

Etablierung einer Methode zur Bestimmung von Lektinen in Beeren des Schwarzen Holunders (*Sambucus nigra*): Teil 1: Zusammenhang zwischen Sorte und Lektiningehalt

HANNELORE SCHENKERMAYR¹, ERIKA STAUDACHER² und REINHARD EDER¹

¹) Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Str. 74

²) Universität für Bodenkultur, Institut für Chemie
A-1190 Wien, Muthgasse 18

Auf Grund viel versprechender medizinischer Anwendungsmöglichkeiten ist in den letzten Jahren das Interesse an Lektinen stark gestiegen. Die bisher hauptsächlich im Bereich der Grundlagenforschung entwickelten Nachweisverfahren sind sehr arbeits- und kostenintensiv, sodass die Etablierung einer Methode für die anwendungsorientierte Obstforschung erforderlich war. Mit Hilfe des von uns entwickelten Verfahrens wurden in einer ersten Serie Beeren von sechs Holundersorten untersucht. Die Saftproben wiesen deutliche Unterschiede in den Proteingehalten auf, der höchste Gehalt wurde bei der Sorte 'Donau' und der niedrigste bei der Sorte 'Prägarten' gemessen. Anhand der durch Agglutination von Erythrozyten entstehenden Trübung konnten die Lektine semiquantitativ nachgewiesen werden. Auch wenn die störenden Phenole eine exakte Quantifizierung nicht ermöglichten, so war doch ersichtlich, dass der Lektiningehalt mit dem Gesamtproteingehalt positiv korreliert. Nach säulenchromatographischer Auftrennung auf einem Anionenaustauscher verursachte bei den Sorten 'Jucy' und 'Allesoe' bereits die Fraktion 4 und bei den anderen Sorten die Fraktion 5 eine lektinpositive Agglutination von Erythrozyten. Dieser Befund wurde durch das Auffinden lektintypischer Banden im Bereich von 30 kDalton mittels SDS-PAGE in diesen beiden Fraktionen bestätigt. Weiters war feststellbar, dass die Sorten 'Donau' und 'Haschberg' deutlich intensivere Lektin-Banden aufwiesen als die Sorten 'Jucy', 'Tulbing' und 'Allesoe'. Lediglich bei der Sorte 'Prägarten', welche bereits auf Grund der niedrigen Proteingehalte auffällig war, konnten keine Lektine detektiert werden. Bei den nachgewiesenen Lektinen kann es sich sowohl um SNA III als auch um SNA IV handeln.

Schlagwörter: Schwarzer Holunder (*Sambucus nigra*), Sorten, Lektine, Erythrozyten-Agglutination, SDS-PAGE, Anionenaustausch-Chromatographie

*Establishment of a procedure for the detection of lectins in the berries of Black Elder (*Sambucus nigra*): Part 1: Correlation between cultivar and lectin content. Over the last years promising medicinal options have aroused increasing interest in lectins. Detection procedures, which have been developed in pure research up to now, are labour- and cost-intensive as well, thus demanding establishment of a procedure for the practical-oriented research in fruits. By means of a procedure designed by us, berries of six elder cultivars were investigated in a first series. The juice samples varied significantly in their protein contents, the highest protein content was found with the cultivar 'Donau', the lowest with 'Prägarten'. By means of cloudiness caused by agglutination of erythrocytes lectins could be determined in a semi-quantitative way, i.e. exact quantification was impossible due to interfering phenols, but it became obvious, that the lectin contents correlate positively with the total protein contents. After a column chromatographic separation by means of an anion exchanger fraction 4 caused lectin-positive agglutination of erythrocytes with the cultivars 'Jucy' and 'Allesoe' (fraction 5 for the other cultivars). In both fractions these findings could be confirmed by detection of lectin-typical banding patterns at 30 kDalton by means of SDS-PAGE. Additionally it was found, that the cultivars 'Donau' und 'Haschberg' show distinctively more intensive banding patterns than*

'Jucy', 'Tulbing' and 'Allesoe'. Only with 'Prägarten', already noticeable because of its low protein contents, no lectins could be detected. The detected lectins could belong both to SNA III and SNA IV.

Key words: Black Elder (*Sambucus nigra*), cultivars, lectins, agglutination of erythrocytes, SDS-PAGE, anion exchange chromatography

Établissement d'une méthode de détermination des lectines dans les baies du sureau (*Sambucus nigra*) : partie 1 : relation entre variété et teneur en lectine. L'intérêt porté aux lectines a fortement augmenté ces dernières années en raison des possibilités prometteuses de leur utilisation dans la médecine. Les méthodes de détection, développées jusqu'à présent surtout dans le cadre de la recherche fondamentale, requièrent un travail intensif et sont très onéreuses, de telle sorte qu'il a été nécessaire d'établir une méthode pour la recherche fruiticole orientée vers la pratique. Dans le cadre d'une première série, des baies de six variétés de sureau ont été examinées à l'aide de la méthode développée par nous. Les échantillons de jus présentaient de grandes différences quant aux teneurs en protéines, la teneur la plus élevée étant constatée chez la variété «Donau» et la teneur la plus basse chez la variété «Prägarten». Une détection semiquantitative des lectines a pu être effectuée sur la base du trouble résultant de l'agglutination d'érythrocytes. Même si les phénols gênants n'ont pas permis une quantification exacte, il a néanmoins été évident qu'il existe une corrélation positive entre la teneur en lectines et la teneur en protéines totales. Après la séparation effectuée par chromatographie sur colonne à l'aide d'un échangeur d'anions, l'agglutination d'érythrocytes influencée par la lectine a été provoquée, pour les variétés «Jucy» et «Allesoe», déjà par la fraction 4, et pour les autres variétés par la fraction 5. Ce résultat a été confirmé par le fait que des bandes typiques pour la lectine ont été trouvées dans la plage de 30 kDalton par voie de SDS-PAGE dans ces deux fractions. En outre, on a pu constater que les variétés «Donau» et «Haschberg» présentaient des bandes de lectine beaucoup plus intenses que les variétés «Jucy», «Tulbing» et «Allesoe». La variété «Prägarten», qui s'est déjà fait remarquer par sa faible teneur en protéines, est la seule où des lectines n'ont pas pu être détectées. Quant aux lectines détectées, il peut s'agir aussi bien de SNA III que de SNA IV.

Mots clés : sureau (*Sambucus nigra*), variétés, lectines, agglutination d'érythrocytes, SDS-PAGE, chromatographie échangeuse d'anions

Sambucus nigra (Schwarzer Holunder) gehört zur Familie der Caprifoliaceae (Geißblattgewächse). Diese Familie umfasst 13 Gattungen mit über 400 Arten, die vor allem in den gemäßigten Zonen der Nordhalbkugel verbreitet sind. Die Gattung *Sambucus* zählt 25 Arten, wovon die meisten ebenfalls auf der Nordhalbkugel, und hier vor allem in den gemäßigten und subtropischen Regionen beheimatet sind. Die drei Hauptvertreter sind *Sambucus nigra* (Schwarzer Holunder), *Sambucus racemosa* (Traubenholunder) und *Sambucus ebulus* (Zwergholunder) (HEGI, 1966).

Mit dem Holunder sind zahlreiche Mythen und Geschichten verbunden. Die Verehrung von Pflanzen ist kulturell gesehen eine sehr frühe Form von Religion. Die Kräfte der Pflanzen, die der Mensch zunächst bei den Tieren beobachtete, wurden durch die unerklärlichen Wirkungen zu mystischen Eigenschaften erhöht. Dass man in einem Strauch, von dem so wundersame und rasche Hilfe bei Krankheiten kam, Götter und Geister vermutete, liegt daher nahe. Durch die Beobachtungen, dass ein Holunderstrauch nie vom Blitz getroffen wurde und auch keine Fraßschäden durch Tiere aufwies (Sambunigrin), wurde diese Annahme noch bestärkt (STOLL und GEMMINGER, 1986; PFANNHAUSER und

PETERS, 1998). Sowohl Rinde, Blätter, Blüten und Beeren als auch die Wurzeln des Holunders werden in der Pflanzenheilkunde für die Heilung der verschiedensten Krankheiten verwendet. Die jüngsten wissenschaftlichen Forschungen über die medizinischen Wirksubstanzen des Holunders haben bestätigt, was in der Volksmedizin aus praktischen Erfahrungen schon lange Zeit bekannt war (HEMGESBERG, 1998; EICHINGER, 1999). Holunderbeeren bestehen zu über 80 % aus Wasser. Der Rest entfällt auf Kohlenhydrate (7,4 %), Ballaststoffe (4 %), Eiweißstoffe (4 %), organische Säuren (0,91 %), Mineralstoffe (0,7 %) und Fette (0,5 %). Der Energiegehalt von 100 g Holunderbeeren beträgt 199 kJ. 25 % der enthaltenen Ballaststoffe entfallen auf wasserlösliche, der Rest auf wasserunlösliche Ballaststoffe. Die Kohlenhydrate setzen sich zum Großteil (7,1 g) aus Monosacchariden (Fructose und Glucose zu gleichen Teilen) und aus Disacchariden (Saccharose) zusammen. An Mineralstoffen sind hauptsächlich Kalium, Phosphor, Calcium und Magnesium enthalten. Die Holunderbeeren enthalten eine Vielzahl an Vitaminen, beispielsweise ca. 18 mg Vitamin C, ca. 1,6 mg Niacin, ca. 1 mg Vitamin E und ca. 0,250 mg Vitamin B6. (ALBRECHT, 1993; ELMADFA et al., 1987; BgVV, 1994).

Das Aroma des Holundersaftes setzt sich aus 34 Verbindungen zusammen, darunter 7 Kohlenwasserstoffe und 27 sauerstoffhaltige Komponenten. Hauptbestandteil ist Phenylacetaldehyd, das in fast allen ätherischen Ölen enthalten ist (SCHMIDT, 1987). Die intensive Farbe der Holunderbeeren und des Saftes beruht hauptsächlich auf dem Anthocyanfarbstoff Cyanidin-3-glucosid. Es wurden auch noch weitere Cyanidine gefunden, und zwar Cyanidin-3-Sambubiosid und Cyanidin-3-Sambubiosid-5-glucosid (HONG and WROLSTAD, 1990; EDER, 1996).

In den Holunderbeeren ist ein cyanogenes Glukosid enthalten, welches Sambunigrin genannt wird. Sambunigrin ist vor allem in rohen oder unreifen Beeren enthalten. Durch enzymatische Spaltung in der Pflanze oder im Magen kann Blausäure freigesetzt werden. Durch Hitzeeinwirkung, z.B. im Zuge des Pasteurisierens, kann das Sambunigrin unschädlich gemacht werden. (SCHMIDT 1987; POGORZELSKI, 1982). Die in 100 g Holunderbeeren enthaltenen Proteine bestehen etwa zur Hälfte aus essenziellen Aminosäuren (1,4 g) und aus nicht essenziellen Aminosäuren (1,1 g).

Proteine mit zwei oder mehr Bindungsstellen für Kohlenhydrate, die für die Agglutination (Verklumpung) von Erythrozyten und anderen Zellen verantwortlich sind, werden, wenn sie pflanzlichen Ursprungs sind, Lektine genannt (STRYER, 1996). Trotz gewisser Unsicherheiten bezüglich ihrer chemischen Charakterisierung werden Lektine zunehmend in der medizinischen Grundlagenforschung eingesetzt. Lektine eignen sich, um bestimmte Zelltypen oder Zellfragmente zu charakterisieren, Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien zu erkennen, normale von Tumorzellen zu unterscheiden, die verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu markieren und verschiedene Zelltypen oder Glykoproteine affinitätschromatographisch voneinander zu trennen (SHARON and LIS, 1989). Über die genaue biologische Bedeutung der Lektine in der Pflanze selbst ist wenig bekannt. Auf Grund zahlreicher Untersuchungen konnten dennoch einige Funktionen beschrieben werden. Viele Lektine sind toxisch und bieten der Pflanze möglicherweise einen Schutz vor Fressfeinden und Krankheitserregern. Weiters spielen Lektine bei der Symbiose des stickstoffbindenden Bakteriums *Rhizobium trifolii* an der Oberfläche der Wurzelhaare von Leguminosen eine große Rolle. Lektine werden auch oft als Mitogene bezeichnet, da sie zellteilungsfördernd wirken können (STRYER, 1996).

Im Gegensatz zu den anderen Proteinen in der Nahrung, die im menschlichen Verdauungstrakt in ihre Be-

standteile aufgetrennt werden, passieren ihn die Lektine in intakter Form. Lektine binden sich an die Wand des Dünndarms und besetzen so die Plätze, die sonst von Bakterien eingenommen werden könnten. Somit können sie die Anheftung schädlicher Bakterien an die Darmschleimhaut blockieren. Auf Grund dieser Eigenschaft werden Lektine auch in der Pharmazie verwendet. Arzneimittel werden an Lektine gebunden und können so ganz gezielt an bestimmte Organe oder Gewebe im Körper transportiert werden, wo die Medikamente wirksam werden. Dadurch können die Dosis an verabreichten Medikamenten und die Nebenwirkungen in anderen Bereichen deutlich verringert werden (SHARON and LIS, 1989). Andererseits ist auch die Anheftung von Krebszellen im Gewebe sowie die Haftung von Mikroorganismen an der Oberfläche von Haut und Schleimhäuten auf die Aktivität von Lektinen zurückzuführen. Die zielgerichtete Hemmung solcher lektinvermittelter Funktionen ist ein neuer Ansatz zur Krebs- und Infektionstherapie. Wenn Oligosaccharide, die ausschließlich oder bevorzugt auf Tumorzellen vorkommen, isoliert werden, könnten Lektine verwendet werden, um daran gekoppelte Krebsmedikamente gezielt in Tumorzellen einzuschleusen (dkfz, 2000).

Der Schwarze Holunder besitzt in nahezu allen Geweben Lektine. Mittlerweile wurden vier Lektine, *Sambucus nigra agglutinin* (SNA) I bis IV, isoliert und beschrieben (PEUMANS et al., 1991; MACH et al., 1991; CITORES et al., 1996). SNA-I hat eine Molmasse von 150000 Dalton und ist ein tetrameres Glycoprotein, bestehend aus zwei Untereinheiten mit 36000 Dalton und zwei Untereinheiten mit 38000 Dalton. Es bindet spezifisch an α Neu5Ac-(2→6)-D-Gal (α -N-Neuraminsäure-5-N-acetat-(2→6)-D-Galactose) und an α Neu5Ac-(2→6)-D-GalNAc (α -Neuraminsäure-5-N-acetat-(2→6)-D-N-acetyl-galactosamin). SNA-I und SNA-II kommen vor allem in der Rinde vor. SNA-II ist ein Glycoprotein mit einer Molmasse von 68000 Dalton, welches aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist. Dieses Agglutinin bindet spezifisch an α -D-GalpNAc-(1→2 3 oder 6)-D-Gal (α -D-N-acetyl-galactosamin-(1→2 3 oder 6)-D-Galactose). Das dimere Glycoprotein SNA-III kommt in den Samen der Pflanze vor und bindet spezifisch an D-N-acetyl-galactosamin. Es hat eine Molmasse von 50000 Dalton und zeigt auf der SDS-PAGE eine Bande bei 33000 Dalton. SNA-IV ist in den Früchten des Schwarzen Holunders enthalten. Das aus zwei Untereinheiten aufgebaute Glycoprotein hat eine Molmasse von 60000 Dalton und bindet spezifisch an Gal/GalNAc (Galactose/N-acetylgalactosamin). In

verschiedenen anderen Publikationen wurden allerdings auch davon abweichende Nomenklaturen für die Lektine in *Sambucus nigra* gefunden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode zum Nachweis von Lektinen in Holunderbeeren, welche rasch und ohne zu großen Material- und Geräteaufwand durchführbar ist. Mit Hilfe dieser Methode sollte zunächst einmal der Einfluss der Sorte untersucht werden. In einer nachfolgenden Arbeit wird der Einfluss des Standortes und des Reifezustandes auf den Lektin Gehalt ermittelt.

Material und Methoden

Probenmaterial

Jeweils ca. 5 kg reife Beeren von sechs Sorten (vier österreichische Selektionen: 'Haschberg', 'Donau', 'Prägarten', 'Tulbing', und zwei dänische Selektionen: 'Allesoe' und 'Jucy') des Schwarzen Holunders (*Sambucus nigra*) wurden Ende August in der Versuchsanlage der Höheren Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau in Klosterneuburg geerntet. Die Holunderbeeren wurden von den Stielen der Dolde getrennt und bis zum Zeitpunkt der Untersuchung bei -18 °C aufbewahrt.

Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung wurden 50 g tiefgefrorene Beeren mit 100 ml destilliertem Wasser vermengt und aufgetaut, anschließend in einem Mixer bei Raumtemperatur fünf Minuten homogenisiert. Das Gemisch wurde durch ein feines Gewebe gepresst, um alle groben Bestandteile zu entfernen, dann 15 Minuten mit 3000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Fa. Beckman, J2-HC Kühlzentrifuge JA20-Rotor). Der Überstand wurde zuerst durch ein Gewebe, dann durch ein Faltenfilter (Fa. Schleicher & Schüll, Filter 595) filtriert. Es wurde eine fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat mit 10 % bzw. 50 % durchgeführt. Die Entsalzung der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -gefällten Probe wurde mit Hilfe von Dialyseschläuchen durchgeführt. Es wurden Dialyseschläuche (Fa. Spectraphor, membrane tubing) mit einer Ausschlussgrenze von mw 6000 bis 8000 Dalton verwendet. Die entsalzten Probe wurde bei 10000 g 10 Minuten zentrifugiert (HOLTZHAUER, 1997).

500 µl Probe wurden in einem 3 ml-Behälter mit Schraubverschluss bei -80 °C sehr rasch tiefgefroren

und anschließend im Lyophilisator (Fa. Christ Alpha 1-4 LMC1) gefriergetrocknet.

Proteinbestimmung

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

Die Coomassie blue-Lösung wurde wie folgt hergestellt: 100 mg Coomassie blue G 250; 50 ml Ethanol (95 %); 100 ml Phosphorsäure (85 %); 200 ml dest. Wasser. Für die Erstellung der Kalibrationskurve wurde Rinderserumalbumin verwendet (Konzentration von 0,01 bis 0,16 mg/2,5 ml). Die Standards und Messlösungen wurden immer gleich hergestellt: 50 µl Probe; 1950 µl dest. Wasser; 500 µl Coomassie blue Lösung.

SDS-Elektrophorese

Für die Durchführung der Elektrophorese wurden aceton- bzw. methanolgefällte Proben verwendet. Die trockenen Proben wurden in 50 µl Probenpuffer aufgenommen: 10 mM Tris/HCl pH 8.0; 1 mM EDTA; 2,5 % SDS; 5 % β-Mercaptoethanol; 0,001 % Bromphenolblau. Anschließend wurde das Gemisch 5 Minuten auf 100 °C erhitzt, rasch bei -18 °C abgekühlt und fünf Minuten bei 15000 g zentrifugiert. 2 µl Probe wurden auf dem Phast Gel homogeneous 12,5 (Fa. Amersham Pharmacia Biotec) mit dem Phast Elektrophorese System (Fa. Amersham Pharmacia Biotec) und dem Trennprogramm für SDS-PAGE in homogenem Medium fraktioniert. Die Silberfärbung erfolgte mithilfe des Entwicklungsprogrammes SDS-PAGE in homogenem Medium für Phast Gel 12,5. Als Molekulargewichtsstandard kam der LMW-Markerkit (Fa. Amersham Pharmacia Biotec) 1:10 verdünnt zur Anwendung.

Ionenaustauscher

Mit Hilfe des Anionenaustauschers Sephadex DEAE A-25 in 50 mM Tris-HCl pH 8.8 erfolgte eine Fraktionierung der Proben. In kleine Säulen wurden 1,5 ml gequollenes Gel gefüllt und mit 20 ml Startpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8.8) gewaschen. 1,5 ml gefriergetrocknete Probe wurden in 0,5 ml Startpuffer aufgenommen, auf die Säule aufgetragen, mit 4 ml Startpuffer nachgespült und mit 4 ml Salzlösung (1 M NaCl in Startpuffer) eluiert. Anschließend erfolgte ein Nachwaschen der Matrix mit 2 ml 2 M NaCl in Startpuffer und 0,1

M NaOH-Lösung (STERNBACH, 1991). Es wurden sechs Fraktionen, die erste Fraktion zu 1 ml, die restlichen fünf Fraktionen zu je 2 ml, ab Probenauftrag gesammelt.

Nachweis von Lektinen

Die Anwesenheit von Lektinen in einer Probe kann mittels Agglutination von Erythrozyten festgestellt werden. 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. Für die Agglutinationsmessung wurden 160 µl Probe aus den Fraktionen nach dem Anionenaustauscher - Probe in Startpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8.8) mit 100 µl Puffer (100 mM NaAc-Puffer pH 4.0) vermischt und anschließend 40 µl einer einprozentigen Erythrozytenlösung (menschliche Erythrozyten; 1 % in Wasser) zugefügt. Die Trübung dieser Mischung wurde bei Raumtemperatur nach einer Stunde optisch bewertet. Dazu wurden die Eprovetten gegen eine Lichtquelle gehalten und mit Hilfe des folgenden Schemas bewertet: (-) = keine Trübung; (~) = schwache Trübung; (+) = Trübung; (++) = starke Trübung.

Eine weitere Möglichkeit, die Trübung einer Lösung festzustellen, ist das Zählen der durch die Reaktion von Lektinen und Erythrozyten entstandenen Aggregate mit Hilfe der Thomakammer. Wegen des großen Zeitaufwandes ist diese Methode für die routinemäßige Untersuchung der Holunderlektine nicht geeignet.

Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde einerseits zur Feststellung der Molmasse der in der Probe enthaltenen Proteine, andererseits zum Entfärben der Holundersaftfraktionen, die einen sehr hohen Farbanteil aufwiesen, verwendet. Für die Feststellung der Molmasse wurden die Gele Sephadex G-75 (Fa. Amersham Pharmacia Biotec), Säulendurchmesser 5 mm, Säulenhöhe 120 cm und Bio-Gel P-100 (Fa. Biorad), Säulendurchmesser 7,5 mm, Säulenhöhe 120 cm, verwendet. Dabei kann das erste Drittel der durchgeronnenen Flüssigkeit verworfen und die restliche Flüssigkeit in der gewünschten Fraktionsmenge gesammelt werden. Es wurde jeweils 1,5 ml Probe aufgetragen. Bei Sephadex G-75 wurden Fraktio-

nen à 1 ml gesammelt, wobei die ersten 30 Fraktionen nach dem Probenauftrag verworfen und anschließend 80 Fraktionen mit einem so genannten Fraktionskollektor gesammelt wurden. Auf Grund des größeren Säulenvolumens wurden bei Bio-Gel P-100 die ersten 70 ml nach dem Probenauftrag verworfen und dann 80 Fraktionen à 2 ml gesammelt.

Für das Entfärben der Holundersaftfraktionen wurde mit Bio-Gel P-100 (Säulendurchmesser 8 mm, Säulenhöhe 65 mm) gearbeitet. Der erste Milliliter nach dem Probenauftrag wurde verworfen und dann Fraktionen à 5 ml gesammelt. Diese entfärbte Probe wurde für die weiteren Untersuchungen benutzt.

Ergebnisse

Proteingehalt

Für die Berechnung des Proteingehalts wurden immer drei Absorptionsmessungen durchgeführt und von diesen Werten der Mittelwert berechnet. Die Ergebnisse der Proteinbestimmung sind in Abbildung 1 dargestellt.

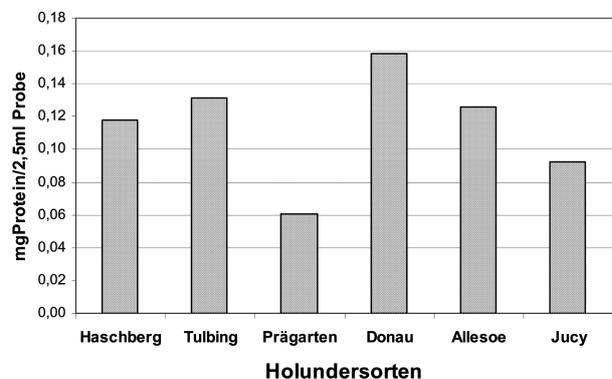


Abb. 1: Proteingehalte in unterschiedlichen Holundersorten

Das Diagramm zeigt sehr deutlich, dass es doch erhebliche Unterschiede im Proteingehalt der einzelnen Sorten gibt. Die Sorte 'Donau' liegt mit etwa 0,16 mg pro 2,5 ml Probe an der Spitze. Im Mittelfeld liegen die Sorten 'Tulbing', 'Haschberg', 'Allesoe' und 'Jucy' mit Werten zwischen 0,09 und 0,12 mg Protein pro 2,5 ml

Probe. Fast um zwei Drittel geringer als bei der Sorte 'Donau' ist der Wert der Sorte 'Prägarten'.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurden jeweils 100 µl Probe mit Aceton gefällt, der trockene Niederschlag in 30 µl Probenpuffer aufgelöst und mittels SDS-PAGE das Proteinmuster bestimmt (Abb. 2).

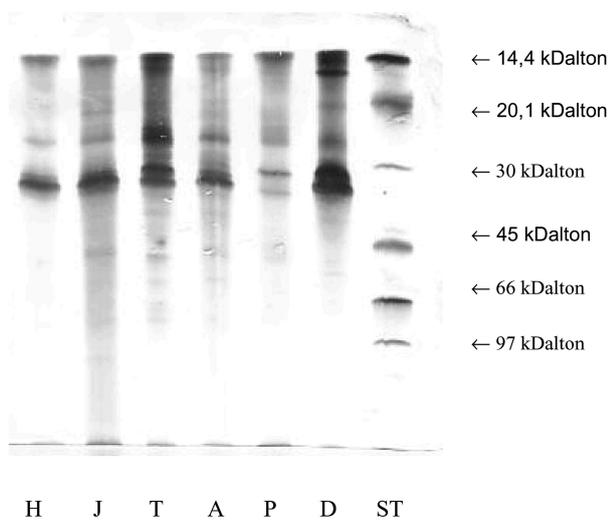


Abb. 2: SDS-PAGE Holundersorten

Die Unterschiede in den Bandenmustern der sechs Sorten sind gering. Der Hauptanteil der im Holunder befindlichen Proteine hat ein Molekulargewicht zwischen 20 und 45 kDalton. Im Molekularbereich von 30 bis 45 kDalton wird bei den Sorten 'Donau', 'Prägarten' und 'Tulbing' eine Doppelbande sichtbar, während bei 'Haschberg', 'Jucy' und 'Allesoe' nur eine Einzelbande zum Vorschein kommt. Nur bei den Intensitätsverhältnissen der Banden sind Unterschiede zu erkennen.

Fraktionierung mittels Anionenaustausch-Chromatographie

Die lyophilisierten Proben wurden weiters in 500 µl Startpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8.8) aufgenommen und mittels Anionenaustauscher (SEPHADEX DEAE A-25) in jeweils sechs Fraktionen aufgetrennt, mit denen die Proteinbestimmung (BRADFORD, 1976) (Abb. 3), die SDS-PAGE (Abb. 4 und 5) und die Trübungs-

messung (Tab. 1) nach der Agglutination durchgeführt wurden.

Es ist deutlich zu sehen, dass ein Teil der Proteine keine Wechselwirkung mit den funktionellen Gruppen des Gels eingeht und dieses ungehindert wieder verlassen. Der Anstieg der Kurve bei Fraktion 2 deutet auf dieses Phänomen hin. In der Fraktion 3 ist der Proteingehalt bei allen Holundersorten niedrig. Die nichtgebundenen Proteine sind bereits durchgelaufen, während alle anderen, die Anionen, noch am Gel gebunden sind. In den Fraktionen 4 und 5 wurde mit Salzlösung eluiert, was dazu führt, dass alle gebundenen Anionen durch die größere Ionenstärke des Salzes von ihren Bindungsstellen verdrängt und aus dem Gel ausgewaschen werden. Die Kurve fällt bis zur Fraktion 6 wieder ab, da bereits alle Proteine aus dem Gel eluiert wurden und mit einer noch höheren Salzlösung nachgewaschen wurde.

Es zeigen sich auch Unterschiede bei den einzelnen Sorten. Wie bereits bei der ersten Proteinbestimmung festgestellt wurde, weisen die Sorten 'Donau', 'Haschberg', 'Tulbing' und 'Allesoe' einen höheren Proteingehalt als die anderen Sorten auf. Ein Agglutinationstest wurde mit allen sechs Fraktionen des Ionenaustauschers durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1:
Agglutinationstest Holundersorten

Sorten	Fraktionen					
	1	2	3	4	5	6
Haschberg	-	-	-	-	+	++
Jucy	-	-	-	+	+	++
Tulbing	-	-	-	-	+	++
Allesoe	-	-	-	~	+	++
Prägarten	-	-	-	-	+	++
Donau	-	-	-	-	+	++

In den Fraktionen 1, 2 und 3 ist bei keiner Sorte eine Trübung feststellbar. Bei der Fraktion 4 ist bereits eine Trübung bei den Sorten 'Jucy' und eine leichte Trübung bei der Sorte 'Allesoe' feststellbar. Alle Sorten zeigen eine Trübung bei der Fraktion 5. Die starke Trübung, die sich in der Fraktion 6 zeigt, wird durch den hohen Salzgehalt der Elutionslösung (2 M NaCl in 50 mM

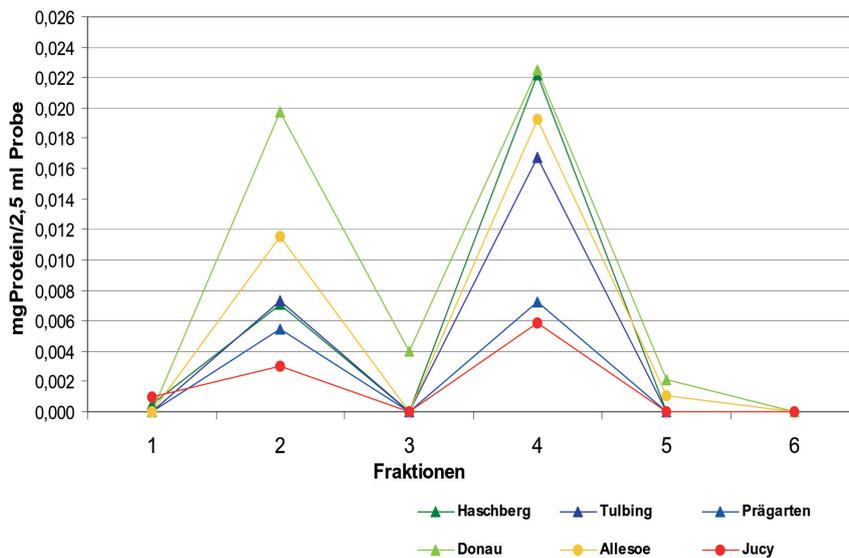


Abb. 3: Proteingehalte in den Fraktionen der verschiedenen Holundersorten nach dem Anionenaustauscher

Tris-HCl pH 8.8) hervorgerufen und ist nicht auf die Lektine in diesen Fraktionen zurückzuführen.

Von 100 µl der Fraktionen 2, 4 und 5 (methanolgefällt) wurde eine SDS-PAGE durchgeführt.

Die Fraktionen 2 nach der chromatographischen Auftrennung zeigen zwar bei der Proteinbestimmung Werte zwischen 0,006 und 0,01 mg je 2,5 ml Probe an, doch handelt es sich dabei um Proteine, die nicht mit den programmierten Einstellungen getrennt werden können (Ergebnisse nicht graphisch dargestellt!). Nur bei der Sorte 'Donau' ist eine dünne Bande im Bereich von 30 kDalton erkennbar.

Nach der chromatographischen Auftrennung sind bei den Fraktionen 4 deutliche Banden im Bereich um 30 kDalton erkennbar (Abb. 4). Bei den Sorten 'Donau' und 'Haschberg' ist die Intensität der Banden deutlich höher als bei den Sorten 'Jucy', 'Tulbing' und 'Allesoe'. Die Sorte 'Prägarten' enthält in der aufgetragenen Probenmenge eine zu geringe Konzentration an Proteinen, wodurch keine Bande im Bereich um 30 kDalton sichtbar ist.

Auch bei den aufgetrennten Proben der Fraktionen 5 (Abb. 5) zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Fraktionen 4. Die Sorten 'Donau' und 'Haschberg' zeigen intensivere Banden als die Sorten 'Jucy', 'Tulbing' und 'Allesoe'. Auf Grund einer zu geringen Proteinkonzentration ist auch in der Fraktion 5 der Sorte 'Prägarten' keine Bande erkennbar.

Diskussion

Methodenentwicklung

Da beim Homogenisieren der Holunderbeeren die fettreichen Kerne zerstört wurden, musste die Probe nach dem Zentrifugieren mit Hilfe eines Gewebes filtriert und somit die entstandene Fettschicht abgetrennt werden. Da das Ausgangsmaterial der Proben für die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung sehr unterschiedlich war (klar bis trüb bzw. grün bis rot gefärbt), kam es zu variierenden Fällungsergebnissen, die sich auf alle folgenden Messungen störend auswirkten. Bei der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung der einzelnen Sorten entstand bei der Sorte 'Prägarten' deutlich

weniger Niederschlag als bei den anderen Sorten. Bei der anschließenden Proteinbestimmung zeigte sich, dass auch hier die Sorte 'Prägarten' den geringsten Wert aufwies. Man konnte also einen direkten Zusammenhang zwischen Niederschlagsmenge bei der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung und dem Proteingehalt der Proben feststellen. Die Niederschläge nach der Fällung zeigten unterschiedliches Lösungsverhalten in Wasser. Manchmal waren sie sehr schwer bis teilweise gar nicht löslich. Auch diese Tatsache könnte die weiteren Messungen beeinflusst haben. Nach dem Auflösen der Niederschläge wurden diese gegen Wasser dialysiert. Da manche Proben sehr trüb waren, konnte das Verkleben von Poren des Dialyseschlauches nicht ausgeschlossen werden, was möglicherweise eine unvollständige Entsalzung mit sich bringt. Die Niederschläge von gefriergetrockneten sowie aceton- und methanolgefällten Proben ließen sich nicht immer leicht auflösen.

Da die Holunderproben eine sehr starke Eigenfarbe aufwiesen, konnte die Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) nicht mit der nativen Probe durchgeführt werden. Um trotz der intensiven Farbe der Probe den Proteingehalt messen zu können, wurde diese mit Wasser verdünnt. Dabei stellte sich heraus, dass bei einer Verdünnung der Probe im Verhältnis von 1:40 eine Störung der Proteinbestimmung durch die Farbstoffe auszuschließen war.

Auch bei der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine kam es zu unerwünschter Schlierenbildung,

(H =Haschberg, J = Jucy; T=Tulbing, A=Allesoe; P=Prägarten; D=Donau, ST=Standard)

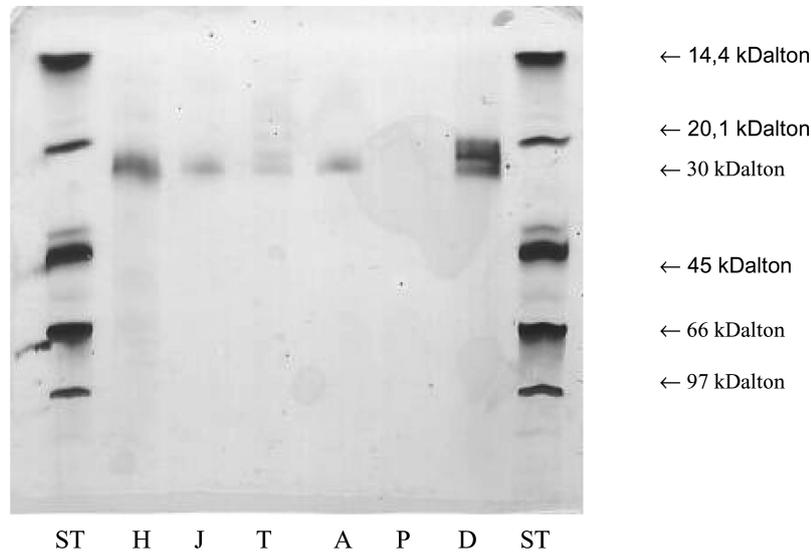


Abb. 4: Holundersorten SDS-PAGE der Fraktion 4 vom Ionenaustauscher

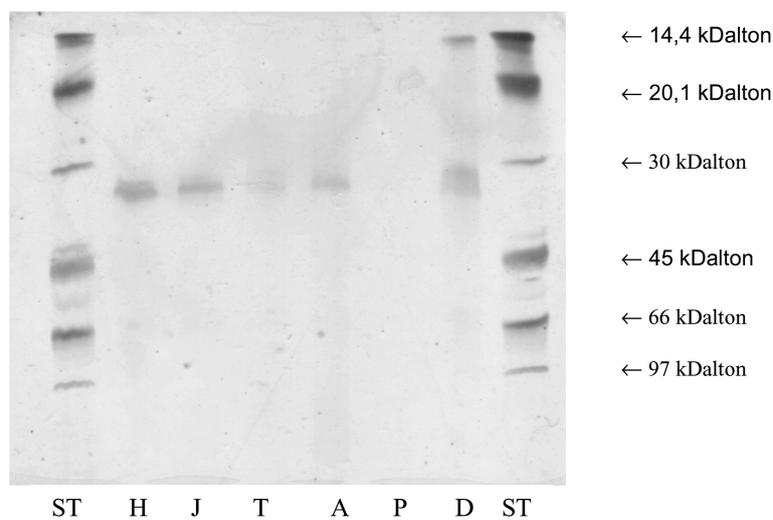


Abb. 5: Holundersorten SDS-PAGE der Fraktion 5 vom Ionenaustauscher

als deren Ursache Gerbstoffe, aber auch feine Partikel von unlöslichen Niederschlagsresten in der Lösung angenommen wurden. Um diesen Faktor ausschließen zu können, wurden die Proben, die in SDS-Puffer aufgelöst wurden, vor dem Auftragen immer zentrifugiert. Die größten Schwierigkeiten bereiteten die Nachweisversuche des Lektinergehalts in den Holunderbeeren. Einerseits war es schwierig, die passende Methode und

Materialien (Blut, Plasma, Erythrozyten, Puffer) zu finden, und andererseits waren wiederum der hohe Phenolgehalt und die starke Probenfärbung störend. Auf Grund dieser Probleme konnten die Ergebnisse aller Trübungsmessungen zwar qualitativ bewertet, aber nicht quantifiziert werden. Mit der für diese Arbeit etablierten Methode konnte der Proteingehalt in den unterschiedlichen Sorten be-

stimmt werden. Dabei zeigte sich, dass einige Sorten einen sehr hohen Proteingehalt (0,16 mg je 2,5 ml Probe) aufweisen, während andere Proben, wie z.B. 'Prägarten' mit 0,06 mg je 2,5 ml Probe, deutlich geringere Menge enthalten. Die Sorten 'Haschberg', 'Jucy', 'Tulbing' und 'Allesoe' liegen mit ihren Proteingehalten dazwischen.

Die von MACH et al. (1991) beschriebene Agglutination von Erythrozyten konnte erfolgreich zum Nachweis von Lektinen eingesetzt werden. Da die Trübung nur optisch bewertet wurde und mit dieser Methode nur das Vorhandensein oder das Fehlen der Lektine in einer Lösung feststellbar ist, konnten keine Angaben über die in den Fraktionen enthaltenen Lektinmengen gemacht werden. Man kann allerdings davon ausgehen, dass der Lektin Gehalt mit dem Gesamtproteingehalt korreliert und dass so in Sorten mit geringem Proteingehalt auch ein geringer Lektin Gehalt zu verzeichnen ist und umgekehrt. Mittels SDS-PAGE wurden Proteinbanden im Bereich von 30 kDalton nachgewiesen, welche laut CITORES et al. (1996) als Lektine anzusehen sind. Da alle Lektine bei 30kDalton Banden bilden, ermöglicht dieser Befund aber keine Unterscheidung der Lektinarten (PEUMANS et al., 1991). Nach MACH et al. (1991) sollte es sich aber um Lektine des Typs SNA IV (typisch für Früchte) und SNA III (typisch für Samen) handeln. Ob eine Unterscheidung der Lektine mittels isoelektrischer Fokussierung möglich wäre, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet. Nach einer Fraktionierung auf einem Anionenaustauscher konnten mittels SDS-PAGE Banden im Bereich von 30 kDalton nur bei den Fraktionen 4 und 5 festgestellt werden. Da in diesen Fraktionen auch eine Agglutination von Erythrozyten auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass die Banden von Lektinen verursacht wurden.

Der Lektinnachweis mit den Fraktionen nach dem Anionenaustauscher zeigt, dass die Sorten 'Jucy' und 'Allesoe' bereits bei der Fraktion 4 und alle Sorten bei Fraktion 5 eine Agglutination zeigen. In der Fraktion 5 wiesen die Sorten 'Donau' und 'Haschberg' die stärkste Färbung der Lektinbanden auf.

Inwieweit das Vorkommen und die Konzentration der Lektine von der Beerenreife und den Standortbedingungen abhängig sind, wird in einem nachfolgendem Artikel dargestellt.

Literatur

- ALBRECHT, H.-J. (1993): Anbau und Verwertung von Wildobst. - Braunschweig: Thalacker, 1993
- BgVV (1994): Bundeslebensmittelschlüssel - Version II. 2. (Hrsgg. vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin). - Berlin, 1994
- BRADFORD, M.M. 1976: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- CITORES, L., BENITO, F., IGLESIAS, R., FERRERAS, J., JIMÉNEZ, P., ARGUESO, 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
- EDER, R. (1996): Pigments. In: Nollet, L. (Ed.): Handbook of food analysis. Vol. 1, p. 937-1014. - New York: Dekker, 1996
- EICHINGER, R. (1999): Holunder: ein bewährtes Hausmittel neu entdeckt. - Stuttgart: Thieme, 1999
- ELMADFA, I., AIGN, W., MUSKAT, E. und FRITZSCHE, D. (2000): Die große GU Nährwert Kalorien Tabelle 2000/01. - München: Gräfe und Unzer, 2000
- HEMGESBERG, H. (1998): Natürlich gesund mit Holunder : Blüten, Blätter und Beeren gegen Alltagsbeschwerden. - Augsburg: Midena, 1998
- HONG, V. and WROLSTAD, R. E. 1990: Characterization of anthocyanin-containing colorants and fruit juices by HPLC/photodiode array detection. *J. Agric. Food. Chem.* 38: 698-708
- HOLTZHAUER, M. (1997): Biochemische Labormethoden. 3. Aufl. - Berlin: Springer, 1997
- MACH, L., SCHERF, W., AMMANN, M., POETSCH, J., BERTSCH, W., MÄRZ, L. and GLÖSSL, J. 1991: Purification and partial characterization of a novel lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) fruit. *Biochem. J.* 278: 667-671
- PEUMANS, W.J., KELLENS, J.T.C., ALLEN, A.K. and VAN DAMME, E.J.M. 1991: Isolation and characterization of a seed lectin from elderberry (*Sambucus nigra* L.) and its relationship to the bark lectins. *Carbohydrate Research* (213): 7-17
- PFANNHAUSER, W. und PETERS, S. (1998). Das Wunder vom Holunder. - Schäffern: Arcturus, 1998
- POGORZELSKI, E. 1982: Formation of cyanide as a product of decomposition of cyanogenic glucosides in the treatment of elderberry fruit (*Sambucus nigra*). *J. Sci. Food Agric.* 33: 496-498
- SCHMIDT, J. (1987): Holunderanbau. - Graz: Stocker, 1987
- SHARON, N. and LIS, H. (1989). Lectins. - New York: Chapman and Hall, 1989
- STERNBACH, H. (1991): Chromatographische Methoden in der Biochemie. - Stuttgart: Thieme, 1991
- STOLL, K. und GREMMINGER, U. (1986): Besondere Obstarten. - Stuttgart: Ulmer, 1986
- STRYER, L. (1996): Biochemie. 4. Aufl. - Heidelberg: Spektrum Akademischer Verl., 1996
- HEGI, G. (1966): Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Bd. VI / 2 Hrsgg. v. Wagenitz, G. - München: Hanser, 1966
- dkfz (2000): Projekt Lektine. - Heidelberg: Deutsches Krebsforschungszentrum, 2000
www.toxea.de/6Moltox/7d-lekt.htm

Manuskript eingelangt am 2. Juli 2002