

**Isolierung und Charakterisierung von
immunologisch aktiven
Glycoproteinen
aus Baptisia tinctoria
(Wilder Indigo)**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Adrian Mühlau
aus Wiesbaden

Marburg / Lahn 2000

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg / Lahn
als Dissertation angenommen am: 06. Juni 2000

Erstgutachter: Prof. Dr. W. Ensinger

Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Legrum

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juni 2000

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	GESCHICHTE	8
1.2	WIRKSAME INHALTSSTOFFE	9
1.3	GATTUNGSGLIEDERUNG	9
1.4	ANWENDUNG	10
1.5	VORKOMMEN	11
1.6	KENNTNISSTAND	12
1.7	DEFINITION VON GLYCOPROTEINEN	15
1.8	AUFGABENSTELLUNG	18
1.8.1	<i>Ziel der vorliegenden Arbeit</i>	18
2	EXPERIMENTELLER TEIL	19
2.1	GEWINNUNG DES AUSGANGSMATERIALS (RETENTAT) FÜR DIE CHROMATOGRAPHISCHE ISOLIERUNG EINES IMMUNOLOGISCH AKTIVEN GLYCOPROTEINS	19
2.2	CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN	20
2.2.1	<i>Ionen-Chromatographie (IC)</i>	20
2.2.2	<i>Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC)</i>	21
2.2.3	<i>Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)</i>	22
2.3	LYMPHOZYTEN-PROLIFERATIONS-TEST (LPT)	22
2.4	BESTIMMUNG DER HOMOGENITÄT MITTELS HP-GPC	23
2.5	ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG	25
2.6	ELEKTROPHORESE NACH LAEMMLI	26
2.6.1	<i>Silberfärbung der Elektrophoresegele</i>	29
2.6.2	<i>Glycoprotein-Nachweis mit Schiff's-Reagenz</i>	31
2.7	DOT-BLOT	32
2.7.1	<i>Dot-Blot zur Ermittlung der Nachweisgrenze des Antigens bei Konstanthaltung der Antikörperkonzentration</i>	34
2.8	WESTERNBLOT	35
2.9	PROTEINBESTIMMUNGEN	37
2.9.1	<i>Biuret-Methode</i>	37
2.9.2	<i>Lowry-Methode</i>	38
2.9.3	<i>UV-Absorptions-Methode</i>	40
2.9.4	<i>BCA (Bicinchoninsäure)-Methode</i>	41
2.9.5	<i>Amidoschwarz-Methode</i>	41
2.9.6	<i>Elementaranalyse</i>	42
2.10	ENZYMATISCHER ABBAU DES PROTEINANTEILS DES GLYCOPROTEINS	42
2.11	BESTIMMUNG VON MONOSACCHARIDEN	43
2.11.1	<i>DC-Bestimmung von Monosacchariden</i>	43

2.11.2	<i>GC-Bestimmung von Monosacchariden</i>	44
2.11.3	<i>HPLC-Bestimmung von Monosacchariden</i>	49
2.12	HPLC-BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN	51
2.12.1	<i>HPLC-Bestimmung von Aminosäuren mit Derivatisierung</i>	51
2.12.2	<i>HPLC-Bestimmung von Aminosäuren ohne Derivatisierung</i>	57
3	ISOLIERUNG VON IMMUNOLOGISCH AKTIVEN GLYCOPROTEINEN AUS BAPTISIA	
	TINCTORIA	59
3.1	IONEN-CHROMATOGRAPHIE (IC) ALS ERSTER SCHRITT	60
3.2	AFFINITÄTS-CHROMATOGRAPHIE (AC) ALS ERSTER SCHRITT	67
3.3	HYDROPHOBE-INTERAKTIONS-CHROMATOGRAPHIE (HIC) ALS ERSTER SCHRITT	67
3.3.1	<i>HIC mit NaCl</i>	68
3.3.2	<i>HIC mit (NH₄)₂SO₄</i>	71
3.4	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER ISOLIERUNG.....	73
4	CHARAKTERISIERUNG VON IMMUNOLOGISCH AKTIVEN GLYCOPROTEINEN AUS	
	BAPTISIA TINCTORIA	75
4.1	LYMPHOZYTEN-PROLIFERATIONS-TEST MIT NMRI-MÄUSEN	75
4.2	LYMPHOZYTEN-PROLIFERATIONS-TEST MIT C3H/HEJ-MÄUSEN.....	77
4.3	HOCHDRUCK-GELPERMEATION-CHROMATOGRAPHIE (HP-GPC)	78
4.4	ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG	81
4.5	ELEKTROPHORESE	83
4.6	DOT-BLOT	85
4.7	WESTERN-BLOT.....	87
4.8	PROTEINNACHWEISE	89
4.9	ENZYMATISCHER ABBAU DES PROTEINANTEILS	93
4.10	BESTIMMUNG VON MONOSACCHARIDEN	97
4.10.1	<i>Dünnschicht-Chromatographische Untersuchung der Monosaccharide</i>	97
4.10.2	<i>Gas-Chromatographische Untersuchung der Monosaccharide</i>	100
4.10.3	<i>HPLC-Untersuchung der Monosaccharide</i>	105
4.11	HPLC-BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN MIT DER OPA-METHODE.....	110
4.12	HPLC-BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN OHNE DERIVATISIERUNG	116
5	ZUSAMMENFASSUNG	118
6	DISKUSSION	121
7	LITERATURVERZEICHNIS	132
8	DANKSAGUNG	138

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

λ	Lambda / Wellenlänge
AA	Anionen-Austauscher
Abb.	Abbildung
AC	Affinitäts-Chromatographie
AS	Ammoniumsulfat
BAnz	Bundesanzeiger
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
Con A	Concanavalin A; Lektin aus Canavalin ensiformis
cpm	counts per minute
CTAB	Cethyl-trimethyl-ammonium-bromid
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GC	Gas-Chromatographie
GP/PS	GlycoProteine / PolySaccharide
GPC	Gel Permeation Chromatography
H ₂ O	Milli Q-Wasser / deionisiertes Wasser
HIC	Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie
HMDS	Hexamethyldisilazan
HP-GPC	High Performance Gel Permeation Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC	Ionen-Chromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig G	Immunglobulin G
Ig M	Immunglobulin M
kDa	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharide
LPT	Lymphozyten-Proliferations-Test
LSD	Licht-Streu-Detektor
Lsg.	Lösung
MeOH	Methanol
MG	Molekular-Gewicht
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
PBS	Phosphate Buffered Saline
Ret	Retentat
RI	Refraktions-Index
RP 18-Phase	Phase aus Silikagel, die mit Chlor-dimethyl-octadecyl-silan derivatisiert wurde, um eine weitgehend unpolare Oberfläche zu erhalten
R _{St}	relativer Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat / Natriumdodecylsulfat
SDS-PAG	Sodiumdodecylsulfat-Poly-Acrylamide-Gel
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Poly-Acrylamide-Gel-Electrophoresis
SI	Stimulations-Indizes
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloroacetic acid / Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS	Tri-Methyl-Silyl
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
v/v	Volumen pro (Gesamt-) Volumen
VIS	Visueller Bereich

Abkürzungen der Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn, Asx	N, B
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Abkürzungen der Monosaccharide

Gal	Galactose
Glu	Glucose
Ara	Arabinose
Rh	Rhamnose
Fuc	Fucose
Xyl	Xylose
Man	Mannose
Galur	Galacturonsäure
Gluur	Glucuronsäure

1 Einleitung

Baptisia tinctoria (L.) R.Brown gehört zu der Familie der Fabacee, Schmetterlingsblütler (Leguminosae).¹

Der Gattungsname leitet sich aus dem griechischen Wort βαπτω (bàpto) ab, was übersetzt „färben“ bedeutet, da die Wurzel stark schwarz färbt. Der Artname rührt vom lateinischen tingere her, was auch „färben“ bedeutet. Der Name bezieht sich auf die Indigogewinnung aus Laubblättern.²



Abb. 1: Oberirdischer Teil der Arzneipflanze *Baptisia tinctoria*

Für *Baptisia tinctoria* gibt es im Deutschen und im Englischen verschiedene Bezeichnungen³:

Deutscher Name	Englischer Name
Färberhülse	American Indigo
Wilder Indigo	False Indigo
Baptisie	Horse-fly Weed
	Indigo Broom
	Indigo-weed
	Rattlebush
	Wild Indigo
	Yellow Indigo

Synonyme: *B. gibbesii* SMALL; *Podalyria tinctoria* (L.) WILLD., *Sophora Tinctoria* L.⁴

1.1 Geschichte

Die Fabacee *Baptisia tinctoria* ist eine auf dem nordamerikanischen Kontinent beheimatete Heilpflanze. Die Indianer verwendeten Wurzeln von *Baptisia tinctoria* bei der Behandlung von Wunden, blauen Flecken und Prellungen. Die Creek-Indianer setzten einen wäßrigen Wurzelauszug bei ersten Anzeichen einer Erkrankung ihrer Kinder ein, um deren Ausbruch zu verhindern.⁵ Die Pawnee nahmen gepulverten Samen einer *Baptisia*-Art in Kombination mit Büffelfett zur Behandlung von Koliken.⁶ Das Wasser, in dem die Wurzel eingeweicht wurde, diente zur Waschung von offenen oder entzündlichen Wunden. Seltener wurde die Wurzel bei Verstopfung und zur Einleitung von Erbrechen eingesetzt. Indianer in maritimen Provinzen von Kanada verwendeten die *Baptisia*-Wurzel bei Gonorrhoe, Nierenkrankheiten und blutigem Auswurf.

Europäische Siedler nahmen die Heilpflanze als Antiseptikum gegen Fieber, Rachenentzündung, Typhus und Scharlach ein.

Die Wirksamkeit der Droge ist bei den genannten Anwendungsgebieten nicht belegt.

Weiterhin fand *Baptisia* als blauer Farbstoff Verwendung, der aus den Blättern gewonnen wurde (s. abgeleitete Namensgebung „Wilder Indigo“).⁷

1.2 Wirksame Inhaltsstoffe

Alkaloide und speziell die Chinolizidin-Alkaloide, wie Cytisin, N-Methylcytisin, Anagyrin und Spartein gehören unter anderem zu den niedermolekularen Wirksubstanzen. Weiterhin zählen Flavon- und Isoflavonderivate, z.B. die Glycoside Baptisin und Trifolirhizin bzw. die Aglyka Maackiain und Formononetin zu den wirkbringenden Substanzen. Darüber hinaus sind die Cumarine Scopoletin und Scopoletin-7-O-glucosid in der Droge zu finden.

Als weitere Inhaltsstoffe werden Polysaccharide (Arabino-Galactan) und Glycoproteine aufgeführt. Diese Polysaccharide sind wasserlösliche, saure, verzweigte Heteroglycane (Arabino-Galactane).^{8,9}

1.3 Gattungsgliederung

Die Gattung *Baptisia* VENT. besteht aus 15 Arten, die 3 phylogenetischen Gruppen angehören:

1. Pflanzen mit Vorblättern: *B. calycosa* CANDY und *B. lecontei* TORR. et GRAY
2. Pflanzen mit einfachen, ungeteilten Blättern: *B. arachnifera* DUNCAN, *B. perfoliata* (L.) R.BR. und *B. simplicifolia* CROOM
3. Typische *Baptisia* Arten wie z.B. *B. alba* (L.) VENT., *B. australis* (L.) R.Br. und *B. tinctoria* (L.) R.BR

Verfälschungen oder Verwechslungen kommen mit den Wurzeln von *Baptisia australis* (Blauer falscher Indigo) und *Baptisia alba* vor. Beide werden auch als Ersatz für *Baptisiae tinctoriae radix* verwendet.^{10, 11}

1.4 Anwendung

Baptisia tinctoria ist als arzneilich verwendete Droge nicht gebräuchlich. Sie findet als Hauptbestandteil des Fertigarzneimittels Esberitox N (zusammen mit *Thuja occidentalis* und *Echinacea purpurea* / *pallida*) Verwendung. Das Anwendungsgebiet liegt bei akuten und chronischen Atemwegsinfekten, bakteriellen Hautinfektionen und Infektanfälligkeit bei einer temporären Abwehrschwäche. Die *Baptisia*-Wurzel wird als eine potentiell abwehrsteigernde Droge (pflanzliches Immunstimulans) angesehen. Durch solche Medikamente sollen z. B. die Häufigkeit von Erkältungskrankheiten gesenkt, die Krankheitsdauer bei Infekten verkürzt und als Begleittherapie bei Virusinfekten Komplikationen vorgebeugt werden. Die immunstimulierende Wirkung von *Baptisia tinctoria* wird mit Glycoproteinen und Polysacchariden in Verbindung gebracht sowie auf die bei Experimenten beobachtete Steigerung der Phagozytose, Interferonproduktion, Lymphozytenstimulation und Antikörperbildung zurückgeführt.^{7 12}

In der Roten Liste von 1999 wird unter der Rubrik pflanzliche Immunstimulanzien zwischen Präparaten, die nur aus einem Einzelstoff und Medikamenten, die aus einer Kombination von Pflanzenextrakten bestehen, unterschieden. Bei den Einzelstoff-Arzneien sind 15 verschiedene Medikamente aufgeführt. Diese registrierten Mittel beinhalten alle die Droge *Echinacea* (Sonnenhut).

Unter der Kategorie „Kombinationen“ sind fünf Produkte erwähnt, von denen drei die Droge *Baptisia tinctoria* enthalten.¹³

Auch im Präparat Pascotox findet man *Baptisia tinctoria*-Extrakte. Dieses Medikament wird als unspezifisches Reiztherapeutikum eingesetzt.

Verwendung finden die frischen unterirdischen Teile (Wurzel; Radix) von *Baptisia tinctoria*.¹⁴

Allgemein wird die Droge wegen ihrer antiseptischen (wundheilend) und laxativen (abführend) Wirkung bei septischen und typhösen Prozessen mit Prostration und Fieber, wie Diphtherie, Grippe, Malaria und Typhus verwendet.

Innerlich wird sie bei Infektionen der oberen Atemwege, Erkältungen, Mandelentzündungen, Schnupfen, Fieber und Lymphknotenentzündung genommen.

Äußerlich wird sie als Salbe bei schmerzlosen Geschwüren, entzündeten Brustwarzen und als Zusatz zum Duschwasser bei Weißfluß verwendet.¹⁵

In hohen Dosen bewirkt die Droge Erbrechen und Diarrhoe. In der Homöopathie wird sie gegen septische Prozesse mit Fieber eingesetzt.

Bei äußerlicher Behandlung findet *Baptisia tinctoria* gegen Geschwüre Anwendung.

Die jungen Sprossen kann man als Gemüse wie Spargel essen.¹⁶

1.5 Vorkommen

Herkunftsbereiche von *Baptisia tinctoria* sind die östlichen und nordöstlichen Staaten der USA. Weiterhin ist die Pflanze im südlichen Kanada heimisch. Man findet sie häufig auf trockenen, sandigen bis tonigen Böden in lichten Laub- und Nadelwäldern, Kahlschlägen, Savannen und an Straßenrändern.¹⁷

Auf dichten bewachsenen Flächen würde *Baptisia tinctoria* leicht durch andere Pflanzen unterdrückt werden, da sie nur langsam wächst. Die durchschnittliche Größe der Pflanze beträgt nach dem ersten Jahr ca. 20 cm und nach dem zweiten Jahr 30-40 cm. Um die endgültige Größe von einem Meter zu erreichen, bedarf es einer Wachstumszeit von drei bis fünf Jahren. Schneller wachsende Pflanzen würden *Baptisia tinctoria* in kurzer Zeit überwuchern und ihr somit das notwendige Sonnenlicht nehmen.¹⁸

Die unterirdischen Pflanzenteile werden durch Wildsammlungen im Herbst geerntet.¹⁹

1.6 Kenntnisstand

Inhaltsstoffe von *Baptisia tinctoria* haben einen Einfluß auf die Immunantwort von Lymphozyten, wie am Beispiel der Mitogenstimulation und der Antikörperproduktion festzustellen ist. Diese immunologische Wirksamkeit wird den Glycoproteinen bzw. Polysacchariden zugeschrieben. Mit Hilfe der ^{13}C - NMR konnte die Existenz eines Arabino-Galactans als Bestandteil der erhaltenen Fraktionen nachgewiesen werden.²⁰

Es wurden *Baptisia tinctoria* Radix-Extrakte durch eine 10-tägige Mazeration mit 30%igem (v/v) Ethanol der entsprechenden Droge gewonnen. Die erhaltenen Extrakte wurden einer Ultrafiltration unterworfen, wobei die Ausschlußgrenze bei 10 kDa lag. Dieser dialysierte *Baptisia*-Extrakt (> 10 kDa) wird als „*Retentat*“ bezeichnet. Die ultrafiltrierten Komponenten wurden gefriergetrocknet, das erhaltene Lyophilisat bei -20 °C gelagert.^{9, 21}

Der Größenausschluß bei 10 kDa wird aus folgenden Gründen durchgeführt:

Die Entfernung von niedermolekularen Substanzen ist erforderlich, da sie in Zellkulturen, welche keine Entgiftungsmechanismen besitzen, zu Störungen führen können.²²

Für die Glycoproteine konnten der intestinale (zum Darmkanal gehörend) Transport und das Verhalten bei der Passage durch die Darmwand belegt werden. Substanzen mit einem Molekulargewicht < 10 kDa wurden im Duodenum (Zwölffingerdarm) gefunden. Dagegen sind die Verbindungen mit einem höheren Molekulargewicht > 10 kDa in den Peyerschen Plaques (immunologisches Erfolgsorgan), als Bestandteil des Immunsystems, anzutreffen.²³

Eine Reinigung wurde durch eine Sephadex G50-Chromatographie (GPC) erzielt. Durch diesen Chromatographie-Schritt erhielt man im Vergleich zum Ausgangsmaterial biologisch aktivere Fraktionen.²⁴

Zur Charakterisierung wurden die isolierten Glycoproteine einer SDS-PAGE unterzogen. Dabei wurden die Glycoproteine in vier Gruppen geteilt. Anhand von Markerproteinen ließen sich die Molekülgrößen dieser Proteine bestimmen. Diese Proteine lagen bei 50, 31/29, 26 und 14 kDa.

Eine weitere Charakterisierung konzentrierte sich auf die Monosaccharide und Aminozucker in den isolierten Verbindungen.

Die chemische Hydrolyse (2 mol/L Trifluoressigsäure/121°C/6h) der gewonnenen G50-Fraktion wurde gaschromatographisch auf Zucker untersucht. Es wurden die Kohlenhydrate Arabinose, Galactose, Glucose, Rhamnose, Xylose und in Spuren Mannose bestimmt.²⁵

Der Zuckeranteil lag zwischen 8 und 27 % bezogen auf das Human-Glycoprotein Transferrin. Weiterhin konnten Beuscher et al.²⁰ in diesen Fraktionen Glucosamin und/oder Galaktosamin in einer Konzentration von weniger als „0,2 mol-%“ bestimmt werden.

Eine G50-Fraktion, die von Beuscher et al. gewonnen wurde, wurde auf Proteingehalt (nach Lowry) untersucht. Er lag bei 180 - 200 µg/mg.⁹

Es wurde ein Molekulargewicht von 300 bis 500 kDa ermittelt.

Mikrobiologische Untersuchungen sollten weitere Eigenschaften der isolierten Substanzen ermitteln.

Durch *Baptisia tinctoria*-Extrakte wird die Immunglobulin M-Synthese auf das 7- bis 8-fache der Kontrolle gesteigert. Dieses konnte sowohl immunchemisch (ELISA) als auch biologisch (Jerne Plaque Test) nachgewiesen werden.

Sowohl in vitro als auch in vivo konnten eine Zunahme an Interleukin-6 (Cytokine) festgestellt werden. Die schwache Bildung von Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor- α war als Wirkung zu beobachten.

In der frühen Phase der bakteriellen Infektabwehr kommt den segmentkernigen Granulozyten eine besondere Bedeutung zu: Diese Zellen werden innerhalb von 4 h durch in-vivo-Applikation der Extrakte von *Baptisia tinctoria* - im Vergleich zur Kontrolle - verdoppelt.²⁶

Die Stimulation der DNS-Synthese, die im Lymphozyten-Proliferations-Test gemessen wird, korreliert mit einer vermehrten Bildung von Antikörpern der IgM-Klasse.

Wagner et al.⁷ beschreiben die Isolierung immunstimulierend wirkender Polysaccharide (Heteroglykane) aus *Baptisia tinctoria*. Durch Extraktion mit Methanol und anschließender Behandlung mit 0,5 mol/L NaOH begann man die Isolierung der Polysaccharide. Die erhaltenen Filtrate wurden mit Ethanol versetzt und mit Trichloressigsäure (15g TCA pro 100 mL Lsg.) und erneut mit Ethanol behandelt. Der Niederschlag wurde mit Wasser aufgenommen und einer Dialyse mit einer Ausschlußgrenze von MG=5 kDa unterworfen. Das Dialysat wurde gefriergetrocknet.

Ein weiterer Reinigungsschritt erfolgte über Ionenaustauscher (DEAE-Sepharose Cl-6). Eluiert wurde mit dest. Wasser bzw. 0,02 mol/L Phosphat-Puffer (pH=7,5) mit einem Gradienten von 0-1,0 mol/L NaCl. Die erhaltenen Fraktionen wurden dialysiert und gefriergetrocknet.

Studien über die niedermolekularen Inhaltsstoffe von *Baptisia tinctoria* konnten keine nenneswerten antiviralen Wirkungen bzw. eine Immunmodulation erbringen.

Die anschließende Charakterisierung durch Wagner et al. ²⁵ beschränkt sich auf die Zuckermanalytik. Polysaccharide wurden einer chemischen Hydrolyse unterworfen. Mit einer 2 mol/L TFA wird das Retentat 2h refluxiert. Der säurefreie Rückstand wurde zur Prüfung auf Alditolacetale mit einem Zuckermanalysator und gaschromatographisch untersucht.

Aus *Baptisia tinctoria* wurden folgende Zucker identifiziert und quantifiziert:

Tab. 1: Molare Zusammensetzung einer Fraktion von *Baptisia tinctoria* Untersuchung und Angabe in „mol-%“ von Wagner

Zucker	molare Zusammensetzung / mol-%
Glucose	2,1
Rhamnose	1,1
Arabinose	1
Mannose	0,1
Galactose	0,6
Xylose	0,5

Wagner charakterisierte seine Fraktion aus *Baptisia tinctoria* als Rhamno-Arabino-Glucan (s. Tab. 1).

Struktur-Wirkungsbeziehungen lassen sich mit den bisher ermittelten Ergebnissen nicht erkennen.

Wahrscheinlich ist auch, daß die komplexer zusammengesetzten Polysaccharide der höheren Pflanzen -im Vergleich zu den einfacher aufgebauten Pilz-Glucanen- schon bei niedriger Konzentration gute Immunstimulatoren sind. Polysaccharide mit Polyanion-Strukturen sind ebenfalls bessere Stimulatoren als Uronsäure-freie Polysaccharide.

1.7 Definition von Glycoproteinen

Proteine, die eine zusätzliche Komponente zu den Aminosäuren besitzen, bezeichnet man als konjugierte Proteine. Der Anteil des Moleküls, bei dem es sich nicht um Aminosäuren handelt, wird prosthetische Gruppe genannt.

Konjugierte Proteine werden anhand der chemischen Natur ihrer prosthetischen Gruppe klassifiziert. Lipoproteine enthalten Lipide, Glycoproteine Zuckergruppen und Metalloproteine Metalle.

Die Silbe Glyco kommt aus dem griechischen und bedeutet „süß“.

Protein: dieses vom griechischen proteios („*erstrangig*“) abgeleitete Wort wurde im Jahr 1836 von Jöns Berzelius geprägt, um die Wichtigkeit jener Stoffgruppe zu betonen.²⁷

Eine veraltete Schreibweise für Glycoproteine ist Glykoproteide.

Glycoproteine enthalten im selben Molekül Kohlenhydrate und Proteine (Zucker und Eiweiß). Deshalb werden sie oftmals auch als Eiweißzucker bezeichnet.

Es handelt sich um O-, N-, oder esterglycosilierte Bindungen mit Peptid - Anteil. Der Zucker-Anteil beeinflusst die physiko-chemischen Eigenschaften des Gesamtmoleküls, indem er Konformations-Stabilität und Beständigkeit gegen Proteasen-Verdauung (Protolyse) verleiht. Die Glycoproteine weisen eine hohe Viskosität auf. Sie besitzen dadurch eine Schmier- und Schutzfunktion sowie eine Inhibitorwirkung gegen Bakterien- und Virusaggressionen.

Die sehr hydrophilen Kohlenhydrateaggregate verändern die Polarität und die Löslichkeit der Proteine.²⁸

Die verzweigten Oligosaccharide setzen sich aus Kern-Oligosacchariden einiger weniger Typen, den peripheren (meist sich wiederholende Galactose und N-Acetyl-D-glucosami-Resten) und terminalen Monosaccharid-Resten zusammen, welche variieren und den größten Teil der Eigenschaften des Glycoproteins ausmachen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist das Entwicklungsstadium der Zelle, der einen Unterschied im terminalen Rest hervorruft. Im Zusammenhang mit dem Altern des funktionellen Proteins und auch bei Krankheiten kann es zur qualitativen und quantitativen Änderung der Glykosylierung kommen.

Das Konglomerat der Kohlenhydrate setzt sich aus Hexosen (Galactose, Mannose, seltener Glucose), N-Acetyl-d-hexosamine, N-Acylneuraminsäure und L-Fucose zusammen.

Zu den Glycoproteinen zählen unter anderem Serumproteine (K-Globuline, Coeruloplasmin), Hormone, Membranproteine (z.B. Blutgruppensubstanzen) und alle Antikörper.

Typisch für Glycoproteine sind ihre verzweigte Struktur und der geringe Polymerisationsgrad (max. 15, meist 2 bis 10 Monosaccharideinheiten, entsprechend einem MG von 450 bis 3200) Weiterhin ist bei dieser Stoffgruppe kein periodischer Aufbau feststellbar.

Der Aufbau der Kohlenhydratsequenz der Glycoproteine ist nicht genetisch gesteuert, sondern unterliegt einem nichtribosomalen Mechanismus, der durch Glycosyltransferasen katalysiert wird. Es werden Abweichungen bei der Synthese der prosthetischen Gruppe beobachtet, die man Mikroheterogenität nennt.²⁹

Einige Glycoproteine sind epithelialen Ursprungs und besitzen wenige aromatische Aminosäuren. Dadurch fehlt diesen das Absorptionsmaximum bei 280 nm.

Waffenschmidt³⁰ beschreibt Effekte, die mit einer Glycosylierung eines Proteins in Zusammenhang gebracht werden:

- Wechselwirkung mit Wasser (Löslichkeit, Gefrierschutz)
- Interaktion untereinander (Aggregation von Untereinheiten, Komplexierung von Makromolekülen, Proteinfaltung)
- Ausscheidungen (von Immunglobulinen aus lymphatischem Gewebe)
- Einbau in die Außenseite des Plasmalemmas und in die extrazelluläre Matrix; dort sind es oft stark geladene saure Glycoproteine, die infolgedessen sehr viel Wasser binden und als Gleitstoff und Quellsubstanzen dienen, worauf die Stabilität des Bindegewebes vor allem beruht.

Kindl³¹ beschreibt Glycoproteine, genauer gesagt **Arabino-Galactan-Proteine (AGP)**, folgendermaßen:

Die **Arabino-Galactan-Proteine** befinden sich in der extrazellulären Matrix, den Pflanzengummen und den schleimigen Exsudaten vieler höhere Pflanzen. Weiterhin sind sie im Außenschleim grüner Kolonie-Algen zu finden.

Es handelt sich dabei um Glycoproteine mit einem hohen Zuckeranteil (bis zu 98 %). Bei einem Anteil an Zucker > 98% spricht man nicht mehr von Glycoproteinen, sondern von Proteoglycanen.

Im Gegensatz zu Extensin besitzt das Arabino-Galactan-Protein einen noch höheren Anteil an Kohlenhydraten. Viele Arabino-Galactane haben ein Molekulargewicht >300 kDa. Arabino-Galactan-Seitenketten sind O-glycosidisch an Hydroxyprolin gebunden. Der Proteinanteil ist sauer (dadurch vom basischen Extensin unterscheidbar) und reich an Serin und Glycin. Der Protein-Anteil bei Arabino-Galactan-Proteine kann sehr niedrig sein. Man spricht dann eher von Arabino-Galactanen.

Blaschek³² geht genauer auf die sauren Eigenschaften der Arabino-Galactane bzw. Arabino-Galactan-Proteine ein. Diese Eigenschaft resultiert aus der Anwesenheit von Uronsäuren in diesen Polymeren. Der Proteinanteil liegt meist unter 10 %. Nach Blaschek sind die vorrangigen Aminosäuren im AGP Alanin und auch Serin.

Zusammengefaßt kann man auf Grund der zuvor genannten Zitate folgende Zusammensetzung für Glycoproteine angeben:

Glycoproteine setzten sich aus einem Zuckeranteil von 1 – 98 % und einem Proteinanteil von 2 – 99 % zusammen, was deren Variabilität deutlich macht.

1.8 Aufgabenstellung

Exberitox N ist ein Kombinationspräparat, bestehend aus einem Mischextrakt der Drogen *Baptisia tinctoriae* (Radix), *Echinaceae purpureae* / *pallidae* (Radix) und *Thujae occidentalis* (Herba). Jede dieser Pflanzenteile bringt für die therapeutische Gesamtwirkung benötigten polymeren Inhaltsstoffe in diese Kombination ein. Es ist jedoch bekannt, daß nicht alle hochmolekularen Inhaltsstoffe auch eine immunologische Aktivität besitzen. Daher soll mit der vorliegenden Arbeit aus der Arzneipflanze *Baptisia tinctoria* eine der möglichen therapeutischen Komponenten (Glycoproteine) isoliert und charakterisiert werden, der diese Eigenschaften zugeschrieben werden.

In Voruntersuchungen wurden für Arabino-Galcatan-Proteine proliferationssteigernde Wirkungen festgestellt.

1.8.1 Ziel der vorliegenden Arbeit

Aus dem Extrakt einer einheitlichen *Baptisia tinctoria* Radix-Charge sind hochmolekulare Inhaltsstoffe (>10 kDa) mit immunologischer Aktivität zu isolieren. Durch chromatographische Trenntechniken sollte aus dem Retentat, einem Vielstoffgemisch, ein reines Glycoprotein mit biologischer Aktivität isoliert werden. Diese Aktivität wird mit Hilfe des Lymphozyten-Proliferations-Tests bestimmt. Nach Bestätigung, daß es sich um Glycoprotein handelt, sind folgende Eigenschaften zu bestimmen:

- Substanzklasse
- Protein- und Zuckeranteil
- Aminosäure-Zusammensetzung des Proteinanteils
- Molekulargewicht
- isoelektrischer Punkt
- weitere chemisch-physikalische und biologische Eigenschaften

Mit bereits vorhandenen Antikörpern, die gegen eine gereinigte Retentat-Fraktion gerichtet sind, sollte auf Interaktionen zwischen diesen und den in der vorliegenden Arbeit isolierten Substanzen geprüft werden. In diesem Zusammenhang stellt sich dann die Frage, welcher Teil (Zucker / Protein) der isolierten Substanz mit Antikörpern reagiert.

Hierzu sollte der Proteinanteil enzymatisch abgebaut werden um zu klären, welcher Teil des Glycoproteins für die lymphozytenproliferationsfördernde Wirkung zuständig ist.

2 Experimenteller Teil

2.1 Gewinnung des Ausgangsmaterials (Retentat) für die chromatographische Isolierung eines immunologisch aktiven Glycoproteins

Nach pharmakognostischer Prüfung* von 175 kg Wurzel Droge (Lieferant Worlée; Freigabenummer: H00287) durch die Abteilung „Qualitätskontrolle“ wurde die gesamte Menge in einem einheitlichen Ansatz extrahiert und lyophilisiert. Das Kriterium für die Verwendung dieser Charge war ein hoher **Glyco-Protein-PolySaccharid-Gehalt (GPPS-Gehalt)** der Droge. Dieser wird im Rahmen einer Eingangsuntersuchung in der „Qualitätskontrolle“ durch einen ELISA-Test ermittelt. Ziel der Aufarbeitung war, ein mengenmäßig ausreichendes und homogenes Retentat als Ausgangsmaterial für diese Arbeit zu erhalten.

Die Aufarbeitung wurde im Einzelnen wie folgt durchgeführt:

Die geschnittene Droge (175 kg) wurde in einem Extrakteur mit 20%iger ethanolischer „Tris-HCl-Puffer-Lösung“ (0,075 mol/L / „pH-Wert: 8,5“) während 5 Tagen extrahiert. Das Endvolumen betrug 875 L (Da ein pH-Wert definitionsgemäß ausschließlich in rein wässrigen Lösungen meßbar ist, handelt es sich bei dem hier genannten Wert nur um einen an der Praxis orientierten -reproduzierbaren- relativen Meßwert).

Nach 2,5-tägiger Mazeration wird alternierend 2- mal arbeitstäglich perkoliert (80 L/h) und nachts mazeriert. Das erhaltene Perkolat wurde über Tiefenfilter KS 300 und KS 80 von Partikeln befreit. Diese Filtration ist notwendig, um einen partikelfreien Auszug (530 L) für die folgende Tangentialfluß-Filtration (Ausschlußgrenze 10 kDa) zu erhalten. Das erhaltene Ultrafiltrat wurde gefriergetrocknet.

Das gewonnene Lyophilisat ist das Ausgangsmaterial für die chromatographischen Isolierungswege. Es wird in der vorliegenden Arbeit als Retentat bezeichnet.

Die Ausbeute aus 175 kg Baptisia-Droge betrug 1,58 kg Retentat (ca. 1%).

* Pharmakognosie: Drogenkunde, Erkennung und Bewertung von Arzneipflanzen

Deionisat

Bei allen chromatographischen Trennungen wurde MilliQ-Wasser verwendet. In der vorliegenden Arbeit ist dieses Deionisat als „H₂O“ bezeichnet.

Lyophilisat

Die Lyophilisate wurden mit folgenden Geräten erhalten:

Ultra-Kryostat: Fa. LAUDA, UK 60 SDW

Gefriertrocknungsanlage: Fa. Christ, Modell Alpha und Delta

2.2 Chromatographische Methoden

FPLC-Anlage:

PHARMACIA

Liquid Chromatography Controller (LCC) 500

Pumpe: Kolbenpumpe P500 und peristaltische Pumpe P1

Detektoren:

UV-Detektor ($\lambda=280$ nm), Fa. Knauer

Differential-Refraktometer, Fa. Knauer

2.2.1 Ionen-Chromatographie (IC)

Schwacher Anionen-Austauscher

Austauschermaterial: Fraktogel EMD DEAE-650 (M) (Fa. MERCK)

Säulenlänge: 25 cm

Säulendurchmesser: 2,6 cm

Äquilibrierungs-Flüssigkeit: H₂O

Durchfluß: 3 mL/min

Auftragsmenge: 6g Retentat /500 mL

Gradient: Batch-Verfahren: 0 mol/L H₂O; 0,3 mol/L NaCl

Starker Anionen-Austauscher

Austauschermaterial: Q-Sepharose (Fa. PHARMACIA)

Säulenlänge: 10 cm

Säulendurchmesser: 2,6 cm

Äquilibrierungs-Flüssigkeit: H₂O

Durchfluß: 5 mL/min

Auftragsmenge: 3g Retentat /250mL

Gradient: Batch-Verfahren: 0 mol/L H₂O; 0,4 mol/L NaCl; 0,4-1,2 mol/L NaCl

Starker Anionen-Austauscher

Austauschermaterial: Mono Q (Fa. PHARMACIA)

Säulenlänge: 10 cm

Säulendurchmesser: 1 cm

Äquilibrierungs-Flüssigkeit: H₂O

Durchfluß: 1,5 mL/min

Auftragsmenge: 3g Retentat /250mL

Gradient: Batch-Verfahren: 0 mol/L H₂O; 0,4 mol/L NaCl; 0,4-1,2 mol/L NaCl

2.2.2 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC)

Material: Phenyl-HIC (Fa. PHARMACIA)

Säulenlänge: 11 cm

Säulendurchmesser: 2,6 cm

Äquilibrierungs-Flüssigkeit: 4 mol/L NaCl

Durchfluß: 2 mL/min

Auftragsmenge: 5g Retentat /500 mL

Gradient: Batch-Verfahren: 4 mol/L; 2 mol/L; 1 mol/L NaCl; 0 mol/L \equiv H₂O

Material: Octyl-HIC (Fa. PHARMACIA)

Säulenlänge: 22 cm

Säulendurchmesser: 2,6 cm

Äquilibrierungs-Flüssigkeit: 4 mol/L NaCl

Durchfluß: 1 mL/min

Auftragsmenge: 5g Retentat /500 mL

Gradient: Batch-Verfahren: 4 mol/L; 2 mol/L; 1 mol/L NaCl; 0 mol/L \equiv H₂O

2.2.3 Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

Material: Superdex 200 (Fa. PHARMACIA)

Säulenlänge: 30 cm

Säulendurchmesser: 1 cm

Äquilibrierungs-Flüssigkeit: H₂O

Durchfluß: 0,5 mL/min

Material: Superose 6 (Fa. PHARMACIA)

Säulenlänge: 30 cm

Säulendurchmesser: 1 cm

Äquilibrierungs-Flüssigkeit: H₂O

Durchfluß: 0,3 mL/min

2.3 *Lymphozyten-Proliferations-Test (LPT)*

Im Lymphozyten-Proliferations-Test (LPT) wird die Induktion der Blasten-Transformation normaler Lymphozyten und deren anschließende Mitose gemessen. Dazu werden isolierte Lymphozyten mit der zu untersuchenden Substanz und ³H-Thymidin inkubiert. Das in der Zell-DNA eingebaute markierte Thymidin wird mit Hilfe eines Flüssigkeits-Szintillationszählers gemessen.³³

Die Einbaurate des ³H-Thymidins kann durch zelltoxische Einflüsse der Prüfsubstanz beeinträchtigt werden. Dies ist bei Testung von Naturstoffen in Zellkulturen zu berücksichtigen. Daher muß der nichttoxische Prüfbereich ermittelt werden. Eine relativ einfache, jedoch unempfindliche Methode ist die mikroskopische Inspektion auf morphologische Degeneration. Bevor Veränderungen in der Morphologie der Zellen erkennbar sind, vollziehen sich aber bereits Veränderungen auf molekularbiologischem Niveau.

Auswirkungen auf die Lymphozytenproliferation lassen sich durch die Einbaurate des ³H-Thymidins messen. Die Ermittlung der Lymphozytenaktivität erfolgt nach einer gleichzeitigen Costimulation der Zellen mit dem Lektin Con A und Phytohämagglutinin.

Durchführung des LPT

Verwendet wurden Mäusemilzen der Mäusestämme NMRI und C3H/HeJ.

Aus Mäusemilzen werden in einer Konzentration von $7,5 \cdot 10^6$ /mL Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Tests werden in „96‘er“- Mikroplatten durchgeführt. Die Platten werden nach Auftrag eines Mediums im Brutschrank äquilibriert. Anschließend werden 100 μ L Zellsuspension und 100 μ L Testlösung bzw. Referenzmitogen hinzupipettiert. Die zu untersuchenden Proben werden bei 37 °C unter CO₂ 72 h inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit (2d) erfolgt die Zugabe von 25 μ L 6-[³H]-Thymidin (spez. Aktivität 2 Ci/mmol) pro Vertiefung. Die Ermittlung der Lymphozytenproliferation wird durch die Menge des eingebauten 6-[³H]-Thymidin (in cpm) bestimmt. Die zu untersuchenden Proben werden ausgehend von einer Konzentration von 1000 μ g Lyophilisat / mL jeweils um die Hälfte bis 7,8 μ g Lyophilisat / mL verdünnt.

Als Positivkontrolle werden 0,8 μ g Con A und 0,48 μ g Phytohämagglutinin eingesetzt.

Auswertung : % Stimulierung = [(cpm test - cpm Kontrolle) / cpm Kontrolle] • 100

2.4 Bestimmung der Homogenität mittels HP-GPC

Bei der Gelchromatographie wird nicht das tatsächliche Molekulargewicht bestimmt, sondern das hydrodynamische Volumen, d. h., sein Maß hängt von der Konformation und der Ladung des Moleküls ab.³⁴

Das Molekülvolumen eines Polymers hängt zwar von seinem Molekulargewicht ab, wird jedoch auch von seiner chemischen Zusammensetzung, seiner Molekülstruktur und experimentellen Parametern, wie dem Lösemittel, der Temperatur und dem Druck, bestimmt.³⁵ Deshalb liefern Kalibrierungen mit Dextranen, die lineare Homopolysaccharide sind, bei der Molekulargewichtsbestimmung verzweigter Heteropolysaccharide nur Näherungswerte, gelangen jedoch aus Mangel an geeigneteren Kalibriersubstanzen trotzdem zum Einsatz.

Bei der Molekülgrößenbestimmung ist es entscheidend, welches Elutionsmittel verwendet wird. Die Größe kann entscheidend niedriger erscheinen, wenn man anstelle von Wasser NaCl-Lösung einsetzt.

Die Überprüfung der isolierten Proben auf ihre Homogenität erfolgte mit einer GPC-Säule. Als Eluent wurde 0,06 mol/L Na₂HPO₄ -Lösung (pH=9,0) eingesetzt. Es wurden ca. 0,5 mg des isolierten Materials in 1mL Elutionsmittel gelöst, filtriert (0,2 µm) und anschließend chromatographisch untersucht. Mit einem Injektionsvolumen von 50 µL und einem Fluß von 1 mL/min wurde bei 280 nm detektiert. Kalibriert wurde mit Standard-Proteinen (Pharmacia Protein-Standard-Kit).

Der pH-Wert liegt weit über dem Bereich des von den isolierten Proben ermittelten isoelektrischen Punktes, um dem zu bestimmenden Protein eine definierte Ladung zu geben. Die Isolierung von Polysacchariden mit GPC kann die Trennung erschweren, weil sie ein polydisperses Molekulargewicht besitzen. Proteine hingegen weisen ein distinktes Molekulargewicht auf, welches ihre Trennung im Vergleich zu Polysacchariden erleichtert.³⁶

Tab. 2: GPC-Untersuchung der isolierten Substanzen / Einwaage von Lyophilisat in 1 mL Elutionsmittel gelöst

Isolierungsschritte			Probenbezeichnung	Einwaage /(mg)	Schema
1.	2.	3.			
Fraktogel	/ Octyl-HIC	/ Superdex 200	0,1M / 4M / P1	1,34	Abb. 6
Fraktogel	/ Octyl-HIC	/ Superdex 200	0,1M / 4M / P2	0,74	Abb. 6
Fraktogel	/ Octyl-HIC	/ Superdex 200	0,1M / 4M / P3	0,62	Abb. 6
Sepharose Q	/ Sephadex G-50	/ Superdex 200	0,4M / P1 / P1	0,70	Abb. 7
Sepharose Q	/ Sephadex G-50	/ Superdex 200	0,4M / P1 / P2	0,69	Abb. 7
Sepharose Q	/ Sephadex G-50	/ Superdex 200	0,4M / P1 / P3	0,94	Abb. 7
Sepharose Q	/ Sephadex G-50	/ Superdex 200	0,4M / P2 / P2	1,17	Abb. 7
Sepharose Q	/ Phenyl-HIC	/ Superdex 200	1,2M / 4M / P1	0,83	Abb. 7
Sepharose Q	/ Phenyl-HIC	/ Superdex 200	1,2M / 4M / P2	0,77	Abb. 7
Sepharose Q	/ Phenyl-HIC	/ Superdex 200	1,2M / 4M / P3	0,94	Abb. 7
Phenyl-HIC	/ Mono Q	/ Superdex 200	4M / 1,5M / P1	0,59	Abb. 11
Phenyl-HIC	/ Mono Q	/ Superdex 200	4M / 1,5M / P2	0,83	Abb. 11
Phenyl-HIC	/ Mono Q	/ Superdex 200	4M / 1,5M / P3	0,69	Abb. 11
Phenyl-HIC	/ Mono Q	/ Superdex 200	2M / 1,5M / P2	0,54	Abb. 11
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung	/ Sephadex G-50	/ Superdex 200	AS / P1 / P1	0,63	Abb. 14
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung	/ Sephadex G-50	/ Superdex 200	AS / P1 / P2	0,95	Abb. 14

Die in Tab. 2 genannten Probenbezeichnungen beziehen sich auf die, mit unterschiedlichen Trennmethoden, isolierten Fraktionen. Die Probengewinnung wird in Kapitel 2 beschrieben. Die Reihenfolge der Kürzel innerhalb der Probenbezeichnungen entspricht der der nacheinander angewandten Trennverfahren. Die Gruppe der Verfahren sind in der Reihenfolge der Entwicklung angeordnet.

Trennbedingungen:

Säule: Suprema 1000 von PSS (8*300 mm) 10 µm

Eluent: 0,06 mol/L Na₂HPO₄ -Lösung (pH=9,0)

Fließgeschwindigkeit: 1 mL/min

Detektion: 280 nm

2.5 Isoelektrische Fokussierung

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punkts der Substanzen wurden die beiden folgenden Ampholyt-Lösungen der Fa. BioRad eingesetzt: Ampholyt-Lösung von pI= 3-10 und pI= 4-6. Bei den Ampholyten handelt es sich um ein Gemisch aus aliphatischen Polyaminopolycarbonsäuren mit verschiedenen isoelektrischen Punkten. Als stabilisierendes Medium eignen sich für analytische Zwecke am besten Polyacrylamidgele.

Monomer-Ampholytlösung (Ansatz für ein 125*65*0,4 mm Gel):

H ₂ O:	5,5 mL
Monomerkonzentration:	2,0 mL
25 mL/100 mL Glycerin :	2,0 mL
Ampholyt:	0,5 mL

<i>Katalysatorlösung:</i>	100 mg/1 mL Ammoniumpersulfat	15 µL
	100 mg/100 mL Riboflavin-5'-phosphat	50 µL
	TEMED	3 µL

Gelvorbereitung:

1. einige Tropfen Wasser auf eine gereinigte Glasplatte pipettieren; Polyacrylamidgel-Trägerfilm luftblasenfrei auf die Platte legen
2. Glasplatte mit Gel-Trägerfilm (hydrophobe Seite an Glasplatte) nach unten auf Gießtablett, so daß es auf den Schienen des Abstandshalters zum liegen kommt

3. Monomer- und Katalysatorlösung ansetzen, vereinigen und anschließend zwischen Glasplatte mit aufgebrachtem Polyacrylamidgel-Trägerfilm und Gießtablett luftblasenfrei pipettieren
4. Polymerisation wird durch die Bestrahlung ($\frac{3}{4}$ h) mit einer UV - Lampe ($\lambda = 366$ nm) unterstützt
5. Nach Bestrahlung Gel wenden und einer nochmaligen Belichtungszeit von $\frac{1}{4}$ h aussetzen, um die Polymerisation zu beenden

Probenvorbereitung:

Salzfrei Probe (5000 μ L) filtrieren und mit Ampholyten (10 μ L) und Glycerin (5 μ L) versetzen

Proben und pI-Marker (Fa. PHARMACIA) an Kathodenseite auftragen

Trennbedingungen:

Fokussierung wird schrittweise durchgeführt, da bei der Trennung Wärme entsteht

1. 100 V, 15 min
2. 200 V, 15 min
3. 450 V, 60 min

Gerät:

BIO-RAD: Mini IEF-Zelle Modell 111

2.6 Elektrophorese nach Laemmli³⁷

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Untereinheiten und zur Überprüfung der Effektivität der durchgeführten chromatographischen Trennung wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Weiterhin sollte die Gelelektrophorese eine Aussage darüber geben, ob die isolierte Substanz proteinhaltig ist.

Die Sichtbarmachung der getrennten Banden wurde durch eine Silberfärbung erzielt. Im Vergleich zu allen anderen Detektionsmethoden ist sie die empfindlichste. Darüber hinaus benötigt man bei dieser Methode wenig Probenmaterial, was in dieser Arbeit ein sehr entscheidender Punkt ist.³⁸

Trenngel („12%“):

H ₂ O	3,35 mL
1,5 mol/L Tris/HCl pH=8,8	2,5 mL
SDS 1g/10mL H ₂ O	0,1 mL
Acrylamid / Bisacrylamid-Stammlsg.	4 mL
Ammoniumpersulfat 1g/10mL Wasser	50 µL
TEMED	5 µL

Sammelgel („4%“)

H ₂ O	6,1 mL
0,5 mol/L Tris/HCl pH=6,8	2,5 mL
SDS 1g/10mL H ₂ O	0,1 mL
Acrylamid / Bisacrylamidstammlsg.	1,3 mL
Ammoniumpersulfat 1g/10mL Wasser	50 µL
TEMED	10 µL

Als Proben- und Elektrodenpuffer wurden folgende Lösungen eingesetzt:

Probenpuffer:

Stammpuffer (pH=6,8):	Tris 6,06 g
	SDS 0,40 g
	NaN ₃ 0,01 g
	mit H ₂ O auf ca. 80 mL auffüllen
	mit 6 mol/L HCl auf pH=6,8 einstellen
	mit H ₂ O auf 100 mL auffüllen

Nichtreduzierender Probenpuffer:

SDS	1000 mg
EDTA (Na-Salz; Tritriplex III [®])	3 mg
NaN ₃	0,01 mg
Bromphenolblau	10 mg
Stammpuffer (pH=6,8)	2,5 mL
	mit H ₂ O auf 100 mL auffüllen.

Reduzierender Probenpuffer:

Der reduzierende Probenpuffer wird durch Zugabe von 100 µL einer DTT-Lösung zu 10 mL des nichtreduzierenden Probenpuffers hergestellt

DTT-Lösung: 250 mg DTT in 0,5 mL H₂O lösen (2,6 mol/L DTT)

Elektrodenpuffer:

Tris	3,03 g
Glycin	14,4 g
SDS	1 g

Mit H₂O auf 1000 mL auffüllen (pH-Wert muß 8,3 betragen)

Die Elektrophorese wird mit konstanter Spannung von 200 V durchgeführt

Elektrophorese-Gerät:

BIO-RAD: Power Supply Modell 1000/500

Alle elektrophoretischen Trennungen wurden mit der oben erwähnten Apparatur durchgeführt

2.6.1 Silberfärbung der Elektrophoresegele

Zum Lokalisieren und Identifizieren der Protein-Banden werden die SDS- ebenso wie die IEF-Gele mit Silbernitrat- und Formaldehyd-Lösung behandelt. Mit dieser Färbemethode können sehr geringe Mengen an Protein detektiert werden.

<u>Fixierlösung:</u>	TCA	120 g ad 1000 mL Lsg.
	Methanol 100 % (v/v)	500 mL MeOH ad 1000 mL Lsg.
<u>Waschlösung:</u>	Ethanol 96 % (v/v)	100 mL EtOH ad 1000 mL Lsg.
<u>Imprägnierlösung:</u>	Ammoniumpersulfat	570 mg ad 1000 mL Lsg.
<u>Silbernitratlösung:</u>	Silbernitrat	1 g ad 1000 mL Lsg.
<u>Entwicklerlösung:</u>	Kaliumcarbonat (wasserfrei)	30 g ad 1000 mL Lsg.
	Formaldehyd (37%ig)	1 mL ad 1000 mL
<u>Stopplösung:</u>	Essigsäure (98%ige)	10 mL ad 1000 mL

Es handelt sich hier um eine modifizierte Silberfärbung nach Heushoven und Dernick.³⁹

1. Gel nach der elektrophoretischen Trennung $\frac{1}{4}$ h in Fixierlösung legen
2. Gel 10 min in ethanolischer Lösung waschen
3. Gel 10 min in Ammoniumsulfat-Lösung legen
4. Gel in Silberlösung transferieren und $\frac{1}{4}$ h behandeln
5. Färbung findet in Entwicklerlösung statt. Dauer 1-2 min
6. Sichtbarmachung der Proteinbanden mit Essigsäure stoppen
7. Gele können im Wasser längere Zeit lagern

Bei einer zu intensiven Färbung kann das Gel entfärbt und der nochmaligen Färbeprozedur unterworfen werden. Man wiederholt dann ab Punkt 3.

Entfärberlösung: 1,0 g /100 mL Lsg. Kaliumhexacyanoferrat (III)
1,6 g /100 mL Lsg. Natriumthiosulfat

Tab. 3: Aufgabemengen der Ursubstanz (Retentat) und der isolierten Substanzfraktionen für eine SDS-Page mit Silberfärbung

Probenbezeichnung	Aufgabemenge / (μg)
Ret	40
0,1M/4M/P2	10
0,4M/P1/P1	12
1,2M/4M/P2	10
4M/1,5M/P2	35
AS/P1/P1	15

Marker („SDS 7“ von PHARMACIA) (1:10 verdünnt) 3 μL

Gel wurde nach Färbung mit Silbernitrat entfärbt (Kaliumhexacyanoferrat/Natriumthiosulfat) und einer nochmaligen Färbung unterzogen

Vorgehensweise bei der Verdünnung:

1,2M/4M/P2 wurde in 200 μL reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und mit 200 μL Wasser verdünnt

Die restlichen Proben wurden in 750 μL reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und mit 750 μL Wasser verdünnt

2.6.2 Glycoprotein-Nachweis mit Schiff's-Reagenz

Proben wurden in reduzierendem Probenpuffer gelöst.

Tab. 4: Aufgabemengen der Ursubstanz (Retentat/Ret) und der isolierten Substanzfraktionen für eine SDS-Page mit Schiff's Reagenz-Färbung

Probenbezeichnung	Volumen / (μL)	Einwaage / (mg / 1500 μL)	Aufgabemenge / (μg)
Ret	15	5,10	51
0,1M/4M/P2	12	11,24	90
0,4M/P1/P2	15	17,76	177
1,2M/4M/P2	5	12,23 in 400 μL	153
4M/1,5M/P2	10	58,14	387
AS/P1/P1	20	17,32	230

Marker 5 μL („SDS 7“ von PHARMACIA)

Elektrophorese (wie unter Punkt 2.6 beschrieben) durchführen. Mit Schiff's Reagenz die Elektrophorese-Gele behandeln

1. ca. 30 min fixieren
70 mL Methanol
10 mL Eisessig, mit H₂O auf 100 mL aufgefüllt
2. 5 min wässern
3. 1g Periodsäure in 30 mL Eisessig/70 mL H₂O 30 min inkubieren
4. Schiff's Reagenz (~24h)
5. Waschen in Wasser, bis der Hintergrund farblos erscheint (ca. 6h)

2.7 Dot-Blot

Membran:

Nitrocellulose BA 85; 0,45 μm

Lösungen:

PBS:

1,9	mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,26	g
8,1	mmol/L Na_2HPO_4	1,15	g
154	mmol/L NaCl	9	g

ad 1000 mL mit H_2O

pH = 7,2-7,4

PBS/ Tween 20:

PBS s. o. versetzt mit 1 mL Tween 20

Triethanolamin-Puffer:

7,5 g NaCl

2,8 mL Triethanolamin

17 mL 1 mol/L HCl

mit 800 mL mit H_2O auffüllen und auf pH = 7,5 einstellen

ad 1000 mL mit H_2O

Färbung:

Eine Chloro-1-naphthol-Tablette (30 mg) in 10 mL Methanol lösen + 90 mL Triethanolamin-Puffer + 100 μL H_2O_2

Durchführung:

1. Nitro-Cellulose-Membranen 20 min auf einer Wippe in PBS äquilibrieren
2. Die Membran in feuchtem Zustand auf eine Gummimatte legen und mit Filterpapier trockentupfen
Das Oberteil der Absaug- und Pipettiereinrichtung auflegen, mit Schrauben fixieren. Die Membran unter Vakuum 5 min lang trocknen
4. Antigen (Lyophilisate) in 750 μL PBS aufnehmen, davon 50 μL pro Napf pipettieren (s. Tab 5: Aufgabenmenge)

Tab. 5: Aufgabemengen der Ursubstanz (Retentat/Ret) und der isolierten Substanzen für einen Dot-Blot

Probenbezeichnung	Aufgabemenge / (μg)
Ret	65
0,1M / 4M / P2	122
0,4M / P1 / P2	180
1,2M / 4M / P2	93
4M / 1,5M / P2	150
2M / 1,5M / P2	85
AS / P1 / P1	120

5. Dot-Blot-Kammer mit Parafilm verschließen und bei RT 1h inkubieren
6. Antigen unter Vakuum entfernen; Blockierung mit 200 μL Rotiblock (1:10 verdünnt); 1h bei RT inkubieren
7. Flüssigkeit unter leichtem Vakuum absaugen; die Membran 3mal mit 200 μL PBS/Tween 20 waschen; anschließend die Membran 5 min trocknen
8. 50 μL des jeweiligen Antikörpers mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pro Napf, bei 37 °C über Nacht inkubieren

Tab. 6: Bezeichnungen der verwendeten monoklonalen Antikörper mit ihrem ermittelten IgG-Gehalt in mg/mL

monoklonale Antikörper	IgG-Gehalt / (mg/mL)
244 I G7	2
236 I H4 Pool 1	1,6
182 I E5	1,2
244 I B7	1,1
196 II A3	0,85
244 I D8 Pool 1	0,99

Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurde durch Verdünnung der jeweiligen Antikörper mit dem entsprechenden Volumen an PBS/Tween 20 und BSA erzielt

9. Flüssigkeit unter Vakuum entfernen und die Membran 3mal mit PBS/Tween 20 waschen
10. Detektionsantikörper in PBS/Tween 20 verdünnen und 100 μ L/Napf pipettieren; 3h bei 37 °C inkubieren
11. Flüssigkeit unter Vakuum entfernen; Membran aus der Dot-Blot-Halterung entnehmen und mit PBS/Tween 20 waschen
12. Färbung mit Chloro-1-naphtol-Lösung

2.7.1 Dot-Blot zur Ermittlung der Nachweisgrenze des Antigens bei Konstanthaltung der Antikörperkonzentration

Nochmaliger Dot-Blot mit der Fraktion 0,1M/4M/P2, die mit den monoklonalen Antikörpern eine Reaktion einging. Die Konzentration des Antigens wurde jeweils um die Hälfte reduziert, die des Antikörpers (10 μ g/mL) wurde konstant gehalten.

6,20 mg der Fraktion 0,1M/4M/P2 in 1500 μ L lösen, pro Napf 50 μ L pipettieren. Das Antigen wurde in folgenden Mengen (in μ g) pro Napf zugesetzt: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25. Die Antikörperkonzentration betrug 10 μ g/mL. Da 50 μ L pro Napf pipettiert wurden, ergibt sich eine Aufgabemenge von 0,5 μ g pro Napf.

Die in Tab. 6 zusammengestellten Antikörper wurden für diesen Versuch eingesetzt.

2.8 Westernblot

Es wurden 7,37 mg 0,1M/4M/P2 in 500 μ L reduzierendem Probenpuffer mit 500 μ L H₂O verdünnt. Eine SDS-Page wurde mit anschließendem Western-Blot durchgeführt. Die verwendeten Antikörper entsprechen denen, die im Abschnitt „Dot-Blot“ beschrieben wurden. Die Konzentration der monoklonalen Antikörper wurde auf 10 μ g/mL eingestellt.

Lösung A:

0,04 mol/L 6-Amino-n-Hexansäure (Capronsäure)

0,025 mol/L Tris

200 mL Methanol ad 1000 mL H₂O

pH = 9,4

Lösung B:

0,025 mol/L Tris

200 mL Methanol ad 1000 mL H₂O

pH = 10,4

Lösung C:

0,3 mol/L Tris

200 mL Methanol ad 1000 mL H₂O

pH = 10,4

Nitrocellulose-Membran auf ca. 10 x 5 cm zuschneiden

6 Whatman-Membranen in **Lösung A** legen

3 Whatman-Membranen in **Lösung B** legen

6 Whatman-Membranen in **Lösung C** legen

Das Unterteil der Western-Blot-Kammer mit H₂O und anschließend mit Lösung C spülen. Die Fläche mit einem Zellstoff-Papier trocknen.

Die 6 Whatman-Membranen aus Lösung C einzeln luftblasenfrei übereinanderlegen. In gleicher Weise werden die 3 Membranen aus Lösung B aufgebracht.

Die Nitrocellulose in Lösung B tränken und auf die Membranen legen. Das Gel in Lösung A kurz waschen und auf die Nitrocellulose legen. Mit Hilfe eines Skalpells wird die Nitrocellulose zusammen mit dem Gel zugeschnitten.

Die Membranen aus Lösung A auf das Gel legen. Mit einer Rolle überschüssigen Puffer (von der Mitte nach außen) aus den Membranen drücken. Das Oberteil der Kammer mit H₂O waschen und mit Lösung A benetzen. Mit Zellstoff das Oberteil abtupfen.

Das Oberteil gerade auf das Unterteil der Kammer legen und festdrücken.

Laufbedingungen:

40 min, 100 V, 50 mA, 5 W. Mit einem Eisbeutel kühlen

Aurodye-Färbung:

- Nitrocellulose-Stück dreimal mit PBS/Tween 20 waschen, bei 37 °C 60 min inkubieren
- bei RT über Nacht in 10 mL Aurodye-Lösung inkubieren

Blot in Stücke schneiden, mit PBS 5mal waschen. Die Stücke mit PBS/Pferdeserum (Blockierungspuffer) versetzen, 1h bei 37 °C inkubieren.

Anschließend die Stücke mit PBS waschen, mit dem jeweiligen Antikörper in Tütchen einschweißen, über Nacht bei 37 °C inkubieren.

Die Konzentration der verwendeten Antikörper betrug bei allen 10 µg/mL.

Die Membranteile 3mal mit PBS-Tween waschen und anschließend den Peroxidase-markierten Anti-Maus-Antikörper 1+999 mit PBS und 10 mL/100 mL Pferdeserum verdünnen; 2h bei 37 °C inkubieren.

Nitrocellulose-Stücke 3mal mit PBS-Tween waschen und mit Chloro-1-naphtol-Lösung (s. Abschnitt 2.7 „Dot-Blot“ „Färbung“) färben.

2.9 Proteinbestimmungen

Alle Messungen der verschiedenen Proteinbestimmungs-Methoden wurden mit dem Gerät „Lambda 12“ der Fa. Perkin-Elmer durchgeführt und mit der Software PECOL ausgewertet. Es wurde bei allen Methoden für die Kalibrierung BSA verwendet.

Substanzen mit Mikroheterogenität können mit der Proteinbestimmungsmethode nach Bradford nicht untersucht werden.⁴⁰

Bestimmung nach Kjeldahl wurde nicht durchgeführt, da bei dieser Methode viel Probenmaterial benötigt wird.

2.9.1 Biuret-Methode

Prinzip der Biuret-Methode

Bei der Biuret-Methode reagieren Cu^{2+} -Ionen mit der Peptidkette und nicht mit Seitengruppen der Aminosäuren. Folglich hängt die Intensität der Färbung von der Zahl der Peptidbindungen im Molekül und nicht von den Aminosäuren der Proteine ab. Die Unterschiede in der Farbentwicklung sind deshalb zwischen den verschiedenen Proteinen viel geringer als bei der Methode von Lowry.

Säureamide, wie z.B. Biuret (Carbonylharnstoff), das der Reaktion den Namen gab, ferner Peptide (ab Tripeptide) und Proteine bilden mit Kupfer (II)-Salzen in alkalischer Lösung intensiv rotviolett gefärbte, anionische Chelatkomplexe mit Cu^{2+} als Zentralatom (Absorptionsmaximum zwischen 540 und 560 nm). Voraussetzung für diese Komplexbildung ist das Vorhandensein von mindestens zwei Säureamidgruppen oder Peptidbindungen. Zahlreiche andere Chelatbildner, wie mehrwertige Hydroxycarbonsäuren (z.B. Citrat, Tatriat) oder Alkohole (z.B. Glycerin) sowie freie Aminosäuren, reagieren ebenfalls mit Cu^{2+} -Ionen, bilden aber blaue Komplexe, deren Farbintensität weitgehend der einer wässrigen Kupfer(II)-Salzlösung (mit dem hellblauen Komplexion $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$) entspricht.⁴¹

Störende Substanzen

Andere zelluläre Makromoleküle sowie freie Aminosäuren stören diesen Test nicht oder wenig. Dagegen stören größere Mengen an Ammoniumsalzen oder an Zuckern. Zucker karamelisiert beim Erhitzen mit Alkali und liefert stark reduzierend wirkende Zersetzungsprodukte, die Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren; dabei fällt gelb bis rot gefärbtes Kupfer(I)-oxid aus. Auch Puffer, wie z.B. Tris-Puffer, können die Biuretreaktion beeinträchtigen.

Nachteil der Biuret-Methode ist ihre geringe Empfindlichkeit. Man benötigt ca. 0,2 mg Protein pro 1 mL Bestimmungsansatz.

Wenn man höhere Empfindlichkeit benötigt, also geringeren Probeneinsatz, so ist die Methode nach Lowry vorteilhafter als die Biuret-Methode.

Ammoniumsalze, die bei der Fällung verwendet wurden, wie auch der Anteil des Tris-Puffers bei der Perkolatation, wurden durch Dialyse und Gelfiltration, die bei allen Trennschritten zum Schluß durchgeführt worden sind, entfernt.

Die Proben wurden abweichend von der Literatur nicht 5 min gekocht, um eine Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ zu verhindern.

Durchführung

In einem Zentrifugenröhrchen wird Lyophilisat in 1 mL Wasser gelöst. Nach Zusatz von 1 mL 3molarer NaOH-Lösung wird die Probe mit Hilfe eines Vortex gemischt. Zu dieser Lösung wird 1 mL einer Kupfersulfat-Lösung (2,5 g/100 mL) gegeben, homogenisiert und eine ½ h bei RT stehengelassen.

Nach Entfernung des ausgefallenen hellblauen Kupfer(II)-hydroxyds durch Zentrifugation (10 min / 3500 U/min), wird der Überstand spektroskopisch bei $\lambda = 555$ nm vermessen.

Kalibriert wird mit einer BSA-Lösung, die in der Stammlösung 2 mg/mL Protein enthält.

2.9.2 Lowry-Methode

Prinzip der Lowry-Methode

Die Methode nach Lowry basiert auf dem „Phenolreagenz“ nach Folin und Ciocalteu⁴⁴. Das Reagenz enthält ein Gemisch der Heteropolysäure 12-Molybdato-phosphorsäure (Phosphormolybdänsäure) und 12-Wolframatophosphorsäure (Phosphorwolframsäure). Phenole und andere reduzierende Substanzen setzen die Säuren zu tiefblauem löslichen „Molybdänblau“ bzw. „Wolframblau“ um (Absorptionsmaximum zwischen 745-750 nm). Es handelt sich dabei um Mischoxide des fünf- und sechswertigen Molybdäns bzw. Wolframs. Die intensive Farbe beruht auf der gleichzeitigen Anwesenheit zweier Oxidationsstufen desselben Elementes in ein und demselben Molekül („Charge-transfer-Komplex“).⁴²

Die Blaufärbung läßt sich zur photometrischen Bestimmung von Proteinen verwenden, da auch Proteine das Folin-Ciocalteu-Reagenz reduzieren. Verantwortlich für die Reduktion sind

bestimmte Aminosäuren in den Proteinen, in erster Linie die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan. Ein Zusatz von Kupfer(II)-sulfat erhöht die Farbintensität und damit die Empfindlichkeit der Reaktion. Cu^{2+} -Ionen bilden mit Peptidbindungen des Proteins Chelatkomplexe und erleichtern in der komplexen Bindung den Elektronenübergang von den Seitenketten der aromatischen Aminosäuren zu den Heteropolysäuren.

Störende Substanzen

Nachteil der Lowry-Methode ist der Mangel an Spezifität. Es gibt Verbindungen, wie z.B. Glycin, Ammoniumsulfat, die die Farbintensität herabsetzen.

Die Störung durch Ammoniumsulfat kann, wie bei Biuret auch bei Lowry, ausgeschlossen werden, da die Proben der Ammoniumsulfat-Fällung einer Dialyse unterworfen wurden. Weiterhin sind diese Fraktionen über die GPC von Salzen befreit worden, da niedermolekulare Verbindungen bei dieser Art der Chromatographie am Schluß eluieren.

Bewertung der Methode

Die Methode nach Lowry ist um 2 Zehnerpotenzen empfindlicher als die von Biuret. Sie ist jedoch viel störanfälliger und nicht reproduzierbar. Vor allem aber liefert die Lowry-Methode nur relative Ergebnisse, denn die Farbintensität ist -bei gleicher Proteinmenge- für die verschiedenen Proteine unterschiedlich, weil sie fast ausschließlich von der Anzahl und Anordnung der aromatischen Aminosäuren im Protein abhängt. Deshalb muß man bei der Angabe von Proteingehalten immer auch das für die Kalibrierkurve verwendete Standardprotein angeben.

Reagenzien

- A 0,15 g Natriumdesoxycholat in 100 mL H₂O
- B 72 g Trichloressigsäure in 100 mL H₂O
- C 1 g CuSO₄ • 5H₂O in 100 mL H₂O
- D 2 g K,Na-tartrat in 100 mL H₂O
- E 3,4 g Na₂CO₃ in 0,2 mol/L NaOH lösen und mit Lsg. auf 100 mL füllen
- F 10 g SDS in 100 mL H₂O
- G Lösung C, D, E und F im Verhältnis 1+1+28+10 mischen
- H Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz 1+3 mit H₂O verdünnt
- I Rinderserumalbumin in Konzentration von 10 - 200 µg/mL H₂O
- J Probenlösung: 1mg/mL H₂O

Durchführung

Lyophilisat mit 1 ml H₂O aufnehmen, mit 0,1 mL A versetzen. Nach zehn Minuten bei RT 0,1 mL B zugeben. Mit Hilfe eines Vortex mischen, nach weiteren 15 min Standzeit bei RT zentrifugieren (3500 U/min; 10 min).

Den Niederschlag in 1,0 mL H₂O aufnehmen und mit G versetzen. Nach 10 min 0,5 mL H hinzugeben, wiederum mit Vortex homogenisieren. Nach 30 min Lösungen bei $\lambda=700$ nm messen.^{43,44}

2.9.3 UV-Absorptions-Methode

Proteinfractionen wurden nach Warburg/Christian⁴⁵ und Kalckar⁴⁶ bestimmt. Die Methode basiert auf der Absorption von Tyrosin- und Tryptophan-Resten bei einer Wellenlänge von 280 nm.

Lyophilisate (~ 0,5 mg) wurden in 1 mL H₂O aufgenommen, anschließend photometrisch gemessen.

2.9.4 BCA (Bicinchoninsäure)-Methode⁴⁷

1. Präparation des Micro-Reagenz A (MA)

8 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$

1,6 g NaOH

1,6 g Na_2 -Tartrat

pH- Wert mit NaHCO_3 auf 11,25 einstellen und mit H_2O auf 100 mL auffüllen

2. Fertigreagenz BCA

3. Herstellung des Micro-Reagenz B (MB)

4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 100 mL lösen; 4 Volumenteile dieser Lösung mit 100 Volumenteilen des Fertigreagenz BCA mischen

4. Darstellung des Färbesubstrats

1 Volumenteil MB mit 1 Volumenteil MA mischen

5. 500 μL der Probelösung werden mit 500 μL Färbesubstrat versetzt

6. Inkubation 60 °C, 60 min

7. Abkühlen auf RT und Absorption bei 562 nm messen

2.9.5 Amidoschwarz-Methode

Reagenzien:

Lösung A

1g/100 mL Amidoschwarz 10B (C.I.20470) in einem Gemisch aus 30 mL Methanol und 70 mL Eisessig

Lösung B

80 mL Methanol + 10mL Eisessig

Lösung C

10 mL Eisessig und 30 mL Methanol ad 100 mL H_2O

Lösung D

1 mol/L NaOH

Durchführung:

Proteinprobe in 1 mL Wasser lösen und von der Lösung A 2 mL hinzusetzen. Nach intensivem Mischen mit Vortex Proben 10 min in ein Eisbad stellen. Anschließend Probe zentrifugieren (3500 U/min, 10min bei 0 °C). Überstand dekantieren, Niederschlag mit Lösung B waschen, bis der Überstand farblos erscheint. Nach dem letzten Waschen Pellet bei Raumtemperatur trocknen.

Luftgetrockneten Niederschlag in 3,0 mL der Lösung D lösen und photometrisch bei $\lambda = 625$ nm messen. Die Kalibrierkurve mit BSA aufnehmen.⁴⁸

2.9.6 Elementaranalyse

Der CHN-Gehalt (nach Dumas) wurde im Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg bestimmt.

2.10 Enzymatischer Abbau des Proteinanteils des Glycoproteins

Proteasen: Sammelbegriff für Enzyme, welche die hydrolytische Spaltung der Peptidbindungen (Proteolyse) in Proteinen und Peptiden katalysieren. Sie werden zu den Hydrolasen gerechnet und in Proteinasen (früher Endopeptidasen) und Peptidasen (Exopeptidasen) unterteilt. Erstere spalten Peptid-Bindungen im Inneren eines Moleküls. Dies war der ausschlaggebende Punkt, diese Art des Enzyms für die Durchführung des enzymatischen Abbaus des Proteinanteils in den Substanzen einzusetzen.

Verwendete Enzyme:

Protease (neutral, Dispease) aus *Bacillus polymyxa* (GradII), Boehringer Mannheim

Proteinase K aus *Tritirachium album*, MERCK

Protease 20 mg/mL in H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert

Proteinase K 20 mg/mL in H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert⁴⁹

Reaktionspuffer:

0,01 mol/L Tris (pH=7,8)

0,005 mol/L EDTA (Na-Salz; Tritriplex III[®])

0,5g/100 mL SDS

Durchführung:

Lyophilisierte Proben in 1 mL Reaktionspuffer aufnehmen, mit dem jeweiligen Enzym (50 µL) versetzen. Lösungen mit Vortex mischen. Diese gelösten Proben wurden bei 37 °C inkubiert. Um den Verlauf des enzymatischen Abbaus zu verfolgen, wurde eine elektrophoretische Trennung mit anschließender Silberfärbung durchgeführt. Da der Abbau bei der ersten Behandlung nicht vollständig verlief, wurden nochmals 50 µL des entsprechenden Enzyms zugesetzt, bis der Proteinanteil in der Elektrophorese nicht mehr detektierbar war.

Der Abbau des Proteins war nach 4maligem Zusatz des Enzyms vollständig (einwöchige Behandlung).

2.11 Bestimmung von Monosacchariden

2.11.1 DC-Bestimmung von Monosacchariden

Fließmittelgemisch: Acetonitril/Wasser/Eisessig

85 + 14 + 1 (v/v)

Dreifach Entwicklung auf einer Kieselgelplatte 60 F₂₅₄ ; 10 x 20 cm (Fa. MERCK)⁵⁰

Detektion⁵¹:

Anilindiphenylaminophosphorsäure:

2 mL	Anilin
2g	Diphenylamin
10 mL	Phosphorsäure
ad 100 mL	Methanol

Tab. 7: Zucker und Zuckersäuren für DC-Bestimmung

Bezeichnung	Auftragemenge /(μL)
Ret	10
D-Galacturonsäure	5
D-Glucuronsäure	5
D-Galactose	5
D-Glucose	5
D-Mannose	5
L-Arabinose	5
L-Rhamnose	5
Fucose	5
D-Xylose	5

2.11.2 GC-Bestimmung von Monosacchariden

Voraussetzung für gaschromatographische Trennungen sind flüchtige und gleichzeitig thermisch stabile Substanzen. Daher muß Zucker vor der Trennung derivatisiert werden.

Die Derivatisierung kann mit folgenden Methoden durchgeführt werden: Umsetzung der Monosaccharide in Methylether, Aldonitrilacetal, O-Trifluoracetyl-O-methyl-Alditol, Trimethylsilylether oder Alditolacetal.

Die bislang gebräuchlichste Derivatisierung von Monosacchariden ist ihre Überführung zu O-Trimethylsilylverbindungen. Bei dieser Art der Derivatisierung erscheint das einzelne Monosaccharid infolge seiner verschiedenen anomeren Formen im Gaschromatogramm fast immer in mehreren Peaks.⁵²

Diese Tatsache kann bei der Bestimmung von einem oder zwei Zuckern noch unproblematisch sein, führt aber bei komplexen Gemischen zu erheblichen Peaküberlagerungen. Die quantitative Bestimmung müßte dann über die Peakhöhen, nicht die Peakflächen, erfolgen.

Durch Überführung der Monosaccharide in die Alditolacetale gibt es pro Zucker im Gaschromatogramm jeweils nur einen Peak. Alle in Frage kommenden Monosaccharide können Basislinien-getrennt werden.

Durch Reduktion der Aldehydfunktion am C-1 und Ringöffnung mit Natriumborhydrid werden die Monosaccharide mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Die entstandenen Alditolacetale ergeben bei der gaschromatographischen Untersuchung pro Zucker nur ein Signal. Uronsäuren werden durch diese Derivatisierungsmethode nicht umgesetzt.

Vergleich der Hydrolysen

Eine Bausteinanalyse des Polysaccharids nach Totalhydrolyse mit Säure ist ein erster Schritt zur Strukturaufklärung. Vor allem bei Heteropolysacchariden ist es schwierig, eine für alle glycosidisch verknüpften Zuckerbausteine gleichermaßen geeignete Hydrolysemethode zu finden. Deshalb wurden verschiedene Hydrolysebedingungen miteinander verglichen.

Die Spaltung des Polysaccharids geschieht durch wäßrige oder methanolische Säurelösungen. Die Hydrolyse im wäßrigen Medium erfolgt entweder mit Schwefelsäure oder mit 2 mol/L TFA. Hier sind die Verluste durch Nebenreaktionen am geringsten. Die Entfernung der TFA durch Verdampfen nach Beendigung der Reaktion ist ein Vorteil gegenüber anderen Hydrolysemöglichkeiten. TFA kann fast alle glycosidischen Bindungen quantitativ spalten, ohne daß es zu größeren Verlusten an säurelabilen Zuckern führt.^{53, 54, 55}

Die Schwefelsäure muß durch Fällung mit Ba(OH)₂ und Ionenaustauscherbehandlung entfernt werden. Bei neutralen Polysacchariden und bei solchen mit niedrigem Uronsäuregehalt, ist die Zersetzungsrates im wäßrigen Medium niedrig. Hingegen werden Polysaccharide, die einen hohen Anteil an Uronsäuren aufweisen, stark zersetzt.

Es empfiehlt sich, die Methanolyse durchzuführen, die zu besseren Ausbeuten führt. Als Umsetzungsprodukte entstehen 1-O-Methylglykoside bzw. 1-O-Methyluronsäuremethylester. Wiederfindungsraten einiger neutraler und saurer Zucker aus Polysacchariden nach Hydrolyse mit 2 mol/L TFA, bzw. nach einer Methanolyse, sind in der Tabelle 8 dokumentiert.

Tab. 8: Vergleich von zwei unterschiedlichen Hydrolysen anhand von Gummi arabicum und Tragant

	Trifluoressigsäure 2 mol/L	Methanolyse
Gummi arabicum	74	80
Tragant	68	78

Tragant ist ein pflanzliches Gummi, das durch Verletzung der Stammrinde von Astragalus-Arten (Fabacee) gewonnen wird. Bei der Pflanze *Baptisia tinctoria* handelt es sich ebenfalls um eine Fabacee.

Bei Gummi arabicum handelt es sich auch um ein pflanzliches Gummi, bestehend aus den Hauptkomponenten Arabinose und Galactose. Diese Zucker sind bei dem behandelten Ausgangsmaterial (Retentat) aus *Baptisia tinctoria* auch die dominierenden Monosaccharide.

Es wurde bei den isolierten Substanzen sowohl die Methanolyse als auch die TFA zur Hydrolyse eingesetzt. Bei der Derivatisierung mit Silylierungsmittel wurde eine Methanolyse und bei der Alditol-Acetal-Umsetzung eine Hydrolyse mit TFA durchgeführt.

Darstellung von Trimethylsilylether

Hydrolysebedingung

Ca. 10 mg Monosaccharide wurden in 1 mL 1 mol/L methanolischer HCl (0,71 mL Acetylchlorid in 10 mL getrocknetem MeOH //Methanolyse) aufgenommen. Die Lösung wird bei 100 °C 16h in einem Pyrex-Gefäß mit Schraubverschluß (Teflondichtung) erhitzt.

Derivatisierung

Die erkalteten Lösungen wurden mit Stickstoff trockengeblasen. Der Rückstand wurde in 200 µL Silylierungsmittel (HMDS/TMCS; 2+1) aufgenommen und 15 min auf 100 °C erhitzt. Es entsteht ein weißlicher Niederschlag. Nach Suspendieren in 1 mL Dichlormethan wird die Lösung bei 3000 U/min 10 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde für die gaschromatographische Untersuchung verwendet.

GC-Trennbedingungen für Trimethylsilylether

Säule: DB-1701 (30 m*0,25 mm I.D, 0,15 µm)

Trägergasfluß: Helium (30 cm/s)

Ofentemperatur: 180 °C (2min) auf 200 (5 °C/min)

Injektor: 250 °C / Split 1:50 / Injektionsvolumen 1 µL

Detektor: FID 260 °C

Darstellung von Alditolacetalen⁵⁶

Hydrolysebedingung

Es wurden 1-2 mg des isolierten Materials in ein Pyrexröhrchen eingewogen und mit 1-2 mL 2 mol/L TFA versetzt. Die braune Suspension erhitzt man 90 min bei 121 °C im Trockenschrank. Das Hydrolysat wird in einen 25 mL Spitzkolben überführt. Diese Lösung wird zur Trockene eingeeengt, zweimal mit je 2 mL MeOH aufgenommen und erneut einrotiert.⁵⁷

Derivatisierung

Es werden jeweils 10 mg pro Referenzzucker in ein Schliffreagenzglas eingewogen. Zu diesen Standardsubstanzen werden 0,5 mL einer Natriumborhydrid-Lösung (1g/100mL) hinzugefügt und 1h bei RT stengelassen. Das überschüssige Natriumborhydrid wird durch Zusatz von 50 µL Eisessig entfernt. Die erhaltene Lösung wird eingedampft und mit MeOH zweimal bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird mit 1000 µL Pyridin (getrocknet) und 500 µL Acetanhydrid (frisch destilliert) versetzt. Diese Lösung wurde 15 min bei 100 °C erhitzt. Die Lösungen wurden in jeweils 5-10 mL Wasser gegeben, um das nicht umgesetzte Acetanhydrid zur Essigsäure zu hydrolysieren. Diese wäßrigen Lösungen werden mit je 5 mL Diethylether dreimal extrahiert. Die organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Die Probe wird mit 2 mL Dichlormethan aufgenommen und vermessen.

GC-Trennbedingungen für Alditolacetale

Säule: DB-225 (30 m*0,25 mm I.D, 0,15 µm)

Trägergasfluß: Helium (30 cm/s)

Ofentemperatur: 207 °C (isotherm)

Injektor: 250 °C / Split 1:50 / Injektionsvolumen 1 µL

Detektor: FID 260 °C

Tab. 9: Einwaagen der isolierten Substanzen und der Ursubstanz (Retentat / Ret) für eine 2 mol/L TFA-Hydrolyse und anschließender Derivatisierung zu Alditolacetal

Probenbezeichnung	Einwaage (mg)
Ret	21,24
0,1M/4M/P1	13,10
0,1M/4M/P2	18,47
0,1M/4M/P3	18,39
0,4M/P1/P2	14,37
0,4M/P1/P3	22,21
1,2M/1,5M/P1	13,32
1,2M/1,5M/P2	14,35
4M/1,5M/P2	15,75
4M/1,5M/P3	15,58
2M/1,5M/P2	19,47
AS/P1/P1	11,73
AS/P1/P2	15,32
AS/P2/P1	19,68

Lyophilisate in 2 mL Trifluoressigsäure aufnehmen und 1h bei 121 °C hydrolysieren.

Nach einem etwas modifizierten Trennprogramm von Kraus ⁵⁸ wurde versucht, die Aminosucker Galactosamin und Glucosamin parallel zu den Alditolacetal-Derivate der Zucker zu identifizieren.

Aminosucker wurden zum Hydrolysieren mit einer 4 mol/L Salzsäure nur 4h bei 100 °C gekocht, damit sie nicht zersetzt werden.

GC-Trennbedingungen nach Kraus⁵⁸

Säule: DB-225 (30 m*0,25 mm I.D, 0,15 µm)

Trägergasfluß: Helium (30 cm/s)

Ofentemperatur: Säulentemperaturgradient: 185 °C 10 min; 3°C /min bis 220 °C; Temperatur 5 min halten; anschließend Temperaturerhöhung bis zur Endtemperatur 235 °C innerhalb von 1 min. Diese Endtemperatur wird 30 min gehalten.

Injektor: 250 °C / Split 1:50 / Injektionsvolumen 1 µL

Detektor: FID 300 °C

Die GC-Bestimmungen der Monosaccharide wurden mit folgendem Gerät durchgeführt:

Perkin-Elmer

GC: PE Autosystem

Detektor: FID

Auswertung mit Software: PE Nelson Turbo-Chrom Version 6.02

2.11.3 HPLC-Bestimmung von Monosacchariden

Lichtstreuendetektor (LSD)

Die Verdampfungs-Lichtstreu-Detektion ist eine universelle Technik, mit der jeder nichtflüchtige Analyt (in diesem Fall Monosaccharide) detektiert werden kann.

Durch die Aerosol-Bildung wird der Eluent in einem Verdampferrohr in Nebel umgewandelt. Das Aerosol wird durch eine Verdampfungsstrecke geleitet, in der das Lösemittel verdampft. Die nicht verdampfbare Komponente (Rest-Aerosol) gelangt in den Detektor. Das Ausmaß der Lichtstreuung, welches im Verhältnis zur Konzentration der zu analysierenden Substanz im Eluenten steht, wird gemessen.

Das erhaltene Lichtintensitätssignal ist proportional der Masse der gelösten Stoffe:

$$I = k m^b$$

I = Intensität des Lichts

m = Masse der streuenden Partikel

k und b = Konstanten

Die logarithmierten Werte $\log I$ gegen $\log m$ stehen in einer linearen Beziehung zu einander. Die Werte der Konstanten k und b sind von einer Reihe experimenteller Bedingungen abhängig (z.B. Temperatur und Art der mobilen Phase).

Die Detektion wird mit polychromatischem Licht einer Wolfram-Halogenlampe durchgeführt.

Diese Technik ist die einzige, bei der vor der Detektion die mobile Phase entfernt wird. Dadurch beseitigt man die Lösemittelfront und stabilisiert die Basislinien.

Gegenüber der Bestimmung von Brechungsindizes der Zucker mit Hilfe eines Refraktometers, das bei der Zuckeranalytik oft eingesetzt wird, bietet der LSD folgende Vorteile:

- Kompatibilität mit Gradientenelution
- kein Lösemittelpeak
- stabile Basislinie, die bei Änderung in der Säulentemperatur unbeeinflusst bleibt

Die Analyten müssen nicht flüchtig sein.

Hydrolysebedingungen zur Darstellung von Methylglycosiden

Die Methanolyse wurde mit einer methanolischen HCl (0,71 mL Acetylchlorid in 10 mL MeOH) durchgeführt (16 h, 100 °C). Das Lösemittel wird im Stickstoffstrom entfernt, der Rückstand mit Wasser aufgenommen. Die Hydrolyse ist gleichzeitig eine Derivatisierung.⁵⁹

60, 61, 62

HPLC-Trennbedingungen für Methylglycoside⁶³

Die Probenbestandteile werden über eine Spherisorb ODS2, 5 µm, 250 * 4,6 mm-Säule getrennt und mit Hilfe eines LSD (30 °C Verdampfungstemp., 25 psi Vernebelungsdruck) detektiert. Die Trennung findet isokratisch mit einem Fließmittelgemisch von H₂O/MeOH (97+3) und einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL/min statt.

Geräte:

TSP Probennehmer Spectra System AS 3000

Pumpe contra Metric 3500/3200

Entgaser: Membran Degasser

Software: PC 1000

Detektoren: Lichtstreuendetektor: S.E.D.E.R.E. Sedex 55

2.12 HPLC-Bestimmung von Aminosäuren

2.12.1 HPLC-Bestimmung von Aminosäuren mit Derivatisierung

Aminosäuren sind amphotere Verbindungen, deren Molekulargewicht zwischen 75 und 200 g/mol liegt. Sie kommen in einer Vielzahl unterschiedlicher Matrices entweder in freier oder gebundener Form vor. Sie sind die Grundbausteine von Peptiden und Proteinen. Im engeren Sinne versteht man darunter die 20 am Protein-Aufbau beteiligten. Pflanzen synthetisieren alle Aminosäuren aus einfachen Vorstufen. Mensch und Tier hingegen können nur die sogenannten nicht essentiellen Aminosäuren aufbauen. Die essentiellen Aminosäuren müssen dagegen mit der Nahrung aufgenommen werden. Die Eiweißsynthese gerät ins Stocken, wenn die essentiellen Aminosäuren in der Nahrung fehlen. Die Folgen können lebensbedrohliche Mangelercheinungen sein.

OPA-Derivatisierung von Aminosäuren⁶⁴

Die OPA-Methode setzt eine genaue und immer gleiche zeitliche Abfolge aller Schritte der Derivatisierung der Gradientelution einschließlich der Säulenäquilibrierung voraus.

Das selbst nicht fluoreszierende ortho-Phthaldialdehyd (OPA) bildet im alkalischen Milieu mit primären Aminosäuren in Gegenwart einer Thiolverbindung ein fluoreszierendes Isoindolringsystem. Bei der Reaktion wird der Amino-Stickstoff in einen Pyrroltyp-Stickstoff

umgewandelt, bei dem beide vorher freien Funktionen und auch das freie Elektronenpaar des Stickstoffs im heteroaromatischen Ringsystem integriert werden.

Daher bilden sekundäre Amine, wie z. B. Prolin, mit OPA kein fluoreszierendes Derivat.

Da OPA selbst nicht fluoresziert, muß das überschüssige Reagenz bei Vorsäulenderivatisierung mit OPA nicht aus der Reaktionsmischung entfernt werden. Deshalb ist für diese Methode nur ein relativ einfacher Derivatisierungsschritt erforderlich.

HPLC-Analyse von Aminosäuren durch Vorsäulenderivatisierung mit OPA

Vorteile der OPA-Methode:

- schnelle Reaktion
- das OPA-Reagenz ist selbst nicht fluoreszierend, somit ist eine Entfernung des Derivatisierungsmittels nicht erforderlich
- es handelt sich um eine Ein-Schritt-Derivatisierung
- die derivatisierten Aminosäuren sind mit einer relativ einfachen Gradienten-Elution zu trennen
- Tryptophan kann mit der OPA-Methode detektiert werden

Nachteile der OPA-Methode:

- sekundäre Aminosäuren wie Prolin und Hydroxyprolin können mit OPA nicht derivatisiert werden
- das OPA-Reagenz ist nicht stabil

Reproduzierbarkeit: Peakflächen: $\sigma\% = 2-4\%$ für Standards

Retentionszeiten: $\sigma = 0,01-0,2$ min für Standards

Reagenzien und Lösungen:

1. Borat-Puffer

0,5 mol/L Natrium-Borat (pH=9,5)

2,515 g Natrium-tetraborat (wasserfrei) werden ad 100 mL H₂O gelöst. Der pH-Wert wird mit NaOH (0,5 mol/L) eingestellt

2. *OPA-Reagenz*

100 mg ortho-Phthaldialdehyd

9 mL Methanol

1 mL Borat-Puffer (s.Pkt.1.)

0,1 mL 2-Mercaptoethanol

ortho-Phthaldialdehyd wird in Methanol gelöst, anschließend mit Borat-Puffer und 2-Mercaptoethanol versetzt

3. *Verdünnte Salzsäure (0,75 mol/L HCl)*

7,4 mL HCl (32%) ad 100 mL mit H₂O

4. *Elutionsmittel*

Eluent A: 50 mmol/L Natriumacetat pH= 7,0

8,203 g Natriumacetat (wasserfrei) ad 2L H₂O, pH mit 1 mol/L HCL
einstellen

Eluent B: Methanol

5. *Solvens für die Aminosäure-Proben*

H₂O /Methanol (2+8, v/v)

Analysenbedingungen

Injektionsvolumen: 20 µL

Säule: Supersher 100 RP 18 (4µm) LiChroCART 250-4

Säulentemperatur: 40 °C

Detektion: Fluoreszenz (Empfindlichkeit = 100) Ex 330 nm/ Em 450 nm

Fließgeschwindigkeit: 1 mL/min

Eluent: A = 50 mmol/L Natriumacetat pH= 7,0

B = Methanol

Gradient:

Zeit / (min)	A (%)	B (%)	Fluß / (mL/min)
0	74	26	1,0
10	74	26	1,0
25	62	38	1,0
40	25	75	1,0
50	25	75	1,0

Geräte:

HPLC-Anlage: TSP Probennehmer Spectra System AS 3000
Pumpe contra Metric 3500/3200
Entgaser: Membran Degasser
Software: PC 1000
Fluoreszenzdetektor: TSP fluoro Monitor 4100

Probenvorbereitung:

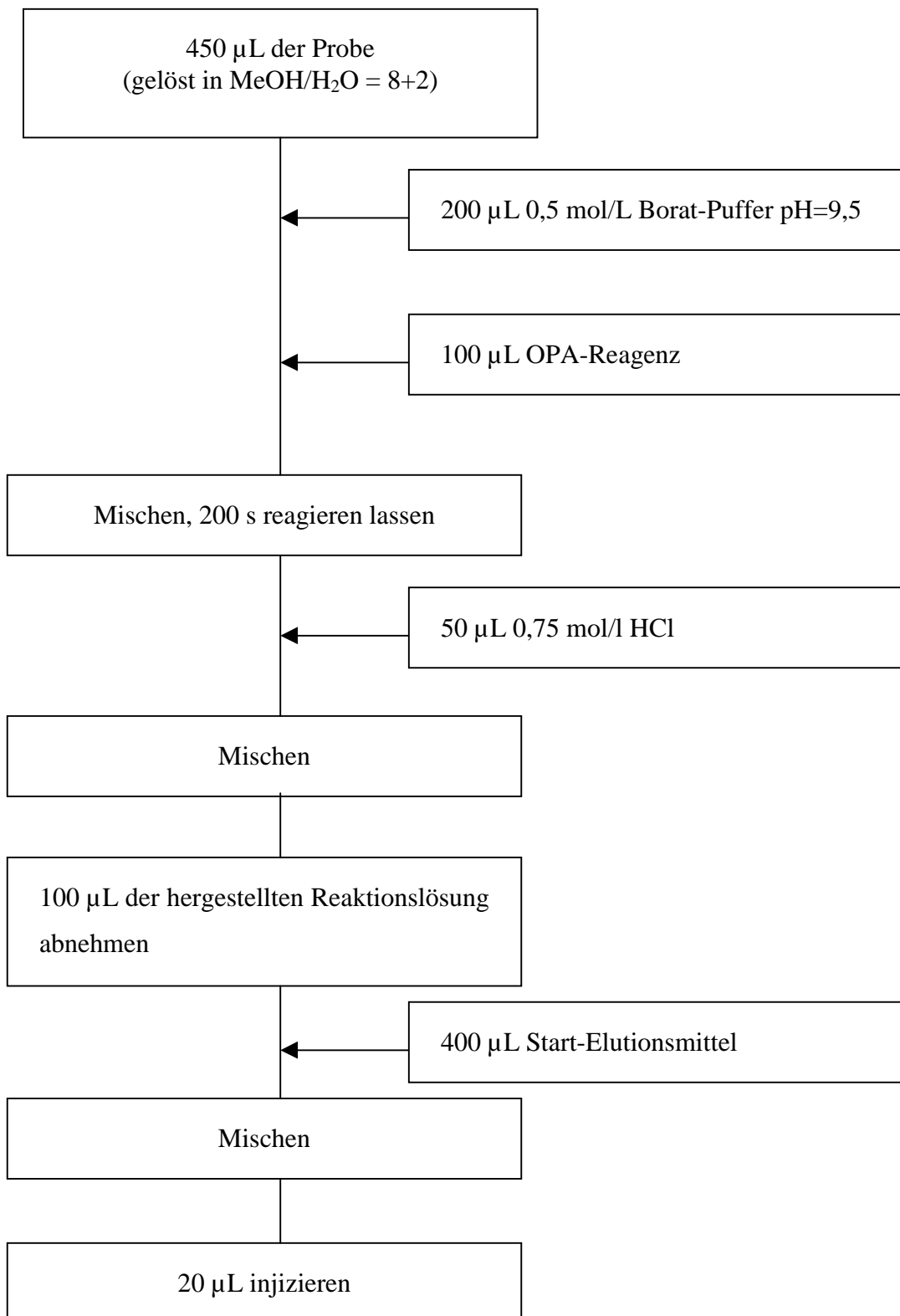
Nach 24-stündigem Hydrolysieren der Proben (s. Tab. 10) wird die Säure (2 mL 6 mol/L HCl) mit einem Rotationsverdampfer entfernt.

Tab. 10: Einwaagen der Proben, die mit der OPA-Methode untersucht wurden

Probe	Einwaage / mg
Ret	21,91
0,1M/4M/P2	17,13
0,4M/P1/P2	15,74
1,2M/4M/P2	14,01
4M/1,5M/P2	8,46
2M/1,5M/P2	7,75
AS/P1/P1	12,84

Der für die Reaktion erforderliche pH-Wert von 9-9,5 wird durch Zugabe des Borat-Puffers (s. Reagenzien und Lösungen; Punkt 1) erzielt. Das OPA-Reagenz (s. Punkt 2) wird zugesetzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit (exakt 3 min) wird die Reaktion durch Zugabe von HCl gestoppt. Dieser Schritt führt zur Erniedrigung des pH-Wertes auf $\text{pH} < 7$. Die genaue Einstellung des pH-Wertes ist wichtig, damit die Reaktion optimal abläuft. Sie dient darüber hinaus zur Schonung der Säule. Ohne diesen Neutralisierungsschritt sinkt die Lebenszeit der Trennsäule drastisch, da auf Silikat basierende Materialien für alkalische Medien nicht geeignet sind. Der anschließende Verdünnungsschritt dient im wesentlichen dazu, die Reaktionsmischung an den Eluenten anzupassen, die Säule vor zu hohen Reagenz- und Pufferkonzentrationen zu schützen und die Rekonditionierungszeit der Säule nach einer Trennung zu minimieren.

Vorsäulen-Derivatisierungs-Vorgang mit OPA-Reagenz



2.12.2 HPLC-Bestimmung von Aminosäuren ohne Derivatisierung

Nach einer Gradientenelution mit H₂O, Acetonitril und TFA auf einer RP-8 Spherisorb (s. Punkt 1) können lipophile Aminosäuren ohne Derivatisierung mit Lichtstreuendetektor (LSD) detektiert werden. Es co-eluieren Aminosäuren.

Mit einem Kationen-Austauscher (s. Punkt 2) können diese und weitere getrennt werden.⁷⁴

Analysenbedingungen

1 Bedingungen für Umkehrphasen-Trennung:

Injektionsvolumen: 20 µL

Säule: RP-8 Spherisorb 100 x 4,6 mm / 5µm Partikelgröße

Säulentemperatur: RT

Detektion: LSD / 60 °C, 2,5 bar

Fließgeschwindigkeit: s. Gradiententabelle

Eluent: A = wässrige TFA mit pH=1,97

B = 50 + 50 Mischung von Eluent A mit Acetonitril

Gradient

Zeit / (min)	A (%)	B (%)	Fluß / (mL/min)
0	100	0	0,3
12	100	0	0,3
20	65	35	1,0
25	65	35	1,2
28	60	40	1,5

2 Bedingungen für Kationenaustauscher-Trennung:

Injektionsvolumen: 20 µL

Säule: Partisil 10 SCX 250*6,35 mm

Säulentemperatur: RT

Detektion: LSD / 60 °C, 2,5 bar

Fließgeschwindigkeit: 1 mL/min

Eluent: A = wässrige TFA mit pH=4,30

B = 4 mL TFA auf 1000 mL

Eluent A wird 15 min konstant gehalten. Die Konzentration von Eluent B steigt innerhalb von 15 min auf 70 %. Dieser Gradient wird 15 min lang gehalten.

Geräte:

HPLC-Anlage

TSP Probennehmer Spectra System AS 3000

Pumpe contra Metric 3500/3200

Entgaser: Membran Degasser

Software: PC 1000

Detektoren: Lichtstreuendetektor: S.E.D.E.R.E. Sedex 55

3 Isolierung von immunologisch aktiven Glycoproteinen aus *Baptisia tinctoria*

Es ist oft mehr als ein Reinigungsschritt notwendig, um die gewünschte Reinheit eines Stoffes zu erreichen. Der Schlüssel zum Erfolg und die effiziente Glycoprotein-Reinigung ist in der Auswahl der geeigneten Technik zu finden. Die optimierte Isolierungsbedingung ist, durch Kombination von Trenntechniken maximale Ausbeuten bei einem Minimum an Arbeitsschritten zu erzielen. Die meisten Reinigungsvorschriften beinhalten eine oder mehrere Arten von Chromatographien. Das ist ein Grund dafür, daß die Chromatographie ein notwendiges Werkzeug in jedem Labor geworden ist, welches sich mit Proteinisolierung beschäftigt. Der Einsatz unterschiedlicher Chromatographie-Techniken mit verschiedenen selektiven Eigenschaften ist eine sinnvolle Kombination zur Isolierung von Naturstoffen.⁶⁵

Die meisten veröffentlichten Reinigungsvorschriften und Applikationen belegen, daß mehr als ein Reinigungsschritt notwendig ist, um gewünschte Glycoproteine zu isolieren. Gut ausgewählte und optimierte Reinigungsschritte führen in weniger als vier Schritten zum Ziel.

In der vorliegenden Arbeit wurden Reinigungsvorschriften erstellt, um eine systematische Vorgehensweise bei der chromatographischen Trennung zu gewährleisten.

Der erste Schritt sollte eine adsorptive Chromatographie-Art sein. Man kann aber auch mit einer Gruppentrennung (mit Hilfe einer GPC) beginnen.

Eine Gruppentrennung wurde durch die Tangentialfluß-Filtration des *Baptisia tinctoria*-Extraktes erreicht. Der Extrakt wurde in niedermolekulare (<10 kDa) und hochmolekulare (>10 kDa) Inhaltsstoffe getrennt. Durch diesen Trennschritt wurde die GPC als erster Isolierungsschritt nicht benötigt. Ein weiteres Argument, die GPC nicht als ersten Schritt für die Isolierung einzusetzen, ist der limitierende Faktor „Probenvolumen“. Die IC, die HIC und die AC waren die Chromatographie-Arten, die als erste Schritte zur Isolierung eingesetzt wurden.

Besonderes Interesse gilt dabei den Glycoproteinen, die unter physiologischen Bedingungen eine bestimmte räumliche Anordnung besitzen. Diese ist entscheidend für die biologische Funktion. Sie muß deshalb während der chromatographischen Trennung vollständig erhalten bleiben. Deshalb werden bei den meisten chromatographischen Arbeiten wäßrige Puffersysteme eingesetzt.

3.1 Ionen-Chromatographie (IC) als erster Schritt

Das Ladungs-/Masse-Verhältnis eines Glycoproteins wie auch eines Polysaccharids ist pH-Wert-abhängig. Dies muß bei der Ionenchromatographie beachtet werden. Es lassen sich neutrale von geladenen Substanzen trennen. Es eluieren zuerst die schwach geladenen. Mit steigender Salzkonzentration werden auch die stärker geladenen Verbindungen eluiert, zu denen Glycoproteine bzw. Polysaccharide gehören.

Da die meisten Proteine unter physiologischen Bedingungen negativ geladen sind, eignen sich für die IC in der Regel Anionenaustauscher.

Durch Untersuchungen von Bodinet et al. an gereinigtem Retentat (G50-Fraktion) von *Baptisia tinctoria* war bekannt, daß die zu isolierenden Verbindungen einen pI-Wert im Bereich von 4-6 haben.⁶⁶ Das Retentat ist also ein saures Gemisch, zu dessen IC-Trennung ein Anionen-Austauscher effektiv einsetzbar sein müßte.

Vier verschiedene Trägermaterialien (DEAE-Sephacel, Fraktogel EMD DEAE-650 (M), Q-Sepharose, Mono Q)⁶⁷ wurden mit derselben Probe, Retentat in H₂O gelöst, beschickt, um den optimalen Anionen-Austauscher zu ermitteln. Fraktionsweise wurde von 0 - 1,2 mol/L in 0,2 mol/L-NaCl-Schritten eluiert und die Fraktionen gesammelt. Die Salzkonzentrations-Stufen wurden klein gewählt, um in diesem Chromatographieverfahren die aktivsten Fraktionen leichter trennen zu können. Alle erhaltenen Fraktionen wurden dialysiert, bis die Leitfähigkeit unter 30 mS/m lag. Anschließend wurden diese dialysierten Proben gefriergetrocknet. Die erhaltenen Lyophilisate wurden dem Lymphozyten-Proliferations-Test (LPT) unterzogen. Die Fraktionen, die vom Anionen-Austauscher Fraktogel EMD DEAE-650 (M) und Q-Sepharose eluierten, zeigten im LPT im Vergleich zu den anderen Austauschern eine höhere biologische Aktivität. Aus diesem Grunde wurden diese beiden Austauscher weiterverwendet. Um den Bereich der biologisch aktiven Fraktionen weiter zu spreizen, wurden die Salzkonzentrationsstufen von 0,2 auf 0,1 mol/L verkleinert.

Ergebnis:

- Schwacher Anionen-Austauscher (Fraktogel EMD DEAE-650 (M)): 0,1-0,3 mol/L NaCl
- Starker Anionen-Austauscher (Q-Sepharose): 0,4-1,2 mol/L NaCl

Diejenigen Fraktionen, die eine signifikante Steigerung der biologischen Aktivität gegenüber dem Retentat aufwiesen, wurden für den zweiten chromatographischen Schritt eingesetzt.

Versuche, bei denen mit einem gepuffertem System (Tris-HCl-Puffer pH=7,5; c=25 mmol/L) gearbeitet wurde, ergaben im Vergleich zum ungepufferten System keine Steigerung im LPT.

Man erkennt bei der Neutralfraktion (0 mol/L -Fraktion des schwachen Anionen-Austauschers Fraktogel EMD DEAE-650 (M)) im Vergleich zum Retentat keine Steigerung der biologischen Aktivität (s. Abb. 2). Die Fraktionen 0,1-0,3 mol/L NaCl zeigen eine hohe eluierte Aktivität. Eine weitere Erhöhung der Elektrolytkonzentration lieferte keine Fraktion mit höherer Aktivität. Die Eluate 0,1-0,3 mol/L NaCl wurden zusammengefaßt, dialysiert und lyophilisiert.

Die in den Fraktionen nach Elution mit 0,1-0,3 mol/L NaCl enthaltenen Verbindungen weisen eine geringe Ladungsdichte auf.

In Abb. 3 sind die Ergebnisse des LPT mit Fraktionen vom starken Anionen-Austauscher (Q-Sepharose) dargestellt. Man erkennt eine biologische Aktivitätssteigerung ab der Fraktion mit einer Konzentration von 0,5 mol/L NaCl. Diese hält bis zur Elution mit der Konzentration 1 mol/L NaCl an. Anschließend ist ein Abfall der Aktivität zu beobachten. Es wurde ein Bereich in der Elektrolytkonzentration von 0,5-1,5 mol/L gewählt. Dieser Bereich der Elektrolytkonzentration wurde so groß gewählt, um möglichst hohe Ausbeuten zu erzielen.

Zur weiteren Isolierung wurden sowohl mit den vereinigten Fraktionen 0,1-0,3 mol/L des schwachen als auch den Fraktionen 0,5-1,2 mol/L des starken Anionen-Austauschers verschiedene HIC (Butyl, Octyl, Phenyl) und GPC durchgeführt. Eine AC brachte keine Steigerung der Aktivität gegenüber dem Ausgangsmaterial (s. Erläuterungen unter Punkt 3.2 „Affinitäts-Chromatographie“).

Im Fließschema (Abb. 6) ist der optimierte Isolierungsweg für den schwachen Anionen-Austauscher dargestellt.

Der optimierte Isolierungsweg für die starke Anionen-Austauscher wird in der Abb. 7 gezeigt.

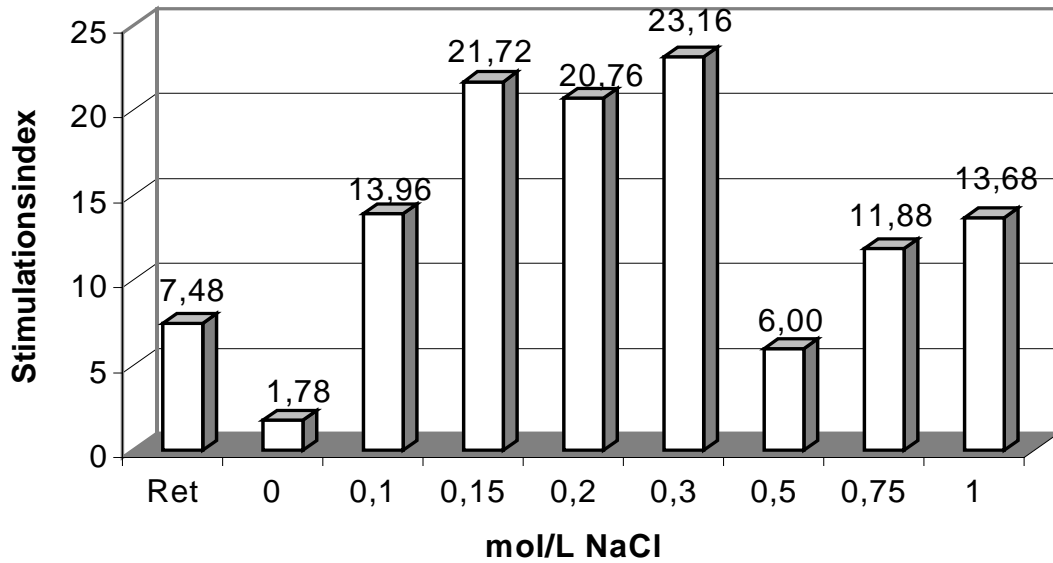


Abb. 2: *Biologische Aktivität der mit Hilfe eines schwachen Anionen-Austauschers (Fraktogel EMD DEAE-650 (M)) gewonnenen Fraktionen, gemessen anhand des LPTests (Konzentration der untersuchten Proben: jeweils 1000 µg Lyophilisat /mL)*

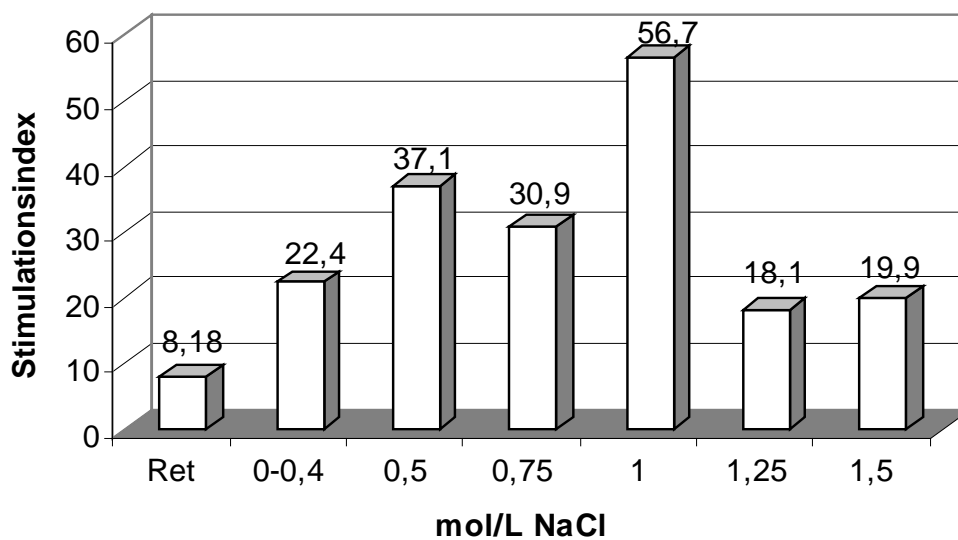


Abb. 3: *Biologische Aktivität der mit Hilfe eines starken Anionen-Austauschers (Q-Sepharose) gewonnenen Fraktionen, gemessen anhand des LPTests (Konzentration der untersuchten Proben: jeweils 1000 µg Lyophilisat /mL)*

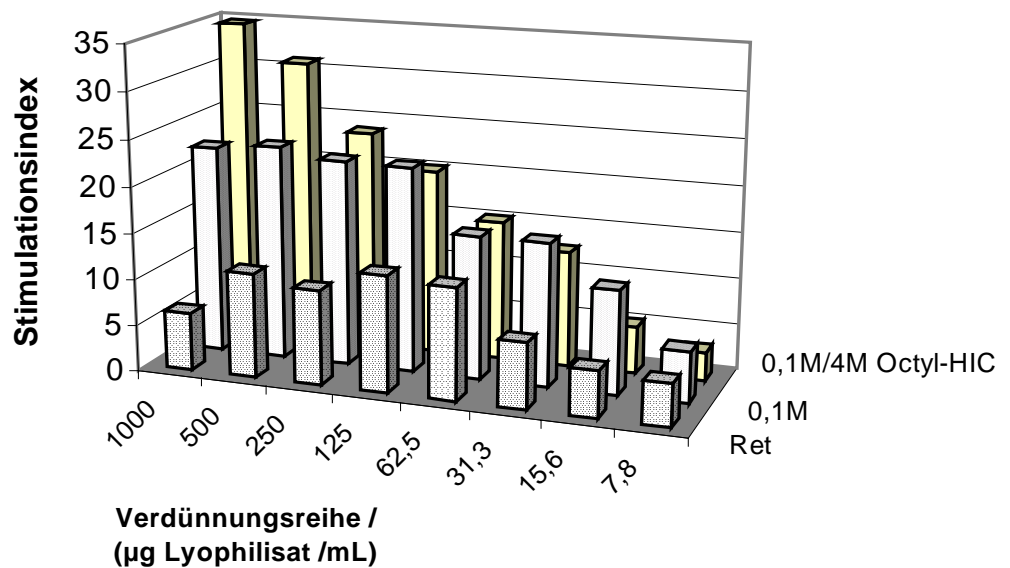


Abb. 4: LPT (Verdünnungsreihe) der Ursubstanz Retentat im Vergleich mit Fraktion 0,1M des ersten (schwacher AA) und zweiten chromatographischen Schrittes 0,1M/4M Octyl-HIC

Das Lyophilisat der 0,1-0,3 mol/L NaCl-Fraktion wurde in einer 4 mol/L NaCl-Lösung aufgenommen, zentrifugiert und filtriert. Aus dieser Probe wurde mit Hilfe der Octyl-HIC eine Substanz isoliert, die eine gesteigerte biologische Aktivität aufwies (s. Abb. 4).

Eine Verdünnungsreihe im LPT wurde durchgeführt, um hemmende Komponenten aus den untersuchten Proben in ihrer Konzentration zu senken, sodaß die biologisch aktiven Komponenten in diesem Test überwiegen und beobachtet werden können.

Eine relative lineare Abnahme der Stimulationsindizes ist bei der Verdünnung der isolierten Proben festzustellen. Im Gegensatz dazu ist beim Retentat -ausgehend von der Konzentration 1000 µg Lyophilisat /mL -ein Anstieg bis zu einer Konzentration von 125 µg Lyophilisat /mL zu erkennen. Nach dem Durchlaufen dieses Maximums sinkt der Stimulationsindex auch hier linear. Dieser anfänglich geringe Stimulationsindex, der im Laufe der Verdünnung steigt und schließlich wieder sinkt, ist auf hemmende Komponenten im Retentat zurückzuführen.

Andere HIC-Chromatographie-Arten (Butyl-, Phenyl-HIC) führten mit der isolierten Fraktion des schwachen Anionen-Austauschers (0,1M) zu keiner Steigerung der biologischen Aktivität.

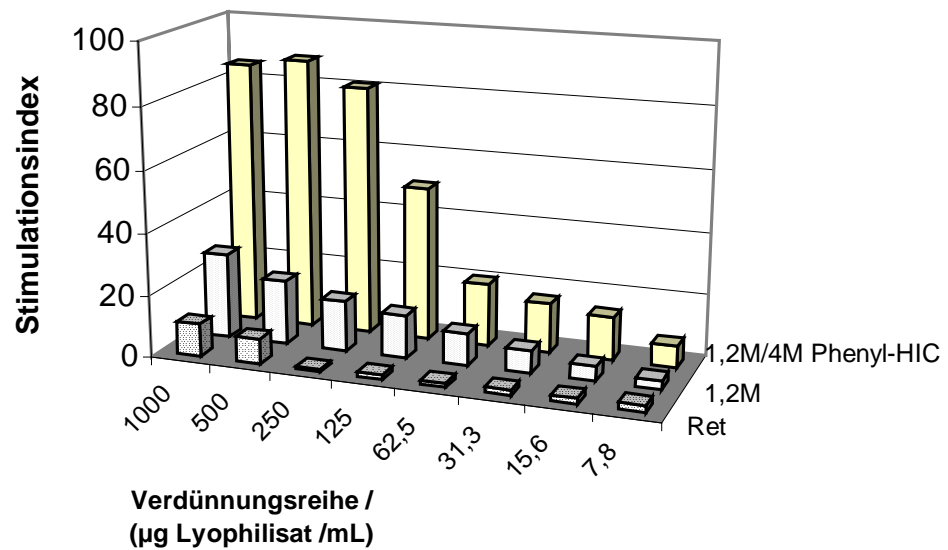


Abb. 5: LPT (Verdünnungsreihe) der Ursubstanz Retentat im Vergleich mit der Fraktion des ersten (starker AA) und zweiten chromatographischen Schrittes (Phenyl-HIC)

Eine weitere Steigerung der biologischen Aktivität der Fraktion 0,4-1,2 mol/L vom starken Anionen-Austauscher (in Abb. 5 als 1,2M bezeichnet) erbrachte eine Elution mit einer 4 molaren NaCl-Lösung von einer Phenyl-HIC.

Sowohl die 0,1-0,3 mol/L NaCl-Fraktion des schwachen als auch die Fraktion 0,4-1,2 mol/L NaCl des starken Anionen-Austauschers wurden auf den jeweiligen HIC-Materialien retentiert. Sie erbrachten mit den Startbedingungen 4 mol/L der HIC eine Aktivitätssteigerung.

Die Aktivitätssteigerungen werden durch das Entfernen biologisch unwirksamer Substanzen erzielt. Letztere gehen eine hydrophobe Wechselwirkung mit dem HIC-Material ein.

Der schwächer hydrophobe Phenyl-Ligand hält im Vergleich zum Octyl-Liganden Substanzen mit hohem hydrophoben Anteil zurück. Die Komponenten, die mit der Octyl-HIC bei der Fraktion des schwachen Anionen-Austauschers entfernt wurde, sind schwächer hydrophob als die des starken Anionen-Austauschers.

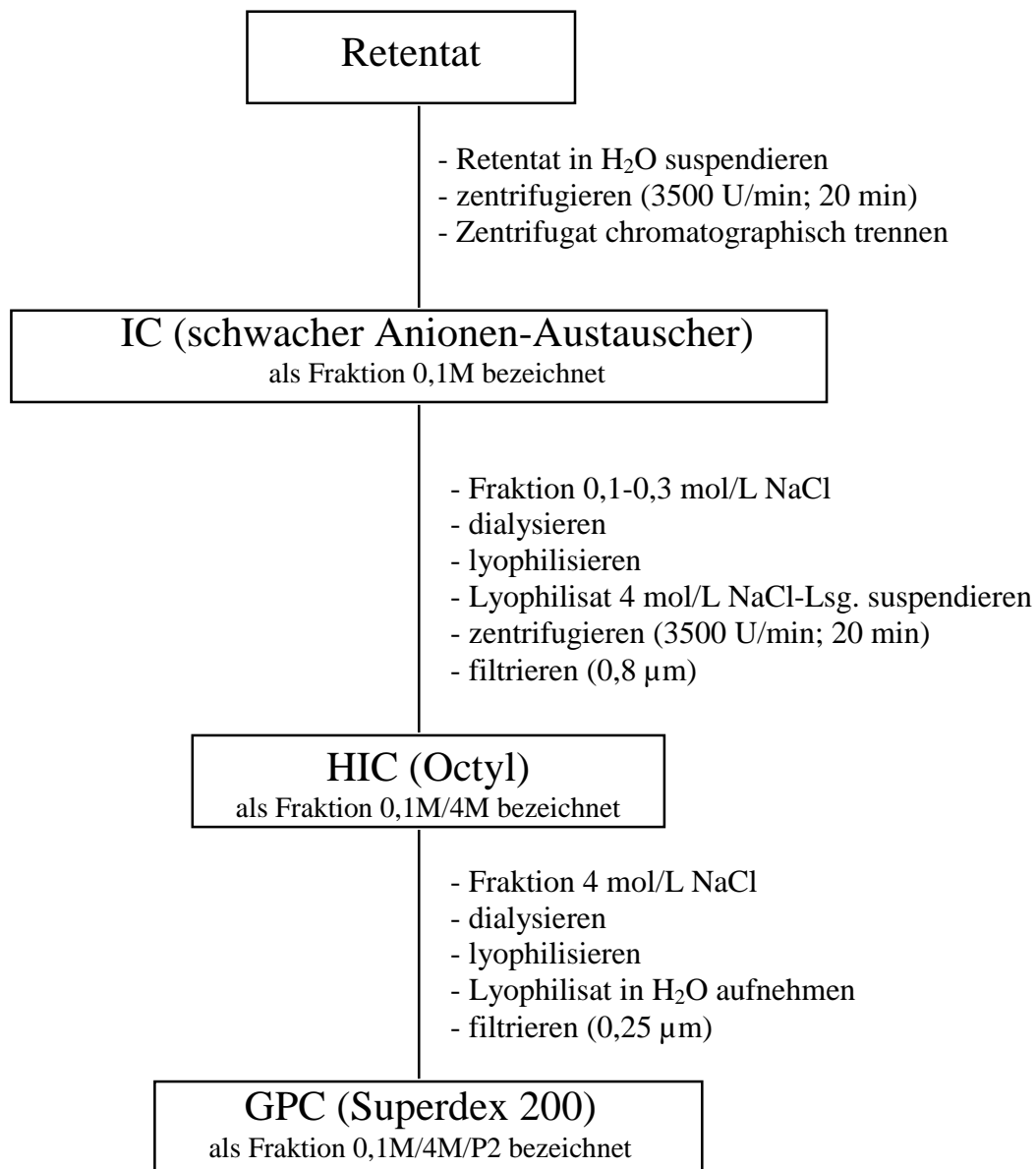


Abb. 6: Fließschema für den optimierten Isolierungsweg mit einem schwachen Anionen-Austauscher (erster chromatographischer Schritt). Hieraus leitet sich die Code-Bezeichnung 0,1M/4M/P2 ab

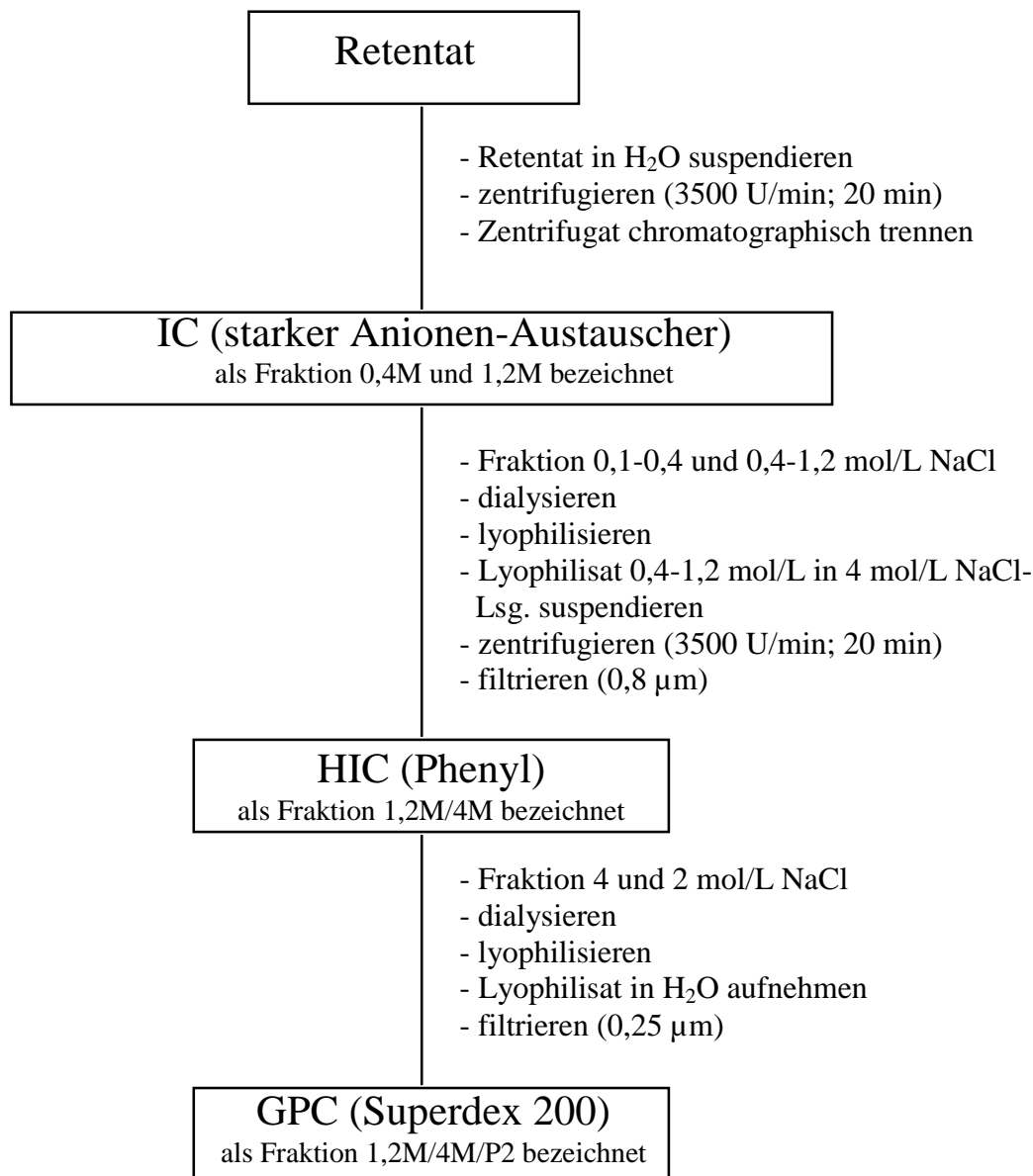


Abb. 7: Fließschema für den optimierten Isolierungsweg mit einem starken Anionen-Austauscher (AA) (erster chromatographischer Schritt). Hieraus leitet sich die Code-Bezeichnung 1,2M/4M/P2 ab

Die Fraktionen der Ionenaustauscher mit ihrer jeweiligen anschließenden HIC wurden zum Abschluß einer GPC unterworfen. In den durch die GPC isolierten Fraktionen wurden keine gravierenden Aktivitätssteigerungen festgestellt. Das Ziel der GPC war es, eine Reinsubstanz zu isolieren und diese anschließend zu charakterisieren.

3.2 Affinitäts-Chromatographie (AC) als erster Schritt

Durch Voruntersuchungen (s. Abschnitt 4.10.1, Abb. 35, 36) am Ausgangsgemisch Retentat wurden u. a. die Zucker Mannose und Glucose bestimmt. Deshalb wurde versucht, ob diese Kohlenhydrate zur Trennung ausgenutzt werden können. Hierzu wurde das gebundene Lektin Con A, das eine Affinität für diese beiden Kohlenhydrate besitzt, verwendet.^{68, 69} Versuche einer Trennung des Ausgangsmaterials (Retentat) und immunologisch aktiver Fraktionen auf einer Affinitätssäule (Con A) führten im LPT zu sehr hohen Stimulationsindizes. Da aber auch der Blindwert einen hohen Stimulationsindex aufwies, konnte die hohe Aktivität nur von dem Säulenmaterial Con A herrühren. Um das „Bluten“ der Säule zu minimieren und sogar zu stoppen, wurde das Trennmateriale mehrmals mit Wasser über eine G4-Fritte gewaschen. Weitere Untersuchungen des Blindwertes mit Hilfe des LPT ergaben eine Absenkung der Blindstimulation unter einen Stimulationindex von < 3 , der als Grenzwert gilt. Proben, deren Index unter diesem Richtwert liegt, gelten als nicht-immunologisch-wirksam. Eine anschließende Trennung des Retentats und der immunologisch aktiven Substanzen erbrachte mit diesem Trägermaterial keine nennenswerten Aktivitätssteigerung. Deshalb wurde die Affinitäts-Chromatographie mit dem Trennmedium Con A nicht weiterverfolgt.

3.3 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC) als erster Schritt

Hydrophobe Interaktions-Chromatographie ist eine der Normalphasen-Chromatographie verwandte Trennmöglichkeit. Sie wird mit einer wasserhaltigen mobilen Phase durchgeführt, um hydrophile Stoffe, wie z.B. Kohlenhydrate, zu isolieren.

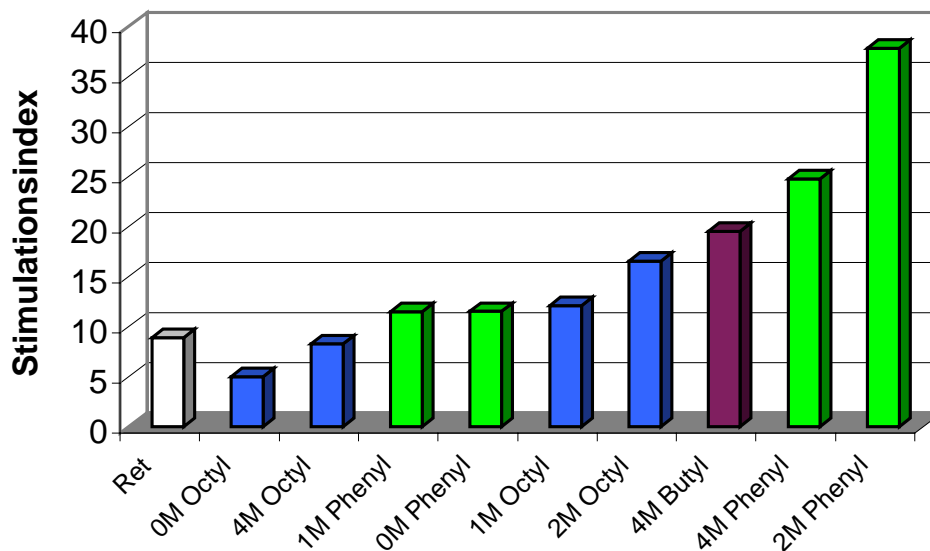
Es eluieren erst die unpolaren, danach die polaren Verbindungen.

Es stehen stärker hydrophobe Liganden wie Octyl-Ketten und weniger stark wirkende Liganden wie Phenyl- oder Butyl-Reste zur Verfügung. Bei Proteinen mit großen hydrophoben Anteilen muß ein Trennmedium mit schwach hydrophoben Gruppen verwendet werden.⁷⁰

Bei der HIC fängt man im Gegensatz zur IC mit einer hohen Salzkonzentration an. Es wurden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - und NaCl-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen angesetzt, denen das Retentat portionsweise hinzugegeben wurde. Der erzeugte Niederschlag wird durch Zentrifugation von der Flüssigphase getrennt.

3.3.1 HIC mit NaCl⁷¹

Das Retentat wurde in einer 4 molaren NaCl-Lösung (1mg/mL) suspendiert. Das zentrifugierte (3500 U/min) und anschließend filtrierte Retentat wurde auf drei verschiedene Säulenmaterialien (Phenyl-, Butyl-, Octyl-HIC) gegeben. Eluiert wurde in Batchverfahren mit einer 2 und einer 1 molaren NaCl - Lösung, schließlich mit Wasser. Die erhaltenen Fraktionen (4, 2, 1, 0 mol/L) von den drei verschiedenen HIC-Säulen wurden dialysiert und gefriergetrocknet. Sie wurden, wie alle isolierten Fraktionen, auf ihre biologische Aktivität untersucht, die in Abb. 8 zusammengestellt sind.



*Abb. 8: LPT der von den **Octyl**-, **Phenyl**- und **Butyl**-HIC eluierten Fraktionen mit den Konzentrationen von 4, 2, 1 und 0 mol/L NaCl (Konzentration der untersuchten Proben: 1000 µg Lyophilisat /mL)*

Die Fraktionen 4 und 2 mol/L NaCl, die von der Phenyl-HIC eluiert wurden, ergaben die höchsten Stimulationsindizes im Vergleich zu den übrigen Fraktionen der unterschiedlichen HIC-Materialien, so daß diese weiter untersucht wurden (Abb. 8).

Die Lyophilisate der Fraktion 4 und 2 mol/L wurden in H₂O gelöst und verschiedenen Ionen-Chromatographien (Fraktogel EMD DEAE-650 (M), Mono Q) unterworfen. Die Eluate, die in einem Konzentrationsbereich von 0,4-1,5 mol/L NaCl vom starken Anionen-Austauscher Mono Q gewonnen wurden, zeigten höhere biologische Aktivität (Abb. 9 und 10).

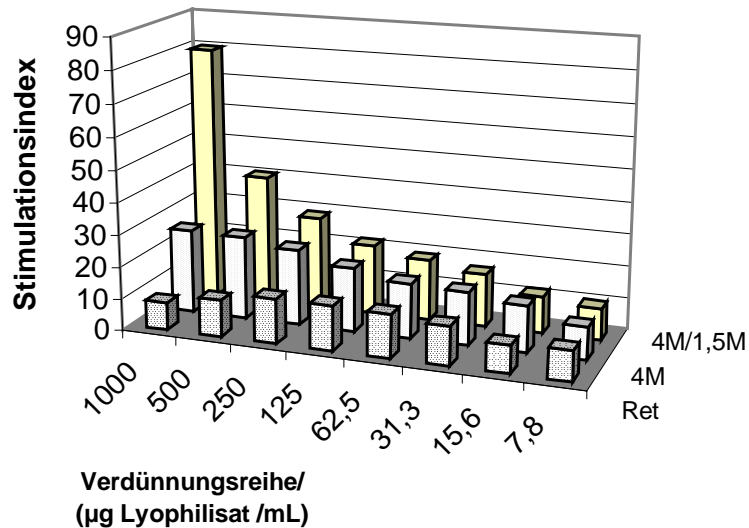


Abb. 9: LPT der Ursubstanz Retentat im Vergleich zu Fraktionen des ersten (4 mol/L NaCl von der Phenyl-HIC) und zweiten chromatographischen Schrittes (0,4-1,5 mol/L NaCl vom starken Anionen-Austauscher)

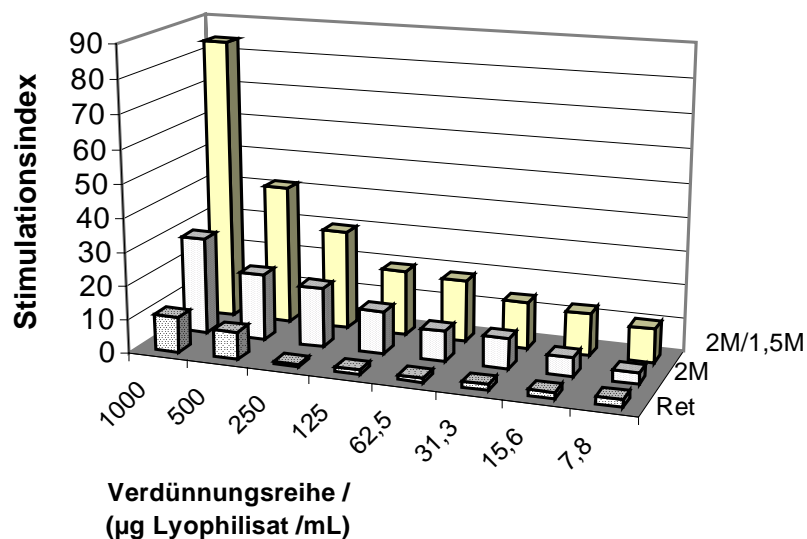


Abb. 10: LPT der Ursubstanz Retentat im Vergleich zu Fraktionen des ersten (2 mol/L NaCl von der Phenyl-HIC) und zweiten chromatographischen Schrittes (0,4-1,5 mol/L NaCl vom starken Anionen-Austauscher)

Abb. 11 faßt den Isolierungsweg zusammen, der mit HIC-Phenyl als erster chromatographischen Schritt beginnt. Dadurch erhält man zwei unterschiedliche, biologisch aktive Fraktionen (4M und 2M). Durch anschließende Ionen-Chromatographie mit einem starken Anionen-Austauscher (4M/1,5M und 2M/1,5M) und abschließender Größenausschluß-Chromatographie wurden die Substanzen mit den Bezeichnungen 4M/1,5M/P2 und 2M/1,5M/P2 isoliert.

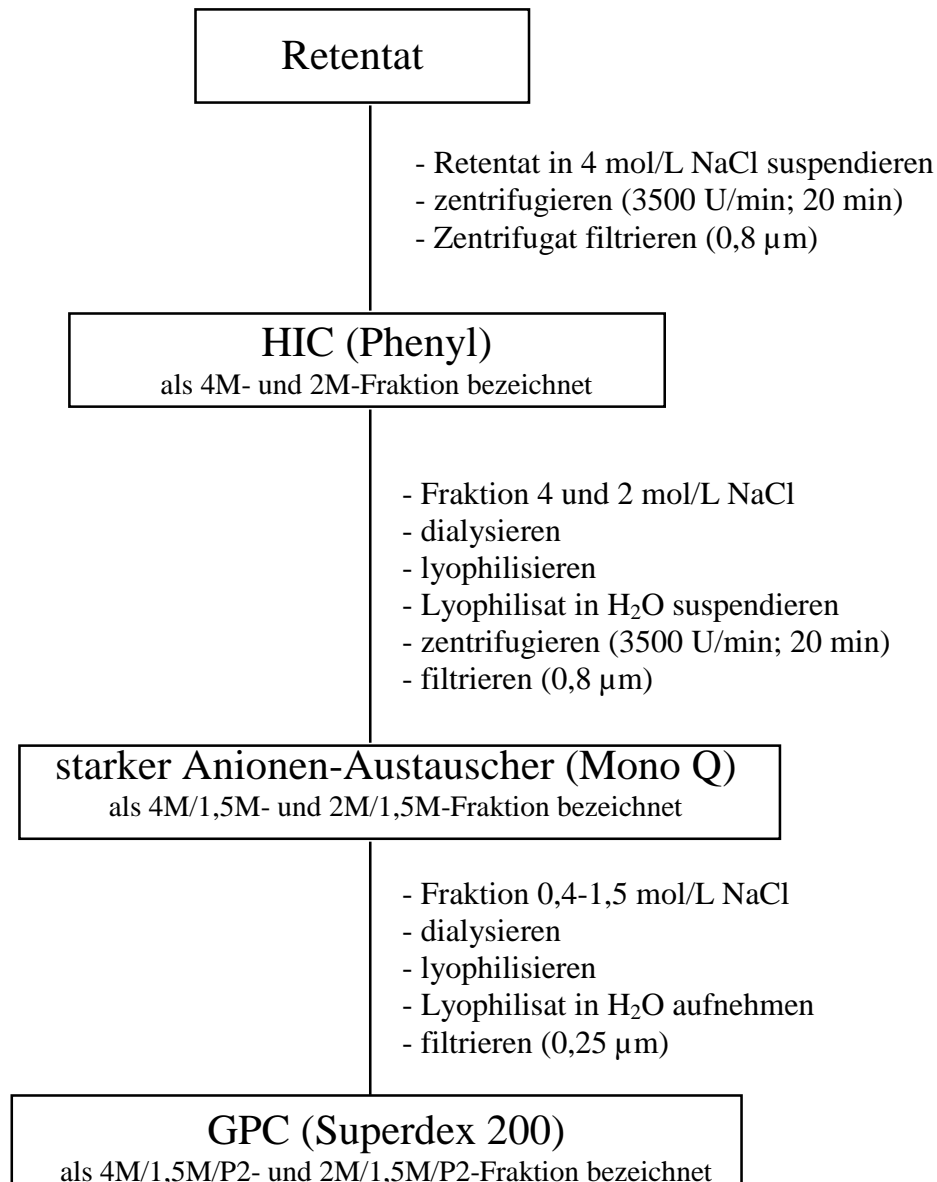


Abb. 11: Fließschema für den optimierten Isolierungsweg, mit HIC-Phenyl (erster chromatographischer Schritt). Hieraus leitet sich die Code-Bezeichnung 4M/1,5M/P2 und 2M/1,5M/P2 ab

3.3.2 HIC mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Dieser Isolierungsweg entstand aus der *Probenvorbereitung* für eine HIC. Wie bereits erläutert (Punkt 3.3), wird bei der HIC mit hohen Salzkonzentration die Trennung begonnen. Beim Lösen des Retentats in den verwendeten Salzlösungen (NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) entsteht ein Überstand und Niederschlag. Im Gegensatz zu den NaCl-Überständen und Niederschlägen wurde mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eine Aktivitätssteigerung im Überstand registriert. Da der Anschluß weiterer chromatographischer Trenntechniken (u. a. auch HIC) zu keiner zusätzlichen Aktivitätssteigerung führte, wurde eine fraktionierte Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ detaillierter untersucht und hierzu wie folgt vorgegangen:

Zu 85 mL in H_2O gelöstem Retentat (1 mg/mL) werden unter sehr gutem Rühren 15 mL Ammoniumsulfat-Lsg. * zugegeben. Nach quantitativer Fällung wird der Niederschlag durch Zentrifugation vom Überstand getrennt. Diesem werden wiederum 15 mL Ammoniumsulfat-Lsg. zugesetzt und ebenso verfahren, wie im vorherigen Arbeitsschritt beschrieben. Dieser Vorgang wird insgesamt 4 mal wiederholt und liefert die Proben „30“, „45“, „60“ und „75“ (Abb. 12). Die dialysierten und gefriergetrockneten Niederschläge und Überstände wurden durch den LPT auf ihre stimulierende Aktivität hin untersucht.

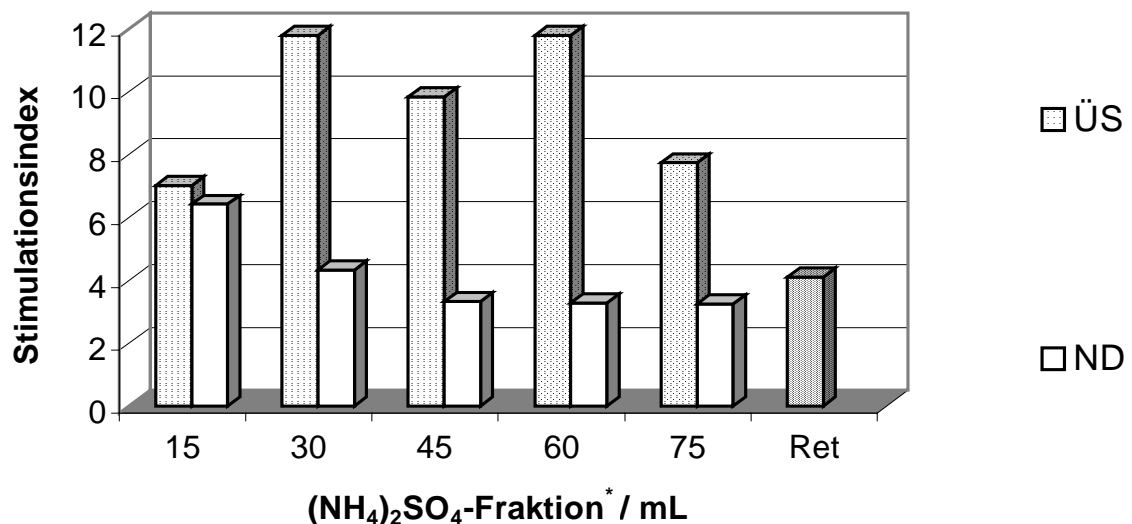


Abb. 12: LPT einer fraktionierten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung; Überstand (ÜS) und Niederschlag (ND) der Fällungen werden mit dem Ausgangsmaterial (Retentat/RET) verglichen (Konzentration der untersuchten Proben: jeweils 1000 μg Lyophilisat /mL)

* bei RT gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lsg.;

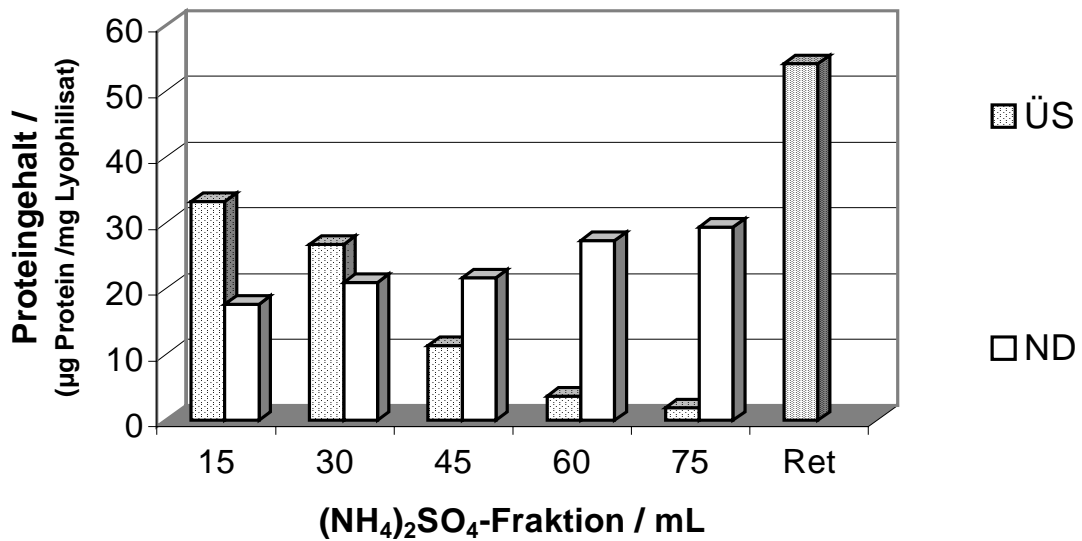


Abb. 13: Protein-Bestimmung (Amidoschwarz) einer fraktionierten (NH₄)₂SO₄-Fällung; Überstand (ÜS) und Niederschlag (ND) der Fällungen werden mit dem Ausgangsmaterial (Retentat/Ret) verglichen

Der Lymphozyten-Proliferations-Test (LPT) der fraktionierten (NH₄)₂SO₄-Fällung zeigt, daß die Überstände der Fraktionen „30“ und „60“ die größte stimulierende Aktivität im Vergleich zum Retentat erbrachten (Abb. 12).

Die Niederschläge sinken schon bei der Fraktion „30“ auf das Stimulations-Niveau des Retentats. Die weiteren Untersuchungen beschränkten sich deshalb auf die Überstände.

Der Proteingehalt des Überstands von Fraktion „60“ -im Vergleich zu dem Überstand der Fraktion „30“ -liegt weit unter der Hälfte (Abb. 13). Bei der höheren Konzentration (Fraktion „60“) werden Proteine stärker gefällt, als bei der niedrigeren Salzkonzentration (Fraktion „30“). Da es Ziel der Arbeit war, ein Glycoprotein zu isolieren, wurde der Überstand der Fraktion „30“ (als AS bezeichnet) zur weiteren Trennung verwendet.

Durch weitere chromatographische Trennungen des Überstands der Fraktion „30“ wurde weder mit der HIC noch mit der IC eine Steigerung der biologischen Aktivität erzielt.

Die Fraktion „30“ wurde mit Hilfe der GPC getrennt (Abb. 14). Um das isolierte Volumen zu vermindern, wurde eine sehr grobe GPC mit Hilfe von Sephadex G-50 durchgeführt (als AS/P1 bezeichnet, da der erste Peak verwendet wird). Der immunologisch aktive Bereich dieser Grobtrennung wurde für eine Feintrennung an Superdex-200 verwendet (als AS/P1/P1 bezeichnet, da auch bei Superdex 200 der erste Peak verwendet wird).

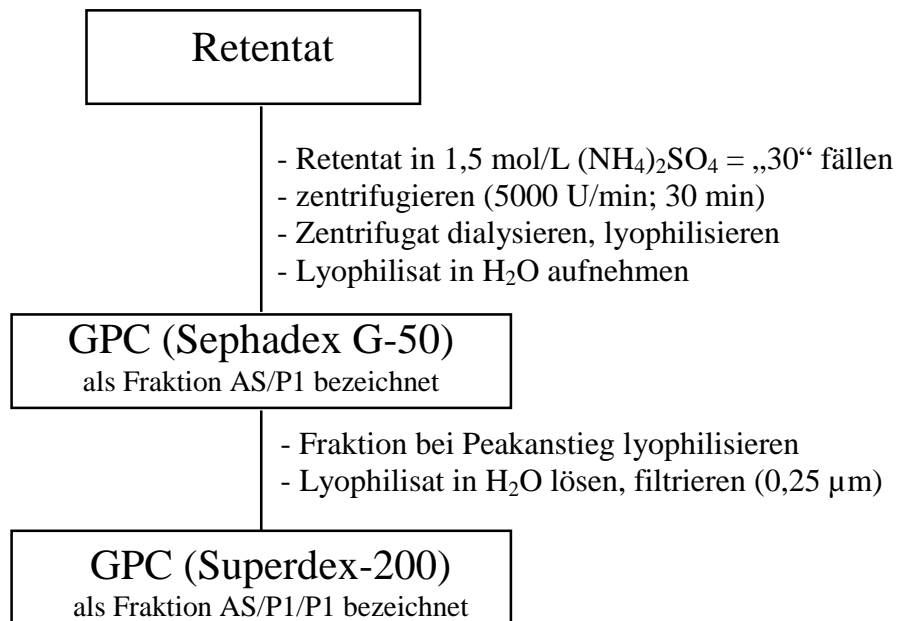


Abb. 14: Fließschema für den optimierten Isolierungsweg mit einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung (erster Trennschritt). Hieraus leitet sich die Code-Bezeichnung AS/P1/P1 ab

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Isolierung

In Abb. 15 werden die unterschiedlichen Isolierungswege dargestellt, auf denen die sechs biologisch aktiven Substanzen isoliert wurden. Hier sind auch die Substanzbezeichnungen der auf unterschiedlichen Wegen gewonnenen Fraktionen bis hin zur jeweiligen Reinsubstanz erläutert.

Zusammenfassung der optimalen Isolierungswege:

- Aus dem im Überstand einer AS-Fällung befindlichen biologisch aktiven Substanzgemisch wurde mit zwei anschließenden größenausschluß-chromatographischen Trennschritten (AS/P1/P1) eine Reinsubstanz isoliert. Auf diesem Isolierungsweg wird die im *Baptisia tinctoria*-Retentat enthaltene biologisch aktive Substanz mit der größten Ausbeute, im Vergleich zu anderen Isolierungsverfahren, gewonnen (Abb. 15 rechts unten *)
- Den geringsten Zeitbedarf für die Isolierung einer biologisch aktiven Substanz benötigt der Isolierungsweg, der die Substanz mit Hilfe des schwachen Anionen-Austauschers (0,1M) isoliert und einer anschließenden HIC (0,1M/4M) und Gröößenausschluß-Chromatographie (0,1M/4M/P2) unterworfen wurde (Abb. 15 links oben **)

Der letzte Schritt jedes Trennungsweges endete mit einer Größenausschluß-Chromatographie. Dieser Schritt brachte bei keiner der isolierten Fraktionen eine weitere Steigerung der biologischen Aktivität. Er wurde jedoch durchgeführt, um eine nach Größe definierte Substanz (Reinsubstanz) zu erhalten, die anschließend charakterisiert werden konnte.

Abb. 15 liefert eine Zusammenstellung aller Versuche zur Isolierung.

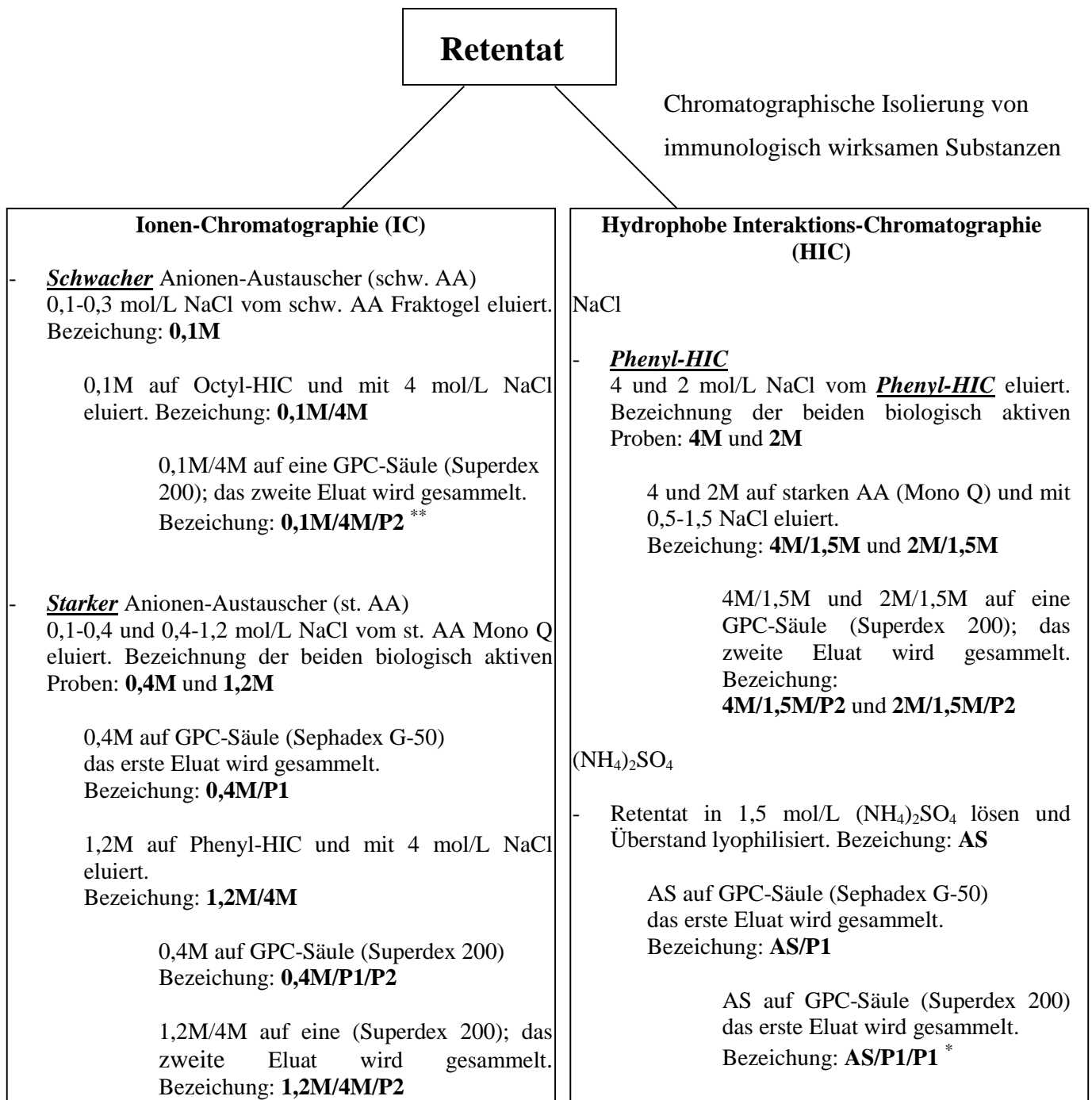


Abb. 15: Schema aller Isolierungswege, die zu biologisch aktiven Substanzen aus *Baptisia tinctoria* führen (und * s. Text)**

4 Charakterisierung von immunologisch aktiven Glycoproteinen aus *Baptisia tinctoria*

4.1 Lymphozyten-Proliferations-Test mit NMRI-Mäusen

Diejenigen Fraktionen, die im LPT die höchsten biologischen Aktivitäten aufwiesen, wurden in einem gesondert durchgeführten LPT erneut miteinander verglichen. Dies ist notwendig, da die Ergebnisse verschiedener LPT nicht miteinander verglichen werden können. Da bei diesem Versuch Mäusemilzsuspensionen verwendet werden, hängt der Test von vielen unterschiedlichen Parametern ab, welche die Mäuse beeinflussen (u. a. jahreszeitlich bedingte Einflüsse, Streß). Es wurden die immunologisch aktivsten Substanzen in einem LPT **gemeinsam** untersucht. Der dann mögliche Vergleich der Stimulationsindizes ist in Abb.16 dargestellt.

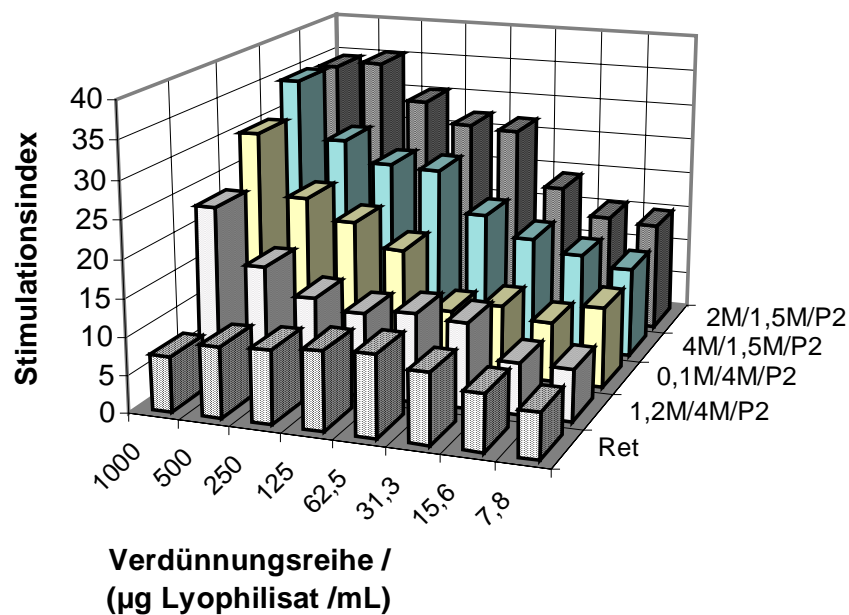


Abb. 16: Lymphozyten-Proliferations-Test der immunologisch aktivsten Substanzen im Vergleich zum Retentat mit NMRI-Mäusen

In Abb. 16 sind die Ergebnisse des LPT von vier der sechs isolierten Substanzen zusammengestellt. Bei diesen vier isolierten Substanzen 2M/1,5M/P2, 4M/1,5M/P2, 0,1M/4M/P2 und 1,2M/4M/P2 handelt es sich um die immunologisch aktivsten. Bei einer

Konzentration von 1000 µg Lyophilisat /mL sind die biologischen Aktivitäten der drei Substanzen 2M/1,5M/P2, 4M/1,5M/P2 und 0,1M/4M/P2 auf einem vergleichbaren Stimulationsniveau. Die Substanz 1,2M/4M/P2 hat im Vergleich dazu die geringste Stimulation.

Durch Verdünnen der Proben jeweils um den Faktor 2 ist eine Abnahme der Stimulationsindizes festzustellen. Im Gegensatz dazu ist beim Retentat, ausgehend von der Konzentration 1000 µg Lyophilisat /mL, ein Anstieg bis zu einer Konzentration von 62,5 µg Lyophilisat /mL zu erkennen. Nach Erreichen des Maximums sinkt der Stimulationsindex auch hier. Dies ist auf hemmende Komponenten im Retentat zurückzuführen. Durch Verdünnen verlieren diese Stoffe ihren inhibierenden Einfluß. Dadurch können die biologisch aktiven Komponenten wieder wirksam werden. Dies sagt aus, daß in den isolierten Substanzen keine Komponenten enthalten sind, welche die Wirkung im LPT inhibieren.

4.2 Lymphozyten-Proliferations-Test mit C3H/HeJ-Mäusen

Um dem Einwand zu begegnen, die beobachteten Stimulationen könnten auf eine eventuelle Kontamination der Substanzen mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) zurückzuführen sein, wurden die gleichen Tests an Milzzellen von C3H/HeJ-Mäusen -einem Inzucht-Mäusestamm durchgeführt- welcher nicht auf LPS sensitiv ist (LPS-resistenter Stamm).

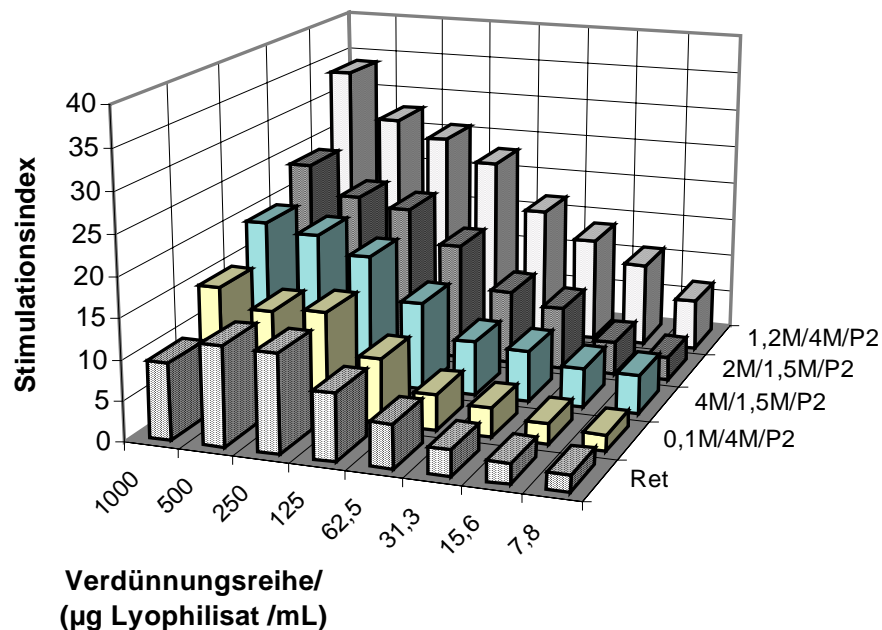


Abb. 17: Lymphozyten-Proliferations-Test der immunologisch aktivsten Substanzen im Vergleich zum Retentat mit C3H/HeJ-Mäusen

In Abb. 17 weisen die Stimationsindizes bei einer Konzentration von 1000 µg Lyophilisat /mL im Gegensatz zu denen in Abb. 16 dargestellten signifikante Unterschiede auf. Die isolierte Substanz 1,2M/4M/P2, die in dem vorherigen Test (s. Abb 16) die biologisch inaktivste Probe darstellte, ist in diesem Test die aktivste. Die Reihenfolge der Aktivität bleibt bei den anderen Substanzen (0,1M/4M/P2, 4M/1,5M/P2, 2M/1,5M/P2) -im Vergleich zur Abb. 16- erhalten, jedoch auf einem niedrigerem Niveau (s. Abb. 17). Die Ursache dieser Unterschiede sind im biologisch Test selbst begründet (unterschiedlicher Mäusestamm, Nahrung, Gewicht usw.).

Wie im LPT mit NMRI-Mäusen ist auch mit C3H/HeJ-Mäusen nach wiederholter Verdünnung ein Abfall der Stimationsindizes der isolierten Substanzen festzustellen. Das

Retentat zeigt einen ähnlichen Verlauf der Stimulationsindizes wie in Abb. 16. Die Ursachen dafür sind bei 4.1 beschrieben.

An Milzzellsuspensionen von C3H/HeJ-Mäusen wurde eine lymphozytenstimulierende Wirkung wie bei den NMRI-Mäusen ermittelt. Die Stimulationsindizes liegen bei etwa 35. Folglich kann die stimulierende Wirkung auf die Lymphozyten nicht durch Lipopolysaccharide ausgelöst worden sein. Somit wäre im Test mit LPS-resistenten Mäusen wesentlich kleinere Stimulation aufgetreten. Weiterhin kann deshalb eine bakterielle Kontamination der Fraktionen durch LPS weitgehend ausgeschlossen werden.

4.3 Hochdruck-Gelpermeation-Chromatographie (HP-GPC)

Die HP-GPC wurde unter zwei Gesichtspunkten durchgeführt:

1. Methode zur Überprüfung der Reinheit
2. Ermittlung des apparenten Molekulargewichts der isolierten Substanz

Es wird nicht das tatsächliche Molekulargewicht bestimmt, sondern das hydrodynamische Volumen. Sein Maß hängt von der Konformation und der Ladung des Moleküls ab. Eine weitere Unsicherheit bei der Molekulargewichtsbestimmung resultiert aus der Kalibrierung, da die eingesetzten Referenzsubstanzen nur annähernd gleiche Strukturen aufweisen können. Alle Isolierungswege wurden mit einer GPC (Superdex 200) abgeschlossen. Um die Homogenität und damit die richtige Fraktionierung zu überprüfen, wurden alle immunologisch aktiven Substanzen einer nochmaligen GPC an Superose 6 unterzogen. Diese ist ein feiner trennendes Gel als Superdex 200. Die aufgenommenen Chromatogramme zeigen einen Peak mit Gauß'scher Verteilung. Hieraus kann auf die Reinheit der in den Fraktionen isolierten Substanzen geschlossen werden.

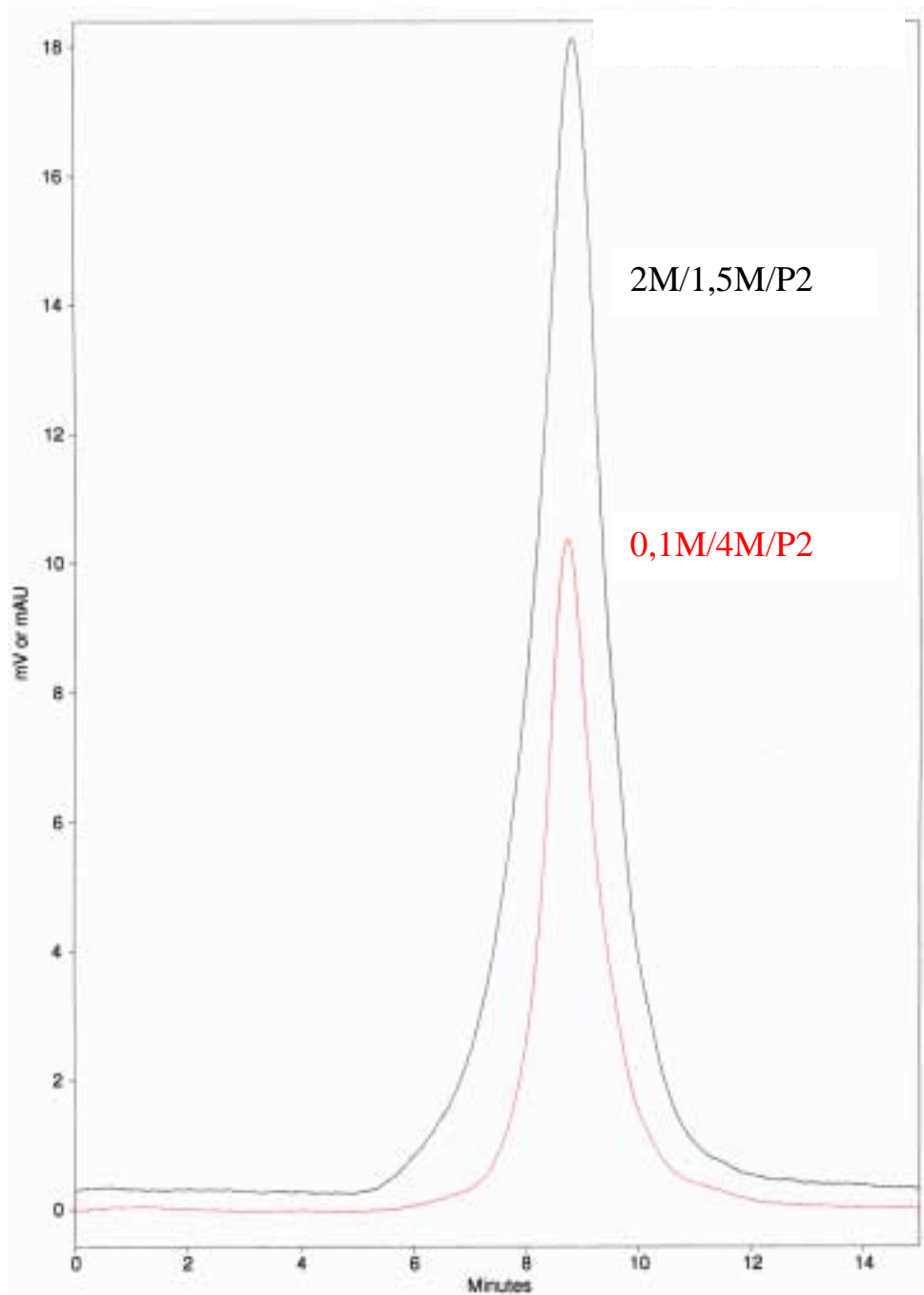


Abb. 18: *HP-GPC der Substanzen 2M/1,5M/P2 und 0,1M/4M/P2 mit 0,06 mol/L Na₂HPO₄-Lösung (pH=9,0) eluiert und bei λ= 280 nm detektiert*

Die HP-GPC gibt darüber hinaus Auskunft über das apparente Molekulargewicht der isolierten Substanz.

Man erkennt aus der Abb. 19 Unterschiede der in den verschiedenen Fraktionen gefundenen scheinbaren Molekularmassen. Durch die verschiedenen chromatographischen Isolierungswege wurden unterschiedliche Substanzen isoliert.

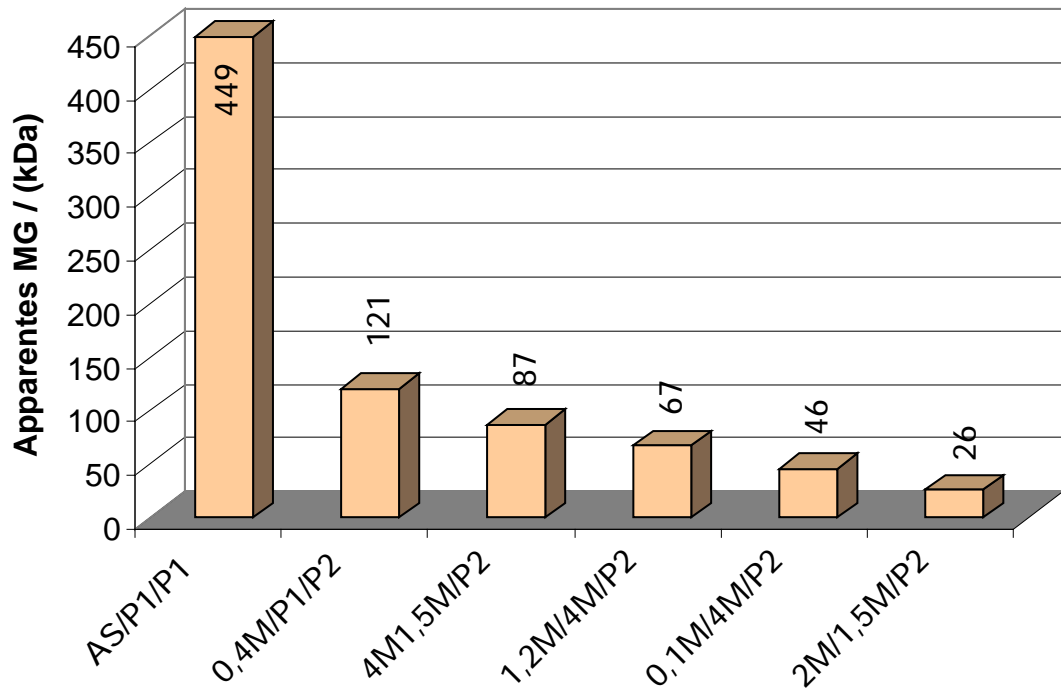


Abb. 19: Ermittlung des apparenten Molekulargewichts (MG) mit Hilfe der HP-GPC

Mit Hilfe der GPC wurden die Molekulargewichte der sechs immunologisch aktiven Substanzen zwischen 26 und 450 kDa bestimmt.

Weiterhin wurde mit dieser Trennmethode bei den Proben jeweils ein symmetrischer Peak (s. Abb. 18) erhalten. Dies ist ein Hinweis auf die Reinheit der isolierten Proben.

4.4 Isoelektrische Fokussierung

Die Isoelektrische Fokussierung wurde unter zwei Gesichtspunkten durchgeführt:

1. Alternative Methode zur Überprüfung der Homogenität
2. Ermittlung des isoelektrischen Punktes (pI-Wert) der isolierten Substanz

Es wurde eine Fokussierung mit einem Ampholyten in einem Bereich von $pI = 3-10$ durchgeführt (Abb. 20). Diese grobe Bestimmung wurde durch eine feinere (im Bereich $pI = 4-6$) optimiert (Abb. 21).

Die isolierten Proben wurden im sauren Bereich fokussiert (s. Abb. 20). Die isoelektrische Fokussierung *Retentat* zeigt in einem Bereich von $pI 3-10$ als einzige Probe auch Banden im neutralen Bereich.

Die Ergebnisse der Fokussierung im Bereich von $pI 4-6$ zeigen einige Banden, die in einem sehr schmalen pI -Bereich liegen (s. Abb. 21).

Die Ursubstanz (Retentat) zeigt in einem Bereich von $pI 4-6$ Banden über den ganzen Bereich. Der pI -Wert der isolierten Substanz 0,1M/4M/P2 liegt zwischen 4,5-4,8. AS/P1/P1 hat einen Wert von 4,2. Probe 0,4M/P1/P2 wies sowohl Banden im Bereich von 4,2 als auch von 4,5-4,8 auf.

Die Proben untereinander unterscheiden sich in ihrem isoelektrischen Punkt, was wiederum den Schluß zuläßt, verschiedene Proteine isoliert zu haben.

Zusammenfassend können aus den Ergebnissen der isoelektrischen Fokussierung folgende Schlüsse gezogen werden:

- es wurde im Bereich von $pI = 3-10$ (Abb. 20) bei den isolierten Substanzen keine neutrale Substanz detektiert. Damit ist belegt, daß neutrale Substanzen chromatographisch entfernt wurden
- im Bereich von $pI = 4-6$ (Abb. 21) wurden die isolierten Substanzen als saure Substanzen detektiert. Sie werden in einem Bereich von $pI = 4,2-4,8$ fokussiert
- nach isoelektrischer Fokussierung der biologisch aktiven Probenmaterialien ist zu erkennen, daß es sich um unterschiedliche Substanzen handelt

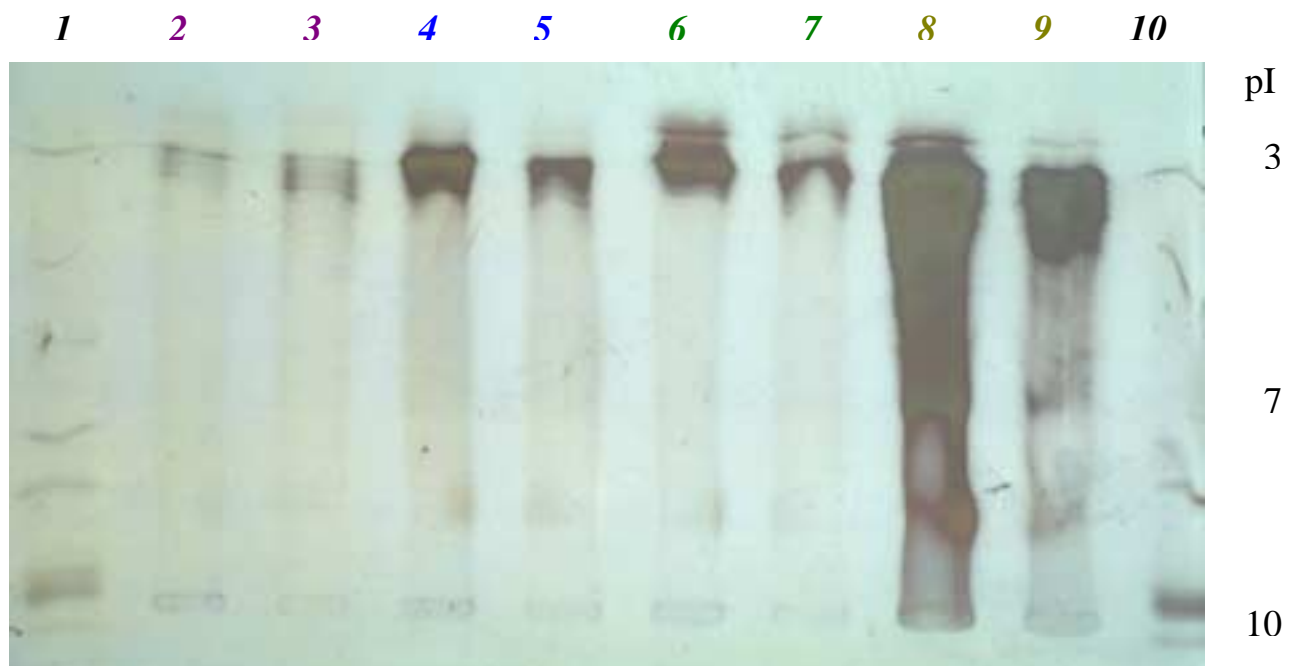


Abb. 20: Isoelektrische Fokussierung im Bereich von $pH=3-10$
 1+10: pI-Marker; 2+3: AS/P1/P1; 4+5: 0,1M/4M/P2; 6+7: 0,4M/P1/P2; 8+9: Retentat
 jeweils linke Bahn der aufgetragenen Proben doppelkonzentriert

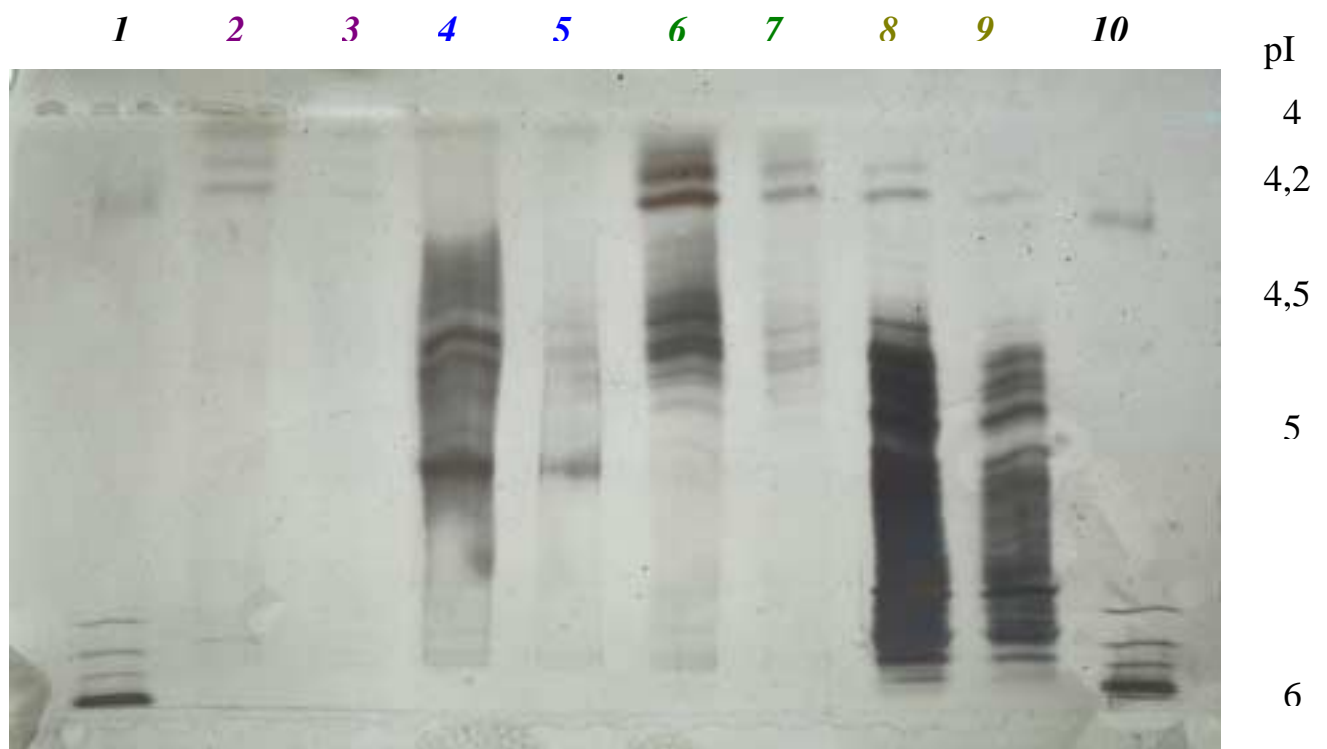


Abb. 21: Isoelektrische Fokussierung im Bereich von $pH=4-6$
 Probenbezeichnungen sind mit denen in der obigen Abbildung identisch

4.5 Elektrophorese

Das Detergenz SDS bewirkt eine besonders intensive Solubilisierung und Denaturierung von Proteinen. Es finden dabei tiefgreifende Strukturänderungen statt, die zur Ausbildung eines uniformen Strukturtyps führen. Das Verhältnis Ladung/Masse wird durch SDS-Behandlung konstant. Proteine weisen bei Anwesenheit höherer SDS-Konzentrationen in der SDS-PAGE Mobilitäten auf, die direkt proportional dem Logarithmus ihres Molekulargewichts sind.

Durch Behandlung der Proben mit SDS und Mercaptoethanol, welches sich im reduzierenden Probenpuffer befindet, wird die Quartärstruktur des Proteins zerstört. Darüber hinaus werden die Proben vor der elektrophoretischen Trennung erhitzt. Die Folge dieser Behandlungen ist ein denaturiertes Protein.

Nach elektrophoretischer Trennung biologisch aktiver Substanzen sowie des Retentats -auf jeweils einer Gelplatte- wurden die Banden gefärbt:

- Silberfärbung

Hierbei werden Untereinheiten von Protein dunkelbraun bis schwarz gefärbt. In Abb. 22 erkennt man anhand dieser Färbung Proteinbanden.

- Färbung mit Schiffs Reagenz

In den selben Bereichen, in denen mit o. g. Silberfärbung Protein nachgewiesen werden konnte, wurde nach Behandlung mit Schiffs Reagenz Violett färbung erzeugt. Dies ist ein Beleg für die Anwesenheit von Zuckern (s. Abb. 23).

Aufgrund dieser beiden spezifischen Färbetechniken kann man auf Anwesenheit glycosidierter Proteine schließen.

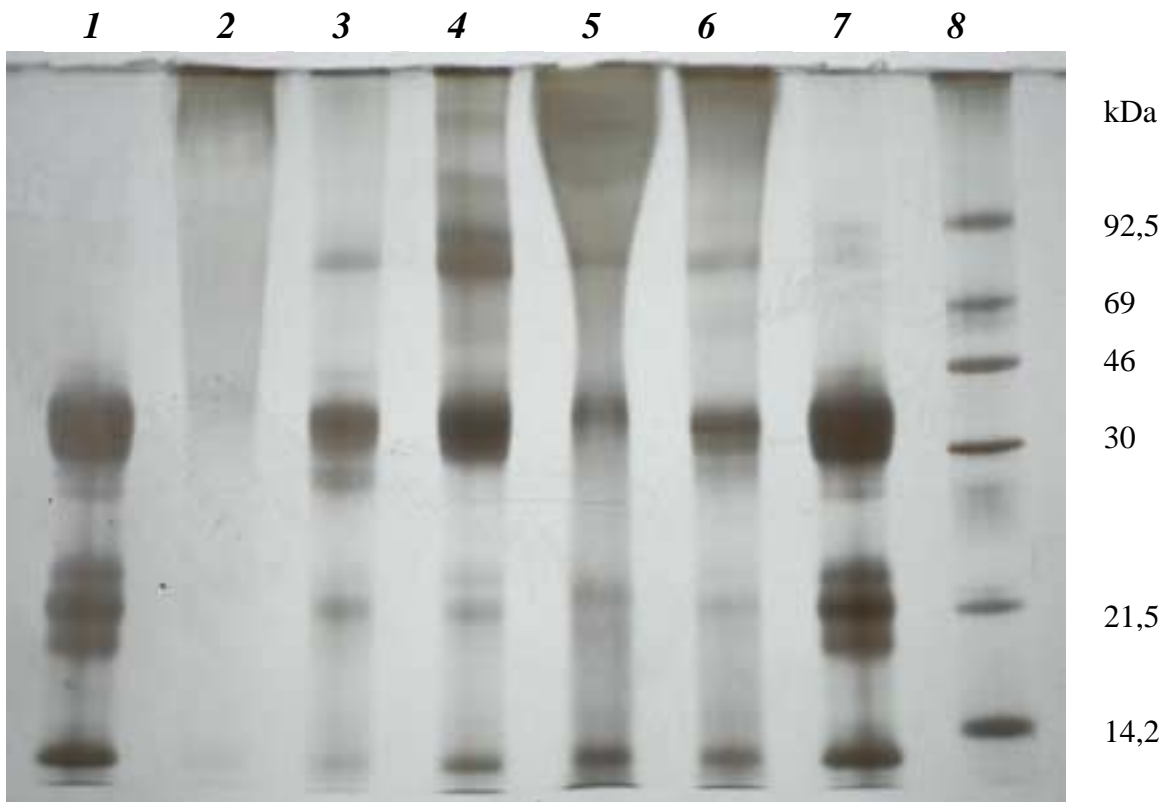


Abb. 22: Elektrophorese der isolierten Substanzen / Qualitativer Protein - Nachweis
 1+7: Ret; 2: 1,2M/4M/P2; 3: 0,4M/P1/P2; 4: 0,1M/4M/P2; 5: 4M/1,5M/P2; 6: AS/P1/P1; 8: Marker

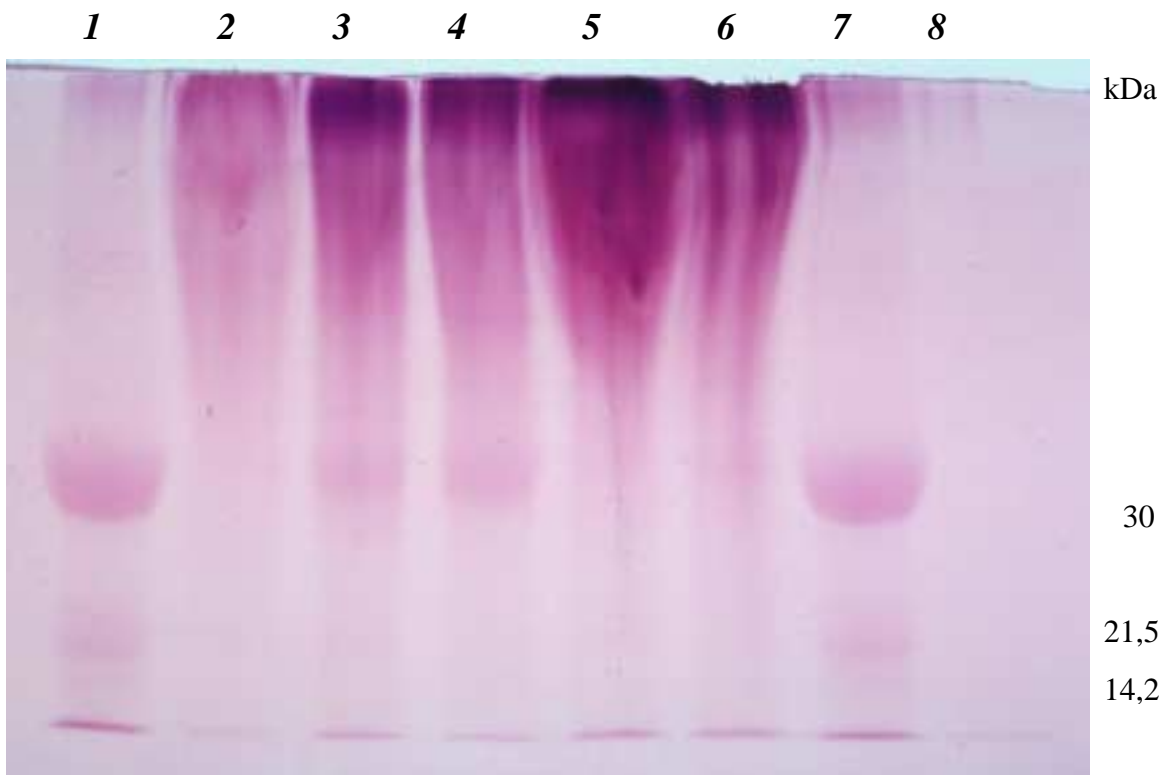


Abb. 23: Elektrophorese der isolierten Substanzen / Qualitativer Zucker - Nachweis
 1+7: Ret; 2: 1,2M/4M/P2; 3: 0,4M/P1/P2; 4: 0,1M/4M/P2; 5: 4M/1,5M/P2; 6: AS/P1/P1; 8: Marker

4.6 Dot-Blot

Mit dieser Methode kann man die isolierten Substanzen nativ mit polyklonalen und mit monoklonalen Antikörpern in Kontakt bringen. Der Dot-Blot liefert Information darüber, welche der Substanzen mit den Antikörpern eine Reaktion eingehen. Er stellt ein Screening-Verfahren für die Antigen-Antikörper-Reaktion dar.

Bei den Antikörpern für diesen Test handelt es sich um monoklonale Antikörper, die gegen Sephadex G-50-Fractionen gerichtet sind.

Die Substanzen 0,1M/4M/P2 und 2M/1,5M/P2 zeigten mit sechs verwendeten monoklonalen Antikörpern (s. Tab. 6) eindeutige reproduzierbare Reaktionen.

Die Abb. 24 belegt, daß diese beiden Substanzen eine Reaktion mit den Antikörpern eingegangen waren. Die dunkelgefärbten Näpfe zeigen an, daß eine Reaktion zwischen Antikörper und Antigen stattgefunden hat. Die anderen Fraktionen (4M/1,5M/P2, AS/P1/P1, 0,4M/P1/P2 und 1,2M/4M/P2) zeigten keine Interaktion.

Mit der Substanz 0,1M/4M/P2 wurde untersucht, bis zu welcher Menge das Antigen bei konstanter Antikörperkonzentration detektierbar ist. Die Aufgabemenge des Antigens wurde hierzu von 200 µg über 100, 50, 25, 12,5, 6,25 bis 3,125 µg variiert. Bei einer Aufgabemenge von 25 µg wurde mit einer konstanten Antikörperkonzentration von 10 µg/mL (Aufgabemenge 0,5 µg) das Antigen mit der angegebenen Färbemethode detektiert (s. Abb. 25).

Das Fazit der Untersuchungsergebnisse der isolierten Proben ist, daß die isolierten Substanzen 0,1M/4M/P2 und 2M/1,5M/P2 als einzige mit sechs verschiedenen Antikörpern eine Interaktion eingehen (Abb. 24). Die Bestimmungsgrenze für die isolierte Substanz 0,1M/4M/P2, bei konstantgehaltener Aufgabemenge (0,5 µg) der Antikörper, lag bei einer Aufgabemenge von 25 µg (Abb. 25) .

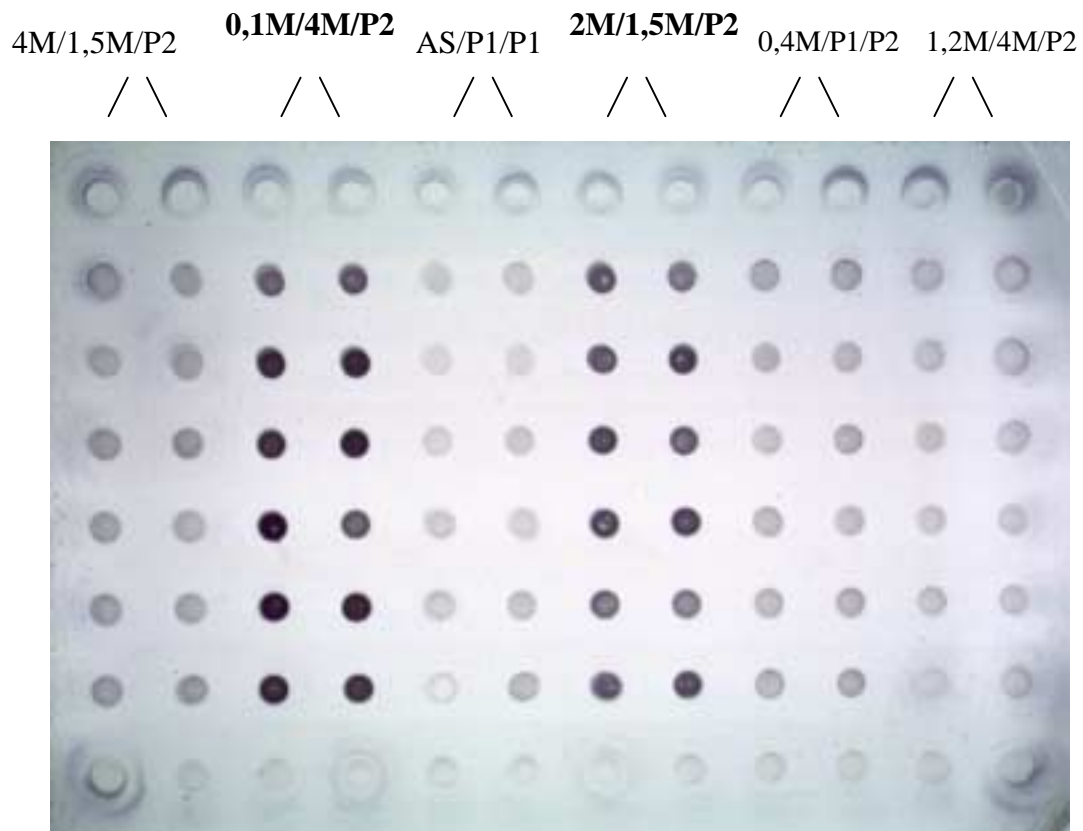


Abb. 24: Dot-Blot von Substanzen mit 6 verschiedenen monoklonalen Antikörpern (AK)
AK1: 196 2A3; **AK2:** 244B7; **AK3:** 244ID8; **AK4:** 236IH4 Pool1; **AK5:** 244IG7; **AK6:** 182IE5

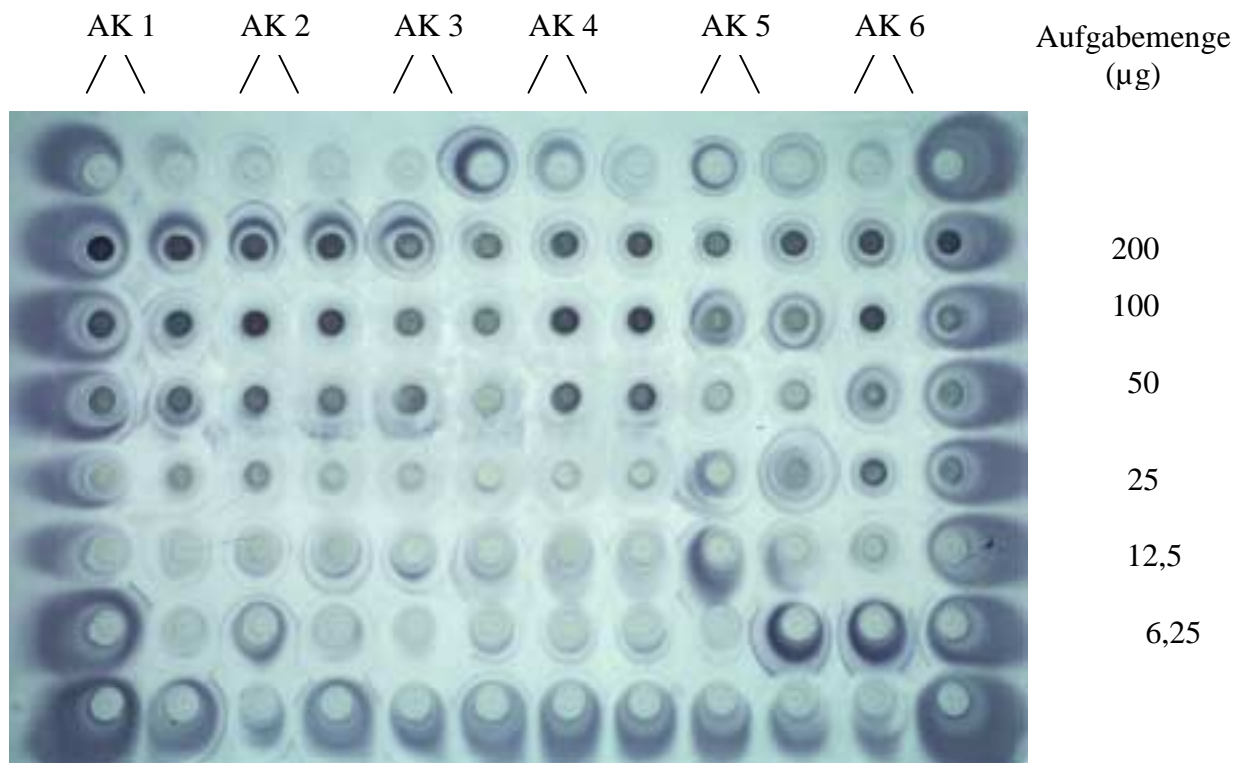


Abb. 25: Dot-Blot zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze der Substanz 0,1M/4M/P2 bei konstant gehaltener Antikörperkonzentration (10 µg/mL)
AK1: 196 2A3; **AK2:** 244B7; **AK3:** 244ID8; **AK4:** 236IH4 Pool1; **AK5:** 244IG7; **AK6:** 182IE5

4.7 Western-Blot

Der im nativen Zustand durchgeführte Dot-Blot gibt nur Information darüber, ob das Antigen mit dem Antikörper eine Wechselbeziehung eingeht.

Der eingesetzte Western-Blot, der unter denaturierenden Bedingungen stattfindet, geht einen Schritt weiter. Er gibt eine Aussage darüber, welcher Bereich des Proteins mit den Antikörpern eine Reaktion eingegangen ist.

Nach der elektrophoretischen Trennung blottet man die Proteine vom SDS-PAGE auf Nitrocellulose. Nach Zugabe eines Antikörpers wird die Nitrocellulose gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Zur Markierung wird 1-Chloro-naphthol verwendet. Die Position des markierten Antikörpers kennzeichnet die molare Masse des nachgewiesenen Proteins.

Zwei Typen von Antikörpern fanden Verwendung: polyklonale und monoklonale. Als polyklonale Antikörper bezeichnet man Antikörper, die von vielen verschiedenen Typen Antikörper-produzierender Zellen erzeugt werden. Die Bildung von Antikörpern erfolgt in immunisierten Tieren. Jeder Zelltyp produziert einen Antikörper, der nur an einem bestimmten, kleinen Teil des antigenen Proteins bindet. Folglich enthalten polyklonale Präparationen eine Vielzahl von Antikörpern, die unterschiedliche Teile des Antigens erkennen.

Im Gegensatz dazu werden monoklonale Antikörper von einer Population identischer Zellen (Klon), die in Zellkulturen wachsen, synthetisiert. Diese Antikörper sind homogen und erkennen alle denselben genau bestimmten Teil eines Antigens.

Diese Gegebenheiten drücken sich in den gezeigten Western-Blots (Abb. 26, 27) aus. Die polyklonalen Antikörper sind zu unspezifisch. Sie erkennen alle elektrophoretisch getrennten Proteinbanden. Der Vergleich zwischen der Aurodye-Färbung und der Markierung durch polyklonale Antikörper beweist dieses.

Die Blots, die dagegen mit den verfügbaren monoklonalen Antikörpern (244 I D8 Pool1, 244 I B7 und 236 I H4) behandelt wurden, zeigen jeweils eine Bande, bei der es zu einer Wechselwirkung zwischen dem monoklonalen Antikörper und dem Antigen in 0,1M/4M/P2 kam (s. Abb. 26, 27).

Die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper findet mit einer Untereinheit des Antigens 0,1M/4M/P2 statt, die ein Molekulargewicht von 21,5 kDa besitzt. In diesem Bereich wurde mit Schiffs Reagenz ein glycosidiertes Protein (s. Abb. 22, 23) ermittelt.

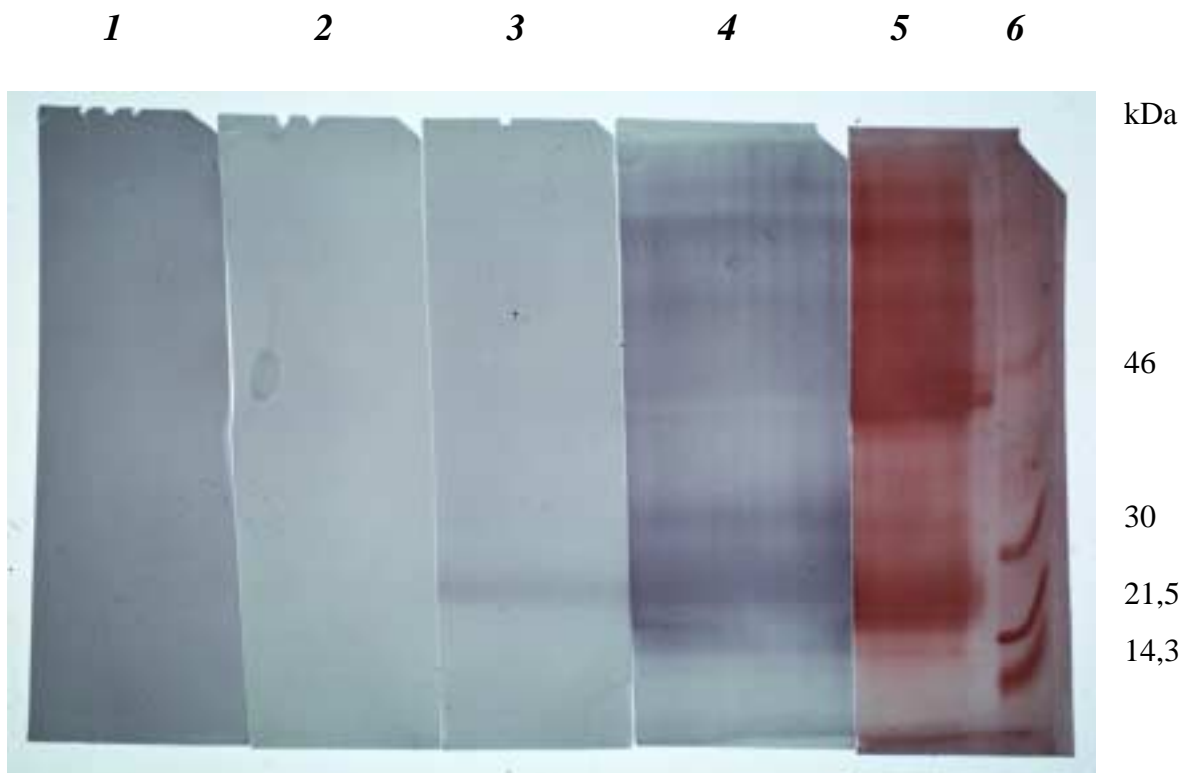


Abb. 26: Western-Blot der Substanz 0,1M/4M/P2
Monokonale Antikörper: 1: AK 196 II A3; 2: AK 182 IE5; 3: AK 244 ID8 Pool1
4: Polyklonaler Antikörper
 5: Aurodye-Färbung des Blots; 6: Marker

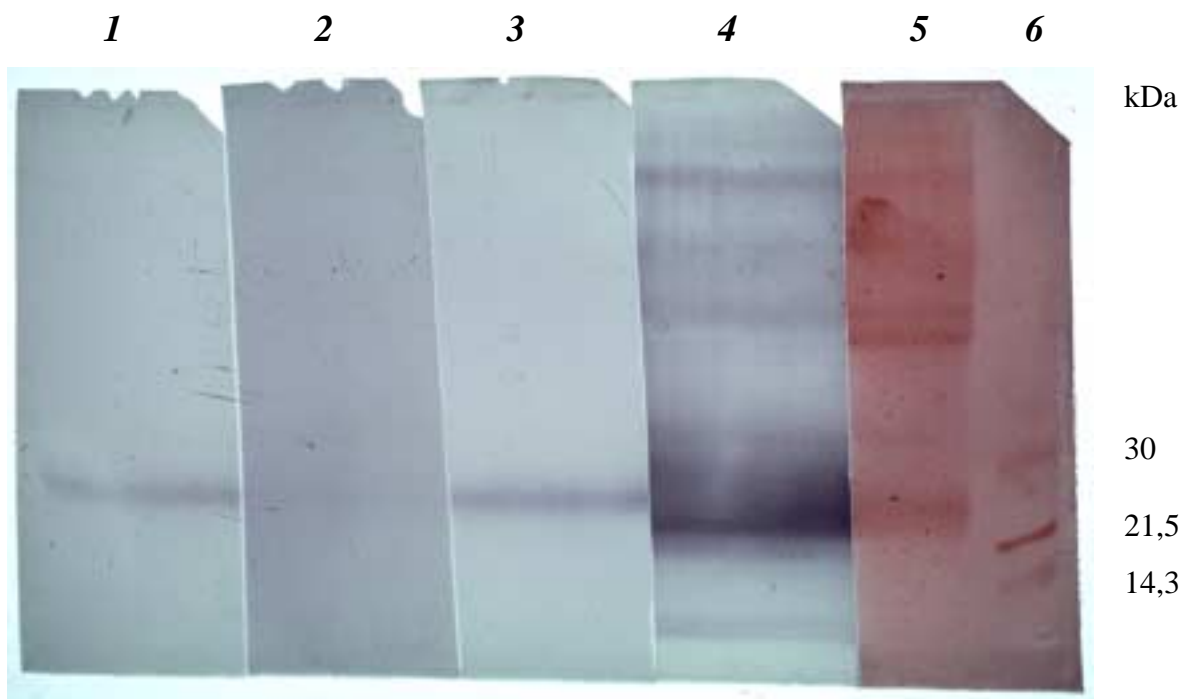


Abb. 27: Western-Blot der Substanz 0,1M/4M/P2
Monokonale Antikörper: 1: AK 236 IH 4 Pool 1; 2: AK 244 IG 7; 3: AK 244 IB 7
4: Polyklonaler Antikörper
 5: Aurodye-Färbung des Blots; 6: Marker

4.8 *Proteinnachweise*

Da unterschiedliche Proteine bei allen in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Proteinbestimmung nicht die gleiche Farbreaktion hervorrufen, kann die Reaktion des BSA von der des untersuchten Proteins mehr oder weniger stark abweichen. Zusätzliche Unterschiede können auftreten, da jede Protein-Bestimmungsmethode auf andere funktionelle Gruppen im Protein reagieren und durch Begleitstoffe (Matrix) unterschiedlich gestört wird. Aus diesen Gründen weichen bei ein und derselben Probe die Ergebnisse verschiedener Protein-Bestimmungsmethoden oft beträchtlich (> 20 %) voneinander ab.

Es wurden Protein-Bestimmungen nach folgenden Methoden durchgeführt:

- Biuret
- Lowry
- Bicinchoninsäure (BCA)
- Amidoschwarz
- Warburg/Christian und Kalckar

Die Bestimmungsmethode nach Biuret wurde eingesetzt, da sie für die zu untersuchenden Fraktionen eine relativ unspezifische Methode darstellt. Es findet eine Farbreaktion mit der Peptidkette und nicht mit bestimmten Aminosäureresten statt.

Die Methode nach Lowry ist um zwei 10er Potenzen empfindlicher als die Biuret-Methode. Sie ist jedoch viel störanfälliger. Alle durchgeführten Proteinbestimmungsmethoden liefern nur relative, keine absoluten Ergebnisse, denn die Farbintensität ist- bei gleicher Proteinmenge- für die verschiedenen Proteine unterschiedlich, weil sie fast ausschließlich von der Anzahl und Anordnung der aromatischen Aminosäuren im Protein abhängt. Deshalb muß man bei der Angabe von Proteingehalten immer auch das für die Kalibrierkurve verwendete Standardprotein angeben.

Die Protein-Bestimmungsmethoden (BCA- und Amidoschwarz) werden bei Proben verwendet, die größere Mengen an Zucker beinhalten.

Die nach Warburg und Kalckar durchgeführten Messungen basieren auf der Erfassung der beiden aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin.

Die graphische Darstellung der Methoden wurde so gewählt, daß die Methoden mit einem annähernd gleichen Resultat in einer Abbildung miteinander verglichen werden.

Die Substanzen weisen einen geringeren Anteil an Protein auf als die Ausgangssubstanz Retentat. Die Methode nach Warburg und Kalckar erbrachte für die Substanz des schwachen Anionen-Austauschers (0,1M/4M/P2) einen etwas höheren Wert im Vergleich zum Retentat (s. Abb. 28).

Die mit BCA und Biuret ermittelten Proteingehalte der isolierten Substanzen und dem Retentat ergeben die gleiche Reihenfolge in bezug auf ihren Proteingehalt, wie sie mit den Methoden nach Warburg und Kalckar bestimmt wurden (s. Abb. 29).

Nach Lowry und mit dem Amidoschwarz-Reagenz erhielt man für das Retentat einen doppelt so hohen Wert wie bei den anderen vier Tests. Die Substanzen hingegen ergaben in dieser Versuchsreihe die niedrigsten Werte (s. Abb. 30).

Durch die Kalibrierung mit BSA erbringen die durchgeführten Proteinbestimmungen nur einen relativen Proteingehalt bezogen auf BSA. Man sieht am Vergleich der verschiedenen Methoden, daß keine exakte Aussage über den Protein-Gehalt getroffen werden kann.

Der Trend bei den Substanzen ist bei den verschiedenen Proteinbestimmungs-Methoden identisch. Der Proteingehalt in der Substanz AS/P1/P1 liegt im Vergleich zu allen Substanzen am niedrigsten. Die Probe 0,1M/4M/P2 enthält die größte Proteinmenge. Ihr Proteingehalt liegt zwischen 100 und 200 µg Protein/mg Lyophilisat.

Eine Elementaranalyse stellt eine absolute Meßmethode in bezug auf die Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff (Elementar-Analyse) dar. Sie wurde durchgeführt, um die Änderung des Stickstoffgehalts von Reinigungsschritt zu Reinigungsschritt am Beispiel der Isolierung mit schwachem Anionen-Austauscher (0,1M), Octyl-HIC (0,1M/4M) und abschließender Größenausschluß-Chromatographie (0,1M/4M/P2) zu ermitteln. Man kann jedoch keinen Rückschluß vom ermittelten Stickstoffgehalt auf den Proteingehalt ziehen (s. Abb. 31).

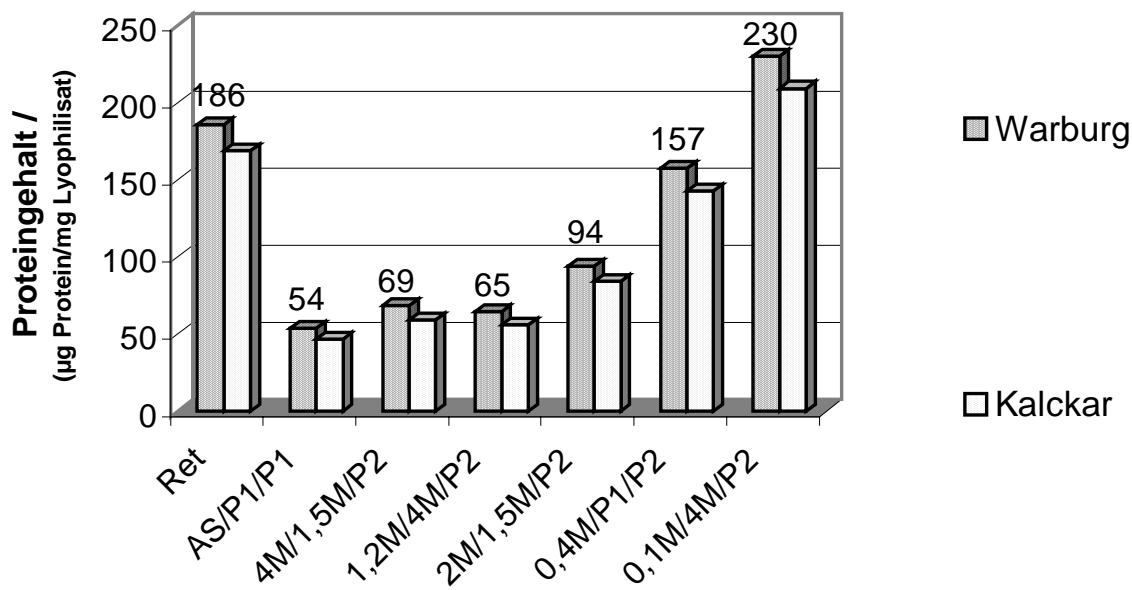


Abb. 20: Proteinbestimmung nach Warburg und Kalckar

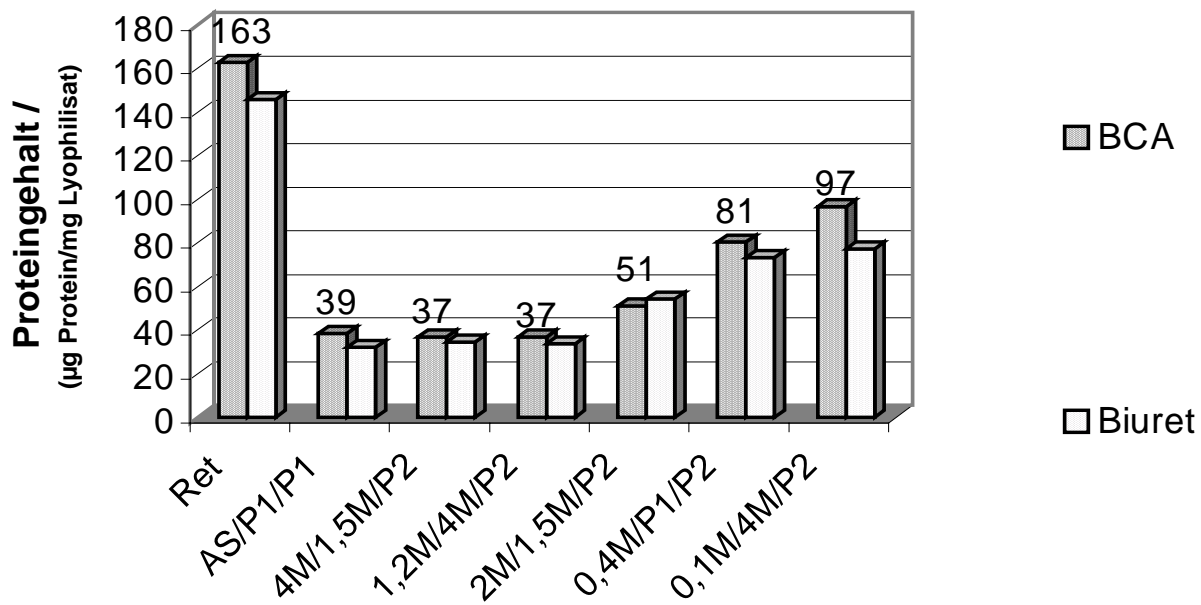


Abb. 21: Proteinbestimmung mit BCA und Biuret

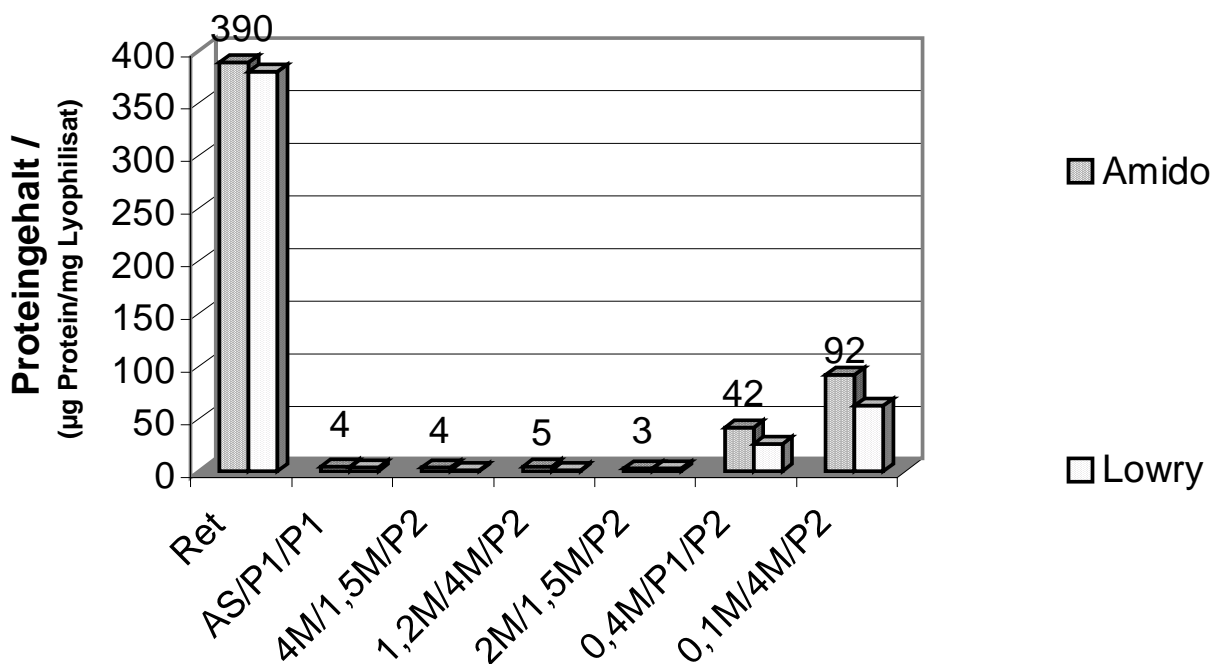


Abb. 22: Proteinbestimmung mit Amidoschwarz und nach Lowry

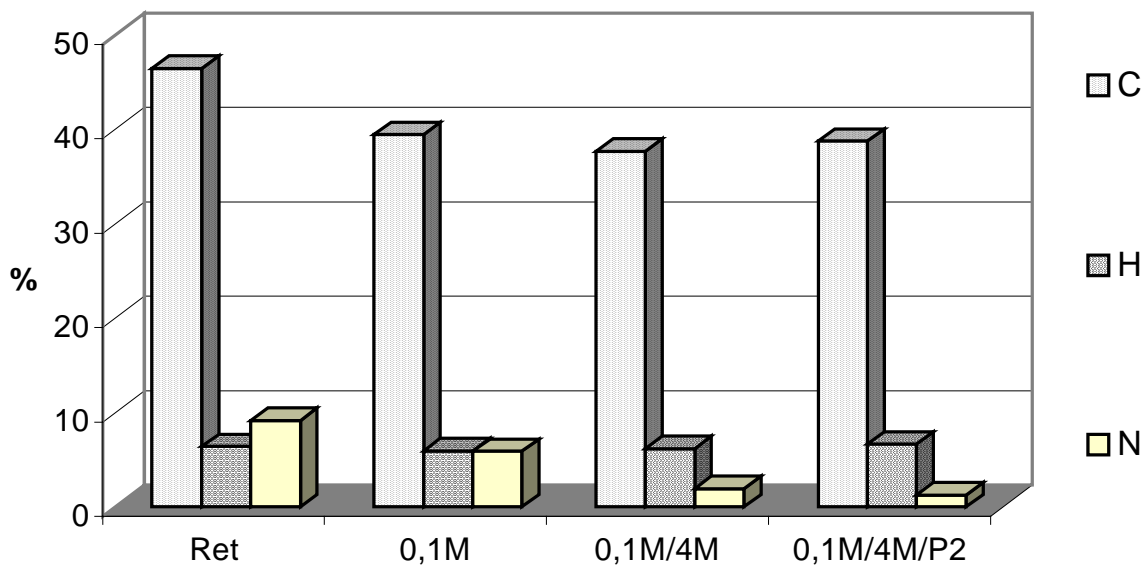


Abb. 23: Elementaranalyse nach der Dumas-Methode

4.9 Enzymatischer Abbau des Proteinanteils

Mit Hilfe der Elektrophorese und mit anschließender Silber-Färbung wie auch den Protein-Bestimmungsmethoden, wurden Proteine in den Substanzen nachgewiesen. Die Frage stellt sich, welcher Anteil des glycosidierten Proteins für die lymphozytenproliferationssteigernde Wirkung verantwortlich ist: der Protein- oder Zucker-Anteil.

In einem Reaktionspuffer wurde ein enzymatischer Abbau des Proteinanteils der Substanzen mit den Enzymen Proteinase K und Protease durchgeführt. Der Fortgang des enzymatischen Abbaus des Retentats mit Proteinase K über mehrere Tage wurde mit Hilfe der Elektrophorese verfolgt (s. Abb. 32).

Auf den Bahnen 3 bis 5 sind Proben, die dem enzymatischen Ansatz mit Retentat zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und elektrophoretisch getrennt wurden (Bahn 3 = Ret, das 7d mit Proteinase K behandelt wurde; Bahn 4 = Ret, das 3d mit Proteinase K behandelt wurde und Bahn 5 = Ret, das 1d mit Proteinase K behandelt wurde). Man erkennt im Bereich von ca. 30 kDa eine Abnahme der Protein-Banden über den Zeitraum von 7d. Der Vergleich mit der Probe, die auf Bahn 7 aufgetragen wurde, bestätigt dieses. Auf Bahn 7 ist das Retentat aufgetragen, welches nicht enzymatisch behandelt wurde. Auf den Bahnen 1, 2 und 6 ist das Enzym Proteinase K als Leerwert mitgeführt worden. Bei den auf Bahn 2 und 6 getrennten Proben handelt es sich um neu angesetzte Proteinase K, im Gegensatz zu Bahn 1, welches 7d inkubiertes und anschließend getrenntes Proteinase K zeigt.

Proben von verdauter biologisch aktiver Substanz 0,1M/4M/P2, die elektrophoretisch getrennt wurden, sind in Abb. 33 zusammengestellt. Die biologisch aktive Substanz 0,1M/4M/P2 wurde sowohl mit dem Enzym Proteinase K als auch mit Protease behandelt. Auch bei dieser Probe ist, wie beim enzymatischen Abbau des Proteinanteils am Retentat, im Bereich von 30 kDa eine Abnahme der Proteinbanden über den Zeitraum von 7d festzustellen (Bahn 2 = 0,1M/4M/P2, 7d mit Protease behandelt; Bahn 3 = 0,1M/4M/P2, 7d mit Proteinase K behandelt). Auf Bahn 1 (Protease) und Bahn 4 (Proteinase K) wurden Enzyme aufgetragen.

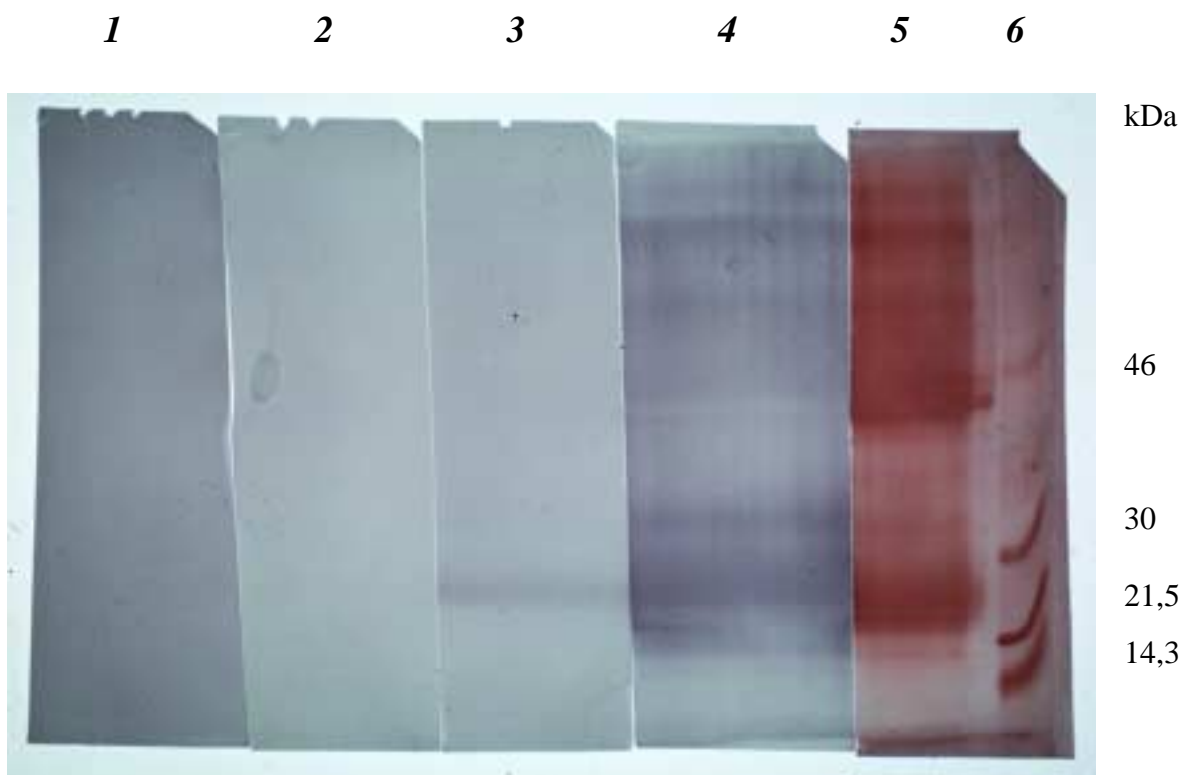


Abb. 26: Western-Blot der Substanz 0,1M/4M/P2
Monokonale Antikörper: 1: AK 196 II A3; 2: AK 182 IE5; 3: AK 244 ID8 Pool1
4: Polyklonaler Antikörper
 5: Aurodye-Färbung des Blots; 6: Marker

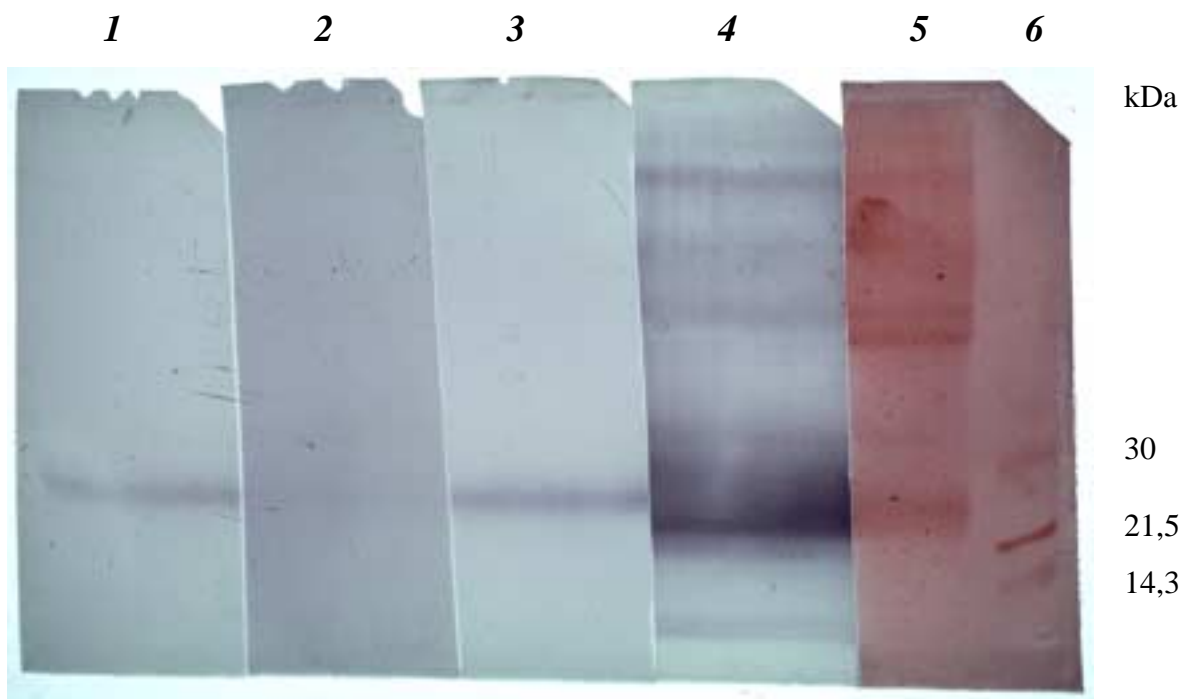


Abb. 27: Western-Blot der Substanz 0,1M/4M/P2
Monokonale Antikörper: 1: AK 236 IH 4 Pool 1; 2: AK 244 IG 7; 3: AK 244 IB 7
4: Polyklonaler Antikörper
 5: Aurodye-Färbung des Blots; 6: Marker

Ein anschließender LPT des Retentats (Ret prot K und Ret prot) und der biologisch aktiven Substanz 0,1M/4M/P2 (0,1M/4M/P2 prot K und 0,1M/4M/P2 prot), deren Proteinanteil enzymatisch entfernt wurde, gibt Auskunft über die biologische Aktivität der behandelten Substanz im Vergleich zu den unbehandelten Proben (mit Proteinanteil / Ret lyoph und 0,1M/4M/P2 lyoph) (Abb. 34, 35). Weiterhin handelt es sich bei den Proben Ret blank und 0,1M/4M/P2 blank um Substanzen, die nur in Reaktionspuffer aufgenommen wurden. Diese Proben sollen Auskunft geben, in wieweit der Probenpuffer eine Wirkung auf den biologischen Test ausübt. Die Blindproben (Prot, Prot K) wurden mitgeführt, um eine Aussage über die lymphozytenstimulierende Aktivität der Enzyme zu erhalten.

Es ist sowohl aus Abb. 34 als auch aus Abb. 35 zu ersehen, daß erst unter einer Verdünnung von 62,5 µg/mL eine erkennbare Stimulation der enzymatisch behandelten Substanzen (Ret prot K, Ret prot und 0,1M/4M/P2 prot K, 0,1M/4M/P2 prot) und der mitgeführten Blindproben (Prot, Prot K) eintritt. Die Konzentrationen von 1000-125 µg/mL lassen einen unterdrückenden Einfluß auf den LPT erkennen. Für das Ausbleiben der stimulierenden Wirkung auf die Lymphozyten ist der Reaktionspuffer (Ret blank, 0,1M/4M/P2 blank) verantwortlich. Ohne die Anwesenheit dieses Reaktionspuffers wäre eine biologische Aktivität auch schon über der o. g. Konzentration von 62,5 µg/mL bei den Proben erkennbar wie an „ret lyoph“ und „0,1M/4M/P2 lyoph“ zu sehen. Durch die Verdünnungsreihe im LPT wurde die hemmende Wirkung des Reaktionspuffers herabgesetzt. Diese Wirkung der Verdünnung wurde in 4.1 und 4.2, im Zusammenhang mit hemmenden Komponenten im Retentat, erläutert. Ohne diese Verdünnungsreihe hätte man die biologische Aktivität der nun vorliegenden Polysaccharide nicht erkannt.

Das unbehandelte Retentat („ret lyoph“) lieferte über die ganze Verdünnungsreihe ähnliche biologische Aktivitäten wie in 4.1 und 4.2 (s. Abb. 16 und 17) gemessen (s. Abb. 34).

Die ermittelten biologischen Aktivitäten -nach enzymatischem Abbau des Proteinanteils an Substanz 0,1M/4M/P2- sind in Abb. 35 dokumentiert. Die Probe „0,1M/4M/P2 lyoph“, die die Ausgangssubstanz dieses Tests ist, zeigt über die ganze Verdünnungsreihe eine biologische Aktivität (s. Abb. 35).

Mit der Konzentration von 62,5 µg Lyophilisat /mL ist eine Stimulation zu erkennen, deren Stimulationsniveau mindestens dem der unbehandelten Probe „ret lyoph“ und „0,1M/4M/P2 lyoph“ entspricht.

Daraus kann man schließen, daß der Proteinanteil für die biologische Aktivität der Substanz keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt.

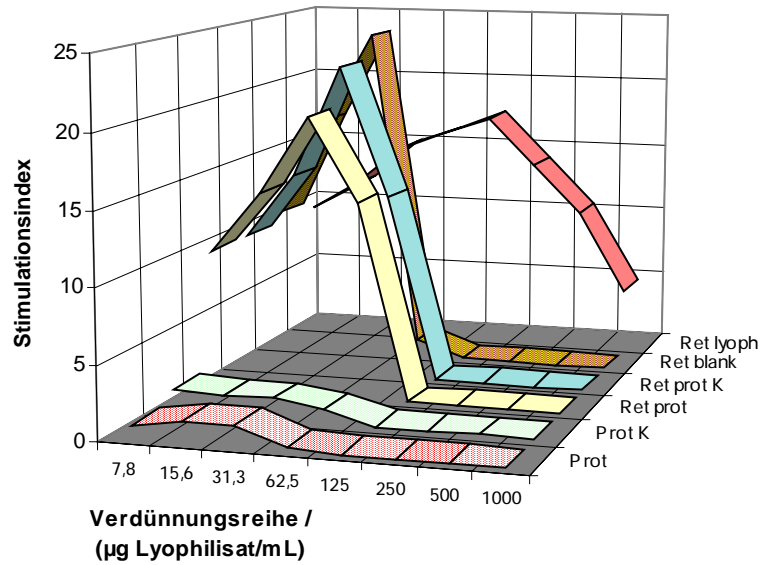


Abb. 24: Lymphozytenstimulation nach enzymatischem Abbau des Proteinanteils ausgehend vom Retentat

(Ret lyoph = Retentat lyophilisiert, Ret blank = Retentat in Reaktionspuffer, Ret prot K = Retentat nach enzymatischer Behandlung mit Proteinase K, Ret prot = Retentat nach enzymatischer Behandlung mit Protease, Prot K = Proteinase K, Prot = Protease)

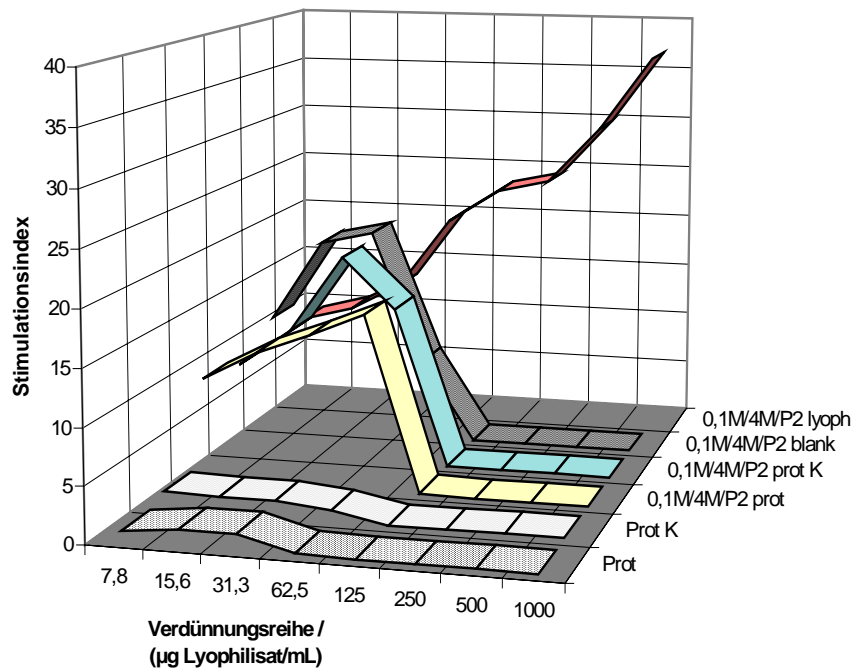


Abb. 25: Lymphozytenstimulation nach enzymatischem Abbau des Proteinanteils ausgehend von Substanz 0,1M/4M/P2

(0,1M/4M/P2 lyoph = 0,1M/4M/P2 lyophilisiert, 0,1M/4M/P2 blank = 0,1M/4M/P2 in Reaktionspuffer, 0,1M/4M/P2 prot K = 0,1M/4M/P2 nach enzymatischer Behandlung mit Proteinase K, 0,1M/4M/P2 prot = 0,1M/4M/P2 nach enzymatischer Behandlung mit Protease, Prot K = Proteinase K, Prot = Protease)

4.10 Bestimmung von Monosacchariden

Zur Bestimmung der Monosaccharide wird mit Säure eine Totalhydrolyse der Polysaccharide in den Glycoproteinen durchgeführt. Vor allem bei Heteropolysacchariden ist es schwierig, eine für alle glycosidisch, verknüpften Zuckerbausteine gleichermaßen geeignete Hydrolyse-methode zu finden. Eine oft angewandte Methode ist die Hydrolyse mit 2 mol/L TFA. Dabei werden fast alle glycosidischen Bindungen quantitativ gespalten, ohne daß es zu größeren Verlusten an säurelabilen Zuckern kommt. Vorteil der TFA ist ihre Flüchtigkeit, was deren Entfernung aus dem Hydrolysat erleichtert. Aus diesem Grunde wurde zur Analyse der Monosaccharide mit Hilfe der DC und GC die Hydrolyse mit 2 mol/L TFA (1h / 121 °C) gewählt.

4.10.1 Dünnschicht-Chromatographische Untersuchung der Monosaccharide

Für die Durchführung der DC-Untersuchung wurde das Vielstoffgemisch Retentat mit TFA hydrolysiert. Mit Hilfe des Rotationsverdampfers wird die überschüssige Säure entfernt. Das Hydrolysat wird in Methanol aufgenommen. Die Referenzzucker wurden ebenfalls in Methanol gelöst.

Durch Dünnschicht-Chromatographische Trennung wurden die in der Ursubstanz Retentat befindlichen Monosaccharide identifiziert. Man erhält dadurch einen Anhaltspunkt für die Zusammensetzung der Zucker.

Nach der chromatographischen Trennung mit dem Laufmittel Acetonitril/Wasser/Eisessig (85/14/1 (v/v)) wurden die Zucker und Uronsäuren mit Anilindiphenylaminophosphorsäure sichtbar gemacht.

Nach durchgeführter DC-Trennung kann man die Referenz-Monosaccharide als auch die Referenz-Uronsäuren den aus dem Retentat stammenden Zuckern und Zuckersäuren zuordnen. Die Zucker Arabinose, Galactose, Glucose, Mannose und in Spuren Xylose und Rhamnose konnten im VIS-Bereich eindeutig zugeordnet werden (s. Abb. 36). Die Zuckersäuren Galacturonsäure und Glucuronsäure konnten ebenfalls detektiert werden.

Der Zucker Fucose wurde erst bei $\lambda=366$ nm detektiert. Dieser Zucker ist nach der DC-Untersuchung nur in Spuren im Retentat enthalten (s. Abb. 37).

Aus den DC-Ergebnissen ist zu ersehen, daß die Polysaccharide im Retentat aus 7 Monosacchariden und 2 Zuckersäuren bestehen.

Eine Auswertung der absoluten R_f -Werte wurde nicht durchgeführt, da sie von den konkreten experimentellen Bedingungen stark beeinflusst werden. Dazu gehören die Schichtdicke, der Feuchtigkeitsgehalt der mobilen und stationären Phase, die Temperatur, der Sättigungsgrad an mobiler Phase in der Entwicklungskammer oder die Proben- bzw. Fleckgröße. Daher wurde ein relativer Retentionsfaktor (R_{st}) verwendet, der im Vergleich zu einer Standardsubstanz bestimmt wird (s. Tab. 11).

Galactose wurde als Standardsubstanz verwendet, da diese der Hauptzucker im Retentat ist.

Tab. 11: Bestimmung der R_{st} -Werte*

Analyten	R_{st}
<i>Galactose</i>	<i>1,0</i>
Galacturonsäure	0,2
Glucuronsäure	0,4
Glucose	1,1
Mannose	1,2
Arabinose	1,3
Fucose	1,4
Xylose	1,5
Rhamnose	1,6

* R_{st} = Wanderungstrecke des Analyten / Wanderungstrecke einer Standardsubstanz

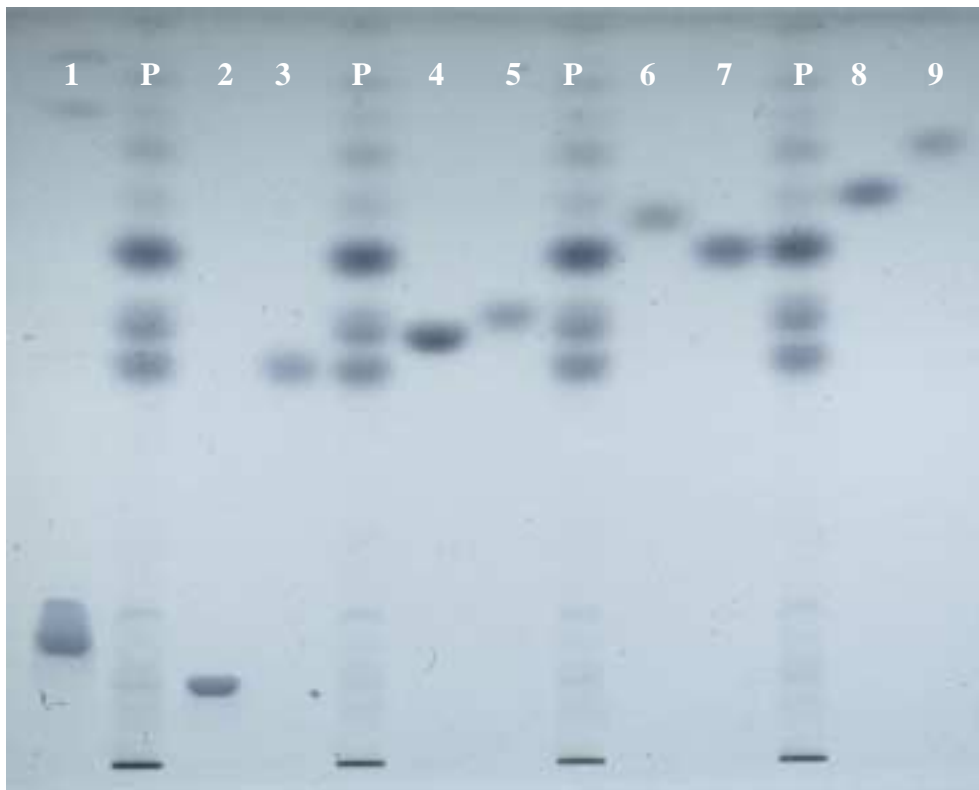


Abb. 36: DC von Monosacchariden/Uronsäuren und hydrolysiertem Retentat nach Anfärbung mit Anilindiphenylaminophosphorsäure (VIS)

1:Glucuronsäure; 2:Galacturonsäure; 3:Galactose; 4:Glucose; 5: Mannose;
6: Fucose; 7:Arabinose; 8:Xylose; 9:Rhamnose; P: Probe (hydrolysiertes „Retentat“)

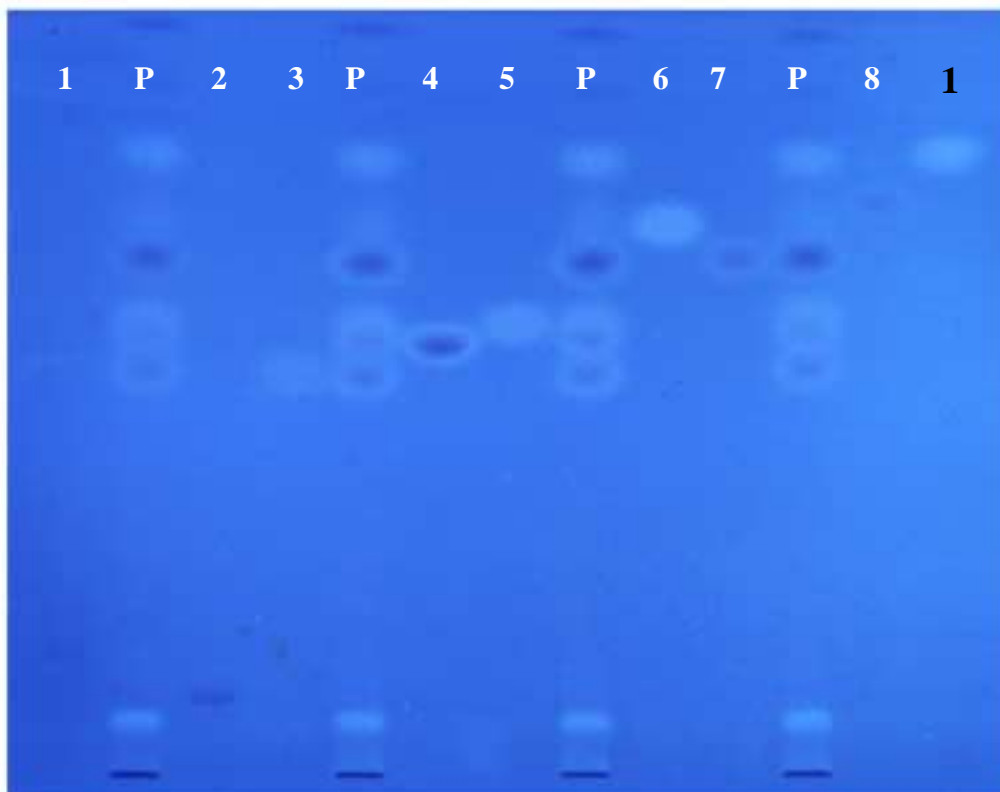


Abb. 37: DC von Monosacchariden/Uronsäuren und hydrolysiertem Retentat nach Anfärbung mit Anilindiphenylaminophosphorsäure ($\lambda=366\text{ nm}$)/ Probenbezeichnungen s. Abb. 36

4.10.2 Gas-Chromatographische Untersuchung der Monosaccharide

Nach der chemischen Hydrolyse der Fraktionen mit TFA wurden die Monosaccharide derivatisiert.

Eine TMS-Derivatisierung des hydrolysierten Retentats führt pro Zucker zu mehreren Isomeren, die gaschromatographisch trennbar sind. Liegt ein komplexeres Zuckergemisch vor, wie in unserem Fall, sind diese Signale jedoch nicht mehr eindeutig zuzuordnen. Die Quantifizierung wäre nur über Peakhöhen möglich, da sich einige Peaks überlappen. Diese Methode ist ungeeignet.

Daher wurde die Alditol-Acetal-Derivatisierung der Monosaccharide gewählt. Hierbei erhält man pro Zucker nur ein Derivat und somit auch nur ein Signal.

Die Derivate wurden nach ihrer gaschromatographischen Trennung mit einem FID detektiert.

Die Monosaccharide wurden mit Hilfe der GC in folgender Reihenfolge getrennt:

Desoxyhexosen: Rhamnose (Rha), Fucose (Fuc)

Pentosen: Arabinose (Ara), Xylose (Xyl)

Hexosen: Mannose (Man), Galactose (Gal), Glucose (Glu)

In Abb. 38 ist das Chromatogramm der Standard-Lösung mit den 7 genannten Standard-Zuckern und diejenigen des Retentats und der immunologisch aktiven Probe 0,1M/4M/P2 gegenübergestellt. Die einzelnen Monosaccharide sind Basislinien-getrennt, wodurch eine quantitative Auswertung über die Peakflächen möglich ist.

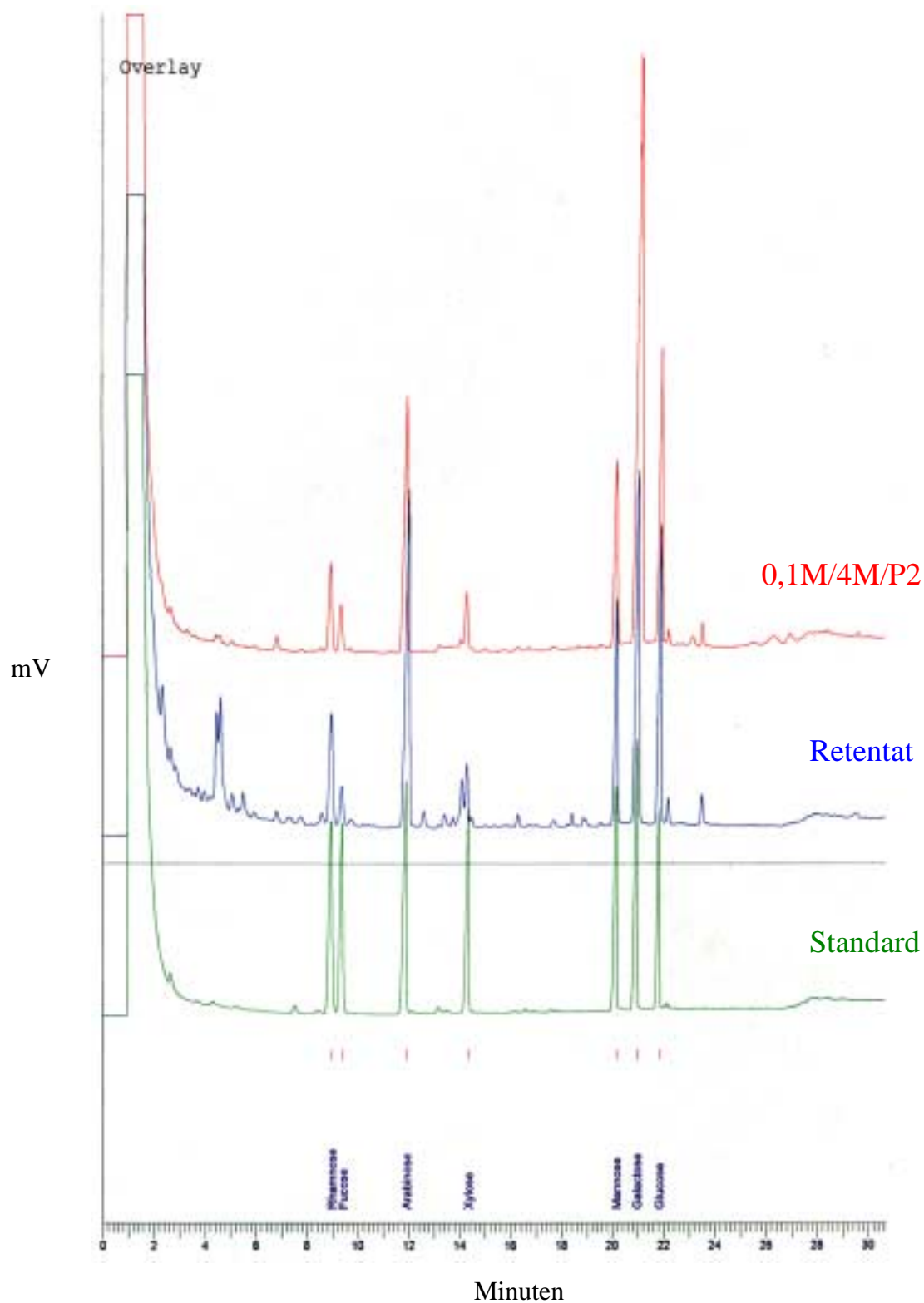


Abb. 26: GC-Chromatogramm eines Zucker-Standardgemisches, der derivatisierten Monosaccharide des Retentats und der derivatisierten Monosaccharide der biologisch aktiven Substanz 0,1M/4M/P2 (Retentat und biologisch aktive Substanz 0,1M/4M/P2 wurden vor der Derivatisierung hydrolysiert)

Die Kalibrierung fand mit Standardzuckern statt, die das gleiche Derivatisierungsprozedere wie die Proben durchgelaufen hatten. Man erhielt die Kalibrierungskurve ($y = mx + b$) und den Korrelationskoeffizienten (r^2) aus den Referenzproben. Weiterhin wurde die relative Standardabweichung der Flächen ($\sigma\%$) und die Standardabweichung der Retentionszeiten (σ) nach 6 Läufen ermittelt. Die Analyseergebnisse für die einzelnen Zucker sind in Tab. 12 zusammengefaßt.

Tab. 12: Gleichungen der Kalibrierkurven, Korrelationskoeffizienten, relative Standardabweichung der Flächen ($\sigma\%$) und Standardabweichung der Retentionszeiten (σ) für die verschiedenen Monosaccharide (GC-Methode)

Monosaccharid	y = mx + b		r ²	Fläche / $\sigma\%$ (n=6)	min / σ (n=6)
	m	b			
Rhamnose	847298	11179	0,9989	0,41	0,002
Fucose	556808	28218	0,9998	0,64	0,002
Arabinose	913723	13266	0,9991	0,33	0,003
Xylose	706399	25880	0,9994	0,54	0,002
Mannose	845845	18287	0,9998	0,51	0,004
Galactose	769170	17304	0,9994	0,44	0,005
Glucose	615453	8679	0,9994	0,35	0,005

Die Ergebnisse der Auswertung werden in den folgenden Abbildungen (s. Abb. 39, 40, 41) dargestellt, wobei die unterschiedlichen Zucker in ein molares Verhältnis zueinander gesetzt wurden. Bei allen Substanzen stellt die Galactose den dominierenden Zucker dar.

Im Retentat wurde neben den dominierenden Zuckern Arabinose und Galactose auch Protein nachgewiesen. Daraus ist zu entnehmen, daß im Retentat u. a. Arabino-Galactan-Protein vorkommen.

Die biologisch aktiven Substanzen unterscheiden sich von dem Retentat in ihrer Zucker-Zusammensetzung gravierend. Die biologisch aktiven Substanzen, deren Zucker-Zusammensetzung untereinander ähnlich ist, sind in jeweils einer Abbildung (s. Abb. 40 u. 41) zusammengefaßt worden.

Die biologisch aktive Substanz 1,2M/4M/P2 ist die einzige, die signifikante Unterschiede im Zusammenhang mit ihrer Zucker-Zusammensetzung mit anderen aufweist. Sie wird mit dem Ausgangsmaterial Retentat in der Abb. 39 verglichen.

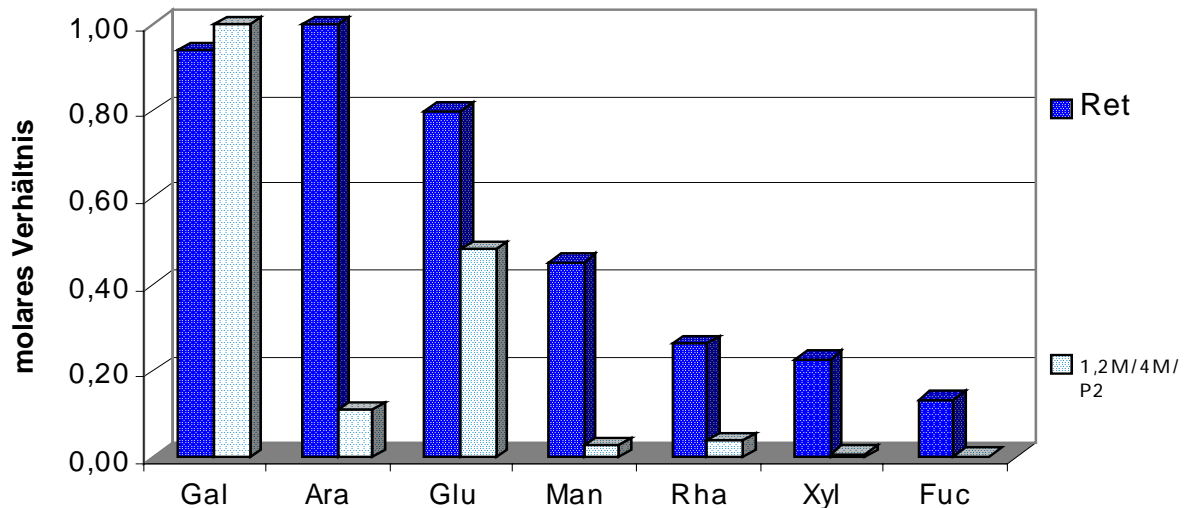


Abb. 27: Vergleich der molaren Verhältnisse der Monosaccharide zwischen der Ursubstanz (Retentat) und der Substanz 1,2M/4M/P2

In der biologisch aktiven Substanz 1,2M/4M/P2 und dem Retentat ist der Zucker Galactose der dominierende. Die Substanz 1,2M/4M/P2 wird als Arabino-Gluco-Galactan charakterisiert. Die anderen Zuckerkomponenten der Substanz 1,2M/4M/P2 haben -bis auf Galactose- im Vergleich zum Retentat abgenommen (s. Abb. 39).

Die Substanzen 0,1M/4M/P2 und 2M/1,5M/P2 sind die einzigen, die im Dot- und Western-Blot mit Antikörpern reagieren. Ihre Zucker werden in Abb. 40 miteinander verglichen. Man erkennt bei diesen Substanzen eine gute Übereinstimmung der Zucker-Zusammensetzung. Diese Substanzen (0,1M/4M/P2 und 2M/1,5M/P2) werden als Arabino-Galactane charakterisiert.

Diese beiden Fraktionen unterscheiden sich aber untereinander deutlich in ihrer biologischen Aktivität (s. Abb. 16), was vermuten läßt, daß es sich doch um zwei unterschiedliche Substanzen handelt.

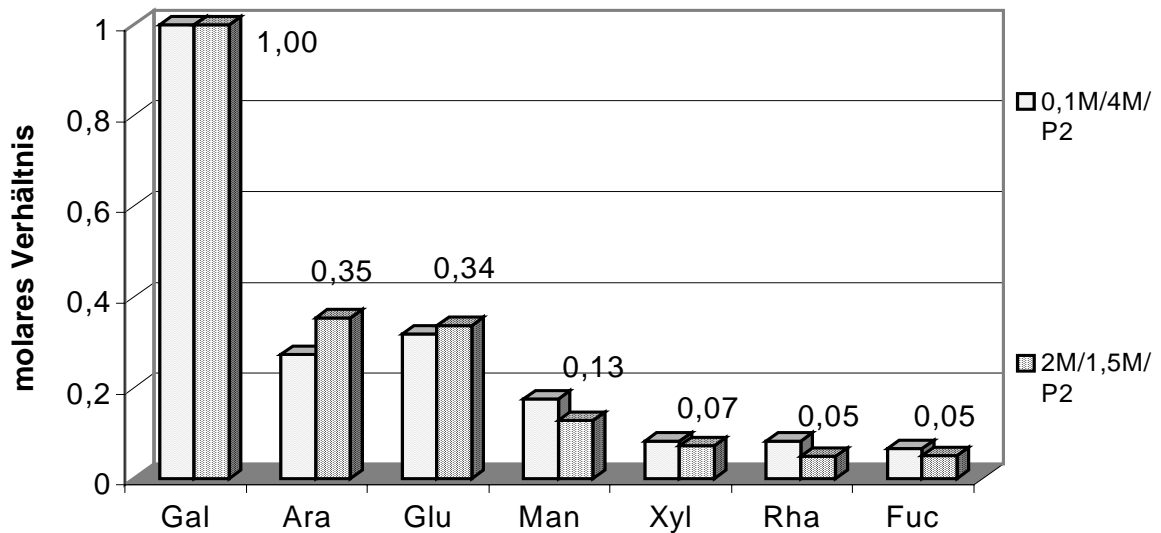


Abb. 28: Vergleich der molaren Verhältnisse der Monosaccharide zwischen den Substanzen 0,1M/4M/P2 und 2M/1,5M/P2

Die drei auf unterschiedliche Weise isolierten Substanzen (s. Abb. 41) besitzen eine Ähnlichkeit in ihrer Zucker-Zusammensetzung. Im Vergleich zu den in Abb. 39 und 40 dargestellten Zucker-Zusammensetzungen spielt bei dieser Gruppe die Mannose eine untergeordnete Rolle. Wiederum sind Galactose und Arabinose die Hauptkomponenten. Die drei Substanzen wurden als Arabino-Galactane identifiziert.

Die Zucker-Zusammensetzung spielt bei dem LPT nicht die entscheidende Rolle. Die Substanzen in der Abb. 41 weisen Ähnlichkeiten in ihrer Monosaccharid-Zusammensetzung auf, zeigen aber größere Unterschiede im LPT.

Die Substanzen 0,4M/P1/P2 und AS/P1/P1 sind in den vergleichenden Darstellungen der LPT-Ergebnisse (s. Abb. 16 und 17) aus Übersichtgründen nicht dargestellt. Beide sind deutlich biologisch inaktiver als die in den genannten Abbildungen dargestellten Substanzen. Diese geringe Wirkung im LPT der Substanzen 0,4M/P1/P2 und AS/P1/P1, im Vergleich zu Substanz 4M/1,5M/P2, kann auf die unterschiedlichen chromatographischen Reinigungsschritte zurückgeführt werden. Die Substanzen 0,4M/P1/P2 und AS/P1/P1 haben „nur“ zwei unterschiedliche Trennschritte durchlaufen. Es scheinen Komponenten der Probe 4M/1,5M/P2 entfernt worden zu sein, die -im Vergleich zu 0,4M/P1/P2 und AS/P1/P1- im LPT eine Aktivitätssteigerung auslösen.

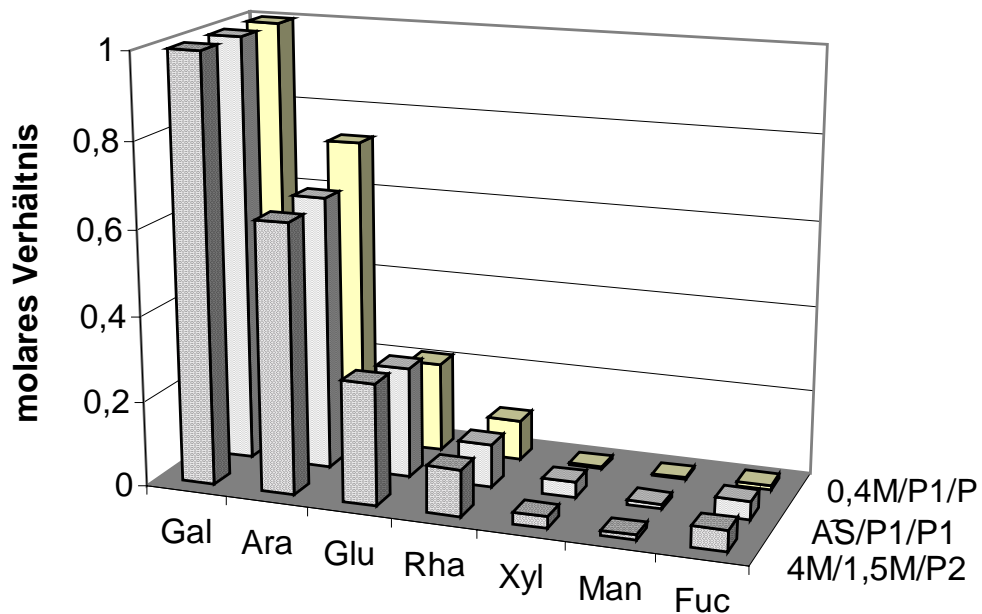


Abb. 29: Vergleich der molaren Verhältnisse der Monosaccharide zwischen den isolierten Substanzen 4M/1,5M/P2, AS/P1/P1 und 0,4M/P1/P2

4.10.3 HPLC-Untersuchung der Monosaccharide

Mit Hilfe einer Methanolyse und der anschließenden Trennung über eine C18-Phase können die Methylglycoside mit einem LSD detektiert werden.

Die Untersuchung der immunologisch aktiven Substanzen auf die Monosaccharid-Zusammensetzung ergab mit der HPLC- im Vergleich zu der GC-Methode vergleichbare Resultate. Die im Abschnitt 4.10.2 „Gas-Chromatographische Untersuchung der Monosaccharide“ in Abbildungen 39-41 zusammengestellten Ergebnisse der Substanzen, die eine Ähnlichkeit in ihrer Zucker-Zusammensetzung aufweisen, konnten mit der HPLC-Methode bestätigt werden.

Die Kalibrierung fand mit Referenzzuckern statt, die das gleiche Derivatisierungsprozedere wie die Proben durchlaufen hatten. Man erhielt die Kalibrierungskurve ($y = mx + b$) und den Korrelationskoeffizienten (r^2) aus den Referenzproben. Weiterhin wurde die relative Standardabweichung ($\sigma\%$) der Flächen und die Standardabweichung der Retentionszeiten (σ)

nach 6 Läufen ermittelt. Die Ergebnisse der HPLC-Untersuchung der einzelnen Zucker sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Gleichungen der Kalibrierkurven, Korrelationskoeffizienten, relative Standardabweichung der Flächen ($\sigma\%$) und Standardabweichung der Retentionszeiten (σ) für die verschiedenen Monosaccharide (HPLC-Methode)

Monosaccharid	y = mx + b		r ²	Fläche / $\sigma\%$ (n=6)	min / σ (n=6)
	m	b			
Rhamnose	2,20	6,93	0,9995	5,8	0,04
Arabinose	2,22	7,78	0,9998	4,8	0,01
Xylose	2,17	7,03	0,9999	4,1	0,02
Mannose	1,74	7,74	0,9998	3,3	0,02
Galactose	1,72	7,82	0,9997	4,2	0,02
Glucose	1,57	7,74	0,9994	3,3	0,02

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu belegen, wurden die Ergebnisse der beiden chromatographischen Trennmethode anhand der Probe 0,1M/4M/P2 in Abb. 42 gegenübergestellt.

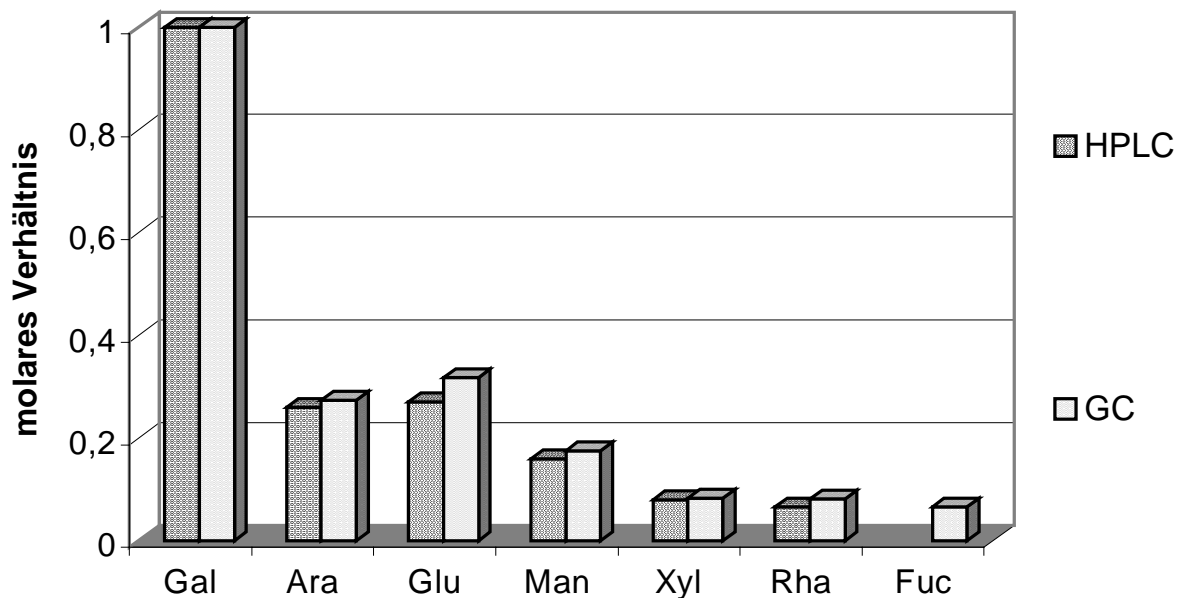


Abb. 30: Vergleich der molaren Verhältnisse der Monosaccharide in Substanz 0,1M/4M/P2 (ermittelt mit HPLC-LSD- und GC-FID-Methode)

Der Zucker Fucose kann in den Proben nicht detektiert werden. Aus dem Vergleich der Chromatogramme (s. Abb. 43) der Probe 0,1M/4M/P2 mit einer Standard-Lösung ist erkennbar, daß mit der verwendeten Methode Fucose von den anderen Standard-Zuckern trennbar ist.

Darüber hinaus sind in dem Chromatogramm der Proben zwei weitere Peaks erkennbar. Sie werden nach 18 und 21 min detektiert. Es handelt sich um Galacturonsäure und Glucuronsäure (s. Abb. 43; 0,1M/4M/P2).

Die Kalibrierung wurde mit Referenz-Uronsäuren durchgeführt, die das gleiche Derivatisierungsprozedere wie die Proben durchlaufen hatten. Man erhielt die Kalibrierungskurve ($y = mx + b$) und den Korrelationskoeffizienten (r^2) aus den Referenzproben. Weiterhin wurde die relative Standardabweichung der Flächen ($\sigma\%$) und die Standardabweichung der Retentionszeiten (σ) nach 6 Läufen ermittelt. Die Ergebnisse der einzelnen Zuckersäuren sind in Tab. 14 zusammengefaßt.

Tab. 14: Gleichungen der Kalibrierkurven, Korrelationskoeffizienten, relative Standardabweichung der Flächen ($\sigma\%$) und Standardabweichung der Retentionszeiten (σ) für die verschiedenen Uronsäuren (HPLC-Methode)

Uronsäuren	$y = mx + b$		r^2	Fläche / $\sigma\%$ (n=6)	min / σ (n=6)
	m	b			
Galacturonsäure	2,09	9,55	0,9917	3,0	0,06
Glucuronsäure	1,73	8,33	0,9951	3,5	0,04

In Tab. 15 werden die molaren Verhältnisse von den Zuckersäuren der Substanzen mit dem des Retentats gegenübergestellt. Die Glucuronsäure wurde auch beim Retentat auf 1 gesetzt, um einen Vergleich mit den isolierten Substanzen zu erhalten.

Das Ergebnis der molaren Verhältnisse der Uronsäuren erbrachte bei den Substanzen eine vergleichbare Konstellation. Bei den gereinigten Substanzen stellt Glucuronsäure den Hauptbestandteil der Uronsäuren dar. Das molare Verhältnis der Galacturonsäure (Galur) zu Glucuronsäure (Gluur) beträgt bei den isolierten Substanzen $Gluur : Galur = 1 : 0,5$.

In der Ursubstanz ist im Vergleich zu den immunologisch aktiven Substanzen, Galacturonsäure die dominierende Zuckersäure (s. Tab. 15).

Tab. 15: Molares Verhältnis der Uronsäuren bei den isolierten Substanzen und der Ursubstanz Retentat /Ret

Probenbezeichnung	Galacturonsäure (molares Verhältnis)	Glucuronsäure (molares Verhältnis)
Ret	1,3	1
0,1M/4M/P2	0,5	1
0,4M/P1/P2	0,5	1
1,2M/4M/P2	0,4	1
4M/1,5M/P2	0,4	1
2M/1,5M/P2	0,6	1
AS/P1/P1	0,5	1

Galactosamin und Glucosamin wurden in dieser Arbeit weder mit der HPLC- noch mit einer modifizierten GC-Methode nach Kraus gefunden. Im Vergleich hierzu wurden diese Aminozucker bei den Untersuchungen von Beuscher et al. in einer G50-Fraktion ermittelt (Gehaltsangaben an Aminozuckern gemäß Beuscher et al.: ~ 0,2 mol-%).

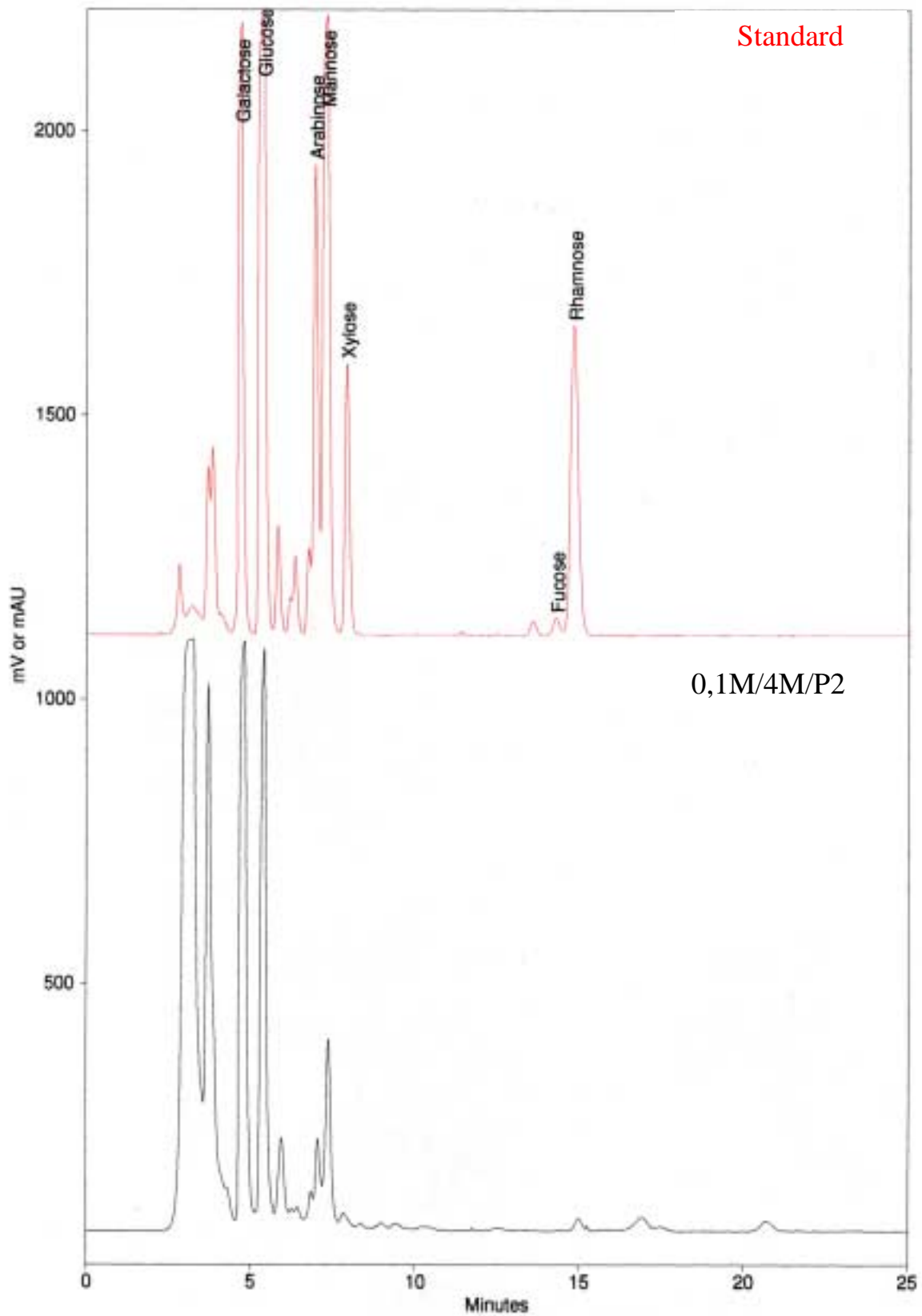


Abb. 31: HPLC-Chromatogramm einer Standard-Lösung von Zuckern und der derivatisierten Monosaccharide der biologisch aktiven Substanz 0,1M/4M/P2 (0,1M/4M/P2 wurde vor der Derivatisierung hydrolysiert)

4.11 HPLC-Bestimmung von Aminosäuren mit der OPA-Methode

Eine Derivatisierung ist bei der quantitativen Bestimmung von Aminosäuren mit UV / VIS und fluorimetrischen Detektoren nötig, da die meisten Aminosäuren, aber auch Proteine und Zucker (und auch Fette) keine UV-absorbierenden Chromophore besitzen (Ausnahmen: u. a. Tryptophan, Phenylalanin). Sie sind im nativen Zustand meist nur mit geringer Empfindlichkeit zu detektieren. Durch Reagenzien, die mit diesen UV-inaktiven Substanzen eine Verbindung eingehen, kann man die Detektionsempfindlichkeit steigern bzw. überhaupt erst eine quantitative Bestimmung ermöglichen.⁷²

Diese Markermoleküle enthalten meistens aromatische oder heteroaromatische Ringsysteme, die bei der Umsetzung mit der zu analysierten Substanz nicht nur deren optische, sondern auch ihre chemische Eigenschaften (z.B. Polarität) ändern. Durch die Derivatisierung der Aminosäuren mit OPA werden die polaren nativen Aminosäuren in hydrophobe Derivate umgewandelt. Somit ist eine Trennung auf einer RP18-Säule möglich.⁷³

Die Kalibrierung fand mit Referenz-Aminosäuren statt, die das gleiche Derivatisierungsprozedere wie die Proben durchlaufen hatten. Man erhielt die Kalibrierungskurve ($y = mx + b$) und den Korrelationskoeffizienten (r^2) aus den Referenzproben. Weiterhin wurde die relative Standardabweichung der Flächen ($\sigma\%$) und die Standardabweichung der Retentionszeiten (σ) nach 6 Läufen ermittelt. Die Ergebnisse der einzelnen Zucker sind in Tab. 15 zusammengefaßt.

Tab. 16: Gleichungen der Kalibrierkurven, Korrelationskoeffizienten, relative Standardabweichung der Flächen ($\sigma\%$) und Standardabweichung der Retentionszeiten (σ) für die verschiedenen Aminosäuren

Aminosäuren	y= mx + b		r ²	Fläche / $\sigma\%$ (n=6)	min / σ (n=6)
	m	b			
Asparaginsäure	5E+08	32455	0,9996	3,7	0,17
Glutaminsäure	3E+08	4396	0,9988	3,8	0,26
Serin	7E+08	1E+06	0,9995	3,7	0,17
Glycin	9E+08	724489	0,9996	2,8	0,19
Threonin	7E+08	85801	0,9993	3,8	0,15
Arginin	7E+08	21572	0,9995	2,5	0,26
Alanin	8E+08	328008	0,9945	3,5	0,32
Tyrosin	5E+08	112645	0,9998	2,1	0,26
2-Aminobuttersäure	5E+08	100377	0,9967	2,4	0,20
Methionin	4E+08	153212	0,9997	2,7	0,21
Valin	7E+08	64050	0,9995	2,6	0,22
Isoleucin	6E+08	165675	0,9985	3,1	0,13
Leucin	5E+08	150503	0,9992	2,8	0,13
Lysin	5E+07	6991	0,9983	4,1	0,11

Die Ergebnisse der Standardabweichung der Flächen ($\sigma\%$) und der Standardabweichung der Retentionszeiten (σ) aus der Tab. 16 entsprechen den Werten, die die Firma Merck in ihrer Applikation zu der Trennung von OPA-Aminosäuren angibt.⁷⁴

$\sigma\%$ der Flächen nach Merck: 2-4 %

σ der Retentionszeiten nach Merck: 0,01-0,2 min

Die folgenden Abbildungen werden entsprechend den Darstellungen in dem Abschnitt 4.10.2 „Gas-Chromatographische Untersuchung der Monosaccharide“ präsentiert. In diesem Abschnitt wurden Substanzen mit Ähnlichkeiten in ihrer Zucker-Zusammensetzung in einer Abbildung dargestellt. Diese Art der Darstellung wird gewählt, um weitere Analogien der Substanzen in bezug auf Aminosäure-Zusammensetzung zu erkennen.

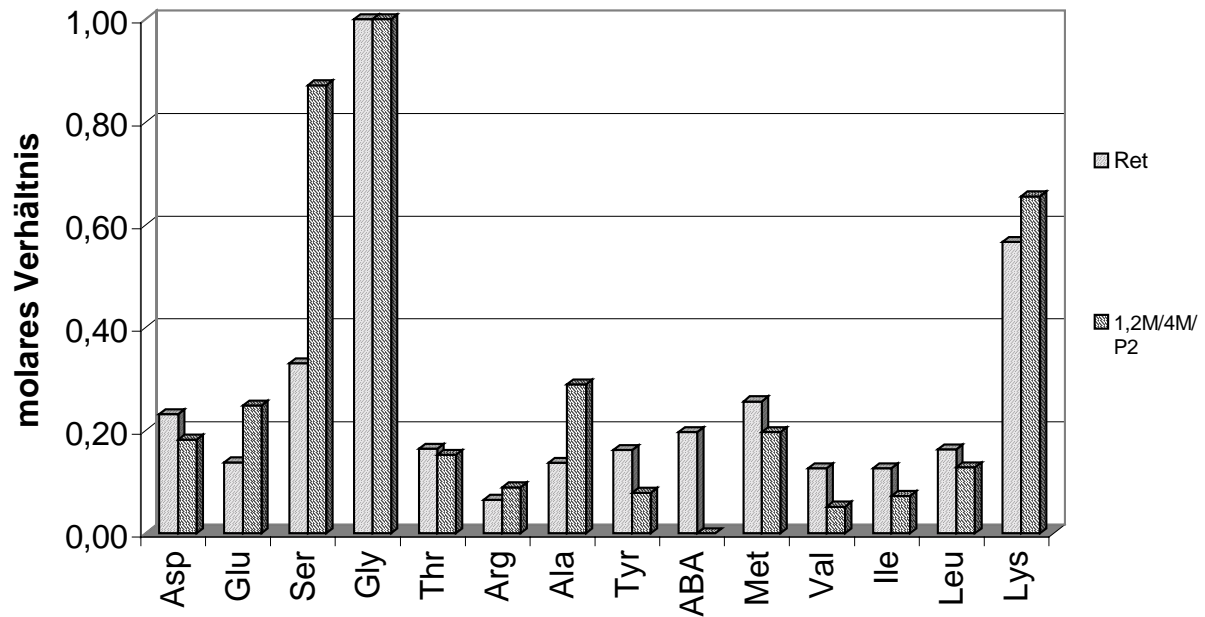


Abb. 32: Vergleich der molaren Verhältnisse der Aminosäuren von Retentat und Substanz 1,2M/4M/P2

Wie aus Abb. 44 zu entnehmen ist, unterscheidet sich das molare Verhältnis der Aminosäuren zueinander im Retentat und der biologisch aktiven Substanz 1,2M/4M/P2 signifikant. Die Aminosäuren Glycin und Lysin dominieren in den untersuchten Proben. Die 2-Aminobuttersäure (ABA) wurde beim Retentat -ebenso wie in den Substanzen 0,1M/4M/P2 und 0,4M/P1/P2- festgestellt. Die anderen Proben enthalten diese Aminosäure nicht.

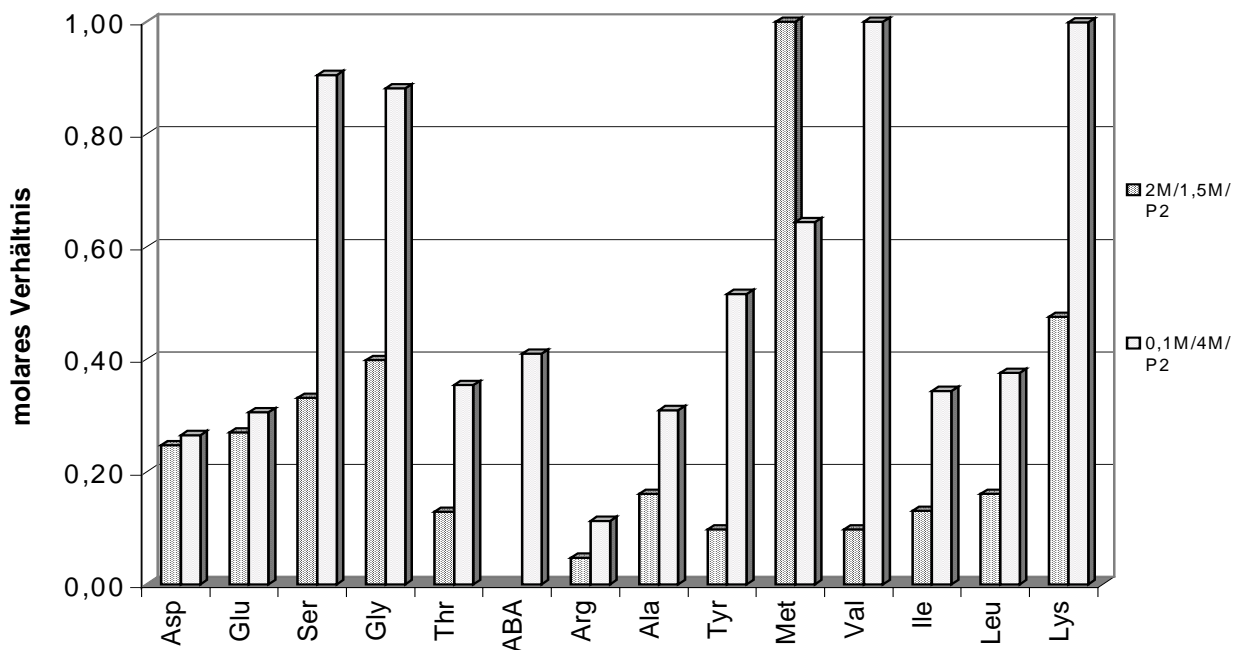


Abb. 33: Vergleich der molaren Verhältnisse der Aminosäuren in den Substanzen 0,1M/4M/P2 und 2M/1,5M/P2

In Abb. 45 werden die molaren Verhältnisse der Aminosäuren von Probe 0,1M/4M/P2 und 2M/1,5M/P2 gegenübergestellt. Der Vergleich zeigt einen deutlichen Unterschied in der Aminosäure-Zusammensetzung. Bei der Untersuchung der Monosaccharide wurde eine Übereinstimmung der Zucker-Zusammensetzung festgestellt. Beide Substanzen zeigten beim Dot- und Western-Blot eine Interaktion mit Antikörpern. Man kommt durch den Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzung zum Ergebnis, daß es sich nicht um die gleiche Substanz handelt. Auch die Größenunterschiede, die mit Hilfe der HP-GPC ermittelt wurden, beweisen, daß es sich um zwei verschiedene Substanzen handelt.

Die beiden Substanzen gleichen sich nur in der Zucker-Zusammensetzung und der Wechselwirkung mit Antikörpern. Als möglicher Grund für die Interaktion ist der Zucker-Anteil der Substanzen zu sehen.

In Abb. 46 werden die Chromatogramme der flüssig-chromatographisch voneinander getrennten derivatisierten Aminosäuren der Substanzen 0,1M/4M/P2 und 2M/4M/P2 dargestellt.

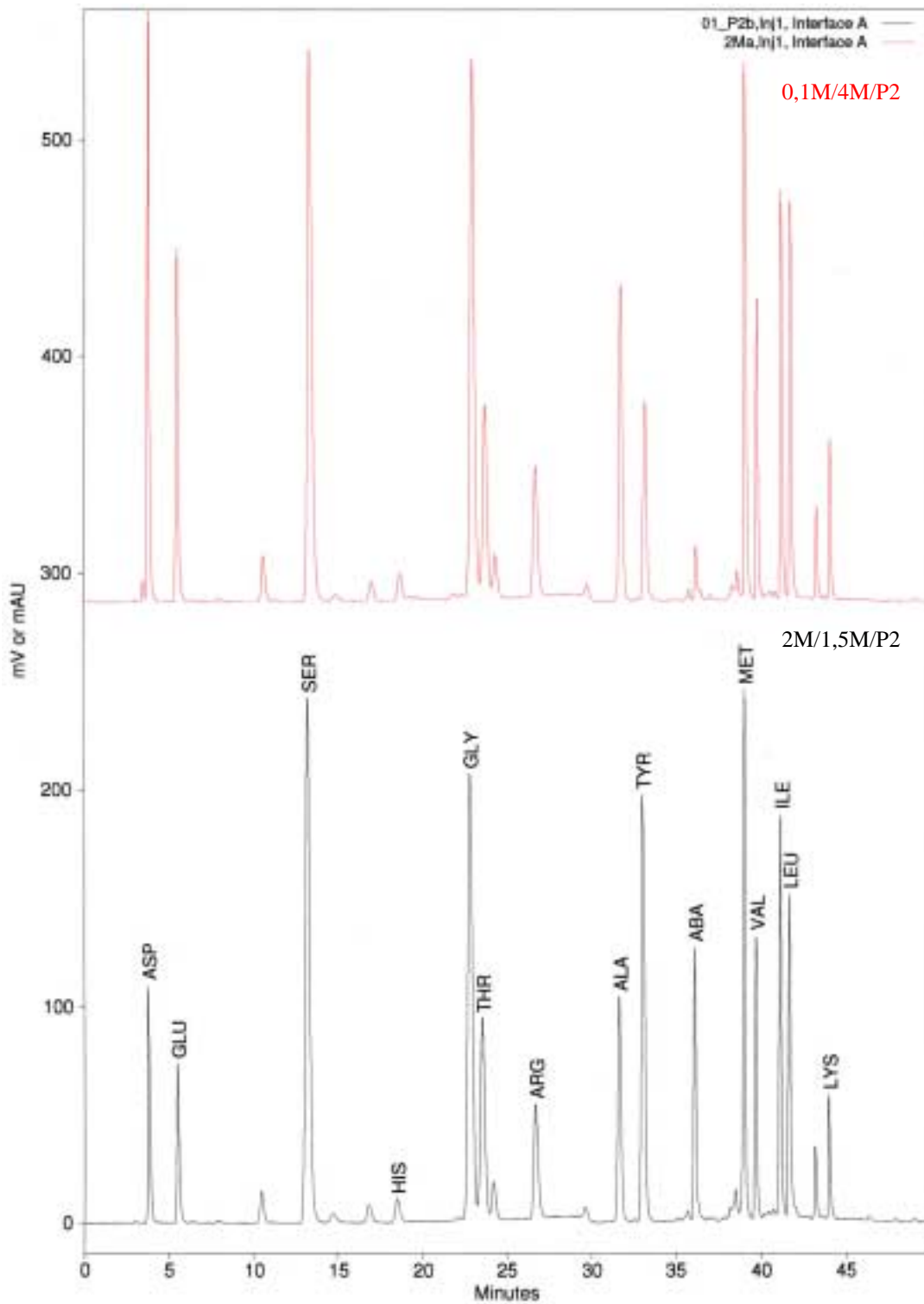


Abb. 34: HPLC-Chromatogramm getrennter OPA-Aminosäuren der biologisch aktiven Substanzen 0,1M/4M/P2 und 2M/1,5M/P2

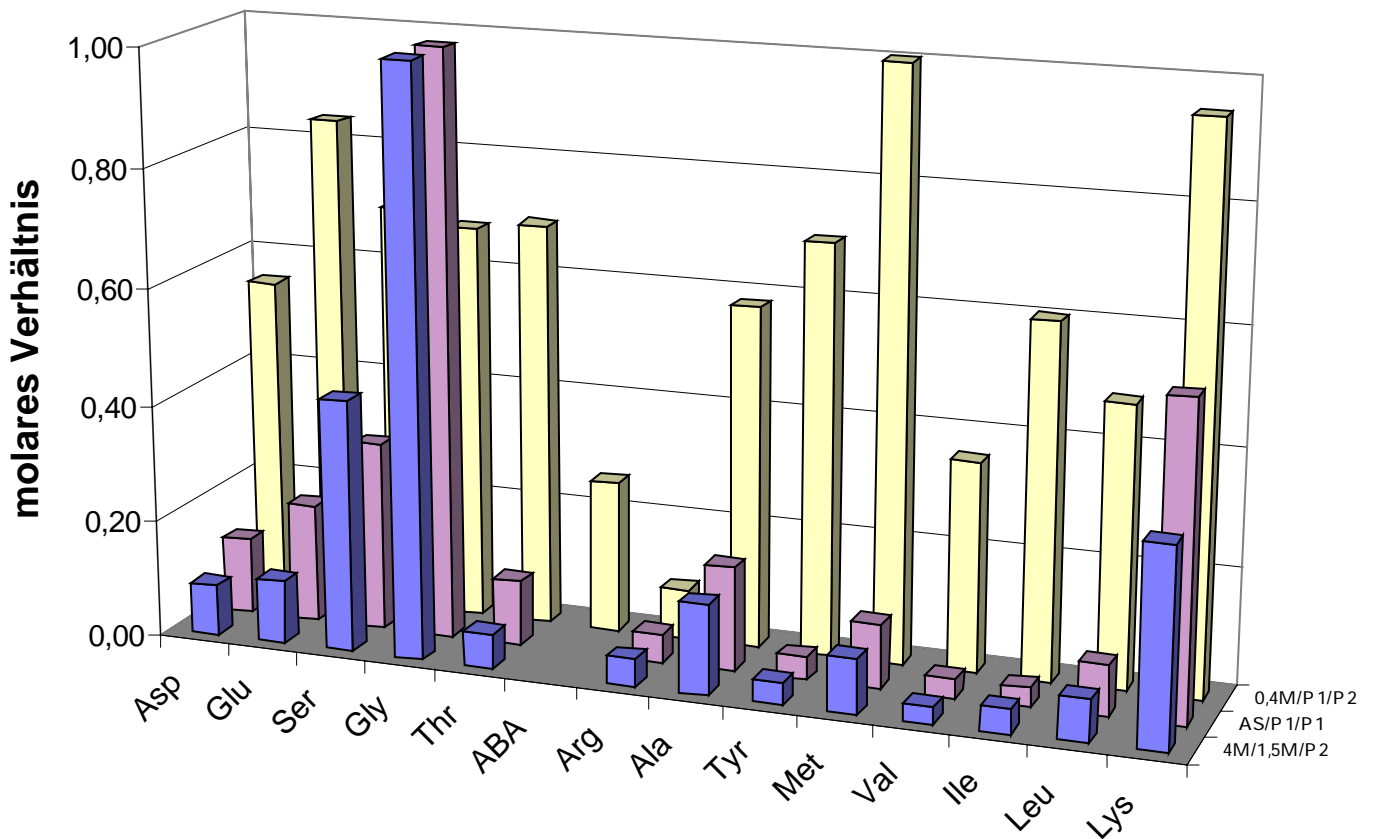


Abb. 35: Vergleich der molaren Verhältnisse der Aminosäuren bei den biologisch aktiven Substanzen 4M/1,5M/P2, AS/P1/P1 und 0,4M/P1/P2

Die in Abb. 47 gezeigten Werte der Substanzen wurden bei den Monosaccharid-Untersuchungen miteinander verglichen. Bei den in Abb. 47 gezeigten molaren Verhältnissen der Aminosäuren ist festzustellen, daß es eine Konformität bei den Substanzen 4M/1,5M/P2 und AS/P1/P1 gibt. Diese Übereinstimmung wurde auch bei der Monosaccharid-Zusammensetzung festgestellt. Die HP-GPC erbrachte zwischen diesen beiden Substanzen einen gravierenden Größenunterschied. Trotz der Übereinstimmungen der Zucker -wie auch der Aminosäure-Zusammensetzung- scheinen unterschiedliche Substanzen isoliert worden zu sein. Die Größe von ~450 kDa bei der Substanz AS/P1/P1 im Vergleich zur Substanz 4M/1,5M/P2 (~87 kDa) scheint durch mehrere chromatographische Schritte bei Substanz 4M/1,5M/P2 im Vergleich zu AS/P1/P1 zu resultieren. Dadurch könnten hochmolekulare Begleitstoffe aus der Probe 4M/1,5M/P2 entfernt worden sein, die sich noch in AS/P1/P1 befinden.

4.12 HPLC-Bestimmung von Aminosäuren ohne Derivatisierung

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC wurde untersucht. Mit der von Chaves das Neves entwickelten Methode sollten underivatisierte Aminosäuren mit Hilfe eines LSD identifiziert werden. Die eingesetzten Substanzen, die vorher einer chemischen Hydrolyse (TFA / 121 °C / 1h) unterworfen wurden, gaben mit der beschriebenen Methode keine auswertbaren Chromatogramme. Auch durch Variation des Laufmittels gab es keine zufriedenstellenden Resultate. Die Methode wurde für die Untersuchung der gewonnenen Substanzen auf Aminosäuren nicht weiter berücksichtigt.⁷⁵

In der Abb. 48 ist eine Zusammenstellung der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zur Charakterisierung gegeben (vgl. Abb. 15).

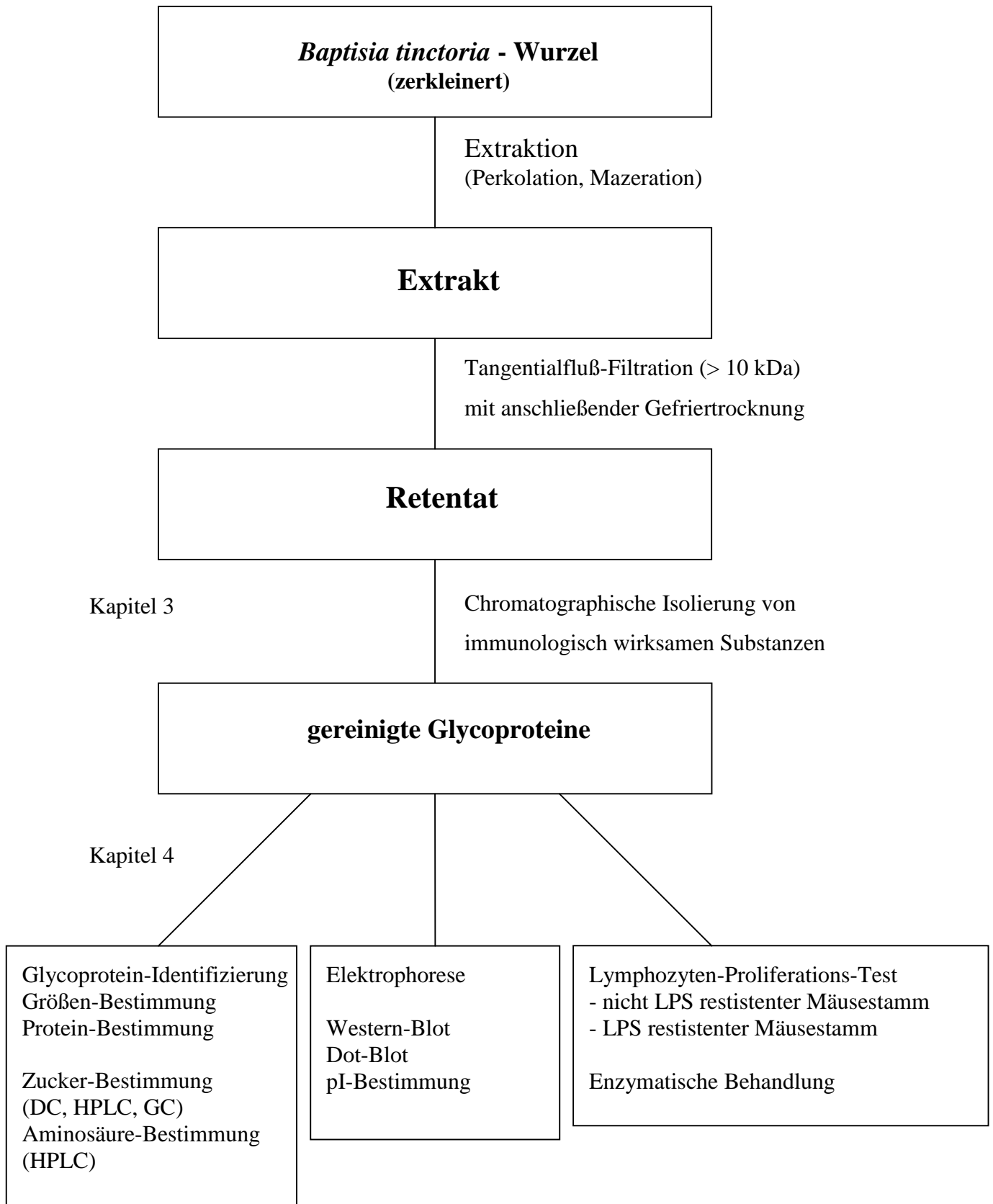


Abb. 36: Fließschema über die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Arbeitsschritte

5 Zusammenfassung

Aus einem ethanolischen Extrakt zerkleinerter Wurzeln der Arzneipflanze *Baptisia tinctoria* wurde durch Tangentialfluß-Filtration (> 10 kDa) das Ausgangsmaterial Retentat für die vorliegende Arbeit gewonnen. Durch verschiedene chromatographische Trennungen wurden sechs immunstimulierende Substanzen gewonnen. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Glycoproteine.

Die biologische Aktivität der gewonnenen Substanzen wurde durch Lymphozyten-Proliferations-Test (LPT) bestimmt. Die Auswahlkriterien für die Fraktionierung sind die Ergebnisse dieses biologischen Tests. Ein weiterer LPT wurde mit einem Mäusestamm durchgeführt, der unempfindlich gegen Lipopolysaccharide ist. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt keine bakterielle Kontamination durch Lipopolysaccharide bei den isolierten Substanzen.

Die Zuckerszusammensetzung der mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Trennmethode (GC-FID und HPLC-LSD) isolierten Substanzen ist identisch.

Alle isolierten Substanzen sind saure Arabino-Galactan-Proteine (*AGP*), die einen pI zwischen 4 und 5 besitzen. Dieser saure Charakter ist auf die Uronsäuren zuzuführen, die in allen Substanzen in gleichen Verhältnissen (Gluur / Galur = 1 / 0,5) bestimmt wurden.

Durch enzymatischen Abbau des Proteinanteils mit anschließendem LPT konnte bei allen Substanzen nachgewiesen werden, daß der Proteinanteil einen untergeordneten bzw. gar keinen Einfluß auf die biologische Aktivität ausübt.

Die apparenten Molekulargewichte der isolierten Substanzen liegen zwischen ca. 23-450 kDa.

Gewinnung der einzelnen Substanzen:

Erste immunologisch wirksame Substanz

Eine immunologisch aktive Substanz wurde mit Hilfe eines schwachen Anionenaustauschers und einer anschließenden Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie isoliert. Mit der abschließenden Größenausschluß-Chromatographie wurde eine Substanz erhalten, die in der vorliegenden Arbeit als 0,1M/4M/P2 bezeichnet wird. Mit Hilfe dieser Größenausschluß-Chromatographie konnte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 46 kDa bestimmt werden.

Der Polysaccharid-Anteil besteht aus Galactose, Arabinose, Glucose; Mannose, Xylose, Fucose und Rhamnose im Verhältnis von 1: 0,3: 0,3: 0,1: 0,07: 0,05: 0,05. Der Protein-Anteil dieser isolierten Substanz beträgt etwa 0,1 mg/mg. Nach hydrolytischer Spaltung des Proteinanteils wurde überwiegend Valin, Lysin, aber auch Serin und Glycin gefunden.

Weiterhin wurde die Aminosäure 2-Aminobuttersäure in den Hydrolysaten der Ursubstanz Retentat und in der Substanz 0,4M/P1/P2 festgestellt.

Die Substanz 0,1M/4M/P2 geht eine Interaktion mit Antikörpern, die gegen eine Sephadex G50-Fraktion von *Baptisia tinctoria* gerichtet sind, ein. Die Bestimmungsgrenze bei konstantgehaltener Antikörperkonzentration (10 µg/mL) wurde bei 25 µg Auftragemenge ermittelt. Diese Wechselwirkung zwischen Antikörper und dem Antigen 0,1M/4M/P2 findet mit einer Untereinheit statt. Mit Hilfe eines Western-Blots und anschließender Färbung wurde für diese Untereinheit ein Gewicht von ca. 21,5 kDa ermittelt. Dieser Bereich wurde mit der Elektrophorese und anschließenden unterschiedlichen Färbemethoden als eine glycosidierte Untereinheit der Substanz 0,1M/4M/P2 identifiziert.

Zweite und dritte immunologisch wirksame Substanz

Mit Hilfe einer HIC, anschließender IC und abschließender GPC wurden die Substanzen 4M/1,5M/P2 und 2M/1,5M/P2 isoliert. Mit GPC wurde ein apparentes Molekulargewicht von 87 kDa für Substanz 4M/1,5M/P2 und für 2M/1,5M/P2 von 26 kDa ermittelt.

Nach chemischer Hydrolyse des Proteinanteils, anschließender Derivatisierung mit OPA und Trennung über eine RP18-Phase, wurden Glycin, Serin und Lysin als die dominierenden Aminosäuren in der Substanz 4M/1,5M/P2 nachgewiesen. Mit der gleichen Untersuchungsmethode konnten in der Substanz 2M/1,5M/P2 Methionin und Lysin als dominierende Aminosäuren festgestellt werden (Abb. 24).

Die Substanz 2M/1,5M/P2 zeigte -ebenso wie die Substanz 0,1M/4M/P2- Wechselwirkung mit Antikörpern.

Vierte immunologisch wirksame Substanz

Die Substanz AS/P1/P1 wurde durch Ammoniumsulfat-Fällung gewonnen. Der Überstand dieser Fällung zeigte deutliche lymphozytenproliferationsfördernde Wirkung. Eine chromatographische Behandlung erbrachte keine weitere Steigerung der biologischen Aktivität. Es wurde mit der Größenausschluß-Chromatographie eine reine Substanz gewonnen, deren apparentes Molekulargewicht ca. 450 kDa beträgt. Damit besitzt diese Substanz das größte Molekulargewicht der in der vorliegenden Arbeit isolierten Substanzen. Sie enthält im Vergleich zu den anderen Substanzen den geringsten Protein-Anteil. Dieser besteht überwiegend aus Glycin und Lysin (Abb. 47).

Fünfte und sechste wirksame Substanz

Mit einem starken Ionenaustauscher wurden zwei immunologisch aktive Fraktionen isoliert. Die eine Fraktion 0,4M wurde mit geringerer (0,1-0,4 mol/L) und die andere mit höherer Salzkonzentration (0,5-1,2 mol/L) eluiert. Die Fraktion 1,2M, die mit höherer Salzkonzentration gewonnen wurde, besitzt eine deutlich höhere biologische Aktivität als die mit niedriger Salzkonzentration gewonnene.

Mit Fraktion 1,2M wurde eine Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie mit anschließender Größenausschluß-Chromatographie durchgeführt. Das hierdurch ermittelte apparente Molekulargewicht der Substanz 1,2M/4M/P2 betrug 67 kDa, für das der Substanz 0,4M/P1/P2 120 kDa.

Die Substanz 1,2M/4M/P2 ist weder in der Zucker- noch in der Aminosäure-Zusammensetzung mit einer anderen isolierten Substanz vergleichbar. Sie setzt sich aus Galactose, Glucose, Arabinose (molares Verhältnis 1: 0,5: 0,1), Spuren anderer Monosaccharide und Protein zusammen. Damit handelt es sich bei dieser Substanz um ein Arabino-Gluco-Galactan mit Proteinanteil. Im Gegensatz zu 1,2M/4M/P2 ist 0,4M/P1/P2 ein Arabino-Galactan-Protein (molares Verhältnis von Galactose zu Arabinose 1: 0,7).

Durch Untersuchung der hydrolysierten Substanzen wurden folgende dominierenden Aminosäuren festgestellt:

- 1,2M/4M/P2: Glycin, Serin und Lysin (Abb. 44)
- 0,4M/P1/P2: Methionin und Lysin (Abb. 47)

Im Retentat, ebenso wie in den 6 isolierten biologisch aktiven Substanzen, wurden -weder mit der HPLC- noch mit einer für diese Aufgabenstellung modifizierten GC-Methode- die Aminosäuren Glucosamin und Galactosamin gefunden.

6 Diskussion

Die sechs isolierten immunologisch aktiven Substanzen aus *Baptisia tinctoria* enthalten Polysaccharide und Proteine, die in unterschiedlichen Mengenverhältnissen zueinander stehen. Um herauszufinden, welcher Bestandteil der Substanz, Protein oder Zucker, für die biologische Aktivität verantwortlich ist, wurde der Proteinteil enzymatisch abgebaut. Der Verlauf des enzymatischen Abbauprozesses wurde durch parallel durchgeführte elektrophoretische Untersuchungen dokumentiert. Die dabei entstandene proteinfreie Substanz führt im LPT zu keiner signifikanten Änderung der Aktivität im Vergleich zu den enzymatisch unbehandelten Substanzen. Daraus ist zu folgern, daß der Proteinanteil einen untergeordneten bzw. keinen, der Polysaccharid-Anteil dagegen einen wesentlichen Einfluß auf die biologische Aktivität der isolierten Substanzen besitzt. Bei dieser Aussage muß berücksichtigt werden, daß sie sich nur auf einen biologischen Test, nämlich dem Lymphozyten-Proliferations-Test, stützt.

Dieses Ergebnis ist mit Hilfe von weiteren biologischen Tests zu bestätigen.

Trotz dieses wichtigen Einwandes werden in den folgenden Diskussionspunkten die Polysaccharide als die wesentliche Komponente betrachtet, die an der immunologischen Wirkung beteiligt zu sein scheinen.

Weitere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die die Bedeutung der Polysaccharide in *Baptisia tinctoria* unterstreichen, werden im folgenden genannt und diskutiert.

1. Ergebnis

Im Dot-Blot und Western-Blot zeigen die Substanzen 0,1M/4M/P2 und 2M/1,5M/P2 als einzige Antigene eine Interaktion mit allen Antikörpern, die gegen die (von Beuscher gewonnen) Sephadex G-50-Fraktion gerichtet sind. Bei dieser Sephadex G-50-Fraktion handelt es sich um ein Substanzgemisch mit höherem Proteinanteil als bei den in der vorliegenden Arbeit isolierten Reinsubstanzen. Diese Antikörper können eine Affinität zu einem Protein- und / oder zu einem Zucker-Anteil des Antigens 0,1M/4M/P2 und 2M/1,5M/P2 besitzen. Die Antigene der beiden isolierten Substanzen unterscheiden sich signifikant in ihrem Proteingehalt (s. Abb. 28, 29, 30). Im Gegensatz dazu weisen sie eine Übereinstimmung in ihrer Zucker-Zusammensetzung (s. Abb. 40) auf.

Daraus ist zu schließen, daß -unabhängig vom Proteinanteil- die Wechselwirkung mit dem Zuckerrest der isolierten Substanzen zusammenhängt.

2. Ergebnis:

Die Hydrophobe Interaktions-Chromatographie hält Substanzen zurück, die eine Wechselwirkung aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaft mit dem Trennmateriale eingehen. Mit Hilfe unterschiedlich hydrophober Trennmateriale (Octyl, Phenyl) wurden biologisch aktive Substanzen isoliert, die nicht von der hydrophoben Phase zurückgehalten wurden. Diese Substanzen gehen keine Wechselwirkung mit dem Trägermaterial ein. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die Substanzen größere Zuckeranteile tragen, welche ihnen hydrophile Eigenschaft verleihen.

3. Ergebnis

Mit Hilfe einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung konnte eine, im Überstand einer Fraktion „30“ befindliche, Substanz (AS) gewonnen werden, die im LPT eine hohe Aktivität zeigte. Fraktion „30“ wurde für weitere Trennungen eingesetzt, da in dieser Fraktion ein deutlich höherer Proteinanteil ermittelt wurde, als für andere AS-Fraktionen, die im LPT einen vergleichbar hohen Stimulationsindex erreichten. Da die Aufgabe der vorliegenden Arbeit lautete, ein Glycoprotein aus *Baptisia tinctoria* zu isolieren, wurde die Fraktion mit

dem größten Proteinanteil der biologisch aktiven Fraktionen verwendet, nämlich Fraktion „30“.

Mit dem Kenntnisstand, daß die Polysaccharide für die biologische Aktivität verantwortlich sind, hätte man auch diejenigen AS-Fraktionen verwenden können, die eine vergleichbar hohe biologische Aktivität im LPT aufzeigen wie die Fraktion „30“ (Abb. 12). Bei den vergleichbar hohen Stimulationsindizes (SI) und der Abnahme des Proteinanteils in den -durch steigende Ammoniumsulfat-Konzentration gewonnenen- Fraktionen, ist die Verhältniszahl (SI/Protein) für die Fraktion mit dem geringsten Proteinanteil am größten. Somit ist der Polysaccharid-Anteil die entscheidende Komponente der isolierten Glycoprotein-Fraktionen.

Gegenüberstellung von Ergebnissen der Charakterisierung von immunologisch aktiven Substanzen aus unterschiedlichen Pflanzen und denen aus *Baptisia tinctoria*

In der vorliegenden Arbeit wurden *Polysaccharide* aus *Baptisia tinctoria* als die für die biologische Aktivität maßgeblich verantwortlichen Komponenten identifiziert. In anderen Arbeiten wurde dies u. a. auch für *Echinacea purpurea* festgestellt.

- Proksch hat aus *Echinacea purpurea* ein saures, immunologisch aktives Polysaccharid isoliert (MG 450 kDa). Es handelt sich um ein saures Arabino-Rhamno-Galactan⁷⁶
- Blaschek beschreibt ein saures, stark verzweigtes Arabino-Galactan (MG 70 kDa). Diese Substanz wurde im Preßsaft von *Echinacea purpurea* nachgewiesen und läßt sich auch im Fertigmedikament messen⁷⁷
- Wagner et al. isolierten aus *Echinacea purpurea*-Zellkulturen ein saures Arabino-Galactan (MG 75 kDa)
- aus den oberirdischen Teilen der südamerikanischen Asteraceae *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC wurden drei Polysaccharide isoliert. Ein Polysaccharid-Glycanogalacturonan (MG 15 kDa)- zeigt eine sehr hohe lymphozytenproliferations-fördernde Wirkung⁷⁹
- aus *Arnica montana* L. Zellkulturen wurde u. a. ein saures immunologisch aktives Polysaccharid isoliert. Es wurde als Arabino-Galactan-Protein mit einem mittleren MG von 100 kDa identifiziert. Sein Proteinanteil lag bei 6,3 %. Dieser enthielt größere Mengen an Alanin und Serin⁷⁸

- isolierte Polysaccharide aus *Dipsacus asperoides* wurden durch Extraktion mit heißem Wasser und anschließender Ethanol-Fällung gewonnen. Durch anschließende Anionen-Austauscher- und Größenausschluß-Chromatographie wurde eine biologisch aktive Substanz (Zusammensetzung: Polysaccharid >90 % und Protein 5-9 %) isoliert. Sowohl durch anschließende enzymatische Behandlung mit Pronase als auch durch Periodat-Oxidation wurde nachgewiesen, daß der Zuckeranteil in den isolierten Substanzen für die mitogene Aktivität verantwortlich ist. Die ermittelten Aktivitäten im LPT sind nicht auf bakterielle Kontamination von Lipopolysacchariden zurückzuführen. Dies ergab ein Test mit C3H/HeJ-Mäusestamm (LPS low-responser), der zu ähnlichen biologischen Aktivitäten wie mit NMRI-Mäusestamm (LPS responser) führte. Es wurde unter anderem ein saures Arabino-Galacto-Glucan (91 kDa) isoliert. Der Proteinanteil ist vernachlässigbar klein.⁵⁷

Diese Ergebnisse, von isolierten biologisch aktiven Polysacchariden aus **unterschiedlichen Pflanzenarten** und **Pflanzenteilen**, decken sich mit den in der vorliegenden Arbeit mit *Baptisia tinctoria*-Polysacchariden ermittelten.

Trotz der unterschiedlichen Pflanzen-Arten (z. B. *Echinacea purpurea* und *Baptisia tinctoria*) und -Teilen (bei *Echinacea purpurea* werden oberirdische Teile und bei *Baptisia tinctoria* die Wurzeln verwendet) und **verschiedensten Aufarbeitungs- und Isolierungs-Schritten** handelt es sich bei den o. g. isolierten biologisch aktiven Polysacchariden vorwiegend um saure Arabino-Galactane. Dies wird auch aus den stimulatorisch aktiven Polysacchariden, die in Tab. 17 zusammengestellt wurden, deutlich.

Somit sind die in der vorliegenden Arbeit isolierten *Baptisia tinctoria*-Polysaccharide -bezüglich der biologischen Aktivität- auch mit anderen aus Arzneipflanzen isolierten Polysacchariden vergleichbar. Die aus Pflanzen isolierten aktiven Polysaccharide zeigen keine Präferenz für bestimmte Pflanzenfamilien.

Für die immunologische Aktivität sind unterschiedliche Polysaccharid-Typen aus verschiedenen Pflanzen verantwortlich, wie in Tab. 17 zusammengestellt.

Tab. 17: Arzneipflanzen mit immunologisch aktiven Polysacchariden

Pflanze	Polysaccharid-Typ
<i>Achyrocline satureioides</i>	Glycanogalacturonane
<i>Althaea officinalis</i>	Rhamnoglycuronan / Glycan
<i>Angelica acutiloba</i>	Arabino-Galactan
<i>Arnica montana</i>	Arabino-Galactan
<i>Bupleurum falcatum</i>	Glucane
<i>Calendula officinalis</i>	Rhamno-Arabino-Galactan, Arabino-Galactan
<i>Chamomilla recutita</i>	Glucuronoxylan
<i>Dipsacus asperoides</i>	Arabino-Galacto-Glucan
<i>Echinacea purpurea</i>	Arabino-Galactan
<i>Eleutherococcus senticosus</i>	Heteroxylan
<i>Eupatorium cannabinum</i>	Glucuronoxylan
<i>Eupatorium perfoliatum</i>	Glucuronoxylan
<i>Melia azadirachta</i>	Arabinoglycane
<i>Nerium Oleander</i>	Glucuronan, saures Arabino-Galactan
<i>Panax Ginseng</i>	saures Arabino-Galactan
<i>Sabal serrulata</i>	saures Arabino-Galactan
<i>Urtica dioica</i>	Glucanogalacturonane, saures Arabino-Galactan
<i>Viscum album</i>	Galacturonan, saures Arabino-Galactan

Weitere unterschiedliche Strukturtypen von Polysacchariden mit immunstimulierendem Potential sind bekannt. Dazu zählen neutrale Xyloglucane, 4-O-Methylglucuronoxylane, Fucogalactoxyloglucane als Polysaccharide mit proliferationsfördernder Wirkung. Deren Molekulargewichte liegen zwischen 20 und 100 kDa.³⁶

Es muß erwähnt werden, daß bei einigen in Tab. 17 aufgelisteten isolierten „Polysacchariden“ ein eindeutiger Beweis einer **Abwesenheit von Proteinanteilen** nicht stattgefunden hat. Einige Autoren vernachlässigen den Nachweis und damit eine eventuelle Wirkung des Proteinanteils. Dieser Anteil kann sowohl keine oder eine untergeordnete (wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt) oder eine positive oder sogar eine synergistische Auswirkung auf die biologische Aktivität haben.

Ursachen für unterschiedliche biologische Aktivitäten

1. Unterschiedliche Probenvorbereitung und Isolierungswege

Die Unterschiede der immunstimulierenden Aktivitäten der einzelnen Substanzen im LPT sind in ihrem unterschiedlichen Isolierungswegen begründet. Substanzen (2M/1,5M/P2, 4M/1,5M/P2, 1,2M/4M/P2, 0,1M/4M/P2), die mehrere chromatographische Trennungen durchlaufen haben, sind biologisch aktiver als diejenigen Proben, die nur eine Fällung mit anschließender Größenausfluß-Chromatographie (AS/P1/P1) durchlaufen haben.

Bei den biologisch aktiveren Substanzen scheinen Komponenten mit Hilfe chromatographischer Trennungen entfernt worden zu sein, die im LPT eine suppressive Eigenschaft auf die biologische Aktivität ausüben.

Eine Möglichkeit biologische Aktivität zu erhalten, die nicht von den isolierten Substanzen aus *Baptisia tinctoria* herrührt, könnte eine bakterielle LPS-Kontamination der isolierten Proben während der Probenvorbereitung oder der Isolierung sein.

Ein LPT mit Lipopolysaccharid-restistenten Mäusen wurde durchgeführt, um eine solche mikrobiologische Lipopolysaccharid (LPS)-Kontamination auszuschließen, die eine Stimulation vortäuschen würde. Da Untersuchungen mit LPS-restistenten und nicht LPS-restistenten Mäusen im LPT vergleichbare Stimulationsindizes lieferten (Abb.), ist davon auszugehen, daß aufgrund sauberer Präparationen keine bakteriell bedingte Kontamination mit LPS eingetreten war.

Daß unterschiedliche Isolierungswege, ausgehend von derselben Pflanzenart, nicht nur zu unterschiedlichen biologischen Aktivitäten führen, sondern auch zu gravierenden Unterschieden der Stoffklasse der isolierten Substanzen soll folgendes Beispiel verdeutlichen.

Trotz der unterschiedlichen Faktoren, die das Wachstum einer Pflanze beeinflussen, sollten die biologisch aktiven Komponenten mehr oder weniger in dieser vorhanden sein. Ab der Probennahme (Ernte) können durch unterschiedliche Probenvorbereitungen und Isolierungswege unterschiedliche, biologisch aktive Komponenten aus **derselben** Pflanzenart (*Baptisia tinctoria*) gewonnen werden.

Zur Isolierung von Glycoproteinen haben Wagner einerseits und Beuscher andererseits bei Einsatz der selben Pflanzenart (*Baptisia tinctoria*) **unterschiedliche Probenvorbereitungen** und Reinigungsschritte angewandt.

Wagner isolierte ein Rhamno-Arabino-Glucan-Protein und Beuscher ein Arabino-Galactan-Protein.

Bei den in der vorliegenden Arbeit isolierten biologisch aktiven Komponenten aus *Baptisia tinctoria* handelt es sich -wie auch von Beuscher beschrieben- um Arabino-Galactan-Proteine.

Es ist auszuschließen, daß bei den o. g. isolierten Komponenten von der selben Charge ausgegangen wurde. Trotzdem führten die Isolierungen von Beuscher und die in der vorliegenden Arbeit zu Komponenten der gleichen Stoffklasse, nämlich zu den Arabino-Galactan-Proteinen. Diese Übereinstimmung kann auf den ersten gleichen Schritt der Probenvorbereitung zum Retentat zurückgeführt werden.

Von der technischen Probenvorbereitung (Extraktion) bis zum Konzentrierungsschritt, der zum Retentat führt, sind die Schritte von Beuscher und die in der vorliegenden Arbeit identisch. Somit können unterschiedliche Probenvorbereitungen und Trennverfahren zu anderen biologisch aktiven Substanzen führen. Der Vergleich der Ergebnisse von Wagner, Beuscher und der vorliegenden Arbeit bestätigen dies.

Daraus folgt, daß die Probenvorbereitung und das analytische Trennverfahren identisch sein müssen, um die gleiche Stoffklasse (Arabino-Galactan-Proteine) zu gewinnen.

Da die Probenvorbereitung bei Beuscher und in der vorliegenden Arbeit identisch ist und beide Arbeiten zu derselben Stoffklasse, nämlich Arabino-Galactan-Proteine, geführt haben, stellt sich die Frage, wie viele aktive Verbindungen es nativ gibt und ob bei der Aufarbeitung Artefakte entstehen.

Die andere Möglichkeit könnte sein, daß die nativen Verbindungen aus einem „Muttermolekül“ hervorgehen.

2. *Strukturelle Ursachen*

Der Zuckeranteil einer von Beuscher gewonnenen Sephadex G50-Fraktion wurde oxidiert (Periodat-Oxidation). Dadurch verlor die Fraktion ihre, durch einen LPT bestimmte, biologische Aktivität.⁷⁹ Damit wurde bewiesen, daß die gemessene Stimulation auf *Baptisia tinctoria*-Polysaccharide zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis wird durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigt.

Kommerziell erhältliches Arabino-Galactan hat im Vergleich zu den aus *Baptisia tinctoria* isolierten Arabino-Galactanen geringe lymphozytenstimulierende Aktivität. Der Aktivitätsunterschied kann durch die verschiedenen Verzweigungsgrade der Polysaccharide erklärt werden. Weitere Ursachen können in einer mangelnden Resorption oder in einer Neutralisierung durch „Komplexierung“ des kommerziell erhältlichen Arabino-Galactan begründet sein.

Die Tatsache, daß ein komplex aufgebautes Polysaccharid im Vergleich zu den wenig verzweigten Pilzglucanen eine größere Zahl von immundeterminanten Zuckerregionen, d.h. Bindungsstellen, besitzt, erklärt das breitere Wirkspektrum.

Eine stimulierende Wirkung auf die Lymphozytenproliferation scheint also von bestimmten strukturellen Voraussetzungen abzuhängen. Ein weiteres Kriterium ist offenbar eine größere Anzahl saurer Gruppen im Molekül. Diese Aussage wird bestätigt durch die in Tab. 17 aufgelisteten Polysaccharide und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Die in dieser Arbeit isolierten Substanzen besitzen alle sauren Charakter (ermittelt mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung). Auch für Polyanionen wie die sulfatierten Polysaccharide Carrageenan, Dextransulfat und Heparin konnte bereits eine mitogene Wirkung nachgewiesen werden. Ebenso spielt der Vernetzungsgrad des Moleküls im Zusammenhang mit immunstimulierenden Reaktionen eine entscheidende Rolle.

3. *Molekulargewicht*

Die Molekulargewichte der bisher untersuchten Polysaccharide schwanken zwischen 20 und 500 kDa. Die Molekulargewichte der auf unterschiedlichen Wegen isolierten **Glycoproteine** aus *Baptisia tinctoria* liegen in einem vergleichbaren Bereich zwischen 26 und 450 kDa. Polysaccharide mit einem Molekulargewicht unter 10 kDa zeigen nur geringe oder keine immunstimulierende Wirkung.

Puhlmann und Gohla⁸¹ beschreiben in ihren Arbeiten einen Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht einer Verbindung und ihrer lymphozytenproliferationsfördernden Aktivität. Gohla untersuchte vier Fraktionen aus *Thuja occidentalis* mit Hilfe des LPT, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Die Substanz mit dem größten Molekulargewicht erbrachte die höchste Aktivität.

Diese Feststellung trifft für die untersuchten *Baptisia tinctoria*-Polysaccharide nicht zu. Auch die von Stuppner⁸⁰ durchgeführten Versuche widersprechen den Aussagen von Puhlmann und Gohla⁸¹. Stuppner trennte gefriergetrockneten *Echinacea purpurea*-Preßsaft in einen höhermolekularen und niedermolekularen Anteil. Durch diesen Trennschritt wurde keine Wirksteigerung erzielt.

Die Molekulargewichte der immunologisch aktiven Substanzen aus *Baptisia tinctoria* liegen zwischen 25 und 90 kDa (ausgenommen die Substanz AS/P1/P1 mit 450 kDa, die aber in der vorliegenden Arbeit die geringste biologische Aktivität zeigte). Damit liegen sie in dem beschriebenen Molekulargewichtsbereich, der den immunologisch aktiven Polysacchariden in Tab. 17 zugerechnet wird. Ein Indiz dafür, daß Moleküle mit geringerem Molekulargewicht eine größere biologische Aktivität besitzen als diejenigen mit höherem, wird am Beispiel der folgenden Substanzen erbracht.

- die isolierten Substanzen 4M/1,5M/P2 und AS/P1/P1 aus *Baptisia tinctoria* besitzen die gleiche Zucker- und Aminosäure-Zusammensetzung, jedoch unterschiedliche Molekulargewichte (450 kDa für AS/P1/P1 und 87 kDa für 4M/1,5M/P2). Die isolierte Substanz 4M/1,5M/P2 zeigt im LPT eine höhere Aktivität als AS/P1/P1
- bei den Substanzen, die Interaktion mit Antikörpern aufweisen, sind Unterschiede im Molekulargewicht festzustellen (0,1M/4M/P2 mit 46 kDa und 2M/1,5M/P2 mit 26 kDa)
Die isolierte Substanz 2M/1,5M/P2 zeigt im LPT eine höhere Aktivität als 0,1M/4M/P2

Aus den genannten Beispielen der aus *Baptisia tinctoria* isolierten Substanzen ist jeweils die Substanz mit geringerem MG im LPT aktiver als jene mit höherem MG.

Zukünftige Isolierungs- und Charakterisierungs-Techniken, die sich aus den diskutierten Ergebnissen ableiten

Die o. g. Ergebnisse verdeutlichen nochmals, daß Polysaccharide für die biologische Aktivität der isolierten Substanzen aus *Baptisia tinctoria* hauptsächlich verantwortlich sind. Somit kann man Trenntechniken verwenden, die **keine** proteinschonende Isolierung als Bedingung haben, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Im folgenden werden einige Trenntechniken zur groben Isolierung von Glycoproteinen aufgelistet.

1. Bleiacetat- oder Ammoniumsulfat-Fällung

Diese Methoden haben den Vorteil, Glycoproteine mit größerem Protein-Anteil von denen mit geringem Anteil zu fällen. Einige saure Pektine und Gluco- und Galactomannane machen eine Ausnahme. Sie fallen erst bei hoher Ammoniumsulfat-Konzentration

2. Ethanol, Propanon (*Aceton*) und andere organische Lösemittel sowie TCA stehen als Fällungsmittel zur Verfügung
3. Hitzebehandlung ist eine Möglichkeit, den Proteinanteil zu denaturieren
4. die in der vorliegenden Arbeit isolierten Glycoproteine besitzen sauren Charakter. Diese können mit kationischen Detergentien -wie CTAB- unlösliche Komplexe bilden. Der Niederschlag kann durch steigende Natriumsulfat-Konzentration schrittweise gelöst werden

Eine weitere Trennung von biologisch aktiven Glycoproteinen könnte mit chromatographischen Trenntechniken erzielt werden. Glycoproteine können auf Grundlage ihrer unterschiedlichen Ladungen und anschließend anhand ihrer Gewichte getrennt werden.

Mit Hilfe des Anionen-Austauschers kann man die neutralen von den sauren Glycoproteinen trennen. Die gebundenen sauren Glycoproteine können mit einem Stufengradienten, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, eluiert werden.

Eine weitere Möglichkeit immunologisch aktive Glycoproteine aus *Baptisia tinctoria* zu isolieren, besteht darin, die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper einzusetzen. Aufgrund der Interaktion der Antikörper (mit zwei aus der vorliegenden Arbeit isolierten immunologisch aktiven Substanzen 0,1M/4M/P2 und 2M/1,5M/P2) können diese für eine Affinitäts-Chromatographie genutzt werden. Die Antikörper werden an ein Trägermaterial gebunden und dienen als stationäre Phase.

Gibt man eine Probe von *Baptisia tinctoria* auf eine solche Chromatographiesäule, die ein Harz mit einem kovalent gebundenen Antikörper enthält, so wird das entsprechende proteinhaltige Polysaccharid **spezifisch** gebunden. Nichtspezifisch reagierende Verbindungen werden nicht zurückgehalten. Die gebundene Substanz ist u. a. durch Salzlösungen eluierbar.

Trotz der verschiedenen Fällungs-, Extraktions und chromatographischen Methoden enthalten viele isolierte Glycoproteine noch einen geringen Anteil an Protein, weil jede pflanzliche Zellwand zusätzliche Glycoproteinschichten als integrierende Bestandteile besitzt.

Die Entfernung der Proteinanteile durch Protease ist erforderlich, um sicherzustellen, daß die gemessene immunologische Aktivität tatsächlich von den Polysacchariden stammt.

Bedingt durch die Tatsache, daß Polysaccharide die biologisch aktiven Komponenten im Wurzelextrakt von *Baptisia tinctoria* sind, können Nachweismethoden auf Polysaccharide als Qualitätsmerkmal eingesetzt werden. Es bieten sich unter anderem folgende einfach durchführbare, kostengünstige und schnelle, photometrische Bestimmungsmethoden an:

- Anthron-Test
- Orcin-Test
- Phenol / H₂SO₄

Diese Methoden liefern einen Summenparameter der in einem Extrakt von *Baptisia tinctoria* enthaltenen Zucker.

Eine Bestimmung mit Hilfe der Methode GC-FID (wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt) gibt eine differenziertere Aussage über die Zuckerzusammensetzung des zu untersuchenden Baptisia-Extraktes. Arabino-Galactane lassen sich mit dieser Methode schnell bestimmen.

7 Literaturverzeichnis

- ¹ Roth L., Daunderer M., Kormann K.: Giftpflanzen / Pflanzengifte; 4. Aufl., ecomed-Verlag; 163-164 (1994)
- ² Madaus G: Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Bd. 1, 1.Aufl., Georg Olms Verlag, Hildesheim (1976)
- ³ Saller R., Reichling J., Hellenbrecht D.: Phytotherapie; Haug-Verlag, 385-387 (1995)
- ⁴ Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Bd. 4; Hänsel R., Keller K., Rimpler H. Springer Verlag; 461-467 (1992)
- ⁵ Moerman, D.E.: American medical ethnobotany; Garland Publ., New York (1977)
- ⁶ Thirty-third ann. Report of the „Bureau of American Ethnology“ to the secretary of the „Smithsonian Institution“: Uses of plants by Indians. Gov. Printing Office, Washington, (1919)
- ⁷ Wagner H, Proksch A., Riess-Maurer I., Vollmar A., Odenthal S., Stuppner H., Juricic K., Le Turdu M., Fang J.N.: Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglykane) aus höheren Pflanzen; *Arzneim. Forsch.* **35**, 1069-1075 (1985)
- ⁸ Beuscher N., Scheit KH., Bodinet C., Kopanski L.: Immunologisch aktive Glykoproteine aus *Baptisia tinctoria*; *Planta Med.* **55**, 358-363 (1989)
- ⁹ Braun H., Frohne D.: Heilpflanzenlexikon; 6.Aufl.; Gustav Fischer Verlag, 95 (1994)
- ¹⁰ Harnischfeger G., Stolze H.: Bewährte Pflanzendrogen in Wissenschaft und Medizin; 1. Aufl., Notamed-Verlag, Bad Homburg (1983)
- ¹¹ Steinegger E., Hänsel R.: Pharmakognosie; 5. Aufl., Springer-Verlag, 648-649 (1992)
- ¹² Teuscher E.: Biogene Arzneimittel; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 78-79 (1997)
- ¹³ Rote Liste: Abschnitt 51; Editio Cantor Verlag (1999)
- ¹⁴ BAnz: *Baptisia tinctoria* / Positiv-Monographie, Nr.190a vom 10. Oktober 1985
- ¹⁵ BHP 39 (1983)
- ¹⁶ Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Bd. III, List P.H., Hörhammer L.: Springer Verlag, 355 ff (1972)
- ¹⁷ Larisey, M. M.: A monograph of genus *Baptisia*, *Ann. Missouri Bot. Gard.* **27**, 119-245 (1940)
- ¹⁸ Millspaugh, C. F: American medicinal plants, Dover Publications, Inc., New York (1974)

-
- ¹⁹ Harnischfeger, G.: Pharmacognostic characterization of *Baptisia tinctoria*, *Angewandte Botanik Berichte* **5**, Hrsg.: Institut für Angewandte Botanik, Universität Hamburg, 15-29 (1997)
- ²⁰ Beuscher N., Kopanski L., Ernwein C.: Modulation of the immune response by polymeric substances from *Baptisia tinctoria* and *Echinacea angustifolia*; *Advances in the Biosciences* **68**, 329-336 (1988)
- ²¹ Beuscher, N.: Immunologisch aktive Inhaltsstoffe des Präparates Exberitox[®] N; *Symbiose* **1**, 13-16 (1991)
- ²² Deifel A., Lehmann H.: Mit Antikörpern auf Spurensuche-Enzymimmunoassays in der chemischen Analytik; *PdN-Ch.* **45**, 7-14 (1996)
- ²³ Heyman M., Bonfils A., Fortier M., Crain-Denoyelle A.M., Smets P., Desjeux J.F.: *Int. J. Pharmaceutics* **37**, 33 (1987)
- ²⁴ Beuscher N., Kopanski L.: Modulation of the immune response by polymeric substances from *Baptisia tinctoria* and *Echinacea angustifolia*; *Pharm.Weekblad Sci. Ed.* **9**, 229 (1987)
- ²⁵ Wagner H., Proksch A., Riess-Maurer I., Vollmar A., Odenthal S., Stuppner H., Juricic K., Le Turdu M., Heur Y.H.: Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglykane) aus höheren Pflanzen, *Arzneim. Forsch.* **34**, 659-661 (1984)
- ²⁶ Beuscher N., Scheit K.H., Bodinet C., Egert D.: Modulation of host resistance by polymeric substances from *Baptisia tinctoria* and *Echinacea purpurea*. In: Masihi K.N., Lange W. (eds.): *Immunotherapeutic prospects of infectious diseases*. Springer Verlag, Berlin 59-63 (1990)
- ²⁷ Stryer L.: *Biochemie*, 3. erw. Aufl., Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH (1988)
- ²⁸ *Römpp Chemie Lexikon*, 9. erw. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, (1995)
- ²⁹ Hauffe D.: Analyse von Glycoproteinen, *GIT* **11**, 1220-1224 (1994)
- ³⁰ Waffenschmidt S., Jaenicke L.: Glykoproteine und Pflanzen-Zellkommunikation; *Chemie in unserer Zeit*, **1**, 29-49 (1991)
- ³¹ Kindl H.: *Biochemie der Pflanzen*, Springer Verlag, 359 (1994)
- ³² Blaschek W., Döll M., Franz G.: *Echinacea-Polysaccharide*, *Zeitschrift für Phytotherapie* **19**, 255-262 (1998)
- ³² Dutton R.W., Eady J.D. , *Immunology* **7**, 40 (1964)

-
- 34 Hofe T., Reinhold G.: Grundlagen der GPC; CLB, **1**, 14-19 (1999)
- 35 Lotz S.: Gelpermationschromatographie – Ein wichtiger Problemlöser in der Polymeranalytik; GIT **8**, 806-808 (1999)
- 36 Franz G.: Polysaccharide; Springer-Verlag, 130 ff (1991)
- 37 Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4; Nature **227**, 680-685 (1970)
- 38 Schwedt G.: Bioanalytik; CLB **11**, 418-421 (1999)
- 39 Heukeshoven, J. ; Dernick, R. : Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem development unit, I. Staining of sodium dodecyl sulfat gels, Electrophoresis, **9**, 28-32 (1988)
- 40 Bradford M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding; Anal. Biochem. **72**, 248-254 (1976)
- 41 Robinson H.W., Hogden C.G.: The biuret reaction in the determination of serum proteins; J. Biol. Chem. **135**, 707-725 (1940)
- 42 Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin Phenol reagent; J. Biol. Chem. **193**, 265-275 (1951)
- 43 Peterson G.L.: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable; Anal. Biochem. **83**, 346-356 (1977)
- 44 Peterson G.L.: Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall; Anal. Biochem. **100**, 201-220 (1979)
- 45 Warburg O., Christian W.; Biochem. Z. **310**, 384-423 (1941)
- 46 Kalckar H.M., Shafran M.: Differential spectrophotometry of purine compounds by mens of specific enzymes; J. Biol. Chem., **167**, 461-475 (1947)
- 47 Smith P.K.: Measurement of protein using bicinchoninic acid; Anal. Biochem., **150**, 76-85 (1985)
- 48 Nakao T., Nakao M., Nagei F.: Microdetermination of proteins not affected by the presence of various buffers, sucrose, ATP and eluates from polysaccharide derivatives; Anal. Biochem. **55**, 358-367 (1973)
- 49 Sambrook J., Fritsch E.F.: Molecular cloning. A laborator manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- 50 Stahl E., Kaltenbach U.: Dünnschicht-Chromatographie; J. Chromatogr., **5**, 351 (1961)

-
- 51 Bailey, R. W., Bourne E.J.: Colour reactions given by sugars and diphenylamine-aniline spray reagents on paper chromatograms; *J. Chromatogr.*, **4**, 206 (1960)
- 52 Reimerdes E.H., Rothkitt K.H.: Die qualitative und quantitative Analyse von Kohlenhydraten in Lebensmitteln; *Fresenius Z. Anal. Chem.* **318**, 220-224 (1984)
- 53 Voelter W., Bauer H., Hoffmann W.U.: Hydrolyse- und Trennmethoden von Kohlenhydraten; *GIT* **4**; 331-334 (1974)
- 54 Gey M.H., Unger K.K.: A strategy for chromatographic and structural analysis of monosaccharide species from glycoproteins; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **356**; 488-494 (1996)
- 55 Bräutigam M., Franz G.: Schleimpolysaccharide aus Spitzwegerichblättern; *Deutsche Apotheker Zeitung* **2**, 58-62 (1985)
- 56 Albersheim, P., Nevins D.J., English P.D., Karr A.: *Carbohydr. Res.* **5**, 340 (1967)
- 57 Zhang Y., Kiyohara H., Matusmoto T., Yamada H.: Fractionation and Chemical Properties of Immunomodulating Polysaccharides from Roots of *Dipsacus asperoides*; *Planta Medica* **63**, 393-399 (1997)
- 58 Kraus R.J. Simultaneous determination of neutral and aminosugars in biological materials; *J. Chromatogr.* **513**, 71-81 (1990)
- 59 Hjerpe A., Engfeldt B.: Separation and determination of neutral monosaccharides using methanolysis and high-performance liquid chromatography; *J. Chromatogr.* **259**, 334-337 (1983)
- 60 Cheetham N.W., Sirimanne P.: High-performance liquid chromatographic separation of methyl glycosides; *J. Chromatogr.* **208**, 100-103 (1981)
- 61 Lampio A., Finne J.: Sugar analysis of glycoproteins and glycolipids after methanolysis by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection; *Anal. Biochem.* **197**, 132-136 (1991)
- 62 Yang C-Y., Kang E., Grimm R.: Determination of the Carbohydrate Composition of Glycoproteins using HPLC; Applikation Note 12-5091-7764E; [http://www.hewlett packard.com](http://www.hewlett-packard.com)
- 63 Baillet A.E., Baylocq-Ferrier D.: Identification of monosaccharides by high-performance liquid chromatography using methanolysis and light-scattering detector (LSD) *J. Chromatogr.* **514**, 70-79 (1990)
- 64 Applications Note von Firma Merck: HPLC Analysis of Amino Acids by Automatic Precolumn Derivatization with OPA/Mercaptoethanol

-
- 65 Jacob L.: Entwicklung einer Reinigungsstrategie für Proteine, *BIOforum* **7-8**, 321 (1996)
- 66 Bodinet C., Beuscher N., Kopanski L.: Purification of immunologically active glycoproteins from *Baptisia tinctoria* roots by affinity chromatography and isoelectric focussing; *Planta Med* **55**, 659 (1989)
- 67 Beissmann B., Reisener H.J.: Isolation and purity determination of a glycoprotein elicitor from wheat stem rust by medium-pressure liquid chromatography; *J. Chromatogr.* **521**, 187-197 (1990)
- 68 Akiki C., Bourbouze R., Luporsi C., Percheron F.: Isolierung wasserlöslicher Pflanzen-Glykoproteide durch Affinitäts-Chromatographie an immobilisiertem Concanavalin B; *J. Chromatogr.* **188**, 435-438 (1980)
- 69 Mislovicova D., Stratilova E., Kolarova N.: Affinity chromatography of glycoproteins on Concanavalin A – bead cellulose; *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **20**, 1367-1379 (1997)
- 70 Raymond J., Azanza J.L., Fotso M.: Hydrophobic interaction chromatography: a new methode for sunflower protein fractionation; *J. Chromatogr.* **212**, 199-209 (1981)
- 71 Portnoy J., Pacheco F., Ballam Y., Barnes C.: Separation of *Alternaria* into protein and carbohydrate fractions with phenyl Sepharose; *J. Allergy Clin. Immunol.* **4**; 789-793 (1987)
- 72 Henschen A., Hupe K.-P., Lottspeich F., Voelter W.: *High-Performance Liquid Chromatography in Biochemistry*; VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1985
- 73 Jensen D., Höfler F.: Grundlagen der Aminosäure-Chromatographie mit IPAD-Detektion; *BIOforum* **5**, 282-284 (1999)
- 74 Beinert W., Meisner A., Fuchs M., Riedel E., Lüpke M., Brückner H.: OPA oder FMOC; *GIT* **10**, 1018-1027 (1992)
- 75 Chaves das Neves H.J., Morais Z.B.: HPLC assay of underivatized free amino acids with column switching and evaporative light-scattering detection; *J. High Resol. Chromatogr.*, **20**, 115-118 (1997)
- 76 Proksch, A.: Über ein immunstimulierendes Wirkprinzip aus *Echinacea purpurea* (L.) Moench; Dissertation, Institut für Chemie und Pharmazie, München (1982)
- 77 Blaschek W., Döll M., Franz G.: Echinacea-Polysaccharide; *Z. Phytotherapie* **19**, 255-262 (1998)

-
- ⁷⁸ Puhlmann, J.: Immunologisch aktive Polysaccharide aus den Herbadrogen von *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. und *Arnica montana* L. Zellkulturen; Dissertation, Institut für Chemie und Pharmazie, München (1989)
- ⁷⁹ Beuscher N., Kopanski L.: Stimulation der Immunantwort durch Inhaltsstoffe aus *Baptisia tinctoria*; *Planta Med.* **5**, 381-384 (1985)
- ⁸⁰ Stuppner H.: Chemische und immunologische Untersuchungen von Polysacchariden aus der Gewebekultur von *Echinacea purpurea* (L.) Moench.; Dissertation, Institut für Chemie und Pharmazie, München (1985)
- ⁸¹ Gohla S.: In vivo- und in vitro-Untersuchungen zur Immunmodulation des spezifischen und unspezifischen Immunsystems durch hochmolekulare Polysaccharidfraktionen der Cupressaceae *Thuja occidentale* (L.); Dissertation, Institut für Angewandte Botanik, Hamburg (1988)

Einflüsse auf Isolierung und Charakterisierung von biologisch aktiven Substanzen

Das qualitative und quantitative Vorkommen von Pflanzeninhaltsstoffen (in der vorliegenden Arbeit: biologisch aktive Glycoproteine) hängt von diversen Parametern ab. Im folgenden werden die Parameter aufgeführt.

- **Pflanzenart** (Baptisia -tinctoria, -alba, -australis)
- Verteilung der Substanzen in den unterschiedlichen **Pflanzenteilen** (Sproß, Blätter, Knospe, Blüte, Wurzeln)
- **Standortfaktoren** (Licht, Temperatur, Wasserversorgung) und **Nährstoffe** (z.B. Düngung)
- **Erntezeitpunkt** (Probenahme)
- **Lagerbedingungen** (Licht, Temperatur, Feuchtigkeit, Lagerdauer)

- **Probenvorbereitung**
 - **Mechanische Bearbeitung**

Die Pflanzenteile bleiben in einem Stück oder werden zerkleinert. Dadurch größere Oberfläche und Gefahr einer Veränderung (Abbau der gesuchten Inhaltsstoffe möglich)
 - **Isolierung (Technische Aufbereitung)**

Herstellen von Extrakten, z. B. durch Extraktion mit Wasser oder wäßrig-alkoholischen Lösungen sowie Herstellen von Preßsäften.⁸¹ Anschließend Dialyse, Gefriertrocknung (Retentat)
 - **Aufarbeitung für analytischen Arbeitsgang**
- **Isolierung (Analytische Trennverfahren, z.B. Fällung, Chromatographie)**
- physikalische oder biologische **Detektion**
- **Analytische Information**