

Arabinogalaktan-Proteine aus *Lycopodium* und Farnen:

Analytische Charakterisierung,
mikroskopische Detektion &
Bindung an dendritische Zellen



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

vorgelegt von

Desirée Bartels

Kiel, 2017

Erste Gutachterin: Prof. Dr. Birgit Classen
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2017
Zum Druck genehmigt: 15.09.2017

Prof. Dr. Natascha Oppelt
(Dekanin)

Wer immer tut, was er schon kann,
bleibt immer das, was er schon ist.

(Henry Ford)

Phantasie ist wichtiger als Wissen,
denn Wissen ist begrenzt.

(Albert Einstein)

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	1
II. Verzeichnisse	5
1. Abkürzungsverzeichnis	5
2. Abbildungsverzeichnis	9
3. Tabellenverzeichnis	12
III. Einleitung	14
1. Farne und ihre Verwandten	14
1.1 Bärlappe	16
1.2 Farne	17
2. Pflanzliche Zellwand	23
2.1 Arabinogalaktan-Proteine	24
3. Zielsetzung	29
IV. Material und Methoden	30
1. Verwendete Geräte und Materialien	30
1.1 Allgemein verwendete Geräte	30
1.2 Allgemein verwendete Chemikalien	31
1.3 Verwendetes Drogenmaterial	31
2. Isolierung der hochmolekularen Polysaccharid-Fractionen	31
3. Isolierung der Arabinogalaktan-Proteine	32
3.1 Synthese des Yariv-Reagenzes	32
3.2 Yariv-Fällung	34
3.3 Überstand der Yariv-Fällung	35
3.4 Yariv-Fällung aus Überstand	35
3.5 Doppelte Yariv-Fällung	35
4. Geldiffusionstest	35

5.	Strukturaufklärende Analytik der HMF & des Yariv-Überstandes: Charakterisierung des Polysaccharidanteils.....	36
5.1	Neutralzuckeranalytik mittels Acetylierung	36
6.	Strukturaufklärende Analytik der AGPs: Charakterisierung des Polysaccharidanteils.....	36
6.1	Neutralzuckeranalytik mittels Acetylierung	36
6.2	Bestimmung der Neutralzucker und Uronsäuren mittels Silylierungsanalyse	38
6.3	Kolorimetrische Quantifizierung der Uronsäuren.....	40
6.4	Reduktion der Uronsäuren	40
6.5	Analyse der Bindungstypen	41
6.6	Smith-Degradation	45
6.7	Alkalische Hydrolyse	45
6.8	Oxalsäure-Hydrolyse.....	46
6.9	Infrarotspektroskopie	46
7.	Strukturaufklärende Analytik der AGPs : Charakterisierung des Proteinanteils.....	47
7.1	Photometrische Quantifizierung des Hydroxyprolin-Anteils.....	47
7.2	Aminosäureanalytik mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	48
8.	Elementaranalyse	48
8.1	Proteinquantifizierung	49
9.	Gelpermeationschromatographie	49
10.	Mikroskopische Untersuchung der Sprossachsen und Mittelrippen.....	51
10.1	Lichtmikroskopie	51
10.2	Fluoreszenzmikroskopie	51
11.	Biologische Aktivitäten der AGPs	55
11.1	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	55
11.2	Bindungsanalyse mittels Durchflusszytometrie	56

V.	Ergebnisse.....	59
1.	Isolierung der hochmolekularen Polysaccharid-Fraktionen.....	59
2.	Isolierung der hochmolekularen Arabinogalaktan-Proteine	61
3.	Geldiffusionstest.....	65
4.	Strukturaufklärende Analytik der HMF und des Yariv-Überstandes: Charakterisierung des Polysaccharidanteils.....	66
4.1	Neutralzuckeranalytik mittels Acetylierung	66
5.	Strukturaufklärende Analytik der AGPs: Charakterisierung des Polysaccharidanteils.....	72
5.1	Neutralzuckeranalytik mittels Acetylierung	72
5.2	Bestimmung der Neutralzucker und Uronsäuren mittels Silylierungsanalyse	83
5.3	Kolorimetrische Quantifizierung der Uronsäuren.....	84
5.4	Reduktion der Uronsäuren	85
5.5	Analyse der Bindungstypen	87
5.6	IR-Messung zur Strukturaufklärung	97
6.	Strukturaufklärende Analytik der AGPs: Charakterisierung des Proteinanteils.....	100
6.1	Photometrische Quantifizierung des Hydroxyprolin-Anteils.....	100
6.2	Aminosäureanalytik mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	100
7.	Elementaranalyse	102
8.	Proteingehalt.....	103
9.	Gelpermeationschromatographie	103
10.	Mikroskopische Untersuchung der Sprossachsen	109
10.1	Lichtmikroskopie	110
10.2	Fluoreszenzmikroskopie	111
11.	Biologische Aktivitäten der AGPs	122
11.1	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	122

11.2	Bindungsanalyse mittels Durchflusszytometrie	124
VI.	Diskussion.....	129
1.	Ausbeute und Zusammensetzung.....	129
1.1	Hochmolekulare Polysaccharid-Fractionen	129
1.2	Polysaccharide der Überstände der Yariv-Fällungen.....	131
1.3	Hochmolekulare Arabinogalaktan-Proteine.....	132
2.	Strukturmodell der AGPs	133
2.1	Kohlenhydratstruktur	133
2.2	Proteinstruktur.....	144
2.3	Strukturmodelle der untersuchten AGPs.....	146
2.4	Strukturmodelle im Vergleich mit anderen AGPs	153
3.	Lokalisierung der AGPs in pflanzlichen Geweben	157
4.	Biologische Aktivitäten der AGPs	159
VII.	Zusammenfassung/Abstract	162
VIII.	Literaturverzeichnis	166
IX.	Danksagung	185
X.	Lebenslauf	186
XI.	Ehrenwörtliche Erklärung.....	187

II. Verzeichnisse

1. Abkürzungsverzeichnis

3- <i>O</i> -Me-Rha	3- <i>O</i> -Methyl-Rhamnose
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
α GalY	(α -D-Gal) ₃ -Yariv-Phenylglycosid
Ac	Acetylierung
AChE	Acetylcholinesterase
AG	Arabinogalaktan
AGP	Arabinogalaktan-Protein
AH	alkalisch hydrolysiert
AK	Antikörper
Ala	Alanin
alk.P.	alkalische Phosphatase
ATR	attenuated total reflection
<i>Aqua bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
<i>Aqua dem.</i>	demineralisiertes Wasser
Ara	Arabinose
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Asx	Asparagin/Asparaginsäure
β GlcY	(β -D-Glc) ₃ -Yariv-Phenylglycosid
BSA	bovine serum albumin
CAU	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
CLSM	confocal laser scanning microscopy
Cys	Cystein
DABCO	1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)-octan
DC	dendritische Zellen
DFM	<i>Dryopteris filix-mas</i>
Dimysl-	Dimethylsulfinyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid

EA	<i>Equisetum arvense</i>
EI	Elektronenstoßionisation
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
<i>f</i>	furanosidisch
Fa.	Firma
FACS	fluorescence-activated cell scanning
FeCl ₃	Eisen(III)chlorid
FID	Flammenionisationsdetektor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FS	forward scatter
FT	Fourier-Transformation
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsäure
GC	Gaschromatographie
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsäure
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
Glx	Glutamin/Glutaminsäure
GPC	Gelpermeationschromatographie
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HCl	Salzsäure
His	Histidin
HMF	hochmolekulare Polysaccharid-Fraktion
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRGP	Hydroxyprolin-reiches Glykoprotein
Hyp	Hydroxyprolin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin

INF	Interferon
Ile	Isoleucin
IR	Infrarot
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
KMT	Komplementmodulationstest
L.	Linnaeus
LA	<i>Lycopodium annotinum</i>
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Me	Methylierung
MALLS	multi-angle-laser-light-scattering
Man	Mannose
MeOH	Methanol
Met	Methionin
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
MWCO	molecular weight cut-off
N_2	Stickstoff
NaBH_4	Natriumborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaNO_3	Natriumnitrat
NaOH	Natriumhydroxid
OR	<i>Osmunda regalis</i>
<i>p</i>	pyranosidisch
PA	<i>Pteridium aquilinum</i>
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline Tween [®] 20
Phe	Phenylalanin
PMAA	partiell methyliertes Alditol-Acetat
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PS	Polysaccharid

Psi	pound-force per square inch
Pro	Prolin
PRP	Prolin-reiches Protein
Rha	Rhamnose
rcf	relative centrifugal force
RI	refractive index
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S	Silylierung
SD	Smith-degradiert
Sek	sekundär
Ser	Serin
SS	side scatter
t	terminal
TBS	tris-buffered saline
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
TIC	Totalionenchromatogramm
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	Tyrosin
ÜS-YF	Überstand der Yariv-Fällung
UR	uronsäurereduziert
WCOT	wall coated open tubular
Xyl	Xylose

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der systematischen Klassifizierung	15
Abbildung 2: Habitus von <i>Lycopodium annotinum</i>	16
Abbildung 3: Habitus von <i>Equisetum arvense</i>	17
Abbildung 4: Habitus von <i>Dryopteris filix-mas</i>	19
Abbildung 5: Habitus von <i>Osmunda regalis</i>	20
Abbildung 6: Habitus von <i>Pteridium aquilinum</i>	21
Abbildung 7: Reaktionsgleichung der Yariv-Reagenz-Synthese nach Yariv <i>et al.</i> , 1962	33
Abbildung 8: Reaktionsschema zur Überführung der Saccharide in Alditolacetate	37
Abbildung 9: Reaktionsschema der Uronsäure-Reduktion	41
Abbildung 10: Reaktionsschema der Methylierung und Umwandlung in Ac-Me-Hexitole (PMAAs)	43
Abbildung 11: Schematische Darstellung der FITC-Färbung von AGPs in pflanzlichem Gewebe	51
Abbildung 12: Vorinkubation mit primären AK (links) & schematische Darstellung des kompetitiven ELISA (rechts)	56
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Zellmarkierung für die Durchflusszytometrie mit AGP (links) & Nullwert-Kontrolle (rechts)	58
Abbildung 14: Vergleich der Ausbeuten von den HMFs zu den Überständen der Yariv-Fällung (ÜS-YF) und AGPs	64
Abbildung 15: Präzipitationsbanden des β GlcY mit den AGPs des Sommers 2014	65
Abbildung 16: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzungen von den HMFs zu den Überständen der Yariv-Fällungen	71
Abbildung 17: FID-Chromatogramme der Alditolacetate von a <i>Lycopodium</i> - und b <i>Osmunda</i> -AGP	75
Abbildung 18: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzungen von den AGPs des Sommers 2014, die aus den HMFs und aus den Überständen der Yariv-Fällungen gefällt wurden	77
Abbildung 19: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung des <i>Dryopteris</i> -AGP des Sommers 2014 nach einfacher und doppelter Yariv-Fällung	79
Abbildung 20: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung der nativen und alkalisch hydrolysierten (AH) AGPs des Sommers 2014	81

Abbildung 21: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung des nativen und Oxalsäure-hydrolysierten <i>Pteridium</i> -AGP des Sommers 2014	82
Abbildung 22: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzungen der nativen und Smith-degradierten (SD) AGPs des Sommers 2014	83
Abbildung 23: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung von den nativen und uronsäurereduzierten (UR) AGPs des Sommers 2014	87
Abbildung 24: FID-Chromatogramm der PMAAs am Beispiel vom <i>Lycopodium</i> -AGP des Sommers 2014	88
Abbildung 25: Totalionenchromatogramm des uronsäurereduzierten <i>Lycopodium</i> -AGP (oben), sowie Massenspektrum des Fragmentierungsmusters der t-Arap (unten)	91
Abbildung 26: Vergleich der Verteilung der Bindungstypen der nativen und uronsäurereduzierten (UR) AGPs (<i>Equisetum</i> ausgenommen)	92
Abbildung 27: Vergleich der Verteilung der Bindungstypen der uronsäurereduzierten (UR) und Smith-degradierten (SD) AGPs	96
Abbildung 28: IR-Messung der AGPs vom Sommer 2013	98
Abbildung 29: GPC-Chromatogramme der nativen AGPs aus der Sommerernte 2013	105
Abbildung 30: Ausschnitte der MALLS-Signale der AGPs im Vergleich zu den RI-Signalen der Pullulane	107
Abbildung 31: Querschnitt der Sprossachse (A-E) von <i>Lycopodium annotinum</i>	112
Abbildung 32: Querschnitt der sterilen Sprossachse (A-F) von <i>Equisetum arvense</i>	114
Abbildung 33: Querschnitt der Sprossachse (A-G) von <i>Dryopteris filix-mas</i>	116
Abbildung 34: Querschnitt der Sprossachse (A-F) von <i>Osmunda regalis</i>	118
Abbildung 35: Querschnitt der Sprossachse (A-F) von <i>Pteridium aquilinum</i>	120
Abbildung 36: Bindung des monoklonalen Antikörpers an <i>Echinacea purpurea</i> -AGP	122
Abbildung 37: Bindung des polyklonalen Antikörpers an <i>Echinacea purpurea</i> -AGP	123
Abbildung 38: Histogramm der Fluoreszenzintensität mit FITC-Gate bei 50 % des Nullwertes (oben) & Balkendiagramm der Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit von der AGP-Konzentration (unten)	126
Abbildung 39: Balkendiagramm der Fluoreszenzzunahme aufgrund der Bindung von <i>Echinacea</i> -, <i>Osmunda</i> - und <i>Pteridium</i> -AGP an die DC2.4 Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration	128

Abbildung 40: Vergleich der Gal- und Ara-Anteile der nativen und uronsäurereduzierten AGPs von Acetylierung (Ac) und Methylierung (Me)	134
Abbildung 41: Strukturmodell des Kohlenhydratgrundgerüsts des <i>Lycopodium</i> -AGP (oben) und Smith-degradiert (unten)	138
Abbildung 42: Strukturmodell des Kohlenhydratgrundgerüsts des <i>Equisetum</i> -AGP (oben) und Smith-degradiert (unten)	139
Abbildung 43: Strukturmodell des Kohlenhydratgrundgerüsts des <i>Dryopteris</i> -AGP (oben) und Smith-degradiert (unten)	140
Abbildung 44: Strukturmodell Kohlenhydratgrundgerüsts des <i>Osmunda</i> -AGP (oben) und Smith-degradiert (unten)	141
Abbildung 45: Strukturmodell des Kohlenhydratgrundgerüsts des <i>Pteridium</i> -AGP (oben) und Smith-degradiert (unten)	142
Abbildung 46: Zwei Modellvorschläge am Beispiel des <i>Osmunda</i> -AGP	148
Abbildung 47: Schematische Darstellung der verschiedenen AGP-Strukturmodelle nach SHOWALTER, 2001 (A-C) und nach SANCHEZ <i>et al.</i> , 2008 (D)	156

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausbeuten der hochmolekularen PS-Fractionen (HMF)	60
Tabelle 2: Ausbeuten der hochmolekularen AGPs	62
Tabelle 3: Ausbeuten der aus dem Yariv-Überstand gefällten hochmolekularen AGPs	63
Tabelle 4: Monosaccharidzusammensetzung der HMFs in % (m/m)	67
Tabelle 5: Vergleich der HMF-Monosaccharide in % (m/m) bei zweifacher unabhängiger Extraktion anhand von <i>Pteridium aquilinum</i>	68
Tabelle 6: Monosaccharidzusammensetzung der Yariv-Überstände (ÜS) vom Sommer 2014 in % (m/m) nach erster und zweiter Yariv-Fällung (YF)	69
Tabelle 7: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung des Yariv-Überstands in % (m/m) bei zweifacher unabhängiger Extraktion anhand von <i>Pteridium aquilinum</i>	72
Tabelle 8: Monosaccharidzusammensetzung der AGPs in % (m/m)	74
Tabelle 9: Vergleich der AGP-Monosaccharide in % (m/m) bei zweifacher unabhängiger Extraktion anhand von <i>Pteridium aquilinum</i>	76
Tabelle 10: Monosaccharidzusammensetzung der AGPs in % (m/m) aus Yariv-Fällungsüberstand	77
Tabelle 11: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung der AGPs in % (m/m) nach einfacher und doppelter Yariv-Fällung der Sommerernte 2013	78
Tabelle 12: Monosaccharidzusammensetzung der alkalisch hydrolysierten AGPs in % (m/m)	80
Tabelle 13: Absolute AGP-Monosaccharidkonzentrationen von Gal und Ara in % (m/m); Vergleich der Ergebnisse der Silylierung (S) mit denen der Acetylierung (Ac)	84
Tabelle 14: Vergleich der Konzentrationen in % (m/m) an GlcA aus Silylierung- und an Uronsäuren aus photometrischer Analyse	85
Tabelle 15: Monosaccharidzusammensetzung der uronsäurereduzierten AGPs in % (m/m)	86
Tabelle 16: Bindungstypanalyse der nativen und der uronsäurereduzierten (UR) AGP-Monosaccharide in % (mol/mol)	89
Tabelle 17: Bindungstypanalyse der Smith-degradierten AGP-Monosaccharide in % (mol/mol)	94
Tabelle 18: Gruppenzuordnung von Peaks (in cm^{-1}) der IR-Messung	99

Tabelle 19: Aminosäurezusammensetzung der AGPs in % (m/m)	101
Tabelle 20: Proteingehalte der AGPs in % (m/m)*	103
Tabelle 21: Vergleich der Molekulargewichte der unterschiedlich behandelten AGPs in kDa	108
Tabelle 22: Anzahl der AGs in den untersuchten AGPs des Sommers 2014	147
Tabelle 23: Aminosäure (AS)-Verteilung des 24 kDa großen Proteinteils* vom <i>Lycopodium</i> -AGP des Sommers 2014	150
Tabelle 24: AS-Verteilung des 8 kDa großen Proteinteils* vom <i>Equisetum</i> -AGP des Sommers 2014	150
Tabelle 25: AS-Verteilung des 22 kDa großen Proteinteils* vom <i>Dryopteris</i> -AGP des Sommers 2014	151
Tabelle 26: AS-Verteilung des 8 kDa großen Proteinteils* vom <i>Osmunda</i> -AGP des Sommers 2014	151
Tabelle 27: AS-Verteilung des 8 kDa großen Proteinteils* vom <i>Pteridium</i> -AGP des Sommers 2014	152

III. Einleitung

1. Farne und ihre Verwandten

Traditionell wurden Farne und weitere Sporenpflanzen zu den Gefäßkryptogamen zusammengefasst, obwohl sie nicht unmittelbar miteinander verwandt sind. Es existieren nur etwa 14.000 Arten, wohingegen es rund 250.000 Arten an Samenpflanzen gibt (GARTMANN, 2015). Mit den samenbildenden Pflanzen haben sie die Gliederung in Wurzel, Sprossachse und Blätter, die Xylemelemente zum Transportieren von Wasser und darin gelösten Nährsalzen besitzen, gemeinsam. Gegenteilig zu Samenpflanzen tragen sie jedoch weder Samen noch Blüten oder Früchte, sondern Sporen. Da sie somit keine nährstoffreichen Samen, auffällig schöne Gestalt oder wohlschmeckende Früchte aufweisen, erregten sie vermutlich weniger das Interesse als andere Pflanzengruppen. Hinzu kommt, dass die Sprosse i.d.R. mit Festigungsgewebe versehen und somit zäh sind. Außerdem enthalten die Pflanzen oft Bitter- und Giftstoffe zum Schutz gegen Insekten, Pilze und pflanzenfressende Säugetiere. Dennoch fanden und finden einige dieser Pflanzen und Pflanzenzubereitungen Anwendung als Nahrungs- oder Heilmittel, als Kosmetikgrundlage oder als Fasern, Farbstoffe und Baumaterial (ALI *et al.*, 2012; GARTMANN, 2015). Insbesondere an Orten mit einem hohen Vorkommen dieser Pflanzen oder Mangel an Alternativen, wie beispielsweise in Indien, Neuguinea und arktischen Zonen, werden sie trotz ihrer teilweise giftigen Inhaltsstoffe verwendet. Zudem bieten sie eventuell noch nicht erkundete pharmazeutische Möglichkeiten.

Die fünf Gefäßpflanzen *Lycopodium annotinum*, *Equisetum arvense*, *Dryopteris filix-mas*, *Osmunda regalis* und *Pteridium aquilinum* wurden aus möglichst verschiedenen Unterabteilungen der Farngewächse und ihren Verwandten ausgewählt, um verschiedene Positionen im phylogenetischen Stammbaum der frühen Landpflanzen zu untersuchen (Abbildung 1). Die untersuchten Farne und ihr Verwandter aus den Bärlappgewächsen gehören zu den Monilophyten (Farngewächsen) bzw. Lycophyten.

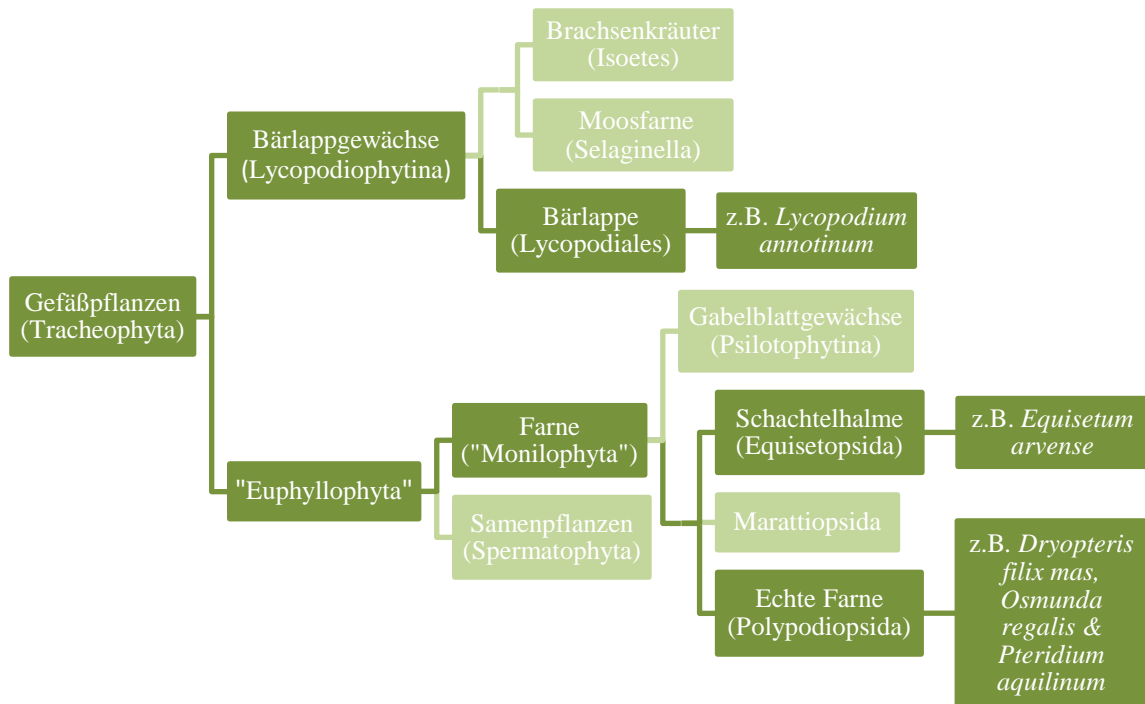


Abbildung 1: Schema der systematischen Klassifizierung

untersuchte Pflanzen *kursiv*; dunkelgrün: relevante Pfade, hellgrün: nicht weiter untersucht

1.1 Bärlappe

1.1.1 Sprossender Bärlapp



Abbildung 2: Habitus von *Lycopodium annotinum*

Bei *Lycopodium annotinum* (Abbildung 2) aus der Familie der *Lycopodiaceae* handelt es sich um eine bis zu etwa 1 m lange, oberirdisch kriechende, sich gabelig verzweigende Pflanze, die kleine nadelförmige Blätter besitzt. An der Basis dieser Blättchen sitzen die Sporangien, in denen die Sporen gebildet werden. Die Sporophylle (ca. 2 – 4 cm lang) stehen am Ende des Sprossabschnitts zu Sporophyllständen

vereinigt. Er ist auf der gesamten Nord- und Südhemisphäre in den gemäßigten und borealen Zonen zu finden, bevorzugt in bodensauren, feuchten und schattigen Wäldern. Diese Pflanzenart bildet eine Varietät an kondensierten polyzyklischen Alkaloiden, in denen hauptsächlich drei strukturelle Klassen, die Lycopodine, Lycodine und Fawcettimine vertreten sind (MA und GANG, 2004).

Teilweise steht das Interesse an diesen Alkaloiden mit ihrer starken Acetylcholinesterase (AChE)-hemmenden Wirkung in Verbindung. Bei AChE handelt es sich um ein Enzym, das durch schnelle Hydrolyse von Acetylcholin dessen Übertragung an cholinergen Synapsen und neuromuskulären Übergängen beendet. Ein Alkaloid der Lycodin-Klasse (Huperzin A) wurde daher beispielsweise hinsichtlich der klinischen Wirksamkeit bei der Behandlung von Alzheimer-Krankheiten und Gefäß-Demenz untersucht (LITTLE *et al.*, 2008; HAO *et al.*, 2009; XING *et al.*, 2014). Es wurde auch gezeigt, dass tetrazyklische Lycopodiumalkaloide als potente AChE-Inhibitoren fungieren könnten (HIRASAWA *et al.*, 2003). Die Inhaltsstoffe Anhydrolycodolin und Annotin-*N*-oxid, aus einer Subspezies von *Lycopodium annotinum* isoliert, wiesen eher eine schwache Inhibitor-Wirkung auf. Dadurch wurde geschlussfolgert, dass Alkaloide mit Lycopodan-Grundgerüst keine potenten Inhibitoren der AChE sind (HALLDORSOTTIR *et al.*, 2010). Früher wurden vor allem die Sporen dieser Lycopodiumart als Heilmittel u.a. zur Blutungsstillung, bei Durchfall und als Diuretikum eingesetzt (ROBUCK, 1985). Sporen des *Lycopodium clavatum* wurden z.B. zur Pillenbestäubung (ANDERSEN *et al.*, 1998) oder als Wundpuder genutzt (ØLLGAARD und TIND, 1993).

1.2 Farne

1.2.1 Eusporangiaten Farn: Ackerschachtelhalm



Abbildung 3: Habitus von *Equisetum arvense*

Equisetum arvense (Abbildung 3) aus der Familie der *Equisetaceae* wächst als einfaches, aufrechtes Kraut, dessen mit Längsfurchen versehender Spross hohl und jeweils auf der Höhe der Knoten durch Querwände in Segmente geteilt ist. An diesen Knoten befinden sich jeweils ein Kreis an kleinen, schuppenförmigen Blättern und quirlig angeordneten Seitenästen. Die fertilen Pflanzen tragen, im Gegensatz zu den sterilen Pflanzen, endständig eine Sporangienähre (1 – 4 cm lang), dafür jedoch keine Seitenäste. Während sterile Pflanzen rund 10-50 cm hoch wachsen können und grün sind, werden fertile nur etwa halb so groß und haben eher eine braun-weißliche Farbe. Der Ackerschachtelhalm hat eine sehr weite, circumpolare Verbreitung in der nördlichen Hemisphäre und besiedelt Äcker sowie andere lehmige feuchte Böden.

Der mengenmäßig wichtigste Inhaltsstoff ist Kieselsäure, die der Pflanze Stabilität gibt und als Schutz dient. Einige andere bekannte Inhaltsstoffe sind weitere Mineralien wie Kalium, Phytosterole, Flavonoide, phenolische Petrosine sowie andere phenolische Verbindungen wie Kaffeesäure-Derivate (OH *et al.*, 2004; SANDHU *et al.*, 2010). Es wurden schmerzstillende, entzündliche, antidiabetische, antioxidative, antimikrobielle, adstringierende, antikonvulsive, diuretische und hepatoprotektive Eigenschaften für bestimmte aus *Equisetum* gewonnene Extrakte beschrieben (DO MONTE *et al.*, 2004; OH *et al.*, 2004; DOS SANTOS *et al.*, 2005; NAGAI *et al.*, 2005; RADULOVIĆ *et al.*, 2006; SOLEIMANI *et al.*, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2014). Pharmazeutisch werden standardisierte Präparate zur Durchspülungstherapie bei Rheuma, Husten und Nieren- bzw. Blasenentzündungen genutzt. Volksmedizinisch diente die Verwendung von *Equisetum arvense* z.B. zur „Reinigung des Blutes“, zur Behandlung von Tuberkulose, Katarrhen in den Nieren- und Blasenregionen, verschiedenen

Blutungen, brüchigen Fingernägeln und Haarausfall, rheumatischen Erkrankungen, Gicht, schlecht heilenden Wunden oder anderen Verletzungen (SANDHU *et al.*, 2010).

Außerdem dienten Schachtelhalme v.a. bei den indigenen Völkern Nordamerikas als Polier- und Nahrungsmittel (GARTMANN, 2015). Dabei können Verwechslungen mit dem ähnlich aussehenden giftigen *Equisetum palustre* (Sumpfschachtelhalm) auftreten.

1.2.2 Leptosporangiate Farne: echter Wurmfarne, Königsfarne & Adlerfarne

Diese Gruppe der Farne zeigt i.d.R. große mehrfach gefiederte Blätter (Wedel), die zu Beginn der Vegetationsperiode wie Bischofsstäbe eingerollt sind. Auf der Unterseite dieser Wedel befinden sich die zu Sori gruppierten sporenbildenden Sporangien. Es handelt sich meist um grüne krautige Pflanzen, die als trichterförmige Rosette angeordnet sind. In bestimmten Regionen (z.B. Tropen) können sie auch baumförmig sein, besitzen jedoch keinen verholzten Stamm. Die Gametophyten sind meist sehr kleine, unscheinbare, herzförmige, ebenfalls grüne Pflänzchen, sog. Prothallien. Diese Farne kommen ubiquitär insbesondere in (halb-)schattigen Gebieten mit hoher Feuchtigkeit, wie z.B. in Wäldern und Schluchten, vor (GARTMANN, 2015).

Bei *Dryopteris filix-mas* (Abbildung 4) aus der Familie der *Dryopteridaceae* handelt es sich um einen fast immergrünen rund 30 – 150 cm großen Vertreter, der in gemäßigten Gebieten der Nordhalbkugel weit verbreitet ist.



Abbildung 4: Habitus von *Dryopteris filix-mas*

Die Blätter sind zweifach gefiedert und laufen in beide Richtungen spitz zu, wobei die Verschmälerung zum Grund hin weniger ausgeprägt ist. Gelbbraune, glanzlose Spreuschuppen besetzen überwiegend den kurzen Blattstiel. Ein Wedel besteht aus etwa 20-35 Blattfiedern auf jeder Seite der Mittelrippe. Die abgerundeten bis spitzen Fiederblättchen sind am Rand leicht gelappt bzw. teils scharf gesägt und tragen auf ihrer Unterseite die in zwei Reihen angeordneten Sori. Das Rhizom enthält mehrere reizende und toxische Stoffe, von denen das Phloroglucinol-Derivat Flavaspidsäure anthelminthisch wirkt. Dadurch wurde das Rhizom des *Dryopteris* früher als Mittel gegen Bandwürmer eingesetzt (ALI *et al.*, 2012). Jedoch schwankte die Konzentration dieser wirksamen und toxischen Inhaltsstoffe innerhalb der verwendeten Droge, wodurch der Einsatz aufgrund von Intoxikationen schwierig war (GARTMANN, 2015). Als Folge dieser Vergiftungen traten u.a. Erbrechen, Durchfall, Bewusstlosigkeit, Seh- und Atmungsstörungen auf oder sie verliefen sogar tödlich (MEHLHORN *et al.*, 2011). Auch oberirdische Teile der Pflanze, wie z.B. die Blätter, fanden wegen ihrer giftigen Inhaltsstoffe als Anthelminthikum Verwendung (HANIF *et al.*, 2009).

Aufgrund der Anwesenheit von Flavonoiden und Phenolen in Extrakten dieser Pflanzenart vermutete man auch ein antioxidatives Potential. Für methanolische Auszüge der Blätter konnte bereits ein stark antioxidatives und zytotoxisches Potential nachgewiesen werden (ALI *et al.*, 2012). Somit ist eine pharmazeutische Nutzung auch für die Zukunft nicht auszuschließen.



Abbildung 5: Habitus von *Osmunda regalis*

Osmunda regalis (Abbildung 5) aus der Familie der *Osmundaceae* ist ein aufrecht stehender, sommergrüner, lang gestielter, etwa 80 – 160 cm hoher Farn. Er besitzt sowohl sterile, hellgrüne, doppelt gefiederte Wedel ohne Sporen auf der Blattunterseite, als auch fertile Wedel, die im unteren Teil grüne Fiedern und im oberen Teil rostbraune, ährig angeordnete Sporangien tragen. Diese erst nach einigen Jahren gebildeten fertilen Sporenblätter stehen im Zentrum der ausgedehnt wachsenden Pflanze. Außerdem ist diese funktionale Trennung in fertile und sterile Blätter ein sehr urtümliches Merkmal im Vergleich zu anderen leptosporangiaten Farnen. Er ist in den gemäßigten Breiten auf der Nord-

und Südhalbkugel in vielen Teilen der Welt zu finden. Dort sind sonnige bis schattige Standorte wie Wälder oder Gräben- und Gewässerränder für ihn geeignet, wenn der Boden feucht bis sumpfig ist und ausreichend Nährstoffe enthält. In Europa ist diese Art der einzige Vertreter der Gattung *Osmunda* (JETTER und RIEDERER, 1999; LANDI und ANGIOLINI, 2010).

Früher galt der Königsfarn als Heilpflanze, dessen Aufguss des Wurzelstocks z.B. harntreibend, choloretisch und stärkend wirken sollte (BÉZANGER-BEAUQUESNE und PINKAS, 1964). Selbst heutzutage wird dieser Farn z.B. noch in einer nordspanischen Provinz als kommerzielle Heilpflanze bei Muskel-Skelett-Erkrankungen, wie Knochenbrüchen, Gelenkproblemen und rheumatischen sowie arthritischen Schmerzen, genutzt (MOLINA *et al.*, 2009). Auch in Indien werden seine Pflanzenteile als Tonikum, zur Blutstillung, zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen, bei Darmproblemen und Rachitis verwendet (PERUMAL, 2010; SINGH und UPADHYAY, 2012).



Abbildung 6: Habitus von *Pteridium aquilinum*

Pteridium aquilinum (Abbildung 6) aus der Familie der *Dennstaedtiaceae* besitzt hellgrüne, auffallend zwei- bis vierfach gefiederte Blätter die i.d.R. 50 cm bis 2 m hoch werden. Die Blätter sind bogenförmig geneigt und der Blattrand ist eingerollt, sodass die Sori, die marginal auf der Blatffiederunterseite stehen, nicht nur von dem Indusium sondern auch vom umgerollten Blattrand geschützt werden. Diese Farnart ist weltweit verbreitet. Jedoch fehlt sie in polaren und in extrem trockenen Gebieten. Sie bevorzugt, neben der an halbschattigen Standorten benötigten Bodenfeuchtigkeit, besonders nährstoffarme, saure Böden und tritt dort in großen Herden auf.

Wie der Wurmfarn ist auch dieser Farn toxisch. Alle Pflanzenteile sind sowohl im frischen als auch getrockneten Zustand giftig. In den jungen Blättern finden sich hohe Konzentrationen an dem cyanogenen Glykosid Prunasin und dem instabilen Glykosid Ptaquilosid. Außerdem kommt v.a. in diesen und im Rhizom ein weiterer Giftstoff, das Enzym Thiaminase, hinzu. Weitere, ebenfalls in den Pflanzenteilen enthaltene Inhaltsstoffe, sind u.a. bestimmte Gerbstoffe und Shikimisäure-Derivate. Ihre Rolle in Bezug auf die Toxizität der Pflanze ist jedoch nicht vollständig geklärt (GIL DA COSTA *et al.*, 2012).

In manchen Gegenden fand und findet der Adlerfarn als Nahrungsmittel Verwendung. So diente beispielsweise das Rhizom in Europa bei Hungersnöten als stärkehaltige Nahrungsquelle. Von indigenen Völkern der südwestlichen USA wird es immer noch aufgrund des Stärkegehalts verzehrt. In Ostasien, Brasilien und einigen anderen Regionen werden die jungen Triebe als Delikatesse, z.B. wie Spargel, gegessen (GIL DA COSTA *et al.*, 2012; GARTMANN, 2015). In diesen Gebieten ist das Vorkommen von verschiedenen Tumoren erhöht und könnte u.a. mit der Einnahme von karzinogenem Ptaquilosid zusammenhängen (SMITH und SEAWRIGHT, 1995; RECOUSO *et al.*,

2003). Auch bei Weidetieren, die Adlerfarn über einen längeren Zeitraum verzehren, kann es zu Vergiftungen, insbesondere zum auf Konchenmarkdepressionen basierenden Stallrot (inneren und äußeren Blutungen bis hin zum Tod), kommen. Diese enzootische Hämaturie wird durch einen Vitamin B1-Mangel hervorgerufen, der u.a. durch das Enzym Thiaminase verursacht wird. Zudem werden die Gifte auch mit der Milch dieser Tiere ausgeschieden und können somit Einfluss auf den Menschen haben. Trotzdem finden die Pflanzenteile sowie Zubereitungen dieses giftigen Farns auch heute noch Anwendung im landwirtschaftlichen und auch im medizinischen Bereich (GIL DA COSTA *et al.*, 2012). So wird das Rhizom in Indien als Aphrodisiakum und ein aus den Wedeln gewonnener Tee bei Bauchkrämpfen bzw. im Kosovo als Diuretikum verwendet. Weitere, in verschiedenen Regionen bekannte Anwendungsgebiete sind Zahnschmerzen und Infektionen der Mundhöhle (GARTMANN, 2015). Auch die antioxidative Wirkung der Flavonoide, insbesondere das des Quercetins, in den Extrakten von *Pteridium* birgt pharmazeutisches Potential (HARWOOD *et al.*, 2007; TALUKDAR *et al.*, 2011).

2. Pflanzliche Zellwand

Pflanzenzellwände sind auf Kohlenhydraten basierende extrazelluläre Matrizen, die sich während der Evolution verändert haben. Sie sind für biologische Prozesse wie Wachstum, Entwicklung und Überleben essentiell. Aus diesem Grund trägt die Charakterisierung der Zusammensetzung und Veränderung der pflanzlichen Zellwände zum Verständnis der evolutionären Entwicklung von Pflanzen bei.

Gefäßpflanzen erschienen vor etwa 410 Millionen Jahren. Im Hinblick auf die aktuelle Taxonomie werden diese Pflanzen in Lycophyten und Euphyllophyten unterteilt. Man ist sich im Allgemeinen darüber einig, dass Lycophyten bereits fast im mittleren Devon (vor ca. 400 Millionen Jahren) von allen anderen lebenden vaskulären Pflanzenlinien getrennt wurden (PRYER *et al.*, 2004; BANKS *et al.*, 2011). Während Lycophyten nur Mikrophyllie besitzen, sind Euphyllophyten, insbesondere in Bezug auf die Vaskularisierung, durch strukturell komplexere Megaphyllblätter charakterisiert (LEROUX *et al.*, 2013). Die heute noch existierenden Euphyllophyten lassen sich zwei Kladen zuordnen, den Monilophyten (Farnen) und Spermatophyten (Samenpflanzen). Innerhalb der Monilophyten können die Schachtelhalme (eusporangiate Farne) auf das obere Devon zurückgeführt werden, während die leptosporangiaten Farne erst im Mississippium (früher: unteres Karbon) erschienen. Im Allgemeinen teilen sich Lycophyten- und Farnzellwände einige Merkmale mit denen von Samenpflanzen, wie das Auftreten von Cellulose und pektischen Polysacchariden (MATSUNAGA *et al.*, 2004; POPPER, 2008; LEROUX *et al.*, 2011). Es gibt allerdings auch Unterschiede, zum Beispiel das Auftreten von gemischten β -Glukanen (SØRENSEN *et al.*, 2008) und Silizium (CURRIE und PERRY, 2009) in Zellwänden von *Equisetum*. Auch die Ligninstrukturen sind heterogen: Sekundärzellwände von Angiospermen und Lycophyten werden mit ligninhaltigen Syringylmonomeren verstärkt, während Farne und Gymnospermen Lignin ablagern, das vorwiegend aus Guaiacylmonomeren stammt (WENG *et al.*, 2008). In Samenpflanzen sind Arabinogalaktan-Proteine (AGPs), als spezielle Gruppe von Zellwand-Proteoglykanen, Schlüsselkomponenten der extrazellulären Matrix mit wichtigen Funktionen, wie z.B. Beteiligung an Zellwachstum, Zellproliferation, Strukturbildung und Reproduktion (SEIFERT und ROBERTS, 2007).

2.1 Arabinogalaktan-Proteine

AGPs gehören einer komplexen Gruppe von hochmolekularen Glykoproteinen bzw. Proteoglykanen der Zellwand an: den Hydroxyprolin-reichen Glykoproteinen (HRGPs). Diese Gruppe enthält neben den stark glykosylierten AGPs auch wenig glykosylierte Prolin-reiche Proteine (PRPs) und moderat glykosylierte Extensine (SHOWALTER *et al.*, 2016). AGPs selbst sind eine sehr heterogene Molekülgruppe, die in ihren Kohlenhydrat- und Proteinstrukturen, sowie ihren Verknüpfungen untereinander variieren und somit verschiedene Gestalten annehmen können (SEIFERT und ROBERTS, 2007).

2.1.1 Funktionen

Diese komplexe und heterogene Gruppe an Molekülen übernimmt in der Pflanze diverse Funktionen, die mit Wachstum und Entwicklung zusammenhängen. Dazu gehören unter anderem Zelldifferenzierungen (KNOX, 1995), Zell-Zell-Interaktionen (SCHULTZ *et al.*, 1998), Strukturbildung (KNOX *et al.*, 1991; LOPEZ und RENZAGLIA, 2014), somatische Embryogenese (VAN HENGEL *et al.*, 2002; DUCHOW *et al.*, 2016), sowie weitere Aspekte des Fortpflanzungsprozesses (ACOSTA-GARCÍA und VIELLE-CALZADA, 2004; LEE *et al.*, 2008), Xylem-Differenzierung (MOTOSE *et al.*, 2004; GOELLNER *et al.*, 2013) und programmierter Zelltod (GAO und SHOWALTER, 1999). Weitere Funktionen, wie die Interaktion mit Mikroorganismen, werden postuliert (MAJEWSKA-SAWKA und NOTHNAGEL, 2000; GASPAR *et al.*, 2004). Ihre amphiphile Beschaffenheit würde für eine Rolle als Mediator zwischen der Zellwand, der Plasmamembran und dem Zytoplasma sprechen. Verschiedene Modelle für den Wirkmechanismus von AGPs werden vorgeschlagen. Zum einen könnten Zucker durch spezifische Enzyme gespalten und in das extrazelluläre Medium freigesetzt werden. Zum anderen könnte durch Abspaltung des GPI-Ankers das komplette Molekül freigesetzt werden (SCHULTZ *et al.*, 1998; VAN HENGEL *et al.*, 2001). Dabei ist es möglich, dass sie dank ihrer Membranassoziiierung mittels GPI-Anker und Vorkommen in löslicher Form als Signalmoleküle dienen oder als Modulatoren und Korezeptoren von Signalstoffen der Morphogenese fungieren (SEIFERT und ROBERTS, 2007). Auch eine Funktion als Kalziumchelator wurde vorgeschlagen (LAMPORT und VÁRNAI, 2013). Die hier aufgeführten Funktionen liefern einen Eindruck der weitreichenden möglichen Aufgaben von AGPs, die in der Vergangenheit schon öfter und vor Kurzem erneut in Reviews zusammengefasst wurden (GASPAR *et al.*, 2001; SEIFERT und ROBERTS,

2007; ELLIS *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2015). Zum großen Teil sind die genauen Funktionen und Funktionsweisen von einzelnen AGPs jedoch nicht aufgeklärt.

Die Mehrheit der Experimente zur Ableitung der AGP-Funktion basieren auf Anti-AGP-Antikörperreaktionen (CASERO *et al.*, 1998; COIMBRA *et al.*, 2007; CHENG *et al.*, 2008; BOUGHANMI *et al.*, 2010; NGUEMA-ONA *et al.*, 2012). Dabei erkennen die meisten Antikörper Kohlenhydrat-Epitope, die wiederum weitestgehend nicht genau charakterisiert sind (YATES *et al.*, 1996). Obwohl diese monoklonalen Antikörper nützlich sind, sind solche Epitope wahrscheinlich nicht nur auf ein spezifisches AGP beschränkt, sondern auf vielen AGPs mit verschiedensten Proteinrückgraten vorhanden. Zusätzlich können auch die verschiedenen Kohlenhydrat-Strukturen für die Funktionen verantwortlich sein. Mutanten mit fehlenden Genen für AGPs können wichtige Hinweise auf die Funktion einzelner AGPs liefern (GASPAR *et al.*, 2001).

Pharmazeutisch betrachtet ist besonders die immunstimulierende Wirkung von Bedeutung. So wurden *in vitro* für ein *Echinacea*-AGP eine Aktivierung des humanen Komplementsystems (ALBAN *et al.*, 2002) und die Bindung an humane Leukozyten (THUDE *et al.*, 2006), sowie für die AGPs von *Baptisia* und *Echinacea* eine immunmodulierende Wirkung auf die Proliferation, IgM-Produktion, Nitrit- und IL-6-Produktion von Maus-Lymphozyten bzw. Maus-Makrophagen beschrieben (CLASSEN *et al.*, 2006). Des Weiteren werden einige AGPs, insbesondere aus *Gummi arabicum*, aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften als Bindemittel, Emulgatoren und Stabilisatoren sowohl in Nahrungsmittel- als auch Pharmaindustrie genutzt (ELLIS *et al.*, 2010).

2.1.2 Biosynthese

Obwohl die Synthese von AGPs noch nicht abschließend geklärt ist, vermutet man aufgrund von einigen Untersuchungen, dass AGPs, wie die Extensine und andere Glykoproteine der Zellwand und Plasmamembran, im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat synthetisiert und anschließend mittels Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert werden (NOTHNAGEL, 1997).

Generell kann die gesamte Biosynthese der AGPs in mehrere Schritte gegliedert werden: Synthese der Proteinkomponente im ER, der Monosaccharideinheiten und der Protein-Kohlenhydrat-Bindungen; Verlängerung der Kohlenhydratketten; intrazellulärer

Transport des vorgeformten oder wachsenden Polymers; Sekretion und extrazellulärer Transport der gebildeten Moleküle (CLARKE *et al.*, 1979).

Ein darauf basierendes hypothetisches Model des AGP-Syntheseweges wäre demzufolge, nach Synthese der Proteinkette, die Hydroxylierung von Prolin durch Prolyl-4-Hydroxylase. Als Nächstes würde eine *O*-Galaktosyltransferase einen Galaktose-Rest mit UDP-D-Galaktose als Donator auf ein Hydroxyprolin übertragen und das entstandene „Zwischenprodukt“ anschließend zum Golgi-Apparat transportiert werden, wo weitere Glykosyltransferasen lokalisiert sind (NOTHNAGEL, 1997; VLAD *et al.*, 2007; OKA *et al.*, 2010).

Schließlich könnte die weitere Anknüpfung der entsprechenden Zuckerbausteine mittels *O*-Galaktosyl-, Arabinosyl- oder anderer Glykosyltransferasen entweder einzeln als Monomere oder blockweise als Oligo- bzw. Polymere erfolgen (FINCHER *et al.*, 1983; KELLY *et al.*, 2006; OKA *et al.*, 2010). Danach würden die entstandenen Moleküle mit Hilfe der Golgi-Vesikel zur Plasmamembran transportiert werden können (FINCHER *et al.*, 1983). Dort können sie außerdem zwischenzeitlich über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Plasmamembran verankert sein (YOUL *et al.*, 1998), bevor sie mittels Phospholipasen freigesetzt werden (SCHULTZ *et al.*, 1998).

2.1.3 Aufbau

AGPs sind strukturell durch eine oder mehrere komplexe Kohlenhydratketten mit Galaktose und Arabinose als Hauptkomponenten, die über *O*-Glykosylierung kovalent an ein Kernprotein-Grundgerüst gebunden sind, charakterisiert.

Normalerweise macht der Arabinogalaktan-Anteil in Blütenpflanzen etwa 90 % (m/m) des Moleküls und das Hydroxyprolin-reiche Proteinrückgrat bis ca. 10 % (m/m) aus. Zusätzlich kann ebenfalls ein GPI-Membrananker vorhanden sein. Ihre Molekülgröße liegt zwischen 60 und 300 kDa (NOTHNAGEL, 1997).

Die meisten AGPs besitzen die Fähigkeit, mit einem synthetisch hergestellten Phenylazoglykosid-Farbstoff, insbesondere dem β -Glukosyl-Yariv-Reagenz, Komplexe zu bilden (YARIV *et al.*, 1962; KREUGER und VAN HOLST, 1996). Auch wenn der genaue Mechanismus dieser Bindung nicht geklärt ist, hat er sich als sehr nützliches Hilfsmittel bei der Detektion, Quantifizierung und Reinigung von AGPs erwiesen (ELLIS *et al.*, 2010).

Das Kohlenhydratgerüst der AGPs von Samenpflanzen besteht zum großen Teil (ca. 90 %) aus Arabinose (Ara) und Galaktose (Gal), wobei Galaktose meist überwiegt, sodass sich häufig ein Ara/Gal-Verhältnis von etwa 1:2 ergibt (FINCHER *et al.*, 1983; NOTHNAGEL, 1997). Es handelt sich dabei i.d.R. um verzweigte Typ-II-Arabinogalaktane (AGs), die hauptsächlich aus 3-, 6- und 3,6-verknüpften β -D-Galp-Ketten mit α -L-Araf-Substituenten bestehen. Je nach AGP können auch geringe Mengen Fucose, Rhamnose, Xylose, Mannose, Glukose, Glukosamin und Uronsäuren substituiert sein (SHOWALTER, 2001). Die einzelnen AGs sind ca. 5 – 25 kDa groß, wobei bei einigen AGPs auch kleine Arabinose-Oligosaccharid-Seitenketten vorkommen (QI *et al.*, 1991; ELLIS *et al.*, 2010).

Im Proteinrückgrat sind neben Hydroxyprolin (Hyp) auch die Aminosäuren Prolin (Pro), Alanin (Ala), Serin (Ser) und Threonin (Thr) mengenmäßig dominierend. In der Regel wird Hyp als die verantwortliche Aminosäure der *O*-glykosidischen Bindung angesehen (NOTHNAGEL, 1997; ELLIS *et al.*, 2010).

Die Genome einiger dieser AGP-Proteinteile wurden mit Hilfe von Genklonierung sequenziert. Die daraus abgeleitete Vielzahl an teils sehr diversen Protein-Rückgrat-Strukturen werden oft in „klassische“ (u.a. Hyp-/Pro-, Ser-/Thr-, Ala-reich) und „nicht-klassische“ (u.a. Hyp-arm, Cys- und Asn-reich) Typen eingeteilt. „Klassische“ AGPs besitzen eine N-terminale hydrophobe Signalsequenz, eine zentrale Pro- bzw. Hyp-reiche Domäne und eine C-terminale Domäne, die hydrophob ist und als Signal für die Kopplung an einen GPI-Anker dienen kann. In einigen „nicht-klassischen“ AGPs ist diese Domäne hydrophil (DU *et al.*, 1996; YOUL *et al.*, 1998), sodass es unwahrscheinlich ist, dass diese einen GPI-Anker besitzen (SHOWALTER, 2001).

Der Aufbau des GPI-Ankers ist dem von anderen Eukaryoten, wie z.B. dem der Tiere, Protozoen und Hefen, ähnlich (OXLEY und BACIC, 1999).

Er wird über seinen Phosphoethanolamin-Rest an eine spezifische Aminosäure im C-terminalen Teil der klassischen AGPs gebunden, und kann später an dieser Stelle beispielsweise mittels GPI-spezifischer Phospholipasen abgespalten werden. Diese Modifikation erfolgt im ER und verankert das AGP in der ER-Membran und anschließend in der Membran der Golgi-Vesikel bevor es an die Außenseite der Plasmamembran sezerniert wird (SHOWALTER, 2001; SEIFERT und ROBERTS, 2007).

2.1.4 Verbreitung

In Angiospermen und Gymnospermen ist das weit verbreitete Auftreten der AGPs bereits gut untersucht und dokumentiert (CLARKE *et al.*, 1979; FINCHER *et al.*, 1983). Sie konnten nicht nur in vielen Samenpflanzen, sondern auch in verschiedensten Pflanzenorganen, wie Blättern, Blütenbestandteilen, Samen, Stängeln und Wurzeln nachgewiesen werden (NOTHNAGEL, 1997). Dort wurden sie oft im Xylem (MOTOSE *et al.*, 2001, 2004; BOSSY *et al.*, 2009; GOELLNER *et al.*, 2013), aber auch in Wundsekreten (ELLIS *et al.*, 2010) oder im Kulturmedium von Zellkulturen gefunden, wobei in den verschiedenen Organen auch verschiedene AGPs auftreten können (NOTHNAGEL, 1997). Auf zellulärer Ebene konnten sie häufig im Zellwandbereich z.B. in Tüpfeln, verankert in der Plasmamembran und in interzellulären Räumen, aber auch intrazellulär in Golgi-Vesikeln detektiert werden (HERMAN und LAMB, 1992; SHOWALTER, 2001; GOELLNER *et al.*, 2013). Wie in III.2.1.3 erwähnt ist eine besondere Eigenschaft von AGPs die Bindung an Yariv's Reagenz, einem roten Farbstoff, der spezifisch mit AGPs interagiert (CLARKE *et al.*, 1978; BASILE und BASILE, 1987). Durch Färbung mit diesem Reagenz konnte das Auftreten von AGPs mikroskopisch unter anderem für ein Moos (SHIBAYA und SUGAWARA, 2009) und eine Braunalge (HERVÉ *et al.*, 2016) gezeigt werden. Das Vorkommen von AGP-Glykan-Epitopen in samenfreien Pflanzen wurde außerdem mittels mikroskopischen Nachweises unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die gegen Arabinogalaktan-Epitope gerichtet sind, sowohl für einige Bryophyten (LIGRONE *et al.*, 2002; KREMER *et al.*, 2004; BERRY *et al.*, 2016), Farne (EECKHOUT *et al.*, 2014; LOPEZ und RENZAGLIA, 2014) und Charophyten (EDER und LUTZ-MEINDL, 2008; DOMOZYCH *et al.*, 2009) als auch Braunalgen (HERVÉ *et al.*, 2016) gezeigt. Allerdings gibt es erst zwei Berichte über die Struktur der AGPs aus Moosen (FU *et al.*, 2007; BARTELS *et al.*, 2017). Darüber hinaus beschränken sich die Daten zur Isolierung und Zusammensetzung von AGPs aus Lycophyten und Farnen auf nur eine Voruntersuchung an einem Arabinogalaktan-reichen Protein aus dem Farn *Osmunda japonica* (AKIYAMA *et al.*, 1987).

3. Zielsetzung

Aufgrund der begrenzten Kenntnis der Zellwandstruktur von Sporenpflanzen ist das Verständnis der Evolution der Zellwand noch immer unvollständig. Da neben Polysacchariden auch Proteoglykane, wie AGPs, wichtige Bestandteile der Zellwand der meisten, wenn nicht aller Samenpflanzen sind, war es zunächst das Ziel der Arbeit die Arabinogalaktan-Proteine, falls vorhanden, in den verschiedenen sporenbildenden Gefäßpflanzen, den Lycophyten und Monilophyten, mikroskopisch mit Hilfe von Immunfluoreszenz zu lokalisieren und in der Folge zu isolieren.

Im Anschluss sollten verschiedene Methoden der Analytik der Strukturaufklärung dieser Arabinogalaktan-Proteine dienen. Von Interesse war dabei auch die Aufklärung möglicher Unterschiede im evolutionären Vergleich zu Moosen und Samenpflanzen.

Somit bietet diese Arbeit eine erste detaillierte Charakterisierung von AGPs aus einem Lycophyten, einem Schachtelhalm und verschiedenen echten Farnen, wobei die Schachtelhalme und Farne eine monophyletische Gruppe darstellen und die engsten lebenden Verwandten der Samenpflanzen sind (PRYER *et al.*, 2001). Sie ist der Schlüsselaspekt dieser Arbeit, wobei Teile der Dissertation schon in der Publikation „Structural investigations on arabinogalactan-proteins from a lycophyte and different monilophytes (ferns) in the evolutionary context“ publiziert wurden (BARTELS und CLASSEN, 2017).

Im Rahmen der Phytotherapie werden immunmodulierende Eigenschaften von AGPs aus *Echinacea*-Arten diskutiert. Daher wurden in dieser Arbeit Bindungsanalysen mittels Fluorescence-activated cell scanning (FACS) durchgeführt, um eine mögliche Wirkung von AGPs auf das Immunsystem durch Bindung an dendritische Zellen nachzuweisen.

IV. Material und Methoden

1. Verwendete Geräte und Materialien

1.1 Allgemein verwendete Geräte

Alle verwendeten Glasgeräte stammten, soweit nicht anders bezeichnet, von der Fa. Duran Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland.

Gefriertrockner:	Christ Alpha 1-4 LSC/Beta 1-8 K, Fa. Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland; Vakuumpumpe: Chemie-HYBRID-Pumpe RC 6, Fa. Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland; Vakuum 1,030 mbar, Eiskondensator -54 °C
Heizblock:	Bioblock Scientific, Code 92607, Thermolyne Corp., USA & Stuart block heater SBH200DC, Fa. Bibby Scientific Limited, Staffordshire, United Kingdom
Pipetten:	Eppendorf research, Fa. Eppendorf, Hamburg mit Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rotationsverdampfer:	Laborota 4000 efficient, Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland; Vakuumpumpe: PC 2001 Vario mit CVC 2000/PC 3001 Vario mit CVC 3000, Fa. Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Vortexer:	MS2 Minishaker, Fa. IKA, Labortechnik, Staufen, Deutschland & Vortex Genie 2, FA: Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waagen:	Satorius laboratory, Fa. Satorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland; Satorius universal, Fa. Satorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland; Satorius Genius, Fa. Satorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland
Wasserbäder:	Typ 1002 GFL & Typ 1033 GFL, Fa. Gesellschaft für Labortechnik m.b.H., Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen:	Heraeus Megafuge 16/Multifuge X3R, verschiedene Rotor- einsätze, Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland

1.2 Allgemein verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien hatten eine hochwertige analytische oder pharmazeutische Qualität.

1.3 Verwendetes Drogenmaterial

Es wurden die frisch getrockneten und zerkleinerten (pulverisierten) oberirdischen Teile, die Sprossachsen und Wedel, der verschiedenen Arten verwendet.

Die Ernte erfolgte an folgenden Orten:

Lycopodium annotinum L. (LA, Sprossender Bärlapp, Lycopodiaceae) in Oberjoch, Deutschland

Equisetum arvense L. (EA, Ackerschachtelhalm, sterile Sprosse, Equisetaceae) im Garten der pharmazeutischen Biologie, Universität Kiel

Dryopteris filix-mas (L.) Schott (DFM, Echter Wurmfarne, Dryopteridaceae) im Garten der pharmazeutischen Biologie, Universität Kiel

Osmunda regalis L. (OR, Königsfarne, Osmundaceae) im Botanischen Garten der Universität Kiel

Pteridium aquilinum (L.) Kuhn (PA, Adlerfarne, Dennstaedtiaceae) am Flughafen Holtenau, Kiel, Deutschland

Beim Adlerfarne wurden die stark verholzten mittleren Teile der Wedel (Mittelrippen) nicht verwendet.

2. Isolierung der hochmolekularen Polysaccharid-Fractionen

Als erstes wurden je 100 g zuvor pulverisiertes Drogenmaterial in 1 l 60 %igem Aceton für 2 h bei 4 °C bewegungsmazeriert.

Das Mazerat wurde abgenutscht und die Drogenrückstände zwei Mal mit 200 ml 60 %igem Aceton gespült, dann erneut in 1 l 60 %igem Aceton über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler gelagert, abgenutscht und zwei Mal mit 200 ml 60 %igem Aceton gespült.

Im Anschluss wurden die Drogenrückstände für ca. 2 Tage getrocknet.

Danach wurden die getrockneten Drogenrückstände in 1 l *Aqua bidest.* über Nacht bei 4 °C geschüttelt, die Ansätze danach auf der Tinkturenpresse (Druck mit über 450 kg/cm²) kaltgepresst und anschließend die Extraktüberstände nochmal zentrifugiert (10 min bei 20 °C mit 20.000 g = rcf).

Mit den so gewonnenen wässrigen Extrakten wurde eine Proteinfällung durchgeführt. Dazu wurden die Extrakte in 200 ml-Portionen bei 95 °C min. 5 Minuten (im Wasserbad) erhitzt und anschließend über Nacht bei 4 °C stehen gelassen.

Die gefällten Proteine wurden abfiltriert und das Volumen der wässrigen Extrakte mit einem Rotationsverdampfer bei 40 °C Wasserbadtemperatur und bis zu 20 mbar Unterdruck eingengt. Falls dabei etwas ausfiel, wurde dies durch Zentrifugation (10 min bei 5.000 revolutions per minute (rpm)) entfernt.

Aus den eingengten (und evtl. nochmal zentrifugierten) Extrakten wurden mittels Ethanol-Fällung die hochmolekularen Polysaccharid-Fractionen (HMFs) (einschließlich der AGPs) präzipitiert.

Dazu wurde gekühlter 99 %iger Ethanol (EtOH) vorlegt und der Extrakt hineingegossen: die Menge an 99 %igen EtOH war so zu berechnen, dass eine 83 %ige ethanolische Lösung entstand. Die Fällungen wurden über Nacht bei 4 °C stehen gelassen, abzentrifugiert (20 min bei 4 °C mit 20.000 g), trocknen gelassen, eingefroren und schließlich gefriergetrocknet und ausgewogen. Je mindestens 1 mg davon wurde acetyliert (Methode siehe IV.6.1) und per Gaschromatographie (GC) vermessen.

Verwendete Geräte und Materialien

Mixer:	Severin Typ 3718, Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Universalschüttler:	SM, Fa. Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Filter:	Rundfilter 3 hw, Fa. Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Tinkturenpresse:	Hafico-Hochdruck (HP)-Tinkturenpresse, Fischer Maschinenfabrik GmbH, Neuss, Deutschland

3. Isolierung der Arabinogalaktan-Proteine

Aus den gewonnenen HMFs, die die hochmolekularen Polysaccharide und AGPs enthalten, konnten nun spezifisch die AGPs mit Hilfe des (β -D-Glc)₃-Yariv-Phenylglycosids, welches vorher selbst synthetisiert (siehe IV.3.1) wurde, gefällt werden.

3.1 Synthese des Yariv-Reagenzes

Die Synthese des (β -D-Glc)₃-Yariv-Phenylglycosids (β GlcY) erfolgte in Anlehnung an YARIV *et al.* (1962).

Zunächst wurde unter Verwendung von Palladium/Aktivkohle als Katalysator aus p-Nitrophenyl- β -D-Glukopyranosid (1) durch Hydrierung mit elementarem Wasserstoff Aminophenyl- β -D-Glukopyranosid (2) hergestellt.

Anschließend wurde eine eisgekühlte Lösung bestehend aus p-Aminophenyl- β -D-glucose gelöst in 0,5 M Salzsäure (HCl) zuerst mit Natriumnitrit zum Diazoniumsalz (3) umgesetzt und danach zu einer auf Eis gekühlten 0,02 M Phloroglucinlösung (4) gegeben. Dabei war es wichtig, dass dauerhaft gekühlt und der pH-Wert der Lösung während der gesamten Zeit der Zugabe und zwei Stunden danach konstant bei pH 9 gehalten wurde. Dies geschah mit Hilfe eines Autotitrators durch Zutropfen von 0,5 M Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung (Abbildung 7).

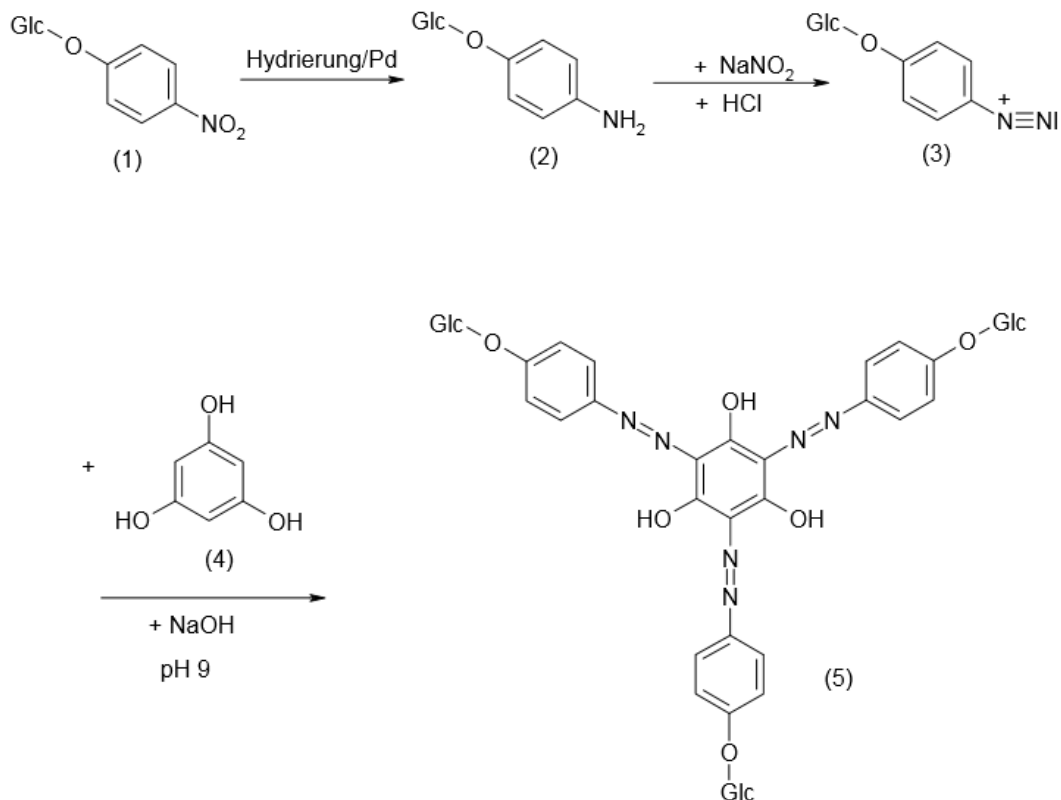


Abbildung 7: Reaktionsgleichung der Yarov-Reagenz-Synthese nach Yariv *et al.*, 1962

Die Lösung des durch Azokupplung entstandenen β GlcY (5) wurde mit Methanol im Verhältnis 1:1 (v/v) über Nacht bei etwa 4 °C gefällt und im Anschluss zentrifugiert (für 20 min, bei 4.000 g).

Um den Rückstand, das β GlcY, aufzureinigen, wurde dieser in Wasser gelöst, erneut im Verhältnis 1:1 (v/v) mit Methanol (MeOH) über Nacht bei 4 °C gefällt, zentrifugiert (20 min. bei 4.000 g) und bei 40 – 45 °C im Trockenschrank getrocknet.

Um bei Analyse-Methoden eine Negativ-Kontrolle zu haben, konnte das (α -D-Gal)₃-Yariv-Phenylglycosid (α GalY) verwendet werden, da es keine Wechselwirkung mit AGP eingeht und somit keine Fällung der AGPs bewirkt. Das α GalY wurde wie oben beschrieben, allerdings aus *p*-Nitrophenyl- α -D-Galaktopyranosid, synthetisiert.

Verwendete Geräte und Materialien

Autotitrator:	Metrohm 719 S-Titrino, Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt, Deutschland
Trockenschrank:	Tv29, Fa. Memmert GmbH & Co. KG., Schwabach, Deutschland

3.2 Yariv-Fällung

Nach Ermittlung der Neutralzuckerzusammensetzung der HMFs per Gaschromatographie (GC) konnten nun Anhand der ermittelten Arabinose- und Galaktosegehalte die benötigten Mengen an HMF, β GlcY, NaCl und *Aqua bidest.* für die AGP-Fällungen berechnet werden. Dabei wurde in Anlehnung an die Vorschrift von KREUGER und VAN HOLST (1995) vorgegangen.

Für die AGP-Fällungen sollte das Verhältnis von AGP und β GlcY möglichst 1:1 (m/m) sein. Die Berechnung der benötigten Mengen an HMF und β GlcY basierte darauf, dass das AGP einen großen Anteil der Arabinose und Galaktose der gesamten HMF ausmacht. Die jeweiligen Lösungen B (1 mg/ml β GlcY, 0,3 M NaCl) wurden in die entsprechenden Lösungen A (HMF gelöst in *Aqua bidest.* (mit Konz. von ca. 1 mg/ml AGP)) gegeben und über Nacht bei 4 °C gefällt.

Am nächsten Tag wurden die Niederschläge (β GlcY-AGP) abzentrifugiert (15 min bei 6 °C mit 20.000 g).

Die Rückstände wurden mit etwa gleichem Volumen *Aqua bidest.* versetzt, die für die jeweiligen Lösungen A verwendet wurden.

Anschließend wurden die Lösungen auf 50 °C erhitzt und solange Natrium-Dithionit hinzugegeben, bis die Lösungen klar bzw. gelblich klar waren und auch beim Abkühlen farblich unverändert blieben. Hatte sich die Lösung erneut rosa gefärbt, musste weiteres Natrium-Dithionit hinzugegeben werden. Die Zugabe des Natrium-Dithionits diente der Zerstörung des β GlcY-AGP-Komplexes.

Danach wurden die Lösungen für 5 Tage bei ca. 4 °C dialysiert und so das AGP von β GlcY, Natriumchlorid (NaCl) und Natrium-Dithionit befreit.

Die dialysierten Lösungen wurden eingefroren, dann gefriergetrocknet und schließlich ausgewogen.

Verwendete Geräte und Materialien

Magnetheizrührer:	RET basic, Fa. IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland Fühler: IKA ETS D5, Fa. IKA Labortechnik, Staufen /VT-4, Fa. VWR, Darmstadt
Dialyseschläuche:	VISKING [®] , Ausschlussgrenze 12.000 – 14.000 Dalton, Fa. Medicell International LTD, London, England

3.3 Überstand der Yariv-Fällung

Mit den Überständen aus der Yariv-Fällung (β GlcY-Fällung), die aufgearbeitet wurden, wurde so verfahren, wie mit den Yariv-Fällungen, abgesehen davon, dass zu Beginn kein *Aqua bidest.* hinzugegeben werden musste, da es sich schon um eine Lösung handelte.

3.4 Yariv-Fällung aus Überstand

Wurde aus den Überständen der ersten Yariv-Fällung, erneut gefällt, also eine zweite Yariv-Fällung durchgeführt, so wurde wie unter IV.3.2 beschrieben verfahren.

3.5 Doppelte Yariv-Fällung

Für die doppelte Yariv-Fällung wurde im Anschluss an die erste Yariv-Fällung, nach Aufreinigung dieser durch Zerstörung des Yariv-AGP-Komplexes und anschließender Dialyse, eine erneute Yariv-Fällung durchgeführt.

4. Geldiffusionstest

Um diesen Test durchzuführen, wurden autoklavierte (121 °C, 1 bar Wasserdampfüberdruck, 20 min.), 1 %ige Agarosegele in 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,3) mit 0,9 % NaCl und 1 mM Calciumchlorid in sterile Kunststoff-Petrischalen gegossen. Aus den erhärteten Gelen wurden je ein zentrales Loch (\emptyset 4 mm) und vier Löcher (\emptyset je 4 mm) im selben Abstand um das zentrale herum ausgestanzt. Die zentralen Kavitäten wurden mit 20 μ l β GlcY (1 mg/ml) und die anderen Kavitäten mit 20 μ l Proben in verschiedenen Konzentrationen gefüllt (HMF-Proben 50 mg/ml und AGP-Proben 10 mg/ml).

So konnten Proben und β GlcY während der zweitägigen Lagerung im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) aufeinander zu diffundieren. Abhängig von der Probe bildeten sich bei Wechselwirkung mit dem β GlcY unterschiedlich starke Präzipitationsbanden.

Verwendete Geräte und Materialien

Dampfsterilisator:	VST 40/60 S, Fa. Zirbus Technology GmbH, Bad Grund, Deutschland
Petrischale:	Petrischale 92 x 16 mm mit Nocken, \varnothing 9 cm, Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

5. Strukturaufklärende Analytik der HMF & des Yariv-Überstandes:

Charakterisierung des Polysaccharidanteils

5.1 Neutralzuckeranalytik mittels Acetylierung

Zur Methode siehe IV.6.1.

6. Strukturaufklärende Analytik der AGPs:

Charakterisierung des Polysaccharidanteils

6.1 Neutralzuckeranalytik mittels Acetylierung

Die Kohlenhydratanteile der Proben wurden zuerst mittels Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung nach der Vorschrift von BLAKENEY *et al.* (1983) in deren Alditolacetate umgewandelt. So konnten die Neutralzucker der Proben anschließend mit Hilfe der Gaschromatographie qualitativ und quantitativ bestimmt werden.

Dafür wurden 1 – 2 mg der Proben genau eingewogen, mit 1 ml 2 M Trifluoressigsäure (TFA) und 50 μ l Inositol-Standard versetzt und 1 h bei 121 °C im Bioblock hydrolysiert.

Nach kurzem Abkühlen wurden die nun Monosaccharide enthaltenden Proben möglichst vollständig in Spitzkolben überführt und dreimal mit 5 ml *Aqua bidest.* mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockene einrotiert (ca. 10 mbar, Wasserbadtemperatur 40 °C).

Die von Säure befreiten Proben wurden mit 200 μ l 1 M wässriger Ammoniaklösung aufgenommen und damit alkalisiert. Durch Hinzugabe von 1 ml Natriumborhydrid in Dimethylsulfoxid (1,0 g NaBH₄ in 50 ml DMSO) und Inkubation bei 40 °C im Trockenschrank wurden die Kohlenhydratmonomere zu den jeweiligen Alditolen

reduziert. Nach 90 Minuten wurde die Reaktion mit 100 μl konzentrierter Essigsäure beendet.

Im nächsten Schritt wurden 200 μl 1-Methylimidazol als Katalysator und 2,0 ml Acetanhydrid (über Molekularsieb 4 \AA getrocknet) als Acetylierungs-Reagenz hinzugegeben. Nach 20 Minuten wurde die Acetylierung durch Zugabe von 10 ml *Aqua bidest.* gestoppt (Abbildung 8).

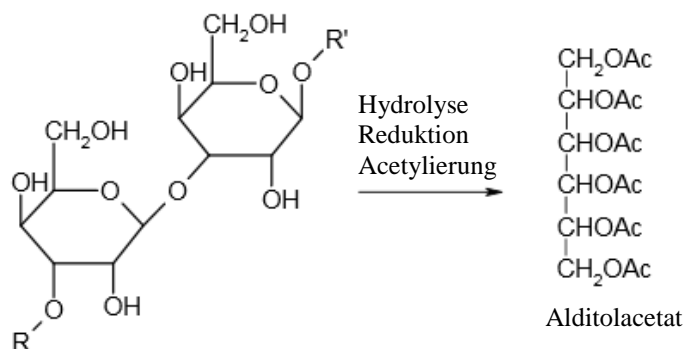


Abbildung 8: Reaktionsschema zur Überführung der Saccharide in Alditolacetate

Nach Ansäuern mit 1 ml 0,1 M Schwefelsäure, konnten die Alditolacetate mit 1 ml Dichlormethan ausgeschüttelt werden. Die Dichlormethan-Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in Vial-Gefäße für die GC-Messung überführt.

Anschließend erfolgte die Vermessung der Alditolacetate im Gaschromatographen.

Die qualitative Auswertung erfolgte über die Retentionszeiten der Zuckermonomere im Vergleich zu den Retentionszeiten der Monomere der Zuckerreferenz (Fucose, Rhamnose, Arabinose, Xylose, Mannose, Galaktose und Glukose). Bei der quantitativen Auswertung wurden die jeweiligen integrierten Peakflächen ins Verhältnis zur Peakfläche des internen Standards (*myo*-Inositol) gesetzt. Da mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) gemessen wurde und dieser unterschiedlich stark auf die verschiedenen Alditolacetate anspricht, mussten Korrekturfaktoren (s.u.) in Korrelation zum internen Standard ermittelt und berücksichtigt werden.

Verwendete Geräte und Materialien

Trockenschrank:	T 6060, Fa. Heraeus, Hannover, Deutschland
Molekularsieb:	4 \AA , Typ 514, Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Gaschromatographie:

Gaschromatograph:	HP 5890 Series II, Fa. Hewlett Packard, USA mit FID-Detektor
Referenzsubstanzen:	L-(+)-Arabinose (> 99 %, Korrekturfaktor 1,16), D-(+)-Galaktose (> 97 %, Korrekturfaktor 1,19), D-(+)-Glucose (> 99,5 %, Korrekturfaktor 1,28), D-(+)-Mannose (> 99 %, Korrekturfaktor 1,23) und D-(+)-Xylose (> 99 %, Korrekturfaktor 1,36), Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland; L-(-)-Fucose (> 99 %, Korrekturfaktor 1,32), Fa. NeoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland; L-(+)-Rhamnose Monohydrat (> 99 %, Korrekturfaktor 1,50), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Säule:	Fused-Silica Kapillarsäule (WCOT-Kapillarsäule), Optima-225-0,25 µm (L 25 m, ID 0.25 mm), Fa Macherey & Nagel, Düren
Trärgas:	Stickstoff
Flussrate:	1,2 ml/min
Splitverhältnis:	1:30
Injektionsvolumen:	1 µl
Injektortemperatur:	240 °C
Ofentemperaturprogramm:	230 °C isotherm
Detektortemperatur:	250 °C
Software:	HP GC Chemstation, Rev. A.09.03 [1417]

6.2 Bestimmung der Neutralzucker und Uronsäuren mittels Silylierungsanalyse

Bei der Silylierungsanalyse nach BLETON *et al.* (1996) wurden die Monosaccharide der AGPs in die jeweiligen Trimethylsilylester umgewandelt und so für die Vermessung mittels GC vorbereitet.

Dafür wurde zuerst 1,0 ml frisch hergestellte methanolische HCl zur getrockneten, mit Stickstoff (N₂) überschichteten Probe (1 – 2 mg) hinzugegeben und diese für 24 h bei 85 °C unter Stickstoffatmosphäre hydrolysiert. Anschließend wurde zum abgekühlten Ansatz 50 ml Pyridin hinzupipettiert und unter N₂-Begasung getrocknet. Um die Säure

vollständig zu entfernen, wurde dieser Vorgang noch zwei Mal mit 0,1 ml MeOH wiederholt.

Als Nächstes wurde der Rückstand in 780 µl Pyridin gelöst und mit 220 µl 1-(Trimethylsilyl)imidazol für 2 h bei 80 °C unter N₂-Atmosphäre umgesetzt, sodass die Probe danach mit der GC-FID vermessen werden konnte. Die qualitative und quantitative Auswertung fand, wie unter IV.6.1 beschrieben, über die Retentionszeiten der Zuckermonomere im Vergleich zu den Retentionszeiten der Monomere der Zuckerreferenzen (Arabinose, Galaktose, Galakturonsäure und Glukuronsäure) und der jeweiligen integrierten Peakflächen im Verhältnis zur Peakfläche des internen Standards (*myo*-Inositol) unter Berücksichtigung der eingesetzten Mengen statt. Durch Verwendung des FID ergaben sich in Korrelation zum internen Standard Inositol Korrekturfaktoren die bei der Auswertung berücksichtigt und bei jeder Messung neu bestimmt wurden. Für die quantitative Berechnung wurde jeweils nur der Hauptpeak herangezogen.

Verwendete Geräte und Materialien

methanolische HCl (für 9 Proben):

- 7,7 ml getrocknetes MeOH
- 0,4 ml 2,2-Dimethoxypropan
- 1,3 ml Acetylchlorid (langsam hinzuge tropft)

1-(Trimethylsilyl)imidazol: Fluka[®] Analytical, Fa. Sigma Aldrich

GC-FID:

Gaschromatograph:	HP 5890 Series II, Fa. Hewlett Packard, USA mit FID-Detektor
Referenzsubstanzen:	L-(+)-Arabinose (> 99 %), D-(+)-Galaktose (> 97 %), D-(+)-Galakturonsäure (> 97 %), & D-(+)-Glukuronsäure (> 97 %), Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Säule:	Fused-Silica Kapillarsäule (WCOT-Kapillarsäule), Supelco SPB-1, 0,25 µm (L 30 m, ID 0.25 mm), Fa. Supelco Park, Bellefonte (PA), USA
Trägergas:	Helium
Flussrate:	1,2 ml/min
Splitverhältnis:	1:30
Injektionsvolumen:	1 µl
Injektortemperatur:	270 °C

Temperaturprogramm: Start: 1 min bei 170 °C, mit 2 °C/min auf 250 °C,
mit 10 °C/min auf 300 °C, 10 min auf 300 °C isotherm
Detektortemperatur: 320 °C
Software: HP GC Chemstation, Rev. A.09.03 [1417]

6.3 Kolorimetrische Quantifizierung der Uronsäuren

Die Bestimmung des Gehaltes der Uronsäuren wurde in Anlehnung an die photometrische Methode von BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN (1973) durchgeführt.

Etwa 2 mg der genau eingewogenen Proben wurden mit 4 %iger Schwefelsäure so gelöst, dass eine Konzentration von 2 mg/ml entstand.

200 µl der Proben wurden entnommen und mit 1200 µl Borax (Dinatriumtetraborat-Decahydrat)/Schwefelsäure (0,288 g Borax auf 100 ml konz. Schwefelsäure) versetzt.

Es folgte eine Inkubation für 20 min in einem 100 °C heißem Wasserbad und anschließend eine Abkühlung für 10 min im Eisbad.

Danach wurden entweder 20 µl des Farbreagenzes (0,15 % 3-Hydroxydiphenyl in 0,5 %iger NaOH) oder 20 µl 0,5 %ige NaOH-Lösung als Blindwert zugegeben.

Nach mindestens 15 min (und maximal 1 h) bei RT wurde die Absorption der Pinkfärbung spektralphotometrisch bei 525 nm vermessen.

Für die Kalibrierung wurde eine Kalibrierungsreihe aus einer Glukuronsäure-Stammlösung (200 µg/ml) hergestellt und anschließend wie mit den Proben verfahren.

Es wurden je ein Blindwert und eine Dreifachbestimmung der Proben und Standards vermessen. Die Absorptionswerte der Proben mussten dabei im kalibrierten Bereich liegen. Ansonsten wurde die Probenkonzentration angepasst.

Verwendete Geräte und Materialien

Spektrophotometer: Cary 50 Scan, Fa. Varian, Palo Alto, USA
mit Polystyrol-Küvetten, Fa. Sarstedt

6.4 Reduktion der Uronsäuren

Die freien Carboxylgruppen der Uronsäuren wurden entsprechend der Vorschrift von TAYLOR und CONRAD (1972) mit Natriumbordeuterid zu zweifach deuterierten Neutralzuckern reduziert. Anhand dieser konnten die Uronsäuren der Bindungstypanalyse mit der GC-gekoppelten Massenspektrometrie (GC-MS) zugänglich gemacht werden.

Zuerst wurden 20 mg Probe in 20 – 30 ml *Aqua bidest.* gelöst, mit einem Tropfen Octanol (gegen die Schaumbildung) versetzt und unter Rühren die freien Carbonsäuren durch Zugabe von 216 mg N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-methylmorpholino)-ethyl]-carbodiimid-4-toluolsulfonat aktiviert. Der pH-Wert der Lösung wurde während der Zeit für 4 h mit 0,01 M Salzsäure konstant auf pH 4,75 gehalten. So wurde die freie Säuregruppe durch das Carbodiimid zu einem reaktiveren Acylisoharnstoff umgewandelt und schließlich durch langsames Zutropfen von Natriumbordeuterid-Lösungen aufsteigender Konzentration (4 ml 1 M, 5 ml 2 M und 5 ml 4 M) reduziert (Abbildung 9). Während der gesamten Reduktion wurde der pH-Wert mit 2 M Salzsäure konstant auf pH 7 gehalten, um das Zersetzen des Natriumbordeuterids im Sauren und eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen aktivierter und nicht aktivierter Uronsäure zugunsten der nicht Aktivierten im Basischen zu verhindern.

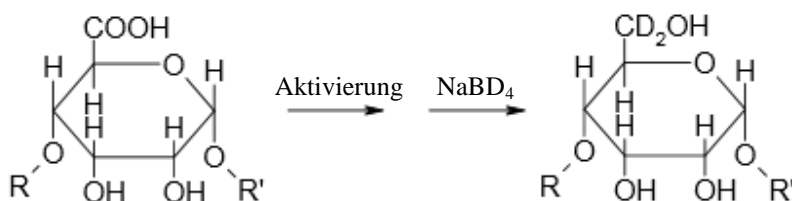


Abbildung 9: Reaktionsschema der Uronsäure-Reduktion

Im Anschluss an die Reduktion wurde der pH-Wert der Lösung mit Essigsäure auf pH 6,5 eingestellt, für 3 Tage dialysiert und gefriergetrocknet.

Verwendete Geräte und Materialien

Magnetrührer:	MR mini, Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland
Autotitrator:	Metrohm 719 S-Titrino, Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt, Deutschland
Dialyseschläuche:	VISKING [®] , Ausschlussgrenze 12000 – 14000 Dalton, Fa. Medicell International LTD, London, England

6.5 Analyse der Bindungstypen

Zur Bestimmung der Bindungstypen der Monomere und Unterscheidung von Furanosen und Pyranosen im Kohlenhydratanteil wurde die Methylierungsanalyse nach HARRIS *et al.* (1984) durchgeführt.

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

Unter Stickstoff-Begasung wurden ca. 800 – 900 mg Kaliumhydrid/Paraffinöl (35 %ig) mehrmals mit ca. je 3 ml (insgesamt ca. 20 ml) n-Hexan gewaschen, sodass das Kaliumhydrid frei von Paraffinöl war, und durch weitere Begasung mit Stickstoff getrocknet werden konnte. Das getrocknete Kaliumhydrid wurde ausgewogen und tropfenweise durch Zugabe von trockenem DMSO, unter ständigem kühlen im Eisbad und vorsichtigem Schütteln gegen die Schaumbildung, bis zu einer Endkonzentration von 77 mg/ml gelöst. Danach wurde die Lösung noch weitere 30 min gerührt.

Methylierung der Proben

Dafür wurden je ca. 2 mg gefriergetrocknete Proben in 460 µl wasserfreiem DMSO gelöst und unter Stickstoff-Begasung, rührend durch Zugabe der Dimsyl-Lösung und des eisgekühlten Methyljodids nach folgendem Schema methyliert:

Zugabe	Reaktionszeit
40 µl Dimsyl-Lösung	10 min
10 µl Methyljodid	5 min
120 µl Dimsyl-Lösung	20 min
30 µl Methyljodid	10 min
240 µl Dimsyl-Lösung	20 min
60 µl Methyljodid	10 min
400 µl Dimsyl-Lösung	30 min
300 µl Methyljodid	10 min

Die methylierten Proben wurden in Zentrifugen-Reagenzgläser mit einer Chloroform/Methanol-Mischung (2:1 (v/v)) überführt, 2 ml *Aqua dem.* hinzugefügt, gevortext und 5 min bei 2.500 g zentrifugiert. Danach wurden die wässrigen Phasen, ohne die Interphase zu verletzen, abpipettiert und verworfen. Dieser Waschvorgang wurde noch vier Mal wiederholt. Zur Chloroform/Methanol-Phase (2:1 (v/v)) wurden 2,2 ml 2,2-Dimethoxypropan, um das restliche Wasser zu binden, sowie 20 µl Eisessig und 3 – 4 Siedeperlen gegeben.

Schließlich wurden die Mischung vorsichtig bei 90 °C im Bioblock, bis das Restwasser abreagiert war, erhitzt und die Probenlösungen unter Stickstoff-Begasung getrocknet.

Hydrolyse der Proben

Die zuvor methylierten Proben wurden mit 1 ml 2 M TFA im Bioblock bei 121 °C für 1 h hydrolysiert und im Anschluss bei 40 °C wieder unter Stickstoff-Begasung getrocknet.

Reduktion und Acetylierung der Proben

Den trockenen Hydrolysaten wurden je 2 ml frisch hergestellte 0,5 M Natriumborhydrid-Lösung (in 2 M Ammoniak) zugesetzt und 1 h bei 60 °C im Trockenschrank reduziert, sodass die für die glykosidische Bindung bzw. den Ringschluss verantwortlichen Gruppen zu Hydroxylgruppen umgewandelt wurden. Die Reaktion wurde mit je 0,5 ml Aceton gestoppt und das Lösungsmittel erneut unter Stickstoff-Begasung bei 40 °C abgedampft.

Für die Acetylierung der zuvor freigesetzten Hydroxylgruppen wurden die Proben mit 200 µl Eisessig aufgenommen, 1 ml Ethylacetat und 3 ml Acetanhydrid hinzugefügt und geschüttelt. Durch Zugabe von 100 µl Perchlorsäure als Katalysator wurde die Acetylierung gestartet und nach 5 min durch Kühlung im Eisbad, Zugabe von 10 ml *Aqua dem.* (durch Inaktivierung des restlichen Acetanhydrids) und 200 µl Methylimidazol wieder gestoppt (Abbildung 10).

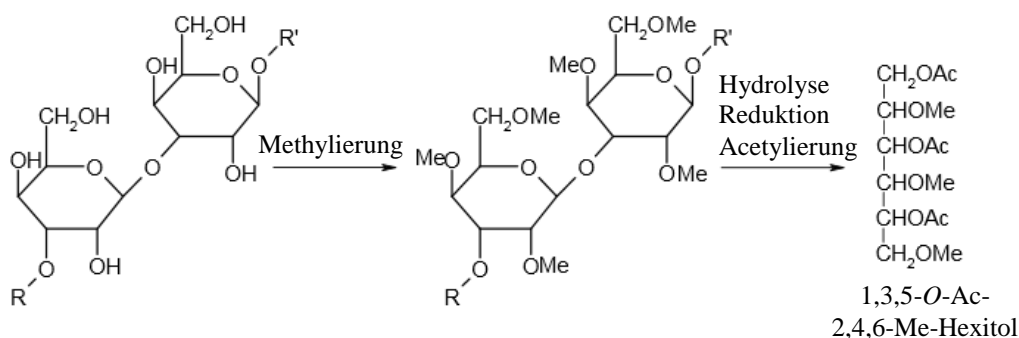


Abbildung 10: Reaktionsschema der Methylierung und Umwandlung in Ac-Me-Hexitole (PMAAs)

Die dadurch entstandenen partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs) wurden mit 2 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Dichlormethanphase wurde abgenommen, etwa auf die Hälfte eingengt und die Proben gaschromatographisch (u.a. mittels der GC-gekoppelten Massenspektrometrie (GC-MS)) vermessen.

Verwendete Geräte und Materialien

Trockenschrank: Tv29, Fa. Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland

GC-MS:

Gaschromatograph: HP 5890 Series II; Fa. Hewlett Packard, USA

Säule: Wall coated open tubular (WCOT)-Kapillarsäule (Fused Silica), Permabond OV-1701/ OPTIMA-1701-0,25 µm (L 25 m, ID 0,25 mm), Fa. Macherey & Nagel, Düren

Trägergas:	Helium
Flussrate:	1,0 ml/min
Split:	mit 7-15 psi (Verhältnis: 1:1 bis 1:4)
Injektionsvolumen:	1 – 5 µl
Temperaturprogramm:	Start: 120 °C, mit 8 °C/min auf 170 °C, mit 0,5 °C/min auf 185 °C, mit 20 °C/min auf 250 °C, 19,5 min 250 °C isotherm;
Detektor/Injektor:	260 °C
EI-MS:	HP MS Engine 5898 A; Fa. Hewlett Packard, USA
Software:	HP G 1034 C-Software für MS Chemstation
<u>GC-FID:</u>	
Gaschromatograph:	HP 5890 Series II; Fa. Hewlett Packard, USA mit FID-Detektor
Säule:	WCOT-Kapillarsäule (Fused Silica), Permabond OV-1701/ OPTIMA-1701-0,25 µm (L 25 m, ID 0,25 mm), Fa. Macherey & Nagel, Düren
Trägergas:	Helium
Flussrate:	1,2 ml/min
Splitverhältnis:	1:50
Injektionsvolumen:	1 µl
Injektor:	250 °C
Temperaturprogramm:	Start: 2 min bei 170 °C, mit 1 °C/min auf 210 °C, 10 min auf 250 °C isotherm;
Detektor:	240 °C
Software:	HP GC Chemstation, Rev. A.09.03 [1417]

Die Identifikation der PMAAs erfolgte durch Vergleich der relativen Retentionszeiten im Totalionenchromatogramm (TIC), durch Analyse der Massenspektren und durch Vergleich dieser Spektren mit denen bekannter PMAAs aus einer in der Arbeitsgruppe erstellten Monosaccharidreferenz-Spektrenbibliothek. Die Bestimmung des Gehaltes der PMAAs erfolgte über die Auswertung der FID-Chromatogramme, indem die Peakflächen integriert wurden. Das unterschiedliche Ansprechverhalten des FID wurde mit Hilfe von Response-Faktoren ausgeglichen, gleichzeitig wurden dadurch die in % (m/m) erhaltenen Ergebnisse in % (mol/mol) umgerechnet (SWEET *et al.*, 1975).

6.6 Smith-Degradation

Die Partialhydrolyse wurde genutzt, um den Polysaccharidteil der AGPs gezielt zu fragmentieren. Dabei wurden vicinale Hydroxylgruppen bei gleichzeitiger Spaltung zwischen den OH-Gruppen tragenden C-Atomen zu Carbonylgruppen oxidiert. Anschließend wurden die entstandenen Carbonylgruppen zu primären Alkoholgruppen reduziert und schließlich sauer hydrolysiert, ohne glykosidische Bindungen zu spalten. Die Smith-Degradation wurde nach den Vorschriften von USOV *et al.* (1997) und FURNEAUX und STEVENSON (1990) durchgeführt.

Oxidation der Proben

Etwa 10 – 20 mg der genau eingewogen Proben wurden mit 10 ml 0,1 M Natriumperiodat-Lösung versetzt und für 48 Stunden bei dunkler Lagerung gerührt. Überschüssiges Natriumperiodat wurde durch Zugabe von Ethylenglycol (19,52 µl/ml Periodat-Lösung) innerhalb von 3 h unter ständigem Rühren umgesetzt.

Reduktion der Proben

Nach Zugabe von 100 mg Natriumborhydrid wurde für 20 h erneut rührend inkubiert. Anschließend wurde die Reduktion durch Neutralisation mit Eisessig gestoppt und dann dialysiert (5 d, 4 °C), um überschüssige Reagenzien zu entfernen. Danach wurden die Proben gefriergetrocknet.

Hydrolyse der Proben

Für die schonende Säurehydrolyse wurden die gefriergetrockneten Proben mit 0,5 M TFA versetzt und bei RT gerührt. Nach 15 h wurde die TFA durch Abrotieren entfernt und die hydrolysierten Proben gefriergetrocknet.

Verwendete Geräte und Materialien

Magnetrührer:	MR mini, Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland
Dialyseschläuche:	VISKING [®] , Ausschlussgrenze 12.000 – 14.000 Dalton, Fa. Medicell International LTD, London, England

6.7 Alkalische Hydrolyse

Mit Hilfe der alkalischen Hydrolyse in Anlehnung an VOLK *et al.* (2007) wurde der Proteinteil der AGP-Proben zerstört, sodass die intakten Oligo- bzw. Polysaccharide mit jeweils einer für die Bindung verantwortlichen Aminosäure isoliert werden konnten.

Dazu wurden 20 mg Probe mit 3 ml 0,44 N NaOH für 18 h bei 105 °C im Bioblock hydrolysiert. Danach wurde für 20 min bei 8.000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 1,0 N HCl neutralisiert. Nach Neutralisation wurde für 9 Tage bei

4 °C dialysiert und abschließend gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Proben wurden schließlich mittels Acetylierung und Gaschromatographie (siehe IV.6.1) sowie der Gelpermeationschromatographie (siehe IV.9) analysiert.

Verwendete Geräte und Materialien

pH-Meter:	761 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland mit Elektrode: Mikroelektrode BlueLine 16 pH, Fa. SI Analytics GmbH, Mainz, Deutschland
Dialyseschlauch:	Spectra/Por [®] Membrane, MWCO 1.000 Da, Fa. Spectrum Laboratories Inc., Deutschland

6.8 Oxalsäure-Hydrolyse

Da labile glykosidische Bindungen, wie v.a. die labile furanosidische Pentose Arabinose, mit Hilfe saurer Hydrolyse nach GLEESON und CLARKE (1979) gespalten werden, wurde etwa 20 mg der genau eingewogenen AGP-Probe in 3 ml 12,5 mM Oxalsäure gelöst und für 5 h bei 100 °C im Bioblock erhitzt. Nachdem das Hydrolysat abgekühlt war, wurde zentrifugiert (10 min bei 6000 rpm) und der Überstand durch Hinzugabe von 99 %igem EtOH bis zu einer Endkonzentration von 80 % über Nacht bei 4 °C gefällt. Die Fällung wurde kalt zentrifugiert (10 min bei 20.000 g bei 6 °C) und der Rückstand dreimal, durch Versetzen mit 4 ml 80 %igem EtOH und anschließendem abzentrifugieren, gewaschen. Der gewaschene und abgedampfte Rückstand wurde mit 2 ml H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet.

6.9 Infrarotspektroskopie

Um Hinweise zur Struktur bzw. zu bestimmten funktionellen Gruppen der Proben zu erhalten, wurden die AGPs mittels Infrarotspektroskopie-Techniken der attenuated total reflection (ATR, abgeschwächte Totalreflexion) und Fourier-Transformation (FT) vermessen.

Es wurde mit einem Diamant-IR-Strahler gemessen.

Verwendete Geräte und Materialien

Spektrometer:	Perkin Elmer, Universal ATR Sampling Accessory, Waltham, USA Perkin Elmer, Spectrum 100, FT-IR-Spektrometer, Waltham, USA
Software:	Spectrum Version 10.4.2

7. Strukturaufklärende Analytik der AGPs :

Charakterisierung des Proteinanteils

7.1 Photometrische Quantifizierung des Hydroxyprolin-Anteils

Die Hydroxyprolin-Gehaltsbestimmung wurde nach der Vorschrift von STEGEMANN und STALDER (1967) durchgeführt.

Um den Gehalt des Hydroxyprolins in den Proben photometrisch vermessen zu können, wurden je 5 mg der AGPs mit 1 ml 6 M HCl für 22 h bei 110 °C im Bioblock vollständig hydrolysiert und die Proteinanteile so in die einzelnen Aminosäuren gespalten. Um die unlöslichen Probenbestandteile abzutrennen, wurde zweimal zentrifugiert (30 min bei 10.000 g). Die nach zweimaliger Zentrifugation erhaltenen Überstände wurden für die Herstellung der Verdünnungen der Probenlösungen verwendet.

0,6 ml der verdünnten Probenlösungen wurden im 2 ml-Eppendorfgefäß mit 0,3 ml Oxidationsreagenz (Chloramin T (Trihydrat) 0,7 g in 10,0 ml Pufferlösung pH 6,8 (siehe unten)) versetzt, gevortext und bei RT 20 min im Dunkeln gelagert. Anschließend wurden 0,3 ml Farbreagenz (4-Dimethylaminobenzaldehyd 2,0 g in 7,0 ml Perchlorsäure/13,0 ml 2-Propanol) zugesetzt. Nach erneutem Vortexen wurden die Proben für 15 min in ein Wasserbad von $60 \pm 0,5$ °C gestellt. Danach wurde 3 min in Eiswasser gekühlt, dann wurden die Proben 30 min bei RT stehen gelassen, schließlich gevortext und vermessen.

Die Extinktion der Lösungen wurde bei 558 nm spektralphotometrisch gemessen.

Zur Herstellung der Kalibriergeraden wurde die Bestimmung mit je 0,6 ml der L-Hydroxyprolin-Standardlösungen aufsteigender Konzentrationen (0,6 – 3 mg/l) durchgeführt. Als Blindwerte wurde die Reaktion mit 0,6 ml *Aqua dem.* durchgeführt. Der Mittelwert der Blindwerte wurde von den ermittelten Extinktionen abgezogen.

Von allen Messungen wurden Zweifachbestimmungen durchgeführt.

Verwendete Geräte und Materialien

Spektrophotometer: Cary 50 Scan, Fa. Varian, Palo Alto, USA
mit Polystyrol-Küvetten, Fa. Sarstedt

Zusammensetzung des Puffers pH 6,8:

- 2,60 g Citronensäure-Monohydrat
 - 1,40 g Natriumhydroxid und
 - 7,80 g Natriumacetat (wasserfrei)
 - 25 ml 1-Propanol
- ad 50 ml *Aqua dem.*

7.2 Aminosäureanalytik mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Für die Untersuchung der Aminosäuren wurden in Anlehnung an GÖLLNER *et al.* (2010) je etwa 35 mg AGP mit 3,5 ml 6 M HCl versetzt und für 22 h bei 110 °C im Bioblock hydrolysiert. Die abgekühlten Proben wurden für 20 min bei 20.000 g zentrifugiert, um die hydrolysierten und verkohlten Polysaccharidanteile der AGPs abzutrennen. Die Überstände (Proteinanteile der AGPs) wurden anschließend zur Trockene einrotiert, in *Aqua bidest.* aufgenommen und gefriergetrocknet. Dieser Vorgang wurde noch einmal zur Aufreinigung wiederholt.

Die Auftrennung und Quantifizierung der Aminosäuren erfolgte per High Performance Liquid Chromatography (HPLC) am Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der Christian-Albrechts-Universität (CAU). Dazu wurden die Proben in 20 %igem Acetonitril (1 mg/150 µl) gelöst und anschließend vermessen.

Verwendete Geräte und Materialien

HPLC:

Aminosäureanalysator:	Biochrom 30, Fa. Biochrom, Berlin
Säule:	PEEK-Trennsäule HP, physiologisch
Fließmittel:	physiologisch, Li-Acetat-Puffer mit steigenden pH-Werten
Injektionsvolumen:	20 µl
Detektion:	photometrisch, Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin
	Detektor: PCB, Fa. Biochrom, Berlin
	440 nm: nur für Hydroxyprolin und Prolin
	570 nm: für alle anderen Aminosäuren

8. Elementaranalyse

Die Methode wird genutzt um die Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel sowohl qualitativ als auch quantitativ zu bestimmen. Die Vermessung der Proben erfolgte am Institut für anorganische Chemie der CAU mit Hilfe der Verbrennungsanalytik.

Dafür wurden ca. 2 mg der Proben in Zinnkapseln genau eingewogen und in einem Ofen bei 990 °C mit Hilfe von reinem Sauerstoff katalytisch verbrannt. Die bei dieser Zersetzungsreaktion entstandenen Reaktionsgase wurden mit Helium als Trägergas direkt über einen 500 °C heißen Kupferkontakt geführt. Dabei wurde überschüssiger Sauerstoff gebunden und zuvor entstandene Stickoxide zu Stickstoff reduziert. Anschließend wurden die im Gasstrom enthaltenen definierten Produktgase Kohlenstoffdioxid, Schwefeldioxid,

Stickstoff und Wasser gaschromatographisch aufgetrennt und nacheinander mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor quantifiziert. Anhand der eingewogenen Probenmengen konnten dann die Massenanteile der einzelnen Elemente Kohlenstoff, Schwefel, Stickstoff und Wasserstoff berechnet werden.

Für die Blindwertbestimmung wurden leere Zinnkapseln verwendet.

Das Gerät wurde mit Sulfanilamid kalibriert.

Verwendete Geräte und Materialien

Analysator: HEKAtech CHNS Analysator, Fa. HEKAtech GmbH,
Wegberg, Deutschland

8.1 Proteinquantifizierung

Anhand des Stickstoffgehalts aus der Elementaranalyse konnte der Proteingehalt mit Hilfe der Multiplikation mit dem Faktor 6,25 nach KJELDAHL (1883) berechnet werden. Die Berechnung des Proteinanteils ist auch durch die Kombination des absoluten Hyp-Gehaltes der photometrischen Hyp-Bestimmung mit dem relativen Hyp-Gehalt der Aminosäureanalytik möglich.

9. Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) ist eine Größenausschlussflüssigkeitschromatographie bei der das Material der Säule die Auftrennung von Molekülen nach ihrer Größe ermöglicht. Zur Detektion der von der Säule austretenden Moleküle wurden ein Brechungsindex- (RI-, refractive index-) und ein Mehrwinkel-Lichtstreu- (MALLS-, Multi-Angle-Light-Scattering-)Detektor verwendet.

Um die relativen und absoluten Molekülgrößen der Proben zu ermitteln, wurde zuerst mit Hilfe der Pullulane - dabei handelt es sich um linear aufgebaute α -1,6-verknüpfte Polymaltotriosen aus dem Pilz *Aureobasidium pullulans* - kalibriert.

Dazu wurden je 5,0 mg bzw. 2,5 mg Pullulanstandard (siehe unten) in 1 ml Eluent bei 4 °C über Nacht quellen gelassen, durchmischt und filtriert.

Die durch den RI-Detektor ermittelten Retentionszeiten wurden gegen die von der Firma angegeben Molekulargewichte aufgetragen und so die Kalibriergerade ermittelt. Für jede Messung wurden 100 μ l eingespritzt. Im Anschluss wurden 2 mg der Proben in 1 ml Eluent über Nacht bei 4 °C und im Ultraschallbad gelöst und anschließend, um die Säule nicht zu stark zu verschmutzen, filtriert. Für jede Messung wurde 100 μ l auf die Säule gegeben. Während der Vergleich mit den Pullulanen das hydrodynamische Volumen der

Proben liefert, können die absoluten Molekulargewichte mit Hilfe des MALLS- in Kombination mit dem RI-Detektor ermittelt werden.

Verwendete Geräte und Materialien

Ultraschallbad:	Sonorex super, Fa. Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Filter:	NALGENE [®] Syringe Filter, 0,45 µm Porengröße, Celluloseacetat, Fa. Thermo Scientific, Rochester, USA
<u>GPC:</u>	
Gerät:	PL-GPC 50 plus + RI-Detektor, Fa. Polymer Laboratories, Varian, USA
Detektor:	MALLS-Detektor mini DAWN, FA. Wyatt Technology Corp, USA
Vorsäule:	PL aquagel-OH Guard 8 µm, 50 x 7,5 mm
Säulen:	PL aquagel-OH 40 8 µm, 300 x 7,5 mm (MW Trennbereich: 10.000 – 200.000 Da), 2 x PL aquagel-OH Mixed 8 µm, 300 x 7,5 mm (MW Trennbereich: 6.000 – 10.000.000 Da), Fa. Polymer Laboratories, Varian, USA
Eluent:	0,1 M-0,25 M Natriumnitrat (NaNO ₃), 0,01 M Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄); pH 7, filtriert (0,1 µm Filter) und entgast (Ultraschallbad)
Pullulane:	Standards (2 mg/ml): 778.000 Da, 404.000 Da, 212.000 Da, 112.000 Da, 47.300 Da, 22.800 Da, 11.800 Da, 5.900 Da Stachyose (2 mg/ml): 667 Da, Glukose (2 mg/ml): 180 Da PL PS-Standard Kit SAC-10, Fa. Varian, Palo Alto, USA
Flussrate:	0,7 ml/min (bzw. 1 ml/min)
Säulenofen:	35 °C
Software:	ASTRA für Windows 4.73.04

10. Mikroskopische Untersuchung der Sprossachsen und Mittelrippen

Von den zu untersuchenden frischen Pflanzen wurden dünne Sprossquerschnitte bzw. Querschnitte der Mittelrippen der Wedel verschiedener Durchmesser mit einem halbautomatischen Handmikrotom angefertigt. Diese Schnitte wurden verschiedenen Färbungen unterzogen.

10.1 Lichtmikroskopie

Zunächst wurden Wasser-, Iod-Kaliumiodid-, Chloralhydrat-, und Phloroglucin/HCl-Präparate von frischen sowie in Ethanol (70 %), Eisessig und Formaldehyd (35 %) (90/5/5 v/v/v) konservierten Schnitten angefertigt, um Informationen über den mikroskopischen Aufbau der Pflanzensprosse zu erhalten. Dazu wurden die Schnitte entweder direkt als Wasserpräparat mikroskopiert und anschließend Iod-Kaliumiodidlösung zugesetzt oder mit Chloralhydrat- bzw. ethanolischer Phloroglucin/HCl-Lösung versetzt und dann mikroskopiert.

Außerdem wurden Färbungen mit α GalY und β GlcY (Vorgehensweise siehe IV.10.2) durchgeführt.

10.2 Fluoreszenzmikroskopie

Färbungen von Schnitten mit α GalY und β GlcY, z.T. zusätzlich mit anschließender Markierung durch Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelte Antikörper, dienen zur Untersuchung der Lokalisation von AGPs in pflanzlichen Geweben (hier v.a. in den Sprossachsen, Abbildung 11).

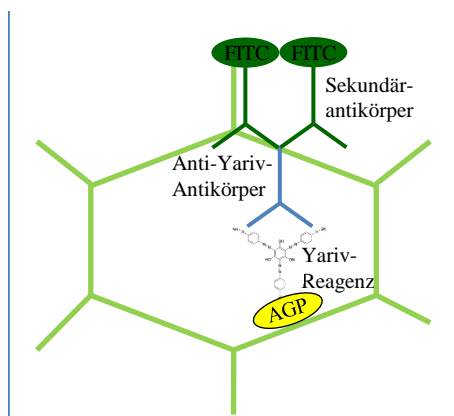
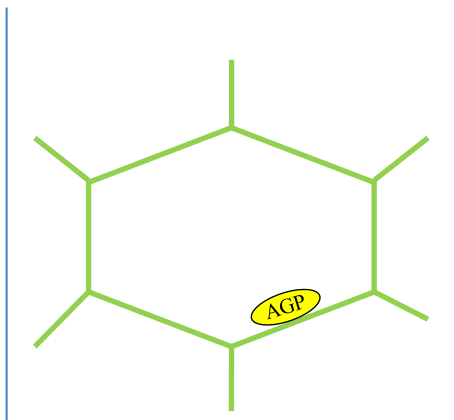


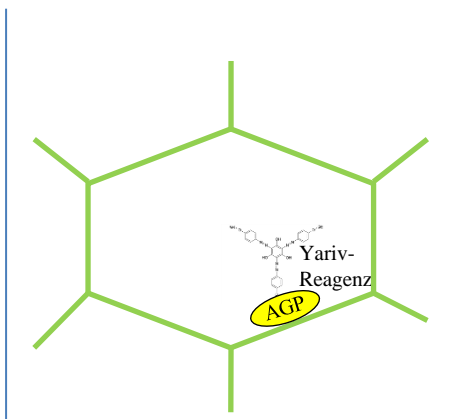
Abbildung 11: Schematische Darstellung der FITC-Färbung von AGPs in pflanzlichem Gewebe

Bei den Färbungen wurde wie folgt vorgegangen:

Die einzelnen Schnitte wurden mit einem Pinsel in die Kavitäten einer 96-Well-Platte überführt. PBS-Puffer wurde zugetropft und nach 30 min wieder abpipettiert.



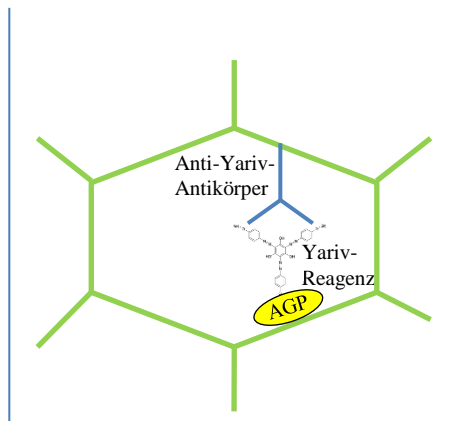
Nach 1 h auf dem Schüttler in Blockierpuffer wurde das β GlcY und für die Negativkontrolle das α GalY auf die Schnitte getropft und diese für 1,5 h auf dem Schüttler inkubiert.



Danach wurde dreimal 5 min mit PBS-Puffer gewaschen und einige Schnitte mit einem Lichtmikroskop mikroskopiert (siehe IV.10.1).

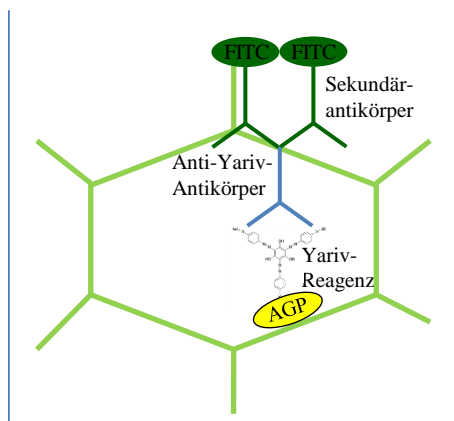
Die restlichen Schnitte wurden 1 h mit dem polyklonalen Anti-Yariv-Antikörper (1:25 aus Kaninchen) auf dem Schüttler in der Feuchtkammer (96-Well-Mikrotitrierplatte) bei RT inkubiert.

Im Anschluss wurde wieder dreimal 5 min mit PBS-Puffer gewaschen und zweimal in der Feuchtkammer für 5 min der Verdünnungspuffer zugesetzt.



Schließlich konnte der FITC-markierte Sekundär-Antikörper (Sek-AK, 1:100, Anti-Kaninchen) auf die Schnitte in die Feuchtkammer zugetropft werden und auf dem Schüttler für 1 h einwirken.

Der Sek-AK wurde dreimal 5 min mit PBST-Puffer abgewaschen und der Puffer dann durch dreimaliges Spülen mit *Aqua bidest.* entfernt.



Nun konnten die Schnitte auf einem Objektträger platziert und überschüssige Flüssigkeit mit Kimwipes[®] (fusselfreiem Zellstoff) abgesaugt werden. Sofort danach wurden die Schnitte mit einem Tropfen Mowiol-DABCO zur Fluoreszenzverzögerung bedeckt und mit einem Deckgläschen geschützt. So wurden die Objekte etwa 12 h kühl und dunkel gelagert, damit das Mowiol-DABCO vollständig auspolymerisieren konnte und die Schnitte mit Hilfe der konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM, i.d.R. 5-fach, 20-fach und 60-fach vergrößert) mikroskopiert werden konnten.

Verwendete Geräte und Materialien

Handmikrotom:	Fa. Euromex Microscopen BV, Arnhem, Niederlande
96-Well-Platte:	Nunc-Immuno [®] Plates MaxiSorp [®] Surface, Fa. Thermo Scientific, Waltham, USA
Schüttler:	Vibrax-VXR, Fa. IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Lichtmikroskop:	Zeiss Phasenkontrastmikroskop 473028, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Anti-Yariv-AK:	1:25 aus Kaninchen, Elution Q, gegen KLH gekoppeltes β GlcY, Charles River Wiga Deutschland GmbH
FITC-markierte Sec-AK:	1:100, Anti-Kaninchen, Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
CLMS:	TCS SP5, Fa. Leica, Wetzlar
Software:	Leica LAS AF Light Version, Fa. Leica, Wetzlar

TBS-Puffer:

3,04 g TRIS-Carbonat, 8,78 g NaCl ad 1,0 l *Aqua bidest.*

Verdünnungspuffer:

0,3 % BSA, 1-2 Tropfen Tween20 in TBS-Puffer

Blockierpuffer:

3 % BSA in TBS-Puffer

PBS-Puffer, pH 7,4:

8,00 g NaCl, 0,20 g Kaliumchlorid (KCl), 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) ad 1,0 l *Aqua bidest.*

PBST-Puffer, pH 7,4:

0,05 % Tween20 in PBS-Puffer

Yariv-Reagenz:

4 mg β -Glc-Yariv, 0,15 M NaCl ad. 10 ml *Aqua bidest.*

Yariv-Negativ-Reagenz:

4 mg α -Gal-Yariv, 0,15 M NaCl ad. 10 ml *Aqua bidest.*

Mowiol-DABCO:

Zur Herstellung wurden 6 g Glycerol (analytical grade), 2,4 g Mowiol 4-88 (Fa. Calbiochem, San Diego, USA), 6 ml *Aqua bidest.*, 12 ml 0,2 M TRIS-Puffer pH 8 und 0,1 % 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) gemischt und 4 – 12 h mit dem Magnetrührer gerührt. Danach wurde die Suspension 2 h ruhen gelassen, 10 min bei 50 °C erwärmt und zentrifugiert (für 15 min bei 5.000 g). Der Überstand wurde in Aliquots abgefüllt und bei - 20 °C eingefroren.

11. Biologische Aktivitäten der AGPs

11.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Testung der AGP-Proben mit ELISA, einem antikörperbasiertem Nachweisverfahren, diente der Untersuchung der Reaktivität mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern, die gegen Epitope des *Echinacea purpurea*-AGP gerichtet waren. Es wurde ein kompetitiver ELISA durchgeführt, bei dem die enzymatische Farbreaktion umso schwächer war, desto stärker der primäre Antikörper während einer Vorinkubation gebunden wurde (Abbildung 12).

Der kompetitive ELISA wurde, wie in BARTELS und CLASSEN (2017) beschrieben, durchgeführt.

Dazu wurde die 96-Well-Platte zunächst für drei Tage bei 36 °C ohne Deckel mit *Echinacea*-AGP (20 µg/ml H₂O; 100 µl/Kavität) inkubiert, sodass die Lösung eintrocknete und AGP maximal am Boden der Platte binden konnte. Danach wurde, um ungebundene Bestandteile zu entfernen, dreimal mit PBST-Puffer (200 µl/Kavität) gewaschen und anschließend, um freie Bindungsstellen abzusättigen, für 1 h bei 36 °C mit BSA-Lösung (10 mg/1ml PBS; 200 µl/Kavität) inkubiert. Überschüssiges BSA wurde durch erneutes dreimaliges Waschen der Platte mit PBST-Puffer entfernt. Parallel wurden je 100 µl unterschiedlicher Konzentrationen (0 – 50 µg/ml PBS) der AGPs von *Lycopodium*, *Equisetum*, *Dryopteris*, *Osmunda*, *Pteridium* und *Echinacea* mit je 100 µl gegen *Echinacea*-AGP (Classen et al., 2005; Classen et al., 2004) gerichteten poly- oder monoklonalem Antikörper (1:100 bzw. 1:300 in PBS) für 1 h bei 36 °C vorinkubiert. Danach erfolgte eine dreifache Messung der AGP-AK Mischungen, indem zuerst 50 µl in die Kavitäten pipettiert (nach Schema) und für 1 h bei 36 °C auf der Platte inkubiert wurden, die Platte wieder dreimal gewaschen und im Anschluss mit sekundärem, alkalische Phosphatase (alk.P.) konjugiertem AK (gegen Kaninchen-IgG oder gegen Maus-IgG, 1:500 in PBS) für 1 h bei 36 °C behandelt wurde. Als Letztes wurde, zur abermals zuvor gewaschenen Platte, die Substratlösung mit p-Nitrophenylphosphat (pNPP, 0,1 mg/ml in 0,2 M TBS; 100 µL/Kavität) hinzugegeben und die Absorption des farbigen Produktes bei 405 nm mit einem ELISA reader gemessen.

Verwendete Geräte und Materialien

96-Well-Platte:	Nunc-Immuno [®] Plates MaxiSorp [®] Surface, Fa. Thermo Scientific, Waltham, USA
Brutschrank:	Elektronisch geregelter Wärmeschrank BE 200, Fa. Memmert GmbH, Schwabach

monoklonaler AK: 4B8D3, siehe CLASSEN *et al.*, 2004
 polyklonaler AK: 639 „Q“, siehe CLASSEN *et al.*, 2005
 alk.P. konjugiertem AK: gegen Kaninchen-IgG oder gegen Maus-IgG, 1:500 in PBS,
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
 ELISA reader: Tecan® Spectra Thermo, Fa. Tecan Group Ltd,
 Männedorf, Schweiz

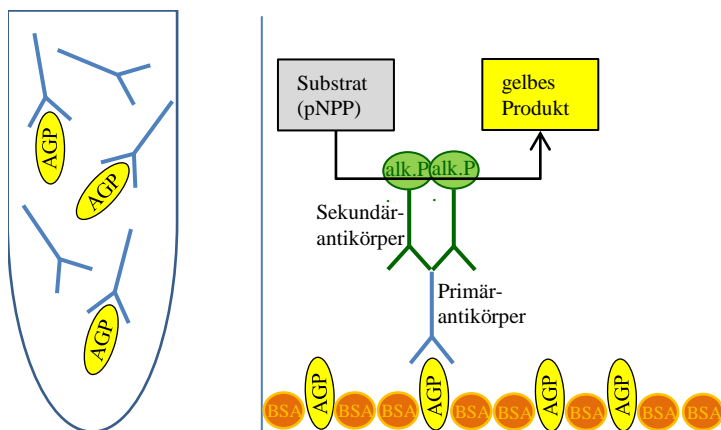


Abbildung 12: Vorinkubation mit primären AK (links) & schematische Darstellung des kompetitiven ELISA (rechts)

11.2 Bindungsanalyse mittels Durchflusszytometrie

Die Bindung von verschiedenen AGPs an dendritische Zellen aus der Maus (DC2.4) wurde mittels FACS getestet. Dabei wurden die Parameter so ausgewählt, dass man eine optimierte Messmethode in Anlehnung an THUDE *et al.* (2006) erhielt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte am Pharmazeutischen Institut in der Abteilung für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der CAU.

Für die Untersuchung der Bindungen wurden die Zellen, nach Kultivierung auf RPMI-Medium, vorsichtig von der Flasche mittels Zellschaber abgelöst und in 10 ml modifiziertem PBS-Puffer suspendiert. Mit dieser Zellsuspension wurde, nach einer 1:10 Verdünnung mit PBS, eine Zellzählung mit 10 % Trypanblau in einer Zählkammer durchgeführt. Anschließend wurde die Zellsuspension durch Nylon-Netzfilter hindurch aufgeteilt, um Zellcluster zu verhindern, und mit PBS so aufgefüllt, dass jeweils 1 ml mit 1 Mio. Zellen pro FACS-Röhrchen vorlag.

Die FACS-Röhrchen wurden im Anschluss bei 1.200 rpm (294 g) für 4 min zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und die Zellen resuspendiert. Wenn unspezifische Bindungen zuerst abgesättigt werden sollten, wurde eine 30 minütige Inkubation auf Eis mit je 100 µl 2 %iger BSA-Lösung (in PBS) und anschließender Waschung, durch Zugabe von 1 ml

PBS, vortexen zum Vermischen, zentrifugieren (1.200 rpm, 4 min), Überstand abgießen und erneut Vortexen zum Resuspendieren der Zellen, durchgeführt. Entweder wurden danach oder direkt je 100 µl der AGP-Verdünnungen (0,1 µg/ml – 100 µg/ml in PBS) in die FACS-Röhrchen pipettiert, gevortext und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zu den Kontrollen wurde statt einer AGP-Verdünnung die entsprechende Menge PBS-Puffer hinzugefügt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze in den FACS-Röhrchen erneut gewaschen. Im nächsten Schritt konnten dann 100 µl des primären polyklonalen Antikörpers (aus Kaninchen gegen *Echinacea*-AGP, 1:50 bzw. 1:300 in PBS, CLASSEN *et al.*, 2005) hinzugegeben, gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert werden. Die Kontrollen wurden gegebenenfalls wieder mit entsprechender Menge Puffer aufgefüllt. Nachdem die Ansätze wieder gewaschen waren, wurde 100 µl FITC-markierter Sekundärantikörper (aus Ziege, gegen Kaninchen-IgG, 1:100 in PBS) oder bei den Kontrollen Puffer hinzupipettiert, für 90 bzw. 30 min auf Eis inkubiert und noch einmal mit 1 ml Puffer gewaschen (Abbildung 13).

Um Messungen von 100.000 Events durchzuführen, wurden die Proben mit 500 µl Puffer versetzt und gemischt. Die Lebend-/Tot-Kontrolle wurde stattdessen mit 7-AAD verdünnt.

Bei den Kontrollen, die durchgeführt wurden, handelte es sich neben der Zellpopulationskontrolle, in der nur Puffer und im letzten Schritt 7-AAD verwendet wurde, um einen Blindwert, in dem nur Puffer verwendet wurde und einen Nullwert, dessen AGP-Konzentration mit Puffer ersetzt wurde.

Die Zellen wurden mit Hilfe folgender Gates vermessen und ausgewertet: Zellen (SS Integral gegen FS Integral), einzelne Zellen (FS Peak gegen FS Integral), lebende Zellen (SS Integral gegen FL4 Integral) und FITC markierte + nicht markierte lebende Zellen (SS Integral gegen FL 1 Integral).

Verwendete Geräte und Materialien

dendritische Zellen:	DC2.4 aus C57BL/6 Maus, Passage 8-17, siehe SHEN <i>et al.</i> , 1997
Zellschaber:	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zählkammer:	Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland
Netzfilter:	NY6000010, Porengröße 60 µm, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FACS-Röhrchen:	Tubes: Flow Cytometry, 5 ml 75x12 mm PS, Sarstedt

polyklonaler AK:	aus Kaninchen gegen <i>Echinacea</i> -AGP, 1:50 in PBS, Squarix, Marl, Deutschland
FITC-Sekundärantikörper:	aus Ziege, gegen Kaninchen-IgG, 1:100 in PBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Durchflusszytometer:	Gallios-3L-10C mit Kaluza Software Version 1.3, Fa. Co. Beckman-Coulter, Florida, USA
Zentrifuge:	Heraeus® Megafuge® 3.0R, Fa. Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Trockenschrank:	Hybridization Oven Shaker RPN2511, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, California, USA
Trypanblau:	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
RPMI Medium:	RPMI 1640 Flüssigmedium mit 2 g/l NaHCO ₃ und stabilem L-Glutamin ergänzt durch 10 % fetales BS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), nicht essentielle Aminosäuren, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland und 2- Mercaptoethanol (700µM), Sigma-Aldrich, Missouri, USA
PBS-Puffer:	PBS-Dulbecco-Lösung w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

modifizierter PBS-Puffer, pH=7,4:

10 ml PBS-Puffer und 100 mg BSA ad 100 ml *Aqua bidest.*

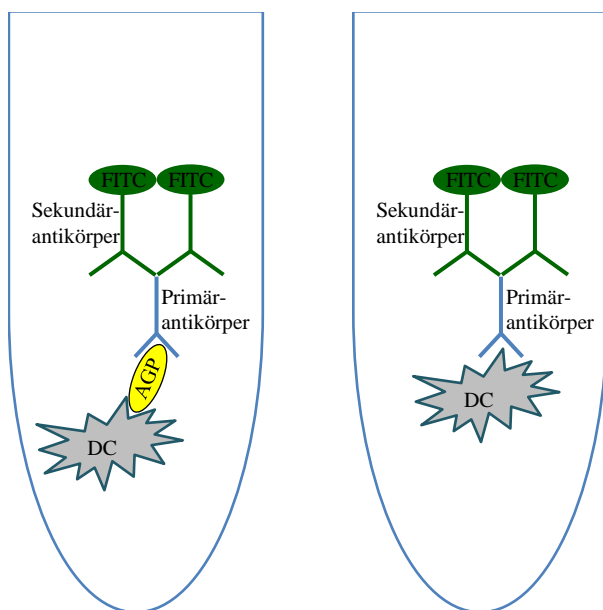


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Zellmarkierung für die Durchflusszytometrie mit AGP (links) & Nullwert-Kontrolle (rechts)

V. Ergebnisse

1. Isolierung der hochmolekularen Polysaccharid-Fractionen

Die Ausbeute der HMFs, die man nach der Präzipitation mit EtOH erhielt, variierte in den untersuchten Pflanzen zwischen 0,6 % und 7,0 % (Tabelle 1). Sie war sowohl abhängig von der Art, also auch vom Erntezeitpunkt.

Der niedrigste Gehalt an HMF wurde in *Lycopodium* gefunden und der mit Abstand höchste in *Equisetum*.

Auffällig ist auch, dass der Gehalt an HMF im Herbst höher war verglichen mit dem Gehalt im Sommer aus demselben Jahr. Das könnte u.a. an einer höheren Stärkespeicherung liegen, die zur Nährstoffreserve der Pflanzen im Winter dient.

Pteridium wurde in zwei Sommern unabhängig voneinander isoliert. Auch hier traten leichte Schwankungen (0,3 % und 0,4 %) auf, was daran liegen könnte, dass die klimatischen Bedingungen in verschiedenen Jahren durchaus unterschiedlich waren.

Tabelle 1: Ausbeuten der hochmolekularen PS-Fractionen (HMF)

Probe	Ernte	Einwaage: getrocknete Droge [g]	Auswaage: HMF [mg]	HMF [%] bezogen auf 100 g getrocknete Droge
<i>Lycopodium annotinum</i>	Sommer 2013	100,0	693,5	0,7
	Sommer 2014	100,0	596,7	0,6
	Sommer 2015	100,0	865,0	0,9
<i>Equisetum arvense</i>	Sommer 2013	100,0	4869,7	4,9
	Herbst 2013	65,0	3718,7	5,7
	Sommer 2014	100,0	6984,7	7,0
<i>Dryopteris filix-mas</i>	Sommer 2013	100,0	1925,3	1,9
	Herbst 2013	65,0	1507,0	2,3
	Sommer 2014	100,0	938,9	0,9
<i>Osmunda regalis</i>	Sommer 2013	100,0	1323,3	1,3
	Herbst 2013	100,0	1750,3	1,8
	Sommer 2014	100,0	997,2	1,0
<i>Pteridium aquilinum</i>	Sommer 2013 1. Charge	100,0	1285,7	1,3
	Sommer 2013 2. Charge	100,0	1592,1	1,6
	Herbst 2013	100,0	2642,5	2,6
	Sommer 2014 1. Charge	100,0	924,3	0,9
	Sommer 2014 2. Charge	100,0	1264,8	1,3

2. Isolierung der hochmolekularen Arabinogalaktan-Proteine

Die aus den HMF mit β GlcY gefällten AGPs wiesen Ausbeuten von 0,08 % bis 0,19 % (Tabelle 2) bezogen auf die getrocknete Droge auf. Auch hier waren Unterschiede abhängig von der Art und dem Erntezeitpunkt zu erkennen aber unabhängig davon, ob im Sommer oder Herbst geerntet wurde.

Lycopodium zeigte erneut den durchschnittlich niedrigsten Gehalt. Allerdings waren hier die durchschnittlichen Ausbeuten alle etwa im selben Bereich (0,10 – 0,15 %). Vor allem die Ausbeuten zweier voneinander unabhängiger HMF-Isolationen der beiden *Pteridium*-Sommerernten glichen sich.

Die HMF der *Dryopteris*-Sommerernten wurden in je zwei etwa gleich große Mengen aufgeteilt und unabhängig voneinander mit β GlcY gefällt. Im Hinblick auf die AGP-Ausbeute waren diese Ergebnisse vergleichbar.

Die AGP-Ausbeute der *Lycopodium*-Ernte vom Sommer 2013 konnte nicht ausgewertet werden, da dort während der Dialyse, die zur Reinigung der AGP-Fällung diente, Verluste auftraten. Sie hätte allerdings größer als 0,09 % sein müssen, da diese Menge schon ohne Verlust isoliert wurde.

Tabelle 2: Ausbeuten der hochmolekularen AGPs

Probe	Ernte	Einwaage: HMF [mg]	Auswaage: AGP-Fraktion [mg]	AGP-Fraktion [%] bezogen auf 100 g getrocknete Droge
<i>Lycopodium annotinum</i>	Sommer 2013	691	92,8 + Verlust	>0,09
	Sommer 2014	590	122,2	0,12
	Sommer 2015	854	74,6	0,08
<i>Equisetum arvense</i>	Sommer 2013	4850	177,6	0,18
	Herbst 2013	1048	22,8	0,12
	Sommer 2014	6974	109,1	0,11
<i>Dryopteris filix-mas</i>	Sommer 2013	970 + 931	75,8 + 83,5	0,16
	Herbst 2013	693	23,5	0,08
	Sommer 2014	505 + 429	59,0 + 65,3	0,12
<i>Osmunda regalis</i>	Sommer 2013	1004	92,5	0,12
	Herbst 2013	696	50,5	0,13
	Sommer 2014	992	193,0	0,19
<i>Pteridium aquilinum</i>	Sommer 2013 1. Charge	1002	85,8	0,11
	Sommer 2013 2. Charge	1389	99,5	0,11
	Herbst 2013	871	56,1	0,17
	Sommer 2014 1. Charge	920	120,7	0,12
	Sommer 2014 2. Charge	1203	99,6	0,10

Um eine vollständigere AGP-Ausbeute zu erreichen wurden die Yariv-Überstände noch einmal mit β GlcY gefällt (IV.3.4). Allerdings wurden in den Yariv-Überständen der getesteten Proben deutlich geringere Mengen an fällbaren AGPs (0,004 – 0,020 %, Tabelle 3) gefunden. Dieses Ergebnis war nicht überraschend, da es sich nur um Reste der HMFs handelte, aus denen bereits AGP gefällt wurde. Es zeigte jedoch auch, dass die AGPs nicht vollständig und in unterschiedlichem Ausmaß aus den HMFs mittels Yariv-Präzipitation gefällt worden waren.

Tabelle 3: Ausbeuten der aus dem Yariv-Überstand gefällten hochmolekularen AGPs

Probe	Ernte	Einwaage: Yariv- Überstand [mg]	Auswaage: AGP-Fraktion [mg]	AGP-Fraktion [%] bezogen auf 100 g getrocknete Droge
<i>Dryopteris filix-mas</i>	Sommer 2014	263	19,5	0,020
<i>Osmunda regalis</i>	Sommer 2014	327	13,4	0,014
<i>Pteridium aquilinum</i>	Sommer 2014	328	3,8	0,004

Zudem fiel auch auf, dass sich das Probenmaterial der EtOH-gefällten HMFs nach der Yariv-Fällung und Aufarbeitung des Yariv-Überstandes verringert hatte. Die Auswaagen der aufgearbeiteten Yariv-Überstände waren für *Lycopodium* 167 mg, für *Equisetum* 331 mg, für *Dryopteris* 268 mg, für *Osmunda* 333 mg und für *Pteridium* 334 mg. Von den ursprünglichen Mengen an dem für die Yariv-Fällung eingesetzten HMF des Sommers 2014, blieb abzüglich der Mengen an Yariv-Überstand und AGP-Ausbeuten noch eine erhebliche Differenz offen (Abbildung 14). Diese betrug für *Dryopteris* 542 mg (58,0 %), für *Osmunda* 466 mg (47,0 %) und für *Pteridium* 455 mg (49,5 %). Teilweise könnte dieser Verlust dadurch begründet sein, dass kleinere, zuvor mittels EtOH gefällte Moleküle (bis 14 kDa) während der Dialyse aus der Probe herausgewaschen wurden. Bei diesen kleineren Molekülen könnte es sich um niedermolekulare Polysaccharide handeln, aber auch um an die Polysaccharide assoziierte wasserlösliche Verbindungen, wie Gerbstoffe, die mit den HMFs mitgefällt wurden. Auch die überwiegend bräunliche und bei *Equisetum* beige Farbe der HMFs ließ auf eine Verunreinigung mit anderen Komponenten schließen, da reine Polysaccharide weiß sind.

Bei den zweiten Chargen von *Pteridium* betrug die Auswaagen 567 mg und 497 mg für die aufgearbeiteten Überstände der Sommerernten 2013 und 2014. Damit ergaben sich, im Vergleich zur ersten Isolation des Sommers 2014, ähnliche Differenzen der HMFs zur AGP- und Überstands-Ausbeute von 723 mg (52,1 %) und 606 mg (50,4 %).

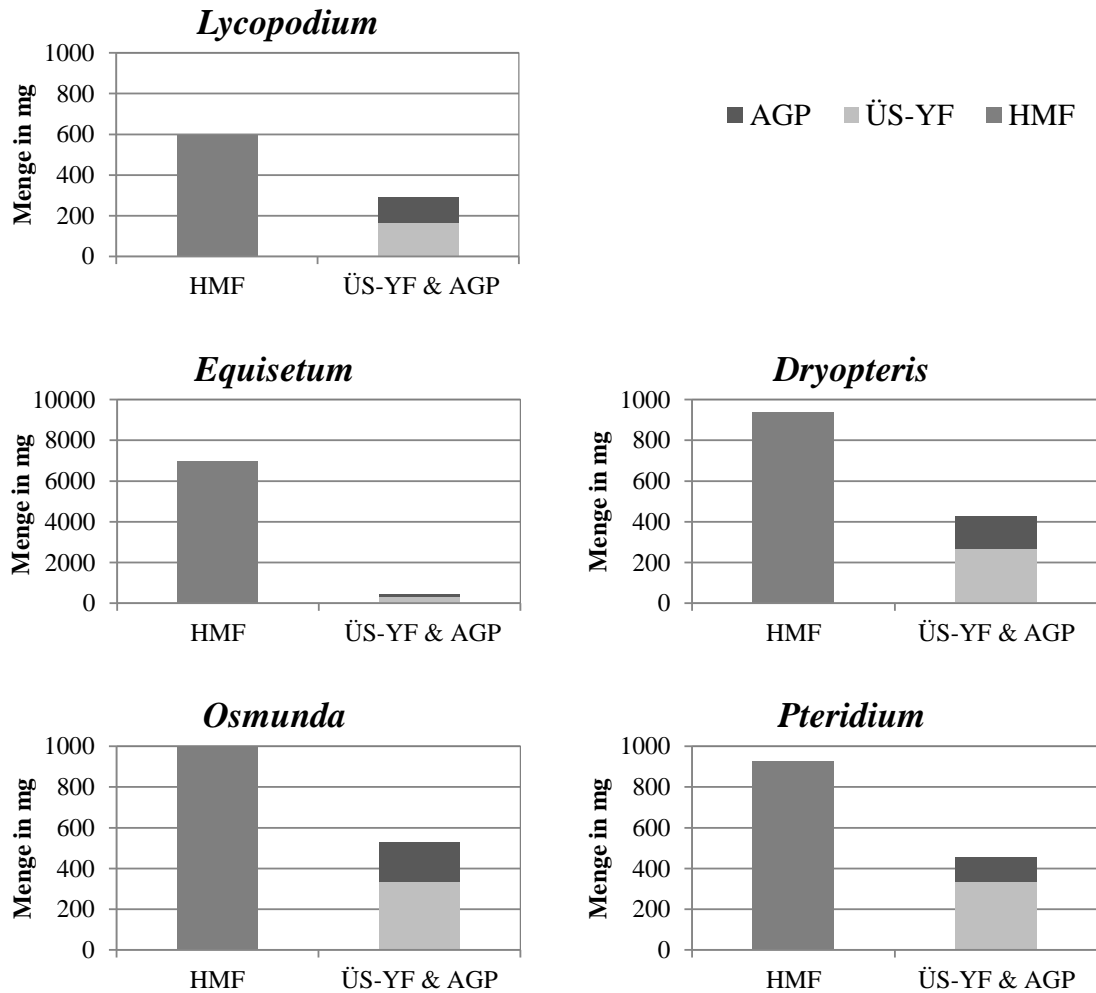


Abbildung 14: Vergleich der Ausbeuten von den HMFs zu den Überständen der Yariv-Fällung (ÜS-YF) und AGPs

3. Geldiffusionstest

Anhand des Geldiffusionstestes kann man makroskopisch die spezifische Präzipitation von Bestandteilen der Polysaccharid-Fractionen und der AGPs mit β GlcY erkennen (siehe IV.4).

Die Entstehung von Präzipitationsbanden der HMFs mit β GlcY im Geldiffusionstest (ohne Abbildung), zeigte also, dass in diesen AGPs enthalten waren. Zum Teil waren diese Banden, wie zum Beispiel für *Dryopteris*, relativ schwach, was auf geringe Konzentrationen an AGP oder eine generell geringe Konzentration an Zuckern hindeutete. Auch das Ausbleiben auftretender Banden beim Geldiffusionstest ist kein Beweis für das Fehlen von AGPs, sondern könnte auch konzentrationsbedingt sein.

Die Anwesenheit der AGPs in den Proben, die mittels β GlcY aus den HMFs gefällt wurden, wurde durch die Bildung von AGP- β GlcY-Komplexen im Geldiffusionstest bestätigt. Da die Stärke der Präzipitationsbanden dieser Komplexe konzentrationsabhängig ist und bei allen fünf Proben dieselbe Konzentration (10 mg/ml) verwendet wurde, waren die Banden etwa gleich stark (Abbildung 15).

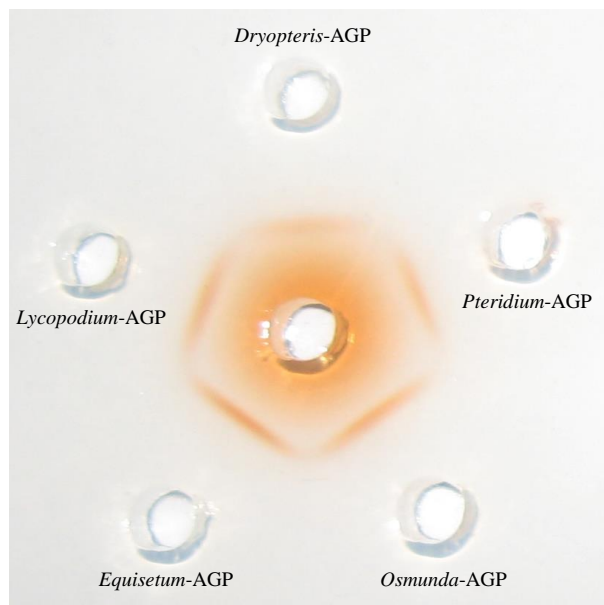


Abbildung 15: Präzipitationsbanden des β GlcY mit den AGPs des Sommers 2014

AGP-Fractionen: 10 mg/ml, Yariv: 1 mg/ml

4. Strukturaufklärende Analytik der HMF und des Yariv-Überstandes:

Charakterisierung des Polysaccharidanteils

4.1 Neutralzuckeranalytik mittels Acetylierung

4.1.1 Neutralzuckeranalytik der HMF

Die qualitative wie die quantitative Zusammensetzung der HMFs variierte abhängig von der Art und bei *Equisetum*, *Dryopteris* und *Osmunda* auch mit dem Erntezeitpunkt (Tabelle 4). Die Zuckerausbeuten der HMFs reichten abhängig von Art und Erntezeitpunkt von 7,4 % bis 41,8 % und waren somit sehr unterschiedlich. Generell zeigten sich bei den Herbsterten niedrigerer Zuckergehalte als bei den Sommerernten aus demselben Jahr. Durchschnittlich waren sie für *Equisetum* sehr gering (9,6 %) und für die anderen untersuchten HMFs etwas höher und in vergleichbarer Konzentration (22,2 – 27,0 %). Neben der bräunlichen Farbe des Probenmaterials deuteten auch die niedrigen Zuckerausbeuten auf andere nicht zuckerartige Komponenten, wie z.B. Gerbstoffe, hin.

Bei *Lycopodium* bestand der Zuckeranteil zu gleichen Teilen hauptsächlich aus Galaktose und Arabinose, gefolgt von erheblichen Mengen Glukose (Glc). Glukose war außerdem das Hauptmonosaccharid in *Equisetum*-HMF, welche zusätzlich in hoher Menge Arabinose, gefolgt von ebenfalls hohen Mengen Galaktose enthielt. *Dryopteris*, *Osmunda* und *Pteridium* wiesen wie *Lycopodium* vor allem auch Galaktose und Arabinose im Zuckeranteil auf, der bei *Osmunda* und *Pteridium* aber mit beachtlichen Mengen an Mannose (Man) und bei *Pteridium* auch durch Xylose (Xyl) und Fucose (Fuc) ergänzt wurde. Bei den HMFs der höheren Farne überwog bei den Ara/Gal-Verhältnissen (bis 1:4,0) allerdings meist deutlich der Galaktoseanteil.

Bei allen untersuchten HMFs, außer der von *Lycopodium*, war auffällig, dass das seltene Monosaccharid 3-*O*-Methyl-Rhamnose (3-*O*-Me-Rha, Trivialname: Acofriose) in der Zuckerzusammensetzung auftauchte. Dieser wurde mittels Retentionszeit des entsprechenden Alditolacetats und des Massenspektrums des zugehörigen PMAAs 1,2,4,5-Tetra-*O*-acetyl-3-*O*-methyl-rhamnitol identifiziert. Der Gehalt an 3-*O*-Me-Rha lag in der *Osmunda*-HMF mit 4,0 – 7,0 % über dem der anderen Monilophyten (0,8 – 2,7 %).

Tabelle 4: Monosaccharidzusammensetzung der HMFs in % (m/m)

(Werte aus Dreifachbestimmung)

	<i>Lycopodium annotinum</i>	<i>Equisetum arvense</i>	<i>Dryopteris filix-mas</i>	<i>Osmunda regalis</i>	<i>Pteridium aquilinum</i>
	Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013
	Sommer 2014	Herbst 2013	Herbst 2013	Herbst 2013	Herbst 2013
	Sommer 2015	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014
Aus- beute	32,2 ± 10,2 29,2 ± 4,9 19,4 ± 0,8	12,8 ± 0,6 8,6 ± 1,5 7,4 ± 1,9	30,6 ± 2,6 8,5 ± 0,9 41,8 ± 2,4	29,4 ± 6,4 17,0 ± 2,8 28,3 ± 2,6	29,3 ± 2,9 20,7 ± 0,6 16,5 ± 1,0
Gal	32,1 ± 0,5 30,1 ± 0,6 32,0 ± 1,1	15,0 ± 0,7 22,2 ± 0,3 10,6 ± 1,7	72,5 ± 2,3 32,3 ± 2,2 71,8 ± 1,2	37,7 ± 2,0 36,1 ± 2,7 41,9 ± 1,8	37,7 ± 0,8 37,5 ± 1,6 37,9 ± 1,6
Ara	29,5 ± 0,3 30,6 ± 1,4 32,9 ± 0,4	18,6 ± 0,7 22,2 ± 0,4 19,5 ± 1,6	19,3 ± 0,8 36,4 ± 1,0 17,8 ± 0,5	17,4 ± 1,1 37,2 ± 2,6 26,3 ± 0,7	15,5 ± 1,1 15,0 ± 0,7 18,6 ± 1,6
3-O- Me- Rha	– – –	1,0 ± 0,8 2,3 ± 0,9 1,3 ± 0,4	0,8 ± 0,1 2,1 ± 1,2 0,9 ± 0,0	4,0 ± 1,4 5,5 ± 1,6 7,7 ± 1,0	2,0 ± 0,5 1,7 ± 0,7 2,7 ± 0,3
Rha	1,2 ± 0,1 1,1 ± 0,2 0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,1 3,3 ± 0,3 1,5 ± 0,5	0,9 ± 0,1 1,9 ± 0,7 1,1 ± 0,1	2,1 ± 0,4 2,6 ± 0,1 2,7 ± 0,4	1,3 ± 0,1 0,7 ± 0,4 1,4 ± 0,3
Fuc	4,3 ± 0,9 1,1 ± 0,2 1,4 ± 0,2	0,3 ± 0,4 0,6 ± 1,1 0,5 ± 0,9	0,6 ± 0,1 2,4 ± 0,5 0,6 ± 0,2	1,4 ± 0,2 2,4 ± 0,4 1,8 ± 0,2	9,7 ± 1,1 10,5 ± 0,8 9,0 ± 1,5
Xyl	9,6 ± 1,7 4,4 ± 0,4 3,9 ± 0,3	1,2 ± 0,5 1,7 ± 0,3 1,9 ± 1,0	1,2 ± 0,1 4,2 ± 0,7 1,6 ± 0,2	7,0 ± 1,7 3,5 ± 0,6 3,5 ± 0,1	15,1 ± 1,7 18,9 ± 2,2 17,7 ± 1,3
Man	6,7 ± 0,4 5,0 ± 0,5 7,0 ± 0,2	3,5 ± 0,7 4,3 ± 0,7 3,0 ± 1,4	2,1 ± 0,8 5,7 ± 0,2 2,1 ± 0,2	17,3 ± 0,7 5,8 ± 0,4 10,8 ± 1,4	13,8 ± 2,6 7,6 ± 0,5 7,6 ± 1,1
Glc	16,6 ± 1,4 27,7 ± 2,2 21,9 ± 1,4	59,3 ± 1,2 43,4 ± 1,3 61,7 ± 2,8	2,6 ± 0,7 15,0 ± 0,9 4,1 ± 0,1	13,1 ± 1,4 6,9 ± 0,6 5,3 ± 0,3	4,9 ± 0,8 8,1 ± 1,1 5,1 ± 2,0
Ara:	1 : 1,1	1 : 0,8	1 : 3,8	1 : 2,2	1 : 2,5
Gal	1 : 1,0 1 : 1,0	1 : 1,0 1 : 0,5	1 : 0,9 1 : 4,0	1 : 1,0 1 : 1,6	1 : 2,5 1 : 2,0

Für *Pteridium* zeigte die zweifache voneinander unabhängige HMF-Isolation beider Sommerernten (2013 und 2014), dass die Ausbeute und Monosaccharidzusammensetzung innerhalb eines Jahres vergleichbar war (Tabelle 5). Beim Vergleich der *Pteridium*-HMFs aus den Sommerernten verschiedener Jahre hingegen waren geringe Unterschiede zu sehen. So trat in der Sommerernte 2014 mehr Ara und damit verbunden auch ein anderes Ara/Gal-Verhältnis auf. Ebenso variierte die Ausbeute abhängig vom Erntezeitpunkt. Sie war in der Sommerernte 2014 geringer als in dem Jahr zuvor.

Tabelle 5: Vergleich der HMF-Monosaccharide in % (m/m) bei zweifacher unabhängiger Extraktion anhand von *Pteridium aquilinum*
(Werte aus Dreifachbestimmung)

<i>Pteridium aquilinum</i>				
Ernte	Sommer 2013 1. Charge	Sommer 2013 2. Charge	Sommer 2014 1. Charge	Sommer 2014 2. Charge
Ausbeute	29,3 ± 2,9	23,6 ± 1,5	16,5 ± 1,0	17,6 ± 4,2
Gal	37,7 ± 0,8	39,1 ± 0,3	37,5 ± 0,8	37,9 ± 1,6
Ara	15,5 ± 1,1	13,5 ± 0,5	18,5 ± 0,1	18,6 ± 1,6
3-O-Me-Rha	2,0 ± 0,5	2,0 ± 0,3	2,7 ± 0,5	2,7 ± 0,3
Rha	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,0	1,4 ± 0,3
Fuc	9,7 ± 1,1	12,6 ± 0,2	6,7 ± 0,3	9,0 ± 1,5
Xyl	15,1 ± 1,7	19,7 ± 0,8	14,5 ± 0,2	17,7 ± 1,3
Man	13,8 ± 2,6	7,1 ± 0,2	10,4 ± 0,9	7,6 ± 1,1
Glc	4,9 ± 0,8	5,1 ± 0,4	8,2 ± 1,3	5,1 ± 2,0
Ara : Gal	1 : 2,5	1 : 2,9	1 : 2,0	1 : 2,1

4.1.2 Neutralzuckeranalytik des Yariv-Überstandes

Da überprüft werden sollte, ob die AGP-Fällung aus den HMFs mittels β GlcY vollständig stattfand, wurde der aufgearbeitete Überstand der Yariv-Fällung hinsichtlich der Monosaccharidzusammensetzung untersucht. Zusätzlich lieferte die Zuckerzusammensetzung der Yariv-Überstände interessante Hinweise auf weitere in der Zellwand der untersuchten Arten vorhandene Polysaccharide. Auch die Überstände, die man aus den aufgearbeiteten Überständen der ersten Yariv-Fällung nach zweiter Yariv-Fällung erhielt, wurden analytisch untersucht (Tabelle 6).

Tabelle 6: Monosaccharidzusammensetzung der Yariv-Überstände (ÜS) vom Sommer 2014 in % (m/m) nach erster und zweiter Yariv-Fällung (YF)
(Werte mit Standardabweichung: n=3)

	<i>Lycopodium annotinum</i>	<i>Equisetum arvense</i>	<i>Dryopteris filix-mas</i>	<i>Osmunda regalis</i>	<i>Pteridium aquilinum</i>
	ÜS erste YF	ÜS erste YF	ÜS erste YF ÜS zweite YF	ÜS erste YF ÜS zweite YF	ÜS erste YF ÜS zweite YF
Aus- beute	48,1 ± 3,0	63,7 ± 5,9	59,3 54,2 ± 6,0	44,1 46,4 ± 1,4	42,5 45,4 ± 1,9
Gal	23,7 ± 0,5	9,0 ± 0,5	64,5 61,8 ± 0,7	34,1 34,1 ± 1,2	35,0 35,1 ± 0,1
Ara	31,9 ± 1,4	14,2 ± 1,4	22,6 25,8 ± 0,9	26,2 25,1 ± 0,7	15,2 14,1 ± 0,1
3-O-Me- Rha	–	1,7 ± 0,3	2,9 1,9 ± 0,2	9,0 8,4 ± 0,6	2,7 1,9 ± 0,1
Rha	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,3 1,6 ± 0,0	3,0 3,1 ± 0,1	1,3 1,2 ± 0,1
Fuc	2,2 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,8 0,5 ± 0,1	1,2 0,8 ± 0,1	10,6 11,2 ± 0,3
Xyl	9,6 ± 0,3	0,5 ± 0,4	2,4 2,8 ± 0,1	5,6 5,2 ± 0,4	23,3 24,7 ± 0,3
Man	4,2 ± 0,4	2,9 ± 0,1	2,2 1,7 ± 0,7	15,1 16,0 ± 0,3	8,8 9,4 ± 0,5
Glc	27,0 ± 1,1	70,6 ± 1,1	3,3 3,9 ± 0,8	5,8 7,3 ± 1,5	3,2 2,4 ± 0,1
Ara:	1 : 0,8	1 : 0,6	1 : 2,9	1 : 1,3	1 : 2,3
Gal			1 : 2,4	1 : 1,4	1 : 2,5

Die Zuckerausbeuten waren bei allen Proben verglichen mit den Zuckerausbeuten der HMFs deutlich höher, vor allem für *Equisetum* war diese in der HMF sehr gering (7,4 %) und im Überstand der Yariv-Fällung am höchsten (63,7 %). Dieses Phänomen könnte durch größere Mengen von niedermolekularen (Nicht-)Zuckern bedingt sein, die evtl. in der HMF mitgefällt und erst während der Dialyse abgetrennt wurden (siehe V.2). Die Unterschiede zwischen den HMFs- und Überstands-Ausbeuten für die anderen untersuchten Proben waren zwar deutlich geringer als 56,3 %, lagen aber dennoch bei beachtlichen 15,8 – 28,7 %.

Verglichen mit den Zuckeranteilen der HMFs war in *Lycopodium*, *Dryopteris* und *Osmunda* der Galaktoseanteil deutlich geringer, wohingegen in *Equisetum* Arabinose deutlich weniger und bei *Pteridium* sowohl Galaktose also auch Arabinose etwas weniger vorkamen. Dafür waren bei *Lycopodium* und *Pteridium* die Xyloseanteile, bei *Equisetum* der Glukoseanteil, bei *Dryopteris* der Arabinose- und bei *Osmunda* der Mannoseanteil am stärksten erhöht (Abbildung 16 bzw. Tabelle 6). Insgesamt ließen die Ara/Gal-Verhältnisse von *Lycopodium* und *Equisetum* vermuten, dass dort eine zweite Yariv-Fällung unnötig war. Für die anderen Farne war eine erneute Yariv-Fällung aus dem Überstand aufgrund der Ara/Gal-Verhältnisse kombiniert mit den hohen Zuckerausbeuten und -anteilen an Galaktose und Arabinose sinnvoll. Die Monosaccharidzusammensetzung beim Vergleich der Yariv-Überstände nach erster und zweiter Yariv-Fällung veränderte sich zueinander kaum (Tabelle 6).

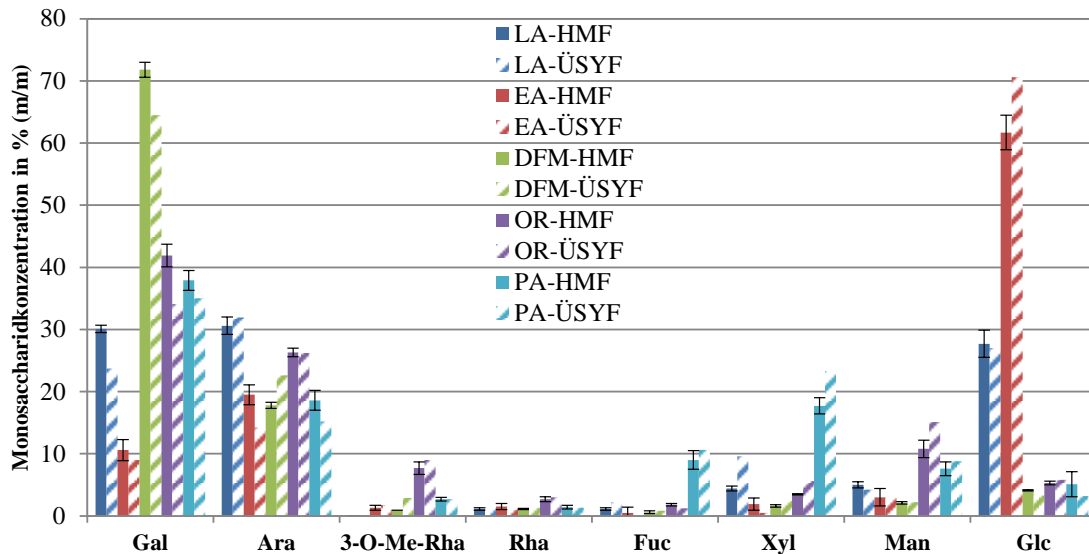


Abbildung 16: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzungen von den HMFs zu den Überständen der Yariv-Fällungen

LA = *Lycopodium annotinum*, EA = *Equisetum arvense*, DFM = *Dryopteris filix-mas*,
OR = *Osmunda regalis* und PA = *Pteridium aquilinum*

Insgesamt waren die Unterschiede der Monosaccharidzusammensetzung zwischen den HMFs und den Yariv-Überständen gering ausgeprägt. Dies war nicht verwunderlich, da der Unterschied zwischen diesen beiden Polysaccharidfraktion eigentlich nur darin bestand, dass die AGPs, die mengenmäßig einen sehr geringen Teil ausmachten, in den Yariv-Überständen fehlten. Allerdings könnte der bereits erwähnte Verlust an niedermolekularen Molekülen während der Dialyse nicht nur auf die Ausbeute sondern auch auf die Zusammensetzung Einfluss genommen haben.

Anhand von *Pteridium* wurden die Yariv-Überstände hinsichtlich ihrer Vergleichbarkeit verschiedener Jahre und innerhalb eines Jahres aber verschiedener Chargen untersucht. Die Überprüfung der Yariv-Überstände nach erster Yariv-Fällung zeigte, dass innerhalb einer Ernte (Sommer 2014), aber unabhängiger Extraktion, keine wesentlichen Unterschiede auftraten. Bei unterschiedlichen Ernten waren die Varianzen bei Arabinose und Fucose etwas stärker ausgeprägt, ansonsten aber waren die Konzentrationen auch vergleichbar (Tabelle 7). Aus der im Sommer 2013 über 5 % geringeren Konzentration an Arabinose ergab sich für diese Ernte auch ein anderes Ara/Gal-Verhältnis (1:3,6) als für das des Sommers 2014 (1:2,3).

Tabelle 7: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung des Yariv-Überstands in % (m/m) bei zweifacher unabhängiger Extraktion anhand von *Pteridium aquilinum*
(Werte mit Standardabweichung: n=3)

	<i>Pteridium aquilinum</i>		
	Sommer 2013 2. Charge	Sommer 2014 1. Charge	Sommer 2014 2. Charge
Ausbeute	33,2 ± 1,6	42,5	27,5 ± 4,3
Gal	36,8 ± 1,0	35,0	36,4 ± 1,2
Ara	10,4 ± 0,3	15,2	16,0 ± 0,6
3-O-Me-Rha	1,5 ± 0,2	2,7	1,8 ± 0,3
Rha	1,1 ± 0,2	1,3	1,2 ± 0,0
Fuc	15,1 ± 0,4	10,6	11,9 ± 0,4
Xyl	25,4 ± 1,1	23,3	24,0 ± 0,5
Man	7,4 ± 0,7	8,8	6,6 ± 0,4
Glc	2,4 ± 0,7	3,2	2,1 ± 0,5
Ara : Gal	1 : 3,6	1 : 2,3	1 : 2,3

5. Strukturaufklärende Analytik der AGPs:

Charakterisierung des Polysaccharidanteils

5.1 Neutralzuckeranalytik mittels Acetylierung

5.1.1 Neutralzuckeranalytik der AGPs

Abhängig von Art und Erntezeitpunkt variierten die Zuckerausbeuten der AGPs (25,7 – 62,1 %, Tabelle 8). Durchschnittlich lagen sie für *Equisetum* bei 60,3 %, für *Lycopodium* bei 57,3 % und für die AGPs der leptosporangiaten Farne in etwa halb so hoher Konzentration (34,8 – 35,6 %) vor. Dass die Zuckerausbeuten nicht 100 % entsprachen, lag neben einem Proteinanteil von typischerweise um die 10 % auch an dem Vorhandensein von sauren Monosacchariden, der Hygroskopie der AGPs und anderen nicht zuckerartigen Komponenten, auf welche die beige Farbe des Probenmaterials

hindeutete. Der Nachweis von Gerbstoffen mittels FeCl_3 zeigte leicht bläuliche Färbungen und somit positive Reaktionen.

Die Zusammensetzung der neutralen Monosaccharide der AGPs, welche aus den HMFs mittels βGlcY gefällt wurden und dessen Ursprungsmaterial im Sommer geerntet wurde, war innerhalb einer Art vergleichbar. Weitestgehend stimmten die Zusammensetzungen auch unabhängig vom Erntezeitpunkt überein. Dominierendes Monosaccharid in den fünf untersuchten AGPs war immer Galaktose (ca. 50 – 60 %) gefolgt von Arabinose (ca. 30 – 40 %). Im Falle der AGPs von *Lycopodium* und *Equisetum* war das Ara/Gal-Verhältnis durch höhere Arabinosemengen (1:1,3) im Vergleich zu den leptosporangiaten Farnen (1:1,7 – 1:1,9) verändert. Beachtliche Unterschiede in Bezug auf den Erntezeitpunkt wurden vor allem bei dem AGP von *Dryopteris* gefunden. Dort wurde im AGP aus der Herbsternnte weniger Galaktose dafür mehr Arabinose und Glukose detektiert. Auch die AGPs aus den Herbstertennten der anderen leptosporangiaten Farne zeigten Ara/Gal-Verhältnisse, die im Vergleich zu den Sommerernten eher geringere Mengen Galaktose beinhalteten.

In allen AGPs mit Ausnahme des *Lycopodium*-AGP wurde 3-O-Me-Rha nachgewiesen. Den höchsten Gehalt zeigte das AGP von *Osmunda* und den niedrigsten das von *Dryopteris* (Abbildung 17). Außerdem wies *Lycopodium*-AGP generell nur Spuren (Sommer 2013 und 2014) unmethylierter Rhamnose auf oder Rhamnose war gar nicht vorhanden (Sommer 2015). Mit der Ausnahme vom *Osmunda*-AGP aus dem Jahr 2014 war die methylierte Rhamnose in den APGs immer in höherer Konzentration vorhanden als in den HMFs. Das ließ darauf schließen, dass Acofriose hauptsächlich als Teil des AGPs in den Zellwänden der untersuchten Pflanzen vorkam. Das Verhältnis von Rhamnose zu methylierter Rhamnose variierte zwischen den Arten und war bei *Equisetum* durchschnittlich 1:8,4 und bei den leptosporangiaten Farnen zwischen 1:1,7 und 1:3,5.

Die Monosaccharide Rhamnose, Fucose, Mannose und Glucose waren im Durchschnitt alle nur in kleinen Mengen (bis 3 %) in den AGPs vorhanden. Eine Ausnahme stellt die Glukosekonzentration im *Equisetum*-AGP dar, die mit ca. 6 % etwas höher lag.

Tabelle 8: Monosaccharidzusammensetzung der AGPs in % (m/m)

(Werte aus Dreifachbestimmung)

	<i>Lycopodium annotinum</i>	<i>Equisetum arvense</i>	<i>Dryopteris filix-mas</i>	<i>Osmunda regalis</i>	<i>Pteridium aquilinum</i>
	Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013
	Sommer 2014	Herbst 2013	Herbst 2013	Herbst 2013	Herbst 2013
	Sommer 2015	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014
Aus- beute	31,0 ± 8,9	61,8 ± 13,2	25,7 ± 1,7	45,7 ± 1,3	46,9 ± 12,7
	52,5 ± 9,5	61,3 ± 2,4	41,9 ± 1,0	31,9 ± 1,2	28,8 ± 1,6
	62,1 ± 3,8	57,9 ± 6,2	37,8 ± 3,0	26,7 ± 3,9	31,1 ± 4,1
Gal	49,0 ± 0,8	45,8 ± 1,4	58,4 ± 2,8	58,0 ± 3,5	56,8 ± 2,8
	52,8 ± 1,5	50,8 ± 0,6	47,1 ± 3,4	52,0 ± 2,5	54,8 ± 1,1
	53,9 ± 0,5	47,3 ± 1,0	61,8 ± 0,4	54,5 ± 1,4	55,8 ± 1,7
Ara	39,0 ± 0,8	37,8 ± 0,9	32,5 ± 1,6	28,4 ± 1,8	29,4 ± 1,7
	42,4 ± 0,6	35,9 ± 0,4	36,1 ± 2,4	33,4 ± 1,3	29,6 ± 0,7
	43,1 ± 0,3	38,8 ± 1,7	29,7 ± 1,7	33,1 ± 0,5	29,5 ± 1,8
3-O- Me- Rha	–	3,8 ± 0,9	1,4 ± 0,9	7,2 ± 1,3	3,7 ± 0,7
	–	5,7 ± 0,5	3,8 ± 0,2	6,7 ± 0,9	4,4 ± 1,0
	–	5,7 ± 0,1	2,4 ± 0,1	7,1 ± 0,2	4,6 ± 0,5
Rha	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,7 ± 0,4
	0,3 ± 0,2	0,7 ± 0,7	2,0 ± 0,5	2,1 ± 0,2	2,9 ± 0,1
	–	0,7 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,5	2,0 ± 0,1
Fuc	1,2 ± 0,1	0,3 ± 0,3	1,1 ± 0,1	0,5 ± 0,2	2,3 ± 0,2
	0,4 ± 0,1	–	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,9 ± 0,1
	0,6 ± 0,1	0,0 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,3	2,2 ± 0,2
Xyl	2,9 ± 0,4	0,6 ± 0,7	0,9 ± 0,0	0,5 ± 0,1	2,2 ± 0,2
	0,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	2,0 ± 0,7	0,2 ± 0,2	1,5 ± 0,1
	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,4	2,0 ± 0,1
Man	2,3 ± 0,8	1,8 ± 0,8	2,7 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,6 ± 0,6
	1,0 ± 0,4	1,9 ± 0,4	3,7 ± 0,7	2,3 ± 0,4	2,4 ± 0,4
	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,0	2,3 ± 0,2	1,5 ± 0,3	2,0 ± 0,8
Glc	5,1 ± 1,0	9,4 ± 1,2	1,4 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,6
	2,5 ± 0,6	3,4 ± 0,6	4,1 ± 5,6	2,1 ± 0,6	2,5 ± 1,0
	0,8 ± 0,1	6,5 ± 0,7	1,1 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,8 ± 0,9
Ara:	1 : 1,2	1 : 1,2	1 : 1,8	1 : 2,0	1 : 2,0
Gal	1 : 1,3	1 : 1,4	1 : 1,3	1 : 1,6	1 : 1,8
	1 : 1,3	1 : 1,2	1 : 2,1	1 : 1,7	1 : 1,9

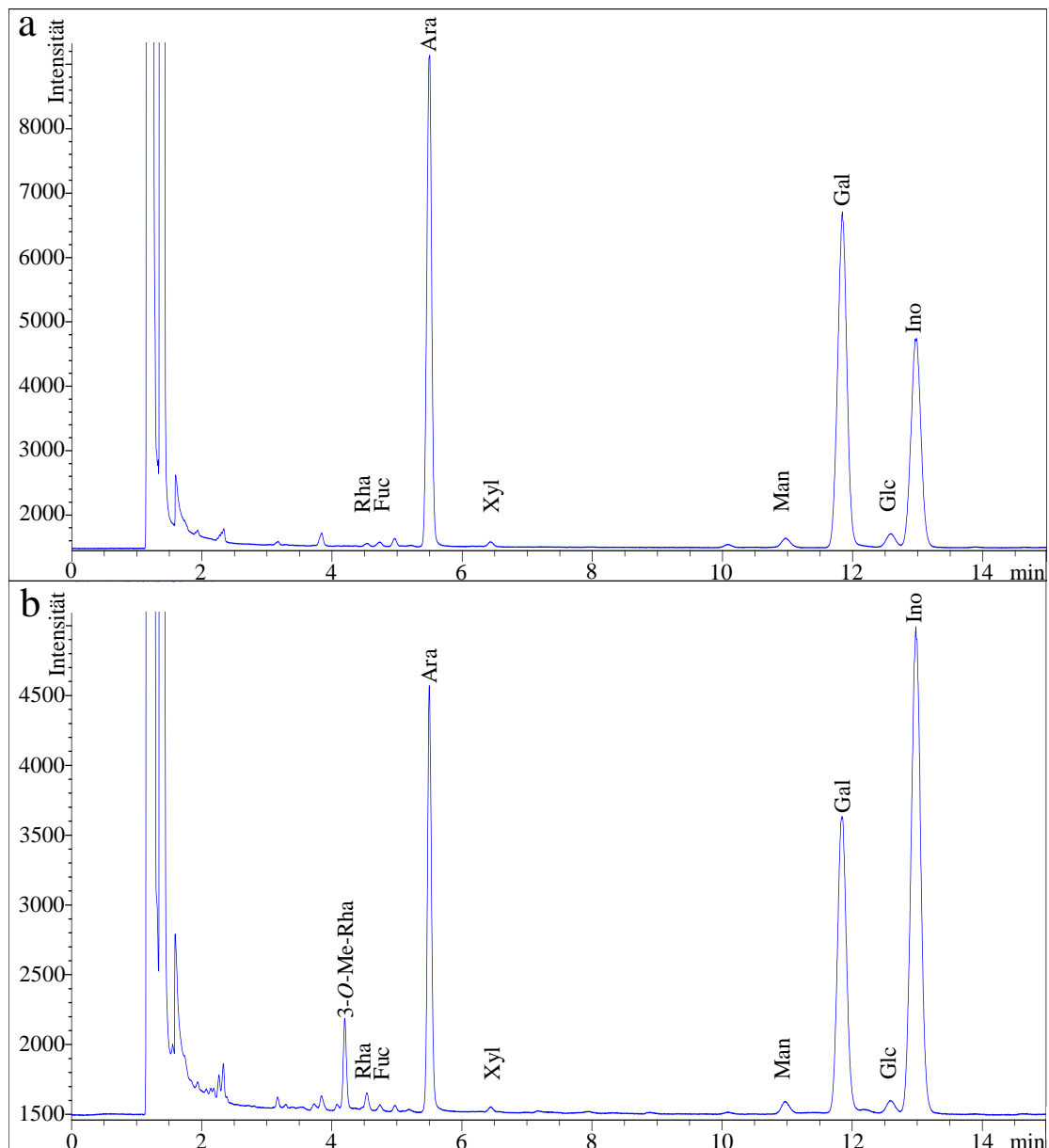


Abbildung 17: FID-Chromatogramme der Alditolacetate von a *Lycopodium*- und b *Osmunda*-AGP

Beim Vergleich unabhängiger AGP-Isolierungen am Beispiel von *Pteridium* ließ sich erkennen, dass der unterschiedliche Zeitpunkt der Extraktion die Zusammensetzung der AGPs nicht wesentlich beeinflusste. Auch der Zeitpunkt der Ernte spielte bei der Monosaccharidzusammensetzung keine Rolle (Tabelle 9). Obwohl die AGPs des Sommers 2013 (2. Charge) und des Sommers 2014 (2. Charge) aus unterschiedlichen Jahren stammten, waren sie sich hinsichtlich der Zuckerzusammensetzung sehr ähnlich.

Tabelle 9: Vergleich der AGP-Monosaccharide in % (m/m) bei zweifacher unabhängiger Extraktion anhand von *Pteridium aquilinum*
(Werte aus Dreifachbestimmung)

<i>Pteridium aquilinum</i>				
Ernte	Sommer 2013 1. Charge	Sommer 2013 2. Charge	Sommer 2014 1. Charge	Sommer 2014 2. Charge
Ausbeute	46,9 ± 12,7	46,6 ± 3,0	31,1 ± 4,1	41,9 ± 1,7
Gal	56,8 ± 2,8	55,2 ± 0,9	55,8 ± 1,7	55,8 ± 0,1
Ara	29,4 ± 1,7	31,8 ± 0,4	29,5 ± 1,8	30,8 ± 0,3
3-O-Me-Rha	3,7 ± 0,7	5,3 ± 0,2	4,6 ± 0,5	5,1 ± 0,4
Rha	1,7 ± 0,4	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Fuc	2,3 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,8 ± 0,2
Xyl	2,2 ± 0,2	1,0 ± 0,0	2,0 ± 0,1	1,5 ± 0,2
Man	2,6 ± 0,6	1,9 ± 0,2	2,0 ± 0,8	1,7 ± 0,2
Glc	1,2 ± 0,6	1,0 ± 0,2	1,8 ± 0,9	1,3 ± 0,2
Ara : Gal	1 : 2,0	1 : 1,7	1 : 1,9	1 : 1,8

5.1.2 Neutralzuckeranalytik der AGPs nach Yariv-Fällung aus Fällungsüberstand

In Bezug auf die Monosaccharidzusammensetzungen unterschieden sich die AGPs aus der Yariv-Fällung und denen aus dem Fällungsüberstand kaum (Vergleich: Tabelle 8 und Tabelle 10, Abbildung 18). Dies war zu erwarten, da es sich vermutlich um dieselbe AGP-Fraktion handelte, die nur bei der ersten Yarivzugabe nicht quantitativ ausgefällt wurde. Eine Tendenz der AGPs aus dem Fällungsüberstand zu etwas geringeren Mengen an Galaktose und bei *Dryopteris* auch an Arabinose, im Vergleich zu den AGPs der direkten Yariv-Fällung, ließ sich erkennen. Dementsprechend waren die Mengen der anderen Monosaccharide, wie z.B. Mannose, minimal höher. Diese Abweichungen waren aufgrund der Standardabweichung der verwendeten Methode allerdings sehr wahrscheinlich nicht signifikant.

Tabelle 10: Monosaccharidzusammensetzung der AGPs in % (m/m) aus Yariv-Fällungsüberstand

	<i>Dryopteris filix-mas</i> Sommer 2014	<i>Osmunda regalis</i> Sommer 2014	<i>Pteridium aquilinum</i> Sommer 2014
Ausbeute	42,4	57,2	36,5
Gal	61,0	52,2	54,4
Ara	29,4	31,7	30,5
3-O-Me-Rha	2,0	7,6	4,4
Rha	1,2	2,0	2,2
Fuc	1,2	0,8	2,3
Xyl	1,3	0,8	2,1
Man	2,7	3,2	3,0
Glc	1,2	1,7	1,1
Ara : Gal	1 : 2,1	1 : 1,6	1 : 1,8

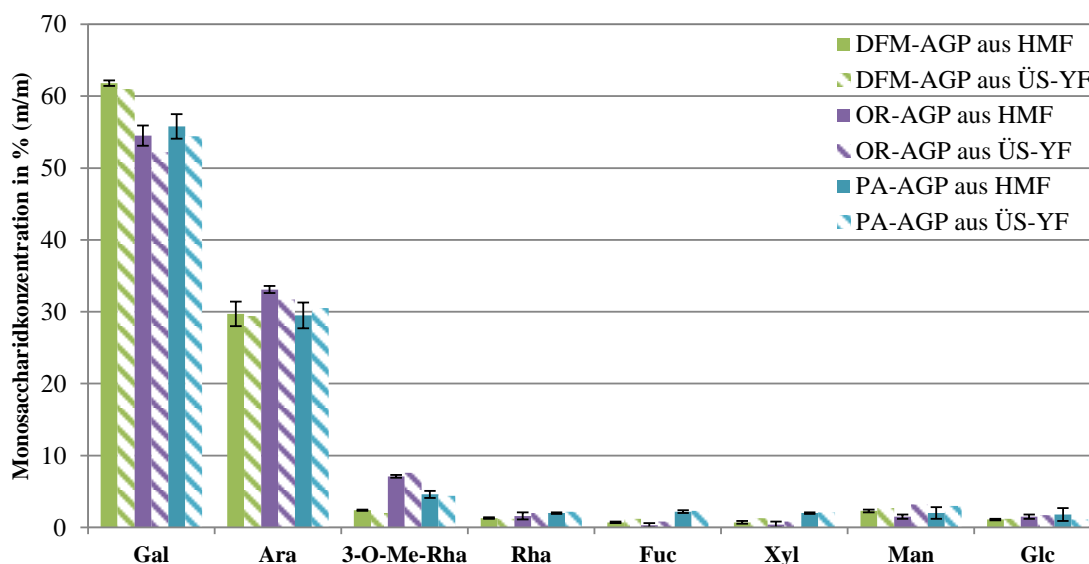


Abbildung 18: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzungen von den AGPs des Sommers 2014, die aus den HMFs und aus den Überständen der Yariv-Fällungen gefällt wurden
DFM = *Dryopteris filix-mas*, OR = *Osmunda regalis* und PA = *Pteridium aquilinum*

Abweichend von der Vergleichbarkeit der Monosaccharidzusammensetzung, war die Zuckerausbeute in den Überständen erhöht. Bei *Dryopteris* und *Pteridium* handelte es sich dabei um nur etwa 5 % Erhöhung, bei *Osmunda* hingegen um über 30 %. Betrachtete man die Auswaage der gefällten AGPs aus dem Überstand der Yariv-Fällung im Hinblick auf die Auswaage der AGPs nach einfacher Yariv-Fällung, so konnte man sehen, dass die Auswaage der AGPs aus dem Überstand deutlich niedriger war (um 84 – 96 %, siehe V.2: Tabelle 2 und Tabelle 3).

5.1.3 Neutralzuckeranalytik der AGPs nach doppelter Yariv-Fällung

Der Unterschied von der einfachen zur doppelten Yariv-Fällung am Beispiel von *Dryopteris* (Tabelle 11) lag vor allem an der Verdopplung der Zuckerausbeute des AGPs.

Tabelle 11: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung der AGPs in % (m/m) nach einfacher und doppelter Yariv-Fällung der Sommerernte 2013

<i>Dryopteris filix-mas</i>				
	einfache YF 1. Ansatz	einfache YF 2. Ansatz	unlöslicher Rückstand der einfachen YF	doppelte YF
Ausbeute	25,7	16,0	17,9	39,4
Gal	58,4	58,6	43,6	65,0
Ara	32,5	30,7	37,2	28,3
3-O-Me-Rha	1,4	2,7	2,7	2,3
Rha	1,6	2,3	1,9	1,6
Fuc	1,1	0,9	1,9	0,5
Xyl	0,9	0,9	2,3	0,3
Man	2,7	2,5	6,9	1,5
Glc	1,4	1,4	3,5	0,5
Ara : Gal	1 : 1,8	1 : 1,9	1 : 1,2	1 : 2,3

Die gesamt AGP-Auswaage war aber um über 80 % verringert, wodurch man statt zuvor 77 mg AGP nach einfacher Yariv-Fällung, nur 13 mg nach doppelter Yariv-Fällung erhielt. Damit würde man rein rechnerisch eine AGP-Ausbeute von 0,03 % (statt 0,16 %, siehe Tabelle 2) bezogen auf 100 g trockenes Drogenmaterial erhalten.

Die Neutralzuckeranalyse der doppelten Yariv-Fällung zeigte zudem eine Erhöhung des Galaktoseanteils, sowie leichte Verringerungen von Arabinose und der meisten restlichen Zucker (Abbildung 19). Daraus resultierte auch das etwas veränderte Ara/Gal-Verhältnis von 1:2,3. Das Ara/Gal-Verhältnis des unlöslichen Rückstands vom AGP nach erster Yariv-Fällung veränderte sich dementsprechend in die entgegengesetzte Richtung. Mit 1:1,2 war es zu niedrigeren Mengen an Galaktose verschoben, wohingegen alle anderen Zuckeranteile außer 3-O-Me-Rha und Rhamnose etwas erhöht waren. Die Ausbeute blieb unverändert.

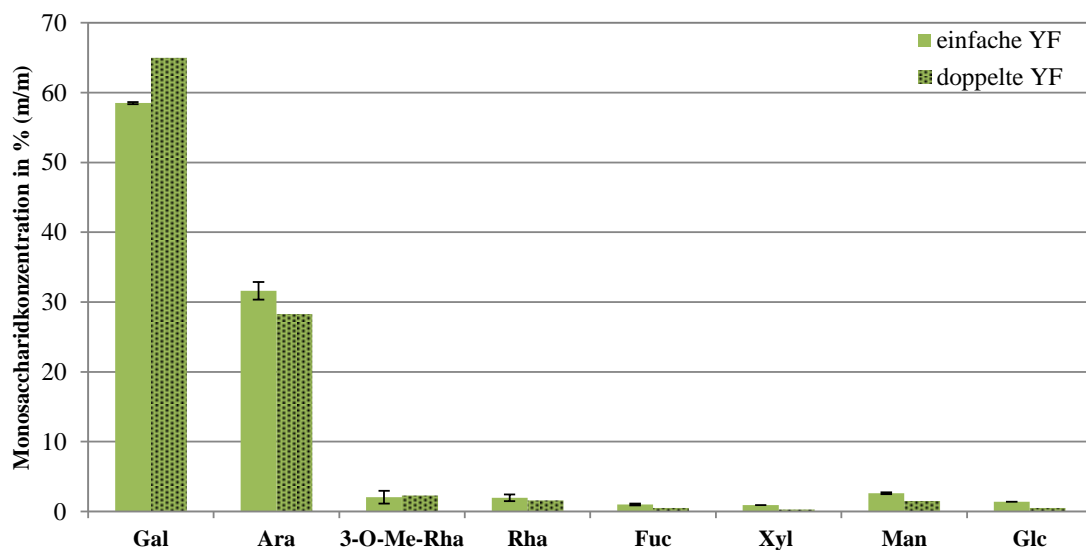


Abbildung 19: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung des *Dryopteris*-AGP des Sommers 2014 nach einfacher und doppelter Yariv-Fällung
(einfache YF: n = 2)

5.1.4 Neutralzuckeranalytik der AGPs nach verschiedenen Hydrolysen

Alkalische Hydrolyse

Die mittels alkalischer Hydrolyse durch Abtrennung vom Proteinrückrat erzeugten Oligo- und Polysaccharide wiesen Zuckerausbeuten von 49,9 % bis 79,5 % (Tabelle 12) auf und lagen damit deutlich höher als bei den nativen AGPs (14,0 – 35,5 %, Tabelle 8). Die deutlichsten Zunahmen waren bei den leptosporangiaten Farnen zu erkennen, da sich bei *Dryopteris* und *Osmunda* die Werte etwa verdoppelten und bei *Pteridium* um das 1,5-fache stiegen.

Tabelle 12: Monosaccharidzusammensetzung der alkalisch hydrolysierten AGPs in % (m/m)

	<i>Lycopodium annotinum</i> Sommer 2014	<i>Equisetum arvense</i> Sommer 2014	<i>Dryopteris filix-mas</i> Sommer 2014	<i>Osmunda regalis</i> Sommer 2014	<i>Pteridium aquilinum</i> Sommer 2014
Ausbeute	79,5	71,9	73,3	49,9	52,2
Gal	54,7	50,1	66,1	58,4	61,5
Ara	42,3	38,6	28,8	33,1	28,9
3-O-Me-Rha	–	3,5	2,1	5,8	3,3
Rha	0,4	0,6	1,3	1,4	1,8
Fuc	0,3	–	0,5	–	1,5
Xyl	0,5	–	0,3	–	1,3
Man	0,7	0,8	0,5	0,7	1,0
Glc	1,1	6,4	0,4	0,6	0,7
Ara: Gal	1:1,3	1:1,3	1:2,3	1:1,8	1:2,1

Bei der Monosaccharidzusammensetzung änderten sich die Anteile an 3-O-Me-Rha zu etwas niedrigeren und an Galaktose zu etwas höheren Mengen. Damit veränderten sich auch die Ara/Gal-Verhältnisse nur leicht in Richtung Galaktose, ansonsten blieben die Monosaccharidzusammensetzungen vergleichbar mit denen der nativen AGPs (Abbildung 20). Eine Änderung der Monosaccharidzusammensetzung war auch nicht zu

erwarten, da die alkalische Hydrolyse nur den Proteinteil abbaut. Dies erklärt auch den Anstieg bei den Zuckerausbeuten.

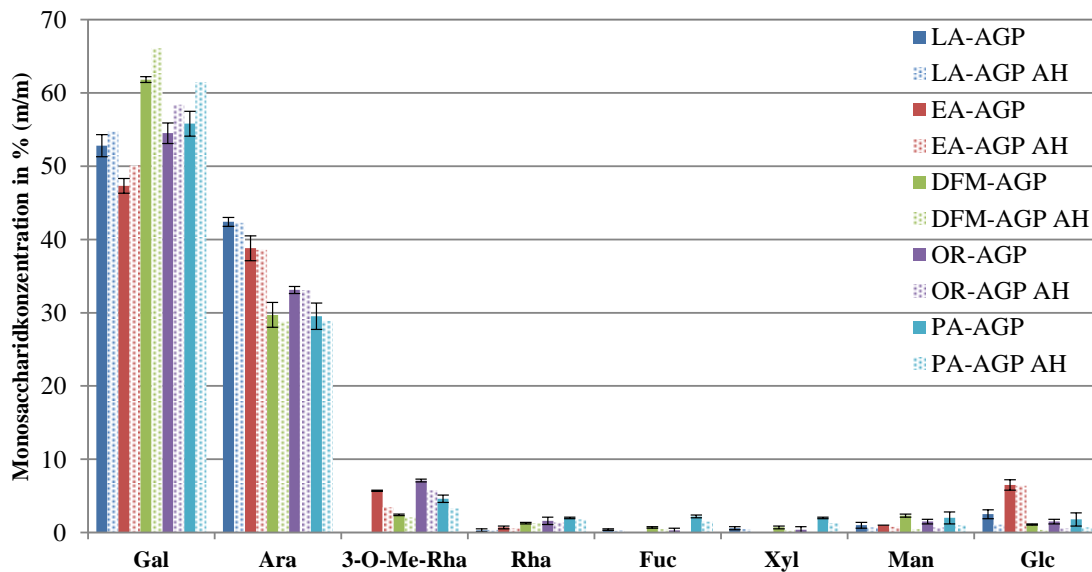


Abbildung 20: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung der nativen und alkalisch hydrolysierten (AH) AGPs des Sommers 2014

LA = *Lycopodium annotinum*, EA = *Equisetum arvense*, DFM = *Dryopteris filix-mas*,
OR = *Osmunda regalis* und PA = *Pteridium aquilinum*

Oxalsäure-Hydrolyse

Die beispielhaft an der zweiten Charge des *Pteridium*-AGP aus dem Sommer 2014 durchgeführte Hydrolyse mit Oxalsäure zeigte eine Zuckerausbeute von 58,7 % und war somit der des nativen AGP (41,9 %) gegenüber deutlich erhöht. Der Galaktoseanteil war nach der Hydrolyse um 21,5 % auf 77,3 % gestiegen und der Arabinoseanteil um 19,4 % auf 11,4 % gesunken. Die restliche Monosaccharidzusammensetzung veränderte sich kaum (Abbildung 21). Da mittels Oxalsäure-Hydrolyse überwiegend labile Zucker, wie t-Araf, abgespalten wurden, war die deutlich geringere Arabinosemenge und daraus resultierende Erhöhung des Galaktoseanteils nicht verwunderlich.

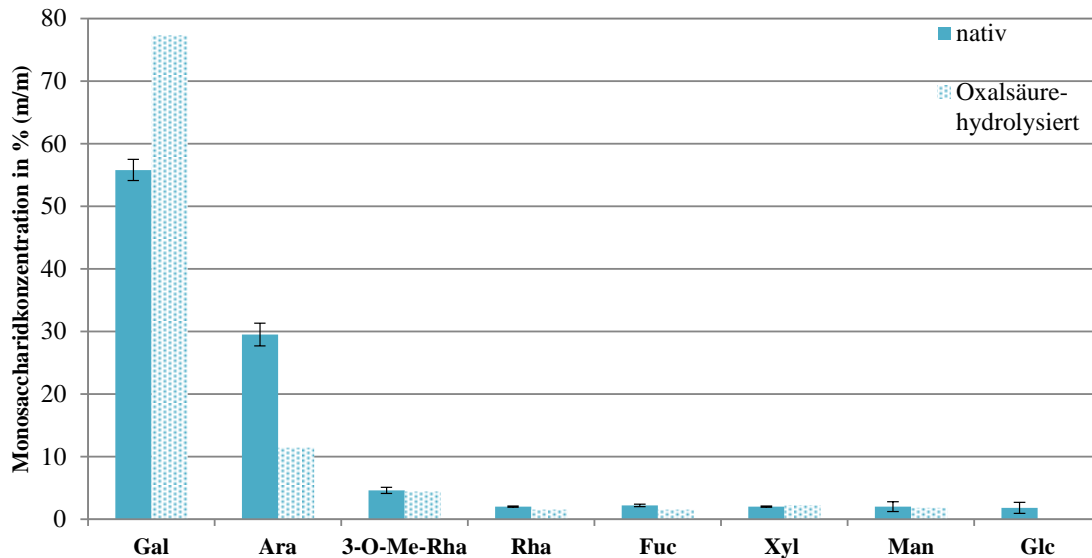


Abbildung 21: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung des nativen und Oxalsäurehydrolysierten *Pteridium*-AGP des Sommers 2014

Smith-Degradation

Die Neutralzuckerbestimmung der Smith-Degradierung wurde exemplarisch bei den AGPs von *Lycopodium*, *Equisetum* und *Osmunda* durchgeführt. Somit wurden neben *Lycopodium* auch ein eusporangiaten und ein leptosporangiaten Farn untersucht. Bei der Neutralzuckeranalyse dieser Smith-degradierten AGPs waren nur noch die Monosaccharide Arabinose, Galaktose und falls zuvor vorhanden 3-O-Me-Rha, quantifizierbar. Das *Lycopodium*-AGP wies, da es im nativen Zustand keine 3-O-Me-Rha enthalten hatte, nach der Degradierung nur Galaktose (77,9 %) und Arabinose (22,1 %) auf. Die Ausbeute lag bei 41,7 %. Auch für die *Equisetum*- und *Osmunda*-AGPs war Galaktose der Hauptbestandteil mit 82,8 % bzw. 79,3 %, gefolgt von 3-O-Me-Rha mit Anteilen von 10,9 % bzw. 11,8 % und Arabinose mit 6,3 % bzw. 8,9 %. Die Ara/Gal-Verhältnisse lagen somit bei 1:3,5 für *Lycopodium*, 1:13,2 für *Equisetum* und 1:8,9 für *Osmunda* (Abbildung 22).

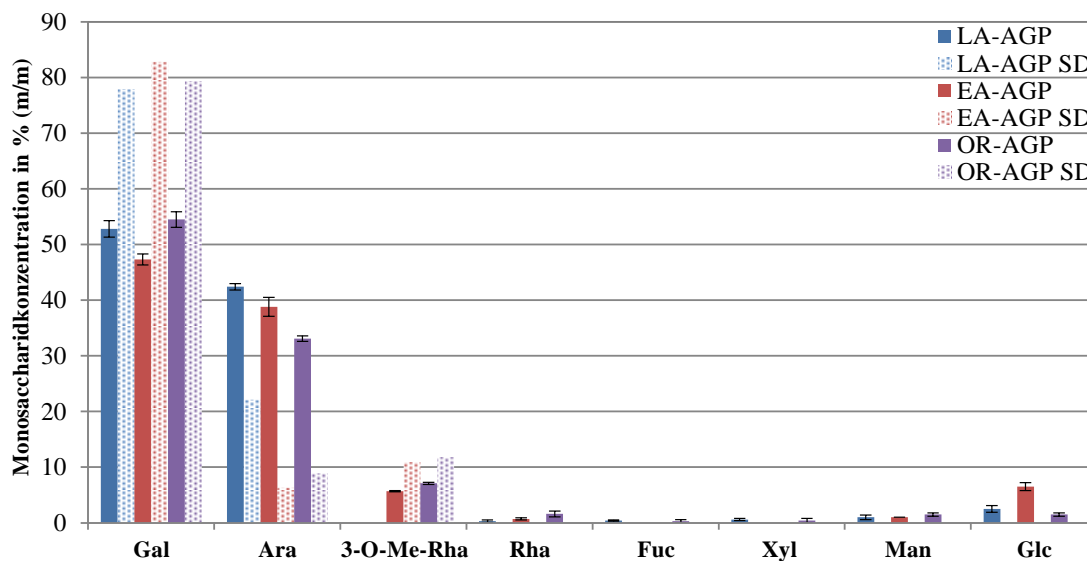


Abbildung 22: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzungen der nativen und Smith-degradierten (SD) AGPs des Sommers 2014

LA = *Lycopodium annotinum*, EA = *Equisetum arvense*, DFM = *Dryopteris filix-mas*,
OR = *Osmunda regalis* und PA = *Pteridium aquilinum*

5.2 Bestimmung der Neutralzucker und Uronsäuren mittels Silylierungsanalyse

Da die Acetylierungsanalyse nur für die Quantifizierung der neutralen Monosaccharide und nicht für die Bestimmung von Uronsäuren geeignet ist, wurden diese separat quantifiziert. Dafür wurde unter anderem die Silylierungsanalyse angewendet, die zeigte, dass Galakturonsäure (GalA) nicht oder nur in Spuren in allen untersuchten AGPs vorhanden war.

In den vier AGPs der Monilophyten wurde Glukuronsäure (GlcA) nachgewiesen. Abhängig von Art und Erntezeitpunkt lagen die Mengen zwischen 1,7 % und 7,2 %. Dabei schwankte allerdings der Gehalt bei wiederholten Messungen derselben Proben und die Standardabweichungen betragen 0,3 % bis 2,5 %. Somit ließ sich zwar erkennen, dass alle untersuchten Monilophyten Glukuronsäure in relativ geringer Menge enthielten, jedoch war eine Aussage über genauere Werte anhand dieser Methode nicht möglich (Tabelle 14).

Im Zuge dieser Methode, wurden auch die Gehalte an Arabinose und Galaktose bestimmt. Stellte man diese Ergebnisse denen der Acetylierung gegenüber, so war zu erkennen, dass sie überwiegend übereinstimmten, allerdings teilweise auch deutliche Abweichungen aufwiesen, wie z.B. beim AGP aus *Equisetum* des Sommers 2013. Die Galaktoseanteile der AGPs aus der Sommer 2014 Ernte lagen ebenfalls nicht in derselben Größenordnung,

hier waren die Werte der Acetylierung i.d.R. um durchschnittlich 10,9 % geringer, bei *Osmunda* jedoch um 5,2 % höher. Insgesamt ließ sich kein eindeutiger Trend feststellen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Absolute AGP-Monosaccharidkonzentrationen von Gal und Ara in % (m/m); Vergleich der Ergebnisse der Silylierung (S) mit denen der Acetylierung (Ac)

	<i>Lycopodium annotinum</i> Sommer 2015	<i>Equisetum arvense</i> Sommer 2013 Sommer 2014	<i>Dryopteris filix-mas</i> Sommer 2013 Sommer 2014	<i>Osmunda regalis</i> Sommer 2013 Sommer 2014	<i>Pteridium aquilinum</i> Sommer 2013 Sommer 2014
Gal S	37,4	20,9 39,9	16,5 35,4	24,9 9,4	27,9 31,5
Gal Ac	33,5	28,3 27,4	15,0 23,3	26,5 14,6	26,6 23,3
Ara S	31,3	17,8 24,9	8,3 12,6	11,8 5,9	14,0 12,1
Ara Ac	26,8	23,4 22,5	8,4 11,2	13,0 8,9	13,8 12,9

5.3 Kolorimetrische Quantifizierung der Uronsäuren

Die photometrische Vermessung nach BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN (1973) wurde als Methode genutzt, um den Gesamtgehalt an Uronsäuren zu bestimmen. Hiermit war die Identifizierung der einzelnen Säuren im Gegensatz zur Silylierungs- oder Reduktionsanalyse nicht möglich. Da jedoch GalA entweder überhaupt nicht oder nur in sehr geringer Menge vorkam (siehe V.5.2), konnte der Gesamtgehalt der Uronsäuren in diesem Fall der GlcA-Konzentration gleichgesetzt werden.

Somit lag der GlcA-Gehalt in den AGP-Proben abhängig von Jahr und Erntezeitpunkt zwischen 1,4 % und 8,9 % (Tabelle 14). Sowohl für die *Lycopodium*-Ernten Sommer 2014 und 2015, als auch für die *Equisetum*-Ernten Sommer 2013 und 2014 ließen sich sehr ähnliche Werte bestimmen. Bei den anderen drei untersuchten Farnen waren deutliche Unterschiede zwischen den Ernten zu erkennen.

Zu den Messunsicherheiten der einzelnen Methoden kam hinzu, dass die Ergebnisse der beiden verschiedenen Uronsäurebestimmungen insbesondere bei der Sommerernte 2014 keine vergleichbaren Daten lieferten.

Zumindest die Ergebnisse der jeweiligen AGPs des Sommers 2013 waren einigermaßen vergleichbar. Außerdem wiesen die GlcA-Ergebnisse der Silylierung und der photometrischen Methode insofern Parallelen auf, als dass die Werte vom Erntezeitpunkt des Sommers 2013 tendenziell höher lagen als die des Sommers 2014. Eine Ausnahme dieses Trends zeigten dabei u.a. die Werte des *Dryopteris*-AGP, die mittels photometrischer Bestimmung ermittelt wurden. Auch das *Pteridium*-AGP, dessen Wert der Silylierungsanalyse im Sommer 2013 eine erhebliche Standardabweichung aufwies, zeigte im Sommer 2014 eine höhere GlcA-Konzentration.

Tabelle 14: Vergleich der Konzentrationen in % (m/m) an GlcA aus Silylierung- und an Uronsäuren aus photometrischer Analyse

	<i>Lycopodium annotinum</i>	<i>Equisetum arvense</i>	<i>Dryopteris filix-mas</i>	<i>Osmunda regalis</i>	<i>Pteridium aquilinum</i>
	Sommer 2014	Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013
	Sommer 2015	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014
GlcA	nicht getestet	4,8 ± 0,3	3,4 ± 0,8	7,2 ± 1,8	4,9 ± 2,5
(Silylierungs- analyse)	–	3,7	1,9	1,7	6,1
Uronsäuren	2,6	3,9	3,8	4,3	4,0
(photometrische Analyse)	2,7	3,6	8,9	1,6	1,4

5.4 Reduktion der Uronsäuren

Da die Messgenauigkeit der beiden zuvor genannten Methoden nicht besonders gut war, wurden die Uronsäuren mittels Reduktion zu ihren korrespondierenden, deuterierten Neutralzuckern umgewandelt und mittels GC-FID und GC-MS vermessen. Anhand der Veränderung der Galaktose- und Glukoseanteile vor und nach der Reduktion, ließ sich feststellen, dass nach Reduktion der Uronsäuren zu den entsprechenden Neutralzuckern die Glukosemenge aller AGPs mit Ausnahme des *Lycopodium*-AGP, zunahm (Tabelle 15 vgl. Tabelle 8, Abbildung 23). Das bedeutete, dass im nativen *Lycopodium*-AGP Glukuronsäure gar nicht oder nur in Spuren vorhanden war. Die vier anderen untersuchten AGPs zeigten eine leichte Zunahme des Glukosegehaltes in den reduzierten

Proben, woran erkennbar war, dass Glukuronsäure Teil der nativen AGPs war. Ansonsten befanden sich die Zuckerzusammensetzungen in den gleichen Bereichen wie die der nativen AGPs, sodass auch hier Rhamnose, Fucose, Xylose und Mannose nur in geringeren Mengen vorkamen.

Tabelle 15: Monosaccharidzusammensetzung der uronsäurereduzierten AGPs in % (m/m)

	<i>Lycopodium annotinum</i>	<i>Equisetum arvense</i>	<i>Dryopteris filix-mas</i>	<i>Osmunda regalis</i>	<i>Pteridium aquilinum</i>
		Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013
	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014
Aus- beute	46,8	42,3 68,5	29,0 44,1	38,2 28,5	34,7 29,8
Gal	53,0	46,5 47,0	57,7 61,1	56,9 54,3	49,1 55,4
Ara	43,3	33,7 37,2	27,6 27,4	23,3 32,2	25,9 27,8
3-O-Me- Rha	–	5,4 5,5	2,5 2,0	7,9 7,3	2,5 4,0
Rha	0,3	0,6 0,6	1,6 0,9	2,2 1,2	1,6 1,7
Fuc	0,4	– –	0,7 0,6	0,4 –	2,1 1,7
Xyl	0,4	– –	0,6 0,4	0,5 –	8,6 1,6
Man	0,6	1,0 0,7	2,0 2,4	1,9 1,1	3,5 2,2
Glc	2,0	12,8 9,0	7,3 5,2	6,9 3,9	6,7 5,6
Ara:		1 : 1,4	1 : 2,1	1 : 2,4	1 : 1,9
Gal	1 : 1,2	1 : 1,3	1 : 2,2	1 : 1,7	1 : 2,0

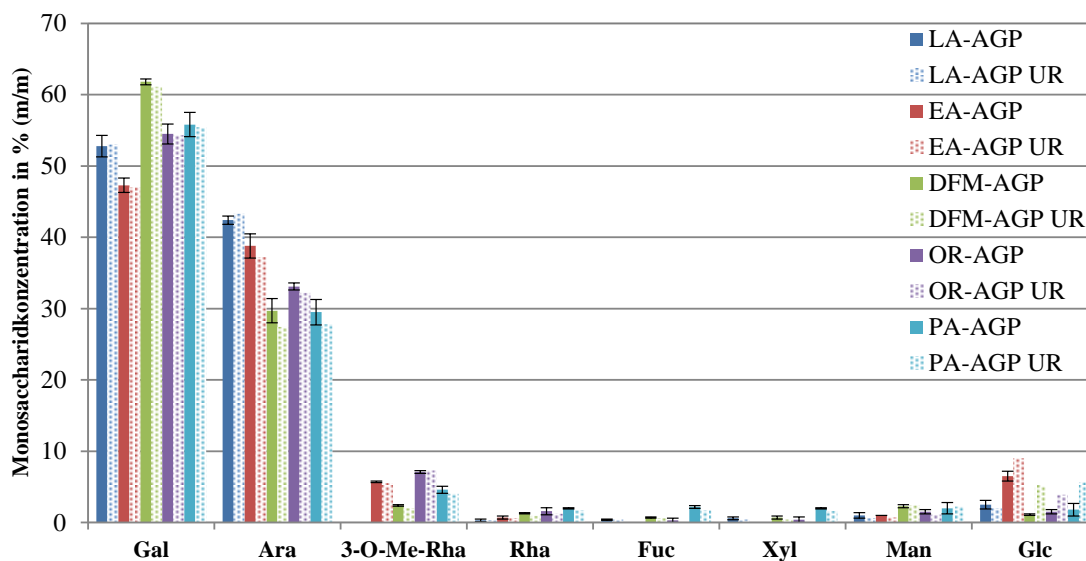


Abbildung 23: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung von den nativen und uronsäurereduzierten (UR) AGPs des Sommers 2014

LA = *Lycopodium annotinum*, EA = *Equisetum arvense*, DFM = *Dryopteris filix-mas*, OR = *Osmunda regalis* und PA = *Pteridium aquilinum*

Allerdings war eine eindeutige Quantifizierung der GlcA bei den untersuchten AGPs auch auf diesem Weg nicht möglich. Die Zuordnung der einzelnen Peaks unter Verwendung der Massenspektren und Abgleich dieser mit einer im Arbeitskreis etablierten Spektrenbibliothek war zwar eindeutig, jedoch eluierte zur selben Retentionszeit der terminalen GlcA auch die terminale Glukose und somit bildeten sie einen gemeinsamen Peak. Die Berechnung über den Vergleich der Mengen der deuterierten Fragmente mit den nicht-deuterierten Fragmenten ist prinzipiell denkbar, wäre aber aufgrund der insgesamt geringen Mengen an Glukuronsäure sehr ungenau. Zusammenfassend wurde durch die drei zuvor genannten Analysen trotzdem klar, dass alle AGPs, mit Ausnahme des *Lycopodium*-AGP, GlcA in geringen Mengen (einstelliger Bereich) enthielten.

5.5 Analyse der Bindungstypen

Die Methylierungsanalyse ist ein geeignetes Verfahren um Verknüpfungen der einzelnen Monosaccharide untereinander zu untersuchen und somit einen wesentlichen Teil zur Strukturaufklärung beizusteuern. Unterschiedlich vorbehandelte AGPs können dabei zusätzliche Informationen liefern. Deshalb wurde die Methode bei den nativen, den uronsäurereduzierten und Smith-degradierten AGPs angewendet.

Die dabei entstandenen charakteristischen PMAAs (Abbildung 24) wurden nach der gaschromatographischen Auftrennung mit Hilfe der Retentionszeiten und der im Arbeitskreis etablierten Massenspektren-Bibliothek identifiziert. Die PMAAs konnten durch ihre Methylierungs- und Acetylierungsmuster dem zuvor im AGP vorliegenden Bindungstyp zugeordnet werden. Fragmente die bei den PMAAs häufig abgespalten werden sind u.a. 60, 42, 32 und 30 m/z.

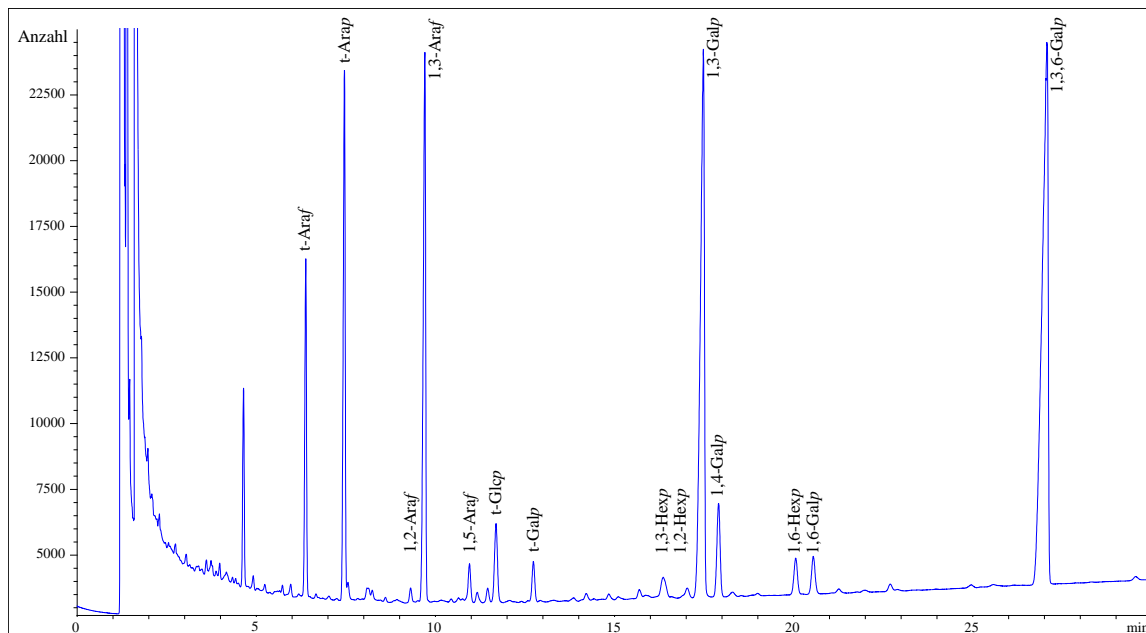


Abbildung 24: FID-Chromatogramm der PMAAs am Beispiel vom *Lycopodium*-AGP des Sommers 2014

Für AGPs von Samenpflanzen typische Monosaccharidbausteine wurden in allen untersuchten AGPs der nativen und uronsäurereduzierten Proben gefunden (Tabelle 16). Das Hauptmonosaccharid Galaktose trat in allen AGPs nur in der pyranosidischen Form auf (51,8 – 70,7 %). Hierbei dominierte der Verzweigungspunkt 1,3,6-Galp mit Mengen von 18,9 – 35,5 % ergänzt von 1,3-Galp, 1,4-Galp, 1,6-Galp und terminaler Galp. Die Konzentration an 1,3-Galp war relativ hoch (16,3 – 21,6 %) und die an 1,6-Galp ziemlich niedrig (0,9 – 2,9 %). In den AGPs von *Dryopteris* und *Pteridium* war der Anteil an terminaler Galaktose höher als in den anderen AGPs. Weitere Hauptkomponente aller AGPs war terminale Araf (4,6 – 23,1 %), i.d.R. begleitet von 1,2-, 1,3- und 1,5-verknüpfter Araf. Auffällige Charakteristika waren u.a. hohe Gehalte an 1,3-verknüpfter Araf (14,2 bzw. 15,2 %) im AGP von *Lycopodium*, 1,5-verknüpfter Araf (14,3 %) im AGP von *Equisetum* und 1,2-Araf (10,6 bzw. 9,6 %) im *Pteridium*-AGP.

Tabelle 16: Bindungstypanalyse der nativen und der uronsäurereduzierten (UR) AGP-Monosaccharide in % (mol/mol)

	<i>Lycopodium annotinum</i>	<i>Equisetum arvense</i>	<i>Dryopteris filix-mas</i>	<i>Osmunda regalis</i>	<i>Pteridium aquilinum</i>
native AGPs:	Sommer 2014		Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014
UR AGPs:	Sommer 2015	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014
1,3,6-Galp	27,6 29,2		20,1 23,7	27,0 35,5	18,9 29,7
1,6-Galp	0,9 1,1	1,8	2,2 2,9	0,7 1,3	1,6 2,2
1,4-Galp	3,2 3,1	5,2	12,4 4,8	2,6 6,3	5,3 7,6
1,3-Galp	19,5 19,5	16,3	18,1 18,5	20,7 19,7	21,6 20,6
t-Galp	0,6 1,3	2,4	4,9 9,0	2,3 3,4	5,0 10,6
1,5-Araf	1,1 1,0	14,3	1,7 2,8	2,9 2,4	2,2 2,5
1,3-Araf	14,2 15,2	0,2	2,1 1,7	1,3 0,8	2,8 1,7
1,2-Araf	– 0,2	0,5	3,4 5,0	4,5 2,9	10,6 9,6
t-Araf	15,0 11,8	23,1	24,1 15,2	27,7 15,9	20,5 4,6
t-Arap	15,6 13,4	–	–	–	–
t-GlcAp/t-Glcp	0,4 2,5	1,7	1,1 4,1	0,9 1,9	1,3 3,1
t-(3-O-Me-)Rhap	– –	3,4	2,9 2,0	7,3 6,2	3,3 1,8
t-Fucp	– 0,2	–	– 0,6	–	1,2 0,7
1,2-Hexp	– 0,2	0,2	– 0,6	– 0,9	– 0,6
1,3-Hexp	0,7 0,7	1,1	2,6 1,8	1,3 0,8	3,9 0,8
1,6-Hexp	1,2 0,6	– 0,8	0,6 1,2	1,3 0,8	–
1,3,4-Hexp	– –	1,7	3,4 4,0	0,5 0,8	1,8 2,9
1,3,4,6-Hexp	– –	0,9	0,4 2,1	– 0,4	– 1,0
End. : Ver.	1 : 0,9 1 : 1,0	1 : 1,0	1 : 0,7 1 : 1,0	1 : 0,7 1 : 1,4	1 : 0,7 1 : 1,7
Ara : Gal	1 : 1,1 1 : 1,4	1 : 1,3	1 : 1,8 1 : 2,4	1 : 1,5 1 : 3,0	1 : 1,5 1 : 3,9

Terminale GlcAp konnte in allen Farn-AGPs identifiziert werden, nicht jedoch im *Lycopodium*-AGP (siehe auch V.5.4). Andere Glukuronsäuren, als die terminale, wurden nicht detektiert.

Generell unterschieden sich die AGPs der Monilophyten von dem des *Lycopodiums* auch in Hinsicht auf die weiteren terminalen Gruppen. Da die freien Hydroxylgruppen der Polysaccharide während der hier angewendeten Methode methyliert wurden, war eine Differenzierung zwischen der terminalen Rhap und terminalen 3-O-Me-Rhap nicht möglich. Möglich wäre eine Abschätzung des Verhältnisses von 3-O-Me-Rha zu Rha über die Acetylierungsanalyse (Tabelle 8). Die vier Monilophyten-AGPs enthielten terminale 3-O-Me-Rhap und Rhap (zusammen: t-(3-O-Me-)Rhap) in größter Menge in *Osmunda* (Ø 6,8 %) und in geringerer in *Equisetum*, *Dryopteris* und *Pteridium* (Ø 2,6 – 3,4 %). Im *Lycopodium*-AGP war dieser ungewöhnliche Zuckerbaustein nicht vorzufinden, dafür wurde interessanterweise eine hohe Konzentration an terminaler Arap (15,0 bzw. 13,4 %, Abbildung 25) detektiert, welche mittels der Hauptfragmente 117, gefolgt von 101, 161, 87, 58, 118, 71 und 59 des PMAA-Massenspektrums identifiziert wurde. Somit war Arap ein wichtiges terminales Monosaccharid dieses AGP.

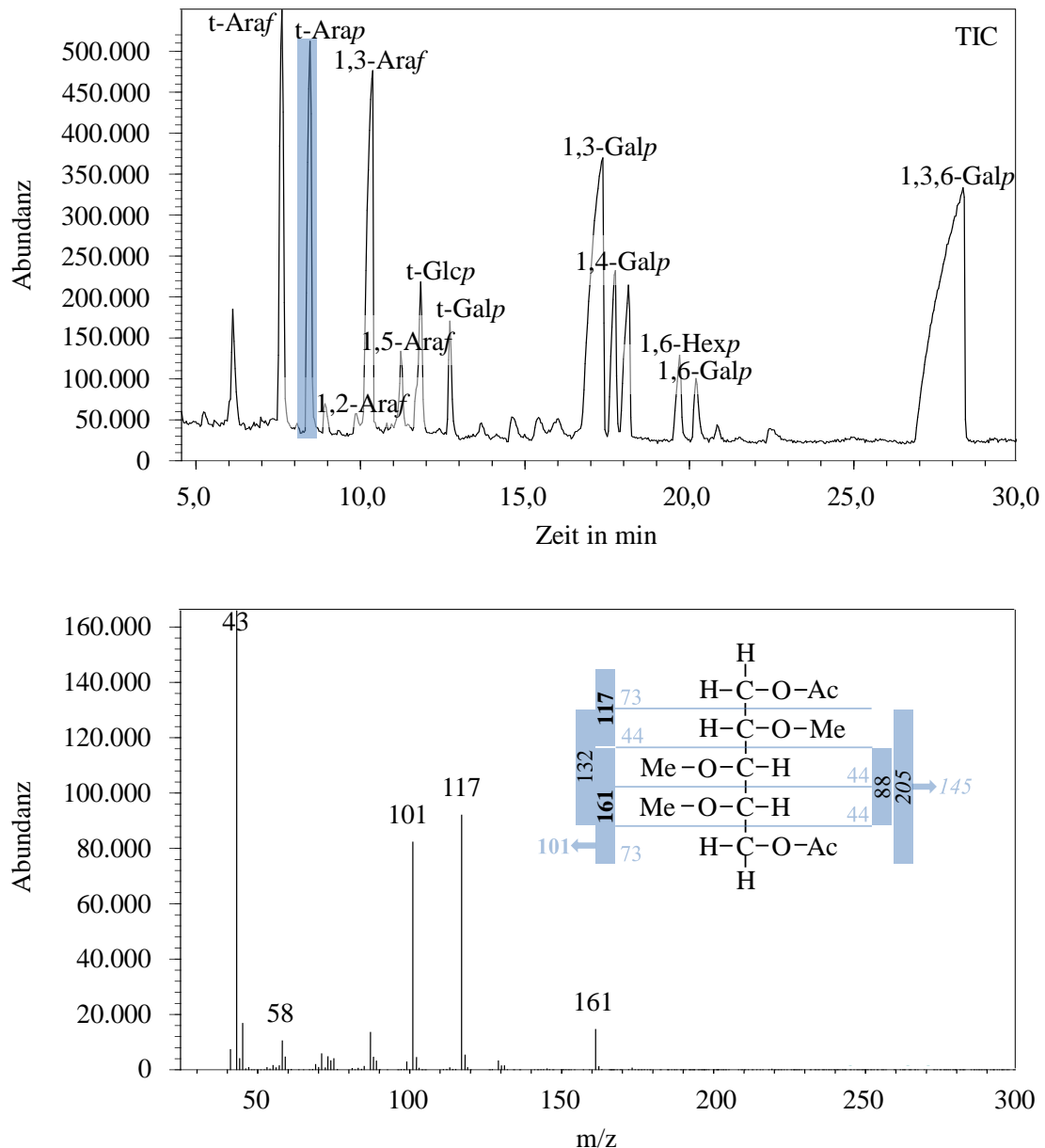


Abbildung 25: Totalionenchromatogramm des uronsäurereduzierten *Lycopodium*-AGP (oben), sowie Massenspektrum des Fragmentierungsmusters der *t-Arap* (unten)

Normalerweise sollten sich die Ergebnisse für native und uronsäurereduzierte AGPs kaum unterscheiden, da bereits gezeigt wurde, dass die AGPs nur geringe Mengen an Glukuronsäure aufwiesen. Größtenteils hatten die in den nativen und uronsäurereduzierten AGPs erhaltenen Mengen der unterschiedlich verknüpften Monosaccharide dieselbe Größenordnung, in gewissen Punkten hoben sie sich aber voneinander ab, wie z.B. in den Gehalten der 1,3,6-Galp in *Osmunda* und *Pteridium*, 1,4-Galp in *Dryopteris*, terminale Galp in *Dryopteris* und *Pteridium* sowie 1,2-Hexp, die in allen uronsäurereduzierten Proben in Spuren und in den Nativen überhaupt nicht

nachgewiesen wurde (Abbildung 26). Auffällig war auch der deutlich geringere Ara-f-Gehalt der uronsäurereduzierten AGPs der leptosporangiaten Farne. Dort könnten leichtflüchtige Monosaccharide während der Analyse zu stark abgedampft und somit verloren gegangen sein. Ansonsten handelte es sich vermutlich um Schwankungen innerhalb der Analyse, sodass die Daten tendenziell trotzdem vergleichbar waren.

Die verschiedenen Arten wiesen Unterschiede zwischen den Ara/Gal-Verhältnissen auf. Während das Verhältnis für *Lycopodium* und *Equisetum* durchschnittlich 1:1,3 betrug, war es für die leptosporangiaten Farne mit 1:2,1 – 1:2,7 deutlich anders.

Die Verhältnisse von End- zu Verzweigungsgruppen der nativen AGPs lagen bei 1:0,7 – 1:0,9 und zeigten somit, dass die AGPs leicht untermethyliert waren. Für die uronsäurereduzierten AGPs traten Verhältnisse von 1:1,0 bis 1:1,7 auf. Dabei wiesen nur die uronsäurereduzierten AGPs der leptosporangiaten Farne *Osmunda* und *Pteridium* verhältnismäßig höhere Mengen an Endgruppen auf, sodass damit der Verlust an leichtflüchtiger, terminaler Ara-f in diesen AGPs bestätigt wurde.

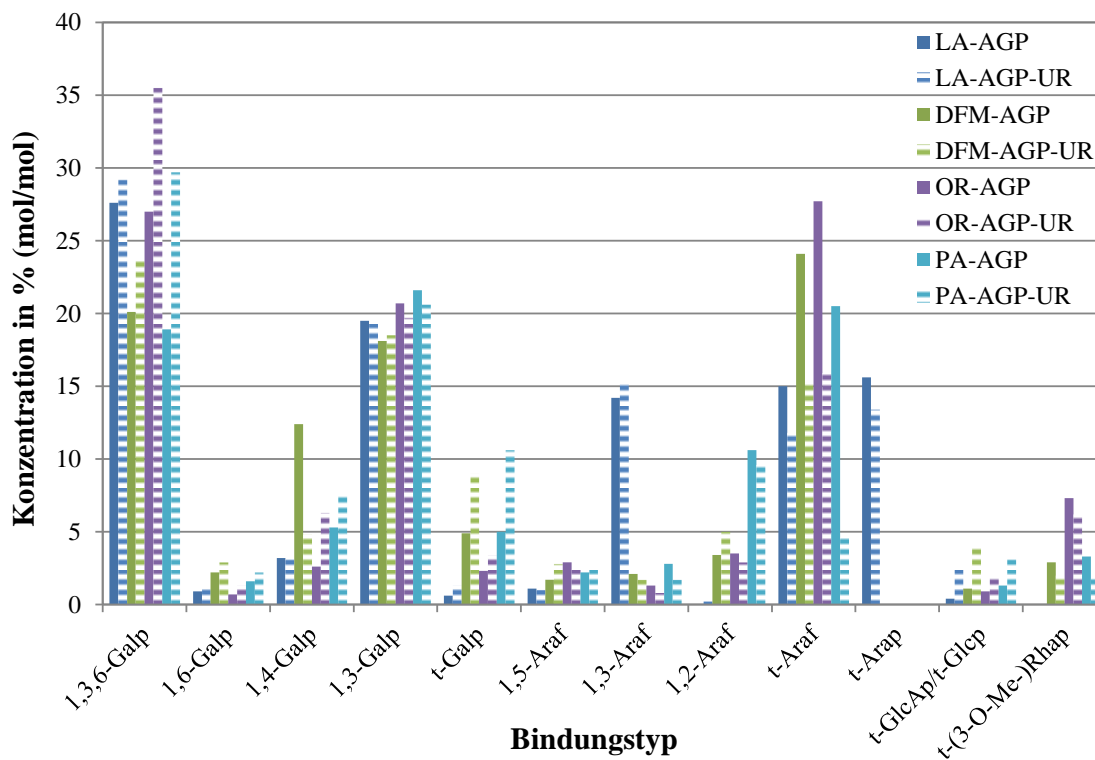


Abbildung 26: Vergleich der Verteilung der Bindungstypen der nativen und uronsäurereduzierten (UR) AGPs (*Equisetum* ausgenommen)

LA = *Lycopodium annotinum*, DFM = *Dryopteris filix-mas*, OR = *Osmunda regalis* und PA = *Pteridium aquilinum*

Bei den, vor der Methylierung, Smith-degradierten Proben wurden die Zucker mit vicinalen OH-Gruppen abgespalten. Dadurch ergaben sich bei der Methylierung andere Bindungstypenverteilungen (Tabelle 17). Diese resultierten daraus, dass bei Abspaltung eines Zuckers mit vicinalen OH-Gruppen, der Anteil an Bindungstypen, an dem dieser Zucker gebunden war, abnahm und infolgedessen eine andere Verzweigung entstand. Typische Periodat-labile AGP-Bausteine sind u.a. *t-Araf*, *t-Arap*, *1,5-Araf*, *t-Galp*, *1,4-Galp*, *1,6-Galp*, während z.B. *3-O-Me-Rha*, *1,2-Araf*, *1,3-Araf*, *1,3-Galp* und *1,3,6-Galp* nicht gespalten werden.

Die Verteilungsveränderung des Kohlenhydrateils, mit Blickpunkt auf die Smith-degradierten AGPs, zeigte für Galaktose eine schwache Abnahme der *1,3,6-Galp* bei den leptosporangiaten Farnen, sowie einen fast vollständigen Verlust an *1,4-Galp* und eine starke Zunahme der *1,6-Galp* aller untersuchten Proben. Auch der terminale *Galp*-Gehalt war überall, außer bei *Lycopodium*, gestiegen. Dafür war bei *Lycopodium* und *Dryopteris* *1,3-Galp* stark erhöht und bei *Equisetum* und *Pteridium* nur leicht. Nahezu komplette Verluste bzw. deutliche Verringerungen der Arabinosebausteine *1,5-Araf*, *1,3-Araf* und *1,2-Araf* waren zu verzeichnen. Bei *Lycopodium* sank zwar der zuvor schon geringe Anteil an *1,5-Araf* nicht, dafür verringerte sich jedoch stark der zuvor hohe Anteil an *1,3-Araf*. Auch die terminale *Arap* des *Lycopodium*-AGP war durch die Smith-Degradierung komplett abgespalten worden. Die terminale *Araf* hingegen war hier und bei *Pteridium* erhöht, bei den anderen AGPs aber erniedrigt. Terminale (3-*O*-Me-)Rhap wurde selbst nicht abgespalten und blieb in seinem Anteil konstant. Terminale *Fucp* und *GlcAp/Glcp* wurden jedoch abgespalten, trotzdem wiesen die AGPs von *Osmunda* und *Pteridium* sogar höhere Mengen an *GlcAp/Glcp* als zuvor auf. Der Zuckerbaustein *1,3,4-Hexp* verschwand nahezu komplett und die zuvor noch nicht detektierte *1,4,6-Hexp* tauchte in Spuren bei *Dryopteris* und *Osmunda* auf. Andere Bausteine veränderten sich nur leicht und waren somit nicht erwähnenswert. In einem hochmolekularen Polysaccharid entspricht der Anteil der Verzweigungspunkte dem der Endgruppen. Bei der Betrachtung der Verhältnisse von Endgruppen zu Verzweigungspunkten fiel auf, dass das durchschnittliche Verhältnis bei den Monilophyten-AGPs fast ausgeglichen war (1:0,9) und beim *Lycopodium*-AGP der Schwerpunkt bei den Verzweigungspunkten lag, was auf das Fehlen von Endgruppen hindeutete.

Die hier ermittelten Ara/Gal-Verhältnisse stimmten tendenziell mit denen der Neutralzuckeranalyse überein, dennoch war die Abweichung bei *Equisetum* von 1:18,3 versus 1:13,2 (siehe V.5.1.4) relativ groß.

Tabelle 17: Bindungstypanalyse der Smith-degradierten AGP-Monosaccharide in % (mol/mol)

	<i>Lycopodium annotinum</i>	<i>Equisetum arvense</i>	<i>Dryopteris filix-mas</i>	<i>Osmunda regalis</i>	<i>Pteridium aquilinum</i>
	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014
1,3,6-Galp	31,6	27,1	21,2	25,9	25,0
1,6-Galp	9,4	19,4	14,0	18,5	13,6
1,4-Galp	–	–	–	–	0,9
1,3-Galp	31,1	21,1	28,9	20,2	23,2
t-Galp	1,2	16,9	14,8	16,1	16,4
1,5-Araf	1,1	–	0,7	0,5	–
1,3-Araf	1,7	–	0,7	–	–
1,2-Araf	–	–	1,3	0,6	4,6
t-Araf	19,0	4,6	8,9	4,4	6,6
t-GlcAp/t-Glcp	–	–	–	3,9	4,0
t-(3-O-Me-)Rhap	–	5,3	1,9	5,1	3,4
1,2-Hexp	–	1,6	–	–	–
1,3-Hexp	1,1	1,6	1,4	1,4	2,3
1,6-Hexp	3,8	2,4	1,2	2,3	–
1,3,4-Hexp	–	–	0,7	–	–
1,4,6-Hexp	–	–	0,6	0,7	–
1,3,4,6-Hexp	–	–	3,7	0,4	–
End. : Ver.	1 : 1,6	1 : 1,0	1 : 1,0	1 : 0,9	1 : 0,8
Ara : Gal	1 : 3,4	1 : 18,3	1 : 6,8	1 : 14,5	1 : 7,0

Anhand der Gegenüberstellung der Smith-degradierten mit den nativen und uronsäurereduzierten AGPs konnten Veränderungen der Polysaccharidstruktur herausgestellt werden (Abbildung 27).

Die nahezu konstant hohen Mengen an 1,3,6-Galp und 1,3-Galp, als auch deutlich erhöhte Werte der 1,6-Galp ließen auf ein, auch nach der Hydrolyse noch, stark verzweigtes Molekül schließen. Die Ara/Gal-Verhältnisse ließen eine stärkere Abspaltung der Arabinose im Vergleich zur Galaktose erkennen und bestärkten die Annahme, dass überwiegend Arabinosen an den Enden der AGP-Seitenketten vorzufinden waren.

Da keine Veränderung der 1,3,6-Galp-Verzweigungspunkte in *Lycopodium* und *Equisetum* beobachtet werden konnte, waren hier keine oder kaum Monosaccharide mit vicinalen Gruppen angehängt. Die überwiegend geringe Abnahme der 1,3,6-Galp in den leptosporangiaten AGPs lag dementsprechend an der geringen Menge von Monosacchariden mit vicinalen OH-Gruppen, die an diesen Verzweigungspunkt geknüpft waren. Wurde dort also das Periodat-labile Monosaccharid abgespalten, entstand wohlmöglich hauptsächlich 1,6-Galp und evtl. etwas 1,3-Galp. Da der Anteil von 1,3-Galp sich eher nicht veränderte oder stieg, lag auch hier die Vermutung nahe, dass keine oder kaum Monosaccharide mit vicinalen Gruppen daran gebunden waren. Die Zunahme der terminalen Gal in den Monilophyten resultierte wahrscheinlich aus der Abspaltung der wenigen Monosaccharide mit vicinalen OH-Gruppen, die theoretisch an 1,3-Galp oder auch 1,3,6-Galp geknüpft waren. Der vicinale Zuckerbaustein 1,4-Galp wurde komplett abgespalten, was eine Verkleinerung der Moleküle bedingte. Auch die Abtrennung von 1,5-Araf und terminalen Zuckern (v.a. Arabinosen) führten zur Verkleinerung der Moleküle. Die Anteile an t-Araf in den Smith-degradierten Proben entstanden vermutlich aus 1,2-Araf und 1,3-Araf, an denen vicinale Gruppen, wie z.B. terminale Arabinose, gebunden waren. Daher war bei *Lycopodium*, welches zuvor durch vergleichsweise viel 1,3-Araf auffiel, weiterhin ein hoher Wert an Araf zu verzeichnen und sogar höher als im intakten AGP. Gleiches traf auf das *Pteridium*-AGP zu, für dessen intakte AGPs viel 1,2-Araf charakteristisch war. (3-O-Me-)Rhap veränderte sich nicht und war deshalb eher an nicht spaltbare Gruppen gebunden. 1,4,6-Hexp wurde vermutlich aus 1,3,4,6-Hexp gebildet, wenn dort Periodat-labile Monosaccharide abgespalten wurden.

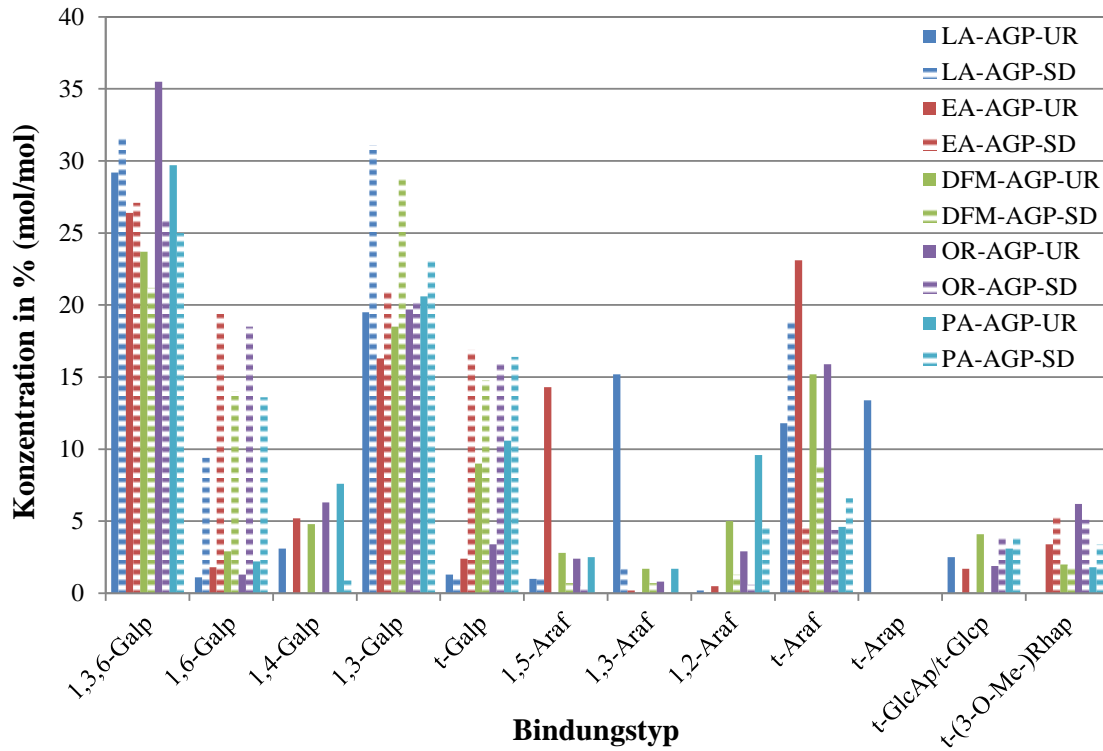


Abbildung 27: Vergleich der Verteilung der Bindungstypen der uronsäurereduzierten (UR) und Smith-degradierten (SD) AGPs

LA = *Lycopodium annotinum*, EA = *Equisetum arvense*, DFM = *Dryopteris filix-mas*, OR = *Osmunda regalis* und PA = *Pteridium aquilinum*

5.6 IR-Messung zur Strukturaufklärung

Die verwendete ATR-IR-Spektroskopie, eine Messtechnik der Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie) für die keine Probenvorbereitung notwendig ist, da die Intensität des durch die Probe reflektierten Lichtes gemessen wird und somit Rückschlüsse über das absorbierende Medium möglich sind, zeigte IR-Spektren in denen die Transmission abhängig von den gemessenen Wellenlängen dargestellt wurde.

Die Transmissionsbanden, die sich aus den IR-Spektren der untersuchten AGPs ergaben (Abbildung 28), wurden, soweit möglich, mit Hilfe der Veröffentlichungen von (KACURÁKOVÁ *et al.*, 2000; CAPEK *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2009; CAPEK *et al.*, 2014) typischen funktionellen Gruppen der AGPs zugeordnet (Tabelle 18).

Es waren in den mittels IR untersuchten Proben die für Kohlenhydrate und Aminosäuren typischen Gruppen vorhanden. Die Polysaccharidbande der OH-Gruppe trat bei ca. 3300 cm^{-1} auf, die der CH_3 - oder CH_2 -Gruppen bei ca. 2900 cm^{-1} und die der C–O–H und C–O–C im Bereich von ca. $1200 - 800\text{ cm}^{-1}$. Aufgrund der unterschiedlichen Feinstrukturen der AGPs im Kohlenhydratanteil variierte vor allem der Bereich des Kohlenhydrats zwischen $1200 - 800\text{ cm}^{-1}$. Dabei zeigten sich i.d.R. maximale Intensitäten bei ca. 1020 cm^{-1} , dicht gefolgt von Peak-Maxima bei etwa 1070 bzw. 1100 cm^{-1} bei *Dryopteris*. Die Proteinbanden der primären Amide lagen zwischen $1700 - 1600\text{ cm}^{-1}$ mit dem stärksten Signal bei durchschnittlich 1634 cm^{-1} , die der sekundären zwischen $1600 - 1450\text{ cm}^{-1}$ und die der tertiären reichten von etwa $1450 - 1200\text{ cm}^{-1}$ mit dem größten Peak bei ca. 1380 cm^{-1} und bei *Lycopodium* bei 1340 cm^{-1} . Teilweise konnte den funktionellen Gruppen der Tabelle 18 keine Wellenlängenangaben zugeordnet werden, weil in den entsprechenden IR-Spektren keine Peak-Maxima zu sehen waren. Allerdings deutete das nicht auf ein Fehlen dieser Gruppen hin, da oft die gesamte Region eine IR-Bande ohne entsprechende Maxima zeigte. Die Signale unterhalb von 800 cm^{-1} waren für aromatische oder ringförmige C–H Bindungen charakteristisch.

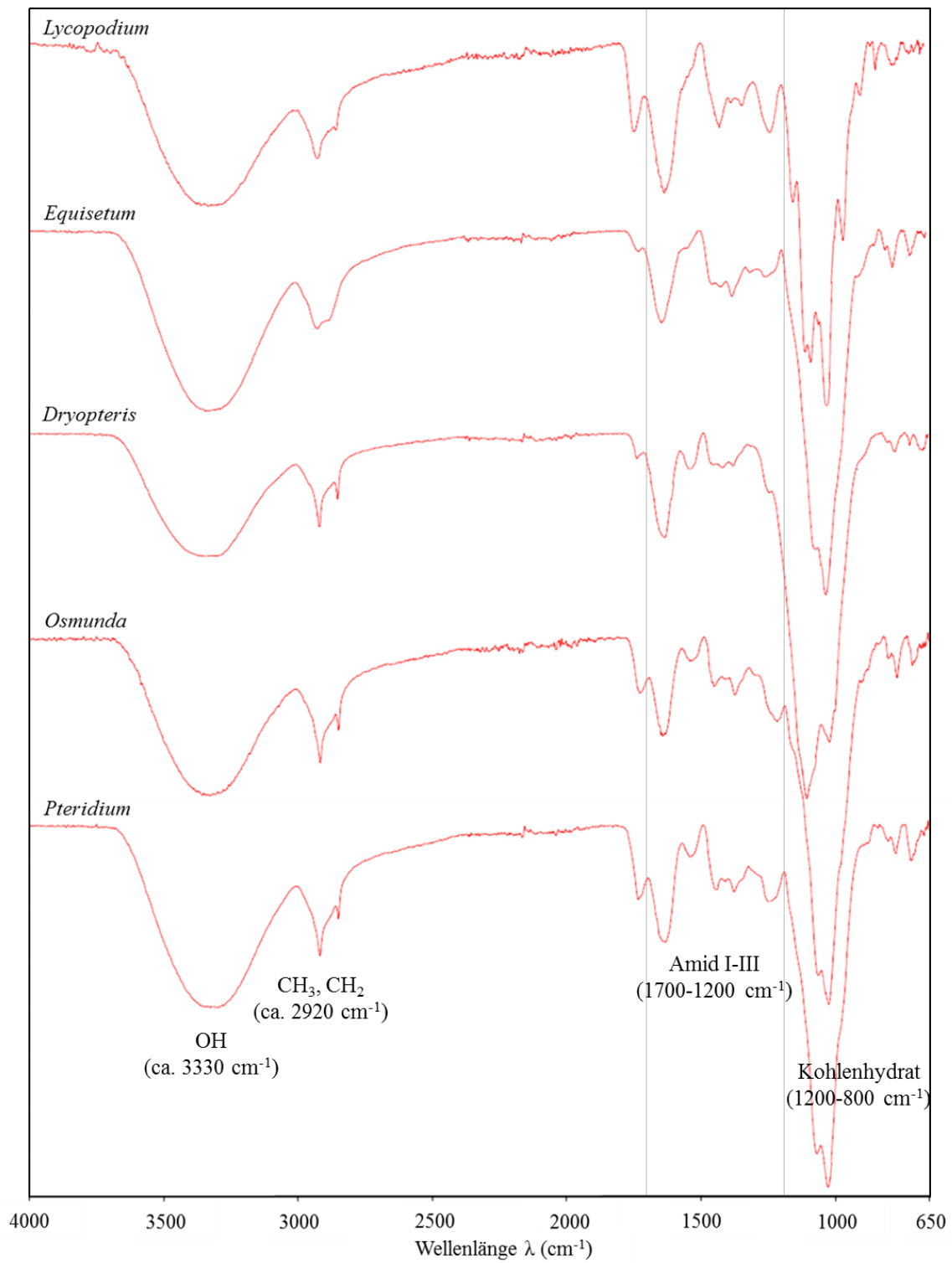


Abbildung 28: IR-Messung der AGPs vom Sommer 2013

Tabelle 18: Gruppenzuordnung von Peaks (in cm^{-1}) der IR-Messung

	<i>Lycopodium annotinum</i>	<i>Equisetum arvense</i>	<i>Dryopteris filix-mas</i>	<i>Osmunda regalis</i>	<i>Pteridium aquilinum</i>
	Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013
PS: O–H ⁺	3331	3344	3348	3327	3298
PS: C–H ⁺	2922	2923	2920	2919	2919
	2850	2880	2851	2850	2850
Ester/Lacton [°]	1739	1730	1750	1730	1733
Amid I: C=O ⁺	1623	1638	1631	1645	1631
Amid II: N–H ⁺	–	1545	1537	1545	1545
Amid III: C–N ⁺	1417	1420	1417	1420	1420
	1380	1376	1390	1380	1376
Amid III ⁺	1340	–	–	–	–
Amid III: C–C ⁺	1227	1260	1260	1230	1244
glc. Galp ^{×+}	1150	–	–	–	–
C–O–H ⁺	1100	–	1102	–	–
Galp ^{×°+} (Hauptkette)	1075	1070	–	1070	1070
Araf ^{×°+} (Seitenkette)	1050	–	–	–	–
C–O–C/H ⁺	1013	1024	1019	1029	1027
	954	–	–	–	–
β -glc. Bindg. ^{×°}	900	910	910	910	880
α -glc. Bindg. [×]	825	810	820	800	830
	770	776	775	775	775
	–	711	740	730	719

[×] Kacuráková *et al.* (2000), [°] Capek *et al.* (2009 & 2014) & ⁺ Zhou *et al.* (2009);

1200 – 800 cm^{-1} Kohlenhydrat, glykosidische Bindung (glc. Bindg.)

6. Strukturaufklärende Analytik der AGPs:

Charakterisierung des Proteinanteils

6.1 Photometrische Quantifizierung des Hydroxyprolin-Anteils

Nachdem Hydroxyprolin zuvor selektiv mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd umgesetzt wurde, wurde dessen Extinktion photometrisch gemessen. Aufgrund dieser Messungen konnten die Hyp-Gehalte der AGPs ermittelt werden und wiesen abhängig von der Art und teilweise dem Erntezeitpunkt Absolutwerte zwischen 0,3 % (m/m) und 1,1 % (m/m) auf. Es handelte sich dabei um Mehrfachbestimmungen von $n > 1$ mit überwiegend sehr kleinen Standardabweichungen von 0,004 bis 0,177, weshalb sie hier nicht im Einzelnen aufgeführt wurden. Die höchsten Hyp-Werte zeigten die AGPs aus *Equisetum* (Sommer 2013 & Sommer 2014) mit 1,12 % und 1,09 % und auch die AGPs aus *Lycopodium* (Sommer 2014 & Sommer 2015) mit 0,88 % und 0,99 %. In den Sommerernten der Jahre 2013 und 2014 enthielten die leptosporangiaten Farne *Dryopteris*, *Osmunda* und *Pteridium* geringere Mengen an Hyp von 0,28 % bzw. 0,45 %, 0,66 % bzw. 0,45 % und 0,58 % bzw. 0,40 %. Wenn der Hyp-Anteil von AGPs mit ca. 10 % des Proteins angenommen werden würde, würden die theoretischen Proteingehalte bei 3 – 11 % liegen. Da es sich dabei nur um einen geschätzten Hyp-Anteil handelt, wurden die genauen Werte mittels Aminosäureanalytik bestimmt.

6.2 Aminosäureanalytik mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Durch die HPLC-Messung wurden die verschiedenen Aminosäuren aufgetrennt, mit Ninhydrin umgesetzt, identifiziert und quantitativ bestimmt (Tabelle 19). Aufgrund der Hydrolyse mit HCl konnte jedoch nicht zwischen Glutamin und Glutaminsäure, sowie zwischen Asparagin und dessen Säure unterschieden werden. Sie wurden daher als Glx bzw. Asx zusammengefasst. In den Kern-Proteinen der AGPs dominierende Aminosäuren mit Anteilen um die 10 % waren Glx und Asx, dicht gefolgt von Threonin, Serin und Leucin. Im Proteinteil des *Lycopodium*-AGP allerdings dominierte die Aminosäure Lysin (10,8 %). Auch Hydroxyprolin, die normalerweise für die Bindung zwischen Polysaccharidketten und Protein verantwortliche Aminosäure, und Alanin waren mengenmäßig stark vertreten. Vor allem im AGP des eusporangiaten Farns *Equisetum* war der Gehalt an Hydroxyprolin überdurchschnittlich hoch (15,9 %), wohingegen er in den anderen vier untersuchten AGPs niedriger war (3,8 – 6,1 %).

Tabelle 19: Aminosäurezusammensetzung der AGPs in % (m/m)

	<i>Lycopodium annotinum</i>	<i>Equisetum arvense</i>	<i>Dryopteris filix-mas</i>	<i>Osmunda regalis</i>	<i>Pteridium aquilinum</i>
	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014
Glx	8,2	10,0	8,8	9,9	12,4
Asx	8,4	8,5	10,0	9,6	12,1
Thr	7,8	9,4	9,0	8,6	8,9
Ser	6,8	10,8	7,9	7,4	8,8
Leu	8,0	6,7	8,8	8,8	8,0
Hyp	5,3	15,9	3,8	5,3	6,1
Ala	5,5	9,1	6,1	7,4	7,9
Val	6,5	6,1	6,6	6,3	6,7
Lys	10,8	2,8	4,5	6,2	3,3
Gly	4,6	5,3	5,3	5,8	6,0
Phe	5,2	2,5	6,0	5,3	4,5
Pro	4,2	4,4	4,7	4,4	3,7
Ile	4,7	2,7	5,0	4,5	3,6
Tyr	3,7	2,4	6,0	3,6	3,2
Arg	6,7	0,8	4,1	3,7	2,4
Met	1,1	1,3	1,4	1,4	1,3
His	1,8	0,7	1,0	0,9	0,0
andere	0,7	0,6	1,0	0,9	1,1

7. Elementaranalyse

Durch die Kombination der gaschromatographischen Untersuchung im Anschluss an die Verbrennungsanalyse konnten die im AGP enthaltenen Elemente Stickstoff, Kohlenstoff, Wasserstoff und Schwefel nach Auftrennung identifiziert und quantifiziert werden.

Es wurden die Monilophyten-AGPs des Sommers 2013 vermessen und im Fall von *Lycopodium*-AGP die der Sommer 2014 & 2015. Bedingt durch die relativ großen Polysaccharidmengen der AGPs lieferte die Elementaranalyse für Kohlenstoff Werte um 37,7 % (30,0 – 41,7 %) (m/m) und für Wasserstoff um 5,2 % (3,2 – 6,3 %) (m/m). Umgerechnet in % (mol/mol) ergab sich ein für Kohlenhydrate typisches molares C/H-Verhältnis von etwa 1:2. Der Stickstoffanteil für *Lycopodium* von 2,7 % und 2,8 % (m/m) und der für die Monilophyten-AGPs von durchschnittlich ca. 1,5 % (1,0 % für *Equisetum*-AGP, 2,0 % für *Dryopteris*-AGP, 1,6 % für *Osmunda*-AGP und 1,3 % für *Pteridium*-AGP) (m/m) wurde durch die Aminogruppen aller Aminosäuren und die auch in den AGPs vorkommenden Aminosäuren Arginin, Lysin, Histidin, Glutamin und Asparagin bedingt. Der im Durchschnitt mit 3,6 % (m/m) relativ niedrige Gehalt an Schwefel wurde durch die Aminosäure Cystein, die in Anteilen von nur durchschnittlich 0,2 % im Protein vorkam und deswegen unter „andere“ (Tabelle 19) mit aufgeführt wurde, verursacht. Wahrscheinlich waren auch Reste von Natriumdithionit, das während der AGP-Isolierung verwendet wurde, nicht vollständig abgetrennt und riefen damit zusätzlich einen höheren Schwefelgehalt hervor. Dies traf besonders auf das *Dryopteris*-AGP des Sommers 2013 zu, da dort ein hoher Gehalt an Schwefel (10,6 %) in Kombination mit einer geringen Kohlenhydrat-Ausbeute (25,7 %, Tabelle 8) bzw. einem geringen Kohlenstoff-Gehalt (30,0 %) vorzufinden war.

8. Proteingehalt

Mit Hilfe verschiedener Methoden konnte der jeweilige AGP-Proteingehalt (Tabelle 20) ermittelt werden. Aus dem Stickstoffgehalt der Elementaranalyse ergaben sich für die AGPs der Monilophyten nach Kjeldahl Proteingehalte von 6,4 – 12,3 %. Das *Lycopodium*-AGP zeigte einen untypisch hohen Proteinwert von 16,8 % bzw. 17,3 % für die Sommerernten 2014 und 2015. Zum anderen konnte der Proteingehalt für die Sommerernten 2014 kalkuliert werden, indem die absoluten Hyp-Mengen der photometrischen Methode mit den mittels Aminosäureanalytik ermittelten relativen Hyp-Gehalten kombiniert wurden. Daraus resultierten vergleichbare Werte von 6,6 – 11,8 % für die AGPs der Monilophyten und 16,6 % für das AGP aus *Lycopodium*.

Die Ergebnisse beider Wege führten innerhalb einer Art zu sehr ähnlichen Ergebnissen, obwohl es sich um verschiedene Erntezeitpunkte handelte. Handelte es sich um denselben Erntezeitpunkt, wie beim *Lycopodium*-AGP des Sommer 2014, waren die Werte sogar fast identisch (s.o) und bestätigten den hohen Proteingehalt dieses AGPs.

Tabelle 20: Proteingehalte der AGPs in % (m/m)*

	<i>Lycopodium annotinum</i>	<i>Equisetum arvense</i>	<i>Dryopteris filix-mas</i>	<i>Osmunda regalis</i>	<i>Pteridium aquilinum</i>
	Sommer 2015	Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013	Sommer 2013
	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014	Sommer 2014
Proteingehalt	17,3	6,4	12,3	9,9	8,3
	16,6	6,9	11,8	8,5	6,6

*Sommer 2013 bzw. 2015: aus Elementaranalyse; Sommer 2014: absoluter Hyp-Gehalt (photometrisch) in Kombination mit relativem Hyp-Gehalt aus Aminosäureanalyse

9. Gelpermeationschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie ermöglicht es Makromoleküle wie z.B. Polysaccharide und Proteine nach der Molekülgröße bzw. dem hydrodynamischen Volumen zu trennen. Die stationäre Phase besteht aus porösen Polymeren mit definierten Porengrößen (siehe IV.9), in die niedermolekulare Moleküle stärker eindringen als hochmolekulare, die somit länger auf der Säule zurückgehalten werden und erst später mit der mobilen Phase eluiert werden. Durch die unterschiedliche Retention kommt es zur Auftrennung von Molekülen mit unterschiedlichem hydrodynamischen Volumina. Das

hydrodynamische Volumen ist u.a. abhängig von Molekulargewicht, Ladung, Hydratisierung, Bindungstyp und Verzweigungsgrad, wodurch eine Aussage über das relative Molekulargewicht z.T. nur bedingt möglich ist. Allerdings kann die Größenordnung des hydrodynamischen Volumens eluierender Moleküle anhand geeigneter Standards mittels konzentrationsabhängigem RI-Detektor bestimmt werden. Dazu wird eine Kalibrierungsreihe von Molekülen mit bekanntem Molekulargewicht erstellt. Wichtig ist dabei möglichst einen Standard zu wählen, der von der räumlichen Anordnung her dem der Probensubstanz ähnelt, da sich globuläre Moleküle anders verhalten als lineare, auch wenn sie das gleiche absolute Molekulargewicht aufweisen. Über den Vergleich der Retentionszeiten der Proben mit denen der Standards können dann Rückschlüsse auf das hydrodynamische Volumen der Proben gezogen werden.

Der MALLS-Detektor (massenselektiver Detektor, ohne Kalibrierung verwendbar) erfasst zusätzlich die absolute Molekülmasse dieser eluierenden Moleküle. Durch Kombination dieser beiden Detektoren kann das absolute Molekulargewicht bestimmen werden. Dafür werden die Daten des MALLS-Detektors, der über mehrere Winkel das Streulicht in Abhängigkeit von der Molekülgröße und -form erfasst, für die Auswertung mit der quantitativen Verteilung der Signale des RI-Detektors ergänzt.

Kleinere Moleküle (unter 1000 Da) können vom MALLS-Detektor jedoch aufgrund von Messunsicherheiten in diesem Bereich nicht mehr richtig erfasst werden.

Im Anschluss an die Größenausschlusschromatographie folgte zur Massenbestimmung der AGPs auch die kombinierte Detektion mit dem MALLS und dem RI und offenbarte Hauptfraktionen mit absoluten Molekulargewichten von 139, 120, 173, 93 und 123 kDa für die nativen AGPs (Durchschnittswerte der Sommer 2013, 2014 und 2015) von *Lycopodium*, *Equisetum*, *Dryopteris*, *Osmunda* und *Pteridium* (Abbildung 29; Tabelle 21). Die absoluten Molekulargewichte der verschiedenen Erntezeitpunkte waren dabei für die jeweilige Art sehr ähnlich.

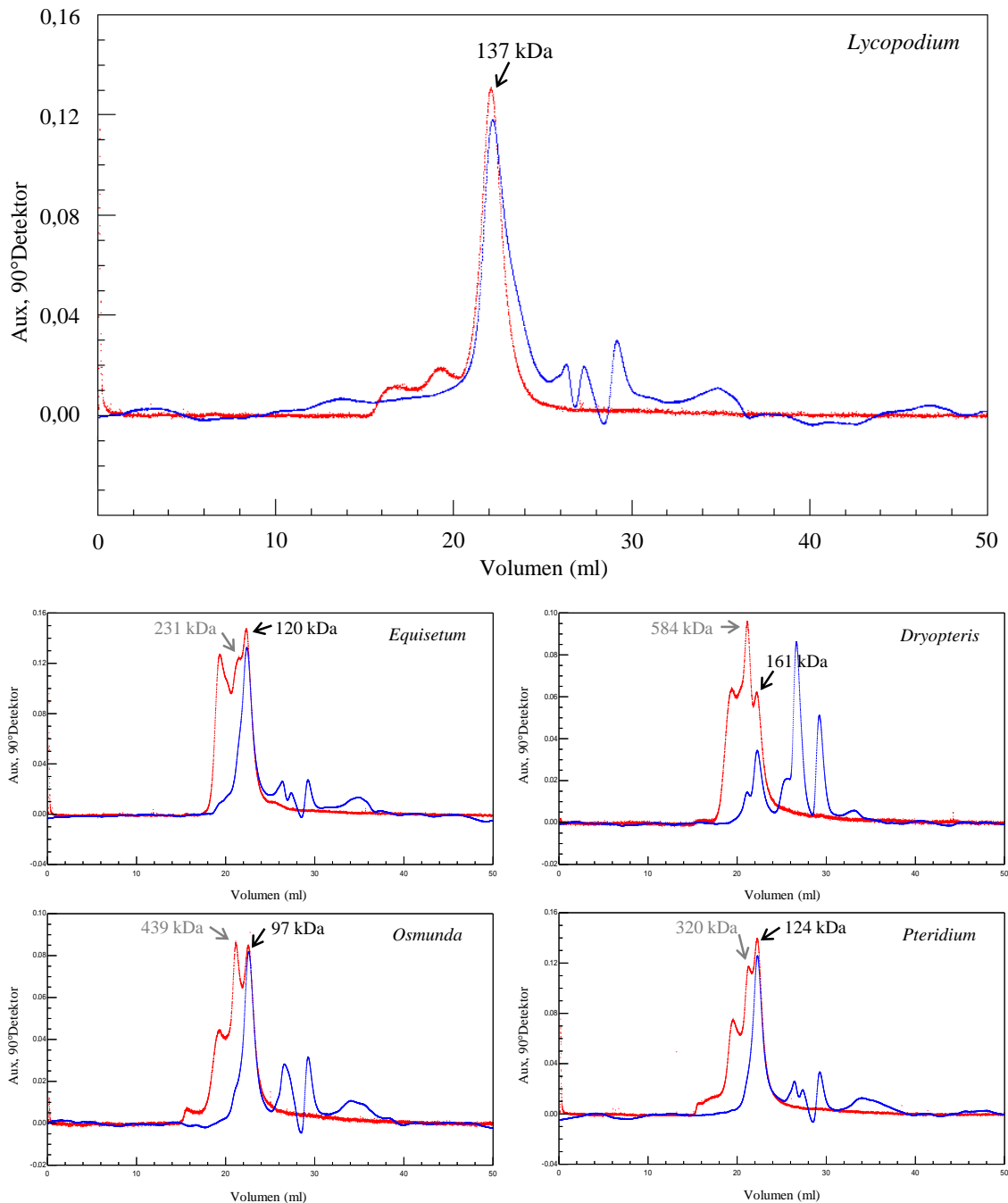


Abbildung 29: GPC-Chromatogramme der nativen AGPs aus der Sommerernte 2013

rot: Signal des MALLS & blau: Signal des RI-Detektors

Neben diesen Hauptfraktionen waren oftmals auch kleine Mengen von Aggregaten mit Molekulargewichten von über 1×10^6 Da zu finden. *Dryopteris*, *Osmunda* und *Pteridium* wiesen zudem auch Nebenfraktionen geringerer Konzentration von 584 kDa, 439 kDa und 320 kDa im Sommer 2013 (siehe Abbildung 29) und 579 kDa, 258 kDa und 296 kDa im Sommer 2014 auf.

Die Nebenfraktionen der jeweiligen Art waren nicht so vergleichbar, wie die Hauptfraktionen, v.a. die Beiden des *Pteridium*-AGP waren sehr unterschiedlich. Auch beim *Equisetum*-AGP war im Sommer 2013 eine Nebenfraktion mit 231 kDa zu sehen. Um die Mengen der einzelnen Fraktionen abzuschätzen, wurde das konzentrationsabhängige RI-Signal zur Auswertung herangezogen, da der MALLS-Detektor unabhängig von der Konzentration größere Moleküle besser detektiert und kleinere zum Teil sogar gar nicht. So wurden in den GPC-Chromatogrammen mittels RI auch bei größeren Retentionsvolumen kleinere Moleküle unterschiedlich hoher Konzentration beobachtet, bei denen es sich vermutlich um Salzpeaks des Fließmittels oder Verunreinigungen der AGPs mit anderen Stoffen, wie oligomere Zucker oder Gerbstoffe, handelte. Ihre Molekulargewichte ließen sich allerdings nicht exakt bestimmen, da die ermittelten Werte sehr stark schwankten und auch die Wahrscheinlichkeiten ihrer Korrektheit ziemlich gering waren. Wie oben bereits erwähnt, ist dies auf die Ungenauigkeit der Messungen des MALLS-Detektors im niedermolekularen Bereich zurückzuführen. Bei *Dryopteris* aus dem Sommer 2013 ließ sich erkennen, dass diese niedermolekularen Fraktionen etwas höhere Konzentrationen als die der Anderen aufwiesen, was durch die geringe Zuckerausbeute bestätigt wurde (siehe Tabelle 8).

Des Weiteren wurde, wie oben beschrieben, die RI-Detektion unter Zuhilfenahme von Pullulanstandards genutzt, um die hydrodynamischen Volumina der AGPs zu bestimmen. Die Hauptfraktionen dieser nativen AGPs wiesen im Vergleich zu den absoluten Molekulargewichten viel kleinere durchschnittliche hydrodynamische Volumina auf und zwar: 67 kDa für *Lycopodium* und *Dryopteris*, 62 kDa für *Equisetum*, 50 kDa für *Osmunda* und 65 kDa für *Pteridium* (Abbildung 30). Damit war das hydrodynamische Volumen etwa nur halb so groß wie das absolute Molekulargewicht. Auch hier waren die Werte der verschiedenen Erntezeitpunkte für die jeweilige Art sehr ähnlich.

Aus den Ergebnissen der absoluten Molekulargewichte im Vergleich zu ihren kleinen hydrodynamischen Volumen ließ sich schlussfolgern, dass alle untersuchten AGPs eine große Masse in einem kleinen Volumen aufwiesen, also eine stark verzweigte Struktur hatten.

Teilweise war dieser Unterschied auch durch die unterschiedlichen räumlichen Strukturen der linearen Pullulane und der verzweigten AGPs bedingt. Trotz dieser Diskrepanz kann das "wattle-blossom" Modell (FINCHER *et al.*, 1983) dennoch ein passender Strukturvorschlag für die untersuchten AGPs sein.

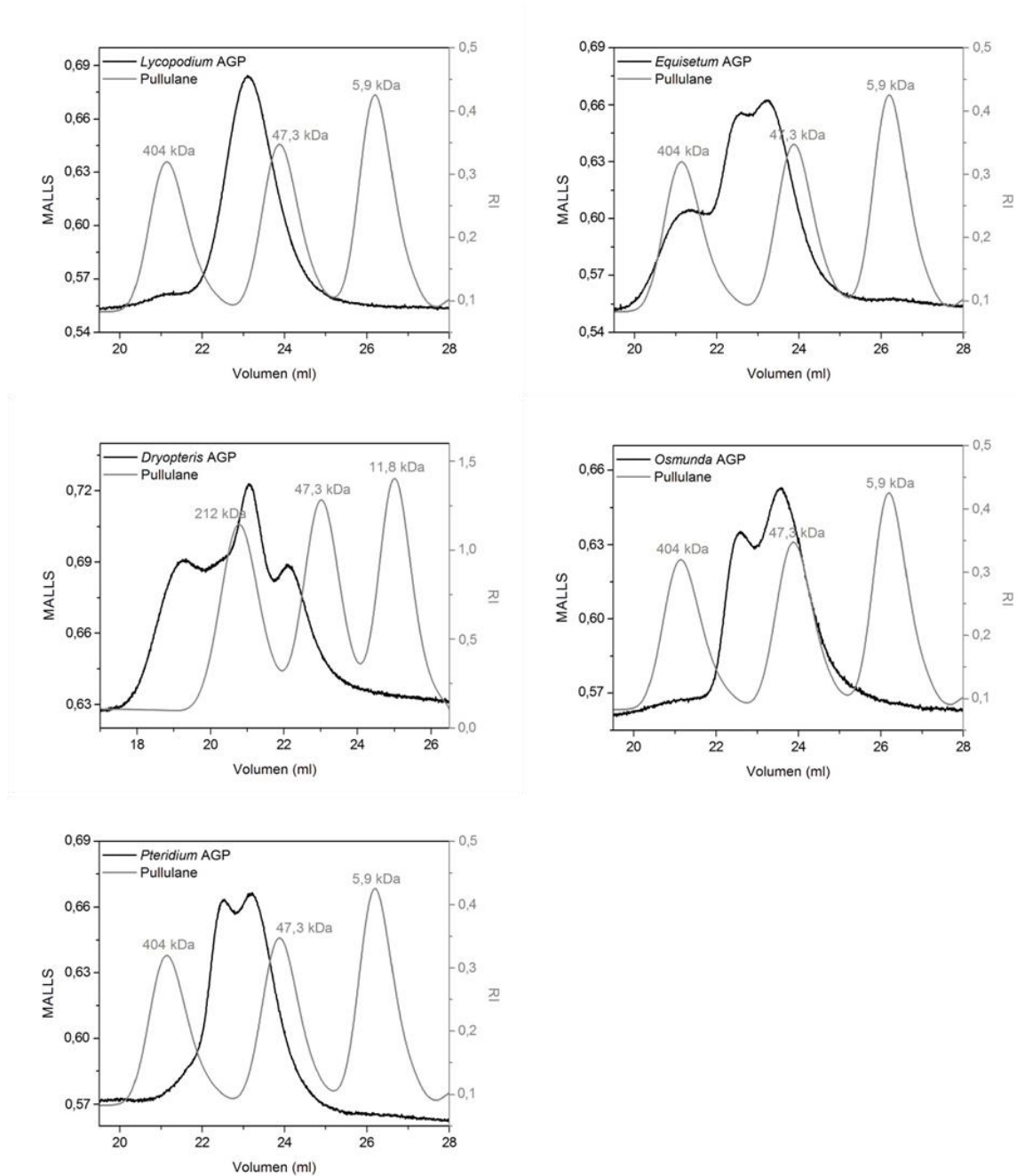


Abbildung 30: Ausschnitte der MALLS-Signale der AGPs im Vergleich zu den RI-Signalen der Pullulane

Lycopodium, *Equisetum*, *Osmunda* und *Pteridium* aus der Sommerernte 2014;
Dryopteris aus der Sommerernte 2013

Die uronsäurereduzierten, alkalisch hydrolysierten bzw. Smith-degradierten AGPs wiesen ebenfalls immer größere absolute Molekulargewichte als hydrodynamische Volumina auf (Tabelle 21). Allerdings war i.d.R. die Differenz bei den Smith-degradierten AGPs nicht mehr ganz so groß, wie die bei den nativen AGPs. Die unterschiedlich behandelten AGPs waren also weiterhin verzweigt, obwohl die Moleküle durch Abspaltung bestimmter

Monosaccharide kleiner wurden. Das absolute Molekulargewicht der uronsäurereduzierten AGPs nahm nur leicht ab, da hier die Moleküle nicht gespalten, sondern nur die Uronsäuren zu den entsprechenden Neutralzuckern reduziert wurden. Wie erwartet, war die Abnahme der Molekulargewichte bei den alkalisch hydrolysierten und Smith-degradierten AGPs stärker. Nach der alkalischen Hydrolyse des Proteinteils der AGPs zeigten sich zwei Hauptfraktionen. Eine Fraktion (68 – 126 kDa), deren absolutes Molekulargewicht sich im Vergleich zu dem entsprechenden nativen AGPs um durchschnittlich 25,4 % (11,3 – 40,8 %) verringerte, und eine weitere (13 – 23 kDa), deren absolutes Molekulargewicht um durchschnittlich 87,2 % (83,2 – 90,8 %) sank. Die Abnahme des absoluten Molekulargewichtes der Smith-degradierten AGPs ist durch den Abbau Periodat-labiler Monosaccharide bedingt und reichte von 46,1 % bis 78,2 % (durchschnittlich: 55,6 %). Das Smith-degradierte AGP des *Dryopteris* wies zudem eine weitere kleinere Fraktion mit einem absoluten Molekulargewicht von 11 kDa auf.

Tabelle 21: Vergleich der Molekulargewichte der unterschiedlich behandelten AGPs in kDa

	<i>Lycopodium annotinum</i>		<i>Equisetum arvense</i>		<i>Dryopteris filix-mas</i>		<i>Osmunda regalis</i>		<i>Pteridium aquilinum</i>	
	abs. MW	hydr. Vol.	abs. MW	hydr. Vol.	abs. MW	hydr. Vol.	abs. MW	hydr. Vol.	abs. MW	hydr. Vol.
nativ										
Sommer 2013	137	68	120	60	161	68	97	51	124	65
nativ										
Sommer 2014	142	66	119	63	184	65	89	48	122	64
nativ										
Sommer 2015	138	67	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
UR										
Sommer 2014	127	59	108	55	179	57	81	44	107	55
AH										
Sommer 2014	126	52	87	51	109	57	68	41	92	50
	23	9	20	11	17	7	13	4	14	6
SD										
Sommer 2014	31	20	56	39	86	46	48	29	64	19
					11	5				

Abs. MW = absolutes Molekulargewicht; hydr. Vol. = hydrodynamisches Volumen;

UR = uronsäurereduziert; AH = alkalisch hydrolysiert; SD = Smith-degradiert & n.t. = nicht getestet

10. Mikroskopische Untersuchung der Sprossachsen

Für die Isolierung der AGPs wurde das oberirdische Material der untersuchten Pflanzen verwendet, welches die Sprossachsen oder Mittelrippen der Wedel (Achsenorgane) als Basis besitzen. Diese oberirdischen Organe sind in ihrer Form und Gestalt vielfältig. Im Inneren zeigt sich der Zentralzylinder mit Leitbündeln und evtl. Mark, umgeben von einer Rindenschicht, die nach außen hin mit einer Epidermis abgeschlossen ist.

Während die meist einschichtige Epidermis Abschluss- und Schutzfunktionen übernimmt, dient das Gewebe der Rinde zur Festigung und Stoffspeicherung. Auch im Zentralzylinder ist, neben Bildungsgewebe und Leitbündeln, Festigungsgewebe (Sklerenchym) für die Stabilität vorzufinden. Die Leitbündel, wiederum unterteilbar in Xylem (Tracheen und Tracheiden) und Phloem (Siebzellen), dienen dem Stofftransport. Dabei übernimmt das Xylem die Aufgabe der Leitung von Wasser und den darin gelösten Mineralsalzen aus der Wurzel in oberirdische Teile der Pflanze. Das Phloem hingegen transportiert die von den Laubblättern gebildeten Assimilate in die restliche Pflanze und in die Speicherorgane (u.a. Wurzel).

Dieser Bau trifft, unabhängig von der abwechslungsreichen Erscheinungsform, bei allen Pflanzen unterschiedlicher Abteilungen der Gefäßpflanzen überein. Trotz ihrer prinzipiellen Übereinstimmung lassen sich im mikroskopischen Bild die Sprossachsenquerschnitte vor allem im Bereich der Leitbündel unterscheiden. Unter anderem weisen Gefäßsporenpflanzen, wie *Lycopodium* und die untersuchten Monilophyten i.d.R. konzentrische Leitbündel vom hadrozentrischen (periphloematischen) Typ (Xylem innen, umgeben vom Phloem) auf. Vorwiegend besteht das Xylem, dessen Zellwände i.d.R. mit Lignin verstärkt sind, bei Farnen aus Tracheiden, selten wie etwa bei *Pteridium aquilinum* bereits auch aus Tracheen. Sekundäres Dickenwachstum fehlt bei den untersuchten Pflanzen. Weitere Details zum Aufbau der jeweiligen Achsenorgane der verschiedenen Arten sind im Folgenden aufgeführt:

Lycopodium annotinum

Der Aufbau dieses kriechenden Sprosses ist denen von Farnen ähnlicher als der des *Equisetums*. Die Achse des Sprosses ist von einem einzigen hadrozentrischen Leitbündel durchzogen. Bei diesem handelt es sich um eine Plektostele, die von einer Stärkescheide umgeben und nach außen hin von einer Endodermis umhüllt ist. Der Zentralzylinder wird von einem massiven Ring an sklerenchymatischer Rinde umgeben. Angrenzend sind vier

parenchymatische Blattbasen mit Hohlräumen zu erkennen, die von der Epidermis nach außen abgeschlossen werden.

Equisetum arvense

Der sterile Sprossquerschnitt eines Internodiums von *Equisetum* weist subepidermal neben dem Sklerenchym und Chlorenchym unterhalb der Furchen „Vallecularkanäle“ in der Rinde auf. Im Zentralzylinder unterhalb der Rippen liegen die Leitbündel und „Carinalkanäle“, wobei Letztere Hohlräume des Protoxylems darstellen. Zusammen formen sie einen Ring um die zentrale Markhöhle, die etwa $\frac{1}{4}$ des gesamten Durchmessers einnimmt. Bei den Leitbündeln handelt es sich um Stränge aus einem im Knoten befindlichen geschlossenen Siphonostelenring mit Innenxylem und Außenphloem. Die Leitbündel des Internodiums sind in Parenchym eingebettet und bilden somit ein Eustelen-Leitsystem, das xylemarme Leitbündel enthält und in seiner Gesamtheit von einer inneren und äußeren Endodermis umschlossen ist.

Dryopteris filix-mas, *Osmunda regalis* und *Pteridium aquilinum*

In diesen Farnen kann die Anzahl und Form der Leitbündel erheblich variieren und somit nur ein einzelnes Leitbündel oder, was häufiger der Fall ist, mehrere Leitbündel aufweisen. Rhizome der jugendlichen Pflanzen weisen meist eine Protostele auf, ältere Pflanzenteile ein formenmannigfaltiges Siphono- und Polystelengerüst. Auch Dictyostelen, eine Variation des Siphonostelentyps, sind häufig. Das oder die hadrozentrischen Leitbündel sind durch Perizykel und Endodermis abgegrenzt und werden von Parenchym, sowie einem äußeren Sklerenchymring umgeben. Zur Umgebung hin wird die Mittelrippe des Wedels, wie bei den anderen Gefäßpflanzen auch, durch die Epidermis abgeschirmt. Bei *Pteridium* kann man zusätzlich unterhalb der Endodermis eine stärkehaltige Zelllage finden, außerdem weist er neben Treppentracheiden auch Treppentracheen auf.

10.1 Lichtmikroskopie

Das mikroskopische Aussehen der Sprossachsen der fünf verwendeten Pflanzen ist in den Abbildung 31 bis Abbildung 35 dargestellt und entspricht dem für *Lycopodium* und Monilophyten generellen und dem im Einzelnen beschriebenen speziellen Aufbau.

Für *Lycopodium* und *Osmunda* wurde je nur ein hadrozentrisches Leitbündel, für *Equisetum*, *Dryopteris* und *Pteridium* wurden mehrere hadrozentrische Leitbündel

gefunden, wobei *Osmunda* ein Leitbündel vom Siphonostelen-Typ und die beiden Letzten eindeutig Leitbündel vom Dictyostelen-Typ besaßen. Bei der sterilen Sprossachse von *Equisetum* im Bereich des Internodiums wies jedes Leitbündel zwei Bereiche von Metaxylem, das an beiden Seiten neben dem Phloem zu finden war, auf. Unterhalb des Phloems befanden sich Reste des Protoxylems.

Das Xylem war in allen Leitbündeln mit Lignin verholzt, welches durch die Färbung mit Phloroglucin/HCl sichtbar gemacht wurde (Abbildung 31.B; Abbildung 32.E; Abbildung 33.C; Abbildung 34.B; Abbildung 35.E). Im parenchymatischen Gewebe war teilweise Stärke und in der Rinde auch Chlorophyll zu erkennen. Das Markparenchym der leptosporangiaten Farne war etwas lockerer als das der Rinde. Das β -Glc-Yariv-Reagenz färbte meist das gesamte Präparat schwach ein, wodurch eine Lokalisierung der AGPs anhand der Lichtmikroskopie nicht eindeutig war (Abbildung 31.A; Abbildung 32.A/D; Abbildung 33.A/D; Abbildung 34.C; Abbildung 35.A/B). Eventuell hätte das mit β GlcY gefärbte Präparat im Anschluss besser gewaschen werden müssen, sodass spezifische Bindungen mit den AGPs hervorgehoben worden wären. Das α -Gal-Yariv-Reagenz, welches als Negativ-Kontrolle verwendet wurde, färbte die Schnitte schwächer als das β GlcY (Abbildung 33.E; Abbildung 34.E; Abbildung 35.C), sodass es dort scheinbar leicht unspezifische Bindungen gab.

10.2 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen Analyse war die AGP-Lokalisierung in den pflanzlichen Präparaten möglich (Abbildung 31 bis Abbildung 35). Die Grundlage des Nachweises basierte auf der spezifischen Bindung des β GlcY an die AGPs. Polyklonale Anti-Yariv-Antikörper banden wiederum an das β GlcY und konnten im Anschluss durch FITC-markierte Sek-AK mittels CLSM sichtbar gemacht werden (in den Abb. als β GlcY/FITC abgekürzt). Somit fluoreszierten die Präparate an den Stellen, wo die AGPs lokalisiert waren. Die Untersuchungen ließen erkennen, dass AGPs bei den hier analysierten Pflanzen, bis auf *Osmunda*, im Xylem zu finden waren (Abbildung 31.C; Abbildung 32.F; Abbildung 33.F; Abbildung 35.D/F). Bei *Osmunda* war die FITC-Färbung im Phloem zu sehen und deutete somit auf das Vorhandensein von AGP im Phloem hin (Abbildung 34.D). Zudem trat in der Sprossachse des *Equisetums* eine Färbung im Bereich der äußeren Endodermis auf. Die Verwendung der Negativkontrolle (in den Abb. abgekürzt als α GalY/FITC) zeigte keine oder eine deutlich schwächere Fluoreszenz (Abbildung 31.D; Abbildung 33.G; Abbildung 34.F).

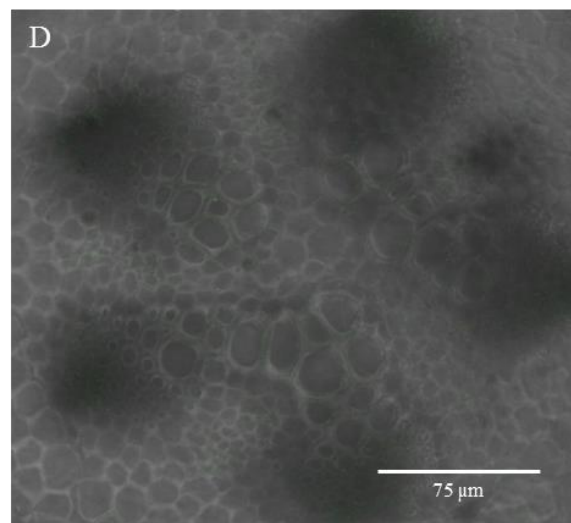
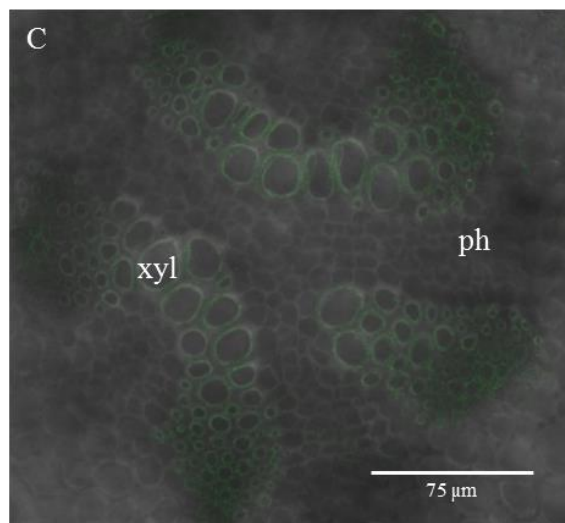
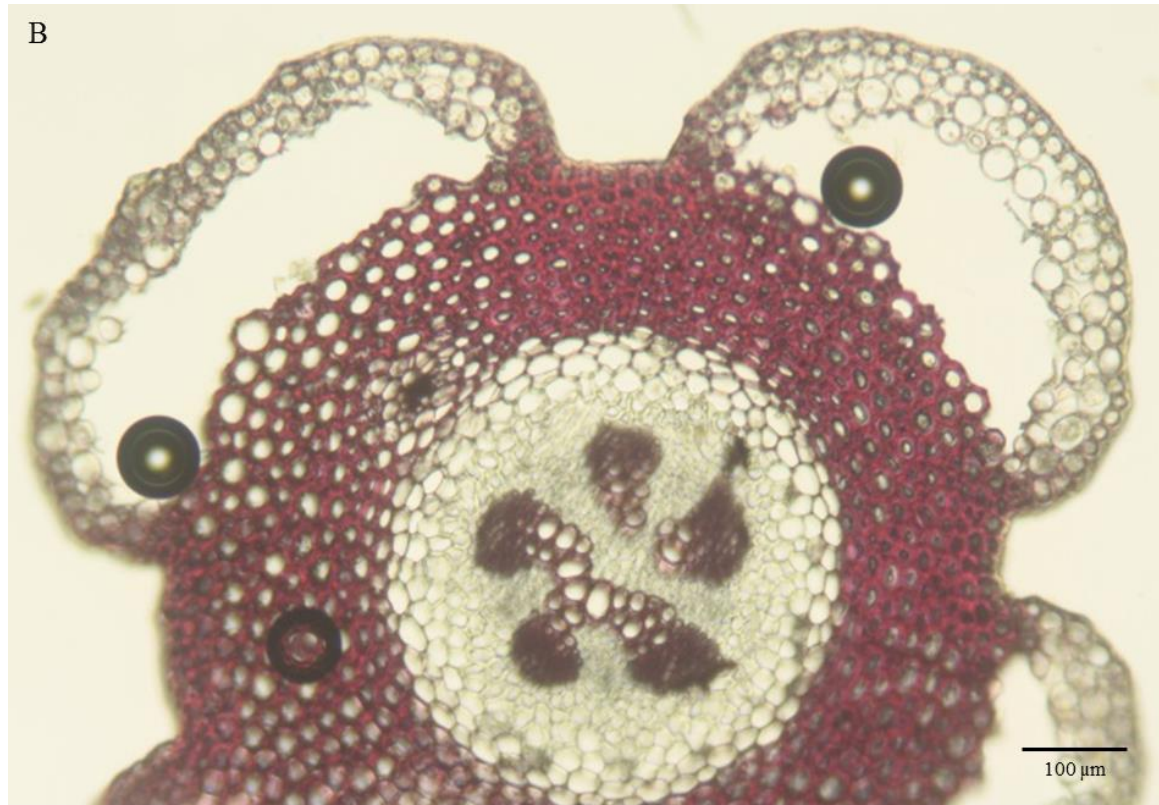
Lycopodium

A



Abbildung 31: Querschnitt der Sprossachse (A-E) von *Lycopodium annotinum*

(A, B) Sprossachse mit Epidermis (e), Sklerenchym (sk), parenchymatische Blattbasis mit Hohlraum (p), Endodermis (ee), Phloem (ph), phloematischem Parenchym (php) und Xylem (xyl). (C, D) Leitbündel mit Phloem (ph) und Xylem (xyl). Färbung: (A) β GlcY, (B) Phloroglucin/HCl, (C) β GlcY/FITC und (D) α GalY/FITC



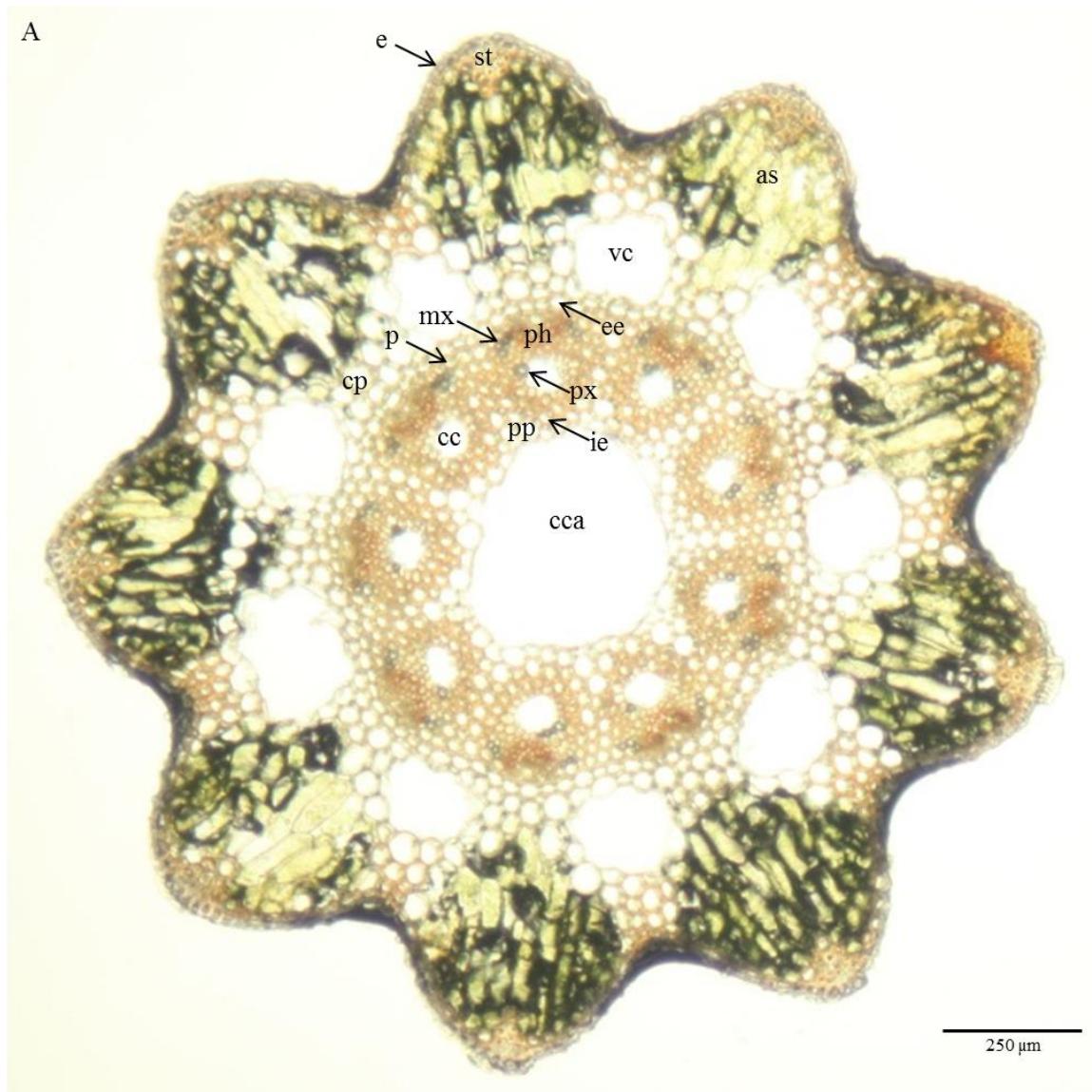
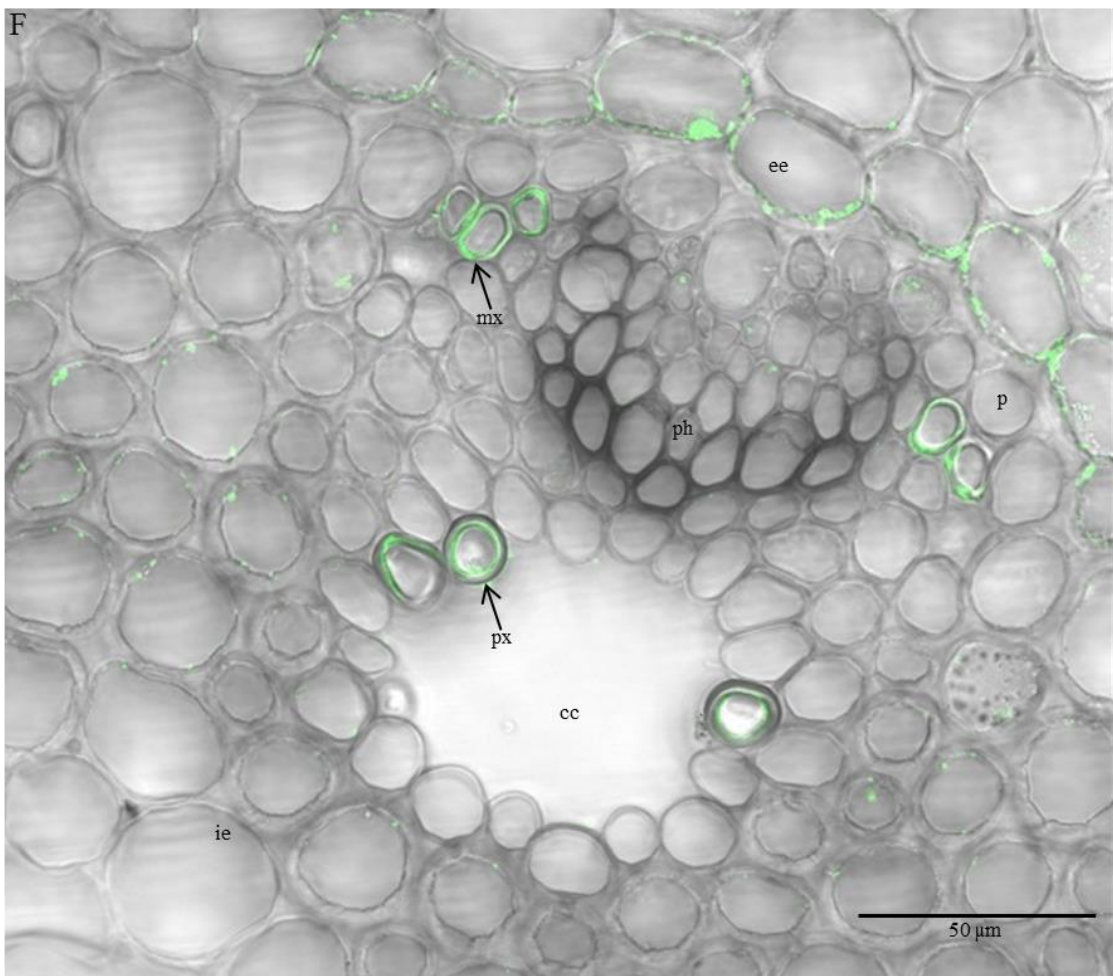
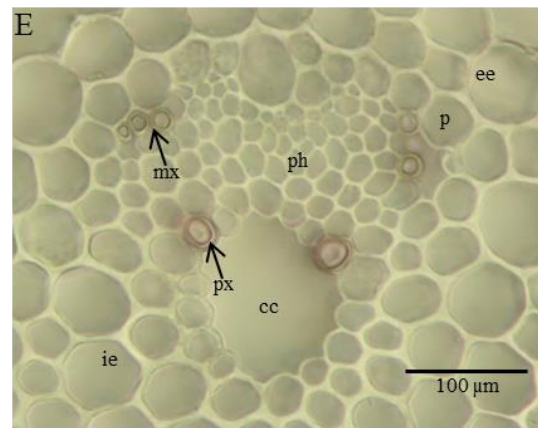
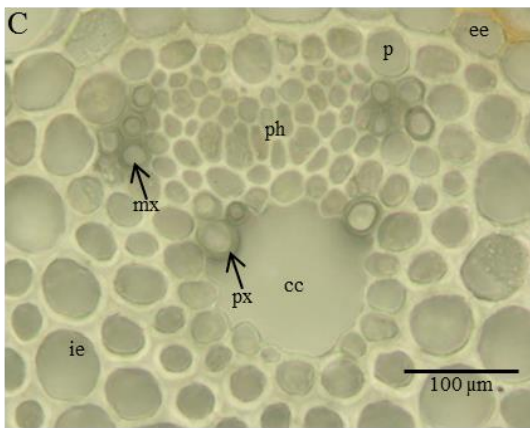
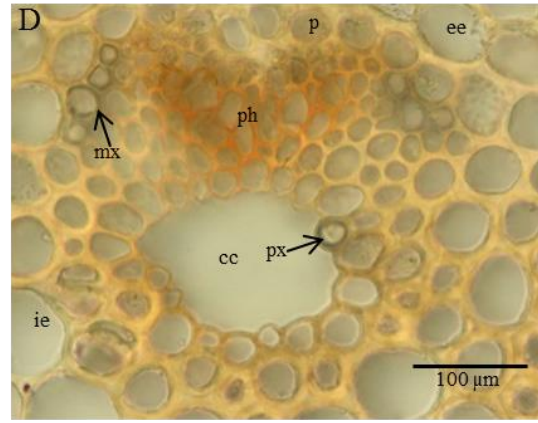
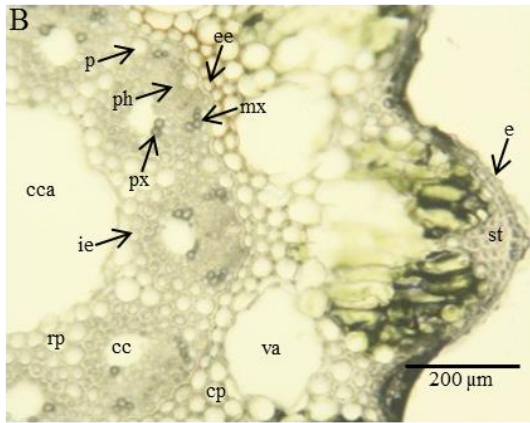
Equisetum

Abbildung 32: Querschnitt der sterilen Sprossachse (A-F) von *Equisetum arvense*

(A, B) Sprossachse mit Epidermis (e), Sklerenchym (st), Assimilationsparenchym (as), zentrale Markhöhle (cca), Carinal- (cc), Vallicularkanäle (vc), Rindenparenchym (cp), Markparenchym (pp), externer Endodermis (ee) mit Caspary-Streifen, interner Endodermis (ie), Perizykel (p), Metaxylem (mx), Protoxylem (px) und Metaphloem (ph). (C-F) kollaterale Leitbündel mit Carinalkanal (cc), externer Endodermis (ee) mit Caspary-Streifen, interner Endodermis (ie), Perizykel (p), Metaphloem (ph), Meta- (mx) und Protoxylem (px). Färbung: (A, D) β GlcY, (E) Phloroglucin/HCl und (F) β GlcY/FITC



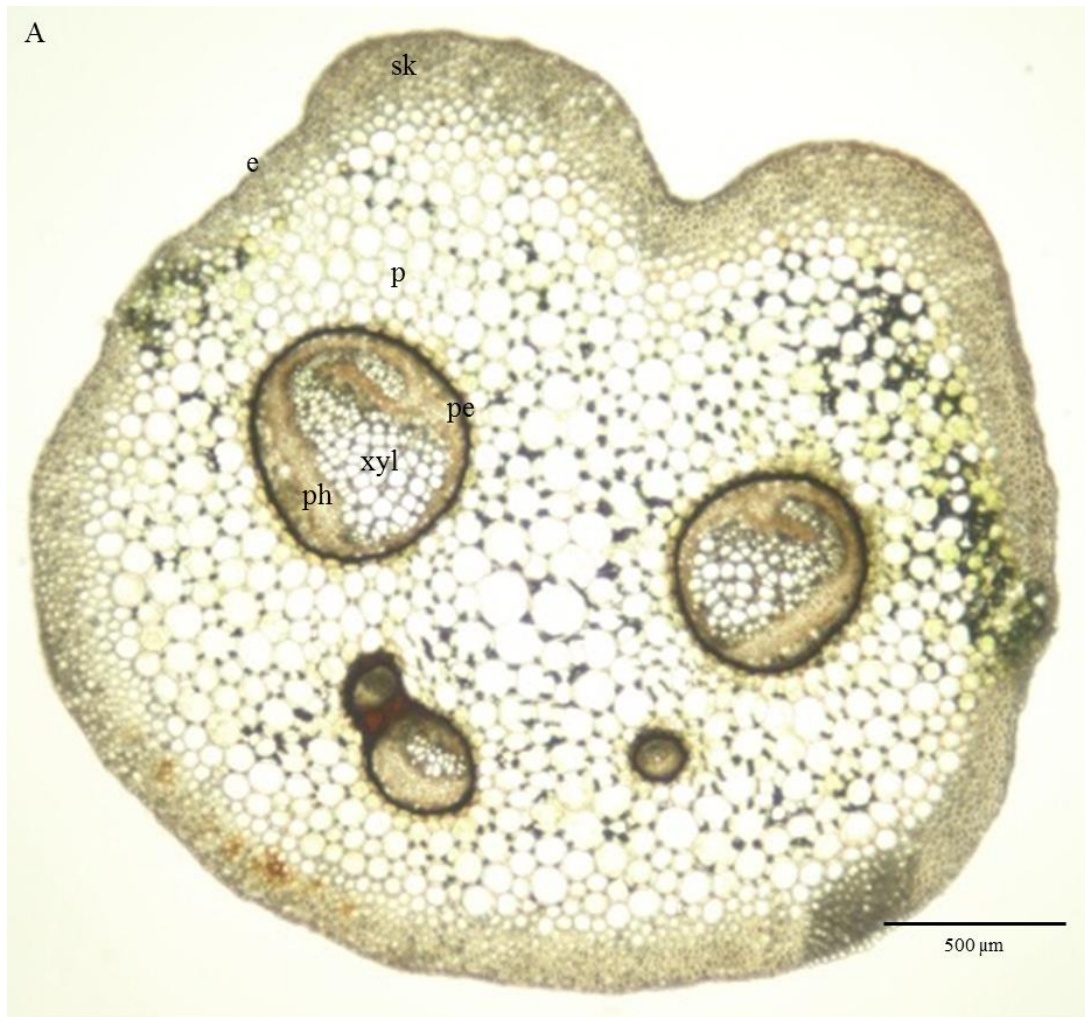
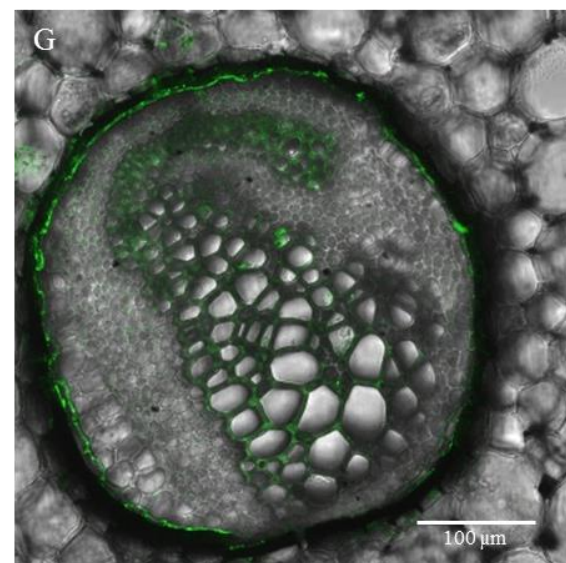
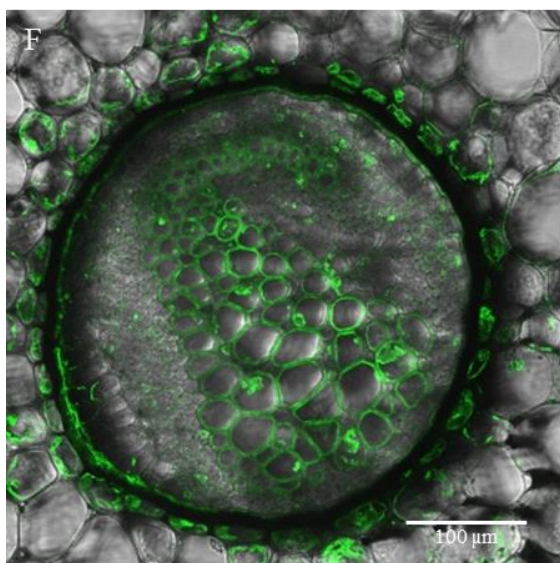
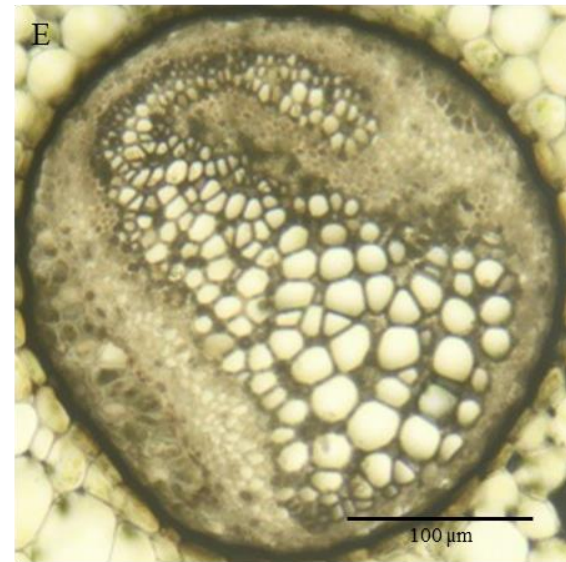
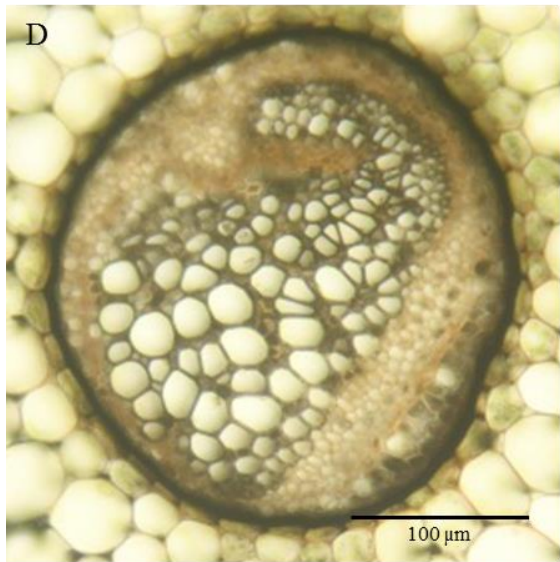
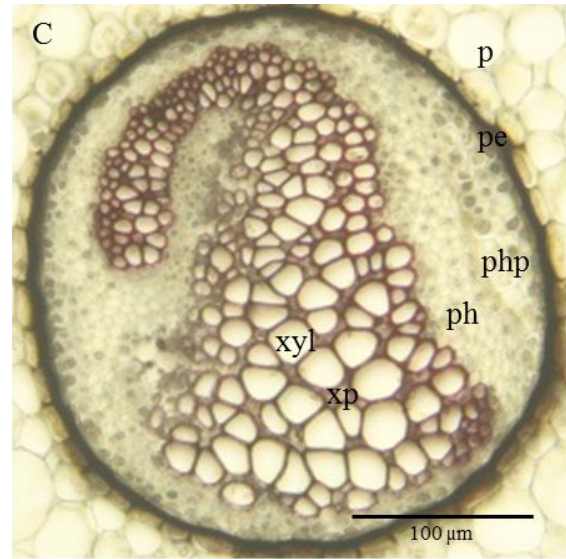
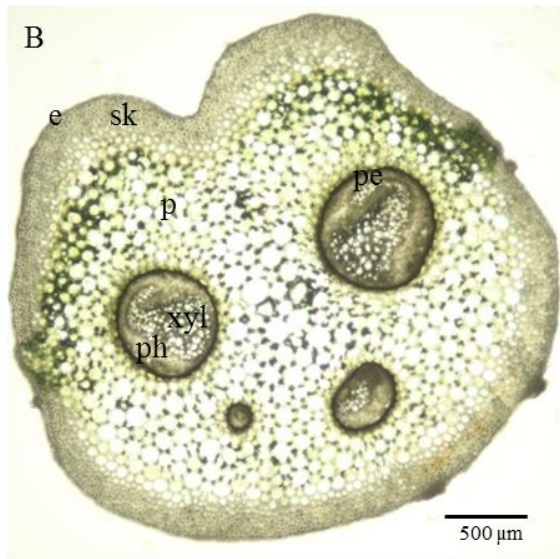
Dryopteris

Abbildung 33: Querschnitt der Sprossachse (A-G) von *Dryopteris filix-mas*

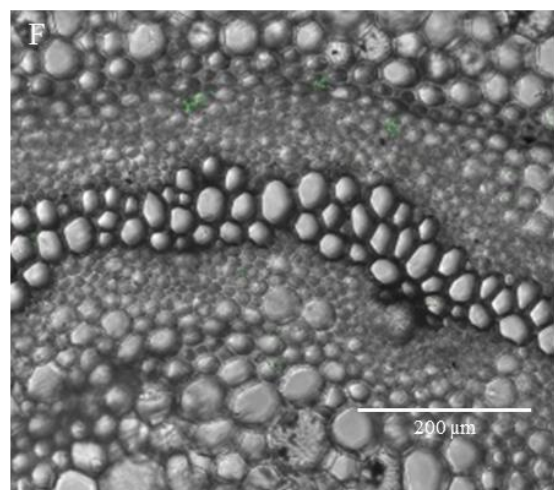
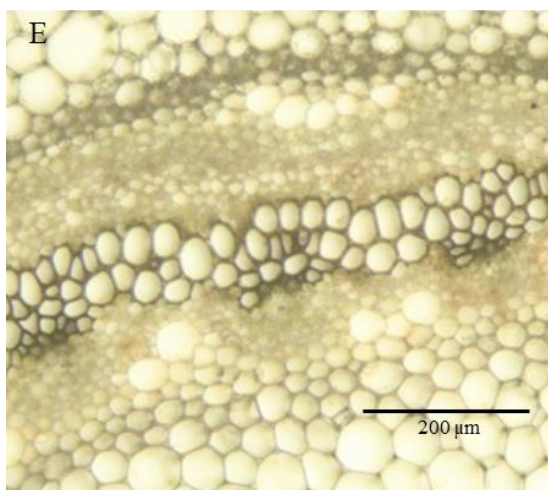
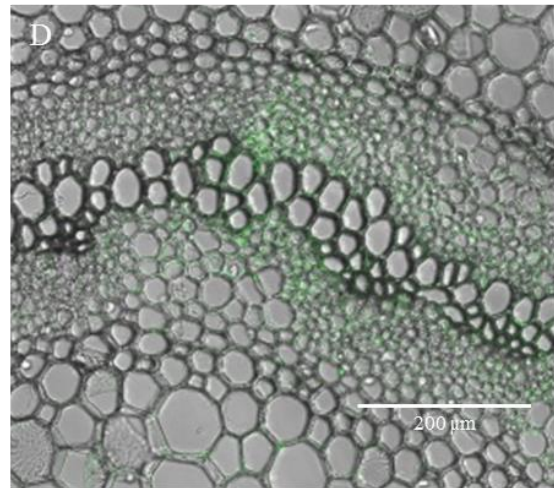
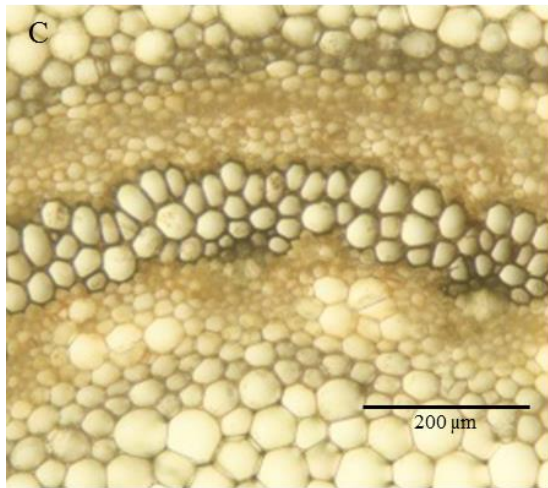
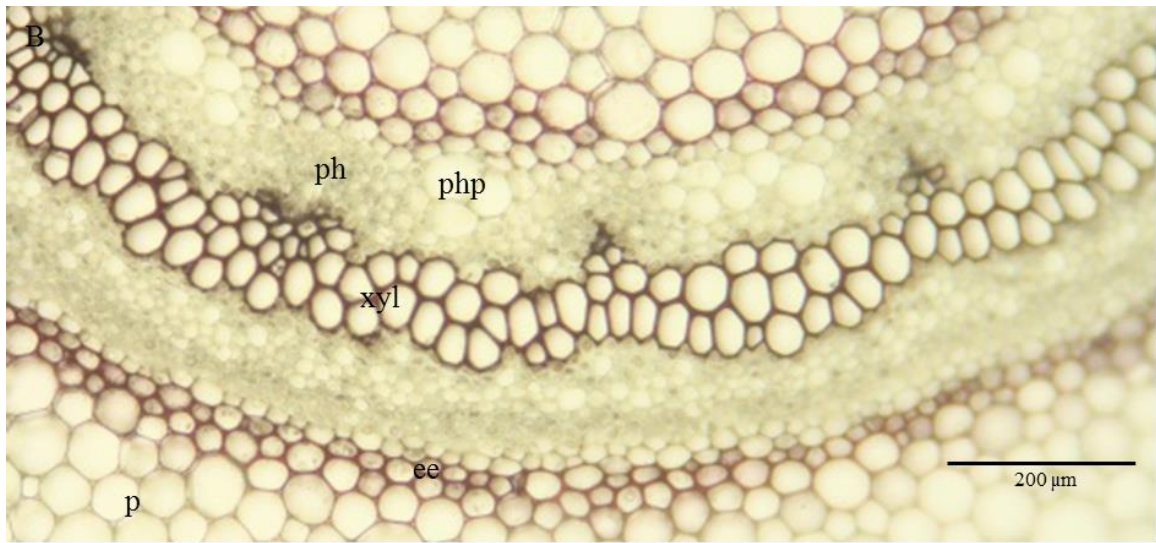
(A, B) Sprossachse mit Epidermis (e), Sklerenchym (sk), Parenchym (p), „Perizykel“-Endodermis (pe), Phloem (ph) und Xylem (xyl). (C-G) hadrozentrische Leitbündel mit Parenchym (p), „Perizykel“-Endodermis (pe), Phloem (ph), phloematisches Parenchym (php), Xylem (xyl) und xylematisches Parenchym (xp). Färbung: (A, D) β GlcY, (C) Phloroglucin/HCl, (E) α GalY, (F) β GlcY/FITC und (G) α GalY/FITC



Osmunda

Abbildung 34: Querschnitt der Sprossachse (A-F) von *Osmunda regalis*

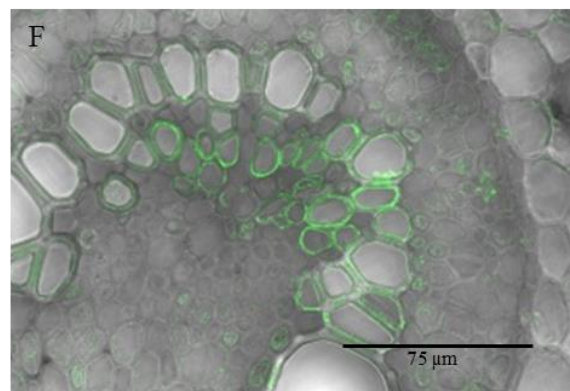
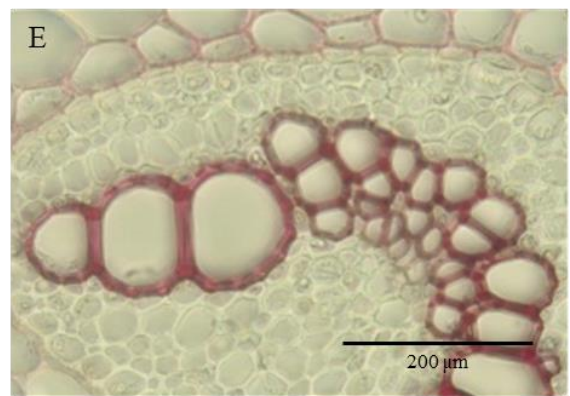
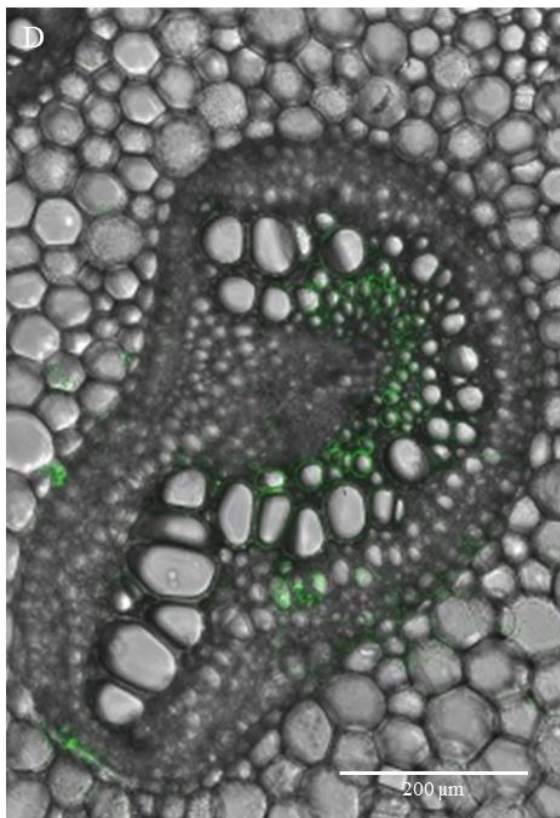
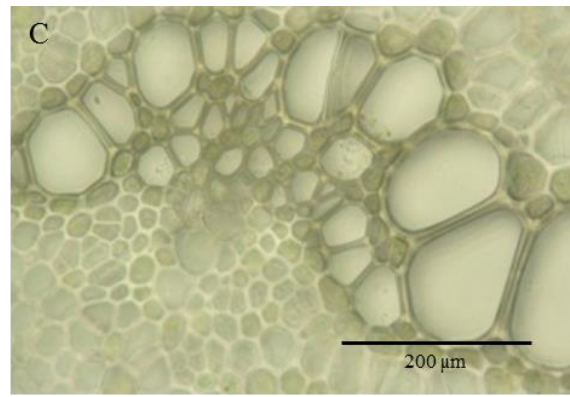
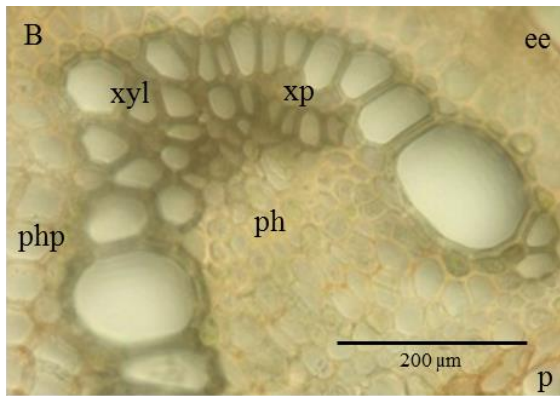
(A) Sprossachse mit Epidermis (e), Sklerenchym (sk), Parenchym (p), Endodermis (ee), Phloem (ph) und Xylem (xyl). (B-G) hadrozentrisches Leitbündel mit Parenchym (p), Endodermis (ee), Phloem (ph), phloematisches Parenchym (php) u Xylem (xyl).
 Färbung: (B) Phloroglucin/HCl, (C) β GlcY, (D) β GlcY/FITC, (E) α GalY und (F) α GalY/FITC



Pteridium

Abbildung 35: Querschnitt der Sprossachse (A-F) von *Pteridium aquilinum*

(A) Sprossachse mit Epidermis (e), Sklerenchym (sk), Parenchym (p), Endodermis (ee), Phloem (ph) und Xylem (xyl). (B-F) hadrozentrische Leitbündel mit Parenchym (p), Endodermis (ee), Phloem (ph), phloematisches Parenchym (php), Xylem (xyl) und xylematisches Parenchym (xp). Färbung: (A, B) β GlcY, (C) α GalY, (E) Phloroglucin/HCl und (D, F) β GlcY/FITC



11. Biologische Aktivitäten der AGPs

11.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um zu untersuchen, ob typische Glykanepitope der AGPs aus Samenpflanzen auch in den hier untersuchten AGPs vorkommen, wurde die Kreuzreaktivität mit mono- und polyklonalen Antikörpern (siehe IV.11.1), die gegen das aus Presssaft des *Echinacea purpurea* gewonnene AGP gerichtet sind, mittels kompetitiven ELISA getestet.

Die Interaktion des monoklonalen Antikörpers mit den Monilophyten-AGPs war sehr schwach und daher nur in hohen Konzentrationen von 50 µg/ml oder sogar 100 µg/ml detektierbar (nicht dargestellt). Nur mit dem *Lycopodium*-AGP war bei allen getesteten Konzentrationen eine schwache Bindungsaffinität sichtbar (Abbildung 36).

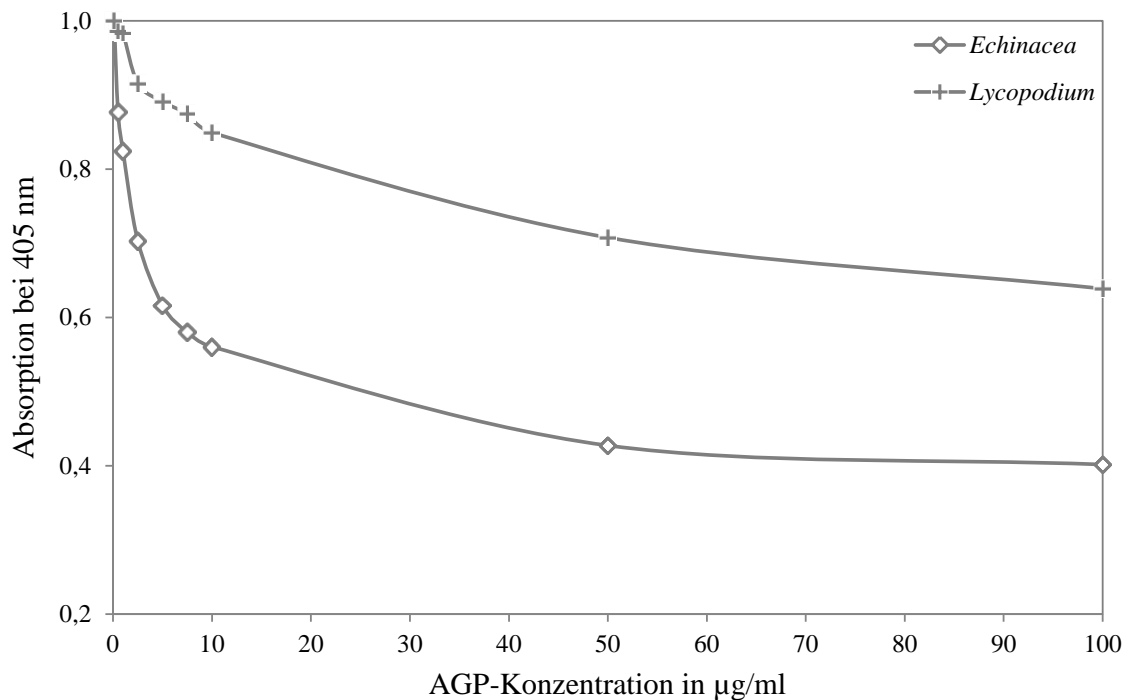


Abbildung 36: Bindung des monoklonalen Antikörpers an *Echinacea purpurea*-AGP bei kompetitiver Reaktion mit den AGPs aus oberirdischen Teilen von *Echinacea* und *Lycopodium*.

Die polyklonalen Antikörper hingegen zeigten im Konzentrationsbereich von 1 µg/ml bis 50 µg/ml mit allen untersuchten AGPs eine starke Reaktion (Abbildung 37). Interessanterweise reagierten diese Antikörper sogar stärker mit den Monilophyten-AGPs als mit dem AGP aus *Echinacea*. Diesmal war allerdings die Bindungsstärke an das *Lycopodium*-AGP schwächer als an die der Anderen. Insgesamt ließen die Interaktionen des monoklonalen Antikörpers mit dem *Lycopodium*-AGP und die der polyklonalen Antikörper mit allen untersuchten AGPs ähnliche oder gar identische Kohlenhydrat-Epitope der AGPs vermuten.

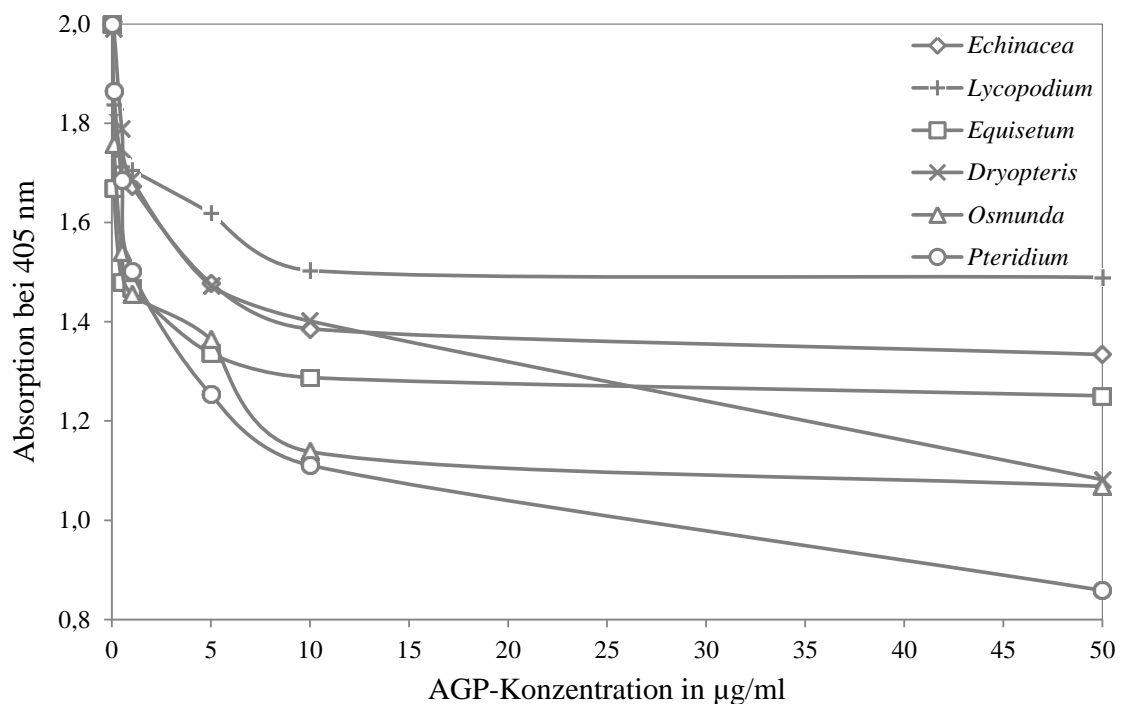


Abbildung 37: Bindung des polyklonalen Antikörpers an *Echinacea purpurea*-AGP bei kompetitiver Reaktion mit den AGPs aus oberirdischen Teilen von *Echinacea*, *Lycopodium*, *Equisetum*, *Dryopteris*, *Osmunda* und *Pteridium*.

11.2 Bindungsanalyse mittels Durchflusszytometrie

Bei dieser Art der Zellvermessung handelt es sich um ein Messverfahren, bei dem die Zellen in hohem Tempo einzeln an einer elektrischen Spannung oder einem Lichtstrahl vorbeifließen. Dabei haben die Eigenschaften, wie z.B. Form, Struktur und/oder Färbung, der Zellen unterschiedliche Einflüsse auf die Messergebnisse und können somit analysiert werden.

Die zu untersuchenden Zellen werden durch einen Hüllstrom fokussiert, durch einen Mikrokanal einer hochpräzisen Küvette einzeln nacheinander in den Messbereich eines Laserstrahls geführt und dort die Emission optischer Signale jeder einzelnen Zelle vermessen.

Die Emission setzt sich aus Fluoreszenzsignal und/oder Streulicht, das wiederum in Vorwärtsstreulicht (FS = forward scatter) und Seitwärtsstreulicht (SS = side scatter) unterteilt wird, zusammen und wird von einem Detektor (Photomultiplier) auch in Form quantitativer Informationen bezüglich aller Zellen ausgewertet. Bei dem Vorwärtsstreulicht handelt es sich um die Beugung des Lichts im flachen Winkel und dieses ist ein Maß für das Volumen der Zellen. Das Seitwärtsstreulicht, das durch die Brechung des Lichts im rechten Winkel verursacht wird, ist ein Maß für die Granularität der Zelle, die Größe und Struktur ihres Zellkerns und die Menge der Vesikel in einer Zelle. Mit Hilfe dieser beiden Parameter lassen sich die Zellen unterschiedlicher Zellpopulationen, also unterschiedlicher Größe und Struktur, gut unterscheiden. Dabei korreliert die Menge des gestreuten Lichts mit der Größe und Komplexität der Zelle. So streuen z.B. Zellen, die eine raue Oberfläche und in ihrem Inneren viele Vesikel haben, deutlich mehr Licht als die Zellen, die eine sehr glatte Oberfläche haben. Dadurch, dass innerhalb kurzer Zeitintervalle sehr große Mengen an Zellen (>1000 Zellen/sec) vermessen werden können, erhält man repräsentative Ergebnisse.

Ziel der durchgeführten Messungen war die Bindung von AGPs an murine dendritische Zellen (DC2.4) zu untersuchen. Bei dendritischen Zellen handelt es sich um antigenpräsentierende Zellen die besonders zur T-Zell-Aktivierung befähigt sind und somit eine primäre Immunantwort auslösen können. Sie kommen überall in der Peripherie verteilt vor, u.a. in Haut und Schleimhäuten, und strecken dort ihre bäumchenartigen Ausläufer durch die sogenannten Tight Junctions der Oberflächen-bedeckenden Epithelien, ohne dabei deren Funktion als Diffusionsbarriere zu beeinträchtigen. Dadurch haben sie die Möglichkeit aus dem Lumen des Gastrointestinaltraktes Antigene bzw. auch AGPs aufzunehmen.

Da bereits für einige AGPs immunstimulierende Wirkungen nachgewiesen wurden, sollte untersucht werden, ob diese AGPs mit dendritischen Zellen interagieren und somit Einfluss auf das Immunsystem nehmen können.

Bei der hier verwendeten Form der Durchflusszytometrie wurden die fluoreszenzmarkierten Zellen in Abhängigkeit ihrer Färbung in unterschiedliche Reagenzgefäße sortiert. Da nur mit einem Fluoreszenzmarker gearbeitet wurde, stand hier die quantitative Analyse der fluoreszierenden Zellen im Vordergrund. Bei Zellfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen. Je mehr AGP also an die Zellen gebunden hatte, desto höher war die Fluoreszenzintensität. Deshalb wurde für die Auswertung der Fluorescence-activated cell scanning (FACS)-Analyse der Mittelwert der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Konzentration in Bezug auf den Nullwert betrachtet. Zunächst wurde die Messmethode anhand von *Echinacea purpurea*-AGP optimiert, da der zum Bindungsnachweis verwendete primäre polyklonale Antikörper gegen dieses AGP gerichtet war.

Bei der optimierten Bindungsanalyse mit *Echinacea purpurea*-AGP zeigte sich eine deutliche konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenz ab 5 µg/ml (Abbildung 38), die aus der Bindung von *Echinacea*-AGP an die DC2.4 Zellen resultierte.

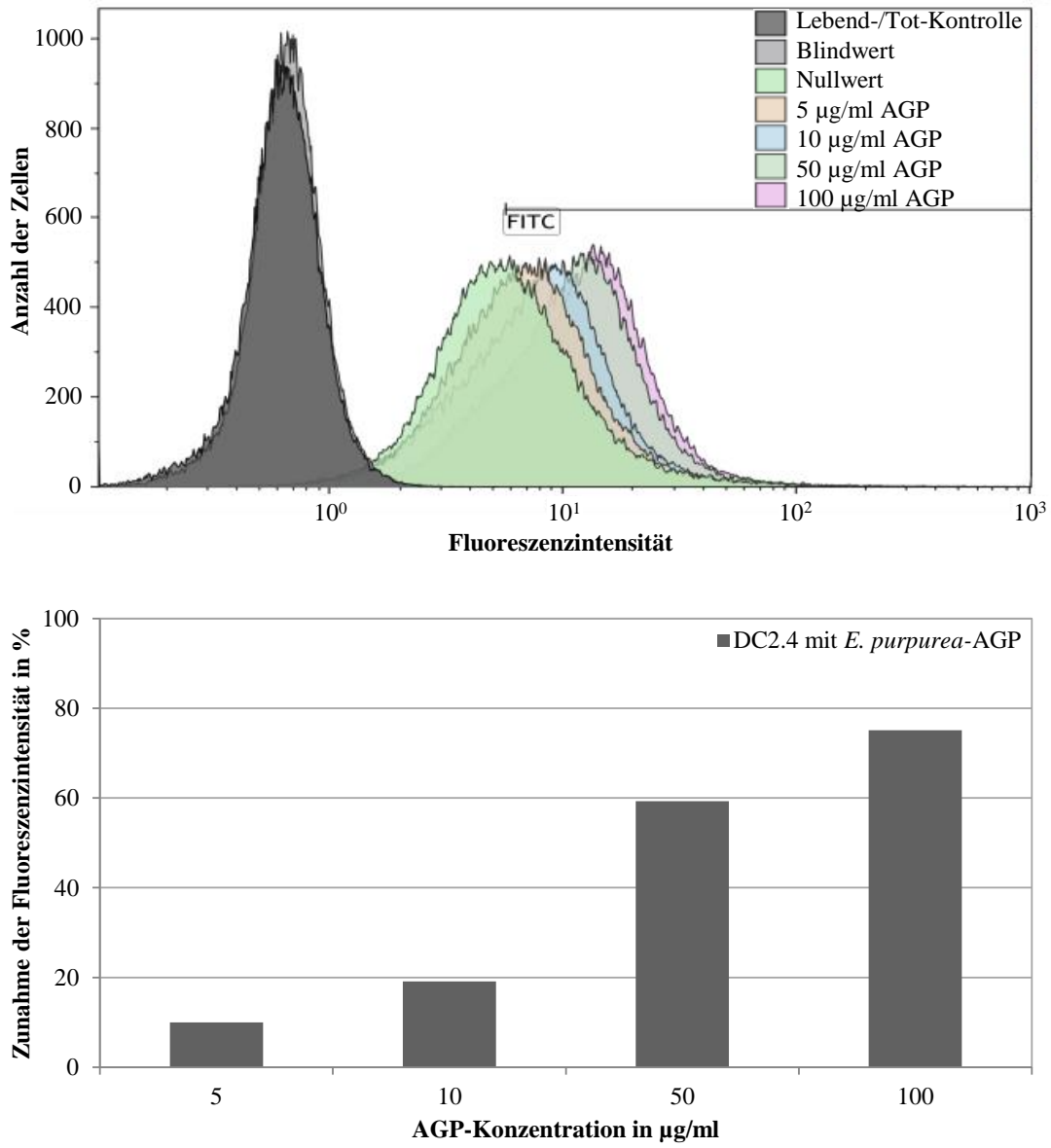


Abbildung 38: Histogramm der Fluoreszenzintensität mit FITC-Gate bei 50 % des Nullwertes (oben) & Balkendiagramm der Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit von der AGP-Konzentration (unten)

Im Anschluss sollte die Bindung der AGPs aus zwei untersuchten Pflanzen an die DC2.4 Zellen analysiert werden. *Osmunda* und *Pteridium* wurden ausgewählt, da sie im ELISA eine gute Kreuzreaktivität mit dem verwendeten primären polyklonalen Antikörper gezeigt hatten. Allerdings wurde die Messmethode noch einmal verändert. Unspezifische Bindungsstellen sollten zuerst mit Hilfe von BSA-Lösung besetzt werden, damit die AGPs nur an die spezifischen Bindungsstellen binden können. Außerdem wurde der primäre Antikörper statt 1:50 nun 1:300 verdünnt und der sekundäre Antikörper statt 90 nur 30 min inkubiert, da die Fluoreszenzintensität bei den Kontrollen und AGP-Vergleichsmessungen in einem zu hohen Bereich lag und Unterschiede schwerer zu erkennen waren. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität könnte evtl. durch eine Veränderung der Zellen aufgrund von einer anderen verwendeten Passage oder auch durch eine andere Charge des primären Antikörpers hervorgerufen worden sein.

Die veränderten Versuchsbedingungen führten zu veränderten Bindungsaffinitäten. Beim Vergleich der Ergebnisse ohne und mit Verwendung von BSA nahm die Fluoreszenzintensität beim AGP aus *Echinacea* zu, bei den AGPs aus *Osmunda* und *Pteridium* hingegen ab (Daten nicht gezeigt).

Die vergleichende Analyse der Bindung der AGPs von *Echinacea*, *Osmunda* und *Pteridium* an die DC2.4 Zellen ergab bei vorheriger Absättigung mit BSA, dass das *Echinacea*-AGP am stärksten an die Zellen band (Abbildung 39). Zwischen 0,1 und 5 µg/ml wurde die Bindung konzentrationsabhängig stärker und nahm anschließend wieder ab. Auch bei dem AGP aus *Osmunda* war schon ab einer Konzentration von 0,1 µg/ml eine sehr schwache Bindung zu erkennen, die ab 5 µg/ml etwas deutlicher zunahm, dann jedoch ab 10 µg/ml etwa auf demselben Niveau blieb. Für das *Pteridium*-AGP konnte erst ab 5 µg/ml eine Bindung nachgewiesen werden, die bis 50 µg/ml konzentrationsabhängig zunahm und bei 100 µg/ml wieder etwas geringer war. Dass die Bindungsstärke bei *Echinacea* und *Pteridium* ab einer bestimmten Konzentration an AGP wieder abnahm, könnte an einer Agglomeration des überschüssigen AGPs liegen, wenn auf den Zelloberflächen nahezu alle möglichen Bindungsstellen der AGPs besetzt worden waren.

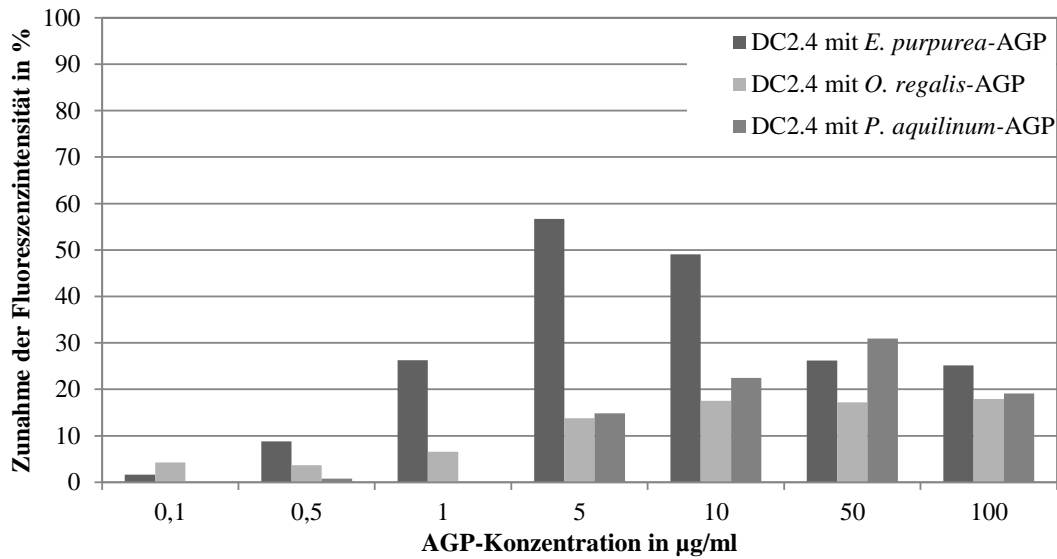


Abbildung 39: Balkendiagramm der Fluoreszenzzunahme aufgrund der Bindung von *Echinacea*-, *Osmunda*- und *Pteridium*-AGP an die DC2.4 Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration

Mehrfache Wiederholungen bei denselben Versuchsbedingungen und somit Reproduzierbarkeit der Ergebnisse werden nicht mit dieser Arbeit abgedeckt.

VI. Diskussion

1. Ausbeute und Zusammensetzung

1.1 Hochmolekulare Polysaccharid-Fractionen

Die Isolierung der HMFs aus den getrockneten oberirdischen Pflanzenmaterialien ergab für *Lycopodium* und die leptosporangiaten Farne relativ geringe Mengen an hochmolekularen Polysacchariden (ca. 1 – 2 %). Bei *Equisetum* jedoch lag der Gehalt an hochmolekularen Polysacchariden bei etwa 6 %. Dieser hohe Gehalt könnte durch an Polysaccharide gebundenes Silizium, welches in hohen Mengen in den Zellwänden von *Equisetum* vorkommt (CURRIE und PERRY, 2009), verursacht worden sein. Für diese Theorie würde auch der durchschnittliche Zuckeranteil dieser Fraktion von 9,6 % sprechen, der deutlich geringer war als der von den anderen untersuchten HMFs. Da diese jedoch auch nur durchschnittliche Zuckeranteile von 25,3 % aufwiesen, lag die Vermutung nahe, dass alle HMFs noch wasserlösliche Verunreinigungen, wie z.B. Gerbstoffe, enthielten. Die Interaktionen von Polyphenolen mit Polysacchariden und Proteinen ist bereits durch entsprechende Literatur bekannt (LE BOURVELLEC und RENARD, 2012). Die Komplexbildung dieser Komponenten könnte bei der Zerkleinerung des Pflanzenmaterials stattgefunden haben, da dort die in Kompartimenten getrennte Aufbewahrung voneinander aufgelöst wurde. In solchen Komplexen können sowohl nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen, als auch kovalente Bindungen auftreten (PRIGENT *et al.*, 2003; PRIGENT *et al.*, 2007). Anscheinend konnten die im Pflanzenmaterial enthaltenen Polyphenole trotz vorheriger Aufreinigung mit 60 %igem Aceton nicht vollständig abgetrennt werden, was in dem Fall der verbliebenen Gerbstoffe auf kovalente Bindungen oder zumindest stark assoziierte Komplexe hindeuten könnte.

Auch Verunreinigungen der HMFs mit anderen „Nicht-Zuckerbestandteilen“ konnten nicht ausgeschlossen werden, obwohl versucht wurde auch diese mit Hilfe entsprechender Maßnahmen, wie z.B. der Proteinfällung, zu entfernen. Auffällig war zudem dass die HMF-Auswaagen in den Herbsterten höher waren, als die desselben Sommers, der Zuckeranteil in der jeweiligen Herbst-HMF aber geringer war. Eine Steigerung der Ausbeute im Herbst konnte folglich nur teilweise durch erhöhte Stärkeproduktion bedingt sein. Vermutlich war im Herbst die Zusammensetzung des Pflanzenmaterials auch dahingehend verändert, dass andere nicht zuckerartige Begleitsubstanzen, wie die Polyphenole, Antioxidantien, Flavonoide oder Öle, in höherer Konzentration vorlagen

und mit extrahiert wurden (COOPER-DRIVER *et al.*, 1977; SONI *et al.*, 2015). Diese Veränderungen sind allerdings von den jeweiligen Pflanzenarten abhängig.

Die Isolierung einer reinen, hochmolekularen Polysaccharid-Fraktion war somit, zumindest mit der verwendeten Methode, nicht möglich. Es wäre daher von Vorteil, diese zu optimieren. Trotzdem ist bei der Zuckerausbeute zu berücksichtigen, dass mit der verwendeten Acetylierungsanalyse nur Neutralzucker erfasst werden konnten. Saure Zucker, wie die in Pektinen, und evtl. daran gebundene Mono- und Disaccharide konnten mit dieser Methode nicht zugänglich gemacht werden und somit wurden wohlmöglich geringere Zuckerausbeuten angezeigt als tatsächlich vorlagen.

Unabhängig vom Erntezeitpunkt beinhalteten *Lycopodium*- und *Equisetum*-HMF u.a. hohe Mengen an Glukose, was aufgrund von Stärke und bei *Equisetum* vor allem durch das Vorkommen des gemischt 3-, 4-verknüpften β -D-Glukan (FRY *et al.*, 2008) verursacht worden sein könnte. Dieses Glukan wurde auch mit der Bindung an Kieselsäure in Zusammenhang gebracht (KIDO *et al.*, 2015). In allen untersuchten HMFs, jedoch insbesondere bei den HMFs von *Osmunda* und *Pteridium*, traten größere Mengen an Mannose auf. Zudem beinhaltete das *Pteridium*-HMF nennenswerte Mengen an Xylose und Fucose.

Das Wissen über Polysaccharide in Zellwänden der Sporenpflanzen ist zwar begrenzt, es wurden aber neben dem Cellulosegrundgerüst verschiedene Polysaccharide wie Pektine, Xyloglukane und Mannane gefunden (POPPER und FRY, 2004; LEROUX *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011; XUE und FRY, 2012). Außerdem wurden in Farnen hauptsächlich Epitope von pektischem Homogalakturonan, Arabinan und Mannan mittels gegen pflanzliche Polysaccharide gerichtete Antikörper in Mikroarray-Analysen detektiert (LEROUX *et al.*, 2015). Aufgrund des hohen Vorkommens an Mannose in Zellwänden von verschiedenen Farnen und Lycophyten wurde auch diskutiert, ob Mannane für das Vernetzen von Polysacchariden in diesen Zellwänden hauptverantwortlich sind (SILVA *et al.*, 2011). Da die HMFs nicht genauer hinsichtlich Begleitsubstanzen untersucht wurden, konnte auf Basis dieser Arbeit in Bezug auf die Zusammensetzung der HMFs keine endgültige Aussage getroffen werden.

Das Auftreten des ungewöhnlichen Zuckers Acofriose in Lyco- und Monilophyten wurde in der Literatur kontrovers beschrieben. Zum Teil wurde 3-O-Me-Rha nicht wie in dieser Arbeit in Monilophyten dafür aber in Lycophyten gefunden (POPPER *et al.*, 2004). Zudem wurde es in *Lycopodium tristachyum* und verschiedenen Farnen, jedoch nicht in *Equisetum hyemale* als Teil des Rhamnogalacturonan II, welches mittels

Gelpermeationschromatographie isoliert wurde, identifiziert (MATSUNAGA *et al.*, 2004). Bisher trat 3-*O*-Me-Rha in Zellwänden von Bryophyten und Charophyten (POPPER und FRY, 2003), in der Grünalge *Chlorella* (OGAWA *et al.*, 1997) und in einigen Polymeren von Bakterien auf (LEE *et al.*, 2000), wurde aber noch nie in Angiospermen detektiert. In den hier analysierten Arten der eu- und leptosporangiaten Farne war 3-*O*-Me-Rha in den HMFs enthalten, in der HMF des hier untersuchten Lycophyten jedoch nicht. Da der Anteil an methylierter Rhamnose in den Monilophyten-AGPs höher als in den entsprechenden HMFs war, konnte davon ausgegangen werden, dass dieser Zucker hauptsächlich Bestandteil der untersuchten AGPs war (siehe VI.2.1, vgl. Tabelle 4).

1.2 Polysaccharide der Überstände der Yariv-Fällungen

Bei der Aufreinigung der Überstände nach der Yariv-Fällung war aufgefallen, dass zusätzlich zum AGP während der Dialyse ein großer Anteil des vorherigen HMFs abgetrennt wurde. Außerdem waren die Zuckerausbeuten dieser hochmolekularen Fraktionen der Überstände gegenüber den HMFs erhöht, obwohl die AGPs bereits daraus gefällt wurden. Dieses Phänomen sprach für eine Abtrennung von niedermolekularen „Nicht-Zuckern“. Vor allem bei *Equisetum* war die Zuckerausbeute zuvor sehr gering (7,4 %) und in dem Yariv-Überstand schließlich sehr hoch (63,7 %), was an der großen Menge Silizium (CURRIE und PERRY, 2009) liegen könnte, die evtl. in der HMF mitgefällt und erst während der Dialyse entfernt wurde. Aber auch andere Bestandteile, wie die zuvor erwähnten Polyphenole, könnten teilweise mit ausgeschwemmt worden sein, solange sie ein Molekulargewicht von 12 – 14 kDa unterschritten. In der Regel waren nach Fällung der AGPs die Ara- und Gal-Gehalte der HMFs verändert. Dadurch traten die anderen in den Zellwänden enthaltenen Polysaccharide mehr hervor. In *Lycopodium* und *Pteridium* deuteten erhöhte Xyl-Gehalte auf entsprechende Zucker wie z.B. Xylane (SILVA *et al.*, 2011) hin. Gleiches galt für *Equisetum*, in dem nun die Glukose des β -D-Glukans (SØRENSEN *et al.*, 2008) in den Vordergrund rückte. Bei *Dryopteris* stieg der Gehalt an Ara und bei *Osmunda* der an Man, sodass dort neben Galaktanen, wie Homogalakturonan, überwiegend Arabinane bzw. Mannane (MOORE *et al.*, 2013 bzw. LEROUX *et al.*, 2015) vermutet werden konnten. Im Überstand der Yariv-Fällung von *Echinacea pallida* wurde bereits ein hochmolekulares Arabinan identifiziert (THUDE und CLASSEN, 2005). Des Weiteren wurde zuvor von (Galakto)-Glukomannanen in dem Lycophyten *Selaginella* und einigen Farnen berichtet (SILVA *et*

al., 2011), die auch in *Pteridium aquilinum* nachgewiesen wurden (BREMNER und WILKIE, 1971). Um diese Hinweise der Literatur zu verifizieren, müssten die Überstände der Yariv-Fällung genauer, v.a. im Hinblick auf die Struktur, mittels geeigneter analytischer Methoden untersucht werden.

1.3 Hochmolekulare Arabinogalaktan-Proteine

Die Menge der AGPs, die aus den verschiedenen HMFs isoliert wurden, lag bei durchschnittlich 0,10 – 0,15 %. Damit waren sie mit den AGP-Ausbeuten der drei Moos-Arten *Sphagnum sp.*, *Physcomitrella patens* und *Polytrichastrum formosum* vergleichbar (0,1 – 0,2 %, BARTELS *et al.*, 2017) und höher als die Ausbeuten der AGPs von Angiospermen bei gleichem Isolierungsverfahren (THUDE und CLASSEN, 2005; WACK *et al.*, 2005). Dabei waren die Zuckeranteile des *Lycopodium*- und *Equisetum*-AGP mit durchschnittlich 57,3 bzw. 60,3 % relativ hoch, für die leptosporangiaten Farne mit durchschnittlich 34,8 – 35,6 % relativ niedrig. Ein Vergleich zu AGPs aus anderen Pflanzen, ist wegen fehlender Angaben innerhalb der Literatur nicht möglich. Vor allem bei den AGPs mit niedrigen Zuckerausbeuten waren neben den im AGP vorhandenen Protein-, Uronsäure- und Wasseranteilen auch Polyphenole zu erwarten, die dann im Nachweis auch leicht positive Reaktionen erzeugten. Trotz Isolierung der AGPs mittels spezifischer AGP-Yariv-Komplexierung, konnten die Bindungen zu den Gerbstoffen vermutlich nicht vollständig aufgebrochen werden. Auch hier wäre eine reinere Isolierung wünschenswert gewesen. Eine doppelte Yariv-Fällung war diesbezüglich leider nicht von Nutzen.

Das Ara/Gal-Verhältnis der leptosporangiaten Farn-AGPs (1:1,7 – 1:1,9) glich dem von vielen Angiospermen-AGPs (1:1,4 – 1:2,9 CLASSEN *et al.*, 2005; GÖLLNER *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu war das Verhältnis vom *Lycopodium*- und *Equisetum*-AGP (1:1,3) zu höheren Mengen an Arabinose verändert.

Die Literatur zu AGPs aus niederen Pflanzen, vor allem zu deren Struktur, ist rar. Bisher sind nur die AGPs aus den Bryophyten *Sphagnum*, *Physcomitrella* und *Polytrichastrum* mittels β GlcY isoliert und charakterisiert. Dort ist auch Acofriose, anders als bei Angiospermen, als Teil der AGPs identifiziert worden (FU *et al.*, 2007; BARTELS *et al.*, 2017).

Darüber hinaus gibt es erst einen älteren Bericht zur Isolierung und Zusammensetzung eines AGP aus einem leptosporangiaten Farn. Dieser befasst sich mit einem Arabinogalaktan-reichen Protein aus dem Farn *Osmunda japonica*, welches eine

Monosaccharidzusammensetzung von 60 mol% Gal, 12 mol% Ara, 10 mol% 3-O-Me-Rha, 9 mol% Rha sowie kleinere Mengen an Fuc, Xyl, Man und Glc aufweist (AKIYAMA *et al.*, 1987). Die dort gezeigten Daten sind in guter Übereinstimmung mit den hier ermittelten Ergebnissen für die gleiche Gattung.

Abgesehen von der methylierten Rhamnose glich die Monosaccharidzusammensetzung der von Angiospermen-AGPs, bei denen Galaktose und Arabinose um die 80 – 90 % der Monosaccharide ausmachten (CLASSEN *et al.*, 2005). Auch die doppelte Yariv-Fällung änderte an dem Ergebnis nichts, obwohl sich das Ara/Gal-Verhältnis in Richtung etwas höherer Mengen an Galaktose veränderte, wie auch bereits beim AGP aus *Triticum aestivum* beobachtet werden konnte (GÖLLNER *et al.*, 2010).

2. Strukturmodell der AGPs

Zusätzlich zur Isolierung und Zusammensetzung sollten auf Basis der Ergebnisse zur Charakterisierung des Kohlenhydrat- und Proteinanteils und unter Berücksichtigung der ermittelten Molekulargewichte AGP-Strukturmodelle entwickelt werden.

2.1 Kohlenhydratstruktur

Mit Hilfe der Acetylierungsanalyse wurden die Kohlenhydratanteile der AGPs charakterisiert. Daraus ergaben sich sowohl für die nativen als auch für die uronsäurereduzierten AGPs Galaktoseanteile von 47 – 62 % und Arabinoseanteile von 27 – 43 %. Weitere Zucker waren nur in geringen Mengen vorhanden.

Die mittels Methylierungsanalyse ermittelten Anteile an Galaktose und Arabinose in den Kohlenhydraten der AGPs sollten in der Regel mit denen der Acetylierung übereinstimmen. Somit hatte man durch die Acetylierungsergebnisse eine gute Kontrolle, ob die Methylierung der Proben vollständig stattfand und ob leicht flüchtige Zucker während der Analyse verloren gegangen waren. Die Bindungstypenanalysen der nativen AGPs offenbarten wie in etwa erwartet Galaktosemengen von 52 – 58 % und Arabinosemengen von 31 – 46 %. Bei den uronsäurereduzierten Proben jedoch reichten die Galaktoseanteile von rund 52 bis 71 % und die Arabinoseanteile von 18 – 42 %. Die Unterschiede in den Anteilen waren auf die leptosporangiaten Farn-AGPs beschränkt und fielen überwiegend bei *Osmunda* und *Pteridium* ins Gewicht. Bei diesen Beiden war Galaktose um knapp über 10 % zu höheren und Arabinose zu ungefähr 10 % niedrigeren Werten hin verändert (Abbildung 40). Diese Tatsache ließ darauf schließen, dass dort

Teile der leichtflüchtigen terminalen Arabinose während der Analyse zu stark abgedampft wurden und muss bei der weiteren Strukturmodellierung berücksichtigt werden. Ferner waren in der Bindungstypanalyse sowohl in den nativen als auch uronsäurereduzierten Proben geringe Mengen anderer Zucker detektiert worden und somit in Übereinstimmung mit den Acetylierungsdaten. Glukuronsäuren kamen nur in relativ geringen Mengen als terminale Monosaccharide in den untersuchten AGPs vor und hatten daher keinen großen Einfluss auf die Unterschiede beim Vergleich der nativen und uronsäurereduzierten Proben.

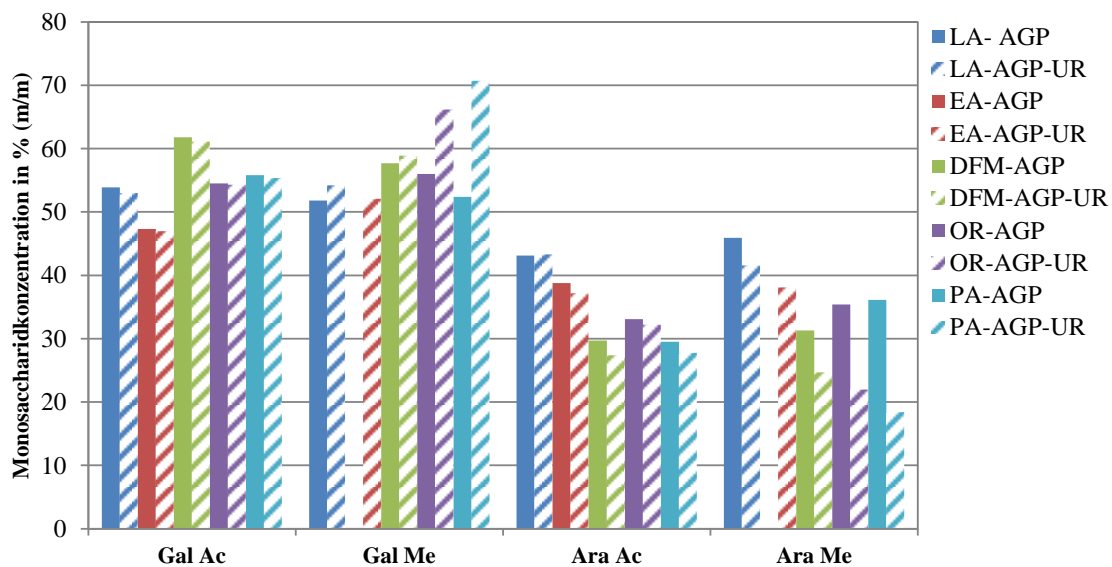


Abbildung 40: Vergleich der Gal- und Ara-Anteile der nativen und uronsäurereduzierten AGPs von Acetylierung (Ac) und Methylierung (Me)

LA = *Lycopodium annotinum*, EA = *Equisetum arvense*, DFM = *Dryopteris filix-mas*,
OR = *Osmunda regalis* und PA = *Pteridium aquilinum*

Die aus den verschiedenen Partialhydrolysen resultierenden Ergebnisse, insbesondere in der Kombination mit Bindungstypanalysen, sollten Erkenntnisse über die genaue Anordnung der Monosaccharide im Kohlenhydrateil liefern.

Da das Probenmaterial aller untersuchten Pflanzen begrenzt war, wurde der Schwerpunkt auf den Vergleich der Monosaccharid-Verknüpfung zwischen den intakten und den Smith-degradierten AGPs gelegt.

Typische Monosaccharidverknüpfungen, wie sie von AGPs aus Samenpflanzen bekannt sind (z.B. 1,3,6-Galp, 1,6-Galp, 1,3-Galp, t-Araf), wurden in allen fünf untersuchten

intakten AGPs gefunden und spiegeln charakteristische Elemente von Typ-II-Arabinogalaktanen wieder (CLARKE *et al.*, 1979).

Der ungewöhnliche Verzweigungspunkt 1,2,3-Galp, der in den AGPs von drei Moosarten detektiert wurde (BARTELS *et al.*, 2017), war im *Lycopodium*-AGP und den AGPs der Monilophyten nicht vorhanden. Neben terminaler Araf waren 1,2-, 1,3- und 1,5-verknüpfte Araf weitere typische Komponenten der AGPs aus Angiospermen (NOTHNAGEL, 1997). Allerdings war interessanterweise beim *Lycopodium*-AGP 1,3-verknüpfte Araf mit etwa 15 %, beim *Equisetum*-AGP 1,5-verknüpfte Araf mit ungefähr 14 % und beim *Pteridium*-AGP 1,2-Araf mit ca. 10 % ungewöhnlich hoch. Dieses Phänomen könnte ein Indiz für mehr Flexibilität in den Arabinoseseitenketten von Sporenpflanzen verglichen mit den von Samenpflanzen sein, deren AGPs normalerweise von terminaler Araf dominiert und nur von kleinen Mengen anderer Ara-Verknüpfungsarten begleitet werden.

AGPs aus Samenpflanzen enthalten meist hauptsächlich terminale Araf, Galp und manchmal auch GlcAp. Die AGPs von Moosen wiesen zusätzlich terminale 3-O-Me-Rhap in Mengen zwischen 2,3 und 11,9 % auf (BARTELS *et al.*, 2017), welche auch in den Monilophyten-AGPs in etwas geringeren Anteilen (1,4 – 7,2 %, Tabelle 8) detektiert wurden. Im AGP von *Lycopodium* trat jedoch neben den üblichen terminalen Zuckern der Angiospermen pyranosidische Arabinose in bemerkenswerter Menge mit rund 14 % auf, dafür aber keine 3-O-Me-Rhap wie bei den untersuchten Monilophyten.

Zwar wurde Arap schon öfter in Arabinogalaktanen nachgewiesen, jedoch bisher nur in geringeren Mengen. Beispiele dafür sind u.a. AGs aus dem Holz verschiedenerer Lärchen-Arten (GOELLNER *et al.*, 2011) und anderer Gymnospermen, wie Fichte und Kiefer (WILLFÖR *et al.*, 2002). Nur selten wurde Arap als Komponente von AGPs beschrieben (BACIC *et al.*, 1987; WACK *et al.*, 2005; CLASSEN, 2007; TRYFONA *et al.*, 2010).

Ein Vergleich der methylierten intakten AGPs mit und ohne Uronsäure-Reduktion lässt Rückschlüsse auf den Bindungstyp der Uronsäuren und deren Verknüpfung mit anderen Monosacchariden zu. Steigt der Gehalt an 1,6-Galp nach Reduktion an, so deutet das auf eine Bindung der Uronsäuren an diese Bausteine (THUDE und CLASSEN, 2005). Das liegt daran, dass die Zucker, an denen Uronsäuren gebunden sind, nach Hydrolyse nicht als Monosaccharide sondern mit dieser Uronsäure zusammen als Di- bzw. Trisaccharide (z.B. Gal-GlcA) vorliegen und somit der Messung unzugänglich sind. Nach einer Carboxylgruppen-Reduktion mit Natriumborodeuterid hingegen kann eine normale

Methylierungsanalyse durchgeführt werden (BIERMANN und MCGINNIS, 1988; THUDE und CLASSEN, 2005).

Für das AGP aus *Equisetum* lagen keine Daten zur nativen Probe vor.

Da bei den anderen vier untersuchten Pflanzen die Mengen an 1,6-Galp jeweils in beiden intakten AGPs (also den nativen und uronsäurereduzierten) sehr gering waren und keine eindeutige Steigerung detektiert wurde, waren die in den Proben enthaltenen Glukuronsäuren vermutlich mit anderen Zuckerbausteinen verknüpft. Überdies konnten weitere Bausteine, wie 1,2-Araf, 1,5-Araf und 1,3-Galp, als Bindungspartner der GlcA ausgeschlossen werden. Bei 1,3-Galp könnte das schon ein Hinweis für das Vorhandensein dieses Bausteins in der Hauptkette und nicht in den Seitenketten sein (GÖLLNER *et al.*, 2010; KITAZAWA *et al.*, 2013).

Weiterhin waren beim Vergleich von unreduzierter zu reduzierter AGP-Probe in *Lycopodium* und den leptosporangiaten Farnen die Mengen an 1,3,6-Galp, bei *Lycopodium* zusätzlich 1,3-Araf und bei *Osmunda* und *Pteridium* auch 1,4-Galp gestiegen. Somit kamen die eben genannten Gruppen als mögliche Verknüpfungsstellen der GlcA in Betracht. 1,3,6-Galp und 1,4-Galp wurden schon bei *Baptisia tinctoria* als mögliche Bindungspartner der GlcA angenommen (WACK *et al.*, 2005). Trotzdem ist dabei zu berücksichtigen, dass leichte Steigerungen der Konzentration auch infolge von Schwankungen innerhalb der Analyse auftreten konnten und damit keine zuverlässigen Parameter sondern nur Indizien sind. Hinsichtlich der Zuverlässigkeit der Ergebnisse müssten Mehrfachbestimmungen durchgeführt werden. So könnten u.a. eventuelle Fehler durch unvollständige Reduktion, unvollständige Methylierung oder unvollständige Oxidation während der Smith-Degradierung vermieden werden.

Die Smith-Degradation der AGPs lieferte zusätzliche Informationen zur Aufklärung der AGP-Strukturen. Dies war insbesondere wichtig, um den Aufbau des Kohlenhydrat-Rückgrats zu beurteilen. Bisher wurde überwiegend von 1,3-verknüpften Galaktose-Rückgraten mit am C-6 verzweigten 1,6-Galp-Seitenketten, an die wiederum am C-3 hauptsächlich Arabinose gebunden war, berichtet (THUDE und CLASSEN, 2005; GÖLLNER *et al.*, 2010). Für einige AGPs wurde außerdem beschrieben, dass diese Hauptkette aus 1,3-Galp durch einzelne Monomere von 1,6-Galp oder 1,5-Araf unterbrochen wurde (FINCHER *et al.*, 1983; CHURMS und STEPHEN, 1984; BACIC *et al.*, 1987; TAN *et al.*, 2004). Teilweise wurde auch dargelegt, dass Arabinose direkt in

Form von Mono- und Oligosacchariden an das Galaktose-Rückgrat gebunden war (PONDER und RICHARDS, 1997; WILLFÖR *et al.*, 2002).

In den Smith-degradierten AGPs wurden je 20 – 30 % 1,3,6- und 1,3-Galp als auch 10 – 20 % 1,6-Galp nachgewiesen. Bei den Monilophyten war zusätzlich ungefähr 15 % terminale Galp vorhanden, beim *Lycopodium* dagegen nur ca. 1 %. Der Unterschied in der Konzentration an Galp bedeutete, dass in den Monilophyten etwas mehr Monosaccharide mit vicinalen OH-Gruppen an 1,3,6- und 1,3-Galp gebunden vorlagen und in *Lycopodium* fast ausschließlich Zucker ohne vicinale OH-Gruppen, wie z.B. die 1,3-Araf. Die mengenmäßige Zusammensetzung der Bausteine deutete aber bei allen untersuchten AGPs auf immer noch stark verzweigte AG-Moleküle hin. Dies wurde auch durch die bei den Smith-degradierten AGPs weiterhin bestehende Differenz zwischen höherem absoluten Molekulargewicht und geringerem hydrodynamischen Volumen bestätigt (siehe VI.2.3). Deshalb lag die Vermutung nahe, dass die Seitenketten der AGPs zuvor nicht nur aus Periodat-labilen Gruppen, wie z.B. 1,6-Galp bestanden, sondern auch über 1,3,6-Galp-Bausteine verfügten.

Es ließ sich daraus jedoch nicht ableiten, ob auch 1,6-Galp zuvor in der Hauptkette vorhanden war. Dieses schien zumindest aufgrund der in den intakten AGPs geringen Menge an 1,6-Galp-Bindungstypen eher unwahrscheinlich. Weiterhin konnte nicht festgestellt werden, ob 1,3-Galp Teil der Seitenketten war. Auch wenn diese Möglichkeit in der Literatur für ein AGP aus *Avena sativa* vorgeschlagen wurde (GÖLLNER *et al.*, 2011), wäre es biosynthetisch fraglich. Daher wurde dieser Aspekt bei weiterer Betrachtung zunächst ausgeschlossen. Überprüft werden könnte dies mittels sich anschließender zweiter Smith-Degradation. Würden dort noch immer 1,3,6-Galp und 1,3-Galp detektiert werden, so spräche dies für 1,3-Galp-Bindungen in den Seitenketten.

Bei der Smith-degradierten Probe des AGP von *Lycopodium* war die terminale Araf gegenüber den intakten *Lycopodium*-AGPs erhöht, was auf die hohe Menge an 1,3-Araf vor der Behandlung zurückzuführen war. Aus diesem Ergebnis konnte geschlossen werden, dass 1,3-Araf im intakten AGP vor allem an andere nicht Periodat-labile Bindungstypen der Seitenkette (z.B. 1,3,6-Galp) verknüpft gewesen sein musste. Diese Schlussfolgerung stimmte zusätzlich gut mit der kurz zuvor genannten Theorie bezüglich der geringen 1,6-Galp-Konzentration der Smith-degradierten Probe des *Lycopodium*-AGP überein, aus der resultierte, dass 1,3,6-Galp-Bausteine in den Seitenketten vorkamen.

Da in den untersuchten AGPs viele verschiedene Bindungstypen auftauchten, ist es nicht möglich endgültige Aussagen bezüglich der Struktur des Kohlenhydrateils zu machen.

Weitere unterschiedliche Hydrolysen (z.B. mit Enzymen) und anschließende Verknüpfungsanalysen würden eine genauere Interpretation möglich machen. Entsprechend den bisher ermittelten Hinweisen zur Kohlenhydratstruktur wurden Strukturvorschläge zur Veranschaulichung entwickelt (Abbildung 41 – Abbildung 45).

Details, wie beispielsweise die Verknüpfung der Glukuronsäure mit C-3 oder C-6 der 1,3,6-Galp konnten nur modellhaft dargestellt werden. Dafür wären genauere Untersuchungen mit z.B. Kernspinresonanzspektroskopie (SAULNIER *et al.*, 1992) oder enzymatischem Abbau durch β -Glukuronidase und anschließender Bindungstypanalyse (KONISHI *et al.*, 2008) nötig. Des Weiteren wären mittels Kernspinresonanzspektroskopie oder NMR Aussagen zur α - bzw. β -Konformation der einzelnen Monosaccharide möglich gewesen (AGRAWAL, 1992; PONDER und RICHARDS, 1997; SIMS und FURNEAUX, 2003).

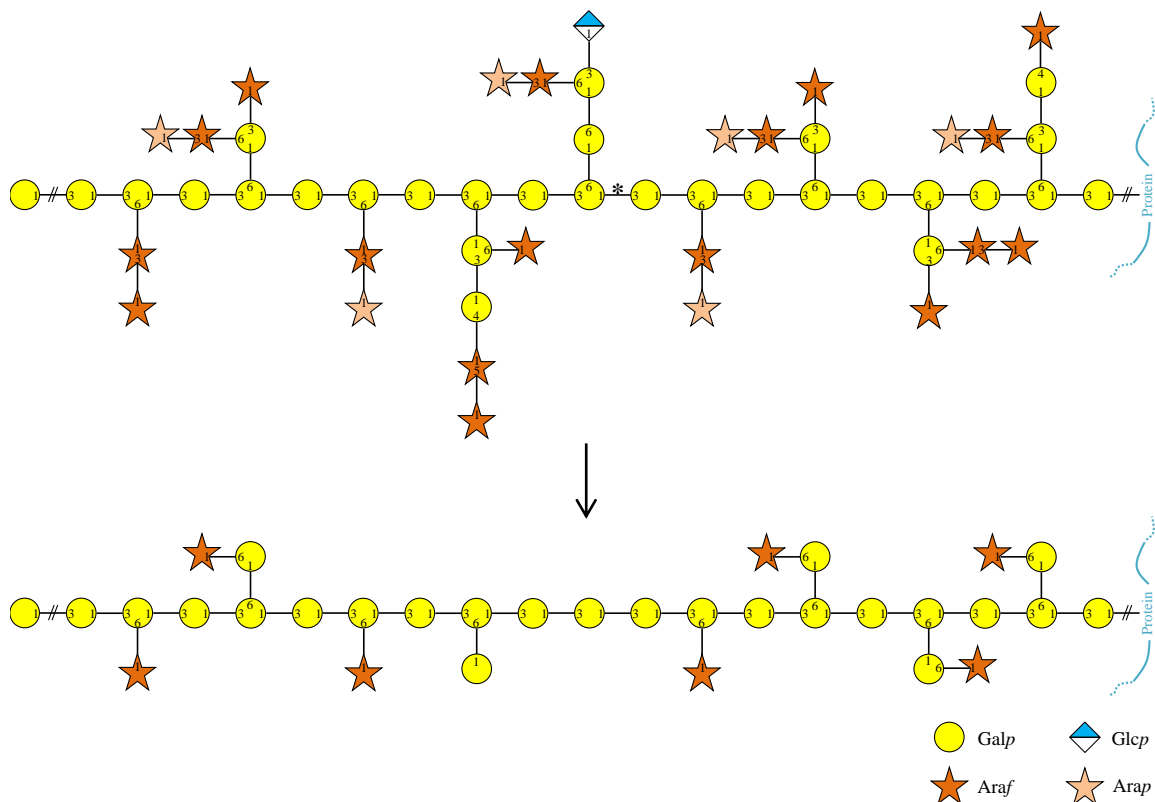


Abbildung 41: Strukturmodell des Kohlenhydratgrundgerüsts des *Lycopodium*-AGP (oben) und Smith-degradiert (unten)

* evtl. 1,6-Galp oder 1,5-Araf z.B. an dieser Stelle in der Hauptkette

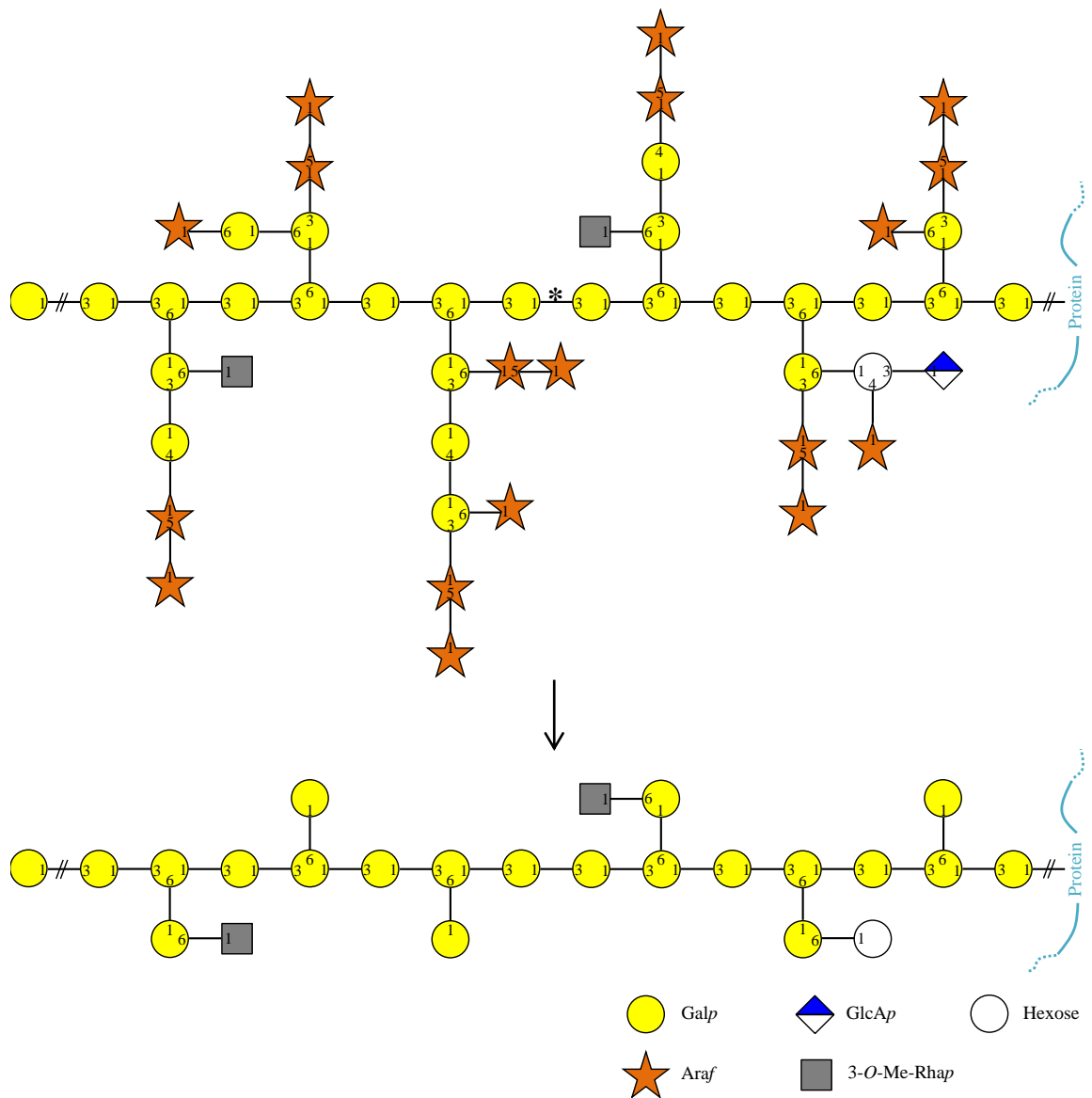


Abbildung 42: Strukturmodell des Kohlenhydratgrundgerüsts des *Equisetum*-AGP (oben) und Smith-degradiert (unten)

* evtl. 1,6-Galp oder 1,5-Araf z.B. an dieser Stelle in der Hauptkette

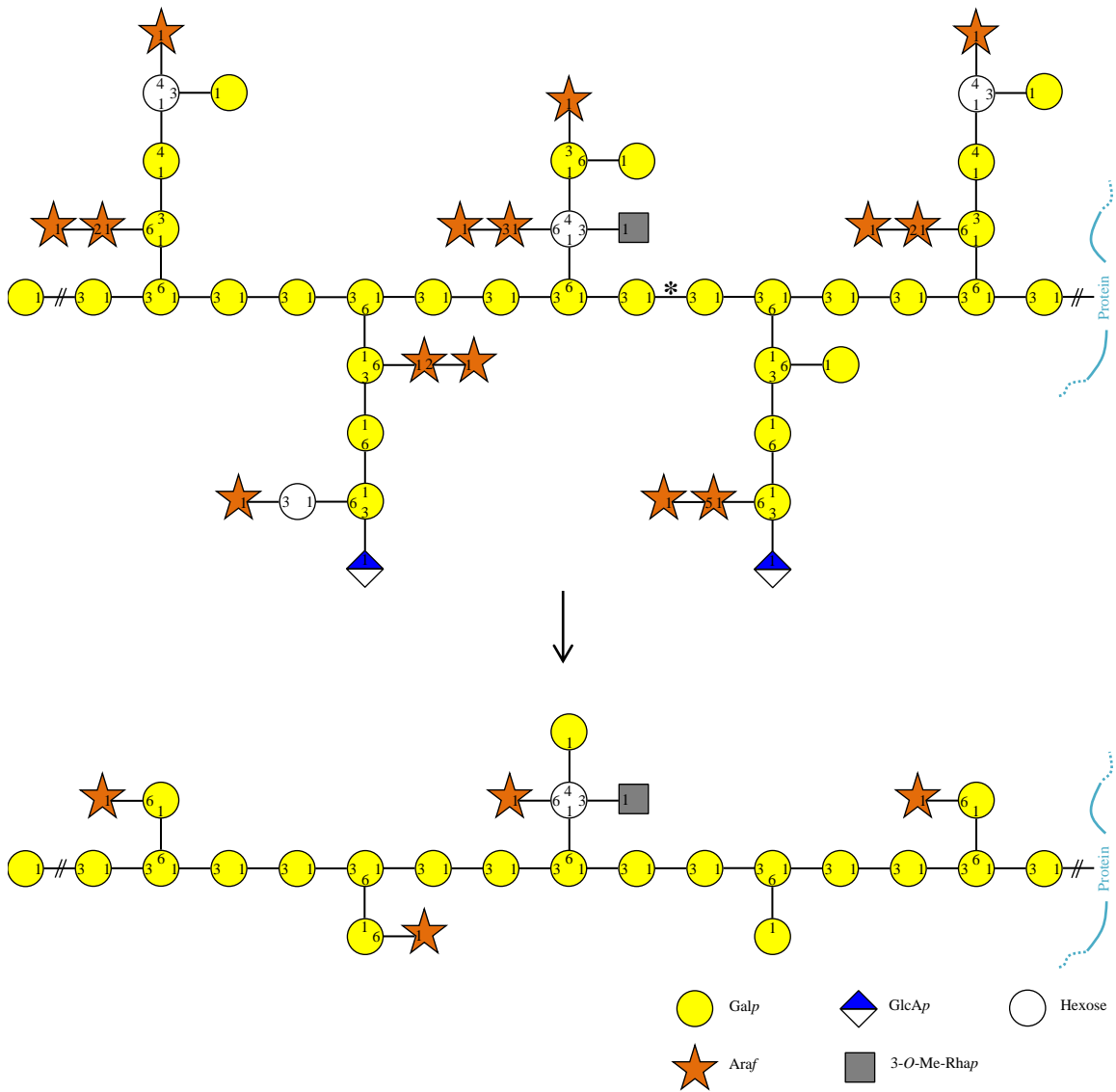


Abbildung 43: Strukturmodell des Kohlenhydratgrundgerüsts des *Dryopteris*-AGP (oben) und Smith-degradiert (unten)

* evtl. 1,6-Galp oder 1,5-Araf z.B. an dieser Stelle in der Hauptkette

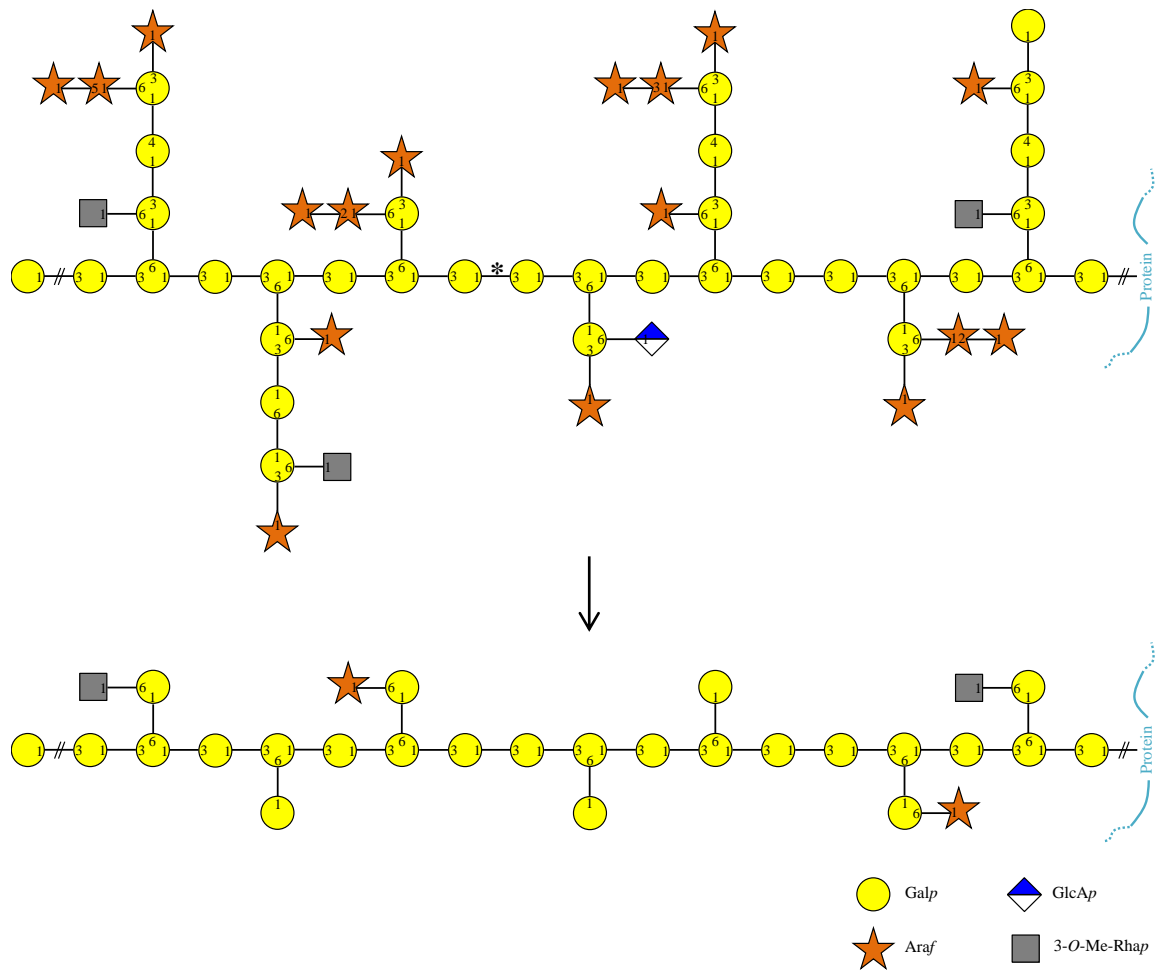


Abbildung 44: Strukturmodell Kohlenhydratgrundgerüsts des *Osmunda*-AGP (oben) und Smith-degradiert (unten)

* evtl. 1,6-Galp oder 1,5-Araf z.B. an dieser Stelle in der Hauptkette

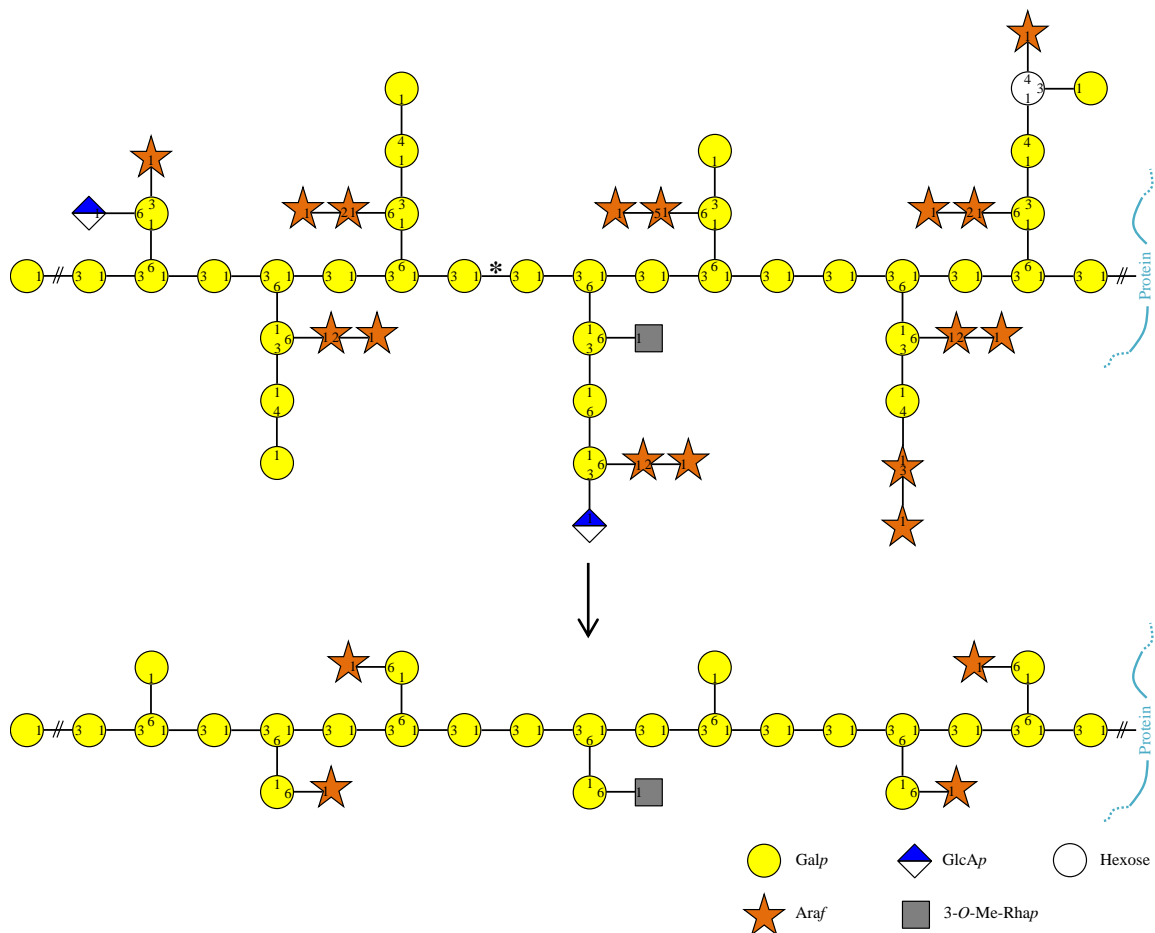


Abbildung 45: Strukturmodell des Kohlenhydratgrundgerüsts des *Pteridium*-AGP (oben) und Smith-degradiert (unten)

* evtl. 1,6-Galp oder 1,5-Araf z.B. an dieser Stelle in der Hauptkette

Der typische Aufbau der 1,6-Galp-Seitenketten mit an C-3 verknüpfter Araf traf für die Modelle der untersuchten AGPs nicht ausnahmslos zu. Oftmals ergab sich aus den Berechnungen, dass Monosaccharide ohne vicinale OH-Gruppen, wie 1,2- und 1,3-Araf an C-6 geknüpft waren und somit die wenigen 1,4- und 1,6-Galp-Moleküle teilweise an C-3 der Seitenkette gebunden sein mussten, auch wenn dieser Aufbau aufgrund der bereits bekannten AGPs untypisch ist. Außerdem waren direkte Bindungen von Arabinose-Oligomeren an das Galaktose-Rückgrat für das *Lycopodium*-AGP (wie dargestellt) denkbar. Diese Ara-Disaccharide könnten aber alle auch nur mit den Galaktose-Seitenketten verknüpft sein.

Zudem konnte nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die AGPs doch vereinzelt 1,6-Galp oder 1,5-Araf in der Hauptkette (evtl. an den in den Abbildungen mit * gekennzeichneten Stellen) oder 1,3-Galp in den Seitenketten besitzen, da der relative Anteil an 1,3-Galp in einigen der Smith-degradierten Proben für die dargestellten Strukturvorschläge eigentlich etwas höher hätte sein müssen. Zumindest für den ersten Fall, dass 1,6-Galp oder 1,5-Araf in der Hauptkette vorhanden ist, hätten niedrigere Molekulargewichte nach der Smith-Degradierung vorhanden sein müssen (Tabelle 21).

Variationen in den Längen der Seitenketten, wie in den untersuchten AGPs, sind bereits für einige AGPs beschrieben worden (WACK *et al.*, 2005; TRYFONA *et al.*, 2010). Auch wurde zuvor schon von unterschiedlichen Strukturen innerhalb der Seitenketten (CLASSEN *et al.*, 2005; WACK *et al.*, 2005) und weiteren untypischen Monosacchariden wie 1,3,4,6-Galp in AGPs berichtet (BACIC *et al.*, 1987).

Trotz der im Vergleich zu Angiospermen-AGPs geringen Menge an 1,6-Galp, sowie höheren Mengen an Periodat-stabiler Arabinose und damit untypischem Aufbau der Seitenketten, konnte das Kohlenhydratgerüst dem Typ-II-AG zugeordnet werden (ASPINALL, 1973). Dieses unterscheidet sich überwiegend in der Hauptkette der AGs vom Typ-I, welche aus 1,4-Galp statt 1,3-Galp aufgebaut ist. Die untersuchten AGPs wiesen zudem an Position 6 des Rückgrates Seitenketten, wie für Typ-II beschrieben, auf.

Weitere Aufschlüsse über die Struktur der untersuchten AGPs lieferten die in ELISAs ermittelten Kreuzreaktivitäten mit Antikörpern, die gegen die Kohlenhydratstrukturen des *Echinacea purpurea*-AGP gerichtet sind. Für den monoklonalen Antikörper wurde früher bereits gezeigt, dass sich das entsprechende Epitop im Galaktan-Grundgerüst befindet (CLASSEN *et al.*, 2004). Da alle untersuchten AGPs zwar die für Typ-II beschriebene Hauptkette mit an C-6 verzweigten Seitenketten, aber kaum bzw. nur kurze 1,6-Galp-Seitenketten aufwiesen, erwartete man entweder bei allen fünf oder keinem der fünf untersuchten AGPs eine Kreuzreaktivität. Bei allen Monilophyten-AGPs war die Reaktion mit dem monoklonalen AK sehr schwach. Infolge der deutlich höheren 1,6-Galp-Konzentration des *Echinacea*-AGP (14,7 %) spräche dies für 1,6-Galp als wichtigen Teil des Epitops, welcher durch den verwendeten Antikörper erkannt wird. Aktuelle Untersuchungen mit synthetisch hergestellten Oligosacchariden konnten diese Vermutung verifizieren (unpublizierte Daten, persönliche Mitteilung von Dr. Fabian Pfrengle, Berlin). Unklar ist, warum das *Lycopodium*-AGP im Vergleich zu den Anderen relativ gut von dem Antikörper erkannt wurde, obwohl es auch kaum 1,6-Galp enthielt.

Bei den polyklonalen AKs wurde bereits festgestellt, dass sie gegen Epitope mit Arap-Resten reagieren (CLASSEN *et al.*, 2005). Deshalb war nicht verwunderlich, dass alle untersuchten AGPs eine Interaktion zeigten. Interessant war dabei vor allem, dass die Monilophyten-AGPs sogar besser von diesen Antikörpern erkannt wurden als das AGP aus dem *Echinacea*-Presssaft. Das *Lycopodium*-AGP stellte erneut eine Ausnahme dar, weil die Kreuzreaktivität mit diesen AKs geringer ausfiel.

Die schwächere Bindung mit dem *Lycopodium*-AGP ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die hohe Menge terminaler Arap zurückzuführen, wodurch die arabinosehaltigen Epitope dieses AGP deutlich anders sind. Für das AGP aus der Zellkultur von *Echinacea purpurea*, welches weniger 1,5-Araf, dafür mehr 1,3-Araf und terminale Arap zeigte, als das aus dem Presssaft gewonnene, war auch eine geringere Kreuzreaktivität gemessen worden (CLASSEN, 2007). Bei den AGPs der Monilophyten hingegen, konnte die Vielfalt der in den polyklonalen AKs vorkommenden Epitop-bindenden Stellen vermutlich besonders gut mit deren Feinstruktur wechselwirken. Ein weiterer Grund für die schwächere Aktivität des *Echinacea*-AGP in diesem Testsystem könnten chargenspezifische Unterschiede sein, wie sie bei Polysacchariden bzw. Glykoproteinen aus Pflanzen in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen (z.B. Erntezeitpunkt, Klima etc.) in der Regel vorkommen. Es handelte sich bei dem eingesetzten *Echinacea*-AGP nicht mehr um das Originalantigen, sondern um eine andere Charge aus einem anderen Erntejahr.

Neben diesen Beiden, gegen das *Echinacea*-AGP gerichteten AKs, gibt es noch weitere zahlreiche mehr oder weniger spezifische, überwiegend monoklonale AKs, die gegen Epitope von Zellwandpolysacchariden u.a. AGPs gerichtet sind. Sie werden zur Detektion von verschiedenen Polysacchariden und AGPs in pflanzlichen Zellwänden genutzt und liefern damit teilweise auch erste Hinweise zu deren Funktionen (CASERO *et al.*, 1998; COIMBRA *et al.*, 2007; CHENG *et al.*, 2008; ALTANER *et al.*, 2010; LEROUX *et al.*, 2011; LEROUX *et al.*, 2015). Eine Testung dieser kommerziell erhältlichen AKs könnte weitere Hinweise zur Struktur der untersuchten AGPs liefern.

2.2 Proteinstruktur

Für die Charakterisierung des Proteinteils der AGPs wurde die Proteinmenge quantifiziert und die Aminosäurezusammensetzung analysiert.

Der Proteingehalt, der mit Hilfe von den zwei verwendeten Methoden (Elementaranalyse und Aminosäureanalyse) bestimmt wurde, lag für die vier Monilophyten-AGPs

durchschnittlich bei 6,7 – 12,1 % und für *Lycopodium*-AGP bei durchschnittlich 17,0 %. Damit waren die Proteingehalte der Monilophyten-AGPs mit denen der Samenpflanzen, welche normalerweise um die 10 % Protein enthielten (CLARKE *et al.*, 1979) vergleichbar. Beim *Lycopodium*-AGP hingegen war die Menge an Protein untypisch hoch und somit vergleichbar mit der des *Acacia robusta*-AGP (18,0 %; CHURMS und STEPHEN, 1984) und des Moos-AGP aus *Polytrichastrum* (17,8 %; BARTELS *et al.*, 2017).

Die Zusammensetzung der AGP-Proteinteile war durch hohe Mengen an Gln/Glu, Asn/Asp, Thr, Ser, Leu, Hyp und Ala charakterisiert, wobei bei *Lycopodium* Lys dominierte. Hyp, Ser, Ala, Thr, Gln/Glu, Asn/Asp und Gly treten als Hauptaminosäuren in AGPs der Angiospermen auf (NOTHNAGEL, 1997; ELLIS *et al.*, 2010; GÖLLNER *et al.*, 2010). Somit ähnelten die untersuchten AGPs den AGPs der Samenpflanzen hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung. Zudem stimmte die Zusammensetzung der Aminosäuren des *Osmunda*-AGP gut mit den Untersuchungen an dem „Arabinogalaktan-reichen Protein“ aus derselben Gattung, in der hauptsächlich Glx, Asx, Ser, Thr und Hyp auftraten, überein (AKIYAMA *et al.*, 1988). Einzig das *Lycopodium*-AGP fiel mit Lys als dominierender Aminosäure besonders ins Auge. Kurze Lys-reiche Regionen innerhalb der AGP-Proteinteile wurden bei Spermatophyten bereits beschrieben (SUN *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2017). Ansonsten glich die Aminosäurezusammensetzung denen der leptosporangiaten Farne.

Verantwortliche Aminosäure für die *O*-glykosidische Bindung zwischen Protein und Polysaccharid-Ketten ist in AGPs hauptsächlich Hyp (NOTHNAGEL, 1997; THUDE und CLASSEN, 2005; GÖLLNER *et al.*, 2010). Die Hyp-Menge des *Equisetum*-AGP war etwas höher, der Proteingehalt allerdings eher geringer als bei Angiospermen. Dafür war verglichen mit den Angiospermen die Hyp-Menge der anderen vier untersuchten AGPs im unteren Bereich. Es ergab sich die Frage, ob in allen fünf AGPs genügend Hyp-Bindungsmöglichkeiten zur Verfügung standen.

Zur Überprüfung der Anzahl an möglichen Bindungsstellen war die Kombination mit den Ergebnissen der absoluten Molekulargewichte notwendig, da so die Größe des Proteinteils der jeweiligen AGPs bestimmt werden konnte (siehe VI.2.3).

2.3 Strukturmodelle der untersuchten AGPs

Die mittels GPC ermittelten durchschnittlichen absoluten Molekulargewichte der Hauptfraktionen der untersuchten AGPs lagen mit 93 – 173 kDa in einem Bereich der auch für Angiospermen-AGPs typisch ist (60-300 kDa, NOTHNAGEL, 1997). Für ein “Arabinogalaktan-reiches Protein” aus *Osmunda japonica* wurde ein hydrodynamisches Volumen von 51 kDa bestimmt (AKIYAMA *et al.*, 1988) und stimmte damit mit der hier untersuchten *Osmunda*-Art überein. Deutlich kleinere hydrodynamische Volumina der untersuchten AGPs deuteten, wie bereits zuvor erwähnt, auf stark verzweigte Moleküle hin.

Unterstützt wurde diese Annahme mittels hoher Mengen an 1,3,6-Galp-Verzweigungspunkten, die in den nativen und Smith-degradierten Proben der Bindungstypanalyse gefunden wurden. Im Vergleich zu den absoluten Molekulargewichten wiesen die Smith-degradierten Proben noch immer teilweise deutlich kleinere hydrodynamische Volumina auf. Da der Unterschied zwischen absolutem Molekulargewicht und hydrodynamischem Volumen allerdings i.d.R. nicht mehr ganz so groß war, deutete das auf eine Abnahme des Verzweigungsgrades hin.

Der Molekulargewichtsvergleich der alkalisch hydrolysierten AGPs mit den nativen AGPs sollte der Bestimmung von Größe und Anzahl der Polysaccharidketten dienen, die an das Proteinrückgrat geknüpft waren.

Dabei wurden nach alkalischer Hydrolyse für jedes untersuchte AGP zwei AG-Fraktionen ausgemacht. Die größeren Fraktionen (68 – 126 kDa) entsprachen basierend auf einem Ara/Gal-Verhältnis von etwa 1:1,5 ca. 400 – 750 Monosacchariden und waren vermutlich Resultate unvollständiger Hydrolyse, da bisher laut Literatur die Größe der Polysaccharideinheiten von AGPs nach alkalischer Hydrolyse zwischen 5 – 30 kDa (entspricht 30 – 180 Monosacchariden) betrug (VOLK *et al.*, 2007; ELLIS *et al.*, 2010; GÖLLNER *et al.*, 2010; GÖLLNER *et al.*, 2011). Die kleineren Fraktionen (13 – 23 kDa) passten mit einer Anzahl von etwa 80 – 140 Monosacchariden zu den Angaben, die in der Literatur beschrieben wurden. Es fiel auf, dass die kleineren AG-Fraktionen der leptosporangiaten Farne mit 13 – 17 kDa im Gegensatz zu *Lycopodium* und *Equisetum* mit 23 und 20 kDa aus weniger Monosacchariden (80 – 105 im Vgl. zu 140 und 120) aufgebaut waren. Abhängig von der Art würden die fünf AGPs, unter Annahme immer gleich großer Zuckerreste innerhalb eines AGPs, 5 – 10 Polysaccharidketten aufweisen. Dadurch würde die Annahme der globulären Struktur unterstützt werden. Es ist jedoch

nicht völlig auszuschließen, dass die AGPs abhängig von der Art eine sehr große und keine oder ein bis drei weitere kleine Ketten enthielten (Tabelle 22, Abbildung 46).

Tabelle 22: Anzahl der AGs in den untersuchten AGPs des Sommers 2014

Probe	MG AGP [kDa]	MG Proteinteil [kDa]	MG Polysaccharidteil [kDa]	MG einzelne AGs [kDa]	Anzahl der AGs pro AGP
<i>Lycopodium annotinum</i>	142	24	118	126 23	1 gr. oder 5 kl.
<i>Equisetum arvense</i>	119	8	111	87 20	1 gr. & 1 kl. oder 7 kl.
<i>Dryopteris filix-mas</i>	184	22	162	109 17	1 gr. & 3 kl. oder 10 kl.
<i>Osmunda regalis</i>	89	8	81	68 13	1 gr. & 1 kl. oder 6 kl.
<i>Pteridium aquilinum</i>	122	8	114	92 14	1 gr. & 2 kl. oder 8 kl.

MG = Molekulargewicht, gr. = große, kl. = kleine

Im *Pelargonium*-AGP wurde beispielsweise eine größere Zuckereinheit (50 kDa) mit weiteren kleineren Zuckereinheiten (0,7 – 15 kDa) vermutet (DUCHOW, 2012). Außerdem war nicht feststellbar, ob an dem Proteinrückgrat der AGPs zusätzlich kleinere Arabinose-Oligosaccharide, wie teilweise in der Literatur beschrieben (ELLIS *et al.*, 2010), vorkamen, weil nach der alkalischen Hydrolyse zuerst dialysiert wurde. So wurden Moleküle mit einem Molekulargewicht von unter 1000 Da vor der GPC-Analyse entfernt. Eine Identifizierung von Ara-Oligosacchariden könnte ohne vorhergehende Dialyse unter Zuhilfenahme von präparativer Auftrennung sowie anschließender Analytik der einzelnen Fraktionen erfolgen.

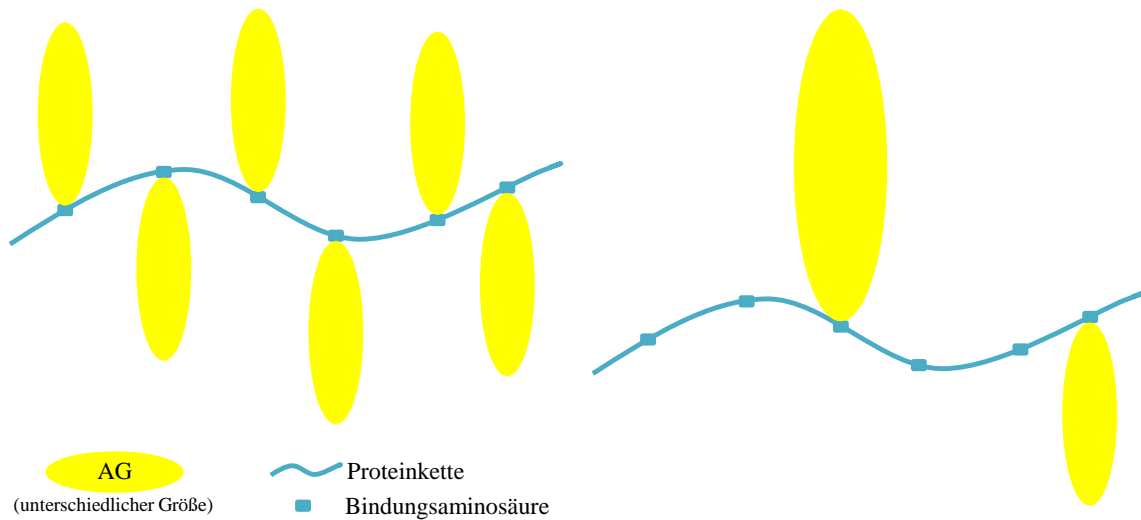


Abbildung 46: Zwei Modellvorschläge am Beispiel des *Osmunda*-AGP

links: mehrere kleine gleichgroße Arabinogalaktan-Ketten;
rechts: eine große und eine kleine Arabinogalaktan-Kette

Wie bereits in VI.2.2 beschrieben, erfolgt die Verknüpfung der Polysaccharidketten vorherrschend über kovalente Bindung der Gal mit dem Hyp des Proteinteils (STRAHM *et al.*, 1981; VAN HOLST und KLIS, 1981; BACIC *et al.*, 1987; QI *et al.*, 1991). Bei den Ara-Oligosacchariden z.B. würde die kovalente *O*-glykosidische Bindung über Ara mit Hyp stattfinden (YAMAGISHI *et al.*, 1976; HAAVIK *et al.*, 1982).

Ebenfalls diskutiert wurden *O*-glykosidische Verknüpfungen mit Ser und Thr sowie *N*-glykosidische über Asn (HILLESTAD *et al.*, 1977; TSUMURAYA *et al.*, 1987; NOTHNAGEL, 1997; SHOWALTER, 2001). So wie auch in dieser Arbeit, fehlen in den meisten wissenschaftlichen Texten zu AGPs genaue Untersuchungen zu den Kohlenhydrat-Protein-Verknüpfungen. Daher ist eine Aussage über die Häufigkeit dieser vorkommenden Verknüpfungsmöglichkeiten schwer. Um nähere Angaben zu den Bindungen der Zuckereinheiten mit den entsprechenden Aminosäuren zu machen, müssten Proteinsequenzierungen durchgeführt werden. Dies könnte z.B. nach Deglykosylierung mit Hilfe des Edman-Abbaus (MORT und LAMPORT, 1977; CLASSEN *et al.*, 2005) oder mittels molekularbiologischer Methoden (HERVÉ *et al.*, 2016) geschehen. Nur Aminosäuren, die in bestimmten Aminosäuresequenzen vorliegen, bilden überhaupt *O*- oder *N*-glykosidische Bindungen aus (KIELISZEWSKI und LAMPORT, 1994; NOTHNAGEL, 1997; LEROUGE *et al.*, 1998; KIELISZEWSKI, 2001). Aufgrund der fehlenden Proteinsequenzierung war keine eindeutige Bestimmung der Bindungsaminosäuren möglich. Da *N*-glykosidische Bindungen in der Regel nur bei

pflanzlichen Polysacchariden mit viel Man und N-Acetylglucosamin (GlcNAc) zu finden sind (LEROUGE *et al.*, 1998), wurde angenommen, dass diese Bindungen nicht in den untersuchten AGPs, die kaum Man und kein GlcNAc aufwiesen, vorkamen. Die Verknüpfungen erfolgten aller Wahrscheinlichkeit nach *O*-glykosidisch.

Unter Einbeziehung des Proteinanteils in Bezug auf das Molekulargewicht der jeweiligen AGPs ergaben sich verschieden große Proteinteile für die untersuchten AGPs (siehe auch Tabelle 22). Daraus wiederum konnte mit Hilfe der Aminosäurezusammensetzung die Anzahl der einzelnen Aminosäuren berechnet werden.

So besaßen die AGPs von *Lycopodium* und *Equisetum* vermutlich genügend Hyp für die Bindungen (Tabelle 23 und Tabelle 24). Sie wiesen rechnerisch jeweils 10 Hyp für 5 bzw. 7 Verknüpfungen mit Polysaccharidketten auf.

Die AGPs von *Dryopteris*, *Osmunda* und *Pteridium* wiesen, blieb man weiterhin bei der Annahme von 6–10 Polysaccharidketten für diese AGPs, zu wenig Hyp für alle Verknüpfungen auf (Tabelle 25 – Tabelle 27). So ergaben sich für das *Dryopteris*-AGP anhand des Hyp nur 6 Bindungsstellen für 10 Polysaccharidketten, für das *Osmunda*-AGP 3 Bindungsstellen für 6 Polysaccharidketten und für das AGP von *Pteridium* 4 Bindungsstellen für 8 Polysaccharidketten. Das würde zu der Schlussfolgerung führen, dass dort auch Bindungen zwischen Gal und Ser bzw. Thr vorliegen müssten. Mit je 17 Ser und Thr für *Dryopteris*, je 6 Ser und Thr für das *Osmunda*-AGP bzw. 7 Ser und 6 Thr für das *Pteridium*-AGP wiesen sie somit genügend Bindungsstellen auf. Durch die wenigen Hyp-Bindungsstellen wäre zudem das Vorkommen von an Hyp gebundenen Arabino-Oligosacchariden in diesen AGPs unwahrscheinlich. Noch zweifelhafter wäre die Anwesenheit dieser Arabino-Oligosaccharide bei Berücksichtigung der Hyp-Kontiguitäts-Theorie, die besagt, dass große Zuckerketten an einzeln angeordnete Hyp-Bausteine und kurze Zuckerketten an aneinandergereihte Hyp-Bausteine gebunden sind (KIELISZEWSKI und LAMPORT, 1994; KIELISZEWSKI *et al.*, 1995). Diese Theorie trifft jedoch im Übrigen nicht bei allen AGPs zu (BALDWIN *et al.*, 1993).

Die Berechnung der absoluten Anzahl an Hyp-Molekülen erfolgte zusätzlich unter Verwendung der photometrisch ermittelten Hyp-Konzentrationen. Die Werte wurden dabei auf die absoluten Molekulargewichte der AGPs bezogen und lieferten nahezu identische Ergebnisse (für *Lycopodium*-AGP 11 Hyp, *Equisetum*-AGP 10 Hyp, *Dryopteris*-AGP 6 Hyp, *Osmunda*-AGP 3 Hyp und *Pteridium*-AGP 4 Hyp).

Tabelle 23: Aminosäure (AS)-Verteilung des 24 kDa großen Proteinteils* vom *Lycopodium*-AGP des Sommers 2014

<i>Lycopodium annotinum</i>				
	AS im Protein in % (m/m)	Molekulargewicht der AS in g/mol	100 % entsprechen 24000 Da	Anzahl an AS im Protein
Glx^x	8,2	147,13	1968	13
Asx^x	8,4	133,10	2016	15
Thr	7,8	119,12	1872	16
Ser	6,8	105,09	1632	16
Leu	8,0	131,18	1920	15
Hyp	5,3	131,13	1272	10
Ala	5,5	89,09	1320	15
Val	6,5	117,15	1560	13
Lys	10,8	145,19	2592	18
Gly	4,6	75,07	1104	15
Phe	5,2	165,19	1248	8
Pro	4,2	115,13	1008	9
Ile	4,7	131,17	1128	9
Tyr	3,7	181,19	888	5
Arg	6,7	174,20	1608	9
Met	1,1	149,21	264	2
His	1,8	155,16	432	3
Cys	0,2	121,16	48	0
Sonstige	0,5		120	1
∑	100,0		24000	192

* Berechnung der Größe auf Basis von absolutem Molekulargewicht und absolutem Proteingehalt des nativen AGP (Sommer 2014); ^x Molekulargewicht der entsprechenden Säure verwendet

Tabelle 24: AS-Verteilung des 8 kDa großen Proteinteils* vom *Equisetum*-AGP des Sommers 2014

<i>Equisetum arvense</i>				
	AS im Protein in % (m/m)	Molekulargewicht der AS in g/mol	100 % entsprechen 8000 Da	Anzahl an AS im Protein
Glx^x	10,0	147,13	800	5
Asx^x	8,5	133,10	680	5
Thr	9,4	119,12	752	6
Ser	10,8	105,09	864	8
Leu	6,7	131,18	536	4
Hyp	15,9	131,13	1272	10
Ala	9,1	89,09	728	8
Val	6,1	117,15	488	4
Lys	2,8	145,19	224	2
Gly	5,3	75,07	424	6
Phe	2,5	165,19	200	1
Pro	4,4	115,13	352	3
Ile	2,7	131,17	216	2

Tyr	2,4	181,19	192	1
Arg	0,8	174,20	64	0
Met	1,3	149,21	104	1
His	0,7	155,16	56	0
Cys	0,3	121,16	24	0
Sonstige	0,3		24	0
Σ	100,0		8000	66

* Berechnung der Größe auf Basis von absolutem Molekulargewicht und absolutem Proteingehalt des nativen AGP (Sommer 2014); ^x Molekulargewicht der entsprechenden Säure verwendet

Tabelle 25: AS-Verteilung des 22 kDa großen Proteinteils* vom *Dryopteris*-AGP des Sommers 2014

<i>Dryopteris filix-mas</i>				
	AS im Protein in % (m/m)	Molekulargewicht der AS in g/mol	100 % entsprechen 22000 Da	Anzahl an AS im Protein
Glx^x	8,8	147,13	1936	13
Asx^x	10,0	133,10	2200	17
Thr	9,0	119,12	1980	17
Ser	7,9	105,09	1738	17
Leu	8,8	131,18	1936	15
Hyp	3,8	131,13	836	6
Ala	6,1	89,09	1342	15
Val	6,6	117,15	1452	12
Lys	4,5	145,19	990	7
Gly	5,3	75,07	1166	16
Phe	6,0	165,19	1320	8
Pro	4,7	115,13	1034	9
Ile	5,0	131,17	1100	8
Tyr	6,0	181,19	1320	7
Arg	4,1	174,20	902	5
Met	1,4	149,21	308	2
His	1,0	155,16	220	1
Cys	0,3	121,16	66	1
Sonstige	0,7		154	1
Σ	100,0		22000	177

* Berechnung der Größe auf Basis von absolutem Molekulargewicht und absolutem Proteingehalt des nativen AGP (Sommer 2014); ^x Molekulargewicht der entsprechenden Säure verwendet

Tabelle 26: AS-Verteilung des 8 kDa großen Proteinteils* vom *Osmunda*-AGP des Sommers 2014

<i>Osmunda regalis</i>				
	AS im Protein in % (m/m)	Molekulargewicht der AS in g/mol	100 % entsprechen 8000 Da	Anzahl an AS im Protein
Glx^x	9,9	147,13	792	5
Asx^x	9,6	133,10	768	6
Thr	8,6	119,12	688	6
Ser	7,4	105,09	592	6

Leu	8,8	131,18	704	5
Hyp	5,3	131,13	424	3
Ala	7,4	89,09	592	7
Val	6,3	117,15	504	4
Lys	6,2	145,19	496	3
Gly	5,8	75,07	464	6
Phe	5,3	165,19	424	3
Pro	4,4	115,13	352	3
Ile	4,5	131,17	360	3
Tyr	3,6	181,19	288	2
Arg	3,7	174,20	296	2
Met	1,4	149,21	112	1
His	0,9	155,16	72	1
Cys	0,7	121,16	56	1
Sonstige	0,2		16	0
Σ	100,0		8000	67

* Berechnung der Größe auf Basis von absolutem Molekulargewicht und absolutem Proteingehalt des nativen AGP (Sommer 2014); ^x Molekulargewicht der entsprechenden Säure verwendet

Tabelle 27: AS-Verteilung des 8 kDa großen Proteinteils* vom *Pteridium*-AGP des Sommers 2014

<i>Pteridium aquilinum</i>				
	AS im Protein % (m/m)	Molekulargewicht der AS g/mol	100 % entsprechen 8000 Da	Anzahl an AS
Glx ^x	12,4	147,13	992	7
Asx ^x	12,1	133,10	968	7
Thr	8,9	119,12	712	6
Ser	8,8	105,09	704	7
Leu	8,0	131,18	640	5
Hyp	6,1	131,13	488	4
Ala	7,9	89,09	632	7
Val	6,7	117,15	536	5
Lys	3,3	145,19	264	2
Gly	6,0	75,07	480	6
Phe	4,5	165,19	360	2
Pro	3,7	115,13	296	3
Ile	3,6	131,17	288	2
Tyr	3,2	181,19	256	1
Arg	2,4	174,20	192	1
Met	1,3	149,21	104	1
His	0,0	155,16	0	0
Cys	0,2	121,16	16	0
Sonstige	0,9		72	1
Σ	100,0		8000	67

* Berechnung der Größe auf Basis von absolutem Molekulargewicht und absolutem Proteingehalt des nativen AGP (Sommer 2014); ^x Molekulargewicht der entsprechenden Säure verwendet

2.4 Strukturmodelle im Vergleich mit anderen AGPs

Bisher war die Isolierung und analytische Charakterisierung von Yariv-präzipitierten AGPs aus nicht blühenden Pflanzen auf drei Moosarten beschränkt (FU *et al.*, 2007; BARTELS *et al.*, 2017).

Nun wurde die Existenz von AGPs im Evolutionsstadium von Lycophyten (*Lycopodium*) und Monilophyten (*Equisetum*, *Dryopteris*, *Osmunda* und *Pteridium*) bestätigt. Dies diente als erster Schritt, um die Wissenslücke zwischen Bryophyten- und Spermatophyten-AGPs zu schließen und die Struktur der untersuchten AGPs im evolutionären Kontext zu vergleichen. Dabei können eigentlich nur die AGPs direkt miteinander verglichen werden, die durch das gleiche analytische Verfahren einschließlich Yariv-Präzipitation isoliert wurden.

Um einen groben Überblick über die in den Proben vorkommenden Strukturen auch im Vergleich zu anderen AGPs zu erhalten, wurden zunächst die IR-Spektren herangezogen. Die IR-Spektren der untersuchten AGPs stimmten mit denen in der Literatur für AGPs gezeigten bzw. beschriebenen überein (KACURÁKOVÁ *et al.*, 2000; CAPEK *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2009; CAPEK *et al.*, 2014). Generell ist die Auswertung der Spektren von hochkomplexen Stoffen durch Überlagerung von Peaks verschiedener Gruppen bei gleichen oder ähnlichen Wellenzahlen jedoch oft nicht eindeutig.

So stammten bei den AGPs die breiten Banden um 3300 cm^{-1} aus den Streckschwingungen von OH- und NH₂-Gruppen der Zucker- und Proteineinheiten. Die Banden von ungefähr 2900 cm^{-1} entstanden aus den C–H Streckschwingungen der Methylene- oder Methylgruppen von sowohl Kohlenhydrat- als auch Aminosäureresten (SAHA *et al.*, 2011).

Ebenso wurde der Bereich von $1200 - 800\text{ cm}^{-1}$ neben den genannten C–O–H- und C–O–C-Signalen durch weitere Signale von C– und –C/C–C-Gruppen beeinflusst.

Die Peaks bei etwa 1065 cm^{-1} und 1026 cm^{-1} mit Schulter bei 964 cm^{-1} waren charakteristisch für AGs (ROBERT *et al.*, 2005). Dabei hängt der durch C–O–C-Bindung (glc.-Bindg.) dominierte Bereich von $1160 - 30\text{ cm}^{-1}$ stark von dem Polysaccharid-Rückgrat ab und kann abhängig von den Zusammensetzungen der Seitenketten variieren (KACURÁKOVÁ *et al.*, 2000). Bei den untersuchten Proben ließ sich das gefundene Maximum von etwa 1020 cm^{-1} vermutlich auf die Valenzschwingung der C–O-Gruppe zurückführen (YAMASSAKI *et al.*, 2015).

Die Proteinbanden der C=O-, N-H- und C-N-Gruppen mit intensiven Banden bei 1420, 1376 und 1225 cm^{-1} (ZHOU *et al.*, 2009) könnten beispielsweise mit dem Signal der Uronsäure (1420 cm^{-1}) überlappen. Zusätzlich hätte die deprotonierte Uronsäure neben dem Signal von 1420 cm^{-1} ein Signal bei 1620 cm^{-1} erzeugt. Hier könnte evtl. das maximale Signal des Amid I, welches i.d.R. bei 1640 cm^{-1} liegt, durch Einfluss der Uronsäure verringert worden sein (Peakshift zu 1623 – 1638 cm^{-1}). Auch bei dem Signal der Ester-Gruppe hätte das Signal der Carboxylsäure-Gruppe mit einfließen können (BOULET *et al.*, 2007). Ebenfalls denkbar ist, dass Peaks teilweise aufgrund von sterischen Interaktionen nicht mehr als einzelne Peaks sichtbar waren.

Vorsicht ist zudem geboten, wenn Verunreinigungen in der Probe enthalten sind, die auch Signale erzeugen, wie z.B. Stärke. Diese zeigt teilweise Banden bei denselben Wellenlängen wie die AGPs: 1150, 1124 und 1100 für C=O & C–C, 1077, 1045, 1022, 994 und 928 für C–OH & CH₂ und 861 für C–O–C (ROBERT *et al.*, 2005). Allerdings sollte in den untersuchten Proben keine Stärke vorhanden sein. Verunreinigungen mit Phenolen könnten durch Banden bei 1517 cm^{-1} für C=C und 1242 cm^{-1} für Phenyl–OH (CAPEK *et al.*, 2014) in den entsprechenden Bereichen zu konzentrationsabhängigen Abweichungen der Signale führen.

Neben den IR-Untersuchungen dienten die weiteren analytischen Charakteristika der untersuchten AGPs einem detaillierteren Vergleich mit AGP-Strukturen der Literatur. Als klassische Merkmale von AGPs wurden ursprünglich das Vorhandensein von AG-Ketten, ein Hyp-reiches Proteinrückgrat und die Bindung mit β GlcY postuliert (DU *et al.*, 1996; TAN *et al.*, 2012; HERVÉ *et al.*, 2016). Diese Definition ist aufgrund der heute bekannten Heterogenität und Komplexität nicht mehr so streng zu sehen. Somit sind die hier Yariv-gefällten AGPs, auch wenn diese teilweise nicht so hohe Hyp-Mengen aufwiesen, der Familie der AGPs zugehörig.

Alle fünf untersuchten AGPs lagen mit ihrem 93 – 173 kDa großen Molekulargewicht im Bereich klassischer AGPs (NOTHNAGEL, 1997). Der Proteinanteil variierte dabei stark, wobei sich nur das *Lycopodium*-AGP wesentlich von dem der klassischen AGPs abhob. Die Ara/Gal-Verhältnisse der leptosporangiaten Farne mit etwa 1:2, das Vorhandensein von Glukuronsäure in den Monilophyten-AGPs und hohe Hyp-Werte im AGP vom eusporangiaten Farn *Equisetum* waren weitere typische Merkmale (GANE *et al.*, 1995; PUTOCZKI *et al.*, 2007; GÖLLNER *et al.*, 2010). Eine relativ niedrige Hyp-Menge, wie die der anderen vier AGPs, ist beispielsweise bereits aus dem *Pelargonium*-AGP

(DUCHOW *et al.*, 2016) bekannt. Im Falle vom AGP aus *Daucus carota* konnte sogar überhaupt kein Hyp nachgewiesen werden (BALDWIN *et al.*, 1993).

In Bezug auf die Feinstruktur zeigte sich, dass bei allen AGPs der Hauptteil aus einem zentralen Galaktan mit vergleichbaren Mengen von 1,3,6- und 1,3-verknüpfter Galp besteht.

Der Gehalt an 1,6-verknüpfter Galp war in den AGPs des Lycophyten und der Monilophyten durchweg niedriger als in den AGPs der Samenpflanzen (THUDE und CLASSEN, 2005; WACK *et al.*, 2005). Er schwankt in den Moos-AGPs, die als Einzige den ungewöhnlichen Verzweigungspunkt 1,2,3-Galp aufweisen (BARTELS *et al.*, 2017). In Bezug auf die terminalen Monosaccharide zeichnen sich die AGPs von Moosen und Farnen durch höhere Mengen an Rhap aus, wobei ein Teil davon als 3-O-Me-Rhap identifiziert wurde (BARTELS *et al.*, 2017). Dieses ungewöhnliche Monosaccharid ist bei Angiospermen-AGPs nicht vorhanden und konnte auch in dem Lycophyten-AGP nicht nachgewiesen werden. Ein ungewöhnliches Merkmal des AGPs aus *Lycopodium* war eine hohe Menge an terminaler Arap, welches den evolutionären Unterschied zu den Bryophyten und auch Monilophyten unterstreicht. Terminale Arap ist bisher in allen AGPs präsent und kommt mit fortschreitender Evolution vor allem in Samenpflanzen-AGPs reichlich vor.

Neben den Definitionen zur Struktur der Arabinogalaktane gibt es verschiedene Modelle zur räumlichen Anordnung der gesamten AGP-Moleküle. Im Laufe der Zeit wurden das „wattle blossom“-Modell (FINCHER *et al.*, 1983), sowie eine modifizierte Art davon (SHOWALTER, 2001), das „twisted hairy rope“-Modell (QI *et al.*, 1991) und ein abgeflachtes ellipsenförmiges bzw. diskusartiges Modell diskutiert (Abbildung 47). Das Letzte ist bis jetzt nur für ein bestimmtes AGP aus *Gummi arabicum* beschrieben worden (SANCHEZ *et al.*, 2008).

Bei dem „wattle blossom“-Modell wird von einer globulären Struktur der Moleküle ausgegangen, da mehrere verzweigte Polysaccharideinheiten um ein Kern-Protein angeordnet sind. Die modifizierte Form dieses globulären Modells liegt dann vor, wenn neben den größeren AG-Ketten weitere, sehr kleine Arabinose-Ketten das Kern-Protein umgeben. Im Gegenteil zu vorher handelt es sich bei dem „twisted hairy rope“-Modell um ein eher langgestrecktes Molekül. Die Polysaccharid- und arabinosehaltigen Oligosaccharid-Ketten sind dabei um ein gestrecktes, stäbchenförmiges Kern-Protein herum gebunden. Jedes vierte Hyp trägt dabei eine Glukuronorhamnoarabinogalaktan-

einheit (QI *et al.*, 1991). Bisher wurde auch mit Hilfe der Modelle die im Raum stehende Frage bezüglich der Größe, der an dem Protein hängenden Kohlenhydrat-Ketten, nicht geklärt. Es bleibt also weiterhin unklar, ob die AG-Ketten ein einheitliches Molekulargewicht (siehe Darstellung in den Modellen, Abbildung 47) oder unterschiedliche Molekulargewichte besitzen.

Trotzdem könnte das für Samenpflanzen (FINCHER *et al.*, 1983) und Moose (BARTELS *et al.*, 2017) verbreitet vorgeschlagene „wattle blossom“-Modell auch für die AGPs aus diesen Farnen und *Lycopodium* zutreffen. Diese Schlussfolgerung ergibt sich überwiegend aus der Gegenüberstellung des absoluten Molekulargewichts zum deutlich niedrigeren hydrodynamischen Volumen.

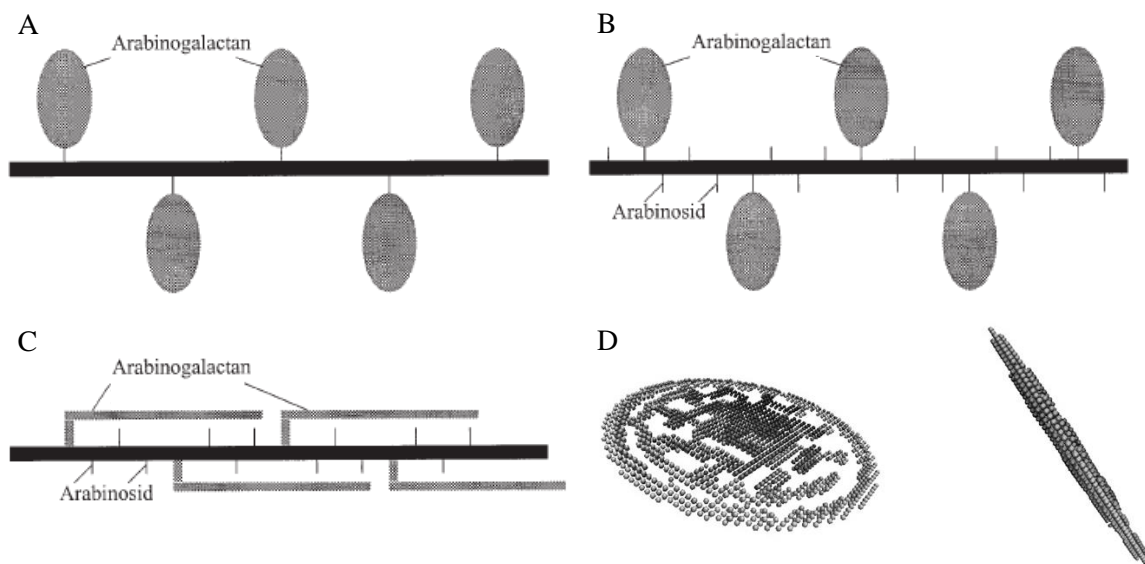


Abbildung 47: Schematische Darstellung der verschiedenen AGP-Strukturmodelle nach SHOWALTER, 2001 (A-C) und nach SANCHEZ *et al.*, 2008 (D)

basierend auf FINCHER *et al.*, 1983 (A), auf SHOWALTER, 2001 (B) und auf QI *et al.*, 1991 (C)

Alles in allem tragen die verschiedenen besonderen Merkmale der hier untersuchten AGPs zu einem tieferen Verständnis ihrer Struktur und der Entwicklung der Pflanzenzellwand in samenlosen Pflanzen bei. Außerdem sind die strukturellen Merkmale der AGPs dieser Gattungen in guter Übereinstimmung mit der phylogenetischen Klassifikation der untersuchten Pflanzen. Neben weiteren strukturellen Untersuchungen an AGPs von nicht blühenden Pflanzen werden die Herausforderungen für die zukünftige Forschung außerdem darin bestehen, Funktionen von AGPs in Bryophyten, Lycophyten

und Monilophyten aufzuklären und nach evolutionären Wurzeln von AGPs in Algen zu suchen.

3. Lokalisierung der AGPs in pflanzlichen Geweben

Die in den pflanzlichen Geweben mittels Yariv-Reagenz markierten AGPs waren nach Fluoreszenzmarkierung bei *Lycopodium*, *Equisetum*, *Dryopteris* und *Pteridium* im Xylem zu finden. Im Gegensatz dazu lagen die AGPs der *Osmunda*-Mittelrippe vor allem im Phloem vor.

Zuvor wurden AGPs schon einige Male mit Hilfe von spezifischen Markierungen durch Antikörper und anschließender Mikroskopie im Gewebe von Pflanzen lokalisiert.

Die verschiedenen gegen AGP gerichteten monoklonalen Antikörper, wie JIM4, JIM8, JIM13, MAC207 und LM2 dienten der Aufklärung von Lokalisierung und Funktionsweise der AGPs (PENNELL *et al.*, 1989; KNOX *et al.*, 1991; CASERO *et al.*, 1998; SHOWALTER, 2001; COIMBRA *et al.*, 2007; BOUGHANMI *et al.*, 2010).

Auf der Ebene von Pflanzenorganen sind AGPs unter anderem in Blättern, Stängeln, Wurzeln, Blütenteilen und Samen gefunden worden (FINCHER *et al.*, 1983; NOTHNAGEL, 1997). Ebenfalls wurden AGPs in verschiedenen Geweben, wie z.B. Xylem, erfasst. Subzellulär wurden AGPs in Bereichen der Plasmamembran (PENNELL *et al.*, 1989; KOMALAVILAS *et al.*, 1991) und den Zellwänden (BASILE und BASILE, 1987), sowie im extrazellulären Raum (SAMSON *et al.*, 1984) und Sekreten (CLASSEN, 2007) identifiziert. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Mehrheit dieser Antikörper Paratope besitzen, die gegen Kohlenhydratstrukturen der AGPs gerichtet sind. Deshalb können diese Antikörper mit mehreren AGPs unterschiedlicher Glykosylierung oder sogar anderen Molekülen (z.B. Pektinen) reagieren (SHOWALTER, 2001), sobald diese ähnliche oder die gleichen Epitope besitzen.

Auf der Ebene von Geweben bzw. Zellen zeigten die AGPs während verschiedener Entwicklungsstadien teilweise deutliche Unterschiede in den Expressionen spezifischer AGP-Zucker-Epitope und ließen somit auf verschiedene Funktionen im Laufe der Entwicklung schließen.

Auch die Lokalisierung der AGPs mit β GlcY kam bereits zur Anwendung. Mit dieser Methode wurde gezeigt, dass sich die AGPs in der Mittellamelle sekundär verdickter Zellen von neu entwickelten Tracheiden befanden oder in den Zellwänden besonders im

Bereich der Tüpfel von Tracheen und Tracheiden vorkamen (PUTOCZKI *et al.*, 2007; BOSSY *et al.*, 2009; GOELLNER *et al.*, 2013). Als Negativ-Kontrolle zum β GlcY diente dort ebenfalls das α GalY, welches unerwarteterweise eine leichte Färbung hervorrief. Für Beide wurde vorgeschlagen, mit Cellulose zu interagieren (TRIPLETT und TIMPA, 1997), welche in allen pflanzlichen Zellwänden vorkommt und somit eine leichte Färbung unabhängig vom AGP verursacht haben könnte.

Ebenso offenbarte die auf dem β GlcY basierende FITC-Markierung der untersuchten Pflanzen, dass die AGPs bei den untersuchten Arten, bis auf das von *Osmunda*, überwiegend im Xylem lokalisiert sind. Eine Rolle der AGPs bei der Differenzierung sowie beim programmierten Zelltod der leitenden Xylemelemente wurde bereits in anderen Arten nachgewiesen (GAO und SHOWALTER, 2000; MOTOSE *et al.*, 2004). Die *Osmunda*-Mittelrippe stellt durch das Vorkommen des AGP im Phloem bisher eine Ausnahme unter den samenlosen Pflanzen dar. Dieser hier entdeckte besondere Fall wurde allerdings u.a. für Zwiebelwurzeln schon einmal beobachtet (CASERO *et al.*, 1998). Dort wurden nur Zellen im Bereich des Phloems durch den Antikörper gebunden und nicht das sich entwickelnde Xylem. Wohingegen in Karotten- und Rettichwurzeln nur sich entwickelnde Xylemzellen und in Erbsenwurzeln neben den Xylemzellen auch einige der Perizykelzellen vor dem Phloem markiert wurden. Im Vergleich zu in Xylem gefunden AGPs gibt es insgesamt aber nur wenige Berichte über das Auftreten von AGPs in Gewebe des Phloems (GAO und SHOWALTER, 2000; GOELLNER *et al.*, 2013).

Insbesondere wäre künftig bei den untersuchten Pflanzen auch der Vergleich verschiedener Entwicklungsstadien von Interesse, um mögliche Funktionen dieser AGPs auszumachen.

4. Biologische Aktivitäten der AGPs

Schon lange wurde angenommen, dass AGPs, da es sich um komplexe und heterogene Moleküle handelt, viele verschiedene Funktionen innerhalb der Pflanze übernehmen. Einige dieser Funktionen sind inzwischen bekannt, während andere noch nicht ausreichend erforscht wurden und daher weiterhin aufgeklärt werden müssen.

Dadurch, dass AGPs Bestandteil der Zellwände vermutlich aller Samenpflanzen sind und daher mit der Nahrung oder auch mit pflanzlichen Arzneimitteln ständig oral aufgenommen werden, wäre auch eine Untersuchung in Bezug auf die Aufnahme von AGPs in den menschlichen Körper interessant und könnte u.a. mittels FITC-Markierung sichtbar gemacht werden. Erste Versuche zur oralen Aufnahme wurden vor einiger Zeit für die makromolekularen Komponenten eines pflanzlichen Immunmodulators aus einer Extraktmischung von u.a. *Echinacea* mittels „plaque-forming cell assay“ unternommen (BODINET *et al.*, 2004). Die Autoren postulieren, dass diese Moleküle mit hochspezialisierten Zellen des Schleimhaut-assoziierten, lymphatischen Gewebes der Peyerschen Plaques im Dünndarm (M-Zellen) in Kontakt treten. Bei M-Zellen handelt es sich um Zellen, die auf die Absorption von antigenen und immunogenen Substanzen ausgerichtet sind und somit eventuell auch für immunmodulierende Wirkungen von AGPs verantwortlich sein können.

Verschiedene Berichte zeigten außerdem, dass pflanzliche Polysaccharide für einen mit Wundheilung verbundenen Einfluss verantwortlich sein könnten (SCHEPETKIN und QUINN, 2006). Für diesen Effekt sind unter anderem Wirkungen auf das Immunsystem von Bedeutung, sodass diese, sobald das Komplement-System involviert war, als Immunmodulatoren bezeichnet wurden. Eine Immunmodulation die mit der Aktivierung des Komplementsystems assoziiert ist, kann unter anderem mit einer Antikörperreaktion, der Induktion von Suppressor- oder Helfer-T-Zellen und der Modulation der T- und B-Zellproliferation zusammenhängen (YAMADA und KIYOHARA, 1999).

Weitere immunstimulierende Wirkungen wurden bereits *in vitro* für verschiedene AGPs bewiesen (ALBAN *et al.*, 2002; CLASSEN *et al.*, 2004; ELLIS *et al.*, 2010; CAPEK *et al.*, 2014).

Für manche AGPs wurden dabei *in vitro* Wechselwirkungen mit dem Komplementsystem nachgewiesen (DIALLO *et al.*, 2001; ALBAN *et al.*, 2002), bei denen gezeigt werden

konnte, dass die Entfernung von Arabinose-Seitenketten des AGPs aus gepresstem Saft von *E. purpurea* zu einem Verlust der *in vitro* komplementstimulierenden Aktivität führt (ALBAN *et al.*, 2002). Außerdem zeigten weitere Analysen zur Immunstimulierung, dass sich das AGP aus *E. pallida* durch eine starke Stimulierung der Proliferation von Maus-Lymphozyten und das aus *Baptisia tinctoria* durch eine hohe Aktivität in Bezug auf die IgM-, Nitrit- und IL6-Produktion im Vergleich zum AGP aus *E. purpurea*-Zellkultur auszeichneten. Diese Entdeckungen ließen vermuten, dass AGPs in Abhängigkeit von charakteristischen Strukturmerkmalen, wie Arabinosen z.B. 1,5-verknüpfter Araf, in immunmodulatorische Effekte involviert sind (CLASSEN *et al.*, 2006).

Zudem basierten für mehrere AGs immunmodulatorische Eigenschaften auf einer Reaktion mit menschlichen und murinen Makrophagen und führten zu einer stärkeren Freisetzung von sowohl entzündlichen (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12 und TNF- α) als auch anti-entzündlichen (IL-10) Zytokinen (SCHEPETKIN und QUINN, 2006). Auch in Untersuchungen zum AGP aus Kaffee wurden verbesserte Proliferationen von Splenozyten und peritonealen Makrophagen bzw. eine aktivierte Produktion von T_H1-Typ-Zytokinen, IL-2, IL-12, TNF- α und IFN- γ beobachtet (GOTODA *et al.*, 2006; NOSÁL'OVÁ *et al.*, 2011; CAPEK *et al.*, 2014). Dort wurde postuliert, dass die Immunantwort der Zellen des Immunsystems von der 1,3-verknüpften Galp abhängen könnte. Für aus Gräsern (v.a. *Alopecurus pratensis*) gewonnene Arabinogalaktane konnte gezeigt werden, dass es in einem Mausmodell für Asthma als antiallergische Substanz vor Sensibilisierung, allergischer Lungenentzündung und Atemwegs-Hyperreaktivität schützte. Die AGs aus Lärche und *Gummi arabicum* besaßen die Allergie-protective Wirkung nicht (PETERS *et al.*, 2010).

Zusätzlich wurde beispielsweise für das aus *E. purpurea* gewonnene AGP eine Bindungsstypanalyse mittels FACS durchgeführt und dadurch eine Bindung dieses AGP an humane Leukozyten nachgewiesen (THUDE *et al.*, 2006).

Aus diesem Grund wurden erste Versuche unternommen, die Bindung von *Echinacea*-AGP und der hier untersuchten AGPs an dendritischen Zellen zu untersuchen. Da es sich um antigenpräsentierende Zellen handelt, die eine primäre Immunantwort auslösen können, könnten die hier mittels FACS-Analyse gezeigten Bindungen von *Echinacea*-, *Osmunda*- und *Pteridium*-AGP an murine dendritische Zellen somit ebenfalls Indizien für den Einfluss der AGPs auf das Immunsystem sein. Diese Ergebnisse können später auch dazu beitragen Rückschlüsse zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen und im Besonderen zum Wirkmechanismus zu ziehen. Zur Untersuchung wurden das *Osmunda*- und *Pteridium*-

AGP ausgewählt, da sie im zuvor durchgeführten ELISA (siehe auch V.11.1) die besten Reaktivitäten mit dem verwendeten primären AK aufwiesen.

Verglichen mit dem aus oberirdischen Teilen gewonnenen *Echinacea*-AGP besaßen die beiden Farn-AGPs weniger 1,6-Galp, 1,5-Araf und terminale Araf, dafür mehr 1,3-Galp und andere terminale pyranosidische Zucker. Da das *Echinacea*-AGP stärker an die dendritischen Zellen band, könnte daraus geschlossen werden, dass Arabinosen wesentlich zur Bindung beitragen. Die Resultate wären damit in guter Übereinstimmung mit denen in der Vergangenheit für AGPs aus *Echinacea* und *Baptisia* beschriebenen Beobachtungen (CLASSEN *et al.*, 2006). Eine Untersuchung der Beeinflussung des Komplementsystems durch die hier untersuchten AGPs und deren strukturell modifizierten Formen würde weitere Aufschlüsse über das immunmodulierende Potential der AGPs und die dafür erforderlichen strukturellen Voraussetzungen liefern.

An welche Rezeptoren die AGPs binden und inwiefern die Zellen des Immunsystems durch solche Bindungen beeinflusst werden, ist eine interessante Fragestellung für die Zukunft. Als humane Rezeptoren, die Galaktose binden und in der Darmschleimhaut vorkommen, sind insbesondere Galektine potentielle Bindungspartner für AGPs.

VII. Zusammenfassung/Abstract

Diese Arbeit bietet die erste detaillierte Charakterisierung von Yariv-präzipitierten AGPs aus einem Lycophyten (*Lycopodium annotinum*), einem eusporangiaten (*Equisetum arvense*) und verschiedenen leptosporangiaten (*Dryopteris filix-mas*, *Osmunda regalis* und *Pteridium aquilinum*) Farnen. Evolutionär sind diese Pflanzengruppen die engsten lebenden Verwandten der Samenpflanzen. Somit werden im Rahmen dieser Arbeit erste Ergebnisse aufgezeigt, die zum besseren Verständnis der Evolution von AGPs in Pflanzenzellwänden beitragen. Die Proteinmenge der Farn-AGPs (6 – 12 %) war in einem mit Angiospermen-AGPs vergleichbaren Bereich. Für das AGP des *Lycopodiums* jedoch war der Proteinanteil deutlich höher (17 %). Auch von der quantitativen Zusammensetzung her waren die Aminosäuren denen der Angiospermen-AGPs ähnlich (vor allem Glx, Asx, Thr, Ser, Leu, Hyp und Ala). Die Hyp-Mengen (4 – 6 %) der AGPs von *Lycopodium* und den leptosporangiaten Farnen waren allerdings eher im unteren Bereich verglichen mit vielen AGPs der Angiospermen, nur die Hyp-Menge des *Equisetum*-AGP war höher (16 %). Das *Lycopodium*-AGP zeichnete sich durch eine ungewöhnlich hohe Konzentration an Lys aus. Die Kohlenhydratketten der untersuchten AGPs zeigten typische Merkmale, die für Typ-II-Arabinogalaktane aus Samenpflanzen bekannt sind. Dazu gehört eine Galaktan-Hauptkette mit relativ großen Mengen an 1,3,6- und 1,3- verknüpfter Galp sowie hohe Konzentrationen an Araf in den Seitenketten. Der Gehalt an 1,6-Galp war allerdings niedriger und die Anteile an 1,2-, 1,3- und 1,5-Araf teilweise deutlich höher als bei AGPs aus Samenpflanzen. Der ungewöhnliche Verzweigungspunkt 1,2,3-Galp, der bisher nur in Moos-AGPs gefunden wurde, war in den hier analysierten AGPs nicht vorhanden und ist somit vermutlich evolutionär auf die Moose beschränkt. In Bezug auf die terminalen Monosaccharide zeichneten sich die Farn-AGPs wie die Moos-AGPs durch höhere Mengen an Rhap aus, wobei ein Teil davon als 3-O-Me-Rhap identifiziert wurde. Dieses selten vorkommende Monosaccharid ist in Angiospermen nicht vorhanden und wurde auch im AGP von *Lycopodium* nicht nachgewiesen. Das *Lycopodium*-AGP wies stattdessen einen hohen Gehalt an terminaler Arap auf. Damit wird der evolutionäre Unterschied von Lycophyten zu Bryophyten und zu Monilophyten auch im Bereich der AGP-Struktur deutlich. Terminale Arap ist in allen bisher bekannten AGPs präsent, tendenziell jedoch in höherer Konzentration in den AGPs der Samenpflanzen. Im Übrigen stimmten die absoluten Molekulargewichte der untersuchten AGPs (90 – 180 kDa) mit denen der Angiospermen-AGPs überein.

Weiterhin ergab die durchgeführte Immundetektion der AGPs in den nicht blühenden Pflanzen eine überwiegende Lokalisierung im xylematischen Leitbündelbereich, wie sie auch bereits für AGPs verschiedener samentragender Pflanzen beschrieben wurde.

ELISA-Analysen mit mono- und polyklonalen Antikörpern gegen *Echinacea*-AGP zeigten eine gute Kreuzreaktivität der polyklonalen AKs mit den Farn-AGPs, vermutlich aufgrund von zum Teil übereinstimmenden Kohlenhydratstrukturen im Bereich terminaler Arap. Das AGP aus *Lycopodium* mit seinem hohen Gehalt an terminaler Arap reagierte schwächer mit den polyklonalen AKs. Im Gegensatz dazu wies dieses AGP eine Bindung an den monoklonalen AK auf.

In dieser Arbeit wurden mittels FACS-Analyse Bindungen von AGPs aus sowohl *Echinacea purpurea* als auch zwei Farnen (*Osmunda* und *Pteridium*) an murine dendritische Zellen nachgewiesen. Auf diesem Wege könnten immunmodulierende Aktivitäten durch AGPs ausgelöst werden.

This work provides the first detailed characterization of Yariv-precipitated AGPs from a lycophyte (*Lycopodium annotinum*), an eusporangiate (*Equisetum arvense*), and different leptosporangiate (*Dryopteris filix-mas*, *Osmunda regalis* and *Pteridium aquilinum*) ferns. Evolutionarily, these plant groups are the closest living relatives to seed plants. In this work, first results are shown which contribute to a better understanding of the evolution of AGPs in plant cell walls. The protein amount of fern AGPs (6 – 12 %) was comparable to angiosperm AGPs. However, for the AGP of *Lycopodium* the protein content was clearly higher (17 %). Also, the quantitative compositions of the amino acids were similar to those of angiosperm AGPs (mainly Glx, Asx, Thr, Ser, Leu, Hyp and Ala). Hyp amounts (4 – 6 %) of AGPs from *Lycopodium* and leptosporangiate ferns were quite low compared to many AGPs of angiosperms, only the Hyp content of *Equisetum* AGP was higher (16 %). A special feature of *Lycopodium* AGP was an unusual high concentration of Lys. The carbohydrate chains of the tested AGPs showed typical characteristics known for type II arabinogalactans from seed plants. This includes a galactan main chain with relatively high amounts of 1,3,6- and 1,3-linked Galp as well as high amounts of Araf in the side chains. However, the content of 1,6-Galp was lower and the amounts of 1,2-, 1,3- and 1,5-Araf were partially higher compared to AGPs from seed plants. The unusual branching point 1,2,3-Galp, which so far has only been detected in moss AGPs, was not present in the AGPs analyzed here and is probably a special evolutionary feature of moss AGPs. With regard to terminal monosaccharides, the fern AGPs, such as the moss AGPs, were characterized by higher amounts of Rhap, which was partly identified as 3-O-Me-Rhap. This rare monosaccharide is not present in angiosperms and has not been detected in the AGP of *Lycopodium*. Another special feature of *Lycopodium* AGP was a high content of terminal Arap. This supports the evolutionary difference between lycophytes and bryophytes as well as monilophytes also with regard to AGP structure. So far, terminal Araf is present in all studied AGPs, but in a higher concentration in AGPs of seed plants. Furthermore, the absolute molecular weights (90 – 180 kDa) of investigated AGPs were consistent with that found in angiosperm AGPs.

In addition, immunostaining of investigated non-flowering plant AGPs resulted in a predominant localization in the xylematic vascular bundle region, as already described for AGPs of different seed-bearing plants.

ELISA analyses with mono- and polyclonal antibodies against *Echinacea* AGP showed a good cross-reactivity of the polyclonal antibodies with the fern AGPs, presumably due to partly identical carbohydrate structures in the terminal Arap region. *Lycopodium* AGP

with its high amount of terminal Arap showed a weaker reaction. In contrast, this AGP exhibited a binding to the monoclonal antibody.

In this work, FACS analysis revealed binding of AGPs from *Echinacea purpurea* and two ferns (*Osmunda* and *Pteridium*) to murine dendritic cells. In this way, immunomodulating activities could be triggered by AGPs.

VIII. Literaturverzeichnis

Acosta-García G und Vielle-Calzada J-P (2004) A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16(10): 2614–2628

Agrawal PK (1992) NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31(10): 3307–3330

Akiyama T, Tanaka K und Iseki S (1988) Blood-group active proteoglycan containing 3-*O*-methylrhamnose (acofriose) from young plants of *Osmunda japonica*. *Carbohydrate Research* 178: 320–326

Akiyama T, Tanaka K und Yamamoto S (1987) An arabinogalactan-rich protein containing 3-*O*-methylrhamnose (acofriose) in young plants of *Osmunda japonica*. *Agricultural and Biological Chemistry* 51(9): 2599–2600

Alban S, Classen B, Brunner G und Blaschek W (2002) Differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin. *Planta Medica* 68(12): 1118–1124

Ali MS, Mostafa K, Raihan MO, Rahman MK, Hossain MA und Alam MS (2012) Antioxidant and cytotoxic activities of methanolic extract of *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott leaves. *International Journal of Drug Development & Research* 4(2): 223–229

Altaner CM, Tokareva EN, Jarvis MC und Harris PJ (2010) Distribution of (1-4)- β -galactans, arabinogalactan proteins, xylans and (1-3)- β -glucans in tracheid cell walls of softwoods. *Tree Physiology* 30(6): 782–793

Andersen TC, Jürgensen GW und Christensen E (1998) *Lycopodium* spores in transrectal ultrasound-guided core biopsies of the prostate. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 32(2): 148–149

Aspinall GO (1973) Carbohydrate polymers of plant cell walls. In: Leowus F (Hrsg.), Biogenesis of plant cell wall polysaccharides. *Academic Press*, 95–115

Bacic A, Churms SC, Stephen AM, Cohen PB und Fincher GB (1987) Fine structure of the arabinogalactan-protein from *Lolium multiflorum*. *Carbohydrate Research* 162: 85–93

- Baldwin TC, McCann MC und Roberts K** (1993) A novel hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein secreted by suspension-cultured cells of *Daucus carota*: Purification and partial characterization. *Plant Physiology* 103: 115–123
- Banks JA, Nishiyama T, Hasebe M, Bowman JL, Gribskov M, de Pamphilis C, Albert VA, Aono N, Aoyama T, Ambrose BA, Ashton NW und Axtell MJ, et al.** (2011) The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332(6032): 960–963
- Bartels D, Baumann A, Maeder M, Geske T, Heise EM, von Schwartzenberg K und Classen B** (2017) Evolution of plant cell wall: Arabinogalactan-proteins from three moss genera show structural differences compared to seed plants. *Carbohydrate Polymers* 163: 227–235
- Bartels D und Classen B** (2017) Structural investigations on arabinogalactan-proteins from a lycophyte and different monilophytes (ferns) in the evolutionary context. *Carbohydrate Polymers* 172: 342–351
- Basile DV und Basile MR** (1987) The occurrence of cell wall-associated Arabinogalactan proteins in the hepaticae. *The Bryologist* 90(4): 401
- Berry EA, Tran ML, Dimos CS, Budziszek Jr. MJ, Scavuzzo-Duggan TR und Roberts AW** (2016) Immuno and affinity cytochemical analysis of cell wall composition in the moss *Physcomitrella patens*. *Frontiers in Plant Science* 7: 248
- Bézanger-Beauquesne L und Pinkas M** (1964) Plantes médicinales de la région du Nord (Nord, Pas-de-Calais, Somme). *Bulletin de la Société Botanique de France* 111(sup3): 380–404
- Biermann CJ und McGinnis GD** (1988) Analysis of carbohydrates by GLC and MS. *CRC press*
- Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ und Stone BA** (1983) A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* 113: 291–299
- Bleton J, Mejanelle P, Sansoulet S, Goursaud S und Tchaplal A** (1996) Characterization of neutral sugars and uronic acids after methanolysis and trimethylsilylation for recognition of plant gums. *Journal of Chromatography A* 720: 27–49

- Blumenkrantz N und Asboe-Hansen G** (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54(2): 484–489
- Bodinet C, Lindequist U, Teuscher E und Freudenstein J** (2004) Influence of peroral application of a herbal immunomodulator on the antibody production of Peyer's patches cells. *Arzneimittel-Forschung* 54(2): 114–118
- Bossy A, Blaschek W und Classen B** (2009) Characterization and immunolocalization of arabinogalactan-proteins in roots of *Echinacea purpurea*. *Planta Medica* 75(14): 1526–1533
- Boughanmi N, Thibault F, Decou R, Fleurat-Lessard P, Bere E, Costa G und Lhernould S** (2010) NaCl effect on the distribution of wall ingrowth polymers and arabinogalactan proteins in type A transfer cells of *Medicago sativa* Gabès leaves. *Protoplasma* 242(1-4): 69–80
- Boulet JC, Williams P und Doco T** (2007) A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 69(1): 79–85
- Bremner I und Wilkie KCB** (1971) The hemicelluloses of bracken: Part II. A galactoglucomannan. *Carbohydrate Research* 20: 193–203
- Capek P, Matulova M, Navarini L und Liverani FS** (2009) A comparative study of arabinogalactan-protein isolates from instant coffee powder of *Coffea arabica* beans. *Journal of Food and Nutrition Research* 48(2): 80–86
- Capek P, Paulovicova E, Matulova M, Mislovicova D, Navarini L und Suggi-Liverani F** (2014) *Coffea arabica* instant coffee - chemical view and immunomodulating properties. *Carbohydrate Polymers* 103: 418–426
- Carneiro DM, Freire RC, de Deus Honório TC, Zoghaib I, de S. e Silva Cardoso FF, Tresvenzol LMF, de Paula JR, Sousa ALL, Jardim PCBV und da Cunha LC** (2014) Randomized, double-blind clinical trial to assess the acute diuretic effect of *Equisetum arvense* (field horsetail) in healthy volunteers. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014: 760683
- Casero PJ, Casimiro I und Knox JP** (1998) Occurrence of cell surface arabinogalactan-protein and extensin epitopes in relation to pericycle and vascular tissue development in the root apex of four species. *Planta* 204(2): 252–259

- Cheng J-S, Lei C, Wu J-C und Yuan Y-J** (2008) Expression of arabinogalactan proteins involved in Taxol production by immobilized *Taxus cuspidata* cells. *Journal of Biotechnology* 133(1): 96–102
- Churms SC und Stephen AM** (1984) Structural studies of an arabinogalactan-protein from the gum exudate of *Acacia robusta*. *Carbohydrate Research* 133: 105–123
- Clarke AE, Anderson RL und Stone BA** (1979) Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry* 18: 521–540
- Clarke AE, Gleeson PA, Jermyn MA und Knox RB** (1978) Characterization and localization of β -Lectins in lower and higher plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 5(5): 707
- Classen B** (2007) Characterization of an arabinogalactan-protein from suspension culture of *Echinacea purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88(3): 267–275
- Classen B, Csavas M, Borbas A, Dingermann T und Zündorf I** (2004) Monoclonal antibodies against an arabinogalactan-protein from pressed juice of *Echinacea purpurea*. *Planta Medica* 70(9): 861–865
- Classen B, Mau S-L und Bacic A** (2005) The arabinogalactan-proteins from pressed juice of *Echinacea purpurea* belong to the hybrid class of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Planta Medica* 71(1): 59–66
- Classen B, Thude S, Blaschek W, Wack M und Bodinet C** (2006) Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from *Baptisia* and *Echinacea*. *Phytomedicine* 13(9-10): 688–694
- Coimbra S, Almeida J, Junqueira V, Costa ML und Pereira LG** (2007) Arabinogalactan proteins as molecular markers in *Arabidopsis thaliana* sexual reproduction. *Journal of Experimental Botany* 58(15-16): 4027–4035
- Cooper-Driver G, Finch S, Swain T und Bernays E** (1977) Seasonal variation in secondary plant compounds in relation to the palatability of *Pteridium aquilinum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 5(3): 177–183
- Currie HA und Perry CC** (2009) Chemical evidence for intrinsic 'Si' within *Equisetum* cell walls. *Phytochemistry* 70(17-18): 2089–2095

- Diallo D, Paulsen BS, Liljebäck THA und Michaelsen TE** (2001) Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. *Journal of Ethnopharmacology* 74(2): 159–171
- Do Monte FHM, dos Santos JG, Russi M, Bispo Lanzotti VMN, Leal LKAM und de Andrade Cunha GM** (2004) Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. *Pharmacological Research* 49(3): 239–243
- Domozych DS, Sorensen I und Willats WGT** (2009) The distribution of cell wall polymers during antheridium development and spermatogenesis in the Charophycean green alga, *Chara corallina*. *Annals of Botany* 104(6): 1045–1056
- Dos Santos JG, Blanco MM, Do Monte FHM, Russi M, Lanzotti VMNB, Leal LKAM und Cunha GM** (2005) Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of *Equisetum arvense*. *Fitoterapia* 76(6): 508–513
- Du H, Clarke AE und Bacic A** (1996) Arabinogalactan-proteins: a class of extracellular matrix proteoglycans involved in plant growth and development. *Cell Biology* 6: 411–414
- Duchow S** (2012) *Pelargonium sidoides* DC: Vermehrung mittels somatischer Embryogenese sowie Charakterisierung von biologisch aktiven Arabinogalaktan-Proteinen. Dissertation, Pharmazeutisches Institut, Christian-Albrechts-Universität, Kiel
- Duchow S, Dahlke RI, Geske T, Blaschek W und Classen B** (2016) Arabinogalactan-proteins stimulate somatic embryogenesis and plant propagation of *Pelargonium sidoides*. *Carbohydrate Polymers* 152: 149–155
- Eder M und Lutz-Meindl U** (2008) Pectin-like carbohydrates in the green alga *Micrasterias* characterized by cytochemical analysis and energy filtering TEM. *Journal of Microscopy* 231(2): 201–214
- Eeckhout S, Leroux O, Willats WGT, Popper ZA und Viane RLL** (2014) Comparative glycan profiling of *Ceratopteris richardii* 'C-Fern' gametophytes and sporophytes links cell-wall composition to functional specialization. *Annals of Botany* 114(6): 1295–1307
- Ellis M, Egelund J, Schultz CJ und Bacic A** (2010) Arabinogalactan-proteins: Key regulators at the cell surface? *Plant Physiology* 153(2): 403–419

- Fincher GB, Stone BA und Clarke AE** (1983) Arabinogalactan-proteins: Structure, biosynthesis, and function. *Annual Review of Plant Physiology* 34: 47–70
- Fry SC, Nesselrode BHWA, Miller JG und Mewburn BR** (2008) Mixed-linkage (1-3,1-4)- β -D-glucan is a major hemicellulose of *Equisetum* (horsetail) cell walls. *New Phytologist* 179(1): 104–115
- Fu H, Yadav MP und Nothnagel EA** (2007) *Physcomitrella patens* arabinogalactan proteins contain abundant terminal 3-O-methyl-L-rhamnosyl residues not found in angiosperms. *Planta* 226(6): 1511–1524
- Furneaux RH und Stevenson TT** (1990) The xylogalactan sulfate from *Chondria macrocarpa* (Ceramiales, Rhodophyta). In: Lindstrom SC, Gabrielson PW (Hrsg.), Thirteenth International Seaweed Symposium. *Springer Netherlands*, 615–620
- Gane AM, Craik D, Munro SLA, Howlett GJ, Clarke AE und Bacic A** (1995) Structural analysis of the carbohydrate moiety of arabinogalactan-proteins from stigmas and styles of *Nicotiana glauca*. *Carbohydrate Research* 277: 67–85
- Gao M und Showalter AM** (1999) Yariv reagent treatment induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *The Plant Journal* 19(3): 321–331
- Gao M und Showalter AM** (2000) Immunolocalization of LeAGP-1, a modular arabinogalactan-protein, reveals its developmentally regulated expression in tomato. *Planta* 210(6): 865–874
- Gartmann F** (2015) Farne und Farnverwandte als Heil-, Nutz- und Zauberpflanzen: Ethnobotanische Bedeutung von Gefäßkryptogamen. *Schweizerische Zeitschrift für Ganzheitsmedizin / Swiss Journal of Integrative Medicine* 27(2): 100–112
- Gaspar Y, Johnson KL, McKenna JA, Bacic A und Schultz CJ** (2001) The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. In: Carpita NC, Campbell M, Tierney M (Hrsg.), Plant Cell Walls. *Kluwer Academic Publishers*, 161–176
- Gaspar YM, Nam J, Schultz CJ, Lee L-Y, Gilson PR, Gelvin SB und Bacic A** (2004) Characterization of the Arabidopsis lysine-rich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (rat1) that results in a decreased efficiency of agrobacterium transformation. *Plant Physiology* 135(4): 2162–2171

- Gil da Costa RM, Bastos MMSM, Oliveira PA und Lopes C** (2012) Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. *Journal of Hazardous Materials* 203-204: 1–12
- Gleeson PA und Clarke AE** (1979) Structural studies on the major component of *Gladiolus* style mucilage, an arabinogalactan-protein. *Biochemical Journal* 181(3): 607–621
- Goellner EM, Gramann JC und Classen B** (2013) Antibodies against Yariv's reagent for immunolocalization of arabinogalactan-proteins in aerial parts of *Echinacea purpurea*. *Planta Medica* 79(2): 175–180
- Goellner EM, Utermoehlen J, Kramer R und Classen B** (2011) Structure of arabinogalactan from *Larix laricina* and its reactivity with antibodies directed against type-II-arabinogalactans. *Carbohydrate Polymers* 86(4): 1739–1744
- Göllner EM, Blaschek W und Classen B** (2010) Structural investigations on arabinogalactan-protein from wheat, isolated with Yariv reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(6): 3621–3626
- Göllner EM, Ichinose H, Kaneko S, Blaschek W und Classen B** (2011) An arabinogalactan-protein from whole grain of *Avena sativa* L. belongs to the wattle-blossom type of arabinogalactan-proteins. *Journal of Cereal Science* 53(2): 244–249
- Gotoda N, Iwai K, Furuya K, Ueda T, Fukunaga T, Kimura R und Takagi M** (2006) Arabinogalactan isolated from coffee beans indicates immunomodulating properties. *Proceedings of 21st International Colloquium on the Chemistry of Coffee (Montpellier)*: 116–120
- Haavik S, Paulsen BS, Wold JK und Grimmer O** (1982) Arabinogalactans in a purified allergen preparation from pollen of Timothy (*Phleum pratense*). *Phytochemistry* 21(8): 1913–1919
- Halldorsdottir ES, Jaroszewski JW und Olafsdottir ES** (2010) Acetylcholinesterase inhibitory activity of lycopodane-type alkaloids from the Icelandic *Lycopodium annotinum* ssp. *alpestre*. *Phytochemistry* 71(2-3): 149–157
- Hanif A, Hossan, Shahadat, Mia, Manzural Kadir, Islam MJ, Jahan P und Rahmatullah M** (2009) Ethnobotanical survey of the Rakhain tribe inhabiting the

Chittagong Hill Tracts region of Bangladesh. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 3(2): 172–180

Hao Z, Liu M, Liu Z und Lu D (2009) Huperzine A for vascular dementia. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*(2): CD007365

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

Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM und Lines TC (2007) A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology* 45(11): 2179–2205

Herman EM und Lamb CJ (1992) Arabinogalactan-rich glycoproteins are localized on the cell surface and in intravacuolar multivesicular bodies. *Plant Physiology* 98: 264–272

Hervé C, Siméon A, Jam M, Cassin A, Johnson KL, Salmeán AA, Willats WGT, Doblin MS, Bacic A und Kloareg B (2016) Arabinogalactan proteins have deep roots in eukaryotes: identification of genes and epitopes in brown algae and their role in *Fucus serratus* embryo development. *New Phytologist* 209(4): 1428–1441

Hillestad A, Wold JK und Paulsen BS (1977) Structural studies of water-soluble glycoproteins from *Cannabis sativa* L. *Carbohydrate Research* 57: 135–144

Hirasawa Y, Morita H, Shiro M und Kobayashi J'i (2003) Sieboldine A, a novel tetracyclic alkaloid from *Lycopodium sieboldii*, inhibiting acetylcholinesterase. *Organic Letters* 5(21): 3991–3993

Jetter R und Riederer M (1999) Long-chain alkanediols, ketoaldehydes, ketoalcohols and ketoalkyl esters in the cuticular waxes of *Osmunda regalis* fronds. *Phytochemistry* 52(5): 907–915

Kacuráková M, Capek P, Sasinková V, Wellner N und Ebringerová A (2000) FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers* 43: 195–203

Kelly J, Jarrell H, Millar L, Tessier L, Fiori LM, Lau PC, Allan B und Szymanski CM (2006) Biosynthesis of the N-linked glycan in *Campylobacter jejuni* and addition onto protein through block transfer. *Journal of Bacteriology* 188(7): 2427–2434

- Kido N, Yokoyama R, Yamamoto T, Furukawa J, Iwai H, Satoh S und Nishitani K** (2015) The matrix polysaccharide (1;3,1;4)- β -D-glucan is involved in silicon-dependent strengthening of rice cell wall. *Plant & Cell Physiology* 56(2): 268–276
- Kieliszewski MJ** (2001) The latest hype on Hyp-*O*-glycosylation codes. *Phytochemistry* 57(3): 319–323
- Kieliszewski MJ und Lamport DTA** (1994) Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *The Plant Journal* 5(2): 157–172
- Kieliszewski MJ, O'Neill M, Leykam J und Orlando R** (1995) Tandem mass spectrometry and structural elucidation of glycoprotein indicate that contiguous hydroxyproline residues are the major sites of hydroxyproline *O*-arabinylation. *The Journal of Biological Chemistry* 270(6): 2541–2549
- Kitazawa K, Tryfona T, Yoshimi Y, Hayashi Y, Kawauchi S, Antonov L, Tanaka H, Takahashi T, Kaneko S, Dupree P, Tsumuraya Y und Kotake T** (2013) β -galactosyl Yariv reagent binds to the β -1,3-galactan of arabinogalactan proteins. *Plant Physiology* 161(3): 1117–1126
- Kjeldahl J** (1883) Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift für Analytische Chemie* 22(1): 366–382
- Knox JP** (1995) The extracellular matrix in higher plants 4: Developmentally regulated proteoglycans and glycoproteins of the plant cell surface. *FASEB Journal* 9(11): 1004–1012
- Knox JP, Linstead PJ, Peart J, Cooper C und Roberts K** (1991) Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *The Plant Journal* 1(3): 317–326
- Komalavilas P, Zhu J-K und Nothnagel EA** (1991) Arabinogalactan-proteins from the suspension culture medium and plasma membrane of Rose cells. *The Journal of Biological Chemistry* 266(24): 15956–15965
- Konishi T, Kotake T, Soraya D, Matsuoka K, Koyama T, Kaneko S, Igarashi K, Samejima M und Tsumuraya Y** (2008) Properties of family 79 β -glucuronidases that hydrolyze β -glucuronosyl and 4-*O*-methyl- β -glucuronosyl residues of arabinogalactan-protein. *Carbohydrate Research* 343(7): 1191–1201

- Kremer C, Pettolino F, Bacic A und Drinnan A** (2004) Distribution of cell wall components in *Sphagnum* hyaline cells and in liverwort and hornwort elaters. *Planta* 219(6): 1023–1035
- Kreuger M und van Holst G-J** (1995) Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 197(1): 135–141
- Kreuger M und van Holst G-J** (1996) Arabinogalactan proteins and plant differentiation. *Plant Molecular Biology* 30(6): 1077–1086
- Lamport DTA und Várnai P** (2013) Periplasmic arabinogalactan glycoproteins act as a calcium capacitor that regulates plant growth and development. *The New Phytologist* 197(1): 58–64
- Landi M und Angiolini C** (2010) Ecological responses of *Osmunda regalis* to forest canopy cover and grazing. *American Fern Journal* 100(3): 137–147
- Le Bourvellec C und Renard CMGC** (2012) Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52(3): 213–248
- Lee CB, Swatek KN und McClure B** (2008) Pollen proteins bind to the C-terminal domain of *Nicotiana alata* pistil arabinogalactan proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 283(40): 26965–26973
- Lee J-B, Hayashi T, Hayashi K und Sankawa U** (2000) Structural analysis of calcium spirulan (Ca-SP)-derived oligosaccharides using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Natural Products* 63(1): 136–138
- Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fischette-Lainé A-C, Gomord V und Faye L** (1998) N-Glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Molecular Biology* 38: 31–48
- Leroux O, Eeckhout S, Viane RLL und Popper ZA** (2013) *Ceratopteris richardii* (C-fern): a model for investigating adaptive modification of vascular plant cell walls. *Frontiers in Plant Science* 4: 367
- Leroux O, Knox JP, Masschaele B, Bagniewska-Zadworna A, Marcus SE, Claeys M, van Hoorebeke L und Viane RLL** (2011) An extensin-rich matrix lines the carinal canals in *Equisetum ramosissimum*, which may function as water-conducting channels. *Annals of Botany* 108(2): 307–319

- Leroux O, Sørensen I, Marcus SE, Viane RL, Willats WG und Knox JP** (2015) Antibody-based screening of cell wall matrix glycans in ferns reveals taxon, tissue and cell-type specific distribution patterns. *BMC Plant Biology* 15: 56
- Ligrone R, Vaughn KC, Renzaglia KS, Knox JP und Duckett JG** (2002) Diversity in the distribution of polysaccharide and glycoprotein epitopes in the cell walls of bryophytes: new evidence for the multiple evolution of water conducting cells. *New Phytologist* 156: 491–508
- Little JT, Walsh S und Aisen PS** (2008) An update on huperzine A as a treatment for Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 17(2): 209–215
- Lopez RA und Renzaglia KS** (2014) Multiflagellated sperm cells of *Ceratopteris richardii* are bathed in arabinogalactan proteins throughout development. *American Journal of Botany* 101(12): 2052–2061
- Ma X und Gang DR** (2004) The *Lycopodium* alkaloids. *Natural Product Reports* 21(6): 752–772
- Ma Y, Yan C, Li H, Wu W, Liu Y, Wang Y, Chen Q und Ma H** (2017) Bioinformatics prediction and evolution analysis of arabinogalactan proteins in the plant kingdom. *Frontiers in Plant Science* 8(66): 1–17
- Majewska-Sawka A und Nothnagel EA** (2000) The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiology* 122(1): 3–10
- Matsunaga T, Ishii T, Matsumoto S, Higuchi M, Darvill A, Albersheim P und O'Neill MA** (2004) Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants. *Plant Physiology* 134(1): 339–351
- Mehlhorn H, Al-Quraishy S, Al-Rasheid KAS, Jatzlau A und Abdel-Ghaffar F** (2011) Addition of a combination of onion (*Allium cepa*) and coconut (*Cocos nucifera*) to food of sheep stops gastrointestinal helminthic infections. *Parasitology Research* 108(4): 1041–1046
- Molina M, Reyes-García V und Pardo-de-Santayana M** (2009) Local knowledge and management of the Royal fern (*Osmunda regalis* L.) in Northern Spain: Implications for biodiversity conservation. *American Fern Journal* 99(1): 45–55

- Moore JP, Nguema-Ona EE, Vicré-Gibouin M, Sørensen I, Willats WGT, Driouich A und Farrant JM** (2013) Arabinose-rich polymers as an evolutionary strategy to plasticize resurrection plant cell walls against desiccation. *Planta* 237(3): 739–754
- Mort AJ und Lamport DTA** (1977) Anhydrous hydrogen fluoride deglycosylates glycoproteins. *Analytical Biochemistry* 82: 289–309
- Motose H, Sugiyama M und Fukuda H** (2001) An arabinogalactan protein(s) is a key component of a fraction that mediates local intercellular communication involved in tracheary element differentiation of *Zinnia* mesophyll cells. *Plant and Cell Physiology* 42(2): 129–137
- Motose H, Sugiyama M und Fukuda H** (2004) A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. *Nature* 429(6994): 873–878
- Nagai T, Myoda T und Nagashima T** (2005) Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. *Food Chemistry* 91(3): 389–394
- Nguema-Ona E, Coimbra S, Vicre-Gibouin M, Mollet J-C und Driouich A** (2012) Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Annals of Botany* 110(2): 383–404
- Nosál'ová G, Prisenznáková L, Paulovicová E, Capek P, Matulová M, Navarini L und Liverani FS** (2011) Antitussive and immunomodulating activities of instant coffee arabinogalactan-protein. *International Journal of Biological Macromolecules* 49(4): 493–497
- Nothnagel EA** (1997) Proteoglycans and related components in plant cells. *International Review of Cytology* 174: 195–287
- Ogawa K, Yamaura M und Maruyama I** (1997) Isolation and identification of 2-*O*-methyl-L-rhamnose and 3-*O*-methyl-L-rhamnose as constituents of an acidic polysaccharide of *Chlorella vulgaris*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61(3): 539–540
- Oh H, Kim D-H, Cho J-H und Kim Y-C** (2004) Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *Journal of Ethnopharmacology* 95(2-3): 421–424

Oka T, Saito F, Shimma Y-i, Yoko-o T, Nomura Y, Matsuoka K und Jigami Y (2010) Characterization of endoplasmic reticulum-localized UDP-D-galactose: Hydroxyproline *O*-galactosyltransferase using synthetic peptide substrates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 152(1): 332–340

Øllgaard B und Tind K (1993) Scandinavian ferns. A natural history of the ferns, clubmosses, quillworts, and horsetails of Denmark, Norway, and Sweden. *Rhodos*, Copenhagen

Oxley D und Bacic A (1999) Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(25): 14246–14251

Pennell RI, Knox JP, Scofield GN, Selvendran RR und Roberts K (1989) A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. *The Journal of Cell Biology* 108: 1967–1977

Pereira AM, Pereira LG und Coimbra S (2015) Arabinogalactan proteins: rising attention from plant biologists. *Plant Reproduction* 28(1): 1–15

Perumal G (2010) Ethnomedicinal use of pteridophyte from Kolli Hills, Namakkal District, Tamil Nadu, India. *Ethnobotanical Leaflets* 14: 161–172

Peters M, Kauth M, Scherner O, Gehlhar K, Steffen I, Wentker P, von Mutius E, Holst O und Bufe A (2010) Arabinogalactan isolated from cowshed dust extract protects mice from allergic airway inflammation and sensitization. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126(3): 648–656

Ponder GR und Richards GN (1997) Arabinogalactan from Western Larch, Part III: Alkaline degradation revisited, with novel conclusions on molecular structure. *Carbohydrate Polymers* 34: 151–261

Popper ZA (2008) Evolution and diversity of green plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11(3): 286–292

Popper ZA und Fry SC (2003) Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. *Annals of Botany* 91(1): 1–12

Popper ZA und Fry SC (2004) Primary cell wall composition of pteridophytes and spermatophytes. *New Phytologist* 164(1): 165–174

- Popper ZA, Sadler IH und Fry SC** (2004) 3-*O*-Methylrhamnose in lower land plant primary cell walls. *Biochemical Systematics and Ecology* 32(3): 279–289
- Prigent SVE, Gruppen H, Visser AJWG, van Koningsveld GA, de Jong GAH und Voragen AGJ** (2003) Effects of non-covalent interactions with 5-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(17): 5088–5095
- Prigent SVE, Voragen AGJ, Visser AJ, van Koningsveld GA und Gruppen H** (2007) Covalent interactions between proteins and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(13): 2502–2510
- Pryer KM, Schneider H, Smith AR, Cranfill R, Wolf PG, Hunt JS und Sipes SD** (2001) Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. *Nature* 409: 618–622
- Pryer KM, Schuettpelz E, Wolf PG, Schneider H, Smith AR und Cranfill R** (2004) Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. *American Journal of Botany* 91(10): 1582–1598
- Putoczki TL, Pettolino F, Griffin MDW, Moller R, Gerrard JA, Bacic A und Jackson SL** (2007) Characterization of the structure, expression and function of *Pinus radiata* D. Don arabinogalactan-proteins. *Planta* 226(5): 1131–1142
- Qi W, Fong C und Lamport DTA** (1991) *Gum arabic* glycoprotein is a twisted hairy rope: A new model based on *O*-galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site. *Plant Physiology* 96: 848–855
- Radulović N, Stojanović G und Palić R** (2006) Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. *Phytotherapy Research* 20(1): 85–88
- Recouso RC, Stocco dos Santos RC, Freitas R, Santos RC, de Freitas AC, Brunner O, Becak W und Lindsey CJ** (2003) Clastogenic effect of bracken fern (*Pteridium aquilinum* v. *arachnoideum*) diet in peripheral lymphocytes of human consumers: preliminary data. *Veterinary and Comparative Oncology* 1: 22–29
- Robert P, Marquis M, Barron C, Guillon F und Saulnier L** (2005) FT-IR investigation of cell wall polysaccharides from cereal grains. Arabinoxylan infrared assignment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(18): 7014–7018

- Robuck OW** (1985) The common plants of the muskegs of southeast Alaska. *Miscellaneous Publication*, Portland
- Saha S, Nosal'ova G, Ghosh D, Fleskova D, Capek P und Ray B** (2011) Structural features and *in vivo* antitussive activity of the water extracted polymer from *Glycyrrhiza glabra*. *International Journal of Biological Macromolecules* 48(4): 634–638
- Samson MR, Jongeneel R und Klis FM** (1984) Arabinogalactan protein in the extracellular space of *Phaseolus vulgaris* hypocotyls. *Phytochemistry* 23(3): 493–496
- Sanchez C, Schmitt C, Kolodziejczyk E, Lapp A, Gaillard C und Renard D** (2008) The *acacia* gum arabinogalactan fraction is a thin oblate ellipsoid: A new model based on small-angle neutron scattering and ab initio calculation. *Biophysical Journal* 94(2): 629–639
- Sandhu NS, Kaur S und Chopra D** (2010) *Equisetum arvense*: Pharmacology and phytochemistry - a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 3(3): 146–150
- Saulnier L, Brillouet J-M, Moutounet M, Du Penhoat CH und Michon V** (1992) New investigations of the structure of grape arabinogalactan-protein. *Carbohydrate Research* 224: 219–235
- Schepetkin IA und Quinn MT** (2006) Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology* 6(3): 317–333
- Schultz C, Gilson P, Oxley D, Youl J und Bacic A** (1998) GPI-anchors on arabinogalactanproteins: implications for signalling in plants. *Trends in Plant Science* 3(11)
- Seifert GJ und Roberts K** (2007) The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* 58: 137–161
- Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G und Rock KL** (1997) Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC I class I and class II molecules. *Journal of Immunology* 158: 2723–2730
- Shibaya T und Sugawara Y** (2009) Induction of multinucleation by β -glucosyl Yariv reagent in regenerated cells from *Marchantia polymorpha* protoplasts and involvement of arabinogalactan proteins in cell plate formation. *Planta* 230(3): 581–588

- Showalter AM** (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58(10): 1399–1417
- Showalter AM, Keppler BD, Liu X, Lichtenberg J und Welch LR** (2016) Bioinformatic identification and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biology* 16(1): 229
- Silva GB, Ionashiro M, Carrara TB, Crivellari AC, Tiné MAS, Prado J, Carpita NC und Buckeridge MS** (2011) Cell wall polysaccharides from fern leaves: evidence for a mannan-rich Type III cell wall in *Adiantum raddianum*. *Phytochemistry* 72(18): 2352–2360
- Sims IM und Furneaux RH** (2003) Structure of the exudate gum from *Meryta sinclairii*. *Carbohydrate Polymers* 52(4): 423–431
- Singh BP und Upadhyay R** (2012) Ethno-botanical importance of pteridophytes used by the tribe of Pachmarhi, Central India. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(1): 14–18
- Smith BL und Seawright AA** (1995) Bracken fern (*Pteridium* spp.) carcinogenicity and human health - a brief review. *Natural Toxins* 3(1): 1–5
- Soleimani S, Azarbaizani FF und Nejati V** (2007) The effect of *Equisetum arvense* L. (Equisetaceae) in histological changes of pancreatic β -cells in streptozotocin-induced diabetic in rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(23): 4236–4240
- Soni U, Brar Seema und Gauttam VK** (2015) Effect of seasonal variation on secondary metabolites of medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 6(9): 3654–3662
- Sørensen I, Pettolino FA, Wilson SM, Doblin MS, Johansen B, Bacic A und Willats WGT** (2008) Mixed-linkage (1-3),(1-4)- β -D-glucan is not unique to the Poales and is an abundant component of *Equisetum arvense* cell walls. *The Plant Journal* 54(3): 510–521
- Stegemann H und Stalder K** (1967) Determination of hydroxyproline. *Clinica Chimica Acta* 18: 267–273
- Strahm A, Amadò R und Neukom H** (1981) Hydroxyproline-galactoside as a protein-polysaccharide linkage in a water soluble arabinogalactan-peptide from wheat endosperm. *Phytochemistry* 20(5): 1061–1063

- Sun W, Xu J, Yang J, Kieliszewski MJ und Showalter AM** (2005) The lysine-rich arabinogalactan-protein subfamily in *Arabidopsis*: Gene expression, glycoprotein purification and biochemical characterization. *Plant & Cell Physiology* 46(6): 975–984
- Sweet DP, Shapiro RH und Albersheim P** (1975) Quantitative analysis by various g.l.c. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydrate Research* 40(2): 217–225
- Talukdar AD, Tarafdar RG, Choudhury MD, Nath D und Choudhury S** (2011) A review on pteridophyte antioxidants and their potential role in discovery of new drugs. *Assam University Journal of Science & Technology* 7(1): 151–155
- Tan L, Qiu F, Lamport DTA und Kieliszewski MJ** (2004) Structure of a hydroxyproline (Hyp)-arabinogalactan polysaccharide from repetitive Ala-Hyp expressed in transgenic *Nicotiana tabacum*. *The Journal of Biological Chemistry* 279(13): 13156–13165
- Tan L, Showalter AM, Egelund J, Hernandez-Sanchez A, Doblin MS und Bacic A** (2012) Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans. *Frontiers in Plant Science* 3: 140
- Taylor RL und Conrad HE** (1972) Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl group. *Biochemistry* 11(8): 1383–1388
- Thude S und Classen B** (2005) High molecular weight constituents from roots of *Echinacea pallida*: an arabinogalactan-protein and an arabinan. *Phytochemistry* 66(9): 1026–1032
- Thude S, Classen B, Blaschek W, Barz D und Thude H** (2006) Binding studies of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* to leucocytes. *Phytomedicine* 13(6): 425–427
- Triplett BA und Timpa JD** (1997) β -Glucosyl and α -Galactosyl Yariv reagents bind to cellulose and other glucans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(12): 4650–4654
- Tryfona T, Liang H-C, Kotake T, Kaneko S, Marsh J, Ichinose H, Lovegrove A, Tsumuraya Y, Shewry PR, Stephens E und Dupree P** (2010) Carbohydrate structural

analysis of wheat flour arabinogalactan protein. *Carbohydrate Research* 345(18): 2648–2656

Tsumuraya Y, Hashimoto Y und Yamamoto S (1987) An L-arabino-D-galactan and an L-arabino-D-galactan-containing proteoglycan from radish (*Raphanus sativus*) seeds. *Carbohydrate Research* 161: 113–126

Usov AI, Bilan MI und Shashkov AS (1997) Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae). *Carbohydrate Research* 303(1): 93–102

van Hengel AJ, Tadesse Z, Immerzeel P, Schols H, van Kammen A und de Vries SC (2001) N-Acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiology* 125: 1880–1890

van Hengel AJ, van Kammen A und de Vries SC (2002) A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 114(4): 637–644

van Holst G-J und Klis FM (1981) Hydroxyproline glycosides in secretory arabinogalactan-protein of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 68: 979–980

Vlad F, Spano T, Vlad D, Bou Daher F, Ouelhadj A und Kalaitzis P (2007) Arabidopsis prolyl 4-hydroxylases are differentially expressed in response to hypoxia, anoxia and mechanical wounding. *Physiologia Plantarum* 130(4): 471–483

Volk R-B, Blaschek W und Classen B (2007) Characterization of an arabinogalactan protein from the pressed juice of *Echinacea purpurea*: Investigations into the type of linkage between the protein and polysaccharide moieties. *Journal of Natural Medicines* 61(4): 397–401

Wack M, Classen B und Blaschek W (2005) An acidic arabinogalactan-protein from the roots of *Baptisia tinctoria*. *Planta Medica* 71(9): 814–818

Weng J-K, Li X, Stout J und Chapple C (2008) Independent origins of syringyl lignin in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(22): 7887–7892

Willför S, Sjöholm R, Laine C und Holmbom B (2002) Structural features of water-soluble arabinogalactans from Norway spruce and Scots pine heartwood. *Wood Science and Technology* 36(2): 101–110

- Xing S-H, Zhu C-X, Zhang R und An L** (2014) Huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease and vascular dementia: A meta-analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014: 1–10
- Xue X und Fry SC** (2012) Evolution of mixed-linkage (1-3,1-4)- β -D-glucan (MLG) and xyloglucan in *Equisetum* (horsetails) and other monilophytes. *Annals of Botany* 109(5): 873–886
- Yamada H und Kiyohara H** (1999) Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. In: Wagner H (Hrsg.), Immunomodulatory agents from plants. *Birkhäuser Verlag*, 161–202
- Yamagishi T, Matsuda K und Watanabe T** (1976) Characterisation of the fragments obtained by enzymic and alkaline degradation of rice-bran proteoglycans. *Carbohydrate Research* 50: 63–74
- Yamasaki FT, Lenzi RM, Campestrini LH, Bovo F, Seyfried M, Soldara-Silva A, Stevan-Hancke FR, Zawadzki-Baggio SF, Pettolino FA, Bacic A und Maurer JBB** (2015) Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. *Carbohydrate Polymers* 125: 241–248
- Yariv J, Rapport MM und Graf L** (1962) The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochemical Journal* 85: 383–388
- Yates EA, Valdor J-F, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Mackie W und Knox JP** (1996) Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6(2): 131–139
- Youl JJ, Bacic A und Oxley D** (1998) Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(14): 7921–7926
- Zhou X-L, Sun P-N, Bucheli P, Huang T-H und Wang D** (2009) FT-IR methodology for quality control of arabinogalactan protein (AGP) extracted from green tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(12): 5121–5128

IX. Danksagung

Mein größter Dank geht an meine Doktormutter Prof. Dr. Birgit Classen für die Überlassung und Betreuung dieses interessanten und unerschöpflichen Themas. Durch Ihr Vertrauen in mich habe ich gelernt, das Thema selbständig zu erarbeiten, Sachverhalte zu hinterfragen und neue Ideen zu entwickeln. Dabei konnte ich von Ihrem umfangreichen Wissen und Ihrer verständnisvollen und lieben Art profitieren.

Auch bedanken möchte ich mich bei Marie und Steffi, die mir den Einstieg in dieses Thema erheblich erleichtert haben, mich in verschiedenste Versuche eingeführt haben und mir wenn nötig immer zur Seite standen.

Natürlich danke ich auch allen anderen meiner Kollegen und Freunde, die die Zeit hier am Institut und besonders während der Mittagspause in der Teeküche oder im Pharmazeutischen Garten, auf Exkursion oder nach Feierabend wie im Flug haben vergehen lassen. Sie hatten immer ein offenes Ohr und haben mich unterstützt.

Dabei möchte ich insbesondere meinen Bürokolleg(inn)en Thomas und Fredi für die schönen Stunden danken, bei denen neben arbeitsrelevanten auch andere wichtige Themen besprochen wurden.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Dr. Ullrich. Girreser für die kompetente Betreuung während der Durchführung von GC-MS-Messungen, Frau Stephanie thor Straten für die HPLC-Analyse der Aminosäuren und besonders bei Judith für die Züchtung und Vorbereitung der Zellen für die FACS-Versuche.

Von ganzem Herzen danke ich auch meinen Freunden, meinem Freund und meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester. Sie haben mich immer unterstützt und mir Mut zugesprochen. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da seid, wenn ich euch brauche.

X. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Desirée Natascha Bartels
 Geburtsdatum: 21.12.1987
 Geburtsort: Hamburg
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Berufliche Tätigkeit

seit 10/2013 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Abteilung Pharmazeutische Biologie
 Anfertigung der Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Birgit Classen

seit 10/2013 Apothekerin in Vertretung in der Apotheke 21, Schenefeld

Hochschulausbildung

08/2013 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation zur Apothekerin

01/2013 – 06/2013 Zweite Hälfte des Pharmaziepraktikums in der Apotheke 21, Schenefeld

07/2012 – 12/2012 Erste Hälfte des Pharmaziepraktikums in der Nordmark Arzneimittel GmbH & Co. KG

04/2012 – 05/2012 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

03/2010 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

04/2008 – 06/2012 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schulbildung

08/1998 – 06/2007 Wolfgang-Borchert-Gymnasium, Halstenbek
 Abschluss: allgemeine Hochschulreife

XI. Ehrenwörtliche Erklärung

zu §8 Absatz 1 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 der Leitung von Professorin Dr. Birgit Classen, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt, bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten 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 vorher weder der Math.-Nat. Fakultät der CAU noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zweck der Promotion eingereicht habe. Außerdem ist diese Arbeit, bis auf die bereits publizierten Daten (BARTELS und CLASSEN, 2017), nicht zur Veröffentlichung eingereicht worden.

Kiel, Juli 2017

Desirée Bartels

