

Pelargonium sidoides DC:
Vermehrung mittels somatischer Embryogenese
sowie Charakterisierung von
biologisch aktiven Arabinogalaktan-Proteinen



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

vorgelegt von
Stefanie Duchow

Kiel, 2012

Erste Gutachterin:
Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Birgit Classen
Prof. Dr. Wolfgang Blaschek

Tag der mündlichen Prüfung:
Zum Druck genehmigt:

22.11.2012
22.11.2012

Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Denn ein Schiff erschaffen heißt nicht
die Segel hissen,
die Nägel schmieden,
die Sterne lesen,
sondern die Freude am Meer wachrufen.

- Antoine de Saint-Exupéry -

Meiner ganzen Familie

I Inhaltsverzeichnis

I	INHALTSVERZEICHNIS	1
II	VERZEICHNISSE.....	7
1.	Abkürzungsverzeichnis.....	7
2.	Abbildungsverzeichnis	11
3.	Tabellenverzeichnis	15
III	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	17
1.	<i>Pelargonium sidoides</i> DC.....	17
1.1	Geschichtliches.....	17
1.2	Beschreibung der Heilpflanze und des Drogenmaterials	17
1.3	Anwendung	18
1.4	Inhaltsstoffe	19
1.5	Pharmakologische Wirkungen.....	20
1.5.1	Antibakterielle Wirkungen.....	20
1.5.2	Wirkungen gegenüber Mykobakterien.....	21
1.5.3	Immunmodulierende Eigenschaften und antivirale Aktivitäten.....	22
1.5.4	Einfluss auf das mukoziliäre System	23
1.5.5	Diskussion der Lebertoxizität	24
1.6	Aspekte des Artenschutzes	24
2.	Arabinogalaktan-Proteine	26
2.1	Allgemeines.....	26
2.2	Verbreitung.....	26
2.3	Biosynthese der AGPs	27
2.4	Aufbau eines AGPs	27
2.4.1	Kohlenhydratgerüst.....	28
2.4.2	Proteinanteil	29
2.4.3	GPI-Anker.....	29
2.5	Funktionen von AGPs	30
3	Motivation und Zielsetzung	31
IV	MATERIAL UND METHODEN.....	32
1.	Isolierung von AGPs aus <i>Pelargonium sidoides</i>	32
1.1	Verwendetes Drogenmaterial	32

1.2	Extrakterstellung	32
1.3	Isolierung der AGPs aus dem Retentat.....	33
1.3.1	Synthese des (β -D-Glc) ₃ -Yariv-Phenylglycosid.....	33
1.3.2	Isolierung der AGPs	34
1.4	Optimierung der Retentatgewinnung	35
1.4.1	Variation von Extraktionszeit, -temperatur und -mittel, sowie Verwendung von frischem Drogenmaterial	36
1.4.2	Entfernung von Gerbstoffen aus den Retentaten	36
1.4.3	Separate Extraktion der Gerbstoffe mit organischen Lösungsmitteln	38
1.4.4	Aufreinigung von AGP-Lösungen.....	38
1.5	Mikroskopische Untersuchungen von Wurzelschnitten	40
2.	<i>Pelargonium sidoides</i>-Zellkulturen	41
2.1	Verwendetes Drogenmaterial	41
2.2	Aseptisches Arbeiten.....	41
2.3	Herstellung von Nährmedien	41
2.3.1	MS-Medium	41
2.3.2	Herstellung von festem MS-Medium	43
2.3.3	Herstellung von flüssigem MS-Medium.....	43
2.3.4	Erweitertes MS-Medium	44
2.3.5	Nährmedium mit Polyamid 6.....	44
2.4	Anlegen von Kalluskulturen.....	44
2.5	Erhaltung von Kalluskulturen	45
2.6	Anlegen von Suspensionskulturen	45
2.7	Erhaltung von Suspensionskulturen	45
2.8	Isolierung der AGPs aus den Suspensionskulturen	46
2.8.1	Isolierung der Arabinogalaktan-Proteine.....	46
2.9	Isolierung von AGPs aus den Kalluskulturen	47
3.	Geldiffusionstest.....	48
4.	Strukturaufklärende Analytik der AGPs	49
4.1	Charakterisierung des Kohlenhydratanteils.....	49
4.1.1	Neutralzuckeranalytik mittels Acetylierung	49
4.1.2	Kolorimetrische Quantifizierung der Uronsäuren	50
4.1.3	Bestimmung der Uronsäuren mittels HPTLC.....	51
4.1.4	Reduktion der Uronsäuren	52
4.1.5	Analyse der Bindungstypen	53
4.1.6	Partielle Säurehydrolyse	56
4.1.7	Enzymatische Hydrolyse	56
4.1.8	Smith Degradation	57

4.1.9	Alkalische Hydrolyse.....	58
4.2	Charakterisierung des Proteinanteils	59
4.2.1	Photometrische Hydroxyprolin-Bestimmung	59
4.2.2	Bestimmung der Aminosäuren per HPLC	60
4.2.3	Photometrische Bestimmung des Proteingehaltes mit Ninhydrin	61
4.3	Gelpermeationschromatographie.....	62
4.3.1	Präparative Gelpermeationschromatographie	64
4.4	Elementaranalyse.....	64
4.5	¹³ C-NMR-Spektroskopie	65
5.	Biologische Aktivitäten der AGPs.....	66
5.1	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	66
5.2	Komplementassay.....	68
5.3	Untersuchung des Einflusses von β -Yariv-Reagenz auf Suspensionskulturen von <i>P. sidoides</i>	69
5.3.1	Bestimmung des Zellwachstums.....	70
5.3.2	Mikroskopische Untersuchungen und Vitalitätsfärbungen	72
5.3.3	Isolierung der DNA und gelelektrophoretische Auftrennung	72
6.	Vermehrung von <i>Pelargonium sidoides</i>	75
6.1	Direkte somatische Embryogenese.....	75
6.1.1	Zusammensetzung der Nährmedien.....	76
6.1.2	Durchführung des Versuches	77
6.1.3	Einfluss von AGPs auf das embryogenetische Potential.....	79
6.1.4	Mikroskopische Untersuchungen der somatischen Embryonen.....	80
6.2	Indirekte somatische Embryogenese	81
6.2.1	Zusammensetzung der Nährmedien.....	81
6.2.1	Durchführung des Versuches	83
V	ERGEBNISSE.....	84
1.	Isolierung von AGPs aus <i>Pelargonium sidoides</i>	84
1.1	Isolierung von AGPs aus dem Wurzel-Extrakt.....	84
1.2	Optimierung der Extraktgewinnung	85
1.2.1	Extraktion der getrockneten und frischen Wurzel bei RT.....	85
1.2.2	Extraktion der getrockneten und frischen Wurzel bei 50°C.....	86
1.2.3	Extraktion der getrockneten und frischen Wurzel bei 100°C.....	86
1.2.4	Extraktion der getrockneten und frischen Wurzel in Ethanol-Wasser-Mischungen	87
1.3	Entfernung der Gerbstoffe	88
1.4	Isolierung von AGPs aus verschiedenen Extrakten	90
1.5	Aufreinigung von isolierten AGPs	92
1.5.1	Erste Schritte der AGP-Aufreinigung	92

1.5.2	Bindungstypanalyse zweier AGPs aus 100°C-Extrakten.....	93
1.5.3	Entfernung der an das AGP gebundenen Stärke.....	94
1.5.4	Abtrennung der Gerbstoffe vom AGP.....	95
1.6	Untersuchungen am Wurzelschnitt	97
2.	Etablierung von <i>Pelargonium sidoides</i>-Zellkulturen.....	99
2.1	Kalluskulturen - Vergleich diverser Nährmedien.....	99
2.2	Suspensionskulturen - Vergleich verschiedener Nährmedien	102
2.2.1	Vergleichende Untersuchung der AGPs aus Suspensionskulturen mit verschiedenen Phytohormonzusätzen.....	104
3.	Charakterisierung von AGPs aus Kallusgeweben	106
3.1	Bestimmung des Molekulargewichtes.....	106
3.2	Qualitative und quantitative Verteilung der Neutralzucker	106
3.3	Reduktion der Uronsäuren.....	107
3.4	Analyse der Bindungstypen.....	108
4.	Charakterisierung von AGPs aus den Zellen von Suspensionskulturen.....	109
4.1	Qualitative und quantitative Verteilung der Monosaccharide	109
4.2	Molekülgrößenbestimmung.....	109
5.	Charakterisierung der ins Nährmedium sezernierten AGPs aus optimierten Suspensionskulturen	110
5.1	Bestimmung der Molekulargewichte der AGPs.....	112
5.2	Analytik des Kohlenhydratanteils	113
5.2.1	Monosaccharidzusammensetzung	113
5.2.2	Qualitative und quantitative Bestimmung der Uronsäuren.....	115
5.2.3	Verknüpfung der einzelnen Monosaccharide im nativen AGP.....	117
5.2.4	Partielle Hydrolyse der AGPs.....	120
5.2.5	Enzymatischer Abbau der AGPs	124
5.2.6	Smith Degradation	125
5.2.7	¹³ C-NMR Spektroskopie.....	127
5.3	Analytik des Proteinanteils	129
5.3.1	Aminosäurezusammensetzung	129
5.3.2	Quantitative Bestimmung von Hydroxyprolin.....	130
5.3.3	Quantitative Bestimmung des Proteingehaltes nach STARCHER	131
5.3.4	Elementaranalyse.....	132
5.3.5	Bestimmung der Bindungsamino(säure(n))	133
5.4	Alkalische Hydrolyse der AGPs	134
6.	Biologische Aktivitäten von AGPs.....	140
6.1	Reaktivität von AGPs im ELISA	140
6.2	Immunmodulierende Eigenschaften der AGPs	142

6.2.1	Einfluss auf den klassischen Weg des Komplementsystems	143
6.2.2	Einfluss auf den alternativen Weg des Komplementsystems	143
6.2.3	Einfluss auf den Lektin-abhängigen Weg des Komplementsystems	144
6.3	Untersuchung des Einflusses von β -Yariv-Reagenz auf Suspensionskulturen von <i>P. sidoides</i>	144
6.3.1	Mikroskopische Beobachtungen der Zellen	144
6.3.2	Beobachtung des Zellwachstums von mit Yariv-Reagenz behandelten und unbehandelten Zellkulturen	147
6.3.3	Isolierung der DNA	157
7.	Vermehrung von <i>Pelargonium sidoides</i> mit Hilfe der somatischen Embryogenese	161
7.1	Etablierung der direkten somatischen Embryogenese	161
7.1.1	Induktion somatischer Embryonen durch diverse Phytohormone	161
7.1.2	Optimierung des Embryogenese-Verfahrens	165
7.1.3	Steigerung des embryogenetischen Potentials	167
7.1.4	Mikroskopische Untersuchungen an den Embryonen	176
7.2	Der Weg der indirekten somatischen Embryogenese	177
7.2.1	Induktion von somatischen Embryonen	177
VI	DISKUSSION	178
1.	Isolierung von AGPs aus der Wurzel Droge	178
1.1	Extraktion des <i>Pelargonium sidoides</i> -Wurzelmaterials	178
1.2	Interaktionen zwischen Polyphenolen und Polysacchariden	179
2.	Etablierung von <i>Pelargonium sidoides</i>-Zellkulturen	184
2.1	Kalluskulturen	184
2.1.1	Die optimale Phytohormonkombination und -konzentration	185
2.1.2	Reduzierung phenolischer Ablagerungen	187
2.2	Suspensionskulturen	188
2.2.1	Vergleich diverser Nährmediumszusätze	188
2.2.2	Polysaccharide und AGPs der Kulturmedium von Suspensionskulturen	189
3.	Isolierung und Analytik der AGPs aus Zellkulturen	190
3.1	Die Entwicklung eines AGP-Strukturmodells	190
3.1.1	Der Kohlenhydratanteil	190
3.1.2	Der Proteinanteil	194
3.1.3	Strukturmodell des <i>Pelargonium sidoides</i> -AGPs	195
3.2	Vergleich des <i>Pelargonium</i> -AGPs mit anderen AGPs der Literatur	199
3.3	Vergleich von AGPs aus verschiedenen Zellkulturen von <i>P. sidoides</i>	201
4.	Biologische Aktivitäten des Zellkultur-AGPs	204
4.1	Immunstimulierende Wirkungen	204

4.2	Untersuchung des Einflusses von β -Yariv-Reagenz auf Suspensionskulturen von <i>P. sidoides</i>	206
5.	Vermehrung von <i>Pelargonium sidoides</i>	212
5.1	Etablierung der somatischen Embryogenese	212
5.2	Einfluss von AGPs auf das embryogenetische Potential	215
VII	ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT	219
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	222
IX	DANKSAGUNG	236
X	LEBENS LAUF	237
	Persönliche Angaben	237
	Berufliche Tätigkeit	237
	Hochschulausbildung	237
	Schulbildung	237
XI	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG ZU §8 ABSATZ 1 DER PROMOTIONSORDNUNG	238

II Verzeichnisse

1. Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	bidestilliertes Wasser
ad	auf
AG	Arabinogalaktan
AGP	Arabinogalaktan-Protein
AK	Antikörper
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Aqua dem.	demineralisiertes Wasser
Ara	Arabinose
AS	Aminosäure(n)
β -Yariv-Reagenz	(β -D-Glc) ₃ -Yariv-Phenylglycosid
α -Yariv-Reagenz	(α -D-Gal) ₃ -Yariv-Phenylglycosid
BAP	Benzylaminopurin
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BSA	Bovines Serum Albumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
Caco	Cacodylatpuffer
CAU	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Ch.	Charge
CH	Schweiz
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	Cobalt(II)chlorid-Hexahydrat
conc.	concisus (geschnitten)
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat/Chalkanthit
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DC	DeCandolle (Erstautor für <i>Pelargonium sidoides</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D ₂ O	deutერიertes Wasser / schweres Wasser
Ø	Durchmesser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
<i>E. purpurea</i>	<i>Echinacea purpurea</i>

ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	Eisen(II)sulfat-Heptahydrat/Melanterit
FID	Flammenionisationsdetektor
Fuc	Fucose
g	Angabe der Beschleunigung als Vielfaches der Erdbeschleunigung
Gal	Galaktose
Glc	Glukose
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GPC	Gelpermeationschromatographie
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
H ₃ BO ₃	Borsäure
HCl	Salzsäure
HPLC	High-performance liquid chromatographie
HPTLC	High-performance thin-layer chromatographie
HRGPs	hydroxyproline-rich glycoproteins
IBA	Indolbuttersäure
IAA	Indolessigsäure
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Kaliumiodid
KOH	Kaliumhydroxid
Konz.	Konzentration
LM	Lösungsmittel
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MAK	Membranangriffskomplex
mAK	monoklonaler Antikörper
MALLS	multi-angle-laser-light-scattering
Man	Mannose
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat/Epsomit
MIC	minimale Hemmkonzentration
MnSO ₄ * H ₂ O	Mangan(II)sulfat-Monohydrat
MS	Murashige & Skoog
MWCO	molecular weight cut off
n	Anzahl der Versuche
N	normal
NAA	Naphthylelessigsäure
NaBH ₄	Natriumborhydrid

NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ * EDTA	Dinatriummethyldiamintetraacetat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	Natriummolybdat-Dihydrat
NaNO ₃	Natriumnitrat
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ O ₄ S ₂	Natriumdithionit
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NH ₄ NO ₃	Ammoniumnitrat
NO	Stickstoffmonoxid
PMAA	partiell methylierte Alditol-Acetate
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenylphosphat
PCD	programmed cell death
PRPs	proline-rich proteins
PS	Polysaccharid
<i>P. sidoides</i>	<i>Pelargonium sidoides</i>
Rad.	Radix
Rha	Rhamnose
RI	refractive index
RT	Raumtemperatur
Stabw	Standardabweichung
TDZ	Thidiazuron
TFA	Trifluoressigsäure
TFF	Tangentialflussfiltration
TIC	Totalionenchromatogramm
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV-Licht	ultraviolettes Licht
WW	Wechselwirkungen
WWF	World Wide Fund For Nature
Xyl	Xylose
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	Zink(II)sulfat-Heptahydrat/Goslarit

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Habitus von <i>Pelargonium sidoides</i> DC sowie Verbreitungsgebiet (rot)	18
Abbildung 2: Strukturformeln ausgewählter Inhaltstoffe aus <i>Pelargonium sidoides</i> DC	20
Abbildung 3: Darstellung eines AGPs im „wattle blossom“ Modell mit einem GPI-Anker	28
Abbildung 4: Reaktionsgleichung der β -Yariv-Reagenz-Synthese	34
Abbildung 5: Variationen der Retentatgewinnung	35
Abbildung 6: Reaktionsschema zur Herstellung von Alditolacetaten	50
Abbildung 7: vereinfachtes Reaktionsschema der Reduktion von Uronsäuren	52
Abbildung 8: Reaktionsschema der Methylierung	54
Abbildung 9: Umsetzung von Aminen mit Ninhydrin	61
Abbildung 10: Schematische Darstellung des indirekten ELISAs	67
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuches	70
Abbildung 12: Bestimmung des „Sinkvolumens“ in speziellen Nasenkolben	70
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Entwicklung somatischer Embryonen	79
Abbildung 14: Induktion der somatischen Embryonen auf dem indirekten Weg	83
Abbildung 15: Geldiffusionstest mit der gefriergetrockneten hochmolekularen Fraktion (>50.000 Da) aus dem wässrigen Wurzelextrakt	85
Abbildung 16: Geldiffusionstests	86
Abbildung 17: Retentate (R) und Filtrate (F) der Extrakte mit 5% EtOH und mit 11% EtOH der getrockneten Wurzel mit zwei Präzipitationsbanden bei den Retentaten	87
Abbildung 18: Geldiffusionstest des aufgereinigten Retentates mit Polyamid 6 der Fa. Roth mit AGPs isoliert aus dem Presssaft von <i>E. purpurea</i> als Positivkontrolle	89
Abbildung 19: Geldiffusionstest der hochmolekularen Fraktion	90
Abbildung 20: Quantitative Verteilung der Bindungstypen der beiden untersuchten AGPs	93
Abbildung 21: ^{13}C -NMR-Spektrum von einem zweifach gefälltem AGP aus dem 100°C-Extrakt der getrockneten Wurzel	96
Abbildung 22: Wasserpräparat der <i>P. sidoides</i> -Wurzel (\varnothing 7 mm)	97
Abbildung 23: Ausschnitte aus dem parenchymatischen Bereich der Rinde	98
Abbildung 24: Keimende <i>Pelargonium sidoides</i> Samen mit Spross- und Wurzelkeimlingen	100
Abbildung 25: Suspensionskulturen mit verschiedenen Phytohormonzusätzen	102
Abbildung 26: Kugelförmige und „würstchenartige“ Zellen einer 3 Wochen alten Suspensionskultur mit 2,4-D und Kinetin sowie Ascorbin- und Citronensäure	102
Abbildung 27: Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Polysaccharidfraktionen isoliert aus dem Kulturmedium von Suspensionskulturen mit verschiedenen Phytohormonzusätzen	103
Abbildung 28: Geldiffusionstests der hochmolekularen Fraktionen isoliert aus Wurzel- u. Spross-Suspensionskulturen mit konzentrationsabhängigen scharfen Präzipitationsbanden	104
Abbildung 29: Monosaccharidzusammensetzung der AGPs aus verschiedenen Flüssigkulturen	105
Abbildung 30: RI- und MALLS-GPC-Profile des S- und des W-K-AGPs	106

Abbildung 31: TIC- und FID-Chromatogramme des W- und S-Kallus-AGPs nach Reduktion der Uronsäuren und Analyse der Bindungstypen	107
Abbildung 32: GPC-Chromatogramm des S-AGPs der 3. Charge mit RI- und MALLS - Detektion	112
Abbildung 33: Gaschromatogramm des acetylierten AGP-V1	113
Abbildung 34: Graphische Darstellung der Monosaccharidverteilung im Kohlenhydrat-Teil der einzelnen AGP-Chargen	114
Abbildung 35: HPTLC-Chromatogramme des W- und S-AGPs der 2. Charge	116
Abbildung 36: FID-Chromatogramme des W- und S-AGPs der 2. Charge nach Reduktion der Uronsäuren und Analyse der Bindungstypen	117
Abbildung 37: Totalionenchromatogramm eines isolierten AGPs sowie Massenspektren und Darstellung der Fragmentierungsmuster der beiden größten Peaks im Chromatogramm	118
Abbildung 38: FID- und TIC-Chromatogramme des W- und S-AGPs der 1. Charge nach Methylierungsanalyse	118
Abbildung 39: Verteilung der Bindungstypen; links: Vergleich der Bindungstypenanalysen der AGPs der 1. und 2. Charge; rechts: Bindungstypenanalysen des intakten und uronsäurereduzierten AGP der 2. Charge	120
Abbildung 40: Änderung der Galaktosebausteine im AGP nach partieller Säurehydrolyse	122
Abbildung 41: Darstellung der Bindungstypen eines oxalsäurehydrolysierten und uronsäurereduzierten AGPs	123
Abbildung 42: Chromatogramme der GPC-Messungen des oxalsäurehydrolysierten W-AGPs der 1. Charge und des oxalsäurehydrolysierten und uronsäurereduzierten W-AGPs der 3. Charge	123
Abbildung 43: Chromatogramm des mit <i>exo-β</i> -1,3-Galaktanase und <i>exo</i> -1,5- <i>α</i> -L-Arabinofuronidase behandelten S-AGPs im Vergleich mit einem Galaktose-Standard	125
Abbildung 44: Graphische Darstellung der Veränderung der Mengen der Galaktose-Bindungstypen von den intakten zu dem Smith degradierten AGPs der 2. Charge	127
Abbildung 45: ¹³ C-Spektrum des W-AGPs der 1. Charge in D ₂ O	128
Abbildung 46: ¹³ C-Spektrum des W-AGPs der 3. Charge in DMSO-d ₆	128
Abbildung 47: Aminosäurezusammensetzung des Core-Proteins	130
Abbildung 48: Ergebnisse der Elementaranalyse der zweiten und vierten AGP-Charge	132
Abbildung 49: Bindungsamino-säuren der einzelnen Oligo- und Polysaccharidseitenketten	133
Abbildung 50: Modellhafte Darstellung der Alkalischen Hydrolyse eines AGPs	134
Abbildung 51: GPC-Chromatogramme der hoch- und niedermolekularen Fraktionen des alkalisch hydrolysierten AGPs im Vergleich mit dem Chromatogramm des Pullulan-Kalibriermixes	136
Abbildung 52: GPC-Chromatogramm der entsalzten hochmolekularen Fraktion	137
Abbildung 53: Chromatogramm der Fraktionierung per präparativer GPC	139
Abbildung 54: Vergleich der Reaktivitäten eines polyklonalen AKs und zweier monoklonaler AK gegen ein AGP aus <i>Pelargonium sidoides</i> ; Reaktivitäten der monoklonalen AK gegen AGPs aus <i>P. sidoides</i> und dem Presssaft von <i>E. purpurea</i> im Vergleich	140
Abbildung 55: Immunreaktionen gegen ein natives (PS-AGP), ein oxalsäurehydrolysiertes (PS-AGP-OHR) und ein uronsäurereduziertes (PS-AGP-U) AGP aus <i>P. sidoides</i>	141
Abbildung 56: Vereinfachte Darstellung der drei Wege des Komplementsystems	142

Abbildung 57: Relative Komplementaktivität des <i>P. sidoides</i> -AGP im klassischen Weg	143
Abbildung 58: Relative Komplementaktivität des <i>P. sidoides</i> -AGP im alternativen Weg	143
Abbildung 59: Relative Komplementaktivität des <i>P. sidoides</i> -AGP im Lektin-abhängigen Weg	144
Abbildung 60: Mikroskopische Beobachtungen der Suspensionskulturen	147
Abbildung 61: Zellwachstum einer unbehandelten <i>P. sidoides</i> Suspensionskultur mit Darstellung der einzelnen Messwerte	150
Abbildung 62: 2. Ansatz in Nasenkolben mit unbehandelten, mit 100 μ Mol α -Yariv und mit 50- und 100 μ Mol β -Yariv behandelte Zellkulturen	151
Abbildung 63: Ergebnisse der einzelnen Messungen des 2. Ansatzes	151
Abbildung 64: Reaktivität von α -Gal-, α -Glc-, β -Gal- und β -Glc-Yariv mit AGPs im Geldiffusionstest	152
Abbildung 65: 3. Ansatz in Nasenkolben mit unbehandelten, mit 100 μ Mol α -Yariv und mit 50- und 100 μ Mol β -Yariv behandelte Zellkulturen	152
Abbildung 66: Ergebnisse der einzelnen Messungen des 3. Ansatzes	153
Abbildung 67: 4. Ansatz in Nasenkolben mit unbehandelten, mit 100, 150 und 200 μ Mol α -Yariv und mit 100- und 200 μ Mol β -Yariv behandelte Zellkulturen	154
Abbildung 68: Ergebnisse der einzelnen Messungen des 4. Ansatzes	154
Abbildung 69: 5. Ansatz in Nasenkolben mit unbehandelten, mit 200 μ Mol α -Yariv und mit 200 μ Mol β -Yariv behandelte Zellkulturen	155
Abbildung 70: Ergebnisse der einzelnen Messungen des 5. Ansatzes	155
Abbildung 71: 6. Ansatz in Nasenkolben mit unbehandelten, mit 200 μ Mol α -Yariv und mit 200 μ Mol β -Yariv behandelte Zellkulturen sowie 2 Kolben mit dem monoklonalen Antikörper 4B8D3 in den Verdünnungen 1:20 und 1:100	156
Abbildung 72: Ergebnisse der einzelnen Messungen des 6. Ansatzes	157
Abbildung 73: 1. Versuch der DNA-Isolierung	158
Abbildung 74: 2. Versuch der DNA-Isolierung	158
Abbildung 75: 3. Versuch der DNA-Isolierung	159
Abbildung 76: 4. Versuch der DNA-Isolierung:	160
Abbildung 77: 5. und 6. Versuch der DNA-Isolierung:	160
Abbildung 78: Veränderung der Explanate auf phytohormonfreiem Nährmedium	162
Abbildung 79: Die 4 Stadien der somatischen Embryogenese: Globuläres S., Herz-S., Torpedo-S. und Kotyledonen-S.	162
Abbildung 80: Von der Induktion des Embryos bis zur Jungpflanze	163
Abbildung 81: Veränderung der Explanate auf oP-Nährmedien	164
Abbildung 82: Wurzelbildung bei Explanaten, die auf einem Induktionsmedium mit 2,4-D und BAP kultiviert wurden	164
Abbildung 83: Kombination von 2,4-D/BAP und Thidiazuron	164
Abbildung 84: zeitlicher Verlauf des vierten Versuches	167
Abbildung 85: Explanat mit 22 Embryonen	168
Abbildung 86: Vergleich der drei Parallelansätze in der Entwicklung der Embryonen	169
Abbildung 87: Vergleich der drei Parallelansätze in der Entwicklung der Embryonen	171

Abbildung 88: Entwicklung der Jungpflanzen im Gewächshaus	172
Abbildung 89: Differenzierungen eines Explanates inklusive mikroskopischen Querschnittes	173
Abbildung 90: Veränderung der Explanate auf oP-Medium unter verschiedenen Einflüssen	174
Abbildung 91: Vergleich der drei Parallelansätze in der Entwicklung der Embryonen	175
Abbildung 92: Entwicklung von meristematischem Gewebe an mit AGP-Lösung beträufelten Explanaten inklusive Regeneration neuer Pflanze	175
Abbildung 93: Übersichtsfärbungen mit Richardson der eingebetteten Embryonen und Stängel	176
Abbildung 94: Übersicht über die Entwicklung des Kallusgewebes während des Versuches, somatische Embryonen zu induzieren	177
Abbildung 95: Grundstrukturen der hydrolysierbaren und kondensierten Gerbstoffe	179
Abbildung 96: Strukturmodell des Smith degradierten AGPs	191
Abbildung 97: Strukturvorschlag des Kohlenhydratgrundgerüsts	193
Abbildung 98: Vorschläge zweier <i>Pelargonium sidoides</i> -AGP-Modelle ohne und mit Beachtung der Hydroxyprolin-Kontiguitäts-Theorie	198
Abbildung 99: Darstellung der bis heute etablierten Strukturmodelle von AGPs	200

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der AGPs nach ihrem Proteinanteil (aus CLASSEN et al. 2005)	29
Tabelle 2: Pullulanstandards mit entsprechenden Molekulargewichten (Angaben laut Hersteller)	63
Tabelle 3: Im ELISA genutzte Antikörper: Herkunft und Ziel-Epitope	66
Tabelle 4: Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Monosaccharide der hochmolekularen Fraktionen (>10.000 Da und >50.000 Da) und des isolierten AGPs	84
Tabelle 5: Ergebnisse der gaschromatographischen Untersuchungen der einzelnen hochmolekularen Fraktionen aus verschiedenen Extraktionsansätzen	87
Tabelle 6: Qualitative und quantitative Zusammensetzung der aufgereinigten Retentate nach den entsprechenden Methoden zur Gerbstoffentfernung	89
Tabelle 7: Quantitative Verteilung der Neutralzucker einer ethanolgefällten Polysaccharidfraktion nach vorangegangener Gerbstoffentfernung durch Aceton und Methanol	90
Tabelle 8: AGP-Zusammensetzung nach einfacher Yarivfällung aus der Polysaccharidfraktion	91
Tabelle 9: AGP-Zusammensetzung nach einfacher Yarivfällung aus verschiedenen Retentaten	91
Tabelle 10: Zusammensetzung der AGPs nach ersten Aufreinigungsschritten	93
Tabelle 11: Zusammensetzung der AGPs nach verschiedenen Methoden zur Stärkeentfernung	94
Tabelle 12: Monosaccharidverteilung und Zuckeranteile der mit Strukturbrechern aufgereinigten AGPs	95
Tabelle 13: Wachstumsbeobachtungen der Kallusgewebe verschiedener Nährmedien	101
Tabelle 14: Menge an aus den Nährmedien isolierten AGPs bezogen auf die gefriergetrockneten Zellmassen der einzelnen Kultivierungsansätze	104
Tabelle 15: Absolute Molekulargewichte und hydrodynamische Volumina der aus Kallusgeweben isolierten AGPs	106
Tabelle 16: Quantitative Verteilung der Neutralzucker in den AGPs isoliert aus Kalluskulturen	107
Tabelle 17: Bindungstypen in den intakten und uronsäurereduzierten AGPs	108
Tabelle 18: Neutralzucker-Verteilung im AGP aus den Zellen der Suspensionskultur der 32. Ernte	109
Tabelle 19: Absolute Molekulargewichte und hydrodynamische Volumina der aus Suspensionskulturzellen isolierten AGPs	109
Tabelle 20: Überblick über die einzelnen Flüssigkulturansätze inkl. Ausbeuten an isolierten Polysacchariden u. AGPs	110
Tabelle 21: Absolute Molekulargewichte und hydrodynamische Volumina der fünf AGP-Chargen	113
Tabelle 22: Neutralzucker-Zusammensetzung der vereinten AGP-Chargen	114
Tabelle 23: Uronsäuregehalt des AGPs der 2. Charge	115
Tabelle 24: Absolute Molekulargewichte und hydrodynamische Volumina der vier AGP-Chargen	117
Tabelle 25: Quantitative Verteilung der einzelnen Bindungstypen in den AGPs der 1. und 2. Charge sowie dem uronsäurereduzierten AGP der 2. Charge	119
Tabelle 26: Neutralzuckerverteilung in den partiell hydrolysierten AGPs und den Lösungen der abgespaltenen Zuckern	121
Tabelle 27: Verteilung der Bindungstypen im Rest-AGP der beiden degradierten AGP-Chargen	121

Tabelle 28: Quantitative Veränderung der Galaktosemengen vom intakten zum degradierten AGP	122
Tabelle 29: Bestimmung des absoluten Molekulargewichtes und des hydrodynamischen Volumens zweier degradiertes AGP-Chargen	124
Tabelle 30: Darstellung der Bindungstypen im Kohlenhydratanteil der Smith degradierten AGP	126
Tabelle 31: Quantitative Veränderung der Galaktose-Bausteine von intakten zu degradierten AGPs	127
Tabelle 32: Molekülgrößenbestimmung der degradierten AGPs mit Na-Periodat	127
Tabelle 33: Chemische Verschiebungen im ^{13}C -Spektrum des in D_2O gelösten AGPs	129
Tabelle 34: Quantifizierung der Aminosäuren im Kern Protein des AGPs der 4. Charge in m/m %	130
Tabelle 35: Übersicht über den Hydroxyprolin- bzw. Proteingehalt einzelner AGP-Chargen	131
Tabelle 36: Proteinmengen der 4. AGP-Charge ermittelt nach der Methode nach STARCHER	132
Tabelle 37: Berechnung des Proteinanteils im AGP nach der Methode nach Kjeldahl	133
Tabelle 38: Quantitative und qualitative Verteilung der „Bindungsaminosäure(n)“	134
Tabelle 39: Absolute Molekulargewichte und hydrodynamische Volumina der hoch- und niedermolekularen Fraktionen des alkalisch hydrolysierten AGPs	136
Tabelle 40: Absolute Molekulargewichte und hydrodynamische Volumina der Zuckereinheiten der hochmolekularen Fraktion nach Entsalzung	137
Tabelle 41: Verteilung der Neutralzucker in den Fraktionen des alkalisch hydrolysierten AGP	138
Tabelle 42: Quantitative Monosaccharidverteilung nach der Fraktionierung anhand des Molekulargewichtes im Vergleich zum intakten AGP und den beiden mittels Ethanol-Fällung gewonnen Fraktionen	139
Tabelle 43: Übersicht über die morphologischen Merkmale zur Unterscheidung apoptotischer (bzw. PCD) von nekrotischer Zellen nach HUBERT (2000)	145
Tabelle 44: Erste vergleichende mikroskopische Beobachtungen von unbehandelten und mit α - und β -Yariv-Reagenz behandelten Zellen bzw. Zellsuspensionen	146
Tabelle 45: Zellzählung im Hämocytozometer	148
Tabelle 46: Quantifizierung der Embryonen von der Entstehung bis zur Übertragung ins Gewächshaus	166
Tabelle 47: Quantifizierung der Embryonen von der Entstehung bis zur Übertragung ins Gewächshaus	167
Tabelle 48: Quantifizierung der Embryonen von der Entstehung bis zur Übertragung ins Gewächshaus	168
Tabelle 49: Quantifizierung der Embryonen von der Entstehung bis zur Übertragung ins Gewächshaus	170
Tabelle 50: Quantifizierung der Embryonen von der Entstehung bis zur Übertragung ins Gewächshaus	173
Tabelle 51: Die sechs Phytohormonklassen und ihre Wirkungen	185
Tabelle 52: Vergleichende Darstellung der Bindungstypen im intakten, oxalsäurehydrolysierten und Smith-degradiertem AGP	192
Tabelle 53: Quantitative Veränderung der Galaktosemengen vom intakten zum degradierten AGP	192
Tabelle 54: Proteinanteile der AGPs aus <i>Pelargonium</i> , ermittelt mit verschiedenen Methoden	195
Tabelle 55: Aminosäureverteilung im Proteinteil des <i>Pelargonium sidoides</i> -AGPs	197
Tabelle 56: Vergleich dreier verschiedener AGPs aus den Zellkulturen von <i>P. sidoides</i>	202

III Einleitung und Zielsetzung

1. *Pelargonium sidoides* DC

1.1 Geschichtliches

Die in Südafrika beheimatete Arzneipflanze *Pelargonium sidoides* DC aus der Familie der Geraniaceae ist eine von 3.000 Arten, die zum Fundus der traditionellen afrikanischen Medizin gehören. Traditionell wurden Aufgüsse und Abkochungen der Pflanze in der einheimischen Bevölkerung unter anderem zur Behandlung von Wunden, Diarrhö und Ruhr (WATT et al. 1962, HUTCHINGS 1996, BRENDLER et al. 2008) hergestellt. Extrakte der rotbraunen Wurzeln fanden außerdem ihren Einsatz bei Erkältungskrankheiten, Fieber und Husten, sowie der später durch Siedler eingeschleppten Tuberkulose. Die Pflanze und deren Heilkraft wurde durch den Engländer Charles H. Stevens in Europa bekannt. Dieser erkrankte in jungen Jahren an Tuberkulose und reiste 1897 auf ärztlichen Rat in das günstige Klima Südafrikas, um sich von einem lokalen Arzt behandeln zu lassen. Nach der erfolgreichen Behandlung mit einem Sud aus den Wurzeln einer lokalen Pflanze kehrte Stevens mit der Droge im Gepäck nach England zurück und führte sie 1897 als Medizin gegen Tuberkulose unter dem Namen „Stevens Consumption Cure“ ein (NEWSOM et al. 2002, TAYLOR et al. 2005, BLADT et al. 2007). Die Etablierung dieser Medizin war aufgrund von Denunzierungen durch die British Medical Association, die Stevens als Quacksalber und Schwindler aufgrund fehlenden Wissens über den botanischen Ursprung der Pflanze sowie ihrer Inhaltsstoffe und pharmakologischen Wirkungen bezeichneten, sehr schwer. Erst 1920 mit der Nutzung des Extraktes zur Behandlung von 800 Patienten durch Dr. Adrien Secheyaye von der Universität Genf und deren akribische Dokumentation wurde die Einführung der Droge in Europa zur Behandlung der Tuberkulose akzeptiert. Mit der Veröffentlichung der ersten Erkenntnisse 1930 durch Secheyaye konnte das Arzneimittel erfolgreich in Europa etabliert werden (SECHEHAYE 1931, SECHEHAYE 1933 und 1951). Nach dem Zweiten Weltkrieg wurde das Arzneimittel in Deutschland produziert und vermarktet und wird heute erfolgreich zur Behandlung von Atemwegserkrankungen in der rationalen Phytotherapie angewendet.

1.2 Beschreibung der Heilpflanze und des Drogenmaterials

Die zur Gattung *Pelargonium* gehörende Heilpflanze wächst als bis zu 80 cm groß werdender Kleinstrauch in den höheren Lagen (bis 2000 m) von Lesotho über Teile des Transvaals und des Orange Free State bis in den Nordosten des Kaplandes (BRENDLER et al. 2008, KOLODZIEJ 2008, BLASCHEK et al. 2009). Die rosettenartig angeordneten großen herzförmigen Laubblätter sind langstielig, haben einen fein gelappten Rand und fühlen sich aufgrund einer starken Behaarung mit kleinen Drüsenhaaren samtig an. Die vorkommenden Nebenblätter sind schmal und 1-2 cm lang. Die in Form von

Trugdolden angeordneten Blütenstände mit ihren rotviolett bis schwarzen kleinen zygomorphen Blüten bestehen aus fünf Kronblättern, von denen zwei dicht beieinander nach oben stehen und drei weiter voneinander entfernt stehend die Unterblätter bilden. Die Blüte der Kapland-Pelargonie enthält zehn Staubblätter mit kugeligen gelborangen Pollen. Die Früchte weisen die für die Familie der Geraniaceen typische storchnabelartige Form auf. Die 1-3,5 cm dicken Wurzeln liegen entweder als kurze, dicke und knollige oder als lange und dünne Abschnitte vor, welches die Einordnung des Drogenmaterials als Wurzel- oder Rhizomdroge erschwert (BRENDLER et al. 2008) (siehe Abbildung 1).

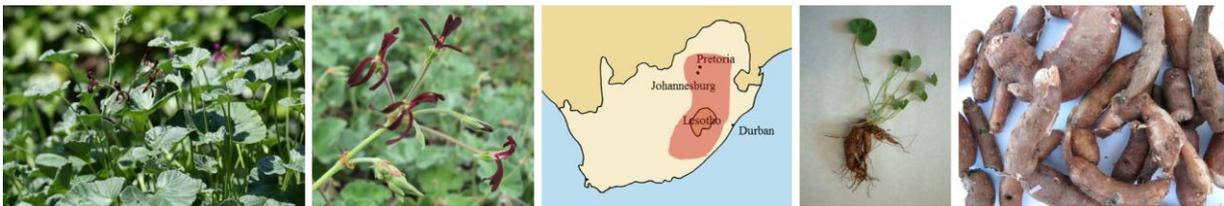


Abbildung 1: Habitus von *Pelargonium sidoides* DC sowie Verbreitungsgebiet (rot)

Die als Droge genutzte getrocknete Wurzel (bzw. das Rhizom) ist intensiv dunkelbraun gefärbt und weist einen leicht bitteren adstringierenden Geschmack auf. Das Europäische Arzneibuch (7.2), das seit 2005 eine Monographie über die *Pelargonium*-Wurzel enthält, lässt aufgrund von morphologischen Ähnlichkeiten nicht nur die zerkleinerten und getrockneten unterirdischen Organe von *Pelargonium sidoides* DC, sondern auch die von *Pelargonium reniforme* Curt zu. Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeiten kam es immer wieder zu Schwierigkeiten bei der taxonomischen Einordnung der Pflanzen, welche durch das Auftreten verschiedener Varietäten bzw. Übergangsformen aufgrund verschiedener Laubblattformen und Blütenfarben (*P. reniforme*: nierenförmige Blätter und magentarote Blüten mit schwarzem Farbmal auf den Petalen und weißlich-grünen Pollen, *P. sidoides*: herzförmige Blätter und dunkelrot bis schwarze Blüten) hervorgerufen wurden. Nach diversen systematischen Um- und Neugruppierungen sowie Namensänderungen, die z.B. dazu führten, dass *P. sidoides* zwischenzeitlich als Varietät von *P. reniforme* galt (= *Pelargonium reniforme* Curtis var. *sidaefolium* (Thunb.) Harv.) (HARVEY et al. 1859, KNUTH 1912, WETTSTEIN 1935, MILLER 2002, KOLODZIEJ 2008), wird *P. sidoides* heute als eigenständige Art angesehen. Um Ausrottungen der Pflanze durch Wildsammlungen vorzubeugen, stammt das heutige Drogenmaterial teilweise aus dem Kulturanbau von mindestens drei Jahre alten Pflanzen (BLASCHEK et al. 2009).

1.3 Anwendung

Traditionell wurden Aufgüsse und Abkochungen des Pflanzenmaterials und speziell der Wurzel bei Erkältungskrankheiten und Husten eingesetzt. Heute wird die Qualität der Droge durch die Arzneibuchmonographie garantiert (Phr. Eur. 7.2). Ein eingestellter wässrig-ethanolischer Extrakt der Wurzel ist bei akuter Bronchitis zugelassen. Außerdem findet er Anwendung bei akuten und

chronischen Infekten (bakterielle und virale Infektionen) der Atemwege und des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs wie Bronchitis, Sinusitis, Angina tonsillaris und Rhinopharyngitis. Neben der Verkürzung der Dauer und Schwere einer akuten Bronchitis und Tonsillopharyngitis, besonders bei Kindern, ist der Extrakt nicht nur aufgrund seiner Linderung von Krankheitssymptomen eine mögliche Alternative gegenüber Antibiotika für Erwachsene und Kinder (BRENDLER et al. 2008). Des Weiteren wird der Extrakt aufgrund seiner immunmodulierenden Eigenschaften auch zu Steigerung der allgemeinen Immunabwehr angewendet. Bis 2011 untermauerten bis dato 20 durchgeführte randomisierte, doppelblinde, plazebo-kontrollierte klinische Studien (hauptsächlich bei akuter Bronchitis, einzelne bei Sinusitis und Erkältung) an mehr als 9.000 Patienten (Erwachsene und Kinder) die gute Wirksamkeit und Verträglichkeit des *Pelargonium*-Wurzelextraktes (KOŁODZIEJ 2011).

1.4 Inhaltsstoffe

Die beiden wichtigsten Inhaltsstoffgruppen in den Wurzeln von *P. sidoides* sind Cumarine und Gerbstoffe (siehe Abbildung 2). Der Gerbstoffgehalt von ca. 9% setzt sich hauptsächlich aus oligomeren Proanthocyanidinen und kondensierten Gerbstoffen mit überwiegend mehr als acht Monomeren der Flavan-3-ole wie (+)-Afzelechin, (+)-Catechin und (+)-Gallocatechin zusammen, die zum Teil als monosubstituierte Oligomere Sulfat- oder Aminogruppen tragen (SCHOETZ et al. 2007). Zusätzlich sind Gallussäure und Gallussäuremethylester zu finden. Die identifizierten Cumarine zeichnen sich durch strukturelle Besonderheiten wie Sulfatierungen, Glykosylierungen und hohe Oxygenierungsgrade aus. Diese di-, tri- und tetraoxygenierten Cumarine wie z.B. Scopoletin (6-Hydroxy-7-methoxycumarin), Umckalin (7-Hydroxy-5,6-dimethoxycumarin) und 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin scheinen charakteristisch für die Gattung *Pelargonium* zu sein, sodass Umckalin und dessen 7-O-Methylester (5,6,7-Trimethoxycumarin) als Leitstrukturen angesehen werden (BRENDLER et al. 2008). Ein weiteres außergewöhnliches Cumarin in der Wurzel ist das acetoxylierte 7-Acetoxy-5,6-dimethoxycumarin. Daneben wurden geringe Mengen an Flavonoiden wie das Quercetin sowie das Phytosterol Sitosterol-3-O- β -D-glucosid gefunden.

Die oberirdischen Bestandteile von *P. sidoides* weisen ähnliche Inhaltsstoffe auf. Neben den Procyanidinen sind auch hydrolysierbare Gerbstoffe wie das Corilagin zu finden (KOŁODZIEJ 2007). Im Gegensatz zu den Wurzeln ist der Gehalt an Cumarinen in den oberirdischen Pflanzenteilen gering, wobei aber mit 6,7-Dihydroxycumarin-8-sulfat eines der sulfatierten Cumarine aus der Wurzel auch im oberirdischen Pflanzenmaterial identifiziert werden konnte (GÖDECKE et al. 2005, GÖDECKE 2005). Zusätzlich wurden größere Mengen an Flavonoiden des C-Glykosyl-Flavon-Typs mit typischen 2'-O-galloyl-Strukturen isoliert und identifiziert. 1998 konnten KAYSER et al. 0,52% ätherisches Öl (bezogen auf die Trockenmasse) per Wasserdampfdestillation aus den Blättern isolieren, welches aus ca. 100 verschiedenen Komponenten besteht, von denen ungefähr 60% Sesquiterpene sind. SCHOETZ et al. veröffentlichten 2008 eine detaillierte Zusammenfassung der Inhaltsstoffe des

kommerziell erhältlichen wässrig-ethanolischen Extraktes, der 40% substituierte und unsubstituierte oligomere Prodelphinidine, 12% monomere und oligomere Kohlenhydrate, 12% Mineralien, 10% Peptide und Aminosäuren, 2% Purinderivate und 2% stark substituierte Benzopyranone bzw. Cumarine (bezogen auf den Trockenextrakt) enthält. Diese Verbindungen machen damit 70-80% des Inhaltsstoffspektrums aus.

Eine vergleichende Auflistung der Inhaltstoffe des ober- und unterirdischen Pflanzenmaterials sowie der identifizierten Inhaltstoffe in dem kommerziell erhältlichen wässrig-ethanolischen Extrakt ist in KOLODZIEJ (2007) dargestellt.

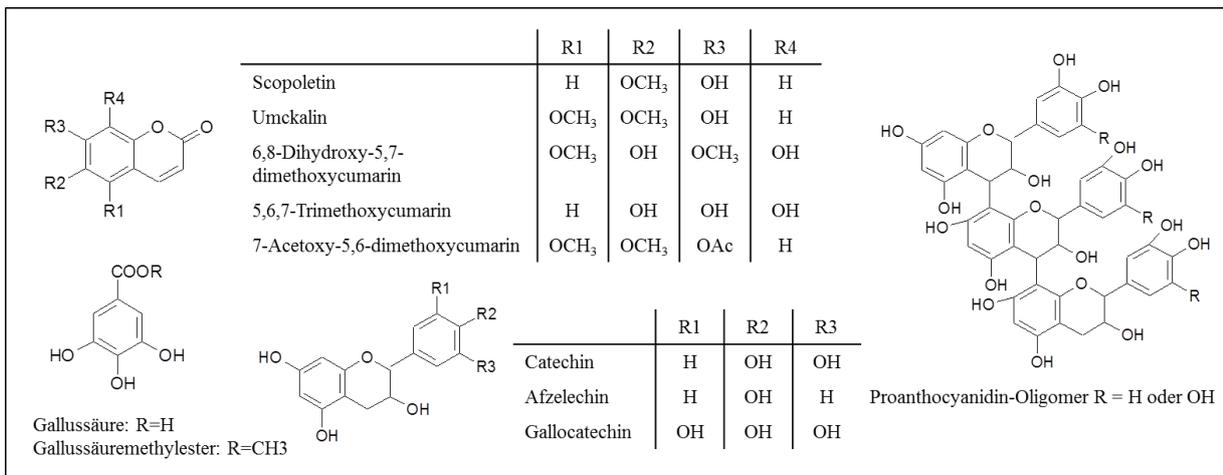


Abbildung 2: Strukturformeln ausgewählter Inhaltstoffe aus *Pelargonium sidoides* DC

1.5 Pharmakologische Wirkungen

Diverse antibakterielle und antivirale Effekte des *Pelargonium*-Wurzelextraktes wurden bereits postuliert und unter anderem den Gallussäuren und phenolischen Verbindungen zugeschrieben. Die detektierten immunmodulierenden Eigenschaften werden vermutlich durch eine Kombination der phenolischen Verbindungen mit den Cumarinen bedingt (BRENDLER et al. 2008). Eine detailliertere Darstellung der pharmakologischen Eigenschaften ist im Folgenden ausgeführt.

1.5.1 Antibakterielle Wirkungen

Umfangreiche Untersuchungen des *Pelargonium*-Wurzelextraktes sowie diverser isolierter Einzelkomponenten auf antibakterielle Aktivität wurden 1997 von KAYSER et al. vorgenommen. Neben den drei grampositiven Stämmen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus* 1451 wurden mit *Eschericia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Haemophilus influenza* auch 5 gramnegative Bakterien getestet. Die hergestellten Extrakte und isolierten Einzelsubstanzen zeigten bereits bei geringen Konzentrationen

moderate antibakterielle Effekte, die je nach Art des Extraktes und Bakteriums minimale Hemmkonzentrationen (MICs) von 200 bis 1000 µg/ml aufwiesen. Umckalin und 6,8-Dihydroxy-5,7-dimethoxycumarin waren dabei die potentesten Hemmstoffe unter den Cumarinen, wobei die Gallussäuremethylester unter den Gerbstoffen die stärksten antibakteriellen Effekte zeigten. 2003 bestätigten KOŁODZIEJ et al. diese Ergebnisse: Sie legten neben einigen bereits untersuchten Bakterienstämmen diesmal besonderes Augenmerk auf diverse multiresistente Stämme von *Staphylococcus aureus*. Des Weiteren zeigten sie, dass die Effekte des Extraktes stärker waren, als die der isolierten Einzelverbindungen. Eine indirekte antibakterielle Wirkung durch Inhibition der Adhäsion von Streptokokken der Gruppe A auf humane Epithelzellen durch den kommerziell erhältlichen Wurzelextrakt konnte ebenfalls gezeigt werden (DASCHNER et al. 2004, DORFMÜLLER et al. 2005), die 2011 von JANECKI et al. genauer spezifiziert wurden: Die Inhibition des Andockprozesses der Streptokokken der Gruppe A wird speziell durch die Proanthocyanidine vom Epigallocatechin- und Galocatechin-Typ hervorgerufen. Weitere Untersuchungen des ethanolischen Extraktes auf die Adhäsionsfähigkeit von Bakterien wurden von WITTSCHIER et al. (2007) und BEIL et al. (2007) durchgeführt. Neben einem dosisabhängigen antiadhäsiven Effekt des Extraktes auf die Anheftung von *Helicobacter pylori* an humanem Magengewebe und an Magenepithelzellen konnte eine Wachstumsinhibition des Bakteriums beobachtet werden, ohne dass es zu einer direkten Zytotoxizität kam. Im Gegensatz dazu veröffentlichte LOPES DE MORAIS CARRAPATOSO (2005) die erhöhte Adhäsion von Streptokokken der Gruppe A (*Streptococcus pyogenes*) auf menschliche bukkale Epithelzellen durch den Wurzelextrakt. Diese gewebeabhängigen Ergebnisse der untersuchten Wirts-Bakterien-Interaktionen konnten durch CONRAD et al. (2007 und 2008) bestätigt werden. KOŁODZIEJ postulierte (2011), dass der Einfluss des ethanolischen Extraktes von *P. sidoides* auf die Adhäsion von Bakterien eher von der äußeren Membranoberfläche der Bakterienart abzuhängen scheint, als vom Zielgewebe.

1.5.2 Wirkungen gegenüber Mykobakterien

In einem radiorespirometrischen Bioassay testeten KOŁODZIEJ et al. (2003) die antimykobakterielle Aktivität eines wässrig-acetonhaltigen *Pelargonium*-Wurzelextrakts, der eine Wachstumshemmung von 96% auf das *Mycobacterium tuberculosis* zeigte, wobei aber keine der isolierten phenolischen Einzelkomponenten wie die Cumarine eine antimykobakterielle Aktivität aufwiesen. TAYLOR und SEIDEL et al. testeten (2004) die antimykobakterielle Aktivität von Hexan-Wurzelextrakten gegen fünf verschiedene Mykobakterienstämme. Der mit ungesättigten und gesättigten Fettsäuren wie Öl- und Linolsäure als aktive Komponenten angereicherte Hexan-Extrakt wies je nach Kettenlänge der Fettsäuren, der Anzahl der Doppelbindungen und dem Mycobakterienstamm antimykobakterielle Aktivitäten auf, wobei Linolsäure mit einer minimalen Hemmkonzentration von ungefähr 2 mg/l am potentesten war. Dies konnte allerdings in einer Testung von *Pelargonium*-Extrakten und Fraktionen

an zwei Mykobakterienstämmen (*M. smegmatis*, *M. aurum*) durch GÖDECKE (2005) nicht bestätigt werden. Es konnten keine signifikanten Effekte auf das Bakterienwachstum ermittelt werden, sodass vermutet wurde, dass die antimykobakteriellen Effekte auf einer Aktivierung des Immunsystems beruhen. Unterstützt wurde diese Vermutung durch MATIVANDLELA et al. (2006 und 2007), die diverse Wurzelextrakte (Ethanol und Aceton) und isolierte Inhaltsstoffe (vier Cumarine und zwei Flavonoide) von *P. sidoides* auf ihre Aktivität gegenüber *Moraxella catarrhalis*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum*, *Haemophilus influenza*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium smegmatis* untersuchten. Signifikante Effekte des ethanolschen Extraktes konnten gegenüber *Aspergillus niger* und *Fusarium oxysporum* ermittelt werden, wohingegen nur geringe Effekte gegen *Rhizopus stolonifer* und *Mycobacterium tuberculosis* erfasst wurden. Keiner der isolierten Einzelverbindungen zeigte eine Aktivität gegen *Mycobacterium tuberculosis*.

Alles in allem scheint die eher moderate antimykobakterielle Aktivität der *Pelargonium*-Wurzel von der Art des Extraktes mit den entsprechenden Komponenten und den Mykobakterien-Stämmen abzuhängen (KOLODZIEJ 2011). Die antimykobakteriellen Effekte des traditionell genutzten wässrigen Drogenextraktes beruhen wohl eher auf der Stimulation des unspezifischen Immunsystems als auf einer direkten Wirkung gegen Mykobakterien.

1.5.3 Immunmodulierende Eigenschaften und antivirale Aktivitäten

Mit Hilfe funktioneller Bioassays und Genexpressionsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass Extrakte der *Pelargonium*-Wurzel sowie isolierte Einzelverbindungen das unspezifische Immunsystem stimulieren, indem sie unter anderem die Produktion und Ausschüttung von NO, TNF, Interferonen und Interleukinen induzieren (KOLODZIEJ et al. 2007, KOLODZIEJ 2011).

Unter anderem zeigte KOLODZIEJ 2003, dass der kommerziell erhältliche *Pelargonium*-Extrakt die Ausschüttung von Typ-I-Interferonen wie IFN- α und IFN- β als entscheidende Akteure der antiviralen Immunabwehr bei virusinfizierten Maus-Fibroblasten induziert und somit zu einer Zytoprotektion beiträgt. Weiterhin wurde an einem Leishmanien-Infektionsmodell an der Maus gezeigt, dass der Extrakt die Makrophagenfunktion stimuliert, welches sich durch eine erhöhte Produktion des Zytokins TNF- α und eine vermehrte Bildung des Moleküls Stickstoffmonoxid (NO) zeigte (KAYSER et al. 2001, KOLODZIEJ et al. 2005, THÄLE et al. 2011). Eine weitere wichtige Rolle im Immunsystem spielen die Phagozyten, deren Aufgabe die Phagozytose von Krankheitserregern ist. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (oxidative burst) steigert die Aktivität der Phagozyten, die mit dem „intrazellulären Killing“ als Maß für die Fähigkeit, die phagozytierten Erreger vollständig zu eliminieren, quantifiziert wird. In einem durchflusszytometrischen Vollblut-Assay wurde gezeigt, dass der *Pelargonium*-Wurzelextrakt einen stimulierenden Effekt auf humane Phagozyten hat (CONRAD et al. 2007), was bereits 2005 von HANSMANN veröffentlicht wurde. Sie konnte zeigen, dass die humane Phagozytoseaktivität und die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies gesteigert wurden. 2011

zeigten LUNA et al. in einer Studie mit Marathonläufern den modulierenden Effekt des Extraktes: nach der Gabe stieg die IgA-Konzentration im Speichel im Vergleich zu Placebo an. Des Weiteren stimulierte der Extrakt konzentrationsabhängig die Abwehr von Wirtszellen über eine Ausschüttung von antimikrobiellen, chemotaktischen sowie immunmodulierenden Peptiden und Proteinen (wie das Bactericidal Permeability Increasing Protein und die Defensine) aus neutrophilen Granulozyten (KOCH et al. 2007).

Die ersten direkten antiviralen Aktivitäten wurden von SCHNITZLER et al. (2008) veröffentlicht. *In vitro* Untersuchungen an mit Herpes Simplex Virus Typ 1 und 2 infizierten Affenierenzellen (RC-37 Zellen) zeigten, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit einem wässrigen Wurzelextrakt sowie die Zugabe des Extraktes noch während der Adsorptionsphase die Ausbreitung des Virus konzentrationsabhängig inhibieren. Somit scheint der *Pelargonium*-Extrakt mit den antiviralen Eigenschaften seiner Inhaltsstoffe, besonders den Polyphenolen, vor der Penetration des Virus in die Wirtszellen zu wirken. MICHAELIS et al. (2011) untersuchten den Einfluss des kommerziell erhältlichen Wurzelextrakts auf eine Auswahl von Viren, die für Atemwegserkrankungen typisch sind. Dabei wurde festgestellt, dass der Extrakt in die Replikation der saisonalen Influenza-Virusstämme H1N1 und H3N2, des Respiratorischen Synzytial-Virus, des humanen Coronavirus, des Parainfluenza-Virus und des Cocksackie-Virus eingriff. Keinen Einfluss auf die Replikation zeigte der Extrakt beim hochpathogenen Influenza-A-Virus H5N1, der die Vogelgrippe auslöst, sowie bei Adeno- und Rhinoviren. Eine Schlüsselrolle bei der Infektion mit Influenza-Viren spielt das Enzym Neuraminidase, welches für die Ausschüttung von Virionen aus infizierten Wirtszellen sowie deren Fortbewegung in den oberen Atemwegen verantwortlich ist. JANECKI et al. (2009) zeigten, dass der *Pelargonium*-Wurzelextrakt, besonders seine Polyphenole wie die Prodelphinidine (Gruppe der Proanthocyanidine), die Aktivität einer bakteriellen Neuraminidase aus *Vibrio cholera* inhibiert. Diesen Einfluss auf die Aktivität der Neuraminidase bestätigten THEISEN et al. (2012) und erweiterten ihn um den Einfluss auf das Hämagglutinin, was darauf hinweist, dass der *Pelargonium*-Wurzelextrakt einen frühen Schritt der Infektion mit Influenza-Viren inhibiert. Außerdem zeigte der Extrakt eine dosisabhängige Aktivität gegenüber pandemischer und Oseltamivir-sensitiver und resistenter saisonaler H1N1, saisonaler H3N2 und einem besonderen H1N1 Laborstamm, welcher auf die Prodelphinidine zurückgeführt wurde. Dabei waren die Oligomere und Polymere mit zwei Ausnahmen (Galocatechin und Epigallocatechin) effektiver als die Monomere und Dimere.

1.5.4 Einfluss auf das mukoziliäre System

In Zellkulturen aus humanem nasalem Flimmerepithel konnte ein positiver konzentrationsabhängiger Einfluss des *Pelargonium*-Extraktes auf die Schlagfrequenz der Zilien beobachtet werden (NEUGEBAUER et al. 2005).

1.5.5 Diskussion der Lebertoxizität

1997 und 2002 postulierten KAYSER und KOLODZIEJ, dass die Zytotoxizität der im *Pelargonium*-Extrakt enthaltenen Cumarine vernachlässigbar sei. Dies wurde untermauert durch Wirksamkeits- und Sicherheitsstudien (CONRAD et al. 2007, SCHULZ 2008), sodass bis dato keine Kontraindikationen und Interaktionen mit anderen Arzneimitteln bekannt waren. Auch LOEW et al. bestätigten 2008, dass keine antikoagulatorische und hepatotoxischen Effekte durch die in der *Pelargonium*-Wurzel vorkommenden 7-Hydroxycumarine-Derivate beobachtet werden konnten. Schon 2007 untersuchten KOCH et al. den Einfluss des kommerziellen Extraktes auf Koagulations-Parameter und die Interaktionen mit dem Antikoagulans Warfarin vom Cumarin-Typ, wobei nach zwei Wochen keine Veränderung der Koagulations-Parameter an Ratten bei Einzel- und/oder Kombinationsgaben beobachtet werden konnte. Die Pharmakokinetik des Warfarins wurde ebenfalls nicht beeinflusst.

Nach 20 Verdachtsmeldungen zu lebertoxischen Eigenschaften des Arzneimittels eröffnete das BfArM im Oktober 2011 ein Stufenplanverfahren der Stufe I mit dem Ziel des Informationsaustausches. Nach der Auswertung von 30 Verdachtsfällen aus den Jahren 2004 bis 2012 durch das BfArM (Stand Januar 2012) hielt die Behörde den Kausalzusammenhang in 6 Fällen für möglich oder wahrscheinlich (DAZ Nr. 14 2012). Im Gegensatz dazu veröffentlichten TESCHKE et al. im Februar und im Juli 2012 ihre Analyse von 15 bzw. 13 Verdachtsmeldungen, wobei sie keine eindeutigen Beweise für eine Lebertoxizität durch den *Pelargonium*-Wurzelextrakt finden konnten. Die unterschiedliche Beurteilung der Verdachtsfälle beruht auf der Anwendung zweier verschiedener Skalen zur Einstufung und Bewertung der einzelnen Fälle. Während das BfArM mit Hilfe der leberunspezifischen, nicht für die Beurteilung von Lebertoxizitäten validierten WHO-Skala bewertete, richtete sich der Expertenkreis um den Gastroenterologen Prof. Dr. Teschke nach den international anerkannten leberspezifischen Bewertungs-Algorithmen - der CIOMS-Skala. Die CIOMS-Skala ist eine auch von der EMA anerkannte leberspezifische, für Hepatotoxizität validierte, strukturierte und quantitative Kausalitätsmethode, die besonders Latenzzeiten, Abklingphasen, Risikofaktoren, Reexpositionstests und alternative Diagnosen berücksichtigt (DAZ Nr. 14 2012). Beide Bewertungsteams bestehen auf der Richtigkeit der von ihnen verwendeten Skalen zur Beurteilung, wobei beide aber fehlende Details bei jeder Verdachtsmeldung bemängeln und das BfArM deshalb auch die WHO-Skala als geeigneter betrachtet. Aufgrund des möglichen Kausalzusammenhangs zwischen der Einnahme von *Pelargonium*-wurzelhaltigen Arzneimitteln und Leberschäden hat das BfArM eine schriftliche Anhörung der Stufe II nach Stufenplan-Verfahren eingeleitet (BfArM-Mitteilung Juni 2012/ DAZ Nr. 27 2012) und die Durchführung einer Fall-Kontrollstudie (Post-authorisation-safety-Studie) angeordnet.

1.6 Aspekte des Artenschutzes

Pelargonium sidoides ist eine von 38 Arten der traditionellen afrikanischen Medizin (umfasst ca. 3.000 Arten), die momentan in größerem Ausmaß kommerziell genutzt werden (BIERMANN 2010) und

damit das Potential für die Pharmaforschung im Land widerspiegeln. Aus diesem Grund ist der Erhalt der Artenvielfalt nicht nur aus Sicht des Umweltschutzes wichtig, sondern auch wirtschaftliche Interessen und der medizinische Eigenbedarf spielen eine Rolle. Das Sammeln von Heilpflanzen ist eine Einnahmequelle für viele und oft die einzige Möglichkeit die Familien zu ernähren. Wird unkontrolliert von ungeschulten Personen gesammelt, gefährdet das nicht nur die Bestände, sondern erhöht auch die Gefahr von Verwechslungen, was wiederum zu Schwankungen in der Qualität des Drogenmaterials führt. Die Grundlage für ein nachhaltiges Sammeln sind die gemeinsamen Richtlinien vom WWF, der Artenschutzorganisation Traffic, dem Bundesamt für Naturschutz und der Weltnaturschutzorganisation - dem International Standard for Sustainable Wild Collection of Medicinal and Aromatic Plants (ISSC-MAP), die 2007 erarbeitet wurden. Eine nachhaltige Wildsammlung und ein kontrollierter Anbau sind Maßnahmen zum Erhalt der Artenvielfalt. Weltweit werden ca. 50.000 Pflanzen für Heilzwecke genutzt, von denen etwa 4.000 in ihrem natürlichen Bestand gefährdet sind (GENSTHALER 2009). Laut WWF werden ca. 80% der Pflanzen wild in der Natur gesammelt, sodass eine Kontrolle durch Vergabe von Sammellizenzen, die Sammelmengen und -zeiten festlegen und somit das Ausplündern von Beständen eingrenzen, notwendig ist. Diese bereits in Südafrika durchgeführte Praxis sichert den Pflanzen Zeiten zur Regeneration, welche bei *P. sidoides* zwischen 3 und 7 Jahren liegen, und schützt ihren natürlichen Bestand. LEWU et al. zeigten 2007, dass eine zweijährige Regenerationszeit nicht ausreichend ist und zu nicht einmal mehr 50% der ursprünglichen Biomasse führte. Unterstützt wird der Erhalt der Bestände durch den Anbau der Kapland-Pelargonie in großen Kulturen seit 2000 (BIERMANN 2010). Durch all diese Bemühungen ist es bis jetzt gelungen, dass *Pelargonium sidoides* nicht auf der roten Liste der gefährdeten Arten sowie in den Anhängen des Washingtoners Artenschutzabkommen (CITES) gelistet ist. Trotzdem erfolgte 2007/2008 eine gemeinsame von Traffic, der WWF und den Universitäten des Landes durchgeführte Untersuchung der Bestände von *P. sidoides* in Lesotho, um die Gefahr für die Population von *P. sidoides* in der Wildnis zu beurteilen (Non-Detriment Finding Case Study). Die Ergebnisse dieser Zusammenarbeit wurden auf der „Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora“ 2008 in Cancun (Mexiko) vorgestellt und sind ein wichtiger Schritt für die Einordnung und Anwendung von CITES bei *Pelargonium sidoides*. Dabei wurde die Population der Kapland-Pelargonie auf ungefähr 5 Mio. Pflanzen in Lesotho geschätzt, von denen ca. 2,5 Mio. Pflanzen in den letzten 7 Jahren geerntet wurden (NEWTON 2008). Aufgrund dieses großen Erntedruckes ist es wichtig, die Pflanze in Kultur zu nehmen. Seit ca. 10 Jahren gibt es Projekte zum Anbau von *P. sidoides* in Südafrika, die bisher nicht erfolgreich genug sind, um Wildsammlungen völlig überflüssig zu machen, sodass die Rote Liste südafrikanischer Pflanzen 2009 die Kapland-Pelargonie als Pflanze mit einem abnehmenden Bestand charakterisierte (MOYO et al. 2012).

2. Arabinogalaktan-Proteine

2.1 Allgemeines

Die in Pflanzen vorkommenden Arabinogalaktan-Proteine (AGPs) sind eine sehr komplexe Gruppe von Makromolekülen, die zu der großen Familie der Prolin/Hydroxyprolin-reichen Zellwand-Glykoproteine bzw. Proteoglykane (HRGPs) gehören. Neben den AGPs sind die nicht bzw. wenig glykosylierten Prolin-reichen Proteine (PRPs), sowie die moderat glykosylierten Extensine (NOTHNAGEL 1997, SEIFERT et al. 2007) Teil dieser Familie. AGPs stellen die Gruppe der am stärksten glykosylierten Makromoleküle unter den HRGPs dar, die sich in ihrer Heterogenität der Kohlenhydratketten, der Komplexität des Protein-Rückgrates sowie den verschiedenen Möglichkeiten der Verknüpfung miteinander hervorheben.

2.2 Verbreitung

Die im Pflanzenreich weit verbreiteten AGPs findet man nicht nur in zahlreichen Familien der Angiospermen und Gymnospermen, sondern auch bei niederen Pflanzen wie den Moosen und Algen. Unter anderem konnten aus dem Moos *Physcomitrella patens* (LEE et al. 2005), aus den Grünalgen der Familie der Chlorophyceae (DOMOZYCH et al. 2012) und in *Codium fragile* aus der Familie der Codiaceae (ESTEVEZ et al. 2008) AGPs isoliert bzw. in ihnen detektiert werden. Interessanterweise findet man in der Klasse der Nacktsamer nicht nur AGPs sondern auch AGs ohne Proteinanteil wie z.B. das Lärchen-AG aus *Larix laricina* aus der Familie der Pinaceae (GOELLNER et al. 2011). In den letzten Jahren wurden bei diversen angiospermen Pflanzen aus den verschiedensten Familien AGPs gefunden und näher charakterisiert. Exemplarisch können hier Weizen und Hafer aus der Familie der Poaceae (GOELLNER et al. 2010 und 2011), *Echinacea purpurea* aus der Familie der Asteraceae (BOSSY et al. 2009), *Viscum album* aus der Familie der Viscaceae (HERBST et al. 2007), *Baptisia tinctoria* aus der Familie der Fabaceae (WACK et al. 2005), *Daucus carota* aus der Familie der Apiaceae (IMMERZEEL et al. 2004), *Rosa sp.* von den Rosaceae (SERPE et al. 1995) und *Nicotiana tabacum* aus der Familie der Solanaceae (AKIYAMA et al. 1981) aufgeführt werden, wobei die einzelnen untersuchten AGPs nicht nur aus dem Pflanzenmaterial sondern teilweise auch aus entsprechenden Zellkulturen stammten.

Innerhalb der Pflanzen konnten AGPs bereits in Blättern, Stängeln, Wurzeln, Blütenbestandteilen und Samen (NOTHNAGEL 1997) mit Hilfe diverser Antikörper detektiert werden. Innerhalb der Organe scheinen sie häufig im Xylem vorzukommen (MOTOSE et al. 2001 und 2004, GOELLNER et al. 2012 submitted). Sie finden sich auch in Wund- und Narbensekreten wie Gummi arabicum (WHISTLER 1993) und werden außerdem von Zellkulturen in das Kulturmedium sezerniert (NOTHNAGEL 1997). Entsprechend ihrer Organ- bzw. Gewebeverteilung sowie ihrer Expression während der Entwicklung

der Pflanze bzw. des Gewebes können die einzelnen AGPs bedingt durch ihr Core-Protein örtlich und zeitlich sehr individuell auftreten (LI et al. 1996, SHOWALTER 2001).

Mit Hilfe der Immunlokalisierung und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten die AGPs auch direkt in der Zelle lokalisiert werden. Neben der Plasmamembran, der Zellwand und interzellulären Räumen wurden AGPs auch in intrazellulären Golgi-Vesikeln gefunden (SHOWALTER 2001).

2.3 Biosynthese der AGPs

Die Synthese von AGPs in der Pflanze ist bis heute nicht vollständig geklärt. Man nimmt an, dass der an der zytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gebildete GPI-Anker sich mit der am rauhen ER synthetisierten Proteinkette verbindet. Danach werden einige Prolinreste der Proteinkette mittels Prolin-4-Hydroxylasen hydroxyliert und die AG-Ketten angeknüpft. Die Anheftung des ersten Zuckers erfolgt mittels *O*-Galaktosyl- bzw. Arabinosyltransferasen. Alle weiteren Zuckerbausteine werden mit Hilfe von Glykosyltransferasen, die teilweise im ER und im Golgi-Apparat lokalisiert sind, angeknüpft (SCHULTZ et al. 1998, OKA et al. 2010). Bis heute ist allerdings nicht geklärt, ob die Anknüpfung der Zucker einzeln oder blockweise erfolgt. Neueste Ergebnisse von OKA et al. 2010 sprechen für die Anknüpfung der einzelnen Galaktosen und anderen Monosacchariden nacheinander. Mit Hilfe von Golgi-Vesikeln werden die AGPs dann zur Plasmamembran transportiert und dort über den GPI-Teil verankert. Später können sie durch Phospholipasen eventuell in die Zellwand freigesetzt werden.

2.4 Aufbau eines AGPs

Entsprechend ihres Namens bestehen diese Makromoleküle aus einem Kohlenhydrat- und einem Proteinanteil. Ersterer macht ca. 90-98% (m/m) des Moleküls mit Arabinose und Galaktose als dominierende Monosaccharide aus. Letzterer bildet mit unter 10 % den kleineren Anteil und bildet als lineare Proteinkette mit den wesentlichen Aminosäuren Hydroxyprolin (Hyp), Prolin (Pro), Alanin (Ala), Serin (Ser), und Threonin (Thr) das Rückgrat des Moleküls (siehe Abbildung 3). Hydroxyprolin wird als die, für die Bindung zwischen Zucker- und Proteinteil, verantwortliche Aminosäure über eine *O*-glykosidische Bindung angesehen. Ein weiteres Merkmal fast aller AGPs ist ein Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) am hydrophoben Ende der Proteinkette (ELLIS et al. 2010) sowie die Bindefähigkeit an den chemischen Farbstoff Yariv-Reagenz, genauer gesagt an das β -Glc-Yariv-Reagenz. Diese für die meisten AGP typische Bindung mit dem Yariv-Reagenz, die bis heute in ihrem Mechanismus nicht aufgeklärt ist, wird für die Detektion, die Quantifizierung und Aufreinigung von AGPs genutzt.

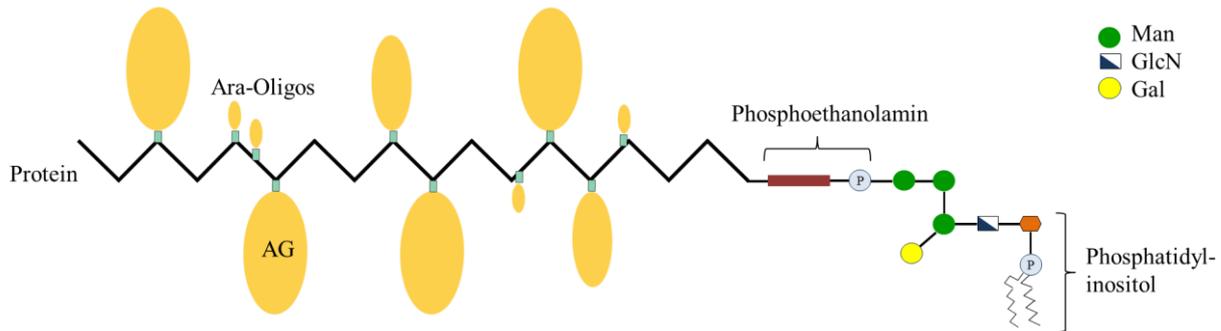


Abbildung 3: Darstellung eines AGPs im „wattle blossom“ Modell mit einem GPI-Anker

2.4.1 Kohlenhydratgerüst

Der ca. 90% des AGPs ausmachende Kohlenhydratanteil setzt sich aus Arabinogalaktan-Untereinheiten (AGs) einer Größe von ca. 5-25 kDa zusammen, neben denen kleine Arabinose-Seitenketten aus 4 bis 6 Monomeren (siehe Abbildung 3) existieren können (KIELISZEWSKI et al. 2001, ELLIS et al. 2010). 1,3 verknüpfte Galaktose bildet das Rückgrat der AGs mit über Position 6 verknüpften 1,6-Galaktoseketten. In der Literatur wird berichtet, dass die 1,3-Gal-Kette zusätzlich in regelmäßigen Intervallen durch sogenannte „kinks“, periodat-sensitive Reste wie 1,6-Galp und/oder 1,5-Araf, unterbrochen sein kann (TAN et al. 2004 und 2012). Dieses für Typ-II-AGs typische Grundgerüst wird durch terminale Arabinosen, Galaktosen, Rhamnosin und/oder Glukuronsäuren ergänzt und resultiert in einem neutralen oder negativ geladenem AGP (ELLIS et al. 2010). Zum Teil können die 1,6 Galaktoseseitenketten auch durch weitere Zucker wie Mannose, Glukose, Fucose, Xylose, Glukosamin und Galakturonsäure modifiziert sein (SHOWALTER 2001).

Der Kohlenhydratanteil ist typischerweise über Hydroxyprolin *O*-glykosidisch mit dem Protein verknüpft. Weitere *O*-glykosidische Verbindungen sind über Ser und Thr möglich (NOTHNAGEL 1997). LEROUNGE et al. postulierten bereits 1998, dass eine *N*-glykosidische Bindung nur bei Proteinen mit Asn-X-Ser/Thr - Sequenzen möglich sei, wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann. Für klassische AGPs sind diese Sequenzen nicht beschrieben, wohl aber für chimerische und Fasciclin-like AGPs (ELLIS et al. 2010). Für die Verteilung der AG-Untereinheiten am Proteinrückgrat wird die Hyp-Kontiguitäts-Hypothese postuliert (KIELISZEWSKI et al. 1994). Je nach Anordnung des Hyp in der Proteinkette verteilen sich die Polysaccharid- und Oligosaccharideinheiten, wobei Hyp-Blöcke Arabinose-Oligosaccharide und nicht zusammenhängendes Hyp wie Ala-Hyp oder Ser-Hyp die größeren AG-Polysaccharideinheiten tragen sollen.

2.4.2 Proteinanteil

Mit Hilfe des Klonens von Genen, die den Proteinteil der AGPs kodieren und deren Analyse konnten neue Erkenntnisse über den Aufbau der AGPs erhalten werden. Mit der Sequenzierung ganzer Genome wurde die große Diversität der AGP-Proteinrückgrate sichtbar. Allein in *Arabidopsis thaliana* wurden mehr als 100 Gene gefunden, die möglicherweise den Proteinteil von AGPs kodieren (ELLIS et al. 2010).

Im Falle der sogenannten „klassischen“ AGPs bilden ca. 100 Aminosäuren das Protein-Backbone (ELLIS et al. 2010), wobei Hyp, Pro, Ala, Ser, Thr und Gly die dominierenden Aminosäuren sind. Des Weiteren findet sich bei klassischen AGPs ein hydrophobes C terminales Ende, welches für die Bindung an den GPI-Anker verantwortlich ist. Nicht-klassische AGPs zeichnen sich durch sehr unterschiedliche Proteinrückgrate aus. Sie können u.a. Hyp-arm, Cys- und Asn-reich sein und haben aufgrund eines fehlenden hydrophoben C Terminus keinen GPI-Anker (SHOWALTER 2001). Entsprechend ihrer Unterschiede im Proteinrückgrat werden AGP in verschiedene Klassen eingeteilt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung der AGPs nach ihrem Proteinanteil (aus CLASSEN et al. 2005)

Klasse	Eigenschaften des Proteinteils
Klassische AGPs	Pro-Hyp reich; Ala-Pro, Ser-Pro, Thr-Pro Wiederholungen
Lysin-reich	zusätzlich Lysin-reiche Regionen
AGP-Peptides	kurze Polypeptid-Backbone mit 10-20 Aminosäuren
Nicht-klassische AGPs	sehr heterogen, Pro-Hyp-Regionen von anderen Regionen unterbrochen wie z.B. Asn oder Cys
Hybrid-AGPs	zeigen Charakteristika zweier verschiedener HGRPs -Mitglieder wie AGPs, Extensine und PRPs
Chimerische AGPs	AGP typische Bereiche wechseln sich mit nicht HRGP-Bereichen ab; z.B. FLAs (Fasciclin-like AGPs)

2.4.3 GPI-Anker

Der Aufbau des GPI-Ankers ist für alle Eukaryoten sehr ähnlich (OXLEY et al. 1999). An den hydrophoben C-Terminus der Proteinkette, der mit aliphatischen und hydrophoben Aminosäuren abschließt, binden über Ethanolamin und Phosphat 3 Mannosen (Man1-2Man1-6Man) an Glukosamin und Inositol, welches mit einem Phosphoceramid einen Lipid-Baustein trägt. Für Pflanzen ist eine zusätzliche 1,4 verknüpfte Galaktose an der dritten Mannose typisch.

2.5 Funktionen von AGPs

Auf Grund der Größe der AGP-Gen Familie sowie der Heterogenität der einzelnen AGPs ist es naheliegend, dass AGPs nicht nur eine einzige spezifische Funktion erfüllen. Sie sind an vielen Prozessen, die das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze betreffen, beteiligt: Neben einer Funktion bei der Entwicklung von Wurzeln (VAN HENGEL et al. 2003) spielen sie eine Rolle in der somatischen Embryogenese (VAN HENGEL et al. 2002), der Zellausdehnung (YANG et al. 2007), der Xylemdifferenzierung (MOTOSE et al. 2004, GOELLNER et al. 2012 submitted) der Resistenz gegenüber einer Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* (GASPAR et al. 2004), der Einleitung der Keimzellbildung (ACOSTA-GARCIA et al. 2004), der Förderung des Wachstums des Pollenschlauches und der Pollenentwicklung (LEE et al. 2008, COIMBRA et al. 2009), bei der Einleitung des programmierten Zelltodes (GAO et al. 1999, CHAVES et al. 2002) und als Stabilisator in der Zellwand während Zeiten des Zellstresses und der Zellausdehnung (LAMPORT et al. 2006). Dabei scheinen AGPs an molekularen Interaktionen, der Hormonsekretion und -antwort, sowie der zellulären Signalübertragung an der Zelloberfläche beteiligt zu sein (SCHULTZ et al. 1998, PARK et al. 2003, XU et al. 2008), die LAMPORT et al. (2006) genauer darstellten. Neben der Interaktion von GPI-verankerten AGPs mit Kinasezeptoren könnten lösliche AGPs nicht nur mit Kinasen sondern auch mit Rezeptoren der Nachbarzellen interagieren. Des Weiteren wird eine verknüpfende Interaktion von GPI-verankerten AGPs mit dem Zytoskelett diskutiert (SARDER et al. 2007, DRIOUICH et al. 2008). Schon 2006 berichteten SARDER et al., dass klassische AGPs die äußere Form der Zelle über ihre Verbindung mit dem Zytoskelett beeinflussen bzw. kontrollieren können. Dabei sind AGPs in die Ausrichtung der Mikrotubuli und die Polymerisation von Aktin involviert.

Eine Übersicht über die Vielzahl der durchgeführten Studien zur Funktion der AGPs ist in ELLIS et al. 2010 dargestellt.

Kommerziell betrachtet spielen AGPs vor allem in Form von Gummi arabicum und Lärchen-Arabinogalaktan eine Rolle (SHOWALTER 2001, FITZPATRICK et al. 2004). Aufgrund der emulgierenden, adhäsiven und wasserbindenden Eigenschaften werden diese in der Nahrungsmittel- und der Pharmaindustrie als Bindemittel, als Emulgator, als Stabilisator und als Überzug für Tabletten eingesetzt.

Außerdem gelten AGPs, insbesondere aus *Echinacea* und *Larix* (FITZPATRICK et al. 2004, CLASSEN et al. 2006) als Stimulatoren des Immunsystems.

3 Motivation und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Isolierung von potentiell immunstimulierenden Arabinogalaktan-Proteinen aus den Wurzeln und der Zellkultur der südafrikanischen Heilpflanze *Pelargonium sidoides*. Die mit Hilfe von Yariv-Reagenz aufgereinigten AGPs sollen im Hinblick auf ihren Polysaccharid- und Proteinanteil charakterisiert werden, wobei gezielte Degradationsreaktionen zur Aufklärung der Feinstruktur der AGPs beitragen sollen.

Weiterhin soll der Einfluss von AGPs auf das Wachstum von *Pelargonium*-Suspensionskulturen untersucht werden. Durch Zugabe von Yariv in das Kulturmedium können AGPs blockiert und damit Aussagen über ihre biologischen Funktionen getroffen werden.

Trotz des Kulturanbaus von *Pelargonium sidoides* gefährden auch heute noch unkontrollierte Wildsammlungen die Bestände. Neue Pflanzen werden in der Kultivierung durch das sehr aufwändige Verfahren der Stecklingsvermehrung gewonnen. Eine weitere in der Pflanzenzüchtung eingesetzte Methode ist die Erzeugung somatischer Embryonen, die nicht nur genetisch identisch sind, sondern auch in kürzerer Zeit eine Menge neuer Jungpflanzen produzieren. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Vermehrung von *Pelargonium sidoides* über die somatische Embryogenese etabliert und deren Beeinflussung durch AGPs, die eine entscheidende Rolle in der somatischen Embryogenese spielen können, untersucht werden.

IV Material und Methoden

1. Isolierung von AGPs aus *Pelargonium sidoides*

1.1 Verwendetes Drogenmaterial

Es wurde getrocknete und geschnittene Geranienwurzel (*Pelargonium sidoides* Rad. conc., Ch./Lot: 10377) von der Firma Alfred Galke (Gittelde), sowie frisches Wurzelmaterial aus den Gewächshäusern der pharmazeutischen Biologie der Universität Kiel verwendet, die von der Pflanze *Pelargonium sidoides* DC aus der Familie der Geraniaceae stammten.

1.2 Extrakterstellung

Als erstes wurden 1,3 kg trockene Wurzel in einer Schlagkreuzmühle (De Longhi 550 W Electronic) pulverisiert, mit demineralisiertem Wasser (13 l) im Verhältnis 1:10 versetzt und bei 4°C über 12 h bewegungsmazeriert. Der gewonnene Extrakt wurde mit Hilfe der Hafico-Hochdruck-Tinkturenpresse (Druck: 300 kg/cm³) vom festen Drogenrückstand getrennt. Zur Entfernung feiner Pulverreste schloss sich eine zehninütige Zentrifugation (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments) bei 5.000 U/min und RT an. Der Zentrifugationsüberstand wurde in Portionen zu je 200 ml aufgeteilt, zur Proteinfällung bei 95°C 10 min lang erhitzt, im Eisbad abgekühlt und über Nacht bei 4°C gelagert. Die Abtrennung der Proteine erfolgte am nächsten Tag bei 5.000 U/min (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments). Bei der im Anschluss folgenden Tangentialflussfiltration wurde der Extrakt in ein hochmolekulares Retentat und ein niedermolekulares Filtrat aufgeteilt.

Tangentialflussfiltration

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

Pumpe: Easy-load[®] Masterflex

Filter: Minitan[®] Filter Plates 4/PK 10.000 NMWL

Low Binding regenerated Cellulose

Cat. No: PLGCOMPO4; Lot No: H3BM98485

Millipore Corporation, Bedford, MA 01730

Die siebentägige Tangentialflussfiltration verlief bei 4°C, um die Keimbelastung möglichst gering zu halten. Die ca. 6 l hochmolekulare Fraktion (Retentat, > 10.000 Da) wurde bei 36 °C und 30 mbar auf ca. 1 l eingengt (Heidolph Laborota 4000 efficient, Vacubrand cvc 3000 Pumpe, Fa. Varia) und zur

Aufreinigung dialysiert. Das Filtrat (< 10.000 Da) wurde unter gleichen Bedingungen eingengen und anschließend gefriergetrocknet und aufbewahrt.

Dialyse

Um eventuell noch vorhandene niedermolekulare Stoffe abtrennen zu können, wurde das Retentat einer kontinuierlichen sechstägigen Dialyse bei 4°C (Schlauch: Spectra/Por[®] Membrane, 14,6 mm Por., MWCO 6.000-8.000 Da, Fa. Spectrum Laboratories Inc.) unterzogen. Danach wurde das Retentat eingefroren und gefriergetrocknet (BETA 1-8K, Fa. Christ; Freeze and Dry System Lymph-Lock 6, Fa. Labconco). Weiterhin wurden verschiedene Variationen der Extrakterstellung getestet (siehe IV 1.4).

1.3 Isolierung der AGPs aus dem Retentat

Die Arabinogalaktan-Proteine können spezifisch mit (β -D-Glc)₃-Yariv-Phenylglycosid gefällt werden. Dieses ist nicht kommerziell erhältlich und muss daher selbst synthetisiert werden.

1.3.1 Synthese des (β -D-Glc)₃-Yariv-Phenylglycosid

Die Synthese des β -Yariv-Reagenzes wurde in Anlehnung an YARIV et al. (1962) durchgeführt.

Im ersten Schritt der Synthese wurde der Ausgangsstoff *p*-Aminophenyl- β -D-Glucopyranosid (Formel 2 aus Abbildung 4) mittels Hydrierung mit elementarem Wasserstoff aus *p*-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid (Formel 1 aus Abbildung 4) erzeugt. Die dabei ablaufende Reduktion fand in Anwesenheit eines Palladium-Katalysators (Palladium/Aktivkohle, Pd 10%, Fa. Merck, Darmstadt) in einer Hydrierungsflasche statt. Das entstandene *p*-Aminophenyl- β -D-Glucopyranosid wurde anschließend in 0,5 M Salzsäure bei 0°C gelöst und mit Hilfe von Natriumnitrit in das entsprechende Diazoniumsalz (Formel 3 aus Abbildung 4) umgewandelt. Diese Reaktionslösung wurde tropfenweise zu einer eisgekühlten 0,02 M wässrigen Phloroglucinlösung (Formel 4 aus Abbildung 4) gegeben. Während der gesamten Reaktion und zwei Stunden danach wurde der pH-Wert mittels Autotitrator (719 S Titrino, Deutsche Metrohm GmbH & Co KG, Filderstadt) durch Zugabe von 0,5 M Natriumhydroxidlösung konstant bei 9 gehalten. Bei dauerhafter Kühlung entstand dabei durch Azokupplung das braunrote β -Glc-Yariv-Reagenz (Formel 5 aus Abbildung 4). Zur erzeugten wässrigen β -Glc-Yariv-Lösung wurde das gleiche Volumen an Methanol gegeben, um das β -Glc-Yariv-Reagenz über Nacht bei 4°C auszufällen. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert (5.000 U/min, 15 min, Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Hanau), in 40 ml Aqua dem. gelöst und nochmals mit dem gleichen Volumen Methanol gefällt. Nach zweistündiger Fällung bei 4°C wurde erneut zentrifugiert und das erhaltene aufgereinigte β -Glc-Yariv abschließend bei 50°C getrocknet.

Die Herstellung des α -Gal-Yariv-Reagenzes, welches als Negativ-Kontrolle bei einigen Methoden benutzt wurde, erfolgte entsprechend der oben beschriebenen Synthese, wobei jedoch *p*-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid als Ausgangssubstanz diente.

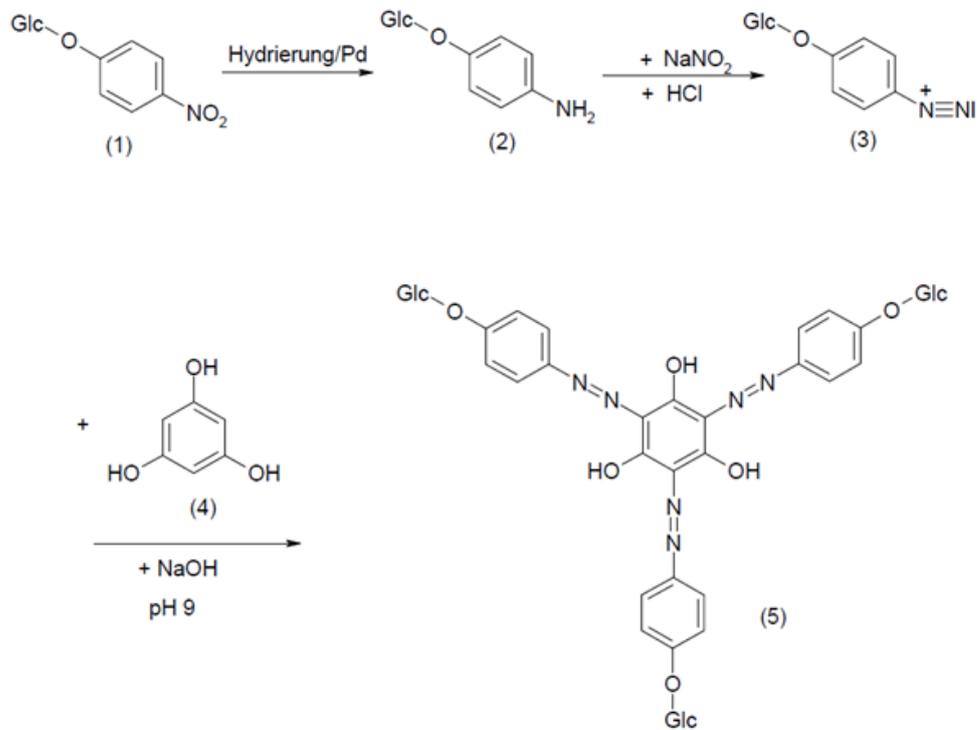


Abbildung 4: Reaktionsgleichung der β -Yariv-Reagenz-Synthese

1.3.2 Isolierung der AGPs

Mit Hilfe des β -Glc-Yariv-Reagenzes wurden aus dem Retentat, welches die hochmolekularen Polysaccharide und AGPs enthält, letztere gewonnen. Der Yariv-Fällung voraus ging eine Acetylierung und gaschromatographische Untersuchung (Durchführung siehe IV 4.1.1) des Retentates, um den Gehalt an Arabinose und Galaktose in der Probe zu ermitteln. Man nimmt an, dass ein großer Anteil der Arabinose und Galaktose in der Polysaccharidfraktion des Retentates das AGP ausmachen. Dies ist wichtig für die AGP-Fällung, bei der das Verhältnis von AGP zu β -Yariv-Reagenz 1:1 sein sollte. Für die Fällung wurden zwei Lösungen gleichen Volumens hergestellt. Lösung A enthält das in Aqua bidest. gelöste Retentat (AGP-Konz. ca. 1 mg/ml). Lösung B besteht aus β -Yariv-Reagenz (1 mg/ml) und 0,3 M NaCl in Aqua bidest. Lösung B wurde zu Lösung A gegeben und über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurde der gefällte AGP-Yariv-Komplex durch Zentrifugation bei 20.000 g (Sigma 3K30, Sigma Zentrifugen GmbH, Osterode am Harz) vom Überstand getrennt und im gleichen Volumen Aqua bidest. wie Lösung A bzw. B suspendiert. Um das reine AGP zu gewinnen, wurde der Komplex mittels Natriumdithionit bei 50°C zerstört. Die entfärbte Lösung konnte im Anschluss dialysiert werden (5 Tage, kontinuierlich bei 4°C, Schlauch: Spectra/Por[®] Membrane, MWCO 12.000-

14.000 Da, Fa. Spectrum Laboratories Inc.). Die nun von NaCl, Natriumdithionit und β -Yariv-Reagenz-Resten befreite AGP-Lösung wurde gefriergetrocknet (BETA 1-8K, Fa. Christ; Freeze and Dry System Lymph-Lock 6, Fa. Labconco).

1.4 Optimierung der Retentatgewinnung

Zur Erhöhung des Polysaccharidgehaltes in der hochmolekularen Fraktion sowie zur Steigerung der isolierbaren AGP-Menge wurden verschiedene Parameter bei der Extraktion der *P. sidoides*-Wurzel variiert. Als erstes wurden bei sämtlichen Extraktionen die anschließende TFF mit einem 50.000 Da-Filter und die darauf folgende Dialyse mit einem 12.000-14.000 Da Schlauch durchgeführt. Daneben wurde die Erhöhung der Temperaturen und die gleichzeitige Verkürzung der Extraktionszeiten, sowie die Verwendung von Ethanol-Wasser-Mischungen als Extraktionsmittel getestet. Zusätzlich erfolgte die Extraktion nicht nur aus der getrockneten Droge, sondern auch aus frisch ausgegrabenen Wurzeln aus den Gewächshäusern der Pharmazeutischen Biologie Kiel. Die Durchführung der Extraktionen, inklusive der Variation der einzelnen Parameter, sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt und werden unter IV 1.4.1 erläutert. Des Weiteren erfolgte eine Aufreinigung des Retentates und die gleichzeitige Erhöhung der Polysaccharidausbeute über die Entfernung von Gerbstoffen, die eindeutig mit Hilfe von Eisen(III)chlorid- und Vanillin/HCl-Färbungen im Retentat und im Extrakt identifiziert werden konnten. Verschiedene Methoden zur Gerbstoffentfernung wie das Ausfällen und die Adsorption an Säulenmaterialien wurden getestet und sind unter IV 1.4.2 aufgeführt. Als letzte Variationsmöglichkeit wurde eine separate Extraktion der Gerbstoffe mit organischen Lösungsmitteln vor der eigentlichen Extraktion der Polysaccharide untersucht.

Mit Hilfe einer gaschromatographischen Untersuchung wurden die aufgereinigten und gefriergetrockneten Proben in Bezug auf ihre enthaltenen Saccharide qualifiziert und quantifiziert. Zusätzlich wurde das Vorhandensein von AGPs während der Optimierung der Extraktion nach den einzelnen Extraktionsschritten (Extraktion, Proteindenaturierung, TFF) mit Hilfe des Geldiffusionstests (Durchführung siehe IV 3.) überprüft.

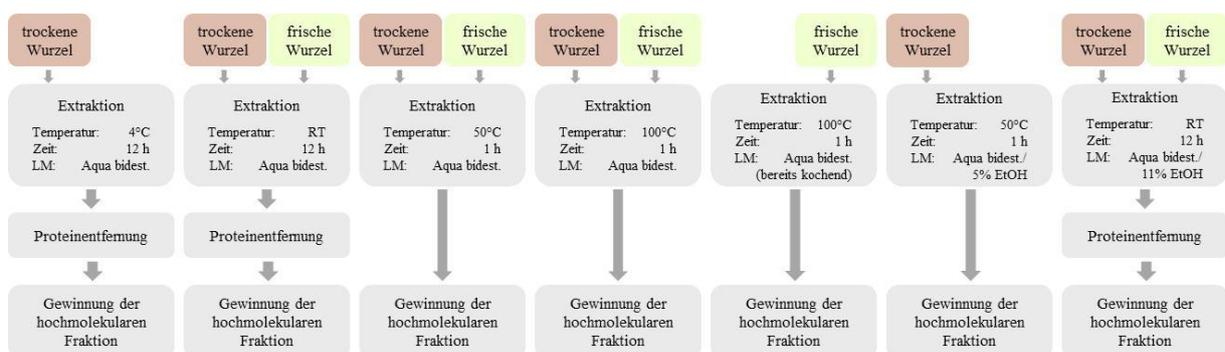


Abbildung 5: Variationen der Retentatgewinnung

1.4.1 Variation von Extraktionszeit, -temperatur und -mittel, sowie Verwendung von frischem Drogenmaterial

Verwendung von frischem Drogenmaterial

Je Ansatz fanden neben der getrockneten Droge auch 100 g frisch geerntete *Pelargonium sidoides*-Wurzeln Verwendung. Die Wurzeln wurden zur Entfernung der restlichen Erde mit Aqua dem. gewaschen, mit Ethanol 96% (v/v) behandelt und 1 h an der Luft getrocknet. Anschließend wurden sie wie die getrocknete Droge mit einer Schlagkreuzmühle (De Longhi 550 W Electronic) pulverisiert.

Variation der Extraktionstemperatur

Neben der Extraktion bei 4°C wurde bei Raumtemperatur, 50°C und 100°C extrahiert. Hierbei wurde die pulverisierte Droge in kaltes Extraktionsmittel gegeben und auf die Extraktionstemperatur erwärmt. Zusätzlich wurde ein Ansatz durchgeführt, bei dem 100 g frische Droge direkt in kochendes Wasser überführt wurden. Bei Ansätzen mit erhöhter Temperatur (50°C und 100°C) erfolgte im Anschluss an die Extraktion eine pH-Messung, dann wurde die Lösung filtriert, bei 20.000 g 10 min lang zentrifugiert (Sigma 3K30, Sigma Zentrifugen GmbH, Osterode am Harz) und in die Tangentialflussfiltration überführt.

Variation der Extraktionszeiten

Extraktionen mit erhöhter Temperatur wurden mit einer verkürzten Extraktionszeit durchgeführt: die 50°C und 100°C-Ansätze wurden 1 h bewegungsmazeriert, wohingegen Extraktionen bei 4°C und bei Raumtemperatur 12 h lang erfolgten.

Variation des Extraktionsmittels

Neben der standardmäßigen Extraktion mit Aqua bidest. wurde die Mazeration des Drogenmaterials auch mit zwei verschiedenen Ethanol-Wasser-Mischungen durchgeführt: 5% (v/v) Ethanol und 11% (v/v) Ethanol.

1.4.2 Entfernung von Gerbstoffen aus den Retentaten

Mit Hilfe von fünf verschiedenen Methoden sollten die Gerbstoffe aus einem rotbraun gefärbten Retentat entfernt werden. Der für die Gerbstoffentfernung verwendete wässrige Extrakt wurde durch eine zwölfstündige Bewegungsmazeration bei 4°C gewonnen, der anschließend zweimal einer TFF unterzogen wurde. In der ersten TFF wurde ein Filter mit einer nominellen Ausschlussgrenze von 10.000 Da verwendet. Die zweite TFF trennte den Extrakt in eine hochmolekulare Fraktion mit Makromolekülen, die größer 50.000 Da waren, und das Filtrat. Eine sechste Methode, die eine

Extraktion der Gerbstoffe mit organischen Lösungsmitteln vor der eigentlichen wässrigen Extraktion der Polysaccharide beinhaltet wurde zum Abschluss durchgeführt.

Fällung der Gerbstoffe mit Blei(II)acetat-Trihydrat

Für die Fällung der Gerbstoffe mit Blei(II)acetat wurde das Retentat, welches Makromoleküle größer 10.000 Da enthielt, verwendet. Aus dem gefriergetrockneten Retentat wurden 100 ml einer 7%igen Lösung hergestellt, die mit 12,0 g Blei(II)acetat-Trihydrat zur Komplexbildung und Fällung der Gerbstoffe versetzt wurde. Die gefällte Lösung wurde anschließend bei 20.000 g 5 min lang zentrifugiert (Sigma 3K30, Sigma Zentrifugen GmbH, Osterode am Harz), der Rückstand verworfen und der Überstand zur Entfernung von überschüssigem Blei einer Fällung mit Na_2SO_4 unterzogen. Das gefällte Bleisulfat wurde durch eine erneute Zentrifugation (20.000 g, 5 min) abgetrennt und der von den Gerbstoffen befreite Überstand zur weiteren Aufreinigung einer fünftägigen kontinuierlichen Dialyse bei 4°C unterzogen (Schlauch: Spectra/Por[®] Membrane, 14,6 mm Por., MWCO 6.000-8.000 Da, Fa. Spectrum Laboratories Inc.) und im Anschluss gefriergetrocknet.

Gerbstoffentfernung mit Hilfe von Chromabond[®] PA

Eine 1%ige Lösung des Retentates (TFF mit 50.000 Da Filter) wurde für die Entfernung der Gerbstoffe mittels Chromabond[®] PA, das als fertig gepackte Säule und als loses Material zur Verfügung stand, verwendet. Das hochreine Säulenmaterial der Fa. Macherey & Nagel bestand aus feinporigem (Porengröße 40-80 µm) Polyamid 6 und wird gerne für die Adsorption von Flavonoiden und polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen genutzt.

Zur Vorbereitung wurden die bereits gepackten Säulen mit Aqua dem. unter Druck konditioniert. Danach konnten pro Säule 6 ml Probenlösung aufgegeben werden, die nach langsamen Pressen durch die Säule aufgefangen und gefriergetrocknet wurden.

3 g des losen Säulenmaterials wurden zuerst in Aqua dem. suspendiert und in eine Glassäule mit Fritte eingeschlämmt. Nach dem Absetzen des Säulenmaterials konnten 30 ml Probenlösung aufgegeben werden. Die von Polyphenolen befreite Lösung wurde aufgefangen und gefriergetrocknet.

Gerbstoffentfernung mit Hilfe von Polyamid 6 von Carl Roth

Neben dem Polyamid der Fa. Macherey & Nagel wurde zusätzlich loses Polyamid 6 mit einer Porengröße von 50-160 µm der Fa. Carl Roth getestet. Dafür wurden 100 g Säulenmaterial 30 min in Aqua dem. suspendiert, in zwei Portionen aufgeteilt (25 und 75 g) und in zwei Glassäulen mit Fritten eingeschlämmt. Die schmale Vorsäule enthielt 25 g Säulenmaterial und wurde über der größeren Hauptsäule mit 75 g Matrix angeordnet. Auf die Vorsäule wurden im Anschluss ca. 1500 ml einer 1%igen Probenlösung (Retentat nach TFF mit 50.000 Da Filter) gegeben. Die langsam eluierende, fast

klare Lösung aus der Vorsäule tropfte direkt auf die Hauptsäule und wurde hier zusätzlich aufgereinigt, sodass am Ende ein klares Eluat aufgefangen und gefriergetrocknet werden konnte.

Gerbstoffentfernung mit Hilfe von Amberlite® FPX 66

Des Weiteren wurde ein Styrol-Divinyl-Benzol-Copolymerisat der Fa. Rohm und Haas, das der Entfärbung und Entfernung von polyphenolischen Substanzen dient, genutzt. 100 g des losen Harzes wurden zur Vorbereitung 30 min in 96%igem (v/v) Ethanol vorgequollen und mit Aqua dem. in eine Glassäule mit Fritte auf eine Betthöhe von 7 cm geschlämmt. Nach dem Spülen des Säulenmaterials mit 2 l Aqua dem. konnten 6 ml einer 1%igen Retentatlösung (TFF mit 50.000 Da Filter) aufgegeben werden. Das klare Eluat wurde aufgefangen und anschließend gefriergetrocknet.

1.4.3 Separate Extraktion der Gerbstoffe mit organischen Lösungsmitteln

Als letzte Möglichkeit, die Gerbstoffe abzutrennen, wurde eine Extraktion in 70%igem Aceton und 100%igem Methanol vor der eigentlichen wässrigen Extraktion der Polysaccharide durchgeführt. Dafür wurden 100 g getrocknetes Wurzelmaterial 5 h bei 4°C in 1 l 70%igem Aceton zur Entfernung hochmolekularer Gerbstoffe (LE BOURVELLEC et al. 2004, SCHOETZ et al. 2007) bewegungsmazeriert, die Extraktionsflüssigkeit durch Filtration abgetrennt und das Drogenmaterial vom restlichen Aceton durch Abdampfen befreit. Im Anschluss erfolgte unter gleichen Bedingungen eine Extraktion des Wurzelmaterials in 1 l 100%igem Methanol zur Entfernung niedermolekularer Gerbstoffe. Nach anschließender Filtration war das Drogenmaterial noch immer stark rotbraun gefärbt, sodass nach einer Pulverisierung des Materials (De Longhi 550 W Electronic Schlagkreuzmühle) eine erneute fünfstündige Extraktion in 1 l 70%igem Aceton durchgeführt wurde. Die rotbraune Extraktionsflüssigkeit wurde abfiltriert und das Drogenmaterial fünfmal mit je 100 ml 70%igem Aceton nachgewaschen. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurde eine wässrige Extraktion des pulverisierten Wurzelmaterials bei 4°C über Nacht angesetzt. Das Mazerat wurde am nächsten Morgen filtriert, die wässrige Lösung einrotiert und eine Proteindenaturierung bei 95°C durchgeführt. Nach Abtrennung der ausgefallenen Proteine erfolgte eine Fällung der Polysaccharide in 80%igem (v/v) Ethanol, die abgetrennt und gefriergetrocknet wurden.

1.4.4 Aufreinigung von AGP-Lösungen

Zur Aufreinigung wurden neben α -Amylase zur Entfernung von Stärke (Glukose) auch Strukturbrecher wie NaCl, Harnstoff und Guanidinium-HCl zur weiteren Abspaltung von Gerbstoffen eingesetzt. Daneben wurde versucht, ein möglichst reines AGP durch eine 2. Yariv-Fällung zu erhalten (Durchführung siehe IV 1.3.2).

Zugabe von α -Amylase

Die durch Yariv-Reagenz isolierten AGPs sollten mit Hilfe einer enzymatischen Behandlung von den großen Glukose-Mengen in Form von Stärke abgetrennt werden. Aus diesem Grund wurde ein zweifach Yariv gefälltes AGP, welches bei der Extraktion der getrockneten Wurzel droge bei 100°C gewonnen wurde, in Aqua bidest gelöst (Konz. 1 mg/ml), der pH-Wert der Lösung auf 7,0 eingestellt und mit 1 mg α -Amylase (Typ VI-B aus Schweine-Pankreas, Fa. Sigma-Aldrich) versetzt. Diese aus dem Pankreas von Schweinen gewonnene Endo-Amylase spaltet α -1,4-glukosidische Bindungen. Die Inkubation der Probenlösung erfolgte 16,5 h bei RT auf einem Schüttler. Die Reaktion wurde anschließend durch 30 minütiges Kochen bei 90°C abgestoppt, die Lösung 4 Tage kontinuierlich bei 4°C dialysiert (Schlauch: Spectra/Por[®] Membrane, 14,6 mm Por., MWCO 12.000-14.000 Da, Fa. Spectrum Laboratories Inc.) und gefriergetrocknet.

Daneben wurde ein einfach gefälltes AGP eines 2. Ansatzes der 100°C-Extraktion mit α -Amylase im Überschuss versetzt. 100 ml der wässrigen AGP-Lösung (0,5 mg/ml) wurden mit 1 g Amylase ergänzt, 15,5 h auf einem Schüttler bei RT inkubiert und das Enzym anschließend durch zehnminütiges Kochen bei 90°C denaturiert. Danach wurde die Lösung unter den oben genannten Bedingungen dialysiert und gefriergetrocknet.

Zugabe von Strukturbrechern

Es sollte untersucht werden, ob die Zugabe von Strukturbrechern wie NaCl, Harnstoff und Guanidinium-HCl den Gerbstoffanteil im AGP senken. Die für die Proteindenaturierung verwendeten Strukturbrecher sind dafür bekannt, in hohen Konzentrationen Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zu stören, die möglicherweise für die Bindung zwischen AGP und Gerbstoff verantwortlich sind. Aus diesem Grund sollten eine 2 M NaCl-Lösung, eine 10 M Harnstoff-Lösung und eine 10 M Guanidinium-HCl-Lösung getestet werden.

20 mg eines zweifach Yariv gefällten AGPs, gewonnen aus dem 100°C-Extrakt der getrockneten Wurzel, wurde mit 20 ml 2 M NaCl-Lösung versetzt, 18 h auf einem Magnetrührer gerührt, bei 4°C 5 d kontinuierlich dialysiert (Schlauch: Spectra/Por[®] Membrane, 14,6 mm Por., MWCO 12.000-14.000 Da, Fa. Spectrum Laboratories Inc.) und anschließend gefriergetrocknet.

Daneben wurden je 10 mg des gleichen AGPs einmal mit 10 ml 10 M Guanidinium-HCl-Lösung und ein weiteres Mal mit 10 ml 10 M Harnstoff-Lösung versetzt, 23 h gerührt und unter den gleichen Bedingungen dialysiert.

Problematisch bei diesem Versuch war der letzte Schritt. Das gewünschte Abtrennen der freien Gerbstoffmonomere wurde durch eine schnelle Dialyse von Guanidinium-HCl verhindert, sodass sich vor der Abtrennung der Gerbstoffe eventuell wieder die hydrophoben Wechselwirkungen ausbilden könnten. Eine Fällung der Polysaccharide direkt aus der inkubierten AGP-Guanidinium-HCl-Lösung in 80%igem (v/v) Ethanol sollte dieses Problem lösen. Die über Nacht ausgefallenen hochmolekularen

Zucker wurden durch Zentrifugation bei 5.000 U/min für 10 min (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments) vom Überstand getrennt und gefriergetrocknet.

1.5 Mikroskopische Untersuchungen von Wurzelschnitten

Von frischen *Pelargonium sidoides*-Wurzeln verschiedener Durchmesser wurden mit dem Handmikrotom (Fa. Euromex Microscopen BV, Arnhem, Niederlande) dünne Schnitte hergestellt, die unter dem Mikroskop (Lichtmikroskop, Fa. Carl Zeiss AG, Deutschland) untersucht und photographisch dokumentiert (Kamera: Canon EOS 1000D) wurden. Neben der Beobachtung von Wasser-, Chloralhydrat- und Phloroglucin/HCl-Präparaten wurden einzelne Schnitte mit Resorcinblau zum Nachweis von Callose und mit Iodkaliumiodidlösung (0,2% Iod) für das Sichtbarmachen von Stärke angefärbt. Neben dem Anfärben der Stärke wurde eine Behandlung von Wasserpräparaten mit α -Amylase mit Inkubationszeiten von 10 min und 5 h durchgeführt. Dieser Versuch diente der Gewinnung von Informationen über die Art der Stärke und deren Speicherung in der *Pelargonium sidoides*-Wurzel, um Probleme bei der Aufreinigung des AGPs mittels α -Amylase zu lösen.

2. *Pelargonium sidoides*-Zellkulturen

2.1 Verwendetes Drogenmaterial

Es wurden durch hauseigenes Fachpersonal eindeutig identifizierte *Pelargonium sidoides* DC Samen der Firma B&T World Seeds (Aigues-Vives, Frankreich) für die Aussaat in den Gewächshäusern der Pharmazeutischen Biologie Kiel verwendet. Des Weiteren wurden diese Samen auch für das Anlegen von Kalluskulturen genutzt.

2.2 Aseptisches Arbeiten

Der Umgang mit Zellkulturen erforderte aseptische Arbeitsbedingungen, die durch Dampfsterilisation, Heissluftsterilisation, Sterilfiltration und das Arbeiten unter einer Laminar-Air-Flow-Bank (antair ZKB, W. H. Mahl Reinraum- und Labortechnik GmbH, Magdeburg) erreicht wurden.

Nährlösungen, Glasgeräte und hitzelabile Geräte (z.B. Eppendorfspitzen) wurden im Autoklaven (Dampfsterilisator VST 40/60S, ZIRBUS Apparate- und Maschinenbau GmbH, Osterode) 20 min lang bei 121°C und 2 bar dampfsterilisiert.

Instrumente und hitzestabile Geräte wurden für 2 h bei 200°C im Trockenschrank heissluftsterilisiert. Für hitzeempfindliche Lösungen (z.B. Phytohormonlösungen) wurde eine Entkeimungsfiltration mit sterilen Einmalfiltern (Rotilabo[®]-Spritzenfilter, PVDF, 0,22 µm, Firma Roth) genutzt.

Das aseptische Arbeiten wie das Gießen von Nährmedien, das Anlegen von Kallus- und Suspensionskulturen, das Überimpfen und die Sterilfiltration wurden unter Benutzung von sterilisierten Geräten und Gefäßen unter der Laminar-Air-Flow-Bank durchgeführt.

2.3 Herstellung von Nährmedien

Für die Herstellung von Petrischalen- und Suspensionskulturen wurde ein MS-Grundmedium in Anlehnung an die Vorschrift von MURASHIGE & SKOOG (1962) verwendet.

2.3.1 MS-Medium

Anorganische Makroelemente:

KNO ₃	1900,00 mg
NH ₄ NO ₃	1650,00 mg
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	370,00 mg
CaCl ₂ wasserfrei	223,16 mg
KH ₂ PO ₄	170,00 mg

Na ₂ * EDTA	37,30 mg
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	27,80 mg

Anorganische Mikroelemente:

MnSO ₄ * H ₂ O	16,90 mg
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	8,6 mg
H ₃ BO ₃	6,20 mg
KI	0,83 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,25 mg
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,025 mg
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,025 mg

Organische Bestandteile

Saccharose	30 g
„Vitaminlösung“	1 ml
„Phytohormonlösungen“	1 Aliquot
Agar (nur bei Petrischalenkulturen)	10 g

Aqua bidest. ad 1000 ml

Vitaminlösung

<i>myo</i> -Inositol	5,0 g
Glycin	100,0 mg
Nicotinsäure	25,0 mg
Pyridoxin-HCl	25,0 mg
Thiaminchloridhydrochlorid	5,0 mg
Aqua bidest.	ad 50 ml

Phytohormonlösungen

A) 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (0,4 mg/l):

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	20,0 mg
Aqua bidest.	ad 50 ml

aliquotiert auf 0,4 mg/ml; ein Aliquot pro l

B) 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (1 mg/l):

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	50,0 mg
Aqua bidest.	ad 100 ml

aliquotiert auf 1 mg/2 ml; ein Aliquot pro l

C) Kinetin (0,2 mg/l):

Kinetin	20,0 mg
1 M NaOH	5 Tropfen
Aqua bidest.	ad 100 ml

aliquotiert auf 0,2 mg/ml; ein Aliquot pro l

D) Benzylaminopurin (5 mg/l):

Benzylaminopurin (BAP)	50,0 mg
DMSO	ad 10 ml

aliquotiert auf 5 mg/ml; ein Aliquot pro l

E) Naphthylessigsäure (1 mg/l):

Naphthylessigsäure (NAA)	10,0 mg
Aqua bidest.	ad 10 ml

aliquotiert auf 1 mg/ml; ein Aliquot pro l

2.3.2 Herstellung von festem MS-Medium

Die anorganischen Elemente des Mediums wurden in Form einer Fertigsalzmischung (MS Plant salts, Firma Serva) verwendet. 4,52 g dieser Salzmischung wurden mit 30 g Saccharose in 1 l Aqua bidest. gelöst. Nach der Einstellung des pH-Wertes auf 5,7-5,8 mit 0,1 N NaOH wurde die Lösung in eine Bluecap-Flasche überführt, die bereits 10 g Bacto-Agar enthielt. Nach dem anschließenden Autoklavieren des Mediums wurde unter der Laminar-Air-Flow-Bank weitergearbeitet. Nach dem Abkühlen des Mediums auf ca. 30-35°C wurden die in Reaktionsgefäßen voraliquotierten Vitamin- und Phytohormon-Lösungen per Sterilfilter (Rotilabo[®]-Spritzenfilter, PVDF, steril, 0,22 µm, Fa. Roth) zugefügt, die Lösung gut gemischt und dann in sterile Petrischalen ausgegossen. Nach dem Aushärten des Nährmediums wurden die einzelnen Petrischalen mit Parafilm verschlossen und bei 7°C im Dunkeln gelagert.

2.3.3 Herstellung von flüssigem MS-Medium

Wie oben beschrieben wurde die Nährlösung aus der Pflanzensalzfertigmischung, der Saccharose und Aqua bidest. hergestellt. Nach der Einstellung des pH-Wertes wurden jeweils 100 ml Lösung in 250 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit einem Cellulosestopfen und Alufolie verschlossen. Die Erlenmeyerkolben wurden dann autoklaviert und bei 7°C im Dunkeln aufbewahrt. Erst direkt vor Gebrauch des Nährmediums wurden die Vitamin- und die Phytohormonlösungen diesem per Sterilfiltration zugefügt.

2.3.4 Erweitertes MS-Medium

Um die Bildung der in den *Pelargonium sidoides*-Zellkulturen auftretenden phenolischen Ablagerungen zu unterdrücken, wurde dem festen und dem flüssigen Medium je 50 mg/l Ascorbin- und Citronensäure wie folgt zugefügt: Die Citronensäure wurde zusammen mit der Fertigsalzmischung und der Saccharose eingewogen, gelöst und anschließend der pH-Wert eingestellt. Die Ascorbinsäure wurde als voraliquotierte Lösung (50 mg/ml, in Aqua bidest.) dem Nährmedium nach dem Autoklavieren per Sterilfiltration zugefügt.

2.3.5 Nährmedium mit Polyamid 6

Neben der Verwendung von Ascorbin- und Citronensäure zur Unterdrückung von phenolischen Ablagerungen wurde das bereits zur Gerbstoffentfernung von Retentaten eingesetzte Säulenmaterial Polyamid 6 der Fa. Carl Roth getestet. Das in das feste Nährmedium eingearbeitete Polyamid sollte die produzierten Phenole adsorbieren und die Entwicklung von hellem und weichem Kallusgewebe unterstützen. Es wurden drei verschiedene Konzentrationen an Polyamid getestet. Je Ansatz wurden dazu 100 ml MS-Grundmedium mit je 0,2 g, 0,5 g und 1,0 g Polyamid 6 hergestellt, autoklaviert, per Sterilfilter (Rotilabo[®]-Spritzenfilter, PVDF, steril, 0,22 µm, Fa. Roth) mit den Phytohormonen 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (1 mg/l) und Kinetin (0,2 mg/l) und der Vitaminlösung ergänzt und ausgegossen. Die Platten wurden unter aseptischen Bedingungen mit etablierten Kalli beimpft und visuell beobachtet.

2.4 Anlegen von Kalluskulturen

Als Ausgangsmaterial für Petrischalenkulturen wurden *Pelargonium sidoides*-Samen verwendet. Um eine keimfreie Aufzucht zu erreichen, mussten die Samen oberflächensterilisiert werden, bevor sie für die Keimung ausgelegt werden konnten. Hierfür wurden die Samen zuerst für 8 min in Ethanol 99% geschwenkt, danach unter der Laminar-Air-Flow-Bank abfiltriert. Nach dem Verdunsten des restlichen Ethanols wurden die Samen in eine 10%ige Domestos[®]-Lösung (Desinfektionsmittel, 10% Domestos in Aqua bidest.), die zur besseren Oberflächenbenetzung nichtionische Tenside enthielt, überführt und 30 min geschüttelt. Nach dem Abfiltrieren der Samen erfolgte ein dreimaliges Waschen in sterilisiertem Wasser für jeweils 5 min. Im Anschluss daran wurden die Samen in mit Filterpapier sterilisierten Glaspetrischalen ausgelegt und im Dunkeln bei 22°C aufbewahrt. Für eine optimale Keimung war es wichtig, dass das Filterpapier mit sterilisiertem Wasser angefeuchtet war. Täglich wurden die Samen auf Wachstum und Pilzbefall kontrolliert. Innerhalb einer Woche bildeten sich Wurzel- und Sprosskeimlinge, die nach 10 Tagen groß genug waren, um auf ein Nährmedium überführt werden zu können. Die Überführung der Keimlinge auf Nährmedien mit 0,4 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure erfolgte unter aseptischen Bedingungen. Die Keimlinge wurden mit

Hilfe eines sterilen Skalpells vom Samen abgetrennt, auf einer sterilen Glasplatte in 0,5 cm große Stücke geschnitten und maximal zu sechst auf dem festen Nährmedium ausgelegt. Die Petrischalen wurden anschließend mit Parafilm verschlossen und im Dunkeln bei 22°C zur Kallusbildung aufbewahrt.

Nach der Ausbildung der Kalluskulturen wurden diese auf drei verschiedenen Nährböden weiterkultiviert:

A) mit 0,4 mg/l 2,4-D

B) mit 1 mg/l 2,4-D und 0,2 mg/l Kinetin

C) mit 5 mg/l BAP und 1 mg/l NAA

2.5 Erhaltung von Kalluskulturen

Die Kalluskulturen wurden nach dem Erreichen einer gewissen Größe (\varnothing 2 cm) auf frisches Nährmedium überführt. Mit Hilfe einer Impföse wurden unter aseptischen Bedingungen Teile der alten Kalli auf neue Petrischalen mit entsprechendem Nährmedium übertragen. Dabei war darauf zu achten, möglichst weiches und helles Gewebe zu überführen. Die neuen Kalluskulturen hatten im Durchschnitt eine Größe von 0,5 cm (Durchmesser). Nach der Etablierung intakter Kalluskulturen erfolgte alle vier Wochen die Umsetzung auf frisches Medium.

2.6 Anlegen von Suspensionskulturen

Zusätzlich wurden Kalluskulturen, die einen Durchmesser von ca. 2 cm hatten, unter sterilen Bedingungen in flüssige Suspensionskulturen überführt. Hierbei war es wichtig, die Zellhaufen leicht zu zerdrücken, damit sich später möglichst eine Suspension ohne große Zellklumpen bildete. Je nach Größe wurden 1-2 helle Kalli pro 100 ml Nährmedium verwendet. Die Nährlösung bestand wie bei den Kalluskulturen aus einer Murashige & Skoog Plant Salts Fertigmischung (4,52 mg/l), Saccharose (30 g/l) und Aqua bidest., die nach pH-Einstellung auf pH 5,7-5,8 in Erlenmeyerkolben autoklaviert wurde. Die Vitamin- und die Phytohormonlösungen wurden vor dem Beimpfen über einen Sterilfilter (Rotilabo®-Spritzenfilter, PVDF, steril, 0,22 μ m, Fa. Roth) zugegeben. Die beimpften Suspensionskulturen wurden bei 22°C im Dunkeln auf einem Horizontalschüttler (120 U/min, Fa. Edmund Bühler GmbH) aufbewahrt.

2.7 Erhaltung von Suspensionskulturen

Die Erhaltung der Suspensionskulturen folgte einem dreiwöchigen Rhythmus parallel zur Isolierung der AGPs aus den Suspensionskulturen. Je nach Größe des Kultivierungsansatzes wurden jeweils 2-3 Kolben zur Beimpfung neuer Suspensionskulturen verwendet. Die restlichen Kolben dienten der Gewinnung der AGPs (siehe IV 2.8.1). Die Übertragung einer ausreichenden Menge an Zellen aus der

Suspension fand unter aseptischen Bedingungen statt. In Erlenmeyerkolben mit frischer Nährlösung, sowie den entsprechenden Vitamin- und Phytohormonlösungen wurde nach Aufschütteln der alten Suspension ein Aliquot derselben überführt. Dabei war darauf zu achten, genügend Zellen zum Anwachsen der neuen Suspension zu übertragen.

2.8 Isolierung der AGPs aus den Suspensionskulturen

Die Arabinogalaktan-Proteine werden spezifisch mit dem eigens synthetisierten (β -D-Glc)₃-Yariv-Phenylglycosid gefällt (Synthese siehe IV 1.3.1).

2.8.1 Isolierung der Arabinogalaktan-Proteine

Die Suspensionskulturen wurden nach ca. drei Wochen Wachstum geerntet. Mit Hilfe einer zehnminütigen Zentrifugation (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Hanau) bei 5.000 U/min wurden die Zellen abgetrennt und anschließend gefriergetrocknet. Die sich im Kulturmedium befindenden Proteine wurden durch zehnminütiges Kochen bei 95°C und einer Lagerung bei 4°C über Nacht ausgefällt und konnten am nächsten Tag bei 5.000 U/min abzentrifugiert (10 min, Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Hanau) werden. Zum Überstand wurde dann soviel eiskalter 99%iger Ethanol gegeben, bis eine Konzentration von 80% (v/v) erreicht war. Bei dieser Konzentration und einer Lagerung bei 4°C über Nacht fielen Polysaccharide und AGPs aus. Die Suspension wurde für 10 min bei 20.000 g zentrifugiert (Sigma 3K30, Sigma Zentrifugen GmbH, Osterode am Harz), der Überstand abgetrennt und die ausgefallenen Polysaccharide und AGPs mit 80%igem Ethanol gewaschen und gefriergetrocknet. Im Anschluss konnten aus dem gefriergetrockneten Material die AGPs mit Hilfe des β -Yariv-Reagenz gewonnen werden (Durchführung siehe IV 1.3.2).

Die Isolierung der Arabinogalaktan-Proteine erfolgte zusätzlich auch aus den gefriergetrockneten Zellen der Suspensionskulturen. Hierfür wurden ca. 9 g gefriergetrocknete Zellen in einer Konzentration von 1 mg/ml in Aqua bidest. suspendiert und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die Zellen durch eine Filtration abgetrennt, der gewonnene Überstand eingengt und zur Gewinnung der Polysaccharide und AGPs eine Ethanol-fällung bei 80% (v/v) durchgeführt. Die bei 4°C über Nacht ausgefallenen Polysaccharide wurden durch Zentrifugation abgetrennt (Sigma 3K30, 20.000 g, 15 min, 4°C), mit Ethanol (80% (v/v)) gewaschen und gefriergetrocknet. Die Isolierung der AGPs erfolgte anschließend wie unter IV 1.3.2 beschrieben.

2.9 Isolierung von AGPs aus den Kalluskulturen

Eine weitere Isolierung von Arabinogalaktan-Proteinen erfolgte aus gefriergetrockneten Kalluskulturen nach CLASSEN et al. (2002).

2 cm große Kalli wurden von den Agarplatten abgenommen und gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Zellmasse wurde in einer Konzentration von 10 g/l in Aqua bidest. suspendiert und 20 h bei Raumtemperatur bewegungsmazeriert. Anschließend konnten mittels 20 minütiger Zentrifugation bei 9.000 g (Sigma 6-16K, Sigma Zentrifugen GmbH, Osterode am Harz) die Zellen abgetrennt und der Überstand mit einem Rotationsverdampfer auf ca. 150 ml eingeengt werden (30 mbar, 40°C, Heidolph Laborota 4000 efficient, Vacubrand cvc 3000 Pumpe, Fa. Varia). Die Fällung der Polysaccharide und AGPs in 80%igem (v/v) Ethanol und die Isolierung der AGPs mit Hilfe des β -Yariv-Reagenzes erfolgte wie unter IV 2.8.1 und 1.3.2 beschrieben.

3. Geldiffusionstest

Mit Hilfe des Geldiffusionstests kann man anschaulich die spezifische Interaktion von isoliertem AGP mit β -Yariv-Reagenz darstellen.

Für die Durchführung des Tests wurde ein 1% Agarosegel in 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,3) mit 0,9% NaCl und 1 mM Calciumchlorid autoklaviert und in sterile Kunststoff-Petrischalen (\varnothing 9 cm) ausgegossen. Nach dem Aushärten des Agarosegels wurden fünf Löcher (\varnothing 4 mm) aus dem Gel ausgestanzt, wobei sich 4 Löcher um eine zentrale Kavität anordnen. Die zentral positionierte Kavität wurde mit 20 μ l β -Glc-Yariv-Lösung (1 mg/ml) gefüllt. Die 4 freien Kavitäten wurden anschließend mit je 20 μ l Probenlösung verschiedener Konzentrationen gefüllt. Während einer 24 stündigen Lagerung des Tests bei Raumtemperatur diffundieren Probe und β -Yariv-Reagenz aufeinander zu und bilden entsprechen ihrem Konzentrationsverhältnis unterschiedlich starke Präzipitationsbanden aus, wenn in der Probe enthaltenes AGP mit dem β -Yariv-Reagenz wechselwirkt.

4. Strukturaufklärende Analytik der AGPs

4.1 Charakterisierung des Kohlenhydratanteils

4.1.1 Neutralzuckeranalytik mittels Acetylierung

Die qualitative und quantitative Untersuchung der Neutralzucker per Gaschromatographie konnte nach einer Probenvorbereitung entsprechend der Vorschrift von BLAKENEY et al. (1983) durchgeführt werden. Hier wird das Polysaccharid hydrolysiert, reduziert und acetyliert und liegt am Ende als Alditolacetat vor (Prinzip siehe Abbildung 6).

Als Probenmenge dienten 2-3 mg AGP. Diese wurden mit 1 ml 2 M Trifluoressigsäure und 0,5 mg *myo*-Inositol als interner Standard versetzt und 1 h bei 121°C im Bioblock (Bioblock Scientific, Fa. Thermolyne, Illkirch, Frankreich) hydrolysiert. Danach wurde die Probe vollständig in einen Spitzkolben überführt und dreimal mit 5 ml Aqua bidest. bis zur Trockene einrotiert (10-20 mbar, 45°C; Heidolph Laborota 4000 efficient; Vacubrand cvc 3000 Pumpe, Fa. Varia). Die nun von der Trifluoressigsäure befreite Probe wurde mit 200 µl 1 M Ammoniaklösung alkalisiert. Im nächsten Schritt wurde 1 ml einer Natriumborhydridlösung in Dimethylsulfoxid (1,0 g NaBH₄ in 50 ml DMSO) zur Probe gegeben und diese bei 40°C im Trockenschrank aufbewahrt. Die nun ablaufende Reduktion der Monomere zu Alditolen wurde nach 90 min durch Zugabe von 100 µl Eisessig abgestoppt. Anschließend begann die 20 minütige Acetylierung der Alditole bei Raumtemperatur mit Hilfe von 2 ml Acetanhydrid (getrocknet) und 200 µl 1-Methylimidazol als Katalysator. Durch Zugabe von 10 ml Aqua bidest. wurde die Acetylierung beendet. Nun wurde die Probe mit 1 ml 0,1 M Schwefelsäure und 1 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die erzeugten Alditolacetate gehen in die Dichlormethanphase über, die mittels einer Pasteurpipette in kleine Vials überführt werden konnte.

Im Anschluss wurde die Dichlormethanphase mit den Alditolacetaten im Gaschromatographen aufgetrennt. Die qualitative Auswertung der Monomere erfolgte über die Retentionszeiten. Für die quantitative Analytik wurden die Flächen der integrierten Peaks im Vergleich zur integrierten Peakfläche des *myo*-Inositol-Standards betrachtet. Wichtig für eine korrekte Auswertung ist die Berechnung von Korrekturfaktoren, da der Flammenionisationsdetektor unterschiedlich stark auf die verschiedenen Alditolacetate anspricht.

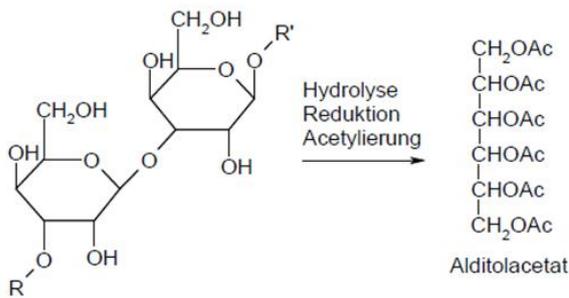


Abbildung 6: Reaktionsschema zur Herstellung von Alditolacetaten

Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion

Gaschromatograph:	Hewlett Packard 5890 Series II, Fa. Hewlett Packard, USA mit FID-Detektor
Säule:	WCOT-Kapillarsäule Optima -225-0,25 μm , 25 m x 0,25 mm Fa. Macherey & Nagel, Düren
Trägergas:	Stickstoff
Flussrate:	1,2 ml/min
Splitverhältnis:	1:30
Injektionsvolumen:	1 μl
Injektor:	250°C
Ofentemperaturprogramm:	230°C isotherm
Detektor:	240°C
Software:	HP GC Chemstation, Rev. A.06.03 [509]

4.1.2 Kolorimetrische Quantifizierung der Uronsäuren

Der Gehalt an Uronsäuren wurde nach der Methode von BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN (1973) photometrisch bestimmt. Hierbei wird der Gesamturonsäuregehalt ermittelt, da die einzelnen Uronsäuren kolorimetrisch nicht voneinander unterschieden werden können.

1 mg Probe wurde mit 1 ml 4%iger Schwefelsäure versetzt, 1 h bei 121°C im Bioblock (Bioblock Scientific, Fa. Thermolyne, Illkirch, Frankreich) hydrolysiert und danach 5 min im Eisbad abgekühlt. Es erfolgte die Zugabe von 1,2 ml Borax/Schwefelsäure-Reagenz (290 mg Natriumtetraborat in 100 ml konzentrierte Schwefelsäure), eine fünfminütige Inkubation in einem 100°C heißen Wasserbad und das zehnmünütige Abkühlen auf Eis. Anschließend wurden entweder 20 μl 3-Hydroxydiphenyl-Farbreakenz (15 mg 3-Hydroxydiphenyl auf 10 ml 0,5%ige NaOH) oder 20 μl 0,5%ige NaOH (Blindwert) zugegeben und die Absorption der roten Färbung nach 10 min bei 520 nm gemessen

(Cary 50 Scan, Fa. Varian, Palo Alto, USA). Für eine Kalibriergerade wurde ein Gemisch aus gleichen Anteilen an Glukuron- und Galakturonsäure verwendet.

Neben der oben beschriebenen Methode wurde ein modifizierter Testaufbau zur Quantifizierung der Uronsäuren durchgeführt. FILISETTI-COZZI und CARPITA postulierten 1991, dass große Mengen an Neutralzuckern während des Hydrolyseschrittes eine starke Braunfärbung hervorrufen, die die photometrische Vermessung des Farbkomplexes am Ende stören. Durch Zugabe von 4 M Sulfaminsäure wurde die Braunfärbung unterdrückt, gleichzeitig aber auch in einem gewissen Maße die Purpur-Färbung des 3-Hydroxydiphenyl-Farbreagenzes.

Die Hydrolyse der Probe wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden 20 µl Sulfaminsäure zugefügt, die Probe kurz gevortext und mit 1,2 ml Borax/Schwefelsäure-Reagenz (290 mg Natriumtetraborat in 100 ml konzentrierte Schwefelsäure) versetzt. Nach einem weiteren kurzen Durchmischungsschritt wurde die Probenlösung 20 min bei 100°C inkubiert, 10 min im Eisbad abgekühlt und mit 20 µl 3-Hydroxydiphenyl-Farbreagenz versetzt. Nach dreimaligem Vortexen und einer Inkubation von 15 min bei RT konnte der entstandene Farbkomplex bei 525 nm im Photometer vermessen werden (Cary 50 Scan, Fa. Varian, Palo Alto, USA).

4.1.3 Bestimmung der Uronsäuren mittels HPTLC

Erste Eindrücke über die Identität der Uronsäuren können mit Hilfe der HPTLC-Methode gewonnen werden. Die Auftrennung der einzelnen Monosaccharide der AGP-Probenlösung erfolgt chromatographisch in einer Horizontalkammer mit anschließender Detektion.

Probenvorbereitung

Ca. 10 mg AGP wurden mit 1 ml 2 M TFA 1 h bei 121°C im Bioblock (Bioblock Scientific, Fa. Thermolyne, Illkirch, Frankreich) hydrolysiert. Danach wurde die Probe dreimal mit je 5 ml Aqua bidest. gewaschen und das Volumen am Rotationsverdampfer (10-20 mbar, 45°C; Heidolph Laborota 4000 efficient; Vacubrand cvc 3000 Pumpe, Fa. Varia) eingeengt. Anschließend wurde die Probe in 0,5 ml 80% (v/v) Ethanol aufgenommen.

Zusammensetzung der Referenzlösung

Für die Referenzlösung wurden je 1-2 mg Arabinose, Galaktose, Glukuron- und Galakturonsäure in 1 ml 80% (v/v) Ethanol gelöst.

Zusammensetzung des Fließmittels

Acetonitril, Aqua bidest. und konzentrierte Essigsäure wurden im Verhältnis 85:14:1 gemischt.

Das Auftragen der Probenlösung auf eine HPTLC-Kieselgelplatte 60 F₂₅₄ (Fa. Merck) erfolgte automatisiert über den CAMAG Linomaten, wobei 1 µl, 2 µl, 5 µl und 10 µl Probenlösung und 2 µl und 3 µl Referenzlösung aufgetragen wurden. Die Platte wurde anschließend zweimal über einer Laufstrecke von 10 cm entwickelt. Nach dem Auftragen und nach jeder Entwicklung wurde die Platte zwecks Minimierung der Bandendiffusion für 10 min bei 80°C im Trockenschrank aufbewahrt. Die Detektion erfolgte durch das Besprühen der Platte mit Detektionsreagenz (2 g Diphenylamin in 100 ml Aceton, 2 ml Anilin und 10 ml 85%ige Phosphorsäure) und einer zehnminütigen Lagerung bei 100°C im Trockenschrank, welches zweimal hintereinander durchgeführt wurde, um die Intensität der Banden zu verstärken. Durch den Vergleich der farbigen Monosaccharidbanden der Probenlösung mit denen der Referenzlösung wurde die Platte ausgewertet.

4.1.4 Reduktion der Uronsäuren

Entsprechend der Vorschrift von TAYLOR und CONRAD (1972) werden die freien Carboxylgruppen der Uronsäuren mit Natriumbordeuterid zu zweifach deuterierten Neutralzuckern reduziert (siehe Abbildung 7) und können somit nach der Bindungstypanalyse in der Massenspektrometrie detektiert werden.

Nach dem Lösen von 20 mg Probe in 20 ml Aqua bidest. wurde die freie Carbonsäure durch Zugabe von 216 mg *N*-Cyclohexyl-*N'*-[2-(*N*-methylmorpholino)-ethyl]-carbodiimid-4-toluolsulfonat unter Rühren aktiviert. Währenddessen wurde der pH-Wert durch Zugabe von 0,01 M Salzsäure für 4 h konstant auf 4,75 gehalten. Die freie Carbonsäure der Uronsäure reagierte dabei mit dem Carbodiimid zu einem Acylisoharnstoff, dessen Reaktivität im Gegensatz zur freien Säurefunktion erhöht ist. Anschließend wird bei pH 7 die aktivierte Säure durch langsames Zutropfen von Natriumbordeuterid-Lösungen aufsteigender Konzentrationen (4 ml 1 M, 5 ml 2 M, 5 ml 4 M) reduziert. Das Halten des pH-Wertes durch 2 M Salzsäure im Neutralen verhindert das Zersetzen des Natriumbordeuterids im Sauren und eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen aktivierter und nicht aktivierter Uronsäure zu Gunsten der nicht aktivierten im Basischen. Während der Reduktion wurde mit Hilfe von 1-2 Tropfen Octanol eine verstärkte Schaumbildung der Lösung verhindert. Nach Abschluss der Reduktion wurde der pH-Wert mit Eisessig auf 6,5 eingestellt, die Lösung 3 Tage dialysiert (kontinuierlich bei 4°C, Schlauch: Spectra/Por[®] Membrane, MWCO 12.000-14.000 Da, Fa. Spectrum Laboratories Inc.) und gefriergetrocknet.

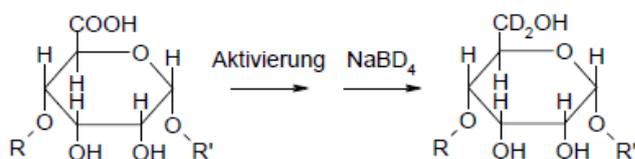


Abbildung 7: vereinfachtes Reaktionsschema der Reduktion von Uronsäuren

4.1.5 Analyse der Bindungstypen

Die Bestimmung der Bindungstypen im Kohlenhydratanteil sowie eine Unterscheidung in furanosidische und pyranosidische Monosaccharide erfolgt mit Hilfe der sogenannten Methylierungsanalyse. Die Durchführung erfolgte prinzipiell sich nach der Vorschrift von HARRIS et al. (1984).

Hierbei wurden zunächst mit Dimethylsulphinyl-Kalium alle freien Hydroxylgruppen des Polysaccharides deprotoniert und unter Zugabe von Methyljodid in einen Methylether überführt. Das methylierte Polysaccharid wurde hydrolytisch in seine Monomere zerlegt (partiell methylierte Monosaccharide), die dann mit Hilfe von Natriumborhydrid reduziert wurden. Die nach der Reduktion freien Hydroxylgruppen im Polysaccharid (waren vorher an der glykosidischen Bindung bzw. am Ringschluss des Monosaccharids beteiligt) wurden im nächsten Schritt mit Acetanhydrid und Methylimidazol acetyliert. Die nun entstandenen partiell methylierten Alditolacetate (siehe Abbildung 8) konnten gaschromatographisch vermessen werden, wobei die Identität über die Retentionszeiten und die entsprechenden Massenspektren bestimmt wurde. Die quantitative Auswertung erfolgte über die Berechnung der Peakflächen im FID-Chromatogramm. Dabei wurde das unterschiedliche Ansprechverhalten des FID mit Hilfe von Response-Faktoren (SWEET et al. 1975) ausgeglichen.

Herstellung der Dimethylsulphinyl-Kalium-Lösung (Dimsyl-Löung)

Ca. 0,9 g in Paraffinöl gelagertes Kaliumhydrid (35%) wurde unter steter Argon-Begasung mit 20 ml *n*-Hexan in 6 Schritten ölfrei gewaschen und anschließend getrocknet. Zum trockenen Kaliumhydrid wurde tropfenweise wasserfreies DMSO gegeben, bis eine Endkonzentration von 0,08 g Kaliumhydrid/ml DMSO erreicht war. Gegen das heftige Schäumen wurde permanent eisgekühlt und geschüttelt. Nach 30 min Rühren erhielt man eine klare Lösung.

Methylierung der Probe

2-3 mg gefriergetrocknete Probe wurde in 460 µl wasserfreiem DMSO gelöst. Unter Argon-Begasung erfolgte die Methylierung mittels Dimsyl-Lösung und eisgekühltem Methyljodid nach folgendem Schema:

+ 40 µl Dimsyl-Lösung	20 min reagieren lassen
+ 10 µl Methyljodid	10 min reagieren lassen
+ 120 µl Dimsyl-Lösung	20 min reagieren lassen
+ 30 µl Methyljodid	10 min reagieren lassen
+ 400 µl Dimsyl-Lösung	30 min reagieren lassen
+ 300 µl Methyljodid	10 min reagieren lassen

Die methylierte Probe wurde anschließend mit 3 ml einer Chloroform/Methanol-Mischung (2:1) versetzt. Nach Zugabe von 2 ml Aqua dem. wurde die Probe geschüttelt (Vortexen) und 5 min bei 2.500 U/min zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Hanau). Die Wasserphase wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Nach erneuter Zugabe von 2 ml Aqua dem. schlossen sich vier weitere Waschschrte an.

Um das restliche Wasser zu entfernen, wurden zur Chloroform/Methanol-Phase 2,2 ml 2,2-Dimethoxypropan, 20 µl Eisessig und 3-4 Siedeperlen gegeben und vorsichtig auf 90°C erhitzt. Nach Entfernung des Wassers wurde die Probe mit Hilfe von Argon-Begasung getrocknet.

Hydrolyse:

Die Hydrolyse der methylierten Probe erfolgte mit Hilfe von 1 ml 2 M Trifluoressigsäure für 1 h bei 121°C (Bioblock Scientific, Fa. Thermolyne, Illkirch, Frankreich). Im Anschluss wurde das Wasser-Trifluoressigsäure-Gemisch bei 40°C mit Stickstoff abgeblasen.

Reduktion:

Für die Reduktion der Probe wurden 2 ml einer frisch hergestellten Natriumborhydrid-Lösung (0,5 M in 2 M Ammoniak) verwendet. Nach der Reduktion bei 60°C im Trockenschrank (1 h) wurde die Reaktion mit 0,5 ml Aceton abgestoppt und das Lösungsmittel bei 40°C mit Stickstoff abgeblasen.

Acetylierung

Nach der Aufnahme der Probe mit 200 µl Eisessig wurden 1 ml Ethylacetat und 3 ml Acetanhydrid hinzugefügt und geschüttelt. Nach Zugabe von 100 µl Perchlorsäure als Katalysator wurde die fünfminütige Acetylierung gestartet. Durch Zugabe von 10 ml Aqua dem. und 200 µl Methylimidazol wurde das restliche Acetanhydrid inaktiviert. Die entstandenen partiell methylierten Alditol-Acetate (PMAA) wurden anschließend mit Dichlormethan ausgeschüttelt und gaschromatographisch vermessen.

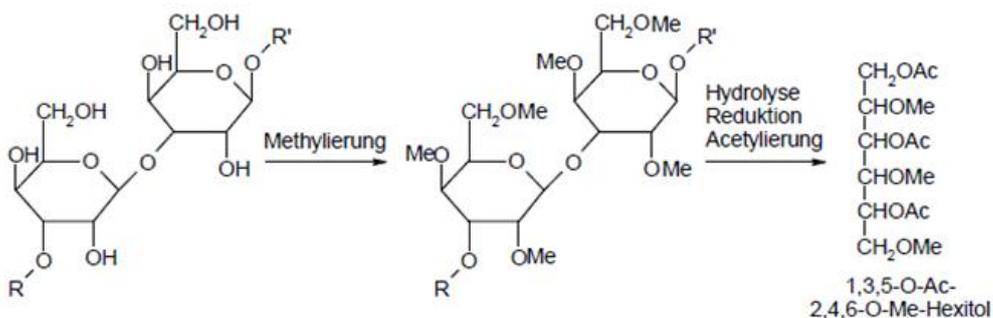


Abbildung 8: Reaktionsschema der Methylierung

Gaschromatographie mit Massenspektrometrie

Gaschromatograph:	Hewlett Packard 5890 Series II, Fa. Hewlett Packard, USA
Säule:	WCOT-Kapillarsäule (fused silica), Permabond OV-1701-DF-0,25, 25 m x 0,25 mm ID, Nr.: 20224-51 Fa. Macherey & Nagel, Düren
Trägergas:	Helium
Flussrate:	1 ml/min (elektronisch geregelt)
Splitverhältnis:	1:18 (1:8 bei stark verdünnten Proben)
Injektionsvolumen:	0,5-1,5 µl (bei stark verdünnten Proben: 2-5 µl)
Injektor:	260°C
Ofentemperaturprogramm:	Beginn: 120°C, mit 8°C/min auf 170°C, mit 0,5°C/min auf 185°C, mit 20°C/min auf 250°C, 5-20 min bei 260°C halten
Detektor:	250°C
EI-MS:	HP MS engine 5898 A, Fa. Hewlett Packard, USA
Software:	HP G 1034 C-Software für MS Chemstation

Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion

Gaschromatograph:	Hewlett Packard 5890 Series II, Fa. Hewlett Packard, USA mit FID-Detektor
Säule:	WCOT-Kapillarsäule (fused silica), Permabond OV-1701-DF-0,25, 25 m x 0,25 mm ID, Nr.: 726058.25 Fa. Macherey & Nagel, Düren
Trägergas:	Helium
Flussrate:	1,2 ml/min
Splitverhältnis:	1:50
Injektionsvolumen:	1 µl
Injektor:	250°C
Ofentemperaturprogramm:	Beginn: 170°C, 2 min bei 170°C, mit 1°C/min auf 210°C, 10 min auf 210°C halten
Detektor:	240°C
EI-MS:	HP MS engine 5898 A, Fa. Hewlett Packard, USA
Software:	Programm HP GC Chemstation, Rev. A.06.03 [509]

Die Identifikation der PMAAs erfolgte durch Vergleich der relativen Retentionszeiten im Totalionenchromatogramm (TIC), durch Analyse der Massenspektren und dem Vergleich der Massenspektren mit einer in der Arbeitsgruppe erstellten Spektrenbibliothek. Die Quantifizierung der PMAAs erfolgte über die Integration der Peakflächen im FID-Chromatogramm.

4.1.6 Partielle Säurehydrolyse

Die Partialhydrolyse mit Hilfe von Oxalsäure dient der Spaltung labiler glykosidischer Bindungen. Diese sind hauptsächlich labile Pentosen wie z.B. Arabinosen. Die Durchführung richtet sich nach der Vorschrift von GLEESON und CLARKE (1979).

25 mg AGP wurden in 2 ml 12,5 mmol Oxalsäure unter Zuhilfenahme des Ultraschallbades gelöst und 5 h bei 100°C im Bioblock (Bioblock Scientific, Fa. Thermolyne, Illkirch, Frankreich) hydrolysiert. Nach dem Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur wurden mittels Zentrifugation (6.000 U/min, 5 min, Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Hanau) unlösliche Reste entfernt. Der Überstand wurde in kalten Ethanol gegossen, bis eine Endkonzentration von 80% (v/v) Ethanol erreicht wurde, und zur Fällung der degradierten Polysaccharide über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die Fällung bei 20.000 g und 6°C 10 min in 2 ml Eppendorf-Caps zentrifugiert (Mikro 22 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen). Der Rückstand wurde zweimal mit 80%igem (v/v) Ethanol gewaschen und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand und die Waschlösungen, die die abgespaltenen Mono- und Oligosaccharide enthalten, wurden vereinigt, zur Trockne einrotiert, in 1 ml Aqua bidest. aufgenommen und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde nach Entfernen des Restalkohols in 2 ml Aqua bidest. gelöst und ebenfalls gefriergetrocknet.

4.1.7 Enzymatische Hydrolyse

Weitere Einblicke in die Feinstruktur der Kohlenhydrateinheit und die Verknüpfung der einzelnen Monosaccharide untereinander können mit Hilfe der enzymatischen Degradation von AGPs mittels rekombinanten Enzymen gewonnen werden. Eine aus *Phanerochaete chrysosporium* isolierte *exo-β-1,3-Galaktanase* und eine *exo-1,5-α-L-Arabinofuronidase* aus *Streptomyces avermitilis* (ICHINOSE et al. 2008) wurden für die in Kooperation mit der Abteilung „Lebensmittel Biotechnologie“ des Nationalen Lebensmittel Forschungsinstitutes in Japan durchgeführte enzymatische Hydrolyse genutzt.

Hierfür wurden einmal 10,0 mg AGP mit 0,66 ml 0,2 M Ammoniumacetat-Puffer pH 5, 200 mU *exo-β-1,3-Galaktanase* und Aqua bidest. (ad 2,0 ml) vermischt. In einem zweiten Ansatz wurden 10,0 mg AGP ebenfalls in 0,2 M Ammoniumacetatpuffer gelöst, aber mit *exo-β-1,3-Galaktanase* und *exo-1,5-α-*

L-Arabinofuronidase gleichzeitig behandelt. Die Reaktionsgemische wurden 24 h bei 37°C inkubiert, zum Abstoppen der Reaktion für 5 min auf 100°C erhitzt und gefriergetrocknet.

Anschließend wurden die Hydrolyseraten der einzelnen Enzyme über die Anzahl der reduzierenden Zucker nach der Methode von SOMOGYI (1952) bestimmt.

Die Untersuchung der freigesetzten Zucker erfolgte mittels Hochleistungs-Anionen-Austausch-Chromatographie mit gepulster amperimetrischer Detektion (HPAEC-PAD, Fa. Dionex, Sunnyvale, USA; Säule: CarboPac PA1, Fa. Dionex; Flussrate: 1 ml/min). Nach der Auftrennung der einzelnen Mono- und Oligosaccharidbruchstücke wurden diese an Hand ihrer Retentionszeiten identifiziert. Für die genaue Zuordnung der Retentionszeiten wurden Mono- und Oligosaccharidstandards verwendet.

4.1.8 Smith Degradation

Die Smith-Degradation dient der gezielten Fragmentierung von Polysacchariden. Dazu wird das Polysaccharid zunächst mit Na-Periodat versetzt, wobei vicinale OH-Gruppen bei gleichzeitiger Spaltung zwischen den OH-Gruppen-tragenden C-Atomen zu Carbonylgruppen oxidiert werden. Die entstandenen Carbonylgruppen werden mit Natriumborhydrid zu primären Alkoholgruppen reduziert und anschließend durch eine milde Säurehydrolyse abgespalten. Die Durchführung erfolgt nach den Vorschriften von USOV et al. (1997) und FURNEAUX und STEVENSEN (1990).

Oxidation der Probe

10 mg Probe wurden mit 5 ml 0,1 M Natriumperiodat-Lösung versetzt und unter Rühren 48 h im Dunkeln gelagert. Nach Zugabe von Ethylenglycol (19,52 µl/ml Na-Periodat-Lösung) wurde überschüssiges Natrium-Periodat umgesetzt und die Lösung für weitere 3 h gerührt.

Reduktion

Nach der Inkubation wurde die Probe mit 100 mg Natriumborhydrid versetzt und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Neutralisation mit Eisessig abgestoppt und zur Entfernung überschüssiger Reagenzien dialysiert (5 d, 4°C, Schläuche: Spectra/Por[®] Membrane, MWCO 12.000-14.000 Da, Fa. Spectrum Laboratories Inc.). An die Dialyse schloss sich eine Gefriertrocknung an.

Hydrolyse

Die gefriergetrocknete Probe wurde einer milden Säurehydrolyse mit 1 M Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur unterzogen. Hierbei werden die durch die Reduktion entstandenen Alkohole

abgespalten, ohne dass glykosydische Bindungen angegriffen werden. Nach 15 h Hydrolyse unter stetigem Rühren wurde die Trifluoressigsäure abrotiert und das Probenmaterial gefriergetrocknet.

Mit Hilfe einer Fällung des degradierten Polysaccharides in 80%igem (v/v) Ethanol konnten anschließend die abgespaltenen Alkohole abgetrennt werden. Dazu erfolgte eine Zentrifugation der alkoholischen Lösung für 10 min bei 10.000 U/min (Sigma 3K30). Der Überstand mit den Alkoholen wurde verworfen und der Niederschlag nach Abdampfen des Ethanols gefriergetrocknet.

4.1.9 Alkalische Hydrolyse

Die Isolierung von intakten Oligo- und Polysaccharidseitenketten mit der jeweils für die Bildung an das Kern-Protein verantwortlichen Aminosäure wurde mit Hilfe der alkalischen Hydrolyse in Anlehnung an die Vorschriften von VOLK et al. (2007), TAN et al. (2004) und ZHAO et al. (2002) durchgeführt.

40,0 mg genau eingewogenes AGP wurden in 6 ml 0,6 N NaOH aufgenommen und bei 105°C für 18 h im Bioblock inkubiert (Bioblock Scientific, Fa. Thermolyne, Illkirch, Frankreich), wobei der Proteinteil vollständig zerstört wurde. Nach dem Abkühlen der Probe erfolgte eine Neutralisation der NaOH mittels 0,1 N HCl (pH-Meter 761 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin).

Die neutralisierte Probe wurde anschließend über drei verschiedene Methoden aufgearbeitet:

- A) Um entstandenes NaCl abzutrennen wurde die Probenlösung zwei Tage kontinuierlich bei 4°C dialysiert (Schlauch: Spectra/Por[®] Membrane, MWCO 1.000 Da, Fa. Spectrum Laboratories Inc.) und anschließend gefriergetrocknet.
- B) Fällung der Polysaccharidseitenketten aus der Probenlösung mittels Ethanol:
Die Fällung erfolgte in einer Endkonzentration von 80% (v/v) Ethanol bei 4°C über Nacht. Der erhaltene Niederschlag wurde anschließend für 15 min bei 5.000 U/min abgetrennt (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Hanau), einmal mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen, in Aqua bidest. aufgenommen und gefriergetrocknet. Der nach der Zentrifugation erhaltene Überstand wurde einrotiert, in Aqua bidest. aufgenommen und ebenfalls gefriergetrocknet.
- C) Fällung der Polysaccharidseitenketten aus der Probenlösung mittels Ethanol und anschließende Entsalzung der Probe:
Die Fällung erfolgte in einer Endkonzentration von 80% (v/v) Ethanol bei 4°C über Nacht. Der erhaltene Niederschlag wurde durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 5.000 U/min

abgetrennt (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Hanau), einmal mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen, in Aqua bidest. aufgenommen und einer fünftägigen kontinuierlichen Dialyse (Schlauch: Spectra/Por[®] Membrane, MWCO 1.000 Da, Fa. Spectrum Laboratories Inc.) bei 4°C zwecks Entfernung des NaCl unterzogen. Der Überstand wurde einrotiert, in Aqua bidest. aufgenommen und das bei der Hydrolyse entstandene Salz mit Hilfe von Sephadex[®] G-25M Säulen (Pharmacia, Uppsala, Schweden) entfernt.

Die Analytik der erhaltenen Proben wurde mittels Acetylierung und Gaschromatographie sowie Gelpermeationschromatographie durchgeführt. Weiterhin erfolgte eine Fraktionierung des Rückstandes und des Überstandes mittels präparativer GPC und die Untersuchung der einzelnen Fraktionen. Zusätzlich konnte mit Hilfe der Aminosäureanalytik der hydrolysierten Probe die Bindung zwischen dem Protein- und dem Kohlenhydratanteil des AGPs genauer charakterisiert werden.

4.2 Charakterisierung des Proteinanteils

4.2.1 Photometrische Hydroxyprolin-Bestimmung

Die quantitative Bestimmung der Aminosäure Hydroxyprolin innerhalb des AGPs erfolgte nach einer photometrischen Methode von STEGEMANN und STALDER (1967).

Zur selektiven Bestimmung von Hydroxyprolin wurde das AGP vollständig hydrolysiert und der Proteinanteil in seine Aminosäuren zerlegt. Dafür wurden ca. 20 mg AGP mit 4 ml 6 M HCl versetzt und 22 h bei 110°C in einem Bioblock (Bioblock Scientific, Fa. Thermolyne, Illkirch, Frankreich) hydrolysiert. Die unlöslichen Probenbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 5.000 U/min für 10 min (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments) entfernt und der Überstand mit den freien Aminosäuren für die Hydroxyprolinbestimmung verwendet.

1 ml Überstand des Hydrolysates wurden mit 0,5 ml Oxidationsreagenz (siehe unten) versetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 0,5 ml Farbreagenz (siehe unten) und gründlichem Durchmischen erfolgten 15 min Inkubation bei 60°C im Wasserbad. Danach wurde die Probe 3 min unter fließendem Wasser abgekühlt und 30 min bis zur Messung bei Raumtemperatur gelagert. Es wurde die Extinktion der Probenlösung bei 558 nm ermittelt (Cary 50 Scan, Fa. Varian, Palo Alto, USA). Als Blindwert diente Aqua dem., das wie die Probe behandelt wurde. Zusätzlich wurde eine Kalibriergerade erstellt, die Hydroxyprolin als Standard in aufsteigenden Konzentrationen (0,6-3 mg/l) enthielt.

Puffer pH 6,8:	Citronensäure-Monohydrat	5,2 g
	Natriumhydroxid-Plätzchen	2,8 g
	Natriumacetat (wasserfrei)	15,6 g
	Aqua bidest.	100 ml
	Thiomersal	20,0 mg
	1-Propanol	50,0 ml
	Aqua bidest.	ad. 200,0 ml
Oxidationsreagenz:	Chloramin T (Trihydrat)	1,4 g
	Puffer pH 6,8	ad 100,0 ml
Farbreagenz:	4-Dimethylaminobenzaldehyd	10,0 g
	Perchlorsäure 60%	35,0 ml
	2-Propanol	65,0 ml

4.2.2 Bestimmung der Aminosäuren per HPLC

Für die Untersuchung wurden ca. 20 mg AGP mit 4 ml 6 M HCl versetzt, 22 h bei 110°C in einem Bioblock (Bioblock Scientific, Fa. Thermolyne, Illkirch, Frankreich) hydrolysiert und die unlöslichen Probenbestandteile bei 20.000 U/min für 10 min (Sigma 3K30, Sigma Zentrifugen GmbH, Osterode am Harz) abgetrennt. Der Überstand wurde zur Trockne einrotiert, in Aqua bidest. aufgenommen und gefriergetrocknet.

Die Auftrennung und Detektion der Aminosäuren erfolgte per HPLC am Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der CAU.

HPLC

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

4.2.3 Photometrische Bestimmung des Proteingehaltes mit Ninhydrin

Die quantitative Erfassung des Proteingehaltes von AGPs basiert auf der Reaktion primärer Amine mit Ninhydrin unter der Bildung eines Farbstoffkomplexes, der photometrisch erfasst werden kann. Mit Hilfe von Ninhydrin erfolgt zunächst die Umsetzung primärer Aminogruppen der Aminosäuren zu Iminen, die anschließend decarboxyliert werden. Nach einer weiteren Abspaltung eines Aminorestes und Bildung von Amino-Ninhydrin dimerisiert dieses mit freiem Ninhydrin zu einem violetten Farbstoffkomplex (Ruhemanns Purpur), der bei 570 nm vermessen wird (siehe Abbildung 9). In Anlehnung an STARCHER (2001) wurde die Methode als Mikrotiterplatten-Assay durchgeführt.

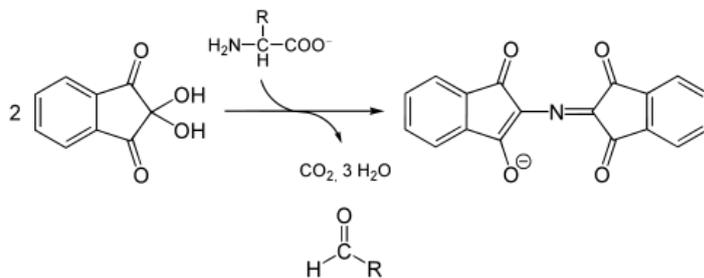


Abbildung 9: Umsetzung von Aminen mit Ninhydrin

Ca. 10 mg Probe wurden zunächst mit 500 µl 6 N HCl versetzt, 24 h bei 100°C im Trockenschrank inkubiert, mit Aqua bidest. auf 10 ml aufgefüllt und verschiedene Verdünnungen (1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80, 1:100) der Probenlösung hergestellt. Anschließend wurden je Kavität einer Mikrotiterplatte (96F without lid SH und U96 PP-0,5 ml, Nunc, Fa. Thermo Fisher Scientific, USA) 100 µl der entsprechenden Probenlösungen mit jetzt frei vorliegenden Aminosäuren pipettiert und mit 100 µl Ninhydrin-Reagenz versetzt. Die Platte wurde dann mit einer Noppenmatte verschlossen, 10 s geschüttelt, 20 min bei 100°C inkubiert und die Absorption des entstandenen Farbkomplexes bei 570 nm vermessen (Tecan[®] Spectra Thermo, Fa. Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz). Zur Quantifizierung wurde zusätzlich eine Kalibriergerade erstellt, die Bovines Serum Albumin (BSA) als Standard in aufsteigenden Konzentrationen (5-100 µg/ml) enthielt.

Ninhydrin-Reagenz:	Ninhydrin	800 mg
	Ethylenglykol	30 ml
	4 M Natriumacetat-Puffer	5 ml
	Zinn(II)chlorid-lösung	1 ml
Zinn(II)chlorid-lösung:	Zinn(II)chlorid	100 mg
	Ethylenglycol	1 ml

4.3 Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) ist ein flüssigchromatographisches Verfahren, um Makromoleküle entsprechend ihres hydrodynamischen Volumens aufzutrennen. Die Trennung erfolgt aufgrund eines Größenausschlusses durch verschieden stark poröse Polymere, wobei hochmolekulare Verbindungen weniger gut in die Poren eindringen als niedermolekulare und somit schneller eluiert werden. Das durch die Retentionszeit ermittelte relative Molekulargewicht wird durch die Ladung, den Bindungstyp, den Verzweigungsgrad und die Hydrathülle des Makromoleküls beeinflusst und entspricht dem hydrodynamischen Volumen. Bei der Kalibrierung mit Substanzen eines definierten Molekulargewichtes können über die Retentionszeiten Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der Probe gezogen werden, wobei die äußere Form der Probe berücksichtigt werden muss, da ein kugeliges Molekül nicht zur gleichen Zeit wie ein lineares Molekül des gleichen absoluten Molekulargewichts eluiert. Dem entsprechend sollte mit Verbindungen kalibriert werden, deren Struktur den Probenmolekülen möglichst ähnlich ist.

Daneben besteht zusätzlich die Möglichkeit, das absolute Molekulargewicht mit Hilfe des Multi-Angel-Laser-Light-Scattering-Detektors (MALLS-Detektor) in Kombination mit einem Brechungsindex-Detektor (RI-Detektor) zu ermitteln. Die Messung und Auswertung des Streulichtes in Abhängigkeit der Molekülgröße und -form über mehrere Winkel des MALLS-Detektors wird hier durch die quantitative Verteilung der Signale durch den RI-Detektor unterstützt. Hierbei ist zu erwähnen, dass der MALLS-Detektor große Moleküle korrekt erkennt, kleine Verbindungen aber ungenau erfasst und unter 1.000 Da nicht einsetzbar ist.

Die Ermittlung der Molekülgrößen von intakten und degradierten AGPs erfolgte über das relative und das absolute Molekulargewicht, wobei die bereits oben erwähnte Diskrepanz beachtet werden sollte. Die dafür nötige Kalibrierung wurde mit Hilfe von Pullulanen, linear aufgebauten α -1,6-verknüpften Polymaltotriosen, die aus dem Pilz *Aureobasidium pullulans* gewonnen werden, durchgeführt (PL Polysaccharid Standard Kit SAC-10, Fa. Varian, Palo Alto, USA). 5,0 mg Pullulanstandard (Tabelle 2) wurden über Nacht bei 4°C in 1 ml Eluent quellen gelassen, kurz durchmischt und filtiert (NALGENE® Syringe Filter, 0,45 μ m Porengröße, Celluloseacetat, Fa. Thermo Scientific, Rochester, USA). Nach dem Aufgeben von 100 μ l Standardlösung wurden die durch den MALLS-Detektor berechneten absoluten Molekulargewichte, sowie die Retentionszeiten der einzelnen Peaks gegen die durch die Firma vorgegebenen Molekulargewichte aufgetragen und die Kalibriergeraden ermittelt.

Tabelle 2: Pullulanstandards mit entsprechenden Molekulargewichten (Angaben laut Hersteller)

Pullulan mit Batch No.	MW
20908-3	788.000
20907-2	404.000
20906-2	212.000
20905-2	112.000
20904-2	47.300
20903-2	22.800
20902-2	11.800
20901-4	5.900
20910-8	667
20909-2	180

Anschließend wurden die AGP-Proben in Konzentrationen von 2 mg/ml im Eluent gelöst, filtriert und zu 100 µl auf die Säule aufgetragen.

Säulen:	Säulentyp mit Abmessungen:	MW Trennbereich:
	PL aquagel-OH Guard 8 µm, 50 x 7,5 mm	Vorsäule
	PL aquagel-OH Mixed 8 µm, 300 x 7,5 mm	100-10.000.000 Da
	PL aquagel-OH 40 8 µm, 300 x 7,5 mm	10.000-200.000 Da
	PL aquagel-OH 20 5 µm, 300 x 7,5 mm	100-10.000 Da
	die Säulen wurden in verschiedenen Kombinationen in Reihe geschaltet	
	Fa. Polymer Laboratories, Darmstadt	
Eluent:	0,1 M NaNO ₃ ; pH 8, filtriert (0,1 µm Filter), entgast (Ultraschall)	
Flussrate:	0,7 ml/min	
Säulenofen:	35°C	
Gerät:	PL-GPC 50 Plus + RI-Detektor, Fa. Polymer Laboratories GmbH	
Detektor:	MALLS-Detektor miniDAWN	
	Fa. Wyatt Technology Europe GmbH, Dernbach	
Software:	ASTRA for Windows 4.70.07	
	PL Instrument Control	

4.3.1 Präparative Gelpermeationschromatographie

Neben dem analytischen Arbeiten und der damit verbundenen Bestimmung der Molekulargewichte von Makromolekülen kann die GPC auch zur Fraktionierung von Lösungen mit verschiedenen Oligo- und Polysacchariden genutzt werden.

Die Auftrennung erfolgte nach den Signalen des MALLS- und RI-Detektors per Hand. Die Proben (Rückstand und Überstand der Alkalischen Hydrolyse) wurden in Aqua bidest. (1-1,5 mg/ml) gelöst und zu 2000 µl auf die Säule aufgetragen.

Säulen:	Säulentyp mit Abmessungen:	MW Trennbereich:
	PL aquagel-OH 30 8 µm, 300 x 25 mm	10.000-30.000 Da
	PL aquagel-OH 40 8 µm, 300 x 25 mm	10.000-200.000 Da
	Fa. Polymer Laboratories, Darmstadt	
Eluent:	0,1 M NaNO ₃ ; pH 8, filtriert (0,1 µm Filter), entgast (Ultraschall)	
Flussrate:	6 ml/min	
Säulenofen:	35°C	
Gerät:	PL-GPC 50 Plus, Fa. Polymer Laboratories GmbH	
Detektor:	MALLS-Detektor miniDAWN	
	Fa. Wyatt Technology Europe GmbH, Dernbach	
	RI-Detektor: Empfindlichkeit = 70%	
Software:	ASTRA for Windows 4.70.07	
	PL Instrument Control	

4.4 Elementaranalyse

Die quantitative Analyse der Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel erfolgte am Institut für anorganische Chemie der CAU Kiel mit Hilfe der Verbrennungsanalytik. Es wurden ca. 2 mg einer genau eingewogene Probe in einer Zinnkapsel platziert, welche in einen Ofen mit einem vorgelegten Überschuss an Sauerstoff fallen gelassen wurde. Bei 990°C im Ofen kam es zu einer Zersetzungsreaktion, wobei gasförmige Substanzen entstanden. Aufgrund des Sauerstoffüberschusses reagierte Kohlenstoff zu Kohlenstoffmonoxid. Ein Wolframtrioxid-Katalysator garantierte die vollständige Oxidation der Probe in der Zinnkapsel, bei der sich Kohlenstoffdioxid, Wasser, Schwefeldioxid und Stickoxide bildeten. Das entstandene Produktgas strömte anschließend über eine 500°C heiße Kolonne mit Kupfergranulat, die der Bindung von Restsauerstoff und der Reduktion der Stickoxide zu Stickstoff diente. Die nun im Gasstrom enthaltenen Analytgas Kohlenstoffdioxid, Wasser, Stickstoff und Schwefeldioxid wurden anschließend im gaschromatographischen System mit Helium als Trägergas und einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor aufgetrennt. Zur Blindwertbestimmung

wurden leere Zinnkapseln eingesetzt. Die Kalibrierung des Geräts erfolgte mittels Sulfanilamid. Da bei dieser Messmethode die Reihenfolge der Elemente (jeweils als Peak detektiert) in einer Probemessung technisch genau festgelegt wurde, erlaubte dies sowohl die eindeutige Identifizierung (qualitative Bestimmung), als auch die quantitative Bestimmung der einzelnen Elemente als Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel über die Peakflächen der Messsignale. Mit Hilfe der bekannten Einwaage konnte der jeweilige Massenanteil der Elemente in der zu analysierenden Probe genau berechnet werden.

Gerät: HEKAtech CHNS Analysator, Fa. HEKATECH, Wegberg

4.5 ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Hinweise auf die Konfiguration der einzelnen am Aufbau eines Polysaccharides beteiligten Monosaccharide am anomeren C-Atom können mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Spektroskopie gewonnen werden. Dies wurde mit aufgereinigtem AGP durchgeführt, wobei ca. 15 mg AGP in 600 μl D_2O unter Zuhilfenahme von Ultraschall und Wärme gelöst wurden. 1 μl Aceton diente als interner Standard mit einer chemischen Verschiebung von 31,5 ppm. Das AGP wurde anschließend 15 h lang in einem 300 MHz Kernresonanzspektrometer vermessen (75,47 MHz, 300 K, Bruker Avance III, Fa. Bruker, Rheinstetten). Die Auswertung der Spektren erfolgte auf Basis der chemischen Verschiebungen und dem Vergleich dieser mit verschiedenen Literaturquellen.

5. Biologische Aktivitäten der AGPs

5.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit Hilfe dieses Immunassays können Antigene mittels Antikörpern über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden. Es sollten hier verschiedene Antikörpern auf ihre Reaktivität gegenüber dem *Pelargonium*-AGP im indirekten ELISA getestet werden.

Für den indirekten ELISA (Abbildung 10) mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern (siehe Tabelle 3) gegen Kohlenhydrat-Epitope von AGPs wurden je Plattenkavität 100 µl *Pelargonium sidoides*-AGP-Lösungen verschiedener Konzentrationen (0,1; 1; 10; 50; 100 µg/ml, in PBS-Puffer) gegen reinen PBS-Puffer als Blindwert aufgetragen und über Nacht bei 37°C ohne Deckel inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit 200 µl PBS-Puffer mit 1% Tween gewaschen und freie Bindungsstellen auf der Platte durch Zugabe von 200 µl BSA-Lösung (Bovines Serum Albumin) je Kavität (250 mg BSA in 25 ml PBS-Puffer) abgesättigt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden je Kavität 100 µl monoklonale bzw. polyklonale Antikörperlösung in drei verschiedenen Verdünnungen (1:25, 1:50, 1:100; in PBS-Puffer) auf die Platte pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde im Anschluss wiederholt mit PBS-Puffer mit Tween gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe des mit einer alkalischen Phosphatase markierten Detektor-Antikörpers (Anti-MausIgG für alle mAKs, Anti-KaninchenIgG für den pAK). Es wurden 100 µl des Detektorantikörpers (1:500, in PBS-Puffer) pro Kavität aufgetragen und wiederum 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift konnten 100 µl Substratlösung (*p*-Nitrophenylphosphat) pro Kavität ergänzt werden. Bei positiver Reaktion setzt das Enzym das Substrat um, spaltet den Phosphatrest ab und bildet ein gelbes Endprodukt, welches nach 2, 5 und 10 min bei 405 nm vermessen wurde.

Tabelle 3: Im ELISA genutzte Antikörper: Herkunft und Ziel-Epitope

Name des Antikörpers	Quelle	monoklonal/ polyklonal	gerichtet gegen
4B8D3	Maus	monoklonal	AGPs aus Presssaft von <i>Echinacea purpurea</i>
639 „Q“	Kaninchen	polyklonal	AGPs aus Presssaft von <i>Echinacea purpurea</i>
4A1	Maus	monoklonal	AGPs aus Haferfrüchten
1B5	Maus	monoklonal	AGPs aus Haferfrüchten

Zusätzlich wurde der indirekte ELISA auch mit degradiertem *Pelargonium sidoides*-AGP durchgeführt. Es wurden ein intaktes, ein oxalsäurehydrolysiertes und ein uronsäurereduziertes AGP aufgetragen und gegen 3 monoklonale AK (4A1, 1B5, 4B8D3) getestet.

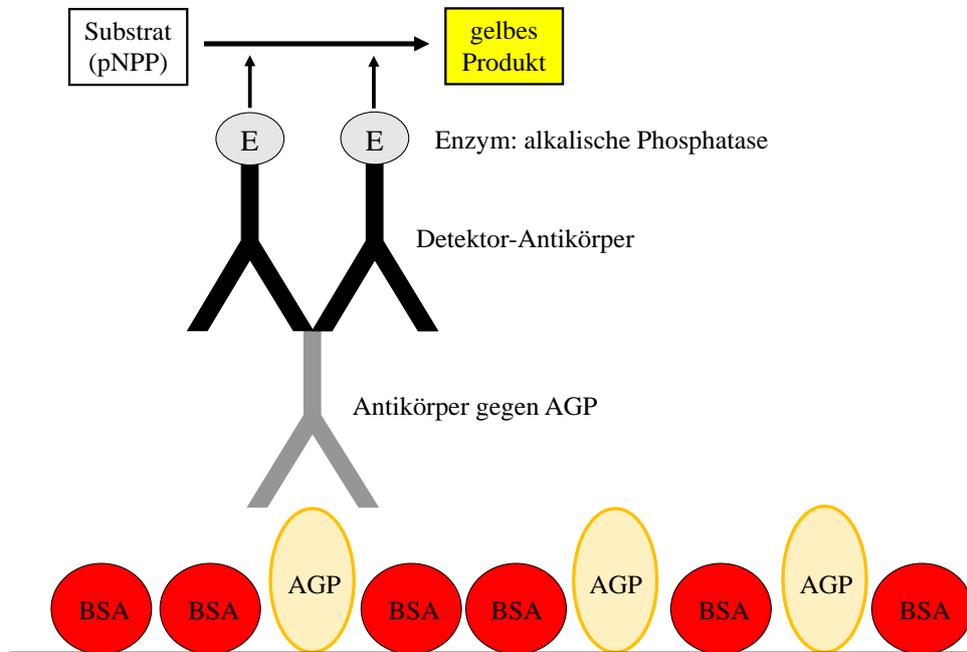


Abbildung 10: Schematische Darstellung des indirekten ELISAs

Brutschrank:	elektronisch geregelter Wärmeschrank BE 200 Fa. Memmert, Schwabach	
ELISA-Platten:	96-well Nunc Immuno [®] Plates Maxisorp [®] Surface Fa. Nunc, Langenselbold	
Washer:	Tecan [®] Columbus Plus, Fa. Tecan Group Ltd., Männedorf (CH)	
Reader:	Tecan [®] infinite F50, Fa. Tecan Group Ltd. Tecan [®] Spectra Thermo, Fa. Tecan Group Ltd.	
PBS-Puffer pH 7,4:	Na ₂ HPO ₄	5,82 g
	NaH ₂ PO ₄	0,95 g
	NaCl	16,30 g
	KCl	0,40 g
	Aqua bidest.	ad 2,0 l
PBS-Puffer mit Tween:	PBS-Puffer pH 7,4 mit Zusatz von 1 g Tween 20 auf 2 l	

5.2 Komplementassay

Anhand eines modifizierten, ursprünglich für klinische Untersuchungen entwickelten Komplement-Mikrotiterplatten-Assays (COMPL 300/COMPL CP310/COMPL AP 330/CMPL MP320, Fa. Euro Diagnostica AB, Malmö, Schweden) sollte der Einfluss von *Pelargonium sidoides*-AGPs auf das humane Komplementsystem untersucht werden. Mit diesem Testsystem können drei Wege der Komplementaktivierung unterschieden werden: klassisch, alternativ und Lektin-abhängig, die als gemeinsamen Endpunkt den Membranangriffskomplex (MAK) aufweisen. Mit Hilfe von Aktivatoren (humane AK - speziell humanes Immunglobulin M für den klassischen Weg, Lipopolysaccharide für den alternativen Weg und Mannan für den Lektin-Weg) auf den Mikrotiterplatten können die einzelnen Wege der Komplementaktivierung untersucht werden, wobei spezielle Zusätze im Puffer die jeweils anderen Wege blockieren. Es wird mit gepooltem, standardisiertem humanem Serum gearbeitet, welches eine moderate Aktivierung jedes Weges zeigt. Durch AGP-Zusatz kann nun ermittelt werden, ob eine Hemmung oder zusätzliche Aktivierung des humanen Komplementsystems erfolgt. Im ELISA-ähnlichen Mikrotiterplatten-Assay wird der gebildete Membranangriffskomplex (MAK) mit Hilfe eines gegen ihn gerichteten Antikörpers quantifiziert. Dieser mit einer Alkalischen Phosphatase markierte Antikörper setzt das Substrat um und bildet einen gelben Farbstoff, dessen Absorption vermessen wird.

Probenvorbereitung

Um eine Aktivierung durch LPS-Verunreinigungen der AGP-Proben und damit eine falsch positive Aktivierung des Komplementsystems auszuschließen, müssen die Proben vor der Testung von Endotoxinen befreit werden. Mit Hilfe von speziellen Adsorptionssäulen (EndoTrap[®]blue 5/1, Fa. Hyglos GmbH, Bernried) konnten die AGP-Lösungen (1 mg/ml) durch zweifaches Auftragen aufgereinigt werden. Als Lösungs- und Elutionsmittel wurde steriles, hypotones und pyrogenfreies Wasser mit einem Zusatz von 0,1 mmol CaCl₂ verwendet. Im Anschluss erfolgte eine Gefriertrocknung der Proben. Bei der Endotoxin-Entfernung war darauf zu achten, dass sämtliche verwendeten Glasgeräte und Verbrauchsmaterialien pyrogenfrei waren.

Durchführung des Assays

Nach einer 60 minütigen Aktivierung der Mikrotiterplatten bei 37°C wurde die Platte mit einem speziellen Wasch-Puffer von ungebundenen Bestandteilen befreit. Anschließend wurden je Test-Weg die Probenlösungen (Verdünnungen von 0,001-500 µg/ml in speziellen Puffern, die die jeweilig anderen Wege inaktivieren) hergestellt, je 50 µl pro Kavität in die Mikrotiterplatten pipettiert und mit 50 µl Test-Serum (1:50,5 und 1:9 verdünnt in speziellem Puffer) versetzt. Dieses Positiv-Serum besteht aus gepooltem humanem Serum, welches bereits von der Firma auf seine Aktivität hin untersucht ist. Von der Firma geliefertes Komplement-inaktives humanes Serum wurde als Negativ-Kontrolle und reiner Verdünnungspuffer als Blindwert verwendet. Nach einem 20 sekundigen Schütteln der Platte

wurde diese 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Danach wurden je Kavität 100 µl Antikörperlösung pipettiert, kurz hin- und her geschwenkt und weitere 30 min bei RT inkubiert. Nach einem wiederholten Waschschrift wurden je Kavität 100 µl Substrat hinzugefügt, wieder kurz hin- und her geschwenkt und weitere 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Absorptionsmessung des gebildeten gelben Produktes bei 405 nm.

Testkit: COMPL 300/COMPL CP310/COMPL AP 330/CMPL MP320,
Fa. Euro Diagnostica AB, Malmö, Schweden
mit speziellen Verdünnungs-Puffern, Wasch-Puffer, Prüflösungen,
Antikörperlösung und Substrat
(Zusammensetzung nicht genau bekannt)

Brutschrank: elektronisch geregelter Wärmeschrank BE 200
Fa. Memmert, Schwabach

Reader: Tecan® infinite F50, Fa. Tecan Group Ltd.

5.3 Untersuchung des Einflusses von β -Yariv-Reagenz auf Suspensionskulturen von *P. sidoides*

Um den Einfluss von AGPs auf die pflanzliche Entwicklung zu untersuchen, wurde β -Yariv-Reagenz dem Medium von Suspensionskulturen zugesetzt, wodurch AGPs gebunden werden. Die Beobachtung des Zellwachstums, die mikroskopischen Untersuchungen der Zellen und Vitalitätsfärbungen, sowie die Isolierung der DNA aus den Zellen und das Auftreten von DNA-Bruchstücken und deren Auftrennung sollen Aufschluss auf den Einfluss von β -Yariv-Reagenz auf die Zellkultur geben.

Für den Versuch wurden Flüssigkulturen von *P. sidoides* in speziell angefertigten Erlenmeyerkolben (Abbildung 12) angelegt, die aus dem MS-Grundmedium mit je 50 mg/l Ascorbin- und Citronensäure sowie den Phytohormonen 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (1 mg/l) und Kinetin (0,2 mg/l) bestanden. Zur Beimpfung des Nährmediums wurden bereits vorbereitete gepoolte *P. sidoides*-Suspensionskulturen mit einer hohen Zelldichte verwendet. Unter aseptischen Bedingungen wurden dann jeweils 16,5 ml Zellsuspension pro Erlenmeyerkolben überführt und direkt im Anschluss das "Sinkvolumen" der frisch beimpften Kultur bestimmt (siehe IV 5.3.1).

Nach dem Beginn des Zellwachstums wurden die Kolben in Gruppen unterteilt und mit Yariv-Reagenz verschiedener Konzentrationen versetzt. Neben der Zugabe von β -Yariv-Reagenz in den Konzentrationen 50, 100, 150 und 200 µM per Sterilfilter (Rotilabo®-Spritzenfilter, PVDF, steril, 0,22 µm, Fa. Roth), wurde eine Gruppe als Negativ-Kontrolle mit 200 µM α -Yariv-Reagenz beimpft. Eine weitere Gruppe blieb unbehandelt (Schema Abbildung 11). Die Ermittlung des Zellwachstums, sowie mikroskopische Untersuchungen der Zellen wurden täglich durchgeführt. Zusätzlich erfolgte

nach individuellem Schema eine Entnahme von ca. 5 ml Zellsuspension unter aseptischen Bedingungen, die für die DNA-Isolierung verwendet wurde.

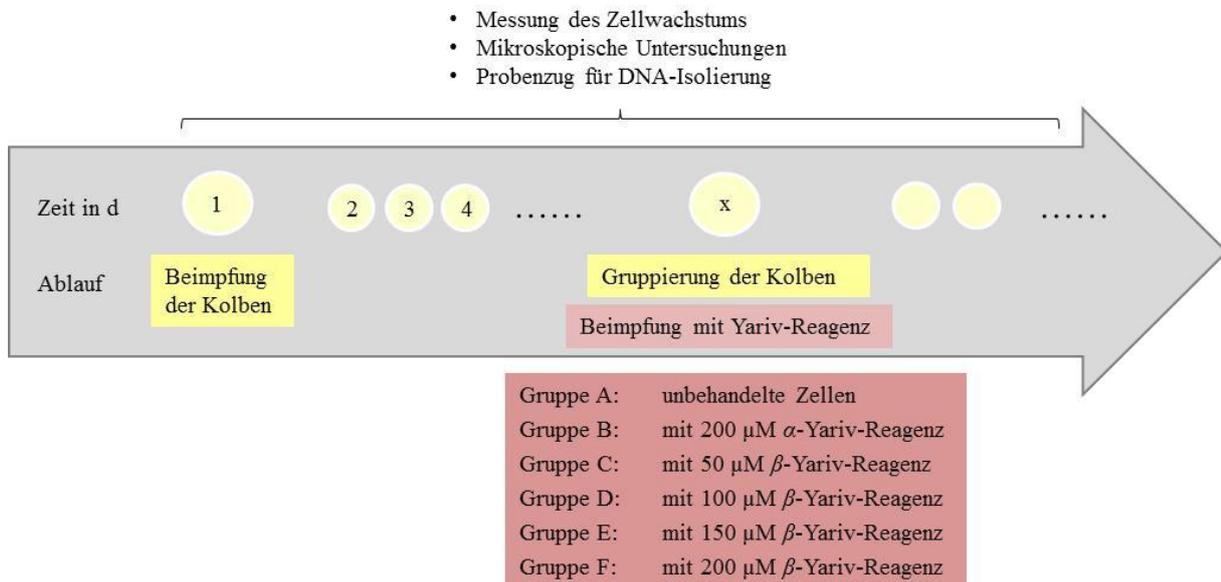


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuches

5.3.1 Bestimmung des Zellwachstums

Ermittlung des „Sinkvolumens“

Die Ermittlung des Zellwachstums erfolgte in speziell angefertigten Erlenmeyerkolben (250 ml Erlenmeyerkolben mit im oberen Drittel schräg angeschweißten, graduierten Zentrifugenröhrchen), die eine *P. sidoides*-Zellsuspension enthielten. Die Messung des „Sinkvolumens“ wurde alle 24 h durchgeführt und diente der Erstellung von Wachstumskurven. Dafür wurde die Suspension aufgeschüttelt und ein Aliquot in das graduierte Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 10 min wurde das Volumen der sedimentierten Zellen an der Skala des Zentrifugenröhrchens abgelesen (Abbildung 12).



Abbildung 12:
Bestimmung des „Sinkvolumens“ in speziellen Nasenkolben

Weitere Methoden zur Erfassung der Zellzahl

Neben der Ermittlung des „Sinkvolumens“ wurden weitere Methoden zur Quantifizierung der Zellzahl getestet.

Die populärste Methode der Zellzählung wird mit einem Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer) durchgeführt und kann sehr gut mit Vitalitätsfärbungen kombiniert werden, sodass parallel die Gesamtzahl der Zellen sowie die Anzahl an toten Zellen erfasst wird. 20 µl homogener Zellsuspension wurden dafür in die Kammer pipettiert, Einzelzellen in den vier äußeren Quadraten der aus neun Quadraten bestehenden Kammer wurden gezählt und mit 10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro µl zu erhalten. Die einzelnen Zählungen wurden pro Probe dreimal durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Probleme bei der Versuchsdurchführung bereiteten die vorhandenen Zellaggregate in den Zellsuspensionen, die das korrekte Pipettieren in die Neubauerkammer verhinderten und die exakte Erfassung der Zellzahl erschwerten. Aus diesem Grund wurden verschiedene Möglichkeiten, eine Einzelzellsuspension zu erzeugen, getestet:

Zuerst wurde in Anlehnung an die Methode von LINDL et al. (2008) die Herstellung von Einzelzellsuspensionen durchgeführt. Hier wurden fertige Suspensionskulturen für 4 Wochen lang alle 7 Tage durch ein autoklaviertes Sieb (Maschenweite 250 µm, Fa. Linker) gegeben und das aufgefangene Filtrat mit den Einzelzellen für die Beimpfung neuer Kolben verwendet.

Zusätzlich wurde versucht, durch Zugabe von Tensiden zu Suspensionskulturen Einzelzelllösungen zu erhalten. Hierfür wurden acht Ansätze mit drei unterschiedlichen Tensiden (Tween 80, Poloxamer 188 und Texapon K12) in verschiedenen Konzentrationen (Tween 80: 0,1%, 0,5%, 1%; Poloxamer 188: 0,1%, 0,5%, 1%, 5%; Texapon K12: 0,01%) hergestellt. Diese wurden einem MS-Flüssigmedium ohne Ascorbin- und Citronensäure vor dem Autoklavieren zugefügt, welches hinterher per Sterilfilter noch mit einer Vitamin- und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäurelösung (0,4 mg/l) ergänzt wurde. Die Kolben wurden mit je 10 ml Zellsuspension beimpft, auf dem Horizontalschüttler (120 U/min, Fa. Edmund Bühler GmbH) im Dunkeln aufbewahrt und optisch auf die Abwesenheit von Zellaggregaten untersucht.

Des Weiteren wurde versucht, die Zellaggregate direkt vor der Zellzählung mit dem Hämozytometer mittels Ultraschall zu zerstören. Hierbei wurden Zellsuspensionen 30 min, 60 min, 90 min und 120 min im Ultraschallbad behandelt.

Die 20 minütige Inkubation von 2 ml Probenlösung mit 2 ml Chromsäure bei 60°C, wobei die ersten und die letzten 5 min die Probe ständig gevortext wurde, ist eine weitere Möglichkeit Einzelzellen direkt vor der Zellzählung zu erhalten. Nach dem Abkühlen der Probe wurde diese mit 8 ml 0,5%iger NaCl-Lösung versetzt und konnte mikroskopiert werden (RICHTER 2003). Bei dieser Methode ist zu beachten, dass Chromsäure die Zellen abtötet, sodass sich dieser Versuch nicht mit einer

Vitalitätsfärbung kombinieren lässt.

Als letztes wurde eine enzymatische Behandlung der Zellsuspension mit Vegazym P (Fa. Erbslöh, Geisenheim), einer mazerierenden Pektinase aus *Aspergillus niger*, die Pektin teilweise abbaut und somit die Mittellamelle auflöst, durchgeführt. Das Spezialenzym kann drei verschiedene Reaktionen beeinflussen: Zum einen fungiert das Enzym als Pektinesterase und spaltet Methylester bei pH 5-6. Daneben kann sie als Endopolygalakturonase 1,4-Verknüpfungen in Galakturonsäureketten spalten und weist als drittes eine Pektinlyaseaktivität auf. Für den Versuch wurden 2,08 µl Enzymlösung zu 10,4 g Zellsuspension gegeben, 30 min bei RT unter ständigem Schütteln inkubiert und die Lösung optisch auf Anwesenheit von Klumpen kontrolliert. Da nach 30 min noch Zellaggregate vorhanden waren, wurde die Inkubationszeit um 15 min verlängert. Es waren wiederum Zellklumpen erkennbar, sodass weitere 10 µl Enzymlösung zum Ansatz ergänzt und 30 bzw. 45 min bei RT inkubiert wurden.

5.3.2 Mikroskopische Untersuchungen und Vitalitätsfärbungen

Die mikroskopische Beobachtung der Zellen der Suspensionskulturen erfolgte täglich. Hierfür wurden nach Aufschütteln der Suspensionen 5 ml Proben von unbehandelten, mit α -Yariv-Reagenz behandelten und mit β -Yariv-Reagenz behandelten Zellkulturen unter aseptischen Bedingungen gezogen. Die einzelnen Zellsuspensionen wurden unter dem Mikroskop (Lichtmikroskop, Fa. Carl Zeiss AG, Deutschland) auf die Form, Größe und andere morphologische Merkmale ihrer Zellen untersucht.

Zusätzlich erfolgte das Anfärben der Suspensionskulturproben mit Hilfe des in der Mikrobiologie für die Vitalfärbung von Zellen verwendeten Farbstoffes Trypanblau. Der anionische Diazofarbstoff durchdringt die Zellmembran toter Zellen und färbt das Zellinnere blau. Lebende Zellen hingegen können den Farbstoff nicht aufnehmen und erscheinen dadurch leuchtend hell. Für die Färbung der Zellen wird eine 1:10 Verdünnung der Zelllösung mit der Trypanblaulösung (0,4%, Fa. Sigma-Aldrich) hergestellt und nach 10 min mikroskopisch untersucht. Die Einhaltung der Einwirkzeit ist zu beachten, da Trypanblau selbst zytotoxisch wirkt.

Die Auswertung der mikroskopischen Untersuchungen erfolgte durch photographische Dokumentation (Kamera: Canon EOS 1000D).

5.3.3 Isolierung der DNA und gelelektrophoretische Auftrennung

Nach den mikroskopischen Untersuchungen und Wachstumsbeobachtungen soll jeweils die DNA aus den Zellen der unbehandelten und behandelten Suspensionskulturen isoliert werden. Eine im Anschluss stattfindende gelelektrophoretische Auftrennung der DNA gibt mit eventuell vorkommenden DNA-Bruchstücken Hinweise auf den Einfluss von Yariv-Reagenz auf die Zellen.

Isolierung der DNA

Die Isolierung der DNA und deren Bruchstücke erfolgte mit Hilfe des MasterPure™ Plant Leaf DNA Purification Kit der Fa. EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, USA.

Für die DNA-Isolierung wurde 50,0 mg gefriergetrocknete Zellmasse in einem autoklaviertem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 600 µl Plant DNA Extraction Solution versetzt und mit einem Mikropistill mechanisch zerkleinert. Nach dem Aufschluss der Zellen wurde die Lösung 30 min bei 70°C inkubiert und anschließend 10 min auf Eis abgekühlt. Die lysierte DNA wurde mit Hilfe einer fünfminütigen Zentrifugation bei 10.000 U/min von den Zelltrümmern abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues autoklaviertes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nochmals zentrifugiert. Nach dem Entfernen sämtlicher Zelltrümmer wurde eventuell in der Probe enthaltene RNA durch Zugabe von 40 µl RNase A (1 µg/µl; Ribonuclease A from bovine pancreas, Sigma-Aldrich) und einer fünfminütigen Inkubation bei 37°C abgebaut. Ein anschließendes Ausfällen der DNA erfolgte durch Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol zur DNA-Lösung und sorgfältigem Inversionsmischen. Das DNA-Pellet wurde durch fünfminütige Zentrifugation bei 10.000 U/min vom Überstand abgetrennt und in 100 µl Cleanup Solution suspendiert. Zur Aufreinigung der DNA erfolgte eine erneute Ausfällung mit 100 µl Isopropanol mit anschließender Zentrifugation bei 10.000 U/min für 5 min. Nach der Entfernung des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit 100 µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und durch wiederholte Zentrifugation vom Ethanol abgetrennt. Mit Hilfe einer Pipette konnte nach kurzem Anzentrifugieren des Pellets der komplette Restalkohol entfernt werden. Die nun aufgereinigte DNA wurde in 50 µl TE-Puffer suspendiert und bei 4°C gelagert.

Gelelektrophorese

Die Auftrennung der einzelnen DNA-Bruchstücke erfolgte in einem 2%igem Agarosegel (1 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer). Das in der Mikrowelle erhitzte Gel wurde nach dem Abkühlen mit 1 µl Ethidiumbromidlösung (10 g/l) ergänzt und ausgegossen. Ethidiumbromid lagert sich bei der Elektrophorese zwischen die Basen der DNA ein und ändert dadurch sein Anregungsspektrum. Dies resultiert in einer Fluoreszenzerhöhung nach einer Anregung im UV-Licht, wobei die Konzentration der DNA proportional zur Lichtintensität der Bande ist.

1 bis 10 µg DNA wurden mit 1 µl Gelladepuffer (0,4% OrangeG, 30% Glycerol und 100 mM EDTA) vermischt und das Volumen auf 10 µl mit sterilem Wasser ergänzt. 10 bzw. 18 µl DNA-Lösung wurden in die einzelnen Geltaschen pipettiert und bei 120 V für 20 min aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines DNA-Markers (3 µl Auftragsmenge) im UV-Licht. Der Vergleich der DNA-Bruchstücke mit denen des Markers gibt einen Aufschluss über die Größe der DNA der Zellen und somit einen Hinweis auf den Grund des Zelltodes.

TAE-Konzentrat pH 8,5

Tris base	24,2 g
0,5 M EDTA pH 8	10,0 ml
Konzentrierte Essigsäure	5,71 ml
Aqua bidest., steril	ad 100 ml

TAE-Puffer

TAE-Konzentrat pH 8,5	20 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

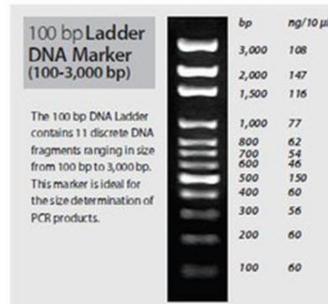
DNA-Marker

100 bp Ladder

mit 12 diskreten DNA-Fragmenten

Fa. Axygen Biosciences,

Union City, USA



6. Vermehrung von *Pelargonium sidoides*

Eine Möglichkeit Pflanzen schnell und günstig zu vermehren, ist das Verfahren der somatischen Embryogenese, das bereits erfolgreich bei verschiedenen *Pelargonium*-Arten im Gartenbau angewendet wird (KLEIN 2004). Mit Hilfe dieser biotechnologischen Methode können aus somatischen Zellen durch Zusatz geeigneter Phytohormone sehr schnell eine sehr große Anzahl erbgleicher Jungpflanzen erzeugt werden.

Es wurden zwei verschiedene Methoden zur Erzeugung somatischer Embryonen getestet. Für beide Methoden (direkt und indirekt) werden Zellen mit embryogenetischer Kompetenz, ein geeignetes Nährmedium sowie ein passender Stimulus benötigt. Je nach verwendeter Methode können bereits etablierte Kalluskulturen (indirekt) oder somatische Zellen aus dem Bereich des Hypokotyls (unterer Teil der Sprossachse vom Wurzelhals bis zu den Keimblättern), der Kotyledonen (Keimblätter), der Petiolen (Blattstiele), der Blattscheiden, der Wurzeln oder der Blütenstandstiele (direkt) dieses embryogenetische Potential aufweisen. Je nach Art der Pflanze gilt es, das optimale Gewebe zu finden und mit Hilfe eines geeigneten Stimulus z.B. Licht/Dunkelheit-Wechsel, Hitze, Schwermetallzusätze ins Nährmedium oder Phytohormonentzug die Entwicklung eines Embryos aus einer somatischen Zelle auszulösen.

Zusätzlich soll nach erfolgreicher Auslösung der somatischen Embryogenese der Einfluss von AGPs und β -Yariv-Reagenz auf das embryogenetische Potential der Zellen getestet werden. Kann ein Zusatz an AGPs ins Nährmedium oder direkt als Lösung auf das entsprechende Gewebe die Anzahl der Embryonen erhöhen und ihre Wachstumszeit verkürzen? Und blockiert das Wegfangen von AGPs mittels Komplexierung mit β -Yariv das Auslösen der somatischen Embryogenese?

6.1 Direkte somatische Embryogenese

Wie bereits oben beschrieben, erfolgt die Entwicklung von somatischen Embryonen bei der direkten somatischen Embryogenese aus pflanzlichen Geweben. Folgende Gewebe sollen hier getestet werden: Petiolen, Blütenstandstiele von geöffneten und geschlossenen Blüten, sowie Blattstückchen. Die Auslösung der Embryogenese soll mit Hilfe verschiedener Phytohormone wie Thidiazuron (KLEIN 2004) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure in Kombination mit Benzylaminopurin (MARSOLAIS 1991) und einem anschließenden Hormonentzug erfolgen. Die Durchführung des Versuches richtet sich nach KLEIN 2004, die bereits im Gartenbau erfolgreich somatische Embryonen bei anderen *Pelargonium*-Arten erzeugen konnte.

6.1.1 Zusammensetzung der Nährmedien

- Induktionsmedien in Petrischalen

A) nach KLEIN 2004:

MS-Grundmedium mit Agar (siehe 2.3)

Vitaminlösung (siehe 2.3)

Ascorbin- und Citronensäure je 50 mg/l

Thidiazuron 2,2 mg/l (22,2 mg in 10 ml 1 M KOH)

B) nach MARSOLAIS 1991:

MS-Grundmedium mit Agar (siehe 2.3)

Vitaminlösung (siehe 2.3)

Ascorbin- und Citronensäure je 50 mg/l

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure 2,2 mg/l (22,2 mg in 10 ml Aqua bidest.)

Benzylaminopurin 0,45 mg/l (4,5 mg in 10 ml DMSO)

- Phytohormonfreies Medium in Petrischalen und Kulturröhrchen

MS-Grundmedium mit Agar (siehe 2.3)

Vitaminlösung (siehe 2.3)

Ascorbin- und Citronensäure je 50 mg/l

- Pikiererde mit Anzuchtsubstrat von Floradur® und 20% Zuschlagstoffen

Bestandteil	Anteil	Anmerkungen
Anzuchtsubstrat (Floradur®)* ¹	80	Pikiererde - fast nährstofffrei
Blähton (fein)	9	für Lufthaushalt des Bodens
Lava	4	für Lufthaushalt des Bodens
Gewaschener Sand	5	für luftige und stabile Bodenstruktur
Perlit (Sieb Nr. 2)	1	für Lufthaushalt des Bodens
Gebannter Ton (Sieb Nr. 1)	1	hält Feuchtigkeit im Boden und bindet Nährstoffe → gleichmäßige Nährstoffabgabe an Pflanze

Chinosollösung (1 Tablette zermörsert auf 1 l) = Fungizid

0,1% Wuxal-Düngerlösung*³

- Torfkultursubstrat mit TKS[®]1 für Pflanzen mit geringem Nährstoffbedarf

Bestandteil	Anteil	Anmerkungen
TKS [®] 1* ²	80	Torfkultursubstrat mit geringem Nährstoffanteil
Blähton	9	für Lufthaushalt des Bodens
Perlit (Sieb Nr. 2)	4	für Lufthaushalt des Bodens
Gebannter Ton (Sieb Nr. 1)	5	hält Feuchtigkeit im Boden und bindet Nährstoffe → gleichmäßige Nährstoffabgabe an Pflanze
Gewaschener Sand	2	für luftige und stabile Bodenstruktur
0,2% Wuxal-Düngerlösung		

*¹: Floradur[®] Anzuchtsubstrat, Floragard Vertriebs GmbH für Gartenbau, Oldenburg

*²: TKS[®]1 Instant, Floragard Vertriebs GmbH für Gartenbau, Oldenburg

*³: Wuxal[®]Super, Aglukon GmbH & Co. KG, Düsseldorf

6.1.2 Durchführung des Versuches

Die Durchführung der somatischen Embryogenese gliederte sich in mehrere Teilschritte (Schema siehe Abbildung 13):

Abtötung und Entfernung von Mikroorganismen

Das entnommene Pflanzenmaterial wurde 3 min lang in 70%igem (v/v) Ethanol geschwenkt und anschließend in eine 10%ige Domestos[®]-Lösung (Desinfektionsmittel, 10% Domestos in sterilisiertem Aqua bidest.) überführt. Durch die enthaltenen nichtionischen Tenside im Domestos erfolgte eine gute Benetzung des Pflanzenmaterials, sodass selbst bei stark behaartem Drogenmaterial eine ausreichende Desinfektion gewährleistet war. Sämtliche Arbeiten erfolgen ab jetzt unter aseptischen Bedingungen und mit sterilisierten Geräten. Nach 5 minütigem Schütteln wurde das Material durch dreimaliges Waschen für 3 min mit sterilisiertem Aqua bidest. vom Domestos befreit.

Präparation der Explanate

Das desinfizierte Pflanzenmaterial wurde unter der Laminar-Air-Flow-Bank auf einer heissluftsterilisierten Glasplatte präpariert: Bei Petiolen und Blütenstandstielen wurden 1 cm lange Randstücke mit Hilfe eines Skalpells entfernt. Das restliche Material mit den nun frischen Schnittkanten wurde in 1 cm lange Explanate geteilt. Zusätzlich erfolgte bei einigen dieser Explanate eine Längsteilung, um eine vergrößerte Schnittfläche zu erhalten.

Inkulturnahme der Explanate

Acht vorbereitete Explanate wurden pro Induktionsplatte (Typ A und B) verwendet, wobei das Auslegen der längs geschnittenen Explanate mit den Schnittseiten auf das Nährmedium erfolgte. Nach dem Verschließen der Platten wurden diese eine Woche bei 25°C in Dunkelheit aufbewahrt.

Nach einer Woche wurden sämtliche Explanate auf phytohormonfreies Plattenmedium (6 Explanate pro Petrischale) überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte nun bei 27°C und unter einem Licht/Dunkelheit-Wechsel von 16 h zu 8 h (32/36 W Röhren, Osram). Die Explanate verblieben ca. 4-6 Wochen auf dem Medium, wobei bereits nach wenigen Wochen die Bildung von Embryonen sichtbar sein sollte. Die Überprüfung auf das Vorhandensein von Embryonen und ihre Einteilung in Stadien (globuläres Stadium, Herz-Stadium, Torpedo-Stadium, Kotyledonen-Stadium), sowie die Quantifizierung erfolgten unter einem binokularen Stereomikroskop (Fa. Olympus).

Embryonen, die das Kotyledonen-Stadium mit einer Größe von 5-10 mm erreicht hatten, wurden durch Anstoßen mit der Skalpellspitze vom Muttergewebe getrennt und einzeln auf frisches phytohormonfreies Nährmedium in Kulturröhrchen zwecks Ausbildung der Wurzeln übertragen. Dies konnte wiederum mehrere Wochen in Anspruch nehmen und erfolgte unter stetem Licht/Dunkelheit-Wechsel von 16 h zu 8 h (32/36 W Röhren, Osram) bei 27°C.

Übertragung der Jungpflanzen ins Gewächshaus

Nach der Ausbildung von Wurzeln - mindestens zwei mit 1 cm Länge - wurden die Jungpflanzen ins Gewächshaus übertragen. Die jungen Pflanzen wurden aus dem Kulturröhrchen entnommen und in lauwarmem Leitungswasser vom restlichen Nährmedium befreit. Die Kultivierung der Jungpflanzen erfolgte dann in einer nährstoffarmen Anzuchterde, die aus Anzuchtsubstrat, sowie Blähton, Lava, gewaschenem Sand, Perlit und gebranntem Ton bestand. Nach dem Einsetzen der Pflanzen wurde mit fungizider Chinosollösung gegossen und nach ca. 2 Wochen mit wenigen Tropfen 0,1%iger Wuxal-Lösung gedüngt. Die Kultivierung der jungen Pflanzen erfolgte in den ersten Wochen in einem Mini-Gewächshaus, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten.

Nach 4-8 Wochen Kultivierung konnten die gewachsenen Jungpflanzen in Torfkultursubstrat gesetzt werden. Dieses enthielt einen höheren Anteil an Nährstoffen und wurde zusätzlich mit Blähton, Perlit, gebranntem Ton und gewaschenem Sand vermengt. Die Düngung der Pflanzen erfolgte nun regelmäßig mit 0,2%iger Wuxal-Lösung.

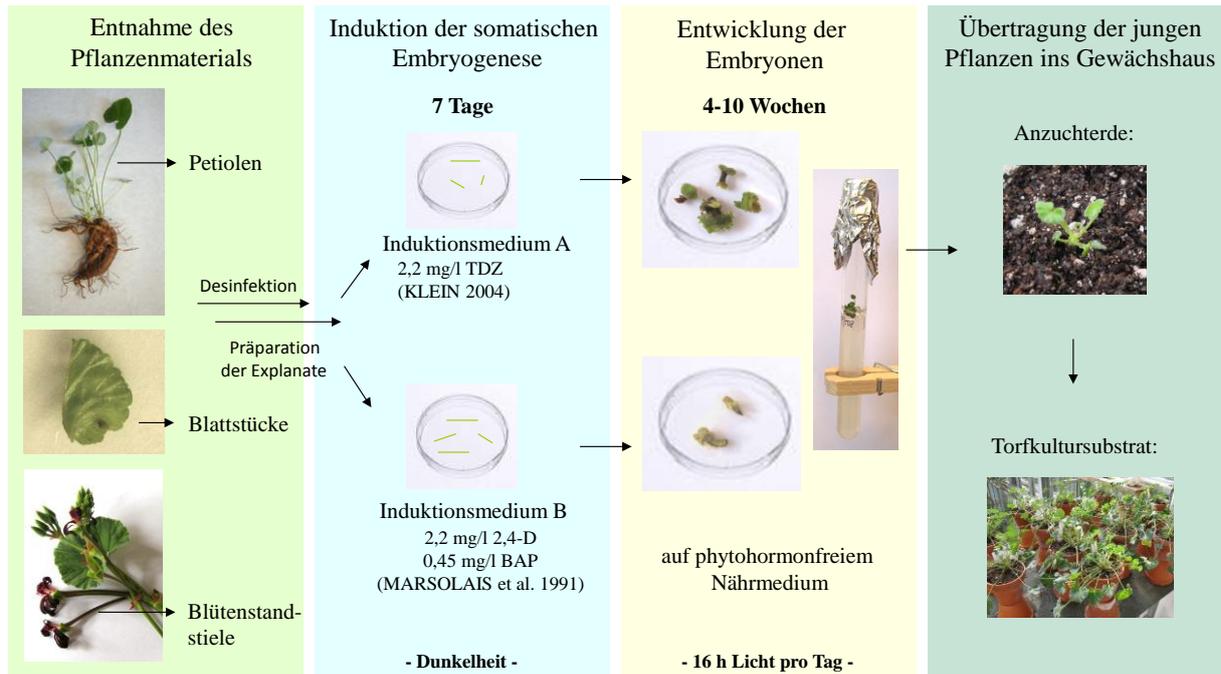


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Entwicklung somatischer Embryonen

6.1.3 Einfluss von AGPs auf das embryogenetische Potential

In diesem Versuch soll auf der einen Seite untersucht werden, ob eine Zugabe von AGPs in das Nährmedium die Embryogenese stimulieren kann und auf der anderen Seite soll getestet werden, ob eine Zugabe von β -Yariv-Reagenz in das Nährmedium die somatische Embryogenese inhibiert.

Dieser Versuch wurde nur mit Blütenstandstielen auf dem Induktionsmedium A (2,2 mg/l Thidiazuron) durchgeführt, wobei das Induktionsmedium mit aus *Pelargonium sidoides*-Suspensionskulturen isolierten AGPs ergänzt wurde. Per Sterilfiltration wurden vor dem Gießen der Platten einmal 0,1 mg/l AGP-Lösung (in Aqua bidest.) und einmal 1 mg/l AGP-Lösung zum Medium zugefügt. Die Explanate verblieben 7 Tage auf dem Induktionsmedium und wurden anschließend auf phytohormonfreies Medium überführt. Parallel zu den Induktionsböden mit AGP wurden auch Explanate auf das Induktionsmedium ohne AGP für spätere Vergleiche ausgelegt. Die Auswertung des Versuches erfolgte über die Quantifizierung der Embryonen in Abhängigkeit der Zeit mit Hilfe des Stereomikroskops (Fa. Olympus).

In einem weiteren Testaufbau wurde eine sterile AGP-Lösung (1 mg/l, inklusive MS-Salzmischung und Saccharose zur Verhinderung von osmotischen Effekten) auf die Schnittkanten der Explanate, die sich auf Platten mit Induktionsmedium A befanden, gegeben. Das Aufbringen von einem Tropfen AGP-Lösung pro Schnittkante erfolgte alle 2-3 Tage unter aseptischen Bedingungen. Parallel hierzu wurden weitere Explanate auf dem Induktionsmedium A mit einer sterilen β -Yariv-Reagenz-Lösung (100 μ M in einer MS-Salzmischung mit Saccharose) unter den oben genannten Bedingungen

behandelt. Es sollte untersucht werden, ob die Komplexierung der AGPs die somatische Embryogenese im pflanzlichen Gewebe inhibiert und die Entwicklung von Embryonen blockiert. Als Negativ-Kontrolle wurden einige Explanatenden mit einer reinen sterilen MS-Salz/Saccharose-Mischung behandelt. Die Herstellung der MS-Salz/Saccharose-Mischung erfolgte entsprechend dem Standardmedium: Nach dem Autoklavieren der Lösung wurden sie aufgeteilt, mit dem AGP bzw. dem β -Yariv-Reagenz ergänzt und über einen Sterilfilter (Rotilabo[®]-Spritzenfilter, PVDF, steril, 0,22 μ m, Fa. Roth) in ein steriles Gefäß aliquotiert.

Nach 7 Tagen wurden die Explanate auf Petrischalen mit phytohormonfreiem Medium überführt und weiterhin alle 2-3 Tage mit den entsprechenden Lösungen behandelt. Die Quantifizierung der Embryonen erfolgte wieder mit Hilfe des binokularen Stereomikroskops (Fa. Olympus).

6.1.4 Mikroskopische Untersuchungen der somatischen Embryonen

Neben der Quantifizierung der somatischen Embryonen unter dem Stereomikroskop wurden die einzelnen Stadien der somatischen Embryogenese (globuläres Stadium, Herz-Stadium, Torpedo-Stadium, Kotyledonen-Stadium) fotografisch dokumentiert (Kameras: Canon EOS 1000D, Canon PowerShot G7). Um genauere Untersuchungen des embryogenetischen Gewebes durchführen zu können, wurden diese zur Gewinnung von Semi-Dünnschnitten eingebettet und mit Richardson angefärbt. Dies erfolgte in der Zentralen Mikroskopie der CAU Kiel.

Fixierung und Einbettung der Embryonen

Neben den somatischen Embryonen in allen vier Stadien sollten auch bereits entwickelte kleine Pflanzen bzw. deren Stängel untersucht werden. Außerdem wurde bei der Präparation der Embryonen unter dem Binokular darauf geachtet, möglichst kleine (2-3 mm) Embryonen mit Übergang zum Muttergewebe zu gewinnen. Die mit Hilfe einer Rasierklinge klein geschnittenen Embryonen wurden dann entsprechend dem unten aufgeführten Fixierungsprotokoll in LR White eingebettet:

Zeit	Durchführung
20 min	Evakuieren der Objekte bei 80 mbar in Fixans: Entfernung der Luft, Erleichterung des Eindringens von Glutaraldehyd
180 min	Objekte in 4% Formaldehyd und 0,25% Glutaraldehyd fixieren
15 min	Objekte mit 0,1 M Ammoniumchloridlösung versetzen: Komplexierung freier Aldehydgruppen des Glutaraldehydes
15 min (3x)	Objekte in 0,1 M Caco 7,3 spülen
15 min	langsames Dehydrieren mit Ethanol 30%
30 min	langsames Dehydrieren mit Ethanol 50%
45 min	langsames Dehydrieren mit Ethanol 70%
30 min (2x)	langsames Dehydrieren mit Ethanol 90%
120 min	Infiltrieren mit LR White-Ethanol 1:2
120 min	Infiltrieren mit LR White-Ethanol 1:1
120 min	Infiltrieren mit LR White-Ethanol 2:1
120 min (3x)	Infiltrieren mit LR White rein
24 h	Infiltrieren mit reinem LR White im Kühlschrank
24 h	Einbetten bei 50°C in Gelatine kapseln (Wärmepolymerisation)

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden anschließend 0,5 µm dicke Semi-Dünnschnitte erzeugt, die teilweise zur Übersicht mit Richardson (Methylenblau und Azur) gefärbt wurden.

6.2 Indirekte somatische Embryogenese

Bei der Entwicklung somatischer Embryonen durch die indirekte Methode erfolgt im ersten Schritt eine Kallusbildung und erst im zweiten Schritt die Induktion der somatischen Embryonen. Das Wachstum von Embryonen kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden: für *Pelargonium*-Arten werden besonders Auxin-haltige Medien als geeignet beschrieben (MARSOLAIS 1991, KLEIN 2004). Die Kombination von Auxinen mit Kinetinen gilt zusätzlich als vielversprechend. Des Weiteren können Hormonentzug, Licht/Dunkelheit-Wechsel und Hitze als Stressfaktoren die somatische Embryogenese auslösen.

6.2.1 Zusammensetzung der Nährmedien

Zwei bereits etablierte Kalluskulturen mit den Phytohormonkombinationen:

- 1) 1 mg/l 2,4-D und 0,2 mg/l Kinetin
- 2) 5 mg/l BAP und 1 mg/l NAA

sollen für diesen Versuch verwendet werden (Zusammensetzung siehe IV 2.3).

Induktionsmedien in Petrischalen

A) ohne Phytohormone:

MS-Grundmedium mit Agar (siehe IV 2.3)

Vitaminlösung (siehe IV 2.3)

Ascorbin- und Citronensäure je 50 mg/l

B) mit 1 mg/l Kinetin:

MS-Grundmedium mit Agar (siehe IV 2.3)

Vitaminlösung (siehe IV 2.3)

Ascorbin- und Citronensäure je 50 mg/l

Kinetin 0,2 mg/l: 5 Aliquots verwendet

C) mit 2 mg/l Kinetin:

MS-Grundmedium mit Agar (siehe IV 2.3)

Vitaminlösung (siehe IV 2.3)

Ascorbin- und Citronensäure je 50 mg/l

Kinetin 0,2 mg/l: 10 Aliquots verwendet

D) mit 1 mg/l Benzylaminopurin:

MS-Grundmedium mit Agar (siehe IV 2.3)

Vitaminlösung (siehe IV 2.3)

Ascorbin- und Citronensäure je 50 mg/l

Benzylaminopurin 5 mg/l: 1/5 des Aliquots verwendet

E) mit 1 mg/l 2,4-D und 0,2 mg/l Kinetin:

MS-Grundmedium mit Agar (siehe IV 2.3)

Vitaminlösung (siehe IV 2.3)

Ascorbin- und Citronensäure je 50 mg/l

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure 1 mg/l: ein Aliquot

Kinetin 0,2 mg/l: 1 Aliquot

F) mit 5 mg/l BAP und 1 mg/l NAA:

MS-Grundmedium mit Agar (siehe IV 2.3)

Vitaminlösung (siehe IV 2.3)

Ascorbin- und Citronensäure je 50 mg/l

Benzylaminopurin 5 mg/l: 1 Aliquot

Naphthyllessigsäure 1 mg/l: 1 Aliquot

6.2.1 Durchführung des Versuches

Die bereits etablierten Kalluskulturen konnten direkt für den Versuch verwendet werden. Sie wurden zuerst 25 Tage auf frischem Grundmedium bei $25\pm 1^\circ\text{C}$ und einem Licht/Dunkel-Wechsel von 16 h zu 8 h (32/36 W Röhren, Osram) kultiviert. Danach konnte mit dem zweiten Schritt, der Induktion der Embryonen begonnen werden. Es sollte versucht werden, durch einen allmählichen Nährstoffentzug das Kallusgewebe zu stressen und die Bildung der Embryonen auszulösen. Aus diesem Grund verblieben die Kalluskulturen 55 Tage ohne Subkultivierung auf ihrem Grundmedium bei $25\pm 1^\circ\text{C}$ und einem Licht/Dunkel-Wechsel von 16 zu 8 h (32/36 W Röhren, Osram). Im Anschluss wurden sie auf sechs verschiedene Induktionsmedien (A-F) überführt (siehe Abbildung 14) und unter den gleichen Temperatur- und Lichtbedingungen kultiviert. Der Beginn der Embryonalentwicklung wurde regelmäßig unter dem binokularen Stereomikroskop (Fa. Olympus) überprüft.

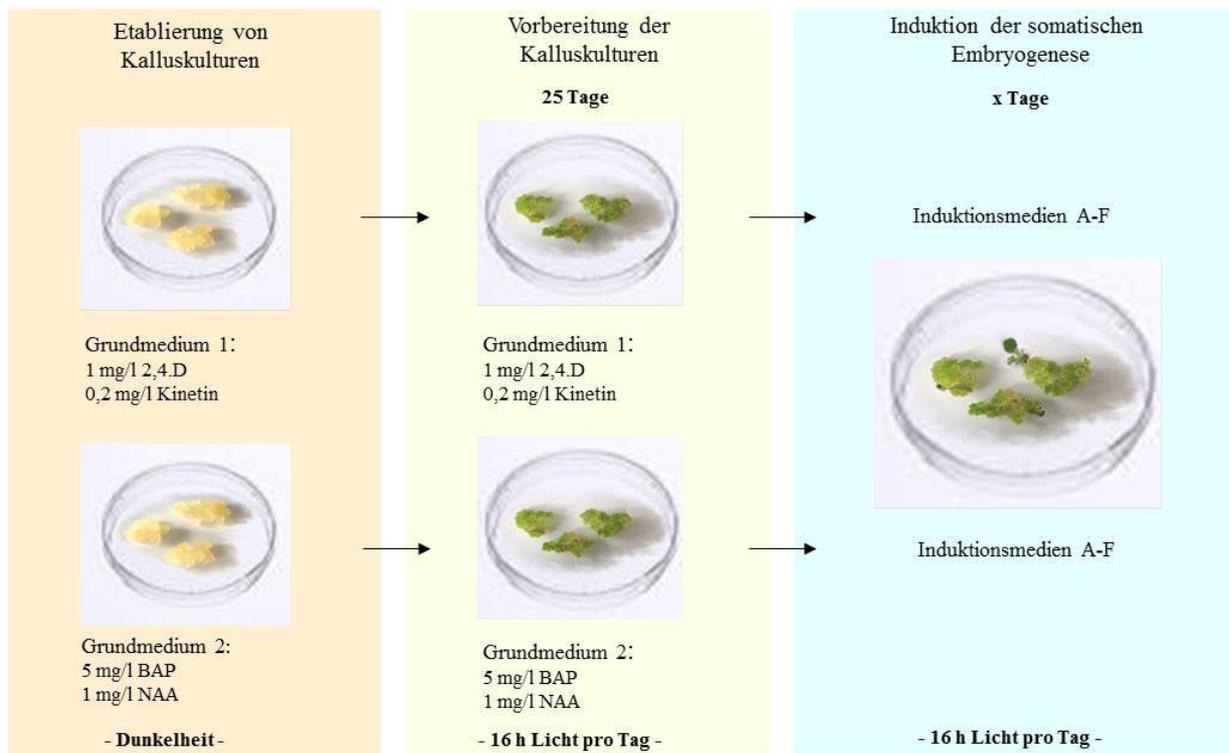


Abbildung 14: Induktion der somatischen Embryonen auf dem indirekten Weg

V Ergebnisse

1. Isolierung von AGPs aus *Pelargonium sidoides*

1.1 Isolierung von AGPs aus dem Wurzel-Extrakt

Die qualitative und quantitative Untersuchung der Polysaccharidfraktion des bei 4°C gewonnenen Extraktes aus der getrockneten Wurzeldroge zeigte mit nur 1,1% eine geringe Ausbeute an Zuckern, was bereits optisch an Hand des nicht weißen, sondern rotbraunen Probenmaterials zu erkennen war. Neben den noch vorhandenen Gerbstoffen in der Fraktion, die durch die nasschemischen Nachweise mit Eisen(III)chlorid (blau-schwarze Färbung) und Vanillin/HCl (rote Färbung) bestätigt wurden, bestand der Zuckeranteil der Probe zu 56,6% aus Glukose und enthielt mit 12,9% und 17,5% nur wenig Arabinose und Galaktose. Das im Anschluss mit Yariv-Reagenz gefällte AGP wies mit 13,6% Arabinose, 19,5% Galaktose und 34,4% Glukose eine ähnliche Monosaccharidzusammensetzung wie das Retentat auf, wobei der Glukoseanteil im AGP 20% niedriger, der Mannoseanteil aber um 17% höher lag als im Retentat. Auch die Ausbeute an Zuckern lag bei nur 5,5% und deutet wiederum darauf hin, dass weitere Bestandteile an das AGP gebunden waren. Neben den oligomeren Proanthocyanidinen, die in der Wurzel von *P. sidoides* enthalten sind, könnte dies auch Stärke sein, was den hohen Anteil an Glukose in der Zuckerfraktion erklären würde.

Tabelle 4: Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Monosaccharide der hochmolekularen Fraktionen (>10.000 Da und >50.000 Da) und des isolierten AGPs

m/m %	Retentat (>10.000 Da)	AGP (aus Retentat >10.000 Da)	Retentat (>50.000 Da)
Ara	12,9	13,6	11,7
Gal	17,5	19,5	13,7
Glc	56,6	34,4	54,6
Rha	4,9	3,2	12,5
Xyl	3,8	8,0	2,5
Man	4,3	21,3	5,0
Fuc	0	0	0
PS-Anteil	1,1	5,5	1,2

Durch eine nachgeschaltete Tangentialflussfiltration mit einem 50.000 Da Filter konnte die Zuckerausbeute von 1,1% lediglich auf 1,2% erhöht werden. Auch die Zusammensetzung der einzelnen Monosaccharide veränderte sich nicht wesentlich im Vergleich mit dem Retentat (>10.000 Da) (Tabelle 4). Aufgrund der geringen Polysaccharid-, Arabinose- und Galaktoseanteile wurde das

Retentat aus der TFF mit dem 50.000 Da Filter in einem Geldiffusionstest auf die Anwesenheit von AGPs untersucht. Die dabei auftretenden konzentrationsabhängigen Präzipitationsbanden des AGP- β -Yariv-Reagenz-Komplexes bestätigten die Anwesenheit von AGPs, wobei aber die Art der Bande eher ringförmig und damit untypisch war (Abbildung 15). Dies könnte am hohen Gerbstoffgehalt in der Probe oder an einer Bindung weiterer Bestandteile an das AGP liegen.

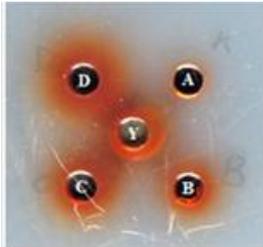


Abbildung 15:

Geldiffusionstest mit der gefriergetrockneten hochmolekularen Fraktion (>50.000 Da) aus dem wässrigen Wurzelextrakt

Retentatkonz.: A) 10 mg/ml, B) 50 mg/ml
C) 100 mg/ml, D) 150 mg/ml

β -Yariv-Reagenz(Y)-Konz.: 1 mg/ml

1.2 Optimierung der Extraktgewinnung

Um den Anteil an Polysacchariden sowie an Arabinose und Galaktose in der hochmolekularen Fraktion zu erhöhen, wurden weitere Extraktionsmethoden durchgeführt. Während der Extraktionen wurden die einzelnen Retentate und teilweise auch Filtrate auf die Anwesenheit von AGPs mittels Geldiffusionstests untersucht. Dabei war zu beachten, dass das Auftreten von Präzipitationsbanden einen positiven AGP-Nachweis darstellte, wohingegen das Nicht-Auftreten von Banden auch an sehr niedrigen AGP-Konzentrationen liegen konnte und kein Beweis für das Fehlen von AGPs war.

1.2.1 Extraktion der getrockneten und frischen Wurzel bei RT

Die Erhöhung der Extraktionstemperatur von 4°C auf Raumtemperatur bei gleichbleibender Extraktionszeit von 12 h zeigte bei der getrockneten Wurzeldroge wieder nur einen geringen Anteil an Zuckern im Retentat, sowie eine ähnliche Verteilung von Arabinose (19,3%) und Galaktose (15,6%) mit einem etwas geringeren Glukoseanteil von 38,2 % (vorher 54,5%) in Bezug auf die Extraktion bei 4°C (Tabelle 5). Die Extraktion der frischen Droge ergab im Gegensatz dazu einen Anteil an Polysacchariden von 36,3%, wobei die Fraktion keine rotbraune Färbung zeigte. Es konnten nur die Anteile von Glukose und Mannose mit 52,0% und 28,6% gesteigert werden, wohingegen die Mengen an Arabinose und Galaktose mit 2,6% und 8,8% deutlich niedriger lagen als bei der getrockneten Wurzel (Ara: 11,6%; Gal: 13,6%). Eine zusätzliche Untersuchung der beiden Retentate im Geldiffusionstest (Abbildung 16) zeigte bei der getrockneten Wurzel zwei diffuse Präzipitationsbanden, die bei der frischen Droge nicht auftraten.

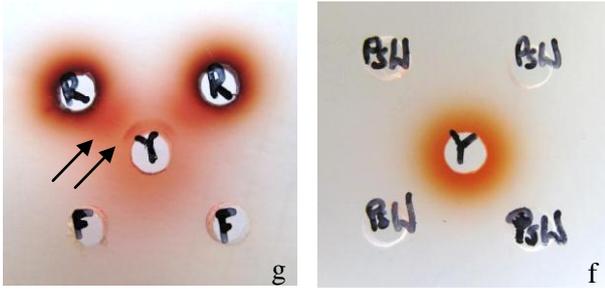


Abbildung 16: Geldiffusionstests

links: Retentat (R) und Filtrat (F) des RT-Extraktes der getrockneten Droge mit zwei unscharfen Banden beim Retentat

rechts: Retentat (PsW) des RT-Extraktes der frischen Wurzel (alle Proben waren flüssig)

Y: β -Yariv-Reagenz: 1 mg/ml

1.2.2 Extraktion der getrockneten und frischen Wurzel bei 50°C

Die einstündige Extraktion der getrockneten und frischen Wurzel bei 50°C für resultierte in Polysaccharid-anteilen von 2,0 % für die getrocknete Droge und 12,8% für die frische Wurzel bezogen auf die hochmolekulare Fraktion. Die Polysaccharidfraktion der getrockneten Wurzel zeichnete sich außerdem durch einen hohen Anteil von Arabinose (20,0%) und Galaktose (31,2%), sowie einen Glukoseanteil von 37,0%. Ähnliche Glukose- und Galaktosemengen (36,1% und 31,0%) zeigte das Retentat der frischen Wurzel, wobei der Arabinoseanteil mit 7,3% um 2/3 niedriger war als bei der getrockneten Droge (Tabelle 5). Im Geldiffusionstest zeigte das Retentat der getrockneten Droge eine schwache Präzipitationsbande, die bei der frischen Droge nicht zu erkennen war (ohne Abbildung).

1.2.3 Extraktion der getrockneten und frischen Wurzel bei 100°C

Die Extraktion der getrockneten Wurzel droge bei 100°C führte das erste Mal mit 12,2% zu Zuckerausbeuten der hochmolekularen Fraktion im zweistelligen Bereich. Dabei machten 7,2% der Polysaccharidfraktion Arabinose und 19,2% Galaktose aus. Mit 60,5% lag der Glukoseanteil sehr hoch. Die Durchführung der Extraktion unter gleichen Bedingungen lieferte bei der frischen Wurzel mit 11,1% vergleichbare Zuckerausbeuten. 11,0% der Zuckerfraktion des Retentates bildete Arabinose, 17,7% Galaktose und 44,1% Glukose. Die Extraktion dauerte 1 h, wobei die Droge in kaltem Aqua bidest. erhitzt wurde. Des Weiteren wurde untersucht, ob eine Extraktion, bei der die Droge direkt in das siedende Wasser gegeben wurde, zu anderen Monosaccharidausbeuten führt. Dieser Versuch wurde mit der frischen Wurzel durchgeführt und lieferte mit 25,1 % einen doppelt so hohen Polysaccharidanteil im Retentat. Der Glukosegehalt stieg von 44,1% auf 72,9%, was für das Vorhandensein von mehr Stärke spricht. Hingegen waren die Anteile an Arabinose mit 2,1% und Galaktose mit 4,7% plötzlich sehr niedrig (Tabelle 5). Im Geldiffusionstest zeigte das Retentat der getrockneten Wurzel ähnlich dem Retentat der Extraktion bei RT zwei Präzipitationsbanden, wobei eine diffus und eine scharf war. Die Probe aus der hochmolekularen Fraktion der frischen Droge zeigte keine Banden, wohingegen der Extrakt der frischen Wurzel, die direkt in das siedende Wasser gegeben wurde, eine Präzipitationsbande lieferte (ohne Abbildung).

1.2.4 Extraktion der getrockneten und frischen Wurzel in Ethanol-Wasser-Mischungen

Die einstündige Extraktion der getrockneten Wurzel in 5%igem Ethanol (EtOH) bei 50°C lieferte mit einem Zuckeranteil von 5,6% der hochmolekularen Fraktion keine verbesserten Ausbeuten. Der Arabinosegehalt lag mit 7,0% niedrig, wohingegen Galaktose mit 30,7% vertreten war. Der Glukosegehalt der Zuckerfraktion betrug 46,2% (Tabelle 5).

Eine Steigerung des Ethanolgehaltes auf 11% (v/v) und eine gleichzeitige Erniedrigung der Extraktionstemperatur auf RT führte bei der getrockneten Wurzel zu Zuckerausbeuten von 0,9% bezogen auf die hochmolekulare Fraktion, mit Anteilen von 10,2% an Arabinose, 13,8% an Galaktose und 65,7% an Glukose. Die Extraktion der frischen Wurzel unter gleichbleibenden Bedingungen führte zu einer geringen Erhöhung der Zuckerfraktion im Retentat (5,5%), welche sich zu 10,1%, 10,0% und 55,3% aus Arabinose, Galaktose und Glukose zusammensetzte (Tabelle 5).

Im Geldiffusionstest zeigten die Retentate der getrockneten Droge beider Extraktionsmethoden jeweils wieder eine scharfe und eine schwächere Bande (Abbildung 17), wohingegen das Retentat der frischen Droge keine Präzitationsbanden aufwies (ohne Abbildung).

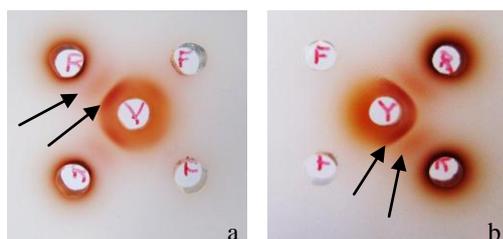


Abbildung 17:

Retentate (R) und Filtrate (F) der Extrakte mit 5% EtOH (a) und mit 11% EtOH (b) der getrockneten Wurzel mit zwei Präzitationsbanden bei den Retentaten (Probenzug erfolgte aus flüssigen Retentaten und Filtraten)

Y: β -Yariv-Reagenz: 1 mg/ml

Tabelle 5: Ergebnisse der gaschromatographischen Untersuchungen der einzelnen hochmolekularen Fraktionen aus verschiedenen Extraktionsansätzen

Retentate (>50.000 Da)			Monosaccharidzusammensetzung in m/m %						
Extraktions-Bedingungen	Droge	PS-Anteil m/m %	Ara	Gal	Glc	Rha	Xyl	Man	Fuc
A. bidest, RT, 12 h	g	1,6	19,3	15,6	38,2	7,6	1,9	3,0	14,4
A. bidest, RT, 12 h	f	36,3	2,6	8,8	52,0	1,6	4,5	28,6	1,9
A. bidest, 50°C, 1 h	g	2,0	20,0	31,2	37,0	7,2	4,6	0	0
A. bidest, 50°C, 1 h	f	12,8	7,3	31,0	36,1	8,3	6,0	10,3	1,0
A. bidest, 100°C, 1 h	g	12,2	7,2	19,2	60,5	9,1	1,1	2,9	0
A. bidest, 100°C, 1 h	f	11,1	11,0	17,7	44,1	0	6,6	20,6	0
A. bidest, 100°C*, 1 h	f	25,1	2,1	4,7	72,9	1,3	0,8	17,9	0,3
5% EtOH, 50°C, 1 h	g	5,6	7,0	30,7	46,2	3,4	6,2	5,5	1,0
11% EtOH, RT, 12 h	g	0,9	10,2	13,8	65,7	5,7	0	4,6	0
11% EtOH, RT, 12 h	f	5,5	10,1	10,0	55,3	9,8	6,0	8,0	0,8

g = getrocknet, f = frisch, * Extraktionszeit begann erst bei siedendem Wasser

1.3 Entfernung der Gerbstoffe

Trotz Variation verschiedener Extraktionsparameter konnte der Anteil an Polysacchariden in der hochmolekularen Fraktion bis auf zwei Ausnahmen nicht auf 20% und mehr gesteigert werden. Zusätzlich war oftmals der Gehalt an Arabinose und Galaktose in der Fraktion gering. Die rötliche Färbung der Retentate sowie der positive Nachweis auf Gerbstoffe mit Eisen(III)chlorid (blauschwarze Färbung, typisch für Catechine und Gallotannine) und Vanillin/HCl (rote Färbung, typisch für Catechin-Gerbstoffe) wiesen auf einen Anteil an wasserlöslichen Gerbstoffen in den Retentaten hin. Aus diesem Grund wurde versucht, die Gerbstoffe aus der hochmolekularen Fraktion (Extraktion bei 4°C und anschließender TFF mit 10.000 Da bzw. 50.000 Da Filter) zu entfernen. Hierbei wurden sechs verschiedene Methoden (siehe IV 1.4.2 und 1.4.3) genutzt, deren Erfolg am Ende an Hand einer gaschromatographischen Untersuchung kontrolliert wurde (Tabelle 6).

Beide Ausgangsretentate hatten mit ca. 1% einen sehr geringen Anteil an Polysacchariden, die zu über 50% (56,6% >10.000 Da und 54,5% >50.000 Da) aus Glukose bestanden. Die Arabinose- und Galaktosemengen lagen in der >10.000 Da Fraktion bei 12,9% und 17,5% sowie in der > 50.000 Da Fraktion bei 11,6% und 13,6% (Tabelle 4). Die Entfernung der Gerbstoffe mittels Fällung mit Blei(II)acetat-Trihydrat führte mit 5,3% nur zu einer geringen Steigerung der Zuckerausbeute und einer ähnlichen Ara-, Gal- und Glc-Zusammensetzung. Die Entfernung der Gerbstoffe über eine Säulenchromatographie mit drei verschiedenen Materialien (Chromabond®PA, Amberlite®FPX66 und Polyamid 6 der Fa. Roth), die polyphenolische Verbindungen adsorbieren, führte zu Zuckerausbeuten von 11,4 bis 22,5% (Tabelle 6). Den größten Zuckergehalt hatte mit 22,5% das mit loseem Chromabond®PA aufgereinigte Retentat, welches zusätzlich einen deutlich geringeren Anteil an Glukose (30,9% statt 54,5%) aufwies. Im Gegensatz dazu, konnte der Anteil an Arabinose und Galaktose auf 17,5% und 26,5% in der Zuckerfraktion gesteigert werden. Ähnliche Werte konnten auch bei der Aufreinigung mit loseem Polyamid der Fa. Roth gefunden werden (Ara: 14,4%, Gal: 25,1%). Der Glukoseanteil lag hier noch einmal niedriger (22,8%), wohingegen der Gehalt an Polysacchariden im Retentat mit 15,2% etwas geringer war.

Tabelle 6: Qualitative und quantitative Zusammensetzung der aufgereinigten Retentate nach den entsprechenden Methoden zur Gerbstoffentfernung

m/m %	>10.000 Da		>50.000 Da		
	BA	Chromabond® PA Katusche	lose	Amberlite® FPX66	PA (R)
Ara	12,3	13,8	17,5	10,8	14,4
Gal	16,8	17,9	26,5	11,0	25,1
Glc	43,9	50,8	30,9	48,9	22,8
Rha	7,0	6,5	13,9	4,6	26,8
Xyl	1,8	2,4	3,2	4,0	4,6
Man	14,9	7,1	6,5	20,7	4,2
Fuc	3,3	1,5	1,5	0	2,1
PS-Anteil	5,3	11,4	22,5	15,8	15,2

BA: Bei(II)acetat-Trihydrat; PA (R): Polyamid 6 der Fa. Carl Roth

Im Anschluss der gaschromatographischen Auftrennung der aufgereinigten und gefriergetrockneten Retentate (jetzt beige statt rotbraun) konnte aufgrund geringer Ausbeuten nur für die durch Polyamid 6 der Fa. Roth bearbeiteten Probe ein Geldiffusionstest zur Überprüfung auf Anwesenheit von AGPs durchgeführt werden. Dabei konnten trotz hoher Probenkonzentrationen (100 mg/ml) keinerlei Präzipitationsbanden detektiert werden (Abbildung 18).

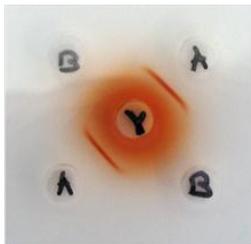


Abbildung 18:

Geldiffusionstest des aufgereinigten Retentates mit Polyamid 6 der Fa. Roth (B) mit AGPs isoliert aus dem Presssaft von *E. purpurea* (A) als Positiv-Kontrolle

Probenkonz.: A) 10 mg/ml

B) 100 mg/ml

β -Yariv-Reagenz (Y) 1 mg/ml

In Anlehnung an die Methode von LE BOURVELLEC et al. 2004 und SCHOETZ et al. 2007 wurden die in der Wurzel enthaltenen Gerbstoffe in 70%igem Aceton und 100%igem Methanol abgetrennt. Diese separate Extraktion lieferte rotbraun gefärbte Extraktionsflüssigkeiten, die auf eine Isolierung der Gerbstoffe hindeutete. Nach zweifacher Extraktion mit Aceton und einfacher Extraktion mit Methanol wurde das pulverisierte Drogenmaterial nach Entfernung des Restlösungsmittels 12 h in Aqua bidest. bei 4°C zur Gewinnung der Polysaccharide bewegungsmazert. Die in 80%igem (v/v) Ethanol gefällten beige gefärbten Polysaccharide bestanden zu 12% aus Zuckern, wobei mit 56,7% Galaktose und 15,8% Glukose die dominierenden Monosaccharide bilden (Tabelle 7). Des Weiteren konnten Arabinose, Rhamnose, Xylose und Mannose in Mengen zwischen 5 und 10% detektiert werden. Fucose wurde nur in Spuren gefunden. Mit nur 12% ist der Polysaccharidanteil in der hochmolekularen Fraktion zwar nicht besonders groß, aber im Geldiffusionstest konnte aufgrund auftretender

Präzipitationsbanden bei Probenkonzentrationen von 50-150 mg/ml die Anwesenheit von mit Yariv-Reagenz fällbaren AGPs bestätigt werden (Abbildung 19).

Tabelle 7: Quantitative Verteilung der Neutralzucker einer ethanolgefällten Polysaccharidfraktion nach vorangegangener Gerbstoffentfernung durch Aceton und Methanol

Extraktionsbedingungen	Droge	PS-Anteil m/m %	Monosaccharidzusammensetzung in m/m %						
			Ara	Gal	Glc	Rha	Xyl	Man	Fuc
A. bidest, 4°C, 12 h (vorher 70% Aceton)	g	12,01	6,1	56,7	15,8	8,1	7,3	5,0	1,0

g = getrocknet



Abbildung 19:

Geldiffusionstest der hochmolekularen Fraktion

Retentatkonz.: A) 10 mg/ml

B) 50 mg/ml

C) 100 mg/ml

D) 150 mg/ml

β -Yariv-Reagenz (Y)-Konz.: 1 mg/ml

1.4 Isolierung von AGPs aus verschiedenen Extrakten

Aufgrund schlechter Ausbeuten, sowie dem negativen Geldiffusionstest, wurde die Weiterarbeit an den durch Gerbstoffentfernung (Fällung und Adsorption an Säulenmaterialien) aufgereinigten ersten fünf Extrakten beendet. Einzig der Ansatz mit der vorgeschalteten separaten Entfernung der Gerbstoffe mittels organischer Lösungsmittel schien durch seinen positiven Geldiffusionstest vielversprechend, sodass eine Isolierung des AGPs erfolgte.

Die Untersuchung der Neutralzuckeranteile (siehe Tabelle 8) des noch immer braun gefärbten AGPs ergab Anteile von 40,7% und 14,2% für Galaktose und Arabinose bei einem AGP, das nur zu 16% aus Zuckern bestand. Weiterhin waren mit ca. 25% noch große Mengen an Glukose sowie Mannose und Rhamnose in Anteilen um die 10 % zu finden. Neben Spuren von Fucose und Xylose zeigt die Analytik der Neutralzucker, dass eine weitere Aufarbeitung des AGPs nötig ist, was aber nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit dargestellt wird. Dies bestätigte auch die Größenbestimmung des AGPs per GPC (ohne Abbildung), die für das rotbraune AGP ein absolutes Molekulargewicht von ca. $341 \pm 31,3$ kDa ermittelte und damit auf eine wahrscheinliche Komplexierung des AGPs mit Gerbstoffen oder auch Stärke deutet.

Tabelle 8: AGP-Zusammensetzung nach einfacher Yarivfällung aus der Polysaccharidfraktion

Extraktions- bedingungen	Droge	PS-Anteil m/m %	Monosaccharidzusammensetzung in m/m %						
			Ara	Gal	Glc	Rha	Xyl	Man	Fuc
A. bidest, 4°C, 12 h (vorher 70% Aceton)	g	16,0	14,2	40,7	24,9	7,7	1,8	10,3	0,4

g = getrocknet

Neben der Isolierung des AGPs aus dem mit Aceton und Methanol vorbehandelten Drogenmaterial wurde versucht, AGPs mittels Fällung mit β -Yariv-Reagenz aus ausgesuchten hochmolekularen Fraktionen mit Zuckeranteilen von über 10% zu isolieren und deren Aufreinigung zu optimieren. Es wurden die Retentate der 100°C Extraktion von frischer und getrockneter Wurzel verwendet und im Anschluss an die Yariv-Fällung die isolierten AGPs gaschromatographisch aufgetrennt (Tabelle 9).

Das AGP aus dem Retentat der getrockneten Droge bestand zu 29,0% aus Zuckern mit Anteilen von 4,7%, 11,1% und 78,8% an Arabinose, Galaktose und Glukose. Im Gegensatz dazu hatte das aus der frischen Wurzel gewonnene AGP mit 15,5% einen um die Hälfte geringeren Zuckeranteil, wobei 7,3% Arabinose und 10,5% Galaktose ausmachten. Der Anteil an Glukose lag mit 56,9% um 1/3 niedriger als im AGP aus der getrockneten Droge, wohingegen der Mannosegehalt mit 24,2% (getrocknet: 2,2%) deutlich erhöht war (Tabelle 9). Das AGP aus dem getrockneten Wurzelextrakt hatte mit 29,0% einen höheren Zuckergehalt und sollte für weitere Aufreinigungen verwendet werden.

Tabelle 9: AGP-Zusammensetzung nach einfacher Yarivfällung aus verschiedenen Retentaten

AGP	Extraktions- bedingungen	Droge	PS-Anteil m/m %	Monosaccharidzusammensetzung in m/m %						
				Ara	Gal	Glc	Rha	Xyl	Man	Fuc
	A. bidest, 100°C, 1 h	g	29,0	4,7	11,1	78,7	2,6	0,8	2,1	0
	A. bidest, 100°C, 1 h	f	15,5	7,3	10,5	56,9	0,7	0,2	24,2	0,2

g = getrocknet, f = frisch

1.5 Aufreinigung von isolierten AGPs

1.5.1 Erste Schritte der AGP-Aufreinigung

Das noch immer rotbraune AGP aus dem Extrakt der getrockneten Wurzel droge stellte den Ausgangspunkt für weitere Aufreinigungsschritte dar.

Zuerst wurde das AGP mit Eisen(III)chlorid versetzt, wobei die auftretende blau-graue Färbung ein Hinweis auf vorhandene Gerbstoffe, speziell Gallotannine im AGP war. Des Weiteren wurde ein Geldiffusionstest durchgeführt, um auszuschließen, dass Reste des β -Glc-Yariv-Reagenzes an das AGP gebunden sind. Die rotbraune Färbung des AGPs sowie der hohe Gehalt an Glukose in der Zuckerfraktion waren Indizien dafür. Das Fehlen von Präzipitationsbanden im Geldiffusionstest bestätigte diese Vermutung, sodass im ersten Aufarbeitungsschritt (A) die AGP-Lösung mit 10 g Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$) versetzt und im Anschluss die Lösung zur Abtrennung von Yariv-Resten fünf Tage dialysiert wurde. Dieser Schritt brachte keine deutliche Verringerung des Glukoseanteiles mit sich. Auch die Zusammensetzung der restlichen Neutralzucker änderte sich nicht (Tabelle 10 - A), jedoch konnten in einem im Anschluss durchgeführten Geldiffusionstest Präzipitationsbanden detektiert werden.

In einem weiteren Schritt (B) wurde das gefriergetrocknete AGP nach Aufreinigung (A) 17 h lang mit 90%igem (v/v) Ethanol versetzt. Hochmolekulare Polysaccharide blieben gefällt, wohingegen vorhandene Monosaccharide in Lösung gingen. Die gaschromatographische Untersuchung des zentrifugierten Rückstandes zeigte keine Veränderungen in der Monosaccharidzusammensetzung (Tabelle 10 - B).

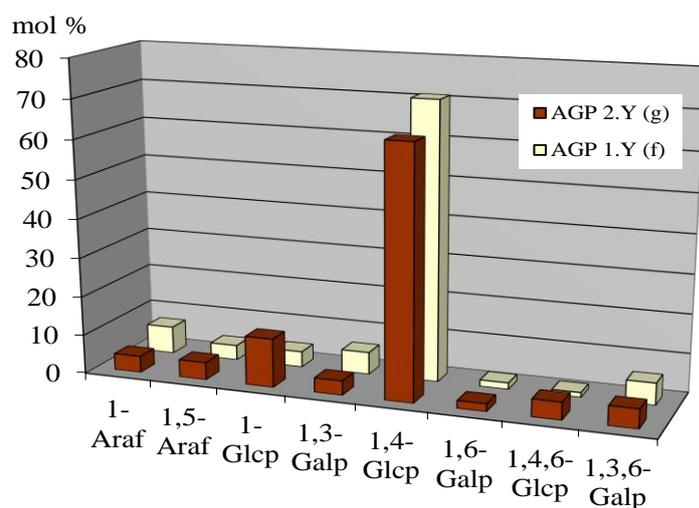
Im nächsten Schritt (C) wurde das aufgearbeitete AGP (A) einer weiteren Yarivfällung unterzogen. Dieser Schritt führte bei AGPs aus Hafer und Weizen (GOELLNER et al. 2010 und 2011) zu reineren AGPs mit geringen Anteilen an Begleitmonosacchariden. Mit 7,4% Arabinose und 14,6% Galaktose konnte der Anteil dieser Monosaccharide leicht erhöht werden. Die restliche Zusammensetzung zeigte keine Änderungen (Tabelle 10 - C). Der weiterhin hohe Anteil an Glukose (74,5%) könnte auf eine Verunreinigung mit Stärke hinweisen, die mit Hilfe der durchgeführten Methoden nicht vom AGP abtrennbar war. Dies wurde mit Hilfe einer Methylierungsanalyse untersucht, die mit dem zweifach yarivgefälltem AGP aus dem Extrakt der getrockneten Wurzel sowie dem einfach gefällten AGP isoliert aus dem Extrakt der frischen Wurzel (beide Extrakte bei 100°C gewonnen) durchgeführt wurde.

Tabelle 10: Zusammensetzung der AGPs nach ersten Aufreinigungsschritten

AGP	Monosaccharidzusammensetzung in m/m %							
Aufarbeitungen	PS-Anteil m/m %	Ara	Gal	Glc	Rha	Xyl	Man	Fuc
<u>Ausgangspunkt:</u>								
einfache Yarivfällung	29,0	4,7	11,1	78,7	2,6	0,8	2,1	0
A + Na ₂ O ₄ S ₂ , Dialyse	25,6	5,6	12,6	75,3	2,8	1,1	2,3	0,3
B + 90%igen EtOH	22,1	6,5	11,5	77,2	1,6	0,8	2,4	0
C Zweite Yarivfällung	25,4	7,4	14,6	74,5	1,8	0,6	1,1	0

1.5.2 Bindungstypanalyse zweier AGPs aus 100°C-Extrakten

Die Analyse der Bindungstypen in beiden AGPs (g: aus getrockneter Droge, f: aus frischer Droge) ergab mit 1-Araf, 1,5-Araf, 1,3-Galp, 1,6-Galp und 1,3,6-Galp die typischen Bindungselemente eines AGPs. Der Anteil dieser AGP-Bestandteile an der Probe war mit ca. 20% klein. Die restlichen Verknüpfungselemente wurden durch 1-Glcp, 1,4-Glcp und 1,4,6-Glcp gebildet. Dabei machte 1,4-Glcp mit 63,8% im AGP (g) und mit 71% im AGP (f) den Großteil der Glucose aus (Abbildung 20). Die Verteilung der einzelnen Glucoseelemente ist typisch für Stärke, die mit 20-30% Amylose und 70-80% Amylopektin hauptsächlich aus linear 1,4 verknüpfter Glucose besteht, sowie im Falle von Amylopektin zusätzliche 1,6-Verknüpfungen aufweist.



mol %	AGP 2.Y	AGP 1.Y
1-Araf	4,2	7,0
1,5-Araf	4,5	3,8
1-Glcp	12,4	4,0
1,3-Galp	3,7	5,7
1,4-Glcp	63,8	71,0
1,6-Galp	2,0	1,7
1,4,6-Glcp	4,5	1,2
1,3,6-Galp	4,9	5,6

Abbildung 20: Quantitative Verteilung der Bindungstypen der beiden untersuchten AGPs

1.5.3 Entfernung der an das AGP gebundenen Stärke

Die mit Hilfe der Methylierungsanalyse nachgewiesene Stärke als Bestandteil des isolierten AGPs wurde mit einer α -Amylase behandelt. Die AGP-Lösung wurde 16,5 h mit der Endo-Amylase, die α -1,4-glukosidische Bindungen spaltet, inkubiert, das Enzym denaturiert und am Ende fünf Tage zur Entfernung der abgespaltenen Glukosestücke dialysiert (A). Anhand der gaschromatographischen Untersuchung des gefriergetrockneten Produktes konnten keine deutlichen Veränderungen in der Monosaccharidzusammensetzung festgestellt werden. Der Glukosegehalt sank von 74,5% auf lediglich 70,0% ab (Tabelle 11 - A).

Für eine Inkubation des AGPs mit α -Amylase im Überschuss, falls die unter A verwendete Menge an Enzym nicht ausreichend war, musste aufgrund von AGP-Mangel zuerst eine neue Extraktion und im Anschluss eine einfache Yarivfällung zur AGP-Isolierung durchgeführt werden. Dabei führte die Inkubation von α -Amylase im Überschuss zu einer Verringerung des Glukoseanteils von 70,0% auf 50,4% (Tabelle 11 - B). Durch anschließendes zehnmütiges Kochen einer AGP-Lösung aus B wurde getestet, ob Stärke in Lösung geht und diese dann durch Zentrifugation abgetrennt werden kann (C). Diese Behandlung führte zwar zu einer Erhöhung des Zuckeranteils von nur 11,6% auf 19,1%, hatte sonst aber keinen Einfluss auf die Monosaccharidverteilung (Tabelle 11 - C). Durch eine zusätzliche Yarivfällung aus (C) konnte das AGP nicht weiter aufgereinigt werden. Der Anteil an Glukose stieg wieder von 52,9% auf 68,2% an, wohingegen sich die Anteile an Arabinose und Galaktose verringerten (Tabelle 11 - D).

Tabelle 11: Zusammensetzung der AGPs nach verschiedenen Methoden zur Stärkeentfernung

AGP		Monosaccharidzusammensetzung in m/m %							
Aufarbeitungen	PS-Anteil m/m %	Ara	Gal	Glc	Rha	Xyl	Man	Fuc	
<u>Ausgangspunkt:</u>									
	Zweite Yarivfällung	25,4	7,4	14,6	74,5	1,8	0,6	1,1	0
A	α -Amylase	25,3	7,3	16,8	70,0	3,0	0,9	2,0	0
<u>Ausgangspunkt:</u>									
<u>2. Extraktion</u>									
	Einfache Yarivfällung	14,2	7,1	15,9	70,0	3,4	0,8	2,8	0
B	α -Amylase im Überschuss	11,6	11,9	20,4	50,4	6,1	4,1	6,5	0,6
C	B 10 min bei 100°C	19,1	11,3	28,2	52,9	3,5	1,5	2,6	0
D	2. Yarivfällung aus C	21,9	7,7	18,3	68,2	2,9	0,7	2,2	0

1.5.4 Abtrennung der Gerbstoffe vom AGP

Die im positiven Eisen(III)chlorid-Test bestätigten Gerbstoffe sollen von den AGPs abgetrennt werden, wobei angenommene Wasserstoffbrückenbindungen der Gerbstoffe an das AGP sowie hydrophobe Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle spielten.

Wie unter V 1.5.1 aufgezeigt, wurde versucht, Gerbstoffe, insbesondere Gallotannine, in Ethanol-Wasser-Mischungen in Lösung zu bringen. AGPs sind in 90%igem (v/v) Ethanol nicht löslich, Gallotannine schon. Die Abtrennung der in Lösung gegangenen Gerbstoffe sollte in einer Erhöhung des Polysaccharidanteils im AGP resultieren, was wie Tabelle 10 - B zeigt, nicht der Fall war.

Aus diesem Grund wurde ein zweifach yarivgefälltes AGP (isoliert aus 100°C Retentat der getrockneten Wurzel Droge) mit Strukturbrechern, die in hohen Konzentrationen Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zerstören, inkubiert. Dabei führte die Behandlung mit 2 M NaCl zur größten Zuckerausbeutensteigerung (von 25,4 auf 56,9%), wobei sich die Zusammensetzung der Monosaccharide nicht änderte. Der eigentlich stärkere Strukturbrecher Guanidinium-HCl, der in einer Konzentration von 10 M eingesetzt wurde, führte zwar auch zu einer Erhöhung des Zuckeranteils, dieser lag mit 37,9% aber unter dem von NaCl (Tabelle 12 - A und B). Die „gerbstoffbefreiten“ AGPs zeigten positive Präzipitationsbanden im Geldiffusionstest, waren aber weiterhin bräunlich gefärbt. Es stellte sich deshalb die Frage, ob ausreichend freigesetzte Gerbstoffe in der Dialyse abgetrennt werden können oder ob der Strukturbrecher schneller dialysiert wird und sich somit die Bindungen zwischen AGP und Gerbstoff wieder ausbilden. Dies wurde mit zwei AGP-Lösungen untersucht, wobei eine mit 10 M Harnstoff (Urea) und die andere mit 10 M Guanidinium-HCl versetzt wurde. Im Anschluss erfolgte eine Fällung in 80%igem (v/v) Ethanol, um die „freien“ AGPs auszufällen. Dabei war optisch schon zu erkennen, dass der Niederschlag eine rotbraune Färbung hatte und somit verwundert einen auch nicht der niedrige Zuckeranteil von 23,8% (Tabelle 12 - C) für das mit Urea behandelte AGP.

Tabelle 12: Monosaccharidverteilung und Zuckeranteile der mit Strukturbrechern aufgereinigten AGPs

AGP		Monosaccharidzusammensetzung in m/m %							
Aufarbeitungen	PS-Anteil m/m %	Ara	Gal	Glc	Rha	Xyl	Man	Fuc	
<u>Ausgangspunkt:</u>									
	Zweite Yarivfällung	25,4	7,4	14,6	74,5	1,8	0,6	1,1	0
A	2 M NaCl	56,9	7,5	14,0	78,5	0	0	0	0
B	10 M GHCl	37,9	3,7	8,1	85,1	1,3	0,5	1,3	0
C	10 M Urea + EtOH	23,8	8,6	19,7	64,4	4,0	1,0	2,3	0

Um die in den nasschemischen Nachweisen bestätigten Gerbstoffe genauer zu identifizieren, wurde eine ^{13}C -NMR-Spektroskopie des zweifach yariivgefällten AGPs durchgeführt. Problematisch dabei war die schlechte Löslichkeit des AGPs in D_2O , die auch durch Wärme- und Ultraschallbehandlung nicht verbessert werden konnte. Neben diesem Löslichkeitsproblem lieferte die Probe zu hochmolekulare Signale, die die Auswertung der Spektren unmöglich machten. Aus diesem Grund wurde das gleiche AGP nach einstündiger Hydrolyse in 2 M TFA bei 121°C und anschließendem dreimaligen Waschen mit Aqua bidest. in D_2O aufgenommen und wiederholt in der ^{13}C -NMR vermessen. Trotz Ultraschall und Wärme war auch diesmal die Löslichkeit gering, sodass Spektren mit einem hohen Grundrauschen detektiert wurden. Die einzelnen C-Atome der entsprechenden Monosaccharide konnten teilweise im Bereich zwischen 60 und 100 ppm identifiziert werden. Bestandteile von Gerbstoffen wie Gallussäure und Catechin (im Bereich von 110-120 ppm) konnten nicht identifiziert werden (Abbildung 21).

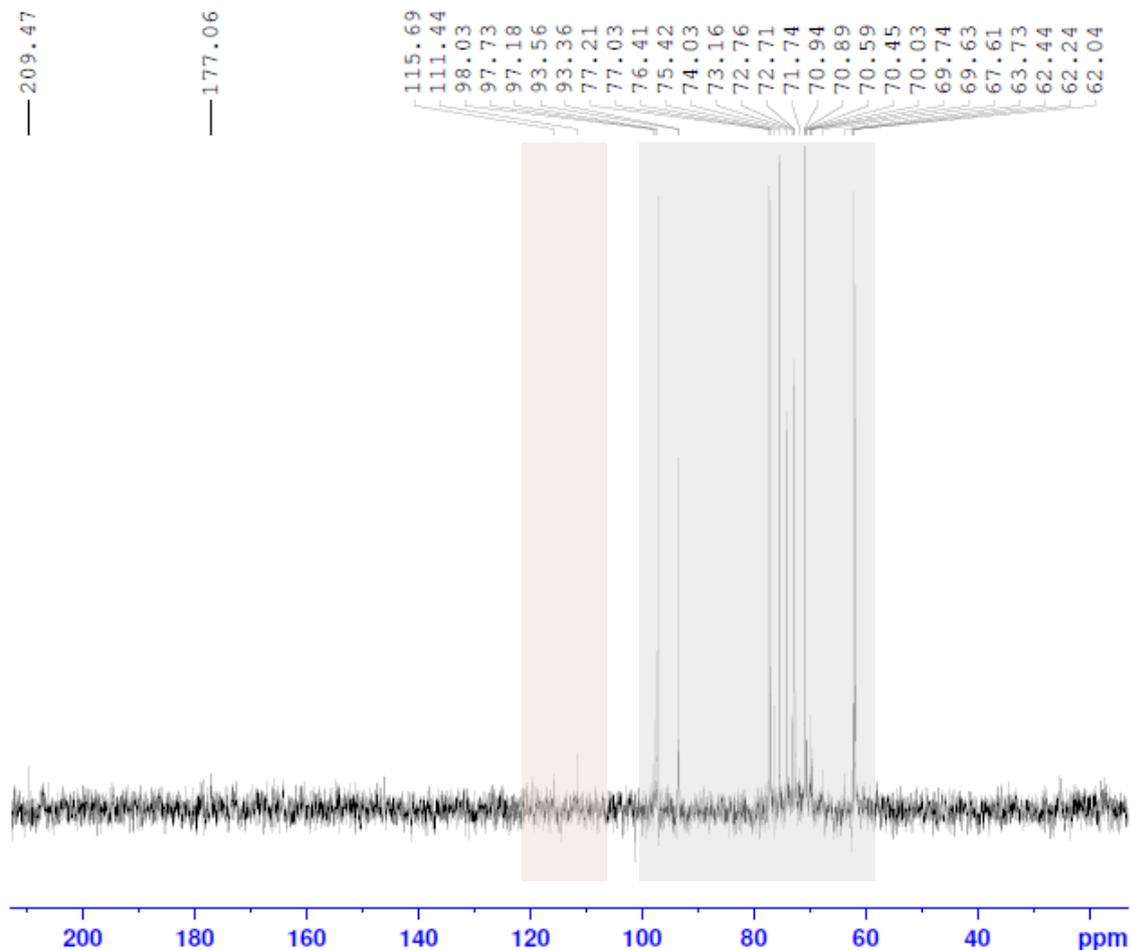


Abbildung 21: ^{13}C -NMR-Spektrum von einem zweifach gefälltem AGP aus dem 100°C -Extrakt der getrockneten Wurzel; grau: typische Signale der Monosaccharid C-Atome, rosa: hier sollten deutliche Signale für das Vorhandensein von Gerbstoffen liegen

1.6 Untersuchungen am Wurzelschnitt

Die unter V 1.5.2 identifizierte Stärke im AGP-Molekül sollte aufgrund der Abtrennungsprobleme vom AGP einmal genauer am Pflanzenschnitt betrachtet werden. Hierfür wurden zunächst Wasserpräparate frischer *Pelargonium sidoides*-Wurzeln hergestellt, die unter dem Lichtmikroskop untersucht wurden (Abbildung 22).

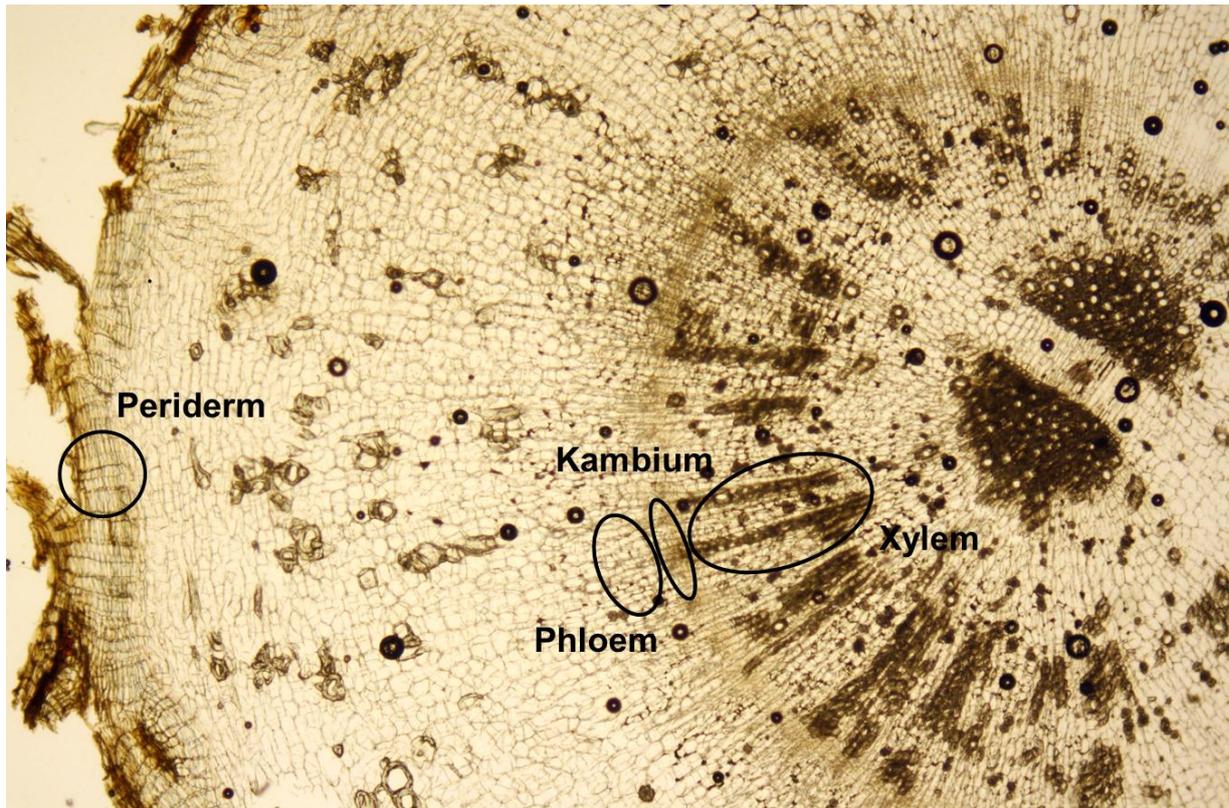


Abbildung 22: Wasserpräparat der *P. sidoides*-Wurzel (Ø 7 mm)

Im Querschnitt der *Pelargonium*-Wurzel sind der Zentralzylinder mit seinen sehr breiten Markstrahlen, die xylematischen und phloematischen Bereiche sowie ein ausgeprägtes Periderm zu erkennen. Daneben konnten Rindenparenchymzellen mit einem auffällig großen Durchmesser sowie Oxalatdrüsen, Steinzellen und kleinkörnige Stärke beobachtet werden. Die im Polarisationsfilter sichtbare und im Rindenparenchym lokalisierte Stärke war nicht ohne weiteres mit Iodkaliumiodidlösung anfärbbar. Erst nach einigen Stunden konnten violett bis schwarz gefärbte Stärkekörner an eingerissenen Gewebestrukturen beobachtet werden (Abbildung 23 a). Des Weiteren reduzierten eine zehnmütige und eine fünfstündige (Abbildung 23 c und d) Behandlung mit α -Amylase den Anteil an Stärkekörnern im Schnitt nicht. Dies bestätigt die Besonderheit der Stärke in der Wurzel. Neben Stärke als Speicherpolysaccharid konnte auch Callose (Abbildung 23 b) im parenchymatischen Bereich des Wurzelschnittes mit Hilfe einer Resorcinblaufärbung identifiziert werden.

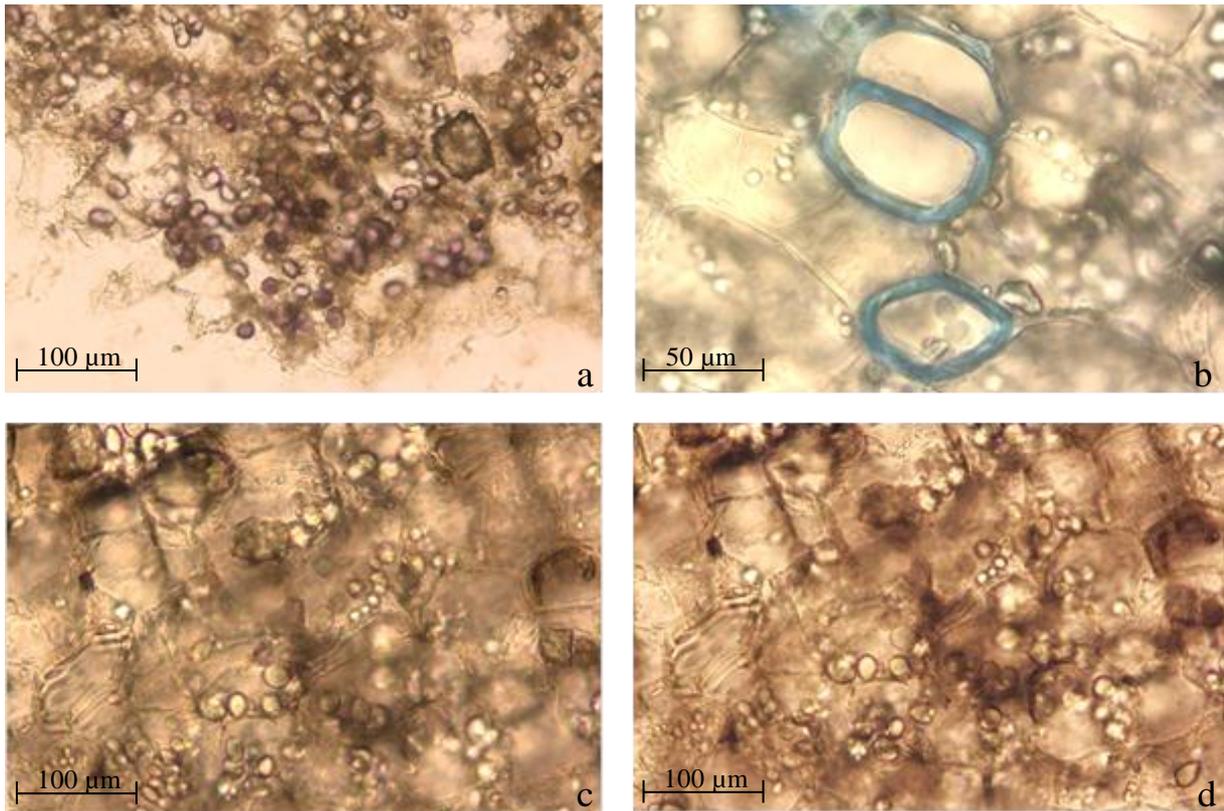


Abbildung 23: Ausschnitte aus dem parenchymatischen Bereich der Rinde
a) Iodkaliumiodidfärbung nach 4 h Einwirkzeit
b) blaugefärbte Callose in Zellwänden der *Pelargonium sidoides*-Wurzel
c) 10 minütige Behandlung des Wurzelschnittes mit α -Amylase
d) 5 stündige Behandlung des Wurzelschnittes mit α -Amylase

2. Etablierung von *Pelargonium sidoides*-Zellkulturen

2.1 Kalluskulturen - Vergleich diverser Nährmedien

Um möglichst schnell wachsendes, helles und weiches Kallusgewebe zu etablieren, wurden Kulturansätze mit verschiedenartigen Zusätzen zu einem Standardmedium (MURASHIGE & SKOOG 1962) angefertigt. Der Einfluss verschiedener Phytohormone wie der Auxine 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und Naphthylessigsäure (NAA) sowie der Cytokinine Kinetin und Benzylaminopurin (BAP) auf das Kalluswachstum wurde in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen untersucht.

Die Verwendung von 0,4 mg/l 2,4-D als Phytohormon, welches das Streckenwachstum fördert, erzeugte lebensfähige, aber sehr dunkel gefärbte Kalluskulturen. Da diese Kalluskulturen nur sehr langsam wuchsen, wurde die 2,4-D-Konzentration auf 1 mg/l erhöht und mit Kinetin, einem zweiten Phytohormon, zur Steigerung der Zellteilungsrate, ergänzt. Die Kombination von 1 mg/l 2,4-D und 0,2 mg/l Kinetin als Phytohormone führte zur gewünschten Wachstumssteigerung, erzeugte aber weiterhin Kalli mit dunklen Ablagerungen. Die parallel dazu laufende Testung von 5 mg/l BAP und 1 mg/l NAA als Phytohormonkombination führte zu einem vergleichbaren Zellwachstum, erzeugte aber harte, trockene Kalli mit verstärkten braunen Ablagerungen. Diese Ausscheidungen, vermutlich phenolischen Ursprungs, sind toxisch für die Zellen und äußern sich in einem verringerten Kalluswachstum. Um die phenolischen Ablagerungen zu minimieren, wurde das Nährmedium mit je 50 mg/l Ascorbin- und Citronensäure versetzt und der Umsetzungsrhythmus der Kalli auf alle zwei Wochen verringert. Nach ca. drei Monaten führte diese Methode zum gewünschten Erfolg und erzeugte helle, lebensfähige Kalli, die von nun an nur noch einmal pro Monat auf ein neues Medium überführt werden mussten. Dabei stellten die Kalli der Phytohormonkombination BAP und NAA mit einer Größe von 3 cm (Ø) pro Monat die am schnellsten wachsenden Gewebe dar, die nur noch selten kleine braune Ablagerungen trugen, jedoch bröckelig trocken waren. Die Kulturen der Kombination 2,4-D und Kinetin waren hingegen durchgehend weich und stellten somit die optimale Erhaltungskultur dar (Tabelle 13).

Die oben beschriebenen Untersuchungen der Kallusgewebe erfolgten sowohl an Wurzel- als auch an Sprosskulturen, wobei keine Unterschiede zwischen beiden zu beobachten waren. Die Unterscheidung zwischen Wurzel- und Sprosskultur beruht auf der Produktion von Wurzel- und Sprosskeimlingen aus den Samen von *P. sidoides* (siehe Abbildung 24) zu Beginn der Arbeit, wodurch in allen folgenden Kultivierungsansätzen zwischen den beiden Grundgeweben (W und S) unterschieden wird.



Abbildung 24:

**Keimende *Pelargonium sidoides*-Samen
mit Spross- und Wurzelkeimlingen**

(Mitte: Sprosskeimling, unten: Wurzelkeimling)

Neben dem Einsatz von Ascorbin- und Citronensäure zur Unterdrückung der phenolischen Ausscheidungen wurde das bereits zur Entfernung von Gerbstoffen bei den Wurzelextrakten eingesetzte Polyamid 6 als Nährmediumszusatz untersucht. Das beim Gießen der Agarplatten ausfallende Polyamid verhinderte in allen drei untersuchten Konzentrationen (0,2; 0,5 und 1 g/100 ml Nährmedium) das Auftreten phenolischer Ablagerungen in den Kulturen mit 1 mg/l 2,4-D und 0,2 mg/l Kinetin. Das sehr weiche und helle Kallusgewebe hatte dabei eine dem 2,4-D in Kombination mit Kinetin vergleichbare Wachstumsgeschwindigkeit (Tabelle 13).

Tabelle 13: Wachstumsbeobachtungen der Kallusgewebe verschiedener Nährmedien

MS-Grundmedium +			Eigenschaften der Kalli			
Foto	Phytohormone	sonstige Zusätze	Größe (Ø) in cm	Farbe	Gewebe	v
	0,4 mg/l 2,4-D		1	braune Ablagerungen	weich	+
	0,4 mg/l 2,4-D	Je 50 mg/l A + C	1	hell	weich	+
	1 mg/l 2,4-D 0,2 mg/l Kinetin		2	braune Ablagerungen	weich	++
	1 mg/l 2,4-D 0,2 mg/l Kinetin	Je 50 mg/l A + C	2	hell	weich	++
	5 mg/l BAP 1 mg/l NAA		2	braune Ablagerungen	trocken hart	++
	5 mg/l BAP 1 mg/l NAA	Je 50 mg/l A + C	3	kaum braune Ablagerungen	trocken hart	+++
	1 mg/l 2,4-D 0,2 mg/l Kinetin	0,2 g/100 ml PA 6	2	hell	weich	++
	1 mg/l 2,4-D 0,2 mg/l Kinetin	0,5 g/100 ml PA 6	2	hell	weich	++
	1 mg/l 2,4-D 0,2 mg/l Kinetin	1 g/100 ml PA 6	2	hell	weich	++

2,4-D: 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, A: Ascorbinsäure, C: Citronensäure, BAP: Benzylaminopurin, NAA: Naphthylessigsäure, PA 6: Polyamid 6

v: Wachstumsgeschwindigkeit der Kalluskulturen: + (langsam), ++ (mittel), +++ (schnell)

2.2 Suspensionskulturen - Vergleich verschiedener Nährmedien

Ähnlich den Kalluskulturen wurden auch Suspensionskulturen mit verschiedenen Phytohormonkombinationen und Ascorbin- und Citronensäure (A+C) untersucht. Aus Kalluskulturen mit 0,4 mg/l 2,4-D (D), mit 1 mg/l 2,4-D und 0,2 mg/l Kinetin (D+K) sowie mit 5 mg/l BAP und 1 mg/l NAA (B+N) wurden Flüssigkulturen angelegt und hinsichtlich ihres Wachstums und der Farbe der Zellkultur untersucht. Dabei wuchsen alle drei Kulturansätze vergleichbar gut und bildeten nach drei Wochen eine Suspension mittlerer Viskosität, die nur bei BAP und NAA dunkler gefärbt war (siehe Abbildung 25 - links). Zusätzlich wurde neben der Kultur mit 0,4 mg/l 2,4-D und Ascorbin- und Citronensäure eine Kultur mit nur 0,4 mg/l 2,4-D angelegt und auch diese in Hinblick auf ihr Wachstum untersucht. Die zwar dunkler gefärbte Suspension bildete im gleichen Zeitraum wie die Vergleichskultur eine entsprechend viskose Zellsuspension (siehe Abbildung 25 - rechts).

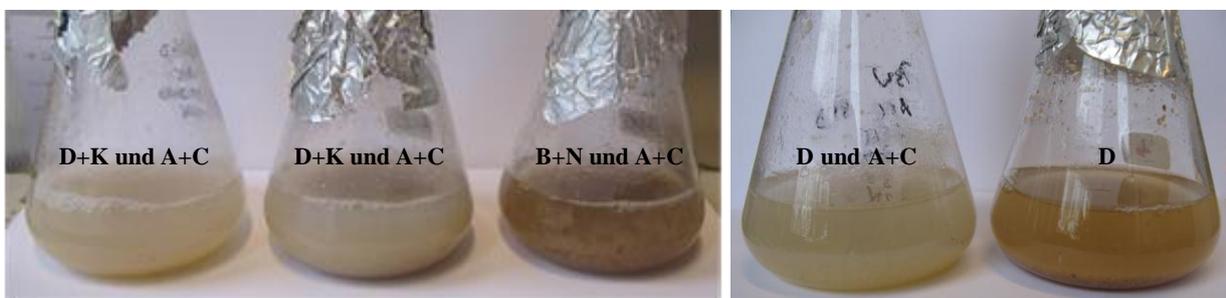


Abbildung 25: Suspensionskulturen mit verschiedenen Phytohormonzusätzen
links: Kolben rechts mit B+N und A+C, Kolben Mitte und links mit D+K und A+C
rechts: beide Kolben mit 0,4 mg/l 2,4-D; linker Kolben enthielt zusätzlich A+C

Die mikroskopische Untersuchung der Zellsuspension zeigte runde, wurstchenartige Zellen ohne differenziertes Gewebe, die sich in den einzelnen Kulturansätzen nicht voneinander unterschieden (Abbildung 26).

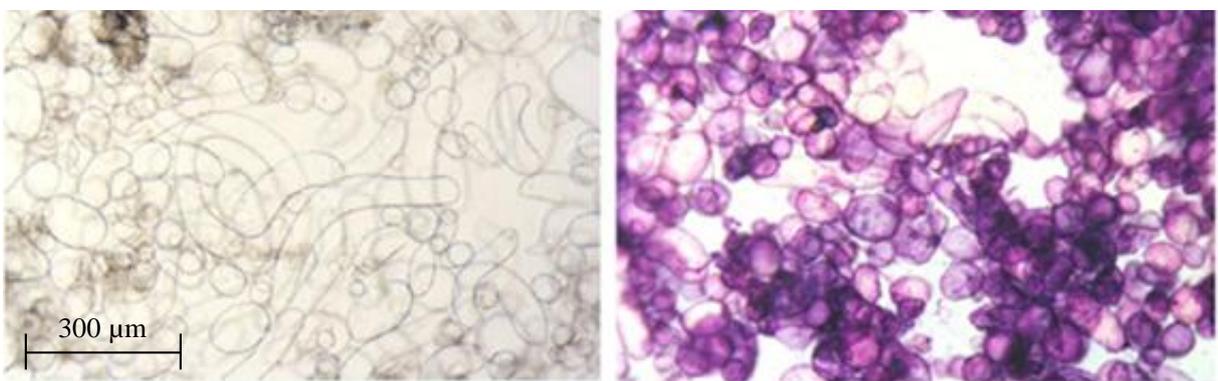


Abbildung 26: Kugelförmige und „wurstchenartige“ Zellen einer 3 Wochen alten Suspensionskultur mit 2,4-D und Kinetin sowie Ascorbin- und Citronensäure
rechts: Wasserpräparat, links: Färbung mit Toluidinblau (alle Zellen sind undifferenziert)

Neben der mikroskopischen Beobachtung der Zellen und der Beurteilung des Zellwachstums wurden die in das Nährmedium sezernierten Polysaccharide untersucht. Dabei wurde nicht nur die unterschiedliche Zusammensetzung der Nährmedien betrachtet; auch der Einfluss des Ursprungsgewebes spielte eine Rolle: von Spross- und Wurzelkeimlingen angelegte Kalluskulturen wurden auch weiterhin in den Flüssigkulturen voneinander getrennt.

Dabei zeigten die durch Ethanol-fällung isolierten Polysaccharide der Kultivierungen mit 0,4 mg/l 2,4-D und 1 mg/l 2,4-D in Kombination mit 0,2 mg/l Kinetin keine signifikanten Unterschiede in der qualitativen und quantitativen Verteilung ihrer Neutralzucker. Die dominierenden Monosaccharide waren mit ca. 45% Galaktose, mit ungefähr 25% Arabinose und mit ca. 10-30% Glukose. Daneben waren sowohl 10% Xylose, 3-5% Rhamnose und Mannose, sowie Spuren von Fucose zu finden (Abbildung 27). Im Gegensatz dazu bildeten Glukose und Galaktose mit ca. 35% und 30% eine ähnlich große Fraktion in den isolierten Polysacchariden des Kulturansatzes mit Benzylaminopurin und Naphthylelessigsäure. Auch Arabinose und Xylose bildeten mit fast 15% eine gleich große Fraktion, neben der noch jeweils 3% an Rhamnose, Fucose und Mannose zu finden waren (Abbildung 27).

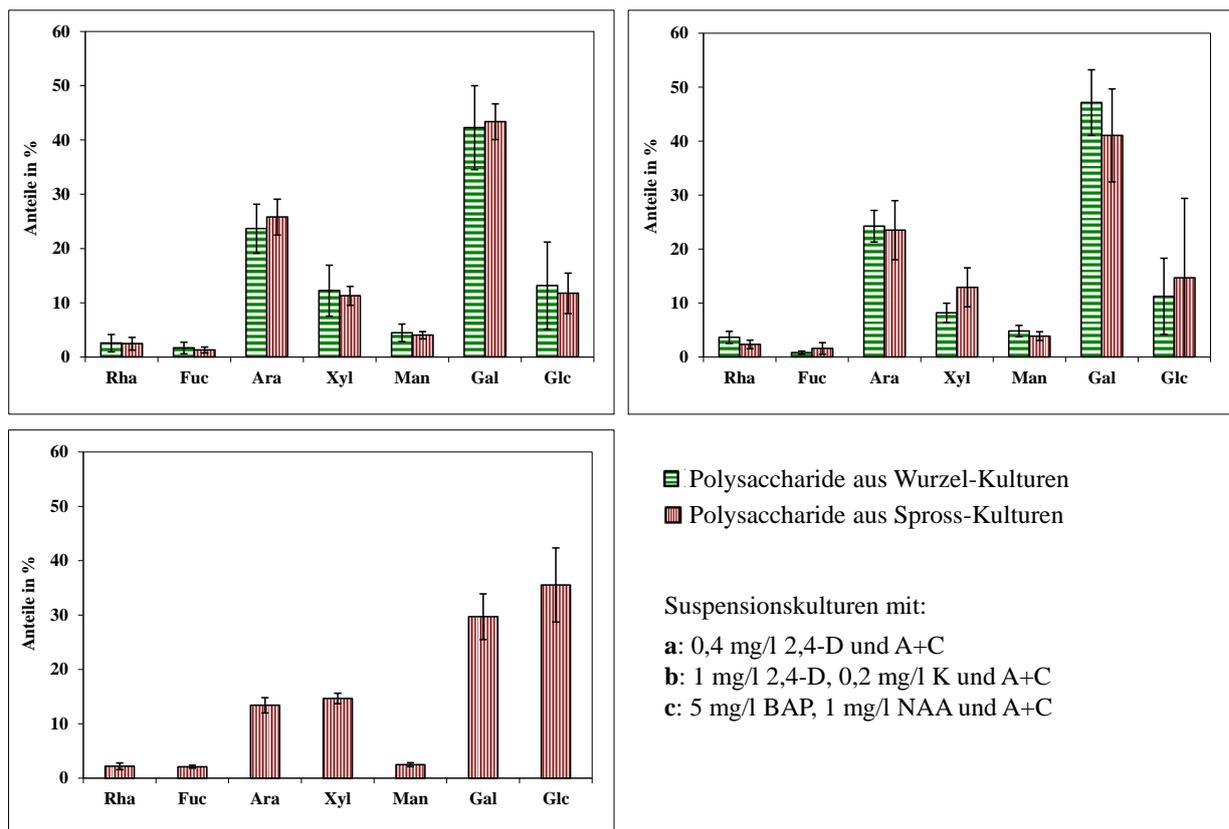


Abbildung 27: Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Polysaccharidfraktionen isoliert aus dem Kulturmedium von Suspensionskulturen mit verschiedenen Phytohormonzusätzen

2.2.1 Vergleichende Untersuchung der AGPs aus Suspensionskulturen mit verschiedenen Phytohormonzusätzen

Vor Beginn der eigentlichen Charakterisierung der AGPs wurden die ethanolgefällten Polysaccharide der Suspensionskulturen in einem Geldiffusionstest untersucht. Neben dem Nachweis auf das Vorhandensein von mit Yariv-Reagenz fällbaren AGPs in hochmolekularen Fraktionen, dient der Test auch der Überlegung, welche strukturellen Voraussetzungen für die Wechselwirkungen zwischen AGPs und dem β -Yariv-Reagenz verantwortlich sein können. Abbildung 28 zeigt die orange-roten Präzipitationsbanden der aus Wurzel- und Sprosskulturen isolierten hochmolekularen Fraktionen mit dem β -Yariv-Reagenz als Nachweis für das Vorhandensein von AGPs im Flüssigkulturmedium.

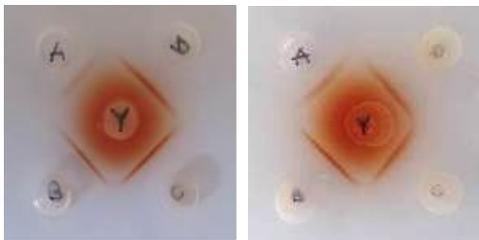


Abbildung 28:
Geldiffusionstests der hochmolekularen Fraktionen (HF) isoliert aus Wurzel- (links) u. Spross-(rechts) Suspensionskulturen mit konzentrationsabhängigen scharfen Präzipitationsbanden; (Y= 1 mg/ml β -Glc-Yariv; A, B, C, D = HF mit 1, 10, 25 und 50 mg/ml)

Die im Durchschnitt zwischen 0,4% und 0,5% liegenden Mengen an isolierten AGPs (bezogen auf die gefriergetrockneten Zellmassen) konnten sowohl bei Wurzel- als auch bei Sprosskulturen erhalten werden. Zusätzlich konnten die geringen Abweichungen in den isolierten AGP-Mengen zwischen den verschiedenen Kultivierungsansätzen die nicht-vorhandenen Unterschiede zwischen den einzelnen Kultivierungen, mit Ausnahme des Ansatzes mit Benzylaminopurin und Naphthylessigsäure, bestätigen. Aus den einzelnen Ansätzen mit BAP und NAA als Phytohormonkombination konnten im Durchschnitt mit 0,24% nur die Hälfte an AGP gewonnen werden (Tabelle 14).

Tabelle 14: Menge an aus den Nährmedien isolierten AGPs bezogen auf die gefriergetrockneten Zellmassen der einzelnen Kultivierungsansätze

Kultivierungsansatz			Mittelwert + Standardabweichung	Anzahl der Ernten
W	0,4 mg/l 2,4-D	A+C	0,53% \pm 0,32%	6
S	0,4 mg/l 2,4-D	A+C	0,39% \pm 0,19%	8
W	0,4 mg/l 2,4-D	A+C	0,51% \pm 0,29%	2
S	0,4 mg/l 2,4-D	A+C	0,41% \pm 0,17%	2
S	5 mg/ BAP + 1 mg/l NAA	A+C	0,24% \pm 0,11%	4
W	1 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l K	A+C	0,42% \pm 0,19%	19
S	1 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l K	A+C	0,78% \pm 1,36%	20

W=AGP aus Wurzelkeimling, S=AGP aus Sprosskeimling, D=2,4-D, K=Kinetin, A+C=Ascorbin- und Citronensäure)

Nach der Isolierung der AGPs aus den hochmolekularen Fraktionen mittels Yarivfällung wurde der Einfluss der Phytohormone auf die Monosaccharidzusammensetzung der ins Nährmedium sezernierten

AGPs untersucht.

Schon bei den Kalluskulturen konnte beobachtet werden, dass es keine Unterschiede zwischen den Geweben aus den ursprünglichen Wurzel- und Sprosskeimlingen gab. Diese Beobachtung setzte sich auch in den Suspensionskulturen fort und konnte u.a. anhand der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Monosaccharide der isolierten AGPs erfasst werden. Mit ca. 60% Galaktose, ca. 30% Arabinose, geringen Mengen an Glukose, Mannose und Xylose sowie Spuren von Rhamnose und Fucose unterschieden sich die AGPs nicht (Abbildung 29). Des Weiteren waren keine Unterschiede in der Monosaccharidverteilung der AGPs aufgrund der verschiedenen Phytohormone in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen festzustellen, obwohl die reine Polysaccharidfraktion der Phytohormonkombination BAP und NAA sich deutlich von den anderen unterschied.

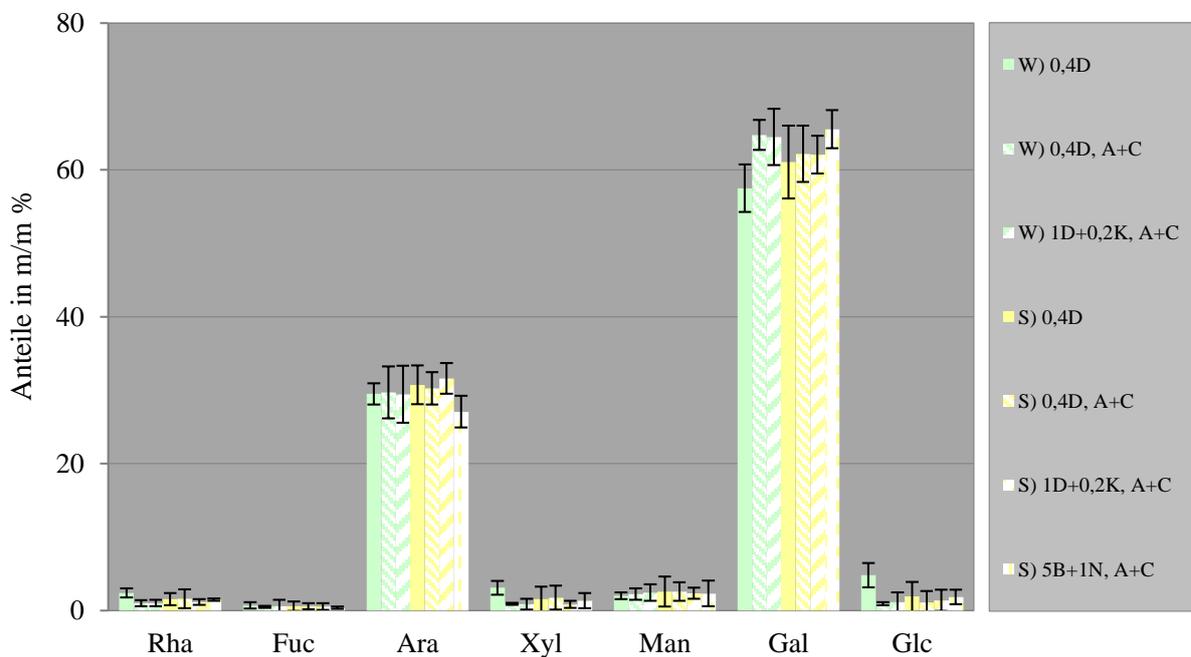


Abbildung 29: Monosaccharidzusammensetzung der AGPs aus verschiedenen Flüssigkulturen
(W=AGP aus Wurzelkeimlingkultur, S=AGP aus Sprosskeimlingkultur,
D=2,4-D, K=Kinetin, A=Ascorbinsäure, C=Citronensäure, B=Benzyaminopurin,
N=Naphthylethylsäure; die Zahlen entsprechen den Konzentrationen in mg/l)

3. Charakterisierung von AGPs aus Kallusgeweben

Es wurden Kallusgewebe mehrerer Ernten gesammelt, vereint und gefriergetrocknet. Die daraus mit Yariv-Reagenz fällbaren AGPs wurden im Hinblick auf ihre Monosaccharidzusammensetzung, die vorherrschenden Bindungstypen sowie deren Verknüpfung untereinander und das Molekulargewicht untersucht. Des Weiteren wurde die Ausbeute an mit Yariv-Reagenz isolierten AGPs betrachtet: bezogen auf die gefriergetrocknete Zellmasse konnten aus den W-Kalli $0,80\pm 0,15\%$ und aus den S-Kalli $0,98\pm 0,27\%$ AGP gewonnen werden (etwas mehr als aus den Suspensionskulturen - siehe V 2.2.1).

3.1 Bestimmung des Molekulargewichtes

Für die jeweils in einem Singlepeak eluierenden W- und S-AGP (Abbildung 30) konnten jeweils absolute Molekulargewichte von ca. 94.100 Da und 100.800 Da ermittelt werden. Die über eine Kalibrierung mit Pullulanstandards berechneten entsprechenden hydrodynamischen Volumina betragen ca. 60.000 Da und 64.000 Da (siehe Tabelle 15).

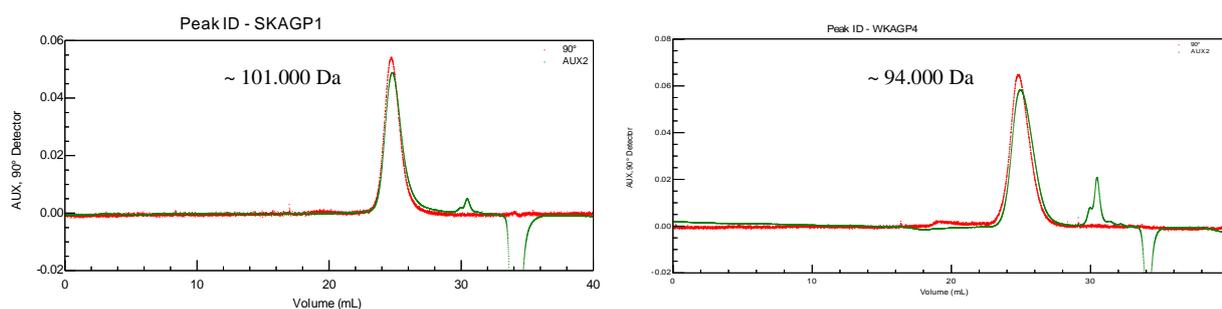


Abbildung 30: RI- und MALLS-GPC-Profile (grün und rot) des S- (links) und des W-K-AGPs (rechts)

Tabelle 15: Absolute Molekulargewichte (MW) und hydrodynamische Volumina der aus Kallusgeweben isolierten AGPs

		n	absolutes MW in Da (MW \pm Stabw)	absolutes MW in Da (nach Kalibrierung)	Hydrodynamisches Volumen in Da
K-AGP	W	4	94.090 \pm 2.649	84.000	59.500
	S	5	100.848 \pm 3.665	90.000	64.000

3.2 Qualitative und quantitative Verteilung der Neutralzucker

Die dominierenden Zucker waren Arabinose mit 25,7% und 30,8% und Galaktose mit 68,4% und 63,3% für das W- und das S-AGP. Das ansonsten vorherrschende Verhältnis von Ara zu Gal von ca. 1:2 wich somit beim W-AGP mit einem Verhältnis von 1:2,7 ab. Glukose und Mannose konnten in

Anteilen von 1,5% und 2,5% detektiert werden. Rhamnose, Xylose und Fucose kamen nur in Spuren unter 1% in den AGPs vor (Tabelle 16).

Tabelle 16: Quantitative Verteilung der Neutralzucker in den AGPs isoliert aus Kalluskulturen (n=2)

		Monosaccharidzusammensetzung in m/m %								
	PS-Anteil m/m %	Ara:Gal	Ara	Gal	Glc	Rha	Xyl	Man	Fuc	
K-AGP	W	48,6±4,0	1:2,7	25,7±0,5	68,4±0,4	1,5±0,1	0,7±0,1	0,9±0,1	2,6±0,6	0,5±0,1
	S	57,4±16,6	1:2,1	30,8±0	63,3±0,5	1,5±0,5	0,9±0,1	0,7±0,1	2,4±0,4	0,6±0,3

3.3 Reduktion der Uronsäuren

Die Qualifizierung und Quantifizierung der Uronsäuren erfolgte mit Hilfe der Uronsäurereduktion, gekoppelt an eine Bindungstypanalyse (siehe V 3.2.2.3).

Anhand der hauseigenen Spektrenbibliothek konnte eindeutig terminale Glukuronsäure mit Anteilen von 5,2% und 4,4% im W- und S-AGP identifiziert werden. Die entsprechenden FID- und TIC-Chromatogramme der uronsäurereduzierten AGPs sind in Abbildung 31 dargestellt. Für das W-AGP dieser Charge wurde die Menge an Uronsäuren auch photometrisch bestimmt, was zu einem 50% geringeren Uronsäuregehalt von 2,6% führte.

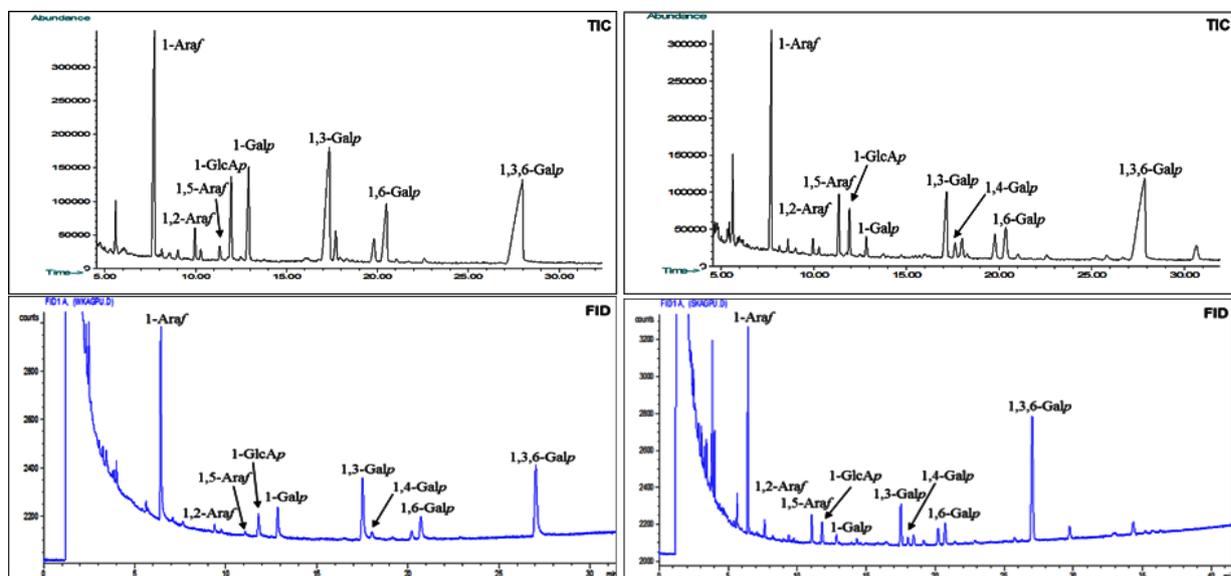


Abbildung 31: TIC- und FID-Chromatogramme des W-(links) und S-Kallus-AGPs (rechts) nach Reduktion der Uronsäuren und Analyse der Bindungstypen

3.4 Analyse der Bindungstypen

Die Analyse der Bindungstypen im Kohlenhydratteil der AGPs erfolgte nach einer vorangegangenen Methylierung freier Hydroxylgruppen mit anschließender Acetylierung der an den glykosydischen Bindungen und dem Ringschluss beteiligten OH-Gruppen. Die entstandenen permethylierten Alditolacetate wurden dann gaschromatographisch aufgetrennt und anhand ihrer Retentionszeiten und Massenspektren identifiziert.

Die unter V 3.3 aufgezeigten FID- und TIC-Chromatogramme der beiden uronsäurereduzierten AGPs ließen eindeutig 1-Araf (ca. 35%), 1,3-Galp (ca. 10-20%) und 1,3,6-Galp (ca. 22-35%) als die im Polysaccharidteil der AGPs dominierenden Bindungstypen erkennen. Geringere Mengen (unter 10%) an terminaler Galaktose, 1,6-verknüpfter Galaktose sowie terminaler Glukuronsäure konnten außerdem identifiziert werden. Des Weiteren wurden geringe Mengen an 1,2-Araf, 1,5-Araf und 1,4-Galp detektiert. Die genauen Anteile der einzelnen Bindungstypen in Prozent sind in Tabelle 17 dargestellt. Auffallend bei der Analyse der Bindungstypen waren die durchgehend unter eins liegenden Verhältnisse von Verzweigungspunkten zu Endgruppen, was für das Vorhandensein von zu vielen Endgruppen sprach.

Tabelle 17: Bindungstypen in den intakten und uronsäurereduzierten AGPs

mol %	K-AGP		K-AGP-U	
	W	S	W	S
1-Araf	33,3	34,2	37,7	33,3
1,2-Araf	1,7	0,7	1,6	1,1
1,5-Araf	1,3	4,7	1,2	6,6
1-GlcAp	-	-	5,2	4,4
1-Galp	7,4	4,0	7,2	2,0
1,3-Galp	20,0	20,2	17,0	10,2
1,4-Galp	3,8	0,1	1,5	1,9
1,6-Galp	6,9	6,1	6,4	5,8
1,3,6-Galp	25,6	30,0	22,2	34,7
VP:EG	0,63	0,78	0,44	0,87
Ara:Gal	1:1,8	1:3,2	1:2,1	1:2,1

4. Charakterisierung von AGPs aus den Zellen von Suspensionskulturen

Die Isolierung von AGPs aus den Zellen der Suspensionskulturen erfolgte exemplarisch anhand der 32. Ernte mit anschließender Berechnung der AGP-Ausbeute sowie einer Betrachtung der Monosaccharidverteilung.

Es konnten 0,42% W-AGP sowie 0,50% S-AGP bezogen auf die gefriergetrockneten Zellmassen isoliert werden, was der Menge der ins Nährmedium sezernierten AGPs ähnelt (siehe Tabelle 14).

4.1 Qualitative und quantitative Verteilung der Monosaccharide

Die qualitative und quantitative Verteilung der Neutralzucker im AGP ist in Tabelle 18 aufgeführt. Die dominierenden Monosaccharide im AGP waren Arabinose und Galaktose mit rund 30% und 65%. Daneben konnten Spuren bzw. geringe Mengen (< 2%) an Fucose, Rhamnose, Xylose, Glukose und Mannose detektiert werden. Zusätzlich konnten nach der neuen Methode nach BLUMENKRANTZ im W-AGP 4,8% und im S-AGP 5,8% Uronsäuren bestimmt werden.

Tabelle 18: Neutralzucker-Verteilung im AGP aus den Zellen der Suspensionskultur der 32. Ernte

		Monosaccharidzusammensetzung in m/m %								
		PS-Anteil m/m %	Ara:Gal	Ara	Gal	Glc	Rha	Xyl	Man	Fuc
R-AGP	W	75,13	1:2,0	32,0	64,3	0,5	1,0	0,2	1,2	0,8
	S	60,7	1:2,5	27,5	67,6	0,6	0,9	0,6	2,0	0,8

4.2 Molekülgrößenbestimmung

Auch die mit Yariv-Reagenz isolierten AGPs aus den Zellen der Suspensionskulturen eluierten in einem separaten Peak mit einem absoluten Molekulargewicht von ca. 75 kDa und ca. 93,4kDa (W- und S-AGP). Die hydrodynamischen Volumina waren mit ca. 55,8 kDa und ca. 62,7 kDa (W- und S-AGP) entsprechend kleiner (Tabelle 19).

Tabelle 19: Absolute Molekulargewichte (MW) und hydrodynamische Volumina der aus Suspensionskulturzellen isolierten AGPs

		n	absolutes MW in Da (MW \pm Stabw)	absolutes MW in Da (nach Kalibrierung)	Hydrodynamisches Volumen in Da
R-AGP	W	3	75.013 \pm 154	70.900	55.800
	S	3	93.357 \pm 5.067	88.400	62.700

5. Charakterisierung der ins Nährmedium sezernierten AGPs aus optimierten Suspensionskulturen

Für die strukturellen Untersuchungen am AGP wurden zur Vereinfachung die isolierten AGPs aus den verschiedenen Flüssigkulturansätzen nach erfolgter Neutralzuckeranalyse und Bestimmung des Molekulargewichtes zu größeren Chargen vereint (Tabelle 20). Hierbei wurden jeweils 3-7 AGPs einzelner Ansätze mit gleichen Molekülmassen sowie gleicher Monosaccharidzusammensetzung in Aqua bidest. gelöst, drei Tage dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Aufgrund der zwei verschiedenen Grundgewebe (aus Wurzel- und Sprosskeimling) wurden die Zellkulturen in den weiteren Kultivierungsansätzen getrennt behandelt. Darauf basiert die Unterscheidung zwischen AGP aus ursprünglichem Wurzelgewebe (W) und aus ursprünglichen Sprossgewebe (S) in der weiteren Arbeit.

Tabelle 20: Überblick über die einzelnen Flüssigkulturansätze inkl. Ausbeuten an isolierten Polysacchariden u. AGPs

Ernte	Infos zur SK	Wurzel					Spross					Anmerkungen		
		Zellmasse		PS-Fraktion		AGP		Zellmasse		PS-Fraktion			AGP	
		mg	mg	%	mg	%	mg	mg	%	mg	%			
	SK direkt aus Kallus 0,4 D	3753,92	68,38	1,82			3631,2	72,9	2,01			keine Yarivfällung aufgrund geringer PS-Mengen		
2	SK direkt aus Kallus 0,4 D	5594,96	178,16	3,18	27,7	0,49	8393,1	215,3	2,57	35,9	0,43	W-AGP-V1 S-AGP-V1		
3	SK direkt aus Kallus 0,4 D	3237,77	97,47		17,4	0,54	2961,2	86,6	2,92	15,3	0,52			
4	1 x subkultiviert 0,4 D	2585,33	84,72	3,28	9,8	0,38	2378,3	86,3	3,63	15,1	0,63			
5	2 x subkultiviert, 21 d alt 0,4 D	keine Suspension gebildet					1702,0	69,8	4,10	4,5	0,26	AGP stark aufgeladen → Verlust bei Auswaage		
6	3 x subkultiviert, 21 d alt 0,4 D	5333,22	113,92	2,14	23,5	0,44	5036,7	79,6	1,58	3,1	0,06	AGP sah untypisch aus: dünne Folie		
7	4 x subkultiviert, 21 d alt 0,4 D	4336,77	50,20		8,5	0,20	4103,5	46,9	1,14	10,6	0,26			
8	5 x subkultiviert, 21 d alt 0,4 D	2645,60	21,17	0,80			2643,0	4,1	0,16			Achtung bei 8. und 9. Ernte: aufgrund von Chargenmischung keine		
8	6 x subkultiviert, 21 d alt 0,4 D	2701,59	37,11	1,37			2604,1					Yarivfällung		
9	SK direkt aus Kallus 0,4 D	854,13	29,37	3,44			930,0	4,6	0,50					
9	SK direkt aus Kallus 0,4 D A+C	699,19	27,67	3,96			2942,9	38,2	1,30					
10	7 x subkultiviert, 21 d alt 0,4 D	3478,09	204,07	5,87	39,6	1,14	3799,7	109,2	2,87	20,6	0,54	Vergleich SK mit und ohne A+C		
10	7 x subkultiviert, 21 d alt 0,4 D A+C	3758,39	43,50	1,16	11,5	0,31	5415,1	83,5	1,54	15,8	0,29			
11	1 x subkultiviert, 26 d alt K+D, A+C	2375,88	34,45	1,45	8,0	0,33	2558,4	18,9	0,74	4,4	0,17	W-AGP-V2 S-AGP-V2		
12	8 x subkultiviert, 29 d alt 0,4 D	keine Suspension gebildet					4448,9	109,6	2,46	19,4	0,44			
12	8 x subkultiviert, 29 d alt 0,4 D A+C	4979,50	92,85	1,86	35,8	0,72	5774,7	88,4	1,53	30,7	0,53			
13	2 x subkultiviert, 22 d alt K+D, A+C	3687,66	53,42	1,45	10,1	0,27	4219,7	20,6	0,49	2,2	0,05	S: Dialyseschlauch hatte ein Loch → AGP-Verlust		
14	3 x subkultiviert, 24 d alt K+D, A+C	6752,60	261,43	3,87	34,9	0,52	10765,8	210,5	1,96	43,7	0,41	S: PS waren dunkel 4. SK zur Erhaltung über Weihnachten		
15	5 x subkultiviert, 26 d alt K+D, A+C	13758,04	137,61	1,00	41,2	0,30	11339,6	276,7	2,44	71,6	0,63	W: geringere Ausbeute (2 geplatzte Zentifugengläser)		
16	6 x subkultiviert, 26 d alt K+D, A+C	9996,17	174,46	1,75	67,4	0,67	9926,1	241,8	2,44	93,1	0,94			

Ernte	Infos zur SK	Wurzel					Spross					Anmerkungen
		Zellmasse	PS-Fraktion		AGP		Zellmasse	PS-Fraktion		AGP		
		mg	mg	%	mg	%	mg	mg	%	mg	%	
17	7 x subkultiviert, 23 d alt K+D, A+C	10021,83	139,79	1,39	32,7	0,33	10720,4	175,9	1,64	35,8	0,33	W-AGP-V3 S-AGP-V3
18	direkt aus Kallus + 1.SK B+N, A+C; 31 d alt	verworfen wegen Verpilzung					verworfen wegen Verpilzung					
19	8 x subkultiviert, 25 d alt K+D, A+C	7411,71	114,66	1,55	9,9	0,13	9547,7	105,8	1,11	25,4	0,27	
20	9 x subkultiviert, 28 d alt K+D, A+C	8513,05	192,26	2,26	68,1	0,80	7472,0	188,8	2,53	38,7	0,52	
21	10 x subkultiviert, 25 d alt K+D, A+C	7653,40	149,54	1,95	35,6	0,46	10381,5	180,0	1,73	40,6	0,39	
22	direkt aus Kallus, 23 d alt B+N, A+C	keine Wurzelkultur angelegt					6117,1	122,4	2,00	8,5	0,14	
23	11 x subkultiviert, 24 d alt K+D, A+C	6631,30	219,70	3,31	25,0	0,38	10290,3	155,1	1,51	44,4	0,43	
24	1 x subkultiviert, 24 d alt B+N, A+C	keine Wurzelkultur angelegt					9316,4	119,2	1,28	28,7	0,31	
25	2 x subkultiviert, 15 d alt B+N, A+C	keine Wurzelkultur angelegt					5984,8	41,6	0,70	10,0	0,17	
26	12 x subkultiviert, 23 d alt K+D, A+C	7060,52	197,31	2,79	28,4	0,40	8354,9	179,8	2,15	66,3	0,79	
27	3 x subkultiviert, 32 d alt B+N, A+C	keine Wurzelkultur angelegt					12662,7	104,3	0,82	46,0	0,36	
28	13 x subkultiviert, 22 d alt K+D, A+C	4505,05	137,43	3,05	16,5	0,37	10291,3	106,1	1,03	22,0	0,21	
29	4 x subkultiviert, 21 d alt B+N, A+C	keine Wurzelkultur angelegt					dunkle, rötliche Suspension: verworfen					
30	14 x subkultiviert, 21 d alt K+D, A+C											Verkeimung während des Aufarbeitens
31	15 x subkultiviert, 25 d alt K+D, A+C											Verkeimung während des Aufarbeitens
32	16 x subkultiviert, 47 d alt K+D, A+C	9733,11	185,40	1,90	45,2	0,46	9063,3	189,1	2,09	42,0	0,46	W-AGP-V4 S-AGP-V4
33	aus Kallus, 21 d alt K+D, A+C	6413,70	254,53	3,97	26,1	0,41	keine Sprosskultur angelegt					
34	1 x subkultiviert, 22 d alt K+D, A+C	10166,96	471,77	4,64	67,0	0,66	4517,8	62,9	1,39	9,2	0,20	S: Reste aus Nasenkolben
35	2 x subkultiviert, 21 d alt K+D, A+C	3483,70	274,11	7,87	25,6	0,74	8162,4	231,0	2,83	60,9	0,75	
36	3 x subkultiviert, 28 d alt K+D, A+C	keine Wurzelkultur angelegt					5784,0	1825,1	31,55	137,7	2,38	S-AGP 36.E
37	1 x subkultiviert, 16 d alt K+D, A+C	14457,67	185,34	1,28	24,1	0,17	für Nasenkolben verwendet					
38	3 x subkultiviert, 23 d alt K+D, A+C	6061,90	74,54	1,23	11,4	0,19	8551,5	35,0	0,41	6,8	0,08	S-AGP-V5 W-AGP-V5
39	4 x subkultiviert, 14 d alt K+D, A+C	3160,80	26,23	0,83			6149,0	80,5	1,31	17,9	0,29	W: Ausbeute zu gering für Yarivfällung
40	5 x subkultiviert, 19 d alt K+D, A+C	komplett für's Beimpfen genutzt					komplett für's Beimpfen genutzt					
41	6 x subkultiviert, 27 d alt K+D, A+C	11164,20	251,12	2,25	33,7	0,30	5817,6	181,5	3,12	18,0	0,31	S: 14 d alt W: 27 d alt
42	7 x subkultiviert, 17 d alt K+D, A+C	keine Wurzelkultur angelegt					7328,4	168,8	2,30	34,5	0,47	
42a	aus Kallus, 42 d alt K+D, A+C (nur Wurzel)		763,81		58,2		komplett für's Beimpfen genutzt					
43	1 x subkultiviert, 17 d alt K+D, A+C (nur Spross)	keine Wurzelkultur angelegt					1466,8	3261,4	222,35	92,5	6,30	
44	x subkultiviert, d alt K+D, A+C	keine Wurzelkultur angelegt						723,8		26,5		

5.1 Bestimmung der Molekulargewichte der AGPs

Mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie in Kombination mit einem Brechungsindex- und einem dreiwinkligem Laser-Detektor (RI- und MALLS-Detektor) konnten das hydrodynamische Volumen sowie das absolute Molekulargewicht der reinen AGPs ermittelt werden.

Die Vermessung der AGPs erfolgte in einem wässrigen System, wobei alle AGPs als individuelle Peaks eluierten. Abbildung 32 zeigt exemplarisch das GPC-Chromatogramm eines AGPs mit RI- und MALLS-Detektion.

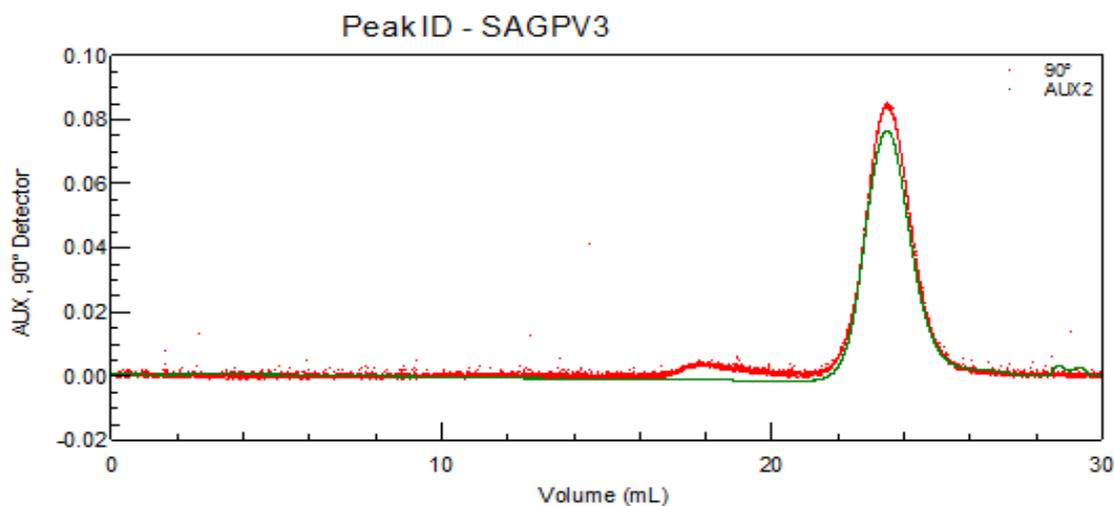


Abbildung 32: GPC-Chromatogramm des S-AGPs der 3. Charge mit RI (grün)- und MALLS (rot) - Detektion

Es wurden alle fünf AGP-Chargen mittels Größenausschlusschromatographie vermessen. Die absoluten Molekulargewichte, sowie die über eine Kalibrierung mit Pullulanstandards berechneten hydrodynamischen Volumina der einzelnen Chargen sind in Tabelle 21 dargestellt. Das durchschnittliche absolute Molekulargewicht betrug für die W-AGPs im Durchschnitt 89 kDa und für die S-AGP 95 kDa. Die entsprechenden hydrodynamischen Volumina, die mit Hilfe der Kalibrierung mit Pullulanen bestimmt wurden, waren kleiner als die absoluten Molekulargewichte und betragen für die W-AGPs im Durchschnitt 63 kDa und für die S-AGPs 66 kDa. Das deutlich kleinere hydrodynamische Volumen weist auf ein stark verzweigtes AGP-Molekül hin.

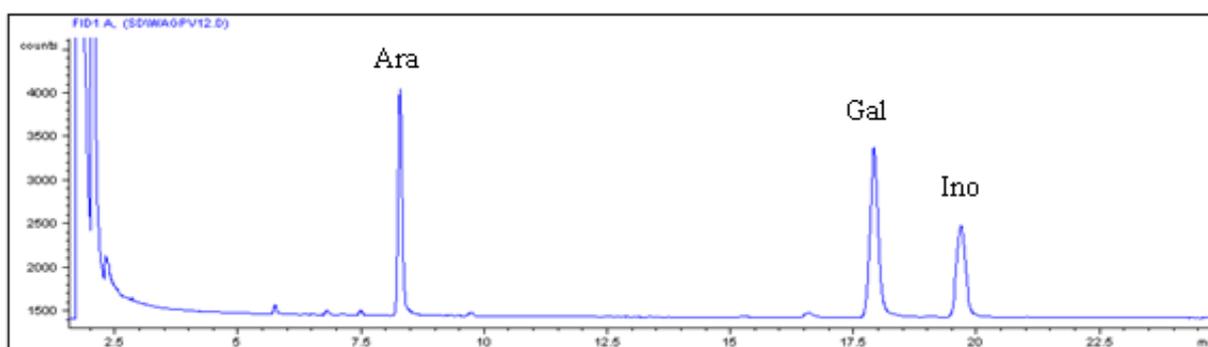
Tabelle 21: Absolute Molekulargewichte (MW) und hydrodynamische Volumina der fünf AGP-Chargen

		n	absolutes MW in Da (MW±Stabw)	absolutes MW in Da (nach Kalibrierung)	Hydrodynamisches Volumen in Da
AGP-V1	W	3	88.628±2.903	88.400	61.200
	S	3	84.252 ±2.352	84.100	59.200
AGP-V2	W	3	79.563±1.506	70.900	72.700
	S	4	82.208±2.720	73.600	71.500
AGP-V3	W	3	84.190±1.733	85.900	68.000
	S	3	87.657±3.985	89.500	71.000
AGP-V4	W	3	116.107±18.052	104.900	56.600
	S	3	111.500±8.758	100.700	59.900
AGP-V5	W	3	77.540±6.141	73.300	58.500
	S	3	110.800±3.759	105.000	67.500
Mittelwert	W	-	89.206±6.067	84.680	63.400
	S	-	95.283±4.315	90.580	65.800

5.2 Analytik des Kohlenhydratanteils

5.2.1 Monosaccharidzusammensetzung

Mit Hilfe der Acetylierungsanalyse (siehe IV 4.1.1) konnten die Neutralzucker der mit Yariv-Reagenz gefällten AGPs gaschromatographisch untersucht werden. Dabei wurden die bei der Derivatisierung entstandenen Alditolacetate aufgetrennt, identifiziert und mit Hilfe von Inositol als internem Standard quantifiziert. Die Auftrennung eines AGPs ist in Abbildung 33 exemplarisch dargestellt.

**Abbildung 33: Gaschromatogramm des acetylierten W-AGP-V1**

Die oben dargestellte Auftrennung des W-AGPs der ersten Charge zeigt deutlich die Reinheit des isolierten AGPs. Dies wird durch die Detektion von rund 30% Arabinose und 60% Galaktose als Bestandteil des AGPs bestätigt. Mit jeweils weniger als 2% wurden nur geringe Mengen an Begleitmonosacchariden wie Mannose, Fucose, Rhamnose, Xylose und Glukose detektiert.

Tabelle 22 zeigt die qualitative und quantitative Verteilung der Neutralzucker der fünf vereinigten AGP-Chargen inklusive Standardabweichungen, die mit einem durchschnittlichen Verhältnis von

Arabinose zu Galaktose von 1:2 das oben dargestellte Chromatogramm widerspiegeln. Die Zuckerausbeuten (53,5-72,8%) liegen deutlich unter 100%, was durch den typischen Proteinanteil von 10-15%, dem Vorhandensein von sauren Monosacchariden, sowie der Hygroskopie der AGPs begründet ist. Die Darstellung der Neutralzuckerzusammensetzung erfolgte zusätzlich für die einzelnen AGP-Chargen in Form eines Diagrammes (Abbildung 34).

Tabelle 22: Neutralzuckerzusammensetzung der vereinten AGP-Chargen

m/m %	AGP-V1 n=3		AGP-V2 n=3		AGP-V3 n=2		AGP-V4 n=1		AGP-V5 n=1	
	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S
Ara	35,7 ±1,9	32,8±3,6	31,6±0,4	32,3±0,5	31,6±1,3	33,1±1,9	28,1	30,5	27,2	32,2
Gal	59,1±3,4	62,5±0,8	66,0±0,5	63,5±0,3	62,9±1,0	59,2±2,2	65,9	63,2	68,3	63,1
Glc	0,9±1,1	0,4±0,4	0,0	0,2±0,4	0,8±0,7	1,1±0,6	1,5	2,8	0,8	0,9
Rha	0,3±0,6	1,1±0,9	0,7±0,1	1,3±0,1	0,6±0,1	0,5±0,1	1,3	0,7	1,1	1,1
Xyl	1,5±2,0	0,7±0,6	0,3±0,0	0,5±0,1	1,1±0,1	0,5±0,1	1,0	0,4	0,8	0,6
Man	2,1±0,9	2,3±0,8	1,3±0,2	1,7±0,1	2,6±0,2	5,4±2,9	1,8	2,3	1,5	1,8
Fuc	0,4±0,7	0,2±0,2	0,1±0,1	0,3±0,0	0,5±0,2	0,3±0,3	0,4	0,1	0,3	0,3
Ausbeute %	62,9±24,6	64,2±10,1	60,0±5,6	53,5±4,9	57,0±4,7	72,8±16,0	52,4	61,0	61,6	70,9
Ara:Gal	1:1,6	1:1,9	1:2,0	1:2,1	1:2,0	1:1,8	1:2,3	1:2,1	1:2,5	1:2,0

Anteile in m/m %

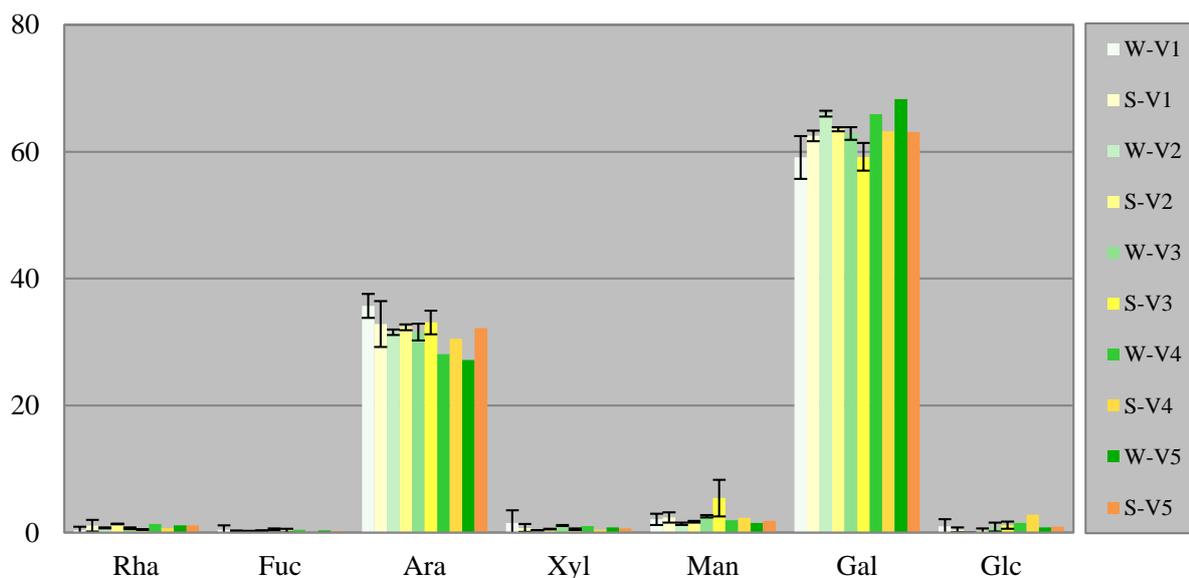


Abbildung 34: Graphische Darstellung der Monosaccharidverteilung im Kohlenhydratteil der einzelnen AGP-Chargen

5.2.2 Qualitative und quantitative Bestimmung der Uronsäuren

5.2.2.1 Kolorimetrische Bestimmung der Uronsäuren nach BLUMENKRANTZ

Die Bestimmung der Uronsäuren erfolgte zuerst mit Hilfe eines photometrischen Tests mit 3-Hydroxydiphenyl als Farbreagenz. Hiermit konnte der Uronsäuregehalt im AGP ermittelt werden, wobei die Identifizierung der einzelnen Säuren nicht möglich war.

Die quantitative Bestimmung der Uronsäuren erfolgte am AGP der zweiten Charge (siehe Tabelle 23), wobei die ersten drei Messungen (M1, M2, M3) nach der alten Methode nach BLUMENKRANTZ und ASBOE-HANSEN (1973) (siehe IV 4.1.2) durchgeführt wurde. Messungen 4-6 erfolgten nach einem modifizierten Verfahren, welches die störende Braunfärbung vorhandener Neutralzucker während des Hydrolyseschrittes durch Zugabe von Sulfaminsäure verringerte (FILISSETTI-COZZI und CARPITA 1991) (siehe IV 4.1.2). Mit ca. 50-70% Neutralzuckern im AGP konnte man einen störenden Einfluss, der in einer erhöhten Absorption und somit einem fälschlich erhöhten Uronsäuregehalt resultiert, erwarten. Die Messungen 4-6 nach der neuen Methode konnten diese Vermutung mit 1-1,6% niedrigeren Werten nicht bestätigen. Solch niedrige Abweichungen können bei der Bestimmung nach BLUMENKRANTZ Messungengenauigkeiten sein. Somit wurden alle sechs Messungen für die durchschnittliche Bestimmung des Uronsäuregehaltes verwendet, der für das W-AGP $8,2\% \pm 1,1\%$ und für das S-AGP $7,1\% \pm 0,8\%$ betrug.

Tabelle 23: Uronsäuregehalt des AGPs der 2. Charge

	alte Methode			neue Methode			MW	Stabw
	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6		
W	8,3%	9,5%	9,3%	7,1%	8,3%	6,8%	8,2%	1,1%
S	7,0%	7,4%	8,5%	6,3%	6,4%	7,1%	7,1%	0,8%

Neben der ausführlichen Bestimmung der Uronsäuren der zweiten AGP-Charge wurden zusätzlich die Uronsäuregehalte des S-AGP-V3 mit 4,4% und des S-AGP-V4 mit 6,1% bestimmt.

5.2.2.2 HPTLC der Uronsäuren

Die Identifizierung der Uronsäuren erfolgte im Anschluss über eine chromatographische Auftrennung der Monosaccharide sowie deren Vergleich mit einer Referenzlösung in der HPTLC-Methode (siehe IV 4.1.3).

Abbildung 35 zeigt die HPTLC-Chromatogramme der AGPs der zweiten Charge (A=W-AGP, B=S-AGP, C und D sind zwei AGPs aus dem 100°C-Extrakt der getrockneten und frischen *Pelargonium*-Wurzel und spielen hier keine Rolle). Die Auftrennung von je 10 µl Probenlösung zeigte die schärfsten Banden, wobei Galaktose und Arabinose eindeutig identifiziert werden konnten. Auch

das Verhältnis von Arabinose zu Galaktose mit 1:2 war anhand der Farbintensität nachvollziehbar. Die Banden im Bereich der Galakturon- und Glukuronsäure waren im Gegensatz dazu nur sehr schwach ausgeprägt. Dies liegt zum Teil an den bereits durch die kolorimetrische Bestimmung nach BLUMENKRANTZ bestätigten niedrigen Gehalt an Uronsäuren von 7-8%. Die Trennung des W-AGP wies mit zwei schwachen Banden auf das Vorhandensein von Galakturon- und Glukuronsäure hin. Die Banden des S-AGPs waren noch schwächer ausgeprägt, sodass hier keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte.

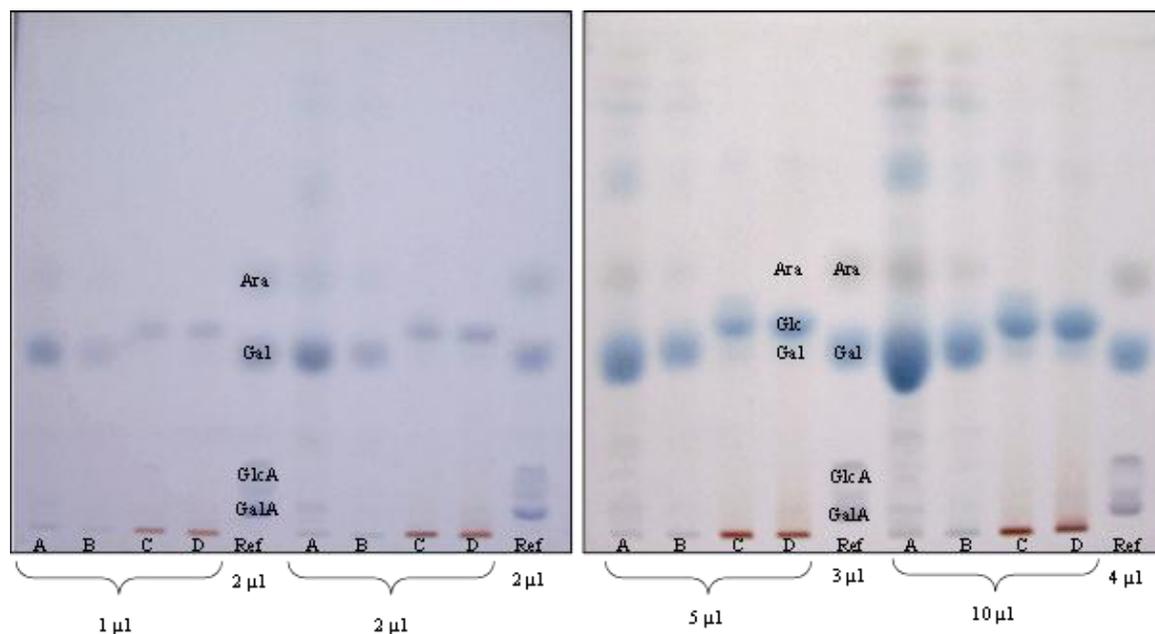


Abbildung 35: HPTLC-Chromatogramme des W- (Banden A) und S-AGPs (Banden B) der 2. Charge

5.2.2.3 Reduktion der Uronsäuren

Eine eindeutige Identifizierung und genauere Quantifizierung der Uronsäuren wurde mit Hilfe der Uronsäurereduktion und einer anschließenden Methylierung erreicht. Hierbei wurden die zu ihren korrespondierenden, deuterierten Neutralzuckern reduzierten Uronsäuren methyliert und mittels GC-FID-Detektion und GC-MS-Detektion vermessen. Die Zuordnung und Auswertung der einzelnen Peaks erfolgte im Anschluss mit Hilfe von Retentionszeiten und dem Vergleich der entsprechenden Massenspektren mit denen der im Arbeitskreis etablierten Spektrenbibliothek.

Abbildung 36 zeigt die entsprechenden FID-Chromatogramme der beiden vermessenen AGPs der zweiten Charge. Mit Hilfe der Analyse der Massenspektren konnte eindeutig Glukuronsäure identifiziert werden, welche terminal mit dem AGP verknüpft war. Die Berechnung des Glukuronsäuregehaltes ergab für das W-AGP 6,2%, für das S-AGP 7,8% und bestätigte somit die Größenordnung der Ergebnisse aus der kolorimetrischen Uronsäurebestimmung mit $8,2 \pm 1,1\%$ für das W-AGP und $7,1 \pm 0,8\%$ für das S-AGP.

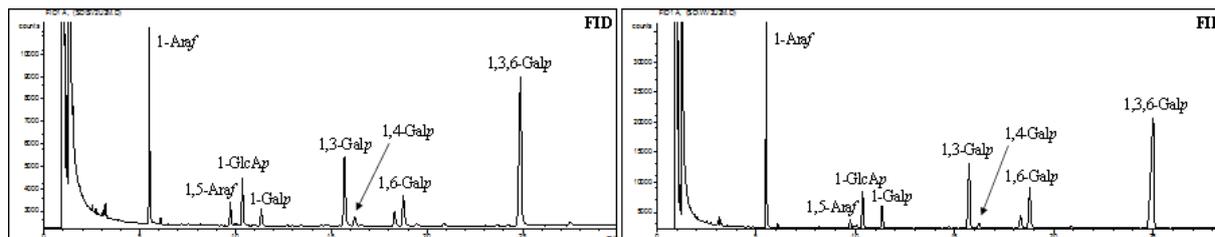


Abbildung 36: FID-Chromatogramme des W- und S-AGPs der 2. Charge (links und rechts) nach Reduktion der Uronsäuren und Analyse der Bindungstypen

Neben der Analyse der Neutralzucker wurde das Molekulargewicht des uronsäurereduzierten AGPs untersucht. Dabei wurde ein absolutes Molekulargewicht von ungefähr 90 kDa sowie ein hydrodynamisches Volumen von ca. 43 kDa ermittelt. Tabelle 24 zeigt die absoluten Molekulargewichte und die hydrodynamischen Volumina der uronsäurereduzierten AGPs im Vergleich zu den nativen AGPs.

Tabelle 24: Absolute Molekulargewichte (MW) und hydrodynamische Volumina der vier AGP-Chargen

		n	absolutes MW in Da (MW±Stabw)	absolutes MW in Da (nach Kalibrierung)	Hydrodynamisches Volumen in Da
AGP-V2	W	3	79.563±1.506	70.900	72.700
	S	4	82.208±2.720	73.600	71.500
AGP-V2-U2	W	3	89.557±5.240	81.000	44.200
	S	3	92.160±8.974	90.000	42.500

5.2.3 Verknüpfung der einzelnen Monosaccharide im nativen AGP

Die Analyse der Bindungstypen zwischen den einzelnen Monosacchariden des Kohlenhydrateils des AGPs erfolgte in vier Teilschritten: zuerst wurden die frei vorliegenden Hydroxylgruppen des Polysaccharides methyliert, die Probe anschließend sauer hydrolysiert, reduziert und die dabei frei gewordenen Hydroxylgruppen, die für die glykosidische Bindung bzw. den Ringschluss der Zucker verantwortlich waren, acetyliert. Die dabei entstandenen permethylierten Alditolacetate (PMAAs) wurden gaschromatographisch aufgetrennt und die einzelnen Peaks anhand ihrer Retentionszeiten und den Massenspektren identifiziert. Eine im Arbeitskreis etablierte umfassende Bibliothek verschiedener PMAAs wurde zum Abgleich der Spektren verwendet. Dabei konnten die einzelnen Massenspektren der PMAAs durch ihre Methylierungs- und Acetylierungsmuster dem zwischen den Monosacchariden herrschenden Bindungstyp zugeordnet werden. In Abbildung 37 ist das TIC-Chromatogramm des aufgereinigten W-AGPs der ersten Charge mit den entsprechenden Massenspektren der beiden größten Signale dargestellt.

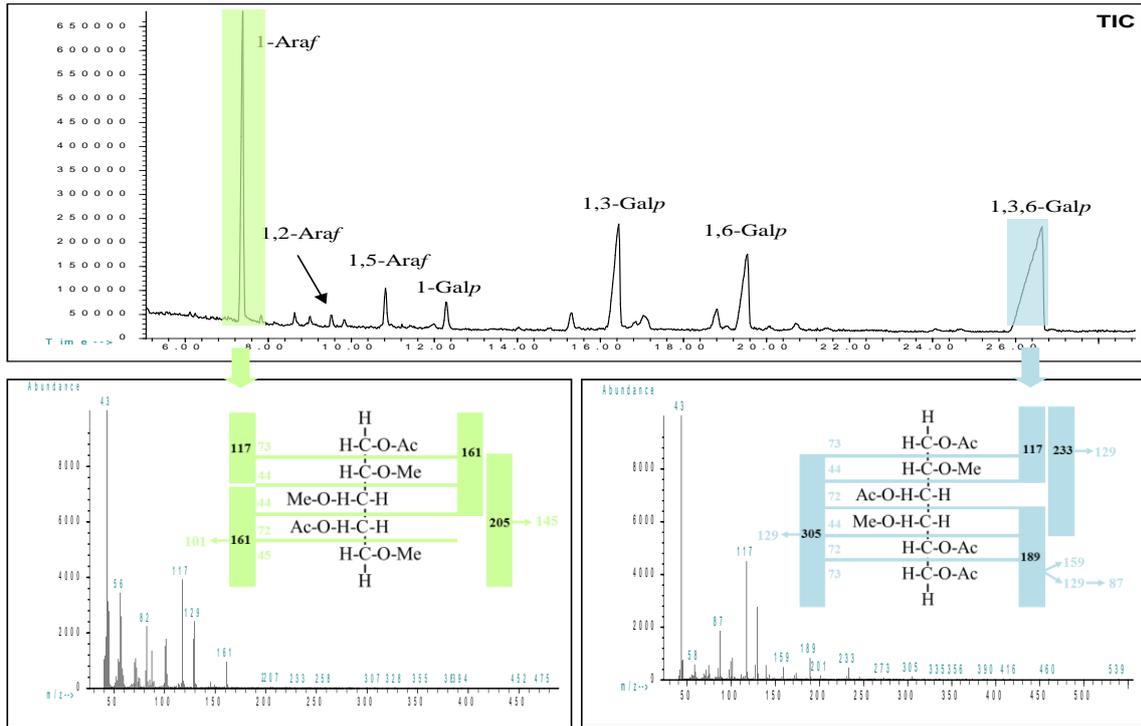


Abbildung 37: Totalionenchromatogramm eines isolierten AGPs (oben) sowie Massenspektren und Darstellung der Fragmentierungsmuster der beiden größten Peaks im Chromatogramm (unten)

Abbildung 38 zeigt die FID- und TIC-Chromatogramme des methylierten W- und S-AGPs der ersten Charge. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass 1,3,6-Galp, 1,3-Galp und 1-Araf die dominierenden Bindungstypen darstellen. Daneben konnten in geringeren Mengen 1,6-Galp, 1-Galp und 1,5-Araf detektiert werden. 1,2-Araf sowie 1,4-Galp wurden nur in Spuren gefunden, wobei 1,4-Galp und 1,4-Glcp im Massenspektrum nicht unterschieden werden konnten und nur geringe Unterschiede in den Retentionszeiten zeigten.

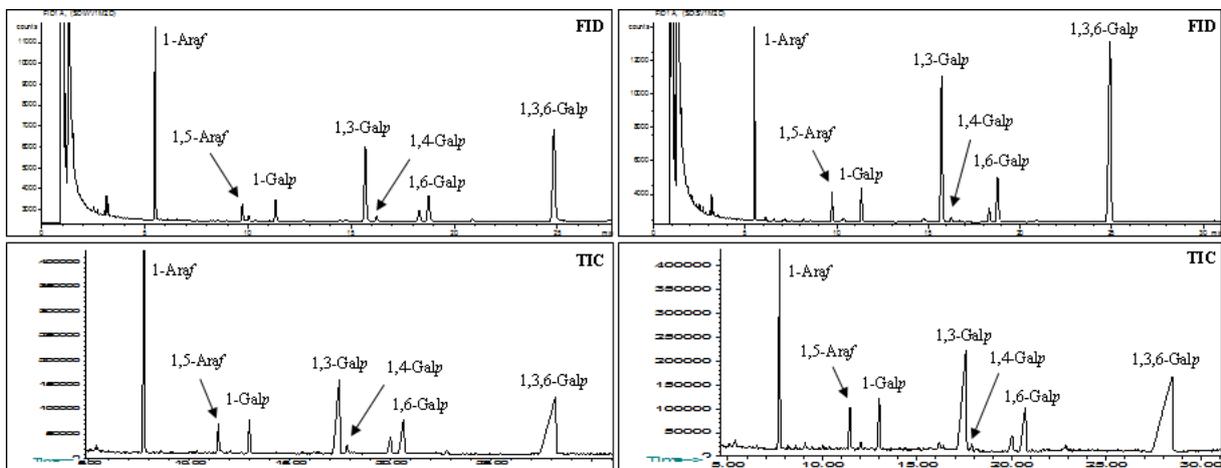


Abbildung 38: FID- und TIC-Chromatogramme des W-(links) und S-AGPs (rechts) der 1. Charge nach Methylierungsanalyse

Die quantitative Verteilung der einzelnen Bindungstypen im Kohlenhydratanteil der aufgereinigten AGPs ist in Tabelle 25 dargestellt, wobei jeweils die Bindungstypen der ersten und zweiten AGP-Charge sowie das uronsäurereduzierte AGP der zweiten Charge untersucht wurden. Mit 30-35% bildet 1,3,6-Galp die größte Fraktion und gleichzeitig auch den im AGP vorherrschenden Verzweigungspunkt. Dem gegenüber sollte die gleiche Anzahl an Endgruppen, die durch 1-Galp, 1-Araf und 1-GlcAp gebildet werden, stehen. Dabei machten im Durchschnitt 25-30% terminaler Arabinose, ca. 3-5% terminaler Galaktose sowie 6-8% terminaler Glukuronsäure ungefähr 30-35% Endgruppen aus und bestätigten das passende Verhältnis von Verzweigungspunkten zu Endgruppen, welches in den einzelnen Messungen zwischen 0,8 und 1,2 lag. Das abweichende Verhältnis von 1,6 kommt durch den Verlust der leicht flüchtigen terminalen Arabinosen zustande, die wahrscheinlich durch zu starkes Abblasen mit Stickstoff verloren gegangen waren. Neben 1,3,6-Galp und 1-Araf bildete 1,3-Galp mit ungefähr 15-20% die drittgrößte Fraktion der Bindungstypen. Daneben konnten ca. 5% 1,5-Araf und ca. 1% 1,2-Araf detektiert werden, wobei letzterer Bindungstyp nur im AGP der zweiten Charge zu finden war. 1,4-Galp konnte ebenfalls nur in Spuren gefunden werden, wobei die Identifikation dieses Bindungstypes schwierig ist, da die Massenspektren mit 1,4-Glcp übereinstimmen und die Retentionszeiten nah beieinander liegen.

Tabelle 25: Quantitative Verteilung der einzelnen Bindungstypen in den AGPs der 1. und 2. Charge sowie dem uronsäurereduzierten AGP der 2. Charge

mol %	AGP-V1		AGP-V2		AGP-V2-U	
	W	S	W	S	W	S
1-Araf	31,9	19,6	27,9	35,2	28,6	25,4
1,2-Araf	-	-	1,1	0,4	-	-
1,5-Araf	4,3	4,3	4,0	6,1	1,6	4,1
1-GlcAp	-	-	-	-	6,2	7,8
1-Galp	5,0	4,9	2,6	0,9	4,1	2,9
1,3-Galp	20,2	23,9	15,0	17,6	14,3	14,2
1,4-Galp	1,3	0,7	-	-	1,1	2,1
1,6-Galp	7,7	8,2	12,8	7,1	9,2	6,8
1,3,6-Galp	29,6	38,4	36,6	32,7	34,9	36,7
VP:EG	0,8	1,6	1,2	0,9	0,9	1,0
Ara:Gal	1:1,8	1:3,2	1:2,1	1:1,4	1:2,1	1:2,1

EG = Endgruppen, VG = Verzweigungspunkte, - = nicht detektiert, U = Uronsäurereduziertes AGP

Abbildung 39 zeigt noch einmal in graphischer Darstellung die Verteilung der Bindungstypen der sechs vermessenen AGPs, wobei die linke Grafik ausschließlich die nativen AGPs darstellt und die rechte Grafik das native AGP der zweiten Charge im direkten Vergleich mit der vorgeschalteten Uronsäurereduktion des AGPs aufzeigt. Hierbei konnte deutlich gezeigt werden, dass es nur geringe

Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen sowie dem W- und dem S-AGP gibt, welche durch Messabweichungen erklärbar waren.

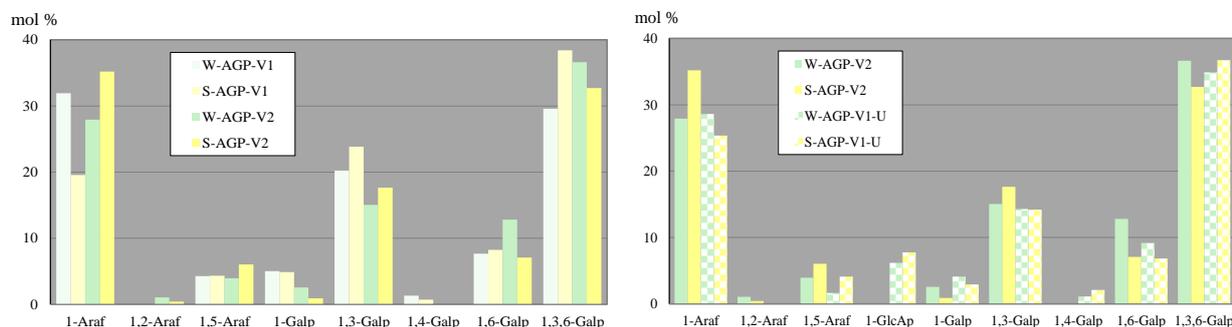


Abbildung 39: Verteilung der Bindungstypen

links: Vergleich der Bindungstypenanalysen der AGPs der 1. und 2. Charge

rechts: Bindungstypenanalysen des intakten und uronsäurereduziertem AGP der 2. Charge

5.2.4 Partielle Hydrolyse der AGPs

Mit Hilfe der milden Säure-Hydrolyse mit Oxalsäure können labile glykosidische Bindungen, wie sie z.B. zwischen Pentosen wie den Arabinosen und anderen Zuckerbausteinen herrschen, leicht gespalten werden. Damit dient diese Methode mit ergänzenden Molekulargewichtsuntersuchungen, sowie der Analyse der Bindungstypen zwischen den einzelnen Monosacchariden des degradierten AGP, der Aufklärung ihrer Feinstruktur.

5.2.4.1 Monosaccharidverteilung nach milder Säurehydrolyse

Nach milder Hydrolyse der AGPs der ersten und zweiten Charge wurden die Probenlösungen einer 80%igen (v/v) Ethanol-fällung unterzogen, die nach anschließender Zentrifugation zur Abtrennung der degradierten AGPs (OHR) von den abgespaltenen Mono- und Oligosacchariden (OHÜ) in Lösung führte. Beide Fraktionen wurden nach erfolgter Gefriertrocknung auf ihre Neutralzuckerzusammensetzung untersucht (Tabelle 26). Das degradierte AGP der ersten Charge wies hierbei einen Galaktosegehalt von 87,5% und 86,0% für das W- und S-AGP auf. Daneben konnten 9% Arabinose und Spuren von Rhamnose, Xylose und Mannose detektiert werden, wobei die letzteren drei genannten Zucker eventuell Verunreinigungen im Isolierungsgang der AGPs darstellen. Es wurde somit eine Reduktion des Arabinoseanteils von ca. 60% erreicht. Eine Verlängerung der Hydrolysezeiten, um eine 100%ige Entfernung der Arabinosen zu erreichen, kann eventuell zu einer Abspaltung von Galaktose führen. Da bereits im untersuchten Überstand 16-17% Galaktose zu finden war, wurde eine Verlängerung der Hydrolysezeit verworfen. Dies war scheinbar auch nicht nötig, da unter gleichen Hydrolysebedingungen, bis auf 1%, der Großteil der Arabinosen vom AGP der zweiten Charge entfernt werden konnten. Die degradierten AGPs bestanden im Nachhinein aus 97% (W) und 96% (S)

Galaktose. Der Anteil an abgespaltenen Arabinosen betrug ähnlich dem Überstand der ersten Charge auch 63-64%.

Tabelle 26: Neutralzuckerverteilung in den partiell hydrolysierten AGPs und den Lösungen der abgespaltenen Zuckern

mol %	AGP-V1-OHR		OHÜ		AGP-V2-OHR		OHÜ	
	W	S	W	S	W	S	W	S
Ara	9,1	9,2	69,4	62,9	0,7	1,0	64,0	62,6
Gal	87,5	86,0	15,9	16,8	96,9	96,4	31,6	32,2
Glc	-	-	3,3	4,6	0,2	0,4	0,7	0,6
Rha	0,7	1,1	3,6	4,9	0,4	0,4	1,3	2,3
Xyl	0,6	0,8	2,2	3,4	-	0,2	0,5	0,4
Man	2,1	2,9	2,7	3,8	1,8	1,6	1,4	1,3
Fuc	-	-	2,9	3,6	-	-	0,5	0,6
Ara:Gal	1:9,7	1:9,3	1:0,2	1:0,3	1:134,6	1:96,4	1:0,5	1:0,5

OHR = Rest-AGP nach Oxalsäurehydrolyse, OHÜ = Überstand nach der Oxalsäurehydrolyse

3.2.4.2 Bindungstypen im degradierten AGP

Neben der Verteilung der Neutralzucker wurden die Bindungstypen im Kohlenhydrateil des degradierten AGPs in Hinblick auf die Veränderung der Galaktose-Bindungstypen untersucht. Die quantitative Verteilung der einzelnen Bindungstypen im degradierten AGP ist in Tabelle 27 dargestellt. Auffällig hierbei ist das Verhältnis von Verzweigungspunkten zu Endgruppen, welches bis auf eine Ausnahme deutlich über zwei liegt und somit auf ein Fehlen von Endgruppen hinweist.

Tabelle 27: Verteilung der Bindungstypen im Rest-AGP der beiden degradierten AGP-Chargen

mol %	AGP-V1-OHR		AGP-V2-OHR	
	W	S	W	S
1-Araf	0	7,6	0,4	0,9
1,5-Araf	0	1,5	0	0
1-Galp	10,5	12,3	8,5	17,4
1,3-Galp	15,0	15,1	14,7	17,0
1,4-Galp	10,3	1,5	0,9	0,1
1,6-Galp	37,2	33,6	53,3	42,1
1,3,6-Galp	27,0	28,4	22,2	22,5
VP:EG	2,6	1,4	2,1	2,5
Ara:Gal	-	1:9,9	1:220,6	1:111,6

Die Darstellung der einzelnen degradierten AGPs im Vergleich mit dem entsprechenden intakten AGP wird in Abbildung 40 aufgezeigt (Messwerte siehe Tabelle 28). Die noch vorhandenen Ara-Reste wurden hier der Übersichtlichkeit halber nicht aufgeführt. Auffällig war die deutliche Abnahme von 1,3,6-Galp als Verknüpfungspunkt mit Arabinosen. Eine Abspaltung von Arabinosen an dem

Verzweigungspunkt resultierte in der Zunahme von 1,6-Galp und 1-Galp. Die Nicht-Zunahme von 1,3-Galp nach der Oxalsäurehydrolyse wies darauf hin, dass mit der 1,3-Gal-Backbone des Polysaccharidteils des AGPs keine einzelnen Arabinosen verknüpft sind.

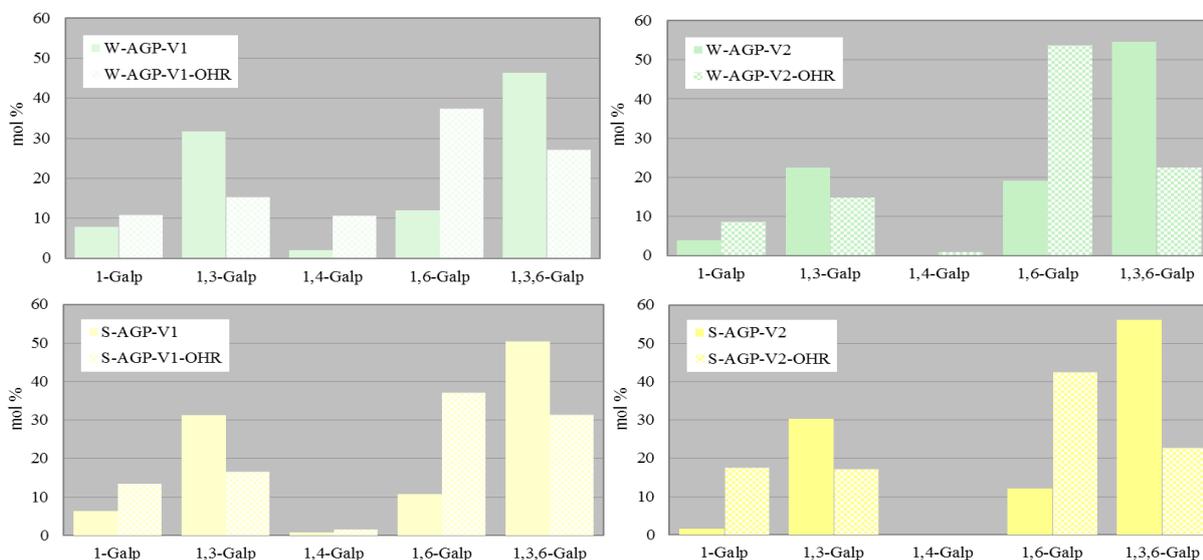


Abbildung 40: Änderung der Galaktosebausteine im AGP nach partieller Säurehydrolyse

Tabelle 28: Quantitative Veränderung der Galaktosemengen vom intakten zum degradierten AGP

mol %	AGP-V1		V1-OHR		AGP-V2		V2-OHR	
	W	S	W	S	W	S	W	S
1-Galp	7,9	6,5	10,5	13,5	3,9	-	8,5	0,2
1,3-Galp	31,7	31,3	15,0	16,6	22,4	30,2	14,7	17,1
1,4-Galp	2,0	0,9	10,3	1,6	-	-	0,9	0,2
1,6-Galp	12,0	10,8	37,2	37,0	19,1	12,2	53,6	42,4
1,3,6-Galp	46,4	50,5	27,0	31,3	54,6	56,1	22,3	22,7

5.2.4.3 Kombination von partieller Hydrolyse und Uronsäurereduktion

Um die Frage zu klären, ob die terminalen Glukuronsäuren mit Arabinosen, Galaktosen oder mit beiden verknüpft sind, wurde im Anschluss an die partielle Hydrolyse des AGPs eine Uronsäurereduktion durchgeführt. Hierfür wurde das AGP der dritten Charge degradiert. Die Analyse der Bindungstypen sowie deren Quantifizierung nach der Reduktion und Deuterierung der Uronsäuren gab Aufschluss über die Verknüpfungsstelle der Glukuronsäure.

In Abbildung 41 sind die Ergebnisse der Bindungstypenanalyse graphisch und tabellarisch dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass das W-AGP nach der partiellen Hydrolyse noch 5,3 % terminale Glukuronsäure (vorher: 6,2 %) und das S-AGP 6,2 % (vorher: 7,8 %) enthielt. Die Abweichungen im Uronsäuregehalt von ca. 1% werden als Messabweichungen interpretiert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die terminalen Glukuronsäuremoleküle mit Galaktosen verknüpft sind. Dies konnte auch durch die photometrische Bestimmung der Uronsäuren nach BLUMENKRANTZ am degradierten

Rest-AGP der ersten Charge, das selbst nach der Oxalsäurehydrolyse noch einen Uronsäuregehalt von 10,3% aufwies, bestätigt werden.

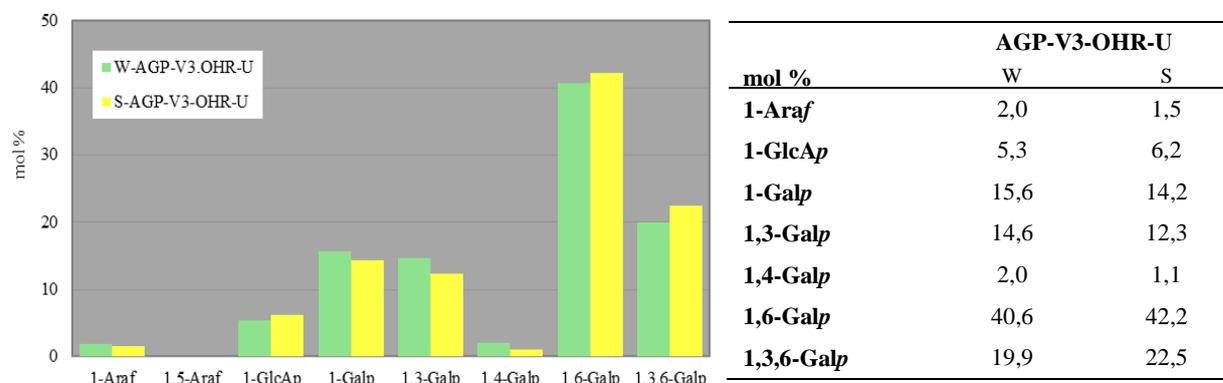


Abbildung 41: Darstellung der Bindungstypen eines oxalsäurehydrolysierten und uronsäurereduzierten AGPs

5.2.4.4 Bestimmung der Molekülgröße des säuredegradierten AGPs

Die Ermittlung des absoluten Molekulargewichtes sowie des hydrodynamischen Volumens des partiell hydrolysierten AGPs mit Hilfe einer wässrigen Größenausschlußchromatographie erfolgten im Anschluss. Dabei wurden die beiden degradierten AGPs der ersten und zweiten Charge sowie das degradierte und uronsäurereduzierte AGP der dritten Charge vermessen (siehe Tabelle 29).

Das absolute Molekulargewicht betrug für die in einem Peak eluierenden degradierten AGPs der ersten Charge ca. 35.000 Da (W-AGP siehe Abbildung 42 links) und für die degradierten AGPs der zweiten Charge ca. 33.000 Da. Letztere wiesen hydrodynamische Volumina von 33.000 bzw. 21.300 Da auf. Von den degradierten AGPs der ersten Charge wurden keine Messungen des hydrodynamischen Volumens durchgeführt. Die degradierten AGPs der dritten Charge wiesen nach erfolgter Uronsäurereduktion ein etwas kleineres Molekulargewicht von ca. 27.100 bzw. 30.000 Da auf, wobei die hydrodynamischen Volumina mit 20.800 und 23.400 Da deutlich kleiner waren als die absoluten Molekulargewichte (W-AGP siehe Abbildung 42 rechts).

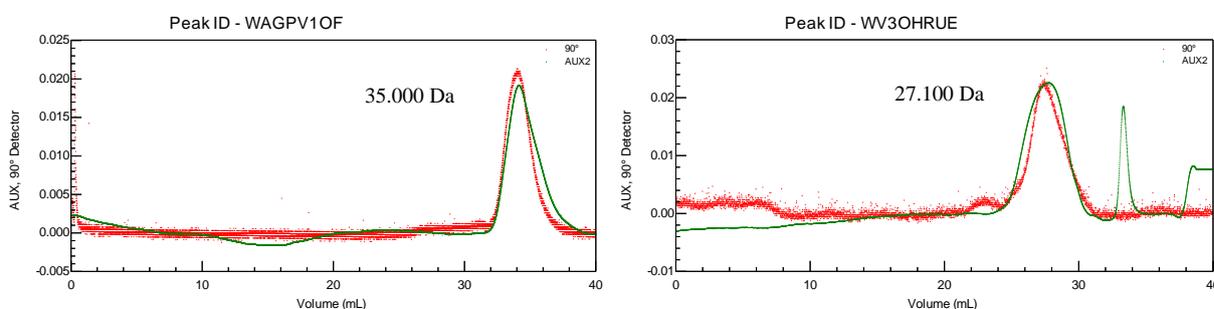


Abbildung 42: Chromatogramme der GPC-Messungen des oxalsäurehydrolysierten W-AGPs der

1. Charge (rechts) und des oxalsäurehydrolysierten und uronsäurereduzierten W-AGPs der
3. Charge (links); rotes Profil = MALLS-Signale, grünes Profil = RI-Signale

Tabelle 29: Bestimmung des absoluten Molekulargewichtes (MW) und des hydrodynamischen Volumens zweier degradiertes AGP-Chargen

		n	absolutes MW in Da (MW±Stabw)	absolutes MW in Da (nach Kalibrierung)	Hydrodynamisches Volumen in Da
AGP-V1-OHR	W	3	34.957±2.156	-	-
	S	3	35.667±2.262	-	-
AGP-V2-OHR	W	4	33.490±2.608	32.900	33.000
	S	3	32.887±3.235	32.300	21.300
AGP-V3-OHR-U	W	3	27.110±2.131	24.900	20.800
	S	3	29.793±1.430	30.000	23.400

OHR = Rest-AGP nach Oxalsäurehydrolyse, OHR-U = Rest-AGP nach Oxalsäurehydrolyse wurde uronsäurereduziert

5.2.5 Enzymatischer Abbau der AGPs

Eine weitere Methode, AGPs zu degradieren, ist die Nutzung von rekombinanten Enzymen, wie die *exo-β-1,3-Galaktanase* isoliert aus *Phanerochaete chrysosporium* und die *exo-1,5-α-L-Arabinofuronidase* isoliert aus *Streptomyces avermitilis*. Dabei wurden die AGP-Proben jeweils einzeln mit der *exo-β-1,3-Galaktanase*, die 1,3-Gal-Verknüpfungen in der Hauptkette spaltet, sowie mit der Kombination von *exo-β-1,3-Galaktanase* mit *exo-1,5-α-L-Arabinofuronidase*, wobei letztere Arabinosen an 1,5-Ara-Verbindungen abspaltet, inkubiert. Die Bestimmung der Hydrolyseraten der Enzyme gab Hinweise auf die Stärke der Degradation, die durch anschließende Untersuchungen der degradierten AGPs durch GPC- und Methylierungsuntersuchungen genauer verifiziert werden sollten. Daneben erfolgte in der Arbeitsgruppe um H. Ichinose in Japan mit Hilfe einer Hochleistungs-Anionen-Austausch-Chromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion die Auftrennung der freigesetzten Zucker, deren Detektion und die Zuordnung mittels Mono- und Oligosaccharidstandards.

Die Hydrolyseraten der jeweiligen Enzyme lagen mit 1-1,2% sehr niedrig, sodass man von einer nur sehr geringen Degradation der AGPs (W- und S-AGP der dritten Charge) ausging. Trotzdem erfolgte in der Hochleistungs-Anionen-Austausch-Chromatographie eine Auftrennung und Identifikation einiger Oligosaccharidbruchstücke (Abbildung 43). Dabei konnten mit Hilfe von Standards und dem Vergleich von Retentionszeiten einige Arabinosen (Abbildung 43 - Markierung 1), die über eine 1,5-glykosidische Bindung mit Arabinosen verknüpft waren, detektiert und identifiziert werden, sowie einzelne Galaktose-, Galaktose-Galaktose- und Arabinose-Galaktose-Galaktose-Bruchstücke (Abbildung 43 - Markierungen 2, 3 und 5). Des Weiteren wurden nicht genau identifizierbare (durch Mangel an entsprechenden Standards) abgespaltene Oligosaccharide aufgetrennt, die im Bereich der größeren Retentionszeiten lagen.

Aufgrund der nur sehr geringen Hydrolyseraten wurde davon abgesehen mit dem enzymatisch behandelten Glykoproteinen eine Bindungstypanalyse sowie Molekulargewichtsbestimmungen durchzuführen.

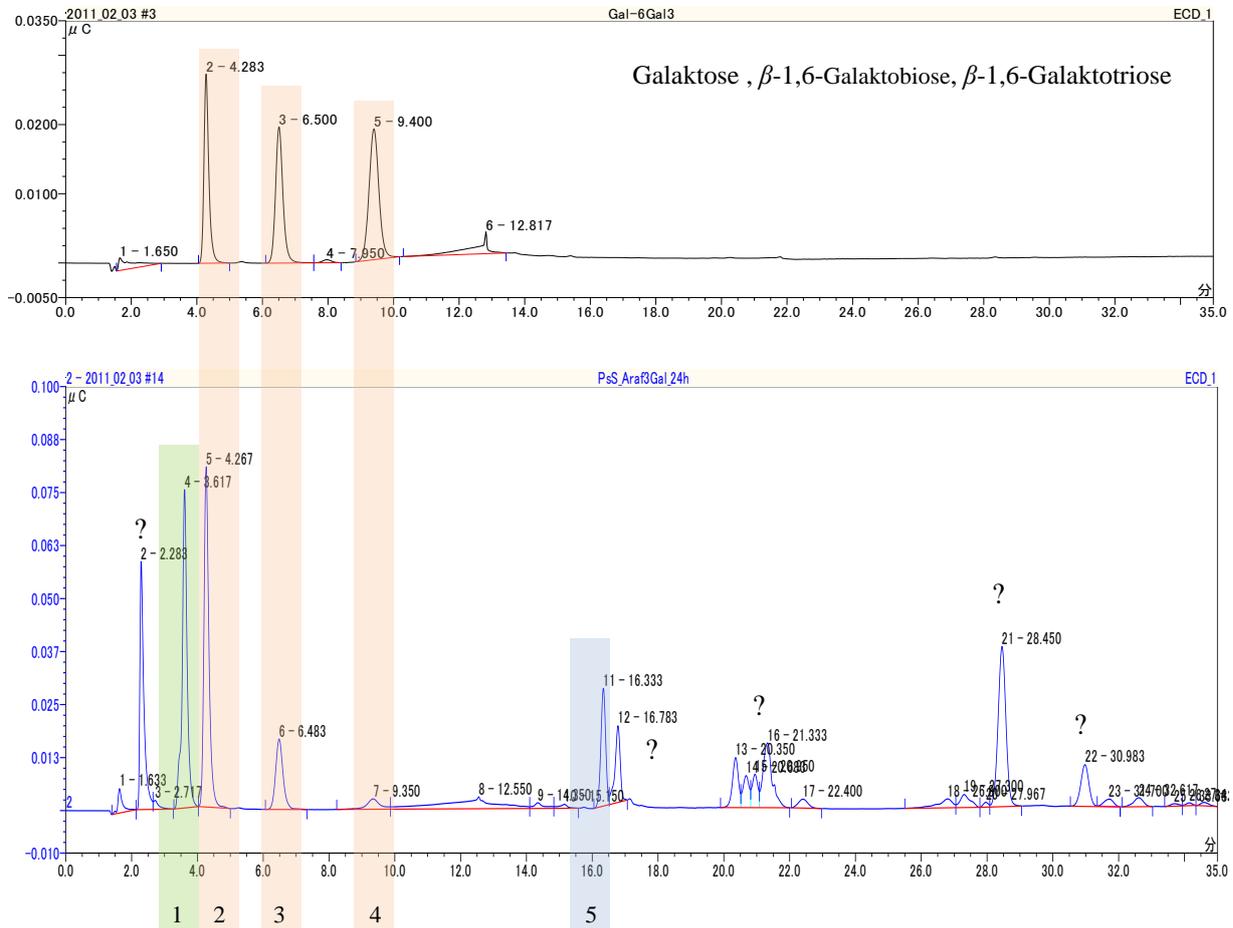


Abbildung 43: Chromatogramm des mit *exo-β-1,3-Galaktanase* und *exo-1,5-α-L-Arabinofuronidase* behandelten S-AGPs (unten) im Vergleich mit einem Galaktose-Standard (oben)

5.2.6 Smith Degradation

Eine gezielte Fragmentierung von Polysacchariden kann mit der Smith Degradation mit Hilfe von Na-Periodat erreicht werden. Dabei werden vicinale Hydroxylgruppen zu Carbonylgruppen oxidiert, wobei die Bindungen zwischen den OH-Gruppen tragenden C-Atomen gespalten werden. Die entstandenen Carbonylgruppen werden anschließend zu primären Alkoholen reduziert und das Polysaccharid mit milder Säure hydrolysiert. Das degradierte AGP wird in 80% (v/v) Ethanol ausgefällt und im Anschluss in Bezug auf seine Bindungstypen und sein Molekulargewicht untersucht.

5.2.6.1 Bindungstypen im AGP nach Smith Degradation

Die quantitative Verteilung der einzelnen Bindungstypen im Kohlenhydratanteil des W- und S-AGPs nach der Smith Degradation ist in Tabelle 30 dargestellt. Die dominierenden Bindungstypen nach dem Periodat-Abbau waren in Anteilen um die 20% 1-Galp, 1,3-Galp, 1,6-Galp und 1,3,6-Galp. Weiterhin auffällig war das Auftauchen eines bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht detektierten Zuckerbausteins (1,4,6-Glcp) mit Anteilen von 1-2%. Des Weiteren wurden geringe Anteile von terminaler Arabinose und 1,4-Galp detektiert. Die Verhältnisse von Verzweigungspunkten zu Endgruppen lagen mit 1,4 und 1,3 etwas über 1 und wiesen damit auf das Fehlen von Endgruppen hin.

Tabelle 30: Darstellung der Bindungstypen im Kohlenhydratanteil der Smith degradierten AGP

mol %	AGP-V2-SDR	
	W	S
1-Araf	1,0	1,1
1-Galp	19,0	20,6
1,3-Galp	26,0	26,5
1,4-Galp	0,7	1,4
1,6-Galp	26,0	22,7
1,4,6-Glcp	1,4	1,4
1,3,6-Galp	25,9	26,3
VP:EG	1,4	1,3
Ara:Gal	1:100,9	1:93,3

SDR= Rest- AGP nach Smith Degradation

Die Darstellung der Galaktosemengen in den intakten und Smith degradierten AGPs konnte die Veränderungen in der Polysaccharidstruktur verdeutlichen (Abbildung 44). Die entsprechenden Messwert sind in Tabelle 32 dargestellt. Dabei konnte beobachtet werden, dass der Anteil von 1,3-Galp nur geringen Veränderungen unterlag, da hier keine vicinalen OH-Gruppen vorlagen. Im Gegensatz dazu sank der Gehalt an 1,3,6-Galp durch die Abspaltung terminaler Arabinosen um 50% und resultierte in einer Zunahme von 1,6-Galp. Die deutliche Zunahme der terminalen Galaktose wird durch die Abspaltung terminaler Arabinosen von 1,6-Galp bedingt. Das Vorhandensein des Verzweigungspunktes 1,3,6-Galp sowie die Zuckerbausteine 1,3- und 1,6-Galp im degradierten AGP wiesen auf ein stark verzweigtes AGP hin.

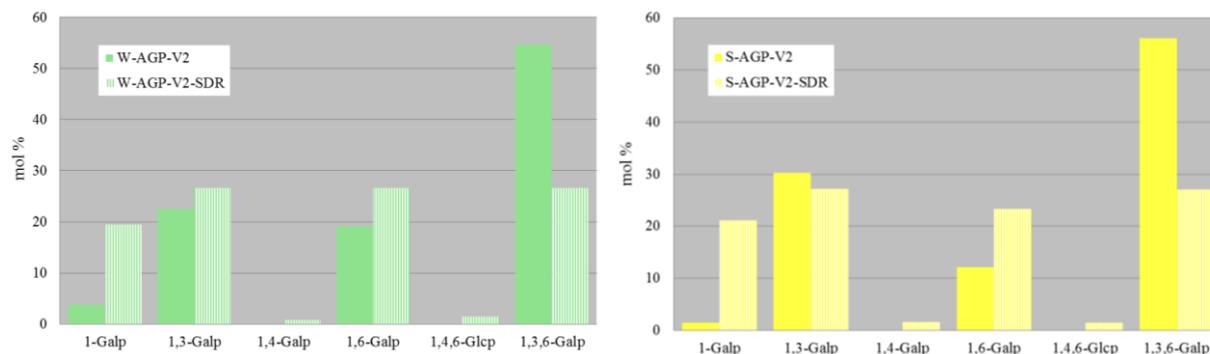


Abbildung 44: Graphische Darstellung der Veränderung der Mengen der Galaktose-Bindungstypen von den intakten zu dem Smith degradierten AGPs der 2. Charge

Tabelle 31: Quantitative Veränderung der Galaktosebausteine von intakten zu degradierten AGPs

mol %	AGP-V2		V2-SDR	
	W	W	S	S
1-Galp	3,8	19,2	1,5	20,9
1,3-Galp	22,4	26,4	30,2	26,9
1,4-Galp	-	0,5	-	1,2
1,6-Galp	19,1	26,4	12,2	23,1
1,4,6-Glcp	-	1,1	-	1,1
1,3,6-Galp	54,7	26,4	56,1	26,8

5.2.6.2 Bestimmung der Molekulargewichte der degradierten AGPs

Das nach der Degradation der AGPs vermessene degradierte AGP wies wie erwartet ein deutlich geringeres Molekulargewicht als das native AGP auf. Das absolute Molekulargewicht (MW) der zweiten Charge lag mit ca. 21.100-22.100 Da um 1/5 niedriger als das der nativen AGPs und wies ein hydrodynamisches Volumen von 28.600 Da bzw. 32.800 Da auf (siehe Tabelle 32).

Tabelle 32: Molekülgrößenbestimmung der degradierten AGPs mit Na-Periodat

	n	absolutes MW in Da		Hydrodynamisches Volumen in Da
		(MW±Stabw)	(nach Kalibrierung)	
AGP-V2-SDR	W	3	21.068±19.212	20.500
	S	2	22.065±10.501	21.500

SDR = degradiertes-AGP nach Smith Degradation

5.2.7 ¹³C-NMR Spektroskopie

Um die Konfiguration der einzelnen Monosaccharide am anomeren C-Atom festzustellen, wurden die aufgereinigten AGPs in einem Kernresonanzspektrometer vermessen.

Die erste Messung eines in D₂O gelösten AGPs erfolgte mit Aceton als internem Standard (31,5 ppm)

für 15 h, wobei das Spektrum aufgrund der nur gering löslichen Substanzmenge, die auch durch Wärmezufuhr und Ultraschall nicht gesteigert werden konnte, stark verrauscht war (siehe Abbildung 45). Die schlechte Löslichkeit äußerte sich z.B. in dem Nicht-Vorhandensein eines Signals der Uronsäuren, das unter gleichen Bedingungen laut Literatur bei 176 ppm liegen sollte. Eine Übersicht der detektierten Signale mit ihren chemischen Verschiebungen sowie der Zuordnung der C-Atome ist in Tabelle 33 aufgeführt. Alle Galaktose-Bausteine liegen in ihrer β -Konformation vor, wohingegen die Arabinosen in ihrer α -Form detektiert wurden.

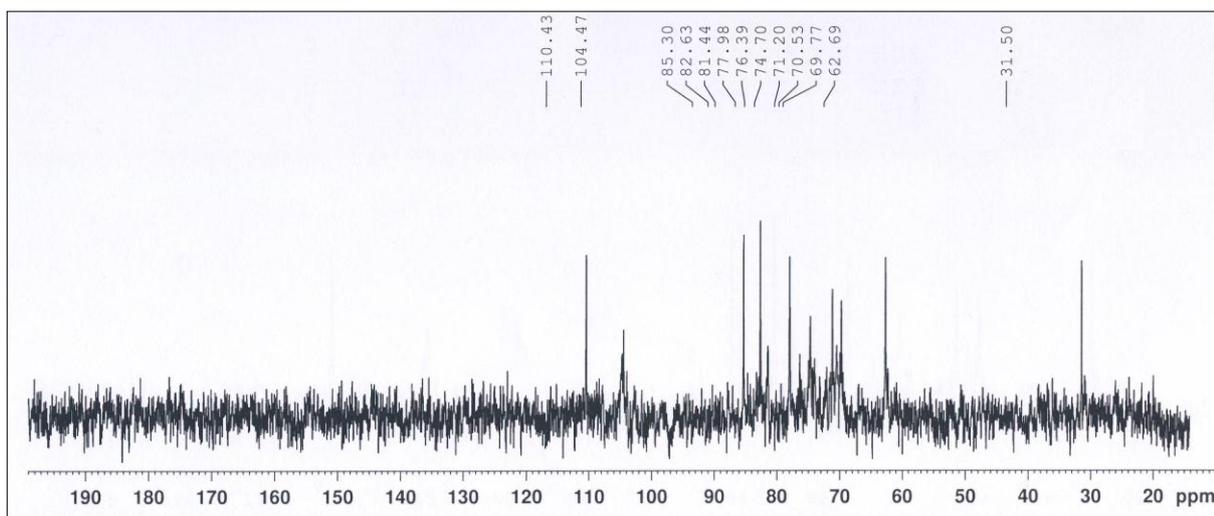


Abbildung 45: ^{13}C -Spektrum des W-AGPs der 1. Charge in D_2O

Aufgrund der schlechten Löslichkeit des AGPs in D_2O wurde als zweites Lösungsmittel deuteriertes DMSO getestet. Bei einer Messzeit von 13,35 h und einer Kalibrierung mit dem Restlösemittelpeak (Septett bei 39,4852 ppm) konnte das Signal-Rausch-Verhältnis des vermessenen W-AGPs der dritten Charge nicht verbessert werden (siehe Abbildung 46).

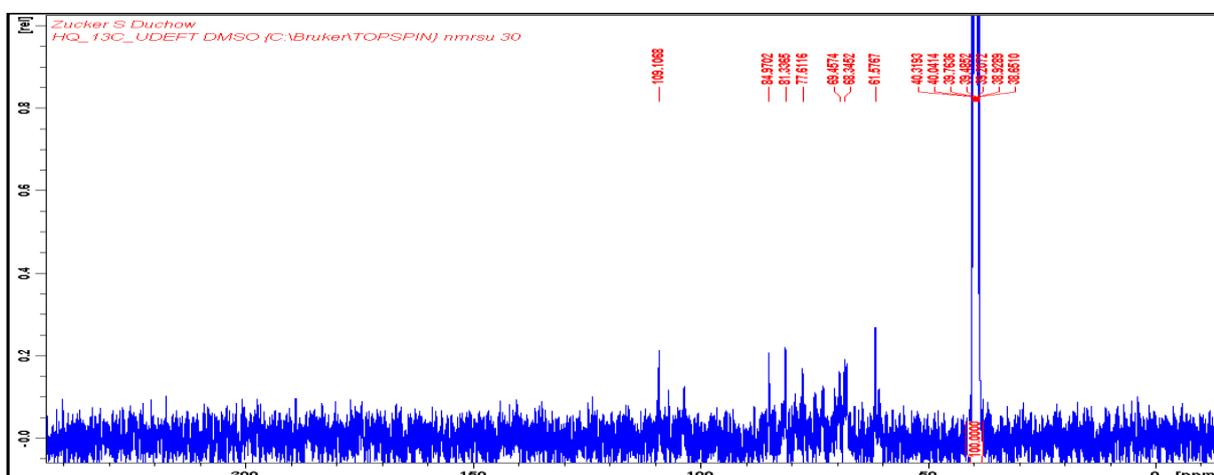


Abbildung 46: ^{13}C -Spektrum des W-AGPs der 3. Charge in DMSO-d_6

Tabelle 33: Chemische Verschiebungen im ^{13}C -Spektrum des in D_2O gelösten AGPs mit entsprechender Zuordnung zu C-Atomen (PONDER et al. 1997, WACK 2004, GOELLNER et al. 2011)

W-AGP-V1			
Peak	C-Atom	ν [ppm]	Zuordnung
1	C1	110,5028	1- α -Araf
2	C1	104,4653	1- β -Galp; 1,6- β -Galp; 1,6- β -Galp; 1,3,6- β -Galp
3	C4 od. C3	85,1546	1- α -Araf od. 1,5- α -Araf
4	C3	82,5998	1,3,6- β -Galp
5	C2	81,3748	1- α -Araf; 1,5- α -Araf
6	C3	77,8681	1- α -Araf
7	C5	76,3174	1- β -Galp
8	C2	72,0182	1- β -Galp; 1,3- β -Galp; 1,6- β -Galp
9	C2 od. C6	71,1387	1,3,6- β -Galp
10	C4	69,7534	1- β -Galp; 1,3- β -Galp; 1,6- β -Galp; 1,3,6- β -Galp
11	C5 od. C6	62,5737	1- α -Araf od. 1,5- α -Araf od. 1- β -Galp
12		31,5478	Aceton
13		31,5014	Aceton

5.3 Analytik des Proteinanteils

5.3.1 Aminosäurezusammensetzung

Die Auftrennung und Detektion der einzelnen Aminosäuren per HPLC erfolgte nach vorangegangener saurer Hydrolyse der Glykoproteine und Abtrennung der verkohlten Zucker mittels Zentrifugation.

Während der HPLC-Messungen der AGPs der vierten Charge konnten 18 verschiedene Aminosäuren aufgetrennt und identifiziert werden (siehe Abbildung 47), wobei aufgrund der Hydrolyse mit HCl nicht zwischen Asparagin und Asparaginsäure sowie Glutamin und Glutaminsäure unterschieden werden kann. Die dominierenden Aminosäuren im Kern-Protein mit einem jeweiligen Anteil von über 10% (m/m) waren Alanin, Asparagin/Asparaginsäure und Serin. Mit Anteilen von 5-10% (m/m) konnten Threonin, Glutamin/Glutaminsäure, Leucin, Glycin, Valin, Lysin und Arginin detektiert werden. Phenylalanin, Prolin, Hydroxyprolin, Isoleucin, Histidin, Tyrosin, Methionin und Cystein konnten in Mengen unter 5% (m/m) detektiert werden. Überraschend war hierbei der mit 2,9 und 3,8 % (m/m) für das W- und das S-AGP niedrig liegende Anteil an Hydroxyprolin, die in der Literatur als typische Aminosäure für die Bindung zwischen den Polysaccharidanteilen und dem Kern-Protein gilt. Die Verteilung der einzelnen Aminosäuren im Kern-Protein der AGPs ist in Tabelle 34 dargestellt.

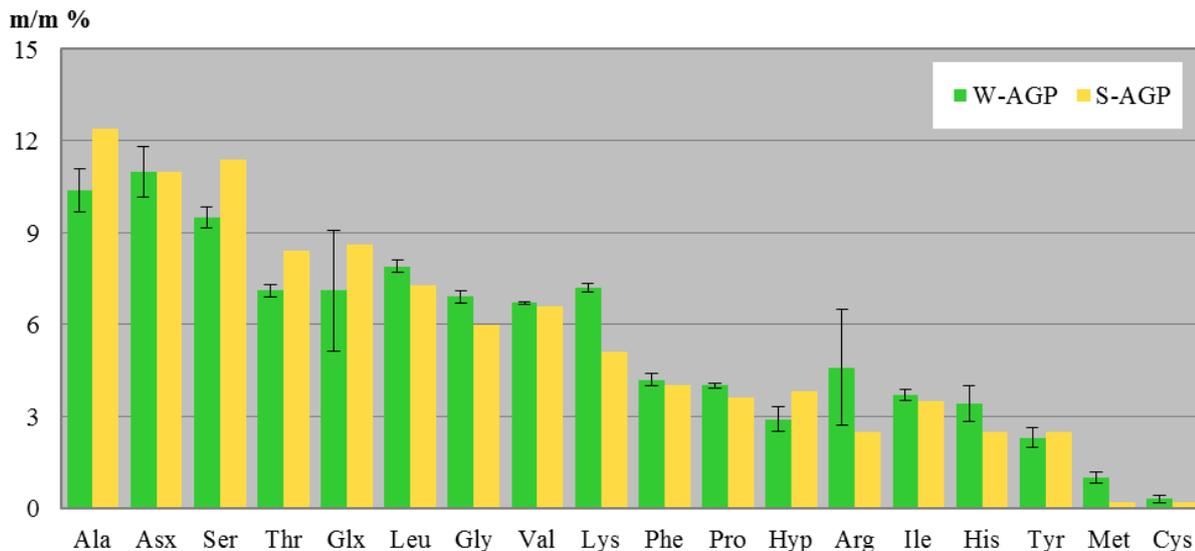


Abbildung 47: Aminosäurezusammensetzung des Core-Proteins

Tabelle 34: Quantifizierung der Aminosäuren im Kern Protein des AGPs der 4. Charge in m/m %

		AGP-V4-M1		AGP-V4-M2
		W (m/m %)	S (m/m %)	W (m/m %)
Alanin	Ala	9,9	12,4	10,9
Asparagin/Asparaginsäure	Asx	11,6	11,0	10,4
Serin	Ser	9,2	11,4	9,7
Threonin	Thr	6,9	8,4	7,2
Glutamin/Glutaminsäure	Glx	8,5	8,6	5,7
Leucin	Leu	8,0	7,3	7,7
Glycin	Gly	7,0	6,0	6,7
Valin	Val	6,7	6,6	6,7
Lysin	Lys	7,3	5,1	7,1
Phenylalanin	Phe	4,3	4,0	4,0
Prolin	Pro	3,9	3,6	4,0
Hydroxyprolin	Hyp	2,6	3,8	3,2
Arginin	Arg	3,3	2,5	5,9
Isoleucin	Ile	3,8	3,5	3,5
Histidin	His	3,8	2,5	3,0
Tyrosin	Tyr	2,0	2,5	2,5
Methionin	Met	0,8	0,2	1,1
Cystein	Cys	0,2	0,2	0,4

Vom S-AGP der 4. Chargen wurde keine 2. Messung der Aminosäuren durchgeführt.

5.3.2 Quantitative Bestimmung von Hydroxyprolin

Die selektive Bestimmung von Hydroxyprolin (Hyp) erfolgte nach Hydrolyse des AGPs und der Zerlegung des Proteinanteils in seine Aminosäuren durch die Umsetzung mit 4-Dimethylamino-benzaldehyd und einer anschließenden photometrischen Vermessung der Extinktion.

Im Durchschnitt betrug der Hyp-Gehalt im AGP $0,37 \pm 0,13\%$, der anhand von acht Messungen

verschiedener AGP-Chargen ermittelt wurde (siehe Tabelle 35). Die Berechnung des Proteinanteils im AGP wurde mit Hilfe des bereits erfassten Hyp-Gehaltes aus der Aminosäureanalytik durchgeführt, wobei der durchschnittliche Hyp-Gehalt auf 3% festgelegt wurde und nur beim AGP der vierten Charge die genau ermittelten Werte verwendet wurden. Der somit berechnete Proteinanteil im AGP betrug $10,8 \pm 1,8\%$, wobei die Unterteilung in W- und S-AGP zu $12,3 \pm 1,0\%$ und $10,0 \pm 1,5\%$ führt (das W-AGP-V3 wurde aus der Mittelwertsbetrachtung aufgrund der hohen Abweichung ausgeschlossen).

Tabelle 35: Übersicht über den Hydroxyprolin- bzw. Proteingehalt einzelner AGP-Chargen

		Hyp % im AGP	Protein % im AGP
AGP-V1	W	nicht vermessen	-
	S	0,35	0,35 entsprechen 3% des Proteins = 11,7
AGP-V2	W	0,36	0,36 entsprechen 3% des Proteins = 12
	S	0,30	0,30 entsprechen 3% des Proteins = 10
AGP-V3	W	(0,68	0,68 entsprechen 3% des Proteins = 22,7)
	S	0,25	0,25 entsprechen 3% des Proteins = 8,7
AGP-V4	W	0,39	0,39 entsprechen 2,9% des Proteins = 13,4
	S	0,32	0,33 entsprechen 3,8% des Proteins = 8,4
AGP 36. Ernte	S	0,34	0,34 entsprechen 3% des Proteins = 11,3
Mittelwert		0,33	10,8 (W-AGP: 12,7; S-AGP: 10,0)
Stabw		0,05	1,8 (W-AGP: 1,0; S-AGP: 1,5)

5.3.3 Quantitative Bestimmung des Proteingehaltes nach STARCHER

Neben der Berechnung des Proteingehaltes über den photometrisch bestimmten Hyp-Gehalt im Proteinanteil des AGPs wurde die Proteinmenge zusätzlich über einen photometrischen Test mit Ninhydrin quantifiziert. Der mit primären Aminen gebildete rot-violette Farbkomplex wurde photometrisch vermessen und der Proteingehalt über eine Kalibrierung mit Rinderserumalbumin quantifiziert.

Die dabei ermittelten Proteinmengen von 9,6% und 6,1% für das W- und das S-AGP der vierten Charge (Tabelle 36) lagen etwas niedriger, als die über den Hyp-Gehalt berechneten Anteile. Dies kommt u.a. durch die fehlende Erfassung der sekundären Amine wie Prolin und Hydroxyprolin, die nur einen gelben Farbstoffkomplex bilden, der nicht bei 570 nm sondern bei 400 nm erfasst wird, zustande. Diese gelbe Färbung wurde in unserem Fall durch die rot-violette der primären Amine überlagert, sodass kein Prolin und Hydroxyprolin detektiert werden konnten.

Tabelle 36: Proteinmengen der 4. AGP-Charge ermittelt nach der Methode nach STARCHER

		1. Messung	2. Messung	MW	Stabw
AGP-V4	W	9,27%	9,99%	9,63%	1,39%
	S	5,71%	6,44%	6,08%	1,30%

5.3.4 Elementaranalyse

Mit Hilfe der Verbrennungsanalytik in Kombination mit einer gaschromatographischen Untersuchung konnten die Elemente Stickstoff, Kohlenstoff, Wasserstoff und Schwefel im AGP aufgetrennt, identifiziert und quantifiziert werden.

Es wurden die AGPs der zweiten und vierten Charge vermessen (siehe Abbildung 48), die bedingt durch den großen Polysaccharidanteil zu ca. 40% (m/m) aus Kohlenstoff und zu ca. 6% (m/m) aus Wasserstoff bestehen. Der Anteil an Stickstoff von 2% und 2,9% (m/m) im W- und S-AGP der zweiten Charge bzw. 1,9% und 1,5% (m/m) im W- und S-AGP der vierten Charge wird durch die Aminogruppen aller Aminosäuren sowie die Aminosäuren Arginin, Lysin, Histidin, Glutamin und Asparagin bedingt, die auch bis auf die fehlende Unterscheidbarkeit von Glutamin und Asparagin von ihren entsprechenden Säuren in der Aminosäureanalytik als Bestandteil der AGPs bestätigt werden konnten. Der mit 0,7-1,5% (m/m) niedrige Gehalt an Schwefel wird durch die Aminosäure Cystein, die aber nur zu Anteilen unter 0,5% im Protein vorkommt und wahrscheinlichen Resten von Natriumdithionit, welcher während der AGP-Isolierung verwendet und nicht vollständig abgetrennt wurde, hervorgerufen.



Abbildung 48: Ergebnisse der Elementaranalyse der zweiten und vierten AGP-Charge

Aus dem quantifizierten Stickstoffgehalt der Elementaranalyse konnte mit Hilfe der Kjeldahl-Methode der Proteingehalt in der Probe bestimmt werden. Dabei wurde der Stickstoffgehalt mit 6,25 multipliziert und ergab den Anteil des Proteins in der Probe, der für die beiden W-AGPs bei 12,8 und 11,8% lag. Die berechneten Proteingehälter der S-AGPs mit 18,0% und 9,7% unterschieden sich im Gegensatz dazu deutlich (Tabelle 37).

Tabelle 37: Berechnung des Proteinanteils im AGP nach der Methode nach Kjeldahl

		N % (m/m)	*6,25 = Protein % im AGP
AGP-V2	W	2,047	12,8
	S	2,872	18,0
AGP-V4	W	1,881	11,8
	S	1,545	9,7

5.3.5 Bestimmung der Bindungsaminosäure(n)

Die mittels alkalischer Hydrolyse erzeugten Oligo- und Polysaccharidseitenketten wurden im Hinblick auf die an den Kohlenhydrateinheiten verbliebenen Bindungsaminosäuren untersucht. Mit Hilfe einer weiteren Hydrolyse (mit HCl siehe IV 4.2.2) wurden die Zuckeranteile abgetrennt und die verbliebenen Aminosäuren in der HPLC aufgetrennt und detektiert.

In Abbildung 49 sind die Bindungsaminosäuren des AGPs der vierten Charge dargestellt. Für die Bindungen zwischen Kohlenhydrat- und Proteinteil konnte keine verantwortliche Aminosäure identifiziert werden, da sich nicht nur die Messungen zwischen dem W- und dem S-AGP massiv unterschieden, sondern auch diverse Aminosäuren detektiert wurden. Dies deutet auf eine unvollständige Hydrolyse bzw. andere Probleme während der Probenaufarbeitung hin. Die quantitative Verteilung der detektierten Aminosäuren ist in Tabelle 38 dargestellt.

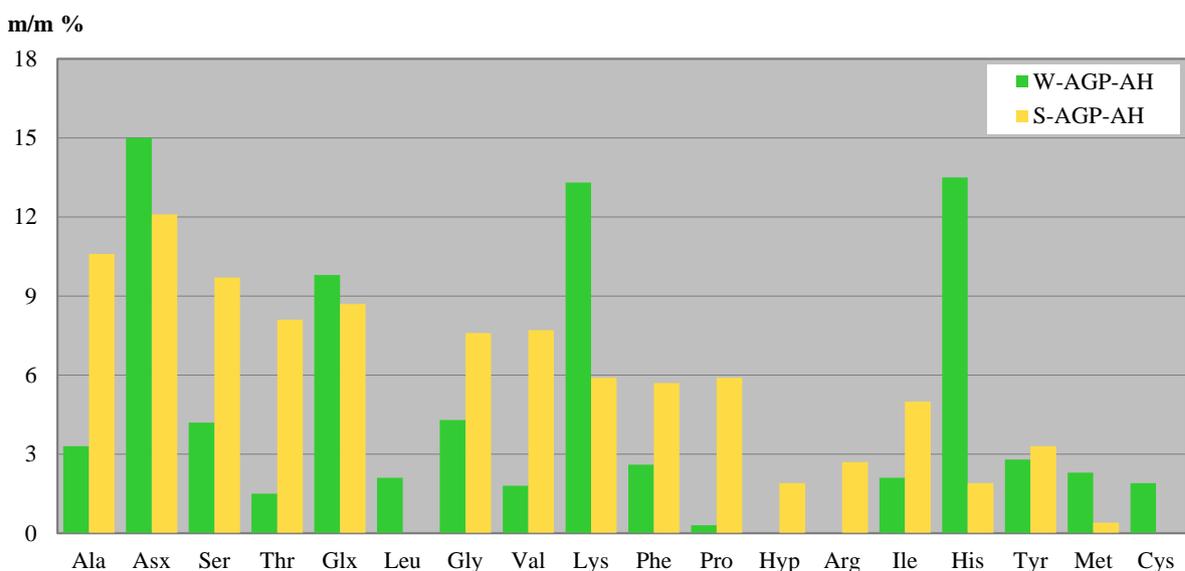


Abbildung 49: Bindungsaminosäuren der einzelnen Oligo- und Polysaccharidseitenketten

Tabelle 38: Quantitative und qualitative Verteilung der „Bindungsaminosäure(n)“

		AGP-V4-AH	
		W (m/m %)	S (m/m %)
Alanin	Ala	3,3	10,6
Asparagin/Asparaginsäure	Asx	15,0	12,1
Serin	Ser	4,2	9,7
Threonin	Thr	1,5	8,1
Glutamin/Glutaminsäure	Glx	9,8	8,7
Leucin	Leu	2,1	0
Glycin	Gly	4,3	7,6
Valin	Val	1,8	7,7
Lysin	Lys	13,3	5,9
Phenylalanin	Phe	2,6	5,7
Prolin	Pro	0,3	5,9
Hydroxyprolin	Hyp	0	1,9
Arginin	Arg	0	2,7
Isoleucin	Ile	2,1	5,0
Histidin	His	13,5	1,9
Tyrosin	Tyr	2,8	3,3
Methionin	Met	2,3	0,4
Cystein	Cys	1,9	0

5.4 Alkalische Hydrolyse der AGPs

Mittels alkalischer Hydrolyse wurden die Bindungen zwischen den Aminosäuren des Kern-Proteins im AGP gespalten, sodass einzelne intakte Oligo- und Polysaccharidseitenketten mit den entsprechenden Bindungsaminosäuren isoliert und untersucht werden konnten (siehe Abbildung 50). Die Analytik der erhaltenen Proben erfolgte mittels Acetylierung/Gaschromatographie und Gelpermeationschromatographie, die der Charakterisierung der Oligo- und Polysaccharidseitenketten diente und eine Zuordnung zu einem AGP-Modell möglich machte.

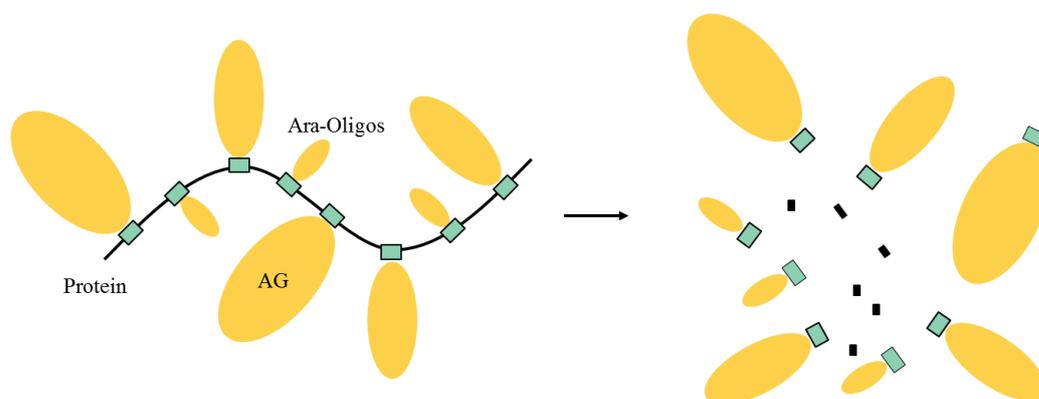


Abbildung 50: Modellhafte Darstellung der Alkalischen Hydrolyse eines AGPs

5.2.7.1 Größenbestimmung der Kohlenhydrateinheiten

Die alkalisch hydrolysierten AGPs wurden nach der Neutralisation auf verschiedenen Wegen aufgearbeitet und im Anschluss die Molekulargewichte der Zuckereinheiten mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) bestimmt.

Im ersten Fall wurde die neutralisierte Probe zwei Tage kontinuierlich dialysiert (MWCO 1.000 Da), um entstandenes NaCl abzutrennen. Die Auftrennung der gefriergetrockneten Kohlenhydrateinheiten in der GPC verdeutlichte, dass, um genaue Angaben über die Größe der Zuckereinheiten treffen zu können, eine weitere Aufarbeitung der Proben nötig war (ohne Abbildung).

Um die Trennung per GPC zu verbessern, wurde das gefriergetrocknete, alkalisch hydrolysierte AGP einer Ethanol-fällung unterzogen, sodass die großen Kohlenhydrateinheiten ausfielen und die niedermolekularen Zucker, meist Mono- und Oligosaccharide, in Lösung blieben. Beide Fraktionen (hochmolekular und niedermolekular) wurden im Anschluss wieder in der GPC vermessen (Chromatogramme siehe Abbildung 51).

Die hochmolekulare Fraktion konnte in zwei Hauptpeaks aufgetrennt werden. Die erste Fraktion wies ein absolutes Molekulargewicht von ca. 32 kDa, sowie ein hydrodynamisches Volumen von ungefähr 34 kDa auf. Das absolute Molekulargewicht der zweiten Fraktion betrug ca. 8 kDa, wobei ihr hydrodynamisches Volumen bei ca. 6,5 kDa lag (Tabelle 39). Der im linken Diagramm der Abbildung 51 erkennbare dritte Peak wurde vom Laser-Detektor nicht mehr erfasst und wurde mit Hilfe des RI-Signals ausgewertet. Es konnte ein hydrodynamisches Volumen von 139 Da bestimmt werden. Da das degradierte AGP dialysiert wurde (MWCO 1.000 Da), wird im Chromatogramm nur eine hochmolekulare Fraktion erwartet. Jedoch zeigt das Chromatogramm auch ein Signal im Bereich niedermolekularer Fraktionen. Vergleicht man das vermeintlich niedermolekulare Signal mit dem Signal des Totvolumens (negativer Peak) (Abbildung 51, rechtes Chromatogramm), haben sie identische Retentionszeiten, sodass Peak 3 aus der Auswertung ausgeschlossen werden konnte.

In der niedermolekularen Fraktion konnten zwei verschieden große Einheiten mit hydrodynamischen Volumina von rund 1,7 und 0,7 kDa identifiziert werden (Tabelle 39), die auf Oligosaccharidseitenketten im AGP-Molekül hinwiesen. Aufgrund des niedrigen Molekulargewichtes war keine Detektion über den MALLS-Detektor möglich.

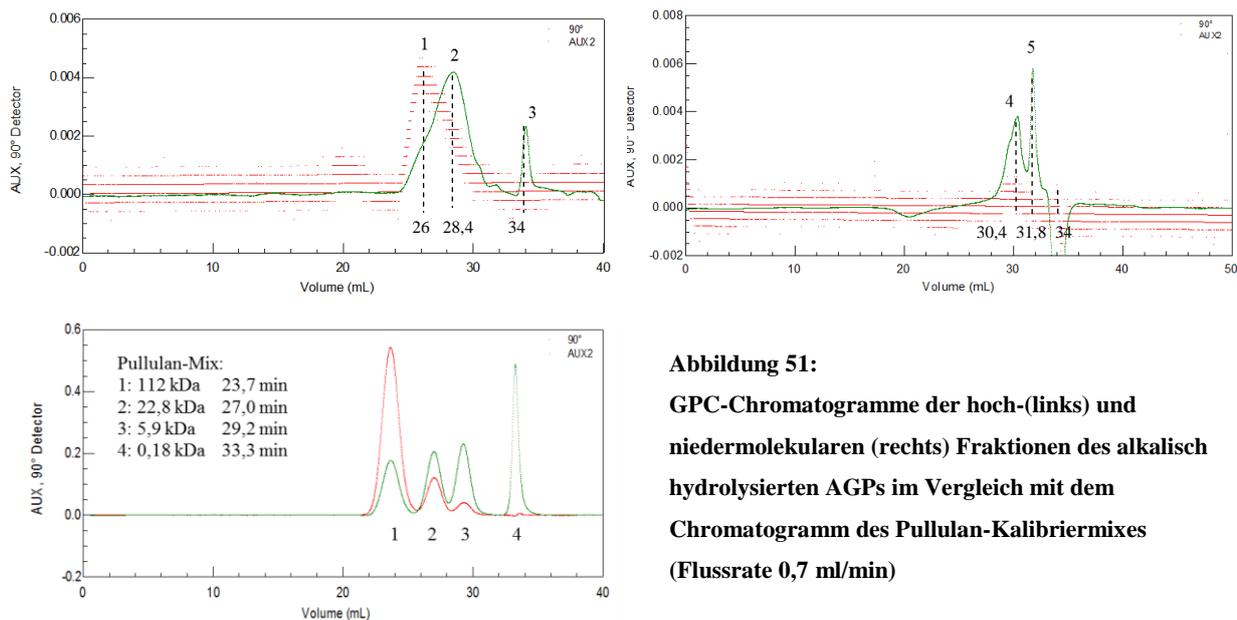


Abbildung 51:
GPC-Chromatogramme der hoch-(links) und niedermolekularen (rechts) Fraktionen des alkalisch hydrolysierten AGPs im Vergleich mit dem Chromatogramm des Pullulan-Kalibriermixes (Flussrate 0,7 ml/min)

Tabelle 39: Absolute Molekulargewichte und hydrodynamische Volumina der hoch- und niedermolekularen Fraktionen des alkalisch hydrolysierten AGPs

Hochmolekulare Fraktion

	absolutes Molekulargewicht in Da					
	M1	M2	M3	Mittelwert	Stabw	nach Kalibrierung
Peak 1	25.850	51.720	28.270	35.280	14.289	32.166
Peak 2	6.543	17.860	4.866	9.756	7.068	8.138
Peak 3	-	-	-	-	-	-

hydrodynamisches Volumen in Da

	Retentionsvolumen in ml					
	M1	M2	M3	Mittelwert	Stabw	nach Kalibrierung
Peak 1	26,03	25,95	26,11	26,03	0,08	34.319
Peak 2	28,49	28,43	28,46	28,46	0,03	6.468
Peak 3	34,06	34,02	34,09	34,06	0,03	139

Niedermolekulare Fraktion

	hydrodynamisches Volumen in Da					
	Retentionsvolumen in ml					
	M1	M2	M3	Mittelwert	Stabw	nach Kalibrierung
Peak 4	30,37	30,38	30,37	30,37	0,01	1.742
Peak 5	31,79	31,80	31,79	31,79	0,01	658

Eine Wiederholung der alkalischen Hydrolyse mit anschließender Ethanol-fällung und der Entsalzung der hochmolekularen Fraktion mittels Dialyse führte zu einer verbesserten Auftrennung der Polysaccharideinheiten in der GPC (siehe Abbildung 52). Es konnten drei Zuckereinheiten verschiedener Größe detektiert werden. Die größte Fraktion wies ein absolutes Molekulargewicht von

ca. 54 kDa auf, welches nur geringen Schwankungen während der Messungen unterlag (Standardabweichung = 691 Da). Die mittlere Fraktion hatte ein absolutes Molekulargewicht von ca. $16,5 \pm 1$ kDa. Die kleinste Fraktion konnte nur noch mit dem RI-Detektor ausgewertet werden und wies ein hydrodynamisches Volumen von ungefähr 0,7 kDa auf, obwohl die Ausschlussgrenze des Dialyseschlauches 1 kDa betrug (siehe Tabelle 40).

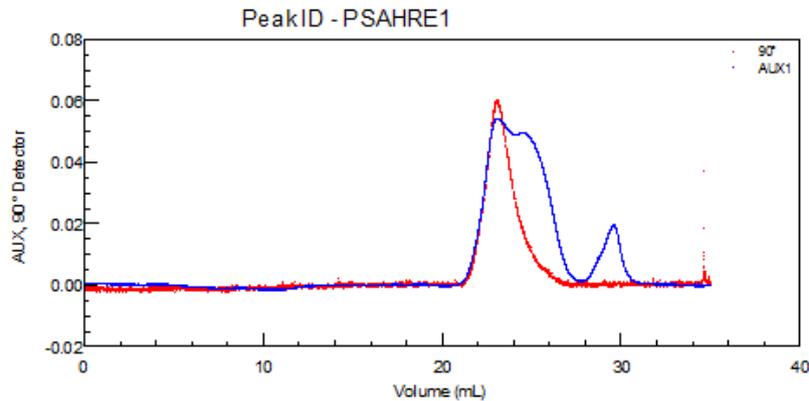


Abbildung 52: GPC-Chromatogramm der entsalzten hochmolekularen Fraktion (Flussrate 0,7 ml/min; rot: MALLS-Signal; blau: RI-Signal)

Tabelle 40: Absolute Molekulargewichte und hydrodynamische Volumina der Zuckereinheiten der hochmolekularen Fraktion nach Entsalzung

Hochmolekulare Fraktion

	absolutes Molekulargewicht in Da					
	M1	M2	M3	Mittelwert	Stabw	nach Kalibrierung
Peak 1	51.920	51.320	50.250	51.163	691	54.384
Peak 2	15.470	13.500	15.990	14.987	1.073	16.489
Peak 3	-	-	-	-	-	-

	hydrodynamisches Volumen in Da					
	Retentionsvolumen in ml					
	M1	M2	M3	Mittelwert	Stabw	nach Kalibrierung
Peak 1	23,07	23,07	23,07	23,07	0	48.512
Peak 2	24,55	24,61	24,55	24,57	0,03	18.465
Peak 3	29,59	29,59	29,59	29,59	0	725

Die mit Hilfe der Ethanol-fällung erhaltenen Fraktionen wurden zusätzlich auch noch hinsichtlich ihrer Monosaccharidzusammensetzung untersucht. Die dominierenden Monosaccharide waren weiterhin Arabinose und Galaktose, wobei das typische Verhältnis von Ara zu Gal mit 1:2 in der niedermolekularen Fraktion mit 1:1,5 nicht mehr vorlag. Auffallend waren die geringen Polysaccharidanteile in beiden Fraktionen, die im hochmolekularen Fall bei 25,2% lag und für die niedermolekulare Fraktion nur noch 6,6% betrug (siehe Tabelle 41).

Tabelle 41: Verteilung der Neutralzucker in den Fraktionen des alkalisch hydrolysierten AGP

Monosaccharidzusammensetzung in m/m %									
	PS-Anteil m/m %	Ara:Gal	Ara	Gal	Glc	Rha	Xyl	Man	Fuc
HF	25,2	1:2,2	28,7	62,6	3,9	0,6	1,8	1,8	0,6
NF	6,6	1:1,5	33,9	49,2	7,7	0	3,2	6,0	0

HF: Hochmolekulare Fraktion, NF: niedermolekulare Fraktion

5.2.7.2 Fraktionierung der Kohlenhydrateinheiten mit anschließender Analyse

Die Analyse der niedermolekularen Fraktion lieferte erste Hinweise auf das mögliche Vorhandensein von Oligosaccharidseitenketten im AGP. Um diesen Anhaltspunkt zu untermauern wurde die niedermolekulare Fraktion mit Hilfe einer präparativen GPC aufgetrennt und die einzelnen aufgefangenen Fraktionen hinsichtlich ihres Molekulargewichtes und ihrer Zuckerzusammensetzung untersucht. Damit möglichst keine Oligosaccharide während der Probenaufarbeitung verloren gingen, aber störendes Salz entfernt werden konnte, wurde die Probenaufarbeitung optimiert. Nach der alkalischen Hydrolyse und der Neutralisation der Proben schloss sich sofort eine Ethanol-fällung an. Die hochmolekulare Fraktion wurde zwecks Entfernung des NaCl dialysiert, die niedermolekulare Fraktion aber wurde zur Salz-entfernung über Sephadex® G-25M Säulen geleitet. So konnte ein Verlust an möglichen kleinen Zuckerketten während des Dialyseschlittes ausgeschlossen werden.

Die Auftrennung der niedermolekularen Fraktion ist in Abbildung 53 dargestellt. Anhand der RI- und MALLS-Signale wurden sieben verschiedene Fraktionen gesammelt, wobei Fraktion sechs mit einem großen RI-Signal am ehesten mögliche Oligosaccharide bzw. Arabinose-Oligosaccharidketten enthielt. Aus diesem Grund wurden die gesammelten Fraktionen 1, 2, 3, 4 und 6 vom Salz des GPC-Fließmittels befreit (Sephadex® G-25M Säulen) und im Hinblick auf ihre Neutralzuckerzusammensetzung untersucht. Tabelle 42 zeigt die detektierten Neutralzucker im Vergleich zum nativen AGP vor der alkalischen Hydrolyse und die beiden durch die Ethanol-fällung gewonnenen hoch- und niedermolekularen Fraktionen. Aufgrund sehr geringer Ausbeuten nach der Fraktionierung waren die Peaks im gaschromatographischen Chromatogramm sehr niedrig und schwer auszuwerten. Trotzdem konnte festgestellt werden, dass Fraktionen 1, 3, 4 und 6 Zucker enthielten, wobei die potentielle Arabinose-Oligosaccharid-Fraktion einen mit 50,9% hohen Anteil an Arabinosen aufwies. Daneben konnten noch 13,1% Galaktose und 36,0% Glukose detektiert werden. Um eindeutig die Frage nach der Art der Seitenketten zu klären, müsste die Verknüpfung der einzelnen Arabinosen zueinander in weiteren Arbeiten untersucht werden.

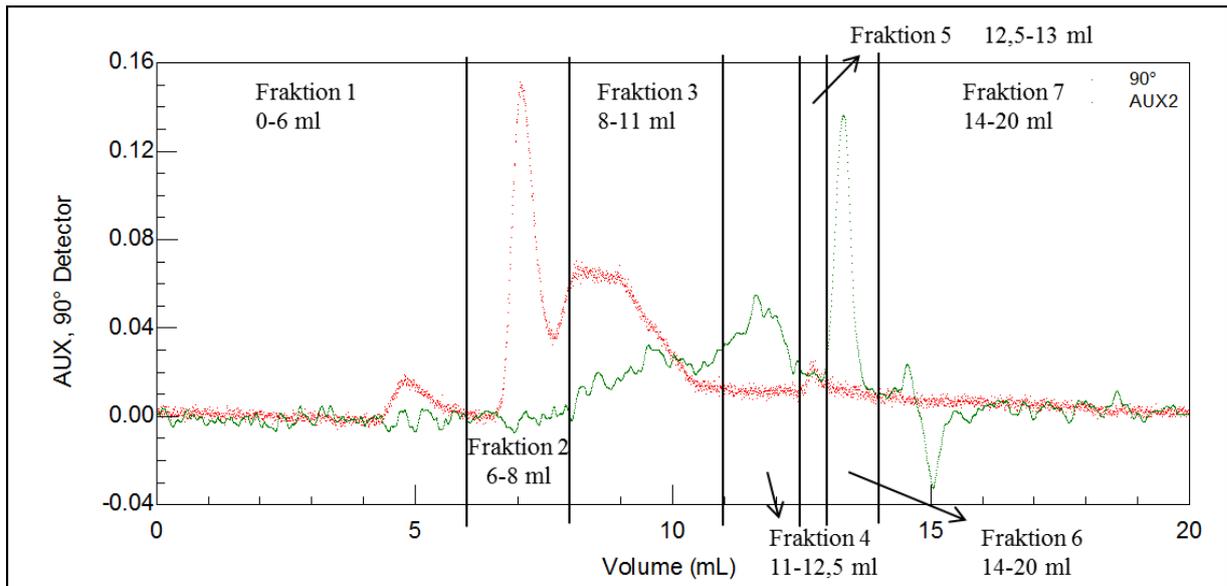


Abbildung 53: Chromatogramm der Fraktionierung per präparativer GPC

Tabelle 42: Quantitative Monosaccharidverteilung nach der Fraktionierung anhand des Molekulargewichtes im Vergleich zum nativen AGP und den beiden mittels Ethanol fällung gewonnenen Fraktionen

Monosaccharidzusammensetzung in m/m %									
	PS-Anteil m/m %	Ara:Gal	Ara	Gal	Glc	Rha	Xyl	Man	Fuc
natives AGP	23,8	1:2,1	28,9	61,7	1,4	1,7	2,0	3,3	1,0
HF entsalzt	75,6	1:1,7	32,2	56,1	8,0	1,0	0,9	1,5	0,3
NF entsalzt	28,0	1:2,2	31,0	66,7	0,3	0,8	0,5	0,5	0,2
Fraktion 1	-	1:1,4	13,7	18,6	50,3	0	0	0	17,4
Fraktion 2	-	-	0	0	0	0	0	0	0
Fraktion 3	-	1:2,0	17,6	35,4	42,8	0,7	0,5	1,3	1,7
Fraktion 4	-	1:1,4	36,2	51,7	9,2	1,2	0,4	1,3	0
Fraktion 6	-	1:0,3	50,9	13,1	36,0	0	0	0	0

6. Biologische Aktivitäten von AGPs

6.1 Reaktivität von AGPs im ELISA

Die Reaktivität verschiedener Antikörper gegen aufgereinigtes *Pelargonium sidoides*-AGP wurde in einem indirekten ELISA-System getestet. Es stehen ein monoklonaler Antikörper (4B8D3, siehe CLASSEN et al. 2004), sowie ein polyklonaler AK (639 „Q“, siehe CLASSEN et al. 2005), gerichtet gegen ein AGP aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea*, zur Verfügung. Gleichzeitig sollen zwei monoklonale Antikörper (1B5 und 4A1) gerichtet gegen ein AGP aus Haferfrüchten auf seine Reaktivität gegen *P. sidoides*-Suspensionskultur-AGP untersucht werden.

Zuerst wurde die Reaktivität von drei Antikörpern (mAK 4B8D3, pAK 639 „Q“ und mAK 1B5) gegen das AGP aus *P. sidoides* mit Hilfe eines indirekten ELISAs untersucht. Während der polyklonale Antikörper im untersuchten Konzentrationsbereich keine Interaktion mit dem AGP aus *P. sidoides* zeigte, wiesen die beiden monoklonalen Antikörper Bindungsaffinitäten gegenüber diesem AGP auf. Dabei war die Bindungsstärke des AKs, der gegen ein AGP aus Haferfrüchten gerichtet ist, deutlich schwächer als die des AKs gegen ein AGP aus dem Presssaft von *E. purpurea* (siehe Abbildung 54 links). Dies lässt vermuten, dass die beiden monoklonalen Antikörper auf ähnliche Epitope reagieren.

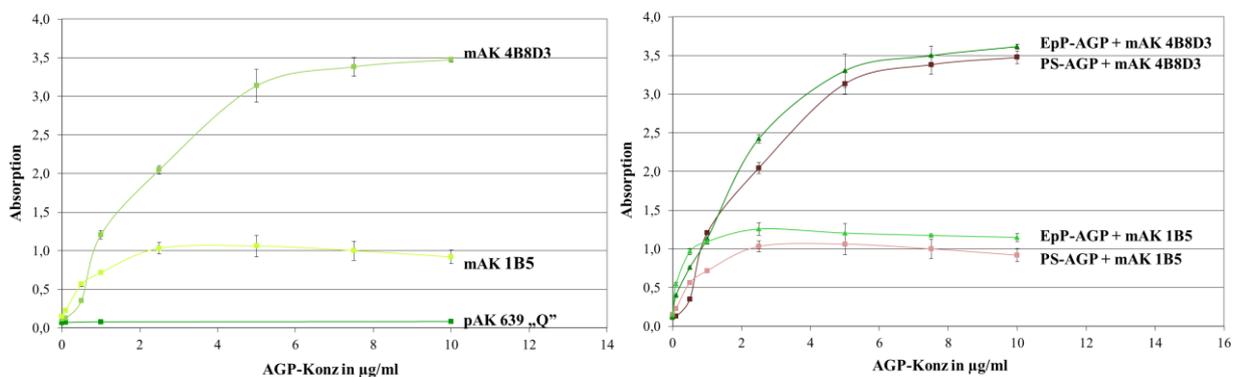


Abbildung 54: links: Vergleich der Reaktivitäten eines polyklonalen AKs ($n=1$) und zweier monoklonaler AK ($n=3$) gegen ein AGP aus *Pelargonium sidoides*
rechts: Reaktivitäten der monoklonalen AK gegen AGPs aus *P. sidoides* und dem Presssaft von *E. purpurea* im Vergleich ($n=3$)

Die monoklonalen Antikörper 4B8D3 und 1B5 sollten in ihrer Reaktivität gegenüber einem AGP aus dem Presssaft von *E. purpurea* und einem AGP aus *P. sidoides* verglichen werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Reaktivitäten der einzelnen Antikörper gegenüber dem AGP aus *P. sidoides* nur minimal niedriger waren als gegenüber dem AGP aus dem Presssaft von *E. purpurea*

(Abbildung 54 rechts). Dies ließ darauf schließen, dass beide AGPs ein ähnliches Kohlenhydrat-Epitop aufweisen. Für den monoklonalen Antikörper 4B8D3 beschrieben CLASSEN et al. 2004, dass das entsprechende Epitop galaktosehaltig war, wobei mögliche Arabinose- oder Uronsäurereste keinen Einfluss auf die AG-AK-Reaktion hatten.

Der Einfluss von Arabinosen und Glukuronsäuren im galaktosehaltigen Epitop des *P. sidoides*-AGPs auf die Immunreaktion wurde mit dem von CLASSEN et al. 2004 verwendeten mAK 4B8D3 sowie zwei weiteren mAKs (1B5 und 4A1, gerichtet gegen ein AGP aus Haferfrüchten) untersucht. Hierfür wurden ein natives (PS-AGP), ein uronsäurereduziertes (PS-AGP-U) und ein partiell hydrolysiertes AGP (PS-AGP-OHR), das keine Arabinosen mehr enthielt, verwendet. Abbildung 55 zeigt, dass es nur minimale Unterschiede in der Reaktivität aller drei Antikörper in Bezug auf die drei AGP-Proben gab. Arabinose sowie Glukuronsäure sind somit vermutlich nicht Bestandteil des Kohlenhydrat-Epitopes, das für die Bindung des mAK 4B8D3 verantwortlich ist. Gleiche Ergebnisse lieferten die Testungen mit den mAKs gegen das AGP aus Haferfrüchten.

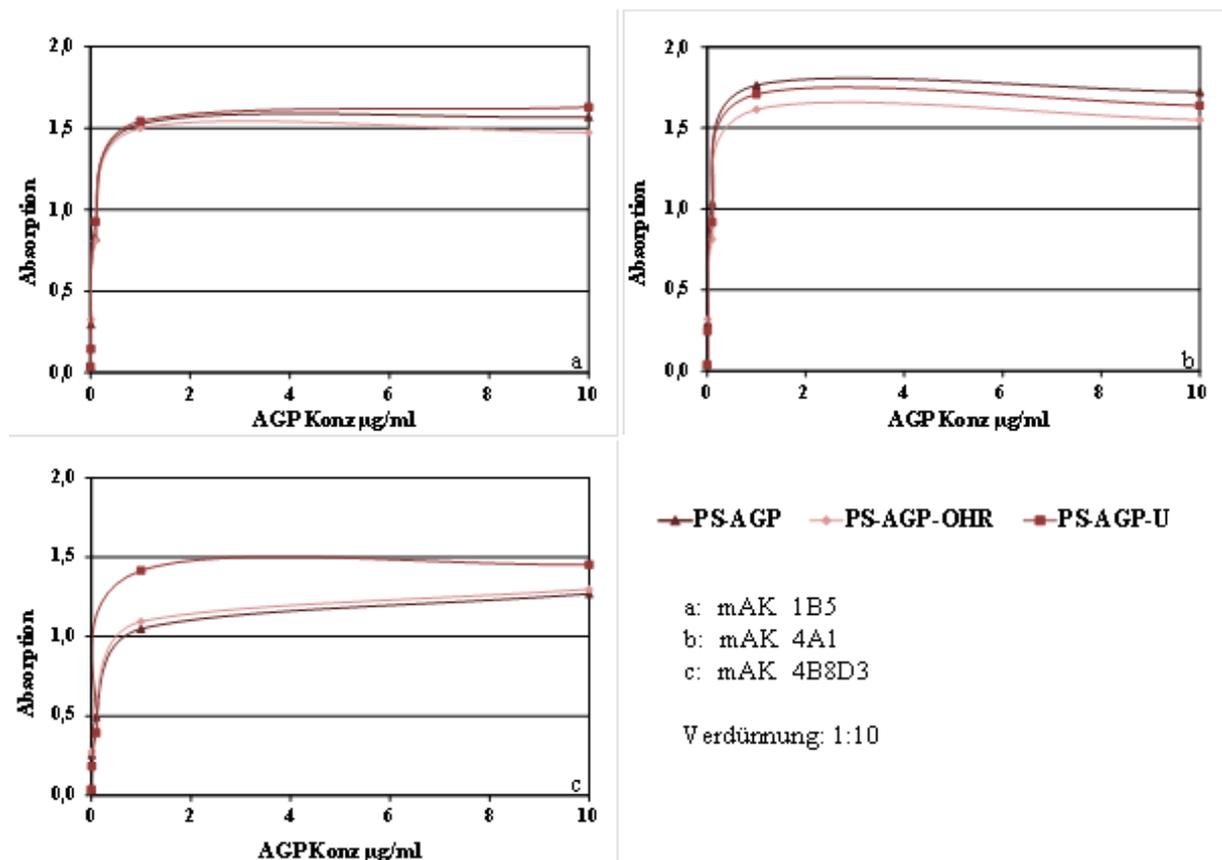


Abbildung 55: Immunreaktionen gegen ein natives (PS-AGP), ein oxalsäurehydrolysiertes (PS-AGP-OHR) und ein uronsäurereduziertes (PS-AGP-U) AGP aus *P. sidoides* (n=1)

6.2 Immunmodulierende Eigenschaften der AGPs

Mit Hilfe eines modifizierten, ursprünglich für klinische Untersuchungen entwickelten Mikrotiterplatten-Assays konnte der Einfluss von *Pelargonium sidoides*-AGP, isoliert aus Suspensionskulturen, auf das humane Komplementsystem getestet werden. Ein Vorteil dieses Testsystems lag in der Möglichkeit, die Aktivierung bzw. Inhibition des Komplementsystems über drei verschiedene Wege - klassisch, alternativ und Lektin-abhängig - zu untersuchen (siehe Abbildung 56). Mittels spezieller Aktivatoren (humanes Immunglobulin M für den klassischen Weg, Lipopolysaccharide für den alternativen Weg und Mannan für den Lektin-Weg) auf der Mikrotiterplatte konnten die einzelnen Wege untersucht werden, wobei durch spezielle Zusätze im Probenpuffer die jeweils anderen Wege blockiert wurden. Als gemeinsamer Endpunkt aller drei Wege galt der Membranangriffskomplex, der zur Quantifizierung des Tests mit Hilfe eines markierten Antikörpers herangezogen wurde. Am Ende wurde der über die Umsetzung des Substrates mit einer alkalischen Phosphatase entstandene Farbkomplex photometrisch vermessen und die Messergebnisse mit Hilfe der Kalibrierung auf die relative Komplementaktivität umgerechnet.

Vor der Testung der AGPs wurden diese mit Hilfe von speziellen Säulen (EndoTrap[®]blue) von möglichen LPS-Verunreinigungen befreit, die den Lektin-abhängigen Weg falsch positiv aktivieren können.

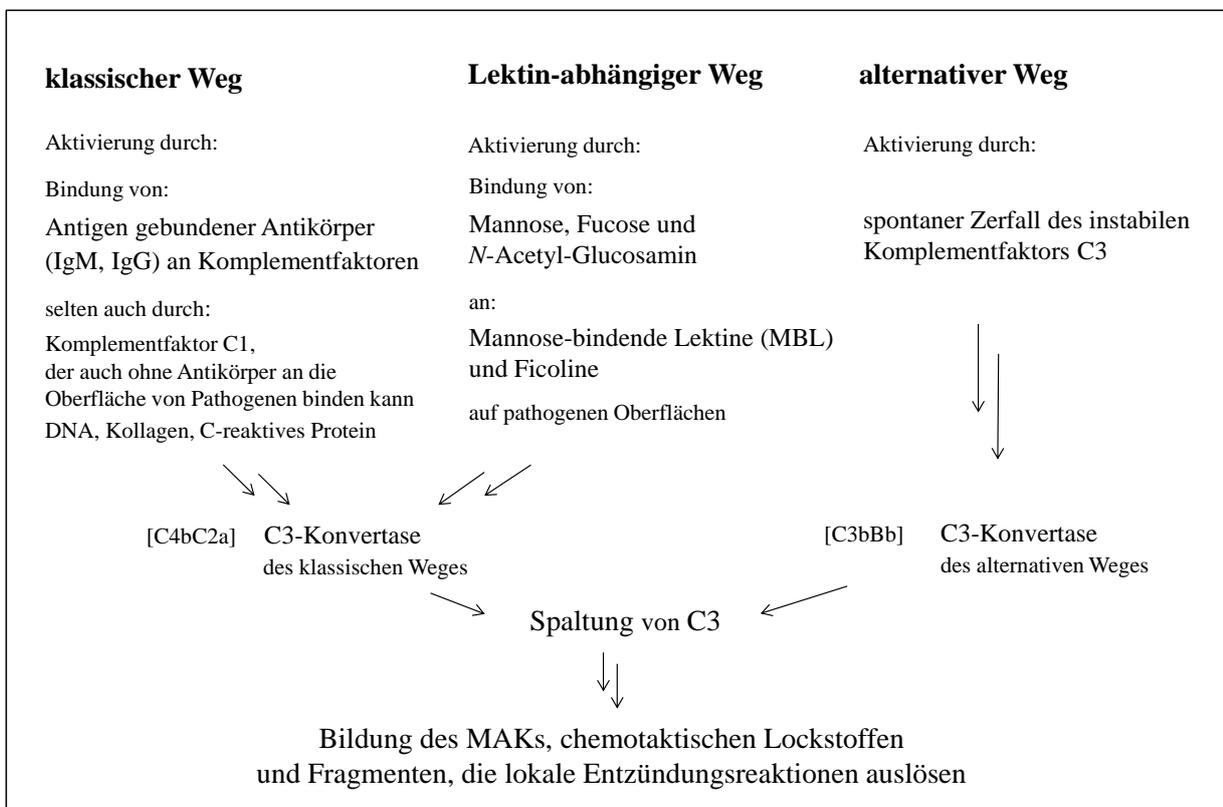
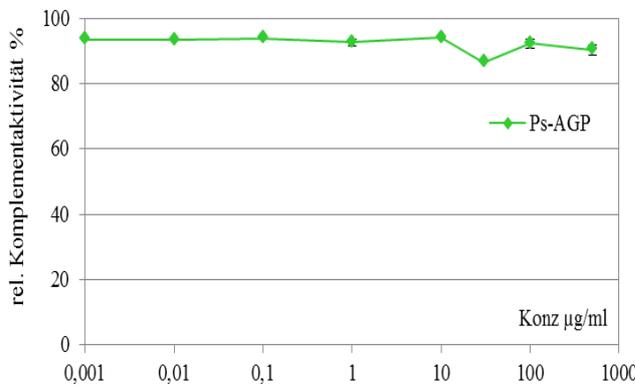


Abbildung 56: Vereinfachte Darstellung der drei Wege des Komplementsystems

6.2.1 Einfluss auf den klassischen Weg des Komplementsystems

Die relative Komplementaktivität zeigt den Einfluss des AGPs auf das Komplementsystem auf, wobei Aktivitäten unter 100% einer Inhibition des Komplementsystems entsprechen und Aktivitäten über 100% einer Aktivierung des Komplementsystems gleich kommen.

Die relative Komplementaktivität des *P. sidoides*-AGPs auf den klassischen Weg des humanen Komplementsystems lag im Durchschnitt bei knapp über 90% und veränderte sich in Abhängigkeit der AGP-Konzentration nicht (Messwerte und graphische Darstellung siehe Abbildung 57). Die nur gering von 100% abweichende relative Komplementaktivität spricht für keine bzw. nur eine minimale Hemmung des humanen Komplementsystems über den klassischen Weg durch AGPs aus den Suspensionskulturen von *P. sidoides*.

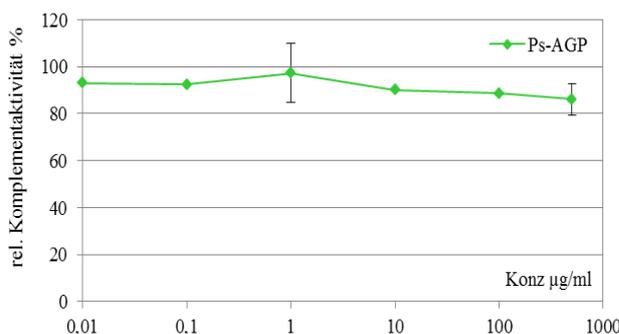


Konz (µg/ml)	rel. Komplementaktivität %			
	M 1	M 2	MW	Stabw
500	89,3	91,5	90,4	1,54
100	91,2	93,4	92,3	1,51
30,19	86,6		86,6	
10	94,1		94,1	
1	91,8	93,5	92,7	1,16
0,1	93,9		93,9	
0,01	93,4		93,4	
0,001	93,6		93,6	

Abbildung 57: Relative Komplementaktivität des *P. sidoides*-AGP im klassischen Weg

6.2.2 Einfluss auf den alternativen Weg des Komplementsystems

Die relative Komplementaktivität des *P. sidoides*-Zellkultur-AGPs betrug bei einer Konzentration von 0,01 µg/ml 93% und fiel über einen Konzentrationsbereich von 0,01 µg/ml bis 500 µg/ml auf 86,1% ab. Diese sehr geringe Hemmung, die bei höheren AGP-Konzentration auftrat, weist auf einen geringen Einfluss des *P. sidoides*-AGPs auf den alternativen Weg des humanen Komplementsystems hin (siehe Abbildung 58).



Konz (µg/ml)	rel. Komplementaktivität %				
	M 1	M 2	M 3	MW	Stabw
500	90,0	90,0	78,2	86,1	6,82
100	88,2		89,0	88,6	0,53
10	90,1			90,1	
1	84,5	109,3	97,9	97,2	12,45
0,1	92,3			92,3	
0,01	93,0			93,0	

Abbildung 58: Relative Komplementaktivität des *P. sidoides*-AGP im alternativen Weg

6.2.3 Einfluss auf den Lektin-abhängigen Weg des Komplementsystems

Der Einfluss des AGPs aus *P. sidoides*-Suspensionskulturen auf den Lektin-abhängigen Weg des Komplementsystems war mit relativen Komplementaktivitäten zwischen 86,3% und 105,5% ähnlich gering wie bei den anderen beiden Wegen. Mit steigenden AGP-Konzentrationen stieg die relative Aktivität knapp über 100%, was aber durch Standardabweichungen von etwa 10% relativiert wurde, sodass man auch im dritten untersuchten Weg, das humane Komplementsystem zu beeinflussen, nur minimale bis keine Aktivitäten des *Pelargonium*-AGPs detektieren konnte (siehe Abbildung 59).

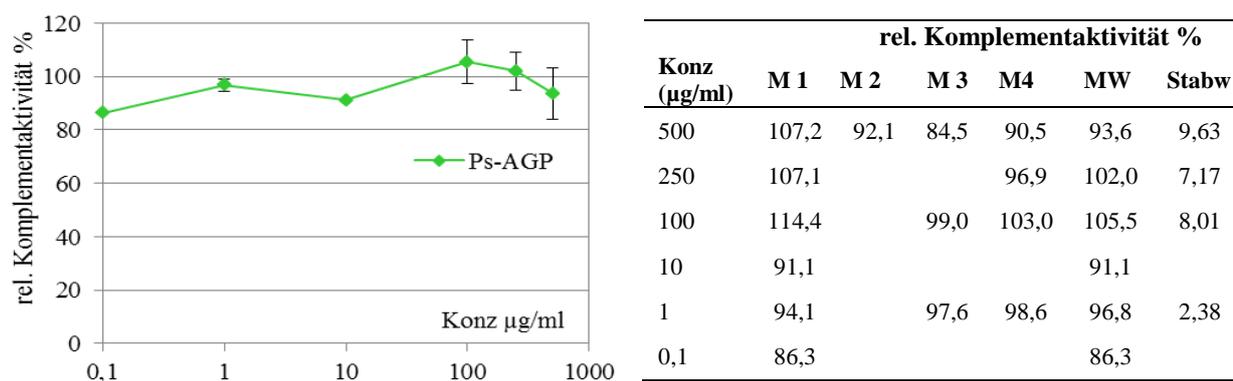


Abbildung 59: Relative Komplementaktivität des *P. sidoides*-AGP im Lektin-abhängigen Weg

6.3 Untersuchung des Einflusses von β -Yariv-Reagenz auf Suspensionskulturen von *P. sidoides*

Durch die Komplexierung von AGPs in pflanzlichen Zellkulturen mittels β -Glc-Yariv-Reagenz soll der Einfluss bzw. die Funktion von AGPs auf die pflanzliche Entwicklung untersucht werden. Für diesen Versuch wurden AGPs in Suspensionskulturen komplexiert, deren Zellwachstum beobachtet, sowie mikroskopische Untersuchungen und Vitalitätsfärbungen durchgeführt. Des Weiteren wurde die DNA der Zellen isoliert und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

6.3.1 Mikroskopische Beobachtungen der Zellen

Exemplarisch wurden die Zellen der unbehandelten und behandelten Kulturen täglich in Hinblick auf ihre Form, Größe und andere morphologische Merkmale unter dem Mikroskop untersucht, die für den entsprechenden Status der Zelle charakteristisch waren. Tabelle 43 zeigt typische Merkmale, die apoptotische/PCD und nekrotische Zellen aufweisen und die für die Beurteilung der eigenen Zellfotos verwendet wurden. Für die mikroskopischen Untersuchungen spielten nicht nur Wasserpräparationen eine Rolle, auch Vitalitätsfärbungen mit dem Farbstoff Trypanblau konnten einige morphologische Veränderungen der Zellen verdeutlichen.

Tabelle 43: Übersicht über die morphologischen Merkmale zur Unterscheidung apoptotischer (bzw. PCD) von nekrotischer Zellen nach HUBERT (2000)

	Apoptose/PCD	Nekrose
Stimuli	physiologisch oder pathophysiologisch	pathologisch
Erscheinung	Einzelzelle	Zellgruppe
Verlust der Adhäsion	früh	spät
Schädigung der Organellen	spät	früh
Freisetzung lysosomaler Enzyme	-	+
Kerne	schrumpfen und zerfallen	verschwinden
Chromatinverdichtung	+	-
DNA-Doppelstrangbrüche	zwischen den Nukleosomen („Leiter“ auf Agarosegel)	zufällig (Schmier auf Agarosegel)
Phospholipidasymmetrie	Phosphatidylserin-Verlagerung auf die äußere Seite der Plasmamembran	bleibt erhalten?
Caspasenaktivierung	+	-
Ergebnis	apoptotische Körperchen	Schwellung und Zerfall
Phagozytose	+	-
Entzündung	-	+

In einem ersten Vorversuch wurden je drei Erlenmeyerkolben mit Zellsuspensionen von Wurzel- und Sprosskulturen angelegt, die direkt mit 40 μMol α -Gal- oder β -Glc-Yariv behandelt wurden. Ein Kolben pro Reihe blieb unbehandelt. Die ersten mikroskopischen Beobachtungen der Suspensionen und der Zellen sind in Tabelle 44 dargestellt. Typische Zellformen (rund, oval und würstchenartig) konnten identifiziert werden. Des Weiteren entwickelten sich die unbehandelten und mit α -Gal-Yariv versetzten Kulturen zeitlich ähnlich und bildeten nach ca. einer Woche bereits Zellsuspensionen aus. Bei fast allen Kolben war auch nach etwa 10 Tagen das erste Auftreten kleiner Zellaggregate zu verzeichnen. Ein typisches Merkmal der Zellsuspensionen mit β -Glc-Yariv war die rötliche Färbung der Ansätze, die selbst nach 17 Tagen noch keine Suspension ausgebildet hatten. Zusätzlich war schon früh der Zellinnenraum als ein Zeichen für das Eindringen von Yariv-Reagenz ins Zellinnere rötlich verfärbt und nach ungefähr 10 Tagen war das Schrumpfen des Zytoplasmas in den einzelnen Zellen zu beobachten. Das Schrumpfen des Zytoplasmas war ein Merkmal, das ausschließlich bei mit β -Yariv-Reagenz behandelten Zellen zu verzeichnen war.

Tabelle 44: Erste vergleichende mikroskopische Beobachtungen von unbehandelten und mit α - und β -Yariv-Reagenz behandelten Zellen bzw. Zellsuspensionen

	Wurzelsuspension			Sprossuspension		
Tag	unbehandelt	40 μ Mol α -Gal	40 μ Mol β -Glc	unbehandelt	40 μ Mol α -Gal	40 μ Mol β -Glc
3	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig)	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig)	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig)	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig)	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig)	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig) rötlicher Zellinnenraum
7	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig) Suspensionsbildung	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig) rötlicher Zellinnenraum Suspensionsbildung	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig)	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig) Suspensionsbildung	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig) rötlicher Zellinnenraum Suspensionsbildung	Intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig)
10	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig) kleine Zellklümpchen	Pilzwachstum! kugelige Zellen	wenige Zellen, sehen tot aus rötlicher Zellinnenraum Zytoplasma schrumpft	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig) kleine Zellklümpchen keine großen Zellinhalte	wenig Zellwachstum viel runde Zellen	große rote Zellklumpen wenige lebende Zellen klare Lösung mit roten Klümpchen Zytoplasma schrumpft
14	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig)		wenige Zellen dunkle, rote Zellhaufen rötlicher Zellinnenraum Zytoplasma schrumpft	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig)	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig) + dunkle Zellhaufen	wenige Zellen dunkle, rote Zellhaufen rötlicher Zellinnenraum Zytoplasma schrumpft
17	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig)		wenige Zellen dunkle, rote Zellhaufen rötlicher Zellinnenraum Zytoplasma schrumpft	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig)	intakte Zellen (rund, oval, würcchenartig)	wenige Zellen dunkle, rote Zellhaufen rötlicher Zellinnenraum Zytoplasma schrumpft

Abbildung 60 zeigt die Zellen einer unbehandelten, einer mit 50 μ Mol α -Gal- und einer mit 50 μ Mol β -Glc-Yariv behandelten Suspensionskultur als Wasserpräparat (obere Reihe) und als Präparation mit Trypanblau. Als gemeinsames Merkmal sind die typischen Formen der Zellen (rund, oval, würcchenartig) in allen Ansätzen zu erkennen. Bild a und d stellen Zellen unbehandelter Kulturen dar. Sie zeigen keine Auffälligkeiten und in der Vitalitätsfärbung mit Trypanblau sind die leuchtend hellen Zellinhalte mit den blauen Umrandungen der Zellen ein Zeichen für intakte lebende Zellen, bei denen zusätzlich die Zellkerne sichtbar sind. Bild b und e sind die mikroskopischen Darstellungen der mit 50 μ Mol α -Gal-Yariv behandelten Zellen. Auch hier sind lebende, intakte Zellen mit hellem Zellinhalt

und blauer Umrandung zu erkennen. Die Zellen in Abbildung c und f weisen im Gegensatz dazu deutliche Veränderungen auf. Allein im Wasserpräparat ist das Schrumpfen des Zytoplasmas als ein Zeichen für den programmierten Zelltod sowie der rote Zellinnenraum durch das Eindringen des Yariv-Reagenzes in die Zellen klar erkennbar. Dies wird durch die Beobachtungen mit Trypanblau bestätigt: das Zellinnere ist blau gefärbt. Dies ist ein Zeichen für eine nicht mehr intakte Plasmamembran, die den Farbstoff ins Zellinnere eindringen lässt. Des Weiteren ist auch hier das geschrumpfte Zytoplasma mit dem Zellkern klar erkennbar.

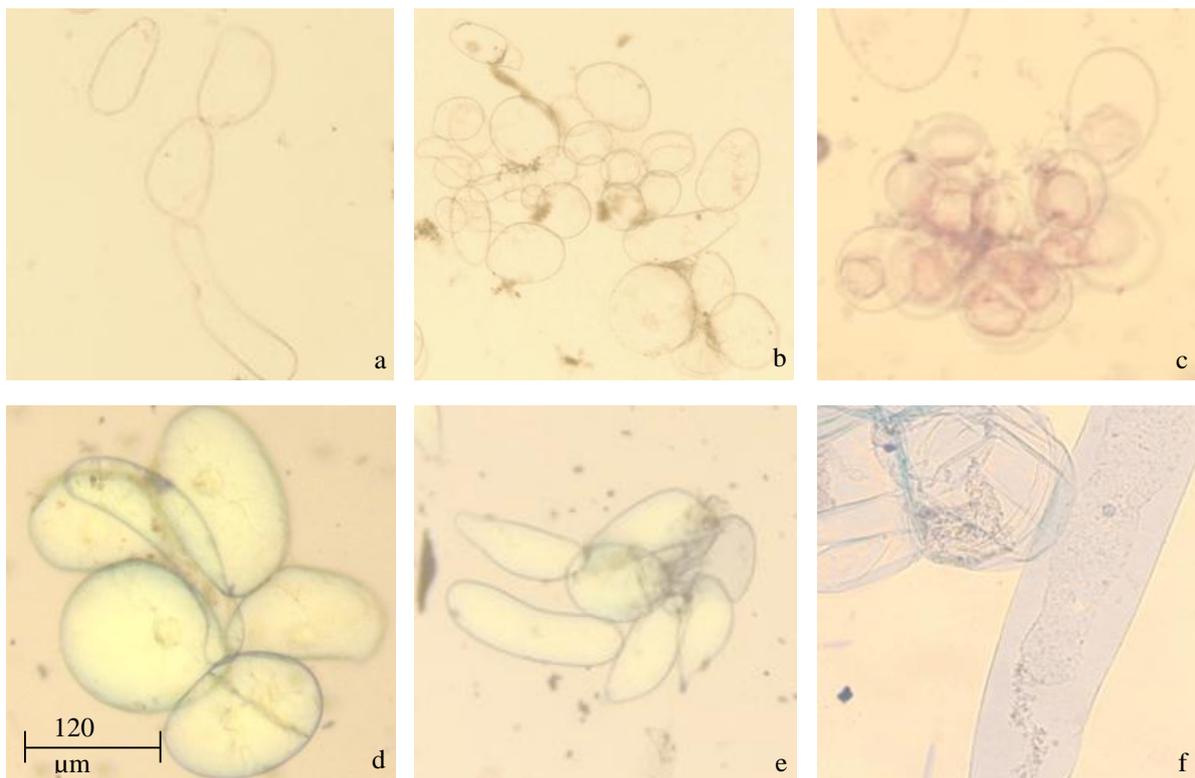


Abbildung 60: Mikroskopische Beobachtungen der Zellen in Suspensionskulturen

obere Reihe: Wasserpräparate, untere Reihe: Vitalitätsfärbung mit Trypanblau

a/d: unbehandelte Zellen: intakte Zellen mit sichtbarem Zellkern

b/e: Zellen mit 50 µM α -Gal-Yariv behandelt: lebende Zellen

c/f: Zellen mit 50 µM β -Glc-Yariv behandelt: Zellen mit geschrumpften Zytoplasma

6.3.2 Beobachtung des Zellwachstums von mit Yariv-Reagenz behandelten und unbehandelten Zellkulturen

Es wurde das Zellwachstum der Suspensionskulturen unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von β -Glc-Yariv-Reagenz untersucht, wobei zu jedem Testansatz eine parallele Reihe unbehandelter Zellen sowie als Negativ-Kontrolle eine Reihe mit α -Gal-Yariv-Reagenz behandelten Zellen kultiviert wurde. Das Zellwachstum der einzelnen Reihen wurde dann miteinander verglichen und statistisch ausgewertet.

6.3.1.1 Vorversuche: Etablierung der optimalen Methode zur Zellzahlbestimmung

Die am weitesten verbreitete Methode, die Zellzahl zu bestimmen, ist das Auszählen der Zellen im Hämocytozometer bzw. in der Neubauer-Zählkammer. Ein Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, sie mit Vitalitätsfärbungen zu kombinieren, sodass mit einer Messung sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Anzahl der toten bzw. lebenden Zellen erfasst werden kann.

In einem Vorversuch wurden zunächst fünf Erlenmeyerkolben mit je 10 ml einer vier Wochen alten W-Suspensionskultur beimpft und nach drei Tagen mit den entsprechenden Yariv-Lösungen versetzt: 50 und 100 μMol α -Gal-Yariv sowie 50 μMol und 100 μMol β -Glc-Yariv. Ein Kolben blieb unbehandelt. Am Tag der Beimpfung wurde exemplarisch die Zellzahl einer Probe der unbehandelten Kolben gezählt. An Tag 4, 7 und 9 erfolgten dann die Zellzahlbestimmungen aus den Probenzügen aller Erlenmeyerkolben in der Neubauer-Kammer. Probleme hierbei bereitete die Zellsuspension mit ihren vielen kleinen und größeren Zellaggregate, die ein genaues Pipettieren aus der homogenen Probe verhinderten. Aus diesem Grund wurden die Proben ein paar Minuten stehen gelassen und aus dem Überstand die Probe für das Zählen gezogen, sodass die ermittelte Zellzahl nicht der wirklichen Anzahl der Zellen in den Kolben entsprach. Des Weiteren führte diese Methode zu sehr starken Schwankungen in der Zellzahl, die teilweise widersprüchlich waren. Es ist zum Beispiel unwahrscheinlich, dass die Gesamtzellzahl an Tag 4 nur bei 25.000 Zellen pro μl liegt, wenn sie den Tag zuvor 800.000 Zellen pro μl betrug. Tabelle 45 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Zellzählungen (Doppelbestimmungen: M1 und M2) mit den Berechnungen der Zellzahlen.

Tabelle 45: Zellzählung im Hämocytozometer

Tag	unbehandelt	50 μMol α -Gal	100 μMol α -Gal	50 μMol β -Glc	100 μMol β -Glc
3	M1: 4/7/1/7 M2: 9/9/18/9 MW: 8 $8 * 10^4 * 10(V)$ =800.000 Z pro μl				
4	M1: 1/0/1/3 M2: 3/0/1/1 25.000 Z pro μl	M1: 0/0/0/0 M2: 2/1/0/1 10.000 Z pro μl	M1: 1/1/0/0 M2: 1/0/0/3 15.000 Z pro μl	M1: 1/1/0/0 M2: 3/0/1/1 17.500 Z pro μl	M1: 0/1/0/1 M2: 1/1/4/1 22.500 Z pro μl
7	M1: 0/3/1/3 M2: 1/0/0/0 20.000 Z pro μl	M1: 1/5/5/4 M2: 4/7/11/5 105.000 Z pro μl	M1: 0/0/2/2 M2: 1/2/2/1 20.000 Z pro μl	M1: 4/4/4/4 M2: 1/1/1/0 47.500 Z pro μl	M1: 2/2/2/5 M2: 3/2/2/2 50.000 Z pro μl
9	M1: 3/0/0/3 M2: 3/1/2/3 137.500 Z pro μl	M1: 0/0/0/0 M2: 0/1/1/0 25.000 Z pro μl	M1: 2/1/2/0 M2: 1/1/3/1 137.500 Z pro μl	M1: 1/1/2/0 M2: 3/0/0/2 112.500 Z pro μl	M1: 1/0/0/0 M2: 0/1/0/0 25.000 Z pro μl

V: Verdünnungsfaktor: zu Beginn 10 ml Zellen auf 100 ml Nährlösung pro Kolben

Im weiteren Verlauf wurde an der Zellzählung mittels Hämozytometer festgehalten, wobei aber mehrere verschiedene Möglichkeiten getestet wurden, eine aggregatfreie Zellkultur zu erzeugen:

Eine Behandlung der gezogenen Zellprobe direkt vor der Zählung im Ultraschallbad führte zu keiner Verringerung der Zellaggregate, wobei 30, 60, 90 und 120 Minuten Ultraschallbehandlung getestet wurden.

In Anlehnung an die Methode von LINDL et al (2008) wurde mit Hilfe eines Siebes mit einer Maschenweite von 250 μm versucht eine Einzelzellsuspension zu erzeugen, wobei alle sieben Tage über einen Zeitraum von vier Wochen die Zellkultur gesiebt wurde. Diese Methode führte allerdings zu einer Suspension mit nur wenigen Einzelzellen, die tot waren.

Die Zugabe von Tensiden (Tween 80, Poloxamer 188 und Texapon), um die Zellaggregate zu beseitigen, ist eine bei bakteriellen Kulturen häufig verwendete Methode. Aus diesem Grund wurden Suspensionskulturen mit den drei Testtensiden in verschiedenen Konzentrationen versetzt und optisch auf Aggregate untersucht. Nach drei Wochen waren noch immer deutliche Zellklumpen zu erkennen, die sich in ihrer Größe nicht von den normalen Zellaggregaten unterschieden. Des Weiteren veränderte sich die Farbe der Suspension von beige zu grau.

Eine Möglichkeit, direkt vor der Zellzählung Einzelzellen zu erhalten, ist die Behandlung der Zellen mit Chromsäure. Nach einer 20 minütigen Behandlung der Probe mit der giftigen und umweltgefährlichen Chromsäure bei 60°C konnte die Lösung ohne Probleme ins Hämozytometer pipettiert werden. Da Chromsäure selber zytotoxisch ist, ließ sich diese Methode nicht mit einer Vitalitätsfärbung kombinieren.

Als letzte Methode wurde eine enzymatische Behandlung der Zellen mit einer mazerierenden Pektinase (Vegazym P), die die Mittellamelle von Zellen und somit auch Zellklumpen auflöst, durchgeführt. Selbst nach 1,5 stündiger Enzymbehandlung waren optisch noch Zellaggregate erkennbar.

Aufgrund der Probleme und Ergebnisse bei den Versuchen, eine aggregatfreie Zellsuspension zu erzeugen, wurde für die folgenden Ansätze eine Bestimmung des Zellwachstums über das Sinkvolumen in speziellen Nasenkolben (siehe Abbildung 12) bevorzugt. Gleichzeitig wurden durch regelmäßige mikroskopische Untersuchungen der Zellsuspensionen die toten Zellen optisch erfasst.

6.3.1.2 Erster Versuch: Ermittlung des Zellwachstums einer unbehandelten Zellkultur im Testsystem

Um den optimalen Zeitpunkt für die Beimpfung der Suspensionskulturen mit α - und β -Yariv-Reagenz zu finden, wurden zuerst vier spezielle Erlenmeyerkolben mit je 8,25 ml viskoser Zellsuspension beimpft und täglich das Wachstum der Zellen als Sinkvolumen bestimmt. Hier konnte beobachtet werden, dass nach einer lag-Phase von fünf Tagen und einer kurzen Beschleunigungsphase am 7. Kulturtag das exponentielle Zellwachstum einsetzte. Der Beginn der stationären Phase und somit die

Stagnation des Zellwachstums konnte nicht beobachtet werden, da die Mess-Skala der Nasenkolben bei 12 ml endete (Abbildung 61). Nach diesem Versuch wurde beschlossen, dass am 7. Kulturtag die Erlenmeyerkolben mit den entsprechenden Lösungen beimpft werden.

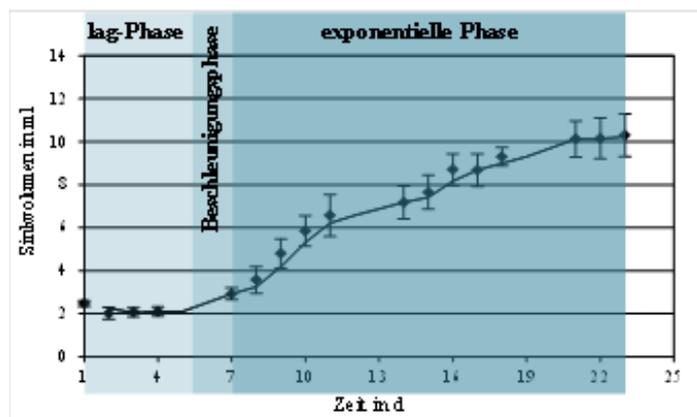


Abbildung 61: Zellwachstum einer unbehandelten *P. sidoides*-Suspensionskultur (n = 4) mit Darstellung der einzelnen Messwerte

Tag	K 1	K 2	K 3	K 4	MW	Stabw
1	2,5	2,5	2,6	2,3	2,5	0,1
2	1,7	2,0	2,4	2,0	2,0	0,3
3	1,9	2,2	2,3	1,9	2,1	0,2
4	2,4	2,0	2,1	1,9	2,1	0,2
7	2,9	2,9	3,3	2,6	2,9	0,3
8	3,7	2,8	4,3	3,5	3,6	0,6
9	4,6	4,5	5,8	4,3	4,8	0,7
10	5,7	5,4	6,9	5,4	5,9	0,7
11	6,3	6,2	8,0	5,8	6,6	1,0
14	6,5	7,3	8,2	6,7	7,2	0,8
15	7,0	7,8	8,7	7,1	7,7	0,8
16	8,2	8,0	9,6	9,0	8,7	0,7
17	8,4	8,1	9,8	8,4	8,7	0,8
18	9,3	8,9	9,9	9,1	9,3	0,4
21	10,3	8,9	10,5	10,8	10,1	0,8
22	10,2	8,8	10,9	10,7	10,2	0,9
23	10,6	8,9	10,5	11,2	10,3	1,0

6.2.1.3 Zweiter und dritter Versuch

Für den zweiten Ansatz wurden 12 Nasenkolben mit je 8,25 ml Zellsuspension einer 25 Tage alten Sprosskultur (15. Subkultur) beimpft und täglich das Sinkvolumen gemessen. Wie unter V 6.2.1.2 beschrieben, sollte am 7. Kultivierungstag die exponentielle Phase des Zellwachstum starten, der gleichzeitig als Beimpfungstag mit α - und β -Yariv-Reagenz festgelegt war. Wie in Abbildung 62 (einzelne Daten der Messung siehe Abbildung 63) zu sehen ist, war erst am 15. Kultivierungstag ein einsetzendes Zellwachstum zu verzeichnen. Der 15 Tage dauernden lag-Phase folgte eine 6 tägige Beschleunigungsphase, die am 21. Kultivierungstag in die exponentielle Phase überging und gleichzeitig als Beimpfungstag mit Yariv-Reagenz festgelegt wurde. Entsprechend des Wachstums der Zellen in den einzelnen Kolben wurden sie den Gruppen zugeordnet: Kolben 2, 6 und 12 wurden nicht behandelt, Kolben 8, 10 und 11 wurden als Negativ-Kontrolle mit jeweils 100 μ Mol α -Gal-Yariv beimpft, Kolben 5, 7 und 9 erhielten je 50 μ Mol β -Glc-Yariv und Kolben 1, 3 und 4 wurden mit je 100 μ Mol β -Glc-Yariv versetzt. Die Wahl der Konzentration des Yariv-Reagenzes erfolgte in Anlehnung an die Veröffentlichung von CHAVES et al. 2002. Das Wachstum der einzelnen Gruppen wurde täglich gemessen und die Mittelwerte graphisch dargestellt, wobei Kolben 12 aufgrund eines fehlenden Wachstums von Anfang an und Kolben 5 ab dem 23. Kultivierungstag aufgrund einer Schimmelpilzbildung am Kolbenrand aus der Statistik ausgeschlossen wurden. Das stärkste Zellwachstum war wie erwartet bei den unbehandelten Zellen zu erkennen. Ein geringeres Wachstum wiesen die Gruppen mit β -Glc-Yariv-Reagenz auf, wobei 50 μ Mol das Zellwachstums weniger stark inhibierten als 100 μ Mol. Überraschend war das im Bereich von 100 μ Mol β -Glc-Yariv liegende

Wachstum der mit α -Gal-Yariv behandelten Gruppe (Negativ-Kontrolle). Es ist bekannt, dass α -Gal-Yariv nicht mit AGPs interagiert (Beweis siehe Gelddiffusionstest in Abbildung 64). Aus diesem Grund wurde für die Negativ-Kontrolle ein mit den unbehandelten Zellen vergleichbares Zellwachstum erwartet. Die Ermittlung des Zellwachstums wurde am 30. Kultivierungstag mit dem Erreichen des maximalen Volumens in der Mess-Skala durch die unbehandelten Zellkulturen beendet.

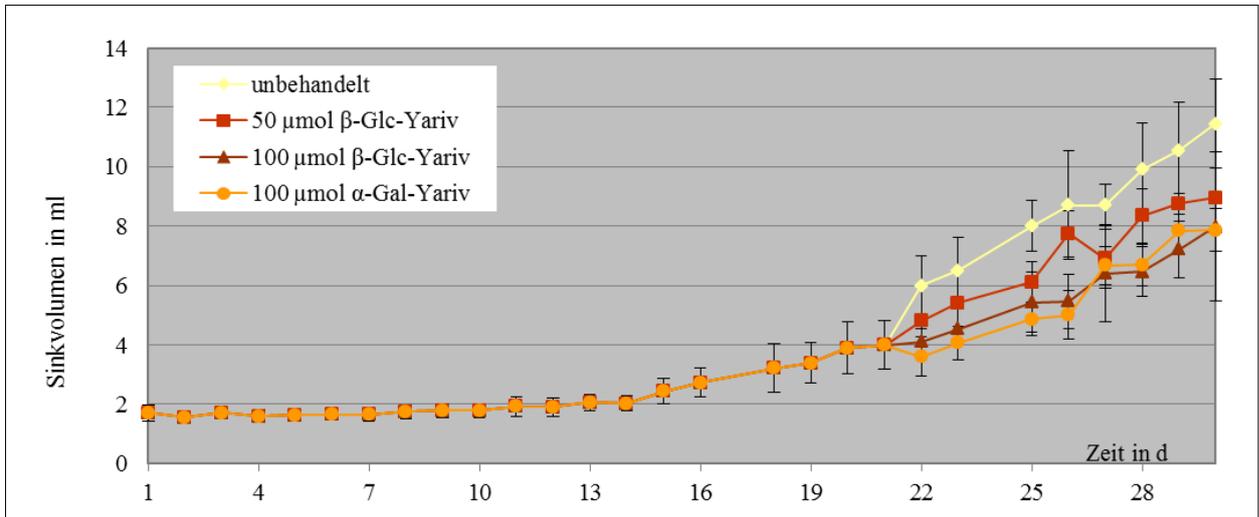
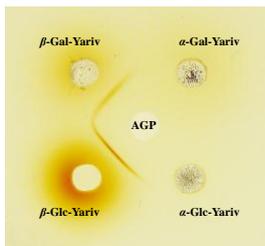


Abbildung 62: 2. Ansatz in Nasenkolben mit unbehandelten, mit 100 µMol α -Yariv und mit 50- und 100 µMol β -Yariv behandelte Zellkulturen

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	MW	Stabw								
1	1,5	1,2	2,1	1,9	1,7	1,8	1,7	2,0	1,9	1,5	1,4	1,6	1,7	0,28								
2	1,6	1,5	1,8	1,8	1,6	1,5	1,6	1,6	1,2	1,4	1,4	1,5	1,5	0,18								
3	1,7	1,7	1,7	1,7	2,0	1,5	1,7	1,7	2,0	1,6	1,6	1,6	1,7	0,16								
4	1,8	1,7	1,9	1,6	1,7	1,7	1,7	1,5	1,3	1,3	1,5	1,6	1,6	0,20								
5	1,4	2,0	1,7	1,6	1,6	1,9	1,7	1,6	1,5	1,4	1,5	1,6	1,6	0,19								
6	1,6	1,9	1,9	1,7	1,8	1,6	1,7	1,6	1,6	1,3	1,4	1,7	1,6	0,19								
7	1,9	1,8	2,0	1,9	1,9	1,6	1,5	1,4	1,3	1,5	1,5	1,6	1,7	0,24								
8	1,6	1,7	2,0	2,0	2,0	2,1	1,8	1,6	1,5	1,6	1,4	1,5	1,7	0,23								
9	1,5	1,6	2,0	2,0	1,8	2,0	2,2	1,6	1,8	1,8	1,4	1,4	1,8	0,24								
10	1,5	1,8	2,0	1,7	2,0	1,9	2,0	1,6	2,1	1,6	1,4	1,8	1,8	0,24								
11	1,6	2,5	2,4	1,9	1,5	2,1	1,9	2,0	1,8	1,9	1,5	1,6	1,9	0,33								
12	1,9	1,9	1,6	2,1	1,6	2,5	2,3	1,9	1,6	2,0	1,5	1,5	1,9	0,32								
13	2,0	2,1	2,4	2,2	2,4	2,0	1,9	1,9	2,3	1,9	1,5	2,0	2,1	0,27								
14	1,8	2,1	2,5	1,9	2,2	2,3	2,1	2,1	2,0	1,7	1,6	1,9	2,0	0,26								
15	2,9	2,5	2,6	2,3	2,9	2,7	2,4	2,4	2,4	2,4	1,3	2,1	2,4	0,43								
16	3,1	2,8	3,5	2,3	3,1	3,0	2,5	2,4	2,6	2,9	1,7	2,0	2,7	0,49								
17																						
18	2,5	4,0	3,5	2,8	3,6	5,0	2,8	2,7	3,4	2,9	2,1	1,8	3,2	0,81								
19	3,5	4,0	3,8	2,5	4,0	3,8	4,0	3,6	3,3	2,8	2,0	1,6	3,4	0,68								
20	3,9	4,0	4,3	3,0	4,7	5,9	3,8	3,2	4,0	3,0	3,0	1,8	3,9	0,88								
21	4,0	4,5	4,7	2,8	4,0	5,5	4,0	4,5	3,5	3,5	2,8	1,8	4,0	0,81	MW (u)	Stabw	MW (100 α)	Stabw	MW (50 β)	Stabw	MW (100 β)	Stabw
22	4,4	5,3	4,3	3,6	5,0	6,7	4,5	4,3	4,9	3,5	3,0	1,7			6,0	0,99	3,6	0,66	4,8	0,26	4,1	0,44
23	4,5	5,7	5,6	3,5	Pilz	7,3	5,4	4,7	5,4	3,6	3,9	2,0			6,5	1,13	4,1	0,57	5,4	0,00	4,5	1,05
24																						
25	5,3	7,4	6,5	4,5		8,6	6,6	5,5	5,6	4,5	4,6	1,9			8,0	0,85	4,9	0,55	6,1	0,71	5,4	1,01
26	5,1	7,4	6,5	4,8		10,0	7,2	5,7	8,3	4,1	5,2	1,8			8,7	1,84	5,0	0,82	7,8	0,78	5,5	0,91
27	6,0	8,2	8,2	5,0		9,2	7,6	7,4	6,2	6,2	6,4	1,8			8,7	0,71	6,7	0,64	6,9	0,99	6,4	1,64
28	6,2	8,8	7,4	5,8		11,0	9,0	7,2	7,7	5,9	7,0	1,8			9,9	1,56	6,7	0,70	8,4	0,92	6,5	0,83
29	6,5	9,4	8,3	6,9		11,7	8,5	8,6	9,0	7,0	7,9	1,7			10,6	1,63	7,8	0,80	8,8	0,35	7,2	0,95
30	6,6	10,4	10,9	6,5		12,5	9,0	8,5	8,9	7,1	8,0	1,8			11,5	1,48	7,9	0,71	9,0	0,07	8,0	2,53

Abbildung 63: Ergebnisse der einzelnen Messungen des 2. Ansatzes

**Abbildung 64:**

Reaktivität von α -Gal-, α -Glc-, β -Gal- und β -Glc-Yariv mit AGPs im Geldiffusionstest: Reaktivität der AGPs mit β -Gal- und β -Glc-Yariv durch Präzipitationsbanden sichtbar, fehlende Reaktivität der AGPs gegenüber α -Yariv - keine Präzipitationsbanden erkennbar

(Probenkonzentrationen: 1 mg/ml)

Mit dem dritten Versuch sollten die Ergebnisse des zweiten Ansatzes überprüft werden, wobei speziell das allgemein verzögerte Zellwachstum, sowie die mit α -Gal-Yariv behandelten Zellen beobachtet wurden. Die Beimpfung der Zellen erfolgte wie im zweiten Versuch beschrieben mit einer Suspensionskultur, die direkt aus Kallusgeweben angesetzt wurde. Um die Statistik zu verbessern, wurden 16 Nasenkolben verwendet und das Wachstum wie gehabt täglich überprüft. Nach acht Tagen zeigten die Kolben ein ausreichendes Zellwachstum, wobei diesmal nicht zwischen lag- und Beschleunigungs-Phase unterschieden werden konnte, da der Verlauf des Zellwachstums linear verlief. Für die Beimpfung mit den Yariv-Reagenzien wurden die Kolben wieder gruppiert: unbehandelt: Kolben 1-4, 100 μ Mol α -Gal: Kolben 5-8, 50 μ Mol β -Glc-Yariv: Kolben 9-12 und 100 μ Mol β -Glc-Yariv: Kolben 13-16. Aus den Kolben der einzelnen Gruppen wurden nach einem Schema regelmäßig Proben für die DNA-Isolierung gezogen: 24 nach Beimpfung Probenzug aus Kolben 5, 9 und 13, nach 48 h Probenzug aus Kolben 6, 10 und 14, nach 72 h Probenzug aus Kolben 7, 11 und 15, nach 96 h Probenzug aus Kolben 8, 12 und 16, nach 216 h Probenzug aus Kolben 3, 5, 6, 9, 13 und 14, nach 264 h Probenzug aus Kolben 6 und 14 und nach 22 Tagen am Ende des Versuches Probenzug aus Kolben 6, 8, 12, 14 und 16. Aufgrund der vielen Probenzüge aus allen Kolben während des gesamten Versuches verlief das Zellwachstum aller Gruppen sehr ähnlich und ließ keine aussagekräftigen Unterschiede erkennen (siehe Abbildung 65, einzelne Daten der Messung siehe Abbildung 66).

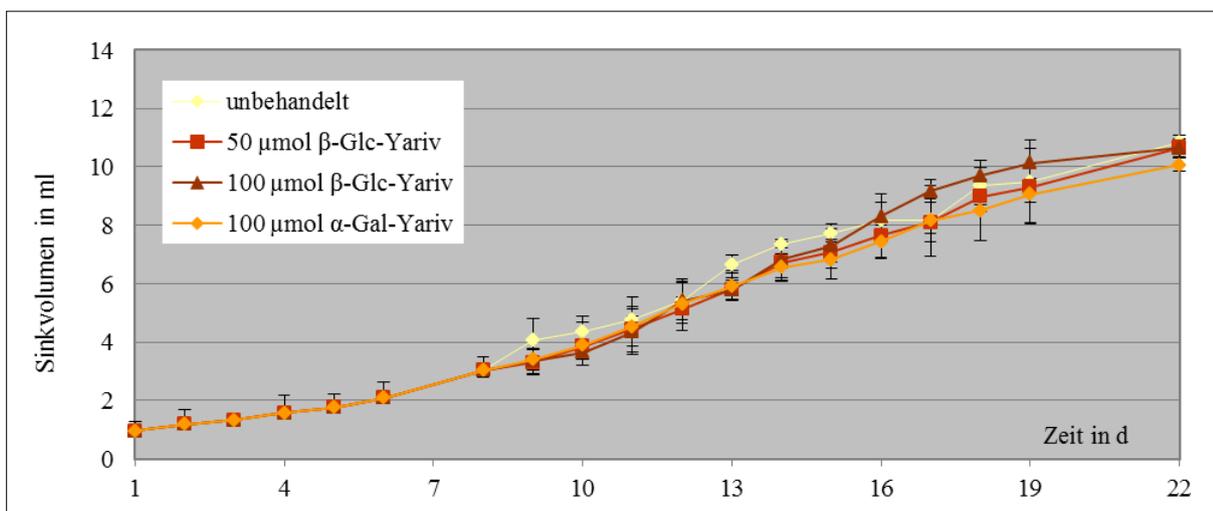


Abbildung 65: 3. Ansatz in Nasenkolben mit unbehandelten, mit 100 μ Mol α -Yariv und mit 50- und 100 μ Mol β -Yariv behandelte Zellkulturen

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	MW	Stabw																						
1	1,1	0,9	1,0	1,0	1,0	1,1	0,9	1,1	0,9	0,8	0,8	0,9	0,9	1,0	1,1	1,1	1,0	0,10																						
2	1,4	1,3	1,1	1,4	1,0	1,3	1,2	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1	1,2	1,2	1,1	1,3	1,2	0,13																						
3	1,7	1,4	1,5	1,5	1,3	1,4	1,3	1,2	1,4	1,3	1,2	1,2	1,2	1,0	1,5	1,2	1,3	0,18																						
4	1,9	1,6	1,6	1,6	1,4	1,7	1,4	1,4	1,9	1,3	1,4	1,5	1,5	1,3	2,0	1,9	1,6	0,24																						
5	1,8	2,0	1,8	1,8	1,6	2,0	1,9	1,5	2,0	1,5	1,7	1,6	1,6	1,7	2,1	1,5	1,8	0,20																						
6	2,2	2,2	2,1	2,1	2,2	2,0	2,1	1,8	2,1	1,8	2,1	1,9	2,1	2,2	2,4	2,2	2,1	0,16																						
7																																								
8	3,1	3,0	3,2	3,5	2,6	3,3	2,9	2,8	3,2	3,0	2,9	2,8	3,2	2,9	3,0	3,2	3,0	0,22	MW (u)	Stabw	MW (100α)	Stabw	MW (50β)	Stabw	MW (100β)	Stabw														
9		3,7	3,6	4,9	3,0	3,7	3,7	3,2	3,4	3,6	2,9	3,3	3,2	2,9	3,4	3,9			4,1	0,72	3,4	0,36	3,3	0,29	3,4	0,42														
10		4,0	4,3	4,7	3,3	3,7	4,2	4,4	4,0	4,5	3,5	3,4	3,5	3,4	3,4	4,3			4,3	0,35	3,9	0,48	3,9	0,51	3,7	0,44														
11		4,7	4,9	4,7	4,2	4,4	5,5	4,0	4,6	4,6	4,4	4,2	4,5	3,2	4,7	5,0			4,8	0,12	4,5	0,67	4,5	0,19	4,4	0,79														
12		5,5	5,6	6,7	5,0	5,4	5,5	5,4	6,0	4,9	4,6	5,0	5,5	4,4	5,5	6,2			5,4	0,64	5,3	0,22	5,1	0,61	5,4	0,74														
13		6,4	6,6	7,0	6,0	5,9	6,2	5,5	6,5	5,7	5,5	5,5	5,6	5,4	5,9	6,2			6,7	0,31	5,9	0,29	5,8	0,48	5,8	0,35														
14		7,2	7,4	7,5	6,7	6,4	7,1	6,0	7,2	6,6	7,1	6,0	7,4	6,0	6,7	7,2			7,4	0,15	6,6	0,47	6,7	0,55	6,8	0,62														
15		7,6	8,1	7,5	7,1	6,8	7,5	5,9	7,6	7,1	7,1	6,5	7,7	6,5	7,3	7,7			7,7	0,32	6,8	0,68	7,1	0,45	7,3	0,57														
16		8,3	8,7	7,5	7,7	7,4	8,0	6,7	8,2	7,3	8,4	6,7	9,3	7,4	8,2	8,3			8,2	0,61	7,5	0,56	7,7	0,79	8,3	0,78														
17		8,6	9,0	7,3	8,5	8,5	8,7	7,3	9,3	7,7	8,5	6,9	9,6	8,8	8,9	9,0			8,2	1,20	8,3	0,64	8,1	1,03	9,1	0,36														
18		10,0	9,8	8,9	9,0	8,5	9,2	7,3	10,0	8,3	9,8	7,8	10,3	8,3	9,5	9,3			9,4	0,64	8,5	0,85	9,0	1,09	9,4	0,82														
19		10,6	10,5	8,5	9,8	8,5	9,5	7,9	10,5	9,0	9,5	8,2	10,7	8,7	9,7	10,0			9,5	1,41	8,9	0,88	9,3	0,96	9,8	0,83														
20		kein																																						
21		Volumen																																						
22		mehr	11,0	10,7	10,2	9,6	10,2	9,8	11,4	10,8	10,6	9,8	11,0	8,8	10,4	10,5			10,9	0,21	10,0	0,30	10,7	0,66	10,2	0,95														

Abbildung 66: Ergebnisse der einzelnen Messungen des 3. Ansatzes

6.2.1.4 Vierter Versuch

Um deutlichere Unterschiede im Zellwachstum beobachten zu können, wurden im vierten Ansatz höhere Konzentrationen des Yariv-Reagenz eingesetzt. Die Beimpfung der Nasenkolben erfolgte unter den Standardbedingungen mit einer viskosen Sprossuspensionszellkultur (1. Subkultur). Nach einer viertägigen lag-Phase schloss sich eine viertägige Beschleunigungsphase an, sodass am 8. Kultivierungstag mit den Yariv-Reagenzien beimpft werden konnte: Kolben 1-3 blieben unbehandelt, Kolben 3-6 wurden mit 100 μMol α -Gal versetzt, Kolben 7 erhielt 150 μMol α -Gal, Kolben 8 und 9 erhielten 200 μMol α -Gal, Kolben 10-12 wurden mit 100 μMol β -Glc-Yariv beimpft und Kolben 13-15 erhielten 200 μMol β -Glc-Yariv. Die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen wurde in Abbildung 67 (einzelne Daten der Messung siehe Abbildung 68) graphisch dargestellt, wobei die Messwerte der Kultivierungstage 13, 14 und 15 nicht mit in die Auswertung eingingen, da viele Ausreißer aufgrund von Vertretungsmessungen beobachtet werden konnten. Es war zu beobachten, dass eine β -Glc-Yariv-Konzentration von 200 μMol das Zellwachstum im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen um ca. 30-40% hemmte. Des Weiteren inhibierten 100 μMol und 200 μMol α -Gal das Zellwachstum ebenfalls, wobei 200 μMol einen stärkeren Einfluss als 100 μMol hatte, aber trotzdem nur die Hälfte der 200 μMol β -Yariv-Inhibition ausmachte. Zwischen den Kurven von 100 μMol und 200 μMol α -Gal wurde die Wachstumskurve der mit 150 μMol α -Gal behandelten Zellen erwartet, die aber ähnlich der Wachstumskurve der unbehandelten Zellen verlief. Dies könnte in der Einzelmessung dieser Konzentration begründet sein. Des Weiteren verlief die Wachstumskurve der mit 100 μMol β -Glc-Yariv behandelten Zellen auch fast identisch zu den unbehandelten Zellen.

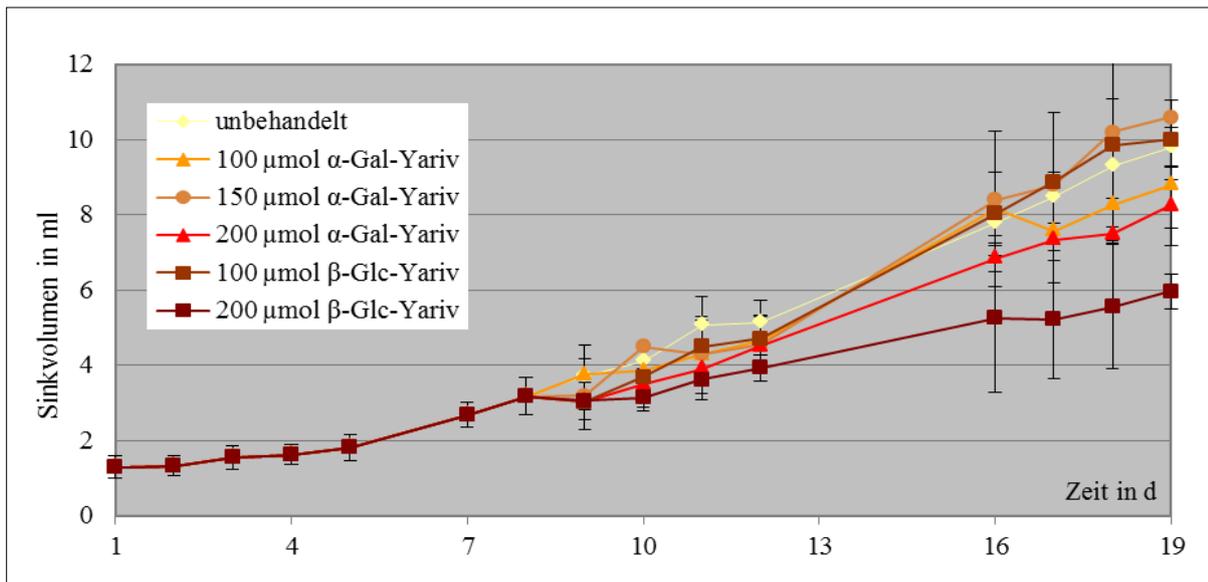


Abbildung 67: 4. Ansatz in Nasenkolben mit unbehandelten, mit 100, 150 und 200 µMol α-Yariv und mit 100- und 200 µMol β-Yariv behandelte Zellkulturen

	unbehandelt			100α			150α			200α			100β			200β				
Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	MW	Stabw			
1	1,9	1,1	1,1	1,3	0,9	1,2	1,5	1,6	1,2	1,2	1,0	1,8	1,5	1,2	1,0	1,3	0,30			
2	1,8	1,2	1,2	1,4	1,1	1,8	1,7	1,3	1,3	1,0	1,1	1,6	1,4	1,1	1,1	1,3	0,27			
3	1,8	1,2	1,3	1,6	1,3	1,8	1,6	1,9	1,5	1,2	1,2	2,2	1,7	1,8	1,4	1,6	0,31			
4	1,9	1,4	1,4	1,6	1,3	1,6	2,1	1,7	1,6	1,4	1,3	2,0	2,0	1,7	1,6	1,6	0,27			
5	2,3	1,5	1,6	1,7	1,7	1,9	2,2	2,1	1,5	1,3	1,4	2,3	2,2	2,0	1,7	1,8	0,34			
6																				
7	3,0	2,5	2,4	2,9	2,5	3,2	3,2	2,5	2,3	2,5	2,4	3,1	2,6	2,9	2,4	2,7	0,32			
8	3,4	2,7	3,3	3,6	3,0	3,8	4,2	2,8	3,0	2,6	2,6	3,7	3,2	3,2	2,8	3,2	0,48	MW (α)	Stabw	
9	4,0	3,2	4,0	3,6	3,1	4,6	3,2	3,2	2,9	2,6	2,6	3,9	3,3	3,4	2,5			3,7	0,46	
10	4,5	3,6	4,3	3,6	3,3	4,7	4,5	3,8	3,2	3,5	2,9	4,7	3,2	3,4	2,9			4,1	0,46	
11	5,4	4,2	5,6	4,1	3,4	5,4	4,3	4,1	3,7	4,3	3,9	5,3	4,0	3,9	3,0			3,9	0,76	
12	5,7	4,5	5,3	5,0	3,9	5,1	4,6	4,7	4,4	4,5	4,3	5,4	4,3	3,9	3,6			4,3	0,76	
13	6,7	6,0	6,5	5,8	5,1	9,0	9,5	8,0	7,5	6,4	4,7	6,8	4,3	7,8	7,7			3,5	0,42	
14	7,3	6,0	7,0	7,5	10,3	9,0	7,0	6,1	6,1	6,4	9,0	-	4,3	5,0	7,3			3,7	0,42	
15	7,3	6,5	8,2	9,6	6,4	12,0	12,0	7,1	6,9	9,3	6,8	12,0	5,8	5,0	8,2			3,9	0,76	
16	8,1	7,2	8,1	7,5	7,5	9,5	8,4	6,1	7,6	8,0	7,0	9,1	5,3	5,7	4,8			3,1	0,21	
17	8,5	7,9	9	7,35	7,2	8,2	8,8	6,5	8,2	8,9	7,9	9,85	5	5,5	5,2			3,0	0,21	
18	9,7	8,3	9,9	8,7	7,4	8,7	10,2	6,3	8,7	9,8	8,7	11,1	5,5	5,7	5,5			0,75	0,21	
19	10,2	9	10,2	8,9	7	10,5	10,6	7,1	9,4	9,5	9	11,5	5,7	6,7	5,5			0,75	0,21	
																		8,3	1,63	
																		10,0	1,32	
																		6,0	0,64	

Abbildung 68: Ergebnisse der einzelnen Messungen des 4. Ansatzes

6.2.1.5 Fünfter Versuch

Aufgrund von erneuten Wachstumsschwierigkeiten am Anfang der Kultivierung in einem Zwischenversuch wurden die Nasenkolben von nun an mit je 16,5 ml Zellsuspension beimpft, um ein schnelleres Zellwachstum zu gewährleisten. Der fünfte Versuchsansatz wurde mit einer Sprosskultur der 1. Subkultur beimpft und sollte die Wachstumsunterschiede zwischen unbehandelten, mit 200 µMol α-Gal- und 200 µMol β-Glc-Yariv beimpften Zellen untersuchen. Die Erhöhung der Zelldichte am Anfang resultierte in einer verkürzten lag-Phase (zwei Tage), die in eine ca. sechsstägige Beschleunigungsphase überging. Die Beimpfung der Zellen erfolgte am 6. Kultivierungstag, wobei Kolben 1-5 unbehandelt blieben und Kolben 6-9 bzw. 10-17 je 200 µMol α-Gal- bzw. 200 µMol

β -Glc-Yariv erhielten. Das Zellwachstum der unbehandelten Zellen verlief exponentiell und war mit dem der mit 200 μ Mol α -Gal-Yariv versetzten Gruppe identisch. Das Wachstum der 200 μ Mol β -Glc-Yariv-Gruppe wurde insoweit inhibiert, dass vier Tage lang kein Zellwachstum zu beobachten war und danach das Zellwachstum wieder langsam einsetzte, wobei der Kurvenverlauf weniger steil als der der unbehandelten Zellkultur war. Es wurde vermutet, dass dieser gemessene Wachstumsverlauf mit einer Schulter durch ein fast 100%iges Wegfangen von AGPs zustande kam, wobei die wenigen verbliebenen freien AGPs die Zellen zu weiterem Wachstum stimulierten, welches aber geringer ausfiel. Problematisch bei diesem Versuchsansatz war die hohe Verkeimungsrate der Nasenkolben, die eine ordentliche statistische Auswertung zunichtemachte (siehe Abbildung 69, einzelne Daten der Messung siehe Abbildung 70).

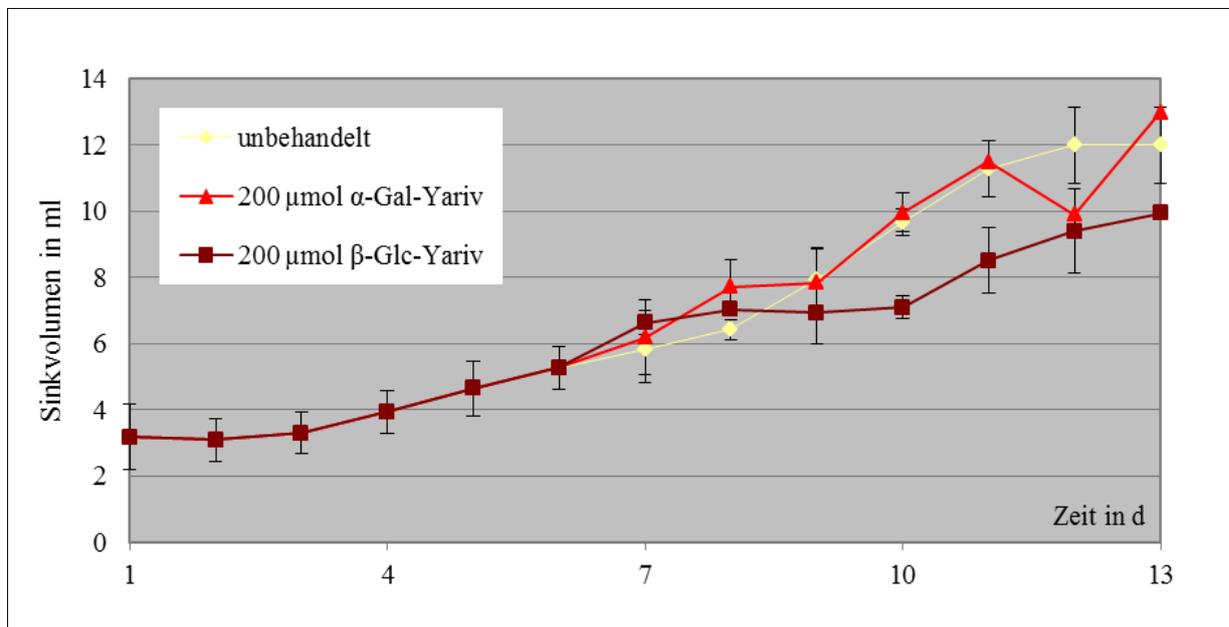


Abbildung 69: 5. Ansatz in Nasenkolben mit unbehandelten, mit 200 μ Mol α -Yariv und mit 200 μ Mol β -Yariv behandelte Zellkulturen

	unbehandelt					200 α				200 β																									
Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	MW	Stabw																
1	2,8	2,3	2,1	3,5	2,1	2,8	4,1	2,3	2,5	2,5	2,8	4,7	5,0	3,7	4,8	3,8	2,2	3,2	1,00																
2	2,9	2,5	2,4	3,0	2,5	3,1	3,9	2,2	2,8	2,9	3,0	3,2	4,3	4,0	4,2	3,3	2,4	3,1	0,65																
3	3,3	3,4	3,1	3,0	3,4	2,2	3,2	2,5	2,7	2,7	3,6	4,0	4,6	3,7	4,0	4,0	2,8	3,3	0,63																
4	4,2	3,3	4,0	5,1	3,3	3,9	4,2	3,5	3,2	4,0	3,4	4,0	4,3	5,0	4,8	4,0	2,9	3,9	0,64																
5	4,6	4,2	4,0	4,4	3,8	4,3	4,5	4,2	4,0	5,5	4,3	5,8	5,5	5,4	4,8	6,4	3,2	4,6	0,82																
6	5,2	4,6	5,0	4,7	4,5	5,5	5,0	6,0	5,2	6,5	4,5	6,0	Pilz	5,8	Pilz	Pilz	Pilz	5,3	0,65	MW (u)	Stabw	MW (200 α)	Stabw	MW (200 β)	Stabw										
7	5,4	5,2	5,5	7,6	5,4	6,0	5,7	5,3	7,8	Pilz	6,3	7,0		6,6						5,8	1,00	6,2	1,12	6,6	0,35										
8	6,5	6,0	6,7	Pilz	6,5	8,7	7,0	8,1	7,1		6,8	7,1	7,2							6,4	0,30	7,7	0,82	7,0	0,21										
9	7,2	8,5	9,0		7,0	Pilz	7,2	9,0	7,3		5,9	7,8	7,1							7,9	0,98	7,8	1,01	6,9	0,96										
10	10,0	9,5	9,2		10,0		10,2	10,4	9,3		6,7	7,3	7,3							9,7	0,39	10,0	0,59	7,1	0,35										
11	9,5	11,4	12,0		10,5		11,5	Pilz	Pilz		Pilz	9,2	7,8							11,3	0,85	11,5	-	8,5	0,99										
12	12,0	10,7	12,0		10,4		9,9					10,3	8,5							12,0	1,15	9,9	-	9,4	1,27										
13	13	11	13		11		13					10	9,9							12,0	1,15	13,0	-	10,0	0,07										

Abbildung 70: Ergebnisse der einzelnen Messungen des 5. Ansatzes

6.2.1.6 Sechster Versuch

Der im fünften Ansatz ermittelte Kurvenverlauf des Zellwachstums sollte mit dem sechsten Versuch wiederholt werden, wobei zusätzlich der im ELISA (siehe V 6.1.1) getestete monoklonale Antikörper 4B8D3 (mAK 4B8D3) in den Verdünnungen 1:20 und 1:100 auf seine Wachstumshemmung überprüft werden soll. Nach dem Beimpfen der Kolben mit einer 14 Tage alten Sprosskultur (6. Subkultur) schloss sich einer eintägigen lag-Phase eine ca. dreitägige Beschleunigungsphase an. An deren Ende erfolgte die Beimpfung der Kolben mit 200 μMol α -Gal- und 200 μMol β -Yariv sowie dem Antikörper. Dazu wurden Kolben 6-10 mit 200 μMol α -Gal-Yariv und Kolben 11-15 200 μMol β -Yariv versetzt. Kolben 1-5 blieben unbehandelt, Kolben 16 erhielt den mAK in einer 1:100 Verdünnung und Kolben 17 wurde mit einer Antikörperverdünnung von 1:20 versetzt. Der Kurvenverlauf (siehe Abbildung 71, einzelne Daten der Messung siehe Abbildung 72) der einzelnen Gruppen entsprach denen in Ansatz fünf, wobei die unbehandelten Zellen, sowie die mit 200 μMol α -Gal-Yariv versetzten Zellen ähnliche Kurven mit keiner Wachstumshemmung zeigten. Die mit 200 μMol β -Yariv behandelten Kulturen zeigten ab dem Beimpfungstag eine totale Inhibition des Zellwachstums, das selbst nach 14 Tagen noch vorhanden war (keine Schulter). Dies könnte mit einer niedrigeren Zelldichte am Beimpfungstag im Vergleich zu Ansatz fünf zusammenhängen. Mit einem durchschnittlichen Sinkvolumen von 4,3 ml im Vergleich zu 5,3 ml waren weniger Zellen mit einem geringeren Anteil an AGPs vorhanden, deren vollständige Blockade vermutlich durch 200 μMol β -Yariv erreicht wurde. Die Zugabe des monoklonalen Antikörpers, der seine Reaktivität im direkten ELISA gegenüber den AGPs aus *P. sidoides* bewiesen hatte (siehe V 6.1.1), zeigte keine Wachstumshemmung, was eventuell durch eine zu geringe Konzentration begründet war.

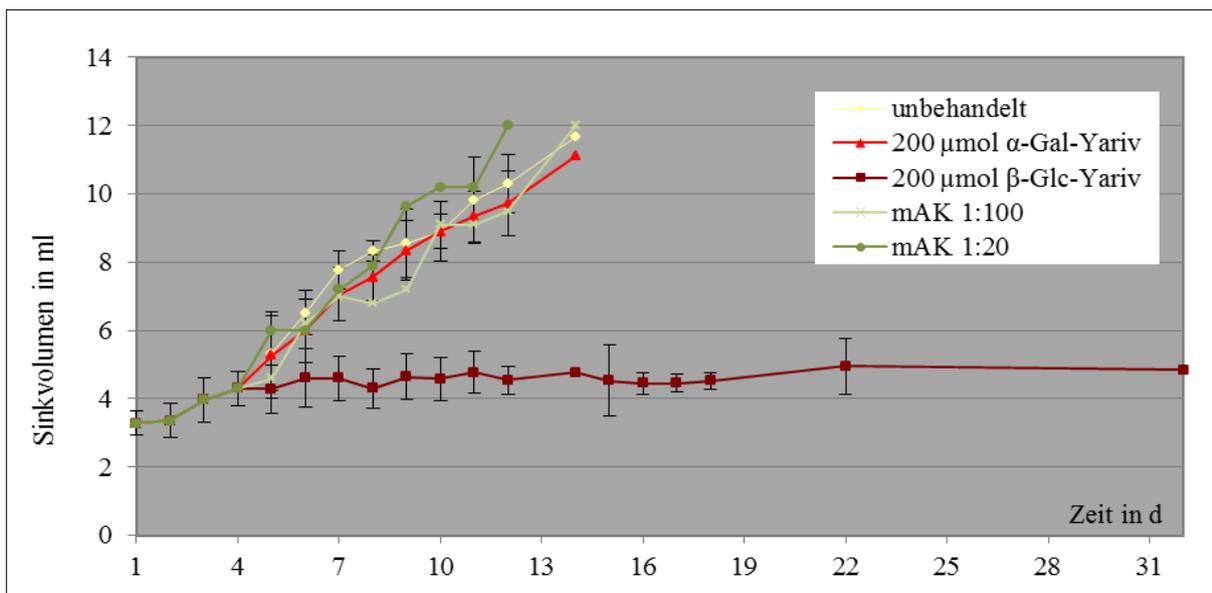
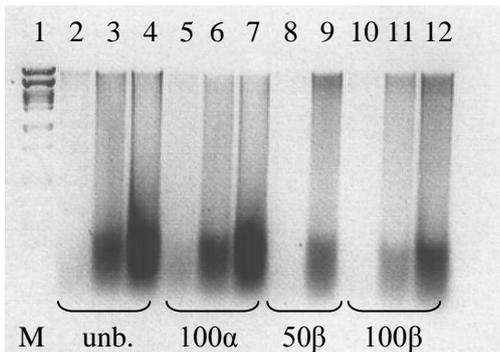


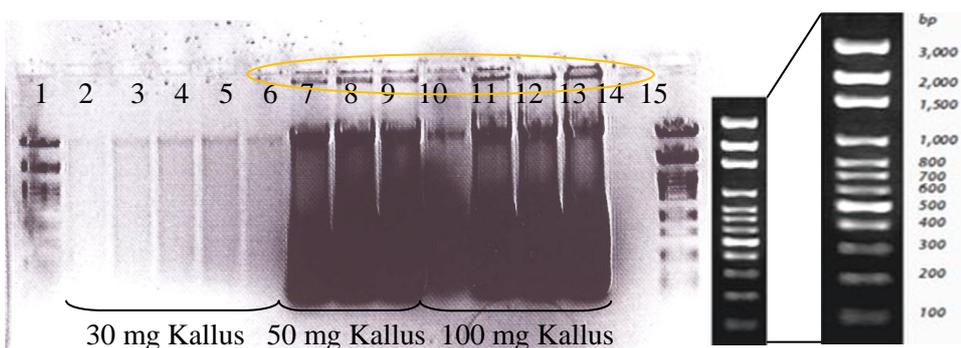
Abbildung 71: 6. Ansatz in Nasenkolben mit unbehandelten, mit 200 μMol α -Yariv und mit 200 μMol β -Yariv behandelte Zellkulturen sowie 2 Kolben mit dem monoklonalen Antikörper 4B8D3 in den Verdünnungen 1:20 und 1:100

**Abbildung 73:****1. Versuch der DNA-Isolierung:**

Gel mit breiten RNA-Banden im unteren Bereich

Auftragsvolumen: Marker (M): 3 μ lDNA aus unbehandelten Zellen: 1, 5 und 10 μ l DNAaus 100 μ Mol α -Yariv Zellen: 1, 5 und 10 μ l DNAaus 50 μ Mol β -Yariv Zellen: 1 und 5 μ l DNAaus 100 μ Mol β -Yariv Zellen: 1, 5 und 10 μ l

Die zweite DNA-Isolierung wurde mit bei -73°C eingefrorenen Kalluskulturen mit Einwaagen von 30, 50 und 100 mg Zellgewebe durchgeführt. Der verbesserte Zellaufschluss erfolgte mit einem Mikropistill aus Edelstahl unter dem Einsatz von mehr Kraft und einer verlängerten Aufschlusszeit. Des Weiteren wurde das MasterPureTM Plant Leaf DNA Purification Kit mit einem Testkit der Fa. GeneOn verglichen. In den Isolierungsgang des neuen Testkits wurde zusätzlich eine Behandlung mit 40 μ l RNase A eingebaut. Die Auftrennung der DNA erfolgte dieses Mal in einem 1%igem Agarosegel für 20 min (siehe Abbildung 74). Der Einbau der RNase-Behandlung in die Isolierung des Testkits der Fa. GeneOn war erfolgreich, sodass keine breiten RNA-Banden im Gel (Bahn 2-6) mehr sichtbar waren. Trotzdem waren auch weiterhin keine DNA-Banden im Gel zu erkennen. Im Gegensatz dazu konnte mit Hilfe des MasterPureTM - Testkits erfolgreich DNA isoliert werden. Direkt unterhalb der Auftragstaschen lag die scharfe Bande der intakten genomischen DNA (orange Markierung). Das Vorhandensein einer zweiten, relativ scharfen Bande bei 3.000 Basenpaaren konnte nicht erklärt werden. Des Weiteren sind die breiten RNA-Banden zu erkennen, da keine RNase Behandlung durchgeführt wurde.

**Abbildung 74: 2. Versuch der DNA-Isolierung: Vergleich 2er Testkits und Einbau einer RNase- Behandlung:**

Bahnen 2-6 Testkit der Fa. GeneOn mit RNase-Behandlung

Bahnen 7-13 MasterPureTM - Testkit ohne RNase-BehandlungAuftragsvolumen: Marker (äußeren Bahnen): 5 μ lProbenvolumen mit fortlaufender Nummerierung: 4, 8, 12, 16, 20, 8, 16, 20, 4, 8, 12 und 20 μ l

Um den Zellaufschluss weiterhin zu verbessern, wurden diesmal die Kalluskulturen vor der Isolierung gefriergetrocknet. Dies erleichtert den Zugang zur DNA und verhindert ein zu starkes Mörsern der Zellen mit dem Mikropistill, was im schlechtesten Fall zur mechanischen Zerstörung der DNA führen kann. Es wurden wiederum beide Testkits verwendet, wobei beide jetzt mit einer RNase A - Behandlung kombiniert wurden. Für die Isolierung mit dem MasterPure™ - Kit wurden 50 mg Zellmasse und für das Kit der Fa. GeneON 30 mg Zellmasse verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte in einem 1%igem Gel für 20 min (siehe Abbildung 75). Beide Testkits führten diesmal zu einer erfolgreichen Isolierung von genomischer DNA, die aufgrund ihrer Größe direkt unter den Auftragstaschen lag (orange Markierung). Die zweite scharfe Bande, die auch schon auf dem Vorgängergel detektiert wurde, war jetzt deutlich zu erkennen und lag wieder auf der Höhe des ersten Marker-Signals bei 3.000 Basenpaaren (rote Markierung). Da die Aufreinigung der DNA mit dem MasterPure™ - Kit zu sauberen Bahnen ohne Schmierer führte, wurde von nun an nur noch mit diesem Kit gearbeitet.

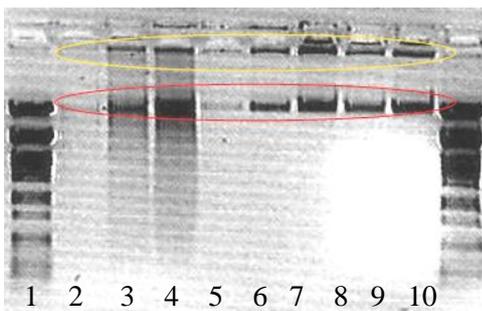


Abbildung 75:

3. Versuch der DNA-Isolierung:

Vergleich zweier DNA-Isolierungs-Testkits mit integrierter RNase-Behandlung (Bahnen 2-4 Testkit der Fa. GeneOn, Bahnen 5-9 MasterPure™ - Testkit)

Auftragsvolumen: Marker (äußeren Bahnen): 5 µl

Probenvolumen mit fortlaufender Nummerierung beginnend mit Bahn 2: 1, 5, 10, 1, 5, 10, 5 und 10 µl

Nachdem die Isolierung der DNA optimiert wurde, sollten nun wieder die mit Yariv-Reagenz behandelten Zellen untersucht werden. Abbildung 76 zeigt hierfür die Auftrennung der isolierten DNA-Proben in einem 1%igem Agarosegel. Bahnen 1-4 zeigen die isolierte DNA von mit 200 µMol α -Gal-Yariv-Reagenz behandelten Zellen, wobei die Auftragsmenge zwischen 10 und 18 µl variierte. Bahnen 5-8 stellen die Auftrennung der DNA aus unbehandelten Zellkulturen mit den gleichen Auftragsmengen dar. Dabei ist zu beobachten, dass sowohl die mit α -Gal-Yariv behandelten Zellen als auch die natürlich gewachsenen Zellen eine vergleichbare intakte genomische DNA-Bande direkt unter der Auftragstasche zeigen. Dies bestätigt das Nicht-reagieren von α -Gal-Yariv mit AGPs, sodass in diesem Fall keine Blockierung der AGPs und ihrer Wirkung vorliegt, was sich in einem normalen Zellwachstum und intakten DNAs widerspiegelt.

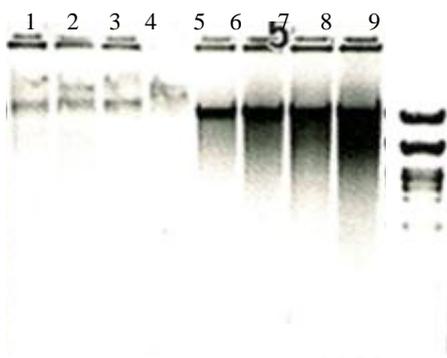


Abbildung 76:

4. Versuch der DNA-Isolierung:

Vergleich der aus unbehandelten und mit α -Yariv behandelten Zellen isolierten DNA

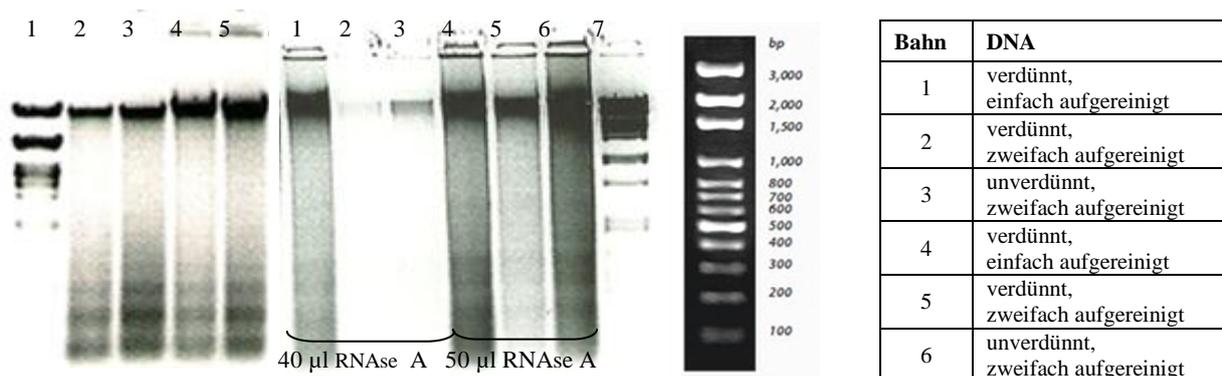
Auftragsvolumen: Marker (rechts außen): 3 μ l Proben

DNA aus unbehandelten Zellen: 10, 18, 10 und 18 μ l

DNA aus 200 μ Mol α -Yariv Zellen: 10, 18, 10 und 18 μ l

Abbildung 77 zeigt Ausschnitte zweier Gele, wobei das mittlere Bild die Auftrennung der DNA aus mit 200 μ Mol β -Glc-Yariv-Reagenz in einem 2%igem Gel darstellt. Die einzelnen Bahnen unterschieden sich in der verwendeten RNA-Menge während der DNA-Aufarbeitung, wobei eine höhere Konzentration keinen Vorteil brachte, sowie der Konzentration und Aufreinigung der DNA. Die Variation der aufgetragenen DNA-Menge diente allein der optimalen Darstellung der DNA und ihrer Bruchstücke auf dem Gel (siehe Abbildung 77, Tabelle).

Wie bei allen Trennungen ist die nicht zuordenbare Bande bei 3.000 Basenpaaren zu erkennen. Des Weiteren sind im unteren Gelbereich mehrere schwach übereinander liegende Banden sichtbar. Diese DNA-Bruchstücke verschiedener Größen liegen ungefähr im Bereich von 100 – 500 Basenpaaren (Vergleich mit DNA-Marker). Die Anordnung einer sogenannten DNA-Ladder ist typisch für den programmierten Zelltod. Eine noch deutlicher detektierbare DNA-Ladder zeigt das rechte Gel, das die DNA einer schlecht wachsenden unbehandelten Suspensionskultur auftrennte.



Bahn	DNA
1	verdünnt, einfach aufgereinigt
2	verdünnt, zweifach aufgereinigt
3	unverdünnt, zweifach aufgereinigt
4	verdünnt, einfach aufgereinigt
5	verdünnt, zweifach aufgereinigt
6	unverdünnt, zweifach aufgereinigt

Abbildung 77: 5. und 6. Versuch der DNA-Isolierung:

rechts: Auftrennung der DNA aus schlecht wachsenden Suspensionskulturen

(Bahn 2 und 4: 10 μ l und Bahn 3 und 5: 18 μ l Probenvolumen)

Mitte: DNA isoliert aus mit 200 μ Mol β -Yariv behandelten Zellen

(Auftragsmengen der DNA: 10 μ l)

Auftragsvolumen des Markers: 3 μ l (Marker-Ladder siehe rechte Abbildung)

7. Vermehrung von *Pelargonium sidoides* mit Hilfe der somatischen Embryogenese

Die somatische Embryogenese ist ein biotechnologisches Verfahren, um schnell und günstig eine große Anzahl von erbgleichen Jungpflanzen aus somatischen Zellen zu erzeugen. Mit dem direkten und dem indirekten Versuchsansatz wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Erzeugung der somatischen Embryonen getestet.

7.1 Etablierung der direkten somatischen Embryogenese

Die Entwicklung der somatischen Embryonen erfolgte bei der direkten Methode aus pflanzlichen Geweben (Petiolen, Blütenstandstiele von geöffneten und geschlossenen Blüten, Blattstücke), die zur Auslösung der Embryogenese mit verschiedenen Phytohormonen (Thidiazuron allein und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und Benzylaminopurin in Kombination) behandelt wurden. Je nach Art der Pflanze muss das optimale Ausgangsgewebe sowie der geeignete Stimulus gefunden werden, um die Entwicklung von Embryonen aus somatischen Zellen auszulösen. In dieser Versuchsdurchführung wurden die oben genannten Phytohormone in Kombination mit einem anschließenden Hormonentzug getestet.

7.1.1 Induktion somatischer Embryonen durch diverse Phytohormone

Im ersten Versuchsansatz wurden Blütenstandstiele geschlossener Blüten (produzierten nach KLEIN 2005 mehr Embryonen als geschlossene Blüten) und Petiolen als Ausgangsgewebe verwendet. Nach einer dreiminütigen Desinfektion in 70%igem (v/v) Ethanol und 5 min in 10%iger Domestos®-Lösung wurde die Hälfte der Explanate für eine Woche auf Agarplatten mit 2,2 mg/l Thidiazuron (TDZ) und die andere Hälfte auf Platten mit 2,2 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und 0,45 mg/l Benzylaminopurin (BAP) ausgelegt. Die Hälfte der 1 cm langen Explanate wurde zusätzlich entlang der Längsseite geteilt, um zu überprüfen, ob eine größere Schnittfläche eine höhere Anzahl von Embryonen liefert.

7.1.1.1 Induktionsmedium mit Thidiazuron

Nach der Kultivierung der Explanate auf dem Phytohormon-enthaltenden Induktionsmedium ohne Licht, wurden die Explanate auf ein Nährmedium ohne Phytohormone (oP-Medium) umgesetzt, bei 27°C und 16 h Beleuchtung aufbewahrt und der Beginn der somatischen Embryogenese unter einem Stereomikroskop überprüft. Die Veränderungen einiger Explanate auf dem phytohormonfreien Medium ist in Abbildung 78 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich das Gewebe an den Schnittkanten trichterartig ausbreitete und der mittlere Teil der Explanate seinen Durchmesser vergrößerte. An den Schnittkanten der Explanatenden bildeten sich neben meristematischem Gewebe

auch die neuen Embryonen, die in ihrem anfänglichen Stadien nur unter dem Mikroskop zu erkennen waren. Ab dem dritten Stadium der somatischen Embryogenese waren die Embryos dann auch mit bloßem Auge zu beobachten. Die Darstellung aller vier Stadien der somatischen Embryogenese zeigt Abbildung 79.

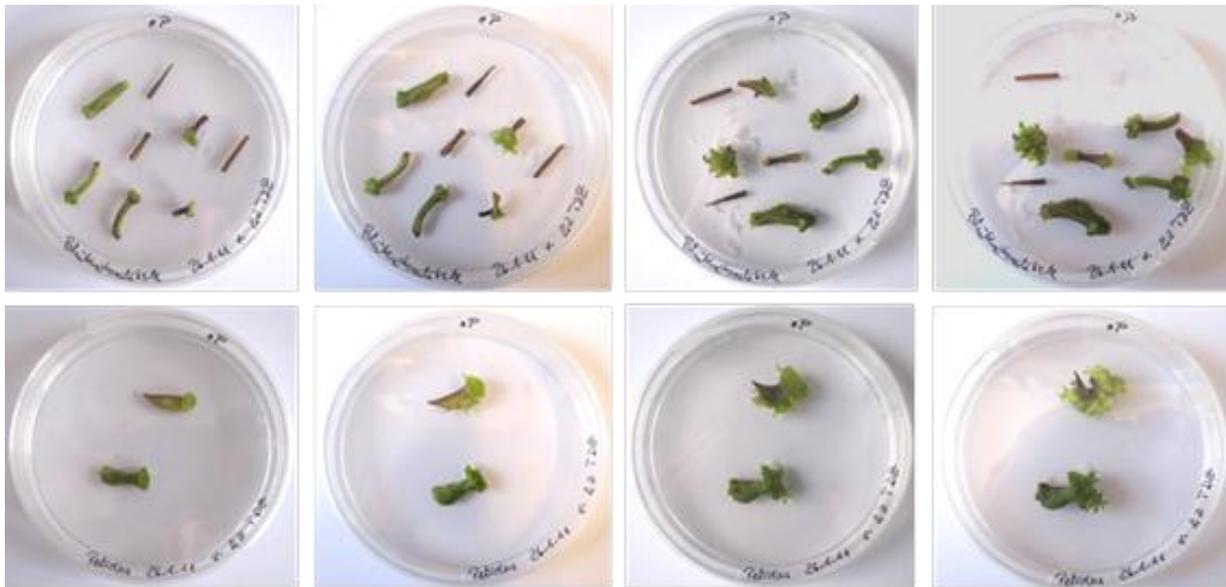


Abbildung 78: Veränderung der Explanate auf phytohormonfreiem Nährmedium

(von links nach rechts: 13 d, 16 d, 20 d und 27 d)

obere Reihe: Explanate von Blütenstandstielen, untere Reihe: Explanate von Petiolen



Abbildung 79: Die 4 Stadien der somatischen Embryogenese:

Globuläres S., Herz-S., Torpedo-S. und Kotyledonen-S. (von links nach rechts)

Sowohl Blütenstandstiele als auch Petiolen produzierten Embryonen, jedoch nicht an allen Explanten. Neben einem Verlust einiger Explanate durch Schimmelpilzbildung (deutlich mehr Explanate von Petiolen als von Blütenstandstielen betroffen) in der ersten Woche, blieben einige klein und braun und vertrockneten. Im Gegensatz dazu zeigten mehrere intakte Explanate bereits nach 13 Tagen Embryonen im globulären Stadium. Nach 20 Tagen waren an diversen Explanten Embryonen der verschiedenen Stadien zu erkennen, die bereits nach 7 weiteren Tagen erste kleine Blätter bildeten. Nach 30 Tagen auf den phytohormonfreien Platten wurden die ersten beiden ca. 0,5-1 cm großen Embryonen in Röhrchen mit oP-Medium zur Wurzelbildung überführt. Nach 43 bzw. 44 Tagen

Kultivierung in den Röhrcchen waren die ersten kleinen Wurzeln erkennbar, sodass die Jungpflanzen am 49. Tag in Anzuchterde übertragen wurden und sich unter gespannter Luft in einem Miniaturgewächshaus weiter entwickelten. Neben regelmäßigem Gießen mit fungizider Chinosollösung wurden die Jungpflanzen alle zwei Wochen mit 0,1%iger Düngertlösung behandelt, sodass sie nach sechs Wochen in TKS1-Erde mit einem höheren Nährstoffanteil umgesetzt und im Kalthaus aufbewahrt werden konnten (zeitlicher Verlauf der Entwicklung vom Embryo bis zu Jungpflanze siehe Abbildung 80).

Neben diesen ersten beiden Embryonen produzierten die Explanate weitere, deren zeitliche Entwicklung aber voneinander abwich und die zu diesem Zeitpunkt des Versuches noch nicht quantifiziert wurden. Trotzdem konnte allein mit Hilfe der fotografischen Dokumentation festgestellt werden, dass die Blütenstandstiele deutlich mehr Embryonen produzierten als die Petiolen. Des Weiteren entwickelten sich an den zusätzlichen längsgerichteten Schnittkanten der halbierten Explanate keine bzw. kaum Embryonen, sodass diese Form der Explanat-Präparation aufgegeben wurde.

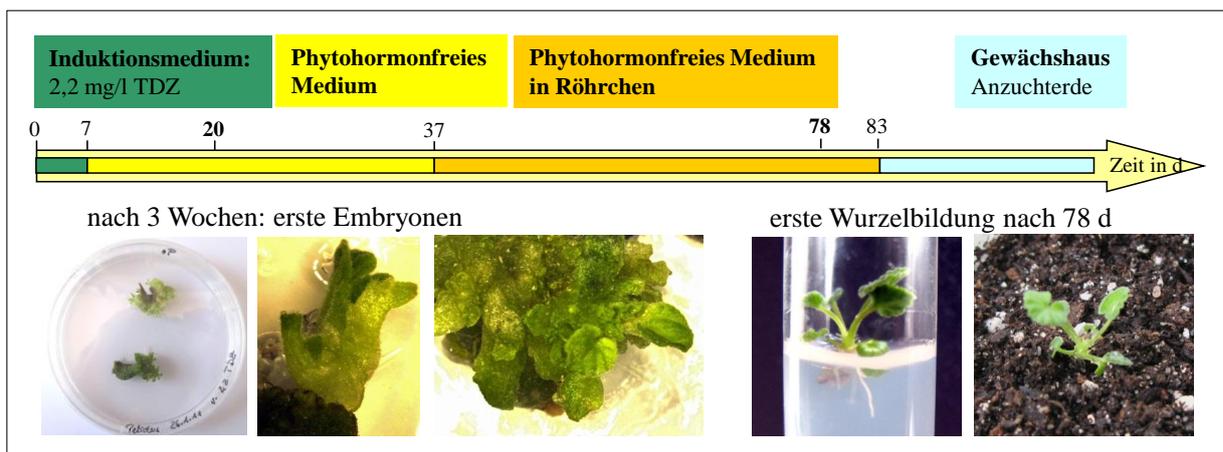


Abbildung 80: Von der Induktion des Embryos bis zur Jungpflanze

7.1.1.2 Induktionsmedium mit 2,4-D und BAP

Der Versuch somatische Embryonen auf einem zweiten Nährmedium mit 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und Benzylaminopurin (BAP) zu induzieren, war weniger erfolgreich. Sowohl Explanate aus Blütenstandstielen als auch aus Petiolen produzierten keine Embryonen. An den Explanatenden war nur die Ausbildung meristematischen Gewebes und überraschenderweise die Ausbildung von Wurzeln zu beobachten (zeitlicher Verlauf der Explanatveränderung siehe Abbildung 81). Nach 20 Tagen konnten die ersten Ansätze der Wurzelbildung als stark behaarte globuläre Bereiche identifiziert werden (siehe Abbildung 82).

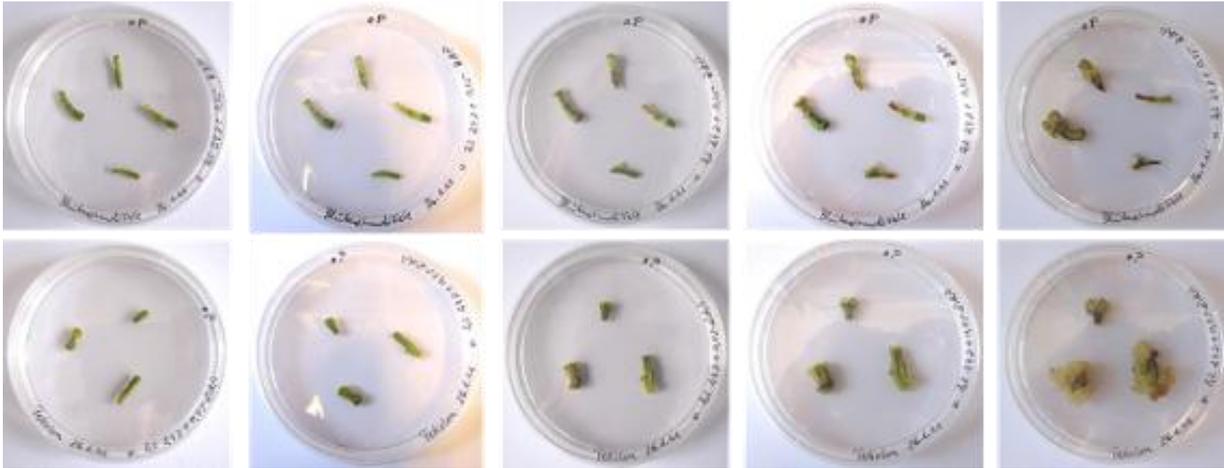


Abbildung 81: Veränderung der Explanate auf oP-Nährmedien (von links nach rechts: 13 d, 16 d, 20 d, 27 d und 44 d)
 obere Reihe: Explanate von Blütenstandstielen, untere Reihe: Explanate von Petiolen

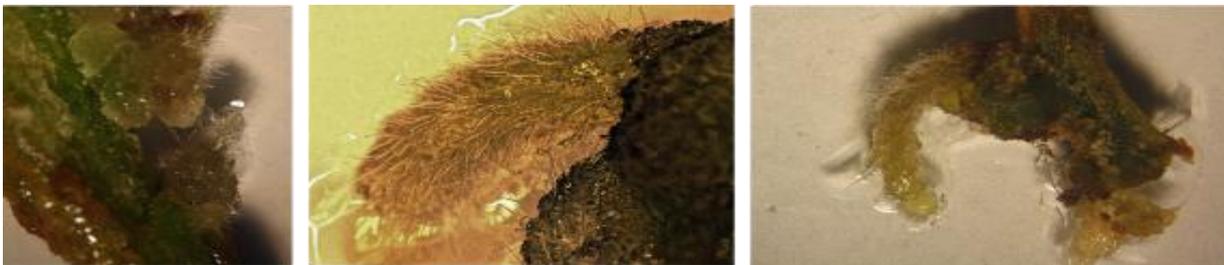


Abbildung 82: Wurzelbildung bei Explanten, die auf einem Induktionsmedium mit 2,4-D und BAP kultiviert wurden

In einem nächsten Schritt wurde versucht, Embryonen an den Wurzelansätzen zu induzieren. Hierfür wurden die Explanate für sieben Tage auf das Induktionsmedium mit 2,2 mg/l Thidiazuron übertragen und anschließend auf einem phytohormonfreien Nährmedium weiterkultiviert. Nach 20 Tagen auf dem oP-Medium differenzierten sich die bräunlichen, stark behaarten Wurzeln zu grünem Gewebe zurück und bildeten Embryonen (siehe Abbildung 83).

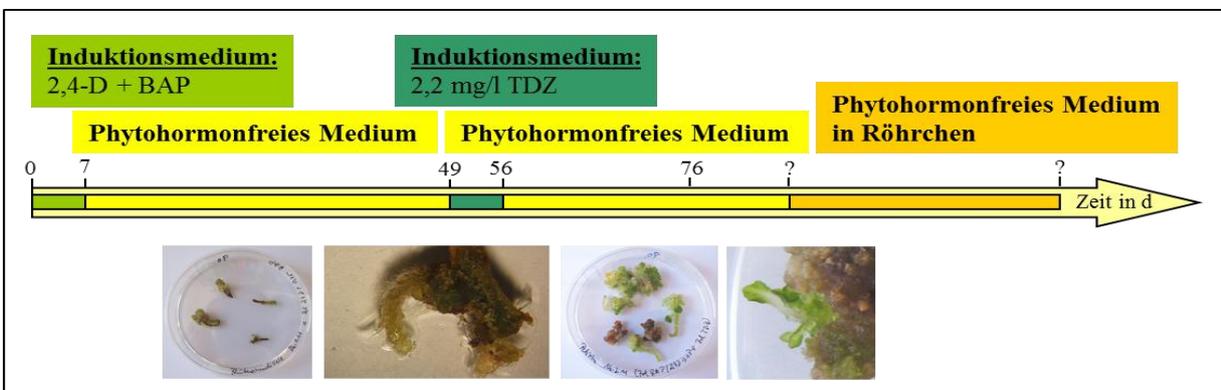


Abbildung 83: Kombination von 2,4-D/BAP und Thidiazuron

7.1.2 Optimierung des Embryogenese-Verfahrens

7.1.2.1 Zweiter Versuchsansatz

Um einige Parameter des ersten Versuchsansatzes zu verbessern, wurden erneut Blütenstandstiele und Petiolen auf einem Induktionsmedium mit 2,2 mg/l TDZ ausgelegt. Die vor dem Auslegen der Explanate stattgefunden Desinfektion wurde als erstes optimiert, um weniger Explanate bereits in den ersten Tagen durch Schimmelpilzbildung zu verlieren. Aus diesem Grund wurde die Einwirkzeit des 70%igen (v/v) Ethanol auf 5 min und die Einwirkzeit der 10%igen Domestos[®]-Lösung auf 15 min gesteigert. Trotzdem trat bei fast allen Petiolen-Explanaten eine Verpilzung auf. Die restlichen unbefallenen Explanate blieben braun und vertrockneten, sodass hier keine Embryonen entstehen konnten. Die Blütenstandstiel-Explanate zeigten keinen Befall mit Schimmelpilzen und bildeten nach 22 Tagen die ersten Embryonen im globulären Stadium. Nach weiteren 22 Tagen konnten bereits die ersten weiterentwickelten Embryonen in Röhrchen mit oP-Medium zur Wurzelbildung überführt werden. Insgesamt konnte eine schnellere Embryonenbildung und -entwicklung beobachtet werden.

Ein weiterer Versuch, bei dem die auf dem Induktionsmedium mit Thidiazuron gebildeten Embryonen schneller zur Wurzelbildung angeregt werden sollten, indem sie nach 22 Tagen auf einem oP-Medium, 14 Tagen auf das Induktionsmedium mit 2,4-D und BAP und im Anschluss wieder auf das oP-Medium übertragen wurden, zeigte keinen Erfolg.

7.1.2.2 Dritter Versuchsansatz

Der dritte Versuchsansatz, mit Blütenstandstielen geschlossener Blüten, Petiolen und kleinen Blattstückchen als Ausgangsgewebe auf einem Induktionsmedium mit der gewohnten TDZ-Konzentration, wurde zur ersten Quantifizierung der gebildeten Embryonen genutzt. Außerdem wurde weiterhin an der Optimierung der Desinfektion gearbeitet. Eine 20 minütige Behandlung mit Domestos[®]-Lösung (10%) nach der fünfminütigen Ethanolbehandlung (70%) sollte die Schimmelpilzbildung reduzieren. Von 17 ausgelegten Blattstückchen zeigten 7 eine Verpilzung, wohingegen nur 1 Blütenstandstiel einen Schimmelpilzbefall zeigte. Dies ist durch die stärkere Behaarung der Blätter erklärbar, die wahrscheinlich einen höheren Anteil an Tensiden als Benetzungsmittel in der Desinfektionslösung benötigt hätten.

Die Induktion von Embryonen aus Blattgeweben und diesmal auch aus den Petiolen war nicht erfolgreich. Zusätzlich waren alle Explanate aus den beiden genannten Ausgangsgeweben nach zwei bis drei Wochen braun bzw. tot. Diese Braunfärbung trat auch bei 6 Explanaten der Blütenstandstiele auf. Die restlichen, sich normal entwickelnden Explanate, zeigten eine Embryonenentwicklung, wobei 11 Explanate 76 Embryonen produzierten. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Verteilung der Embryonen pro Explanat von 1 bis 11 schwankte. Von den 76 Embryonen wurden 10 in Röhrchen mit

oP-Medium übertragen, von denen drei eine Wurzelbildung zeigten und ins Gewächshaus überführt werden konnten (siehe Tabelle 46).

Tabelle 46: Quantifizierung der Embryonen von der Entstehung bis zur Übertragung ins Gewächshaus (GH)

	Blütenstandstiele	Petiolen	Blattstücke
ausgelegte Explanate	20	25	17
Explanate auf oP- Platten	19	25	10
Embryonen bei... Explanaten	11	0	0
Anzahl der Embryonen	76	0	0
Embryos in Röhrchen	10	-	-
Jungpflanzen im GH	3	-	-

7.1.2.3 Vierter Versuchsansatz

Da die Blütenstandstiele ein für die Induktion von somatischen Embryonen geeignetes Ausgangsgewebe darstellten, sollte in einem neuem Versuchsansatz untersucht werden, ob die Nutzung der Blütenstandstiele von geschlossenen („Nicht-Blüh“) oder geöffneten („Blüh“) Blüten einen Einfluss auf die Embryonenanzahl und deren Entwicklung hat. Die Desinfektion der Explanate erfolgte wie im dritten Versuch beschrieben, da davon ausgegangen wurde, dass eine Verlängerung der Desinfektionszeit dem Gewebe schadet und es zu einem verstärkten Anstieg von braunem, nicht-embryobildungsfähigem Gewebe kommt.

13 Explanate der „Blüh“-Reihe wurden aufgrund von Schimmelpilzbildung ausgeschlossen. Ursache war vermutlich eine unzureichende Desinfektion der Explanate. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass sehr viel Explanate beider Reihen klein und braun blieben. Die Blütenstandstiele der geschlossenen Blüten produzierten überraschenderweise keinerlei Embryos, sondern nur meristematisches Gewebe mit stark behaarten globulären Ausstülpungen, die erste Anzeichen für eine Differenzierung in Richtung Wurzeln mit Wurzelhaaren darstellten. Die Entwicklung dieser Wurzelansätze zu langen Wurzeln blieb allerdings aus. Im Gegensatz dazu produzierten die Gewebe der Blütenstandstiele von blühenden Pflanzen 59 Embryonen an 5 Explanaten, wobei die Anzahl der Embryonen pro Explanat zwischen 4 und 21 variierte. Ein Embryo aus den 59 war nur soweit entwickelt, dass er zur Wurzelbildung in Röhrchen mit oP-Medium übertragen werden konnte. Nach 41 Tagen in den Röhrchen konnte die Jungpflanze ins Gewächshaus übertragen werden (siehe Abbildung 84). Zur Quantifizierung des Versuchsansatzes siehe Tabelle 47.

Tabelle 47: Quantifizierung der Embryonen von der Entstehung bis zur Übertragung ins Gewächshaus (GH)

	„Blüh“	„Nicht-Blüh“
ausgelegte Explanate	57	34
Explanate auf oP- Platten	44	34
Embryonen bei... Explanaten	5	0
Anzahl der Embryonen	59	0
Embryos in Röhrchen	1	-
Jungpflanzen im GH	1	-

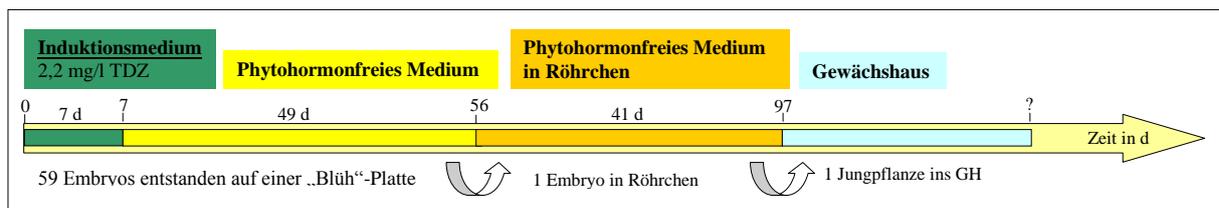


Abbildung 84: zeitlicher Verlauf des vierten Versuches

7.1.3 Steigerung des embryogenetischen Potentials

Nach erfolgreicher Induktion von somatischen Embryonen sollte der Einfluss von AGPs und β -Yariv-Reagenz auf das embryogenetische Potential der Zellen getestet werden. Dabei sollte untersucht werden, ob der Zusatz von AGPs ins Nährmedium oder direkt als Lösung auf das entsprechende Gewebe die Anzahl der Embryonen steigert und ihre Entwicklungszeit verkürzt. Des Weiteren sollte getestet werden, ob das Blockieren der AGPs über eine Komplexierung mit einer β -Yariv-Lösung die Auslösung der somatischen Embryogenese unterdrücken kann.

7.1.3.1 Fünfter Versuchsansatz

Zur Untersuchung von AGP-Zusätzen auf das embryogenetische Potential wurden Blütenstandstiele von geschlossenen Blüten als Ausgangsgewebe verwendet. Die AGP-Zusätze wurden in das Nährmedium, das 2,2 mg/l TDZ enthielt, eingearbeitet, wobei mit 0,1 mg/l und 1 mg/l zwei verschiedene AGP-Konzentrationen gegen eine unbehandelte Platte getestet wurden. Vor dem Auslegen der Explanate wurden diese wieder 5 min in 70%igem (v/v) Ethanol und 20 min in Domestos®-Lösung (10%) desinfiziert. Trotzdem zeigten 10 Explanate der unbehandelten Platten, 8 Explanate der niedrigen AGP-Konzentration und 6 Explanate der hohen AGP-Konzentration einen Befall mit Schimmelpilzen und wurden von dem Versuch ausgeschlossen. Von den 7 Explanaten der unbehandelten Platten produzierten drei 22 Embryonen (zwischen 6 und 10 Embryonen pro Explanat), wobei 7 davon in Röhrchen und 1 Jungpflanze davon ins Gewächshaus übertragen werden konnte. Bei den Platten mit der AGP-Konzentration von 0,1 mg/l bildeten 2 Explanate 13 Embryonen (zwischen 3 und 10 Embryonen pro Explanat), von denen 3 in Röhrchen und 2 ins Gewächshaus überführt wurden.

5 Explanate auf dem Medium mit 1 mg/l AGP produzierten 54 Embryonen (zwischen 1 und 26 Embryonen pro Explanat), von denen 16 in Röhren und 10 ins Gewächshaus überführt werden konnten (siehe Tabelle 47). Es konnte beobachtet werden, dass Explanate mit einer sehr großen Anzahl von Embryonen, aufgrund des Platzmangels ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr wuchsen und dann nach dem Übertragen in Röhren mit oP-Medium aufgrund ihrer noch geringen Größe Probleme in ihrer Entwicklung hatten, oft braun wurden und abstarben (siehe Abbildung 85). Betrachtet man die durchschnittliche Anzahl der Embryonen pro Explanat, bildeten sich an den Blütenstandstielen der unbehandelten Platten 7,3 Embryonen, bei einem Zusatz von 0,1 mg/l AGP ins Nährmedium 6,5 Embryonen und bei einem Zusatz von 1 mg/l AGP 10,8 Embryonen pro Explanat. Die Anzahl der Embryonen der unbehandelten Platte war vergleichbar mit dem Medium mit der niedrigen AGP-Konzentration, wohingegen eine AGP-Konzentration von 1 mg/ml eine Steigerung der Embryonenanzahl um mehr als 20% ausmachte.



Abbildung 85:
Explanat mit
22 Embryonen

Tabelle 48: Quantifizierung der Embryonen von der Entstehung bis zur Übertragung ins Gewächshaus (GH)

	TDZ	TDZ +0,1 mg/l AGP	TDZ +1 mg/l AGP
ausgelegte Explanate	17	14	17
Explanate auf oP- Platten	7	6	11
Embryonen bei... Explanaten	3 (1)	2 (1)	5 (1)
Anzahl der Embryonen	22 (7,3)	13 (6,5)	54 (10,8)
Embryos in Röhren	7	3	16
Jungpflanzen im GH	1	2	10

Abbildung 86 zeigt den zeitlichen Verlauf der Induktion und Entwicklung der Embryonen, der eindeutig erkennen lässt, dass die Zugabe von AGPs ins Nährmedium zwar die Anzahl der Embryonen steigert, aber nicht ihre Entwicklungszeit verkürzt. Selbst nach mehreren Monaten können ins Röhren mit oP-Medium überführte Embryonen noch Wurzeln ausbilden und ins Gewächshaus übertragen werden.

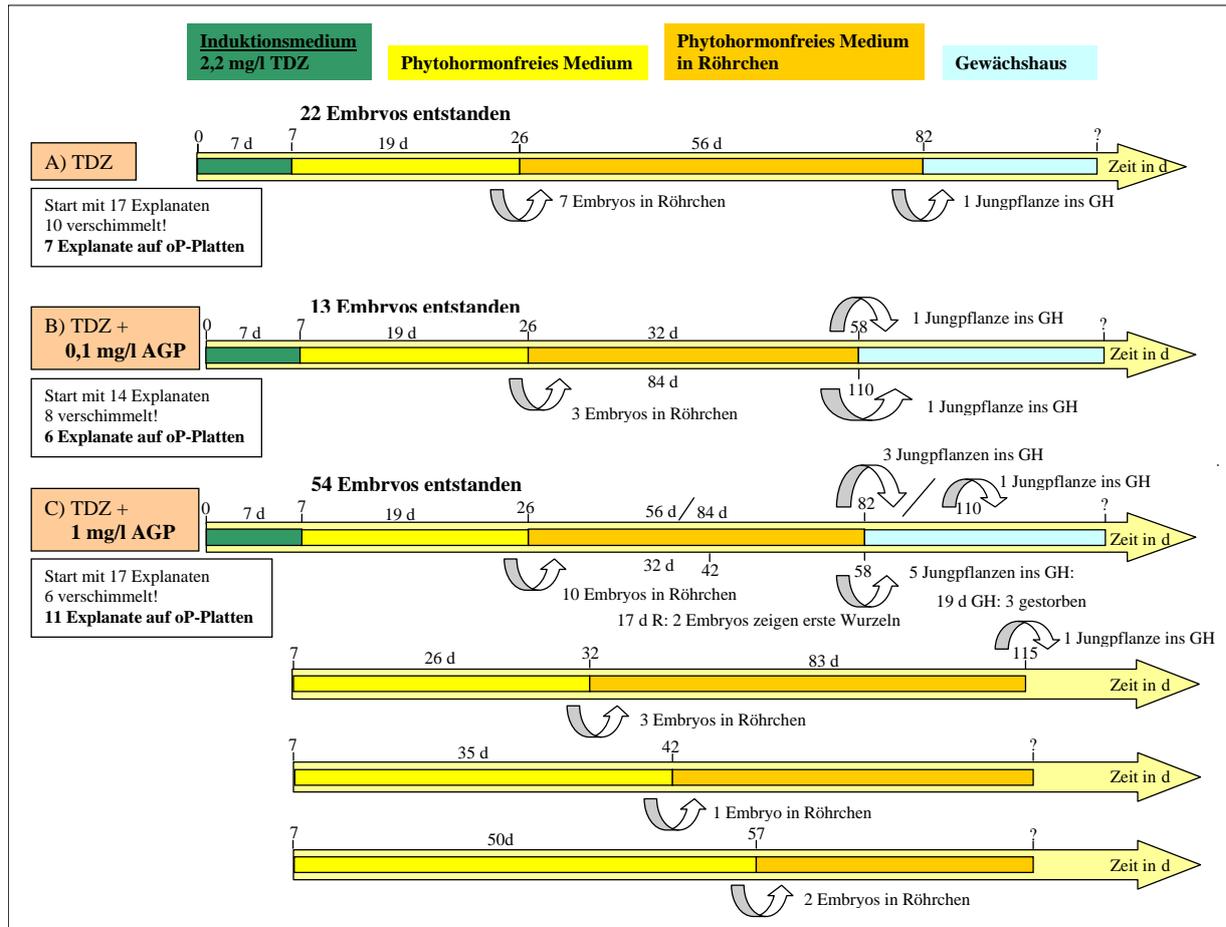


Abbildung 86: Vergleich der drei Parallelansätze in der Entwicklung der Embryonen

7.1.3.2 Sechster Versuchsansatz

Der sechste Versuchsansatz diente der Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des fünften Versuches, wobei die Einwirkzeit des Ethanol von 5 auf 7 min gesteigert wurde, um die immer wieder auftretende Schimmelpilzbildung zu reduzieren bzw. zu verhindern.

Von 20 ausgelegten Explanaten auf Platten mit nur TDZ im Medium zeigten 4 einen Befall mit Schimmelpilzen. Bei den beiden Medien mit AGP mussten jeweils 5 Explanate von 21 vom Versuch ausgeschlossen werden, sodass trotzdem noch ausreichend Explanate für eine statistische Auswertung vorhanden waren. Von 16 Explanaten auf den unbehandelten Platten zeigten 8 eine Embryonenbildung (125 Stück), wobei die Anzahl der Embryonen pro Explanat zwischen 1 und 26 variierte. 68 der 125 Embryonen wurden in Röhren mit oP-Medium überführt und 15 davon als Jungpflanzen ins Gewächshaus übertragen. 7 Explanate von 16 zeigten auf dem Nährmedium mit 0,1 mg/l AGP eine Auslösung der Embryogenese, sodass 70 Embryonen an 7 Explanaten gebildet wurden (1-27 Embryos pro Explanat). 26 der 70 Embryonen waren ausreichend entwickelt und wurden in Röhren weiterkultiviert bis sie ins Gewächshaus übertragen werden konnten, was bei 10 Jungpflanzen der Fall war. Die Explanate auf dem Medium mit der höchsten AGP-Konzentration (1 mg/l) bildeten 114 Embryonen an 13 Explanaten (bzw. 75 an 8 nach einem plötzlichen Absterben von 5 Explanaten). 50

Explanate waren ausreichend groß, um in Röhren übertragen werden zu können, von denen 18 als Jungpflanzen in Anzuchterde gesetzt wurden (Quantifizierung der Embryonen über den Versuchszeitraum siehe Tabelle 49).

Zur besseren Vergleichbarkeit der drei Parallelansätze wurde die durchschnittliche Anzahl der Embryonen pro Explanat bestimmt. Es bildeten sich 15,6 Embryonen pro Blütenstandstielstück auf der einfachen Platte mit nur TDZ, 10 Embryonen pro Explanat auf Medium mit 0,1 mg/l AGP und 8,8 bzw. 9,4 Embryonen pro Explanat auf dem Nährmedium mit 1 mg/l AGP. Somit widerspricht dieser Versuch mit der sinkenden Embryonenanzahl pro Explanat mit steigender AGP-Konzentration im Nährmedium den Ergebnissen des vorherigen Versuchsansatzes.

Tabelle 49: Quantifizierung der Embryonen von der Entstehung bis zur Übertragung ins Gewächshaus (GH)

	TDZ	TDZ +0,1 mg/l AGP	TDZ +1 mg/l AGP
ausgelegte Explanate	20	21	21
Explanate auf oP- Platten	16	16	16
Embryonen bei... Explanaten	8 (1)	7 (1)	13/8* (1)
Anzahl der Embryonen	125 (15,6)	70 (10)	114/75* (8,8/9,4)
Embryos in Röhren	68	26	50
Jungpflanzen im GH	15	10	18

* Nach 19 d auf oP-Platten starben plötzlich 5 Explanate mit Embryonen ab

Die zeitliche Entwicklung der einzelnen Embryonen in den drei Ansätzen des Versuches ist in Abbildung 87 dargestellt.

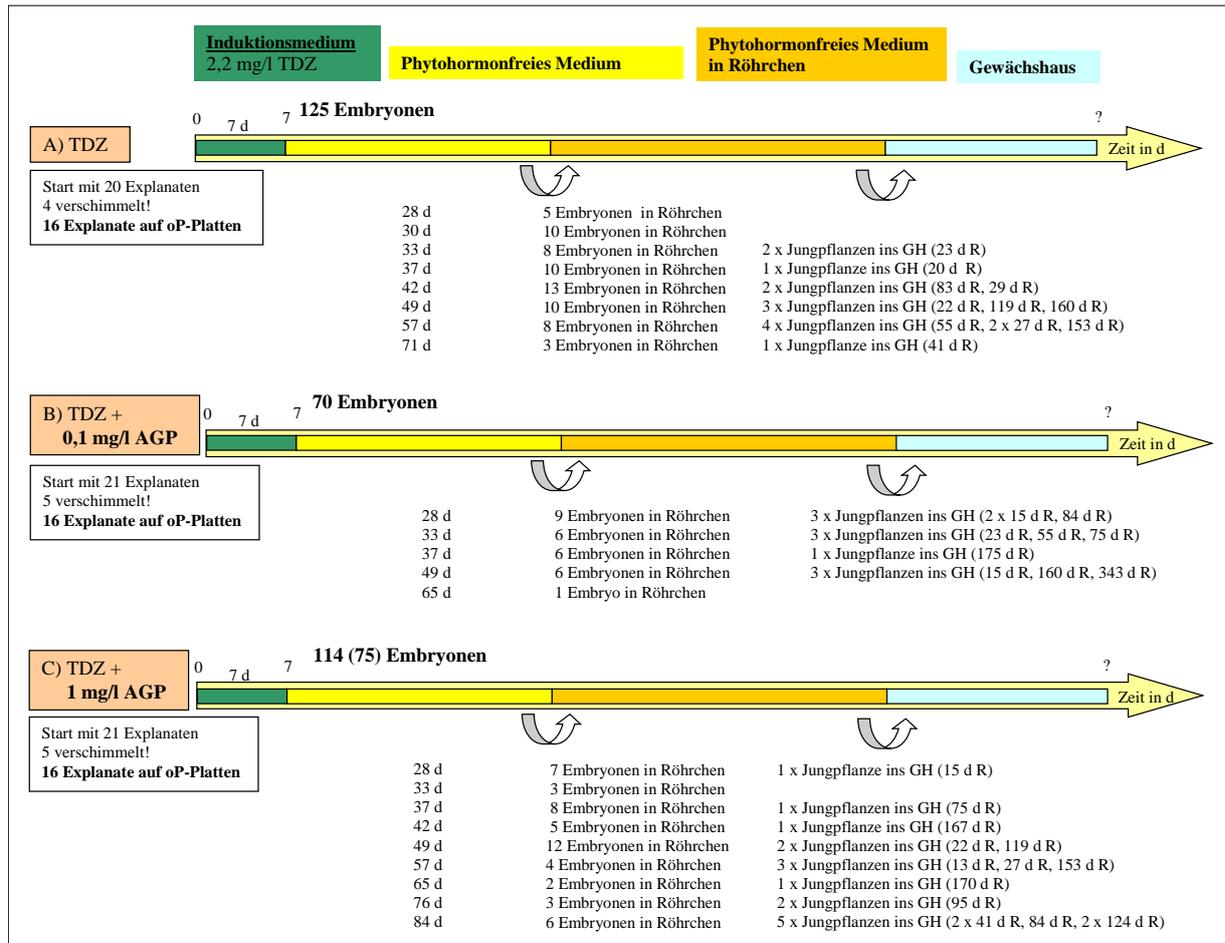


Abbildung 87: Vergleich der drei Parallelansätze in der Entwicklung der Embryonen

Die Entwicklung der einzelnen Jungpflanzen nach der Wurzelbildung und die damit verbundenen Übertragung ins Gewächshaus sind in Abbildung 88 dargestellt. Nach einer zwei-vierwöchigen Phase in einem Mini-Gewächshaus mit Anzuchterde bei hoher Luftfeuchtigkeit, um die Verdunstungsrate der Blätter zu minimieren, wurden die Jungpflanzen im temperierten Haus (18-20°C, normale Luftfeuchtigkeit) weiterkultiviert und nach vier bis acht Wochen im Gewächshaus in Torfkultursubstrat umgesetzt. Nach ca. acht Wochen konnten die gut entwickelten ca. 10-15 cm hohen Pflanzen ins Kalthaus überführt werden.

Dort entwickelten sich die Jungpflanzen weiter, wo die ersten nach ungefähr 12 Wochen das erste Mal blühten und im Anschluss Samen produzierten. Die ausgesäten Samen liefen mit einer Keimfähigkeit von 72% nach einer Woche auf.



Abbildung 88: Entwicklung der Jungpflanzen im Gewächshaus
 Bilder von links nach rechts: 1 Monat alte Jungpflanze im Mini-Gewächshaus, 2-3 und 7-9 Monate alte Jungpflanzen im temperierten Haus, 9-12 Monate alte Pflanzen im Kalthaus

7.1.3.3 Siebter Versuchsansatz

Auf Grund der gegensätzlichen Ergebnisse wurde in einem neuen Ansatz erneut der Einfluss von AGPs auf das embryogenetische Potential untersucht, wobei diesmal nur eine AGP-Konzentration von 1 mg/l, zusätzlich aber auch 100 μ Mol β -Glc-Yariv verwendet wurde.

Die AGPs (und das Yariv-Reagenz) wurden dieses Mal nicht in die Nährböden (mit 2,2 mg/l TDZ) eingearbeitet, sondern als sterile Lösung alle zwei Tage (mit Pausen über die Wochenenden) auf die Explanate geträufelt. Daneben wurde eine Reihe mit der reinen Grundlösung zum Vergleich behandelt. Insgesamt wurden die Explanatenden 16 mal beträufelt (3 mal auf dem Induktionsmedium und 13 mal auf den oP-Platten). Außerdem wurde die Desinfektion weiter optimiert, da als Zeichen einer zu geringen Desinfektion weiterhin Schimmelpilzbildung auftrat. Im Gegensatz dazu aber diverse Explanate gleich braun wurden und nicht wuchsen, was auf eine Zellschädigung durch zu starke Desinfektion zurückgeführt wurde. Aus diesem Grund wurde statt der Domestos[®]-Lösung, die Wasserstoffperoxid enthielt, die Desinfektion des Pflanzengewebes mit Natriumhypochlorit durchgeführt (LINDL et al. 2008, KLEIN 2004). Nach einer dreiminütigen Ethanolbehandlung (70%) wurden die verwendeten Blütenstandstiele (geschlossene Blüten) 5 min mit einer Natriumhypochlorit-Lösung mit 1% aktivem Chlor und Tween zur besseren Benetzung der stark behaarten Oberflächen behandelt.

Die Quantifizierung des Versuches ist in Tabelle 50 dargestellt. Von den insgesamt 109 ausgelegten Explanaten zeigte keines einen Befall mit Schimmelpilzen. Von 35 ausgelegten Explanaten, die mit reiner MS-Lösung beträufelt wurden, zeigten erstaunlicherweise nur 5 Explanate eine Entwicklung von Embryonen (1-5 Embryos pro Explanat). Von den 14 entstandenen Embryonen entwickelte sich nur 3 soweit, dass sie Röhrchen mit oP-Medium überführt werden konnten. Im Gegensatz dazu produzierten 26 Explanate von 40 ausgelegten 117 Embryonen unter dem Einfluss von 1 mg/l AGP in MS-Lösung (1-22 Embryonen pro Explanat). Dabei konnte beobachtet werden, dass ein Explanatstück ein Nodium enthielt, in dessen Bereich besonders viele Embryonen gebildet wurden (22 Stück). 83 Explanate konnten in die oP-Röhrchen überführt werden, wobei die ersten bereits nach 27 Tagen

und die letzten nach 77 Tagen auf den oP-Platten übertragen wurden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden 45 Jungpflanzen ins Gewächshaus übertragen, wobei die ersten Jungpflanzen bereits nach 18 Tagen in den Röhrrchen ausreichend Wurzelmaterial gebildet hatten. An den Explanaten, die mit Yariv-Reagenz-Lösung beträufelt wurden, bildeten sich 26 Embryonen an sechs Explanaten von eigentlich 35 ausgelegten (1-13 Embryonen pro Explanat). 17 Explanate konnten in oP-Röhrrchen überführt werden, von denen 8 Wurzeln bildeten und ins Gewächshaus übertragen wurden.

Tabelle 50: Quantifizierung der Embryonen von der Entstehung bis zur Übertragung ins Gewächshaus (GH)

	TDZ	TDZ +1 mg/l AGP	TDZ +100 µMol β-Yariv
ausgelegte Explanate	34	40	35
Explanate auf oP- Platten	34	40	35
Embryonen bei... Explanaten	5 (1)	26 (1)	6 (1)
Anzahl der Embryonen	14 (2,8)	117 (4,5)	26 (4,3)
Embryos in Röhrrchen	3	84	17
Jungpflanzen ins GH	-	45	8

Viele Explanate, die nicht mit AGP-Lösung behandelt wurden, blieben klein und färbten sich mit der Zeit braun. Die Entwicklung der Explanate auf phytohormonfreiem Medium innerhalb von 38 Tagen ist in Abbildung 90 dargestellt. Auffallend war hier, dass manche Explanate zwar keine Embryonalbildung induzierten, aber auch nicht direkt abstarben. Diese Explanate, die ausschließlich mit reiner MS- oder mit Yariv-Lösung behandelt wurden, zeigten Differenzierungen eines Blattes mit Epidermis, Trichomen und einem breiten parenchymatischen Bereich (siehe Abbildung 89). Des Weiteren konnte nach ca. sechs Wochen auf oP-Platten eine Bildung von meristematischem Gewebe an einigen Explanatstücken, die entweder mit MS- oder mit AGP-Lösung behandelt wurden, beobachtet werden.



Abbildung 89: Differenzierungen eines Explanates inklusive mikroskopischen Querschnittes (Wasserpräparat)



Abbildung 90: Veränderung der Explanate auf oP-Medium unter verschiedenen Einflüssen:
obere Reihe: beträufelt mit MS-Lösung, mittlere Reihe: beträufelt mit MS-AGP-Lösung,
untere Reihe: beträufelt mit MS-Yariv-Lösung (von links nach rechts: 3 d, 13 d, 27 d u. 41 d Explanate)

In Abbildung 91 ist der Verlauf der Induktion sowie der Entwicklung der Embryonen dargestellt. Der zeitliche Verlauf der Embryonenentwicklung kann durch das Beträufeln mit AGP-Lösung nicht verkürzt werden, jedoch wurde die Anzahl der entstandenen Embryonen stark erhöht (ähnlich dem 5. Versuchsansatz). Die Entwicklung einer Wurzel und damit die Übertragung ins Gewächshaus kann mehrere Wochen in Anspruch nehmen. Ähnlich verhielten sich die Explanate, die mit Yariv-Lösung beträufelt wurden. Die Entwicklung der Embryonen glich derjenigen der mit AGP- bzw. reiner MS-Lösung beträufelten Explanate. Allerdings blockierte das Yariv-Reagenz bei fast allen Explanaten die Induktion von Embryonen, sodass sich nur wenige Embryonen entwickelten. Auch bei den mit reiner MS-Lösung beträufelten Explanaten entwickelten sich wenig Embryonen.

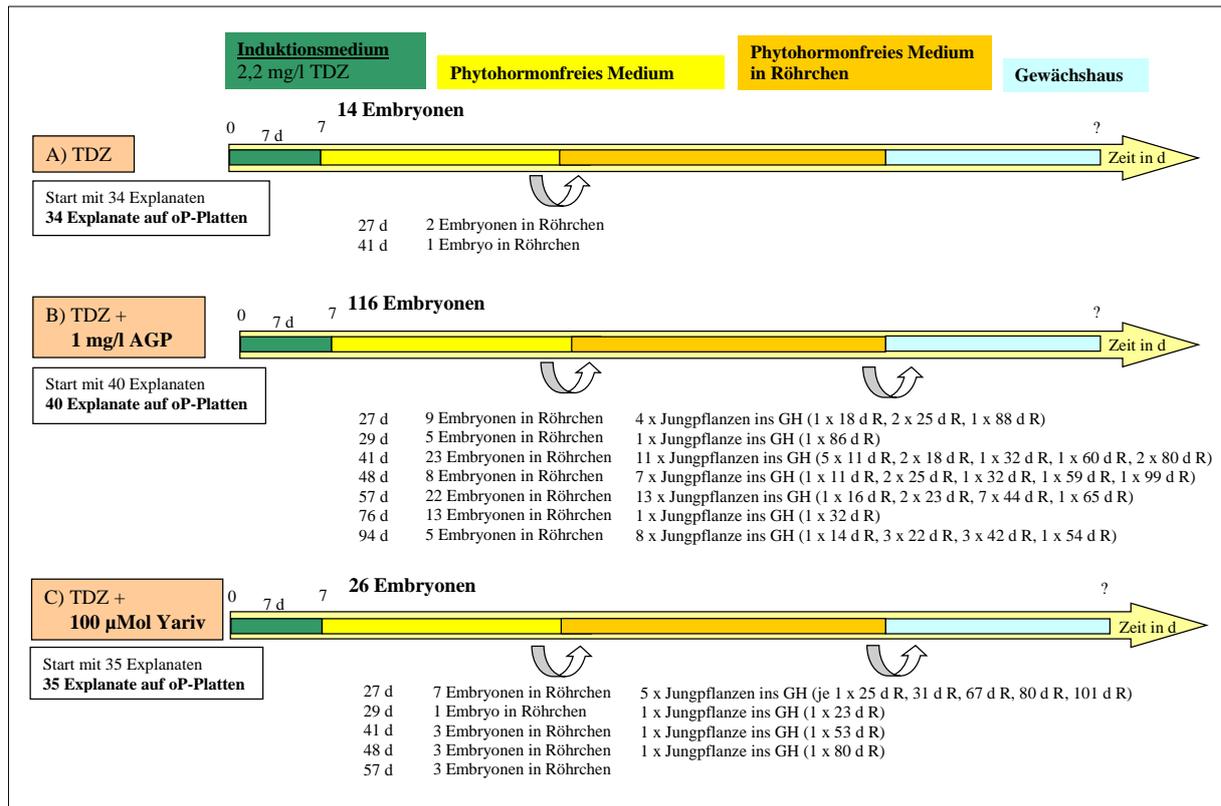


Abbildung 91: Vergleich der drei Parallelansätze in der Entwicklung der Embryonen

Circa sechs Wochen nach dem Ende des fünfwöchigen Beträufelns der Explanatenden, bildete sich an einigen Explanaten, die mit AGP-Lösung behandelt wurden, meristematisches Gewebe aus. Dies konnte zusätzlich einmal bei phytohormonfreien Platten, die mit MS-Lösung behandelt wurden, beobachtet werden. Diese schnell wachsenden, im Durchmesser zwischen 2-3 cm großen Kallusgewebe zeigten bereits nach 14 Tagen Zeichen von Zelldifferenzierung und Regeneration neuer Pflanzen, mit Ausnahme der einen Platte, die mit MS-Lösung behandelt wurde. Es waren Sprosse und Blätter zu beobachten, wobei nicht unterschieden werden konnte, ob es sich um weiterentwickelte somatische Embryonen oder um Regenerationen von Pflanzen aus den Kallusgeweben handelte (siehe Abbildung 92).



Abbildung 92:

Entwicklung von meristematischem Gewebe an mit AGP-Lösung beträufelten Explanaten inklusive Regeneration neuer Pflanze

7.1.4 Mikroskopische Untersuchungen an den Embryonen

Es wurden Semi-Dünnschnitte der in LR White eingebetteten Embryonen verschiedener Stadien und kleiner Jungpflanzen für die mikroskopischen Untersuchungen angefertigt und zur Übersicht mit Richardson angefärbt.

Abbildung 93 zeigt Embryonen im Torpedo- und Kotyledonen-Stadium, sowie den Längsschnitt eines jungen Stängels. Typisch für die Embryonen in frühen Stadien sind die im Vergleich zum Muttergewebe kleinen, parenchymatischen Zellen. Außerdem ist in Abbildung 93 rechts oben die typische fehlende Leitbündelverbindung zwischen dem Embryo und dem Muttergewebe zu erkennen.

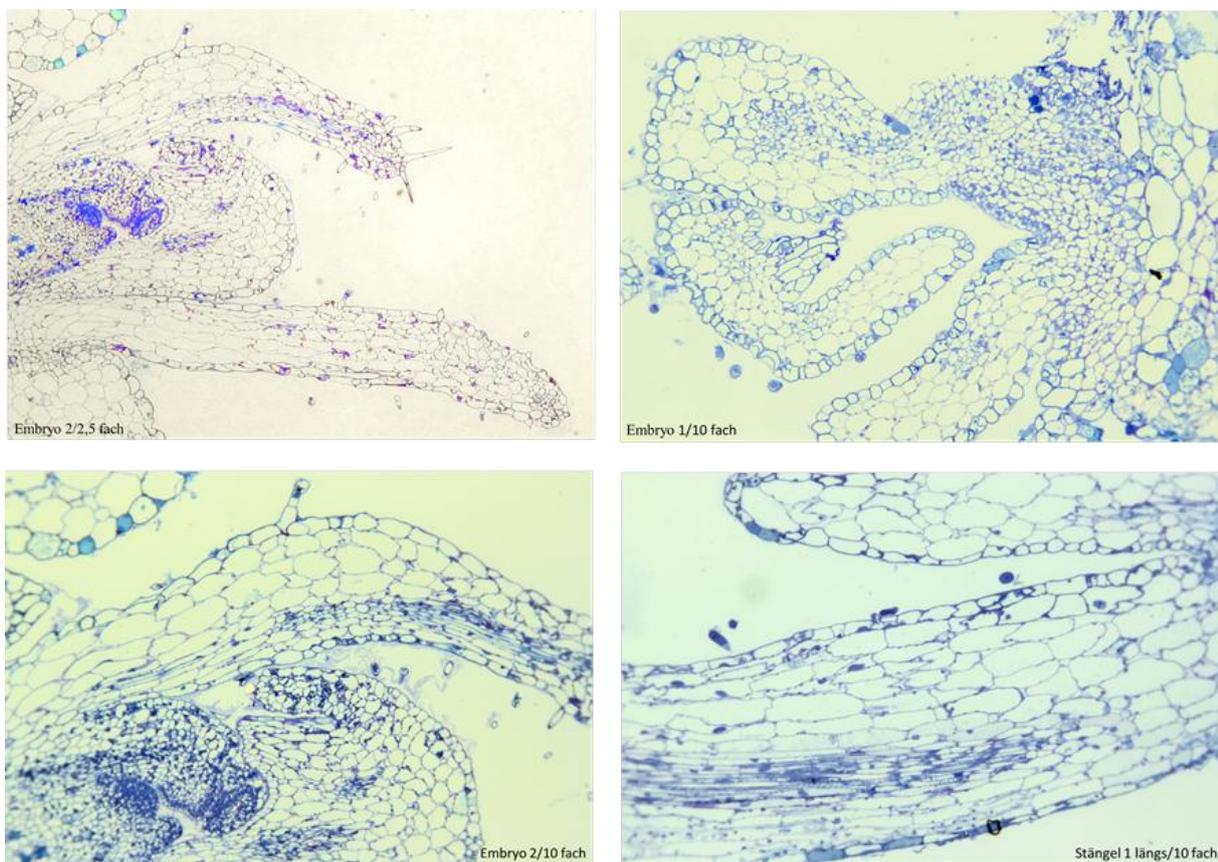


Abbildung 93: Übersichtsfärbungen mit Richardson der eingebetteten Embryonen und Stängel
links oben und unten: Embryo im Kotyledonen-Stadium,
rechts oben: Embryo im Torpedo-Stadium mit Übergang zum Muttergewebe
rechts unten: Längsschnitt eines jungen Blattstieles

7.2 Der Weg der indirekten somatischen Embryogenese

Bei der Methode der indirekten somatischen Embryogenese werden Kalluskulturen unter einem geeigneten Stimulus (häufig Phytohormone) zur Induktion somatischer Embryonen angeregt.

7.2.1 Induktion von somatischen Embryonen

Es wurden etablierte Kalluskulturen auf zwei Nährmedien mit unterschiedlichen Phytohormonkombinationen (1: 1 mg/l 2,4-D und 0,2 mg/l Kinetin; 2: 5 mg/l BAP und 1 mg/l NAA) für die Durchführung des Versuches verwendet. Nach 25 d auf ihrem Grundmedium und einem Licht/Dunkelwechsel von 16 h zu 8 h verblieben die Kalli 55 Tage auf dem Grundmedium, um durch den beginnenden Nährstoffentzug die Induktion der Embryogenese auszulösen, die dann nach der Übertragung auf sechs verschiedene Induktionsmedien (A-F) sichtbar werden sollte.

Bei keinem der sechs Induktionsmedien konnte eine Embryonenbildung beobachtet werden. Die unterschiedlichen Kalli zeigten in der ersten Phase des Versuches ausschließlich normales bis reduziertes Wachstum und durch den Licht/Dunkel-Wechsel teilweise eine Grünfärbung des Gewebes durch produziertem Chlorophyll. Im Laufe des Nährstoffentzuges verfärbten sich die meisten Kulturen braun und stagnierten in ihrem Wachstum (siehe Abbildung 94). Auffallend war außerdem das von Beginn an schlechtere Wachstum der Kulturen auf dem Grundmedium 2 mit der Kombination von BAP und NAA.

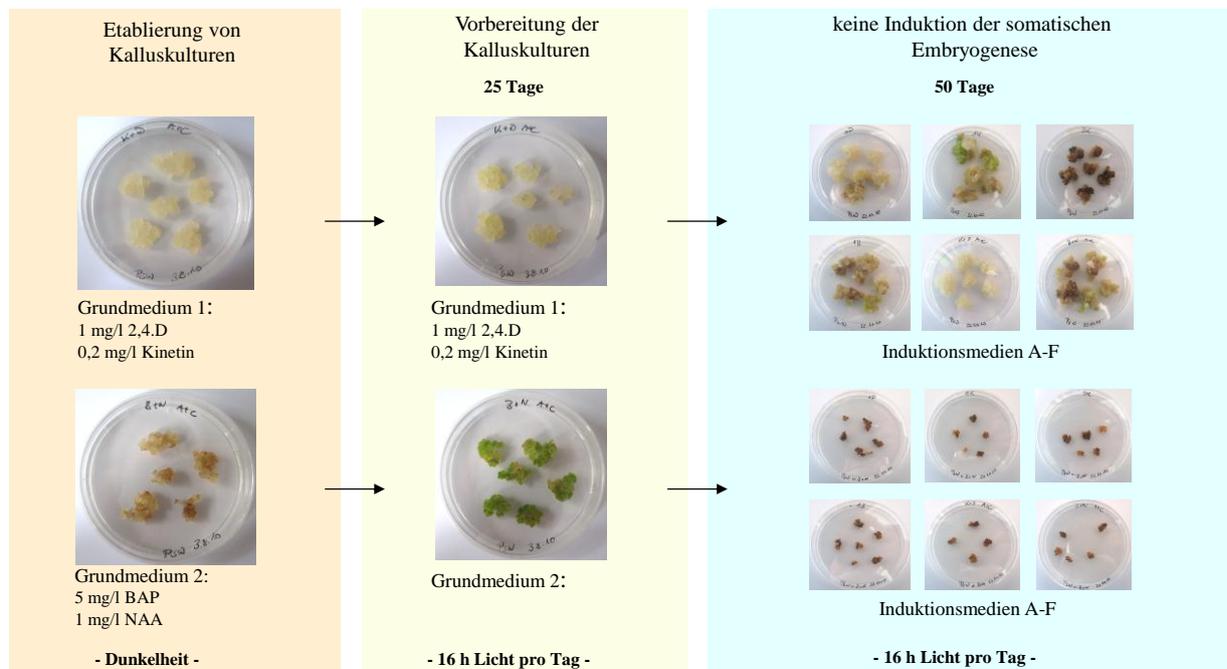


Abbildung 94: Übersicht über die Entwicklung des Kallusgewebes während des Versuches, somatische Embryonen zu induzieren

VI Diskussion

1. Isolierung von AGPs aus der Wurzeldroge

1.1 Extraktion des *Pelargonium sidoides*-Wurzelmaterials

Die Isolierung von AGPs aus dem getrockneten Wurzelmaterial von *Pelargonium sidoides* war schwierig. In der zunächst isolierten, rotbraun gefärbten, hochmolekularen Fraktion fanden sich nur ca. 1% Polysaccharide. Mit Eisen(III)chlorid und Vanillin/HCl positive Nachweise auf Gerbstoffe bestätigten ein Vorhandensein von Polyphenolen in dieser Fraktion. Die mit Yariv-Reagenz isolierte AGP-Fraktion war weiterhin rotbraun gefärbt und wies mit ca. 5% nur einen geringen Anteil an Polysacchariden auf. Zusätzlich waren die Anteile an Arabinose und Galaktose mit ungefähr 14% und 20% nicht besonders hoch. Glukose und Mannose waren mit ca. 35% und 21% die Hauptmonosaccharide in der isolierten AGP-Fraktion. Um eine verbesserte Isolierung eines reinen AGPs zu erreichen, wurde die Extraktion des Drogenmaterials variiert. Neben der Variation der Extraktionstemperatur, der -zeit und dem -mittel wurde auch frisches Wurzelmaterial untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Ausbeuten an Polysacchariden in den hochmolekularen Fraktionen bei der frischen Wurzel größer waren, als bei der getrockneten Wurzel. Allerdings stiegen in den meisten Fällen die Anteile von Glukose und anderer Begleitmonosaccharide, die von Arabinose und Galaktose aber nicht. Dies deutet besonders im Fall der Temperaturerhöhung eher auf eine vermehrte Extraktion von Stärke hin, die für die Steigerung der Polysaccharidausbeute verantwortlich war. Dass der Anteil an AGPs in der Fraktion nicht stieg, konnte auch durch negative Geldiffusionstests der hochmolekularen Fraktionen des frischen Wurzelmaterials bestätigt werden.

Da die Variation der Extraktionsbedingungen nicht die gewünschten Ergebnisse lieferte, wurde versucht, die Gerbstoffe mittels verschiedener Methoden von den Extrakten abzutrennen. Neben der Fällung der Gerbstoffe mit Blei(II)acetat-Trihydrat wurden drei verschiedene, in der Säulenchromatographie zur Adsorption von polyphenolischen Verbindungen eingesetzte, Polymere getestet. Dabei erzielten in Bezug auf die Gerbstoffabtrennung und Erhöhung der PS-Ausbeute die Aufreinigungen der Extrakte mit den verschiedenen Säulenmaterialien die besseren Ergebnisse im Vergleich zur Fällung mit Bleiacetat. Von den drei eingesetzten Säulenmaterialien waren die Polyamide am effektivsten, wobei selbst gepackte Säulen wiederum einen Vorteil brachten. Die erhaltenen Extrakte waren klar und bestätigten eine vollständige Abtrennung der Gerbstoffe. Leider zeigten die aufgereinigten Fraktionen in Geldiffusionstests keinerlei Präzipitationsbanden mehr, was darauf hindeutete, dass die AGPs gemeinsam mit den Gerbstoffen abgetrennt worden waren.

1.2 Interaktionen zwischen Polyphenolen und Polysacchariden

Um den Mechanismus der Gerbstoff-Polymer-Interaktionen genauer verstehen zu können, soll an dieser Stelle eine kurze Zusammenfassung der verschiedenen Gerbstofftypen erfolgen. Die wasserlöslichen, schwach sauer reagierenden, in Pflanzen vorkommenden phenolischen Verbindungen können in vier verschiedene Gruppen eingeteilt werden: hydrolysierbare, kondensierte und komplexe Gerbstoffe sowie Phlorotannine. Hydrolysierbare Gerbstoffe stellen Ester der Gallussäure und deren Derivate dar. Sie werden strukturell in zwei Gruppen unterteilt: die Ester der Gallussäure - Gallotannine genannt und die Ester der Hexahydroxydiphensäure, die nach der Ellagsäure als Ellagitannine bezeichnet werden. Ellagitannine unterscheiden sich von den Gallotanninen durch die nur bei ihnen vorkommenden C-C-Verbindungen. Kondensierte Gerbstoffe, die heutzutage auch als Proanthocyanidine bezeichnet werden, stellen oligomere und polymere Verbindungen der Flavan-3-ole wie Catechin und Epicatechin dar, die in weitere Untergruppen wie Procyanidine (Grundstrukturen sind ausschließlich Catechin und Epicatechin) und Prodelphinidine (Grundstrukturen sind ausschließlich Gallocatechin und Epigallocatechin) unterteilt werden können. Grundstrukturen der hydrolysierbaren und kondensierten Gerbstoffe sind in Abbildung 95 dargestellt. Merkmale der kondensierten und hydrolysierbaren Gerbstoffe findet man in den komplexen Gerbstoffen wieder. Die auch als Algengerbstoffe bezeichneten Phlorotannine sind Polymere des Phloroglucins und kommen bei Algen vor (TANG et al. 2003, LE BOURVELLEC et al. 2012).

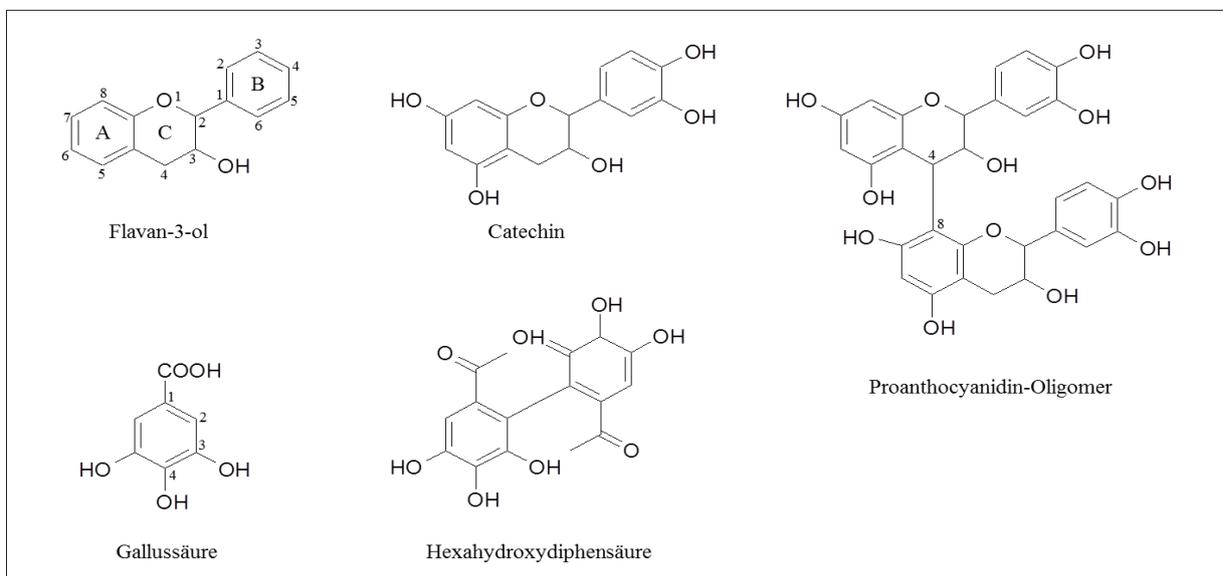


Abbildung 95: Grundstrukturen der hydrolysierbaren und kondensierten Gerbstoffe

Interaktionen zwischen Polyphenolen und Proteinen sind bereits lange bekannt und in der Literatur gut untersucht (LE BOURVELLEC et al. 2012). Neben schwachen nicht-kovalenten Wechselwirkungen (WW), die unter anderem Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe WW und van-der-Waals-Kräfte

beinhalten, finden auch kovalente Interaktionen statt (PRIGENT et al. 2003 und 2007). Diese im Gegensatz zu den nicht-kovalenten WW nicht reversiblen Interaktionen beinhalten zum Teil durch Enzyme bedingte oxidative Veränderungen der phenolischen Verbindungen zu o- oder Halb-Chinonen oder durch Säuren bedingte Spaltungen von interflavanischen Bindungen der Procyanidine mit gleichzeitiger Bildung von Carbo-Kationen (LE BOURVELLEC et al. 2012).

Polysaccharid-Gerbstoff-Interaktionen wurden lange Zeit in der Wissenschaft vernachlässigt. Erste Hinweise auf mögliche Interaktionen konnten allerdings schon 1981 erfasst werden, wobei ungewöhnlich hohe Affinitäten zwischen Polyphenolen und Prolin-reichen Proteinen beobachtet wurden (HAGERMAN et al. 1981). Mit der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Pektinen und Gerbstoffen im Obst, die für einen Verlust der Adstringenz während des Reifeprozesses verantwortlich waren, konnten weitere Erkenntnisse über die Interaktionen zwischen Polyphenolen und Polysacchariden gewonnen werden (OZAWA et al. 1987, TAIRA et al. 1997).

Genauere Untersuchungen zum Mechanismus der Interaktionen fanden an Cyclodextrinen als Modellsubstanz statt. 1997 berichtete CONNORS, dass während und nach der Komplexbildung mit Gerbstoffen keine kovalenten WW stattfanden. Als treibende Kräfte der Komplexbildung werden van-der-Waals-WW, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe WW angesehen (KOKKINO et al. 2000, YAN et al. 2006). CAI et al. postulierten 1990, dass Hydroxylgruppen am C3 des Flavan-3-ols Wasserstoffbrückenbindungen mit Hydroxylgruppen des C2 und C3 der Cyclodextrine eingehen. Sind die Hydroxylgruppen an C3 des Flavan-3-ols mit Gallussäure verestert (=Epicatechingallat), ist die Affinität zum Cyclodextrin erhöht, da drei freie Hydroxylgruppen der Gallussäure Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können (CAI et al. 1990). Im Gegensatz dazu reduziert eine erhöhte Anzahl von Hydroxylgruppen am B-Ring des Flavan-3-ols die Affinität zum Cyclodextrin (CAI et al. 1990). Einen ähnlichen Effekt hat die Proanthocyanidinbildung über C4, die die Komplexbildung mit den Cyclodextrin aufgrund sterischer Hinderungen unterdrückt (CAI et al. 1990, LE BOURVELLEC et al. 2012). Der B-Ring ist der für die Interaktionen entscheidende strukturelle Teil der Flavan-3-ole (ISHIZU et al. 1999, KRÍŽ et al. 2003, JULLIAN et al. 2007). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Interaktion zwischen Polyphenolen und Cyclodextrinen von der Hydrophobizität und der Größe beider, sowie der Hohlraumgröße, der Ladung und der räumlichen Ausdehnung der Seitenketten des Cyclodextrins abhängen (LE BOURVELLEC et al. 2012).

Des Weiteren wurden Interaktionen von Polyphenolen mit Pektinen, AGPs, Hefe bzw. Mannoproteinen (TAIRA et al. 1997, RIOU et al. 2002), Stärke und Cellulose untersucht, wobei z.B. im Falle von Stärke die Menge der adsorbierten kondensierten Gerbstoffe vom Ursprung der Stärke und der Gerbstoffe abhing (LE BOURVELLEC et al. 2012). Die Analyse von WW zwischen Mannoproteinen aus der Weinhefe und Gerbstoffen bzw. Anthocyanen zeigte, dass die Ladung und deren Verteilung im Molekül einen weiteren wichtigen Aspekt in der Adsorption von Gerbstoffen spielen (CARIDI 2007). Die von TANG et al. 2003 untersuchten Interaktionen von Cellulose und Kollagen mit 24

verschiedenen polyphenolischen Verbindungen belegten, dass neben dem Molekulargewicht von Gallo- und Ellagitanninen auch die Anzahl von Galloylgruppen und die Hydrophobizität einen Einfluss auf die Affinität haben. Die erwähnten Galloylgruppen gelten als die wichtigsten funktionellen Gruppen bei den Wechselwirkungen und führen bei steigender Anzahl zu einer Dominanz der hydrophoben WW. Die höhere Anzahl dieser funktionellen Gruppen bei Gallotanninen erklärt die stärkeren Interaktionen von Polysacchariden mit Gallotannin im Vergleich zu Ellagitanninen. Weitere Aspekte der Wechselwirkungen zwischen Polyphenolen und Polysacchariden wurden von RENARD et al. 2001 und LE BOURVELLEC et al. 2004 und 2005 an Apfel-Zellwänden untersucht. Sie bestätigten, dass elektrostatische und ionische WW bei der Komplexierung von Procyanidinen und Zellwänden bzw. Zellwandmaterialien keine Rolle spielen, genau wie pH-Variationen zwischen 2,2 und 7. Im Gegensatz dazu führten Temperaturerhöhungen aufgrund verringerter Wasserstoffbrückenbindungen zu erniedrigten Adsorptionen, genau wie Urea-, Dioxan- und Ethanolzugaben. Eine Erhöhung der Ionenstärke konnte die Absorption verstärken und zeigt zusammen mit den genannten Ergebnissen, dass hydrophobe WW und Wasserstoffbrückenbindungen eine wichtige Rolle in der Komplexierung spielen. Besonders oligomere und polymere Procyanidine binden spontan an Zellwände bei Gewebeerstörungen, dabei steigt die Menge der gebundenen Gerbstoffe mit der Procyanidinkonzentration, dem durchschnittlichen Polymerisationsgrad, dem Anteil an Galloylgruppen, sowie dem Anteil an (+)-Catechin. Außerdem spielen Stereochemie, Konformation, Flexibilität und Molekulargewicht der Polyphenole eine Rolle.

Viele Arbeiten berichteten auch über den Einfluss von neutralen und anionischen Polysacchariden auf die Bindung zwischen Polyphenolen und Proteinen (OZAWA et al. 1987, RIOU et al. 2002, MCRAE et al. 2011). Dabei waren Pektine, Gummi arabicum, Carragenane, Polygalakturonsäuren und Xanthane effektive Inhibitoren des Protein-Polyphenol-Komplexes (LUCK et al. 1994). Im Gegensatz dazu hatten Glukose, Dextran, β -Cyclodextrin und Arabinogalaktane kaum einen Einfluss auf den Komplex und zeigten somit, dass der Einfluss der Polysaccharide auf die Gerbstoff-Protein-Interaktionen durch die Ladung und Größe der Polysaccharide beeinflusst wurde (FREITAS et al. 2003, LUCK et al. 1994).

In lebenden Pflanzen liegen Polyphenole, Proteine und Polysaccharide in definierten Konformationen und in speziellen Kompartimenten getrennt voneinander vor. Diese Trennung wird durch biosynthetische Mechanismen und physikalische und chemische Bedingungen in der Umwelt geregelt und bei der Zerstörung des Pflanzenmaterials bzw. des Gewebes aufgehoben (LE BOURVELLEC et al. 2012). Dabei treten die vorher getrennten Strukturen in Kontakt miteinander und es kommt zu Komplexierungen.

Die Verwendung von getrocknetem, bereits zerkleinertem Drogenmaterial von *P. sidoides* für die Extraktion von Polysacchariden scheint unter diesem Gesichtspunkt von vornherein schwierig. Durch die Zerstörung des Gewebes während des Zerkleinerungsvorganges und der Lagerung konnte es bereits

zu Interaktionen zwischen Polysacchariden und Gerbstoffen kommen. Dabei spielen wahrscheinlich nicht nur Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe WW und van-der-Waals-Kräfte eine Rolle, sondern auch enzymatische Oxidationsprozesse, ausgelöst durch Phenoloxidasen. Bei Verletzungen der Zellen oxidieren diese im Zytoplasma bzw. in der Zellwand lokalisierten kupferhaltigen Enzyme mit Hilfe von molekularem Sauerstoff die in der Vakuole der Zelle gelagerten Phenole zu höher polymeren Gerbstoffen bis hin zu Phlobaphenen (SCHOPFER 2010). Diese können dann mit den Zellwand-Polysacchariden schwer zerstörbare Komplexe bilden. Die Ausbildung dieses Zucker-Gerbstoff-komplexes konnte bei den wässrigen bzw. wässrig-ethanolischen Extraktionen der *Pelargonium*-Wurzel durch die rotbraune Farbe der Extraktionsflüssigkeit und anhand der rotbraunen Farbe der hochmolekularen Fraktion beobachtet werden. Der etwa 9% ausmachende Anteil an Gerbstoffen in der Wurzel, der sich hauptsächlich aus oligomeren und polymeren Proanthocyanidinen neben einem geringeren Anteil an Gallussäuren und Gallussäuremethylestern zusammensetzt (BLASCHEK et al. 2009), bildete mit den Polysacchariden der hochmolekularen Fraktion komplexe Verbindungen. Wie bereits unter VI 1.3.2 beschrieben, kommt es dabei häufig bei Flavan-3-ol-Derivaten und Gallotanninen zur Ausbildung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben WW und van-der-Waals-Kräften (CAI et al. 1990, LE BOURVELLEC et al. 2012). Aufgrund dieser Wechselwirkungen waren die Versuche, die Gerbstoffe mittels Fällungen und Adsorptionen an polymeren Säulenmaterialien abzutrennen, nicht erfolgreich.

Eine Fällung der AGP mittels Yariv-Reagenz aus der hochmolekularen Polysaccharid-Gerbstoff-Fraktion führte wiederum zu einem isolierten Polysaccharid-Gerbstoff-Gemisch. Der Versuch der Abtrennung der Gerbstoffe aus AGP-Lösungen mittels Strukturbrechern wie NaCl, Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid führte nur zu geringen Verbesserungen ebenso wie die Abtrennung mittels Ethanol. Die Erhöhung des Polysaccharidanteils in dem gefällten AGP um über 100% auf ca. 57% mit 2 M NaCl oder die Steigerung auf ca. 38% mit 10 M Guanidinium-HCl (vorher ca. 25%) wies die Behandlung mit Strukturbrechern als positive Option aus, die allerdings für keine 100%ige Abtrennung der Gerbstoffe sorgte, da das restliche AGP noch immer rotbraun gefärbt war. Laut Literatur erschien die Behandlung mit zum Teil starken Strukturbrechern, die Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zerstören, vielversprechend (RENARD et al. 2001, LE BOURVELLEC et al. 2004).

Die Monosaccharidanalyse der mit Strukturbrechern aufgereinigten AGPs zeigte neben dem maximal bei 50% liegendem Zuckeranteil, dass 65-85% der Zuckerfraktion aus Glukose bestanden. In einer darauf folgenden Analyse der Bindungstypen konnten die für Stärke typischen Bausteine identifiziert werden. Somit besteht das isolierte AGP nicht nur aus Polyphenolen und AGPs, sondern zu einem großen Anteil an Stärke, die trotz spezifischer Fällung des AGPs mit dem Yariv-Reagenz nicht abgetrennt wurde. Dies führt zur Vermutung, dass auch die Stärke mit den Polyphenolen und dem AGP interagiert. Bestärkt wurde diese Vermutung durch die erfolglose Degradation der Stärke mittels α -Amylase, die α -1,4-glukosidische Bindungen der Amylose spalten sollte. Einerseits könnte dies

durch die Komplexierung der Stärke mit den Gerbstoffen hervorgerufen werden, sodass die α -Amylase keinen geeigneten Zugang zur Stärke hatte. Andererseits könnte es dadurch bedingt sein, dass die besonders feinkörnige im gesamten Rindenparenchym lokalisierte Stärke der *Pelargonium*-Wurzel zu einem Hauptteil aus Amylopektin besteht und eine Behandlung mit Isoamylasen zur Spaltung der Stärke nötig wäre. Dies würde auch die mittels Iod-Kaliumiodid-Reagenz untypisch verlaufende Färbung der Stärke im Wurzelschnitt erklären, die erst nach mehreren Stunden an verletzten Gewebestrukturen auftrat. Für das mögliche Vorhandensein eines Polysaccharid-Polysaccharid-Komplexes sprechen unter anderem die bereits veröffentlichten Vernetzungen von AGPs/AGs mit Zellwandpolysacchariden wie den Pektinen und Xylanen (TAN et al. 2012). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass es während der Isolierung der AGPs zur Komplexbildung von AGPs mit Gerbstoffen und wahrscheinlich mit Stärke gekommen war, die mittels der angewandten diversen Methoden nicht reversibel war.

Aus diesem Grund wurde versucht, die Gerbstoffe vor der eigentlichen Extraktion der Polysaccharide aus dem Drogenmaterial zu isolieren (C. RENARD - persönliche Mitteilung; LE BOURVELLEC et al. 2004). Diese separate Extraktion der hochmolekularen Gerbstoffe mit Aceton wurde mit einer Extraktion mit Methanol, um auch vorkommende niedermolekulare Gerbstoffe zu isolieren, kombiniert (LE BOURVELLEC et al. 2004). Dabei war der Acetonextrakt deutlich stärker rotbraun gefärbt als der Methanolextrakt und wies somit auf einen höheren Anteil an hochmolekularen Gerbstoffen in der Polyphenolfraktion von *P. sidoides* hin. Eine zweifache Wiederholung der Extraktion des Drogenmaterials mit Aceton führte weiterhin zu rotbraun gefärbten Extraktionsflüssigkeiten und einem bräunlichen pulverisierten Drogenmaterial. Die im Anschluss durchgeführte wässrige Extraktion und Fällung der Polysaccharide mittels Ethanol führte leider wieder nur zu Polysacchariden mit einem geringen Zuckeranteil, die allerdings zu 63% aus Arabinose und Galaktose und nur zu 16% aus Glukose bestanden. Nach einem positiven AGP-Nachweis im Geldiffusionstest konnten bräunlich verfärbte AGPs isoliert werden. Die bräunliche Farbe des AGP und der nur bei 16% liegende Anteil an Zuckern im AGP zeigt, dass es wahrscheinlich wieder zur Komplexierung mit Gerbstoffen gekommen ist. Unterstützt wird dies durch eine Vermessung des AGPs in der GPC, die ein absolutes Molekulargewicht von ca. 350 kDa ergab. Das deutlich größere Molekulargewicht in Bezug auf das aus den Zellkulturen isolierte AGP mit ca. 90 kDa weist darauf hin, dass es auch hier zur Komplexbildung zwischen AGPs und Polyphenolen gekommen ist. Somit ist die separate Extraktion ein erster Schritt in Richtung der Isolierung reiner AGPs aus den Wurzeln von *Pelargonium sidoides*, muss aber noch weiter optimiert werden.

2. Etablierung von *Pelargonium sidoides*-Zellkulturen

Die Etablierung pflanzlicher Zell- und Gewebekulturen ist nicht nur Ausgangspunkt für die Pflanzenzüchtung, sondern teilweise auch für die Gewinnung und Produktion von Naturstoffen, sowie die Aufklärung von Biosynthesewegen. Dabei spielt unter anderem die als Totipotenz der Pflanzenzelle bezeichnete Eigenschaft, aus einzelnen Zellen sämtliche Gewebe bis hin zur ganzen Pflanze zu entwickeln, eine wichtige Rolle. Die Gewinnung von Primär- und zum Teil auch Sekundärstoffen aus pflanzlichen Zellkulturen, die u.a. in der Medizin, der Pharmazie und in der Lebensmitteltechnologie verwendet werden, hat eine gewisse biotechnologische Relevanz. Dabei hat sich die erhoffte breite Anwendung von pflanzlichen Zellkulturen zur Gewinnung großer Mengen von Aroma- und Farbstoffen sowie relevanter pharmazeutischer Wirkstoffe bis heute nicht etabliert. Bis jetzt zeigt sich die gelungene biotechnologische Umsetzung u.a. in der Biotransformation von Methyldigitoxin zu Methyldigoxin in *Digitalis lanata*-Zellkulturen sowie der Produktion des in der Tumorthherapie verwendeten Wirkstoffes Paclitaxel (RICHTER 2003, BARTSCH 2004). Dieser wurde zunächst aus der Rinde der Pazifischen Eibe gewonnen, wobei das Entfernen der Rinde die seltenen, sehr langsam wachsenden Bäume zugrunde gehen ließ. Seit 2002 wird der Wirkstoff ausschließlich aus Suspensionskulturen unter standardisierten Produktionsbedingungen gewonnen und sichert damit einerseits langfristig den Bedarf an Paclitaxel und sorgt andererseits für die Erhaltung der zwischenzeitlich stark vom Aussterben bedrohten Pazifischen Eibe (BARTSCH 2004).

Im Falle dieser Arbeit diente die Etablierung von Kallus- und Suspensionskulturen der Isolierung der AGPs als spezielle Primärstoffwechselprodukte. Zusätzlich wurden etablierte Kalluskulturen für Vermehrungsversuche von *Pelargonium sidoides* mittels der indirekten somatischen Embryogenese verwendet.

2.1 Kalluskulturen

Bis heute ist wenig über die Vermehrung von *Pelargonium sidoides*, insbesondere über die Etablierung von Zell- und Gewebekulturen bekannt. LEWU et al. berichteten 2007 von einer erfolgreichen Induktion von Kallusgeweben aus Blättern, Stängeln und Samenembryos auf MS-Medien unter dem Einfluss der Auxine 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) oder Indolbuttersäure (jeweils 1-4 mg/l), wobei sich Indolbuttersäure in einer Konzentration von 3 mg/l in Kombination mit Dunkelheit am erfolgreichsten erwies. Die Induktion von bröckeligem Kallusgewebe durch eine Kombination von Kinetin und Naphthyllessigsäure (3 und 0,5 μ M) aus Petiolen wurde 2012 von MOYO et al. erwähnt, aber nicht weiter optimiert. Somit gibt es zwar erste Anhaltspunkte zur Gewinnung von Kallusgeweben aus *Pelargonium sidoides*, allerdings besteht weiterhin ein großer Forschungsbedarf, um optimal wachsendes Kallusgewebe ohne Differenzierungen zu erhalten.

2.1.1 Die optimale Phytohormonkombination und -konzentration

Um ein optimales Wachstum der Kalluskulturen zu erreichen, müssen neben dem Grundmedium aus organischen und anorganischen Stoffen gewisse chemische Substanzen, die das Wachstum und die Differenzierung sowie den Sekundärstoffwechsel der Pflanzen steuern, dem Nährmedium ergänzt werden. Diese strukturell sehr verschiedenartigen Phytohormone zeigen ein breites Wirkungsspektrum. Ein und dasselbe Phytohormon kann unterschiedliche Wachstums- und Stoffwechselfvorgänge regulieren, wobei die Konzentration des Hormons ebenso wie die Kombination mit anderen Phytohormonen für die jeweilige Wirkung entscheidend ist (BECK et al. 2009). Beispielhaft ist hier 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure zu nennen, die in niedrigen Konzentrationen das Streckungswachstum fördert, in zu hoher Konzentration aber zu überschießenden, unkontrolliertem Wachstum führt und die Pflanze zugrunde gehen lässt. Ausgenutzt wird dies in der Unkrautbekämpfung. Die Wirkung der sechs Phytohormonklassen inklusive der wichtigsten natürlich vorkommenden und synthetisch erzeugten Vertreter ist in Tabelle 51 dargestellt, wobei bis heute die genauen molekularen Wirkmechanismen der einzelnen Stoffe nur teilweise bekannt sind.

Tabelle 51: Die sechs Phytohormonklassen und ihre Wirkungen

(aus „Grundlagen der Pharmazeutischen Biologie“, Becker und Reichling 1999, „Molekulare Entwicklungsbiologie“, Westhoff et al. 1996 und „Pharmazeutische Biologie“, Reinhard et al. 2009)

Klasse	Vertreter	Funktion
Auxine	<u>natürlich vorkommend:</u> β -Indoleessigsäure <u>synthetisch erzeugt:</u> 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure α -Naphthyleessigsäure Indolbuttersäure 2,3,6-Trichlorbenzoesäure	<ul style="list-style-type: none"> – Stimulation und Regulation des Streckungswachstums – Förderung der Zellteilung (besonders im Kambium) – Förderung der Wurzelbildung (besonders der Seitenwurzel) – Ausbildung der Apikaldominanz – Hemmung des Blattfalls – Regulierende Effekte auf den Sekundärstoffwechsel – Starker Einfluss auf die Enzymaktivität
Cytokinine	<u>natürlich vorkommend:</u> 6-Isopentenylaminopurin Zeatin Topoline <u>synthetisch erzeugt:</u> Furfurylaminopurin (Kinetin) 6-Benzylaminopurin Thidiazuron	<ul style="list-style-type: none"> – Förderung der Zellteilung – Beeinflussung der Samenruhe – Förderung der Seitentriebe – Verzögerung des Alterungsprozesses – Beeinflussung der Genaktivität
Gibberelline	<u>natürlich vorkommend:</u> Gibberellin A3	<ul style="list-style-type: none"> – Steigerung des Längenwachstums (Förderung der Zellteilung - besonders im Kambium - und der Zellstreckung) – Förderung der Blütenbildung – Förderung der Samenkeimung – Förderung der Fruchtentwicklung – Brechung der Winterruhe bei Knospen – Steigerung der Genaktivität

Jasmonate	<u>natürlich vorkommend:</u> Jasmonsäure Methyljasmonat	– Induktion von Wundgenen – Auslösung der Rankenkrümmung – Induktion der Knollenbildung
Abscisinsäure	<u>natürlich vorkommend:</u> Abscisinsäure	– Förderung des Blatt- und Fruchtfalls – Förderung der Winterruhe bei Knospen – Beschleunigung des Alterungsprozesses – Hemmung der Keimung – Hemmung der Zellteilung und -streckung – Hemmung der Genaktivität (Antagonist der Gibberellinsäure)
Ethylen	<u>natürlich vorkommend:</u> Ethylen	– Beschleunigung der Fruchtreife – Hemmung des Zellwachstums – Förderung der Samenkeimung – Förderung des Blatt- und Fruchtfalls

Die Kombination von Auxinen und Cytokininen ist eine Phytohormonkombination, die bei *Pelargonium*-Arten zu einem optimalen Zellwachstum führt. Dabei spielt das Verhältnis von Auxin zu Cytokinin eine entscheidende Rolle, um undifferenziertes Kulturgewebe zu erhalten (BROWN et al. 1986). Bei zu hohen Auxinkonzentration bilden sich leicht Wurzeln, wohingegen ein Mangel an Auxinen und ein Überschuss an Cytokininen zu Sprossbildungen führt (EL-NIL et al. 1976, RAO 1994, BECK et al. 2009, MOYO et al. 2012). Somit spielt nicht nur die absolut zugefügte Hormonmenge, sondern auch das Verhältnis der einzelnen Wuchsstoffe zueinander und die Sorte des einzelnen Hormons innerhalb der Klasse eine entscheidende Rolle (ENDRESS 1994). Für jede Pflanzenspezies muss dieser Punkt einzeln erforscht werden, um eine optimale Kallusentwicklung bzw. -erhaltung und/oder Organogenese zu erreichen.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Kulturansätze mit einem Murashige & Skoog-Standardmedium (MS-Medium) unter Zusatz von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), Naphthyllessigsäure (NAA), Kinetin und Benzylaminopurin (BAP) in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen angefertigt und das Wachstum der Kalluskulturen untersucht. Dabei zeigten die Kalluskulturen auf dem Nährmedium mit 5 mg/l BAP und 1 mg/l NAA das schnellste Kalluswachstum, gefolgt von der Kombination von 1 mg/l 2,4-D und 0,2 mg/l Kinetin. Kalli auf Platten mit nur 0,4 mg/l 2,4-D, welches z.B. bei *Echinacea purpurea* schnell wachsende, helle und weiche Kulturen erzeugte (CLASSEN 2007), wuchsen im Vergleich am langsamsten. Leider entwickelte sich das Zellgewebe der BAP/NAA-Kulturen nicht optimal. Im Gegensatz zu den anderen beiden Platten mit 2,4-D, welche helle und weiche Kalli produzierten, waren die Kulturen dunkler gefärbt, trocken, hart und bröckelig. Dies zeigt deutlich, dass für jede Pflanze das optimale Phytohormon bzw. die optimale Phytohormonkonzentration gefunden werden musste. Die Kombination von 2,4-D mit Kinetin wirkt sich deutlich vorteilhafter auf das Wachstum der *Pelargonium sidoides*-Kalluskulturen aus, als BAP mit NAA.

2.1.2 Reduzierung phenolischer Ablagerungen

Obwohl sich die drei oben beschriebenen Nährmedien in der Wachstumsgeschwindigkeit der Kallusgewebe, sowie ihren Gewebeeigenschaften unterschieden, zeigten sie alle gemeinsam eine Auffälligkeit: Das Auftreten von braunen Ablagerungen, die sich schnell ausbreiteten und das Wachstum der Kalli inhibierten. Diese dunklen Ablagerungen phenolischen Ursprungs wurden schon mehrfach bei Zellkulturen aus verschiedenen Pflanzen mit einem hohen Gerbstoffanteil beobachtet (VATANPOUR-AZGHANDI et al. 2002, ZAGOSKINA et al. 2003). In Gewebekulturen von *P. sidoides* wurden diese phenolischen Inhaltsstoffe mit Hilfe des Folin & Ciocalteu-Assays quantifiziert. Weitere Beobachtungen stellten erstaunlicherweise eine Erhöhung der phenolischen Ablagerungen durch Zugabe von Kinetin ins Nährmedium fest (MOYO et al. 2012). Im Gegensatz dazu fanden LEWU et al. (2007) keinerlei phenolische Ablagerungen während des Kalluswachstums von *P. sidoides* vor.

Durch Zugabe von Ascorbin- und Citronensäure in Konzentrationen von je 50 mg/l zum Nährmedium kann die Bildung von Polyphenolen unterdrückt werden (KAVI KISHOR 1999, KLEIN 2004, SATHYANARAYANA et al. 2007). Die Zugabe der Antioxidantien Ascorbin- und Citronensäure in Kombination mit einer Subkultivierung alle 14 Tage führte auch in unserem Fall zur Unterdrückung der phenolischen Ablagerungen. 2002 berichteten TIWARI et al. am Beispiel der Teakbaum-Zellkulturen, dass kurze Kultivierungsintervalle das Auftreten von Braunverfärbungen im Gewebe verhindern. Ascorbin- und Citronensäure inhibieren vermutlich Polyphenoloxidasen und damit die Braunfärbung der Kallusgewebe (PIZZOCARO et al. 1993). Bestätigt wurde diese Hemmung der Enzymaktivität an diversen Obstsorten (JANG et al. 2011, SUTTIRAK et al. 2010). Interessanterweise scheint auch eine Reduktion der 2,4-D-Konzentration die Braunfärbung zu minimieren (SUNDRAM et al. 2012). Dies konnte anhand der eigenen Kalluskulturen nicht bestätigt werden. Sowohl 0,4 mg/l und 1 mg/l 2,4-D produzierten mengenmäßig vergleichbare phenolische Ablagerungen, die bei der Phytohormonkombination BAP und NAA noch viel stärker ausgeprägt waren.

Zusätzlich wurde eine weitere Möglichkeit zur Unterdrückung der Polyphenolbildung getestet. Gerbstoff-adsorbierende Polyamide (siehe IV 1.4.2) wurden in das Nährmedium eingearbeitet und das Kalluswachstum beobachtet. Die schnell wachsenden, sehr hellen und weichen Kalluskulturen zeigten eindrucksvoll, dass die phenolischen Ausscheidungen der Gewebe an das Polyamid 6 im Nährmedium adsorbierten und somit keine toxischen Effekte mehr auf das Kallusgewebe ausüben konnten. Im Vergleich zu Ascorbin- und Citronensäure erzeugte eine Zugabe von Polyamid 6 ins Nährmedium deutlich hellere und weichere Kalli, die ähnlich schnell wuchsen.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Kombination von 1 mg/l 2,4-D und 0,2 mg/l Kinetin das optimale Verhältnis von Auxin und Kinetin zur Förderung des Streckungswachstums und

der Zellteilungsrate darstellen und mit Polyamid 6 zur Unterdrückung der phenolischen Ausscheidungen ergänzt werden sollten, um optimal wachsende *Pelargonium sidoides*-Kalluskulturen ohne Differenzierungen bei RT zu erhalten. Dies ist das erste Mal, dass berichtet wird, dass Polyamid auch in der Zellkultur zur Adsorption von Gerbstoffen eingesetzt wird. Da bedingt durch das Polyamid 6 eine Übertragung der gleichen Versuchsbedingungen auf die Flüssigkulturen sehr arbeitsintensiv wäre, wurden die Erhaltungskulturen von *Pelargonium sidoides* nur mit Ascorbin- und Citronensäure und nicht mit Polyamid 6 ergänzt. Das Anlegen von Suspensionskulturen mit einem festen Medium mit Polyamid 6 am Boden und einer Nährlösung wäre in der Handhabung kompliziert und garantiert nicht die gleichmäßige Abgabe phenolischer Verbindungen aus der Suspension an das Polyamid im Nährboden. Eine Subkultivierung der einzelnen Kalli erfolgte nach erfolgreicher Unterdrückung der phenolischen Ablagerungen alle vier Wochen.

2.2 Suspensionskulturen

Die etablierten Kallusgewebe dienen einerseits als Erhaltungskulturen, andererseits als Ausgangsmaterial für Suspensionskulturen, die aus Zellen bzw. Zellaggregaten in bewegten, flüssigen Medien bestehen und gewisse Vorteile gegenüber Kalluskulturen aufweisen. Suspensionskulturen zeichnen sich durch homogeneres Zellmaterial, schnelleres Wachstum und eine erhöhte Stoffwechselaktivität, die zu höheren Erträgen führen, aus (MOMSEN 1997, LINDL 2008) und eignen sich deshalb besonders gut zur Gewinnung von speziellen Naturstoffen wie z.B. den AGPs.

2.2.1 Vergleich diverser Nährmediumszusätze

Für die Suspensionskulturen wurden dieselben Phytohormone bzw. Phytohormonkonzentrationen verwendet wie für die Kalluskulturen. Wie bereits bei den Kalluskulturen beobachtet werden konnte, unterdrückte auch in den flüssigen Kulturen ein Zusatz von Ascorbin- und Citronensäure die Bildung von phenolischen Ausscheidungen. Außerdem konnte deutlich beobachtet werden, dass Kulturen mit 2,4-D (allein oder in Kombination mit Kinetin) helle, relativ homogene Suspensionen bildeten. Im Gegensatz dazu waren die Suspensionen des Ansatzes mit der Phytohormonkombination BAP und NAA dunkler gefärbt und stark bröckelig.

Somit decken sich die Beobachtungen der Flüssigkulturen und der Kallusgewebe, wobei die Kombination der Phytohormone 2,4-D und Kinetin (1 und 0,2 mg/l) bei Raumtemperatur helle, schnell wachsende, homogene Suspensionskulturen bildeten. Der Zusatz von Ascorbin- und Citronensäure erwies sich wiederum als erfolgreiche Methode zur Unterdrückung von phenolischen Ausscheidungsprodukten.

2.2.2 Polysaccharide und AGPs der Kulturmedium von Suspensionskulturen

Neben der mikroskopischen Beobachtung der Zellen und der Beurteilung des Zellwachstums wurden die in das Nährmedium sezernierten Polysaccharide untersucht. Dabei wurde nicht nur die unterschiedliche Zusammensetzung der Nährmedien betrachtet, auch der Einfluss des Ursprungsgewebes spielte eine Rolle: von Spross (S)- und Wurzel (W)-keimlingen angelegte Kalluskulturen wurden auch weiterhin in den Flüssigkulturen voneinander getrennt.

Dabei unterschieden sich die mittels Ethanol-fällung gewonnenen Polysaccharide aus den Kultivierungsmedien mit 0,4 mg/l 2,4-D und 1 mg/l 2,4-D in Kombination mit 0,2 mg/l Kinetin (beide mit Ascorbin- und Citronensäure) in ihrer Monosaccharidverteilung nicht voneinander. Galaktose und Arabinose bildeten dabei mit ca. 45% und 25%, Glukose mit 10-30% die dominierenden Monosaccharide der hochmolekularen Fraktion. Die Kultivierungsansätze mit 5 mg/l BAP und 1 mg/l NAA sowie Ascorbin- und Citronensäure unterschieden sich nicht nur optisch, sondern auch in ihrer Monosaccharidzusammensetzung von den andern Ansätzen. Mit 30-35% bildeten Glukose und Galaktose eine vergleichbare große Fraktion, ähnlich wie Xylose und Arabinose (ca. 15%). Dies zeigt deutlich, dass die Kombination der Phytohormone auf die Zusammensetzung der ins Nährmedium sezernierten Polysaccharide einen Einfluss hat. Im Gegensatz dazu hat das Ursprungsgewebe (Wurzel- oder Sprosskeimling) keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Monosaccharidzusammensetzung.

Die Unterschiede in der Monosaccharidverteilung in der hochmolekularen Fraktion bedingt durch die unterschiedlichen Phytohormonkonzentrationen spiegelte sich nicht bei den AGPs wieder. Die isolierten AGPs aus den drei verschiedenen Nährmedien bestanden zu 60% aus Galaktose und zu 30% aus Arabinose. Nur die Menge an isolierten AGPs unterschied sich, wobei die Kultivierungsansätze mit BAP und NAA nur die Hälfte der im Durchschnitt (0,4-0,5%) gewonnenen AGP-Menge bezogen auf die gefriergetrockneten Zellmassen aufwiesen.

3. Isolierung und Analytik der AGPs aus Zellkulturen

3.1 Die Entwicklung eines AGP-Strukturmodells

Für das AGP aus dem Kulturmedium der Suspensionskulturen soll ein Strukturmodell entwickelt werden. Dies erfolgt anhand der Ergebnisse der Charakterisierung des Kohlenhydrat- und des Proteinanteils der W-AGPs, da sich die W- und die S-AGPs bedingt durch ihre Gewinnung aus undifferenzierten Zellen, nicht voneinander unterscheiden.

3.1.1 Der Kohlenhydratanteil

Der Hauptteil des AGPs besteht aus Zuckern, wobei Galaktose und Arabinose mit ungefähr 60% und 30% die dominierenden Monosaccharide darstellen. Weitere neutrale Monosaccharide wie Rhamnose, Xylose, Glukose, Fucose und Mannose wurden in Anteilen bis maximal 2% detektiert und können auch Verunreinigungen aus dem Isolierungsgang der AGPs darstellen und sind somit nicht Teil des AGPs. Dies konnte auch in der Bindungstypanalyse des intakten AGPs bestätigt werden. Hier wurden neben 1,3,6-Galp, 1,3-Galp und 1-Araf als die dominierenden Bindungstypen, geringere Mengen an 1,6-Galp, 1-Galp und 1,5-Araf detektiert. 1,2-Araf sowie 1,4-Galp wurden nur in Spuren und nicht in allen getesteten AGPs gefunden, wobei 1,4-Galp und 1,4-Glcp weder im Massenspektrum noch anhand der Retentionszeiten unterschieden werden konnten.

Nach erfolgreicher Reduktion der Uronsäuren im AGP, konnten diese qualifiziert und quantifiziert werden. Ungefähr 6-7% des Polysaccharidanteils der AGPs stellen Glukuronsäuren dar, die als terminale Bausteine im Zuckerteil vorkommen.

Durch unterschiedliche Degradationsmethoden konnten Erkenntnisse über die genaue Anordnung der verschiedenen Monosaccharide im Zuckerteil gewonnen werden.

Die Spaltung labiler glykosidischer Bindungen mittels Oxalsäure führte zu Abspaltung der Arabinosen. Das aus Galaktosen bestehende degradierte AGP mit einem absoluten Molekulargewicht zwischen 30 kDa und 35 kDa wurde im Anschluss uronsäurereduziert und methyliert. Die detektierte terminale Glukuronsäure mit einem Anteil von ca. 6% zeigt deutlich, dass sämtliche Glukuronsäuremoleküle mit Galaktose und nicht mit Arabinose verknüpft sind. Tabelle 52 und 53 zeigen vergleichend die Monosaccharidzusammensetzung des nativen und des partiell hydrolysierten AGPs. Dabei kann unter anderem festgestellt werden, dass der 54,7% große Anteil von 1,3,6-Galp im nativen AGP im oxalsäurehydrolysierten AGP nur noch ca. die Hälfte davon ausmacht. Andersherum verhält es sich mit 1,6-Galp, dessen Anteil von ca. 20% auf 50% nach der Oxalsäurehydrolyse ansteigt. Dies weist darauf hin, dass die abgespaltenen Arabinosen mit Position 3 der Galaktosen verknüpft waren. Da außerdem der Anteil an 1,3-Galp nach der Oxalsäurehydrolyse nicht steigt, ist eine Verknüpfung der

Arabinosen mit der 1,3-Gal-Hauptkette unwahrscheinlich.

Genauere Erkenntnisse über die Verknüpfung der Galaktosebausteine untereinander konnten durch die Smith Degradation erhalten werden. Dies war unter anderem nötig, um festzustellen, ob das Rückgrat des Kohlenhydrates ausschließlich aus 1,3-verknüpfter Galaktose besteht oder, wie es für andere AGPs beschrieben wurde, durch 1,6-Galp- oder 1,5-Araf-Einheiten unterbrochen wird (BACIC et al. 1987, TAN et al. 2004). Nach einer einmalig durchgeführten Smith Degradation konnten sowohl 1-Galp, 1,3-Galp, 1,6-Galp, und 1,3,6-Galp in Anteilen von je ca. 25% detektiert werden (siehe Abbildung 96). Dies ist eine Bestätigung für die starke Verzweigung des AGPs, das nicht nur aus Periodat-labilen 1,6-Gal-Seitenketten bestand, sondern auch 1,3,6-Gal-Bausteine in den Seitenketten aufweist (siehe Tabelle 53). Eine eindeutige Aussage über das Vorhandensein von 1,6-Galp-Bausteinen in der 1,3-verknüpften Galaktose-Hauptkette konnte nicht getroffen werden, scheint aber aufgrund der rechnerischen Betrachtung der Galaktosebausteine unwahrscheinlich. Der Fall, ob 1,3-Galp-Bausteine Teile der Seitenketten darstellen, wird in der Literatur nicht beschrieben und aufgrund der oben genannten rechnerischen Betrachtung ausgeschlossen. Überprüft werden kann dies mit einer zweiten Smith Degradation des bereits degradierten AGPs. Wenn auch nach der zweiten Smith Degradation 1,3-Galp- und 1,3,6-Galp-Bindungstypen übrig sind, kann von 1,3-Galp-Bindungstypen in der Seitenkette ausgegangen werden. Das Vorhandensein von 1% Arabinose nach der Smith Degradation weist auf das gelegentliche Auftreten einer Periodat-stabilen Bindung zwischen Arabinosen wie die Ara1-2Ara-Verknüpfung hin.

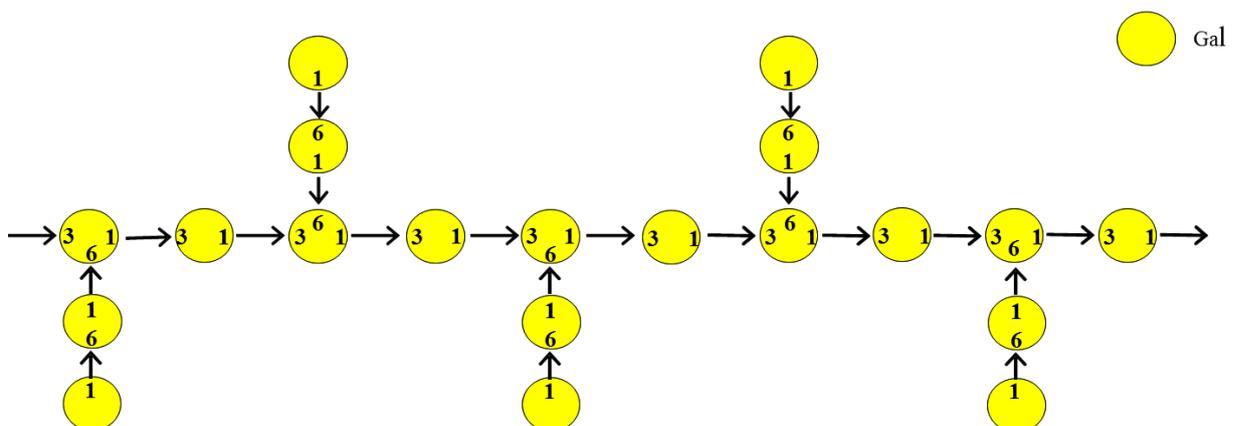


Abbildung 96: Strukturmodell des Smith degradierten AGPs

Aufgrund sehr schlechter Hydrolyseraten während der enzymatischen Degradation, die höchstwahrscheinlich durch die starke Verzweigung des Kohlenhydratanteils bedingt ist, konnten mit dieser Methode kaum neue Erkenntnisse über die Feinstruktur gewonnen werden. Die enzymatische Abspaltung eines Ara1-5Ara-Bruchstückes aus der Peripherie des AGPs wies darauf hin, dass die mit ca. 4% vorkommenden 1,5-Araf-Bausteine nicht Teil der 1,3-Gal-Hauptkette sind. Somit kann davon

ausgegangen werden, dass die 1,3-Gal-Hauptkette nicht durch sogenannte „kinks“, Periodat-sensitive Bausteine wie 1,5-Araf und 1,6-Galp, unterbrochen ist (TAN et al. 2004).

Tabelle 52: Vergleichende Darstellung der Bindungstypen im nativen, oxalsäurehydrolysierten und Smith degradiertem AGP

mol %	natives AGP	oxalsäurehydrolysiertes AGP	Smith degradiertes AGP
1-Araf	27,9	0,4	1,0
1,2-Araf	1,1	-	-
1,5-Araf	4,0	-	-
1-Galp	2,6	8,5	19,0
1,3-Galp	15,0	14,7	26,0
1,4-Galp	-	0,9	0,7
1,6-Galp	12,8	53,3	26,0
1,4,6-Glcp	-	-	1,4
1,3,6-Galp	36,6	22,2	25,9

Tabelle 53: Quantitative Veränderung der Galaktosemengen vom nativen zum degradierten AGP

mol %	natives AGP	oxalsäurehydrolysiertes AGP	Smith degradiertes AGP
1-Galp	3,8	8,5	19,2
1,3-Galp	22,4	14,7	26,4
1,4-Galp	0	0,9	0,5
1,6-Galp	19,1	53,6	26,4
1,4,6-Glcp	-	-	1,1
1,3,6-Galp	54,7	22,3	26,4

Entsprechend der oben beschriebenen Interpretation der Ergebnisse konnte der in Abbildung 97 dargestellte Strukturvorschlag für das Kohlenhydratgrundgerüst entwickelt werden. Dabei sind einige Details nur modellhaft dargestellt und benötigen eine genauere Untersuchung, wie z.B., ob die Glukuronsäure über Position 6 oder 3 mit der Galaktose verknüpft ist. Dies könnte z.B. mit Hilfe einer enzymatischen Degradation mit β -Glucuronidase überprüft werden (KONISHI et al. 2008). Des Weiteren wird in der Literatur nicht berichtet, dass die 1,6-Galp-Seitenkette an Position 3 mit einer weiteren 1,6-verknüpften Galaktose verbunden sein kann. Dieses scheint biosynthetisch eher unwahrscheinlich, ist aber in unserem Fall aufgrund der Berechnungen durchaus möglich. Die dargestellte Kettenlänge der 1,6-Gal-Seitenketten ist in dem unten dargestellten Modell zwar gleich, kann aber auch variieren, wie für verschiedene andere AGPs beschrieben (z.B. AGP aus Weizenmehl, TRYFONA et al. 2010).

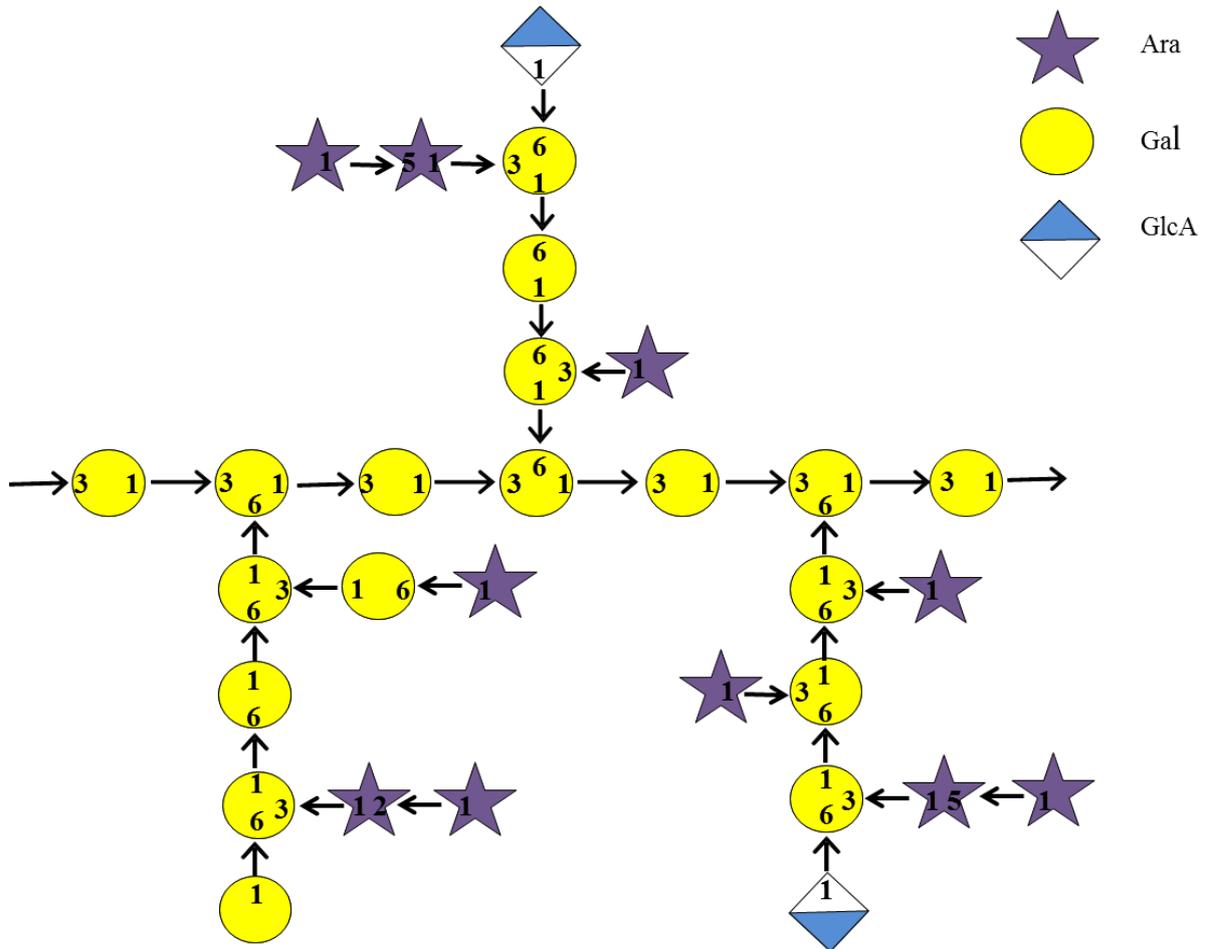


Abbildung 97: Strukturvorschlag des Kohlenhydratgrundgerüsts

Mit dem typischen Rückgrat aus 1,3-verknüpfter Galaktose und den 1,6-Gal-Seitenketten, sowie den vorkommenden terminalen Arabinosen kann das Kohlenhydratgrundgerüst als Typ-II-AG nach Aspinall (1973) bezeichnet werden.

Die Testung der Reaktivität verschiedener Antikörper gegen aufgereinigtes *Pelargonium*-AGP in einem indirekten ELISA-System konnten diese Ergebnisse bestätigen.

Eine positive Reaktion wurde mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen ein AGP aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea* gerichtet ist, ermittelt. Für diesen Antikörper ist bekannt, dass er mit dem Galaktose-Rückgrat der TypII-AGs reagiert und keinerlei Veränderung der Bindungsaffinitäten nach Abspaltung von Arabinosen oder Reduktion der Uronsäuren zeigt (CLASSEN et al. 2004). Ebenfalls positive Reaktionen mit *Pelargonium*-AGP, jedoch schwächer ausgeprägt, zeigten zwei andere monoklonale Antikörper (gerichtet gegen ein AGP aus Haferfrüchten). Ein Bindungsepitop dieser Antikörper ist jedoch noch nicht bekannt. Da keine deutlichen Unterschiede der Bindungsaffinitäten zwischen den nativen und modifizierten AGPs ermittelt wurden, lassen sich auch bei diesen monoklonalen Antikörpern Zielepitope im Bereich des Galaktose-Rückgrates vermuten.

Im Gegensatz dazu zeigte der polyklonale Antikörper, gerichtet gegen ein AGP aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea*, keine messbare Reaktion mit *Pelargonium*-AGP. Dies lässt sich durch Unterschiede in der Feinstruktur zwischen *Pelargonium*- und *Echinacea*-AGP begründen: polyklonale Antikörper binden an eine Vielzahl unterschiedlicher Epitope desselben Moleküls und bilden demnach in ihrer Gesamtheit Teile der Feinstruktur des Moleküls ab. So bleibt der polyklonale Antikörper spezifisch für die Feinstruktur des *Echinacea*-AGPs, die sich u.a. in dem Verlust der Bindungsaffinitäten nach Abspaltung von Arabinosen äußert (CLASSEN et al. 2005).

Neben diesen speziell, gegen ausgewählte und aufgereinigte AGPs, hergestellten Antikörper, sind in der Literatur viele mehr oder weniger spezifische monoklonale Antikörper gegen AGPs und andere Zellwandpolysaccharide verbreitet, die unter anderem für die Isolierung, Detektion und der Aufklärung von Funktionen von AGPs in pflanzlichen Geweben verwendet werden (EDER et al. 2008, MOLLER et al. 2008, PATTATHIL et al. 2010).

3.1.2 Der Proteinanteil

Mit Hilfe verschiedener Methoden wurde der Proteinanteil des AGPs charakterisiert, wobei nicht nur der Gesamtproteinanteil quantifiziert, sondern auch die Aminosäurezusammensetzung untersucht wurde.

Erste Hinweise auf den Anteil des Proteins lieferte hierbei die Elementaranalyse, deren Stickstoffanteil mit Hilfe der Methode von Kjeldahl (HACH et al. 1985) auf den Proteingehalt im AGP umgerechnet wurde und im Durchschnitt 11% betrug. Bestätigt werden konnten diese Ergebnisse mit Hilfe der Hydroxyprolinbestimmung und der photometrischen Bestimmung des Gesamtproteingehaltes mittels Ninhydrin (nach STARCHER). Letzterer detektiert primäre Amine, die einen roten Farbkomplex bilden. Dies führt leider zum Problem, dass sekundäre Amine wie z.B. Prolin und Hydroxyprolin, die nur einen gelben Farbkomplex bilden, von der Farbe überdeckt werden und somit nicht erfasst werden können. Aus diesem Grund liegt der Proteingehalt nach STARCHER auch etwas niedriger (siehe Tabelle 54). Des Weiteren kann auch über die Aminosäureanalytik mit HPLC-Auftrennung der Gesamtproteingehalt durch Addition der Aminosäuren erfasst werden, der aber durch die Probenaufarbeitung (z.B. der Hydrolyse) deutlich niedriger ausfällt. Insgesamt kann von einer Proteinkette, die ca. 10% des AGPs ausmacht ausgegangen werden. Somit liegt der Proteinanteil im für AGPs typischen Bereich von 1-10% (ELLIS et al. 2010).

Die mittels Aminosäureanalytik detektierten dominierenden Aminosäuren im AGP waren Alanin, Asparagin/Asparaginsäure, Serin, Threonin, Glutamin/Glutaminsäure und Leucin. Alanin, Serin, Threonin und Glycin gelten neben Prolin/Hydroxyprolin in der Literatur als die typischen Aminosäuren von klassischen AGPs (NOTHNAGEL 1997, SHOWALTER 2001, ELLIS et al. 2010). Der Anteil an Prolin und Hydroxyprolin im *Pelargonium sidoides*-AGP fällt mit 3-4% relativ niedrig aus. Im Gegensatz dazu zeichnen sich Nicht-klassische AGPs z.B. durch sehr hohe Asparagin-, Histidin- oder

Cysteinmengen oder durch einen sehr niedrigen Alanin- oder Hydroxyprolinanteil aus (QI et al. 1991, KIELISZEWSKI et al. 1992, BALDWIN et al. 1993, MOLLARD et al. 1994, MAU et al. 1995, LIU et al. 2007, AIZAT et al. 2011).

Tabelle 54: Proteinanteile der AGPs aus *Pelargonium*, ermittelt mit verschiedenen Methoden

Proteingehalt, bestimmt über:					
		HPLC der Aminosäuren	Photometrische Hydroxyprolin- bestimmung	Photometrische Bestimmung des Proteingehaltes nach STARCHER	Elementaranalyse
AGP-V4	W	4,1%	12,7%	9,3%	11,8%
	S	2,6%	10,0%	6,1%	9,7%

3.1.3 Strukturmodell des *Pelargonium sidoides*-AGPs

Die Größe der AGPs wurde durch größenausschlusschromatographische Untersuchungen ermittelt, wobei das absolute Molekulargewicht durchschnittlich 90 kDa betrug und somit im für AGP typischen Bereich zwischen 60-300 kDa lag (NOTHNAGEL 1997). Das deutlich kleinere hydrodynamische Volumen von ca. 65 kDa wies auf ein stark verzweigtes AGP hin. Diese Vermutung konnte mit Hilfe der Bindungstypenanalysen, insbesondere der großen Anzahl von 1,3,6-Galp-Verzweigungspunkten (im nativen und degradierten AGP) bestätigt werden.

Mit Hilfe der alkalischen Hydrolyse konnte die Größe der Zuckereinheiten bestimmt und deren Anzahl berechnet werden. Dabei wurden neben einer 50 kDa großen Zuckereinheit eine 15 kDa große Fraktion und kleinere Einheiten von ungefähr 0,7 und 1,5 kDa bestimmt. Betrachtet man die Größe des intakten AGPs mit 90 kDa bzw. 81 kDa nach Abzug des Proteinteils, könnte man vermuten, dass nur eine 50 kDa große Polysaccharideinheit neben zwei 15 kDa großen Zucker-„bäuschen“ und wahrscheinlich 1-2 kleinen Oligosacchariden vorkommen. Dabei würde die große Einheit ungefähr 300 und die mittlere ca. 100 Monosaccharidbausteine umfassen. Große komplexe Polysaccharideinheiten wurden bereits in AGPs, isoliert aus der Weizensaat, beschrieben (GOELLNER et al. 2010). Laut Literatur schwankt die Größe der Polysaccharideinheiten zwischen 5-25 kDa (entspricht 30-120 Monosacchariden) (ELLIS et al. 2010). Für ein AGP aus Weizen wurde z.B. ein Molekulargewicht von 20 kDa für die Zuckereinheiten ermittelt, wohingegen ein AGP aus Hafer mit 11 kDa deutlich kleinere Polysaccharideinheiten aufwies (GOELLNER et al. 2010 und 2011). Im Gegensatz dazu wurden 30 kDa große Zuckereinheiten in einem AGP, isoliert aus dem Presssaft von *Echinacea purpurea*, ermittelt (VOLK et al. 2007). Nicht ganz auszuschließen ist daher, dass das für den Polysaccharidteil des *Pelargonium*-AGPs ermittelte Molekulargewicht von 50 kDa eventuell auch auf eine unvollständige Hydrolyse des Proteinteils zurückzuführen ist.

Die kleinen Oligosaccharidseitenketten bestehen aus ca. 5 bis 10 Monosacchariden, die teilweise ein Ara-Gal-Gemisch oder reine Ara-Seitenketten darstellen. Die in der Literatur diskutierte Anwesenheit von Arabinose-Oligosacchariden in AGPs (ELLIS et al. 2010) wurde nach erfolgter präparativer Auftrennung und Analytik der einzelnen Fraktionen auch für das *Pelargonium*-AGP als sehr wahrscheinlich erachtet. Den endgültigen Beweis würde eine noch durchzuführende Bindungstypanalyse der kleinsten Zuckereinheit erbringen.

Die kovalente Verknüpfung des Proteinteils mit den Kohlenhydrateinheiten erfolgt in der Regel über Hydroxyprolin (Hyp). Dabei findet die Verknüpfung der AG-Polysaccharide über *O*-glykosidische Verknüpfungen von Galaktose mit Hyp statt. Bei einem Vorkommen kleinerer Arabinose-Oligosaccharide sind diese ebenfalls *O*-glykosidisch an Hyp gebunden. Unter anderem wurden in AGPs aus *Phaseolus vulgaris* und aus Gummi arabicum solche Ara-*O*-Hyp-Verbindungen identifiziert (VAN HOLST et al. 1981, GOODRUM et al. 2000). SHOWALTER (2001) präziserte diese Verbindung und postulierte, dass besonders kurze Arabinoseseitenketten *O*-glykosidisch mit Hyp verbunden sind. Bindungen über die Hydroxylgruppen von Serin (Ser) und Threonin (Thr) sowie *N*-glykosidische Bindungen über Asparagin werden ebenfalls diskutiert, wobei die *O*-glykosidischen Bindungen die dominanteren darstellen (NOTHNAGEL 1997, SHOWALTER 2001). Neben Gal-*O*-Ser-Verknüpfungen in AGPs aus den Blättern von *Cannabis sativa* (HILLESTAD et al. 1977) und den Suspensionskulturen von *Zea mays* (KIELISZEWSKI et al. 1992) wurden in AGPs aus *Phaseolus vulgaris* unter anderem auch Gal-*O*-Thr-Verknüpfungen gefunden (VAN HOLST et al. 1981). Im Falle der *O*-glykosidischen Bindungen mit Ser wurden dabei nicht nur Verknüpfungen mit AG-Einheiten bei AGPs, sondern auch mit nur einem Galaktosebaustein bei Extensinen beschrieben (KIELISZEWSKI et al. 2001). Da in den meisten AGP-Studien Angaben über die Kohlenhydrat-Protein-Bindung fehlen, fällt es schwer, die Häufigkeit der *O*-glykosidischer Bindungen über Ser und Thr bzw. *N*-Glykosidische Bindungen zu bewerten.

Bedingt durch den relativ niedrigen Hyp-Gehalt im *Pelargonium*-AGP könnte eine Verknüpfung über Ser und Thr oder auch *N*-glykosidisch möglich sein. Tabelle 55 zeigt die Berechnung der Aminosäurenverteilung des aus 76 Aminosäuren bestehenden 9 kDa großen Proteinteils. Von diesen 76 Aminosäuren sind 3 x Hyp, 6 x Thr, 10 x Ser und 7 x Asn oder Asp mögliche Kandidaten für die Bindung zwischen Kohlenhydrat- und Proteinteil. Bezieht man in die Betrachtung der Protein-Polysaccharid-Bindung jetzt noch die Anzahl der Zuckereinheiten ein, so kann aufgrund der vier verschieden großen Fraktionen nach der alkalischen Hydrolyse davon ausgegangen werden, dass höchstwahrscheinlich eine 50 kDa große, zwei 15 kDa große und ein bis zwei 1,5 kDa und 0,7 kDa große Zuckereinheiten im AGP vorkommen.

Tabelle 55: Aminosäure(AS)-Verteilung im Proteinteil des *Pelargonium sidoides*-AGPs

	AS im Protein m/m %	Molekulargewicht der AS g/mol	10% entsprechen 9000 Da	Anzahl an AS
Ala	12,4	89,09	1120	13
Asx	11,0	133,1	994	7
Ser	11,4	105,09	1030	10
Thr	8,4	119,12	759	6
Glx	8,6	147,13	777	5
Leu	7,3	131,18	660	5
Gly	6,0	75,07	542	7
Val	6,6	117,15	596	5
Lys	5,1	146,19	461	3
Phe	4,0	165,19	361	2
Pro	3,6	115,13	325	3
Hyp	3,8	131,13	343	3
Arg	2,5	174,2	226	1
Ile	3,5	131,17	316	2
His	2,5	155,16	226	1
Tyr	2,5	181,19	226	1
Met	0,2	149,21	18	0
Cys	0,2	121,16	18	0
Σ	100,0		9000	76

Um genaue Angaben über die Verknüpfung der fünf Zuckereinheiten mit den oben genannten Aminosäuren treffen zu können, ist eine Analyse der Aminosäuresequenz nötig. Denn nur gewisse AS-Sequenzen bilden *O*- oder *N*-glykosidische Bindungen aus. Die Sequenzen Ser-Hyp₂₋₄, Thr-Hyp₂₋₄ sowie Cluster von Ala-Hyp, Ser-Hyp, Thr-Hyp bzw. Ala-Pro, Ser-Pro, Thr-Pro und Pro-Val bilden Hyp-*O*-glykosidische Bindungen aus (NOTHNAGEL 1997, KIELISZEWSKI et al. 1994 und 2001, CLASSEN et al. 2005, TAN et al. 2010). Prolin wird je nach Sequenz ebenfalls erst hydroxyliert und im Anschluss glykosyliert, wobei Lys-Pro, Tyr-Pro, Phe-Pro nicht hydroxyliert sind, Pro-Val im Gegensatz dazu immer (KIELISZEWSKI et al. 1994). Sequenzen mit Asn-X-Ser und Asn-X-Thr bilden hingegen *N*-glykosidische Bindungen, wobei X jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann (LEROUGE et al. 1998, NOTHNAGEL 1997). Da in unserem Fall keine Sequenzierung der Aminosäuren durchgeführt wurde und die Ermittlung der Bindungsaminosäure(n) nach alkalischer Hydrolyse und anschließender saurer Hydrolyse der Zucker keine verwertbaren Ergebnisse lieferte, stellen die folgenden Annahmen zur Polysaccharid-Protein-Verknüpfung Vermutungen dar:

Es wird davon ausgegangen, dass keine *N*-glykosidischen Bindungen vorkommen, da diese hauptsächlich bei pflanzlichen Polysacchariden mit viel Mannose und *N*-Acetylglucosamin zu finden sind (LEROUGE et al. 1998), welches nicht Teil des *Pelargonium*-AGPs ist. Überprüft werden könnte dies z.B. mittels einer Peptid-N-Glykosidase-F-Behandlung (PNGase F), die *N*-glykosidische Bindungen spaltet. Aus diesem Grund sollten die fünf Zuckereinheiten *O*-glykosidisch gebunden sein,

wobei aufgrund der nur drei Hydroxyprolinbausteine, Bindungen mit Ser und Thr vorhanden sein müssten. Dabei ist nicht jedes Ser und jedes Thr glykosyliert, sondern nur, wenn gewisse Sequenzen vorliegen. Interessant ist auch, dass bis jetzt nur von Hyp-*O*-Arabino-Oligosaccharid-Bindungen berichtet wurde (ELLIS et al. 2010). Dies führt zu der Frage, ob in unserem Fall die Arabinoseseitenketten bzw. Oligosaccharide *O*-glykosidisch mit den Hyp-Bausteinen verknüpft sind und die größeren Zuckereinheiten dann folglich über Ser und Thr gebunden werden? Eine Deglykosylierung mit anschließender Sequenzierung der Aminosäuren mittels Edman-Abbau würde einige dieser Unklarheiten klären. Es wurden bereits mehrere Methoden (β -Elimination, chemische Deglykosylierung mit Trifluormethansäure und PNGase F Behandlung einzeln und in Kombinationen) getestet, um das deglykosylierte AGP zu erhalten (Daten nicht gezeigt). Bedauerlicherweise führte bis jetzt wahrscheinlich aufgrund der stark verzweigten Kohlenhydratanteils keine Methode zum Erfolg, sodass die häufig in der Literatur beschriebene Flusssäure-Behandlung zur Deglykosylierung in Zukunft untersucht werden sollte (BALDWIN et al. 1993, GOODRUM et al. 2000, SCHULTZ et al., 2000, CLASSEN et al. 2005).

Eine Sequenzierung und damit der Nachweis über die Anordnung der Hyp- und anderen Aminosäure-Bausteine wäre auch zwecks Beurteilung der von KIELISZEWSKI et al. (1994, 2001) postulierten Hyp-Kontiguitäts-Theorie sinnvoll. Diese Theorie beschreibt die Anordnung der Zuckerbausteine anhand der Verteilung des Hydroxyprolins in der Proteinkette. Dabei tragen einzeln angeordnete Hyp-Reste die großen Polysaccharideinheiten im Gegensatz zu Hyp-Blöcken, die mit kurzen Arabinose-Seitenketten verknüpft sind. Aufgrund der geringen Anzahl an Hydroxyprolin könnte man davon ausgehen, dass es unwahrscheinlich ist, dass die drei Hyp-Bausteine als Block vorkommen. Bereits mehrere Veröffentlichungen konnten zeigen, dass die Hyp-Kontiguitäts-Theorie durchaus nicht bei allen AGPs anzuwenden ist (BALDWIN et al. 1993, CLASSEN et al. 2005). Abbildung 98 zeigt jeweils ein Modellvorschlag des *Pelargonium*-AGP nach Hyp-Kontiguitäts-Theorie und ohne.

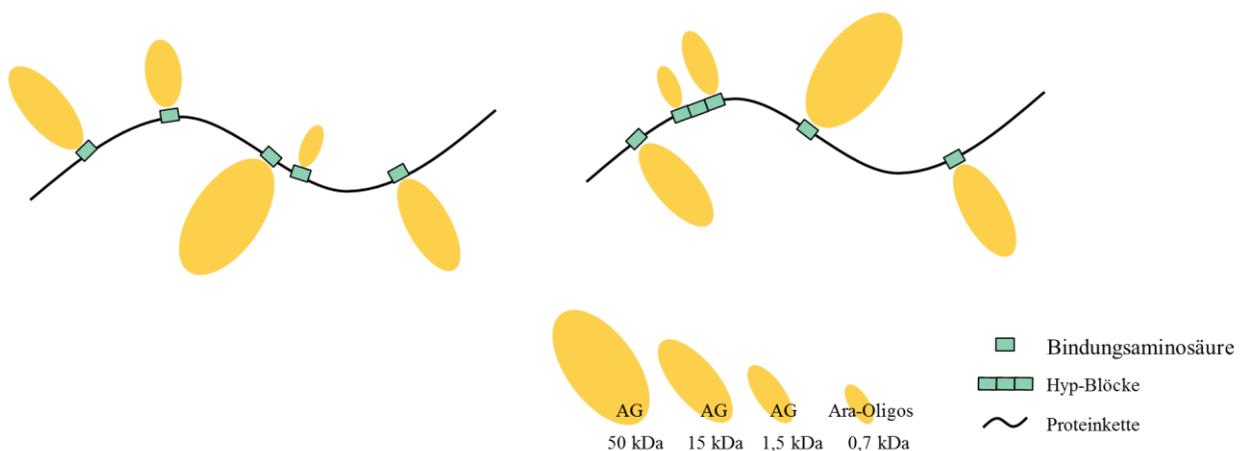


Abbildung 98: Vorschläge zweier *Pelargonium sidoides*-AGP-Modelle ohne (links) und mit (rechts) Beachtung der Hydroxyprolin-Kontiguitäts-Theorie

3.2 Vergleich des *Pelargonium*-AGPs mit anderen AGPs der Literatur

Bis heute wurden bereits AGPs aus den Kulturmedien von Suspensionskulturzellen verschiedenster Pflanzen untersucht: *Rosa sp.* (KOMALAVILAS et al. 1991), *Oryza sativa* (SMALLWOOD et al. 1996), *Malva sylvestris* (CLASSEN et al. 2002), *Daucus carota* (IMMERZEEL et al. 2004), *Echinacea purpurea* (CLASSEN 2007) und *Silybum marianum* (SÁNCHEZ-SAMPEDRO et al. 2008) sind nur einige Beispiele. Bis heute gibt es keinerlei Berichte über AGPs aus der Familie der Geraniaceae bzw. aus Zellkulturen von *Pelargonium*- und *Geranium*-Arten. Es wird zwar angenommen, dass AGPs ubiquitär verbreitet sind, trotzdem muss der Beweis anhand einzelner Pflanzen bzw. Familien noch erbracht werden (SHOWALTER 2001).

Das mit 90 kDa große *Pelargonium*-Zellkultur-AGP mit seinem Proteinanteil von 10%, sowie dem Verhältnis von Arabinose zu Galaktose mit 1:2 und dem Vorhandensein von terminalen Glukuronsäuren weist typische Merkmale klassischer AGPs auf. In der Literatur werden folgende Kriterien als typisch für AGPs diskutiert: das Vorhandensein von AG-Ketten, ein Hyp-reiches Proteinrückgrat und die Bindung mit β -Glc-Yariv-Reagenz (TAN et al. 2012). Aufgrund der heute bekannten Komplexität und Heterogenität der AGPs gelten diese strengen Definitionen nicht mehr, sodass auch das *Pelargonium*-AGP mit seinem relativ niedrigen Hyp-Gehalt zur Familie der AGPs gezählt werden kann. Dieser recht niedrige Gehalt an Hydroxyprolin und die damit verbundene Frage nach der Bindung der Polysaccharide an die Proteinkette stellen eine Besonderheit des *Pelargonium*-AGPs dar. Im Falle eines AGPs aus den Suspensionskulturen von *Daucus carota* zeigte die Aminosäureanalytik eine für das Kern-Protein von AGPs typische Verteilung der Aminosäuren (AS) mit größeren Anteilen von Ala, Ser, Thr, Gly, Asx und Glx, mit Ausnahme von Hyp, das nicht detektiert wurde (BALDWIN et al. 1993). Dies unterstreicht die Annahme, dass in einigen AGPs neben *O*-glykosidischen Bindungen über Hyp auch Bindungen mit Ser oder Thr vorhanden sein müssen.

Heute existieren drei Modelle (siehe Abbildung 99) der räumlichen Anordnung von AGPs: das „wattle blossom“ Modell, das „twisted hairy rope“ Modell sowie ein modifiziertes „wattle blossom“ Modell (FINCHER et al. 1983, QI et al. 1991, SHOWALTER 2001). Daneben wird ein nur für ein AGP aus Gummi arabicum geltendes ellipsenförmiges, diskusartiges Modell vorgeschlagen (SANCHEZ et al. 2008). Das „wattle blossom“ Modell zeichnet sich durch verzweigte Kohlenhydrateinheiten aus, die um das Kern-Protein angeordnet sind und dem AGP insgesamt eine globuläre räumliche Gestalt verleihen. Im Gegensatz dazu besitzt das „twisted hairy rope“ Modell Polysaccharid- und Arabino-Oligosaccharid-Ketten, die sich um ein gestrecktes, mehr oder weniger stabförmiges Kern-Protein wickeln. Dabei trägt jedes vierte Hyp eine Glukuronorhamnoarabinogalaktankette. Das modifizierte „wattle blossom“ Modell umfasst das Vorkommen großer Arabinogalaktaneinheiten neben kurzen

Arabinoseseitenketten in einem insgesamt globulären Molekül. Offen bleibt die Frage, ob alle Arabinogalaktaneinheiten ein einheitliches Molekulargewicht aufweisen, wie man es aus den Darstellungen der Modelle schließen würde. Trotzdem erscheint das modifizierte „wattle blossom“ Modell am wahrscheinlichsten für das AGP aus den Suspensionskulturen von *Pelargonium sidoides*, das aufgrund seines im Vergleich zum absoluten Molekulargewicht deutlich kleineren hydrodynamischen Volumens eine globuläre Gestalt aufweisen müsste.

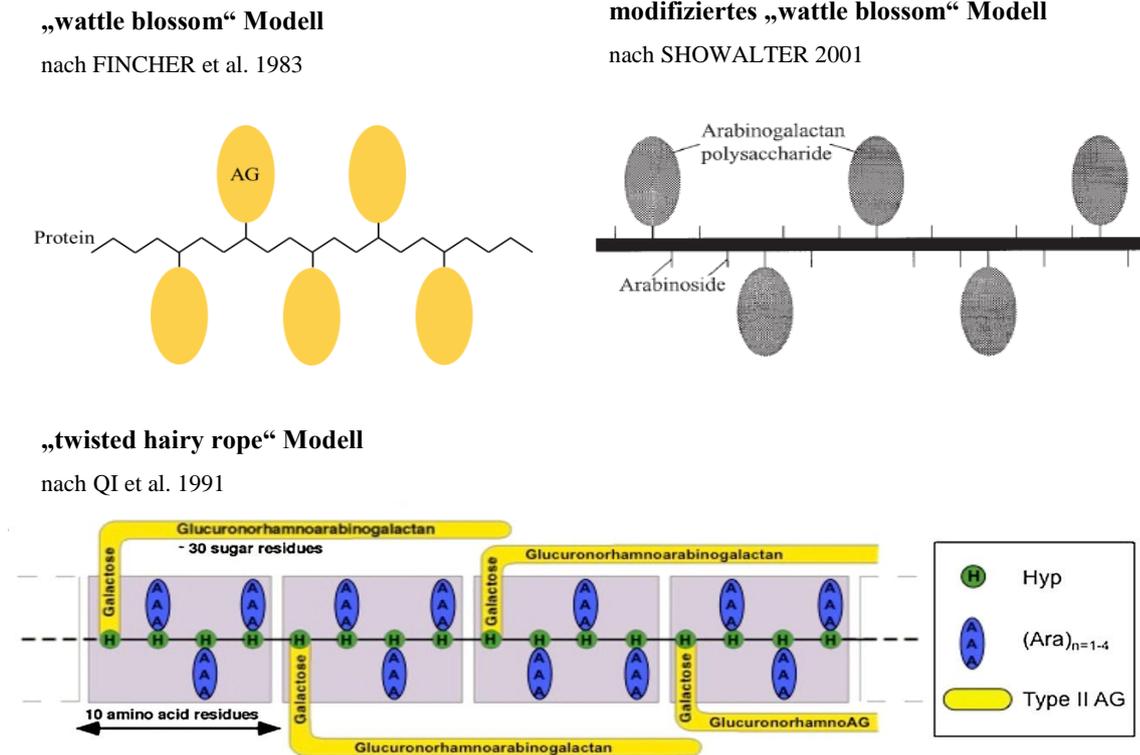


Abbildung 99: Darstellung der bis heute etablierten Strukturmodelle von AGPs

Die neuesten Entwicklungen und Methoden im Bereich der Molekularbiologie können dazu beitragen, dass *Pelargonium sidoides*-AGP Strukturmodell zu komplettieren. Dabei spielen Klonierungsversuche von Genen, die diverse AGP-Proteinbackbones pro Spezies kodieren und bioinformatische Screening-Methoden, die neben AGPs auch andere HRGPs identifizieren und klassifizieren, eine entscheidende Rolle (SCHULTZ et al. 2002, ELLIS et al. 2010, SHOWALTER et al. 2010). Ein weiterer Weg, um mehr Informationen über die Proteinsequenz und die davon abhängige Glykosylierung zu gewinnen, ist das Einschleusen von Test-Substraten (verschiedene AS-Kombinationen und Genkonstrukte) in die Zelle mit anschließender Analyse der erzeugten AGPs und HRGPs in Bezug auf die Hydroxylierung bzw. Glykosylierung der Aminosäuren (KIELISZEWSKI et al. 2001).

3.3 Vergleich von AGPs aus verschiedenen Zellkulturen von *P. sidoides*

Neben der Isolierung und intensiven Charakterisierung des aus dem Kulturmedium von Suspensionskulturen erhaltenen AGPs, wurden zusätzlich AGPs aus den Zellen der Suspensionskulturen und Kalluskulturen isoliert und strukturell untersucht.

Erste Unterschiede konnten dabei in den Ausbeuten der AGPs beobachtet werden: Aus den Zellen der Suspensionskulturen sowie aus deren Kulturmedien wurden im Durchschnitt 0,4 % und 0,5% AGPs bezogen auf die gefriergetrocknete Zellmasse erhalten. Aus den Zellen von Kalluskulturen konnten fast 100% mehr AGPs isoliert werden. Unterschiede zwischen den einzelnen AGP-Ausbeuten können durch die Kultivierung und das Ausgangsgewebe bedingt sein. Exemplarisch können hier die signifikanten Unterschiede in der AGP-Ausbeute zwischen aus Zellkulturen gewonnenen AGPs und aus pflanzlichen Geweben bzw. Drogenmaterial am Beispiel von *Echinacea purpurea* dargestellt werden: mit AGP-Ausbeuten von ca. 0,4-0,8% aus dem Kulturmedium von Suspensionskulturen gleicht es der Ausbeute des *Pelargonium*-AGPs aus dem Nährmedium, liegt aber höher als die AGP-Menge von 0,13% aus der getrockneten *Echinacea purpurea*-Wurzel (BOSSY 2008). Vergleichende Betrachtungen können nicht exakt für das *Pelargonium*-AGP durchgeführt werden, da das aus dem getrockneten Wurzelmaterial isolierte AGP nicht rein war. Nichtsdestotrotz liegt der Gehalt deutlich niedriger als in der *Echinacea*-Wurzel: die Ausbeute des „unreinen“ AGPs betrug 0,02% bezogen auf die getrocknete Wurzel Droge. Vergleicht man dies mit den AGP-Mengen von 0,04% und 0,02% aus den Wurzeln von *Echinacea pallida* und *Baptisia tinctoria*, dann scheint der Gehalt in der *E. purpurea*-Wurzel besonders hoch zu sein (CLASSEN et al. 2006). Eine andere Möglichkeit, die Ausbeute an AGPs in Zellkulturen zu erhöhen, wäre eventuell die Etablierung von hairy root cultures (COLLING et al. 2010).

Weitere signifikante Unterschiede zwischen den drei unterschiedlichen AGPs sind kaum auszumachen. Das absolute Molekulargewicht betrug durchschnittlich 90 kDa, das hydrodynamische Volumen ungefähr 60 kDa und das Verhältnis von Arabinosen zu Galaktosen ca. 1:2 (siehe Tabelle 56). Leichte Abweichungen wurden der Erkenntnis, dass AGPs enzymatisch synthetisierte Naturstoffe darstellen, sowie den teilweise durchgeführten Einzelmessungen zugeordnet. Die Analyse der Bindungstypen zweier AGPs verdeutlicht auch hier die geringen Unterschiede zwischen den AGPs. Aufgrund des gleichen Ursprungsgewebes der einzelnen undifferenzierten Zellkulturen sollten auch keinerlei Unterschiede in der Zusammensetzung der AGPs vorhandensein.

Tabelle 56: Vergleich dreier verschiedener AGPs aus den Zellkulturen von *P. sidoides*

	AGPs aus:					
	Kallusgewebe		Suspensionskulturen			
	Zellen		Zellen		Kulturmedium	
	W	S	W	S	W	S
Ausbeuten %	0,90	0,79	0,42	0,50	0,49	0,53
absolutes MW in Da	94.100	100.800	75.000	93.400	88.300	94.300
hydrodynamisches Volumen in Da	59.500	64.000	55.800	62.700	64.000	67.500
Monosaccharidzusammensetzung m/m %						
Ara	25,6	30,8	32,0	27,5	30,8	32,2
Gal	68,3	63,3	64,3	67,6	64,4	62,3
Glc	1,5	1,4	0,5	0,6	0,8	1,1
Rha	0,7	0,9	1,0	0,9	0,9	1,0
Xyl	0,9	0,7	0,2	0,6	0,9	0,5
Man	2,5	2,3	1,2	2,0	1,9	2,7
Fuc	0,5	0,6	0,8	0,8	0,3	0,2
PS-Ausbeute %	48,6	57,4	75,1	60,7	58,8	64,5
Ara:Gal	1:2,7	1:2,1	1:2,0	1:2,5	1:2,1	1:2,0
Bindungstypen der uronsäurereduzierten AGPs mol %						
1-Araf	37,7	33,3			28,6	25,4
1,2-Araf	1,6	1,1			-	-
1,5-Araf	1,2	6,6			1,6	4,1
1-GlcAp	5,2	4,4			6,2	7,8
1-Galp	7,2	2,0			4,1	2,9
1,3-Galp	17,0	10,2			14,3	14,2
1,4-Galp	1,5	1,9			1,1	2,1
1,6-Galp	6,4	5,8			9,2	6,8
1,3,6-Galp	22,2	34,7			34,9	36,7
VP:EG	0,44	0,87			0,9	1,0
Ara:Gal	1:2,1	1:2,1			1:2,1	1:2,1

Eine Besonderheit in Bezug auf andere aus Zellkulturen gewonnene AGPs stellt das Fehlen des 1,3-Araf-Bindungstypes dar. Sowohl in AGPs aus dem Kulturmedium von *Silybum marianum*, als auch aus *Araucaria angustifolia*, *Malva sylvestris* und *Echinacea purpurea*-Zellkulturen wurden neben 1,2-Araf und 1,5-Araf auch 1,3-Araf detektiert (CLASSEN at al. 2002, CLASSEN 2007, SÁNCHEZ-SAMPEDRO et al. 2008, MAURER et al. 2010). Dabei unterschieden sich die Mengen stark: mit 23,9% bezogen auf den Polysaccharidanteil lag der Gehalt im Mariendistel-AGP im Vergleich zum Brasilkiefer-, Malven- und Sonnenhut-AGP mit 7-8%, 3,5% und 2,4% sehr hoch.

Weitere interessante in der Literatur berichtete Unterschiede existieren zwischen AGPs einer Spezies, gewonnen aus verschiedenen Pflanzenteilen und den Zellkulturen. Die vergleichende Betrachtung des Kohlenhydratgerüsts des *Echinacea purpurea*-AGPs zeigt u. a. eine unterschiedliche Verteilung der einzelnen Bindungstypen im AGP aus den Zellkulturen, der Wurzel und oberirdischer Teile der Pflanze (CLASSEN 2007, BOSSY et al. 2009). AGPs aus den Samen von *Daucus carota* und aus dem Nährmedium von Karotten-Zellkulturen zeigten deutliche Unterschiede in ihrer Monosaccharidzusammensetzung (IMMERZEEL et al. 2004). Dabei wies das Zellkultur-AGP nur geringe Mengen an Arabinose, aber relativ hohe Anteile an Glukuronsäure und Rhamnose auf. Im Gegensatz dazu bestand das Karottensamen-AGP aus einer Arabinose- und Galaktosereichen-Fraktion mit wenig Glukuronsäure. Wenn man bedenkt, dass mit Hilfe der Sequenzanalysen von DNAs bereits mehrere Gene für die Codierung von verschiedenen AGP-Protein-Backbones innerhalb einer Pflanze gefunden wurden, verwundert es nicht, dass eine Spezies mehrere unterschiedliche AGPs aufweist (ELLIS et al. 2010). Dies unterstützt die Vermutung, dass sich die zeitliche Expression von AGPs innerhalb einer Pflanze während des Wachstums und der Differenzierung von Organen, Geweben und Zelltypen verändert (LANGAN et al. 1997).

4. Biologische Aktivitäten des Zellkultur-AGPs

Es ist bekannt, dass AGPs verschiedene Aufgaben innerhalb einer Pflanze bzw. innerhalb von Zellen und Zellverbänden erfüllen. Viele dieser Funktionen sind bis heute noch nicht ausreichend erforscht. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit eine Blockade von AGPs durch Yariv's Reagenz in *Pelargonium*-Suspensionskulturen das Wachstum beeinflusst. Des Weiteren wurde die Rolle von AGPs in der somatischen Embryogenese bzw. während der Induktion von Embryonen ermittelt (siehe VI 5.2). Neben der Untersuchung dieser speziellen Aspekte für die Entwicklung der Pflanzen sollten auch pharmakologische Eigenschaften des *Pelargonium*-AGPs untersucht werden. Da bereits für mehrere AGPs immunstimulierende Wirkungen nachgewiesen wurden, erfolgte eine Untersuchung der Aktivität des *Pelargonium*-AGPs auf das menschliche Komplementsystem.

4.1 Immunstimulierende Wirkungen

Polysaccharide aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien werden schon seit Jahren in Hinblick auf ihren ernährungsspezifischen und medizinischen Nutzen erforscht. Dabei spielen sie einerseits eine Rolle in der Regulierung der Darmfunktion, der Wundheilung, der Hämostase, sowie der Blutglukose- und Lipidspiegel. Andererseits sind sie von großem Interesse bedingt durch ihre regulierenden Effekte auf das Immunsystem, Entzündungsreaktionen und Tumorerkrankungen (PAULSEN 2002, LEE et al. 2004, LEUNG et al. 2006, SCHEPETKIN et al. 2006, BOUDJEKO et al. 2009, RAMBERG et al. 2010), wobei bis heute teilweise die genauen Angriffspunkte bzw. die entsprechenden Rezeptoren für einzelne Polysaccharide nicht bekannt sind. Trotzdem konnten in diversen Studien an gesunden und erkrankten Tieren und Menschen der immunmodulierende Einfluss vieler verschiedener Polysaccharide nach oraler oder intravenöser Gabe beobachtet werden, wo unter anderem anti-inflammatorische und antiallergische Effekte z.B. bei Stomatitis mit Aphthen und allergischer Rhinitis beobachtet wurden (RAMBERG et al. 2010).

Für AGPs aus den oberirdischen Teilen von *Echinacea purpurea* konnte eine konzentrationsabhängige Bindung an humane Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten) ermittelt werden, wobei die Bindung der AGPs an die Lymphozyten nicht über CD4- oder CD8-Rezeptoren erfolgte (THUDE et al. 2006). AGPs aus den Wurzeln von *Baptisia tinctoria* und *Echinacea pallida* zeigten ebenfalls immunmodulatorische Eigenschaften. Sie erhöhten die Proliferation und IgM-Produktion von Maus-Lymphozyten, sowie die Nitrit- und Interleukin-6-Produktion von Maus-Makrophagen (CLASSEN et al. 2006). Mit Interleukin-2 stimulierte ein AGP, isoliert aus Instant-Kaffeepulver, neben der Ausschüttung von TNF- α und Interferon- γ ebenfalls die Sekretion eines Interleukins aus immunkompetenten Zellen (NOSÁL'OVÁ et al. 2011). Weitere immunstimulierende Effekte auf das angeborene Immunsystem zeigte ein Arabinogalaktan aus der Lärche, das u.a. die Konzentration der natürlichen Killerzellen und Zytokine beeinflusste (KELLY 1999, CURRIER et al. 2003). Daneben konnte außerdem die Lymphozytenproliferation und die Anzahl der CD8⁺ Lymphozyten sowie die

Konzentration eines IgG-Subtypes erhöht werden (NANTZ et al. 2001, UDANI et al. 2010). Einen weiteren interessanten Aspekt verdeutlichten PETERS et al. (2010) mit der Untersuchung von AGs aus dem Kuhstallstaub, die ursprünglich aus dem Tierfutter - speziell *Alopecurus pratensis* - stammten. In einem Maus-Modell für allergisches Asthma konnten sie zeigen, dass AGs die Mäuse vor der Entwicklung von Sensibilisierungen, allergischen Entzündungen sowie Überreaktionen der Luftwege schützen. Dabei scheint die Wirkung des Gräser-AGs sehr spezifisch, da Kontroll-AGs/AGPs aus der Lärche und Gummi arabicum keinerlei Allergie-protective Wirkungen zeigten. Dass Pollen-AGPs einen Einfluss auf die Bildung ebenfalls Allergie-spezifischer IgG-4-Antikörper haben, konnte am Beispiel von *Phleum pratense* bestätigt werden (BRECKER et al. 2005).

Alles in allem gibt es bereits einige Beispiele für AGPs als Immunmodulatoren, wobei es unklar erscheint, ob für die immunmodulierenden Eigenschaften der Proteinteil nötig ist, da auch AGs, als Teil von Pektinen oder als eigenständiges Polysaccharid wie in der Lärche, das Immunsystem beeinflussen (KELLY 1999, PAULSEN 2002, UDANI et al. 2010). Dass eine gewisse Struktur-Wirkungs-Beziehung besteht, konnten bereits an drei verschiedenen AGPs gezeigt werden: Nach Abspaltung der Arabinosen, speziell der 1,5-verknüpften Arabinosen zeigte das degradierte AGP aus *Echinacea purpurea* keine bzw. schwache Effekte im hämolytischen Komplementassay (ALBAN et al. 2002). Nach Entfernung der Arabinosen vom *Alopecurus pratensis*-AGP war die protective Wirkung gegenüber allergischen Reaktionen reduziert (PETERS et al. 2010). Die enzymatische Degradation von AGs aus *Astragalus mongholicus* führte zu verminderten Aktivitäten der immunkompetenten Zellen in den Peyer'schen Plaques des darmassoziierten lymphatischen Gewebes (KIYOHARA et al. 2010).

Um mehr Daten über den Einfluss von AGPs auf das Immunsystem zu gewinnen, wurde das aus Zellkulturen gewonnene *Pelargonium*-AGP im Hinblick auf seine Effekte auf das humane Komplementsystem untersucht.

Dies erfolgte mit Hilfe eines modifizierten, ursprünglich für klinische Untersuchungen entwickelten Mikrotiterplatten-Assays. Ein Vorteil dieses Testsystems lag in der Möglichkeit, die Aktivierung bzw. Inhibition des Komplementsystems über drei verschiedene Wege - klassisch, alternativ und Lektin-abhängig - zu untersuchen. Die Beeinflussung des humanen Komplementsystems wurde als relative Komplementaktivität ausgedrückt, wobei Aktivitäten unter 100% einer Inhibition des Komplementsystems entsprechen und Aktivitäten über 100% einer Aktivierung des Komplementsystems gleichkommen. Vor der eigentlichen Testung der AGPs wurden diese mit Hilfe von speziellen Säulen (EndoTrap[®]blue) von möglichen LPS-Verunreinigungen befreit, die den Lektin-abhängigen Weg falsch positiv aktivieren können. Die erfolgreiche Aufreinigung des AGPs konnte u.a. anhand der fehlenden Interaktion mit Toll-like-Rezeptoren bewiesen werden, was für ein LPS-freies AGP spricht (Daten nicht gezeigt).

Mit einer ermittelten Komplementaktivität, die unabhängig der AGP-Konzentration knapp unter 100% lag, zeigte das *Pelargonium*-AGP minimale inhibierende Eigenschaften auf dem klassischen und

alternativen Weg des humanen Komplementsystems. Zusätzlich konnten auch im Lektin-abhängigen Weg nur minimale bis keine Aktivitäten des *Pelargonium*-AGPs detektiert werden, sodass eindeutig belegt werden konnte, dass das *Pelargonium*-Zellkultur-AGP keinen nennenswerten Einfluss auf das humane Komplementsystem aufweist.

Neben denen in der *Pelargonium*-Wurzel vorkommenden Gerbstoffen und Cumarinen, die nachweislich an der immunmodulierenden Wirkung des kommerziell erhältlichen Extraktes beteiligt sind (siehe III 1.5.3), wäre eine Testung des aus der Wurzel isolierten AGPs wünschenswert, da diese strukturell durchaus anders aufgebaut sein könnten als die AGPs aus Suspensionskulturen. Für *Echinacea purpurea* konnte gezeigt werden, dass AGPs aus der Pflanze sich in der Feinstruktur des Arabinogalaktanteils von denen aus der Zellkultur unterscheiden (CLASSEN 2007). Aufgrund der oben erwähnten Interaktionen war es nicht möglich ein reines AGP aus der Wurzel zu erhalten, sodass eine Testung nicht durchgeführt werden konnte.

4.2 Untersuchung des Einflusses von β -Yariv-Reagenz auf Suspensionskulturen von *P. sidoides*

AGPs üben verschiedene Funktionen in Bezug auf die pflanzliche Entwicklung aus (siehe III 2.5). Neben ihrem Einfluss auf die Differenzierung von Zellen, ihrer Beteiligung an der Zellteilung und der Zellproliferation, führen sie zum Teil eine Mediatorfunktion zwischen Zellwand, Plasmamembran und Zytoplasma aus (SEIFERT et al. 2007). Blockiert man biologische Funktionen von AGPs durch Interaktion der AGPs mit β -Yariv-Reagenz, können eingeschränkte biologische Aktivitäten beobachtet werden. Exemplarisch sind dabei die Inhibition des Zellwachstums, sowie eine verringerte Zellviabilität in pflanzlichen Zellkulturen (LANGAN et al. 1997), eine Reduktion der Zellteilung mit der damit verbundenen verringerten Proliferation von Suspensionskulturzellen (SERPE et al. 1994), eine reduzierte apikale Zellausdehnung (LEE et al. 2005) und ein reduziertes Wurzelzellwachstum (WILLATS et al. 1996) zu nennen.

Ein in der Literatur besonders auf molekularer Ebene wenig untersuchter Prozess ist die Rolle der AGPs während des programmierten Zelltodes (PCD), wobei sich die Frage stellt, ob generell AGPs an der Induktion des programmierten Zelltodes beteiligt sind. Interessant ist dabei der Widerspruch, dass AGPs einerseits in differenzierten Pflanzenzellen am PCD beteiligt zu sein scheinen (MOTOSE et al. 2001, BOSSY et al. 2009), andererseits ihre Komplexierung bzw. Blockade in undifferenzierten Zellkulturen ebenfalls den PCD auslöst. Diverse biotische und abiotische Stimuli wie z.B. Kälte, Salz, Trockenheit, oxidativer Stress und Chemikalien wie Wasserstoffperoxid oder Acetylsalicylsäure (SOLOMON et al. 1999, GREENBERG et al. 1996, HOUOT et al. 2001, GARCÍA-HEREDIA et al. 2008, WANG et al. 2010) können ebenfalls den PCD triggern.

Dabei ist der programmierte Zelltod ein aktiver, physiologisch ablaufender Prozess, der auch während

der normalen Entwicklung von Pflanzen z.B. bei der Differenzierung der wasserleitenden Elementen des Xylems (GROOVER et al. 1997, MOTOSE et al. 2001, BOSSY et al. 2009) und bei diversen Alterungsprozessen, aber auch zur Abwehr von Pathogenen (hypersensitive Antwort) abläuft (GREENBERG 1996, SHOWALTER et al. 2001, LIU et al. 2010). In der Wissenschaft wird der pflanzliche PCD von der tierischen Apoptose (= Unterform des PCDs) abgegrenzt, obwohl beide Prozesse viele gemeinsame Merkmale aufweisen: Es kommt zur Kondensation des Zytoplasmas und des Chromatins, zum Schrumpfen der Zellen, sowie zur Bildung von Ausstülpungen der Plasma- und der Kernmembran („apoptotische Körperchen“), die sich als Vesikel abschnüren („blebbing“) (GREENBERG 1996, HUG 2000). Außerdem kann die Teilung der DNA zwischen den Nukleosomen durch Endonukleasen in oligonukleosomale Fragmente – der sogenannten DNA-Ladder bzw. DNA-Leiter, die als ein sensibler Indikator der Apoptose bzw. des PCDs gilt - beobachtet werden. Auch bei der Nekrose, dem traumatischen Zelltod, kommt es zum DNA-Abbau, allerdings haben die Bruchstücke eine zufällige Größe und bedingen somit eine Schmierbande in der Gelelektrophorese. Auf molekularer Ebene gibt es viele mechanistische Ähnlichkeiten zwischen dem PCD und der Apoptose, wobei einige dabei ablaufende Prozesse noch nicht bis ins Detail untersucht wurden: z.B. die Bindung gewisser Faktoren an die sogenannten Todesrezeptoren, die mittels Aktivierung von spezifischen Cystein-Proteasen (Caspasen) die Apoptose/PCD-Kaskade als den wichtigsten Abschnitt des PCDs einleiten (SOLOMON et al. 1999). Die ablaufenden Prozesse unterscheiden sich dabei u.a. aufgrund der strukturell verschiedenen Proteasentypen und den damit verbundenen unterschiedlichen Angriffspunkten, sowie deren unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb der Zelle (LAMKANFI et al. 2002, SANMARTÍN et al. 2005, WOLTERING 2010). Neben den Metacaspasen in Pflanzen, Pilzen und Protozoen wurden u.a. auch sogenannte vacuolar processing enzymes (VPEs) und Saspasen in Pflanzen gefunden, die Caspase-ähnliche Aktivitäten besitzen (SANMARTÍN et al. 2005, WOLTERING 2010). Weitere Unterschiede zwischen den beiden ähnlichen Prozessen werden u.a. bedingt durch das Vorkommen der Zellwand und dem Fehlen eines Immunsystems bei Pflanzen. Durch letzteres können tote Zellen/Zellstücke im tierischen Organismus entfernt werden (Phagozytose), wohingegen sie bei Pflanzen in der Vakuole gespeichert werden müssen. Ein Platzen dieser triggert dann u.a. das DNA-Laddering.

In diesem Versuch wurde untersucht, wie sich die Vitalität von Zellen einer Suspensionskultur unter dem Einfluss von β -Yariv-Reagenz verhält. Wie bereits von GAO et al. (1999) und CHAVES et al. (2002) beschrieben, löst das Wegfangen der ins Nährmedium sezernierten AGPs und das Blockieren von AGPs an der Zellwand von Zellen durch β -Yariv-Reagenz, den programmierten Zelltod aus. Die Untersuchung dieses Phänomens sollte mit Hilfe von speziell angefertigten Erlenmeyerkolben, die *P. sidoides*-Suspensionskulturen enthielten, durchgeführt werden. Dabei eignen sich Suspensionskulturen aufgrund ihrer höheren Homogenität, höheren Wachstumsgeschwindigkeiten und keinerlei Beeinflussung durch die Schwerkraft und Nährmediumsgradienten besonders und sind experimentellen

Bedingungen außerdem leicht zugänglich (LINDL et al. 2008). Während des Versuches wurde das Zellwachstum beobachtet, mikroskopische Untersuchungen und Vitalitätsfärbungen durchgeführt, sowie die DNA der Zellen isoliert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die mikroskopische Beobachtung der Zellen der Suspensionskulturen erfolgte täglich. Hierfür wurden Proben von unbehandelten, mit α -Gal-Yariv- und mit β -Glc-Yariv-Reagenz behandelten Zellkulturen auf die Form, die Größe und das Auftreten von Hinweisen des PCDs wie z.B. das Schrumpfen des Zytoplasmas (HUG 2000) untersucht, sowie Vitalitätsfärbungen mit Trypanblau durchgeführt.

Die intakten runden, ovalen oder würstchenartigen Zellen der Suspensionskulturen zeigten bereits in Wasserpräparaten eindeutige Veränderungen unter β -Yariv-Reagenz Einfluss, der mit Hilfe der Trypanblaufärbungen noch verdeutlicht wurde. Bereits bei mit 40 μ Mol und 50 μ Mol β -Yariv behandelten Zellen konnte ein Zytoplasmaschrumpfen, sowie das Eindringen des rotgefärbten Yariv-Reagenz in die Zellen beobachtet werden. Die Färbung mit Trypanblau verdeutlichte die Schädigung der Plasmamembran, sodass die blaue Farbe auch in die Zellen eindrang. Im Gegensatz dazu erschienen un- und mit α -Yariv-Reagenz (Negativ-Kontrolle) behandelte Zellen hell leuchtend mit blauer Umrandung, als Zeichen einer intakten Plasmamembran.

Die Bestimmung des Zellwachstums unter dem Einfluss der verschiedenen Yariv-Reagenzien gestaltete sich schwieriger als erwartet. Die in der Wissenschaft weit verbreitete Methode, Zellen in einem Hämozytometer zu zählen, konnte in unserem Fall aufgrund einer aggregatreichen Zellkultur nicht angewendet werden. Auch eine Ermittlung der Anzahl der toten Zellen durch die Kombination der Zellzählung unter dem Mikroskop mit der Trypanblaufärbung war auf diesem Weg nicht möglich. Zahlreiche Versuche, eine aggregatfreie Zellkultur zu erzeugen schlugen fehl, wie z.B. eine Ultraschallbehandlung, die Zugabe von Tensiden ins Kulturmedium und eine Behandlung mit Enzymen (Pektinasen). Vielversprechend erschien die Methode von LINDL et al. (2008), die durch häufiges Sieben in einem Zeitraum von vier Wochen Einzelzellkulturen erzeugen sollte. Bedauerlicherweise führte dies zu Suspensionen mit nur wenigen, abgestorbenen Einzelzellen. Dabei wiesen die Zellen Merkmale des programmierten Zelltodes auf, der u.a. auch durch eine zu geringe Zelldichte in Suspensionskulturen ausgelöst werden kann (MCCABE et al. 1997, GAO et al. 1999). Eine Möglichkeit, direkt vor der Zellzählung Einzelzellen zu erhalten, ist die Behandlung der Zellen mit Chromsäure, sodass die Zellen mit Hilfe des Hämozytometers gezählt werden können. Da eine Chromsäurebehandlung zytotoxisch wirkt, kann diese Methode nicht mit einer anschließenden Vitalitätsfärbung kombiniert werden. Eine Methode die Vitalität lebender Zellen trotz Zellaggregation, die typisch für pflanzliche Zellkulturen sind, zu bestimmen, ist der TTC-Test. Hierbei reduzieren intakte Zellen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) zu rotem Formazan, dessen Absorption bei 485 nm vermessen wird. Problematisch hier ist einerseits, dass nicht alle Gewebe eine eindeutige Reaktion geben und andererseits die rote Eigenfärbung der mit Yariv-Reagenz behandelten Zellen, die

die Absorptionsmessung des roten Formazans unmöglich macht. Aus diesem Grund wurde entschieden, vom TTC-Test Abstand zu nehmen und auf eine genaue Bestimmung der Anzahl der toten Zellen zu verzichten. Alle anderen in der Literatur beschriebenen Methoden zur Zellzahlbestimmung wie der Coulter Counter, die Trübungsmessung oder das Durchflusszytometer kamen aufgrund der Zellaggregatproblematik ebenfalls nicht infrage. Letztendlich wurde das Zellwachstum in Form des Sinkvolumens in speziell angefertigten Nasenkolben mit einer Mess-Skala erfasst und die Anzahl toter Zellen optisch durch regelmäßige mikroskopische Untersuchungen abgeschätzt.

Unbehandelte Zellen zeigten typische Wachstumsverläufe mit lag-, Beschleunigungs- und stationärer Phase, wobei der Verlauf der stationären Phase aufgrund der begrenzten Mess-Skala nicht beobachtet werden konnte. Die Beimpfung der Kolben mit β -Glc-Yariv-Reagenz und α -Gal-Yariv als Negativ-Kontrolle erfolgte während der Beschleunigungsphase. Unbehandelte Suspensionskulturen wiesen einen steten Anstieg des vermessenen Sinkvolumens auf. Mit α -Gal-Yariv behandelte Zellen zeigten bedingt durch die nicht vorkommende Komplexbildung der AGPs (JERMYN et al. 1975) einen den unbehandelten Zellen ähnlichen Wachstumsverlauf, der auch durch steigende α -Gal-Yariv-Konzentrationen nicht beeinflusst wurde. Bereits der zweite Versuch zeigte, dass das Zellwachstum durch β -Glc-Yariv-Reagenz konzentrationsabhängig gehemmt wurde. Des Weiteren verdeutlicht er ein Problem des gesamten Versuches: während der Durchführung der einzelnen Versuchsansätze kam es oft zur Verzögerungen im Zellwachstum. Dies konnte auch nicht 100%ig durch die Verdoppelung des Beimpfungsvolumens verhindert werden, obwohl in der Literatur bekannt ist, dass zu geringe Zelldichten zur Auslösung des programmierten Zelltodes führen und somit kein Zellwachstum stattfinden kann (MCCABE et al. 1997). Neben dieser Wachstumsverzögerung waren die Zellen, wahrscheinlich bedingt durch die Zellulosestopfen, sehr anfällig für Schimmelpilzbildung, sodass die zu Beginn geringe Anzahl an Kolben (drei pro Ansatz) noch reduziert wurde und eine statistische Auswertung erschwert bzw. nicht mehr möglich war. Aus diesem Grund wurde die Anzahl der Nasenkolben erhöht, um statistisch besser reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Weiterhin wurde die Konzentration der Yariv-Reagenzien erhöht, um eindeutige Aussagen treffen zu können. In mehreren Ansätzen konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 200 μ Mol β -Glc-Yariv das Zellwachstum je nach Anfangszelldichte inhibiert bzw. nahezu blockiert. Dies hängt mit der Konzentration der bereits in Nährmedium sezernierten AGPs zusammen, die durch das β -Yariv-Reagenz komplexiert werden und ihre biologische Funktion nicht mehr ausüben können. Wird nicht das gesamte AGP komplexiert, können einige Zellen weiter wachsen. Dies zeigt sich u.a. in den sehr flachen Wachstumskurven des vierten und fünften Versuchsansatzes, im Gegensatz zu der kompletten Inhibition des Zellwachstums des sechsten Ansatzes, der durch eine Gerade gekennzeichnet ist. Zusätzlich verdeutlichten diese Ansätze, dass selbst Konzentrationen von 200 μ Mol α -Gal-Yariv das Zellwachstum nicht beeinflussen.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass eine Komplexierung der AGPs durch β -Glc-Yariv-Reagenz das Zellwachstum konzentrationsabhängig inhibiert. Die Negativ-Kontrolle unter Verwendung

von α -Gal-Yariv beweist, dass es sich hierbei nicht um eine zytotoxische Reaktion des Yariv-Reagenzes handelt.

Bis hierhin konnten mittels der durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen und den Wachstumsbeobachtungen der Zellkulturen Hinweise für die Auslösung des programmierten Zelltodes durch die Komplexbildung der AGPs mit Yariv-Reagenz gewonnen werden. Bestätigt wurde dies mit Hilfe der erfolgreichen Isolierung der DNA aus den behandelten und unbehandelten Zellen und ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung. Dabei weist die Art der detektierten DNA eindeutig darauf hin, ob es sich um eine intakte genomische DNA handelt oder ob sie aus nekrotischen oder apoptotischen/PCD Zellen stammt. Eine intakte genomische DNA tritt als scharfe Bande im hochmolekularen Bereich auf. DNA aus nekrotischen Zellen zeichnet sich als breite Schmierbande im höher molekularen Bereich aus. Im Gegensatz dazu liefert die DNA von Zellen, die den PCD bzw. die Apoptose eingeleitet hatten, viele DNA-Bruchstücke, die sich im Falle von apoptotischen Zellen jeweils um ca. 140-170 bzw. 170-200 Basenpaare (bp) unterscheiden (STEIN et al. 1999, CHAVES et al. 2002).

Diese sogenannte DNA-Ladder ist neben weiteren Methoden wie die Markierung des 3`OH-Endes der DNA-Fragmente mit dUTP (TUNEL-Assay), diversen Färbemethoden, der elektronenmikroskopischen Chromatinfärbung und der Detektion aktiver Proteasen oder Proteaseprodukte eine Möglichkeit, den programmierten Zelltod bzw. die Apoptose nachzuweisen (STEIN et al. 1999). Problematisch ist im Fall der DNA-Ladder die oftmals vorkommende, sehr schwache Färbung und die schwer detektierbare Größe der einzelnen Bruchstücke, die durch die Anzahl der Zellen, die synchron in den PCD gehen, bedingt wird (GROOVER et al. 1997, GAO et al. 1999, CHAVES et al. 2002). Letztere wird wiederum durch die Ausgangszellzahl, das Zellwachstum und die β -Yariv-Konzentration beeinflusst. Aus diesem Grund ist bei niedrigen Yarivkonzentrationen bzw. nur wenigen Zellen, die in den PCD gehen, ein TUNEL-Assay aussagekräftiger (GAO et al. 1999). Hilfreich bei der Darstellung der DNA-Leiter könnte die Verwendung einer Positiv-Kontrolle sein. Wasserstoffperoxid gilt als ein möglicher Auslöser des programmierten Zelltodes, wobei je nach Spezies die richtige Konzentration und Inkubationszeit ermittelt bzw. weitere verantwortliche Faktoren gefunden werden müssen (DESIKAN et al. 1998). Dies war in unserem Fall nicht nötig, da mehrere deutlich erkennbare DNA-Bruchstücke im Bereich der kleinen Basenpaare als Vielfaches der in der Literatur berichteten 140-170 bzw. 170-200 bp bei mit β -Yariv-Reagenz behandelten Zellen auftraten (STEIN et al. 1999, CHAVES et al. 2002). Überraschenderweise konnten auch bei unbehandelten Suspensionskulturen, die keinerlei Zellwachstum zeigten, scharfe DNA-Bruchstückbanden detektiert werden. Dies lieferte die Erklärung für das Nicht-Wachsen einiger Zellkulturen. Die aus mit α -Gal-Yariv-Reagenz behandelten Zellen isolierte genomische DNA konnte entsprechend den unbehandelten Zellkulturen als scharfe, hochmolekulare Bande, die knapp unter der Auftrageschale liegt, detektiert werden.

Die mikroskopischen Beobachtungen wie das Zytoplasmaschrumpfen und die negative Vitalitätsfärbung, die Inhibition des Zellwachstums und das Auftreten von DNA-Bruchstücken nach der Isolierung und Auftrennung der DNA bestätigen die wichtige Rolle der AGPs für eine intakte Zellfunktion, die bei Komplexierung der AGPs zum PCD führt. Dies ist (u.a. bedingt durch die Ausgangszellzahl) zeit- und konzentrationsabhängig, wie bereits in *Arabidopsis thaliana*-, *Nicotiana tabacum*- und *Araucaria angustifolia*-Zellkulturen gezeigt werden konnte (GAO et al. 1999, CHAVES et al. 2002, MAURER et al. 2010). Das erfolgreiche Auftrennen und Detektieren der DNA-Bruchstücke ist in unserem Fall besonders hervorzuheben, da es wenig aussagekräftige Literatur zu dieser Methode gibt.

Bis heute ist nicht geklärt, warum die Blockade der AGPs in Zellkulturen zur Einleitung des PCDs führen. Weiterhin ist widersprüchlich, dass AGPs einerseits am PCD im Rahmen von Differenzierungsprozessen beteiligt sind, andererseits ihre Komplexierung aber ebenfalls den PCD induzieren kann. In tierischen Zellen wurde bereits gezeigt, dass eine Störung der Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktionen Apoptose induziert, sodass die Komplexierung von AGPs als Bestandteil von Zellwänden ähnlich wirken könnte (GAO et al. 1999). Hinweise darauf lieferten LAMPORT et al. (2006), die zeigen konnten, dass eine Komplexierung von AGPs in der Zellwand die Porosität des Pektinnetzwerkes erhöhte. Auch von GUAN et al. (2004) wurde dieser Aspekt unterstützt, die in mit Yariv-Reagenz behandelten *Arabidopsis*-Zellkulturen verstärkte Zellwandauflagerungen und eine erhöhte Callose-Syntheserate beobachteten, was zur Vermutung führte, dass die zu beobachtenden wundheilungsähnlichen Prozesse durch die nicht mehr intakte Interaktion/Kommunikation der Zellwandbestandteile induziert wurden.

5. Vermehrung von *Pelargonium sidoides*

Die Pflanzenvermehrung ist ein typischer im Gartenbau verwendeter Begriff, der mehrere verschiedene Methoden umfasst, Pflanzen zu reproduzieren. Dabei kann zwischen generativer und vegetativer Vermehrung unterscheiden werden. Die generative Vermehrung, die auf der geschlechtlichen Fortpflanzung mittels Samen beruht, produziert Pflanzen, die sich genetisch von der Mutterpflanze unterscheiden. Die Vermehrung über die Samen bzw. das Saatgut kann in großen Stückzahlen erfolgen und erschwert eine Übertragung von Pflanzenkrankheiten und Schädlingen. Zu den vegetativen Vermehrungsverfahren gehören unter anderem die Vermehrung mit Hilfe von Stecklingen oder durch Gewebekulturen, bei denen aus Teilen der Mutterpflanze neue erbgleiche Pflanzen erzeugt werden. Diese ausschließlich auf mitotischen Zellteilungen beruhende, ungeschlechtliche Vermehrung eignet sich bedingt durch die genetische Uniformität der neuen Pflanzen (=Klone) besonders gut für Züchtungen, wobei der Prozess deutlich kürzer ist und somit häufig für hochwertige Zierpflanzen angewendet wird.

5.1 Etablierung der somatischen Embryogenese

Aufgrund der weiten Verbreitung von *Pelargonium*-Arten im Gartenbau gibt es eine große Anzahl an Literatur über die Vermehrung der Geranienarten im Zierpflanzenbau, die hauptsächlich über Samen und Stecklinge erfolgt (MITHILA et al. 2001, WOJTANIA et al. 2004, HAENSCH 2004, MOYO et al. 2012). Weiterhin existieren auch einige Publikationen zur Vermehrung mittels somatischer Embryogenese (MARSOLAIS et al. 1991, HAENSCH 2007, HUTCHINSON et al. 1996, WOJTANIA et al. 2004) oder Organogenese (MITHILA et al. 2001). Bedingt durch die vielen verschiedenen Genotypen und die damit verbundenen unterschiedlichen Nährmedien, gibt es bis heute keine universelle Methode *Pelargonium*-Spezies zu vermehren. Die vegetative Vermehrung von *Pelargonium sidoides* wurde bisher nur wenig erforscht. Die Regeneration von Sprossen aus Petiolen unter dem Einfluss fünf verschiedener Cytokinine (BAP, Kinetin und drei Topoline) in diversen Konzentrationen wurde von MOYO et al. (2012) veröffentlicht, wobei *meta*-Topolin signifikant mehr Sprosse im Vergleich zu BAP und Kinetin erzeugte. Im Anschluss untersuchten die Autoren den Einfluss von diversen Auxinen (IAA, IBA, NAA und 2,4-D) verschiedenster Konzentrationen auf die Regenerationsfähigkeit von Wurzeln an den erzeugten Sprossen, wobei alle bis auf 2,4-D eine Wurzelbildung induzierten und gleichzeitig noch zur Sprossvermehrung beitrugen. LEWU et al. berichteten bereits 2007 von einer erfolgreichen Induktion von Kallusgeweben und der Differenzierung von Wurzeln und Sprossen bis hin zur intakten Pflanze. Daneben zeigten sie 2006, dass *P. sidoides* relativ anspruchslos vegetativ als Kopf- und Blattsteckling vermehrt werden kann, wobei das Ausgangsgewebe sowie seine Größe einen Einfluss auf die Vermehrung hatten. Keinerlei Veröffentlichung gibt es allerdings zum Thema Vermehrung von *Pelargonium sidoides* mit Hilfe von somatischen Embryonen, welche im Laufe dieser Arbeit erfolgreich etabliert wurde.

Die somatische Embryogenese ist eine biotechnologische Methode, Pflanzen auf vegetativem Weg zu vermehren. Dabei können auf direktem oder indirektem Wege schnell und günstig eine große Anzahl erbgleicher Jungpflanzen erhalten werden. Im ersten Fall werden aus somatischen Zellen (Einzelzellen meist parenchymatischen Ursprungs), die unter anderem von Hypokotylen, Blattscheiden, Blütenstandstielen und Wurzeln stammen können, auf asexuelle Weise Embryonen erzeugt. Bei der indirekten somatischen Embryogenese werden aus Kalluskulturen neue Jungpflanzen gewonnen, wobei unabhängig vom Weg die embryonale Entwicklung über vier verschiedene Stadien (globulär, Herz, Torpedo, Kotyledon) verläuft. Um erbgleiche Embryonen zu erhalten, müssen gewisse Voraussetzungen gegeben sein: Neben der embryogenetischen Kompetenz des Ausgangsgewebes bzw. der Ausgangszelle ist ein geeigneter Stimulus (z.B. Phytohormongabe oder -inhibition, Schwermetallionen, Hitzeschock, Dehydration) sowie ein optimales Nährmedium von Nöten (IKEDA-IWAI et al. 2003, KLEIN 2004). Anhand zweier *Pelargonium*-Arten wurden diverse Einflussfaktoren auf die somatische Embryogenese untersucht wie z.B. die Nährmediumszusammensetzung (Auxinart und -konzentration, Aminosäuren, pH-Wert, Basalmedium) und der Genotyp der Pflanzen (MARSOLAIS et al. 1991). Eine erfolgreiche Produktion von somatischen Embryonen findet u.a. ihre Anwendung in der Massenvermehrung von Pflanzen und dient der Entwicklung künstlicher Samen (artificial seeds), wobei Embryonen des Torpedo-Stadiums aus Flüssigkulturen eingekapselt werden und für die Keimung zu einem späteren Zeitpunkt gelagert werden (KLEIN 2004).

Im folgenden Kapitel soll hauptsächlich die Etablierung der direkten somatischen Embryogenese diskutiert werden, da auf indirektem Weg bei *Pelargonium sidoides* keinerlei somatische Embryonen induziert wurden.

Wie bereits oben erwähnt, wurde die Induktion von somatischen Embryonen bei *Pelargonium*-Arten im Zierpflanzenbau bereits untersucht. Auffällig ist dabei, dass in älteren Publikationen vermehrt Kombinationen von Auxinen und Cytokinen somatische Embryonen induziert haben (MARSOLAIS et al. 1991, SLIMMON et al. 1991, MITHILA et al. 2001), wobei die Frequenz der Embryogenese eher niedrig war. Mit der Entdeckung der Wirksamkeit des pflanzlichen Wachstumsfaktors Thidiazuron konnte die Stimulation der Embryonenbildung verbessert werden (VISSER et al. 1992). Dabei greift Thidiazuron als Phenylharnstoffverbindung mit cytokininähnlicher Wirkung wahrscheinlich in die Biosynthese oder den Metabolismus von endogenem Auxin ein. Es kommt zur Anhäufung von endogenem Auxin und Cytokinin in den Explanaten, sowie zur Steigerung der Anzahl meristematischer Zentren (HUTCHINSON et al. 1996). Dies verdeutlicht, dass die endogene Konzentration und Verteilung von Auxin und Cytokinin eng mit der Induktion und Entwicklung somatischer Embryonen verbunden ist.

Vertreter aus diesen beiden Phytohormonklassen wurden auch zur Induktion von somatischen Embryonen bei *Pelargonium sidoides* getestet. Dabei sollten zuerst zwei verschiedene Induktionsmedien verwendet werden, wobei das erste Medium eine Kombination von

2,2 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und 0,45 mg/l Benzylaminopurin (BAP) und das zweite Induktionsmedium ausschließlich 2,2 mg/l Thidiazuron (TDZ) enthielt. Die verwendeten Petiolen und Blütenstandstiele geschlossener Blüten wurden eine Woche bei RT und Dunkelheit auf den Induktionsmedien kultiviert und im Anschluss auf phytohormonfreie Platten übertragen. Die Kultivierung der Explanate bei 27°C und einem regelmäßigem Licht/Dunkelheit-Wechsel führte bereits nach 14 Tagen zur Beobachtung erster Embryonen im globulären Stadium bei beiden Explanattypen. Nach 3 Wochen kam es zur Entwicklung erster Blätter, wobei nach vier Wochen die Embryonen soweit entwickelt waren, dass sie zur Wurzelbildung in Röhrchen mit phytohormonfreiem Medium übertragen werden konnten. Auffällig bei der Entwicklung der Embryonen waren die zeitlichen Unterschiede. Bereits nach drei Monaten waren einige Jungpflanzen soweit entwickelt, dass sie ins Gewächshaus überführt werden konnten, wohingegen andere deutlich mehr Zeit zur Regeneration benötigten. Dabei zeigten sich die ersten Unterschiede bereits bei der Induktion und der Entwicklung der Embryonen. Die von MARSOLAIS et al. (1991) erfolgreich verwendete Kombination von 2,4-D und BAP zur Induktion von somatischen Embryonen bei *Pelargonium x hortorum* und *Pelargonium x domesticum* zeigte keinerlei Erfolg. Anstelle einer Induktion von somatischen Embryonen war eine Ontogenese von stark behaarten Wurzeln zu beobachten.

Die Entwicklung von somatischen Embryonen bei *Pelargonium sidoides* wurde auch an histologischen Schnitten eingebetteter Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien nachvollzogen. Dabei grenzen sich die Embryonen mit ihren kleinen, parenchymatischen Zellen mit dichtem Zytoplasma deutlich vom Muttergewebe ab, zu dem es außerdem keinerlei Gefäßverbindungen gab. Die typische bipolare Struktur von somatischen Embryonen mit einem Spross- und einem Wurzelpol war nicht eindeutig zu erkennen (MITHILA et al. 2001, HAENSCH 2004, 2007). Laut HAENSCH 2004 ist dies aber nötig um eindeutig zwischen somatischen Embryonen und Embryo-ähnlichen Strukturen unterscheiden zu können, die meist eine Sprossentwicklung, aber keine Anzeichen für eine Keimwurzel aufweisen.

Aufgrund der fehlenden Induktion der somatischen Embryonen bei 2,4-D und BAP wurden alle weiteren Untersuchungen zum Ablauf der somatischen Embryogenese und zur Entwicklung der Embryonen mit Thidiazuron-haltigem Induktionsmedium durchgeführt.

Dabei konnte deutlich beobachtet werden, dass Blütenstandstiele geschlossener Blüten eine größere Anzahl von Embryonen im Vergleich zu Blattstielen (Petiolen) produzierten. Die vergleichende Untersuchung der Embryonenanzahl von Blütenstandstielen geschlossener Blüten und geöffneter Blüten konnte aufgrund von Problemen während des Desinfektionsprozesses nicht ausgewertet werden, wobei aber festgestellt wurde, dass auch an Blütenstandstielen geöffneter Blüten Embryonen induziert wurden. Keinerlei Embryonen konnten allerdings bei Blattstückchen erzeugt werden, wobei dies bis heute für keine *Pelargonium*-Art beschrieben wurde. Die Anzahl der Embryonen an den Blütenstandstielen geschlossener Blüten und an Petiolen konnte durch eine Halbierung des

Explanatgewebes nicht gesteigert werden. Dies beobachtete auch KLEIN (2004), die vermutete, dass die große Fläche der Gewebeverletzung das Gewebe bzw. die Zellen stresst, sodass weniger Embryonen produziert werden.

Je nach Spezies ist die Induktion der somatischen Embryonen oder deren Regeneration zu voll entwickelten Pflanzen unterschiedlich problematisch. Dabei hängt die Induktion nicht nur vom Genotyp und vom passenden Stimulus, sondern auch vom Ausgangsgewebe bzw. dessen Zustand und Alter ab (MURTHY et al. 1999, KLEIN 2004, ALOMA et al. 2011). Keimlinge von Karottensamen zum Beispiel, die eine Länge von 3 cm überschritten hatten, bildeten keinerlei Embryonen mehr aus (NISHIWAKI et al. 2000). Es konnten bei diversen Pflanzen somatische Embryonen erzeugt werden, die sich nicht zu Jungpflanzen entwickelten und in den verschiedensten Phasen einen Wachstumsstopp zeigten. Zum Beispiel wurden bei *Araucaria angustifolia* Embryonen induziert, aber nur in geringer Zahl und mit schlechter Regenerationsfähigkeit (MAURER et al. 2010). Somit ist die vollständige Regeneration der Embryonen zu intakten Pflanzen bei *P. sidoides* ein äußerst positives Resultat. Des Weiteren entwickelten sich die genetisch identischen Pflanzen bis zu Blüte und Samenreife, wobei die Samen mit einer sehr guten Keimungsrate von 72% aufliefen. Dies ist bei vielen Pflanzen, die mittels somatischer Embryogenese vermehrt wurden, ein Problem, da entweder keine Blütenbildung erfolgt oder sterile Samen resultieren (persönliche Korrespondenz Prof. W. Blaschek). Selbst die Viabilität und Keimungsfähigkeit von wilder *P. sidoides*-Saat ist sehr niedrig (LEWU et al. 2006). In Anbetracht dessen, dass *Pelargonium*-Saat allgemein sehr teuer ist, hebt das die somatische Embryogenese als schnelle und kostengünstige Vermehrungstechnik hervor (MITHILA et al. 2001). Dabei ist der direkte Weg aufgrund seiner wenigen auftretenden somaklonalen Variationen von Vorteil gegenüber der indirekten Methode mit den im Kallusgewebe möglicherweise auftretenden Mutationen.

Trotz erfolgreicher Etablierung der somatischen Embryogenese für *P. sidoides* kann auch hier die Regenerationsfähigkeit noch verbessert werden, wobei die Stimulation der Wurzelbildung und damit die schnellere Übertragung der Jungpflanze ins Gewächshaus am meisten Potential bieten. Denn von den erzeugten Embryonen können im Durchschnitt die Hälfte zur Wurzelbildung in Röhrchen überführt werden, von diesen bilden dann unter 50% der Pflanzen Wurzeln und entwickeln sich zur intakten Pflanze.

Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Ansatz versucht die Regenerationsfähigkeit sowie das embryogenetische Potential zu steigern.

5.2 Einfluss von AGPs auf das embryogenetische Potential

Wie bereits SEIFERT et al. (2007) beschrieben, haben AGPs nicht nur einen Einfluss auf das Zellwachstum und die -entwicklung, sondern sind auch an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt. Des

Weiteren spielen sie eine gewisse Rolle in der somatischen Embryogenese, wobei bis heute nicht vollständig geklärt ist, welchen Einfluss AGPs auf das embryogenetische Potential von Geweben haben bzw. warum embryogenetische Zellen zum Teil andere AGPs aufweisen als nicht-embryogenetische Zellen (SAARE-SURMINSKI et al. 2000). Im Allgemeinen ist der Prozess der somatischen Embryogenese mit seinen Einflussfaktoren wie z.B. gewissen Extrazellulärproteinen oder anderen Signalmolekülen (VAN ENGELEN et al. 1992, EGERTSDOTTER et al. 1993, VAN HENGEL et al. 2001) nicht nur auf genetischer Ebene (LUCAU-DANILA et al. 2010), sondern auch im Hinblick auf morphologische Veränderungen des Gewebes noch nicht ausreichend untersucht (ŠAMAJ et al. 1999, FILONOVA et al. 2000, POON 2012, PORTILLO et al. 2012).

In dieser Arbeit wurde auf der einen Seite getestet, ob eine Gabe von AGPs die somatische Embryogenese stimuliert und auf der anderen Seite, ob eine Behandlung der Explanate mit β -Yariv-Reagenz zu einer Inhibition dieser führt. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Versuchsansätze getestet: Zum einen wurden Induktionsmedien mit TDZ mit 0,1 mg/l oder 1 mg/l AGPs, isoliert aus *Pelargonium sidoides*-Suspensionskulturen, versetzt und die Induktion und die Entwicklung der somatischen Embryonen mit einer normalen TDZ-Platte verglichen. Im zweiten Versuchsaufbau wurden alle Explanate auf TDZ-Induktionsmedien ausgelegt und entweder mit reiner MS-Lösung, mit AGP-Lösung (1 mg/ml) oder mit β -Glc-Yariv-Lösung (100 μ M) alle 2-3 Tage beträufelt. Nach dem Überführen der Explanate auf phytohormonfreies Medium wurden die Explanate weitere vier Wochen behandelt.

Eine Zugabe von AGPs ins Induktionsmedium von 1 mg/l konnte die Embryonenanzahl im Vergleich zur Standardplatte erhöhen, wobei in der Wiederholung des Versuches genau das Gegenteil beobachtet wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse kann mit Hilfe dieses Versuchs keine eindeutige Aussage über den Einfluss von AGPs auf die Embryonenanzahl getätigt werden. Zusätzlich war keine Verbesserung der Regenerationsfähigkeit in Abhängigkeit von AGPs zu beobachten, was u.a. an dem kurzen Zeitraum (eine Woche) der AGP-Behandlung liegen könnte. Aus diesem Grund wäre ein erneuter Versuchsansatz mit zusätzlichem AGP im phytohormonfreien Medium sicher interessant, wobei sich die Frage stellt, wie schnell das ins Nährmedium eingearbeitete AGP verbraucht wird.

Um diesem Problem aus dem Weg zu gehen, wurde im zweiten Versuchsansatz das AGP nicht ins Nährmedium eingearbeitet, sondern als Lösung direkt auf die Schnittflächen der Explanate gegeben. Dies scheint ein geeigneterer Versuchsaufbau zur Beeinflussung der Embryoneninduktion und -entwicklung zu sein, da zwischen den drei Vergleichsgruppen (Behandlung mit MS-Lösung, mit AGP-Lösung oder mit Yariv-Lösung) signifikante Unterschiede festgestellt werden konnten. 65% der mit AGP-Lösung behandelten Explanate produzierten Embryonen, im Gegensatz zu nur 14% und 15% bei Explanaten mit MS- und Yarivlösung. Überraschend war, dass bei Explanaten, die mit reiner MS-Lösung behandelt wurden, ebenfalls eine Hemmung der Embryoneninduktion beobachtet wurde. Vermutlich übt die hohe Salzkonzentration nach Verdunstung des Wassers aus der Nährlösung einen

negativen Effekt auf die Zellen der Explanate aus. Die geringe Anzahl von Explanaten, die Embryonen zeigten bzw. die sich dann auch weiter entwickelten, bei mit Yariv-Lösung behandelten Blütenstandstielen weist auf einen Einfluss der AGPs hin. Bereits in der Literatur wurde der Einfluss der AGPs in der somatischen Embryogenese beschrieben. Der Zusatz von AGPs in Zellkulturen von *Daucus carota* zeigte je nach AGP nicht nur stimulierende, sondern auch inhibierende Effekte auf die embryogenetischen Flüssigkulturen, wobei das Gewebe, aus dem die AGPs isoliert wurden (Karottensamen, Kulturmedium von Karotten-Suspensionskulturen, Tomatensamen), keine Rolle spielte (KREUGER et al. 1993 und 1995). Eine zusätzlich durchgeführte Behandlung der Explanate mit β -Yariv-Reagenz resultierte in einer Inhibition der somatische Embryogenese (KREUGER et al. 1993 und 1995). Embryonenkulturen der Norwegischen Fichte bildeten nach AGP-Zugabe in einem AGP-freiem Medium neue somatische Embryonen (EGERTSDOTTER et al. 1995). CHAPMAN et al. (2000) zeigten, dass die Induktion von somatischen Embryonen aus Wurzeln eines *Cichorium* Hybriden in Flüssigkultur durch die Zugabe von 250 μ M β -Glc-Yariv vollständig inhibiert wurde. Des Weiteren lokalisierten sie mit Hilfe monoklonaler Antikörper (JIM 13, JIM 16 und LM 2) AGPs in der Zellwand der äußeren Zellreihe eines globulären Embryos und vermuteten eine räumlich-zeitliche Expression der AGPs während der Differenzierung des Embryos vom globulären Stadium zur Torpedoform. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Embryonen der Banane und der Pfirsichpalme konnten diese ultrastrukturellen Veränderungen und die räumlich-zeitliche Expression von AGPs während der Induktion und Entwicklung von somatischen Embryonen bestätigt werden (PAN et al. 2011, STEINMACHER et al. 2012). Mit der Identifizierung von potentiellen, in die somatische Embryogenese involvierten Genen in embryogenetischen Zelllinien von *Cichorium* und der gleichzeitigen Entdeckung eines AGP-codierenden überexprimierten Gens in genau diesen Kulturen, konnte der Arbeitskreis auf genetischer Ebene einen deutlichen Hinweis auf die Rolle von AGPs im Rahmen der somatischen Embryogenese erbringen (LUCAU-DANILA et al. 2010). Diese biologische Aktivität scheint teilweise auch unabhängig von der Glykosylierung zu sein. Ein von Baumwollkalluskulturen produziertes AGP stimulierte die somatische Embryogenese auch wenn es teilweise oder vollständig deglykosyliert wurde (POON (2012)).

Auffällig ist, dass alle in der Literatur berichteten Versuche ausschließlich mit embryogenen Flüssigkulturen durchgeführt wurden, sodass die Untersuchung der Einflüsse an Explanaten auf festem Medium ganz neue Erkenntnisse liefert.

Unser Experiment zeigt eindrucksvoll, dass eine äußere AGP-Zugabe die Explanatanzahl, die Embryonen entwickeln, stark erhöht (65% anstatt 43-59% beim Standardmedium). Zusätzlich wurde die Regenerationsfähigkeit verbessert, wobei 72% der induzierten Embryonen in phytohormonfreie Röhren überführt werden konnten (auf normalen Standardplatten waren es nur 13-54%). Von diesen entwickelten bis zum Zeitpunkt des Beendens dieser Arbeit 54% Wurzeln und wurden ins Gewächshaus übertragen (bei der normalen Standardplatte waren es nur 14-30%). Der Zeitpunkt der Wurzelentwicklung bleibt auch weiterhin nicht klar definierbar, da einige Jungpflanzen bereits nach

zwei Wochen wurzelten, andere bis zu zwei Monate brauchten und die letzten nach zwei Monaten sehr gut entwickelt waren, aber bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Wurzelbildung zeigten. Die Behandlung der Explanate mit Yariv-Reagenz und die damit verbundene Komplexbildung der AGPs im Gewebe führt zu einer starken Inhibition der Embryoneninduktion im Vergleich zu unbehandelten Explanaten. Um statistisch noch umfassendere Aussagen machen zu können, sollten in Zukunft weitere, längerfristige Versuche diesbezüglich erfolgen.

Welche Faktoren das embryogenetische Potential beeinflussen, ist in der Literatur noch nicht genau untersucht. Mit dieser Arbeit konnte sowohl der Einfluss von externen AGPs, als auch von β -Glc-Yariv-Reagenz aufgezeigt werden. Interessant wäre an diesem Punkt sicherlich eine Untersuchung des Einflusses weiterer, verschiedener AGP-Konzentrationen auf die Embryoneninduktion und deren Regenerationsfähigkeit, da KREUGER et al. (1995) bei AGP-Konzentrationen von 10 mg/l eine maximale Stimulation an Karottenkulturen feststellten. Eine gleichzeitige Testung von AGPs verschiedener Quellen (verschiedene Spezies der Ein- und Zweikeimblättrigen und Zellkulturen) würde ebenfalls neue Erkenntnisse bringen.

Neben dem Einfluss von AGPs wurden außerdem andere interessante Stimuli gefunden, wobei deren Mechanismen der Beeinflussung ungeklärt sind. Acetylsalicylsäure, die als Zusatz in einem TDZ-Medium die Anzahl der Explanate, die Embryonen erzeugen, erhöhte und gleichzeitig die Embryonalentwicklung synchronisierte, sodass nach 35 Tagen 80% der Embryonen den gleichen Entwicklungsstand aufwiesen, zeigte ein deutliches Potential (HUTCHINSON et al. 1996). Des Weiteren konnte bei Ko-Kultivierung von Hypokotylen mit einem symbiotischen Bakterium die Induktionsfrequenz und die Qualität der somatischen Embryonen verbessert werden (MURTHY et al. 1999).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es gelungen ist, *Pelargonium sidoides* erfolgreich mit Hilfe der direkten somatischen Embryogenese zu vermehren. Diese Methode zeichnet sich besonders dadurch aus, dass in geringer Zeit eine große Anzahl erbgleicher Pflanzen erzeugt werden kann. Im Hinblick auf die kommerzielle Nutzung der Kapland-Pelargonie für die Herstellung von Phytopharmaka ist eine effektive und erfolgreiche Kultivierung dieser Pflanze wichtig. Dabei ist eine qualitativ gleichbleibende Vermehrung des optimalen Genotypes mit hohen Konzentrationen der gewünschten Stoffwechselprodukte, sowie besonderer Resistenz gegenüber potentiellen Krankheitserregern ein weiterer Pluspunkt. In Hinblick auf den sinkenden Bestand der wildwachsenden, sich nur langsam regenerierenden Pflanzen ist die erfolgreiche und kostengünstige Vermehrung von *Pelargonium sidoides* ein Gewinn für den Artenschutz und die industrielle Vermehrung der Pflanze (LEWU et al. 2007, COLLING et al. 2010), die bisher nur unzureichend durch Kultivierungen in Treibhäusern erreicht werden konnte (WHITE et al. 2008).

VII Zusammenfassung/Abstract

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig Arabinogalaktan-Proteine (AGPs) in der Familie der Geraniaceae - speziell von der Art *Pelargonium sidoides* - nachgewiesen, isoliert und charakterisiert. Dabei dienten getrocknete und frische Wurzeln sowie etablierte Zellkulturen, die ein optimales Wachstum in MS-Medium mit 1 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, 0,2 mg/l Kinetin und je 50 mg/l Ascorbin- und Citronensäure zeigten, als Ausgangsmaterial. Die Isolierung von reinem AGP aus dem Wurzelmaterial erwies sich als schwierig, da die Glykoproteine mit den in der *Pelargonium*-Wurzel vorkommenden Proanthocyanidinen und hydrolysierbaren Gerbstoffen sowie der Stärke vermutlich nicht-kovalente Interaktionen ausbildeten. Im Gegensatz dazu war die Isolierung von reinen AGPs sowohl aus Kalluskulturen als auch aus den Zellen und dem Kulturmedium von Suspensionskulturen erfolgreich. Im Rahmen ihrer Charakterisierung konnte der 10% große Proteinanteil mit einer für klassische AGPs annähernd typischen Aminosäurezusammensetzung mit hohen Mengen an Ala (12%), Ser (11%), Asx (11%) und Thr (8%), sowie relativ niedrigen Anteilen von Pro (3%) und Hyp (4%) detektiert werden. Den Hauptteil des AGPs macht das Polysaccharid aus, welches ein stark verzweigtes Arabinogalaktan (AG) des Typ-II darstellt. Dabei bildet eine β -1,3-glykosidisch verknüpfte Galaktosekette das Rückgrat des AGs, welches über 1,3,6-Galp-Verzweigungspunkte mit 1,6-Gal-Seitenketten verbunden ist, die ihrerseits 1,2- und 1,5-verknüpfte furanosidische Arabinosen tragen. Mit ca. 28% bilden die terminalen Arabinosen neben 6-7% terminaler Glukuronsäure und ca. 4% terminaler Galaktose die dominierenden Endgruppen des Moleküls. Neben diesen stark verzweigten Arabinogalaktaneinheiten, die unterschiedliche Größen aufweisen, lassen sich auch kleine Oligosaccharide aus Arabinose finden. Die Zucker sind vor allem über O-glykosidische Bindungen via Hyp und eventuell auch via Ser und Thr mit dem Proteinteil verknüpft und bilden ein 90 kDa großes AGP.

Neben der analytischen Charakterisierung wurden verschiedene biologische Aktivitäten der AGPs sowohl auf den menschlichen Organismus als auch auf die pflanzlichen Gewebe und ihre Entwicklung getestet. Im Gegensatz zu AGPs aus *Echinacea purpurea* konnte keine signifikante Inhibition oder Aktivierung des humanen Komplementsystems über die drei verschiedenen möglichen Wege (klassisch, alternativ und Lektin-abhängig) durch aufgereinigtes *Pelargonium*-Zellkultur-AGP ermittelt werden. Anhand von Suspensionskulturen wurde nachgewiesen, dass die Blockade von AGPs durch Zugabe von Yariv-Reagenz zum programmierten Zelltod (PCD) der behandelten Zellen führt. In speziell angefertigten Nasenkolben zeigten mit β -Glc-Yariv-Reagenz behandelte Zellkulturen von *P. sidoides* nicht nur eine konzentrations- und zeitabhängige Wachstumsinhibition, sondern auch die typischen morphologischen Veränderungen von Zellen, die dem PCD unterliegen, wie z.B. das Schrumpfen des Zytoplasmas. Des Weiteren konnte erfolgreich die beim PCD mittels Endonukleasen entstehenden DNA-Bruchstücke isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und als DNA-Ladder detektiert werden. Daneben wurde der Einfluss der AGPs auf die somatische Embryogenese bzw. in

der Induktion der Embryonen an dem erstmals für *P. sidoides* etablierten Vermehrungsverfahren nachgewiesen. Dabei konnten auf dem direkten Weg aus Blütenstandstielen und Petiolen mittels Kombination von Thidiazuron-haltigem und phytohormonfreien Kultivierungsphasen nicht nur Embryonen induziert, sondern auch deren Anzahl und Regenerationsfähigkeit durch Behandlung der Explanate mit AGP-Lösungen gesteigert werden. Somit konnten innerhalb kurzer Zeit eine große Anzahl neuer erbgleicher Jungpflanzen erzeugt werden, die blühfähig waren und Samen mit einer sehr guten Keimungsrate von 72% lieferten. Im Hinblick auf den sinkenden Bestand der wildwachsenden südafrikanischen Heilpflanze ist die erfolgreiche und kostengünstige Vermehrung mittels somatischer Embryogenese ein Gewinn für den Artenschutz und die industrielle Verwendung.

For the first time arabinogalactan-proteins (AGPs) could be identified and characterised within the plant family Geraniaceae - in this case in the species *Pelargonium sidoides*. Fresh and dried roots as well as established cell cultures were used as starting material. Cell cultures on MS-media with 1 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 0.2 mg/l kinetin as phytohormones and also ascorbic- and citric acid (each 50 mg/l) revealed an optimal growth. The isolation of pure AGPs from the roots of *Pelargonium sidoides* was difficult because of high amounts of starch and proanthocyanidins and hydrolysable tannins, which are potentially bound to AGPs by non-covalent interactions. Contrary to that, pure AGPs could be isolated from callus cultures as well as from cells and media of suspension cultures. The structural characterisation of AGPs revealed a protein part, which represents 10% of the AGP and contains high amounts of Ala (12%), Ser (11%), Asx (11%) and Thr (8%) as typical amino acids of classical AGPs, whereas the amounts of Hyp (4%) and Pro (3%) are relatively low. The polysaccharide part as the main component of the AGP is a highly branched arabinogalactan (AG) type II (structure see figure 97). The AG has a backbone of β -1,3-linked Galp residues (~14%) substituted at position 6 by galactosyl side chains containing 1,6-Galp residues (~9%) as well as 1,3,6-Galp branch points (~35%) which are linked to 1,2-Araf (~1%) and 1,5-Araf moieties (~3%). Terminally linked arabinose represents the dominant end group (~28%) besides terminal glucuronic acid (~7%) and small amounts of terminal galactose (~4%). Besides these highly branched AG moieties, which vary in size, small oligoarabinosides have been detected, too. Sugar part is linked O-glycosidically to Hyp residues and maybe also to Ser and Thr. The AGP represents a 90 kDa big, spherical glycoprotein.

Furthermore, AGPs were tested for biological activities on the human organism as well as within the plant tissue. In contrast to AGPs from *Echinacea purpurea*, AGPs from *Pelargonium sidoides* revealed neither inhibition nor activation of the human complement system in the three different pathways of activation (classical, alternative and lectin-dependent). Within plant suspension cultures, it was proven, that blocking of AGPs by Yariv reagent leads to programmed cell death of the cells. Besides inhibition of growth, treatment with β -Glc-Yariv reagent leads to typical morphological changes such as shrinkage of the cytoplasm within cells and fractionation of DNA, which was detected as typical DNA-ladder in gel electrophoresis. In this work, a method for reproduction of *Pelargonium sidoides* via somatic embryogenesis has been developed. After direct induction of somatic embryos with thidiazuron from blossom stems and petioles, the treatment of explants with an AGP-solution increased the amount of somatic embryos as well as the embryo to plantlet conversion. This new method allows an increased production of clones of one plant, including the abilities to flower and to produce seeds with high rates of germination (72%). With regard to the decreasing population of the wild growing plants of *Pelargonium sidoides* in South Africa, somatic embryogenesis represents a successful and cheap propagation method with great benefit for species protection and industrial usage.

VIII Literaturverzeichnis

- Lebertoxisches Umckaloabo? (2012): In: *Deutsche Apotheker Zeitung* 152 (14), S. 1766–1768.
- Stufe II für Umckaloabo (2012): In: *Deutsche Apotheker Zeitung* 152 (27), S. 3335.
- Acosta-Garcia, G.; Vielle-Calzada, J.-P. (2004): A Classical Arabinogalactan Protein Is Essential for the Initiation of Female Gametogenesis in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell* 16 (10), S. 2614–2628.
- Aizat, W.M.; Preuss, J.M.; Johnson, A.A.T.; Tester, M.A.; Schultz, C.J. (2011): Investigation of a His-rich arabinogalactan-protein for micronutrient biofortification of cereal grain. In: *Physiologia Plantarum* 143 (3), S. 271–286.
- Akiyama, Y.; Kato K. (1981): An extracellular arabinogalactan-protein from *Nicotiana tabacum*. In: *Phytochemistry* 20 (11), S. 2507–2510.
- Alban, S.; Classen, B.; Brunner, G.; Blaschek, W. (2002): Differentiation between the Complement Modulating Effects of an Arabinogalactan-Protein from *Echinacea purpurea* and Heparin. In: *Plante Medica* 68, S. 1118–1124.
- Aloma, E.; Haensch, K.-T.; Henning, F. (2011): Jahresbericht 2009/2010, Leibnizinstitut für Gemüse- und Zierpflanzenbau, Großbeeren/Erfurt. Aus Einer zu Millionen - über Embryonen. Teltow: Druckerei Grabow.
- Aspinall, G.O. (1973): Carbohydrate polymers of plant cell walls. In "Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides". New York: Academic Press.
- Bacic, A.; Churms, S.C.; Stephen, A.M.; Cohen, P.B.; Fincher, G.B. (1987): Fine structure of the arabinogalactan-protein from *Lolium multiflorum*. In: *Carbohydrate Research* 162 (1), S. 85–93.
- Baldwin, T. C.; McCann, M.C.; Roberts, K. (1993): A Novel Hydroxyproline-Deficient Arabinogalactan Protein Secreted by Suspension-Cultured Cells of *Daucus carota* (Purification and Partial Characterization). In: *Plant Physiology* 103 (1), S. 115–123.
- Bartsch, V. (2004): Das Taxol-Buch. 55 Tabellen. 2. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.
- Beck, E.; Hartig, K. (2009): Wie Hormone die Zellteilung der Pflanzen kontrollieren. Auxin und Cytokinin. In: *Biologie in unserer Zeit* 39 (4), S. 268–277.
- Becker, H.; Reichling, J. (1999): Grundlagen der pharmazeutischen Biologie. Mit 21 Tabellen. 4. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
- Beil, W.; Kilian, P. (2007): EPs 7630, an extract from *Pelargonium sidoides* roots inhibits adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. In: *Phytomedicine* 14 Suppl 6, S. 5–8.
- Biermann, D. (2010): Heilpflanzen Südafrikas - Zwischen Raubbau und Anbau. In: *Pharmazeutische Zeitung* 155 (24), S. 2280–2287.
- Bladt, S.; Wagner, H. (2007): From the Zulu medicine to the European phytomedicine Umckaloabo®. In: *Phytomedicine* 14, S. 2–4.
- Blakeney, A.B.; Harris, P.J.; Henry, R.J.; Stone, B.A. (1983): A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. In: *Carbohydrate Research* 113 (2), S. 291–299.
- Blaschek, W.; Löw, D. (Beitrag Pelargonium-Wurzel) (2009): Teedrogen und Phytopharmaka. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. 5. Aufl. Hg. v. Max Wichtl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
- Blumenkrantz, N.; Asboe-Hansen, G. (1973): New method for quantitative determination of uronic acids. In: *Analytical Biochemistry* 54 (2), S. 484–489.
- Bossy, A. (2008): Isolierung, Charakterisierung und Lokalisierung von Arabinogalaktan-Proteinen aus *Echinacea purpurea*. Dissertation. Christian-Albrechts-Universität, Kiel. Pharmazeutisches Institut.
- Bossy, A.; Blaschek, W.; Classen, B. (2009): Characterization and immunolocalization of arabinogalactan-proteins in roots of *Echinacea purpurea*. In: *Planta Medica* 75 (14), S. 1526–1533.

- Boudjeko, T.; Rihouey, C.; Ndoumou, D.O.; El Hadrami, I.; Lerouge, P.; Driouich, A. (2009): Characterisation of cell wall polysaccharides, arabinogalactans-proteins (AGPs) and phenolics of *Cola nitida*, *Cola acuminata* and *Garcinia kola* seeds. In: *Carbohydrate. Polymers* 78 (4), S. 820–827.
- Brecker, L.; Wicklein, D.; Moll, H.; Fuchs, E.C.; Becker, W.-M.; Petersen, A. (2005): Structural and immunological properties of arabinogalactan polysaccharides from pollen of timothy grass (*Phleum pratense* L.). In: *Carbohydrate Research* 340 (4), S. 657–663.
- Brendler, T.; van, Wyk B.-E. (2008): A historical, scientific and commercial perspective on the medicinal use of *Pelargonium sidoides* (Geraniaceae). In: *Journal of Ethnopharmacology* 119 (3), S. 420–433.
- Brown, J.T.; Charlwood, B.V. (1986): The control of callus formation and differentiation in scented pelargoniums. In: *Journal of Plant Physiology* 123 (5), S. 409–417.
- Cai, Y.; Gaffney, S.H.; Lilley, T.H.; Magnolato, D.; Martin, R.; Spencer, C.M.; Haslam, E. (1990): Polyphenol interactions. Part 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins. In: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* (12), S. 2197–2209.
- Caridi, A. (2007): New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity. In: *International Journal of Food Microbiology* 120 (1-2), S. 167–172.
- Chapman, A.; Blervacq, A.-S.; Vasseur, J.; Hilbert, J.-L. (2000): Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of β -glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. In: *Planta* 211 (3), S. 305–314.
- Chaves, I.; Regalado, A.P.; Chen, M.; Ricardo, C.P.; Showalter, A.M. (2002): Programmed cell death induced by (β -D-galactosyl)₃ Yariv reagent in *Nicotiana tabacum* BY-2 suspension-cultured cells. In: *Physiologia Plantarum* 116 (4), S. 548–553.
- Classen, B.; Blaschek, W. (2002): An arabinogalactan-protein from cell culture of *Malva sylvestris*. In: *Planta Medica* 68 (3), S. 232–236.
- Classen, B.; Csavas, M.; Borbas, A.; Dingermann, T.; Zuendorf, I. (2004): Monoclonal antibodies against an arabinogalactan-protein from pressed juice of *Echinacea purpurea*. In: *Planta Medica* 70 (9), S. 861–865.
- Classen, B.; Mau, S.-L.; Bacic, A. (2005): The arabinogalactan-proteins from pressed juice of *Echinacea purpurea* belong to the "hybrid" class of hydroxyproline-rich glycoproteins. In: *Planta Medica* 71 (1), S. 59–66.
- Classen, B.; Thude, S.; Blaschek, W.; Wack, M.; Bodinet, C. (2006): Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from *Baptisia* and *Echinacea*. In: *Phytomedicine* 13 (9-10), S. 688–694.
- Classen, B. (2007): Characterization of an arabinogalactan-protein from suspension culture of *Echinacea purpurea*. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88 (3), S. 267–275.
- Coimbra, S.; Costa, M.; Jones, B.; Mendes, M.A.; Pereira, L.G. (2009): Pollen grain development is compromised in *Arabidopsis* agp6 agp11 null mutants. In: *Journal of Experimental Botany* 60 (11), S. 3133–3142.
- Colling, J.; Groenewald, J.-H.; Makunga, N.P. (2010): Genetic alterations for increased coumarin production lead to metabolic changes in the medicinally important *Pelargonium sidoides* DC (Geraniaceae). In: *Metabolic Engineering* 12 (6), S. 561–572.
- Connors, K.A. (1997): The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. In: *Chemical Reviews* 97, S. 1325–1357.
- Conrad, A.; Hansmann, C.; Engels, I.; Daschner, F.D.; Frank, U. (2007): Extract of *Pelargonium sidoides* (EPs7630) improves phagocytosis, oxidative burst, and intracellular killing of human peripheral blood phagocytes in vitro. In: *Phytomedicine* 14 Suppl 6, S. 46–51.
- Conrad, A.; Jung, I.; Tioua, D.; Lallemand, C.; Carrapatoso, F.; Engels, I.; Daschner, F.D.; Frank, U. (2007): Extract of *Pelargonium sidoides* (EPs7630) inhibits the interactions of group A-streptococci and host epithelia in vitro. In: *Phytomedicine* 14 Suppl 6, S. 52–59.
- Conrad, A.; Kolodziej, H.; Schulz, V. (2007): *Pelargonium sidoides*-Extrakt (EPs[®]7630): Zulassung bestätigt Wirksamkeit und Verträglichkeit. In: *Wiener Medizinische Wochenschrift* 157 (13-14), S. 331–336.
- Conrad, A.; Frank, U. (2008): Extract of *Pelargonium sidoides* (EPs7630) displays anti-infective properties by enhanced phagocytosis and differential modulation of host-bacteria interactions. In: *Planta Medica* 74 (6), S. 682–685.

- Currier, N.L.; Lejtenyi, D.; Miller, S.C. (2003): Effect over time of in-vivo administration of the polysaccharide arabinogalactan on immune and hemopoietic cell lineages in murine spleen and bone marrow. In: *Phytomedicine* 10 (2-3), S. 145–153.
- Daschner, F.; Dorfmueller, A.; Engels, I.; Frank, U. (2004): Untersuchungen zum antibakteriellen Wirkmechanismus von EPs7630. In: *Phytopharmaka und Phytotherapie*, Abstract 15.
- Desikan, R.; Reynolds, A.; Hancock, J.T.; Neill, S.J. (1998): Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. In: *The Biochemical Journal* 330 (Pt 1), S. 115–120.
- Domozych, D.S.; Ciancia, M.; Fangel, J.U.; Mikkelsen, M.D.; Ulvskov, P.; Willats, W.G.T. (2012): The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. In: *Frontiers in Plant Science* 3 (Artikel 82).
- Dorfmueller, A.; Jung, I. Tioua, D.L.; Engels, I.; Daschner, F.D.; Frank, U. (2005): Indirekte antibakterielle Wirkmechanismen des *Pelargonium-sidoides*-Wurzelextraktes EPs7630: Hemmung der Interaktion von A-Streptokokken und Hep-2-Zellen. In: *Zeitschrift für Phytotherapie* 26, S. S6-S7
- Driouich, A.; Baskin, T.I. (2008): Intercourse between cell wall and cytoplasm exemplified by arabinogalactan proteins and cortical microtubules. In: *American Journal of Botany* 95 (12), S. 1491–1497.
- Eder, M.; Tenhaken, R.; Driouich, A.; Lütz-Meindl, U. (2008): Occurrence and characterization of arabinogalactan-like proteins and hemicelluloses in *Micrasterias* (Streptophyta). In: *Journal of Phycology* 44 (5), S. 1221–1234.
- Egertsdotter, U.; Mo, L.H.; Arnold, S. (1993): Extracellular proteins in embryogenic suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies*). In: *Physiologia Plantarum* 88 (2), S. 315–321.
- Egertsdotter, U.; Von, Arnold S. (1995): Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). In: *Physiologia Plantarum* 93 (2), S. 334–345.
- Ellis, M.; Egelund, J.; Schultz, C.J.; Bacic, A. (2010): Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? In: *Plant Physiology* 153 (2), S. 403–419.
- El-Nil, M.M.; Hildebrandt, A.C.; Evert, R.F. (1976): Effect of auxin-cytokinin interaction on organogenesis in haploid callus of *Pelargonium hortorum*. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant* 12 (8), S. 602–604.
- Endress, R. (1994): Plant cell biotechnology. With 234 tables. Berlin: Springer.
- Estevez, J. M.; Fernandez, P. V.; Kasulin, L.; Dupree, P.; Ciancia, M. (2008): Chemical and in situ characterization of macromolecular components of the cell walls from the green seaweed *Codium fragile*. In: *Glycobiology* 19 (3), S. 212–228.
- Filisetti-Cozzi, T.M.C.C.; Carpita, N.C. (1991): Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. In: *Analytical Biochemistry* 197 (1), S. 157–162.
- Filonova, L.H.; Bozhkov, P.V.; Von, Arnold S. (2000): Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. In: *Journal of Experimental Botany* 51 (343), S. 249–264.
- Fincher, G.B.; Stone, B.A.; Clarke, A.E. (1983): Arabinogalactan-Proteins: Structure, Biosynthesis, and Function. In: *Annual Review of Plant Physiology*. 34 (1), S. 47–70.
- Fitzpatrick, A.; Roberts, A.; Witherly, S. (2004): *Larch* arabinogalactan: A novel and multifunctional natural product. In: *Agro FOOD industry hi-tech*, S. 30–32.
- Freitas, V. de; Carvalho, E.; Mateus, N. (2003): Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. In: *Food Chemistry* 81 (4), S. 503–509.
- Furneaux, R.H.; Stevenson, T.T. (1990): The xylogalactan sulfate from *Chondria macrocarpa* (Ceramiales, Rhodophyta). In: *Hydrobiologia* 204-205, S. 615–620.
- Gao, M.; Showalter, A.M. (1999): Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. In: *The Plant Journal* 19 (3), S. 321–331.
- García-Heredia, J.M.; Hervás, M.; La Rosa, M.A.; Navarro, J.A. (2008): Acetylsalicylic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures. In: *Planta* 228 (1), S. 89–97.

- Gaspar, Y.M.; Nam, J.; Schultz, C.J.; Lee, L.Y.; Gilson, P.R.; Gelvin, S.B.; Bacic, A. (2004): Characterization of the *Arabidopsis* Lysine-Rich Arabinogalactan-Protein AtAGP17 Mutant (rat1) That Results in a Decreased Efficiency of *Agrobacterium* Transformation. In: *Plant Physiology* 135 (4), S. 2162–2171.
- Gensthaller B.M. (2009): Heilpflanzen - Artenvielfalt in Gefahr. In: *Pharmazeutische Zeitung* 154 (1-2), S. 20.
- Gleeson, P.A.; Clarke, A.E. (1979): Structural studies on the major component of *Gladiolus* style mucilage, an arabinogalactan-protein. In: *The Biochemical Journal* 181 (3), S. 607–621.
- Goedecke, T. (2005): Phytochemical and Pharmacological Research on *Pelargonium sidoides* DC. Dissertation. FU Berlin, Berlin.
- Goedecke, T.; Kaloga, M.; Kolodziej, H. (2005): A phenol glucoside, uncommon coumarins and flavonoids from *Pelargonium sidoides* DC. In: *Zeitschrift fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences* 60 (6), S. 677–682.
- Goellner, E.M.; Blaschek, W.; Classen, B. (2010): Structural investigations on arabinogalactan-protein from wheat, isolated with Yariv reagent. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (6), S. 3621–3626.
- Goellner, E.M.; Ichinose, H.; Kaneko, S.; Blaschek, W.; Classen, B. (2011): An arabinogalactan-protein from whole grain of *Avena sativa* L. belongs to the wattle-blossom type of arabinogalactan-proteins. In: *Journal of Cereal Science* 53 (2), S. 244–249.
- Goellner, E.M.; Utermoehlen, J.; Kramer, R.; Classen, B. (2011): Structure of arabinogalactan from *Larix laricina* and its reactivity with antibodies directed against type-II-arabinogalactans. In: *Carbohydrate Polymers* 86 (4), S. 1739–1744.
- Goellner, E.M.; Gramann, J.C.; Classen, B. (2012): Antibodies against Yariv's reagent for immunolocalization of arabinogalactan-proteins in aerial parts of *Echinacea purpurea*. In: *Planta Medica* submitted.
- Goodrum, L.J.; Patel, A.; Leykam, J.F.; Kieliszewski, M.J. (2000): Gum arabic glycoprotein contains glycomodules of both extensin and arabinogalactan-glycoproteins. In: *Phytochemistry* 54 (1), S. 99–106.
- Greenberg, J.T. (1996): Programmed cell death: a way of life for plants. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 93 (22), S. 12094–12097.
- Groover, A.; DeWitt, N.; Heidel, A.; Jones, A. (1997): Programmed cell death of plant tracheary elements differentiating in vitro. In: *Protoplasma* 196 (3-4), S. 197–211.
- Guan, Y.; Nothnagel, E.A. (2004): Binding of Arabinogalactan Proteins by Yariv Phenylglycoside Triggers Wound-Like Responses in *Arabidopsis* Cell Cultures. In: *Plant Physiology* 135 (3), S. 1346–1366.
- Hach, C.C.; Brayton, S.V.; Kopelove, A.B. (1985): A powerful Kjeldahl nitrogen method using peroxymonosulfuric acid. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33 (6), S. 1117–1123.
- Haensch, K.-T. (2004): Morpho-histological study of somatic embryo-like structures in hypocotyl cultures of *Pelargonium x hortorum* Bailey. In: *Plant Cell Reports* 22 (6), S. 376–381.
- Haensch, K.-T. (2004): Thidiazuron-induced morphogenetic response in petiole cultures of *Pelargonium x hortorum* and *Pelargonium x domesticum* and its histological analysis. In: *Plant Cell Reports* 23 (4), S. 211–217.
- Haensch, K.-T. (2007): Influence of 2,4-D and BAP on callus growth and the subsequent regeneration of somatic embryos in long-term cultures of *Pelargonium x domesticum* cv. *Madame Layal*. In: *Electronic Journal of Biotechnology* 10 (1)
- Hagerman, A.E.; Butler, L.G. (1981): The Specificity of Proanthocyanidin-Protein Interactions. In: *The Journal of Biological Chemistry* 256 (9), S. 4444–4497.
- Hansmann, C. (2005): Einfluss von Umckaloabo auf die Funktion humaner Phagozyten. Dissertation. Universität Freiburg, Freiburg/Breisgau.
- Harris, P.J.; Henry, R.J.; Blakeney, A.B.; Stone, B.A. (1984): An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. In: *Carbohydrate Research* 127 (1), S. 59–73.
- Harvey, W.H.; Sonder, O.W. (1859): Flora Capensis: Being a Systematic Description of the Plants of Cape Colony, Caffraria and Port Natal (and neighbouring territories). In: *Hodges Smith and Co, Duplin* (1), S. 300–301.
- Herbst, B.; Classen, B.; Ulmer, A.; Blaschek, W. (2007): Structural and immunological comparison of arabinogalactan-proteins from *Viscum album* L. berries and herb. In: *Planta Medica* 73 (09).

- Hillestad, A.; Wold, J.K.; Engen, T. (1977): Water-soluble glycoproteins from *Cannabis sativa* (Thailand). In: *Phytochemistry* 16 (12), S. 1953–1956.
- Houot, V.; Etienne, P.; Petitot, A.-S.; Barbier, S.; Blein, J.-P.; Suty, L. (2001): Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. In: *Journal of Experimental Botany* 52 (361), S. 1721–1730.
- Hug, H. (2000): Apoptose: die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz. In: *Biologie in unserer Zeit* 30 (3), S. 128–135.
- Hutchings, A. (1996): Zulu medicinal plants. Pietermaritzburg: Natal University Press.
- Hutchinson, M.J.; Krishnaraj S.; Saxena, P.K. (1996): Morphological and Physiological Changes during Thidiazuron-Induced Somatic Embryogenesis in Geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) Hypocotyl Cultures. In: *International Journal of Plant Sciences* 157 (4), S. 440–446.
- Hutchinson, M.J.; Saxena, P.K. (1996): Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) tissue cultures. In: *Plant Cell Reports* 15 (7), S. 512–515.
- Ichinose, H.; Kotake, T.; Tsumuraya, Y.; Kaneko, S. (2008): Arabinogalactan-proteins degrading enzymes. In: *Journal of Applied Glycoscience* 55 (2), S. 149–155.
- Ichinose, H.; Yoshida, M.; Fujimoto, Z.; Kaneko, S. (2008): Characterization of a modular enzyme of exo-1,5- α -l-arabinofuranosidase and arabinan binding module from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 (3), S. 399–408.
- Ikeda-Iwai, M.; Umehara, M.; Satoh, S.; Kamada, H. (2003): Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Journal* 34 (1), S. 107–114.
- Immerzeel, P.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J.; de Vries Sacco C. (2004): Different arabinogalactan proteins are present in carrot (*Daucus carota*) cell culture medium and in seeds. In: *Physiologia Plantarum* 122 (2), S. 181–189.
- Ishizu, T.; Kintsu, K.; Yamamoto, H. (1999): NMR Study of the Solution Structures of the Inclusion Complexes of β -Cyclodextrin with (+)-Catechin and (–)-Epicatechin. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 103 (42), S. 8992–8997.
- Janecki, A.J.; Kiderlen, A.F.; Kolodziej, H. (2009): In vitro evaluation of EPs[®]7630 for its ability to inhibit neuraminidase using sodium (4-methyl-umbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic acid) as substrate. In: *Planta Medica* 75 (09), S. 989.
- Janecki, A.; Conrad, A.; Engels, I.; Frank, U.; Kolodziej, H. (2011): Evaluation of an aqueous-ethanolic extract from *Pelargonium sidoides* (EPs[®]7630) for its activity against group A-streptococci adhesion to human HEp-2 epithelial cells. In: *Journal of Ethnopharmacology* 133 (1), S. 147–152.
- Jang, J.-H.; Moon, K.-D. (2011): Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. In: *Food Chemistry* 124 (2), S. 444–449.
- Jermyn, M.A.; Yeow, Y.M.; Woods, E.F. (1975): A Class of Lectins Present in the Tissues of Seed Plants. In: *Australian Journal of Plant Physiology* 2 (4), S. 501.
- Jullian, C.; Miranda, S.; Zapata-Torres, G.; Mendizábal, F.; Olea-Azar, C. (2007): Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+) catechin by NMR and molecular modeling. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (9), S. 3217–3224.
- Kavi Kishor, P.B. (1999): Plant Tissue Culture and Biotechnology: Emerging Trends: Universities Press (India).
- Kayser, O. (1997): Phenolische Inhaltsstoffe von *Pelargonium sidoides* DC. und Untersuchungen zur Wirksamkeit der Umcka-Droge (*Pelargonium sidoides* DC. und *Pelargonium reniforme* Curt.). Dissertation. Freie Universität, Berlin.
- Kayser, O.; Kolodziej, H. (1997): Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*. In: *Planta Medica* 63 (6), S. 508–510.
- Kayser, O.; Lattè, K.; Kolodziej, H.; Hammerschmidt, F.-J. (1998): Composition of the essential oils of *Pelargonium sidoides* DC. and *Pelargonium reniforme* Curt. In: *Flavour and Fragrance Journal* 13 (3), S. 209–212.

- Kayser, O.; Kolodziej, H.; Kiderlen, A.F. (2001): Immunomodulatory principles of *Pelargonium sidoides*. In: *Phytotherapy Research* 15 (2), S. 122–126.
- Kelly, G.S. (1999): Larch arabinogalactan: clinical relevance of a novel immune-enhancing polysaccharide. In: *Alternative Medicine Review* 4, S. 96–103.
- Kieliszewski M.J.; Kamyab A.; Leykam J.F.; Lamport, D.T. (1992): A Histidine-Rich Extensin from *Zea mays* is an Arabinogalactan Protein. In: *Plant Physiology* 99 (2), S. 538–547.
- Kieliszewski, M.J.; Lamport, D.T.A. (1994): Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. In: *The Plant Journal* 5 (2), S. 157–172.
- Kieliszewski, M.J.; Shpak, E. (2001): Synthetic genes for the elucidation of glycosylation codes for arabinogalactan-proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins. In: *Cellular and Molecular Life Science* 58, S. 1386–1398.
- Kiyohara, H.; Uchida, T.; Takakiwa, M.; Matsuzaki, T.; Hada, N.; Takeda, T. et al. (2010): Different contributions of side-chains in β -d-(1→3,6)-galactans on intestinal Peyer's patch-immunomodulation by polysaccharides from *Astragalus mongholicus* Bunge. In: *Phytochemistry* 71 (2-3), S. 280–293.
- Klein, D. (2004): Somatische Embryogenese als modernes, biotechnologisches Vermehrungsverfahren. Dissertation. Technische Universität München, München. Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt Lehrstuhl für Zierpflanzenbau.
- Knuth, R. (1912): Geraniaceae. In: Engler A, editor. Das Pflanzenreich. IV. Leipzig: Engelmann.
- Koch, E.; Biber, A. (2007): Treatment of rats with the *Pelargonium sidoides* extract EPs[®]7630 has no effect on blood coagulation parameters or on the pharmacokinetics of warfarin. In: *Phytomedicine* 14, S. 40–45.
- Koch, E.; Wohn, C. (2007): *Pelargonium sidoides* root extract EPs[®]7630 stimulates release of anti-microbial peptides from neutrophil granulocytes in human whole blood. In: *Planta Medica* 73, S. 846.
- Kokkinou, A.; Makedonopoulos, S.; Mentzafos, D. (2000): The crystal structure of the 1:1 complex of β -cyclodextrin with trans-cinnamic acid. In: *Carbohydrate Research* 328 (2), S. 135–140.
- Kolodziej, H.; Lis-Balchin, M. (editor) (2002): Geranium and Pelargonium. *Pelargonium reniforme* and *Pelargonium sidoides*: their botany, chemistry and medicinal use. London: Taylor & Francis.
- Kolodziej, H.; Kayser, O.; Radtke, O.A.; Kiderlen, A.F.; Koch, E. (2003): Pharmacological profile of extracts of *Pelargonium sidoides* and their constituents. In: *Phytomedicine* 10 (Suppl. 4), S. 18–24.
- Kolodziej, H.; Burmeister, A.; Trun, W.; Radtke, O.A.; Kiderlen, A.F.; Ito, H.; Hatano, T.; Yoshida, T.; Foo, L.Y. (2005): Tannins and related compounds induce nitric oxide synthase and cytokines gene expressions in *Leishmania major*-infected macrophage-like RAW 264.7 cells. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13 (23), S. 6470–6476.
- Kolodziej, H.; Kiderlen, A.F. (2007): In vitro evaluation of antibacterial and immunomodulatory activities of *Pelargonium reniforme*, *Pelargonium sidoides* and the related herbal drug preparation EPs7630. In: *Phytomedicine* 14 (Suppl. 6), S. 18–26.
- Kolodziej, H. (2007): Fascinating metabolic pools of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*, traditional and phytomedicinal sources of the herbal medicine Umckaloabo. In: *Phytomedicine* 14 (Suppl. 6), S. 9–17.
- Kolodziej, H. (2008): Aqueous ethanolic extract of the roots of *Pelargonium sidoides*-new scientific evidence for an old anti-infective phytopharmaceutical. In: *Planta Medica* 74 (6), S. 661–666.
- Kolodziej, H. (2011): Antimicrobial, Antiviral and Immunomodulatory Activity Studies of *Pelargonium sidoides* (EPs[®]7630) in the Context of Health Promotion. In: *Pharmaceuticals* 4 (10), S. 1295–1314.
- Komalavilas, P.; Zhu, J.K.; Nothnagel, E.A. (1991): Arabinogalactan-proteins from the suspension culture medium and plasma membrane of rose cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 266 (24), S. 15956–15965.
- Konishi, T.; Kotake, T.; Soraya, D.; Matsuoka, K.; Koyama, T.; Kaneko, S.; Igarasji, K.; Samejima, M.; Tsumuraya, Y. (2008): Properties of family 79 β -glucuronidases that hydrolyze β -glucuronosyl and 4-O-methyl- β -glucuronosyl residues of arabinogalactan-protein. In: *Carbohydrate Research* 343 (7), S. 1191–1201.
- Kreuger, M.; van, Holst G.-J. (1993): Arabinogalactan-protein are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L.. In: *Planta* 189 (2), S. 143–248.

- Kreuger, M.; van, Holst G.-J. (1995): Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. In: *Planta* 197 (1), S. 135–141.
- Kríz Z, Koca J. Imberty A. Charlot A. Auzély-Velty R. (2003): Investigation of the complexation of (+)-catechin by beta-cyclodextrin by a combination of NMR, microcalorimetry and molecular modeling techniques. In: *Organic & Biomolecular Chemistry* 1 (14), S. 2590–2595.
- Lamkanfi, M.; Declercq, W.; Kalai, M.; Saelens, X.; Vandennebeele, P. (2002): Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. In: *Cell Death & Differentiation* 9 (4), S. 358–361.
- Lamport, D.T.A.; Kieliszewski, M.J.; Showalter, A.M. (2006): Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function. In: *New Phytologist* 169 (3), S. 479–492.
- Langan, K.J.; Nothnagel, E.A. (1997): Cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to cell proliferation and viability. In: *Protoplasma* 196 (1-2), S. 87–98.
- Le Bourvellec, C.; Guyot, S.; Renard, C.M.G.C. (2004): Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material Part I. Effect of some environmental parameters. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1672 (3), S. 192–202.
- Le Bourvellec, C.; Bouchet, B.; Renard, C.M.G.C. (2005): Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1725 (1), S. 10–18.
- Le Bourvellec, C.; Renard, C.M.G.C. (2005): Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part II: Quantification and impact of cell wall drying. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1725 (1), S. 1–9.
- Le Bourvellec, C.; Renard, C.M.G.C. (2012): Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52 (3), S. 213–248.
- Lee, C.B.; Swatek, K.N.; McClure, B. (2008): Pollen Proteins Bind to the C-terminal Domain of *Nicotiana glauca* Pistil Arabinogalactan Proteins. In: *Journal of Biological Chemistry* 283 (40), S. 26965–26973.
- Lee, C.-J.; Huo, Y.-S.; Lee, L.H.; Lu, C.-H.; Koizumi, K. (2004): Immunomodulating fungal and plant polysaccharides; Biochemistry, immunologic activity and clinical application. In: *Journal of Traditional Medicines*. 21, S. 67–80.
- Lee, K.J.D.; Sakata, Y.; Mau, S.-L.; Pettolinoc, F.; Bacic, A.; Quatranob, R.S.; Knighta, C.D.; Knox, J.P. (2005): Arabinogalactan Proteins Are Required for Apical Cell Extension in the Moss *Physcomitrella patens*. In: *The Plant Cell* 17, S. 3051–3065.
- Lerouge, P.; Cabanes-Macheteau, M.; Rayon, C.; Fischette-Lainé, A.-C.; Gomord, V.; Faye, L. (1998): N-Glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. In: *Plant Molecular Biology* 38 (1/2), S. 31–48.
- Leung, M.Y.K.; Liu, C.; Koon, J.C.M.; Fung, K.P. (2006): Polysaccharide biological response modifiers. In: *Immunology Letters* 105 (2), S. 101–114.
- Lewu F.B.; Grierson D.S.; Afolayan A.J. (2006): Clonal propagation of *Pelargonium sidoides*: A threatened medicinal plant of South Africa. In: *African Journal of Biotechnology* 5 (2), S. 123–125.
- Lewu, F.B.; Adebola, P.O.; Afolayan, A.J. (2007): Commercial harvesting of *Pelargonium sidoides* in the Eastern Cape, South Africa: Striking a balance between resource conservation and rural livelihoods. In: *Journal of Arid Environments* 70 (2), S. 380–388.
- Lewu, F.B.; Grierson, D.S. Afolayan, A.J. (2007): Micropropagation of *Pelargonium sidoides*. In: *Catrina* 2 (1), S. 77–81.
- Li, S.X., Showalter, A.M. (1996): Cloning and developmental/stress-regulated expression of a gene encoding a tomato arabinogalactan protein. In: *Plant Molecular Biology* 32 (4), S. 641–652.
- Lindl, T.; Gestraunthaler, G. (2008): Zell- und Gewebekultur. Von den Grundlagen zur Laborbank. 6. Aufl. Heidelberg, Akad. Verlag: Spektrum.
- Liu, C.; Mehdy, M.C. (2007): A Nonclassical Arabinogalactan Protein Gene Highly Expressed in Vascular Tissues, AGP31, Is Transcriptionally Repressed by Methyl Jasmonic Acid in Arabidopsis. In: *Plant Physiology* 145 (3), S. 863–874.

- Liu, W. Z.; Zhou, Y. F.; Wang, X.; Jiao, Z. J. (2010): Programmed cell death during pigment gland formation in *Gossypium hirsutum* leaves. In: *Plant Biology* 12 (6), S. 895–902.
- Loew, D.; Koch, E. (2008): Cumarine - Differenzierte Risikobetrachtung mit dem Beispiel eines pflanzlichen Arzneimittels. In: *Zeitschrift für Phytotherapie* 29, S. 28–36.
- Lopes de Morais Carrapatoso, F.M. (2005): Adhäsionshemmung von bakteriellen Erregern oberer Atemwegsinfekte an buccalen Epithelzellen durch das Phytotherapeutikum Umckaloabo®. Dissertation. Universität Freiburg, Freiburg/Breisgau.
- Lucau-Danila, A.; Laborde, L.; Legrand, S.; Huot, L.; Hot, D.; Lemoine, Y.; Hilbert, J.-L.; Hawkins, S.; Quillet, M.-C.; Hendriks, T.; Blervacq, A.-S. (2010): Identification of novel genes potentially involved in somatic embryogenesis in chicory (*Cichorium intybus* L.). In: *BMC Plant Biology* 10, S. 122.
- Luck, G.; Liao, H.; Murray, N.J.; Grimmer, H.R.; Warminski, E.E.; Williamson, M.P. et al. (1994): Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. In: *Phytochemistry* 37 (2), S. 357–371.
- Luna, L.A. Jr.; Bachi, A.L.L.; Novaes, e. Brito R.R.; Eid, R.G.; Suguri, V.M.; Oliveira, P.W.; Gregorio, L.C.; Vaisber, M. (2011): Immune responses induced by *Pelargonium sidoides* extract in serum and nasal mucosa of athletes after exhaustive exercise: Modulation of secretory IgA, IL-6 and IL-15. In: *Phytomedicine* 18 (4), S. 303–308.
- Marsolais, A.A.; Wilson, D.P.M.; Tsujita, M.J.; Senaratna, T. (1991): Somatic embryogenesis and artificial seed production in Zonal (*Pelargonium* × *hortorum*) and Regal (*Pelargonium* × *domesticum*) geranium. In: *Canadian Journal of Botany* 69 (6), S. 1188–1193.
- Mativandlela, S.P.N.; Lall, N.; Meyer, J.J.M. (2006): Antibacterial, antifungal and antitubercular activity of (the roots of) *Pelargonium reniforme* (CURT) and *Pelargonium sidoides* (DC) (Geraniaceae) root extracts. In: *South African Journal of Botany* 72, S. 232–237.
- Mativandlela, S.P.N.; Meyer, J.J.M.; Hussein, A.A.; Lall, N. (2007): Antitubercular Activity of Compounds Isolated from *Pelargonium sidoides*. In: *Pharmaceutical Biology* 45 (8), S. 645–650.
- Mau, S.-L.; Chen, C.-G.; Pu, Z.-Y.; Moritz, R.L.; Simpson, R.J.; Bacic, A.; Clarke, A.E. (1995): Molecular cloning of cDNAs encoding the protein backbones of arabinogalactan-proteins from the filtrate of suspension-cultured cells of *Pyrus communis* and *Nicotiana glauca*. In: *The Plant Journal* 8 (2), S. 269–281.
- Maurer, J.B.B.; Bacic, A.; Pereira-Netto, A.B.; Donatti, L.; Zawadzki-Baggio, S.F.; Pettolino, F.A. (2010): Arabinogalactan-proteins from cell suspension cultures of *Araucaria angustifolia*. In: *Phytochemistry* 71 (11-12), S. 1400–1409.
- Maurer, J.B.B.; Pereira-Netto, A.B.; Pettolino, F.A.; Gaspar, Y.M.; Bacic, A. (2010): Effects of Yariv dyes, arabinogalactan-protein binding reagents, on the growth and viability of Brazilian pine suspension culture cells. In: *Trees* 24 (2), S. 391–398.
- Mccabe, P.F.; Levine, A.; Meijer, P.-J.; Tapon, N.A.; Pennell, R.I. (1997): A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. In: *The Plant Journal* 12 (2), S. 267–280.
- McRae, J.M.; Kennedy, J.A.: Wine and Grape Tannin Interactions with Salivary Proteins and their Impact on Astringency: A Review of Current Research. In: *Molecules* 16, S. 2348–2364.
- Michaelis, M.; Doerr, H.W.; Cinatl, J. (2011): Investigation of the influence of EPs®7630, a herbal drug preparation from *Pelargonium sidoides*, on replication of a broad panel of respiratory viruses. In: *Phytomedicine* 18 (5), S. 384–386.
- Miller, D.; Lis-Balchin M. (editor) (2002): Geranium and pelargonium. The genera *geranium* and *pelargonium* - The taxonomy of *Pelargonium* species and cultivars, their origins and growth in the wild. London ;, New York: Taylor & Francis.
- Mithila, J.; Murch, S.J.; KrishnaRaj, S.; Saxena, P.K. (2001): Recent advances in *Pelargonium* in vitro regeneration systems. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67 (1), S. 1–9.
- Mollard, A.; Joseleau, J.-P. (1994): *Acacia senegal* cells cultured in suspension secrete a hydroxyproline-deficient arabinogalactan-protein. In: *Plant Physiology and Biochemistry* 32 (5), S. 703–709.
- Moller, I.; Marcus, S.E.; Haeger, A.; Verhertbruggen, Y.; Verhoef, R.; Schols, H.; Ulvskov, P.; Mikkelsen, J.D.; Knox, J.P.; Willats, W. (2008): High-throughput screening of monoclonal antibodies against plant cell wall glycans by hierarchical clustering of their carbohydrate microarray binding profiles. In: *Glycoconjugate Journal* 25 (1), S. 37–48.

- Momsen, B. (1997): Beeinflussung des Alkaloidgehaltes und des Alkaloidspektrums in Zellkulturen von *Nicotiana spec.* durch Phytohormone und den Elicitor Chitosan. Dissertation. Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- Motose, H.; Sugiyama, M.; Fukuda, H. (2001): An arabinogalactan protein(s) is a key component of a fraction that mediates local intercellular communication involved in tracheary element differentiation of zinnia mesophyll cells. In: *Plant & Cell Physiology* 42 (2), S. 129–137.
- Motose, H.; Sugiyama, M.; Fukuda, H. (2004): A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. In: *Nature* 429 (6994), S. 873–878.
- Moyo, M.; Finnie, J.F.; Staden, J. (2012): Topolins in *Pelargonium sidoides* micropropagation: do the new brooms really sweep cleaner? In: *Plant Cell, Tiss Organ Cult* 110 (3), S. 319–327.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962): Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: *Physiologia Plantarum* 15, S. 473–97.
- Murthy, B.N.S.; Vettakkorumakankav, N.N.; KrishnaRaj, S.; Odumeru, J.; Saxena, P.K. (1999): Characterization of somatic embryogenesis in *Pelargonium* × *hortorum* mediated by a bacterium. In: *Plant Cell Reports* 18 (7-8), S. 607–613.
- Nantz, M.P.; Parker, A.R.; McGill, C.; Percival, S.S. (2001): Evaluation on arabinogalactan`s effect on human immunity. In: *The FASEB Journal* 15 (4), S. A633.
- Neugebauer, P.; Mickenhagen, A.; Siefer, O.; Walger, M. (2005): A new approach to pharmacological effects on ciliary beat frequency in cell cultures-exemplary measurements under *Pelargonium sidoides* extract (EPs7630). In: *Phytomedicine* 12 (1-2), S. 46–51.
- Newsom, S.W.B. (2002): Stenevs`cure: a secret remey. In: *Journal of the Royal Society of Medicine* 95, S. 463–467.
- Newton, D. (2008): Development of a nondetriment finding process for *Pelargonium sidoides* in Lesotho. International Expert Workshop on CITES Non-Detriment Findings. Cancun, Mexiko, 2008.
- Nishiwaki, M.; Fujino, K.; Koda, Y.; Masuda, K.; Kikuta, Y. (2000): Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. In: *Planta* 211 (5), S. 756–759.
- Nosalova, G.; Prisenznakova, L.; Paulovicova, E.; Capek, P.; Matulova, M.; Navarini, L.; Liverani, F.S. (2011): Antitussive and immunomodulating activities of instant coffee arabinogalactan-protein. In: *International Journal of Biological Macromolucules* 49 (4), S. 493–497.
- Nothnagel, E.A. (1997): Proteoglycans and related components in plant cells. In: *International Review of Cytology* 174, S. 195–291.
- Oka, T.; Saito, F.; Shimma, Y.-I.; Yoko-o, T.; Nomura, Y.; Matsuoka, K.; Jigami, Y. (2010): Characterization of Endoplasmic Reticulum-Localized UDP-D-Galactose: Hydroxyproline O-Galactosyltransferase Using Synthetic Peptide Substrates in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiology* 152 (1), S. 332–340.
- Oxley, D.; Bacic, A. (1999): Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 96 (25), S. 14246–14251.
- Ozawa, T.; Lilley, T.H.; Haslam, E. (1987): Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. In: *Phytochemistry* 26 (11), S. 2937–2942.
- Pan, X.; Yang, X.; Lin, G.; Zou, R.; Chen, H.; Šamaj, J.; Xu, C. (2011): Ultrastructural changes and the distribution of arabinogalactan proteins during somatic embryogenesis of banana (*Musa spp.* AAA cv. ‘Yueyoukang 1’). In: *Physiologia Plantarum* 142 (4), S. 372–389.
- Park, M.H. (2003): CsAGP1, a Gibberellin-Responsive Gene from Cucumber Hypocotyls, Encodes a Classical Arabinogalactan Protein and is Involved in Stem Elongation. In: *Plant Physiology* 131 (3), S. 1450–1459.
- Pattathil, S.; Avci, U.; Baldwin, D.; Swennes, A.G.; McGill, J.A.; Popper, Z.; Bootten, T.; Albert, A.; Davis, R.H.; Chennareddy, C.; Dong, R.; O`Shea, B.; Rossi, R.; Leoff, C.; Freshur, G.; Narra, R.; O`Neill, M.; York, W.S.; Hahn, M.G. (2010): A Comprehensive Toolkit of Plant Cell Wall Glycan-Directed Monoclonal Antibodies. In: *Plant Physiology* 153 (2), S. 514–525.

- Paulsen, B.S. (2002): Biologically active polysaccharides as possible lead compounds. In: *Phytochemistry Reviews* 1 (3), S. 379–387.
- Peters, M.; Kauth, M.; Scherner, O.; Gehlhar, K.; Steffen, I.; Wentker, P.; Mutius, E. von; Holst, O.; Bufe, A. (2010): Arabinogalactan isolated from cowshed dust extract protects mice from allergic airway inflammation and sensitization. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126 (3), S. 648–656.
- Pizzocaro, F.; Torreggiani, D.; Gilardi, G. (1993): Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. In: *Journal of Food Processing and Preservation* 17 (1), S. 21–30.
- Ponder, G.R.; Richards, G.N. (1997): Arabinogalactan from Western Larch, Part II; A Reversible Order-Disorder Transition. In: *Journal of Carbohydrate Chemistry* 16 (2), S. 195–211.
- Poon, S.; Heath, R.L.; Clarke, A.E. (2012): A Chimeric Arabinogalactan Protein Promotes Somatic Embryogenesis in Cotton Cell Culture. In: *Plant Physiology* 160 (2), S. 684–695.
- Portillo, L.; Olmedilla, A.; Santacruz-Ruvalcaba, F. (2012): Cellular and molecular changes associated with somatic embryogenesis induction in *Agave tequilana*. In: *Protoplasma* 249 (4), S. 1101–1107
- Prigent, S.V.E.; Gruppen, H.; Visser, A.J.W.G.; van Koningsveld, G.A.; Jong, G.A.H. de; Voragen, A.G.J. (2003): Effects of Non-covalent Interactions with 5- *O* -Caffeoylquinic Acid (Chlorogenic Acid) on the Heat Denaturation and Solubility of Globular Proteins. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (17), S. 5088–5095.
- Prigent, S.V.E.; Voragen, A.G.J.; Visser, A.J.W.G.; van Koningsveld, G.A.; Gruppen, H. (2007): Covalent interactions between proteins and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid). In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87 (13), S. 2502–2510.
- Qi, W.; Fong, C.; Lamport, D.T.A. (1991): Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope. A new model based on *O*-galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site. In: *Plant Physiology* 96 (3), S. 848–855.
- Ramberg, J.E.; Nelson, E.D.; Sinnott, R.A. (2010): Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. In: *Nutrition Journal* 9 (54), S. 1–22
- Rao, P.V.L (1994): In vitro plant regeneration of scented-leaved geranium *Pelargonium graveolens*. In: *Plant Science* 98 (2), S. 193–198.
- Reinhard, E.; Dingermann, T. (2009): Pharmazeutische Biologie. 7. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
- Renard, C.M.G.C.; Baron, A.; Guyot, S.; Drilleau, J.-F. (2001): Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 29 (2), S. 115–125.
- Richter, G. (2003): Praktische Biochemie. Grundlagen und Techniken ; 19 Tabellen. Stuttgart: Thieme.
- Riou, V.; Vernhet, A.; Doco, T.; Moutounet, M. (2002): Aggregation of grape seed tannins in model wine-effect of wine polysaccharides. In: *Food Hydrocolloids* 16 (1), S. 17–23.
- Saare-Surminski, K.; Preil, W.; Knox, J.P.; Lieberei, R. (2000): Arabinogalactan proteins in embryogenic and non-embryogenic callus cultures of *Euphorbia pulcherrima*. In: *Physiologia Plantarum* 108 (2), S. 180–187.
- Samaj, J.; Baluska, F.; Bobák, M.; Volkmann, D. (1999): Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. In: *Plant Cell Reports* 18 (5), S. 369–374.
- Sanchez, C.; Schmitt, C.; Kolodziejczyk, E.; Lapp, A.; Gaillard, C.; Renard, D. (2008): The *acacia* gum arabinogalactan fraction is a thin oblate ellipsoid: a new model based on small-angle neutron scattering and Ab initio calculation. In: *Biophysical Journal* 94 (2), S. 629–639.
- Sanchez-Sampedro, M.A.; Pelaez, R.; Corchete, P. (2008): An arabinogalactan protein isolated from medium of cell suspension cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. In: *Carbohydrate Polymers* 71 (4), S. 634–639.
- Sanmartin, M.; Jaroszewski, L.; Raikhel, N.V.; Rojo, E. (2005): Caspases. Regulating death since the origin of life. In: *Plant Physiology* 137 (3), S. 841–847.
- Sardar, H.S.; Yang, J.; Showalter, A.M. (2006): Molecular Interactions of Arabinogalactan Proteins with Cortical Microtubules and F-Actin in Bright Yellow-2 Tobacco Cultured Cells. In: *Plant Physiology* 142 (4), S. 1469–1479.

- Sardar H.S., Showalter A.M. (2007): A Cellular Networking Model Involving Interactions Among Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anchored Plasma Membrane Arabinogalactan Proteins (AGPs), Microtubules and F-actin in Tobacco BY-2 Cells. In: *Plant Signaling & Behavior* 2 (1), S. 8–9.
- Sathyanarayana, B.N.; Varghese, D.B. (2007): Plant tissue culture. Practices and new experimental protocols. New Delhi: I.K. International Pub. House.
- Schepetkin, I.A.; Quinn, M.T. (2006): Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. In: *International Immunopharmacology* 6 (3), S. 317–333.
- Schnitzler, P.; Schneider, S.; Stintzing, F.C.; Carle, R.; Reichling, J. (2008): Efficacy of an aqueous *Pelargonium sidoides* extract against herpesvirus. In: *Phytomedicine* 15 (12), S. 1108–1116.
- Schoetz, K.; Nödlner, M. (2007): Mass spectroscopic characterisation of oligomeric proanthocyanidins derived from an extract of *Pelargonium sidoides* roots (EPs®7630) and pharmacological screening in CNS models. In: *Phytomedicine* 14, S. 32–39.
- Schoetz, K.; Erdelmeier, C.; Germer, S.; Hauer, H. (2008): A detailed view on the constituents of EPs7630. In: *Planta Medica* 74 (6), S. 667–674.
- Schopfer, P.; Brennicke, A.; Mohr, H. (2010): Pflanzenphysiologie. 7. Aufl. München: Elsevier, Spektrum Akad. Verlag
- Schultz, C.; Gilson, P.; Oxley, D.; Youl, J.; Bacic, A. (1998): GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. In: *Trends in Plant Science* 3 (11), S. 426–431.
- Schultz, C.J.; Johnson, K.L.; Currie, G.; Bacic, A. (2000): The classical arabinogalactan protein gene family of *Arabidopsis*. In: *Plant Cell* 12 (9), S. 1751–1767.
- Schultz, C.J.; Rumsewicz, M.P.; Johnson, K.L.; Jones B.J.; Gaspar, Y.M.; Bacic, A. (2002): Using Genomic Resources to Guide Research Directions. The Arabinogalactan Protein Gene Family as a Test Case. In: *Plant Physiology* 129 (4), S. 1448–1463.
- Schulz, V. (2008): Umckaloabo und die Sicherheit von Phytopharmaka. In: *Zeitschrift für Phytotherapie* 29, S. 3–4.
- Sechehaye, A. (1931): Présentation de trois cas de tuberculose rénale ou vésicale traités par l'umckaloabo, le 26 juin 1930 à la Société médicale de Genève. In: *Revue Medicale de la Suisse Romande* 51, S. 100–104.
- Sechehaye, A. (1933): Die Behandlung der organischen und chirurgischen Tuberkulose durch Umckaloabo. Freiburg/Breisgau, 1933.
- Sechehaye, A. (1951): Umckaloabo in der inneren Behandlung der Tuberkulose: Darlegung des Verfahrens, klinische Beobachtungen, Schlussfolgerungen, Gutachten schweizerischer und anderer Ärzte. Knödler, Reutlingen, 1951.
- Seidel, V.; Taylor, P.W. (2004): In vitro activity of extracts and constituents of *Pelargonium* against rapidly growing mycobacteria. In: *International Journal of Antimicrobial Agents* 23 (6), S. 613–619.
- Seifert, G.J.; Roberts, K. (2007): The biology of arabinogalactan proteins. In: *Annual Review of Plant Biology* 58, S. 137–161.
- Serpe, M.D.; Nothnagel, E.A. (1994): Effects of Yariv phenylglycosides on Rosa cell suspensions: Evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. In: *Planta* 193 (4), S. 542–550.
- Serpe, M.D.; Nothnagel, E.A. (1995): Fractionation and Structural Characterization of Arabino-galactan-Proteins from the Cell Wall of Rose Cells. In: *Plant Physiology* 109 (3), S. 1007–1016.
- Showalter, A.M. (2001): Arabinogalactan-proteins: Structure, expression and function. In: *Cellular and Molecular Life Science* 58 (10), S. 1399–1417.
- Showalter, A.M.; Keppler, B.; Lichtenberg, J.; Gu, D.; Welch, L.R. (2010): A Bioinformatics Approach to the Identification, Classification, and Analysis of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins. In: *Plant Physiology* 153 (2), S. 485–513.
- Slimmon, T.; Qureshi, J.A.; Saxena, P.K. (1991): Phenylacetic acid-induced somatic embryogenesis in cultured hypocotyl explants of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey). In: *Plant Cell Reports* 10 (11).
- Smallwood, M.; Yates, E.A.; Willats, W.G.T.; Martin, H.; Knox, J.P. (1996): Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. In: *Planta* 198 (3), S. 452–459.

- Solomon M., Belenghi B., Delledonne M., Menachem E., Levine A. (1999): The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. In: *The Plant Cell* 11 (3), S. 431–444.
- Somogyi M. (1952): Notes on sugar determination. In: *Journal of Biological Chemistry* 195 (1), S. 19–23.
- Starcher, B. (2001): A Ninhydrin-Based Assay to Quantitate the Total Protein Content of Tissue Samples. In: *Analytical Biochemistry* 292, S. 125–129.
- Stegemann, H.; Stalder, K.H. (1967): Determination of hydroxyproline. In: *Clinica Chimica Acta* 18, S. 267–273.
- Stein, J.C.; Hansen G. (1999): Mannose Induces an Endonuclease Responsible for DNA Laddering in Plant Cells. In: *Plant Physiology* 121, S. 71–79.
- Steinmacher, D.A.; Saare-Surminski, K.; Lieberei, R. (2012): Arabinogalactan proteins and the extracellular matrix surface network during peach palm somatic embryogenesis. In: *Physiologia Plantarum* 146 (3), S. 336–349.
- Sundram, T.C.M.; Suffian, M.; Annuar, M.; Khalid, N. (2012): Optimization of culture condition for callus induction from shoot buds for establishment of rapid growing cell suspension cultures of Mango ginger (*Curcuma mangga*). In: *Australian Journal of Crop Science*.
- Suttirak, W.; Manurakchinakorn, S. (2010): Potential Application of Ascorbic Acid, Citric Acid and Oxalic Acid for Browning Inhibition in Fresh-Cut Fruits and Vegetables. In: *Walailak Journal Science & Technic* 7 (1), S. 5–14.
- Sweet, D.P.; Shapiro, R.H.; Albersheim, P. (1975): Quantitative analysis by various G.L.C. Response-Factor Theories for Partially Methylated and Partially Ethylated Alditol Acetates. In: *Carbohydrate Research*, S. 217–225.
- Taira, S.; Ono, M.; Matsumoto, N. (1997): Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. In: *Postharvest Biology and Technology* 12 (3), S. 265–271.
- Tan, L.; Qiu, F.; Lamport, D.T.A.; Kieliszewski, M.J. (2004): Structure of a Hydroxyproline (Hyp)-Arabinogalactan Polysaccharide from Repetitive Ala-Hyp Expressed in Transgenic *Nicotiana tabacum*. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (13), S. 13156–13165.
- Tan, L.; Varnai, P.; Lamport, D.T.A.; Yuan, C.; Xu, J.; Qiu, F.; Kieliszewski, M.J. (2010): Plant O-Hydroxyproline Arabinogalactans Are Composed of Repeating Trigalactosyl Subunits with Short Bifurcated Side Chains. In: *Journal of Biological Chemistry* 285 (32), S. 24575–24583.
- Tan, L.; Showalter, A.M.; Egelund, J.; Hernandez-Sanchez, A.; Doblin, M.S.; Bacic, A. (2012): Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans. In: *Frontiers in Plant Science* 3 (Artikel 140)
- Tang, H.R.; Covington, A.D.; Hancock, R.A. (2003): Structure-activity relationships in the hydrophobic interactions of polyphenols with cellulose and collagen. In: *Biopolymers* 70 (3), S. 403–413.
- Taylor, P.; Maalim, S.; Coleman, S. (2005): The strange story of umckaloabo. In: *Pharmaceutical Journal* 275, S. 790–792.
- Taylor, R.L.; Conrad, H.E. (1972): Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. In: *Biochemistry* 11 (8), S. 1383–1388.
- Taylor P.W. (2004): Antimycobacterial activity of indigenous South African plants. In: *South African Medical Journal* 93 (12), S. 904–907.
- Teschke, R.; Frenzel, C.; Schulze, J.; Eickhoff, A. (2012): Spontaneous reports of primarily suspected herbal hepatotoxicity by *Pelargonium sidoides*: Was causality adequately ascertained? In: *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63 (1), S. 1–9.
- Teschke, R.; Frenzel, C.; Wolff, A.; Herzog, J.; Glass, X.; Schulze, J.; Eickhoff, A. (2012): Initially purported hepatotoxicity by *Pelargonium sidoides*: the dilemma of pharmacovigilance and proposals for improvement. In: *Annals of Hepatology* 11 (4), S. 500–512.
- Thäle, C.; Kiderlen, A.; Kolodziej, H. (2011): Anti-infective Activities of *Pelargonium sidoides* (EPS®7630): Effects of Induced NO Production on *Leishmania major* in Infected Macrophages and Antiviral Effects as Assessed in a Fibroblast-Virus Protection Assay. In: *Planta Medica* 77 (07), S. 718–725.

- Theisen, L.L.; Muller, C.P. (2012): EPs[®]7630 (Umckaloabo[®]), an extract from *Pelargonium sidoides* roots, exerts anti-influenza virus activity in vitro and in vivo. In: *Antiviral Research* 94 (2), S. 147–156.
- Thude, S.; Classen, B.; Blaschek, W.; Barz, D.; Thude, H. (2006): Binding studies of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* to leucocytes. In: *Phytomedicine* 13 (6), S. 425–427.
- Tiwari, S.K.; Tiwari, K.P.; Siril, E.A. (2002): An improved micropropagation protocol for teak. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71 (1), S. 1–6.
- Tryfona, T.; Liang, H.-C.; Kotake, T.; Kaneko, S.; Marsh, J.; Ichinose, H.; Lovegrove, A.; Tsumuraya, Y.; Shewry, P.R.; Stephens, E.; Dupree, P. (2010): Carbohydrate structural analysis of wheat flour arabinogalactan protein. In: *Carbohydrate Research* 345 (18), S. 2648–2656.
- Udani, J.K.; Singh, B.B.; Barrett, M.L.; Singh, V.J. (2010): Proprietary arabinogalactan extract increases antibody response to the pneumonia vaccine: a randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot study in healthy volunteers. In: *Nutrition Journal* 9 (32), S. 1–7.
- Usov, A.I.; Bilan, M.I.; Shashkov, A.S. (1997): Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae). In: *Carbohydrate Research* 303 (1), S. 93–102.
- Van Engelen, F.A.; de Vries, S.C. (1992): Extracellular proteins in plant embryogenesis. In: *Trends in Genetics* 8 (2), S. 66–70.
- Van Hengel, A.J.; Tadesse, Z.; Immerzeel, P.; Schols, H.; Van Kammen, A.B.; de Vries, S.C. (2001): N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. In: *Plant Physiology* 125 (4), S. 1880–1890.
- Van Hengel, A.J.; Van, Kammen A.B.; de Vries, S.C. (2002): A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. In: *Physiologia Plantarum* 114 (4), S. 637–644.
- Van Hengel, A.J.; Roberts, K. (2003): AtAGP30, an arabinogalactan-protein in the cell walls of the primary root, plays a role in root regeneration and seed germination. In: *The Plant Journal* 36 (2), S. 256–270.
- Van Holst, G.-J.; KLis, F.M. (1981): Hydroxyproline Glycosides in Secretory Arabinogalactan-Protein of *Phaseolus vulgaris* L. In: *Plant Physiology* 68, S. 979–980.
- Vatanpour-Azghandi, A.; Villiers, T.A.; Ghorbani, A.M.; Tajabadi, A. (Hg.) (2002): The microscopy of tissue decolouration and browning problem in pistachio callus cultures. III International Symposium on Pistachios and Almonds. Zaragoza, Spain. ISHS.
- Visser, C.; Qureshi, J.A.; Gill, R.; Saxena, P.K. (1992): Morphoregulatory role of thidiazuron. Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. In: *Plant Physiology* 99 (4), S. 1704–1707.
- Volk, R.-B.; Blaschek, W.; Classen, B. (2007): Characterization of an arabinogalactan protein from the pressed juice of *Echinacea purpurea*: investigations into the type of linkage between the protein and polysaccharide moieties. In: *Journal of Natural Medicine* 61 (4), S. 397–401.
- Wack, M. (2004): Isolierung und Charakterisierung von Arabinogalaktan-Proteinen aus *Baptisia tinctoria* und *Baptisia australis*. Dissertation. Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Pharmazeutisches Institut.
- Wack, M.; Classen, B.; Blaschek, W. (2005): An Acidic Arabinogalactan-Protein from the Roots of *Baptisia tinctoria*. In: *Planta Medica* 2005 (9), S. 814–818.
- Wang, J.; Li, X.; Liu, Y.; Zhao, X. (2010): Salt stress induces programmed cell death in *Thellungiella halophila* suspension-cultured cells. In: *Journal of Plant Physiology* 167 (14), S. 1145–1151.
- Watt, C.; Breyer-Brandwyk, M.G. (1962): Medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa. Edinburgh/London: Livingstone.
- Westhoff, P. (1996): Molekulare Entwicklungsbiologie. Vom Gen zur Pflanze. Stuttgart: Thieme.
- Wettstein, R. (1935): Handbuch der systematischen Botanik. Leipzig: Deiticke.
- Whistler, R.L. (Whistler R.L.; BeMiller, J.N. Editoren) (1993): Exudate gums. "Industrial Gums, Polysaccharides and their Derivatives". San Diego: Academic Press.

- White, A.G.; Davies-Coleman, M.T.; Ripley, B.S. (2008): Measuring and optimising umckalin concentration in wild-harvested and cultivated *Pelargonium sidoides* (Geraniaceae). In: *South African Journal of Botany* 74 (2), S. 260–267.
- Willats, W.G.T.; Knox, J.P. (1996): A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of beta-glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant Journal* 9 (6), S. 919–925.
- Wittschier, N.; Faller, G.; Hensel, A. (2007): An extract of *Pelargonium sidoides* (EPs7630) inhibits in situ adhesion of *Helicobacter pylori* to human stomach. In: *Phytomedicine* 14 (4), S. 285–288.
- Wojtania, A.; Gabryszewska, E.; Marasek, A. (2004): Regeneration of *Pelargonium × hederæfolium* ‘Bonete’ from petiole explants. In: *Acta Physiologiae Plantarum* 26 (3), S. 255–262.
- Woltering, E.J. (2010): Death proteases: alive and kicking. In: *Trends in Plant Science* 15 (4), S. 185–188.
- Xu, J.; Tan, L.; Lamport, D.T.A.; Showalter, A.M.; Kieliszewski, M.J. (2008): The *O*-Hyp glycosylation code in tobacco and *Arabidopsis* and a proposed role of Hyp-glycans in secretion. In: *Phytochemistry* 69 (8), S. 1631–1640.
- Yan, C.; Li, X.; Hao, Z. (2006): A quantum-mechanical study on the complexation of β -cyclodextrin with Quercetin. In: *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 764, S. 95-100
- Yang, J.; Sarde, H.S.; McGovern, K.R.; Zhang, Y.; Showalter, A.M. (2007): A lysine-rich arabinogalactan protein in *Arabidopsis* is essential for plant growth and development, including cell division and expansion. In: *The Plant Journal* 49, S. 629-640
- Yariv, J.; Rappaport M.M.; Graf, L. (1962): Interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. In: *Biochemical Journal* 85, S. 383–388.
- Zagoskina, N.V.; Dubravina, G.A.; Alyavina, A.K.; Goncharuk, E.A. (2003): Effect of Ultraviolet (UV-B) Radiation on the Formation and Localization of Phenolic Compounds in Tea Plant Callus Cultures. In: *Russian Journal of Plant Physiology* 50 (2), S. 270–275.
- Zhao, Z.D.; Tan, L.; Showalter, A.M.; Lamport, D.T.A.; Kieliszewski, M.J. (2002): Tomato LeAGP-1 arabinogalactan-protein purified from transgenic tobacco corroborates the Hyp contiguity hypothesis. In: *The Plant Journal* 31 (4), S. 431–444.

IX Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Birgit Classen für die Überlassung des interessanten und abwechslungsreichen Themas, für das Vertrauen, die vielen fruchtbaren Fachgespräche und die immer offen stehende Tür für Hilfestellungen. Zusammen mit der freundschaftlichen Atmosphäre, ob bei Tagungen oder im Universitäts-Alltag und ihrer immerwährenden Unterstützung förderte sie meine Freude an der selbständigen Erarbeitung dieses Themas.

Ich danke außerdem Prof. Dr. W. Blaschek für sein schier unerschöpfliches Wissen, den vielen guten Ideen und Anregungen und der herzlichen Art, die einen immer gerne zu ihm kommen ließen. Zusammen mit seiner Frau Heidi sorgte er für eine familiäre Atmosphäre im gesamten Arbeitskreis, die das tägliche Arbeiten zur Freude machten.

Mein Dank gilt außerdem meinen alten und neuen Kollegen für die vielen tollen Momente während der Betreuung von Studenten, auf Kongressen, auf Exkursionen oder in der Universität. Die gemeinsamen Mittagessen, sowie die an Niveau nicht zu überbietenden Fachgespräche werden mir lange in Erinnerung bleiben. Ich danke euch für die schöne Zeit: Ann-Kathrin, Betti, Dani, Juliane, Karina, Maria, Marie, Nina, Simone, Suse, Tino und Yvonne.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei den fleißigen Mitarbeitern des Institutes für die Vorbereitung des Praktikums, die Unterstützung während der Laborarbeit, der Reparatur und Wartung von Geräten und dem vielen „Papierkram“ (Claudia, Dana, Dina, Frauke, Helle, Kalle, Kirsten, Marion, Patrycja und Susanne). Besonders danken möchte ich an dieser Stelle dem gärtnerischen Fachpersonal (Carsten, Henning und Steffi) für die liebevolle und kompetente Aufzucht und Pflege der *Pelargonium*-„Babys“ und vielen wertvollen Tipps und Tricks im Umgang mit Pflanzen.

Herrn Dr. U. Girreser danke ich für die Durchführung der GC-MS-Messungen, Frau S. thor Straten für die HPLC der Aminosäuren und Frau H. Ichinose aus Japan für die Durchführung der enzymatischen Hydrolyse.

Ich danke meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, die immer für mich da sind, mir Mut zusprechen und meine Kreativität fördern. Vielen Dank für eure immerwährende bedingungslose Unterstützung.

X Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Stefanie Duchow
 Geburtsdatum: 12.08.1983
 Geburtsort: Rostock
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Berufliche Tätigkeit

01/2009-11/2012 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
 Anfertigung der Dissertation im Arbeitskreis von
 Prof. Dr. Wolfgang Blaschek und Prof. Dr. Birgit Classen,
 Pharmazeutisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,
 Abteilung Pharmazeutische Biologie

Hochschulausbildung

10/2003-11/2007 Studium der Pharmazie an der
 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 08/2005 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
 11/2007 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
 12/2007-05/2008 Erste Hälfte des Pharmaziepraktikums in der
 Beiersdorf AG in Hamburg
 06/2008-11/2008 Zweite Hälfte des Pharmaziepraktikums in der
 John-Brinckman Apotheke in Rostock
 12/2008 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
 12/2008 Approbation zur Apothekerin

Schulbildung

09/1990 – 07/1994 Grundschule Buchenberg, Bad Doberan
 09/1994 – 07/2003 Friderico-Francisceum-Gymnasium zu Bad Doberan
 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 Professor 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 bisher weder der Math.-Nat. Fakultät der CAU noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zweck der Promotion eingereicht habe.

Kiel, den 22.10.2012