan-peptide from wheat endosperm.
Phytochemistry, 1981. 20(5): 1061-1063.

Svetek J, Yadav MP, Nothnagel EA;

Presence of a glycosylphosphatidylinositol lipid anchor on rose arabinogalactan proteins.
The Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(21): 14724-14733.

Sweet DP, Shapiro RH, Albersheim P;

Quantitative analysis by various GLC response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates.

Carbohydrate Research, 1975. 40(2): 217-225.

Tang XC, He YQ, Wang Y, Sun MX;

The role of arabinogalactan proteins binding to Yariv reagents in the initiation, cell developmental fate, and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas.

Journal of Experimental Botany, 2006. 57(11): 2639-2650.

Taylor RL, Conrad HE;

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

Biochemistry, 1972. 11: 1383-1388.

Ternes W, Täufel A, Tunger L, Zobel M;

Lebensmittel-Lexikon.

Behr Verlag Hamburg, 2005. 4. Auflage.

Thude S, Classen B;

High molecular weight constituents from roots of *Echinacea pallida*: An arabinogalactan-protein and an arabinan.

Phytochemistry, 2005. 66(9): 1026-1032.

Thude S, Classen B, Blaschek W, Barz D, Thude D;

Binding studies of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* to leucocytes.

Phytomedicine, 2006. 13: 425-427.

Van den Bulck K, Swennen K, Loosveld AMA, Courtin CM, Brijs K, Proost P, Van Damme J, Van Campenhout S, Mort A, Delcour JA;

Isolation of cereal arabinogalactan-peptides and structural comparison of their carbohydrate and peptide moieties.

Journal of Cereal Science, 2005. 41(1): 59-67.

Van den Bulck K, Loosveld AMA, Courtin CM, Proost P, Van Damme J, Robben J, Mort A, Delcour JA;

Amino acid sequence of wheat flour arabinogalactan-peptide, identical to part of grain softness protein GSP-1, leads to improved structural model.

Cereal Chemistry, 2002. 79(3): 329-331.

Vaughn KC, Talbot MJ, Offler CE, McCurdy DW;

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, 2007. 48(1): 159-168.

Vitaglione P, Napolitano A, Fogliano V;

Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut.

Trends in Food Science & Technology, 2008. 19(9): 451-463.

Volk RB, Blaschek W, Classen B;

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, 2007. 61(4): 397-401.

Wack M, Classen B, Blaschek W;

An Acidic Arabinogalactan-Protein from the Roots of *Baptisia tinctoria*.

Planta Medica, 2005. 71: 814-818.

Willats WGT, Marcus SE, Knox JP;

Generation of a monoklonal antibody specific to (1→5)- α -L -arabinan

Carbohydrate Research, 1998. 308: 149-152.

Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP;

Pectin: cell biology and prospects for functional analysis.

Plant Molecular Biology, 2001. 47: 9-27.

Woods EF, Liley GG, Jermyn MA;

The self-association of glycosyl phenylazo dyes (Yariv antigens)

Australian Journal of Chemistry, 1978. 31: 2225-2238.

Xu J, Tan L, Lamport DTA, Showalter AM, Kieliszewski MJ;

The O-Hyp glycosylation code in tobacco and Arabidopsis and a proposed role of Hyp-glycans in secretion.

Phytochemistry 2008. 69(8): 1631-1640.

Yamagishi T, Matsuda K, Watanabe T;

Characterization of the fragments obtained by enzymic and alkaline degradation of rice-bran proteoglycans.

Carbohydrate Research, 1976. 50: 63-74.

Yang SH, Wang H, Sathyan P, Stasolla C, Loopstra CA;

Real-time RT-PCR analysis of loblolly pine (*Pinus taeda*) arabinogalactan protein and arabinogalactan protein-like genes.

Physiologia Plantarum, 2005. 124: 91-106.

Yariv J, Rapport MM, Graf L;

The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides.

The Biochemical Journal, 1962. 85: 383-388.

Youl JJ, Basic A, Oxley D;

Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1998. 95(14): 7921-7926.

Zhou XL, Sun PN, Bucheli P, Huang TH, Wang D;

FT-IR methodology for quality control of arabinogalactan protein (AGP extracted from green tea (*Camellia sinensis*)).

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. [e-Publikation vorm Druck]

Danksagung

G Danksagung

Mein besonderes Dankeschön für die Überlassung des interessanten und weitläufigen Themas gilt **Herrn Professor Dr. Wolfgang Blaschek**. Als schier unerschöpflicher Quell guter Ideen und Anregungen weiß ich es besonders zu schätzen, dass er mir die Möglichkeit gab, selbstständig zu arbeiten und er mir doch immer in seiner herzlichen Art mit Rat und Tat zur Seite stand. Gerade die familiäre und freundschaftliche Atmosphäre am Institut, nicht zuletzt auch der Verdienst seiner Frau Heidi Blaschek, ließen mich jeden Morgen gerne zur Arbeit radeln.

PD Doktor Birgit Classen danke ich für ihre kompetente Hilfestellung und unglaubliche Unterstützung während meiner universitären Laufbahn. Gerade die fruchtbaren Gespräche führten zum Gelingen meiner Doktorarbeit und zum Entstehen vieler weiterführender Ideen.

In enger Zusammenarbeit mit dem AK Professor Susanne Alban ergab sich am Institut eine wunderbare Arbeitsatmosphäre, in der einige Kollegen sogar zu Freunden wurden (mAmDmJumS). Erwähnen möchte ich hier die schönste Kongressreise aller Zeiten nach Graz, die gerade durch den Zusammenhalt innerhalb der Doktoranden zum Erlebnis wurde. Ich danke allen meinen neuen und alten Kollegen für die an Kompetenz nicht zu überbietenden Fachgesprächen über Hochglanzmagazin-relevante Themen und seelische Streicheleinheiten in Form gemeinsam eingenommener Rauschmittel wie Schokolade und co. Ihr macht die Arbeit zum Vergnügen; Bernadette, Betty, Christopher, Daniela, Inken, Juliane, Kerstin, Niels, Nina, Simone, Stefanie, Ule!

Besonderer Dank gilt den fleißigen Mitarbeitern des Instituts, die kaum zu bremsen waren bei der Bearbeitung von Reiseanträgen (Marion), der Yariv-

Danksagung

Herstellung (Helle), dem Abwasch (Kirsten), der Reparatur von Geräten und diversen Lötkursen (Kalle), der Praktikumsvorbereitung (Claudia, Dana, Frauke, Helle, Kirsten und Susanne K.) und der Zucht von kleinen, feinen Pflänzchen (Dietrich, Carsten und Henning).

Von der Universität Kiel danke ich Herrn Dr. Girreser für die GC-MS-Messung des ‚Klebzeugs‘, Frau Dr. Mulisch für die Einweisung ins CLSM und Frau Thor Straten für die HPLC der Aminosäuren. Frau Prof. Berit Smestad Paulsen (Universität Oslo, Norwegen) danke ich für die Silylierungsanalyse. Besonderer Dank geht auch an Frau Dr. Ilse Zündorf (Goethe-Universität, Frankfurt a.M.) für die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Hafer-AGP und Frau Hitomi Ichinose (Nationales Lebensmittel Forschungsinstitut, Japan) für die Durchführung der enzymatischen Hydrolyse.

Besonders danken möchte ich auch meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund, die den Ursprung meiner Schaffenskraft und Kreativität gelegt haben und immer dafür Sorge tragen, dass es mir gut geht.

H Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Esther Marie Göllner
Geburtsdatum: 4. Dezember 1981
Geburtsort: Berlin-Wilmersdorf
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

seit 01/2007 Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Pharmazeutischen Institut der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,
Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. W. Blaschek

HOCHSCHULAUSBILDUNG

2001-2005 Pharmaziestudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/2003 1. Staatsexamen Pharmazie
11/2005 2. Staatsexamen Pharmazie
01-06/2006 Pharmaziepraktikum Esmarch- Apotheke, Kiel
06-12/2006 Pharmaziepraktikum Pharmazeutische Biologie, CAU Kiel
01/2007 3. Staatsexamen Pharmazie
01/2007 Approbation zur Apothekerin

SCHULAUSBILDUNG

1994-2001 Gymnasium: Albert-Einstein-Oberschule, Berlin
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

I 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 Professor Dr. Wolfgang Blaschek, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt, bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der vorliegenden Arbeit angeführten Hilfsmittel benutzt habe und die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist. 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 22.06.2009