

Bestimmung von Lektinen in Beeren des Schwarzen Holunders (*Sambucus nigra*)

Teil 2: Zusammenhang zwischen Reifestadium und Lektiningehalt

REINHARD EDER¹, HANNELORE SCHENKERMAYR¹, KARL KAACK² und ERIKA STAUDACHER³

¹ Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74
E-mail: Reinhard.Eder@hblawo.bmlfuw.gv.at

² Danish Institute of Agricultural Sciences, Research Centre Aarslev, Department of Fruit, Vegetable and Food Science
DK-5792 Aarslev, Kirstinebjergvej 10, Postbox 102

³ Universität für Bodenkultur, Department für Chemie
A-1190 Wien, Muthgasse 18

Von wild wachsenden Holundersträuchern zweier Standorte wurden im Verlauf von zehn Wochen Holunderbeeren entnommen und in deren Presssaft der Gehalt an Proteinen sowie das Vorhandensein von Lektinen überprüft. Im Reifeverlauf konnte festgestellt werden, dass in den reifen Holunderbeeren im Gegensatz zu den unreifen und überreifen der höchste Proteingehalt pro Saftvolumen enthalten war. Wurde hingegen der Proteingehalt auf die Beerenanzahl bezogen, so war in den unreifen Beeren der höchste Proteingehalt zu verzeichnen, da in diesen der Wassergehalt geringer war als in reifen Beeren. Mittels Anionenaustauschchromatographie erfolgte eine Fraktionierung der Holunderbeerenproben. Die höchsten Proteingehalte wurden in den anionischen Fraktionen gefunden, die mit dem Gel eine Wechselwirkung zeigten und erst mit Salzlösung eluiert werden konnten. Mit wenigen Ausnahmen gelang nur in diesen Fraktionen mittels Erythrozyten-Agglutinationstest ein positiver Lektinnachweis. Eine Separierung der Proteine mit SDS-Polyacrylgelelektrophorese ergab in diesen Fraktionen ebenfalls lektintypische Banden im Bereich von 30 KDa, wobei aber die Art des Lektins, SNA III oder SNA IV, nicht identifiziert werden konnte.
Schlagwörter: Schwarzer Holunder (*Sambucus nigra*), Lektine, Reife, Erythrozyten-Agglutination, SDS-Polyacrylgelelektrophorese (SDS-PAGE)

*Determination of lectins in berries of black elder (*Sambucus nigra*), Part 2: Connection between ripening stage and lectin content. Samples of elderberry were taken from wild growing elder shrubs from two locations over a period of ten weeks. The content of proteins and the presence of lectins were investigated in the processed press juices. With respect to the course of ripening it was found that contrary to unripe and overripe berries the highest protein contents per juice volume were determined in the ripe elderberries. When calculated per berry number the highest protein contents were detected in the unripe elderberries, due to the fact that their water content was lower than that of the ripe berries. By means of anion exchange chromatography the samples were fractionated. Highest protein contents were found in the anionic fractions which interacted with the gel and could only be eluated by salt solution. With a few exceptions only in these fractions lectins were found by means of erythrocyte agglutination test. A separation of the proteins by SDS-polyacrylgelelectrophoresis showed lectin typical patterns at the range of 30 KDa, the kind of lectin, SNA III or SNA IV, however, could not be identified.*

Keywords: Elderberry, lectins, maturation, erythrocyte agglutination, SDS-polyacrylgelelectrophoresis (SDS-PAGE)

Détermination de lectines dans les baies du sureau (*Sambucus nigra*), 2^{ème} partie : la relation entre le degré de maturité et la teneur en lectines. Au cours de dix semaines, des baies de sureau sauvages poussant à deux endroits différents ont été prélevées et leurs jus pressés ont été examinés en vue de déterminer leur teneur en protéines et la présence de lectines. On a pu constater au cours de la maturation que les baies de sureau mûres - contrairement à celles non mûres et trop mûres - présentaient la teneur en protéines la plus élevée par volume de jus. En revanche, si l'on mettait la teneur en protéines en relation avec le nombre de baies, les baies non mûres présentaient la teneur en protéines la plus élevée, car leur teneur en eau était inférieure à celle des baies mûres. On a procédé à un fractionnement des échantillons de baies de sureau au moyen de la chromatographie sur un échangeur d'anions. Les teneurs en protéines les plus élevées ont été trouvées dans les fractions anioniques qui présentaient une interaction avec le gel et qui n'ont pu être éluées qu'au moyen d'une solution saline. À quelques exceptions près, les lectines n'ont pu être détectées que dans ces fractions à l'aide d'un test d'agglutination d'érythrocytes. Dans ces fractions, la séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamides-SDS a eu pour résultat des bandes typiques aux lectines dans une plage de 30 kDa, le type de lectine, SNA III ou SNA IV, n'ayant pas pu être identifié.

Mots clés : Sureau (*Sambucus nigra*), lectines, maturité, agglutination d'érythrocytes, électrophorèse sur gel de polyacrylamides - SDS (SDS-PAGE)

Verschiedene Teile, wie Früchte, Blüten, Blätter, Wurzel und Rinde, des Schwarzen Holunders (*Sambucus nigra*) werden seit langem für die Heilung unterschiedlicher Krankheiten verwendet (HEMGESBERG, 1998). Die positive gesundheitliche Wirkung dürfte unter anderem auf den hohen Gehalt an Mineralstoffen (hauptsächlich Kalium), die Vielzahl an Vitaminen (Vitamine B6, C, E, Niacin u.a.) und den hohen Phenol- und insbesondere Anthocyanengehalt (Cyanidinglycoside) zurückzuführen sein (HERMANN, 1996; ABUJA et al., 1998). Aufgrund des hohen Gehaltes an Aromastoffen (Hauptbestandteil ist Phenylacetaldehyd) eignen sich die Blüten und Früchte sehr gut für die Herstellung von Limonaden und aromatisierten Getränken (POLL und LEWIS, 1986). Problematisch ist hingegen das Vorkommen von Sambunigrin, eines cyanogenen Glukosides, in rohen oder unreifen Beeren, da durch enzymatische Spaltung in der Pflanze oder im Magen Blausäure freigesetzt werden kann (JENSEN and NIELSEN, 1973). Infolge Hitzeeinwirkung (z.B. Maischeerhitzung, Pasteurisation) wird hingegen das Sambunigrin abgebaut, ohne dass im Produkt eine merkbare Zunahme der Blausäure festgestellt werden kann (KAACK, 1990).

In den letzten Jahren sind spezielle Proteine des Holunders, nämlich die Lektine, in das Zentrum des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Es handelt sich hierbei um Pflanzenproteine, die über zwei oder mehr Bindungsstellen für Kohlenhydrateinheiten verfügen und somit eine Agglutination (Verklumpung) von Erythrozyten und anderen Zellen verursachen können. Somit können Lektine in der medizinischen Grundlagenforschung eingesetzt werden, da sie eine Charakterisierung von Zelltypen oder Zellfragmenten sowie eine Unterscheidung von normalen und Tumorzellen ermöglichen

(SHARON and LIS, 1989). In der Pflanze haben die Lektine aufgrund ihrer toxischen Wirkung wahrscheinlich Schutzfunktion, außerdem wirken sie zellteilungsfördernd und sind an der Symbiose mit dem stickstoffbindenden Bakterium *Rhizobium trifolii* beteiligt (STRYER, 1996).

Da Lektine in intakter Form den Verdauungstrakt passieren, können sie an der Wand des Dünndarms Plätze besetzen, die sonst von Bakterien eingenommen werden. Somit können sie das Anhaften schädlicher Bakterien an der Darmschleimhaut blockieren beziehungsweise zur punktgenauen Verabreichung von Medikamenten eingesetzt werden, wodurch die Dosis und die Nebenwirkungen deutlich verringert werden können. *In vivo* können Lektine auch das Anhaften von Krebszellen und Mikroorganismen am Gewebe ermöglichen, sodass eine zielgerichtete Hemmung dieser Lektinfunktion einen neuen Ansatz zur Krebs- und Infektionstherapie darstellt (LEE-HUANG, 1991). Eine andere therapeutische Anwendung ist die Kopplung von Krebs oder Virus hemmenden Medikamenten an passende Oligosaccharide und Lektine, um diese dann gezielt in krebs- oder virusinfizierte Zellen einzuschleusen (TILL et al., 1989).

In verschiedenen Geweben des Schwarzen Holunders wurden bisher vier Lektine, *Sambucus nigra*-Agglutinine (SNA I bis SNA IV), beschrieben. SNA-I ist ein tetrameres Glycoprotein (Molmasse: 150 kDalton) bestehend aus zwei Untereinheiten mit 36 kDalton und zwei Untereinheiten mit 38 kDalton und bindet spezifisch an α -2,6-Sialinsäurereste. SNA-II ist ein aus zwei Untereinheiten aufgebautes Glycoprotein (Molmasse: 68 kDalton), das an Oligosaccharide mit N-Acetylgalactosamin und Galactose bindet (KAKU et al., 1990).

SNA-I und SNA-II kommen vor allem in der Rinde vor. Das dimere Glycoprotein SNA-III (Molmasse: 50 kDalton) kommt in Samen und Früchten vor und bindet ebenfalls an Oligosaccharide mit N-Acetylgalactosamin oder Galactose (PEUMANS et al., 1991). Auch SNA-IV besteht aus zwei Untereinheiten (Molmasse: 60 kDalton), ist in den Beeren enthalten und bindet ebenfalls an Galactose und N-Acetylgalactosamin (MACH et al., 1991; CITORES et al., 1996).

In einer vorausgehenden Arbeit wurde ein verlässliches, relativ einfaches Analysenverfahren zum Nachweis von Lektinen in Holunderbeeren entwickelt und die Lektinhalte in verschiedenen Sorten des Schwarzen Holunders bestimmt (SCHENKERMAYR et al., 2002). Ergänzend dazu sollte in dieser Arbeit der Einfluss unterschiedlicher Reifezustände auf das Vorkommen von Lektinen in Beeren des Schwarzen Holunders untersucht werden.

Material und Methoden

Probenmaterial

Für die Untersuchungen reifebedingter Veränderungen der Protein- und Lektinhalte von Holunderbeeren wurden im Zeitraum von zehn Wochen (6. 7. bis 12. 9. 2000) wöchentlich 50 g Beeren von zwei Sträuchern an unterschiedlichen Standorten (Standort A: Sonnenstandort; Standort B: Schattenstandort) geerntet und bis zur genauen Analyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Probenvorbereitung

Ca. 50 g tiefgefrorene Beeren wurden mit 100 ml destilliertem Wasser versetzt, aufgetaut und bei Raumtemperatur fünf Minuten homogenisiert. Zur Abtrennung grober Bestandteile wurde das Homogenat zunächst durch ein feines Gewebe abgeseiht, dann 15 Minuten lang mit 3000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Fa. Beckman, J2-HC Kühlzentrifuge JA20-Rotor) und schließlich der Überstand durch ein Gewebe- und ein Faltenfilter (Fa. Schleicher & Schüll, Filter 595) filtriert. Anschließend erfolgte eine fraktionierte Fällung mit 10 % bzw. 50 % Ammoniumsulfat. Zur Entsalzung der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -gefällten Probe kamen Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgrenze von 6000 bis 8000 Dalton (Fa. Spectraphor membrane tubing) zur Anwendung. Die entsalzten Probe wurde bei 10000 g für 10 Minuten zentrifugiert (HOLTZHAUER, 1997). Vom Über-

stand wurden 500 μl Probe genommen, in einem 3 ml-Behälter mit Schraubverschluss bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren und anschließend lyophilisiert (Fa. Christ Alpha 1-4 LMC1).

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach BRADFORD (1976) mit dem Farbstoff Coomassie blue durch Messung der Absorption bei 595 nm.

SDS-Elektrophorese

Für die Durchführung der Elektrophorese wurden aceton- bzw. methanolgefällte Proben verwendet. Eine genaue Beschreibung der Vorschrift wurde von SCHENKERMAYR et al. (2002) gegeben.

Anionenaustauscher

Die Fraktionierung der Proben erfolgte mit einem Anionenaustauscher (Fa. Sephadex, DEAE A-25) und wurde bereits früher ausführlich beschrieben (SCHENKERMAYR et al., 2002).

Nachweis von Lektinen

Die Anwesenheit von Lektinen in einer Probe wurde mittels Agglutination von Erythrozyten festgestellt. Die Lektine binden spezifisch an die an der Oberfläche der Erythrozyten befindlichen Kohlenhydrate und verursachen so das Agglutinieren (Verklumpen) der Zellen, welches optisch durch Trübung der Lösung feststellbar ist. Eine genaue Beschreibung des Verfahrens wurde bereits im ersten Teil dieser Studie publiziert (SCHENKERMAYR et al., 2002).

Ergebnisse

Während des zehnwöchigen Untersuchungszeitraumes wurden von wild wachsenden Holundersträuchern an zwei Standorten (Standort A: sonnig; Standort B: schattig) jeweils 50 g Beeren geerntet. Das in Tabelle 1 dargestellte Verhältnis unreifer (grün gefärbter) zu reifen (schwarz gefärbten) Beeren weist kaum Unterschiede im Reifeverlauf auf.

In Abbildung 1 sind die Proteingehalte der im Zeitraum von 6. 7. bis 12. 9. 2000 geernteten Holunderbeeren dargestellt. Für die Untersuchungen wurden jeweils 50 g Beeren verwendet und der Proteingehalt in Milli-

Tabelle 1:
Anteil an unreifen (grünen) und reifen (schwarzen) Beeren in Prozent

Datum	Standort A (sonnig)		Standort B (schattig)	
	unreif	reif	unreif	reif
6. 7.	100	-	100	-
12. 7.	100	-	100	-
20. 7.	50	50	50	50
27. 7.	2	98	5	95
3. 8.	-	100	-	100
10. 8.	-	100	-	100
17. 8.	-	100	-	100
24. 8.	-	100	-	100
29. 8.	-	100	-	100
12. 9.	-	100	-	100

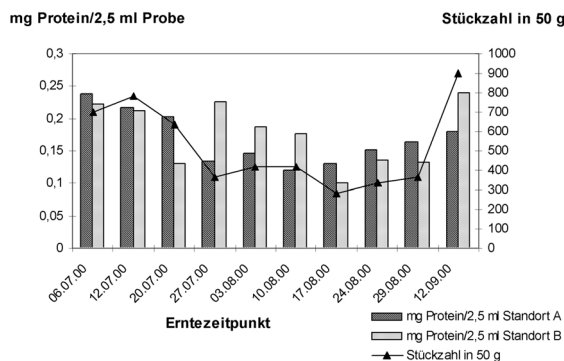


Abb. 1: Proteingehalt im Saft sowie Stückzahl von Holunderbeeren pro 50 Gramm in Abhängigkeit vom Erntezeitpunkt

gramm pro 2,5 Milliliter Probe dargestellt. Der unterschiedliche Wassergehalt der Beeren zu den einzelnen Erntezeitpunkten, der das Beerengewicht und somit die Konzentration der Inhaltsstoffe beeinflusst, wurde zunächst nicht berücksichtigt. Das unterschiedliche Beerengewicht wurde aber in Form der Stückzahl (Anzahl Holunderbeeren pro 50 Gramm Probe) erfasst und ist ebenfalls in der Abbildung dargestellt. Zu Beginn der Untersuchungen (6. 7. 2000) war der Proteingehalt mit 0,20 bzw. 0,25 mg Protein je 2,5 ml Probe an beiden Standorten hoch. Im weiteren Reifeverlauf nahmen die Proteingehalte mit Ausnahme

vom Erntetermin 20. 7. am Standort B ab. Lässt man besagten Ausreißer außer Acht, so ist beim sonnigen Standort A eine frühere Abnahme des Proteingehaltes feststellbar als beim schattigen Standort B, was als Standorteffekt gewertet werden kann. Somit zeigt diese Studie, dass in unreifen, grünen Beeren ein höherer Proteingehalt vorhanden ist als in schwarzen, reifen Beeren.

Erst gegen Ende der Untersuchungsperiode nahmen die Proteingehalte wieder zu. Anhand der zunehmenden Stückzahl ist erkennbar, dass dieser Anstieg auf verdunstungsbedingte Schrumpfungsvorgänge und eine somit unspezifische Inhaltsstoffkonzentrierung zurückzuführen ist. Andererseits waren aber die unreifen Beeren (6. 7. bis 20. 7. 2000) deutlich kleiner als die reifen Beeren, wodurch sich für 50 g Untersuchungsmaterial eine hohe Anzahl an Beeren ergab.

Anhand der Stückzahl ist zusätzlich erkennbar, dass ein hoher Proteingehalt mit einer großen Beerenanzahl (6. 7. bis 20. 7. und 12. 9. 2000) und ein niedriger Proteingehalt (27. 7. bis 29. 8.) mit einer geringen Beerenanzahl zusammenfällt. Um diesen zusätzlichen Einflussfaktor zu berücksichtigen, ist es überlegenswert, den Proteingehalt nicht auf ein konstantes Beerengewicht, sondern auf eine konstante Beerenanzahl zu berechnen (Abb. 2). Bei der Darstellung des Proteingehaltes in 100 Beeren

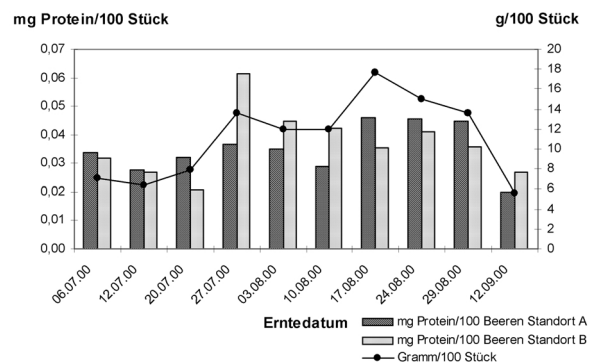


Abb. 2: Veränderung des Proteingehaltes in 100 Beeren (mg) sowie des 100 Beeren-Gewichtes (g)

während des Reifeverlaufes ist in den unreifen Beeren (6. 7. bis 20. 7. 2000) ein geringerer Wert festzustellen. Auch bei den überreifen, großteils verdorrten Beeren vom 12. 9. ist ein geringer Proteingehalt zu verzeichnen. Somit ergeben sich die höchsten Proteingehalte pro Beere in den reifen Beeren zwischen dem 27. 7.

und dem 29. 8., wobei sie in diesem Stadium auch das höchste Beerengewicht aufwiesen.

Für die SDS-PAGE wurden 100 µl Probe mit Aceton gefällt und der trockene Niederschlag in 50 µl Probenpuffer für die Elektrophorese aufgenommen.

Die Proteinbandenmuster der zu unterschiedlichen Zeitpunkten am Standort A gepflückten Beeren sind in Abbildung 3 abgebildet.

Lediglich bei den unreifen Beeren (6. 7. bis 20. 7.) traten

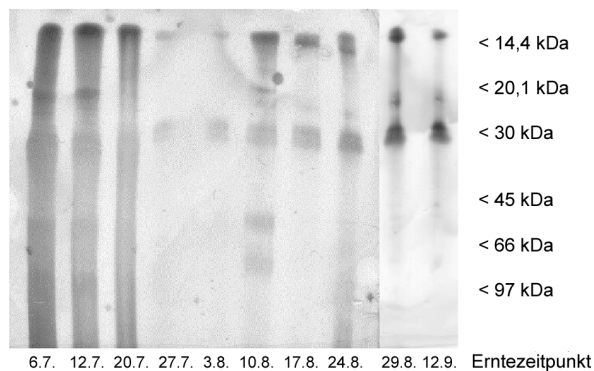


Abb. 3: Veränderung der Proteinmuster mit zunehmender Reife am Standort A (SDS-PAGE und Silberfärbung)

störende Schlieren auf (eventuell Phenole), deutliche Proteinbanden im Bereich von 30 kDa und 20 kDa waren gut sichtbar. Während jene im Bereich von 30 kDa während des gesamten Reifeverlaufs zu erkennen waren, traten die Banden bei 20 kDa nur zu Beginn und gegen Ende des Reifeverlaufes auf. Lediglich in der am 10. 8. 2000 geernteten Probe sind auch im Molekularbereich von 60 kDa leichte Banden zu erkennen, die in allen anderen Reifestadien aber fehlten.

Bei den Proben von Standort B zeigt sich bei der SDS-PAGE ein ähnliches Bild wie bei den Proben vom Standort A. Ebenfalls sind bei den unreifen Beerenproben (Erntetermine bis zum 27. 7. 2000) Schlieren über die gesamte Laufstrecke zu sehen. Das könnte mit dem Schattenstandort in Zusammenhang stehen, da der Anteil an grünen Beeren in dieser Fraktion höher als bei der gleichen Fraktion von Standort A ist. Die Schlieren in der Probe vom 12. 9. werden von den hohen Farbannteilen hervorgerufen. Die sichtbaren Proteinbanden konzentrieren sich auch beim schattigen Standort auf den Bereich von 20 bis 30 kDa und sind während der Erntezeitpunkte von Anfang Juli bis Mitte September verschieden stark ausgeprägt.

Für den Nachweis von Lektinaktivitäten wurden die

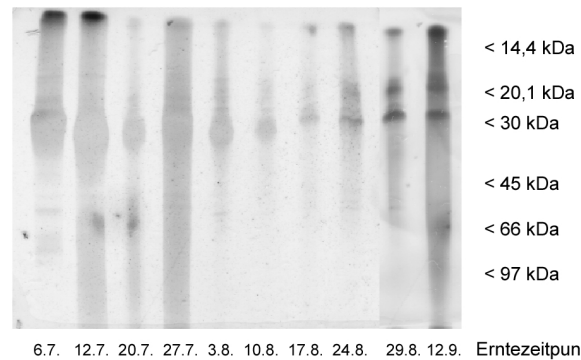


Abb. 4: Veränderung der Proteinmuster mit zunehmender Reife am Standort B (SDS-PAGE und Silberfärbung)

lyophilisierten Proben (trockene Probe aus je 1,5 ml) in 0,5 ml Startpuffer (50 mM Tris/HCl-Puffer, pH-Wert 8,8) aufgenommen und mittels Anionenaustauscher in sechs Fraktionen aufgetrennt.

Die Verteilung der Proteingehalte in den mittels Anio-

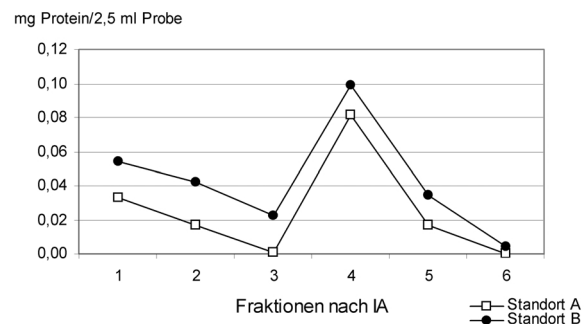


Abb. 5: Verteilung der Proteingehalte in den Anionenaustausch-Fractionen bei den am 6. 7. 2000 geernteten Holunderbeeren

nen austauscher gewonnenen Fraktionen zeigt bei unreifen Beeren vom 6. 7. an den Standorten A und B einen ähnlichen Verlauf (Abb. 5). Der Proteingehalt ist in den Fraktionen, die nicht an den Anionenaustauscher binden (Fraktion 1 bis 3), aber auch in der Fraktion 4 im Vergleich zu den Proben der anderen Erntezeitpunkte (Abb. 6 bis 8) sehr hoch.

Am 6. 7. betragen die Proteingehalte der Fraktion 4 am Standort A 0,08 mg bzw. 0,10 mg am Standort B, während am 27. 7. nur 0,02 mg (Standort A) bzw. 0,04 mg Protein (Standort B) erreicht wurden.

Bei den Fraktionen des Anionenaustauschers vom Ern-

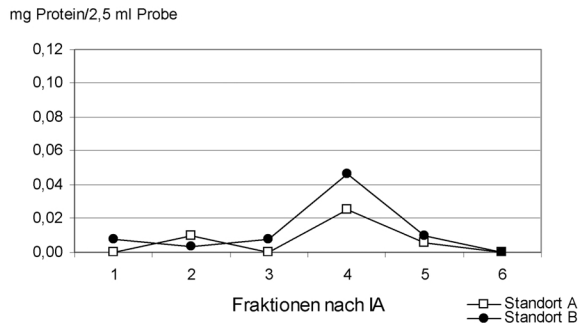


Abb. 6: Verteilung der Proteingehalte in den Anionenaustausch-Fractionen bei den am 27. 7. 2000 geernteten Holunderbeeren

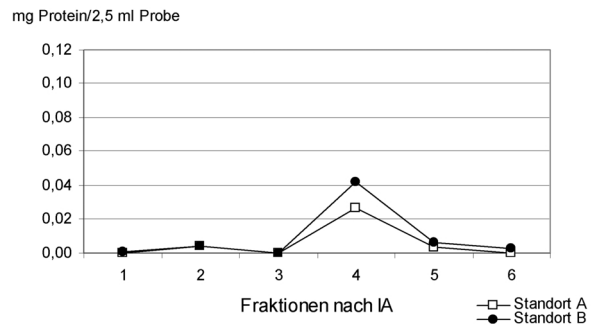


Abb. 8: Verteilung der Proteingehalte in den Anionenaustausch-Fractionen bei den am 29. 8. 2000 geernteten Holunderbeeren

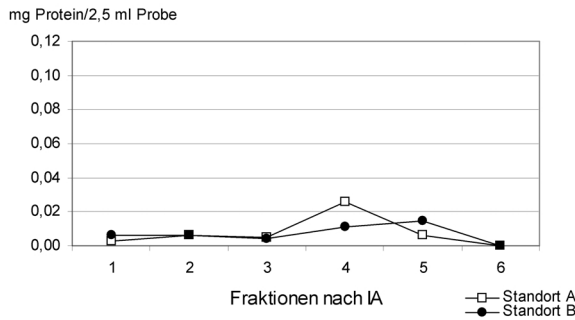


Abb. 7: Verteilung der Proteingehalte in den Anionenaustausch-Fractionen bei den am 17. 8. 2000 geernteten Holunderbeeren

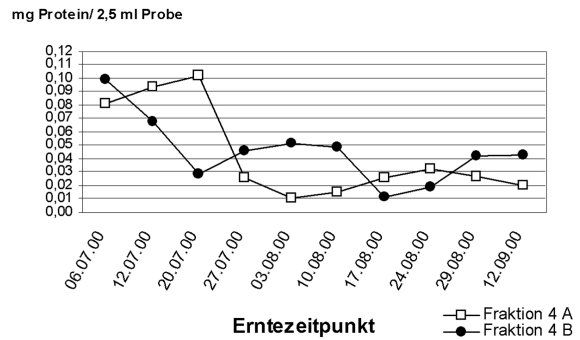


Abb. 9: Verlauf der Proteingehalte in der Anionenaustausch-Fraktion 4 in Abhängigkeit vom Erntetermin an beiden Standorten

tedatum 17. 8. zeigen die Kurven des Proteingehalts von Standort A und B einen ähnlichen Verlauf. Bei Standort A ist ein steilerer Anstieg in Fraktion 4 zu erkennen, während der Proteingehalt von Standort B seinen Höhepunkt erst in Fraktion 5 erreicht.

Auch am 29. 8. (Abb. 8) zeigen die Proteingehalte in den sechs Fraktionen ein ähnliches Bild wie bei den Abbildungen zuvor. Der optimale Erntezeitpunkt der Beeren zur Saftgewinnung lag im Untersuchungs-jahr 2000 zwischen dem 20. und 30. August. Zu diesen Zeitpunkten sind die ermittelten Proteinmengen relativ gering.

Der Proteingehalt in den Fraktionen 4 und 5 ist von besonderem Interesse, da in diesen die Lektine zu finden sind. Der Verlauf der Gehalte während des Reifeverlaufes ist daher in den Abbildungen 9 bzw. 10 gesondert dargestellt.

Die Ergebnisse von Abbildung 9 zeigen, dass der höch-

ste Gehalt in beiden Standorten mit 0,1 mg gleich war und am Standort B gleich zu Untersuchungsbeginn (6. 7.) festgestellt wurde, während am Standort A erst beim dritten Erntetermin (20. 7.) 0,1 mg erreicht wurden. In den reifen Beeren (ab 27. 7.) liegen die Werte zwischen 0,01 mg und 0,05 mg Protein je Probenansatz. Auffällig sind die tendenziell höheren Proteingehalte in den Beeren vom schattigen Standort B.

Die Proteingehalte der Fraktion 5 von den beiden Standorten A und B erreichen maximal 0,035 mg Protein pro Probenansatz, Standort A erreicht seinen höchsten Wert um den 20. 8., während am Standort B die Maximumwerte am Beginn der Untersuchungsreihe liegen (Abbildung 10).

Der Nachweis von Lektinen erfolgte durch Bestimmung der Agglutination nach Zugabe der Holunderproben zu Erythrozytenlösungen, wobei eine deutliche Trübung (+ bzw. ++) das sichere Vorhandensein von

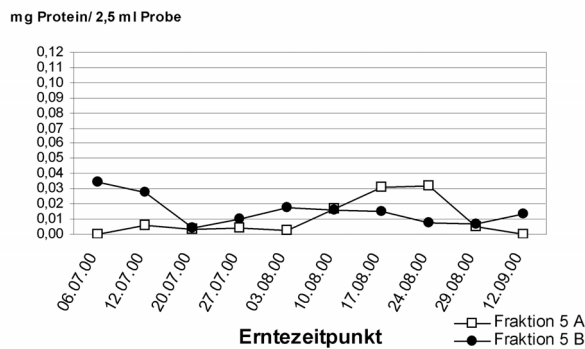


Abb. 10: Verlauf der Proteingehalte in der Anionenaustausch-Fraktion 5 in Abhängigkeit vom Erntetermin an beiden Standorten

Lektinen anzeigt. Alle sechs Anionenaustausch-Fractionen von allen zehn Ernteterminen und von beiden Standorten wurden auf das Lektinvorkommen hin getestet. Die Ergebnisse der visuellen Beurteilung sind in Tabelle 2 für den Standort A und in Tabelle 3 für den Standort B zusammengefasst.

Am Standort A sind in allen Anionenaustausch-Fractionen 1 bis 3 keine Trübungen feststellbar. In den unreifen Beeren vom 6. 7. und vom 12. 7. ist in der Frak-

Tabelle 2:

Ergebnisse der Agglutinationstests von den Anionenaustausch-Fractionen zu verschiedenen Erntezeitpunkten (Standort A)

- keine Trübung; ~ schwache Trübung; + Trübung; ++*) starke Trübung (auf Aussalzungseffekte zurückzuführen)

Erntezeitpunkt	Fraktion					
	1	2	3	4	5	6
2000						
6. 7.	-	-	-	~	+	++*)
12. 7.	-	-	-	~	+	++*)
20. 7.	-	-	-	-	+	++*)
27. 7.	-	-	-	-	+	++*)
3. 8.	-	-	-	-	+	++*)
10. 8.	-	-	-	-	+	++*)
17. 8.	-	-	-	-	+	++*)
24. 8.	-	-	-	-	+	++*)
29. 8.	-	-	-	-	+	++*)
12. 9.	-	-	-	-	+	++*)

tion 4 eine leichte Trübung, und in den Fractionen 5 und 6 eine deutliche bzw. starke Trübung erkennbar. Die starke Trübung in den Fractionen 6 beruht aber auf der in den Proben enthaltenen hohen Salzkonzentration, welche die Lektin-Erythrozyten-Bindung stören und daher nicht als positiver Lektinnachweis angesehen werden kann.

In den Anionenaustausch-Fractionen von Standort B

Tabelle 3:

Ergebnisse der Agglutinationstests von den Anionenaustausch-Fractionen zu verschiedenen Erntezeitpunkten (Standort B)

- keine Trübung; ~ schwache Trübung; + Trübung; ++*) starke Trübung (auf Aussalzungseffekte zurückzuführen)

Erntezeitpunkt	Fraktion					
	1	2	3	4	5	6
2000						
6. 7.	-	-	-	~	+	++*)
12. 7.	-	-	-	-	+	++*)
20. 7.	-	-	-	-	+	++*)
27. 7.	-	-	-	~	+	++*)
3. 8.	-	-	-	+	+	++*)
10. 8.	-	-	-	+	+	++*)
17. 8.	-	-	-	-	+	++*)
24. 8.	-	-	-	-	+	++*)
29. 8.	-	-	-	-	+	++*)
12. 9.	-	-	-	+	+	++*)

zeigt sich ein ähnliches Bild, die Fractionen 1 bis 3 sind lektin-negativ. Ab den Fractionen 4 sind in den unreifen Beeren leichte (6. 7. und 27. 7.) und in den reiferen Beeren deutliche Trübungen (3. 8., 10. 8. und 12. 9. 2000) erkennbar, womit das Lektinvorkommen am Schattenstandort deutlicher ausgeprägt ist als am sonnigen Standort. Die Trübungen in den Fractionen 5 und 6 der Proben vom Standort B verhalten sich wie die vom Standort A, wobei insbesondere die sechsten Fractionen aufgrund der hohen Salzkonzentrationen nicht als lektin-positiv interpretiert werden sollten.

Zusätzlich zu den Proteinbestimmungen und den Agglutinationstests wurden von den Anionenaustausch-Fractionen auch mittels SDS-PAGE die Proteinmuster aufgenommen.

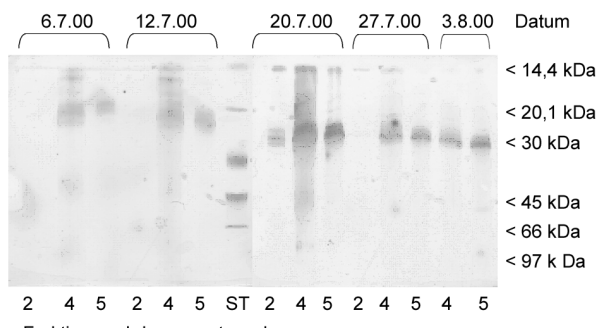


Abb. 11a: Mittels SDS-PAGE ermittelte Proteinmuster der Anionenaustausch-Fractionen in Abhängigkeit vom Erntetermin (6. 7. bis 3. 8. 2000) am Standort A (ST = Proteinstandard)

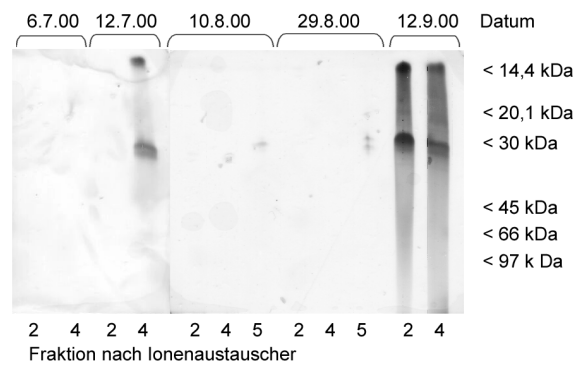


Abb. 12: Mittels SDS-PAGE ermittelte Proteinmuster der Anionenaustausch-Fractionen in Abhängigkeit vom Erntetermin am Standort B

Es wurden die Fraktionen 2, 4 und 5 aufgetragen, um einen Unterschied zwischen den nichtbindenden Proteinen (in Fraktion 2) und den gebundenen Proteinen (Fraktion 4 und 5) auf der Elektrophorese zu sehen. Das Bild, welches sich dabei ergibt, ist in allen durchgeführten Auftrennungen das gleiche (Abb. 11a und 11b). In Fraktion 2 sind auf der gesamten Laufstrecke keine Banden zu erkennen im Gegensatz zu den Fraktionen 4 und 5, bei denen eine einzelne oder mehrere Banden im Bereich um 30 kDa sichtbar werden. Die Proteinbanden der Fraktionen 4 und 5 unterscheiden sich nur in der Intensität, nicht aber in der Molekularmasse.

Vom Standort B wurden Proben der Fraktionen 2, 4 und 5 vom 6. 7., 12. 7., 10. 8., 29. 8. und vom 12. 9. 2000 für die elektrophoretische Trennung verwendet (Abb. 12). Verglichen mit den Proben vom sonnigen Standort wurden aber in den vierten Fraktionen seltener Banden im Bereich von 30 kDa nachgewiesen, so weist die Fraktion 4 am 6. 7., 10. 8. und am 29. 8. keine

lektinspezifischen Banden auf. Die Banden der Fraktionen 5 sind sehr schwach. Eine Ausnahme stellen die Proben vom 12. 9. (Fraktion 2 und 4) dar, hier ist eine deutliche Bande auch in der Fraktion 2 erkennbar. Die Fraktion 4 zeigt bei derselben Molmasse ebenfalls eine Bande, jedoch mit geringerer Intensität.

Diskussion

Ausgehend von 50 Gramm Probenmaterial sind an beiden Standorten in unreifen und überreifen Beeren die höchsten Proteinmengen nachgewiesen worden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Arbeit von CITORES et al. (1996) überein. Zusätzlich war zu erkennen, dass am sonnigen Standort A der Proteingehalt früher absank als am schattigen Standort B. Unter anderem sind aber die geringeren Gehalte in den reifen Beeren auf die reifebedingten Zunahmen der Beerengewichte zurückzuführen, da bei 50 Gramm unreifen, kleinen Beeren die Stückzahl höher ist als bei 50 Gramm reifen, schweren Beeren. Das Einzelbeerengewicht stellt somit einen zusätzlichen reifeabhängigen Einflussfaktor dar, der auch eine andere Interpretation der Proteingehalte zulässt. Bezogen auf eine konstante Beerenzahl liegt dann nämlich der Proteingehalt bei den reifen (= schwarzen) Beeren höher als bei den unreifen bzw. überreifen Früchten. Anders ausgedrückt korreliert ein hoher Proteingehalt mit einer großen Beerenzahl.

Mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese konnte in allen Beerenproben eine Bande bei 30 kDa nachgewiesen werden, bei einigen Proben waren auch Proteinbanden bei 20 kDa und 60 kDa sichtbar. Bei den unreifen Beeren wurden dicke, intensive Banden, bei den reifen

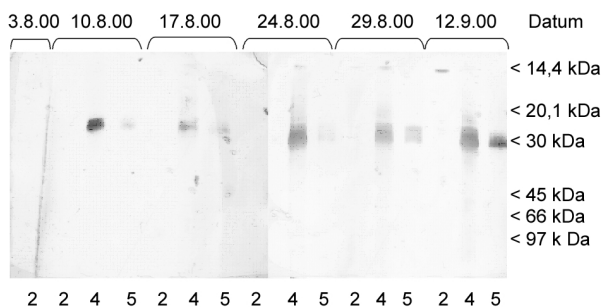


Abb. 11b: Mittels SDS-PAGE ermittelte Proteinmuster der Anionenaustausch-Fractionen in Abhängigkeit vom Erntetermin (3. 8. bis 12. 9. 2000) am Standort A (ST = Proteinstandard)

Beeren hingegen weniger intensive, dünne Banden nachgewiesen, was mit den bei der Proteinbestimmung in 50 g Beeren ermittelten Proteinwerten gut übereinstimmt. Die Trennschärfe der Elektrophorese war aber nicht ausreichend, um genau zu erkennen, ob es sich um eine Einzelbande oder um eine Doppelbande bei 30 kDa handelt. Somit konnte keine Aussage über die Art des Lektins (SNA III oder SNA IV) gemacht werden.

Nach Fraktionierung mittels Anionenaustauscher waren die Proteingehalte der Proben von den beiden Standorten A und B vergleichbar. Analog zu den Beerenextrakten war auch bei den Einzelfraktionen eine Verringerung der Proteingehalte während des Untersuchungszeitraumes feststellbar. Erst gegen Ende August bis Mitte September steigt der Proteingehalt wieder leicht an. Auf der SDS-PAGE von Standort A konnten Proteinbanden nur in den Fraktionen 4 und 5 nachgewiesen werden, wobei die Banden der Frak-

tion 4 immer deutlich sichtbar waren, während die Banden der Fraktion 5 schwächer bis kaum sichtbar waren. Bei Standort B sind nur Banden in Fraktion 4 vom 12. 7. und in Fraktion 2 und 4 vom 12. 9. 2000 zu erkennen. Somit wurden die Ergebnisse von MACH et al. (1991) bestätigt, wonach die Anionenaustausch-Chromatographie ein geeignetes Verfahren zur Aufreinigung von lektinhaltigen Pflanzenextrakten ist. Mit dem Agglutinationstest wurden in den Anionenaustausch-Fraktionen 4 und 5 Trübungen festgestellt. Das heißt, dass in allen untersuchten Beeren an allen zehn Ernteterminen und von beiden Standorten Lektine nachgewiesen werden konnten. Mit den angewandten Methoden konnte keine Quantifizierung durchgeführt werden. Auch konnte aufgrund der undeutlichen Banden die Art des Lektins (SNA III: eine Bande bei ca. 30 kDa, oder SNA IV: Doppelbanden bei 32 und 33 kDa) nicht festgestellt werden.

Literatur

- ABUJA, P.M., MURKOVIC, M. and PFANNHAUSER, W. 1998: Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density lipoprotein oxidation. *J. Agric. Food. Chem.* 46: 4091-4096
- BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgramm utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254; zitiert in: ZOECKLEIN, B.W., FUGELANG, K.C., GUMP, B.H. and NURY, F.S. (1994): *Wine analysis and production*. - New York: Chapman and Hall, 1976
- CITORES, L., BENITO, F., IGLESIAS, R., FERRERAS, J., JIMÉNEZ, P., ARGÜESO, P., FARIAS, G., MÉNDEZ, E. and GIRBÉS, T. 1996: Isolation and characterization of a new non-toxic two-chain ribosome-inactivating protein from fruits of elder (*Sambucus nigra* L.). *J. Exp. Bot.* 47: 1577-1585
- HEMGESBERG, H. (1998): *Natürlich gesund mit Holunder Blüten, Blätter und Beeren gegen Alltagsbeschwerden*. - Augsburg: Midena, 1998
- HERMANN, K. 1996: Inhaltsstoffe der Schwarzen Holunderbeere. *Ind. Obst- und Gemüseverwertung* 71(12): 394-397
- JENSEN, S.R. and NIELSEN, B.J. 1973: Cyanogenic glucosides in *Sambucus nigra* L. *Acta Chemica Scandinavica* 27: 2661-2685
- KAACK, K. 1990: Processing of juice from sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Tidsskr. Planteavl.* 94: 107-116
- KAKU, H., PEUMANS, W.J. and GOLDSTEIN, I.J. 1990: Isolation and characterization of a second lectin (SNA II) present in elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark. *Arch. Biochem. Biophys.* (277): 255-262
- LEE-HUANG, S., KUNG, H.F., HUANG, P.L., LI, B.Q., HUANG, P., HUANG, H.I. and CHEN, H.C. 1991: A new class of anti-HIV agents: GAP31, DAPs 30 and 32. *FEBS Letters* (291):139-144
- MACH, L., SCHERF, W., AMMANN, M., POETSCH, J., BERTSCH, W., MARZ, L. and GLOSSL, J. 1991: Purification and partial characterization of a novel lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) fruit. *Biochem. J.* (278): 667-671
- POLL, L. and LEWIS, M.J. 1986: Volatile components of elderberry juice. *Lebensm. Wiss. Technol.* 19: 258-262
- PEUMANS, W., KELLENS, J., ALLEN, A. and VAN DAMME, E. 1991: Isolation and characterization of a seed lectin from elderberry (*Sambucus nigra* L.) and its relationship to the bark lectins. *Carbohydrate Res.* (213): 7-17
- SCHENKERMAYR, H., STAUDACHER, E. and EDER, R. 2002: Etablierung einer Methode zur Bestimmung von Lektinen in Beeren des Schwarzen Holunders (*Sambucus nigra*): Teil 1: Zusammenhang zwischen Sorte und Lektin Gehalt. *Mitt. Klosterneuburg* 52: 175-244
- SHARON, N. and LIS, H. (1989): *Lectins*. - New York: Chapman and Hall, 1989
- STRYER, L. (1996): *Biochemie*. Aus dem Englischen von Günther Stoll. 4. Aufl. - Heidelberg: Spektrum-Akad. Verl., 1996
- TILL, M.A., ZOLLA-PAZNER, S., GORNY, M.K., PATTONS, J.S., UHR, J.W. and VITETTA, E.S. 1989: Human immunodeficiency virus-infected T cells and monocytes are killed by monoclonal human anti-gp41 antibodies coupled to ricin A chain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 1987-1991

Manuskript eingelangt am 16. September 2003